

观赏南瓜及葫芦种质资源遗传多样性分子评价

汤青林 宋明 肖祖梅 王志敏

(西南大学园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室/重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 利用 RAPD 和 ISSR 标记对 28 份观赏南瓜及葫芦种质资源进行遗传多样性分子评价。结果表明: 12 个 RAPD 引物和 13 个 ISSR 引物分别扩增出 89 条和 93 条清晰谱带, 平均每个引物分别扩增出 6.1 条和 6.2 条多态性谱带, 多态性比率分别为 82% 和 86%。RAPD 和 ISSR 标记检测供试材料的遗传相似性系数(GS) 范围分别为 0.31~0.99 和 0.33~0.99, ISSR(平均 GS 值 0.68) 检测多态性效果高于 RAPD(平均 GS 值 0.73)。利用 UPGMA 法基于 RAPD 与 ISSR 混合聚类, 将 28 份观赏南瓜及葫芦种质分为 3 类, 类群的划分与果实形状明显相关: 第 I 类群包括 15 份种质, 为扁圆形、卵圆形、圆球形或圆筒状的早熟或晚熟果实; 第 II 类群包括 11 份种质, 为汤匙形、梨形、扁球形或皇冠形的早中熟果实; 第 III 类群包括 2 份种质, 为葫芦形的晚熟果实。

关键词: 观赏南瓜及葫芦; RAPD; ISSR; 遗传多样性

Molecular Evaluation on Genetic Diversity of Ornamental Pumpkin and Gourd Germplasm

TANG Qing-lin, SONG Ming, XIAO Zu-mei, WANG Zhi-min

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education/Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715)

Abstract: Genetic relationships and diversities of 28 ornamental pumpkin and gourd accessions were assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. The results showed that 89 and 93 amplification bands were obtained by 12 selected RAPD and 13 selected ISSR primers, respectively. The PPB (percentage of polymorphic bands) in ISSR detection (86%) was higher than that in RAPD (82%). The similarity coefficient ranging from 0.33 to 0.99 and from 0.31 to 0.99 respectively, and the ISSR (mean value of GS was 0.68) was more efficient than RAPD (mean value of GS was 0.73). Using cluster analysis (UPGMA) based on those polymorphism mixture bands amplified with RAPD and ISSR primers, the 28 accessions were classified into three groups obviously related with fruit skin color and shape. Group I included 15 accessions, which fruit shapes were oblate, ovoid, spherical or cylinder, and which fruit developmental traits were early or late maturation. Group II included 11 accessions, which fruit shapes were soup spoon, pear, oblate spheroid or crown, and which fruit developmental traits were early or middle maturation. Group III included 2 accessions with the fruit traits of gourd shape and late maturation.

Key words: Ornamental pumpkin and gourd; RAPD; ISSR; Genetic diversity

观赏南瓜及葫芦 (Ornamental pumpkin and gourd) 又称玩具南瓜及葫芦, 原产于中南美洲地区, 其类型丰富, 是葫芦科南瓜属或葫芦属一年生蔓性

草本植物。与食用南瓜及葫芦不同, 观赏南瓜及葫芦以果实器官作为观赏对象, 外形乖巧美观, 色彩丰富, 果实成熟后, 大部分品种果壳坚硬, 观赏期长。

收稿日期: 2011-07-16 修回日期: 2011-08-25

基金项目: 国家自然科学基金(31000908); 重庆市自然科学基金(2009BB1307 2011BA1002)

作者简介: 汤青林, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园艺植物育种与发育调控研究。swutql@163.com

通讯作者: 宋明, 教授, 硕士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。swausongm@yahoo.com.cn

适合种植在庭院,可作园林绿化、造型布景之用,具有独特的观赏性。近年来,随着对其观赏价值的不断追求,人们越来越强烈的期待新品种的产生,这无疑对育种者提出了更高要求。因此有必要对其种质资源进行深入系统的分析评价,以拓宽育成品种的遗传基础,使育种水平再上新台阶。

目前有关分子标记对食用南瓜遗传多样性分子评价已有一些报道。例如,Gwanama 等^[1]利用 RAPD 标记将 31 份热带南瓜种质分为 4 组,其中来自马拉维的材料分为 3 组,赞比亚的材料为 1 组。利用 RAPD 技术可以很好地分析南瓜属种内不同品种(系)的亲缘关系,不仅与其地域来源形态特征基本符合^[2],而且与果实分类标准一致^[3]。此外,也有人采用 AFLP、ISSR 和 SSR 等分子标记对南瓜种质进行遗传多样性分

析^[4-5]。这些对食用南瓜种质资源的分子标记研究^[6-9],对观赏南瓜及葫芦种质多样性评价提供了很好的参考与借鉴。

本试验以 RAPD 和 ISSR 分子标记为基础,对收集保存的 28 份观赏南瓜及葫芦种质资源遗传多样性进行较系统的研究,为种质资源的鉴定、优良种质的挖掘、杂种优势的利用等奠定基础,从而为新品种改良和创新提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试 28 份观赏南瓜及葫芦材料是从美国、日本和中国台湾等引进,经多代自交纯化而成的稳定自交系(图版 I 和表 1)。本试验在重庆市蔬菜学重点实验室完成。



图版 I 观赏南瓜及葫芦的果实

Plate I Fruits of ornamental pumpkin and gourd

表 1 供试材料及来源

Table 1 The origins of the materials

编号 Code	名称 Cultivar	来源地 Origin	瓜形 Fruit shape	瓜皮色 Skin color	单瓜重(kg) Single fruit mass	熟性 Maturity
1	东升	中国北京	圆球形,瓜顶有明显的脐	橘黄色	2.0	晚熟
2	白蛋	中国台湾	卵圆形	乳白色	0.15	早熟
3	椪柑	台湾农友种苗	圆球形	橙黄色	0.15	早熟
4	短柄龙凤瓢	台湾农友种苗	汤匙形(上方短柄状,下方为球形)	果实球形底部为深绿色,短柄为橙黄色	0.1	早熟
5	瓜皮	台湾农友种苗	扁球形	果实绿色,有明显浅绿色间隔条纹	0.2	早熟
6	熊宝贝	台湾农友种苗	扁球形	果皮浅橙色,果面有浅绿和深绿点状分布	0.75	晚熟
7	花皮	中国台湾	扁球形,有凹沟线	果皮橙黄,果面有明显墨绿色斑点	1.2	早熟
8	黄皮	中国台湾	扁球形	果皮浅黄,果面有橙色间隔条纹	1.2	早熟
9	黄皇冠	台湾农友种苗	形似皇冠	果皮橙色,果面有乳白色条纹间隔	0.3	中熟
10	五福	台湾农友种苗	扁帽形大果	上部橙色,下部乳白与橙色相间	2.0	晚熟
11	长柄龙凤瓢	台湾农友种苗	汤匙形(上方长柄状,下方为球形)	从上部长柄至球形底部1/3~1/4处为橙黄色,果底为浅绿色	0.2	早熟
12	白秋	美国	卵圆形	橙黄色	0.6	早熟
13	白皇冠	台湾农友种苗	形似皇冠	果皮乳白色,靠近果柄处为浅绿色	0.3	中熟
14	黄蛋	中国台湾	卵圆形	半熟果有浅绿间隔线,成熟果全为浅黄色	0.15	早熟
15	地瓜	中国台湾	尖桃形,有明显棱纹线	乳白色	0.1	早熟
16	白疙瘩	台湾农友种苗	果实圆球形,果面有明显疣状突起	果实米白色	0.15	早熟
17	小千成兵丹	台湾农友种苗	小“8”字形,上下两端圆球形,连接部较细	果皮光滑,青绿色	0.15	晚熟
18	大千成兵丹	台湾农友种苗	大“8”字形,上下两端圆球形,连接部较粗	果皮光滑,呈绿色	1.0	晚熟
19	金童	台湾农友种苗	扁圆形,有明显短棱纹线	鲜橙色	0.15	早熟
20	玉女	台湾农友种苗	扁圆形,有明显短棱纹线	雪白色	0.15	早熟
21	吉美	美国	圆筒形,有明显短棱纹线	金黄色	1.0	早熟
22	元阳	日本	果实上圆筒状,下圆球形,有明显短棱纹线	米白色	2.5	早熟
23	绿皇冠	台湾农友种苗	形似皇冠	果皮浅绿色,果面分布深绿色条纹或斑点	0.3	早熟
24	大兴瓜	日本	圆球形	成熟果为金黄色	0.5	早熟
25	小鸳鸯梨	台湾农友种苗	西洋梨形(上细小而下大圆球形)	果实底部为深绿色,上方为金黄色	0.1	早熟
26	大鸳鸯梨	台湾农友种苗	西洋梨形(上细小而下大圆球形)	果实底部为浅绿色,上方为橙色,各有淡黄色条纹相间	0.15	早熟
27	黄疙瘩	台湾农友种苗	果实球形,果面有明显疣状突起	果实浅黄色,果面有橙色间隔线	0.15	早熟
28	如意	美国	圆筒状,有明显的长棱纹线	半熟果乳白并间隔绿斑点,成熟果全为乳白色	1.0	早熟

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[10] 提取观

赏南瓜叶片基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计分别检测 DNA 质量和浓度, 并稀释到

20ng/ μ l 后于 -20°C 冰箱保存备用。

1.2.2 RAPD 及 ISSR 扩增及扩增产物的检测
所用引物参照加拿大英属哥伦比亚大学(UBC)公布的第9套引物序列^[11],由上海生工合成。经过正交优化,20 μ l 反应体系最佳 RAPD 扩增条件为:10 \times PCR buffer 2 μ l,模板 DNA 20ng,10pmol/ μ l 引物,dNTPs 为 0.2mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1 U, Mg^{2+} 2.0mmol/L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s,36 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min,循环 40 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

20 μ l 反应体系最佳 ISSR 扩增条件为:10 \times PCR buffer 2 μ l,模板 DNA 80 ng,10pmol/ μ l 引物,dNTPs 为 0.25mmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 0.5U, Mg^{2+} 2.0mmol/L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s,53 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min,循环 35 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相保存。

1.2.3 数据处理与分析 谱带采用人工计数,同一

位置条带有记为 1,无则记为 0,建立 Excel 数据库。NTSYS-pc2.1 统计软件计算遗传相似系数(GS)^[12]: $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,其中 N_{ij} 为材料的 i 和 j 共有扩增片段数, N_i (或 N_j) 为材料 i (或 j) 中出现的扩增片段数。根据 GS 值或者遗传距离 GD($1-GS$) 按不加权成对群算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类^[13]。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性分析

利用 3 个表型差异较大的材料分别筛选 RAPD 和 ISSR 引物,共选出带型清晰的 26 条 RAPD 引物和 21 条 ISSR 引物。淘汰扩增效果差、带型不易辨认的引物,最终确定 12 条 RAPD 引物和 13 条 ISSR 引物,用于观赏南瓜及葫芦种质多态性分析(图 1)。由表 2 可知:12 条 RAPD 引物扩增出 89 条谱带,其中多态性条带数为 73,每个引物平均 6.1 条,引物多态性信息含量变幅 70%~100%,平均为 82%。13 条 ISSR 引物扩增出 93 条谱带,其中多态性条带数为 81,每个引物平均 6.2 条,引物多态性信息含量变幅 60%~100%,平均为 86%。

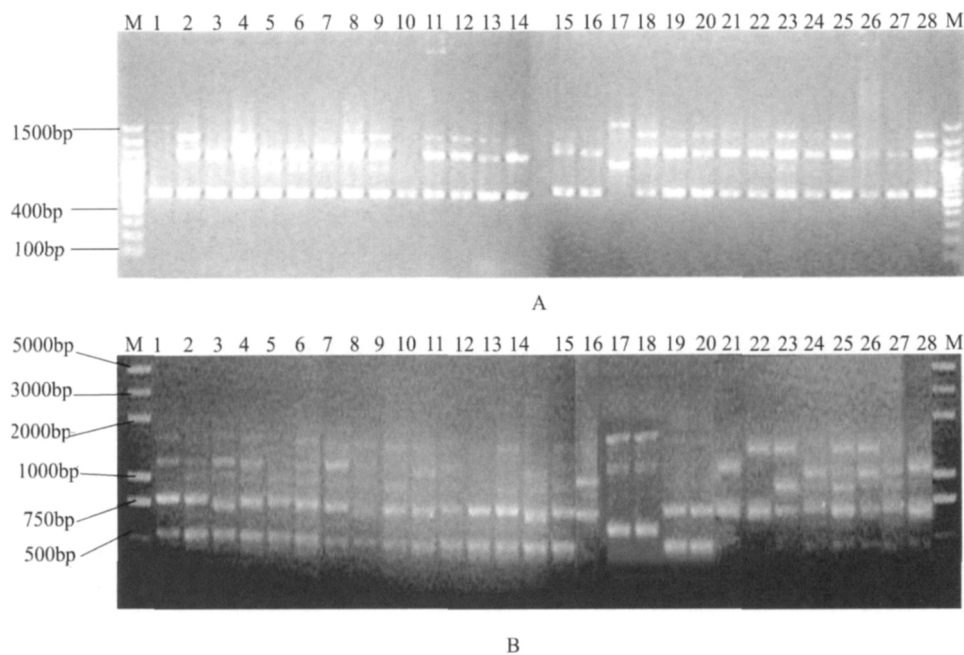


图 1 RAPD 引物 S263(A)和 ISSR 引物 UBC811(B)对 28 份观赏南瓜及葫芦种质 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification patterns by primer S263 (A) of RAPD and UBC811 (B) of ISSR on 28 ornamental pumpkin and gourd accessions

1~28: 不同的观赏葫芦资源,编号同表 1;图 A 和图 B 中的 M 分别为:100bp DNA Ladder 和 GeneRuler™ Express Marker

A: RAPD-PCR by primer S263 of RAPD; B: ISSR-PCR by primer UBC811 of ISSR

1-28: Different ornamental pumpkin and gourd accessions listed in Table 1; M: 100bp DNA Ladder and GeneRuler™ Express Marker

表2 RAPD 和 ISSR 分析所用的引物序列与扩增结果

Table 2 The primer sequence and the amplified results of RAPD and ISSR analysis

标记类型	引物编号	序列	扩增谱带数	多态性带数	多态百分率(%)	
Marker type	Code of primer	Sequence	No. of scored bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism	
RAPD	S20	GGACCCCTTAC	11	8	72.7	
	S67	GTCCCGACGA	11	10	90.9	
	S99	GTCAGGGCAA	6	5	83.3	
	S104	GGAAGTCGCC	5	5	100	
	S198	CTGGCGAACT	6	5	83.3	
	S205	GGGTTTGGCA	10	7	70	
	S254	TGGGTCCCTC	6	6	100	
	S260	ACAGCCCCCA	7	6	85.7	
	S263	GTCCGGAGTG	6	5	83.3	
	S287	AGAGCCGTCA	5	4	80	
	S293	GGGTCTCGGT	8	6	75	
	S299	TGAGGTCCC	8	6	75	
	小计 Total		12	89	73	82
	ISSR	UBC807	(AG) ₈ T	7	7	100
UBC808		(AG) ₈ C	5	3	60	
UBC810		(GA) ₈ T	6	5	83.3	
UBC811		(GA) ₈ C	7	7	100	
UBC812		(GA) ₈ A	9	7	78	
UBC814		(CT) ₈ A	4	3	75	
UBC826		(AC) ₈ C	8	5	62.5	
UBC834		(AG) ₈ YT	7	7	100	
UBC835		(GA) ₈ YC	7	6	85.7	
UBC836		(GA) ₈ YA	11	10	90.9	
UBC845		(CT) ₈ RG	7	7	100	
UBC855		(AC) ₈ YT	9	8	88.9	
UBC866		(CTC) ₆	6	6	100	
小计 Total			13	93	81	86

2.2 遗传相似性分析

基于 RAPD 和 ISSR 数据分别估计观赏南瓜及葫芦种质的遗传相似系数(GS)。RAPD 分析表明: 28 份观赏南瓜及葫芦种质之间的 GS 值在 0.31~0.99 之间, 平均为 0.73。其中, 小千成兵丹与其他观赏南瓜及葫芦种质之间的遗传相似系数(GS) 值在 0.31~0.72 之间(与东升之间的 GS 值最低, 为 0.31; 与大千成兵丹之间的 GS 值最高, 为 0.72), 平均为 0.39, 普遍比其他材料之间的 GS 值低。而白疙瘩、黄疙瘩与瓜皮、吉美与如意、地瓜与金童、玉女、小鸳鸯梨与大鸳鸯梨之间的 GS 值都在 0.90 以上, 说明这些材料之间的遗传差异性极小, 亲缘关系极为相近。

ISSR 分析表明: 28 份材料之间的 GS 值在 0.33~0.99 之间, 平均为 0.68。其中, 小千成兵丹与其他观赏南瓜及葫芦种质之间的遗传相似系数最低, GS 值在 0.33~0.83 之间(与地瓜之间的 GS 值最低, 为 0.33; 与大千成兵丹之间的 GS 值最高, 为 0.83), 平均为 0.44, 普遍比其他材料之间的 GS 值

低。而白蛋与黄蛋、白疙瘩、黄疙瘩与瓜皮、吉美与如意、金童与玉女、短柄龙凤瓢与长柄龙凤瓢、小鸳鸯梨与大鸳鸯梨之间的 GS 值都在 0.90 以上, 说明这些种质之间的遗传差异性极小, 亲缘关系极为相近。

2.3 聚类分析

2.3.1 RAPD 与 ISSR 分别聚类

根据 RAPD 或 ISSR 标记计算的遗传相似系数矩阵, 按 UPGMA 法分别建立材料间的遗传关系聚类图(图 2、图 3)。

当 RAPD 标记的相似系数 GS 为 0.72~0.76 时, 可将 28 份观赏南瓜及葫芦种质划分为以下几个类群(图 2)。第 I 类群包括 13 份种质, 可进一步分为 3 个亚群: 第 1 亚群 2 份(东升、五福); 第 2 亚群 3 份(白蛋、白秋、黄蛋); 第 3 亚群 8 份(短柄龙凤瓢、长柄龙凤瓢、瓜皮、熊宝贝、花皮、黄皮、白皇冠、黄皇冠)。第 II 类群包括 13 份种质, 又可进一步分为 3 个亚群: 第 1 亚群 4 份(椪柑、白疙瘩、黄疙瘩、大兴瓜); 第 2 亚群 4 份(地瓜、玉女、金童、元阳);

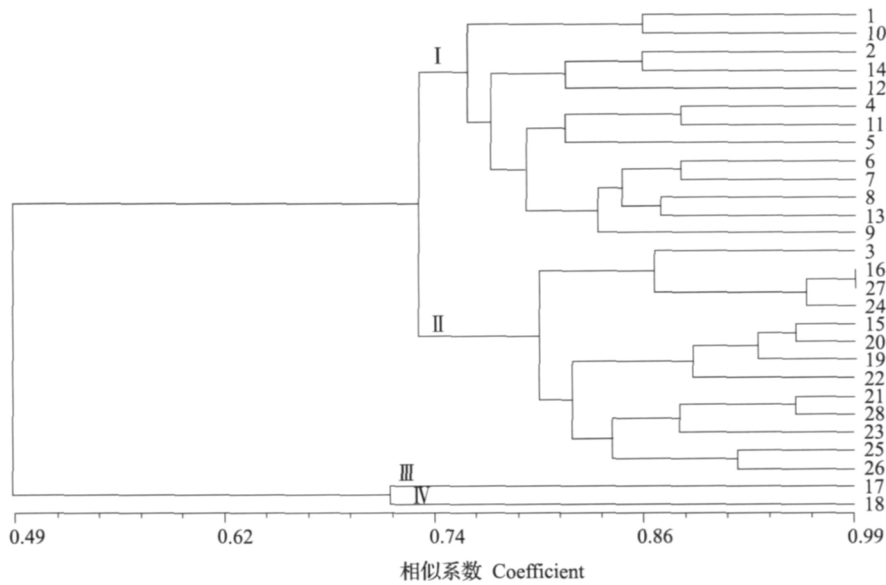


图 2 28 份观赏南瓜及葫芦的 RAPD 标记聚类图

Fig. 2 Dendrogram for 28 ornamental pumpkin and gourd based on RAPD makers by UPGMA method

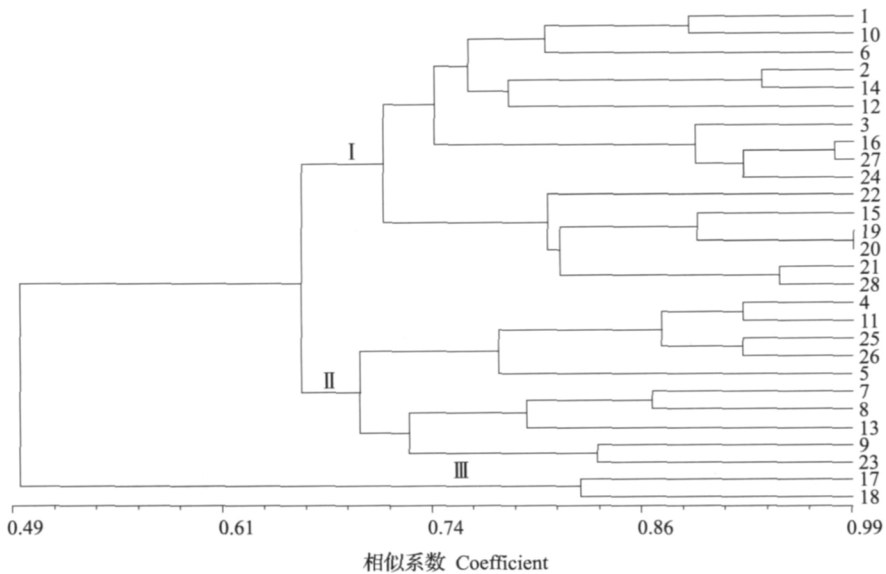


图 3 28 份观赏南瓜及葫芦的 ISSR 标记聚类图

Fig. 3 Dendrogram for 28 ornamental pumpkin and gourd based on ISSR makers by UPGMA method

第 3 亚群 5 份(吉美、如意、绿皇冠、小鸳鸯梨、大鸳鸯梨)。第 III 类群和第 IV 类群分别只有 1 个,小千成兵丹和大千成兵丹,这 2 份种质又在 $GS = 0.72$ 时聚为一类。虽然与其他种质的关系较远,但是它们之间的亲缘关系还是比较接近的,因此可以把第 IV 类群(大千成兵丹)合并到第 III 类群。

当 ISSR 的相似系数 GS 在 $0.67 \sim 0.70$ 时,可将 28 份观赏南瓜及葫芦种质划分为 3 个类群(图 3)。

第 I 类群包括 16 份种质,又可进一步分为 4 个亚群:第 1 亚群 3 份(东升、熊宝贝、五福);第 2 亚群 3 份(白蛋、黄蛋、白秋);第 3 亚群 4 份(椴柑、白疙瘩、黄疙瘩、大兴瓜);第 4 亚群 6 份(元阳、地瓜、金童、玉女、吉美、如意)。第 II 类群包括 10 份种质,又可进一步分为 3 个亚群:第 1 亚群 5 份(短柄龙凤瓢、长柄龙凤瓢、小鸳鸯梨、大鸳鸯梨、瓜皮);第 2 亚群 3 份(花皮、黄皮、白皇冠);第 3 亚群 2 份(黄

皇冠和绿皇冠)。第Ⅲ类群包括小千成兵丹、大成兵丹共 2 份种质。

2.3.2 RAPD 与 ISSR 混合聚类 由 2.3.1 可见, RAPD 与 ISSR 对 28 份种质分别聚类存在一定的差异,为了能够更好地评价观赏南瓜及葫芦种质的遗

传多样性,进行了 RAPD 与 ISSR 混合聚类分析。将 RAPD 和 ISSR 数据混合,按 UPGMA 法构建材料间的遗传关系聚类图(图 4)。当 GS 在 0.70 ~ 0.74 时,可将 28 份种质划分为 3 个类群,类群的划分与果实形状明显相关。

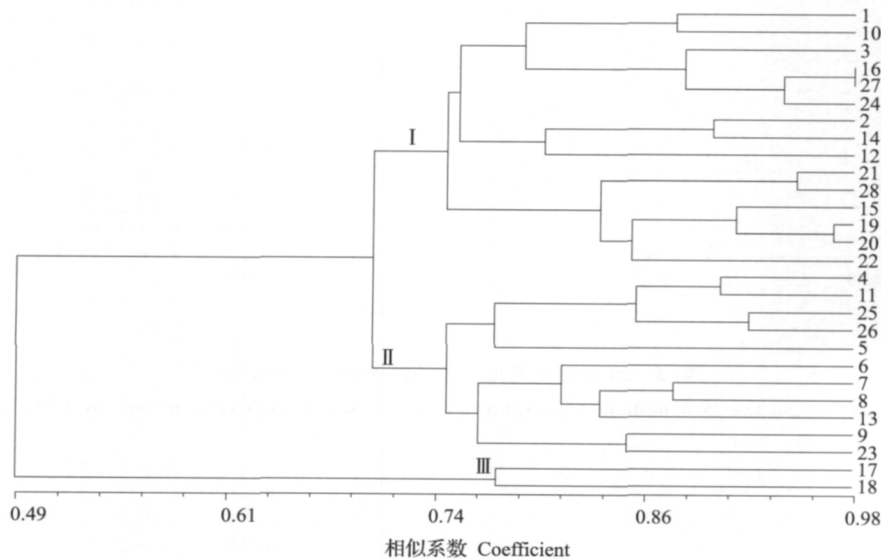


图 4 基于 RAPD 和 ISSR 综合数据绘制的 28 份观赏南瓜及葫芦的聚类图

Fig. 4 Dendrogram for 28 ornamental pumpkin and gourd based on RAPD and ISSR makers

第 I 类群包括 15 份种质,为扁圆形、卵圆形、圆球形或圆筒状的早熟或晚熟果实。可进一步分为 4 个亚群。第 1 亚群包括东升、五福,为圆球形或扁圆形、果皮橙黄色的大果型晚熟种质,该亚群在植物学分类里属于葫芦科南瓜属印度南瓜种;第 2 亚群包括白蛋、白秋、黄蛋,为卵圆形的中小果型早熟种质;第 3 亚群包括槿柑、白疙瘩、黄疙瘩、大兴瓜,为圆球形小果型早熟种质;第 4 亚群包括元阳、地瓜、金童、玉女、吉美、如意,为扁圆形或圆筒状中小型早熟种质。第 2 至第 4 亚群在植物学分类里属于葫芦科南瓜属美洲南瓜种。

第 II 类群包括 11 份种质,以红、黄、白、绿等某一颜色为主色,并掺有杂色的汤匙形、梨形、扁球形或皇冠形的早中熟果实。可进一步分为 3 个亚群。第 1 亚群包括短柄龙凤瓢、长柄龙凤瓢、小鸳鸯梨、大鸳鸯梨、瓜皮,为汤匙形、梨形或扁球形的小果型早熟种质;第 2 亚群包括熊宝贝、花皮、黄皮、白皇冠,为扁球形或皇冠形的小果型早中熟种质;第 3 亚群包括黄皇冠和绿皇冠,为皇冠形小果型早中熟种质。该大类群

在植物学分类里也属于葫芦科南瓜属美洲南瓜种。

第 III 类群共 2 份种质,为葫芦形的晚熟果实。包括小千成兵丹、大千成兵丹,为“8”字形或葫芦形的绿色晚熟种质。该类群在植物学分类里属于葫芦科葫芦属植物。

2.3.3 RAPD + ISSR 与 RAPD、ISSR 聚类的相关性分析 为了检测观赏南瓜材料间的 RAPD 和 ISSR 分析的相关程度和可靠度,本研究对 RAPD、ISSR、RAPD + ISSR 的遗传相似系数矩阵进行相关分析, RAPD 与 ISSR 相关系数为 0.862; RAPD + ISSR 与 ISSR 的相关系数为 0.965、与 RAPD 的相关系数为 0.963,均达极显著水平。说明经过优化后的 RAPD 和 ISSR 技术较为稳定,表明应用这两种技术对观赏南瓜及葫芦种质进行遗传多样性分析具有较高的一致性和可信度。

3 讨论

在种质资源遗传多样性研究中不同的遗传标记均有应用,但不同研究者对不同标记系统有不同评

价。RAPD 标记难以区分杂合和纯合基因型, 易受反应条件的影响, 重复性差。而 ISSR 标记对 PCR 扩增的敏感性低于 RAPD 标记, 这是由于 ISSR 引物长度一般在 15 ~ 24bp, 反应退火温度较高, 引物——模板复合物比较稳定的原因, 扩增时很少出现由于随机因素造成反应不稳定的情况。ISSR 标记理论上检测区域可覆盖整个基因组, 扩增的多态性条带能较全面地反映群体变异。高山等^[14] 利用 ISSR 标记有效地分析了 38 份瓠瓜材料间的遗传变异。本研究中, RAPD 和 ISSR 技术都能扩增出各自的多态性谱带, 检测到观赏南瓜及葫芦种质的遗传多样性。其中 12 条 RAPD 引物扩增谱带的多态性比例为 82%, 而 13 条 ISSR 引物扩增谱带的多态性比例为 86%, ISSR 比 RAPD 检测到更多的遗传多态性。产生差异的主要原因与它们对基因组 DNA 进行扩增时引物结合位置不同有关^[15]。

将本试验 RAPD 和 ISSR 分析的遗传相似系数进行比较, 发现两种标记检测出的 GS 虽然大小不同 (RAPD 分析的 GS 在 0.31 ~ 0.99 之间, 平均为 0.73; 而 ISSR 分析的 GS 在 0.33 ~ 0.99 之间, 平均为 0.68), 但趋势相似。ISSR 比 RAPD 的遗传相似系数低, 多态性检测水平高, 可检测到更高的遗传差异。这与高山等^[16] 对苦瓜遗传多样性分析时 ISSR (平均 GS 值 0.672) 检测多态性效果高于 RAPD (平均 GS 值 0.694) 的结论相似, 也与王利群等^[17] 对青麻遗传多样性研究时 ISSR 多态性比率 (88.89%) 高于 RAPD (87.34%) 的结论相似。本研究对 RAPD 与 ISSR 相关分析表明, 其相关系数为 0.862, 达到显著水平。说明两种分子标记对 28 份观赏南瓜及葫芦种质遗传多样性评价的总体趋势一致。

本研究 RAPD + ISSR 混合聚类 (图 4) 与 RAPD、ISSR 分别聚类 (图 2、图 3) 比较可知: ISSR 与 RAPD + ISSR 较为接近, 都聚成了 3 个类群, 并且在两个聚类图中 (图 3 和图 4) 只有熊宝贝的聚类结果不一致 (ISSR 将其聚到第 I 类群第 1 亚群, RAPD + ISSR 将其聚到第 II 类第 2 亚群)。这说明在 28 份观赏南瓜及葫芦种质遗传多样性评价中, ISSR 比 RAPD 更稳定、更可靠。这与宋明等^[18] 对芥菜遗传多样性分析时 RAPD + ISSR 混合聚类或 ISSR 聚类优于 RAPD 的结论类似。Gwanama 等^[1] 和 Ferriol 等^[3] 利用 RAPD 对食用南瓜遗传多样性

分析, 发现聚类结果与果实的分类标准相关。本研究与此相似, 对观赏南瓜及葫芦类群的划分与果实形状明显相关: 第 I 类群为扁圆形、卵圆形、圆球形或圆筒状的早熟或晚熟果实; 第 II 类群为汤匙形、梨形、扁球形或皇冠形的早中熟果实; 第 III 类群为葫芦形的晚熟果实。这为观赏南瓜及葫芦种质资源利用及品种改良等深入研究提供了科学依据。

参考文献

- [1] Gwanama C, Labuschagne M T, Botha A M. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker [J]. *Euphytica*, 2000, 113: 19-24
- [2] 李海真, 许勇, 武峻新, 等. 南瓜属三个种的亲缘关系与品种分子鉴定研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(2): 161-164
- [3] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic variability in pumpkin (*Cucurbita maxima*) using RAPD markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2001 (24): 94-96
- [4] Paris H S, Yonash N, Portnoy et al. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(6): 971-978
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282
- [6] 刘小俊, 李跃建, 赵云, 等. 中国部分栽培南瓜种质资源遗传多态性 RAPD 分析 [J]. *西南农业学报*, 2004, 17(5): 567-571
- [7] 李俊丽, 向长萍, 张宏荣, 等. 南瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *园艺学报*, 2005, 32(5): 824-829
- [8] 李海英, 赵晓萌, 赵福宽, 等. 适于南瓜遗传多样性分析的 RAPD 引物筛选 [J]. *北方园艺*, 2006 (1): 20-22
- [9] 褚盼盼, 向长萍, 张称心, 等. 中国南瓜种质资源农艺性状与 RAPD 标记分析 [J]. *核农学报*, 2007, 21(5): 441-446
- [10] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbaric and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76
- [11] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化工出版社, 2005
- [12] Rohlf F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [M]. Version 2. 1. New York: Exeter Software, Applied Biostatistics Inc, 1998
- [13] Sneath P H, Sokal R R. Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification [M]. San Francisco: W. H. Freeman, 1973: 573
- [14] 高山, 许端祥, 林碧英, 等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(4): 396-400
- [15] 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 [J]. *Sci Hort*, 2008, 116: 240-247
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 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