

苹果砧木亲缘关系 AFLP 分析

王 涛,祝 军,李光晨,周爱琴,张 文

(中国农业大学园艺学院,北京 100094)

摘要:在构建苹果 AFLP 指纹图谱的基础上,分析了我国及世界苹果生产中 20 个重要苹果砧木间的遗传差异和亲缘关系。根据 AFLP 扩增结果,计算出 20 个苹果砧木间的平均遗传距离为 $0.55 \pm 0.14\sigma$ 。按 UPGMA 法进行了聚类分析,并绘制了亲缘关系树状图,表明苹果属(*Malus* Mill)中的两个亚属的砧木被分别聚成了两个大组,即花秋苹果亚属(*Sorbomalus* Zabel)大组和真正苹果亚属(*Eumalus* Zabel)大组。前者包括拥有河南海棠血统的 4 个砧木;后者 M 系、MM 系矮化砧木自成一个聚类小组。研究结果与已知苹果砧木间的系谱是一致的。表明应用 AFLP 技术能在 DNA 分子水平上较好地揭示苹果砧木的遗传背景及其亲缘关系。

关键词:AFLP; DNA 指纹; 亲缘关系; 苹果砧木

中图分类号:S661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0578-1752(2001)03-0256-05

AFLP Analysis of Genetic Relationships in Apple Rootstocks

WANG Tao, ZHU Jun, LI Guang-chen, ZHOU Ai-qin, ZHANG Wen

(College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The genetic variations and genetic relationships had been analyzed among 20 apple rootstocks widely used in both China and world apple production after the constructing of AFLP fingerprinting. The average genetic distance of 20 rootstocks was $0.55 \pm 0.14\sigma$, which was calculated with AFLP data. The cluster analysis was made and dendrogram was drawn from UPGMA method. It is shown from the dendrogram that the rootstocks within the two subgenera of *Malus* were clustered into two sections: *Sorbomalus* section and *Eumalus* section. The former includes rootstocks which possess the bloodline of *M. Henanensis*; in the latter, M and MM clonal dwarfed rootstocks had been clustered into one small group. The genealogy from this study is same as that, which is already known, of rootstocks tested. It is indicated from this experiment that AFLP can successfully reveal the genetic variation and genetic relationships of apple rootstocks at DNA molecular level.

Key words: AFLP; DNA fingerprinting; Genetic relationship; Apple rootstock

苹果砧木亲缘关系的研究是苹果种质资源学研究的重要内容和苹果砧木育种的重要基础。关于应用过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶和谷氨酸脱氢酶同工酶以及 RAPD 技术分析苹果属不同种间亲缘关系的研究已有报道^[1~3];而应用 AFLP 技术分析苹果砧木亲缘关系的研究国内外尚未见报道。AFLP 技术的基本原理是选择性扩增带有人工接头的基因组 DNA 双酶切片段而产生的多态性^[4]。业已表明, AFLP 技术在生物遗传育种研究中具有广阔的应用前景^[5]。本试验旨在采用 AFLP 技术,研究我国及世

界苹果生产上主要应用的 20 个砧木基因型间的亲缘关系,为探讨其遗传变异规律,选育新的砧木提供分子依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试的 20 个苹果砧木(*Malus* Mill)基因型及其主要特征如表 1 所示^[6]。试材采自北京市农林科学院林果研究所“苹果砧木资源圃”。

1.2 方 法

收稿日期:2000-02-23

基金项目:国家自然科学基金(39600101),北京市自然科学基金资助项目(5952008)

作者简介:王 涛(1962-),男,山东泰安人,副教授,博士,主要从事果树分子遗传学研究。Tel:010-62893552;E-mail:Tao.Wang@263.net

1.2.1 DNA 提取 用 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法从鲜叶中提取基因组 DNA^[7]。

1.2.2 AFLP 扩增 AFLP 扩增的详细步骤按祝军的方法进行^[8]。

1.2.3 数据分析 各样品 AFLP 扩增条带,有时记为 1,无带则为 0。根据 Jaccard 公式计算样品间的遗传距离,按 UPGMA 法进行聚类分析,用 NTSYS 软件进行数据分析,并构建树状图^[9]。

表 1 供试的苹果砧木

Table 1 Apple rootstocks (*Malus*) used in this study

编号 No.	砧木 Rootstock	种名 Species	来源 Origin	特性 Trait
1	M7	<i>M. pumila</i> Mill.	自然实生苗 Seedling	半矮化 Semi-dwarf
2	M9	<i>M. pumila</i> Mill.	自然实生苗 Seedling	矮化 Dwarf
3	M26	<i>M. pumila</i> Mill.	M16×M9	矮化 Dwarf
4	M27	<i>M. pumila</i> Mill.	M13×M9	极矮化 Very dwarf
5	MM106	<i>M. pumila</i> Mill.	君袖 Spy×M1	半矮化 Semi-dwarf
6	N29	<i>M. prunifolia</i> Borkh.	崂山柰子 Laoshannaizi	矮化 Dwarf
7	N32	<i>M. prunifolia</i> Borkh.	崂山柰子 Laoshannaizi	矮化 Dwarf
8	S19	<i>M. honanensis</i> Rehder	河南海棠 Henanhaitang	矮化 Dwarf
9	S63	<i>M. honanensis</i> Rehder	河南海棠 Henanhaitang	半矮化 Semi-dwarf
10	SH7	<i>M. pumila</i> Mill. × <i>M. Honanensis</i> Rehder	国光 Rall×河南海棠 Henanhaitang	半矮化 Semi-dwarf
11	SH9	<i>M. pumila</i> Mill. × <i>M. Honanensis</i> Rehder	国光 Rall×河南海棠 Henanhaitang	半矮化 Semi-dwarf
12	CG24	<i>M. pumila</i> Mill.	M8 自然实生 Seedling of M8	矮化 Dwarf
13	CG57	<i>M. pumila</i> Mill.	M8 自然实生 Seedling of M8	矮化 Dwarf
14	B9	<i>M. pumila</i> Mill.	M8×红色标准 Red Standard	矮化 Dwarf
15	B490	<i>M. pumila</i> Mill.	M8×?	半矮化 Semi-dwarf
16	渥太华 3 Ottawa 3	(<i>M. baccata</i> Borkh. × <i>M. sieversii</i> Roemer) × <i>M. Pumila</i> Mill.	鲁宾 Robin×M9	矮化 Dwarf
17	西府海棠 Xifuhaitang	<i>M. micromalus</i> Makino	不详 Unknown	乔化 Vigor
18	山定子 Shandingzi	<i>M. baccata</i> Borkh.	不详 Unknown	乔化 Vigor
19	小金海棠 Xiaojinhaitang	<i>M. xiaojinensis</i> Cheng et Jing	不详 Unknown	半矮化 Semi-dwarf
20	宁夏-8 Ningxia-8	<i>M. spectabilis</i> Borkh.	实生海棠 Seedling of Haitang	矮化 Dwarf

2 结果与分析

2.1 指纹图谱与遗传多样性

图 1 为应用筛选出的引物组合 Pst I -AAC/Mse I -GAC 构建的供试砧木基因型的 AFLP 指纹图谱。该组合 Pst I 引物的序列为 5'-GACTGCG-TACATGCAAAC-3', 选择性碱基为 5'-AAC-3'; Mse I 引物的序列为 5'-GATGAGTCCT-GAGTAA-3', 选择性碱基为 5'-GAC-3'。

该引物共扩增出 DNA 片段 105 条,其中多态性片段 67 条,多态性片段比例为 63.8%。这说明,一方面,该引物具有很强的检测苹果砧木基因型间遗传变异的能力;另一方面,不同苹果砧木基因型间确实存在着相对较为丰富的遗传多样性。从图 1 中还可以看出,不同砧木基因型间差异程度各异。表现为种间(如西府海棠、山定子、小金海棠和河南海棠)基因型间的多态性带数量明显多于种内(如 M7、M9、M26 和 M27)基因型间的多态性带数量。例如, M7 与小金海棠之间的多态性带为 32 条,而 M7 与 M9 之间仅为 11 条。图 1 还表明,同一指纹图谱中,多态性片段比例从顶部大片段区域到底部小片段区域逐渐降低。

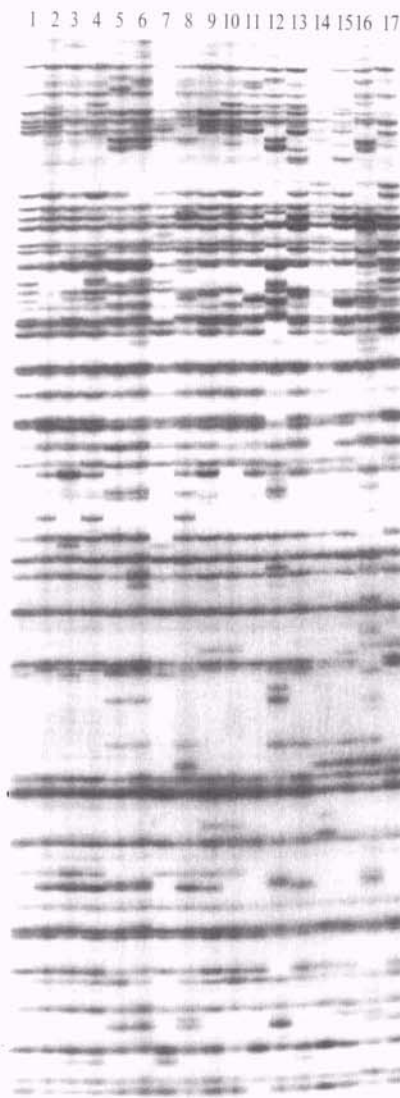
2.2 遗传差异

通过筛选引物,确定了 13 对多态性较高、带型质量较好的引物组合。用这些引物组合对供试的 20 个苹果砧木进行 AFLP 扩增。13 对引物共对苹果砧木基因组 DNA 中 689 个位点进行了有效扩增,发现多态性位点 507 个。为了比较苹果不同砧木间的遗传差异,根据 13 对引物获得的 AFLP 多态性数据计算了品种间的遗传距离(表 2)。

由表 2 可知,20 个苹果砧木基因型间的遗传距离范围为 0.08~0.83,平均遗传距离为 0.55 ± 0.14σ。其中,西府海棠与 S19 间遗传距离最大,为 0.83;N29 与 N32 间的遗传距离最小,为 0.08。遗传距离大于 0.65 的组合有 44 对,占有组合的 23.2%,说明苹果砧木基因型间的遗传差异程度是比较大的。遗传距离小于 0.35 的组合只有 12 对,占 6.3%,其中,有 9 对集中在 M 和 MM 系内。这 9 对 M 和 MM 系砧木基因型间的平均遗传距离为 0.32。另外 3 对分别是 N29 与 N32, B9 与 B490 和 B9 与 CG57。可见种内基因型间的遗传差异程度远远小于种间或杂种间的遗传差异程度。

2.3 聚类分析

为了确定不同苹果砧木基因型间的遗传关系,



1. M7, 2. M9, 3. M26, 4. M27, 5. SH7, 6. SH9, 7. CG24, 8. CG57, 9. B9, 10. B490, 11. N32, 12. S63, 13. 渥太华 3 Ottawa 3, 14. 西府海棠 Xifuhaitang, 15. 山定子 Shandingzi, 16. 小金海棠 Xiaojinhaitang, 17. 宁夏-8 Ningxia-8

图 1 苹果砧木 AFLP 指纹 (Pst I -AAC/Mse I -GAC)

Fig. 1 AFLP fingerprinting of apple rootstocks amplified with Pst I -AAC/Mse I -GAC

利用上述 AFLP 遗传距离矩阵, 经过聚类分析, 构建供试材料基因型间的亲缘关系树状图(图 2)。

聚类结果表明, 供试砧木基因型中, M 系和 MM 系的 5 个砧木同属苹果种, 其亲缘关系比较近, 被聚到了一起, 且自成一小组。其中, M9、M27 和 M26 位置最为靠近, 因为 M27 为 M13×M9, M26 为 M16×M9, 二者都有 M9 的亲本。B9 和 B490 因为都含有苹果种中 M8 的亲本, 聚类位置彼此紧邻, 而且靠近苹果种的聚类位置。Ottawa 3 号

因含有苹果种中 M9 的血统, 其聚类位置也靠近苹果种。N29 和 N32 都是从崂山柰子中选育出来的矮化类型, 聚类位置介于苹果种和山定子种之间, 而且更靠近于苹果种。西府海棠和小金海棠因与其它基因型共性成分较少, 因此聚类位置较远, 而且相对各自孤立。上述砧木基因型都属于苹果属 (*Malus Mill*) 中两个亚属之一的真正苹果亚属 (*Eumalus Zabel*), 因此, 它们的聚类位置归属于同一大类。属于河南海棠种的 S19、S63 和拥有河南海棠种血统的 SH7 和 SH9 等 4 个基因型被聚类到了一起, 因为它们都属于苹果属中另外一个亚属花秋苹果亚属 (*Sorbomalus Zabel*), 并且与其它基因型的聚类位置最远。总之, 该聚类分析的结果与供试砧木已知的系谱关系是一致的。

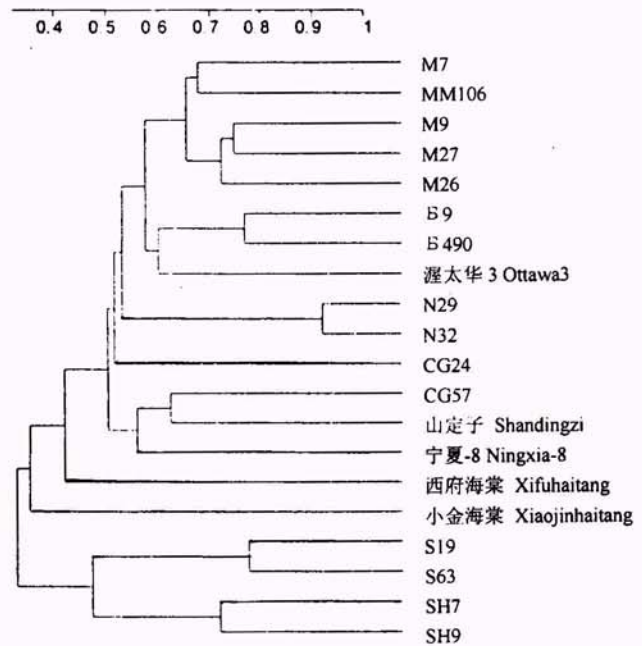


图 2 苹果砧木 AFLP 分析聚类树形图

Fig. 2 Dendrogram of apple rootstocks based on AFLP data

3 讨论

AFLP 扩增中, 每一条扩增带代表着基因组 DNA 分子上的一个位点。每个 AFLP 引物可以检测基因组 DNA 分子上几十个, 甚至上百个位点; 而每个 RAPD 引物和 RFLP 探针只能检测几个、至多十几个位点。可见, AFLP 检测的效率超过 RFLP 和 RAPD 的几倍、甚至十几倍^[5]。

表2 苹果砧木遗传距离¹⁾Table 2 Genetic distance among apple rootstocks (*Malus Mill*) in this study

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.00																			
2	0.35	0.00																		
3	0.32	0.30	0.00																	
4	0.36	0.25	0.26	0.00																
5	0.32	0.36	0.33	0.35	0.00															
6	0.50	0.42	0.46	0.45	0.43	0.00														
7	0.50	0.43	0.48	0.45	0.44	0.08	0.00													
8	0.79	0.79	0.75	0.77	0.76	0.81	0.80	0.00												
9	0.79	0.79	0.74	0.77	0.75	0.79	0.78	0.22	0.00											
10	0.55	0.58	0.55	0.54	0.53	0.61	0.59	0.55	0.49	0.00										
11	0.51	0.57	0.56	0.56	0.54	0.63	0.61	0.55	0.51	0.28	0.00									
12	0.46	0.48	0.49	0.49	0.48	0.52	0.52	0.80	0.80	0.57	0.56	0.00								
13	0.47	0.45	0.44	0.43	0.49	0.52	0.53	0.74	0.72	0.53	0.51	0.51	0.00							
14	0.38	0.39	0.34	0.36	0.38	0.49	0.47	0.77	0.75	0.50	0.49	0.42	0.36	0.00						
15	0.44	0.43	0.42	0.41	0.44	0.47	0.46	0.77	0.76	0.55	0.54	0.45	0.43	0.23	0.00					
16	0.49	0.51	0.44	0.45	0.47	0.52	0.52	0.75	0.72	0.53	0.52	0.54	0.43	0.37	0.42	0.00				
17	0.56	0.57	0.64	0.64	0.60	0.60	0.59	0.83	0.81	0.65	0.64	0.66	0.52	0.48	0.57	0.55	0.00			
18	0.47	0.50	0.50	0.52	0.53	0.56	0.57	0.80	0.78	0.62	0.59	0.58	0.38	0.41	0.47	0.44	0.53	0.00		
19	0.63	0.69	0.69	0.68	0.67	0.73	0.73	0.78	0.77	0.68	0.65	0.71	0.53	0.60	0.66	0.62	0.67	0.55	0.00	
20	0.51	0.52	0.52	0.54	0.51	0.56	0.55	0.79	0.78	0.59	0.60	0.59	0.44	0.46	0.53	0.52	0.58	0.45	0.58	0.00

¹⁾表中序号1~20同表1 The No. code from 1 to 20 in Table 2 is same as that in Table 1

程家胜(1986)^[1]根据过氧化物酶同工酶酶谱特征构建了苹果属13个种类的亲缘关系树状图。试材中有4个种类与本试验相同,其中仅有秋子的归属与本试验不同,这可能与所选用的试材类型不同有关。肖尊安等(1989)^[2]进行了苹果属17个种类酯酶同工酶和谷氨酸脱氢酶同工酶的模糊聚类分析。尽管其中仅有5个种类与本试验相同,但它们的聚类位置与本试验是一致的。这说明DNA分子标记与同工酶标记在亲缘关系研究上具有一定的相似性。Dunemann等^[3](1994)应用RAPD分子标记技术对苹果属17个野生种间的亲缘关系进行了研究,并构建了相应的聚类分析树状图。本试验仅有3个种类与其相同,由于试材间差别太大,研究结果难以相互比较。总之,本研究表明AFLP技术为研究苹果砧木间的亲缘关系提供了一个理想的工具。

References:

- [1] Cheng J S. Study on the application of isoenzyme analysis in fruit germplasm and genetics[J]. China Fruit Trees, 1986, (1): 19-22. (in Chinese)
程家胜. 同工酶分析在果树种质资源分类遗传研究中的应用[J]. 中国果树, 1986, (1): 19-22.
- [2] Xiao Z A, Chen M H, Li X L. Fuzzy cluster analysis of *Malus* spp. With Isoenzyme profiles [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1989, 11(5): 485-490. (in Chinese)
肖尊安, 成明昊, 李晓林. 苹果属植物两种同工酶的模糊聚类分析[J]. 西南农业大学学报, 1989, 11(5): 485-490.
- [3] Dunemann F, Kahnam R and Schmidt H. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD "fingerprinting" of cultivars and wild species [J]. Plant Breeding, 1994, 113: 150-159.
- [4] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new techniques for DNA fingerprinting [J]. Nucl. Ac. Res. 1995, 23(21): 4407-4414.
- [5] Jia J Z. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker-assisted breeding [J]. Scientia Agricultural Sinica, 1996, 29(4): 1-10. (in Chinese)
贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [6] Zhen Zhou Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science. Fruit Stock Collected Workes [C]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1985: 12-354. (in Chinese)
中国农业科学院郑州果树所, 果树砧木论文集[C]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985: 12-354.
- [7] Wang G Y. Genetic Engineering Experiment Technology. [M]. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 1997: 43-46. (in Chinese)
王国英. 基因工程实验技术[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 43-46.
- [8] Zhu J. Study on DNA Identification of (*Malus*) and peach Genotypes and Molecular Markers of Apple Co Gene [D]. Ph. D Dissertation, Beijing: China Agricultural University, 1998: 1-102. (in Chinese)
祝 军. 苹果、桃基因型DNA水平鉴定和苹果Co基因分子标记的研究[D], 博士学位论文, 北京: 中国农业大学, 1998: 1-102.
- [9] Rohlf F J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-PC, V, 1.70) [M]. Exeter Software, Setauleer, New York, 1993.