

部分中国砂梨和日本梨的 RAPD 分析

沈玉英^{1,2} 滕元文^{1*} 田边贤二³

(¹浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 浙江杭州 310029; ²杭州万向职业技术学院生物技术系, 浙江杭州 310023; ³鸟取大学农学部, 鸟取 680 - 8553, 日本)

摘 要: 采用 RAPD 分子标记技术, 对来自福建和浙江的 6 份中国砂梨和 36 份日本梨的亲缘关系进行了分析。27 个引物产生了可记录的多态性条带 261 条。聚类分析将这些梨品种和类型分为 4 个中国砂梨群和 5 个日本梨群。其中 4 个日本梨群中都包含有日本高知县的品种或类型。尽管由于取样的偏差, 中国砂梨和日本梨在聚类分析中没有混合聚为大群, 但中国砂梨品种与部分日本梨, 特别是来自高知县的日本梨的相似系数高于与中国梨之间的相似系数。

关键词: 梨; RAPD 标记; 聚类分析

中图分类号: S 661.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 03-0621-04

RAPD Analysis for Genetic Assessment of Some Cultivars of *Pyrus pyrifolia* Derived from China and Japan

Shen Yuying^{1,2}, Teng Yuanwen^{1*}, and Tanabe Kenji³

(¹Department of Horticulture, Zhejiang University, the State Agricultural Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth/Development & Biotechnology, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; ²Department of Biotechnology, Hangzhou Wanxiang Polytechnic, Hangzhou, Zhejiang 310023, China; ³Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680 - 8553, Japan)

Abstract: The present study, using RAPD analysis, was undertaken to characterize genetic variation in Japanese pears and Chinese sand pears, as well as their genetic relationships. The materials used consisted of 36 Japanese pears and 6 Chinese accessions from Zhejiang and Fujian provinces. A total of 27 primers generated 261 scorable polymorphic RAPD bands. Clustering analysis revealed 9 groups: 4 consisting of Chinese sand pears and 5 from Japan, of which 4 Japanese pear groups contained cultivars or types from Kouchi Prefecture, Japan. Chinese sand pears and Japanese pears were not mingled together into groups due to sampling bias. However, Chinese sand pear cultivars showed higher affinities to some Japanese pears, especially those from Kouchi prefecture than to Chinese ones.

Key words: Pear; RAPD marker; Cluster analysis

1 目的、材料与方法

日本梨品种的起源一直存有争议。菊池秋雄认为日本梨的栽培品种是从日本野生的 *P. pyrifolia* Nakai 中演化而来^[1]。但近年果实外观等特性的调查^[2]及同工酶分析^[3]表明, 部分日本梨品种与中国和朝鲜半岛的梨品种非常相近; 本文通讯作者曾利用 RAPD 标记对原产于中国、日本和朝鲜半岛的梨属植物种和品种做过比较, 发现部分日本梨特别是来自日本高知县的地方品种和中国砂梨亲缘关系很近^[4,5]。为此, 作者在日本高知县的山区调查采集了还没有收集保存过的梨类型, 也采集了一些在作者以前的试验中没有包括的日本古老品种, 利用 RAPD 分析, 进一步探讨日本梨和中国砂梨的亲缘关系。

中国砂梨品种全部采自中国农业科学院果树研究所国家梨种质资源圃, 中国野生砂梨的一个类型和部分日本梨采自日本鸟取大学附属农场品种资源圃, 高知类型均实地采自高知县境内 (表 1)。

收稿日期: 2005 - 10 - 18; 修回日期: 2006 - 01 - 16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370988)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ywteng@zju.edu.cn)

表 1 供试砂梨材料
Table 1 Accessions of *Pyrus pyrifolia*

编号 Code	品种 Cultivars	起源地 Origin	编号 Code	品种 Cultivars	起源地 Origin
1	饼子梨 Bingzili	福建 Fujian	22	高知 11 Kouchi 11	高知县 Kouchi Pref
2	满顶雪梨 Mandingxueli	福建 Fujian	23	高知 12 Kouchi 12	高知县 Kouchi Pref
3	秋白砂梨 Qiubaishali	福建 Fujian	24	高知 13 Kouchi 13	高知县 Kouchi Pref
4	义乌梨子 Yiwulizi	浙江 Zhejiang	25	高知 24 Kouchi 24	高知县 Kouchi Pref
5	棕包梨 Zongbaoli	福建 Fujian	26	高知 25 Kouchi 25	高知县 Kouchi Pref
6	野生砂梨 <i>P. pyrifolia</i>	中国 China	27	高知 27 Kouchi 27	高知县 Kouchi Pref
7	天之川 Amanokawa	高知县 Kouchi Pref	28	高知 29 Kouchi 29	高知县 Kouchi Pref
8	长十郎 Chojuro	神乃川县 Kanagawa Pref	29	高知 31 Kouchi 31	高知县 Kouchi Pref
9	朝鲜 Chousen	群马县 Gunma Pref	30	高知 50 Kouchi 50	高知县 Kouchi Pref
10	福岛 Fukushima	未知 Unknown	31	黑木 Kuroki	未知 Unkown
11	迎春 Geishun	未知 Unknown (Nagano?)	32	大古河 Ookoga	新 县 Niikata Pref
12	市原早生 Ichiharawase	高知县 Kouchi Pref	33	Onba	岛根县 Shimane Pref
13	今村秋 Imamuraki	高知县 Kouchi Pref	34	二十世纪 Nijisseiki	千叶县 Chiba Pref
14	河内古木 Kawauchikoboku	广岛县 Hiroshima Pref	35	下市古木 Shimoichikoboku	奈良县 Nara Pref
15	高知 1 Kouchi 1	高知县 Kouchi Pref	36	霜被 Shimokaburi	九州地区 Kyushu region
16	高知 2 Kouchi 2	高知县 Kouchi Pref	37	称名寺梨 Shoumyoujinashi	未知 Unknown
17	高知 4 Kouchi 4	高知县 Kouchi Pref	38	Tsukushiinunashi	九州地区 Kyushu region
18	高知 5 Kouchi 5	高知县 Kouchi Pref	39	Tsukutounashi	未知 Unknown
19	高知 6 Kouchi 6	高知县 Kouchi Pref	40	津轻青 Tsugaruao	青森县 Aomori Pref
20	高知 7 Kouchi 7	高知县 Kouchi Pref	41	马次郎 Umajiro	高知县 Kochi Pref
21	高知 8 Kouchi 8	高知县 Kouchi Pref	42	吉野古木 Yoshinokoboku	奈良县 Nara Pref

改良 SDS法提取总基因组 DNA^[3]。RAPD的最佳反应条件参考文献 [4]。PCR反应在 Thermocycler (Model 480; Perkin/Elmer, Norwalk, Conn USA) 上进行。反应程序为: 95 5 min; 然后以 95 1 min, 37 1.5 min, 72 2 min, 45个循环; 72 5 min, 4 保存备用。RAPD引物采用经过筛选的对梨有效的 Kit A、C和 26中的部分引物 (Operon Technologies, Alameda, Calif USA)^[4~6] (表 2)。10 μL 扩增产物在 85~90 V 下, 采用 2%的琼脂糖凝胶在含有溴化乙锭的 TAE buffer (40 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中电泳 3 h, 于紫外检测仪上观察照相。DNA Marker 为经 *EcoR* I 和 *Hind* III 消化后的 Lambda DNA 片段。将电泳谱带上清晰且重复性的条带计为 1, 相对应位置没有条带者则计为 0, 形成原始矩阵。用 NTSYS-PC (2.02j) 软件计算相似性系数, 得到相似性系数矩阵, UPGMA 法进行聚类分析, 生成聚类图。

2 结果分析与讨论

2.1 RAPD 标记的特征

利用优化的反应程序, 得到了清晰的 RAPD 多态性谱带, 同一样品 (高知 50) 的 3 次独立反应

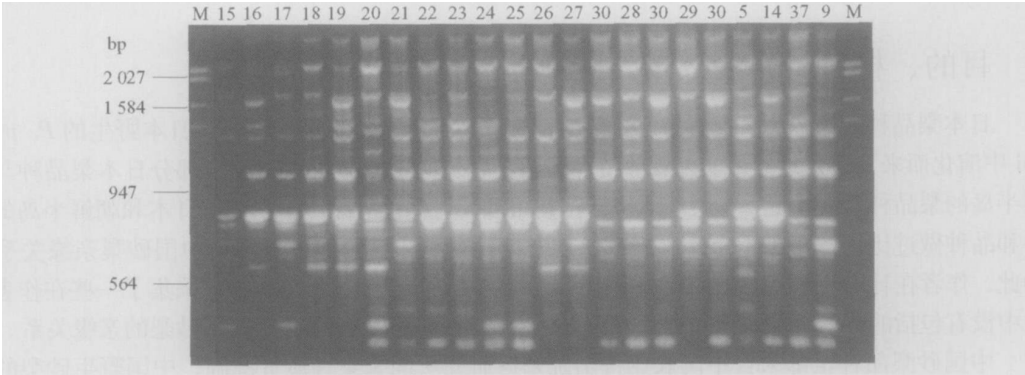


图 1 用引物 OPC-09产生的 20个梨品种或类型的 RAPD 图谱
编号代表材料见表 1。

Fig 1 RAPD profiles for 22 pear cultivars using OPC-09
See Table 1 for accessions code

表明了良好的重复性 (图 1)。所用 27 个 RAPD 引物共产生了 261 条可以记录的多态性条带, 大部分在 200~2 000 bp 之间, 平均每个引物产生 9.7 个 (表 2), 表明供试材料具有丰富的遗传多样性。本试验每对引物扩增的可记录的多态性条带数少于以前的报道^[4~6], 可能是本次试验中没有包括西洋梨品种和其他东方梨种之故。

表 2 27 个 RAPD 引物的碱基序列和可记录的多态性谱带

Table 2 27 primers used in RAPD analysis, their sequence, number of scorable polymorphic bands

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	多态性带 Scorable polymorphic bands	引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	多态性带 Scorable polymorphic bands	引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	多态性带 Scorable polymorphic bands
OPA-07	GAAACGGGTG	14	OPC-05	GATGACCGCC	8	OP-26-05	GGAACCAATC	6
OPA-09	GGGTAACGCC	15	OPC-06	GAACGGACTC	7	OP-26-08	TGGTAAAGGG	7
OPA-10	GTGATCGCAG	6	OPC-07	GTCCCGACGA	14	OP-26-15	GATCCAGTAC	13
OPA-11	CAATCGCCGT	11	OPC-08	TGGACCGGTG	7	OP-26-16	GATCAGCTAC	4
OPA-12	TCGGCGATAG	14	OPC-09	CTCACCGTCC	10	OP-26-18	GATCTCAGAC	6
OPA-16	AGCCAGCGAA	13	OPC-11	AAAGCTGCGG	9	OP-26-20	GATCAATCGC	15
OPA-18	AGGTGACCGT	8	OPC-14	TGCGTGCTTG	9	OP-26-22	GATCGCATTTG	7
OPA-19	CAAACGTCGG	10	OPC-19	GTTGCCAGCC	10	OP-26-24	GATCATAGCC	12
OPA-20	GTTGCGATCC	9	OP-26-02	TGGA TTGGTC	8	OP-26-25	GATCTAAGGC	9

2.2 聚类分析

品种间的 Dice 相似系数从 ‘津轻青’ 和 ‘黑木’ 之间的 0.4813 到 ‘高知 50’ 和 ‘今村秋’ 之间的 0.9749, 系统关系树如图 2, 共形成 9 个大群 (Group)。中国砂梨没有形成一个单独的群, 而是分散地形成 4 个大群: 单独或者两两成群。日本梨品种形成了 5 个大群, 高知县的品种和类型分布在日本梨的 4 个大群里。

第 1 群集中了大部分日本梨品种, 由高知县的品种和来自日本其他地方的品种组成。本群可以进一步的分成几个小群 (Subgroup)。几乎每个小群中都包含高知县的品种。有些品种之间的最末端的连接反映了其起源地, 如 ‘二十世纪’ 和 ‘长十郎’ 是日本关东地方起源的品种, 属于末端连接。但起源于高知县以外的大部分品种的末端连接者都是高知县的品种, 如新县的 ‘大古河’ 与高知县的 ‘天之川’, 广岛县的 ‘河内古木’ 与 ‘高知 8’, 群马县的 ‘朝鲜’ 与高知县的 ‘今村秋’ 和 ‘高知 50’ 等。这虽然不能排除由于本研究中高知县的品种数量较多可能形成聚类偏差, 但另一方面也可能说明高知县的品种具有丰富的遗传多样性, 也同时暗示日本其他地方的梨品种的起源可能与高知县的品种有直接关系。作者在只包括少量高知县品种的试验中也曾观察到类似的现象^[4]。

第 2 群由日本高知县的 ‘马次郎’ 和奈良县的 ‘吉野古木’ 组成。第 3 群由中国浙江省的 ‘义鸟梨子’ 和福建省的 ‘秋白砂梨’ 构成。福建省的 ‘棕包梨’ 单独形成第 4 群。高知县的两个类型



图 2 根据 Dice 相似系数采用 UPGMA 聚类方法生成的 36 个日本梨和 6 个中国砂梨的系统关系树
编号代表材料见表 1。

Fig. 2 Dendrogram of 36 Japanese pears and 6 Chinese accessions

See Table 1 for accessions code

‘高知 4’和‘高知 5’聚类形成第 群。中国原产的野生砂梨 (*P. pyrifolia*) 和‘高知 31’分别独自成为第 群和第 群。‘饼子梨’和‘满顶雪梨’均来自福建省,形成了第 群。‘津轻青’原产日本青森县,独自成为第 群,和其他品种和类型的亲缘关系较远。该品种可能来自中国,不属于砂梨系统^[7]。

日本梨和中国砂梨同属 *P. pyrifolia*, 但对于两者之间的关系一直存在争议。分析本研究中所用中国砂梨和日本梨的相似系数,除‘饼子梨’和‘满顶雪梨’显示了最近的亲缘关系外,其余中国砂梨品种皆与日本梨具有最高的相似系数,而不是与同类的中国砂梨。如‘义乌梨子’和日本的‘Tsukutounashi’的相似系数达 0.7014,而与和它构成一群的中国品种‘秋白砂梨’的相似系数只有 0.64789。虽然‘Tsukutounashi’和本试验中所有日本梨的平均相似系数只有 0.6322,远远低于与‘义乌梨子’的 0.7014,但它和‘Kouchi 11’的相似系数达 0.75,所以它们聚在一起,而不是和中国‘义乌梨子’聚在一起。这也是与日本梨具有较高相似系数的其它中国梨品种没有和日本梨聚在一起的原因。我们推测和中国梨具有较高相似系数的这些日本梨的祖先可能来自中国,这些来自中国的梨经过长期的演变,包括实生繁殖、相互杂交等形成独特的类型,其中一部分较原始的类型保留了中国梨较近的亲缘关系,但后来演化的品种则可能逐渐远离了它们的祖先。

‘下市古木 (Shimoichikoboku)’是日本奈良县的半栽培类型,在以前的研究中,和中国砂梨及白梨组成了一个亚群^[4],本研究中它和中国的‘义乌梨子’和‘饼子梨’显示了很近的亲缘关系。来历不明的‘Tsukutounashi’分别和中国的‘义乌梨子’和‘棕包梨’表现出近缘关系。‘称名寺梨 (Shoumyoujinashi)’分别与中国的‘义乌梨子’和‘饼子梨’有较高的相似系数。‘棕包梨’与‘高知 11号’、‘秋白砂梨’与‘长十郎’分别显示了最高的相似系数。

历史上,中国宁波—日本鹿儿岛—高知县—大阪的堺市是中国和日本进行贸易的一条非常重要的海路。中国砂梨很可能通过这条路线传到日本九州的鹿儿岛和四国的高知,再由这些地方传到日本其他地方繁殖选育,形成了现在的日本梨系统。为了全面了解日本梨品种的演化和与中国砂梨的关系,尚需要收集鹿儿岛地区的地方品种,扩大中国梨的取样数量,用不同的 DNA 标记进行研究。

参考文献:

- 1 Kikuchi A. Horticulture of fruit trees, Vol. 1. Tokyo: Yokendo, 1948. 64~120
- 2 Kajiuira I, Suzuki S. Variations in fruit shapes of Japanese pear cultivars (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder): Geographic differentiation and changes. Jpn. J. Breeding, 1980, 30: 309~328
- 3 Jang J T, Tanabe K, Tamura F, Banno K. Identification of *Pyrus* species by leaf peroxidase isozyme phenotypes. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1992, 61: 273~286
- 4 Teng Y, Tanabe K, Tamura F, Itai A. 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, 2002, 127: 262~270
- 5 Teng Y, Tanabe K, Tamura F, Itai A. Genetic relationships of pear cultivars in Xinjiang, China as measured by RAPD markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2001, 76: 771~779
- 6 Monte-Corvo L, Cabrita L, Oliveira C, Leitão J. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47: 257~265
- 7 Kajiuira I, Sato Y. Recent progress in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) breeding and descriptions of cultivars based on literature review. Bulletin of Fruit Trees Research Station Extra, 1990, 1: 1~329