

利用 SSR 结合表型性状构建寒地梨资源核心种质

卜海东¹, 张冰冰^{2,*}, 宋洪伟², 梁英海², 刘延杰¹, 程显敏¹, 顾广军¹, 刘畅¹

(¹ 黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 黑龙江牡丹江 157041; ² 吉林省农业科学院果树研究所, 长春 130033)

摘要: 遵照核心种质构建的原则, 采用 SSR 分子标记手段, 对 201 份砂梨、白梨、秋子梨和西洋梨资源进行分子标记核心种质构建研究, 最终确定核心种质 36 份。其中包括秋子梨 26 份, 占秋子梨原种质的 16.9%; 白梨 5 份, 占白梨原种质的 50%; 砂梨 4 份, 占砂梨原种质的 21.1%; 西洋梨 1 份, 占西洋梨原种质的 11.1%。

关键词: 梨; 资源; 寒地; SSR; 核心种质

中图分类号: S 661.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 11-2113-11

Construction Core Collections of Pear Germplasms in Cold Region by SSR and Phenotypic Traits

BU Hai-dong¹, ZHANG Bing-bing^{2,*}, SONG Hong-wei², LIANG Ying-hai², LIU Yan-jie¹, CHENG Xian-min¹, GU Guang-jun¹, and LIU Chang¹

(¹ Mudanjiang Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041, China; ² Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Two hundred and one *Pyrus pyrifolia* (Burm.) germplasms [involved Nakai (*P. serotina* Rehd.) *P. bretschneideri* Rehd., *P. ussuriensis* Maxim. and *Pyrus communis* L.] were further analyzed by the method of SSR, and 36 pear resources of them were determined as the core collection of cold region in this study: Included 26 kinds of *P. ussuriensis* Maxim., which accounted for 16.9% of the original germplasms of *P. ussuriensis* Maxim., 5 of *P. bretschneideri* Rehd., which accounted for 50% of the original germplasms of *P. bretschneideri* Rehd., 4 kinds of *P. pyrifolia* (Burm.) Nakai (*P. serotina* Rehd.), which accounted for 21.1% of the original germplasms of *P. pyrifolia* (Burm.) Nakai (*P. serotina* Rehd.) and 1 kind of *P. communis* L., which accounted for 11.1% of the original germplasms of *P. communis* L.

Key words: pear; resource; cold region; SSR; core germplasm

中国寒地梨种质资源主要分布在年平均温度 7.8 °C 以下的北方地带。由于果树资源数量庞大, 其给资源保存带来了巨大困难。核心种质资源的研究已经应用于小麦 (郝晨阳 等, 2008)、水稻 (李晓玲 等, 2007)、碗豆 (宗绪晓 等, 2008)、大白菜 (李丽 等, 2009)、胡萝卜 (庄飞云 等, 2006)、油菜 (何余堂 等, 2002)、茶树 (李娟和江昌峻, 2004)、蜡梅 (赵冰和张启翔, 2007)、梅花 (明

收稿日期: 2012-06-09; 修回日期: 2012-10-16

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项项目 (201003021)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: Zbb4005@163.com; Tel: 0434-6283348)

军 等, 2005) 等领域, 然而果树核心种质的构建研究却比较少。为了达到以最少的资源来保存种质资源的目的, 建立一个核心子集是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 201 份寒地梨资源材料采自吉林省农业科学院果树研究所——国家果树种质公主岭寒地果树圃 (表 1)。其中秋子梨 *Pyrus ussuriensis* Maxim. 158 份, 白梨 *P. bretschneideri* Rehd. 9 份, 砂梨 *P. pyrifolia* (Burm. f) Nakai 23 份, 西洋梨 *P. communis* L. 11 份。于 2008 年 5—6 月间采集梨的幼嫩叶片, 放于保温盒中用冰袋保鲜, 带回实验室后立即提取 DNA 或置于 - 70 °C 冰箱中冷冻备用。

表 1 种质资源名称
Table 1 Name of resources

种类 Species	编号 Code	种质名称 Name of resource	表型性状 Phenotypic characteristic
秋子梨	2	友 12-91 You 12-91	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
P. ussuriensis Maxim.	3	54-20-17 54-20-17	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	5	真红霄梨 Zhenhongxiaoli	抗寒; 果面有红晕 Resistance to cold; Fruit's surface with a little of red
	6	平顶香 Pingdingxiang	抗寒; 果较大 Resistance to cold; Fruit larger
	7	公 520 Gong 520	抗寒 Resistance to cold
	8	药梨 Yaoli	极抗寒 Strong resistance to cold
	9	金香水 Jinxiangshui	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	10	青皮黄 Qingpihuang	极抗寒 Strong resistance to cold
	11	北丰梨 Beifengli	极抗寒; 维生素含量高 Strong resistance to cold; High vitamin content
	13	尖把 4 Jianba 4	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	14	冻秋梨 Dongqiuli	抗寒; 冻贮 Resistance to cold; Frozen storage
	17	友谊 351 Youyi 351	果中大; 品质好; 丰产 Fruit medium-sized; Good quality; High yield
	18	友 22-7 You 22-7	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	19	冻花盖 Donghuagai	极抗寒 Strong resistance to cold
	20	72-06	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	21	公 56-520 Gong 56-520	抗寒 Resistance to cold
	22	朝阳川 Chaoyangchuan	抗寒 Resistance to cold
	24	早黄梨 Zaohuangli	极抗寒; 早熟; 早果 Strong resistance to cold; Precocious; Early fruit
	25	龙香梨 Longxiangli	极抗寒; 果小 Strong resistance to cold; Small fruit
	26	黑 468 Hei 468	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	27	柳河黄香水 Liuhe Huangxiangshui	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	31	公 2-10 Gong 2-10	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	32	酸梨锅子 Suanliguozi	抗寒 Resistance to cold
	33	尖把 7 Jianba 7	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	34	大大香水 Dadaxiangshui	较抗寒; 果大 Medium resistance to cold; Fruit large
	35	八楞梨 Balengli	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	36	1-7	抗寒 Resistance to cold
	37	矮山梨 Aishanli	抗寒; 生长缓慢 Resistance to cold; Slow growth
	39	八里香 Balixiang	抗寒; 味香 Resistance to cold; Flavor
	40	公 19-60 Gong 19-60	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	41	520	抗寒 Resistance to cold
	42	呼盟秀水香 Humeng Xiushuixiang	极抗寒; 品质较好 Strong resistance to cold; Medium quality
	44	270	抗寒 Resistance to cold
	45	晚香梨 Wanxiangli	抗寒; 耐贮; 冻贮 Resistance to cold; Storability; Frozen storage
	46	公 57-18 Gong 57-18	抗寒; 果大; 品质好 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	47	谢 × 大 Xie × Da	抗寒 Resistance to cold

续表 1

种类 Species	编号 Code	种质名称 Name of resource	表型性状 Phenotypic characteristic
	49	黑龙江秋黄 Heilongjiang Qiuhuang	极抗寒 Strong resistance to cold
	50	5-8	果实中; 较丰产 Fruit of medium size; Relatively high yield
	52	尖把 6 Jianba 6	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	53	呼苹香梨 Hupingxiangli	极抗寒; 品质较好 Strong resistance to cold; Medium quality
	54	红霄梨 Hongxiaoli	抗寒 Strong resistance to cold
	55	伏香梨 Fuxiangli	抗寒; 早熟; 丰产 Resistance to cold; Early-maturing; High yield
	56	苹香梨 Pingxiangli	抗寒; 果大; 品质佳 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	58	115	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	59	9101	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	60	冻香梨 Dongxiangli	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	62	平顶香 (3) Pingdingxiang (3)	极抗寒 Strong resistance to cold
	63	后果园 11 号 Houguoyuan 11	抗寒; 味甜 Resistance to cold; Sweet
	65	红南果 Hongnanguo	抗寒; 果面红; 品质佳 Resistance to cold; Fruit's surface red; Good quality
	66	大安大香水 Da'an Daxiangshui	抗寒; 果大 Resistance to cold; Fruit large
	67	公 1-5 Gong 1-5	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	69	山鸭梨 Shanyali	极抗寒 Strong resistance to cold
	70	尖把王 Jianbawang	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	71	72-09	极抗寒 Strong resistance to cold
	72	11-2	极抗寒; 品质较好 Strong resistance to cold; Medium quality
	75	大旺八棵树 Dawangbakeshu	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	76	尖把酸 Jianbasuan	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	77	早香甜 Zaoxiangtian	抗寒; 软肉; 味甜 Resistance to cold; Soft flesh variety; Sweet
	78	油红梨 Youhongli	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	79	公 72-8-7 Gong 72-8-7	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	81	老道梨 Laodaoli	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	82	18-8	抗寒 Resistance to cold
	85	青皮脆 Qingpicui	极抗寒; 丰产 Strong resistance to cold; High yield
	86	3-4	较抗寒; 果大 Medium resistance to cold; Fruit large
	88	红金秋 Hongjinqiu	抗寒; 果大; 品质好 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	90	牡育 81-33-1 Muyu 81-33-1	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	91	友谊 1 号 Youyi 1	极抗寒; 果甜酸; 耐贮 Strong resistance to cold; Fruit sweet and sour; Storability
	94	N8-7	果实小; 较丰产 Small fruit; Relatively high yield
	95	摩天大香水 Motian Daxiangshui	果中; 品质中; 较丰产 Fruit of medium size; Medium quality; Relatively high yield
	96	74-2-1-880	抗寒; 冻贮 Resistance to cold; Frozen storage
	97	真红霄梨 Zhenhongxiaoli	抗寒; 果面有红晕 Resistance to cold; Fruit's surface with a little of red
	98	74-2-8-48	抗寒; 冻贮 Resistance to cold; Frozen storage
	99	87-2-35	抗寒 Resistance to cold
	100	早白梨 Zaobaili	抗寒 Resistance to cold
	101	东宁 5 号 Dongning 5	抗寒; 品质较好; 大果 Resistance to cold; Medium quality; Fruit large
	105	公 3-5 Gong 3-5	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	106	友 34-7 You 34-7	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	107	桑皮梨 Sangpili	抗寒; 果皮褐色 Resistance to cold; Peel brown
	108	冬蜜梨 Dongmili	抗寒; 冻贮; 风味佳 Resistance to cold; Frozen storage; Good flavor
	110	代号 1 Daihao 1	抗寒 Resistance to cold
	112	小山梨 Xiaoshanli	抗寒; 抗病; 品质好 Resistance to cold; Resistance to disease; Good quality
	113	麻秋子 Maqiuzi	极抗寒; 果中; 品质差 Strong resistance to cold; Fruit medium-sized; Poor quality
	116	秋香水 Qiuxiangshui	果实中小; 品质中; 较丰产 Fruit small and medium; Medium quality; Relatively high yield
	118	1456	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	119	秋香梨 Qiuxiangli	抗寒; 果甜 Resistance to cold; Sweet
	120	72-2-1-446	抗寒; 冻贮 Resistance to cold; Storability

续表 1

种类 Species	编号 Code	种质名称 Name of resource	表型性状 Phenotypic characteristic
	121	寒香梨 Hanxiangli	抗寒; 果大; 品质佳 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	122	87-2-63	较抗寒; 晚熟; 耐贮 Medium resistance to cold; Late-maturing; Storability
	123	黑 79-1268 Hei 79-1268	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	124	74-2-1-442	抗寒; 冻贮 Resistance to adversity; Frozen storage
	125	公 74-2-1-459 Gong 74-2-1-459	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	127	友 19-7 You 19-7	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	129	72-10-31	较抗寒; 晚熟 Medium resistance to cold; Late-maturing
	130	友 24-96 You24-96	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	132	87-2-59	抗寒 Resistance to adversity
	133	74-10-5	抗寒; 晚熟 Resistance to adversity; Late-maturing
	135	72-2-22-25	较抗寒; 中熟 Medium resistance to cold; Mid-maturing
	136	友 22-83 You 22-83	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	138	甜秋子 Tianqiuzi	抗寒 Resistance to adversity
	139	友 23-65 You 23-65	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	140	代号 2 Daihao 2	抗寒 Resistance to cold
	141	黑 1273 Hei 1273	抗寒 Resistance to cold
	142	友 72-24-64 You 72-24-64	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	143	1521	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	144	友 72-51 You 72-51	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	145	12-75	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	146	脆香梨 Cuixiangli	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	147	牡红 68-4-2 Muhong 68-4-2	抗寒 Resistance to cold
	148	黑 79-1 Hei 79-1	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	149	公 57-54 Gong 57-54	抗寒; 果大; 耐贮 Resistance to cold; Fruit large; Storability
	150	红旗白糖梨 Hongqi Baitangli	抗寒; 垂枝; 高糖 Resistance to cold; Hanger wood; High sugar
	151	山梨 5 Shanli 5	抗寒 Resistance to cold
	152	山梨 7 Shanli 7	抗寒 Resistance to cold
	153	山梨 4 Shanli 4	抗寒 Resistance to cold
	154	金香水 Jinxiangshui	抗寒; 品质好
	155	57-17	抗寒 Resistance to cold
	156	开原无脐白 Kaiyuan Wuqibai	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	157	山梨 6 Shanli 6	抗寒 Resistance to cold
	159	延边大香水 Yanbian Daxiangshui	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	160	山梨 14 Shanli 14	抗寒 Resistance to cold
	161	山梨 11 Shanli 11	抗寒 Resistance to cold
	162	锦丰梨 Jinfengli	较抗寒; 果大; 耐贮 Medium resistance to cold; Fruit large; Storability
	164	山梨 10 Shanli 10	抗寒 Resistance to cold
	165	山梨 3 Shanli 3	抗寒 Resistance to cold
	166	山梨 12 Shanli 12	抗寒 Resistance to cold
	167	山梨 2 Shanli 2	抗寒 Resistance to cold
	168	山梨 9 Shanli 9	抗寒 Resistance to cold
	169	山梨 1 Shanli 1	抗寒 Resistance to cold
	170	山梨 8 Shanli 8	抗寒 Resistance to cold
	171	山梨 13 Shanli 13	抗寒 Resistance to cold
	172	冻香水 Dongxiangshui	抗寒; 石细胞大 Resistance to cold; Large stone cells
	173	涩梨 Seli	抗寒 Resistance to cold
	174	糖梨 Tangli	抗寒; 高糖 Resistance to cold; High sugar
	175	南果梨 Nanguoli	抗寒; 品质佳 Resistance to cold; Good quality
	176	五香梨 Wuxiangli	极抗寒 Strong resistance to cold
	177	山世纪 Shanshiji	极抗寒 Strong resistance to cold
	178	小城子 Xiaochengzi	抗寒 Resistance to cold
	180	花盖 Huagai	极抗寒; 石细胞大 Strong resistance to cold; Large stone cells
	181	奈叶甜 Naiyetian	极抗寒 Strong resistance to cold
	182	红糖梨 Hongtangli	抗寒; 高糖 Resistance to cold; High sugar
	183	麻梨 Mali	极抗寒 Strong resistance to cold

续表 1

种类 Species	编号 Code	种质名称 Name of resource	表型性状 Phenotypic characteristic
白梨 <i>P. bretschneideri</i> Rehd.	184	猪嘴梨 Zhuzuili	极抗寒 Strong resistance to cold
	185	马蹄黄 Matihuang	极抗寒; 果中; 品质差 Strong resistance to cold; Fruit medium-sized; Poor
	186	葫芦梨 Hululi	抗寒; 果酸甜 Resistance to cold; Sweet
	187	公 4-2 Gong 4-2	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	188	大黄梨 Dahuangli	抗寒 Resistance to cold
	189	黄香梨 Huangxiangli	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	190	安梨 Anli	抗寒; 味酸; 多汁 Resistance to cold; Acid; Juicy fruit
	191	小香水 Xiaoxiangshui	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	192	黑龙江红花盖 Heilongjiang Honghuagai	抗寒; 冻贮 Resistance to cold; Storability
	193	高接 95 Gaojie 95	抗逆; 优质 Resistance to adversity; Best quality
	194	长把子 Changbazi	抗寒 Resistance to cold
	195	407	抗寒; 果甜 Resistance to cold; Sweet
	196	19 号 19 Hao	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	197	延边大香水 Yanbian Daxiangshui	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	199	软把子 Ruanbazi	抗寒; 软肉 Resistance to cold; Soft flesh variety
	200	山 × 大 Shan × da	极抗寒 Strong resistance to cold
	201	天下第一香 Tianxiadiyixiang	抗寒; 软肉品种 Resistance to cold; Soft flesh variety
	1	秋苹果 Qiupingguo	抗寒; 果较大; 品质好 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	57	呼辅 Hufu	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	89	大慈梨 Dacili	抗寒; 果大; 耐贮 Resistance to cold; Fruit large; Storability
砂梨 <i>P. pyrifolia</i> (Burm. f) Nakai	93	18 号 18 Hao	抗寒; 早熟 Resistance to cold; Precocious
	114	苹果梨 Pingguoli	较抗寒; 果大; 品质好 Medium resistance to cold; Fruit large; Good quality
	134	寒红梨 Hanhongli	抗寒; 果面红; 品质佳 Resistance to cold; Fruit red; Good quality
	158	礅子梨 Gunzili	较抗寒 Medium resistance to cold
	163	西丰京白 Xifeng Jingbai	抗寒; 抗病 Resistance to cold; Resistance to disease
	198	2-26	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	4	和龙 85 Helong 85	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	12	和龙 3 Helong 3	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	15	红秀 3 号 Hongxiu 3	极抗寒 Strong resistance to cold
	16	公 23-272 Gong 23-272	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	28	和龙 102 Helong 102	抗寒 Resistance to cold
	29	和龙 6 Helong 6	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	30	和龙 36 Helong 36	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	48	和龙 18 Helong 18	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	51	和龙 40 Helong 40	抗寒 Resistance to cold
	64	和龙 41 Helong 41	抗寒; 品质好 Resistance to cold; Good quality
	68	3000 伦大梨 3000 Lundali	抗寒 Resistance to cold
	73	丰香梨 Fengxiangli	抗寒; 品质较好 Resistance to cold; Medium quality
	74	大梨 Dali	抗寒; 果大; 宜制罐头 Resistance to cold; Fruit large; Appropriate for tins
	83	513	较抗寒; 果大; 较甜 Medium resistance to cold; Fruit large; Sweet
西洋梨 <i>P. communis</i> L.	84	蔗梨 Zheli	抗寒; 果大; 味甜 Resistance to cold; Fruit large; Sweet
	87	苹博香 Pingboxiang	抗寒; 果大; 品质佳 Resistance to cold; Fruit large; Good quality
	92	公 11-17 Gong 11-17	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	102	公 57-318 Gong 57-318	较抗寒; 果酸; 果大 Medium resistance to cold; Sour; Fruit large
	109	7181	抗寒 Resistance to cold
	111	和龙 7 Helong 7	抗寒 Resistance to cold
	115	公 87-391 Gong 87-391	抗逆; 优质; 高产 Resistance to adversity; Best quality; High yield
	128	磨盘 54 Mopan 54	较抗寒; 果大 Medium resistance to cold; Fruit large
	131	87-8-2	抗寒; 早熟 Resistance to cold; Early-maturing
	23	远东 2 号 Yuandong 2	抗寒 Resistance to cold
	38	客发梨 Kefali	抗寒; 果大; 品质较好 Resistance to cold; Fruit large; Medium quality
	43	奥利亚 Aoliya	极抗寒 Strong resistance to cold
	61	大头梨 Datouli	抗寒 Resistance to cold

续表 1

种类 Species	编号 Code	种质名称 Name of resource	表型性状 Phenotypic characteristic
	80	古高 Gugao	极抗寒 Strong resistance to cold
	103	远东 1 号 Yuandong 1	抗寒 Resistance to cold
	104	乔玛 Qiaoma	极抗寒 Strong resistance to cold
	117	龙园洋梨 Longyuanyangli	抗逆; 高产 Resistance to adversity; High yield
	126	小营 1 号 Xiaoying 1	抗寒; 果大; 品质较好 Resistance to cold; Fruit large; Medium quality
	137	吉林小洋梨 Jilin Xiaoyangli	抗寒; 石细胞多; 风味好 Resistance to cold; More stone cells; Good flavor
	179	远东 3 号 Yuandong 3	抗寒 Resistance to cold

1.2 DNA 的提取与 SSR 引物的筛选

用 DNA 提取试剂盒提取，具体步骤按基因组 DNA 提取试剂盒（北京天根公司）的说明进行。SSR 引物按孙文英（2008），Yamamoto 等（2001，2002），Kimura 等（2002）和曹玉芬等（2007）报道的梨 SSR 引物序列，由上海生工公司合成。

1.3 SSR-PCR 扩增反应

采用 Biometra 的 UNO II 型 PCR 仪（德国）进行 SSR-PCR 反应。dNTP 和 *Taq*DNA 为北京天根公司所生产。反应体系见表 2。

1.4 核心种质的筛选与构建

采用优先取样法，构建寒地梨的核心种质。具体选择方法是基于 201 份寒地梨材料聚类的结果，在遗传距离较近的资源材料中，依据其表型性状，选择抗寒性、产量及果实品质等优良的材料。如两个遗传距离较近的资源材料，一个表现为较抗寒，另一个表现为极抗寒，则选择极抗寒的资源进入核心库。用这样的方法，首先构建寒地梨的初级核心种质，再由初级核心种质构建核心种质。

表 2 寒地梨 SSR 反应体系
Table 2 SSR analysis system of cold regions pear

体系成分 System composition	工作液浓度 Working liquid concentration	加样量/ μ L Sample volume
$10 \times$ PCR Buffer (Mg^{2+})		2.0
dNTP	$1\text{ mmol} \cdot L^{-1}$	4.0
<i>Taq</i>	2.5 U	0.4
SSR primer (forward)	$10\text{ mmol} \cdot L^{-1}$	1.0
SSR primer (reverse)	$10\text{ mmol} \cdot L^{-1}$	1.0
模板 DNA Template DNA	$15 \sim 20\text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$	2.0
双蒸水 Double-distilled water		9.6
总反应体积 The total reaction volume		20

2 结果与分析

2.1 SSR 引物扩增后的检测结果

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测筛选出的 21 对梨的 SSR 引物对 201 份寒地梨材料进行 PCR 扩增，获得 189 个等位基因，平均每个位点 9 个。SSR 引物对部分梨品种资源 DNA 扩增结果如图 1、图 2。每对引物扩增出的等位位点在 5 ~ 14 之间，位点杂合度在 0.5208 ~ 0.9126 之间（表 3）。

应用 21 对 SSR 引物扩增出的数据，根据 Nei 和 Li 的方法，计算 Dice 相似系数，以非加权数据分析法 (UPGMA) 生成亲缘关系树状图。201 份寒地梨材料的相似系数在 0.53 ~ 1.00 之间，平均值为 0.6195。

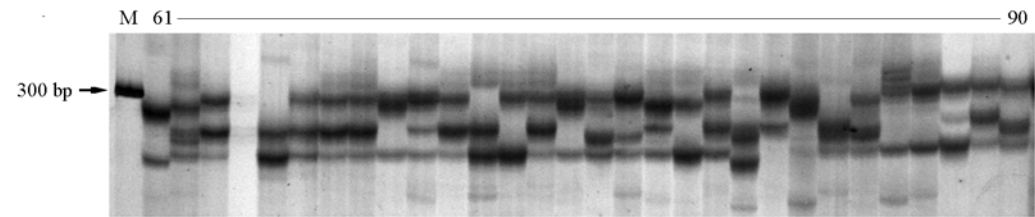


图 1 引物 M7a 扩增梨材料 61 ~ 90 的 SSR 图谱
Fig. 1 SSR amplified by primer M7a in 61 to 90 pears fingerprint

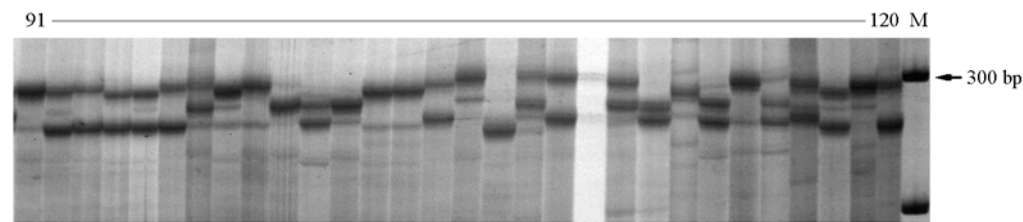


图 2 引物 M7a 扩增梨材料 91 ~ 120 的 SSR 图谱
Fig. 2 SSR amplified by primer M7a in 91 to 120 pears fingerprint

表 3 21 对 SSR 引物扩增出的等位位点数和位点杂合度
Table 3 Number of allelic loci heterozygosity accessions by 21 SSR primers

序号 Code	引物名称 Primer	等位基因数 Number of allelic	位点杂合度 Loci heterozygosity	序号 Code	引物名称 Primer	等位基因数 Number of allelic	位点杂合度 Loci eterozygosity
1	NH009b	14	0.9118	12	CH02B1	7	0.7661
2	NH017a	12	0.8569	13	M7a	6	0.7496
3	NH019b	8	0.8026	14	M9a	13	0.9054
4	NH013a	5	0.7947	15	PS12A02	11	0.8845
5	NH020a	8	0.8630	16	KU-10	10	0.8539
6	NH030a	7	0.8452	17	BGT23b	7	0.8172
7	NB111a	11	0.8855	18	NH004a	11	0.8971
8	NB102a	6	0.7923	19	NH011b	7	0.8295
9	KA16	9	0.8367	20	NH015a	14	0.9126
10	CH01B12	10	0.8605	21	KA14	5	0.5208
11	CH01H01	8	0.8068				

2.2 初级核心种质构建

采用优先取样法，得到 51 份寒地梨的初级核心种质（图 3），包括 48 份秋子梨（平顶香、晚香梨、柳河黄香水、友 12-91、友 34-7、74-2-1-880、药梨、72-2-1-446、青皮黄、公 19-60、北丰梨、友谊 1 号、龙香梨、冻秋梨、尖把王、五香梨、12-75、西丰京白、花盖、友 23-65、秋香梨、苹香梨、伏香梨、红糖梨、猪嘴梨、小香水、安梨、软把子、冻花盖、红旗白糖梨、黑龙江红花盖、公 2-10、青皮脆、山梨一、太安大香水，白梨苹果梨、寒红梨、大慈梨、18 号、呼辅，砂梨公 11-17、和龙 6、和龙 36、丰香梨、72-09、和龙 18、红秀 3 号、苹博香）和 3 份西洋梨（乔玛、远东 1 号、远东 2 号）。

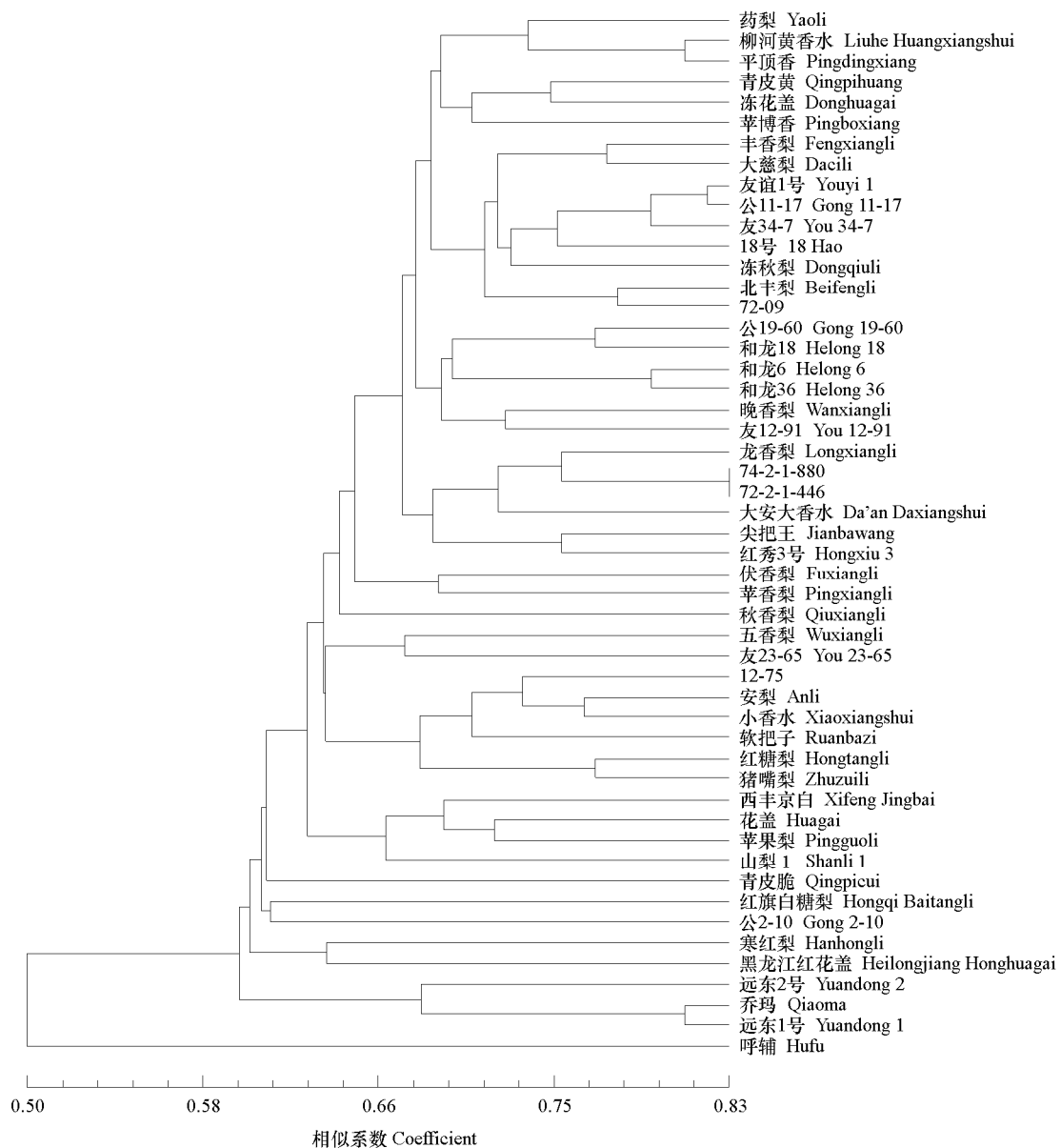


图 3 51 份寒地梨初级核心种质的树状图

Fig. 3 Dendrogram of 51 cold regions pear primary core collection

2.3 寒地梨核心种质的构建

采用多次聚类优先取样法, 结合表型性状, 最终筛选出了 36 份核心种质 (图 4)。

36 份核心种质分类学地位如下:

- (1) 秋子梨系统: 晚香梨、药梨、青皮黄、北丰梨、友谊 1 号、龙香梨、冻秋梨、五香梨、12-75、西丰京白、花盖、友 23-65、秋香梨、苹香梨、伏香梨、红糖梨、猪嘴梨、小香水、安梨、软把子、冻花盖、红旗白糖梨、黑龙江红花盖、公 2-10、青皮脆、山梨一。占秋子梨原种质的 16.9%。
- (2) 白梨系统: 苹果梨、寒红梨、大慈梨、18 号、呼辅。占白梨原种质的 50%。
- (3) 砂梨系统: 和龙 6、72-09、红秀 3 号、苹博香。占砂梨原种质的 21.1%。
- (4) 西洋梨系统: 远东 1 号。占西洋梨原种质的 11.1%。

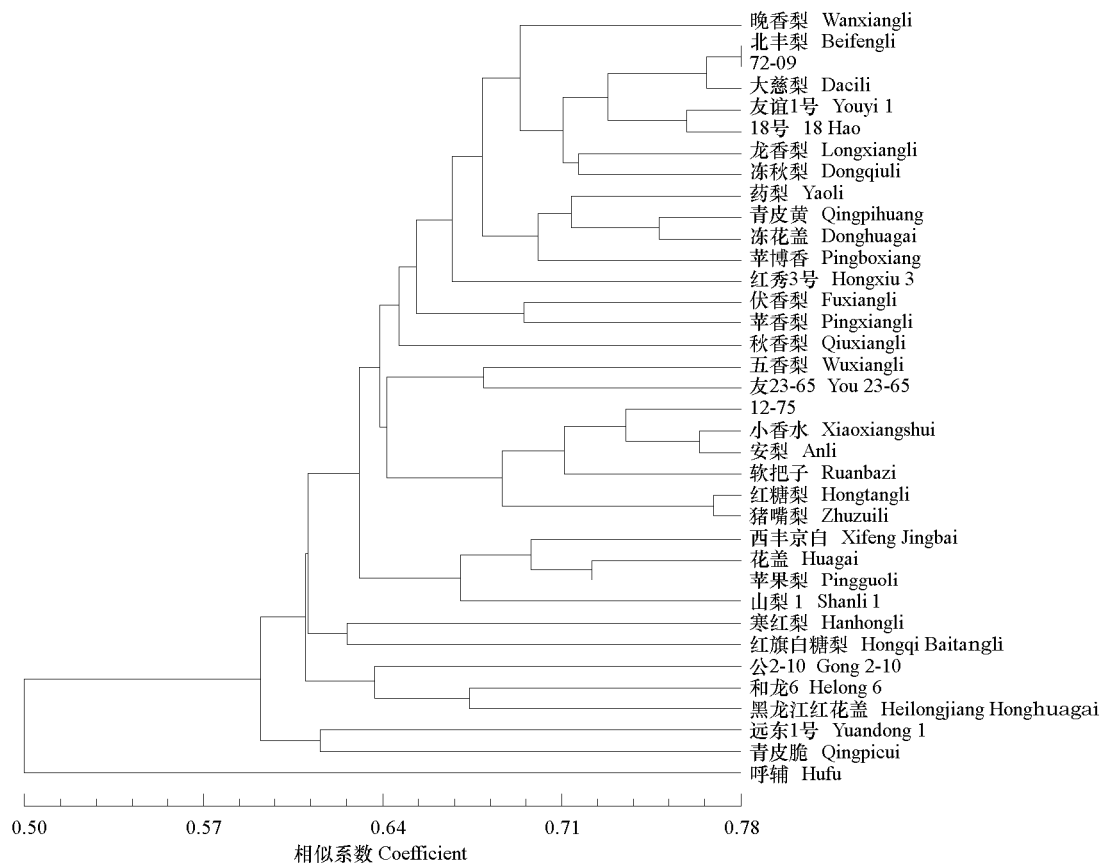


图 4 36 份寒地梨初级核心种质的树状图

Fig. 4 Dendrogram of 36 cold regions pear core collection

2.4 寒地梨核心种质的评价

通过对原种质、初级核心种质和核心种质各群体遗传多样性指数进行比较，构建的核心种质的遗传多样性指数与原种质的遗传多样性指数十分接近（表 4），说明本试验通过多次聚类结合表型性状，采取优先取样法构建的寒地梨核心种质准确性高，能够代表寒地梨资源的遗传多样性。

表 4 不同群体之间遗传多样性指数的比较

Table 4 Comparison of genetic diversity index among different groups

样本群 Group	种质数量 The number of germplasm	遗传多样性指数 Gene diversity (<i>H</i>)
原种质 Original germplasm	201	0.8291
初级核心种质 Primary core germplasm	51	0.8282
核心种质 Core germplasm	36	0.8196

3 讨论

3.1 分类探讨

本文试验材料大体上分为东方梨与西方梨两大部分。与曹玉芬等（2007）利用 SSR 分子标记技术对梨资源进行遗传多样性分析的结果一致。这种现象的产生可能是因为东方梨与西方梨沿着两个不同方向独立演化而形成的。本试验中西方梨远东 1 号、远东 2 号、奥利亚、乔玛聚在了一起，在西方梨的分组中还包括 3 个东方梨，1-7、秋苹果和尖把 4，其中 1-7 与奥利亚的相似系数 0.8148，

尖把 4 与西方梨系统中的远东 2 号的相似系数高达 0.8624, 秋苹果与远东 2 号的相似系数为 0.6825, 都高于平均相似系数 0.6195。作者认为这 3 个东方梨与西方梨之间有着较近的亲缘关系, 这 3 个东方梨含有西方梨的血缘, 是东方梨与西方梨的自然杂交种。另外, 其他的西方梨如古高、远东 3 号、龙园洋梨和吉林小洋梨等交错于东方梨之中, 未能单独聚类, 说明这些西方梨也杂有东方梨的血缘。

3.2 苹果梨的分类地位

张冰冰 (2008) 通过 RAPD 分子标记技术的研究, 发现苹果梨与白梨聚在了一起, 认为苹果梨属于白梨系统; 曲柏宏等 (2002) 利用 RAPD 技术对苹果梨的分类地位进行了研究, 最终认为苹果梨应该归为白梨系统。鲁凤娟和张玉星 (2009) 利用 AFLP 分子标记对苹果梨和其它梨的关系进行了研究, 确定苹果梨归属于白梨系统。本试验从聚类结果上看, 苹果梨与秋子梨聚在一起。从相似系数上分析, 苹果梨与秋子梨中秋香水和黑 1273 的相似系数较高, 分别为 0.8148 和 0.7460, 苹果梨与砂梨中红秀 3 号的相似系数为 0.5979, 苹果梨与白梨中红霄梨的相似系数为 0.6455。作者认为苹果梨的亲本中可能含有秋子梨、白梨及砂梨的血缘, 是一个具有 3 个种基因高度杂合的特殊种质。这与马兵钢等 (2003) 运用同工酶技术分析认为苹果梨的亲本之一来源于秋子梨的研究结果相似。通过以上研究与分析, 更进一步的明确了苹果梨这个较为特殊资源的分类地位, 依据经典分类学与前人及本研究结果, 本文中得出苹果梨是含有秋子梨、白梨及砂梨血缘的白梨的结论。亦因其特殊性, 本文中也将其列为重要核心种质。

3.3 寒地梨种质资源的核心种质

本试验中的 36 份核心种质中与张冰冰 (2008) RAPD 构建的核心种质相同的材料为 21 份, 分别为远东 1 号、龙香梨、冻秋梨、苹果梨、五香梨、12-75、西丰京白、花盖、秋香梨、苹香梨、伏香梨、红糖梨、猪嘴梨、小香水、安梨、软把子、冻花盖、黑龙江红花盖、公 2-10、青皮脆、山梨一。不同的为 15 份, 分别为晚香梨、和龙 6、药梨、青皮黄、北丰梨、72-09、大慈梨、友谊 1 号、18 号、红秀 3 号、苹博香、友 23-65、寒红梨、红旗白糖梨、呼辅。其中, 有 7 份资源为张冰冰 (2008) RAPD 研究中未取材料, 分别为和龙 6、北丰梨、友谊 1 号、晚香梨、友 23-65、红秀 3 号、寒红梨, 有 7 份资源同样被选为初级核心种质, 分别为药梨、72-09、大慈梨、青皮黄、苹博香、红旗白糖梨、呼辅, 有 1 份材料未被张冰冰选为核心种质, 为 18 号。有 4 份梨资源为 RAPD 中核心种质, 经过多次聚类优先取样而被本试验排除, 分别为友 72-51、马蹄黄、长把子、大安大香水。本试验的核心种质材料是利用材料的表型性状和 SSR 分子标记相结合的方式构建的, 具有较高的准确性; 与 RAPD 相同的 21 份核心种质材料两种分子标记方法完全重合, 证明这 21 份材料作为核心种质准确性更高。

References

- Cao Yu-fen, Liu Feng-zhi, Gao Yuan, Jiang Li-jie, Wang Kun, Ma Zhi-yong, Zhang Kai-chun. 2007. SSR analysis of genetic diversity of pear cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 305 - 310. (in Chinese)
- 曹玉芬, 刘凤之, 高 源, 姜立杰, 王 昆, 马智勇, 张开春. 2007. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性. *园艺学报*, 34 (2): 305 - 310.
- 郝晨阳, 董玉琛, 王兰芬, 游光霞, 张洪娜, 盖红梅, 贾继增, 张学勇. 2008. 我国普通小麦核心种质的构建及遗传多样性分析. *科学通报*, 53 (8): 908 - 915.
- He Yu-tang, Tu Jin-xing, Fu Ting-dong, Li Dian-rong, Chen Bao-yuan. 2002. Preliminary development of core collection of *Brassica campestris* in Shanxi Province. *Chinese Journal of Oil Crops Sciences*, 24 (1): 6 - 9. (in Chinese)
- 何余堂, 涂金星, 傅廷栋, 李殿荣, 陈宝元. 2002. 陕西省白菜型油菜核心种质的初步构建. *中国油料作物学报*, 24 (1): 6 - 9.
- Kimura T, Shi Y Z, Shoda M, Kotobuki K, Matsuta N, Hayashi T, Ban Y, Yamamoto T. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breeding Science*, 52: 115 - 121.

- Li Juan, Jiang Chang-jun. 2004. Preliminary construction of core germplasm about *Camellia sinensis* in China. Journal of Anhui Agricultural University, 31 (3): 282 - 287. (in Chinese)
- 李娟, 江昌俊. 2004. 中国茶树核心种质的初步构建. 安徽农业大学学报, 31 (3): 282 - 287.
- Li Li, He Wei-ming, Ma Lian-ping, Liu Pang-yuan, Xu Hai-ming, Xu Jia-bing, Zheng Xiao-ying. 2009. Construction Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) core collection and its EST-SSR fingerprint database by EST-SSR molecular markers. Genomics and Applied Biology, 28 (1): 76 - 86. (in Chinese)
- 李丽, 何伟明, 马连平, 刘庞源, 徐海明, 徐家柄, 郑晓鹰. 2009. 用 EST-SSR 分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库. 基因组学与应用生物学, 28 (1): 76 - 86.
- Li Xiao-ling, Li Jin-quan, Lu Yong-gen. 2007. Constructing strategy of core collection for *Oryza sativa* L. Journal of Shenyang Agriculture College, 38 (5): 681 - 687. (in Chinese)
- 李晓玲, 李金泉, 卢永根. 2007. 水稻核心种质的构建策略研究. 沈阳农业大学学报, 38 (5): 681 - 687.
- Lu Feng-juan, Zhang Yu-xing. 2009. Taxonomic status identification of ping guo pear by AFLP molecular marker. Anhui Agricultural Sciences, 37 (5): 1937 - 1938. (in Chinese)
- 鲁凤娟, 张玉星. 2009. 利用 AFLP 分子标记鉴定苹果梨的分类地位. 安徽农业科学, 37 (5): 1937 - 1938.
- Ma Bing-gang, Niu Jian-xin, Feng Jian-rong, Liu Yan, Qin Wei-ming. 2003. Using isozyme on phylogenetic relationship in *Pyrus*. Journal of Shihezi University, 7 (6): 119 - 123. (in Chinese)
- 马兵钢, 牛建新, 冯建荣, 刘艳, 覃伟铭. 2003. 同工酶在梨属系统发育分析中的应用. 石河子大学学报, 7 (6): 119 - 123.
- Ming Jun, Zhang Qi-xiang, Lan Yan-ping. 2005. Core collection of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. Journal of Beijing Forestry University, 27 (2): 65 - 69. (in Chinese)
- 明军, 张启翔, 兰彦平. 2005. 梅花品种资源核心种质构建. 北京林业大学学报, 27 (2): 65 - 69.
- Qu Bai-hong, Jin Xiang-lan, Chen Yan-qiu, Liu Hong-zhang, Wang Pi-wu. 2002. Classification study of apple-pear in Yanbian area using RAPD markers. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 24 (3): 155 - 157. (in Chinese)
- 曲柏宏, 金香兰, 陈艳秋, 刘洪章, 王丕武. 2002. 利用 RAPD 技术探讨延边苹果梨的分类地位. 延边大学农学学报, 24 (3): 155 - 157.
- Sun Wen-ying. 2008. Genetic linkage map construction and gene localization of agronomic traits in pear (*Pyrus* L.) [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Agriculture University of Hebei: 28 - 30. (in Chinese)
- 孙文英. 2008. 梨 (*Pyrus* L.) 遗传连锁图谱构建及其农艺性状的基因定位研究[博士学位论文]. 保定: 河北农业大学: 28 - 30.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica, 124: 129 - 137.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor Appl Genet, 102: 865 - 870.
- Zhang Bing-bing. 2008. Study on the genetic diversity of winterhardy apple and pear germplasm resources [Ph. D. Dissertation]. Changchun: Jinlin Agricultural University: 6. (in Chinese)
- 张冰冰. 2008. 抗寒苹果、梨种质资源遗传多样性研究[博士学位论文]. 长春: 吉林农业大学: 6.
- Zhao Bing, Zhang Qi-xiang. 2007. Preliminary construction of the core germplasm of *Chimonanthus praecox* in China. Journal of Beijing Forestry University, 29 (supplement 1): 16 - 21. (in Chinese)
- 赵冰, 张启翔. 2007. 中国蜡梅种质资源核心种质的初步构建. 北京林业大学学报, 29 (增刊 1): 16 - 21.
- Zhuang Fei-yun, Zhao Zhi-wei, Li Xi-xiang, Hu Hong, Fang Zhi-yuan. 2006. A core collection of Chinese traditional carrot germplasm. Acta Horticulturae Sinica, 33 (1): 46 - 51. (in Chinese)
- 庄飞云, 赵志伟, 李锡香, 胡鸿, 方智远. 2006. 中国地方胡萝卜品种资源的核心样品构建. 园艺学报, 33 (1): 46 - 51.
- Zong Xu-xiao, Guan Jian-ping, Wang Shu-min, Liu Qing-chang, Robert R Redden, Rebecca Ford. 2008. Genetic diversity and core collection of alien *Pisum sativum* L. germplasm. Acta Agronomica Sinica, 34 (9): 1518 - 1528. (in Chinese)
- 宗绪晓, 关建平, 王述民, 刘庆昌, Robert R Redden, Rebecca Ford. 2008. 国外栽培豌豆遗传多样性分析及核心种质构建. 作物学报, 34 (9): 1518 - 1528.