

## 采用 RAPD 技术探讨花椒的遗传多样性及其与环境的关系

李庆芝\*, 刘振伟, 毕于义, 李承永, 李玲

莱芜市农业科学研究院, 山东莱芜 271100

**摘要:** 采用 RAPD 分子标记方法分析 11 个花椒品种的遗传多样性, 以及遗传多样性与环境因素的相关性。从 60 条随机引物中筛选出 10 条引物, 共扩增出 67 条带, 平均每个引物扩增出 6.7 条, 其中 56 条具有多态性, 多态比例为 84%。根据品种间的遗传距离构建的聚类分析树状图, 11 个花椒品种的相似系数在 0.08~0.92 之间, 可分为 2 个类群, 这种分类与花椒的叶的外形分类结果一致。不同地域种植的同一种材料遗传距离较大, 显示花椒的遗传多样性与地域分布有关系。

**关键词:** 花椒; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

## Exploring Genetic Diversity and Its Relations to Environmental Factors in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. by RAPD Technique

LI Qing-Zhi\*, LIU Zhen-Wei, BI Yu-Yi, LI Cheng-Yong, LI Ling

Laiwu Agriculture Academic Research Institute, Laiwu, Shandong 271100, China

**Abstract:** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to analyze the genetic diversity and its relations with environmental factors in 11 cultivars of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.. Ten primers were screened out of 60 random primers. A total of 67 detectable fragments were amplified with an average of 6.7 bands per primer. Fifty-six fragments were polymorphic and the percentage was about 84%. We also used the result of RAPD to assess the genetic distance and to perform clustering analysis. The genetic similarity coefficient was 0.08–0.92 among 11 cultivars of *Z. bungeanum*. The 11 cultivars of *Z. bungeanum* could be divided into two major clusters and this taxonomy was consistent with the one according to leaf morphology. The abundant genetic differentiation of *Z. bungeanum* in different regions indicated the genetic variation of *Z. bungeanum* was related with regional differences.

**Key words:** *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.; randomly amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity; clustering analysis

花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)属芸香科(Rutaceae)花椒属, 是我国特有的香料植物。它不仅是提炼制作高级食用香精的好原料, 而且是上等的食用调味品。花椒皮和种子均可入药, 具有开胃、健脾和增强体质的功能。我国是花椒的原产地, 也是世界上花椒栽培面积最大和产量最高的国家。由于历史和地理因素的影响, 加之人为因素的作用, 花椒的分类依据不统一, 许多驯化栽培品种存在着品种杂乱和名称混淆的问题, 有‘大红袍’、‘小红袍’、‘八月椒’、‘六月椒’、‘枸椒’、‘陕西大红袍’及‘莱芜大红袍’等多种名称。这种现象既给生产销售带来不便, 又给科研和医用带来较多麻烦。因此, 建立准确有效的花椒品种间鉴别系统的意义重大, 分析品种的遗传背景与花椒外观及种植环境之间的相关性, 对花椒的进一步育种开发和花椒产业的更大发展是非常必要的。

近年来, 采用 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)、RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性)等技术进行特定品种的分子鉴别与指纹图谱构建的应用已经成熟, 此类方法不仅准确可行, 操作简单, 而且经济实用(刘春林等 2000; 王秋锦等 2007; 熊丹等 2008; Bogani 等 1996; Tanksley 2004)。本文采用 RAPD 技术, 对包括‘大红袍’、‘莱芜多味花椒’、甘肃花椒、‘四川青花椒’及日本花椒在内的共 11 个不同来源的品种进行了遗传多样性检测和遗传相似性分析, 并探索了遗传多

收稿 2009-06-24 修订 2009-08-26

资助 山东省农业良种工程项目。

\* 通讯作者(E-mail: qingzhili123@sohu.com; Tel: 0634-8867570)。

样性与环境的关系,以期达到鉴别花椒品种、分析环境对花椒遗传特性的影响以及高效定向育种的目的。

## 材料与amp;方法

实验采用的花椒(*Zanthoxylum bungeanum*

Maxim.)品种 11 个(除来自莱芜本地的种植品种以外,其余均为实验同年春季引种的来自各地的品种),名称代号、产地来源、叶形及特性等见表 1。

从各品种花椒中随机选择 6 株,取新梢顶部的 1~4 片嫩叶,每个品种各取 5 g,于 -80 °C 下保存备用。

表 1 花椒的产地和形态特性

Table 1 Origins and morphology of *Z. bungeanum*

品种名称及代号	产地	叶形	特性
‘四川青椒’(S)	四川	椭圆状披针形,叶缘稀锯齿	麻味纯正,味重,椒皮熟后青色,有刺
‘日本葡萄’(P)	日本	椭圆状披针形,叶缘卷曲	麻味纯正,椒皮熟后红色,少刺
‘日本琉锦’(L)	日本	椭圆状披针形,整叶卷曲	麻味纯正,椒皮熟后红色,无刺
‘日本无刺’(R)	日本	椭圆状披针形,整叶卷曲	麻味纯正,椒皮熟后红色,无刺
‘甘肃 1 号’(Y1)	甘肃陇南	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,椒皮红色,新梢顶无刺
‘甘肃 2 号’(Y2)	甘肃陇南	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,椒皮熟后红色,钝宽刺
‘甘肃 3 号’(Y3)	甘肃天水	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,椒皮熟后红色,钝宽刺
‘甘肃 4 号’(Y4)	甘肃秦安	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,椒皮熟后红色,钝宽刺,刺稀少
‘优椒 5 号’(Y5)	甘肃秦安	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,椒皮熟后红色,刺极少
‘莱芜多味花椒’(N)	山东莱芜	椭圆状披针形,叶缘细锯齿	茴香味,椒皮熟后青色,尖刺
‘大红袍’(D)	山东莱芜	卵状椭圆,叶缘稀锯齿	麻味纯正,味麻香,椒皮熟后红色,刺基部宽顶部尖

总基因组 DNA 的提取采用本试验室改良的 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法,针对花椒 DNA 提取过程中褐化严重、多糖物质含量高的特点,提取过程中巯基乙醇的用量及 DNA 的纯化次数均增加。具体步骤为:取 10 mL 2×CTAB 加入 200 μL 巯基乙醇,65 °C 预热;取各品种花椒的嫩叶各 1.5 g,液氮研磨后,加入预热的上述溶液中,迅速混匀,65 °C 中保温 1 h;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀,静置 15 min,室温下 4 625×g 离心 20 min;转移上清液至新的离心管中,加入 1/10 体积预热的 10% CTAB,混匀后,再加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,静置分层后,4 °C 4 625×g 离心 20 min;取上清液加入 2.5 倍体积无水乙醇,充分混匀,置于常温下沉淀 1 h;取出沉淀放入新的小离心管中,用 80% 乙醇洗涤沉淀,再离心去上清液,沉淀用真空泵吸干;再加入 500 μL 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混匀,室温下放置片刻,514×g 离心 5 min;吸取上清液,加入 2.5 倍体积无水乙醇,取出沉淀,根据 DNA 的量加入 50~200 μL 双蒸水,待其溶解后,将得到的 DNA 以琼脂糖凝胶电泳检测。电泳检测的具体方法为:制备 100 mL 1% 琼脂糖凝胶,加入

50 μg 溴化乙锭;凝胶后,每孔加入 20 μL 浓度为 500 ng·mL<sup>-1</sup> 的 DNA 样品和 2 μL 溴酚蓝,于 90~100 V 的电压下电泳约 15 min。选择带型紧凑亮度清晰的各品种的 DNA,稀释成 200 ng·μL<sup>-1</sup>,于 -20 °C 下保存备用。

实验设计 60 条随机引物(上海生工生物工程技术服务有限公司合成),分别以 11 个品种的花椒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,实验设置各个参数的多变量组合,选择出合适的 PCR 方法。扩增程序为:94 °C 6 min;94 °C 50 s,50 °C 1 min,72 °C 1 min,36 个循环;72 °C 5 min。将扩增结果进行琼脂糖凝胶电泳分析,选择扩增条带重复性好、清晰稳定和 多态性强的 10 条引物(引物序列见表 2)进行随机扩增。

将所选随机引物的扩增结果,按照相同迁移率上有带记为 1,无带记为 0,转换成 0/1 矩阵,用 SPSS 14.0 数据分析软件计算各样品间的 Nei's 遗传距离 (Nei 1972)并进行聚类分析,将结果与花椒原始的生长环境和品种的表型进行比较,进一步分析花椒的遗传背景多样性同环境因素及表型的相关性。



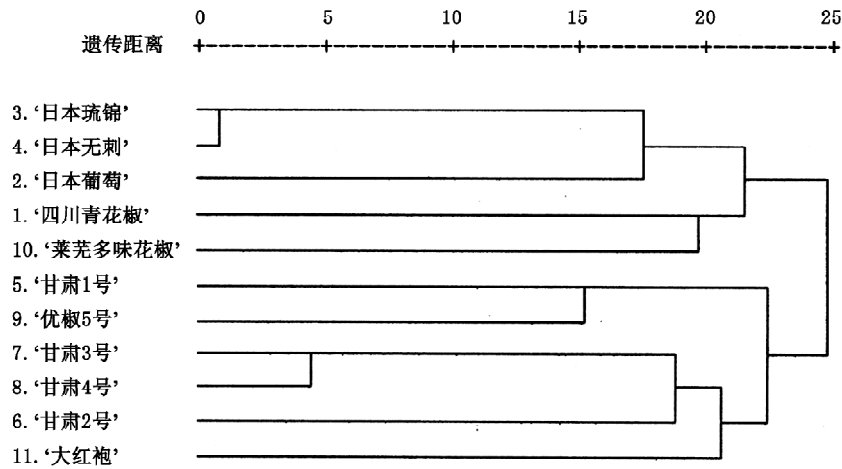


图2 11个花椒品种的RAPD聚类分析图

Fig.2 Dendrograms of 11 different cultivars of *Z. bungeanum* by RAPD analysis

### 3 不同地域的同一品种花椒的差别分析

甘肃花椒的5个品种(Y1、Y2、Y3、Y4和Y5)聚类分析的结果同属于类群II,均是甘肃的不同地域长期种植的同品种,这些来自不同种植地的同品种条带差异也很大,其相似系数在0.21~0.70之间,说明不同种植地区的天然种群具有较高的遗传多样性。虽然这些不同地区的种群叶外形和椒皮形状颜色区别不大,但从不同种群的生长势、产量和刺的外形可以区分这些不同地区种植的同品种,这在一定程度上反映出这些同品种不同种群的遗传背景不同;另外,这些外观的细微差异及遗传物质的明显区别,能够反映出不同种植区域环境因子如纬度、海拔等与种群间遗传距离明显相关。

## 讨 论

综合本文结果,可以得出:

(1) RAPD聚类分析结果显示,从I、II这2个类群的划分看,以花椒叶的表型为依据划分花椒类群是比较稳定的指标,说明叶的表型的稳定变化与DNA的变化有一致性;从亚类的划分结果来看,有无刺性和刺性的多少取决于DNA的多态性。这2点说明,在花椒的进化过程中,基因组的变异可能易发生在控制叶表型和控制刺有无的位点上,尤其叶形控制基因位点可能为单基因位点,在整个进化过程中极易发生变异,这与我们所做的辐射诱变结果相一致(试验数据正在整理中,尚未发表);而控制刺性有无的基因可能为多基因位点,产生一致的有益变异的难度相对较大。这说明通过一般的诱

变或在自然进化过程选择稳定的叶形突变是比较容易的,而想得到刺性改良这种大突变的机率则非常小,困难也很大;同时说明叶外形的稳定变异可以用作育种中的选择依据或参考指标。

(2) 不同区域种植的同一品系的聚类和差异的分析结果表明,品种的遗传差异与地域分布有一定的相关性,说明了花椒因长期地域环境不同会产生较大的自然变异,这些变异多发生于控制数量性状的多个位点上,以致花椒的品质产量有不同程度的变化,为人们提供了丰富的种质资源。同时还启示人们,花椒虽然不用杂交繁殖,但长期来也会发生变异和退化,同样需要品种的纯化和复壮;另外也说明花椒的道地性较明显,作为中药材应用时应该从适宜的地方选择好的品种。

## 参考文献

- 刘春林, 官春云, 李梅(2000). 关于植物随机引物扩增多态性标记的DNA可靠性问题. 植物生理学通讯, 36 (1): 56~59
- 王秋锦, 高杰, 孙清鹏, 杨爱珍, 赵福宽(2007). 茄子品种遗传多样性的RAPD检测与聚类分析. 植物生理学通讯, 43 (6): 1035~1039
- 熊丹, 谢伟, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵(2008). 香果树组织培养过程中遗传变异的RAPD分析. 植物生理学通讯, 45 (1): 37~41
- Bogani P, Simoni A, Lio P, Scialpi A, Buiatti M (1996). Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. Genome, 39: 846~853
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. Am Natl, 106: 283~292
- Tanksley SD (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. Plant Cell, 16: S181~S189