

苹果属小金海棠种的遗传一致性研究

李英慧¹ 韩振海^{1*} 许雪峰¹ 鲁韧强² 亓丽萍¹

(¹中国农业大学园艺学院园艺植物研究所, 北京 100094; ²北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100083)

摘要: 应用 AFLP 技术, 用 8 对引物对 20 株小金海棠家植实生群体进行遗传一致性分析。结果表明, 小金海棠实生群体内具有高度的遗传一致性, 遗传相似系数为 98.92 %; 1.08 % 的遗传差异可能是由于有性杂交的基因重组导致差异片段出现所造成的。

关键词: 苹果属; 小金海棠; AFLP; 遗传一致性

中图分类号: S 661 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 06-0571-02

1 目的、材料与方法

小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 是苹果属的四倍体野生种质资源 ($2n=4x=68$), 具有耐盐碱、耐热、耐旱、耐涝、抗寒、抗白粉病等特性, 是非常有希望的实生半矮化砧木^[1,2]。又是携带铁高效利用基因、抗缺铁黄叶病的资源^[3]。小金海棠的无融合生殖能力较强^[4], 据报道, 去雄套袋后花朵坐果率为 86.7 %^[5], 但在自然授粉条件下无融合生殖情况未见报道。本试验的目的是利用 AFLP 技术研究小金海棠的无融合生殖情况, 检测其家植实生群体个体间的遗传一致性。

供试材料采自北京市农林科学院林果所的 15 年生 20 株小金海棠实生群体, 春季取嫩叶进行分析。DNA 的提取和定量采用改良的 CTAB 法^[6]。将提取的 DNA 溶于适量的 TE 中, 经紫外分光光度法和溴化乙锭荧光强度琼脂糖电泳定量法将符合纯度要求的样品 DNA 浓度调整到 200 ng/μL。AFLP 分析: 50 μL 的酶切体系中含 DNA 模板 1.0 μL, $10\times R^+$ 缓冲液 5.0 μL, *EcoR* I (10 U/μL) 0.5 μL, *Mse* I (10 U/μL) 0.5 μL, 超纯水 43 μL。37℃ 酶切 3 h, 65℃ 酶切 3 h。然后加入 10 μL 接头连接液, 含有 T₄ DNA 连接酶 (10 U/μL) 0.2 μL, $10\times R^+$ 缓冲液 2.0 μL, *EcoR* I 接头和 *Mse* I 接头 (50 pmol/μL) 各 1.0 μL, ATP (10 pmol/μL) 1.0 μL, 超纯水 4.8 μL。22℃ 连接 6 h, 65℃ 处理 10 min。预扩增反应体系为 50 μL, 其中连接样品 5 μL, $10\times$ PCR 缓冲液 4.0 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4.0 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 超纯水 33.8 μL, M-A 和 E-C 引物 (50 ng/μL) 各 1.5 μL。扩增程序为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s。选择性扩增反应体系为 20 μL, 其中 5 μL 稀释 $20\times$ 预扩增产物, *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物 (50 ng/μL) 各 0.6 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.1 μL, $10\times$ PCR 缓冲液 2.0 μL, 超纯水 10.6 μL。扩增程序为 94℃ 变性 120 s, 然后 94℃ 30 s, 65~56℃ 30 s (每一个循环下降 0.7℃, 至 56℃ 后退火温度不再变化), 72℃ 60 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 4 min。选择性扩增产物的检测: 95℃ 变性 3 min 后点样于 6% 的变性聚丙烯酰胺序列胶电泳, 银染。DNA 扩增仪为 Techne 公司的 TEDHGENE-FITGENE 5D, *EcoR* I 酶、*Mse* I 酶及 T₄ DNA 连接酶购自 MBI, Taq 酶购自中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 其它试剂购自上海生工, 接头和引物由上海生工合成。

2 结果与分析

用随机抽取的 8 对皆含有 3 个选择性碱基的引物对 20 株小金海棠样本进行 AFLP 分析, 获得了较好的扩增结果 (图 1), 共得到清晰度较好的片段 10 049 个, 其中差异片段为 109 个, 每一对引物在

收稿日期: 2002-01-07; 修回日期: 2002-05-28

基金项目: 教育部高校青年教师教科奖励基金资助项目; 北京市重点实验室“果树逆境生理与分子生物学实验室”资助项目

* 通讯作者

样本间都可以有效地扩增出 10~ 22 个差异片段。8 对引物在全部分析样本中的扩增结果见表 1。

表 1 表明, 每个样本由 8 对引物扩增出的平均片段数为 62. 8, 平均差异片段数为 0. 68, 遗传相似系数为 98. 92 % , 说明小金海棠家植实生群体内具有高度的遗传一致性。从表 1 结合图 1 可见, 在 109 个差异片段中, 有 94 个分布在 S8 泳道, 说明了 S8 是有性杂交后代, 差异片段来源于有性杂交的基因重组。换言之, 自然条件下, 小金海棠的实生群体内无融合生殖率为 95%。在其它样本的泳道上零星地分布有 15 个差异片段, 可能是由于苹果属植物染色体上某个位点发生了点突变等基因突变所造成的, 由此可估测, 自然条件下小金海棠的基因突变率为 0. 15%。

表 1 8 对引物在 20 株小金海棠样本中的扩增结果
Table 1 The number of polymorphic fragments in *M. xiaojinensis* produced by each of the eight pairs of primers used in AFLP analysis

引物 Primer	总片段数 No. of total fragments	差异片段数 No. of polymorphic fragments	差异片段百分率 Percentage of polymorphic fragments (%)
M CAC~ E- ACC	1110	8(+) 2(-)	0. 90
M CAT~ E AAC	1662	14(+) 8(-)	1. 32
M CAC~ E- ACG	1172	8(+) 4(-)	1. 02
M CAA~ E ACG	810	8(+) 2(-)	1. 24
M CAG~ E AAC	1353	10(+) 3(-)	0. 96
M CTA~ E AGG	1417	12(+) 5(-)	1. 20
M CAA~ E ACT	1375	10(+) 5(-)	1. 09
M CAT~ E AAC	1150	8(+) 2(-)	0. 87

注: (+) 代表增多的差异片段, (-) 代表缺少的差异片段。
Note: (+) added polymorphic fragments, (-) deficient polymorphic fragments.

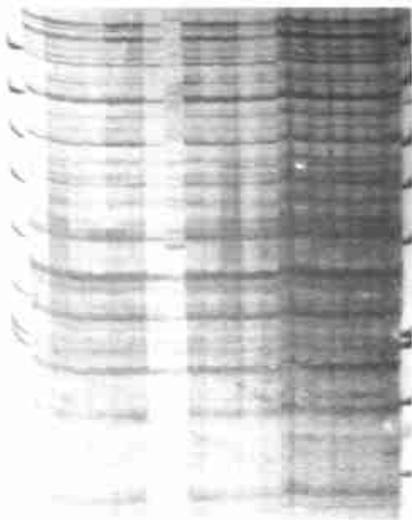


图 1 引物 M CAT~ E AAC 在 20 个样品中所产生的 AFLP 带型
泳道从左至右分别为 Marker, 样品 S1~ S20, Marker。

Fig. 1 The AFLP profile of the 20 samples analyzed in the experiment produced by primer M CAT- E AAC
Lanes (left to right) are marker, samples S1- S20, marker.

参考文献:

1 王继世, 董绍珍, 张桂琴, 等. 苹果无融合生殖型砧木 ‘762’ 的利用研究初报. 果树科学, 1985, (1): 14~ 19
2 成明昊, 李晓林, 张云贵. 苹果优良砧木—小金海棠研究进展. 西南农业大学学报, 2000, 22 (5): 383~ 386
3 韩振海, 许雪峰. 不同铁效率果树基因型研究的现状和前景. 园艺学年评, 1995, 1: 1~ 16
4 周志钦, 李育农. 苹果属植物无融合生殖研究进展. 园艺学报, 1995, 22 (4): 341~ 347
5 成明昊, 扬晓红. 苹果砧木资源—小金海棠的调查研究初报. 西南农学院学报, 1984, 3: 38~ 43
6 Haymes K M. Mini prep method suitable for a plant breeding program. Plant Molcular Biology Reporter, 1996, 14 (3): 280~ 284

Genetic Identity Analysis of *Malus xiaojinensis* by AFLPs

Li Yinghui¹, Han Zhenhai¹, Xu Xuefeng¹, Lu Renqiang², and Qi Liping¹
(¹College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ²Forestry and Fruit Institute, Beijing Academy of Agroforestry Sciences, Beijing 100083, China)

Abstract: AFLP was applied in this experiment to detect the genetic identity of *Malus xiaojinensis* from natural population. The fingerprinting of 20 seedlings of *M. xiaojinensis* with 8 pairs of primers showed that *M. xiaojinensis* in natural population had a high degree of genetic identity, its genetic similar coefficient being 98. 92 %. Genetic difference also existed in this population, 1. 08 % fragments were different fragments. The patterns analysis indicated that these different fragments were resulted from gene recombination of sexual hybridization.

Key words: *Malus*; *Malus xiaojinensis*; AFLP; Genetic identity