

# 枳属种质遗传多样性及其与近缘属植物亲缘关系的 SSR 和 cpSSR 分析

龚桂芝, 洪棋斌\*, 彭祝春, 江 东, 向素琼

(中国农业科学院柑橘研究所, 西南大学柑橘研究所, 重庆 400712)

**摘 要:** 应用核基因组 SSR 和叶绿体基因组 SSR, 分析了枳属 28 份枳及枳杂种种质的遗传多样性及其与近缘属植物的亲缘关系。核基因组 SSR 分析表明普通枳的遗传差异明显, 22 个 SSR 位点的平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.51, 平均期望杂合度为 0.52, 表明中国枳种质资源具有较丰富的遗传多样性。在遗传距离约 0.16 时, 22 份普通枳可以分成 4 个类型。叶绿体基因组 SSR 分析则发现普通枳间基本无差异, 表明以母系遗传为特征的枳叶绿体基因组相对保守。富民枳与普通枳无论是在核基因组还是在叶绿体基因组上均存在较大差异, 支持富民枳种的地位。SSR 和 cpSSR 结合使用可比较准确地鉴定枳杂种。

**关键词:** 枳; SSR; cpSSR; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S 666 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 12-1742-09

## Genetic Diversity of Poncirus and Its Phylogenetic Relationships with Relatives as Revealed by Nuclear and Chloroplast SSR

GONG Gui-zhi, HONG Qi-bin\*, PENG Zhu-chun, JIANG Dong, and XIANG Su-qiong

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** Twenty-eight accessions of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.), hybrids and seven accessions of its relatives, were analyzed for genetic diversity and phylogenetic relationship using nuclear and chloroplast SSR markers. Average PIC (polymorphism information content) value of 0.51 and average expected heterozygosity of 0.52 were given according to nuclear SSR results. Twenty-two common trifoliate orange accessions could be divided into four groups with a genetic distance of 0.16. It indicates a rich genetic diversity of China trifoliate orange germplasm. cpSSR revealed no difference among common trifoliate orange accessions which indicates a relatively conservative chloroplast genome. Four cpSSR loci were found different between Fumin (*P. polyandra* S. Q. Ding et al.) and common trifoliate orange. Fumin trifoliate orange is genetically distant from common trifoliate orange, from its hybrids as well as relatives. Therefore it could be regarded as a true species. The combined application of nuclear and chloroplast SSR could serve a more accurate way to identify trifoliate orange hybrids.

**Key words:** *Poncirus trifoliata*; SSR; cpSSR; genetic diversity; phylogenetic relationship

枳属 (*Poncirus*) 是柑橘的近缘属, 原产中国, 分布广泛。落叶性、三出复叶是枳区别于其他柑橘近缘属的明显特征。同时枳具有抗病、抗寒、矮化、使接穗品种早结丰产等特性, 是柑橘栽培的重要砧木资源和遗传研究的重要材料。以枳为亲本育成的部分砧木, 如卡里佐枳橙等, 已取代酸橙、粗柠檬等砧木, 广泛用于世界柑橘栽培。

收稿日期: 2008 - 06 - 27; 修回日期: 2008 - 09 - 27

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2006AA100108); 重庆市 '十一五' 柑橘选引种重大专项 (2007—2010); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC, 2007BB1381)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qibinhong@163.com)

枳属长期被认为是单种属,但在几千年的栽培过程中产生了丰富的变异类型(郭天池等,1996),并与其近缘属杂交产生了众多的天然枳杂种,仅在国家果树种质重庆柑橘圃就收集保存了百余份枳资源材料。根据形态特征,枳被划分成大叶系、小叶系、无刺系、畸形花等多种类型,根据园艺性状及染色体特性,又鉴定出矮化系及多倍体类型等。枳属另一特异种质——富民枳的发现,动摇了人们对枳属为单种属的认识,较多的研究支持富民枳种的地位(丁素琴等,1984; Fang, 1993; Pang et al, 2003; 吴兴恩等, 2003),但富民枳究竟是种还是杂种迄今仍有争议。

利用 SSR (simple sequence repeat) 标记对柑橘及近缘属植物研究已经有一些报道(Pang et al, 2003; Barkley et al, 2006),但较少涉及枳属种质资源。对枳属植物较系统的研究多集中在 RAPD (吴兴恩等, 2003)、RFLP、ISSR (Fang et al, 1997) 和 AFLP (庞晓明等, 2003) 等分子标记上。

作者从 150 多对 SSR 和 EST-SSR 引物中筛选出了在枳属种质中表现多态性的 22 对引物,结合在枳和枳杂种上表现差异的 7 对 cpSSR (chloroplast simple sequence repeat) 引物,选取保存在国家果树重庆柑橘圃的枳属 28 份普通枳和枳杂种以及部分可能参与枳杂种形成的柑橘近缘属材料 7 份,进行了遗传多样性分析和亲缘关系研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

本研究选用了保存在国家果树重庆柑橘圃不同地理来源的普通枳 (*Poncirus trifoliata* Raf) 22 份(表中 1~22 号),特异种质即富民枳 (*P. polyandra* S. Q. Ding et al) 1 份,枳杂种 5 份。此外,还选用了参与或可能参与枳杂种形成的近缘属代表材料朱红橘 (*Citrus erythrosa* Hort ex Tanaka)、华盛顿脐橙 (*C. sinensis* Osbeck)、马叙葡萄柚 (*C. paradisi* Macf)、晚白柚 (*C. grandis* Osbeck)、宜昌橙 (*C. ichangensis* Swingle)、云南小香橼 (*C. medica* L. var *yunnanensis* S. Q. Ding) 和金豆 (*Fortunella hindsii* var *chintou* Swingle) 用于枳天然杂种来源的鉴定。材料详见表 1。

### 1.2 总 DNA 的提取

于 2007 年春取供试材料嫩叶,用 CTAB 法提取总 DNA,加 RNaseA 至终浓度  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 37 保温 1 h 去除 RNA,重新用乙醇沉淀并溶解在少量超纯水中,琼脂糖电泳结合 Biorad 紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度,将 DNA 浓度稀释至  $50 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , -20 保存备用。

### 1.3 SSR 及其产物的扩增检测

SSR 引物来源于已公开发表的文献 (Chen et al, 2006; Jiang et al, 2006; 张连峰等, 2006) 和根据 GenBank 中的 EST 序列自行设计,设计方法见 Jiang 等 (2006) 的文献,由上海英骏生物工程公司合成。叶绿体 SSR 引物根据新近发表的柑橘叶绿体基因组序列 (Bausher et al, 2006),通过搜索其中的简单重复序列,采用 Primer Premier 5 设计。

核基因组 SSR 扩增采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系。各组分终浓度为: 25~50 ng 总 DNA、1  $\times$ buffer、1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,上游引物和下游引物各 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶 1 U。叶绿体 SSR 扩增反应体系经优化,除模板 DNA 调整为 10 ng, *Taq* DNA 聚合酶调整为 0.5 U,其余与核基因组 SSR 相同。

PCR 扩增反应在 Biometra 公司生产的 PCR 仪上进行。核基因组 SSR 采用 Touch-down PCR 扩增程序进行扩增: 94 预变性 4 min; 94 45 s, 起始退火温度 60~56 45 s, 72 45 s, 每循环降 0.5, 10 个循环; 94 45 s, 56~52 45 s, 72 45 s, 24 个循环; 72 延伸 5 min; 4 保存。退火温度根据相关引物的  $T_m$  值进行调整。叶绿体 SSR 参照核基因组 SSR 扩增程序进行优化后确定为: 起始退火温度 65~58, 7 个循环, 每个循环降 1; 降落后退火温度 58, 17 个循环, 其余

步骤与前者相同。扩增产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染检测。

#### 1.4 引物筛选

选择地理来源和形态差异较大的旺苍大叶枳和 5号小花枳进行基因组 SSR 引物的初步筛选, 从 150多对引物中筛选出多态性好、分辨率高的 22对核基因组 SSR 引物。cpSSR 则采用旺苍大叶枳、5号小花枳、富民枳、卡里佐枳橙进行初步筛选, 从 11对引物中获得 7对在枳和枳杂种间表现差异的引物。

#### 1.5 数据处理

每对 SSR 引物检视 1个位点, 每条多态性带为 1个等位基因, 有带记为 1, 无带记为 0。转化成 AA、AB、BB 矩阵用 popgen32软件计算等位基因数、等位基因频率、观测杂合度和期望杂合度。参照文献计算标记位点的多态性信息含量 (PIC) (Smith et al, 1997)、遗传相似系数和遗传距离 (Nei & Li, 1979)。用 Treecon (version 1.3b) 软件, 根据遗传距离矩阵, 按 UPGMA (unweighted pair group method arithmetic averages) 法进行聚类分析, 并对数据进行 500次重复抽样 bootstrap 检验。

表 1 不同来源的枳、枳杂种和可能的亲本材料

Table 1 Accessions of Poncirus, its hybrids and relatives in this study

编号 Code	种质名称 Accession name	类型 Type	来源 Origin
1	黄岩枳 Huangyan	大叶大花 Large-leaf, large flower	浙江黄岩 Huangyan, Zhejiang
2	厚皮枳 Thick-skin	大叶大花 Large-leaf, large flower	福建闽侯 Minhou, Fujian
3	东海枳 Donghai	大叶大花 Large-leaf, large flower	江苏东海 Donghai, Jiangsu
4	泸溪枳 Luxi	大叶大花 Large-leaf, large flower	湖南 Hunan
5	旺苍大叶枳 Wangcang Daye	大叶大花 Large-leaf, large flower	四川旺苍 Wangcang, Sichuan
6	湖北早实枳 Hubei Zaoshi	大叶小花; 实生选系 Large-leaf, small-flower; Seedling	湖北武汉 Wuhan, Hubei
7	薄皮枳 Thin-skin	大叶小花 Large-leaf, small-flower	福建闽侯 Minhou, Fujian
8	唐河枳 Tanghe	大叶小花 Large-leaf, small-flower	河南唐河 Tanghe, Henan
9	莒南枳 L ūn	大叶小花 Large-leaf, small-flower	山东莒南 L ūn, Shandong
10	皱皮枳 Crinkle-skin	大叶小花 Large-leaf, small-flower	江苏 Jiangsu
11	永顺枳 Yongshun	大叶小花 Large-leaf, small-flower	湖南永顺 Yongshun, Hunan
12	日本枳 Japanese	大叶小花 Large-leaf, small-flower	日本 Japan
13	22号枳 22	小叶大花; 实生选系 Small-leaf, large-flower; Seedling	重庆北碚 Beibei, Chongqing
14	小叶枳 Small-leaf	小叶大花 Small-leaf, large-flower	美国 America
15	枣阳小花枳 Zaoyang Small-flower	小叶小花 Small-leaf, small-flower	湖北枣阳 Zaoyang, Hubei
16	77-1	小叶小花; 实生选系 Small-leaf, small-flower; Seedling	重庆北碚 Beibei, Chongqing
17	飞龙枳 Flying Dragon	变种 Variation	美国 America
18	灌云 1号 Guanyun 1	四倍体 Tetraploid	江苏灌云 Guanyun, Jiangsu
19	5号小花 Small-flower 5	大叶小花; 实生选系 Large-leaf, small-flower; Seedling	重庆北碚 Beibei, Chongqing
20	东湖 1号 Donghu 1	大叶大花 Large-leaf, large-flower	湖北武汉 Wuhan, Hubei
21	穿城 1号 Chuancheng 1	大叶小花 Large-leaf, small-flower	江苏泗阳 Siyang, Jiangsu
22	84-85	小叶小花 Small-leaf, small-flower	湖北枣阳 Zaoyang, Hubei
23	富民枳 Fun in	常绿 Evergreen	云南富民 Fun in, Yunnan
24	朱红橘 枳 Zhuhong Citrandarin	人工杂种 ( <i>C. erythrosa</i> × <i>P. trifoliata</i> )	重庆北碚 Beibei, Chongqing
25	卡里佐枳橙 Carrizo Citrange	人工杂种 ( <i>C. sinensis</i> × <i>P. trifoliata</i> )	美国 America
26	施文格枳柚 Swingle Citrumelo	人工杂种 ( <i>C. paradisi</i> × <i>P. trifoliata</i> )	美国 America
27	简阳枳柚 Jianyang Zhiyou	天然杂种 ( <i>P. trifoliata</i> × <i>C. grandis</i> )	四川简阳 Jianyang, Sichuan
28	枳宜昌 Zhiyichang	天然杂种 ( <i>P. trifoliata</i> × <i>C. ichangensis</i> )	河南唐河 Tanghe, Henan
29	朱红橘 Zhuhong Tangerine		浙江黄岩 Huangyan, Zhejiang
30	华盛顿脐橙 Washington Navel Orange		美国 America
31	马叙葡萄柚 Marsh Grapefruit		美国 America
32	晚白柚 Wanbaiyou		福建 Fujian
33	宜昌橙 Ichang Papeda		重庆北碚 Beibei, Chongqing
34	云南小香橼 Yunnan Xiaoxiangyuan		云南 Yunnan
35	金豆 Golden Bean Kumquat		湖南 Hunan

## 2 结果与分析

### 2.1 核基因组 SSR标记多态性及枳种质遗传多样性分析

28份枳属种质材料在 22个核基因组 SSR位点共扩增出 103个等位基因, 平均每个位点可检测 4.68个, 最少为 2个, 最多为 10个。平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.74和 0.59。SSR标记多态性信息含量 (PIC) 为 0.42~0.81, 平均 0.58。若除去富民枳和枳杂种, 22份普通枳在 22个 SSR位点共扩增出 55个等位基因, 每个位点可检测 2~6个, 平均 2.50个; 平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.79和 0.52; PIC值为 0.28~0.77, 平均 0.51。

PIC是衡量微卫星 DNA座位变异程度高低的重要指标。当某微卫星座位  $PIC > 0.5$  时, 表明其为高度多态座位;  $0.25 < PIC < 0.5$  时, 为中度多态座位;  $PIC < 0.25$  时, 为低度多态座位 (Botstein et al, 1980)。从表 2可见, TAA41、CMS4、F10、Cit12、Cit05在 22份普通枳上的 PIC值大于 0.5, 表现为高度多态座位, 其余为中度多态座位。若加上富民枳、枳杂种, 则除 Cit20、CSSR052、F52外, 均表现为高度多态。

期望杂合度是假定各基因座位符合 Hardy-Weinberg平衡的前提下计算的杂合度, 多个座位期望杂合度的平均值为平均期望杂合度, 常用来度量群体遗传多样性, 平均期望杂合度值越高, 反映群体遗传一致性就越低, 遗传多样性越丰富 (Frankham et al, 2002)。在多倍体中, PIC常被用来代替期望杂合度 ( $H_e$ ) 近似地估算遗传多样性水平。本研究中, 22份普通枳在 22个 SSR位点的平均期望杂合度为 0.52, 平均 PIC为 0.51, 若将枳杂种及富民枳计算在内, 则平均期望杂合度和平均 PIC分别达 0.59和 0.58 (表 2), 表明我国枳种质资源遗传多样性较丰富, 属中偏高水平。

表 2 22对 SSR引物对 28份枳种质材料的扩增多态性

Table 2 Diversity statistics for 22 SSR markers studied in 28 Poncirus accessions

SSR 位点 SSR loci	普通枳 (1~22) Common trifoliate orange				普通枳、富民枳、枳杂种 (1~28) Common and Fumin trifoliate orange, and hybrids			
	等位基因数	观测杂合度 ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ )	PIC值	等位基因数	观测杂合度 ( $H_o$ )	期望杂合度 ( $H_e$ )	PIC值
	Alleles observed	Observed heterozygosity	Expected heterozygosity	PIC value	Alleles observed	Observed heterozygosity	Expected heterozygosity	PIC value
cAGG9	3	0.18	0.42	0.41	3	0.21	0.54	0.53
CMS4	4	1.00	0.66	0.65	7	0.96	0.75	0.73
TAA15	2	0.86	0.50	0.49	5	0.86	0.62	0.61
TAA41	6	1.00	0.79	0.77	10	0.96	0.82	0.81
Cit05	3	1.00	0.59	0.57	5	0.96	0.64	0.63
Cit12	3	0.68	0.62	0.61	6	0.71	0.73	0.71
Cit15	2	0.86	0.50	0.49	5	0.82	0.66	0.65
Cit20	2	0.81	0.49	0.48	2	0.64	0.50	0.49
CSSR035	2	0.82	0.49	0.48	4	0.79	0.53	0.52
CSSR045	2	0.86	0.50	0.49	4	0.79	0.58	0.57
CSSR052	2	0.81	0.49	0.48	3	0.79	0.55	0.54
CSSR059	2	0.86	0.50	0.49	6	0.21	0.58	0.57
F9	2	0.82	0.49	0.48	5	0.79	0.54	0.53
F10	3	1.00	0.67	0.65	3	0.86	0.64	0.63
F14	2	0.50	0.50	0.49	6	0.57	0.62	0.61
F21	2	0.86	0.50	0.49	4	0.79	0.58	0.57
F31	2	0.82	0.49	0.48	3	0.79	0.55	0.54
F41	2	0.86	0.50	0.49	5	0.86	0.57	0.56
F52	3	0.32	0.29	0.28	5	0.43	0.43	0.42
F53	2	0.82	0.49	0.48	3	0.82	0.53	0.52
F65	2	0.82	0.49	0.48	4	0.68	0.56	0.55
F72	2	0.82	0.49	0.48	5	0.79	0.54	0.53
平均 Average	2.50	0.79	0.52	0.51	4.68	0.74	0.59	0.58

## 2.2 枳、枳杂种、富民枳及其近缘属植物的 cpSSR 多态性分析

11对 cpSSR 引物的扩增产物在普通枳 (1~22号材料) 间均无差异 (图 1)。其中有 7对引物在普通枳和以枳为父本的枳杂种间表现出多态性, 有 4对引物在普通枳和富民枳间表现出多态性。7个 cpSSR 位点在 35份供试材料中共检测出 37个等位基因, 平均每对可检测 5.29个。标记位点的多态性信息含量为 0.31~0.55, 平均 0.48。

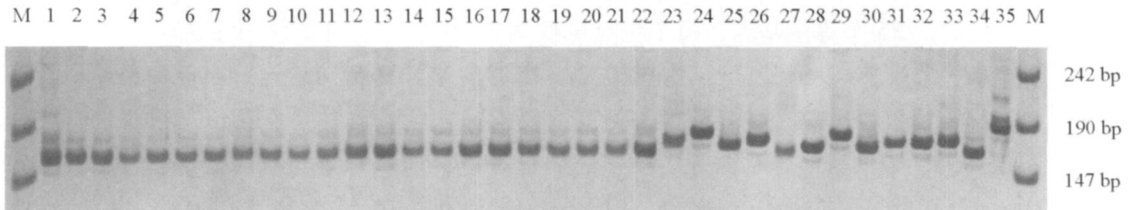


图 1 引物 14T12对 35份材料的扩增结果

编号对应种质见表 1。

Fig 1 The band profiles of cpSSR amplified by the primer pairs of 14T12

The codes were the same as Table 1; M: pUC18/*M. sp* IDNA marker

## 2.3 枳种质及近缘属植物的聚类分析

### 2.3.1 基于核基因组 SSR 标记的聚类分析

根据 22对核基因组 SSR 引物的扩增数据, 按 Nei和 Li (1979) 遗传距离矩阵进行 UPGMA 法聚类 (图 2)。从聚类结果可见, 在遗传距离 0.77时, 聚类图有最大跳跃值, 35份材料被划分为两个类群: 即普通枳、枳杂种及富民枳为一个类群, 柑橘属、金柑属材料为另一类群, 表明枳属与柑橘属和金柑属间确实存在较大的遗传差异。进一步对枳属材料内部进行分析, 在遗传距离 0.53时, 22份普通枳紧密聚成一类, 从枳杂种和富民枳中分离出来, bootstrap 值高达 97%; 当遗传距离为 0.16时, 22份普通枳又可分为 4个类型: 第一类包括唐河枳、莒南枳、湖北早实枳、日本枳、飞龙枳、皱皮枳、黄岩枳、东海枳, 除飞龙枳外, 均为大叶类型; 第二类包括灌云 1号、厚皮枳、泸溪枳、永顺枳、小叶枳、穿城 1号, 除小叶枳外, 也均为大叶类型; 第三类包括旺苍大叶枳、22号枳、东湖 1号枳, 为大花类型; 第四类包括 5号小花、84-85、枣阳小花枳、77-1枳, 为小花类型。

22份普通枳遗传距离在 0~0.6之间。其中, 一类中的黄岩枳、皱皮枳和东海枳, 二类中的泸溪枳、永顺枳、小叶枳和穿城 1号枳, 以及三类中的旺苍大叶、东湖 1号和 22号枳, 遗传距离均为 0, 22个 SSR 位点均不能将它们区分开来, 反映了各类内这些材料之间遗传差异很小。枣阳小花枳、77-1枳、5号小花、84-85与其他枳差异较大, 遗传距离在 0.4~0.6之间。富民枳与 22份普通枳、枳杂种及近缘属材料的遗传距离都较大, 分别为 0.67~0.71、0.65~0.83、0.71~0.90。在本研究中旺苍大叶枳与 5号小花遗传差异较大, 遗传距离为 0.60, 从聚类图上看属不同的类群, 而 Pang等 (2003) 应用 AFLP标记的研究则将它们聚在一起。22份普通枳材料也没有严格按地域特点进行聚类, 这与庞晓明等 (2003) 的研究结果一致。飞龙枳与日本枳聚在一起, 再与大部分来自我国江浙等东海沿岸的枳相聚, 这与飞龙枳为日本从枳的变异中选出这一实际情况相符, 而日本枳可能也是就近从我国山东或江浙一带引入。

从聚类图 2还可以看出, 富民枳聚于普通枳和枳杂种的外围, 说明富民枳与枳的亲缘关系比枳杂种与枳的亲缘关系更远。



图 2 基于核基因组 SSR 标记的 35 份枳属种质及其近缘属材料聚类树状图  
 Fig. 2 Dendrogram of 35 accessions in this study based on nuclear SSR data

2. 3. 2 基于叶绿体基因组 SSR 标记的聚类分析

根据 7 对叶绿体基因组 SSR 标记的扩增数据，进行 UPGMA 聚类分析所得的亲缘关系树状图如图 3。当遗传距离为 0.72 时，所有材料可以分 4 组：（1）22 份普通枳和简阳枳柚；（2）富民枳、云南小香橼、卡里佐枳橙、华盛顿脐橙、晚白柚、施文格枳柚、马叙葡萄柚；（3）金豆；（4）朱红橘 × 枳、朱红橘、枳宜昌、宜昌橙。从图 3 还可以看出，已知亲本的枳杂种卡里佐枳橙、朱红橘 × 枳分别毫无差异地与其母本华盛顿脐橙、朱红橘聚在一起；施文格枳柚与其母本邓肯葡萄柚的芽变马叙葡萄柚无差异地聚在一起；22 份普通枳与简阳枳柚也完全无差异地为一类，表明简阳枳柚应为以枳为母本的杂种来源；枳宜昌远离枳而与宜昌橙、朱红橘、朱红橘 × 枳聚在一起，表明枳宜昌的母本来源并非枳。

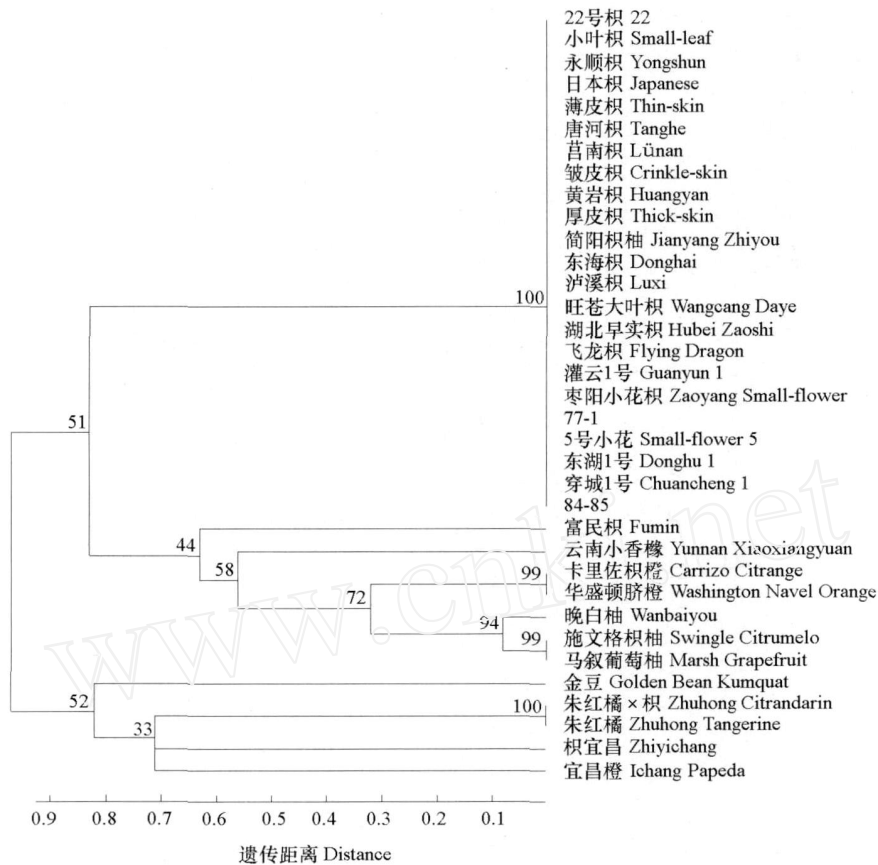


图 3 基于叶绿体基因组 SSR 标记的 35 份枳属种质及其近缘属材料聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of 35 accessions in this study based on cpSSR data

### 3 讨论

#### 3.1 我国枳种质资源的遗传多样性及变异来源

长期以来, 枳一直被认为可能是真正柑橘植物中最稳定、变异最少的种。但由于枳具有一年多次开花、大多数枳为单多胚混合类型、自交亲和、属间杂交可育、易产生芽变等特点, 使其仍然可能通过有性及无性繁殖的方式产生变异。枳从我国传至国外时间不长, 但美国鉴定出并加以命名的枳类型达 40 个以上, 日本除早期发掘若干变种外, 还鉴定出大叶系、小叶系、曲针系、单胚系、四倍体、无刺系等多种类型 (郭天池 等, 1996)。我国为枳属植物的起源中心, 有更悠久的栽培历史, 产生的变异类型更为丰富。庞晓明 (2002) 采用 AFLP 标记对 69 份枳种质的研究, 获得平均 28.22% 的多态性比率, 对比 Fang 等 (1997) 用 RFLP 及 ISSR 标记检测美国保存的 48 份枳材料所得到的约 10% 的多态性比率, 认为我国现存的枳资源要比美国保存的资源含有更丰富的遗传多样性。从本研究核基因组 SSR 标记位点的平均 PIC 及遗传杂合度看, 我国的枳资源遗传多样性较丰富, 群内变异应属中偏高水平, 此结果支持庞晓明 (2002) 的观点。从本研究 cpSSR 标记分析可以看出, 以母性遗传为特征的叶绿体基因组在普通枳间无差异, 认为我国枳属种质群内变异主要来自种内杂交、自交、及自然突变等。虽然大部分枳变异类型都是从实生后代中选出, 但却不能肯定变异究竟来自有性杂交还是珠心系的无性突变, 但由于自然条件下无性突变的概率极低, 因此认为, 变异可能主要还是来自有性繁殖产生的基因重组。

### 3.2 富民枳的分类地位

富民枳分布于云南富民县老青山海拔 2 399 ~ 2 480 m 的半山沟中。因其在形态上不同于普通枳, 为常绿类型, 丁素琴等 (1984) 认为是枳属一新种。范眸天等 (1998) 通过对富民枳、普通枳及其近缘属植物花粉形态的比较, 认为富民枳是较枳更为原始的种类。刘利勤等 (2007) 通过对富民枳染色体核型的研究, 也认为富民枳是较枳更为原始的类型, 并支持富民枳种的地位。Fang (1993) 通过对富民枳、普通枳、柑橘属、金柑属 6 种同工酶的比较, 支持富民枳种的地位, 并认为在进化过程中, 富民枳可能是联系枳属与柑橘属的“桥梁”。庞晓明 (2003) 根据高纯合频率 SSR 位点也支持富民枳种的地位。但郭天池等 (1996) 推测可能是人为遗弃的半野生天然枳杂种。吴兴恩等 (2003) 对枳、富民枳、枳橙进行 RAPD 分析认为富民枳与枳橙亲缘关系更近而与枳更远。根据本研究核基因组 SSR 分析, 富民枳与枳杂种、普通枳、柑橘属及金柑属植物的遗传距离分别为 0.75、0.69、0.80、0.79, 结合聚类分析发现富民枳与枳杂种和普通枳亲缘关系均较远, 但与柑橘属及金柑属植物相比, 则其与普通枳的亲缘关系还是相对近些, 因此推测富民枳不大可能从柑橘属及金柑属直接衍生而来。从基于叶绿体基因组 SSR 标记的聚类图看, 富民枳叶绿体 DNA 与普通枳差异大而更接近枸橼、柚和甜橙, 据此推测富民枳可能与枸橼、柚等有更相似的母系血缘或起源关系。

与庞晓明等 (2003) 的研究结果一致, 富民枳在 22 个位点的纯合频率非常高, 达 21/22。本研究中还发现, 在普通枳中, SSR 位点的纯合频率相对较高的还有枣阳小花枳、77-1 枳、5 号小花、84-85, 分别为 10/22、12/22、12/22、13/22, 其余为 3/22 ~ 5/22, 其中 77-1 枳和 5 号小花为近年的实生选系, 枳杂种纯合频率为 3/22 ~ 9/22。因为 SSR 位点的遗传符合孟德尔分离规律, 自交、回交、种内杂交有利于位点纯合频率的提高。即便是富民枳来源于当年马帮遗弃的枳杂种, 也应该是枳杂种经多代自交以及长期自然选择幸存下来的类似亲本的个体。此外, 35 份供试材料中 SSR 位点纯合频率较高的还有柑橘属及金柑属材料, 而且被认为更原始的宜昌橙 (14/22)、云南小香橼 (17/22) 和金豆 (16/22) 明显高于栽培种的朱红橘 (9/22)、华盛顿脐橙 (8/22) 和马叙葡萄柚 (9/22) 等。因此, 本研究支持富民枳种的地位, 并认为富民枳是较原始的种, 但富民枳在枳属植物起源与演化过程中究竟起什么作用仍需进一步研究。

### 3.3 枳杂种的鉴定及天然杂种简阳枳柚与枳宜昌的来源

从本研究 cpSSR 分析看, 已知亲本的枳杂种卡里佐枳橙、朱红橘 枳分别毫无差异地与其母本华盛顿脐橙、朱红橘聚在一起, 施文格枳柚则与其母本邓肯葡萄柚的芽变马叙葡萄柚无差异地聚在一起, 验证了通过 cpSSR 鉴定某一杂种母本来源的可行性。天然杂种简阳枳柚毫无差异地与普通枳聚成一类, 枳宜昌则远离枳而与宜昌橙聚在一起, 说明简阳枳柚是一以枳为母本的枳杂种, 而枳宜昌则不然。从聚类图 3 可以看出, 枳宜昌虽然与宜昌橙聚在一起, 但其叶绿体 DNA 遗传差异较大。造成这种差异的原因可能有两个: (1) 本试验所用宜昌橙是采自重庆北碚金刀峡的野生宜昌橙, 而枳宜昌则引自河南唐河, 毗邻湖北枣阳, 可能是由于不同来源的宜昌橙之间叶绿体 DNA 也存在差异的缘故; (2) 本试验所用的枳宜杂种来自于以宜昌橙为父本的杂种后代。从核基因组 SSR 分析看, 枳杂种均聚于普通枳的外围, 简阳枳柚与卡里佐枳橙和施文格枳柚聚在一起, 与卡里佐枳橙的亲缘关系更近。众多的研究表明, 甜橙的起源和柚有关 (Nicolosi et al, 2000; Barkley et al, 2006), 结合简阳枳柚树势强、嫩梢有毛、有部分花序花等形态特征, 认为简阳枳柚可能是以枳为母本的天然枳柚杂种。枳宜昌则是以枳为父本的天然枳杂种或宜昌橙杂种后代与枳的杂种。此外, 不论从核基因组 SSR 还是从 cpSSR 聚类分析看, 枳宜昌与朱红橘都存在某种关系, 而朱红橘和宜昌橙都具有耐寒、有异味的特点, 但朱红橘是否有宜昌橙血缘, 以及不同来源的宜昌橙叶绿体 DNA 是否存在差异, 均还需进一步研究求证。



## References

- Barkley N A, Roose M L, Krueger R R, Federici C T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus gemplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1519 - 1531.
- Bausher M G, Singh N D, Lee S B, Jansen R K, Daniell H. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': Organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biol*, 6: 21.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32: 314 - 331.
- Chen C, Zhou P, Choi Y A, Huang S, Gmitter F G J. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theor Appl Genet*, 112: 1248 - 1257.
- Ding Su-qin, Zhang Xian-nu, Bao Zhuo-ran, Liang Ming-qing. 1984. A new species of *Poncirus* from China. *Acta Botanica Yunnanica*, 6 (3): 292 - 293. (in Chinese)
- 丁素琴, 张显努, 暴卓然, 梁明清. 1984. 中国枳属一新种. *云南植物研究*, 6 (3): 292 - 293.
- Fan Mou-tian, Liang Ming-qing, Pu Wei-qiong. 1998. Studies on the pollen morphology and taxonomic position of *P. trifoliata* and *P. polyandra*. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 13 (3): 298 - 300. (in Chinese)
- 范眸天, 梁明清, 浦卫琼. 1998. 富民枳与枳的花粉形态与分类位置探讨. *云南农业大学学报*, 13 (3): 298 - 300.
- Fang D Q. 1993. Intra and intergeneric relationships of *Poncirus polyandra*: Investigation by leaf isozymes. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 11 (1): 34 - 40.
- Fang D Q, Roose M L, Krueger R R, Federici C T. 1997. Fingerprinting trifoliolate orange gemplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, 95: 211 - 219.
- Frankham R, Balbu J D, Briscoe D A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press. 29 - 62.
- Guo Tian-chi, Chen Quan-you, Ye Yin-min, Du Yi-xiu. 1996. Gemplasm of *Poncirus trifoliata* L. Raf. *China South Fruit*, 25 (3): 8 - 10. (in Chinese)
- 郭天池, 陈全友, 叶荫民, 杜宜秀. 1996. 枳 [*Poncirus trifoliata* L. Raf.] 的种质资源. *中国南方果树*, 25 (3): 8 - 10.
- Jiang Dong, Zhong Guang-yan, Hong Qi-bin. 2006. Analysis of microsatellites in *Citrus unigenes*. *Acta Genetica Sinica*, 33 (4): 345 - 353.
- Liu Li-qin, Yang Jing, Gu Zhi-jian. 2007. Karyomorphology and taxonomic position of *Poncirus polyandra* (Rutaceae). *Acta Botanica Yunnanica*, 29 (2): 198 - 200. (in Chinese)
- 刘利勤, 杨静, 顾志建. 2007. 富民枳的核型与分类位置探讨. *云南植物研究*, 29 (2): 198 - 200.
- Nei M, Li W H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Appl Genet Sci USA*, 76: 5269 - 5273.
- Nicolosi E, Deng Z N, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 100: 1155 - 1166.
- Pang Xiao-ming. 2002. Studies on phylogeny of citrus and its relatives and on genetic diversity of *Poncirus* using molecular markers [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 庞晓明. 2002. 用分子标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系和枳的遗传多样性 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Pang Xiao-ming, Deng Xiu-xin, Hu Chun-gen. 2003. Construction of AFLP fingerprint of 36 *Poncirus* accessions. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 394 - 398. (in Chinese)
- 庞晓明, 邓秀新, 胡春根. 2003. 枳属 36 份特异种质的 AFLP 指纹图谱构建与分析. *园艺学报*, 30 (4): 394 - 398.
- Pang Xiao-ming, Hu Chun-gen, Deng Xiu-xin. 2003. Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 30 (1): 81 - 87.
- Smith J S C, Chin E C L, Shu H, Smith O S, Wall S J, Senior M L, Mitchell S E, Kresovich S, Ziegler J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize: Comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet*, 95: 163 - 173.
- Wu Xing-en, Fan Mou-tian, Gao Jun, Li Wen-xiang, Long Wen-hong, Xu Ming-hui. 2003. Studies on the RAPD analysis and taxonomic relationship of trifoliolate orange, Funi in trifoliolate orange and citrange. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 18 (3): 277 - 280. (in Chinese)
- 吴兴恩, 范眸天, 高峻, 李文祥, 龙雯虹, 许明辉. 2003. 枳、富民枳与橙橙 RAPD 分析与分类 (亲缘) 关系探讨. *云南农业大学学报*, 18 (3): 277 - 280.
- Zhang Lian-feng, He Jian, Feng Yan, Liu Li, Guo Qi-gao, Liang Guo-lu. 2006. Phylogenetic relationships among *Fortunella* and its relatives as revealed by SSR markers. *Journal of Fruit Science*, 23 (3): 335 - 338. (in Chinese)
- 张连峰, 何建, 冯焱, 刘利, 郭启高, 梁国鲁. 2006. 金柑属及其近缘属植物亲缘关系的 SSR 分析. *果树学报*, 23 (3): 335 - 338.