

梨属种质资源的 RAPD 分析

曲柏宏¹ 金香兰¹ 陈艳秋¹ 刘洪章² 王丕武²

(¹ 延边大学农学院园艺系, 龙井 133400; ² 吉林农业大学生物技术学院, 长春 130000)

摘 要: 对梨属 40 个品种及类型进行了 RAPD 扩增, 根据相似系数进行 UPGMA 法聚类, 将起源于欧洲的西洋梨与起源于中国的 3 个种明显区分开, 起源于中国的 3 个种虽未完全各自聚类, 但各材料间都有不同的遗传距离, 证明 RAPD 技术可作为梨种质分类鉴定的依据。

关键词: 梨属; RAPD; 品种鉴定; 亲缘关系

中图分类号: S 661.2; Q 75 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 05-0460-03

1 目的、材料与方法

对梨属种质资源进行 RAPD 分析, 旨在提供其亲缘关系及分类方面新的分子证据。试材取自中国农业科学院果树研究所国家种质资源梨圃和吉林省延边地区 (表 1)。

表 1 供试的梨品种
Table 1 Pear cultivars used in this study

编号和品种 No. and Cultivars	来源 Origin	编号和品种 No. and Cultivars	来源 Origin
1 谢花甜 Xiehuatian	延边 Yanbian	22 苹果梨 Pingguoli	不详 Unknown
2 花盖梨 Huagaili	延边 Yanbian	23 东宁五号大梨	苹果梨芽变
		Dongning No. 5 dali	Sport of Pingguoli
3 南果梨 Nanguoli	辽宁 Liaoning	24 夏嘎 Xiaga	苹果梨芽变 Sport of Pingguoli
4 冻秋子梨 Dongqiuizi	延边 Yanbian	25 苹博香 Pingboxiang	苹果梨 ×博多青 Pingguoli ×Boduqing
5 延边尖把梨 Yanbian jianbali	延边 Yanbian	26 锦丰 Jinfeng	苹果梨 ×荏梨 Pingguoli ×Chili
6 延边大香水 Yanbian daxiangshui	延边 Yanbian	27 杂交种 Hybrid	苹果梨 ×巴梨 Pingguoli ×Bartlett
7 延边小香水 Yanbian xiaoxiangshui	延边 Yanbian	28 像苹果梨 Xiangpingguoli	不详 Unknown
8 鸭梨 Yali	河北 Hebei	29 早香 2 号 Zaoxiang No. 2	香水梨 ×二十世纪
9 砀山酥梨 Dangshan suli	安徽 Anhui		Xiangshuili ×Ershishiji
10 栖霞大香水 Qixiada xiangshui	山东 Shandong	30 桔蜜 Jumi	京白梨 ×秋白梨 Jingbaili ×Qiubaili
11 荏梨 Chili	山东 Shandong	31 五九香 Wujiuxiang	鸭梨 ×巴梨 Yali ×Bartlett
12 黄县长把梨 Huangxian changbali	山东 Shandong	32 柠檬黄 Ningmenghuang	不详 Unknown
13 金花 4 号 Jinhua No. 4	金花芽变 Sport of Jinhua	33 锦香 Jinxiang	南果梨 ×巴梨 Nanguoli ×Bartlett
14 明月梨 Mingyueli	延边 Yanbian	34 身不知 Shenbuzhi	不详 Unknown
15 黄花梨 Huanghuali	浙江 Zhejiang	35 1275	乔马 ×锦丰 Qiaoma ×Jinfeng
16 长十郎 Changshilang	日本 Japan	36 1131	龙香梨 ×155 Longxiangli ×155
17 长寿梨 Changshouli	日本 Japan	37 2-23	早酥梨 ×早白梨 Zaosuli ×Zaobaili
18 新星 Xinxing	日本 Japan	38 2-55	早酥梨 ×八方梨 Zaosuli ×Bafangli
19 茄梨 Clapps Favorite	欧洲 Europe	39 甜梨 Tianli	韩国 Korea
20 巴梨 Bartlett	欧洲 Europe	40 瓢梨 Piaoli	朝鲜 Korea-North
21 日面红 Flemish Beauty	欧洲 Europe		

于 7 月中旬采取新梢上成熟叶片, 提取总 DNA^[1]。PCR 扩增引物购自美国 Opron 公司 (10 bp), Taq 酶、dNTPs 均购自北京鼎国生物技术中心。PCR 扩增反应液总体积为 25 μL, 其中含 Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L、KCl 50 mmol/L、MgCl₂ 2.0 mmol/L、Dntp 0.2 mmol/

收稿日期: 2001 - 05 - 29; 修回日期: 2001 - 07 - 25
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960049)

L、模板 DNA 10 ng、引物 8 pmol、Tag 酶 1.0 U，其余用 ddH₂O 填充。扩增反应在 UNO Biometra 扩增仪（德国产）上进行。反应程序为：94 120 s，94 60 s，37 75 s，72 120 s，循环 40 次，72 下延伸 10 min。扩增产物在 1.4 % 琼脂糖凝胶上电泳（恒压 100 V，1.5 h），溴化乙锭染色，紫外透射反射仪上观察并拍照。以 2 次重复出现的扩增带作为统计对象，有电泳带记为 1，无电泳带记为 0。作 0，1 矩阵图，计算每两份样品间的相似系数，利用 NTSYS-pc 软件的 UPGMA 方法构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 DNA 扩增结果 从 100 个随机引物中筛选出 12 个引物，对供试的 40 份试材进行 RAPD 分析，共在 146 个位点上扩增出条带，平均每个引物扩增位点 12.2 个，多态性位点 141 个，占总带数的 96.6 %（表 2）。12 个引物对 40 个梨品种的区分率达 83.3 % ~ 100 %。扩增出 DNA 带的大小在 450 ~ 4000 bp 之间。引物 OPH09 扩增的 RAPD 产物图谱如图 1。

表 2 12 个 RAPD 引物在 40 个梨品种上的扩增
Table 2 RAPD amplifications with 12 primers on 40 cultivars of pear

引物 Primers	序列 (5' - 3') Sequence	扩增带数 (多态带数) Total ampli- fied bands (Po- lymorphic bands)	多态带百分 率 Percent- tage of por- lymorphic bands (%)	引物 Prime	序列 (5' - 3') Sequence	扩增带数 (多态带数) Total ampli- fied bands (Po- lymorphic bands)	多态带百分 率 Percent- tage of poly- morphic bar- nds (%)
OPA-08	GTGACGTAGG	9 (9)	100	OPH-18	GAATCGCCCA	12 (10)	83.3
OPA-10	GTGATCGCAG	15 (15)	100	OPG-01	CTACGGAGGA	15 (15)	100
OPA-12	TCGCCGATAG	12 (12)	100	OPG-09	CTGACGTCAC	9 (9)	100
OPA-18	AGGTGACCGT	12 (11)	91.7	OPG-14	GGATGAGACC	12 (12)	100
OPB-01	TTTCGCTCCC	13 (12)	92.3	OPF-16	TCTCCGCCCT	14 (14)	100
OPH-09	TGTAGCTGGG	10 (10)	100	OPF-18	TGCCCAGCCT	13 (12)	92.3

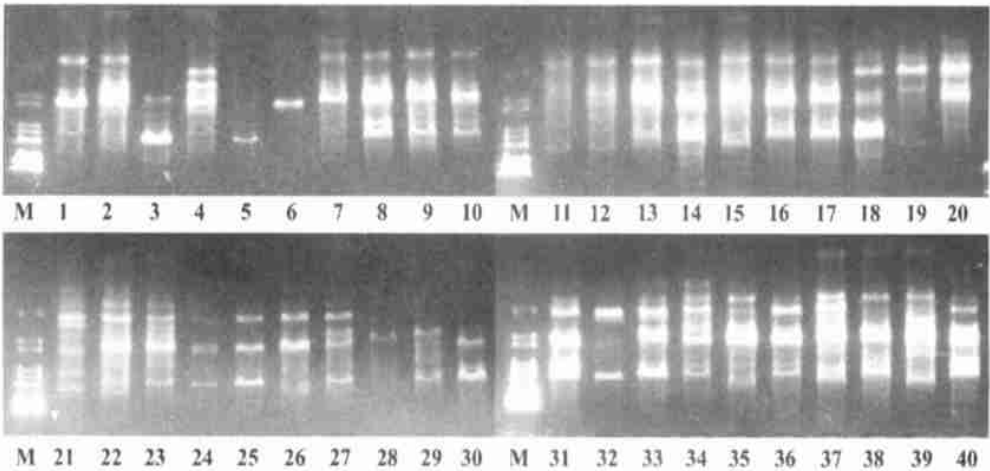


图 1 引物 OPH09 对 40 个梨品种和类型的扩增图谱
Fig. 1 The amplification map of OPH09 on 40 cultivars

2.2 聚类结果 如图 2 所示，在 0.585 阈值下可将 40 个品种及类型划分为 7 类。第 1 类包括 15、16、13、17、11、12、14、1 号，主要由砂梨系统和白梨系统的部分品种组成。第 2 类包括 19、20、21、18 号，主要是西洋梨品种。第 3 类包括 2、3、5、6、4 号，主要是秋子梨系统品种。第 4 类包括 9、10、8、7 号，主要是白梨系统品种。第 5 类包括 22、

23、24、25、26、27 号, 主要由苹果梨及其芽变和杂交品种组成。第 6 类包括 32、33、31、40、35、36、34、37、38 号, 主要由种间杂种和来源不详品种组成。第 7 类由 28、29、30 号组成。

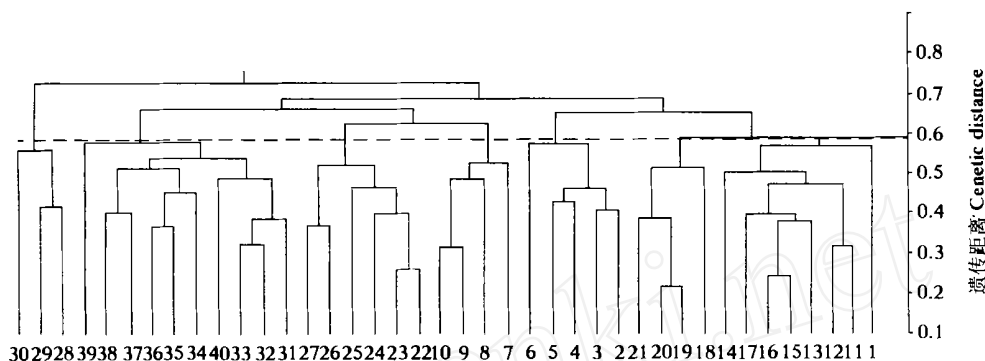


图 2 40 个梨品种和类型的 RAPD 聚类分析树状图
Fig. 2 Tree diagram of 40 cultivars based on RAPD markers

白梨系统中的茺梨、黄县长把梨、金花 4 号与砂梨系统的品种聚在一起, 表明白梨与砂梨的亲缘关系较近。这与黄礼森等^[2]、林伯年等^[3]的研究结果一致。俞德浚^[4]认为白梨与秋子梨和砂梨的形态特征、生物学特性等差异较大, 应作为一个独立的种。杨槐俊^[5]研究证明白梨、砂梨、秋子梨和洋梨的花粉粒大小和孔穴特征各不相同。本试验中白梨系统的砀山酥梨、栖霞大香水、鸭梨和秋子梨系统的花盖梨、南果梨、冻秋子梨、延边尖把梨、延边大香水各自独立聚类, 表明它们可作为白梨、秋子梨的代表品种。苹果梨与白梨系统的代表品种首先聚类在一起, 证明苹果梨应归属于白梨系统。

参考文献:

- 1 王丙旭. RAPD 在梨种质资源亲缘关系和品种鉴定中的应用: [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学, 1998. 1~9
- 2 黄礼森, 李树玲, 傅全生, 等. 中国梨属植物花粉形态的比较观察. 园艺学报, 1993, 20 (1): 17~22
- 3 林伯年, 沈德绪. 利用过氧化物酶同工酶分析梨属种质特性及亲缘关系. 浙江农业大学学报, 1983, 9 (3): 235~242
- 4 俞德浚. 中国果树分类学. 北京: 农业出版社, 1979. 122~146
- 5 杨槐俊. 孢粉学在部分梨属植物分类研究中的应用. 果树科学, 1985, 2 (3): 2~9

RAPD Analysis of Germplasm Resources in *Pyrus*

Qu Baihong¹, Jin Xianglan¹, Chen Yanqiu¹, Liu Hongzhang², and Wang Piwu²

(¹Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400; ²Department of Biology Technique, Jilin Agricultural university, Changchun 130000)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was done on 40 *Pyrus* cultivars. Based on the similar coefficient, the clustering analysis was done. The results showed that *Pyrus communis* L. originated in Europe could be distinctly distinguished from the other three species originated in China by RAPD technique. Three Chinese species were not clustered into different groups respectively, but there were different distance between any two accessions. It showed that RAPD technique could be used in the classification and identification of *Pyrus* of species.

Key words: *Pyrus*; RAPD; Cultivar identification; Phylogenetic relationship