

中国石榴居群遗传结构的 ISSR 分析

赵丽华

(西昌学院 农业科学学院, 四川 西昌 615013)

摘要:为了更有效地保护、利用石榴种质资源,采用 PopGen32 软件,利用 ISSR 标记对中国 7 个石榴主产区 46 个石榴品种进行了研究分析。结果表明:7 个石榴种群遗传多样性依次为:山东种群>陕西种群>云南种群>河南种群>安徽种群>四川种群>新疆种群;7 个种群间的基因分化系数(G_{st})为 0.1911,表明分布在种群间的遗传变异占总遗传变异的 19.11%,种群内遗传变异占 81.89%,种群间表现出低水平的遗传分化;群间基因流的估测值(N_m)为 2.1169,种群间的遗传相似性(I)变化范围为 0.9218~0.9759,表明种群间存在较强的基因流,遗传相似性很高,石榴品种间的遗传多样性能够得以维持。

关键词:石榴;ISSR;遗传多样性;基因流

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)10-0103-05

石榴(*Punica granatum* L.)为石榴科石榴属落叶灌木或小乔木植物。石榴原产伊朗、阿富汗等中亚一带,传入中国至今已有 2 000 余 a 的栽培历史,经长期天然杂交和基因突变,以及采用实生、分株、嫁接等多种繁殖方法,产生了复杂多样的品种和类型,据不完全统计,我国现有石榴品种资源约 200 多个^[1],形成陕西、山东、河南、安徽、云南、四川、新疆七大重要的产区。由于石榴是小杂果,国内外对石榴种质资源的研究起步较晚,为了更有效地保护石榴资源及选育新品种提供遗传信息,该研究旨在利用 ISSR 标记技术,对中国七大石榴居群进行遗传结构分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 46 个石榴品种(表 1)于 2009 年 4 月采自云南蒙自县石榴研究所石榴品种资源圃、四川会理县农业局石榴品种资源圃及新疆、河南等地的零星采集,置于一 80℃冰箱保存。参照赵丽华等^[2]的改良 CTAB 法提取石榴叶片基因组 DNA。

1.2 PCR 扩增

参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套引

物序列合成 100 条 ISSR 引物^[3],筛选出 DNA 条带清晰、多态性较高的引物,用 Mastercycler Gradient PCR 仪(Eppendorf)筛选出各条引物的最适退火温度(表 2),对 46 个石榴品种基因组 DNA 进行 PCR 扩增。优化 25 μ L 的 PCR 反应体系为: Mg^{2+} 1.75 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 1 U、模板 DNA 40 ng、引物 0.6 mmol/L 及 1 \times PCR buffer。扩增程序为^[4-5]:94℃预变性 4 min;94℃变性 45 s,退火 1 min,72℃延伸 2 min,40 个循环;72℃再延伸 10 min,hold 10℃。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶(含 100 μ L/L Goldview 核酸染料)分离扩增产物,电压为 2 V/cm,电泳 2 h,用紫外 FR-200A 全自动紫外与可见分析装置观察并拍照记录。

1.3 数据统计分析

电泳图谱采用 Cross Checker-2.91 版软件对各引物 2 次扩增后稳定条带进行统计,每 1 条带为 1 个分子标记,根据各 DNA 片段的迁移率及其有无进行统计,对清晰的带(包括强带和清晰可辨的弱带),在相同迁移位置上有带记录为 1,无带记录为 0,亮度相差 2 倍的记录为不同的条带,统计各条引物的多态性位点,建立由“0、1”组成的二元数据矩阵数据库。采用 PopGen32 软件计算基因分化系数(G_{st})、基因流(N_m)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样(H)、Shannon 信息指数(I)、多态位点百分率(P)、Nei's 遗传距离(D_g)、Nei's 遗传相似系数(S_g)。

作者简介:赵丽华(1972-),女,博士,副教授,现主要从事园艺植物分子生物学及遗传育种的教学与科研工作。

基金项目:四川省教育厅科研基金资助项目(08zc014);西昌学院科研资助项目(YJSA0615)。

收稿日期:2011-03-25

表 1

供试石榴品种的编号、名称、来源及特性

Table 1

Code, name, source and characteristics of pomegranate cultivars

编号 Code	名称 Name	产地 Origin place	花色 Flower color	花型 Flower form	编号 Code	名称 Name	产地 Origin place	花色 Flower color	花型 Flower form
D1	冰糖石榴 Bingtangshiliu	山东	红色	单瓣	Y8	莹皮	云南	红色	单瓣
D2	峰红一号 Yihongyihao	山东	红色	单瓣	Y9	黄花石榴	云南	黄色	单瓣
D3	峰红 88-1 Yiliu 88-1	山东	红色	单瓣	N1	河阴铜皮	河南	红色	单瓣
D4	麻皮糙 Mapicao	山东	红色	单瓣	N2	天红蜜	河南	红色	单瓣
D6	缩叶大青皮 Suoyidaqingpi	山东	红色	单瓣	N3	天红蜜	河南	红色	单瓣
D6	鲁石榴 Lushiliu	山东	红色	单瓣	N4	牡丹红花	河南	红色	重瓣
D7	粉红牡丹 Fenhongmudan	山东	粉红	重瓣	N5	牡丹黄花	河南	黄色	重瓣
D8	泰山红 Taishan hong	山东	红色	单瓣	N6	牡丹白花	河南	红色	重瓣
D9	大青皮甜 Daqingpitian	山东	红色	单瓣	N7	牡丹花石榴	河南	红色	重瓣
X1	百日雪 Bairixue	陕西	白色	重瓣	N8	酸红皮石榴	河南	红色	单瓣
X2	墨石榴 Moshiliu	陕西	红色	单瓣	N9	月月红	河南	红色	单瓣
X3	醉美人 Zuimeiren	陕西	红色	台阁	H1	大笨籽	安徽	红色	单瓣
X4	墨籽石榴 Mozishiliu	陕西	红色	单瓣	H2	火葫芦	安徽	红色	单瓣
X5	净皮甜 Jingpitian	陕西	红色	单瓣	H3	水粉皮	安徽	红色	单瓣
X6	天红甜 Tianhongtian	陕西	红色	单瓣	H4	玛瑙籽	安徽	红色	单瓣
X7	御石榴 Yushiliu	陕西	红色	单瓣	H5	玉石籽	安徽	红色	单瓣
Y1	白花石榴 Baihuashiliu	云南	白色	单瓣	H6	红巨蜜	安徽	红色	单瓣
Y2	红皮白籽 Hongpibaizi	云南	红色	单瓣	J1	酸石榴	新疆	红色	单瓣
Y3	青皮白籽 Qingpibaizi	云南	红色	单瓣	J2	甜石榴	新疆	红色	单瓣
Y4	绿皮酸 Lvpi suan	云南	红色	单瓣	J3	红皮石榴	新疆	红色	单瓣
Y5	火炮 Huopao	云南	红色	单瓣	C1	水晶石榴	四川	红色	单瓣
Y6	糯米石榴 Nuoshiliu	云南	红色	单瓣	C2	青皮软籽	四川	红色	单瓣
Y7	花红皮 Huahongpi	云南	红色	单瓣	C3	会理红皮	四川	红色	单瓣
						Huilihongpi	四川	红色	单瓣

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增结果

多态性高的 6 条 ISSR 引物对 46 个石榴品种进行 PCR 扩增,共扩出 120 条 DNA 条带,平均每条引物扩增出 20 条 DNA 条带,其中 109 条显示多态性,平均每条引物扩增出 18.2 条多态性条带,多态性条带比率(P)为 90.83%(表 2),通过与 DL 2 000 比较分析,石榴 ISSR 扩增片段大小约在 200~2 800 bp 之间。6 条 ISSR 引物扩增的 DNA 条带数在 11~24 条之间,多态性百分率在 85.71%~100%之间(表 2);其中引物 UBC 846 扩增出的 DNA 谱带数最少,为 11 条,但多态性条带比率最高,达 100%,引物 UBC 868(图 1)和 UBC900 扩增出的 DNA 条带数最多,为 24 条,多态性比率分别为 87.50%和 95.83%,结果显示,采用不同的 ISSR 引物对石榴进行 PCR 扩增,扩增出的谱带数差异较大,但多态性谱带的比例差异不大(表 2)。

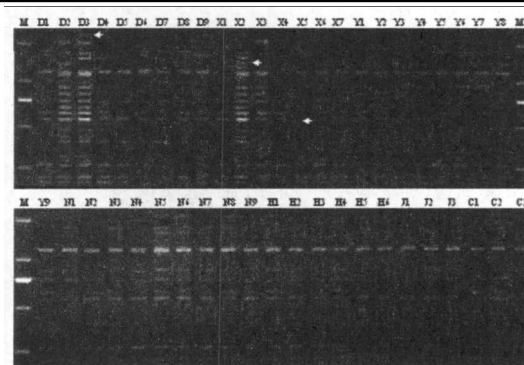


图 1 引物 UBC868 对 46 个石榴品种 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 The ISSR-PCR amplification electrophoresis of 46 cultivars pomegranate by primer UBC 868.

注:品种编号同表 1;M DL 2000;CK 对照;箭头表示品种独特或缺失 DNA 条带。

Note: Cultivars code refer to the samples listed in Table 1; M DL2000 marker; CK control; arrows is cultivars unique or absence amplification bands.

表 2

ISSR 引物序列、退火温度和扩增结果

Table 2

Sequence ,annealing temperaturesand amplification results of ISSR primers

引物 Primer	序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperature/℃	谱带数 Number of bands	多态性带数 Number of polymorphic bands	多态位点 百分率 The percentage of polymorphic/%	特异谱带数 Number of specific bands		片段大小 Fragment size/bp
						独特 Unique	缺失 Absence	
UBC 826	(AC) ₈ C	58.0	18	16	88.89	2	2	200~2 300
UBC 846	(AC) ₈ RT	52.3	11	11	100.00	1	0	600~2 200
UBC 857	(AC) ₈ YG	57.3	21	18	85.71	1	0	260~2 500
UBC 868	(GAA) ₅	49.3	24	21	87.50	2	1	200~2 300
UBC 899	CATGGTGT TGGTCATT GTTCCA	56.5	22	20	90.9	3	0	200~2 500
UBC 900	ACTTCCCC AGAGGTTA ACACA	58.0	24	23	95.83	2	1	230~2 800
总计 Total			120	109	—	11	4	—
平均			20	18.2	90.83	1.83	0.67	—

注: R 为 A 或 G, Y 为 C 或 T。
Note: R is A or G, Y is C or T.

2.2 种群遗传多样性

利用 6 条 ISSR 引物对 7 石榴种群 46 个品种 DNA 进行了扩增,在 7 个种群水平上多态性条带比率(P)分布范围为 23.33%~62.50%(表 3),其中山东种群多态性条带比率最大,为 62.50%,其对应的有效等位基因(Ne)、Nei's 氏多样性指数(H)与 Shannon 多样性指数(I)也为最大值,分别为:1.3004±0.3415、0.1843±

0.1823、0.2860±0.2608,表明该种群遗传多样性最为丰富;其次为陕西,多态性条带比率为 59.17%;依次为云南、河南、安徽、四川、新疆,多态性条带比率依次为:53.33%、53.33%、51.67%、26.67%、23.33%,有效等位基因(Ne)、Nei's 氏多样性指数(H)与 Shannon 多样性指数(I)各群体中的变化趋势一致。

表 3

种群间遗传多样性

Table 3

Genetic diversity among populations

种群 Populations	Ap	P/%	Na/s	Ne/s	H/s	I/s
物种水平 Species level	109	90.83	1.908 3 (0.289 8)	1.294 5 (0.309 4)	0.189 7 (0.161 8)	0.309 1 (0.219 8)
山东 Shandong	75	62.50	1.625 0 (0.486 2)	1.300 4 (0.341 5)	0.184 3 (0.182 3)	0.286 0 (0.260 8)
陕西 Shanxi	71	59.17	1.591 7 (0.493 6)	1.275 8 (0.336 7)	0.169 7 (0.180 0)	0.265 0 (0.258 1)
云南 Yunnan	64	53.33	1.533 3 (0.501 0)	1.224 3 (0.300 3)	0.142 9 (0.168 1)	0.226 7 (0.246 5)
河南 Henan	64	53.33	1.533 3 (0.501 0)	1.239 6 (0.315 8)	0.149 6 (0.175 2)	0.234 4 (0.254 9)
安徽 Anhui	62	51.67	1.516 7 (0.501 8)	1.235 9 (0.310 8)	0.148 6 (0.172 3)	0.233 3 (0.252 6)
新疆 Xinjiang	28	23.33	1.233 3 (0.424 7)	1.165 5 (0.327 0)	0.093 5 (0.176 1)	0.136 8 (0.253 8)
四川 Sichuan	32	26.67	1.266 7 (0.444 1)	1.153 5 (0.283 5)	0.094 0 (0.162 6)	0.142 4 (0.242 0)

注: Ap:多态性带数;P:多态性位点百分率;Na:等位基因数;Ne:有效等位基因数;H: Nei's 遗传多样性;I:Shannon 信息指数;括号内数值为标准差。

Note: Ap: Number of polymorphic bands; P: Percentage of polymorphic loci; Na: Observed number of alleles; Ne: Effective number of alleles; H: Nei's gene diversity; I: Shannon's information index; The value in the bracket is standard deviation.

2.3 种群遗传距离及遗传分化

用 PopGen32 对各种群间的亲缘关系做进一步分析,得各种群间的 Nei's 氏遗传相似系数(Sg)和遗传距离(Dg)(表 4),由表 4 可知,各种群间的遗传相似系数很高,变化范围为 0.9218~0.9759,平均为 0.9554,各种群

间的遗传距离很近,变化范围为 0.0244~0.0814,平均为 0.0457。其中云南种群与陕西种群亲缘关系最近,遗传相似性最高,为 0.9759,遗传距离最近,为 0.0244;山东种群与四川种群的亲缘关系最远,遗传相似性最低,为 0.9218,遗传距离最远,为 0.0814。用 PopGen32 进行

ISSR 谱系分析得种群内遗传多样性(H_t)为 0.1735,总的遗传多样性(H_s)为 0.1404,遗传分化系数(G_{st})为 0.1911 ± 0.0230 (表 5),表明分布在种群间的遗传变异占

总遗传变异的 19.11%,种群内遗传变异占 81.89%;种群间基因流的估测值(N_m)为 2.1169 ± 0.0142 , $N_m > 2$,表明种群间存在较强的基因流。

表 4
Table 4 7 个石榴种群间的遗传距离及遗传相似系数
Genetic identity and genetic distance among 7 populations

种群 Population	山东 Shandong	陕西 Shanxi	云南 Yunnan	河南 Henan	安徽 Anhui	新疆 Xinjiang	四川 Sichuan
山东 Shandong	* * * *	0.959 9	0.948 2	0.965 7	0.943 3	0.936 4	0.921 8
陕西 Shanxi	0.040 9	* * * *	0.975 9	0.965 5	0.966 1	0.958 5	0.945 1
云南 Yunnan	0.053 2	0.024 4	* * * *	0.954 7	0.973 7	0.960 1	0.958 0
河南 Henan	0.034 9	0.035 1	0.046 4	* * * *	0.958 8	0.959 2	0.931 9
安徽 Anhui	0.058 3	0.034 5	0.026 7	0.042 1	* * * *	0.965 2	0.957 1
新疆 Xinjiang	0.065 7	0.042 4	0.040 7	0.041 7	0.035 5	* * * *	0.958 8
四川 Sichuan	0.081 4	0.056 4	0.042 9	0.070 5	0.043 8	0.042 1	* * * *

注:上三角遗传相似系数,小三角遗传距离。

Note: Neis genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

表 5
Table 5 7 个石榴种群的遗传分化系数及基因流
7 pomegranate population genetic differentiation and gene flow

	n	H_t	H_s	G_{st}	N_m
平均值 (mean)	46	0.173 5	0.140 4	0.191 1	2.116 9
标准差 (s)				0.023 0	0.014 2

注: n 样本数, H_t 种内遗传多样性, H_s 总的遗传多样性, G_{st} 遗传分化系数, N_m 基因流。

Note: n sample size, H_t genetic diversity in populations, H_s total genetic diversity, G_{st} genetic differentiation N_m gene flow

3 讨论

种群是生活在一定时间与一定空间上的所有同种个体的总和,是进化的基本单位^[6]。该研究表明,石榴在我国的 7 个主产区种群中遗传多样性依次为:山东种群>陕西种群>云南种群>河南种群>安徽种群>四川种群>新疆种群,山东种群遗传多样性最高,山东地理位置临近陕西,从陕西引种后,由于生态环境因子及生态各异的驱动力或者人为选择的压力等因素使石榴资源产生应答,在较短的时间尺度内促进生物物种的多样化进程^[7],更多的出现基因突变、基因流、选择等现象,形成 44 个地方品种,因而具有极其丰富遗传多样性;新疆是丝绸之路的第一站,孙云蔚等在考证石榴引种路线时就指出石榴首先传入我国的新疆^[8],可能新疆与其它石榴主产区地理位置相距较远,形成一定的种群隔离,加之人为选择压力作用不强,主要栽培品种目前仅甜石榴、酸甜石榴、酸石榴等 7 个品种,因而表现出遗传多样性最低。该研究与 Yuan Z H 等^[9]用 AFLP 对中国石榴资源的分析结果不完全一致,这可能是因为种群间进行了较强的基因交流,使遗传差异在各种群间差异小,主要存在种群内,且所选用的石榴品种不同,造成分析种

群间多样性大小时出现一定差异。

汪小凡认为 $N_m > 1$ 基因流就足以抵制种群由遗传漂变引起的遗传结果,维持遗传变异的多样性,防止近交衰退^[10-11]。该研究中石榴 7 个种群间基因流的估测值(N_m)为 2.1169(表 5), $N_m > 2$,表明种群间存在较强的基因流,能维持石榴遗传变异的多样性,防止近交衰退^[12-13],这与 Yuan Z H 等用 AFLP 对中国石榴资源的分析结果一致^[9]。植物的基因流主要是借助于花粉、种子等遗传物质携带者的迁移或运动来实现的,石榴是多年生小乔木,异花授粉,但在栽培石榴的 7 个省份间,有的地理距离相距较远,花粉传播形成基因流的可能性很低,应主要靠人工引种栽培完成遗传物质的迁移,形成基因流,因此,各地在进行石榴引种丰富当地的遗传多样性时,同时要注意地方品种资源的保护。

参考文献

- [1] 汪小飞. 石榴品种分类研究[D]. 南京:南京林业大学,2007:20-49.
- [2] 赵丽华,王先磊. 成熟石榴叶片 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15141-15143.
- [3] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001:91-129.
- [4] 戴正,陈力耕,董品璋. 香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析

- [J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1125-1130.
- [5] 邱长玉, 高国庆, 陈伯伦, 等. 茉莉花 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 北方园艺, 2008(2): 214-217.
- [6] 韩建萍, 陈士林, 张文生, 等. 椴树遗传多样性及遗传分化的 RAPD 分析[J]. 中国药理学, 2007, 42(23): 1774-1778.
- [7] Carroll S P, Hendw A P, Reznick D N, et al. Evolution on ecological time-scales[J]. Functional Ecology, 2007, 21: 387-39.
- [8] 张建成, 屈红征, 张晓伟. 中国石榴的研究进展[J]. 河北林果研究, 2005, 20(3): 65-69.
- [9] Yuan Z H, Yin Y L, Zhu L, et al. Population Genetic Diversity in Chinese Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Revealed by Fluorescent-AFLP Mark-ers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(12): 1061-1071.
- [10] Whitlock M C, David E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$ [J]. Heredity, 1999, 8(2): 117-125.
- [11] 汪小凡, 廖万金, 宋志平. 小毛茛居群的遗传分化及其与空间隔离的相关性[J]. 生物多样性, 2001(2): 138-144.
- [12] 刘义飞, 黄宏文. 植物居群的基因流动态及其相关适应进化的研究进展[J]. 植物学报, 2009, 44(3): 351-362.
- [13] Schaal B A, Hayworth D A, Olsen K M, et al. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects[J]. Molecular Ecology, 1998, 7(4): 465-474.

Population Genetics Structure of Pomegranate *Punica granatum* L. Revealed by ISSR Markers in China

ZHAO Li-hua

(College of Agricultural Sciences, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: For better exploiting pomegranate resources in China, population genetics structure of pomegranate were studied using ISSR markers. The results showed that the genetic diversity of 7 pomegranate populations as follows: Shandong > Shanxi > Yunnan > Henan > Anhui > Sichuan > Xinjiang; Nei's gene differentiation coefficient of 7 populations (G_{ST}) was 0.1911, that genetic variation of among populations was 19.11% and the genetic variation within populations was 81.89%, low levels of genetic differentiation among these populations; the gene flow of 7 pomegranate populations (N_m) was 2.1169, the genetic similarity of these 7 populations (I) ranged from 0.9218 to 0.9759, it showed a strong gene flow and high genetic similarity among these populations and the diversity of genetic variation of pomegranates could be maintained.

Key words: pomegranates *Punica granatum* L.; ISSR; genetic diversity; gene flow

哪些蔬菜不能拌着吃

要想生吃蔬菜,最好选择那些无公害的绿色蔬菜或有机蔬菜,在无土栽培条件下生产的蔬菜,也可以放心生吃。洗一洗就可生吃的蔬菜,包括胡萝卜、白萝卜、番茄、黄瓜、柿子椒、大白菜心等。这些蔬菜中所含的营养素例如维生素 C 及 B 族,很容易受到加工及烹调的破坏,生吃有利于营养成分的保存。生吃的方法包括饮用自制的新鲜蔬菜汁,或将新鲜蔬菜凉拌,可适当加点醋,少放点盐。然而,并非每一种蔬菜都适合直接生食,有些蔬菜最好放在开水里焯一焯再吃;有些蔬菜则必须煮得熟透后再食用。

马齿苋等野菜需要焯一下彻底去除尘土和小虫,防止过敏。

十字花科蔬菜如西兰花、菜花等,这些富含营养的蔬菜焯过后口感更好,其中丰富的纤维素也更容易消化。

芥菜类蔬菜如大头菜等,它们含有一种叫硫代葡萄糖苷的物质,经水解后能产生挥发性芥子油,具有促进消化吸收的作用。

含草酸较多的蔬菜如菠菜、竹笋、茭白等,草酸在肠道内会与钙结合成难吸收的草酸钙,干扰人体对钙的吸收。凉拌前一定要用开水焯一下,除去其中大部分草酸。

此外,茼蒿、荸荠等生吃之前也最好先削皮、洗净,用开水焯一下再吃,这样更卫生,也不会影响口感和营养含量。