

利用 AFLP 分子标记鉴定苹果梨的分类地位

鲁凤娟^{1,2}, 张玉星¹ (1. 河北农业大学, 河北保定 071001; 2. 中国环境管理干部学院, 河北秦皇岛 066004)

摘要 苹果梨是梨属中优良的抗寒种质资源, 但关于其分类地位一直存在争议。利用 AFLP 分子标记技术对其进行研究, 通过聚类分析和遗传相似系数分析, 重点探讨了苹果梨在 DNA 水平上的分类地位, 认为将苹果梨归为白梨系统较为适宜。

关键词 分子标记; 苹果梨; 分类地位; AFLP

中图分类号 S661.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-01937-02

Taxonomic Status Identification of Hng guo Pear by AFLP Molecular Marker

LU Fengjuan et al (Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract Hng guo pear is an excellent germplasm resource of *Pyrus* with cold resistance. But its taxonomic status is always in dispute. Hng guo pear was studied by using AFLP molecular marker technique. The taxonomic status of Hng guo pear at DNA level was emphatically discussed by clustering analysis and genetic similarity coefficient analysis. It was thought that it was suitable for classifying Hng guo pear to white pear system.

Key words Molecular marker; Hng guo pear; Taxonomic status; AFLP

苹果梨是梨属中优良的抗寒种质资源, 曾有研究认为, 其可能是日本的今村秋与秋子梨或秋子梨与砂梨杂交育成的^[1-2]。更有很多学者对其进行了形态学、酶学、孢粉学的研究, 但关于苹果梨的分类地位一直存在争议。笔者利用 AFLP 分子标记技术分别对不同的梨属植物材料进行分析, 着重探讨了苹果梨在 DNA 水平上的分类地位, 为其分类归属提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 AFLP 分子标记技术所用梨属植物材料如表 1 所示。

表1 用于 AFLP 分析的 44 个梨属植物供试材料

Table 1 44 test materials of *Pyrus* used in AFLP analysis

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
1	王子廿世纪 Wangzi ershishiji	16	南果 Nanguo	31	天生伏 Tianshengfu
2	爱甘水 Aganshui	17	红南果 Hongnanguo	32	早熟句句 Zaoshujuju
3	新星 Xinxing	18	小香水 Xiaoxiangshui	33	爱宕 Aidang
4	黄金 Huangjin	19	鸭梨 Yali	34	雪花 Xuehua
5	今村秋 Jincunqiu	20	晋县大鸭梨 Jinxian dayali	35	晋酥 Jinsu
6	巴黎 Bali	21	赵县大鸭梨 Zhaoxi dayali	36	秦丰 Qin feng
4	红巴黎 Hongbali	22	垂枝鸭梨 Chuzhi yali	37	黄县长把 Huangxianchangba
8	红茄 Hongqie	23	胎黄梨 Taihuangli	38	柠檬黄 Nimgenghuang
9	保利阿斯卡 Boli asika	24	金花梨 Jinhuali	39	栖霞大香水 Qixiadaxiangshui
10	朱丽比恩 Zhuli ben	25	金花4号 Jinhua4hao	40	黄酸梨 Huangsuandi
11	其力阿木提 Qili amiti	26	苹果梨 Pingguoli	41	二宫白 Ergongbai
12	武威冰珠梨 Wuweibingzhuli	27	苹香 Pingxiang	42	铁头 Tietou
13	花长把 Huachangba	28	锦香 Jinxiang	43	京白 Jingbai
14	兰州长把 Lanzhouchangba	29	中梨1号 Zhongli yi hao	44	茄梨 Qeli
15	库尔勒香梨 Kulelexiangli	30	贵妃 Gufeli		

1.2 方法 健康植株新梢上的成熟叶片用于提取 DNA,

基金项目 河北省自然科学基金(302240)。

作者简介 鲁凤娟(1978-), 女, 河北昌黎人, 硕士, 讲师, 从事园艺与绿色食品方面的研究。

收稿日期 2008-12-10

DNA 提取采用 CTAB 法^[3-4]。

AFLP 分析: 参照鲁凤娟等的方法^[5]。应用筛选出的 10 对引物组合(表 2) 进行扩增。结果记录: 每个引物的扩增产物选稳定而清晰的条带作为统计数据。条带“有”记为“1”, “无”记为“0”, 最后将多态性统计数据输入计算机。

聚类分析: 利用统计软件 SPSS 计算供试材料之间的欧氏距离, 利用离差平方和法进行聚类分析, 输出欧氏距离表并产生聚类树状图。

表2 筛选引物的名称及其选择性碱基

Table 2 The name of selected primers and their selective bases

引物组合 Primer combination	选择性碱基 Selective bases	引物组合 Primer combination	选择性碱基 Selective bases
M/E ₅	MCAG/EACG	M/E ₆	MCTC/EACG
M/E ₆	MCAG/EACG	M/E ₅	MCTG/EACG
M/E ₇	MCAG/EAGG	M/E ₇	MCTG/EAGG
M/E ₈	MCAI/EACT	M/E ₅	MCTI/EACG
M/E ₄	MCTC/EACC	M/E ₆	MCTI/EAGC

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增结果 用 10 对多态性引物组合对 44 个梨品种进行了 AFLP 分析, 都能得到比较清晰、稳定的指纹图谱。10 对引物共扩增出 371 个位点, 其中多态性位点 306 个, 占总位点数的 82.5%; 每个引物组合扩增的位点数变化在 23~55 个, 平均 37.1 个。

2.2 聚类分析 根据 DNA 扩增的结果计算出苹果梨与其他梨品种之间的欧氏距离。从欧氏距离表(表略) 可以看出, 苹果梨和白梨系统的鸭梨欧氏距离最小, 为 7.416; 其次是砂梨系统中的新星, 欧氏距离为 7.746; 然后是秋子梨系统中的小香水, 欧氏距离为 8.062; 与西洋梨系统中的红茄欧氏距离最小, 为 9.849。从构建的 44 个梨品种的聚类图中可知, 苹果梨首先与白梨系统中的金花 4 号聚在一起, 再与其杂交品种苹香聚在一起, 说明苹果梨与白梨系统有较近的亲缘关系。

3 讨论

顾模认为, 苹果梨系 *Pyrus ussuriensis* var. *ovoides* × *P. pyrifolia* rchd 的自然授粉杂交种^[6], 并在《东北中部地区果树资源调查》一书中将其归纳为砂梨系统^[7]。从形态学上, 苹果梨具有砂梨的某些特征, 因而蒲富慎、王宇霖、俞德浚等

都将其归为砂梨系统^[8-10]。后来,蒲富慎又将其归为白梨系统^[11],吴耕民的看法与之一致^[12]。在《梨主要品种原色图谱》和《果树栽培学各论》中也将苹果梨归属于白梨系统^[13-14]。辛培刚等利用过氧化物同工酶进行亲缘关系研究,结果表明,苹果梨的杂交后代锦丰与白梨系统的鸭梨关系密切^[15]。邹乐敏等对苹果梨的花粉研究表明,苹果梨花粉形态既不同于白梨也不同于砂梨,故其起源从花粉学未作出定论^[16]。曲柏宏等研究发现,苹果梨从花粉粒大小和形状上看形状独特,但纹饰特征上与白梨系统的鸭梨更相似,且苹果梨与鸭梨及黄花梨聚在一起,认为从孢粉学角度将苹果梨归入白梨系统合理^[17]。王丙旭、马艳芝利用 RAPD 技术的研究表明,苹果梨和白梨系统的距离比砂梨系统近,并且和白梨系统的品种聚在一起,认为苹果梨应属于白梨系统^[18-19];曲柏宏等的研究结果与之一致^[20]。赵国芳利用 ISSR 技术研究表明,苹果梨与白梨系统的代表品种白枝母秧、鸭梨、荏梨首先聚在一起,其亲缘关系较近^[21]。而藤元文等用 RAPD 标记所作结果表明,苹果梨等原产朝鲜半岛的品种具有不同于白梨、砂梨、秋子梨等独特的 RAPD 谱带,在系统树中形成独特的类群,建议将苹果梨和其他原产于朝鲜半岛的和苹果梨相近的品种暂时统称为朝鲜梨^[22]。马兵钢等的 RAPD 数据建议将苹果梨独立于供试的 5 个种之外,将其上升为种一级阶元^[23]。该研究通过利用 AFLP 分子标记技术对苹果梨与其他梨属植物进行聚类分析,更倾向于将苹果梨归为白梨系统。

参考文献

[1] 王宇霖. 落叶果树育种学[M]. 北京: 农业出版社,1988:192-193.

(上接第1933页)

此,充分利用转基因技术的潜在价值,实现转基因技术的实用化、商业化、转基因动物的产业化,是生物科学工作者的努力目标。

参考文献

- [1] 黄翠芬. 遗传工程理论与方法[M]. 北京: 科学出版社,1987:7-11.
- [2] 郭勇,倪和民,朱裕鼎. 显微注射法培育转基因哺乳动物的研究进展[J]. 生物工程进展,1997,17(1):42-46.
- [3] GORDON K, LEE E, VITALE J, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk[J]. Biotechnology, 1987, 5:1183-1187.
- [4] PALMITER R D, BRINSTER R L, HAMMER R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes[J]. Nature, 1982, 300:611-615.
- [5] WILMUT I, SCHNEKE A E, MC WHIR J, et al. Viable offspring derives from fetal and mammalian cell[J]. Nature, 1997, 385:810-813.
- [6] LAI L, PARK K W, CHEONG H T, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine treated fibroblasts as donor cells[J]. Mol Reprod Dev, 2002, 62:300-306.
- [7] ZERMANN D H, DOGGWELER W R. Central of the kidney. What can we learn from a study in an animal model[J]. J Urol, 2005, 17(3):1033-1038.
- [8] LAMTRANO M, LAMON A, FAZI V M, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: gene transfection of mice[J]. J Cell, 1989, 57:717-723.
- [9] ANTHONY G F P, TERUOKO WAKAYAMA, HIDEFUMI KISHIKAWA, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection[J]. J Science, 1999, 284:1180-1183.

- [2] 曲泽洲,潘季淑,闪重辉. 北京果树志[M]. 北京: 北京出版社,1990:239-240.
- [3] 王关林,方宏均. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社,1998:370-372.
- [4] 胡春根,郝玉,邓秀新,等. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法[J]. 遗传, 1998, 20(4):31-33.
- [5] 鲁凤娟,张玉星,王国英,等. 梨 AFLP 技术体系的摸索与建立[J]. 梨科研与生产进展,2003(2):176-178.
- [6] 顾模. 延边苹果梨综合栽培技术研究报告[R]. 1955.
- [7] 顾模. 东北中部地区果树资源的调查[M]. 北京: 科学出版社,1956.
- [8] 蒲富慎,王宇霖. 东北的梨[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1959:89-109.
- [9] 蒲富慎,王宇霖. 中国果树志第三卷 梨[M]. 上海: 上海科学技术出版社,1963.
- [10] 俞德俊. 中国果树分类学[M]. 北京: 农业出版社,1979.
- [11] 蒲富慎. 梨种质资源及其研究[J]. 中国果树,1988(2):42-46.
- [12] 吴耕民. 中国温带果树分类学[M]. 北京: 农业出版社,1984:33-80.
- [13] 中国果树研究所. 梨主要品种原色图谱[M]. 北京: 农业出版社,1976.
- [14] 河北农业大学. 果树栽培学各论[M]. 北京: 农业出版社,1984:60.
- [15] 辛培刚,王存喜,公庆党,等. 梨树过氧化物同工酶分析及亲缘关系探讨[J]. 果树科学,1989,6(3):153-158.
- [16] 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,1986,11(4):219-223.
- [17] 曲柏宏,严花淑,陈艳秋,等. 部分梨品种花粉形态观察[J]. 梨科研与生产进展,2003(2):80-88.
- [18] 王丙旭. RAPD 在梨种质资源亲缘关系和品种鉴定中的应用[D]. 长春: 吉林农业大学,1998:1-9.
- [19] 马艳芝. 梨属(*Pyrus* L.) 植物 RAPD 反应体系的建立及其应用研究[D]. 保定: 河北农业大学,2003.
- [20] 曲柏宏,金兰香,陈艳秋,等. 利用 RAPD 技术探讨延边苹果梨的分类地位[J]. 延边大学学报,2002,24(3):155-158.
- [21] 赵国芳. ISSR 对梨属(*Pyrus* L.) 栽培品种基因组的指纹分析[D]. 保定: 河北农业大学,2003.
- [22] TIENG 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 Amer Soc Hort Sci, 2002, 127:262-270.
- [23] 马兵钢,牛建新,吴忠华,等. 应用 RAPD 对新疆梨属主要品种亲缘关系的分析[J]. 梨科研与生产进展,2003(2):162-169.
- [10] KORIE K J. 生物技术应用于猪育种的展望[J]. 甘肃畜牧兽医,1993(2):57-58.
- [11] QUIRKE J F. 生物技术在畜牧业中的应用[J]. 国外畜牧科技,1988(6):9-11.
- [12] 赵少斌,崔伟. 转基因技术在动物营养上的应用[J]. 江西饲料,2008(3):10-13.
- [13] PURSEL V G, WALL R J. Production of transgenic swine is super-ovulation of donors effective[J]. Anim Sci, 1993, 71(SI):218.
- [14] 王洪才,马巍,王军. 转基因技术研究进展及在动物生产中的应用[J]. 中国奶牛,2008(5):29-32.
- [15] CARBER E A. Avian cells expressing the neurine protein are resistant to influenza infection[J]. Virology, 1991(18):754-762.
- [16] 沈子龙,廖建民,徐寒梅,等. 转基因动物技术与转基因动物制药[J]. 中国药科大学学报,2002,33(2):81-86.
- [17] MATHEW J T, TOSHTAKA Y, YUSU G, et al. Bion-induced amyloid heart disease with high blood infectivity in transgenic mice[J]. Science, 2006, 313:94-97.
- [18] 李光华,叶绍辉. 动物体细胞克隆技术的研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖,2006,14(1):17-20.
- [19] YANG X D, GUO D Q, BAOS J, et al. Resistance analysis of the binary insect-resistant transgenic soybean to *Hliothis virescens*[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3):67-69.
- [20] 张锐,陶勇,章孝荣. 哺乳动物异种体细胞核移植技术的应用及影响因素[J]. 动物医学进展,2007,28(5):53-57.
- [21] HU F J, ZHANG Y L, YANG Z J, et al. Effect of insulin-transferrin-selenium on goat oocytes maturation and embryo development[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3):107-110.