

SSR 标记技术在梨属植物亲缘关系研究中的应用

鲁 敏¹, 汤 浩 茹², 罗 娅², 张 勇², 刘 泽 静²

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘 要:通过 SSR 标记技术在梨属植物属间、种间及亲子鉴定等方面的亲缘关系分析, 阐明了 SSR 标记在梨属植物亲缘关系研究中的重要性。

关键词:梨属植物; SSR; 亲缘关系

中图分类号:Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0193-04

梨属蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae)梨属(*Pyrus* L.)植物, 是世界上最主要的水果之一, 在欧洲和亚洲已经栽种了 2 000~3 000 年。梨在全世界约有 30 多个种。一般认为梨起源于新生代中国西部的山脉地带。由于梨属植物群落的地理隔离和对寒冷干旱条件的适应性, 促使梨属植物发生了演化。经演化将世界梨属植物的 30 余种中的 28 种分为 2 个系 4 个种群, 即西方梨系(包括欧洲种群、北非种群和西亚种群)和东方梨系(仅 1 个东亚种群); 同时形成了世界栽培梨的三大起源中心, 即中国中心、中亚中心和近东中心。梨属植物亲缘关系的研究不仅对揭示物种的演化有重要意义, 而且有利于指导梨的杂交育种工作, 如对亲本的检测和对后代分离情况进行预测等。

SSR(Simple Sequence Repeat)技术以其丰富的多态性、共显性遗传、特异性强、发生频率高、分布于整个基因组、重复性好和操作简便等优点已日益受到重视, 而正是这些优点使其在梨属植物亲缘关系研究中发挥着极为显著的作用。目前, 梨属植物上 SSR 标记大部分来自于苹果上的 SSR^[1-3], 但随着梨属植物 SSR 标记的发展, 从梨属植物自身开发的引物已日益增多^[4-8]。随着研究的进一步深入, SSR 标记将在梨属植物亲缘关系研究中发挥更为广泛的作用。

1 属间亲缘关系研究

梨属(*Pyrus* L.)与苹果属(*Malus* × *domestica* Borkh.)植物在分类系统中同属于蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae), 亲缘关系非常近。Dickson 等^[9]证实

了这个观点, 认为苹果核 DNA 内容物相似度大概为 66.7%。而因为苹果 SSR 标记之间的交叉可转移性^[8,10]及其侧翼序列的高度保守性^[11], 近年来, SSR 标记在苹果亲缘关系研究中得到了广泛应用。随着苹果上的 SSR 标记引物相继成功地应用于梨属植物^[6,12-22], 推动了苹果基因组比较作图的发展, 对苹果亲缘关系的研究上升到了分子水平。Yamamoto 等^[13]以 SSR 位点为锚式位点对‘Discovery’图谱与‘Bartlett’图谱之间的相关性进行了研究, 发现 37 个 SSR 位点能够在‘Bartlett’与‘Discovery’染色体上彼此连锁, 其中只有 2 个 SSR 位点定位到了不同的连锁群, 而其余 35 个则被定位到假定的苹果同源染色体上, 表明苹果与梨的 SSR 位点在位置及连锁上都是极其保守的, 也证明了苹果与梨在基因组成上的高度相似性。Pierantoni 等^[22]分别采用 SSR 标记对‘Passe Crassane’×‘Harrow Sweet’和‘Abbè Fétel’×‘Max Red Bartlett’进行了遗传作图, 并将此 4 个梨遗传连锁图谱与苹果‘Discovery’和‘Fiesta’的遗传连锁图谱进行基因组比较作图, 发现 6 个图谱在 3 个连锁群(LG10, LG12, LG14)上发生了交集, 并且 SSR 位点几乎分布在其相同位置, 证明了苹果遗传图谱的相似性。

Yamamoto 等^[6]研究表明, 来自苹果的 31 个 SSR 中, 已有 14 个被定位到了梨的公共图谱上; 而来自亲缘关系稍远的李亚科、李属(2n=16, x=8)的桃的 66 个 SSR 中, 只有 6 个被定位到了该图谱上; 在来自樱桃的 5 个 SSR 中, 也只有 1 个得到了定位。王彩虹等^[23]用来自苹果基因组的 6 个 SSR 标记引物, 对蔷薇科植物的 6 属(苹果属、梨属、李属、山楂属、木瓜属、蔷薇属)19 个种的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 发现对引物 CH03dl1 来说, 除了苹果属和梨属的材料外, 在其它几个属间及种间几乎观察不到多态现象。同样证明了梨属(*Pyrus* L.)与苹果属(*Malus* × *domestica* Borkh.)具有极近的亲缘关系。

第一作者简介:鲁敏(1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为果树遗传生理。E-mail: 48181266@qq.com.

责任作者:汤浩茹(1963-), 男, 重庆人, 教授, 博士生导师, 现主要从事果树遗传育种与生物技术等研究工作。E-mail: htang@sicau.edu.cn.

收稿日期:2012-08-27

2 种间亲缘关系研究

梨属植物全世界约有 30 多个种,栽培种主要有白梨(*P. bretschneider*)、砂梨(*P. pyrifolia* Nakai)、秋子梨(*P. ussuriensis*)、新疆梨(*P. sikiangensis*)和西洋梨(*P. communis*)等,因为梨种间杂交是梨种进化的重要途径,所以各种之间亲缘关系显得较为复杂。

Bao 等^[24]、曹玉芬等^[25]采用 SSR 标记明确将供试梨属材料划分为西洋梨和东方梨两大类,这与江先甫等^[26]从形态特征, Teng 等^[27-29]采用 RAPD、ISSR 标记研究结果一致,表明西洋梨与东方梨亲缘关系较远,且东方梨和西洋梨可能是独立演化的。

Kimura 等^[30]、曹玉芬等^[25]、Bao 等^[24]采用 SSR 标记对梨属植物进行亲缘关系分析,均发现原产中国的白梨和砂梨品种归类相互交错,说明白梨和砂梨具有很近的亲缘关系。这与林伯年等^[31]采用过氧化物同工酶标记;曲柏宏等^[32]、贾彦利等^[33]采用 RAPD 标记; Lin 等^[34]采用 AFLP 标记;黄礼森等^[35]、李秀根等^[36]采用花粉形态研究结果一致。Teng 等^[28-29]根据其 RAPD、ISSR 标记分析结果,大胆推测白梨系统可能是砂梨系统的一个变种,并提出用 *Pyrus pyrifolia* var. *sinensis* (Lindley) Teng et Tanabe 来表示白梨系统的建议。

Bao 等^[24]采用 6 对 SSR 标记引物对原产东亚的 98 个梨品种和类型进行亲缘关系研究,发现一些日本梨对中国砂梨显示出很高的亲和力,表明中国砂梨和日本梨具有很近的亲缘关系,这与 Teng 等^[28-29]、沈玉英等^[37]采用 RAPD、ISSR 标记研究结果一致。滕元文等^[38]还认为砂梨和日本梨系统可能起源于共同的祖先,即分布于我国长江流域的野生砂梨。并且沈玉英等^[37]推测,中国砂梨很可能通过中国宁波-日本鹿儿岛-高知县-大阪的堺市这条中国和日本进行贸易的重要海路传到日本九州鹿儿岛和四国的高知,再由这些地方传到日本其它地方繁殖选育,形成了现在的日本梨系统,其中一部分较原始的类型保留了和中国梨较近的亲缘关系。曹玉芬等^[25]同时也发现韩国砂梨品种与我国砂梨品种和日本砂梨品种聚在一起,表明韩国砂梨品种的起源可能也是来自于我国长江流域的野生砂梨。

Kimura 等^[30]利用 SSR 标记技术对亚洲梨(28 个日本梨和 19 个中国梨)和欧洲梨进行了亲缘关系分析,发现中国梨中的白梨和新疆梨并没有明显区分开。新疆梨的亲缘关系系统至今没有得到很好的解决,但其与白梨聚在一起的事实却证明了江先甫等^[26]从形态特征, Teng 等^[27]采用 RAPD 标记得出的关于认可白梨可能是新疆梨的杂交亲本之一的观点。

3 亲子关系鉴定

梨为配子体型自交不亲和性果树^[39-40],现今梨的栽

培品种大多都是在自然杂交的情况下形成的或是育种学家有意识地杂交育成的。前者系谱复杂,许多品种具有不同种之间的中间特性。后者系谱一般都很清楚,但也有个别品种,由于各种原因,对杂交组合的记载有误或丢失,根据表型性状所做的亲子关系推断存在误差。所以,不论是前者,还是后者,在某些时候,都需要用亲子鉴定来判断亲本与子代之间是否存在亲生关系。

Yamamoto 等^[12]利用 7 个 SSR 标记引物对 6 组亲子组合进行了确认,证明 282-12 是‘丰水’与‘拉法兰西’杂交的子代;‘拉法兰西’、‘巴黎’、‘晚三吉’和‘丰水’分别是‘Silver Bell’、‘Le Lectier’、‘Hougetsu’和‘Ckusui R’的母本;而‘幸水’则是‘Akiduki’的父本。同时发现‘Syugyoku’与其中一个亲本‘幸水’表现出显著不亲和性,证明‘幸水’可能不是其亲本之一。

‘新世纪’被认为是‘20 世纪’与‘长十郎’的杂交后代,但 Bassil 等^[19]在进行种质鉴定时偶然发现在 7 个 SSR 扩增位点中,‘长十郎’与‘新世纪’在 6 个位点上都存在差异,可以断定保存在美国奥勒冈州科瓦利斯县种质圃中收录的‘长十郎’可能并不是‘新世纪’的亲本之一。

Kimura 等^[41]用 20 种 SSR 标记对梨种内杂交产生的 8 个品种及种间杂交得到的 6 个品种的亲子关系进行了鉴定。结果发现‘长十郎’和‘二十世纪’不是‘丹泽’的双亲,‘晚三吉’不是‘大原红’的亲本之一,‘二宫’的父本也不是‘Le Conte’,‘梨-14’和‘八云’也不是‘丰水’的双亲。为了进一步确认‘丰水’的双亲, Sawamura 等^[7]采用 10 对 SSR 标记对挑选出的 9 个可能的亲本组合加以确定,发现‘丰水’的双亲可能为‘幸水’和‘I-33’(‘石井早生’×‘二十世纪’)。进一步通过对叶绿体 trnL-F 区域进行测序确定‘丰水’的母本为‘幸水’,父本为‘I-33’。这个发现对于日本梨品种育种工作中的亲本选择和选配有十分重要的意义。

4 SSR 标记在梨属植物上的应用前景

由于具有多态性好、共显性、技术简单等优点,SSR 技术已成为梨属植物亲缘关系研究的重要工具之一,是已有的分子标记方法(RFLP 技术和 RAPD 技术等)和传统方法的补充和完善。总体而言,苹果属植物的 SSR 标记对梨属植物遗传育种具有重要意义,因为苹果 SSR 标记研究起步较早,遗传图谱构建、功能基因及 QTL 定位等研究相对较为成熟。梨属植物标记辅助选择育种可在借鉴苹果研究成果的基础上,进一步加以改良与创新,随着 SSR 标记技术的不断进步,可从以下几方面开展相应研究,一是构建梨属植物及蔷薇科植物的系统发育树;二是建立我国梨属植物种质资源指纹图谱数据库;三是通过种间杂交、突变体筛选,定位和克隆我国梨属植物资源的抗性和品质基因,以及杂交优势的预测。

参考文献

- [1] Guilford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 249-254.
- [2] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1069-1076.
- [3] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) Mol[J]. Breed, 2002, 10: 217-241.
- [4] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear[J]. Euphytica, 2002, 124: 129-137.
- [5] Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, et al. Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Molecular Ecology Notes, 2002(2): 14-16.
- [6] Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, et al. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears [J]. Theor Appl Genet, 2002, 106: 9-18.
- [7] Sawamura Y, Toshihiro Saito, Norio Takada, et al. Identification of Parentage of Japanese Pear 'Housui' [J]. Japan Soc Hort Sci, 2004, 73(6): 511-518.
- [8] Inoue E, Matsuki Y, Anzai H, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Molecular Ecology Notes, 2007(7): 445-447.
- [9] Dickson E E, Arumuganathan K, Kresovich S, et al. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae[J]. Am J Bot, 1992, 79: 1081-1086.
- [10] Fernandez F, Harvey N G, James C M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.) [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(4): 1039-1041.
- [11] Yamamoto T, Sawamura T, Kimura T, et al. Microsatellite markers of *Pyrus* spp.: Sequence similarity and polymorphism between pear and apple identified by apple SSR[C]. Plant and Animal Genome VIII Conference. Town and Country Hotel, San Diego, CA, 2000.
- [12] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 865-870.
- [13] Yamamoto T, Kimura T, Satito T, et al. Genetic Linkage Maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. Acta Horticulturae, International Society for Horticultural Science (ISHS) [J]. Leuven Belgium, 2004, 663(1): 51-56.
- [14] Bouvier L, Guerif P, Djulbic M, et al. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers[J]. Euphytica, 2002, 123: 255-262.
- [15] Terakami S, Shoda M, Adachi Y, et al. Genetic mapping of the pear scab resistance gene Vnk of Japanese pear cultivar Kinchaku[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 743-752.
- [16] 易苟文, 李进斌, 周小昱, 等. 云南省梨属植物资源的微卫星分析研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(2): 192-196.
- [17] Hemmat M, Weeden N F, Brown S K, et al. Mapping and evaluation of *Malus × domestica* microsatellites in apple and pear[J]. Amer Hort Sci, 2003, 128: 452-620.
- [18] Maharaj R, van Dyk M M, Rees D J G, et al. Development of microsatellite markers for marker-assisted breeding in pears (*Pyrus* spp.) [C]. Acta Horticulturae, International Society for Horticultural Science (ISHS), 2005: 307-313.
- [19] Bassil N V, Hummer K E, Postman J D. Microsatellites are used to examine apple and pear identities and genetic relationships[J]. Hort Science, 2006, 41(4): 993.
- [20] Booi S, van Dyk M M, du Preez M G, et al. Molecular typing of red and green phenotypes of 'BON ROUGE' pear trees, with the use of microsatellites. ISHS[C]. Acta Horticulturae, IX International Pear Symposium, 2005, 671: 293-297.
- [21] Wunsch A, Hormaza J I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 113: 37-43.
- [22] Pierantoni L, Cho K H, Shin I S, et al. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1519-1524.
- [23] 王彩虹, 田义柯, 赵静. 来自苹果的 SSRs 在蔷薇科植物资源上的通用性分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 500-502.
- [24] Bao L, Chen K S, Zhang D, et al. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers[J]. Genet Resour Crop Evol, 2007, 54(5): 959-971.
- [25] 曹玉芬, 刘凤之, 高源, 等. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 305-310.
- [26] 江先甫, 初庆刚, 张长胜. 中国梨属植物的分类和演化[J]. 莱阳农学院学报, 1992, 9(1): 18-21.
- [27] Teng Y, Tanabe K, Tamura F, et al. Genetic relationships of pear cultivars in Xinjiang, China as measured by RAPD markers[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2001, 76: 771-779.
- [28] Teng Y, Tanabe K, Tamura F, et al. Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers[J]. J Am Soc Hort Sci, 2002, 127: 262-270.
- [29] Teng Y W, Tanabe K. Reconsideration on the origin of cultivated pears native to East Asia. 4 International Symposium of Taxonomy and Nomenclature of Cultivated Plants[J]. Acta Horticulturae, 2004, 634: 175-182.
- [30] Kimura T, Shi Y Z, Shoda M, et al. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis [J]. Breeding Science, 2002, 52: 115-121.
- [31] 林伯年, 沈德绪. 利用过氧化物同工酶谱分析梨属植物种质特性及亲缘关系[J]. 浙江大学学报, 1981, 9(3): 235-243.
- [32] 曲柏宏, 金春兰, 陈艳秋, 等. 梨属种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2001, 28(5): 460-462.
- [33] 贾彦利, 田义柯, 王彩虹, 等. 梨品种资源遗传差异的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(4): 525-528.
- [34] Lin S, Fang C, Song W, et al. AFLP molecular markers of 10 species of T1 in China[J]. Acta Horticulturae, 2002, 587: 233-236.
- [35] 黄礼森, 李树玲, 傅仓生, 等. 中国梨属植物花粉形态的比较观察[J]. 园艺学报, 1993, 20(1): 19-24.
- [36] 李秀根, 杨健. 花粉形态数量化分析在中国梨属植物起源、演化和分类中的应用[J]. 果树学报, 2002, 19(3): 145-148.
- [37] 沈玉英, 滕元文, 田边贤二. 部分中国砂梨和日本梨的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 621-624.
- [38] 滕元文, 柴明良, 李秀根. 梨属植物分类的历史回顾及新进展[J]. 果树学报, 2004, 21(3): 252-257.
- [39] 张绍铃, Hiratsuka Shin, 徐国华, 等. 梨自交不亲和及其亲和突变品种花柱内 S₁ (S₁SM) 基因的表达与作用比较[J]. 植物学报, 2001, 43(11): 1172-1178.
- [40] 徐义流, 张绍铃. 梨配子体自交不亲和性及其分子机理[J]. 果树学报, 2003, 20(1): 59-63.
- [41] Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, et al. Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. [J]. Japan Soc Hort Sci, 2003, 72: 182-189.

大戟科主要木本油料植物组培快繁中 初代诱导研究进展

冯邦朝¹, 黄艳², 朱镜如², 罗克明^{2,3}

(1. 百色学院 化学与生命科学系, 广西 百色 533000; 2. 西南大学 生命科学学院 资源植物研究所, 重庆 400715;
3. 西南大学 生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:从组培快繁工厂化育苗的角度, 通过查阅相关文献资料, 从外植体、基本培养基、外源激素以及培养条件等方面, 对油桐、乌桕、麻疯树的组织培养快繁技术中的初代芽诱导进行了综述和分析, 概括总结出适合工厂化生产的初代芽诱导的技术特点, 并提出初代诱导中尚需解决的问题, 为建立成熟、稳定、高效的组培快繁体系提供参考。

关键词:大戟科; 木本油料植物; 初代诱导

中图分类号:Q 813. 1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号** 1001—0009(2012)23—0196—04

大戟科是产油植物的大科, 从草本到大乔木都有油料植物, 其中研究最多、生产上比较重要的是油桐、乌桕、麻疯树三大木本植物。组织培养快繁技术是目前大戟科植物研究的一项重要内容。用组织培养法繁殖植物具有繁殖周期短、繁殖速度快, 能够进行苗木脱毒, 培养条件可以人为控制并进行工厂化育苗, 因而其应用越来越广泛^[1]。组织培养快繁技术环节中, 初代芽的诱导

是关键性的环节, 诱导出的初代芽苗的质量、数量决定着整个组培快繁流程的效率与产品质量。现通过查阅相关文献资料, 从外植体、基本培养基、外源激素以及培养条件等方面, 对油桐、乌桕、麻疯树的组织培养快繁技术中的初代芽诱导进行了综述和分析, 试图概括总结出适合工厂化生产的初代芽诱导的技术特点, 并提出初代诱导中尚需解决的问题, 为建立成熟、稳定、高效的组培快繁体系提供参考。

1 外植体的选择

1.1 外植体的种类

无性繁殖是保持品种优良特性的必要途径。经过有性阶段、愈伤组织阶段产生的植物器官, 容易产生变异, 所以生产上一般采用优良株系的营养器官做外植体。初代芽诱导的方法有 2 种, 1 种是外植体原有的芽直接萌动形成芽苗, 包括顶芽和腋芽; 另 1 种外植体诱导出不定芽。不定芽再生有直接途径和间接途径。直接途径是在外植体组织上直接分化出不定芽, 不经过愈

第一作者简介:冯邦朝(1966-), 男, 广西靖西人, 本科, 农艺师, 现主要从事资源植物的教学与科研工作。E-mail: fbch66@163. com.

责任作者:罗克明(1974-), 男, 重庆潼南人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事转基因植物基因的删除及植物转录因子调控及林木育种等研究工作。E-mail: luokeming@hotmail. com.

基金项目:人事部留学回国人员科技活动择优资助项目; 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2009B018); 重庆市自然科学基金资助项目(2009BA1004); 重庆市自然科学基金“直通车”资助项目(CSTC, 2009BB004)。

收稿日期:2012—08—31

The Applied Research Progression of SSR in Studying Parentage Relationship of *Pyrus* L.

LU Min¹, TANG Hao-ru², LUO Ya², ZHANG Yong², LIU Ze-jing²

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: SSR markers have been utilized extensively in study of parentage relationship of *Pyrus* L., including parentage relationship in the genus, in the species, and in the cultivated varieties. It's of great importance in study of parentage relationship in *Pyrus* L. .

Key words: *Pyrus* L. ; SSR; parentage relationship