

芫荽遗传多样性 RAPD 分析

李小梅, 张立微, 张景涛

(哈尔滨市农业科学院 蔬菜花卉分院, 黑龙江 哈尔滨 150029)

摘要:以 96 份芫荽为试材, 采用 RAPD 分析方法, 研究了芫荽种质资源遗传多样性。结果表明: 从 300 条随机引物中筛出 23 条扩增性强、清晰度高和稳定性好的引物, 扩增出 53 条带, 其中 34 条为多态性带, 多态性比例 64.2%。通过聚类分析, 生成 96 份芫荽亲缘关系树状图, 在遗传距离 0.50 处, 试材划分为 6 类。RAPD 分析揭示了芫荽的遗传背景并为其分类提供了依据。

关键词:芫荽; RAPD; 遗传多样性

中图分类号:S 573⁺.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)15-0097-04

芫荽(*Coriandrum sativum*) 属伞形科一二年生草本绿叶蔬菜, 耐寒, 喜冷凉忌炎热, 芫荽可四季栽培, 春秋两季栽培品质好, 是重要的蔬菜和调味料^[1]。芫荽叶、根、茎、籽均可入药, 可治麻疹, 食物积滞, 感冒风寒等症^[2-3]。

种质资源是遗传育种和品种改良的基础^[4]。分子标记是种质资源亲缘关系及检测其多样性的有效工具^[5]。遗传多样性是物种长期进化的结果, 也是培育优良品种的基础^[6]。芫荽研究在我国集中在种植、成分分离和功能验证方面, 而在分子水平上研究芫荽遗传多样性在国内外鲜见报道。Lo'pez 等^[7]利用 AFLP 分子标记技术对芫荽进行了遗传多样性及聚类分析。DNA 分子标记的发展及应用, 为种质资源遗传多样性的研究提供了更多手段^[8]。RAPD 方法简便、灵敏、费用低, 可以检测到大量多态位点, 已被广泛地用于遗传多样性分析^[9]。该研究利用 RAPD 分子标记对芫荽遗传多样性进行分析, 确定其亲缘关系, 以期品种选育、生产加工、资源研究及保护提供理论依据^[10]。

第一作者简介:李小梅(1982-), 女, 硕士研究生, 农艺师, 现主要从事辣椒及芫荽栽培与育种等研究工作。E-mail: eileen828@126.com.

责任作者:张景涛(1963-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事蔬菜育种等研究工作。E-mail: chiillii@126.com.

收稿日期:2014-02-10

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 2009、2010 年在哈尔滨市农业科学院试验基地种植的 96 份芫荽为试验材料, 材料名称及来源详见表 1。

供试仪器: PCR 仪(Eppendorf 公司), 离心机(Eppendorf 公司 Centrifuge 5804R), 紫外分光光度计(日本岛津公司 UV-2550), 电泳仪(北京六一厂 DYY-11 型), 凝胶成像分析系统(北京赛智创业科技有限公司 ChampGel 6000), 水浴锅, 超低温冰箱, Eppendorf 微量移液器。

供试试剂: dNTP 购自天泽基因工程有限公司, Buffer(10×PCR Buffer)、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎盛昌盛生物技术有限责任公司; RNaseA、DNA Marker DL 2000 购自宝生物公司; 随机引物购自上海生工; CTAB、EDTA、Tris、HCl、NaCl、PVP、β-巯基乙醇、无水乙醇、氯仿、异戊醇等均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法提取芫荽总 DNA。

1.2.2 引物的筛选 从 300 条随机引物中筛选出多态性高的引物做 3 次重复。

1.2.3 基因组 DNA 的扩增和电泳检测 扩增体系为: 总体积 20 μL, 模板 DNA 浓度 1.0 ng/μL, dNTP 浓度

dinucleotide, trinucleotide and tetranucleotide repeat motifs, and the total ratio was 83.3%. The proportion of pentanucleotide and hexanucleotide was low, with the ratio of 16.7%. The average lengths of dinucleotide to hexanucleotide repeat motifs were 21, 15, 14, 16, 20 bp respectively. The PCR products can be amplified by 81 of total 82 designed self designed SSR primers successfully, and the maximal polymorphism was 48.1%. The results showed that the distribution of SSR in melon genome was relative stable, and it is helpful for future work in SSR and ISSR.

Key words: melon; genome; SSR; distribution; polymorphism

表 1 材料名称及来源

Table 1 Names and origin of materials

种质代号 Germplasm code	名称 Name	来源 Origin	种质代号 Germplasm code	名称 Name	来源 Origin
1	Ames18563	法国	49	Cori286	阿塞拜疆
2	Ames18565	德国	50	Cori289	俄国
3	Ames18568	意大利	51	Cori29	亚美尼亚
4	Ames18594	英国	52	Cori292	荷兰
5	Ames18595	罗马尼亚	53	Cori293	荷兰
6	Ames20047	亚美尼亚	54	Cori313	阿塞拜疆
7	Ames21655	俄国	55	Cori316	乌兹别克斯坦
8	Ames24907	保加利亚	56	Cori317	哈萨克斯坦
9	Ames24909	保加利亚	57	Cori318	哈萨克斯坦
10	Ames24915	美国	58	Cori322	乌兹别克斯坦
11	Ames24927	前苏联	59	Cori349	前苏联
12	Ames25696	叙利亚	60	Cori365	阿塞拜疆
13	Cori139	叙利亚	61	Cori37	格鲁吉亚
14	Cori138	叙利亚	62	Cori377	俄国
15	Cori82	叙利亚	63	Cori386	乌兹别克斯坦
16	Cori87	叙利亚	64	Cori387	乌兹别克斯坦
17	Cori86	叙利亚	65	Cori389	越南
18	Cori136	叙利亚	66	Cori401	亚美尼亚
19	Cori140	叙利亚	67	Cori406	泰国
20	Cori356	美国	68	Cori247	荷兰
21	Cori147	伊朗	69	Cori246	日本
22	Cori115A	苏丹	70	Cori245	日本
23	Cori85	叙利亚	71	Cori244	日本
24	Cori71	格鲁吉亚	72	Cori237	荷兰
25	Cori70	格鲁吉亚	73	Cori236	荷兰
26	Cori68	格鲁吉亚	74	Cori23	俄国
27	Cori66	亚美尼亚	75	Cori222	亚美尼亚
28	Cori64	格鲁吉亚	76	Cori220	俄国
29	Cori57	塔吉克斯坦	77	Cori217	格鲁吉亚
30	Cori54	格鲁吉亚	78	Cori192	荷兰
31	Cori455	前苏联	79	Cori174	叙利亚
32	Cori45	格鲁吉亚	80	Cori161	亚美尼亚
33	Cori446	阿塞拜疆	81	Cori160	哈萨克斯坦
34	Cori44	格鲁吉亚	82	Cori158	哈萨克斯坦
35	Cori429	亚美尼亚	83	Cori157	哈萨克斯坦
36	Cori425	格鲁吉亚	84	Cori152	格鲁吉亚
37	Cori422	格鲁吉亚	85	Cori151	格鲁吉亚
38	Cori42	格鲁吉亚	86	Cori148	埃塞俄比亚
39	Cori41	格鲁吉亚	87	Cori146	格鲁吉亚
40	Cori409	泰国	88	Cori143	埃塞俄比亚
41	Cori408	泰国	89	Cori142	埃塞俄比亚
42	Cori407	泰国	90	Cori134	叙利亚
43	Cori248	荷兰	91	Cori112	塔吉克斯坦
44	Cori250	前苏联	92	Cori108	格鲁吉亚
45	Cori257	荷兰	93	Cori106	格鲁吉亚
46	Cori272	阿塞拜疆	94	Cori104	格鲁吉亚
47	Cori281	叙利亚	95	Cori102	格鲁吉亚
48	Cori285	亚美尼亚	96	Cori101	格鲁吉亚

0.45 mmol/L, 随机引物浓度 1.3 μ mol/L, *Taq* 酶浓度 0.6 U, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L。热循环程序: 94℃ 预变

性 4 min, 40 个循环(94℃ 变性 30 s, 39℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s), 72℃ 延伸 10 min, 在 4℃ 终止反应。产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 拍照。

1.3 数据分析

RAPD 电泳结果采取 0/1 赋值记带, 在相同迁移位置, 有谱带记为 1, 无谱带记为 0, -1 表示数据缺失或无记录, 形成 0/1 矩阵图, 用 NeiLi 公式计算遗传相似系数及遗传距离, 采用离差平方和、Ward 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

在 300 条随机引物中筛选出 23 条扩增性强、清晰和稳定的引物(表 2), 共扩增 53 条带, 其中 34 条为多态性条带, 多态性比例为 64.2%。如引物 S509 扩增图谱(图 1)。

表 2 RAPD 引物及序列

Table 2 RAPD primers and sequence

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
S1	GTTTCGCTCC	S183	CAGAGGTC
S21	CAGGCCCTTC	S507	ACTGGCTGA
S24	AATCGGGCTG	S509	TGAGCACGAG
S29	GGGTAACGCC	S1260	ACATCAGCCC
S30	GTGATCGCAG	S2003	GTGCGAGAAC
S31	CAATCGCGCT	S2006	GGACGACCGT
S43	GTCGCCGTCA	S2007	GGGTGCGATC
S45	TGAGCGGACA	S2008	CCACAGCCGA
S52	CACCGTATCC	S2020	GAGCGCTACC
S167	CAGCGACAAG	S2025	GGGCCGAACA
S169	TGGAGAGCAG	S2029	AGGCCGGTCA
S177	GGTGGTGAIG		

2.2 聚类分析

相似系数越高, 种质间的遗传变异越低, 亲缘关系越近; 反之, 亲缘关系越远。采用 NeiLi 公式计算相似系数和遗传距离, 结果表明, 96 份茼蒿相似系数在 0.32~0.90 之间, 平均为 0.62; 遗传距离在 0.10~0.71 之间, 平均为 0.38。其中 Cori101 和 Cori41 的相似系数 0.32, 亲缘关系远; Cori115A 和 Cori54 相似系数 0.90, 亲缘关系近。96 份材料具有丰富的遗传多样性。

通过遗传距离、离差平方和、Ward 法进行聚类分析, 生成茼蒿亲缘关系树状图(图 2)。在遗传距离 0.50 处, 供试材料被分为 6 个类群。最有特点的为第 I 类群: 3~15 片叶, 平均叶长 10~20 cm, 分枝少, 果实千粒重 6.0~12.0 g, 适于果用; 第 IV 类群: 生育期长, 基生叶片数 20~45 片, 最长基生叶长 25~40 cm, 叶形为两回或多回羽状复叶, 叶丛匍匐, 分枝多, 适合于叶用。

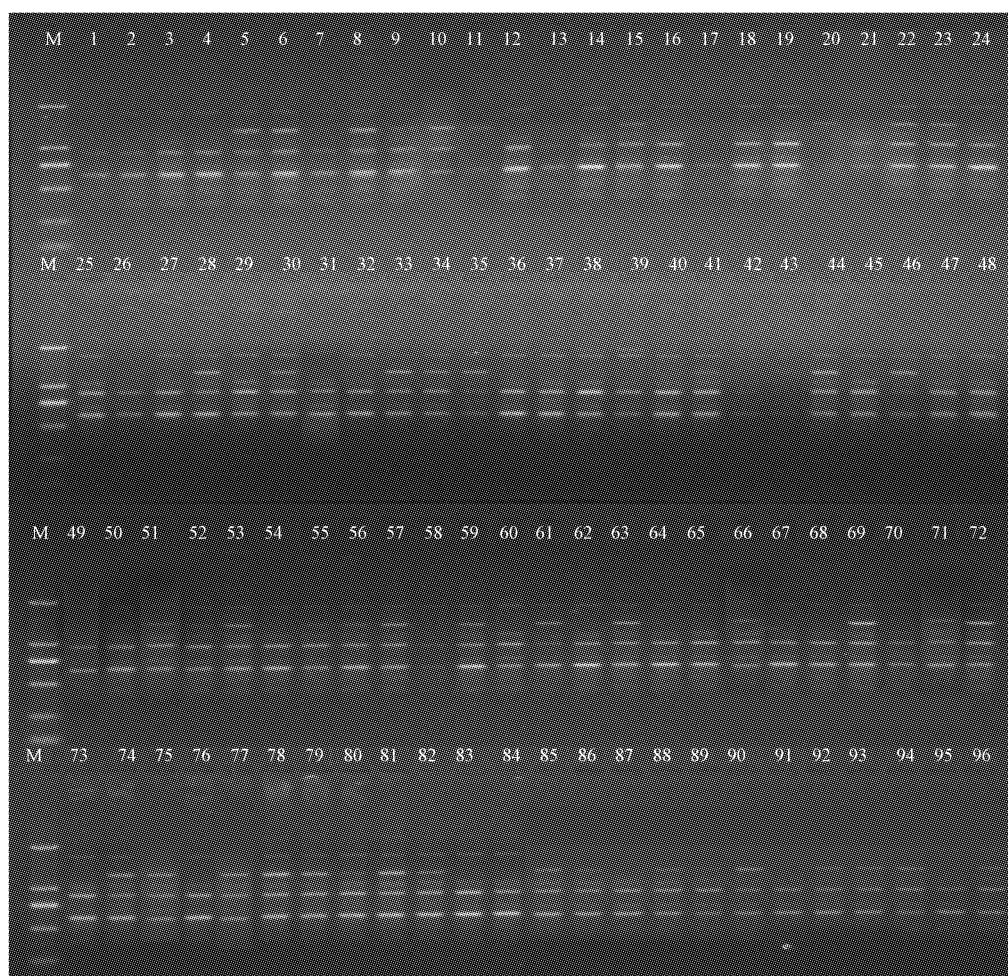


图1 引物 S509 扩增结果

M:DNA 分子量标准 DL 2 000。品种编号见表 1。

Fig.1 The amplification result of primer S509

M:DL 2 000 DNA marker. The materials No. as in table 1.

3 讨论与结论

遗传资源保存和品种资源目录的建立都依赖对其遗传多样性及亲缘关系的掌握^[11]。该研究选用筛选的 23 条 RAPD 引物对 96 份芫荽种质进行检测,共扩增 53 条带,其中 34 条为多态性条带,多态性比例为 64.2%,通过严格控制反应体系和条件,得到重复性好的扩增结果,明确了芫荽种质间的遗传距离,RAPD 分子标记可以有效的揭示芫荽种质资源的遗传多样性,并为芫荽育种提供准确的遗传信息。

物种遗传多样性越高,对环境变化的适应能力就越强,进化的潜能就越大^[12],该研究中选用的 96 份芫荽种质资源具有丰富的遗传多样性与宽广的遗传基础,可以利用其优良变异类型,创造新的变异,选育优良品种。

该研究在遗传距离 0.50 处,将 96 份芫荽分为 6 个类群,分类与来源地不具有一定的相关性,说明种质资源间的亲缘关系与来源地之间的关系不密切,这可能与种质资源的交换和广泛的遗传变异有关。

参考文献

- [1] 郭红转,陆占国,李健. 芫荽的研究开发现状[J]. 食品研究与开发, 2005,26(2):104-106.
- [2] 李良松,刘懿,杨丽萍. 香药本草[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000.
- [3] 唐庭栋. 大兴安岭药用资源[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,2001.
- [4] 黄三文,王晓武,张宝玺,等. 蔬菜作物分子标记研究进展与我国的发展策略[J]. 中国蔬菜,1999(1):50-53.
- [5] 张应华,刘荣,许彬. 分子标记在蔬菜作物上的应用[J]. 云南农业大学学报,2002,17(3):287-290.
- [6] 季祥彪,王国鼎,乔光,等. 贵州野生春兰遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 华中农业大学学报,2008,27(2):297-302.
- [7] Lo'pez P A,Widrechner M P,Simon P W,et al. Assessing phenotypic, biochemical, and molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) germplasm[J]. Genet Resour Crop Evol,2008,55:247-275.
- [8] 马晓静,李广平,郑晓静,等. 20 个青菜品种的遗传多样性分析[J]. 长江蔬菜(学术版),2012(22):13-16.
- [9] 高日,廉美兰,吴松权,等. 东北刺人参遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 湖北农业科学,2008,47(6):627-628.
- [10] 华树妹,涂前程,雷伏贵. 福建山药种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(2):195-200.

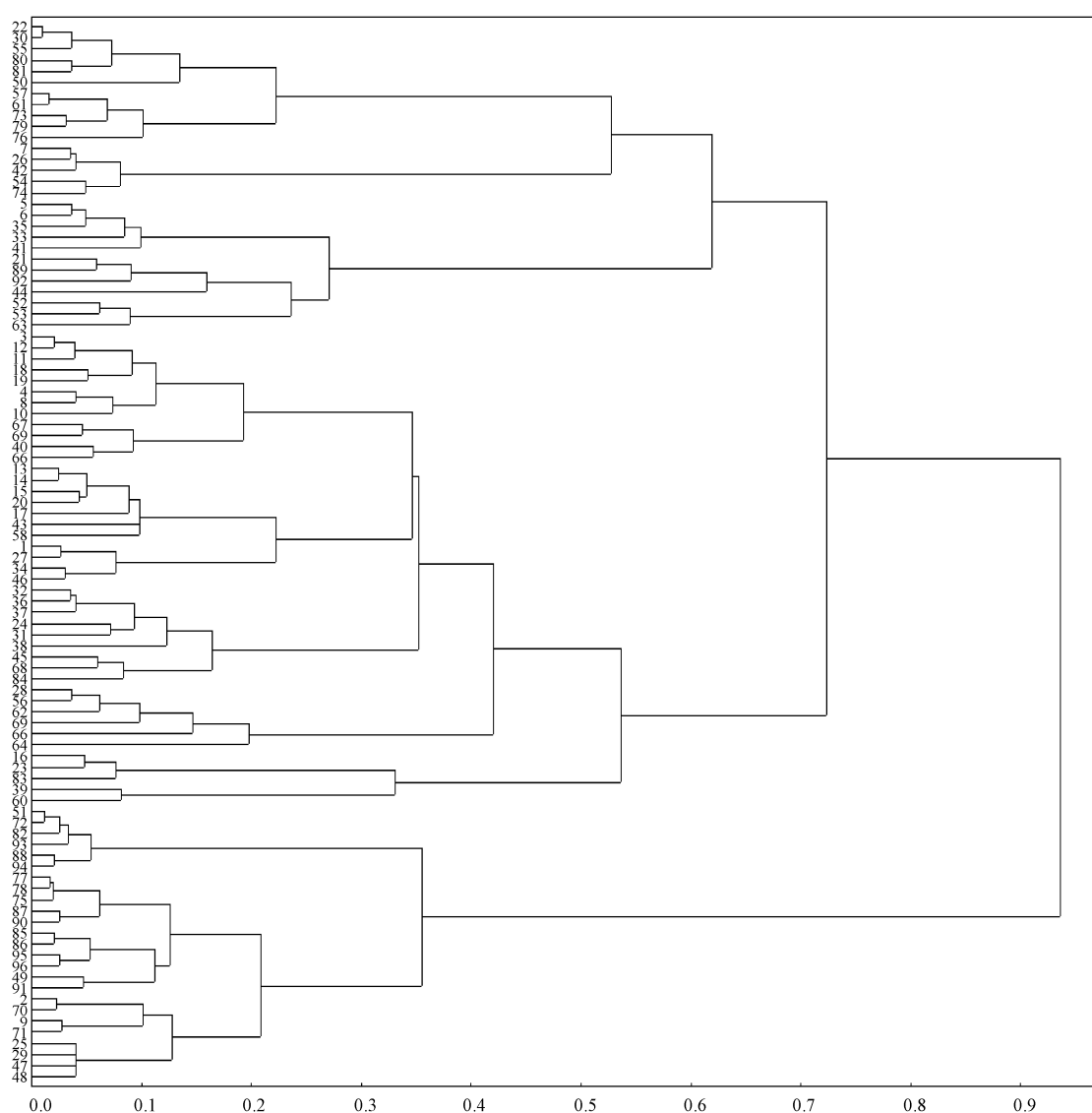


图 2 96 份芫荽品种的 Nei's 遗传距离矩阵聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis for 96 coriander germplasm based on Nei's distance

[11] Bendhifi M, Baraket G, Zourgui L, et al. Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 158: 1-7.

[12] 侯茜, 雷英, 刘丽莎, 等. 西部地区濒危药用植物秦艽遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 214-216.

RAPD Analysis of Genetic Diversity for Coriander

LI Xiao-mei, ZHANG Li-wei, ZHANG Jing-tao

(Vegetables and Flowers Research Institute, Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150029)

Abstract: Taking 96 coriander samples as materials, using the RAPD analysis method, the genetic diversity of germplasm resources of coriander was studied. The results showed that 23 random primers were screened from 300 primers that were amplification of strong, high resolution and good stability. 34 bands were polymorphic among 53 bands identified. The percentage of polymorphic loci was 64.2%. All the germplasm could be divided into six categories at the genetic distance 0.50 by cluster analysis. RAPD analysis reflected the complex genetic background and provided the supporting to the identification and classification of coriander.

Key words: *Coriandrum sativum*; RAPD; genetic diversity