园 艺 学 报 2010，37（8）：1325－1328
Acta Horticulturae Sinica

梨果实褐皮性状的 SSR 标记

宋 伟，王彩虹*，田义轲，田 伟，殷 豪
（青岛农业大学园艺学院，山东青岛 266109）

摘 要：以梨品种‘黄金’（*Pyrus pyrifolia* Nakai‘Whangkeumbae’）与‘砀山酥’（*Pyrus bretschneideri* Rehd.‘Dangshansu’）的 F_1 代杂交分离群体为试材，用分离群体分组分析法（Bulked Segregant Analysis，BSA）对果实褐皮性状进行了 SSR 分子标记研究。通过对源自梨和苹果基因组的 281 对 SSR 引物的筛选，获得了与梨果实褐皮性状相连锁的 SSR 标记 CH01c06 和 Hi20b03，遗传连锁距离分别为 4.8 cM 和 12.0 cM，据此，将控制该性状的基因定位在梨公共遗传图谱的 LG8 上。

关键词：梨；褐皮性状；SSR 标记；基因定位
中图分类号：S 661.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0513-353X（2010）08-1325-04

SSR Molecular Markers Linked to the Fruit Russet Skin of Pear

SONG Wei，WANG Cai-hong*，TIAN Yi-ke，TIAN Wei，and YIN Hao
（*College of Horticulture*，*Qingdao Agricultural University*，*Qingdao*，*Shandong* 266109，*China*）

Abstract：With the progenies produced from the cross *Pyrus pyrifolia* Nakai ‘Whangkeumbae’× *Pyrus bretschneideri* Rehd.‘Dangshansu’，the method of bulked segregant analysis （BSA） was used to identify molecular markers linked to the trait of fruit russet skin in pear. Two hundred and eighty one pairs of SSR primers derived from pear and apple genome were screened. Two SSR markers，CH01c06 and Hi20b03，which linked to russet skin of fruit at a distance of 4.8 cM and 12.0 cM，respectively，were obtained. This suggests that the gene which determines fruit russet skin be located on LG8 of the pear consensus genetic map.

Key words：pear；russet skin；SSR marker；gene localization

关于梨果皮褐色的遗传机理，王宇霖等（1991）曾指出，黄绿色对褐色为显性，在黄绿色品种‘早酥’（*Pyrus bretschneideri* Rehd.‘Zaosu’）与褐皮品种‘幸水’（*Pyrus pyrifolia* Nakai‘Kosui’）杂交的后代中，黄绿色果占 71.4%。而沈德绪等（1979）则认为褐色对绿色表现显性，且呈质量性状遗传，控制皮色的基因在两对以上。Kim 等（2005）以‘新高’×‘秋子梨’（*Pyrus pyrifolia* Nakai ‘Niitaka’ × *Pyrus ussuriensis* Maxim.）种间杂交 F_1 代群体为试材，研究认为其杂交后代群体果皮颜色表现为正态分布。可见，梨果皮色泽的遗传较为复杂，不同研究之间尚存争议。

SSR 作为一种共显性的分子标记，已受到广泛关注。筛选与果皮褐色性状相关的 SSR 分子标记，不仅可用作梨育种中早期辅助选择的手段，而且还可以实现相关基因在遗传连锁图谱上的定位，这

收稿日期：2010－03－16；**修回日期**：2010－06－23
基金项目：国家‘863’计划项目（2006AA100108-3-5）；山东省良种工程项目
* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：chwang@qau.edu.cn）

对进一步开展有关基因的区域作图等具有重要意义。

1 材料与方法

试验于 2007 年 7 月至 2009 年 9 月在青岛农业大学果树育种实验室进行。以梨品种‘黄金’与‘砀山酥’的 6 年生 F_1 代杂交分离群体为试材，取自青岛农业大学莱阳果树实验站。用于性状遗传统计学分析的单株为 194 株。由于部分植株死亡或被间伐等原因，最终用于标记筛选的单株为 121 株（果实褐皮的 19 株，非褐皮的 102 株）。田间观察结果植株，对果实皮色性状的分离情况进行记录。

以萌动的幼芽为试材，采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA（田义轲 等，2003）。

根据分离群体分组分析法（BSA 法）将试材分为褐皮/非褐皮两组，从两组样品中各随机选出 10 份，将其 DNA 等量混合，组成褐皮/非褐皮对比基因池。

在对比基因池间，对 24 对来自梨（Yamamato et al.，2002a，2002b，2002c）和 257 对来自苹果（Liebhard et al.，2002；Silfverberg-Dilworth et al.，2006）基因组的 SSR 引物对进行筛选，将出现多态性的引物进一步在杂交后代分离群体上进行分析。

SSR 引物由上海生工合成。PCR 扩增采用 25 μL 反应体系 模板 DNA 50 ng，$MgCl_2$ 2.5 mmol · L^{-1}，$dNTP_S$ 0.2 mmol · L^{-1}，正反向引物各 0.2 μmol · L^{-1}，*Taq* 酶 1.2 U。PCR 反应在 MJ Research PTC-200 PCR 扩增仪上进行。扩增产物用 3.5%琼脂糖凝胶电泳检测，EB 染色后于凝胶成像系统中观察拍照。

计算标记与目标性状的重组率，根据 Kosambi 函数估算遗传距离，用 Joinmap 4.0 软件分析所获得的标记及目标基因间的连锁关系。

2 结果与分析

2.1 梨果实褐皮/非褐皮性状的遗传分析

194 个结果株中褐皮果个体 26 株，非褐皮果个体 168 株，估测分离比例为 1 : 7，$\chi^2 = 0.144$。由此推测，梨果皮褐色/非褐色性状在此杂交后代群体中的分离是由两对独立分配基因的遗传差异造成的，褐皮性状可能受控于两对纯合隐性基因。

2.2 梨果实褐皮/非褐皮性状的 SSR 标记与定位

通过对 281 对分别源自苹果和梨基因组的 SSR 引物的 BSA 筛选与群体分析表明，引物对 CH01c06 和 Hi20b03 可以扩增出与梨果实褐皮/非褐皮性状相连锁的多态性片段。其中 CH01c06 的多态性片段为 180 bp 左右（图 1），出现在非褐皮性状个体上，而在褐皮性状个体上则表现为缺失。在所分析的 121 个单株中有 6 株表现为标记与性状的重组，即重组率为 4.96%。而 Hi20b03 的多态性片段为 230 bp 左右（图 2），也是出现在非褐皮个体上，而褐皮性状个体上表现为缺失。在所分析的 121 个单株中有 16 株表现为标记与性状的重组，即重组率为 13.22%。

在 Liebhard 等（2003）发表的苹果遗传连锁图谱中，CH01c06 被定位在苹果品种‘Fiesta’和‘Discovery’的第 8 连锁群上，Silfverberg-Dilwort 等（2006）又将 Hi20b03 定位在苹果品种‘Fiesta’的第 8 连锁群上。由于 Yamamoto 等（2004）建立了苹果与梨的公共图谱连锁群间的对应关系，其中，在苹果图谱 LG8 上与 CH01c06 连锁的标记 CH01h10 被定为到了梨品种‘Housui’（‘丰水’）的第 8 连锁群上。

因此推测，控制梨果皮褐色性状的基因也应位于梨遗传图谱的第 8 连锁群上。这里，被标记和定位的基因应是两对基因其中之一（暂将其命名为 R_1/r_1）。

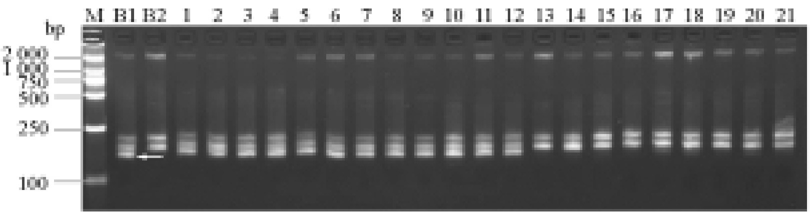

图 1　引物 CH01c06 在对比基因池及 F_1 杂交后代部分个体上的扩增结果

M. DL2000 marker；B1. 非褐皮基因池；B2. 褐皮基因池；1 ~ 12. 非褐皮个体；13 ~ 21. 褐皮个体。箭头所指为标记片段。

Fig. 1　The amplification results of primer CH01c06 in contrast gene bulks and several F_1 individuals

M. DL2000 marker；B1. Non-russet skin bulk；B2. Russet skin bulk；1 – 12. Non- russet skin individuals；13 – 21. Russet skin individuals. The arrow indicates polymorphic fragment.

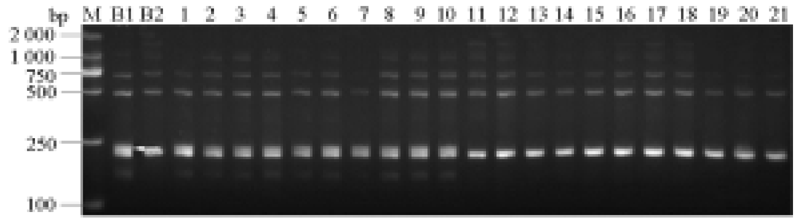

图 2　引物 Hi20b03 在对比基因池及 F_1 杂交后代部分个体上的扩增结果

M. DL2000 marker；B1. 非褐皮基因池；B2. 褐皮基因池；1 ~ 10. 非褐皮个体；11 ~ 21. 褐皮个体。箭头所指为标记片段。

Fig. 2　The amplification result of primer Hi20b03 in contrast gene bulks and several F_1 individuals

M. DL2000 marker；B1. Non-russet skin bulk；B2. Russet skin bulk；1 – 10. Non-russet skin individuals；11 – 21. Russet skin individuals. The arrow indicates polymorphic fragment.

2.3　遗传连锁分析

用 Joinmap 4.0 软件分析表明标记与目标性状间存在连锁关系（图 3）。CH01c06 和 Hi20b03 分别位于 R_1 基因的两侧位置，与 R_1 基因的遗传连锁距离分别为 4.8 cM 和 12.0 cM。由于 CH01c06 与目标基因 R_1 间的遗传距离在 5 cM 以内，应属于一种紧密连锁关系，因此，该标记可以作为标记辅助选择的工具在育种实践中加以应用。

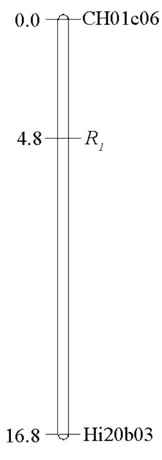

图 3　CH01c06、Hi20b03 及梨 R_1 基因间的连锁关系图

Fig. 3　Genetic linkage relationship of CH01c06, Hi20b03 and R_1 gene in pear

3　讨论

菊池秋雄等认为日本梨的皮色表现是由 *R* 和 *H* 两对基因互作的结果（沈德绪，1992）。梨果皮的基色呈绿色，有些品种因为在果皮上形成木栓层而呈褐色。木栓层的形成受 *R* 基因控制，而 *H* 基因则能抑制木栓层的形成。因此，绿色品种的基因型为 *rrHH*、*rrHh* 或 *rrhh*，褐色品种的基因型为 *RrHH*、*RrHh*、*Rrhh* 及 *RRHH*、*RRHh*、*RRhh*。根据这一说法，绿色品种间相互杂交是不可能出现褐色类型的。但是，根据浙江农业大学资料，当用绿色品种‘八云’分别与绿色品种‘哀家’、‘杭青’或‘杭红’杂交时，后代都出现 1/3 以上的褐色个体（沈德绪，1992）。另外，

本研究中所用的杂交组合双亲也均为非褐色品种，结果杂交后代中也出现了约为 1/8 的褐色个体。所以梨果皮的褐色性状在遗传上较为复杂，直至目前，此问题仍未有较好的答案。

本研究中，通过田间杂交试验，对‘黄金’与‘砀山酥’的 6 年生 F_1 杂交后代群体性状分离进行了统计学分析，初步认为梨果实褐皮性状是由两对独立分配的隐性基因控制。在王宇霖等（1991）的研究中也曾指出果皮黄绿色对褐色为显性，在‘早酥’（非褐皮）与‘幸水’（褐皮）154 株杂交后代中，褐皮 32 株，非褐皮 122 株。进行符合性测验，发现其杂交后代分离符合 1 : 3 的分离比例（χ^2 = 1.463）。这也与褐皮性状是由两对纯合隐性基因控制的推测相符，即‘早酥’的基因型为 $R_1r_1R_2r_2$，‘幸水’的基因型为 $r_1r_1r_2r_2$。

由于本研究中的两个亲本均为非褐皮品种，目前还很难确定各自的基因型，但可以推测亲本之一的基因型应是双位点杂合型，即：$R_1r_1R_2r_2$,；而另一亲本应具有一个隐性纯合位点，即：$R_1r_1r_2r_2$ 或 $r_1r_1R_2r_2$。由于缺乏现有的可供目标性状遗传分析的其它杂交分离群体，因此，这一问题目前还无法确定。

References

Kim D，Hwang J H，Shin Y U，Shin I S，Lee H J，Hong S S，Kang S J. 2005. Development of molecular markers linked to several fruit traits in orental pear. Acta Hort，671：315－321.

Liebhard R，Gianfranceschi L，Koller B，Ryder C D，Tarchini R，van de Weg E，Gessler C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple（*Malus* × *domestica* Borkh.）. Molecular Breeding，10：217－241.

Liebhard R，Koller B，Gianfranceschi L，Gessler C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple（*Malus* × *domestica* Borkh.）genome. Theor Appl Genet，106：1497－1508.

Shen De-xu. 1992. Fruit tree thremmatology. Beijing：China Agriculture Press：261－262. (in Chinese)

沈德绪. 1992. 果树育种学. 北京：中国农业出版社：261－262.

Shen De-xu，Li Zai-long，Zheng Shu-qun. 1979. Inheritance of pear fruit appearance. Acta Agriculturae Universities Zhejiangesis，5 (1)：83－94. (in Chinese)

沈德绪，李载龙，郑淑群．1979．梨果实外观性状的遗传．浙江农业大学学报，5 (1)：83－94.

Silfverberg-Dilworth E，Matasci C L，van de Weg W E，van Kaauwen M P W，Walser M，Kodde L P，Soglio V，Gianfranceschi L，Durel C E，Costa F，Yamamoto T，Koller B，Gessler C，Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple（*Malus* × *domestica* Borkh.）genome. Tree Genetics & Genomes，2：202－224.

Tian Yi-ke，Wang Cai-hong，Zhang Ji-shu，Dai Hong-yi，Chu Qing-gang. 2003. A RAPD marker of apple columnar gene（*Co*）. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，23 (12)：2176－2179. (in Chinese)

田义轲，王彩虹，张继澍，戴洪义，初庆刚. 2003. 一个与苹果柱型基因（*Co*）连锁的RAPD标记．西北植物学报，23 (12)：2176－2179.

Wang Yu-lin，Wei Wen-dong，Li Xiu-gen. 1991. Studies of the trends of inheritance of commercial characteristics of crossed Chinese pear in their progenies. Journal of Fruit Science，8 (2)：75－82. (in Chinese)

王宇霖，魏闻东，李秀根．1991. 梨杂种后代亲本性状遗传倾向研究．果树科学，8 (2)：75－82.

Yamamoto T，Kimura T，Saito T，Kotobuki K，Matsuta N，Liebhard R，Gessler C，van de Weg W E，Hayashi T. 2004. Genetic linkage maps of Japanese and European pear aligned to the apple consensus map. Acta Horticulturae，663 (1)：51－56.

Yamamato T，Kimura T，Sawamura Y，Manabe T，Kotobuki K，Hayashi T，Ban Y，Matsuta N. 2002a. Simple sequence repeats or genetic analysis in pear. Euphytica，124：129－137.

Yamamato T，Kimura T，Shoda M，Ben Y，Hayashi T，Matsuta N. 2002b. Development of microsatellite markers in the Japanese pear（*Pyrus pyrifolia* Nakai）. Molecular Ecology Notes，2：14－16.

Yamamoto T，Kimura T，Shoda M，Imai T，Saito T，Sawamura Y，Kotobuki K，Hayashi T，Matsuta N. 2002c. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. Theor Appl Genet，106：9－18.