

## 40 份梨种质资源的 SSR 分析

鲁 敏<sup>1,2</sup>, 汤浩茹<sup>3\*</sup>, 罗 娅<sup>3</sup>, 张 勇<sup>3</sup>, 刘泽静<sup>3</sup>

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省果树工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025;

3. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 为了对梨属植物不同类群的分类提供理论参考, 并为苹果梨与身不知等的归属问题研究提供一定参考, 采用 SSR 标记对 40 份梨种质资源进行分类研究。结果表明, 根据 4 对 SSR 引物对 40 份梨材料的扩增数据, 将早七黄、石宝生和鄂梨 1 号归为砂梨(*P. pyrifolia*)类群, 南宫慈、红长青、鄂梨 2 号和中华玉梨归为白梨(*P. bretschneideri*)类群, 川霞、早酥和身不知归在西洋梨(*P. communis*)类群, 苹果梨归在秋子梨(*P. ussuriensis*)类群。

**关键词:** 梨; 分类; SSR 标记

中图分类号: S661.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)12-0102-04

## Analysis of 40 Pears(*Pyrus*) by SSR Markers

LU Min<sup>1,2</sup>, TANG Hao-ru<sup>3\*</sup>, LUO Ya<sup>3</sup>, ZHANG Yong<sup>3</sup>, LIU Ze-jing<sup>3</sup>

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Engineering Research Center of Fruit Crop, Guiyang 550025, China; 3. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** To provide theoretical references for the taxonomy of *Pyrus* cultivars, 40 pear germplasms were analyzed using SSR markers. Based on the PCR amplification data from four SSR markers, Zaoqihuang, Shibaosheng and Eli 1 were classified into the group of *P. pyrifolia*, Nangongci, Hongchangqing, Eli 2 and Zhonghuayuli were classified into the group of *P. bretschneideri*, Chuanxia, Zaosu and Mishirazi were classified into the group of *P. communis*, and Pingguoli was classified as *P. ussuriensis*.

**Key words:** pear; classification; SSR markers

梨属植物全世界约 30 多个种, 栽培种主要有砂梨(*P. pyrifolia*)、白梨(*P. bretschneideri*)、秋子梨(*P. ussuriensis*)、新疆梨(*P. sikiangensis*)和西洋梨(*P. communis*)等, 因为梨种间形态极为类似, 且种间杂交是梨种进化的重要途径, 所以梨属植物分类显得较为困难。虽然梨属植物分类研究工作从形态学<sup>[1]</sup>、孢粉学<sup>[2-4]</sup>、同工酶<sup>[5-6]</sup>及分子标记<sup>[7-11]</sup>等方面得以广泛开展, 但从材料的选择上来说, 早七黄、石宝生、南宫慈、红长青、川霞等珍贵育种材料的分类尚未见报道。同时, 对于苹果梨、身不知等的分类在学术界仍然存在争议<sup>[12-18]</sup>。SSR (simple sequence repeat) 技术以其特异性强、重复性好和操作简便等优

点, 已在梨属植物分类研究中发挥了巨大作用<sup>[19-26]</sup>。因此, 采用 SSR 标记对 40 份梨种质资源进行分类研究, 以期部分珍贵育种资源的分类提供一定依据, 并为解决苹果梨与身不知的归属问题提供一定参考, 为进一步的梨育种研究提供理论基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试梨材料均采自四川农业大学教学科研园区梨种质资源圃, 共有 40 份, 如表 1 所示。采集健康正常幼叶适量, 分别标号带回四川农业大学园艺植物生物技术实验室, 清洗干燥后放入 -20℃ 冰箱内, 保存待用。

收稿日期: 2013-05-07

作者简介: 鲁 敏(1984-), 女, 四川乐山人, 讲师, 博士, 主要从事果树栽培与生理生态研究。E-mail: 48181266@qq.com

\* 通讯作者: 汤浩茹(1963-), 男, 重庆人, 教授, 博士, 主要从事果树育种与生物技术研究。E-mail: htang@sicau.edu.cn

表 1 供试的梨品种或类型

序号	品种或类型	来源	归属
1	茄梨	美国	西洋梨
2	斯塔克红	茄梨的红色芽变品种	
3	康弗伦斯	英国	
4	巴梨	英国	
5	鲜美	巴梨的枝变品种	
6	日面红	比利时	
7	香水	中国东北	秋子梨
8	安梨	中国北部	
9	金川	中国四川	白梨
10	金花	金川实生后代	
11	崇化	中国四川	
12	庆宁早	中国四川	
13	香早	中国四川	
14	金冠	中国东北	
15	苹果梨 57	中国东北	
16	苹果梨 6-5	中国东北	
17	二十世纪	日本,偶然实生苗	砂梨
18	太白	日本,偶然实生苗	
19	晚三吉	早生三吉实生后代	
20	金珠果	中国河南	
21	苍溪	中国四川	
22	宝珠	中国云南	
23	身不知	日本	种间杂种
24	早酥	苹果梨×身不知	
25	鄂梨 1 号	伏梨×金水酥	
26	鄂梨 2 号	中香×(伏梨×启发)	
27	中华玉梨	大香水×鸭梨	
28	川农宝珠	中国四川	砂梨
29	南宫慈	中国	未知
30	红长青	中国	
31	早七黄	中国	
32	新雪	今村秋×晚三吉	种内杂种
33	川霞	中国	未知
34	石宝生	中国	
35	长寿	旭×君塚早生	种内杂种
36	独逸	日本,偶然实生苗	砂梨
37	君塚早生	新幸藏×独逸	
38	藤梨	日本	
39	日早	中国四川	白梨
40	北新	新世纪×北甘	种内杂种

1.2 方法

1.2.1 DNA 制备 采用 SDS-氯仿-异戊醇法<sup>[27]</sup>提取梨叶片总 DNA,根据其纯度及浓度,按 PCR 反应体系需要稀释至 10 ng/ $\mu$ L。

1.2.2 SSR 分析 选用 4 对已定位在梨遗传连锁图谱上的多态性较高的 SSR 引物<sup>[26,28]</sup>,参见表 2。

PCR 扩增反应在美国百乐公司生产的 PTC-200 基因扩增仪上进行。SSR 反应体系为:20  $\mu$ L 体系中含基因组 DNA 10 ng,引物 1  $\mu$ mol/L,dNTPs 100  $\mu$ mol/L,MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L,1×PCR buffer,Taq 聚合酶 1 U。SSR 扩增程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 7 min;4℃保存。扩增产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测,数码相机拍照保存。

表 2 SSR 引物的序列及扩增长度

引物名称	引物序列	等位基因长度/bp	
		苹果	梨
CH01h01	F gaaagacttgcagtgggagc R ggagtgggtttgagaaggtt	114~134	105~139
CH03d02	F aaactttcactttcacccacg R actacatttttagattgtgcgtc	201~223	188~245
CH04a12	F cagcctgcaactgcacttat R atccatggtcccataaacca	158~196	159~207
CH05d04	F acttgtgagccgtgagaggt R tccgaaggtatgcttcgatt	124~214	172~216

1.3 数据分析

电泳图谱采用 Gelpro32 软件分析,扩增出的每条多态性条带为 1 个等位基因,有带记为 1,无带记为 0。用 NTSYS-pc 2.1 软件对数据进行分析,以 Dice 相似系数采用非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性检测结果

4 对 SSR 引物在 40 份梨材料上共扩增出 115 个等位基因,平均每个 SSR 位点扩增出 28.75 个等位基因,不同引物扩增的等位基因数差异较大,从 21 个(CH01h01)到 36 个(CH04a12)不等;对于每份梨材料,每对引物产生 3 个或 4 个等位基因,有的甚至产生 6 个或 7 个等位基因,如表 3、图 1 所示。

表 3 4 对 SSR 引物检测梨材料的等位基因数 个

引物名称	砂梨	白梨	秋子梨	西洋梨	总计
CH01h01	8	5	3	5	21
CH03d02	7	7	4	8	26
CH04a12	11	10	4	11	36
CH05d04	10	8	5	9	32
总计	36	30	16	33	115



M, Marker; 1—40 为 40 份梨材料的序号

图 1 引物 CH05d04 对 40 份梨材料扩增电泳结果

## 2.2 聚类分析结果

根据 4 对 SSR 引物对 40 份梨属植物种质资源的扩增数据,以 Dice 相似系数采用 UPGMA 聚类,得到的梨系统关系树如图 2 所示。40 份梨属植物种质资源的相似系数在 0.27~0.95,根据系统树可以划分为 4 个组。

第 1 组以砂梨类群为主,包括二十世纪、北新、独逸、藤梨、金珠果、太白、晚三吉、新雪、宝珠、川农宝珠、鄂梨 1 号、长寿、君塚早生、早七黄和石宝生,共 15 个品种或类型。没有分类信息的早七黄和石宝生归在这一类。种间杂种鄂梨 1 号也归在这一类。

第 2 组以白梨类群为主,包括金川、苍溪、南宫慈、金花、崇化、香早、庆宁早、日早、鄂梨 2 号、中华玉梨、红长青,共 11 个品种或类型。没有分类信息的南宫慈和红长青归在这一类。种间杂种鄂梨 2 号和中华玉梨也归在这一类。

第 3 组以秋子梨类群为主,包括苹果梨 6-5、苹果梨 57、香水和安梨 4 个品种或类型。

第 4 组以西洋梨类群为主,包括早酥、身不知、茄梨、斯塔克红、川霞、金冠、鲜美、巴梨、康弗仑斯、日面红,共 10 个品种或类型。没有分类信息的川霞归在这一类。种间杂种早酥和身不知也归在这一类。被认为是白梨品种的金冠也归在这一类。

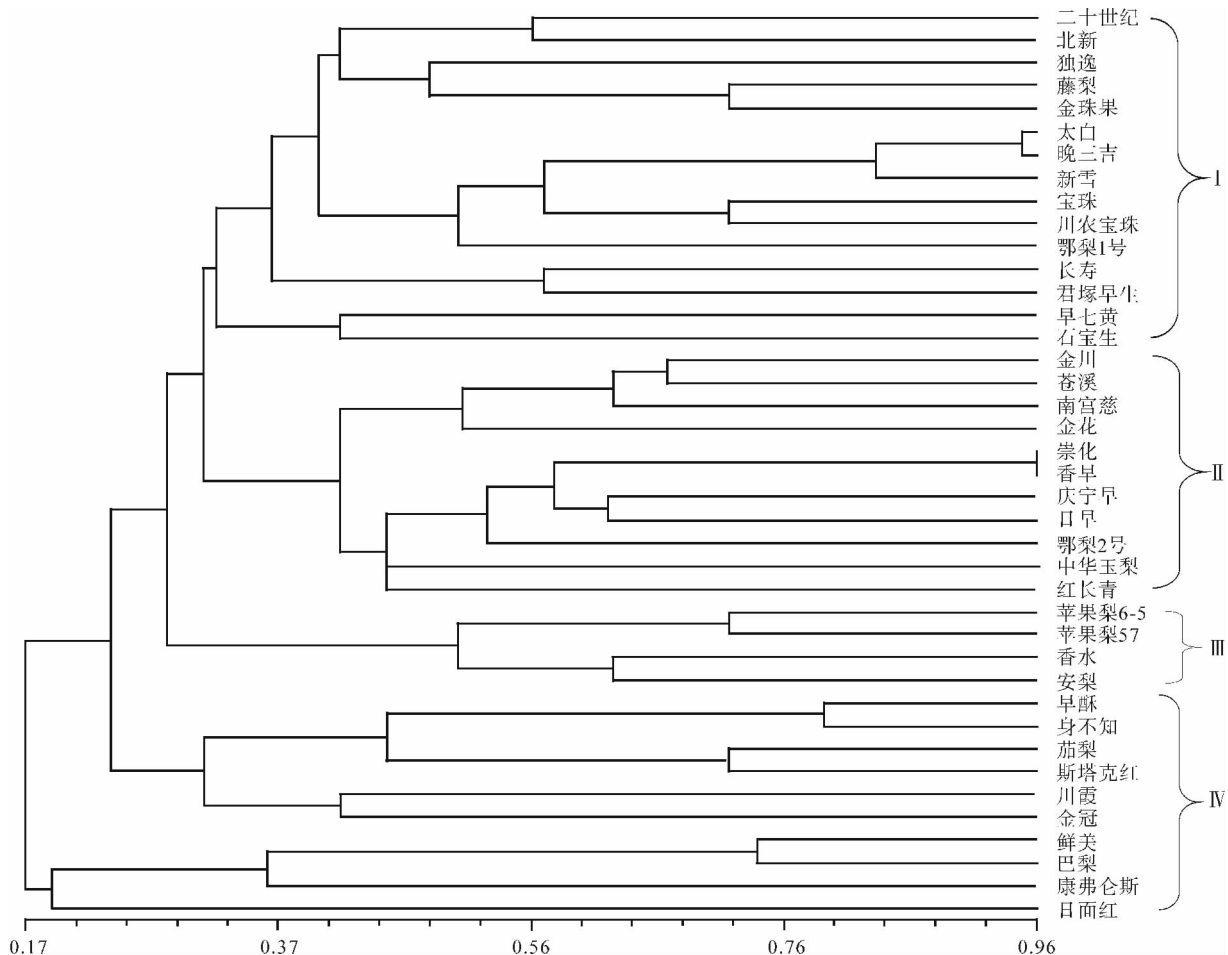


图 2 40 份梨材料聚类分析结果

### 3 讨论

从形态学上,苹果梨具有砂梨的某些特征,因而将其归为砂梨系统。后来,吴耕民<sup>[12]</sup>和蒲富慎<sup>[13]</sup>又将其归为白梨系统。辛培刚等<sup>[6]</sup>利用过氧化物同工酶进行亲缘关系研究,认为苹果梨的杂交后代锦丰与白梨系统的鸭梨关系密切。曲柏宏等<sup>[14]</sup>、杨林先等<sup>[17]</sup>采用孢粉学及 RAPD 技术也将苹果梨归入白梨系统。而邹乐敏等<sup>[2]</sup>对苹果梨的花粉研究表明,苹果梨花粉形态既不同于白梨也不同于砂梨,故从花粉学不能对其起源作出定论。Teng 等<sup>[9]</sup>用 RAPD 标记研究表明,苹果梨等原产朝鲜半岛的品种具有不同于白梨、砂梨、秋子梨等独特的 RAPD 谱带,在系统树中形成独特的类群,建议将苹果梨和其他原产于朝鲜半岛的与苹果梨相近的品种暂时统称为朝鲜梨。马兵钢等<sup>[15-16]</sup>的同工酶及 RAPD 数据则表明苹果梨与秋子梨距离最近,本试验研究结果与之一致。关于苹果梨的分类问题仍需进一步研究。

身不知从形态学上被分类为西洋梨,而曹丽等<sup>[18]</sup>采用 POD 同工酶标记却将其归为砂梨,本研究认为身不知更接近于西洋梨系统。早酥是苹果梨与身不知的杂交种,本试验中其与父本身不知聚为一类,归为西洋梨,与马兵钢等<sup>[15]</sup>研究结果一致。

#### 参考文献:

- [1] 江先甫,初庆刚,张长胜. 中国梨属植物的分类和演化[J]. 莱阳农学院学报,1992,9(1):18-21.
- [2] 邹乐敏,张西民,张志德,等. 根据花粉形态探讨梨属植物的亲缘关系[J]. 园艺学报,1986,13(4):119-223.
- [3] 黄礼森,李树玲,傅仓生,等. 中国梨属植物花粉形态的比较观察[J]. 园艺学报,1993,20(1):19-24.
- [4] 李秀根,杨健. 花粉形态数量化分析在中国梨属植物起源、演化和分类中的应用[J]. 果树学报,2002,19(3):145-148.
- [5] 林伯年,沈德绪. 利用过氧化物同工酶谱分析梨属植物种质特性及亲缘关系[J]. 浙江大学学报,1981,9(3):235-243.
- [6] 辛培刚,王存喜,公庆党,等. 梨树过氧化物同工酶分析及亲缘关系探讨[J]. 果树科学,1989,6(3):153-158.
- [7] 曲柏宏,金春兰,陈艳秋,等. 梨属种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2001,28(5):460-462.
- [8] 贾彦利,田义轲,王彩虹,等. 梨品种资源遗传差异的 RAPD 分析[J]. 果树学报,2007,24(4):525-528.
- [9] Teng Y W, Tanabe K, Tamura F, et al. Genetic relationships of pear cultivars in Xinjiang, China as measured by RAPD markers[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2001, 76: 771-779.
- [10] Lin S, Fang C, Song W, et al. AFLP molecular markers of 10 species of *Pyrus* in China[J]. Acta Horticul-

turae, 2002, 587: 233-236.

- [11] 沈玉英,滕元文,田边贤二. 部分中国砂梨和日本梨的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2006,33(3):621-624.
- [12] 吴耕民. 中国温带果树分类学[M]. 北京:农业出版社,1984:33-80.
- [13] 蒲富慎. 梨种质资源及其研究[J]. 中国果树,1988(2):42-46.
- [14] 曲柏宏,金兰香,陈艳秋,等. 利用 RAPD 技术探讨延边苹果梨的分类地位[J]. 延边大学农学学报,2002,24(3):155-158.
- [15] 马兵钢,牛建新,冯建荣,等. 同工酶在梨属系统发育分析中的应用[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2003,7(2):119-123.
- [16] 马兵钢,牛建新,吴忠华,等. 新疆主要梨品种亲缘关系的分子标记分析[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2004,22(2):97-102.
- [17] 杨林先,李伟,严花淑,等. 部分梨品种花粉形态观察[J]. 河南农业科学,2010(3):78-82.
- [18] 曹丽,曲柏宏. 应用 POD 同工酶技术研究梨品种的分类地位[J]. 湖北农业科学,2006,45(1):89-91.
- [19] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 865-870.
- [20] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear[J]. Euphytica, 2002, 124: 129-137.
- [21] Kimura T, Shi Y Z, Shoda M, et al. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis[J]. Breeding Science, 2002, 52: 115-121.
- [22] Ghosh A K, Lukens L N, Hunter D M, et al. European and Asian pears: Simple sequence repeat-polyacrylamide gel electrophoresis-based analysis of commercially important North American cultivars[J]. Hort Science, 2006, 41(2):304-309.
- [23] Bao L, Chen K S, Zhang D, et al. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54(5):959-971.
- [24] 曹玉芬,刘凤之,高原,等. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性[J]. 园艺学报,2007,34(2):305-310.
- [25] 范太伟,蔡丹英,李红旭,等. 甘肃中部梨资源遗传变异和亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报,2007,24(3):268-275.
- [26] 鲁敏,汤浩茹,罗娅,等. 日本‘二十世纪’梨及其近缘品种的 SSR 分析[J]. 中国南方果树,2012,41(6):1-4.
- [27] 马兵钢,赵宗胜,冯建荣,等. 梨属 DNA 提纯方法的比较研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2000,4(4):277-281.
- [28] Lu M, Tang H R, Chen X Y, et al. Comparative genome mapping between apple and pear by apple mapped SSR markers[J]. American-Eurasian J Agric & Environ Sci, 2010, 9(3):303-309.