

# 桂热杧系列品种(系)的亲缘关系分析

黄国弟<sup>1,2</sup>, 罗聪<sup>1</sup>, 何新华<sup>1\*</sup>, 欧世金<sup>1</sup>, 周俊岸<sup>2</sup>

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西亚热带作物研究所, 南宁 530001)

**摘要:** 从 100 条 ISSR 引物中选取 12 条多态性好的引物, 对广西亚热带作物所选育的 16 个杧果(*Mangifera indica* L.) 品种(系)及其可能亲本共 22 个样品的亲缘关系进行了分析。结果表明: 这 12 条引物共扩增出 127 条 DNA 谱带, 其中多态性条带为 85 条, 条带多态百分率为 66.93%。聚类分析显示, 所有供试品种(系)之间的亲缘关系都较近, 相似系数在 0.81 以上; 如果以相似系数 0.82 为标准, 可将供试的 22 个品种(系)分为 3 大类。利用 ISSR 技术能较好地地区分桂热杧系列品种(系)的亲缘关系。

**关键词:** 杧果; ISSR; 亲缘关系

中图分类号: S667.702.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)06-0521-05

## Analysis on the Genetic Relationship of Gui Re Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars or Lines

HUANG Guo-di<sup>1,2</sup>, LUO Cong<sup>1</sup>, HE Xin-hua<sup>1\*</sup>, OU Shi-jin<sup>1</sup>, ZHOU Jun-an<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Institute of Subtropical Crops, Nanning 530001, China)

**Abstract:** Twelve ISSR primers screened from 100 primers, were selected to analysis the genetic relationship of 22 materials belonging to 16 mango (*Mangifera indica* L.) cultivars or lines selected and breded by the Guangxi Institute of Subtropical Crops. The results showed that 85 scorable polymorphic bands of a total 127 bands were produced and percentage of polymorphic bands was 66.93%. Based on UPGMA analysis, all samples showed higher similarities and their coefficients were more than 0.81. If the coefficient 0.82 was regarded as divided line of their genetic relationship, 22 materials could be clustered into three groups by ISSR. The genetic relationship of Gui Re Mango cultivars or lines could be better assessed by ISSR-PCR.

**Key words:** Mango; ISSR; Genetic relationship

杧果(*Mangifera indica* L.)为漆树科(Anacardiaceae)杧果属植物,是重要的热带、亚热带水果。杧果栽培历史悠久,分布范围较广,过去多用实生繁殖,加之杧果是异源多倍体所形成的高度杂合体,极易发生品种变异,因而,形成的品种、品系较多,目前全世界约有千余个品种(品系),我国也有近 200 个品种(品系)。这些品种(品系)绝大多数是从实生选种、自然杂交或遗传突变的优良单株选择,并通过无性繁殖保存下来。近年来已成功应用 RAPD、SSR、ISSR 等技术进行杧果的遗传关系、品种鉴定等的研究。Karihaloo 等<sup>[1]</sup>用 24 条 RAPD 引物扩增出 314

条带,把印度的杧果分成了两大类(北部和东部是一类,西部和南部是一类);余贤美等<sup>[2]</sup>采用 ISSR 标记技术对海南、云南、广西的 12 个杧果野生居群共 265 个个体的遗传多样性水平及居群遗传结构进行了研究,认为广西的 3 个居群(那坡、邕宁、平南)优先与云南的文山居群聚为一支;而云南的永德和版纳居群各自聚为一支。何新华等<sup>[3]</sup>对 23 个广西栽培杧果品种进行 ISSR 分析,表明广西品种与秋杧、马切苏杧、象牙杧和爱文杧归为一个大类,且广西本地品种之间的亲缘关系较近。

收稿日期: 2008-02-18 接受日期: 2008-03-30

基金项目: 国家科技基础条件平台重点项目(2005DKA21000-5-22); 广西自然科学基金项目(桂科自 0542022); 广西自然科学基金应用基础研究专项(桂科基 0731040)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

桂热杧系列品种(系)是广西亚热带作物研究所经过几十年选育出来的优良品种,多为实生选种。有些品种(系)是老一代科研工作者选育出来的,没有详细的记载,其亲缘关系尚不完全清楚,为了进一步弄清这些杧果品种(系)的亲缘关系和遗传多样性,我们采用 ISSR 技术进行分析研究,为杧果的资源保护和开发利用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试样品来自广西亚热带作物研究所杧果种质资源圃,供试品种见表 1。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

芒果基因组 DNA 的提取参照何新华等<sup>[3]</sup>的 CTAB 法,并稍加改良。抽提时第一步用碱性酚(pH 8.0),然后再用氯仿:异戊醇(24:1)进行抽提。酚是强烈的蛋白质变性剂,通过连续的酚和氯仿抽提

可去除 CTAB、多糖、蛋白质复合物等杂质,使提取的 DNA 更纯。

### 1.3 PCR 扩增

所用引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的引物序列(University of British Columbia, Set No. 9, No. 8012900),引物由上海生工合成。PCR 反应采用 20  $\mu$ l 反应体系: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L mixed dNTP, 0.25  $\mu$ mol/L 引物, 1 U 的 *Taq* 聚合酶(Takara Biotechnology), 模板 DNA 约 60 ng; PCR 的反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min(不同引物退火温度不同), 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用 Thermo PCR 仪进行扩增, PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, Marker 为 GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA, EB 染色, 紫外凝胶成像记录电泳结果。

表 1 供试品种

Table 1 Cultivars (lines) of mango tested

编号 No.	品种或品系 Cultivars or lines	来源地 Origin	亲本或母本 Parent	种子胚性 Embryonic
1	桂热杧 23 号 Gui Re Mango 23	广西 Guangxi	?	多胚 Polyembryonic
2	桂热杧 14 号 Gui Re Mango 14	广西 Guangxi	印度杧 901 号 Neelum	单胚 Monoembryonic
3	桂热杧 10 号 Gui Re Mango 10	广西 Guangxi	黄象牙杧 Yellow Aroemwnis	单胚 Monoembryonic
4	桂热杧 108 号 Gui Re Mango 108	广西 Guangxi	印度杧 902 号 India Mango 902	多胚 Polyembryonic
5	白象牙杧 Nang Klang Wan	泰国 Thailand	?	单胚 Monoembryonic
6	桂热杧 2 号 Gui Re Mango 2	广西 Guangxi	?	多胚 Polyembryonic
7	桂热杧 120 号 Gui Re Mango 120	广西 Guangxi	黄象牙杧 Yellow Aroemwnis	单胚 Monoembryonic
8	桂热杧 3 号 Gui Re Mango 3	广西 Guangxi	黄象牙杧 Yellow Aroemwnis	单胚 Monoembryonic
9	生食杧 Keawsawey	泰国 Thailand	?	多胚 Polyembryonic
10	桂热杧 82 号 Gui Re Mango 82	广西 Guangxi	印度杧 901 号 Neelum	多胚 Polyembryonic
11	黄象牙杧 Yellow Aroemwnis	泰国 Thailand	?	单胚 Monoembryonic
12	桂热杧 60 号 Gui Re Mango 60	广西 Guangxi	印度杧 901 号 Neelum	单胚 Monoembryonic
13	桂热杧 7 号 Gui Re Mango 7	广西 Guangxi	黄象牙杧 Yellow Aroemwnis	单胚 Monoembryonic
14	金煌杧 Jin Huang Mango	台湾 Taiwan	白象牙杧 $\times$ 凯特杧 Nang Klang Wan $\times$ Keitt	多胚 Polyembryonic
15	桂热杧 284 号 Gui Re Mango 284	广西 Guangxi	?	多胚 Polyembryonic
16	桂热杧 285 号 Gui Re Mango 285	广西 Guangxi	桂热杧 10 号 Gui Re Mango 10	多胚 Polyembryonic
17	印度杧 901 号 Neelum	印度 India	椰香杧 Deshehari	多胚 Polyembryonic
18	桂热杧 265 号 Gui Re Mango 265	广西 Guangxi	?	单胚 Monoembryonic
19	桂热杧 94 号 Gui Re Mango 94	广西 Guangxi	印度杧 902 号 India Mango 902	单胚 Monoembryonic
20	桂热杧 71 号 Gui Re Mango 71	广西 Guangxi	白象牙杧 Nang Klang Wan	多胚 Polyembryonic
21	印度杧 902 号 India Mango 902	印度 India	?	多胚 Polyembryonic
22	桂热杧 264 号 Gui Re Mango 264	广西 Guangxi	印度杧 901 号 Neelum	多胚 Polyembryonic

?: 不确定或尚存争议。? means unknown, indefinable or still disputed.

## 1.4 数据分析

ISSR 为显性标记,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,电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记(Marker),并代表一个引物的结合位点。对在重复实验中能稳定出现的差异带用于数据分析,谱带统计软件用 NTSYS,以 GeneRuler™ 100 bp DNA ladder 为 Marker,按凝胶同一位置上 DNA 条带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,UPGMA 法构建品种之间的分子系统树,分析品种之间的亲缘关系。

## 2 结果和分析

### 2.1 ISSR 引物筛选与 PCR 扩增

ISSR 引物筛选所用的模板为桂热杧 10 号、桂

热杧 94 号、红象牙杧、桂热杧 120 号,从已公布的 100 条引物中,选择多态性丰富、重复性好、条带清晰的引物,最终选定 UBC-868、UBC-812、UBC-828、UBC-890、UBC-811、UBC-841、UBC-859、UBC-857、UBC-851、UBC-840、UBC-835、UBC-856 共 12 条,然后用这 12 条引物对供试的 22 个样品进行 ISSR-PCR 分析,共扩增出 127 条 DNA 谱带,其中多态性条带为 85 条,条带多态百分率为 66.93%,表明 22 个杧果栽培品种间具有丰富的遗传多样性(图 1)。

### 2.2 聚类分析

对所得条带进行 DICE 统计,用 UPGMA 法构建分子系统树(图 2)。

由图 2 可以看出,这 22 个杧果栽培品种(系)之间的同源性很高,在 0.81 ~ 0.96 之间,其中以桂热

表 2 ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplification result of ISSR primer

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	扩增带数 Total amplified bands	多态性带数 Number of polymorphic bands	多态性带数百分数 Percentage of polymorphic bands
UBC-868	(GAA) <sub>6</sub>	9	6	66.7
UBC-828	(AC) <sub>8</sub> C	9	5	55.6
UBC-812	(GA) <sub>8</sub> A	8	5	62.5
UBC-890	VHV(GT) <sub>7</sub>	7	3	42.9
UBC-811	(GA) <sub>8</sub> C	9	5	55.6
UBC-841	(GA) <sub>8</sub> YC	13	12	92.3
UBC-859	(TG) <sub>8</sub> RC	9	5	55.6
UBC-857	(AC) <sub>8</sub> YG	14	7	50
UBC-851	(GT) <sub>8</sub> YG	14	11	78.6
UBC-840	(GA) <sub>8</sub> YT	7	5	71.4
UBC-835	(AG) <sub>8</sub> YC	16	11	68.8
UBC-856	(AC) <sub>8</sub> YA	12	10	83.3
Total		127	85	66.9

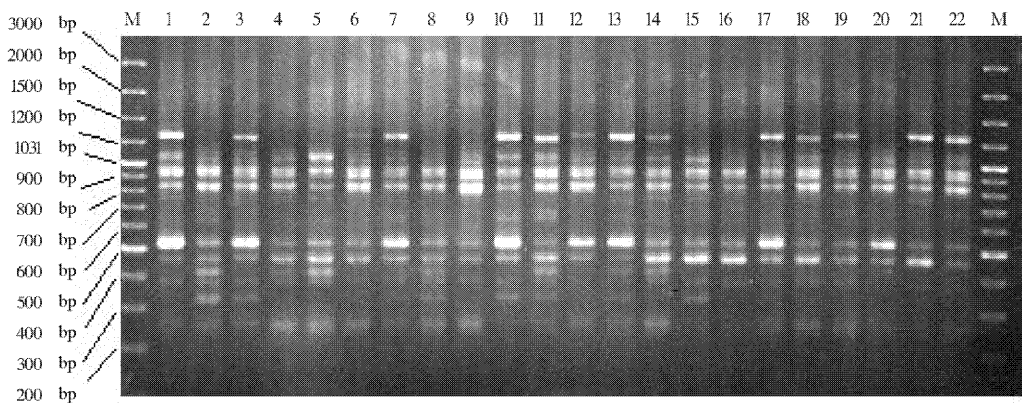


图 1 引物 UBC-857 对 22 个杧果品种(系)的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplified pattern of twenty-two mango cultivars or lines with primer UBC-857

M: GeneRuler™ 100 bp DNA Marker; 1 ~ 22 见表 1。1 ~ 22 see Table 1.

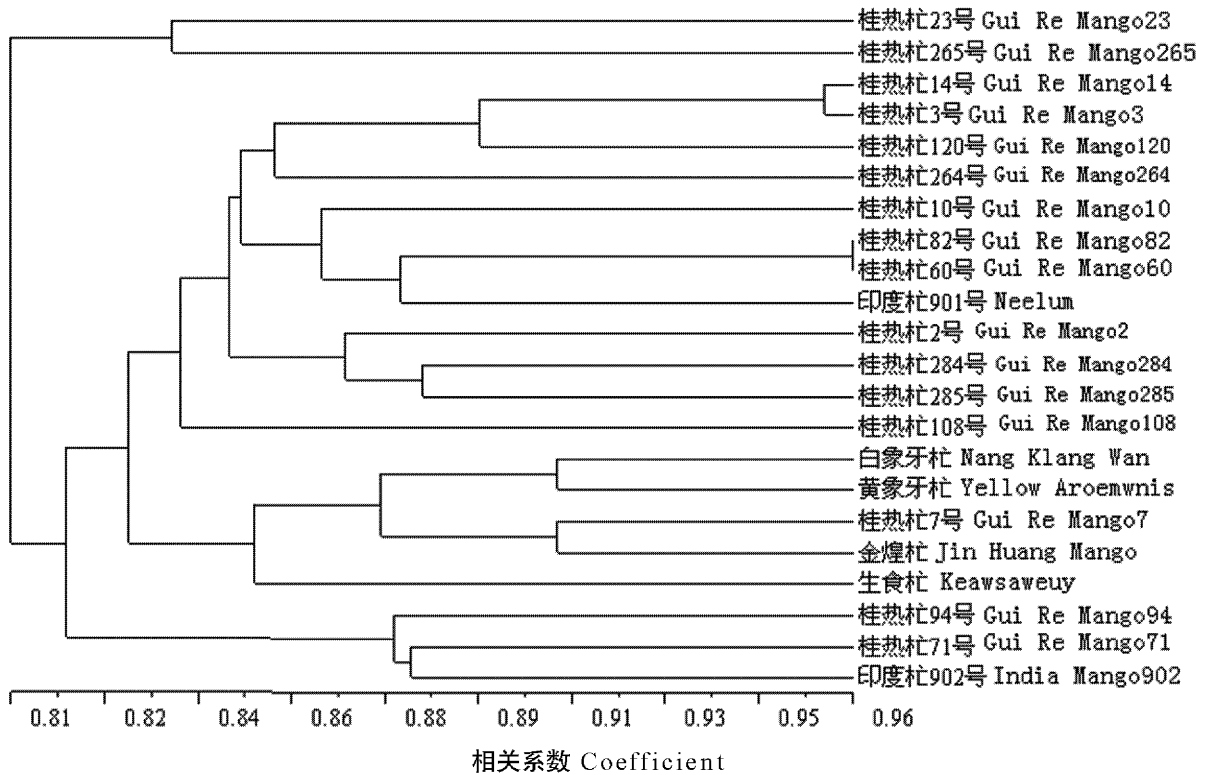


图 2 22 个芒果品种(系)的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram among 22 mango cultivars or lines

芒 82 号与桂热芒 60 号的相似系数最高,达到了 96%。这 12 条 ISSR 引物除不能区分桂热芒 82 号与桂热芒 60 号外,其余品种都能区分。如果以相似系数 0.82 为界,可以将 22 个芒果品种归为 3 大类:第一类有桂热芒 23 号和桂热芒 265 号;第二类有桂热芒 14 号、桂热芒 3 号、桂热芒 120 号、桂热芒 264 号、桂热芒 10 号、桂热芒 82 号、桂热芒 60 号、印度芒 901 号、桂热芒 2 号、桂热芒 284 号、桂热芒 285 号、桂热芒 108 号、白象牙芒、黄象牙芒、桂热芒 7 号、金煌芒和生食芒;第三类有桂热芒 94 号、桂热芒 71 号和印度芒 902 号。

### 3 讨论

#### 3.1 亲缘关系分析

从聚类图上可以看出,姊妹系:桂热芒 60 号、桂热芒 82 号、桂热芒 14 号和桂热芒 264 号(它们的亲本均为印度芒 901 号),桂热芒 3 号、桂热芒 120 号和桂热芒 10 号(它们的亲本为黄象牙芒)聚类在一起;亲子系:黄象牙芒与桂热芒 7 号、白象牙芒与金煌芒、桂热芒 10 号与桂热芒 285、印度芒 902 号与桂热芒 94 号都能很好地聚类在一起,反映出它

们之间具有密切的亲缘关系。也就是说,利用 ISSR 技术能很好地区分亲缘关系较近的品种(系),并对它们进行分类。

桂热芒 71 号是从白象牙芒的实生变异单株以嫁接繁殖的无性后代中选出的优良单株<sup>[4]</sup>,其亲缘关系理论上应该很近,但是白象牙芒并没有与桂热芒 71 号聚到一起,而是与桂热芒 94 号和印度芒 902 号聚类到一起。从植物学特征和生物学特性上比较,白象牙芒与桂热芒 71 号区别明显;从种子胚性上来看白象牙芒为多胚性,桂热 71 号为单胚性,说明它们之间的遗传基因发生了变异,由此推测桂热芒 71 号可能来自白象牙芒的杂种后代。桂热芒 94 号和桂热芒 108 号都是印度芒 902 号的实生后代,桂热芒 94 号与其亲本印度芒 902 号聚类到一起,反映其亲缘关系密切,但是桂热芒 108 号却没有与其亲本聚类到一起,这可能是由于芒果长期开放式授粉使桂热芒 108 号的遗传组成更偏向于另一亲本的缘故,可以推测桂热芒 108 号可能是印度芒 902 的杂种后代,桂热芒 94 号可能是印度芒 901 号的实生后代。王令霞等<sup>[5]</sup>和王家保等<sup>[6]</sup>把白象牙芒、黄象牙芒、金煌芒聚类到一起,与本试验的结果

一致。

### 3.2 杧果胚性的聚类分析

按照种子中胚的多少可将杧果分为单胚类型和多胚类型<sup>[7]</sup>, 目前杧果的胚性遗传规律尚无定论。有研究<sup>[8-10]</sup>根据 RAPD 结果, 认为可以将杧果单胚类型和多胚类型分开, 并发现了若干可能与种子胚性相关的 RAPD 标记, 但也有研究<sup>[12-14]</sup>认为利用 RAPD 技术不能区分杧果的胚性。Eiadthong 等<sup>[11]</sup>和王家保等<sup>[7]</sup>利用 ISSR 技术也不能区分单胚与多胚类型杧果品种, 这与我们的结果一致。在生产上有些品种, 如桂香杧的胚性受环境影响, 表现不稳定, 有些年为单胚, 有些年又是多胚; 甚至在同一棵树上能发现既有单胚也有多胚的现象。莫饶<sup>[15]</sup>等报道, 多胚类群的品种中有单胚现象出现。因此我们认为在分子水平上区分种子的胚性具有不确定性。

**致谢** 本实验是在广西农业科学院作物遗传改良生物技术重点实验室完成, 在此特别鸣谢。

### 参考文献

- [1] Karihaloo J L, Dwivedi Y K, Archak S, et al. Analysis of genetic diversity of Indian mango cultivars using RAPD markers [J]. Hort Sci Biotechn, 2003, 78: 285-289.
- [2] Yu X M (余贤美), Ai C X (艾呈详). Genetic diversity of wild *Mangifera indica* populations detected by ISSR [J]. J Fruit Sci (果树学报), 2007, 24(3): 329-333. (in Chinese)
- [3] He X H (何新华), Li Y R (李杨瑞), Guo Y Z (郭永泽), et al. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of different native mango cultivars in Guangxi [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2005, 6(3): 829-834. (in Chinese)
- [4] Huang G D (黄国弟), Chen H J (陈豪军), Li R W (李日旺), et al. The selection and breeding of an excellent plant of Gui Re Mango 71 [J]. Guangxi Trop Agri (广西热带农业), 2007, 108(1): 10-11. (in Chinese)
- [5] Wang L X (王令霞), Wu Z X (吴志祥), Wang J B (王家保), et al. The fuzzy cluster analysis of the main mango cultivars in Hainan [J]. J Trop Crops (热带作物学报), 2003, 24(4): 29-34. (in Chinese)
- [6] Wang J B (王家保), Wang L X (王令霞), Du Z J (杜中军), et al. Analysis on the genetic relationship of some mango (*Mangifera indica* L.) germplasms by ISSR markers [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2007, 34(1): 87-92. (in Chinese)
- [7] Malo S E. Mango and avocado cultivars: Present status and future developments [J]. Proc Trop Reg Amer Soc Hort, 1970, 14: 74-85.
- [8] Xie J H (谢江辉), Liu C M (刘成明), Ma W H (马蔚红), et al. Analysis of genetic relationships among mango germplasm by RAPD markers [J]. J Fruit Sci (果树学报), 2005, 22(6): 649-653. (in Chinese)
- [9] Valenzuela-Lopez J A, Martinez O, Paredes-Lopez O. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers [J]. Hort Sci, 1997, 32(6): 1105-1108.
- [10] Viruel M A, Escribano P, Barbieri M, et al. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) with microsatellites [J]. Mol Breed, 2005(15): 383-393.
- [11] Eiadthong W, Yonemori K, Sugiura A, et al. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat (SSR) anchored primers [J]. Sci Hort, 1999(82): 57-66.
- [12] Xu B Y (徐碧玉), Jin Z Q (金志强), Peng S Q (彭世清), et al. RAPD analysis of genomic DNA in mango cultivars in Hainan Island [J]. J Trop Crops (热带作物学报), 1998, 19(3): 33-36. (in Chinese)
- [13] Schnell R J, Ronning C M, Knight R J. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers [J]. Theor Appl Genet, 1995(90): 269-274.
- [14] Ravlshankar K V, Anand L, Dinesh M R. Assessment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD markers [J]. J Hort Sci Biotechn, 2000, 75(2): 198-201.
- [15] Mo R (莫饶), Luo Y H (罗远华), Zhou S M (周世民), et al. Polyembryony in mango (*Mangifera indica* L.) and genetic analysis [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2005, 13(6): 475-479. (in Chinese)