

王其鹏,王丽乔,张巍巍,等. 洋葱 EST-SSR 标记在大葱中的通用性及多态性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):45-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.011

洋葱 EST-SSR 标记在大葱中的通用性及多态性分析

王其鹏¹, 王丽乔², 张巍巍³, 袁瑞江², 冯大领³

(1. 河北农业大学现代科技学院, 河北保定 071000; 2. 石家庄市农林科学研究院蔬菜研究所, 河北石家庄 050021;
3. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000)

摘要:以 31 个大葱自交系为材料,用 14 个洋葱 EST-SSR 标记,对各个自交系的 PCR 扩增产物进行分析。结果表明,其中 13 个 EST-SSR 标记在大葱不同自交系上具有通用性,1 个标记(ACM024)在 31 个大葱自交系上没有扩增产物,可用于大葱与洋葱的区分;13 对引物在 31 个自交系中共检测到等位位点 28 个,平均每对引物可以检测到 2.15 个;通过扩增产物的多态性分析,10 个引物具有多态性;通过聚类分析获得了各个自交系间的遗传距离及各自交系间的亲缘关系。在相似性系数 0.72 水平上,自选材料 1、日本品种山木一本与其他类型关系较远。各自交系间的遗传距离在 0~2.11 之间,其中遗传距离最小为 0(2013 年山东田选寒青巨葱与大梧桐象青叶 1 号;河北无极鸡腿葱与赞皇选日本型大葱;横滨大葱与自选材料 6),遗传距离最大值为 2.11(自选材料 1 与山木一本)。该研究为大葱品种鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建等奠定了基础。

关键词:大葱;洋葱;EST-SSR 标记;通用性;多态性

中图分类号:S633.103.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0045-05

葱 (*Allium fistulosum* L.) 是百合科 (Liliaceae) 葱属

(*Allium* L.) 多年生草本植物。在我国有 3 个变种,即普通大葱 (*A. fistulosum* L. var. *giganteum* Makion)、分葱 (*A. fistulosum* L. var. *caespitosum* Makino) 和楼葱 (*A. fistulosum* L. var. *viviparum* Makino), 各个变种内还有不同的栽培类型。在北方地区种植的章丘大葱、北京高脚白、河北隆尧大葱、山东莱芜鸡腿葱等均为普通大葱的栽培类型^[1]。大葱在我国栽培历史悠久,不仅作为重要的蔬菜和调味料作物,其食用及药用价值也不断被人们发掘^[2-3],因此大葱的价值越来越被人们所重视。但长期以来,大葱育种工作发展缓慢,大葱作物的品质和产量潜力尚未被充分挖掘。

收稿日期:2017-08-12

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:14226306D-6);河北省科技厅农业关键共性技术攻关专项(编号:16226304D-3);河北农业大学大学生创新创业训练计划(编号:cxzr2014009)。

作者简介:王其鹏(1994—),男,山东德州人,主要从事植物分子生物学及基因组学的研究。E-mail:1261870339@qq.com。

通信作者:袁瑞江,研究员,主要从事蔬菜育种和栽培等研究工作, E-mail:yrj208@126.com;冯大领,博士,副教授,主要从事植物遗传育种及利用等工作, E-mail:bjdalingfeng@163.com。

本研究对这方面内容进行了有效的补充。

参考文献:

- [1] Viola R E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis[J]. Accounts of Chemical Research, 2001, 34(5): 339-349.
- [2] Huminiecki L, Bicknell R. In silico cloning of novel endothelial-specific genes[J]. Genome Research, 2000, 10(11): 1796-1806.
- [3] Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, et al. Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs[J]. Genome Research, 2001, 11(3): 422-435.
- [4] Schultz J, Doerks T, Ponting C P, et al. More than 1 000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining[J]. Nature Genetics, 2000, 25(2): 201-204.
- [5] 张德礼, 丁培国, 凌伦奖, 等. 人类新基因 *C17orf32* 的电子克隆和编码区序列 RT-PCR 验证[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(4): 543-549.
- [6] 唐 军, 邓武军, 李仕新. 人类 PGAM 基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2012, 25(2): 8-12.
- [7] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(1): 122-128.
- [8] 王 杰, 薛 鹏, 程 睿, 等. 人类新基因 ACBP5cDNA 的克隆及其同源物在小鼠/鸡胚发育过程中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(2): 163-169.
- [9] 郭 慧, 金司阳, 刘 寒, 等. 甘蓝 AP2/ERF 转录因子的克隆和生物信息学分析[J]. 中国药师, 2017, 20(1): 6-10.
- [10] 靳聪飞, 梁婷玉, 刘新峰, 等. 牛 *GUCY1A3* 和 *SFXN1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 357-364.
- [11] 邹 筱, 韩粉霞, 陈明阳, 等. 大豆脂肪酸主要组分含量 QTL 定位[J]. 作物学报, 2014, 40(9): 1595-1603.
- [12] 闫海波, 王 艳, 赵 琳, 等. 大豆蛋白和油分含量的 QTL 分析[J]. 大豆科学, 2016, 35(2): 228-233.
- [13] 韩英鹏, 赵 雪, 李修平, 等. 大豆种质对花叶病毒病和疫霉根腐病抗病性的 SSR 标记辅助鉴定[J]. 大豆科学, 2014, 32(1): 27-30.
- [14] 张闻博, 蒋洪蔚, 李仙东, 等. 基于元分析的大豆胞囊线虫抗性 QTL 的整合[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(1): 104-109.

EST-SSR 是目前分子育种中最常用的分子标记之一。EST-SSR 标记来源于表达基因中相对保守的序列,该标记不仅能够直接反映基因的编码信息,也为功能基因的直接鉴定提供依据,还可以在种内不同栽培类型、属内不同种甚至科内不同属种之间具有较好的通用性^[4-7]。日本和美国学者开发了葱属植物的 EST-SSR 标记^[8-10],进而日本学者 Hikaru 等利用 42 个洋葱 SSR、InDel、CAPS、dCAPS 标记和 212 个大葱 SSR 标记构建了大葱基于 SSR 标记的染色体连锁图谱^[11]。我国大葱种质资源丰富,栽培类型多种多样,分析洋葱 EST-SSR 标记在不同大葱种质资源上的通用性研究还少有报道。本研究选用洋葱 EST-SSR 标记对大葱的多份种质资源进行分析,为大葱种质资源鉴定、杂种纯度分析、亲缘关系分析等研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及基因组 DNA 的提取

本试验材料为 31 个不同来源的大葱自交系(表 1),于 2015 年春季在石家庄农林科学研究院蔬菜研究所大葱试验基地取材,在河北农业大学蔬菜种质创新与利用实验室内完成。

选取新鲜幼嫩的大葱叶片,采用常规 CTAB 法提取基因组 DNA,-20℃ 保存。

1.2 EST-SSR 标记来源

EST-SSR 标记引自 VegMarks 网站(<https://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp>),选取洋葱不同连锁群上的 EST-SSR 标记,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

表 1 大葱自交系材料

代号	来源	代号	来源	代号	来源
1	自选材料 1	12	辽研 5 号	22	日本带回亚洲寒冬
2	自选材料 2	13	大梧桐象青叶 1 号	23	河北无极鸡腿葱
3	2013 年山东田选寒青巨葱	14	辽宁辽研 3 号	24	山木一本
4	山东特选中华葱王	15	河北高脚白	25	青川一本
5	2004 年备圃定植的青叶 1 号 C3	16	灵寿贾引安徽大葱	26	赞皇选日本型大葱
6	2011 年山东田选大梧桐	17	山东 11 金杆 88	27	日本带亚洲寒冬
7	自选材料 3	18	河南伟葱 8 号	28	大藏野
8	自选材料 4	19	无名	29	横滨大葱
9	李供市场购买特长白葱	20	山东寒丰快葱	30	自选材料 5
10	河南巨葱 80 白	21	河南英邦国际	31	自选材料 6
11	山东章丘金柱				

表 2 洋葱不同连锁群的 EST-SSR 标记

标记序号	标记名称	引物序列 (5'→3')	重复基序	染色体
1	ACM154	F:CTTGTTTTGGCAGTTGGGAT;R:CGATGAATACACCGATGACG	(GAA) ₈	1
2	ACE020	F:AGTGGTCATGGTTGTCTTGCTT;R:TGCACAAGTACACAGCGACAAAC	(AT) ₃ (AC) ₃ AT(AC) ₄	2
3	ACE111	F:ACTTGGATGTAGAAATTCACAACATT;R:TTGACCTAACAAATATAGTCCCACAAA	(TCA) ₁₄	2
4	ACM024	F:CCCCATTTCTTCATTTTCTCA;R:TGCTGTTCGTGTTGTTGTTG	(GCA) ₁₀	2
5	ACE101	F:TTTAACAGGTCTCCCTCTTCCTCCC;R:AGGGGGTACTTTCATCACTCCGTT	(TAA) ₃ C(TA) ₅ , (TC) ₆	2
6	ACE044	F:ATGTACCGCAGAATCTCGTCCCTTTT;R:TTCAAATTCITTTGCTGATGGGTTTC	(CGT) ₇	3
7	ACE087	F:AGGCCACATCTGATTATGCTTTTCC;R:TCCCGGAATCTTGAATAGAAGACA	(TA) ₃₁	4
8	ACM005	F:CGCTTCAGCAGTGAGTTGTT;R:TGTTGTCCGATACAGAGTTGCT	(ACA) ₅	4
9	ACE039	F:ATGGTCTGCCATTTCTTATTGAAGT;R:TTGATGTATGAGGCAGCATTTCTACTG	(CG) ₄ C(AC) ₄ (TC) ₃ T- (AC) ₄ GTGCA(TG) ₃	4
10	ACM071	F:TCTCATTTCAACTTTCTACCTATCC;M:CTGACATTTGCTCGACTGGA	(AG) ₁₀	5
11	ACE127	F:TCGAGACGAGCAGCATGAAAA;R:AGCTCCATTGTCCGTTCCATT	(TG) ₄ TATG(TA) ₆ TG- TGG(TG) ₃ (TA) ₆	5
12	ACM096	F:GTGGGCAATTCACGTTATGTGTGT;R:AGTTCCAAGCACCAAAAGAAGCAC	(CTA) ₅	6
13	ACE088	F:ATTTATAGCCATCATCTTTTTT;R:GGGATATCTAGTATTGCATGTCTGC	(TA) ₃₃	6
14	ACE113	F:ATCAGACCTCGGACAATCAAACCTTC;R:TCGAGAACAAGCATCCAACAATTCCA	(TCA) ₆	7

1.3 PCR 反应体系及反应条件

PCR 反应体系(10 μL):DNA 模板 1 μL,10×DNA Buffer (含 Mg²⁺) 1 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.8 μL,100 μmol/L 引物各 0.5 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.1 μL,ddH₂O 6.1 μL。

PCR 反应程序:标记 1、2、5、6、8、9、10、11、12、14 的反应程序为 94℃ 预变性 2 min;94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 30 s,10 个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 4 min,终止反应。标记 3、4、7 的反应程序为 94℃ 2 min;

94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,10 个循环;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 4 min,终止反应。标记 13 的反应程序为 94℃ 预变性 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,10 个循环;94℃ 30 s,45℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 4 min,终止反应。

试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 PCR 产物检测

PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,GoldView 显色,并在 Bio-Rad Universal Hood II 紫外凝胶成像系统下拍照。

1.5 数据处理

统计 14 对引物对 31 个自交系的扩增结果时,在相同的迁移位置上有带的计为“1”,无带的计为“0”,缺失的记为“9”。用数值分类与多变量分析系统(numerical taxonomy and multivariate analysis system,NTSYSpc)软件进行处理,非加权配对算术平均(unweighted pair group method using arithmetic average,UPGMA)法进行聚类分析,获得聚类图和遗传距离。

2 结果与分析

2.1 洋葱 EST-SSR 标记在不同大葱自交系中的通用性分析

由表 3 可知,采用 14 对来自于洋葱的 EST-SSR 引物对 31 个大葱自交系进行扩增,除了 4 号引物外,其余 13 对引物均在 31 个自交系中有扩增产物,占检测引物的 92.86%。说明洋葱的 13 对 EST-SSR 引物在大葱不同自交系的基因组

上有良好的通用性。4 号引物 ACM024 未能在大葱 31 个不同自交系上扩增到 PCR 产物,可能是因为该引物为洋葱特有。ACM024 位于洋葱 2 号染色体,可用于在分子水平上鉴定大葱和洋葱。

2.2 洋葱 EST-SSR 标记在大葱不同自交系中的多态性表现

由表 3 可知,在 13 对有扩增产物的引物中,有多态性的引物有 10 对,分别为 ACE101、ACE127、ACE113、ACE111、ACE087、ACE088、ACM154、ACE020、ACE044、ACE039,占总引物的 71.43%,占有扩增产物引物的 76.92%。多态性表现最好的引物是 ACE088,该引物在其中 1 个自交系中未扩增出条带,在 13 个自交系中扩增出 2 条条带,在 7 个自交系中扩增出 3 条条带,在 9 个自交系中扩增出 4 条条带,而其他引物只在少数自交系中表现出多态性。在 13 对引物中没有表现出多态性的是 ACM005、ACM071、ACM096。

表 3 洋葱 14 对 EST-SSR 引物在 31 个大葱自交系的扩增结果

标记名称	扩增结果																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
ACM154	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACM154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACE020	1	1	1	1	9	9	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACE020	0	0	0	0	9	9	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACE111	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE111	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
ACE111	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACM024	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
ACE101	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE101	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
ACE044	9	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	1	1	1	1	1	1
ACE044	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACE087	9	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
ACE087	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ACE087	9	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	1	1	1	1	1	1
ACM005	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE039	0	1	1	1	0	9	1	1	9	9	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
ACE039	1	0	0	0	1	9	0	0	9	9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
ACM071	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE127	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE127	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACE127	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
ACM096	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	1	1	1	1	1	1	1
ACE088	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	9	1	1	0	1	1	1	1	1
ACE088	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ACE088	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1
ACE088	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1
ACE113	9	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	1	1	1	1	1	1
ACE113	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

13 对引物在 31 个自交系中共检测到等位点 28 个,平均每对引物可以检测到 2.15 个。其中 ACM154、ACE020、ACE101、ACE044、ACE039、ACE113 可以检测到 2 个;ACE111、ACE087、ACE127 可以检测到 3 个;ACE088 可以检测到 4 个。

2.3 大葱 31 个自交系的聚类分析

由图 1 可以看出,在相似性系数 0.66 水平上,该类群自

交系可分为 2 类,一个是自选材料 1,一个是其他类型。在相似性系数 0.81 水平上,可分为 6 类,一是自选材料 1,二是 24,三是 5、6、8,四是 19、27、23、26、25、29、31、30,五是 11、28、15,六是 2、3、13、18、20、21、4、16、7、12、17、9、10、14、22。在相似性系数 0.72 水平上,自选材料 1、日本品种山木一本与其他类型关系较远。从该数据得知,日本引进大葱品种并没有严格与我国的栽培葱分开,说明我国大葱与日本大葱的亲缘关系很

近,或同源性较高,没有因地域差异显示出大的遗传距离。由表 4 可知,遗传距离在 0~2.11 之间,其中遗传距离最

小为 0(3 与 13;23 与 26;29 与 31)。遗传距离最大值为 2.11 (1 与 24)。

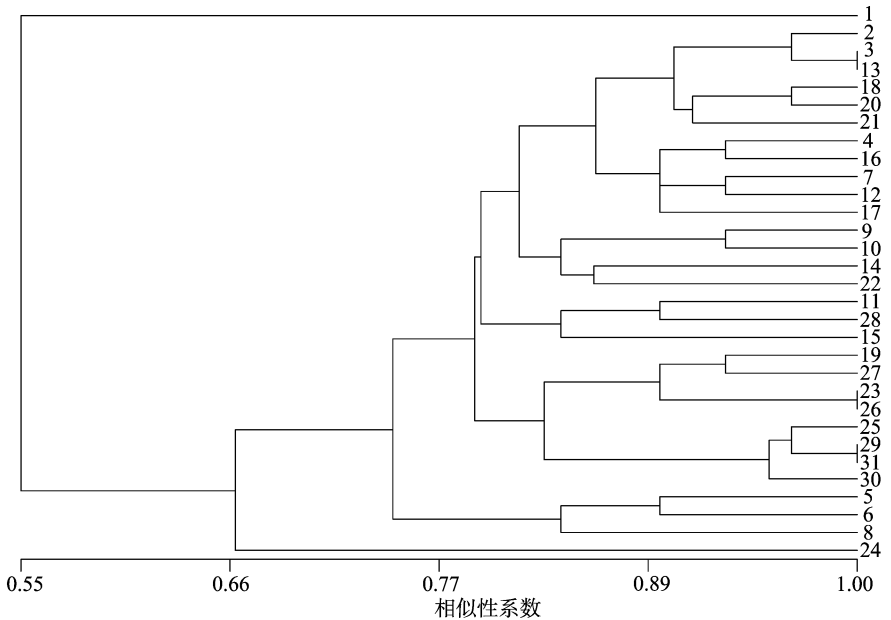


图1 基于 EST-SSR 标记的 31 个大葱自交系的聚类

表 4 大葱 31 个自交系的遗传距离

自交系 代号	遗传距离																																
1	0																																
2	0.78	0																															
3	0.78	0.03	0																														
4	0.75	0.09	0.06	0																													
5	1.72	0.90	0.89	0.87	0																												
6	1.92	0.89	0.89	0.86	0.28	0																											
7	0.72	0.12	0.09	0.09	0.84	0.83	0																										
8	1.75	0.90	0.89	0.83	0.01	0.29	0.84	0																									
9	1.58	0.86	0.85	0.84	1.66	0.28	0.80	1.69	0																								
10	1.58	0.79	0.78	0.80	1.67	0.29	0.81	1.70	0.01	0																							
11	0.78	0.12	0.08	0.09	0.90	0.89	0.12	0.86	0.86	0.83	0																						
12	0.59	0.12	0.08	0.09	0.86	0.86	0.06	0.86	0.82	0.83	0.12	0																					
13	0.78	0.03	0	0.06	0.89	0.89	0.09	0.89	0.85	0.78	0.08	0.08	0																				
14	0.57	0.18	0.14	0.15	0.82	0.86	0.12	0.90	0.78	0.79	0.18	0.12	0.14	0																			
15	1.62	0.82	0.81	0.84	1.76	1.82	0.85	1.76	1.70	1.64	0.82	0.86	0.81	0.86	0																		
16	0.57	0.15	0.12	0.06	0.87	0.86	0.09	0.83	0.79	0.80	0.15	0.09	0.12	0.09	0.84	0																	
17	0.67	0.20	0.15	0.10	0.82	1.14	0.07	0.82	1.28	1.28	0.20	0.13	0.15	0.13	0.87	0.10	0																
18	0.61	0.08	0.05	0.12	0.89	0.89	0.09	0.89	0.81	0.78	0.14	0.08	0.05	0.08	0.81	0.06	0.15	0															
19	0.75	0.22	0.18	0.13	0.87	0.90	0.09	0.79	0.84	0.84	0.15	0.15	0.18	0.22	0.92	0.13	0.10	0.18	0														
20	0.62	0.11	0.08	0.14	0.87	0.91	0.11	0.87	0.80	0.77	0.17	0.11	0.08	0.11	0.84	0.08	0.18	0.03	0.14	0													
21	0.76	0.06	0.08	0.15	0.86	0.89	0.12	0.86	0.82	0.79	0.18	0.12	0.08	0.18	0.86	0.15	0.20	0.08	0.15	0.05	0												
22	0.74	0.18	0.14	0.15	0.82	0.89	0.12	0.90	0.82	0.79	0.18	0.18	0.14	0.12	0.91	0.22	0.13	0.21	0.15	0.17	0.18	0											
23	0.66	0.17	0.14	0.14	0.96	0.98	0.18	0.87	0.88	0.80	0.17	0.24	0.14	0.24	0.88	0.14	0.18	0.14	0.08	0.11	0.17	0.17	0										
24	2.11	0.69	0.51	0.66	1.87	2.00	0.93	1.82	1.84	1.47	0.92	0.96	0.51	0.99	1.66	0.93	0.90	0.72	0.89	0.72	0.92	0.72	0.52	0									
25	0.79	0.17	0.14	0.14	0.87	0.95	0.25	0.87	0.88	0.80	0.17	0.24	0.14	0.17	0.92	0.21	0.18	0.20	0.14	0.16	0.17	0.11	0.11	0.52	0								
26	0.66	0.17	0.14	0.14	0.96	0.98	0.18	0.87	0.88	0.80	0.17	0.24	0.14	0.24	0.88	0.14	0.18	0.14	0.08	0.11	0.17	0.17	0.00	0.52	0.11	0							
27	0.77	0.15	0.12	0.06	0.92	0.90	0.09	0.83	0.88	0.84	0.09	0.15	0.12	0.22	0.88	0.13	0.10	0.18	0.06	0.21	0.22	0.15	0.08	0.66	0.14	0.08	0						
28	0.65	0.14	0.11	0.12	0.97	0.95	0.22	0.89	0.89	0.82	0.08	0.21	0.11	0.21	0.81	0.12	0.23	0.11	0.18	0.14	0.21	0.28	0.08	0.69	0.14	0.08	0.12	0					
29	0.65	0.19	0.16	0.17	0.90	0.97	0.27	0.90	0.86	0.79	0.19	0.26	0.16	0.13	0.90	0.17	0.20	0.16	0.17	0.13	0.19	0.13	0.08	0.54	0.02	0.08	0.17	0.10	0				
30	0.62	0.17	0.14	0.14	0.87	0.95	0.25	0.91	0.84	0.77	0.24	0.24	0.14	0.11	0.88	0.14	0.18	0.14	0.21	0.11	0.17	0.11	0.11	0.54	0.05	0.11	0.21	0.14	0.02	0			
31	0.65	0.19	0.16	0.17	0.90	0.97	0.27	0.90	0.86	0.79	0.19	0.26	0.16	0.13	0.90	0.17	0.20	0.16	0.17	0.13	0.19	0.13	0.08	0.54	0.02	0.08	0.17	0.10	0.00	0.02	0		

3 讨论

研究表明,DNA 分子标记可用于葱属植物的品种鉴定、多样性研究、SSR 标记的开发、颜色的改良、可溶性固形物含量、雄性不育系和 DNA 测序等工作^[12]。Kutty 等利用 90 个 RAPD 引物对 24 个洋葱栽培种进行了分类分析^[13];Xu 等利用 5 个 RAPD 标记对 31 个大蒜栽培种进行了分类鉴定^[14];我国学者徐启江等利用 ISSR 标记对洋葱种质资源进行了遗传多样性分析^[15];高莉敏等开发了与雄性不育相关的大葱 SCAR 分子标记^[16-17];Khar 等利用 EST-SSR 对短日照热带印度洋葱及其相关变种的种群进行了遗传多样性分析^[18]。但利用 EST-SSR 标记对大葱的栽培种进行多样性分析还少有报道。

有大量研究表明在同属、同科植物间甚至单子叶植物、双子叶植物间的 EST-SSR 标记均有较高的通用性^[19-21]。本研究将洋葱 EST-SSR 标记应用于尚未大量开发 EST-SSR 标记的各个大葱栽培类型中,具有很高的通用性。该试验证实洋葱 EST-SSR 标记在大葱不同栽培类型上的通用性比率为 92.86%,为大葱分子标记辅助选择提供了一些可行的 EST-SSR 引物,降低了单独开发大葱 EST-SSR 引物的成本。本研究为大葱遗传作图、遗传多样性分析、功能基因定位和克隆等提供了有效途径,同时,也为大葱种质资源收集、保存、评价及优良种源筛选奠定了基础。

引物的多态性条带不仅能说明引物的多态性,同时也能反映一个群体的遗传变异程度^[22-26]。本研究所用的 13 对 EST-SSR 引物共检测到 28 个等位基因位点,平均每条引物 2.15 个。此结果说明该大葱群体的遗传多样性程度相对较低。这可能是由于大葱食用、药用等价值较大,多年来人类有目的地种植,造成有些基因型丢失,遗传背景不断趋于单一化,导致形成了较低的遗传多样性。此外,为深入分析大葱不同栽培种的遗传多样性,开发新的 EST-SSR 标记势在必行。

参考文献:

- [1] 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国蔬菜品种志[M]. 北京: 中国农业科技出版社,2002.
- [2] 韩春然. 大葱提取物对微生物抑制作用的研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(6):65-68.
- [3] 苗锦山,刘彩霞,杨文才,等. 葱种质资源品质性状的遗传多样性研究[J]. 西北农业学报,2012,21(3):122-131.
- [4] Graner A, Varshney R, Michalek W, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,106(3):411-422.
- [5] 姜春芽,廖 娇,徐小彪,等. 植物 EST-SSR 技术及其应用[J]. 分子植物育种,2009,7(1):125-129.
- [6] 杨维泽,许宗亮,杨绍兵,等. 三种植物 EST-SSR 引物在滇重楼上的通用性分析[J]. 西南农业学报,2014(4):1686-1690.
- [7] 文明富,陈 新,王海燕,等. 木薯基因组 SSR 和 EST-SSR 在麻疯树和橡胶树中的通用性分析[J]. 作物学报,2011,37(1):74-78.
- [8] Fukuoka H, Nunome T, Minamiyama Y, et al. Read2Marker: a data

- processing tool for microsatellite marker development from a large data set[J]. BioTechniques,2005,39(4):472,474,476.
- [9] Kuhl J C, Cheung F, Yuan Q, et al. A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales[J]. Plant Cell,2004,16(1):114-125.
- [10] Martin W J, McCallum J, Shigyo M, et al. Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity[J]. Molecular Genetics and Genomics,2005,274(3):197-204.
- [11] Hikaru T, Ken - Ichiro Y, Shigenori Y, et al. Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*) [J]. Theoretical and Applied Genetics,2008,117(8):1213-1223.
- [12] Lakshmana R, Khandagale K, Aswath C, et al. Molecular markers in the improvement of *Allium* crops[J]. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding,2013,49(4):131-139.
- [13] Kutty M S, Gowda R V, Anand L. Analysis of genetic diversity among Indian short-day onion (*Allium cepa* L.) cultivars using RAPD markers [J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology,2006,81(4):774-777.
- [14] Xu P, Liu H, Gao Z, et al. Genetic identification of garlic cultivars and lines by using RAPD assay[J]. Acta Horticulturae (ISHS), 2001,555:213-220.
- [15] 徐启江,崔成日,贾铁金. 洋葱种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国农学通报,2007,23(6):126-130.
- [16] 高莉敏,董 飞,霍雨猛,等. 大葱细胞质雄性不育基因的 SCAR 标记开发[J]. 园艺学报,2013,40(7):1382-1388.
- [17] 盖树鹏,孟祥栋. 大葱胞质雄性不育位点 RAPD 标记转化为 SCAR 标记的研究[J]. 莱阳农学院学报,2004,21(3):189-192.
- [18] Khar A, Lawande K E, Negi K S. Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. [J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2011,58(5):741-752.
- [19] 钟 敏,程须珍,王丽侠,等. 绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性[J]. 作物学报,2012,38(2):223-230.
- [20] 向 闯,宁祖林,康 明,等. 中国板栗 EST-SSR 信息分析及其通用性[J]. 热带亚热带植物学报,2010,18(6):665-669.
- [21] 柴呈森,姜 蔚,李 娜,等. 单、双子叶作物间 EST-SSRs 引物和标记的通用性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(1):75-82.
- [22] 李青燕,陈向东,董 娜,等. 利用分子标记建立杂交小麦亲本分子指纹图谱[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):32-34.
- [23] 梁 田,杨 霞,张 勋,等. 绵羊 Toll 样受体 7 基因多态性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):26-29.
- [24] 宋 慧,王毓洪,张香琴. 瓠瓜类型砧木遗传作图群体双亲多态性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):48-50.
- [25] 陈明辉,张志录,杨雨华,等. 红豆杉种质资源遗传多样性的目标起始密码子多态性(SCoT)分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):116-119.
- [26] 杨 阳,刘 振,赵 洋,等. 利用 EST-SSR 标记研究黄金茶群体遗传多样性及遗传分化[J]. 茶叶科学,2009,29(3):236-242.