

# 西藏酸橙资源发掘及遗传多样性分析

陶丽雯<sup>1</sup>, 曾秀丽<sup>2</sup>, 红 英<sup>2</sup>, 李媛蓉<sup>2</sup>, 邓秀新<sup>1</sup>, 柴利军<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850032)

**摘 要:**以西藏一份新发现的酸橙资源为材料, 对其生理指标和遗传背景进行了鉴定。结果表明, 西藏酸橙单果重 40.8 ~ 58.7 g, 果实横径 47.06 ~ 53.88 mm, 纵径 36.73 ~ 46.04 mm, 单胚率 75 %, 可溶性固形物为 13.88 %, 可滴定酸为 7.49 %, 与其他 9 种酸橙材料相比有高糖、高酸的特点。对西藏酸橙果实进行全基因组重测序分析, 得到 18.2G 的原始测序数据, 经过滤质控处理后, 基于“Citrus ID”平台, 对西藏酸橙的遗传背景进行了分析, 结果显示其遗传背景主要为橘柚杂交, 且占比高达 68.38 %, 推测西藏酸橙的遗传背景较为纯合。对西藏酸橙进行 S-RNase 基因特异 PCR 扩增, 其中 S2 标记有条带显示, 表明西藏酸橙可能含有 S2 基因型。

**关键词:**酸橙; 种质鉴定; 全基因组重测序; 遗传背景

**中图分类号:**S666.4 **文献标识码:**A

## Exploitation and Genetic Diversity Analysis of Tibetan Sour Orange Germplasm

TAO Li-wen<sup>1</sup>, ZENG Xiu-li<sup>2</sup>, HONG Ying<sup>2</sup>, LI Yuan-rong<sup>2</sup>, DENG Xiu-xin<sup>1</sup>, CHAI Li-jun<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education), Huazhong Agricultural University, Hubei Wuhan 430070, China;  
2. Institute of Vegetables, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

**Abstract:** Sour orange (*Citrus aurantium* L.) is widely distributed in the south of China and has a long history of cultivation. It is often used as a rootstock for sweet orange and Mandarin in production, and it also has great application potential in the exploration and genetic improvement of citrus germplasm resources. This study explored and identified physiological traits and genetic background of a new sour orange resource collected from Tibet. We evaluate the traits including fruit weight, fruit diameter and length, pericarp thickness, total soluble solids and titratable acidity, embryony characteristic. The results showed that the fruit weight of Tibetan sour orange was 40.8 ~ 58.7 g, the fruit diameter was 47.06 ~ 53.88 mm, the fruit length was 36.73 ~ 46.04 mm, the monoembryony rate was 75 %, the average total soluble solids was 13.88 %, the average titratable acidity was 7.49 %, compared with the other 9 types of sour orange materials, it has the characteristics of high brix and high titratable acidity. About 18.2G raw bases data were obtained via whole genome resequencing of Tibetan sour orange. After processing, the genetic background analysis was carried out using ‘Citrus ID’. The results showed that the genetic background of Tibetan sour orange was mainly hybrid from orange and pomelo, the proportion was as high as 68.38 %, which can be speculated that the genetic background of Tibetan sour orange is more homozygous than others. After S-RNase gene PCR amplification of Tibetan sour orange, only S2 marker showed a band, indicating that it may contain S2 genotype.

**Key words:** Sour orange; Germplasm identification; Whole genome resequencing; Genetic background

收稿日期: 2020 - 10 - 12

**基金项目:**国家重点研发项目多年生园艺作物无性系变异和繁殖的基础与调控课题“芽变的基因组基础与变异机制”(20418YDF1000101)西藏柑橘资源收集评价;第二次青藏高原综合科学考察研究课题植物多样性可持续利用与评估(2019QZKK0502)子课题“传统农业植物资源调查与研究评估”(2019QZKK05020302)

**作者简介:**陶丽雯, 华中农业大学林学院园艺学院 2019 届本科毕业生; \* 为通讯作者: 柴利军(1983 - ), 男, 副教授, 研究方向果树种质资源与遗传育种, E-mail: chailijun@mail.hzau.edu.cn。

酸橙有悠久的历史, 在我国至少有 800 年以上的栽培历史, 有入药、作砧木、提取香精、供赏玩等用途<sup>[1]</sup>。酸橙在我国分布较广, 其中湖南地区分布较多, 特别是湖南沅江、大庸、泸溪及邵阳等地<sup>[2]</sup>。较常见的酸橙品种有代代, 福建、江苏栽培较多, 适应能力强, 但不耐霜冻, 是一种重要的香料植物, 其花蕾可制香茶; 兴山酸橙, 湖北地方品种, 耐旱, 病虫害少, 用作甜橙砧木可起到矮化和改进果实品质的作用, 但对衰退病敏感, 也可用作中药材“枳壳”。郭

天池等在西藏进行柑橘资源考察后,发现西藏有丰富的柑橘资源,存在野生和半野生状态的类型,主要分布于雅鲁藏布江下游的河谷台地,其中有未记录过的类型,但起源不明,在我国其他地区也未曾见过<sup>[3]</sup>。

本研究的西藏酸橙是西藏自治区农牧科学院2018年前后多次在西藏察隅田野调查中发现的味酸而苦涩、果皮有香味的百年酸橙种质资源,于2019年对其形态及生理性状进行了初步分析,基于重测序技术对该种质资源的遗传背景进行了研究,用S-RNase基因特异分子标记对其进行鉴定分析,为进一步了解、改良、开发与利用该酸橙资源提供理论依据,同时也为柑橘种质资源的遗传改良和挖掘提供优良的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

2018年12月至2019年3月分别从西藏察隅县采集并邮寄至实验室的西藏酸橙果实及叶片材料,以及由华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室提供的黄皮酸橙、江津酸橙、秭归酸橙、意大利酸橙、小叶酸橙、德弗和桤酸橙等材料。

1.2 方法

1.2.1 资源保存 (1)种子处理:用1 mol/L的NaOH溶液浸泡种子5~10 min,以去除果胶。播种前可以将种皮剥去,使种子更快发芽。

(2)将种子放于湿润的纱布上,并在种子上盖一层纱布,置于28℃培养箱中培养,隔2 d浇一次水。

(3)将发芽的酸橙种子移至育苗杯中,置于培养室中保存。

1.2.2 酸橙果实常规品质测量及拍照 (1)用游标卡尺对果实的横径、纵径、果皮厚进行测量。

(2)用电子天平称量单果重、种子重。

(3)记录果实的囊瓣数、种子数量。

(4)用糖度计、酸度计测定果实可溶性固形物、可滴定酸含量。

(5)用Canon 550D单反相机,配备镜头Canon18-55mm,对果实、种子等进行拍照。

(6)观察并记录胚的类型,并在体式显微镜下对胚进行拍照。

(7)在《柑橘资源数据登记表》中记录西藏酸橙资源的各项指标。

将测量所得数据录入Excel中,对各项表型性状的数据进行统计、分析。

1.2.3 酸橙DNA提取 应用实验室的改良CTAB大量法(Cheng, et al., 2003)提取西藏酸橙果实DNA,用于全基因组重测序及S-RNase基因特异分子标记鉴定。另用CTAB少量法提取黄皮酸橙、江津酸橙等9种酸橙材料的DNA,用于S基因分子标记鉴定,与西藏酸橙进行对比。

1.2.4 DNA质量检测 (1)紫外分光光度计检测:取DNA样品,使用仪器NanoDrop ND1000微量紫外可见分光光度计和配套软件NanoDrop 1000, Nucleic Acids模式检测DNA样品的浓度以及在230、260和280 nm的吸光值。高质量DNA的指标:OD<sub>260/230</sub>在2.0~2.5, OD<sub>260/280</sub>在1.8~2.0。

(2)琼脂糖凝胶电泳检测:将提取的DNA样品稀释到200 ng/μL左右,配制1%琼脂糖凝胶(需加入核酸染料),120 V电泳20 min,结束后在凝胶成像系统中观察结果。高质量DNA的指标:条带整齐且明亮,无严重弥散现象,下方没有或者只有不明显的条带。

1.2.5 重测序数据处理与分析 对原始测序数据进行过滤质控处理有利于后续的下游分析。获得高质量的西藏酸橙测序数据后,用“Citrus ID”平台检

表1 9对S基因引物信息

编号	引物名称	前引物	后引物
1	CgRNS1	TTCCTGCAATTCCTCGGGTG	CGGATCATGTCCGTCGGTAG
2	CgRNS2	GGCCACATGGCTATTGCTTG	GTTTGCTTGGACACCTACGC
3	CgRNS3	CGTCGGGATTCCACCACCTTT	TCGGAGCAGGGAACCTGATG
4	CgRNS4	GAGCTGGCCACCTGTCTATT	CTGCCATGCTGTTCCTCACTC
5	CgRNS5	CGTTCTTCATGGCCTCTGGC	TCTAGGGGCTCGTGTGAAAA
6	CgRNS6	GCCTCTGGCCCGTAAATCT	TACCGCACGTAGTTGATCCC
7	CgRNS7	TCGTCTACATGGCCTCTGG	CCCCACAGTCTCGGTTTTC
8	CgRNS8	GCGCCCCGAAATGTATCAAGG	CACCACCTGTTGTTGAGCAC
9	CgRNS9	GCCACTCGACTTCGTCTCTAC	CAGTCTGATAGCCGCTTGA

测西藏酸橙的遗传背景。

1.2.6 S-RNase 基因特异分子标记鉴定 用 9 对 S-RNase 基因特异引物(表 1),对西藏酸橙、代代酸橙、黄皮酸橙、江津酸橙、秭归酸橙、意大利酸橙、小叶酸橙、德弗和桠酸橙、高橙、枸头橙共 10 种酸橙进行 S 基因的分子标记鉴定。

配制 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系,包括 Mix10  $\mu\text{L}$ ,前引物、后引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , $\text{ddH}_2\text{O}$  8  $\mu\text{L}$ ,在 PCR 仪上设定反应程序,进行 PCR 反应。PCR 反应完成后,电泳检测结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 西藏酸橙资源描述

西藏酸橙植株的树姿开张,树体高大,树龄较大。西藏酸橙叶片为椭圆形,翼叶不明显,呈线形,果实为高扁圆形,果基微凹,果顶有凸环,果皮为橙色,果面粗糙,油胞密度中等,果顶有印环,剥皮较难,果心充实,白皮层为黄白色,果肉为橙色。

细嫩,汁水较多,味道极酸、苦而涩,可食性差(过熟落地后人和动物均不取食),果实有香味(图 1~2)。西藏酸橙种子较多,单多胚混杂,其中单胚类型较多,子叶为乳白色(图 2)。

### 2.2 酸橙果实常规品质分析

对西藏酸橙果实的单果重、横径、纵径、果形指数、果皮厚度、囊瓣数、果皮色差值、种子数、种子重、叶长、叶宽、叶形指数、糖度、酸度、固酸比共 15 个性状的极值、平均值、标准差、变异系数等数据进行统计分析(表 2)。结果显示,15 个性状的变异系数  $c.v.$  值介于 0.01 % ~ 0.23 %,变异系数较小。西藏酸橙果皮的色差值 RL、Ra、Rb 均为正值,分别说明果皮颜色比标准板偏亮、偏红、偏黄。西藏酸橙平均可溶性固形物含量为 13.88 %,平均可滴定酸含量为 7.49 %,将其与柳俊杰研究中巴西酸橙、蚌柑、城固酸橙等共 9 种其他酸橙类型的可固、可滴定酸含量进行比较和单样本  $T$  检验分析<sup>[4]</sup>,发现西藏酸橙的可固含量最高,且与其他 9 种酸橙呈极显著差异,

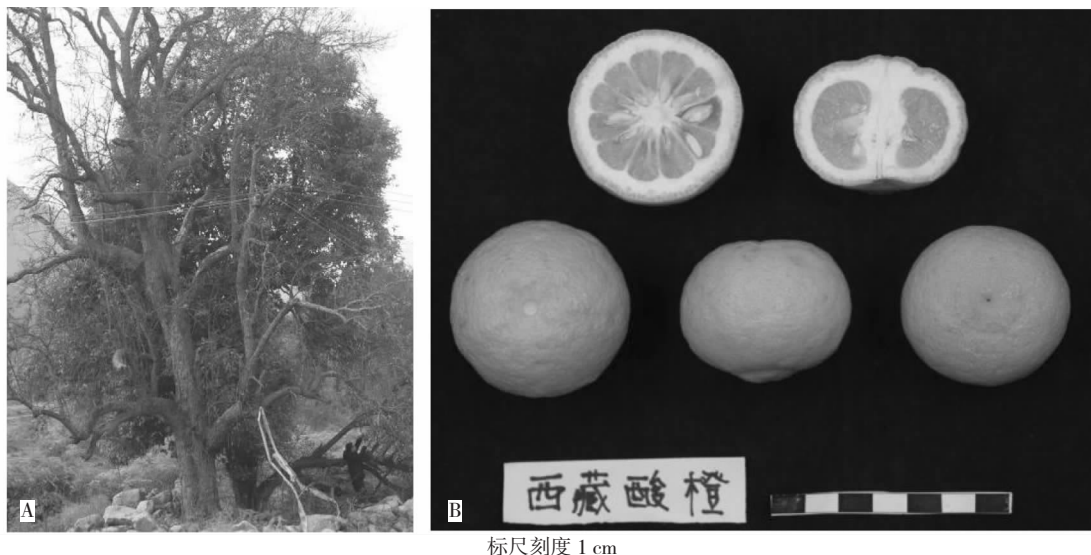


图 1 西藏酸橙植株和果实的外观形态(A:西藏酸橙植株;B:西藏酸橙果实)

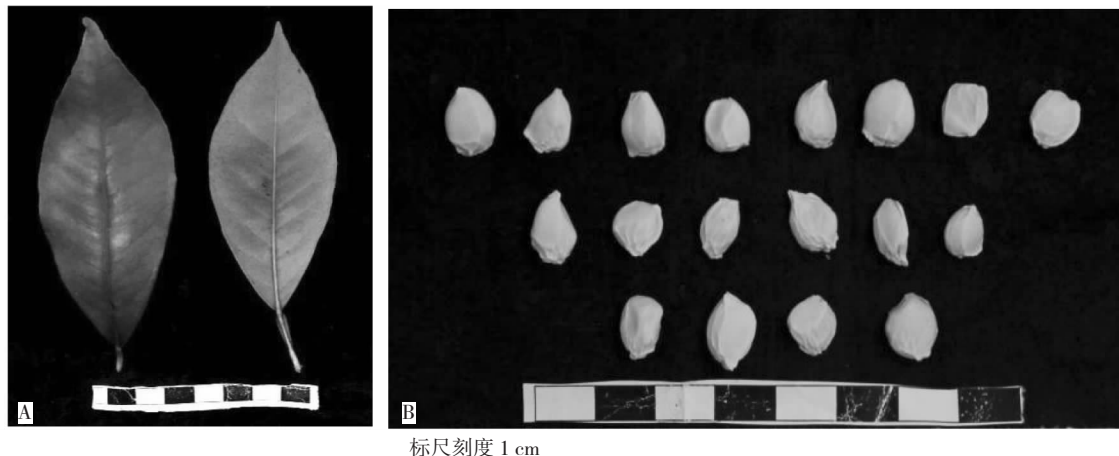


图 2 西藏酸橙叶片和种子的外观形态(A:西藏酸橙叶片;B:西藏酸橙种子)

表 2 西藏酸橙 15 个性状数据分析

性状	最小值	最大值	平均值 ± 标准差	中位数	变异系数(%)
单果重(g)	40.80	58.70	48.01 ± 6.16	46.30	0.13
横径(mm)	47.06	53.88	49.52 ± 2.04	48.86	0.04
纵径(mm)	36.73	46.04	40.68 ± 3.09	39.97	0.08
果形指数	0.75	0.90	0.82 ± 0.05	0.81	0.06
果皮厚度(mm)	3.80	7.22	5.23 ± 0.90	5.18	0.17
囊瓣数	10	11	10.40 ± 0.52	10	0.05
果皮色差值 RL	74.12	75.76	74.70 ± 0.52	74.54	0.01
果皮色差值 Ra	11.98	14.63	13.29 ± 0.76	13.32	0.06
果皮色差值 Rb	13.67	16.15	14.63 ± 0.76	14.48	0.05
种子数(饱满)	6	13	9.86 ± 2.27	10	0.23
种子重(g)	0.15	0.19	0.17 ± 0.02	0.17	0.10
叶长(mm)	84.20	117.60	101.77 ± 10.91	100.20	0.11
叶宽(mm)	39.80	72	50.40 ± 9.86	49.85	0.20
叶形指数	1.56	2.36	2.06 ± 0.27	2.12	0.13
可溶性固形物(%)	13.70	14.20	13.88 ± 0.19	13.80	0.01
可滴定酸(%)	7.20	7.88	7.49 ± 0.26	7.44	0.03
固酸比	1.74	1.97	1.85 ± 0.09	1.85	0.05

西藏酸橙的可滴定酸含量最高,与其他 8 种酸橙呈极显著差异,与枸头橙无显著差异,表明西藏酸橙是一种含糖、高酸的酸橙品种(图 3)。西藏酸橙的固酸比较小,与其果味酸苦的特点相符。

从若干西藏酸橙果实中随机选取饱满种子 81 颗,观察并统计其单多胚情况(图 4 和表 3),得到单胚种子 61 颗,占比 75 %,含有 2 个胚的种子 7 颗,3 个胚的种子 5 颗,4 个胚的种子 7 颗,5 个胚的种子 1 颗,占总数百分比分别为 9 %、6 %、9 %、1 %,说明在西藏酸橙种子中,主要为单胚类型,多胚类型较少。

2.3 DNA 样品质量检测

用微量紫外可见分光光度计检测提取的西藏酸橙、黄皮酸橙、江津酸橙、秭归酸橙等的 DNA 样品质量。10 份酸橙 DNA 样品的浓度符合要求,意大利

酸橙、高橙、枸头橙 DNA 样品的 OD<sub>260/280</sub> 值偏高,说明样品中含 RNA 杂质较多,德弗和桤酸橙、高橙、枸头橙的 OD<sub>260/230</sub> 值偏低,说明样品中有多糖或有机试剂污染。电泳检测 DNA 样品质量,可观察到 DNA 样品条带。DNA 样品质量为 A 类,总量及质量均满足后续建库要求。

2.4 重测序数据质量控制

西藏酸橙 DNA 样品进行重测序后,共产出 Raw Bases 18.2G,过滤后得到 Clean Bases 17.9G,产出 Raw Reads 130629220,过滤后得到 Clean Reads 128243064,Q30 质量均大于 93 %,低质量数据占 0.51 %,数据质量较好。

使用 FastQC 对西藏酸橙的重测序数据进行质量评估,比较过滤前后序列的质量(图 5),结果显示数据整体质量较好,可以用于进行后续的下游分析。

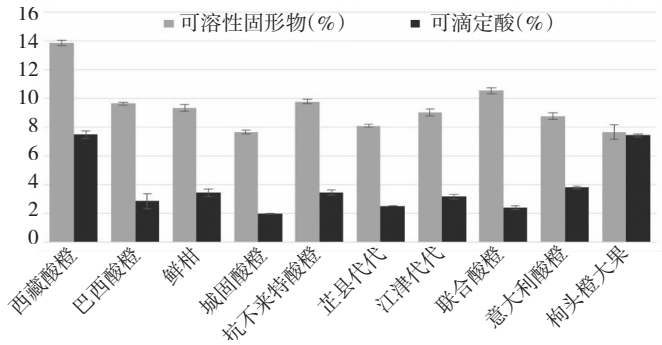


图 3 不同酸橙类型可溶性固形物、可滴定酸含量比较

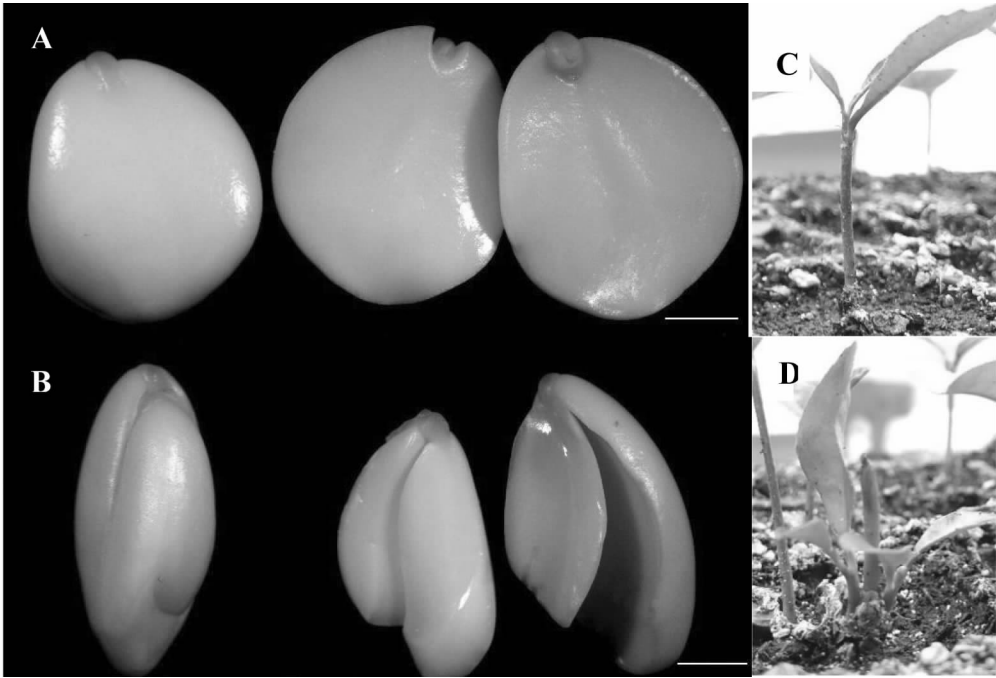


图 4 西藏酸橙单、多胚种子和实生苗 (A:单胚种子;B:多胚种子;C:单胚苗;D:多胚苗)

表 3 西藏酸橙单多胚数量统计

胚数量	1	2	3	4	5	总数
统计数量	61	7	5	7	1	81
比例	0.75	0.09	0.06	0.09	0.01	

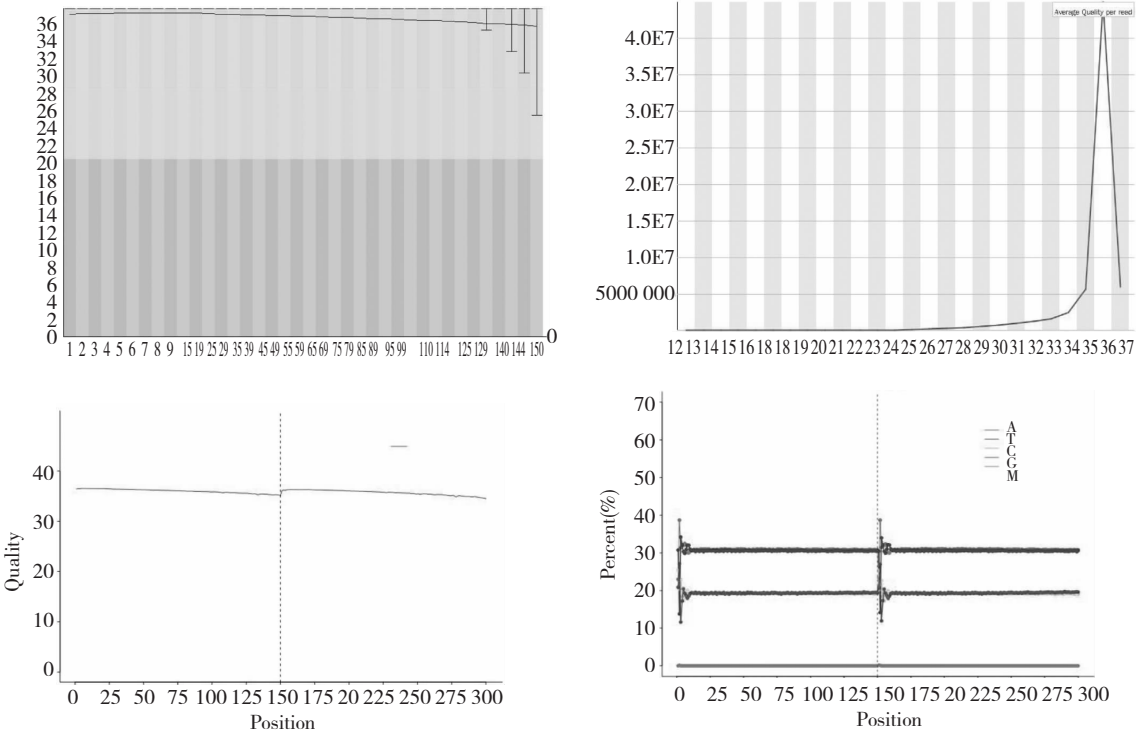
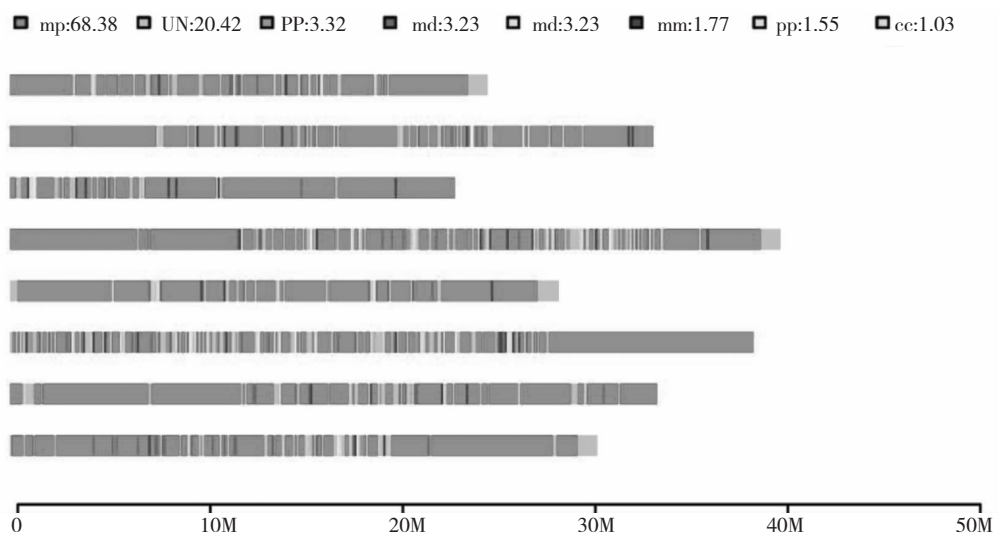


图 5 FastQC 进行质量评估的部分图示

2.5 西藏酸橙遗传背景分析

用 Trimmonmatic 对重测序数据进行切除接头序列、过滤低质量序列处理后,得到高质量的测序数

据,将其导入“Citrus ID”平台,进行西藏酸橙遗传背景的检测。检测结果显示,西藏酸橙的遗传背景主要是橘×柚,高达 68.38 % ,其次是未知成分,占



1. mp 表示橘×柚；2. UN 表示未知；3. PP 表示枳壳；4. md 表示橘×枸橼；5. FF 表示金柑；6. mm 表示橘；7. pp 表示柚；8. CC 表示宜昌橙

图 6 西藏酸橙“Citrus ID”检测结果

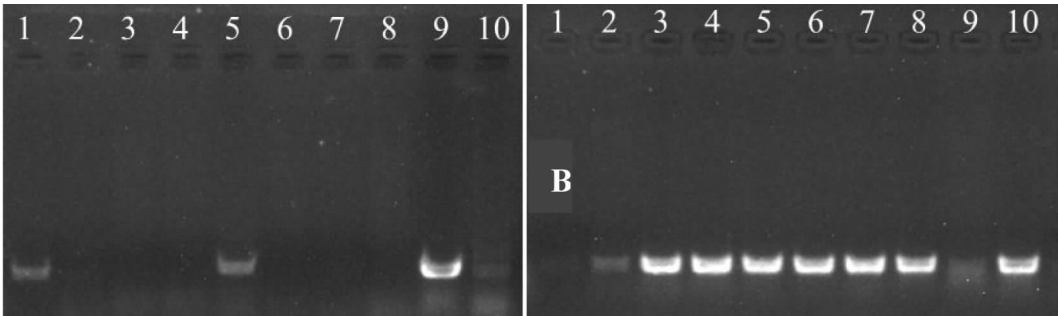


图 7 部分 S-RNase 基因分子标记胶图 (A:S2 标记；B:S4 标记)

20.42 % ,此外还有极少量的枳壳纯合位点、橘×枸橼、金柑纯合位点、橘纯合位点、柚纯合位点、宜昌橙纯合位点,占比分别为 3.32 %、3.23 %、1.8 %、1.77 %、1.55 % 和 1.03 %。该结果证明,西藏酸橙是橘柚杂交的后代(图 6)。

2.6 S-RNase 基因特异分子标记鉴定结果

用 9 对 S-RNase 基因特异引物,以 10 份酸橙材料的 DNA 样品为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测,点样孔从 1~10 的样品分别是西藏酸橙、代代酸橙、黄皮酸橙、江津酸橙、秭归酸橙、意大利酸橙、小叶酸橙、德弗和桤酸橙、高橙、枸头橙。检测结果显示,西藏酸橙 DNA 样品只扩增出 S2 标记,同样扩增出 S2 标记的还有秭归酸橙和高橙。9 个标记中,有 7 种酸橙的 DNA 样品都扩增出了 S4 标记,其次是 S7 标记,有 4 种酸橙 DNA 样品扩增出了该标记的条带(图 7)。具体检测结果汇总见表 4。

3 讨 论

柑橘果实的糖、酸含量及其转化对果实风味品

表 4 电泳检测结果汇总

酸橙材料	扩增出的标记类型
西藏酸橙	S2
代代酸橙	S7
黄皮酸橙	S3, S4
江津酸橙	S4, S9
秭归酸橙	S2, S4
意大利酸橙	S4, S7
小叶酸橙	S4, S7
德弗和桤酸橙	S4, S7
高橙	S2, S5
枸头橙	S4, S7

质有较大影响,因此研究柑橘果实糖、酸含量变化规律,挖掘控制柑橘糖、酸合成及转化的基因有重要意义。Strazzer 等<sup>[5]</sup>发现了 CitPH1 和 CitPH5 两种柑橘基因,这些基因编码转运蛋白,将氢离子泵入液泡,从而增强细胞酸度。该研究还显示了几种抑制 CitPH1 和 CitPH5 表达的甜味特征突变。西藏酸橙果实有高糖、高酸的特点,是作为糖、酸基因挖掘及

糖酸转化机制研究的优良材料。

前人对于柑橘亲本类型和来源的分析多使用 DNA 分子标记<sup>[6]</sup>。本研究利用全基因组重测序数据,对在西藏地区发现的一种新的酸橙种质资源进行鉴定,通过“Citrus ID”平台的分析,发现西藏酸橙表现出橘柚杂交的特性。西藏酸橙树龄较大,与柳俊杰研究中的部分酸橙材料遗传背景检测结果相比<sup>[4]</sup>,西藏酸橙橘柚杂交组分的占比较高,可以推测西藏酸橙的遗传背景较为纯合,是一种较为古老的酸橙种质资源,可以作为酸橙起源及遗传演化的重要研究材料。本研究还未深入分析西藏酸橙的具体亲本类型,后期需围绕此问题开展深入的研究工作。

因该西藏酸橙植株周围未发现其他柑橘植物,而我们在统计其种子数时发现,西藏酸橙有较多饱满的可萌发的种子,因此推测它有可能是自交亲和的。S 基因型鉴定结果显示,西藏酸橙可以扩增出 S2 标记,而在较多其他酸橙中可以扩增出的 S7、S4,西藏酸橙均没有扩增出来,说明西藏酸橙种质较为特别,可能含有 S2 基因型,但它是 S2 纯合还是另有一种未知的 S 基因型,还未研究。

为进一步研究和利用西藏酸橙种质资源,建议后续从以下几个方面开展研究:

(1)测定西藏酸橙果实中含有的各种化学成分

类型和组成。

(2)西藏酸橙糖、酸基因挖掘。

(3)根据西藏酸橙的遗传背景分析结果,后续研究中可结合橘、柚及其杂交种等的基因组数据,对西藏酸橙的遗传进化进行更深入的分析。

(4)深入研究西藏酸橙自交亲和机制及基因型演化。

(5)继续考察西藏地区一些有栽培历史的柑橘种质及野生或半野生的种质,加以收集、保存和利用,这对保护当地重要柑橘资源和研究柑橘起源进化均有重要意义。

#### 参考文献:

- [1]周开隆,叶荫民. 中国果树志·柑橘卷[M]. 北京:中国林业出版社, 2010: 341-344.
- [2]肖润林,李玲,陈朝明. 酸橙的利用价值及其柚苷含量的研究[J]. 农业现代化研究, 1987(5): 49-52.
- [3]郭天池,李荣. 西藏柑桔资源[J]. 中国柑桔, 1988(1): 3-5.
- [4]柳俊杰. 酸橙资源发掘及遗传多样性分析[D]. 武汉:华中农业大学,2018.
- [5]Strazzer P, Spelt C E, Li S J, et al. Hyperacidification of Citrus fruits by a vacuolar proton-pumping P-ATPase complex[J]. Nature Communications, 2019, 10: 744.
- [6]龚桂芝,洪棋斌,彭祝春,等. 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[J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1742-1750.