

# 雷州半岛菠萝蜜种质遗传多样性的 RAPD 分析

叶春海 李映志 丰 锋

(广东海洋大学农学院, 湛江 524088)

**摘 要:** 用 RAPD 标记方法对我国雷州半岛的 65 份菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) 实生种质资源 DNA 的遗传多样性进行了检测, 16 个引物共检测到 78 条带, 其中 69 条具多态性 (占 88.4%)。聚类分析表明, 65 份菠萝蜜材料在遗传距离 0.26 处可分为 3 大类。供试种质虽具有丰富的形态性状变异, 但在 DNA 水平上平均相似性系数为 0.7341。干、湿胞类型及引自马来西亚的种质均不能独立聚类。对菠萝蜜品种的干、湿胞分类法及菠萝蜜品种的引种区域进行了讨论。

**关键词:** 菠萝蜜; 遗传多样性; 种质资源; RAPD

中图分类号: S 667.8 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1088-04

## Analysis of Genetic Diversity of Jackfruit Germplasm Grown in Leizhou Peninsula, China, Using RAPD Marking Method

Ye Chunhai, Li Yingzhi, and Feng Feng

(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** RAPD (random amplified polymorphic DNA) variation was assessed in 65 accessions of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) from Leizhou peninsula, southern China. Among 78 bands detected by 16 RAPD primers, 69 were polymorphic. The cluster analysis showed that three groups could be clustered when genetic distance coefficient was given as 0.26. In contrast to high diversity among morphology characters, high average genetic similarity coefficient was observed (0.7431) on RAPD markers. Soft type and firm type could not form an independent cluster, nor the germplasm introduced from Malaysian species. The classification methods and the introduction strategy of jackfruit germplasm were discussed.

**Key words:** Jackfruit; Genetic diversity; Germplasm resources; RAPD

### 1 目的、材料与方法

菠萝蜜 (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) 是热带、亚热带名特果树树种, 在我国海南、广东、广西等省区均有分布和栽培。长期以来, 我国对菠萝蜜种质资源的收集与评价工作很少, 而国外对菠萝蜜种质资源调查研究工作较多。印度历经 7 年, 调查研究了近 1 800 株菠萝蜜种质, 筛选和保存了约 35 个优质株系<sup>[1]</sup>; 孟加拉国对本国菠萝蜜种质资源做了比较完整的调查和评价, 建立了菠萝蜜种质资源库<sup>[2]</sup>。本研究利用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分子标记分析近年来广东海洋大学收集的国内外菠萝蜜种质资源的遗传多样性, 以期指导后续的品种选育及鉴定工作。

试材共 65 份 (名称见图 2), 除 4 份引自马来西亚 (MY 系列) 外, 均来自广东粤西地区菠萝蜜产区 (徐闻县南山镇, 东海岛民安镇、东山镇, 廉江市青平镇、安铺镇、横山镇, 雷州市乌石镇、龙门镇、覃斗镇, 茂名市羊角镇, 吴川市塘缀镇) 的正常结果植株。

田间采集试验植株的叶片, 置于液氮中运输、保存, 采用程运江等<sup>[3]</sup>的方法提取总 DNA。

先采用 4 份种质 (NT-10, XK-13, NT-15, XK-41) 进行预备试验, 从 80 个 RAPD 引物 (上海博

收稿日期: 2005-04-19; 修回日期: 2005-08-04

基金项目: 广东省农业厅农业科技项目 (B03083); 广东省科技厅农业攻关项目 (2005B20901030)

致谢: 本校吴钊副教授、硕士研究生毛琪和本科生莫泽广同学参加了部分工作, 特此致谢。

亚合成) 中选出 16 个能获得清晰条带、反应稳定具有多态性的引物 (表 1) 进行下一步分析。

每个筛选出的引物重复两遍。扩增反应在 PE 公司生产的 480 型扩增仪上进行, 20  $\mu\text{L}$  反应体系, 含 Tris-HCl 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , KCl 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  0.1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 每种 dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 0.1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , BSA 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , DNA 模板 25 ng, Taq 酶 2.5 U, 石蜡油覆盖。反应程序 94 4 min; 94 1 min, 36 1 min, 72 2 min, 40 个循环; 72 10 min。反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶 (1  $\times$  TBE) 电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统检测。100 bp 的 DNA ladder 作分子量标记。

同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 属于同一位点的产物按扩增阳性 (1) 和扩增阴性 (0) 记录电泳带谱, 形成表型数据矩阵。其中, 强带计为 “1”, 可重复弱带计为 “1”, 不可重复弱带计为 “0”。使用 NTSYS-pc 软件计算样品间 (OUT) 的表征 Nei 氏相似性系数<sup>[4]</sup>, 并由此计算其相对遗传距离; 对得到的遗传相似性矩阵进行非加权组法 (UPGMA) 聚类分析, 建立样品间的亲缘关系树图。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增结果

琼脂糖电泳分析表明, 16 个 RAPD 随机引物在 65 份菠萝蜜种质中共扩增出 78 条带, 产生的 DNA 片段大小分布在 0.2 ~ 1.8 kb 之间; 其中多态性条带 69 条, 共占 88.4%; 平均每个引物扩增的 DNA 条带数为 4.85 (表 1)。16 个引物可将 65 份菠萝蜜种质完全区分开。引物 B-9 的扩增效果见图 1。

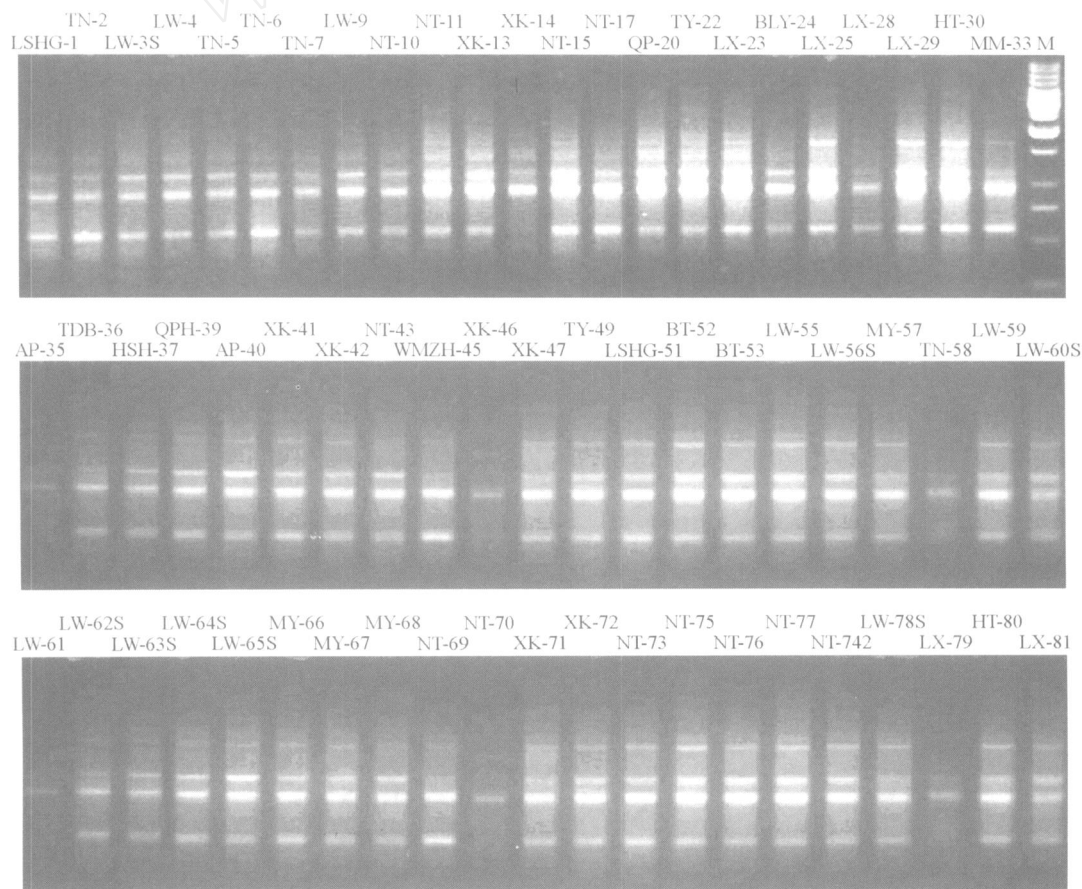


图 1 引物 B-9 在 65 份菠萝蜜种质的扩增

Fig 1 DNA fragments amplified by B-9 in 65 jackfruit accessions

表 1 16个多态性引物在 65份菠萝蜜材料上的扩增结果

Table 1 Polymorphic primers and its amplification results on 65 jackfruit accessions

| 引物<br>Primer | 引物序列<br>Nucleotide sequence<br>(5'-3') | 扩增条带数 (多态性带数)<br>Number of amplified bands<br>(polymorphic) | 引物<br>Primer | 引物序列<br>Nucleotide sequence<br>(5'-3') | 扩增条带数 (多态性带数)<br>Number of amplified bands<br>(polymorphic) |
|--------------|--|---|--------------|--|---|
| A13          | GCGGCTGGAG                             | 11 (11)   | L-1          | TGCGCCTCAC                             | 7 (6)   |
| A15          | CCAACGTGCT                             | 3 (3)   | A-19         | AGCGACCGGC                             | 5 (4)   |
| A18          | CAAGCATAGT                             | 5 (3)   | A-27         | AGCACGGGCA                             | 6 (6)   |
| A6           | TGCCGTCCTC                             | 3 (3)   | B-4          | CTCTCGCCCC                             | 8 (8)   |
| E7           | AGGACGTG                               | 4 (3)   | B-6          | TAGGACTCCG                             | 3 (3)   |
| H-08         | GCTCCCCCA                              | 3 (2)   | B-9          | AGTGCA TC GA                           | 4 (3)   |
| H-12         | CTCTCGGTTG                             | 3 (3)   | B-13         | CTCTCGGTTG                             | 4 (4)   |
| H-13         | GCCACCTCGT                             | 4 (4)   | B-16         | AGCGACTCGA                             | 5 (3)   |

2.2 菠萝蜜种质的聚类分析

在 Nei氏相似性矩阵中，各种质间的遗传相似系数（Genetic similarity）分布在 0.2778 ~ 0.8841 之间，平均为 0.7341。

UPGMA构建的系统树中（图 2），65份种质基本可分为 3组。AP-35和 XK-46为一组，与其他种质的遗传距离最远，在遗传距离 0.37处与其他种质分开。XK-14单独为一组，在 0.26处与剩余 62 份种质分开。绝大多数种质的遗传距离都在 0.26以下，表明这些种质的遗传多样性较低。

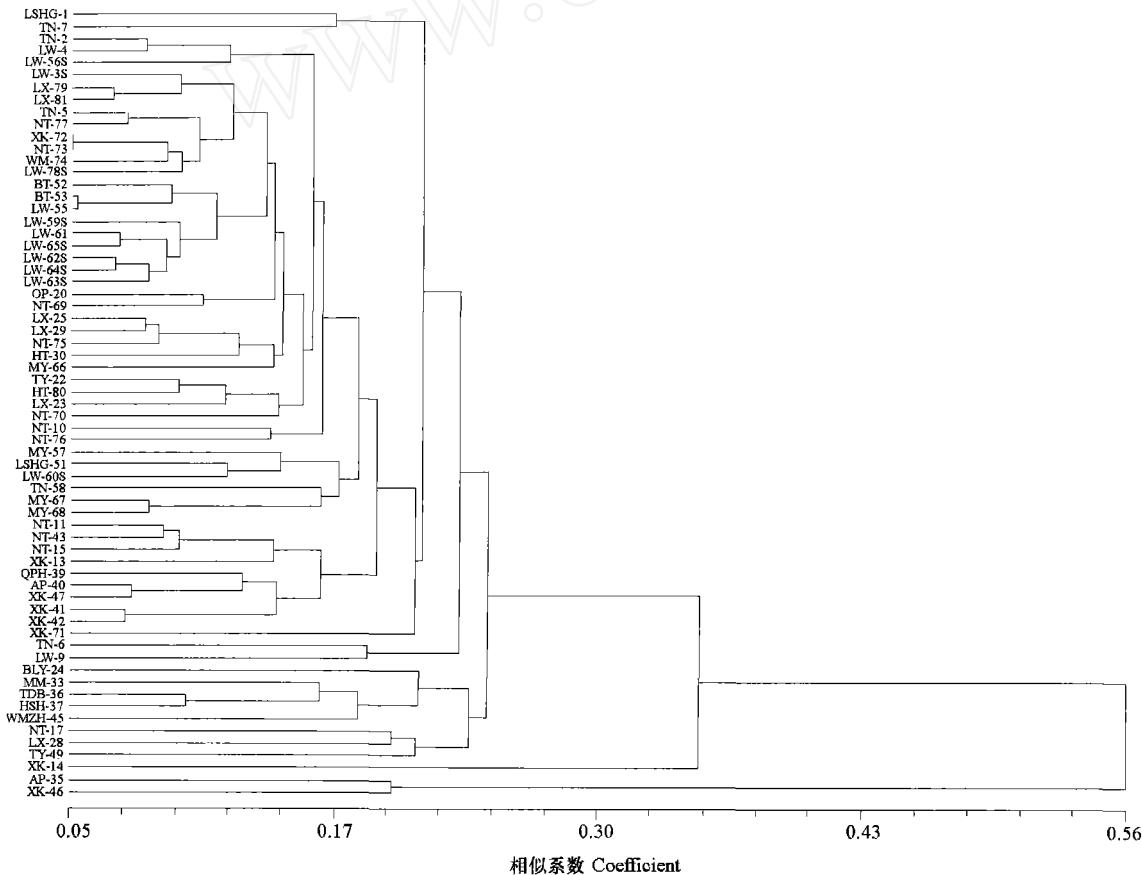


图 2 基于 RAPD 分析产生的菠萝蜜种质 UPGMA 聚类

Fig. 2 UPGMA dendrogram of cluster analysis based on RAPD data for jackfruit germplasm

AP-35为廉江市安铺镇种质，XK-46为湛江东海岛的种质。从调查的植株和果实性状上，这两者与其他一些种质的区别不大，未见特殊的植物学性状。但两者独立聚类，可能源自不控制形态性状的核苷酸区域。XK-14为东海岛的种质，与其他种质也没有很明显的区别。

9份湿胞种质(编号后加S系列)除5份(LW-64S、LW-65S、LW-62S、LW-59S、LW-63S)明显聚为一类外,其余4份(LW-3S、LW-78S、LW-60S、LW-56S)与干胞种质混聚。干胞、湿胞种质不能独立成组,说明干、湿胞在DNA水平上可能并没有较大的差异。值得注意的是,有同一家系的一组实生后代,即干胞LW-59与其实生后代干胞LW-9,干胞LW-9与其实生后代湿胞LW-3S都没有聚在一起,说明实生后代有较大的分离。而同一植株的两个主干一边干胞一边湿胞的两份种质(NT-52、NT-53)在聚类树中聚在一起,两者的特异条带不能区分其干、湿胞类群。

4份引自马来西亚的品种有3个(MY-57、MY-68、MY-67)聚在一起,另一个(MY-66)与本地种质聚为一起,表明这些引进品种可能与本地某些种质有较大的相似性。

### 3 讨论

传统上我国将菠萝蜜品种大致分为干、湿胞两大类,干胞果肉爽脆,湿胞果肉相对湿软,市场上以干胞类型较受欢迎,很少有果农保留湿胞单株。国外一般也将菠萝蜜大致分为硬肉和软肉两大类<sup>[6]</sup>。

从本研究的结果来看,以实生繁殖为主的菠萝蜜群体,无论其果实形状、颜色等外观性状,还是果实胞、瓣颜色、糖度等内在性状变化都很大,如果实颜色有绿、黄、褐、黑等;可溶性固形物含量14%~31%,但干、湿胞之间没有绝对的差异;从外观形态性状来看,两者也没有特异的性状可区分。在资源调查中,我们也发现,干胞类的实生后代可以产生湿胞类型。由此,笔者认为,以干、湿胞性状来进行分类的方法不能代表菠萝蜜品种间遗传物质的差异,干胞、湿胞间的差异有可能是单个或几个质量性状位点间的差异。

本研究所用种质在形态性状上有较大差异。果实质量3.22~1.94 kg;果胞数量70~654个;果肉0.55~8.16 kg;可溶性固形物14.7%~31.5%;果皮有绿色,黄绿色,褐色和金黄色;果胞有黄色,浅黄色,金黄色;果瓣有白色和黄色;种子有褐色,灰白色;果肉有淡香及浓香等。多数种质果心流胶粘手,部分种质果心不流胶或很少流胶。NT-742还具有一年多次开花的习性。然而与形态性状的多样性相比,DNA水平上的多样性较低,这与国外的研究结果<sup>[5]</sup>类似。DNA水平上较高的相似性,反映出这些种质相对较为单一的遗传背景,可能与长期栽培留种过程中的人为选择有关。

菠萝蜜原产印度和东南亚地区,国外的研究表明<sup>[7]</sup>,这两个地区的菠萝蜜种质可以单独聚类,具有不同的遗传背景。本研究结果中,引自马来西亚的4个品种和我国的菠萝蜜种质资源遗传差异较小,说明我国菠萝蜜可能多数来自东南亚地区。因此,为丰富我国菠萝蜜种质基因库,今后重点应引进印度地区的品种,以创造更多的遗传差异。

### 参考文献:

- 1 Mitra S K, Maity C S. A summary of the genetic resources of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lank.) in west Bengal, India. *Acta Hort* (ISHS), 2002, 575: 269~271
- 2 Haq N, Hossain A, Basha A. Survey of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) in Bangladesh. London: The Commonwealth Science Council Publications, 1995. 90p
- 3 程运江, 伊华林, 庞晓明, 郭文武, 邓秀新. 几种木本果树 DNA 的有效提取. *华中农业大学学报*, 2001, 20 (5): 481~483  
Cheng Y J, Yi H L, Pang X M, Guo W W, Deng X X. An efficient method for genomic DNA extraction from woody fruit plants. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20 (5): 481~483 (in Chinese)
- 4 Nei M. Genetic distances between populations. *Amer Nat*, 1972, 106: 283~292
- 5 Schnell R J, Olano C T, Campbell R J, Brown J S. AFLP analysis of genetic diversity within a jackfruit germplasm collection. *Scientia Horticulturae*, 2001, 91 (3-4): 261~274