

用 AFLP 标记分析广西龙眼种质遗传多样性

彭宏祥¹, 李冬波^{1*}, 朱建华¹, 李江舟², 曹辉庆¹, 潘丽梅²

(¹广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007; ²广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要: 选用 10 对 AFLP 引物组合分析了广西 38 个龙眼品种 (优良单株) 和两个龙眼近缘亚种龙荔单株, 以及 10 个来自国内外其他产区龙眼品种的遗传多样性。在所扩增的 570 条 AFLP 主带中, 有 485 条具有多态性, 占 85.1%。所用引物可将供试的品种 (优良单株) 区分开来, 供试材料的遗传相似系数在 0.39 (两个亚种间) 至 0.98 之间。根据遗传相似系数 (UPGMA, N-J) 得到的分类树状图与传统方法的分类结果相类似。研究结果表明广西龙眼种质具有较广泛的遗传多样性。

关键词: 龙眼; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: S 667.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 10-1511-06

Genetic Diversity of Longan in Guangxi Assessed by AFLP Markers

PENG Hong-xiang¹, LI Dong-bo^{1*}, ZHU Jian-hua¹, LI Jiang-zhou², CAO Hui-qing¹, and PAN Limei²

(¹Horticulture Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; ²Agriculture College, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: To determine the genetic diversity of longan (*Dioscarpus longan* Lour.) varieties in Guangxi, we employed 10 pairs of AFLP primer combinations on 38 varieties and 2 subspecific varieties [*Dioscarpus confinis* (How et Ho) H. S. Do] in Guangxi, and 10 varieties in other regions and countries. A total of 570 major AFLP bands were observed, and 485 bands (85.1%) were polymorphism. All of the cultivars could be divided with the markers used. Genetic similarities among all taxa ranged from 0.39 (between the two subspecies) to 0.98. Phenetic trees based on genetic similarities (UPGMA, N-J) were similar to known taxonomic relationships. The results showed that the genetic diversity of longan is very high in Guangxi.

Key words: longan; genetic diversity; AFLP

龙眼在分类上属无患子科龙眼属 (*Dioscarpus* Lour.) 龙眼亚种, 当今国内外栽培的龙眼品种都属于本亚种中的龙眼变种 (var. *longan*) (邱武陵和章恢志, 1996)。近年来关于分子标记应用于龙眼种质资源的研究已有一些报道, 但研究材料主要为福建和广东的品种, 对广西品种研究较少 (林同香等, 1998; 易干军等, 2003)。广西是龙眼原产地之一, 龙眼栽培历史悠久, 在长期的人工栽培和选择过程中形成了种类繁多的品种或类型 (朱建华等, 2002)。苏伟强等 (1993, 1997) 应用过氧化物酶分析研究了广西龙眼亲缘关系, 但同工酶标记太少, 不能区分很多亲缘关系较近的品种; 陈有志和刘成明 (2001) 应用 RAPD 标记对广西 5 个龙眼品种进行了鉴别分析, 但分析材料少, 未能反映广西龙眼的遗传多样性。作者在对广西龙眼种质资源进行系统调查、收集保存的基础上, 应用 AFLP 标记对广西主要龙眼品种以及近年来通过初步评选的优良单株进行遗传多样性分析, 并且将广西龙眼种质与国内外不同产区、不同生态类型的品种, 以及近缘属植物相结合进行分析研究, 以期对其亲缘关系有更全面了解, 为广西龙眼种质资源的保护与利用以及龙眼遗传育种提供参考。

收稿日期: 2008 - 06 - 11; 修回日期: 2008 - 09 - 22

基金项目: 广西自然科学基金项目 (桂科自 0339023)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lidongbo6230@yahoo.com.cn)

1 材料与方法

1.1 龙眼品种 (优良单株) 材料

50份材料均于 2006年 7月取自广西农业科学院园艺研究所龙眼种质资源圃。其中有 38个是原产于广西的龙眼品种或优良单株 (包括广西所有主栽品种及大部分优良单株), 3个原产于广东和 3个原产于福建的龙眼品种, 3个泰国龙眼品种 (均为当地主栽品种), 1个热带生态型龙眼优良单株和 2个龙眼近缘种龙荔单株 (为本所优选单株)。具体名称见表 1。

表 1 供试龙眼品种 (优良单株) 及近缘种龙荔名称

Table 1 Name of longan and longli varieties used in this study

编号 No	名称 Name	编号 No	名称 Name
1	细核脆香 Xihe Cuixiang	26	车站 Chezhan
2	桂圆 0506 Guiyuan 0506	27	六司 Liusi
3	桂香 Guixiang	28	佳圆 1号 Jiayuan 1
4	石硖 Shixia	29	国宝 Guobao
5	白平 Baiping	30	大乌圆 Dawuyuan
6	油面石硖 Youmian Shixia	31	桂龙早 1号 Guilongzao 1
7	五象岭石硖 Wuxiangling Shixia	32	大乌圆 8213 Dawuyuan 8213
8	中秋 1号 Zhongqiu 1	33	巨乌 Juwu
9	中秋 (北流) Zhongqiu (Beiliu)	34	大乌圆 8902 Dawuyuan 8902
10	国庆 1号 Guoqing 1	35	大乌圆 (nx-1) Dawuyuan (nx-1)
11	国庆 2号 Guoqing 2	36	大乌圆 (nx-2) Dawuyuan (nx-2)
12	桂明 1号 Guiming 1	37	木格大乌圆 Muge Dawuyuan
13	迟广眼 Chi Guangyan	38	迟白露 Chi Baibu
14	早熟广眼 Zaoshu Guangyan	39	早白露 Zao Baibu
15	小广眼 Xiao Guangyan	40	热带型龙眼 (pn-1) Tropical longan (pn-1)
16	大广眼 Da Guangyan	41	依器 Yixiao
17	博白广眼 Bobai Guangyan	42	依登 Yideng
18	冰糖肉 Bingtangrou	43	苗翘 Miaoqiao
19	冰糖果 Bingtangguo	44	储良 Chuliang
20	灵龙 Linglong	45	双孖木 Shuangzimu
21	桂焦 2号 Guijiao 2	46	普明庵 Puming An
22	桂焦 1号 Guijiao 1	47	油潭本 Youtanben
23	桂圆 0503 Guiyuan 0503	48	立冬本 Lidongben
24	桂圆 0501 Guiyuan 0501	49	龙荔 - 1 Longli-1
25	良庆 2号 Liangqing 2	50	龙荔 - 2 Longli-2

1.2 DNA提取及 AFLP分析

DNA提取参照肖璇等 (2005) 的方法。AFLP分析参照 AFLP Analysis System 说明书进行 (Invitrogen life technologies)。AFLP接头和引物设计均按 Pieter等 (1995) 报道的方法进行, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。预扩增引物 EA 为: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'; MC 为: 5'-GATGAGTCTGAGTAAC-3'。选择性扩增分别选取带 3个选择性碱基的引物 (表 2), 银染检测参照 Promega公司的银染测序法。

根据银染结果, 选择清晰的片段进行统计, 为了提高试验重复性, 将较弱的片段忽略不计。根据扩增片段的有无将其分别记为 0和 1, 每个多态性片段分别代表一个基因组位点。采用多变量分析系统 (NTSYS-pc, 2.10版) 软件中的 DICE法计算遗传相似系数。然后根据相似系数用 SAHN Clustering和不加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP选择性扩增结果

利用从 64 对 AFLP 引物中筛选出的 10 对扩增产物多态性好、谱带清晰的引物，对 50 份材料的基因组 DNA 进行扩增片段长度多态性分析，获得了较好的扩增结果（图 1）。10 对引物组合在 50 个材料中扩增出 570 条清晰的带，引物扩增条带数 34 ~ 72 条（表 2），平均每对引物扩增 57 条，其中多态性带共有 485 条，多态性比例为 85.1%，10 对引物能将所有的材料区分出来。可见 AFLP 检测龙眼种质资源遗传多样性的效率很高，同时也充分体现了广西龙眼种质具有较高的遗传多样性。

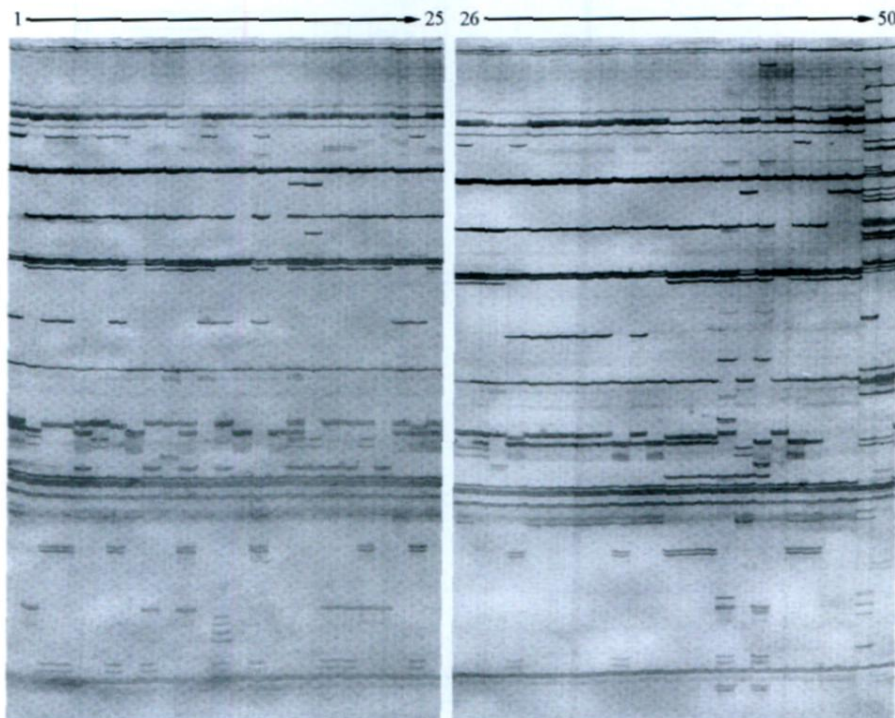


图 1 引物 E-ATG/M-CAG 组合对龙眼的 AFLP 扩增图谱

1 ~ 50: 材料编号同表 1。

Fig 1 AFLP fingerprinting patterns of longan using the primer combine of E-ATG/M-CAG

1 - 50: The cultivars serial number is the same as Table 1.

表 2 10 对 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

Table 2 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the 10 primer pairs

引物组合 Primer combination	总扩增带数 Total band number	多态性带数 Polymorphic band number	多态性带百分率 / % Polymorphic band percentage
E-ACA/M-CGA	34	25	73.5
E-AGG/M-CAT	63	58	92.1
E-AGG/M-CGT	41	37	90.2
E-AGG/M-CGG	62	48	77.4
E-AGG/M-CGC	44	34	77.3
E-AGG/M-CTG	68	66	97.1
E-AGG/M-CCC	45	39	86.7
E-AAG/M-CGC	65	54	83.1
E-ATG/M-CAG	72	62	86.1
E-AGC/M-CTC	67	57	85.1

2.2 龙眼种质资源的聚类分析

在所选的 50 份材料中两两间遗传相似系数的范围为 0.39 ~ 0.98, 其中两个近缘种龙荔单株与龙眼品种 (优良单株) 间亲缘关系较远, 它们与龙眼品种 (优良单株) 两两之间相似系数都在 0.41 以下, 其余龙眼品种 (优良单株) 间相似系数在 0.80 ~ 0.98, 其中桂龙早 1 号和大乌圆 8213 亲缘关系最近, 相似系数为 0.98。

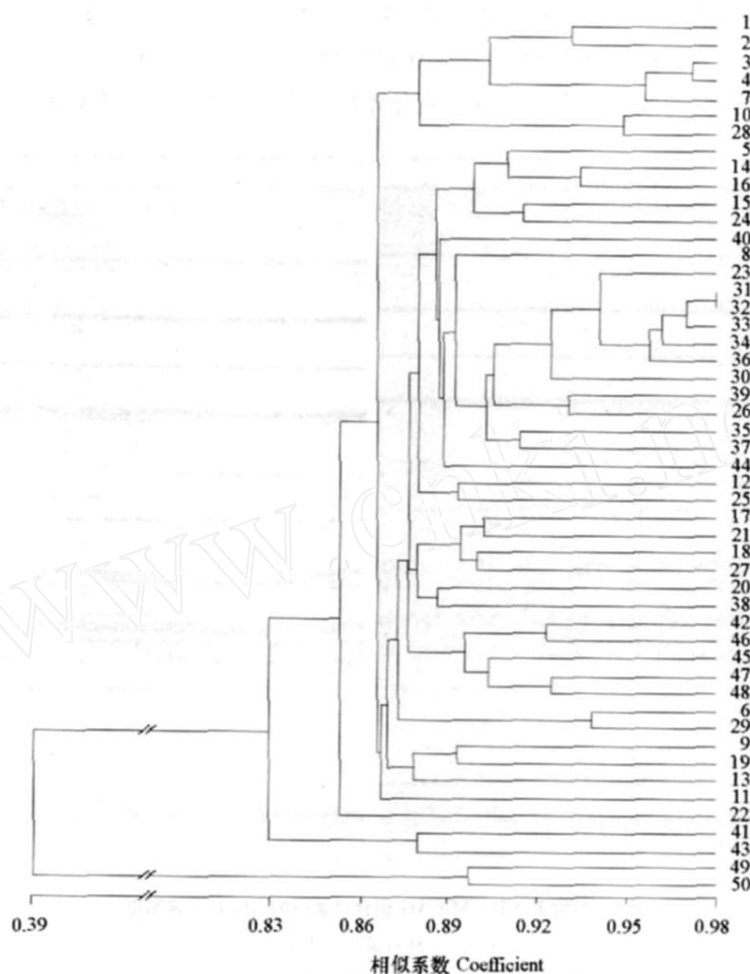


图 2 龙眼种质聚类图

Fig 2 Dendrogram of longan varieties

从图 2 可以看出, 龙眼品种 (优良单株) 间亲缘关系较近, 以 0.88 的相似系数为阈值, 可以将本试验的品种 (优良单株) 分为 10 个类群。类群 1 有细核脆香 (1)、桂圆 0506 (2)、桂香 (3)、石硖 (4)、五象岭石硖 (7)、国庆 1 号 (10)、佳圆 1 号 (28) 等 7 个品种 (优良单株), 为石硖类型或性状与之相近的品种 (优良单株)。类群 2 包括白平及储良等 19 个品种, 其又可以分为 5 个亚类, 亚类 包括白平 (5)、早熟广眼 (14)、大广眼 (16)、小广眼 (15)、桂圆 0501 (24) 等大部分广眼类型品种; 亚类 包括桂圆 0503 (23)、桂龙早 1 号 (31)、大乌圆 8213 (32)、巨乌 (33)、大乌圆 8902 (34)、大乌圆 (nxy-2) (36)、大乌圆 (30)、大乌圆 (nxy-1) (35)、木格大乌圆 (37) 等大乌圆类型品种 (优良单株) 和早白露 (39)、车站 (26) 等品种, 其余 3 个品种 (优良单株) 中秋 1 号 (8)、热带型龙眼 (pn-1) (40)、储良 (44) 与同一类群中的其他品种 (优良单株) 亲缘

关系较远, 分别单独归为一个亚类。类群 3 有桂明 1 号 (12) 和良庆类 2 号 (25) 2 个品种。类群 4 有博白广眼 (17)、桂焦 2 号 (21)、冰糖肉 (18)、六司 (27)、灵龙 (20)、迟白露 (38) 等 6 个品种。类群 5 有 5 个品种, 包括 1 个泰国品种 (依登) (42), 一个广东品种 (双孖木) (45) 和 3 个福建品种油潭本 (47)、立冬本 (48) 和普明庵 (46)。类群 6 有油面石硠 (6) 和国宝 (29) 两个品种。类群 7 有中秋 (北流) (9)、冰糖果 (19) 和迟广眼 (13) 3 个品种, 类群 8 有国庆 2 号 (11) 1 个品种, 类群 9 有桂焦 1 号 (22) 1 个品种。类群 10 为依器 (41) 和苗翘 (43) 两个泰国品种。具体亲缘关系见图 2。

2.3 广西龙眼种质与不同产区龙眼的亲缘关系鉴定

在所选的 10 个不同产区的龙眼品种中, 从总体上看, 除泰国龙眼品种依器和苗翘外, 其余品种间的遗传相似系数均高于部分广西龙眼品种 (优良单株), 说明广西龙眼品种 (优良单株) 遗传多样性较高。其中广东品种双孖木、泰国品种依登和 3 个福建品种 (油潭本、立冬本和普明庵) 聚在一起, 单独分为一类, 表明其可能起源相同, 在演化的过程中发生了一些变异; 而另外两个泰国品种依器和苗翘与其它龙眼品种的亲缘关系较远, 说明在不同的生态条件下形成了不同品种类型。

石硠和储良是两个原产于广东的著名品种, 也是目前广西的主栽品种。其中石硠引入广西时期较早, 经过实生繁殖, 形成了不同品系。通过聚类分析发现有一些品种 (优良单株) 与其亲缘关系较近, 可以分在一个类群。其中桂香与其相似系数大于 0.97, 说明其可能是来自石硠的变异品种。而储良引进广西时间较晚, 虽同大乌圆类型品种聚在一大类群, 但与大乌圆类型品种遗传距离较远, 没有发现与其亲缘关系非常相近的品种, 可以单独归为一个亚类。说明随着栽培水平的提高, 广西近年已不再采用实生繁殖方式, 因此没有发现与储良亲缘关系较近的优良单株。

大乌圆为原产于广西容县的一个老品种, 也是广西龙眼主栽品种之一。其主要特点是果型大, 果肉厚, 可食率高, 丰产性强。本试验中在遗传相似系数 0.90 处与大乌圆聚在一起的 10 个材料均为大果型品种, 同时在形态上也表现出种子大而饱满, 叶柄较短, 叶片无光泽且互相堆叠等大乌圆品种的特征, 与石硠、储良、广眼等品种有明显差异。各个大乌圆类型品种 (优良单株) 间也有一些不同, 如桂龙早 1 号表现出枝梢节间短、树体矮化等品种特性。说明这些大乌圆类型品种 (优良单株) 起源相同, 但在长期栽培和实生繁殖过程中也形成了不同类型, 这与实际调查结果相符。

2.4 特殊种质分析

焦核龙眼因胚败育种子萎缩变小, 果肉较厚, 可食率高, 是一种珍稀种质资源。本试验中采用的两个焦核品种遗传差异较大, 属于不同的类群, 其中桂焦 2 号与广西其他龙眼品种 (优良单株) 的亲缘关系最远, 单独聚为一类。说明不同焦核龙眼品种 (优良单株) 基因组间差异较大, 这与林同香等 (1998) 用 RAPD 分析得到的结果一致。

热带生态型龙眼起源于热带地区, 能一年多次开花结果, 是不同于我国亚热带生态型龙眼的另一种品种类型。本试验选取广西省农业科学院园艺研究所等单位筛选的热带型龙眼优良单株 'pn-1', 分析发现其与大乌圆类型有一定亲缘关系, 但有别于同类型的其它品种 (优良单株), 可单独归为一个亚类。

龙眼近缘种龙荔是一种特殊的种质资源, 既具有龙眼的性状又具有荔枝的性状。经 AFLP 聚类分析发现, 本试验中采自两个不同地区的龙荔单株与龙眼品种在相似系数 0.39 时聚在一起, 远高于龙眼品种之间的变异, 说明它们虽与龙眼间存在着一定的亲缘关系, 但亲缘关系较远, 属于不同的种。

3 讨论

目前关于龙眼品种的分类主要有形态学、生物化学和分子生物学等方法。从本试验结果可以看出, 广西所有的大乌圆类型都聚在一起, 属于同一个类群, 大部分广眼类型以及部分石硠类型也都聚

在一起,该结果与传统的分类方法结论基本一致。但在部分品种的分类上存在差异,例如热带生态型龙眼根据其来源和形态应与我国南亚热带生态型龙眼有较大区别,但本试验根据 AFLP分类发现其与广西龙眼的亲缘关系比较接近,原因有待进一步探讨。

本试验研究结果表明 38 个广西品种 (优良单株) 间的相似系数变化范围为 0.85~0.98 之间,大部分品种相似系数在 0.86 以内,表明分子水平上龙眼品种间的遗传多样性并不如形态上那样丰富。广西是龙眼的起源中心之一,栽培历史悠久,历史上长期沿用实生繁殖。由于长期的人工选择,加上选择时多侧重于经济性状,因此现在大多数优良的单株可能源自几类优良的祖先。而目前的龙眼品种 (优良单株) 主要选自实生后代,因此得到的品种多属于几个大的类群,同一类群品种间的遗传多样性不高, AFLP 分析变异程度不大。当然,本研究的供试品种都是综合性状优良或具有某些特殊性状的品种 (优良单株),还不能完全代表广西龙眼的全部遗传背景,有待今后开展更为深入的研究。

References

- Chen You-zhi, Liu Cheng-ming 2001. Study and analysis longan cultivars based on RAPD markers. *China Fruits*, (4): 28 - 29. (in Chinese)
- 陈有志, 刘成明. 2001. 龙眼品种 RAPD 鉴别及分析. *中国果树*, (4): 28 - 29.
- Lin Tong-xiang, Chen Zhen-guang, Dai Si-lan, Wu Nai-hu 1998. Taxonomic study of *Dimocarpus longan* by random amplified polymorphic DNA technique. *Acta Botanica Sinica*, 40 (12): 1159 - 1165. (in Chinese)
- 林同香, 陈振光, 戴思兰, 吴乃虎. 1998. RAPD 技术在龙眼品种分类中的应用研究. *植物学报*, 40 (12): 1159 - 1165.
- Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Homes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper, Marc Zabeau 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407 - 4414.
- Qiu Wu-ling, Zhang Hui-zhi 1996. The collection of fruit trees in China. *Longan and loquat*. Beijing: Chinese Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 邱武陵, 章恢志. 1996. 中国果树志·龙眼枇杷卷. 北京: 中国林业出版社.
- Su Wei-qiang, Huang Hai-bin, Lu Yu-ying, Liu Rong-guang 1993. Analysis genetic relationship of longli, longan and litchi based on the peroxidase and isoenzyme. *Guangxi Agricultural Sciences*, (4): 158 - 159. (in Chinese)
- 苏伟强, 黄海滨, 陆玉英, 刘荣光. 1993. 龙荔与龙眼荔枝过氧化物酶同工酶分析及亲缘关系研究初报. *广西农业科学*, (4): 158 - 159.
- Su Wei-qiang, Huang Hai-bin, Lu Yu-ying, Liu Ye-qiang 1997. Analysis the peroxidase and isoenzyme of major longan cultivars in Guangxi. *Guangxi Agricultural Sciences*, (3): 121 - 122. (in Chinese)
- 苏伟强, 黄海滨, 陆玉英, 刘业强. 1997. 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*, (3): 121 - 122.
- Xiao Xuan, Sun Min, Wang Xin-yan, Qiao Ai-min 2005. Study on genomic DNA extraction from recalcitrant *Dimocarpus longan* Lour. *Biotechnology*, 15 (1): 44 - 47. (in Chinese)
- 肖璇, 孙敏, 王心燕, 乔爱民. 2005. 顽拗植物龙眼基因组 DNA 提取方法的研究. *生物技术*, 15 (1): 44 - 47.
- Yi Gan-jun, Tan Wei-ping, Huo He-qiang, Zhang Qiu-ming, Li Jian-guang, Zhou Bi-rong 2003. Studies on the genetic diversity and relationship of longan cultivars by AFLP analysis. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (3): 272 - 276. (in Chinese)
- 易干军, 谭卫萍, 霍合强, 张秋明, 李建光, 周碧蓉. 2003. 龙眼品种 (系) 遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析. *园艺学报*, 30 (3): 272 - 276.
- Zhu Jian-hua, Peng Hong-xiang, Su Wei-qiang, He Xin-hua, Huang Feng-zhu 2002. Progress in germplasm resources and selective breeding of longan in Guangxi Province. *Subtropical Plant Science*, 31 (supplement): 44 - 47. (in Chinese)
- 朱建华, 彭宏祥, 苏伟强, 何新华, 黄凤珠. 2002. 广西龙眼种质资源研究及品种选育. *亚热带植物科学*, 31 (增刊): 44 - 47.