

海南部分荔枝种质的 RAPD 分析

陈业渊¹ 邓穗生¹ 张欣² 魏守兴¹ 高爱平¹ 王家保³ 周斌⁴

(¹ 中国热带农业科学院品种资源所, 儋州 571737; ² 中国热带农业科学院植保所, 儋州 571737; ³ 华南热带农业大学园艺系, 儋州 571737; ⁴ 海南琼山水果所, 海口 570000)

摘要: 采用 10 个 10 碱基的随机引物, 通过 RAPD 分析的方法, 在分子水平上对海南 30 份荔枝种质进行鉴定、分类和亲缘关系分析。结果表明, 大多数种质相似系数在 55% ~ 80% 之间, 说明他们之间的亲缘关系较近; 在相似系数为 0.61 的水平上, 30 份海南荔枝种质被分为 4 组, 与以龟裂片特征为主要分类依据的形态分类有一定的相关性, 但是 RAPD 分类比形态分类的分类范围更细。因此, 传统形态分类不能完全反映出品种间的亲缘关系, 有待结合 RAPD 分析方法进一步完善。

关键词: 荔枝; RAPD 标记; 聚类分析; 亲缘关系

中图分类号: S 667.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0224-03

RAPD Analysis of Genetic Relationship among Partial Litchi Germplasms in Hainan Island

Chen Yeyuan, Deng Suisheng¹, Zhang Xin², Wei Shouxing¹, Gao Aiping¹, Wang Jiabao³, and Zhou Bin⁴
(¹ Germplasm Research Institute of Tropical Crops, ² Plant Protection Research Institute of Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China; ³ Department of Horticulture, South China University of Tropical Agriculture, Danzhou 571737, China; ⁴ Qionghuan Research Institute of Fruit, Haikou 570000, China)

Abstracts: Identification, classification and genetic relationship of 30 litchi germplasms of Hainan island were measured at the molecular level by random amplified polymorphic DNA (RAPD) with ten arbitrary primers of 10 bases. The results revealed that similarity coefficients of most of litchi germplasms were among 55% - 80%, which indicated that the genetic relationships between them were closer related. 30 litchi germplasms were divided into 4 groups at the level of the similarity coefficient of 61%. Although a certain correlation with the morphological classification based mainly on the characteristic of tubercles on the ripe fruit skin, the range of classification by RAPD was more detailed than that of morphological classification. It is concluded that the traditional morphological classification system can not reflect fully the genetic relationships between litchi germplasms, and need further improvement according to the result by RAPD analysis.

Key words: Litchi; RAPD marker; Cluster analysis; Genetic relationship

1 目的、材料与方

海南是我国荔枝原产地之一, 其荔枝种质中的特大果型、无核型、矮生型在我国荔枝种质中都是较独特的^[1-3], 但有关海南荔枝种质资源的研究不多。本研究采用 RAPD 技术, 2002 年 12 月对收集于琼山水果所和中国热带农业科学院品种资源所的 30 份海南荔枝种质 (种质编号及名称见表 1), 进行鉴定、分类和亲缘关系分析。

采用新梢嫩叶, 按文献 [1] 的方法 (改良后) 提取 DNA, DNA 经紫外分光光度计定量后置于 -20℃ 下保存备用。PCR 反应体系为 25 μL 的反应体积中含有 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTPs, 0.2 μmol/L 引物, 50 ng DNA 及 0.5 单位的 Taq

DNA 聚合酶。反应程序为 94℃ 5 min (预变性); 94℃ 1 min, 36℃ 1 min, 72℃ 2 min (45 个循环); 72℃ 10 min (延伸反应)。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪中观察并照相。Marker 为 pGEM DNA Marker。相似系数计算公式为: 相似系数 = $(2M_{xy}/M_x + M_y) \times 100\%$ (M_{xy} 表示种质 x、y 共有片段总和, M_x 表示 x 种质片段数, M_y 表示 y 种质片段数), 通过 UPGMA 分析软件进行数据处理, 计算种质间的相似系数, 进行聚类分析, 并与形态分类进行比较。

2 结果分析与讨论

2.1 荔枝种质 DNA 扩增反应结果

本试验用的引物购自 Operon Technologies 公司生产的 E、F、H、I、O 组的 50 个引物, 进行初步筛选后, 确定 10 个多态性好的引物来对 30 份种质进行扩增反应, 扩增出清晰可辨、重现性好的 DNA 片段共有 140 个, 其中具多态性的片段有 60 个, 占总扩增片段总数的 46.1%, 不同引物扩增的片段数在 6~18 条之间 (表 2), 扩增出的 DNA 片段在 400~3000 bp 之间, 引物 OPF-05 扩增图谱见图 1。

2.2 种质间相似系数和遗传多样性

依据 RAPD 遗传标记计算出供试荔枝种质间的相似系数结果表明: 各种质之间的相似系数最高的农美 9 号与琼山水果所 27 号之间为 94%, 琼山水果所 21 号与琼山水果所 25 号, 琼山水果

表 1 荔枝种质资源的来源

Table 1 The origins of lichi germplasm

编号 No.	种质名称 Germplasm name	采集地点 Collection site	形态分类类别 Morpho. classification	RAPD 组别 RAPD group
1	琼山水果所 5 号 Qiongsan 5	QSFI	TI	I
3	琼山水果所 21 号 Qiongsan 21	QSFI	TI	I
4	琼山水果所 25 号 Qiongsan 25	QSFI	TP	I
6	大丰风霜 Dafeng Fengshuang	DZGRI	TI	I
7	屯昌风霜 Tunchang Fengshuang	DZGRI	TI	I
8	琼山水果所 16 号 Qiongsan 16	QSFI	TI	I
10	榆林丁香 Yulin Dingxiang	DZGRI	TI	I
11	琼山水果所 11 号 Qiongsan 11	QSFI	TP	I
12	琼山水果所 14 号 Qiongsan 14	QSFI	TI	I
21	琼山水果所 2 号 Qiongsan 2	QSFI	TI	I
13	琼山水果所 24 号 Qiongsan 24	QSFI	TP	I
20	鹅蛋 Edan	DZGRI	TI	II
26	妃子笑 Feizixiao	DZGRI	TP	II
30	鸭姆笼 Yamulong	DZGRI	TI	II
22	琼山水果所 9 号 Qiongsan 9	QSFI	TF	II
28	紫荔 Zili	DZGRI	TI	II
25	白糖罽 Baitangying	DZGRI	TF	II
24	牛心 Niuxin	DZGRI	TF	II
23	三月红 Sanyuehong	DZGRI	TF	II
2	琼山水果所 20 号 Qiongsan 20	QSFI	TI	III
5	琼山水果所 19 号 Qiongsan 19	QSFI	TI	III
9	琼山水果所 17 号 Qiongsan 17	QSFI	TI	III
14	琼山水果所 12 号 Qiongsan 12	QSFI	TP	IV
15	琼山水果所 8 号 Qiongsan 8	QSFI	TP	IV
16	琼山水果所 15 号 Qiongsan 15	QSFI	TI	IV
27	青皮 Qingpi	DZGRI	TP	IV
17	南岛无核 Nandao Wuhe	DZGRI	TI	IV
18	农美 9 号 Nongmei 9	DZGRI	TP	IV
19	琼山水果所 27 号 Qiongsan 27	QSFI	TP	IV
29	龙桥 Longqiao	QSFI	TI	IV

注: QSFI 代表琼山水果所, DZGRI 代表儋州品资所, TP 代表龟裂片突起类, TI 代表龟裂片隆起类, TF 代表龟裂片平坦类。

Note: QSFI, Qiongsan Fruit Institute; DZGRI, Danzhou Germplasm Resource Institute; TP, Tubercles pointed; TI, Tubercles intermediate; TF, Tubercles flattened.

表 2 10 个引物扩增结果统计

Table 2 The amplified results of 10 primers

引物 Primer	总条带数 Total amplified bands	多态性条数 polymorphic bands	引物序列 The frequency of the primer
OPE-10	6	3	5'CACCAGGTGA 3'
OPI-10	14	8	5'ACAACGCGAG 3'
OPF-05	18	8	5'CCGAATTCCC 3'
OPI-15	13	6	5'TCATCCGAGG 3'
OPF-10	11	5	5'GGAAGCTTGG 3'
OPI-20	15	8	5'AAAGTGCGGC 3'
OPF-20	18	9	5'GGTCTAGAGG 3'
OPO-15	9	4	5'TGGCGTCCTT 3'
OPH-05	12	3	5'AGTCGTCCCC 3'
OPO-20	14	6	5'ACACACGCTG 3'

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

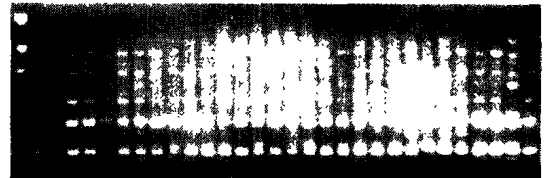


图 1 引物 OPF-05 对 30 个荔枝种质扩增图谱

编号种质名称见表 1

Fig. 1 RAPD patterns amplified by primer OPF-05

No. and name see table 1

所 11 号与琼山水果所 24 号之间同为 91%，最低的是琼山水果所 20 号与鸭姆笼之间为 33%，多数在 55%~80%，而且，这 30 份种质的遗传多样性程度为 46.1%。从这些数据可以看出，在 DNA 水平上，海南荔枝并不象其形态学表现的那样多样，可能是因为栽培荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 只有 1 个种^[2]，且其起源和地理分布狭窄，群体间的遗传变异多数在种内进行，很难像其它物种那样可通过广泛地与近缘种或远缘种杂交从而获得外源基因。这与丁晓东等人的研究结果^[3]一致。

2.3 同名异物和同物异名问题

海南荔枝种质的命名主要有海垦系列、琼山水果所系列和农美系列。三者重复命名严重，鉴定工作正在进行。本研究根据 RAPD 聚类分析结果和果皮龟裂片和片峰特征等形态特征，对 30 份海南荔枝种质进行综合分析（见图 2 和表 1），结果表明农美 9 号和琼山水果所 27 号的相似系数为 0.94，且形态特征很相似，应为同一种质；而大丰风霜、屯昌风霜和琼山水果所 16 号虽然形态特征很相似，聚类分析也归为同一类，但其相似系数仅分别为 0.86、0.80 和 0.80，是否属同一种质有待进一步分析。

2.4 RAPD 分类与传统分类比较

国内荔枝普遍以果皮龟裂片特征为主，结合果形和果实大小等形态性状进行分类。中国果树志·荔枝卷将其分为 3 种类型：（1）龟裂片突起类；（2）龟裂片平坦类；（3）龟裂片隆起类。广东、广西荔枝志分为 3 大类 7 个品种组。这样的分类不能完全反映品种间的亲缘关系，而且分类范围过宽。本文对 30 份海南荔枝种质的 RAPD 聚类分析结果见图 2，在相似系数为 0.61 水平上，30 个荔枝种质可分为 4 组（见表 1 和图 2）。将聚类分析结果与形态分类结果进行比较，结果表明，RAPD 分类与形态分类有一定的相关性，如 RAPD 分类的第 I 组多为龟裂片大而隆起，片峰钝，属形态分类的龟裂片隆起类；RAPD 分类的第 II 组多为龟裂片平坦，属形态分类的龟裂片平坦类；RAPD 分类第 III 组都是龟裂片隆起类；RAPD 分类的第 IV 组多为果圆球或近圆型，龟裂片突起片峰尖刺型，属形态分类的龟裂片突起类。但是 RAPD 分类比形态分类的分类范围更细，如 RAPD 分类分为 4 组，而传统形态分类分为 3 组，且在除第 III 组的其他 3 个 RAPD 分类组中都有形态分类的不同类型。可见，根据龟裂片特征为主要分类依据的传统形态分类不能完全反映出其亲缘关系（这与最近的研究结果^[4]一致），有待结合 RAPD 等分子生物学方法进一步完善。

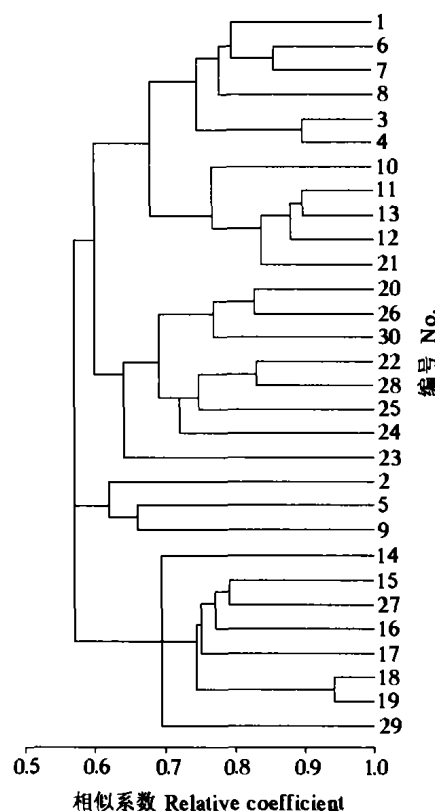


图 2 30 个荔枝种质的 RAPD 分析聚类树状图

图中编号的种质名称见表 1

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of 30 litchi germplasm
No. and name see table 1

参考文献

- 1 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯頓 R E, 等著. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 37~38
- 2 俞德浚. 中国果树分类学. 北京: 农业出版社, 1979. 319~321
- 3 丁晓东, 吕柳新, 陈晓静, 等. 利用 RAPD 标记研究荔枝品种的亲缘关系. 热带亚热带植物学报, 2000, 8 (1): 49~54
- 4 易干军, 霍合强, 陈大成, 等. 荔枝品种亲缘关系的 AFLP 分析. 园艺学报, 2003, 30 (4): 399~403