

# 荔枝品种亲缘关系的 AFLP 分析

易干军<sup>1</sup> 霍合强<sup>1</sup> 陈大成<sup>2</sup> 黄自然<sup>2</sup> 蔡长河<sup>1</sup> 邱燕萍<sup>1</sup>(<sup>1</sup> 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640; <sup>2</sup> 华南农业大学, 广州 510640)

**摘 要:** 应用 AFLP 技术, 对 39 个荔枝品种进行了遗传多样性分析及分类研究。筛选出适于荔枝 AFLP 分析的最佳引物组合 3 对, 分别为 *Eco*RI AAC + *Mse*I CTG, *Eco*RI AGC + *Mse*I CAT, *Eco*RI ACC + *Mse*I CAT。在分子水平上, 荔枝品种的遗传多样性并非形态学性状所体现的那样丰富。AFLP 分析将 39 个荔枝品种分成了 6 组, 与传统的以果皮龟裂片隆起类型为分类标准的分类没有一致性。初步建立起荔枝主要栽培品种的分子标记标准图谱。应用 AFLP 技术对来自两个不同地方的两个荔枝品种 (桂味、妃子笑) 进行了鉴别。

**关键词:** 荔枝; 亲缘关系; AFLP

**中图分类号:** S 602.3; S 667.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0399-05

我国荔枝种质资源极其丰富, 不同地域间的品种交换导致同物异名、同名异物的现象相当普遍。至目前为止, 对荔枝种质资源的鉴别仅限于形态学性状, 对其分类研究也主要是通过形态学性状观察, 以果实的龟裂片及其隆起类型大致分为三大类, 未能建立起一整套科学系统的分类体系<sup>[1,2]</sup>。有关分子标记技术在荔枝种质资源上应用的报道很少<sup>[3]</sup>。本研究旨在从分子水平上探索各栽培品种相互之间的亲缘关系, 为其更有效地保存和利用提供技术支持和理论依据。

## 1 材料与方法

样品采自广东省农业科学院果树研究所国家果树种质广州荔枝圃。选取健壮、无病虫害的 20~25 年生荔枝树的嫩叶, 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℃ 低温冰箱中备用。具体材料见表 1。

AFLP (扩增片段长度多态性, Amplified Fragment Length Polymorphism) 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, 详细步骤按文献 [4] 的方法进行。以冲洗好的 X 胶片记录谱带, 易于辨认的多态性带记为 “1”, 空缺时记录为 “0”。所有记录的数据均录入计算机并计算频率、方差和变异系数等。相似系数和聚类分析应用 NTSYS1.80 数据分析软件进行, 相似系数采用 Dice 系数, UPGMA 方法聚类。多样性分析和比较采用多态性标记比例 ( $P_j$ )。对于样品而言, 统计在该样品中出现的标记 (记录下来的多态性带) 数并计算其占有所有样品中出现的多态性标记总数的比例, 即为  $P_j$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 多样性分析

从 AFLP 试剂盒提供的 64 对引物组合中选取两对: *Eco*RI AAC + *Mse*I CTG, *Eco*RI ACC + *Mse*I CAT (扩增带信号强度一致性好, 条带分布比较均匀) 对 39 个荔枝品种进行 AFLP 分析 (图 1), 得到 106 个扩增位点, 其中多态性位点 92 个, 多态性位点比例平均为 87.1%, 品种间的区分率达到 100%。

根据 39 个品种在两对引物组合中的扩增表现, 调查单个材料所具有的多态性带, 并计算其占总检测到的 106 个多态性带的比例 (表 1)。从表 1 可以看出, 39 个荔枝品种多态性带数介于 18 (布袋)

收稿日期: 2002-12-17; 修回日期: 2003-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39700101); 广东省自然科学基金资助项目 (970678)

和 63 (元寿红) 之间, 多态性带比例介于 0.1698 (布袋) 和 0.5943 (元寿红) 之间, 其中最大部分介于 0.39~0.53 之间, 说明它们具有的多态性位点比较丰富。布袋的多态性比例很小, 暗示它可能有基因缺失产生, 而损失了一些扩增位点。

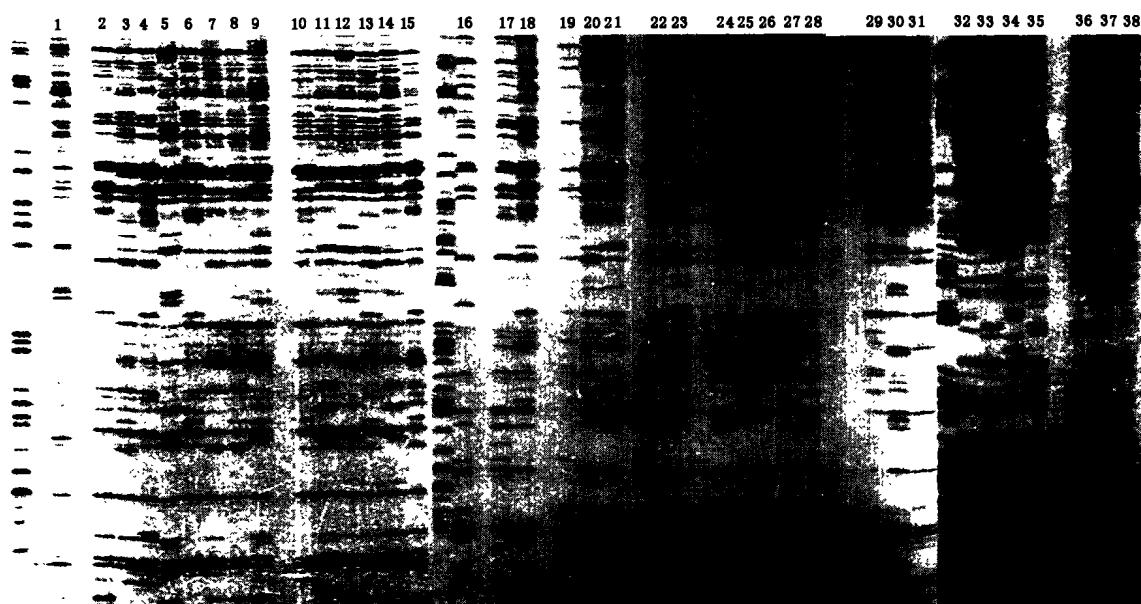


图 1 引物 E-AAC + M-CTG 扩增结果 (代号见表 1)

Fig. 1 Amplified result of litchi by using primer pairs E-AAC + M-CTG (No. see table 1)

表 1 筛选出的 AFLP 引物对 39 个供试荔枝品种 (系) 的扩增结果

Table 1 Amplified results of 39 litchi varieties with AFLP selected primers

代号 No.	名称 Name	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比例 Ratio of polymorphic sites	代号 No.	名称 Name	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比例 Ratio of polymorphic sites
1	三月红 Sanyuehong	43	0.4057	23	玉麒麟 Yuqilin	47	0.4434
2	糯米糍 Nuomici	42	0.3962	24	怀枝 Huaizhi	42	0.3962
3	尚书怀 Shangshuhuai	47	0.4434	25	赤叶 Chiye	50	0.4717
4	七月熟 Qiyueshu	42	0.3962	26	高州糖驳 Gaozhou Tangbo	43	0.4057
5	元阳 1 号 Yuanyang 1	51	0.4811	27	兰竹 Lanzhu	51	0.4811
6	新兴香荔 Xinxing Xiangli	39	0.3679	28	禾角 Hejiao	42	0.3962
7	将军荔 Jiangjunli	48	0.4528	29	乌面 Wumian	29	0.2736
8	雪怀子 Xuehuazizi	46	0.4340	30	元寿红 Yuanshouhong	63	0.5943
9	无核荔 Wuheli	56	0.5283	31	及第 Jidi	48	0.4528
10	称砣 Chengtuo	45	0.4245	32	乌叶舅 Wuyejou	48	0.4528
11	黑叶 Heiye	58	0.5472	33	上番枝 Shangfanzhi	56	0.5283
12	水东 Shuidong	54	0.5094	34	下番枝 Xiafanzhi	52	0.4906
13	桂味 (小核) Guiwei	55	0.5189	35	乌叶 Wuye	47	0.4434
14	白蜡 Baila	48	0.4528	36	宋香 Songxiang	57	0.5377
15	禾虾串 Hexiachuan	46	0.4340	37	鉴江红糯 Jianjiang Hongnuo	51	0.4811
16	八宝香 Babaoxiang	39	0.3679	38	妃子笑 Feizixiao	50	0.4717
17	甜岩 2 号 Tianyan 2	40	0.3774	39	桂味 (大核) Guiwei	52	0.4906
18	黑面登 Heimian deng	48	0.4528	40	妃子笑 Feizixiao*		
19	布袋 Budai	18	0.1698	41	桂味 (小核) Guiwei**		
20	麻雀春 Maquechun	51	0.4811	42	妃子笑 Feizixiao*		
21	中山脆肉 Zhongshan Cuirou	51	0.4811	43	桂味 (小核) Guiwei**		
22	惠东四季荔 Huidong Sijili	42	0.3962				

\* 增城仙村果场; \*\* 花都辛田果场。

\* Xiancun orchard, Zengcheng; \*\* Xintian orchard, Huadu.

## 2.2 亲缘关系分析

从聚类图 (图 2) 可以看出, 荔枝品种之间的亲缘关系比较复杂, 不是一种平行分化的关系, 内部聚类清晰。依相似系数 0.78 的水平, 可以将所研究的 39 个荔枝品种分成 6 组。第一组: 三月红。第二组: 包括糯米糍、七月熟、尚书怀、雪怀子、乌叶舅、麻雀春、鉴江红糯、高州糖驳、及第、下番枝、称砣、怀枝、兰竹、惠东四季荔、玉麒麟、将军荔、桂味 (大核)、桂味 (小核)、禾虾串、黑面登、中山脆肉、新兴香荔、禾角。第三组: 包括八宝香、甜岩 2 号。第四组: 包括元阳 1 号、黑叶、水东、元寿红、上番枝、宋香、无核荔、赤叶、妃子笑、白蜡、乌叶。第五组: 乌面。第六组: 布袋。

39 个荔枝品种相互之间相似系数一般达到 0.75 以上, 表明在分子水平上, 荔枝品种间的遗传多样性不太丰富, 上番枝 (33 号) 和宋香 (36 号) 相似系数最大, 达 0.97, 表明其亲缘关系较近, 布袋与其它品种方面的相似系数在 0.5 左右。

## 2.3 应用 AFLP 进行荔枝品种鉴别

应用引物组合 *EcoRI* AGC + *MseI* CAT 对来自广东增城仙村果场、花都辛田村果场的桂味 (小核)、妃子笑荔枝与位于广东省农科院果树研究所内的国家果树种质广州荔枝圃中的桂味 (小核)、妃子笑荔枝进行 AFLP 分析, 以鉴定增城仙村果场、花都等地的桂味、妃子笑品种。结果表明, 其扩增的数量、多态性以及扩增带的强弱都完全一致 (图 3)。鉴定出增城仙村果场、花都辛田村果场的桂味、妃子笑品种是纯正的, 并且其桂味为小核品种, 与作者对其进行形态学性状的观察结果相符。

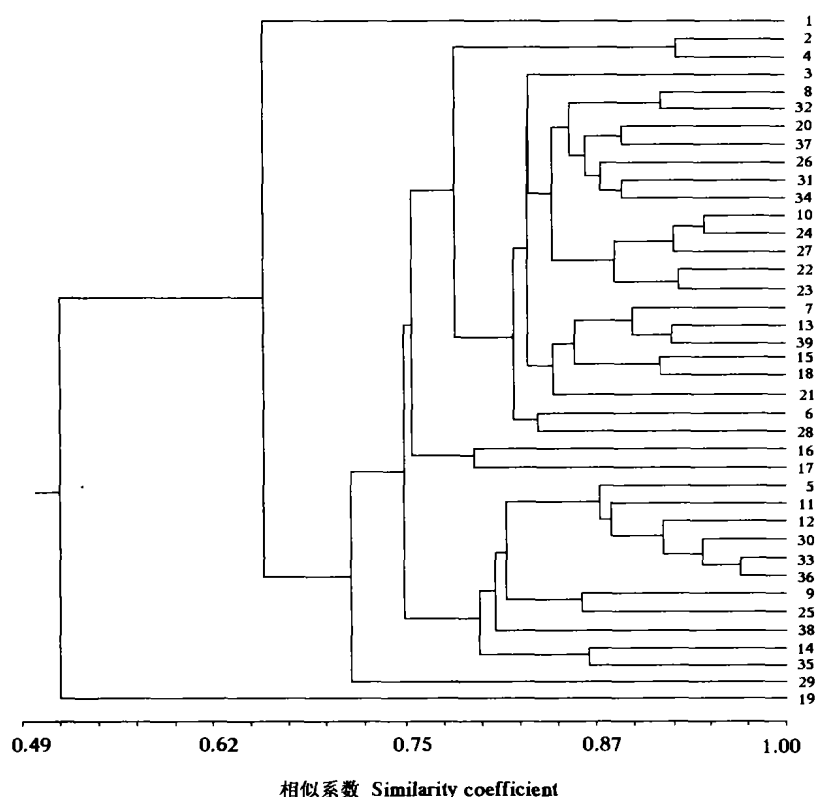


图 2 荔枝品种 AFLP 分析聚类树状图

(代号见表 1)

Fig. 2 Dendrogram of litchi varieties based on AFLP data

(No. see table 1)



图 3 应用 AFLP 进行荔枝品种鉴别

(代号见表 1)

引物组合: E-ACC + M-CAT

Fig. 3 Identification of litchi varieties by using primer

(No. see table 1)

pairs E-ACC + M-CAT

## 2.4 特殊种质分析

从聚类图可以看出,三月红自成一组,并且与其它绝大部分栽培品种遗传距离较远。三月红是一个早熟品种,在广州地区其开花时间大约在 12~1 月之间,果实成熟期在 5 月上中旬;而中熟品种妃子笑的开花期在 3 月中下旬,果实成熟期在 6 月中下旬,早、中熟品种之间开花期相差近 3 个月,而成熟期则只相差 1 个月。这种特性与其它的果树相比,是非常特殊的。大多数果树早、中熟品种之间开花最多相差 10~30 d。暗示三月红与其它中、晚熟品种存在较大的遗传差别。因此,将三月红单独分为一组是可以理解的,进一步的研究工作应多选择 1~2 个早熟品种,比较其一致性。

## 3 讨论

关于荔枝的分类,以前一直限于形态学性状,较为普遍采用吴淑娴等提出的方法<sup>[1]</sup>,即以表现比较稳定的果实中部的龟裂片峰的形态作为荔枝品种分类的主要依据,将全国的荔枝品种分为 3 大类型——果皮龟裂片尖突类型、果皮龟裂片隆起类型、果皮龟裂片平坦类型。按照此方法对本研究所涉及的 39 个荔枝品种进行分类,其中属于果皮龟裂片尖突类型的有:妃子笑、玉麒麟、桂味(大核)、桂味(小核)、宋香、无核荔、惠东四季荔、元寿红、中山脆肉、八宝香;属于果皮龟裂片隆起类型的有:麻雀春、糯米糍、七月熟、尚书怀、新兴香荔、高州糖驳、元阳 1 号、下番枝、黑面登、及第、布袋、乌叶、上番枝、禾虾串、禾角;属于果皮龟裂片平坦类型的有:鉴江红糯、雪怀子、乌叶舅、黑叶、怀枝、将军荔、称砣、兰竹、三月红、白蜡、甜岩 2 号、赤叶、水东、乌面。与本研究结果相比,两者之间基本没有一致性,对荔枝品种的形态学分类有待进一步研究。

李来荣等将福建省荔枝品种按果形分为 4 个类型<sup>[6]</sup>,即长卵圆形、心脏形、短心脏形、圆形。刘红兵等利用过氧化物同工酶(POD)对部分荔枝品种进行了分类研究,但因所得的多态性位点太少,其所得的分类结果还有待进一步充实。Degani C 利用 ACO、AAT、IDH、LAP、PGI、PGM、SKDH、SOD 和 IPT 等多种同工酶系统对 30 个以色列荔枝品种的亲缘关系进行研究<sup>[7]</sup>,将所研究的品种分成了 5 组,并有效的鉴定了两个品种是重名,如妃子笑和玉荷包(引自台湾)是同一品种。丁晓东等应用 RAPD 标记对 34 个荔枝品种进行了分类<sup>[3]</sup>,将其分为 4 组,但因其所选择的品种大多为福建当地品种,与本研究所采用的品种只有少数相同,研究结果缺乏可比性。

由于缺乏荔枝品种间系统及详细的谱系关系资料,不同的作者根据不同的标准做为分类依据,所得的结果差异较大。本文作者首次应用 AFLP 分子标记对荔枝种质资源进行了鉴别与分类,获得了 39 个荔枝品种的遗传树状图,弄清了一些品种之间的亲缘关系及其系统关系。

本文研究的品种来源于不同的荔枝产区,并且包括了广东大部分栽培品种,在遗传上具有一定的代表性。我国荔枝品种类型丰富多样,应该说其遗传多样性极其丰富的。然而从本文研究结果可以看出,大部分荔枝品种之间的相似系数都在 0.7 以上,最高达 0.97,其多态性带比例介于 0.1698(布袋)和 0.5943(元寿红)之间,其中大多数品种介于 0.39~0.53 之间,表明在分子水平上,荔枝品种之间的遗传多样性并非形态学性状所体现的那样丰富。丁晓东等<sup>[3]</sup>应用 RAPD 技术对 34 个荔枝品种的研究也得出了相似的结论。从理论上讲,提高一个物种的遗传多样性程度,一是通过基因突变,二是通过有性杂交,后者所起的作用更大。荔枝在植物分类学上属于无患子科(*Sapindaceae*)荔枝属(*Litchi* Sonn.)。荔枝属只有荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)和菲律宾荔枝(*Litchi philippinensis* Radlk)两个种。其中荔枝是唯一的栽培种,其起源和栽培中心都在中国,加上荔枝不能象其它果树(如香蕉)那样能广泛进行近缘和远缘杂交,而且国外大多数地方引种我国荔枝也是从近 300 年才开始的,因此总的来说引入外源基因的机会就相对较少。当然,因本研究未能涉及野生荔枝,采用的 39 个品种也并不能代表荔枝的全部遗传背景,因此有关荔枝的遗传多样性有待进一步研究。

## 参考文献:

- 1 广东省农业科学院. 广东荔枝志. 广州: 广东科技出版社, 1978. 1~90
- 2 阮少唐. 荔枝品种分类问题的探讨. 园艺学报, 1963, 2 (4): 345~350
- 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 Vos P, Hogers R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 1995, 23 (21): 4407~4414
- 5 肖顺元, Gmitter T, Grosses J. RAPD 分析鉴定柑桔体细胞杂种的快速方法. 遗传, 1995, 17 (4): 40~42
- 6 李来荣, 方 绮. 关于荔枝龙眼的研究. 北京: 科学出版社, 1956. 1~10
- 7 Degani C. Identifying lychee cultivars by isozymesis. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1995, 120 (2): 307~312

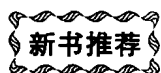
## Studies on Genetic Relationship among Litchi Varieties by Using AFLP

Yi Ganjun<sup>1</sup>, Huo Heqiang<sup>1</sup>, Chen Dacheng<sup>2</sup>, Huang Ziran<sup>2</sup>, Cai Changhe<sup>2</sup>, and Qiu Yanping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China; <sup>2</sup>South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Identification and classification of 39 litchi varieties were studied based on AFLP analysis. Three pair of primers (*Eco*RI AAC + *Mse*I CTG, *Eco*RI AGC + *Mse*I CAT, *Eco*RI ACC + *Mse*I CAT) were screened from 64 pair of primers. The analysis of genetic diversity among litchi varieties indicated on morphological level less abundant than molecular level. The cluster analysis results showed that the 39 cultivars could be divided into 6 groups. It is different from the traditional classification system based on peel morphology including peel smoothness, scale size, scale arrangement. The results showed peel morphology can not be used for litchi varieties classification as the only criterion. The molecular marker standard map of the main litchi varieties was established. Two varieties (*Litchi chinensis* 'Guiwei' and *Litchi chinensis* 'Feizixiao') come from different area were identified.

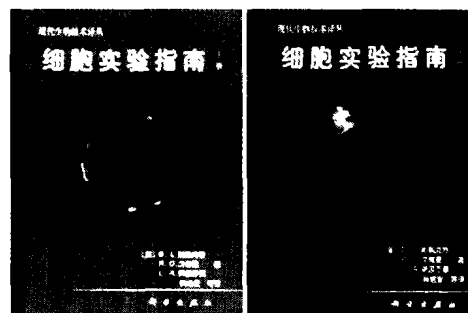
**Key words:** Litchi; AFLP; Genetic relationship



## 新书推荐

## 《细胞实验指南》

由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿, 本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法, 它们由三大主体组成: 细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。本书与备受称赞的冷泉港实验室出版的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点, 对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。定价: 244 元 (上、下册, 含邮资)。



## 基因工程原理 (第二版) 上、下册 吴乃虎著译

本书由科学出版社出版。全书共十二章, 分上下两册, 书末附有基因工程名词术语解释及索引。

上册: 一至六章 (基因与基因工程、基因操作的主要技术原理、基因克隆的酶学基础、基因克隆的质粒载体、噬菌体载体和柯斯载体、基因的分离与鉴定)。定价 58 元 (含邮费)。

下册: 七至十二章 (基因的表达与调节、真核基因在大肠杆菌中的表达、植物基因工程、哺乳动物基因工程、重组 DNA 与现代生物技术、重组 DNA 与医学研究)。定价 78 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局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。