

梨极早熟芽变品种‘六月酥’的 AFLP 分析

张小军,徐凌飞,吴中营

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】从 DNA 分子水平研究‘早酥梨’及其极早熟芽变品种‘六月酥’的遗传差异,为极早熟梨的分子育种提供理论依据。【方法】以‘早酥梨’和‘六月酥’梨的幼叶为试材,采用改良 CTAB 法提取梨叶片基因组 DNA,应用 AFLP 技术对‘早酥梨’和‘六月酥’进行遗传差异分析。【结果】DNA 完整性较好,纯度高。64 对 AFLP 引物组合中有 47 对检测出 DNA 分子多态性,产生了 1 931 条清晰谱带,其中多态性位点有 95 个,多态性条带比例为 9.38%,遗传相似系数为 95.24%,差异片段主要集中在 200~900 bp;47 对不同引物组合均能在‘早酥梨’和‘六月酥’梨间检测到 AFLP 扩增差异位点。【结论】‘六月酥’和‘早酥梨’之间的差异与遗传物质的改变相关,其中一些差异可能与决定梨极早熟性状的基因有关。

【关键词】 早酥梨;六月酥梨;芽变;AFLP

【中图分类号】 S661.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0139-07

AFLP analysis of extra early mutant cultivar of pear ‘Liuyuesu’

ZHANG Xiao-jun, XU Ling-fei, WU Zhong-ying

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The genetic diversity was researched for pear cultivars ‘Zaosu’ and extra early mutant cultivar ‘Liuyuesu’ on molecular level, which would provide academic basis for the breeding of extra early pear on molecular level. 【Method】With young leaves of pear cultivars ‘Zaosu’ and ‘Liuyuesu’ as materials, improved CTAB method was used to extract high quality genomic DNA, and the AFLP marker technology was used to analyze the genetic diversity of pear cultivars ‘Zaosu’ and ‘Liuyuesu’. 【Result】47 of 64 selective primer pairs amplified 1 931 clear bands, 95 of them were polymorphic loci. The polymorphic rate and Neis similarity coefficient were 9.38% and 95.24% respectively. The range of the polymerphic fragments was mainly 200—900 bp. 【Conclusion】The results indicated that there were some differentiation on molecular level between ‘Liuyuesu’ and ‘Zaosu’ pear. Some variations may be related with the genes deciding the early mature traits.

Key words: Zaosu pear; Liuyuesu pear; bud mutation; AFLP

芽变育种是果树育种的一种重要途径,因其育种时间短、效果好,已被广泛应用于苹果^[1]、桃^[2]、梨^[3]等多种果树优良品种的选育。芽变是体细胞突变的一种,此种突变发生在芽的分生组织细胞中,当芽萌发长成枝条时,在性状上表现出与原类型的不同,这是果树新品种的重要来源之一^[4]。用分子标

记对变异分生组织的 DNA 酶切片段所产生的扩增产物进行多态性分析,就可在早期从分子水平上鉴定突变体是饰变还是遗传变异,从而缩短育种周期,提高芽变选种的效率。

DNA 分子标记是基因组在分子水平上遗传多态性的直接反映,其具有无表型效应、不受环境限制

* [收稿日期] 2009-04-07

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程项目(2008ZDKG-08);陕西省科技攻关项目(2008K01-11);西北农林科技大学科研启动项目

[作者简介] 张小军(1982—),男,山西芮城人,在读硕士,主要从事果树生物技术与育种研究。E-mail: xiaojun196@yahoo. cn

[通信作者] 徐凌飞(1969—),男,陕西乾县人,副教授,博士,主要从事果树生物技术与育种研究。E-mail: lingfxu@tom. com

等优点。AFLP 技术(Amplified Fragment Length Polymorphism) 又称扩增片段长度多态性,是由 Zabeau 等^[5]发明,并由 Vos^[6]发展起来的一种 DNA 分子标记技术。该技术充分结合了酶切的稳定性和 PCR 扩增的灵敏性等特点,具有结果稳定可靠、重复性强和多态性丰富等优点,已成为植物遗传多样性检测^[7-8]、突变体鉴定^[9-10]、遗传图谱构建及基因定位的重要手段之一^[11-12],且已先后在桃^[11]、苹果^[13]、山葡萄^[14]、板栗^[9]、桂花^[8]等上得到了很好的应用。但是,利用该技术对梨极早熟突变的研究尚未见报道。

‘六月酥’梨是由西北农林科技大学园艺学院从早酥梨极早熟芽变中选育出的新品种。该新品种于 2007-01 通过陕西省果业管理局审定。其果实 6 月下旬成熟,比早酥梨早 1 个月左右,是目前梨树生产中比较理想的极早熟新品种。本研究以‘六月酥’及其芽变母株‘早酥梨’为材料,采用 AFLP 技术,从 DNA 分子水平上研究‘六月酥’与‘早酥梨’间的遗传差异,以期为极早熟梨的分子标记辅助选择、梨极

早熟基因的 QTL 定位及利用基因工程技术培育优良极早熟梨新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 ‘六月酥’和‘早酥梨’新鲜幼叶于 2008 年 4 月中旬采自西北农林科技大学梨种质资源圃,放入液氮中短时间处理后,置于一 80 ℃超低温冰箱中保存备用。

1.1.2 主要试剂 试验所用 RNA 酶、*Taq* DNA 聚合酶,均购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 和 T4ligase,均购自 NEB 公司;选择性扩增引物由上海生物工程公司合成,分为 E 和 M 2 组引物,其中 E 和 M 分别表示 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物共同序列,E 与 M 后的 3 个碱基(用 N 表示)为选择性碱基,分别连接在 E 和 M 的 3′端。E 引物序列为 5′-GACTGCGTACCAATTCNNN-3′;M 引物序列为 5′-GATGAGTCCTGAGTAANNN-3′;其选择性扩增引物见表 1。

表 1 所用 AFLP 选择性扩增引物序列

Table 1 Sequence of selected amplification used in this analysis

E 引物 E primer	选择性碱基 Selective base	M 引物 M primer	选择性碱基 Selective base
E1	AAC	M1	CAA
E2	AGG	M2	CAT
E3	AAG	M3	CAC
E4	ACG	M4	CAG
E5	ACC	M5	CTA
E6	ACT	M6	CTT
E7	ACA	M7	CTC
E8	AGC	M8	CTG

1.2 方 法

1.2.1 供试梨品种 DNA 的提取 参考佟兆国等^[15]的改良 CTAB 法提取梨叶片基因组 DNA。DNA 质量通过 DU-640 核酸蛋白分析仪和 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。将符合要求的 DNA 样品稀释为 100 ng/ μ L。

1.2.2 供试梨品种 DNA 片段的酶切连接反应体系 酶切连接反应体系总体积为 30 μ L,含样品 DNA 2 μ L (100 ng/ μ L),*EcoR* I、*Mse* I (10 U/ μ L) 各 0.6 μ L,E-adapter、M-adapter(50 μ mol/L)各 1.0 μ L,10 $\times$ Reaction buffer 3.0 μ L,BSA(10 mmol/L) 0.4 μ L,T4 DNA 连接酶(300 U/ μ L)1 μ L,ddH₂O 20.4 μ L。将上述混合液置于 0.2 mL 的离心管中混匀,8 000 r/min 离心 10 s,37 ℃保温 5 h,16 ℃过夜(8~12 h),连接完成后于 70 ℃变性 10 min,灭活

连接酶。

1.2.3 供试梨品种 DNA 片段的预扩增反应体系 连接产物用 ddH₂O 稀释 10 倍。预扩增反应体系总体积 20 μ L,含连接后的 DNA 稀释样品 5 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L,dNTP(10 mmol/L)0.4 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L)4 μ L,*Mse*I+C (50 ng/ μ L) 1 μ L,*EcoR*I+A (50 ng/ μ L) 1 μ L,ddH₂O 8.8 μ L,混匀后稍离心(8 000 r/min、10 s)。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 2 min;然后 94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。取 6 μ L 预扩增产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.2.4 供试梨品种 DNA 片段的 选择性扩增反应体系 将预扩增产物用 ddH₂O 稀释 15 倍。选择性

扩增反应体系总体积 20 μL , 含预扩增后稀释的 DNA 样品 5 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , dNTP(10 mmol/L) 0.4 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.6 μL , M 引物(50 ng/ μL) 0.8 μL , E 引物(50 ng/ μL) 0.8 μL , ddH₂O 9.2 μL , 混匀后稍离心(8 000 r/min、10 s)。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 65~57.3 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 12 个循环;再 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 23 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.2.5 选择性扩增产物的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳、银染 选择性扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染参考 Sanguinetti 等^[16] 的方法并作了改动:用体积分数 1% 硝酸固定 5 min, 去离子水洗 2 次, 每次 1~2 min;1 g/L 硝酸银(含体积分数 37% 甲醛 6 mL/L)染色 5 min, 去离子水漂洗 5 s;倒入预冷的 Na₂CO₃ (含体积分数 37% 甲醛 160 μL /L)显色, 直至 Marker 或阳性模板条带清晰为止;弃显色液, 加终止液(同固定液)3~5 min 后, 去离子水洗 2 次, 每次 1~2 min;拍照记录。

1.2.6 数据的统计与分析 应用 DPS 统计软件, 按扩增带的有无记数, 当某一扩增带出现时赋值为“1”, 不存在时赋值为“0”, 从而将图形资料转换为数

据资料。
采用 Nei 和 Li^[17] 的遗传相似系数 (Genetic Similarity, GS) 计算公式对多态性进行统计分析:

$$GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)。$$

式中: N_{ij} 表示样本 i 和 j 的公共条带数, N_i 、 N_j 分别为样本 i 、 j 的带数。

多态性条带比例按下式计算:多态性=多态性条带数/总扩增条带数 $\times 100\%=(N_i+N_j-2N_{ij})/(N_i+N_j-N_{ij})\times 100\%。$

2 结果与分析

2.1 供试梨品种 DNA 质量的检测

凝胶电泳检测结果(图 1)表明, 梨叶片基因组 DNA 条带整齐无弥散, 表明基因组 DNA 完整性较好, 降解较少;点样孔附近无滞留物亮点出现, 溴酚兰指示剂前没有光亮区, 表明提取到的 DNA 纯度高, 蛋白质、酚类及多糖类等杂质去除彻底, 无 RNA 残留。用 DU-640 核酸蛋白分析仪检测, DNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0。上述结果说明, 该提取法能较完全地去除蛋白质、酚类及多糖类等杂质, 符合 AFLP 试验下游操作的要求。该方法提取的梨叶片基因组 DNA 酶切连接产物呈均匀弥散状(图 2), 可用作预扩增的模板。

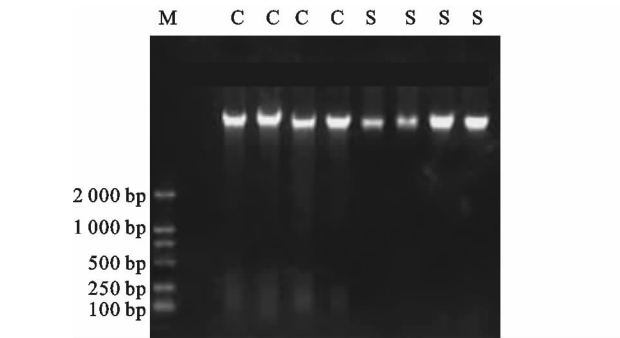


图 1 供试梨品种基因组 DNA 的电泳结果

C. 对照‘早酥梨’;S. 芽变品种‘六月酥’;

M. DNA Marker(DL 2000)

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA of the tested pear cultivars

C. Contrast cultivar ‘Zaosu’;S. Bud mutation cultivar ‘Liuyesu’;

M. DNA Marker(DL 2000)

2.2 供试梨品种扩增引物的筛选及多态性分析

以‘早酥梨’和‘六月酥’为模板, 通过 64 对 AFLP 引物组合的 PCR 扩增, 筛选两者之间具有多态性 DNA 片段的引物组合, 然后用所选引物组合重复扩增 2 次, 直到筛选出‘早酥梨’与‘六月酥’梨

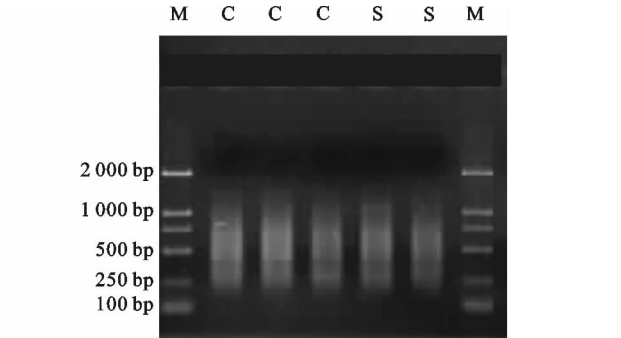


图 2 供试梨品种基因组 DNA 的酶切连接结果

C. 对照‘早酥梨’;S. 芽变品种‘六月酥’;

M. DNA Marker(DL 2000)

Fig. 2 Restriction-ligation reaction result of the genomic DNA of the tested pear cultivars

C. Contrast cultivar ‘Zaosu’;S. Bud mutation cultivar ‘Liuyesu’;

M. DNA Marker(DL 2000)

两者之间稳定的重复出现的特异引物组合。由表 2 可知, 共筛选出 47 对在芽变品种(S)‘六月酥’梨与对照(C)‘早酥梨’之间存在多态性的引物组合。47 对引物组合共扩增出 1 931 条清晰可辨的条带, 对照和芽变品种各有 979 条和 952 条;共有谱带 918

条,多态性条带 95 条,计算得遗传相似系数为 95.24%,多态性条带比例为 9.38%,差异片段大部分集中在200~900 bp,表明芽变与对照品种的遗传

背景虽然基本一致,但两者在 DNA 分子水平上差异显著,遗传物质发生了较大的变化。

表 2 47 对引物组合出现的 AFLP 扩增条带数及其多态性

Table 2 AFLP fragment number amplified by different primer combination

引物 Primer	项目 Item	材料 Materials		引物 Primer	项目 Item	材料 Materials		引物 Primer	项目 Item	材料 Materials		引物 Primer	项目 Item	材料 Materials	
		C	S			C	S			C	S			C	S
E1/M1	A	21	19	E2/M7	A	17	17	E4/M7	A	20	19	E7/M2	A	17	15
	B	2			B	1	1		B	1			B	2	
E1/M2	A	17	18	E3/M2	A	26	25	E4/M8	A	19	19	E7/M3	A	16	17
	B	1	2		B	1			B	1	1		B		1
E1/M3	A	24	23	E3/M3	A	18	19	E5/M1	A	27	28	E7/M4	A	22	23
	B	1			B	1	2		B		1		B		1
E1/M4	A	28	26	E3/M4	A	16	14	E5/M2	A	31	30	E7/M5	A	25	23
	B	2			B	3	1		B	1			B	2	
E1/M6	A	23	22	E3/M5	A	20	18	E5/M5	A	22	21	E7/M7	A	19	19
	B	1			B	2			B	2	1		B	1	1
E1/M7	A	20	21	E3/M6	A	15	15	E5/M6	A	29	30	E7/M8	A	23	22
	B		1		B	1	1		B		1		B	2	1
E1/M8	A	16	17	E3/M7	A	24	21	E5/M8	A	18	18	E8/M4	A	25	26
	B	1	2		B	5	2		B	1	1		B		1
E2/M1	A	16	15	E3/M8	A	18	17	E6/M1	A	15	13	E8/M5	A	17	18
	B	1			B	2	1		B	2			B	1	2
E2/M2	A	22	22	E4/M2	A	15	12	E6/M3	A	20	21	E8/M6	A	21	24
	B	1	1		B	3			B		1		B		3
E2/M3	A	21	19	E4/M3	A	13	13	E6/M4	A	25	24	E8/M7	A	28	26
	B	2			B	2	2		B	1			B	2	
E2/M4	A	25	24	E4/M4	A	14	14	E6/M5	A	29	26	E8/M8	A	24	23
	B	1			B	1	1		B	3			B	1	
E2/M6	A	20	18	E4/M5	A	15	14	E6/M8	A	23	24	累计 Total	A	979	952
	B	2			B	1			B		1		B	61	34

注:A. 扩增位点;B. 扩增多态性位点;C. 对照‘早酥梨’;S. 芽变品种‘六月酥’。
Note: A. Amplified sites; B. Polymorphic sites; C. Contrast cultivar ‘Zaosu’; S. Bud mutation cultivar ‘Liuyuesu’.

图 3 为部分引物组合扩增的多态性片段。结果显示,在所用 47 对引物组合进行的 AFLP 扩增中,每对引物在 2 个对照品种‘早酥梨’之间或 2 个芽变品种‘六月酥’之间扩增条带一致,无差异条带出现,这与它们两两为同一材料来源的实际相符;而同 1 对引物在对照品种和芽变品种之间的扩增存在差异,这说明,‘六月酥’与‘早酥梨’相比,其遗传物质已发生了变化,从而导致扩增多态性条带的出现。

由表 2 可以看出,47 对不同引物组合均能在‘早酥梨’和‘六月酥’间检测到 AFLP 扩增差异位点,但差异程度各有不同。引物组合 E3/M7 的扩增多态性位点最多,为 7 个,其他多数引物组合产生的扩增多态性位点为 2~4 个;E3 引物与 7 条 M 引物组合产生的多态性条带数最多,共产生 22 条差异条带,其他的 E 引物与 M 引物组合产生的多态性差异位点在 8~13 个,说明 DNA 水平变异在整个基因组上是随机的。如果以每一扩增片段代表基因组的 1 个

GACATTAGAATTGAAGAGCCGTACAAAATT
GCCGAAATCAAAATGAAGGAGAAACAAAAC
GTCCAAGAGACTAAAAAACGGGAGGAACTT
GAAGCTACGGCTGATCCTGTTGAAGCCATG
TTGTTTGACATGATTCCAAGTCTTGGTATG
AAAAAAGCTGAAACTACATATACGAGTACT
CGAGATGAGAAACCAGCACCGGATCCAATA
CCGAATGCAGGACCTTCAAAGAAAAAGAAA
GTTAGCTACAAGGATATTGCTAGTGAGCTG
CTAAAGGATTGGTAAATTGATTTCTGCGTT
AGGGTTGTCTCTTTTGTATGTAATGGATCC
GGAGTTACTCAGGACTCATC(470 bp);
E3/M7-344:

GACTGCGTACCAATTCACAGCTTGTCTC
TGAGCCATCGACTTTTCTTTACTATTCCCAA
GTTTTATTTTTGACAAAAAGCGCTTCTTCC
CTTAAGGGTTTTGATGTATCTGGGCACAAT
AATGCACATAATGAACAGTTCAATAGCTTC
AAAGAAATGTTTACAGCATTGTATTACAAG
GGAACTAACAGACTCTTCTGGAATCCCAGTC
CATCTAGCTGCTATCATGGTGAAGACATCAC
CATGGGGATTACTAAGGAGTTCAATGAGTG
CAGAGTCTTTAGAGAATGTGCCATCAGCCGC
AATTCTATCTGGGAATAATCTGCAGTTACTC
AGGACTCATC(344 bp)。

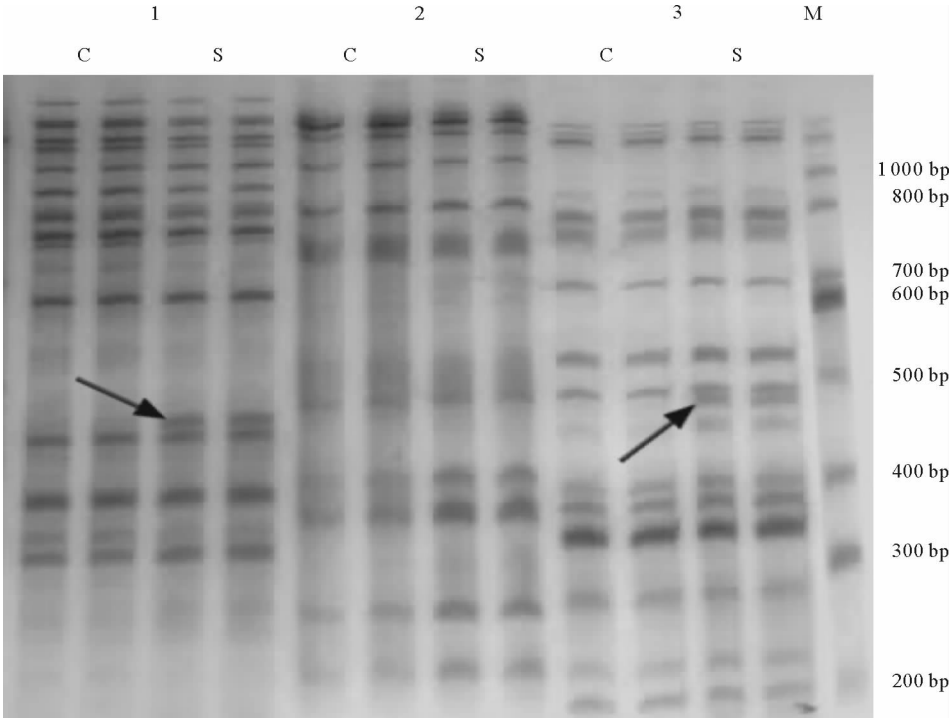


图 3 不同引物组合下芽变品种‘六月酥’和对照品种‘早酥梨’的 AFLP 电泳图谱
1. E1/M7;2. E7/M2;3. E7/M3;C. 对照‘早酥梨’;S. 芽变品种‘六月酥’;M. DNA Marker(1 000 bp Marker)
Fig. 3 DNA band patterns of mutant cultivar ‘Liuyesu’ and contrast cultivar ‘Zaosu’
amplified by different primer combinations
1. E1/M7;2. E7/M2;3. E7/M3;C. Contrast cultivar ‘Zaosu’;S. Bud mutation cultivar ‘Liuyesu’;
M. DNA Marker(1 000 bp Marker)

3 讨 论

3.1 ‘六月酥’梨 AFLP 反应体系的优化

试验在提取高质量 DNA 的基础上,通过对酶切连接反应体系、扩增反应体系和聚丙烯酰胺变性凝胶电泳体系各个组分浓度的优化,建立了梨 AFLP 反应体系的最优程序。同时,对聚丙烯酰胺

凝胶的反应条件和银染过程的一些步骤进行了改进。如用 6%聚丙烯酰胺变性凝胶进行电泳检测。凝胶的银染较重要,在银染过程中要注意:使用超纯水或双蒸水可获得较好的效果,如果水中有杂质,则低分子量条带可能无法显现;要使用较新的、高纯度的碳酸钠;染色后的洗涤时间不宜过长,因为洗涤时间太长,银颗粒会脱离,只能产生很少或不产生序列

信号,如果洗涤时间过长,则染色步骤应重新进行;显影液预冷 10~12 ℃可以减小背景杂色;使用新配的染色及显影溶液,临用前在显影溶液中加入甲醛;尽量不要重复使用任何溶液,如果重复使用硝酸银溶液,则需延长染色时间。将本试验优化的 AFLP 反应体系用于‘早酥梨’和‘六月酥’的差异分析,得到了背景颜色较淡、条带清晰的电泳图片,有利于条带的统计、回收及再扩增,为后续试验的进行奠定了基础。

3.2 AFLP 是鉴定果树芽变的有效手段

关于果树的芽变,普遍认为是由基因突变、染色体结构变异、染色体数目变异及细胞质突变等引起的细胞中遗传物质的改变^[18]。芽变选种已成为果树育种的一种重要途径,但因饰变因素的存在,需要对芽变进行鉴定。形态学观察,同工酶分析,染色体倍性、数量与结构变异检测,DNA 分子标记等方法,均可用于果树芽变鉴定。因为果树芽变的实质是遗传物质的变异,因此基于染色体和 DNA 分子水平的分子标记技术可以避免形态性状描述的缺陷,达到早期鉴定的目的。AFLP 技术更是结合了 RFLP 的稳定性和 RAPD 技术的简便高效性,同时又能克服 RFLP 带型少、信息量小以及 RAPD 技术不稳定的缺点,是一种多态性检出率非常高的分子标记技术,是检测一些果树营养系变异行之有效的手段。罗安才等^[19]用 AFLP 技术分析了奉节脐橙的低酸和晚熟芽变株系基因组 DNA 的遗传差异,发现与普通的奉节脐橙相比,低酸芽变株系基因组有 7 条差异带,晚熟芽变株系有 2 条差异带。徐月等^[9]对板栗短雄花序芽变及其母株进行了 AFLP 分析,结果表明 72 对引物组合共产生 5 129 条清晰谱带,多态性位点为 53 个,多态性比例为 2.05%,表明短雄花序芽变和母株之间的变异与遗传物质的改变相关。

近年来,已有一些关于 DNA 分子标记在梨种质遗传多样性^[20]、品种鉴定与分类^[21]、构建遗传连锁图谱以及目的基因标记^[22]等方面的研究报道。但有关应用 DNA 分子标记技术对梨极早熟性状的研究尚未见报道。本试验用 64 对 AFLP 引物组合对‘六月酥’及其芽变母株‘早酥梨’进行了鉴定与分析,其中 47 对引物组合在‘六月酥’与‘早酥梨’间扩增得到了差异条带。对差异片段进行克隆测序,并与拟南芥基因库中已知基因或片段进行比对,得到 2 条与拟南芥功能蛋白 DNA ligase IV 和 DNA-directed DNA polymerase family protein 相关的差异

条带:E2/M6-470 和 E3/M7-344。这些差异片段可能与控制梨极早熟性状的基因有关,或者与这些基因的表达调控有关。后续试验中将根据测序结果,设计 SCAR 特异引物,将得到的 AFLP 标记转化为稳定性好、重复性高的 SCAR 标记,来验证所得 AFLP 标记是否与梨极早熟基因连锁,为梨极早熟基因的精细定位、克隆及梨分子标记辅助选择体系的建立提供基础资料。

[参考文献]

[1] 田建保,孙俊杰,程恩明,等. 苹果新品种‘红锦富’[J]. 园艺学报,2007,34(5):1329.
Tian J B, Sun J J, Cheng E M, et al. A new apple variety ‘Hongjinfu’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(5): 1329. (in Chinese)

[2] 李培环,纪仁芬,董晓颖,等. 早熟蟠桃新品种‘双红蟠’[J]. 园艺学报,2008,35(1):149.
Li P H, Ji R F, Dong X Y, et al. A new early-ripening flat peach cultivar ‘Shuanghongpan’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(1):149. (in Chinese)

[3] 李俊才,隋洪涛,王家珍,等. 梨芽变新品种——尖把王梨的选育[J]. 果树学报,2006,23(6):912-913.
Li J C, Sui H T, Wang J Z, et al. Breeding report on Jianbawang, a bud mutation of Jianba pear cultivar [J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(6):912-913. (in Chinese)

[4] 伊凯,闫忠业,刘志,等. 苹果芽变选种鉴定及应用研究[J]. 果树学报,2006,23(5):745-749.
Yi K, Yan Z Y, Liu Z, et al. Review on identification and utilization of apple sport selection [J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(5):745-749. (in Chinese)

[5] Zabeau M, Vos P. European patent application publication number: EP,0534858 [P]. 1993-03-31.

[6] Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.

[7] Andrea M, Roberto P, Elena B, et al. Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces [J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116(5):657-669.

[8] 韩远记,董美芳,袁王俊,等. 部分桂花栽培品种的分析[J]. 园艺学报,2008,35(1):137-142.
Han Y J, Dong M F, Yuan W J, et al. Studies on the genetic diversity of some osmanthus fragrans cultivars based on AFLP markers [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(1):137-142. (in Chinese)

[9] 徐月,曹庆芹,冯永庆,等. 短雄花序板栗芽变的 AFLP 分析[J]. 园艺学报,2006,33(6):1321-1324.
Xu Y, Cao Q Q, Feng Y Q, et al. AFLP analysis on the short catkins mutation of chestnut [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(6):1321-1324. (in Chinese)

[10] 廖振坤,张秋明,刘卫国,等. 利用 AFLP 鉴定柑橘变异[J].

果树学报,2006,23(3):486-488.

Liao Z K,Zhang Q M,Liu W G,et al. Identification of citrus mutants by AFLP technique [J]. Journal of Fruit Science, 2006,23(3):486-488. (in Chinese)

[11] Xu D H,Wahyuni S,Sato Y,et al. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing [J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2006,53(5):883-889.

[12] Grimmer M K, Trybush S, Hanley S. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP,SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to beet necrotic yellow vein virus [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114: 1151-1160.

[13] 朱元娣,孙凌霞,李春雨,等. 利用 cDNA-AFLP 技术研究苹果柱型与非柱型 cDNA 的差异表达 [J]. 园艺学报,2007,34(2):283-288.

Zhu Y D,Sun L X,Li C Y,et al. Differential expression analysis of cDNA between columnar and non-columnar apples using cDNA-AFLP [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(2): 283-288. (in Chinese)

[14] 唐美玲,孔 瑾,许雪峰,等. 山葡萄性别相关 AFLP 标记筛选及 SCAR 标记转化 [J]. 园艺学报,2008,35(2):195-200.

Tang M L,Kong J,Xu X F,et al. Screening of the AFLP markers associated to the sex locus of vitis amurensis rupr and its conversion to SCAR marker [J]. Acta Horticulturae Sinica,2008,35(2):195-200. (in Chinese)

[15] 佟兆国,王富荣,章 镇,等. 一种从果树成熟叶片提取 DNA 的方法 [J]. 果树学报,2008,25(1):122-125.

Tong Z G,Wang F R,Zhang Z,et al. A method for DNA extraction from mature leaves of fruit trees [J]. Journal of Fruit Science,2008,25(1):122-125. (in Chinese)

[16] Sanguinetti C J,Dias N E,Simpson A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques,1994,17:915-919.

[17] Nei M,Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci,1979,76:5269-5273.

[18] 沈德续. 果树育种学 [M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2000: 55-64.

Shen D X. Fruit tree thremmatology [M]. 2nd ed. Beijing: Agriculture Press of China,2000:55-64. (in Chinese)

[19] 罗安才,李纯凡,黄仁湖,等. 奉节脐橙芽变株系的 AFLP 分析 [J]. 中国农学通报,2003,19(6):20-24.

Luo A C,Li C F,Huang R H,et al. Analysis of the mutants of Fengjie navel orange by AFLP [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2003,19(6):20-24. (in Chinese)

[20] Hironori K,Shiho A,Toshiya Y,et al. A wide range of genetic diversity in pear (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) genetic resources from Iwate,Japan revealed by SSR and chloroplast DNA markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007,54(7):1573-1585.

[21] 王 斐,林盛华,方成泉,等. 梨新品种及其亲本 AFLP 分析 [J]. 园艺学报,2007,34(4):847-852.

Wang F,Lin S H,Fang C Q,et al. AFLP analysis of new pear cultivars and their parents [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007,34(4):847-852. (in Chinese)

[22] 孙文英,张玉星,乐文全,等. 梨分子遗传图谱构建及生长性状的 QTL 分析 [J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):182-189.

Sun W Y,Zhang Y X,Le W Q,et al. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis for some leaf traits in pear (*Pyrus* L.) [J]. Journal of Plant Genetic Resources,2009,10(2):182-189. (in Chinese)

(上接第 138 页)

[12] 郑国琦,罗 杰,许 兴,等. 宁夏枸杞果实和叶片糖积累及其枸杞多糖单糖组成研究 [J]. 农业科学研究,2008,29(3):1-4.

Zheng G Q,Luo J,Xu X,et al. Research on the sugar accumulation and monosaccharide composition of polysaccharide of *Lycium barbarum*'s fruits and leaves in Ningxia [J]. Journal of Agricultural Sciences,2008,29(3):1-4. (in Chinese)

[13] Paterson A H,Lander E S,Hewitt D J,et al. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms [J]. Nature,1998,335:721-726.

[14] 李文表,周先叶,李 勇,等. 棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化 [J]. 广西植物,2006,26(2):204-208.

Li W B,Zhou X Y,Li Y,et al. Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei* [J]. Guihaia, 2006, 26(2):204-208. (in Chinese)

[15] 高 丽,杨 波. 春兰 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 华中农业大学学报,2006,25(3):305-309.

Gao L,Yang B. Establishment of ISSR-PCR reaction system in *Cymbidium goeringii* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2006,25(3):305-309. (in Chinese)