

石榴种质资源过氧化物酶同工酶的亲缘关系分析

马 丽, 王玉海, 明东风

(枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160)

摘 要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对 19 份石榴品种的过氧化物酶(POD)同工酶酶谱进行分析,并利用系统聚类的方法,研究了 19 个品种间的亲缘关系。结果表明:19 个品种的 POD 同工酶酶谱多态性较高,不同品种的酶带数目、相对迁移率及酶活性均有差异;19 个石榴品种的 POD 同工酶酶谱共呈现 12 条酶带,其中 1 条酶带为所有种质共有的酶带; R_f 为 0.216 的谱带为大青皮酸品种的特征谱带, R_f 为 0.113 的酶带为大马牙甜石榴的特征谱带。POD 同工酶聚类分析结果在阈值 0.60 处将 19 个品种分为 5 类,类群间遗传差异较大。

关键词:石榴;种质资源;POD 同工酶;聚类分析;亲缘关系

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0124-04

石榴(*Punica granatum* L.)属石榴科(Punicaceae)石榴属(*Punica* L.)二倍体果树。石榴果实营养丰富,含有多种人体所需的营养成分,是一种高档的珍稀水果,同时还有药用价值。我国具有 2 000 多年的石榴栽培历史,石榴资源丰富,但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],妨碍了石榴种质资源的挖掘利用,给种质资源的保存、引种和育种带来困难。

同工酶是基因表达的直接产物,生物的不同种属、个体、组织和发育阶段都可能产生同工酶的差异,同工酶酶谱的差异在一定程度上能反映生物个体的遗传差异,因此可以作为研究植物品种鉴定及亲缘关系的有效遗传标记。目前,同工酶在植物遗传多样性研究中已经得到广泛应用,其中以 POD 同工酶应用较多^[2-6],但有关石榴 POD 同工酶的研究鲜见报道。该研究以 19 个石榴地方栽培品种为材料,通过分析品种间 POD 同工酶的差异,研究品种间的亲缘关系,为石榴种质保存、开发及育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以山东枣庄峄城石榴种植园内 19 个石榴主栽品种为试材,其品种编号分别为:A:大青皮甜;B:大青皮酸;C:小青皮甜;D:小青皮酸;E:大红袍甜;F:大红袍酸;

G:小红袍甜;H1:小红袍;H:墨阳红;I:谢花甜;J:二红袍;K:玉石籽;L:大马牙甜;M:小马牙甜;N:铁皮钢柳;O:会里青皮软籽;P:牡丹红;Q:双花;R:白石榴。分别采集每个品种的幼叶,置于冰袋后保存于-20℃冰箱内,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 酶液提取 取石榴叶片,剪去叶柄,称取 5 g,冰浴研磨后加入 12 倍体积磷酸缓冲液(pH 6.8),冲洗转移到离心管中,4 000 r/min,离心 20 min,上清液置于-20℃冰箱备用^[7]。

1.2.2 凝胶电泳、染色及照相 采用垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳系统,分离胶浓度 7.5%,浓缩胶浓度 4%,每管上样 60 μ L。电泳缓冲液为 pH 值 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液。先进行 50 V 预电泳 30 min,调电压至 180 V,再电泳 6~7 h,溴酚蓝离玻璃板底部 1 cm 附近停止电泳^[7]。采用醋酸联苯胺染色。取醋酸联苯胺溶液 5 mL,加入 3%双氧水 2 mL,蒸馏水 93 mL,将取出的胶轻轻浸入染色液中 5~10 min,在染色过程中轻轻振荡装有胶片和染色液的容器,待棕色酶带清晰即取出用蒸馏水漂洗,然后拍照记录^[7]。

1.3 数据分析

根据电泳的酶谱结果计算 POD 同工酶酶带相对迁移率(R_f)= $\frac{\text{酶带迁移距离}}{\text{溴酚蓝(标准分子)的迁移距离}}$ 。按相对迁移率 R_f 值绘制模拟图并标定酶带位置。在同一个 R_f 值位置处,分析每个品种的酶谱,有带的记为 1,无带的记为 0。按 Nei 的方法计算材料间相似系数(GS), $GS = \frac{2N_{ij}}{(N_i + N_j)}$,其中 N_i 为 i 材料出现的谱带数,

第一作者简介:马丽(1980-),女,博士,副教授,现主要从事石榴分子生物学遗传育种研究工作。E-mail:mary1976816@163.com.

基金项目:枣庄学院博士科研启动基金资助项目(YSY08003)。

收稿日期:2012-07-02

N_j 为 j 材料出现的谱带数, N_{ij} 为 i 材料和 j 材料共有的谱带数。利用 GS 值计算相异系数(相异系数=1-GS), 利用软件 DPS 3.01 按 UPGMA 法进行遗传相异性聚类分析。

2 结果与分析

2.1 19 个石榴品种间 POD 同工酶谱及迁移率分析

经 PAGE 电泳表明, 石榴品种的过氧化物酶同工酶谱比较清晰(图 1), 不同品种间在酶带数量、酶带的深浅、扩散宽窄程度, 相对迁移率(Rf)等方面均有大差异, 说明 POD 同工酶谱带在品种间呈现较强的多态性。

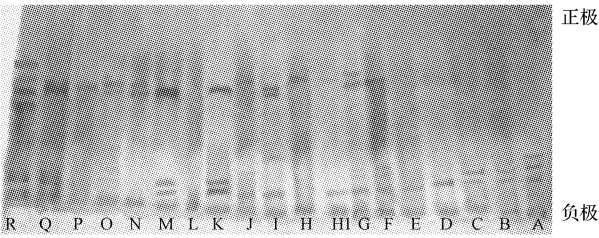


图 1 19 个石榴品种的 POD 同工酶谱

Fig. 1 The POD isozyme zymogram of 19 pomegranates varieties

表 1 19 种石榴过氧化物酶同工酶 Rf 值

Table 1 Rf values of POD isozyme of 19 pomegranates varieties

酶带/Isozyme bands	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合计 Total
A	0.113	0	0.167	0	0.196	0	0.284	0	0	0	0	0	4
B	0.113	0	0.167	0	0	0.216	0	0	0	0	0	0	3
C	0.113	0	0.167	0	0.196	0	0	0	0	0	0	0	3
D	0.113	0	0.167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
E	0.113	0.147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
F	0.113	0.147	0	0	0.196	0	0.284	0	0.618	0	0	0	5
G	0.113	0.147	0	0	0.196	0	0.284	0	0.618	0	0.657	0	6
H1	0.113	0.147	0	0	0	0	0	0	0	0.637	0	0	3
H	0.113	0	0	0	0	0	0	0	0	0.637	0	0	2
I	0.113	0.147	0	0	0	0	0.284	0.588	0.618	0	0	0	5
J	0.113	0.147	0	0	0.196	0	0	0	0	0.637	0	0	4
K	0.113	0.147	0	0.186	0	0	0	0	0.618	0	0	0	4
L	0.113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M	0.113	0.147	0	0.186	0	0	0	0	0.618	0	0	0	4
N	0.113	0.147	0	0	0	0	0	0	0.618	0	0.657	0	4
O	0.113	0.147	0	0.186	0	0	0	0	0.618	0	0.657	0	5
P	0.113	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.657	0	2
Q	0.113	0	0	0.186	0	0	0	0	0	0	0.657	0	3
R	0.113	0.147	0	0.186	0	0	0	0.588	0.618	0	0.657	0.706	7

Rf 为 0.216 仅在 B 品种中存在, 此谱带可作为 B 品种的特征谱带。而 Rf 为 0.147 的谱带在 11 个品种中出现, 说明此酶谱在石榴品种中是普遍存在的一种类型。在 POD-b 区, Rf 为 0.618 的谱带在 8 个品种中都存在, 酶带染色较深, 酶活性较强。

19 个品种间呈现的酶带数量不尽相同, 带位也有差异。L 仅有 1 条 $Rf=0.113$ 酶带, 此谱带可作为大马牙甜石榴的特征谱带; R 共有 7 条酶带, 其中有 3 条强带, 2

据酶谱计算每个品种的 Rf 值见表 1, 按相对迁移率 Rf 值绘制模拟图见图 2。由图 2 和表 1 统计结果可知, 19 个石榴品种共有 12 条 POD 同工酶谱带, 由负极向正极方向, 按电泳迁移率(Rf)的集中程度可大致分为 POD-a 和 POD-b 2 个区。POD-a 区 Rf 范围为 0.113~0.284, POD-b 区 Rf 范围为 0.588~0.706。在 POD-a 区酶带数量较多, 其中 Rf 为 0.113 的酶带在 19 个品种中均出现, 是 19 个品种共有的特征谱带, 但酶活性较弱;

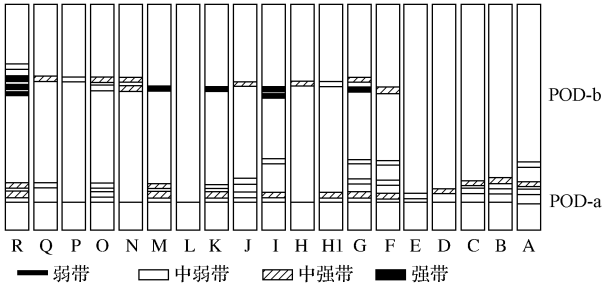


图 2 19 个石榴品种过氧化物酶谱模式

Fig. 2 The POD isozyme pattern of 19 pomegranates varieties

条中强带, 说明此品种中 POD 活性较高。K 和 M 2 个品种谱带数量和位置相同(谱带为 1、2、4、8), 说明二者亲缘关系较近。总之, 19 个品种间酶带数量的差异和酶带强弱的差异说明了 19 个品种间存在的遗传差异。

2.2 19 个品种间亲缘关系的聚类分析

根据 Rf 构建 19 份品种获得的谱带矩阵, 按 Nei 的方法计算品种间的遗传相似系数(GS), 根据遗传相似系数(GS)计算遗传相异系数进行聚类分析, 聚类结果见图

3. 由图 3 可知,在阈值 0.60 处,19 个品种可分为五大类,分别命名为 I、II、III、IV、V。第 I 类仅包括 L(大马牙甜石榴)一个品种,与其它品种的相异系数最小为 0.25,最大为 0.86,与多数品种亲缘关系较远;第 II 类包括:Q(双花石榴)、P(牡丹红)、N(铁皮钢柳)3 个品种。第 III 类包括 7 个品种,分别为 R(白石榴)、O(会里青皮软籽石榴)、M(小马牙甜石榴)、K(玉石籽)、I(谢花甜石榴)、G(小红袍甜石榴)、F(大红袍酸石榴)。其中 F 和 G 亲缘关系较近,相异系数为 0.17;小马牙甜和玉石籽 2 个品种的亲缘关系最近,遗传相异系数为 0.0。此类群内的品种多数为甜石榴,但也出现了大红袍酸石榴品种。第 IV 类包括 4 个品种,分别为 H(墨阳红)、J(二红袍)、H1(小红袍酸石榴)、E(大红袍甜石榴)。此类中小红袍酸石榴和二红袍亲缘关系较近,遗传相异系数为 0.25。此类群内的石榴品种多数为红花石榴,但风味特点有甜石榴也有酸石榴。第 V 类中包括 A(大青皮甜石榴)、C(小青皮甜石榴)、B(大青皮酸石榴)、D(小青皮酸石榴)4 个品种。4 个品种与其它品种的变异系数范围分别为:A 为 0.25~0.90,C 为 0.25~0.86,B 为 0.33~0.86,D 为 0.33~0.83,变异系数较大,与其它品种的亲缘关系较远。此类群内的品种多数为果皮青色石榴品种,但与风味分类的结果不一致。

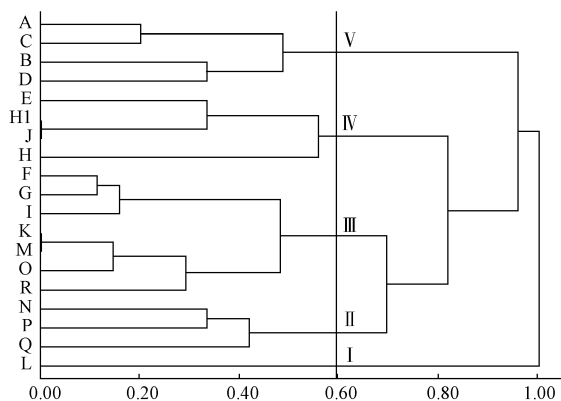


图 3 19 个品种的过氧化物同工酶聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis POD isozyme of 19 pomegranates varieties

综上所述,19 个石榴品种按照 POD 同工酶酶谱的差异分为五大类群,第 I 类与第 V 类群中的品种与其它类群的品种亲缘关系相对较远;第 II、第 III 和第 IV 类群内的品种亲缘关系相对较近。每个类群内的品种特点与形态学分类不尽一致。根据该研究分类结果及结合性状特点,可筛选出大马牙甜石榴、大青皮酸石榴、大青皮甜石榴、小青皮甜石榴、小青皮酸石榴等性状优良、与其它品种遗传差异大的品种作为石榴杂交育种的优异材料。

3 讨论与结论

同工酶是基因表达的产物,酶谱比较稳定,可作为一种重要的遗传标志对植物进行亲缘关系鉴定^[8-9]。该研究结果表明,19 个石榴品种的 POD 酶带清晰,多态性好,能反映不同品种的亲缘关系。19 个品种共呈现 12 条酶带,其中 R_f 为 0.216 的谱带为大青皮酸品种的特征谱带; R_f 为 0.113 的酶带,为大马牙甜石榴的特征谱带。聚类结果表明,19 个石榴品种被分为五大类群。其中小红袍甜石榴与大红袍酸石榴、小红袍酸石榴和二红袍亲缘关系较近;小马牙甜和玉石籽二品种亲缘关系最近。大马牙甜石榴、大青皮甜石榴、小青皮甜石榴、大青皮酸石榴和小青皮酸石榴与其它品种的遗传关系相对较远,可作为石榴杂交育种的种质材料;其余的大部分石榴品种遗传关系相对较近,说明枣庄地区的石榴品种的遗传基础较窄,需要引进新的品种丰富当地的种质资源。

但是,由于同工酶表达与植物的发育阶段有关^[10-11],在同一组织或器官中不可能稳定不变地表达,使同工酶表现型变化较大,酶谱聚类结果可能会存在误差。因此同工酶研究需要结合形态学及分子标记研究,才能更准确的确定石榴品种之间的亲缘关系。

参考文献

- [1] 杨荣萍,李文祥. 石榴种质资源研究概况[J]. 福建果树,2004(2): 16-19.
- [2] 韩琳娜,周凤琴. 不同种源引种紫锥菊的过氧化物酶同工酶分析[J]. 四川农业大学学报,2011,29(1):55-58.
- [3] 连建国,孟庆杰,王光全,等. 罐装黄桃种质过氧化物同工酶的酶谱分析[J]. 落叶果树,2010(6):12-13.
- [4] 吕秀兰,张光伦,龚荣高,等. 22 个葡萄品种过氧化物同工酶研究[J]. 四川农业大学学报,2005,23(2):182-185.
- [5] 张翠萍,袁建玉,龚义勤,等. 萝卜种质资源的同工酶分析[J]. 中国蔬菜,2010(2):28-32.
- [6] 孙婴宁,王维禹,方妹. 常见观赏竹类过氧化物酶同工酶及可溶性蛋白分析[J]. 北方园艺,2011(21):110-112.
- [7] 丁之恩,徐迎碧,周先锋,等. 石榴同工酶研究方法探讨[J]. 经济林研究,2004,22(4):35-38.
- [8] Magoma G N. Biochemical differentiation in *Camellia sinensis* and its wild relatives as revealed by isozyme and catechin patterns [J]. Biochemical Systematics and Ecology,2003,31(9):995-1010.
- [9] 刘海学,王翌,季静. 16 个向日葵品种过氧化物酶同工酶分析[J]. 中国油料作物学报,2007,29(2):64-67.
- [10] 刘永军,王同坤,齐永顺. 不同板栗品种(系)过氧化物酶同工酶的分析比较(简报)[J]. 河北科技师范学院学报,2006(4):72-75.
- [11] 孟学平,杨恒,候立自. 冬小麦不同发育时期过氧化物酶研究[J]. 华北农学报,2001,16(3):56-60.

沙棘品种“实优 1 号”的组织培养技术

董敬超

(辽宁省风沙地改良利用研究所, 辽宁 阜新 123000)

摘要:以沙棘品种“实优 1 号”的 1~2 a 生带休眠芽茎段(腋芽未萌发)为外植体,采用不同培养方式、不同类型基本培养基和不同激素浓度组合对沙棘组织培养过程中的影响进行系统的研究。结果表明:茎段分化培养采用 1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L,诱导率可达 85% 以上;最佳增殖和诱导愈伤培养基为 1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.5 mg/L,愈伤诱导率在 90% 以上,增殖系数达到 4~6;最佳生根培养基均为 1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.5 mg/L,平均生根率 85% 以上。接种后进行暗培养 7 d,向培养基中添加 6.5 g/L 琼脂,1.5 g/L 活性炭,可有效防治褐化。

关键词:沙棘;“实优 1 号”;茎段;组织培养

中图分类号:S 793.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0127-04

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)属胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*)多年生落叶灌木或小乔木,也是一种新兴的小浆果类树种,果实中维生素 C 含量较高,沙棘油具有药用价值^[1],沙棘耐干旱、生长迅速、侧根发达,还具有固氮能力,防风固沙,是优良的水土保持树种,在生态环境治理,尤其在辽西地区生态建设过程中发挥着巨大作用。

沙棘雌雄异株,靠种子繁殖在生产上很难保持优良

品种的优势,根蘖繁殖系数较低,目前生产上采用的扦插繁殖成活率也不高,还易受病害侵染。利用组织培养繁育种苗能大大提高繁殖速度,还可保持原种优势,是加快苗木规模化繁育的主要办法。但时常出现初代培养困难、组培苗褐化、玻璃化、污染、增殖系数低、生根率低等问题,导致不能工厂化生产优良沙棘种苗,周洁等^[2]以“实优 1 号”沙棘为试材,以 B5 为基本培养基进行了研究。现采用 MS 为基本培养基对沙棘品种“实优 1 号”组培苗生产中存在的问题进行进一步分析和研究,为今后的生产提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以阜新国家科技园区大棚内的沙棘品种“实优

作者简介:董敬超(1979-),女,本科,助理研究员,现主要从事植物组织培养与生态农业实验室常规化验工作。E-mail: djchlt@163.com.

收稿日期:2012-06-13

Analysis of Genetic Relationship for *Punica granatum* L. Germplasm Based on Peroxidase Isozyme

MA Li, WANG Yu-hai, MING Dong-feng

(College of Life Science, Zaozhuang University, Zaozhuang, Shandong 277160)

Abstract: The peroxidase (POD) isozyme of 19 pomegranates germplasm cultivars were determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the genetic relationship were studied with clustering analysis method. The results showed that a better polymorphism was observed in POD enzyme. The number, the activity and R_f of POD enzyme were difference among 19 pomegranates. 12 enzyme bands were detected and there was a common locus for total experiment material in the zymogram patterns; the two specific locuses that R_f was 0.216 and 0.113 were obtained for ‘Daqingpisan’ cultivar and ‘Damayatan’ cultivar respectively. Furthermore, the clustering analysis indicated 19 pomegranates were divided into five groups based on 0.60 of similarity coefficient, which indicated that the genetic difference between groups was significant.

Key words: *Punica granatum* L. (pomegranates); germplasm; POD isozyme; cluster analysis; genetic relationship