

嫩食型南瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

荆赞革, 吕 叶, 裴徐梨*, 焦 鹏, 朱丽瑞, 杨四玉
(昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214)

摘要: ISSR 分子标记可较好地应用于南瓜种质资源遗传多样性分析和亲缘关系鉴定. 以嫩食型南瓜为材料, 采用 ISSR 分子标记技术对其遗传多样性进行分析. 结果表明, 17 条引物可扩增出 99 条带, 其中多态性条带 97 条, 多态性比例为 97.79%. 在遗传相似系数 0.74 处, 将试验材料分为两大类: 第 1 类群包含 27 份嫩食型南瓜材料, 可分为 4 个亚组; 其他 5 份瓜类 (外群) 则聚类到第 2 类群.

关键词: 嫩食型南瓜; ISSR; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: S642.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2021) 06-0084-04

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2021.06.013

Genetic Diversity Analysis on Fresh-edible Pumpkin Germplasm Resources by ISSR Markers

JING Zange, LV Ye, PEI Xuli*, JIAO Peng, ZHU Lirui, YANG Siyu
(School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: ISSR molecular markers can be used to analyze genetic diversity and clarify their genetic relationships of pumpkin germplasm resources. In this study, the selected fresh-edible pumpkin varieties were determined by ISSR technology for genetic diversity and cluster analysis. The results showed that the total of 99 bands were amplified by 17 primers, in which 97 bands were polymorphic, and the polymorphic locus ratio was 97.79%. At the genetic similarity coefficient of 0.74, the test varieties were divided into two categories: the first group contains 27 fresh-edible pumpkin varieties, which can be further divided into four subgroups. The second group was composed by five other cucurbits (out group).

Key words: fresh-edible pumpkin; ISSR; molecular marker; genetic diversity

分子标记是 DNA 水平遗传多态性的直接反映. 目前, 应用较普遍的有 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等分子标记. 此外, 简单序列重复区间扩增多态性 (ISSR) 分子标记技术也广泛应用于品种鉴定^[1]、遗传多样性分析^[2]、基因定位^[3]、植物基因组作图以及指纹图谱建立^[4]. 例如: 陈桂平等^[5]利用 ISSR 标记对无花果品种进行鉴定, 发现引物 811F 和 836F 可特异性将 2 号和 20 号种质资源区分出来; 王庆军等^[6]对观赏石榴进行遗传多样性分析, 发现其遗传变异较大, 存在较丰富的遗传多样性; Kojima 等^[7]利用分子标记构建了小麦

品种的遗传连锁图, 发现多个 ISSR 位点可被定位到染色体上; 邵雪花等^[8]采用 ISSR 标记对余甘子品种的遗传多样性进行了分析和指纹图谱建立, 发现只需引物 UBC809 和引物 UBC886 就可成功区分广东省的 28 份余甘子种质资源.

嫩食型南瓜主要以嫩瓜作为食用对象, 深受消费者的喜爱. 但是, 嫩食型南瓜栽培品种由于地区间相互引种、自繁自育等原因, 导致一些地方资源种源混杂, 种性退化严重等问题, 给资源搜集和新品种育种造成较大困难^[9]. 因此, 本研究利用 ISSR 分子标记技术对搜集到的嫩食型南瓜种质资源

收稿日期: 2021-03-29

基金项目: 昆明学院引进人才科研项目“姜柄瓜种质资源的收集评价和创新利用研究”(YJL19009); 云南省教育厅科学研究基金项目“南瓜白粉病室内苗期抗病性鉴定方法及抗性种质资源筛选”(2021Y717).

作者简介: 荆赞革 (1983—), 男, 河南灵宝人, 助理研究员, 博士, 主要从事蔬菜分子生物学研究.

*通信作者: 裴徐梨 (1990—), 女, 云南蒙自人, 讲师, 博士, 主要从事蔬菜分子生物学研究, E-mail: xuliP@163.com.

进行遗传多样性分析, 鉴定其亲缘关系, 以期为嫩食型南瓜的利用和新品种选育及育种提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

以收集的多份不同类型的嫩食型南瓜品种为试

验材料, 具体名称见表 1.

1.2 DNA 的提取和引物筛选

种子催芽后进行穴盘育苗, 待长到四叶一心时, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Takara) 提取叶片 DNA.

ISSR 引物根据已公布序列随机挑选合成. 筛选出条带清晰、重复性好的引物, 用于后续试验.

表 1 用于 ISSR 标记分析的材料

编号	种质名称	来源	编号	种质名称	来源
1	浅花	山西	17	阿童木	四川
2	嫩早一串铃南瓜	湖南	18	一串铃青蓝	湖南
3	珍玉四号 F1	山西	19	多嫩多 (三号嫩早南瓜)	四川
4	玉玲珑	河北	20	无蔓珍珠 F1	山西
5	早喜一号	四川	21	小青瓜	山西
6	圆珠五号	河北	22	精选七叶瓜	山西
7	玉玲	河北	23	精选小青瓜	山西
8	珍玉四号	山西	24	圆珠一号	河北
9	白花皮一串铃	新疆	25	美特	宁夏
10	一串金二号	四川	26	蜜本南瓜	河北
11	多嫩多 (四号嫩早南瓜)	四川	27	蜜本南瓜	河北
12	一串铃花篮	湖南	28	西葫芦 (晶莹粹)	河北
13	玉玲珑 F1	河北	29	黄皮笋瓜	西安
14	圆珠二号	河北	30	黑籽南瓜	黑龙江
15	无蔓早二号 F1	山西	31	黄瓜	天津
16	高丽小南瓜	山西	32	西瓜	北京

1.3 ISSR-PCR 反应和检测

PCR 扩增程序为 95 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 40 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 10 ℃ 保存; 扩增体系为 DNA 模板 1.5 μL, 引物 1 μL, 2 × Mix 10.0 μL, ddH₂O 补足 20 μL. 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测.

1.4 凝胶电泳产物检测与统计分析

根据迁移率不同, 在同一位点有条带的标记为 “1”, 无条带的标记为 “0”. 利用 NTsys2.10e 软件进行聚类分析.

2 结果

2.1 ISSR-PCR 扩增结果分析

本试验共筛选出 17 条扩增条带清晰、重复性较好的引物 (表 2). 这些引物共扩增出 99 条带, 每个引物平均扩出条带为 5.82 条, 多态性条带为 97 条, 多态性比例为 97.79%. 其中: 引物 ISSR14 和 ISSR17 扩增出的带数最多, 为 10 条; ISSR18 扩增出

的带数则最少, 只有 4 条, 其中 3 条为多态性条带. 图 1 显示了 ISSR22 引物扩增产物的电泳结果.

2.2 嫩食型南瓜品种聚类分析

利用分子标记检测数据构建亲缘关系聚类图 (图 2). 结果显示, 在遗传相似系数 0.74 处, 把嫩食型南瓜材料分为两大类 (图 2). 第 1 大类包含 27 份材料, 其中: 21 (小青瓜) 和 22 (精选七叶瓜) 均来自山西, 亲缘关系较近, 位于同一个小的分支; 1 (浅花) 和 5 (早喜一号) 的亲缘关系很近, 聚在一起, 而 3 (珍玉四号 F1) 亲缘关系则与来自同一省份的 1 (浅花) 稍远, 但三者仍然聚在同一个小分支中; 7 (玉玲)、9 (白花皮一串铃)、10 (一串金二号)、12 (一串铃花篮)、21 (小青瓜) 和 22 (精选七叶瓜) 的遗传相似系数均在 0.874 以上, 位于同一个大的分支. 第 2 大类包含 28 [西葫芦 (晶莹粹)]、29 (黄皮笋瓜), 30 (黑籽南瓜)、31 (黄瓜) 和 32 (西瓜), 这 5 份外群材料与嫩食型南瓜的亲缘关系较远.



图 1 ISSR22 引物扩增电泳结果

表 2 ISSR 引物扩增及其结果统计

引物名称	引物序列	总带数	多态性带数	多态性比例/%
ISSR2	(AG) ₈ T	4	4	100.00
ISSR3	(AG) ₈ C	6	6	100.00
ISSR4	(AG) ₈ G	6	6	100.00
ISSR5	(GA) ₈ T	6	5	83.33
ISSR6	(GA) ₈ C	5	5	100.00
ISSR10	(CA) ₈ T	4	4	100.00
ISSR11	(CA) ₈ G	4	4	100.00
ISSR12	(TC) ₈ G	4	4	100.00
ISSR13	(AC) ₈ T	5	5	100.00
ISSR14	(AC) ₈ C	10	10	100.00
ISSR15	(AC) ₈ G	6	6	100.00
ISSR17	(AG) ₈ YT	10	10	100.00
ISSR18	(AG) ₈ YC	4	3	75.00
ISSR19	(AG) ₈ YA	6	6	100.00
ISSR20	(GA) ₈ YT	6	6	100.00
ISSR21	(GA) ₈ YC	5	5	100.00
ISSR22	(GA) ₈ YG	8	8	100.00
总数		99	97	
平均值		5.82	5.71	97.79

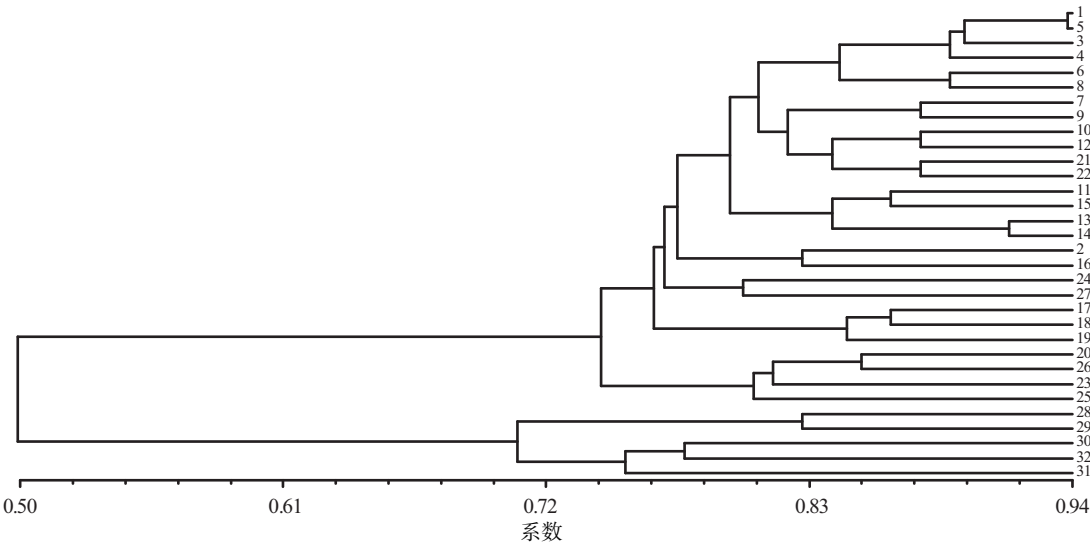


图 2 嫩食型南瓜材料聚类分析图

3 讨论

遗传多样性是物种进化的本质, 对于遗传多样性研究有助于种质资源的保护和利用^[6]. 前人已经使用不同的分子标记手段对南瓜的遗传多样性进行了分析, 如: 朱海生等^[10]使用 ISSR 分子标记技术分析了南瓜种质资源的遗传多样性, 发现 6 对引物中共获得条带 125 条, 多态性比例为 92%; 朱白婢等^[11]利用 4 对 ISSR 分子标记共扩增出条带 63 条, 多态性条带有 60 条, 多态性比例为 93.38%. 而本试验通过 ISSR-PCR 扩增出多态性条带比例为 97.79%, 如此高比例的多态性, 可能是由于几个外群亲缘关系与南瓜相差太远所致.

本研究通过亲缘关系分析把嫩食型南瓜分为两个大类, 分析结果显示, 嫩食型南瓜品种间差异较明显, 南瓜品种间遗传变异率较高. 从聚类图可以看出, 部分不同来源的一些种质资源聚在同一类群, 其原因可能是由于栽培过程中相互引种, 从而导致不同地区的种质资源亲缘关系较近. 而有些(同一来源的)品种没有聚在一起, 可能是由于本试验采用的 ISSR 分子标记太少, 未能真实反映其亲缘关系. 本试验结果说明, 嫩食型南瓜种质资源具有较丰富的遗传多样性, 有利于物种适应环境. 因此, 嫩食型南瓜引种时要充分考虑各种影响因素, 才能更明确其亲缘关系, 保持更为丰富的遗传多样性.

[参考文献]

- [1] CULLEY T M, WOLFE A D. Population genetic structuer of the cletstogamuos plant species *Viola pubescens* Aiton

(Vilaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers [J]. Heredity, 2001, 86 (5): 545 – 556.

- [2] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用 [J]. 种子, 2010, 29 (2): 55 – 59.
- [3] 易克, 徐向利, 卢向阳, 等. 利用 SSR 和 ISSR 标记技术构建西瓜分子遗传图谱 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2003, 29 (4): 333 – 337.
- [4] 李冬梅. 饲草型小黑麦的遗传图谱构建及草产量和抗锈每相关基因的 QIL 定位 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [5] 陈桂平, 张胜珍, 段英姿, 等. 25 种无花果种质资源的 ISSR 分析 [J]. 西部林业科学, 2019, 48 (3): 23 – 27, 33.
- [6] 王庆军, 马丽, 郝兆祥, 等. 观赏石榴种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30 (2): 236 – 241.
- [7] KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K, et al. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96 (1): 37 – 45.
- [8] 邵雪花, 刘牛, 赖多, 等. 28 份余甘子品种遗传多样性的 ISSR 分析及指纹图谱构建 [J]. 西北农林科技大学学报, 2020, 48 (8): 129 – 136.
- [9] 张娜. 葡萄种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2015.
- [10] 朱海生, 卢丽芳, 陈敏氢, 等. 南瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (6): 1302 – 1308.
- [11] 朱白婢, 蔡兴来, 周曼, 等. 基于 ISSR 标记的印度南瓜种质遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2016, 14 (12): 3596 – 3600.

