

石榴遗传标记研究进展

王雪¹, 赵登超², 时燕¹, 刘冬芝¹, 侯立群²

(¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²山东省林业科学研究院, 济南 250014)

摘要:石榴属石榴科石榴属植物,是中国古老的栽培果树之一,具有较高的营养价值、药用价值、观赏价值。在系统地介绍当前遗传标记主要类型及特征的基础上,分别对形态学标记、细胞学标记、生物化学标记、和分子标记在石榴上的应用进展进行了综述,并对当前石榴领域遗传标记研究存在的问题及对策进行了分析和探讨。遗传标记将为石榴种植资源保存、亲缘关系鉴定、遗传多样性、指纹图谱构建、辅助育种等方面的研究提供最有效的方法和手段,应用前景广阔。

关键词:石榴;形态学标记;细胞学标记;生物化学标记;分子标记

中图分类号:Q75 文献标识码:A 论文编号:2009-1668

Research Advances on Genetic Markers in *Punica granatum*

Wang Xue¹, Zhao Dengchao², Shi Yan¹, Liu Dongzhi¹, Hou Liqun²

(¹The Life Science Department, Shandong Normal University, Jinan 250014;

²Shandong Academy of Forestry, Jinan 250014)

Abstract: The pomegranate (*P. granatum* L.), a species belonging to the family *Punicaceae*, is one of ancient cultivation fruits. It possesses high nutritive, medical and ornamental value. On the basis of introducing the main types of present genetic markers and the characteristics of each mark, the application of morphological markers, cytological markers, biochemical markers and molecular markers in pomegranate was summarized. Practical problems and resolutions of genetic markers were also analyzed and discussed. With broad application prospect, genetic markers will provide the most effective methods and means for the studies on pomegranate from the aspects of germplasm resources preservation, relationship identification, genetic diversity, construction of genetic map, assistant breeding etc.

Key words: *Punica granatum*, morphological markers, cytological markers, biochemical markers, molecular markers

0 引言

石榴(*Punica granatum* L.)别名安石榴、若榴、丹若、金罌、金庞、涂林等,在植物分类学上属石榴科(Punicaceae)、石榴属植物,是一种常见果树,具有较高的营养、药用、观赏价值。石榴在中国约有2000多年栽培历史,系公元前119年汉使张骞出西域,从涂林安石国沿古丝绸之路带入,最早在皇家园林作为观赏树木栽培^[1]。目前,中国石榴栽植总面积根据不完全统计共66.7万hm²^[2],居于世界第一位。近年来随着其经济价值的不断提高,对石榴的研究也在不断深入。

遗传标记包括了形态学标记(morphological marker)、细胞学标记(cytological marker)、生物化学标记(biochemical marker)、免疫学标记(immune genetic markers)和分子标记(molecular marker)5种类型。除免疫学标记外,在石榴研究方面均有应用,尤以分子标记的发展最为迅速,已成为分子生物学的重要方面^[3]。

1 形态学标记研究

形态学标记是指肉眼可见的或仪器测量的外部特征,以形态性状、生理性状及生态地理分布等特征

第一作者简介:王雪,女,1984年出生,山东济南人,硕士,研究方向:植物生理及分子生物学。通信地址:250014 山东省济南市文化东路88号 山东师范大学生命科学学院, E-mail: kinow-wang@163.com。

通讯作者:侯立群,男,1959年出生,山东莱芜人,研究员,博士。主要从事经济林木育种与栽培技术研究。通信地址:250014 山东省济南市文化东路42号 山东省林业科学研究院, Tel: 0531-88557748, E-mail: lqhou@163.com。

收稿日期:2009-08-17,修回日期:2009-09-12。

为遗传标记,研究物种间的关系、分类和鉴定。《中国植物志》对石榴的形态发育特征包括植物学特性和生长发育特性有详细记载。中国石榴传统分类按照果型大小、果皮色泽、籽粒风味、籽粒口感、成熟期及用途等进行划分^[4]。

汪小飞等^[5]在前人研究的基础上,根据实地调查的结果,对石榴品种分类依据进行了研究,提出石榴品种形成属于同一种系来源,并建立了品种群——品种系统,即按照花瓣将石榴品种分为4个品种群,同时认为花瓣、花色、结实性、果色、果实大小及果重是品种分类的主要依据,而籽粒软硬、萼筒形状、新叶颜色、茎刺有无等特征可作为次级分类特征。

赵先贵等^[6]在1996年利用光学显微镜和扫描电子显微镜,对中国石榴科的花粉形态进行了研究。观察结果表明,除花粉都具3孔沟这一点与前人的观点一致外,还发现在电镜下石榴科花粉表面凹凸不平,细纹块状,而不是网状雕纹;更为独特的是光镜下,它的种及各变种之间的花粉形态存在明显差异。主要表现在花粉的形状、大小及内孔特征等方面,并据此讨论了石榴的种下分类的孢粉学依据,建立了石榴种及各变种花粉形态检索表。

2 细胞学标记研究

细胞学标记是指能明确显示遗传多态性的细胞学特征,如染色体的结构特征及数量特征^[3]。染色体结构特征包括染色体的核型分析、染色体长度、着丝点位置、臂比、随体大小等。不同物种的染色体都有各自特定的形态结构,而且这种形态特征是相对稳定的。

徐迎碧^[7]等采用常规根尖压片法对芽变新品种(白玉)、白玉母本、玉石籽、大笨子4个石榴品种的染色体数目进行了统计及核型分析。研究发现:4个石榴品种的染色体数都为18,且核型不对称性类型均为2B型,说明4个品种间的染色体核型变异不大。根据Stebbins的理论^[8],得到了4个石榴品种中芽变新品种是较为进化的品种,大笨子、玉石籽为较原始的品种,且后两者亲缘关系较近。4个石榴品种的染色体都具有随体,且随体位置相同,但大小稍有不同,染色体总体积亦不相同。

3 生化标记研究

生化遗传标记是以生物体内的某些生化性状为遗传标记,主要指储藏蛋白标记和同工酶标记。同工酶技术是通过电泳和组织化学方法进行特异性染色而把酶蛋白分子分离,并将其位置和活性直接在染色区带标记出来,该技术逐渐成为分子水平上研究生命现象的一种重要手段^[9-10]。同工酶是基因的直

接产物,植物个(群)体同工酶差异直接反映了遗传基础的差异,因此借助同工酶技术对石榴不同居群近缘种内或品种间比较,进行遗传多样性分析,探讨其种间分类问题及品种间的相互关系,为形态分类提供佐证,具有深远意义^[9]。近几年有关石榴生化标记的研究多集中在同工酶标记上。同工酶标记结果不受环境因素影响,稳定可靠,但可选择的同工酶种类少且其表达存在阶段特异性和器官特异性等局限^[11]。

熊红等^[12]对石榴9个品种用5种同工酶进行酶谱测定,结果仅酯酶同工酶测出10个谱带。根据酯酶同工酶将所测9个品种分为5类,并且提出了传统意义上用果皮色泽进行品种分类存在一定的局限性。丁之恩等^[13]采用常规方法、定性分析与对比实验及在前2种方法基础上的改良方法,对石榴同工酶进行试验研究。结果表明,通过制作丙酮粉将叶片中酶提纯和浓缩后,石榴不同品种的谱带清晰、分辨率大大提高,品种间差别显著,芽变品种和其母本也能容易区分。徐迎碧等^[14]采用聚丙烯酰胺垂直平板不连续凝胶电泳技术,对安徽怀远4个石榴品种的过氧化物酶(POD)同工酶和酯酶(EST)同工酶进行了酶谱测定。研究表明:芽变新品种的白玉和其母本谱带极为相似,但稍有差异,说明两者亲缘关系极近,变异后遗传物质确实改变;玉石籽与大笨子的亲缘关系较为接近。并提出单纯利用一两种同工酶的相似度来判断物种的亲缘关系是不全面的,应由多种同工酶分析来相互印证。何和明^[15]对栽培于同一生境的6个石榴居群同一生长期叶片中酯酶(EST)同工酶酶谱进行了比较分析。结果表明:EST同工酶酶谱在各居群间,甚至在同一居群内除少数共有的特征谱带外,其余的存在较明显的频率差异。

4 分子标记研究

目前,石榴的品种和种下分类相当混乱,分类标准尚未统一^[16]。长期以来人们以外观、风味、籽粒色泽等作为分门类别依据,名称混乱,给品种资源的收集、整理、分类及综合利用带来不便,各石榴产区品种名称很不统一,有不少同物异名或同名异物,这就势必制约与影响石榴食、药用质量的稳定性^[16-17]。近几年,随着分子生物学的飞速发展,检测DNA分子多态性的技术得到了不断发展和完善,把种质资源的研究提高到一个新水平,分子标记推动的遗传分析也已经成为研究复杂性状遗传的强有力工具^[18-21]。

4.1 基因组DNA提取方法的研究

提取高质量的DNA是有效开展分子生物学研究的前提。多糖污染是木本植物DNA提取中最常遇

到的问题^[22]。由于石榴含有多糖和酚类物质,在DNA提取过程中这些物质包围着DNA,干扰DNA的絮状结构,明显的加大了DNA提取难度^[23]。有关石榴DNA的提取方法研究目前报道较多。

张明水^[24]以石榴不同品系的成熟叶片和幼叶为材料,采用SDS法提取基因组DNA,试验表明,用幼叶能提取高质量的基因组DNA, $A_{260}/A_{280}=1.88$,可直接用于RAPD分析。而成熟叶片由于酚类、丹宁、色素和多糖等物质的含量较高,对Taq酶的活性起抑制作用,不能直接用于RAPD。巩雪梅^[25]用改良CTAB法成功的提取出了石榴成熟叶片的基因组DNA,试验发现在幼嫩的红色叶片中提取DNA时,由于有红色素的影响,提取的DNA颜色微红,但是采用转绿的幼叶能获得较好的基因组DNA。杨荣萍等^[23]比较了SDS-CTAB微量提取法和改进的SDS微量提取法提取的石榴叶片DNA质量,结果认为两种方法提取的DNA均可用于RAPD分析。陈延惠等^[26]以4个石榴品种为实验材料,用SDS I、SDS II、CTAB I、CTAB II 4种方法提取石榴叶片DNA。综合考虑,CTAB I法是提取石榴叶片DNA的最佳方法。张四普^[27]对石榴叶片DNA的提取方法进行了研究。结果发现,和大田叶片相比,扦插枝条叶片DNA的提取效果较好;SDS法和CATB法相比,SDS法尽管得率较高,但OD值低,无法进行下游的操作。而改良CATB法,是理想的提取石榴叶片DNA的方法。

综上所述,目前应以绿色扦插幼叶为材料,采用CTAB I法提取的石榴叶片DNA的效果最佳。

4.2 DNA标记技术的研究

分子标记是以DNA分子多态性为基础的遗传标记,其作用是在生物的基因组内或各染色体上提供基因的准确位置,为研究基因的结构、序列、功能及其遗传和变异规律提供基础资料。由于石榴分子标记的研究起步较晚,目前,广泛应用于石榴研究领域中的分子标记技术主要有随机引物扩增DNA多态性标记、限制性酶切片段长度多态性标记、简单重复序列间扩增等。

4.2.1 随机引物扩增DNA多态性标记的应用 RAPD即随机扩增多态性(Random amplified polymorphic),以基因组DNA为模板,单个人工合成的随机多态核苷酸序列(通常为10个碱基对)为引物,通过PCR扩增产生不同大小的DNA片段,用于检测DNA的多态性。

目前对石榴品种分子鉴定的研究多基于此类技术。Messaoud等^[28]采取主成分分析和UPGMA聚类

分析研究了突尼斯的11个石榴品种30个样本,结果表明果实大小、果皮色、果汁成分中,pH是品种主要鉴别依据,同时对影响石榴品种资源的多样性因素进行了讨论。巩雪梅^[25]将50个石榴品种(系)划为11类,对石榴变种的划分提出了新的见解:认为粉红花白边重瓣石榴、小青皮、四川会理软籽石榴、山东的大红袍等品种可定为新的变种,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,青粉皮和粉皮也可以单独划分为一个新的变种。并用多态性较好的32个引物进行扩增,得到了50个石榴品种(系)的指纹图谱,并找到了16个品种(系)独有的特异性谱带。杨荣萍等^[29]利用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。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。卢龙斗等^[30]以55个石榴栽培品种为试验材料,利用RAPD分析,将55个石榴品种分为4个类群。结果表明:采用UPGMA法聚类的结果与形态上的分类存在着一定的差异,即与根据花色和果味进行的分类没有相关性而与瓣型进行的分类有一定的相关性。

由上可见,分子标记与形态分类不完全一致,依据形态分类有一定的局限性。形态容易受到环境以及长期引种、杂交、芽变等的影响,而分子标记从遗传物质上进行研究,不易受到环境的影响。

4.2.2 扩增片段长度多态性标记的应用 扩增片段长度多态性标记(Amplified fragment length polymorphism),简称AFLP。AFLP多态性很强,适用于分析基因组较大的材料,利用放射性标记在变性的聚丙烯酰胺凝胶上可以检测到100~150个扩增产物,被认为是指纹图谱技术中多态性最丰富的一项技术,因而非常适合绘制品种的指纹图谱和分类研究。

苑兆和等^[31]利用从64对EcoRI/MseI引物中筛选出的8对引物,对山东省25个石榴品种进行AFLP-PCR分析,利用UPGMA法进行聚类。根据AFLP结果,在相似性系数为0.786处将山东省的25个石榴品种聚为4大类,同时探讨了山东石榴品种的亲缘关系与新品种选育的前景。李丹^[32]选出23对多态性好、谱带清晰的引物,分别对15个类型71个供试石榴材料的基因组DNA进行AFLP遗传多样性和聚类分析,据系统聚类图可将所有品种分为3大类,该结果与传统的形态分类结论存在一定差异。

4.2.3 简单重复序列间扩增 简单重复序列间扩增(Intersimple sequence repeats),简称ISSR。用于ISSR-PCR扩增的引物通常为16~18个碱基序列,由

1~4个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,通过PCR扩增SSR之间的DNA片段。ISSR技术重复性高于RAPD,成本低于AFLP。近年来,在果树研究上发展较快,但在石榴上报道鲜少。洪明伟等^[31]以酸绿石榴为材料,对ISSR反应体系中的各个主要影响因子进行优化筛选,首次建立了石榴ISSR反应体系,为进一步研究石榴遗传多样性、遗传图谱绘制、品种鉴定及数量性状基因定位(QTL)等方面的研究奠定了基础。

5 问题与展望

在遗传多样性方面,虽然已有学者开始进行生理生化及分子标记水平上的研究工作,但大部分仍根据形态学进行分类、鉴定,局限性大,亲缘关系定位不明确。在育种方面,目前仍以扦插、嫁接等传统手段为主进行品种改良,种质资源的保存不够完善。基因定位、分子标记辅助育种等有相关研究文献报道较少。在分子标记方面,RAPD技术的报道最多,然而RAPD标记本身并不稳定。由于缺乏石榴遗传背景知识及本身遗传特点限制,遗传图谱构建工作难度较大,部分工作多集中于早期阶段。

鉴于以上问题,石榴遗传标记研究应借助高速发展的AFLP、SSR、SCRA等分子标记技术,进一步确定品种间亲缘关系、构建遗传图谱,为建立石榴种质资源基因库,不断繁育出适合中国栽培、经济性状好的优良品种打下坚实的基础。

随着分子标记的广泛应用、分子生物学及相关学科理论与技术的不断发展,遗传标记将在石榴种植资源保存、亲缘关系鉴定、遗传多样性、指纹图谱构建、辅助育种等方面发挥越来越重要的作用,极大地提高育种的目地性、精确性,缩短育种周期。

参考文献

- [1] 曲泽洲,孙云蔚.果树种类论[M].北京:农业出版社,1990:139-143.
- [2] 冯玉增,梅亭.石榴生产现状与发展建议[J].林业科技开发,2000,14(5):6-9.
- [3] 杨玉珍,彭方仁.遗传标记及其在林木研究中的应用[J].生物技术通讯,2006,17(5):788-791.
- [4] 张建成,屈红征,张晓伟,等.中国石榴的研究进展[J].河北林果研究,2005,20(3):265-267.
- [5] 汪小飞,向其柏,尤传楷,等.石榴品种分类研究[J].南京林业大学学报:自然科学版,2006,30(4):81-84.
- [6] 赵先贵,肖玲.中国石榴科花粉形态的研究[J].西北植物学报,1996,16(1):52-55.
- [7] 徐迎碧,丁之恩,姚玉敏,等.4个石榴品种的染色体核型分析[J].经济林研究,2008,26(1):47-52.
- [8] Stebbins G L. Chromosome Evolution in Higher Plants[M]. London: Edward Aronld,1971:88.
- [9] 吴少伯.植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J].植物生理学通讯,1979,(1):30-33.
- [10] 雷泞菲,苏智先,陈劲松.同工酶技术在植物研究中的应用^①[J].四川师范学院学报:自然科学版,2000,21(4):321-325.
- [11] Tanksley SD, Oroton J. Isozyme in plant genetic and breeding [M]. Amsterclam: Elserior,1983.
- [12] 熊红,张旭东,彭世逞.石榴品种酯酶(Est酶)同工酶分析[J].西昌高等师范专科学校学报,2001(3):25-26.
- [13] 丁之恩,徐迎碧,周先锋,等.石榴中同工酶的研究的方法[J].经济林研究,2004,(4):35-38.
- [14] 徐迎碧,周先锋,殷彪,等.4种不同石榴品种同工酶分析[J].防护林科技,2006,71(2):17-19.
- [15] 何和明.石榴种内不同居群酯酶(EST)同工酶谱特征分析[J].海南师范学院学报:自然科学版,2006,19(3):269-271.
- [16] 杨荣萍,李文祥,武绍波,等.石榴种质资源研究概况[J].福建果树,2004,129(2):16-19.
- [17] 汪小飞,向其柏,尤传楷,等.石榴品种分类研究进展[J].果树学报,2007,24(1):94-97.
- [18] 兰彦平,顾万春.生物分子标记在林木种质资源研究中的应用[J].世界林业研究,2003,16(2):12-15.
- [19] 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J].中国农业科学,1995,29(2):1-10.
- [20] 甘四明,施季森,白嘉雨,等.林木分子标记研究进展[J].林业科学研究,1998,11(4):428-434.
- [21] 陈少瑜.分子标记及其在林木种质资源和遗传育种研究中的应用[J].云南林业科技,2002,101(4):63-70.
- [22] 程运江,伊华林,庞晓明,等.几种木本果树DNA的有效提取[J].华中农业大学学报,2001,20(5):481-483.
- [23] 杨荣萍,李文祥,龙文红,等.石榴DNA提取方法的比较及抗氧化剂对DNA质量的影响[J].云南农业大学学报,2005,20(5):624-626.
- [24] 张明水.石榴品种(系)选育和再生体系建立及RAPD条件优选[D].安徽合肥:安徽农业大学,2003:27-29.
- [25] 巩雪梅.石榴品种资源遗传变异分子标记研究[D].安徽合肥:安徽农业大学,2004:12-13.
- [26] 陈延惠,张四普,胡青霞,等.不同方法对石榴叶片DNA提取效果的影响[J].河南农业大学学报,2005,39(2):182-186.
- [27] 张四普.石榴优异资源的调查、收集和RAPD鉴定方法的研究[D].安徽合肥:安徽农业大学,2005:26-27.
- [28] Messaoud M, Mohamed M. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.)germplasm in Tunisia[J].Genetic Resources and Crop Evolution,1999,46:461-467.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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分析[J].园艺学报,2008,35(1):107-112.
- [32] 李丹.石榴优良品系筛选及遗传多样性分析[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2008:46-48.
- [33] 洪明伟,杨荣萍,李文祥.石榴ISSR-PCR反应体系的优化研究[J].云南农业大学学报,2008,20(3):15-18.