

应用 RAPD 技术对 、李、桃亲缘关系的探讨

吴少华 张大生 潘东明 赖钟雄

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 利用 RAPD 技术对 、桃、李部分南方品种进行鉴定, 并探讨了 与桃李之间的亲缘关系。聚类分析结果显示, 不是桃和李的杂交种, 或李的变种, 应当是李属的一个种或亚种。RAPD 技术能很好地用于桃、李、 种间和品种之间的鉴定。

关键词: 桃; 李; ; 品种鉴定; 亲缘关系; RAPD

中图分类号: S 66 文献标识码: A 文章编号: 0513 353X (2002) 01-0066- 03

1 目的、材料与方法

是福建特产果树之一, 果大、种子小, 肉厚, 品质优, 是鲜食加工兼用型优良果树, 但与李、桃的亲缘关系尚不清楚^[1~ 3]。作者试图通过 RAPD 技术对 及桃形李与南方水蜜桃、福建硬肉桃和李的部分品种进行比较, 研究 的亲缘关系和分类地位。

采集桃、李、 部分南方品种嫩叶为试材, 置于- 70℃保存。编号、名称及采集地点如下: 1. 油 , 福建农林大学植物园; 2. 花 , 福建沙县夏茂; 3. 青 , 福建福安; 4. 嵊县桃形李, 浙江杭州; 5. 浦江桃形李, 浙江杭州; 7. 早红李 (大石早生), 浙江杭州; 8. 胭脂李, 福建永泰园艺场; 9. 芙蓉李, 福建永泰园艺场; 10. 红心李, 浙江杭州; 11. 好莱坞 (美洲李), 福建永泰园艺场; 12. 青脆李 (云南李), 福建永泰园艺场; 14. 早霞露 (南方水蜜桃), 福建永安; 15. 西选一号 (南方水蜜桃), 福建永安; 16. 苦桃 (福建野生硬肉桃), 福建福州; 17. 砖冰桃 (福建硬肉桃), 福建福州; 18. 鹰嘴桃 (福建硬肉桃), 福建泉州。

按陈大明等^[4]两步法提取基因组 DNA, 稍做改动。称幼叶 1.0 g 左右, 陶瓷研钵中加液氮快速研碎, 立即倒入 4 mL 提取缓冲液 (0.4 mol/L 葡萄糖, 3% PVP, 10 mmol/L β - 巯基乙醇), 继续研磨至糊状, 移入 10 mL 离心管中, 4℃、10 000 g、10 min 离心, 弃上清液, 重新加入 2 mL 提取缓冲液, 悬浮沉淀, 4℃、10 000g、10 min 离心, 弃上清液。用 2 mL 65℃预热的裂解缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 1.5 % SDS) 悬浮沉淀, 65℃水浴 30~ 60 min, 不时轻轻摇动。加入 2mL 氯仿: 异戊醇: 乙醇 (20: 1: 4), 轻轻颠倒混匀, 室温静置 10 min。4℃、10 000 g、10 min 离心。小心将上清液移入新的 10 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温静置 15 min, 此时出现 DNA 絮状沉淀。用带勾的玻璃针钩出 DNA, 转入含 0.5 mL TE 缓冲液 (pH 8.0) 的 1.5 mL 离心管中。加 RNase A (无 DNase) 37℃处理 10 min。加等体积酚/氯仿, 轻轻混匀, 室温静置 10 min, 4℃、12 000 g、10 min 离心。上清液移入新的离心管中, 加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 混匀后, 加入 2 倍体积的冰无水乙醇, 颠倒混匀, - 20℃放置 30 min, 使 DNA 絮状沉淀形成。用玻璃针钩出 DNA, 晾干后, 重新溶于 200 μ L TE 缓冲液中, 4℃保存。以标准 λ DNA 为对照, 在 0.5 % 琼脂糖凝胶上检测 DNA 浓度。

PCR 扩增条件: 总体积 20 μ L, 随机引物 0.2 μ mol/L (Sangon 公司), dNTP 200 μ mol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, Tag 酶 2 U (购自上海博亚公司), 矿物油 40 μ L。96℃变性 10 min 后, 94℃ 1 min, 38℃ 1 min, 72℃ 2 min, 45 个循环, 72℃延展 10 min。所用引物是从 56 个随机引物中筛选出的 20 个具有多态性的有效引物, 编号、产品代号、序列 (5' - - - - 3') 如下:

1 BA300 AGCCGTGGAA	8 BA1444 GTAGGCCTCA	32 S346 TCGTTCCGCA
2 BA1 GTTTCGCTCC	9 BA27 GAAACGGGTG	42 S249 CCACATCGGT
3 BA1456 AACGGGCGTC	10BA1448 GGCAGGCAAG	43 S351 ACTCCTGCGA
4 BA1455 TTTGCCCCGT	11 BA113 GACGCCACAC	44 S13 TTCCCCCGCT
5 BA1451 CAATCGGGTC	15 BA32 TCGGCGATAG	48 S505 GACCTAGTGG
6 BA1454 GAACGAGGGT	18 BA442 ACGTAGCGTC	50 S96 AGCGTCCTCC
7 BA1155 GAAGGCTCCC	20 BA19 ACCCCCGAAG	

PCR 产物在 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳，2.5 V/cm，GeneRuler 100 bpDNA 作 Marker，凝胶成像仪观察拍照。

应用 VILBER LOVERMAT 公司提供的 Bio 1D+ + 软件进行电泳图谱的检测，手检除去胶版上亮点等引起的计算机误检，清晰可辨的条带全部用于统计分析。分别使用 Nei-Li 相似系数法（DICE 法）和 Jaccard 相似系数法进行聚类分析，对比分析结果。

2 结果分析与讨论

2.1 品种聚类分析

Nei-Li 法和 Jaccard 法分类的结果一致，只是遗传相似系数略有差异（图 1、图 2）。可以得出初步结果，即 是李属的一个种或亚种。

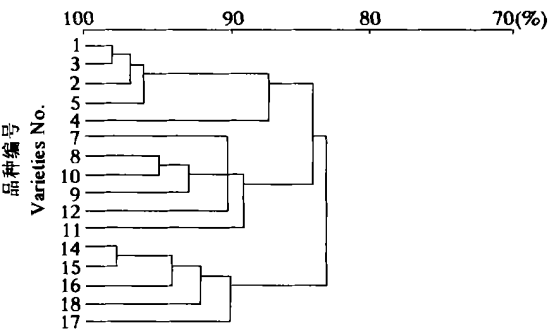


图 1 Nei Li 法聚类的遗传树状图

1~ 5: 品种; 7~ 12: 李品种; 14~ 18: 桃品种

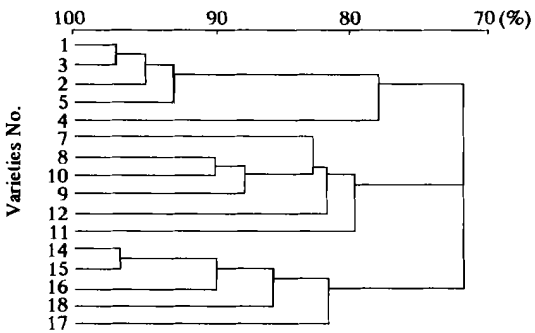


图 2 Jaccard 法聚类的遗传树状图

1~ 5: 品种; 7~ 12: 李品种; 14~ 18: 桃品种

Fig. 1 Phylogenetic tree based on Nei-Li cluster analysis method

Fig. 2 Phylogenetic tree based on Jaccard cluster analysis method

1~ 5: Varieties of nai; 7~ 12: Varieties of plum;

14~ 18: Varieties of peach

1~ 5: Varieties of nai; 7~ 12: Varieties of plum;

14~ 18: Varieties of peach

2.2 Nei-Li 法聚类的遗传树状图分析

2.2.1 的分类地位及品种的亲缘关系

从遗传树状图可以看出，桃、李、 同属蔷薇科核果类，遗传上有很大的相似性（图 1）。相似系数约在 83% 时，可将试样分为桃、李（ ）两大类，1~ 12 为李（ ）类，14~ 18 为桃类；相似系数在 85% 时，可将桃、李、 加以区分。由遗传树状图谱可以看出， 在遗传上较为接近李类；另外，由扩增的 DNA 带型也可看出， 与李有共有的条带，而与桃品种的带型相差甚远（图 3）。同样桃品种所共有的条带，李和 品种却没有，这些特征带型都显示， 的特性较接近李。

然而， 不具有桃与李共有的条带，说明 并非是桃与李杂交而成的类型。根据试验结果，我们建议把 确定为李属的一个种或亚种。油 、花 和青 是福建主栽品种，形态学分类上把油 和青 归为青皮黄肉类品种，而花 归为红皮红肉类品种。从遗传树状图上分析也证实这一点，油 与青 的亲缘关系较近（相似系数高达 98%），而花 与前二者亲缘关系较远。

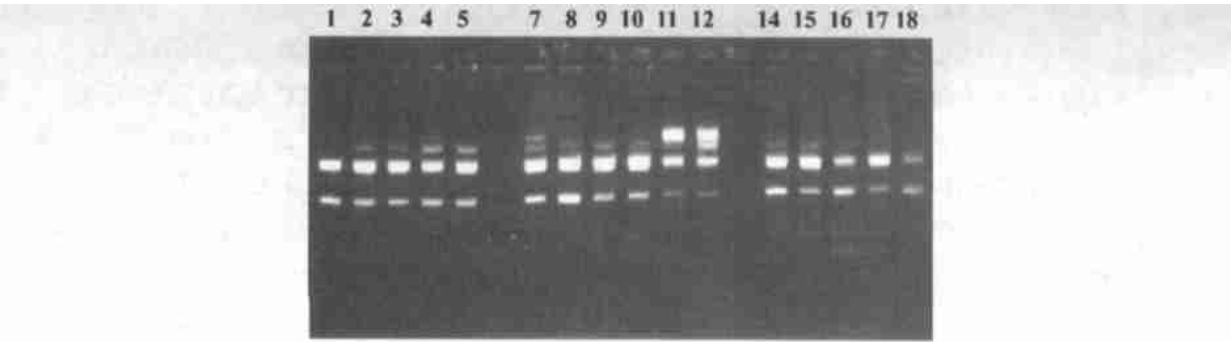


图 3 18# (5'-ACGTAGCGTC 3') 随机引物扩增结果

1~ 5: 品种; 7~ 12: 李品种; 14~ 18: 桃品种

Fig. 3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) banding patterns using primer 18# (5'-ACGTAGCGTC 3')

1- 5: varieties of nai; 7- 12: varieties of plum; 14- 18: varieties of peach

2.2.2 浦江桃形李与嵊县桃形李的亲缘关系

浦江桃形李和嵊县桃形李是浙江的两个桃形李实（桃形状而肉质和皮似李）的品种。由遗传树状图看出，浦江桃形李与 类之间的亲缘关系较近（相似系数达 95%），而嵊县桃形李则与 类相差较远（相似系数 88%），说明这两类桃形李亲缘关系较远。另外，大多数浦江桃形李成熟果实中存在空腔的特性，这与福建 非常相似。作者认为浦江桃形李可能是福建油 引种至浙江浦江，与油 为同种异名现象。

2.2.3 李部分品种的亲缘关系

根据 Nei Li 法聚类的遗传树状图分析，可以大致判断李品种，即江南的芙蓉李、胭脂李和红心李，好莱坞（美洲李），早红李（大石早生，日本李），青脆李（云南李品种）之间的亲缘关系。

从遗传树状图来看，嵊县桃形李是介于李、 之间的一个品种，是李的变种，或 的变种，或李、 杂种尚无法确定，有待进一步研究。

参考文献:

1 吴少华. 李树栽培新技术. 福州: 福建科技出版社, 1997. 14~ 16
2 陈振光, 谢锡瑜, 何碧珠. 的亲缘关系初探. 中国果树, 1988 (3): 13~ 16
3 杨 军, 徐 凯, 严春国, 等. 李属过氧化物同工酶酶谱的研究. 安徽农业大学, 1998, 25 (4): 404~ 407
4 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究. 浙江农业大学学报, 1997, 23 (6): 621~ 624

Cultivar Identification of Peach, Plum and Nai and Study on the Genetic Relationship of Nai (*Prunus*) Cultivars by RAPD Analysis

Wu shaohua, Zhang dasheng, Pan dongming, and Lai zhongxiong
(College of Horticulture of Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: Some southern cultivars of plum, peach and nai were examined by RAPDs in this assay and discussed the genetic relationships of nai cultivars. Cluster analysis based on similarity coefficients showed that nai was one of species in *Prunus* instead of the hybrid between peach and plum, or variety of *Prunus*. RAPD is a valuable tool for the identification of specific genotypes and analysis of genetic relationships.

Key words: Peach; Plum; Nai; Cultivar identification; Genetic relationships; RAPD