

不同生态类型龙眼种质亲缘关系的 ISSR 分析

朱建华¹, 潘丽梅^{3,4}, 秦献泉^{1,4}, 彭宏祥¹, 王 忆², 韩振海²

(¹广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007; ²中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100193;

³广西药用植物园, 南宁 530023; ⁴广西作物遗传改良重点开放实验室, 南宁 530007)

摘要:利用 ISSR 分子标记技术对不同生态类型的 39 份龙眼种质进行亲缘关系分析。研究表明,从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条重复性好、条带清晰的引物,对 39 份龙眼种质基因组 DNA 进行扩增,得到 152 个位点,其中多态性位点 117 个,多态性比例为 76.97%。供试龙眼种质间遗传相似系数变幅为 0.57~0.92,说明 ISSR 标记能够揭示材料间较高的遗传多样性。UPGMA 聚类结果表明,在 0.65 相似水平可以将 39 份龙眼种质分为 III 个类群,类群 I 均为来自中国的南亚热带生态型龙眼;类群 II 包括石硖和大乌圆 2 个南亚热带生态型龙眼品种,以及热带生态型龙眼四季蜜类型的品种和单株;类群 III 包括来自越南和泰国的龙眼种质。不同生态类型对龙眼的亲缘关系影响不大,热带生态型和南亚热带生态型龙眼相互聚在一起,说明两种不同生态类型龙眼具有较多相同的遗传背景。本实验结果将有助于进一步开展龙眼的分类、遗传与进化研究。

关键词:龙眼;生态类型;亲缘关系;ISSR

Analysis on Genetic Relations in Different Ecotypes of Longan (*Dimocarpus longan*) Germplasm Resources by ISSR Markers

ZHU Jian-hua¹, PAN Li-mei^{3,4}, QIN Xian-quan^{1,4}, PENG Hong-xiang¹, WANG Yi², HAN Zhen-hai²

(¹Institute of Horticulture, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007; ²Institute for Horticulture Plants,

China Agricultural University, Beijing 100193; ³Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023;

⁴Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning 530007)

Abstract: ISSR markers were used to study genetic diversity and relationship of different ecotypes of longan germplasm resources. The results showed that 12 primers from 100 ISSR primers were selected for amplify the genome DNA of 39 materials. Totally 152 ISSR loci including 117 polymorphic loci were produced, with a polymorphism rate of 76.97%. The genetic similarity coefficients among 39 different ecotypes longan materials were between 0.57 and 0.92. That means ISSR markers can reveal the genetic diversity of these tested materials. All of the cultivars could be separated into three groups at about 0.65 similarity value with UPGMA, including a group of south subtropical ecotype longan from China; a group of south subtropical ecotype longan Shixia and Dawuyuan, and tropical ecotype longan Sijimi genotype, and a group of longan from Vietnam and Thailand. It was also showed that the genetic relationship has a higher level of genetic background in different ecotypes of longan. These results will provide much more useful information for studying classification, genetics, and evolution of longan germplasm resources.

Key words: *Dimocarpus longan* Lour.; Ecotype; Genetic relationship; ISSR

收稿日期:2012-02-17 修回日期:2012-05-15

基金项目:广西自然科学基金(桂科自 0339023,桂科自 0728070);国家荔枝龙眼产业技术体系育种岗位“熟期育种”(nycytx-32-05);农业部热带作物种质资源保护专项“荔枝、龙眼种质资源保护”

作者简介:朱建华,研究员,从事果树种质资源和栽培技术研究。E-mail: y66899@126.com

通信作者:韩振海,教授,博士生导师。E-mail: rschan@cau.edu.cn

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 的起源中心为 Myanmar 山脉至中国南部^[1], 除我国外主要分布于东南亚、澳大利亚和美国等地的热带和亚热带地区。龙眼在不同分布地区的生态条件下经长期演变而形成了不同的生态类型种群^[2], 主要可分为南亚热带生态型和热带生态型^[2-3]。我国主栽的龙眼品种属于南亚热带生态型龙眼, 表现为需要低温诱导花芽分化^[2-3], 每年只在春季开花; 而热带生态型龙眼主要来源于越南南部, 该地区属于热带季风气候区, 雨量充沛而季节不分明, 在这种气候条件下经长期演变而形成的龙眼品种其花芽分化不需要低温诱导, 极易成花, 而且一年可多次开花结果^[2]。对不同生态类型龙眼种质亲缘关系进行分析, 将有助于进一步开展龙眼的分类、遗传与进化研究。

关于龙眼种质亲缘关系已有较多研究, 并在龙眼品种鉴定、分类、遗传多样性和评价等方面取得了可喜的进展^[4-6]。但以往的研究多以南亚热带生态型龙眼种质为研究对象, 而对不同生态类型龙眼的亲缘关系研究较少。在钟伟等^[7]、彭宏祥等^[8]和陈虎等^[9-10]的研究中, 虽然采用了热带生态型龙眼四季蜜作为供试样本, 但都仅用 1 个热带生态型龙眼种质样本; Sithiphrom 等^[11]和 Yonemoto 等^[12]在对龙眼种质进行 RAPD 标记时分别采用了 4 个和 2 个热带生态型龙眼种质作供试样本, 但仍然存在研究样本数量少的问题, 并且没有采用中国龙眼产区推广种植的热带生态型龙眼四季蜜作为供试样本。为此, 本研究对来自中国、越南和泰国的南亚热带生态型和热带生态型龙眼进行 ISSR 标记, 以期对两种不同生态类型龙眼的亲缘关系有更全面的了解。

1 材料与方法

1.1 试验材料

39 份供试材料取自广西农业科学院园艺研究所龙眼果园和苗圃(表 1)。编号 1~12 为南亚热带生态型龙眼, 其中 1~4 起源于福建, 5~8 起源于广东, 9~12 起源于广西。编号 13~23 为热带生态型龙眼, 其中编号 13 的四季蜜为目前国内栽培最多的热带生态型龙眼品种, 已分别在广西和福建两省(区)通过品种审定(认定)。编号 14~23 来源于不同地区, 植物学性状与四季蜜相似, 统称为四季蜜类型龙眼。其中编号 17、18 的官城-1、官城-2 为广西平南县官城镇的实生单株, 编号 19~23 为官城-1

和官城-2 的实生后代, 均具有一年多次开花的特性。编号 24~33 来源于越南, 其中编号 24~26 为越南北部的南亚热带生态型龙眼单株, 编号 27~33 为来自越南胡志明市的热带生态型龙眼单株。编号 34~35 引自泰国清迈, 据泰方介绍来源于越南, 其中编号 34 为热带生态型龙眼, 编号 35 为南亚热带生态型龙眼。编号 35~39 为泰国的南亚热带生态型龙眼品种。

试样采集方法: 在选定的植株上采集叶片数片, 首选嫩绿叶片随机采集数片, 如果没有嫩叶则随机采集成熟叶片, 放于密封口袋置于冰盒中带回实验室, 于 -30 ℃ 的低温冰箱中保存备用。

表 1 供试材料

Table 1 List of materials

编号 Code	名称 Name	起源地 Origin Area	类型 Ecotype
1	立冬本 Lidongben	中国福建	南亚热带生态
2	东壁 Dongbi	Fujian China	型龙眼
3	松风本 Songfengben		South subtropi-
4	郊溪早熟 Jiaoxizaoshu		calcecotype lon-
5	古山 2 号 Gushan No. 2	中国广东 Guangdong	gan
6	石硤 Shixia	China	
7	春龙早 1 号 Chunlongzao No. 1		
8	储良 Chuliang		
9	桂香 Guixiang	中国广西	
10	大乌圆 Dawuyuan	Guangxi China	
11	桂明 1 号 Guiming No. 1		
12	灵龙 Linglong		
13	四季蜜 Sijimi	东南亚	热带生态型
14	武宣-1 Wuxuan-1	Southeast Asia	龙眼
15	南宁-1 Nanning-1		Tropicalecotype
16	粤引-1 Yueyin-1		longan
17	官城-1 Guancheng-1		
18	官城-2 Guancheng-2		
19	官城-3 Guancheng-3		
20	官城-4 Guancheng-4		
21	官城-5 Guancheng-5		
22	官城-6 Guancheng-6		
23	官城-7 Guancheng-7		

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	起源地 Origin Area	类型 Ecotype
24	越(北)引-1 North Vietnam longan-1	越南 Vietnam	南亚热带生态 型龙眼
25	越(北)引-2 North Vietnam longan-2		South subtropi- calecotype
26	越(北)引-3 North Vietnam longan-3		longan
27	越(南)引-1 South Vietnam longan-1		热带生态型 龙眼
28	越(南)引-2 South Vietnam longan-2		Tropicalecotype longan
29	越(南)引-3 South Vietnam longan-3		
30	越(南)引-4 South Vietnam longan-4		
31	越(南)引-5 South Vietnam longan-5		
32	越(南)引-6 South Vietnam longan-6		
33	越(南)引-7 South Vietnam longan-7		
34	泰引-1 Thailand-1		
35	泰引-2 Thailand-2		南亚热带生态 型龙眼
36	依器 Ee-Hea	泰国 Thailand	South subtropi- calecotype
37	苗翘 Beow Koew		longan
38	依多 E-Daw		
39	番通 Faimtouing		

1.2 试验方法

基因组 DNA 的提取与检测:采用改良 CTAB 法提取叶片总 DNA^[13],用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;使用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀,检测 DNA 纯度与浓度。

ISSR-PCR 扩增及电泳:PCR 扩增反应在 PTC-100 梯度 PCR 仪上进行。反应体系共 20 μ l,包括 2.0 μ l 10 \times Buffer (含 Mg²⁺) 0.2 μ l、0.5U *Taq* polymerase 0.2 μ l、1.0 mmol/L dNTPs 0.4 μ l、1.5 μ mol/L ISSR 引物 1 μ l、DNA 模板 45 ng/ μ l, ddH₂O 补足 20 μ l。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 复性退火温度随引物而定 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增反应结束后加入 4 μ l 溴酚蓝混匀, 取 6 μ l 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, 电极缓冲液为 1 \times TBE, 溴化乙锭 (EB) 染色, 染色后显色拍照。

1.3 数据分析

ISSR 为显性标记,按条带的有无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0。按 NTsys2.10e 软件格式要求输入赋值,采用 NTsys2.10e 软件中 DICE 法进行遗传相似性系数计算,并用 UPGMA 程序构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条重复性好、条带清晰的引物,利用这 12 条 ISSR 引物扩增得到 152 个位点,其中多态性位点 117 个,多态性比例为 76.97%,说明本研究中的样品间存在的遗传差异较大(表 2)。

表 2 ISSR 引物和多态性分析

引物 Primer	总条带数 No. of total bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性比例(%) Percentage of polymorphic bands
UBC 816	14	10	71.43
UBC 857	15	12	80.00
UBC 866	14	12	85.71
UBC 862	11	8	72.73
UBC 881	16	13	81.25
UBC 884	10	7	70.00
UBC 878	12	9	75.00
UBC 880	15	11	73.33
UBC 883	9	8	88.89
UBC 845	13	10	76.92
UBC 889	12	9	75.00
UBC 891	11	8	72.72
Total	152	117	
Average			76.97

2.2 聚类分析

利用 NTsys2.10e 软件对 ISSR 引物的扩增结果进行聚类分析(图 1)。从图 1 可以看出,不同生态类型龙眼遗传相似系数变化在 0.57 ~ 0.92 之间。在 0.65 相似水平可以将本实验的龙眼种质分为 III 个类群,类群 I 均为广西、广东和福建的南亚热带生态型龙眼;类群 II 包括石碇和大乌圆 2 个南亚热带生态型龙眼品种,以及热带生态型龙眼四季蜜类型

的品种和单株;类群Ⅲ包括来自越南和泰国的龙眼种质,并在相似系数 0.769 的水平上又可分为Ⅳ个类群,类群Ⅰ包括泰国的南亚热带生态型龙眼依器和苗翹;类群Ⅱ为来自越南的热带生态型龙眼和南亚热带生态型龙眼,其中来自越南北部的 3 个南亚

热带生态型龙眼单株在相似系数 0.880 的水平上自聚为 1 类;类群Ⅲ为引自泰国的 1 个热带生态型龙眼单株(泰引-1)和 1 个南亚热带生态型龙眼单株(泰引-2);类群Ⅳ为泰国的南亚热带生态型龙眼依多和番通。

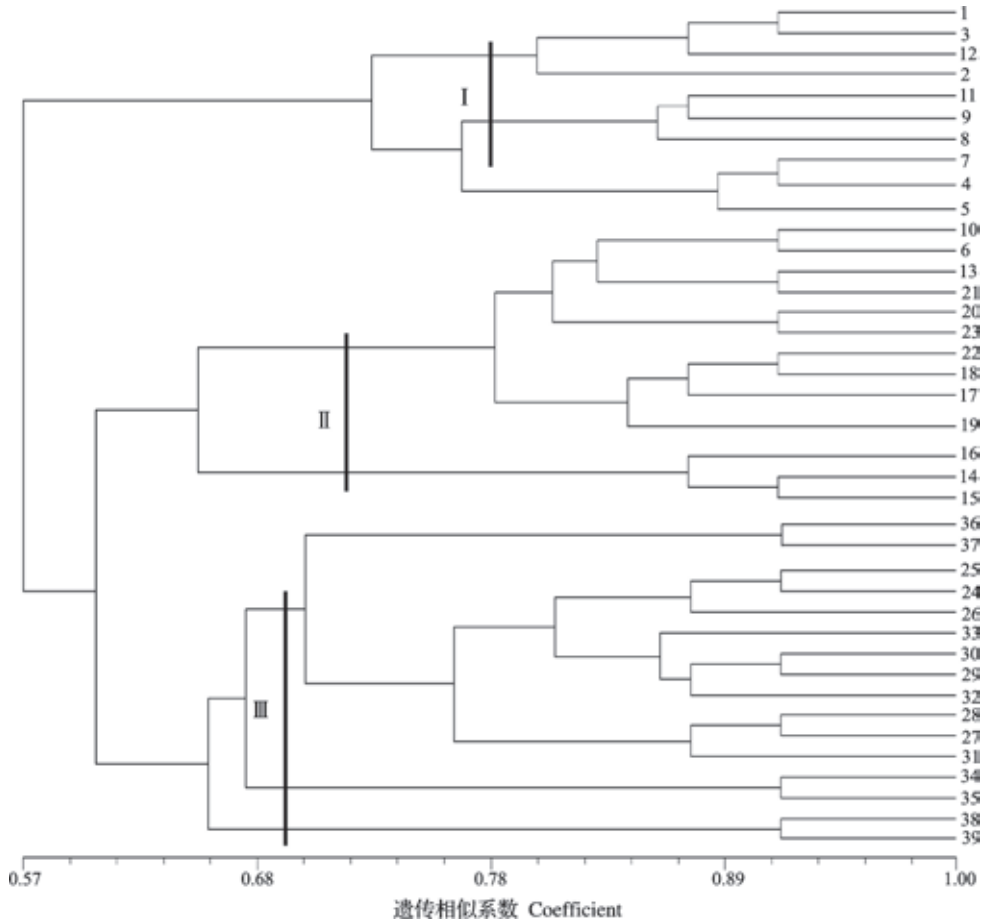


图 1 39 份龙眼种质的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA dendrogram of 39 longan cultivars

1~39;39 份龙眼供试材料,编号对应表 1

1-39;39 longan cultivars. Code name as table 1

热带生态型龙眼具有不同类型,并反映在 ISSR 聚类结果中。如四季蜜类型叶片小、生势较弱、枝条开张、果肉干苞爽脆不流汁,植物学性状与越南南部的热带生态型龙眼有较大区别,两者相似系数仅为 0.60。在越南南部的热带生态型龙眼中,越(南)引-3、-4、-6 为 Xuong com vang 的不同单株,叶片短、叶缘内卷、果大肉厚、果肉黄色、幼果果皮有红斑、果肉具特殊香气,这类龙眼在 0.88 相似水平聚为一类;来自越南南部的另外几个热带生态型龙眼种质[越(南)引-1、-2、-5]具有生势旺盛、叶片长、果肉白色、肉薄、流汁、不易离核、具特殊香气等特征,也在 0.88 相似水平聚为一类。引自泰国清迈的泰引-2 虽

然一年内只在春季开一次花,但极易成花,属于低需冷量的南亚热带生态型龙眼,与热带生态型龙眼泰引-1 在 0.91 相似水平聚为一类,并在 0.67 相似水平与越南龙眼聚为一类,说明泰引-1 和泰引-2 有可能起源于越南,并且泰引-2 是较接近于热带生态型的南亚热带生态型龙眼。

3 讨论

Yonemoto 等^[12]的研究结果表明,来自越南的热带生态型龙眼 Xuong com vang 和 Tiew Da Bo 在相似系数为 0.665 时与来自泰国和中国的南亚热带生态型龙眼聚为一类。本研究结果也显示不管是起源于

越南南部或是四季蜜类型的热带生态型龙眼,都没有聚为一类,而是和南亚热带生态型龙眼聚在一起,说明两种不同生态类型龙眼具有较多相同的遗传背景,龙眼的不同生态类型对亲缘关系远近的影响并不是很大。中国南部和越南北部为龙眼栽培起源地^[14-15],而这些地区长期以来以种植南亚热带生态型龙眼为主,因此推测热带生态型龙眼是由南亚热带生态型龙眼演化而来。Sitthiphrom 等^[11]的 RAPD 分析结果表明,热带生态型龙眼和南亚热带生态型龙眼在相似系数为 0.75 时聚为两类,得出了与 Yonemoto 等^[12]和本研究的不同结果,可能是因为采用了不同的龙眼种质作供试材料。在本研究中,也有部分热带生态型龙眼种质在相似系数 0.88 时聚为一类的情况出现。

研究结果还表明龙眼种质的聚类结果与地理分布有一定关系,起源于中国的龙眼供试种质大部分在 0.73 相似水平聚为一类,而来源于越南的龙眼在 0.769 相似水平聚为一类。此外,来自越南和泰国的龙眼在 0.658 相似水平聚为一类,说明供试的越南和泰国龙眼种质有一定相同的遗传背景。Yonemoto 等^[12]的研究结果显示,在来自中、泰、美、日和台湾的龙眼种质中,越南龙眼 *Xuong com vang* 和 *Tiew Da Bo* 与泰国龙眼 *Haew* 亲缘关系最近,与本研究结果相符合。有学者认为泰国的龙眼由中国传入^[15-16],但越南北部也是龙眼栽培的起源地之一^[14-15],因此不排除部分泰国龙眼栽培品种的祖先来自于越南。

目前对四季蜜类型龙眼的来源没有确定结果^[9],有报道认为其来源于泰国^[17]、越南^[18]或广西与越南交界的地区^[7]。彭宏祥等^[8]应用 AFLP 分析结果表明四季蜜与广西大乌圆类型龙眼亲缘关系较近,陈虎等^[9]应用 ISSR 分析结果表明四季蜜与广西主栽龙眼品种石硖亲缘关系较近。本研究结果表明四季蜜类型龙眼种质与大乌圆和石硖亲缘关系较近,得出了与彭宏祥等^[8]和陈虎等^[9]相似的研究结果,同时支持陈虎等^[9]关于四季蜜龙眼与广西龙眼品种的起源有较大关系,以及钟伟等^[7]关于四季蜜龙眼母树位于广西与越南交界地区的观点。由于四季蜜龙眼在国内栽培已有 10 多年历史,引种到广西、广东、福建、海南、云南等地,部分采用实生繁殖,因此出现了不同程度变异。本研究结果表明,实生繁殖以及不同来源的四季蜜类型单株在分子水平上

出现了不同程度的差异。

除了热带生态型龙眼栽培品种外,在东南亚(特别是在马来西亚)还存在有适应热带地区湿热和长日照气候条件、容易开花结果的热带龙眼亚种^[1,3,16]。本实验没有能采集到热带龙眼亚种作为供试样品,对全面分析南亚热带生态型与热带生态型龙眼亲缘关系有一定影响,有待今后开展更深入研究加以完善。

参考文献

- [1] Choo W K. Longan production in Asia[M]. Bang KoK: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000
- [2] 朱建华, 黄凤珠, 彭宏祥, 等. 热带生态型龙眼新品种四季蜜产期调节技术及应用前景[J]. 广西农学报, 2011, 26(2): 37-39
- [3] 黄辉白. 热带亚热带果树栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 50
- [4] 陈虎, 何新华, 潘介春, 等. 分子标记技术在龙眼研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 26-30
- [5] 吴元立, 易干军, 周碧容, 等. 荔枝与龙眼种质资源研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4): 498-502
- [6] 于平福, 朱建华, 黄凤珠, 等. 广西龙眼种质资源果实性状的 AHP-FUZZY 综合评判[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 284-288
- [7] 钟伟, 林晓东, 朱芳德, 等. 应用 RAPD 技术分析热带龙眼四季蜜与常规龙眼品种的遗传差异[J]. 中山大学学报, 2006, 43(S1): 65-68
- [8] 彭宏祥, 李冬波, 朱建华, 等. 用 AFLP 标记分析广西龙眼种质遗传多样性[J]. 园艺学报, 2008, 35(10): 1511-1516
- [9] 陈虎, 何新华, 朱建华, 等. 37 份龙眼种质资源亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 288-292
- [10] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654
- [11] Sitthiphrom S, Anuntalabhochai S, Dum-ampai N, et al. Investigation of genetic relationships and hybrid detection in longan by high annealing temperature RAPD[J]. Acta Hort, 2005, 665: 161-169
- [12] Yonemoto Y, Chowdhury A K, Kato H, et al. Cultivars identification and their genetic relationships in *Dimocarpus longan* subspecies based on RAPD markers[J]. Sci Hort, 2006, 109(2): 147-152
- [13] 潘丽梅, 朱建华, 秦献泉, 等. 龙荔基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系的建立与优化[J]. 西南农业学报, 2009, 22(1): 145-149
- [14] 邱武陵, 章恢志. 中国果树志·龙眼枇杷卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996: 8
- [15] Anupunt P, Sukhvibul N. Lychee and longan production in Thailand[J]. Acta Hort, 2005, 665: 53-59
- [16] Menzel C M, Waite G K. Litchi and longan; botany, production and uses[M]. Trowbridge: Cromwell Press, 2005
- [17] 潘学文, 唐小浪. 龙眼品种图谱[M]. 广州: 广东科技出版社, 2006: 112
- [18] 俞征瑶. ‘四季花’龙眼成花规律以及调控机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009