

鸭梨及其变异类型的 RAPD 分析

马艳芝^{1,2}, 张玉星¹

(¹河北农业大学园艺学院, 保定 071001; ²唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000)

摘要:鸭梨为梨属白梨系统优良资源, 生产中其变异类型较多。本文首次对鸭梨及其 9 个鸭梨变异类型进行 RAPD 分析, 并初步筛选出 3 个多态性引物即 S28、S32、S176。研究发现: 芽变品种垂枝鸭梨增加了 1 条特异带 (S32-600)。在芽变品种魏县巨鸭梨、甜鸭梨、垂枝鸭梨的扩增产物中均少 1 条特异带 (S28-400)。魏县巨鸭梨扩增产物中缺少 2 条特异性条带 (S176-900 和 S176-1150) 和阎庄白花结实鸭梨缺少 1 条特异性条带 (S176-1150)。可见魏县巨鸭梨、甜鸭梨、垂枝鸭梨与阎庄白花与其他类型能区分开。

关键词:鸭梨; 变异类型; RAPD

Analysis of Yali Pear and Mutation Types by RAPD

MA Yan-zhi^{1,2}, ZHANG Yu-xing¹

(¹College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; ²Department of Biological Science, Tangshan Teacher's College, Tangshan 063000)

Abstract: Yali pear is an excellent *P. bretschneideri* Rehd. germplasm resource. Yali pear and its mutations were studied by RAPD technique for the first time. Three polymorphism primers—S28, S32, and S176 were selected from 50 RAPD primers. The results showed that: Compared with other mutations, the RAPD amplifications of Chuizhiyali pear existed one specific band: S32-600; the RAPD amplifications of Weixianjuyali pear, Tianyali pear and Chuizhiyali pear were short of one specific band: S28-400; the RAPD amplifications of Weixianjuyali pear were short of two specific bands: S176-900 and S176-1150; Yanzhuangzihuayali pear was short of one specific band: S176-1150. It indicated that Weixianjuyali, Tianyali, Chuizhiyali and Yanzhuangzihua pear could be differentiated from other types.

Key words: Yali pear; Mutations; RAPD

梨是世界五大果树之一, 中国是世界梨主要原产地, 种质资源极为丰富, 栽培历史悠久, 品种繁多, 栽培面积和产量均居世界首位。河北省是我国第一产梨大省, 原产的鸭梨、雪花梨、安梨驰名中外。果品也被列为河北省三大农业主导产业之一, 梨果产业在河北省果品业中居首位, 被省政府确定为优势果树重点发展^[1]。鸭梨在中国栽培历史久远, 广泛分布于十多个省、直辖市、自治区, 管理经验丰富, 技术水平较高, 是我国农村经济建设和农民致富的重要产业之一, 还是我国重要的传统外销果品, 享誉海

内外^[2]。鸭梨在长期的栽培过程中, 产生了许多变异类型, 不少产区从中选出芽变优良品系和优良单株^[3-4]。目前, 从鸭梨中已选出各具特点的突变系 15 个, 其中大果系 8 个、优质系 2 个、自花结实系 3 个、早熟系及垂枝系各 1 个^[2]。关于鸭梨变异类型曾进行过酶谱特征、果实和叶片性状鉴定等方面的研究^[3-5]。

RAPD 技术是建立在 PCR (polymerase chain reaction) 基础上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的 DNA 分子标记技术^[6], 被广

收稿日期: 2009-04-20

修回日期: 2010-05-04

基金项目: 河北省自然科学基金 (303240)

作者简介: 马艳芝, 硕士, 讲师, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: mayanzhiwx@163.com

通讯作者: 张玉星, 教授, 博士, 研究方向为果树结实生理与分子生物学研究

泛应用于果树种质资源研究中。RAPD 技术在梨属种质资源方面的研究较苹果等其他果树类型少。1998 年, Botta 等^[7]应用此技术研究了意大利北部城市皮埃蒙特(Piemonte)的梨属种质资源, 鉴别了 17 个梨品种并建立起了系统发育关系图。2000 年, Kim 等^[8]讨论了 RAPD 技术在梨树品种鉴定应用的潜力与局限性, 并揭示了供试品种的亲缘关系。2000 年, Wen 等^[9]对原产中国的梨属植物 13 个种进行分析, 探讨了新疆梨的分类地位, 并对供试材料进行了聚类分析。王丙旭^[10]应用 RAPD 技术对梨树种质资源的秋子梨、砂梨、白梨和西洋梨系统的 40 个品种进行了品种鉴定、亲缘关系和分类研究, 发现苹果梨和白梨系统的鸭梨和栖霞大香水聚在一起, 库尔勒香梨和西洋梨的品种聚在一起, 得出了和表型标记不同的结果, 认为对它们的分类地位应重新确定。2001 年, 曲柏宏等^[11]对梨属植物 40 个种和品种类型进行了 RAPD 分析, 将起源于欧洲的西洋梨和起源于中国的 3 个种明显分开, 发现白梨和砂梨的亲缘关系最近, 也认为苹果梨应归属于白梨系统。近几年还有一些关于梨资源遗传多样性的文章陆续发表^[12-14]。

迄今, 有关鸭梨芽变的 RAPD 分析还未见报道。本研究选用 50 条 RAPD-PCR 引物对鸭梨及其变异类型进行 RAPD 扩增, 初步筛选 RAPD 标记, 为鸭梨种质资源的开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2002 年 4 月至 2003 年 4 月在河北农业大学园艺学院实验室进行, 所用鸭梨及其变异类型采自河北省邯郸市魏县和中国农业科学院果树资源圃(表 1)。选择健康的植株(枝条), 摘取较幼嫩叶片用于提取 DNA。

1.2 方法

DNA 提取及 RAPD 扩增: 基因组 DNA 的提取及 RAPD 扩增参照马艳芝等^[15]的方法。RAPD 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB)电泳分离, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 电泳于 DYY-III 稳压电泳仪上进行(电压 3.5V/cm)。根据扩增片段的大小, 适时停止电泳。电泳结果在紫外透射仪上观察, 照相。50 个 RAPD 引物分别为 S1、S17、S22、S28、S30、S24、S32、S66、S67、S81、S85、S93、S109、S126、S136、S134、S139、S142、S178、S176、S135、S89、

表 1 鸭梨及其变异类型

Table 1 Yali pear and its mutation types applied in this study

编号 Code	名称 Name	类型 types
1	普通鸭梨	
2	魏县巨鸭梨	芽变
3	魏县大鸭梨	枝变
4	晋县大鸭梨	枝变
5	赵县大鸭梨	芽变
6	阎庄自花	芽变
7	金坠梨	芽变
8	甜鸭梨	芽变
9	光鸭梨	枝变
10	垂枝鸭梨	芽变

S281、S285、S287、S284、S300、S309、S318、S324、S338、S355、S353、S448、S451、S455、S460、S444、S491、S1005、S1009、S1026、S1125、S1128、S1137、S1389、S1429、S1444、S1450、S1508, 引物序列见 http://www.sunbio-tech.com.cn/e_more.asp?id=740。

2 结果与分析

一般认为, OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.5 以上即可进行 RAPD 分析。本实验通过 CTAB 法提取鸭梨及其变异类型的基因组 DNA, 样品 OD_{260}/OD_{280} 的比值均在 1.6~1.9 之间(表 2), 表明提取的 DNA 质量较高, 可用于 RAPD 扩增。

表 2 鸭梨及其变异类型基因组 DNA 的 OD_{260}/OD_{280}

Table 2 The OD_{260}/OD_{280} of genomic DNA from different tissues

编号 Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD_{260}/OD_{280}	1.9	1.8	1.8	1.6	1.8	1.7	1.9	1.8	1.7	1.9

通过对普通鸭梨及其 9 个鸭梨变异系进行 RAPD 分析, 从 50 个引物中筛选出 3 个多态性引物, 即 S32、S28、S176, 其扩增结果如图 1 所示。

扩增结果表明, 在引物 S32 的扩增产物中, 在大约 600bp 处垂枝鸭梨多了 1 条特异带, 其他带型基本一致(图 1-A)。引物 S28 的扩增产物中, 与其他材料相比, 在大约 400 bp 处魏县巨鸭梨、甜鸭梨、垂枝鸭梨没带(图 1-B)。在引物 S176 的扩增产物中, 魏县巨鸭梨在 900 bp 和 1150 bp 处没带; 阎庄自花

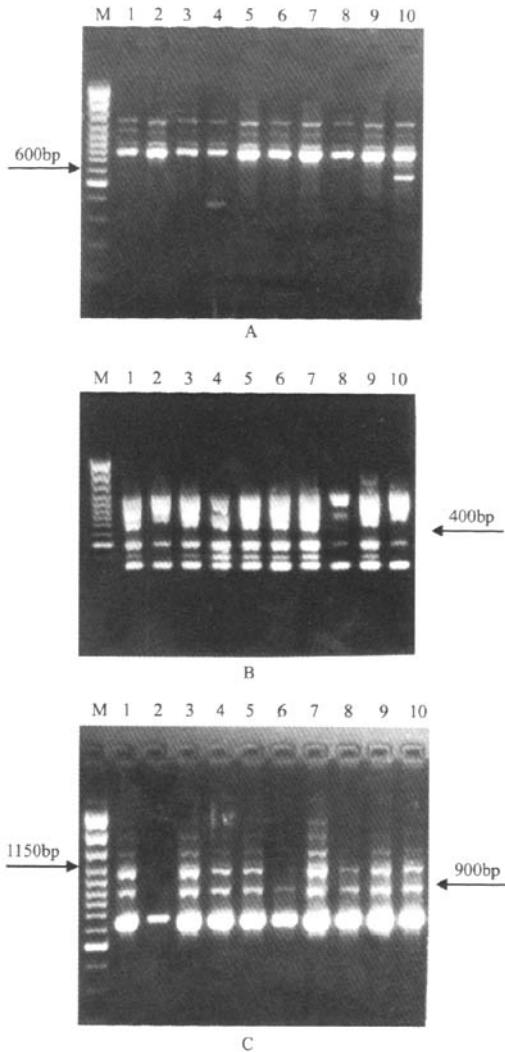


图 1 鸭梨及其变异类型的扩增结果

Fig. 1 Amplification of Yali Pear and its mutation types

A, B, C 引物分别为 S32, S28, S176; M: Maker; 1-10 为品种编号

1150 bp 处没带(图 1-C)。

与对照普通鸭梨比较,魏县巨鸭梨、阎庄白花、甜鸭梨、垂枝鸭梨分别有 2 条、1 条、1 条和 3 条特异条带,可将这 4 种类型与普通鸭梨区分开,而其他类型与普通鸭梨则不能相互区分。

3 讨论

果树芽变的实质是遗传物质的变异,基于 DNA 分子水平的芽变鉴定方法可以避免形态性状描述的缺陷,达到早期鉴定的目的^[16]。建立在 PCR 基础上的 RAPD 标记,以其在果树芽变鉴定中表现出的技术简便、快速、经济、易于检测等优点,更易被人们

接受与应用^[17]。尽管已有成功利用 RAPD 标记鉴别果树芽变的报道,但更多的研究表明 RAPD 标记鉴别芽变的几率是相当低的^[18-22],这种现象和其他植物的研究情况相符^[23-25]。

本试验应用 RAPD 技术对 9 个鸭梨变异系进行了分析,筛选出了 3 个多态性引物,即 S28、S32、S176。试验中所用鸭梨变异系经过了多年的研究观察,发现其变异特点稳定,从而确认这些变异不是环境条件引起的饰变,而是遗传物质引起的变异,但缺乏直接证据,而 RAPD 技术为此提供了 DNA 水平的证据。虽然 RAPD 所用的一系列引物序列各不相同,但对于任何特定的引物,它同基因组 DNA 序列都有特异结合位点,如果基因组这些区域发生 DNA 片段插入或缺失等突变,就有可能导致这些特定结合位点分布发生改变,使 RAPD 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中的 DNA 条带增加(图 1-A)、减少(图 1-B、C)或分子量发生改变。

虽然有的研究认为 RAPD 标记无法鉴定由多倍性引起的芽变^[26],甚至有些学者认为用分子标记技术很难检测出来^[27],而且刘继红等^[28]研究认为 RAPD 技术不能检测出芽变。但金勇丰等^[29]、Debenner 等^[30]的研究结果表明,应用 RAPD 能将芽变系与其对照品种区分开。而本研究鉴别了芽变优系,可能是这几个芽变优系的变异程度较大。关于鸭梨及其变异类型的 RAPD 分析,还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 曹玉芬,刘凤之,王昆,等.梨种质资源主要描述标准比较分析[J].植物遗传资源学报,2005,6(4):460-463
- [2] 郝荣庭.中国鸭梨[M].北京:中国林业出版社,1999
- [3] 王彦敏,申连长.鸭梨新优系选育初报[J].河北果树,1998(增刊):56-58
- [4] 郝荣庭,董启凤.鸭梨芽变新优系主要器官过氧化物酶同工酶研究[C]//梨科研与生产进展.北京:中国农业出版社,1998
- [5] 申连长,王彦敏.鸭梨 5 个芽变优系果实和叶片性状鉴定评价[J].中国果树,2004(3):12-14
- [6] 房经费,张镇,周兴华,等. RAPD 标记鉴定苹果芽变的可行性分析[J].果树学报,2001,18(3):182-185
- [7] Botta R, Akkak A, Me G, et al. Identification of pear cultivars by molecular markers[J]. Acta Horti culturae, 1998, 52(1): 63-70
- [8] Kim C S, Lee G P, Han D H, et al. Classification and identification of *Pyrus perfoliata* using RAPD[J]. Journal of Korean Society for Horticultural Science, 2000, 41(2): 119-214
- [9] Wen T Y, Tanabe K, Tamura F, et al. Genetic relationships of pear cultivars in Xin Jiang, China, as measured by RAPD markers[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2000, 76(6): 771-779
- [10] 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
- [11] 曲柏宏,金香兰,陈艳秋,等.梨属种质资源中的 RAPD 分析[J].园艺学报,2001,28(5):460-462

鸭梨及其变异类型的RAPD分析

作者: [马艳芝](#), [张玉星](#), [MA Yan-zhi](#), [ZHANG Yu-xing](#)
 作者单位: [马艳芝, MA Yan-zhi \(河北农业大学园艺学院, 保定, 071001; 唐山师范学院生命科学系, 河北唐山, 063000\)](#), [张玉星, ZHANG Yu-xing \(河北农业大学园艺学院, 保定, 071001\)](#)
 刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC | PKU**
 英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)
 年, 卷(期): 2010, 11 (4)

参考文献(30条)

1. [Challice J S; Westwood M N](#) Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters [外文期刊] 1973
2. [俞德浚](#) [中国果树分类学](#) 1979
3. [Wen T Y; Tanabe K; Tamura F](#) Genetic relationships of pear cultivars in Xin Jiang, China, as measured by RAPD markers 2000 (06)
4. [Kim C S; Lee G P; Han D H](#) Classification and identification of *Pyrus perfolia* using RAPD 2000 (02)
5. [Botta R; Akkak A; Me G](#) Identification of pear cultivars by molecular markers 1998 (01)
6. [房经贵; 张镇; 周兰华](#) RAPD标记鉴定苹果芽变的可行性分析 [期刊论文] - [果树学报](#) 2001 (03)
7. [申连长; 王彦敏](#) 鸭梨5个芽变优系果实和叶片性状鉴定评价 [期刊论文] - [中国果树](#) 2004 (03)
8. [郗荣庭; 董启凤](#) 鸭梨芽变新优系主要器官过氧化物酶同工酶研究 1998
9. [王彦敏; 申连长](#) 鸭梨新优系选育初报 1998 (增刊)
10. [Debener T; Janakiram T; Mattiesch L](#) Sports and seedlings of 10 rose varieties analysed with molecular markers [外文期刊] 2000 (1)
11. [金勇丰; 张耀洲; 陈大明](#) 桃早熟芽变种'大观一号'的RAPD分析及其特异片段的克隆 1998 (02)
12. [刘继红; 刘春根](#) RAPD技术在果树研究中的应用 1998 (01)
13. [许方](#) 中国梨属植物划分电镜图谱 1993
14. [河北省农业科学院果树研究所](#) [河北省果树志](#) 1959
15. [曲泽洲; 王永蕙; 李树林](#) 果树品种分类学研究进展 1986 (02)
16. [黄礼森; 李树玲](#) 我国梨品种染色体数目观察 1986 (01)
17. [姚宜轩; 许方](#) 我国梨属植物花粉形态观察 1990 (01)
18. [蒲富慎; 陈瑞阳](#) 中国梨属植物核型研究(二) 1986 (02)
19. [蒲富慎](#) 我国梨的种质资源和梨的育种 1979 (02)
20. [Rubzev G A](#) Geographical distribution of the genus *Pyrus* and trends and factors in its evolution 1944
21. [孙文英; 张玉星; 张新忠](#) 梨分子遗传图谱构建及生长性状的QTL分析 [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2009 (02)
22. [韩振海](#) [落叶果树种质资源学](#) 1994
23. [马艳芝; 王向东; 张玉星](#) 梨属植物RAPD反应体系的建立与优化 [期刊论文] - [西北农林科技大学学报](#) 2007 (03)
24. [贾彦利; 田义轲; 王彩虹](#) 梨品种资源遗传差异的RAPD分析 [期刊论文] - [果树学报](#) 2007 (04)
25. [马兵钢; 牛建新; 潘立忠](#) RAPD-PCR对梨属植物品种鉴定的研究 [期刊论文] - [西北农业学报](#) 2004 (01)
26. [文晓鹏; 庞晓明; 邓秀新](#) 不同自然分布区刺梨遗传多样性的RAPD分析 [期刊论文] - [中国农业科学](#) 2003 (07)
27. [曲柏宏; 金香兰; 陈艳秋](#) 梨属种质资源中的RAPD分析 [期刊论文] - [园艺学报](#) 2001 (05)

28. [王丙旭](#) RAPD在梨种质资源亲缘关系和品种鉴定中的应用 1998
29. [郗荣庭](#) 中国鸭梨 1999
30. [曹玉芬](#); [刘凤之](#); [王昆](#) 梨种质资源主要描述标准比较分析[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2005(04)

引证文献(1条)

1. [支婷](#). [刘春琴](#). [崔建州](#). [杜克久](#) 鸭梨Hc ISSR-PCR反应体系的优化[期刊论文]-[北方园艺](#) 2011(12)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201004017.aspx