

学术著作



金花梨变异单系生物学特性调查比较及 RAPD多态性分析

刘遵春 包东娥 廖明安 著

 中国农业出版社

金花梨变异单系生物学特性调查比较及 RAPD 多态性分析

刘遵春 包东娥 廖明安 著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

金花梨变异单系生物学特性调查比较及 RAPD 多态性分析 / 刘遵春, 包东娥, 廖明安著. —北京: 中国农业出版社, 2017. 8

ISBN 978-7-109-23160-3

I. ①金… II. ①刘… ②包… ③廖… III. ①梨—生物学性状—研究 IV. ①S661.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 169964 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 王玉英

北京印刷一厂印刷 新华书店北京发行所发行
2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 3.25

字数: 140 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

金花梨 (*Pyrus Brestchneideri* Nak cv Jinhua) 是四川省的科技工作者在金川县从金川雪梨的实生变异中选出的优良品种, 目前已在全国推广栽培, 是四川梨的主栽品种, 其栽培面积和产量占四川栽培梨的 30% 左右。但在较长时期大面积金花梨的栽培过程中, 发现金花梨具有果实大小不均, 特别是果实偏大、质地稍粗、品质差异较大等缺点。因此, 对金花梨的芽变单系进行优中选优, 筛选比金花梨更为优秀的品系或品种, 将对梨的科学研究与生产实践都具有十分重要的理论和实践意义。本书通过对金花梨及其各变异单系的物候期、生长结果习性、果实经济性状等进行观测, 从形态学方面予以鉴定筛选。同时探讨了梨基因组 DNA 的提取方法, 并对金花梨及其 18 个变异单系进行 RAPD 的分子生物学鉴定, 以期筛选出综合性状优良的变异单系, 为进一步提纯选优和资源利用奠定基础。本书可供广大科研学者参考。

前 言

金花梨原产于四川省金川县，是从金川雪梨中选出的自然实生后代，因丰产质优而超冠全县，被誉为“金川之花”，故名金花梨。金花梨以其果大、质优、外观美等优点，在国内外市场备受青睐。金花梨树势强健，丰产，果心小，肉雪白，质细脆，汁多，微香，品质好，耐贮运，适应性广。金花梨已经成为许多地区生产上大量栽培的良种，促进了我国梨果产业的发展。该品种是目前四川省的主栽品种，占梨栽培总面积的30%左右，大量栽培于金川、汉源、雅安、西昌、成都、龙泉、仁寿等地，不少地区还建起了万亩以上规模的金花梨基地。同时该品种已逐步推广到全国多个省（自治区、直辖市）栽培，均表现出良好的适应性和丰产性。但是，在金花梨的生产发展过程中，低产低效较为普遍。主要原因是：肥水不足，管理粗放，果品档次低，病虫害发生严重。我国梨栽培总面积和总产量虽然已跃居世界第一，但单产、质量、国际市场占有率和经济效益还远不及发达国家，核心问题是品质欠佳。金花梨品质优于鸭梨，前景广阔。我国已加入WTO，与国际接轨已是必由之路，重视新品种（品系）的选育已成为梨产业发展的关键问题。金花梨在长期的栽培过程中，逐渐表现产量不稳定，果实大小不均匀，整齐度不一致，有的个果过大，品质差异大，特别是质地偏

粗、抗逆性降低、病虫害普遍等，严重影响了经济效益。急需对其提纯选优、优中选优，以满足生产和消费需要。四川农业大学的研究者早在 20 世纪 60 年代推广金花梨过程中就发现金花梨易发生变异，并着手对其优良变异进行调查、收集和繁殖。到 1974 年已先后收集了 18 个优良变异单系，分别记为金花梨变异单系 1 号（简称 J1）、金花梨变异单系 2 号（简称 J2）……金花梨变异单系 18 号（简称 J18），定植在四川农业大学梨品种园内。经观察研究，各单系在植物学性状（如果实形状）、开花结果习性（如果实成熟期）、果实品质等方面均存在一定差异。

由于金花梨为全国性优良品种，其推广栽培面积较大，若能从中选出更优良的品种或品系，将产生较大的经济效益和社会效益。本书通过对金花梨及其各变异单系的物候期、生长结果习性、果实经济性状等进行观测，从形态学方面予以鉴定筛选。同时探讨了梨基因组 DNA 的提取方法，并对金花梨及其 18 个变异单系进行 RAPD 的分子生物学鉴定，以期筛选出综合性状优良的变异单系，为进一步提纯选优和资源利用提供依据，为系列新品种的筛选奠定基础。

本书在出版过程中，对关心和支持本书出版的同行专家、同事和朋友表示衷心的感谢！对于资助本书出版的研究课题在此也表示深深的感谢！另外，由于作者的知识水平有限，难免存在错误和纰漏之处，敬请广大读者和同行专家批评指正。

刘遵春

2016 年 11 月

目 录

前言

一、研究背景	1
(一) 梨的生产概况	1
(二) 梨品种选育概况	4
(三) 梨的芽变与选种	6
1. 梨芽变的特点	6
2. 梨芽变的变异性状	7
3. 梨芽变的发生与机理	9
4. 梨的芽变选种	9
(四) 果树变异的鉴定	10
1. 形态学鉴定	10
2. 细胞学鉴定	12
3. 生理生化鉴定	12
4. DNA 分子标记鉴定	15
(五) 研究的目的和意义	33
二、材料与方法	35
(一) 试验材料	35
(二) 试验方法	35

1. 田间中梨生物学特性调查	36
2. 金花梨及其变异单系叶片叶绿素和 光合效能的测定	36
3. 金花梨及其变异单系的果实品质分析	36
4. 金花梨及其变异单系抗病性研究	37
5. 金花梨变异单系基因组 DNA 的快速 提取方法研究	38
6. 金花梨及其变异单系的 RAPD 分析	39
7. 层次分析法在金花梨果实品质评价上的应用	41

三、结果与分析 42

(一) 金花梨及其变异单系生物学特性调查比较 42

1. 金花梨变异单系树体基本性状调查比较	42
2. 金花梨变异单系物候期调查比较	43
3. 金花梨变异单系坐果调查比较	44
4. 金花梨变异单系落果情况调查	45
5. 金花梨变异单系单株产量调查	47

(二) 金花梨及其变异单系叶片基本情况和 光合效能调查比较 48

(三) 金花梨及其变异单系果实品质分析比较 50

1. 金花梨变异单系果实外观品质调查	50
2. 金花梨变异单系果实总糖含量分析	52
3. 金花梨变异单系果实总酸含量和糖酸比	53
4. 金花梨变异单系果实 TSS 和维生素 C 含量分析	55

(四) 金花梨及其变异单系叶片抗病性调查比较 56

1. 金花梨变异单系叶片抗黑星病情况调查	56
2. 金花梨变异单系叶片抗黑星病不同时期调查	57

3. 金花梨变异单系叶片抗梨锈病情况调查	58
4. 金花梨变异单系叶片抗梨锈病不同时期调查	59
(五) 金花梨基因组 DNA 提取方法研究	60
1. 不同维生素 C 添加量对提取基因组 DNA 产率和 质量的影响	60
2. 不同组织器官对提取基因组 DNA 的产率和 质量的影响	61
3. 基因组总 DNA 的提取和质量评估	62
(六) 金花梨及其变异单系的 RAPD 分析	64
1. PCR 扩增	64
2. 聚类结果	65
(七) 层次分析法在金花梨果实品质评价上的应用	67
1. 建立综合评价模型结构	68
2. 构造判断矩阵及一致性检验	68
3. 实验结果	70
4. 各指标无量纲化及综合评分	71
5. 综合排序	72
四、讨论	80
(一) 生物学特性	80
(二) 果实品质	81
(三) DNA 的提取方法	82
(四) RAPD 的稳定性	85
五、小结	87
参考文献	89

一、研究背景

(一) 梨的生产概况

梨属于被子植物门 (Angiospermae)、双子叶植物纲 (Dicotyledones)、蔷薇目 (Rosales)、蔷薇科 (Rosaceae)、梨亚科 (Pomoideae)、梨属 (Pyrus) 植物。全世界的梨属植物有 30 多个种, 均原产于欧洲和亚洲。从栽培的角度可将世界梨属植物划分为两大栽培类群 (蒲富慎等, 1963): 一是原产于欧洲的梨称为西洋梨, 又称欧洲梨或西方梨。西洋梨主要栽培在欧洲的意大利、德国、前苏联、西班牙、法国、北美洲的美国、南美洲的阿根廷, 以及非洲的南非等国 (Benjamin J. E. Teskey, 1985; TomvanderZwet, 1982)。二是原产于亚洲的梨称为东方梨, 又称亚洲梨 (Asian Pear)。东方梨包括了白梨、砂梨、秋子梨、新疆梨和川梨等栽培种, 主要栽培在亚洲的中国、日本、韩国和土耳其等国 (俞德浚, 1981; 沈德绪, 2000)。梨能在世界上得以广泛栽培, 是因梨具有以下特点 (韩振海, 1995; 等):

①梨树产量高、寿命长、适应性强。如能耐盐碱、耐湿热等。

②营养价值高。梨果实含糖 8%~20%, 每 100g 可食部

分含蛋白质 0.19g、脂肪 0.19g、碳水化合物 9.0g、钙 5.0mg、磷 6.0mg、铁 0.2mg、胡萝卜素 0.01mg、硫胺素 0.02mg、核黄素 0.01mg、尼克酸 0.1mg、维生素 C 4.0mg。

③医疗保健作用大。梨果具有止咳化痰，润肺去火，促进消化，解酒祛疮等多种功能。

④梨成熟期较长，耐贮运，可周年供应。梨从 7 月至 11 月可陆续成熟，且大多数梨果实成熟期正值盛夏季节，汁多味甜、风味优美，是鲜食佳品。

⑤梨能制成许多加工品。如加工制成梨膏、梨干、梨汁、梨脯、梨酱、梨酒和罐头等。

⑥梨木是很好的工业原料。梨木质地坚硬，纹理细密，可用于制作家具、象棋和纺织业的原料等。因而梨在世界各地广泛栽培，现已成为世界五大主要水果之一。

全世界现有 76 个国家生产梨，2000 年世界梨产量达到 1 623.9 万 t。欧美国家主要栽培西洋梨，日本、韩国则以生产砂梨为主（李秀根，2001）。在梨的生产中，世界各地均向早果、优质、丰产、矮化密植、良种化、机械化、集约化方向发展，并强调生产专业化、经营产业化、管理优质化、服务社会化、设施现代化，充分利用种质资源，发挥品种优势，形成优质、高产、低成本的梨产业经营模式。在科研上各国都很重视优良品种的选育，特别是日本培育和选择了不少优良品种，如三水梨等。在选好品种的同时，注重优质高产的配套技术研究，大力探讨早、高、稳、优、低的栽培技术与方法。另外，梨的矮化密植栽培发展也很快，法国、德国已全部实现矮化栽培，美国、意大利、英国、波兰、丹麦、俄罗斯等国也正在逐步实现矮化栽培。近年来，世界已

兴起梨的无病毒、无公害化栽培，并推行绿色和有机食品的梨果品生产。

我国是世界梨的主要原产地和栽培地之一，栽培历史已达 3 000 多年（张志鹏，1991；彭镜波等，1989；沈德绪，2000 等）。在我国果树生产中，梨居全国果品产量的第 3 位和世界梨产量的首位，其栽培面积和产量已连续 10 年居世界第一。2001 年我国梨栽培面积达 101.5 万 hm^2 ，总产量 841.2 万 t，占世界梨产量的 48.3%。分别占全国水果总面积的 10.7% 和水果总产量的 12.6%，单产 468.2 kg/亩^①，人均占有量 5.5 kg，超过了世界人均占有量。梨树的发展对于增加我国国民经济收入和发展大农业起着重要作用（窦连登，1999；李秀根，1999 等）。但从单产、质量和经济效益来看，较之世界果业发达国家如美国、日本、意大利、阿根廷的差距甚远，这与世界梨果大国的称号极不相称，为了满足消费者的需要，为了适应市场特别是加入 WTO 后的激烈竞争，不断培育和早期鉴定出适应国际、国内市场需求的梨新品种（品系）已成为迫切需要。在增加产量的同时，提高果实品质 and 经济效益，增强市场竞争力，已成为目前国内梨生产发展的主要趋势。

梨也是四川的主栽果树，其产量位居全国梨产量第 8 位和四川水果产量的第 2 位，在四川果树生产中占有十分重要的地位。2001 年四川梨树种植面积 5.2 万 hm^2 ，产量 39.5 万 t，占水果总产量 14.1%。但是，四川梨生产能力还很落后，一直存在单产低（平均 335 kg/亩，同期日本达到

^① 亩为非法定计量单位，1 hm^2 = 15 亩。

1 732kg/亩)、品种杂乱、良种占有率低($<30\%$)、果实商品性差(优质果率 $<10\%$)、经济效益低等问题,严重影响和制约了四川梨的发展。因此,如何进行品种改良,达到优质高产已成为四川梨生产中函待解决的问题。

目前,世界果树生产正处于一个品种更新换代和矮密早丰优集约化栽培的新阶段,在果树生产发展中,品种占有至关重要的地位。产量的高低、品质的优劣在很大程度上取决于品种本身。虽然我国梨品种资源极为丰富,梨树优良品种多,而许多主要推广品种又各具特色和优点,但每一品种在综合性状上尚存在一些问题,古老的地方品种也由于长期栽培成为一个复杂的品种群体并发生许多分离,使其产量降低、品质变差、抗性减弱。为了迅速发展梨果生产,满足多方面的需要,实现品种良种化,必须开展梨的品种选育工作。多年来,育种工作者对梨进行了大量的理论研究、技术探讨和实践摸索,选育出了不少优良品种或品系(彭镜波, 1989; 张志鹏, 1991),但真正能跻身于国际市场且具有竞争力的优良品种却很少,其根源在于对选育种开展的前期基础工作,如对种质资源的研究(沈德绪, 1992),优良品种(品系)的发掘、筛选和早期鉴定等研究工作还很薄弱。

(二) 梨品种选育概况

我国梨品种选育历史悠久,早在公元前就已培育出了不少珍贵品种,经过选育形成了达千个以上的地方良种,其中一些品种驰名中外。我国在梨品种选育上做了大量研究工作(张志鹏, 1991; 沈德绪, 1992),现将这些研究工作的主要

方面归纳如下。

(1) 在各重点梨区陆续开展了大规模的资源调查,在此基础上陆续编写了《梨树志》、《梨品种图谱》和《目录》等,为进一步研究利用提供了依据,并开展了大量的引种工作,极大地丰富和改进了一地区的品种,加速了品种良种化的进程,有计划地分区建立了梨原始材料圃,保存品种 1 000 余个。

(2) 在资源研究方面,早期着重从宏观上研究梨形态特征和生物学特性,20 世纪 70 年代后,开展了梨细胞学和同工酶研究。如细胞学鉴定发现梨中存在 3 倍体种,鸭梨有 2—4 型嵌合体芽变;同工酶研究证明,梨属植物具有共同的酶谱特征,种间、品种(品系)间存在着一定的差异,杂种的谱带表现分离,说明酶带与性状有一定关系。

(3) 在品种选育方面取得了显著成绩。首先表现在已选育出许多新的优良品种,如金水 1 号、黄花、早酥、翠伏、金花、鸭梨、砀山酥梨等。还结合梨的选育种进行性状遗传规律的研究,为杂交育种提供预见性依据。其次,形成了各具特色的选育种方法,如实生选种、自然突变选种、杂交育种、诱变育种、组织培养、基因工程育种等。自然突变选种是果树选育种常用的方法之一。梨和其他果树一样,普遍存在自然突变,近 30 年来已筛选出一些比较优良的突变品种,如河北石家庄果树研究所在鸭梨中选出了 3 个有一定价值的变异品种,即自花结实力强的金坠梨、大果型的大鸭梨和垂枝鸭梨;新疆沙溢东园艺场从香梨中选出了大果型的沙 01 香梨;还选出了果实的红色变异,如强梨的芽变—皇家红强,巴梨的芽变—深红巴梨。近年来,也发现了梨的不少突

变,如巴梨芽变—鲁梨 1 号(尹永胜,1999),南果梨芽变—红南果梨(焦言英,1999)。一些古老的地方品种、优良品种常发生变异、分离。因此,通过调查和研究选育出一批产量高、品质优的新品种(品系),尽快实现梨树品种的良种化,这是梨科学研究的重要任务。

(三) 梨的芽变与选种

芽变(sport)是体细胞突变的一种独特形式,突变发生在芽分生组织细胞内,包括突变芽发育而成的枝条与繁殖而成的单株变异。梨是容易产生芽变的树种,而且容易被发现。因此,对梨的芽变进行探讨,开展芽变选种,筛选新的品系或品种具有十分重要的意义。

1. 梨芽变的特点

梨的芽变表现形式多样复杂,其主要特征表现具有多样性、重演性、稳定性、局限性和多效性等(许方,1992)。

(1) 芽变的多样性(diversity)

梨的芽变表现在多种方面,有形态特征的变异,如株型、果型的突变。也有生物学特性的变异。生物学特性变异包括生长结实习性、物候期、果实品质、抗性 & 育性等方面的变异。

(2) 芽变的重演性(reappearance)

同一品种相同类型的芽变,可在不同地点、不同时期、不同单株上重复发生,其实质是基因突变的重演性。因而不能将所发现的芽变均当成新的芽变,应经分析比较和鉴定之

后，方可确定是否为新的芽变类型。

(3) 芽变的稳定性 (stability)

有些芽变极为稳定，性状一经改变，便可长期保存在它的使用寿命中，无论采取何种繁殖方法，都能把变异性状遗传下来。而有的芽变只能在无性繁殖中保持稳定，当进行有性繁殖时，性状发生分离，或全部后代都恢复成为原有性状，即回归突变，如梨果皮的锈褐色即属此种变异性状。

(4) 芽变的局限性 (limitation) 与多效性 (multiefficiency)

芽变未经遗传物质的重组，只是原类型遗传物质的突变，包括基因突变与染色体变异，这些突变所能引起的通常是少数性状的变异，这些变异性状必然是有局限性的。但有些芽变也会表现出多效性，如红色芽变，主要是果皮变红，叶片、枝梢也带红色，这种相关变异就是生理上的一因多效。

2. 梨芽变的变异性状

梨芽变的变异性状多种多样，有植株形态特征的变异，有果实色泽、风味品质的变异，有生长结实习性和物候期的变异，也有适应性和抗逆性的变异。主要表现在以下几个方面。

(1) 形态突变

形态 (shape) 突变主要包括株型突变和果型突变。株型突变是指整个植株的许多器官及生长习性都发生一系列的相关变异，如河北石家庄的垂枝鸭梨，树冠矮小，枝条自然下垂。果型突变是指果实的大小或性状等发生了变异。梨出

现了不少大果型芽变,如石家庄鸭梨的“芽变大鸭梨”,从库尔勒香梨选出的“新疆砂—01号香梨”、晋县大鸭梨,从延边苹果梨选出的大苹果梨,从日本长十郎选出的“新长十郎”,还有砀山酥梨的大果芽变,土佐锦的大果芽变,西洋梨中有巴梨、恩久梨、丰产梨和四季梨的芽变等。

(2) 色泽突变

果皮色泽(color)的变异是最常见的变异,尤以红色最为普遍。如从巴梨中选出的红巴梨、深红巴梨、绛红巴梨,从茄梨中选出的红星梨,从恩久梨中选出的红恩久,从哈蒂中选出的皇家红哈蒂等均属此类。

(3) 风味突变

风味(flavor)突变表现多种多样,有的变甜,有的变酸,有的酸味甜味都增加;有些风味或变浓或变淡或淡而无味。如山东从博山酥梨中选出的一个优良单株,不仅果实外形美观,而且甜味极浓,含可溶性固形物 14.2%,而对照仅为 11.6%。四川从金川雪梨无性系中选出的短把鸡腿梨,味浓甜,可溶性固形物高达 13.5%~14.0%;另一品系的鸡腿梨,果品纯甜。

(4) 成熟期突变

目前选出的多为早熟类型,如西北农学院从莱阳梨选出的早往梨,提早 20 天成熟。从砀山酥梨中选出了早熟大果类型。四川金川县从金川雪梨选出的白瓜梨,早熟 10~15 天;四川金川县从崇化大梨中筛选出的安宁棉花梨,成熟期提前 15 天左右。日本从 20 世纪选出的早生 20 世纪,早熟 10~14 天;从长十郎中选出的早生长十郎,从幸藏梨筛选出的早生幸藏,成熟期均提前。