

利用转座子显示技术鉴别柑橘芽变品种

柯玲俊, 余惠文, 许海丹, 谢宗周, 邓秀新, 徐 强*

(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)

摘要: 在依据柑橘全基因组信息的基础上, 针对转座子序列开发了一种适合鉴别柑橘芽变品种分子技术。以 43 个柑橘芽变品种和 7 个普通柑橘品种为材料, 采用转座子显示技术 (transposon display, TD) 对转座子进行多态性分析。结果表明: 5 个 DNA 转座子 (DTM63、DTM58、Helitron1、Spem 和 mPing2) 和 4 个反转录转座子 (Line1、LTR-Gypsy3、LTR-Gypsy5 和 Tcs2) 可以较好地鉴别柑橘不同芽变品种。罗伯逊脐橙及其早熟芽变品种罗脐 35 号能被 DTM63、Spem 和 mPing2 鉴别; mPing2 能鉴别罗伯逊脐橙/罗脐 35 号、暗柳/红暗柳、普通椪柑/黔阳无核椪柑, 以及红肉琯溪蜜柚/橙皮琯溪蜜柚这 4 对芽变品种。DNA 转座子 DTH3 在甜橙芽变品种中多态性高, 可以鉴别不同的甜橙芽变品种。因此, TD 技术是一种值得关注的能有效鉴别柑橘芽变品种分子标记技术。

关键词: 柑橘; 芽变; 转座子显示; 多态性; 鉴别

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 06-1207-10

Identification the Citrus Bud Mutants by Transposon Display Technology

KE Lingjun, YU Huiwen, XU Haidan, XIE Zongzhou, DENG Xiuxin, and XU Qiang*

(Key Laboratory of Horticulture Plant Biology (MOE), College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Based on the citrus genome information, this study developed a molecular technology based on the transposon sequences to distinguish bud mutants in citrus. Transposon display (TD) technology was used to investigate the transposon polymorphisms of 43 citrus bud mutant cultivars and 7 wild type citrus cultivars. The results showed that 5 DNA transposons (DTM63, DTM58, Helitron1, Spem and mPing2) and 4 retrotransposons (Line1, LTR-Gypsy3, LTR-Gypsy5 and Tcs2) could clearly identify the differences between bud mutants. Robertson navel orange and its early-maturing cultivar Robertson 35 could be identified by DTM63, Spem and mPing2; mPing2 could identify 4 pairs of bud mutants as following: Robertson navel orange and Robertson 35, Anliu and Hong Anliu, the common ponkan and Qianyang seedless ponkan, red flesh and orange skin of Guanxi pummelo. DTH3, a DNA transposon, was highly polymorphic among sweet oranges, and it could identify different bud mutants in sweet orange. Therefore, TD is a type of noticeable and effective molecular marker technology in the identification of citrus bud mutants.

Keywords: citrus; bud mutation; transposon display; polymorphism; identification

收稿日期: 2017-01-16; **修回日期:** 2017-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3157210); 农业部公益性行业专项 (201303093); 教育部创新团队项目 (IRT13065)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xuqiang@mail.hzau.edu.cn)

芽变是多年生果树遗传变异的重要来源和品种选育途径。柑橘的芽变性状多种多样，有成熟期早晚（物候期）、无核或少核（育性）、果皮果肉色泽变异（品质）等，极大地丰富了柑橘种质资源（邓秀新等，1996；刘永忠，2006；陶能国，2006；张敏和邓秀新，2006；付莉莉等，2016）。有些芽变具有明显的外观性状变化，在田间易被辨别。然而，在分子水平上要找到芽变与原来品种的差异却不是件容易的事情（邓秀新和彭抒昂，2013）。外观性状受环境影响较大，而且许多是需要结果甚至果实成熟才能区分。因此，找到芽变在 DNA 上的差异是品种鉴别、保护以及早期筛选工作中所期望的。开发有效的分子标记用于鉴别芽变品种一直是人们追求的目标。柑橘的遗传背景高度杂合（张敏和邓秀新，2006），目前大多数分子标记还不能鉴别柑橘芽变品种。

转座子作为一段特异的、具有转位特性的独立 DNA 序列，常发生跳跃，插入基因附近或基因内部，调控基因的表达，是引起芽变的原因之一（Slotkin & Martienssen, 2007; Le et al., 2015）。甜橙中调控 MYB 转录因子活性的 RUBY 基因上游插入 copia-like 反转录转座子，促进果实合成花青苷，出现了血橙这一富含花青苷的品种（Butelli et al., 2012）。当然，不同品种形成的条件和机制不同，同一转座子在不同品种中的拷贝数也往往存在差异，这就成为鉴别不同芽变品种的依据（Pedersen & Zisoulis, 2016; Wicker et al., 2016）。蒋爽等利用梨基因组的转座子序列信息开发了 RBIP 和 SSAP 标记研究梨品种的遗传变异和起源进化（蒋爽等，2014; Jiang et al., 2015, 2016）。转座子显示技术（transposon display, TD）最早由 Va 等（1998）建立，并将其应用于矮牵牛 W138 品系 dTph1 家族拷贝数和侧翼序列特征的研究。近年来，TD 技术作为一种高效的分子技术在其他植物中也有应用。Casa 等（2000）利用 TD 技术研究 MITE 转座子 Heartbreaker 在玉米 B73 × Mo17 重组自交系中的多态性来开发标记。Macko 和 Grzebelus（2008）基于 DcMaster 转座子运用 TD 技术评价胡萝卜育种材料的多样性以及检测胡萝卜的杂种纯度。TD 技术也广泛应用于水稻遗传图谱的完善（Kwon et al., 2005），水稻种间的进化关系（Hirano et al., 2011），以及水稻愈伤组织的转座子激活状况（Takagi et al., 2007）等研究中。柑橘基因组平台的不断完善（Xu et al., 2013），为 TD 技术应用于柑橘研究奠定了基础（朱安丹，2012; 许海丹，2016），但应用 TD 技术探究转座子在柑橘芽变品种中的多态性还未见报道。拟采用该技术来鉴别柑橘芽变品种，希望为芽变品种分子鉴别提供了一种新方法，为后续相关性状芽变机理的研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

50 份试验材料（表 1）中 37 份来自华中农业大学国家柑橘育种中心，6 份来自湖南，6 份来自福建，1 份来自江西。其中 43 份为柑橘芽变品种，7 份普通品种作为对照。

表 1 试验材料

Table 1 The experimental materials in this study

材料种类 Material type	采样地 Sampling site	种质类型 Germplasm type	编号 Number	品种 Cultivar
甜橙 <i>Citrus sinensis</i> Osbeck	华中农业大学国家柑橘 育种中心 National Center of Citrus Breeding, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China	Selecta 的芽变 Bud mutation of Selecta	1	华盛顿脐橙 Washington navel orange
		甜橙色泽芽变	2	血橙 Blood orange
		Flesh color mutation of sweet orange	30	红肉脐橙 Cara cara navel orange
		甜橙晚熟芽变	3	夏金 Summer-gold navel orange
		Late-maturing mutation of sweet orange	4	秋金 Autumn-gold navel orange
			5	班菲尔 Barnfield navel orange

续表 1				
材料种类	采样地	种质类型	编号	品种
Material type	Sampling site	Germplasm type	Number	Cultivar
			6	鲍威尔 Powell navel orange
			7	能晚 Lanelate navel orange
			18	伏令夏橙 Valencia orange
			8	奉节 72-1 Fengjie 72-1
		华脐丰产性芽变 Highly productive mutation of Washitong navel orange		
		奉节 72-1 晚熟芽变 Late-maturing mutation of Fengjie 72-1	9	奉晚 95-1 Fengwan 95-1
		甜橙早熟芽变 Early-maturing mutation of sweet orange	10	长红脐橙 Changhong navel orange
			11	清家 Seike navel orange
			12	福本 Fukumoto navel orange
			13	梦脐橙 Dream navel orange
			14	纽霍尔 Newhall navel orange
			16	罗伯逊脐橙 Robertson navel orange
		罗脐早熟芽变 Early-maturing mutation of Robertson navel orange	17	罗脐 35 号 Robertson 35 navel orange
		伏令夏橙无核芽变 Seedless mutation of valencia orange	19	蜜萘夏橙 Midnight valencia orange
		伏令夏橙芽变 Mutation of valencia orange	20	卡特夏橙 Cutter valencia orange
		甜橙无核芽变 Seedless mutation of sweet orange	21	露德红夏橙 Rohde Red valencia orange
		甜橙少核芽变 Seedless mutation of sweet orange	22	黔阳无核大红甜橙 Qianyang Seedless Dahong
		甜橙普通品种 Common cultivar of sweet orange	23	锦橙 101 Jincheng 101
		暗柳色泽芽变 Flesh color mutation of Anliu sweet orange	28	暗柳 Anliu sweet orange
		暗柳色泽芽变 Flesh color mutation of Anliu sweet orange	31	哈姆林甜橙 Hamlin sweet orange
		暗柳色泽芽变 Flesh color mutation of Anliu sweet orange	29	红暗柳 Hong Anliu sweet orange
	江西赣州 Ganzhou, Jiangxi	纽霍尔早熟芽变 Early-maturing mutation of Newhall navel orange	15	纽霍尔早熟 Early-maturing Newhall navel orange
	湖南怀化 Huaihua, Hunan	甜橙普通品种 Common cultivar of sweet orange	24	大红甜橙 (有核) Dahong sweet orange (seedy)
		大红甜橙少核芽变 Seedless mutation of Dahong	25	大红甜橙 (少核) Dahong sweet orange (seedless)
	湖南湘西 Xiangxi, Hunan	甜橙普通品种 Common cultivar of sweet orange	26	浦市甜橙 (有核) Pushi sweet orange (seedy)
		浦市甜橙无核芽变 Seedless mutation of Pushi	27	浦市甜橙 (无核) Pushi sweet orange (seedless)
橘 <i>C. reticulata</i>	华中农业大学国家柑橘育种中心 National Center of Citrus Breeding, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China	椪柑普通品种 Common cultivar of ponkan	32	普通椪柑 Ponkan
Blanco	湖南湘西 Xiangxi, Hunan	椪柑无核芽变 Seedless mutation of ponkan	33	黔阳无核椪柑 Qianyang seedless ponkan
		椪柑普通品种 Common cultivar of ponkan	34	泸溪椪柑 Luxi ponkan
		椪柑无核芽变 Seedless mutation of ponkan	35	湘西无核椪柑 Xiangxi seedless ponkan
柚 <i>C. grandis</i>	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	柚普通品种 Common cultivar of pummelo	36	白肉琯溪蜜柚 White flesh Guanxi pummelo
Osbeck		柚色泽芽变 Flesh color mutation of pummelo	37	黄肉琯溪蜜柚 Yellow flesh Guanxi pummelo
			38	红肉琯溪蜜柚 Red flesh Guanxi pummelo
			39	红绵琯溪蜜柚 Red albedo Guanxi pummelo
			40	橙皮琯溪蜜柚 Orange skin Guanxi pummelo
			41	三红琯溪蜜柚 Sanhong Guanxi pummelo
温州蜜柑 <i>C. unshiu</i>	华中农业大学国家柑橘育种中心 National Center of Citrus Breeding, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China	温州蜜柑早熟芽变 Early-maturing mutation of satsuma	42	国庆 1 号 Guoqing 1
Marc			43	国庆 2 号 Guoqing 2
			44	国庆 3 号 Guoqing 3
			45	国庆 4 号 Guoqing 4
			46	国庆 5 号 Guoqing 5
			47	光明早 Guangmingzao
			48	日南 1 号 Nichinan 1
			49	大分早生 Oita Wase
		温州蜜柑色泽芽变 Flesh color mutation of satsuma	50	山下红 Yamasitabeni Wase

1.2 DNA 的提取和检测

柑橘叶片 DNA 的提取采用 CTAB 法。用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 提取是否成功，并用 UV-1601 紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。DNA 原液置于 -20 °C 保存备用。

1.3 TD 技术分析转座子在柑橘芽变品种中的多态性

实验技术流程如图 1 所示，包括 DNA 酶切和连接、预扩增、选择扩增、电泳检测分析。

采用 *EcoR* I 进行酶切。12.5 μL 酶切体系：2.5 μL 10× 缓冲液，0.3 μL *EcoR* I (10 U · μL⁻¹)，5.0 μL DNA (100 ng · μL⁻¹)，4.7 μL ddH₂O，37 °C 酶切 8 h 后，立即取出置于冰上，与等量的连接体系混合。12.5 μL 连接体系：2.5 μL T4 连接酶缓冲液，1.0 μL T4 连接酶 (3 U · μL⁻¹)，1.0 μL *EcoR* I 接头 (5.0 μmol · L⁻¹)，8.0 μL ddH₂O。其中，*EcoR* I 的接头引物序列为 CTCGTAGACTGCGTACC 和 AATTGGTACGCAGTC，接头复性的 PCR 程序为 65 °C 10 min，37 °C 10 min，25 °C 10 min，4 °C 25 min。16 °C 连接过夜。连接完成后 -20 °C 保存。

预扩增。10.0 μL 反应体系：0.5 μL DNA (酶切连接液)，0.5 μL 预扩正向引物 (25 ng · μL⁻¹)，0.5 μL 预扩反向引物 (25 ng · μL⁻¹)，5.0 μL DreamTaq Mix，3.5 μL ddH₂O。反应程序：94 °C 5 min，94 °C 30 s，55 °C 45 s，72 °C 90 s，28 个循环，72 °C 5 min，4 °C 20 min。预扩增引物序列见表 2。

选择扩增。10.0 μL 反应体系：0.5 μL DNA (预扩增产物)，0.5 μL 选扩正向引物 (25 ng · μL⁻¹)，0.5 μL 选扩反向引物 (25 ng · μL⁻¹)，5.0 μL DreamTaq Mix，3.5 μL ddH₂O。反应程序：94 °C 5 min，94 °C 30 s，67 °C 45 s (-1.0 °C/循环)，72 °C 1 min，13 个循环，94 °C 30 s，55 °C 45 s，72 °C 1 min，20 个循环，72 °C 5 min，4 °C 20 min。选择扩增引物序列见表 2。

扩增后的产物加入 5.0 μL 上样缓冲液 (98% 甲酰胺，0.005% 二甲苯青，0.005% 溴酚蓝)，混合均匀，94 °C 变性 5 min 后立即置于冰上冷却。上样，80 W 恒定电泳 1 h 左右 (二甲苯青指示剂距底部 1/3 处)，银染、漂洗、显色，拍照，分析条带。

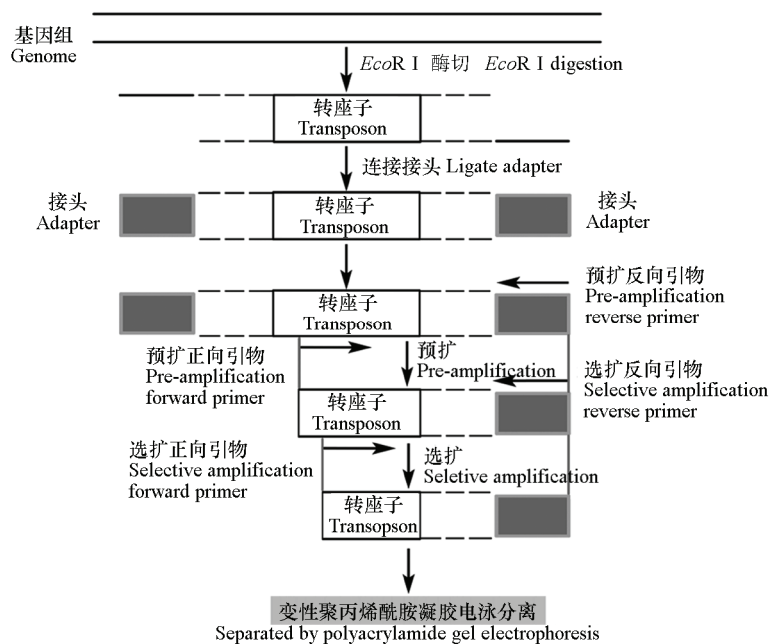


图 1 TD 技术流程

Fig. 1 Technology flow chart of transposon display

表 2 转座子及对应引物序列

Table 2 Transposons and their corresponding primer sequences

转座子 Transposon	预扩引物 Pre-amplification primer		选扩引物 Selective amplification primer		
	正向 Forward	反向 Reverse	正向 Forward	反向 Reverse	
DNA 转座子	DTM63	GCTACAGACTGCAGCATC	GACTGC	AGATGTTTGTACAGAAT	GACTGCGT
DNA	DTM58	TTTTAGTGATAGTGATGGGTA	GTACCA	AATTTTTTGTCTCAGGACAT	ACCAATTC
transposon	Helitron1	TTCTGACCGCTCATCCTG	ATTCA	CTTGTTCCGTTCTCGTA	ATA
	Spem	CTGAGTAAGAGATTGATTGC		CCGAAGTGCTACAAGTGG	
	mPing2	GACCTTTAGCCCAGTTGT		AGCCTCGTATGACTTGAA	
	DTH3	GAGTTAATTCTCCCTCT		TTTGCCACATAGGTAAGC	
反转录转座子	Line1	CTCCACCTCAATGTAACCTCT		GTTGTCCATTCCCGTCAT	
Retrotransposon	LTR-Gypsy3	TGGTGGTAGATGGAGTTAGA		TGGTGGTAGATGGAGTTAGA	
	LTR-Gypsy5	ACAATCCCTGCTCCTGAACC		ACTCCGAGTAGCAACCACA	
	Tcs2	AGGAGTCCAGTATCACTT		TTCTGTCTTCGCCCGTGG	

2 结果与分析

2.1 DNA 转座子鉴别柑橘芽变品种

通过 TD 技术研究转座子拷贝数在芽变品种中的多态性, 观察芽变品种间的差异带。从 DNA 转座子中筛选出 DTM63、DTM58、Helitron1、Spem 和 mPing2 这 5 个转座子可用于鉴别芽变品种 (图 2)。DTM63 能鉴别罗伯逊脐橙 (16) 及其早熟品种罗脐 35 号 (17); DTM58 能鉴别浦市甜橙 (26) 及其无核芽变 (27); Helitron1 能鉴别琯溪蜜柚中的白肉琯溪蜜柚 (36) 和黄肉琯溪蜜柚 (37); Spem 能鉴别纽荷尔 (14) 和它的早熟芽变 (15) 以及罗伯逊脐橙 (16) 和它的早熟品种罗脐 35 号 (17); mPing2 鉴别出了以下几组芽变品种: 罗伯逊脐橙 (16) 和它的早熟品种罗脐 35 号 (17),

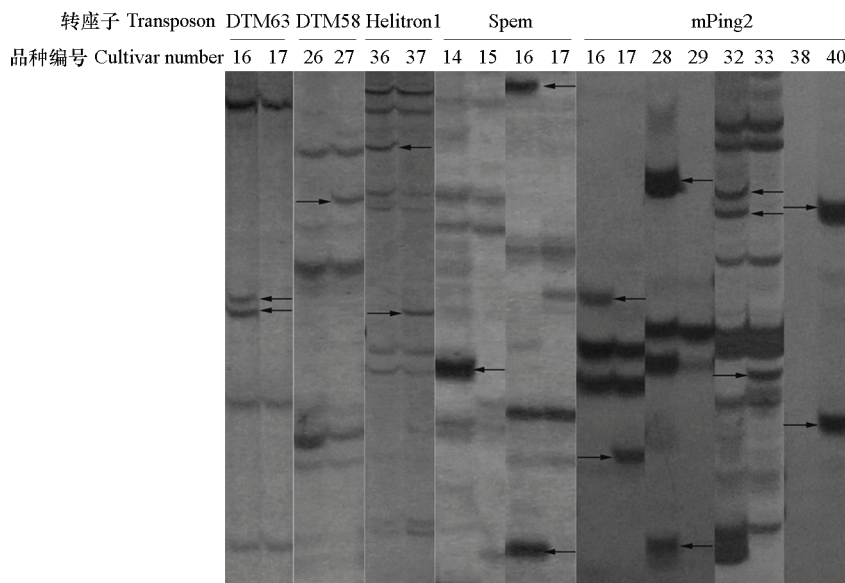


图 2 能鉴别柑橘芽变品种的 5 个 DNA 转座子

品种编号对应的芽变品种见表 1, 箭头标出了芽变品种间的差异片段。

Fig. 2 Five DNA transposons that are effective in the identification of citrus bud mutants

The cultivar number indicated the corresponding bud mutants in Table 1. The arrows marked the polymorphisms between bud mutants.

暗柳 (28) 和红暗柳 (29), 普通椪柑 (32) 和黔阳无核椪柑 (33), 以及红肉琯溪蜜柚 (38) 和橙皮琯溪蜜柚 (40)。

2.2 反转录转座子用于芽变品种鉴别

从反转录转座子中筛选出 4 个能明显鉴别芽变品种的转座子——Line1、LTR-Gypsy3、LTR-Gypsy5 和 Tcs2 (图 3)。Line1 能鉴别华盛顿脐橙 (1) 和长红脐橙 (10); LTR-Gypsy3 同样能鉴别红肉琯溪蜜柚 (38)、红绵琯溪蜜柚 (39) 和橙皮琯溪蜜柚 (40); LTR-Gypsy5 能够鉴别夏金 (3) 和其晚熟芽变秋金 (4)、奉节 72-1 (8) 及其晚熟芽变奉晚 95-1 (9); Tcs2 能鉴别来自湖南怀化的大红甜橙 (24) 和它的少核芽变 (25)、普通椪柑 (32) 和它的无核芽变黔阳无核椪柑 (33)、泸溪椪柑 (34) 和湘西无核椪柑 (35) 这几组芽变品种。

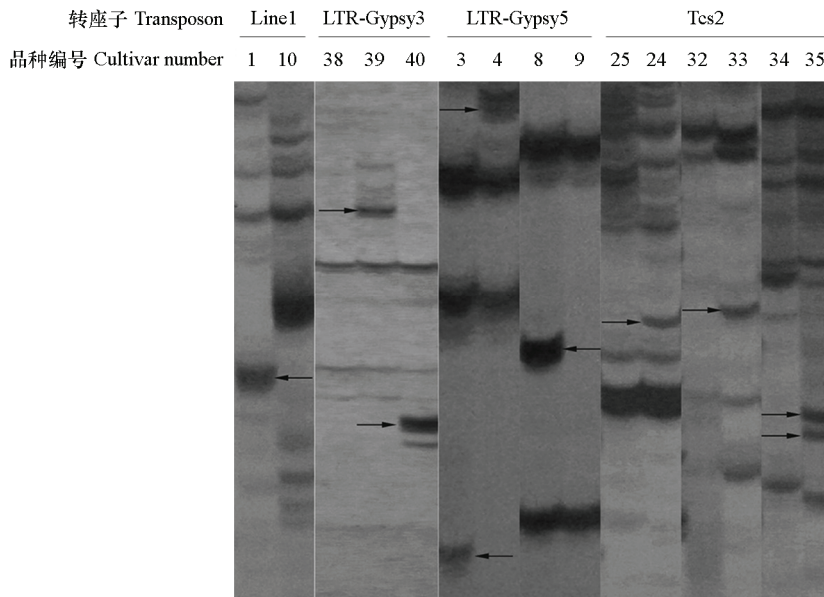


图 3 能鉴别柑橘芽变品种的 4 个反转录转座子

品种编号对应的芽变品种见表 1, 箭头标出了芽变品种间的差异片段。

Fig. 3 Four retrotransposons that are effective in the identification of citrus bud mutants

The cultivar number indicated the corresponding bud mutants in Table 1. The arrows marked the polymorphisms between bud mutants.

2.3 转座子鉴别芽变品种的效率

转座子鉴别芽变品种有一定的偏好性 (表 3), 普通椪柑和黔阳无核椪柑, 罗伯逊脐橙和罗脐 35 号这 2 对组合能被 2 个或者 2 个以上的转座子鉴别, 而 Spem、LTR-Gypsy5、Tcs2 及 mPing2 这 4 个转座子能鉴别不少于 1 个的芽变组合, 利用率较高。能鉴别罗伯逊脐橙和罗脐 35 号的转座子最多, 有 DTM63、Spem 和 mPing2; 而 mPing2 能鉴别的最多: 罗伯逊脐橙和它的早熟品种罗脐 35 号、暗柳和红暗柳、普通椪柑和黔阳无核椪柑, 以及红肉琯溪蜜柚和橙皮琯溪蜜柚 4 组。

2.4 甜橙芽变品种中活跃的转座子 DTH3

DTH3 是一个 DNA 类转座子。DTH3 在甜橙芽变品种中多态性很高, 而在温州蜜柑芽变品种 (42~50) 中没有明显的多态性 (图 4), 表明该转座子在甜橙芽变过程中比较活跃, 可用于鉴别多种甜橙芽变品种, 也可能参与甜橙芽变品种的形成。

表 3 转座子及其能鉴别的芽变品种

Table 3 Transposons and their effectiveness in the identification of bud mutants

转座子 Transposon	能鉴别的芽变品种 Bud mutants that can be distinguished	计数 Count
DTM63	罗伯逊脐橙和罗脐 35 号 Robertson navel orange and Robertson 35 navel orange	1
Spem	纽荷尔和纽荷尔早熟芽变品种; 罗伯逊脐橙和罗脐 35 号 Newhall navel orange, Robertson navel orange and Robertson 35 navel orange	2
LTR-Gypsy5	夏金和秋金; 奉节 72-1 和奉晚 95-1 Summer-gold navel orange and Autumn-gold navel orange, Fengjie 72-1 and Fengwan 95-1	2
Tcs2	大红甜橙(有核)和少核大红甜橙(湖南怀化); 普通椪柑和黔阳无核椪柑; 泸溪椪柑和湘西无核椪柑 Dahong sweet orange (seedy) and Dahong sweet orange (seedless), pokan and Qianyang seedless ponkan, Luxi ponkan and Xiangxi seedless ponkan	3
mPing2	罗伯逊脐橙和罗脐 35 号; 暗柳和红暗柳; 普通椪柑和黔阳无核椪柑; 红肉琯溪蜜柚和橙皮琯溪蜜柚 Robertson navel orange and Robertson 35 navel orange, Anliu sweet orange and Hong Anliu sweet orange, ponkan and Qianyang seedless ponkan, Red flesh Guanxi pummelo and Orange skin Guanxi pummelo	4

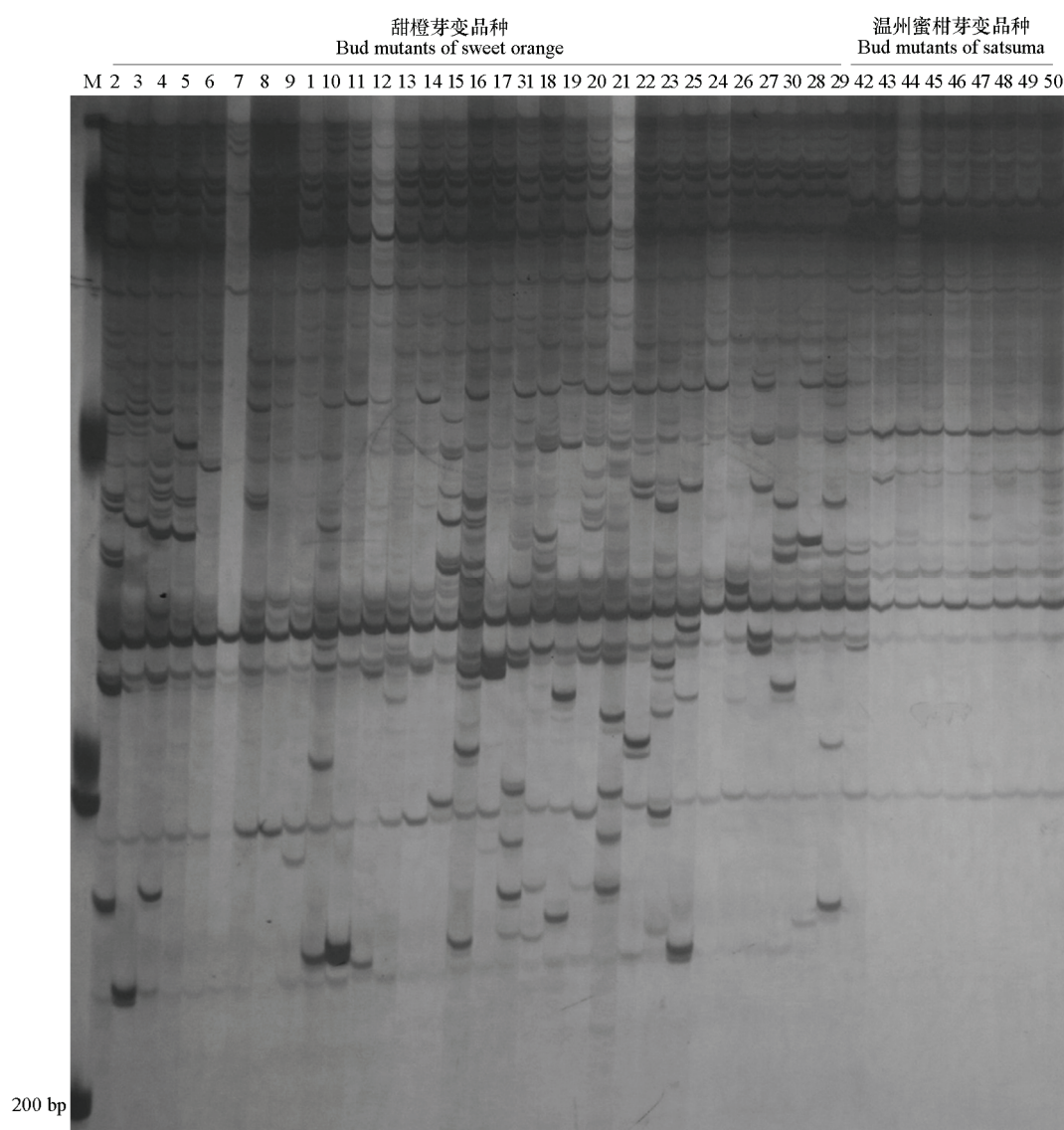


图 4 DTH3 在不同柑橘品种中的多态性

Fig. 4 The polymorphisms of DTH3 in different citrus cultivars

M: 100 bp marker.

3 讨论

柑橘品种选育的实际工作中, 通过表型观察将芽变品种和普通品种区别开来, 从而选育出新品系或品种。但柑橘遗传背景高度杂合, 加之芽变是基因组的微小变化, 常见的分子标记无法有效地区分芽变品种。转座子跳跃是引起芽变的主要原因之一, 运用 TD 技术来研究不同转座子在柑橘芽变品种中的多态性, 是柑橘芽变研究的一个较好的切入点。本试验在柑橘全基因组信息的基础上选高丰度的转座子研究柑橘不同芽变品种, 通过分析芽变品种间的差异带, 找到了一些鉴别柑橘芽变品种的标记。从 DNA 转座子中遴选出 5 个, 从反转录转座子中遴选出 4 个可以有效地鉴别柑橘不同成熟期、有核无核、色泽突变等多种性状的芽变品种, 表明两类转座子都可以较好地用于鉴别芽变品种, 因此 TD 技术是一种能有效鉴别柑橘芽变品种的分子标记技术, 值得推广和应用。

柑橘的芽变机理复杂, 一直是柑橘研究中的热点和难点。柑橘在进化过程中, 不同的转座子的活跃度不同, 较活跃的转座子可能引起芽变。本研究中的 mPing2 这个转座子能鉴别 4 个不同的芽变品种组合, DTH3 在甜橙众多的芽变品种中多态性丰富, 都可成为柑橘芽变机理中重点关注的转座子; 而有些芽变品种在形成过程中, 由于环境和基因组自身的复杂性, 多个转座子表现活跃, 如罗伯逊脐橙和它的早熟芽变品种罗脐 35 号之间, 就能被 DTM63、Spem 和 mPing2 这 3 个转座子鉴别开来, 这些转座子中可能存在引起罗伯逊脐橙发生芽变形成罗脐 35 号的候选转座子。试验所用材料中有些芽变品种有其对应的野生型品种, 如: 奉节 72-1 和其晚熟芽变品种奉晚 95-1、浦市甜橙和其无核芽变、暗柳和其色泽芽变红暗柳等, 能鉴别这些芽变组合的转座子, 有可能是引起芽变的原因, 值得后续关注应用到相关芽变性状形成机理的研究中。

转座子是植物基因组的重要组成成分, 柑橘基因组的 TE (transposon element) 含量是 20% 或更高 (朱安丹, 2012)。转座子占基因组比例较高, 而且种类丰富, 但对其还知之甚少。Gao 等 (2009) 利用 TD 技术在水稻的不同芽变系中寻找激活的转座子, 这提供了一种思路。TD 技术是在 AFLP 技术基础上发展而来的一种较新的分子技术, 但针对的目的区域是转座子序列 (Va et al., 1998)。该序列重复度和复杂程度高 (Slotkin & Martienssen, 2007), 因此 TD 技术体系的特异性和稳定性不如 SSR 体系, 但结合基因组信息对转座子进行仔细筛选, 并在 PCR 扩增过程中优化体系后, 有较高的稳定性, 如 DTM63。TD 技术打破了传统分子标记的局限, 较好地利用基因组中特殊元件转座子的信息, 而转座子跳跃是芽变品种的重要来源 (Yao et al., 2001; Kobayashi & Goto-Yamamoto, 2004; Butelli et al., 2012), 这就决定了 TD 技术应用于芽变品种的鉴别有其独特的优势。RFLP 技术主要是基于分子杂交, 昂贵低效, 较少用于资源鉴定; RAPD 技术的引物是随机合成的 10 多个碱基 (王和勇 等, 1999), 重复性不好; 而传统的 SSR 和 AFLP 等分子标记技术 (Oliveira et al., 2002; Dorji & Yapwattanaphun, 2015) 在柑橘芽变品种中一般很难产生多态性, 鲜有报道用于柑橘芽变品种的鉴别。与上述分子标记相比, 本研究的结果初步表明 TD 技术能有效鉴别柑橘芽变品种, TD 技术的应用能为植物芽变品种的鉴别和转座子的研究提供了一种方法和思路。

References

- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, Reforgiato-Recupero G, Martin C. 2012. Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *The Plant Cell*, 24 (3): 1242 - 1255.
- Casa A M, Brouwer C, Nagel A, Wang L J, Zhang Q, Kresovich S, Wessler S R. 2000. The MITE family Heartbreaker (Hbr): molecular

- markers in maize. PNAS, 97 (18): 10083 - 10089.
- Deng Xiu-xin, Guo Wen-wu, Sun Xu-hua. 1996. Progress on the breeding of seedless citrus in China—Review. Acta Horticulturae Sinica, 23 (3): 235 - 240. (in Chinese)
- 邓秀新, 郭文武, 孙绪华. 1996. 我国无核柑桔类型选育研究进展——文献综述. 园艺学报, 23 (3): 235 - 240.
- Deng Xiu-xin, Peng Shu-ang. 2013. Citrus. Beijing: China Agriculture Press: 107 - 115. (in Chinese)
- 邓秀新, 彭抒昂. 2013. 柑橘学. 北京: 中国农业出版社: 107 - 115.
- Dorji K, Yapwattanaphun C. 2015. Assessment of the genetic variability amongst mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions in Bhutan using AFLP markers. BMC Genetics, 16: 39.
- Fu Li-li, Wu Ju-xun, Yi Hua-lin. 2016. Expression analysis of citrate metabolic related genes in late-ripening mutant of navel orange and its wild type. Acta Horticulturae Sinica, 43 (1): 38 - 46. (in Chinese)
- 付莉莉, 吴巨勋, 伊华林. 2016. 脐橙晚熟突变体及其野生型果实柠檬酸代谢基因表达分析. 园艺学报, 43 (1): 38 - 46.
- Gao Dong-ying, Vallejo V A, He Bing, Gai Yun-chao, Sun Li-hua. 2009. Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSRs makers and transposon display. Plant Cell Tiss Organ Cult, 98: 187 - 196.
- Hirano R, Naito K, Fukunaga K, Watanabe K N, Ohsawa R, Kawase M. 2011. Genetic structure of landraces in foxtail millet [*Setaria italic* (L.) P. Beauv.] revealed with transposon display and interpretation to crop evolution of foxtail millet. Genome, 54: 498 - 506.
- Jiang S, Zheng X, Yu p, Yue X, Ahmed M, Cai D, Teng Y. 2016. Primitive genepools of Asian pears and their complex hybrid origins inferred from fluorescent sequence-specific amplification polymorphism (SSAP) makers based on LTR retrotransposons. PLoS ONE, 11 (2): e0149192.
- Jiang S, Zong Y, Yue X, Postman J, Teng Y, Cai D. 2015. Prediction of retrotransposons and assessment of genetic variability based on developed retrotransposon-based insertion polymorphism makers in *Pyrus* L. Molecular Genetics and Genome, 290: 225 - 237.
- Jiang Shuang, Cai Dan-ying, Teng Yuan-wen. 2014. Prediction, evolution and expression analysis of reverse transcriptase of LTR retrotransposons in pear. Acta Horticulturae Sinica, 41 (11): 2196 - 2207. (in Chinese)
- 蒋 爽, 蔡丹英, 滕元文. 2014. 梨反转录转座子逆转录酶序列预测及其进化和转录分析. 园艺学报, 41 (11): 2196 - 2207.
- Kobayashi S, Goto-Yamamoto N. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science, 304: 982.
- Kwon S J, Park K C, Kim J H, Lee J K, Kim N S. 2005. Rim2/Hipa CACTA transposon display: a new genetic maker technique in *Oryza* species. BMC Genetics, 6: 15.
- Le T N, Miyazaki Y, Takuno S, Saze H. 2015. Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Research, 43 (8): 3911 - 3921.
- Liu Yong-zhong. 2006. Formation mechanism of a late-ripening bud mutant of navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘永忠. 2006. 脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 晚熟芽变性状形成机理研究 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Macko A, Grzebelus D. 2008. DcMaster transposon display makers as a tool for diversity evolution of carrot breeding materials and for hybrid seed purity testing. J Appl Genet, 49 (1): 33 - 39.
- Oliveira A C, Garcia A N, Cristofani M, Machado M. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR makers. Euphytica, 128 (3): 397 - 403.
- Pedersen I M, Zisoulis D G. 2016. Transposable elements and miRNA: regulation of genomic stability and plasticity. Mobile Genetic Elements, 6 (3): e1175537.
- Slotkin R K, Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nature Reviews Genetics, 8 (4): 272 - 285.
- Takagi K, Ishikawa N, Maekawa M, Tsugane K, Iida S. 2007. Transposon display for active DNA transposons in rice. Genes Genet Syst, 82: 109 - 122.
- Tao Neng-guo. 2006. Cloning and characterization of carotenoid biosynthetic genes from sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) red-fleshed mutants [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)

- 陶能国. 2006. 甜橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 红肉突变体类胡萝卜素合成相关基因的克隆与特性分析[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Va D, De N, Broeck N, Maes T, Sauer M, Zethof J, Peter D, Keukeleire E, Dhauw M, Va M, Montagu N, Gerats T. 1998. Transposon display identifies individual transposable elements in high copy number lines. *Plant Journal*, 13: 121 - 129.
- Wang He-yong, Chen Min, Liao Zhi-hua, Sun Min. 1999. RFLP, RAPD and AFLP molecular markers and their application in plant biotechnology. *Journal of Biology*, 16 (4): 24 - 25. (in Chinese)
- 王和勇, 陈敏, 廖志华, 孙敏. 1999. RFLP、RAPD、AFLP 分子标记及其在植物生物技术中的应用. *生物学杂志*, 16 (4): 24 - 25.
- Wicker T, Yu Y, Haberer G, Mayer K F, Marri P R, Rounsley S. 2016. DNA transposon activity is associated with increased mutation rates in genes of rice and other grasses. *Nature Communications*, 7: 12790.
- Xu Hai-dan. 2016. The study on transposon activation in long-term subculture citrus calli [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 许海丹. 2016. 长期继代的柑橘愈伤组织中转座子激活研究[硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Xu Q, Chen L L, Ruan X A, Chen D J, Zhu A D, Chen C L, Bertrand D, Jiao W B, Hao B H, Lyon M P, Chen J J, Gao S, Xing F, Lan H, Chang J W, Ge X H, Lei Y, Hu Q, Miao Y, Wang L, Xiao S X, Biswas M K, Zeng W F, Guo F, Cao H B, Yang X M, Xu X W, Chen Y J, Xu J, Liu J H, Luo O J H, Tang Z H, Guo W W, Kuang H H, Zhang H Y, Roose M L, Nagarajan N, Den X X, Ruan Y J. 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetic*, 45: 59 - 66.
- Yao J, Dong Y, Morris B A. 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (3): 1306 - 1311.
- Zhang Min, Deng Xiu-xin. 2006. Advances in research of citrus cultivars selected by bud mutation and the mechanism of formation of mutated characteristics. *Journal of Fruit Science*, 23 (6): 871 - 876. (in Chinese)
- 张敏, 邓秀新. 2006. 柑橘芽变选种以及芽变性状形成机理研究进展. *果树学报*, 23 (6): 871 - 876.
- Zhu An-dan. 2012. Citrus genome evolution and transcriptomic studies on postharvest fruits [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 朱安丹. 2012. 柑橘基因组进化和果实采后转录组学研究 [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.

征稿

《Horticultural Plant Journal》 (《园艺学报》英文版) 征稿

《园艺学报》英文版《Horticultural Plant Journal》由中国科学技术协会主管, 中国园艺学会、中国农业科学院蔬菜花卉研究所和中国农业科学技术出版社共同主办, 于 2015 年 7 月创刊, 国内统一连续出版物编号 CN10-1305/S, 国际标准连续出版物编号 ISSN 2095-9885, Online ISSN 2468-0141, 双月刊, 大 16 开, 与国际出版商 Elsevier 合作, 在 ScienceDirect 网络出版平台实现全文开放存取 (主页网址 <http://www.journals.elsevier.com/horticultural-plant-journal/>)。

办刊宗旨: 准确、全面、及时地报道园艺学科领域重大研究成果和科研进展, 反映学科研究水平和发展动向, 为学术交流服务, 为促进学科发展作贡献。

刊载范围: 有关园艺作物种质资源、遗传育种、栽培技术、生理生化、生态、基因组学、生物技术、植物保护、采后处理与利用等原创性研究论文、研究简报及综述等。

欢迎投稿: 投稿网址 https://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=HPJ。同时请将纸质稿件 (连同作者授权协议) 挂号信寄至: 北京中关村南大街 12 号, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部 (邮编 100081)。联系电话: 010-82109523; 010-62192388。