

文献著录格式: 鲁忠富, 王莎, 吴晓花, 等. 利用插入/缺失标记分析我国瓠瓜资源遗传多样性 [J]. 浙江农业科学, 2014 (5): 668-672.

利用插入/缺失标记分析我国瓠瓜资源遗传多样性

鲁忠富, 王莎, 吴晓花, 胡耀文, 汪宝根, 吴新义, 徐沛, 李国景
(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 瓠瓜作为重要的葫芦科作物之一, 在我国已有悠久的栽培历史。瓠瓜分子标记研究大大落后于黄瓜、白菜等作物, 应用分子标记技术开展瓠瓜种质资源的遗传多样性和亲缘关系研究, 对促进瓠瓜重要种质资源的开发和利用具有重要意义。本研究选择 96 份具有广泛代表性的我国瓠瓜种质材料, 利用插入/缺失分子标记技术, 研究分析了其遗传多样性和亲缘关系, 探讨我国瓠瓜品种间的基因差异和瓠瓜亚种间及亚种内的亲缘关系。结果表明, 瓠瓜种质遗传相似系数 0.30~1.00, 在遗传相似系数 0.68 处可将 96 份瓠瓜种质材料分为 8 类, 各种质材料分布较平均; 相同瓜型的材料有聚集在一起的趋势, 根据瓜型可将这 96 份瓠瓜种质大致分为 3 类。

关键词: 瓠瓜; 聚类分析; 插入/缺失标记; 遗传多样性

中图分类号: Q 75 文献标志码: A 文章编号: 0528-9017(2014) 05-0668-05

瓠瓜 (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) 为雌雄同株异花一年生草本植物 ($2n = 2x = 22$), 隶属葫芦科 (Cucurbitaceae) 葫芦属 (*Lagenaria*), 是世界上重要的葫芦科作物之一^[1]。瓠瓜原产赤道非洲南部低地^[2], 是人类最早种植的作物之一, 1 万年前就有考古学上的证据表明人类已开始种植瓠瓜。我国瓠瓜遗传资源丰富, 其栽培史可上溯到新石器时代, 被认为是瓠瓜的次生起源中心之一^[3]。瓠瓜在我国主要分布在长江流域及以南地区, 近年来, 山东、河北、河南等地也有栽培^[4], 可作为瓜果蔬菜食用, 既可烧汤做菜, 又可腌制晒干; 其成熟果还可用作容器或乐器; 此外, 瓠瓜可用作嫁接西瓜的砧木, 用来预防西瓜枯萎病^[3,5]。

目前瓠瓜分类主要根据种质资源的表型特征, 按形态分, 有圆柱形、牛腿形、手榴弹形等; 按大小分, 老瓜大的可达 8~10 kg, 小的不足 0.1 kg; 按嫩瓜颜色分, 有深绿、浅绿、白色、白底带花青斑等; 按品质分有柔滑型、硬肉型 (硬于黄瓜); 按口味分, 有淡味型、甜味型、清苦型 (类似苦瓜之苦味)、剧苦型; 按生育期可分为早熟型、中熟型、晚熟型。此外, 不同类型、不同品种的长势

强弱、抗病性、抗逆性等也都有差异^[6-7]。但目前在 DNA 水平上检测瓠瓜不同种质间遗传多样性的研究还较少。

我国瓠瓜生产上以瓠子类品种为主, 种质来源局限性大, 缺乏遗传多样性。近年来瓠瓜生产中病毒病、白粉病、枯萎病等病害多发, 苦味瓜不时产生, 商品瓜性状多样性跟不上消费者需求等问题日益严重, 亟需拓宽栽培瓠瓜的遗传多样性, 以培养新一代良种, 为此有必要深入了解我国现有瓠瓜品种的遗传多样性和亲缘关系。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为浙江省农业科学院蔬菜所瓠瓜豇豆组历年搜集并具有广泛代性的 96 份地方品种资源所组成的自然群体。代号南秀为 LS1, 孝感瓠子为 LS2, 贵州圆瓠瓜为 LS3, 长瓠为 LS4, 龙岩长四月瓠为 LS5, 长蒲 1 为 LS6, 甬砧 1 号为 LS7, 新疆瓠瓜为 LS8, 东阳农家种 1 为 LS9, 白葫芦为 LS10, 萧山园蒲为 LS11, 广东早瓠瓜为 LS12, 松桃瓠瓜为 LS13, 金钱蒲为 LS14, 全化蒲瓜为 LS15, 东阳农家种 2 为 LS16, 四川长瓠

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 浙江省农业新品种选育专项 (2012C12903)

作者简介: 鲁忠富 (1963-), 男, 浙江杭州人, 实验师, 从事蔬菜育种及新品种推广工作。E-mail: lz0522@163.com。

通信作者, 李国景。E-mail: ligj@mail.zaas.ac.cn。

瓜为 LS17, 临夏瓠子为 LS18, 长蒲 2 为 LS19, 肖长蒲为 LS20, 湖南圆瓠瓜为 LS21, 小籽瓠瓜为 LS22, 长蒲 3 为 LS23, 安吉地蒲为 LS24, 武都瓠子为 LS25, 清秀为 LS26, 湖南瓠瓜为 LS27, 台江瓠瓜为 LS28, 津胜特选为 LS29, 青砧为 LS30, 辽宁瓠子为 LS31, 蒲县瓠瓜为 LS32, 新蔡瓠瓜为 LS33, 湖南圆瓠 1 号为 LS34, G22②①为 LS35, 绍兴长瓜为 LS36, 短筒瓠子为 LS37, G32②②为 LS38, 杭州长瓜为 LS40, 云南农家种为 LS41, 麦瓠为 LS42, 小葫芦为 LS43, 新选为 LS44, 汉龙青玉为 LS45, 长蒲 4 为 LS46, 极早熟瓠瓜为 LS47, 宁波夜开花为 LS48, 观赏瓠子分离出为 LS50, 本地义序芋瓠瓜为 LS53, 南平青花插杆瓠为 LS54, 清流长芋瓠为 LS55, 思南瓠瓜为 LS56, 松桃瓠瓜分离为 LS57, 贵州长瓠瓜 1 为 LS58, 长瓠子为 LS59, 湖北瓠子为 LS60, 花皮葫芦分离出为 LS61, 永泰圆筒瓠为 LS63, 贵州长瓠瓜 2 为 LS64, 榕江瓠瓜为 LS65, 正阳瓠瓜为 LS66, 湖南早瓠瓜为 LS67, 雄溪瓠瓜为 LS68, 菜葫芦为 LS69, 三江口葫芦为 LS70, 瓢葫芦为 LS71, 九山园蒲 1 为 LS72, 丽水农家种为 LS73, 义乌农家种为 LS75, 东阳农家种分 1 为 LS76, 东阳农家种分 2 为 LS77, 东阳农家种分 3 为 LS78, 汉龙碧玉为 LS79, 葫芦蒲为 LS80, 火焰蒲为 LS81, 金华农家种为 LS82, 九山园蒲 2 为 LS83, 南秀公主为 LS84, 爬地蒲为 LS86, 青皮圆蒲为 LS87, 三山牛腿蒲为 LS88, 绍兴长蒲为 LS90, 透年蒲为 LS91, 腰葫芦为 LS93, 引 10-4②②为 LS94, 圆葫芦为 LS95, 浙江圆瓠 1 号为 LS96, 园蒲为 LS97, 越蒲 1 号为 LS98, 云南为 LS99, 早熟瓠子为 LS101, 砧木为 LS102, 08 扁蒲-1 为 LS103, G26②①/②为 LS104, J077-1 I77①为 LS105 和长条瓠瓜为 LS106。

供试材料经浸种、催芽、育苗、移植等一系列处理后, 使用改进的 CTAB 法提取基因组 DNA^[6-8]。

1.2 方法

1.2.1 插入/缺失标记的来源

本试验所使用的插入/缺失标记是由瓠瓜豇豆基因组前期开展的 RAD-Seq 基因组测序开发而来, 包括 85 条差异片段超过 10 bp 的多态性插入/缺失标记。

1.2.2 PCR 反应条件

PCR 体系包括 10 ng 的 DNA, 2.5 pmol 的引

物, 2.5 nmol 的 dNTPs, 18.6 nmol 的 $MgCl_2$, 0.2 U 的 *rTaq* 酶以及 10 × Buffer, 用水补足体积至 12.5 μ L。PCR 扩增程序为: ①预变性 94 °C 3 min; 扩增循环: ②变性 94 °C 30 s, ③退火 52 °C 30 s, ④延伸 72 °C 40 s, ②-④共重复 36 个循环; ⑤72 °C 延伸 5 min, ⑥4 °C 保存。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

PCR 产物在室温条件下使用 8% 的垂直非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis 为 19:1 或 29:1 或 39:1) 电泳分离, 银染法染色, 拍照分析。根据电泳结果记录清晰可重复的条带, 将电泳图中同一位置上清晰且可重复的不同带型分别赋值为 0, 1, 2, 以此类推, 统计各引物的多态性条带的比率并作进一步分析。

1.2.4 遗传多样性分析

对每种基因型在每个位点上的等位基因数和出现频率进行统计。使用 PIC_Calc 0.6 (<http://www.esnips.com/doc/9171097b-ac41-424a-9d35-e7d4e540ec9f/Picalc>) 计算每个插入/缺失位点的 PIC 值, 计算公式为: $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ 。其中: P_{ij} 代表在第 i 个位点出现第 j 个等位基因的频率^[9]。使用 NTSY Spc 2.10 进行 Nei's 遗传距离计算 (DA) 和主坐标分析 (PCoA)。最后根据 DA 的结果用 SAHN 程序中的 UPGMA 法进行聚类分析, 并用 EIGEN 程序求特征值和特征向量进行主坐标分析, 用 Tree Plot 模块生成聚类图, 构建分子进化树, 用 3D Plot 生成主坐标图。

2 结果与分析

等位基因变异的多态性位点数和百分率不仅可以反映植物的多态性指数, 而且可以评价引物反应多样性信息量的多少。本研究从 85 条插入/缺失引物中共筛选出 22 条多态性较好且能稳定扩增的引物。不同的引物所产生的条带数不同, 最多的为 8 条 (如引物插入/缺失-33590), 最少的为 1 条 (如引物插入/缺失-24033), 扩增的 DNA 片段大小范围为 75 ~ 500 bp, 除了插入/缺失-17370 (多态性条带大小为 500 bp 左右), 多态性条带大小均为 100 ~ 200 bp。22 条引物共扩增出 64 条带, 其中 27 条带表现出多态性, 平均每条引物扩增 2.78 条带, 平均多态性比例为 42.19% (表 1)。

基于插入/缺失扩增的 22 个多态性标记, 通过 NTSYS-pc (2.1 版) 软件对 96 份瓠瓜种质资源进行了聚类分析, 得到了基于插入/缺失的聚类树状

表1 插入/缺失引物多态性分析

引物编号	扩增总带数	多态性扩增 条带数	多态性比率/ %
插入/缺失-9470	4	1	25
插入/缺失-17370	3	1	33
插入/缺失-24033	1	1	100
插入/缺失-24849	2	1	50
插入/缺失-25208	5	2	40
插入/缺失-32260	2	1	50
插入/缺失-32630	2	1	50
插入/缺失-33188	2	1	50
插入/缺失-33590	8	2	25
插入/缺失-40571	6	1	17
插入/缺失-42061	3	1	33
插入/缺失-45015	1	1	100
插入/缺失-52443	1	1	100
插入/缺失-65626	3	2	67
插入/缺失-75892	2	1	50
插入/缺失-83521	5	2	40
插入/缺失-85024	2	1	50
插入/缺失-100187	2	1	50
插入/缺失-42722	3	2	67
插入/缺失-51166	3	1	33
插入/缺失-96511	3	1	33
插入/缺失-104571	1	1	100
总计	64	27	

图(图1)。瓠瓜种质之间的遗传距离(GD)变幅0~2.54。其中,LS73(丽水农家种)和LS82(金华农家种),LS12(广东早瓠瓜)和LS105(J077-1 I77①),LS2(孝感瓠子)和LS11(萧山圆蒲),LS9(东阳农家种1)和LS103(08扁蒲-1),LS25(武都瓠子)和LS61(花皮葫芦分离种)的GD均接近0.00,说明它们的亲缘关系极近。

从树状图中并无明显可作为分类标准的特性,但可以根据各种不同的趋势,将96份瓠瓜种质材料在遗传相似系数为0.68处分为8类(图1)。第1类与其他材料相似性系数最小,仅有0.36,即与其他材料的距离最远,仅有1份瓠瓜种质,即来自辽宁的小葫芦,该材料瓜型为单腰且较小,瓜长仅10cm左右。第2类也只有1份种质,来自宁夏的临夏瓠子,瓜型中长棒形,瓜色绿白,瓜条较长,早熟,该材料与其他材料相比地理来源较远,亲缘关系也较远。第3类同样只包括1份瓠瓜材料,为来自新疆的瓢葫芦,瓜色浅绿,瓜型为长把梨形且较小,瓜长19cm左右,早熟。第4类包括3份材料,分别为来自浙江的全华蒲瓜、肖长蒲和杭州长瓜,瓜型均为长棒形,瓜色绿色,瓜长45~50cm,早熟。第5类共有9份材料,均表现为早熟,

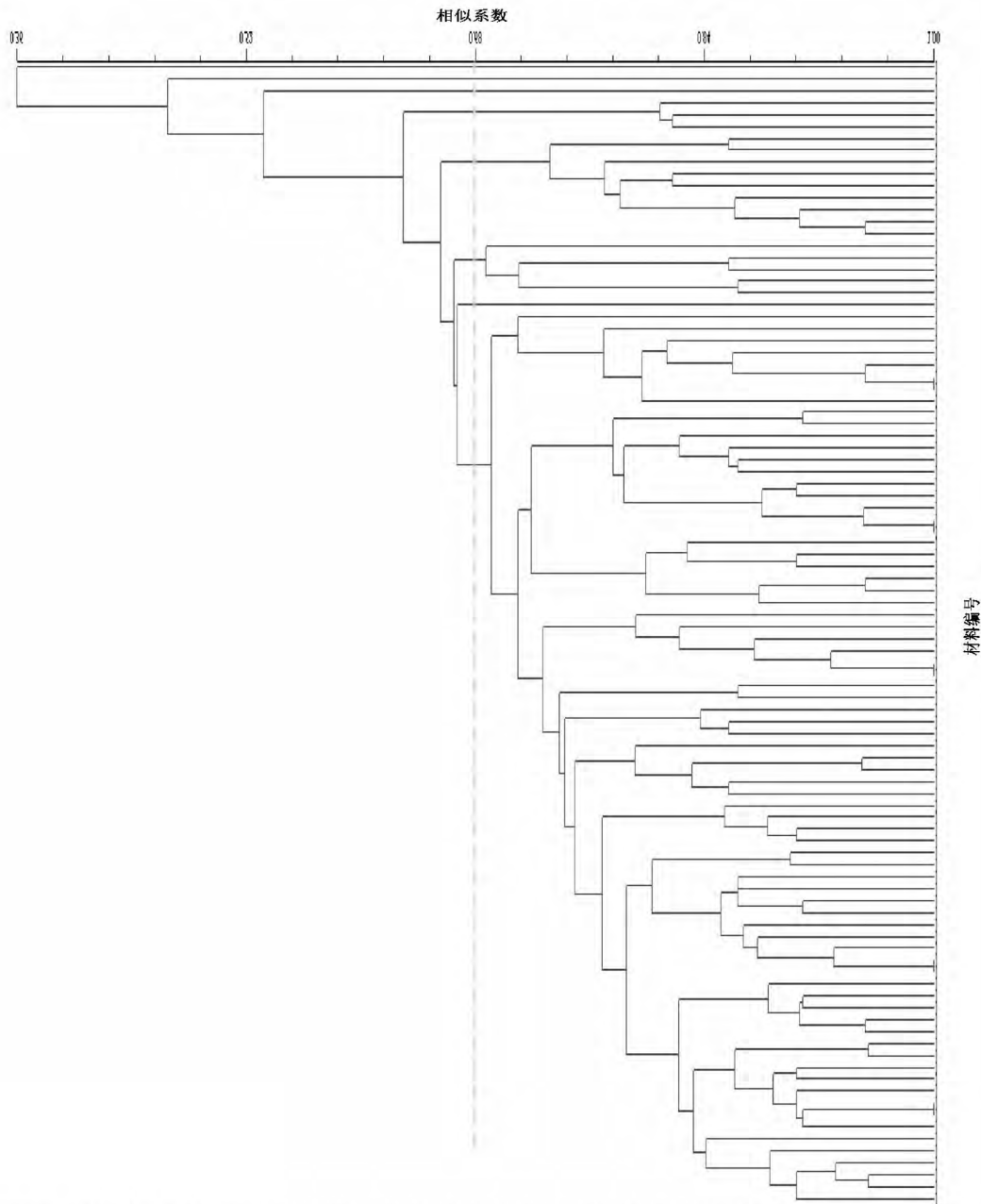
其中7份材料瓜色为绿白相间,而这7份材料中有5份材料的瓜型均为牛腿形,2份来自云南的材料也聚集在一起。第6类包括5份材料,分别为清秀、新蔡瓠瓜、麦瓠、南平青花插杆瓠、砧木。这组材料瓜色均表现为绿色,其中除砧木以外的4份材料瓜型为棒形,瓜长较短,早熟。第7类仅有1份材料,绍兴长蒲,瓜型棒形,瓜色油绿,瓜条较长(41cm),熟性较早。余下的75份材料被归为第8类,以瓜型不同又可细分为3组,第1组瓜型为棒形(除腰葫芦外),包括8份材料,瓜皮绿色,瓜长中等(25~35cm),早熟。第2组材料包括17份,瓜型多为牛腿形,近圆形有5份,占到近圆形材料总数的1/2;瓜色均表现为绿色,瓜长较短,熟期较晚,仅有的3份晚熟型的材料(火焰蒲、透年蒲和圆葫芦)均聚集在本组。第3组包括50份材料,来源较广泛,瓜型大部分为棒形,瓜色多变,以纯绿色为主,本试验中全部9份极早熟材料(萧山园蒲、长蒲1、长蒲2、长蒲3、长蒲4、津胜特选、湖南圆瓠1号、观赏瓠子分离种)均聚集在本组。

在主成分分析中,没有明显的可以作为分类标准的特征,材料较平均地分布于图中,但相对于产地而言,相同瓜型的材料有聚集在一起的趋势(图2)。上窄下宽的牛腿形、长把梨形材料,大部分集中分布在图左部和右上的位置;近圆形材料在图上分布较分散,但大部分集中分布在中间靠左的位置;棒筒形材料最多,集中在图中间部分,这与树状图的结果基本一致。

3 小结和讨论

我国瓠瓜资源众多,遗传变异非常丰富,但较为全面、系统的遗传多样性分析还比较少见。应用分子标记技术研究分析主栽品种的亲本与优良品系间的亲缘关系,可为瓠瓜育种实践中优化亲本选配,减少杂交组合数目,提高品种质量及育种效率提供依据。通常,在阐明种质资源的遗传多样性后,选择能最大程度代表物种遗传多样性的核心种质构成核心种质库是长期整合、保存种质基因资源、方便育种亲本选配的重要途径。

插入/缺失标记是指两亲本间在全基因组序列中的差异,在生物的遗传多样性分析、纯度鉴定、亲子分析等方面已有广泛的应用。然而,插入/缺失引物在蔬菜中应用较少,在瓜类中更加少见。本研究首次使用插入/缺失引物研究非模式物种——



材料编号由下向上依次为LS1, LS, LS 31, LS 87, LS 72, LS 53, LS 80, LS 10, LS73, LS82, LS35, LS84, LS98, LS 70, LS 77, LS 8, LS 48, LS 58, LS 67, LS 75, LS 12, LS 105, LS 94, LS 34, LS 38, LS 45, LS 104, LS 64, LS 101, LS 14, LS 57, LS 3, LS 5, LS 83, LS 4, LS 19, LS 60, LS 23, LS 24, LS 50, LS 6, LS 63, LS 68, LS 86, LS 88, LS 2, LS 11, LS 29, LS 46, LS 79, LS 66, LS 7, LS 17, LS 28, LS 13, LS 30, LS 97, LS 9, LS 103, LS 76, LS 81, LS 91, LS 55, LS 95, LS 96, LS 56, LS 16, LS 78, LS 22, LS 25, LS 61, LS 36, LS 65, LS 27, LS 106, LS 93, LS 90, LS 26, LS 33, LS 42, LS 54, LS 102, LS 21, LS 37, LS 32, LS 44, LS 47, LS 59, LS 69, LS 41, LS 99, LS 15, LS 40, LS 20, LS 71, LS 18和LS 43

图1 96份瓠瓜材料聚类分析树状图

瓠瓜的遗传多样性。Decker-Walters 等^[10]利用 38 个 RAPD 标记研究了世界范围内 74 个瓠瓜品系的遗传多样性,发现世界范围内瓠瓜可以大洲为界限划为不同类群,非洲、亚洲的瓠瓜种质相对独立,

新大陆(美洲)的种质起源于非洲,但受到亚洲种质的一些影响,而商业品种由于地理起源和遗传组成的差异有很大不同,由于这些品种的流通使得难以完整地界定某些品种。Yetisir 等^[11]利用形态

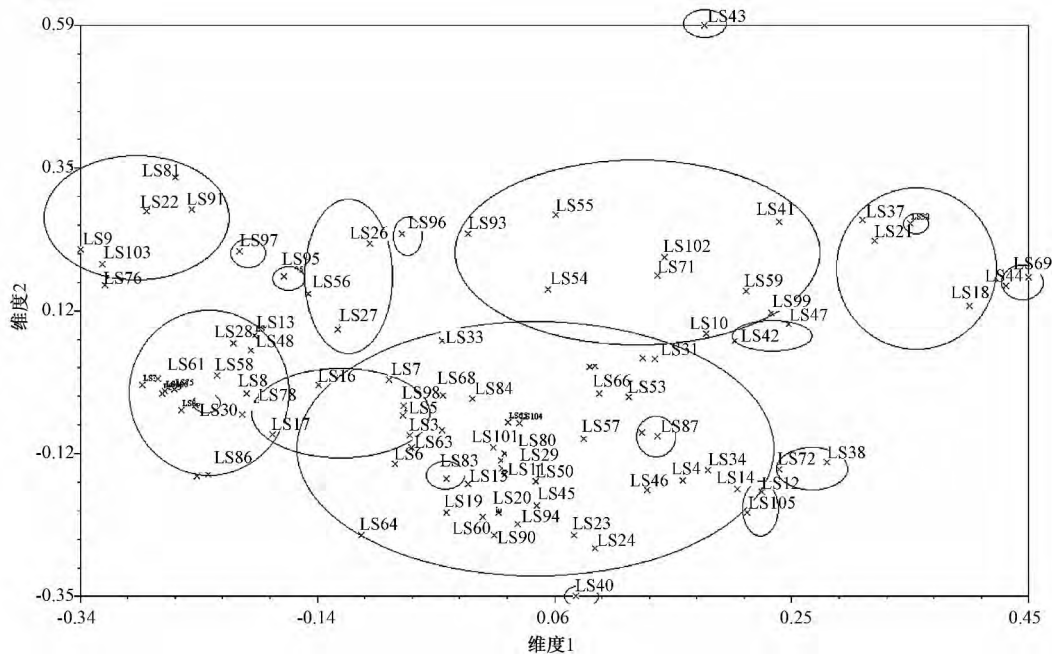


图2 96份瓠瓜材料插入/缺失聚类分析二维坐标图

学标记研究土耳其的182份瓠瓜的果实和种子材料,在统计学和多变量分析共同研究所得的数据基础上,发现瓜型和大小可以作为区分瓠瓜亚类的主要标准,这与本研究的结论一致。

本研究利用插入/缺失标记方法,从分子水平上对我国96份瓠瓜资源的遗传多样性及亲缘关系进行研究,可以为我国瓠瓜资源的合理开发利用以及进一步开展瓠瓜育种研究、指导亲本选配提供重要依据;同时可为瓠瓜种质的分类、核心种质库的构建,以及瓠瓜种质资源的进一步收集保存、创新利用提供分子水平上的依据,以缩短瓠瓜育种年限,提高育种效率。

参考文献:

- [1] Beevy S S, Kuriachan P. Chromosome numbers of south Indian Cucurbitaceae and a note on the cytological evolution in the family [J]. *Journal of Genetics and Cytology*, 1996, 31: 65-71.
- [2] Decker-Walters D S, Wilkins-Ellert M, Chung S M, et al. Discovery and genetic assessment of wild bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standley; Cucurbitaceae] from Zimbabwe [J]. *Economic Botany*, 2004, 58 (4): 501-508.
- [3] Lee J M. Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods, and benefits [J]. *HortScience*, 1994, 29 (4): 235-239.

- [4] 彭庆务,何晓明,谢大森,等.瓠瓜的特征特性及育种对策[J].*广东农业科学*,2003(1):18-19.
- [5] Yetisir H, Sari N. Effect of different rootstock on plant growth, yield and quality of watermelon [J]. *Animal Production Science*, 2003, 43 (10): 1269-1274.
- [6] 潭俊杰,蒋光明.蔬菜栽培学各论[M].北京:中国农业出版社,1999.
- [7] 吕家龙.蔬菜栽培学各论:南方本[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [8] Maguire T L, Collins G G, Sedgley M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12 (2): 106-109.
- [9] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36 (1): 181-186.
- [10] Decker-Walters D, Staub J, Lopez-Sese A, et al. Diversity in landraces and cultivars of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*; Cucurbitaceae) as assessed by random amplified polymorphic DNA [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2001, 48 (4): 369-380.
- [11] Yetisir H, Şakar M, Serce S. Collection and morphological characterization of *Lagenaria siceraria* germplasm from the Mediterranean region of Turkey [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2008, 55 (8): 1257-1266.

(责任编辑:高峻)