

锦橙系列品种资源的遗传鉴定

杨海健¹ 张云贵¹ 但 芳² 韩国辉¹ 周心智¹ 洪 林¹ 谭 平¹

1.重庆市农业科学院果树研究所/长江中游柑橘综合试验站,重庆 401329;
2.国家农业信息化工程技术研究中心/北京农业信息技术研究中心,北京 100097

摘要 采用 SRAP 分子标记技术对重庆地区的 16 份锦橙(*Citrus sinensis* Osbeck)资源进行遗传鉴定,结果显示:锦橙资源间的亲缘关系非常接近。在 16 份锦橙的 PCR 扩增中,80 对 SRAP 引物中只有 30 对引物扩增出了差异带,多态性引物比例为 37.5%,共扩增出 56 份特征带,平均每对引物扩增出 1.87 条差异带。聚类结果显示,八楞锦橙和长叶橙与其他锦橙类型遗传距离较远,而遗传关系最近的是 BDQ222 与 BDM221、S26。SRAP 的鉴定结果显示,此标记在鉴定锦橙这种亲缘关系非常近的芽变类型上具有较高的可应用性。进一步对部分差异片段测序分析,推测这些差异片段有可能与锦橙的变异性状相关。

关键词 锦橙; 品种资源; 芽变; SRAP; 遗传鉴定

中图分类号 S 666.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0001-05

锦橙原产重庆,在当地种植广泛,是可鲜食、也可加工的优良甜橙品种资源^[1]。三峡库区是我国柑橘优势区域发展规划中最主要的橙汁加工原料生产基地^[2],而锦橙作为甜橙良种在三峡库区的鲜食生产和果汁加工中都占有重要地位,目前三峡库区柑橘加工所采用的中熟品种 90%以上为锦橙^[3]。锦橙在我国具有悠久的栽培历史,并在种植过程中不断产生自然芽变。目前我国主栽的众多锦橙资源均具有芽变背景,有熟期、叶形、果形等多种变异类型。这些变异类型在植物学特征上有相似的一面,也有在品质及生物学特性方面的不同之处,使用分子标记对变异类型进行遗传鉴定,建立特征标记库有利于今后的保存、推广和苗木繁育。

SRAP 分子标记自 2001 年被 Li 等^[4]开发以来得到了广泛应用,此标记在基因连锁图中是均匀分布的,这一点与 AFLP 标记没有区别。此种标记已经广泛应用于蔬菜、果树、花卉等物种上并成功扩增^[5-7]。韩慧君^[8]在利用 SRAP 分析红橘优系时,认为 SRAP 标记操作简单、并在稳定性和多态性方面表现较好。本研究以重庆的 16 份锦橙资源为试验材料,利用 SRAP 分子标记对其进行遗传鉴定,记录特征标记,克隆差异片段,旨在为锦橙资源的保存、利用和基因重要变异信息发掘提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

于 2014 年在重庆地区采集锦橙类型共计 16 份样品,见表 1。

表 1 16 份试验材料
Table 1 16 samples for experiments

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
1	大叶大果 Daye daguo	9	蓬安 100 Pengan 100
2	铜水 72-1 Tongshui 72-1	10	梨橙 2 号 Licheng-2
3	BDQ222	11	红 6-6 Red 6-6
4	北碚 447 Beibei 447	12	长叶橙 Changye Cheng
5	BDM221	13	八楞 Baleng
6	S26	14	甜橙 863 Sweet orange 863
7	渝津橙 Yujin Cheng	15	BBS227
8	BSG223	16	涪陵晚熟 Fuling late-maturing

1.2 DNA 提取和凝胶电泳

采集样品嫩叶,用蒸馏水清洗后利用 CTAB 法提取 DNA 备用。采用 SRAP 分子标记技术进行

收稿日期: 2015-05-25
基金项目: 重庆市基本科研业务费专项(2013cstc-jbkg-00534);国家现代柑橘产业技术体系(SARS-27)
杨海健,助理研究员,研究方向:果树栽培与育种. E-mail: yanghaijian126@126.com
通信作者:谭 平,副研究员,研究方向:果树区域经济及技术推广. E-mail:tanp_168@163.com

PCR 扩增、6%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,最终获得标记图谱。

SRAP 引物来自文献[9],由上海生工合成。采用 Applied Bio systems PCR 仪进行 DNA 扩增,扩增体系参照李巧燕等^[10]的方法。电泳设备采用北京六一电泳槽,电泳功率 80 W,电压 2 000 V。

1.3 多样性及聚类分析

根据扩增图谱中差异条带的有无来构建数据矩阵(模糊条带不计算在内),再利用 NTSYS-pc2.1 软件计算相似系数,利用 UPGMA 法聚类分析,构建

亲缘关系树状图。

1.4 特异片段的回收、测序

采用康为世纪快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (version 05152012 Cat.No.CW2302)进行回收,送上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

经过筛选,最终得到能获得较清晰谱带的引物共 80 对,表 2 所示为正反向引物序列。

表 2 SRAP 引物序列表

Table 2 Primer sequences for SRAP analysis

编号 No.	正向引物(5'—3') Forward primer	编号 No.	反向引物(5'—3') Reverse primer
1	me1f: TGAGTCCAAACCGG-ATA	10	em1r: GACTGCGTACGAATT-AAT
2	me2f: TGAGTCCAAACCGG-AGC	11	em2r: GACTGCGTACGAATT-TGC
3	me3f: TGAGTCCAAACCGG-AAT	12	em3r: GACTGCGTACGAATT-GAC
4	me4f: TGAGTCCAAACCGG-ACC	13	em4r: GACTGCGTACGAATT-TGA
5	me5f: TGAGTCCAAACCGG-AAG	14	em5r: GACTGCGTACGAATT-AAC
6	ME7F: TGAGTCCAAACCGG-TCC	15	em6r: GACTGCGTACGAATT-GCA
7	ME8F: TGAGTCCAAACCGG-TGC	16	em7r: GACTGCGTACGAATT-CAA
8	ME9F: TGAGTCCAAACCGG-ATG	17	Em7r: GACTGCGTACGAATT-ATG
9	ME10F: TGAGTCCAAACCGG-CTT	18	Em8r: GACTGCGTACGAATT-CTG
		19	Em9r: AGGCGGTTGTCAATT-GAC
		20	Em10r: TGTGGTCCGCAAATT-TAG

2.2 扩增结果

80 对 SRAP 引物中仅有 30 对扩增出了差异,共 56 条差异带,平均每对多态性引物扩出 1.87 条差异带。在 16 份不同的锦橙材料中,能够扩增出 2 条以上差异带的引物共 10 对,分别为:me1f-em5r 、

me1f-Em7r、 me5f-em1r、 ME7F-em1r、 ME7F-Em7r、 ME7F-Em9r、 ME8F-Em9r、 ME9F-em1r、 ME9F-em4r、ME9F-Em9r 。3 条以上差异带的只有 4 对,分别为:me1f-Em9r、ME7F-Em9r、ME8F-Em9r、ME9F-Em9r。

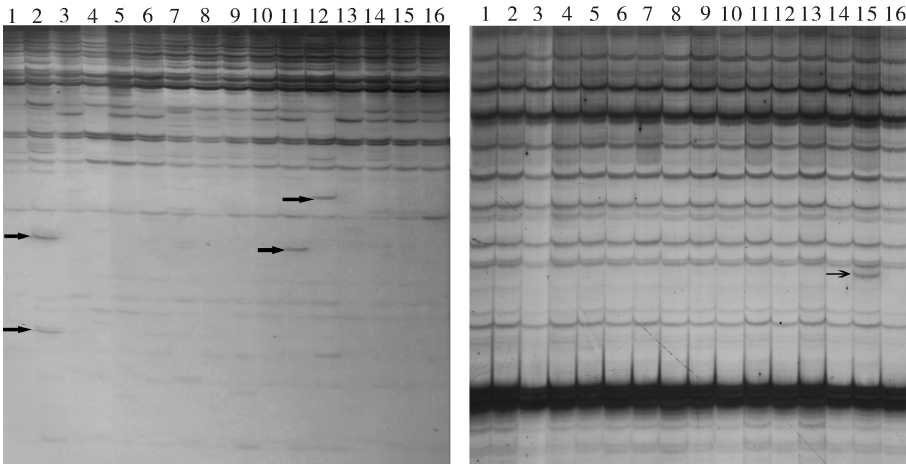


图 1 引物 me1f/Em9r(左)和 me2f/em6r(右)的 SRAP 电泳图

Fig.1 SRAP marker of primers me1f/Em9r(Left)and me2f/em6r(Right)

2.3 亲缘关系分析

利用 80 对 SRAP 引物共获得了 16 份锦橙样品的 30 个差异图谱。采用聚类软件得到聚类图(图 2),如图所示,在遗传相似系数为 0.867 时(图 2 中竖线处),可以将 16 份锦橙分成 7 类,其中 3、4、5、6、9、10、11、14、15、16 号聚为一类,其余 6 份锦橙

各自单独归为一类。八楞锦橙与其他锦橙遗传距离最远,其次是长叶橙。获得的遗传相似度显示,16 份锦橙之间的遗传相似系数在 0.613~0.984 之间。其中,相似系数最小值分别产生在八楞锦橙与长叶橙、八楞锦橙与 BSG223 之间,最大值则出现在 BDQ222 与 BDM221、BDQ222 与 S26 之间。

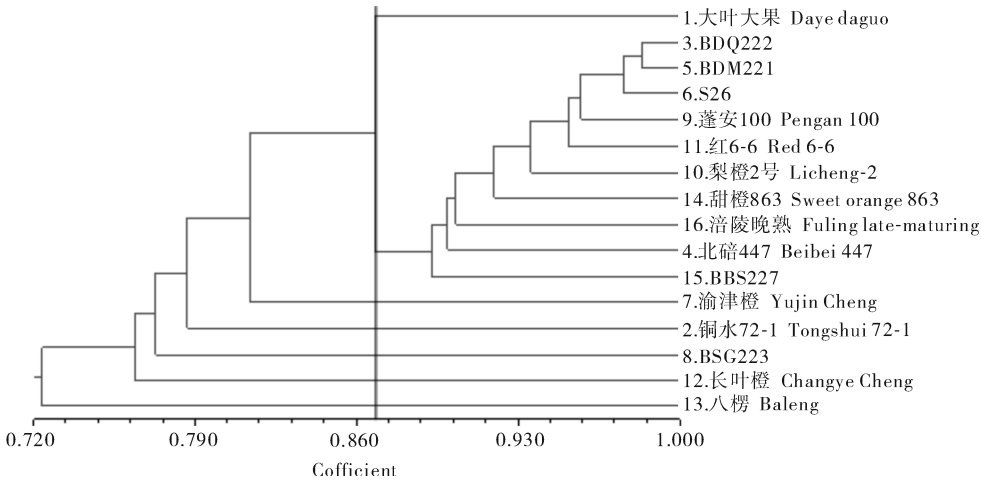


图 2 16 份锦橙材料的亲缘关系树状图
Fig.2 UPGMA dendrogram for 16 Jincheng resources

表 3 克隆片段信息
Table 3 Information of cloned fragments

片段来源 Fragment source	引物 Primer	片段序列长度/bp Fragment length	比对基因长度/bp Corresponding gene length	相似度/% Similarity	基因信息 Genetic information
BSG223	ME8F/	179	3 908	99	与植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的合成相关 Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
BSG223	Em8r				
BSG223	ME9F/	63	8 525	92	β -半乳糖苷酶合成基因 Putative beta-galactosidase
BSG223	Em9r				
八楞	ME10F/	159	15 242	100	与多核糖核苷酸核苷酸基转移酶合成相关 Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
Baleng	em4r				
八楞	ME9F/	191	1 173	95	未经鉴定的基因 Putative uncharacterized protein (Fragment)
Baleng	em2r				
渝津橙	ME8F/	134	8 781	98	与肌醇单磷酸酶 3 合成相关 Inositol monophosphatase 3
Yujin Cheng	Em9r				
渝津橙	ME8F/	166	25 262	96	叶绿体中依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合成酶基因 Ferredoxin-dependent glutamate synthase
Yujin Cheng	Em9r				
长叶橙	ME9F/	147	3 307	98	与细胞壁结构成分相关 Structural constituent of cell wall
Changye Cheng	em2r				
北碚 447	ME9F/	147	3 307	98	与细胞壁结构成分相关 Structural constituent of cell wall
Beibei 447	em2r				
涪陵晚熟	ME8F/	165	3 908	99	与植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的合成相关 Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase
Fuling late-maturing	Em8r				

2.4 差异片段的测序、比对

将差异明显的特异带进行回收测序,共获得 24

条序列,克隆得到的差异片段长度为 22~255 bp。在华中农业大学甜橙基因组数据库中进行比对后发

现,匹配程度在 95% 以上的有 9 条(表 3)。

3 讨 论

本研究在 16 份锦橙的 PCR 扩增中,80 对 SRAP 引物中只有 30 对引物扩增出了差异带,多态性引物比例为 37.5%,且大部分引物只能扩增出 1 条差异带(图 1 右),扩增出 3 条以上差异(图 1 左)的引物仅 4 对。可见,锦橙不同品种资源之间的亲缘关系非常接近,不易区分。主要原因可能是由于锦橙的不同类型均来源于个别或少数基因发生突变而产生的自然芽变。亲缘关系分析显示,八楞、长叶橙与其余锦橙关系较远,推测八楞和长叶橙是锦橙在自然生长过程中通过多次变异产生。另外,部分学者对将长叶橙归为锦橙类持不同观点,而本研究结果似乎也佐证了这一观点,究竟是否为锦橙芽变还有待进一步研究。BDQ222 与 BDM221、BDQ222 与 S26 两两关系最近,推测 BDQ222、BDM221 和 S26 是由其中某一个变异产生。说明锦橙是极易产生芽变的柑橘类型。

芽变是果树新种质产生的一个重要来源,在果树保持遗传多样性和培育新品种上具有重要意义^[11]。但芽变往往是极少数功能基因发生变异,因此,很多标记不易区分。SRAP 标记既具有像 SSR 标记一样简便的操作和高重复性,也具有类似 AFLP 一样的高产率、集两者之长的特性使得此标记自出现以来一直得到广泛的关注和应用。本研究中所有锦橙类型均能通过 30 对 SRAP 特异性引物做出正确区分,显示了 SRAP 标记在鉴定锦橙这类亲缘关系非常接近的芽变类型上具有较高的可应用性,这一点与阳志慧^[12]在利用 SRAP 分析纽荷尔脐橙变异株系时获得的结论一致。因此,此技术可在植物资源保存中鉴定重复资源和芽变资源、提高资源保存效率方面发挥重要作用。

本研究测序结果中,9 条匹配程度在 95% 以上的序列分布在 6 份锦橙品种中。BSG223 和涪陵晚熟在同一引物下(ME8F/Em8r)分别克隆到 179 bp 和 165 bp 的片段,且这 2 条序列均以 99% 的相似性共同比对到一个长为 3 908 bp 的基因的不同区段上。此基因与植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的合成相关,具有与植物生长发育、激素信号转导和植物抗病防御等相关的基因功能^[13]。此外,其他测序片段比对上的基因还有:肌醇单磷酸酶 3 合成相关

基因、多核糖核苷酸核苷酸基转移酶合成相关基因、细胞壁结构成分相关基因、叶绿体中依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合成酶基因等,还包括一个未经鉴定的甜橙功能基因。可见,通过分子标记不仅能标记出芽变材料的差异位点,还能在基因库中比对上已知基因。从比对上的基因类型上看,发生在锦橙上的变异表现为多样性,这点从锦橙不同的形态和农艺性状上也能得到充分体现。对差异片段回收测序,并在基因库中比对匹配的基因序列,可通过查看基因功能获知该基因的相关信息,如果再通过后期克隆基因全长和利用转基因技术将目的基因导入植物受体观察验证,将能进一步发掘、获知该基因的某些未知功能,本研究做了差异片段的回收、测序及比对,初步获得了某些片段信息。锦橙芽变类型中,有的呈现叶形变异、有的表现为果形变异,还有的是熟期变异,这些经过测序的特异序列和未经测序的差异片段有可能包含了揭示锦橙品种资源之间性状差异的重要信息,因此,仍具有进一步研究的价值。

参 考 文 献

- [1] 陈竹生,万良珍.中国柑橘良种彩色图谱[M].成都:四川科学技术出版社,1993.
- [2] 湖南省林业厅.湖南森林昆虫图鉴[M].长沙:湖南科学技术出版社,1992:636.
- [3] 淳长品,彭良志,雷霆,等.不同柑橘砧木对锦橙果实品质的影响[J].园艺学报,2010,37(6):991-996.
- [4] LI Q, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PGR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [5] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(2): 271-282.
- [6] 任羽,王得元,张银东,等.辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J].分子植物育种,2004,2(5):689-693.
- [7] 刘小飞,唐飞雄,刘晓荣,等.鸡冠花诱变选育系和栽培选育系的 SRAP 分子鉴定[J].北方园艺,2013(7):128-130.
- [8] 韩慧君.红橘优系遗传鉴定及起源研究[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [9] 孙佳琦,梁建国,石少川,等.SRAP 标记在观赏植物遗传育种中的应用[J].分子植物育种,2010,8(3):577-588.
- [10] 李巧燕,林瑞庆,朱兴全.SRAP 分子标记及其应用概述[J].热带医学杂志,2006,6(4):467-470.
- [11] 张敏,邓秀新.柑橘芽变选种以及芽变性状形成机理研究进展

[J].果树学报,2006,23(6):871-876.

[13] 查笑君,马伯军,潘建伟,等.植物富亮氨酸重复类受体蛋白激酶的研究进展[J].浙江师范大学学报(自然科学版),2010,33(1):7-12.

[12] 阳志慧.纽荷尔脐橙变异株系主要性状及 SRAP 分析研究[D].长沙:中南大学,2009.

Genetic identification of Jincheng sweet oranges with SRAP markers

YANG Haijian¹ ZHANG Yungui¹ DAN Fang² HAN Guohui¹
ZHOU Xinzhi¹ HONG Lin¹ TAN Ping¹

1.*Institute of Fruit Research ,Chongqing Academy of Agricultural Sciences/
Citrus Experiment Station of the Middle Reaches of Yangtze River ,Chongqing 401329,China ;*
2.*National Engineering Research Center for Information Technology in Agriculture/
Beijing Research Center for Information Technology in Agriculture ,Beijing 100097,China*

Abstract 80 pairs of SRAP primer were used to analyze the genetic relationship among 16 Jincheng (*Citrus sinensis* Osbeck) germplasms from Chongqing area.The results showed that the genetic relationship between different Jincheng species was very close.In the PCR amplification,only 30 pairs of primers (37.5%) were polymorphic.56 polymorphic bands were obtained,with an average of 1.87 band each pair of primers.Results of cluster analysis showed that the genetic relationship between Baleng Cheng and Changye Cheng was more far than that between other types.The closest relationship was between BDQ222 and BDM221,and between BDQ222 and S26.SRAP markers have a high applicability in identifying plant types with close genetic relationship.By sequencing and analyzing polymorphic fragments,we speculate that some polymorphic fragments may be associated with variation of some traits of Jincheng.It will provide basis for future exploring Jincheng germplasm.

Keywords Jincheng(*Citrus sinensis* Osbeck); germplasm; bud variation; SRAP; genetic identification

(责任编辑:张志钰)