果 树 学 报 2026,43(3):547-558
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250317

山东石榴种质资源遗传多样性分析与DNA指纹图谱构建

吴志苹[1],杨 阳[1],罗 华[2],马 丽[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:【目的】探究山东石榴种质资源的遗传多样性并构建DNA指纹图谱,为科学分类、品种鉴定及遗传改良提供理论依据。**【方法】**以76份石榴种质资源为材料,用16个ISSR引物进行PCR扩增,采用UPGMA法构建聚类图,利用PopGene软件分析遗传多样性,分析引物的区分效率并构建DNA指纹图谱。**【结果】**16个引物共扩增305个位点,其中多态性比率为88.2%;平均等位基因数(*Na*)为1.980 7,有效等位基因数(*Ne*)为1.651 7,Nei's基因多样性(*He*)为0.370 4,Shannon信息指数(*I*)为0.545 1,表明山东石榴遗传多样性较丰富;聚类结果将76份种质聚为4类;利用引物组合UBC834/UBC835成功构建了76份种质的DNA指纹图谱。**【结论】**本研究构建的DNA指纹图谱具有品种特异性,可为石榴种质的分类、鉴定及新品种选育提供科学依据。

关键词:石榴;ISSR分子标记;遗传多样性;DNA指纹图谱

中图分类号:S665.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)03-0547-12

Genetic diversity analysis and construction of DNA fingerprint for pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm resources in Shandong Province

WU Zhiping[1], YANG Yang[1], LUO Hua[2], MA Li[1*]

([1]College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, Shandong, China; [2]Pomegranate Research Center, Zaozhuang 277300, Shandong, China)

Abstract:【Objective】Pomegranate (*Punica granatum* L.), distinguished by its exceptional environmental adaptability and extensive cultivation history in China, has emerged as a globally significant economic tree crop. As a primary pomegranate production region within China, Shandong Province faces substantial challenges in germplasm resource management. Being predominantly cross-pollinated, cultivated pomegranates in the region exhibit considerable genetic complexity arising from spontaneous somatic mutations, introductions of germplasm from diverse geographical sources, and extensive varietal exchange. Consequently, this has resulted in pronounced varietal disorganization, ambiguous genetic relationships, and significant lineage confusion, collectively impeding the efficient conservation and utilization of pomegranate germplasm resources. Furthermore, accelerated commercial breeding programs have exacerbated genetic homogenization, rendering conventional morphological identification methods inadequate for precise varietal discrimination and classification. This critical limitation severely constrains the development of elite cultivars and hinders the sustainable advancement of the pomegranate industry. To address these challenges, this study employed Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers to investigate the genetic diversity and elucidate the genetic relationships among 76 distinct pomegranate germplasm accessions native to Shandong Province. The primary objective was to construct a robust DNA fingerprinting system, providing scientific foundation for enhancing germplasm

收稿日期:2025-06-19 **接受日期:**2025-09-02

基金项目:枣庄学院博士科研基金(1020740)

作者简介:吴志苹,女,博士,研究方向为分子生物学。E-mail:wuzhiping288@163.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:mary1976816@163.com

preservation, formulating efficient breeding strategies, and achieving precise molecular identification of pomegranate genetic resources.【Methods】Experimental materials comprised 76 authenticated pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm accessions systematically curated from the China Pomegranate Germplasm Resources Nursery located in Zaozhuang City, Shandong Province. Genomic DNA was extracted from fresh young leaf tissue using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol. Sixteen ISSR primers with clear amplification bands and high polymorphism were selected for PCR amplification of 76 pomegranate germplasm accessions. PopGene software was used to calculate: Mean number of observed alleles per locus (Na), Effective number of alleles per locus (Ne), Nei's unbiased gene diversity index (He), and Shannon's information index (I) for population genetic diversity analysis. The genetic similarity coefficient (*GS*) was calculated using NTSYS clustering software. The genetic relationships between pomegranate germplasm accessions were analyzed by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA). Based on the UPGMA clustering results, the discrimination efficiency of a single primer or primer combinations for germplasm accessions was evaluated. Primers/combinations capable of distinguishing all accessions were selected to construct DNA fingerprints for the germplasm accessions.【Results】A total of 305 loci were detected in 76 accessions using 16 primers, of which 269 were polymorphic loci, with a primer polymorphism ratio of 88.2%. This indicated that the 16 primers exhibited good polymorphism. The results of genetic diversity analysis showed that mean number of observed alleles per locus (*Na*) was 1.980 7, effective number of alleles per locus (*Ne*) was 1.651 7, Nei's unbiased gene diversity index (*He*) was 0.370 4, and Shannon's information index (*I*) was 0.545 1. These metrics collectively demonstrated that moderate to high genetic diversity existed within the sampled Shandong germplasm. UPGMA cluster analysis based on genetic similarity coefficients (GS range: 0.49 to 0.98) clustered all 76 accessions into a hierarchical dendrogram. At a GS threshold of 0.688, four distinct genetic clusters emerged: Group Ⅰ (*n*=40): Encompassed accessions with extensive morphological variation, including red/pink flowers, single/double petals, and both ornamental/edible fruit types. Group Ⅱ (*n*=27): Contained varieties exhibiting diverse pericarp colors and floral characteristics. Group Ⅲ (*n*=2): Comprised morphologically distinct accessions. Group Ⅳ (*n*=7): Included varieties with heterogeneous phenotypic traits. Critically, the molecular classification exhibited incongruence with prior morphological taxonomy across all groups. Accessions in Groups Ⅲ and Ⅳ showed the greatest genetic divergence, making them prime candidates for hybrid breeding programs to exploit heterosis and introgress novel genetic variation. Notably, 67 accessions (88.16% of the collection) coalesced into a single cluster at *GS*=0.678, indicating constrained genetic diversity within the dominant Shandong germplasm. This finding necessitates strategic introduction of genetically distant elite germplasm to broaden the genetic base for sustained breeding progress. According to the UPGMA clustering results, the variety discrimination efficiency of a single primer was 15.78% to 85.52%. No single primer distinguished all 76 accessions, necessitating combinatorial screening. The primer pair UBC834/UBC835 achieved 97.37% discrimination efficiency, generating unique banding profiles for 74 accessions. Only cultivars No. 75 (Hydrangea Peony) and No. 76 (Purple Skin Sweet) shared identical fragment patterns, suggesting either recent divergence or clonal relationship. Consequently, a comprehensive DNA fingerprinting system was established using polymorphic markers from the UBC834/UBC835 combination, enabling unambiguous molecular identification of 74 accessions.【Conclusion】The 16 ISSR primers used in this study were able to successfully analyze the genetic variation of pomegranate germplasm resources. The genetic diversity of the pomegranate population in Shandong Province was relatively rich, and the ISSR classification results were not consistent with tra-

ditional morphological classification. The DNA fingerprints system of 74 accessions established in this study exhibited cultivar-specific characteristics, offering a scientific basis for the scientific classification, precise identification, and breeding of new pomegranate cultivars of pomegranate germplasm resources.

Key words: Pomegranate; ISSR molecular marker; Genetic diversity; DNA fingerprint

石榴（*Punica granatum* L.）为千屈菜科（Lythraceae）石榴属（*Punica* L.）落叶灌木或小乔木[1]，是世界上重要的经济林树种之一。果实富含维生素C等多种营养成分，具有抗氧化、抗炎、抗癌和预防心血管疾病等重要功能[2]。石榴在中国栽培历史悠久，2023年全国的栽培面积11万hm^2，年产量200万t[3]。山东省是全国石榴主产区之一，目前栽培面积达1万hm^2，年产量10万t，石榴种植是农民增收致富的重要产业[4]。石榴为异花授粉果树，由于栽培过程中自发突变、不同地域间的引种、品种交换等造成亲缘关系模糊，谱系混乱现象突显，严重影响了种质资源的高效利用。传统上对石榴种质间的遗传关系、品种鉴定经常依据花色、瓣型、果色等表型性状，但这些性状极易受环境影响，导致结果不准确。市场上“假树苗”以次充好现象层出不穷，造成新品种权得不到保护，极大地影响了育种单位的积极性和果农的经济利益。随着商业化育种进程加速，石榴种质资源同质化现象加剧，传统形态学鉴定方法难以满足精准分类需求，分子标记技术的发展为解决这类问题提供了新途径。

采用DNA标记技术鉴定石榴种质能从分子水平解析种质间的遗传差异，比形态学、细胞学更准确[5-7]。目前，多种分子标记已应用于研究石榴种质资源的遗传关系分析，其中RAPD标记使用最广泛但不稳定。因此，AFLP、SSR等分子标记更多地应用于石榴属植物间的遗传关系研究[8]。基于SSR技术建立的ISSR分子标记无需预知物种基因组信息，多态性高、重复性好、成本较低，在植物遗传多样性、品种鉴定、遗传图谱构建等研究中应用广泛，目前已用于樱桃[9]、枇杷[10]、番石榴[11]、桃[12]、匙羹藤[13]等植物种质资源的研究。然而，目前大多数研究多聚焦于局部种质资源，缺乏系统性分析。本研究采用ISSR技术，系统分析山东产区石榴种质资源的遗传多样性、亲缘关系并构建指纹图谱数据库，为石榴的科学分类、品种鉴定和遗传改良提供理论基础和科学依据，对今后优异种质的挖掘及高效利用具有重要意义。

1　材料和方法

1.1　材料来源

供试76份山东石榴种质资源均来自中国石榴种质资源圃（位于山东省枣庄市），石榴种质资源信息见表1。

1.2　DNA提取及ISSR-PCR扩增检测

石榴嫩叶基因组DNA提取、ISSR-PCR扩增条件及检测参考朱薇等[14]的方法。

1.3　数据分析

以DL2000 DNA Marker（天根生化科技有限公

表1　76份石榴种质资源信息

Table 1　Information on 76 pomegranate germplasm accessions

编号 Code	名称 Name	花色 Flower color	瓣型 Petal shape	果色 Pericarp color	籽粒性状 Seed character
1	峄城实生石榴 Yicheng Seedling Pomegranate	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
2	峄城青皮月季 Yicheng Cyan-skinned Rose	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
3	峄城重瓣粉红月季 Yicheng Double Petal Pink Rose	粉红 Pink	重 Double petal	青 Cyan	硬 Hard
4	峄城大果红皮月季 Yicheng Large-fruit Red-skinned Rose	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
5	峄城小叶2号 Yicheng Small-leaf No.2	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
6	峄城小叶3号 Yicheng Small-leaf No.3	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard

表 1 （续） Table 1 (Continued)

编号 Code	名称 Name	花色 Flower color	瓣型 Petal shape	果色 Pericarp color	籽粒性状 Seed character
7	峄城小籽三白 Yicheng Small-seed Sanbai	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
8	峄城大个红皮 Yicheng Big Pomegranate Red-skinned	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
9	峄城小叶红皮 Yicheng Small-leaf Red-skinned	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
10	峄城大叶 Yicheng Large-leaf	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
11	峄城红籽白石榴 Yicheng Red-seed White Pomegranate	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
12	峄城红皮月季 Yicheng Red-skinned Rose	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
13	峄城发芽红 Yicheng Sprouting Red	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
14	峄城白皮酸 Yicheng White-skinned Sour	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
15	峄城单瓣粉红白皮酸 Yicheng Single Petal Pink White-skinned Sour	粉红 Pink	单 Single petal	白 White	硬 Hard
16	峄城单瓣玛瑙 Yicheng Single Petal Agate	复色 Multiple	单 Single petal	乳白 Milky white	硬 Hard
17	峄城红牡丹石榴 Yicheng Red Peony Pomegranate	红 Red	复 Multiple petal	红 Red	硬 Hard
18	峄城重瓣白皮酸 Yicheng Double Petal White-skinned Sour	白 White	复 Multiple petal	白 White	硬 Hard
19	峄城小红牡丹 Yicheng Small Red Peony	红 Red	重 Double petal	红 Red	硬 Hard
20	峄城抗寒砧木1号 Yicheng Cold-resistant Rootstock No.1	红 Red	重 Double petal	红 Red	硬 Hard
21	峄城竹叶青 Yicheng Bamboo-leaf Cyan	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
22	峄城重瓣白花酸 Yicheng Double Petal White Flower Sour	白 White	复 Multiple petal	白 White	硬 Hard
23	峄城超红 Yicheng Ultra Red	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
24	峄城青皮大籽 Yicheng Cyan-skinned Large-seed	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
25	峄城白楼无刺 Yicheng Bailou Thornless	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
26	峄城和顺庄无刺 Yicheng Heshunzhuang Thornless	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
27	峄城紫粒青皮甜 Yicheng Purple-seed Cyan-skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
28	峄城超青 Yicheng Ultra Cyan	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
29	峄城超大白皮甜 Yicheng Extra-large White-skinned Sweet	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
30	峄红1号 Yihong No.1	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
31	峄城重瓣红皮酸 Yicheng Double Petal Red-skinned Sour	红 Red	重 Double petal	红 Red	硬 Hard
32	峄城大粒青皮岗榴 Yicheng Large-seed Cyan-skinned Gangliu	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
33	峄城峄青 Yicheng Yiqing	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
34	峄城单瓣粉红酸 Yicheng Single Petal Pink Sour	粉红 Pink	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard

表1 （续） Table 1 (Continued)

编号 Code	名称 Name	花色 Flower color	瓣型 Petal shape	果色 Pericarp color	籽粒性状 Seed character
35	峄城红花重瓣紫皮酸 Yicheng Red Flower Double Petal Purple-skinned Sour	红 Red	重 Double petal	紫 Purple	硬 Hard
36	峄城青皮大籽 Yicheng Cyan-skinned Large-seed	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
37	峄城红花重瓣青皮酸 Yicheng Red-flower Double Petal Cyan-skinned Sour	红 Red	重 Double petal	青 Cyan	硬 Hard
38	峄城粉红重瓣白皮甜 Yicheng Pink Double Petal White-skinned Sweet	粉红 Pink	重 Double petal	白 White	硬 Hard
39	峄城青皮谢花甜 Yicheng Cyan-skinned Xiehuatian	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
40	峄城半口青皮谢花甜 Yicheng Bankou Cyan-skinned Xiehuatian	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
41	峄城大红皮甜 Yicheng Large Red-skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
42	峄城白皮大籽 Yicheng White-skinned Large-seed	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
43	峄城胭脂红 Yicheng Rouge Red	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
44	峄城超大青皮甜 Yicheng Extra-large Cyan-skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
45	峄城白皮马牙甜 Yicheng White-skinned Mayatian	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
46	峄城败育石榴 Yicheng Abortion Pomegranate	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
47	峄城玛瑙石榴 Yicheng Agate Pomegranate	复色 Multiple	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
48	峄城半口青皮酸 Yicheng Half Cyan-skinned Sour	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
49	峄城红皮马牙甜 Yicheng Red-skinned Mayatian	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
50	峄城多刺 Yicheng Thorny	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
51	峄城青厚皮 Yicheng Thick Cyan-skinned	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
52	峄城大红皮酸 Yicheng Large Red-skinned Sour	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
53	峄城大青皮酸 Yicheng Large Cyan-skinned Sour	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
54	峄城厚皮甜 Yicheng Thick-skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
55	宁津单瓣玛瑙 Ningjin Single Petal Agate	复色 Multiple	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
56	宁津红皮酸 Ningjin Red-skinned Sour	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
57	泰山红牡丹 Taishan Red Peony	红 Red	重 Double petal	红 Red	硬 Hard
58	白珍珠 White Pearl	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
59	潍坊青皮 Weifang Cyan-Skinned	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
60	蒙阳红直立 Mengyang Red Upright	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
61	墨石榴 Ink Pomegranate	红 Red	单 Single petal	紫 Purple	硬 Hard
62	月季石榴 Rose Pomegranate	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard

表1（续） Table 1 (Continued)

编号 Code	名称 Name	花色 Flower color	瓣型 Petal shape	果色 Pericarp color	籽粒性状 Seed character
63	苍山红皮 Cangshan Red-skinned	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
64	山东大叶红皮 Shandong Large-leaf Red-skinned	红 Red	单 Single petal	红 Red	硬 Hard
65	鲁白榴2号 Lubailiu No.2	白 White	单 Single petal	白 White	硬 Hard
66	鲁青榴3号 Luqingliu No.3	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
67	白花单瓣酸 White Flower Single Petal Sour	白 White	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
68	青皮马牙酸 Cyan-skinned Maya Sour	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
69	大马牙 Damaya	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
70	岗榴 Gangliu	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
71	秋艳 Qiuyan	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
72	黄金榴 Golden Pomegranate	白 White	单 Single petal	黄 Yellow	硬 Hard
73	日本看石榴 Japanese Ornamental Pomegranate	红 Red	重 Double petal	红 Red	硬 Hard
74	候孟青皮甜 Houmeng Cyan-skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	青 Cyan	硬 Hard
75	绣球牡丹 Hydrangea Peony	红 Red	复 Multiple petal	青 Cyan	硬 Hard
76	紫皮甜 Purple-Skinned Sweet	红 Red	单 Single petal	紫 Purple	硬 Hard

司，北京）的谱带分子质量为参考标准，用Quantity One软件结合肉眼观察获得扩增DNA谱带分子质量，根据谱带在凝胶同一迁移率位置上的有无，按照有扩增谱带记为“1”，无扩增谱带记为“0”的统计标准，形成每条引物标记的（0，1）数据原始矩阵。统计并计算引物多态性百分比率。引物多态性比率=a/（a+b）×100%，a为多态条带数目，b为所有品种共享数目。用PopGene软件统计遗传多样性参数。用NTSYS2.10软件计算遗传相似系数（*GS*），用UPGMA法绘制遗传关系图。通过聚类分析单引物或引物组合对供试品种的区分效率，品种区分率高的引物用于构建DNA指纹。

2 结果与分析

2.1 ISSR引物扩增结果分析

部分ISSR引物扩增PAGE电泳图如图1所示，供试品种扩增谱带清晰，产生的位点迁移率各异，多态性较好。由表2可知，16个引物所得位点数为14~25个，每条引物平均产生位点19个，多态性位点16.8个，引物多态性比率为70.6%~95.4%。引物UBC834扩增出来的位点最多，多态性比率较好，为92.0%。引物UBC827的多态性位点比率最高，为95.4%。引物平均多态性比率为88.2%，说明这16个引物适合山东石榴种质资源遗传多样性研究。

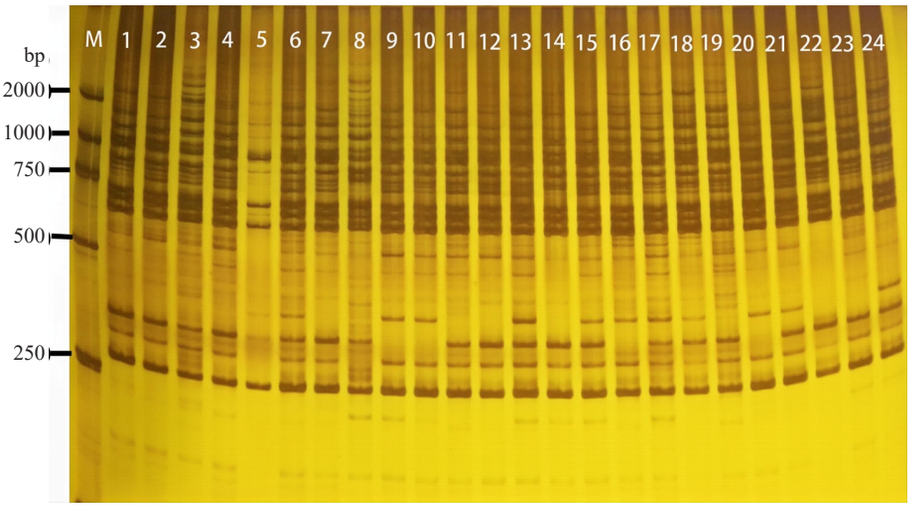
2.2 单引物的区分效率

统计每个引物对76份种质的区分效率，结果如表2所示：单引物的区分效率为10.53%~85.53%；引物UBC835的区分率最高，为85.53%，但仍有11份种质不能区分开。因此，单引物对76份种质的区分能力较差，需要筛选种质区分率较高的引物组合构建DNA指纹图谱。

2.3 核心引物组合的区分效率

将区分效率较高的引物UBC827、UBC834、UBC835、UBC841和UBC842进行两两组合，分析10组引物对76份种质的区分效率（表3）。

从表3可知，10组引物组合的区分效率均高于单引物，区分效率为88.16%~97.37%，其中引物组合UBC834/UBC835的区分效率为97.37%，仅不能区



M. DL 2000 marker；图中数字编号与表 1 的编号相同。

M. DL 2000 marker; The number codes in the figure are the same as those in Table 1.

图 1　引物 UBC835 对部分石榴种质的扩增结果

Fig. 1　Amplification results of primer UBC835 for some pomegranate germplasm accessions

表 2　ISSR 引物信息、扩增结果及品种区分效率

Table 2　ISSR primers information, amplification results and cluster discrimination rate

引物名称 Primer name	引物序列 (5′ to 3′) Primer sequence (5′ to 3′)	退火温度 Ta/℃	谱带数 Number of bands	多态性谱带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Percentage of polymorphic bands, PPB/%	聚类区分率 Cluster discrimination rate/%
UBC834	$(AG)_8YT$	55	25	23	92.0	77.63
UBC808	$(AG)_8C$	52	17	16	94.1	19.70
UBC809	$(AG)_8G$	52	22	20	90.9	31.58
UBC841	$(GA)_8YC$	52	24	20	83.3	76.32
UBC890	$HVH(TG)_7$	52	15	13	86.7	34.21
UBC811	$(GA)_8C$	50	14	12	85.7	34.21
UBC842	$(GA)_8YG$	52	23	19	82.6	68.42
UBC816	$(CA)_8T$	50	17	16	94.1	36.84
UBC835	$(AG)_8YC$	52	23	20	86.9	85.53
UBC827	$(AC)_8G$	50	22	21	95.4	72.37
UBC861	$(ACC)_6$	50	15	14	93.3	34.21
UBC880	$(GGAGA)_3$	50	18	15	83.3	10.53
UBC840	$(GA)_8YT$	50	20	18	90.0	32.89
UBC826	$(AC)_8C$	52	17	12	70.6	30.26
UBC888	$BDB(CA)_7$	52	16	15	93.7	15.78
UBC810	$(GA)_8T$	52	17	15	88.2	31.58
总计 Total			305	269	–	
平均 Average			19	16.8	88.2	

分 75 号和 76 号种质（图 2），其原因可能是这两份种质的遗传背景差异较小，本研究中所用引物难以鉴别。根据 DNA 指纹构建的原则，选取引物组合 UBC834/UBC835 构建 76 份种质的 DNA 指纹图谱（图 2）。除第 75 号和第 76 号外，其他 74 份种质的 DNA 指纹图谱均不同，能够被高效准确地鉴定。

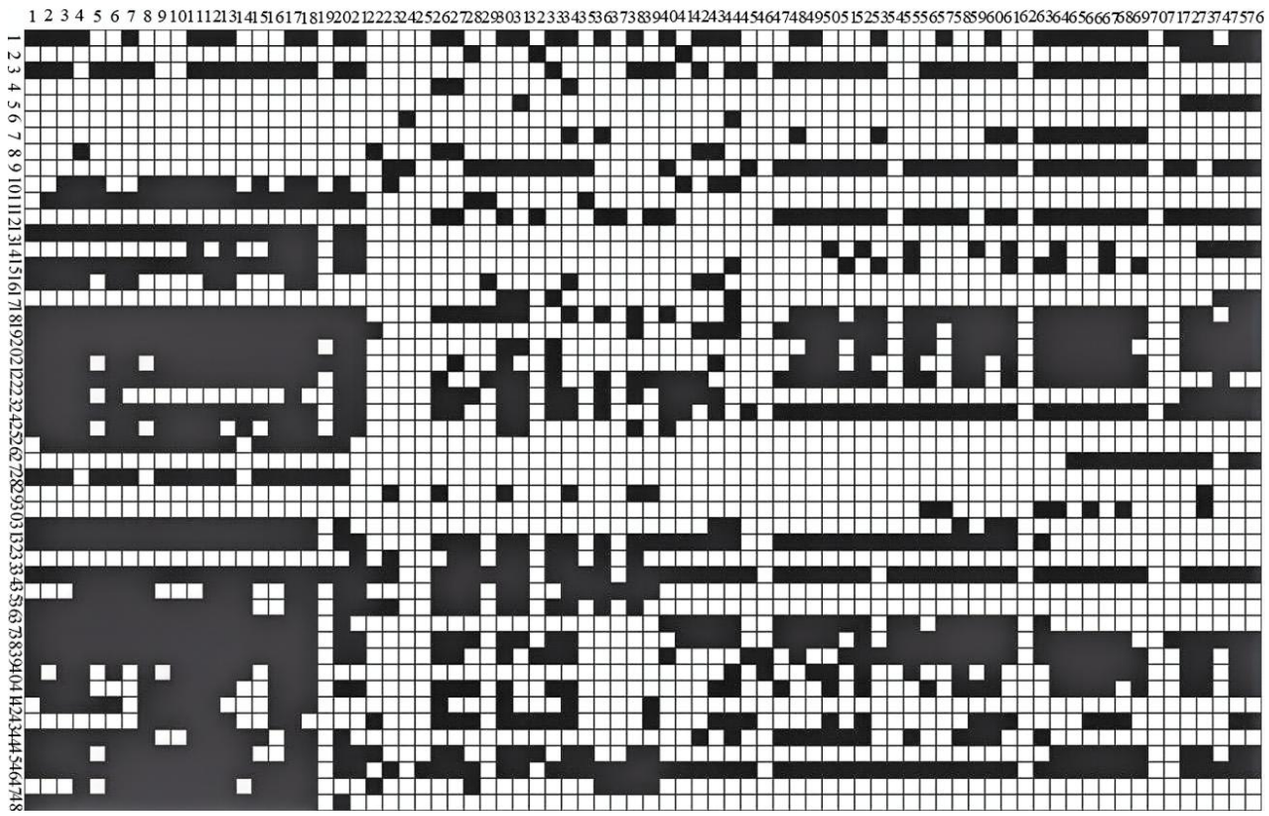
2.4　山东石榴种质资源的遗传多样性与遗传关系分析

76 份种质资源遗传多样性参数分析表明，*Na* 为 1.980 7，*Ne* 为 1.651 7，*He* 为 0.370 4，*I* 为 0.545 1，这表明山东石榴种质资源遗传多样性比较丰富。利用 NTSYS2.10 软件进行遗传关系聚类，结果表明遗传

表3 10组引物组合对76份种质的品种区分效率

Table 3 The discrimination rate for 76 accessions of 10 primer combinations

引物组合 Primer combination	谱带数 Number of bands	多态谱带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 PPB/%	最大遗传相似性系数 Maximum *GS*	聚类区分效率 Cluster discrimination rate/%
UBC834/ UBC841	49	43	87.7	1.00	90.79
UBC834/ UBC842	48	42	87.5	1.00	90.79
UBC834/UBC835	48	43	89.6	1.00	97.37
UBC834/UBC827	47	39	93.6	1.00	89.47
UBC841/UBC842	47	25	82.9	1.00	88.16
UBC841/UBC835	47	40	85.1	1.00	96.05
UBC841/UBC827	46	41	89.1	1.00	88.16
UBC842/UBC835	46	39	84.8	1.00	90.79
UBC842/UBC827	45	40	88.9	1.00	90.79
UBC835/UBC827	45	41	91.1	1.00	96.05



图中黑色方框代表有扩增谱带，白色方框代表无扩增谱带；行中1~76数字编号与表1相同，列中1~48数字编号代表引物组合UBC834/UBC835扩增产生的48个DNA位点。

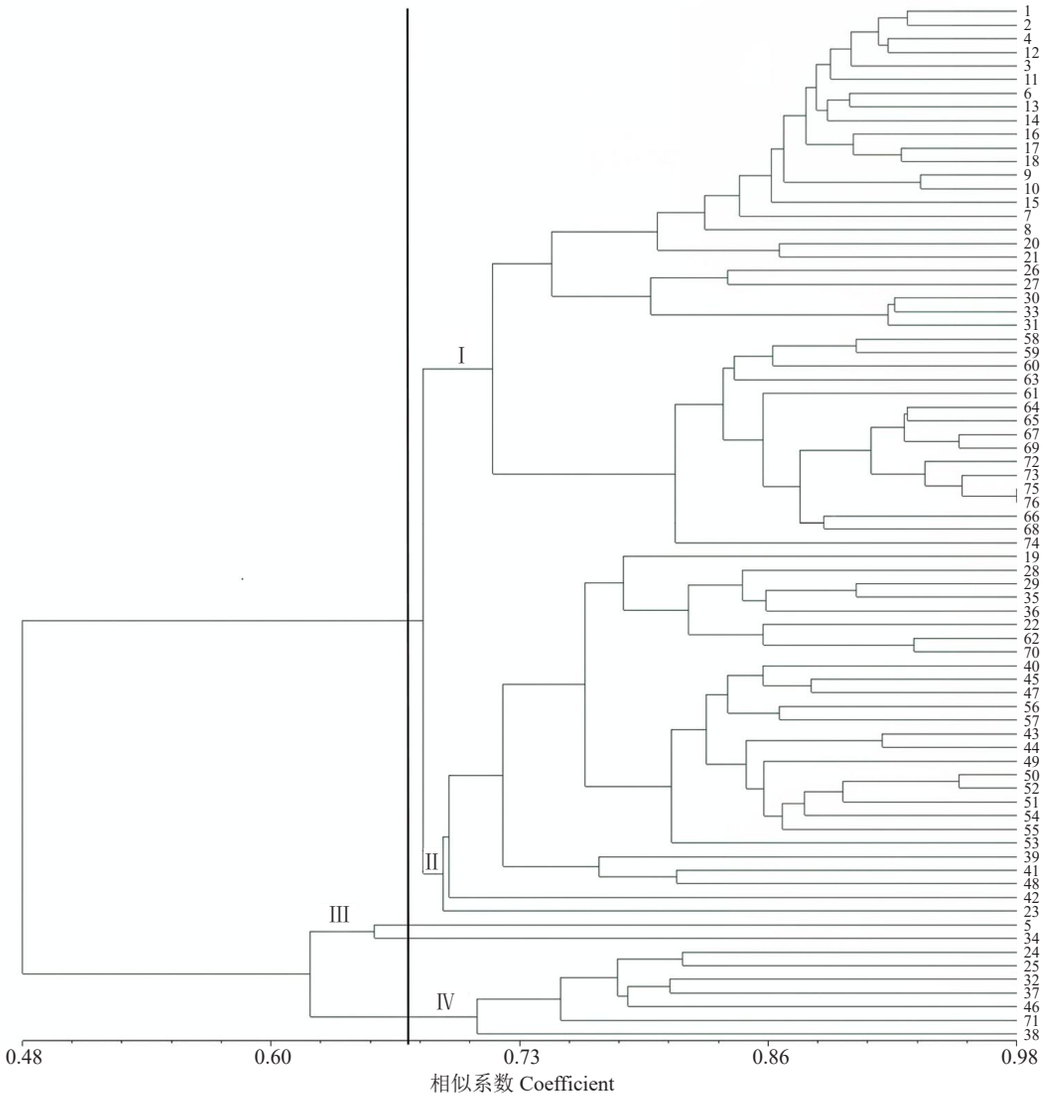
The black frames in the figure indicate the presence of amplified bands, while the white frames indicate the absence of amplified bands. The numbers 1−76 in the row are the same as in Table 1, and the 1−48 numbers in the columns indicate the 48 DNA sites from UBC834/UBC835 primers.

图2 76份石榴种质的DNA指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprints of 76 pomegranate germplasm accessions

相似系数*GS*为0.49~0.98，当*GS*阈值约为0.688时，将76份石榴种质分为4个类群。

由图3可知，第Ⅰ类群包含40份种质，该类群种质的花色有红色、粉红色，花瓣有单瓣、重瓣等，果实有观赏、食用等多种类型，分类结果与形态分类有较大差异。第Ⅱ类群有27份种质，该类群的花色、果色等形态性状也各异。第Ⅲ类群有2份种质，为峄城小叶2号和峄城单瓣粉红酸石榴。第Ⅳ类群有峄城青皮大籽、白楼无刺等7份种质，这些种质的形态性状也不尽相同。4个类群中，第Ⅲ和第Ⅳ类群的



图中种质编号与表 1 的编号相同。

The number of the accessions in the Fig. 3 is same as in Table 1.

图 3　76 份种质的 UPGMA 遗传关系聚类图

Fig. 3　UPGMA genetic relationship cluster of 76 accessions

种质与其他种质遗传距离较大，可以选为杂交育种亲本材料，利用杂交优势进行石榴种质资源的遗传改良。

ISSR 聚类结果表明同一类群中有些种质的表型性状差异较大，如峄城抗寒砧木 1 号和峄城竹叶青亲缘关系较近，但性状差异较大；绣球牡丹（75 号）和紫皮甜（76 号）虽然都属观赏类型，遗传相似系数为 0.985，遗传关系最近，但果皮颜色和瓣型都不同，表型性状差异较大。这些结果表明 ISSR 标记与形态分类结果不一致。在相似系数约为 0.678 时，第Ⅰ类和第Ⅱ类种质又聚为同一类，包含 67 份种质，占供试种质总数的 88.16%，说明这些种质的遗传关系相对较近。

3　讨　论

关于石榴遗传分析的研究方法主要包括形态学[15]和分子标记[16]。目前，用于石榴遗传多样性、遗传关系研究的 DNA 标记主要包括 RAPD、AFLP、SRAP、ISSR 等[17]，各种标记的引物多态性不尽相同。Youssef 等[18]研究表明，SRAP 标记在 11 个不同石榴品种中的引物多态性平均为 74.92%；Faraj 等[19]研究表明 ISSR 在 24 个石榴品种中呈现 79%的引物多态性；Almiahy 等[20]研究表明 ISSR 在不同石榴基因型中的引物多态性为 80.6%；Moslemi 等[5]研究表明 AFLP 在 67 个石榴品种中的多态性为 54.13%。本研究中，16 个 ISSR 引物在 76 份石榴种质中呈现

的多态位点比例为88.2%，明显高于前人文献报道的SRAP[18]、AFLP[5]和RAPD[21]的多态性，与Faraj等[19]和Almiahy等[20]的研究结果接近。ISSR标记在其他果树遗传分析中同样展现出优异的多态性特征。对西北喜马拉雅地区50份杏种质资源的遗传变异及群体结构研究显示，ISSR标记检测到83.33%~87.50%的高多态性，精准解析了杏种群的遗传结构[22]。对罗马尼亚本土苹果栽培品种进行研究，ISSR标记多态性达82.3%，可有效用于苹果品种的分子鉴定[23]。本研究中，ISSR标记在石榴中检测到88.2%的高多态性，与杏（83.33%~87.50%）[22]、苹果（82.3%）[23]等的研究结果基本一致。ISSR标记在石榴及其他果树遗传分析中均表现出稳定的高多态性，是种质资源评价的有效工具，未来可结合功能基因组学方法挖掘其在重要性状关联分析中的应用价值。

遗传多样性是评价生物多样性的参考指标之一，物种的遗传多样性越丰富，对环境变化的适应能力就越强。本研究表明山东石榴种质的*Ne*为1.370 4，*He*为0.370 4，*I*为0.545 1，*GS*为0.49~0.98，与王庆军等[24]、赵丽华等[25]研究的结果相似。76份种质中有67份种质在*GS*约为0.678时聚为一大类，表明这些山东石榴种质资源的遗传关系较近。为了石榴种质的保存与遗传改良，需要引进外地品种，或者选用遗传关系较远的优良品种（如第Ⅲ和第Ⅴ类）进行杂交等，以拓宽山东石榴种质的遗传背景、提高多样性。

形态性状分类是通过肉眼对可见性状的异同进行分类，是对基因变异的间接反映，而ISSR是基于DNA层面对基因变异的直接反映。沈进等[26]研究表明石榴品种DNA水平的聚类模式与其发源地和农艺性状无明显相关性。本研究表明ISSR聚类结果与形态学分类不一致，与沈进等[26]结论相一致。这可能是由于长期栽培的人为选育、自然杂交以及品种交换等造成石榴遗传背景比较复杂，形态学特征只是某一性状的外在表现。因此要准确解析种质资源的遗传变异，必须提升到DNA水平，这一观点在多种果树上得到验证。Bădulescu等[23]利用ISSR标记技术评估苹果栽培品种间的遗传变异，ISSR标记成功区分了形态和遗传背景极其相似的Remar和Iris品种，说明该技术能精准鉴定亲缘关系密切的个体基因型。在橄榄种质资源研究中，Raji等[27]证实25株果实性状突出的候选优质橄榄树间存在显著的个体差异，且该差异可通过ISSR标记有效鉴别，其中，CPT14不仅具有独特的形态学特征，其ISSR标记谱型也呈现明显区分度，表明ISSR标记能够精准筛选出形态相似群体中的优异种质，避免了单纯依赖形态可能存在的漏选风险。在杧果遗传多样性研究中，Rocha等[28]证实ISSR标记的遗传分类结果不受地理环境因素的干扰，有效排除了表型因环境不同所造成的形态性状变异，直接从DNA层面揭示了品种间的真实遗传关系。本研究进一步说明ISSR标记同样适用于石榴，能从DNA水平解析其种质的遗传变异和亲缘关系。

DNA指纹图谱构建的方法有多种，如单引物法[29]、引物组合法[30]、特征谱带法[31]等。张安世等[32]采用ISSR技术构建了猕猴桃的DNA指纹，但由于缺乏指纹编码，因此在实际生产应用中受限。王世强等[33]绘制了黄精的SSR指纹，但是复杂的指纹编码限制了实际应用。本研究比较单引物和引物组合对石榴种质的区分效率，结果表明所有单引物均不能将供试种质区分开，最高区分效率为85.53%，而引物组合的区分效率明显高于单引物，最高区分效率为97.37%，仅无法区分2份种质。这一结果与邵雪花等[11]的相似，表明通过优化引物组合可明显提高分子标记的鉴别能力。因此选用引物组合UBC834/UBC835构建了76份种质的DNA指纹图谱，除了75号（绣球牡丹）和76号（紫皮甜）的指纹相同外，其他74份种质的DNA指纹均不相同，具有高度特异性，可用于品种的真实性鉴定。本研究构建的这套ISSR-DNA指纹图谱与形态性状相比能更高效、准确地鉴定石榴种质，为中国石榴指纹数据库的建立提供了理论依据。

4 结 论

本研究证实了ISSR标记能有效解析石榴种质的遗传变异，揭示了山东石榴种质遗传多样性相对丰富，但仍需引进外来优异种质拓宽遗传基础。构建的74份种质DNA指纹图谱具有高度特异性，可用于种质的真实性鉴定。

参考文献 References：

[1] LYU Y，PORAT R，YERMIYAHU U，HELER Y，HOLLAND D，DAG A. Effects of nitrogen fertilization on pomegranate fruit，aril and juice quality[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2020，100(4)：1678-1686.

[2] BAGHEL R S，KEREN-KEISERMAN A，GINZBERG I. Metabolic changes in pomegranate fruit skin following cold storage promote chilling injury of the peel[J]. Scientific Reports，2021，11：9141.

[3] 罗华，毕润霞，赵登超，舒秀阁，李志强，任艳华，侯乐峰，郝兆祥 . 我国石榴产业发展现状与对策[J]. 黑龙江农业科学，2025(6)：92-98.
LUO Hua，BI Runxia，ZHAO Dengchao，SHU Xiuge，LI Zhiqiang，REN Yanhua，HOU Lefeng，HAO Zhaoxiang. Development status and countermeasures of pomegranate industry in China[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences，2025(6)：92-98.

[4] 郝兆祥，程作华，侯乐峰，罗华，赵亚伟 . 山东枣庄石榴产业发展现状、存在问题及对策[C]. 怀远：第二届中国石榴博览会暨第七届全国石榴生产与科研研讨会论文集，2017：28-34.
HAO Zhaoxiang，CHENG Zuohua，HOU Lefeng，LUO Hua，ZHAO Yawei. Current situation，problems and countermeasures of pomegranate industry development in Zaozhuang，Shandong[C]//Huaiyuan：Proceedings of the 2nd China Pomegranate Expo and the 7th National Symposium on Pomegranate Production and Scientific Research，2017：28-34.

[5] MOSLEMI M，ZAHRAVI 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(4)：441-447.

[6] PATIL P G，SINGH N V，PARASHURAM S，BOHRA A，SOWJANYA R，GAIKWAD N，MUNDEWADIKAR D M，SANGNURE V R，JAMMA S M，INJAL A S，BABU K D，SHARMA J. Genome-wide characterization and development of simple sequence repeat markers for genetic studies in pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. Trees，2020，34(4)：987-998.

[7] 洪文娟，郝兆祥，刘康佳，罗华，毕润霞，苑兆和，宗世祥，王君 . 基于石榴全基因组序列的SSR标记开发及鉴定[J]. 北京林业大学学报，2019，41(8)：38-47.
HONG Wenjuan，HAO Zhaoxiang，LIU Kangjia，LUO Hua，BI Runxia，YUAN Zhaohe，ZONG Shixiang，WANG Jun. Development and identification of SSR molecular markers based on whole genomic sequences of *Punica granatum*[J]. Journal of Beijing Forestry University，2019，41(8)：38-47.

[8] LU L J，YANG J，ZHANG S M，YU F F，SUN Q B，ZHOU J Y. Advances in molecular marker techniques in pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. Agricultural Science & Technology，2016，17(1)：8-11.

[9] 彭磊，包九零，乔光，文晓鹏 . 贵州大樱桃种质资源亲缘关系ISSR分析[J]. 种子，2020，39(4)：1-4.
PENG Lei，BAO Jiuling，QIAO Guang，WEN Xiaopeng. Genetic relationship analysis of sweet cherry germplasm in Guizhou based on ISSR markers[J]. Seed，2020，39(4)：1-4.

[10] 刘小英，黄飞龙，刘国强，张游南 . 枇杷ISSR分子标记的研究进展[J]. 中国农学通报，2021，37(21)：106-110.
LIU Xiaoying，HUANG Feilong，LIU Guoqiang，ZHANG Younan. ISSR molecular markers in loquat：research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2021，37(21)：106-110.

[11] 邵雪花，赖多，肖维强，刘传和，贺涵，匡石滋 . 番石榴遗传多样性的ISSR分析及指纹图谱构建[J]. 中国农学通报，2023，39(21)：39-47.
SHAO Xuehua，LAI Duo，XIAO Weiqiang，LIU Chuanhe，HE Han，KUANG Shizi. *Psidium guajava* L.：Genetic diversity analysis based on ISSR markers and construction of fingerprints[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2023，39(21)：39-47.

[12] DEMIREL S，PEHLUVAN M，ASLANTAŞ R. Evaluation of genetic diversity and population structure of peach (*Prunus persica* L.) genotypes using inter- simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution，2024，71(3)：1301-1312.

[13] VAISHNAV K，TIWARI V，DURGAPAL A，MEENA B，RANA T S. Estimation of genetic diversity and population genetic structure in *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Schult. populations using DAMD and ISSR markers[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology，2023，21(1)：42.

[14] 朱薇，吴志苹，李雪，王庆军，袁立新，马丽 . 观赏石榴品种的ISSR遗传关系与DNA指纹研究[J]. 北方园艺，2023(15)：59-65.
ZHU Wei，WU Zhiping，LI Xue，WANG Qingjun，YUAN Lixin，MA Li. Study on genetic relationship and DNA fingerprint of ornamental pomegranate cultivars based on ISSR markers[J]. Northern Horticulture，2023(15)：59-65.

[15] MARTÍNEZ J J，MELGAREJO P，HERNÁNDEZ F，SALAZAR D M，MARTÍNEZ R. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties[J]. Scientia Horticulturae，2006，110(3)：241-246.

[16] PATIL P G，SINGH N V，BOHRA A，RAGHAVENDRA K P，MANE R，MUNDEWADIKAR D M，BABU K D，SHARMA J. Comprehensive characterization and validation of chromosome-specific highly polymorphic SSR markers from pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. Tunisia genome[J]. Frontiers in Plant Science，2021，12：645055.

[17] CHAUHAN R D，KANWAR K. Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant，2012，48(6)：579-594.

[18] YOUSSEF M，ALHAMMADI A S，RAMÍREZ-PRADO J H，SÁNCHEZ-TEYER L F，ESCOBEDO-GRACIAMEDRANO R M. Remarks on genetic diversity and relationship of *Punica protopunica* and *P. granatum* assessed by molecular analyses[J]. Genetic Resources and Crop Evolution，2018，65(2)：577-590.

[19] FARAJ J M. Morpho-phytochemical screening and molecular diversity of pomegranate accessions grown in Halabja Governorate，Kurdistan Region-Iraq[J]. Genetic Resources and Crop Evolution，2023，70(8)：2657-2670.

[20] ALMIAHY F H，JUM'A F F.Evaluation of the genetic diversity of pomegranate accessions some Iraqi Pomegranate (*Punica gra-*

natum L.) genotypes using ISSR marker[J]. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)，2017(10)：44-49.

[21] 杨荣萍，龙雯虹，张宏，许彬，李文祥 . 云南 25 份石榴资源的 RAPD 分析[J]. 果树学报，2007，24(2)：226-229.
YANG Rongping，LONG Wenhong，ZHANG Hong，XU Bin，LI Wenxiang. RAPD analysis of 25 *Punica granatum* germplasm resources collected in Yunnan Province[J]. Journal of Fruit Science，2007，24(2)：226-229.

[22] SHEIKH Z N，SHARMA V，AHMAD SHAH R，SHARMA N，SUMMUNA B，AL-MISNED F A，EL-SEREHY H A，MIR J I. Genetic diversity analysis and population structure in apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown under north-western himalayas using ISSR markers[J]. Saudi Journal of Biological Sciences，2021，28(10)：5986-5992.

[23] BĂDULESCU L，UDRIȘTE A A，BUTCARU A C，IORDĂCHESCU M. Genetic diversity analysis among several apple genotypes using ISSR markers[J]. Fruit Growing Research，2022，38：40-44.

[24] 王庆军，马丽，郝兆祥，罗华，毕润霞，赵丽娜，侯乐峰 . 观赏石榴种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 浙江农业学报，2018，30(2)：236-241.
WANG Qingjun，MA Li，HAO Zhaoxiang，LUO Hua，BI Runxia，ZHAO Lina，HOU Lefeng. Analysis on germplasm genetic diversity of ornamental pomegranate (*Punica granatum* L.) by ISSR markers[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis，2018，30(2)：236-241.

[25] 赵丽华，李名扬，王先磊，刘华敏 . 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.
ZHAO Lihua，LI Mingyang，WANG Xianlei，LIU Huamin. Genetic diversity and genetic relationship of pomegranate (*Punica granatum*) germplasm evaluated by ISSR markers[J]. Journal of Fruit Science，2011，28(1)：66-71.

[26] 沈进 . 中国石榴资源初级核心种质构建及其 ISSR 分子标记研究[D]. 合肥：安徽农业大学，2008.
SHEN Jin. Study on construction of primary core collection in pomegranate germplasm resources in China and its ISSR marker[D]. Hefei：Anhui Agricultural University，2008.

[27] RAJI R，SIRIL E A. Genetic diversity analysis of promising Ceylon olive (*Elaeocarpus serratus* L.) genotypes using morphological traits and ISSR markers[J]. Current Plant Biology，2021，26：100201.

[28] ROCHA A，SALOMÃO L C C，SALOMÃO T M F，CRUZ C D，DE SIQUEIRA D L. Genetic diversity of ‘Ubá’ mango tree using ISSR markers[J]. Molecular Biotechnology，2012，50(2)：108-113.

[29] 唐浩，余汉勇，张新明，魏兴华 . 水稻新品种测试的标准品种 DNA 指纹图谱多样性分析[J]. 植物遗传资源学报，2015，16(1)：100-106.
TANG Hao，YU Hanyong，ZHANG Xinming，WEI Xinghua. Analysis on the diversity of DNA fingerprinting of the example varieties used for the test of rice new varieties[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2015，16(1)：100-106.

[30] 缪恒彬，陈发棣，赵宏波，房伟民，石丽敏 . 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 中国农业科学，2008，41(11)：3735-3740.
MIAO Hengbin，CHEN Fadi，ZHAO Hongbo，FANG Weimin，SHI Limin. Genetic diversity and construction of fingerprinting of *Chrysanthemum* cultivars by ISSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica，2008，41(11)：3735-3740.

[31] 高源，刘凤之，王昆，王大江，龚欣，刘立军 . 基于 TP-M13-SSR 指纹图谱的中国原产苹果属植物分子身份证的建立[J]. 植物遗传资源学报，2015，16(6)：1290-1297.
GAO Yuan，LIU Fengzhi，WANG Kun，WANG Dajiang，GONG Xin，LIU Lijun. Establishment of molecular identity card for *Malus* Mill. originated from China based on the fingerprints of TP-M13-SSR[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2015，16(6)：1290-1297.

[32] 张安世，韩臣鹏，齐秀娟，张中海 . 基于 ISSR 标记的猕猴桃品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报，2017，26(3)：19-26.
ZHANG Anshi，HAN Chenpeng，QI Xiujuan，ZHANG Zhonghai. Genetic diversity analysis and fingerprinting construction of cultivars of *Actinidia* spp. based on ISSR marker[J]. Journal of Plant Resources and Environment，2017，26(3)：19-26.

[33] 王世强，王立儒，刘帅，牛俊峰，冯书超，梁晓艳，强毅，王喆之 . 基于 SSR 标记的黄精品种(系)DNA 指纹图谱库构建[J]. 分子植物育种，2018，16(6)：1878-1887.
WANG Shiqiang，WANG Liru，LIU Shuai，NIU Junfeng，FENG Shuchao，LIANG Xiaoyan，QIANG Yi，WANG Zhezhi. Construction of DNA fingerprint database based on SSR marker for *Polygonatum* varieties (lines) [J]. Molecular Plant Breeding，2018，16(6)：1878-1887.