

梅花不同样本间亲缘关系的 AFLP 初步分析

杨朝东¹, 王 健¹, 张俊卫¹, 张 波², 包满珠¹

(¹华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ²中国梅花研究中心, 武汉 430074)

摘要:应用 AFLP 技术初步研究 20 个梅花株系间的亲缘关系, 19 对选择性引物扩增出清晰的总位点数 918 个, 其中多态性位点 324 个, 占总位点数的 35.29%。采用 SAS 类平均法聚类分析 AFLP 数据, λ 值为 0.9759 时, 将 20 个梅花株系分为 4 个类群。半野生种曲梗梅的多态性位点数最高, ‘多萼朱砂’、‘复瓣小官粉’等梅花品种次之。在类群 IV 中, 具有明显亲缘关系的两组亲本及其杂交子代各自聚为一组, 表明 AFLP 技术和聚类分析方法可以用来研究梅花品种间的亲缘关系。‘小官粉’、‘江南朱砂’和它们的子代亲缘关系密切, 结果仍能区别其较小差异, 这有助于解决梅花中存在的不同产地相同品种异名和同名而品种不同的问题。垂枝类梅花品种间有较近的亲缘关系或者遗传来源, 支持枝姿作为梅花分类的重要形态特征, 垂枝类品种属于梅花中比较进化的类群与其历史演化相吻合。本研究中所采用的 DNA 限制性内切酶酶切组合及所筛选的 AFLP 选择性引物对适合研究梅花品种间的亲缘关系和遗传多样性。

关键词: 梅花 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.); AFLP; 聚类分析; 亲缘关系

A Preliminary Analysis of Genetic Relationships for *Prunus mume* Sieb. et Zucc. by AFLP

YANG Chao-dong¹, WANG Jian¹, ZHANG Jun-wei¹, ZHANG Bo², BAO Man-zhu¹

(¹College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

²China Mei Flower Research Center, Wuhan 430074)

Abstract: The genetic relationships among a variety, a hybrid and 18 Mei flower cultivars were preliminarily investigated using AFLP. Nineteen selected primer combinations revealed 918 legible loci, 324 of which were polymorphic ones that accounting for 35.29% of the total. Based on the SAS average similarity cluster analysis, 20 Mei samples were classified into four groups as $\lambda = 0.9759$. *P. mume* var. *cernua* showed the highest polymorphism among these samples. ‘Duohezhusa’ and ‘Fubanxiaogongfen’ showed less polymorphism than *P. mume* var. *cernua*. In the group IV, AFLP and cluster analysis results were as follows: Parentages of some Mei flower cultivars were successfully identified. The results showed differences between ‘Xiaogongfen’, ‘Jiangnanzhusa’ and their hybrids which would be useful to clear the confusions of homonyms and synonyms. There were close genetic relationships among cultivars of pendulous group, which supported traditionally classified system using branch gesture as the important morphological character in Mei flowers. The pendulous cultivars were more evolutionary than others, which is in conform with their cultivated history. These results demonstrate that AFLP technique is an efficient method for evaluating the genetic relationships and diversity of Mei flower.

Key words: *Prunus mume*; AFLP; Cluster analysis; Genetic relationships

根据考古和有关史料记载, 梅 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 在中国的应用已有 3 000~5 000 年的历史, 汉代始有直枝梅类中的江梅、宫粉的记载, 宋代有杏

梅的记录, 进入近代才见垂枝和龙游梅, 因此梅花品种在其演化史上有一个明确的演进方向^[1,2]。梅种的起源和演化问题比较复杂, 目前尚无定论。一般认为梅

收稿日期: 2004-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30170666)

作者简介: 杨朝东 (1971-), 男, 博士, 主要从事园林植物遗传改良和生物技术研究。包满珠为通讯作者, Tel: 027-87282435; Fax: 027-87282095; E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn

起源于杏的一个分支,由原始杏通过渐变的方式逐渐演化而来^[1,3];或是由杏与李的天然杂交种长期演化而来^[3]。在梅的演化过程中可能渗入了杏、李、桃、山桃等近缘种的血缘。花梅是野梅经果梅演化而来的,但存在着逆向演化^[1,4],它是梅原始种在演化过程中扩增遗传多样性的途径之一。川、滇、藏交界的横断山区被认为是野梅、半野生梅的自然分布中心,即梅的变异与种质多样化中心^[3~5]。

近年来,利用 RAPD 分子标记研究认为梅归于杏属^[6],梅与杏的亲缘关系最近,与李较近,与山桃、毛樱桃较远^[7,8]。梅的基因中渗入了较多杏、李的基因,李、杏在梅的系统发育过程中处于基本等同的地位,桃、樱与梅的亲缘关系则相隔较远^[9]。中国梅花品种繁多,其种系(种型、系统)、类、型分类含 3 种系 5 类 18 型^[10]。梅花品种等位酶研究结果与形态标记等的分类具相似性^[11],孢粉学证据支持传统的二元三级品种分类系统^[12]。张永春利用同工酶研究梅花,结果支持枝姿作为真梅品种分类的第一级标准^[13]。AFLP 技术研究表明,美人梅与近缘种的亲缘关系依次为梅、紫叶李、李、山桃、桃花、山杏和杏^[14];垂枝梅的分类与形态分类结果基本一致^[15]。

人工选育具观赏价值的梅花品种历史悠久,包括种间和种内杂交品种的选择,由于历史记录不详,导致品种间的遗传亲缘关系不清楚,对进一步选育新品种造成诸多困难,如不同地方之间的同物异名或者同名异物。AFLP 技术由于含有高信息量的 DNA 长度多态性,DNA 多态性的检出率高,重复性好,不需 DNA 序列方面的信息,因而在植物的亲缘关系和遗传多样

性评价中得到了广泛应用。本文利用该技术初步研究了部分梅花品种间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 20 个梅花株系,列于表 1,除曲梗梅为半野生种,雪梅 ♀× 粉皮宫粉为杂交种外,其余均为品种。取叶片(采自武汉中国梅花研究中心)备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和检测 于 2003 年 4 月初采集梅花健康嫩叶,提取基因组 DNA、检测,方法参照张俊卫改良的 SDS 提取法^[9]。

1.2.2 AFLP 分子标记试验流程 参照陆光远^[16]和 Vos^[17]的方法。采用 *EcoR* I 和 *Pst* I 限制性内切酶组合酶切梅花基因组 DNA,选择性引物带有 2 个选择性碱基。

1.2.3 数据收集、处理方法 AFLP 显带的记录方法为:记录胶片上清晰的 67~500 bp 之间的条带,针对某一具多态性位点而言,‘有’记作‘1’,‘无’记作‘0’,只记载清晰易辨的扩增带,将 19 对选择性扩增引物产生的 DNA 扩增带数据输入到数据矩阵。对于没有多态性的位点,只记录每对引物扩增的相同位点总数。采用 SAS 类平均法聚类分析 AFLP 数据。

2 结果与分析

2.1 AFLP 选择性扩增结果

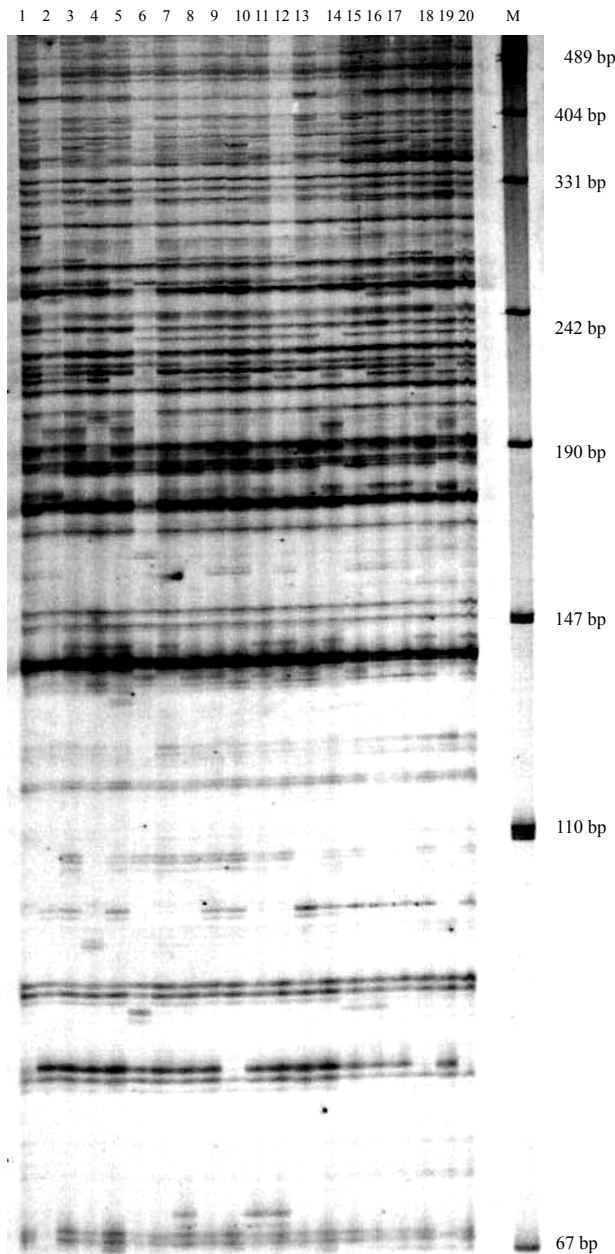
根据建立的梅花 AFLP 分析体系^[18],筛选出 19 对多态性高、条带分布均匀、易于识别的选择性引物。

表 1 供试材料

Table 1 Experiment materials

编号 No.	株系 Line	亲本 Parents	编号 No.	株系 Line	亲本 Parents
1	单红垂枝 Danhongchui zhi	-	11	大羽 Dayu	-
2	磨山垂枝 Moshanchui zhi	-	12	粉皮宫粉 Fenpigongfen	-
3	曲梗梅 Qugengmei	-	13	雪梅 ♀× 粉皮宫粉 Xuemei ♀×Fenpigongfen	-
4	雪梅 Xuemei	-	14	多萼朱砂 Duozhusha	-
5	小红长须 Xiaohongchangxu	小宫粉♀×江南朱砂 Xiaogongfen♀×Jiangnanzhusha	15	复瓣小宫粉 Fubanxiaogongfen	-
6	单轮朱砂 Danlunzhusha	小宫粉♀×江南朱砂 Xiaogongfen♀×Jiangnanzhusha	16	跳雪垂枝 Tiaoxuechui zhi	-
7	小宫粉 Xiaogongfen	-	17	残雪 Canxue	-
8	江南朱砂 Jiangnanzhusha	-	18	粉皮垂枝 Fenpichui zhi	-
9	江砂宫粉 Jiangshagongfen	小宫粉♀×江南朱砂 Xiaogongfen♀×Jiangnanzhusha	19	双碧垂枝 Shuangbichui zhi	-
10	江南台阁 Jiangnantaige	小宫粉♀×江南朱砂 Xiaogongfen♀×Jiangnanzhusha	20	锦生垂枝 Jingshengchui zhi	-

以E-GT/P-AG选择性引物对20株梅花的AFLP扩增结果为例,经6% PAGE凝胶电泳、银染等步骤,得到清晰胶片(图1),亲缘关系较近的品种间,多态性位点差异小;反之,则大。19对选择性引物共扩增并记录918个位点,其中多态性位点324个,占总位点数的



1~20 为 20 个梅花株系、M 为 pUC mix8 markers
1-20 were the samples in the studies, M were the pUC mix8 markers

图 1 E-GT/P-AG 对 20 个梅花株系的 AFLP 选择性扩增结果
Fig. 1 AFLP profiles of 20 Mei samples generated by the primer combination of E-AT/P-AT

35.29%, 平均每对引物扩增出 48.31 位点, 17.05 个多态性位点(表 2)。

2.2 聚类分析结果

采用 SAS 类平均法聚类分析 AFLP 数据结果表明(图 2), λ 值为 0.9759 时, 将 18 个梅花品种、1 个半野生种和 1 个杂交子代分为 4 个类群, 类群 I: 曲梗梅; 类群 II: ‘多萼朱砂’; 类群 III: ‘复瓣小宫粉’; 类群 IV: ‘单红垂枝’、‘磨山垂枝’、‘雪梅’、‘小红长须’、‘单轮朱砂’、‘小宫粉’、‘江南朱砂’、‘江砂宫粉’、‘江南台阁’、‘大羽’、‘粉皮宫粉’、‘雪梅’(♀) × ‘粉皮宫粉’(♂) 杂交子代、‘跳雪垂枝’、‘残雪’、‘粉皮垂枝’、‘双碧垂枝’和‘锦生垂枝’。

2.3 梅花亲缘关系分析

根据聚类分析结果, 类群 I: 半野生曲梗梅多态性带最多, 含有最丰富的遗传多态性位点, 与梅花栽培品种的亲缘关系相距较远。类群 II 和类群 III 的‘多萼朱砂’和‘复瓣小宫粉’2 个梅花品种具有多瓣和多雌蕊现象, 在形态特征方面属于比较进化的品种。类群 IV 中, 具有明显亲缘关系的‘雪梅’ × ‘粉皮宫粉’杂交子代聚为一组; ‘小宫粉’ × ‘江南朱砂’及其杂交子代‘小红长须’、‘单轮朱砂’、‘江南台阁’、‘江砂宫粉’聚为一组。最先是具单瓣和单雌蕊形态特征的‘小红长须’和‘单轮朱砂’聚合, 再与父本‘江南朱砂’聚合; 具有多瓣和多雌蕊形态特征的母本‘小宫粉’与‘江砂宫粉’先聚合; ‘江南台阁’的表型与亲本差异较大, 尤其花台阁状, 但在聚类分析结果中, 仍与父母本聚为一组。表明利用 AFLP 技术和聚类分析方法可以用来研究梅花品种间的亲缘关系。垂枝类梅花品种: ‘单红垂枝’、‘磨山垂枝’、‘跳雪垂枝’、‘残雪’、‘粉皮垂枝’、‘双碧垂枝’、‘锦生垂枝’聚为一组, 其中‘磨山垂枝’、‘跳雪垂枝’和‘粉皮垂枝’是‘残雪’的后代, 其父本记录不详。垂枝类梅花品种在聚类分析图中聚为一组, 表明它们有较近的亲缘关系或者遗传来源, 支持将枝姿作为梅花传统分类的重要形态特征, 垂枝类品种属于梅花中进化的类群, 与梅花演化历史记录相符^[3]。

宫粉型的梅花品种最多, 本研究中的‘小宫粉’与‘江砂宫粉’亲缘关系密切, 结果仍能区别其较小差异, 表明本方法可用于分析众多宫粉型梅花品种的亲缘关系, 这也有助于解决梅花中存在的不同产地相同品种异名和同名而品种不同等问题。本试验结果为进一步筛选、鉴别效率更高的 AFLP 选择性引物来研究梅花的遗传多样性和亲缘关系打下良好基础。在本研究中,

表 2 20 个梅花株系 AFLP 分析所选用的引物组合及其扩增结果

Table 2 The amplification results of AFLP primer combinations in 20 Mei samples

引物 Primer combination	扩增位点数 No. of amplified loci	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点的比例 Ratio of polymorphic loci (%)
E-AT/P-AT	37	23	62.16
E-TG/P-AG	55	20	36.36
E-TG/P-TT	44	18	40.90
E-TC/P-AA	58	27	46.55
E-TA/P-AT	39	15	38.46
E-GC/P-CT	53	18	33.96
E-AC/P-TA	75	28	37.33
E-AG/P-GC	46	18	39.13
E-GT/P-AG	53	20	37.73
E-GT/P-TA	56	27	48.21
E-GC/P-AC	57	13	22.80
E-TT6/P-AC	51	13	25.49
E-CA/P-AG	46	13	28.26
E-AC/P-AA	30	13	43.33
E-GA/P-CA	34	11	32.35
E-GC/P-TC	46	12	26.08
E-CA/P-CC	36	13	36.11
E-TG/P-AC	40	11	27.50
E-GG/P-AT	62	11	17.74
合计 Total	918	324	35.29

P. *Pst* I ; E. *EcoR* I

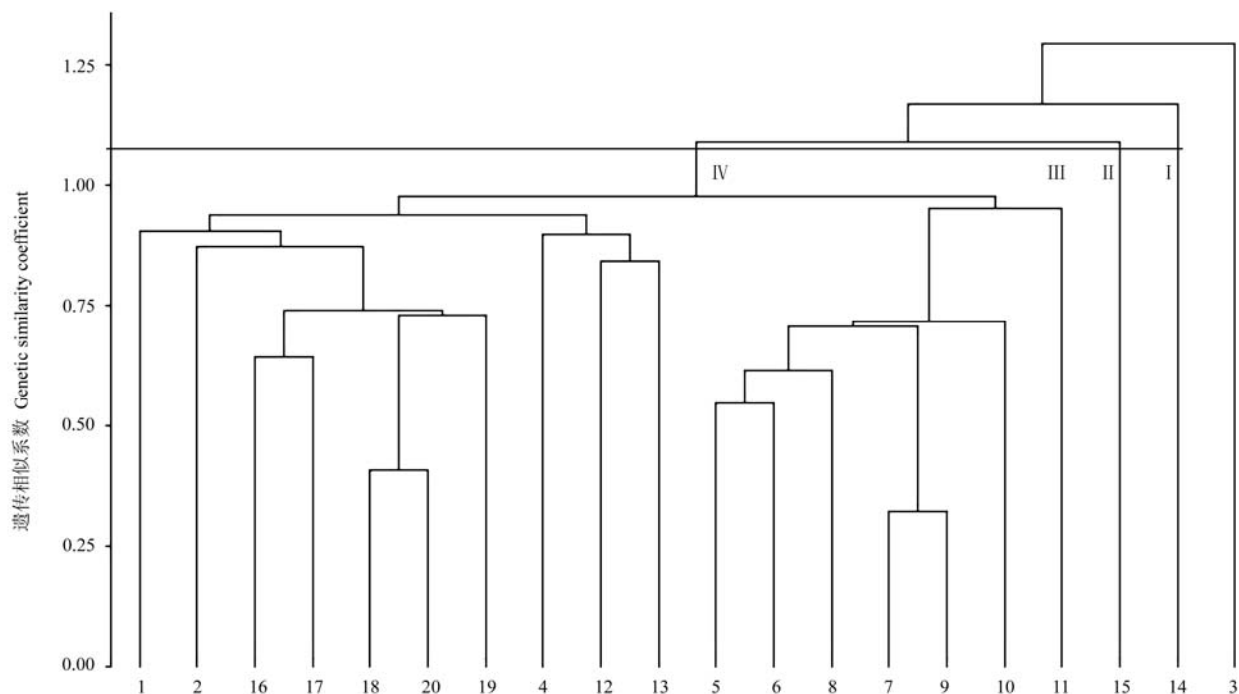


图 2 20 个梅花株系基于 AFLP 数据的 SAS 类平均聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of 20 Mei samples based on AFLP data

梅花亲本与其子代的亲缘关系最近,在聚类分析图中聚为一组,表明本文中所采用的 DNA 限制性内切酶酶切组合及所筛选的选择性引物对,聚类结果中梅花品种间亲缘关系与实际相符,应用 AFLP 技术有助于研究形态特征近似的梅花品种间的亲缘关系。

3 讨论

AFLP 作为一种新的分子标记方法,只要选择足够多且具有代表性的种、亚种、类型进行深入研究,在分析亲缘关系、研究系统发育、种质资源利用等方面将发挥重要作用。应用 AFLP 技术初步研究梅花品种间的亲缘关系,其结果与杂交育种结果一致,对利用该技术更进一步研究更多梅花品种间的亲缘关系、梅花种的系统发育演化打下良好基础。采用 2 个识别六碱基限制性内切酶组合酶切梅花基因组 DNA 的 AFLP 技术适合于研究梅花品种间的亲缘关系和遗传多样性。

目前对杏属植物的亲缘关系和遗传多样性研究较多。用 SSR、ITS、trnL-trnF 和聚类分析方法研究北美梅属植物的遗传亲缘关系,结果与形态分类一致^[19]。47 个不同地理分布的野生杏与栽培品种的遗传多样性由前苏联向南欧递减,这与杏的亚洲起源和自然地理分布一致^[20]。应用 AFLP 分子标记研究杏抗 sharka 病毒的遗传多样性^[21],在适应杏生长的意大利南部地区,采用 AFLP 技术辅助杏的遗传育种和品质改良^[22]等。这些利用分子标记分析杏的地理分布和抗病;通过分析其保守序列的核苷酸变异,了解其分子进化;对同属的梅花研究具有借鉴意义。

中国野梅分布范围较为广阔,包括长江流域及整个江南地区。花梅和果梅的栽培分布与野梅的分布相似,品种繁多,遗传背景复杂。理清品种间、类型间的亲缘关系与遗传多样性,对选育新品种具有重要意义。梅的起源和演化与其地理自然分布密切相关,弄清梅花品种间的亲缘关系与遗传多样性同其地理分布的关系十分必要,有利于梅花的遗传育种和品质改良等研究。

4 结论

本文采用 *EcoR* I 和 *Pst* I 限制性内切酶组合的 AFLP 方法,选择的梅花样本在枝姿、花色、花型和花心颜色等形态特征上差别很大,筛选的 19 对选择性引物扩增的总位点数为 918 个,其中多态性位点 324 个,占总位点数的 35.29%。

采用 SAS 类平均法聚类分析 AFLP 数据,将 20 个梅花株系分为 4 个类群。半野生种曲梗梅的多态性位点数最高,‘多萼朱砂’等梅花品种次之。在类群 IV 中,具有明显亲缘关系的两组杂交亲本及其子代各自聚为一组。‘小宫粉’、‘江南朱砂’和它们的子代亲缘关系密切,聚类分析结果仍能区别其较小差异,这有助于解决梅花品种中的同名异物和同物异名。垂枝类梅花品种间有较近的亲缘关系,支持枝姿作为梅花分类的重要形态特征。本结果为从分子水平探讨梅花种质资源的亲缘关系、遗传多样性和遗传连锁图谱的构建,以及辅助梅花育种奠定了坚实的基础。

References

- [1] 刘青林. 梅花起源与品种演化问题初探. 北京林业大学学报, 1996, 18(2): 71-82.
Liu Q L. Discussion on the origin and cultivar evolution of Mei. *Journal of Beijing Forestry University*, 1996, 18(2): 71-82. (in Chinese)
- [2] 陈俊愉. 中国梅花. 海口: 海南出版社, 1996.
Chen J Y. *Chinese Mei Flowers*. Haikou: Hainan Publishing House, 1996. (in Chinese)
- [3] 李 璠. 中国栽培植物发展史. 北京: 科学出版社, 1984: 174-175.
Li P. *The Development History of Cultivar Plants in China*. Beijing: Science Press, 1984: 174-175. (in Chinese)
- [4] 刘连森, 贺善文, 林美红. 湖南省果梅品种资源种质杂化状况的初步研究. 园艺学报, 1993, 20(4): 225-230.
Liu L S, He S W, Lin M H. A preliminary study on cultivar resources of *Prunus mume* in Hunan the status of hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 1993, 20(4): 225-230. (in Chinese)
- [5] 包满珠, 陈俊愉. 中国梅的变异与分布研究. 园艺学报, 1994, 21(1): 81-86.
Bao M Z, Chen J Y. Studies on the variation and distribution of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21(1): 81-86. (in Chinese)
- [6] 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. 中国南方果树, 2003, 32(3): 45-50.
Cheng Z P. Phylogenetic analysis of *amygdalus*, *prunus*, *armeniaceae*, *mume* and *cerasus* plants based on RAPD markers. *South China Fruit*, 2003, 32(3): 45-50. (in Chinese)
- [7] 刘青林, 陈俊愉. 梅花亲缘关系 RAPD 研究初报. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 81-85.
Liu Q L, Chen J Y. A preliminary research on the relationship of *Prunus mume* cultivars and its close relatives by using RAPD assay.

- Journal of Beijing Forestry University*, 1999, 21: (2) 81-85. (in Chinese)
- [8] Hagen L S, Lambert P, Audergon J M, Khadari B. Genetic relationships between apricot (*Prunus armeniaca* L.) and related species using AFLP markers. *Acta Horticulture*, 2001, 546:205-208.
- [9] 张俊卫, 包满珠, 陈龙清. 梅、桃、李、杏、樱的 RAPD 分析. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 12-15.
- Zhang J W, Bao M Z, Chen L Q. Analysis of *Prunus mume*, *P. persica*, *P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. subhirtella* and *P. lannesiana* by RAPD. *Journal of Beijing Forestry University*, 1998, 20(2): 12-15. (in Chinese)
- [10] 陈俊愉. 中国梅花品种分类最新修正体系. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 1-6.
- Chen J Y. The New revised system of classification for Chinese Mei cultivars. *Journal of Beijing Forestry University*, 1999, 21 (2) : 1-6. (in Chinese)
- [11] 朱晓琴, 马建霞, 姚青菊, 汪诗珊, 王保根. 应用等位酶多态性进行梅花品种鉴别. 江苏林业科技, 1997, 24(3): 13-16.
- Zhu X Q, Ma J X, Yao Q J, Wang S S, Wang B G. Cultivar identification in Mei flower (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) using allozyme polymorphisms. *Journal of Jiangsu Forestry Science of Technology*, 1997, 24(3): 13-16. (in Chinese)
- [12] 康素红, 包满珠, 陈龙清, 黄燕文, 刘晓祥. 梅花品种分类的花粉形态学研究. 园艺学报, 1997, 24(2): 170-174.
- Kang S H, Bao M Z, Chen L Q, Huang Y W, Liu X X. Classification of *Prunus mume* cultivars by pollen morphology. *Acta Horticulturae Sinica*, 1997, 24(2): 170-174. (in Chinese)
- [13] 张永春, 包满珠, 陈龙清, 黄燕文, 刘小祥. 梅花品种资源同工酶多态性分析. 北京林业大学学报, 1999, 21(2): 94-99.
- Zhang Y C, Bao M Z, Chen L Q, Huang Y W, Liu X X. Analysis of isozyme diversities in the cultivar resources of mei flower(*Prunus mume*). *Journal of Beijing Forestry University*, 1999, 21(2): 94-99. (in Chinese)
- [14] 明 军, 张启翔, 毛庆山, 晏小兰. '美人'梅与其近缘种亲缘关系的 AFLP 研究. 园艺学报, 2002, 29 (6): 588-589.
- Ming J, Zhang Q X, Mao Q S, Yan X L. AFLP analysis of genetic relationships *Prunus mume* 'Meiren' and relatives. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29(6): 588-589. (in Chinese)
- [15] Ming J, Zhang Q X, Yan X L, Lan Y P. Genetic relationships among *Prunus mume* var. *pendula* using AFLP markers. *Forestry Studies in China*, 2003, 5(4): 26-30.
- [16] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 413-415.
- Lu G Y, Yang G S, Fu T D. Silver-Stained AFLP-A novel assay for DNA fingerprinting in *Brassica napus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20(5): 413-415. (in Chinese)
- [17] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4 407-4 414.
- [18] Yang C D, Zhang J W, Xu Q, Xiong C F, Bao M Z. Establishment of AFLP technique and assessment of primer combinations for Mei flower. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23(1): 79a-79l.
- [19] Rohrer J R, Ahmad R, Southwick S M, Potter D. Microsatellite analysis of relationships among North American plums (*Prunus* sect. *Prunocerasus*, *Rosaceae*). *Plant Systematics Evolution*, 2004, 244: 69-75.
- [20] Hagen L S, Khadari B, Lambert P, Audergon J-M. Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 298-305.
- [21] Hurtado M A, Westman A, Beck E, Abbott G A, Ll acer G, Badenes M L. Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica*, 2002, 127: 297-301.
- [22] Ricciardi L, Giorgio V, de Giovanni C, Lotti C, Gallotta A and Fanizza G. The genetic diversity of Apulian apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) assessed using AFLP markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2002, 7: 431-436.

(责任编辑 曲来娥)