

变叶海棠起源的 AFLP 分析

石胜友 梁国鲁 成明昊* 郭启高 李晓林 周志钦*

(西南农业大学园艺园林学院, 重庆市果树学重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 利用 4 对 AFLP 引物组合 (*EcoR* AAC+*Mse* CAC, *EcoR* ACG+*Mse* CAG, *EcoR* ACC+*Mse* CTA, *EcoR* ACT+*Mse* CAG) 对花叶海棠、陇东海棠和变叶海棠不同的变异类型进行分析, 共得到扩增位点 231 个, 其中多态性位点 211 个, 多态性比例为 91.34%, 区分率达 100%; 利用 AFLP 标记对变叶海棠、陇东海棠、花叶海棠的亲缘关系进行分析, 结果与形态学、细胞学和同工酶的结果一致, AFLP 数据表明变叶海棠是花叶海棠和陇东海棠的杂交种, 从而在分子水平上揭示了变叶海棠的杂种起源。变叶海棠的变异类型是在漫长的进化过程中变叶海棠与花叶海棠和陇东海棠产生渗入杂交的结果。

关键词: 变叶海棠; AFLP; 起源; 杂交种

中图分类号: S 661.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0802-05

AFLP Analysis of the Origin of *Malus toringoides* Hughes

Shi Shengyou, Liang Guolu, Cheng Minghao*, Guo Qigao, Li Xiaolin, and Zhou Zhiqin*

(College of Horticulture and Landscape, Southwest Agricultural University, The Key Laboratory for Pomology of Chongqing, Chongqing 400716, China)

Abstract: We studied the relationship of *Malus toringoides* Hughes and its parents by applying AFLP. 231 polymorphic bands were obtained with four AFLP primers, and among them 211 (91.34%) bands were polymorphic with an average of 57.8 per AFLP primers combination. The relationships among *M. toringoides* Hughes, *M. transitoria* Schneid and *M. kansuensis* Rehd were analysed with AFLP. The results are consistent with previous studies based on morphological, cytological and isozyme data. AFLP marker data show that *M. toringoides* Hughes has been the hybrid of *M. transitoria* Schneid and *M. kansuensis* Rehd, and that the variation types of *M. toringoides* Hughes have been the results of introgressive hybridization between *M. toringoides* Hughes and *M. transitoria* Schneid or between *M. toringoides* Hughes and *M. kansuensis* Rehd.

Key words: *Malus toringoides* Hughes; AFLP; Origin; Hybrid

苹果属植物变叶海棠 (*Malus toringoides* Hughes) 主要分布在四川西部和甘肃南部。变叶海棠作苹果砧木利用, 具有抗逆性强、半矮化、丰产和提高果实品质等优良性状^[1]。前人对变叶海棠的研究主要集中在形态学特征、核型、同工酶、地理分布和杂交试验等方面^[2~6], 成明昊等研究了 3 个变叶海棠居群 (100 个单株) 的花、叶、果等主要分类性状, 其形象化散点图表明变叶海棠遗传多样性是变叶海棠与花叶海棠 (*M. transitoria*) 和陇东海棠 (*M. kansuensis* Rehd) 3 个种的杂交复合体, 其杂种指数值均在花叶海棠和陇东海棠之间, 揭示了变叶海棠是花叶海棠和陇东海棠的杂交种^[4, 7], 然而在分子水平上未见变叶海棠起源的研究报道。近年来 AFLP 技术越来越多地用于果树资源的研究^[8~10]。作者利用 AFLP 技术探讨变叶海棠与花叶海棠和陇东海棠的亲缘关系, 从而探讨变叶海棠的起源及演化机制, 为苹果属种质资源的利用提供科学依据。

1 材料与方法

供试材料采自西南农业大学苗圃两年生实生苗, 其种子来源于阿坝州农业科学研究所后山变叶海

收稿日期: 2004-11-12; 修回日期: 2005-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471206)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ssy7299@sina.com)

棠居群，变叶海棠 24个单株样本，陇东海棠和花叶海棠各 5个单株的混合样本。

DNA提取采用 CTAB法。AFLP扩增按照鼎国生物技术有限责任公司提供的试剂盒中的程序，主要包括模板 DNA的制备，酶切片段扩增及凝胶电泳分析 3个步骤。银染参照 Bassam 等的方法^[11]。各样品 AFLP扩增条带的有、无分别赋值 1和 0，利用单匹配系数（Simple matching coefficient）估计基因频率，采用 NTSYS-pc2.02a软件进行数据分析，按 UPGMA 方法聚类。多态性比率（%）=（总谱带数 - 共有带数）/总谱带数 ×100。

2 结果与分析

2.1 AFLP选择性扩增结果

从 AFLP试剂盒中的 64对引物中筛选出 4对引物组合对供试材料进行 AFLP分析（表 1）。4对引物组合共扩增出 231条带，其中多态性带为 211条，多态性比率为 91.34%；平均每对引物组合扩增多态性带 57.8条。图 1为引物组合 *EcoR* AAC + *Mse* CAC的扩增结果。

表 1 4对 AFLP引物组合扩增结果

Table 1 The results amplified by four AFLP primers

| 引物组合 Primer combination | 总扩增带 Amplified sites | 多态性带 Polymorphic sites | 多态性比率 of polymorphic sites (%) | Ratio | 区分率 Identified rate (%) |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------|-------------------------------|
| AAC + CAC | 54 | 48 | 88.89 | | 100 |
| ACG + CAG | 60 | 55 | 91.67 | | 100 |
| ACC + CTA | 61 | 57 | 93.44 | | 100 |
| ACT + CAG | 56 | 51 | 91.07 | | 100 |

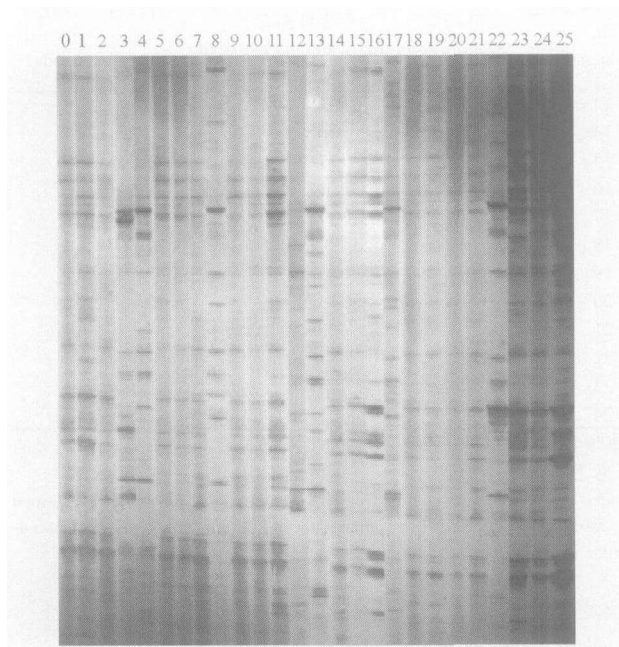


图 1 引物 AAC + CAC的 AFLP指纹图谱

0: 花叶海棠；1~24: 变叶海棠；25: 陇东海棠。

Fig 1 AFLP finger print with AAC + CAC primers

0: *M. transitoria*; 1 - 24: *M. toringoides*; 25: *M. kansuensis*

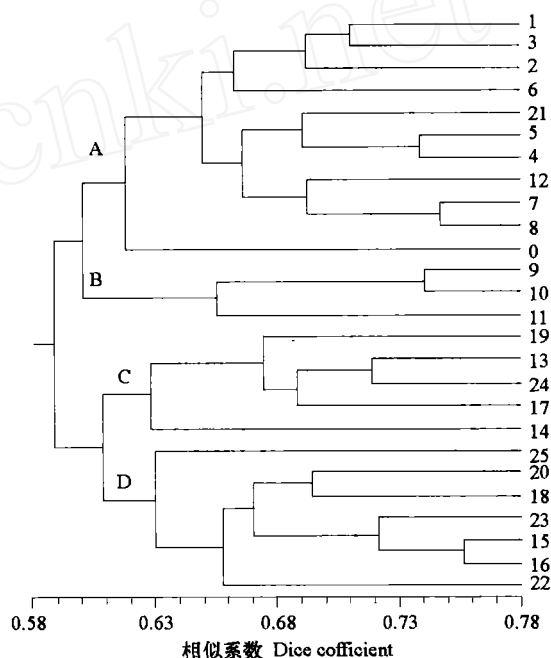


图 2 共试材料的 AFLP聚类图

0: 花叶海棠；1~24: 变叶海棠；25: 陇东海棠。

Fig 2 Dendrogram based on AFLP

0: *M. transitoria*; 1 - 24: *M. toringoides*; 25: *M. kansuensis*

2.2 亲缘关系分析

为了探讨变叶海棠与花叶海棠和陇东海棠基因型间的遗传关系，根据 AFLP数据，按 UPGMA方法对所有供试材料进行聚类分析，构建亲缘关系树状图（图 2）。从聚类图上可以看出变叶海棠的变异类型与花叶海棠和陇东海棠的亲缘关系。24份变叶海棠材料很明显地分为 4组，A组与花叶海棠聚为一类，亲缘关系较近；D组与陇东海棠聚为一类，亲缘关系较近。B和 C两组介于花叶海棠和陇东海棠之间，根据杂种偏母型（A、D）的特点，变叶海棠可能是陇东海棠和花叶海棠正反交（互为父母本）的自然杂种。

2.3 变叶海棠、花叶海棠和陇东海棠 AFLP谱带分析

根据 Smith的方法^[11], 我们将 4对引物在变叶海棠、花叶海棠和陇东海棠中扩增出的谱带记录为 3种情况: (1) 变叶海棠与花叶海棠和陇东海棠共有的; (2) 变叶海棠与花叶海棠或陇东海棠之一共有的; (3) 变叶海棠特有的。那些共存于变叶海棠、花叶海棠和陇东海棠中的谱带以及存在于亲本部分个体的特有谱带不列入分析, 因为这些谱带对杂种的确定帮助不大。确定杂种的原则是, 如果变叶海棠的 AFLP谱带是来自于花叶海棠和陇东海棠谱带的叠加或部分叠加, 就将其定为花叶海棠和陇东海棠的杂种^[11]。不同变异类型的变叶海棠与花叶海棠或陇东海棠共享谱带的数目, 变叶海棠特有谱带数目见表 2。该表说明了花叶海棠和陇东海棠的谱带数在变叶海棠中出现的比例。例如, 在变叶海棠类型 1 中, 花叶海棠的 36 条专有谱带, 有 23 条出现在其中, 陇东海棠的 30 条专有谱带, 有 9 条出现在其中, 叠加性为 48.48%, 证实变叶海棠是花叶海棠和陇东海棠的自然杂交种。那么, 这种谱带的叠加是不是来自于他们的共同祖先呢? 于是我们将花叶海棠和陇东海棠之一作为杂种, 将变叶海棠作为亲本之一算出叠加性 (表 3)。从表 3 中可以看出, 变叶海棠无论是与花叶海棠或是与陇东

表 2 变叶海棠变异类型的 AFLP谱带

Table 2 AFLP bands of variation types of *M. toringoides* Hughes

| 变叶海棠 <i>M. toringoides</i> | 花叶海棠和 变叶海棠 ^a <i>M. transitoria</i> and <i>M. toringoides</i> | 陇东海棠和 变叶海棠 ^b <i>M. kansuensis</i> and <i>M. toringoides</i> | 叠加性 ^c Additive (%) | 特有带 Special bands | 变叶海棠 <i>M. toringoides</i> | 花叶海棠和 变叶海棠 ^a <i>M. transitoria</i> and <i>M. toringoides</i> | 陇东海棠和 变叶海棠 ^b <i>M. kansuensis</i> and <i>M. toringoides</i> | 叠加性 ^c Additive (%) | 特有带 Special bands |
|-------------------------------|--|---|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--|---|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 23/36 | 9/30 | 48.48 | 8 | 13 | 13/36 | 18/30 | 46.97 | 8 |
| 2 | 17/36 | 7/30 | 36.36 | 4 | 14 | 11/36 | 10/30 | 31.82 | 11 |
| 3 | 20/36 | 17/30 | 56.06 | 6 | 15 | 14/36 | 17/30 | 44.97 | 9 |
| 4 | 18/36 | 8/30 | 39.39 | 9 | 16 | 10/36 | 21/30 | 44.97 | 5 |
| 5 | 18/36 | 5/30 | 34.84 | 6 | 17 | 9/36 | 17/30 | 39.39 | 7 |
| 6 | 21/36 | 11/30 | 48.48 | 8 | 18 | 12/36 | 21/30 | 50.00 | 9 |
| 7 | 22/36 | 11/30 | 50.00 | 6 | 19 | 25/36 | 23/30 | 72.72 | 14 |
| 8 | 22/36 | 11/30 | 50.00 | 7 | 20 | 15/36 | 15/30 | 45.45 | 9 |
| 9 | 19/36 | 14/30 | 50.00 | 12 | 21 | 16/36 | 20/30 | 54.54 | 11 |
| 10 | 15/36 | 11/30 | 39.39 | 6 | 22 | 11/36 | 24/30 | 53.03 | 8 |
| 11 | 15/36 | 13/30 | 42.42 | 9 | 23 | 17/36 | 24/30 | 62.12 | 12 |
| 12 | 31/36 | 22/30 | 80.30 | 10 | 24 | 18/36 | 22/30 | 60.61 | 13 |

注: a 变叶海棠和花叶海棠共有谱带数/只出现在花叶海棠的谱带数; b 变叶海棠和陇东海棠共有谱带数/只出现在陇东海棠的谱带数; c 为前两列分子之和除以分母之和, 表示变叶海棠中分子标记体现的杂交程度。

Note: a The bands obtained both in *M. transitoria* and *M. toringoides*/The bands only obtained in *M. transitoria*; b The bands obtained both in *M. kansuensis* and *M. toringoides*/The bands only obtained in *M. kansuensis*; c The sum of numerator of a and b/The sum of denominator of a and b, it showed the degree of hybrid of *M. toringoides* in molecular markers

表 3 变叶海棠作为亲本之一的 AFLP谱带

Table 3 AFLP bands of *M. toringoides* Hughes as one of parents

| 变叶海棠和花叶海棠为亲本 <i>M. toringoides</i> and <i>M. transitoria</i> Hughes are parents | | | | 变叶海棠和陇东海棠为亲本 <i>M. toringoides</i> and <i>M. kansuensis</i> are parents | | | |
|--|------------------|-------|------------------|--|------------------|-------|------------------|
| 序号 Na | 叠加性 Additive (%) | 序号 Na | 叠加性 Additive (%) | 序号 Na | 叠加性 Additive (%) | 序号 Na | 叠加性 Additive (%) |
| 1 | 14.28 | 13 | 28.57 | 1 | 16.67 | 13 | 27.27 |
| 2 | 19.65 | 14 | 19.29 | 2 | 22.22 | 14 | 20.00 |
| 3 | 28.08 | 15 | 23.61 | 3 | 33.33 | 15 | 25.00 |
| 4 | 21.74 | 16 | 22.51 | 4 | 23.44 | 16 | 25.43 |
| 5 | 15.15 | 17 | 17.28 | 5 | 19.73 | 17 | 21.43 |
| 6 | 25.00 | 18 | 30.16 | 6 | 23.33 | 18 | 25.00 |
| 7 | 24.62 | 19 | 22.50 | 7 | 26.00 | 19 | 33.33 |
| 8 | 33.33 | 20 | 23.81 | 8 | 30.77 | 20 | 25.00 |
| 9 | 25.94 | 21 | 30.00 | 9 | 25.43 | 21 | 31.67 |
| 10 | 20.00 | 22 | 28.17 | 10 | 21.31 | 22 | 26.51 |
| 11 | 26.67 | 23 | 28.12 | 11 | 20.00 | 23 | 25.81 |
| 12 | 30.77 | 24 | 31.67 | 12 | 35.38 | 24 | 29.85 |

海棠作为亲本, 他们的叠加都降低了。例如 1号, 将变叶海棠作为亲本之一, 花叶海棠和陇东海棠分别作为杂种之一, 它们的叠加性分别降为 14.28%和 16.67%。这说明谱带的叠加不是由于它们来自于共同的祖先而是由于杂交的缘故^[13]。AFLP数据提供的证据表明, 变叶海棠是花叶海棠和陇东海棠的杂交种。

3 讨论

3.1 变叶海棠的起源

对于推测杂种起源的物种, 首要问题是鉴定杂种并推测其亲本。成明昊等报道变叶海棠可能是花叶海棠与陇东海棠的自然杂交种, 它以兼性无融合生殖方式与陇东海棠和花叶海棠产生渗入杂交变异, 其变异类型介于陇东海棠和花叶海棠之间, 且呈连续变异, 也有间断的变异类型。在变叶海棠的主要分布区内, 有陇东海棠和花叶海棠 (或其中之一) 的零星分布, 它们在四川西部和甘肃南部汇集, 表现为地理亲缘^[2-5]。因此分布区的重叠可能使它们产生基因交流, 出现种间杂交。

分子生物学研究的结果表明, 基因的进化可以反映物种的进化, 并且不同的基因由于变异频率不同, 从而在不同的分类等级上具有一定的保守性^[14]。另外由于生殖隔离、地理隔离或生态位上的差异, 不同种在进化过程中固定了不同的基因, 其中某些被固定的基因在种级水平上具有高度的保守性, 这些差异通过 DNA 指纹技术可以比较容易发现^[15]。因此我们用 DNA 分子标记来探讨变叶海棠的起源。通常情况下, AFLP每 1条扩增带都对应着 1个基因组 DNA 分子位点。我们统计 4对 AFLP 引物扩增出的谱带发现, 陇东海棠和花叶海棠的基因组 DNA 分子位点具有明显的差异, 而变叶海棠的基因组 DNA 分子位点均出现在两个亲本种中, 证实了变叶海棠杂交起源的推测。另一方面, 花叶海棠和陇东海棠基因组 DNA 分子位点在变叶海棠的不同变异类型中出现的频率不同, 如在 1号, 花叶海棠基因组 DNA 分子位点出现的频率就要大于陇东海棠, 而在 24号, 陇东海棠基因组 DNA 分子位点出现的频率要大于花叶海棠。这种渗入杂交的可能结果就是杂种性物种的形成。

3.2 变叶海棠的演化

杂交是植物演化的主要机制之一, 似乎一个时期的杂交之后接着出现一个时期的稳定性, 并且这种图式周期性地重复进行。杂交代表了最高重组时期, 而稳定性则代表了对所形成的最适重组的选择。不同类型的植物, 在任何一个时期内都占有这个时期的不同部分, 因此我们有可能对它进行各方面的研究^[16]。四川省阿坝州农业科学研究所后山变叶海棠居群边缘有在形态上较为稳定的类型 A 和两株叶片不分裂的类型 B 的分化^[7]; 四川省马尔康县大郎足沟的变叶海棠居群内存在着单株类型的分化、地方宗 (变种) 的分化。即该地区的变叶海棠居群占有上述这个周期的不同部分^[17]。

一般大部分杂种对两亲环境的适应能力都不如亲本物种, 结果即使这些杂交种能够生殖, 也常被淘汰, 不会广泛增殖, 只有生存环境由于一些原因发生重大改变, 杂种才可能成为普遍性的生物^[18]。变叶海棠不仅以杂交和环境因素的变迁促进了物种的变异与分化, 而且还以无融合生殖这一繁殖优势拓展其分布空间。多倍体是植物演化的一个主要特征, 在长期的进化过程中, 变叶海棠形成了具有 2x、3x和 4x不同倍性水平的多倍体复合体。这个种正处于分化之中^[6]。象变叶海棠这样具有渗入杂交、兼性无融合生殖和多倍现象 3套过程同时存在的类群, 演化过程极其复杂, 其演化方向有待于进一步研究。

参考文献:

- 1 成明昊, 杨晓红, 曾维光. 变叶海棠的研究初报. 西农科技, 1987, 16 (3): 104 ~ 111
Cheng M H, Yang X H, Zeng W G. The primary research of *Malus toringoides* Hughes. Science and Technic Southwest Agricultural University, 1987, 16 (3): 104 ~ 111 (in Chinese)
- 2 成明昊, 张云贵, 李晓林, 金 强, 谢晓黎. 变叶海棠多样性的区系地理学研究. 西南农业大学学报, 1999, 22 (5): 130 ~ 136
Cheng M H, Zhang Y G, Li X L, Jin Q, Xie X L. Studies on the floristic geography of *Malus toringoides* Hughes. Journal of Southwest Agri-

- cultural University, 1999, 22 (5): 130 ~ 136 (in Chinese)
- 3 成明昊, 李晓林, 王 玫, 曾维光, 吴福寿, 金 强. 变叶海棠的变异类型研究. 园艺学报, 1992, 19 (3): 233 ~ 239
Cheng M H, Li X L, Wang M, Zeng W G, Wu F S, Jin Q. A study on variant types of *Malus toringoides* Hughes. Acta Horticulturae Sinica, 1992, 19 (3): 233 ~ 239 (in Chinese)
 - 4 邓洪平, 成明昊, 周志钦, 李晓林. 变叶海棠居群多样性的形成与分化研究. 园艺学报, 2002, 29 (2): 95 ~ 99
Deng H P, Cheng M H, Zhou Z Q, Li X L. The formation and differentiation of the diversity of *Malus toringoides* Hughes. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (2): 95 ~ 99 (in Chinese)
 - 5 李晓林, 成明昊, 金 强, 刘杨青, 谢晓黎, 欧平贵. 四川阿坝州苹果属植物两种同工酶分析. 西南农业大学学报, 1995, 22 (5): 130 ~ 136
Li X L, Cheng M H, Jin Q, Liu Y Q, Xie X L, Ou P G. Isozyme analysis of *Malus* in Aba prefecture of Sichuan. Journal of Southwest Agricultural University, 1995, 22 (5): 130 ~ 136 (in Chinese)
 - 6 梁国鲁, 李晓林. 中国苹果属植物染色体研究. 植物分类学报, 1993, 31 (3): 236 ~ 251
Liang G L, Li X L. Chromosome studies of Chinese species of *Malus* Mill. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1993, 31 (3): 236 ~ 251 (in Chinese)
 - 7 Cheng Minghao, Zhou Zhiqin, Deng Hongping. Variation and differentiation among and within populations of *Malus toringoides* Hughes revealed by morphological evidence. Journal of Shandong Agricultural University, 2002, 33: 19 ~ 24
 - 8 祝 军, 王 涛, 赵玉军, 张 文, 李光晨. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种. 园艺学报, 2000, 27 (2): 102 ~ 106
Zhu J, Wang T, Zhao Y J, Zhang W, Li G C. Identification of apple varieties with AFLP molecular markers. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27 (2): 102 ~ 106 (in Chinese)
 - 9 易干军, 谭卫平, 霍合强, 张秋明, 李建光, 周碧容. 龙眼品种 (系) 遗传多样性及亲缘关系分析. 园艺学报, 2003, 30 (3): 272 ~ 276
Yi G J, Tan W P, Huo H Q, Zhang Q M, Li J G, Zhou B R. Studies on the genetic diversity and relationship of longan cultivars by AFLP analysis. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (3): 272 ~ 276 (in Chinese)
 - 10 王 涛, 祝 军, 李光晨, 周爱琴, 张 文. 苹果砧木亲缘关系 AFLP 分析. 中国农业科学, 2001, 32 (3): 256 ~ 259
Wang T, Zhu J, Li G C, Zhou A Q, Zhang W. AFLP analysis of genetic relationships in apple rootstocks. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 32 (3): 256 ~ 259 (in Chinese)
 - 11 Bassam B J, Anolles G C, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry, 1991, 196: 80 ~ 83
 - 12 Smith J F, Burke C C, Wagner W L. Interspecific hybridization in natural population of *cyrtanda* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. Plant Systematic and Evolution, 1996, 200: 61 ~ 77
 - 13 邹喻平, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 135 ~ 139
Zou Y P, Ge S, Wang X D. Molecular marker of systematic and evolutionary botany. Beijing: Science Press, 2001. 135 ~ 139 (in Chinese)
 - 14 汪小全, 洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展. 植物分类学报, 1997, 35 (5): 465 ~ 480
Wang X Q, Hong D Y. Progress in molecular systematics of plants in recent five years. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1997, 35 (5): 465 ~ 480 (in Chinese)
 - 15 Fumon B J, Grattapaglia D, Dvorak W S. Analysis of genetic relationship of the Co-2 locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-specific selection. Theor Appl Genet, 1998, 96: 494 ~ 502
 - 16 斯特斯 C A 著. 植物分类学与生物系统学. 韦仲新, 缪汝槐, 谢韩铁译. 北京: 科学出版社, 1986. 161 ~ 181
Stace C A. Plant taxonomy and biosystematics. Translated by Wei Z X, Miao R H, Xie H T. Beijing: Science Press, 1986. 161 ~ 181 (in Chinese)
 - 17 成明昊, 梁国鲁, 石胜友, 周志钦, 李晓林. 变叶海棠种群分化与马尔康海棠起源研究. 西南农业大学学报. 2003, 25 (1): 1 ~ 3
Cheng M H, Liang G L, Shi S Y, Zhou Z Q, Li X L. Studies on population differentiation of *Malus toringoides* Hughes and origin of *Malus maekangensis* Cheng Zeng et Jin. Journal of Southwest Agricultural University, 2003, 25 (1): 1 ~ 3 (in Chinese)
 - 18 Mettler L E, Grogg T G. 族群遗传学与生物演化. 李学勇译. 台北: 国立编译馆出版, 1988. 89 ~ 92
Mettler L E, Grogg T G. Population genetics and bio-evolution. Translated by Li X Y. Taipei: National Translated and Edit Press, 1988. 89 ~ 92 (in Chinese)