

龙眼品种(系)遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析

易干军¹ 谭卫萍² 霍合强¹ 张秋明² 李建光¹ 周碧容¹

(1 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640; 2 湖南农业大学, 长沙 410128)

摘 要: 选用两对引物组合 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTT 和 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTC 对 46 份龙眼材料进行 AFLP 分析, 共得到扩增位点 111 个, 其中多态性位点 103 个, 多态性比例达 92.69%, 区分率达 100%。对 AFLP 扩增结果进行聚类分析, 根据相似系数 0.76 的水平可将 46 份龙眼品种(系)分为 11 个品种群。供试各品种多态性比例介于 0.2703 和 0.4955 间。福建东壁与广东东壁应为不同品系; 早熟一号为一个新品系。

关键词: 龙眼; AFLP; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: S 667.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0272-05

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 在植物分类学上属于无患子科龙眼属, 与荔枝近缘。长期以来, 我国科学工作者就龙眼种质资源的收集、分类和鉴别做了大量工作, 建立了国家果树种质福州龙眼圃^[1]。有关龙眼的起源分类研究近年来已取得了一定的进展^[2~11], 但仍存在分类标准不统一、分类结果不一致以及同名异物、同物异名等问题。林同香、陈有志等曾通过 RAPD 技术对 35 个福建龙眼品种和广西 5 个龙眼品种进行了亲缘关系的研究^[11,12]。本试验在相关研究的基础上, 试图运用 AFLP 技术^[13]进行龙眼遗传多样性的分子评价和分类研究, 以期对龙眼种质资源的合理利用、品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

46 份材料取自广东省农业科学院果树研究所龙眼园和国家果树种质福建龙眼圃。选取健壮、无病虫害危害的嫩叶, 每份样品以保鲜薄膜袋包装, 置于冰壶内, 3 h 内携回实验室, 以自来水和无菌水冲洗后用吸水纸吸干叶面水分, 保存于 -20℃ 冰箱中备用。AFLP 扩增遵循 Gibco 公司提供的反应程序, 主要包括模板 DNA 的制备, 酶切片段扩增及凝胶电泳分析 3 个步骤。以冲洗好的 X 胶片记录谱带, 将条带的有、无分别赋值 1、0, 得到原始数据表。数据均录入计算机, 计算频率、方差和变异系数等。相似系数和聚类分析应用 NTSYS-pc2.10e 软件进行, 相似系数采用 Dice 系数, UPGMA 方法聚类, 得到龙眼亲缘关系树状图。多态性比率 (%) = (总谱带数 - 共有带数) / 总谱带数 × 100。

2 结果与分析

2.1 龙眼 AFLP 选择性扩增结果

从 AFLP 试剂盒内的 64 对引物中随机选出两对引物组合 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTT 与 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTC 对 46 个龙眼品种(系)进行 AFLP 分析, 共得到扩增位点 111 个, 其中多态性位点 103 个, 多态性比率达 92.69%; 平均每对引物组合扩增多态性位点 53 个。两对引物组合对 46 个龙

表 1 两对 AFLP 引物组合对 46 份龙眼材料的扩增结果

Table 1 Amplified results of 46 longan materials with AFLP primers

引物对 Selected primers	总扩增带 Amplified sites	多态性条带 Polymorphic sites	多态性比率 Ratio of polymorphic sites (%)	区分率 Identified rate (%)
ACT + CTT	60	55	91.70	100
ACT + CTC	51	48	94.10	100

眼品种的区分率均达到 100% (表 1)。引物 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTT 的扩增条带信号强度较为一致, 条带分布均匀 (图 1)。与之相比, 引物 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTC 的扩增条带信号强度一致性稍差。各品种

收稿日期: 2002-12-11; 修回日期: 2003-04-17

基金项目: 广东省国际科技合作项目

(单株) 的多态性带数和比例均存在差别, 多态性带数最多的早禾石硤为 55 条, 多态性比率高达 49.55%, 可见杂合程度较高。多态性最低的是驼背木, 仅有 30 条, 多态性比例为 27.03% (表 2)。

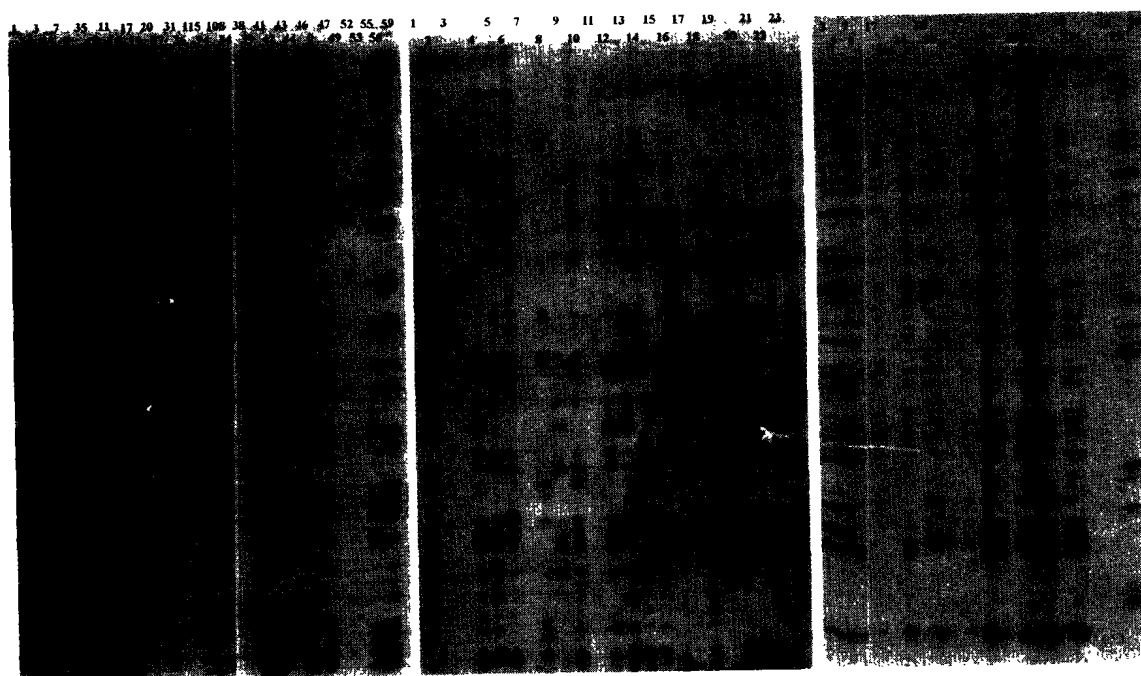


图 1 引物 E-ACT + M-CTT 扩增结果

Fig. 1 Amplified result of longan by using primer pairs E-ACT + M-CTT

表 2 龙眼品种 (系) 及选育种单株多态性比率比较

Table 2 Comparison of polymorphism on *Dimocarpus longan* Lour. varieties

代号 No.	品种名 Name	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphic rates(%)	代号 No.	品种名 Name	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphic rates(%)
0	赤壳软 Chikeruan	32	28.82	30	古山二号 Gushan 2	46	41.44
2	大乌圆 Dawuyuan	39	35.13	31	泰-1 Tai-1	44	39.64
4	石硤 Shixia	43	38.74	33	新活乌圆 Xinjiao Wuyuan	47	42.34
5	陕西脆肉 Shanxi Cuirou	36	32.43	34	赐合种 Ciheshong	52	46.85
6	早熟一号 Zaoshu 1	31	27.93	35	水眼 Shuiyan	33	29.73
7	脆肉 Cuirou	40	36.04	37	水南一号 Shuinan 1	49	44.14
9	迟龙眼 Chi Longyan	36	32.43	40	早禾石硤 Zaohe Shixia	55	49.55
10	从化大个圆 Conghua Dageyuan	40	36.04	41	顺德十叶 Shunde Shiye	39	35.14
11	新活大乌圆 Xinjiao Dawuyuan	36	32.43	42	鸡肾眼 Jishenyan	37	33.33
12	荔枝种 Lizhizhong	38	34.23	43	河洞广眼 Hedong Guangyan	38	34.23
13	福建东壁 Fujian Dongbi	38	34.23	45	青壳石硤 Qingke Shixia	44	39.64
14	鸡卵眼 Jiluanyan	30	27.03	46	台山龙眼 Taishan Longyan	39	35.14
15	毛叶大果 Maoye Daguo	38	34.23	47	迟龙眼 2 号 Chi Longyan 2	35	31.53
18	驼背木 Tuobeimu	30	27.03	55	鸡蛋龙眼 Jidan Longyan	33	29.73
19	罗伞木 Luosanmu	31	27.93	56	南湖焦核 Nanhu Jiaoke	36	32.43
20	白花木 Baihuamu	36	32.43	71	九月乌 Jiuyuewu	39	35.14
21	储良 Chuliang	35	31.53	75	青桥柴螺 Qingqiao Chailuo	36	34.23
22	旺高堂广眼 Wanggaotang Guangyan	41	36.93	76	青桥水柜 Qingqiao Shuigui	32	28.83
23	和路广眼 1 号 Helu Guangyan 1	46	41.44	94	广东东壁 Guangdong Dongbi	39	35.41
24	和路广眼 2 号 Helu Guangyan 2	38	34.42	108	开元寺东壁 Kaiyuansi Dongbi	36	32.43
25	沙梨肉 Shalirou	40	36.04	39	宴中龙眼 Yanzhong Longyan	43	38.74
26	青皮 Qingpi	37	33.33	47f	先锋四号 Xianfeng 4	41	36.93
28	卷叶 Juanye	42	37.84	17	沙梨木 Shalimu	31	29.93

2.2 龙眼各品种群的划分

根据 46 份龙眼材料 DNA 选择性扩增结果计算出各材料之间的相似系数, 由相似系数构建亲缘关系树状图 (图 2)。在相似系数 0.76 的水平将供试的 46 个龙眼材料分为 11 个品种群。品种群 I: 赤壳软。品种群 II: 早禾石硌、大乌圆、新溜乌圆、古山二号、水南一号。品种群 III: 第一组, 石硌、脆肉、顺德十叶、青壳石硌、陕西脆肉、储良、青皮、新溜大乌圆、荔枝种、宴中龙眼、旺高堂广眼; 第二组, 罗伞木、鸡蛋龙眼、沙梨肉、水眼、迟龙眼、鸡肾眼、台山龙眼、河洞广眼、迟龙眼 2 号; 第三组, 从化大个圆、卷叶、九月乌、南湖焦核、福建东壁、开元寺东壁、广东东壁、先锋四号。品种群 IV: 和路广眼 1 号、和路广眼 2 号。品种群 V: 泰-1。品种群 VI: 驼背木、白花木、沙梨木。品种群 VII: 鸡卵眼。品种群 VIII: 毛叶大果。品种群 IX: 早熟一号。品种群 X: 青桥柴螺、青桥水柜。品种群 XI: 赐合种。

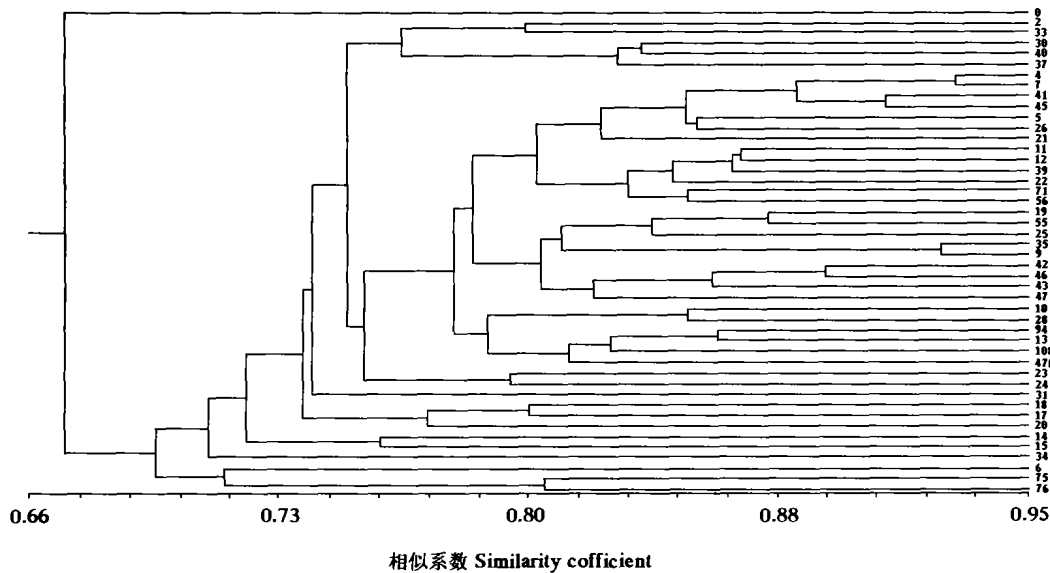


图 2 龙眼品种 AFLP 分析聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of longan varieties based on AFLP data

2.3 亲缘关系鉴定

从聚类图上可以看出各品种间的亲缘关系及其在分类上的系统位置。该结果与传统的分类结论基本一致, 但在部分品种的分类地位问题上存在差异。

早熟一号为广东省农业科学院果树研究所从该所龙眼园中选出的新株系, 为特早熟品种, 7 月上旬成熟, 形态学性状与从化大个圆相似, 据说是由从化大个圆中选出。但本试验的结果表明早熟一号与从化大个圆亲缘关系相距较远, 相似系数为 0.80。从 DNA 指纹图谱上来看, 某些共带缺失, 而在某些稀有位点则扩增出特异性条带, 在树状图中单独归为一类。

通过 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTT 和 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTC 两对引物组合对福建东壁、广东东壁和开元寺东壁的 AFLP 分析得出: 福建东壁与广东东壁的亲缘关系较近, 先聚在一起, 然后再与开元寺东壁聚为一大类, 这一结论与实际情况相符合。东壁原产于福建泉州开元寺, 福建东壁与广东东壁应为开元寺东壁的实生后代。

石硌是栽培历史悠久、品质最优的鲜食良种之一, 为广东、广西的主栽品种之一。古山二号是广东省果树研究所于 1983 年在揭东选出, 为粤东的主栽品种之一, 其品质与石硌相似。两品种的过氧化物同工酶谱中仅差一条带, 亲缘关系较近^[6]。而李建光在 6 种同工酶的研究中得出石硌与古山二号分属两个不同的类别的结果^[10], 本试验研究得出古山二号与早禾石硌存在较近的亲缘关

系, 同属品种群 II。

脆肉与石硖在树形、树姿、叶片、叶缘形态、花穗、果穗、果皮颜色等形态学性状方面都有很大的相似之处。一般认为, 脆肉就是石硖的一个类型^[2]。在本试验的聚类结果中, 二者在相似系数 0.91 处聚在一起, 表明它们的亲缘关系很近。脆肉与陕西脆肉相似系数为 0.86, 同工酶分析结果将脆肉与陕西脆肉分为不同的两类^[10], 而本试验得出它们应属于同一类。

南湖焦核为福建的优稀品种, 林同香等^[11]通过 RAPD 分析将其单独归为一类, 认为该品种与其他品种的亲缘关系较远。而从本研究的结果来看, 南湖焦核与石硖, 大乌圆、九月乌有着较近的亲缘关系, 相似系数 0.86。造成这种差异的原因有待探讨。

2.4 特殊种质分析

龙荔 [*Dimocarpus confinis* (How et Ho) H. S. Do] 是龙眼同属不同种的近缘种, 且为半野生种, 既具有龙眼的性状又具有荔枝的性状。经 *EcoR* I ACT + *Mse* I CTT 引物组合的 AFLP 分析发现, 与龙眼品种在相似系数为 0.54 时聚在一起, 说明龙荔与龙眼间存在着一定的亲缘关系, 至于龙荔是否为荔枝和龙眼的杂种或为过渡类型, 有待进一步探讨。

毛叶大果为引自越南的一个品种, 叶面有绒毛, 果实特大, 为少见的品种。从聚类结果看, 毛叶大果单独聚为一类, 说明它与其它品种的相似程度较低, 与我国的龙眼亲缘关系较远, 可能是起源于越南的一个特异品种。

赐合种原产于广东普宁, 母株为 100 年老树。该品种果皮表面粗糙, 黄褐带绿色, 龟纹状和疣状突起明显, 带有较原始的特征, 在指纹图谱中某些共带上缺失, 出现多条特异带, 在聚类图上单独归为一类。

3 讨论

3.1 龙眼品种的分类和亲缘关系分析

有关龙眼品种的分类经历了形态学、孢粉学、生物化学和分子生物学 4 个阶段。这 4 种分类法在分类目的上具有一致性, 在分类结果上具有一定的延续性和继承性, 在演化过程上具有合理性。形态学性状是植物品种最直观的, 也是品种鉴别的重要依据, 主要借助于目测法, 分类标准简便、快速经济, 但精度和效率低。如黄金松^[14]按龙眼复叶中小叶形态和叶片大小将福建龙眼品种分为 3 种类型: 小叶型、大叶型和圆叶型。孢粉学主要以花粉粒形态和结构特征为标准, 采用扫描电子显微技术、透射电子显微技术, 其局限性大。同工酶技术以基因表达的产物蛋白质为研究对象, 多态性较高, 技术简单, 但同工酶具有器官和阶段特异性。李建光^[10]等运用同工酶技术对广东的龙眼品种进行了分类研究, 其结果与本试验结论基本一致。用分子标记技术进行分类是基于 DNA 序列的差异, 其多态性高, 分辨率高, 重复性好。RAPD 技术已用于福建国家龙眼种质圃中 36 份龙眼种质^[11]和广西 5 个品种的分类^[12], 因为其所采用的品种与本试验基本不同, 研究结果无法进行比较。总之, 龙眼的分类由于标准不统一, 分类手段有一定的局限性, 所得分类结果差异较大。如福建品种普明庵与乌龙岭在形态学上分属不同的类别, 而 RAPD、同工酶分析结果将它们归为一类^[8, 11]。作者应用 AFLP 技术对龙眼种质资源进行了多样性和聚类分析, 获得了 46 个龙眼品种的遗传树状图, 对龙眼选育种研究工作具有一定的意义。

3.2 龙眼种质资源的遗传多样性分析

本试验结果表明 46 个品种间的相似系数变化范围为 0.62 ~ 0.93, 多态性比例介于 0.2703 ~ 0.4955 间, 大部分品种多态性比例介于 0.3000 ~ 0.4000 间, 表明分子水平上龙眼品种间的遗传多样性并非那样丰富。我国是龙眼的起源中心之一, 据不完全统计, 全国约有 400 个品种(系)。长期以来龙眼的繁殖多采用实生播种, 仅依靠亚种间自然杂交, 缺少远缘杂交, 自然选择多侧重于抗性与适应性。龙眼虽有 2000 多年的栽培历史, 但人工驯化栽培在近 500 ~ 600 年内才受到重视, 因而变异的

程度不大^[15]。加之龙眼在世界范围内栽培地域不广,绝大部分国家最初的龙眼品种均引自我国,不同地区间品种的相互交换较少,引入外源基因的机会相对较少。当然,本研究采用的 46 个龙眼品种不能代表龙眼的全部遗传背景,有关龙眼的遗传多样性有待进一步的研究。

参考文献:

- 1 柯冠武. 我国龙眼科技工作的进展与成就. 中国果树, 1989, 4: 6~8, 14
- 2 邱武陵, 章恢志. 中国果树志·龙眼枇杷卷. 北京: 中国林业出版社, 1996. 1~18
- 3 柯冠武, 黄进华, 邵小华. 龙眼各品种花粉形态及系统位置. 园艺学报, 1988, 15 (2): 109~114
- 4 柯冠武, 张 春, 唐自法. 龙眼栽培起源的孢粉学研究. 园艺学报, 1994, 21 (4): 323~328
- 5 苏伟强, 黄海滨, 陆玉英. 龙荔与龙眼过氧化物同工酶分析及亲缘关系分析. 广西农业科学, 1993, 4: 158~159
- 6 肖 艳, 黄建昌, 陈赞盛, 等. 广东龙眼主栽品种过氧化物酶同工酶研究. 仲恺农业技术学院学报, 1998, 11 (3): 34~38
- 7 苏伟强, 黄海滨, 陆玉英, 等. 广西主要龙眼品种过氧化物酶同工酶分析初报. 广西农业科学, 1997, 3: 121~122
- 8 陈 熹, 柯冠武. 应用过氧化物同工酶分析对福建龙眼品种的分类初探. 中国果树, 1989 (1): 18~21
- 9 刘舒芹, 沈德绪, 林伯年. 龙眼品种过氧化物酶与多酚氧化酶同工酶分析及其亲缘关系. 园艺学报, 1988, 15 (4): 217~221
- 10 李建光, 潘学文, 胡桂兵, 等. 广东龙眼主要品种的同工酶分析及分类. 广东农业科学, 1997, 3: 21~23
- 11 林同香, 陈振光, 戴思兰, 等. RAPD 技术在龙眼品种分类中的应用研究. 植物学报, 1998, 40 (12): 1159~1165
- 12 陈有志, 刘成明. 龙眼品种的 RAPD 鉴别及分析. 中国果树, 2001, 4: 28~29
- 13 Vos P. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407~4414
- 14 黄金松. 龙眼. 福州: 福建人民出版社, 1979. 25~26
- 15 李永清. 龙眼的遗传进化与种群生态. 云南农业大学学报, 1989, 4 (1): 47~51

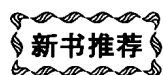
Studies on the Genetic Diversity and Relationship of Longan Cultivars by AFLP Analysis

Yi Ganjun¹, Tan Weiping², Huo Heqiang¹, Zhang Qiuming², Li Jianguang¹, and Zhou Birong¹

(¹Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The study is mainly on the genetic diversity and relationship of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) cultivars by applying AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). 103 polymorphic distinct bands were obtained with two pairs of primers (*EcoR* I ACT + *Mse* I CTT and *EcoR* I ACT + *Mse* I CTC), which were enough to distinguish the 46 cultivars from each other. UPGMA analysis showed that 46 cultivars were divided into 11 groups. The ratio of polymorphic rate varied from 0.2703 to 0.4955. The result showed that the Fujian Dongbi was different from Guangdong Dongbi and they were different types from Kaiyuansi Dongbi. Zaoshu 1 was supposed to be a new type. The results supplied theoretical basis for cultivar classification.

Key words: Longan; AFLP; Genetic diversity; Relationship



新书推荐

《分子克隆实验指南》(第三版)

作者对图书内容进行了全面升级,修订了试验的每条方案,增加了大量新的材料,拓宽了所涉及试验的领域。前面的章节描述了一些基本的技术,后面的几章是关于 cDNA 克隆和外显子截留、核酸探针的使用、突变和 DNA 测序的介绍。最后的章节主要解决筛选表达文库、克隆基因在原核和真核细胞的表达、转录物和蛋白质分析、探测蛋白质与蛋白质的相互作用,附录中包含了试剂、载体、培养基、技术支持等基本信息。定价:187 元(上、下册,含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。