

关于胡柚起源的分子研究

陈力耕¹ 胡西琴¹ 赵四清²

(¹浙江大学园艺系, 杭州 310029; ²浙江常山油茶研究所, 常山 324233)

摘要: 对5个主要柑橘种类的 RAPD 分析结果表明, 在重复性好的 OP46 引物的扩增中, 胡柚与柚相同的谱带有6条, 与宽皮橘相同的有6条, 与甜橙相同的有4条, 结合品种表型性状特征和抗寒性分析, 推断胡柚是由宽皮橘、柚和甜橙重复进行自然杂交所产生的杂柑类品种。

关键词: 胡柚; 起源; RAPD

中图分类号: S 666.9 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 03-0276-02

1 目的、材料与方法

胡柚原产于浙江常山县, 是我国珍贵的柑橘种质资源, 因其果大、丰产、质优、耐贮、风味独特而广为栽培。但自被发掘利用以来, 对其起源一直没有定论, 至今尚无种名, 通常将其归为杂柑类。吴耕民^[1]、蔡剑华等^[2]根据形态特征和过氧化物同功酶分析, 认为胡柚可能是柚与甜橙的自然杂种; 贝增明等^[3]则认为可能是柚与其它柑桔的自然杂种。为了从分子水平上探明胡柚的真正起源, 为胡柚的适地适作和深度开发提供科学依据, 我们结合形态特征和抗性表现, 对5个柑橘品种进行了 RAPD 鉴定和综合比较分析。

供试材料为当地栽培历史悠久的柚 (*Citrus grandis* Osbeck)、柑 (*C. reticulata* Blanco)、衢橘 (*C. reticulata* Blanco)、甜橙 (*C. sinensis* Osbeck) 和胡柚 (Huyou), 均取自浙江常山县柑橘品种园。4月15日采集春梢嫩叶置于液氮中带回实验室, 保存于-70℃冰箱中。DNA 提取按陈大明^[4]的方法进行。DNA 浓度和纯度用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶法测定。总共 25 μL 的 RAPD 反应体系包括 KCL 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, dntp 0.2 mmol/L 及 1U TagDNA 聚合酶 (均购自 promega 公司)。扩增引物 (终浓度为 5 pmol/L) 为美国 operon 公司产品。扩增程序为: 预变性 94℃ 3 min, 变性 94℃ 1 min, 退火 36℃ 90 s, 延伸 72℃ 120 s, 45 个循环, 终延长 72℃ 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。2000 年 3 月实地调查胡柚及其它品种的冻害情况并进行性状特征的相互比较分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 多态性分析

使用 100 个引物分别在 5 个供试材料间进行多态性引物筛选, 共有 74 个引物扩增出带型, 其中有 14 个引物产生的 33 个位点在各供试材料间存在多态性, 然后选用具有代表性的 OP46 引物进行重复性检验, 结果获得 9 个稳定的 RAPD 标记, 其片段大小在 610~1575 bp 之间 (图 1), 其中分子量为 720 bp 的扩增带为 5 个供试材料所共

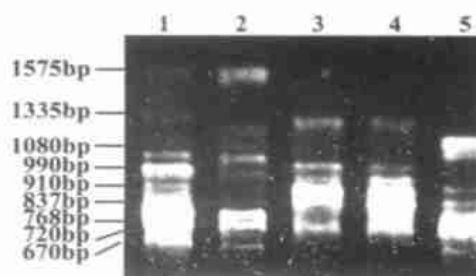


图 1 引种 OP46 对五种 柑品种的扩增

1. 胡柚; 2. 柚; 3. 柑; 4. 衢橘; 5. 甜橙

Fig 1 The amplification pattern of five cultivars with primer OP46

1. Huyou; 2. Pomeelo; 3. Ponkan; 4. Tangerin; 5. Orange

收稿日期: 2001-08-27; 修回日期: 2001-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070634)

有; 分子量为 837 bp、910 bp 的两条带是胡柚、 柑、 衢橘与甜橙所共有, 但胡柚的这两条带较弱; 990 bp 与 1080 bp 的两带在柚、 柑、 衢橘和胡柚上是一致的; 610 bp 带在甜橙、 柚和胡柚中均存在; 1335 bp 带则在 柑、 衢橘与胡柚中存在; 而 768 bp 与 1 575 bp 的两条带只存在于柚与胡柚中。由此可见, 在 OP46 引物的扩增带中, 胡柚与柚相同的带有 6 条, 与甜橙相同的带有 4 条, 与 柑、 衢橘相同的带也有 6 条。这表明, 胡柚的起源过程与柚、 橙、 宽皮橘均密切相关, 其中宽皮橘和柚可能是主要的起源亲本。

2.2 性状特征与抗寒性比较

胡柚的果形、色泽及囊衣微苦的性状象柚; 树形、叶形、翼叶大小和花器构造介于柚与甜橙之间; 果实中汁胞较短粗、种子中有 5% 左右的淡绿色胚, 则是宽皮柑橘所特有的性状。同时, 胡柚的抗逆性强, 适应性广, 尤其是耐寒性明显强于柚、甜橙和 柑, 在 1999 年 12 月罕见的大冻中, 浙江的胡柚与温州蜜柑受冻最轻。作者 2000 年 1 月在浙江省宁波市调查, 胡柚与温州蜜柑除晚秋梢外基本未受冻害; 而脐橙与 柑大多为 2~ 3 级冻害; 部分弱树达 4~ 5 级冻害。在浙江常山相同立地条件下, 柑与甜橙大多为 3~ 4 级冻害, 部分已冻死, 而胡柚多 2 级左右冻害, 全县约 40% 的胡柚果园基本无冻害。同属台州市的三门与玉环两近邻县, 大面积的玉环柚达 3~ 4 级冻害, 而胡柚基本无冻害。由此可见, 胡柚的强耐寒性基因可能来自当地一种抗寒的实生橘类。

综合品种表型性状特征、抗寒性表现及 RAPD 多态性分析结果, 认为胡柚是柚、宽皮柑橘和甜橙重复进行自然杂交而产生的, 根据胡柚与柚及宽皮柑橘相同的 RAPD 扩增带均有 6 条, 而与甜橙相同的带有 4 条, 说明柚与宽皮柑橘可能在胡柚的起源过程中起着主要的和原初基因重组的作用, 因此, 推断其演变过程是先由某种宽皮橘与柚杂交, 其自然杂种再与甜橙杂交, 从而产生带有柚、橘、橙三亲基因的胡柚母树, 经过多次优中选优而形成现今商品生产的良种胡柚。

参考文献:

- 1 吴耕民. 金柚特性及其栽培技术要点. 中国柑桔, 1987, (1): 16~ 18
- 2 蔡剑华, 贺善安, 缪天纲, 等. 珍贵的柑桔种质资源. 见: 张上隆主编. 纪念吴耕民教授诞辰一百周年论文集. 北京: 中国农业出版社, 1995. 18~ 22
- 3 贝增明, 叶杏元. 我国杂柑良种常山胡柚简介. 见: 张上隆主编. 纪念吴耕民教授诞辰一百周年论文集. 北京: 中国农业出版社, 1995. 23~ 24
- 4 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究. 浙江农业大学学报, 1997, 23 (6): 621~ 624

Molecular Research on Huyou Origin

Chen Ligeng¹, Hu Xiqin¹, and Zhao Siqing²

(¹Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Zhejiang Changshan Oiltea Institute, Changshan 324233, China)

Abstract: RAPD analysis on five cultivars of citrus showed that in the amplification bands of OP46 primer, huyou had six bands same as pomelo's and tangerin's respectively; and had four bands same as orange's. Combined RAPD analysis with characteristics and cold resistance, it can be inferred that huyou is polyhybrid from repeatedly natural hybridization of pomelo, tangerin and orange.

Key words: Huyou; Origin; RAPD