

云南黑籽南瓜种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析

杨正安^{1,2,3}, 孟平红², 代 贤³, 杨立芳³, 张兴国¹

(¹西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ²南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715; ³云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)

摘要:采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对来源于云南省 6 个地州 13 份黑籽南瓜种质进行遗传多样性分析。结果表明:6 个 RAPD 和 6 个 ISSR 引物分别扩增出 43 条和 41 条带, 多态性比率分别为 90.70% 和 51.21%; RAPD 和 ISSR 标记检测供试材料的遗传相似性系数范围分别为 0.340~0.895 和 0.162~0.941, ISSR 检测多态性效果高于 RAPD。RAPD 标记聚类分析将供试种质分为 3 个类群 5 组; ISSR 标记聚类分析将供试种质分为 4 个类群 6 组, RAPD 和 ISSR 标记的遗传相似性系数呈显著相关。基于 UPGMA 聚类结果, 可为黑籽南瓜的引种栽培或品种改良提供参考。

关键词:黑籽南瓜; 种质; 遗传多样性; RAPD; ISSR

Genetic Diversity of *Cucurbita ficifolia* Bauche Based on RAPD and ISSR

YANG Zheng-an^{1,2,3}, MENG Ping-hong², DAI Xian³, YANG Li-fang³, ZHANG Xing-guo¹

(¹School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715;

²Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715;

³College of Landscape and Horticultural, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers were used to detect the genetic diversity among 13 *Cucurbita ficifolia* resources from 6 prefecture of Yunnan. The results showed that 43 and 41 bands were obtained by RAPD and ISSR markers amplified through 6 selected primers respectively. The PPB (percentage of polymorphic bands) in RAPD detection (90.70%) was higher than that in ISSR (51.21%). The similarity coefficient ranging from 0.340 to 0.895 and from 0.162 to 0.941 respectively, and the ISSR was more efficient than RAPD. The germplasms were divided into three main cluster groups and five inferior groups by RAPD, and it also could be divided into four main cluster groups and six inferior groups by ISSR. The significant correlation between RAPD and ISSR markers was observed. The dendrogram was constructed by UPGMA method could provide theoretical basis for *Cucurbita ficifolia* introduction culture or cross breeding in future.

Key words: *Cucurbita ficifolia*; Germplasm; Genetic diversity; RAPD; ISSR

黑籽南瓜 (*Cucurbita ficifolia* Bauche), 因种子的种皮颜色黑而得名, 是南瓜属的一年生或多年生草本藤蔓性植物。因其成熟后瓜瓤很像米线或粉丝, 云南农民又称之为“米线瓜”或“粉丝瓜”^[1]。原产中美洲至南美洲, 现分布于世界各地, 因其适宜生长

的范围小, 食用价值又不高, 因此栽培的地区极少, 在我国的云南、四川和贵州等海拔较高的地区有较长的栽培历史。云南省多数地区都适于黑籽南瓜的生长发育, 已成为国内的主产区, 据项目组初步调查, 云南黑籽南瓜总产量已达万余吨, 总产值已达

收稿日期: 2011-05-06 修回日期: 2011-07-13

基金项目: 云南省自然科学基金 (2008CD125); 云南省教育厅基金 (08Y0173)

作者简介: 杨正安, 博士, 副教授, 研究方向为蔬菜生物学及生物技术。E-mail: dyangza@yahoo.cn

通讯作者: 张兴国, 教授, 博士生导师, 研究方向为蔬菜生物学及生物技术研究。E-mail: zhangxg63@163.com

孟平红, 研究员, 研究方向为蔬菜遗传与育种。E-mail: mphdream@yahoo.com.cn

3.2 亿元。目前,云南黑籽南瓜产地生产较为混乱,品质有优有劣,资源分类不明晰,采用分子标记技术对其进行整理和分类,可为黑籽南瓜的引种和新品种选育提供参考,为黑籽南瓜产业的进一步发展提供指导。

目前,关于我国黑籽南瓜种质资源的 RAPD 分析,最早由刘小俊等^[2]报道,有关 ISSR 的分析,尚未见相关报道。国内外 RAPD 及 ISSR 分子标记已在苦瓜^[3-5]、冬瓜^[6]、青麻^[7]、青花菜^[8]和芥菜^[9]、萝卜^[10]等作物上广泛应用,本研究利用 RAPD 和 ISSR 标记技术,对来源于云南省 6 个地州 13 份黑籽南瓜

种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行了分析,并比较这两种标记在黑籽南瓜种质资源多样性检测中的有效性,为黑籽南瓜遗传资源的鉴定,优良品质资源的开发、引种和品种改良的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

13 份样本来自于云南 6 个不同的地州和乡镇,除昆明的 3 份样本记录了形态特征外,其他样本,因采样关系,没有相应的记录数据。黑籽南瓜的序号、特征及名称、来源见表 1。

表 1 13 份黑籽南瓜材料的名称及来源

Table 1 The name and origins of 13 *Cucurbitaficifolia* Bauche

序号 Code	名称 Name	来源 Origin	序号 Code	名称 Name	来源 Origin
1	白皮绿纹黑籽南瓜	昆明	8	绿茂黑籽南瓜	东川(绿茂乡)
2	白皮黑籽南瓜	昆明	9	建水普雄黑籽南瓜	建水县普雄乡
3	绿皮白纹黑籽南瓜	昆明	10	个旧牛街黑籽南瓜	个旧牛街乡
4	石屏牛街黑籽南瓜	石屏县	11	丽江黑籽南瓜	丽江
5	青龙十字街黑籽南瓜	建水县青龙乡	12	武定黑籽南瓜	武定县
6	大海子黑籽南瓜	会泽县大海子	13	大理祥云黑籽南瓜	祥云县
7	建水官厅黑籽南瓜	建水县官厅镇			

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 播种黑籽南瓜,待植株长到 10cm 高时采摘幼叶作为样品提取基因组 DNA。采用 CTAB 法提取黑籽南瓜基因组 DNA^[11],提取的黑籽南瓜基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度,稀释至 10 ng/ μ l, -20℃ 冰箱内保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 RAPD-PCR:25 μ l 总反应体积中,含 10 \times 反应缓冲液 2.5 μ l,模板 DNA 20ng, MgCl₂2.0mmol,引物 12 pmol, dNTP 50 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1U。扩增程序为:94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 30s, 37℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 72℃ 最终延伸 10min。

ISSR-PCR:25 μ l 反应体系中,含 10 \times 反应缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μ l, 1.5mmol/L MgCl₂、1.0U TaqDNA 聚合酶、150mmol/L dNTP、10pmol/L 引物、15ng 模板 DNA。扩增程序为:95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 52℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 90s, 进行 40 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。

PCR 反应结束后,取 10 μ l 样品,加 2 μ l 6 \times 上

样缓冲液混合,在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。以 DL2000 作为分子量 Marker,每孔上样 6 μ l。电泳缓冲液为 1 \times TAE,电泳电场强度为 5v/cm,溴化乙锭(EB)染色,UVI 凝胶成像系统下,观察拍照。

1.2.3 数据处理与统计分析 将电泳图谱清晰且可重复的条带赋值为 1,同一位置上的弱带且不重复或未出现带的赋值为 0,形成 1、0 数据矩阵,计算单位引物扩增的条带、多态性条带及多态性条带百分率^[12]。根据 Nei-Li 相似系数法^[13]求遗传相似系数,用 NTSYS-pc2.10e 软件^[14]进行数据分析,分别求 RAPD、ISSR 和 RAPD + ISSR 的相似系数(GS)矩阵。用 UPGMA 方法进行聚类分析,生成聚类图。用 Graphics Mxcomp 对 3 个遗传相似性系数矩阵进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用 3 份不同形态的昆明黑籽南瓜材料进行引物筛选,从 38 条 RAPD 引物筛选到有多态谱带的引物 20 条,选取其中扩增效果较好的 6 条引物进行统

计(表 2);在 100 条 ISSR 引物中筛选到有多态性的引物 10 条,选取扩增效果好的 6 条 ISSR 引物进行统计(表 3)。RAPD 扩增条带在 50 ~ 750bp 之间,图 1 为引物 S129 扩增结果;6 条引物共扩增出 43 条谱带,多态谱带 39 条,多态性位点比率为 90.70%。ISSR 扩增条带在 50 ~ 1500bp 之间,图 2 为 ISSR - 5 的扩增图;6 条 ISSR 引物,共扩增出 41 条谱带,多态谱带 21 条,多态性位点比率为 51.21%。

表 2 RAPD 引物及其扩增结果
Table 2 RAPD primers and amplification results

引物 Primer	碱基序列 Primer sequence	总谱带数 Amplified No.	多态性带数 Polymorphic band No.	多态率(%) Polymorphic rare
OPO13	GTCAGAGTCC	7	7	100.00
OPO15	TGGCGTCCTT	8	8	100.00
S129	CCATGCAGGT	6	5	83.33
S151	GAGTCTCAGG	5	5	100.00
S358	TGGTCGCAGA	9	8	88.89
S1131	GTCCATGCAG	8	6	75.00
合计 Total		43	39	90.70

表 3 ISSR 引物及其扩增结果
Table 3 ISSR primers and amplification results

引物 Primer	碱基序列 Primer sequence	总谱带数 Amplified No.	多态性带数 Polymorphic band No.	多态率(%) Polymorphic rare
ISSR - 2	5' - (AGC)(ACT)(AGC)(GT) ₇ - 3'	8	2	25.00
ISSR - 4	5' - G(CA) ₄ C - 3'	6	2	33.33
ISSR - 5	5' - (CT) ₈ (AG)G - 3'	6	3	50.00
ISSR - 7	5' - CCC(GT) ₆ - 3'	10	7	70.00
ISSR - 26	5' - (GA) ₈ (CT)G - 3'	5	3	60.00
ISSR - 40	5' - (GGAGA) ₃ - 3'	6	4	66.67
合计 Total		41	21	51.21

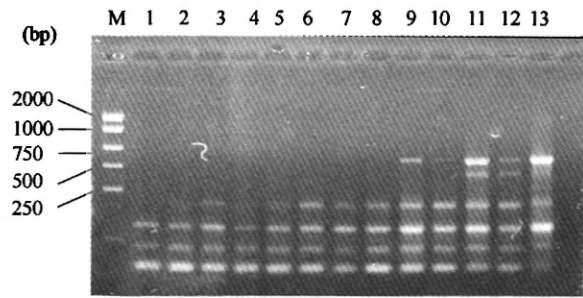


图 1 引物 S129 扩增的 RAPD 图谱
Fig.1 The RAPD pattern amplified by primer S129
1 ~ 13:13 个黑籽南瓜样品;M:分子量标准 DL2000;下同
1 - 13;Treatment 1 - 13;M:DNA Marker DL2000;
The same as below

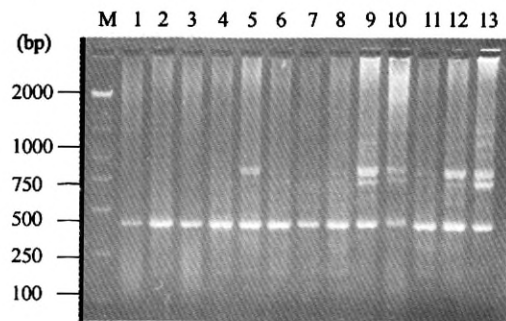


图 2 引物 ISSR - 5 扩增的 ISSR 图谱
Fig.2 The ISSR pattern amplified by primer ISSR - 5

2.2 聚类分析

2.2.1 13 份黑籽南瓜种质资源多样性的 RAPD 分析

13 个黑籽南瓜种质的 GS 值在 0.340 ~ 0.895 之间。在平均数 0.698 处分为 3 类(图 3),第 I 类是来源于昆明,属白皮绿纹的类型。第 II 类包括 2 组,第 1 组是来源于昆明的 2 份,包括白色瓜皮和绿皮白纹的类型,第 2 组是来源于石屏的样本。第 III 类包括 2 组,第 1 组又分为 2 个亚组,第 1 亚组包括来源于建水青龙乡、会泽大海子和东川 3 份材料,第 2 亚组分为建水普雄镇、大理祥云县和个旧牛街等 5 份材料;第 2 组是来源于建水官厅镇的材料。

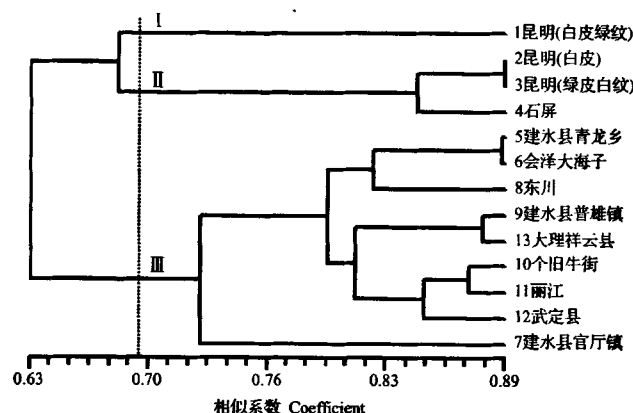


图 3 基于 RAPD 标记的 13 个黑籽南瓜资源的树状聚类图

Fig.3 The clustering dendrogram of 13 *Cucurbita ficifolia* Bauche based on RAPD markers

2.2.2 13 份黑籽南瓜种质资源多样性的 ISSR 分析

13 个黑籽南瓜种质的 GS 值在 0.162 ~ 0.941 之间。在平均数 0.481 处分为 4 类(图 4),第 I 类是来源于昆明白皮带绿纹的材料。第 II 类包括 2 组,第 1 组又分为 2 个亚组,第 1 亚组包括来源于昆明的 2 份,包括白色瓜皮和绿皮带花纹的材料,还有来源于石屏县的材料,第 2 亚组包括来源于建水县青龙乡和会泽大海子 2 份材料;第 2 组包括来源于丽江、武定和大理祥云县的 3 份材料。第 III 类分成 2 个组,第 1 组是来源于东川的材料;第 2 组包括来源于建水普雄镇和个旧牛街 2 份材料。第 IV 类是来源于建水官厅镇的材料。

2.2.3 整合 RAPD 与 ISSR 对 13 份黑籽南瓜种质进行聚类分析 将 RAPD 与 ISSR 的 0,1 矩阵结合进行聚类分析,GS 值在 0.369 ~ 0.929 之间。由图 5 可见,平均值在 0.672 处将供试的黑籽南瓜种质资源分类 4 类,第 I 类包括 2 个组,第 1 组又分为 2 个亚组,第 1 亚组包括来源于昆明的 3 份材料和来源

于石屏的 1 份材料,第 2 亚组是来源于建水青龙乡和会泽大海子的样本,第 2 组是来源于建水官厅镇的材料。第 II 类是来源于昆明东川的材料。第 III 类包括来源于建水普雄镇和个旧牛街的材料。第 IV 类分为 2 个组,第 1 组包括丽江和武定县的材料,第 2 组是来源于大理祥云县的材料。

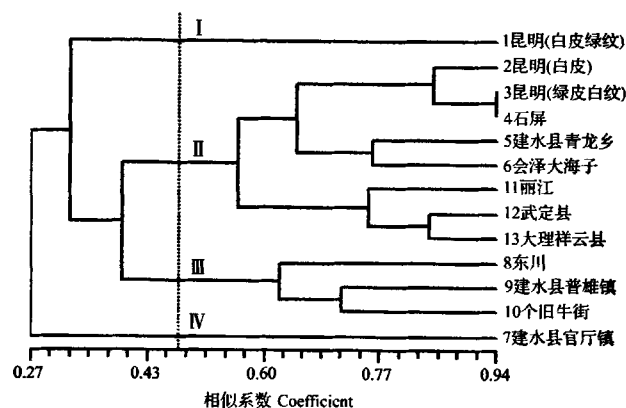


图 4 基于 ISSR 标记的 13 个黑籽南瓜资源的树状聚类图

Fig.4 The clustering dendrogram of 13 *Cucurbita ficifolia* Bauche based on ISSR markers

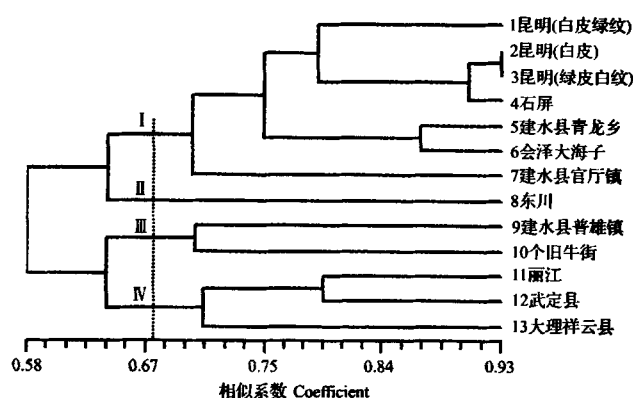


图 5 基于 RAPD + ISSR 标记的 13 个黑籽南瓜资源的树状聚类图

Fig.5 The clustering dendrogram of 13 *Cucurbita ficifolia* Bauche based on RAPD + ISSR markers

2.2.4 RAPD、ISSR 与 RAPD + ISSR 聚类分析相关分析

对 RAPD、ISSR 与 RAPD + ISSR 标记的相似性系数矩阵进行相关性分析。结果表明,RAPD 和 ISSR 标记的相关系数为 $r = 0.536$,呈显著相关。RAPD + ISSR 标记与 RAPD 标记的相关系数 $r = 0.552$,与 ISSR 标记的相关系数 $r = 0.737$ 。

3 讨论

3.1 开展黑籽南瓜种质资源研究的意义

我国的黑籽南瓜资源不多,仅分布在云南、四川

和贵州等高海拔地区。云南省多数地区都适于黑籽南瓜的生长发育,已成为国内的主产区。总产量也达万余吨,平均售价 3.0 万元/t,总产值达 3.2 亿元,该数据仅包括种用黑籽南瓜,不包括作为炒货用的南瓜种子。据项目组前期调查,黑籽南瓜主产区集中在云南红河州的建水县、个旧市和石屏县等地区,就种子质量而言,建水官厅镇的质量最优,以发芽率高、发芽势强最为出名。2010 年,随着广东省 2 条黑金刚瓜子炒货的生产线建立,更使黑籽南瓜供不应求,造成了种子用和炒货用黑籽南瓜种子争市场的趋势。所以,在云南省更多地区推广黑籽南瓜的种植,是山区农民致富的一大途径。开展对黑籽南瓜种质资源的研究,可为黑籽南瓜的引种提供依据。同时,本研究中,建水官厅镇的黑籽南瓜从起源来看,同其他地区的差异较大,处于最基础的地位,这可能也是建水官厅镇黑籽南瓜品质较优的原因。

3.2 基因组 DNA 的遗传多态性

本研究供试的黑籽南瓜种质中,采用 RAPD 和 ISSR 技术都能扩增出各自的多态性谱带,反映了黑籽南瓜种质丰富的遗传多样性,但两种标记的多态性和检测水平各不相同。RAPD 标记的平均多态性条带数和比率均高于 ISSR 标记,而平均 GS 值小于 ISSR 标记,GS 值变幅小于 ISSR 标记。说明 RAPD 标记和 ISSR 标记均可用于黑籽南瓜种质遗传多样性的检测,但 ISSR 标记比 RAPD 标记可检测遗传多样性的能力更高。在聚类图中可以清楚地看到:昆明白皮带绿纹资源都处在聚类图的最上端;而建水官厅镇的材料资源处在聚类图的最基础地位。

RAPD 与 ISSR 标记的相似系数矩阵间显著相关,但相关系数较小,产生差异的主要原因一方面与这两种标记所检测的基因座位不同有关^[10],另一方面由于不同的引物检测得到的多态性不一样,随着引物数量的增加必然引起遗传距离的变化。RAPD 和 ISSR 两种标记获得的聚类树相似但不完全相同。由此可见,不同的分子标记之间并不是相互排斥和相互取代,不同标记间结合利用可相互补充,能更好地揭示种质之间的遗传多样性。

3.3 黑籽南瓜种质资源遗传多样性与亲缘关系

从来源于昆明的黑籽南瓜资源来看,尽管它们具有不同的外观性状,但亲缘关系较近,从 3 种分子

标记分类来看,它们具有相同的起源,和植物学性状没有多大关系;此外,从建水 3 个不同乡镇的黑籽南瓜资源来看,RAPD 和 ISSR 标记均表明,它们的遗传差异较大,分属不同的类型,建水青龙乡和建水普雄镇,在 2 种标记中,均与会泽大海子、东川和个旧牛街等 8 个材料黑籽南瓜亲缘关系较近,而建水县官厅镇的黑籽南瓜与青龙乡、普雄镇的亲缘关系较远,形成独立的类型,说明在建水的黑籽南瓜资源中,不同乡镇的引种并不相同,这也说明地域上的不同不是造成这些黑籽南瓜材料间亲缘关系远近的原因,这一观点与刘小俊等^[2]的研究结果是一致的。

参考文献

- [1] 赖众民. 黑籽南瓜——优异的种质资源[J]. 云南农业科技, 1991(4):40-42
- [2] 刘小俊,李跃建,赵云,等. 中国黑籽南瓜种质资源遗传多样性分析[J]. 四川大学学报:自然科学版,2005,42(3):599-604
- [3] 高山,林碧英,许端祥,等. 苦瓜种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(1):78-83
- [4] 张长远,孙妮,胡开林. 苦瓜品种亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种,2005,3(4):515-519
- [5] Behera T K, Singh A K, Staub J E, et al. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies[J]. Sci Hort, 2008, 115:209-217
- [6] Verma V K, Behera T K, Munshi A D, et al. Genetic diversity of ash gourd [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.] inbred lines based on RAPD and ISSR markers and their hybrid performance[J]. Sci Hort, 2007, 113:231-237
- [7] 王利群,戴雄泽,李雪峰,等. 利用 RAPD 和 ISSR 标记分析青麻种质遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1):126-131
- [8] Lu X J, Liu L W, Gong Y Q, et al. Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers[J]. Sci Hort, 2009, 122:645-648
- [9] 宋明,刘婷,汤青林,等. 芥菜种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2009,36(6):835-842
- [10] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers[J]. Sci Hort, 2008, 116:240-247
- [11] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社, 2002:742-744
- [12] 李锡香,朱德蔚,杜永臣,等. 黄瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 鉴定与分类研究[J]. 植物遗传资源学报,2004,5(2):147-152
- [13] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. PNAS, 1979, 76:5269-5273
- [14] Rohlf F J. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 [CP]. New York:Exeter Software, 2004

作者：杨正安，孟平红，代贤，杨立芳，张兴国，YANG Zheng-an，MENG Ping-hong，DAI Xian，YANG Li-fang，ZHANG Xing-guo

作者单位：杨正安, YANG Zheng-an(西南大学园艺园林学院, 重庆400715; 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆400715; 云南农业大学园林园艺学院, 昆明650201)，孟平红, MENG Ping-hong(南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆, 400715)，代贤, 杨立芳, DAI Xian, YANG Li-fang(云南农业大学园林园艺学院, 昆明, 650201)，张兴国, ZHANG Xing-guo(西南大学园艺园林学院, 重庆, 400715)

刊名：植物遗传资源学报 ISTIC PKU

英文刊名：Journal of Plant Genetic Resources

年，卷(期)：2011, 12(6)

参考文献(14条)

1. Rohlf F J NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 2004
2. Nei M; Li W H Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[外文期刊] 1979
3. 李锡香; 朱德蔚; 杜永臣 黄瓜种质资源遗传多样性的RAPD鉴定与分类研究[期刊论文]-植物遗传资源学报 2004(02)
4. Liu L W; Zhao L P; Gong Y Q DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers[外文期刊] 2008
5. 宋明; 刘婷; 汤青林 芥菜种质资源的RAPD和ISSR分析[期刊论文]-园艺学报 2009(06)
6. Lu X J; Liu L W; Gong Y Q Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers[外文期刊] 2009
7. 张长远; 孙妮; 胡开林 苦瓜品种亲缘关系的RAPD分析[期刊论文]-分子植物育种 2005(04)
8. 高山; 林碧英; 许端祥 苦瓜种质遗传多样性的RAPD和ISSR分析[期刊论文]-植物遗传资源学报 2010(01)
9. 刘小俊; 李跃建; 赵云 中国黑籽南瓜种质资源遗传多样性分析 2005(03)
10. 赖众民 黑籽南瓜——优异的种质资源 1991(04)
11. 王利群; 截雄泽; 李雪峰 利用RAPD和SSR标记分析青麻种质遗传多样性 2009(01)
12. Verma V K; Behera T K; Munshi A D Genetic diversity of ash gourd[Benincasa hispida (Thunb.) Cogn.] inbred lines based on RAPD and ISSR markers and their hybrid performance[外文期刊] 2007
13. Behera T K; Singh A K; Staub J E Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter melon(Momordica charantia L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies 2008
14. 王关林; 方宏筠 植物基因工程 2002

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201106005.aspx