

# 韭菜种质资源 DNA 指纹库构建与聚类分析

刘宏敏, 张 明\*, 李延龙, 曹秀敏, 王 贞, 乔保健, 尹守恒  
(平顶山市农业科学院, 河南 平顶山 467001)

**摘要:** 应用 ISSR 分子标记方法, 以 96 份有代表性的韭菜资源为材料, 进行遗传多样性和亲缘关系分析, 为韭菜品种创新提供理论依据。结果表明, 从 77 条 ISSR 引物筛选出 20 条多态性好的引物, 通过 PCR 扩增、PAGE 指纹检测和凝胶成像指纹数据采集, 建立第 1 个韭菜种质资源 DNA 指纹库。韭菜 DNA 的 ISSR 扩增多态性比率达 94.7%, 是韭菜种质资源研究的一种有效分子标记。应用 Nei li 相似系数法估算了 96 份材料间的遗传相似系数 (genetic similarity, Gs), 其 GS 在 0.58~0.88, 遗传多样性比较丰富。部分材料聚类与其来源地有明显相关性, 与其亲缘关系较近有关, 符合植物种群分布一般规律; 新疆野生韭等个别品种自成一类, 与其特异的遗传基础有关; 选育推广的韭菜品种聚类比较集中, 遗传基础相对狭窄, 所以在新品种创新研究中要加强国内外远缘韭菜种质的导入。

**关键词:** 韭菜; 种质资源; DNA 指纹库; 构建; 聚类分析

中图分类号: S633.3      文献标识码: A      文章编号: 1004-3268(2011)08-0164-05

## DNA Fingerprint Library Construction and Cluster Analysis of Leek Germplasm Resources

LIU Hong-min, ZHANG Ming\*, LI Yan-long, CAO Xi-min, WANG Zhen,  
QIAO Bao-jian, YIN Shou-heng  
(Pingdingshan Academy of Agricultural Sciences, Pingdingshan 467001, China)

**Abstract:** In order to provide theoretical information for leek breeding, this study was to probe genetic diversity of the leek germplasms. 96 leek samples were used to detect the intra- and inter-specific genetic variation by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. The result showed that 20 ISSR primers were screened from 77 primers based on 96 leek samples. The first leek DNA fingerprint library was constructed by PCR amplification, PAGE fingerprint detection, and fingerprint data collection of Gel imaging. The ISSR amplification diversity reached 94.7%, which was an effective molecular marker. The genetic similarity (GS) among 96 leek samples ranged from 0.58 to 0.88, which could fully show that they have rich genetic diversity. The result of cluster analysis showed that the cluster analysis correlated with sample origin and was consistent with species distribution. The breeding and spreading cultivars with relatively low diversity clustered more together, which means the new leek breeding innovation should introduce germplasms from home and abroad base.

**Key words:** Leek; Genetic diversity; DNA fingerprint database; Construction; Cluster analysis

韭菜是一种食药同源的蔬菜植物, 原产于中亚和西亚。中国具有丰富的野生韭菜和栽培驯化的农家韭菜品种资源。韭菜育种是河南省平顶山市农业科学院的优势研究项目, 在全国处于领先地位, 平顶

山市农科院先后育成推广韭菜新品种和一代杂交种 12 个, 取得了显著的经济效益和社会效益。ISSR 标记已广泛应用于小麦、水稻、烟草、甘薯等多种作物的遗传多样性和亲缘关系分析研究<sup>[1-4]</sup>, 而在韭菜

收稿日期: 2011-04-11  
基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (623010200)  
作者简介: 刘宏敏 (1958-), 男, 河南巩义人, 副研究员, 主要从事作物育种工作。  
\* 通讯作者: 张 明 (1963-), 男, 河南汝州人, 副研究员, 主要从事作物育种工作。E-mail: mzm269@163.com  
© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

研究上的应用较少。鉴此,对韭菜种质资源 DNA 指纹库构建与分子标记辅助育种技术进行研究,从遗传基础上追寻和探讨韭菜种质资源的多样性和品种间的相似问题,为韭菜种质资源的可持续利用和韭菜品种创新研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

平顶山市农业科学院现有韭菜种质资源 174 份,约占国家韭菜种质资源总量的 60%<sup>[5]</sup>,从中选

取 96 份有代表性的资源材料构建指纹库。其中韭菜种质资源初级核心库材料 69 份,自育韭菜品种材料 9 份,其他品种(系)材料 18 份(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的提取 2009 年 3 月从韭菜资源圃采集资源材料新叶,采用改良 SDS 法<sup>[6]</sup>提取各资源材料基因组 DNA,利用紫外分光光度计(北分瑞利)检测基因 DNA 质量浓度和纯度,保存在 - 20℃冰箱内,使用时稀释到 20 ng/μL,作为构建 DNA 指纹库的 PCR 扩增模板。

表 1 供试材料的试验编码、品种名称和来源

序号	加样序号	资源名称	引种来源	序号	加样序号	资源名称	引种来源
1	1- 1	上海强韭-1	上海市郊区	49	3- 1	平丰 1 号	平顶山市
2	1- 2	上海强韭-2	上海市郊区	50	3- 2	平韭四号	平顶山市
3	1- 3	上海强韭-3	上海市郊区	51	3- 3	平丰 8 号	平顶山市
4	1- 4	上海强韭-6	辽宁省	52	3- 4	平丰 9 号	平顶山市
5	1- 5	桂林穿山韭	湖北襄阳市	53	3- 5	平丰 10 号	平顶山市
6	1- 6	环韭	华中农业大学	54	3- 6	平丰苔韭	平顶山市
7	1- 7	新疆白根	新疆库尔乐市和静县	55	3- 7	抗寒薹韭	平顶山市
8	1- 8	新疆马蔺韭	新疆库尔乐市和静县	56	3- 8	佳木斯竹杆青	哈尔滨市
9	1- 9	天津大金钩	天津市	57	3- 9	竹杆青	辽宁省沈阳市
10	1- 10	吉林大马蔺	长春市	58	3- 10	阜新 130	辽宁省沈阳市
11	1- 11	津引一号	天津市	59	3- 11	家嘉兴	辽宁省沈阳市
12	1- 12	天津大青苗	天津市	60	3- 12	春寒 cc	辽宁省沈阳市
13	1- 13	南京马鞭韭	南京市郊区	61	3- 13	小兰韭	辽宁省沈阳市
14	1- 14	西蒲韭	成都市	62	3- 14	张家口马蔺韭	辽宁省沈阳市
15	1- 15	白绵韭	陕西省西安市	63	3- 15	红花野韭	辽宁省沈阳市
16	1- 16	南京寒青韭	南京市郊区	64	3- 16	内蒙古马蔺韭	辽宁省沈阳市
17	1- 17	铜山薹韭	江苏省铜山县	65	3- 17	薹韭	辽宁省沈阳市
18	1- 18	四季青	新疆库尔乐市和静县	66	3- 18	抚顺北湾韭	辽宁省沈阳市
19	1- 19	四季青(选)	陕西省长安县	67	3- 19	凌原野生韭	辽宁省沈阳市
20	1- 20	春韭	上海市北新泾	68	3- 20	江西韭菜	辽宁省沈阳市
21	1- 21	长沙香韭	南京市郊区	69	3- 21	汉日三韭菜	辽宁省沈阳市
22	1- 22	桂林小红根	桂林	70	3- 22	雪里青	辽宁省沈阳市
23	1- 23	兰州白根	兰州市郊区	71	3- 23	312 号	辽宁省沈阳市
24	1- 24	独根红	山东寿光市	72	3- 24	双城王家韭	辽宁省沈阳市
25	2- 1	早花韭	云南建水县	73	4- 1	汉中春韭	辽宁省沈阳市
26	2- 2	重庆小韭菜	重庆市郊	74	4- 2	俄罗斯野生韭	辽宁省沈阳市
27	2- 3	嘉兴白根	嘉兴市	75	4- 3	紫根韭	辽宁省沈阳市
28	2- 4	扬子洲韭	江西南昌市	76	4- 4	嵩县野生韭	河南省嵩县
29	2- 5	杭州雪韭	杭州市郊区	77	4- 5	泉州野生韭	福建省泉州市
30	2- 6	791 自交系	平顶山市	78	4- 6	画眉谷野生韭	河南省鲁山县
31	2- 7	桂林大叶	贵州(引自安顺)	79	4- 7	B 钩 123	平顶山市
32	2- 8	铁杆青	沈阳市新民	80	4- 8	界首当地韭	安徽省界首市
33	2- 9	大黄苗	天津市郊区	81	4- 9	云南呈贡韭	中国农业科学院
34	2- 10	黄山当地韭	安徽黄山	82	4- 10	阔韭	中国农业科学院
35	2- 11	犀蒲韭	成都市	83	4- 11	霞浦韭菜	中国农业科学院
36	2- 12	宁陕大坝坎	西安市郊	84	4- 12	四季苔韭	中国农业科学院
37	2- 13	黑龙江大马蔺	哈尔滨市	85	4- 13	浦口韭菜	中国农业科学院
38	2- 14	宁夏马蔺选	华中农业大学	86	4- 14	辽宁马蔺	辽宁省沈阳市
39	2- 15	新疆弯苗	乌鲁木齐	87	4- 15	仙韭	湖北襄樊市
40	2- 16	广州大叶	广州市郊区	88	4- 16	日本宽叶韭	华中农业大学
41	2- 17	扬子洲韭	江西南昌市	89	4- 17	汉中冬韭	陕西省西安市
42	2- 18	黑环韭选	陕西省长安县	90	4- 18	B 钩 124	平顶山市
43	2- 19	新疆野生韭	辽宁省	91	4- 19	黄格子(选)	武汉市
44	2- 20	秦岭北鸡窝子	西安市郊	92	4- 20	青格子	武汉市青陵乡
45	2- 21	独根红选大花	山东寿光市	93	4- 21	嘉兴雪莲	嘉兴市郊竹林乡
46	2- 22	山东大青根	山东济南市	94	4- 22	平丰 6 号	平顶山市
47	2- 23	石汉三	陕西汉中市	95	4- 23	西峡野生韭	河南省西峡县
48	2- 24	津不育	平顶山市	96	4- 24	焦作野生韭	河南省焦作市

1.2.2 引物筛选及扩增条件控制 从 77 条 ISSR 随机引物(上海捷瑞生物工程公司合成)中,筛选带型稳定、多态性好的引物,用于创建指纹库,用 BIO RAD 梯度 PCR 仪(icycler)筛选各引物适宜退火温度。

扩增反应体系优化<sup>[7]</sup>: 10μL 反应体积, 10× Buffer 1μL, 20ng/μL 的模板 DNA 1μL, 0.6mmol/L 的引物 3.3μL, 10mmol/L 的 dNTP 0.4μL, 25mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 0.6μL, 2.5 U/μL 的 *Taq* 酶(上海捷瑞生产) 0.2μL, 纯水 3.5μL。扩增条件: 94℃预变性 5min; 94℃变性 60s, 退火 40s, 72℃延伸 60s, 35 个循环; 72℃延伸 10min, 4℃保存。

1.2.3 电泳、显色和数据采集 扩增产物采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)<sup>[8]</sup>和银染显色检测,用凝胶成像系统(BIO RAD Gel Doc XR)采集扩增 DNA 指纹数据,以 Marker II 作为扩增产物分子量标记。

1.2.4 数据处理与统计分析 用 Quantity One 软件对扩增 DNA 指纹进行处理,将每个品种在电泳图上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置无带和不易分辨的弱带记为“0”,建立原始矩阵。运用 Nei-Li 指数法<sup>[9]</sup>计算样本间遗传相似系数,利用 DPS 软件,按类平均法进行聚类,绘制材料间亲缘关系树状图。

2 结果和分析

2.1 韭菜种质资源 DNA 指纹库构建及多态性分析

从 77 条 ISSR 引物中,筛选出 20 条带型稳定、多态性好的引物(表 2)。其中,ISSR-62 引物扩增

表 2 ISSR 引物序号、碱基序列及退火温度

引物序号	碱基序列	退火温度/℃
ISSR-4	ACACACACACACACAG	52.6
ISSR-12	GAGGAGGAGGAGGAGGAG	59.5
ISSR-22	ACACACACACACACAA	50.3
ISSR-24	ACACACACACACACTC	52.6
ISSR-26	ACACACACACACACCC	54.9
ISSR-32	AGAGAGAGAGAGAGAGAC	52.6
ISSR-33	AGAGAGAGAGAGAGAGAT	50.3
ISSR-34	AGAGAGAGAGAGAGAGAA	50.3
ISSR-35	AGAGAGAGAGAGAGAGTA	50.3
ISSR-43	ACACACACACACACCT	52.6
ISSR-45	ACACACACACACACGC	54.9
ISSR-52	TGTGTGTGTGTGTGGA	52.6
ISSR-56	AGAGAGAGAGAGAGAGTT	50.3
ISSR-57	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	52.6
ISSR-58	AGAGAGAGAGAGAGAGGA	52.6
ISSR-60	AGAGAGAGAGAGAGAGGG	54.9
ISSR-61	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	52.6
ISSR-62	AGAGAGAGAGAGAGAGCA	52.6
ISSR-63	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	52.6
ISSR-75	AGTGAGTGAGTGAGTG	49.2

产物条带最多,指纹位点 15 个,ISSR-4 引物扩增产物条带最少,指纹位点 9 个(图 1、图 2、表 3)。20 条引物对 96 份材料进行 ISSR-PCR 扩增,共扩增出指纹位点 229 个。其中多态性位点 217 个,多态性比率 94.7%,表明 ISSR 分子标记在检测韭菜基因组 DNA 遗传多样性上有显著的检出效率,是韭菜种质资源遗传多样性与亲缘关系的一种有效分子标记。利用多态性指纹位点数据,建立起第 1 个韭菜种质资源 DNA 指纹数据库。

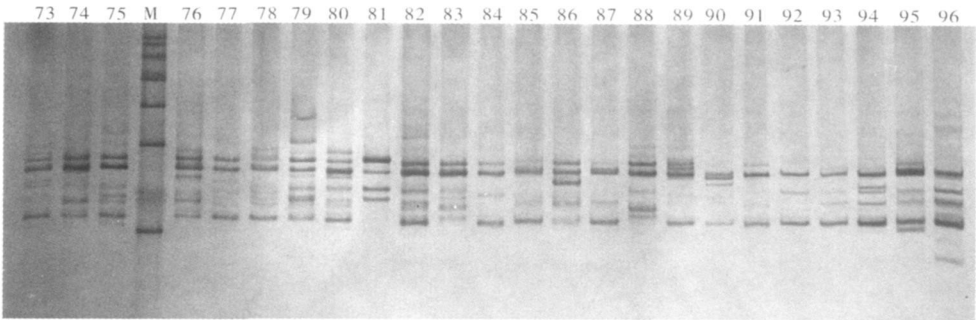


图 1 ISSR-4 对 73—96 号材料扩增产物指纹图谱

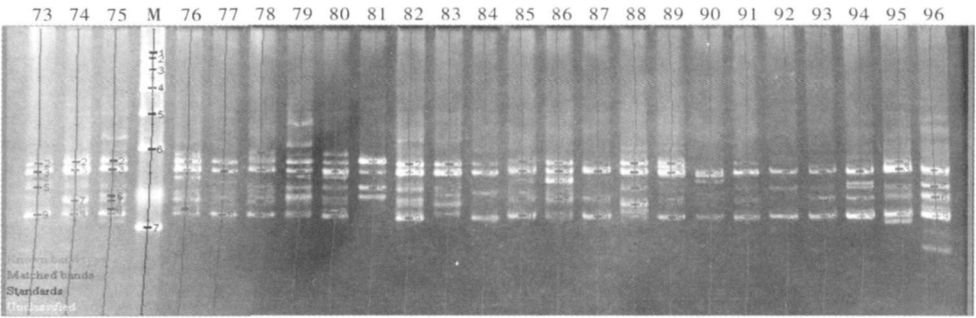


表 3 ISSR -4 对 73 — 96 号韭菜材料指纹图谱认读数据

指纹编号	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
- 1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
- 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
- 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
- 4	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
- 5	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
- 6	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
- 7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
- 8	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
- 9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

注: 73- 96 为资源编号

2.2 韭菜种质资源分子聚类与遗传多样性分析

应用分子标记数据, 进行 96 个材料分子聚类, 绘制亲缘关系树状图(图 3)。从聚类结果看, 韭菜

种质资源间相似度(GS) 在 0. 58~ 0. 88, 遗传距离 (GD= 1- GS) 在 0. 12~ 0. 42, 说明供试材料间的遗传多样性比较丰富。

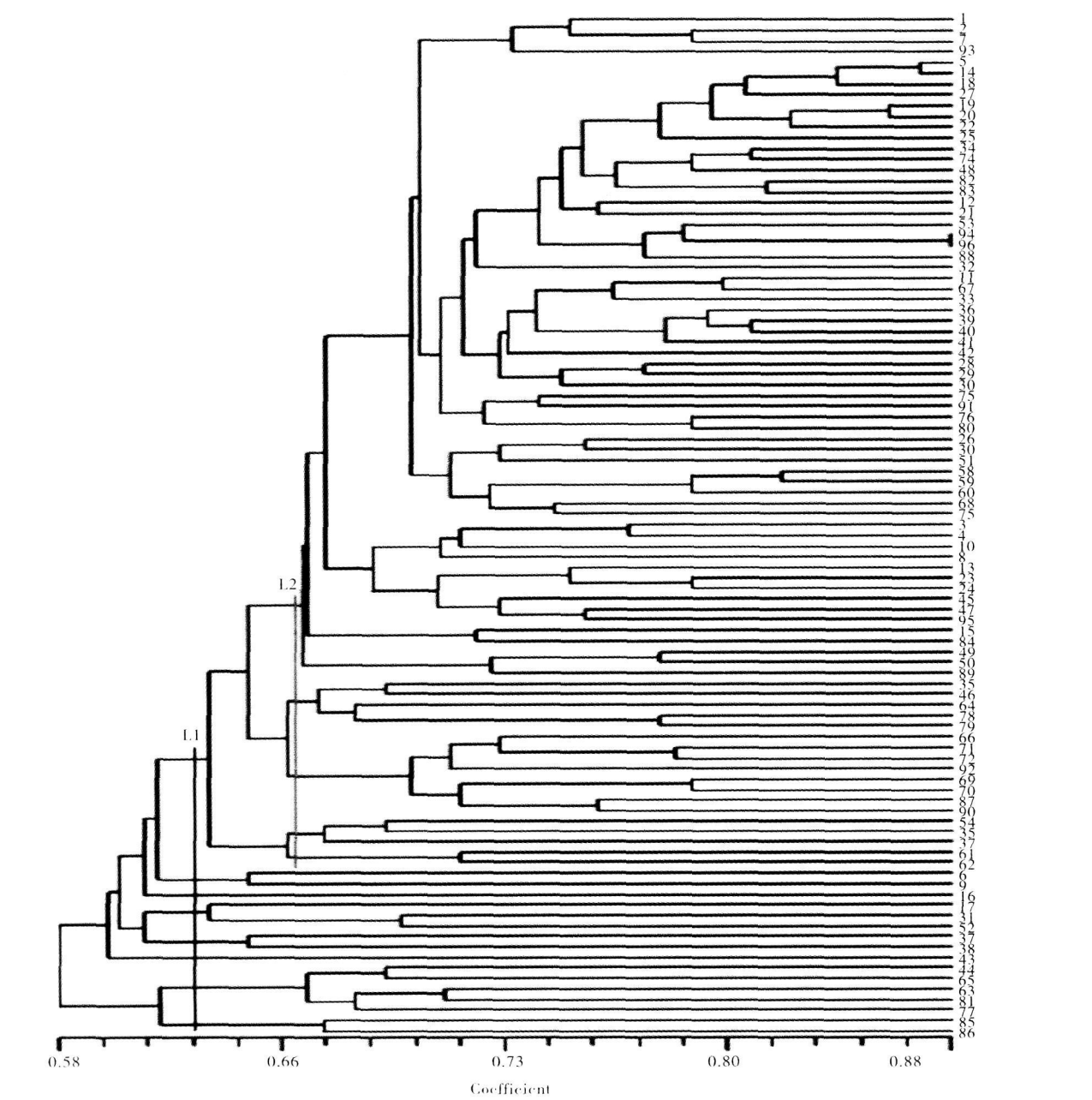


图 3 基于 ISSR 数据绘制的 96 份韭菜供试种间材料的分子聚类图谱

在相似度 0.628 处划 L1 分割线, 可将全部材料分为 8 类。其中, 第 1 类 79 个资源材料, 约占建库资源总量的 82.3%, 基本包含目前推广利用的韭菜品种和大多数农家品种, 说明现有建库韭菜种质资源遗传基础比较接近。第 2-8 类共 17 个品种资源, 虽然数量上较少, 但其与第 1 类资源材料的相似度低, 遗传差异比较大, 利用后 7 类中的种质资源和第 1 类中的优良资源杂交, 更有利于培育遗传基础丰富、适应性广泛的韭菜新品种。尤其是南京寒青韭独聚一类, 与其表型的特异性是一致的。新疆野生韭独聚一类, 且与第 1 类的相似度低, 说明是一个比较好的远缘亲本资源材料。

在相似度 0.67 处划 L2 分割线, 又能把第 1 类划分为 5 类, 具有比较明显的来源地分布特征, 符合同类研究的一般规律<sup>[10-11]</sup>。其中, 1-1 类 61 个品种, 绝大多数是淮河以南的资源材料; 1-2 类 5 个品种, 属于中间过渡类型, 南北中资源都有; 1-3 类 8 个品种, 都是从辽宁省农科院引进的资源材料; 1-4 类 3 个品种, 包括本单位育成的品种 2 个, 是耐寒的品种材料; 1-5 类 2 个品种, 均来自东北地区。

在相似度 0.69 位置, 上海强韭 4 个选系材料聚为 2 类, 说明系统选择对品种创新效果是明显的, 这可能与韭菜植物常异花授粉特性有关。2 类分别与新疆白根和新疆马蔺韭聚在一起, 表明上海强韭与新疆韭菜资源的遗传关系可能比较密切。

### 3 讨论

本研究发现韭菜 ISSR 标记稳定性好、遗传多态性位点多, 这一点与梁景霞等研究报道一致<sup>[3]</sup>。本研究从 77 条 ISSR 引物中筛选出 20 条多态性好的引物, 而 Joshi 等<sup>[2]</sup>在水稻中用 30 条 ISSR 引物, 有 18 条的引物能够产生清晰、多态性扩增产物的报道, 这与所选材料的遗传基础差异有关。

本研究从遗传基础上追寻和探讨韭菜种质资源的多样性和品种间的相似性问题, 不仅可用于指导韭菜育种创新的亲本选配, 还能为韭菜品种种子纯度 DNA 指纹鉴定<sup>[12]</sup>和韭菜品种权保护, 提供分子水平的理论依据。

本研究供试材料的遗传基础是丰富的, 但入选建库的 9 个自育推广韭菜品种, 聚类结果除平丰 9 号外, 其余 8 个品种均聚在第 1 类内, 说明他们的遗传基础比较接近, 这与潘敏等<sup>[13]</sup>的研究结果一致, 说明取材的遗传差异对结果的影响较大。

总之, 通过对供试 96 份韭菜材料的 ISSR 分子

标记, 发现其在检测韭菜基因组 DNA 遗传多态性上有较显著的检出效率, 是开展韭菜遗传多样性与亲缘关系研究的一种有效分子标记。随后的聚类分析表明, 供试材料总体上具有丰富的遗传多样性, 部分地理来源相同的品种有相对集合现象, 育成推广品种多数聚在一类, 这些都与其亲缘关系较近有关。这些研究结果是进一步开展韭菜种子纯度鉴定、品种权保护和杂交组合亲本选配等的基础。

### 参考文献:

- [1] Nagaoka T, Ogiwara Y. Application of ISSR polymorphism in cultivars using RAPD finger printing [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94(5): 597-602.
- [2] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1311-1320.
- [3] 梁景霞, 祁建民, 方平, 等. 烟草种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 聚类分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 286-294.
- [4] 李强, 刘庆昌, 翟红, 等. 中国甘薯主要亲本遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(6): 972-977.
- [5] 尹守恒, 刘宏敏, 杨宛玉, 等. 韭菜 [M]. 郑州: 河南科技出版社, 2007.
- [6] 陈亮, 杨亚军, 虞富莲, 等. 15 个茶树品种遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 21-27.
- [7] 李延龙, 张明, 曹秀敏, 等. 韭菜 ISSR-PCR 反应体系的优化 [J]. 河南农业科学, 2009(1): 91-93.
- [8] 张明, 李延龙, 乔保健, 等. PAGE 技术对韭菜 ISSR-PCR 产物指纹检测效果的影响 [J]. 生物学通报, 2010, 45(1): 46-48.
- [9] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [10] 李国民, 李忠超, 许凯扬, 等. 抗癌植物冬凌草种质资源遗传多样性分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(2): 116-122.
- [11] 李钧敏, 林俊. 青花菜品种的 ISSR 分析 [J]. 江苏农业科学, 2008(2): 85-88.
- [12] 刘宏敏, 张明, 曹秀敏, 等. 韭菜 ISSR-PCR 的韭菜种子纯度的 DNA 指纹检测技术 [J]. 河南农业科学, 2010(1): 96-98.
- [13] 潘敏, 杨建平, 曹德航, 等. 韭菜栽培品种遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 44-47.