

doi:10.11937/bfyy.20170631

## 基于成熟期的梨品种遗传多样性 SSR 分析

赵思思, 刘兴菊, 李雪雁, 王晓叶, 梁海永, 刘 铭

(河北农业大学 林学院, 河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

**摘 要:**以 63 个梨主栽品种为试材, 采用 SSR 分子标记技术与毛细管电泳技术相结合的方法, 研究了梨不同成熟期的种质资源遗传多样性, 以为梨栽培品种的品种鉴别、亲子关系鉴定、分类及系统关系研究、遗传图谱构建与标记辅助育种在分子水平上提供参考依据。结果表明: 3 份梨种质的观测等位基因数 ( $N_a$ ) 平均为 14.8, 有效等位基因数 ( $N_e$ ) 平均为 7.363 1, Shannon 多样性指数 ( $I$ ) 平均为 2.195, 期望杂合度 ( $N_{ei}$ ) 平均为 0.845, 说明梨总群体遗传变异偏高。依据梨系统将其分为白梨、秋子梨、日本梨、砂梨和西洋梨 5 个类群, 其中白梨系统在 Shannon 多样性指数和期望杂合度上最高, 分别为 2.069 9 和 0.831 1, 秋子梨系统最低, 分别为 0.420 8 和 0.303 6, 白梨与砂梨类群的遗传一致度最高为 0.715 2。

**关键词:**梨; 简单重复序列(SSR); 毛细管电泳; 成熟期; 遗传多样性

**中图分类号:**S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)16-0043-07

梨(*Pyrus* L.)属蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae)植物, 在我国栽培范围广泛。目前我国梨树有 18 个种, 丰富的梨种质资源不仅为有效挖掘和筛选适合育种需求的种质提供了宝贵的材料, 同时也有利于培育满足市场和生产需要的新品种。我国早在 20 世纪 50 年代就开始了梨属植物种质资源的研究, 主要从解剖学、同工酶和细胞学等方面进行<sup>[1-4]</sup>。由于局限在传统的鉴定方法中, 难以满足对保存的大量梨资源进行有效的多样性分析的需求, 同时许多栽培品种是由地方品种构成的, 而地方品种大都是从偶然实生苗或芽变中选种, 无法利用传统的表观性状进行鉴别<sup>[5-9]</sup>。

针对梨种质资源遗传多样性的 DNA 分子标

记研究始于 1998 年。毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)是在 20 世纪 80 年代后期迅速崛起的一种新型分离分析技术, 相比其它分离技术, 具有快速、高效、定量、灵敏、可重现及自动化等优点, 目前在小分子、小离子、多肽及蛋白质的分离分析研究中得到了广泛的应用, 在 DNA 测序、DNA 多态性分析等也有应用<sup>[10-15]</sup>。随着分子生物学的发展, DNA 标记技术在梨栽培品种种质资源评价中得到了广泛应用。但是, 关于梨不同成熟期的梨种质资源遗传多样性的研究较少, 该研究利用 SSR 分子标记技术与毛细管电泳技术相结合, 对不同成熟期的梨栽培品种进行分析, 并对栽培品种的鉴别、分类和系统发育关系进行研究, 以为遗传图谱构建与标记辅助育种在分子水平上提供参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

收集 63 份梨栽培品种, 摘取顶端嫩叶, 编号放入标本收集袋, 置于一 80 ℃超低温冰箱中保存, 供试材料情况见表 1。

**第一作者简介:**赵思思(1991-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。E-mail: 852729371@qq.com.

**责任作者:**梁海永(1973-), 男, 河北保定人, 本科, 副教授, 现主要从事林业生物技术等研究工作。E-mail: lianghy@hebau.edu.cn.

**基金项目:**国家林业公益性行业资助项目(201104039); 国家林业局科技发展中心资助项目(XPC-201505)。

**收稿日期:**2017-04-06

表 1

63 份梨供试材料

Table 1

63 pear cultivars used in this study

编号 No.	品种 Variety	成熟时间 Mature time	成熟期 Mature period	编号 No.	品种 Variety	成熟时间 Mature time	成熟期 Mature period
1	“早红考密斯”梨	8月下旬至9月初	中熟	33	“甘泉”梨	8月下旬至9月上旬	中熟
2	“黄冠”梨	8月中旬	中熟	34	“21世纪”梨	7月下旬至8月上旬	中熟
3	“红太阳”梨	7月底至8月上旬	中熟	35	“金二十世纪”梨	7月下旬至8月上旬	中熟
4	“冀蜜”梨	8月下旬	中熟	36	“新水”梨	8月上旬	中熟
5	“小香水”梨	10月上旬	晚熟	37	“雪花”梨	9月中旬	中熟
6	“鸭梨”	9月下旬至10月上旬	晚熟	38	“金花4”梨	10月中旬	晚熟
7	“红巴”梨	8月下旬	中熟	39	“矮香”梨	8月下旬至9月上旬	中熟
8	“新梨7号”	7月中下旬	早熟	40	“满天红”梨	9月上中旬	中熟
9	“香蕉”梨	9月上中旬	中熟	41	“玛瑙”梨	7月中下旬	早熟
10	“八月红”梨	8月中旬	中熟	42	“早冠”梨	7月下旬至8月上旬	中熟
11	“紫巴”梨	7月下旬至8月上旬	中熟	43	“早金酥”梨	8月上旬	早熟
12	“大巴”梨	8月中旬	中熟	44	“葫芦”梨	7月上旬	早熟
13	“园黄”梨	7月中下旬	早熟	45	“硕丰”梨	9月初	中熟
14	“锦丰”梨	10月上旬	晚熟	46	“晋蜜”梨	9月底至10月上中旬	晚熟
15	“满丰”梨	9月下旬至10月上旬	晚熟	47	“七月酥”梨	7月上旬	早熟
16	“红香酥”梨	9月下旬	晚熟	48	“幸水”梨	8月上中旬	中熟
17	“早美酥”梨	7月中旬	早熟	49	“秀丰”梨	7月上中旬	早熟
18	“香红”蜜梨	10月上旬	晚熟	50	“美人酥”梨	9月中下旬	中熟
19	“爱宕”梨	10月中下旬	晚熟	51	“大水晶”梨	10月中旬	晚熟
20	“新雪”梨	9月上中旬	晚熟	52	“红安久”梨	9月下旬至10月上旬	晚熟
21	“新高”梨	10月中下旬	晚熟	53	“蜜梨”	9月中旬或下旬	中熟
22	“华酥”梨	7月上旬	早熟	54	“砀山酥”梨	9月上中旬	中熟
23	“绿宝石”梨	7月末至8月上旬	早熟	55	“早美酥”梨	7月上旬	早熟
24	“玉冠”梨	7月上旬	早熟	56	“华酥”梨	7月上旬	早熟
25	“鄂梨二号”梨	7月上旬	早熟	57	“早红”梨	7月上旬	早熟
26	“六月酥”梨	6月下旬	早熟	58	“早魁”梨	8月初	早熟
27	“筑水”梨	8月上中旬	中熟	59	“金花”梨	9月上中旬	中熟
28	“南水”梨	9月中旬	早熟	60	“五九香”梨	9月上中旬	中熟
29	“翠冠”梨	7月上旬	早熟	61	“茄”梨	8月中旬	中熟
30	“中梨1号”	7月上旬	早熟	62	“红星”梨	7月初	早熟
31	“满天红”梨	9月上中旬	中熟	63	“红茄”梨	8月中旬	中熟
32	“黄金”梨	9月中下旬	早熟				

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法<sup>[16]</sup>。取 1  $\mu\text{L}$  DNA 原液于紫外分光光度计上测定  $\lambda_{260\text{nm}}$  及  $\lambda_{280\text{nm}}$  的吸光值,测定 DNA 浓度。根据  $\lambda_{260\text{nm}}$  与  $\lambda_{280\text{nm}}$  的比值是否接近 1.8 来判断 DNA 的纯度。将符合要求的 DNA 样品用双蒸水稀释成浓度为  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  备用。

### 1.2.2 PCR 反应体系和扩增程序

PCR 反应在 10  $\mu\text{L}$  体系中进行:  $2 \times \text{Taq}$  Master Mix 5  $\mu\text{L}$ , 正反引物均为 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase-free water 为 3  $\mu\text{L}$ , DNA 模板为 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序:  $95^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $50 \sim 55^\circ\text{C}$

1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 7 min,  $4^\circ\text{C}$  保存。

### 1.2.3 引物筛选

SSR 引物是从蔷薇科基因组数据库(<http://www.bioinfo.wsu.edu/>)中的梨引物序列中挑选出的,由上海生工生物技术有限公司合成。选用 33 对梨基因组 SSR 引物,以 4 个梨基因组 DNA 为模板,按照已优化的 SSR 反应程序,从中筛选出多态性稳定且丰富的 28 对 SSR 引物。SSR 位点均匀分布于 17 对染色体上。

### 1.2.4 毛细管电泳

SSR 标记 PCR 产物在 QIAxcel Advanced 毛细管电泳系统中进行电泳以及数据的记录和分析。

1.3 数据分析

电泳结果通过使用 QINGEN advance system 系统来判断,统计后构成基因型的原始数据矩阵。假设等位基因频率符合哈迪-温伯格平衡定律。利用 Popgene 软件对梨群体 Nei's 基因多样性(*H*)、期望杂合值、Shannon 信息指数(*I*)、观测杂合值、等位基因频率等进行计算。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

选用了 33 对梨基因组 SSR 引物,以 4 个梨基因组 DNA 为模板,按照已优化的 SSR 反应程序,从中筛选出多态性稳定且丰富的 28 对 SSR 引物(表 2)。

表 2 试验中所使用的 SSR 引物  
Table 2 SSR primers used in identification experiment

编号 No.	染色体 Chromosome	标记位点 Locus	正向引物序列 Positive sequence primers(5'-3')	反向引物序列 Reverse sequence primers(5'-3')
1	Ba1-1	CH03g12-2	GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT	CAAGGATGCGCATGTATTTG
2	Ba2	CH02f06	CCCTCTTCAGACCTGCATATG	ACTGTTTCCAAGCGATCAGG
3	Ba2	CH02B10	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG
4	Ba3	CH03g12-1	GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT	CAAGGATGCGCATGTATTTG
5	Ba4	CH02c02b	TGCATGCATGGAAACGAC	TGGA AAAAGTCACACTGCTCC
6	Ba5	CH02b12	GGCAGGCTTTACGATTATGC	CCCACTAAAAGTTCACAGGC
7	Ba5	CH05c06	ACACGCACAGAGACAGAGACAT	GTTGAATAGCATCCCAATGGT
8	Ba6	CH03d12	GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC	ATTGCTCCATGCATAAAGGG
9	Ba7	CH04e05	AGGCTAACAGAAATGTGGTTTG	ATGGCTCCTATTGCCATCAT
10	Ba9	CH05c07	TGATGCATTAGGCTTGTACTT	GGGATGCATTGCTAAATAGGAT
11	Ba9	CH01h02	AGAGCTTCGAGCTTCGTTTG	ATCTTTTGGTGCTCCACAC
12	Ba10	CH02c11	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC
13	Ba10	CH01F07A	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC
14	Ba11	CH04h02	GGAAGCTGCATGATGAGACC	CTCAAGGATTTCATGCCAC
15	Ba11	CH03d02	AAACTTTCACCTTTCACCCACG	ACTACATTTTATAGTTTGTGCGTC
16	Ba11	CH04g07	CCCTAACCTCAATCCCAAT	ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA
17	Ba12	CH05d04	ACTTGTGAGCCGTGAGAGGT	TCCGAAGGTATGCTTCGATT
18	Ba12	CH01f02	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTTTCTCCAGC
19	Ba12	CH04d02	CGTACGCTGCTTCTTTGCT	CTATCCACCACCCGTCAACT
20	Ba13	CH03a08	TTGGTTTGCTAGGAAAAGAAGG	AAGTTTATCGGGCTACACG
21	Ba14	CH01g05	CATCAGTCTCTTGCACTGGAAA	GACAGAGTAAGCTAGGGCTAGGG
22	Ba14	CH03g06	ATCCACAGCTTCTGTTTTTG	TCACAGAGAATCACAAGGTGGA
23	Ba15	CH01D08	CTCCGCGCTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG
24	Ba15	CH02d11	AGCGTCCAGAGCAACAGC	AACAAAAGCAGATCCGTTGC
25	Ba15	CH02c09	TTATGTACCAACTTGTCTAACCTC	AGAAGCAGCAGAGGAGGATG
26	Ba16	CH05c06-1	ATTGGAAGCTCTCCGTATTGTGC	ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT
27	Ba17	CH01H01	GAAAGACTTGACGTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT
28	Ba17	CH01b12	CGCATGCTGACATGTTGAAT	CGGTGAGCCCTCTTATGTGA

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 SSR 引物多态性

由表 3 可知,利用选出的 28 对 SSR 核心引物对 63 份梨种质材料进行扩增,共扩增出 414 个等位基因,其中有效等位基因数为 230.102 7 个,占总等位基因数的 55.58%,观测等位基因数(*N<sub>a</sub>*)为 11.0~18.0,平均为 14.8,引物 CH02c02b、CH02d11 最低,CH02B10、CH02b12、CH04d02 最高。有效等位基因数(*N<sub>e</sub>*)为 3.824 3~12.613 6,

平均为 8.217 9,引物 CH01h02 最低,CH02B10 最高。Shannon 多样性指数(*I*)为 1.834 6~2.715 1,平均为 2.315 3,引物 CH02c02b 最低,CH02B10 最高。期望杂合度(*N<sub>e</sub>*)为 0.738 5~0.920 7,平均为 0.862 6,引物 CH01h02 最低,CH02B10 最高。观测杂合值(*Obs\_Het*)为 0.131 1~0.836 1,平均为 0.563 8,引物 CH01b12 最低,CH05c06-1 最高。通过比较,可以看出引物 CH01h02 多态性不高,引物

CH02B10 的多态性相对较高。期望杂合值(0.869 8)远高于期望纯和值(0.130 2),但其观测杂合值(0.563 8)略高于观测纯和值(0.436 2),表

明这 63 份梨种质的纯和基因较多,亲本自花授粉为主要方式,其遗传多样性较低。

表 3

28 对引物对 63 份梨材料的扩增结果

Table 3

Amplified results of 63 pear cultivars with 28 SSR primers

标记位点 Locus	观测等位基 因数 $N_a$	有效等位基 因数 $N_e$	Shannon 多样性 指数 $I$	期望杂合度 Obs_Hom	观测杂合值 Obs_Het	期望纯合值 Exp_Hom	期望杂合值 Exp_Het	期望杂合度 Nei
CH03g12-2	13.0	9.480 3	2.382 9	0.541 0	0.459 0	0.098 1	0.901 9	0.894 5
CH02f06	16.0	11.124 1	2.570 5	0.557 4	0.442 6	0.082 4	0.917 6	0.910 1
CH02B10	18.0	12.613 6	2.715 1	0.262 3	0.737 7	0.071 7	0.928 3	0.920 7
CH03g12-1	14.0	10.139 0	2.476 3	0.557 4	0.442 6	0.091 2	0.908 8	0.901 4
CH02c02b	11.0	3.996 8	1.834 6	0.590 2	0.409 8	0.244 0	0.756 0	0.749 8
CH02b12	18.0	11.682 9	2.670 0	0.278 7	0.721 3	0.078 0	0.922 0	0.914 4
CH05e06	15.0	9.553 3	2.435 8	0.606 6	0.393 4	0.097 3	0.902 7	0.895 3
CH03d12	16.0	9.480 3	2.502 1	0.557 4	0.442 6	0.098 1	0.901 9	0.894 5
CH04e05	13.0	7.014 1	2.210 2	0.213 1	0.786 9	0.135 5	0.864 5	0.857 4
CH05c07	13.0	6.201 7	2.070 3	0.475 4	0.524 6	0.154 3	0.845 7	0.838 8
CH01h02	13.0	3.824 3	1.871 4	0.754 1	0.245 9	0.255 4	0.744 6	0.738 5
CH02c11	12.0	4.971 3	1.943 4	0.819 7	0.180 3	0.194 6	0.805 4	0.798 8
CH01F07A	16.0	9.142 5	2.383 8	0.245 9	0.754 1	0.102 0	0.898 0	0.890 6
CH04h02	14.0	9.097 8	2.404 1	0.295 1	0.704 9	0.102 6	0.897 4	0.890 1
CH03d02	16.0	12.022 6	2.615 8	0.196 7	0.803 3	0.075 6	0.924 4	0.916 8
CH04g07	16.0	10.364 9	2.515 5	0.278 7	0.721 3	0.089 0	0.911 0	0.903 5
CH05d04	14.0	7.593 9	2.264 9	0.327 9	0.672 1	0.124 5	0.875 5	0.868 3
CH01f02	16.0	11.074 4	2.569 8	0.163 9	0.836 1	0.082 8	0.917 2	0.909 7
CH04d02	18.0	10.194 5	2.580 9	0.295 1	0.704 9	0.090 6	0.909 4	0.901 9
CH03a08	16.0	5.987 1	2.266 0	0.573 8	0.426 2	0.160 1	0.839 9	0.833 0
CH01g05	14.0	6.095 0	2.162 7	0.655 7	0.344 3	0.157 2	0.842 8	0.835 9
CH03g06	16.0	7.632 8	2.297 9	0.311 5	0.688 5	0.123 8	0.876 2	0.869 0
CH01D08	16.0	4.329 3	1.974 0	0.639 3	0.360 7	0.224 6	0.775 4	0.769 0
CH02d11	11.0	6.080 1	2.008 6	0.311 5	0.688 5	0.157 6	0.842 4	0.835 5
CH02c09	16.0	10.785 5	2.532 2	0.360 7	0.639 3	0.085 2	0.914 8	0.907 3
CH05c06-1	14.0	5.769 0	2.142 3	0.163 9	0.836 1	0.166 5	0.833 5	0.826 7
CH01H01	16.0	9.009 7	2.430 6	0.311 5	0.688 5	0.103 6	0.896 4	0.889 0
CH01b12	13.0	4.841 9	1.996 5	0.868 9	0.131 1	0.200 0	0.800 0	0.793 5
平均值 Mean	14.8	8.217 9	2.315 3	0.436 2	0.563 8	0.130 2	0.869 8	0.862 6

## 2.2.2 聚类分析

对 63 份梨种质的分子标记信息进行 0-1 数据统计,利用 DPS 软件进行聚类分析,得到梨的遗传距离矩阵,其中遗传距离最近的是“甘泉”品种和“新高”品种,为 0.434,遗传距离最远的是“满丰”品种和“早红考密斯”品种,为 0.939。由图 1 可知,在遗传距离为 0.86 处将 63 份梨种质分为六大类群,其中“早红考密斯”“红巴”“紫巴”等 5 个品种为一类,“黄冠”“红香酥”等 4 个品种为一类,“早美酥”“金华”“大巴梨”为一类,“满丰”和“早红”各单独为一类,“红太阳”“冀蜜”等 49 个品种为一大类。其中“早红考密斯”“红巴”“紫巴”均为西洋梨,可以看出遗传关系较近聚为一类,而“红太阳”“冀蜜”等大类中,多为白梨和砂梨系统的品种。

## 2.3 不同成熟期分析

选取部分梨样品,依据成熟期将其分为早熟种(成熟期在 6 月下旬至 7 月底)、中熟种(成熟期在 8 月上旬至 9 月中下旬)和晚熟种(成熟期在 9 月下旬至 10 月中下旬)。由表 4 可知,中熟种在观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、Shannon 多样性指数( $I$ )以及期望杂合度( $N_{ei}$ )上均明显高于其它 2 个类群,分别为 11.035 7、6.527 2、2.049 5 和 0.821 4,表现出较高的遗传多态性。晚熟种的观测杂合值(Obs\_Het)最高,为 0.617 3,而中熟种的最低,为 0.556 4。综合来看,中熟种的杂合性相对来说较高,杂合程度较大。

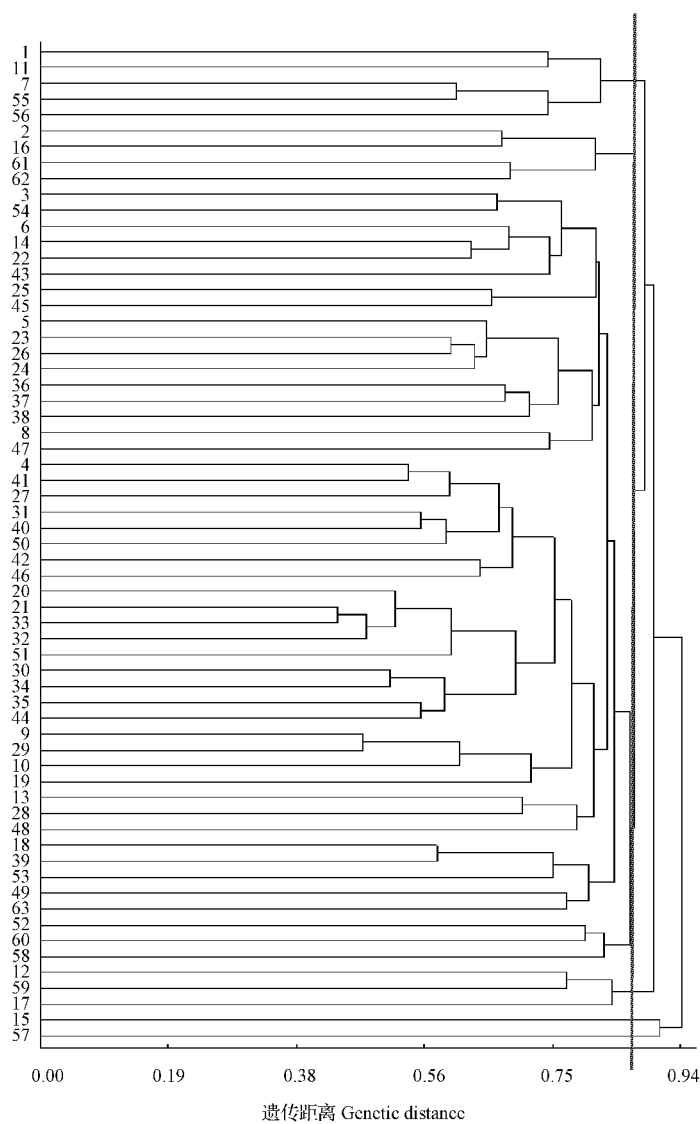


图 1 63 份梨种质的聚类结果

Fig. 1 Clustering results of 63 pear germplasms

表 4 不同成熟期梨品种的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of different mature period of pear cultivars

成熟期 Mature period	观测等位基 因数 Na	有效等位基 因数 Ne	Shannon 多样性 指数 I	观测纯合值 Obs_Hom	观测杂合值 Obs_Het	期望纯合值 Exp_Hom	期望杂合值 Exp_Het	期望杂合度 Nei
早熟 Early maturity	6.392 9	4.963 3	1.682 0	0.398 8	0.601 2	0.151 5	0.848 5	0.777 8
中熟 Middle maturity	11.035 7	6.527 2	2.049 5	0.443 6	0.556 4	0.156 4	0.843 6	0.821 4
晚熟 Late maturity	6.535 7	5.004 3	1.679 6	0.382 7	0.617 3	0.170 7	0.829 3	0.770 0

从遗传一致度看(表 5),中熟种与晚熟种的遗传一致度最高,为 0.700 7,早熟种与晚熟种的遗传一致度最低,为 0.577 4。反映到遗传距离上,中熟种与晚熟种的遗传距离最近,为 0.355 7,早熟种与晚熟种的遗传距离最远,为 0.549 2。

表5 3个群体的 Nei 氏遗传一致度及遗传距离的无偏估计值

Table 5 Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance between three groups

成熟期 Mature period	早熟期 Early maturity	中熟期 Middle maturity	晚熟期 Late maturity
早熟期 Early maturity	—	0.631 8	0.577 4
中熟期 Middle maturity	0.459 2	—	0.700 7
晚熟期 Late maturity	0.549 2	0.355 7	—

注:左下表示遗传距离,右上表示遗传一致度。

Note: Bottom left show genetic distance, bottom right show genetic identity.

### 3 讨论与结论

梨品种的正确鉴别有利于对梨种质资源的保存、研究和利用,同时也便于新品种的登记和保护。传统的品种鉴定主要依赖于形态学调查,DNA 标记技术的应用为梨品种快速和客观的鉴定提供了有效手段<sup>[17-18]</sup>。KIMURA 等<sup>[19]</sup>利用 SSR 标记技术,采用 9 对 SSR 引物鉴定了 6 个梨属种共 60 个梨品种,共扩增出 133 个等位基因,成功地区分了 58 个品种,另外 2 个品种可能为无性系品种无法区分。LEE 等<sup>[20]</sup>通过将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记,可以将 19 个砂梨品种与 6 个西洋梨品种完全区分开。韩宏伟等<sup>[21]</sup>利用 6 对 SSR 引物对 19 个主要的梨栽培品种进行 SSR 分析,通过一种类似于植物常规分类方法,编制了这 19 个梨品种的指纹检索表。该试验选取了 63 份梨种质,利用 SSR 标记与毛细管电泳技术。通过 28 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,共扩增出 414 条 DNA 谱带,能够很好的区分所有品种。而且毛细管电泳表现出更高的分辨率,分离精度可以达到 1~3 bp。程本义等<sup>[22-24]</sup>研究表明,利用荧光标记毛细管电泳检测方法进行水稻品种指纹鉴定技术 also 具有很好的可行性和可靠性。

PAN 等<sup>[25-27]</sup>研究表明,将 SSR 分子标记技术与毛细管电泳技术相结合,可以为甘蔗属的遗传多样性分析、指纹图谱的构建、杂交效率的评定等提供可靠、快速的技术方法。梁俊等<sup>[28]</sup>利用 SSR 标记与毛细管电泳技术,探讨甘蔗属内不同种之间的遗传多样性,利用 19 对引物对 12 个甘蔗材料进行检测,检测到 229 个 DNA 多态性条

带,平均每个引物可检测到 12.1 个条带,扩增片段大小在 100~260 bp。该试验选取了 63 份梨种质,采用 SSR 标记与毛细管电泳技术相结合,进行遗传多样性分析,共扩增出 414 条 DNA 谱带,其中有效等位基因数为 230.102 7 个,占总等位基因数的 55.58%,观测等位基因数 ( $N_a$ ) 为 11~18,平均为 14.8,有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 3.824 3~12.613 6,平均为 8.217 9,很好的分析了 63 份梨种质的遗传信息,结果表明观测等位基因数平均为 14.8,有效等位基因数平均为 7.363 1,Shannon 多样性指数平均为 2.195,期望杂合度平均为 0.845,表明梨总群体遗传变异较高。对 63 份梨种质进行聚类分析,大致分为了六大类群,其中“早红考密斯”“红巴”“紫巴”等 5 个品种为一类,“黄冠”“红香酥”等 4 个品种为一类,“早美酥”“金华”“大巴梨”为一类,“满丰”“早红”各单独为一类,“红太阳”“冀蜜”等 49 个品种为一大类。“早红考密斯”与“满丰”的遗传距离最远,“新高”与“甘泉”的遗传距离最近。选取部分梨样品,依据成熟期将其分为早熟种、中熟种和晚熟种,其中中熟种的遗传多态性较高,而中熟种与晚熟种的遗传关系较近。说明了利用 SSR 分子标记技术与毛细管电泳技术相结合,能够很好对梨栽培品种资源进行品种鉴别、亲子关系鉴定、分类和系统关系研究、为遗传图谱构建与标记辅助育在分子水平上提供依据。

### 参考文献

- [1] 蒲富慎,黄礼森,孙秉均,等. 梨品种[M]. 北京:农业出版社,1989.
- [2] 林伯年,沈德绪. 利用过氧化物同工酶分析梨属种质及亲缘关系[J]. 浙江农业大学学报,1983(9):235-242.
- [3] 邹乐敏,张西民,张志德,等. 根据花粉形态探讨梨属植物的亲缘关系[J]. 园艺学报,1986(13):219-223.
- [4] 曲柏宏,严花淑,陈艳秋,等. 同工酶分析在梨品种分类中的应用[J]. 延边大学农学学报,2003,25(1):86-91.
- [5] 杨槐俊. 孢粉学在部分梨属植物分类研究中的应用[J]. 果树科学,1985(3):2-9.
- [6] 孔旭. 中国果树栽培学[M]. 北京:农业出版社,1987:558-559.
- [7] BAO L, CHEN K S, ZHANG D, et al. An assessment of genetic variability and relationships with in Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers[J]. Hort Science, 2008, 116:374-380.

- [8] 滕元文,鲍露,郑小艳. 梨属植物的起源和系统关系[M]//赵尊训. 园艺学进展(6). 西安:陕西科学技术出版社,2004:23-29.
- [9] 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]. Genetic Sources and Crop Evolution, 2007, 54: 959-971.
- [10] 田义柯,王彩虹,贾彦利,等. 梨矮化基因 *pcDw* 的 SSR 标记定位[J]. 果树学报 2008, 25(3): 404-407.
- [11] KEVIN D A. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography[J]. J Chromatography, 1999, 856: 443-463.
- [12] 孙毓庆,孙国祥,金郁. 毛细管电泳指纹图谱及毛细管电泳质谱联用在中药质量控制中的作用[J]. 色谱, 2008, 26(2): 160-165.
- [13] 高源,田路明,刘凤之,等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446.
- [14] ROBINSON J P, HARRIS S A, JUNIPER B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh[J]. Pl Syst Evol, 2001, 226: 35-38.
- [15] OHTA S, NISHITAN C, YAMAMOTO T. Chloroplast microsatellites in *Prunus*, Rosaceae[J]. Mol Ecol Notes, 2005(5): 837-840.
- [16] 王桂娥,晁群芳,梁建芳,等. 改良 CTAB 法提取新疆一枝蒿干叶基因组 DNA[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015(12): 19-22.
- [17] 韦兴笃,胡学峰,陈容,等. 10 个良种梨的果实特征调查及品质评析[J]. 山西果树, 2003(3): 28.
- [18] 马兵钢,赵宗胜,冯建荣,等. 梨属 DNA 提纯方法的比较研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2000, 4(4): 277-281.
- [19] KIMURA T, SHI Y Z, SHODA M, et al. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis[J]. Breeding Science, 2002, 52: 115-121.
- [20] 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.
- [21] 韩宏伟,杨敏生,徐兴兴,等. 利用 SSR 标记鉴定主要梨栽培品种[J]. 中国农学通报, 2006, 22(12): 383-386.
- [22] 程本义,施勇烽,沈伟峰,等. 南方稻区国家水稻区域试验品种的微卫星标记分析[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(1): 7-12.
- [23] 程本义,施勇烽,沈伟峰,等. 水稻品种 DNA 指纹检测技术体系及其应用[J]. 杂交水稻, 2008, 23(1): 54-59.
- [24] 程本义,吴伟,夏俊辉,等. 浙江省水稻品种 DNA 指纹数据库的初步构建及其应用[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(6): 555-560.
- [25] PAN Y B, BURNER D M, LEGENDRE B L. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers [J]. Genetica, 2000, 108: 285-295.
- [26] PAN Y B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing [J]. Sugar Tech, 2006(8): 246-256.
- [27] PAN Y B, SCHEFFLER B E, RICHARD E P. High-through molecular genotyping of commercial sugarcane clone with microsatellite (SSR) markers[J]. Sugar Tech, 2007(9): 176-181.
- [28] 梁俊, PAN Y B, 李杨瑞,等. 利用 SSR 标记与毛细管电泳对甘蔗属进行的遗传分析[J]. 广西植物, 2010, 30(1): 106-111.

## Genetic Diversity of SSR Analysis of Pear Cultivars Based on Maturity

ZHAO Sisi, LIU Xingju, LI Xueyan, WANG Xiaoye, LIANG Haiyong, LIU Ming

(College of Forestry, Agricultural University of Hebei/Key Lab of Genetic Resources of Forest and Forest Protection of Hebei Province, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Sixty-three main varieties of *Pyrus* L. were used as experimental materials. The method of combination with SSR molecular marker technique and capillary electrophoresis technique was used to study the genetic diversity of *Pyrus* L. varieties in order to supply reference for breed identification, parent-child relationship identification, classification and systematic research, genetic map construction and marker-assisted breeding of *Pyrus* L. The results showed that, the average number of alleles ( $N_a$ ) was 7.363 1, the Shannon diversity index ( $I$ ) was 2.195, the expected heterozygosity ( $N_{ei}$ ) average of 0.845, indicating that the total genetic variation of the pear population was high. According to the pear system, it was divided into five groups: white pear, autumn pear, Japanese pear, Chinese pear and European pear. The white pear system was the highest in Shannon diversity index and expected heterozygosity, which were 2.069 9 and 0.831 1, respectively. The lowest were respectively 0.420 8 and 0.303 6, white pear and sand pear group genetic consistency of the highest, was 0.715 2.

**Keywords:** *Pyrus* L.; simple sequences repeat (SSR); capillary electrophoresis; maturity; genetic diversity