

苏小俊, 徐海, 陈龙正, 等. 丝瓜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (3): 42-46

丝瓜种质资源亲缘关系的 ISSR 分析

苏小俊, 徐海, 陈龙正, 宋波, 袁希汉, 陈劲枫*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部南京蔬菜遗传改良重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用 ISSR 标记, 对来源于不同地区的丝瓜种质资源的亲缘关系进行了分析。从 80 个 ISSR 引物中筛选出多态性强、重复性好的 9 个引物, 对 43 份丝瓜种质基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 60 条谱带, 平均每个引物扩增出 6.67 条带, 其中多态性带 47 个, 多态性位点百分率为 78.3%。丝瓜种质间遗传相似系数变化范围在 0.37~0.98 之间, 暗示了丝瓜栽培种内的遗传基础相对狭窄。利用 UPGMA 聚类分析, 43 份丝瓜种质被划分为 6 个类群, 类群的划分与形态学性状较吻合, 而且与地理来源也有较高的相关性。

关键词: 丝瓜; 种质资源; 亲缘关系; ISSR

中图分类号: S642.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2010)03-0042-05

Analysis on the phylogenetic relationship of luffa (*Luffa cylindrical* (L.) Roem.) germplasm based on ISSR

SU Xiao-jun, XU Hai, CHEN Long-zheng, SONG Bo, YUAN Xi-han, CHEN Jin-feng*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Key Laboratory of Southern Vegetable Crops Genetics Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Phylogenesis of 43 common luffa germplasm from different regions was analyzed with ISSR. 9 primers were selected from 80 ISSR primers. 60 DNA fragments were amplified from 43 samples and each primer resulted in 6.67 DNA fragments. 47 fragments were polymorphic (percentage of polymorphic bands was 78.3%). The value of Nei's genetic similarity (GS) indexes of 43 common luffa germplasm varied from 0.37 to 0.98, suggesting that the genetic diversity among them is short. Cluster analysis with UPGMA method showed that the 43 germplasm could be divided into six groups. The results according to the pedigree relations had connections with morphological traits and regions of germplasm origin.

Key words: luffa (*Luffa cylindrical* (L.) Roem.); germplasm resources; genetic relationship; ISSR

丝瓜 (*Luffa cylindrical* (L.) Roem.) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 丝瓜属 (*Luffa* Mill.) 植物, 原产印度或亚洲南部热带地区, 为一年生攀缘性草本植物。丝瓜自宋代、明代引入我国以来, 由南至北, 普遍栽培, 逐渐形成具有地方特色的丝瓜种质, 种质资源 (尤其是地方资源) 比较丰富^[1], 对这些种质资源的鉴定和评价是再收集和利用的前提。然而, 关于丝瓜种质资源分类评价的研究报道很少, 目前多依据形态性状或园艺学特征进行分类。对丝瓜种质材料间遗传关系的研究也不够深入, 这在一定程度上限制了丝瓜新品种的选育。

简单序列重复区间扩增多态性 (ISSR), 由于其稳定性好, 易操作等, 而被广泛应用于居群遗传学、品种鉴定、物种分类与系统学比较以及物种的进化关系等研究中^[2-7], 但在丝瓜中尚未见相关报道。本研究旨在利用 ISSR 标记技术, 以国家蔬菜种质资源库中保存的具有代表性的丝瓜种质资源为试材, 探讨 ISSR 标记在鉴定丝瓜种质资源遗传多样性中的有效性, 同时应用该方法研究其亲缘关系, 以期对丝瓜种质资源的收集、保存、创新和有效利用提供 DNA 分子水平上的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

根据《中国蔬菜品种资源目录》中的性状描述, 从中国农业科学院蔬菜花卉研究所国家蔬菜种质

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家 863 计划项目 (2008AA10Z150); 江苏省高技术研究项目 (BG2007301)

作者简介: 苏小俊, 研究员, 博士研究生, E-mail: suxj606@yahoo.com.cn.* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 从事蔬菜遗传育种研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn.

资源中期库中提取有代表性的普通丝瓜种质 42 份, 有棱丝瓜品种 1 份 (表 1)。全部材料均种植于江苏省农业科学院实验基地。

表 1 供试材料及来源

Table 1 The materials and source in the study

序号 No.	材料 Materials	引种地/原产地 Place of collection/origin	引种时间 Collection time
1	早丝瓜 Early luffa	浙江绍兴 Shaoxing Zhejiang	1993
2	肉丝瓜 Rou luffa	四川雅安 Yaan Sichuan	1994
3	线丝瓜 Xian luffa	四川成都 Chengdu Sichuan	1994
4	黑籽有皱丝瓜 Black-seed wrinkled luffa	四川达县 Daxian Sichuan	1994
5	乐山丝瓜 Leshan luffa	四川乐山 Leshan Sichuan	1994
6	芦山丝瓜 Lushan luffa	四川芦山 Lushan Sichuan	1994
7	白籽线丝瓜 White-seed xian luffa	四川渠县 Quxian Sichuan	1994
8	万源丝瓜 Wanyuan luffa	四川万源 Wanyuan Sichuan	1994
9	荣经丝瓜 Yingjing luffa	四川荣经 Yingjing Sichuan	1994
10	光泽丝瓜 Guangze luffa	福建光泽 Guangze Fujian	1993
11	福州抗病越初丝瓜 Fuzhou kangbingyuechu luffa	福建福州 Fuzhou Fujian	1993
12	桂林水瓜丝瓜 Guilin shuigua luffa	广西桂林 Guilin Guangxi	1993
13	林县丝瓜 Linxian luffa	河南林县 Linxian He'nan	1996
14	尉氏丝瓜 Weishi luffa	河南尉氏 Weishi He'nan	1996
15	开封丝瓜 Kaifeng luffa	河南开封 Kaifeng He'nan	1996
16	郑州棒锤丝瓜 Zhengzhou wooden club luffa	河南郑州 Zhengzhou He'nan	1996
17	株州沙田丝瓜 Zhuzhou shatian luffa	湖南株州 Zhuzhou Hu'nan	1999
18	白丝瓜 White luffa	江西广丰 Guangfeng Jiangxi	1993
19	黑籽丝瓜 Black-seed luffa	四川荣经 Yingjing Sichuan	1993
20	玉露丝瓜 Yulu luffa	浙江衢州 Quzhou Zhejiang	1993
21	本地丝瓜 Native luffa	江苏海安 Haian Jiangsu	1994
22	蛇形丝瓜 Snake-like luffa	江苏南京 Nanjing Jiangsu	1994
23	白籽丝瓜 White-seed luffa	江苏连云港 Lianyungang Jiangsu	1994
24	香丝瓜 Fragrant luffa	江苏苏州 Suzhou Jiangsu	1994
25	贵阳短丝瓜 Guiyang short luffa	贵州贵阳 Guiyang Guizhou	1993
26	长沙肉丝瓜 Changsha rou luffa	湖南长沙 Changsha Hu'nan	1993
27	半长丝瓜 Middle length luffa	江苏无锡 Wuxi Jiangsu	1996
28	宁德长丝瓜 Ningde long luffa	福建宁德 Ningde Fujian	1993
29	芜湖丝瓜 Wuhu luffa	安徽芜湖 Wuhu Anhui	1993
30	香丝瓜 Fragrant luffa	上海 Shanghai	1993
31	邵阳香丝瓜 Shaoyang fragrant luffa	湖南邵阳 Shaoyang Hu'nan	1993
32	香丝瓜 Fragrant luffa	江苏泰州 Taizhou Jiangsu	1993
33	宜兴丝瓜 Yixing luffa	江苏宜兴 Yixing Jiangsu	1993
34	杞县丝瓜 Qixian luffa	河南杞县 Qixian He'nan	1993
35	汉寿棒丝瓜 Hanshou stick-like luffa	湖南汉寿 Hanshou Hu'nan	1997
36	沅江大肉丝瓜 Yuanjiang big rou luffa	湖南沅江 Yuanjiang Hu'nan	1997
37	黑籽肉丝瓜 Black-seed rou luffa	四川成都 Chengdu Sichuan	1993
38	黑籽肉丝瓜 Black-seed rou luffa	四川内江 Neijiang Sichuan	1993
39	肉丝瓜 Rou luffa	江西宜春 Yichun Jiangxi	1998
40	黑籽丝瓜 Black-seed luffa	宁夏银川 Yinchuan Ningxia	2000
41	长条丝瓜 Bar luffa	福建永安 Yongan Fujian	1995
42	德江丝瓜 Dejiang luffa	贵州德江 Dejiang Guizhou	1995
43	绿胜 2 号 Lüsheng 2 luffa	广东广州 Guangzhou Guangdong	2006

1.2 试验方法

基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[8]。ISSR 标记技术参照陈学军等^[9]的方法。ISSR 反应体系共 20 万方数据

μL 。在灭菌的 0.2 mL PCR 薄壁管中依次加入下列组分: 双蒸水 11.8 μL , $10 \times \text{Buffer}$ 溶液 2 μL , 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$ 2 μL , 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{dNTPs}$ 2.5 μL , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 20 碱基随机引物 0.5 μL , 1 U 的 *TaqDNA* 聚合酶, 20~40 ng 模板 DNA 1 μL (以上各反应组分均购于上海生工生物工程技术有限公司)。稍加离心混匀后, 于 PTC-100 PCR 仪 (MJ, 美国) 中扩增。

反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55.8 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离 1.5 h ($5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$), 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭染色, 用上海培青凝胶成像系统进行拍照分析。扩增片段的分子大小标记是 Fermentas GenRuler 100 bp Plus DNA Ladder。

1.3 数据统计

每个引物重复扩增 2 次, 结果相同的进行数据统计, 以 0、1 表示条带的有无。利用 PopGene 32 Version 1.32 软件计算多态性比例及相似性系数。利用 NTSYS2.11 版软件的非加权算术平均法 (UPGMA) 进行系统聚类分析, 构建分子进化系统树。

2 结果与分析

2.1 43 份丝瓜种质总 DNA 扩增产物的多态性分析

利用优化的反应体系从 80 个 ISSR 引物中选取扩增条带清晰、稳定性好的 9 条引物进行统计分析 (图 1)。用 9 个 ISSR 引物对 43 份丝瓜种质资源进行 PCR 扩增, 结果如表 2 所示, 共在 60 个位点获得扩增片段, 平均每个引物扩增片段为 6.67 条, 扩增片段最多的引物是 S17, 为 9 条, 最少的引物为 S37, 只有 4 条。多态性带共有 47 条, 多态性比例为 78.3%, 平均每个引物产生 5.22 条多态性带, 多态性变幅为 66.7%~88.9%, 引物 S17 多态性信息含量最高 (88.9%), 引物 S1 含量最低 (66.7%), 丝瓜种质 ISSR 多态性比例相对较低, 说明丝瓜遗传基础相对狭窄。

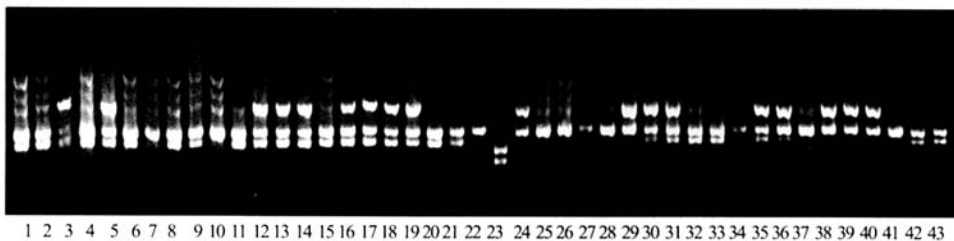


图 1 引物 S24 对 43 份丝瓜种质扩增的 ISSR 带型

Fig. 1 ISSR banding pattern of 43 luffa accessions produced by the primer S24

1-43 为种质编号, 见表 1。1-43 are the accessions listed in Table 1. The same as follows.

表 2 9 个引物对 43 份丝瓜种质 DNA 扩增带数

Table 2 The number of the total and polymorphic bands amplified by 9 ISSR primers among 43 luffa accessions

引物 Primer	序列 Sequence	多态性带数 No. of polymorphic bands	总带数 Total band numbers	多态性位点比例/% Polymorphic rate
S1	(CTC) 6	4	6	66.7
S11	(GAA) 6	4	5	80.0
S17	(GACA) 4	8	9	88.9
S19	(TCT) 6	6	8	75.0
S24	(AC) 8CG	4	5	80.0
S37	(AC) 8CT	3	4	75.0
S44	(TG) 8GC	6	8	75.0
S45	(AG) 8GC	6	8	75.0
S57	(AG) 8TG	5	7	85.7
总计/平均 Total/Mean		47	60	78.3

2.2 依据 ISSR 标记的 43 份丝瓜种质的聚类分析

43 份丝瓜种质两两间的相似系数分布在 0.37~0.98 之间。其中绿胜 2 号和其他 42 份种质的相似系数最小, 为 0.37, 表明种质间的亲缘关系最远; 来自四川荣经的荣经丝瓜 (V05H0032) 和黑籽丝瓜 万方数据

(V05H0033) 以及来自江苏连云港的白籽丝瓜 (V05H0190) 和来自江苏无锡的半长丝瓜 (V05H0179) 之间的相似系数最大, 为 0.98, 表明两种质间的亲缘关系最近。

从聚类图上可以看出, 以相似系数 0.67 为标准, 43 份丝瓜种质可分为 6 类 11 组 (图 2)。第 I、II、III、IV 和 V 类是普通丝瓜种质, 第 VI 类是有棱丝瓜种质。以相似系数 0.77 为标准, 各类可以进一步分组。

第 I 类可分为 2 组: 第 1 组包括宁德长丝瓜、长条丝瓜、早丝瓜和汉寿棒丝瓜, 主要为植株长势旺、瓜皮色深绿、果形长圆筒形、果径较小类型的种质; 第 2 组包括光泽丝瓜和福州抗病越初丝瓜。

第 II 类分为 3 组: 第 1 组包括株州沙田丝瓜、沅江大肉丝瓜和白丝瓜 3 份种质, 这一组种质主要为瓜皮绿白色到白色类、圆筒形果的品种; 第 2 组含长沙肉丝瓜、邵阳香丝瓜、肉丝瓜 (V05H0202) 等 12 份种质, 主要为短圆筒形果的品种; 第 3 组含黑籽有皱丝瓜、黑籽肉丝瓜 (V05H0009)、黑籽肉丝瓜 (V05H0025) 和德江丝瓜 4 份种质, 主要为中圆筒形、果皮皱的品种。

第 III 类为 1 组: 包括尉氏丝瓜、开封丝瓜、杞县丝瓜、郑州棒锤丝瓜、林县丝瓜和黑籽丝瓜 (V05H0203) 6 份种质。这一组主要是来自河南的 5 份种质和来自宁夏银川的 1 份种质, 果实为短棒形。

第 IV 类分为 3 组: 第 1 组包括来源不同的 3 份香丝瓜 (V05H0187、V05H0212、V05H0188) 种质, 为短棒形、果实具有清香风味的品种; 第 2 组包括本地丝瓜、白籽丝瓜和玉露丝瓜 3 份种质, 主要果实为中长棒形; 第 3 组包括半长丝瓜、宜兴丝瓜、蛇形丝瓜和芜湖丝瓜 4 份种质, 主要果实为长棒形, 长度 60 cm 左右, 其中蛇形丝瓜 150 cm 以上。

第 V 类仅包括桂林水瓜 1 份种质, 属单独的一组。

第 VI 类仅包括绿胜 2 号 1 份种质, 为有棱丝瓜品种, 属单独的一组。

3 讨论

本研究表明, 从 ISSR 扩增图谱来看, ISSR 扩增片段多态性最高的为 88.9%, 而最少的仅为 66.7%, 平均 78.3%, 多态性比例相对较小, 说明丝瓜遗传基础相对狭窄。从遗传相似系数来看, 丝瓜遗传相似系数分布在 0.37~0.98 之间。但是, 进一步分析发现, 普通丝瓜种内相似系数较高, 材料之间遗传相似系数变幅较小, 表明尽管丝瓜属的遗传多样性可能比较丰富, 但是仅仅体现在种间, 种内遗传变异较小, 遗传基础相对狭窄, 这与夏军辉等^[10]利用 RAPD 技术的研究结果相似。因此, 可以进行丝瓜属种间杂交, 进行新种质资源的创制, 拓宽育种材料遗传背景, 为丝瓜育种奠定基础。

聚类分析发现, 以大部分形态学和生物学性状类似的种质首先聚在一起。如第 I 类中, 果形长圆筒形、果径较小类型的种质聚为一类; 第 II 类中, 19 份种质分为 3 组, 3 份圆筒形、12 份长远筒形和 4 份短圆筒形的种质材料分别聚为一类; 第 VI 类中, 10 份种质分为 3 组, 3 份短棒形、3 份中长棒形和 4 份长棒形的种质材料分别聚为一类。表明聚类分析结果与形态学分类比较吻合。

从聚类分析结果可见, 多数来源地相同的种质表现出较为密切的亲缘关系。如第 I 类第 2 组, 两份来自福建的丝瓜种质聚在一起; 第 III 类中, 5 份来自河南的种质资源被聚在一起; 来自四川的丝瓜种质资源被聚在第 II 类中; 来自浙江、福建、上海、江苏的大部分种质资源聚为一类, 说明这些地区丝瓜种质资源之间交流相对频繁。以上结果表明: 种质资源分类与地域有关, 这与在茄子^[4]上的研究不一致。

万方数据

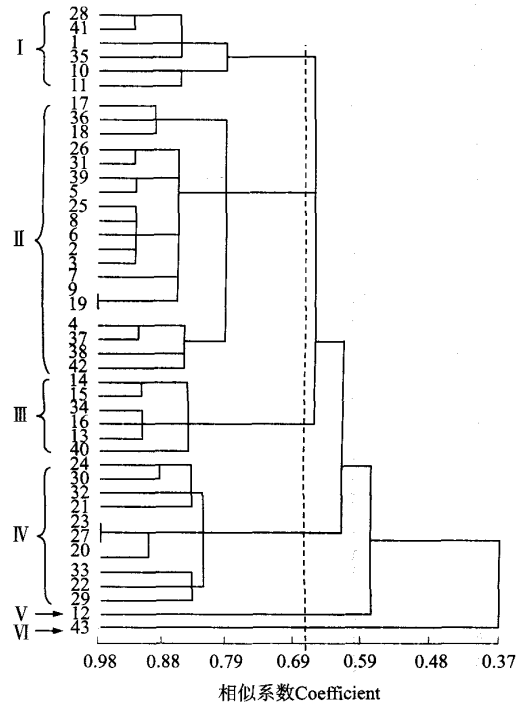


图 2 依据 ISSR 标记的丝瓜种质聚类图
Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis for 43 luffa accessions based on ISSR markers

这可能与丝瓜自宋代传入中国以后,丝瓜种质资源在远距离的地域之间交流并不频繁,经过长期的种植和选择逐渐形成了具有地域特色的地方种质资源。因此,在丝瓜育种工作中应该加强地方种质资源之间的交流,丰富育种材料。

参考文献:

- [1] 舒迎澜. 主要瓜类蔬菜栽培简史 [J]. 中国农史, 1998, 17 (3): 95 - 98
- [2] Vijayan K, Srivastava P P, Awasthi A K. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers [J]. Genome, 2004, 47: 439 - 448
- [3] Chao-zhi M A, Ting-dong F U, Tuevesson S, et al. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs) [J]. Plant Genetic Resources, 2003, 1 (2/3): 169 - 174
- [4] 毛伟海, 杜黎明, 包崇来, 等. 我国南方长茄种质资源的 ISSR 标记分析 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (5): 1109 - 1112
- [5] Nan Peng, Shi Suhua, Peng Shaolin, et al. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and south-west China as revealed by ISSR makers [J]. Annals of Botany, 2003, 91: 329 - 333
- [6] 张敏, 黄苏珍. 鸚尾属种质资源的 ISSR 分析 [J]. 南京农业大学学报, 2008, 31 (4): 43 - 48
- [7] 梁景霞, 祁建民, 方平平, 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
- [8] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321 - 4325
- [9] 陈学军, 程志芳, 陈劲枫, 等. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27 (4): 662 - 670
- [10] 夏军辉, 向长萍. 丝瓜种质资源遗传多样性的形态和 RAPD 标记分析 [J]. 中国蔬菜, 2008 (10): 21 - 25

责任编辑: 范雪梅

丝瓜种质资源亲缘关系的ISSR分析

作者: [苏小俊](#), [徐海](#), [陈龙正](#), [宋波](#), [袁希汉](#), [陈劲枫](#), [SU Xiao-jun](#), [XU Hai](#), [CHEN Long-zheng](#), [SONG Bo](#), [YUAN Xi-han](#), [CHEN Jin-feng](#)
作者单位: [南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部南京蔬菜遗传改良重点开放实验室](#), 江苏, 南京, 210095
刊名: [南京农业大学学报](#) 
英文刊名: [JOURNAL OF NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY](#)
年, 卷(期): 2010, 33 (3)

参考文献(10条)

1. [Chao-zhi M A;Ting-dong F U;Tuevesson S Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed \(Brassica napus L.\) analyzed by inter-simple sequence repeats\(ISSRs\) 2003 \(2/3\)](#)
2. [Vijayan K;Srivastava P P;Awasthi A K Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry \(Morus\) species using molecular markers 2004](#)
3. [舒迎澜 主要瓜类蔬菜栽培简史\[期刊论文\]-中国农史 1998 \(03\)](#)
4. [陈学军;程志芳;陈劲枫 辣椒种质遗传多样性的RAPD和ISSR及其表型数据分析\[期刊论文\]-西北植物学报 2007 \(04\)](#)
5. [Murray H G;Thompson W F Rapid isolation of higher weight DNA\[外文期刊\] 1980](#)
6. [梁景霞;祁建民;方平平 烟草种质资源遗传多样性与亲缘关系的ISSR聚类分析\[期刊论文\]-中国农业科学 2008 \(01\)](#)
7. [张敏;黄苏珍 鸢尾属种质资源的ISSR分析\[期刊论文\]-南京农业大学学报 2008 \(04\)](#)
8. [夏军辉;向长萍 丝瓜种质资源遗传多样性的形态和RAPD标记分析\[期刊论文\]-中国蔬菜 2008 \(10\)](#)
9. [Nan Peng;Shi Suhua;Peng Shaolin Genetic diversity in Primula obconica \(Primulaceae\) from central and south-west China as revealed by ISSR makers\[外文期刊\] 2003 \(3\)](#)
10. [毛伟海;杜黎明;包崇来 我国南方长茄种质资源的ISSR标记分析\[期刊论文\]-园艺学报 2006 \(05\)](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_njnydxxb201003008.aspx