

王浩涵,杨洁清,欧阳小健,等. 化州柚 SCoT-PCR 反应体系的优化及分类鉴别研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):34-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.008

化州柚 SCoT-PCR 反应体系的优化及分类鉴别研究

王浩涵, 杨洁清, 欧阳小健, 孙杨杨, 黄海波

(广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要:用目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, 简称 SCoT)分子标记对化州柚及其近缘种进行鉴别研究。为构建适合化州柚的 SCoT-PCR 最佳反应体系,对 PCR 体系的 5 大要素采用 $L_{25}(5^6)$ 表设计正交试验,得到最佳 20 μL 反应体系:3 mmol/L Mg^{2+} 、0.25 mmol/L dNTPs、0.75 U *Taq* 酶、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物、50 ng DNA。从 36 条引物中筛选出 6 条多态性明显的引物并优化其退火温度。最后用优化的 6 条引物对 25 份样品进行扩增,共扩增出 94 条条带,其中多态性条带 69 条,多态性比例范围 55.56% ~ 85.00%,平均多态性 73.4%。构建的非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, 简称 UPGMA)聚类树能够较好地地区分化州柚与其他柚类,且不同品种的化州柚间也存在一定的差异。因此在化州柚的分类鉴别研究中,SCoT 标记不失为一种便捷、有效的手段。

关键词:化州柚;化橘红;SCoT;遗传多样性;分类鉴别

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0034-06

化橘红药用历史悠久,疗效显著,具有理气宽中、燥湿化痰等功效,用于治疗呕恶痞闷、咳嗽痰多等病症,为广东十大南药之一,主要产于广东化州。化橘红基原植物为芸香科柑橘属化州柚(*Citrus maxima* Tomentosa)或柚(*Citrus maxima* L. Osbeck)及其栽培变种^[1],前者别称毛橘红,后者别称光橘红。在目前的研究中普遍认为毛橘红的质量优于光橘红^[2-3],而光橘红产量大,成本低,品种来源广泛,容易与毛橘红混淆,已经对毛橘红市场造成了冲击。目前市场中的毛橘红基原也较复杂,仅文献中提及的就有凤尾、假西洋、密叶、黄龙、金钱脐等十余个品种,并且在植物形态及质量上均有差

异^[4-5]。大量柚类及化州柚品种都可能被用作化橘红药材,而其在苗期难以区分,因此,开发一种可靠有效的方法有助于准确鉴别化橘红基原植物及其种苗。

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, 简称 SCoT)是 Collard 等于 2009 年在水稻上提出的一种新型分子标记^[6]。该标记是针对 ATG 起始密码子侧翼的保守序列设计的单引物,其扩增的片段多偏向候选功能基因,目前在化州柚的种质资源研究中尚未见报道。本研究通过正交试验设计构建 SCoT-PCR 的最佳反应体系,筛选引物并优化其最佳退火温度,对不同品种化州柚及柚类进行遗传多态性分析,构建其非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, 简称 UPGMA)聚类树,以期化橘红基原植物的鉴别分类提供一种有效可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料均采集自植株顶芽往下第 3~5 张幼嫩叶片,用吸水纸吸干表面水分后用塑封袋封口,2 d 内放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰

收稿日期:2017-11-18

基金项目:国家中医药管理局公益性行业科研专项(编号:201407002-06);全国第四次中药资源普查项目(编号:2017-152);广东省岭南中药材保护专项(编号:2017-60)。

作者简介:王浩涵(1991—),男,云南德宏人,硕士,主要从事中药鉴定及分子生物学研究。E-mail:410790512@qq.com。

通信作者:黄海波,副教授,主要从事中药鉴定与质量评价研究。E-mail:2865055919@qq.com。

colorectal cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2014, 21(S4): 634-639.

[5] Yuan J, Zhang Y, Yan F T, et al. Association of *PRKAA1* gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population[J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2016, 20(6): 564-568.

[6] 孙成娟,许厚强,陈伟,等. 贵州从江香猪 *FoxO4*、*PRKAA1* 基因在不同组织中的表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 35(3): 841-846.

[7] Kim Y D, Yim D H, Eom S Y, et al. Risk of gastric cancer is associated with *PRKAA1* gene polymorphisms in Koreans[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(26): 8592-8598.

[8] 张依裕,胡尚,周训军. 高坡猪种质资源特性初步研究[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(5): 115-117.

[9] Tong J, Zhu M J, Underwood K R, et al. AMP-activated protein kinase and adipogenesis in sheep fetal skeletal muscle and 3T3-L1 cells[J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(6): 1296-1305.

[10] 任阳. 饱和与不饱和脂肪酸对猪肌纤维组成的影响及其 AMPK 途径研究[D]. 杭州:浙江大学, 2014: 19-40.

[11] Zhong W, Xie Y, Abdallah M, et al. Cellular stress causes reversible, *PRKAA1/2*-, and proteasome-dependent ID2 protein loss in trophoblast stem cells[J]. Reproduction, 2010, 140(6): 921-930.

[12] 田万强. 牛 AMPK 家族 7 个基因 SNP 检测及其与生长和肉质性状的关联分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013: 20-45.

[13] 宋娇,付睿琦,李颖颖,等. 肉鸡 *PRKAA* 基因表达与 *MyHC* 基因表达和肌肉脂肪沉积关系的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(23): 10-13.

箱保存备用。本试验于 2017 年 4—11 月在广州中医药大学创新中药研发公共服务平台分子生物学实验室进行,样品由广州中医药大学中药鉴定教研室主任黄海波副教授鉴定,凭证标本保存于广州中医药大学,样品详细信息见表 1。

1.2 试验仪器和试剂

OSE-Y20 电动研磨仪,购自天根生化科技(北京)有限公司;Centrifuge 5424R 冷冻离心机,购自 Eppendorf 公司;NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计、Arktik PCR 仪,购自 Thermo 公司;Power Pac Basic 电泳仪,购自 Bio-Rad 公司;Tanon-2500 凝胶成像系统,购自上海天能科技有限公司。

dNTPs、Mg²⁺、10×ExTaq Buffer(无 Mg²⁺)、ExTaq DNA 聚合酶、琼脂糖、DL5000 maker、Goldview I,购自 TaKaRa 公司;β-巯基乙醇、Tris 平衡酚、Tris-乙酸电泳缓冲液(50×TAE),

购自广州瑞舒生物科技有限公司;DP305 植物基因组 DNA 提取试剂盒、6×上样缓冲液(loading buffer),购自天根生化科技有限公司;其余均为国产分析纯试剂。36 条 SCoT 引物序列均参照文献[6],由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.3 DNA 提取

称取 0.1 g 样品置于经预冷的 1.5 mL 离心管中,加入液氮使叶片充分冷冻,用研磨仪迅速将其研成粉末。试验步骤参照天根 DP305 植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行,为提取到浓度更好的 DNA,增加水浴时间至 1 h。

1.4 DNA 质量检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 降解情况。取 1 μL DNA,在超微量分光光度计下检测吸光度以测定其浓度及纯度,并将所有样品稀释至 50 ng/μL。

表 1 化州柚及其近缘品种样品信息

编号	样品名称	学名	采集时间 (年-月-日)	采集地点
A ₁	化州柚(凤尾)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-06	广东省化州市江湖镇
A ₂	化州柚(凤尾)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-06	广东省化州市香雪化橘红基地
A ₃	化州柚(密叶)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-06	广东省化州市江湖镇
A ₄	化州柚(正毛)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-19	广东省吴川市长岐镇
A ₅	化州柚(正毛)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-07-27	广东省广州市果树研究所
A ₆	化州柚(凤尾)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-06	广东省化州市橘红研究所
A ₇	化州柚(凤尾)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-18	广东省化州市平定镇马力村
A ₈	化州柚(假西洋)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-18	广西省陆川县清湖镇
A ₉	化州柚(假西洋)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-18	广东省化州市平定镇大岭村
A ₁₀	化州柚(正毛)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-06-18	广东省化州市平定镇新华村
A ₁₁	化州柚(正毛)	<i>Citrus maxima</i> ‘Tomentosa’	2017-10-15	广东省广州市广州中医药大学
A ₁₂	沙田柚	<i>Citrus maxima</i> ‘Shatian Yu’	2015-08-11	广东省梅州市梅县区隆文镇
A ₁₃	沙田柚	<i>Citrus maxima</i> ‘Shatian Yu’	2017-07-21	海南省琼海市
A ₁₄	沙田柚	<i>Citrus maxima</i> ‘Shatian Yu’	2017-07-21	海南省琼海市
A ₁₅	琯溪蜜柚(五一)	<i>Citrus maxima</i> ‘Guanxi You’	2017-02-06	云南省瑞丽市姐相乡
A ₁₆	琯溪蜜柚(白皮)	<i>Citrus maxima</i> ‘Guanxi You’	2017-07-27	广东省广州市果树研究所
A ₁₇	琯溪蜜柚(红皮)	<i>Citrus maxima</i> ‘Guanxi You’	2017-07-27	广东省广州市果树研究所
A ₁₈	琯溪蜜柚(黄皮)	<i>Citrus maxima</i> ‘Guanxi You’	2017-07-27	广东省广州市果树研究所
A ₁₉	琯溪蜜柚	<i>Citrus maxima</i> ‘Guanxi You’	2015-08-11	广东省梅州市梅县区隆文镇
A ₂₀	红玉香柚	<i>Citrus maxima</i> *	2017-02-06	云南省瑞丽市姐相乡
A ₂₁	酸柚(本地种)	<i>Citrus maxima</i> *	2017-08-30	云南省德宏州芒市
A ₂₂	大富五号	<i>Citrus maxima</i> *	2017-02-06	云南省瑞丽市姐相乡
A ₂₃	水晶柚	<i>Citrus maxima</i> *	2017-02-06	云南省瑞丽市姐相乡
A ₂₄	酸柚(光青)	<i>Citrus maxima</i> *	2017-06-06	广东省化州市香雪化橘红基地
A ₂₅	柠檬(优力克)	<i>Citrus Limon</i> (L.) Burm. f.	2017-02-06	云南省瑞丽市姐相乡

注: * 表示未查找到拉丁名。

1.5 SCoT-PCR 反应体系正交试验设计

引物选择 S32,样品采用 A6 化州橘红研究所的化州柚(凤尾),对 PCR 体系的 5 个主要因素 Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq 酶和 DNA 模板的用量进行优化,每个影响因素设置 5 个水平(表 2)。正交试验共 25 组,每组重复 3 次,反应采用 20 μL 体系,每个体系添加 1×PCR buffer,余量以 ddH₂O 补足。

1.6 PCR 扩增及电泳检测

PCR 扩增程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,49℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,36 个循环;72℃延伸 10 min。取 5 μL 扩增产物与 1 μL loading buffer 混匀,在 GoldView 染色后的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,缓冲液为

表 2 L₂₅(5⁶) 正交因素水平设计

水平	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	Taq 酶 用量(U)	引物浓度 (μmol/L)	DNA 用量 (ng)
1	1.0	0.10	0.50	0.2	10
2	1.5	0.15	0.75	0.4	20
3	2.0	0.20	1.00	0.6	30
4	2.5	0.25	1.25	0.8	40
5	3.0	0.30	1.50	1.0	50

1×TAE,电压为 120 V,时间为 1 h,最后于凝胶成像系统中拍照保存。

1.7 引物筛选及退火温度优化

采用优化后的最佳反应体系对 6 个样品 (A_4 吴川正毛、 A_8 清湖假西洋、 A_9 大岭假西洋、 A_{11} 广中医正毛、 A_{20} 红玉香柚、 A_{25} 柠檬) 筛选所有引物, 选择条带清晰、间距明显且多态性好的引物进行退火温度筛选。在 ArkTik PCR 仪上设定温度范围 46 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$, 在自动生成的 12 个梯度温度中选择 9 个温度 (46.0、47.4、48.4、49.6、51.1、52.5、53.5、54.3、55.0 $^{\circ}\text{C}$) 对条带清晰、多态性好的引物进行优化。

1.8 数据处理及统计

1.8.1 反应体系正交分析 对正交设计的凝胶图像采用姜小凤等的方法^[7-8]综合打分。按条带的清晰度、亮度及数量从低到高赋值 1 ~ 25 分, 对 3 次重复进行 3 次独立计分。依据计分结果进行直观分析, 假设各因素之间不存在交互作用, 计算各因素在各水平下的平均分, 以反映因素的各个水平

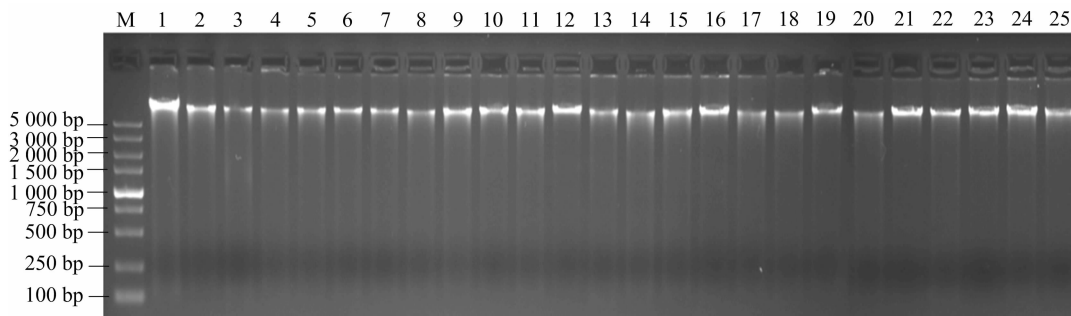
对体系的影响程度。

1.8.2 UPGMA 聚类分析 对得到的 SCoT 电泳条带图谱应用 Tanon-2500 系统 GIS 软件进行分析, 对图谱中同一迁移率位置清晰出现的条带赋值“1”, 无条带的赋值“0”, 条带模糊或不清晰的不予统计, 构建“0/1”表。对所得的“0/1”表应用 NTSYS-pc2.10e 软件计算其遗传距离, 对计算结果采用 UPGMA 算法聚类, 对聚类结果构建 SAHN 树状图。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

2.1.1 电泳检测结果 由图 1 可知, 所有样品均呈现出 1 条清晰的条带, 无拖尾现象, 且无蛋白污染, 表明提取到的 DNA 质量较好, 适用于后续研究。



M—maker; 1~25—对应表 1 A_1 ~ A_{25} 。图 2、图 5 同。

图 1 25 份样品总 DNA 提取结果

2.1.2 纯度与浓度检测 提取的所有样品的 DNA 浓度范围在 70 ~ 187 $\text{ng}/\mu\text{L}$, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均在 1.8 左右, 说明试剂盒法能在柚类植物中提取到质量优、纯度高的 DNA, 符合试验要求。

2.2 PCR 正交设计结果

对凝胶图谱 (图 2) 按条带清晰程度及数量打分, 3 次独立打分的平均分依次为 4.00、5.33、3.67、0、0、7.67、8.67、4.67、6.37、2.00、7.00、10.00、16.33、16.67、11.67、12.00、

9.00、13.67、14.67、10.33、2.67、9.67、19.33、25.00、22.33 分。依据直观分析的结果 (表 3), 按极差 R 值的大小各因素对反应体系的影响程度依次为 Mg^{2+} 浓度 > dNTPs 浓度 > 引物浓度 > Taq 酶用量 > DNA 用量, 其中 Mg^{2+} 浓度对反应结果的影响最大, 而 DNA 浓度则对反应结果影响最小。根据均值 K , 各因素各水平下均值最高的为最优用量, 则得到的最优反应体系为 3 mmol/L Mg^{2+} 、0.25 mmol/L dNTPs、0.75 U Taq 酶、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物、50 ng DNA。

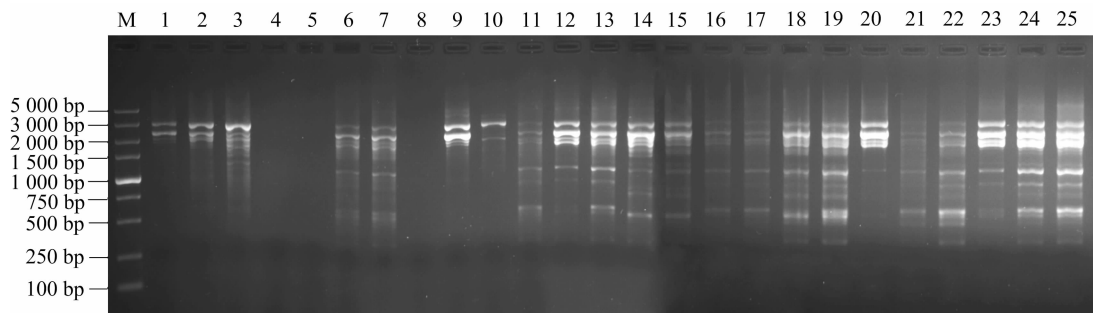


图 2 SCoT-PCR 正交试验电泳结果

2.3 引物筛选及退火温度优化

依据优化的最佳反应体系, 以差距较大的 6 个样品 (A_4 吴川正毛、 A_8 清湖假西洋、 A_9 大岭假西洋、 A_{11} 广中医正毛、 A_{20} 红玉香柚、 A_{25} 柠檬) DNA 为模板, 对 36 条引物进行筛选, 得到 6 条 (S_2 、 S_{14} 、 S_{15} 、 S_{20} 、 S_{30} 、 S_{32}) 条带清晰、多态性高的引物, 部分引物筛选结果见图 3。对筛选到的 6 条引物逐一进行退火温度筛选, 在设置的 9 个温度条件下选择条带清晰且多态性高的作为最适退火温度。部分退火温度筛选结果见

图 4, 最终得到各引物的最适退火温度 (表 4)。

2.4 SCoT 标记的多态性分析

利用筛选出的 6 条引物以最优退火温度条件对 25 份化州柚及近缘种样品 (A_{25} 柠檬样品不计入多态性结果) 进行扩增, 共扩增出 94 条条带, 其中 69 条具有多态性 (表 4)。筛选出的每条 SCoT 引物平均可扩增出条带 15.67 条, 多态性比例 55.56% ~ 85.00%, 平均多态性 73.4%, 表明 SCoT 标记在化州柚种质中扩增效率高, 化州柚及其近缘种遗传多态性较丰

表 3 正交设计直观分析结果

试验 编号	因素				
	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	Taq 酶用量 (U)	引物浓度 (μmol/L)	DNA 用量 (ng)
1	1.0	0.10	0.50	0.20	10
2	1.0	0.15	0.42	0.40	20
3	1.0	0.20	1.00	0.60	30
4	1.0	0.25	1.25	0.80	40
5	1.0	0.30	1.50	1.00	50
6	1.5	0.10	0.75	0.60	40
7	1.5	0.15	1.00	0.80	50
8	1.5	0.20	1.25	1.00	10
9	1.5	0.25	1.50	0.20	20
10	1.5	0.30	0.50	0.40	30
11	2.0	0.10	1.00	1.00	20
12	2.0	0.15	1.25	0.20	30
13	2.0	0.20	1.50	0.40	40
14	2.0	0.25	0.50	0.60	50
15	2.0	0.30	0.75	0.80	10
16	2.5	0.10	1.25	0.40	50
17	2.5	0.15	1.50	0.60	10
18	2.5	0.20	0.50	0.80	20
19	2.5	0.25	0.75	1.00	30
20	2.5	0.30	1.00	0.20	40
21	3.0	0.10	1.50	0.80	30
22	3.0	0.15	0.50	1.00	40
23	3.0	0.20	0.75	0.20	50
24	3.0	0.25	1.00	0.40	10
25	3.0	0.30	1.25	0.60	20
K ₁	2.600	6.668	9.202	10.006	10.868
K ₂	5.876	8.534	11.734	12.132	10.940
K ₃	12.334	11.534	10.934	11.868	6.602
K ₄	11.934	12.542	9.800	7.336	8.800
K ₅	15.800	9.266	6.874	7.202	11.334
R	13.200	5.874	4.860	4.930	4.732

富(图 5)。

2.5 SCoT 标记的聚类分析

将所有引物在 25 份样品得到的结果转化为“0/1”表,利用 NTSYS 计算其相似系数,25 份试材的遗传相似系数分布在 0.600~0.992 之间,以黑、灰、白 3 种颜色分别代表最低值、中间值、最高值,构建遗传相似系数热图(图 6)。对图 6 直观分析可知,图中数据颜色大多数较浅,表明 25 份试材之间相似度较高。

用 UPGMA 算法构建树状图(图 7),在相似系数为 0.65 左右时可将柠檬(A₂₅)与柚类样品区分,在相似系数为 0.79 左右时可将柚类样品分为 2 个类群。所有的化州柚(A₁~A₁₁)及 1 份沙田柚(A₁₂)样品为第 1 个类群,在第 1 个类群中不同的化州柚品种没有各自聚为一支,且与 1 份沙田柚(A₁₂)同聚为一支;第 2 个类群中先是将沙田柚(A₁₃、A₁₄)聚为一支,另一分支中云南瑞丽的本地实生种红玉香柚(A₂₀)独自聚为一支,不同品种和采集地的 5 份琯溪蜜柚(A₁₅~A₁₉)先聚为一支后与云南芒市的本地柚聚为一支,瑞丽的水晶柚(A₂₃)和优选品种大富五号(A₂₂)聚为一支后与光青(A₂₄)聚为一支。

3 结论与讨论

本研究通过正交设计优化了 SCoT-PCR 反应体系,从 36 条引物中筛选出 6 条并优化了其退火温度,最终扩增得到了 55.56%~85.00% 的多态比例,构建了适用于化州柚及其近缘种的 SCoT 分子标记体系。通过 UPGMA 聚类分析发现,化州柚能够较好地与琯溪蜜柚、水晶柚等其他柚类品种区分开,但可能由于嫁接因素,沙田柚显示出与化州柚较近的亲缘关系。不同品种的化州柚没有很好地聚在一起,也表现出一定的差异,且这种差异不是由产地因素引起的,可能存在更多的化州柚品种。凤尾与密叶亲缘关系较近而与假西洋较远,正毛则在凤尾和假西洋中均有分布,提示正毛和副毛的区分可

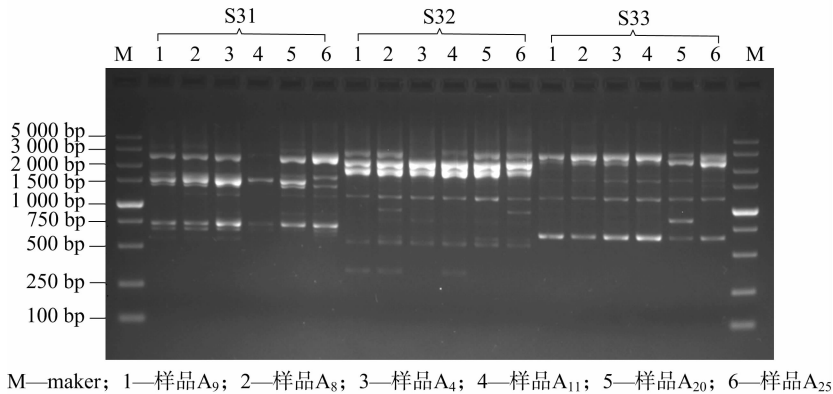


图 3 S31、S32、S33 引物筛选结果

能是因商品等级而非品种差异。

目前在化橘红种质资源的研究中,已有多种分子标记显示出较低的多态性,且不同品种的化州柚相似度高、分类困难。SCoT 分子标记较好地揭示了 25 份化州柚及其近缘种的遗传差异,并且扩增得到的片段多为候选功能基因,能够进行更进一步的研究,是适用于化州柚种质资源分析的有效手段。

SCoT 分子标记技术对 PCR 反应体系的要求较高^[9],在

本试验中发现,体系内各因素浓度微小的变动都有可能影响试验结果,因此对 SCoT-PCR 反应体系的优化十分必要。在化州柚种质资源的 SCoT 标记研究中,本试验取得了 55.56%~85.00% 的多态性比例。而邓锋等利用 ISSR 标记在化橘红种质资源研究中则获得的多态性不够明显^[10],张秋镇等利用 AFLP 标记也仅取得了 5.21% 的多态性^[11]。从对多态性的揭示效率来看,SCoT 标记可作为研究化州柚种质资源的一种有

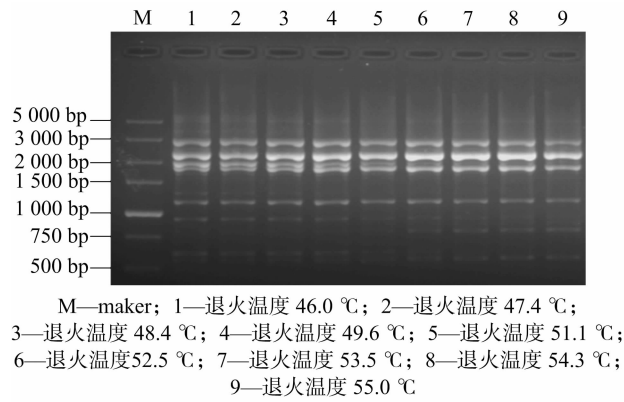


图4 S32 引物退火温度筛选结果

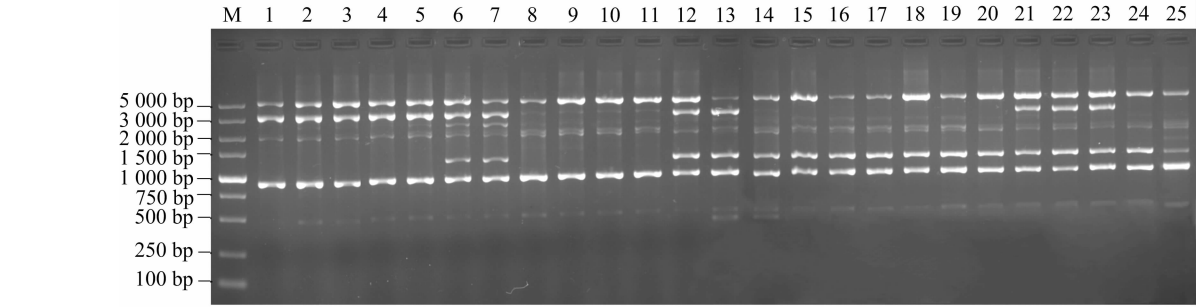


图5 S20 引物对 25 份样品扩增结果

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25
A1	1.000																								
A2	0.900	1.000																							
A3	0.917	0.983	1.000																						
A4	0.917	0.983	0.983	1.000																					
A5	0.917	0.983	0.983	1.000	1.000																				
A6	0.825	0.908	0.892	0.892	0.892	1.000																			
A7	0.817	0.900	0.883	0.883	0.883	0.992	1.000																		
A8	0.825	0.892	0.892	0.892	0.892	0.883	0.892	1.000																	
A9	0.825	0.892	0.892	0.892	0.892	0.883	0.892	0.983	1.000																
A10	0.808	0.875	0.875	0.875	0.875	0.883	0.892	0.983	0.983	1.000															
A11	0.808	0.875	0.875	0.875	0.875	0.883	0.892	0.983	0.983	0.983	1.000														
A12	0.792	0.858	0.858	0.858	0.858	0.850	0.858	0.833	0.833	0.817	0.817	1.000													
A13	0.758	0.808	0.808	0.825	0.825	0.817	0.808	0.767	0.767	0.767	0.767	0.833	1.000												
A14	0.775	0.792	0.792	0.808	0.808	0.817	0.808	0.767	0.750	0.767	0.750	0.800	0.867	1.000											
A15	0.783	0.833	0.833	0.850	0.850	0.825	0.817	0.808	0.808	0.792	0.792	0.825	0.825	0.825	1.000										
A16	0.775	0.842	0.825	0.842	0.842	0.833	0.825	0.800	0.800	0.783	0.783	0.817	0.817	0.817	0.992	1.000									
A17	0.775	0.825	0.825	0.842	0.842	0.817	0.808	0.800	0.800	0.783	0.783	0.817	0.817	0.817	0.992	0.983	1.000								
A18	0.767	0.817	0.817	0.833	0.833	0.825	0.817	0.792	0.792	0.775	0.775	0.808	0.825	0.825	0.983	0.975	0.992	1.000							
A19	0.767	0.817	0.817	0.833	0.833	0.808	0.800	0.792	0.792	0.775	0.775	0.808	0.825	0.825	0.983	0.975	0.992	0.983	1.000						
A20	0.750	0.800	0.783	0.800	0.800	0.808	0.817	0.792	0.775	0.775	0.775	0.792	0.775	0.775	0.867	0.875	0.875	0.883	0.833	1.000					
A21	0.750	0.783	0.783	0.800	0.800	0.758	0.750	0.758	0.758	0.742	0.742	0.808	0.792	0.792	0.900	0.892	0.908	0.900	0.900	0.833	0.833	1.000			
A22	0.733	0.783	0.783	0.800	0.800	0.742	0.733	0.775	0.775	0.758	0.758	0.775	0.792	0.792	0.883	0.875	0.892	0.883	0.883	0.883	0.883	1.000			
A23	0.733	0.783	0.783	0.800	0.800	0.775	0.783	0.808	0.808	0.792	0.792	0.808	0.808	0.808	0.867	0.858	0.875	0.883	0.867	0.850	0.833	0.917	1.000		
A24	0.717	0.783	0.767	0.783	0.783	0.775	0.767	0.725	0.725	0.708	0.708	0.775	0.792	0.792	0.867	0.875	0.875	0.883	0.867	0.833	0.900	0.883	0.900	1.000	
A25	0.698	0.698	0.625	0.625	0.625	0.633	0.625	0.633	0.633	0.617	0.617	0.600	0.700	0.683	0.675	0.667	0.667	0.675	0.675	0.642	0.642	0.658	0.692	0.675	1.000

图6 化州柚及其近缘种的遗传相似系数热图

效手段。

本试验所构建的UPGMA树状图能够将化州柚样品与其他柚类样品分开,但有1份沙田柚样品与化州柚聚类关系较近,这可能是如今化州柚多嫁接于沙田柚上培育的结果。陈晓颖等研究发现,化州柚与沙田柚在ITS1序列上仅有2个碱基的差异^[12],谭婉菁等研究也发现,正毛和沙田柚的相似程度高,并且认为正毛和沙田柚有一定的关系^[13]。而另外的2份沙田柚样品均来自海南琼海且聚为一支,它们在当地有15年以上的树龄,由于海南地理位置的特殊性,生长环境的差异可能造成了这2份沙田柚与广东沙田柚的差别。试验结果能够将对对照品种柠檬与柚类分开,且柚类品种如化州柚和琯溪蜜柚都能够很好地聚类,体现出SCoT标记在柚类植物中分类鉴别的有效性和准确性。

表4 SCOT 引物筛选优化结果						
引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度(℃)	条带总数(条)	多态性条带数(条)	多态性比例(%)	
S2	CAACAATGGCTACCACCC	51.1	18	15	83.33	
S14	ACGACATGGCGACCACGC	46.0	19	13	68.42	
S15	ACGACATGGCGACCGCGA	52.5	20	17	85.00	
S20	ACCATGGCTACCACCGCG	45.4	9	5	55.56	
S30	CCATGGCTACCACCGGCG	46.0	15	10	66.67	
S32	CCATGGCTACCACCGCAC	46.0	13	9	69.23	
总计			94	69		
平均			15.67	11.5	73.40	

针对不同品种化州柚的分析,本研究显示出以下几个特点:(1)同一品种的化州柚样品没有很好地聚为一支,但其聚类结果相对集中,凤尾与假西洋样品没有混在同一小分支的情况,且同一采集地的不同品种有区分(如江湖镇的凤尾和密叶),同一品种采集地不同也能聚为一支(如广西和大岭村的假西洋);(2)本试验中的假西洋样品能够聚为一类,而4个凤尾样品则相对分散,这可能由于凤尾是比较古老的品种,在长期繁衍的过程中,其后代发生变异的可能性较大^[14],赵俊生等利用单核苷酸多态性(SNP)标记对不同品种化州柚的基因分型研究中也表明化橘红种质资源可能存在更多的品系^[15];(3)笔者在化州实地采样中了解到密叶是相对较新的品种,并且可能由凤尾演化而来,而本试验结果也印证了这一观点;(4)本研究中正毛样品被分为2支,分别与凤尾和假西

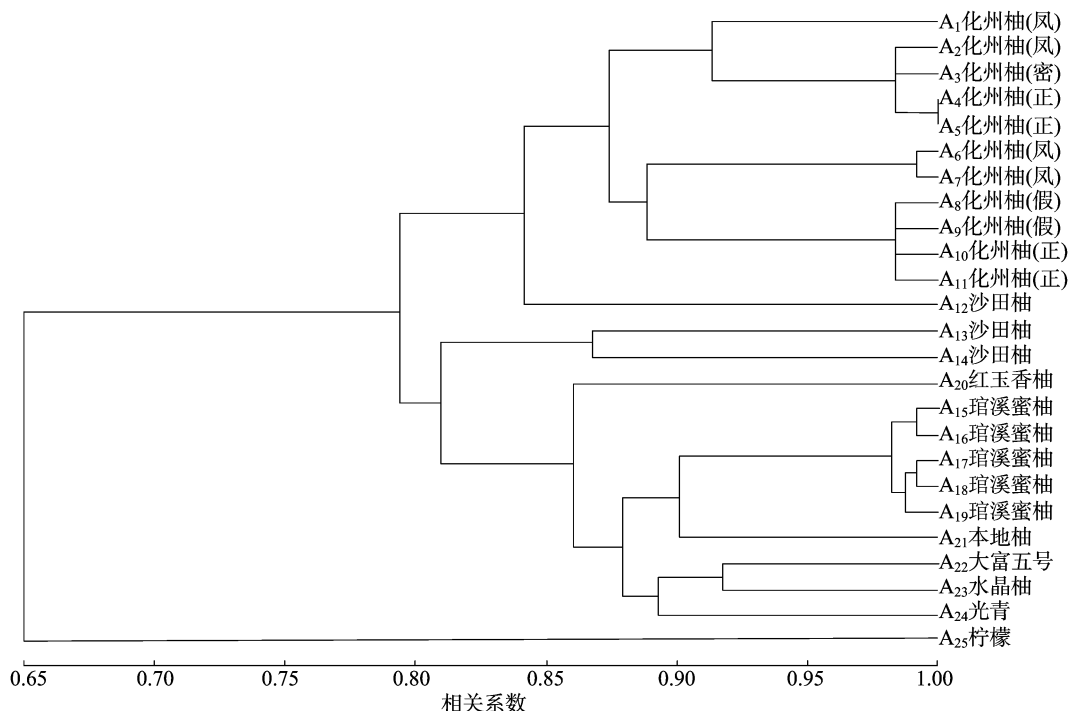


图7 化州柚及其近缘种植物的 UPGMA 聚类结果

洋表现出较近的亲缘关系。正毛、副毛、光青是依据果实表面茸毛的多寡进行区分的,在早期是一种商品的分类方法,这种称谓一直沿用至今。而化州柚在长时间的繁衍下,已衍生出多个品种,正毛化橘红也可能来源于不同的品种。赵俊生等的 SNP 分型研究中发现,相同来源的正毛样品基因型不同,却分别与另一不同来源的正毛样品基因型相同^[15],庞一波的研究中也得到了相似的结论^[16]。化州当地也有专家认为,正毛、副毛不应归为化州柚的不同品种而应作为不同的商品等级,同一植株在不同环境及管理条件下都有可能呈现果实茸毛的多寡,并且化州柚果实存在越成熟毛越少的特性^[17],因此同一植株的果实也可能出现“正毛”或“副毛”的特性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:75.
- [2] 王铁杰,宋茜,江坤,等. 毛橘红与光橘红的 HPLC 药效指纹图谱比较研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(5):896-902.
- [3] 林励,李向明,万建义,等. 化橘红药材质量评价、监测与应用研究[J]. 中国现代中药,2010,12(8):21-26,36.
- [4] 赵红英,文海涛,林励,等. 化州柚不同栽培品种总黄酮及柚皮苷含量的比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(2):183-186.
- [5] 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.
- [6] Collard B Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism;a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2009,27(1):86-93.
- [7] 姜小凤,高燕会,童再康,等. 石蒜属植物 SCoT-PCR 反应体系构建及优化[J]. 浙江农林大学学报,2013,30(3):444-452.
- [8] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):76-77.
- [9] 陈明辉,张志录,杨雨华,等. 红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):116-119.
- [10] 邓锋,莫结丽,陈浩桢. 采用 ISSR 分子标记法鉴别道地药材化橘红[J]. 广东药学院学报,2009,25(5):455-458.
- [11] 张秋镇,赵红英,林励,等. 不同栽培品种化州柚质量的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10790-10792,10815.
- [12] 陈晓颖,高晓霞,罗源生,等. 化橘红 rDNA ITS 序列特征的初步分析[J]. 中药材,2007,30(3):268-270.
- [13] 谭婉菁,郑锦铃,简嘉棋,等. 化州橘红种质资源的 SSR 标记分析[J]. 福建果树,2011(1):7-10.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 庞一波. 化州橘红种质资源的分子评价及其类黄酮主要成分含量的分析[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
- [17] 陈小红,陈康,潘超美,等. 化橘红药材商品规格等级标准分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017(11):23-28.