

# 枣树品种、品系及其近缘种的 RAPD 分析

赵 锦, 刘孟军

(河北农业大学中国枣研究中心, 保定 071001)

**摘要:**对 25 个枣品种、品系及其 2 个近缘种酸枣和毛叶枣进行了 RAPD 分析, 采用类平均法进行聚类并建立了树状图。首次从 DNA 水平上揭示了枣属中这 3 个重要种之间的亲缘关系, 重点探讨了几组枣品种和品系的亲缘关系, 初步建立了 25 个枣品种、品系及酸枣和毛叶枣的 RAPD 指纹, 发现仅用 OPE1、OPE9 和 S130 这 3 个引物就可将其全部分开。

**关键词:**枣树; 近缘种; RAPD 分析

## RAPD Analysis on the Cultivars, Strains and Related Species of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.)

ZHAO Jin, LIU Meng-jun

(Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

**Abstract:** Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) is an important native and advantageous fruit tree in China. The genetic relationships between 25 cultivars, strains, and 2 related species (*Z. acidojujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu. and *Z. mauritiana* Lam.) of Chinese jujube were studied using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique. A tree diagram was constructed by using AVERAGE method. The genetic relationships of some group of cultivars (strains) were discussed in relation to earlier results basing on morphological characters, utilization and distribution. At the same time, the genetic relationships between the three important species were also revealed; RAPD fingerprint system of 25 cultivars (strains) of Chinese jujube and its 2 related species *Z. acidojujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu. and *Z. mauritiana* Lam. was established using only 3 primers: OPE1, OPE9 and S130.

**Key words:** Chinese jujube; Related species; RAPD analysis

枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 是中国最重要的特色和优势果树树种之一, 资源丰富, 栽培品种多达 700 余个<sup>[1]</sup>。目前, 枣的品种分类大多以形态、用途和分布特征等为依据, 易受环境、人为因素影响, 导致同物异名、同名异物现象比较严重。迄今, 能准确反映各品种间亲缘演化关系的系统分类方法尚未建立起来, 这种现状不利于枣品种资源的科学利用。

针对以上问题, 笔者利用近年来以操作简单、迅速而得以广泛应用的 RAPD 技术<sup>[2-5]</sup>, 对枣树的若干名、优、稀、特品种、品系及其近缘种进行了分子鉴

定和亲缘关系分析, 以期枣树优异种质的科学利用及分子标记辅助育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试材包括枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.)、酸枣 (*Z. acidojujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu.) 和毛叶枣 (*Z. mauritiana* Lam.) 3 个种的 27 个品种、品系, 详见表 1。

表 1 供试名、特、优、稀枣品种、品系及其近缘种<sup>1)</sup>

Table 1 Excellent and rare cultivars, strains and related species of Chinese jujube tested in this study

编号 No.	品种/品系/种 Cultivars/strains/species	采集地 Collected location	编号 No.	品种/品系/种 Cultivars/strains/species	采集地 Collected location
1	金丝小枣 Jinsixiaozao	河北沧州 Cangzhou Hebei	15	哈密大枣 Hamidazao	山西太谷 Taigu Shaanxi
2	金丝小枣 Jinsixiaozao	河北沧州 Cangzhou Hebei	16	晋矮 6 号 Jinai6	山西太谷 Taigu Shaanxi
3	无核小枣 Wuhexiaozao	河北沧州 Cangzhou Hebei	17	板栗枣 Banzao	山西太谷 Taigu Shanxi
4	无核小枣 Wuhexiaozao	河北沧州 Cangzhou Hebei	18	早板栗枣 Zaobanzao	山西太谷 Taigu Shanxi
5	大叶无核 Dayewuhe	山西太谷 Taigu Shanxi	19	冬枣 Dongzao	河北沧州 Cangzhou Hebei
6	灰枣 × 无核 Huizao × Wuhe	河北农大 Baoding Hebei	20	山东梨枣 Shandonglizao	山东泰安 Taian Shandong
7	灰枣 Huizao	山西太谷 Taigu Shanxi	21	阜平大枣 Fupingdazao	河北阜平 Fuping Hebei
8	赞皇大枣 Zanhuangdazao	河北赞皇 Zanhuang Hebei	22	木枣 Muzao	陕西清涧 Qingjian Shaanxi
9	赞皇大枣 Zanhuangdazao	河北赞皇 Zanhuang Hebei	23	葫芦木枣 Hulumuzao	陕西清涧 Qingjian Shaanxi
10	赞新大枣 Zanxindazao	山西太谷 Taigu Shanxi	24	月出(韩国) Wolchul( Korean )	河北农大 Baoding Hebei
11	河北龙枣 Hebeilongzao	山西太谷 Taigu Shanxi	25	绵城(韩国) Manseong( Korean )	河北农大 Baoding Hebei
12	河南龙枣 Henanlongzao	山西太谷 Taigu Shanxi	26	酸枣 <i>Z. acidojujuba</i> C. Y. Cheng	河北农大 Baoding Hebei
13	大荔龙枣 Dalilongzao	山西太谷 Taigu Shanxi		et M. J. Liu	
14	相枣 Xiangzao	山西太谷 Taigu Shanxi	27	毛叶枣 <i>Z. mauritiana</i> Lam.	海南海口 Haikou Hainan

<sup>1)</sup> 6 号样品为灰枣与无核小枣杂交后获得的实生苗 Number 6 was the hybrid of Huizao × Wuhexiaozao

## 1.2 方法

采用改进的 CTAB 法,从幼嫩叶片或茎尖中提取基因组 DNA<sup>[6]</sup>。RAPD 扩增反应为 25  $\mu$ l 体系: 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l; 10×PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l; 10 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>引物 1.5  $\mu$ l; 20 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> DNA, 1.5  $\mu$ l; 2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 2  $\mu$ l; 5 U· $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq DNA 聚合酶, 0.3  $\mu$ l; DDW(双蒸水), 15.2  $\mu$ l。加入 18  $\mu$ l 矿物油覆盖,按如下程序进行扩增(最后 4℃保温): 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 36℃ 40 s, 72℃ 1 min, 50 cycles; 72℃ 8 min。

RAPD 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> EB)电泳分离,电泳缓冲液为 0.5×TBE。多态性统计结果应用类平均法(AVERAGE)进行聚类分析,建立树状图。

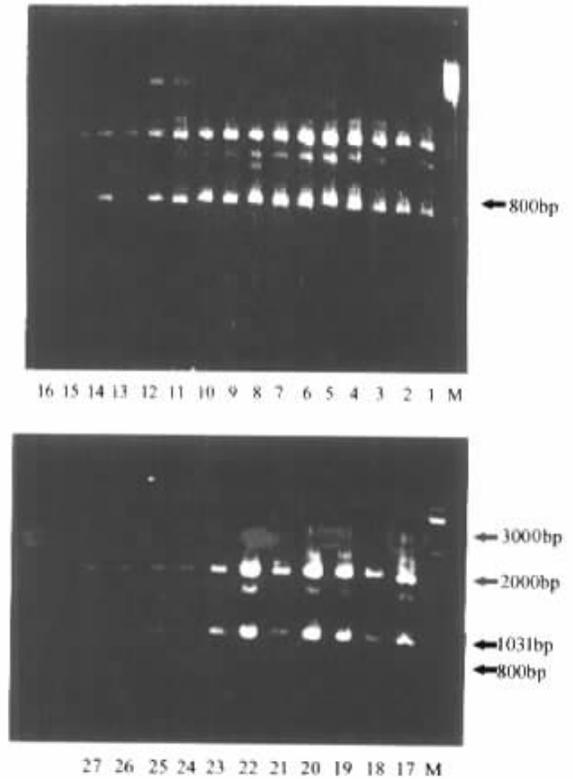
## 2 结果与分析

### 2.1 枣品种、品系及其近缘种 RAPD 扩增结果

本试验利用筛选出的 15 个多态性引物,对 27 个供试样品进行了 RAPD 扩增,共扩增出 92 条 DNA 带,分子量在 300~3 000 bp 之间,其中多态性带 77 条,占总数的 83.69%。OPE2 引物得到的 RAPD 图谱见图 1。聚类分析建立树状图可将供试品种分为 6 大类,见图 2。

### 2.2 枣品种、品系及其近缘种的特征性 RAPD 指纹

本试验在供试的 27 个材料范围内,找到了各自特征性的 RAPD 指纹图谱,如表 2 所示。用 OPE1、OPE9、S130 这 3 个引物可以将除赞皇大枣 2 个品系外的供试枣品种、品系及其近缘种全部分开。其



M 为 DNA 分子量标准(100 bp), 1~27 编号对应的样品名见表 1

M DNA marker(100 base-pair ladder), number 1~27 refer to the samples listed in Table 1

图 1 引物 OPE2 获得的 25 个枣品种、品系及其 2 个近缘种的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD pattern of 25 cultivars, strains and its 2 related species of Chinese jujube amplified using primer OPE2

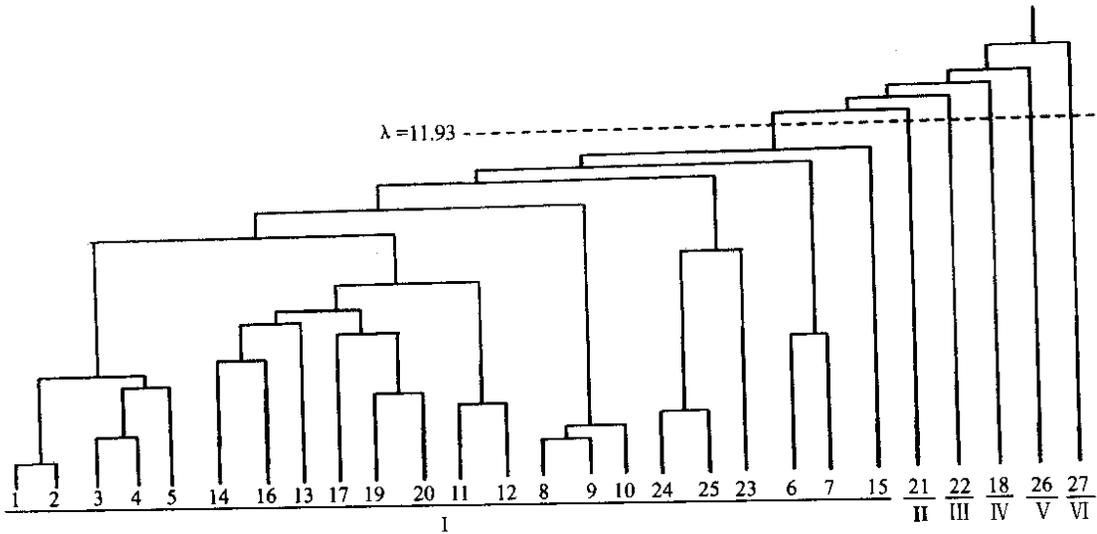


图 2 25 个名特优枣品种、品系及其 2 个近缘种的类平均法树状图

Fig.2 Tree diagram for 25 cultivars , strains and its 2 related species of Chinese jujube( AVERAGE )

表 2 供试 25 个枣品种、品系及其 2 个近缘种的 RAPD 指纹

Table 2 The RAPD fingerprints of 25 cultivars , strains and 2 related species of Chinese jujube

RAPD Marker	品种 /品系/ 种 Cultivars/strains / species																													
	1 ~ 27																													
OPE1 - 490 bp	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPE1 - 1 120 bp	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE1 - 1 250 bp	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPE9 - 660 bp	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPE9 - 800 bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
OPE9 - 1 520 bp	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
OPE9 - 2 000 bp	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
S130 - 1 250 bp	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
S130 - 1 820 bp	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
S130 - 2 100 bp	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	

中各引物的鉴别效率是不同的,以 OPE1 效率最高,可将供试样品分为 16 类,S130 和 OPE9 可将供试样品分别分为 15 类和 13 类。

2.3 几组枣品种、品系及枣近缘种间的亲缘关系分析

2.3.1 毛叶枣、酸枣、枣 从树状图可以看出,毛叶枣均是最后与其它样品聚到一起的,酸枣次之,这说明毛叶枣与其它枣品种间遗传距离最大,酸枣次之。这与传统的分类结果完全一致,即毛叶枣与枣形态和地理分布差异大,被认为是枣属中两个亲缘关系较远的种,而酸枣与枣形态和地理分布相似,枣是由酸枣演化而来的栽培种,亲缘关系很近。

2.3.2 金丝小枣、无核小枣与大叶无核 金丝小枣与无核小枣 2 个品种无论在形态特征上还是地理分布上都非常相似,二者主要是有核、无核的差异。从

聚类图上可以看出,2 个金丝小枣品系、2 个无核小枣品系最早聚到一起,然后与大叶无核(果实无核,但形态上与无核小枣有很大差别)聚为一类。该结果从分子水平上证明了金丝小枣和无核小枣的近缘关系。根据扩增谱带的原始记录,计算出供试 2 个金丝小枣之间遗传距离仅为 0.014,2 个无核小枣之间遗传距离仅为 0.045,金丝小枣与无核小枣间的遗传距离为 0.043 ~ 0.085,大叶无核与金丝、无核小枣之间的遗传距离为 0.118 ~ 0.132,而供试多数品种间的遗传距离在 0.200 ~ 0.577 之间。可见,大叶无核与金丝、无核小枣亲缘关系较近,金丝与无核之间亲缘关系最近,这与形态上三者之间的差异情况基本一致。刘孟军也曾得出类似结果<sup>[7]</sup>。

2.3.3 赞皇大枣与赞新大枣 赞新大枣一直被认为是从内地引入新疆的赞皇大枣的变异。本试验的

RAPD 分析结果完全支持了这种观点。从树状图可以看出,2 个赞皇大枣最早聚到一起,随后与赞新大枣聚集,2 个赞皇大枣与赞新大枣之间遗传距离仅为 0.047,低于大多数品种间的遗传距离。这说明赞新大枣虽发生了一些遗传变异,但其本质上仍应属于赞皇大枣品种群。

**2.3.4 相枣、晋矮 6 号、哈密大枣** 晋矮 6 号是从相枣产区选出的矮化变异类型,果实与相枣的基本一致。树状图中二者很快聚到一起,遗传距离为 0.175,也说明二者亲缘关系较近。

哈密大枣与相枣形态上有些相似之处,故有人怀疑是从内地引入新疆哈密的相枣,但从聚类结果看,二者聚到一起较晚,其遗传距离为 0.269,说明二者亲缘关系较远,应该是两个独立的品种。

**2.3.5 龙枣系列** 龙枣又称龙爪枣、曲枝枣,一般树体小,树姿开张,枝形奇特,观赏价值较高。但不同地区的龙枣外部形态是有差异的,河南龙枣弯曲度最大,河北龙枣次之,陕西大荔龙枣弯曲度最小,而且比前两种要丰产。从本试验聚类结果看,河南龙枣与河北龙枣先聚到一起,遗传距离为 0.117,而陕西大荔龙枣与前 2 种龙枣亲缘关系较远,遗传距离分别为 0.328 和 0.258。彭建营也曾对河北龙枣、山东龙枣、陕西大荔龙枣进行了 RAPD 分析,发现陕西龙枣与河北龙枣、山东龙枣的遗传距离较大,为多起源的不同品种<sup>[8]</sup>。RAPD 分析结果支持《中国果树志·枣卷》将陕西大荔龙枣列为单独一品种,而将河北、河南、山东、山西等地龙枣统称为龙枣<sup>[1]</sup>。

**2.3.6 杂交后代的分子鉴定** 杂交后代应具双亲的特征或与某一亲本比较相近,本试验对灰枣与无核小枣杂交后获得的实生苗进行了分子鉴定。聚类结果表明,该“杂交后代”首先与灰枣聚到一起,遗传距离为 0.180,与无核小枣相聚较晚,遗传距离为 0.267,同时计算出了双亲之间的遗传距离为 0.320。另一方面,该“杂交后代”具有无核小枣的特征带(OPE9-2 000 bp、S130-1 820 bp 等)及灰枣的特征带(S186-500 bp、OPE1-1 250 bp 等)。这些结果表明,该“杂交后代”是灰枣与无核小枣杂交成功的杂种后代。

**2.3.7 韩国的 2 个枣品种** 韩国是世界第二枣树生产国<sup>[9]</sup>。本试验对其 2 个主栽枣品种月出和绵城进行了 RAPD 分析,聚类结果表明,这 2 个品种很快就聚到一起,遗传距离仅为 0.092,而且被包含在整个的第一类中国品种群内。由此分析,韩国枣的遗

传背景是较窄的,而且从起源上看,它们是从中国引种过去的。

**2.3.8 板枣与早板枣** 板枣外形美观,品质优良,是制干、鲜食兼用的优良品种<sup>[1]</sup>。早板枣是板枣产区枣农提供的果形类似板枣的一种类型,因其成熟期比板枣提前近 1 个月,故称“早板枣”。通过 RAPD 分析聚类结果表明,板枣与所谓“早板枣”相聚相对较晚,遗传距离为 0.165,比大叶无核与金丝、无核小枣之间的距离(0.118~0.132)和河北、河南龙枣之间的距离(0.117)都要远。就此看来,应该有两种可能,第一种可能就是“早板枣”因其成熟期比板枣提前了近 1 个月,发生了较大变异,故与板枣的遗传距离拉得较远;另一种更大的可能是所谓的“早板枣”只是生长在板枣产区,某些外部特征与板枣相似,实质上是与板枣完全不同的另一种类型。

### 3 讨论

从整个聚类结果看,由 RAPD 分析反映的种间、品种间遗传关系远近情况与传统观点基本一致。这些一致性进一步证实了 RAPD 分析的可靠性与科学性。同时,RAPD 技术为准确判断早板枣与板枣、哈密大枣与相枣这些亲缘关系较模糊的品种间的亲缘关系提供了强有力的证据。说明 RAPD 分析不仅可以从 DNA 水平上对以往研究结果进行验证,而且可以起到进一步的修正作用。

就 RAPD 技术的鉴定效率而言,本试验仅用 3 个引物就将供试的枣品种及其近缘种全部分开。同时,还获得了绝大多数供试种、品种及品系的特征性 RAPD 标记。从不同引物的鉴定效率分析,增加引物筛选数量,可望获得更高效率的引物。因此,RAPD 技术应用在枣品种、品系的分析鉴定中是完全可行的,并可以很好地反映各品种、品系的亲缘关系,具有良好的应用前景。

### References

- [1] 曲泽洲,王永惠.中国果树志·枣卷.北京:中国林业出版社,1993:22.  
Qu Z Z, Wang Y H. *Chinese Fruit Trees Record*. Chinese Jubu. Beijing: Chinese Forestry Publisher, 1993:22. (in Chinese)
- [2] Parent J G, Lacroix M, Page D, Vézina L, Végiard S. Identification of *Eruinia carotovora* from soft rot disease plant by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Disease*, 1996, 80(50):494-499.
- [3] Laroche A, Gaudet D A, Schoalje G B, et al. Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating,

- RAPD and RFLP analysis. *Mycological Research*, 1995, 99 (3): 297 - 310.
- [ 4 ] 张恒庆, 安利佳, 祖元刚, 红松. RAPD 试验中各组成成分含量对试验结果的影响. *植物研究*, 1999, 19(2): 183 - 188.  
Zhang H Q, An L J, Zu Y G. Effect on the experimental result of the content of composition in RAPD experiment of *Pinus koraiensis*. *Bulletin of Botanical Research*, 1999, 19(2): 183 - 188. (in Chinese)
- [ 5 ] 胡春根, 郝玉, 邓秀新, 史永忠. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法. *遗传*, 1998, 20(4): 31 - 33.  
Hu C G, Hao Y, Deng X X, Shi Y Z. DNA extraction method for RAPD analysis in pears. *Hereditas*, 1998, 20(4): 31 - 33. (in Chinese)
- [ 6 ] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992.  
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning A laboratory Manual* 2nd ed. Translated by Jin D Y, Li M F. Beijing: Science Press, 1992.
- [ 7 ] 刘孟军. RAPD 技术在枣和酸枣种质鉴定中的应用研究. 中国科协第二届青年学术年会园艺学论文集, 北京: 北京农业大学出版社, 1995: 337 - 341.  
Liu M J. The application of RAPD technique on germplasm identification of Chinese jujube and Acid jujube. *The Second Annual Meeting of Chinese Association of Scientists ( Horticultural Theses )*. Beijing: Press of Beijing Agricultural University, 1995: 337 - 341. (in Chinese)
- [ 8 ] 彭建营, 束怀瑞, 孙仲序. 中国枣种质资源的 RAPD 分析. *园艺学报*, 2000, 27(3): 171 - 176.  
Peng J Y, Shu H R, Sun Z X. RAPD analysis of germplasm resources on Chinese Date. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(3): 171 - 176. (in Chinese)
- [ 9 ] 刘孟军. 韩国枣树的生产现状及主要科研成果. *河北林果研究*, 1999, 14(1): 94 - 100.  
Liu M J. Present production status and reseach achievements of Chinese jujube in South Korea. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 1999, 14(1): 94 - 100. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)