

应用 RAPD 标记技术探讨枣与酸枣的分类学关系*

刘 平 彭建营 彭士琪 周俊义 代 丽

(河北农业大学园艺学院 保定 071001)

关键词: 枣; 酸枣; 群体遗传; 分类; RAPD

中图分类号: S718.49; S718.46 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2005)02-0182-04

Study on Systematic Relationships of *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus spinosa* Using RAPD Technique

Liu Ping Peng Jianying Peng Shiqi Zhou Junyi Dai Li

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei Baoding 071001)

Abstract: Genetic relationships between *Ziziphus jujuba* and *Ziziphus spinosa* populations were studied using RAPD data in population genetics. 275 loci were gained among which 249 loci were polymorphic by 22 primers. The polymorphic loci percentage was 89% among *Z. spinosa* population while that of *Z. jujuba* population was 56%. 31 specific RAPD markers were detected on 3 *Z. jujuba* varieties and 15 *Z. spinosa* forms. Cluster analysis showed: when $\lambda=12$, the forms tested were divided into 2 groups. One included *Z. jujuba* cv. Zanzhuangdazao, Yudichuangan, Yuanshichuangan, Xiaochuangan, Qiantai No.1, Luzhuangchuangan; the other included *Z. jujuba* cv. Zilingdan and 26 *Z. spinosa* forms. All above indicated that *Z. jujuba* and *Z. spinosa* should be regarded as two separate species.

Key words: *Ziziphus jujuba*; *Ziziphus spinosa*; population genetics; systematic relationship; RAPD

我国枣树(*Ziziphus jujuba*)、酸枣(*Ziziphus spinosa*)资源丰富,枣树以无性繁殖为主,酸枣除有性繁殖外,也可进行根蘖繁殖,枣和酸枣均为多年生植物。赞皇大枣是目前发现的唯一的自然三倍体品种¹⁾,其他枣品种和酸枣均为二倍体。河北省赞皇县是赞皇大枣的原产地,于2000年对赞皇县及附近的枣品种和酸枣进行了普查,除酸枣外,还有赞皇大枣、榆底串杆、吕庄串杆、紫铃蛋、前台1号、元氏串杆、小串杆7个枣品种。

群体遗传学以居群(population)为研究对象,研究居群遗传组成变化,最终阐明生物进化的机制。RAPD技术在探测群体的遗传多样性、了解群体的遗传学结构、探讨系统发育和进化等方面发挥越来越重要的作用(王中仁,1996)。枣和酸枣的分类学关系一直是学者们关注的问题,但由于试验手段和取材的原因,得到的结果不一。本研究以河北省赞皇县及附近的枣群体和酸枣群体为试材,对枣和酸枣进行群体遗传关系研究,以期从群体遗传学角度,揭示枣和酸枣的分类学关系。

1 材料与方 法

1.1 材料 7个枣品种和26个酸枣类型均取自河北省赞皇县,树龄从10~200年不等。酸枣处于野生状态,枣树生长良好。供试枣品种有赞皇大枣、榆底串杆、吕庄串杆、紫铃蛋、前台1号、元氏串杆、小串杆;供试酸枣有s1~s26共26个类型,年龄在10~200年不等。2001年4月下旬取幼嫩叶片(20片左右)放入冰壶中带回实验室,液氮处理后立即放入-70℃冰箱保存,以备RAPD分析之用。

1.2 方法 优化的枣和酸枣RAPD反应体系为:20μL反应体系中,模板40~60ng, Taq酶为1.2U, dNTPs浓度100μmol·L⁻¹, Mg²⁺浓度2.0mmol·L⁻¹, 引物浓度为0.2μmol·L⁻¹。利用22个多态引物(S7、S8、S12、S27、S34、S43、S104、S105、S107、S108、S171、S174、S176、S301、S303、S304、S305、S314、S366、S368、S375、S376)对供试2个群体进行扩增。RAPD谱带有记为1,无记为0。

收稿日期:2003-09-05。

基金项目:河北省自然科学基金(300123)。

* 彭建营为通讯作者。

1) 阎桂军.1984.枣细胞学研究.河北农业大学硕士学位论文

利用统计软件 SPSS(statistical program for social science) for Windows 计算两两类型之间的欧氏距离, 利用离差平方和法(Ward' s method) 对数据进行聚类分析, 以度量群体间遗传学关系。

2 结果与分析

2.1 枣及酸枣的 RAPD 扩增结果 利用 22 个引物对 7 个枣品种和 26 个酸枣类型进行了扩增, 部分扩增结果见图 1。共扩增出 275 个位点, 其中多态位点为 249 个, 多态位点百分率为 91 % (表 1)。7 个枣品种共扩增出 183 个位点, 多态位点占 56 %; 26 个酸枣类型共扩增出 265 个位点, 多态位点占 89 %。共有 3 个枣品种和 15 个酸枣类型共扩增出 31 个特异位点, 这些特异位点为枣品种和酸枣类型的鉴别提供了依据(表 2)。

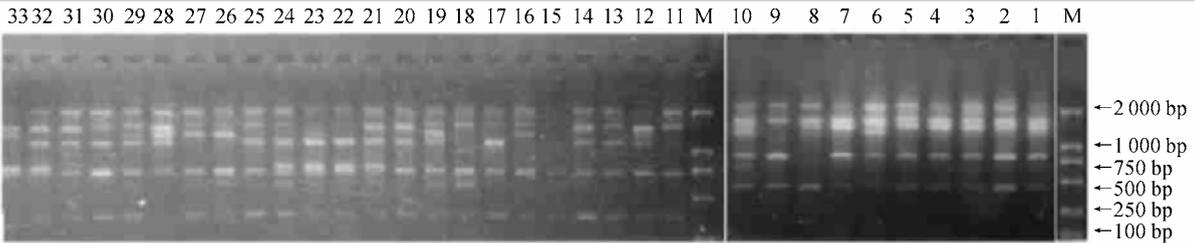


图 1 引物 S108 的 RAPD 扩增结果

Fig. 1 RAPD pattern amplified by primer S108

M: 标准 Marker; 1 ~ 7: 分别为赞皇大枣、榆底串杆、前台 1 号、元氏串杆、小串杆、紫铃蛋、吕庄串杆 Zanzhuangdazao, Yudichuangan, Qiantai No.1, Yuanshichuangan, Xiaochuangan, Zilingdan, Luzhuangchuangan in order; 8 ~ 33: 分别为 s1 ~ s26 s1 ~ s26 in order.

表 1 22 个多态引物对枣群体和酸枣群体扩增的多态位点比例^①

Tab. 1 Proportion of polymorphic loci of *Z. jujuba* population and *Z. spinosa* population by 22 primers

引物 Primer	酸枣 <i>Z. spinosa</i>			枣 <i>Z. jujuba</i>			TL	TP	AR/ %
	L	P	R/ %	L	P	R/ %			
S7	17	16	94	9	4	44	17	16	94
S8	12	12	100	7	5	71	12	12	100
S303	10	10	100	7	6	86	10	10	100
S12	13	12	92	10	8	80	13	13	100
S27	18	17	94	8	5	63	19	19	100
S34	9	8	89	9	5	56	11	10	91
S43	10	7	70	10	5	50	11	8	73
S104	16	14	88	11	9	82	17	15	88
S105	9	6	67	7	2	29	10	7	70
S107	15	13	87	9	4	44	15	13	87
S108	11	9	82	7	2	29	11	9	82
S171	11	11	100	10	9	90	12	12	100
S174	16	16	100	12	9	75	16	16	100
S176	5	3	60	4	1	25	5	3	60
S301	15	15	100	7	4	57	15	15	100
S304	12	12	100	7	4	57	12	12	100
S305	10	6	60	8	4	50	10	8	80
S314	11	9	82	9	4	44	11	9	82
S366	11	9	82	9	1	11	11	9	82
S368	15	14	93	10	8	80	16	15	94
S375	11	9	82	7	3	43	12	10	83
S376	9	8	89	6	3	50	9	8	89
总和 Total	265	236	89	183	103	56	275	249	91

①L: 扩增位点数量 Locus number amplified; P: 多态位点数量 Polymorphic loci number; R: 多态位点比例 Ratio of polymorphic number; TL: 总扩增位点数量 Total locus number amplified; TP: 总多态位点数量 Total polymorphic loci number; AR: 平均多态位点比例 Average ratio of polymorphic number.

2.2 枣和酸枣群体间的遗传学关系 利用 SPSS 软件计算供试类型间的欧氏距离, 前台 1 号和 s8 的欧氏距离最远, 为 10.050, 元氏串杆和小串杆的欧氏距离最近, 为 4.123, 平均欧氏距离为 7.513。枣品种平均欧氏距

表 2 供试品种或类型的特有标记
Tab. 2 Specific RAPD markers of varieties or forms tested

品种或类型 Variety or form	特有标记 Specific marker(s)	品种或类型 Variety or form	特有标记 Specific marker(s)
紫铃蛋 Zilingdan	S27 - 1550 ;SI 04 - 2000	前台 1 号 Qiantai No.1	S368 - 530
元氏串杆 Yuanshichuangan	S34 - 970 ;S43 - 2050	s3	SI 2 - 1000 ;S34 - 1750
s4	S375 - 520	s6	SI 2 - 680 ;S301 - 1750
s7	S368 - 850	s11	S303 - 670 ;S314 - 450
s13	S7 - 1650 ;SI04 - 1350		S8 - 1000 ;S27 - 1270
s12	S7 - 1050	s15	S27 - 1800
s14	SI04 - 1170 ;S7 - 800	s16	S7 - 480
s17	S303 - 900 ;S304 - 2200 ; S368 - 680 ;S8 - 1500	s18	S8 - 1800 ;SI 74 - 1075
s22	SI04 - 1450	s20	SI 76 - 550
		s26	SI 07 - 2400

离为 6.502,其中小串杆与紫铃蛋最远,为 8.602,元氏串杆和小串杆的欧氏距离最近,为 4.123;酸枣平均欧氏距离为 8.487,其中 s3 与 s8 最远,为 9.899,s1 与 s2 最近,为 6.481;枣与酸枣间的平均欧氏距离大于酸枣平均欧氏距离和枣平均欧氏距离,为 8.676,其中赞皇大枣与 s3 最近,为 7.141,前台 1 号与 s8 最远,达 10.050(数据未列出)。

根据欧氏距离,利用离差平方和法(Ward 方法)对供试品种、类型的聚类结果见图 2。截取 $\lambda=12$,可将供试类型分为 2 类:第 1 类包括赞皇大枣、榆底串杆、元氏串杆、小串杆、前台 1 号、吕庄串杆 6 个枣品种;第 2 类包括枣品种紫铃蛋和 26 个酸枣类型。从聚类图看,同样生长在赞皇县的枣品种和酸枣基本可以分开。

3 讨论

关于枣和酸枣的分类学关系,前人已经作过多方面研究。目前有 2 种观点。一些学者认为枣和酸枣为一个种。阎桂军¹⁾根据细胞学研究结果,将枣和酸枣定为同一种,酸枣为原生种,枣为栽培类型。李树林²⁾认为枣和酸枣在花粉形态上极度相似,中间类型大马枣(*Z. jujuba* cv. Damazao)的出现说明二者划为一个种是符合自然规律的。宋婉³⁾分析了 67 个枣优良品种和 1 个酸枣类型的 AFLP 谱带,认为枣和酸枣应为一个种。

另一些学者将枣和酸枣定为 2 个种。酸枣在枝条弯曲度、托刺、叶片、花、果实、外(中)果皮厚度、果实风味、种仁饱满度等方面与枣存在显著差异,刘孟军⁴⁾对分布于各省、市的 200 多个枣品种和 150 个酸枣类型的

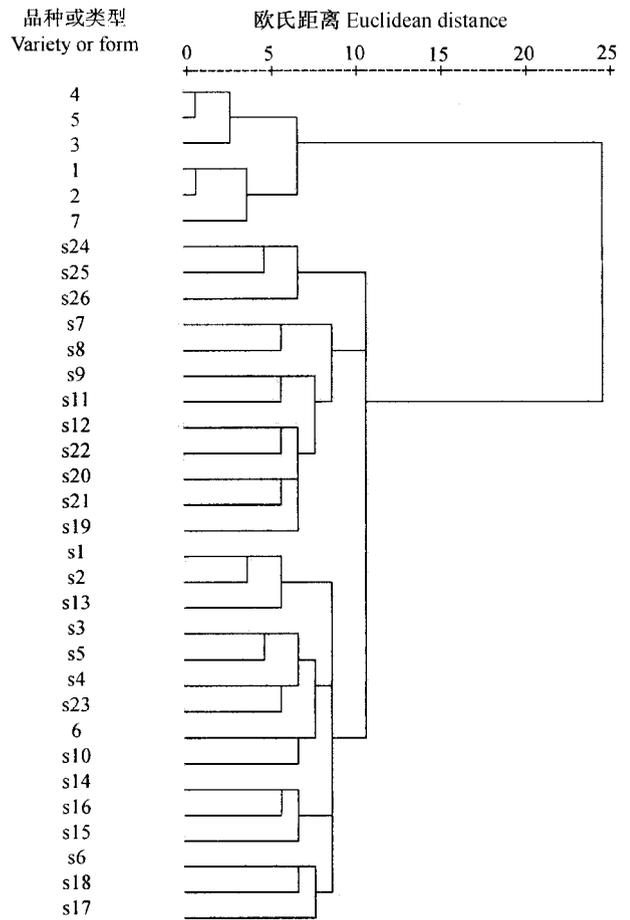


图 2 供试枣品种、酸枣类型的聚类图(离差平方和法)

Fig. 2 Clustering for *Z. jujuba* cultivars and *Z. spinosa* forms tested (Ward's method)
1~7:分别为赞皇大枣、榆底串杆、前台 1 号、元氏串杆、小串杆、紫铃蛋、吕庄串杆 7 个枣品种 *Z. jujuba* cv. Zanhuangdazao, Yudichuangan, Qiantai No.1, Yuanshichuangan, Xiaochuangan, Zilingdan, Luzhuangchuangan in order.

1) 阎桂军.1984.枣细胞学研究.河北农业大学硕士学位论文
2) 李树林.1985.枣花粉形态的研究——论枣的品种分类与进化.河北农业大学硕士学位论文
3) 宋婉.1999.中国枣优良品种 DNA 指纹图谱的研究.北京林业大学博士学位论文
4) 刘孟军.1993.中国枣属植物的分类学研究.北京医科大学博士学位论文

部分数量性状进行了统计分析表明:枣和酸枣在各性状的极端数值上均有交叉,但从标准偏差看,在果实长度、中果皮厚度与果核直径的比及果核长度等性状上存在明显间断。另外,酸枣与枣的果肉 Vc 含量、花蕾的芦丁和桑色素含量及花粉的(异)丙氨酸含量、花粉形态、枝皮过氧化物同工酶谱带差异显著。建议把枣和酸枣定为 2 个独立的种。

以上结果多以 1 个或少数几个酸枣类型作为研究对象。RAPD 可应用于遗传多样性和系统学研究(洪棋滨等,2001;施苏华等,1998;Ayres *et al.*,1999;Huang *et al.*,1998)。本研究利用 22 个引物对赞皇县的 7 个枣品种和 26 个酸枣类型进行了 RAPD 分析,从聚类图上可以看出:截取 $\lambda=12$,可把供试的品种和类型分为 2 类。一类由赞皇大枣、榆底串杆、元氏串杆、小串杆、前台 1 号、吕庄串杆 6 个枣品种组成;另一类由 26 个酸枣类型、紫铃蛋(枣品种)组成。说明,同样生长在赞皇县境内的枣和酸枣基本可以分开。从群体遗传学角度,DNA 水平的研究表明,枣和酸枣宜作为 2 个独立的种。

参 考 文 献

- 洪棋滨,侯 磊,罗小英,等. 2001. 应用 RAPD 分析川西北高原青稞的遗传背景. 中国农业科学,34(2):133 - 138
- 施苏华,唐绍清,陈月琴,等. 1998. 11 种金花茶植物的 RAPD 分析及其系统学意义. 植物分类学报,36(4):317 - 322
- 王中仁. 1996. 植物等位酶分析. 北京:科学出版社
- Ayres D R, Ryan F J. 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi*(Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. American Journal of Botany,86(3):344 - 353
- Huang H W, Dane F, Kubisiak T L. 1998. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the American chestnut(Fagaceae). American Journal of Botany,85(7):1013 - 1021