

# 节瓜自交系遗传多样性的 ISSR 分析

王 鹏, 刘政国, 黄成秋, 陈 勇, 覃海平

(广西大学农学院, 南宁 530005)

**摘要:** 利用 ISSR 分子标记技术对 36 份节瓜自交系进行遗传多样性分析。从 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条多态性明显、条带清晰、反应稳定的引物, 对 36 份节瓜材料基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 76 条清晰稳定的条带, 其中多态性条带 45 条, 多态性比例为 59.21%。36 份材料间遗传相似系数在 0.57~0.96 之间, 表明材料间遗传多样性较为狭窄。聚类分析结果显示, 以遗传相似系数 0.76 为阈值时, 可将 36 份节瓜自交系材料聚为 3 类, 分类结果与供试材料的地理来源较为吻合。基于聚类分析结果, 可为今后节瓜的新品种选育、遗传改良以及分子遗传连锁图谱构建的杂交亲本选择提供科学依据。

**关键词:** 节瓜; 自交系; 遗传多样性; ISSR

## Genetic Diversity of 36 Chieh-qua Inbred Lines Based on ISSR

WANG Peng, LIU Zheng-guo, HUANG Cheng-qiu, CHEN Yong, QIN Hai-ping

(College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530005)

**Abstract:** Genetic diversity of 36 chieh-qua inbred lines based on ISSR was analyzed in our research. 14 obviously polymorphic primers were selected from 100 ISSR primers for PCR amplification in 36 Chieh-qua samples. The results showed that 76 bands were amplified from 36 samples, 45 bands were polymorphic and the percentage of polymorphic bands was 59.21%. The genetic similarity coefficient of 36 chieh-qua samples which ranged from 0.57 to 0.96 showed that genetic diversity was narrow. The cluster analysis showed that 36 chieh-qua inbred line samples could be classified into three groups, which had a higher correlation with the geographical origin of the samples. The dendrogram could provide a scientific basis for chieh-qua breeding and parents selection in constructing genetic linkage map of chieh-qua.

**Key words:** chieh-qua; inbred line; genetic diversity; ISSR

节瓜 (*Benincasa hispida* Cogn. var. *chieh-qua* How.), 别名毛瓜, 为葫芦科冬瓜属冬瓜种一年生攀缘植物, 是冬瓜的一个变种。节瓜在广东、广西以及海南有着悠久的栽培历史以及较大的栽培面积, 是华南地区瓜类主要种类之一。由于其栽培面积大, 产量高, 供应时间长, 目前已是调节蔬菜市场供应, 南菜北运的主要蔬菜种类之一。广西作为节瓜的主产区之一, 区内的节瓜育种工作者在节瓜新品种研发方面做了大量工作, 但由于节瓜的遗传背景狭窄, 尚未取得突破性进展。狭窄的遗传背景决定了节瓜的育种水平主要取决于育种材料的遗传多样

性程度及对种质资源特性的了解。目前, 广大育种者虽然已经育成许多性状优良的节瓜自交系, 但由于许多材料形态学上较为接近, 传统方法难以区分, 并且材料间的亲缘关系也不甚明了, 给节瓜育种过程中的亲本选配及杂种优势利用带来了困难。因而, 需要对节瓜育种材料进行遗传多样性及亲缘关系分析, 以提高育种效率。

简单序列重复区间标记技术 (ISSR, inter-simple sequence repeat) 是一种基于真核生物基因组内微卫星 DNA 基础上的分子标记技术。其操作简单, 重复性好, 快速灵敏, 多态性丰富, 目前已广泛应用于辣

收稿日期: 2014-10-09 修回日期: 2014-11-21 网络出版日期: 2015-08-04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150804.1050.002.html>

基金项目: 农业良种培育中心建设示范-节瓜种质材料的创新研究与利用(桂科能 14121008-1-3)

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail: JLNWP2017@163.com

通信作者: 刘政国, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: liu-zhengguo@126.com

椒、蚕豆、凤梨等多种植物的种质资源遗传多样性分析<sup>[1-11]</sup>,但在节瓜遗传多样性分析方面鲜有报道。本研究利用 ISSR 分子标记技术,对来源于广西壮族自治区的 36 份节瓜自交系(已育成 4 个审定品种)的遗传多样性和亲缘关系进行分析,为今后的节瓜分子标记辅助育种及遗传资源的鉴定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

36 份节瓜自交系材料由广西大学及南宁科农种苗有限责任公司搜集,经多代自交纯化而育成的高代自交系,名称及编号见表 1。其中 1、2、4、5、11、12、14、26、34 号材料来自广西;15 号材料来自泰国;17、19、23 号材料来自印尼;16、28、29、33 号材料来自广东;6、7、8、9 号材料为广西节瓜与泰国节瓜杂交分离后代;3、31、32、36 号材料为广西节瓜与印尼节瓜杂交分离后代;10、13、18、20、21、22、24、25、27、30、35 号材料为广西与广东节瓜杂交分离后代。*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司。100 条 UBC-ISSR 引物、PCR Marker (D2000)、dNTPs、 $Mg^{2+}$  购自上海生工公司。

表 1 供试材料的名称及来源

Table 1 Origins and names of materials investigated

编号 Code	材料 Materials	编号 Code	材料 Materials
1	GZ-4-3	19	YNY-12
2	GX-2	20	DXZ-34K
3	GY-7-2-2-2	21	LM07-3
4	NZ-5-5	22	GY-4-3-4-1-1
5	W-1-23	23	YN-5
6	YN-701	24	XD-72w
7	GY-8-3-1-1	25	DXZ-101
8	GY-3-4-1	26	HXZ-1-3-3
9	GK-3-4-2-1	27	DXZ-44
10	TM-1-1	28	ND-3-2-3
11	YDS-36	29	NDL-2
12	KF-2-3-1	30	DXZ-27
13	MG-721	31	H-F2-7
14	WH-3	32	H-F2-101
15	TL-1-2-1	33	GD-3-1
16	GD-1-1	34	XN-2-4-1
17	YNY-33	35	LM01-2
18	GF-7-1-1	36	H-F2-110

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 待幼苗长至 2 片真叶时采集嫩叶,于液氮冰冻后在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存,基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[12]</sup>,用核酸蛋白检测仪及 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 质量,并稀释至约  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。

**1.2.2 ISSR-PCR 扩增** 引物参照加拿大英属哥伦比亚大学(UBC, University of British Columbia)公布的 100 条 ISSR 引物序列。反应体系总体积为  $20\ \mu\text{L}$ ,包括  $3\ \mu\text{L}\ 10\times\text{Buffer}$ ,  $1\ \text{U}\ \text{Taq}$  酶; $200\ \mu\text{mol/L}$  dNTPs,  $2.0\ \text{mmol/L}\ \text{Mg}^{2+}$ ,  $0.75\ \mu\text{mol/L}$  引物,  $40\ \text{ng}$  模板 DNA。PCR 反应程序为: $94^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ;  $94^{\circ}\text{C}$  变性  $30\ \text{s}$ ;  $32.9\sim 63.8^{\circ}\text{C}$  退火  $45\ \text{s}$ (不同引物采用不同  $T_m$  值),  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $90\ \text{s}$ ,  $37$  个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸  $7\ \text{min}$ ;  $4^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 GelRed 核酸染料)电泳检测,电泳电场强度为  $5\ \text{v}/\text{cm}$ ,电泳结束后,用 UVP 凝胶成像系统拍照分析。

**1.2.3 数据统计与分析** 根据 PCR 扩增产物的电泳检测结果,将电泳图谱中同一迁移位置上清晰且可重复的条带赋值为 1,无条带或弱带且不重复的赋值为 0,建立 1、0 数据矩阵。统计单位引物扩增的总条带数及多态性条带数,计算多态性位点百分率<sup>[13]</sup>。利用 NTSYSpc 2.10e 软件<sup>[14]</sup>,根据 Nei-Li 相似系数法<sup>[15]</sup>,计算供试材料间的遗传相似性系数,采用非加权组平均法(UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic means)进行聚类分析,构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR 引物扩增多态性分析

以 6 份农艺性状差异较大的节瓜自交系材料对 100 条 UBC-ISSR 引物进行初步筛选,获得 27 条具有多态性条带的 ISSR 引物,并从中进一步筛选出 14 条条带清晰、重复性好的引物用于 36 份节瓜材料的 PCR 扩增。共扩增出 76 条清晰稳定的条带,其中多态性条带 45 条,多态性比例为 59.21% (表 2)。图 1 为引物 ISSR-56 对 36 份节瓜自交系材料的扩增图谱。

### 2.2 节瓜遗传多样性分析

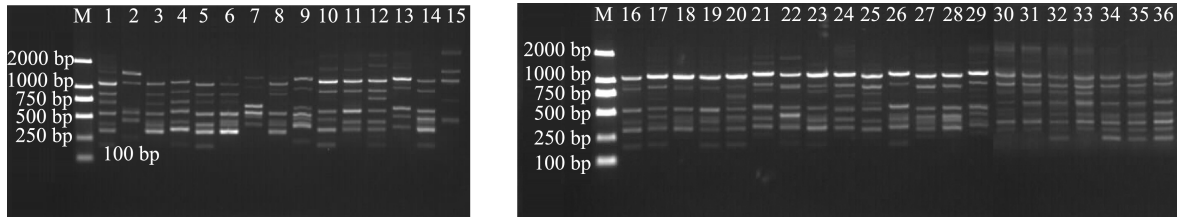
36 份节瓜自交系间的遗传相似系数分布在  $0.57\sim 0.96$  之间,平均值为 0.76,其中 H-F2-101 与 GK-3-4-2-1 的遗传相似系数最小(0.56579),遗传距离最远;YNY-12 和 YNY-33、YN-5 和 YNY-33 以及

表 2 用于节瓜遗传多样性分析的 ISSR 引物及其扩增结果

Table 2 ISSR primers used in analysis of genetic diversity of Chieh-qua and their amplification results

引物名称 Primer name	碱基序列(5'→3') Primer sequence	总条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性比率(%) Percentage of polymorphic bands
ISSR-11	(GA) <sub>8</sub> C	6	3	50.00
ISSR-12	(GA) <sub>8</sub> A	5	3	60.00
ISSR-13	(CT) <sub>8</sub> T	6	5	83.33
ISSR-26	(AC) <sub>8</sub> C	5	3	60.00
ISSR-32	(AT) <sub>8</sub> YC	4	1	25.00
ISSR-35	(AG) <sub>8</sub> YC	6	5	83.33
ISSR-42	(GA) <sub>8</sub> YG	7	3	42.86
ISSR-55	(AC) <sub>8</sub> YT	6	4	66.67
ISSR-56	(AC) <sub>8</sub> YA	9	5	55.56
ISSR-59	(TG) <sub>8</sub> RC	4	4	100.00
ISSR-66	(CTC) <sub>6</sub>	4	1	25.00
ISSR-68	(GAA) <sub>6</sub>	5	3	60.00
ISSR-74	(CCCT) <sub>4</sub>	3	3	100.00
ISSR-78	(GGAT) <sub>4</sub>	6	2	33.33
总计 Total		76	45	59.21

R = (A ,G),Y = (C ,T)



M;2000 bp DNA maker; ,1~36:为表 1 中 36 份节瓜育种材料

M;2000 bp DNA marker,1-36 were the DNA of the 36 chieh-qua breeding materials in table 1

图 1 引物 ISSR-56 对 36 份节瓜材料的 PCR 扩增图谱

Fig.1 ISSR-PCR pattern of 31 chieh-qua accessions produced by primer ISSR-56

NDL-2 和 ND-3-2-3 的遗传相似系数最大(0.960526),表明这 3 个组合的亲缘关系非常近。通过材料间的两两比较,对 630 个遗传相似系数进行次数分布分析(图 2),由图 2 可知,83.33%的材料遗传相似系数分布在 0.65~0.90 之间,频率最高的区间为 0.65~0.70(22.22%),表明供试的 36 份节瓜材料具有一定的遗传多样性,但遗传背景仍较为狭窄。

2.3 聚类分析

利用 UPGMA 进行聚类分析,得到 36 份节瓜材料的系统进化树(图 3)。由图 3 可知,以相似系数平均值 0.76 为阈值时,可将 36 份节瓜材料分为 3 类。第 I 类包括 22 份自交系材料,第 II 类包括 13

份自交系材料,第 III 类仅包括 1 份自交系材料 TL-1-2-1。

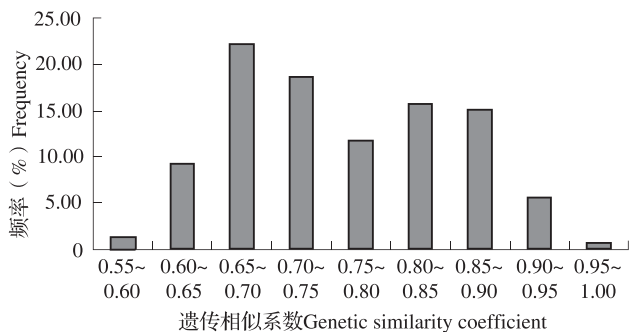


图 2 遗传相似系数分布

Fig.2 Histogram distribution of genetic similarity coefficient

第 I 类群中,DXZ-27 等 13 份自交系源自于广东或广东与广西节瓜杂交分离后代,H-F2-7 等 6 份自交系源自印尼或印尼与广西节瓜杂交分离后代,XN-2-4-1 等 2 份自交系源于广西当地。第 II 类群中,GX-2 等 6 份自交系源自于广西,是由广西地方品种经多代选育得到的自交系;YN-701 等 4 份自交系来源于广西节瓜与泰国节瓜杂交分离后代;TM-

1-1 等 2 份自交系源自广西与广东节瓜杂交分离后代;GY-7-2-2-2 源自广西节瓜与印尼节瓜杂交分离后代。第 III 类群的 1 份材料 TL-1-2-1 来源于泰国。从聚类结果来看,分类结果与供试材料的地理来源较为吻合。大部分来源相同或相近的材料能够聚在同一类中,表现出较为密切的亲缘关系。

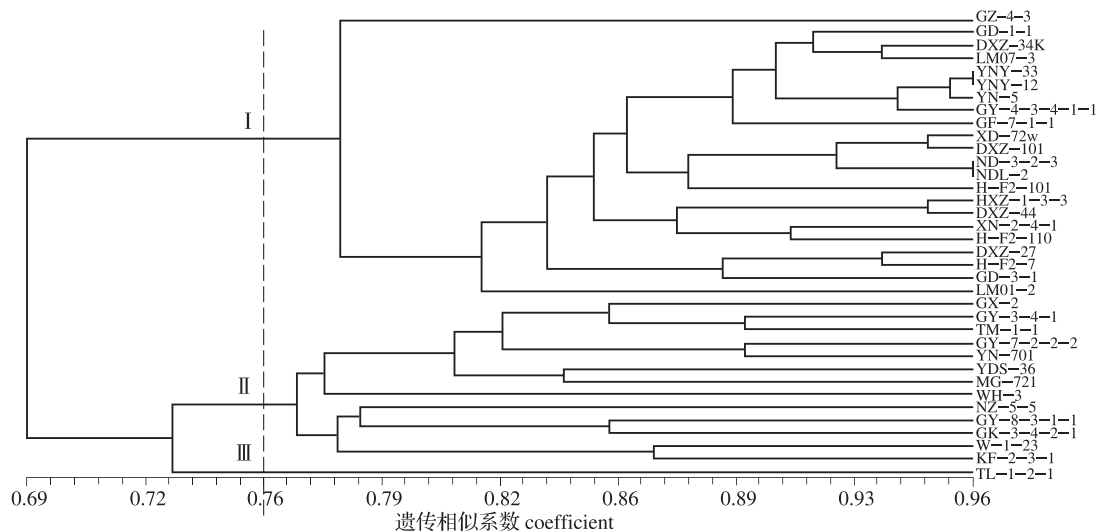


图 3 36 份节瓜自交系 ISSR 聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of 36 inbred lines of chieh-qua from ISSR data analysis

### 3 讨论

目前,分子标记技术已经作为一种成熟的手段广泛应用于作物的种质资源亲缘关系分析和遗传多样性研究<sup>[16-19]</sup>,在葫芦科瓜类作物方面,分子标记技术已广泛应用于南瓜、西瓜、黄瓜、甜瓜以及苦瓜等瓜类<sup>[4,7,9,13,20-22]</sup>,但在节瓜种质资源亲缘关系分析和遗传多样性研究方面的应用报道较少。乔燕春等<sup>[23]</sup>以 38 份冬瓜、节瓜种质资源为材料,利用 SRAP 标记技术对其进行多样性分析,将 38 份材料划分为 5 个类群,遗传相似系数在 0.95 ~ 0.99 之间,认为节瓜的遗传背景非常狭窄。本研究利用 ISSR 分子标记技术对广西 36 份节瓜自交系的遗传多样性进行了分析研究。结果显示,材料间的遗传相似系数分布在 0.57 ~ 0.96 之间,表现出的遗传多样性高于前人结果。但其中 83.33% 的材料遗传相似系数分布在 0.65 ~ 0.90 之间,表明其遗传多样性较为狭窄,这与乔燕春等<sup>[23]</sup>通过 SRAP 分析得到的结论相近。狭窄的遗传背景不利于节瓜的育种工作,今后需要加强节瓜的资源创新工作,加大对节瓜野

生资源的搜寻和开发,保护现有的遗传多样性强的品种,并通过对国外资源的引进与利用,丰富我国节瓜种质资源的多样性。

通过聚类分析,将 36 份节瓜自交系分为 3 个类群。从类群划分结果来看,源自泰国的 TL-1-2-1 独自聚为一类,源自广东以及广东与广西节瓜杂交分离后代的材料大部分分布在第 I 类群,源自广西的 9 份自交系中有 6 份分布在第 II 类群,7 份源自印尼或印尼与广西节瓜杂交分离后代材料中,6 份分布在第 I 类群。表明分类结果与地理距离对材料的划分有一定的吻合性。分析认为,这可能是由于不同地区根据具有当地特色的育种目标长期人工选择的结果。

综上所述,本研究通过 ISSR 分子标记技术明确了 36 份广西节瓜自交系的遗传关系及各材料的分类地位,为这些育种资源的合理利用以及今后节瓜分子遗传连锁图谱构建的杂交亲本选择提供了理论依据。

### 参考文献

[1] 刘林娅,党选民,曹振木,等. 黄灯笼辣椒种质资源遗传多样

