橘核遗传多样性与柠檬苦素类化合物含量的相关性分析

胡 静，王 黎，裴 瑾*，陈 江，吴清华，陈君玉

成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地，四川 成都 611137

摘 要：目的 研究橘核种质资源遗传多样性与柠檬苦素类化合物含量的相关性，为筛选橘核的主要基原品种提供参考。**方法** 以四川不同产地、不同品种的 35 份橘核样品为材料，首先利用 NTSYSpc2.10e 软件对 ISSR 标记结果进行多态性分析；再采用 UPLC 法测定橘核样品中柠檬苦素类化合物（柠檬苦素、诺米林、黄柏酮）的含量；最后通过 SPSS 21.0 软件对二者数据进行相关性分析。**结果** 筛选出的 33 条 ISSR 引物共扩增出 240 条清晰可辨 DNA 带，遗传相似系数变化范围为 0.72～0.92；其中椪柑与大红袍亲缘关系最近，且柠檬苦素类化合物含量类似，而其余品种橘核与大红袍亲缘关系较远，柠檬苦素类化合物含量差异较大。**结论** 与大红袍亲缘关系越接近的品种其类柠檬苦素含量越高，可考虑将椪柑作为橘核的主要基原品种。

关键词：橘核；遗传多样性；柠檬苦素类化合物；相关性；基原品种

中图分类号：R282.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2018)03 - 0678 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.025

Correlation analysis between genetic diversity and limonin compounds content of *Citri reticulatae* Semen

HU Jing, WANG Li, PEI Jin, CHEN Jiang, WU Qing-Hua, CHEN Jun-Yu

The State Key Laboratory Breeding Base of TCM Resources Research and Development, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the correlation between the genetic diversity and limonin compounds content of *Citri reticulatae* Semen germplasm resources in Sichuan to provide a reference for screening the main source varieties of *C. reticulatae* Semen. **Methods** Firstly, NTSYSpc2.10e software was used to analyze the ISSR markers results of 35 *C. reticulatae* Semen samples from different habitats and different varieties in Sichuan. Then, UPLC was used to determine the contents of limonin compounds (limonin, nomilin, and obacunone). Finally, all the results were analyzed by SPSS 21.0 software. **Results** A total of 240 clear and detectable DNA bands were generated from 33 ISSR primers, and the variation range of genetic similarity coefficient were 0.72—0.92. *Citrus reticulate* 'Ponkan' and *C. reticulate* 'Dahongpao' have the closest relationship and their Limonin compounds contents were similar, but the relationship between other varieties and *Citrus reticulate* 'Dahongpao' was far and limonin compounds contents had great difference. **Conclusion** The relationship of variety is closer to the *C. reticulata* 'Dahongpao', the content of limonin compounds is higher, and *Citrus reticulate* 'Ponkan' could be considered as the main source variety of *Citri reticulatae* Semen.

Key words: *Citri reticulatae* Semen; genetic diversity; limonin compounds; correlation; source varieties

橘核为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟种子，具有理气、散结、止痛的功效，现代临床主要用于治疗急性乳腺炎、乳腺增生[1]等疾病，其药用价值受到重视。研究表明橘核的主要有效成分为柠檬苦素类化合物[2]，该类化合物具有抗肿瘤[3-4]、抑制 HIV[5]、消炎镇痛[6]、抗氧化[7]、昆虫拒食[8]等多种作用，有良好的开发应用前景。而作为柑橘主产区的四川历年来都以大红袍 *Citrus reticulate* Blanco 'Dahongpao' 作为橘核的主要基源品种。由于橘是世界第一大水果，为了迎合市场消费的需求，逐渐出现了无核或者橘核相对较少的新品种，如椪柑 *Citrus reticulata* 'Ponkan'、血

收稿日期：2017-07-11

基金项目：国家自然科学基金人才项目（J131003340-13）；四川省科技厅项目（2015TD0028）

作者简介：胡 静，女，在读硕士，研究方向为中药资源开发与利用。Tel: 18380455368 E-mail: 1114983816@qq.com

***通信作者** 裴 瑾，女，教授，博士生导师，研究方向为中药品质与资源开发。Tel: 13880369322 E-mail: peixjin@163.com

橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Egyptian Blood、宜昌橙 *Citrus ichangensis* Swingle 等。新品种的出现使得传统药用品种大红袍逐渐被市场淘汰，加之新品种是在传统品种的基础上嫁接而生长，使得种质资源混乱，有效成分可能发生变化，质量无法保证，导致临床疗效无法确保。因此，四川地区药用柑橘资源的品种选育和鉴定越发紧迫重要。

随着生物技术的发展，RFLP、AFLP、RAPD、SSR 等分子标记现已用于柑橘种质资源的研究和评价[9]，但存在缺点，如 RFLP 需同位素放射；AFLP 需酶切和连接；RAPD 稳定性、重复性不够好；SSR 操作复杂、成本较高等。而简单序列重复区间扩增多态性（inter-simple sequence repeat，ISSR）标记具有样品用量少、操作简便、成本较低、实验重复性好、多态性高等优点，现已被广泛应用于国内外柑橘种质品种鉴定与遗传多样性研究。如 Fang 等[10]对不同品种柑橘的 68 份材料进行 ISSR 标记分析，结果成功将 33 份甜橙材料区分为 14 个类型，7 份葡萄柚材料区分为个 2 类型，且 29 份宽皮柑橘品种间亦存在极大差异，较容易将其区分为不同的品系和类型。随后 Fang 等[11]又采用该标记技术对 46 份柑橘种质资源的亲缘关系进行研究，所得结果与 Swingle 柑橘属分类系统一致。钟凤林[12]曾利用 14 条 ISSR 引物对分布在福建的 16 份柚类种质资源进行检测，扩增共产生 177 条 ISSR 标记带，其中多态性带 123 条，多态性百分率为 69.49%，能较好地反映各柚类型的遗传差异。黄绿红等[13]利用 ISSR 标记对 16 个湖南主要柑橘品种进行亲缘关系研究，发现橙类中彭娜和纽荷兰亲缘关系最近。刘冰浩等[14]也曾通过 ISSR 对广西地方与野生柑橘种质资源的遗传多样性与亲缘关系进行准确分析与评价。但有关该标记技术在四川柑橘种质资源遗传背景的分析中尚未得到应用。

故本实验旨在采用 ISSR 分子标记对四川不同产地、不同品种橘核样品的遗传多样性进行分析，并与超高效液相色谱（UPLC）所测得柠檬苦素类化合物含量进行相关性分析，为筛选橘核的主要基原品种提供参考。

1 材料

1.1 样品收集

样品于 2015 年 10—12 月采自四川柑橘主产地邛崃、泸州、广元、宜宾、自贡等不同地区，橘叶、果实用无水乙醇清洁后，果实摘取种子，剥去种皮，与橘叶同置于−80 ℃冰箱保存，备用。样本收集具体情况见表 1。

表 1 样品收集情况

Table 1 Sample collection

编号	品种	收集地	收集时间	编号	品种	收集地及产地	收集时间
1	大红袍	邛崃市蒲江县	2015-10-11	19	椪柑	雅安市雨城区	2015-11-11
2	椪柑	邛崃市蒲江县	2015-10-11	20	大红袍	眉山市丹棱县	2015-11-13
3	血橙	邛崃市蒲江县	2015-10-11	21	椪柑	眉山市丹棱县	2015-11-13
4	椪柑	泸州市古蔺县	2015-10-14	22	血橙	眉山市丹棱县	2015-11-13
5	橘橙	广元市苍溪县	2015-10-22	23	金橘	成都市温江区	2015-11-19
6	椪柑	广元市苍溪县	2015-10-22	24	大红袍	资阳市雁江区	2015-11-27
7	大红袍	广元市苍溪县	2015-10-22	25	血橙	资阳市雁江区	2015-11-27
8	大红袍	乐山市犍为县	2015-10-27	26	椪柑	资阳市雁江区	2015-11-27
9	椪柑	乐山市犍为县	2015-10-27	27	椪柑	内江市东兴区	2015-11-28
10	血橙	乐山市犍为县	2015-10-27	28	大红袍	内江市东兴区	2015-11-28
11	大红袍	宜宾市高县	2015-10-30	29	大红袍	南充市高坪区	2015-11-30
12	椪柑 1	宜宾市高县	2015-10-30	30	宜昌橙	南充市高坪区	2015-11-30
13	椪柑 2	宜宾市长宁县	2015-10-31	31	血橙	南充市高坪区	2015-11-30
14	甜橙	宜宾市长宁县	2015-10-31	32	椪柑	南充市高坪区	2015-11-30
15	血橙	宜宾市长宁县	2015-10-31	33	大红袍	遂宁市大英县	2015-12-01
16	大红袍	自贡市荣县	2015-11-01	34	椪柑	江油市义新乡	2015-12-03
17	椪柑	自贡市荣县	2015-11-01	35	大红袍	江油市义新乡	2015-12-03
18	大红袍	雅安市雨城区	2015-11-11				

1.2　仪器

电泳槽（Mini-Subcell GT，美国 Bio-Rad）、凝胶水平电泳仪（Power Pac Basic，美国 Bio-Rad）、凝胶成像系统 EB 室内（Gel DocTM XR＋SOP，美国 Bio-Rad）、PCR 仪（T100TM Thermal Cycler，美国 Bio-Rad）、微波炉（格兰仕）、高速离心机（CTISRE 型，日本 HITACHI 公司）、冷冻离心机（Allegra X-22R，德国 Beckman Coulter 公司）、涡旋震荡仪（Vortex-5，海门市共门贝尔仪器公司）、Agilent 1290 infinity 高效液相色谱系统、Agilent MassHunter 工作站、Agilent UPLC 色谱分析柱、HH-S24S 数显恒温水浴锅（上海君竺仪器制造有限公司）、KQ5200E 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、电子天平（感量 0.01 mg，德国 Sartoius 公司）、色谱柱：ZORBAX SB-C_{18} USPL1 柱（150 mm×3.0 mm，1.8 μm）。

1.3　试剂

植物总 DNA 提取试剂盒（Plant DNA kit，OMEGA 生物公司）、2×Taq PCR MasterMix（天根生化科技有限公司）、ddH_2O（天根生化科技有限公司）、液氮（成都飞克生物科技有限公司）、Gold view（BioBRK）、6×Loading buffer（天根生化科技有限公司）、超纯水（优普超纯水制造系统）、Agarose LE（天根生化科技有限公司）、β-巯基乙醇（上海艾研生物科技有限公司）、冰醋酸（天津市富宇精细化工有限公司）、Na_2EDTA（成都市科龙化工试剂厂）、无水乙醇（成都市科龙化工试剂厂）、石油醚（分析级，美国 Fisher 公司）、甲醇（色谱级，美国 Fisher 公司）、超纯水；对照品柠檬苦素（批号 MUST-14123005）、诺米林（批号 MUST-15040418）、黄柏酮（批号 MUST-15051318）均购自成都曼思特生物科技有限公司，质量分数大于 98%。

2　方法与结果

2.1　遗传多样性分析

2.1.1　DNA 提取与检测　采用 OMEGA 生物公司植物总试剂盒说明书中方法二（适用于新鲜/冷冻样品提取）提取叶片总 DNA，进行 2.0%琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上进行紫外检测，并拍照记录。结果见图 1。35 份橘叶 DNA 条带清晰，亮度高，无明显拖尾和弥散现象，说明 DNA 完整性较好，得率较高。

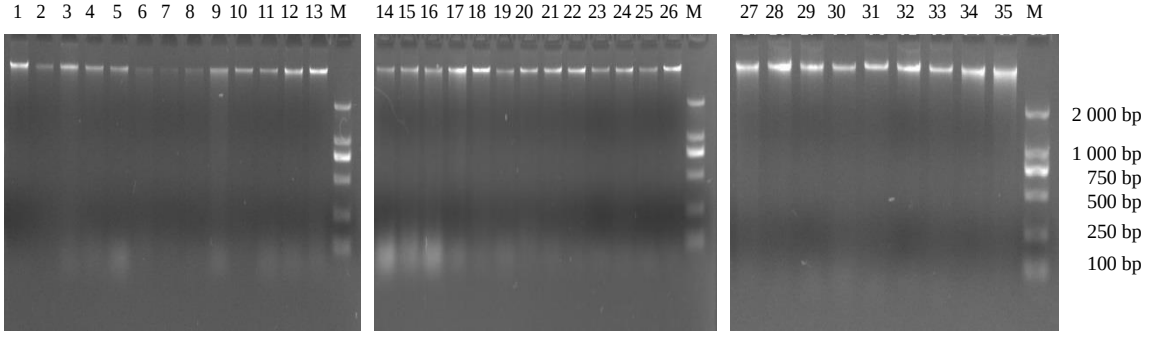


图 1　样品的 DNA 电泳图

Fig. 1　Samples of DNA electrophoresis

2.1.2　引物最佳退火温度确定　反应体系 20 μL，分别包括 DNA 模板 2 μL；2×Taq PCR MasterMix 10 μL，引物 2 μL，ddH_2O 6 μL。采用 PCR 仪进行退火温度梯度试验，逐一确定所筛选引物的最佳退火温度。本实验选用 010 引物，设定退火温度梯度范围（45～55 ℃），自动形成 8 个梯度。扩增程序为 94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s；45～55 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 1.5 min，35 个循环；72 ℃延伸 10 min；12 ℃ Forever。扩增后的 DNA 用 2.0%琼脂糖凝胶进行电泳，紫外检测拍照，确定最佳退火温度。结果见图 2。46.9 ℃

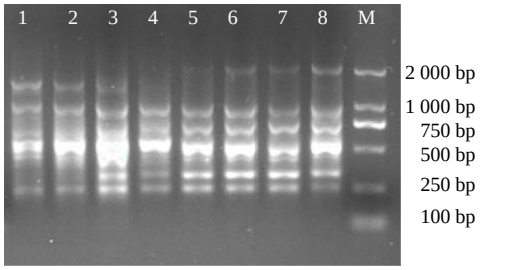


图 2　最佳退火温度筛选

Fig. 2　Best annealing temperature

条件下多态性条带最多且清晰，因此确定最佳退火温度为 46.9 ℃。

2.1.3 ISSR-PCR 引物筛选 采用加拿大 British Columbia 大学设计的 100 条引物为筛选对象[15]，通过已确定的反应体系与扩增程序选出多态性好、扩增谱带清晰的引物。从 100 对 ISSR 引物中筛选出 33 对扩增效果较好的引物（表 2），图 3 为 ISSR 引物 055 扩增后琼脂糖凝胶电泳后获得的凝胶图，图中显示出 ISSR 多态性好，不同类型材料差异明显。

表 2 ISSR 引物中筛选出 33 对引物

Table 2 ISSR primers selected 33 primers

编号	引物 (5’→3’)	编号	引物 (5’→3’)
7	AGAGAGAGAGAGAGAGT	42	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
8	AGAGAGAGAGAGAGAGC	44	CTCTCTCTCTCTCTCTRC
9	AGAGAGAGAGAGAGAGG	45	CTCTCTCTCTCTCTCTRG
10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	54	TCTCTCTCTCTCTCTCRG
11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	55	ACACACACACACACACYT
12	GAGAGAGAGAGAGAGAA	56	ACACACACACACACACYA
18	CACACACACACACACAG	57	ACACACACACACACACYG
25	ACACACACACACACACT	59	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
26	ACACACACACACACACC	60	TGTGTGTGTGTGTGTGRA
27	ACACACACACACACACG	64	ATGATGATGATGATGATG
28	TGTGTGTGTGTGTGTGA	73	GACAGACAGACAGACA
30	TGTGTGTGTGTGTGTGG	76	GATAGATAGACAGACA
34	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	80	GGAGAGGAGAGGAGA
35	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	81	GGGTGGGGTGGGGTG
36	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	99	CATGGTGTTGGTCATTGTTCCA
40	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	100	ACTTCCCCACAGGTTAACACA
41	GAGAGAGAGAGAGAGAYC		

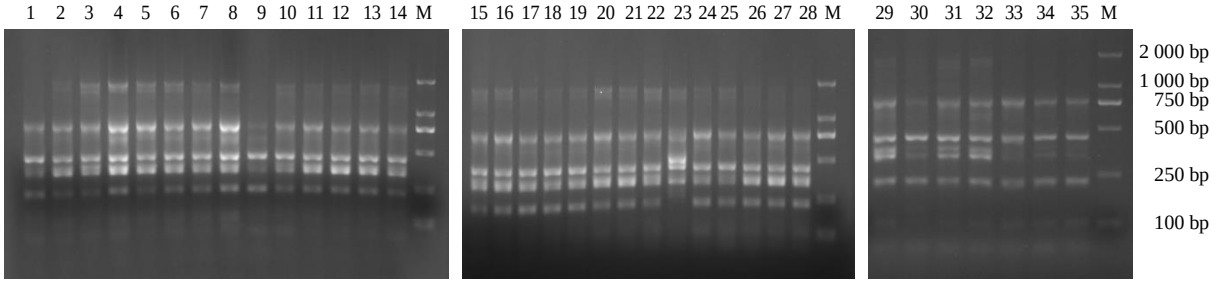


图 3 橘核样品 ISSR 引物 055 的扩增结果电泳图

Fig. 3 Ampilificationg results electrophoresis of ISSR primer 055 in samples of *C. reticulata* seed

2.1.4 数据分析 以条带清晰可见可重复为标准，对同一引物的扩增产物，迁移率相同条带记为 1 个位点，有条带记为“1”，无条带记为“0”。所得数据输入 Excel 建立原始表征数据矩阵，利用 NTSYSpc2.10e 计算 Dice 遗传相似系数，用非加权组配对算数平均法（UPGMA）进行遗传多样性和聚类分析。

利用筛选出的 33 条 ISSR 引物逐个对 35 份柑橘种质基因组 DNA 进行 PCR 扩增，共获得 240 条清晰条带。图 4 为利用 UPGMA 聚类分析所得的亲缘关系聚类图。35 份柑橘种质资源间的遗传相似系数介于 0.72～0.92，其中资阳椪柑与内江椪柑的遗传相似系数最高，为 0.92，推测是由于其作为砧木的大红袍遗传物质类似，且资阳与内江两地相隔较

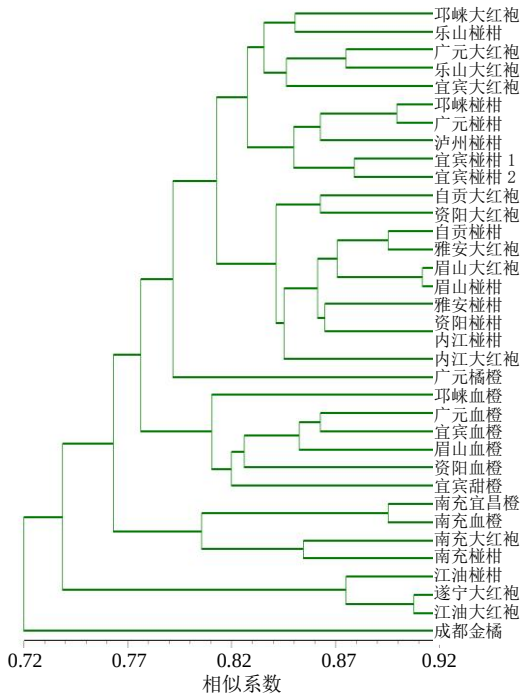


图 4　35 批橘核样品 ISSR 标记的亲缘关系聚类图

Fig. 4　Dendrogram of genetic relationships 35 batches of *C. reticulata* seed samples using ISSR

近，影响椪柑生长的气候、土壤等自然环境条件相似，从而导致其 2 地椪柑亲缘关系最近。金橘与其余 34 份样品的相似系数最低，为 0.72，是由于金橘为金橘属类，而其余样品为柑橘属类所致；相似系数在 0.80 处，30 号南充宜昌橙、31 号南充血橙，3 号邛崃血橙、10 号乐山血橙、15 号宜宾血橙、22 号眉山血橙、25 号资阳血橙、14 号宜宾甜橙，5 号广元橘橙各自聚为一类；剩余大红袍与椪柑聚集，其相似系数在 0.83～0.91，其中眉山大红袍与椪柑亲缘关系最近，相似系数为 0.91。所有品种与大红袍亲缘关系由近到远的顺序为椪柑＞（甜橙、宜昌橙、血橙、橘橙）＞金橘。

2.2　柠檬苦素类化合物含量分析[2]

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Zorbax SB-C_{18} USPL1 柱（150.0 mm×3.0 mm，1.8 μm）；流动相为甲醇-0.05%磷酸水（65∶35）；检测波长 210 nm；柱温 30 ℃；体积流量 0.2 mL/min；进样量 2 μL。

2.2.2　对照品溶液的制备　取对照品柠檬苦素、诺米林、黄柏酮适量，精密称定，加色谱甲醇制成含柠檬苦素 0.363 mg/mL、诺米林 0.289 mg/mL、黄柏酮 0.335 mg/mL 的混合对照品溶液。

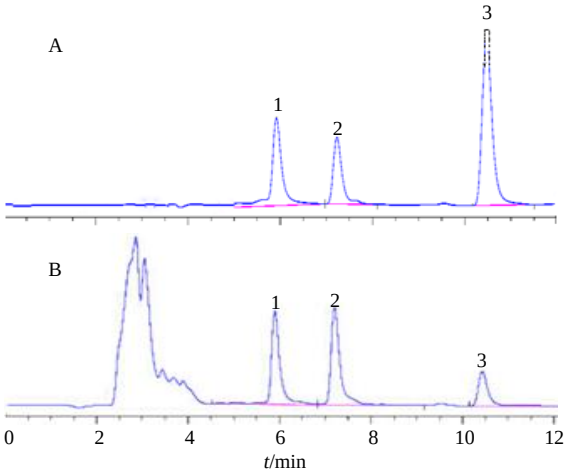
2.2.3　供试品溶液的制备　取橘核粉末（过三号筛）约 0.5 g，精密称定，置 150 mL 锥形瓶中，加入 15 mL 石油醚（60～90 ℃）置 65 ℃水浴回流脱脂 1 h，滤过，弃去石油醚，残渣中加入 10 mL 甲醇，置 70 ℃（甲醇沸点为 64.5 ℃）水浴回流提取 40 min，摇匀，放置室温，滤过（0.2 μm 微孔滤膜），取续滤液备用。

2.2.4　方法学考察　根据文献方法[2]考察线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验，3 种化合物质量分数的 RSD 值均小于 0.5%，符合实验要求。

2.2.5　柠檬苦素类化合物含量分析　对 35 份橘核样品的柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量进行测定，混合对照品与样品色谱图见图 5，3 种有效成分均于 12 min 之前出峰。所有样本的测定结果见表 3，图 6 为不同品种橘核柠檬苦素类化合物平均质量分数图。从图中可看出，除椪柑与大红袍含量类似外，其余品种含量均低于大红袍。

2.3　橘核遗传多样性与柠檬苦素类化合物含量的相关性分析

利用 SPSS 21.0 分析软件对 ISSR 标记所得多态性结果与 UPLC 测得橘核柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量进行聚类分析，结果如图 7 所示。以标尺值 25 为界点，可将橘核分为 2 类：与大红袍亲缘关系较远，且成分含量较低的不同产地血橙、甜橙、橘橙、宜昌橙、金橘（3 号邛崃血橙、10 号乐山血橙、15 号宜宾血橙、22 号眉山血橙、25 号资阳血橙、31 号南充血橙、14 号宜宾甜橙、5 号广元橘橙、30 号南充宜昌橙、23 号成都金橘）聚为一类；而所有亲缘关



1-柠檬苦素　2-诺米林　3-黄柏酮
1-limonin　2-nomilin　3-obacunone

图 5　混合对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig. 5　Chromatogram of mixed standard (A) and samples (B)

表 3 有效成分含量测定结果 (n = 3)

Table 3 Assay results of active ingredient (n = 3)

样本编号	柠檬苦素/%	诺米林/%	黄柏酮/%
1	0.528 3	0.661 6	0.046 0
2	0.535 5	0.783 3	0.078 4
3	0.699 8	0.410 5	0.026 4
4	0.677 8	0.792 3	0.041 8
5	0.322 2	0.371 8	0.018 7
6	0.494 1	0.602 0	0.025 9
7	0.796 3	0.986 7	0.050 0
8	0.682 5	0.737 3	0.047 2
9	0.542 8	0.746 7	0.044 8
10	0.433 2	0.222 8	0.012 4
11	0.445 8	0.870 8	0.028 7
12	0.544 6	0.572 8	0.063 6
13	0.598 0	0.791 3	0.050 4
14	0.471 8	0.524 4	0.044 1
15	0.668 2	0.475 4	0.024 3
16	0.748 5	0.817 5	0.036 6
17	0.483 8	0.744 8	0.033 3
18	0.516 9	0.904 1	0.070 0
19	0.416 4	0.689 8	0.039 6
20	0.271 4	0.389 5	0.031 8
21	0.401 4	0.669 5	0.026 8
22	0.399 3	0.427 9	0.021 8
23	0.091 2	0.112 4	0.051 7
24	0.712 6	0.736 2	0.082 4
25	0.587 3	0.219 4	0.011 9
26	0.464 6	0.603 4	0.061 8
27	0.378 8	0.596 1	0.035 6
28	0.650 1	0.558 0	0.030 9
29	0.569 1	0.636 9	0.090 9
30	0.433 8	0.434 0	0.022 7
31	0.280 7	0.272 4	0.013 2
32	0.478 4	0.538 6	0.013 1
33	0.670 0	0.724 8	0.035 6
34	0.437 7	0.483 7	0.035 4
35	0.611 6	0.717 0	0.044 0

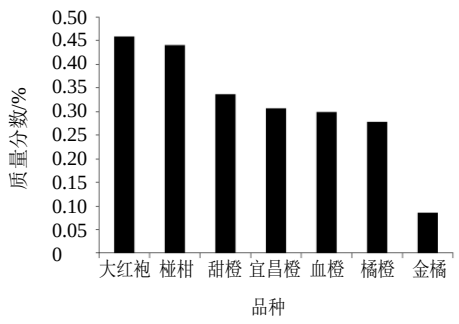


图 6 不同品种橘核柠檬苦素类化合物的质量分数

Fig. 6 Average percentage of different varieties limonin compounds

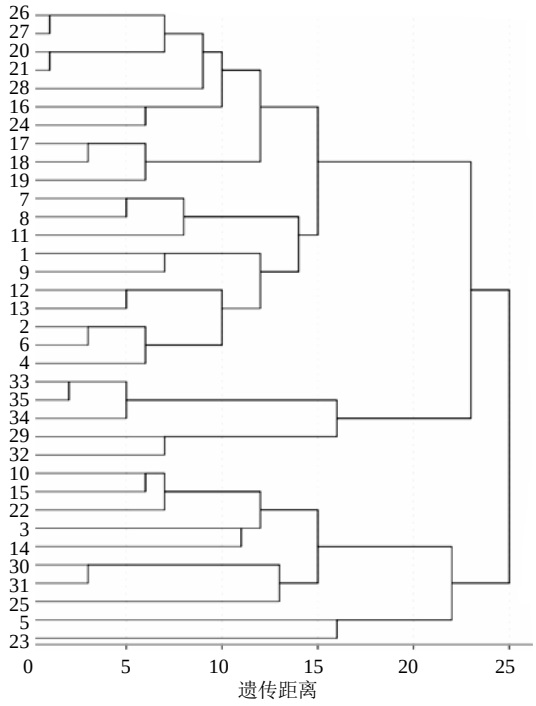


图 7 橘核柠檬苦素类化合物积累与遗传多样性的聚类分析

Fig. 7 Dendrogram of *C. reticulatae* based on limonin compounds accumulation and genetic diversity

系较近，且柠檬苦素类化合物含量类似的大红袍、碰柑聚为另一类。其中以眉山大红袍与碰柑距离最近，与 ISSR 分析结果一致。说明橘核遗传多样性对柠檬苦素类化合物的含量影响较大，与橘核传统药用品种大红袍亲缘关系越接近的品种，其柠檬苦素类物质的含量越高，越可优先考虑作为橘核的主要基原品种。

3 讨论

本研究从 100 条 ISSR 引物中筛选出了 33 条条带清晰、多态性高的引物对进四川柑橘资源遗传多样性和亲缘关系进行分析。聚类分析中除大红袍与碰柑在 0.83～0.91 的相似系数范围内聚集外，其余品种的柑橘材料（金橘、宜昌橙、血橙、甜橙、橘橙）各自聚为一类。这些结果在一定程度上都支持了前人的研究结果[16]，同时也说明了本研究方法分析结果的可靠性，为课题组后期运用 ISSR 技术构建柑橘 DNA 指纹图谱奠定了良好基础。

橘核为常用中药材，柠檬苦素类化合物不仅为其药理活性成分，亦是其主要有效成分[2]。其中柠檬苦素和诺米林在橘核中的质量分数最高[17]，而黄柏酮次之，故本研究选择此 3 种有效成分作为指标成分，对四川不同产地、不同品种橘核样品进行含

量测定，为筛选橘核的主要基原品种提供依据。在前期研究中课题组曾采用 UPLC 法，以甲醇-水作为洗脱体系成功测定了橘种子生长发育过程中茎、叶、果皮及种子等不同器官中的柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量[18]。在本次研究中，改用甲醇-磷酸水体系获得了更好的分离效果，此 3 类成分均提前 3 min 出峰。实验结果也证实了磷酸的加入可减小拖尾，改善峰形和各峰的分离度，其质量分数在 0.05%～0.1%时对各成分间的分离效果影响不大。前期研究还表明，角鲨烯合成酶（SS）、角鲨烯环氧酶（SE）、葡萄糖基转移酶（LGT）等功能基因在柠檬苦素类化合物生物合成路径的中、下游阶段发挥着重要作用[18]，而基因表达量的多少又与遗传背景相关。由于椪柑大多是在大红袍的基础上嫁接而生长，其遗传背景相似，亲缘关系接近，致使控制柠檬苦素类化合物合成的 SS、SE、LGT 等功能基因的表达量类似，最终导致其有效成分含量相差无几。

《中国药典》2015 年版规定橘核来源的栽培品种主要为大红袍 *Citrus reticulata* Blanco cv. ‘Dahongpao’和福橘 *Citrus reticulata* Blanco cv. ‘Tangerina’[1]。而大红袍由于其产量低、无市场竞争力，现已逐渐被果农淘汰，大都选择了在大红袍上嫁接而生长的椪柑这一经济效益更高的品种进行大面积栽培，仅有少数果农栽培供自己食用，从而导致橘核基原品种发生变迁。作为品质优良、抗寒性强、适应性广、抗病、丰产、成熟期较晚且耐贮运的食用品种椪柑不仅橘肉肉质脆嫩、酸甜可口，受到广大消费者的喜爱，且其橘核柠檬苦素类化合物的含量与传统药用品种大红袍相似，亲缘关系也接近，因此可考虑将其作为橘核的主要基原品种，以提高橘核产量、满足市场需求。在今后研究中，课题组还可结合基因表达，找出遗传多样性与基因表达、化学成分三者之间的关联性，为进一步研究功能基因在不同品种橘核的柠檬苦素类物质合成过程中的作用及其调控机制研究提供更多的信息。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 何中燕, 裴 瑾, 莫书蓉, 等. 不同橘核炮制品中柠檬苦素和诺米林的测定 [J]. 中成药, 2011, 33(10): 1761-1764.

[3] Miller E G, Fanous R, Rivera-Hidalgo F, *et al*. The effects of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 1989, 10(8): 1535-1537.

[4] Kim J, Jayaprakasha G K, Muthuchamy M, *et al*. Structure-function relationships of citrus limonoids on p38 MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells [J]. *Europ J Pharm*, 2011, 670(1): 44-49.

[5] Battinelli L, Mengoni F, Lichtner M, *et al*. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells [J]. *Planta Med*, 2003, 69(10): 910-913.

[6] 施 英, 徐玉娟, 吴娱明, 等. 桔核中柠檬苦素类物质消炎镇痛作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(B11): 456-458.

[7] Poulose S M, Harris E D, Patil B S. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity [J]. *J Nutr*, 2005, 135(4): 870-877.

[8] 赵雪梅, 费洪荣, 王桂玲, 等. 柑桔属中柠檬苦素类化合物研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 36(18): 2860-2862.

[9] 鲁振华, 梁 君. 几种主要 DNA 分子标记在柑橘种质资源研究中的应用 [J]. 南方农业, 2007, 1(6): 68-70.

[10] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *TAG Theoret Appl Genet*, 1997, 95(3): 408-417.

[11] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected *Citrus germplasm* accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *J Am Soc Horticult Sci*, 1998, 123(4): 612-617.

[12] 钟凤林, 施维属, 潘东明, 等. 福建柚类种质资源的 ISSR 分析 [J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 1964-1968.

[13] 黄绿红, 刘咏红, 李高阳, 等. ISSR 标记技术在湖南柑橘主要品种亲缘关系研究中的应用 [J]. 湖南农业科学, 2012, 8(17): 117-119.

[14] 刘冰浩, 邓崇岭, 陈传武, 等. 广西地方柑橘资源的 ISSR 分析 [J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1001-1006.

[15] 刘林娅. 辣椒种质资源遗传多样性的形态学及 ISSR 标记分析 [D]. 海口: 海南大学, 2013.

[16] 李小孟. 柑橘及其近缘属植物的分子进化与栽培柑橘的起源研究 [D]. 成都: 西南大学, 2010.

[17] 孙崇德, 陈昆松, 戚行江, 等. 柑桔果实柠檬苦素类化合物的研究与应用 [J]. 浙江农业学报, 2002, 14(5): 297-302.

[18] 王 黎, 罗 静, 裴 瑾, 等. 橘核柠檬苦素类化合物积累与功能基因表达的灰色关联度分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 345-350.