

梨新品种及其亲本的 AFLP 分析

王 斐, 林盛华, 方成泉*, 李连文

(中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100)

摘 要: 利用荧光 AFLP 技术, 对 20 个梨新品种及其 23 个亲本 (共 43 个品种) 进行研究。从 64 对引物组合中筛选出 7 对用于扩增, 共获得 784 条带, 其中多态性带 699 条, 多态性为 89.2%。扩增结果显示, 7 对引物组合在 29 个品种中扩增出特征带, 每对引物组合均能将所有品种鉴别开, 表明荧光 AFLP 技术用于梨品种鉴定的效率很高。通过聚类, 从分子水平对梨新品种及其亲本的遗传关系进行分析, 并对 20 个梨新品种进行分类, 为梨杂交育种的亲本选配提供了理论参考。

关键词: 梨; 品种; 鉴定; 荧光 AFLP; 指纹图谱

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0847-06

AFLP Analysis of New Pear Cultivars and Their Parents

WANG Fei, L N Sheng-hua, FANG Cheng-quan*, and L I Lian-wen

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: Forty-three pear cultivars including 20 new pear cultivars and their parents were subjected to fluorescent AFLP (amplified fragments length polymorphism) analysis. Seven primer combinations selected from 64 primer combinations produced a total of 784 fragments, of which 699 were polymorphic with a polymorphism percentage of 89.2%. The results showed that characteristic bands were amplified from 29 cultivars, and any primer combination could identify all the cultivars. Fluorescent AFLP was proved to be a very reliable method to identify pear cultivars. The genetic relationship between new pear cultivars and their parents was analyzed and 20 new cultivars were classified on molecular level by clustered analysis, which provided theoretical reference for parent selection in pear hybridization breeding.

Key words: *Pyrus*; Cultivar; Identification; Fluorescent AFLP; Fingerprinting

我国梨种质资源丰富, 栽培历史悠久, 通过各种选育方法, 梨的品种不断增多。梨大多采用无性繁殖, 随着梨种质的交流, 品种混杂的现象较为多见, 利用形态学等传统的鉴别方法很难对品种进行准确的鉴定和分类。应用 RAPD (Oliveira et al, 1999; Monte-Corvo et al, 2000; Teng et al, 2002)、AFLP (Lin et al, 2002; Pan et al, 2002)、SSR (Kimura et al, 2002) 及将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记 (Kim et al, 2000; Lee et al, 2004) 等方法, 可以较准确地对梨属植物进行分类、亲缘关系分析和品种鉴定。

作者通过荧光 AFLP 技术从分子水平对亲缘关系较近的梨新品种及其亲本进行品种鉴定和遗传关系分析, 旨在探索该技术在梨品种鉴定上的高效性, 以期为梨新品种的鉴定、保护和利用提供借鉴。通过遗传关系和分类研究, 为梨杂交育种亲本的选配提供理论依据, 以更好地指导梨杂交育种研究。

收稿日期: 2007 - 04 - 03; 修回日期: 2007 - 05 - 30

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2002AA241191)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: fchqcrip@126.com)

1 材料与方法

1.1 材料

试材取自中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城梨资源圃和梨育种高接圃，共 43 个梨品种 [20 个新品种（1~20）及其亲本（21~43）]，其分属秋子梨、白梨、砂梨和西洋梨 4 个种（表 1）。

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

编号 Code	品种 Cultivars	所属种 Species	编号 Code	品种 Cultivars	所属种 Species
1	早酥 (苹果梨 × 身不知) Zaosu (Pingguoli × Mishirazu)	b	23	新世纪 Shinseiki	p
2	锦丰 (苹果梨 × 慈梨) Jinfeng (Pingguoli × Cili)	b	24	幸水 Kosui	p
3	五九香 (鸭梨 × 巴梨) Wujiuxiang (Yali × Bartlett)	c	25	茄梨 Clapp's Favorite	c
4	华酥 (早酥 × 八云) Huasu (Zaosu × Yakumo)	b	26	乔马 T ma	c
5	华金 (早酥 × 早白) Huajin (Zaosu × Zao bai)	b	27	鸭梨 Yali	b
6	锦香 (南果 × 巴梨) Jinxiang (Nanguo × Bartlett)	c	28	巴梨 Bartlett	c
7	红香酥 (库尔勒香梨 × 郑州鹅梨) Hongxiangsu (Kuerle Xiangli × Zhengzhou Eli)	b	29	雪花 Xuehua	b
8	早美酥 (新世纪 × 早酥) Zaomeisu (Shinseiki × Zaosu)	p	30	小香水 Xiaoxiangshui	u
9	七月酥 (幸水 × 早酥) Qiyuesu (Kosui × Zaosu)	p	31	慈梨 Cili	b
10	中梨一号 (新世纪 × 早酥) Zhongli 1 (Shinseiki × Zaosu)	p	32	金水一号 Jinshui 1	p
11	八月红 (茄梨 × 早酥) Bayuehong (Clapp's Favorite × Zaosu)	c	33	秋白 Qiubai	b
12	北丰 (乔马 × 早酥) Beifeng (Tma × Zaosu)	c	34	身不知 Mishirazu	c
13	冀蜜 (雪花 × 黄花) Jimi (Xuehua × Huanghua)	b	35	郑州鹅梨 Zhengzhou Eli	b
14	黄冠 (雪花 × 新世纪) Huangguan (Xuehua × Shinseiki)	b	36	八云 Yakumo	p
15	早香一号 (小香水 × 二十世纪) Zaoxiang 1 (Xiaoxiangshui × Nijisseiki)	u	37	南果 Nanguo	u
16	金水秋 (慈梨 × 晚三吉) Jinshuiqiu (Cili × Okusankichi)	b	38	黄花 Huanghua	p
17	晚香 (乔马 × 大冬果) Wanxiang (Tma × Dadongguo)	b	39	二十世纪 Nijisseiki	p
18	金水酥 (兴隆麻梨 × 金水一号) Jinshuisu (Xinglong Mali × Jinshui 1)	b	40	晚三吉 Okusankichi	p
19	早魁 (雪花 × 黄花) Zaokui (Xuehua × Huanghua)	b	41	大冬果 Dadongguo	b
20	桔蜜 (京白 × 秋白) Jumi (Jingbai × Qiubai)	b	42	兴隆麻梨 Xinglong Mali	b
21	苹果梨 Pingguoli	b	43	京白 Jingbai	u
22	库尔勒香梨 Kuerle Xiangli	b			

注：b：白梨；c：西洋梨；p：砂梨；u：秋子梨。
Note: b: *Pyrus bretschneideri* Rehd.; c: *Pyrus communis* L.; p: *Pyrus pyrifolia* Nakai; u: *Pyrus ussuriensis* Maxim.

1.2 方法

4月下旬取新梢嫩叶，用蒸馏水冲洗干净，吸干水后按 0.4 g 分装到冷藏管中，放入 -70℃ 冰箱备用。基因组 DNA 提取参考鲁凤娟（2004）的方法。基因组 DNA 质量通过 Gene spec V 核酸蛋白分析仪和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。将符合要求的 DNA 样品稀释成浓度为 100 ng·μL⁻¹，待用。

荧光 AFLP 分析体系的反应条件、试剂用量均按照 RDye™ Fluorescent AFLP Kit 说明进行。酶切反应体系为 12.5 μL，包括 5×Reaction buffer 2.5 μL，模板 DNA 1.0 μL（100 ng·μL⁻¹），EcoR / Mse enzyme mix 1.0 μL 和去离子水 8.0 μL。混合离心后，37℃ 保温 2 h，70℃ 保温 15 min。在酶切产物中加入 12.0 μL Adapter mix 和 0.5 μL T4 DNA ligase 为接头连接的反应体系（共 25.0 μL），20℃ 连接 2 h，将连接产物稀释 10 倍后进行预扩增反应。预扩增反应体系为 25.5 μL，含稀释的酶切连接产物 2.5 μL，AFLP Pre-amp primer mix 20.0 μL，10×PCR reaction buffer 2.5 μL 和 Taq DNA polymerase（5 units·μL⁻¹）0.5 μL。反应程序为：94℃ 变性 30 s，56℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1 min，20 个循环，将产物稀释 40 倍用于选择性扩增。选择性扩增反应体系为 11.0 μL，包括 Taq DNA polymerase working mix 6.0 μL，稀释的预扩增产物 2.0 μL，Mse primer 2.0 μL，EcoR primer A 0.5 μL，EcoR primer B 0.5 μL。反应程序为：94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 1 min，1 个循环；94℃ 30 s，

65 （每循环降低 0.7 ） 30 s, 72 1 min, 12个循环； 94 30 s, 56 30 s, 72 1 min, 23个循环。其中 *EcoR* 引物用荧光染料进行标记。

将选择性扩增产物 0.8 μL 载于 6.5%聚丙烯酰胺凝胶，在 LHCOR 4300 DNA 测序仪上进行电泳。电泳结束后，通过 SAGA^{MX}软件对数据进行处理，采用 SPSS（13.0版）软件对统计结果进行分析，用 Ward's method（离差平方和法）计算品种间的遗传距离（用欧氏距离表示），并进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP多态性分析

从 64对引物组合中筛选出 7对带型清晰且多态性较高的引物组合用于 AFLP分析。

7对引物组合在 43个梨品种中总共扩增出 784条带，其中多态性条带 699条，多态性百分率为 89.2 %，平均每对引物组合产生 112条带（表 2）。

图 1为引物组合 M-CTC/E-AAC的扩增结果。

表 2 7对引物组合的扩增结果及产生的多态性

Table 2 Amplified results and polymorphism of 7 primer combinations

引物组合 Primer combination	总条带数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态性百分率 Polymorphic percentage (%)
M-CTG/E-AAC(M7/E2)	86	73	84.9
M-CTC/E-AAC(M6/E2)	145	132	91.0
M-CTG/E-AAG(M7/E1)	105	87	82.7
M-CAA/E-ACC(M1/E3)	132	126	95.5
M-CAC/E-ACT(M2/E7)	83	79	95.2
M-CAC/E-AAG(M2/E1)	140	122	87.1
M-CAC/E-AAC(M2/E2)	93	80	86.0
总计 Total	784	699	89.2

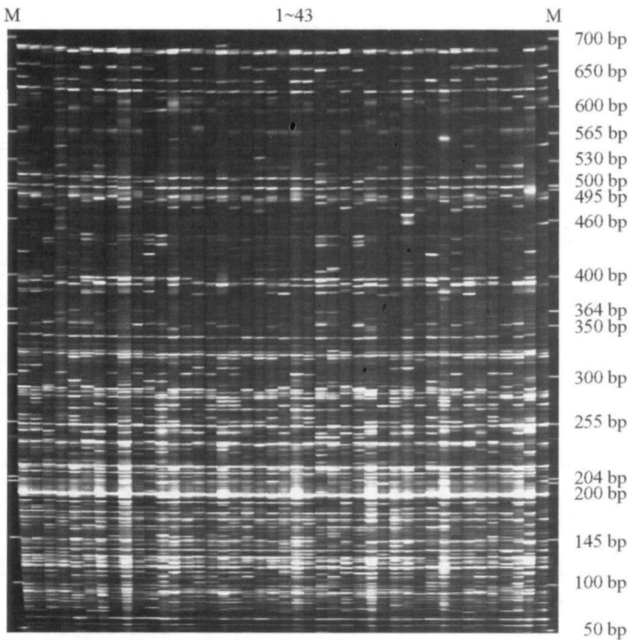


图 1 引物组合 M-CTC/E-AAC扩增结果
1~43的品种名详见表 1。

Fig 1 Result amplified by primer combination M-CTC/E-AAC
Names of 1 - 43 are elaborated in Table 1.

2.2 品种特征带及品种鉴定

本试验筛选出的每对引物组合均能在不同的品种上产生不同的带型。在供试的 43个品种中有 29个品种扩增出特征带。筛选出的 7对引物组合都能将所有品种鉴别开。由此可见荧光 AFLP技术可以高效准确地对梨属植物进行品种鉴定。具有特征带的品种及其特征带的大小、表现形式见表 3。

表 3 具有特征带的品种及特征带大小
Table 3 Cultivars with characteristic bands and base pairs of the bands

品种 Cultivar	特征带数量 Number of characteristic bands	表现为“存在”的特征带 Characteristic bands represent present (bp)	表现为“缺失”的特征带 Characteristic bands represent absent (bp)
早魁 Zaokui	2		M7/E2-105 M6/E2-443
晚三吉 Okusankichi	6	M2/E1-351	M7/E2-158 M1/E3-133 M2/E2-254 M7/E1-219 M7/E1-243
八云 Yakumo	1		M6/E2-123
库尔勒香梨 Kuerle Xiangli	1	M6/E2-136	
京白 Jingbai	10	M6/E2-455	M6/E2-157 M6/E2-208 M6/E2-495 M6/E2-506 M7/E1-459 M1/E3-1381 M1/E3-381 M2/E1-108 M2/E1-621
黄花 Huanghua	1		M6/E2-236
兴隆麻梨 Xinglong Mali	3	M6/E2-341	M1/E3-111 M1/E3-325
郑州鹅梨 Zhengzhou Eli	4	M6/E2-377 M2/E7-133 M2/E2-63 M2/E2-240	
乔马 Tama	3	M6/E2-409 M7/E1-550 M2/E1-277	
金水一号 Jinshui 1	1	M6/E2-467	
茄梨 Clapp's Favorite	2	M6/E2-525	M2/E1-391
桔蜜 Jumi	1	M6/E2-535	
早香一号 Zaoxiang 1	2	M6/E2-575	M2/E1-175
晚香 Wanxiang	3	M6/E2-694 M2/E1-563 M2/E2-204	
秋白 Qiubai	2		M7/E1-158 M2/E1-293
华金 Huajin	2	M1/E3-678	M7/E1-252
五九香 Wujiuxiang	1	M7/E1-303	
大冬果 Dadongguo	5	M7/E1-304 M7/E1-507 M1/E3-223 M2/E2-346 M2/E2-394	
金水秋 Jinshuiqiu	1		M1/E3-157
华酥 Huasu	3	M1/E3-451 M2/E7-542 M2/E1-669	
锦香 Jinxiang	3	M1/E3-475 M1/E3-655 M2/E2-459	
身不知 Mishirazu	1	M1/E3-591	
红香酥 Hongxiangsu	2	M2/E2-453	M2/E7-81
金水酥 Jinshuisu	2	M2/E7-87	M2/E2-86
巴梨 Bartlett	1	M2/E7-88	
中梨一号 Zhongli 1	1		M2/E7-217
新世纪 Shinseiki	2		M2/E1-246 M2/E1-315
北丰 Beifeng	1	M2/E2-218	
苹果梨 Pingguoli	1	M2/E2-396	

2.3 新品种与亲本的遗传关系分析

对 AHP统计结果进行聚类分析，得到亲缘关系树状图（图 2）。当阈值在 14左右时，所有品种聚为 4个组： 砂梨组，包括砂梨以及含有砂梨血缘的品种； 秋子梨组，包括秋子梨和含有秋子梨血缘的品种； 白梨组，包括白梨和含有白梨血缘的品种； 西洋梨组，包括西洋梨和含有西洋梨血缘的品种。

20个梨新品种在聚类过程中，有的与母本聚在同一组中，有的与父本聚在同一组中，有的不与任何一个亲本聚在一起。据此，将 20个新品种分为 3个类型：趋母本聚类型，即聚在母本所在的组中，与母本的亲缘关系较近，共 9个品种，占有新品种的 45.0%；趋父本聚类型，即聚在父本所在的组中，与父本的亲缘关系较近，共 9个品种，占有新品种的 45.0%；不与亲本聚类型，即不聚在任何一个亲本所在的组中，只有两个品种，占有新品种的 10.0%。‘早酥’、‘锦丰’和‘红香酥’均与父、母本聚在同一组中，但三者与母本的遗传距离较近，因此，将‘早酥’、‘锦丰’和‘红香酥’归为趋母本聚类型。新品种聚类所在组及聚类类型详见表 4。

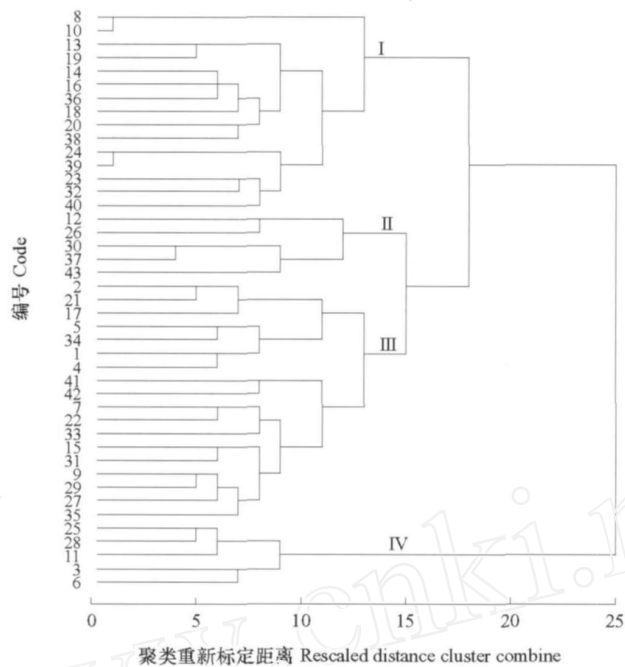


图 2 聚类树状图

1 ~ 43 的品种名详见表 1。

Fig 2 Dendrogram

Names of 1 - 43 are elaborated in Table 1.

表 4 新品种聚类所在组及聚类类型

Table 4 Clustered group and clustered type of new cultivars

聚类所在组 Clustered group	趋母本聚类型 Mother-tended cluster type	趋父本聚类型 Father-tended cluster type	不与亲本聚类型 Deviated type
砂梨组 <i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai	早美酥，中梨一号 Zaomeisu, Zhongli 1	冀蜜，黄冠，金水秋，金水酥，早魁 Jimi, Huangguan, Jinshuiqiu, Jinshuisu, Zaokui	桔蜜 Jumi
秋子梨组 <i>P. ussuriensis</i> Maxim.	北丰 Beifeng		
白梨组 <i>P. bretschneideri</i> Rehd	早酥，锦丰，红香酥，华酥，华金 Zaosu, Jinfeng, Hongxiangsu, Huasu, Huajin	七月酥，晚香 Qiyuesu, Wanxiang	早香一号 Zaoxiang 1
西洋梨组 <i>P. communis</i> L.	八月红 Bayuehong	五九香，锦香 Wujiuxiang, Jinxiang	

3 讨论

3.1 新品种与亲本间遗传关系分析

虽然在 20 个新品种中，45.0%为趋母本聚类型，45.0%为趋父本聚类型，不与亲本聚类型只占 10.0%，这说明在分子水平上，杂交后代表现出与父、母本的亲缘关系相一致；然而在趋母本聚类型的品种中，‘锦丰’、‘华酥’、‘红香酥’和‘北丰’4 品种分别与各自的母本直接且紧密地聚在一起，但在趋父本聚类型的品种中却没有出现这种现象。由此可见，杂交后代与母本的相似性大于父本。因此，在进行杂交亲本的选配时，建议将具有重要性状以及一些少见的有利性状和可贵类型的品种选作母本，这样在子代中出现目标性状的比例会大一些。虽荧光 AFLP 技术在梨属植物遗传关系上的研究尚未见报道，但本研究可为杂交育种提供理论依据与参考。有关‘早香一号’和‘桔蜜’两个品种出现偏离现象的原因，有待进一步研究。

3.2 ‘身不知’和‘库尔勒香梨’的分类

‘身不知’是引自日本（浦一郎和佐藤義彦，1990）的西洋梨品种，蒲富慎等（1989）推测其可能是砂梨与西洋梨的杂交种。然而在本试验中，其既不与西洋梨聚类也不与砂梨聚类，而与白梨聚在一起。从指纹图谱可以看出，‘身不知’与西洋梨的相同谱带较多，判断其亲本之一是西洋梨。‘身不知’适应性强，在吉林延边地区和辽宁西部均有栽培，其抗寒性不及秋子梨，但与白梨相近，比砂梨强，故推测其另一亲本不是砂梨，而是白梨，该结果有待进一步验证。

‘库尔勒香梨’是新疆地区的主栽品种，一般归于白梨。孢粉学研究认为，‘库尔勒香梨’的花粉表面纹饰倾向于西洋梨，再加上果实香味较浓，推测其可能是白梨与西洋梨的种间杂种（杨槐俊，1985；邹乐敏等，1986）；Teng等（2001）用RAPD方法对新疆梨进行亲缘关系分析，结果表明‘库尔勒香梨’与西洋梨具有共同谱带，结合其脆肉特性和叶片形状，亦认为其是白梨与西洋梨的种间杂种；本研究结果显示，‘库尔勒香梨’聚在白梨组，与白梨具有较近的亲缘关系，但从指纹图谱可以看出，其还具有较多与西洋梨相同的谱带，说明其含有西洋梨血缘，这也验证了上述观点。

References

- Chiro Kajiura, Yoshihiko Sato. 1990. Recent progress in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) breeding and descriptions of cultivars based on literature review. Bulletin of the Fruit Tree Research Station Extra No. 1: 220 - 221. (in Japanese)
- 浦一郎, 佐藤義彦. 1990. ニホンナシの育種及びその基礎研究と栽培品種の来及特性. 果 試験場報告, 特別報告第 1 号: 220 - 221.
- Kim C S, Lee G P, Han D H, Ryu K H, Lee C H. 2000. SCARs markers derived from RAPD for cultivar identification in *Pyrus pyrifolia*. J. Kor. Soc. Hort. Sci., 41: 125 - 128.
- Kimura T, Yong Z S, Shoda M, Kotobuki K, Matsuta N, Hayashi T, Ban Y, Yamamoto T. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. Breed Sci., 52: 115 - 121.
- Lee G P, Lee C H, Kim C S. 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *P. pyrifolia* and *P. communis*. Theor. Appl. Genet., 108: 1487 - 1491.
- Lin Sheng-hua, Fang Cheng-quan, Song Wen-qin, Zhang Feng. 2002. AFLP molecular markers of 10 species of *Pyrus* in China. Acta Hort., 587: 233 - 241.
- Lu Feng-juan. 2004. System establishment and application of AFLP technique in *Pyrus* L. [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei (in Chinese)
- 鲁凤娟. 2004. 梨 (*Pyrus* L.) AFLP反应体系的建立及在品种鉴定中的应用 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Monte-Corvo L, Cabrita L, Oliveira C, Leitão J. 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 47: 257 - 265.
- Oliveira C M, Mota M, Monte-Corvo L, Goulão L, Silva D M. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Scientia Horticulturae, 79: 163 - 174.
- Pan Z, Kawabata S, Sugiyama N, Sakiyama R. 2002. Genetic diversity of cultivated resources of pear in north China. Acta Hort., 587: 187 - 194.
- Pu Fu-shen, Huang Li-sen, Sun Bing-jun, Li Shu-ling. 1989. Pear cultivars. Beijing: Agricultural Press (in Chinese)
- 蒲富慎, 黄礼森, 孙秉均, 李树玲. 1989. 梨品种. 北京: 农业出版社.
- Teng Y, Tanabe K, Tamura F, Itai A. 2001. Genetic relationships of pear cultivars in Xinjiang, China as measured by RAPD markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76 (6): 771 - 779.
- Teng Y, Tanabe K, Tamura F, Itai A. 2002. Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127: 262 - 270.
- Yang Huai-jun. 1985. The role of palynology in study of taxonomy of species of genus *Pyrus*. Fruit Science, 3: 2 - 9. (in Chinese)
- 杨槐俊. 1985. 孢粉学在部分梨属植物分类研究中的应用. 果树科学, 3: 2 - 9.
- Zou Lem-in, Zhang Xin-min, Zhang Zhi-de, Song Bao-bang, Guo Shao-xian. 1986. Studies on the systematic relationship of some of the species in the genus *Pyrus* based on pollen grain morphology. Acta Horticulturae Sinica, 13 (4): 219 - 224. (in Chinese)
- 邹乐敏, 张西民, 张志德, 宋保邦, 郭绍仙. 1986. 根据花粉形态探讨梨属植物的亲缘关系. 园艺学报, 13 (4): 219 - 224.