

不同梨品种的 AFLP 分子鉴别

杨谷良¹, 秦仲麒²

(1. 黄冈师范学院 生命科学与工程学院, 湖北 黄冈 438000; 2. 国家果树种质武昌砂梨圃, 湖北 武汉 430209)

摘要: 利用 8 对引物对 30 个梨品种进行 AFLP 分析。结果表明: 共检测到 203 个标记, 其中多态性标记为 135 条, 占有标记数的 66.5%, 证明不同梨品种在 DNA 水平上存在广泛的遗传差异。根据 AFLP 标记结果计算不同梨品种间的遗传距离, 通过聚类, 发现所有品种聚为 4 个组: 第 1 组主要是日本梨及与日本梨有亲缘关系的部分品种; 第 2 组为中国砂梨品种; 第 3 组只有 2 个品种: 黄冠梨和清香梨, 它们的一个共同亲本为新世纪梨; 第 4 组是康德梨, 其亲本中有 1 个是西洋梨, 被单独聚为一类。从聚类结果看, 不同的品种之间表现出了一定的地域相关性。

关键词: 梨; 品种; 特异性条带; AFLP

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0123-03

我国的梨属植物有 14 个种, 栽培品种达到 3 500 个左右^[1], 种质资源相当丰富, 并且不断培育出新的品种。同时, 各地之间品种交流相当频繁, 品种混杂现象不可避免。所以, 很有必要开展梨品种种质资源的鉴定工作^[2]。由于 DNA 序列的多态性与品种的亲缘关系相关, 品种的亲缘关系越近, 遗传变异越小。所以, 可以根据扩增条带的差异性来鉴定不同的品种, 确定品种间的亲缘关系^[3]。现以生产上广泛推广或者具有一定特色的梨地方品种为材料, 通过 AFLP 分析, 以期对梨品种鉴定、亲缘关系分析等研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验样品于 2007 年 5 月采自湖北省农业科学院果茶所武汉砂梨种质资源圃, 采集适量的叶片后, 用冰盒保存带回实验室, 置于-70℃冰箱中保存、备用。所有样品的名称、亲本、原产地等相关资料见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 参考杨谷良等^[4]的方法提取各试验材料的总 DNA。

1.2.2 AFLP 分析 采用北京鼎国生物技术有限公司 AFLP 试剂盒, PCR 扩增在 eppendorf 梯度 PCR 仪上进行。筛选 8 对引物组合为: Ea/M7、Ec/M3、Ec/M7、Ed/M3、Ed/M6、Ed/M7、Eg/M1、Eg/M7。

1.2.3 电泳 选择性扩增产物经变性后在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上进行, 80 W 恒功率电泳至 Loading Buffer 带移动到胶的下端为止。电泳后参考 Tixier 等^[5]的银染方法进行 AFLP 指纹显色反应。Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司的 100 bp DNA Ladder Marker。

1.3 数据转换及分析方法

假定凝胶上所有迁移位置相同的条带均来自同一位点上的同一序列。对扩增产物的电泳结果采用“0-1”系统记录谱带位置, 观察某一扩增条带的有无, 有带记为“1”, 无带记为“0”。用 NTSYSpc 2.11F 软件进行数据分析。对原始矩阵用 SimQual 程序求 DICE 相似系数矩阵, 并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

利用所筛选出的 8 对(表 2)带型清晰且多态性较高的引物组合对 30 个梨品种进行 AFLP 分析, 共扩增出 203 条带, 其中多态性条带为 135 条, 多态性百分率平均为 66.5%。每个引物组合产物的扩增条带数存在差异, 引物组合 Ea/M7 产生的扩增条带最多(图 1), 达 40 条带, 引物组合 Ed/M6 产生最少, 为 13 条, 平均每个引物组合产生条带数为 25.4 条。

2.2 聚类分析

用 Ntsyspc 2.11 软件 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成亲缘关系树状图(图 2)。

第一作者简介: 杨谷良(1974-), 男, 湖南宁乡人, 博士, 讲师, 现从事梨自交不亲和性研究工作。E-mail: swygl@hgnu.edu.cn。
基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2006ABA186); 湖北省教育厅青年基金资助项目(Q200727004); 湖南省科技三项基金资助项目(QJZY2155)。

收稿日期: 2010-09-26

表 1		供试梨品种材料			
编号	品种名	亲本	原产地	种类	备注
C1	爱甘水	长寿× 多摩	日本	砂梨	
C2	幸水	菊水× 早生幸藏	日本	砂梨	1967年引入
C3	黄金	二十世纪× 新高	韩国国立园艺所	砂梨	
C4	青魁	(八云× 袁家)× 杭青	浙江大学	砂梨	1990
C5	金水2号	长十郎× 江岛	湖北省农科院果茶所	砂梨	
C6	黄冠	雪花× 新世纪	河北林科院石家庄果树所		
C7	得胜香	偶然实生	四川	砂梨	
C8	雪英	雪花× 新世纪	浙江		
C9	雅青	杭青× 鸭梨	浙江大学		1986 育成
C10	红香酥	库尔勒× 鹅梨	中国农科院郑州果树所	白梨	1980 杂交
C11	圆黄	早生赤× 晚三吉	韩国国立园艺所	砂梨	
C12	鄂梨1号	伏梨× 金水酥	湖北省农科院果茶所	砂梨	2002 育成
C13	金秋	慈梨× 晚三吉	湖南安江	砂梨	1994年鉴定
C14	康德	西洋梨× 中国砂梨	美国	西洋梨	
C15	鄂梨2号	中香× (伏梨× 启发)	湖北省农科院果茶所	砂梨	2002 育成
C16	晚三吉	早生三吉的偶然实生	日本	砂梨	1953 引入
C17	八月酥	栖霞大香水梨× 鸭梨	郑州果树所		1996 育成
C18	清香	新世纪× 三花	浙江园艺所等	砂梨	1978 杂交
C19	新雅	鸭梨× 新世纪	浙江大学		
C20	金花4号	雪梨实生	重庆果树所等		
C21	七月酥	幸水× 早酥	中国农科院郑州果树所	砂梨	
C22	安农1号	二宫白实生	湖南安江农校	砂梨	
C23	二宫白	鸭梨× 真谕	日本	砂梨	
C24	丰水	(菊水× 八云)× 八云	日本	砂梨	1954年育成
C25	早酥	苹果梨× 身不知	中国农科院果树所	白梨	1956
C26	长十郎	偶然实生	日本	砂梨	
C27	早美酥	新世纪× 早酥	中国农科院郑州果树所	砂梨	
C28	爱宕	二十世纪× 金春秋	日本	砂梨	
C29	冀蜜	雪花× 黄花	河北农科院石家庄果树所		1977 育成
C30	翠冠	幸水× (新世纪× 杭青)	浙江省农科院	砂梨	

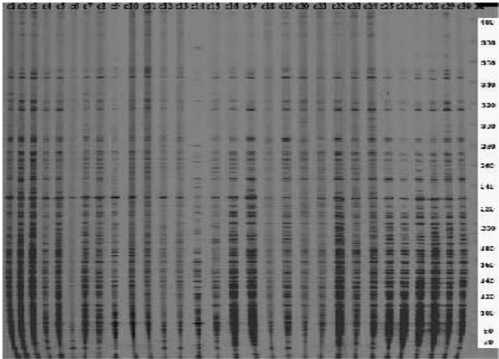


图1 AFLP引物组合 Ea/ M7 对所选样品的扩增效果
注: 从左到右依次为 C1~C30.

表 2 8 对引物组合的扩增结果及产生的多态性

引物组合	总条带数	多态性条带数	多态性百分率 %
Ea/ M7	40	8	20. 0
Ea/ M3	26	17	65. 4
Ea/ M7	19	16	84. 2
Ed/ M3	29	26	89. 7
Ed/ M6	13	9	69. 2
Ed/ M7	20	16	80. 0
Eg/ M1	33	27	81. 8
Eg/ M7	23	16	69. 7
小计	203	135	66. 5

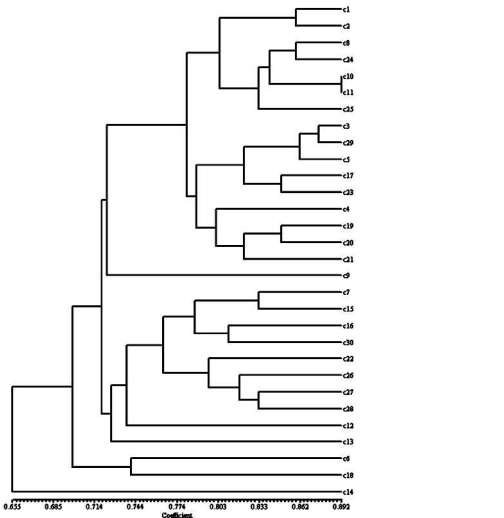


图2 基于AFLP方法的UPGMA聚类分析树状图

从图2可看出,当相似系数在0.720左右时,所有品种聚为4个组,第1组主要是日本梨及与日本梨有亲缘关系的一些品种;日本梨及与日本梨有亲缘关系的品种首先聚在一起,然后与部分中国白梨和砂梨聚在一起对于日本梨的起源,主要有2种学说:渡来说与改良学。渡来说的观点认为,日本现在栽培的梨品种是从中国大

陆与朝鲜传到日本的^[6]；第2种观点认为，日本梨品种是从日本野生的 *P. pyrifolia* 中改良而来的^[7]。由于在日本还没有发现野生的 *P. pyrifolia* 种群，所以，目前普遍支持第1种观点。从该试验的聚类结果可看出，日本梨及与日本梨有亲缘关系的品种与部分中国白梨和中国砂梨被聚为一类。可能是因为地理上的长期隔离，由于进化，在遗传上发生了一定的变异，导致部分中国砂梨被单独聚为一类。第2组为中国砂梨品种；第3组只有2个品种：黄冠和清香梨，它们的一个共同亲本为新世纪^[8]；第4组是康德梨，其亲本之一是西洋梨^[8]，被单独聚为一类。

3 结论与讨论

由于 AFLP 技术结合了 RFLP 和 PCR，具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性。所产生的标记数目是无限的，理论上可产生覆盖整个基因组、无限数目的标记，其标记具有较高的遗传多态性^[8]。在该试验中，平均每组引物产生的条带数为 25 条，多态百分率达 66.4%，具有扩增效率高、多态性强的特点。

由于梨的栽培面积广泛，各栽培地之间气候复杂，地形多变，由于植物对生态环境的适应和不断的品种改良，地理来源与品种间的相似系数会呈现一定的相关性，但不表现必然联系^[9]。该试验所研究的 30 个材料被聚类为四大类，其中，日本梨品种及与其有亲缘关系的品种和部分中国梨聚为一类，这有效的支持了日本梨品种是由中国和韩国引进的观点，同时，可能由于地域上的相对隔离，随着品种对环境的适应和品种的改良，部分品种的基因型发生了一定的变化，因而与其它一些中国梨品种产生了较远的亲缘关系。

黄冠和清香梨被单独聚为一类，二者有一个共同特点，其亲本之一为新世纪，但没有与另外 2 个具有新世纪亲缘关系的新雅和翠冠聚在一起，可能与遗传上的偏

向性有关系，同时也可能是因为随着品种的改良和对环境的适应，物种的基因型发生改变，因此，与其它日本梨品种的亲缘关系稍微远一些。黄冠梨的亲本为雪花（白）×新世纪（日本砂梨），和另一亲本之一为新世纪的砂梨品种清香聚为一类，所以，具有遗传上的亲父本性，可以认定为一个砂梨品种。

康德梨是从美国引进的一个品种，其亲本之一为西洋梨，其叶片具有钝圆波状齿，叶尖小，叶片卵圆形，叶基截形，而其它东方梨品种的叶片一般较大，边缘有锐锯齿，在形态特征上也与东方梨存在较大的差异，被单独聚为一类。

参考文献

[1] 菊富慎 王宇霖. 中国果树志(梨)[M]. 3 卷. 上海: 上海科学技术出版社 1963: 62-63, 339-345.
[2] Pan Z, Kawabata S, Sugiyama N, et al. Genetic diversity of cultivated resources of pear in north China[J]. Acta Hort., 2002, 58(7): 187-194.
[3] Vos P, Hogens R, Bleeder M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res., 1995, 23(21): 4407-4414.
[4] 杨谷良, 谭晓风, 乌云塔娜. 应用 CTAB 法对砂梨品种 DNA 提取效果的研究[J]. 生物技术, 2005, 15: 41-43.
[5] Tixier M H, Sourdille R M, Leroy P, et al. Detection of wheat microsatellites using a non-radioactive silver-nitrate staining method[J]. J Genet Breed 1997, 51: 175-177.
[6] 尾浦一郎, 山木昭平, 大村三男 等. 東アジア産ナシ類果實中に含まれ糖成分の歴史的変化と糖組成について主成分分析による品種分類[J]. 育種, 1979, 29: 1-12.
[7] 菊池秋雄. 果树園藝學(上卷)果樹種類各論[M]. 東京: 養賢堂 1948: 98-108.
[8] Lee G P, Lee C H, Kim C S. Molecular markers derived from RAPD SCAR and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *P. pyrifolia* and *P. communis*[J]. Theor Appl Genet 2004, 108: 1487-1491.
[9] 俞德浚. 中国果树分类学[M]. 北京: 农业出版社, 1979: 122-143.

AFLP Fingerprinting Analysis of Different Pear Cultivars

YANG Gu-liang¹, QIN Zhong-qi²

(1. Huanggang Normal College of Life Science and Engineering, Huanggang, Hubei 438000; 2. Wuchang Pears Garden, Wuhan, Hubei 430209)

Abstract: Eight pairs of AFLP primers were screened out and used for the analysis of 30 *Pyrus* cultivars such as *Aiganshuili pyrus* et al. These primers generated 203 fragments, 135 polymorphism fragments among them. Percentage of the polymorphism fragments produced by each pair of primers was 66.5% in average. All these data indicated that considerable genetic variation existed among the studied pear cultivars at DNA level. Molecular genetic distances among the studied cultivars were calculated, and the relationship among them was described quantitatively. All of the cultivars were clustered into 4 groups. The cultivars of the 1st group were the Japanese pear or have genetic relationship with Japanese pear. The cultivars of the 2nd group were mainly the cultivars of Chinese pear. Huangguanli *pyrus* and Qingxiangli *pyrus* were clustered to the 3rd group; these two cultivars had a common parent of Shinseiki *pyrus*. The 4th group had only 1 cultivar of *Kangdeli pyrus*. One of its parents was *Pyrus communis*, was clustered into 1 group. The clustering results showed that different varieties had certain regional correlation.

Key words: pear; cultivars; characteristic bands; AFLP