

The Study of Based on RAPD Molecular Markers in Celery Cultivars Relationship

Liu Panguan, Zhang Baohai, Zhao Hong, He Weiming, Wang Huijie

National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing, China

Email address:

liupanguan@nercv.org (Liu Panguan), zhangbaohai@nercv.org (Zhang Baohai), zhaohong@nercv.org (Zhao Hong), heweiming@nercv.org (He Weiming), 1416402647@qq.com (Wang Huijie)

To cite this article:

Liu Panguan, Zhang Baohai, Zhao Hong, He Weiming, Wang Huijie. The Study of Based on RAPD Molecular Markers in Celery Cultivars Relationship. *Science Discovery*. Vol. 5, No. 5, 2017, pp. 312-316. doi: 10.11648/j.sd.20170505.12

Received: March 21, 2017; Accepted: July 6, 2017; Published: August 4, 2017

Abstract: In this study, from forty different varieties of celery in different regions of China as test material, the scientific character of RAPD technology in the identification of celery cultivars was carried out in the verification and analysis technology. The results show that the RAPD can well distinguish the genetic relationship of celery varieties of far and near, is suitable for the analysis of celery cultivars relationship between simple and ideal DNA molecular marker technology. One of the thirteen bases of different length of primer RAPD technique in the analysis of celery cultivars relationship between definition and the number of bands have the obvious difference, method based identification as celery varieties with different genetic relationship.

Keywords: Celery, RAPD, Relationship

芹菜品种资源亲缘关系的RAPD的研究

刘庞源, 张宝海, 赵泓, 何伟明, 王慧杰

国家蔬菜工程技术研究中心, 北京, 中国

邮箱

liupanguan@nercv.org (刘庞源), zhangbaohai@nercv.org (张宝海), zhaohong@nercv.org (赵泓), heweiming@nercv.org (何伟明), 1416402647@qq.com (王慧杰)

摘要: 本研究以来自中国不同地区四十种不同品种芹菜为试材, 对RAPD技术在鉴定芹菜品种中的科学性进行了技术上的验证与分析。结果表明通过RAPD技术能很好的区分芹菜品种间亲缘关系的远近, 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。其中十三个碱基数不同长度的引物的RAPD技术在芹菜品种亲缘关系分析中体现出谱带清晰度以及数量等有明显区别, 以此为基础作为鉴定芹菜的不同品种的亲缘关系的方法。

关键词: 芹菜, RAPD, 亲缘关系

1. 引言

芹菜 (*Apium graveolens* L.) 是伞形花科二年生草本植物, 原产地中海沿岸[1], 在中国已有2000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。目前中国南北各地均有种植, 芹菜种植面积逐年扩大, 可

以一年四季周年生产。目前中国国内种植的芹菜品种主要是有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, 再加

上芹菜味二年生蔬菜，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。

本研究提供了一种基于RAPD分子标记分析的芹菜品种亲缘关系的分析方法。

2. 材料与方法

2.1. 材料

供试材料共40个，分别引种于北京、天津、河北、西安等地，是当地的主栽品种，请参见表1。

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Trans 5K DNA Marker购于北京全式金生物技术有限公司。

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	亘青 (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中心
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	北京市芳萱苑种子有限公司
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

2.2. 取样及样品处理

采用正常生长的芹菜品种，每个品种10株，每株10片新鲜幼叶放入冰盒，置于-40℃超低温冰箱中储存24h后冷冻干燥成粉末状（由SCANVAC公司生产的CoolSafe™-55-4真空冻干机冻干后，用手轻微揉碎），将其充分混匀；

2.3. NA提取及其纯度和浓度监测

以幼叶干粉为材料，取0.2g，采用改良2×CTAB（提取缓冲液）提取总DNA，使用0.8w%琼脂糖对所获基因组DNA的纯度进行检测，利用蛋白核酸定量测定仪检测DNA浓度。

2.3.1. 2×CTAB的配制方法

成分终浓度

Tris-HCl缓冲液 (pH8.0) 100mmol/L,
EDTA-Na₂ (EDTA二钠) (pH8.0) 20mmol/L,
NaCl1.4mol/L,
CTAB2w% (20g/L) ,
DNA提取前加入 β-巯基乙醇2ml/L (0.2w%) 。

2.3.2. DNA提取方法

(1) 取6ml预热到60°C的2×CTAB溶液于装有0.2g叶片粉末的离心管中, 60°C水浴30分钟, 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6ml 氯仿-异戊醇 (体积比24: 1), 置于摇床上30分钟充分混匀; (3) 12000rpm离心10分钟; (4) 将上清液转入新的离心管中, 加入2倍体积预冷 (-20°C) 无水乙醇, 混匀, 在-20°C冰箱中放30分钟, 使核酸沉淀成絮状; (5) 室温下12000 rpm离心10分钟; (6) 弃上清, DNA沉淀风干后,

溶解于800μl去离子水中, 作为PCR模板DNA, -20°C保存备用;

使用0.8w%琼脂糖对所获基因组DNA的纯度进行检测, 利用蛋白核酸定量测定仪检测DNA浓度。使用Thermo公司NANODROP2000微量分光光度计直接测得DNA浓度, OD260/280的比值在1.8-2.0之间, OD260/230的比值在2.0-2.5之间, DNA浓度大于10mg/ml。

2.4. 引物筛选和RAPD分析

在对芹菜进行RAPD分析的PCR扩增体系优化——对DNA模板量从5ng, 10ng, 20ng, 40ng, 60ng, 80ng, 100ng进行优化, 最总选择20ng。然后, 选取40个 (表1) 芹菜品种进行RAPD140个引物 (见表2) 筛选。

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 (见图1)。

表2 140个随机引物编号及序列。

SBSA			
01CAGGCCCTTC	02TGCCGAGCTG	03AGTCAGCCAC	04AATCGGGCTG
05AGGGGTCTTG	06GGTCCCTGAC	07GAAACGGGTG	08GTGACGTAGG
09GGGTAACGCC	10GTGATCGCAG	11CAATCGCCGT	12TCGGCGATAG
13CAGCACCCAC	14TCTGTGCTGG	15TTCCGAACCC	16AGCCAGCGAA
17GACCGCTTGT	18AGGTGACCGT	19CAAACGTCGG	20TTGCGATCC
SBSB			
01GTTTCGCTCC	02TGATCCCTGG	03CATCCCCCTG	04GGACTGGAGT
05TGCGCCCTTC	06TGCTCTGCCC	07GGTGACGCAG	08GTCCACACGG
09TGGGGGACTC	10CTGCTGGGAC	11GTAGACCCGT	12CCTTGACGCA
13TTCCCCCGCT	14TCCGCTCTGG	15GGAGGGTGTT	16TTTGCCCGGA
17AGGGAACGAG	18CCACAGCAGT	19ACCCCGAAG	20GGACCCTTAC
SBSC			
01TTCGAGCCAG	02GTGAGGCGTC	03GGGGGTCTTT	04CCGCATCTAC
05GATGACCGCC	06GAACGGAATC	07GTCCCGACGA	08TGGACCGGTG
09CTCACCGTCC	10TGCTGGGTG	11AAAGCTGCGG	12TGTCATCCCC
13AAGCCTCGTC	14TGCGTGCTTG	15GACGGATCAG	16CACACTCCAG
17TTCCCCCAG	18TGAGTGGGTG	19GTTGCCAGCC	20ACTTCGCCAC
SBSD			
01ACCGCGAAGG	02GGACCCAACC	03GTCGCCGTCA	04TCTGGTGAGG
05TGAGCGGACA	06ACCTGAACGG	07TTGGCACGGG	08GTGTGCCCCA
09CTCTGGAGAC	10GGTCTACACC	11AGCGCCATTG	12CACCGTATCC
13GGGGTGACGA	14CTTCCCCAAG	15CATCCGTGCT	16AGGGCGTAAG
17TTCCACCGG	18GAGAGCCAAC	19CTGGGGACTT	20ACCCGGTCAC
SBSE			
01CCCAAGGTCC	02GGTGCGGGAA	03CCAGATGCAC	04GTGACATGCC
05TCAGGGAGGT	06AAGACCCCTC	07AGATGCAGCC	08TCACCACGGT
09CTTCACCCGA	10CACCAGGTGA	11GAGTCTCAGG	12TTATCGCCCC
13CCCGATTCCG	14TGCGGCTGAG	15ACGCACAACC	16GGTGAATGTG
17CTACTGCCGT	18GGACTGCAGA	19ACGGCGTATG	20AACGGTGACC
SBSM			
01GTTGGTGGCT	02ACAACGCCTC	03GGGGGATGAG	04GGCGGTTGTC
05GGGAACGTGT	06CTGGGCAACT	07CCGTGACTCA	08TCTGTTCCCC
09GTCTTGCGGA	10TCTGGCGCAC	11GTCCACTGTG	12GGGACGTTGG
13GGTGGTCAAG	14AGGGTCGTTC	15GACCTACCAC	16GTAACCAGCC
17TCAGTCCGGG	18CACCATCCGT	19CCTTCAGGCA	20AGGTCTTGGG
SBSN			
01CTCACGTTGG	02ACCAGGGGCA	03GGTACTCCCC	04GACCGACCCA
05ACTGAACGCC	06GAGACGCACA	07CAGCCCAGAG	08ACCTCAGCTC
09TGCCGGCTTG	10ACAACCTGGG	11TCGCCGAAA	12CACAGACACC
13AGCGTCACTC	14TCGTGCGGGT	15CAGCGACTGT	16AAGCGACCTG
17CATTGGGGAG	18GGTGAGGTCA	19GTCCGTA CTG	20GGTGCTCCGT

40个芹菜品种采用13个引物，在Gene Amp PCR System 9700PCR扩增仪上进行DNA扩增。采用20μL反应体系进行PCR扩增，反应体系总体积为20μL，含10μL2×EasyTagPCRSuperMix (+dye)（北京全式金生物技术有限公司）+2μL5mM引物+20ngDNA。

PCR反应程序为：94°C预变性5min30s；接着94°C变性1min30s，40°C复性1min，72°C延伸2min，40个循环；最后72°C后延伸10min。

扩增产物用1.6w%、含1v%Goldenview的琼脂糖凝胶电泳分离2-3h，电压为6V/cm；在UV光下检测扩增结果并通过凝胶成像系统（GelDocXR⁺）照相，分别得到40种芹菜的随机扩增多态DNA标准图谱，如其中SBSE20引物的扩增多态DNA标准图谱（图1）。

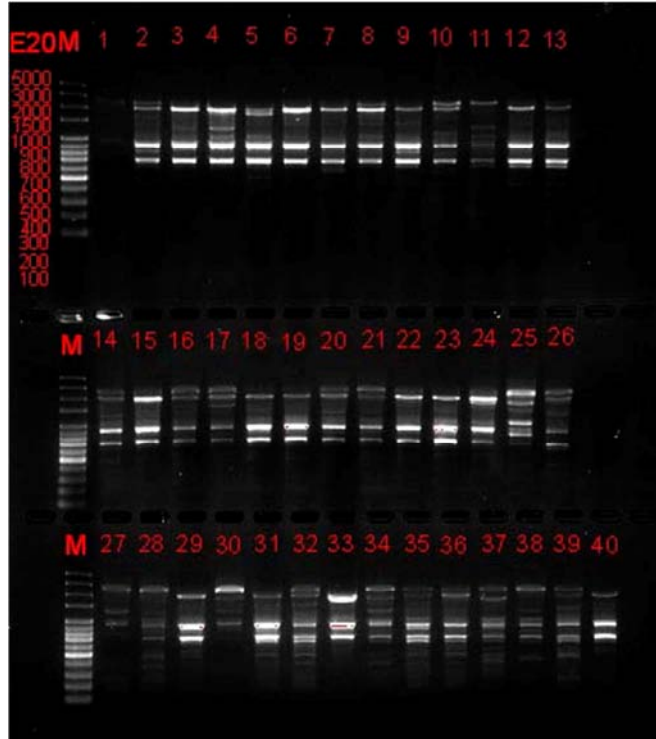


图1 40个芹菜品种采用引物SBS E20（AACGGTGACC）扩增的DNA标准图谱。

2.5. 统计分析

统计个样本扩增条带（每条多条带视为一个等位基因，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（见图2）。

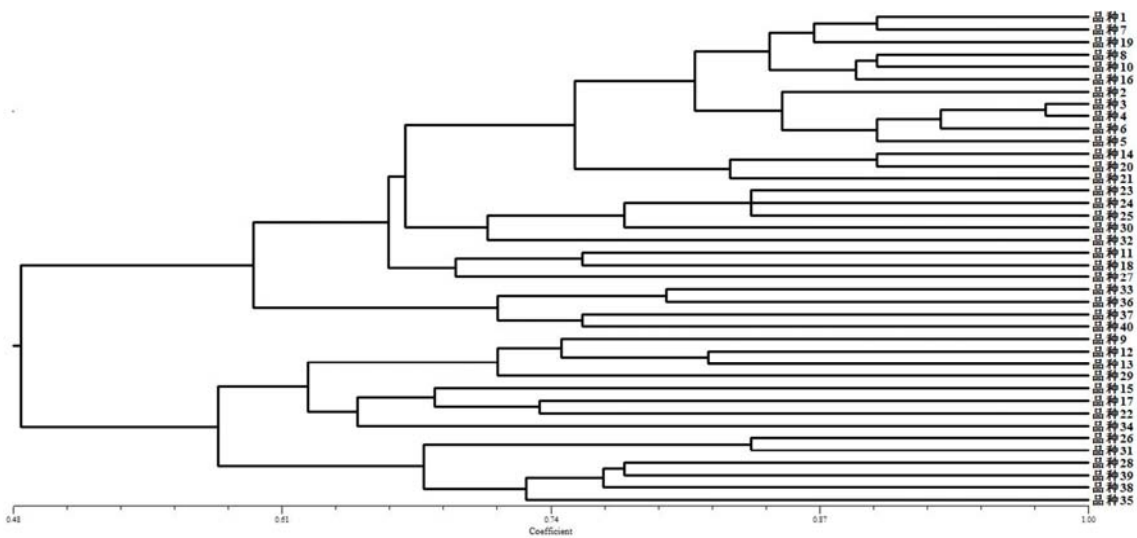


图2 40份芹菜品种聚类分析树状图。

3. 结果与分析

每个引物扩增产生了一种特有RAPD指纹图谱，从分析得出的扩增的大部分图谱出现有，如图1是用其中一个SBS E20引物扩增的RAPD指纹图谱，图中从左至右的图谱编号分别为M和1-40，其中M:DNA分子量标准，Trans5K DNA Marker Go149（北京全式金生物技术有限公司）；1-40：芹菜品种编号，见表1。

对于供试芹菜品种的5个重复个体而言，引物SBS E20分别扩增产生相一致的DNA指纹图谱，出现多态性，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，从分子水平上说明，能够判定芹菜品种亲缘关系的远近。

4. 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0.61为进行划分，可将所有测试品种划分为4类。其中第一类主要为西芹品种22份，第二类品种好号为：33, 36, 37, 40，为本芹，第三类为：9、12、13、29、15、17、22、34属于西芹类型，生长势强，第四类为：26、31、28、39、38、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。

5. 结论与讨论

本试验聚类分析结果在遗传相似系数为0.61水平上，将40个芹菜品种进行亲缘关系分析，将40个品种分为四大类，第一类和第三类都属于西芹类型，植株抱合紧实，开展度小，叶柄实心，叶肉厚，口味较淡。但第一类和第三类的区别是侧芽数普遍低于第一类的侧芽数，有一定区别。第二类为本芹类型，植株松散，开展度大，叶肉较薄，口味浓。第四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。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。本研究的分析表明大部分芹菜资源集中到第一类，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，但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，也有可能是同名异物造成的结

果或是经过长期的栽培极有可能与其他种杂交出现不同方向的进化，同时也证实本芹与西芹具有较近的亲缘关系。

参考文献

- [1] Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers Cuiju Cui; Yan Li; Yanling Liu; Xiaojie Li; Shiju Luo; Zhuan... Comptes rendus - Biologies 2016-06-15.
- [2] Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers Baruah; B. Gogoi; K. Das; N. M. Ahmed; D. K. Sarmah; M. Lal. Industrial Crops & Products 2016-10-13.
- [3] 白芍种质资源的DNA分子标记研究徐攀；梁卫青；周洁；张宏建；胡轶娟中华中医药学刊2017-04-10。
- [4] An N, Guo H B, KEW D. Genetic Variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) Germplasms from China Assessed by RAPD Markers[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(1):31~39.
- [5] Yang RW, Zhou YH, Ding C B, et al. Biological Plantarum, Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(2):237~241.
- [6] Wang Y J, Lu JN. The research on RAPD genetic markers of grape seed lessness gene[J]. Journal of Northwest A & F University Na.t Sc.i Ed., 1996, 5(24):10~20.
- [7] Williams JG K, Kubelik A R, Liva k. J, et al DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:6531~6535.
- [8] Lin KH, 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 Horti culturae, 2009, 120(1):2~7.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.