

湖南柚种质资源的遗传多样性和亲缘关系

李先信^{1,2}, 杨迎花³, 陈婕平⁴, 邹学校⁵, 邓子牛^{4*}

(1.中南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2.湖南省农业经济和农业区划研究所, 湖南 长沙 410125; 3.株洲市农业局, 湖南 株洲 412007; 4.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 5.湖南省农业科学研究院, 湖南 长沙 410125)

摘要:采用形态学标记与序列相关扩增多态性(SRAP)分子标记技术,对分布于湖南特定生态条件下的 47 份地方柚类种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行分析。结果表明:①根据花与果实性状等形态学标记进行聚类分析,在欧式遗传距离 10 处可将柚类资源分为 6 个组群;②基于柚资源的 SRAP 分子标记进行分析,47 份地方柚资源间的遗传相似系数为 0.65~0.93,在相似系数 0.798 处可分为 7 个组群;③SRAP 标记扩增结果表明,17 对引物共扩增出 319 条带,其中 275 条带具有多态性,平均每对引物扩增出多态性带 16.2 条,多态性比率 86.52%,基因多样性 0.724 3,表明湖南柚类品种间具有丰富的遗传多样性;④将形态学标记聚类结果与 SRAP 分子标记聚类结果进行比较,发现二者都能很好地将柚类品种进行分类,SRAP 标记不受环境因素影响,所揭示的柚类种质间的遗传差异更准确。综合以上结果,利用 SRAP 标记产生的特异性遗传标记可以区别大部分湖南地方柚类种质资源。

关键词:柚;种质资源;遗传多样性;亲缘关系;湖南

中图分类号:S666.3

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)04-0363-08

Genetic diversity and relationship of pummelo germplasms in Hunan province based on morphological traits and SRAP molecular markers

LI Xian-xin^{1,2}, YANG Ying-hua³, CHEN Jie-ping⁴, ZHOU Xue-xiao⁵, DEN Zi-niu^{4*}

(1.Longping Branch of Central South University, Changsha 410125, China; 2.Hunan Institute of Agriculture Economy and Regional Planning, Changsha 410125, China; 3.Zhuzhou Agriculture Bureau, Zhuzhou, Hunan 412007, China; 4.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 5.Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Germplasm resources is important material basis for plant genetic improvement, study on the genetic relationship and genetic diversity of pummelo germplasms are important for pummelo genetic improvement and new variety selection. In this paper, the genetic relationship and genetic diversity were studied based on morphological traits and the sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers. The main results were as follows: ① The results of cluster analysis based on morphological traits using SPSS 17.0 software showed that the pummelo germplasms tested in the experiment could be divided into 6 groups when the index of genetic similarity was 10. ② The UPGMA result showed that the genetic similarity index among the 47 pummelo germplasms varied from 0.65 to 0.93, which could be divided into 7 groups when the genetic similarity index was 0.798. ③ 319 SRAP bands were acquired by PCR and 275 out of them were polymorphic, it was approximately 16.2 polymorphic bands per SRAP primers. The diversity ratio and the gene diversity value was 86.52% and 0.724 3 respectively. ④ Compared the results of cluster analysis based on morphological traits and SRAP remarker, one could find that the 47 pummelo germplasm could be easily classified into different groups either by morphological traits or by SRAP remarker, and most of the pummelo germplasms could be

收稿日期:2013-06-12

基金项目:国家“863”计划项目(2011AA100205);中南大学博士创新基金项目(2340-77226)

作者简介:李先信(1962—),男,湖南浏阳人,博士研究生,研究员,主要从事柑橘资源与育种研究, nkyllx118@163.com; *通信作者, deng7009@163.com

separated from each other by the acquired special polymorphic bands of SRAP.

Key words: pummelo; germplasm resources; genetic diversity; relationship; Hunan

柚 (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) 属芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus*) 植物, 是柑橘家族中的后起之秀, 其果形硕大, 果肉晶莹脆嫩, 甘甜清香, 风味独特, 素有天然罐头之美称。中国是柚的起源中心之一, 已有 3 000 多年的柚栽培历史。柚种质资源丰富^[1], 现有的柚类品种和品系达 200 多个^[2]。湖南是中国宽皮柑橘的起源中心, 也是柚类种质多样化分布中心之一^[1]。湖南境内的生态环境复杂多变, 长期的自然杂交演化和数千年的人工栽培与筛选, 在湖南境内形成了众多的柚地方品种资源^[3]。这些资源是改良柚类品种、创新柚类种质的重要物质基础。由于缺乏系统研究, 人们对湖南柚类种质资源的多样性分布状况及品种间亲缘关系尚缺乏了解。

序列相关扩增多态性(sequence-related amplified

polymorphism, SRAP) 具有简便、稳定、在基因组中分布均匀、中等产率和容易得到选择条带序列等特点^[4]。本课题组采用形态学标记与 SRAP 标记技术, 对 47 份湖南地方柚类种质资源进行亲缘关系与遗传多样性分析, 旨在为湖南柚类种质资源的收集、保存、分类鉴定与合理开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

47 份供试柚类种质资源均来源于湖南省境内, 主要采集于湖南西部武陵山脉和雪峰山脉所辖县域, 包括张家界市的慈利县、桑植县和怀化市安江镇及永州市江永县等(表 1)。

表 1 供试柚种质资源

Table 1 Materials of pummelo germplasms

编号	种质	来源地	编号	种质	来源地
1	安农 1 号(Annong No.1)	安江	25	慈利甜柚 3 号(Cilitianyou No.3)	慈利
2	安江冰糖柚(Anjiangbingtangyou)	安江	26	慈利文旦柚(Ciliwendanyou)	慈利
3	安江红心柚(Anjianghongxinyou)	安江	27	慈利香柚(Cilixiangyou)	慈利
4	假石榴柚(Jiashiliuyou)	安江	28	砧板柚(Zhenbanyou)	慈利
5	金兰柚(Jinlanyou)	安江	29	饭团柑(Fantuangan)	慈利
6	糯米柚(Nuomiyou)	安江	30	张家界晚白柚(Zhangjiajiewanbaiyou)	张家界
7	三萼半柚(Sandoubanyou)	安江	31	天门柚(Tianmenyou)	张家界
8	安江沙田柚(Anjiangshatianyou)	安江	32	牛腿柚(Niutuiyou)	张家界
9	石榴柚(Shiliuyou)	安江	33	空心塔柚(Kongxintayou)	张家界
10	安江酸柚(Anjiangsuanyou)	安江	34	菊花心柚(Juhuaxinyou)	张家界
11	安江香柚(Anjiangxiangyou)	安江	35	大果红瓢柚(Daguohongrangyou)	张家界
12	安江无核香柚(Anjiangwuhexiangyou)	安江	36	永定红心柚(Yongdinghongxinyou)	张家界
13	安江无核红心柚(Anjiangwuhongxinyou)	安江	37	白玉霜柚(Baiyushuangyou)	张家界
14	安江早香柚 1 号(Anjiangzaoxiangyou No.1)	安江	38	白米柑(Baimigan)	桑植
15	安江早香柚 2 号(Anjiangzaoxiangyou No.2)	安江	39	红米柑(Hongmigan)	桑植
16	安江早香柚 3 号(Anjiangzaoxiangyou No.3)	安江	40	耙耙柑(Babagan)	桑植
17	安江早香柚 4 号(Anjiangzaoxiangyou No.4)	安江	41	桑植酸抛子(Sangzhisuanpaozi)	桑植
18	中秋蜜柚(Zhongqiumiyou)	安江	42	桑植抛子(Sangzhipaozi)	桑植
19	慈利矮晚柚(Ciliiwanyou)	慈利	43	桑植酸柚(Sangzhisuanyou)	桑植
20	菠萝香柚(Boluoxiangyou)	慈利	44	桑植杂柚(Sangzhizayou)	桑植
21	慈利水柚子(Cilishuiyouzi)	慈利	45	江永香柚(Jiangyongxiangyou)	江永
22	慈利金香柚(Cilijinxiangyou)	慈利	46	江永酸柚(Jiangyongsuanyou)	江永
23	慈利甜柚 1 号(Cilitianyou No.1)	慈利	47	胡柚(Huyou)	江永
24	慈利甜柚 2 号(Cilitianyou No.2)	慈利			

1.2 方法

1.2.1 形态性状的观测

在开花期和果实成熟期分别对各品种的花器官和果实形态性状进行观测和记载，并参照文献[5]、[6]对形态性状进行特征分类和评分。

1.2.2 DNA提取与检测

参照程运江等^[7]、Dellaporta等^[8]改进的CTAB法提取幼叶总DNA。纯化后的DNA用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，并用核酸蛋白仪检测DNA浓度和质量。将DNA质量浓度稀释至50 ng/ μ L，-20℃保存，备用。

1.2.3 PCR扩增

按照文献[4]中的原则设计SRAP引物，共设计、

合成10对正向引物和11对反向引物(表2)。引物组合共110对。PCR扩增采用25 μ L反应体系，包括1 μ L 50 ng/ μ L总DNA，3 μ L 10 \times Buffer，2.0 μ L 20 mmol/L MgCl₂，0.3 μ L 10 mmol/L dNTP，0.5 μ L 2 U/ μ L *Taq* DNA聚合酶，0.2 μ L 2.5 μ mol/L双向引物。PCR扩增程序：94℃预变性5 min；94℃变性1 min，55℃复性1 min，72℃延伸2 min，5个循环；94℃变性1 min，55℃复性1 min，72℃延伸2 min，55个循环；最后72℃延伸10 min，4℃保存。反应在Biometra Tgradient上进行。

SRAP产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离，保持电压110 V。电泳结束后，在凝胶成像系统下观测、照相，检测PCR效果。

表2 本研究中所采用的引物序列及组合

Table 2 Sequences of the primers and their combinations for SRAP used in this study

上游引物	序列(方向 5'-3')	引物长度/bp	下游引物	序列(方向 5'-3')	引物长度/bp
Me1	TGA GTC CAA ACC GG ACC	17	Em1	GAC TGC GTA CGA ATT TGC	18
Me2	TGA GTC CAA ACC GG TAA	17	Em2	GAC TGC GTA CGA ATT CAA	18
Me3	TGA GTC CAA ACC GG TCA	17	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT CGA	18
Me4	TGA GTC CAA ACC GG ACG	17	Em4	GAC TGC GTA CGA ATT GCA	18
Me5	TGA GTC CAA ACC GG AGC	17	Em5	GAC TGC GTA CGA ATT CAG	18
Me6	TGA GTC CAA ACC GG AAG	17	Em6	GAC TGC GTA CGA ATT CCA	18
Me7	TGA GTC CAA ACC GG TGC	17	Em7	GAC TGC GTA CGA ATT CTA	18
Me8	TGA GTC CAA ACC GG AAT	17	Em8	GAC TGC GTA CGA ATT AAC	18
Me9	TGA GTC CAA ACC GG AGG	17	Em9	GAC TGC GTA CGA ATT TAC	18
Me10	TGA GTC CAA ACC GG TGT	17	Em10	GAC TGC GTA CGA ATT GAG	18
			Em11	GAC TGC GTA CGA ATT GCC	18

1.3 数据分析

对于形态学性状数据，首先通过标准化去量纲，然后用SPSS17.0软件计算欧式遗传距离，采用类平均距离法对47份柚资源进行聚类，绘制聚类树状图。

对于同一引物的扩增产物，分别以1和0记录扩增谱带的“有”“无”，将迁移率相同的条带记为一个位点。按此方法对所有SRAP引物的电泳谱带进行统计，并将原始数据输入计算机，获得了(0, 1)矩阵，计算各位点在总样本中的基因多样性(GD)。用NTSYS-PC Version2.10e软件的Qualitative data程序计算相似性系数，获得相似系数矩阵；用SAHN

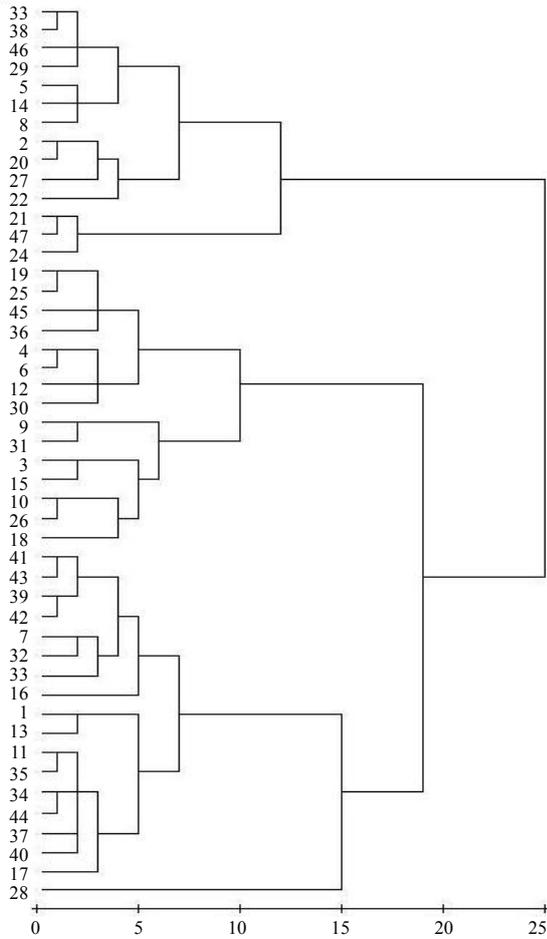
程序和UPGMA方法进行聚类分析，并通过Tree plot模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 基于形态学标记的聚类分析结果

利用37个花器官和果实性状指标对47个柚类品种资源进行聚类分析(图1)，在欧式距离10处可分为6个组群。

第1组群包含11个材料，分别是慈利甜柚1号、白米柑、江永酸柚、饭团柑、金兰柚、安江早香柚1号、安江沙田柚、安江冰糖柚、菠萝香柚、慈利香柚和慈利金香柚。以欧式距离7.1为临界值，第1



图左侧数据对应表1中的品种编号。

图1 基于形态标记的47份柚种质聚类图

Fig.1 Dendrogram of cluster analysis for 47 pummelo genotypes based on morphological traits

组可划分为2个亚组，第1亚组包括前7个品种，为白肉甜柚类型；第2亚组为除冰糖柚外的由菠萝香柚、慈利香柚和慈利金香柚组成的杂种类型。

第2组群为杂种类型，包括慈利水柚子、胡柚和慈利甜柚2号。第1组群和第2组群在欧式距离12

处聚合为1个大组。

第3组群为慈利矮晚柚、甜柚3号、江永香柚、永定红心柚、假石榴柚、糯米柚、安江无核香柚和晚白柚。

第4组群为石榴柚、天门柚、安江红心柚、安江早香柚2号、安江酸柚、慈利文旦柚和中秋蜜柚。

第5组群最大，包含17个品种类型，以欧式距离7.1为临界值。本组群可分为2个亚组，第1亚组为桑植酸抛子、桑植酸柚、红米柑、桑植抛子、三萼半柚、牛腿柚、空心塔柚和安江早香柚3号；第2亚组为安农1号、安江无核红心柚、安江酸柚、大果红瓢柚、菊花芯柚、桑植杂柚、白玉霜柚、粑粑柑和安江早香柚4号。

第6组群为砧板柚。

2.2 基于 SRAP 标记的分析结果

2.2.1 SRAP 多态性引物的筛选

利用6个遗传差异较大的材料(分别来自安江酸柚、安江香柚、琯溪蜜柚、慈利水柚子、金香柚、大红甜橙基因组)对10条正向引物和11条反向引物组成的110对SRAP引物组合进行多态性筛选，共筛选出35对带型清晰、多态性较好的引物(扩增片段大部分集中在100~2 000 bp)。选取其中表现较佳、稳定性好的17对引物组合(表3)用于后续柚资源的遗传多样性分子标记分析，其中，正向引物为Me1、Me5、Me6、Me7、Me8、Me9、Me10；反向引物为Em2、Em5、Em9、Em10、Em11。

表3 SRAP 引物及等位基因数、片段大小与多态性信息量

Table 3 SRAP primers, allelic loci, size range and value of gene diversity(GD)

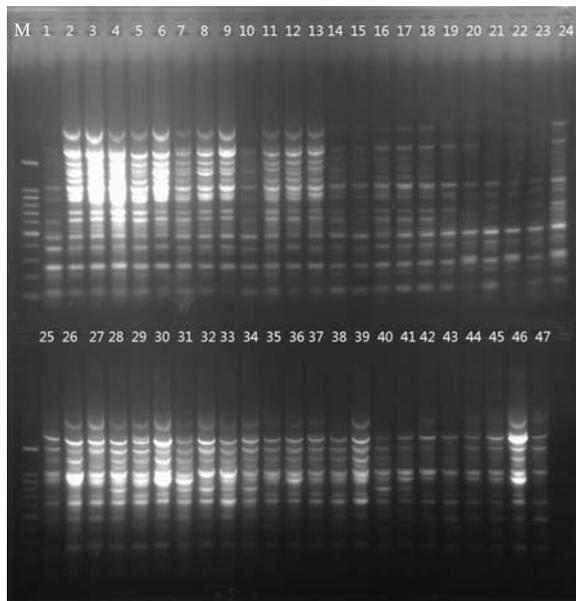
编号	SRAP 引物	等位基因数/个	多态性带数/条	多态性比例/%	片段大小/ bp	基因多样性
1	Me1-Em2	19	14	73.7	80~1 500	0.815 1
2	Me5-Em2	12	18	90.0	80~1 580	0.793 7
3	Me5-Em5	20	16	80.0	80~2 000	0.760 7
4	Me5-Em9	15	13	86.7	90~1 800	0.746 4
5	Me6-Em2	12	10	83.3	250~1 700	0.617 1
6	Me6-Em5	26	24	92.3	90~2 050	0.711 0
7	Me6-Em7	21	20	95.2	220~1 800	0.614 2
8	Me6-Em9	21	17	81.0	120~2 600	0.687 2

续表

编号	SRAP引物	等位基因数/个	多态性带数/条	多态性比例/%	片段大小/bp	基因多样性
9	Me7-Em5	22	18	81.8	100~2 150	0.794 2
10	Me7-Em9	21	16	79.2	110~2 050	0.600 3
11	Me7-Em11	17	15	88.2	90~2 000	0.692 6
12	Me8-Em1	23	20	87.0	70~2 000	0.752 3
13	Me8-Em2	14	13	92.9	140~1 800	0.725 1
14	Me8-Em7	13	12	92.3	210~2 000	0.671 9
15	Me9-Em2	15	12	80.0	350~1 850	0.725 1
16	Me10-Em1	18	17	94.4	80~2 000	0.792 3
17	Me10-Em9	22	20	90.9	100~2 000	0.817 2

2.2.2 47份柚类资源的SRAP扩增效率及多态性

以47份柚基因组DNA为模板进行多态性分析，共检测出319条带(片段大小为70~2 600 bp)，其中多态性条带275条，平均每对引物的多态性带为16.2条，多态性比率为86.52%(各引物组合多态性比例变幅为73.7%~95.2%)，在检测的所有位点上的基因多样性为0.600 3(Me7-Em9)~0.817 2(Me10-Em9)，平均为0.724 3(表3和图2)。



图中数据对应表1中品种编号；M 100 bp 梯度DNA。

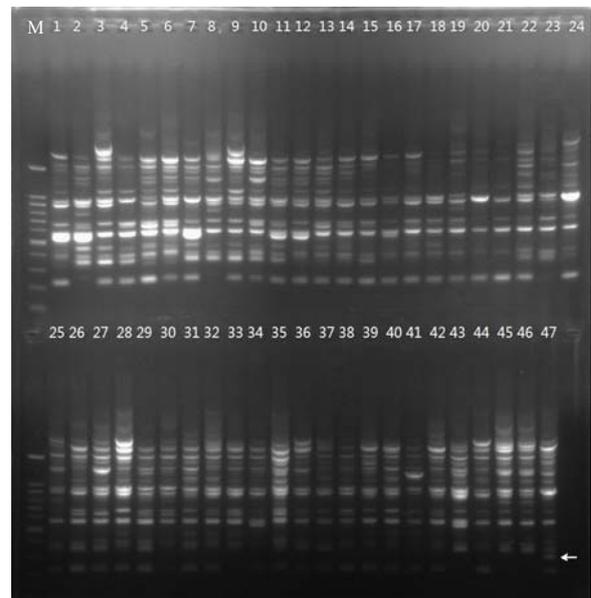
图2 SRAP引物Me7-Em9对47份柚类的扩增图谱

Fig.2 Electrophoretic patterns of 47 pummelo germplasms with SRAP primer Me7-Em9 (genotypes)

2.2.3 部分柚类品种的特征带

试验结果表明，47份基因型中有6份产生了16个特异性遗传标记，其中，安江三萼半柚在Me6-Em9的280 bp处、安江酸柚在Me10-Em1的500

bp处、桑植红米柑在Me8-Em1的600 bp处各出现了1条特征带；菠萝香柚在Me8-Em7的390 bp和Me8-Em1的1 100 bp处各出现1条特征带；安江冰糖柚在Me6-Em5的920 bp和在Me6-Em9的1 900、2 600 bp处各出现1条特征带；胡柚在Me5-Em2的250 bp、Me5-Em5的900 bp、Me6-Em5的800 bp、Me6-Em7的320 bp、Me7-Em11的580 bp、Me8-Em2的900 bp、Me8-Em7的700 bp和Me10-Em1的700 bp处各出现1条特征带(图3)。此外，在引物Me5-Em2的1 450 bp处仅慈利甜柚3号和慈利香柚出现了扩增带，而在引物Me1-Em2的950 bp处仅慈利甜柚3号和慈利文旦柚出现了扩增带，在1 000 bp处仅慈利文旦柚和慈利香柚出现扩增带；在Me7-Em5的960 bp



图中数据对应表1中的品种编号；M 100 bp 梯度DNA。

图3 SRAP引物Me6-Em7对47份柚类的扩增图谱

Fig.3 Electrophoretic patterns of 47 pummelo germplasms with SRAP primer Me7-Em9 (genotypes)

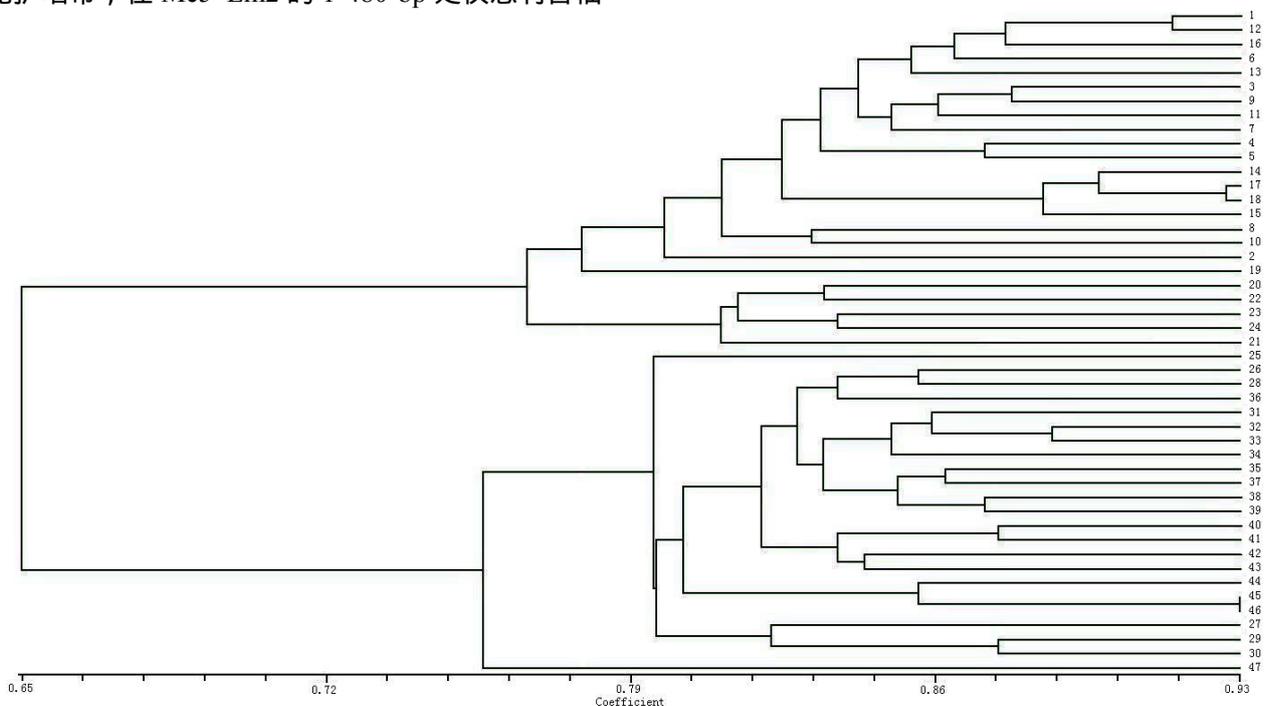
处仅桑植酸抛子和桑植酸柚出现了扩增带，而在 Me6-Em7 的 550 bp 处仅菊花芯柚和桑植酸柚出现了扩增带；在 Me6-Em9 的 1 300 bp 处仅张家界晚白柚和天门柚出现了扩增带。

在 47 份柚种质中，在引物 Me8-Em7 的 850 bp 处仅安江早香柚 2 号无扩增带；在 Me7-Em9 的 1 700 bp 处仅慈利水柚子无扩增带；在 Me6-Em7 的 1 560 bp 处仅安江早香柚 3 号无扩增带；在 Me6-Em5 的 1 950 bp 处仅慈利矮晚柚无扩增带；在 Me6-Em7 的 880 bp 处仅假石榴柚和三萼半柚无扩增带；在 Me6-Em7 的 1 700 bp 处仅慈利水柚子和慈利甜柚 1 号无扩增带，在 Me6-Em7 的 950 bp 处仅菠萝香柚和慈利水柚子无扩增带，而在 Me7-Em9 的 700 bp 处仅菠萝香柚和慈利金香柚无扩增带、在 Me7-Em11 的 1 550 bp 处仅菠萝香柚和慈利甜柚 2 号无扩增带；在 Me5-Em2 的 1 150 bp 处仅桑植酸柚和桑植杂柚无扩增带，而在 Me6-Em9 的 750 bp 处仅桑植酸抛子和桑植杂柚无扩增带；在 Me6-Em5 的 390 bp 处仅石榴柚和张家界晚白柚无扩增带；在 Me6-Em5 的 610 bp 处仅天门柚和白米柑无扩增带，而在 700 bp 处仅天门柚和慈利金香柚无扩增带；在 Me5-Em2 的 1 480 bp 处仅慈利香柚

和牛腿柚无扩增带。

2.2.4 柚类种质的 UPGMA 聚类分析结果

对 319 个 SRAP 标记采用非加权平均法 (UPGMA) 进行聚类分析，以 47 份柚类种质的 319 个位点的谱带数据组成(0,1)原始矩阵，计算两两柚类种质间的相似系数。聚类分析结果(图 4)表明，以相似系数 0.798 为临界值，可将 47 个柚类资源分为 7 个组群：第 1 组群包括第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 号共 18 个品种资源，主要为沙田柚系列，且集中分布于武陵山脉与雪峰山脉交接处的怀化市安江一带；第 2 组群为第 19 号资源；第 3 组群包括第 20、21、22、23、24 号共 5 个品种资源，属自然种间杂交类型，主要分布于张家界的慈利县；第 4 组群为第 25 号资源；第 5 组群包括第 26、28、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46 号共 18 个品种资源，以沙田柚类型和实生变异类型为主，除第 45 和第 46 号外，其余品种均分布于武陵山脉张家界市境内；第 6 组群包括第 27、29、30 号共 3 个品种资源；第 7 组群为第 47 号资源。



图右侧数据对应表 1 中的品种编号。

图 4 基于 SRAP 标记的 47 份柚类种质的 UPGMA 聚类图

Fig.4 Dendrogram of cluster analysis for 47 pummelo genotypes based on SRAP markers

第1、2组群在相似系数0.778处聚在一起,在相似系数0.766处与第3组群聚在一起,成为一个大的类群;第5、6组群在相似系数0.796处聚在一起,又在相似系数0.795处与第4组群聚为一类;第7组群在相似系数0.750处与第4、5、6组群聚为一个大大类。

第5组群在相似系数0.802处分成2个亚组,第1亚组由慈利文旦柚、砧板柚、天门柚、牛腿柚、空心塔柚、菊花芯柚、大果红瓢柚、永定红心柚、白玉霜柚、白米柑、红米柑、粑粑柑、桑植酸抛子、桑植抛子、桑植酸柚等15个品种资源组成;第2亚组由桑植杂柚、江永香柚、江永酸柚3个品种组成,其中江永香柚和江永酸柚在相似系数0.930处聚在一起。

3 结论与讨论

a. 关于柚类种质的遗传多样性。遗传多样性与物种适应性密切相关,一般而言,物种的分布越广泛,其遗传多样性也越广泛^[9]。本研究中采用传统的形态学标记和SRAP标记技术,对长期生长在湖南特定生态环境下的47份地方柚类资源进行多样性研究。基于花和果实形态学质量性状和数量性状指标的聚类结果显示,各柚类品种的花、果形态性状指标间存在较大差异,47份柚类品种可聚为6大大类群,其中自然杂种类型很明显地聚在一起,砧板柚果形独特,单独聚为一类,其余柚类品种则交叉聚为不同的类群,体现出柚类不同品种和类型间遗传亲缘关系的远近,说明柚类花果形态的差异除了受自然生态条件的影响外,更多的可能是柚类种质在遗传多样性方面的表型^[10]体现。利用SRAP标记对47份柚类基因组DNA进行多态性扩增的结果表明,湖南地方柚类种质资源存在广泛的遗传多样性。17对SRAP引物共检测出319条带(片段大小为70~2600 bp),平均每对引物检测出18.76条带,其中多态性条带275条,平均每对引物的多态性带为16.2条,多态性比率为86.52%(各引物组合的多态性比率为73.7%~95.2%),在所检测的位点上,基因多样性高达0.7243(各引物组合的基因多样性约为0.6003~0.8172)。用SRAP标记检测到的柚类种质及近缘种的多态性比率高于用RAPD^[11]、AFLP^[12]等标记检测

到的,而与ISSR^[10]标记检测的结果相当,说明利用SRAP标记检测柚类种质的遗传多样性比用其他标记更有优势。

b. 关于不同柚品种和类型间的遗传相互关系。关于柚类的划分,陈振光等^[13]曾按果肉色泽把柚分为果肉红瓢和果肉白瓢两大类,并按果形将柚类进一步划分为卵圆形、圆形和扁圆形三类,共分成6个组型。何天富^[2]根据柚的形态学特征将柚类划分为沙田柚、文旦柚和杂种柚3个品种群。从本研究的花果形态聚类图来看,菠萝香柚、慈利金香柚、慈利水柚子、胡柚和慈利甜柚2号等杂种柚明显地聚在一起;红瓢柚类群除安江红心柚、永定红心柚和天门柚外,安江无核红心柚、菊花芯柚、空心塔柚、大果红瓢柚、红米柑、牛腿柚、桑植酸抛子等红瓢柚相对集中,聚为一类,说明这些品种间具有较高的遗传同源性。相对于杂种柚品种,文旦柚品种群和沙田柚品种群相对分散。由SRAP标记的聚类结果来看,杂种柚类胡柚单独成为一类,其余杂种柚聚为一类,这可能与其亲本来源不同有关。红瓢柚类除安江红心柚和安江无核红心柚外,其余红瓢柚品种相对集中,聚为一类,这从分子水平揭示了它们的遗传关系,其结果在一定程度上与形态学标记的相吻合。从本研究中的聚类结果看出,文旦柚系列品种和沙田柚系列品种未能得到明显的区分,而是以不同生态区域为中心交叉聚类,呈现出鲜明的地域差别,即分布于武陵山脉核心生态区的柚类品种集中聚类为第5和第6组群,而分布于武陵山脉向雪峰山脉过渡的生态区域的柚类资源聚类为一个组群,其原因可能是在长期的自然演化过程中,同一生态区域内不同柚品种和类型间的基因相互渗透,引起基因漂移,使在同一生态区域内的柚类种质具有更高的遗传同源性^[10,14]。

c. 关于酸柚的分类地位。酸柚种类广泛。本研究中用作柚类授粉品种的安江酸柚、江永酸柚、桑植酸柚和桑植酸抛子等品种未能聚在一起。相反,安江酸柚和江永酸柚分别与安江沙田柚和江永香柚紧紧聚在一起,这与刘勇等^[12]的研究结果一致,表明在传统形态学意义上的酸柚群体的遗传背景并不完全一致,尚缺乏作为柚类独立类群的遗传学证据。特别是江永酸柚与江永香柚在相似系数

0.930处聚在一起,说明两者的遗传亲缘关系很近,同源性很高。

d. 柚形态标记与分子标记的差异。本研究中基于花果形态学标记的聚类结果与基于SRAP分子标记的聚类结果不完全一致,这可能是由如下原因所致:植物形态性状的表现是基因型与生态环境互作的结果,传统的形态学分类主要是根据其表型来分类,基因型的表达常常会受到环境因素的影响,而DNA结构的差异不一定都能在形态上表现出来;

形态学标记和分子标记属于不同性质的位点,形态特征与分子标记内部的基因位点也不相同,基因位点的突变频率及基因表达功能的约束性^[10]不可能同步变化;植物DNA序列超乎想象的多样性也给取样、测序和数据处理带来了实际困难^[15];从已有的相关研究^[16-18]看,有的分子系统树支持形态系统树^[14],有的则与形态系统树差异很大^[17],而采用不同分子标记建立的系统树往往存在差异^[18]。因为植物形态学性状的表达受遗传基因和生态环境的双重影响,而分子标记不受环境及其他因素的影响,表现为中性,所以,笔者认为基于SRAP标记的分子系统树更能揭示柚类种质间的遗传相互关系,根据SRAP标记产生的特异性遗传标记可以区分大部分湖南地方柚类种质资源。

参考文献:

- [1] 叶荫民. 柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 种质多样化中心的探讨[J]. 中国南方树, 1997, 26(1): 3-5.
- [2] 何天富. 中国柚类栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 12.
- [3] 李先信, 杨迎花, 阳志慧, 等. 湖南柚类资源的初步调查研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(): 21-27.
- [4] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP) a newmarker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Apple Genet, 2001, 103(3): 455-461.
- [5] IPGRI. Descriptors for *Citrus*[M]. Rome: IPGRI Publication, 1999.
- [6] 江东, 龚桂芝. 柑橘种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [7] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 等. 几种木本果树DNA的有效提取[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481-483.
- [8] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini-preparation: Version . Extension of the linkage map in *Citrus* using randplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89(5): 604-614.
- [9] Hamrick J L, Godt M J W, Murawski D A, et al. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology[C]// Genetics and Conservation of Rare Plants. New York: Oxford University Press, 1991: 75-86.
- [10] 彭瑜, 苏智先, 张素兰, 等. 利用叶片形态学性状和 ISSR标记检测柚类的遗传多样性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(4): 104-110.
- [11] 张太平, 彭少麟, 王峥峰, 等. 柚类品种遗传相互关系的 RAPD 标记研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(4): 322-328.
- [12] 刘勇, 孙中海, 刘德春, 等. 柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2308-2315.
- [13] 陈振光, 赖钟雄. 中国柚的种质资源及其研究[J]. 福建农学院学报: 自然科学版, 1993, 22(3): 290-295.
- [14] Bruford M W. Microsatellites and their application to conservation genetics[C]// Smith T B, Wayne R K. Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford: Oxford University Press, 1996: 237.
- [15] 胡志昂. 对中国遗传多样性研究的几点意见[C]//生物多样性研究进展. 北京: 中国科学技术出版社, 1995.
- [16] 武耀庭, 张天真, 殷剑美, 等. 利用分子标记和形态学性状检测陆地棉栽培品种的遗传多样性[J]. 遗传学报, 2001, 28(11): 1040-1050.
- [17] 许先松, 刘志钦, 林晓丹, 等. 基于形态及 SRAP 标记的辣椒资源遗传多样性及亲缘关系比较[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(1): 48-53.
- [18] 钱韦, 葛松, 洪德元, 等. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒水稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库