

九种李属植物的 RAPD 亲缘关系分析

阮颖¹ 周朴华¹ 刘春林²

(¹ 湖南农业大学理学院, 长沙 410128; ² 湖南农业大学作物基因工程湖南省重点实验室, 长沙 410128)

摘要: 以李属植物 9 个种的 20 个材料为研究对象, 用 RAPD 技术对其进行亲缘关系分析。在建立适合李属植物的 PCR-RAPD 反应体系的基础上, 从 45 个随机引物 (10 mer) 中筛选出 24 个, 对所有供试材料进行扩增, 共获得 24 张 DNA 指纹图谱, 326 条 DNA 谱带, 其中有 311 条为多态带。建立了基于 RAPD 的李属植物亲缘关系树形图, 树形图的聚类结果与经典的李属植物的起源、分布和分类基本一致。另外, 根据聚类结果, 作者认为: 1) 乌苏里李是中国李的一个变种而非一独立的种; 2) 杏李是一李杏杂种且与杏有较近的亲缘关系; 3) 从分子水平证明了欧洲李 (*Prunus domestica* L.) 是由櫻桃李 (*P. cerasifera* Ehrh.) 和黑刺李 (*P. spinosa* L.) 自然杂交形成的后代。

关键词: 李属; RAPD; 亲缘关系分析

中图分类号: S 662.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 03-0218-06

李是一类具有重要经济价值的果木, 在全世界都有广泛的栽培。对于李属植物的亲缘关系研究, 国内外已有一些文献资料报道^[1~4]。由于李属植物的异花授粉特性, 以及长期的引种选择, 其变异较大, 中间类型多, 种的界限不清楚, 常出现同名异种或同种异名的现象。加之以往对李属植物亲缘关系的确定主要是根据形态标记、生殖特性及染色体核型来进行, 结果不尽一致, 这些都给李属种质资源的筛选、鉴定和利用带来了困难。本研究以李属植物 9 个种的 20 个材料为研究对象, 用 RAPD 技术对其进行亲缘关系分析, 旨在构建 20 个材料的聚类分析树状图, 为李属植物系统学的研究提供分子水平上的证据; 同时为李属植物种质资源的保护和品种鉴定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为李属植物 9 个种中的 20 个材料, 其中 A~K 取自辽宁省果树研究所熊岳国家李杏种质资源圃, L~T 材料取自湖南农业大学园艺系果树实验基地。供试材料的编号、名称、来源和核型的信息^[5,6]见表 1。随机引物、dNTP、Taq 酶和琼脂糖等试剂均购自 Sangon 公司。

1.2 试验方法

基因组 DNA 的提取和质量检测参照文献 [7] 的方法, 并根据李属植物的特征进行了修改。DNA 的质量和浓度检测在 DU-640 核酸蛋白质分析仪上进行。根据所测得的浓度, 取样品 DNA 在 14 g L⁻¹ 的琼脂糖凝胶上电泳, 以 DNA/EcoR + Hind 为 Marker, 推算 DNA 分子的大小。

PCR 反应体系为: 引物浓度为 0.20 μmol L⁻¹, dNTP 为 200 μmol L⁻¹, TaqDNA 聚合酶为 2U, 模板 DNA 为 40 ng, Mg²⁺ 为 2 μmol L⁻¹。反应热循环程序为: 预变性 94 °C, 3 min; 变性 92 °C, 50 s; 退火 35 °C, 50 s; 循环 39 次, 延伸 72 °C, 100 s; 后延伸 72 °C, 5 min。

从 45 个随机引物 (10 mer) 中筛选出 24 个 (表 2, 序列见 Sangon 产品说明书) 有稳定的扩增产物的随机引物进行 PCR 扩增。PCR 产物在 17 g L⁻¹ 的琼脂糖凝胶上 (内含溴化乙锭 0.5 μg mL⁻¹) 电

收稿日期: 2001 - 09 - 19; 修回日期: 2001 - 12 - 18

感谢辽宁省果树研究所孙升副研究员和湖南农业大学园艺系钟晓红教授提供的试验材料和帮助。

泳, 电压 85 V, 电泳 4 h。Marker 同上。电泳结果在 Gel Doc 1000 凝胶分析系统上进行数据采集、处理、分析和结果输出。

将每个 PCR 反应重复 1 次, 选择重现性好且稳定的扩增反应和谱带, 每条 DNA 谱带作为 1 个单位, 同一 RAPD 位点上有带的赋值为 1, 无带的赋值为 0。对 20 个材料 24 个引物扩增的结果进行统计, 以 1、0 矩阵输入计算机, 用 UPGMA 法对材料进行聚类分析。

表 1 用于 RAPD 分析的李属材料

Table 1 Materials in *Prunus* used in RAPD analysis

编号 No.	种名 Name of species	材料名称 Name of materials	来源 Origin	染色体数目及核型 Chromosome and karyotype
A	中国李 <i>Prunus salicina</i> Lindl.	大石早生 Dashizaosheng	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
B	中国李 <i>P. salicina</i> Lindl.	龙园秋李 Longyuanqiuli	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
C	中国李 <i>P. salicina</i> Lindl.	花红李 Huahongli	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
D	美洲李 <i>P. americana</i> March.	牛心李 Niuxinli	北美 North American	$2n = 2x = 16 = 8m + 6sm + 2st$
E	欧洲李 <i>P. domestica</i> L.	大玫瑰 Grand rose	新疆、西亚、欧洲 Xinjiang, Western Asia, Europe	$2n = 6x = 48 = 36m + 12sm$
F	欧洲李 <i>P. domestica</i> L.	甘李 Ganli	新疆、西亚、欧洲 Xinjiang, Western Asia, Europe	$2n = 6x = 48 = 36m + 12sm$
G	杏李 <i>P. Simonii</i> Carr	香扁李 Xiangbianli	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
H	李杏杂种 <i>P. simonii</i> Carr × <i>P. salicina</i> Lindl.	转子红 Zhuanzihong	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
I	乌苏里李 <i>P. ussuriensis</i> Kov. et Kost	绥棱香蕉李 Suilingxiangjiaoli	中国 China	$2n = 2x = 16 = 10m + 6sm$
J	櫻桃李 <i>P. cerasifera</i> Ehrhart	红果櫻桃李 Hongguoyingtaoli	新疆、欧洲、西亚 Xinjiang, Europe, Western Asia	$2n = 2x = 16 = 12m + 4sm$
K	黑刺李 <i>P. spinosa</i> L.	黑刺李 Heicili	欧洲、西亚 Europe, Western Asia	$2n = 4x = 32$
L	种间杂种 Interspecific crossing	大紫 Dazi	东亚 Eastern Asia	$2n = 2x = 16$
M	种间杂种 Interspecific crossing	艳红 Yanhong	东亚 Eastern Asia	不详 Uncertain
N	Black gem × Queen Rosa	黑琥珀 Black amber	引种于美国 American	不详 Uncertain
O	种间杂种 Interspecific crossing	早美丽 Zao beauty	引种于美国 American	不详 Uncertain
P	Gaviota × Nubiana	黑宝石 Black gem	引种于美国 American	不详 Uncertain
Q	种间杂种 Interspecific crossing	安哥诺 Angeleno	引种于美国 American	不详 Uncertain
R	种间杂种 Interspecific crossing	奥德罗达 El Dorada	引种于美国 American	不详 Uncertain
S	杏 <i>P. amaniaca</i> L.	杏 <i>P. amaniaca</i> L.	中国 China	$2n = 2x = 16$
T	桃 <i>P. persica</i> (L.) Batsch	瑞光二号 Ruiguangerhao	中国 China	$2n = 2x = 16$

2 结果与分析

2.1 供试材料基因组 DNA 的扩增结果

扩增产物的电泳结果见表 2, 24 个随机引物共扩增出 326 条 DNA 谱带, 其中多态性 DNA 片段(多态带)有 311 条, 占扩增总带数的 95.3 %。每个引物扩增的带数在 7 ~ 21 条之间, 平均为 13 条; 其中扩增带数最多的为引物 S41 和 S55, 各具 21 条扩增带; 最少的为引物 S1, 仅具 7 条带。扩增出的 DNA 带的片段大小在 250 ~ 2200 bp 之间。在扩增出的 326 条谱带中, 有 15 条为全部供试材料所共有(共有带), 这在一定程度上表明了各材料间的同源性。从表中可以看出: 不同的引物扩增出的带数不同; 同一引物, 不同供试材料间的扩增带数也不相同; 这充分表现了李属植物遗传背景的复杂性和 DNA 的多态性。图 1 为引物 S8 和 S2 的扩增结果图。

2.2 供试材料特有的 RAPD 标记

目前, 种和品种的特殊谱带标记已作为重要的分子性状用于作物品种的鉴定^[8,9]。在供试的 20 个

材料中（见表 3），有 12 个材料产生了特征带，占供试材料的 60 %。其中，T（桃）、S（杏）分别具有 11 和 8 条特征带，说明桃、杏与被称之为李的李属种或品种间有较明显的异质性，其遗传差异比较大。F（甘李）、G（香扁李）具 5 条特征带；L（大紫）具 4 条；D（牛心李）、J（红果櫻桃李）具 3 条；K（黑刺李）具 2 条；E（大玫瑰）、N（黑琥珀）、O（早美丽）、P（黑宝石）各具 1 条；这些特征带结合多态带，都可作为区别于其它种或品种的分子性状，快速、有效、准确地将供试材料区分开来。在供试的 20 个材料中，只需 2 个引物便能将其完全区分开来（图 1 所示）。在引物 S2 扩增的结果中，除 L、M、O 的带型相同外，其它 17 个材料的 DNA 多态带带型完全不同，而另一引物 S8 的扩增结果中，L、M、O 的 DNA 多态带带型也完全不同，从而将 20 个材料完全区分。

表 2 24 个随机引物对 20 个供试材料的扩增结果

Table 2 Amplification results of 24 primers on materials in Prunus							
引物 Primer	扩增带数 Total bands	多态带 Polymorphic bands	多态带百分率 Polymorphic bands percentage	引物 Primer	扩增带数 Total bands	多态带 Polymorphic bands	多态带百分率 Percentage of polymorphic bands
S1	7	3	42.8	S41	21	20	95.2
S2	12	12	100	S42	20	16	80.0
S3	9	9	100	S43	16	16	100
S4	7	7	100	S45	13	13	100
S5	16	16	100	S48	7	3	37.5
S7	13	11	84.6	S52	20	20	100
S8	16	16	100	S55	21	19	93.3
S11	8	7	87.7	S59	8	8	100
S12	15	15	100	S60	13	12	92.3
S13	9	9	100	S67	15	14	91.0
S14	17	17	100	S73	16	16	100
S40	15	15	100	S75	12	11	91.6

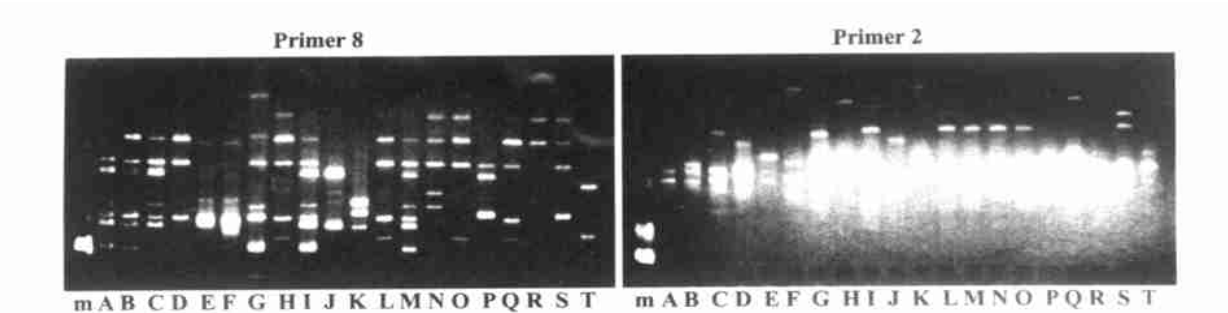


图 1 引物 S8 和 S2 的扩增结果
Fig. 1 Amplification results of Prunus materials by S8 and S2

表 3 供试材料特有的 RAPD 标记

Table 3 Materials-specific marke of RAPD in Prunus			
供试材料 Materials	标记 Cultivar-specific markers of RAPD	供试材料 Materials	标记 Cultivar-specific markers of RAPD
D	S43-14 ,S55-1 ,S75-1	E	S60-9
F	S12-2 ,S12-14 ,S2-2 ,S8-3 ,S5-6	G	S14-6 ,S14-16 ,S12-1 ,S75-4 , S5-15
J	43-9 ,S40-1 ,S41-5	K	S1-4 ,S73-13
L	S52-3 ,S52-8 ,S52-13 ,S52-19	N	S60-13
O	S13-1	P	S55-20
S	S12-7 ,S43-15 ,S3-9 ,S59-2 ,S59-3 , S59-4 ,S59-5 ,S59-6	T	S14-5 ,S14-14 ,S7-8 ,S12-15 ,S43-2 ,S43-3 , S60-12 ,S60-5 ,S75-10 ,S75-11 ,S8-10

注：材料编号与表 1 一致。Note：Materials No. is same as that in table 1.

2.3 聚类分析

在聚类分析中，把 2 个样品聚为一类的依据有两种，一是样品间的相似性系数，另一种是样品间的距离^[10]。基于 RAPD 的扩增结果，用 UP-GAM 法进行聚类分析，得到的供试材料相似形系数表（表 4）和李属植物亲缘关系树状图。

从图 2 可以看出：当遗传距离取 0. 0128 ~ 0. 2227 时，李属植物可分为五大类：第一类为櫻桃李（J）和黑刺李（K）；第二类为大玫瑰（E）和甘李（F），是欧洲李的 2 个品种；第三类为美洲李（D 牛心李）和黑宝石（P）；第四类为中国李、杏李、乌苏里李的聚类；第五类为桃（T）。这五类与传统的李属植物的起源和分布完全吻合。起源于欧洲及西亚的櫻桃李、黑刺李、欧洲李与起源于北美的美洲李、起源于东亚的中国李、杏李、乌苏里李明显地区分开来。当遗传距离 D 值取 0. 1852 ~ 0. 1993 时，李属植物可分为八类，可区分供试材料 9 个种当中的 6 个种。它们分别是：櫻桃李、黑刺李、欧洲李、美洲李、杏、桃。其中 为黑宝石，是一个从美国引进的栽培品种。 是中国李、杏李、乌苏里李及一些材料的聚类。中国李、杏李、乌苏里李都是原产于中国的种，在此比较小的遗传距离内尚不能区分开，说明其亲缘关系比较近；而与美洲李、櫻桃李、黑刺李的亲缘关系相对较远。当遗传距离取 0. 0238 ~ 0. 0471 时，原产中国的中国李、杏李、乌苏里李可完全区开。

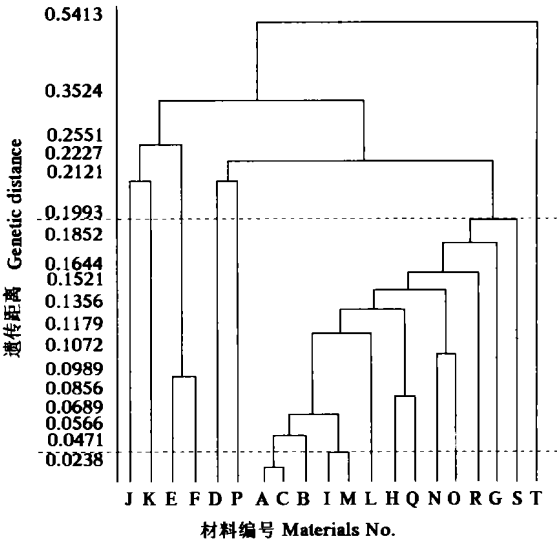


图 2 李属植物聚类分析图
Fig. 2 Cluster tree of materials in Prunus

表 4 基于 RAPD 标记的供试材料的相似性系数

Table 4 Similariy coefficients between materials in Prunus on the basis of RAPD markers

材料 Materials	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A																				
B	0.898																			
C	0.953	0.888																		
D	0.666	0.719	0.678																	
E	0.397	0.477	0.497	0.470																
F	0.479	0.516	0.491	0.453	0.821															
G	0.717	0.666	0.717	0.670	0.527	0.532														
H	0.758	0.832	0.758	0.738	0.479	0.508	0.722													
I	0.883	0.835	0.883	0.688	0.488	0.494	0.723	0.730												
J	0.538	0.538	0.526	0.484	0.607	0.556	0.503	0.482	0.564											
K	0.494	0.508	0.482	0.526	0.632	0.609	0.497	0.477	0.520	0.653										
L	0.779	0.781	0.791	0.678	0.472	0.491	0.742	0.769	0.771	0.500	0.482									
M	0.901	0.873	0.890	0.674	0.503	0.497	0.734	0.740	0.910	0.567	0.534	0.824								
N	0.749	0.720	0.737	0.659	0.514	0.530	0.696	0.707	0.742	0.555	0.533	0.760	0.807							
O	0.686	0.717	0.698	0.701	0.522	0.539	0.717	0.736	0.737	0.564	0.530	0.756	0.747	0.807						
P	0.624	0.640	0.637	0.654	0.548	0.553	0.653	0.610	0.634	0.553	0.556	0.624	0.635	0.692	0.739					
Q	0.774	0.831	0.763	0.751	0.522	0.522	0.723	0.843	0.750	0.500	0.481	0.749	0.753	0.742	0.726	0.666				
R	0.687	0.696	0.687	0.620	0.573	0.516	0.667	0.681	0.671	0.520	0.525	0.723	0.716	0.751	0.699	0.596	0.765			
S	0.646	0.659	0.646	0.639	0.440	0.418	0.662	0.632	0.678	0.432	0.430	0.671	0.698	0.709	0.707	0.617	0.662	0.683		
T	0.304	0.289	0.305	0.372	0.342	0.386	0.362	0.348	0.329	0.340	0.276	0.318	0.310	0.320	0.331	0.323	0.345	0.331	0.336	

注：材料编号与表 1 一致。Note：Materials No. is same as that in table 1.

3 讨 论

3.1 基于 RAPD 标记的李属植物的亲缘关系分析

基于 RAPD 标记建立起的树状图来看,所有供试材料的遗传距离都大于零,又都能够聚类在一起,这表明李属植物之间既有相同遗传背景,但相互之间又存在一定的差异。当遗传距离取 0.1852~0.1993 时,供试的李属植物可明显地分为 (J)、(K)、(E、F)、(D)、(P)、(A、B、C、I、M、L、H、Q、N、O、R、G)、(S) 和 (T) 八个类群,除、外,其余均为櫻桃李、欧州李、美洲李、杏、桃种的分类。而 为 P (黑宝石),是由美国引进的品种,由 Cavita × Nubiana 杂交而来。Nubiana 是由中国李与美洲李杂交后育成的;而 Cavita 的来源不详;但从试验结果看,Cavita 可能属于美洲李品系,因为黑宝石与美洲李的遗传距离较小且聚为一类。为杏李、中国李、乌苏里李 3 个种和种间杂种的聚类。值得一提的是,从树状图可以看出,中国李、乌苏里李之间的遗传距离非常之小,仅为 0.0233,甚至还小于中国李两个品种(A. 大石早生与 B. 龙园秋李)之间的距离,这表明乌苏里李与中国李的亲缘关系非常近。在植株及果实性状方面,乌苏里李也与中国李有许多相似之处。尽管经典的形态分类将乌苏里李作为一种来处理,但有些植物分类学者(如 B. JI. Komapob)^[11],并不把它作为独立的种来看待,而把它看作是中國李的一个变种。本试验的结果从分子水平上支持了乌苏里李为中国李的一个变种而非一个独立种的观点。

3.2 杏李分类地位

本试验选用了杏李(*P. simonii* carr)的代表品种香扁李(G)及另一李杏杂种转子红(H)来研究比较杏李的分类地位问题。李杏杂种转子红的父本是否,母本是李,转子红的许多性状兼具有李、杏的特性。从树状图中也可看出,李杏杂种转子红与中国李的遗传距离较小,仅为 0.0165,说明这一李杏杂种更靠近李,而离杏相对较远。而杏李原产中国,1627 传入法国后被认为是一个独立的种。日本的菊池秋雄教授从生态分布和产地,认为杏李是中国李的一个变种。本试验的研究结果是:杏李与中国李的遗传距离为 0.1282,与杏的遗传距离 0.0141,说明杏李的分类地位介于中国李和杏之间,并且与杏的亲缘关系较中国李更近。这一结果与菊池秋雄教授的观点相左。我们认为:杏李不太可能是中国李的一个变种,而很可能是一李杏杂种。加之迄今为止,尚未发现杏李的野生种,因此,将其视为中国李与杏的杂种,该杂种经长起的进化和选择,最终与亲本发生分离而成为一独立的种。

3.3 欧洲李的起源问题

欧洲李原产于西亚。多年来,有关欧洲李起源问题一直是人们关注的焦点^[11]。Darlington 等观察发现,属于欧州李的各种李都是六倍体($2n = 6X = 48$),而大多数李属种是二倍体。Crane 和 Lawrence (1952 年)指出,欧洲李起源于一个由二倍体的櫻桃李(*P. cerasifere*)和四倍体的黑刺李(*P. spinosa*)杂交的杂种后代。1962 年,他们进一步用形态标记的特征来证明欧洲李是由櫻桃李和黑刺李杂交而来的结论。其后,列维娜(E. .)根据果实的化学成分分析也支持了欧洲李是櫻桃李和黑刺李的种间杂种。

1988 年,林培钧等^[5]在新疆伊犁地区发现有 4 处野生欧洲李的分布,并证明其是欧洲李的野生种。1994 年,林盛华等^[4]观察了 2 份来自新疆野生欧洲李的染色体核型,其中一份全为六倍体($2n = 6x = 48$),另一份是六倍体和二倍体两种倍数($2n = 6x = 48$ 和 $2n = 2x = 16$),并不完全都是六倍体,这与目前栽培的欧洲李全为六倍体的事实不符。因此,目前栽培的欧州李到底是来源于野生种还是来源于由櫻桃李、黑刺李杂交而形成的种间杂种仍是一个疑团。

从地理分布来看,櫻桃李和黑刺李分布范围和地理位置基本一致,这说明它们有很大的自然杂交的可能性。早在 1933 年,前苏联的科学工作者就在高加索地区发现有大量黑刺李和櫻桃李的自然杂种。本试验的研究结果是:当遗传距离取 0.288 时,櫻桃李、黑刺李和欧洲李很自然地聚类在一起,而与其它的李属种明显地区分开来,从分子水平上证明了欧洲李是櫻桃李和黑刺李自然杂交后形成的

种间杂种，支持了细胞学和形态学关于欧洲李起源的证据。

参考文献：

- 1 钟秀芬, 张立彬, 于凤鸣, 等. 中国李品种过氧化物同工酶研究. 园艺学报, 1992, 19 (2): 12~128
- 2 孙 升. 李属资源若干数量性状评价标准探讨. 园艺学报, 1999, 26 (1): 7~12
- 3 孙 升. 李属资源对细菌性穿孔病抗性的初步研究. 中国果树, 1999, (5): 35~41
- 4 林盛华, 方成泉, 蒲富慎, 等. 中国李属植物染色体数目和核型. 园艺学进展. 北京: 中国农业出版社, 1994. 78~85
- 5 张加延, 周 恩. 中国果树志 李卷. 北京: 中国林业出版社, 1995. 13~21
- 6 余德俊. 中国果树分类学. 北京: 农业出版社, 1979. 305~309
- 7 孙勇如. 植物遗传学手册. 长沙: 湖南科技出版社, 1989. 580~588
- 8 Schnell R J, Ronning C M, Knight Jr R J. Identification of materials and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. Using RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 1995, 90: 269~274
- 9 Yang X, Quiros C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor Appl. Genet., 1993, 86: 205~212
- 10 马育华. 田间试验和统计方法. 北京: 中国农业出版社, 1979. 163~178
- 11 Jules Janick, James N Morre. Advances in Fruit Breeding. Purdue: Purdue University Press, 1969. 166~192

Phylogenetic Relationship among Nine *Prunus* Species Based on Random Amplified Polymorphic DNA

Ruan Ying¹, Zhou Puhua¹, and Liu Chunlin²

(¹ Science School of Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; ² Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract : In this study, nine species of *Prunus* (20 materials) were analyzed using random amplified polymorphic DNA markers. 24 primers were screened from 45 arbitrary 10-mer primers, and a total of 326 DNA bands were amplified, 311 of which (95.4 %) were polymorphism. According to the data, a tree diagram of phylogenetic relationship was constructed using UPGMA in NYSYS. The results showed that: 1) *P. ussuriensis* was a variety of *P. salician*, not a independent species; 2) *P. simonii* was a hybrid of *P. salician* and *P. amaniaca* and was closely related to *P. amaniaca*; 3) *P. domestica* was a offspring formed by naturally crossing between *P. cerasifera* and *P. spinosa*.

Key words : *Prunus*; RAPD analysis; Phylogenetic relationship

新书推荐

《细胞实验指南》

由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿，是一部最新、最权威的综合性细胞实验技术操作指南。本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法，它们由三大主体组成：细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。

本书与备受称赞的冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点，对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。本书可供在不同领域从事生命科学研究的人员参考。定价：244 元（上、下册，含邮资）

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。

