

新高系梨 9 个品种 SSR 标记分析

莫文娟¹, 袁德义¹, 段经华², 邹 锋¹

(1. 中南林业科技大学 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 中国林业科学研究院 经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003)

摘要: 为了有效区分和利用亲缘关系较近的新高系梨品种, 利用简单序列重复(SSR)分子标记技术对新高系梨 9 个品种进行了多态性分析、遗传相似性和聚类分析。从 12 对引物中筛选出 3 对多态性高、分辨能力强的引物, 在供试材料中共扩增出 22 条带, 其中多态性带 22 条, 多态性达 100%; 每对引物扩增出的条带数 4~9 条不等, 平均为 7.3 条; 且这 3 对引物组合可以成功地区分全部供试品种。9 份材料之间遗传相似系数变化范围为 0.47~0.91, 平均值为 0.67, 揭示出它们的遗传基础相对比较狭窄。加权成组配对法(UPGMA)聚类分析结果表明, 供试材料可以分为 3 个组和 2 个亚组, 其中新高 *Pyrus pyrifolia* ‘Niitaka’ 和黄金 ‘Whangkeum Bae’, 大果水晶 ‘Sujeong’ 和华丰 ‘Huafeng’ 的相似系数最大, 为 0.91, 说明其亲缘关系最近; 天皇 ‘Yewang’ 和鲜黄 ‘Sunhwang’ 分别单独聚为一类, 并对其结果的原因进行了初步探讨。图 3 表 3 参 17

关键词: 园艺学; 新高系梨; 简单重复序列(SSR); 亲缘关系; 聚类分析

中图分类号: S661.22

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2009)05-0639-05

Simple sequence repeat analysis on pear cultivars in Niitaka line

MO Wen-juan¹, YUAN De-yi¹, DUAN Jing-hua², ZOU Feng¹

(1. The Key Laboratory of Non-wood Forestry Product of State Forestry Administration, Central South Forestry & Technology University, Changsha 410004, Hunan, China; 2. Non-timber Research and Development Center, The Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China)

Abstract: In order to efficiently distinguish and use pear cultivars come of *Pyrus pyrifolia* ‘Niitaka’ with a near genetic relationship, the polymorphism and cluster analysis based on genetic similarity matrices of simple sequence repeat (SSR) markers were used on nine cultivars. Results showed that 3 pairs of SSR primes (KA4b, NH013a and CH02D11) produced 22 amplified fragments of which 22 (100%) were polymorphic. The average number of alleles per SSR locus was 7.3 with a range from 4 to 9. Using these 3 sets of SSR primers could discriminate 9 cultivars in the study. Also, the genetic similarity coefficients among the 9 cultivars ranged from 0.47 to 0.91 with an average of 0.67, which indicated that the genetic relationships were close between them. The UPGMA cluster analysis showed that the 9 cultivars could be divided into 3 groups and 2 sub-groups. The closest relationship was ‘Niitaka’, ‘Whangkeum Bae’, ‘Sujeong’, and ‘Huafeng’, whose genetic similarity coefficient is 0.91, while ‘Yewang’ and ‘Sunhwang’ were highly divergent from the other cultivars. [Ch, 3 fig. 3 tab. 17 ref.]

Key words: horticulture; pear cultivars in Niitaka line; simple sequence repeat (SSR); genetic relationship; cluster analysis

收稿日期: 2008-10-15; 修回日期: 2009-02-18

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2008GB2D200219); 国家林业局林木新品种新技术推广项目([2007] 113 号)

作者简介: 莫文娟, 从事经济林育种与栽培研究。E-mail: mwj862004@yahoo.com.cn。通信作者: 袁德义, 教授, 博士, 从事经济林等研究。E-mail: yuan-deyi@163.com

新高系梨是指以新高梨 *Pyrus pyrifolia* ‘Niitaka’ 为材料, 通过人工杂交和芽变选育的系列砂梨品种。这些品种具有风味浓、石细胞少、肉质嫩、口感好、果实大、含糖高、耐储运等诸多优点, 是当前生产上重要的栽培品种, 同时也是重要的育种材料^[1]。随着农业产业结构的调整, 对优良梨品种的苗木需求正呈不断上升的趋势。进行品种鉴定, 保证品种的真实性和纯度, 维护生产者与育种者的利益显得日益重要。传统上一般采用形态性状进行品种鉴定, 周期长, 可靠性较低, 且梨为多年生木本植物, 生命周期长, 品种间在非果期的形态差异较小, 利用传统的形态等方法无法鉴别各个品种^[2]。对新高系梨品种鉴定和亲缘关系方面研究的缺乏, 限制了对它们的正确评价和合理利用。近年来迅速发展的 DNA 标记技术为优良品种的引进, 品种间快速客观的鉴定和假伪苗木的早期识别提供了有效的手段^[2]。SSR (simple sequence repeat, 简单序列重复) 标记, 通常又称为微卫星, 具有高多态性、共显性、标记带型简单以及覆盖整个基因组等特点^[3]。在梨品种鉴定和亲缘关系等研究领域得到了有效应用^[4]。利用 SSR 标记, 韩宏伟等^[2]鉴定了主要梨栽培品种, 张东等^[5]对 29 个砂梨品种 (主要为红皮型) 做了鉴定, 并对其亲缘关系进行了分析, 曹玉芬等^[6]对梨 41 个栽培品种进行了遗传多样性分析。然而, 应用 SSR 技术对新高系梨品种鉴定和亲缘关系的研究尚未见相关报道。本研究利用 SSR 标记技术对新高系梨进行鉴定, 并揭示它们间的亲缘关系, 为这些资源的合理保存和利用提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验所用材料 (表 1) 采自中南林业科技大学株洲校区校内教学试验基地梨品种园和中国农业科学院果树研究所 (辽宁兴城) 梨资源圃。新鲜嫩叶材料用体积分数为 70% 乙醇清洗表面, 用无菌去离子水冲洗干净, 再用洁净滤纸吸干, 剪去大叶脉, -70 °C 超低温冰箱保存待用。其中中华丰梨 *Pyrus pyrifolia* ‘Huafeng’ 原初定名为晚大新高梨, 2007 年国家林业局进行了品种审定定名; 华高梨 *Pyrus pyrifolia* ‘Huagao’ 原初定名为早蜜新高梨, 2007 年经国家林业局品种审定委员会审定定名。

表 1 植物材料

Table 1 Materials tested

品种编号	品种名称	亲本或起源	原产地
1	新高 ‘Niitaka’	天の川 ‘Amanokawa’ × 今村秋 ‘Imamuraaki’	日本
2	黄金 ‘WhangKeum Bae’	新高 ‘Niitaka’ × 二十世纪 ‘Nijisseiki’	韩国
3	大果水晶 ‘Sujeong’	新高芽变 bud mutant of ‘Niitaka’	韩国
4	华高 ‘Soumi Tunitaka’	新高芽变 bud mutant of ‘Niitaka’	日本
5	天皇 (韩国称 ‘林金’) ‘Yewang’	新高芽变 bud mutant of ‘Niitaka’	韩国
6	金秋 ‘Jinqiu’	新高芽变 bud mutant of ‘Niitaka’	中国
7	早生黄金 ‘Josengwhangkeum’	新高 ‘Niitaka’ × 新兴 ‘Shinkou’	韩国
8	华丰 ‘Huafeng’	新高 ‘Niitaka’ × 丰水 ‘Hosui’	日本
9	鲜黄 ‘Sunhwang’	新高 ‘Niitaka’ × 晚三吉 ‘Okusankichix’	韩国

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取、纯化 梨基因组 DNA 抽提主要参考较适合梨叶片基因组提取的改良 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 法^[7-8], 并进行 DNA 纯化^[9-10]。

1.2.2 SSR-PCR 扩增反应体系及程序 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 扩增在 PE-9600 型 PCR 仪上进行。梨 SSR 扩增条件经优化确定为: 20 μL 反应体系体含 10 ng 基因组 DNA, 10 × buffer 2.0 μL, MgCl₂ 1.50 mmol·L⁻¹, dNTP 0.25 mmol·L⁻¹, 正反向引物各 5.0 μmol·L⁻¹, Taq 聚合酶为 16.67 nkat。参照相关文献^[11-14]确定扩增程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 1 min, 退火温度 55 °C 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环。最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物在 60.0 g·kg⁻¹ 非变性聚丙烯酰胺

凝胶中电泳分离^[15-16]，用改良银染法^[17]染色。

1.2.3 SSR 引物筛选 从 12 对梨 SSR 引物^[2,5-6,11]筛选出 3 对能扩增出图谱清晰的引物(表 2)。

表 2 梨 SSR 引物

Table 2 SSR primers of pear

引物	引物序列(5' - 3')	引物	引物序列(5' - 3')
KU10	AGTATGTGACCACCCCGATGTT	BGA35	AGAGGGAGAAAGGCGATT
	AGAGTCGGTIGGGAAATGATTG		GCTTCATCACCGTCTGCT
BGT23b	CACATTCAAAGATTAAGAT	KA16	GCCAGCGAACTCAAATCT
	ACTCAGCCTTTTTTCCCAC		AACGAGAACGACGAGCG
NH004a	AGGATGGGACGAGTTAGAG	KB16	GATTTTGTCCGACGTT
	CCACATCTCTCAACCTACCA		AAAGAACAGCAAGAACCA
KA4b	AAAGGTCTCTCACTGTCT	NH004a	AGGATGGGACGAGTTAGAG
	CCTCAGCCCAACTCAAAGCC		CCACATCTCTCAACCTACCA
KA5	CAACAACAACAAAAACAGTAA	NH013a	GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG
	AGCCTTAGAAATAGAAACAACA		CATTGACTTTAGGGCACATTTT
CH02D11	AGCGTCCAGAGCAACAGC	NH017a	CAGAAAGGAGAGGGCTACAG
	AACAAAAGCAGATCCGTTGC		CCCTCACCCAATCAAACACT

1.2.4 数据分析 将重复性好且清晰的条带进行记录(有无条带分别记为 1 和 0)，然后根据 Nei 和 Li (1979) 的方法计 Dice 相似系数，建立相似矩阵利用聚类分析软件 NTSYS PC22. 10 (Rohlf, 1994)软件，用 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages, 算术平均数的非加权成组配对法)生成系统树。

2 结果分析

2.1 引物筛选与 SSR 多态性

基于 12 对 SSR 引物的扩增，最后筛选出 3 对扩增图谱清晰的引物 KA4b, NH013a 和 CH02D11。3 对引物对 9 份材料共扩增出 22 条带，其中 22 条具有多态性，平均多态性百分率为 100%(表 3)；每对引物扩增的条带数从 4 条到 9 条不等，平均为 7.3 条。说明所用微卫星标记在新高梨遗传资源中具有较高的多态性，适合对其遗传多样性结构和水平进行检测。图 1 和图 2 分别是引物 KA4b 和 NH013a 对 9 份梨材料的扩增结果。

表 3 SSR 引物的序列及扩增的长度范围

Table 3 SSR primer sequences and allele size ranges

引物	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$	等位基因的 大小/bp	等位位点 /个	多态性带 比例/%
KA4b	55	90 ~ 110	9	100
NH013a	55	200 ~ 280	4	100
CH02D11	55	102 ~ 160	9	100



图 1 以 KA4b 为引物的扩增产物于 60.0 g·kg⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Figure 1 The 60.0 g·kg⁻¹PAGE gel electrophoresis of products amplified with KA4b primer



图 2 以 NH013 为引物的扩增产物于 60.0 g·kg⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Figure 2 The 60.0 g·kg⁻¹PAGE gel electrophoresis of products amplified with NH013a primer

2.2 聚类分析

根据 Dice 相似系数，采用 UPGMA 法进行聚类，得到新高系梨品种系统进化关系树(图 3)。9 个

新高梨品种的相似系数为 0.47 ~ 0.91。9 个新高梨品种均能区分开，在相似系数为 0.701 处可以分为 3 个类群，从图 3 中可以看出，在所有的供试材料中，第 I 类群为‘天皇’；第 II 类群为‘鲜黄’；第 3 类群包括‘新高’‘黄金’‘大果水晶’‘华丰’‘早生黄金’‘华高’和‘金秋’；在第 III 类群中，以 0.822 水平值又分为 2 个亚群，第 I 亚群包括‘新高’‘黄金’‘大果水晶’和‘华丰’，其中‘新高’和‘黄金’，‘大果水晶’和‘华丰’的材料来源最相似，相似系数最大；第 II 亚群包括‘早生黄金’‘华高’和‘金秋’。从结果看，‘鲜黄’与其他新高梨类型的进化关系较远，原因可能是受其父本‘晚三吉’的影响较大；‘天皇’与其他的类型也很难聚为一类。在生产实践中，‘天皇’表现为花大果大，果实比其他 8 个品种更大，其平均单果质量为 900 g，最大可达 2 000 g，大约为其他品种的 2 倍，需要进一步的研究分析。

本研究用 SSR 标记法能将 9 个新高系梨品种区分鉴定出来，对于选用准确而有效的方法来鉴定新高系梨品种和研究其亲缘关系，具有很重要的意义。上述结果为准确保存和合理利用这些新高系梨品种提供了理论依据。

参考文献：

- [1] 袁德义, 谭晓风, 张琳, 等. 新高系梨 10 个品种基因型的鉴定[J]. 园艺学报, 2007, **34** (6): 1356 - 1360.
YUAN Deyi, TAN Xiaofeng, ZHANG Lin, *et al.* Identification of S-genotype of ten cultivars from Niitaka line pear [J]. *Acta Horti Sin*, 2007, **34** (6): 1356 - 1360.
- [2] 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, **25** (12): 383 - 386.
HAN Hongwei, YANG Minsheng, XU Xingxing, *et al.* Identification on the main cultivated varieties of *Pyrus* using SSR DNA marker [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2006, **25** (12): 383 - 386.
- [3] POWELL W, MACHRAY G, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. *Trends Plant Sci*, 1996, **1** (7): 215 - 222.
- [4] KIMURA T, SHI Y Z, SHODA M, *et al.* Identification of Asian pear varieties by SSR analysis [J]. *Breed Sci*, **52**: 115 - 121.
- [5] 张东, 舒群, 滕元文, 等. 中国红皮砂梨品种的 SSR 标记分析[J]. 园艺学报, 2007, **34** (1): 47 - 52.
ZHANG Dong, SHU Qun, TENG Yuanwen, *et al.* Simple sequence repeat analysis on genetic assessment of Chinese red skinned sand pear cultivars [J]. *Acta Horti Sin*, 2007, **34** (1): 47 - 52.
- [6] 刘凤之. 梨栽培品种 SSR 标记遗传多样性研究[D]. 郑州: 中国农业科学院果树研究所, 2006.
LIU Fengzhi. *SSR Study of Genetic Diversity of Pear Cultivars* [D]. Zhengzhou: The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou Institute of Pomology, 2006.
- [7] 乌云塔娜, 张党权, 谭晓风. 梨不同 DNA 提取方法的效果研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, **23** (7): 98 - 101.
WUYUN Tana, ZHANG Dangquan, TAN Xiaofeng. Studies on methods of isolating pear DNA [J]. *China Biotechnol*, 2003, **23** (7): 98 - 101.
- [8] 谭晓风, 漆龙霖, 黄晓光, 等. 山茶属植物叶片 DNA 抽提[J]. 中南林学院学报, 1999, **19** (4): 16 - 21.
TAN Xiaofeng, QI Longlin, HUANG Xiaoguang, *et al.* DNA extraction from the leaves of *Camellia* plants [J]. *J Cent South For Univ*, 1999, **19** (4): 16 - 21.
- [9] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 4 版. 马学军, 舒跃龙, 译. 北京: 科学出

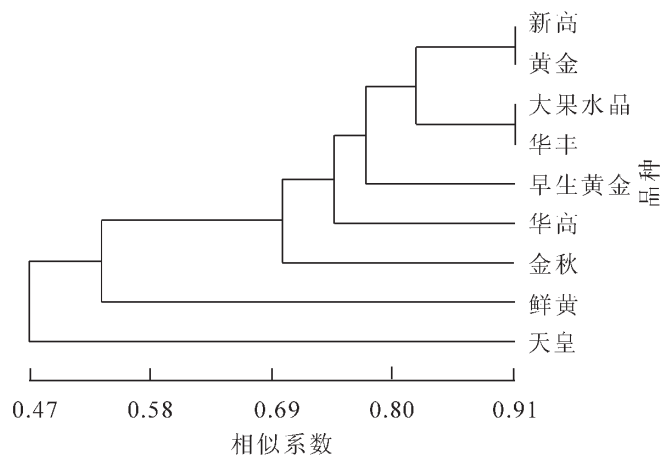


图 3 用 UPGMA 方法生成的 9 个品种的系统关系树

Figure 3 The phylogenetic tree of 9 pear cultivars based on UPGMA cluster analysis

版社, 2005.

- [10] 曾艳玲, 谭晓风, 张党权, 等. 5 个中国砂梨品种 S 基因型的确定[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (6): 654 – 660.
ZENG Yanling, TAN Xiaofeng, ZHANG Dangquan, *et al.* Identification of S-genotypes from five cultivars of *Pyrus pyrifolia* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (6): 654 – 660.
- [11] YAMAMOTO T, KIMURA T, SAWAMURAY, *et al.* Simple sequence repeats for genetic analysis in pear [J]. *Euphytica*, 2002, **124**: 129 – 137.
- [12] 俞明亮, 马瑞娟, 许建兰, 等. 桃种间亲缘关系的 SSR 鉴定[J]. 果树学报, 2004, **21** (2): 106 – 112.
YU Mingliang, MA Ruijuan, XU Jianlan, *et al.* Identification of genetic relationship of peach species by SSR [J]. *J Fruit Sci*, 2004, **21** (2): 106 – 112.
- [13] 王爱德, 李天忠, 许雪峰, 等. 苹果品种的 SSR 分析[J]. 园艺学报, 2005, **32** (5): 875 – 877.
WANG Aide, LI Tianzhong, XU Xuefeng, *et al.* SSR analysis for apple cultivars [J]. *Acta Horti Sin*, 2005, **32**(5): 875 – 877.
- [14] 柳晓磊, 汤华, 李东栋, 等. 海南椰子栽培品种的 SSR 标记分析[J]. 园艺学报, 2008, **35** (8): 1199 – 1204.
LIU Xiaolei, TANG Hua, LI Dongdong, *et al.* Genetic diversity of coconut cultivars from Hainan Province based on SSR molecular markers [J]. *Acta Horti Sin*, 2008, **35** (8): 1199 – 1204.
- [15] 张志峰, 史洪才, 武坚, 等. 微卫星 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)银染法的改良[J]. 生物技术, 2005, **15**(3): 51 – 53.
ZHANG Zhifeng, SHI Hongcai, WU Jian, *et al.* Advanced technique for silver staining of polyacrylamide gel of microsatellite DNA [J]. *Biotechnology*, 2005, **15** (3): 51 – 53.
- [16] 胡卫华, 李铁臣, 孙惠兰. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染法临床应用探讨[J]. 实用医学杂志, 2005, **21** (4): 425 – 427.
HU Weihua, LI Tiechen, SUN Huilan. Clinical application of non denaturant polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining test [J]. *J Pract Med*, 2005, **21** (4): 425 – 427.
- [17] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, **24** (3): 335 – 336.
XU Shaobin, TAO Yufen, YANG Zhaoqing, *et al.* A simple and rapid method used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas*, 2002, **24** (3): 335 – 336.