

鲁 敏, 汤浩茹, 吴 燕, 等. 18 个早熟梨品种的 SSR 分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 32–34.

# 18 个早熟梨品种的 SSR 分析

鲁 敏<sup>1,2</sup>, 汤浩茹<sup>3</sup>, 吴 燕<sup>3</sup>, 罗 姪<sup>3</sup>, 张 勇<sup>3</sup>, 刘泽静<sup>3</sup>

(1. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省果树工程技术研究中心, 贵州贵阳 550025;  
3. 四川农业大学园艺学院, 四川雅安 625014)

**摘要:**采用 SSR 标记技术对 18 个早熟梨品种进行鉴定, 并对其亲缘关系进行分析。结果表明: 4 对 SSR 引物 (CH01b12、CH01d03、CH02a08、CH03g12) 共扩增出 49 个等位变异条带; 除同物异名品种林金和天皇外, 这 4 对引物组合可以成功鉴别其余品种; 系统聚类分析可以将 18 个早熟梨品种明显分成 2 个大组, 即西洋梨和东方梨, 种间杂交品种早酥梨与西洋梨聚在一起, 鄂梨 1 号和鄂梨 2 号与东方梨聚为一类。

**关键词:**早熟梨; SSR 分析; 品种鉴别; 亲缘关系

**中图分类号:** S661.203.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)07–0032–02

四川省梨栽培历史悠久, 早在 2000 年前就出现梨栽培。四川省早熟梨的熟期较长江中游的江西省、湖北省、湖南省、安徽省等地区相同品种提早 10~15 d, 较长江下游的浙江省、上海市、江苏省等地区相同品种提早 15~20 d, 较日本、韩国的早熟梨提早 25 d 左右, 较我国北方早熟梨成熟更早。因此, 四川省自然形成了具有独特优势的早熟梨生产区<sup>[1]</sup>。早熟梨品种大多是通过种内或种间杂交选育而成, 因此导致某些品种分类尚不明确。SSR (simple sequence repeat) 技术以其多态性丰富、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、操作简便等优点, 已在梨属植物分类研究中发挥了巨大作用<sup>[2–9]</sup>。本研究拟采用 SSR 标记对 18 份早熟梨资源进行品种鉴别及聚类分析, 以期为进一步的育种研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的 18 份梨材料均采自四川农业大学梨种质资源圃 (表 1)。采取适量健康正常幼叶, 分别标号后带回实验室, 清洗后除去叶面附水, 放入冰箱内 -20 ℃ 保存待用。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取及质量检测** 采用 SDS–氯仿–异戊醇法<sup>[10]</sup>提取梨叶片总 DNA, 用德国 Eppendorf 核酸蛋白仪 (Bio-Photometer Plus 型) 测定其纯度及浓度。根据 PCR 反应体系需要将其稀释至 10 ng/μL。

**1.2.2 SSR 标记** 选用 4 对已定位在梨遗传连锁图谱上的多态性较高的 SSR 引物 (CH01b12, CH01d03, CH02a08, CH03g12)<sup>[11–13]</sup>。PCR 扩增反应在美国百乐公司生产的 PTC–200 基因扩增仪上进行。SSR 反应体系为: 20 μL 体系中含基因组 DNA 10 ng, 引物 1 μmol/L, dNTPs 100 μmol/L, MgCl<sub>2</sub>

表 1 供试梨品种材料

编号	品种	来源	归属
1	康弗伦斯	英国	西洋梨
2	巴梨	英国	西洋梨
3	二宫白	日本, 太白 × 二十世纪	砂梨
4	金二十世纪	日本, 二十世纪辐射芽变	砂梨
5	新水	日本, 菊水 (太白 × 二十世纪) × 君塚早生	砂梨
6	喜水	日本, 明月 × 丰水 [(菊水 × 八云) × 八云]	砂梨
7	幸水	日本, 菊水 × 早生幸藏	砂梨
8	长寿	日本, 旭 [205 (二十世纪 × 长十郎) × 太白] × 君塚早生	砂梨
9	多摩	日本, 祇圆 (长十郎 × 二十世纪) × 幸水	砂梨
10	爱甘水	日本, 长寿 × 多摩	砂梨
11	君塚早生	日本, 新幸藏 × 独逸	砂梨
12	天皇	韩国, 新高梨芽变	砂梨
13	林金	韩国, 新高梨芽变	砂梨
14	若光	日本, 新水 × 丰水	砂梨
15	早七黄	中国	砂梨
16	早酥	中国, 苹果梨 × 身不知	种间杂种
17	鄂梨 1 号	中国, 伏梨 × 金水酥	种间杂种
18	鄂梨 2 号	中国, 中香 × (伏梨 × 启发)	种间杂种

1.5 mmol/L, 1 × PCR buffer, Taq 聚合酶 1 U。SSR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min; 4 ℃ 保存。扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染检测, 数码相机拍照保存。

### 1.3 数据分析

采用 Gelpro32 软件分析电泳图谱, 扩增出的每条多态性条带为 1 个等位变异条带, 有带记为 1, 无带记为 0。用 NT-SYS–pc2.1 软件分析试验数据, 以 Dice 相似系数采用非加权类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 多态性

如表 2 所示, 4 对 SSR 引物在 18 个梨材料上共扩增出 49

收稿日期: 2013–01–06  
作者简介: 鲁 敏 (1984—), 女, 四川荣县人, 博士, 讲师, 主要从事果树栽培与生理生态研究。E–mail: 48181266@qq.com。  
通信作者: 汤浩茹, 博士, 教授, 主要从事果树遗传育种研究。Tel: (0835) 2882515; E–mail: htang@sicau.edu.cn。

个等位变异条带,平均每个 SSR 位点扩增出 12.25 个等位变异条带,不同引物扩增的等位变异条带数差异较大,从 7 个(CH01d03)到 16 个(CH03g12)不等;对于每个梨材料或类型,每对引物产生 1~2 个等位变异条带,有的甚至产生 3 个或 4 个等位变异条带。

表 2 4 对 SSR 引物对 18 个早熟梨品种扩增出的等位变异条带大小

品种名称	SSR 扩增等位变异条带大小(bp)			
	CH01b12	CH01d03	CH02a08	CH03g12
康弗伦斯	133/173	139/154	133/159	170/183/192/202
巴梨	133/152/173	139/150	140/159	170/189
二宫白	135/148/171	152	133/161	174/183
金二十世纪	135/148/171	157	143/171	174/186/197
新水	135/148	152	143/171	166/180/189/197
喜水	135/148	152	143/171	174/189/199/211
幸水	135	157	145/171	174/186/197/211
长寿	135/159/175	157	143/171	186/197/207
多摩	135/155/171	152	145/167	174/189/199/211
爱甘水	135/148/171	152	145/171	174/189/199/211
君塚早生	135/148/166/175	140/145/157	133/157	166/174/186/189
天皇	135/148/164/171	157	145/171	183/199
林金	135/148/164/171	157	145/171	183/199
若光	139/148	147/157	143/161	186/197/207
早七黄	135	147	143/161	174/186/194/207
早酥	137/152/162/175	139/150	133/147/163	177/186/194
鄂梨 1 号	135	157	138/161	170/183/194/202
鄂梨 2 号	135/148/171	154	133/157	170/183/204

2.2 品种鉴别

任何 1 对单独的 SSR 引物都不能将 18 个早熟梨品种鉴别出,必须 2 个以上标记同时作用才能将其全部区分。例如引物 CH03g12,在 18 份梨材料中最多能检测到 16 条多态性条带,但是不能区分长寿和若光,而其他 3 对引物却能对其区分;CH03g12 也不能区分喜水、爱甘水、多摩,而引物 CH01b12、CH02a08 却可以将三者区分。4 对引物都不能鉴别天皇和林金。

2.3 聚类分析

根据 4 对引物扩增数据,以 Dice 相似系数采用 UPGMA 聚类,18 个早熟梨品种的相似系数在 0.32~1.00 之间。在相似系数为 0.32 处可以划分为 2 个类群,与地理起源相关,如图 1 所示。类群 I 包括巴梨、早酥、康弗伦斯,为西洋梨或西洋梨与其他种间杂交品种;其余品种均属于类群 II,原产于中国、日本、韩国,为东方梨。种间杂种早酥(苹果梨×身不知)与西洋梨聚在一起,鄂梨 1 号和鄂梨 2 号与东方梨聚为一类。中国砂梨品种、日本砂梨品种、韩国砂梨品种聚在一起,没有被明显区分开。

3 结论与讨论

本研究采用 SSR 标记明确将供试的 18 个早熟梨品种划分为西洋梨和东方梨 2 大类,并将早酥梨归为西洋梨一类,这与前人研究结果<sup>[6-7]</sup>一致。中国砂梨品种、日本砂梨品种、韩国砂梨品种没有被明显区分开,可能是由于其均起源于我国长江流域的野生砂梨<sup>[7]</sup>。

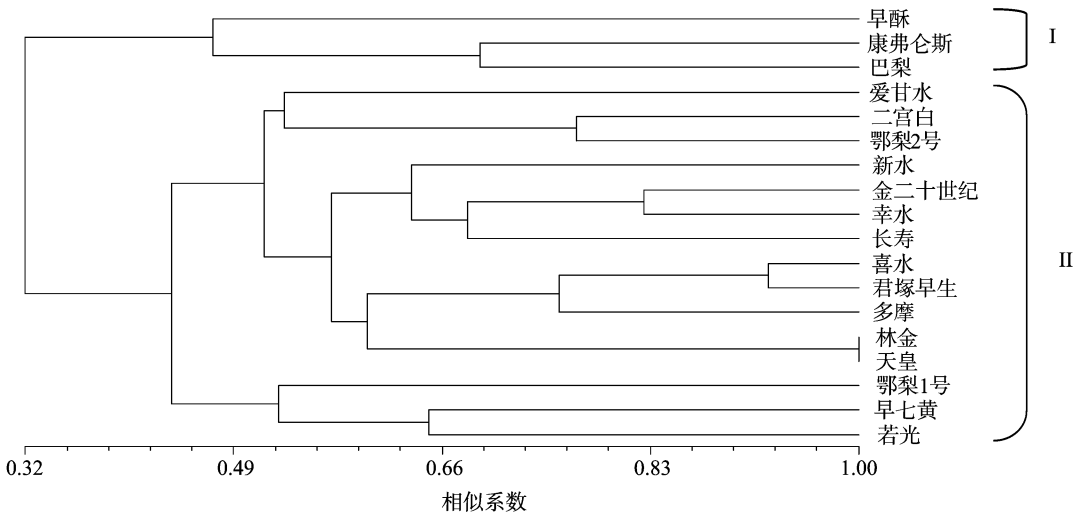


图1 18个梨材料聚类分析树状图

林金从韩国引入中国后,在中国被称为天皇<sup>[14]</sup>,但近年来天皇和林金却作为 2 个不同品种用于试验研究<sup>[15-16]</sup>,本研究认为天皇和林金为同物异名品种,不宜作为 2 个品种对待。若光梨是日本千叶县农业试验场育成的早熟品种,亲本为新水×丰水,日本农林水产省于 1992 年 1 月 16 日正式登录该品种,登录号为第 3006 号<sup>[17]</sup>,但也有学者认为其是日本喜水梨的芽变品种<sup>[18]</sup>。本研究认为,若光并不与其可能亲本之一的新水或芽变原始品种喜水聚在一起,是否存在同名异物现象尚须进一步考证。

参考文献:

[1] 范理璋,邓国涛,刘仁道,等. 利用四川独特的生态优势发展以早熟梨为主的优质梨产业[J]. 中国果业信息,2007,24(6):16-17.  
[2] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(6/7): 865-870.  
[3] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear[J]. Euphytica, 2002, 124: 129-137.

刘 刃,吕 乐,竺锡武. 红颊草莓组培标准化及穴盘壮苗研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):34-37.

# 红颊草莓组培标准化及穴盘壮苗研究

刘 刃,吕 乐,竺锡武

(浙江理工大学生物工程研究所,浙江杭州 310018)

**摘要:**将红颊草莓组培苗生长时期划分为丛生芽生成期、幼苗期、中苗期、不定根生成期、成苗期共 5 个时期,对组织培养过程中的激素组合和浓度进行筛选,发现组培苗在中苗期时采用 MS + 6-BA 0.3 mg/L + IBA 0.05 mg/L + GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L 培养基具有较高的增殖系数(6.03),不定根生成期时采用 1/2MS + IBA 0.4 mg/L + 活性炭 0.3 g/L 培养基较适宜红颊草莓不定根的诱导,并建立了红颊组培操作标准流程。通过基质配比、相对含水量和肥料浓度 3 因素试验,以穴盘苗壮苗指数和外部形态为比较分析指标,获得最佳参数组合:泥炭基质、相对含水量 60%、MS 大量元素母液 500 倍稀释液施肥,适合培育红颊草莓穴盘壮苗。

**关键词:**红颊草莓;组织培养;标准化;穴盘

**中图分类号:**S668.404<sup>+</sup>.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0034-04

草莓(*Fragaria ananassa*)为蔷薇科草莓属植物,近年来被世界各地广泛引种。目前,我国草莓的种植面积和产量均已成为世界第一<sup>[1]</sup>。红颊是我国民众喜爱的优质草莓品种,目前,红颊草莓组培苗在质量与数量上不能满足农民的种植需求。草莓组织培养已有相关研究。顾虹开展了草莓组培苗标准化研究,确定了草莓组培苗工业化生产的最低标准<sup>[2]</sup>,草莓组织培养过程标准化研究尚未见报道。穴盘炼苗作为组培苗移栽到田间种植的重要中间环节,前人对很多植物组培

苗穴盘炼苗开展了研究<sup>[3-4]</sup>。草莓穴盘育苗的报道主要集中在空间利用率和炼苗存活率方面<sup>[5-6]</sup>,在利用穴盘培育红颊草莓组培苗、对壮苗技术的系统研究尚未见报道。本试验开展红颊草莓组培过程标准化及穴盘壮苗技术研究,以期红颊草莓从组培苗生产到移栽种植提供完整的技术流程,为规模化生产优质红颊草莓种苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试红颊草莓脱毒苗,从宁波华夏现代农业研究所购得,田间种植后,将其植株的不同部位进行灭菌诱导快速繁殖,以获得红颊草莓组培苗作为后续试验材料;50 孔聚苯乙烯(PS)塑料穴盘(52 cm×26 cm),购于商品市场;6-BA、IBA、GA<sub>3</sub>,购于杭州汇普化工仪器有限公司,均为分析纯。

收稿日期:2012-12-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:31071729)。

作者简介:刘 刃(1986—),男,硕士研究生,研究方向为天然药物与生物反应器。E-mail:liuren0313@163.com。

通信作者:竺锡武,副研究员,硕士生导师。E-mail:zhuxw9999@yahoo.com.cn。

[4] Kimura T, Shi Y Z, Shoda M, et al. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis[J]. Breeding Science, 2002, 52(2): 115-121.

[5] Ghosh A K, Lukens L N, Hunter D M, et al. European and Asian pears; simple sequence repeat - polyacrylamide gel electrophoresis - based analysis of commercially important north American cultivars [J]. HortScience, 2006, 41(2): 304-309.

[6] 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 Resources and Crop Evolution, 2007, 54(5): 959-971.

[7] 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.

[8] 范太伟, 蔡丹英, 李红旭, 等. 甘肃中部梨资源遗传变异和亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 268-275.

[9] 鲁 敏, 汤浩茹, 罗 娅, 等. 日本“二十世纪”梨及其近缘品种的 SSR 分析[J]. 中国南方果树, 2012, 41(6): 1-4.

[10] 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.

[11] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence re-

peats for the genetic analysis of apple[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96: 1069-1076.

[12] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 217-241.

[13] Lu M, Tang H R, Chen X Y, et al. Comparative genome mapping between apple and pear by apple mapped SSR markers [J]. American - Eurasian J Agric & Environ Sci, 2010, 9(3): 303-309.

[14] 夏月明, 李元军. 韩国果树考察报告[J]. 烟台果树, 2002(1): 48-49.

[15] 邓彦涛, 谢 艳, 赵 玲, 等. 梨新品种的花粉量、花器特性、花芽率及开花物候期调查[J]. 山西果树, 2004, 98(2): 31-32.

[16] 谢 艳. 梨树的高接换头及栽培技术要点[J]. 落叶果树, 2005(2): 55-58.

[17] 刘学平, 陶建敏. 早熟梨若光在南京的表现及栽培技术要点[J]. 中国南方果树, 2008, 37(2): 60.

[18] 胡钟东, 乔王山, 渠慎春, 等. 若光梨叶片诱导不定芽的研究[J]. 江苏农业科学, 2007(2): 91-92.