

石榴分子标记的研究进展

刘兴满¹, 葛金涛¹, 吴秋月²

(1. 连云港农业科学院 果林研究室, 江苏 连云港 222000; 2. 东海县农委 花卉推广站, 江苏 连云港 222000)

摘 要:分子标记技术对石榴遗传多样性研究以及石榴的育种具有重要意义。现通过综述国内外石榴分子标记的研究进展,并综合目前石榴研究中常见的4种分子标记技术,研究各地区石榴种质资源遗传多样差异,以期今后开展石榴分子标记研究提供参考和对照,也为石榴种植资源的引进与开发提供依据。

关键词:石榴;分子标记;遗传多样性;研究进展

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0194-06

石榴(*Punica granatum* L.)属石榴科石榴属落叶乔木或灌木。该属含2种,另1个种为索科特拉野石榴(*Punica protopunica*)^[1-2],因其果小含糖度低,栽培价值低,仅分布于叶门索科特拉岛^[3]。石榴原产伊朗、阿富汗、印度北部等中亚地带^[2,4-5],具有极高栽培价值。石榴果实富含矿物质、维生素、粗纤维^[5],尤其是果汁和果皮富含花青素苷具有抗氧化、抗炎、抗癌作用^[5-6],根、皮、籽富含鞣质、生物碱、甾类等广泛用于工业、饲料、医药领域^[7]。此外,石榴花繁叶茂,硕果累累是优良的园艺观赏树种。目前石榴广泛分布于亚洲、欧洲南部北美洲和热带非洲^[8]。

石榴在长期栽培过程中产生了大量的栽培品种,在我国已有238种之多^[1]。土库曼斯坦植物遗传资源试验站是最大石榴资源资源圃,从四大洲26个国家收集1157个石榴品种。过去石榴品种的分类主要靠生态学指标,如果实酸甜度^[9]、花粉亚微形态结构^[10]、单瓣重瓣性状、籽粒硬度、叶片长度等,但形态学分类容易受到植物发育状况、季节和环境因素等的影响,分类结果不准确。分子标记能直接揭示来自DNA的变异,不受外界环境的影响,且具有共显性,不影响目标性状表达,手段迅速简单、稳定可靠、可重复等优点,已在石榴品种鉴别,遗传多样性分析等方面得到广泛应用。目前,RAPD、AFLP、SSR、SRAP等多种分子标记已在石榴上得到广泛应用。

1 RAPD(random amplified polymorphic DNA 随机扩增多态性DNA标记)分子标记

RAPD分子标记技术是目前国内外石榴研究中运用最多的分子标记技术(表1),它是一种随机引物的PCR标记,具有技术简单,需要DNA量少,无需特意设计引物等优点。最初RAPD只用来分析某个地区石榴品种间的遗传多样性和相似性,以利于区分品种和品种分类。如Talebi等^[11]最早将RAPD用于伊朗28石榴品种的遗传多样性分析,可是检测出较低的多态性,随后Sarkhosh等^[12]从100条引物中挑选出16条引物对伊朗24个品种进行RAPD-PCA扩增,得到178条引物,其中102条具有多态性,通过UPGMA聚类分析,其最高和最低遗传相似度为0.89和0.29。在土耳其,Ercisli等^[13]研究了土耳其23个野生石榴品种的遗传多样性,86条引物中有12条扩增出条带145条,其中有91%是多态性的。基因相似度为0.08~0.24,表明土耳其地区的野生石榴遗传多样性较高。

在国内,巩雪梅^[14]利用RAPD分子标记技术建立了全国50个石榴品种(系)的指纹图谱,并找到16个品种(系)的特异性谱带,可作为这些品种(系)鉴别的分子标记,通过聚类分析,其认为不应当以花的重瓣、单瓣性状作为观赏石榴变种划分的依据。热娜·卡司木等^[15]运用RAPD分子标记技术对新疆23个石榴品种进行遗传关系研究,从50条10bp随机引物中筛选出7条扩增效果较好的引物进行扩增,共扩增出88条带,其中多态性带为61条,多态率达69%。根据扩增结果进行UPGMA聚类分析,聚类结果将23个品种分为五大类群。研究结果表明,石榴品种间的遗传多态性有明显差异,即使父母本相同的品种也能区别。

第一作者简介:刘兴满(1981-),男,江苏泗阳人,硕士,园林工程师,助理研究员,现主要从事果树与观赏树木新品种选育等研究工作。E-mail:672643419@qq.com。

基金项目:连云港市科技局资助项目(CN1301)。

收稿日期:2014-11-19

表 1

RAPD 分子标记应用于石榴的研究进展

Table 1

Summary of RAPD molecular markers used for *P. granatum* L.

产地	遗传多样性分析	分析软件	品种数	总引物数/条	可用引物数/条	扩增位点数	多态性位点数	多态性百分率	多态性范围	参考文献
山东枣庄	SC 0.51~1.00	NTSYS	38	—	20	146	109	74.66	57.2~88.8	[43]
云南、安徽、河南	GD 0.0889~0.9808	TFPGA	55	120	15	125	92	73.60	58.3~100.0	[19]
云南	GD 0.10~0.90	TFPGA	11	15	6	63	51	80.90	55.6~100.0	[20]
云南、陕西、山东	GD 0.027~0.441	Statistic	36	128	12	111	80	72.07		[44]
新疆	SC 0.82~0.94	MVSP	23	50	7	88	61	69.32		[15]
云南	GD 0.027~0.342	Statistic	25	128	12	110	79	71.80	53.3~88.9	[18]
伊朗	SC 0.29~0.89	NTSYS	24	100	16	178	102	57.30		[12]
土耳其野生品种	SC 0.08~0.24	RAP Distance	23	86	12	145	132	91.03		[13]
伊朗北部	SC 0.15~0.78	PAST	50	100	18	229	174	76.90	46.15~93.33	[17]
印度	SC 0.225~1.000	NTSYSpc	13	—	10	119	110	92.44	83.33~100.0	[42]
中国	SC 0.604~0.962	SPSS	50	60	32	217	199	91.70		[14]

注:SC-相似信息度;GD-遗传距离。

Note:SC-Similar information degree;GD-Genetic distance.

经过多年发展,RAPD 标记技术在分析石榴品种遗传多样性的同时,开始与石榴的形态学特征开始比较。Sarkhosh^[16]收集 21 个伊朗软籽石榴品种,通过 37 个形态性状分析与利用 RAPD 分子标记技术进行遗传多样性分析,21 个品种遗传相似度为 0.13~1.00,基于品种性状的分类与分子标记技术的分类没有表现出明显的相互关系($r=-0.35$)。Zamani 等^[17]利用 RAPD 分子标记技术和形态学性状分析了伊朗北部 37 个野生种和 12 个栽培品种和一个外地品种。形态学研究表明,果实直径,花青素指数。假种皮长、果实风味、可滴定酸度(TA)、可溶性固含物(TSS)、籽粒硬度和叶片长度可作为主要多态性指标。RAPD-PCR 扩增出条带 229 条其中多态性的占 76.9%。基因相似度为 0.15~0.78,平均 0.42,表明较高的基因型多样性,但 RAPD 分子标记与形态学分类间得相关系数性不高($r=0.45$)。

杨荣萍等^[18]用 RAPD 标记技术分析了 25 份云南地方石榴材料(品种或类型)的亲缘关系,从 128 个随机引物中筛选出 12 个重复性好、条带清晰的多态性引物,并用这些引物对 25 份云南石榴材料进行 RAPD 扩增,共扩增出 110 条谱带,平均每个引物 9.17 条。多态性程度达到 71.8%。用 Statistic 分析软件计算品种间的遗传距离为 0.027~0.342。对 25 份材料进行了 UPGMA 法聚类,亲缘关系树状图显示,25 份云南石榴材料的遗传背景较复杂,难以划分类群。研究结果与生产上根据风味、花色、皮色、子粒颜色、核软硬程度等某一性状及栽培目的的分类方法不一致。以上研究都表明,运用 RAPD 分子标记与形态学的相关性较低,但卢龙斗等^[19]利用 RAPD 技术对来自云南、安徽、河南三地的 55 个石榴栽培品种进行遗传分析,并与花色,重瓣或重萼与否等性状作对比。15 条引物扩增出多态性条带 92 条,多态性百分率 73.6%。通过 UPGMA 分析后建立 55 个石榴品种的聚类图,在遗传距离 4.0 处,将 55 个品种分为 4 类,其中有 2 类都是单瓣品种。若在遗传距离 3.0 处

分类,可将 55 个品种分为 10 类,可将所有复瓣品种(此处复瓣不包括重瓣)归为一类。刘素霞等^[20]通过试验也证明,分子水平上的分类与形态分类有一些冲突,但基本上与将花型作为形态分类标准相一致。可见,花型是与 RAPD 分子标记分类相关性较高的形态学指标。

此外,RAPD 分子标记也与植物其它性状进行关联分析,Ercisli 等^[21]运用气相色谱法分析 6 个石榴品种脂肪酸含量。品种 cv. kirli hanim 有一个明显的脂肪酸谱不同于其它品种。该品种中检测到不饱和脂肪酸,而其它品种有不同程度的亚油酸。RAPD 数据也表明,该品种形成一个独特的条带。其建议脂肪酸谱可以用来区分一些石榴品种。Zamani 等^[22]研究了品种 MTS (Malase-Tourshe-Saveh)自交和开放杂交的后代和品种 MTS 和 Narm-Daneh 杂交后代的遗传图谱和基因相似性,结果表明父本与子代分离,母本与子代聚合。

RAPD 技术中影响因素很多,所以试验的稳定性和重复性差。张彦苹等^[23]用 2 种电泳方法对 RAPD 扩增产物进行分析,结果显示琼脂糖凝胶电泳方法共检测出 76 条带,其中有 43 条为多态性谱带,多态性比率为 56.4%;而在 PAGE 电泳方法共检测出 123 条谱带,多态性谱带数为 87 条,多态性比率为 70.95%,表明不同的电泳方法对分子标记分析结果有较大影响。

2 AFLP(amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)分子标记

在 RAPD 分子标记之后,AFLP 分子标记运用也较广泛(表 2),尤其随着荧光标记及自动测序仪的引用,AFLP 技术也变得简单快速。Yuan 等^[24]最早将 AFLP 分子技术用于石榴遗传多样性分析,收集了我国 6 个省份共 85 个石榴品种,通过 AFLP-PCR,发现 86 个品种相似度在 0.57~0.88,高于国外。Awamleh 等^[25]利用 AFLP 分子标记对约旦 12 个石榴品种进行遗传多样性分析,发现品种间的相似系数为 0.46~0.87。Moslemia 等^[26]运用 AFLP 分子标记对伊朗 67 个品种进行研究表

明,品种间相似度信息为 0.36~0.88,多态性信息 PIC 为 0.34~0.44,表明伊朗种质资源较为丰富。Sarkhosh 等^[27]专门对伊朗 21 个软籽石榴品种进行了 AFLP 分子

标记分析,结果显示 21 个品种相似度为 0.17~1.00,表明品种间差异较大。

表 2

AFLP 分子标记应用于石榴的研究进展

Table 2

Summary of AFLP molecular markers used for *P. granatum* L.

品种 来源地	遗传多样性 分析	分析 软件	品种 数	初选 引物数 /对	适用 引物数 /对	扩增 位点数	多态性 位点数	多态性 百分率 /%	多态性 范围	等位基因 分析	参考 文献
山东	SC 0.76~0.89	NTSYS	25	64	8	1 728	722	41.80	32.41~58.33	H=0.1133, I=0.1752, Ne=1.1874	[41]
伊朗软籽	SC 0.17~1.00	NTSYS	21	72	31	1 290	503	38.99	31.71~47.06		[27]
伊朗	SC 0.26~0.88	NTSYS	67		8	221	118	54.13	40.00~69.23	H=0.3646, I=0.5327, Ne=1.6467	[26]
山东、安徽、陕西、河南、云南和新疆	SC 0.57~0.88	NTSYS	85	64	8	1 728	1 266	73.26	62.50~86.11	H=0.1539, I=0.2447, Ne=1.2491	[24]
约旦	SC 0.46~0.87	NTSYS	12		8	257	235	91.40	56.70~100.00		[25]
云南、四川	SC 0.71~0.93	NTSYS	42	64	5	362	235	65.66	60.64~75.93	H=0.1603, I=0.2531, Ne=1.260	[3]

注:SC-相似信息度;H-平均 Nei's 基因多样性;I-平均香农信息指数;Ne-平均有效等位基因数。

Note:SC-Similar Information Degree;H-Nei's genetic diversity;I-Shannon's index;Ne-effective number of alleles per locus.

3 SSR(simple sequence repeat 简单重复序列)分子标记

SSR 分子标记是目前最接近理想的分子标记,其具有序列丰富、遗传信息量大、多态性高、共显性、DNA 用量少、操作简便、重复性好、通用性高^[28]。但其也有缺

点,主要是在某一物种 DNA 序列未测序的情况下,要获得微卫星,需要知道重复序列两端的序列信息,引物设计要根据微卫星两端的序列而定,因此不易获得。目前 SSR 分子标记已经在石榴的遗传多样性分析中得到广泛应用(表 3)。

表 3

SSR 分子标记应用于石榴的研究进展

Table 3

Summary of SSR molecular markers used for *P. granatum* L.

产地	分析结果	分析软件	品种 数	初选 引物数 /对	适用 引物数 /对	基因 位点数	等位 基因数	参考 文献
中国	SC 0.706~0.975 PIC 0.09~0.619 Ho 0.119~0.619	NTSYSpc 和 Power-Marker	42	59	18	18	42	[37]
伊朗	PIC 0.164~0.699 Ho 0.00~1.00	PowerMarker	20	15	11	13	44	[30]
意大利、西班牙、土耳其	PIC 0.06~0.52 Ho 0.06~0.71	PowerMarker	34	9	7	7	22	[31]
突尼斯	Ho 0.037~0.592 He 0.036~0.491	Arlequin	27	18	11	11	25	[32]
印度	Ho 0.15~0.87 He 0.29~0.65 PIC(0.26~0.61)	POPGENE32 和 CERVUSv. 2.0 for PIC	60	58	12	12	58	[34]
西班牙、以色列、美国、印度、土耳其	PIC(0.09~0.71)	GeneMapper4.0	11	112	55	55	146	[35]
突尼斯、意大利	Ho 0.030~0.527 He 0.030~0.758 PIC 0.031~0.525	GenAlex6.1, Populations1.2.30, MEGA4	33	15	12	12	34	[33]

注:SC-相似信息度;PIC-多态信息含量;Ho-观测杂合度;He-预期杂合度。

Note:SC-Similar Information Degree;PIC-Polymorphism Information Content;Ho-Observed heterozygosity;He-expected heterozygosity.

Koohi 等^[29]最早运用 SSR 分子标记技术。从石榴品种‘Malase Yazd’中分离 2 个分别富含 51%GA 和 47%GT 的 SSR 序列,根据这 2 条基因序列设计了 15 对 SSR 分子标记引物,其中有 5 对引物在 29 个品种中得到了预期大小的谱带。Ebrahimi 等^[30]利用磁珠富集法构建了富含 AG 和 ATG 微卫星基序的基因组文库,通过菌落 PCR,60 个阳性克隆中有 43 个获得高质量序列,这其中有 32 个具有 SSR 序列。据此设计的 15 对 SSR 引物对 20 个石榴品种(系)进行扩增,有 11 对表现多态性。11 对引物在 13 个扩增位点获得 44 个等位基因(有 2 对引物有 2 个基因位点),13 个位点的平均多态性为 0.433。通过聚类分析,能将野生种与驯化品种区分开来。Currò 等^[31]利用 SSR 分子标记分析了意大利、土耳其和西班牙 34 个品种的遗传多样性,由于基因库较小,仅获得 7 个基因位点。并且将该 SSR 引物用于小瓣萼距花(*Cuphea micropetala* Kunth)和紫薇(*Lagerstroemia*

indica L.)没有发现预期谱带。推测石榴科与同目的千屈菜科遗传距离较远。Hasnaoui 等^[32]2010 年运用 SSR 分子标记技术研究了突尼斯 27 个石榴品种的遗传多样性,表明 SSR 分子标记能很好揭示石榴品种的基因多样性。在 2012 年,Hasnaoui 等^[33]利用分子标记分析了 32 个突尼斯石榴品种和 1 个意大利石榴品种的基因多态性,12 个基因位点共获得 34 个等位基因,其平均观测杂合度(Ho)和平均预测杂合度(He)为 0.243 和 0.245。Pirseyedi 等^[34]用 SSR 分子标记研究了石榴原产地之一印度的 60 个品种,结果表明印度 60 个石榴品种间观测杂合度为 0.15~0.87, PIC 为 0.26~0.61。Soriano 等^[35]从西班牙、以色列、美国、印度河土耳其收集了 11 个石榴品种,利用 SSR 分子标记研究其多态性为 0.09~0.71。

虽然 SSR 分子标记已在石榴品种间遗传多样性分析中得到大量应用,但 SSR 标记数量仍旧较少,没有遍

布整个基因组, Nadia 等^[36]利用鸟枪法测序法从石榴皮 cDNA 中获得了超过 1 亿条基因片段, 经加工获得 9 839 条转组件, 共获得 115 个 SSR 基因, 其中 77 个可以设计引物。出现最多的重复序列是 AG/GA, 其次为 CT/TC。在国内, Zai 等^[37]从石榴基因库中构建了 66 个 SSR 序列, 其中 53 个位点可以设计 59 条引物, 引物构建率达到了 80.3%, 对 42 个石榴品种进行扩增共得到 42 个等位基因, 多态信息量(PIC)为 0.090~0.619, 观测杂合度(Ho)为 0.119~0.619。

4 SRAP(Sequence-related amplified polymorphism 相关序列扩增多态性)分子标记

该分子标记通过独特的双引物设计对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点。目前已在石榴上得到应用 Soleimani 等^[38]利用 SRAP 分子标记研究伊朗不同地区野生石榴、栽培石榴和观赏石榴的遗传多样性, 结果表明 63 个品种的遗传距离 0.10~0.37。利用 UPGMA 聚类方法表明观赏石榴与部分野生种遗传距离较近。国内, 张四普等^[39]对国内主栽 23 个石榴品种进行基因遗传多样性的 SRAP 分析, 23 个基因型遗传距离在 0.0769~0.4131, 在遗传距离 0.33 处, 可将石榴基因型分为 A、B、C、D 和 E 5 个类群。4 种单瓣白花基因型都聚类在 A 组; B 组都是单瓣红花、味甜的鲜食品种; C 组中鲜食品种果皮都不着色; 4 种不同花色或叶型的单瓣、赏食兼用基因型则聚在 D 组; 观赏型墨石榴与其它基因型显著不同, 单独聚为一类(E 组)。此分类与形态学分类匹配度最高, 薛华柏等^[40]利用 SRAP 分子标记鉴别了 4 个生产上主要推广的石榴品种。并制作了依靠 2 对引物鉴别 4 个品种的“分子身份证”号码。

5 结论

石榴因其具有较高的经济价值和观赏价值, 受到国内外广泛关注和研究, 但石榴品种繁多、命名混乱, 一直影响着石榴的开发和利用。随着分子标记技术的发展, 石榴品种的鉴定取得了长足发展, 鉴别出大量同物异名现象, 分子标记也帮助分析了石榴品种间的遗传多样性信息, 对于石榴种质资源研究、遗传图谱、分子标记辅助育种研究具有积极作用。目前, 通过分子标记分类石榴品种与通过形态学性状分类的结果相关性较低, 这也表明分子标记技术对石榴品种分类具有重要作用。经研究分析, 花型性状相较于其它形态性状更能揭示石榴品种间的遗传关系。

通过近几年国内外分子标记的研究, 发现我国石榴种植资源不如原产地伊朗、突尼斯等地。这主要由于我国野生石榴种质资源匮乏, 栽培品种经过各地育种家的

不断引种, 遗传距离较近。但国内, 各地种质资源丰富程度也不同。

在我国除研究石榴食用和医用价值外, 还注重开发石榴的观赏价值, 并注重选育更高观赏价值的石榴品种, 这不但表现在分子标记研究, 在花色相关基因克隆方面也有大量研究^[41-45]。

5.1 不同地区分子标记整合工作有待发展

受条件所限, 个人不能收集到所有石榴品种, 以及不断有新品种问世, 这就需要有统一标准进行整合分子标记的信息, 尽可能包含更多品种的遗传多样性比较和进化树图, 但目前由于分子标记方法众多, 各地品种众多, 难以做到这点, 但随着 SSR 分子标记的发展, 其具有的不同品种通用性和高重复性, 可以促进此项工作的进行。

5.2 分子标记辅助育种工作开展

目前石榴分子标记研究局限在分析品系间的遗传多样性, 对研究与石榴某些性状连锁的分子标记, 来辅助选育新品种仍未开展。目前石榴仍是以扦插为主要繁殖手段, 当选择扦插母本时, 无法准确鉴定其真实性和纯度, 会对后期生产产生较大损失, 目前已开始运用分子标记鉴别分子品种的研究, 但快速便捷且廉价的检测手段仍待研究。

参考文献

- [1] 冯玉增, 宋梅亭. 我国石榴种质资源概括[J]. 中国果树, 2006(4): 57-58.
- [2] Guarino L, Miller T, Baazara M, et al. Socotra, the island of bliss revisited[J]. Diversity, 1990, 6(3/4): 28-31.
- [3] 赵丽华. 石榴(*Punica granatum* L.)种质资源遗传多样性及亲缘关系研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [4] 汪小飞, 周耘峰, 黄埔, 等. 石榴品种数量分类研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(5): 1093-1098.
- [5] Charles D J. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources[M]. New York: Springer-Verlag, 2012: 447-487.
- [6] Adhami V M, Khan N, Mukhtar H. Berries and Cancer Prevention[M]. New York: Springer New York, 2011: 209-226.
- [7] 汪小飞, 周耘峰, 孙龙, 等. 石榴的经济与植物文化价值研究[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(4): 27-43.
- [8] Stover E, Mercure E W. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise[J]. Hort Science, 2007, 42(5): 1088-1092.
- [9] 徐凯, 钟家煌, 杨军. 安徽省石榴优良品种资源[J]. 作物品种资源, 1997(3): 48-50.
- [10] 杨尚尚, 苑兆和, 尹燕雷, 等. 观赏石榴花粉亚微形态结构观察[J]. 山东农业科学, 2013, 45(1): 42-45.
- [11] Talebi B M, Sharifnabi B, Bahar M. Analysis of genetic diversity in pomegranate cultivars of Iran, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers[C]. Iran: Proceedings of the 3rd National Congress of Biotechnology, 2003(2): 343-345.
- [12] Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, et al. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate genotypes[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 111: 24-29.

- [13] Ercisli S, Gadze J, Agar G, et al. Genetic relationships among wild pomegranate (*Punica granatum*) genotypes from Coruh Valley in Turkey [J]. Genetics and Molecular Biology, 2011, 10(1): 459-464.
- [14] 巩雪梅. 石榴品种资源遗传变异分子标记研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004.
- [15] 热娜·卡司木, 帕丽达·阿不力孜, 朱焱. 新疆石榴品种的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2447-2450.
- [16] 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.
- [17] Zamani Z, Adabi M, Khadivi-Khub A. Comparative analysis of genetic structure and variability in wild and cultivated pomegranates as revealed by morphological variables and molecular markers[J]. Plant Systematics and Evolution, 2013, 299: 1967-1980.
- [18] 杨荣萍, 龙雯虹, 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.
- [19] 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.
- [20] 刘素霞, 洪达, 高武军, 等. 石榴 RAPD 反应体系优化及亲缘关系研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(36): 11775-11777.
- [21] Ercisli S, Agar G, Orhan E, et al. Inter specific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in Southern Anatolia region in Turkey [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, 35: 764-769.
- [22] 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.
- [23] 张彦苹, 曹尚银, 初建青, 等. 16 份石榴 RAPD 扩增产物的两种电泳方法检测及其序列特征[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 890-896.
- [24] 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: 1061-1071.
- [25] Awamleh H, Hassawi D, Migdadi H, et al. Molecular characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) landraces grown in Jordan using amplified fragment length polymorphic markers [J]. Biotechnology, 2009, 8(3): 316-322.
- [26] Moslemia M, Zahravib M, Khaniki 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.
- [27] Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, et al. Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2011, 17(3): 305-311.
- [28] Morgante M, Hanafey H, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genome[J]. Nature Genetics, 2002, 30: 194-200.
- [29] Koohi D M, Sayed-Tabatabaei B E, Yamchi A, et al. Microsatellite markers in pomegranate[J]. Acta Horticulturae, 2007, 760: 179-183.
- [30] Ebrahimi S, Sayed-Tabatabaei B E, Sharifnabi B. Microsatellite isolation and characterization in pomegranate (*Punica granatum* L.). Iranian[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2010, 8(3): 165-163.
- [31] Currò S, Caruso M, Distefano G, et al. New microsatellite loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lythraceae)[J]. American Journal of Botany, 2010, 97: 58-60.
- [32] Hasnaoui N, Buonamici A, Sebastiani F, et al. Development and characterization of SSR markers for pomegranate (*Punica granatum* L.) using an enriched library[J]. Conservation Genet Resour, 2010(2): 283-285.
- [33] Hasnaoui N, Buonamici A, Sebastiani F, et al. Molecular genetic diversity of *Punica granatum* L. (pomegranate) as revealed by microsatellite DNA markers (SSR)[J]. Gene, 2012, 493: 105-112.
- [34] Pirseyedi S M, Valizadehghan S, Mardi M, et al. Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010(11): 2010-2016.
- [35] Soriano J M, Zuriaga E, Rubio P, et al. Development and characterization of microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. Molecular Breeding, 2011, 27: 119-128.
- [36] Nadia N O, Monica T B, Joseph N F, et al. Exploring the transcriptome landscape of pomegranate fruit peel for natural product biosynthetic gene and SSR marker discovery [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(10): 800-813.
- [37] Zai H J, Xin S L, Jian B H, et al. Mining microsatellite markers from public expressed sequence tag sequences for genetic diversity analysis in pomegranate[J]. Journal of Genetics, 2012, 91: 353-358.
- [38] Soleimani M H, Talebi M, Sayed-Tabatabaei B E. Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran [J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298: 1141-1149.
- [39] 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.
- [40] 薛华柏, 郭俊英, 司鹏, 等. 4 个石榴基因型 SRAP 鉴定[J]. 果树学报, 2010, 27(4): 631-635.
- [41] 苑兆和, 尹燕雷, 朱丽琴, 等. 山东石榴品种遗传多样性与亲缘关系的荧光 AFLP[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 107-112.
- [42] Singh S K, Meghwal P R, Pathak R, et al. Genetic diversity in *punica granatum* revealed by nuclear rRNA, internal transcribed spacer and RAPD polymorphism[J]. National Academy Science Letters, 2013, 36(2): 115-124.
- [43] 马丽, 马耀华, 郝兆祥, 等. 38 个石榴品种的 RAPD 遗传关系分析[J]. 北方园艺, 2014(9): 101-105.
- [44] 杨荣萍, 龙雯虹, 杨正安, 等. 石榴品种资源的 RAPD 亲缘关系分析[J]. 河南农业科学, 2007(2): 69-72.
- [45] 招雪晴, 苑兆和, 陶吉寒, 等. 粉花石榴二氢黄酮醇还原酶基因 cDNA 片段的分离及鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(1): 233-236.

Research Progress on Molecular Marker of Pomegranate (*Punica granatum* L.)

LIU Xing-man¹, GE Jin-tao¹, WU Qiu-yue²

(1. Laboratory of Fruiter, Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Lianyungang, Jiangsu 222000; 2. Flower Promotion Station, Donghai Agriculture Committee, Lianyungang, Jiangsu 222000)

生物炭在农业领域应用的研究进展与前景

翁福军, 卢树昌

(天津农学院 农学与资源环境学院, 天津 300384)

摘要:生物炭是生物质在高温缺氧条件下热裂解的产物。其具有多孔性、高阳离子交换量(CEC)和低容重特征,对土壤性状改良、环境污染修复和作物生长等方面都有一定的积极作用。生物炭的农业应用作为一种农业碳汇减排和提高土壤生产力技术途径已得到广大学者的关注。现从土壤性状改善、作物生长、生态环境效应方面综述了生物炭的研究进展,基于生物炭的研究方法、范围、内容及推广应用等方面存在的几大问题,展望了生物炭今后的研究趋向与前景,指出生物炭在农业领域中的研究应用存在巨大潜力,以期生物炭在农业领域的有效应用与推动现代农业可持续发展提供遵循依据。

关键词:生物炭;农业;生产;环境;应用

中图分类号:S 154.2;S 131.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0199-05

21 世纪,人地矛盾突出问题日趋严重,由此造成农业土壤质量退化的问题越来越受到人们重视。其中,农业土壤碳库问题对土壤肥力质量、环境质量退化的影响成为人们关注的焦点。如何减少土壤碳的排放、补充汇集碳于土壤之中得到国内外学者广泛研究。Sombroek^[1]对亚马逊河地区的黑色土壤研究引起了全球众多学者对生物炭(biochar)的广泛关注。2007 年,生物炭在澳大利亚第一届国际生物炭会议上取得统一命名^[2]。广义上,生物炭属于黑炭范畴,是由生物质在无氧或缺氧条件下经过高温裂解产生的一种碳质材料^[3]。常见生物炭的种类包括秸秆炭、木炭、草炭、竹炭等^[4]。

生物炭主要由芳香结构、烷基和单质碳组成的复杂化合物,其表面含有羧基、羟基和芳香环等官能团,一般含 C 量在 60% 以上,除 C 元素还含有 H、O、N、S 等元素^[5-7]。具有自身容重小,多孔性,比表面积大,呈碱性和

高 CEC 等特性^[8-10]。但是,原材料不同、制备工艺条件的差异也会导致生物炭比表面积、结构与碳素含量等理化性状差异显著^[11]。以木本植物为材料制作的生物炭,其含碳量明显高于畜粪类生物炭,而灰分含量明显低于后者^[12-13],并且原料中木质素含量高的原料与生物炭的产出是成正比的^[14-15]。

美国、巴西、澳大利亚等国家在生物炭生产工艺与应用研究方面处于世界领先地位。英国洛桑试验站于 2009 年在 Woburn 农场启动了有关生物炭的长期定位试验计划^[16]。巴西研究组织机构 EMBRAPA 开展的生物炭项目已进入了实施推广阶段,目标是创造更多的“肥沃高碳黑土”。我国研究生物炭起步较晚。中国农业大学在 2010 年 6 月 12 日成立了中国首个生物炭网络中心,这将为生物炭在国内的研究与应用起到一定的积极推动作用。据研究文献显示,全球关于生物炭的期刊科研论文数从 2000 年的几篇上升到 2009 年的 80 篇以上。尤其在 2010 年以后,关于生物炭的研究越来越多。据不完全统计,2010 年至今有关生物炭的科技论文达到 2 000 余篇,其中约 75% 的研究涉及农业领域方面。国内外的科研工作者相继对生物炭在土壤改良、作物生长、生态环境效应及其自身性质等方面进行了大量研

第一作者简介:翁福军(1991-),男,硕士研究生,研究方向为农田土壤与作物生长环境关系。E-mail:wengfujun@126.com.

责任作者:卢树昌(1970-),男,博士,教授,现主要从事农田土壤质量与植物营养等教学与科研工作。E-mail:lsc9707@163.com.

基金项目:天津市科技支撑重点计划资助项目(13ZCZDNC00500)。

收稿日期:2014-11-10

Abstract: Molecular marker is of great significance in the study of genetic distance of pomegranate and pomegranate breeding. This paper reviewed the advancement of molecular marker in pomegranate, studied on the differences of genetic diversity in the world by comparing 4 kinds of common molecular markers in pomegranate research, and aimed at providing reference for the future research on molecular markers and a theoretical basis on the introduction and development of germplasm resources of pomegranate.

Keywords: pomegranate; molecular marker; genetic diversity; research progress