

38 个石榴品种的 RAPD 遗传关系分析

马 丽¹, 马耀华¹, 郝兆祥², 侯乐峰², 明东风¹, 郑 珂¹

(1. 枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160; 2. 枣庄市石榴研究中心, 山东 枣庄 277300)

摘 要:以山东省枣庄市峄城区中国石榴种质资源圃内 38 个石榴品种为试材, 用 20 条 RAPD 引物对其进行扩增, 根据扩增结果进行 UPGMA 聚类分析和主坐标分析, 研究了 38 份材料的亲缘关系。结果表明: 20 条 RAPD 引物在 38 份材料中共产生 146 个位点, 多态性位点为 109, 多态性比率为 74.6%; 38 个品种间遗传相似系数变化范围为 0.45~1.00; 在相似系数为 0.58 处, 将 38 个品种可以分为四大类, 得出品种间的亲缘关系与形态学和地理分布没有明显相关性; 38 份材料可以分为两大类, 主坐标分析结果与 UPGMA 的聚类结果存在一定差异。

关键词:石榴种质资源; RAPD; 遗传关系; 主坐标分析

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)09-0101-05

石榴(*Punica granatum* L.)果实营养丰富, 是一种高档的珍稀水果。我国有 2 000 多年的石榴栽培历史, 形成了八大著名产区, 其中山东枣庄是主要石榴产区之一。山东省枣庄市峄城区中国石榴种质资源圃内收集国内外石榴品种 280 余份。随石榴资源的广泛征集和不断交换, 导致品种混杂, 同名异物或同物异名现象严重^[1-2], 妨碍了石榴种质资源的保存、发掘与利用。因此, 很有必要开展石榴资源的遗传背景和亲缘关系研究。

国内外学者主要用形态学方法和分子标记技术对石榴进行研究。但形态学方法容易受季节和环境的影响, 鉴定的结果不准确^[3-4]。在分子水平上主要利用 RAPD、AFLP、SRAP 等技术进行石榴品种鉴定研究^[5-7], 其中 RAPD 技术报道最多^[8-12]。该研究以山东省枣庄市峄城区中国石榴种质资源圃保存的 38 个石榴品种为材料, 用 20 条 RAPD 随机引物对供试材料扩增, 初步研究 38 份材料的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据性状和来源, 在资源圃内取 38 个代表性的石

榴品种为研究材料, 品种名称及来源见表 1。

筛选的 20 条多态性好、表现稳定的随机引物由宝生物工程有限公司合成, 引物名称及序列见表 2。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取与检测 采用 CTAB 法提取 38 个石榴品种的基因组 DNA。DNA 的完整性、浓度和纯度用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外光谱法检测。DNA 稀释到 50 ng/ μ L, -20°C 保存。

1.2.2 RAPD 扩增 PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 包括 2 \times Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, (TIANGEN BIOTECH 公司生产), 10 pmol 引物, 模板 50 ng。扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 36 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 扩增反应为 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据分析

统计所有引物的扩增结果, 同一引物在同一分子位置有电泳谱带记为“1”, 无谱带记为“0”, 建立“0”、“1”二元数据矩阵。用 NTSYS-2.01 软件进行 UPGMA 聚类分析和主坐标分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记结果分析

20 条引物对 38 个品种扩增均呈现不同程度的多态性。由图 1 可知, OPY06 共产生 9 个位点, 多态性位点 8 个, 多态性比率 88.8%, 在 20 条引物中多态性最高。由表 2 可知, 扩增位点最少的引物是 S68, 仅有 5 个位点; 多态性最低的引物为 S31, 为 57.2%。20 条引物在 38 个品种中产生的谱带数变化为 5~9 条, 共产生 146 个位点, 多态性位点为 108 个, 多态性比率为 74.6%。每条引物平均产生 7.3 个位点, 多态性位点 5.5。总之, 20 条

第一作者简介:马丽(1980-), 女, 山东郯城人, 博士, 副教授, 研究方向为石榴分子生物学遗传育种。

责任作者:侯乐峰(1962-), 男, 山东枣庄人, 研究员, 研究方向为石榴种质资源收集及保存与创新利用。E-mail: houlefeng@126.com.

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201204402); 国家林业局林木种苗工程资助项目([2012]1888 号); 枣庄学院博士启动基金资助项目(307070903); 枣庄学院科研基金资助项目(307050907); 枣庄市石榴工程技术研究中心建设资助项目。

收稿日期:2014-01-10

表 1

石榴品种编号、来源及主要性状

Table 1

Code, name, origin and characteristics of pomegranate cultivars

编号 Code	品种名称 Name	原产地 Origin	主要性状 Characteristics	编号 Code	品种名称 Name	原产地 Origin	主要性状 Characteristics
1	“大粒白皮马牙甜”	山东峰城	甜、粒大	20	“潍坊小红皮甜”	山东潍坊	甜
2	“半口青皮酸”	山东峰城	酸甜	21	“蒙阳红”	山东临沂	枝条直立
3	“半口青皮谢花酸”	山东峰城	酸甜	22	“蒙阳红”	山东临沂	枝条开张
4	“单瓣粉红青皮甜”	山东峰城	甜	23	“河阴软籽”	河南荥阳	软籽、甜
5	“大青皮酸”	山东峰城	酸	24	“满天红酸”	河北元氏	酸
6	“大红皮甜”	山东峰城	甜	25	“御石榴”	陕西礼泉	酸
7	“大红皮酸”	山东峰城	酸	26	“突尼斯软籽”	突尼斯	软籽、甜
8	“重瓣白花酸”	山东峰城	酸	27	“日本软籽”	日本	软籽、甜
9	“超青”	山东峰城	甜	28	“中农红”	河南郑州	软籽、甜
10	“峰城多刺”	山东峰城	枝刺特多	29	“白花红边玛瑙”	安徽淮北	白花带红边
11	“青皮马牙甜”	山东峰城	甜	30	“半口红皮酸”	安徽淮北	酸甜
12	“小青皮酸”	山东峰城	酸	31	“玛瑙籽”	安徽怀远	甜
13	“满天红甜”	河北元氏	甜	32	“大青皮酸”	安徽淮北	酸
14	“玛瑙石榴”	山东峰城	重瓣	33	“淮北二白”	安徽淮北	白花、白皮、红籽
15	“白皮马牙甜”	山东峰城	甜	34	“小青皮甜”	安徽淮北	甜
16	“墨石榴”	山东峰城	酸	35	“紫皮甜”	安徽淮北	甜
17	“重瓣月季”	山东峰城	重瓣、红花	36	“红皮酸”	安徽淮北	酸
18	“薛城无刺”	山东薛城	枝刺特少	37	“大青皮甜”	安徽淮北	甜
19	“泰安无刺”	山东泰安	枝刺特少	38	“白玉籽籽”	安徽怀远	半软籽、甜

引物在 38 个石榴品种中的多态性比率均高于 50%，能用于石榴种质资源的品种鉴定及亲缘关系分析。

表 2 20 条引物名称、序列及扩增结果

Table 2

The name and sequence of

20 RAPD primer and amplification results

引物名称 Name	引物碱基序列 Primer sequence	扩增位点数 Number of locus	多态性为点数 Number of polymorphic locus	多态位点比率 Percentage of polymorphic locus/%
TIBMBB-03	5'-TCACGTGGCT-3'	8	5	62.5
TIBMBB-09	5'-AGGCCGGTCA-3'	7	5	86.0
TIBMBB-14	5'-GTGGGACCTG-3'	8	6	75.0
TIBMBB-15	5'-AAGTGCCCTG-3'	8	6	75.0
OPY06	5'-AAGGCTCACC-3'	9	8	88.8
OPY13	5'-GGGTCTCGGT-3'	7	5	75.0
S47	5'-AGATGCAGCC-3'	6	4	66.6
S31	5'-AAAGCTGCGG-3'	7	4	57.2
S1510	5'-ACTGCCGGAC-3'	8	7	87.5
OPY10	5'-AGGTCCAGGA-3'	8	6	75.0
S19	5'-ACCCCGAAG-3'	8	7	87.5
S68	5'-TGGACCGGTG-3'	5	3	60.0
S228	5'-AGGAGCGACA-3'	9	7	77.7
S1304	5'-AGGAGCGACA-3'	8	6	75.0
S1483	5'-GAAGGAGGCA-3'	5	3	60.0
S1311	5'-CTGCCACGAG-3'	8	7	87.5
S1440	5'-ACGGAAGTGG-3'	9	6	66.6
S1507	5'-CACAGACCTG-3'	9	7	77.7
ZY12	5'-GGTGCTCCGT-3'	9	7	77.7
综述		146	109	74.6

由图 2 可知，以遗传相似系数 0.58 为阈值，38 个品种可以分为四大类。

第 I 类包括 4 个品种，分别为 1 号（“大粒白皮马牙甜”）、38 号（“白玉籽籽”）、15 号（“白皮马牙甜”）、33 号（“淮北二白”）。该类品种都属于白花石榴，其中“淮北二白”与“白皮马牙甜”遗传相似系数为 0.97，遗传差异较小，亲缘关系较近。2 个品种的性状差异主要是籽粒颜

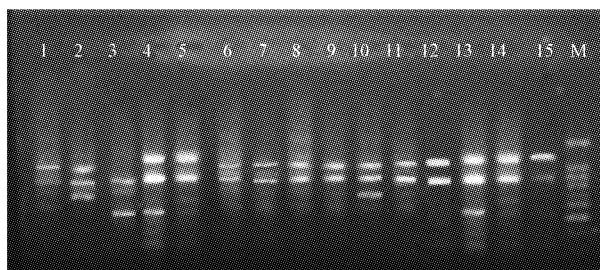


图 1 引物 OPY06 对部分品种的 RAPD 扩增结果

注：M:2 000 bp DNA marker; 编号与表 1 中材料编号相同，下同。

Fig. 2 The RAPD-PCR amplification electrophoresis of partial pomegranate cultivars by primer OPY06

Note: M:2 000 bp DNA marker; the code is same as the table 1, the same as below.

2.2 38 个石榴品种的亲缘关系聚类分析结果

根据 RAPD 扩增结果，计算 38 个品种间遗传相似系数。并绘制遗传关系聚类图。由图 2 可知，38 个品种的遗传相似系数变化范围为 0.45~1.00，品种间表现出显著的遗传变异。18 号（“薛城无刺”）、19 号（“泰安无刺”）和 25 号（“御石榴”）之间的遗传相似系数较小，这 2 个品种与“御石榴”的遗传异质性较大。9 号（“超青”）、11 号（“青皮马牙甜”）之间的遗传相似系数为 1.00，初步推测“超青”和“青皮马牙甜”可能为同物异名品种。此外，13 号（“满天红甜”）和 24 号（“满天红酸”），15 号（“白皮马牙甜”）和 33 号（“淮北二白”），16 号（“墨石榴”）和 35 号（“紫皮甜”）品种间的遗传相似系数均为 0.97，遗传相似性较大。

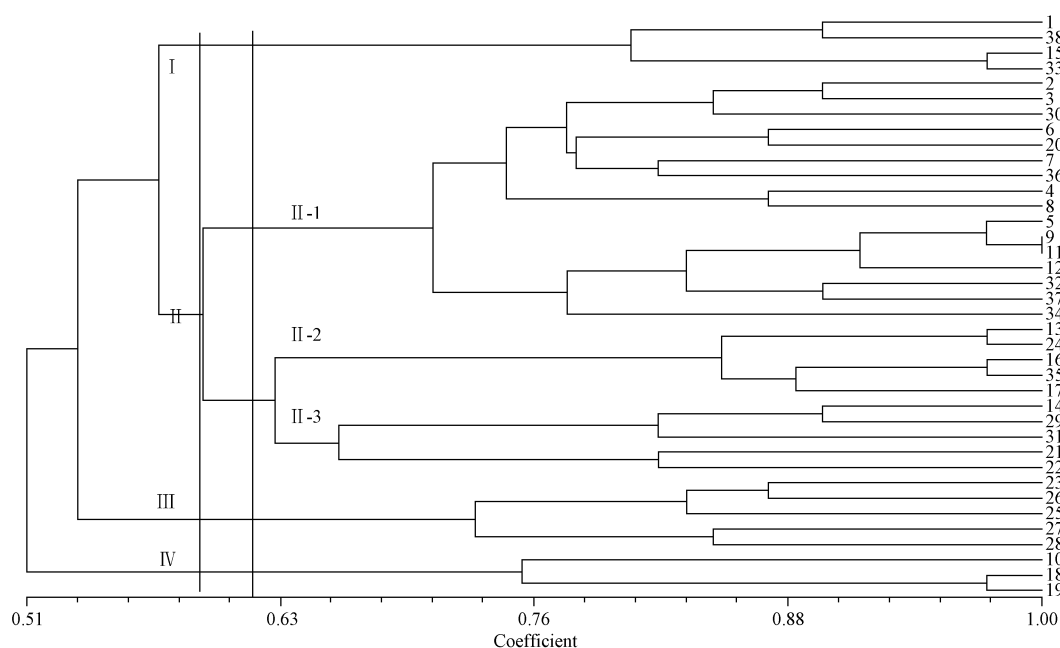


图2 38个石榴品种遗传相似系数UPGMA聚类结果

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 38 pomegranate cultivars based on genetic similarity coefficient

色不同,其它性状相似,也说明2个品种遗传背景较近。该类中1号和15号来源于山东枣庄峄城,38号和33号来源于安徽,4个品种遗传背景较近,说明两地域间的栽培品种存在一定的基因交流。

第Ⅱ类包括26个品种。以遗传相似系数0.65为阈值,26个品种又可进一步分为三大亚组,分别以Ⅱ-1、Ⅱ-2、Ⅱ-3表示。

Ⅱ-1组包括16个品种,分别为“半口青皮酸”、“半口青皮谢花酸”、“半口红皮酸”、“大红皮甜”、“潍坊小红皮甜”、“大红皮酸”、“红皮酸”、“单瓣粉红青皮甜”、“重瓣白花酸”、“大青皮酸”(峄城)、“超青”、“青皮马牙甜”、“小青皮酸”、“大青皮酸”(淮北)、“大青皮甜”(淮北)、“小青皮甜”。该组品种果实基本特点是口味为酸、甜或酸甜,果皮为红色或黄绿色。

Ⅱ-2组包括“满天红甜”、“满天红酸”、“墨石榴”、“紫皮甜”、“重瓣月季石榴”5个品种。此类中“满天红甜”与“满天红酸”的遗传相似系数为0.97,2个品种均为河北元氏的传统主栽品种,亲缘关系较近,说明地理因素对品种的遗传背景有一定影响。“重瓣月季石榴”和“墨石榴”、“紫皮甜”聚为一类,3个品种在形态上均表现为植株矮小、叶片小,在植物学性状上表现一定的相似性,说明3个品种的遗传背景较近。

Ⅱ-3组包括“玛瑙石榴”、“白花红边玛瑙”、“玛瑙籽”、“蒙阳红”(直立型)、“蒙阳红”(开张型)5个品种。2个“蒙阳红”品种原产地相同,但枝条性状不同,遗传相似系数为0.82,说明二者存在一定的遗传异质性。

第Ⅲ类包括“河阴软籽”、“突尼斯软籽”、“御石榴”、“日本软籽”、“中农红”5个品种。该组品种中除“御石榴”外,均为软籽石榴,说明不同地域来源的软籽石榴遗传背景相近。

第Ⅳ类包括“峄城多刺”、“薛城无刺”、“泰安无刺”3个品种,该类中多刺品种与无刺品种聚为一类,不符合性状分类的结果。

2.3 主坐标分析

主坐标(PCO)分析的依据是遗传相似系数,因此,主坐标分析图能反映群体及个体间的遗传相似性。对20条RAPD引物的结果对全部供试材料进行主坐标聚类分析,得到主坐标二维聚类图。从图3可知,38个品种可分为两大类,其中A类为Ⅲ类群的全部材料,为软籽石榴品种,与UPGMA系统聚类结果一致;该类品种原产地不同,生长环境不同而聚为一类,初步说明品种间的亲缘关系与其地理分布没有明显相关。

B类包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ类的材料。B类进一步可分为3亚类。B-1亚类包括Ⅰ类群的“白玉石籽”等4个白花石榴品种,Ⅱ类群的6个品种;B-2亚类包括其中Ⅱ类群的9份材料;B-3亚类包括Ⅱ类群的10份,Ⅳ类的3份,共13个品种。Ⅱ-3组的21号(“蒙阳红”枝条直立型)离中心点的距离较近,与其它品种分离,与其它品种遗传距离较远。以上结果可知Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ类群材料与主坐标分类结果基本一致,Ⅱ类群的26份材料遗传背景复杂,分散于B-1、B-2和B-3亚类,与Ⅱ-1组、Ⅱ-2、Ⅱ-3组的分类不完全相同,表明主坐标分类结果与UPGMA聚类结果存在一定差异。

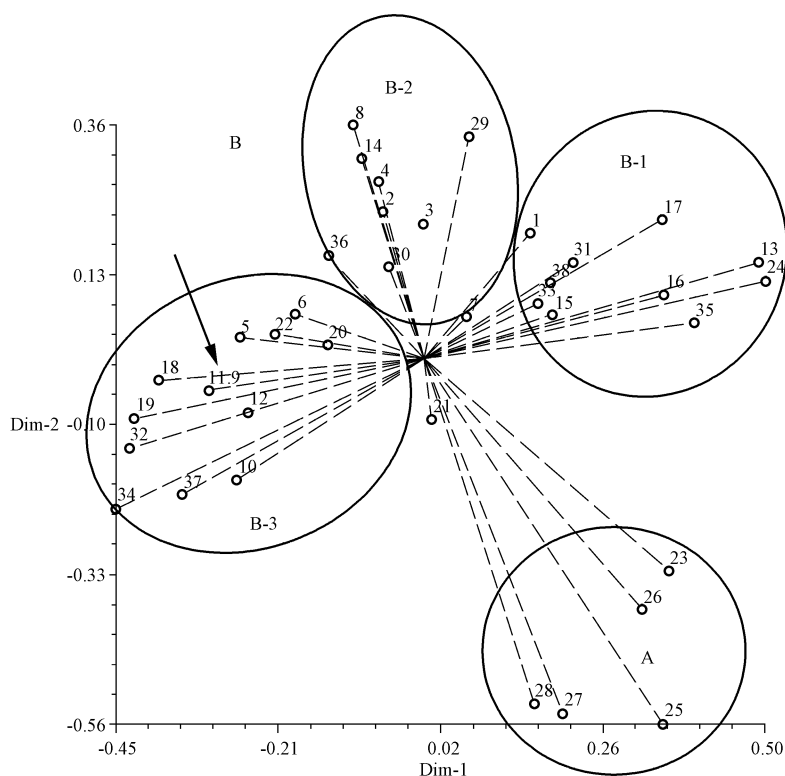


图3 38个石榴品种亲缘关系的主坐标分析

Fig. 3 Principal coordinates analysis of the 38 pomegranate cultivars based on genetic similarity coefficient

B-3亚类中9号和11号位置几乎重叠(图3中箭头所示),说明二者遗传异质性较小;“重瓣玛瑙”、“白花红边玛瑙”和“玛瑙籽”在UPGMA分类中聚为一类,而在主坐标中“重瓣玛瑙”、“白花红边玛瑙”在B-2亚类,“玛瑙籽”在B-1亚类,表明“玛瑙籽”与“重瓣玛瑙”、“白花红边玛瑙”存在遗传差异,说明主坐标分析更加直观的反映了品种间的遗传关系。

3 讨论与结论

近年来,在种质资源亲缘关系研究中,很多学者采用主坐标分析处理分子标记获得的数据,多数研究的结果表明系统聚类分析与主坐标分析的结果基本一致^[3-4,13-14],主坐标分析能从不同的方向和层面直观的提供更多关于种质或群体的关系,该研究中某些品种主坐标分类结果与系统聚类结果一致。如Ⅲ类材料(软籽石榴品种)、Ⅰ类材料(单瓣白花石榴品种)和Ⅳ类材料用2种聚类方法所获结果一致。但也存在主坐标分类结果与系统聚类的结果有差异的品种,尤其是Ⅱ类材料表现的更为明显。此结果一方面反映Ⅱ类材料的遗传基础复杂,另一方面说明需要用更多的材料和先进的分子标记如ISSR、SSR等验证系统聚类分析与主坐标分析获得结果的一致程度。

该试验中38个品种的遗传相似系数变化为0.45~1.00,表明38个品种遗传多样性丰富。但也出现遗传相

似性较高的品种,如“超青”和“青皮马牙甜”之间遗传相似系数为1.00,“超青”为“青皮马牙甜”的芽变品种,2个品种的果皮颜色、叶形、果型和树型等性状十分相似,遗传背景十分相近,也可认为是同物异名品种。“满天红甜”和“满天红酸”2个品种,“墨石榴”和“紫皮甜”2个品种性状有明显差异,但遗传相似性较高,与生产中根据性状分类相差较大。

Yuan等^[15]用85个石榴品种的分类结果研究了品种的地理分布情况,表明地理因素对品种有较大的影响。而该研究中聚类结果显示38个石榴品种没有严格按照地理分布分类。但该研究结果与卢龙斗等^[8]、Durgac等^[16]、赵丽华等^[17]利用分子标记聚类分析结果一致。其原因可能是石榴在栽培过程中经长期的自然选择和人工选择累积了丰富的遗传变异,遗传组成非常复杂;此外,地域间频繁引种,导致地域间的基因交流广泛,使具有不同性状、不同地理来源的品种分子标记结果相似系数较高。

该研究中某些品种的分类与形态分类结果一致。如试验中软籽石榴聚为一类;白花石榴品种聚为一类。但多数品种的分类结果与形态分类不一致。这说明形态分类仅依据可见性状的差异进行分类,不能检测一些不可见的差异或变异^[3-4]。而RAPD技术是从石榴整个基因组层面对石榴进行研究,能检测多个性状的综合变异,准确反映品种间的遗传关系。因此用分子标记技术

对石榴种质资源进行研究时,应结合形态学,才能更好的为石榴种质资源保存、利用及品种改良等提供科学依据。

参考文献

- [1] 冯玉增,宋梅亭,宋长治. 河南省石榴种质资源的研究[J]. 中国果树, 2003(2):25-28.
- [2] 杨荣萍,李文祥,武绍波,等. 石榴种质资源的研究概况[J]. 福建果树, 2004(2):16-19.
- [3] Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, et al. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 121:313-319.
- [4] Durgac C K, Özgen M, Simsek Ö, et al. Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(9):1294-1301.
- [5] 薛华柏,郭俊英,司鹏,等. 4个石榴基因型的 SRAP 鉴定[J]. 果树学报, 2010, 27(4):631-635.
- [6] 张四普,汪良驹,曹尚银,等. 23个石榴基因型遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 果树学报, 2008, 25(5):655-660.
- [7] Moslemia M, Zahravib M, Khanikic G B. Genetic diversity and population genetic structure of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Iran using AFLP markers[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 126:441-447.
- [8] 卢龙斗,刘素霞,邓传良,等. RAPD 技术在石榴品种分类上的应用[J]. 果树学报, 2007, 24(5):634-639.
- [9] 杨荣萍,刘雯虹,张宏,等. 云南 25 份石榴资源的 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(2):226-229.
- [10] Ercisli S, Gadze J, Agar G, et al. Genetic relationships among wild pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes from Coruh Valley in Turkey[J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(1):459-464.
- [11] Hasnaoui N, Mars M, Chibani J, et al. Molecular Polymorphisms in Tunisian Pomegranate (*Punica granatum* L.) as Revealed by RAPD Fingerprints[J]. Diversity, 2010(2):107-114.
- [12] Zamani Z, Zarei A, Fatahi R. Characterization of progenies derived from pollination of pomegranate cv. Malase-Tourshe-Saveh using fruit traits and RAPD molecular marker[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 124:67-73.
- [13] 高山,许端祥,林碧英,等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4):396-400.
- [14] 马琳,余显权,赵福胜. 贵州地方水稻品种的 SSR 遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(3):237-243.
- [15] Yuan Z H, Yin Y L, Qu J L, et al. Population genetic diversity in Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars revealed by fluorescent-AFLP markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(12):1061-1071.
- [16] Durgac C, Mustafa O, Ozhan S, et al. Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(9):1294-1301.
- [17] 赵丽华,李名扬,王先磊,等. 石榴种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 果树学报, 2011, 28(1):66-71.

Genetic Relationship Analysis of 38 *Punica granatum* L. Cultivars Based on RAPD Markers

MA Li¹, MA Yao-hua¹, HAO Zhao-xiang², HOU Le-feng², MING Dong-feng¹, ZHENG Ke¹

(1. Department of Life Science, Zaozhuang College, Zaozhuang, Shandong 277160; 2. Zaozhuang Pomegranate Research Center, Zaozhuang, Shandong 277300)

Abstract: Taking 38 pomegranate cultivars from China germplasm nursery at Yicheng of Zaozhuang as materials, they were amplified by 20 primers of RAPD, and the cluster analysis and principal coordinate analysis based on amplification results, the genetic relationship of 38 cultivars of the material were studied. The results showed that total 146 bands were amplified from 38 cultivars, in which 109 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic band was 74.6%. The genetic similarities coefficient between cultivars ranged from 0.45 to 1.0 pomegranate cultivars were divided into four groups at 0.58 based on UPGMA method. The clustering analysis results did not show obvious correlation with the morphologic classification and the geographical distribution. 38 pomegranate cultivars were divided into two groups based on the principal coordinates analysis, the results of the principal coordinates analysis were not consistent with that of the UPGMA cluster.

Key words: pomegranate germplasm; RAPD; genetic relationship; principal coordinates analysis