

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^{*}

钟 伟¹, 林晓东¹, 朱芳德², 郑丽霞¹, 吴定尧³, 黄上志¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广东省肇庆市科委龙眼研究所, 广东 肇庆 526040;

3. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 为分析不同龙眼品种之间的遗传差异及亲缘关系, 以近年从广西引进的四季蜜龙眼和原产广东、福建、广西的 9 个龙眼品种的叶片为材料, 以基因组 DNA 为模版, 使用 100 条随机引物进行 RAPD 扩增, 其中 18 条引物扩增出清晰的具多态性的 DNA 谱带。采用 UPGMA 法对这 18 条引物扩增的谱带进行聚类分析发现, 遗传距离系数为 0.8 时, 可将 10 个龙眼品种 (系) 分为 3 组, 第 1 组含四季蜜, 第 2 组含灵龙, 第 3 组含其余 8 个常规龙眼品种, 它们是古山二号、储良、友谊、龙优、石硃、松风本、大乌圆和广眼。

关键词: 龙眼; RAPD; 聚类分析

中图分类号: S667.2 Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) S1-0065-04

龙眼原产中国, 是我国热带亚热带地区的特产水果, 它在我国南方部分省 (区) 的农业生产中占有较高的地位^[1]。龙眼品种繁多, 不同地区存在同名异种或同品种异名的混乱情况, 因此应用新技术新方法对龙眼品种的分类研究越来越受到重视。近年来国内已有学者利用 RAPD 技术对福建和广西的一些龙眼品种的亲缘关系进行了研究, 并提出一些新的见解^[2,3]。

四季蜜龙眼是肇庆科委龙眼研究所 1995 年从广西引进的新品系, 已连续 8 a 对其进行了生物特性、经济性状及适应性的观察和研究, 发现该龙眼具有肉质晶莹嫩爽、味浓蜜甜等优良性状。与其他龙眼品种相比, 四季蜜龙眼树型紧凑, 分枝力稍弱, 叶形狭长细小, 具有特殊的成花特性。该龙眼在苗期及幼树容易成花座果, 成年树一年中可以观察到多次开花的现象, 成花无需低温干旱条件, 尤其以 4—5 月和 8—9 月成花较多, 座果率较高。可见, 该龙眼同目前常规龙眼品种有较大的生物性状差异, 因此, 分析它同常规龙眼品种的遗传差异, 对进一步确定其起源与分类地位, 对以后品种の利用与繁育有着重要的意义。本实验以四季蜜龙眼及原产广东、福建、广西的 9 个龙眼品种为材料, 利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术分析它们之间的遗传差异及亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 叶片。10 个龙眼品种为, 四季蜜、古山二号、大乌圆、石硃、储良、灵龙、松风本、广眼、龙优和友谊, 其中四季蜜、灵龙、松风本、广眼、龙优和友谊来自肇庆市科委龙眼研究所种植园, 古山二号、大乌圆、石硃、储良采自华南农业大学龙眼圃。每个品种在不同位置采集 3 棵树。

1.2 龙眼基因组 DNA 的提取

1.2.1 常规的 CTAB 法 参照 Murray 等 (1980) 方法^[4]。

1.2.2 改良 CTAB 法 参照丁晓东等 (2000) 方法^[5], 略加修改, 增加抽提次数, 确保分离的 DNA 质量。

1.2.3 SDS 法 参照 Dellaporta 等 (1983) 方法^[6]。

1.3 RAPD 扩增

使用了 100 条由上海博亚生物技术公司生产的 10 碱基随机引物, Taq 酶和 dNTP 均购置于北京鼎国生物技术公司。25 μ L 反应体系中有 100 ng 模板 DNA、200 μ mol/L dNTP、0.2 μ mol/L 引物、2 mmol/L Mg^{2+} 、2 U Taq 酶。反应参数为 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 10 s, 36 $^{\circ}C$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,

* 收稿日期: 2003-12-08

基金项目: 广东省科技计划 (农业攻关) 资助项目 (A20406)

作者简介: 钟伟 (1975 年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 黄上志; E-mail: lsshz@zsu.edu.cn

40 个循环; 72 ℃延伸 5 min^[7]。扩增后产物在 $w=1.2\%$ 琼脂糖凝胶上电泳 (加 EB 至 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 分离, 凝胶成像仪成像。

1.4 数据处理

多态性 RAPD 带的表示方法是用 1 表示强带和可重复出现的弱带, 0 表示无带或不能重复出现的弱带。由此计算出品种 x 和 y 之间的遗传距离^[8]

$$D = 1 - 2N_{xy} / (2N_{xy} + N_x + N_y)$$

其中, N_x 表示样品 x 有而 y 没有的 DNA 扩增片段数, N_y 表示样品 y 有而 x 没有的 DNA 扩增片段数, N_{xy} 则表示样品 x 和 y 共有的 DNA 片段数。使用软件 RAPDistance, 采用 UPGMA 法进行聚类分析并构建遗传树。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 提取

龙眼等热带果树的组织细胞中含有大量的多酚、多糖、原花色素、单宁等次生代谢物, 为了提取高质量的 DNA, 尝试了多种基因组 DNA 提取方法。实验中发现 (图 1), 常规的 CTAB 法和改进的 CTAB 法所提取的龙眼基因组 DNA 电泳差异不大, 但作为 RAPD 反应模板, 前者往往扩增不出谱带或扩增出的带很少。而常规 SDS 法所提取的龙眼基因组 DNA 产量高, 但是 DNA 沉淀为深褐色, 难溶解, A_{260}/A_{280} 比值偏低, 不能用于做酶切和 RAPD 扩增。改进的 CTAB 法优点在于细胞核完全裂解之前, 用核分离液去除细胞质中的多糖和酚类物质, 以免它们与 DNA 共沉淀, 影响 DNA 的质量。该方法也被应用于荔枝的基因组 DNA 提取^[9]。

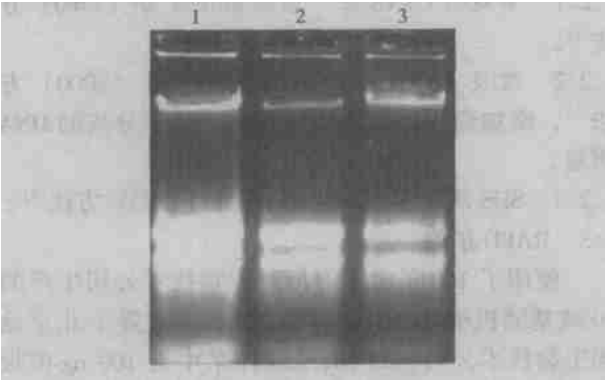


图 1 龙眼基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis (1.2%) of longan DNA

- 1. 常规 CTAB 法, 四季蜜龙眼 DNA;
- 2. 改进 CTAB 法, 四季蜜龙眼 DNA;
- 3. 改进 CTAB 法, 石硃龙眼 DNA

2.2 RAPD 扩增

2.2.1 条件的优化 从常规的 RAPD 反应条件入

手, 以龙眼基因组 DNA 为反应模板, 对 RAPD 反应的条件进行了优化。实验中发现模板量在 100 ~ 150 ng 时扩增效果较好, 而一般的 RAPD 反应体系中模板量为 5 ~ 10 ng 时就可以获得良好的扩增结果^[10], 这可能同 DNA 模版质量有关。在 RAPD 反应条件上我们使用了优化的 RAPD 反应条件, 优化后的 RAPD 反应扩增出的带在凝胶电泳后更为清晰明亮。

2.2.2 RAPD 扩增结果 使用 100 条引物对 10 个龙眼品种 (系) 进行 RAPD 扩增。经过筛选发现, 有 15 条引物扩增失败; 有 32 条引物扩增出具有多态性的 DNA 片段, 占引物总数的 32%, 其中条带清晰可用作 RAPD 结果分析的引物有 18 条 (表 1)。

表 1 18 条引物序列及 10 个龙眼品种 RAPD 扩增总带数和位点数

Tab 1 The sequences of 18 primers and the total numbers of fragment and locus amplified in RAPD reaction of 10 longan cultivars

引 物	序 列	扩增总带数	位点数
H04	GGAAGTCGCC	59	9
F08	GGGATATCGG	61	10
I01	ACCTGGACAC	45	6
U06	ACCTTTGCGG	38	5
X03	TGGCGCAGTG	60	8
X18	GACTAGGTGG	64	8
M12	GGGACGTTGG	48	7
AH15	CTACAGCGAG	51	11
AH17	CAGTGGGGAG	41	6
AH13	TGAGTCCGCA	65	10
AH20	GGAAGGTGAG	36	6
AI02	AGCGGTTTAC	45	6
AI03	GGGTCCAAAG	64	9
AK10	CAAGCGTCAC	56	8
AI08	AAGCCCCCA	56	7
AJ18	GGCTAGGTGG	72	9
AJ20	ACAAGTGTGTC	46	7
AK11	CAGTGTGCTC	54	7

这 18 条引物 G+C 含量均在 60% ~ 70%, 扩增的位点数为 5 ~ 11 个, 供试的 10 个龙眼品种 (系) 共扩增出了 961 条带, DNA 扩增带大小在 0.25 ~ 4 kb 之间, 其中多态性带为 393 条, 占扩增总带数的 41.2%, 说明这 10 个品种 (系) 之间具有一定的多态性。其中, 扩增片段数最多的引物是 AJ18 (图 2-a), 共扩增出了 72 条带, 平均每个品种 7.2 条带。扩增位点数最多的引物是 AH15 (图 2-b), 扩增的位点数达 11 个。运用软件 RAPDistance 计算了样品间的遗传距离并应用 UPGMA 法构建了树系图 (图 3)。从树系图中可以看出, 热带龙眼四季蜜与其它常规龙眼品种的遗传

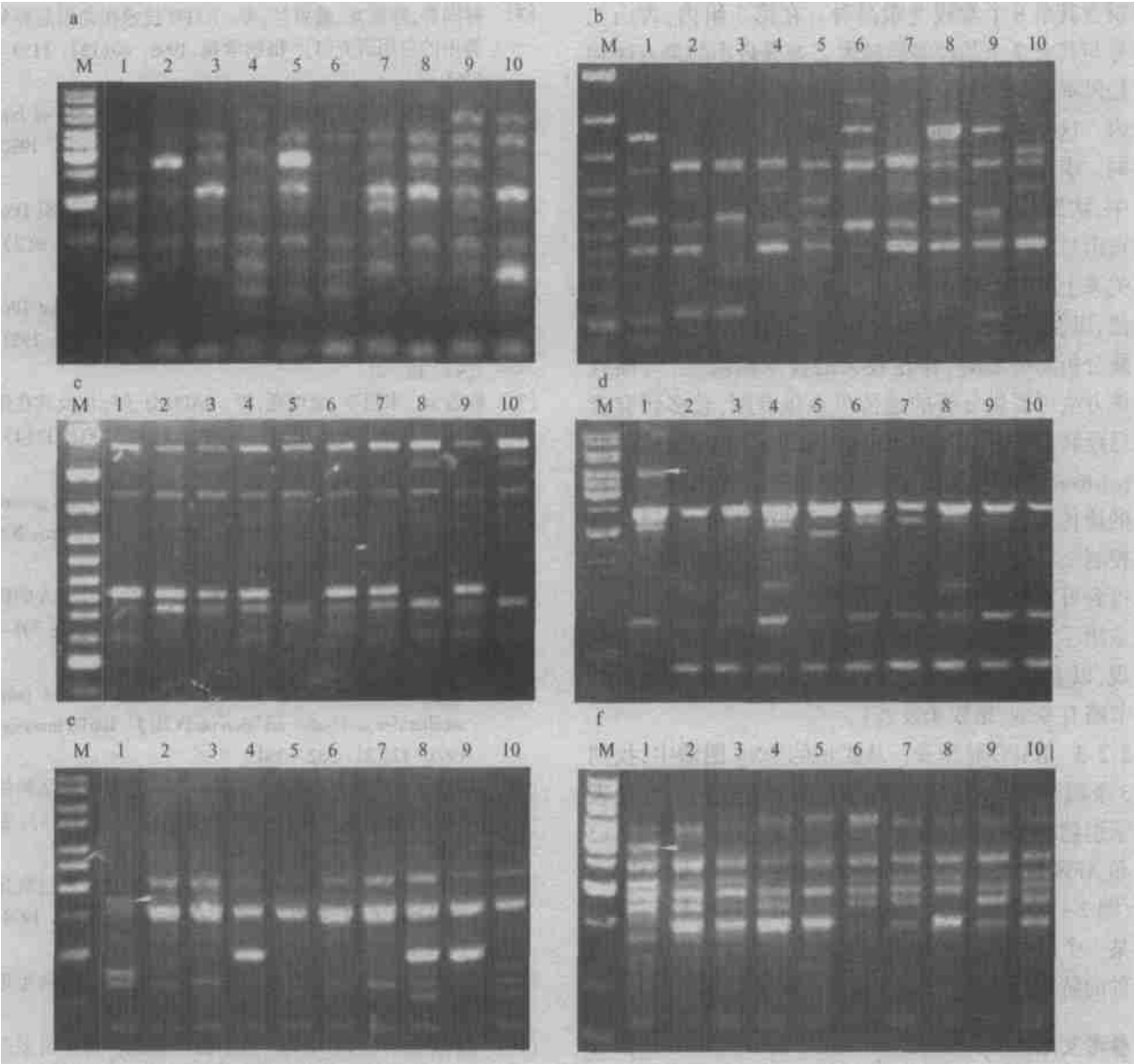


图 2 由不同引物扩增龙眼部 DNA 产生的 RAPD 带型

Fig. 2 RAPD profiles of DNAs from different longan cultivars amplified with primers

AJ18(a), AH15(b), AH17(c), F08(d), X03(e), AI08(f)

1. 四季蜜 Si jimi; 2. 古山二号 Gushan 2; 3. 古峡 Shixia; 4. 大乌圆 Dawuyuan; 5. 储良 Chuliang; 6. 灵龙 Linglong;
7. 广眼 Guangyan; 8. 松风本 Songfengben; 9. 龙优 Longyou; 10. 友谊 Youyi; M. DNA 相对分子质量标准

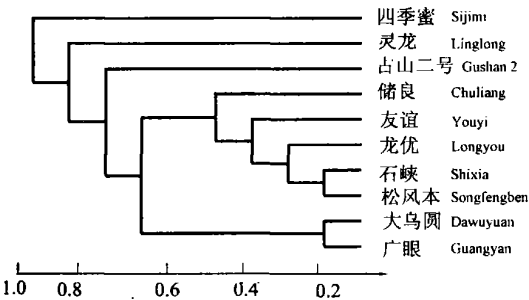


图 3 龙眼品种 DNA 多态性聚类分析树系图

Fig. 3 Dendrogram of polymorphic DNAs of longan cultivars with cluster anlysis

差异最大,在分类上有一定的特殊地位。遗传距离系数在 0.8 左右时,可将 10 个龙眼品种分为 3 组:第 1 组仅含四季蜜。在我国,研究者对热带龙眼的存在,一般抱审慎态度。而在泰国,研究人员承认存在热带龙眼和亚热带龙眼之分,前者主要起源于越南,在泰国中部的热带地区栽培。这类的龙眼,叶片小,发梢弱,1 a 有 2 次成花,果实较小,已经在泰国龙眼的反季节生产上应用 (Suranant, 2000, 个人通信)。四季蜜龙眼在生物性状上同这类龙眼有较大的相似,这可能同它的来源有关,它的母树位于广西与越南交界的地区。要进一步确认热带龙眼的遗传特征,需要采集更多这一类型的龙眼进行分析。第 2 组只含灵龙,是广西培育的晚熟龙眼品种。第 3

组合其余 8 个常规龙眼品种。在第 3 组内, 古山二号与其它 7 个品种差异较大。差异最小的是石硌和松风本, 大乌圆和广眼, 而它们各分在不同的亚组内。这个结果与前人用同工酶分析的结果略有不同。李建光等^[1]把大乌圆和广眼归在不同的类别中, 认为它们之间的亲缘关系较远。肖艳等^[12]报道古山二号与石硌同工酶谱较相似, 认为它们在亲缘关系上较近。这种差异产生可能同应用不同分析方法, 以及品种采集差异有关。已经有报道, 应用同工酶分析品种差异, 存在较大的技术局限性^[13], 而且该方法可提供分析的遗传位点极有限, 较多研究者已经转向应用 RAPD、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 等新的分子生物学技术方法分析品种的遗传差异。应用 RAPD 技术进行分析, 只要严格控制反应条件和选择适合的分析软件, 是完全可以得到可重复验证的实验结果^[14, 15]。在本研究中, 还应用了 PHYLIP 软件构建这 10 个品种的树系图发现, 以上结果都得到支持, 只是其中个别品种分类细节略有差别(结果未发表)。

2.2.3 RAPD 特征带 从扩增的 DNA 图谱中, 找到 3 条四季蜜龙眼的 RAPD 特征带, 分别是: F08 1(表示引物 F08 扩增的第 1 带, 图 2—d), X03 2(图 2—e) 和 AI08 1(图 2—f)。而 F08 6(图 2—d) 和 AH17 2(图 2—c) 则为储良龙眼的特征带。这些特征带为某一个品种(系)所特有, 可在一定程度上反映该品种的特异性, 可能适用于品种的快速鉴定。

参考文献:

[1] 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.
[2] 陈有志, 刘成明. 龙眼品种 RAPD 鉴别与分析[J]. 中国果树, 2001(4): 28—29.

[3] 林同香, 陈振龙, 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.
[4] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321—4325.
[5] 丁晓东, 吕柳新. 从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 142—145.
[6] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A plant DNA miniprep: version II[J]. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1(4): 19—21.
[7] 陈若雷, 宋道军, 余增亮, 等. RAPD 分子标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 生物学杂志, 2000, 17(4): 32—34.
[8] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 74: 5267—5273.
[9] 邓九生, 陈大明, 彭民璋. 龙眼和荔枝染色体 DNA 的提取与鉴定[J]. 广西农业大学学报, 1998, 17(4): 393—395.
[10] DEMEKE T, ADAMS R P. The effects of plant polysaccharides and buffer addition on PCR[J]. BioTechniques, 1992, 12 (3): 332—334.
[11] 李建光, 潘学文, 胡桂兵, 等. 广东龙眼主要品种的同工酶分析及分类[J]. 广东农业科学, 1997(3): 21—23.
[12] 肖艳, 黄建昌, 陈赞盛, 等. 广东龙眼主栽品种过氧化物酶同工酶研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1998, 11(3): 34—38.
[13] 周光宇. 有关同工酶分析的几个问题[J]. 植物生理学通讯, 1983(1): 1—4.
[14] 刘春林, 官春云, 李恂. 关于植物随机引物扩增多态性 DNA 标记的可靠性问题[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 56—59.
[15] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38 (12): 954—962.

Analysis of Genetic Difference of Longan Cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA

ZHONG Wei¹, LIN Xiao dong¹, ZHU Fang de², ZHENG Li xia¹, WU Ding yao³, HUANG Shang zhi¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Zhaoqing Longan Institute, Zhaoqing 526040, Guangdong, China;

3. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Genetic difference and relationship among 10 samples of longan cultivars was studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD). One hundred primers were used in screening by RAPD and 18 selected primers were able to produce clear polymorphic patterns. The results generated by using UPGMA algorithm to cluster genetic distance calculated from RAPD data showed that these 10 cultivars were divided into tree groups. Group I included cultivar “Sijimi”. Group II included “Linglong”. Group III included the other longan cultivars. They were Gushan 2, Chuliang, Youyi, Longyou, Shixia, Songbenfeng, Dawuyuan, Guangyan.

Key words: longan; RAPD; cluster analysis