

文章编号: 1000-5692(2004)01-0040-04

# 应用 RAPD 技术探讨红叶李、李和杏的亲缘关系

程晓建<sup>1</sup>, 杨萍<sup>1</sup>, 林伯年<sup>2</sup>, 郑炳松<sup>1</sup>

(1. 浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

**摘要:** 为了对红叶李 *Prunus cerasifera* cv. *Atropurpurea*, 李 *P. salicina* 和杏 *P. armeniaca* 的亲缘关系、品种识别及资源保存提供分子生物学依据, 也为了验证传统的形态学分类方法, 从 132 个随机引物中筛选出 20 个引物对红叶李、李和杏的 8 个材料进行了基因组 DNA 扩增, 均具有多态性, 共扩增出 264 条带, 平均每个引物产生 13.2 个 RAPD 片段。RAPD 带型及聚类分析表明: RAPD 技术能将红叶李、李属植物和杏属植物完全分开, 红叶李、李和杏之间表现出一定的亲缘关系, 各属品种之间都有不同的遗传距离, 证明 RAPD 技术可作为种和属水平的分类鉴定依据; 利用红叶李、李和杏品种的特异谱带结合 DNA 指纹, 可将参试的各品种鉴别出来, 从而说明了 RAPD 技术能够用于种或品种之间的鉴定。图 2 表 2 参 12

**关键词:** 植物学; 红叶李; 李; 杏; 随机扩增多态性 DNA (RAPD); 亲缘关系; 鉴定

**中图分类号:** S718.3 **文献标识码:** A

《浙江植物志》第 3 卷把红叶李 *Prunus cerasifera* cv. *Atropurpurea*, 李 *P. salicina* 和杏 *P. armeniaca* 全部归为蔷薇科李属植物, 而有的学者则提出杏、李应各自归属<sup>[1,2]</sup>。RAPD 经 PCR 循环, 对所研究的基因组 DNA 片段进行扩增, 扩增片段的差异经电泳分离后可直接检测<sup>[3,4]</sup>。应用 RAPD 技术对杨梅 *Myrica nuba*, 桃 *P. persica*, 杏和葡萄 *Vitis vinifera* 等许多果树的系统发育研究及品种鉴定已有报道<sup>[5-9]</sup>。本研究的目的是借助 RAPD 技术来检测红叶李、李和杏品种的基因组 DNA 之间的差异性, 并采用计算机软件对基因组 DNA 差异进行聚类分析, 以期对经典的形态分类学作出验证, 并探讨 RAPD 技术在红叶李、李和杏品种鉴定上的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

共用 8 个材料, 其中红叶李 1 个, 李品种 5 个, 杏品种 2 个。其编号、名称和来源如表 1 所列。分别采集以上材料的叶片于 -70 °C 冰箱中保存。

### 1.2 DNA 提取

选用改良 CTAB 法提取 DNA。取 0.5 ~ 1.0 g 幼叶于液氮中充分研磨成粉末, 转入含 2% PVP, 经 55 °C 预热的 20 mL 2 倍 CTAB 提取缓冲液 [2% CTAB, 100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, 1.4 mol · L<sup>-1</sup> NaCl] 中, 加入 400 μL β-巯基乙醇, 在 55 °C 水浴中轻轻混匀, 使样品溶液温度达到 50 °C 以上, 取出于室温下静置 10 ~ 15 min, 加入 20 mL 氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀, 10 000 s<sup>-1</sup> 离心

收稿日期: 2003-10-27; 修回日期: 2003-12-29

基金项目: 浙江省科学技术厅重大项目资助(021102537)

作者简介: 程晓建(1971-), 男, 浙江开化人, 讲师, 硕士, 从事经济林培育研究。E-mail: xj-fruit@zjfc.edu.cn

20 min. 移出上清液, 再加入 20 mL 氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀抽提 1 次, 移出上清液, 加入等体积的经 -20 °C 预冷的异丙醇, 混匀, 取出 DNA 沉淀, 用 5 mL 70% 乙醇清洗 2 次, 用 5 mL 无水乙醇清洗 1 次, 37 °C 干燥 30 ~ 60 min, 加入 600 ~ 1 000  $\mu$ L TE 缓冲液和 5  $\mu$ L 10 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 RNase, 于 65 °C 水浴中溶解, 处理 30 min 后冰箱贮存备用。

表 1 供试材料名录

Table 1 List of materials tested in RAPD analysis

编号	测试材料	来源
1	实生杏 <i>Prunus ameniaca</i> cv. Seedling Apricot	浙江林学院种质资源圃
2	金太阳 <i>P. ameniaca</i> cv. Jintaiyang	浙江林学院种质资源圃
3	红叶李 <i>P. cerasifera</i> cv. Atropurpurea	浙江林学院校园内
4	青宵李 <i>P. salicina</i> cv. Qingxiaoli	浙江嵊州
5	大石早生 <i>P. salicina</i> cv. Oishi	浙江林学院种质资源圃
6	天目蜜李 <i>P. donestica</i> cv. Tianmumili	浙江临安
7	黑琥珀 <i>P. ameniaca</i> cv. Black Amber	浙江林学院种质资源圃
8	桃形李 <i>P. salicina</i> cv. Younai	浙江浦江

### 1.3 引物筛选

为使检测的 DNA 尽量覆盖整个基因组, 从上海生物工程有限公司生产的 132 个引物中筛选出扩增结果较好且具多态性的 20 个引物 (表 2) 对所有样品进行 PCR 扩增。

### 1.4 DNA 扩增条件

扩增反应体积为 20  $\mu$ L, 内含 ddH<sub>2</sub>O 8.8  $\mu$ L, 2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 2  $\mu$ L, 0.1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> DNTP 2  $\mu$ L, 0.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 引物 2  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, 1 个单位 (U) TaqDNA 聚合酶。反应在 Perkin Elmer 9600 上进行, 反应参数如下: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 40 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 38 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。取出后加入溴酚蓝上样缓冲液 2  $\mu$ L 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, Gene Ruler 100 bp DNA 作 Marker, VDS 凝胶自动成像系统观察拍照。

### 1.5 谱带的统计分析

每个引物扩增片段由大到小按顺序编号, 所有材料在同一位点 RAPD 谱带存在时赋值 1, 不存在时赋值 0。所有样品间两两进行比较, 求出共同带的数目。按照公式  $F = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$  求出相似系数  $F$ 。  $m_{xy}$  为 2 样品共同带数;  $m_x$  为 1 个样品总扩增带数;  $m_y$  为另一个样品总扩增带数。以  $1 - F$  为遗传距离, 进行类平均法系统聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 揭示的红叶李、李和杏基因组多态性程度

选用复筛后的 20 个引物 (表 2) 对所有样品进行 PCR 扩增, 共计扩增出 264 个片段, 250 条具多态性, 多态性比例为 94.7%, 平均每个引物产生 13.2 个 RAPD 片段, 反映了各个材料间的多态性。

### 2.2 红叶李、李和杏品种聚类分析

从系统亲缘关系树状图上可以看出, 红叶李、李和杏同属蔷薇科核果类, 遗传上有很大的相似性

表 2 本研究所用的引物序列及不同引物扩增产物的多态性

Table 2 The primers used in this study and DNA polymorphism amplified with different primers

引物	引物序列	扩增片段数	种间特异片段数
S42	GGA CCC AACC	11	11
S43	GTC GCC GTCA	14	14
S44	TCT GGT GAGG	17	17
S51	AGC GCC ATTG	11	11
S55	CAT CCG TGCT	15	14
S82	GGC ACT GAGG	13	13
S197	TGG GGA CCAC	10	10
S259	GTC AGT GCGG	12	10
S439	GTC CGT ACTG	12	12
S440	GGT GCT CCGT	11	11
S445	CCC AGT CACT	13	13
S446	CCA CGG GAAG	17	17
S447	CAG CAC TGAC	15	12
S448	CCT CCA GTGT	13	13
S450	TCA GAG CGCC	14	13
S452	CAG TGC TGTG	9	8
S453	GTC AGA GTCC	12	10
S455	TGG CGT CCTT	15	13
S456	TCG GCG GTTC	17	17
S462	TCG GCA GGCA	13	13
合计		264	250

(图1), 当遗传距离值  $d$  取  $d > 0.579$  时, 分成一个大类, 即李属; 当遗传距离值  $d$  取  $0.297 < d < 0.470$  时, 分成三大类, 即红叶李、李与杏; 红叶李、李、杏各自聚类, 说明三者能明显区分开; 在李、杏类群中李、杏各自聚类, 说明李、杏之间有一定的遗传距离。这与前人的研究结果相符<sup>[2]</sup>。从所有的供试材料来看, 各个材料之间的遗传距离都大于 0, 又能够聚类在一起, 表明红叶李、李和杏之间有相同的遗传背景, 但相互间又存在一定的差异。本研究的聚类结果与经典的分类结果基本一致, 证明 RAPD 技术在本研究中是一个有效的分类手段。

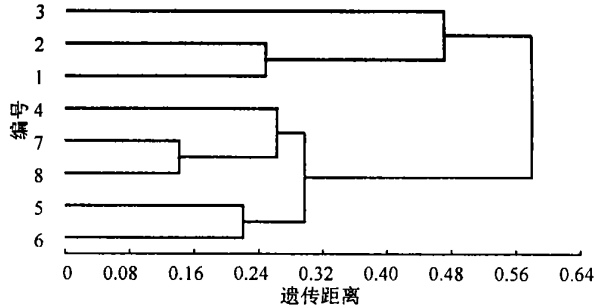


图1 参试样品的 RAPD 聚类图

Figure 1 The RAPD cluster graph of tested materials

1. 实生杏; 2. 金太阳; 3. 红叶李; 4. 青宵李; 5. 大石早生; 6. 天目蜜李; 7. 黑琥珀; 8. 桃形李  
1. Seedling Apricot; 2. Jintaiyang; 3. Atropupurea; 4. Qingxiaoli; 5. Oishi; 6. Tianmumili; 7. Black Amber; 8. Younai

### 2.3 红叶李、李和杏的 DNA 多态性分析

从图2可以看出, 所有样品在 700 bp 和 900 bp 处有共同带, 表明各样品间均有一定的亲缘关系; 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 样品在 1500 bp, 2700 bp 处有一共同带, 表明杏属植物与李属植物之间具有一定的亲缘关系; 1号样品在 300 bp 处有 1 条特异带, 2号样品在 400 bp 处有 1 条特异带, 3号样品与 8号样品在 800 bp 处有一共同带, 同样 4, 5, 6, 7, 8 各品种间都有其特异性谱带, 通过特异性谱带能将它们互相区分开来, 因此, RAPD 技术也能在一定程度上进行品种的鉴定。用其他引物扩增的结果也能表现出类似的结果。

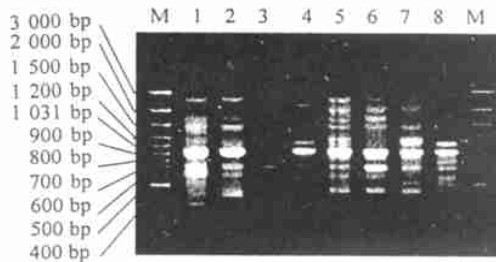


图2 引物 S445 对李、杏不同品种扩增图谱

Figure 2 The PCR-map of S445 of different cultivars of plum and apricot

1. 实生杏; 2. 金太阳; 3. 红叶李; 4. 青宵李; 5. 大石早生; 6. 天目蜜李; 7. 黑琥珀; 8. 桃形李  
1. Seedling Apricot; 2. Jintaiyang; 3. Atropupurea; 4. Qingxiaoli; 5. Oishi; 6. Tianmumili; 7. Black Amber; 8. Younai

## 3 讨论

### 3.1 红叶李的分类地位及李和杏的亲缘关系

李、杏等核果类果树之间花粉具亲和性, 没有生殖隔离, 在植物学分类上相似性很高。形态学分类主要有 2 种观点, 一是将其归为 1 个属或 1 个亚属, 二是将其分为 2 个属或 2 个亚属; 同工酶和花粉孢粉学研究的结论多倾向于第一种观点<sup>[10, 11]</sup>, 而实际上李和杏是核果类中最为古老的树种, 也是整个核果类的来源。从 3 个树种 DNA 扩增结果表明, 红叶李、李和杏在 DNA 水平上有较明显区别。

应各自归属, 而李、杏的结果与汪祖华等<sup>[5]</sup>认为杏是由李演化而来, 应为一属的研究结果不一致; 当遗传距离值  $d$  取  $0.47 < d < 0.579$  时, 红叶李与杏属植物聚在一起, 可能是红叶李在进化过程中已渗入较多的其他种质基因之故, 应进一步进行研究。

### 3.2 李部分品种的亲缘关系

根据类平均法聚类的遗传树状图分析, 可以大致判断李品种, 即青宵李、大石早生、天目蜜李、黑琥珀和桃形李之间亲缘关系。黑琥珀与桃形李的遗传距离最小, 其原因有待于进一步研究。

### 3.3 RAPD 技术的在品种鉴定上的应用

在核果类果树上, 对桃芽变鉴定有类似报道<sup>[12]</sup>。本试验从 132 个引物中筛选得到 20 个引物, 对参试品种进行扩增, 均具多态性, 找到了各品种的特异性谱带, 结合 DNA 指纹, 仅用 1 个引物就可以把参试的所有品种鉴别开来, 证明 RAPD 技术可以用于果树的品种鉴别, 而 RAPD 技术结果的稳定性、重现性和特异引物的选择是品种鉴别成败的关键。

### 参考文献:

- [1] 程中平. 利用分子标记对桃、李、杏、梅、樱类植物系统发育的分析[J]. 中国南方果树, 2003, 32(3): 45-50.
- [2] 韦直, 何业祺. 浙江植物志: 第 3 卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Res.* 1990 18(24): 7213-7218.
- [5] 林伯年, 徐林娟, 贾春蕾. RAPD 技术在杨梅属植物分类研究中的应用[J]. 园艺学报, 1999 26(4): 221-226.
- [6] 高志红, 章镇, 盛炳成, 等. 桃梅李杏 4 种主要核果类果树 PARD 指纹图谱初探[J]. 果树学报, 2001, 18(2): 120-121.
- [7] 吴树敬, 陈学森. 杏品种的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2003, 20(2): 107-111.
- [8] 程中平, 陈志伟, 胡春根, 等. 利用 RAPD 技术对蟠桃品种的分析[J]. 河北农业大学学报, 2003 26(1): 28-32.
- [9] 雷日平, 陈辉, 谢利国. 锥栗不同品种遗传距离的 RAPD 分析[J]. 浙江林学院学报, 2002 19(3): 240-243.
- [10] 汪祖华, 陆振翔, 郭鸿. 李、杏、梅亲缘关系及分类地位的同工酶研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 97-110.
- [11] 包满珠, 陈俊愉. 不同类型梅的花粉形态及其与桃、李、杏的比较研究[J]. 北京林业大学学报, 1992, 14(增刊 4): 70-73.
- [12] 金勇丰, 张耀洲, 陈大明, 等. 桃早熟芽变品种‘大观一号’ RAPD 分析及其特异片段的克隆[J]. 果树科学, 1998 15(2): 103-106.

## Genetic relationship of myrobalan plum, plum and apricot cultivars by RAPD analysis

CHENG Xiao-jian<sup>1</sup>, YANG Ping<sup>1</sup>, LIN Bo-nian<sup>2</sup>, ZHENG Bing-song<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China)

**Abstract:** To provide evidence for conservation and identification of genetic relationship among myrobalan plum, plum and apricot cultivars and testify the traditional morphology-based taxonomy, genomic DNA's of 8 accessions are amplified by RAPD (random amplified polymorphic DNA) with 20 primers selected from 132 random primers. The result shows that they are all of polymorphism. 264 fragments had been amplified, with 13.2 RAPD fragments amplified from each primer on the average. Clustering analysis shows that myrobalan plum, plum and apricot cultivars can be distinguished by RAPD; there is some genetic relationship among them; and the distance between varieties of each genus is different. The genetic distance reflects genetic relationship among tested materials. It has been proved that RAPD technique can be used for the classification and identification of genera. We can identify each cultivar of tested materials by DNA fingerprints and the specific bands. It shows that RAPD can be used for the identification of species or cultivars. [Ch, 2 fig. 2 tab. 12 ref.]

**Key words:** botany; myrobalan plum; plum; apricot; RAPD; genetic relationships; identification