

# 龍眼種原遺傳多樣性之 ISSR 標誌研究<sup>1</sup>

蔣功國<sup>2</sup> 溫英杰<sup>2,3</sup> 李維育<sup>2</sup> 張靜誼<sup>2</sup>

## 摘 要

蔣功國、溫英杰、李維育、張靜誼。2010。龍眼種原遺傳多樣性之 ISSR 標誌研究。台灣農業研究 59:185–196。

為做好龍眼種原之利用，以簡單重複序列間區分子標誌技術 (ISSR)，對農業試驗所歷年來收集之 24 份龍眼種原進行遺傳相似度分析。從 134 條 ISSR 引子中篩選出 15 條引子，其產生之增幅條帶具多型性且再現性良好。利用這 15 條引子共擴增 149 條條帶，其中 137 條為多型性條帶 (92.5%)；本研究並發現其中 5 條屬於特徵性條帶，可用於品種鑑定之參考標記。群集分析結果顯示，24 個龍眼品種可分為二個主群與粉殼及青殼二個單群，二個主群又可進一步細分為七個亞群。在所分析的 24 個龍眼品種中，遺傳相似度係數介於 0.54–0.91 之間，紅殼硬枝品種和紅殼品種的遺傳相似度係數為 0.91，表示其親緣關係最近；青殼與其他龍眼品種之遺傳相似度係數為 0.54，親緣關係最遠。對照的荔枝品種與其他龍眼品種之遺傳相似度則為 0.44。

**關鍵詞：**龍眼、遺傳多樣性、簡單重複序列間區分子標誌技術。

## 前 言

龍眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 原產中國大陸，不僅為中國南方亞熱帶特產果樹，越南、泰國也有廣泛的栽培 (Huang *et al.* 2005)。龍眼對土壤適應性強，紅土丘陵等貧瘠土地也可生長，栽培管理容易而且樹命長，在台灣受到大家的喜愛，屋前屋後總會種上幾株龍眼，既可遮陰乘涼，又可採收果實食用，因此台灣鄉間百年以上的龍眼樹並不少見。龍眼為台灣夏季重要果樹，果實營養價值高，除鮮食外，亦可乾燥做成龍眼乾，

是民間常用的滋補品。根據農業統計年報顯示，2008 年台灣龍眼栽培面積 11,704 ha，產量 101,909 t，台中縣、台南縣和高雄縣是主要產地 (Council of Agriculture 2008)。

簡單重複序列間區分子標誌技術 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 是由 Zietkiewicz *et al.* (1994) 所提出的一種在聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 中直接使用微衛星序列，進行 DNA 擴增的分子標誌技術，它有實驗操作簡單、快速、效率高的特性，不需預先知道研究對象的基因序列，就能擁有高度的穩定性及再現

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2413 號。接受日期：99 年 10 月 7 日。
2. 本所作物種原組技術員、研究員兼組長、技術員、研究助理。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：icwen@tari.gov.tw；傳真：(04)23390791。

性的增幅條帶，是一種結合隨機增殖多型性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 及簡單重複序列 (simple sequence repeat, SSR) 優點的分子標誌技術。ISSR 可以對整個基因組 DNA 進行多型性分析，用以建立特定基因標誌，或提供種和品種的演化關係、分類及鑑定依據等。利用一系列的引子進行 PCR 反應，能獲得不同長度的 DNA 片段，根據電泳所顯示條帶的差異，可以計算品種間遺傳距離或相似性係數，建立譜系關係樹狀圖，用來鑑別它們的差異程度及親緣關係。

利用基因組 DNA 做分子標記，由於不同的分子標記可以在不同的類群中產生獨特的帶型或者得到種或種以上分類特異性的條帶，沒有傳統分類法易受環境及季節影響的缺點，因此 DNA 分子標記用於種級分類的研究越來越多。如今 ISSR 分子標誌技術已是最常被用來研究果樹親緣關係的方法之一，國內、外學者利用 ISSR 技術已發表的研究報告有山楂 (Dai *et al.* 2007)、木瓜 (Carrasco *et al.* 2009)、李 (Wang *et al.* 2008)、西瓜 (Yang *et al.* 2009)、芒果 (Wang *et al.* 2007; Yu & Ai 2007)、咖啡 (Masumbuko & Bryngelsson 2006; Aga *et al.* 2005)、枇杷 (Fu *et al.* 2009)、柑橘 (Fang & Roose 1997)、草莓 (Arnau *et al.* 2002)、梨 (Monte-Corvo *et al.* 2001)、無花果 (Ikegami *et al.* 2009; Amel *et al.* 2004, 2005)、菠蘿蜜 (Ye *et al.* 2009)、椰子 (Pan *et al.* 2010)、楊梅 (Pan *et al.* 2008)、葡萄 (Wu *et al.* 2006) 及蘋果 (Guo *et al.* 2010) 等，此說明 ISSR 技術已在許多果樹品種的親緣鑑定上得到廣泛的應用。本試驗採集不同地區龍眼品種 24 份，荔枝 1 份 (對照) 利用 ISSR 分子標誌技術分析種原來源與其親緣關係，並尋找可作為品種標誌之特殊 DNA 譜帶。

## 材料與方法

### 植物材料

試驗所用材料為 24 份龍眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 及 1 份荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.)，採自農業試驗所及嘉義分所種原保存園，樹齡為 10–15 年生之嫁接苗，其名稱、來源、成熟期及果重詳如表 1。

### DNA 抽取方法

從不同植株採取新鮮的嫩葉 0.1–0.2 g，利用液態氮脫水乾燥，再研磨成粉末。加入 600  $\mu$ L 之 65°C DNA 萃取緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl; 2% (w/v) CTAB; 1% (v/v) PEG 6000; 0.5% (v/v) 2-Mercaptoethanol)，輕輕混勻後，置於 65°C 水浴鍋中 30 分鐘，取出靜置至室溫。加入 600  $\mu$ L 氯仿/異戊醇 (chloroform-isoamyl alcohol 24 : 1, v/v) 溶液混勻，以離心機 (Heraeus biofuge fresco, Kendro Laboratory Products, Inc.) 4°C 12,000 rpm 離心 10 分鐘。取上層液至新的微量離心管中，加入 400  $\mu$ L 的異丙醇 (isopropanol) 混勻，於室溫下靜置 10 分鐘，再以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘。去上清液，加入 1 mL 的洗滌緩衝液 [76% (v/v) ethanol; 10 mM ammonium acetate] 清洗沈澱物，以 4°C 12,000 rpm 離心 10 分鐘。去上清液，沈澱物以真空乾燥之。沈澱物溶於 200  $\mu$ L TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA) 中，加入 RNaseA，於 37°C 下反應 1 小時。將 DNA 稀釋 100 倍，利用光電比色計 (SmartSpec 3000, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 測定 OD<sub>260</sub> 及 OD<sub>280</sub> 的吸光值，計算 DNA 的濃度，稀釋成 5 ng/ $\mu$ L 存於 -20°C 冰箱中備用，DNA 原液儲存於 -80°C 冰箱中。

### ISSR 分子標誌分析

ISSR 分析所用之引子為 UBC SSR Primer Oligonucleotide Set 100/9 (John Hobbs, NAPs Unit, University of British Columbia, Vancouver,

Canada) 共 100 個及 34 個較長序列引子，其編號及序列詳見表 2。PCR 反應則以 30 ng 的 genomic DNA 當模板，在總體積 25  $\mu$ L 反應溶液中進行聚合酶連鎖反應。其溶液中另含有 5 $\times$  PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)；2.5  $\mu$ M 引子及 0.5 unit Taq DNA polymerase (Promega)，置入 DNA 熱循環儀

(XP cycler, Biomer technology Co. Ltd.) 中。反應溫度先以 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，55 $^{\circ}$ C 1 分鐘 30 秒，72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，進行 42 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘結尾，反應完成時自動保存於 4 $^{\circ}$ C 恆溫槽中。

取 12  $\mu$ L 經聚合酶連鎖反應增殖的 DNA 溶液，加入 1  $\mu$ L 稀釋 6 倍之電泳指示液

表 1. 試驗所用材料品種名稱、來源、成熟期及果重

Table 1. The name, origin, ripening season and fruit weight of 24 longan and 1 litchi cultivars used in the assay

No.	Cultivar name	Scientific name	Original country	Ripening season	Fruit wight (g)
1	Bai Dum	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	Thailand	mid-July	10.5
2	Bai Kew	<i>D. longan</i> Lour.	Thailand	early-Sep.	12.8
3	Carambo	<i>D. longan</i> Lour.	Hawaii	mid-Aug.	9.5
4	Jhuang Yuan Hong	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	China	early-June	22.2
5	Ponyai	<i>D. longan</i> Lour.	Florida	mid-July	11.0
6	Ta U Yun	<i>D. longan</i> Lour.	China	mid-July	12.3
7	Sak IP	<i>D. longan</i> Lour.	Hawaii	mid-July	9.5
8	E Wai	<i>D. longan</i> Lour.	Thailand	mid-Aug.	8.0
9	Siao He	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	late-Sep.	14.2
10	Shih Yue Siao He	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Oct.	11.5
11	Fen Ke	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	mid-Aug.	11.8
12	Da Fen Ke (I)	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	mid-Aug.	14.0
13	Da Fen Ke (II)	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	mid-Aug.	13.7
14	Shao An Liao	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	8.1
15	Dong Shan Fong Li Wei	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	9.3
16	Fu Yan	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	9.6
17	Di Tian	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	9.5
18	Hong Ke Ruan Jhih	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	10.8
19	Hong Ke Ying Jhih	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	11.0
20	Hong Ke	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	11.2
21	Yang Tao Ye	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	early-Aug.	11.3
22	Si Gong Mao	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	mid-Aug.	12.1
23	Ching Ke	<i>D. longan</i> Lour.	Taiwan	mid-Aug.	12.2
24	Yin Jiao	<i>D. longan</i> Lour.	China	—	—
25	Kahala	<i>D. longan</i> Lour.	Hawaii	early-Aug.	11.6

表 2. 試驗所用之 ISSR 引子

Table 2. Sequences of ISSR primers used in this study

Primer code	Primer sequence 5'→3'	Primer code	Primer sequence 5'→3'
L1	(AG) <sub>8</sub> GT	L18	CATC(ATC) <sub>9</sub>
L2	GSG(GT) <sub>6</sub>	L19	CATC(TTG) <sub>9</sub>
L3	CCA(GTG) <sub>4</sub>	L20	GAT(CTT) <sub>9</sub> CT
L4	DBD(CA) <sub>6</sub>	L21	GATC(GAGG) <sub>7</sub>
L5	(CA) <sub>9</sub> A	L22	GATC(GTAG) <sub>7</sub>
L6	(CA) <sub>9</sub> C	L23	GATC(AGTG) <sub>7</sub>
L7	(CA) <sub>9</sub> T	L24	GATC(TTCG) <sub>7</sub>
L8	(GA) <sub>9</sub> A	L25	GATC(TCTG) <sub>7</sub>
L9	(GA) <sub>9</sub> C	L26	GATC(GACA) <sub>7</sub>
L10	(GA) <sub>9</sub> T	L27	GATC(GATC) <sub>7</sub>
L11	CCGGATCC(GA) <sub>9</sub>	L28	GATC(TTAG) <sub>8</sub>
L12	CCGGATCC(CT) <sub>9</sub>	L29	GATC(TATC) <sub>7</sub>
L13	CCGGATCC(GT) <sub>9</sub>	L30	GATC(TATG) <sub>8</sub>
L14	CCGGATCC(CA) <sub>9</sub>	L31	GATC(GATA) <sub>7</sub>
L15	CATC(CGG) <sub>9</sub>	L32	GA(TCTAG) <sub>6</sub>
L16	CATC(TGG) <sub>9</sub>	L33	GAT(CTATG) <sub>6</sub>
L17	CATC(GAG) <sub>9</sub>	L34	CAT(CTTTT) <sub>6</sub> C

(loading dye, 30% Glycerol; 0.025% Bromophenol blue), 以 1.5% 瓊脂膠體 (Agarose, Boehringer Mannheim GmbH Germany) 進行電泳, 時間約 30 分鐘。結束後以 0.5 mg/mL 溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色 2 分鐘, 於 UV 燈下觀察膠體 DNA 多型性片段, 照相及貯存影像於柯達影像分析系統 (Kodak digital science ID image analysis, Eastman Kodak Co.), 進行資料比對分析。

#### 遺傳相似性分析

依 Jaccard (1901) 所提之相似度計算公式計算各族群間的相似度, 其公式如下:  $Nab/(Na + Nb - Nab)$ , 其中 Na 是樣本 a 的條帶數, Nb 是樣本 b 的條帶數, Nab 是樣本 a 和 b 共有的條帶數。依此法將所有樣本間兩兩的相似度計算出。並利用 NT-SYS (Exeter Software Co.) 軟

體所提供的未加權平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA), 來計算其放大 DNA 片段相似性及建立其親緣關係樹狀圖。

## 結 果

#### ISSR 分子標誌分析

以 100 條加拿大哥倫比亞大學所研發之 ISSR 引子, 針對本實驗之試驗材料進行篩選, 得到 3 條引子 (UBC 809, 881, 890) 對試驗材料之 DNA 可呈現多型性且再現性良好。參考他人研究所合成之 34 條較長序列引子篩選試驗材料 (Blair *et al.* 1999), 則有 12 條呈現多型性且再現性良好。綜合上述結果, 長序列 ISSR 引子對龍眼種原 DNA 多型性擴增結果較好。由此 15 個引子所獲得的 ISSR 產物在電泳膠片

上總共產生 149 個可辨識之條帶，其中多型性條帶 137 條占 92.5%。每個 ISSR 引子擴增的 DNA 條帶數在 4–15 條之間，條帶大小介於 250 bp 至 1750 bp。整體而言，所篩選的 ISSR 引子以 L1、L2、L3、L13、L22、UBC809 及 UBC890 等 7 組可產生 10 條以上的多型性條帶，效果最好 (表 3)。以 L10 引子進行 PCR 反應結果獲得 6 條多型性片段，其中包含可供鑑

別紅殼龍眼品種的特殊片段 (850 bp) (圖 1 及表 4)。L13 引子擴增結果產生 10 條多型性 DNA 片段，其中 900 bp 之片段為粉殼龍眼品種標誌之特定條帶 (圖 2 及表 4)，總計 15 條逢機引子擴增結果共獲得 L9 (900)、L13 (900)、L23 (480)、L10 (850)、L8 (400) 等 5 條多型性 DNA 片段，可以作為紅殼、粉殼及 Ponyai 龍眼品種的鑑別標誌 (表 4)。

表 3. 15 個 ISSR 引子在龍眼及荔枝品種上擴增結果

Table 3. Observed polymorphism with 15 primers used for ISSR analysis in longan and litchi cultivars

Primer code	Primer sequence 5'→3'	No. of polymorphic bands	No. of amplified bands	Band size (bp)	
				Min.	Max.
L1	(AG) <sub>8</sub> GT	11	11	250	1300
L2	GSG(GT) <sub>6</sub>	14	12	250	1700
L3	CCA(GTG) <sub>4</sub>	10	10	330	950
L4	DBD(CA) <sub>6</sub>	4	4	430	900
L8	(GA) <sub>9</sub> A	8	7	330	800
L9	(GA) <sub>9</sub> C	9	8	430	1050
L10	(GA) <sub>9</sub> T	7	6	550	1400
L11	CCGGATCC(GA) <sub>9</sub>	8	8	400	1600
L13	CCGGATCC(GT) <sub>9</sub>	11	10	380	1000
L22	GATC(GTAG) <sub>7</sub>	15	15	280	1100
L23	GATC(AGTG) <sub>7</sub>	9	8	320	900
L26	GATC(GACA) <sub>7</sub>	9	9	400	950
809	(AG) <sub>8</sub> G	12	9	300	1050
881	(GGGTG) <sub>3</sub>	9	9	600	1500
890	VHV(GT) <sub>7</sub>	13	11	400	1750
Total		149	137		

表 4. 龍眼品種之特定 ISSR 片段

Table 4. Specific ISSR fragments of Longan cultivars by 134 primers

Cultivars	Primer revealing specific fragments (base pairs)
Fen Ke	L9 (900), L13 (900), L23 (480)
Hong Ke	L10 (850)
Ponyai	L8 (400)



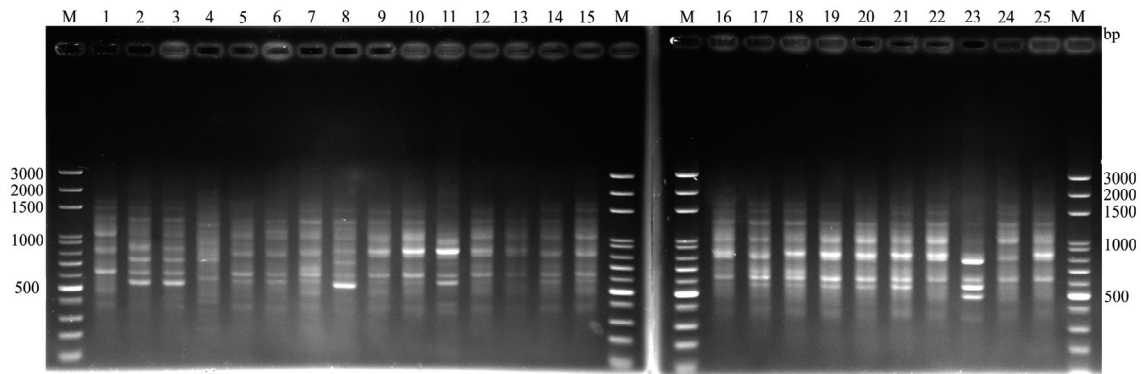


圖 1. 以 L10 為引子之 25 個龍眼及荔枝品種 ISSR 圖譜 (1-25 為品種代號，詳見表 1)。

**Fig. 1.** ISSR patterns of 25 longan and litchi cultivars obtained with primers L10. Line numbers at top refer to the number in Table 1. M: molecular weight marker (bp).

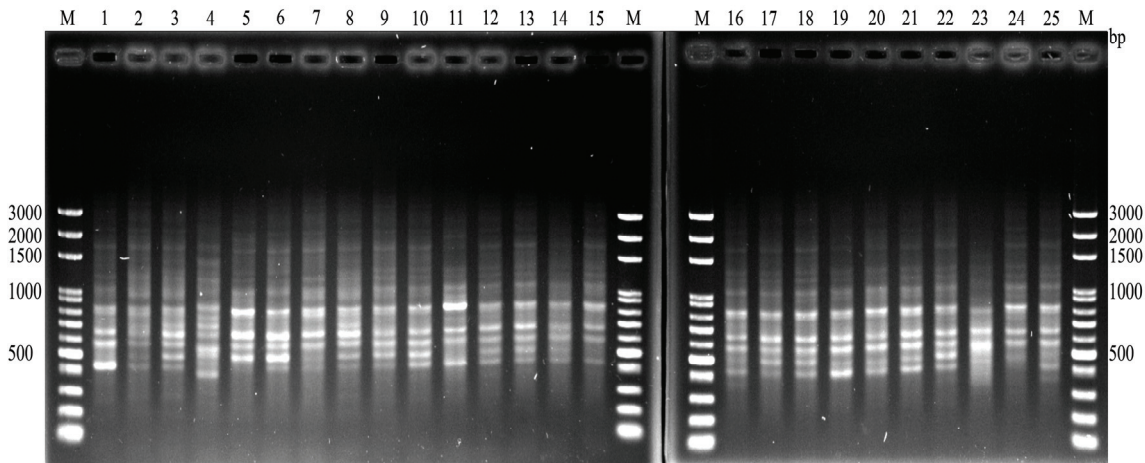


圖 2. 以 L13 為引子之 25 個龍眼及荔枝品種 ISSR 圖譜 (1-25 為品種代號，詳見表 1)。

**Fig. 2.** ISSR patterns of 25 longan and litchi cultivars obtained with primers L13. Line numbers at top refer to the number in Table 1. M: molecular weight marker (bp).

### 遺傳相似度及群集分析

將篩選得到的 15 條逢機引子，就其 ISSR 產物產生之 149 個可辨識之條帶，進行未加權平均法群集分析，並以 Jaccard 氏的相似度係數分析方法，來估算試驗品種間之遺傳相似度係數。再以相似度係數矩陣 (similarity coefficient matrix) (表 5) 繪製相似度樹狀圖 (dendrogram)，相似

度係數越高代表親緣關係越近。分析結果顯示 24 個龍眼種原可分為 4 群，第一群包括 Bai Dum、Sak IP、Bai Kew、Carambo、E Wai、大烏圓、小核、十月小核、大粉殼 (I)、大粉殼 (II)、紹安寮、東山鳳梨味、Ponyai 等 13 個品種，其中來自泰國的 Bai Dum 與來自夏威夷的 Sak IP 成一亞群，來自泰國的 Bai Kew、E Wai

表 5.25 個參試品種間的 ISSR 標誌相似性係數矩陣 (1-25 為品種代號, 詳見表 1)

Table 5. Matrix of similarity coefficients of ISSR markers among 25 cultivars of longan and litchi. Line numbers refer to the number in Table 1

ID	Cultivar ID No.																												
No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25				
1	1																												
2	0.3145	1																											
3	0.2485	0.4069	1																										
4	0.1263	0.1695	0.1808	1																									
5	0.1556	0.2036	0.2531	0.1319	1																								
6	0.1514	0.2047	0.1954	0.1657	0.4041	1																							
7	0.1554	0.2203	0.2316	0.1392	0.3694	0.3018	1																						
8	0.1842	0.1913	0.2717	0.1320	0.2123	0.2542	0.3034	1																					
9	0.1620	0.1686	0.2229	0.1319	0.1429	0.2275	0.2500	0.3152	1																				
10	0.1467	0.1657	0.1977	0.1421	0.1469	0.2683	0.2386	0.3095	0.5379	1																			
11	0.1436	0.1299	0.1543	0.1389	0.1180	0.1792	0.1444	0.1934	0.2284	0.2866	1																		
12	0.1170	0.1093	0.1648	0.1751	0.1412	0.2321	0.2191	0.2807	0.3467	0.3758	0.2722	1																	
13	0.1348	0.1747	0.1657	0.1905	0.1687	0.2209	0.2011	0.2057	0.2357	0.2313	0.2372	0.3517	1																
14	0.1337	0.1264	0.1500	0.1602	0.2071	0.2294	0.1838	0.1755	0.2515	0.2105	0.1734	0.2716	0.4143	1															
15	0.0942	0.1160	0.1148	0.1629	0.1686	0.1771	0.1739	0.1354	0.2407	0.2000	0.1976	0.2767	0.3265	0.3851	1														
16	0.1808	0.1813	0.2216	0.1311	0.2056	0.1908	0.1489	0.2179	0.2256	0.1525	0.0989	0.1341	0.1818	0.1714	0.1609	1													
17	0.2343	0.2590	0.1788	0.1204	0.1886	0.2102	0.2054	0.1968	0.1818	0.1405	0.1695	0.1538	0.2242	0.2114	0.1297	0.2981	1												
18	0.1977	0.2349	0.1897	0.1290	0.1930	0.2081	0.1838	0.1571	0.1930	0.1897	0.1534	0.1196	0.1314	0.1685	0.1022	0.2733	0.4621	1											
19	0.1976	0.1988	0.1677	0.1314	0.2000	0.2160	0.1695	0.1676	0.1294	0.1538	0.1302	0.1279	0.1071	0.1011	0.0904	0.2062	0.2987	0.3517	1										
20	0.1667	0.1737	0.1928	0.1105	0.1890	0.2422	0.1732	0.1977	0.1747	0.2000	0.1412	0.1657	0.1250	0.1056	0.1011	0.2405	0.2229	0.2675	0.4496	1									
21	0.1421	0.1744	0.1930	0.1189	0.1618	0.2638	0.1429	0.1658	0.1686	0.2071	0.2121	0.2156	0.1471	0.1202	0.1348	0.1412	0.1943	0.2202	0.3041	0.3517	1								
22	0.1397	0.1939	0.1706	0.1676	0.1598	0.2331	0.1593	0.1703	0.1807	0.1988	0.1818	0.1928	0.1377	0.1561	0.1322	0.2086	0.2515	0.2500	0.3147	0.2819	0.3311	1							
23	0.1548	0.1761	0.1595	0.1636	0.2157	0.1718	0.1754	0.1534	0.1481	0.1524	0.1280	0.1677	0.1765	0.2025	0.1688	0.2143	0.1617	0.1515	0.1410	0.1830	0.1265	0.1974	1						
24	0.1381	0.1637	0.1552	0.1657	0.2147	0.1667	0.1703	0.1813	0.1647	0.1686	0.1387	0.1834	0.1779	0.2024	0.2284	0.1706	0.1573	0.1160	0.1047	0.1353	0.1845	0.2357	0.2267	1					
25	0.1667	0.1250	0.1718	0.1345	0.1534	0.1092	0.1600	0.1850	0.1605	0.1863	0.1472	0.1801	0.2297	0.1497	0.1667	0.1887	0.1879	0.1566	0.1321	0.1582	0.1455	0.2349	0.1678	0.2483	1				

與夏威夷的 Carambo 另成一亞群。中國大陸的大烏圓與 6 個台灣品種 [小核、十月小核、大粉殼 (I)、大粉殼 (II)、紹安寮、東山鳳梨味] 組成第三亞群，而佛羅里達 Ponyai 品種與第一群品種遺傳相似度較低，單獨成一亞群。第二群包括福眼、奎田、紅殼軟枝、紅殼硬枝、紅殼、楊桃葉、西公帽、Kahala 及銀角等 9 個品種，台灣品種福眼、奎田成一亞群，夏威夷品種 Kahala 與紅殼軟枝、紅殼硬枝、紅殼、楊桃葉、西公帽等五個台灣品種另成一亞群，中國

大陸品種銀角與第二群品種遺傳相似度較低，單獨成一亞群。台灣品種粉殼及青殼與上述兩群品種的親緣關係較遠，單獨成為第三及第四群，對照的荔枝品種獨立成為第五群。在所分析的 24 個龍眼品種中，遺傳相似度係數介於 0.54–0.91 之間，紅殼硬枝和紅殼遺傳相似度係數為 0.91，親緣關係最近；青殼與其他龍眼品種之遺傳相似度係數為 0.54，親緣關係最遠。對照的荔枝品種與其他龍眼品種之遺傳相似度則為 0.44 (圖 3)。

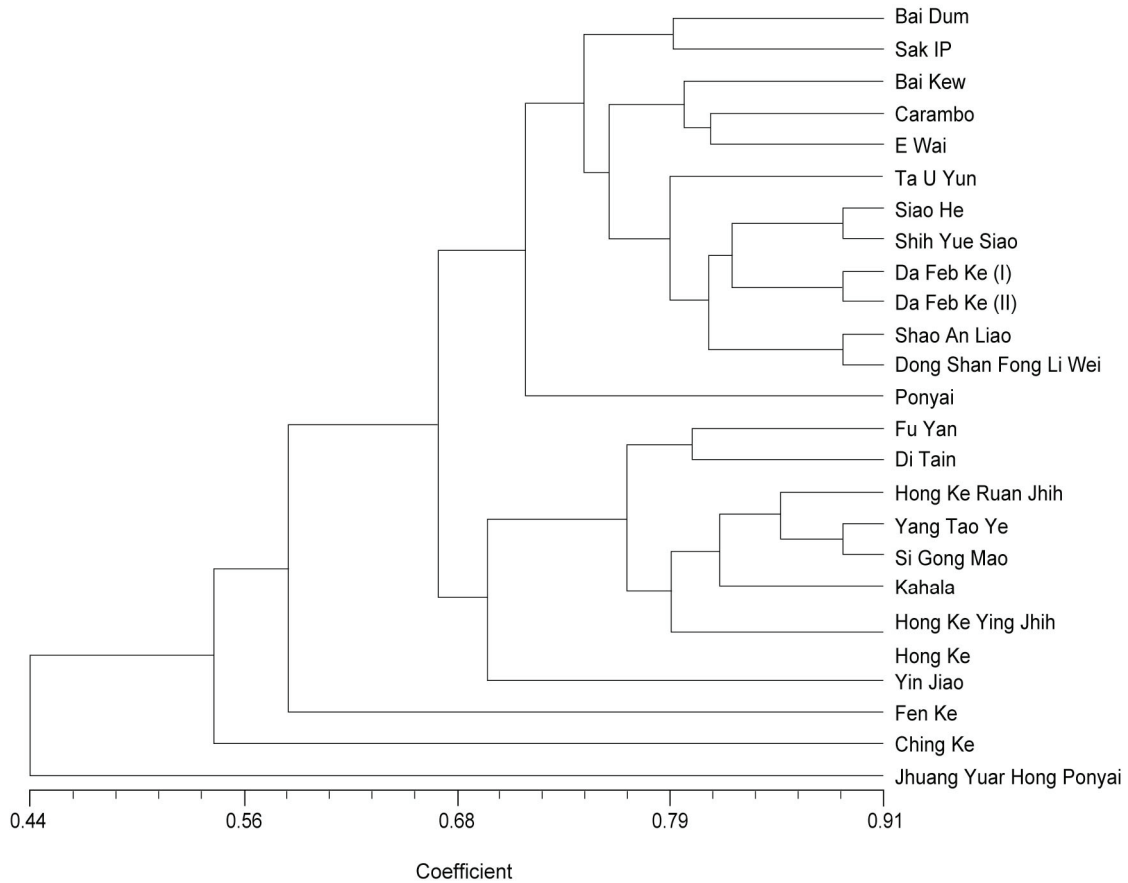


圖 3. 25 個龍眼及荔枝品種之 ISSR 遺傳相似度聚類分析樹狀圖。

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 25 longan and litchi varieties, constructed by Jaccard's distance and UPGMA clustering method from 149 ISSR markers.



## 討 論

利用 ISSR 分子標誌技術分析 24 個來自不同地區龍眼種原之遺傳相似度，由聚落分析圖得知，24 個龍眼品種遺傳相似度係數介於 0.54–0.91 之間。利用 RAPD 分子標誌技術分析本省桃、李種原之親緣關係，參試 30 個桃種原其遺傳相似度係數介於 0.73–0.93 (Wen & Chieh 2003)，所分析的 30 個李種原遺傳相似度係數則介於 0.32–0.94 之間 (Wen & Liu 2004)，可知參試龍眼種原的遺傳多樣性介於台灣蒐集保存的桃、李種原之間。

利用 100 條加拿大哥倫比亞大學所發展之 ISSR 引子擴增龍眼種原 DNA，僅有 3 條引子對試驗材料之 DNA 可呈現多型性且再現性良好 (UBC 809, 881, 890)，比例太低。34 條增加核苷酸重複數及改變引子兩端核苷酸數目之 ISSR 引子，在水稻 DNA 多型性擴增取得良好成果 (Blair *et al.* 1999)，以這些較長序列之 ISSR 引子篩選龍眼種原，則有 12 條呈現多型性且再現性良好，有效性高於 1/3。在 12 條可呈現多型性之引子中，改變 5' 端核苷酸數目者有 8 條，增加 1 個核苷酸重複數的有 3 條，另 1 條為改變 3' 端核苷酸數目 (表 3)。不同果樹間 SSR 分子標記通用性報導已有很多，Cipriani *et al.* (2001) 從桃中開發的引子在李、杏、櫻桃上亦成功得到擴增。Yamamoto *et al.* (2001) 將蘋果中分離的微衛星引子在梨的遺傳多樣性分析中也得到成功應用。Zheng *et al.* (2007) 應用棉花上開發的 SSR 引子在香蕉上得到了有效擴增，進一步說明 SSR 引子在植物間之通用性。本試驗印證在水稻擴增良好的 ISSR 引子，有 1/3 在龍眼品種亦得到良好結果，因此以 ISSR 分子標誌技術來分析植物間之遺傳相似性，可不再侷限於 UBC 發展出來之引子。

試驗所用龍眼種原，來自泰國的 Bai Dum、Bai Kew、E Wai、來自佛羅里達的 Ponyai 與來自夏威夷的 Carambo 和 Sak IP 集中在第一群構成三個亞組，夏威夷與泰國品種分散分佈，推測夏威夷品種的親本可能為泰國龍眼。大粉殼在產地依據果肉品質，果農把它分為兩種：品質好的與品質差的，但是名稱皆為大粉殼，遺傳相似度分析結果兩者為不同品種，為給消費者大粉殼為優良龍眼品種之印象，應將二者做出區隔。具有小核 (胚退化) 現象的兩個品種 (小核及十月小核) 聚集一起，顯示龍眼種子胚退化應為基因控制，育成大果小核的龍眼品種應為可行。夏威夷的 Kahala 與 5 個台灣龍眼品種構成第二群中的一亞群，推測 Kahala 的親本可能為台灣龍眼。大陸品種大烏圓與銀角都與台灣品種聚合成一亞群，但都與台灣品種明顯區隔，可以推論台灣龍眼品種來自大陸，但歷經幾百年來的人為選拔與演化已與大陸品種有所區隔。粉殼與青殼龍眼與其他參試龍眼品種遺傳相似度較低，在品種保存及雜交育種上都值得注意保存與運用。

## 誌 謝

本試驗承蒙嘉義分所張哲璋主任及王婉伶小姐提供部分龍眼種原材料，增加試驗材料多樣性及代表性，謹致無上謝忱。

## 引用文獻 (Literature cited)

- Aga, E., E. Bekele, and T. Bryngelsson. 2005. Inter simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica* 124:213–221.
- Amel, S. H., T. Mokhtar, Z. Salwa, H. Jihène, M. Messaoud, R. Abdelmajid, and M. Mohamed. 2004. Inter simple sequence repeat fingerprints to assess genetic diversity in Tunisian fig (*Ficus carica* L.) germplasm. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51:269–275.

- Amel, S. H., C. Khaled, M. Messaoud, M. Mohamed, and T. Mokhtar. 2005. Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52:563–573.
- Arnaud, G., J. Lallemand, and M. Bourgoïn. 2002. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129:69–79.
- Blair, M. W., O. Panaud, and S. R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780–792.
- Carrasco, B., P. Avila, J. Perez-Diaz, P. Muñoz, R. García, B. Lavandero, A. Zurita-Silva, J. B. Retamales, and P. D. S. Caligari. 2009. Genetic structure of highland papayas [*Vasconcellea pubescens* (Lennéet C. Koch) Badillo] cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by inter simple sequence repeats (ISSR). *Genet. Resour. Crop Evol.* 56:331–337.
- Cipriani, G., M. T. Marrazzo, G. D. Gaspero, and R. Testolin. 2001. DNA microsatellite in fruit crops: isolation, length polymorphism, inheritance, somatic stability and cross-species conservation. *Acta Hort.* 546:145–150.
- Council of Agriculture. 2008. Yearly Report of Taiwan's Agriculture. Taiwan. 365pp. (in Chinese)
- Dai, H. Y., Z. H. Zhang, C. S. Shou, H. Li, and X. W. Guo. 2007. Establishment and optimization of ISSR system in *Crataegus* spp.. *J. Fruit Sci.* 24:313–318. (in Chinese with English abstract)
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408–417.
- Fu, Y., N. Luo, Q. Yang, Y. Q. Wang, Q. X. Deng, J. Q. Li, H. M. Qin, and G. L. Ruan. 2009. Establishment and optimization of ISSR reaction system for species of *Eriobotrya*. *J. Fruit Sci.* 26:180–185. (in Chinese with English abstract)
- Guo, C. K., J. Li, W. S. Li, S. P. Luo, J. Yu, C. Li, and J. H. Shan. 2010. Identification and genetic relationships of an ISSR marker for Fuji sport and main cultivars of apple planted in Xinjiang. *J. Xinjiang Agric. Univ.* 33:105–108. (in Chinese with English abstract)
- Huang, X., S. Subhadrabandhu, S. K. Mitra, R. Ben-Arie, and R. A. Stern. 2005. Chapter 1. Origin, history, production and processing. p.1-23. *in: Litchi and Logan.* (Menzel, C. M. and G. K. Waite, eds.) CABI pub.
- Ikegami, H., H. Nogata, K. Hirashima, M. Awamura, and T. Nakahara. 2009. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56:201–209.
- Jaccard, P. 1901. Study of comparative distribution of flower in the portion of Alpes and Jura. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 37:547–549.
- Masumbuko, L. I. and T. Bryngelsson. 2006. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of diploid coffee species and cultivated *Coffea Arabica* L. from Tanzania. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53:357–366.
- Monte-Corvo, L., L. Goulão, and C. Oliveira. 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:517–522.
- Pan, H., X. H. He, Y. W. Li, Y. Z. Guo, and G. X. Huang. 2008. Genetic diversity of wild *Myrica* resources in Guangxi analysed by inter simple sequence repeats (ISSRs). *J. Fruit Sci.* 25:353–357. (in Chinese with English abstract)
- Pan, K., W. Q. Wang, L. L. Tang, Y. Wu, and L. X. Tang. 2010. Analysis of the genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera*) by inter simple sequence repeats (ISSR) technique. *J. Fruit Sci.* 27:238–243. (in Chinese with English abstract)
- Wang, J. B., I. X. Wang, Z. J. Du, X. T. Lei, Y. Y. Chen, and B. Y. Xu. 2007. Analysis on the genetic relationship of some mango (*Mangifera indica* L.) germplasms by ISSR markers. *Acta Hort. Sin.* 34:87-92. (in Chinese with English abstract)
- Wang, J., Q. He, Y. Ou, G. I. Liang, B. He, Q. G. Guo, and S. Q. Xiang. 2008. Germplasm identification and phylogenetic analysis of plum using Issr marker. *J. Fruit Sci.* 25:182–187. (in Chinese with English abstract)
- Wen, I. C. and T. C. Chieh. 2003. Genetic relationship analysis on peach germplasm by RAPD. *J. Agric. Res. China* 52:143–151. (in Chinese with English abstract)

- Wen, I. C. and Y. L. Liu. 2004. Evaluation and genetic relationship analysis by RAPD on oriental plum germplasm. *J. Agric. Res. China* 53:97–110. (in Chinese with English abstract)
- Wu, Z. L., L. Y. Fang, J. Wang, and Y. J. Shen. 2006. Analysis of genetic relationship of 15 *Vitis* germplasm resources by ISSR markers. *J. Fruit. Sci.* 23:605–608. (in Chinese with English abstract)
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamury, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi, and N. Matsuts. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102:865–870.
- Yang, X. P, G. Liu, X. L. Hou, J. H. Xu, and C. Z. Cao. 2009. Polymorphism analyses of watermelon (*Citrullus lanatus*) mapping parents using RAPD and ISSR molecular markers. *Jiangu J. Agric. Sci.* 25:1100–1107. (in Chinese with English abstract)
- Ye, C. H., Y. H. Wang, Y. Z. Li, and F. Feng. 2009. Analysis of genetic diversity of Jackfruit germplasm using ISSR marking method. *J. Fruit Sci.* 26:659–665. (in Chinese with English abstract)
- Yu, X. M. and C. X. Ai. 2007. Genetic diversity of wild *Mangifera indica* populations detected by ISSR. *J. Fruit Sci.* 24:219–333. (in Chinese with English abstract)
- Zheng, L. S., Y. L. Yuan, J. Y. Wang, X. R. Ji, B. Z. Huang, and Y. T. Wu. 2007. Transferability of cotton SSR marker to *Musa*. *J. Mol. Plant Breed.* 5:557–672. (in Chinese with English abstract)
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183.



## Genetic Diversity Analysis Using ISSR Marker on Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Germplasm<sup>1</sup>

Kung-Kuo Chiang<sup>2</sup>, Ien-Chie Wen<sup>2,3</sup>, Wei-Yu Lee<sup>2</sup>, and Ching-Yi Chang<sup>2</sup>

### Abstract

Chiang, K. K., I. C. Wen, W. Y. Lee, and C. Y. Chang. 2010. Genetic diversity analysis using ISSR marker on longan (*Dimocarpus longan* Lour.) germplasm. *J. Taiwan Agric. Res.* 59:185–196.

In order to have a better utilization of the longan (*Dimocarpus longan* Lour.) germplasm, the genetic relationships of 25 longan and litchi cultivars collected by the Taiwan Agricultural Research Institute were analyzed by using ISSR markers. A total of 134 primers were screened for their ability to produce strongly amplified products and 15 of them were selected positively. Out of 149 DNA bands amplified by these 15 primers, 137 of which were polymorphic (92.5%). A dendrogram based on the UPGMA cluster analysis was constructed. All tested 24 longan cultivars were divided into four groups, including 2 major groups of longan cultivars and 2 individual cultivar groups. Two major groups can be subdivided into seven subgroups. Cultivar Hong Ke Ying Jih and Hong Ke had 91% similarity indexes, indicating the closest genetic relationship in the cultivar tested. Nevertheless, cultivar Ching Ke having only 54% similarity indexes with other tested longan cultivars indicated the farthest genetic relationship to the rest longan cultivars. The litchi cultivar-Jhuang Yuan Hong had 44% similarity indexes with other 24 longan cultivars.

**Key words:** *Dimocarpus longan*, Genetic diversity, ISSR.

- 
1. Contribution No. 2413 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: October 7, 2010.
  2. Respectively, Technical Assistant, Senior Researcher and Director, Technical Assistant, Research Assistant, Plant Germplasm Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Corresponding author, e-mail: icwen@tari.gov.tw; Fax: (04)23390791.