

應用 RAPD 技術對荔枝品種遺傳變異性之研究¹

李文立^{2,3} 鄧永興² 林榮貴²

摘 要

李文立、鄧永興、林榮貴。應用 RAPD 技術對荔枝品種遺傳變異性之研究。台灣農業研究 56:281-288。

以十三個荔枝品種為材料，進行 RAPD 的片段分析。經篩選 200 個隨機引子後，選出 23 個引子所產生的 259 個條帶 (RAPD markers)，做為十三個荔枝品種間的親緣關係評估之依據。並利用 Jaccard 氏的計算方法，求得不同樣品間的相似度；並利用 UPGMA 方法，建立其親緣關係圖。結果顯示參試的十三個荔枝品種可區分為兩大群，其中玉荷包與三月紅最為相似，並與竹葉、新興、糖薄、高雄早生等品種叢聚在指數 0.53 處，而沙坑小核、尚書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉等品種則成另一叢聚在指數 0.52 處，其中桂味與桂枝的相似度 100%，顯示這兩個品種可能為同種異名。另外，就引子所產生條帶數而言，在 23 個引子中，以 UBC-199 產生 9 個條帶數為最少，其次為 OPE-06 及 OPG-01 產生 10 個條帶數，而 OPG-08 產生 26 個條帶數為最多，平均每個引子可以產生 15 個條帶，從這些引子中篩檢出鑑別玉荷包品種的專一性條帶 7 條、鑑別糯米滋品種的專一性條帶 6 條、鑑定沙坑小核品種的專一性條帶 7 條、及鑑定高雄早生品種的專一性條帶 6 條、一個尚書淮品種的專一性條帶、四個新興品種的專一性條帶、一個竹葉品種的專一性條帶及兩個桂味及桂枝品種共有的專一性條帶，這些品種專一性的條帶將可供作不同荔枝品種鑑別用。

關鍵詞：遺傳變異、荔枝、隨機擴大多型性 DNA。

前 言

荔枝原產於中國南部，在中國栽培歷史已經超過 2000 年。目前廣泛的分布在熱帶及亞熱帶區域，包括印度、馬來西亞、泰國、中國、澳洲、以色列、台灣、南非、美國等均有商業栽培 (Menzel 2002)，由於歷經長期的傳播，及跨越不同國度後語言文字的差異，往往造成名稱的改變，使部分荔枝栽培品種有同種異名或是異種同名的情形 (Menzel & Simpson 1990)。

台灣荔枝品種大多沿用早期自中國引入時的名稱，但因中國華南地區的荔枝品種名稱也頗為混亂，目前在嘉義農業試驗分所與鳳山熱帶園藝試驗分所已建立種源庫並保存共有 47 個品種的種原，但因形態分類不易，致使同一品種的變異品系無法分辨，造成育種及種原保存上的困難。

此外，荔枝大多利用無性繁殖，有關荔枝的枝條變異頻率及遺傳的研究，目前尚付之闕如，欲進行荔枝的品種改良，必須先了解其遺傳變異性，因此，各品種間遺傳的歧異程度，確實有探討的

1. 行政院農業委員會農業試驗所農業研究報告第 2302 號。接受日期：96 年 12 月 09 日。

2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員、研究員及副研究員。台灣 高雄縣 鳳山市。

3. 通訊作者，電子郵件：leewenli@fthes-tari.gov.tw；傳真機：(07)7315590。

必要性。過去使用同功異構酶作為遺傳分析的工具，具有簡單快速的優點 (Degani *et al.* 1995; Mallikarjuna *et al.* 1995)，但是容易因取樣的組織部位、栽培技術及生長環境的差異，影響分析的結果。利用 DNA 增幅指紋技術以短序列引子進行基因組 DNA 增幅多型性進行偵測則有不易受環境影響等優點 (Williams *et al.* 1990; Gustave *et al.* 1991)，目前無性繁殖作物包括芒果 (Schnell *et al.* 1995)、菊花 (Wolff *et al.* 1995)、蘋果 (Landry *et al.* 1994) 及百合 (Yamagish 1995; Lee 1997) 等作物，均已利用 DNA 標誌分析遺傳親緣性，且獲得良好成果。因此，本研究目的在於建立荔枝 DNA 增幅指紋多型性圖譜，以提早評估種源的蒐集與利用之效率，提高育種效率。

材料與方法

供試荔枝材料

本研究中所使用之荔枝種原材料除了沙坑小核為嘉義縣竹崎鄉沙坑村選出之品種之外，均為台灣最早期由中國大陸地區所引進之荔枝品種，保存於鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹種原保存園，均為成齡且經型態鑑定之種原，計有玉荷包、高雄早生、三月紅、黑葉、糯米滋、竹葉、尚書淮、新興、桂味、桂枝、沙坑小核、六月雪及糖薄等十三個荔枝品種，並以粉殼種龍眼為外源對照。

DNA 萃取分法

DNA 的萃取過程概要如下：取荔枝植株嫩葉 0.15 g，加適量液態氮於研鉢中磨碎後，加入適量 PVPP，以 1 mL 萃取液 (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM NaCl, 80 mM EDTA-Na₂, 10 mM, 2-mercaptoethanol 0.1% (v / v), sodium sarkosyl 2% (w / v))，置於 65°C 水浴 10 min，之後以 12,000 rpm 離心 10 min，取上澄液，注入新離心管中，並加入 5 µL RNase A (5 mg / mL) 並保持在 37°C 20 min，去除 RNA 後，加入 600 µL 酚/氯仿 (pheno / chloroform) 混合液，去除蛋白質，離心後取上澄液，添加 0.6 倍體積的異丙醇 (isopropanol)，在室溫下進行 DNA 沉降，至少 20 min，離心後，倒除異丙醇後，以 70%酒精清洗兩次，風乾後，加入適量的 1 X TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA-Na₂) 並使 DNA 完全溶解後，置於 -20°C 下 儲存備用。

PCR 條件

聚合酵素連鎖反應溶液為 1 X PCR 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25°C, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% (w / v) Triton X-100), dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP 各 200 µM。引子 (primer) 濃度為 2.5 µM，荔枝基因組 DNA 50 ng，0.5 U DNA polymerase (*Thermus brockianus*, DynaZyme™II)，總反應體積為 25 µL，所有溶液混合後，覆蓋上 50 µL 礦物油 (Sigma mineral oil M3516)，置於 PCR 儀 (ABI 2400) 進行反應。聚合酵素連鎖反應程式設定為 95°C，30 sec.、42°C，60 sec.、72°C，90 sec.，總共進行 40 次循環，最後以 72°C，600 sec. 使反應完全。待反應結束後，加入 2.5 µL 的 10 X sample loading dye (1.0 mM EDTA-Na₂, 0.4% bromophenol blue (w / v), 0.4% Xylene cyanol (w / v), 50% glycerol) 混合後，在 1.5%的瓊脂膠進行電泳分析，再以 ethidium bromide 染色，在 UV 燈下觀察並照相記錄。

逢機引子篩選

以 200 組逢機引子 (Operon f, g, h, y, aa 及 UBC kit 1) 作為初步的篩選，從其中選出 23 個引子進行實驗，各試驗重複 3 次。

資料分析

DNA 條帶圖譜依該條帶出現記為 1，未出現記為 0 的方式建立二維矩陣並依 Jaccard (1901) 所提之相似度計算公式計算各族群間的相似度，公式如下： $S_m = N_{11} / (N - N_{00})$ ， S_m ：相似度， N_{11} ：兩親本共有之條帶， N ：總條帶數， N_{00} ：兩親本都沒有的條帶數。叢群分析 (cluster analysis) 則利用 NTSYS 軟體計算各族群間的相似度並依 UPGMA 法統計兩兩族群間的遺傳距離並繪製成親緣關係樹狀圖 (dendrogram)。

結 果

荔枝 DNA 萃取

荔枝全株均富含二次代謝物質及酚類化合物，在 DNA 萃取過程中容易氧化使 DNA 溶液成爲黑褐色 (Puchooa 2004)，一旦 DNA 溶液成爲黑褐色將會影響後續 PCR 試驗。本研究初期以酚及氯仿之萃取方式進行純化，所得之 DNA 純度並不理想，在嘗試套袋及其他前處理及加入 PVPP 藥劑後，才使 DNA 的萃取工作得以順利進行。所得到的 DNA 以分光光度計量測其吸收光波 A260 及 A280 的比值可到達 1.8-2.0 之間，經換算後每克鮮重葉片可以萃取出約 500 ug 的基因組 DNA。

RAPD 條帶生成

從 200 條 10 個核苷酸的隨機引子中篩選獲得主要條帶清晰及重複性佳的引子共 23 個，這些引子總共產生 259 個條帶 (RAPD markers)，其中有 20 個條帶爲僅出現在某一品種的專一性條帶，可以作爲不同品種的區分。在 23 個引子中平均每個引子可以產生 11.3 個條帶，其中以 UBC-199 產生 9 個條帶爲最少，以 OPG-08 產生 26 個條帶數爲最多，並由這些引子中篩檢出 8 個玉荷包品種專一性的條帶、6 個糯米滋品種專一性條帶、7 個沙坑小核品種專一性條帶、6 個高雄早生品種專一性條帶、1 個尙書淮品種專一性條帶、4 個新興品種專一性條帶、2 個黑葉品種專一性條帶、1 個竹葉品種專一性條帶及兩個桂味及桂枝品種共有的專一性條帶。這些不同品種的特異性條帶可以交互利用來鑑別出不同的荔枝品種 (圖 1)，亦可應用於這些品種的雜交後代之鑑別。

資料分析

將每一個 RAPD 的條帶當作是一個獨立的性狀，利用 NTSYS 套裝軟體進行分析，求得不同樣品間的遺傳相似度 (表 1)，並依照此表所列的不同樣品間的遺傳相似度，依 UPGMA 方法建立這 18 個荔枝的親緣關係圖 (圖 2)，結果顯示此 13 個品種，18 個荔枝樣品可以區分爲兩大群，其中玉荷包、三月紅、竹葉、新興、糖薄與高雄早生叢聚在指數 0.53 處，沙坑小核、尙書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉則成另一叢聚在指數 0.52 處，其中桂味與桂枝的相似度指數爲 1，亦即在 259 個 RAPD 條帶中每一個條帶均完全相同，顯示在鳳山分所保存的這兩個品種應爲同種異名或是在種源收集保存的過程中發生混淆，需要再一次的引種或是從其他保存園取樣以便進一步確定。

討 論

荔枝 DNA 被認爲是比較困難萃取之植物種類，因其含有大量酚類化合物容易干擾核酸物質分離與純化，本研究中所採行之 DNA 萃取方式較 Puchooa 2004 提出之 CTAB 加入 PVP 的萃取方式所獲得的 DNA 在品質上與數量均較佳。在進行常規 RAPD 時，一般採用 37°C 作爲 PCR 之鍊合溫度 (annealing temperature)，本研究中採 42°C 相對嚴格的溫度條件，此溫度雖然會使部分條帶無法

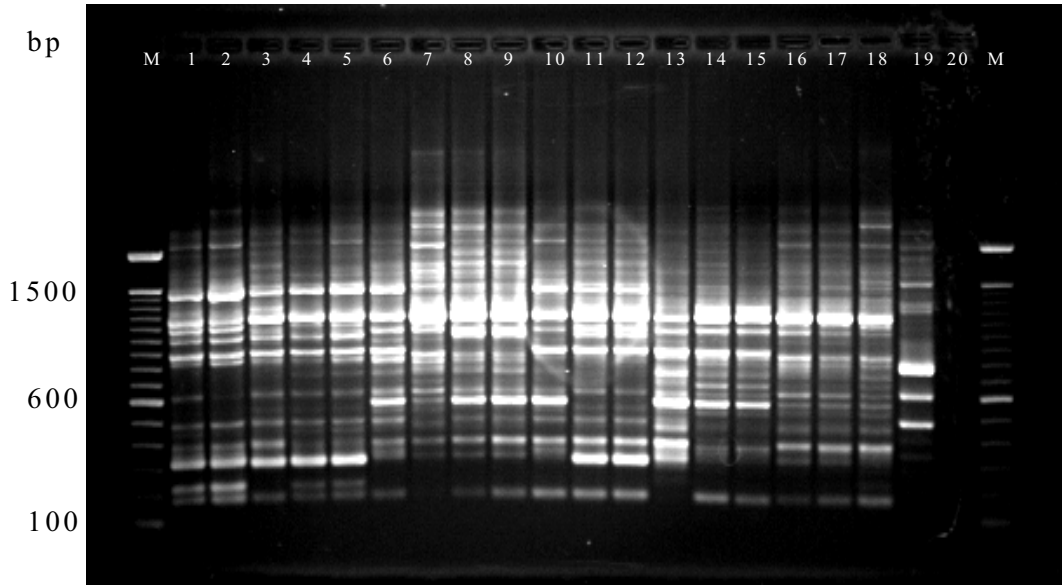


圖 1. 不同荔枝品種 DNA 樣本利用 OPG6 (GTGCCTAACC) 引子所顯示之圖譜。M 為分子標記，每一條帶間隔 100 bp，1、2.玉荷包，3.三月紅，4、5.高雄早生，6.六月雪，7、8.沙坑小核，9.新興，10.黑葉，11，12.竹葉，13.糖薄，14、15.糯米滋，16.尚書懷，17.桂枝，18.桂味，19.龍眼，20.H₂O。

Fig. 1. RAPD profiles generated by Operon primer G6 in 1.2% agarose gel. (M, DNA maker; 1,2. Yu ho pao; 3. San yue hong; 4,5. Gao xiong zao sheng; 6. Liu yue xue; 7,8. Sha keng xiao ho; 9. Xin xing; 10. Hei yeh; 11, 12. Zhu yeh; 13. Tang bao; 14,15. No mi zi; 16. Shang shu huai; 17. Kwai zi; 18. Kwai wei; 19. Longan; 20. H₂O).

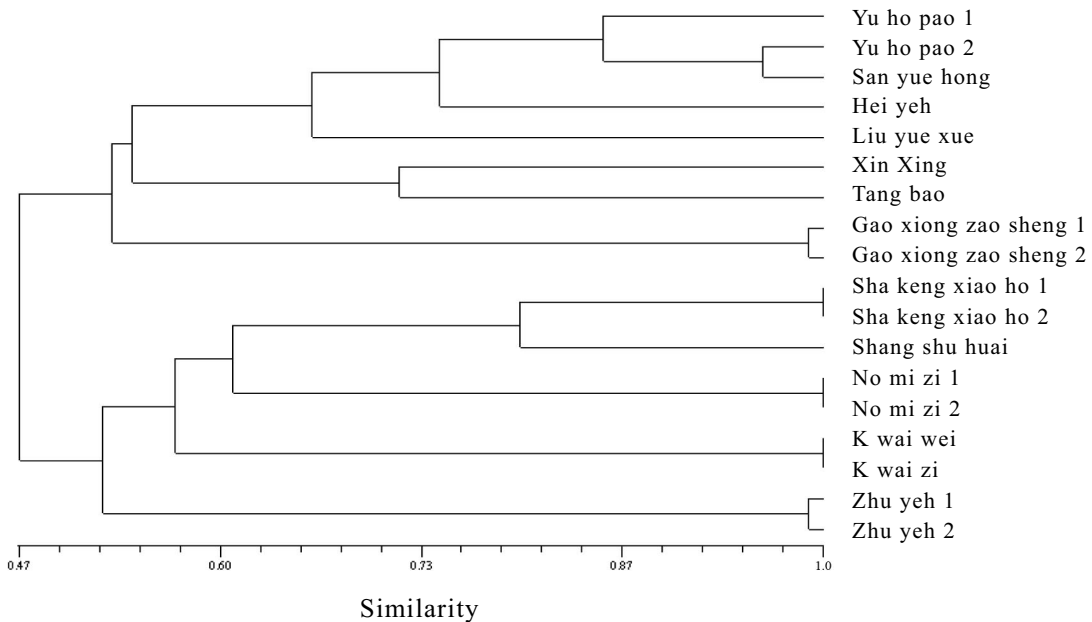


圖 2. 不同荔枝品種間的親緣關係圖。

Fig. 2. Relationships among different accessions of lychee via UPGMA analysis using Jaccard similarity analysis.

表 1. 依 Jaccard 公式計算荔枝 RAPD 條帶所求得之品種間的相似度

Table 1. Genetic similarity of RAPD banding patterns among lichee varieties analyzed by Jaccard coefficient of similarity

	YHP-1z	YHP-2	SYH	GXZS-1	GXZS-2	LYX	SKXH-1	SKXH-2	XX	ZY-1	ZY-2	HY	TB	NMZ-1	NMZ-2	SSH	KZ	KW	
YHP-1	1.00	0.89	0.86	0.57	0.57	0.65	0.49	0.49	0.52	0.53	0.53	0.73	0.55	0.39	0.39	0.47	0.40	0.40	
YHP-2		1.00	0.97	0.60	0.60	0.70	0.52	0.51	0.52	0.56	0.56	0.76	0.59	0.41	0.41	0.50	0.40	0.40	
SYH			1.00	0.58	0.58	0.70	0.53	0.52	0.53	0.54	0.54	0.74	0.58	0.42	0.42	0.49	0.40	0.40	
GXZS-1				1.00	0.99	0.55	0.49	0.49	0.49	0.50	0.51	0.51	0.54	0.44	0.44	0.51	0.39	0.39	
GXZS-2					1.00	0.56	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.54	0.44	0.44	0.50	0.39	0.39	
LYX						1.00	0.58	0.57	0.56	0.50	0.51	0.64	0.63	0.44	0.44	0.54	0.40	0.40	
SKXH-1							1.00	0.99	0.61	0.61	0.62	0.49	0.62	0.60	0.60	0.80	0.55	0.55	
SKXH-2								1.00	0.61	0.62	0.62	0.49	0.62	0.60	0.60	0.80	0.55	0.55	
XX									1.00	0.49	0.49	0.48	0.74	0.43	0.43	0.54	0.45	0.45	
ZY-1										1.00	1.00	0.58	0.54	0.52	0.52	0.61	0.42	0.42	
ZY-2											1.00	0.58	0.54	0.51	0.51	0.62	0.42	0.42	
HY												1.00	0.56	0.40	0.40	0.49	0.40	0.40	
TB													1.00	0.50	0.50	0.63	0.44	0.44	
NMZ-1														1.00	1.00	0.64	0.59	0.59	
NMZ-2															1.00	0.64	0.59	0.59	
SSH																1.00	0.54	0.54	
KZ																	1.00	1.00	
KW																		1.00	1.00

z YHP, Yu ho pao; SYH, San yue hong; ZY, Zhu yeh; LYX, Liu yue xue; XX, Xin Xing; TP, Tang bo; GXZS, Gao xiong zao sheng; SKXH, Sha keng xiao ho; SSH, Shang shu huai; NMZ, No mi zi; KW, Kwai wei; KZ, Kwai zi; HY, Hei yeh.

被擴增，卻也使 RAPD 的穩定性與再現性獲得較好的表現 (Lee 1997)。在叢群分析 (cluster analysis) 中，玉荷包、三月紅、竹葉、新興、糖薄、高雄早生屬於同一群，而沙坑小核、尙書淮、糯米滋、桂味、桂枝及黑葉歸分為同一群。此結果與 Viruel 以 12 個富含 CT 的微衛星區域進行 21 個荔枝品種遺傳分析之遺傳相似度從 0.23 至 0.93 的結果吻合 (Viruel & Hormaza 2004)。在這些荔枝品種 RAPD 條帶的分析結果顯示，不同來源的相同品種雖然在相似度尚有少許的差異性，但是在與其他品種比較後，統計結果顯示均被歸類為最相近的一群，但是在分析其遺傳相似度時，不同來源的兩個玉荷包品種遺傳相似度僅達 89%，不同來源的竹葉、沙坑小核及糯米滋品種則分別為 100%。為釐清玉荷包品種間變異性，曾取樣 100 個不同個體的玉荷包荔枝，個別萃取其基因組 DNA 後進行遺傳分析結果卻顯示個體間無差異 (相似度 100%)，顯示本分所所蒐集不同來源的玉荷包品種顯然有混雜或變異的情形。此外，被歸類為不同品種的桂味與桂枝荔枝卻在本研究中分析其遺傳相似度呈現 100% 相同的情形 (表 1) 而這十三個荔枝品種間遺傳歧異度在 16% 至 63% 間，平均相似度為 0.52 ± 0.08 與梅樹品種間遺傳相似度介於 0.42-0.91 近似 (Wen *et al.* 2006)，除因荔枝為異交作物，遺傳組成較複雜外，也顯示品種間的受到人為選拔的影響較少。另外，由於荔枝採取嫁接、高壓等無性繁殖方法為個體增加之方法，同品種的不同個體間可以視為純系，因此不論來源的同一品種其遺傳背景應該完全相同，DNA 條帶型也應該完全一致，除非品種混淆與突變。

部分品種有不同參試個體，其中高雄早生品種兩個體間有 0.58% 的差異性及竹葉品種兩個體間有 0.5% 的差異，應為試驗上的機差而非品種混淆，而不同來源的糯米滋與沙坑小核在 259 個條帶均完全相同，遺傳相似度 100%，顯示無性繁殖的荔枝能夠保有個體間的同質性。較令人意外的是桂味與桂枝兩個不同的品種間遺傳相似度為 100%，由於 DNA 指紋檢測技術的敏感度可以明顯區分兄弟株，因此本試驗中的這兩個品種應該是同一個品種而無疑慮，此結果顯示這兩個品種是同種異名，值得從事荔枝育種工作人員注意。

在本試驗中亦加入同屬無患子科的龍眼為外源對照，其產生的 RAPD 條帶型與荔枝各品種間差異甚大，任何一組的引子均可在荔枝與龍眼表現出完全不同的引子條帶型。因基因組本身差異極大，因此並未將其數據統計分析，但是於試驗中的各個電泳圖均可以顯示龍眼與其他參試的荔枝品種明顯的不同。利用 RAPD 技術檢測荔枝基因組的變異性具有快速、有效的特性，除了可以儘早評估種原的收集成果 (例如本試驗中桂枝與桂味是否同種異名或在品種收集與保存時發生混淆) 以及在荔枝品種內是否已經有變異的產生，還可以評估不同荔枝品種間遺傳背景及瞭解其親緣性以備育種者參考，另外藉由 RAPD 標誌的篩選可以將品種特有的條帶轉換為核酸定序增幅區域標誌 (Sequence Characterized Amplified Region markers, SCAR markers)，進一步強化試驗的專一性並簡化判讀與鑑定時間。

誌 謝

本試驗研究經費承行政院農業委員會補助及試驗期間鳳山熱帶園藝試驗分所同仁張鳳娥小姐、廖美惠小姐及陳先利先生盡心協助試驗工作，特此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Degani, C., A. Beiles, R. El-Batsri, M. Goren, and S. Gazit. 1995. Identifying lychee cultivars by isozyme analysis. *J. Am., Soc. Hortic. Sci* 120:307-312.
- Gustavo, C. A., B. J. Bassam, and P. M. Gresshoff. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9:553-556.
- Jaccard, P. 1901. Study of comparative distribution of flower in the portion of Aipes and Jura. (Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura.) *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 37:547-549.
- Landry, B. S., R. Q. Li, W. Y. Cheung, and R. L. Granger. 1994. Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. *Theor. Appl. Genet.* 89:847-852.
- Lee, W. L. 1997. Investigation on Morphological Variation and Analysis of Random Amplifical Polymorphic DNA (RAPD) for *Lilium formosanum* and *Lilium longiflorum* in Taiwan. Master dissertation. National Taiwan University. 109 pp. (in Chinese with English abstract)
- Menzel C. 2002. The lychee crop in Asia and Pacific. FAO, Bangkok. 108 pp.
- Aradhya M. K., L. K. Yee, F. T. Zee, and R. M. Manshardt. 1995. Isozyme variation in lychee. *Scientia Horticulturae* 63:21-35.
- Puchooa. D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) *African J. Biotechnol.* 3:253-255.
- Schnell, R. J., C. M. Ronning, and R. J. Knight Jr. 1995. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:269-274.
- Viruel M. A., and J. I. Hormaza. 2004. Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). *Theor Appl Genet* 108:896-902.
- Wen I. C., C. Y. Chang, and W. T. Shaw. 2006. Evaluation and phylogeny of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. germplasm by using RAPD analysis. *J. Agric. Res. Taiwan* 55:250-261. (in Chinese with English abstract)
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucliec Acids Res.* 18:6531-5653.
- Wolff, K., E. Zietkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91:439-447.
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.* 91:830-835.

Using RAPD Markers to Study Genetic Variation among Lychee Cultivars¹

Wen-Li Lee^{2,3}, Yung-Shing Teng² and Rong-Quey Lin²

Abstract

Lee, W. L., Y. S. Teng, and R. Q. Lin. 2007. Using RAPD markers to study genetic variation among Lychee cultivars. *J. Taiwan Agric. Res.* 56:281-288.

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to identify the genetic relationship among introduced lychee cultivars in this study. Among 200 different decamer primers, 23 primers were selected; the selected primers amplified a total of 259 DNA bands. The total number of amplified bands per primer varied from 9 (UBC-199) to 26 (OPG-08), on an average 11.3 bands were induced by each primer. Jaccard's similarity coefficients for interval measure within and between cultivars were used to produce a cluster diagram using the unweighted pair-group method (UPGMA). The results showed that eighteen samples from thirteen lychee cultivars could be divided into two major groups: one included Yu ho pao, San yue hong, Zhu yeh, Xin xing, Liu yue xue, Tang bo and Gao xiong zao sheng; the other included Sha keng xiao ho, Shang shu huai, No mi zi, Kwai wei, Kwai zi and Hei yeh. The Jaccard's similarity coefficient of Kwai wei and Kwai zi was 1.00, implying that Kwai wei and Kwai zi may be the same cultivar. From 259 RAPD marker bands, we discovered 8 specific bands for Yu ho pao, 6 for No mi zi, 7 for Sha keng xiao ho, 6 for Gao xiong zao sheng, 1 for Shang shou huai, 4 for Xin xing, 2 for Hei yeh, 1 for of Zhu yeh and 2 for Kwai wei (Kwai zi). Those specific single bands of different cultivars will be recovered from agarose gel and cloned into TA vector system for sequencing, in order to develop new specific primer sets for the use of identifying different cultivars and hybrid posterity.

Key words: Genetic variation, Lychee, RAPD markers.

1. Contribution No.2302 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 9, 2007.

2. Assistant Horticulturist, Senior Horticulturist and Associate Horticulturist. FengShan Tropical Horticultural Experiment Station, ARI, FengShan, Taiwan, ROC.

3. Corresponding author, e-mail:leewenli@fthes-tari.gov.tw; Fax:(07)7315590.