利用 RAPD 技术对葱属品种遗传关系的分析

孟祥栋 马红 张卫华

(山东农业大学园艺系, 泰安 271018)

摘要 利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析了我国栽培的几个主要葱属品种。所用的 20 个引物, 有 11 个能扩增出重现性好且稳定的谱带, 10 个品种共扩增出 102 条带, 其中 68 条具多态性。根据 DNA 谱带计算的 10 个品种相似系数范围为 0.571~0.947。对 10 个品种的 UPGMA 聚类分析表明, 章丘大葱 (*Allium fistulosum* var. *gigantum* cv. Zhangqiu Welsh onion)、天津五叶齐 (*A. fistulosum* var. *gigantum* cv. Tianjin Wuyeqi Welsh onion)、上海分葱 (*A. fistulosum* var. *caepitosum* cv. Shanghai Spring onion)、南京冬葱 (*A. fistulosum* var. *caepitosum* cv. Nanjing Winter onion) 和韩国大葱 (*A. fistulosum* var. *gigantum* cv. Korea Welsh onion) 关系较近。根据聚类结果, 将章丘大葱、天津五叶齐、上海分葱、南京冬葱、韩国大葱、细香葱 (*A. schoenoprasum*) 以及楼葱 (*A. fistulosum* var. *viviparum*) 归为葱组; 而将胡葱 (*A. ascalonicum*)、洋葱 (*A. cepa*) 及洋葱和大葱的杂交种归为洋葱组。最后根据 RAPD 标记, 讨论了各品种之间的亲缘关系。

关键词 RAPD, 葱属, 遗传关系

The analysis of genetic relationship among some *Allium* cultivars determined by RAPD markers / MENG Xi-ang-Dong, MA Hong, ZHANG Wei-Hua

Abstract Nine cultivars belonging to four species and one hybrid of *Allium* commonly cultivated in China were analyzed by RAPD markers to determine their genetic relationship. Of the 20 decamer nucleotide primers screened, 11 showed consistent banding patterns and amplification and produced 102 bands with 68 polymorphic. The similar indices among the materials ranged from 0.571 to 0.947. *A. fistulosum* var. *gigantum* cv. Zhangqiu Welsh onion, *A. fistulosum* var. *gigantum* cv. Tianjin Wuyeqi Welsh onion, *A. fistulosum* var. *caepitosum* cv. Shanghai Spring onion and *A. fistulosum* var. *caepitosum* cv. Nanjing Winter onion (Spring onion) had the highest similar indices of 0.947 and 0.942 respectively. Relationship between the cultivars determined by UPGMA cluster analysis demonstrated Zhangqiu Welsh onion, Tianjin Wuyeqi Welsh onion, Shanghai Spring onion and Nanjing Winter onion were clustered together respectively. The two Welsh onion cultivars, two Spring onion cultivars and Welsh onion from Korea were clustered very closely. *A. schoenoprasum* and *A. fistulosum* var. *viviparum* were subclustered further in the group of *A. fistulosum*, including *A. fistulosum*, *A. schoenoprasum*, *A. ascalonicum* and *A. cepa* were clustered together. The hybrid of Zhangqiu Welsh onion $\times$ *A. cepa* was clustered very closely with *A. ascalonicum* and *A. cepa*, but clustered with the group of *A. fistulosum* with the furthest linkage distance. *A. ascalonicum* and *A. cepa* could be included in the group of *A. cepa*. The taxonomy of *Allium* was discussed on the basis of RAPD markers.

Key words RAPD, *Allium*, genetic relationship

Author's address Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018

葱属 (*Allium*) 蔬菜在人们生活中占有重要地位。我国栽培的主要葱属蔬菜有大葱 (*A. fistulosum* var. *gigantum*)、分葱 (*A. fistulosum* var. *caepitosum*)、洋葱 (*A. cepa*)、胡葱 (*A.*

ascalonicum)、细香葱(*A. schoenoprasum*)和楼葱(*A. fistulosum* var. *viviparum*)等。由于葱属蔬菜的异花授粉特性,以及长期引种、选择的结果,常出现同名异种或同种异名的问题,加之以往对葱属亲缘关系的确定主要是根据外观形态、生殖特性及染色体核型等来进行,且结果不一致,这些都给准确进行葱属种质资源的筛选、鉴定和利用带来了困难^[1]。

RAPD 技术是以 DNA 为模版,利用 10 个核苷酸随机引物进行 PCR 反应,扩增的 DNA 产物经琼脂糖电泳而将 DNA 谱带显示出来,从而在 DNA 水平上进行不同生物的特性描述和鉴定。该方法具有操作方便、迅速,不受取样环境、时间、器官限制且准确性高等优点,被广泛用于植物种属的鉴定和分类^[2~4]。本研究的目的是利用 RAPD 技术分析我国栽培较普遍的一些葱属品种,探索利用该技术对葱属品种进行鉴定和遗传关系分析的可行性,为更好地研究和利用种质资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用较有代表性的 9 个葱属品种及 1 个大葱和洋葱的杂交种为试材。它们均取自山东农业大学园艺系葱品种资源圃。材料名称及来源见表 1。

表 1 实验选用的葱属品种及来源

Table 1 Cultivars of *Allium* and their origin in this study

编号 No.	中文名 Chinese name	种和栽培种名称 Name of species and cultivars	来源 Origin
1	胡葱	<i>Allium. ascalonicum</i>	广州 Guangzhou
2	上海分葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>caepitosum</i> cv. Shanghai Spring onion	上海 Shanghai
3	南京冬葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>caepitosum</i> cv. Nanjing winter onion	南京 Nanjing
4	楼葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>viviparum</i>	中国农科院蔬菜所 Inst. of Vegetable Sci., CAAS
5	细香葱	<i>A. schoenoprasum</i>	德国 Germany
6	洋葱	<i>A. cepa</i>	山东农大 Shandong Agric. Univ.
7	章丘大葱 × 洋葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>gigantum</i> cv. Zhangqiu Welsh onion × <i>A. cepa</i>	山东农大 Shandong Agric. Univ.
8	韩国大葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>gigantum</i> cv. Korea Welsh onion	韩国 Korea
9	章丘大葱	<i>A. fistulosum</i> var. <i>gigantum</i> cv. Zhangqiu Welsh onion	山东泰安 Taian, Shandong
10	天津五叶齐	<i>A. fistulosum</i> var. <i>gigantum</i> cv. Tianjin Wuyeqi Welsh onion	天津 Tianjin

1.2 DNA 提取方法

从每一品种多个个体中取幼叶 2 g 提取 DNA,参考 Oard 等人^[5]方法。样品加液氮磨细,加 10 ml 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇)混匀,60℃ 水浴保温 30 min;加等体积氯仿-异戊醇(24:1)混匀,于 3000 rpm 离心 15 min;取上清液并加 2/3 体积冷异丙醇混匀,于 10 000 rpm,4℃ 离心 10 min;用 70%和 95%乙醇分别洗沉淀 1 次,干燥后加 500 μ l TE 溶解 DNA,并加 3 μ l RNase(去 DNase,10 μ g/ μ l),37℃ 保温 30 min;再用重蒸酚/氯仿-异戊醇(24:1)提取 1 次。最后用 500 μ l TE 溶解干燥 DNA。测定提取 DNA 的 OD 280 nm 和 OD 260 nm 值,并结合琼脂糖凝胶电泳来判断 DNA 的含量与质量,根据 DNA 浓度将其稀释成 30 ng/ μ l,用于 PCR 反应。

1.3 PCR 反应条件

20 个引物为美国 Operon 公司产品,引物序列见表 2。dNTP 为 Sigma 公司产品, *Taq* 酶为华美公司产品。反应体积为 20 μ l,其中包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,100 μ mol/L dNTP,0.2 μ mol/L 引物,DNA 模板 30 ng,1.5 u *Taq* 酶。PCR 反应在 PTC-100 型 DNA 扩增仪中进行。反应程序为 94 30 s,36 40 s,72 1 min,44 个循环,最后 72 延伸 3 min。

表 2 实验所用的引物及序列*

Table 2 Primers used in this study and their sequences

引物 Primer No.	序列 Sequence	引物 Primer No.	序列 Sequence	引物 Primer No.	序列 Sequence
OPH01	GGTCGGA GAA	OPH02	TCGGACGTGA	OPH03	AGACGTCCAC
OPH04	GGAA GTCGCC	OPH05	AGTCGTCCCC	OPH06	ACGCATCGTG
OPH07	CTGCA TCGTG	OPH08	GAAACACCCC	OPH09	TGTA GCTGGG
OPH10	CCTACGTCA G	OPH11	CTTCCGCA GT	OPH12	ACGC GCA TGT
OPH13	GACGCCACAC	OPH14	ACCA GGTTGG	OPH15	AATGGC GCA G
OPH16	TCTCA GCTGG	OPH17	CACTCTCCTC	OPH18	GAA TCGGCCA
OPH19	CTGACCA GCC	OPH20	GGGA GACA TC		

* 引物 OPH01,OPH05,OPH07,OPH09,OPH11,OPH12,OPH13,OPH15,OPH16,OPH17,OPH18 的扩增结果用于遗传关系分析
The amplified results of primer OPH01,OPH05,OPH07,OPH09,OPH11,OPH12,OPH13,OPH15,OPH16,OPH17,OPH18 were used for the analysis of *Allium* genetic relation

PCR 产物经 1.2 %琼脂糖凝胶电泳分离并经溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察、照相。每个反应重复 2 次以上,选择重现性好且稳定的扩增反应和谐带,将 10 个品种 11 个引物扩增的结果进行统计分析。每条 DNA 谱带作为 1 个单位,如果有带则定为 1,没有带则定为 0。根据公式 $F = (2 X_{1,2} / X_1 + X_2) \times 100 \%^{[6]}$ 计算不同品种之间的相似系数,其中 F 表示相似系数, $X_{1,2}$ 为品种 1 和品种 2 共同具有的分子量相同的 DNA 谱带数, X_1 为品种 1 的 DNA 扩增谱带数, X_2 为品种 2 的 DNA 扩增谱带数。各品种之间的遗传距离 $P = 1 - F$ 。根据遗传距离并利用 STATSOFT 软件进行各品种间 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic mean)聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 DNA 扩增结果

选用的 20 个引物,有 11 个能扩增出具有重现性且稳定清晰的 DNA 谱带,11 个引物对 10 个品种扩增 DNA 谱带总数为 102 条(表 3),扩增谱带分子量在 200 bp 到 3300 bp 之间。图 1 列出了引物 OPH09、OPH13 的 DNA 扩增图谱。

表 3 10 个葱属品种 11 个引物的扩增谱带

Table 3 RAPD products of 11 primers of the 10 species

总谱带数 Total bands	具多态性谱带数 Polymorphic bands	无多态性谱带数 Monomorphic bands	每个引物扩增谱带数 Bands per primer
102	68	34	9.3

2.2 遗传关系分析

根据 DNA 扩增结果计算各品种间相似系数,其分布范围从 57.1 %到 94.7 % (表 4)。其中章丘大葱和天津五叶齐、上海分葱和南京冬葱彼此之间相似系数最大,分别为 94.7 %和 94.2 %,这 2 对品种有彼此最相似的基因型,而外部形态观察也与之相吻合。这 2 对品种分别是目前生产上普遍栽培的大葱和分葱品种。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Primer OPH09

Primer OPH13

图1 10个葱属品种的 RAPD 产物图谱

Fig. 1 RAPD products of some primers with the 10 *Allium* cultivars

M = DNA/ HindIII 1 ~ 10 = 品种 1 ~ 10, No. 1 ~ 10

表4 10个葱属品种的相似系数与遗传距离 (×100) *

Table 4 Similarity index (×100) and genetic distance (×100) of 10 cultivars from *Allium*

	品种 Cultivars									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	- -	77.0	73.1	67.2	71.2	86.3	85.7	73.1	74.2	77.7
2	23.0	- -	94.2	80.0	85.7	62.9	76.4	91.7	89.1	92.7
3	26.9	5.80	- -	80.7	86.7	62.4	77.8	94.1	91.5	94.1
4	32.8	20.0	19.3	- -	77.2	57.1	73.8	82.5	85.2	83.5
5	28.8	14.3	13.3	22.8	- -	61.8	74.1	85.0	82.1	85.2
6	13.3	37.1	37.6	42.9	38.2	- -	81.2	60.8	63.4	63.2
7	14.3	23.6	22.2	26.2	25.9	18.8	- -	78.5	80.4	80.0
8	26.9	8.30	5.90	17.5	15.0	39.2	21.5	- -	93.2	92.6
9	25.8	10.9	9.50	14.8	17.9	36.6	19.6	6.80	- -	94.7
10	23.3	7.30	5.90	16.5	14.8	36.8	20.0	7.40	5.30	- -

* 在“- -”上方的数据为相似系数,下方为遗传距离

The data above “- -” were similar indices and below were genetic distance

图2 根据 RAPD 标记而做出的 10 个葱属品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Tree diagram for 10 *Allium* cultivars resulting from UPGMA cluster of genetic distances derived from RAPD marker scores

由遗传距离而获得的 UPGMA 聚类分析图 (图 2) 表明,不同品种之间聚合程度差异较大,目前分类中将章丘大葱和天津五叶齐,上海分葱和南京冬葱分别定为葱种的大葱变种和分葱变种^[1],与本研究的聚类结果一致,而韩国大葱则可能是介于大葱和分葱变种之间的一种类型。细香葱在分类上是葱属的一个种^[1],这与本研究中细香葱不能与葱种品种聚在一起的结果一致。根据 RAPD 标记进行的遗传距离聚类分析,楼葱次于细香葱与葱种相聚,这与分类上楼葱是大葱的变种不一致。这一问题有待于进一步研究。

胡葱和洋葱聚类在一起,这表明虽然两者在分类上属两个不同的种,但亲缘关系仍很近,而且两者与大葱和洋葱的杂种关系也较近,这与“胡葱亲缘关系与大葱相近”的结论不一致^[1]。但与将胡葱与洋葱归为一类的结果相似^[4]。综合 10 个

品种材料的聚类分析结果,胡葱、洋葱及大葱和洋葱的杂种可归为一组;而大葱中的章丘大葱和天津五叶齐、分葱中的上海分葱和南京冬葱、韩国大葱以及细香葱、楼葱则可归另一组。这与将前者归为洋葱组、后者归为葱组栽培植物的划分结果一致^[1]。

根据 RAPD 标记的聚类结果,大葱和洋葱的杂种与洋葱关系较近而与葱组关系较远,胡葱与洋葱的关系非常近而与葱组关系较远,而胡葱的形态特征介于洋葱与大葱之间。此外,目前仍未发现胡葱野生种,其次生分布中心为地中海地区;而洋葱的起源中心在阿富汗,次生分布中心在地中海沿岸,葱的起源中心在中国西北、北部、中亚、西伯利亚^[1]。因此,根据这些结果,初步推断胡葱可能是洋葱与大葱的杂交后代逐渐进化来的。

综上所述,利用 RAPD 标记能够在 DNA 水平上进行不同品种之间关系的分析,而且方法简便、迅速。通过大量重复及对有代表性样品的系统分析,可以在分子水平上进行植物品种的鉴定和亲缘关系分析,为准确地进行植物种质资源的鉴定、筛选和利用提供依据。

致谢 张启沛先生提供试材并提出指导意见,特此感谢。

参 考 文 献

- 1 张启沛. 葱. 见:周长久(主编),蔬菜种质资源概论,北京:北京农业大学出版社,1995,192~210
- 2 Farnham M W. Genetic variation among and within United States collard cultivars and landraces as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1996, **121**:374~379
- 3 Williams J G K, Kubelic A R, Livak K J et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.*, 1990, **18**:6531~6533
- 4 Susan E W, Peter G I, Robert J S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, **86**:497~504
- 5 Oard J H, Dronavalli S. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1992, **10**:236~241
- 6 Packer C, Gilbert D A, Pusey A E et al. A molecular genetic analysis of kinship of cooperation in Africa lions. *Nature*, 1991, **351**:562~565