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

提要: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品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 *Zan-thoxylum 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, Shangdong 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 修定 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5g,于-80℃下保存备用。

	表1	花椒的产地和形态特性
Tabla 1	Origina	and mamphagements of 7 human

rable r Origins and morphography of 2. bungeanam						
品种名称及代号	产地	叶形	特性			
'四川青花椒 '(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 ℃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 ℃中保温1h;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4625×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℃4625×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1h;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 mL1%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⁻¹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⁻¹,于-20 ℃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℃6 min;94℃ 50 s,50℃1 min,72℃1 min, 36个循环;72℃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。

表 2 用于分析的 10 条随机引物序列及每条 引物扩增的条带数

Table 2 Sequences of the selected primers used in RAPD analysis and the number of amplified bands for each primer

随机引物编号	引物序列(5'→3')	扩增条带数	多态性位点数
S10	GGACCCTTAC	6	4
S22	TGCCGAGCTG	4	4
S27	GAAACGGGTG	6	6
S28	GTGACGTAGG	8	7
S29	GGGTAACGCC	8	6
S32	TCGGCGATAG	6	4
S33	CAGCACCCAC	9	7
\$367	AGCGAGCAAG	7	6
S369	CCCTACCGAC	9	9
S2008	CCACAGCCGA	4	3

实验结果

1 花椒遗传多样性的 RAPD 分析

以11份材料的DNA为模板,用10条随机扩 增多态性引物共扩增出67条清晰可辨的条带,其中 56条具有多态性,多态比例占84%。平均每个引 物扩增出的条带数为6.7,条带的片段大小在200~ 1500 bp之间。67条带中只有11条是共有条带, 这些条带可能是花椒的基本带,可以作为制作花椒 指纹图谱(图1)的分子标记依据。

2 不同品种花椒的遗传距离和聚类分析

经过 SPSS14.0 分析软件处理得到 Jaccard 相 似系数范围为 0.08~0.92, 从表 3 可以看出, 不同品 种间的遗传距离差距较大, 花椒种质的遗传背景比 较复杂。分析 11 份种质的 RAPD 分子标记的聚类





M: DNA 分子标准, 共8条带, 从小到大依次为: 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000, 3 000 和5 000 bp。

结果(图2)表明,在遗传距离等值线23的水平上,11 个品种可分为2个类群——类群I和类群II,这与 叶的表型特征的分类结果相一致。类群1为3个来 自日本的无刺或稀刺品种以及'四川青花椒'和'莱 芜多味花椒,它们的共同点是叶形均为披针形或 椭圆状披针形, 叶色浅绿。类群Ⅱ为甘肃花椒的 5个品种和'大红袍',它们的共同点是叶形为卵至 椭圆形, 叶基钝圆, 叶呈墨绿至紫褐色。在遗传距 离等值线20的水平上,这11个品种分为4个亚类 群,其对应的可区分的表型特征为花椒的刺性:类 群I中的第一亚类有无刺和稀刺的3个日本品种; 第二亚类有多刺的'四川青花椒'和'莱芜多味花 椒';类群Ⅱ中的第一亚类有'甘肃1号'和'优椒 5号', 它们的共同点是无刺或稀刺; 第二亚类有3 个甘肃花椒品种和'大红袍', 它们的共同点是 有刺, 但椒皮大小、色泽、厚度和生长势比较 一致。

表3 不同品种花椒之间的相似系数

	Ν	D	S	Р	L	R	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5
Ν		0.67	0.80	0.24	0.76	0.77	0.71	0.67	0.32	0.44	0.64
D			0.75	0.31	0.67	0.60	0.63	0.63	0.47	0.63	0.50
S				0.29	0.74	0.69	0.62	0.54	0.27	0.50	0.59
Р					0.26	0.28	0.23	0.20	0.17	0.08	0.24
L						0.92	0.57	0.52	0.24	0.41	0.58
R							0.60	0.49	0.16	0.31	0.61
Y1								0.65	0.28	0.48	0.70
Y2									0.48	0.63	0.35
Y3										0.52	0.21
Y4											0.49
Y 5											

Table 3 Nei's genetic identity between different cultivars of Z. bungeanum





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 地域长期种植的同一品种,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为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, 李栒(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