

文章编号: 1000-5692(2005)05-0481-05

浙江丽水 16 个柑橘特色品种的 RAPD 分析

曾燕如¹, 胡 瑛¹, 斯金平², 徐象华²

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省丽水市林业科学研究所, 浙江 丽水 323000)

摘要: 以浙江省丽水市生产的 16 个柑橘品种为试验材料, 利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对其亲缘关系进行研究。用 21 个引物扩增出了 216 个 RAPD 位点, 平均每个引物 10.29 个位点, 其中多态性位点达 96.76%。每个引物不同的品种能扩增出 0~10 条条带。引物 S13 信息量最少, 扩增出了 48 条条带, 而引物 S317 信息量最大, 扩增出了 143 条条带。文旦 *Citrus grandis* var. *wentanyu* 是最特殊的品种, 21 个 PCR 扩增引物中有 8 个引物未扩增出任何条带。UPGMA 聚类结果是瓯柑类、柑类、温州蜜柑类及柚类基本上能聚在一起; 南香 *Citrus unshiu* × *Citrus clementina* 与天草 *Citrus hybrid* 在遗传上与温州蜜柑类接近; 属于杂柑的胡柚 *Citrus paradisi* 'Changshanhuoyou' 与红肉脐橙 *Citrus sinensis* var. *brasiliensis* 在遗传上接近。另外, 用引物 S304 可以区分无籽瓯柑 *Citrus suavisissima* 'Seedless' 与普通瓯柑 *C. suavisissima*, 用 S356 可以区分无籽柑 *Citrus poonensis* 'Seedless' 与普通柑 *C. poonensis*。研究结果表明, 这些柑橘不仅在 DNA 水平上是有差异的, 而且 RAPD 标记技术可用于柑橘 DNA 水平的鉴别。图 4 表 1 参 8

关键词: 随机扩增多态 DNA; 柑橘品种; 亲缘关系; 无籽瓯柑; 无籽
中图分类号: S666; Q946.2 **文献标识码:** A

浙江省丽水市是柑橘的传统产区, 现有柑橘栽培面积 2.35 万 hm^2 , 年产量 18.65 万 t, 占丽水市水果总产量 29.95 万 t 的 62.3%。“九五”以来, 利用丰富的柑橘资源开展了本地品种的选育工作, 成功地选育出了翡翠柚 *Citrus grandis*, 处红柚 *C. grandis* 'Chuhong', 无籽瓯柑 *C. suavisissima* 'Seedless' 等本地良种, 还引进了脐橙 *Citrus sinensis* var. *brasiliensis* 和天草 *Citrus hybrid* 等品种。为了从遗传学上论证良种的遗传物质基础, 鉴别一些外观极其相似的品种, 我们以丽水市目前栽培的 16 个主要柑橘品种为试验材料, 利用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术, 对其亲缘关系进行了研究, 同时研究是否可能利用 RAPD 简单的实验操作, 将无籽瓯柑与普通瓯柑等外观其相似的品种区分开来。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2003 年春, 在浙江省丽水市选择供试品种共 16 个(表 1)。按抽样方法采摘各品种叶片样品。现场用硅胶干燥, 带回实验室后置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮存备用。

收稿日期: 2004-12-09; 修回日期: 2005-04-11

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2003C2002)

作者简介: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林研究。E-mail: zengyr@hotmail.com

表1 供试样品一览

Table 1 Samples tested

编号	品种	编号	品种
1	无籽瓠柑 <i>Citrus suavisima</i> 'Seedless'	9	大津4号 <i>Citrus unshiu</i> 'Otsu No. 4'
2	普通瓠柑 <i>Citrus suavisima</i>	10	山川3号 <i>Citrus unshiu</i> 'Yamakawa No. 3'
3	处红柚 <i>Citrus grandis</i> 'Chuhong'	11	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>
4	无籽甜柑 <i>Citrus poonensis</i> 'Seedless'	12	早香柚 <i>Citrus grandis</i> 'Zaoxiang'
5	南香 <i>Citrus unshiu</i> × <i>Citrus clementina</i>	13	红肉脐橙 <i>Citrus sinensis</i> var. <i>brasiliensis</i>
6	天草 <i>Citrus hybrid</i>	14	甜柑 <i>Citrus poonensis</i>
7	胡柚 <i>Citrus paradisi</i> 'Changshanhuayu'	15	青岛 <i>Citrus unshiu</i> 'Aoshima'
8	文旦 <i>C. grandis</i> var. <i>wentanyu</i>	16	翡翠柚 <i>Citrus grandis</i> 'Feicui'

1.2 方法

采用改进的 CTAB 裂解-硅珠吸附法提取叶片的 DNA^[1,2]。提取的 DNA 经 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 同时用 GeneQuantpro RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) 测定 OD_{260} , OD_{280} 及其比值, 以此来检测 DNA 的质量。将 DNA 稀释至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 用于 PCR 扩增。

243 个 PARD 引物(上海生工生物工程公司生产)经初筛及复筛, 最终选中 21 个引物进行 PCR 扩增。20 μL 的 PCR 反应体系包括 DNA 模板, $10\times$ PCR 缓冲液, Mg^{2+} (22 mM), dNTP (2 mM), Taq 酶 ($83.35 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$), PARD 引物 (5 μM), 水; PCR 扩增在 PE9600 扩增仪(Perkin Elmer)上进行, 反应条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $35.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 90 s, 38 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 7 min; $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持。PCR 产物经 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果在 ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech) 成像系统中成像, 以 0 和 1 统计各位点条带。统计结果用 POPGENE 32 进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 分析结果

16 个样品除 3 个样品 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值为 1.7~1.8 外, 其余样品均为 1.8~2.0, 无 RNA, 质量较好。用 21 个引物扩增出 216 个 RAPD 位点, 平均每个引物 10.29 个位点, 其中多态性位点 96.76%。每个引物不同的品种能扩增出 0~10 个条带。引物 S13 信息量少, 扩增出了 48 个条带, 而引物 S317 信息量最大, 扩增出了 143 个条带。文旦是最特殊的品种, 21 个 PCR 扩增引物中有 8 个引物未扩增出任何条带(图 1)。

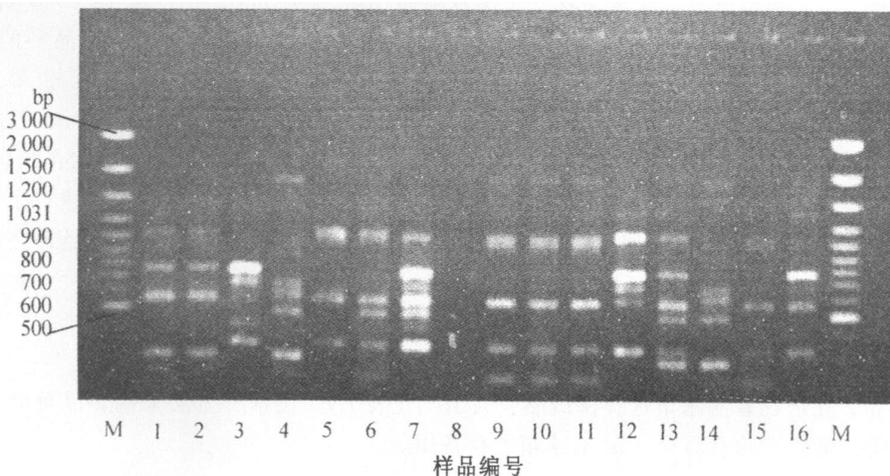


图1 引物 S28PCR 扩增产物的电泳结果

Figure 1 Electrophoresis of the PCR product amplified with the primer S28

2.2 聚类结果分析

聚类结果如图 2。供试品种并不是纯的橘、柑、橙或柚，背景复杂。山川 3 号、大津 4 号、青岛同属于温州蜜柑；南香为引自日本的杂柑类品种，它是温州蜜柑与克里迈丁红橘 *Citrus clementina* 的杂种；天草为(清见×兴津早生)×佩奇橘柚的杂种，而清见为宫川早生温州蜜柑×曲洛维他甜橙的杂种，兴津早生与温州蜜柑属于同一类，佩奇橘柚为克里迈丁红橘×明尼奥拉橘柚的杂种，明尼奥拉橘柚又是邓肯葡萄柚 (*Citrus paradisi*)×丹西红橘 *Citrus tangerina* 的杂种，因而天草属柑、橙、柚的有性杂交后代^[3]；胡柚是柚和其他柑橘(如宽皮橘)的自然杂交种；翡翠柚是浙江省丽水市林科所从柚类中选育的优良新株系；处红柚是浙江省丽水市林科所从柚类中选育的早熟优良新品种^[4]，它们和早香柚、文旦一起同属于柚类；红肉脐橙是秘鲁选育的华脐芽变系；柑属于橘类。从聚类结果来看，瓯柑类、柑类、温州蜜柑类分别聚在一起；南香和天草遗传上与温州蜜柑类接近；柚类中除文旦这个特殊品种外，其余 3 个品种聚在一起；胡柚与红肉脐橙的遗传关系接近，这与胡柚的来源有关。

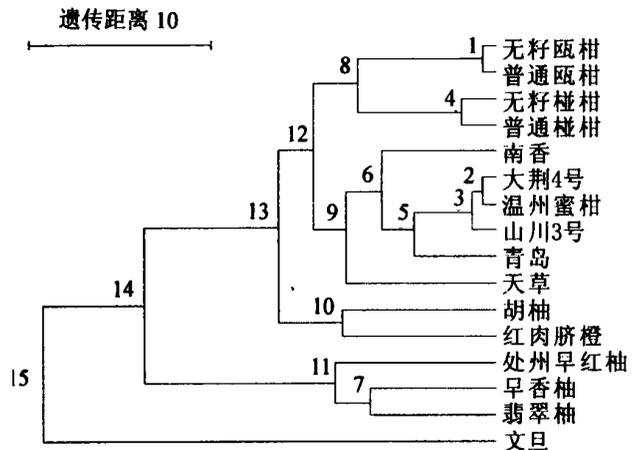


图 2 无籽瓯柑等 16 个品种 UPGMA 聚类图

Figure 2 Clustering of 16 varieties

2.3 利用 RAPD 区分无籽瓯柑与普通瓯柑

在本实验条件下，用 S304 等多个引物进行 RAPD 分析可以区别无籽瓯柑与普通瓯柑(图 3)。实验结果可见，用引物 S304 进行扩增，在 900~1 030 bp，普通瓯柑有一扩增条带，而无籽瓯柑没有，且无籽瓯柑在 700 bp 处，普通瓯柑在 700~800 bp 各有特异的条带。

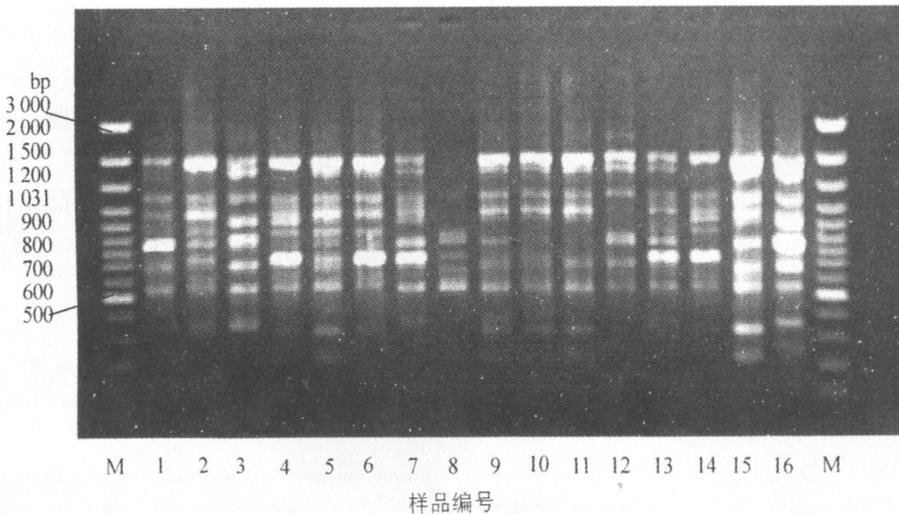


图 3 引物 S304 PCR 扩增产物的电泳结果 (泳道 1 为无籽瓯柑，泳道 2 为普通瓯柑)

Figure 3 Electrophoresis of the PCR product amplified with the primer S304 (Lane 1: *Citrus suavisima* 'Seedless'; Lane 2: *Citrus suavisima*)

2.4 利用 RAPD 区分无籽椪柑与普通椪柑

在实验条件下，同样用 S356 等多个引物进行 RAPD 分析可以区别无籽椪柑与普通椪柑(图 4)。实验结果可见，用引物 S356 在 200~300 bp 偏 200 bp 左右和 300~400 bp，无籽椪柑有明显的扩增条带，而普通椪柑则没有。

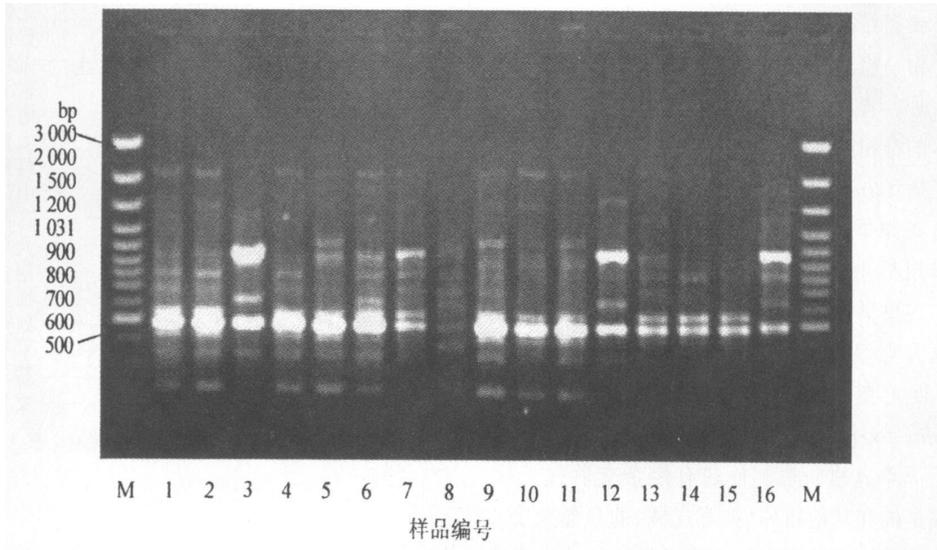


图4 引物 S356 PCR 扩增产物的电泳结果

(泳道 4 为无籽柑, 泳道 14 为普通柑)

Figure 4 Electrophoresis of the PCR product amplified with the primer S356

(Lane 4: *Citrus poonensis* 'Seedless'; Lane 14: *Citrus poonensis*)

3 讨论

RAPD 技术在柑橘品种区分与鉴定中的应用有不同的报道。利用 RAPD 技术, Deng 等^[5]对 250 多个农家品种的柑橘进行了分析并建立了指纹图谱; 范眸天等^[6]对 15 个柑橘种质资源进行了品种鉴定、亲缘关系研究和分类。但 Natividade Targon 等^[7]对甜橙 *Citrus sinensis* 品种进行评价的结果表明, 尽管甜橙品种表型上有差异, 但未检测到基因多样性, 因此他们认为 RAPD 不适合用于甜橙品种的鉴定。Cabrita 等研究了 22 个柑橘品种的遗传关系, 研究发现 RAPD 可以区分所有的种及柑橘品种, 但不能区分生物类型(Biotype)中的不同品种^[8]。在本实验中, 我们用 RAPD 标记对无籽瓯柑等 16 个品种进行了区分, 并利用 RAPD 标记区分了瓯柑及柑中的有籽品种与无籽品种, 说明这些品种不仅在 DNA 水平上是有差异的, 而且 RAPD 标记技术至少可用于丽水市目前主栽柑橘品种 DNA 水平的鉴别。

参考文献:

- [1] Hoss M, Paabo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method [J]. *Nucl Acids Res*, 1993, **21**: 3 913—3 914.
- [2] Boom R, Sol C J A, Salimans M M, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acid [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, **28** (3): 495—503.
- [3] 龚宁. 杂柑之王, 换代精品——天草[EB/OL]. Available from <http://www.rsy.gov.cn/shownews.asp?id=133>, 2004-01-05.
- [4] 斯金平, 丁丽惠, 章志勇, 等. 名特优柑橘绿色栽培与经营技术[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2004.
- [5] Deng X X, Hu C G, Huo H *et al.* A preliminary study of *Citrus* germplasm conservation and its evaluation by RAPD analysis [R]. Eilat: ISHS *Acta Horticulturae* 535-First International *Citrus* Biotechnology Symposium, 2000.
- [6] 范眸天, 高俊, 吴兴恩, 等. 15 种柑橘种质资源的 RAPD 分析[J]. *中国南方果树*, 2002, **31** (6): 3—6.
- [7] Natividade Targon M L P, Machado M A, Coletta Filho H D, *et al.* Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA [R]. Eilat: ISHS *Acta Horticulturae* 535-First International *Citrus* Biotechnology Symposium, 2000.
- [8] Cabrita L, Elisario P, Leitao J, *et al.* Assessment of the genetic relationship among *Citrus* species and varieties by isozyme and RAPD markers [R]. Montpellier: ISHS *Acta Horticulturae* 546-International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, 2001.

RAPD analysis of 16 orange varieties in Lishui of Zhejiang

ZENG Yan-ru¹, HU Ying¹, SI Jin-ping², XU Xiang-hua²

(1. Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300 Zhejiang, China; 2. Lishui Institute of Forestry Science, Lishui 323000, Zhejiang, China)

Abstract: Sixteen orange varieties cultivated in Lishui of Zhejiang were analyzed for their phylogeny with RAPD markers. Totally 216 RAPD loci were amplified with 21 primers, with 10.29 loci per primer on the average. Polymorphic loci accounted for 96.76%. For different varieties, 0—10 bands could be amplified with each primer. Among all the primers used, the primer S13 is the least informative with only 48 bands amplified and S317 most informative with 143 bands amplified. *Citrus grandis* var. *wentanyu* is a very special variety, in which 8 out of 21 primers had no bands amplified. It has been found through UPGMA clustering that varieties of Ougan, Ponkan, Unshu Mikan and fruitgrape clustered separately; *Citrus unshiu* × *C. clementina* and *C. hybrid* were close to Unshu Mikan in genetic distance and *C. paradisi* 'Changshanhuoyou' to *C. sinensis* var. *brasiliensis*. In addition, *C. suavisissima* 'Seedless' could be distinguished from *C. suavisissima* with primer S304, while *C. poonensis* 'Seedless' from *C. poonensis* with primer S356. It is concluded that the varieties tested here are different from one another in DNA and RAPD markers could be used to distinguish them. [Ch, 4 fig, 1 tab, 8 ref.]

Key words: RAPD; orange variety; phylogeny; *Citrus suavisissima* 'Seedless'; *Citrus poonensis* 'Seedless'

浙江林学院循环经济研究中心成立

为了推动循环经济发展, 促进资源循环式利用, 鼓励企业循环式生产, 推动产业循环式组合, 倡导社会循环式消费, 大力降低原材料和能源消耗, 努力实现废弃物的资源化、减量化、无害化, 切实提高资源利用效率, 经研究, 2005年5月20日成立浙江林学院循环经济研究中心。

该中心的成立, 将对浙江林学院相关的科学研究和学科建设起到积极有效的促进作用, 并为浙江生态省建设和节约型社会建设作出应有的贡献。该中心下设6个研究所, 研究领域主要涉及环境经济、资源管理、资源再生利用工程、生态规划、环境治理工程、能源管理和循环经济制度等方面。该中心将根据需要每年招收一定数量的研究生, 联合培养博士生, 并为社会各界、企业举办各种专题或短期培训, 同时, 将为国内外有关部门、机构和企业提供生态规划、环境治理、资源管理、能源利用等多方面的咨询和技术服务。“浙江循环经济”网站同时开通运行。

浙江林学院循环经济研究中心顾问由浙江林学院党委书记陈敬佑教授、浙江林学院院长张齐生院士担任, 名誉主任由全国人大常委会委员、全国人大环境与资源保护委员会副主任、博士生导师冯之浚教授担任, 浙江林学院教授单胜道博士任中心主任。

(科技处)