

# 8 个云南主要栽培梨品种亲缘关系的 ISSR 分析

易琼<sup>1</sup>, 殷海滨<sup>1</sup>, 龚丽琼<sup>1</sup>, 陈丽梅<sup>1</sup>, 舒群<sup>2</sup>, 李昆志<sup>1</sup>

(1. 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 云南昆明 650224; 2. 云南省农业科学院园艺研究所, 云南昆明 650205)

**摘要** [目的] 探索利用简单序列重复间区 (ISSR) 分子标记研究供试栽培梨品种的分类和系统发育。[方法] 利用 ISSR 分子标记技术对 8 种云南主要栽培梨品种的亲缘关系进行分析。[结果] ISSR-PCR 反应体系优化结果表明, 20 μl ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度分别为: 1 × PCR buffer, 100 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L 引物, 20 ng 的模板 DNA 和 1.5 U Taq DNA 聚合酶, 并在此基础上建立了梨 ISSR-PCR 反应体系。从 24 个引物中筛选出 9 个能扩增出清晰带并具多态性的引物, 共扩增出了 135 条 DNA 片段, 其中 102 个 DNA 片段呈现多态性, 占总扩增片段的 75.5%。利用 NTSYS-pc 2.10t 软件计算 8 种梨品种间的 Jaccard 遗传相似系数, 结果显示梨品种间的相似性系数为 0.186 ~ 0.750, 平均遗传相似性系数为 0.476。UPGMA 聚类分析表明, 8 种梨品种可以聚为 2 类: 第一类群包括日本水晶梨、早 95-2、四川火把和西子绿; 第二类群由早酥、金花、早黄酥和砀山梨 4 个品种组成, 这与传统分类结果一致。[结论] 该研究为梨资源的开发利用及新品种的选育提供科学依据。

**关键词** 栽培梨; ISSR; 遗传关系; 聚类分析

**中图分类号** S661.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 02 - 00506 - 04

## Analysis on Genetic Relationships among 8 Main Pear Cultivars in Yunnan Province Based on ISSR Molecular Markers

YI Qiong et al (Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract** [Objective] The research aimed to discuss the feasibility of classification and systematical development of pear cultivars by ISSR. [Method] The Inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers were used to analyze the genetic relationship of 8 main pear cultivars in Yunnan Province. [Result] The results of optimal experiment showed that 1 × PCR buffer, 100 μmol/L dNTP, 0.3 μmol/L primer, 20 ng template DNA and 1.5 U Taq DNA polymerase in a total volume of 20 μl were suitable for ISSR-PCR amplification system of pear cultivars in Yunnan Province, 9 primers were screened from 24 random primers. A total number of 135 bands were amplified, among which 102 were polymorphic. The polymorphic ratio was 75.5%. The genetic similarity coefficients among 8 pear cultivars were between 0.186 and 0.750, and the average genetic similarity coefficient was 0.476. The clustering analysis conducted with UPGMA indicated that 8 main pear cultivars in Yunnan Province could be classified into 2 groups. Ribenshuijingli, Zao95-2, Sichuanhuoba and Xizilu made up of the first group, and Zaosu, Jinhua, Zaohuangsu and Dangshanli constituted the second group. This accorded with previous results made by traditional morphological study. [Conclusion] The study will provide the reference for utilization and new variety selection of pear resources.

**Key words** Main pear cultivars; ISSR; Genetic relationships; Cluster analysis

梨是云南省生物资源中十分有特色的资源,也是云南省产量占第 1 位的大宗水果。由于云南梨种质资源丰富,加上近年来从国外引进的品种,生产上梨的栽培品种比较混乱。长期以来,不同地域相互引种栽培,致使出现了一些同名异物或同物异名的现象,导致品种分类十分混乱。如,水晶梨就有日本水晶、韩国水晶等,是目前日韩梨中名称混乱、品种之间难以分辨清楚的品系,给种质资源的保存、育种和生产带来极大不便。常规果树品种分类方法包括形态学、细胞学和生理生化等方法,易受植物状况和环境因素影响。因此,利用分子生物学手段,从分子水平研究地方梨属植物的遗传背景和亲缘关系是非常必要的。

简单序列重复间区 (ISSR) 标记技术是由 Zietkiewicz 等提出的一种新型的微卫星类分子标记技术,具有稳定性好、多态性高、实验操作简单和快速等特点,而且 ISSR 标记可以揭示整个基因组的一些特征,不受季节、环境等外在因素的影响,并呈孟德尔式遗传。因此,该技术一问世就被广泛应用于植物遗传作图与基因定位、种质资源鉴定、植物分类、进化及遗传多样性研究<sup>[1]</sup>。在果树品种,品系鉴定方面也广泛应用<sup>[2]</sup>。冯唇净等选用 12 对引物对 14 份杏的种质资源进行了亲源关系及多样性分析<sup>[3]</sup>;宣继萍等构建了 7 个苹果品种的 ISSR 指纹图谱,用 IS061 和 IS062 2 对引物就能将它们

区分开<sup>[4]</sup>;潘鸿等选用 12 条引物对 40 份杨梅样品进行 ISSR 分析,将供试杨梅样品分为 4 大类,并进行了杨梅资源的分类和遗传多样性探讨<sup>[5]</sup>。该试验采用 ISSR 分子标记对 8 种云南主要栽培梨品种进行种间亲缘关系分析,探索利用 ISSR 分子标记研究供试栽培梨品种的分类和系统发育的可行性,以期全面了解云南地方梨品种的亲缘关系及构建指纹图谱提供技术支持,同时也为梨资源的开发利用及新品种的选育提供科学依据。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 材料采自云南安宁市红梨公司红梨果园梨种质资源库(表 1)。

表 1 研究材料及其所属系统

Table 1 Research materials and their systems

编号 Code	品种 Cultivar	所属系统 System
1	西子绿 Xizilu	砂梨 Sand pear
2	早酥 Zaosu	白梨 White pear
3	四川火把 Sichuanhuoba	砂梨 Sand pear
4	早 95-2 Zao 95-2	砂梨 Sand pear
5	金花 Jinhua	白梨 White pear
6	日本水晶梨 Ribenshuijingli	砂梨 Sand pear
7	砀山梨 Dangshanli	白梨 White pear
8	早黄酥 Zaohuangsu	白梨 White pear

## 1.2 方法

**1.2.1 植物基因组 DNA 的提取。** 选用上海 Sangon 的 UnlQ-10 柱式 DNA 抽提试剂盒方法分别提取 8 种栽培梨嫩叶组织

**基金项目** 云南省学术技术带头人后备人才培养基金(2006py01-10)。

**作者简介** 易琼(1985 - ),女,江西宜春人,硕士研究生,研究方向:植物代谢基因工程。\*通讯作者,博士,教授, E-mail: likunzhikm@yahoo.com.cn。

**收稿日期** 2008-10-09

基因组 DNA, 配制 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的大小和完整性, 并用 UV-1700 紫外分光光度计测定基因组 DNA 的浓度和质量。

**1.2.2 ISSR-PCR 反应程序。** PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55  $^{\circ}$ C (引物不同退火温度不同) 退火 90 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像系统观察照相。

**1.2.3 ISSR-PCR 反应体系的优化。** 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 对 dNTP 浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度和 TaqDNA 聚合酶浓度进行 4 因素 3 水平筛选, 方案如表 2、3 所示。

表 2 ISSR-PCR 反应体系的因素与水平

Table 2 Factors and levels of ISSR-PCR reaction system

水平 Level	dNTP $\mu$ mol/L	Primer $\mu$ mol/L	模板 DNA//ng Template DNA	Taq DNA 聚 合酶//U/20 $\mu$ l Taq DNA polymerase
1	50	0.1	20	0.5
2	150	0.2	50	1.5
3	250	0.3	100	2.5

表 3 ISSR-PCR 反应体系的正交试验设计 [ $L_9(3^4)$ ]

Table 3  $L_9(3^4)$  orthogonal design of ISSR-PCR reaction system

处理组合 Treatment combination	dNTP $\mu$ mol/L	Primer $\mu$ mol/L	模板 DNA//ng Template DNA	Taq DNA 聚 合酶//U/20 $\mu$ l TaqDNA polymerase
1	50	0.1	20	0.5
2	50	0.2	50	1.5
3	50	0.3	100	2.5
4	100	0.1	50	2.5
5	100	0.2	100	0.5
6	100	0.3	20	1.5
7	250	0.1	100	1.5
8	250	0.2	20	2.5
9	250	0.3	50	0.5

除表中变化因素外, 每管反应体系中还含有  $1 \times$  PCR buffer 和  $2.5 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$ , 引物选用 UBC857。

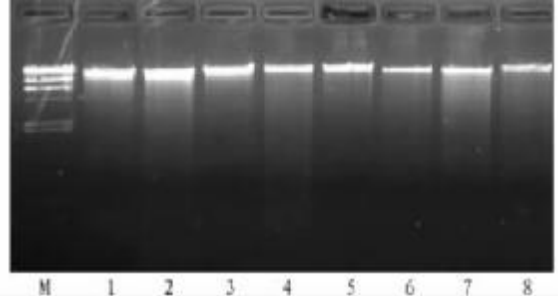
**1.2.4 ISSR 引物的筛选。** 以砀山梨的基因组为模板, 进行引物筛选。供筛选的 24 条 ISSR 引物由北京华大中生科技发展有限公司合成, 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的第 9 套 ISSR 引物序列。

**1.2.5 电泳及染色。** 将筛选得到的引物分别以所有供试梨叶片基因组 DNA 为模板, 按照优化后的 PCR 体系进行 PCR 反应。反应结束后, 在 3.5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后, 先在  $1 \mu\text{g/ml}$  的 EB 液中浸染 10 min, 然后用蒸馏水漂洗干净, 用 Quantity One 6.0 软件 (Bio-Rad) 进行分析, 并记录数据。

**1.3 数据处理** 采用 Quantity One 6.0 分析软件并结合人工方法读带, ISSR 扩增电泳图谱的每 1 条清晰且能重复出现的带, 均为 1 个分子标记 (Marker), 代表 1 个引物结合位点。在相同的迁移位置上, 无带用 0 表示, 有带用 1 表示。采用 NTSYS-pc 2.10t 分析软件计算样品间的遗传相似性系数, 同时用 UPGMA 进行聚类分析, 构建聚类图。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA 提取及检测结果** 如图 1 所示, 可以看见条带清晰且基本无弥散, 无 RNA 污染。胶孔清晰, 无蛋白和糖类杂质污染。用 UV-1700 紫外-可见分光光度计检测 DNA 样品的  $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  和  $OD_{260}/OD_{280}$  的值, 结果显示所有样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  值都为 1.64 ~ 1.82。说明样品符合 PCR 的反应要求。



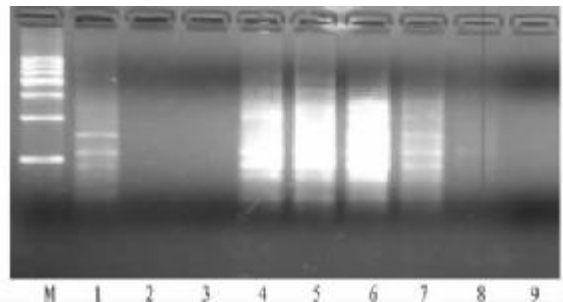
注: M 为  $\lambda$ DNA Marker; 1 ~ 8 分别是西子绿、早酥、四川火把、早 95-2、金花、日本水晶梨、砀山梨和早黄酥。

Note: M.  $\lambda$ DNA Marker; 1-8 are Xizilu, Zaosu, Sichuanhuoba, Zao 95-2, Jinhua, Ribenshuijingli, Dangshanli and Zaohuangsu, respectively.

图 1 8 种样品的基因组 SANGON 试剂盒提取结果

Fig. 1 Extraction results of genomic DNA from 8 samples in SANGON kit

**2.2 ISSR 反应体系优化结果** 通过对图 2 中条带的清晰度、背景以及多态性条带多少的分析<sup>[6]</sup>可知, 组合 1、4、5、6 和 7 能扩增出明显清晰的多态性条带。而这 5 种组合中, 又以 6 号组合的条带最清晰, 亮度最高, 背景也较干净, 且多态性条带也较多。因此, 后续的研究采用 6 号组合的扩增条件, 即 20  $\mu$ l 体系中含  $1 \times$  PCR buffer、100  $\mu\text{mol/L}$  dNTP、0.3  $\mu\text{mol/L}$  引物、20 ng 的模板 DNA 和 1.5 U Taq DNA 聚合酶。图 3 所示即为引物 UBC857 在优化后的条件下对 8 种不同样品 DNA 模板扩增的凝胶电泳检测结果。由图 3 可见, 条带清晰、背景干净、无弥散、多态性高、符合试验需要。



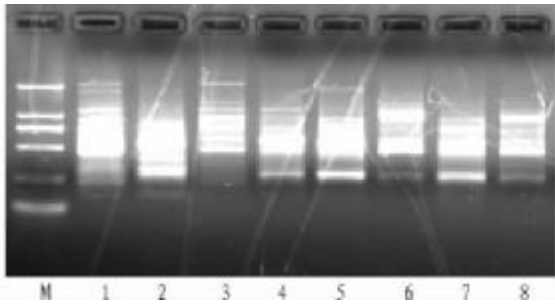
注: M 为 Marker III; 1 ~ 9 位为表 2 的处理组合编号; 引物为 UBC857。

Note: M. Marker III; 1-9 are the codes of treatment combinations. The primer is UBC857.

图 2 正交试验设计 ISSR-PCR 反应体系扩增结果

Fig. 2 Amplification results of ISSR-PCR reaction system with orthogonal design

**2.3 引物筛选及 PCR 扩增产物的多态性分析结果** 以四川火把梨的基因组 DNA 为模板, 从 24 条 ISSR 引物筛选出 9 条有效引物 (表 4)。共扩增出 135 条 DNA 条带, 条带大小为 100 ~ 2 000 bp。多态性 DNA 条带 102 条, 占总带数的



注: M 为 Marker D2000; 1 ~ 8 分别是西子绿、早酥、四川火把、早 95-2、金花、日本水晶梨、砀山梨和早黄酥。  
Note: M. Marker D2000; 1 - 8 are Xizilu, Zaosu, Sichuanhuoba, Zao 95-2, Jinhua, Ribenshuijingli, Dangshanli and Zaohuangsu, respectively.

图 3 引物 UBC857 对 8 种样品的扩增结果

Fig.3 Amplification results of 8 samples with UBC857 primer 75.5%。说明 8 种供试样品间的遗传多样性在种群水平上较高。其中扩增条带最多的是引物 UBC857, 共扩出 26 条带, 且多态性条带比率也最高, 达 88.5%; 扩增条带最少的是引物 842, 只能扩出 7 条带(表 5)。9 条 ISSR 引物扩增的平均条带数是 15, 平均多态性条带数为 11.3。因此, ISSR 分子标记技术对于分析供试的 8 种样品的遗传多样性能够提供比较大的信息量。此外, 在这 9 个引物中, 引物 UBC857 构建的指纹图谱能将 8 种供试样品很好的区分开来。这为鉴定梨属的不同品种提供了另一种可行的方法。

表 4 引物编号及其序列

Table 4 Primer code and its sequence

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence
UBC821	(GT) <sub>8</sub> T
UBC823	(TC) <sub>8</sub> C
UBC833	(AT) <sub>8</sub> YG
UBC834	(AG) <sub>8</sub> YT
UBC835	(AG) <sub>8</sub> YC
UBC841	(GA) <sub>8</sub> YC
UBC842	(GA) <sub>8</sub> YG
UBC851	(GT) <sub>8</sub> YG
UBC857	(AC) <sub>8</sub> YG

表 5 9 个有效 ISSR 引物的扩增结果

Table 5 Amplification results of 9 effective ISSR primers

引物编号 Primer code	扩增带数//条 Amplification bands	多态性条带//条 Polymorphic bands	多态性比率//% Polymorphic proportion
UBC821	9	5	55.6
UBC823	12	9	75.0
UBC833	16	11	68.8
UBC834	17	12	70.1
UBC835	15	12	80.0
UBC841	18	14	77.8
UBC842	7	5	71.4
UBC851	15	11	73.3
UBC857	26	23	88.5
总数 Total	135	102	0
平均 Average	15	11.3	75.6

2.4 种间遗传相似性及聚类分析 用 NTsys-pc2. 10t 分析

软件计算供试样品间的 Jaccard 遗传相似性系数(图 4)。由图 4 可知, 8 种不同栽培梨品种遗传相似性系数分布于 0.186 ~ 0.750。平均遗传相似性系数为 0.476。Zao95-2 与砀山梨之间的相似性系数最低, 为 0.186。说明它们之间的亲缘关系最远。而亲缘关系最近的是 Zao95-2 与日本水晶, 它们的相似性系数达 0.75。从整体来看, 8 种供试样品间的亲缘关系都比较远。说明种间的差异明显, 遗传分化程度高。UPGMA 聚类分析的结果显示, 8 种梨品种可以聚为 2 类: 第一类群包括日本水晶梨、早 95-2、四川火把梨和西子绿; 第二类群由早酥、金花、早黄酥和砀山梨 4 个品种组成。而第一类群中又分为 2 个亚群, 早 95-2 与日本水晶梨为一个亚群, 四川火把梨和西子绿为另一个亚群。同样的, 第二类群中也分为 2 个亚群, 分别是早酥和金花、砀山梨和早黄酥。从样品所属系统来看, 第一类群的 4 个品种都属于砂梨系统, 而第二类群都属于白梨系统。这说明所属不同系统间的梨品种差异要大于同一系统内部梨品种间的差异。并且这种差异能够通过 ISSR 分子标记技术来区分。

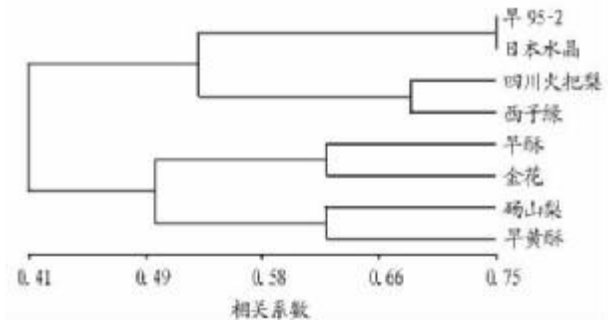


图 4 8 种云南栽培梨品种的 UPGMA 聚类

Fig.4 UPGMA cluster of 8 pear cultivars in Yunnan Province

3 结论与讨论

ISSR 以加锚 SSR 寡聚核苷酸为引物, 对位于反向排列的 SSR 之间的 DNA 序列进化 PCR 扩增。ISSR 引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列在 DNA 复制的过程中存在滑动和不均等交换现象, 使得它们在不同品种或个体间的重复次数存在较大差异, 更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片段长度产生差异。ISSR 由于引物序列较长, 退火温度较高, 因此试验的重复性较好, 稳定性较高; 与 FRLP、RAPD、SSR 相比, ISSR 可揭示更多的多态性, 现已在遗传多样性、起源进化、系统发育等方面得到广泛应用<sup>[7]</sup>。

该试验在优化 PCR 体系的时候采用了正交试验设计法, 从 DNA 模板浓度、dNTP 浓度、Taq 聚合酶浓度以及引物浓度 4 因素 3 个水平, 对云南 8 种不同栽培梨 ISSR-PCR 反应体系进行了优化分析。结果表明, 筛选出的反应体系对于 ISSR-PCR 的扩增是最佳的反应体系。相比于以往单因素 ISSR-PCR 体系优化设计, 正交试验更能了解各因素之间的内在规律, 能够迅速获得满意的试验结果, 并且重复性好, 稳定性强, 具有均衡分散、综合可比、伸缩性强、效应明显的特点<sup>[8]</sup>。此外, 该试验中并没有考察 Mg<sup>2+</sup> 浓度以及退火温度对试验条件的影响。但是这 2 个条件在 PCR 的反应中是非常重要的。据文献报道<sup>[1,6,9]</sup>, 绝大多数 ISSR-PCR 反应体系中 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.5 ~ 3.0 mmol/L, 而该试验中采用的是 2.5

mmol/L,效果也可以。而对于退火温度,随着不同的物种和不同的引物变化而变化。试验中采用的是不同引物相对应的最佳温度来扩增的。

遗传多样性是生物多样性研究的核心,它可以反映出物种的遗传背景、育种潜力和利用价值,对优质种质的保护和发掘利用具有重要意义。该研究对梨的相似指数及聚类分析表明,品种间相似性低、遗传距离大,并且相似指数的范围较宽(0.186~0.750),表明供试的8种梨种质资源的遗传多样性较高。通过聚类分析和亲缘关系的分析试验同样说明ISSR在梨种质品种鉴定和亲缘关系上具有很好的应用性。

梨的分类问题一直存在着争议。一般分为4类:沙梨、白梨、秋子梨和西洋梨<sup>[10]</sup>。其中沙梨、白梨和秋子梨均起源于中国,属于东方梨;西洋梨起源于欧洲。东方梨和西洋梨无论是在形态上还是在分子水平上都存在着明显的差异性,故目前的研究多认为二者之间亲缘关系很远。有关白梨品种起源的问题在学术界有很大的争议,许多研究资料表明沙梨与白梨亲缘关系较近<sup>[11]</sup>,在分类过程中通常无法明显区分或各自聚类。该试验的8个样品中日本水晶梨、西子绿、四川火把梨属于砂梨系统,金花梨、早酥梨、砀山梨和早黄酥属于白梨系统。早95-2属于东方红色砂梨品种。根据相似性系数图和进化树可以得出与果树常规分类相同的分类结果:日本水晶梨、早95-2、四川火把梨、西子绿归为一类,金花梨、早酥梨、砀山梨、早黄酥归为另一类。结果表明,白梨系统与砂梨系统亲缘关系虽然比较近,可是依然能够通过

分子标记的技术进一步区分它们之间的亲缘关系。说明ISSR分子标记技术在鉴定物种亲缘关系上有重要的应用价值。此外,结果中显示的早95-2与日本水晶的相似性系数最高,这可能是因为早95-2是日本水晶梨与云南本地红皮砂梨杂交育种的后代。

综上所述,该研究利用ISSR标记技术初步揭示了云南主要栽培梨品种的亲缘关系和丰富的遗传多样性,为进一步对云南梨品种进行遗传多样性分析奠定了一定的理论基础。

#### 参考文献

- [1] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报,2004,39(2):19-21.
- [2] 张青林,罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报,2004,21(1):54-58.
- [3] 冯晨静,张元慧,徐秀英,等. 14 份杏种质的 ISSR 分析[J]. 河北农业大学学报,2005,28(5):52-55.
- [4] 宣继萍,章镇,房经贵,等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报,2002,19(6):421-423.
- [5] 潘鸿,何新华,李一伟,等. 广西野生杨梅资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 果树学报,2008,25(3):353-357.
- [6] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.
- [7] 谢佳燕,张知彬. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. 兽类学报,2004,24(1):71-77.
- [8] 盖钧益. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:286-287.
- [9] 余艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(1):15-19.
- [10] 俞德俊. 中国果树分类学[M]. 北京:农业出版社,1979.
- [11] LIN S H, FANG C Q. AFLP molecular marker of 10 species of pyrus in China[J]. Acta Hort,2002,587:223-236.
- [10] TAYLOR A O, ROWLEY J A. Plants under climatic stress [J]. Plant Physiol,1971,47:713-718.
- [11] PAPAGEORGIOU G. Bioenergetics of photosynthesis [M]. New York: Academic Press,1975:319.
- [12] 余叔文,汤章成. 植物生理与分子生物学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1998:262-267.
- [13] 向彦,贺浩华,刘宜柏,等. 东乡野生稻耐冷性研究进展[J]. 江西农业大学学报,2003,25(4):482-486.
- [14] 韩龙植,曹桂兰,安永平,等. 水稻种质资源芽期耐冷性的鉴定与评价[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(4):346-350.
- [15] 李霞,戴传超,程睿,等. 不同生育期水稻耐冷性的鉴定及耐冷性差异的生理机制[J]. 作物学报,2006,32(1):76-83.
- [16] 李霞,程睿. 水稻不同生育期耐冷性鉴定[J]. 江苏农业科学,2005(2):23-26.
- [17] 曾乃燕,何军贤,赵文,等. 低温胁迫期间水稻光合膜色素与蛋白水平的变化[J]. 西北植物学报,2000,20(1):8-14.
- [18] 王国莉,郭振飞. 低温对水稻不同耐冷品种幼苗光合速率和叶绿素荧光参数的影响[J]. 中国水稻科学,2005,19(4):381-383.
- [19] 陈善娜,邹晓菊,梁斌. 水稻不同抗冷性品种幼苗叶细胞膜系统的电镜观察[J]. 植物生理学通讯,1997,33(3):191-194.
- [20] HETHERINGTON S E, HE J, SMILE R M. Photoinhibition at low temperature in chilling sensitive and resistant plants [J]. Plant Physiol,1989,90:1609-1615.
- [21] WEEDEN N F, BUCHANAN B B. Leaf cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase: A potential targets in low temperature stress [J]. Plant Physiol,1983,72:259-261.
- [22] 李平,刘鸿先,王以柔,等. 低温对杂交水稻及其亲本三系始穗期旗叶光合作用的影响[J]. 植物学报,1990,32(6):456-464.
- [23] 李平,陈贻竹,李晓萍,等. 水稻的耐冷性与亲本的关系[J]. 植物学报,1994,37(7):544-551.

(上接第 500 页)

于进一步研究。

该研究鉴定筛选出 3 个发芽期、芽期和苗期的耐冷性强的野生稻 DNA 导入后代:05D4-92、05D4-160 和 05D4-161,为水稻耐冷育种提供了资源材料和方法手段,也为野生稻的进一步利用奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 韩龙植,张三元. 水稻耐冷性鉴定评价方法[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(1):75-80.
- [2] 韩龙植,曹桂兰,芮钟斗,等. 水稻芽期耐冷性与其他耐冷性状的相关关系[J]. 作物学报,2004,30(10):990-995.
- [3] SASAKI T, HOOMA H. Studies on breeding for germinability at low temperature of rice varieties adapted to direct sowing cultivation in flooded paddy field in cool region VI. Effectiveness of individual selection for germinability at low temperature on some agronomic characters in early segregating generations [J]. Japan J Breeding,1977,27(2):105-115.
- [4] 韩国育种学会. 育种实验指导[M]. Seoul:Korea,1996:214-215.
- [5] 李太贵. 在低温下筛选水稻不同生长期耐寒品种的室内方法[J]. 国外农业科技,1981(4):18-21.
- [6] 应存山. 中国稻种资源[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,1993:540.
- [7] JIAO D M, JI B H, LI X. Characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice [J]. Photosynthetica,2003,41(1):33-41.
- [8] 陈大洲,肖叶青,赵社香,等. 东乡野生稻苗期和穗期的耐寒性研究[J]. 江西农业学报,1996,8(1):1-6.
- [9] BERRY J, BJOKMAN D. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol,1980,31:491-543.