

# 化州柚种质资源的 SSR 分析及其果实 不同发育期柚皮苷含量变化

田 静<sup>1</sup> 庞一波<sup>2</sup> 陈嘉景<sup>1</sup> 袁子或<sup>1</sup> 曾继吾<sup>3</sup> 徐 娟<sup>1</sup>

1. 华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 浙江省台州市农业科学研究院, 临海 317000; 3. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640

**摘要** 采用 SSR 分子标记技术研究化州柚不同品系及柑橘属各代表种质间的亲缘关系, 结果表明: 25 对 SSR 引物在 15 个样品中扩增得到 175 个等位基因, 聚类分析证实化州柚与柚类亲缘关系较近, 而且一些化州柚同名材料在遗传上存在差异。利用高效液相色谱(HPLC)法检测不同种质幼果及不同果径果实不同组织中柚皮苷含量, 结果表明: 化州柚幼果中柚皮苷含量显著高于化州本地柚光青及其他地区普通柚, 且受年份和环境的影响较大; 随着果径的增大, 2 个化州柚种质正毛(吴)和假西洋(吴)果皮及果肉中柚皮苷含量均呈现下降趋势, 且果肉中柚皮苷含量比果皮中高。综合分析果实大小和有效成分含量得出, 果实直径 4~8 cm 时是化州柚适宜采收期, 果径 6 cm 左右为最适采果期。

**关键词** 化州柚; 化橘红; SSR; 柚皮苷; 种质鉴别; 适采期; 高效液相色谱(HPLC)

**中图分类号** S 666.302.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0064-07

化橘红(*Exocarpium Citri Grandis*)为芸香科植物化州柚(*Citrus grandis* Osbeck var. *Tomentosa* Hort.)或柚(*C. grandis* Osbeck)的未成熟或近成熟的干燥外层果皮, 前者习称“毛橘红”, 后者习称“光七爪”、“光五爪”, 具有散寒燥湿、利气消痰功效<sup>[1]</sup>。化州柚是柚的栽培变种, 产于广东省化州市部分乡镇, 果皮有细密茸毛。由于长期实生繁殖, 化州柚分化为多个形态上有明显差异的不同品系, 当地果农根据果实表面茸毛多少, 俗称“黄龙”、“正毛”、“密叶正毛”、“假西洋”、“副毛”等品系<sup>[2-3]</sup>。

已有研究表明, 化橘红的主要有效成分为柚皮苷(naringin)等类黄酮物质<sup>[4-5]</sup>, 其中柚皮苷是《中国药典》2015 版规定的含量测定指标成分。柚皮苷的合成前体是柚皮素, 柚皮素先在 7-O-葡萄糖苷转移酶(7-GlcT)的催化作用下形成柚皮素-7-O-葡萄糖苷, 再由 1,2-鼠李糖基转移酶(1,2-RhaT)在 C7 位的葡萄糖苷上加上一个鼠李糖苷形成柚皮苷<sup>[6]</sup>。

不同品系的化州柚在形态上存在较大的差异, 且果实类黄酮成分含量也各不相同, 而且会随着果实增大而逐渐降低<sup>[7-8]</sup>。鉴于此, 本研究采用 SSR

分子标记技术对分布于化州市平定镇的化州柚主要品系进行遗传多样性分析, 为化州柚种质鉴别和育种提供参考; 此外, 对化州柚不同发育期果实中柚皮苷含量进行检测, 以期在生产上选择适宜采收期提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

化州柚采于广东省化州市平定镇 3 个地点: 高车村吴德祥家(简称“吴”)、马力村黎汉良家(简称“黎”)、山车村化州中药厂(简称“山”), 经当地有经验的果农从形态上对不同品系进行鉴定。

1) SSR 分子标记材料。供试材料共有 15 份种质, 见表 1。其中, 化州柚 6 份, 化州本地柚 1 份: 光青(黎), 其他柑橘种质 8 份。采摘各种质幼嫩叶片, 清洗表面粉尘后置于-80℃冰箱中保存备用。

2) 幼果柚皮苷含量检测。幼果采自 2011 年 6 个种质: 正毛(吴)、正毛(黎)、副毛(黎)、假西洋(吴)、假西洋(黎)和光青(黎); 2012 年 11 个种质: 正毛(吴)、正毛(黎)、正毛(山)、副毛(黎)、副毛(山)、

收稿日期: 2019-02-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31521092); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303093)

田 静, 硕士, 科研助理。研究方向: 柑橘品质生物学。E-mail: tianjing880226@163.com

通信作者: 徐 娟, 博士, 教授。研究方向: 果实品质生物学与调控。E-mail: xujuan@mail.hzau.edu.cn;

曾继吾, 博士, 研究员。研究方向: 果树栽培与育种。E-mail: jiwuzeng@163.com

表 1 SSR 分子标记材料  
Table 1 Plant materials for SSR analysis

编号 Number	材料名称 Chinese name	英文名 English name	拉丁学名 Scientific name	采样地点 Sources
1	正毛(吴)	Zhengmao (Wu)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	广东化州 Huazhou, Guangdong
2	正毛(黎)	Zhengmao (Li)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
3	凤尾(吴)	Fengwei (Wu)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
4	假西洋(吴)	Jiaxiyang (Wu)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
5	假西洋(黎)	Jiaxiyang (Li)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
6	副毛(黎)	Fumao (Li)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
7	光青(黎)	Guangqing (Li)	<i>C. grandis</i> Osbeck var. <i>Tomentosa</i> Hort.	
8	琯溪蜜柚	Guanximiyou	<i>C. grandis</i> Osbeck	湖北武汉 Wuhan, Hubei
9	沙田柚	Shatianyou	<i>C. grandis</i> Osbeck	
10	鄂柑 1 号	E-gan No.1 ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco	
11	国庆 1 号	Guoqing No.1 satsuma	<i>Citrus unshiu</i> Marc.	
12	尤力克柠檬	Eureka lemon	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	
13	早金甜橙	Early Gold sweet orange	<i>C. sinensis</i>	
14	枳	Trifoliolate orange	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	
15	黄皮	Wampee	<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	

假西洋(吴)、假西洋(黎)、光青(山)、红肉蜜柚、琯溪蜜柚和沙田柚。化州柚及化州本地柚——光青采自广东化州,红肉蜜柚、琯溪蜜柚和沙田柚采自福建平和。用游标卡尺测量果实的果径,选取果径大小约为 2 cm 的无病虫害果实。采摘后用蒸馏水洗净果实表面、擦干。整果切碎后,迅速加入液氮于磨样机中磨成粉末,然后放入冷冻干燥仪(Heto Lyolab3000)中冻干至恒质量,于-80℃冰箱保存。

3)果实不同生长发育时期柚皮苷检测。选定树体健康、生长势中庸的正毛(吴)和假西洋(吴)各 3 株,于 2011 年分别采摘果径大小约 4、6、8 和 10 cm 的果实,2012 年分别采摘果径大小约 4、6、7、8、9 和 11 cm 的果实。采摘后用蒸馏水洗净果实表面、擦干,用天平称量果实各时期质量。2011 年果实做如下处理:4 和 6 cm 的果实分成 3 层(黄皮层、白皮层和果肉层),8 和 10 cm 果实分成 4 种组织(黄皮层、白皮层、囊衣和汁胞);2012 年采收的果实均分成 2 层,果皮层(含黄皮层和白皮层)和果肉层(含汁胞和囊衣)。分层后,迅速加液氮磨成粉末,放冷冻干燥仪冻干至恒质量,于-80℃冰箱保存备用。

1.2 SSR 分子标记检测

采用改良 CTAB 法提取叶片基因组 DNA<sup>[9]</sup>。经 NanoDroP 1000 紫外分光光度计(Thermo Scientific, USA)检测质量合格后,将其稀释到 50 ng/ $\mu$ L 保存备用。

SSR 引物来自文献[10-11]以及笔者所在实验室开发(表 2)。PCR 扩增反应参考 Pang 等<sup>[12]</sup>的方法,略微改动。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,添加的组分为:50 ng/ $\mu$ L DNA 模板 2  $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>

1.2  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L,10 $\times$ Taq Buffer 2  $\mu$ L,2 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L 正、反向引物各 0.3  $\mu$ L,灭菌双蒸水 12  $\mu$ L。PCR 扩增程序为:94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,34 个循环;最后 72℃延伸 7 min;4℃保存。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测及银染方法参照陈鹏<sup>[13]</sup>的方法。

SSR 数据统计分析时,每对 SSR 引物视为 1 个位点,每条多态性条带为 1 个等位基因。聚类分析时,有条带记为 1,没有条带记为 0,形成“0-1”数据矩阵,通过 NTSYS2.10e 分析软件计算样品之间的相似系数,利用 UPGMA 法进行聚类分析并构建系统进化树<sup>[14]</sup>。

1.3 类黄酮的提取及检测

精确称取 0.1 g 冻干样品粉末,加入 5 mL 80% 甲醇溶液,置于 FS60 超声波萃取仪中提取 60 min,然后于 4℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min,用一次性注射器吸取 1 mL 上清经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 检测。

色谱检测系统为:Waters 1525 型高效液相色谱仪,2996 二极管阵列检测器,717 自动进样器,C18 色谱柱(4.6 mm  $\times$  150 mm,5  $\mu$ m 粒度)和 Empower 2 管理软件。流动相 A 相为 0.3% 甲酸,B 相为色谱甲醇,采用梯度洗脱的方式:0~10 min,15%~20% B;10~20 min,20%~30% B;20~35 min,30%~45% B;35~45 min,45%~60% B;45~55 min,60%~75% B;55~60 min,75%~75% B;60~63 min,75%~15% B;63~65 min,15%~15% B。流速保持在 1 mL/min,每次进样量

表 2 SSR 引物序列  
Table 2 SSR primer sequences

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence
CIP02	GATCCAAGGATGGTGTAAACAG	TCCAGAAGCTTTGACGGCATCT
CIP11	AGGCCATTGAGATCTCTGGCT	ACAACGCTTGAGACTGGCTCC
CIP12	ACGGACACGAGAGCAGCAGC	CAAATTACACACTAGCTGGGCAG
CIP14	GTTCTCCNAGGCACTGC	TTCTGGCCACGGGCAACAC
TAA1	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC
TAA15	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC
TAA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC
TAA33	GGTACTGATAGTACTGCGGCG	GCTAATCGCTACGTCTTCGC
TAA45	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTGAGTTGGTTACG
CT19	CGCCAAGCTTACCCTACTACTAC	GCCACGATTTGTAGGGGATAG
CT19-02 <sup>6</sup>	ACCACTCACTACTTAATTACCTTTT	AGGGTTGCCACGATTTGTAG
CT21	CGAACTCATTAAAAGCCGAAAC	CAACAACCACCACTCTCACG
CAC15	TAAATCTCCACTCTGCAAAAGC	GATAGGAAGCGTCGTAGACCC
CAC39	AGAAGCCATCTCTCTGTCTGC	AATTCAGTCCCATTCCATTCC
CAG01	AACACTCGCACCAAAATCCTC	TAAATGGCAACCCAGCTTTG
AG14	AAAGGGAAAGCCTAATCTCA	CTTCTCTTGCGGAGTGTTCT
GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC	TGCTCCGAAGTTCATCATTG
CCT01	TCAACACCTCGAACAGAAGG	CCCACATGCTAGCACAAAGA
cAGG9	AATGCTGAAGATAATCCGCG	TGCCTTGCTCTCCACTCC
Ma2_1303	GCGTCCGTGCGATTCTAT	GAAGGGCGGGAAGAGTAAAC
Ma2_1401	CCCTCATTTCCTTCTATCTCTCTC	CCCCAGTGGAAAAGAACAAA
Ma2_1416	CGTCCGCAATTTCTCTTTCTC	TATAGGGGCTTGTGTCCA
Ma2_1599	GTGACATACGCACACACAGC	TGTGGTGATTGACAAGTTTTTG
Ma2_1662	ATGCGGATCTAAAAGGGGAC	CCTTTAAGCCTCCAACATCG
Ma2_1678	CAACCAGTCCACATAGCCCT	TGGGTCCGTGTGTTTCAGTA

10  $\mu\text{L}$ , 检测波长为 340 nm, 柱温控制在室温。

#### 1.4 柚皮苷标准曲线的制定

将柚皮苷标准品用 80% 色谱纯甲醇溶液融化, 定容至 1 mg/mL, 作为母液。取母液 100  $\mu\text{L}$ , 2 倍稀释, 即取 100  $\mu\text{L}$  母液后加入 100  $\mu\text{L}$  80% 甲醇溶液, 再以此为母液重复上述操作。共稀释 11 次, 得到 12 个不同浓度的标样, 并分别进行 HPLC 检测。以柚皮苷质量浓度为横坐标( $X$ ), 出峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲线并建立回归方程。得到柚皮苷的回归方程为:  $Y = 25799.94X + 25752.82$ ,  $r = 0.99998$ 。

#### 1.5 精密度、稳定性、加标回收率检测

**精密度:** 在相同的条件下, 连续进样柚皮苷标准品 5 次, 计算柚皮苷色谱峰面积的 RSD 为 0.87%。

**稳定性:** 利用柚皮苷标准品, 每隔 1 h 进 1 次样, 重复 5 次, 计算柚皮苷色谱峰面积的 RSD 为 0.85%。

**加标回收率:** 以 2011 年正毛(吴)10 cm 果径汁胞为样品, 加入已知量的柚皮苷标准品, 于相同条件检测, 计算得到柚皮苷的回收率为 94.5%。

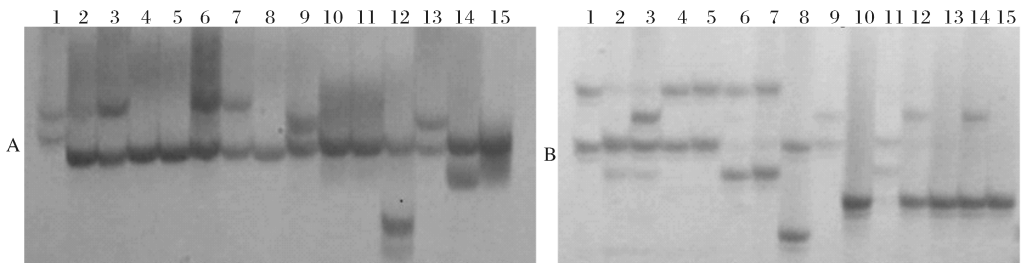
## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 位点的多态性分析

从 120 对 SSR 引物中筛选出 25 对多态性较好的引物用于 SSR 扩增。15 份材料共扩增得到 176 个等位基因, 其中多态性等位基因 175 个, 多态率达 99.43% (图 1)。平均每对引物可扩增得到 7.04 个等位基因, 最少的 4 个, 最多的 9 个。

### 2.2 SSR 聚类分析

根据 SSR 扩增图谱所得数据矩阵进行聚类分析(图 2), 结果显示, 15 份种质的相似系数为 0.57~0.98。在相似系数为 0.65 时, 化州柚与化州本地柚——光青(黎)、琯溪蜜柚、沙田柚等普通柚聚在一起, 证实化州柚类与柚类存在较近的亲缘关系; 在相似系数为 0.72 时, 化州柚与琯溪蜜柚、沙田柚分开, 但化州柚几个品系仍能聚在一起, 说明化州柚各品系的亲缘关系更近。从化州柚内部来看, 假西洋(黎)和假西洋(吴)的相似系数为 1, 表明 2 个种质是一样的; 化州本地柚——光青(黎)与副毛(黎)聚在一起, 但未改变其无毛的表型; 值得关注的是, 正



1~15 分别为正毛(吴)、正毛(黎)、凤尾(吴)、假西洋(吴)、假西洋(黎)、副毛(黎)、光青(黎)、琯溪蜜柚、沙田柚、鄂柑 1 号、国庆 1 号、尤力克柠檬、早金甜橙、枳和黄皮。1 to 15 represent Zhengmao (Wu), Zhengmao (Li), Fengwei (Wu), Jiaxyang (Wu), Jiaxyang (Li), Fumao (Li), Guangqing (Li), Guanximiyou, Shatianyou, E-gan No.1 ponkan, Guoqing No.1 satsuma, Eureka lemon, Early Gold sweet orange, Trifoliolate orange and Wampee.

图 1 SSR 引物 TAA27(A) 和 CCT01(B) 在 15 份柑橘材料中的扩增谱带

Fig.1 Amplification band of 15 citrus samples generated by SSR primers TAA27(A) and CCT01(B)

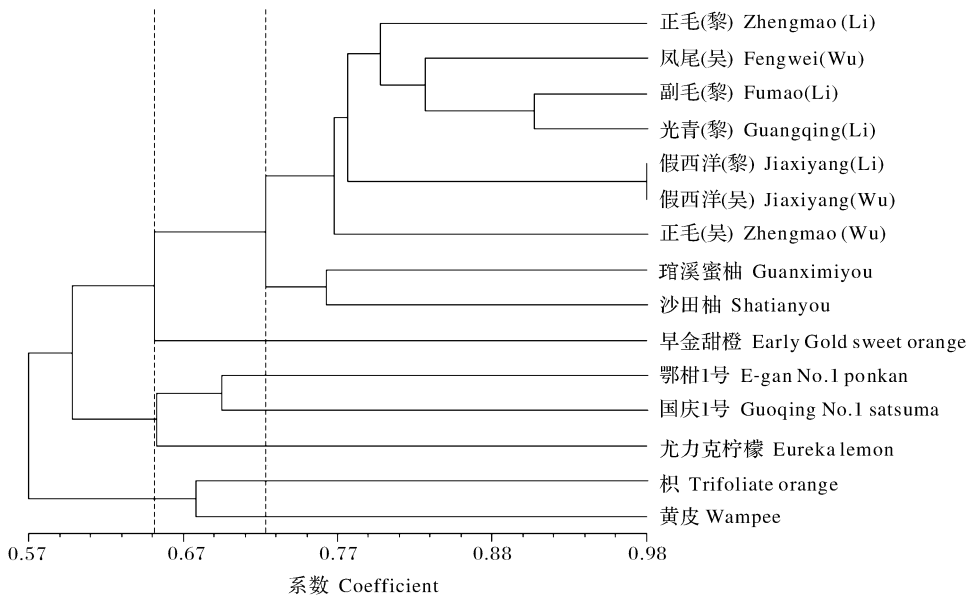


图 2 基于 SSR 分析构建的聚类树形图

Fig.2 Cluster tree diagram based on SSR analysis

毛(吴)是化州柚几个品系中与普通柚亲缘关系最近的,反而与正毛(黎)的距离较远,说明产区的正毛有同名异物的现象。

2.3 不同柚种质幼果中的柚皮苷含量差异分析

2011 年及 2012 年不同产地不同柚种质果径为 2 cm 时的柚皮苷含量检测如表 3 所示。2011 年,化州柚类柚皮苷含量普遍高于本地柚——光青(黎),最高的为副毛(黎)和假西洋(黎),均为光青(黎)的 1.6 倍。2012 年,化州地区柚(含光青)柚皮苷含量均显著高于外地产普通柚,也以副毛(黎)和假西洋(黎)最高,最低的为沙田柚,相差近 3.5 倍。且除正毛(黎)外,相同种质的柚皮苷含量均随年份不同而有显著差异性。

柚皮苷含量大都差异显著,一方面可能因化州柚种质存在一些种质混杂和同名异物现象,另一方面可能由土壤等环境差异所导致。

2.4 化州柚生长发育期柚皮苷含量的检测

在相同的生长环境下,选取 2 个常用种质正毛(吴)和假西洋(吴)研究化州柚果实生长发育期柚皮苷含量变化。

1)不同果龄和组织柚皮苷含量分析。2011 年对正毛(吴)和假西洋(吴)的果实进行了详细分层,其不同果径各组织所含柚皮苷检测结果见表 4。正毛(吴)种质中,柚皮苷在 4 cm 和 6 cm 小果的果肉层中含量最高;在 8 cm 和 10 cm 果实中,则以囊衣占优,其次为白皮层、汁胞,以黄皮层含量最低;各组织中柚皮苷的含量随果径增大显著降低。

此外,由表 3 可见,采集于不同果园的同一种质

表 3 不同柚 2 cm 幼果中的柚皮苷含量差异分析  
Table 3 Analysis of naringin content in 2 cm young fruit of different pomelos mg/g

产地 Place of origin	种质 Germplasm	年份 Year	
		2011	2012
广东化州 Huazhou, Guangdong	正毛(吴) Zhengmao(Wu)	349.66±4.03c	309.80±4.14c*
	正毛(黎) Zhengmao(Li)	321.40±29.38c	337.87±23.28b
	正毛(山) Zhengmao(Shan)		218.26±8.08f
	副毛(黎) Fumao(Li)	486.59±52.56a	364.35±6.71a*
	副毛(山) Fumao(Shan)		252.78±18.83e
	假西洋(吴) Jiaxyiyang(Wu)	417.17±19.42b	273.12±4.98 d*
	假西洋(黎) Jiaxyiyang(Li)	487.58±50.56a	365.86±1.79a*
	光青(黎) Guangqing(Li)	299.45±8.37c	
福建平和 Pinghe, Fujian	光青(山) Guangqing(Shan)		349.25±10.09ab
	红肉蜜柚 Guanximiyou red mutant		156.81±8.37g
	琯溪蜜柚 Guanximiyou		144.59±14.03g
	沙田柚 Shatianyou		105.33±5.31h

注 Note: 同列数据后不同小写字母表示同一年份柚皮苷在不同种质果实中的含量差异显著( $P<0.05$ )。同行数据后\*表示同一种质在 2012 年与 2011 年间柚皮苷含量差异显著( $P<0.05$ )。Different letters in the same column indicate in same year the content of naringin in different germplasms is significant difference( $P<0.05$ ). \* in the same row indicate the content of naringin in same germplasm is significant difference between 2012 and 2011( $P<0.05$ ).

表 4 不同果径化州柚果实各组织柚皮苷含量差异分析  
Table 4 Difference analysis of naringin content in different tissues of different 'Tomentosa' fruit diameter mg/g

种质 Germplasm	果实组织 Fruit tissue	果径大小/cm Fruit diameter			
		4	6	8	10
正毛(吴) Zhengmao(Wu)	黄皮 Flavedo	142.98±7.23cA	56.45±3.07cB	9.73±0.14dC	2.79±0.32dC
	白皮 Albedo	185.63±17.53bA	97.20±3.70bB	42.57±1.65bC	35.75±1.07bC
	果肉 Pulp	422.52±25.28aA	290.55±10.29aB		
	囊衣 Segment membrane			84.34±5.53aA	39.56±1.89aB
	汁胞 Juice sacs			27.37±0.56cA	5.33±0.14cB
假西洋(吴) Jiaxyiyang(Wu)	黄皮 Flavedo	30.19±2.48cA	22.87±0.94cB	13.87±0.37cC	0.42±0.05bD
	白皮 Albedo	88.85±3.49bA	47.05±3.85bB	27.34±1.41bD	33.47±1.05aC
	果肉 Pulp	316.59±11.70aA	195.06±5.81aB		
	囊衣 Segment membrane			81.17±2.42aA	34.97±2.99aB
	汁胞 Juice sacs			13.52±1.44cA	3.22±0.25bB

注 Note: 对于 4 cm 和 6 cm 的幼果,“果肉层”表示未对囊衣和汁胞进行分离检测。同列数据后不同小写字母表示相同果实发育时期(果实大小)、柚皮苷在不同果实组织中的含量差异显著( $P<0.05$ );同行数据后不同大写字母表示相同果实组织、柚皮苷在不同发育时期(果实大小)的含量差异显著( $P<0.05$ )。For 4 cm and 6 cm, the “pulp layer” indicates that the segment membrane and juice sacs were not separated and detected. Different lowercase letters in the same column indicate in same fruit diameter size the content of naringin in different fruit tissue is significant difference ( $P<0.05$ ). Different capital letters in the same row indicate in same fruit tissue the content of naringin in different fruit diameter size is significant difference ( $P<0.05$ ).

假西洋(吴)不同果实生长发育时期中柚皮苷的含量均低于同时期的正毛(吴)果实,且其柚皮苷在不同组织和不同时期的变化趋势同在正毛(吴)中非常相似。

2)不同果龄商业化处理果实不同部位柚皮苷含量分析。参照产业中对果实的处理,2012 年仅将正毛(吴)和假西洋(吴)不同果径大小的果实分成了果皮层(含黄皮层和白皮层)和果肉层(含囊衣和汁胞)。如图 3 所示,正毛(吴)果肉中柚皮苷含量较果皮中高,随着果径增大,果皮中柚皮苷的含量一直呈

降低的趋势;果肉中柚皮苷的含量以果径 7 cm 时为拐点,先缓慢升高后急剧降低。假西洋(吴)的变化趋势与正毛(吴)大体一致,果皮、果肉中柚皮苷的含量均随着果实增大呈下降趋势。

综合来看,2012 年柚皮苷在正毛(吴)和假西洋(吴)中于 4~6 cm 时含量较高,此时汁胞的发育尚不完全,果实含水量也远低于后期,但果实大小也有一定的规模。结合 2011 年和 2012 年 2 a 检测数据,正毛(吴)和假西洋(吴)的适宜采收期是 4~8 cm,最适采果期为 6 cm 左右。



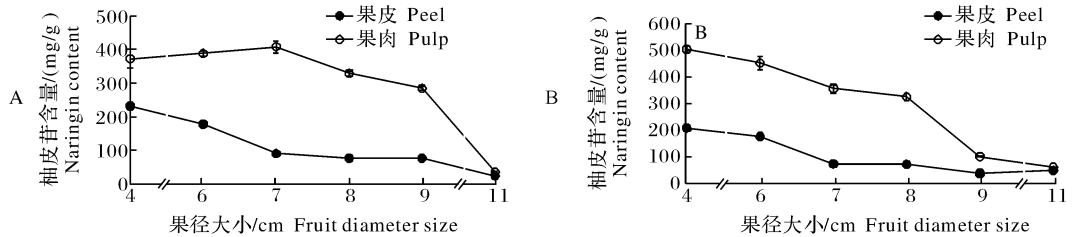


图3 正毛(吴)(A)和假西洋(吴)(B)不同果径柚皮苷含量

Fig.3 Naringin content in different fruit diameter of Zhengmao (Wu) (A) and Jiaxiyang (Wu) (B)

### 3 讨论

林励等<sup>[15]</sup>通过对不同产地和不同品系的化州柚与柚的 RAPD 分析,表明产地改变或有性繁殖都可能会诱导化州柚遗传特征发生变异;赵俊生等<sup>[16]</sup>利用 SNP 分析标记对 21 份化州柚及 3 份近缘种质进行了基因分型,显示化州柚种质资源存在着同名异物和同物异名的现象。本研究采用 SSR 分子标记对化州柚不同品系间的遗传多样性进行了分析,假西洋(吴)和假西洋(黎)表现出 100% 的一致性,而不同果园的正毛(吴)与正毛(黎)表现出较大的差异性。且对化州柚 2 cm 幼果中柚皮苷进行检测发现,采集于不同果园的同名化州柚柚皮苷含量差异显著。说明在长期的栽培和繁殖过程中,化州柚存在一定的种质混杂现象,亟需加强对化州柚种质资源的收集、鉴定和评价工作。

作为化州市特有树种,化州柚已有 1 500 多年的种植历史。本研究发现,化州柚及化州本地柚——光青 2 cm 幼果中柚皮苷含量均显著高于其他产地的柚。研究表明,柚皮苷的含量受气候和土壤影响很大,与土壤中锰含量极为相关,与土壤中有有效铜和有效硫也呈正相关关系,此外,与土壤中多种无机元素如铝、钾、钙等也显著相关<sup>[17]</sup>。广东省化州市的土壤以赤壤土为主,其中含有大量的中药礞石<sup>[18]</sup>,可能是导致化州柚与非化州产区普通柚中柚皮苷含量差异的原因之一。此外,本研究所显示的年份间的差异,也属于环境的差异。因此,化州柚中柚皮苷的大量积累是基因型差异和环境差异共同作用的结果。在未来阐明其分子机制时,一方面应考虑化州柚特异基因的挖掘和功能验证,另一方面可针对土壤特殊元素分析其对类黄酮代谢相关基因的调控效应。

果龄对化州柚类黄酮含量、产量及药材质量均有很大的影响。韩寒冰等<sup>[19]</sup>采用 HPLC 分离和测

定化州柚果实生长发育过程中柚皮苷、野漆树苷、柚皮素和芹菜素的含量并建立指纹图谱,结果显示:15~60 d 不同果龄的果实中类黄酮含量水平(DW)随着果龄增大而降低,而每果中类黄酮总量则随着果龄的增加、果实生物产量的增大而大幅提高。本研究检测了正毛(吴)和假西洋(吴)不同果径、不同组织中柚皮苷含量,发现各组织中柚皮苷的含量均有随果径增大而降低的趋势。林励等<sup>[20]</sup>认为果龄 41 d、质量 110 g 左右采果作为毛橘红原药材,质量较优;但从经济价值和有效成分含量两方面综合考虑,当地药农在果龄 55 d、质量 185 g 左右采果也是可取的,2 种时期分别对应本研究果径 6.5 cm 及 8~8.5 cm 时期,与本研究推荐采收的 6 cm 最适果径及 4~8 cm 适宜果径相似。但是,2 cm 和 4 cm 幼果中柚皮苷含量也相当可观,且柚等柑橘类树体有不同程度的生理落果现象,生产上可考虑结合疏果和分批采果等技术,最大限度提高果园产值。

### 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 74-75.
- [2] 李润唐, 李映志, 汪永保, 等. 中药“化橘红”原料植物化州柚种质资源初步研究[J]. 中国南方果树, 2012, 41(4): 53-55.
- [3] 王艳慧. 化橘红的研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2017, 19(6): 1076-1082.
- [4] LI P L, LIU M H, HU J H, et al. Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014, 90: 167-179.
- [5] 张秋玲, 伍柏坚, 黄晓丹, 等. 化州柚入药部位的探讨[J]. 中国现代中药, 2016, 18(5): 583-587.
- [6] 陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 等. 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展[J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 384-400.
- [7] 袁旭江, 林励, 陈志霞, 等. 果龄对化橘红化学成分含量的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(3): 188-190.
- [8] DUAN L, GUO L, DOU L L, et al. Comparison of chemical

- profiling and antioxidant activities of fruits, leaves, branches, and flowers of *Citrus grandis* 'Tomentosa' [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62:11122-11129.
- [9] CHENG Y J, GUO W W, YI H L, et al. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species [J]. Plant molecular biology reporter, 2003, 21:177a-177g.
- [10] KIJAS J M H, THOMAS M R, FOWLER J C S, et al. Integration of trinucleotide microsatellite into a linkage map of *Citrus* [J]. Theoretical and applied genetics, 1997, 94:701-708.
- [11] BARKLEY N A, ROOSE M L, KRUEGER R R, et al. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) [J]. Theoretical and applied genetics, 2006, 112(8): 1519-1531.
- [12] PANG X M, HU C G, DENG X X. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers [J]. Acta genetica sinica, 2003, 30(1):81-87.
- [13] 陈鹏. 中国野生山金柑种质资源调查及遗传多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- [14] 马丽丽, 解凯东, 叶俊丽, 等. 基于 SSR 标记的早花柠檬亲缘关系分析[J]. 果树学报, 2013, 30(3):381-385.
- [15] 林励, 欧剑锋, 肖凤霞, 等. 化橘红种质资源的随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(4):350-354.
- [16] 赵俊生, 杨晓燕, 曾祥有, 等. 利用 SNP 分子标记分析化橘红种质资源[J]. 分子植物育种, 2016, 14(5):1203-1211.
- [17] 林励, 欧剑锋, 廖观荣, 等. 化橘红道地性的初步研究[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(2):163-170.
- [18] 黄锦勇. 化州橘红栽培技术措施探讨[J]. 南方农业, 2017, 11(15):3-4.
- [19] 韩寒冰, 李海航, 曾祥有, 等. 化橘红果实生长发育过程中类黄酮的动态变化[J]. 植物学报, 2014, 49(4):424-431.
- [20] 林励, 黄兰珍, 欧剑锋, 等. 化橘红原植物化州柚生长过程中黄酮类成分的变化规律研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(3):256-261.

## SSR analyses of germplasm resources and changes of naringin content at different developmental stages of *Citrus grandis* 'Tomentosa' fruit

TIAN Jing<sup>1</sup> PANG Yibo<sup>2</sup> CHEN Jiajing<sup>1</sup> YUAN Ziyu<sup>1</sup> ZENG Jiwu<sup>3</sup> XU Juan<sup>1</sup>

1.College of Horticulture & Forestry Sciences/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology

(Ministry of Education), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Zhejiang Province, Linhai 317000, China;

3.Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences,

Guangzhou 510640, China

**Abstract** Simple sequence repeat (SSR) markers were used to study the genetic relationship among different strains of *Citrus grandis* 'Tomentosa' and other representative germplasms of *Citrus*. 175 alleles were amplified with 25 pairs of SSR primers and 15 samples. The results of cluster analyses showed that 'Tomentosa' and pomelos were closely related. Some 'Tomentosa' materials with homonym are found to be genetically different. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of naringin in young fruit of different germplasm and fruit tissue of 'Tomentosa' with varied diameters. The results showed that the content of naringin in the young fruit of 'Tomentosa' was significantly higher than that of Huazhou local pomelo 'Guangqing' and common pomelo from other areas, affected by the growing season and environmental factors. With the increase of fruit diameter, the content of naringin in pericarp and pulp of 'Zhaomao(Wu)' and 'Jiaxiyang(Wu)' decreased, and the content of naringin in pulp was higher than that in pericarp. The results of comprehensively analyzing fruit size and active ingredient content showed that the fruit diameter of 4-8 cm was the suitable harvesting period of 'Tomentosa', and the fruit with diameter of 6 cm was optimal for harvesting.

**Keywords** *Citrus grandis* Osbeck var. *Tomentosa* Hort.; *Exocarpium Citri Grandis*; simple sequence repeat (SSR); naringin; germplasm identification; optimal period for harvesting; high performance liquid chromatography (HPLC)

(责任编辑:张志钰)