

柚类品种遗传相互关系的 RAPD 标记研究

张太平^{1*} 彭少麟¹ 王峥峰¹ 凌定厚¹ 甘廉生²

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 利用 22 个经筛选在样品间具多态性的 10 碱基随机引物, 对柚 [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] 的主要品种及柚的一个野生近缘种云南红河橙 (*C. hongheensis* Y. M. et al.)、一个栽培近缘种葡萄柚 (*C. × paradisi* Macfad) 共 79 个样品的总 DNA 进行 PCR 扩增。在样品间共产生 164 条 RAPD 标记带, 其中多态性带 134 条, 多态性百分率为 81.71%; 以 NTSYS-pc (Version 1.80) 软件计算样品间的 Jaccard 遗传相似系数, 并进行 UPGMA 聚类分析。结果表明野生近缘种云南红河橙及栽培近缘种葡萄柚与柚三个种内聚合良好, 种间分异明显, 为柚分类上的地位奠定了遗传学基础。特异性 RAPD 分子标记的研究为柚类品种的鉴定提供了重要指标。

关键词: 柚; 遗传分化; RAPD 分子标记; UPGMA 聚类分析

中图分类号: S666.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)04-0322-07

GENETIC RELATIONSHIPS AMONG CULTIVARS OF *CITRUS MAXIMA* (BURM.) MERR. USING RAPD MARKER TECHNIQUE

ZHANG Tai-ping¹ PENG Shao-lin¹ WANG Zheng-feng¹ LING Ding-hou¹ GAN Lian-sheng²

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. The Pomology Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The relationships among cultivars of Pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] and two related species, Grapefruit (*C. × paradisi* Macfad) and Honghe Papeda (*C. hongheensis* Y. M. et al.), were investigated from 79 samples, which were probed using RAPD technique and statistical analysis. Twenty-two random 10-base primers were screened for the study. They produced 164 RAPD marker bands among 79 accessions, in which 134 RAPD bands were polymorphic. The rate of polymorphic RAPD bands was 81.71%. Using NTSYS-pc program and the method of UPGMA, Jaccard genetic similarity coefficient among accessions was calculated, and the dendrograms were constructed. The results show that three species correspond with three clusters of UPGMA dendrogram, supporting the species status of pomelo. Some cultivar-specific RAPD markers are found as important markers for pomelo identification.

Key words: Pomelo; Genetic differentiation; RAPD marker; UPGMA cluster analysis

收稿日期: 2000-10-24

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(3989370); 中日美国际合作华南退化坡地绿色食品生产及保护与提高生物多样性研究项目(199906); 中国科学院院地合作项目(1999年度); 中国科学院广州分院、广东省科学院科技计划项目(99B05920X)资助

* 现工作地址: 华南理工大学环境科学与工程系, 广州 510641

我国是柑桔的起源中心和遗传多样性分布中心之一,资源极其丰富。柚 *Citrus maxima* (Burm.) Merr. 为亚热带地区柑桔属常绿果树,是一类重要的经济作物种质资源^[1]。据不完全统计,我国现有柚的品种(系)120个以上,包括沙田柚、平和琯溪蜜柚、玉环文旦柚、梁平平顶柚等国内大面积栽培的优良品种;四季抛、丝线柚、金兰柚、常山胡柚、化州橘红柚、八月柚、大马八斤柚等我国珍稀品种。柚为栽培变种,至今还未发现其野生种,国内外对其分类地位尚存争议^[1,2]。由于栽培历史悠久,大部分柚的品种遗传来源不清,同名异物或同物异名现象在柚中普遍存在,若仅根据其物候、形态及部分生化测定来分类还难以确定。本研究利用 RAPD 分子标记技术,以柚的野生近缘种云南红河橙、栽培近缘种葡萄柚两个外类群作参照,探讨国内外柚的主要品种的遗传相互关系及其分子系统分类与鉴定,以解决柚在传统分类上的疑难问题,并为柚的种质资源保护及生产利用提供资料。

1 材料和方法

实验材料包括柚 [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.], 柚的野生近缘种云南红河橙(红河大翼橙)(*C. hongheensis* Y. M. et al.)与葡萄柚(*C. × paradisi* Macfad)共 79 份样品,其中柚的品种材料 75 份,葡萄柚的品种材料 3 份,云南红河橙野生个体材料 1 份。云南红河橙又叫红河大翼橙(Honghe Papeda),为 1976 年云南红河地区发现的柑桔属大翼橙亚属一新种^[3]。材料主要由中国农业科学院柑桔种质资源圃(重庆)提供,部分为广东柚类种植园采集(表 1)。

试剂 TaqDNA 聚合酶购于宝(TAKARA)生物工程(大连)有限公司,10 碱基随机引物购于 Sangon Ltd. Canada 广州代理(表 2)。

总 DNA 的提取 取实验材料的春梢幼嫩叶片 4℃ 保鲜带回实验室,-30℃ 保存,采用 Edwards 等的方法^[4],稍作修改,分别取新鲜幼叶 1 cm² 左右,按 CTAB 法提取 DNA,提取物溶于 200 μl TE 中,以 BECKMAN(DU-7)分光光度计测定 DNA 含量,-30℃ 保存备用。使用前取部分稀释为 10 ng μl⁻¹ DNA 溶液用于 PCR 反应。

PCR 反应及其产物电泳 扩增反应在 Biometra 的 UNO-Thermoblock 上进行。25 μl 反应液包括 10 mmol/L Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 50 mmol/L KCl, 0.01% triton X-10, 1.9 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L 4× dNTP, 0.2 μmol/L 10 碱基随机引物, 1 单位 TaqDNA 聚合酶, 50 ng 模板 DNA。反应液上加约 20 μl 矿物油防止反应过程中水分蒸发。反应过程共 45 个循环,除第一个循环经 94℃ 预变性 30 s, 每一个循环都包括 92℃ 变性 1 min, 35℃ 引物与模板结合 1 min, 72℃ 引物延伸 2 min, 最后一次循环还包括 72℃ 保温 5 min, 降温至 10℃ 等候取出或直接取出样品在冰箱中 4℃ 保存。

扩增产物中加入 5 μl 加样缓冲液(6×)混匀,取 11 μl 在 1.7% 的琼脂糖凝胶、5V cm⁻¹ 条件下电泳,以 GeneRuler™100 bpDNA Ladder Plus(100-3 000 bp)为分子标记(Marker),溴化乙锭染色,凝胶在紫外灯下用 Polaroid 667 照相记录。通过反复预备实验,保持每次 PCR 反应条件的严格一致,必要时重复一次。

RAPD 标记的数据获得与分析 根据照相记录,以清晰可辨且可重复为标准,对每一引物的 RAPD 扩增带进行样品间比较,在 Marker 分子量为 300-3 000 bp 之间,样品间出现 DNA 扩增带的位置有带记为“1”,无带记为“0”。获取所有样品 22 个引物的 RAPD 分析结果的二元数据矩阵。以 Jaccard(1908)系数公式 $S_{ij} = a/(a+b+c-d)$ 计算样品间成对比较的遗传相似性,其中 a 和 d 分别代表样品 i 和 j 所有 DNA 扩增带有和无的数目, b+c 代表样品间非对应关系数目之和。根据遗传

相似性矩阵对样品进行 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 聚类分析, 并绘制系谱图。以上由 NTSYS-pc (Version 1.80) 软件^[5]在计算机上完成。

表 1 实验所用样品的名称与来源

Table 1 Pomelo cultivars used in the study

编号 No.	柚名 Cultivars	原产地 Origin	编号 No.	柚名 Cultivars	原产地 Origin
1	梁平柚 1 号 Liangpingyou 1	四川 Sichuan	41	宜安倭柚 Yi'anwoyou	越南 Viet Nam
2	梁平柚 2 号 Liangpingyou 2	四川 Sichuan	42	早熟暹罗柚 Zaoshuxianluoyou	泰国 Thailand
3	垫江白心柚 Dianjiangbaixinyou	四川 Sichuan	43	暹罗蜜柚 Xianluomiyou	泰国 Thailand
4	垫江红心柚 Dianjianghongxinyou	四川 Sichuan	44	彭县暹罗柚 Pengxianxianluoyou	泰国 Thailand
5	北碚柚 Beibeiyou	四川 Sichuan	45	缅甸柚 Burma pomelo	缅甸 Myanmar
6	金堂无核柚 Jintangwuheyou	四川 Sichuan	46	晚白柚 Wanbaiyou	马来西亚 Malaysia
7	金堂薄皮柚 Jintangbaopiyou	四川 Sichuan	47	福建文旦 Fujianwendan	福建 Fujian
8	合江柚 Hejiangyou	四川 Sichuan	48	坪山柚 Pingshanyou	福建 Fujian
9	毛化红柚 Maohuahongyou	四川 Sichuan	49	孟古文旦 Mengguwendan	福建 Fujian
10	锅魁柚 Guokuiyou	四川 Sichuan	50	世界蜜柚 Shijiemiyou	浙江 Zhejiang
11	大极图柚 Taijiyou	四川 Sichuan	51	楚门文旦 Chumenwendan	浙江 Zhejiang
12	龙安柚 Longanyou	四川 Sichuan	52	马叙葡萄柚 Marsh grapefruit	美国 U.S.A.
13	金堂绿柚 Jintangluyou	四川 Sichuan	53	汤普森葡萄柚 Thompson grapefruit	美国 U.S.A.
14	葵柚 Kuiyou	四川 Sichuan	54	星路比葡萄柚 StarRuby grapefruit	美国 U.S.A.
15	通贤柚 Tongxianyou	四川 Sichuan	55	云南红河橙 Honghe Papeda	云南 Yunnan
16	脐柚 Qiyou	四川 Sichuan	56	四季抛 1 Sijipao 1	浙江 Zhejiang
17	江北无核柚 Jiangbeiwuheyou	四川 Sichuan	57	四季抛 2 Sijipao 2	浙江 Zhejiang
18	凤凰柚 Fenghuangyou	四川 Sichuan	58	四季抛 3 Sijipao 3	浙江 Zhejiang
19	夔府红心柚 Kuifuhongxinyou	四川 Sichuan	59	香蜜柚 Xiangmiyou	福建 Fujian
20	冰糖柚 Bingtangyou	四川 Sichuan	60	扁形文旦 Bianxingwendan	福建 Fujian
21	蓬溪柚 Pengxiyou	四川 Sichuan	61	瑯溪蜜柚 Guanximiyou	福建 Fujian
22	江津红心柚 Jiangjinhongxinyou	四川 Sichuan	62	渡口蜜柚 Dukouniyou	福建 Fujian
23	五布红心柚 Wubuhongxinyou	四川 Sichuan	63	泰国柚 Thailand pomelo	泰国 Thailand
24	菊花心沙田柚 Juhuaxinshatianyou	广西 Guangxi	64	梅州金柚 Meizhoujinyou	广西 Guangxi
25	冬瓜圈沙田柚 Dongguaquanshatianyou	广西 Guangxi	65	梅花早柚 Meihuazaoyou	广西 Guangxi
26	古老钱沙田柚 Gulaoqianshatianyou	广西 Guangxi	66	软枝沙田柚 Ruanzhishatianyou	广西 Guangxi
27	垫江沙田柚 Dianjiangshatianyou	广西 Guangxi	67	沙田柚变异株 Shatianyou mutant	广西 Guangxi
28	岭南沙田柚 Lingnanshatianyou	广西 Guangxi	68	沙田柚早熟株 Prematured Shatianyou	广西 Guangxi
29	段氏柚 Duanshiyou	广西 Guangxi	69	白官早柚 Baigongzaoyou	广东 Guangdong
30	无核沙田柚 Wuheshatianyou	广西 Guangxi	70	砧板柚 Zhenbanyou	广东 Guangdong
31	金香柚 Jinxiangyou	湖南 Hunan	71	水晶柚 Shuijingyou	广东 Guangdong
32	安江香柚 Anjiangxiangyou	湖南 Hunan	72	白芽柚 Baiyayou	广东 Guangdong
33	安江橙 Anjiangchen	湖南 Hunan	73	丝线柚 Sixianyou	广东 Guangdong
34	安江红心柚 Anjianghongxinyou	湖南 Hunan	74	金兰柚 Jinlanyou	广东 Guangdong
35	甜柚 Tianyou	湖北 Hubei	75	桑麻柚 Sangmayou	广东 Guangdong
36	金兰柚 Jinlanyou	江西 Jiangxi	76	化州橘红柚 Huazhoujuhongyou	广东 Guangdong
37	古巴柚 Gubayou	古巴 Cuba	77	酸柚(授粉树) Suanyou (pollination tree)	广东 Guangdong
38	Reinking	美国 U.S.A.	78	酸柚(砧木) Suanyou (root-stock)	广东 Guangdong
39	Chandler	美国 U.S.A.	79	酸柚(半野生) Suanyou (semi-wild)	广东 Guangdong
40	越南小柚 VietNam pomelo	越南 Viet Nam			

样品 1-58 采自中国农业科学院柑桔种质资源圃(重庆); 样品 59-79 采自广东省柚类种植园。

Samples No. 1-58 were obtained from the National Citrus Nursery (Chongqing, China), No. 59-79 from Pomelo Plantation of Guangdong Province, China. All the names listed in the Table are cultivars of *Citrus grandis* except that No. 52 to 54 are cultivars of *C. paradisi* and No. 55 is a species.

2 结果和分析

2.1 PCR 扩增反应结果

利用所购 10 碱基随机引物 100 个,筛选出扩增效果好、样品间具多态性的引物 22 个^[1],用于所有样品的 PCR 扩增反应,22 个有效引物在所有 79 个样品间共获得清晰可重复的 RAPD 扩增带 164 条,其中表现为多态性的扩增带为 134 条, RAPD 扩增带的多态性百分率为 81.71% (表 2)。图 1 为引物 S8、S79 部分样品的 PCR 反应结果。

表 2 实验所用引物及其序列

Table 2 Primers used in the study and their sequences

引物 Primer No.	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 No. of RAPD bands	引物 Primer No.	序列(5'-3') Sequence	扩增带数 No. of RAPD bands
S1	GTTTCGCTCC	5(4)	S8	GTCCACACGG	10(8)
S10	CTGCTGGGAC	4(3)	S20	GGACCCITAC	4(3)
S25	AGGGGTCTTG	6(4)	S33	CAGCACCCAC	5(4)
S39	CAAAVGTCCG	7(7)	S41	ACCGGAAGG	4(3)
S42	GGACCCAACC	6(4)	S47	TTGGCACGGG	5(3)
S48	GTGTGCCCCA	6(5)	S72	TGTCA1CCCC	9(8)
S73	AAGUCTCGTC	10(9)	S75	GACGGATCAG	11(11)
S76	CACACTCCAG	7(6)	S79	GTTGCCGGCC	9(7)
S80	ACTTCGCCAC	12(10)	S84	AGCGTGTCCTG	7(6)
S88	TCACTGCCAC	5(2)	S90	AGGGCCGTCT	12(9)
S91	TGCCCGTCGT	6(6)	S92	CAGCTCACGA	14(12)

括号中的数字为多态性 RAPD 扩增带 The numbers in parentheses are polymorphic RAPD bands

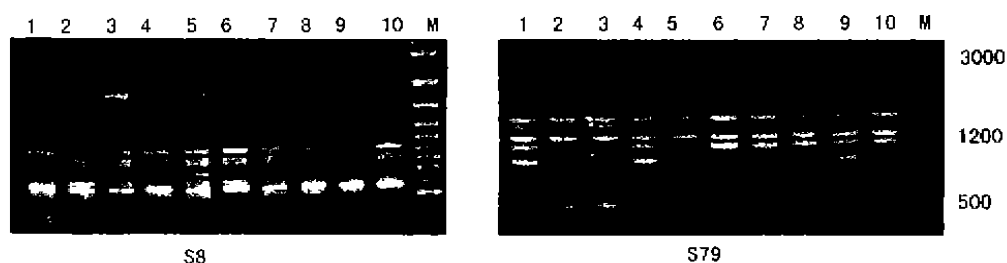


图 1 引物 S8、S79 对样品 1-10 的 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis profiles showing products of PCR of the total DNA of samples 1-10 (for sample no. see Table 1) using primers S8, S79. M is marker GeneRulerTM 100 bpDNA Ladder Plus (100-3 000bp)

2.2 柚类品种间的聚类分析

利用 NTSYS-pc 软件分析柚类 79 个样品间的 RAPD 标记数据矩阵,并根据相似系数作 UPGMA 聚类图,结果如图 2。

由图 2 可知,相似性系数在 0.73 以上柚的各品种聚为一类;在 0.65 左右,葡萄柚与柚聚在一起,而柚的品种古老钱沙田柚与世界蜜柚介于柚与葡萄柚之间,古老钱沙田柚与柚稍靠近,世界蜜柚则更接近于葡萄柚;柚的野生近缘种云南红河橙与柚及葡萄柚的相似系数为 0.50。由此可知,通

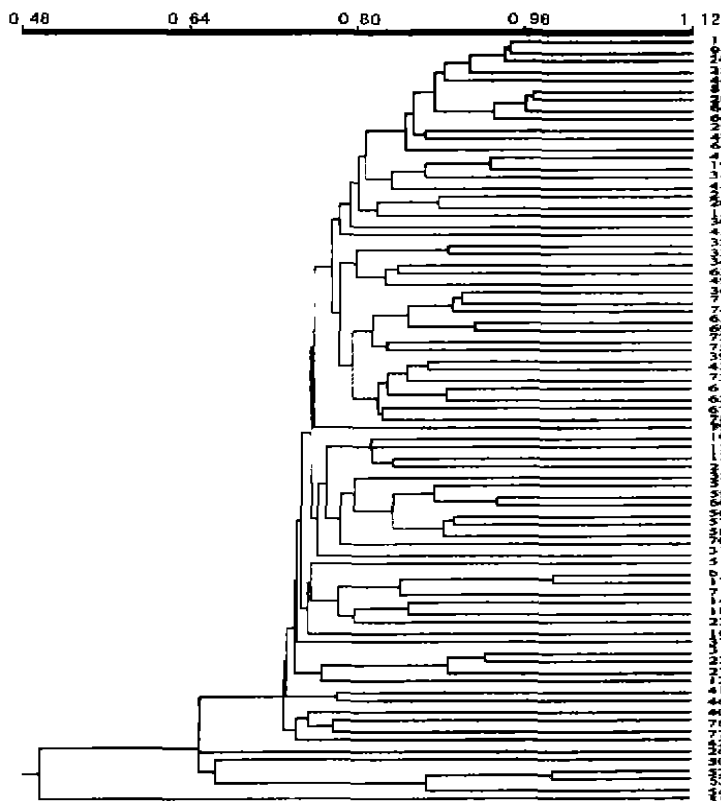


图 2 柚类 RAPD 标记多态性 UPGMA 分析树形图

Fig. 2 Dendrogram of polymorphic RAPD markers of pomelo cultivars, grapefruit cultivars and Hongte Papeda (*C. hongheensis*) using UPGMA

以上分枝图中,每一分枝横线对应一个柚类品种如下: 1 梁平柚 1 号 Liangpingyou 1; 9 毛化红柚 Mahuahongyou; 24 菊花心沙田柚 Juhua xinshatianyou; 25 冬瓜圈沙田柚 Dongguaquanshhatianyou; 44 彭县暹罗柚 Pengxianxianluoyou; 8 合江柚 Hejiangyou; 28 岭南沙田柚 Lingnanshhatianyou; 64 梅州金柚 Meizhoujinyou; 66 软枝沙田柚 Ruanzhishhatianyou; 29 段氏柚 Duanshiyou; 47 福建文旦 Fujianwendan; 68 沙田柚早熟株 Prematured Shatianyou; 4 垫江红心柚 Dianjianghongxinyou; 19 夔府红心柚 Kuifuhongxinyou; 38 Reinking; 48 坪山柚 Pingshanyou; 2 梁平柚 2 号 Liangpingyou 2; 20 冰糖柚 Bingtangyou; 15 通贤柚 Tongxianyou; 30 无核沙田柚 Wuheshhatianyou; 45 缅甸柚 Burma pomelo; 32 安江香柚 Anjiangxiangyou; 33 安江橙 Anjiangchen; 34 安江红心柚 Anjianghongxinyou; 63 泰国柚 Thailand pomelo; 49 孟古文旦 Mengguwendan; 36 金兰柚 Jinlanyou; 71 水晶柚 Shuijingyou; 74 金兰柚 Jinlanyou; 65 梅花早柚 Meihuazaoyou; 69 白富早柚 Baigongzaoyou; 72 白芽柚 Baiyayou; 75 桑麻柚 Sangmayou; 39 Chandler; 43 暹罗蜜柚 Xianluomiyou; 73 丝线柚 Sixianyou; 61 瑄溪蜜柚 Guanximiyou; 62 渡口蜜柚 Dukoumiyou; 67 沙田柚变异株 Shatianyou mutant; 78 酸柚(砧木) Suanyou (root-stock); 79 酸柚(半野生) Suanyou (semi-wild); 10 鹤魁柚 Gunkuiyou; 11 大板图柚 Taijituoyou; 13 金堂绿柚 Jintangluyou; 21 遂溪柚 Pengxiyou; 35 甜柚 Tianyou; 51 楚门文旦 Chumenwendan; 59 香蜜柚 Xiangmiyou; 60 扁形文旦 Bianxingwendan; 56 四季抛(1) Sijipao 1; 57 四季抛(2) Sijipao 2; 58 四季抛(3) Sijipao 3; 70 砧板柚 Zhenbanyou; 31 金香柚 Jinxiangyou; 5 北碚柚 Beibeiyou; 6 金堂无核柚 Jintangwuheyu; 17 江北无核柚 Jiangbeiwuheyu; 7 金堂薄皮柚 Jintangbaopiyou; 14 夔柚 Kuyou; 18 凤凰柚 Fenghuangyou; 23 五布红心柚 Wubuhongxinyou; 16 脐柚 Qiyou; 37 古巴柚 Gubayou; 3 垫江白心柚 Dianjiangbaxinyou; 22 江津红心柚 Jiangjinhongxinyou; 27 垫江沙田柚 Dianjiangshhatianyou; 12 龙安柚 Longanyou; 41 宜安矮柚 Yianwayou; 46 晚白柚 Wanbaiyou; 40 越南小柚 VietNam pomelo; 76 化州橘红柚 Huazhoujuhongyou; 77 酸柚(授粉树) Suanyou (pollination tree); 42 早熟暹罗柚 Zaoshuxianluoyou; 26 古老钱沙田柚 Gulaoqianshhatianyou; 50 世界蜜柚 Shijiemiyou; 52 马叙葡萄柚 Marsh grapefruit; 53 汤普森葡萄柚 Thompson grapefruit; 54 星路比葡萄柚 StarRuby grapefruit; 55 云南红河橙 Hongte Papeda

过 RAPD 标记研究,可明显区分柚类野生近缘种云南红河橙、柚及葡萄柚三个不同种。柚的各品种中沙田柚系列的绝大部分品种在相似性系数大于 0.80 以上聚为一大类,其他在此水平上聚类比较典型的包括垫江红心柚、夔府红心柚、坪山柚、Reinking 柚聚为一类;金兰柚(江西)、水晶柚、金兰柚(广东)、梅花早柚、白富早柚、白芽柚、桑麻柚聚为一类;Chandler 柚、暹罗蜜柚、丝线柚、瑄溪蜜柚、

渡口蜜柚、沙田柚园变异树、酸柚(砧木)聚为一类;楚门文旦、香蜜柚、扁形文旦、四季抛(1-3)、甜柚聚为一类。在相似性系数 0.90 以上聚为一类的包括梁平柚 1 号、毛化红柚、菊花心沙田柚与冬瓜圈沙田柚;合江柚、岭南沙田柚、梅州金柚与软枝沙田柚;垫江红心柚与夔府红心柚;金堂无核柚与北江无核柚;垫江白心柚与江津红心柚。

根据已知的系谱关系及历史记录,相似性系数在 0.90 以上聚为一类的基本上为无性繁殖变异品系;同一品种的实生树如四季抛 1-3 相似性系数在 0.88-0.89 之间,说明植株间有一定的遗传差异,但介于无性繁殖变异品系与品种间。

2.3 柚类品种 RAPD 特异性分子标记

在所获得的所有 RAPD 扩增带中,部分为不同品种所特有,称为特异性 RAPD 分子标记,是作物品种鉴定的重要分子性状,任意一个或多个特异性 RAPD 分子标记都能作为一个品种的标志性性状。云南红河橙为柚类的野生先头近缘种,亲缘关系相对较远,所以相对于柚类栽培品种存在较多的特异性 RAPD 分子标记,这里不作分析,而主要讨论在柚及葡萄柚的品种鉴定中具有重要意义特异性 RAPD 分子标记。

一般认为葡萄柚由柚演化而来,二者遗传物质具有较高的同源性,但相对于柚而言仍然存在较丰富的特异性 RAPD 分子标记,如 S1-1000(S1 为引物,1000 为扩增片段长度的 bp 数,下同)、S75-2500、S79-2000、S90-1400、S92-1500,基本上为葡萄柚所特有(部分也存在于世界蜜柚中),这也说明葡萄柚作为有别于柚的另一个种的遗传特异性。

作为同一栽培种的柚的各品种间遗传物质同源性更高,但其品种间仍存在丰富的特异性 RAPD 分子标记,如北碚柚的 S8-700、S39-520,世界蜜柚的 S20-1500,古老钱沙田柚的 S39-1300、S73-1800、S75-1600,酸柚(授粉树)的 S42-600,楚门文旦的 S75-2500,龙安柚的 S80-1300,安江红心柚的 S91-1800,金堂薄皮柚的 S92-650 等。以上特异性 RAPD 分子标记为单一品种所特有,即可作为该品种的标志性分子性状。除此以外,存在于两个或几个或一类柚的品种内的 RAPD 分子标记还很多,这里不一一列举。如果将 RAPD 分子标记与传统分类群结合起来,将能更有效地进行柚类品种的鉴定。这里需要说明的是这些特异性 RAPD 标记的对应的 DNA 片段长度是根据标记 DNA(Marker)的估计值,其精确长度及结构,需进一步作遗传分析。考虑到清晰可辨与可重复性,可能低估或漏掉部分柚类品种的 RAPD 特异性遗传标记,要想更加明确其特异性标记,需进一步的重复实验。

3 讨论

3.1 柚类部分品种间的遗传相互关系

沙田柚是我国名优古老品种,通过对其天然杂交、人工杂交及芽变的选育,已形成了包括岭南沙田柚、梅州金柚、菊花心沙田柚、冬瓜圈沙田柚、无核沙田柚、古老钱沙田柚、沙田柚早熟株等多个品种(系)在内的沙田柚系列。从图 2 可以看出,合江柚也应为沙田柚的无性繁殖系;段氏柚被认为是沙田柚的变异品系,却与福建文旦聚为一类,可能为它们间的杂交实生系;生产中发现沙田柚园出现变异树,实际应为酸柚(砧木)混杂;垫江沙田柚及古老钱沙田柚与沙田柚其他品种遗传关系较远,但却保存了沙田柚的部分经济性状,应为人工多次杂交、多次选育而来。梅花早柚应为白

高早柚的变异品系。

金兰柚为广东传统古老品种,被广泛栽培。江西金兰柚、梅州水晶柚与广东珠三角金兰柚应为其实生变异;文旦柚包含多个品种,福建浙江一带广为种植,除部分文旦类品种聚类外,大部分遗传关系较远,所以文旦虽为一大类,实际只是当地对柚的习惯称谓。

美洲柚的三个品种古巴柚、Reinking、Chandler,相互间遗传关系疏远,难成一类,很明显来源各不相同,但一般认为美洲柚来源于亚洲^[1]。除古巴柚自成一类,其来源不确定外,Reinking 与中国的夔府红心柚、垫江红心柚遗传关系较近,说明其应来源于中国;而 Chandler 与暹罗蜜柚聚为一类,说明其祖先应在泰国。

另外,有的柚品种游离在柚的大的聚类群之外,如古老钱沙田柚、世界蜜柚,它们为实生变异,但其父系来源不清,推测为柚与其他柑桔属植物的种间杂种(系)。

3.2 柚的品种与其近缘物种云南红河橙及葡萄柚的相互关系

柚 *Citrus maxima* (Burm.) Merr. 为柑桔属的一个种,目前尚未发现其野生种,所以有人对其种的地位提出质疑,但从其野生近缘种云南红河橙及栽培近缘种葡萄柚与柚的遗传相互关系的 RAPD 标记研究来看,种内聚合良好,种间分异明显,为柚的种的地位奠定了不可动摇的遗传学基础。另一方面,有人将柚的品种上升到种的地位,似乎又夸大了柚品种间的遗传差异^[9]。

3.3 柚的品种聚类与传统分类的相互关系

几乎所有的沙田柚及其衍生品种,品系、类型在相似性系数 0.80 聚在一类;楚门文旦、香蜜柚、扁形文旦、四季抛(1-3)、甜柚在此水平上聚类,主要为文旦类品种;古老钱沙田柚、世界蜜柚为实生变异品种,但其父系来源不清,推测为柚与其他柑桔属植物的种间杂种,游离在柚的大的聚类群之外,但已知的种间杂种夔柚却并未游离,原因有待进一步探讨。一般将中国柚按大的品种群可分为沙田柚、文旦柚和杂种柚(种间),但有意见认为文旦柚品种群应细分为真正文旦柚和普通柚两类^[9],这与 RAPD 标记分析所反映的遗传相互关系在一定程度上相辅相成。

参考文献:

- [1] 叶荫民. 柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 种质多样化中心的探讨 [J]. 中国南方果树, 1997, 26(1):3-5.
- [2] 方德秋,章文才,肖顺元. 应用同工酶进行柑橘分类和进化研究 [J]. 植物分类学报, 1993, 31(4):329-352.
- [3] 叶荫民,刘晓东,丁紫琴,等. 云南红河橙—柑桔属大翼橙亚属的一个新种 [J]. 植物分类学报, 1976, 14(1):57-59.
- [4] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(6):1349.
- [5] Rohlf F J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80 [M]. New York: Exeter Software, Setauket, 1993.
- [6] 张太平,李丹,彭少麟,等. 柚类种质资源 RAPD 标记研究的引物筛选 [J]. 广西植物, 2000, 20(4):313-318.
- [7] 柳子明. 柑桔类(Citrus Fruits)的起源和发展 [J]. 湖南农学院学报, 1983, 4:71-76.
- [8] 曾勉. 对柑橘分类的认识体会和整理意见 [J]. 中国果树, 1960, (2):31-37.
- [9] 何大富. 中国柚类栽培 [M]. 北京:中国农业出版社, 1999, 7-48.