

花椒种质资源的 RAPD 分析

郑海星¹, 李周岐^{1*}, 薛惠丹¹, 王大玮¹, 孙 勇²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 宝鸡职业技术学院 生物工程系, 陕西 宝鸡 712013)

摘 要:利用 30 条 RAPD 引物对 21 份花椒种质资源的 DNA 进行了扩增, 计算了样品间的遗传距离并进行了聚类分析。共扩增出 257 条谱带, 其中多态性谱带 186 条(占 72.37 %), 平均每条引物扩增多态位点 6.2 个。21 份种质材料间均存在遗传差异, 其中韩城红葡萄椒和韩城大红袍遗传距离最近, 平均遗传距离为 0.290 4; 凤县野生构椒和韩城白葡萄椒的遗传距离最远, 平均遗传距离为 0.833 6; 同一种质资源内个体间存在不同程度的差异, 其中山东大红袍个体间差异最大, 个体间平均遗传距离为 0.087 2, 但临夏一号和凤县大红袍 2 份种质内个体间均未检测到差异。当遗传距离取 0.529 7~0.576 3 时, 21 份花椒种质资源可以聚类为 3 组, 当遗传距离取 0.496 3~0.503 7 时, 可聚类为 7 组。RAPD 多态性分析从分子水平上反映出了花椒种质资源复杂的遗传背景; 为花椒品种的鉴定与分类研究提供了依据。

关键词:花椒; 种质资源; RAPD

中图分类号: S722.3

文献标志码:

文章编号: 1001-7461(2011)02-0096-05

RAPD Analysis of the Germplasm Resources of *Zanthoxylum bungeanum*

ZHENG Hai-xing¹, LI Zhou-qi^{1*}, XUE Hui-dan¹, WANG Da-wei¹, SUN Yong²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Department of Bio-engineering, Baoji Vocational Technology College, Baoji, Shaanxi 712013, China)

Abstract: Thirty RAPD primers were utilized to amplify the DNA of 21 germplasms of *Zanthoxylum bungeanum*. The genetic distances among different samples were calculated and cluster analysis was conducted. Two hundred and fifty-seven DNA fragments were amplified, including 186 polymorphic bands(which stood for 72.37 %, and each primer amplified 6.2 polymorphic locus in average. The result showed that genetic differences existed among the 21 germplasms. The samples between Hongputao from Hancheng and Dahongpao from Hancheng had the smallest genetic distance at 0.290 4 in average, and that between Goujiao from Fengxian and Baiputao from Hancheng had the largest genetic distance of 0.833 6 in average. Difference among individuals within the same germplasm also existed in different degrees, and individuals of Dahongpao from Shandong had the greatest differences with 0.087 2 in average, however, Linxia 1 and Dahongpao from Fengxian did not have significant individual difference. When the genetic distance among 0.529 7—0.576 3, 21 germplasms clustered to three groups, when the genetic distance among 0.496 3—0.503 7, it could cluster to seven groups. The analysis of RAPD reflected the complex genetic background of *Z. bungeanum*. The results obtained could support the identification and classification of *Z. bungeanum*.

Key words: *Zanthoxylum bungeanum*; germplasm resources; RAPD

收稿日期: 2010-03-17 修回日期: 2010-07-30

基金项目: 陕西省“13115”科技创新工程项目(2007ZDKG-12); 西北农林科技大学唐仲英育种基金项目资助。

作者简介: 郑海星, 女, 硕士研究生, 研究方向: 林木遗传。

* 通讯作者: 李周岐, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事林木遗传育种。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn

花椒(*Zanthoxylum bungeanum*)古名椒、椒聊等,属芸香科花椒属植物,是一种干、枝、叶和果实均具浓郁辛香的落叶灌木或小乔木,在我国栽培历史悠久,分布广泛、经济价值高^[1-3]。由于历史和地理因素的影响,加之人为因素的作用,花椒在由野生向栽培驯化的过程中,形成了诸多品种(品系),其分类依据各不相同,叫法颇多。存在同名异物和同物异名现象,由此造成文献研究的混乱,也给生产和销售带来不便^[4-5],因此,花椒种质资源鉴定与分类研究是花椒育种的重要研究内容之一。种质资源的鉴定传统上多应用形态标记和生化标记,但效果往往不够理想,建立在 DNA 水平上的分子标记的出现,为种质资源研究开辟了新的途径,其中,随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA,RAPD),是近几年应用较为广泛的一种遗传标记,是研究遗传多样性的有力工具^[6-8]。本研究利用 RAPD 技术从 DNA 分子水平上研究了花椒种质资源多态性,对于花椒种质资源的收集保存和有效利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采自西北农林科技大学花椒种质资源圃(表 1),于 2009 年 4 月从 21 份花椒种质资源中各随机选取 6 株分别采集嫩叶并编号(用 1-①表示 1 号种质中的第 1 株,以此类推),-20℃保存备用。

表 1 试验所用花椒种质资源

种质编号	品种	采集地
1	韩城白葡萄椒	陕西韩城
2	河北涉县黄金椒	河北涉县
3	河北平山大红袍	河北平山县
4	河北平山川椒	河北平山县
5	韩城红葡萄	陕西韩城
6	韩城大红袍	陕西韩城
7	山东小红袍	山东
8	山东大红袍	山东
9	临夏 1 号	甘肃临夏
10	油椒	陕西凤县
11	秦安 1 号	甘肃秦安
12	绵椒	甘肃秦安
13	凤县豆椒	陕西凤县
14	武都 3 号二红袍	甘肃武都
15	凤县野生枸椒	陕西凤县
16	凤县无刺椒	陕西凤县
17	凤椒	陕西凤县
18	羊椒	甘肃武都
19	武都无刺原种	甘肃武都
20	刺椒良种	甘肃武都
21	韩城黄盖椒	陕西韩城

1.2 试验仪器与试剂

试验所用的随机引物(random primers)来自上海生物工程公司,TaqDNA 聚合酶购自 Fermentas 公司、100bp DNA ladder、6×loading-burfffer 购自 Solarbio 公司,dNTP 购自上海生物工程公司。PCR 扩增仪为 MJ Reareh PTC-200,电泳仪为北京六一仪器厂生产的 DYY-II 型,凝胶成像系统为 Bio-Rad 凝胶成像系统。

1.3 方法

- 1.3.1 DNA 模板的提取与检测 采用 CTAB 法^[9-11]提取 DNA,用 0.8 %的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计检测浓度,模板 DNA 浓度稀释成 50~100 ng·μL⁻¹用于 PCR 扩增。
- 1.3.2 引物筛选及 PCR 反应 PCR 反应体系包括:模板 DNA,1 μL;10×buffer,2.0 μL;dNTP(10 mmol·L⁻¹),0.5 μL;MgCl₂(25 mmol·L⁻¹),2.0 μL;随机引物(5 mmol·L⁻¹),2.0 μL;TaqDNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹),0.4 μL;加 ddH₂O 至最终的体积为 25 μL。扩增程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,38℃退火 30 s,72℃延伸 80 s,循环 38 次;循环结束后于 72℃后延伸 10 min。

经过初筛和复筛,从 300 条随机引物(random primers)中筛选出 30 个有稳定的扩增产物且多态性较高的引物进行 PCR 扩增。取扩增产物加 7 μL,加入 2 μL 6×loading-buffer,于 2%琼脂糖凝胶中恒压电泳(3~5 V·cm⁻¹),电泳结束后用 EB 溶液染色,在 Bio-Rad 凝胶成像系统上扫描成像,然后用 Quantity One 软件进行扩增条带的检测分析。

1.3.3 数据处理 记录每份 DNA 的分子带型,有带记为 1,无带记为 0。计算各样品之间的遗传距离、各种质资源内 6 株个体间的平均遗传距离及各种质资源两两间的平均遗传距离,采用欧氏距离 UPGMA 进行聚类分析,并基于 Rogers 遗传距离系数^[12]构建聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 花椒种质资源的 RAPD 扩增谱带分析

扩增产物片段多集中在 200~2 000 bp 之间,30 条引物共扩增出 257 条带谱,其中多态性条带 186 条,占总条带数的 72.37 %,这种多态性不仅表现在不同种质资源之间,而且也表现在同一种质资源内个体之间。引物 S10 和 S167 扩增谱带数最多,均为 10 条,引物 S65、S160、S164、S169 和 S211 的扩增谱带数最少,均为 4 条,平均每条引物可扩增出 6.2 条有多态性带谱(表 2、图 1)。

表 2 不同引物扩增结果
Table 2 Results of PCR amplification of different primers

引物名称	扩增带数	多态带数	多态带百分率/%	引物名称	扩增带数	多态带数	多态带百分率/%	引物名称	扩增带数	多态带数	多态带百分率/%
S59	11	8	72.73	S160	9	4	44.44	S211	5	4	80.00
S62	11	7	63.64	S164	6	4	66.67	S10	11	10	90.91
S65	8	4	50.00	S166	8	5	62.50	S43	7	7	100.00
S68	11	5	45.45	S167	12	10	83.33	S38	9	7	77.78
S87	11	6	54.55	S169	4	4	100.00	S51	6	5	83.33
S69	8	7	87.50	S178	10	9	90.00	S350	7	5	71.43
S95	9	7	77.78	S201	9	6	66.67	S278	8	7	87.50
S157	8	7	87.50	S205	12	8	66.67	S40	9	5	55.56
S159	10	7	70.00	S207	6	6	100.00	S156	7	5	71.43
S23	9	5	55.56	S218	8	7	87.50	S444	8	5	62.50

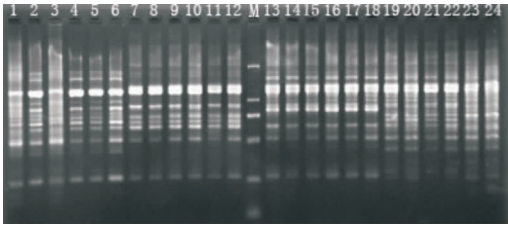


图 1 引物 S10 扩增结果

Fig. 1 The result of RAPD amplification of the primer S10
注：泳道 1~6 河北涉县黄金椒；7~12 河北平山大红袍；13~16 河北平山川椒；17~24 韩城白葡萄椒；M 为 Marker(2 000、1 000、750、500、250、100 bp)。

2.2 花椒种质资源间及种质资源个体间的遗传距离
21 份花椒种质资源间的遗传距离 (*GD*) 在

0.290 4~0.833 6 之间,所有种质间均有不同程度的遗传差异,根据遗传距离和相似系数可知种质间亲缘关系的远近,其中韩城红葡萄椒与韩城大红袍遗传距离最近(*GD*=0.290 4),表明差异最小、相似性(亲缘关系)最近;韩城白葡萄椒与凤县野生构椒的遗传距离最远(*GD*=0.833 6),表明差异最大、亲缘关系(相似性程度)最远(表 3)。同一种质资源内个体间的也存在不同程度的差异,其中山东大红袍个体间差异最大,个体间平均遗传距离 0.087 2,个体间最大遗传距离为 0.149 3,最小遗传距离为 0.010 7;临夏一号和凤县大红袍个体间遗传距离均为 0,在这 2 份种质个体间未检测到差异(表 4)。

表 3 种质资源间的平均遗传距离
Table 3 The average genetic distance among germplasm resources

种质编号	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	种质编号	
1		0.353 9	0.454 8	0.495 6	0.545 9	0.520 8	0.571 0	0.524 7	0.658 6	0.550 0	21	
2	0.424 7		0.386 9	0.523 8	0.607 6	0.512 9	0.650 5	0.486 7	0.645 6	0.509 0	20	
3	0.394 0	0.443 1		0.513 0	0.608 5	0.481 6	0.654 6	0.508 0	0.644 8	0.533 5	19	
4	0.485 3	0.477 4	0.416 5		0.496 0	0.594 4	0.451 1	0.571 0	0.664 2	0.605 0	18	
5	0.434 7	0.490 7	0.483 6	0.461 6		0.660 2	0.235 6	0.680 8	0.790 2	0.560 9	17	
6	0.438 7	0.465 2	0.456 8	0.508 6	0.290 4		0.705 1	0.513 2	0.672 2	0.502 0	16	
7	0.543 0	0.520 8	0.481 6	0.507 9	0.422 1	0.398 0		0.669 0	0.817 8	0.661 1	15	
8	0.543 3	0.550 5	0.523 1	0.546 1	0.514 5	0.470 5	0.304 9		0.622 1	0.486 7	14	
9	0.561 8	0.524 8	0.569 2	0.499 0	0.527 7	0.591 7	0.544 9	0.546 8		0.605 5	13	
10	0.645 6	0.553 4	0.589 1	0.566 4	0.529 6	0.559 0	0.509 2	0.531 4	0.403 4		12	
11	0.616 8	0.576 5	0.592 3	0.600 6	0.568 9	0.611 9	0.574 0	0.563 8	0.494 9	0.421 8		
12	0.653 8	0.659 4	0.616 2	0.605 5	0.604 4	0.589 1	0.560 9	0.549 5	0.554 3	0.515 9	0.487 4	
13	0.552 7	0.510 9	0.552 8	0.698 9	0.461 6	0.508 6	0.507 9	0.546 1	0.499 0	0.566 4	0.600 6	
14	0.617 0	0.552 4	0.577 4	0.622 1	0.560 9	0.539 6	0.599 1	0.554 6	0.543 0	0.549 4	0.546 8	
15	0.833 6	0.825 2	0.803 2	0.817 8	0.566 6	0.748 9	0.701 5	0.681 6	0.739 7	0.680 1	0.699 2	
16	0.545 6	0.557 2	0.565 5	0.672 2	0.590 0	0.544 0	0.623 7	0.575 5	0.561 8	0.552 5	0.527 7	
17	0.780 3	0.790 2	0.769 6	0.790 2	0.712 7	0.726 7	0.679 3	0.661 9	0.726 0	0.647 3	0.667 4	
18	0.708 3	0.729 6	0.682 4	0.664 2	0.620 5	0.654 6	0.650 5	0.611 9	0.629 0	0.623 9	0.595 2	
19	0.660 9	0.560 9	0.618 8	0.644 8	0.561 8	0.551 6	0.608 4	0.571 0	0.576 5	0.523 8	0.474 3	
20	0.625 3	0.598 0	0.629 8	0.645 6	0.555 9	0.597 4	0.612 7	0.584 5	0.492 9	0.545 9	0.523 8	
21	0.597 1	0.632 3	0.596 3	0.658 6	0.593 5	0.637 3	0.629 7	0.589 9	0.536 4	0.544 0	0.554 3	
种质编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	种质编号

表 4 种质资源内个体间遗传距离
Table 4 The genetic distance among individuals

种质编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
最大遗传距离	0.062 5	0.031 7	0.062 5	0.072 5	0.092 3	0.082 5	0.111 7	0.149 3	0.000 0	0.021 3	0.092 3
最小遗传距离	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.010 7	0.010 7	0.021 3	0.021 3	0.010 7	0.000 0	0.000 0	0.010 7
平均遗传距离	0.032 3	0.016 3	0.036 5	0.038 5	0.059 5	0.042 7	0.056 8	0.087 2	0.000 0	0.007 1	0.046 7
种质编号	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
最大遗传距离	0.052 4	0.072 5	0.092 3	0.021 3	0.042 1	0.000 0	0.010 7	0.010 7	0.031 7	0.021 3	
最小遗传距离	0.000 0	0.010 7	0.010 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	
平均遗传距离	0.019 7	0.038 5	0.051 4	0.009 2	0.021 2	0.000 0	0.005 7	0.005 7	0.020 5	0.016 3	

2.4 花椒种质资源聚类分析

种质资源内 6 个样本首先聚类,且不存在种质资源间样本聚类交叉现象,说明种质间的遗传距离明显的高于种质内个体间,可以将 21 份种质资源很明显的分开(图 2)。当遗传距离取 0.529 7~0.576 3时,21 份花椒种质资源可划分为 3 类。第 1 类包括:1 韩城白葡萄、2 河北涉县黄金椒、3 河北平山大红袍、4 河北平山川椒、13 凤县豆椒、5 韩城红葡萄、6 韩城

大红袍、7 山东小红袍;第 2 类包括:8 山东大红袍、9 临夏 1 号、10 油椒、11 秦安 1 号、12 绵椒、14 武都 3 号二红袍、16 凤县无刺椒、19 武都无刺原种、20 刺椒良种、21 韩城黄盖椒;第 3 类包括:15 凤县野生构椒、17 凤椒、18 羊椒。当遗传距离取 0.496 3~0.503 7时,21 份花椒种质资源可分为 7 类:1 韩城白葡萄、2 河北涉县黄金椒、3 河北平山大红袍、4 河北平山川椒为第 1 类;13 凤县豆椒、5 韩城红葡萄、6 韩城大红袍、7 山东小红袍为第 2 类;8 山东大红袍、9 临夏 1 号、10 油椒为第 3 类;11 秦安 1 号、12 绵椒、14 武都 3 号二红袍为第 4 类;16 凤县无刺椒为第 5 类;19 武都无刺原种、20 刺椒良种、21 韩城黄盖椒为第 6 类;15 凤县野生构椒、17 凤椒、18 羊椒为第 7 类。

3 结论与讨论

RAPD 技术是利用随机引物在生物种群中寻找同源序列,并将同源序列之间的片段扩增出来的一种分子标记技术。该技术主要通过 DNA 带的有无统计分析生物种群或个体间的遗传多样性和亲缘关系^[13-15]。在供试的样品基因组中,30 条 RAPD 引物分析结果表明,21 份种质资源共 126 个样品中都有共有的谱带、多态性谱带,这些谱带可以作为花椒种质资源鉴定与分类的分子标记。21 份花椒种质材料之间存在丰富的遗传多样性,其中最大平均遗传距离 0.833 6,最小平均遗传距离 0.290 4。同一花椒种质资源内的个体间也存在不同程度的差异,这可能与花椒实生繁殖的特点有关。临夏 1 号和凤椒个体间的遗传距离均为 0,2 份种质个体间均未检测到差异,这可能与花椒单性结实、无融合生殖的特点有关。本研究还发现花椒种质材料的遗传背景并不一定与该区域其他资源有相关性,其相互的遗传关系并不一定很近;与之相反,来自不同地区的材料却很有可能具有更相近的亲缘关系,这与李庆芝^[16]等研究的花椒因长期地域环境不同会产生较大的自然变异的结论不符。如地域关系最近的韩城大红袍和凤县大红袍的平均遗传距离为 0.726 7,地域关系较

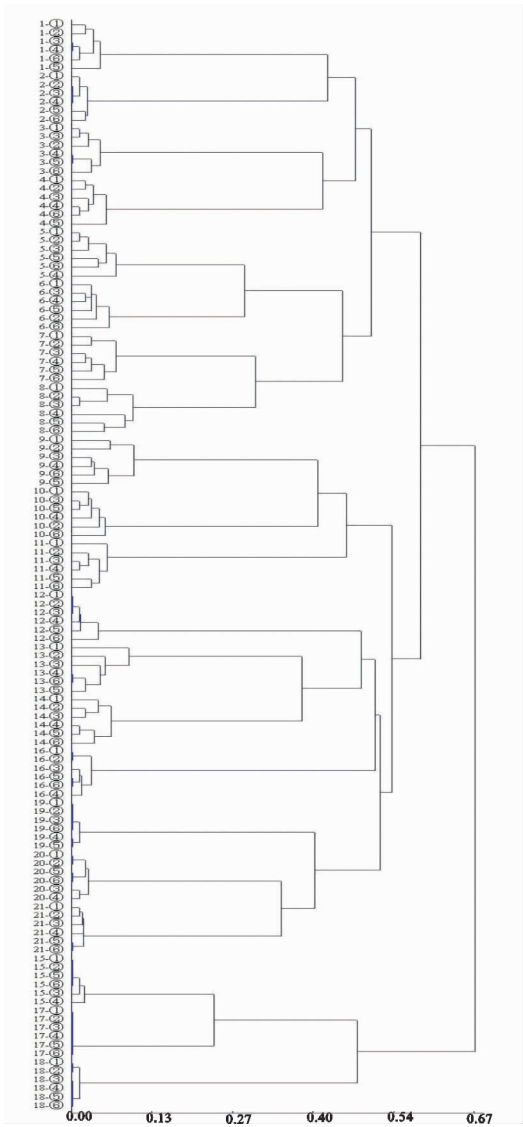


图 2 花椒种质资源聚类分析图
Fig. 2 Cluster tree of *Z. bungeanum*

远的河北大红袍和韩城大红袍平均遗传距离为 0.456 8,河北大红袍和凤椒的平均遗传距离为 0.769 6。其遗传关系若仅由种质材料来源区域的远近和生产上品种的名称来判断无疑是很难得到准确信息的。因此只有借助于各种新的分子水平的检测手段才能得到更有效、更准确的分析和评估,为资源利用和育种实践提供有力支持。鉴于 RAPD 标记存在一定局限性,下一步应该尝试用其他的分子标记技术,如 ISSR、AFLP 进行进一步分析。

参考文献：

[1] 朱健,玛敏杰. 花椒[M]. 西安:陕西科技出版社,1993:1-7.

[2] 党心德,蒲淑芬. 花椒栽培及病虫害防治[M]. 陕西 杨陵:天则出版社,1989:1-2.

[3] 林鸿荣. 椒史初探[J]. 中国农史,1985(2):63-67.

[4] 毕君,王春荣,赵京献,等. 北方花椒主产区种质资源考察报告[J]. 河北林果研究,2003,18(2):165-168.
BI J, WANG C R, ZHAO J X, *et al.* Investigation of *Zanthoxylum bungeanum* species and resource in north producing [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 2003,18(2): 165-168. (in Chinese)

[5] 毕君,赵京献,王春荣,等. 国内外花椒研究概况[J]. 经济林研究,2002,20(1):46-48.
BI J, ZHAO J X, WANG C R, *et al.* World research progress in bunge pricklyash (*Zanthoxylum bungeanum*) [J]. Econmic Forest Researches, 2002,20(1):46-48. (in Chinese)

[6] WELSH J, MCCLELL M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl. Acids Res. , 1990, 18:7213-7218.

[7] WILLIAM J G K, HANAFEY M K, RUBELIK A R, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl. Acids Res. , 1990, 18: 6231-6235.

[8] 邹喻苹. RAPD 技术在检测遗传多样性中的应用[M]. 中国科学院植物研究所系统与进化植物开放研究实验室. 北京:1994: 1-32.
ZOU Y P. The application of RAPD technique in detecting genetic diversity[M]. Beijing:State Key Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany (LSEB), Institute of Botany, the

Chinese Academy of Sciences, 1994:1-32.

[9] 白凤虎,谢晓美,李德芳,等. 改良 CTAB 法用于提取红麻成熟叶片高质量 DNA 的研究[J]. 中国麻业科学,2007,29(3):158-169.
BAI F H, XIE X M, LI D F, *et al.* The research of improved CTAB method used in the mature leaves of Kenaf for high quality DNA [J]. Plant Fiber Sciences in China, 2007,29(3): 158-169. (in Chinese)

[10] 李守勇,续九如,孙浩元. 不同产地冬枣的 RAPD 分析[J]. 西北林学院学报,2006,21(5):89-93.
LI S Y, XU J R, SUN H Y. Marker analysis of Dongzao ju-jube in different sites[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006,21(5):89-93. (in Chinese)

[11] 潘和平,晋玲,高天鹏,等. 沙拐枣 DNA 提取方法改进及 PCR 扩增检测[J]. 草业科学,2006,23(10):28-31.
PAN H P, JIN L, GAO T P, *et al.* Improvement of DNA extraction method and PCR test of *Calligonum mongolicum* [J]. Pratacultural Science, 2006,23(10):28-31. (in Chinese)

[12] 吕雪梅,杨关福,张细权. RAPD 分析中遗传距离计算方法的比较[J]. 华南农业大学学报,1997,18(增刊):90-97.
LU X M, YANG G F, ZHANG X Q. Comparisons of calculation methods for genetic distance in RAPD analysis[J]. J. South China Agric. Univ. , 1997,18:90-97. (in Chinese)

[13] PENNER G A, CHONG J, WIGHT C P, *et al.* Identification of a RAPD marker for the crown rust resistance gene Pc68 in oats [J]. Genome, 1993,36:818-820.

[14] CHENG F C, WEEDEN N F, BROWN S K. Identification of codominant RAPD markers tightly linked to fruit color in apple [J]. Theor. Appl. Genet. , 1996, 93:222-227.

[15] 刘春林,官春云,李桷. 植物 RAPD 标记的可靠性研究[J]. 生物技术通报,1999(2):31-34.
LIU C L, GUAN C Y, LI S. Studies on the authenticity of plant RAPD marker[J]. Biotechnology Information, 1999, (2):31-34. (in Chinese)

[16] 李庆芝,刘振伟,毕于义,等. 采用 RAPD 技术探讨花椒的遗传多样性及其与环境的关系[J]. 植物生理学通讯,2009,45(9):865-868.
LI Q Z, LIU Z W, BI Y Y, *et al.* Exploring genetic diversity and its relations to environmental factors in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim by RAPD technique [J]. Plant Physiology Communications, 2009,45(9):865-868. (in Chinese)