

• 药材与资源 •

SCoT 分子标记对茶枝柑及近缘种遗传多态性分析

席秀丽, 黄海波*, 楼步青, 詹若挺, 王浩涵

广州中医药大学, 广东 广州 510006

摘要:目的 采用 SCoT 分子标记方法对茶枝柑及近缘种进行遗传多态性分析。方法 使用正交设计方法, 对 Mg^{2+} 、dNTPs、ExTaq DNA 聚合酶、引物浓度及模板 DNA 用量 5 个因素进行筛选, 筛选适合茶枝柑及近缘种的 SCoT-PCR 反应体系, 同时通过梯度温度筛选最佳退火温度, 并验证其多态性引物。结果 得到适于茶枝柑的 SCoT 标记 PCR 反应体系, 最终筛选出 12 条清晰、条带丰富的作为茶枝柑及近缘种 SCoT 分子标记的引物, 同时通过 NTSYS 软件分析得到茶枝柑及近缘种的相似系数表和 UPGMA 聚类树。结论 运用 3 个不同地域柑橘基因组 DNA 对优化的 SCoT-PCR 反应体系进行验证, 获得了多态性丰富、条带清晰的扩增图谱, 表明茶枝柑 SCoT 分子标记技术体系稳定可靠。而聚类分析结果能够直观、科学地从分子角度对茶枝柑及近缘种 13 种材料进行初步区分。

关键词: 茶枝柑; SCoT 分子标记; 正交设计; 遗传多样性; PCR 反应

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2426-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.026

Genetic polymorphism analysis of *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka and its relatives by SCoT molecular marker

XI Xiu-li, HUANG Hai-bo, LOU Bu-qing, ZHAN Ruo-ting, WANG Hao-hang

Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To carry out genetic polymorphism analysis of *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka and its relatives by using SCoT molecular marker method. **Methods** Five factors of Mg^{2+} , dNTPs, TaqDNA polymerase, primer, and template DNA concentration were used to screen the suitable SCoT-PCR reaction system for *C. reticulata* and its relatives by the method of orthogonal design. The optimum annealing temperature was screened by gradient temperature, and its polymorphic primers were verified. **Results** A total of 12 clear and rich bands were finally screened out as the primers of SCoT molecular marker for *C. reticulata* and its relatives in the optimized PCR reaction system, and the genetic distance and the UPGMA clustering tree of *C. reticulata* and its relatives were got by NTSYS software analysis. **Conclusion** The optimized SCoT-PCR reaction system was validated by using three different places of citrus genomic DNA to obtain the polymorphism and the clear amplified bands, which showed that the SCoT molecular marker system of *Citrus reticulata* is stable and reliable. The results of cluster analysis were able to make a preliminary separation of 13 kinds of materials scientifically and intuitively in molecule level.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka; SCoT molecular marker; orthogonal design; genetic polymorphism; PCR reaction

芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 *Citrus* L. 植物茶枝柑 *Citrus reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka 的成熟果皮可入药。茶枝柑的外层果皮制干即为广陈皮, 具有理气健脾、燥湿化痰之功效, 用于胸脘胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等疾病^[1]。同时其可制成陈皮茶、饮料、添加剂和香料等, 具有很高的食用价值^[2]。因其

需求量巨大, 同时由于环境、地域的差异, 陈皮药材来源混杂, 且一般陈皮与广陈皮价格相差较大, 导致以次充好现象严重, 造成了药材质量不稳定, 难以保证临床用药的安全和有效。因此建立科学的鉴定方法是保证陈皮质量亟需解决的问题。

目标起始密码子多态性分子标记 (start codon

收稿日期: 2017-12-23

基金项目: 广东省教育厅高校重点实验室滚动支持项目“春砂仁等十大广药 DNA 条形码标准化研究”(2013CXZDA011); 国家公益性行业科研专项 (201407002)

作者简介: 席秀丽 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为中药资源开发利用与保护、中药品质鉴定。Tel: 15622178600 E-mail: 840564430@qq.com

*通信作者 黄海波 (1965—), 男, 副教授, 研究方向为中药品质鉴定。Tel: 18602034233 E-mail: 2865055919@qq.com

targeted polymorphism, SCoT) 是 Collard 等^[3]在水稻上开发的基于单引物扩增反应 (SPAR) 的新的目的基因分子标记方法。其原理是根据植物基因中 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性设计单引物, 对基因组进行扩增, 产生偏向候选功能基因区的显性多态性标记。SCoT 标记结合了 ISSR 标记和 RAPD 标记的优点, 操作简单, 成本低, 引物设计简单且可以通用, 多态性丰富, 可用于分子辅助育种^[4]。目前 SCoT 已被成功应用于柑橘^[5]、龙眼^[6]、铁皮石斛^[7]、草莓^[8]等作物, 在种属间、品种间的遗传多样性分析及杂交后代的遗传分析等研究中取得较多进展, 但尚未见有关其在茶枝柑及近缘种中应用的研究报道。本研究采用正交设计方法, 建立适于茶枝柑植物的 SCoT-PCR 反应体系, 并运用不同基因组 DNA 对建立的体系进行验证, 同时利

用该体系对 13 份茶枝柑及近缘种材料的遗传多样性进行分析, 以期对茶枝柑及近缘种的分子鉴别提供参考。

1 材料与试剂

1.1 材料

材料的收集包括茶枝柑同属近缘种 13 种, 其中茶枝柑 *C. reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka、福橘 *C. reticulata* Blanco cv. *tangerina* Tanaka、椪柑 *C. reticulata* Blanco cv. *poonensis* Tanaka 等材料分别采自广东、福建和浙江等地。所有材料均由广州中医药大学黄海波副教授鉴定, 凭证标本保存于广州中医药大学。采集植物新鲜幼嫩叶片, 用 75% 乙醇水溶液清洁叶表面后迅速置于硅胶密封袋中, 快速干燥后保存于 -20 °C 冰箱备用, 实验材料详细信息见表 1。

表 1 样品信息表

Table 1 Sample information table

样品名称	拉丁名	采样时间	采集地
茶枝柑	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>chachiensis</i> Tanaka	2015-12-17	广东省江门市新会区新宝堂种植基地
橘	<i>C. reticulata</i> Blanco (ju)	2016-01-25	广东省梅州市平远县差干五指石
砂糖橘	<i>C. reticulata</i> Blanco (shatangju)	2016-01-27	广东省梅州市平远县热柘镇
红橘	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>tangerina</i> (hongju)	2016-04-29	四川省自贡市沿滩区九洪乡联合村
蜜橘	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>subcompressa</i>	2016-04-29	浙江省衢江区莲花镇山外村
福橘	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>tangerina</i> Tanaka (fuju)	2016-05-07	福建三明市将乐县高塘镇赖地沙坪路
瓯柑	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>suavissima</i>	2016-06-17	浙江省温州市瓯海区应塘村
椪柑	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>poonensis</i> Tanaka	2016-06-19	浙江省台州市椒江区玉岙水果场
山下红	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>unshiu</i> (shanxiahong)	2016-06-19	浙江省台州市椒江区玉岙水果场
本地早	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>succosa</i>	2016-06-19	浙江省台州市椒江区玉岙水果场
宫川	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>unshiu</i> (gongchuan)	2016-06-19	浙江省台州市椒江区玉岙水果场
尤良	<i>C. reticulata</i> Blanco cv. <i>unshiu</i> (youliang)	2016-06-19	浙江省台州市黄岩头陀镇柑橘研究所
红美人	<i>C. reticulata</i> Blanco (hongmeiren)	2016-06-19	浙江省台州市黄岩头陀镇柑橘研究所

1.2 仪器和试剂

OSE-Y20 动研磨仪 (天根生化有限公司); ARKTIK PCR 仪 (Thermo 公司); T960 PCR 仪 (杭州晶格有限公司); Power Pac Basic 电泳仪 (Bio-Rad 有限公司); 离心机 (Eppendorf 公司); NANODROP 2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo 公司); Tanon-2500 凝胶成像系统 (上海天能有限公司)。dNTPs、ExTaqDNA 聚合酶、Mg²⁺、10 × ExTaq Buffer、DL5000Maker、琼脂糖 (Takara 公司); β-巯基乙醇 (Sigma 公司); 植物基因组提取试剂盒、RNase、Loading Buffer (天根生化有限公司); 其余为国产分析纯试剂,

参考 Collard 和 Mackill 提供的 36 条 SCoT 引物 (S1~S36), 序列由北京六合华大基因科技有限公司合成。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取与检测

选取健康无病害的嫩叶, 置于冰盒中带回实验室, 采用植物基因组试剂盒提取基因组 DNA。用超微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳法检测其质量, 将 DNA 浓度稀释至 20 ng/μL 后置于 20 °C 保存备用。

2.2 SCoT-PCR 反应体系的正交试验设计

选用 L₂₅(5⁴) 正交试验设计 (表 2), 对 Mg²⁺、

表 2 茶枝柑 SCoT-PCR 反应体系正交设计

Table 2 Orthogonal in SCoT-PCR reaction system of *C. reticulata* Blanco cv. *chachiensis*

序号	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	Taq/U	引物/(μmol·L ⁻¹)	DNA/ng
1	1.25 (1)	0.25 (1)	0.50 (1)	0.250 (1)	20 (1)
2	1.25	0.30 (1)	0.75 (2)	0.375 (2)	30 (2)
3	1.25	0.35 (1)	1.00 (3)	0.500 (3)	40 (3)
4	1.25	0.40 (1)	1.25 (4)	0.625 (4)	50 (4)
5	1.25	0.45 (1)	1.50 (5)	0.750 (5)	60 (5)
6	1.50 (2)	0.25	0.75	0.500	50
7	1.50	0.30	1.00	0.625	60
8	1.50	0.35	1.25	0.750	20
9	1.50	0.40	1.50	0.250	30
10	1.50	0.45	0.50	0.375	40
11	1.75 (3)	0.25	1.00	0.750	30
12	1.75	0.30	1.25	0.250	40
13	1.75	0.35	1.50	0.375	50
14	1.75	0.40	0.50	0.500	60
15	1.75	0.45	0.75	0.625	20
16	2.00 (4)	0.25	1.25	0.375	60
17	2.00	0.30	1.50	0.500	20
18	2.00	0.35	0.50	0.625	30
19	2.00	0.40	0.75	0.750	40
20	2.00	0.45	1.00	0.250	50
21	2.25 (5)	0.25	1.50	0.625	40
22	2.25	0.30	0.50	0.750	50
23	2.25	0.35	0.75	0.250	60
24	2.25	0.40	1.00	0.375	20
25	2.25	0.45	1.25	0.500	30
K ₁	9.8	20.6	20.60	15.2	17.2
K ₂	15.0	17.4	16.20	16.4	16.2
K ₃	16.2	16.6	14.80	15.8	14.6
K ₄	21.6	11.6	12.40	16.8	16.2
K ₅	17.0	13.4	15.60	15.4	15.4
R	11.8	7	8.20	1.60	2.6

dNTPs 浓度、ExTaqDNA 聚合酶、引物和 DNA 用量进行 5 因素 4 水平的正交试验。以茶枝柑 DNA 为模板, 选择预试验初筛的 S12 为扩增引物, 反应总体积 20 μL, 含有 10×PCR Buffer 2 μL, 每个处理重复 3 次。

2.3 SCoT-PCR 引物筛选和退火温度筛选

根据正交试验结果选择最佳反应体系对 36 条引物进行筛选, 设平行组, 且对筛选后的引物进行

温度筛选, 在 ARKTIK PCR 仪上设定温度区间 45~55 °C, 自动形成 12 个温度梯度: 45.0、45.2、46.0、47.0、48.2、49.4、50.6、51.8、53.0、54.0、54.7、55.0 °C, 其中除退火温度不同外, 反应程序均相同。

2.4 SCoT-PCR 反应体系的验证与多态性引物筛选

以茶枝柑、福橘和蜜橘的基因组 DNA 为模板, 按照上述优化的 SCoT-PCR 体系进行 SCoT 分子标记, 采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 筛选出多态性好、条带清晰的引物。

2.5 SCoT-PCR 扩增与检测

PCR 扩增反应在 ARKTIK PCR 仪 (Thermo 公司) 上进行, 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 49 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 36 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增反应结束后, 加入 2 μL 6×Loading Buffer, 取 8 μL 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 电极缓冲液为 1×TAE, 在凝胶成像仪下拍照。

2.6 数据分析

根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 对清晰且易于辨认的条带采用“0/1”系统记录其位置, 在凝胶的某个相同迁移率位置上有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 建立 SCoT 标记的 0/1 矩阵。用 NTSYS-pc 2.1 软件计算样品间的相似系数, 并用非加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

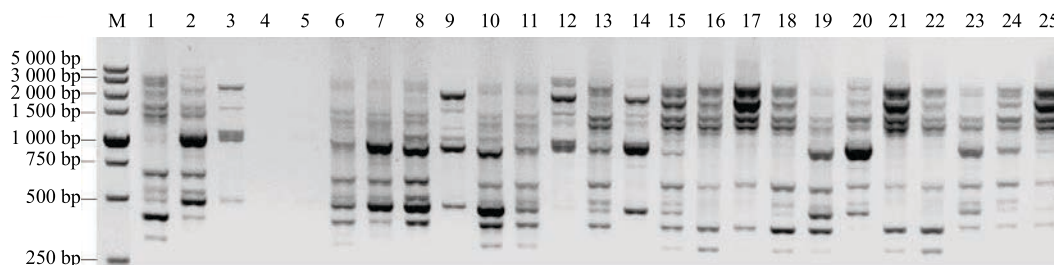
3 结果与分析

3.1 SCoT-PCR 反应体系正交优化结果分析

使用引物 S12 对反应体系优化的电泳结果见图 1, 参考桂腾琴等^[9]的直观评价法依次对 25 个实验组结果多态性进行评分, 条带数量丰富、清晰的计 25 分, 涂布或无条带的计 1 分, 反应 1~25 组体系的平均整数计分依次为 20、16、11、1、1、18、16、14、10、17、18、10、21、14、18、23、22、25、21、17、24、23、12、12、14 分。依照计分原则, 计算同一水平下各个因素的平均值 (K_n), 以及各因素的极差值 (R), 见表 2, 根据各因素水平下的得分数据平均值 K_n (K 值得分最高) 可以确定各个因素的最适浓度。由表 2 中的 K 值可以初步确定 5 个因素的最适用量分别为 1×PCR buffer, 2 mmol/L Mg²⁺, 0.25 mmol/L dNTPs, 0.625 μmol/L 引物, 0.5 U ExTaq 酶, 20 ng 模板 DNA。

3.2 引物筛选及退火温度优化

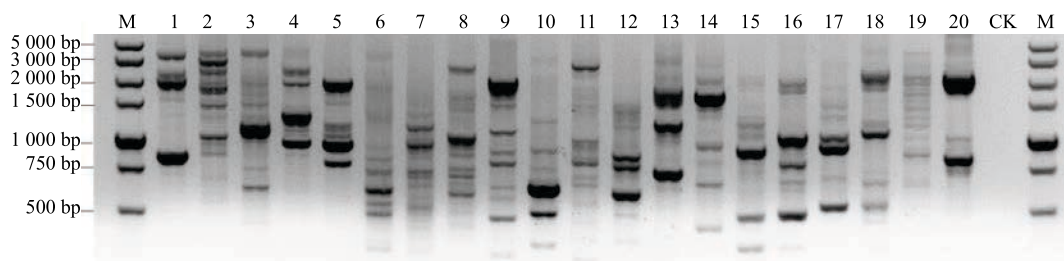
以最佳反应体系对 36 条 SCoT 通用引物进行筛选, 重复 3 次初筛选出 20 条引物见图 2, 对 20 条



1~25 分别为正交 1~25 组不同反应体系 M-Marker
1—25 was orthogonal 1—25 groups of different reaction systems M-Marker

图 1 SCoT 正交体系优化电泳

Fig. 1 Optimized electrophoregram of SCoT orthogonal system



1~20 分别为 S4、S5、S6、S8、S9、S12、S13、S16、S17、S18、S21、S22、S23、S27、S28、S29、S30、S32、S34、S35 号引物 CK-对照 M-Marker
1—20 was respectively S4, S5, S6, S8, S9, S12, S13, S16, S17, S18, S21, S22, S23, S27, S28, S29, S30, S32, S34, and S35 primers CK-control M-Marker

图 2 SCoT 引物初筛电泳图

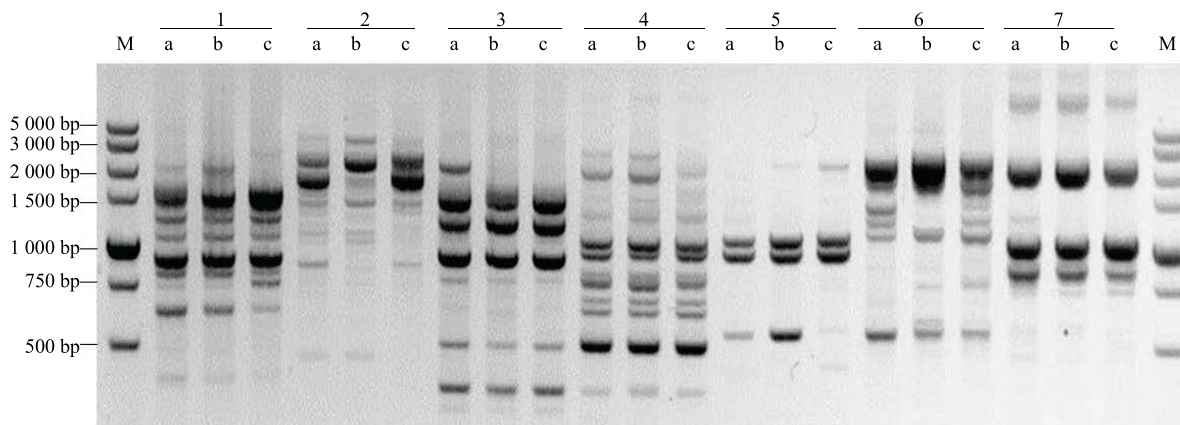
Fig. 2 Electrophoregram of from preliminary screening SCoT primers

引物进行 12 个退火温度梯度筛选，电泳图经 tannonGIS 凝胶成像系统分析，根据信号强度判断条带，最终获得在最适退火温度下扩增引物。

3.3 SCoT 扩增的多态性分析

以茶枝柑、福橘、蜜橘 3 个地域差异大的样品对退火优化后的引物进行多态性筛选，部分 SCoT 引物扩增结果见图 3。最终获得 12 条扩增带型完

整、清晰、多态性丰富的引物（表 3）。其中 S13 引物对 13 份材料 SCoT-PCR 扩增电泳图见图 4。利用这 12 条引物对 13 份材料进行 SCoT 扩增，共获得总条带 1 411 条，其中多态性条带共 1 112 条，多态位点百分率共占 78.8%，多态性比率高，在分子水平证实了茶枝柑及近缘种间具有丰富的种内遗传多样性。



a-茶枝柑 b-福橘 c-蜜橘 1-引物 S22 2-引物 S27 3-引物 S28 4-引物 S29 5-引物 S30 6-引物 S32 7-引物 S35 M-Marker
a-*C. reticulata* Blanco cv. *chachiensis* b-*C. reticulata* Blanco cv. *tangerina* c-*C. reticulata* Blanco 1-S22 2-S27 3-S28 4-S29 5-S30 6-S32 7-S35 primer M-Marker

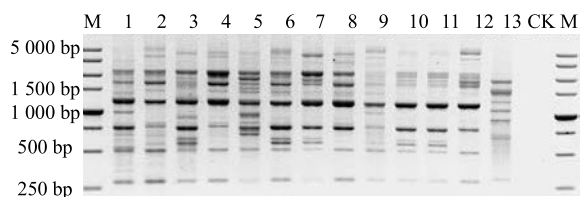
图 3 部分 SCoT 引物多态性筛选

Fig. 3 Polymorphic screening of partial SCoT primers

表 3 SCoT 引物扩增结果

Table 3 Amplification results of SCoT primers

引物名称	序列 (5'-3')	退火温度/℃	扩增条带总数	多态性条带数	多态性比率/%
S6	CAACAATGGCTACCACGC	47.6	113	113	100.00
S12	ACGACATGGCGACCAACG	47.6	115	102	88.70
S13	ACGACATGGCGACCATCG	53.3	142	129	90.85
S16	ACCATGGCTACCACCGAC	46.5	124	85	68.55
S17	ACCATGGCTACCACCGAG	45.7	94	94	100.00
S18	ACCATGGCTACCACCGCC	54.2	146	81	55.48
S21	ACGACATGGCGACCCACA	47.6	96	70	72.92
S22	AACCATGGCTACCACCAC	49.0	118	79	66.95
S27	ACCATGGCTACCACCGTG	45.7	123	123	100.00
S28	CCATGGCTACCACCGCCA	46.5	94	42	44.68
S29	CCATGGCTACCACCGGCC	45.7	127	114	89.76
S32	CCATGGCTACCACCGCAC	49.0	119	80	67.23
合计			1 411	1 112	
平均			117.6	92.7	78.80



1-茶枝柑 2-福橘 3-蜜橘 4-红橘 5-砂糖橘 6-瓯柑 7-山下红 8-本地早 9-椪柑 10-宫川 11-由良 12-红美人 13-橘
CK-阴性对照 M-Marker

1-*C. reticulata* Blanco cv. *chachiensis* Tanaka 2-*C. reticulata* Blanco cv. *tangerina* Tanaka (fuju) 3-*C. reticulata* Blanco cv. *subcompressa* 4-*Citrus reticulata* Blanco cv. *tangerina* (hongju) 5-*C. reticulata* Blanco (shatangju) 6-*C. reticulata* Blanco cv. *suavissima* 7-*C. reticulata* Blanco cv. *unshiu* (shanxiahong) 8-*C. reticulata* Blanco cv. *succosa* 9-*C. reticulata* Blanco cv. *poonensis* 10-*C. reticulata* Blanco cv. *unshiu* (gongchuan) 11-*C. reticulata* Blanco cv. *unshiu* (youliang) 12-*C. reticulata* Blanco (hongmeiren) 13-*C. reticulata* Blanco (ju) CK-negative control M-Marker

图 4 S13 引物对 13 份材料 SCoT-PCR 扩增电泳图

Fig. 4 SCoT-PCR amplification electrophoregram of 13 copies of materials by S13 primers

3.4 SCoT 标记的遗传相似性及聚类分析

利用 NTSYS 软件构建全部材料基于 SCoT 数据的相似系数 (表 4) 和 UPGMA 树状图 (图 5)。13 份材料两两之间的相似系数在 0.497 5~0.864 3, 其中宫川与由良的相似度最高为 0.864 3; 而椪柑与橘的相似系数最小为 0.497 5, 说明两者差异最大。

通过 UPGMA 聚类分析得知在相似系数 0.65 水平上可将 13 份材料划分为 3 大类群, 第 1 类群以茶枝柑、福橘、蜜橘和红橘为代表, 同山下红、本地早、瓯柑及砂糖橘聚为 1 组; 第 2 类群则以椪柑、宫川、由良和红美人聚为一组, 橘则单独构成第 3 类群, 由此可见茶枝柑及近缘种 13 种材料在 UPGMA 树状图上得以区分开来, 证明了 SCoT 分子标记在茶枝柑及近缘种鉴别上的可行性。

表 4 茶枝柑及近缘种基于 SCoT 分子标记的相似系数

Table 4 Similarity coefficient of *C. reticulata* cv. *chachiensis* and its relatives based on SCoT molecular marker

品种	茶枝柑	福橘	蜜橘	红橘	砂糖橘	瓯柑	山下红	本地早	椪柑	宫川	由良	红美人	橘
茶枝柑	1.000 0												
福橘	0.783 9	1.000 0											
蜜橘	0.783 9	0.809 0	1.000 0										
红橘	0.698 5	0.794 0	0.763 8	1.000 0									
砂糖橘	0.703 5	0.678 4	0.718 6	0.673 4	1.000 0								
瓯柑	0.683 4	0.688 4	0.738 7	0.713 6	0.688 4	1.000 0							
山下红	0.713 6	0.678 4	0.788 9	0.723 6	0.668 3	0.718 6	1.000 0						
本地早	0.698 5	0.673 4	0.723 6	0.748 7	0.723 6	0.673 4	0.773 9	1.000 0					
椪柑	0.648 2	0.703 5	0.613 1	0.708 5	0.603 0	0.643 2	0.653 3	0.638 2	1.000 0				
宫川	0.653 3	0.698 5	0.728 6	0.693 5	0.598 0	0.668 3	0.768 8	0.673 4	0.703 5	1.000 0			
由良	0.638 2	0.673 4	0.703 5	0.678 4	0.562 8	0.643 2	0.723 6	0.678 4	0.648 2	0.864 3	1.000 0		
红美人	0.608 0	0.643 2	0.613 1	0.618 1	0.603 0	0.582 9	0.593 0	0.618 1	0.658 3	0.653 33	0.708 5	1.000 0	
橘	0.567 8	0.502 5	0.552 8	0.527 6	0.532 7	0.542 7	0.532 7	0.577 9	0.497 5	0.572 9	0.577 9	0.587 9	1.000 0

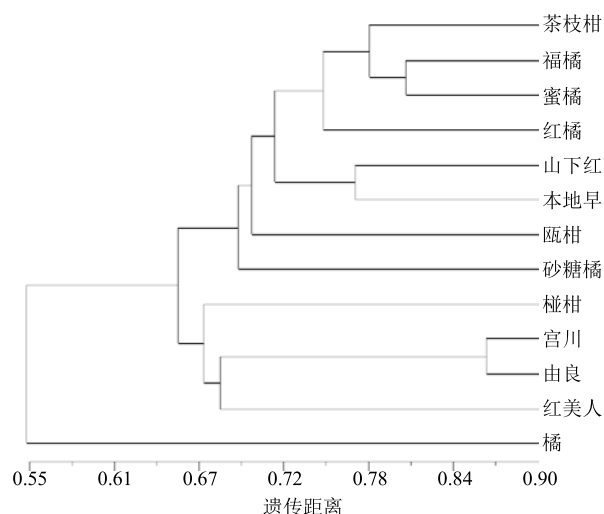


图 5 茶枝柑及近缘种基于 SCoT 分子标记的 UPGMA 树状图
Fig. 5 UPGMA tree of *C. reticulata* cv. *chachiensis* and its relatives based on SCoT molecular marker

4 讨论

SCoT 标记作为一种新型的基因分子标记,虽然具有操作简单、重复性好、引物通用性强的优点,但对反应体系要求较高,且对于不同材料所适用的反应体系仍有很大不同,因此本实验利用正交设计方法,得到了茶枝柑 SCoT-PCR 的最佳反应体系: Mg^{2+} 2.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、引物 0.625 μ mol/L、ExTaq DNA 聚合酶 0.5 U、模板 DNA 20 ng,加双蒸水至 20 μ L。同时对茶枝柑 SCoT-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、ExTaq 酶、引物及模板 DNA 等因素进行了研究,发现各因素对反应体系的影响程度大小为 $Mg^{2+} > dNTPs > ExTaq \text{ 酶} > \text{模板 DNA} > \text{引物}$,研究认为 Mg^{2+} 浓度对 ExTaq DNA 聚合酶的活性起决定作用,当其浓度过低时,酶活力明显降低,浓度过高则催化非特异片段的扩增^[10]。侯小改等^[11]对牡丹的研究中,认为 Mg^{2+} 是影响 SCoT-PCR 反应体系最主要的因素,这与本研究结果相一致。

从 36 条 SCoT 通用引物中初步筛选出 20 条符合多态性要求的 SCoT 引物,同时通过 12 个退火温度梯度优化,多态性筛选,最终筛选出 12 条清晰、

条带丰富的作为茶枝柑及近缘种 SCoT 分子标记的引物,验证了其稳定性及可靠性。引物扩增多态位点百分率占 78.8%,在分子水平证实了茶枝柑及近缘种间具有丰富的种内遗传多样性。通过 NTSYS 软件进行相似系数和 UPGMA 聚类分析,从分子角度对茶枝柑及近缘种 13 种材料进行了区分。聚类分析结果能够直观、科学地将茶枝柑与近缘种进行划分,为茶枝柑与其近缘种的科学筛选提供了分子生物学依据,也为此标记应用于其他植物的研究提供了借鉴。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 单 杨. 柑桔加工技术与产业化开发 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 423-427.
- [3] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating genotargeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 86-93.
- [4] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点目的基因标记技术 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [5] 蒋巧巧, 龙桂友, 李武文, 等. SCoT 结合克隆测序鉴别湖南甜橙变异类型 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 148-154.
- [6] 陈 虎, 何新华, 罗 聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654.
- [7] 赵瑞强, 高燕会, 章晓玲, 等. 铁皮石斛 SCoT-PCR 反应体系构建及优化 [J]. 核农学报, 2012, 26(4): 648-655.
- [8] 秦国新, 何 桥, 梁国鲁, 等. 草莓属植物 SCoT 分析体系的建立及优化 [J]. 果树学报, 2012, 29(3): 393-397.
- [9] 桂腾琴, 孙 敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系 [J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.
- [10] 周 静, 陈书霞, 程智慧, 等. 大蒜 SSR 体系的建立与优化 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(11): 117-122.
- [11] 侯小改, 王 娟, 贾 甜, 等. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选 [J]. 华北农学报, 2011, 26(5): 92-96.