

基于 RAPD 分子标记芹菜品种亲缘关系分析研究

刘庞源, 张宝海, 何伟明, 赵泓, 王慧杰 (国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097)

摘要 [目的]研究 RAPD 分子标记芹菜品种亲缘关系分析方法。[方法]以来自中国不同地区 40 种不同品种的芹菜为试材, 对 RAPD 技术在鉴定芹菜品种中的科学性进行验证与分析。[结果]13 种不同长度引物扩增的不同品种芹菜 DNA 的谱带清晰度以及数量等有明显区别, 在相似系数为 0.61 时, 可将所有测试芹菜品种划分为 4 类。[结论]RAPD 技术是适用于分析芹菜品种亲缘关系的简易与理想的 DNA 分子标记技术, 能很好的区分芹菜品种间亲缘关系的远近。

关键词 芹菜(*Apium graveolens* L.); RAPD; 亲缘关系

中图分类号 S636.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)27-10923-03

Analytical Method of Celery Cultivars Relationship Based on RAPD Molecular Markers

LIU Pang-yuan et al (National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100097)

Abstract With forty variety of celery from different regions of China as test materials, the scientific character of RAPD technology in the identification of celery cultivars was verified and analyzed. The results showed that the spectral definition and quantity of different cultivars celery DNA amplified by thirteen lengths primers have obvious differences. When the correlation coefficient is 0.61, the tested celery cultivars could be divided into 4 categories, indicating RAPD technology is a simple and ideal DNA molecular marker technology for analyzing celery cultivars relationships.

Key words *Apium graveolens* L.; RAPD; Relationship

芹菜(*Apium graveolens* L.)是伞形科(Umbelliferae)2年生草本植物, 原产地中海沿岸^[1], 在中国已有 2 000 多年的栽培历史, 具有药用和保健功效, 深受种植者和消费者的喜爱。我国南北各地均有种植, 芹菜种植面积逐年扩大, 一年四季均可生产。目前, 国内种植的芹菜品种主要是国内地方品种和国外引进的杂交品种, 同名不同种及同种不同名的现象较多, 且芹菜品种间形态特征差异不明显, 从植物学上很难区分, 易受环境和人为因素的影响; 而芹菜为 2 年生蔬菜, 生长期长, 因此进行芹菜优良性状早期鉴定和遗传关系研究十分重要。笔者提供了一种基于 RAPD 分子标记分析芹菜品种亲缘关系的方法, 以期对芹菜的鉴定与合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。供试芹菜, 共 40 个, 分别引种于北京、天津、河北和西安等地, 是当地的主栽品种(表 1)。

1.1.2 主要仪器。CoolSafe™ - 55 - 4 真空冻干机, 由 SCANVAC 公司生产; NANODROP 2000 微量分光光度计, 由 Thermo 公司生产。

1.1.3 主要试剂。随机引物, 购自北京赛百盛基因技术有限公司; 2 × EasyTaq PCR SuperMix 和 DNA 分子量标准 Trans5K DNA Marker, 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 取样及样品处理。取正常生长的不同品种芹菜, 每个品种 10 株, 每株 10 片新鲜幼叶放入冰盒, 置于 -40 °C 超低温冰箱中储存 24 h 后冷冻干燥成粉末状, 经真空冻干机冻干后, 用手轻微揉碎, 充分混匀, 待用。

表 1 芹菜品种及其来源

编号	保存编号	品种名称	详细来源
1	TC08001	斯地德西芹	河北农欢种业
2	TC08014	文图拉	天津 TIANYU SEED
3	TC08015	改良文图拉	北京嘉禾千秋农业技术研究所
4	TC08016	文图拉	北京市特种蔬菜种苗公司
5	TC08017	文图拉	北京美农东方科技发展有限公司
6	TC08018	文图拉	北京金丹隆种子有限公司
7	TC08019	聚星文图拉	北京聚萍兴利农业科技有限公司
8	TC08020	文图拉	北京绿金蓝种苗有限责任公司
9	TC08002	奥德斯西芹	河北农欢种业
10	TC08003	尤特	北京绿金蓝种苗有限责任公司
11	TC08004	AX100	北京阿特拉斯种业有限公司
12	TC08005	ATX200	北京阿特拉斯种业有限公司
13	TC08006	Rising Sun	天津科润蔬菜研究所
14	TC08007	皇菲	天津科润蔬菜研究所
15	TC08008	法国西芹	北京生光地公司
16	TC08009	皇后西芹	巨青(Tezier)
17	TC08010	美琪	北京华耐种子有限公司
18	TC08011	美国百利	河北大禹种业有限公司
19	TC08012	精选加州王	北京市特种蔬菜种苗公司
20	TC08013	CALIFORNIA EMPEROR	北京市特种蔬菜种苗公司
21	TC08021	阿波罗	北京市特种蔬菜种苗公司
22	TC08022	玉皇	RIJK ZWAAN
23	TC08023	帝王	RIJK ZWAAN
24	TC08024	京芹 1 号	北京京研益农科技发展有限公司
25	TC08025	百利	河北邯郸市裕康蔬菜种苗服务中心
26	TC08026	美国西芹	广州番禺丰顺种子经营部
27	TC08027	津锋	天津市兴科种子有限公司
28	TC08028	希望	河北邯郸市永年裕康蔬菜种苗服务中心
29	TC08029	皇冠	法国
30	TC08030	名旌	北京绿金蓝种苗有限责任公司
31	TC08031	特选加州王	北京市特种蔬菜种苗公司
32	TC36001	四季西芹	天津科润蔬菜研究所
33	TC36002	百强西芹	天津科润蔬菜研究所
34	TC37001	本芹	甘肃张掖
35	TC37002	四季小香芹	北京市芳莹苑种子有限公司
36	TC37003	日本小香芹	北京市特种蔬菜种苗公司
37	TC37004	四季实芹	山东宁阳县华鲁种业有限公司
38	TC37005	马家沟芹菜	山东
39	TC38001	红芹	美毅
40	TC38002	紫芹菜	北京市特种蔬菜种苗公司

基金项目 北京市农业局叶类蔬菜产业技术体系北京市创新团队 blvt-05。

作者简介 刘庞源(1965 -), 女, 北京人, 副研究员, 从事种质资源研究, E-mail: liupangyuan@nercv.org。

收稿日期 2013-07-14

1.2.2 2 × CTAB 溶液的配制。取 100 mmol/L Tris - HCl 缓

冲液 (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA - Na₂ (EDTA 二钠) (pH8.0), 1.4 mol/L NaCl, 2% (2 g/L) CTAB, 2 ml/L (0.2%) DNA 提取前加入 β-巯基乙醇, 混匀即得。

1.2.3 DNA 的提取。①取 6.0 ml 预热到 60 °C 的 2 × CTAB 溶液于装有 0.200 g 叶片粉末的离心管中, 60 °C 水浴 30 min, 间或轻摇几次, 使粉末和溶液混匀; ②取出离心管, 待冷却后加入 6.0 ml 氯仿 - 异戊醇 (V/V, 24:1), 置于摇床上充分混匀 30 min; ③12 000 r/min 离心 10 min; ④将上清液转入新的离心管中, 加入 2 倍体积预冷 (-20 °C) 的无水乙醇, 混匀, 在 -20 °C 冰箱中存放 30 min, 使核酸沉淀成絮状; ⑤室温下 12 000 r/min 离心 10 min; ⑥弃上清, DNA 沉淀风干后, 溶解于 800 μl 去离子水中, 作为 PCR 模板 DNA, -20 °C 保存备用; ⑦使用 0.8% 琼脂糖对所获基因组 DNA 的纯度进行检测

表 2 140 个随机引物编号及序列

SBS A			
01 CAGGCCCTTC	02 TGCCGAGCTG	03 ACTCAGCCAC	04 AATCGGGCTG
05 AGGGTCTTTC	06 GGTCCCTGAC	07 GAAACGGGTG	08 GTGACGTAGG
09 GGGTAACGCC	10 GTGATCGCAG	11 CAATCGCCGT	12 TCGGCGATAG
13 CAGCACCCAC	14 TCTGTGCTGG	15 TTCCGAACCC	16 AGCCAGCGAA
17 GACCGCTTGT	18 AGGTGACCGT	19 CAAACGTCCG	20 GTTGCGATCC
SBS B			
01 GTTTCGCTCC	02 TGATCCCTGG	03 CATCCCCTG	04 GGACTGGAGT
05 TGCGCCCTTC	06 TGCTCTGCCC	07 GGTGACGCAG	08 GTCCACACGG
09 TGGGGACTTC	10 CTGCTGGGAC	11 GTAGACCCGT	12 CCTTGACGCA
13 TTCCCGCGCT	14 TCCGCTCTGG	15 GGAGGGTGTT	16 TTTGCCCGGA
17 AGGAACGAG	18 CCACAGCAGT	19 ACCCCCGAAG	20 GGACCCTTAC
SBS C			
01 TTCGAGCCAG	02 GTGAGGCGTC	03 GGGGGTCTTT	04 CCGCATCTAC
05 GATGACCCGC	06 GAACGGACTC	07 GTCCCGACGA	08 TGGACCCGTC
09 CTCACCGTCC	10 TGCTTGGGTG	11 AAAGCTGCGG	12 TGTCATCCCC
13 AAGCTCTGTC	14 TGGCTGCTTG	15 GACGGATCAG	16 CACACTCCAG
17 TTCCCGCCAG	18 TGAGTGGGTG	19 GTTGCCAGCC	20 ACTTCCGCCA
SBS D			
01 ACCGCGAAGG	02 GGACCCAACC	03 GTCGCCGTCA	04 TCTGGTGAGG
05 TGAGCGGACA	06 ACCTGAACGG	07 TTGGCACGGG	08 GTGTGCCCCA
09 CTCTGGAGAC	10 GGTCTACACC	11 AGCGCCATTG	12 CACCGTATCC
13 GGGGTGACGA	14 TTCCCCAAG	15 CATCCGTGCT	16 AGGGCGTAAG
17 TTTCCACGG	18 GAGAGCCAAC	19 CTGGGGACTT	20 ACCCGGTAC
SBS E			
01 CCAAGGTCC	02 GGTGCGGGAA	03 CCAGATGCAC	04 GTGACATGCC
05 TCAGGGAGGT	06 AAGACCCCTC	07 AGATGCAGCC	08 TCACCACGGT
09 CTFACCCCGA	10 CACCAGGTGA	11 GAGTCTCAGG	12 TTATCGCCCC
13 CCCGATTCGG	14 TGCCGGCTGAG	15 ACGCACAACC	16 GGTGACTCTG
17 CTACTGCCGT	18 GGACTGCAGA	19 ACGGCGTATG	20 AACGGTGACC
SBS M			
01 GTTGGTGGCT	02 ACAACGCCCTC	03 GGGGGATGAG	04 GGCGGTTGTC
05 GGAACCGTGT	06 CTGGGCAACT	07 CCGTACTCA	08 TCTGTTCCCC
09 GTCTTGCGGA	10 TCTGGCGCAC	11 GTCCACTGTG	12 GGGACGTTGG
13 GGTGGTCAAG	14 AGGGTCTGTC	15 GACCTACCAC	16 GTAACCAGCC
17 TCAGTCCGGG	18 CACCATCCGT	19 CCTTCAGGCA	20 AGGTCTTGGG
SBS N			
01 CTCACGTTGG	02 ACCAGGGGCA	03 GGTACTCCCC	04 GACCGACCCA
05 ACTGAACGCC	06 GAGACGCACA	07 CAGCCAGAG	08 ACCTCAGCTC
09 TGCCGGCTTG	10 ACAACTGGGG	11 TCGCCGAAA	12 CACAGACACC
13 AGCGTCACTC	14 TCGTGGGGGT	15 CAGCGACTGT	16 AAGCGACCTG
17 CATTTGGGGG	18 GGTGAGGTCA	19 GTCCGTACTG	20 GGTGCTCCGT

测, 利用蛋白核酸定量测定仪检测 DNA 浓度。使用 NANO-DROP 2000 微量分光光度计直接测得 DNA 浓度, $OD_{260/280}$ 值在 1.8 ~ 2.0, $OD_{260/230}$ 在 2.0 ~ 2.5, DNA 浓度大于 10 mg/ml。

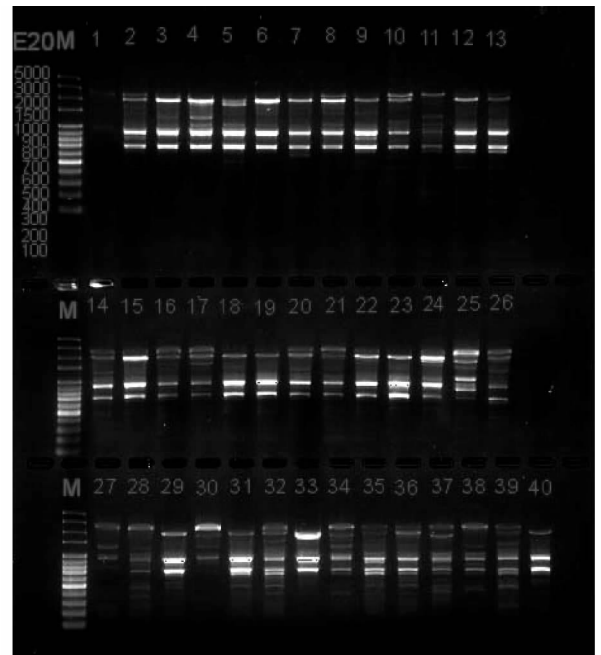
1.2.4 DNA 纯度及浓度测定。以芹菜幼叶干粉为材料, 分别取 0.200 g, 采用改良 2 × CTAB (提取缓冲液) 提取总 DNA, 使用 0.8% 琼脂糖对所获基因组 DNA 的纯度进行检测, 并利用蛋白核酸定量测定仪检测 DNA 浓度。

1.2.5 引物筛选和 RAPD 分析。对芹菜进行 RAPD 分析的 PCR 扩增体系优化。以 DNA 模板量分别为 5、10、20、40、60、80 和 100 ng 进行试验, 测定结果选择 20 ng; 然后, 选取 40 个芹菜品种进行 RAPD 140 个引物 (表 2) 筛选; 并从得到的 DNA 指纹图谱中, 筛选出 13 个扩增带清晰、多态性明显、重复性好的引物, 进行 PCR 扩增。反应体系为 10 μl 2 × EasyTaq PCR SuperMix (+ dye) + 2 μl 5mmol/L 引物 + 20 ng DNA, 总体积为 20 μl。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 330 s; 94 °C 变性 90 s, 40 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 120 s, 40 个循环; 最后于 72 °C 延伸 600 s。扩增产物用 1.6% 的琼脂糖 (含 1% Golden view) 凝胶电泳分离 2 ~ 3 h, 电压为 6 V/cm; 在 UV 光下检测扩增结果并通过凝胶成像系统 (Gel Doc XR⁺) 照相, 分别得到 40 种芹菜的随机扩增多态 DNA 标准图谱。

1.2.6 统计分析。统计样本扩增条带 (每条多条带视为 1 个等位基因, 有带赋值为 1, 无带赋值为 0), 利用 NTSYS 软件对数据进行分析, 以不加权重对算术平均法 (UPGMA) 对材料进行聚类分析作图。

2 结果与分析

2.1 40 种芹菜采用引物扩增的 DNA 标准图谱分析 试验结果表明, 采用引物扩增后, 40 种芹菜的 DNA 均产生了一种特有的 RAPD 指纹图谱。图 1 是用其中一个引物 SBSE20 扩



注: M 为 Trans5K DNA Marker Gol49; 1 ~ 40 为 40 种不同品种芹菜。
图 1 40 个芹菜品种采用引物 SBS E20 (AACGGTGACC) 扩增的 DNA 标准图谱

增的 RAPD 指纹图谱。对于供试芹菜品种的 5 个重复个体而言,引物 SBSE20 分别扩增产生相一致的 DNA 指纹图谱,出现多态性。而且,40 种芹菜品种扩增图谱相互之间有明显相同和不同的条带。这可以从分子学水平上表明,RAPD 技术能够判定芹菜品种亲缘关系的远近。

2.2 芹菜亲缘关系的鉴定 根据分子标记数据获得的聚类图(图 2),在相似系数为 0.61 时进行划分,可将所有测试

品种划分为 4 类。其中第 1 类主要为 22 种西芹品种。第 2 类品种号分别为:33、36、37 和 40,为本芹。第 3 类品种号分别为:9、12、13、29、15、17、22 和 34,属于西芹类型,生长势强。第 4 类品种号分别为:26、31、28、39、38 和 35,属于西芹与本亲的中间类型。芹菜品种存在地域差别,随着交通便利发展和科技的进步,地域影响正在减小,特别是北京地区,由于地理位置的特殊性,品种起源比较复杂。

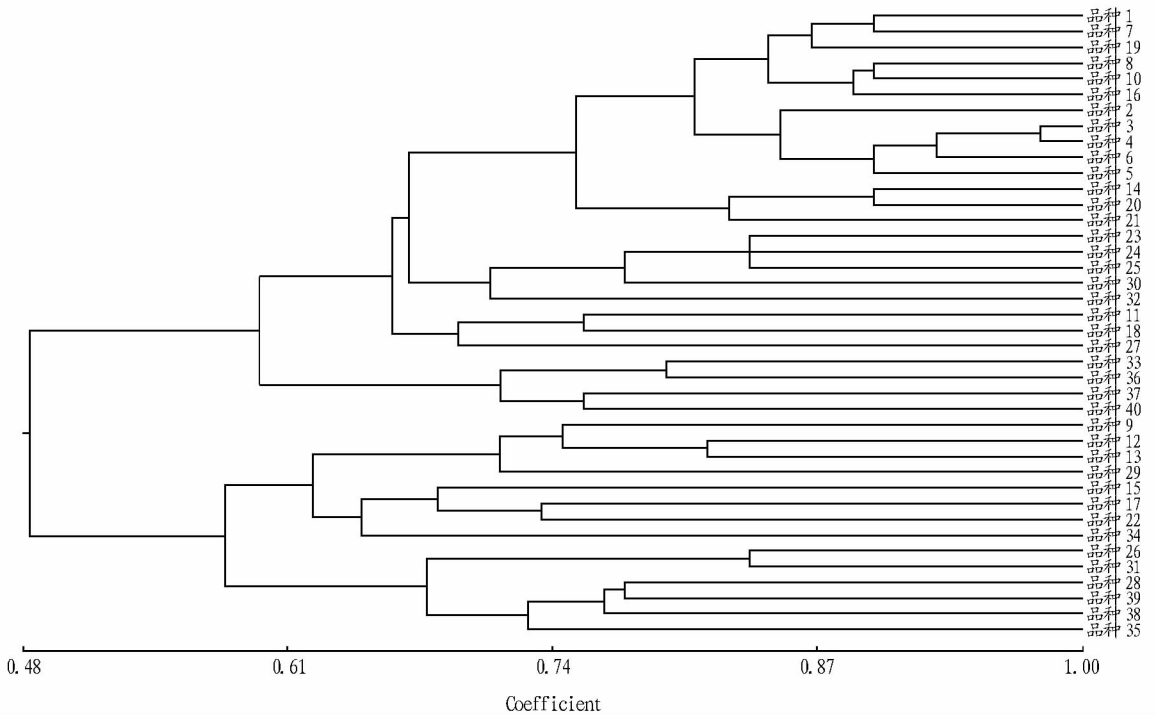


图 2 40 份芹菜品种的聚类分析树状图谱

3 结论与讨论

聚类分析在遗传相似系数为 0.61 水平上,将 40 个芹菜品种进行亲缘关系分析,将 40 个品种分为 4 大类,第 1 类和第 3 类都属于西芹类型,植株抱合紧实,开展度小,叶柄实心,叶肉厚,口味较淡。而第 3 类与第 1 类的区别是侧芽数普遍低于第 1 类。第 2 类为本芹类型,植株松散,开展度大,叶肉较薄,口味浓。第 4 类为西芹与本芹的中间型,叶柄比西芹叶柄窄,叶柄较长,实心。

试验结果表明,北方地区栽培的主要芹菜资源亲缘关系较近,聚类分析结果与地域来源和形态特征有一定对应关系。结果显示,大部分芹菜资源集中到第 1 类,说明芹菜资源亲缘关系较近,也说明我国栽培的芹菜资源遗传背景比较狭窄。另外,中国本芹与西芹在形态上具有极大的区别,个别西芹品种归类到本芹类中,但比较分散,与某些本芹的亲缘关系较近。另外,也有个别本芹品种归属到西芹类别中,可能是同名异物造成的结果,或是在经过长期栽培过程中与其他种杂交出现不同方向的进化,证实本芹与西芹具有较近的亲缘关系。

参考文献

[1] AN N, GUO H B, KEW D. Genetic Variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo*

nucifera Gaertn. ssp. *nucifera*) Germplasm from Chi - Na Assessed by RAPD Markers[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(1): 31 - 39.

[2] YANG R W, ZHOU Y H, DING C B, et al. *Biologia Plantarum*, Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers[J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(2): 237 - 241.

[3] WANG Y J, LU J N. The research on RAPD genetic markers of grape seedlessness gene[J]. *Journal of Northwest A & F University Nat Sci Ed*, 1996, 5(24): 10 - 20.

[4] WILLIAMS J G K, KUBELIKA R, LIVAK J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531 - 6535.

[5] LIN K H, LAI Y C, LI H C. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis[J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 120(1): 2 - 7.

[6] CAI Y L, CAO D W, ZHAO G F. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 111(3): 248 - 254.

[7] 马艳芝, 张玉星. 梨种质资源遗传多样性研究中的 RAPD 技术引物筛选[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(11): 30 - 33.

[8] 高道侠, 文海涛, 林励, 等. 江西酸橙不同栽培变种 RAPD 分析[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3457 - 3459.

[9] 李莉, 彭建营, 白瑞霞. 中国枣属植物亲缘关系的 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2009, 36(4): 475 - 480.

[10] 杨向晖, 李平, 刘成明, 等. 枇杷属植物及其近缘属植物亲缘关系的 RAPD 分析[J]. *果树学报*, 2009, 26(1): 55 - 59.

[11] 谭雪, 郭爽, 郑少薇, 等. 菜薹种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J]. *华北农学报*, 2011(S1): 18 - 22.