

不同地域野生欧李及其近缘植物 亲缘关系的 RAPD 分析

王鹏飞¹, 李利锋², 杜俊杰¹, 张建成¹, 纪 薇¹, 穆霄鹏¹, 曹 琴¹

(¹山西农业大学园艺学院, 太谷 030801; ²山西国瑞药业有限公司, 太原 030500)

摘要: 利用 RAPD 分子标记技术对 21 个不同地域欧李及其近缘种属植物(桃、杏、李、樱桃)进行了遗传亲缘关系及分类研究。结果表明, 用于不同地域野生欧李分析的 25 条引物中, 共扩增出 441 个清晰可用的 DNA 片段, 其中多态性位点 366 个, 多态性比为 82.99%。在遗传相似系数为 0.71 时, 可将中国野生欧李资源划分为 3 个大的区域, 分别为东北分布群、华北华东分布群与中西部分布群。用于欧李及其近缘种属植物分析的 20 条引物中, 共扩出多态性带 683 条, 多态性比率为 98.99%。聚类分析表明, 在遗传相似系数为 0.61 时, 欧李与其近缘种属植物分为 3 大类; 欧李与麦李的亲缘关系最近, 与桃亲缘关系最远。

关键词: 欧李; 野生种群; RAPD; 遗传多样性; 近缘植物; 聚类分析

Genetic Diversity among Wild Chinese Dwarf Cherry from Different Regions and its Closely Related Plant Species Based on RAPD Analysis

WANG Peng-fei¹, LI Li-feng², DU Jun-jie¹, ZHANG Jian-cheng¹, JI Wei¹, MU Xiao-peng¹, CAO Qin¹

(¹ College of Horticulture, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801;

² Shanxi Guorui Pharmaceutical Industry Limited Company, Taiyuan 030500)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to evaluate the genetic relationship among 21 Chinese dwarf cherry wild resources accessions from different regions and four close relatives (peach, apricot, plum and cherry etc.). The results of UPGMA cluster proved that 25 primers were selected for amplification wild Chinese dwarf cherry from different regions of unambiguous and high polymorphic bands. These 25 primers amplified total 441 bands out of which 366 bands (82.99%) were polymorphic. UPGMA cluster analysis of the similarity matrix obtained from the RAPD database resulted in a dendrogram of genetic relationships that grouped 21 accessions into 3 clusters at the genetic similarity value of 0.71. They were Northeast distribution group, Northern China and eastern China distribution group, and Central and Western China distribution group, respectively. Among Chinese dwarf cherry and its closely related plant species of unambiguous, 20 primers screened for amplification amplified 683 and of which 98.99% were polymorphic. UPGMA cluster analysis showed that Chinese dwarf cherry and its closely related plant species accessions were grouped into 3 separate clusters at the genetic similarity value of 0.61. The largest inheritance distance was between Chinese dwarf cherry and *Prunus glandulosa* while the least inheritance distance was between Chinese dwarf cherry and peach (*Prunus persica*).

Key words: Chinese dwarf cherry; wild populations; RAPD analysis; genetic diversity; closely related plant; UPGMA cluster analysis

收稿日期: 2014-03-03 修回日期: 2014-04-11 网络出版日期: 2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2218.014.html>

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20121403110003); 山西省科技基础条件平台建设项目(2013091004-0101); 山西省科技重大专项(20121101010); 山西农业大学育种基金(2006060)

第一作者主要从事欧李育种与栽培技术研究。E-mail: pengfei wang2004@163.com

通信作者: 杜俊杰, 研究方向为果树种质资源研究与创新。E-mail: dj738@163.com

欧李 [*Cerasus humilis* (Bge.) Sok.] 为我国特有的灌木果树^[1], 是典型的根状茎克隆植物^[2], 植株耐旱、耐寒、耐瘠薄, 防风固土、防止水土流失能力强, 果实既可鲜食又可加工果汁、果酒, 是一种兼具生态效益和经济价值的灌木树种, 也是我国果树可持续发展战略性树种^[3]。近 30 年来, 各地学者在资源调查、品种选育、栽培技术及加工产品研制等方面进行了持续研究, 已将其从野生状态发展为人工规模化栽培^[4]。野生欧李广泛分布于我国东北^[5-7]、华北^[8-12]、西北^[13-15]、内蒙古^[16-17]等地区, 多生长在向阳山坡、沙丘边缘或灌丛中。不同地域野生欧李在形态上存在较大差异, 根据叶片形态初步分为阔叶欧李和窄叶欧李 2 大类型^[18]。

RAPD 是基于基因组的多态性的一种分子标记技术, 具有技术简单、操作简便、成本较低、检测速度快、引物序列通用性强和所需 DNA 样本量较少等优点, 至今仍被广泛地应用到珍稀特有植物资源的遗传多样性分析^[19]、种群遗传结构分析^[20]及亲缘关系鉴定^[21]等方面。应用 RAPD 标记技术已在梨^[22]、杏^[23]、樱桃^[24]、荔枝^[25]、罗汉果^[26]、树莓^[27]、杨桃^[28]等多种果树植物上开展了遗传多样性分析, 从分子水平上揭示了不同种质间的亲缘关系, 这对研究果树遗传规律、开展品种育种具有重要参考依据。欧李为我国特有的灌木果树资源, 但对丰富的野生种质资源了解尚不够深入, 仅从孢粉学^[29]、地理分布^[30]及同工酶^[31]等方面对不同地区欧李种质进行了研究, 有必要采用分子标记技术进行欧李种质特性研究。

在欧李科属分类上, 果树分类学家俞德浚^[1]将欧李归为蔷薇科樱桃属矮樱亚属, 而国外仍把桃、杏、李、樱桃、梅归为大李属范畴。张红等^[32]根据自交不亲和 S 基因对欧李及其近缘种属间的亲缘关系进行了探讨, 认为将欧李划分到樱亚属可能欠妥。国内外学者关于欧李在核果类果树分类尚持不同看法, 原因可能是所采用的分类手段和依据不同。因此, 研究欧李与其近缘种属的亲缘关系, 对于欧李在核果类果树中的分类地位具有重要意义。本文采用 RAPD 分子标记技术对不同地域野生欧李资源及其与近缘种属植物的亲缘关系进行了分析, 为今后开展欧李核心种质构建、杂交育种及研究欧李起源、演化及分类提供分子学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2009 年 3 月到 2010 年 12 月进行, 野生

欧李资源来自主要自然分布区 8 个省份 21 个不同地域, 每个地域选择 10 个不同植株, 植株间隔 10 m 以上, 取每植株基生枝中部 3~5 片嫩叶, 将叶片混合样提取 DNA 用于试验分析。样品种群编号、来源地区、所属山脉及地理坐标见表 1。其中河南嵩山 1(SS1)、河南嵩山 2(SS2)、河南嵩山 3(SS3) 和陕西旬邑 1(XY1)、陕西旬邑 2(XY2) 为同一分布地区间隔较远的不同野生欧李种群。欧李与其近缘种的来源见表 2, 其中麦李、山桃、櫻桃李、榆叶梅为普通野生种或实生繁殖后代, 近缘植物材料采自山西农业大学果树试验站。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与 RAPD 反应体系 DNA 提取参照张红等^[32]的改良 CTAB 法进行。试验中 DL2000™ DNA Marker、*Tap* DAN 聚合酶 5 U/μL、含 Mg^{2+} 的 10 × PCR Buffer、dNTP Mixture 均购自宝生物工程有限公司, 随机引物购自北京博迈德生物科技发展有限公司。试验对 RAPD 反应体系进行了优化, 经优化的扩增反应条件为: 20 μL 的 RAPD 反应体系中: DNA 模板 20 ng, *Taq* 酶 2.0 U, dNTP 终浓度为 150 μmol/L, Mg^{2+} 的终浓度为 2.0 mmol/L, 引物终浓度为 1.2 μmol/L。RAPD 扩增反应在 Bio-RAD PTC-200 型 PCR 仪上进行。扩增反应程序先进行 94 °C 预变性, 再进行 40 个循环的 94 °C 变性 30 s、36 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 最后进行 72 °C 延伸 8 min。扩增产物于 0.5 × TBE 电泳缓冲液、50 V 电压下, 在 1.2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL EB) 中电泳 4 h 后, 于凝胶成像系统 (ORTO) 下观察、拍照。不同地域野生欧李的 RAPD 分析, 筛选 25 条清晰、稳定性好、多态性丰富的 10 碱基随机引物用于分析。欧李及其近缘种属植物的 RAPD 分析, 采用 20 条清晰、稳定性好、多态性丰富的 10 碱基随机引物用于分析。

1.2.2 数据统计与分析 RAPD 扩增所获得的琼脂糖凝胶电泳图谱中, 根据 Marker 在胶片上的对应位置, 计算出扩增产物的分子量大小。有特征带记为 1, 无特征带记为 0, 整理成 1/0 矩阵。使用 NT-SYS-PC (Version 2.10y) 软件进行数据分析, 分别计算样品间遗传相似系数与遗传距离, 并导出对应的矩阵表。聚类分析树状图使用其中的 SAHN 程序, 选用非加权组平均法 (UPGMA) 生成。遗传相似系数 (GS) 的计算公式为: $GS = 2a / (2a + b + c)$, 其中 a 为两样品共有的条带数, b 为其中一样品特有条带数, c 为另一样品特有条带数; 遗传距离指数 (D) 按公式 $D = 1 - GS$ 计算。

表 1 野生欧李取样地点

Table 1 Samples location of wild Chinese dwarf cherry

编号	野生种群	采样地	所属山脉	地理坐标
No.	Population	Site of samples	Situated at mountain	Geographical coordinate
01	SY	吉林松原	黑山山脉北端	124°49'E,45°8'N
02	BX	辽宁本溪	千山山脉北端	123°45'E,41°17'N
03	KEQ	内蒙古科尔沁右翼中旗	大兴安岭山脉中部	121°28'E,45°3'N
04	WLHT	内蒙古乌兰浩特中旗	大兴安岭山脉中部	122°5'E,46°4'N
05	TZ	山西天镇	恒山山脉北部	114°5'E,40°25'N
06	YS	山西榆社	太岳山脉东部	112°58'E,37°4'N
07	GP	山西高平	太行山山脉南部	112°55'E,35°47'N
08	ZQ	山西左权	太行山山脉中部	113°22'E,37°4'N
09	JX	山西绛县	中条山脉北部	111°34'E,35°29'N
10	YT	山东烟台	昆崙山脉北端	112°26'E,37°27'N
11	TA	山东泰安	泰山脉南端	117°5'E,36°12'N
12	CL	河北崇礼	大马群山山脉西部	115°16'E,40°58'N
13	FN	河北丰宁	大马群山山脉东部	116°38'E,41°12'N
14	CC	河北赤城	大马群山山脉中部	115°55'E,40°54'N
15	SS1	河南嵩山 1	伏牛山系中部	113°0'E,34°31'N
16	SS2	河南嵩山 2	伏牛山系中部	113°0'E,34°31'N
17	SS3	河南嵩山 3	伏牛山系中部	113°0'E,34°31'N
18	LB	河南灵宝	崤山山脉中部	110°53'E,34°31'N
19	XA	陕西西安	秦岭中部	108°56'E,34°15'N
20	XY1	陕西旬邑 1	子午岭南端	108°20'E,35°6'N
21	XY2	陕西旬邑 2	子午岭南端	108°20'E,35°6'N

表 2 欧李与其近缘种属植物来源

Table 2 Resources of Chinese dwarf cherry with relative species and genera

编号	资源	种/品种来源
No.	Resource	Species or cultivars origin
01	KEQ	欧李/内蒙古科尔沁右翼中旗
02	JX	欧李/山西绛县
03	SYHMT	普通桃/十月寒蜜
04	ST	山桃
05	YYM	榆叶梅
06	SJHX	杏/沙金红
07	LYQL	中国李/龙园秋李
08	YTL	樱桃李
09	AGNL	欧洲李/安哥诺李
10	ZDG	欧洲甜樱桃/乌克兰早大果
11	MYT	毛樱桃
12	MHL	马哈利樱桃
13	ML	麦李

2 结果与分析

2.1 野生欧李种质资源的 RAPD 多样性

在所筛选的 25 条引物中,供试材料共扩增出

441 条清晰可用的条带,其中多态性带 366 条,多态性比率为 82.99%,各引物扩增出的条带数在 9~28 之间,平均每个引物产生 14.64 条多态性带(表 3),绝大多数谱带集中在 500~1000 bp 之间(图 1)。

2.2 欧李及其近缘种属植物的 RAPD 多样性

RAPD 扩增产物经检测,所使用的 20 条引物中,共扩增出 690 条清晰可用的条带,其中多态性带 683 条,多态性比率为 98.99%,各引物扩增出的条带数在 28~45 之间,平均每个引物产生 34.15 条多态性带(表 4),谱带在 250~2000 bp 之间均有分布(图 2),且多态性条带数与多态性比率均高于野生欧李种质资源所统计结果。

2.3 不同地域野生欧李的聚类分析

采用 NTSYS-PC 软件计算不同地域野生欧李的遗传相似系数和遗传距离(表 5),21 份野生欧李的相似度在 0.6100~0.8639 之间,其中河北丰宁和河北赤城相似系数最高(0.8639),而陕西旬邑 2 和内蒙古科尔沁右翼中旗的相似系数最低(0.6100)。根据遗传相似系数经 UPGMA 生成聚类树状图(图 3),在遗传相似系数为 0.71 处可将不同地域的 21

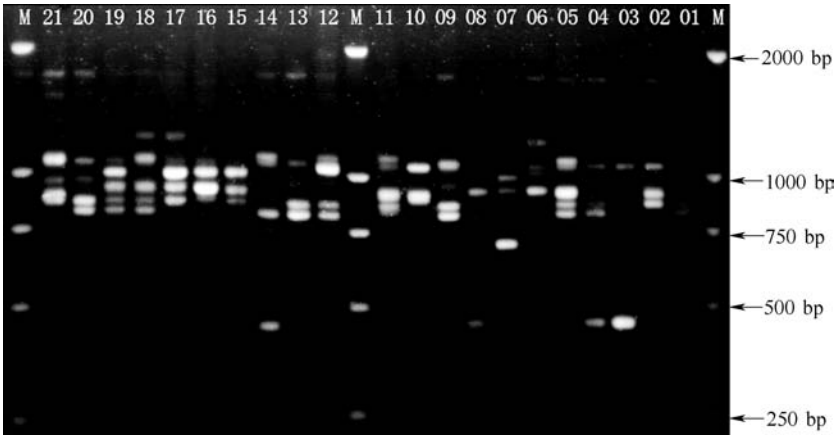


图1 RAPD 引物 S18 对不同地域野生欧李的扩增结果

Fig.1 The profiles of population using the RAPD primer(S18)for wild Chinese dwarf cherry of different regions

表3 用于不同地域野生欧李 RAPD 分析的引物及扩增条带多态性

Table 3 Primers used and polymorphism statistical results of RAPD analysis for wild Chinese dwarf cherry of different regions

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	扩增带数 No. of amplified bands	共有带数 No. of common bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率(%) Percentage of polymorphic bands
S01	TGATCCCTGG	21	5	16	76.19
S02	GGACTGGAGT	21	5	16	76.19
S03	GTAGACCCGT	17	4	13	76.47
S04	CCTTGACGCA	21	2	19	90.48
S07	CCACAGCAGT	23	4	19	82.61
S08	AGTCAGCCAC	16	4	12	75.00
S09	GTGACGTAGG	15	1	14	93.33
S10	CAATCGCCGT	21	4	17	80.95
S14	AGGTGACCGT	15	4	11	73.33
S16	TCTGGTGAGG	10	3	7	70.00
S17	ACCTGAACGG	19	0	19	100.00
S18	CTCTGGAGAC	12	0	12	100.00
S21	CACCGTATCC	15	2	13	86.67
S22	CATCCGTGCT	18	3	15	83.33
S23	GAGAGCCAAC	20	6	14	70.00
S28	AAGCCTCGTC	14	4	10	71.43
S29	TGCGTGCTTG	21	4	17	80.95
S31	CACACTCCAG	9	0	9	100.00
S32	ACTTCGCCAC	15	2	13	86.67
S34	AGCGTGCTCTG	15	1	14	93.33
S38	CTGACGTCAC	17	3	14	82.35
S41	ACGACCGACA	28	7	21	75.00
S45	AGACGTCCAC	22	3	19	86.36
S47	CTGCATCGTG	17	2	15	88.24
S49	CTTCCGCAGT	19	2	17	89.47
总计 Total		441	75	366	82.99
平均 Average		17.64	3	14.64	82.99

份野生欧李资源分为 3 个类群:陕西与河南资源为第Ⅰ类群;山东、河北和山西野生欧李资源为第Ⅱ类群;内蒙古、辽宁、吉林的野生欧李资源为第Ⅲ类群。第Ⅰ类群中所采集的野生欧李资源生长位置均在 35°33′N 以南,第Ⅲ类群中所采集的野生欧李资源生长位置均位于 40°49′N 以北,第Ⅱ类群中所采河北、山东、山西的野生欧李资源生长位置的纬度,基本位于第Ⅰ类与第Ⅲ类之间。聚类结果反映出野生欧李资源存在一定程度因地理差异造成的种群差异。

2.4 欧李与其近缘种属植物的聚类分析

采用 NTSYS-PC 计算欧李与其近缘种属植物的遗传相似系数和遗传距离(表 6),野生欧李与其近缘种属植物的相似度在 0.5812~0.7986 之间,其中

表 4 欧李及其近缘种属 RAPD 分析的引物及扩增条带多态性

Table 4 Primers used and polymorphism statistical results of RAPD analysis on Chinese dwarf cherry and its relative species and genera

引物 Primer	序列 Sequence(5′-3′)	扩增带数	共有带数	多态性带数	多态性比率(%)
		No. of amplified bands	No. of common bands	No. of polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands
S01	TGATCCCTGG	28	1	27	96.43
S02	GGA CTGGAGT	29	0	29	100.00
S03	GTA GACCCGT	29	0	29	100.00
S04	CCTTGACGCA	31	0	31	100.00
S05	GGAGG GTGT	34	1	33	97.06
S06	AGGGAACGAG	31	0	31	100.00
S07	CCACAGCAGT	41	0	41	100.00
S08	AGTCAGCCAC	32	1	31	96.88
S09	GTGACGTAGG	31	0	31	100.00
S10	CAATCGCCGT	31	0	31	100.00
S11	TCTGTGCTGG	40	0	40	100.00
S12	AGCCAGCGAA	41	0	41	100.00
S13	GACCGCTTGT	45	0	45	100.00
S14	AGGTGACCGT	39	0	39	100.00
S15	GTGCGATCC	35	1	34	97.14
S16	TCTG GTGAGG	32	0	32	100.00
S17	ACCTGAACGG	36	0	36	100.00
S18	CTCTGGAGAC	29	0	29	100.00
S19	GGTCTACACC	37	0	37	100.00
S20	AGCGCCATTG	39	3	36	92.31
总计 Total		690	7	683	98.99
平均 Average		34.50	0.35	34.15	98.99

绛县野生欧李(JX)和内蒙古科尔沁野生欧李(KEQ)之间的相似系数最高(0.7986),绛县野生欧李(JX)与麦李(ML)的相似系数较高,为 0.7159,内蒙古科尔沁野生欧李(KEQ)和十月寒蜜桃(SYHMT)相似系数最低(0.5812)。聚类结果表明,在遗传相似系数为

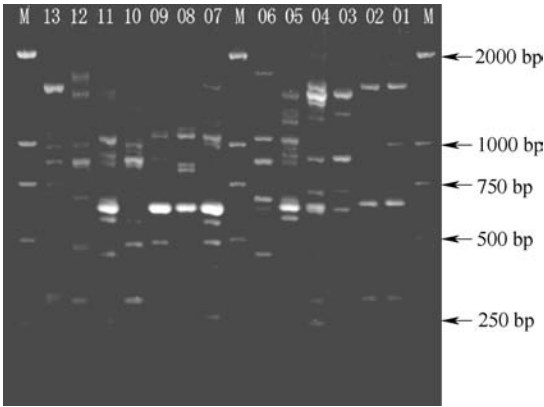


图 2 引物 S14 对欧李及其近缘种属植物的扩增结果图
Fig.2 RAPD amplification pattern using the primer S14 for Chinese dwarf cherry and its relative species and genera

0.61 时,可将供试材料分为 3 大类(图 4),其中李、杏、毛樱桃、榆叶梅、欧李、麦李先聚为一类,马哈利樱桃和欧洲甜樱桃聚为一类,桃和山桃聚为一类。说明欧李与麦李亲缘关系最近,与李、杏亲缘关系较近,而与甜樱桃亲缘关系较远,与桃亲缘关系最远。

表 5 欧李野生种质资源的相似系数(左下)和遗传距离(右上)

Table 5 Similarity coefficients (down left) and genetic distance (up right) between wild germplasm resources of Chinese dwarf cherry

	SY	BX	KEQ	WLHT	TZ	YS	GP	ZQ	JX	YT	TA	CL	FN	CC	SS1	SS2	SS3	LB	XA	XY1	XY2
SY		0.1882	0.2766	0.2766	0.3107	0.3265	0.3311	0.3424	0.3265	0.2812	0.2902	0.3311	0.3152	0.3152	0.3537	0.3537	0.3220	0.3311	0.3673	0.3583	0.3583
BX	0.8118		0.2381	0.2200	0.2812	0.3107	0.3061	0.2993	0.2971	0.2880	0.2698	0.2925	0.2902	0.2948	0.3379	0.3243	0.3424	0.3560	0.3560	0.3469	0.3696
KEQ	0.7234	0.7619		0.1814	0.3107	0.3039	0.3129	0.3016	0.3084	0.3129	0.3084	0.3311	0.2971	0.3152	0.3673	0.3447	0.3401	0.3401	0.3719	0.3719	0.4127
WLHT	0.7234	0.7800	0.8186		0.2381	0.2494	0.2812	0.2880	0.3084	0.3039	0.3175	0.3084	0.3152	0.3288	0.3900	0.3673	0.3764	0.3628	0.3764	0.3855	0.3900
TZ	0.6893	0.7188	0.6893	0.7619		0.1973	0.2381	0.2449	0.2608	0.3107	0.3016	0.2834	0.2948	0.3220	0.3379	0.3333	0.3016	0.2971	0.3469	0.3424	0.3696
YS	0.6735	0.6893	0.6961	0.7506	0.8027		0.2041	0.2018	0.2268	0.2449	0.2585	0.3039	0.3107	0.3243	0.3129	0.3175	0.3084	0.3039	0.3265	0.3356	0.3311
BP	0.6689	0.6939	0.6871	0.7188	0.7619	0.7959		0.1973	0.2132	0.2721	0.2630	0.3129	0.3197	0.3243	0.3129	0.3311	0.2948	0.3356	0.3265	0.3356	0.3492
ZQ	0.6576	0.7007	0.6984	0.7120	0.7551	0.7982	0.8027		0.1565	0.2381	0.2381	0.2789	0.2766	0.2766	0.3333	0.3379	0.3152	0.3333	0.3107	0.2925	0.3107
JX	0.6735	0.7029	0.6916	0.6916	0.7392	0.7732	0.7868	0.8435		0.2041	0.1950	0.2449	0.2290	0.2426	0.2857	0.3084	0.2902	0.3129	0.2993	0.2766	0.2721
YT	0.7188	0.7120	0.6871	0.6961	0.6893	0.7551	0.7279	0.7619	0.7959		0.1497	0.2313	0.2336	0.2336	0.2766	0.2721	0.2857	0.2948	0.2902	0.2993	0.2812
TA	0.7098	0.7302	0.6916	0.6825	0.6984	0.7415	0.7370	0.7619	0.8050	0.8503		0.2358	0.2472	0.2472	0.2948	0.2766	0.2676	0.2721	0.2630	0.2902	0.2540
CL	0.6689	0.7075	0.6689	0.6916	0.7166	0.6961	0.6871	0.7211	0.7551	0.7687	0.7642		0.1519	0.1701	0.2585	0.2540	0.2993	0.3084	0.2857	0.2948	0.3039
FN	0.6848	0.7098	0.7029	0.6848	0.7052	0.6893	0.6803	0.7234	0.7710	0.7664	0.7528	0.8481		0.1361	0.2744	0.2608	0.2971	0.2880	0.2698	0.2608	0.3061
CC	0.6848	0.7052	0.6848	0.6712	0.6780	0.6757	0.6757	0.7234	0.7574	0.7664	0.7528	0.8299	0.8639		0.2608	0.2653	0.2925	0.2789	0.2971	0.2698	0.2925
SS1	0.6463	0.6621	0.6327	0.6100	0.6621	0.6871	0.6871	0.6667	0.7143	0.7234	0.7052	0.7415	0.7256	0.7392		0.1769	0.2041	0.2358	0.2585	0.2676	0.2766
SS2	0.6463	0.6757	0.6553	0.6327	0.6667	0.6825	0.6689	0.6621	0.6916	0.7279	0.7234	0.7460	0.7392	0.7347	0.8231		0.1723	0.2404	0.2585	0.2812	0.2812
SS3	0.6780	0.6576	0.6599	0.6236	0.6984	0.6916	0.7052	0.6848	0.7098	0.7143	0.7324	0.7007	0.7029	0.7075	0.7959	0.8277		0.1859	0.2313	0.2766	0.2857
LB	0.6689	0.6440	0.6599	0.6372	0.7029	0.6961	0.6644	0.6667	0.6871	0.7052	0.7279	0.6916	0.7120	0.7211	0.7642	0.7596	0.8141		0.2494	0.2449	0.2948
XA	0.6327	0.6440	0.6281	0.6236	0.6531	0.6735	0.6735	0.6893	0.7007	0.7098	0.7370	0.7143	0.7302	0.7029	0.7415	0.7415	0.7687	0.7506		0.1859	0.2494
XY1	0.6417	0.6531	0.6281	0.6145	0.6576	0.6644	0.6644	0.7075	0.7234	0.7007	0.7098	0.7052	0.7392	0.7302	0.7324	0.7188	0.7234	0.7551	0.8141		0.1723
XY2	0.6417	0.6304	0.5873	0.6100	0.6304	0.6689	0.6508	0.6893	0.7279	0.7188	0.7460	0.6961	0.6939	0.7075	0.7234	0.7188	0.7143	0.7052	0.7506	0.8277	

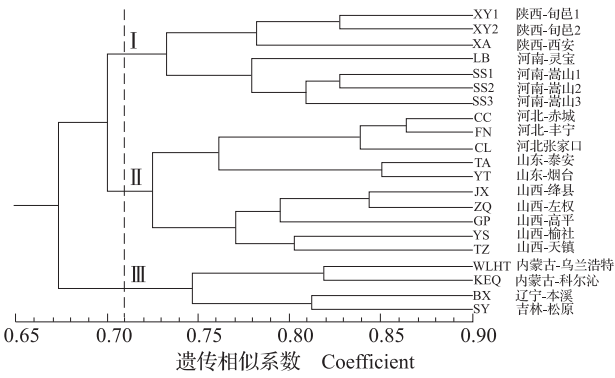


图3 不同地域野生欧李的遗传距离聚类分析
Fig.3 Tree diagram of wild Chinese dwarf cherry of different regions

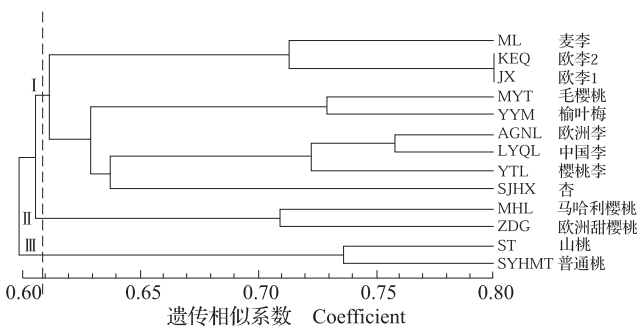


图4 欧李与其近缘种属的聚类树状图
Fig.4 Tree diagram of Chinese dwarf cherry and its relative species and genera

3 讨论

3.1 野生欧李种质资源多样性与地理隔离的关系

分子标记不仅可以反映品种差别、地理差别,而且能够指导定向育种。本研究首次对野生欧李进行了 RAPD 聚类分析,将不同地域野生欧李分为 3 大类群。第Ⅲ类群中所采野生欧李种质资源生长位置位于近 40°N 以北,第Ⅰ类群与第Ⅱ类群位于近 40°N 以南地区。这与王有信等^[30]根据不同地区欧李植物学特征的分类近似,说明地理隔离是造成野生欧李种质资源多样性差异的原因。野生欧李之间的遗传距离与地理距离存在一定的相关性,较远的地域差异可以造成野生欧李遗传相似度的差异,但地理距离较近的范围内,亲缘关系与地理位置并未表现出绝对相关性,如河北野生欧李先与山东野生欧李聚为一类,然后与山西野生欧李共聚为第Ⅱ大类,但山西天镇资源与河北资源的地理距离要比山东资源更近;另外,山西中部榆社资源先与北部天镇资源聚在一起,山西中部的左权资源先与山西南部的绛县

资源聚在一起,然后所有山西野生欧李种质资源才聚在一起,而并不是地理距离较近的榆社和左权资源先聚为一类。由此说明野生欧李种质资源的差异性并非只受地理隔离的影响,还可能受到种质资源的演化及传播的影响。应继续采用其他分子标记手段或先进的测序技术研究欧李种质资源多样性,而最终揭示不同地区欧李种质特性。

3.2 欧李与其他核果类果树的亲缘关系及分类地位

核果类果树的分类与系统进化至今仍是一个存在争议的问题。国内外众多学者探讨了桃、杏、李、樱桃、梅果树间亲缘关系,张俊卫等^[33]对梅、桃、李、杏、樱的 RAPD 分析中,杏与李先聚为一类,然后与梅类聚为一类,再与桃类聚类,最后与樱类聚在一起。凌志奋等^[34]对主要核果类果树的花粉进行了电镜扫描的比较鉴定观察,根据花粉大小形状特征分析,发现并提出演化顺序是李属→樱桃属→杏梅属→桃属。唐前瑞等^[35]在对桃李梅杏 4 种核果类植物亲缘关系的过氧化物酶酶谱比较研究时指出,李的酶谱简单,杏、梅介于桃、李之间,桃的酶谱最复杂,并认为它们在演化进程中,李较原始,桃较进化,梅与杏则介于桃、李之间。刘艳玲等^[36]依据 ITS 序列探讨了核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系,认为樱属为一单系分支,桃、李、杏共同构成另一单系分支。王化坤等^[37]根据 ITS 序列构建了核果类果树的进化和系统发育关系,其结果支持核果类果树归为一个属,演化顺序为共同的原始材料首先分化出樱桃,再分化出桃、李、杏、梅,且李进化产生桃,杏进化产生梅,与刘艳玲等^[36]的研究结果基本一致。本研究表明欧李与李、杏归为一类,甜樱桃、桃分别分化为一类,桃为较原始的材料。

张红等^[32]根据 S 基因将山东昆嵛山野生欧李与其他核果类进行聚类分析,认为桃、李、梅、杏、樱桃起源于共同祖先,应归为一个属,且欧李与扁桃有着更近的亲缘关系。张立彬等^[31]发现欧李与毛樱桃有较近的亲缘关系。野生樱桃种质资源的 RAPD 聚类分析表明,欧李与毛樱桃和草原樱桃亲缘关系很近^[38]。欧李、麦李、毛樱桃在形态学上较为相似,且均为灌木,本研究 RAPD 聚类分析的结果与植物形态特征较为吻合。同时表明欧李、麦李、毛樱桃等矮生樱亚属果树与欧洲甜樱桃亲缘关系较远,而与李、杏亲缘关系更近,这与 S. Takehiko 等^[39]的观点一致。欧李与其近缘种属植物亲缘关系由近及远依次为欧李、麦李、李、杏、甜樱桃、桃。

表 6 欧李与其近缘种属的相似系数(左下)和遗传距离(右上)

Table 6 Similarity coefficients(down left) and genetic distance(up right) between Chinese dwarf cherry and its relative species and genera

	KEQ	JX	SYHMT	ST	YYM	SJHX	LYQL	YTL	AGNL	ZDG	MYT	MHL	ML
KEQ		0.2014	0.4188	0.3797	0.3783	0.3826	0.4000	0.3841	0.4000	0.3783	0.3870	0.4014	0.2942
JX	0.7986		0.4000	0.3928	0.3797	0.3899	0.4130	0.4058	0.4217	0.4000	0.3768	0.4058	0.2841
SYHMT	0.5812	0.6000		0.2652	0.4058	0.3870	0.4246	0.4203	0.4101	0.4377	0.4000	0.4261	0.4000
ST	0.6203	0.6072	0.7348		0.3812	0.3971	0.4000	0.3986	0.3855	0.4072	0.3870	0.4072	0.3986
YYM	0.6217	0.6203	0.5942	0.6188		0.3696	0.3841	0.3594	0.3812	0.4029	0.2725	0.4029	0.3768
SJHX	0.6174	0.6101	0.6130	0.6029	0.6304		0.3942	0.3551	0.3449	0.4014	0.3812	0.3957	0.4043
LYQL	0.6000	0.5870	0.5754	0.6000	0.6159	0.6058		0.2942	0.2435	0.4101	0.3986	0.4391	0.3754
YTL	0.6159	0.5942	0.5797	0.6014	0.6406	0.6449	0.7058		0.2652	0.3739	0.3536	0.4116	0.3884
AGNL	0.6000	0.5783	0.5899	0.6145	0.6188	0.6551	0.7565	0.7348		0.3841	0.3580	0.4130	0.3957
ZDG	0.6217	0.6000	0.5623	0.5928	0.5971	0.5986	0.5899	0.6261	0.6159		0.3710	0.2928	0.3710
MYT	0.6130	0.6232	0.6000	0.6130	0.7275	0.6188	0.6014	0.6464	0.6420	0.6290		0.3710	0.3710
MHL	0.5986	0.5942	0.5739	0.5928	0.5971	0.6043	0.5609	0.5884	0.5870	0.7072	0.6290		0.4058
ML	0.7058	0.7159	0.6000	0.6014	0.6232	0.5957	0.6246	0.6116	0.6043	0.6290	0.6290	0.5942	

参考文献

[1] 俞德浚. 中国果树分类学[M]. 北京: 农业出版社, 1982: 76

[2] 汤俊兵, 肖燕, 安树青. 根茎克隆植物生态学研究进展[J]. 生态学报, 2010, 30(11): 3028-3036

[3] 束怀瑞. 中国果树产业可持续发展战略研究[J]. 落叶果树, 2012, 44(1): 1-4

[4] 杜俊杰, 王鹏飞, 张建成. 山西省钙果(欧李)产业现状、存在问题与发展对策[J]. 山西果树, 2012(2): 38-39

[5] 聂绍荃, 袁晓颖, 杨逢建. 黑龙江植物资源[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 365-366

[6] 李书心. 辽宁植物志: 上册. [M]. 沈阳: 辽宁科学出版社, 1988: 850-851

[7] 周以良. 中国东北植被地理[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 171

[8] 陈汉斌, 郑亦津, 李法曾. 山东植物志[M]. 青岛: 青岛出版社, 1995: 348

[9] 王中英, 童德中, 朱文勇, 等. 山西果树志[M]. 北京: 中国经济出版社, 1991: 437

[10] 贺士元, 邢其华, 尹祖堂, 等. 北京植物志: 上册[M]. 北京: 北京出版社, 1984: 410-411

[11] 贺士元, 王金维, 汪劲武, 等. 河北植物志: 1 卷[M]. 石家庄: 河北科学出版社, 1986: 680-681

[12] 丁宝章, 王遂义. 河南植物志[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1988: 269

[13] 李景侠, 蔡靖, 李登武. 西北主要乔灌木[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2002: 87

[14] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志: 1 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1974: 584-585

[15] 陕西省果树研究所. 陕西果树志[M]. 西安: 陕西人民出版社, 1978: 375

[16] 中国科学院内蒙古宁夏综合考察队. 内蒙古植被[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 124

[17] 内蒙古植物志编写组. 内蒙古植物志: 3 卷[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1977: 129-132

[18] 王鹏飞. 欧李种质资源评价与遗传变异研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2006: 14-16

[19] 杨正安, 孟平红, 代贤, 等. 云南黑籽南瓜种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 860-864

[20] 李明, 王树香, 高宝嘉. 油松天然次生林居群遗传多样性及与产地地理气候因子的关联分析[J]. 生态学报, 2013, 33(12): 3602-3610

[21] 李瑞环, 李新岗, 黄建, 等. 枣和酸枣亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 366-373

[22] 马艳芝, 张玉星. 鸭梨及其变异类型的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 479-482

[23] Shiran B, Amirbakhtiar N, Kiani S, et al. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers[J]. Sci Hort, 2007, 111: 280-292

[24] Cai Y L, Cao D W, Zhao G F. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis[J]. Sci Hort, 2007, 111: 248-254

[25] 邓穗生, 陈业渊, 张欣. 应用 RAPD 标记研究野生荔枝种质资源[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 288-291

[26] Tang S Q, Li Y, Geng Y P, et al. Clonal and spatial genetic structure in natural populations of Luohanguo(*Siraitia grosvenorii*), an economic species endemic to South China, as revealed by RAPD markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2007, 35: 557-565

[27] Gomes F, Costa R, Ribeiro M M, et al. Analysis of genetic relationship among *Arbutus unedo* L. genotypes using RAPD and SSR marker[J]. J Fore Res, 2013, 24(2): 227-236

[28] 刘锴栋, 袁长春, 黎海利, 等. 杨桃遗传多样性的形态特征与 RAPD 标记的相关性分析[J]. 果树学报, 2013, 30(1): 69-74

[29] 王鹏飞, 曹琴, 杜俊杰, 等. 不同分布地区野生欧李花粉形态特征观察[J]. 山西农业科学, 2008, 36(11): 81-83

[30] 王有信, 何卫军, 李向东, 等. 欧李种质资源分布及种群分类特性研究[J]. 山西果树, 2005(6): 36-38

[31] 张立彬, 陈丽珍, 郭密成, 等. 欧李种质资源过氧化物酶同工酶研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(1): 94-96

[32] 张红, 张艳敏, 陈晓流, 等. 欧李自交不亲和 S 基因的克隆及序列分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 876-881

[33] 张俊卫, 包满珠. 梅、桃、李、杏、樱的 RAPD 分析[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 12-15

[34] 凌志奋, 王业遵, 吴邦良. 核果类主要果树花粉形态的鉴定观察[J]. 园艺学报, 1992, 19(1): 29-33

[35] 唐前瑞, 魏文娜. 桃李梅杏四种核果类植物亲缘关系的研究 III. 过氧化物酶同工酶谱谱比较[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(4): 337-340

[36] 刘艳玲, 徐立铭, 程中平. 基于 ITS 序列探讨核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 23-28

[37] 王化坤, 陶建敏, 渠慎春, 等. 核果类果树 ITS 序列分子进化及系统发育关系研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 363-374

[38] 蔡宇良. 野生樱桃种质资源的遗传分析及其栽培品种的 DNA 指纹鉴定[D]. 西安: 西北大学, 2006: 42-44

[39] Takehiko S, Hiroko H, Kouichi N, et al. The genetic diversities of 4 species of subg. *Lithocerasus* (*Prunus*, Rosaceae) revealed by RAPD analysis[J]. Euphytica, 2001, 117: 85-90