

## 利用 RAPD 标记研究荔枝品种的亲缘关系

丁晓东<sup>1\*</sup>, 吕柳新<sup>2</sup>, 陈晓静<sup>2</sup>, 关雄<sup>3</sup>

(1. 东北农业大学园艺系, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 福建农业大学园艺系, 福建 福州 350002;  
3. 福建农业大学生物技术中心, 福建 福州 350002)

**摘要:** 采用改进的 CTAB 方法提取 34 个荔枝品种的基因组 DNA 为模板, 从 50 个 10 碱基的随机引物中获得了 37 个多态性 RAPD 标记, 聚类分析结果表明这 34 个荔枝品种可以分成 4 组, 第一组有“状元红”、“元红”、“桂林”、“宋家香”、“台湾荔”、“下番枝”、“东刘一号”、“妃子笑”、“白糖罂”、“香丸”、“绿沙”; 第二组有“无栗子”、“水东”、“乌叶”、“蔡家肉丸”、“青壳糯米糍”、“糯米糍”; 第三组有“桂味”、“光明”、“白荔枝”、“陈紫”、“兰竹”、“及第”、“踏死牛”; 第四组有“回头降”、“葡萄本”、“淮枝”、“南海荔”、“大造”、“早红”、“火烧荔”、“乌叶舅”、“密丁香”、“绿荷包”。

**关键词:** 荔枝; RAPD; 聚类分析

中图分类号: Q94-336

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)01-0049-06

## IDENTIFYING LITCHI CULTIVARS AND EVALUATING THEIR GENETIC RELATIONSHIPS BY RAPD MARKERS

DING Xiao-dong<sup>1</sup>, LU Liu-xin<sup>2</sup>, CHEN Xiao-jing<sup>2</sup>, GUAN Xiong<sup>3</sup>

(1. *Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;*

2. *Department of Horticulture, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China;*

3. *Center of Biotechnology, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China)*

**Abstract:** In this paper, we used modified CTAB method to extract genomic DNA from litchi for amplifying RAPD markers. We got 37 polymorphic RAPDs out of 259 total RAPDs from 34 litchi cultivars with 50 random primers. The results showed that these 34 cultivars could be divided into 4 groups. Group I included “Zhuangyuanhong”, “Yuanhong”, “Guilin”, “Songjiaxiang”, “Taiwanli”, “Xiafanzhi”, “Dongliu No. 1”, “Feizixiao”, “Baitangying”, “Xiangwan”, “Lusha”. Group II comprised “Wulizi”, “Shuidong”, “Wuye”, “Caijiawanzi”, “Qingkenuomici”, “Nuomici”. Group III included “Guiwei”, “Guangming”, “Bailizhi”, “Chenzi”, “Lanzhu”, “Jidi”, “Tasiniu”. Group IV consisted of “Huitoujiang”, “Putaoen”, “Huaizhi”, “Nanhaili”, “Dazao”, “Zaohong”, “Huoshaoli”, “Wuyejiu”, “Midingxiang”, “Luhebao”. The results of cluster suggested that the polymorphism of litchi germplasm was narrower than expected.

**Key words:** Litchi; RAPD; Cluster analysis

\*1997 年 10 月-1999 年 10 月在福建农业大学做博士后研究

收稿日期: 1999-05-20

基金项目: 国家自然科学基金和福建省自然科学基金资助项目

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属植物, 该属只有两个种, 栽培种荔枝原产于我国南部地区, 在我国栽培历史至少有二千年, 培育了众多的优良品种, 这些品种形态各异, 经长期的交流和引种, 许多品种已广布我国南部荔枝栽培区, 并被引种到其他国家<sup>[1]</sup>。据《中国荔枝志》(1992) 上的记载, 我国现有荔枝品种, 单株和野生、半野生类型 220 多个。但由于大部分品种的谱系关系不清, 存在着同名异品种和同品种不同名的混乱现象, 这对生产和遗传育种工作都是不利的<sup>[2]</sup>。

利用 DNA 分子标记来分析检测生物遗传特征是 90 年代发展起来的一种新技术, 它可使分类学家能在更高分辨率的基础上对大量分类群体进行比较分析, 通过统计分析方法可以明确物种及品种间的亲缘关系。其中 RAPD 是一种 DNA 水平上的标记, 其特点是快速, 简便, 适合于分析大量群体<sup>[3]</sup>, 不受其它生理和环境因素的影响。本文利用 RAPD 标记分析荔枝品种间的分类问题。

## 1 材料和方法

**材料** 34 个荔枝品种均于 1998 年 4 月上旬在福建省漳州市内寮荔枝品种园采集。

**基因组 DNA 的提取** 根据改进的 CTAB 法提取基因组 DNA, 即将 200 mg 的嫩叶在液 N<sub>2</sub> 中磨成细粉后加 2 ml 核分离液 (200 mmol/L Tris-HCl pH7.0, 300 mmol/L 葡萄糖, 1% 2-巯基乙醇) 继续磨成糊状, 转入 5 ml 离心管中, 在 4 ℃, 8000 × g 离心 5 min 后去上清液, 再加 3 ml 核分离液悬浮沉淀, 离心去上清液, 反复 3-4 次。向沉淀中加入 3 ml 预热的核裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 20 mmol/L EDTA pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 1% 2-巯基乙醇, 1.5% CTAB) 和 20 mg 的活性炭粉末后在 65 ℃ 中水浴 40 min, 将离心管冰浴 10 min, 在 4 ℃, 10000 × g 离心 15 min 后取上清液用等体积的异丙醇沉淀 DNA, 再经去 RNA 纯化后, 将所得 DNA 溶解在 TE 溶液中备用。

**RAPD 扩增方法** 总共使用了 50 个由上海生工 (Sangon) 生物工程公司生产的 S 系列 10 碱基的随机引物, *Taq*-DNA 聚合酶 (5 U μl<sup>-1</sup>) 和 dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 浓度各为 10 mmol/L) 均购自上海生工公司。25 μl 的反应体积中含有 200 μmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 的随机引物, 50 ng 的模板 DNA, 0.5 U *Taq*-DNA 聚合酶, 2 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 覆 50 μL 无 DNase 矿物油, 热循环程序为 94 ℃ 解链 5 min (一次), 94 ℃ 1 min, 39 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 45 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min (一次), PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。每个样品重复扩增一次, 取可重复出现的带用于分析使用。

**数据处理** 多态性 RAPD 标记的计分方式是根据某品种某条带的有 (记为 1) 和无 (记为 0) 来计数的, 由此再计算出品种 i 和 j 之间的相似系数 S<sub>ij</sub><sup>[4]</sup>:  $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$

这里的 N<sub>ij</sub> 是品种 i 和 j 之间的共同带数, N<sub>i</sub> 和 N<sub>j</sub> 分别是品种 i 和品种 j 各自的总带数。将相似系数输入 SYSTAT 5.03 软件包进行品种间亲缘关系的聚类分析。

## 2 结果和分析

在所用的 50 条引物中有 18 条没有扩增出 RAPD 产物, 属于无效引物, 其余 32 条引物中有 28 条为多态性引物, 由于在 28 条多态性引物对 34 个品种总共扩增出了 259 条带, 大小处于

0.4–3.7 kb, 其中 37 条为多态性带, 平均每条引物扩增出 9.2 条带包括 1.3 条多态性带, 引物  $S_{255}$  扩增出多态性带最多的引物(图 1), 多态性带占总数的 14.7%(表 1)。

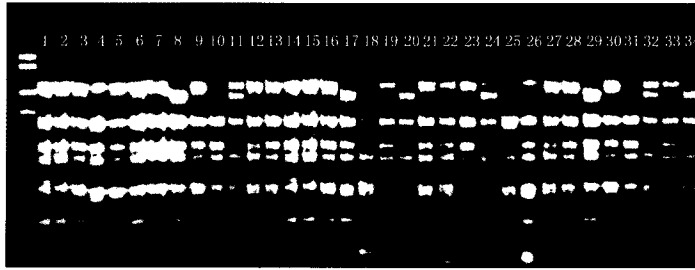


图 1 引物  $S_{255}$  对 34 个荔枝品种扩增出的 RAPD 标记

Fig. 1 RAPD markers of 34 litchi cultivars amplified by  $S_{255}$  primer

1. 状元红 Zhuangyuanhong; 2. 元红 Yuanhong; 3. 桂林 Guilin; 4. 宋家香 Songjiaxiang; 5. 台湾荔 Taiwanli; 6. 下番枝 Xiafanzhi; 7. 东刘一号 Dongliu No. 1; 8. 妃子笑 Feizixiao; 9. 白糖罂 Baitangying; 10. 香丸 Xiangwan; 11. 绿沙 Lusha; 12. 无栗子 Wulizi; 13. 水东 Shuidong; 14. 乌叶 Wuye; 15. 蔡家肉丸 Caijiawanzi; 16. 青壳糯米糍 Qingkwuomici; 17. 糯米糍 Nuomici; 18. 桂味 Guiwei; 19. 光明 Guangming; 20. 白荔枝 Bailizhi; 21. 陈紫 Chenzi; 22. 兰竹 Lanzhu; 23. 及第 Jidi; 24. 踏死牛 Tasiniu; 25. 回头降 Huitoujiang; 26. 葡萄本 Putaoben; 27. 淮枝 Huaizhi; 28. 南海荔 Nanhaili; 29. 大造 Dazao; 30. 早红 Zaohong; 31. 火烧荔 Huoshaoli; 32. 乌叶舅 Wuyejiu; 33. 密丁香 Midingxiang; 34. 绿荷包 Luhebao.

根据 RAPD 标记计算出各品种间的相似系数  $S_{ij}$ , 结果表明在所研究的品种之间, 品种“下番枝”和“东刘一号”之间的相似系数最高, 为 0.954, 品种“密丁香”和“妃子笑”的相似系数最低, 为 0.272。经聚类分析后绘成品种亲缘关系树(图2)。从图中可以看出, 所研究的34个荔枝品种可以由结合线  $L=0.5$  分成 4 组。第一组有“状元红”、“元红”、“桂林”、“宋家香”、“台湾荔”、“下番枝”、“东刘一号”、“妃子笑”、“白糖罂”、“香丸”、“绿沙”; 第二组有“无栗子”、“水东”、“乌叶”、“蔡家肉丸”、“青壳糯米糍”、“糯米糍”; 第三组有“桂味”、“光明”、“白荔枝”、“陈紫”、“兰竹”、“及第”、“踏死牛”; 第四组有“回头降”、“葡萄本”、“淮枝”、“南海荔”、“大造”、“早红”、“火烧荔”、“乌叶舅”、“密丁香”、“绿荷包”。

### 3 讨论

#### 3.1 荔枝品种的遗传多样性

从形态学上来看, 荔枝品种类型丰富多样, 但迄今为止尚无人对荔枝的遗传多样性的分子基础进行研究。本文

表 1 荔枝 RAPD 标记的扩增情况

Table 1 Summary of the detection of RAPD markers in litchi

引物总数	50
Total number of primers	50
多态性引物 Number of polymorphic primers	28
多态性引物扩增出的条带总数	259
Total number of bands amplified from polymorphic primers	259
扩增产物的范围 Size range of amplification products (kb)	0.4–3.7
平均每条引物扩增出的带数 Average number of bands per primer	9.2
共检测出的多态性条带的总数 Total number of polymorphic bands (RAPDs) identified	37
平均每条多态性引物扩增出的多态性带数 Average number of polymorphic bands amplified by each polymorphic primer	1.3
多态性条带占总数的百分比 Percentage of polymorphic bands in total bands	14.7

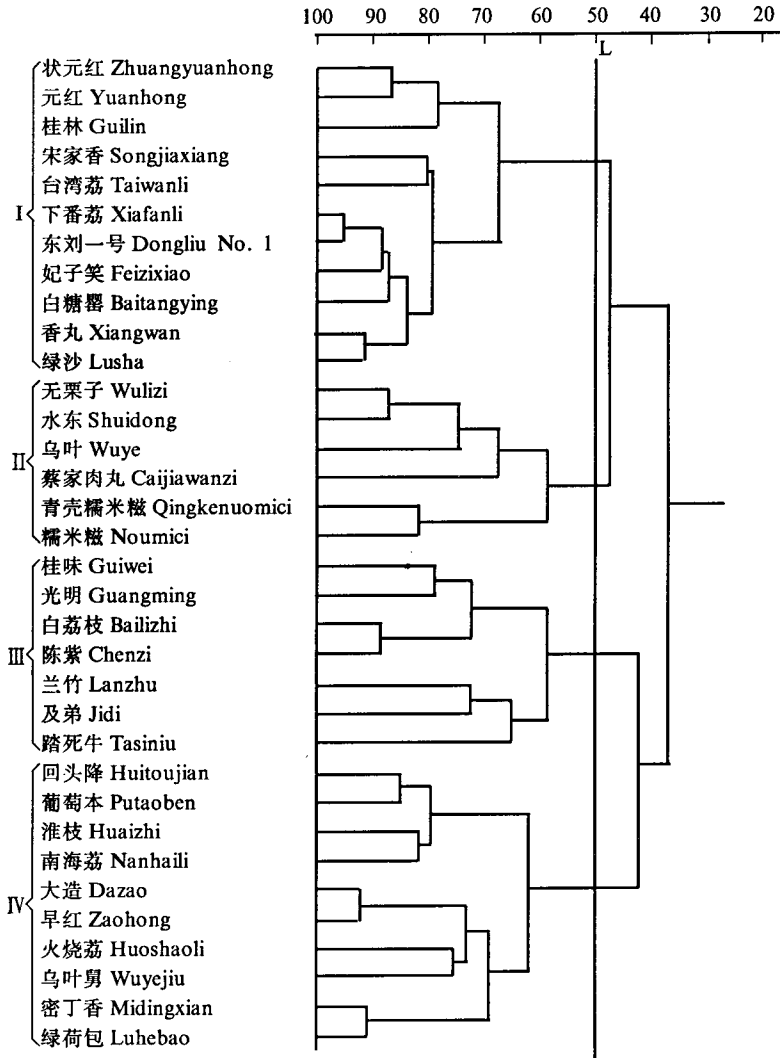


图2 荔枝品种聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of litchi cultivars

所取的荔枝品种虽然在数量上不多,但从来源上来看,它们很多是引自或起源于全国其它荔枝栽培区,在遗传上具有了一定的代表性。已有的研究表明,不同物种其基因组DNA的多样性程度(用扩增出来的多态性带占总数的平均百分比表示)是不一样的,本文荔枝的遗传多样性程度为14.7%,醋栗为26.4%<sup>[5]</sup>,番茄为37.2%<sup>[6]</sup>,越桔为39.2%<sup>[7]</sup>,桃为44.7%<sup>[8]</sup>,高粱为55.0%<sup>[9]</sup>,芥菜为81.9%<sup>[10]</sup>。另一方面,RAPD标记的聚类分析结果还表明,本文所研究的荔枝品种间的相似系数大多数在70%以上,最高达95.4%,从这些数据可以看出,在DNA水平上,荔枝的遗传多样性并不象形态学所体现的那样丰富。理论上讲要提高一个物种群体的遗传多样性程度,不外乎通过两个途径,一是随着物种进化发生新的基因突变;二是通过有性过程同其它物种进行杂交获得新基因,而后者在提高一个物种遗传多样性方面起到的作用更大。荔枝属只有2个种,其中荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)是唯一一个栽培种,其起源和栽培中心都在中国,加上它不能象其它树种那样广泛地同其近缘和远缘种杂交<sup>[2,11]</sup>,因此引入外源基因的机

会就少。

### 3.2 荔枝的同名异品种和异名同品种问题

由于频繁引种对品种重复命名导致荔枝的同名异品种和异名同品种问题很严重, 这给生产和科研都带来了不利因素。RAPD 标记从分子水平上揭示生物的遗传特性, 通过分类研究将能很好地解决这一问题。对“状元红”这个品种来说, 资料显示在福建省、广东省和广西壮族自治区有多个品种都叫该名称<sup>[12,13]</sup>, 本文的结果排除了它是“元红”和“陈紫”的别名<sup>[14]</sup>, 可能是广东省的品种, 聚类分析的结果表明它与“元红”的亲缘关系较近。“东刘一号”是从“下番枝”选出的品种, 这是为数不多的谱系关系清楚的品种<sup>[15]</sup>, RAPD 标记聚类分析结果说明他们的亲缘关系很近。相近品种“糯米糍”和“青壳糯米糍”也聚在同一类; 对广西品种“大造”(别名“大早”)来说, 有资料认为它与“早红”是异名同品种<sup>[14]</sup>, 本文结果认为这两个品种是有差异的, 但亲缘关系较近。

### 3.3 RAPD 分类结果与其它分类结果

对名目繁多的荔枝品种和类型, 过去不少学者从不同的角度对其进行了分类整理, 使用的方法主要是形态学, 同工酶。如郭华秀把广东省品种分为 14 类, 主要以果形, 斑(即龟裂片), 刺(即裂片峰)来分, 但过于繁琐; 李来荣等把福建省荔枝品种按果形分为四个类型, 即(一)长卵圆形, (二)心脏形, (三)短心脏形, (四)圆形; 周其明将广东省荔枝品种分为三个类型, 七个品种群(组), 以果皮特征为第一级标准, 以果形为第二级标准, 其它性状为第三级标准进行分类。刘红兵等<sup>[16]</sup>利用 POD 同工酶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于进一步充实。Degani<sup>[17]</sup>利用 ACO, AAT, IDH, LAP, PGI, PGM, SKDH, SOD 和 TPI 多种同工酶系统对 30 个以色列荔枝品种(其中包括许多从中国引进的品种)的亲缘关系进行了研究, 它将研究的品种分成了 5 组, 并有效地鉴定了很多品种是重名, 如“妃子笑”和“玉荷包”(引自台湾)是同一品种。

由于缺乏荔枝品种间系统、详细的谱系关系资料, 不同的作者根据不同目的选用不同的标准作为分类依据, 所得的结果有一定的差异。本文首次从 DNA 分子水平对荔枝分类和进化进行研究, 这将为该种果树的遗传育种和品种鉴定工作提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] 华南农学院. 果树栽培学(各论, 上册) [M]. 北京: 农业出版社, 1981, 153-167.
- [2] 俞德浚. 中国果树分类学 [M]. 北京: 农业出版社, 1979, 319-321.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18:6531-6535.
- [4] Nei L, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10):5269-5273.
- [5] Lanham P G, Bernnan R M, Hackett C et al. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90:166-172.
- [6] Williams C E, Clair D A. Phenotypic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accession of *Lycopersicon*

- esculentum* [J]. *Genome*, 1993, 36:619-630.
- [7] Levi A, Rowland L J. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) anchored primers [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1997, 122(1):74-78.
- [8] Warburton M L, Bliss F A. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L.) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1996, 121(6): 1012-1019.
- [9] Tao Y, Menners J M, Ludlow M M et al. DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) [J]. *Theor App Gent*, 1993, 86:679-688.
- [10] 乔爱民, 刘佩英, 雷建军. 芥菜 16 个变种的 RAPD 的研究 [J]. *植物学报*, 1998, 40(10):915-921.
- [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 [J]. *植物学报*, 1998, 40(12):1159-1165.
- [12] 广东省农业科学院. 广东荔枝志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1978, 1-90.
- [13] 吴仁山. 广西荔枝志 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1986, 100-198.
- [14] 福建农学院. 福建荔枝谱 [M]. 福州: 福建科技出版社, 1990, 1-60.
- [15] 郭仰楚. 荔枝下番枝、东刘一号选种简报 [J]. *福建果树*, 1994, (3):28-29.
- [16] 刘红兵. 荔枝品种 POD 同工酶分析 [J]. *广西农业科学*, 1990, (5):27-29.
- [17] Degani C. Identifying lychee cultivars by isozyme analysis [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1995, 120(2):307-312.