

# 应用 SRAP 标记绘制 88 份南瓜属 种质资源 DNA 指纹图谱

陶爱芬<sup>1</sup>, 魏嘉俊<sup>1</sup>, 刘 星<sup>1</sup>, 徐建堂<sup>1</sup>, 朱忠南<sup>2</sup>, 祁建民<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>教育部作物遗传育种与综合利用重点实验室/福建省分子设计育种实验室/福建农林大学, 福州 350002;

<sup>2</sup>上海市崇明县蔬菜科学技术推广站, 上海 202150)

**摘要:**为了给南瓜属种质资源鉴定和分类提供分子生物学依据,本研究采用 SRAP 分子标记技术与 DNAMAN 指纹图谱绘制软件对 88 份南瓜属种质资源(包含美洲南瓜、中国南瓜、印度南瓜)进行分子指纹图谱绘制。结果表明:35 对 SRAP 多态性引物共扩增出 499 条清晰条带,其中多态性条带 438 条,多态性条带比率高达 87.8%。根据扩增出的条带成功绘制出 88 份南瓜属种质资源的 DNA 指纹图谱,每一份种质都具有其独特的分子身份证,使得每份种质均可被区别开来。其中,多态性最好的引物是 E5EM8,可以同时绘制 72 份南瓜属种质资源的指纹图谱。所有供试材料用 5 对多态性 SRAP 引物即可全部区别开来。研究表明,SRAP 分子标记技术可成功地绘制南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱。本研究对南瓜属种质资源鉴别、分子数据库构建及品种权保护具有较重要的意义。

**关键词:**南瓜属; 金丝瓜; SRAP; DNA 指纹图谱

## Construction of Molecular Fingerprinting Map for 88 Accessions of *Cucurbita* by SRAP Markers

TAO Ai-fen<sup>1</sup>, WEI Jia-jun<sup>1</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>, XU Jian-tang<sup>1</sup>, ZHU Zhong-nan<sup>2</sup>, QI Jian-min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops/Fujian Provincial Key Laboratory of Crops by Design/Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

<sup>2</sup>Vegetable Technology Extension Station of Chongming County, Shanghai 202150)

**Abstract:** In order to provide molecular foundation for identification of *Cucurbita* L. germplasm, in present study, the molecular fingerprints of 88 accessions of *Cucurbita* L. including *C. pepo* L., *C. moschata* Duchesne and *C. maxima* Duchesne were mapped using SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) molecular markers technology and DNAMAN software. The results were as followed; the genome DNA of 88 *Cucurbita* L. germplasm were amplified by 35 pairs of SRAP primers selected from 200 pairs of primers. 499 bands were got totally, of which 438 were polymorphic bands, and the rate of polymorphic bands reached as high as 87.8%. DNA fingerprints of all these 88 *Cucurbita* L. germplasm were well constructed according to the amplified bands, and a unique molecular ID card was mapped for each species so that it can be identified successfully. Furthermore, the primer E5EM8, which had the best polymorphism, can distinguish 72 *Cucurbita* L. accession thoroughly. All the 88 *Cucurbita* L. germplasm could be identified using 5 pairs of SRAP primers. The results also showed DNA fingerprints of *Cucurbita* L. germplasm can be constructed successfully by SRAP molecular markers technique. This study had significance on identifying the accessions, constructing molecular database and protecting cultivar patent of *Cucurbita* L.

**Key words:** *Cucurbita* L.; spaghetti squash; SRAP; DNA fingerprints

收稿日期:2016-06-20 修回日期:2016-09-12 网络出版日期:2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1417.026.html>

基金项目:引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划项目)(2013-Z70);福建省高水平大学建设项目(612014005)

第一作者研究方向为经济作物遗传育种。E-mail:281770126@qq.com

通信作者:祁建民,研究方向为经济作物遗传育种与分子生物学。E-mail:qijm863@163.com

南瓜为葫芦科(Cucurbitaceae)南瓜属(*Cucurbita*)一年生草本植物,在世界各地广泛栽培,也是中国重要的蔬菜作物之一。南瓜属共有 27 个种,其中美洲南瓜(*C. pepo* L.)、中国南瓜(*C. moschata* Duchesne)和印度南瓜(*C. maxima* Duchesne)是主要的栽培种<sup>[1-2]</sup>。

南瓜属作物虽然在我国被广泛栽培,但目前育种方法相对落后,我国仅少数科研单位进行系统选育与鉴定研究。长期以来,大多数种子保存、引种与利用系通过民间自发进行<sup>[3]</sup>,因而导致南瓜属种质出现同种异名的现象,另外也使得南瓜属的遗传基础变得狭窄。研究表明,DNA 指纹图谱是进行种质资源鉴别的有效方法,由于其具有高度的变异性和稳定的遗传性,且仍按简单的孟德尔方式遗传,因此成为目前最具吸引力的生物鉴定技术<sup>[4]</sup>。近年来 DNA 指纹图谱技术广泛运用于小麦<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>、玉米<sup>[7]</sup>、棉花<sup>[8]</sup>等大宗作物和蔬菜、水果及纤维作物等多种经济作物种质鉴别研究上<sup>[9-11]</sup>。SRAP(Sequence Related Amplified Polymorphism)是较新型的

分子标记技术,具有稳定性高、重复性好、多态性丰富等优点<sup>[12]</sup>。目前 SRAP 技术已被广泛运用于 DNA 指纹图谱构建<sup>[13-14]</sup>、遗传多样性分析<sup>[15-16]</sup>与遗传连锁图谱构建等研究上<sup>[17-18]</sup>。

尽管前人对南瓜属资源进行了 DNA 指纹图谱绘制,但所用的种质资源数量有限,且来源地比较单一<sup>[19-20]</sup>。因此,本研究拟采用 SRAP 方法,绘制南瓜属 88 份种质资源的 DNA 指纹图谱,制作其分子身份证,为南瓜属品种鉴别、分子数据库构建及遗传多样性分析等研究提供可靠方法和有效依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试南瓜属种质资源共 88 份,主要来自上海崇明县蔬菜技术推广站与福建农林大学作物遗传改良研究所多年收集及选育的品种资源,包括 73 份美洲南瓜种质(其中 56 份为金丝瓜种质)、6 份中国南瓜种质和 9 份印度南瓜种质(表 1)。

表 1 南瓜属 3 个种的种质资源名称及来源

Table 1 The code, name and origin of *Cucurbita* L. germplasm used in this study

学名	编号	品种名	产地	学名	编号	品种名	产地
Species	Code	Name	Origin	Species	Code	Name	Origin
美洲南瓜	1	TWJ2211	中国台湾	美洲南瓜	22	TM	中国湖北
<i>C. pepo</i> L.	2	XA	中国西安	<i>C. pepo</i> L.	23	TM-2	中国湖北
	3	XJ	中国新疆		24	HLD	中国辽宁
	4	崇金 1 号	中国上海		25	BX	中国新疆
	5	HN01	中国湖南		26	BH	中国安徽
	6	XIE	中国北京		27	CM04	中国上海
	7	SD02	中国山东		28	CM05	中国上海
	8	CM31-1	中国上海		29	CM16	中国上海
	9	CM30	中国上海		30	CM26	中国上海
	10	CM30-2	中国上海		31	CM26-2	中国上海
	11	CM29	中国上海		32	CM31	中国上海
	12	CM28	中国上海		33	CM32	中国上海
	13	CM27	中国上海		34	30 变黄	中国上海
	14	CM27-2	中国上海		35	30-1	中国上海
	15	CM25	中国上海		36	30-2	中国上海
	16	CM06	中国上海		37	JA02	日本
	17	505	中国江西		38	3* -1	中国上海
	18	无蔓金丝瓜	中国江苏		39	3* -2	中国上海
	19	金丝搅瓜	中国江苏		40	HNO2	中国湖南
	20	福农 1 号	中国福建		41	乐山	中国四川
	21	福农 2 号	中国福建		42	B 小	中国上海

表 1(续)

学名	编号	品种名	产地	学名	编号	品种名	产地
Species	Code	Name	Origin	Species	Code	Name	Origin
美洲南瓜	43	2124	中国台湾	美洲南瓜	66	京胡一号	中国北京
<i>C. pepo</i> L.	44	LH	中国上海	<i>C. pepo</i> L.	67	墨帝	中国山东
	45	T2	中国湖北		68	金黄后	美国
	46	美丝	中国江苏		69	绿宝 2 号	中国山东
	47	美丝-2	中国江苏		70	金珠 F <sub>1</sub>	中国安徽
	48	501	中国江西		71	艺农	中国江苏
	49	B1	中国新疆		72	宝玉西葫芦	中国江苏
	50	CQ	中国重庆		73	美国绿丹	美国
	51	AH06	中国安徽	中国南瓜	74	pumpkin F <sub>1</sub>	英国
	52	AH07	中国安徽	<i>C. moschata</i>	75	一串铃	中国湖南
	53	AH08	中国安徽	Duchesne	76	武夷山本地	中国福建
	54	PAL	中国江苏		77	蜜枣 998	中国福建
	55	BW-1	中国上海		78	庭院南瓜	中国福建
	56	BW-2	中国上海		79	密本南瓜	中国浙江
	57	Marrow	英国	印度南瓜	80	Gnoss	英国
	58	Tiger Gross	英国	<i>C. maxima</i>	81	君川金粟	中国福建
	59	Buffernut	英国	Duchesne	82	美国大南瓜	美国
	60	新早青一号	中国陕西		83	绿皮南瓜	中国江西
	61	碧珠宝玉	中国江苏		84	短蔓红南瓜	美国
	62	雪玉	中国福建		85	胜粟	中国山西
	63	油亮西葫芦	中国福建		86	谢花面	中国山西
	64	欧宝 F <sub>1</sub>	法国		87	甜粟	中国安徽
	65	黑美丽	中国福建		88	黑冠军	印度

试验所用 SRAP 引物序列参考 G. Li 等<sup>[12]</sup>的文献,引物由上海生工生物技术有限公司合成。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 基因组 DNA 提取参照徐建堂等<sup>[21]</sup>改良的 CTAB 法,并通过琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。利用 DNA 微量测定仪检测其浓度和纯度,将 DNA 稀释至 25 ng/μL 并置于 -20 °C 冰箱保存。

**1.2.2 SRAP 分子标记分析** 利用从 200 对 SRAP 引物组合中筛选获得的 35 对多态性引物,对 88 份南瓜属种质的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增反应体系为 15.0 μL,其中 DNA 模板 3.0 μL,上下游引物各 0.75 μL, Mix 6.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 1 min,35 °C 1 min,72 °C 1 min,5 个循环;94 °C 1 min,52 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上检测。

**1.2.3 数据统计与分析** PCR 产物在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测,不同分子量大小的片段呈现不同的位置。根据同一水平上不同材料扩增片段标记来显示多态性的变化,读带时选取清晰的条带进行统计,“1”代表有条带,“0”代表没有条带,建立“0,1”数据矩阵,采用 DNAMAN 软件绘制供试材料的 DNA 指纹图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 多态性 SRAP 引物筛选及扩增结果

以供试南瓜属 3 个种中来源于不同地区且形态差异较大的 6 份材料的基因组 DNA 为模板,对 200 对 SRAP 引物组合进行 PCR 多态性扩增,经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,筛选获得 35 对多态性理想的 SRAP 引物(表 2)。采用此 35 对 SRAP 引物对 88 份南瓜属种质的基因组 DNA 进行 PCR 扩增(图 1),共扩增出 499 条清晰条带,其中多态性条带 438

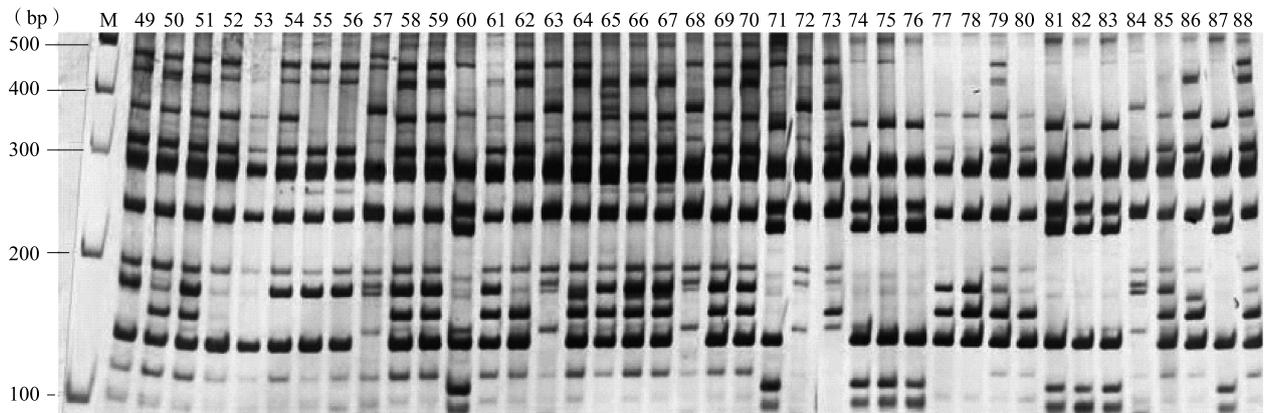
条,多态性条带比率高达 87.8%,平均每对引物扩增出的多态性条带数目为 12.5 条。研究表明,

SRAP 技术是对南瓜属资源进行分子标记相关研究的较理想的方法。

表 2 35 对 SRAP 引物的编号及序列

Table 2 The code and sequence of 35 pairs of SRAP primers used in present study

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence
E1EM1	TGAGTCCAAACCGGATA GACTGCGTACGAATTAAT	E9EM3	TGAGTCCAAACCGGAGG GACTGCGTACGAATTGAC
E1EM5	TGAGTCCAAACCGGATA GACTGCGTACGAATTAAC	E10EM5	TGAGTCCAAACCGGAAA GACTGCGTACGAATTAAC
E1EM6	TGAGTCCAAACCGGATA GACTGCGTACGAATTGCA	E12EM6	TGAGTCCAAACCGGAGA GACTGCGTACGAATTGCA
E3EM2	TGAGTCCAAACCGGAAT GACTGCGTACGAATTGCA	E12EM15	TGAGTCCAAACCGGAGA GACTGCGTACGAATTGAT
E3EM6	TGAGTCCAAACCGGAAT GACTGCGTACGAATTGCA	E14EM1	TGAGTCCAAACCGGTAG GACTGCGTACGAATTAAT
E3EM8	TGAGTCCAAACCGGAAT GACTGCGTACGAATTCAC	E14EM9	TGAGTCCAAACCGGTAG GACTGCGTACGAATTCAG
E3EM9	TGAGTCCAAACCGGAAT GACTGCGTACGAATTCAG	E14EM13	TGAGTCCAAACCGGTAG GACTGCGTACGAATTCTG
E3EM13	TGAGTCCAAACCGGAAT GACTGCGTACGAATTCTG	E15EM3	TGAGTCCAAACCGGCAT GACTGCGTACGAATTGAC
E4EM2	TGAGTCCAAACCGGACC GACTGCGTACGAATTGCA	E16EM8	TGAGTCCAAACCGGTCT GACTGCGTACGAATTCAC
E4EM3	TGAGTCCAAACCGGACC GACTGCGTACGAATTGAC	E16EM9	TGAGTCCAAACCGGTCT GACTGCGTACGAATTCAG
E4EM7	TGAGTCCAAACCGGACC GACTGCGTACGAATTCAA	E16EM10	TGAGTCCAAACCGGTCT GACTGCGTACGAATTCAT
E5EM8	TGAGTCCAAACCGGAAG GACTGCGTACGAATTCAC	E17EM5	TGAGTCCAAACCGGTAA GACTGCGTACGAATTAAC
E7EM6	TGAGTCCAAACCGGACG GACTGCGTACGAATTGCA	E17EM6	TGAGTCCAAACCGGTAA GACTGCGTACGAATTGCA
E7EM13	TGAGTCCAAACCGGACG GACTGCGTACGAATTCTG	E17EM11	TGAGTCCAAACCGGTAA GACTGCGTACGAATTCTA
E8EM3	TGAGTCCAAACCGGACT GACTGCGTACGAATTGAC	E18EM5	TGAGTCCAAACCGGTCC GACTGCGTACGAATTAAC
E8EM6	TGAGTCCAAACCGGACT GACTGCGTACGAATTGCA	E18EM6	TGAGTCCAAACCGGTCC GACTGCGTACGAATTGCA
E8EM13	TGAGTCCAAACCGGACT GACTGCGTACGAATTCTG	E18EM10	TGAGTCCAAACCGGTCC GACTGCGTACGAATTCAT
E9EM4	TGAGTCCAAACCGGAGG GACTGCGTACGAATTTGA		



49 ~ 88 : 试验所用的南瓜属种质资源编号

No. 49-88 represents different code of *Cucurbita* L. germplasm used in this study, M: Marker

图 1 引物 E4EM3 的部分扩增结果

Fig.1 Amplified result of primer E4EM3

## 2.2 SRAP 引物对供试种质资源的鉴别效果分析

采用 DNAMAN 软件对 35 对 SRAP 引物的扩增条带进行分析,绘制了 88 份南瓜属种质资源的 DNA 指纹图谱。研究表明,35 对引物可鉴别不

同数目的南瓜属种质,均为有效引物。所用引物中,大部分引物能鉴别的种质数目在 20 ~ 50 之间,但不同引物对种质资源的鉴别能力差别较大(表 3),其中引物 E5EM8 可同时鉴别 72 份种质资源,为鉴别

表 3 35 对 SRAP 引物所能鉴别的南瓜属种质资源的数目

Table 3 Numbers of specific germplasm resources of *Cucurbita* L. detected by 35 pairs of SRAP primers

引物名称 Name of primers	种质数量 Total numbers of germplasm	可以鉴别 的种质数目 Identified numbers of germplasm	引物名称 Name of primers	种质数量 Total numbers of germplasm	可以鉴别 的种质数目 Identified numbers of germplasm
E1EM1	88	48	E9EM13	88	26
E1EM5	88	51	E10EM5	88	42
E1EM6	88	12	E12EM6	88	11
E3EM2	88	28	E12EM15	88	32
E3EM6	88	38	E14EM1	88	32
E3EM8	88	44	E14EM9	88	38
E3EM9	88	20	E14EM13	88	18
E3EM13	88	30	E15EM3	88	24
E4EM2	88	34	E16EM8	88	17
E4EM3	88	26	E16EM9	88	12
E4EM7	88	11	E16EM10	88	42
E5EM8	88	72	E17EM5	88	23
E7EM6	88	20	E17EM6	88	13
E7EM13	88	37	E17EM11	88	54
E8EM3	88	24	E18EM5	88	26
E8EM6	88	28	E18EM6	88	36

表3(续)

引物名称 Name of primers	种质数量 Total numbers of germplasm	可以鉴别 的种质数目 Identified numbers of germplasm	引物名称 Name of primers	种质数量 Total numbers of germplasm	可以鉴别 的种质数目 Identified numbers of germplasm
E8EM13	88	36	E18EM10	88	11
E9EM4	88	15			

效果最理想的 SRAP 引物。其次,引物 E17EM11 可同时鉴别 54 份资源, E1EM5 能鉴别 51 份资源, 亦为鉴别效果理想的 SRAP 引物。个别引物能鉴别的资源数目较少, 如引物 E4EM7、E12EM6 和 E18EM10 能鉴别的资源数目均为 11 份, E1EM6 和 E16EM9 则分别能鉴别 12 份资源。值得一提的是, 引物 E14EM9 能够同时鉴别供试材料中所有的中国南瓜及印度南瓜资源, 亦可同时鉴别除 56 份金丝瓜资源(1~56号)之外的绝大部分美洲南瓜资源(金皇后、宝玉西葫芦除外)。分析结果还表明, 所有供试的 88 份资源最少仅用 5 对 SRAP 引物即可区别开来, 这 5 对引物分别是 E5EM8、E17EM11、E1EM5、E1EM1 和 E16EM10。

### 2.3 供试南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱分析

指纹图谱绘制结果表明, 大多数供试材料的指纹图谱存在明显差异, 但其中有的种质资源相互之间仅存在一个谱带位点上的差异(图2), 如 Tiger Gross 与 Buffernut、黑美丽与京胡1号、pumpkin F<sub>1</sub> 与一串铃及武夷山本地、庭院南瓜与蜜本南瓜及蜜枣

998、胜粟与谢花面、AH06 与 AH07 及 AH08、TM 与 TM-2、CM31 与 CM32、30 变黄与 30-1、3\*-1 与 3\*-2 等品种资源每 2 份或 3 份之间的 DNA 指纹图谱仅存在一个谱带位点上的差异, 说明其亲缘关系较近, 遗传差异性不大。并且我们发现这些分子水平上遗传差异较小的种质资源大部分有相同的来源地, 但也有少数种质来源于不同国家或地区。如 pumpkin F<sub>1</sub>、一串铃与武夷山本地等 3 份种质, 分别来自英国、中国湖南和福建等 3 个不同地区, 但是它们的 DNA 指纹图谱相互之间仅存在一个谱带位点的差异, 说明它们虽然来自不同地区, 但在分子水平上的遗传差异较小, 这一现象可能与引种利用及人工驯化有关。pumpkin F<sub>1</sub> 虽然系从英国引进, 但其与一串铃和武夷山本地一样, 在分类上均属于中国南瓜, 并且从名称上判断, 其应为南瓜的后代品系而非成熟的品种, 因此推测 pumpkin F<sub>1</sub> 的亲本可能来自中国或者和中国的南瓜有亲缘关系, 这应该是导致这 3 份种质在分子水平上遗传差异较小的原因。

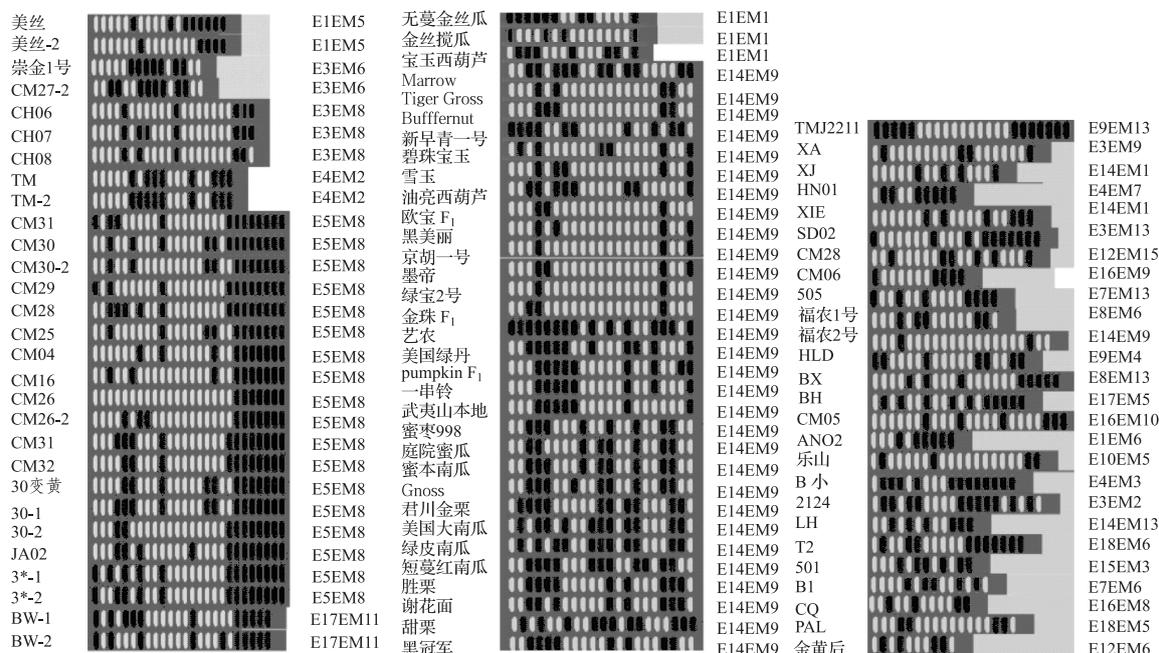


图2 88份南瓜属种质资源的DNA指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprints of 88 accessions of *Cucurbita* L.

另外,在供试材料中,TWJ2211、XA、XIE、福农 1 号、福农 2 号、HLD、BX 等资源的 DNA 指纹多态位点与其他种质差别较明显,表明其在分子水平上与其他种质资源的遗传差异较大,亲缘关系较远,同时表明供试材料具有较丰富的遗传多样性。

### 3 讨论

南瓜属作物被引进中国栽培已有 500 多年的历史,通过长期的引种、自然杂交和创新利用,已经形成了各具特色的品种,具有丰富的品种资源。但目前品种保存、引种与利用大多通过农户自发进行<sup>[3]</sup>,因而导致其存在同种异名或无法准确定名的现象。研究表明,DNA 指纹图谱可简洁明了地表达多态性位点的遗传信息<sup>[13]</sup>,是进行种质资源鉴别的有效方法。近年来,南瓜属 DNA 指纹图谱绘制的研究取得了一些进展,如云天海等<sup>[19]</sup>采用 SRAP 结合 ISSR 分析的方法,绘制了 28 份海南农家品种南瓜的指纹图谱,刘泽发<sup>[20]</sup>采用 SRAP 与 RSAP 结合的方法,绘制了 4 份印度南瓜的指纹图谱。但前人的研究中用来绘制 DNA 指纹图谱的种质资源数目较少且地域性较强,难以构建南瓜属核心种质的分子数据库。而本研究成功绘制了 88 份南瓜属资源的 DNA 指纹图谱,研究结果可为南瓜属遗传资源鉴定与评价、品种保护和利用及分子辅助育种等提供科学依据及有益参考。

利用分子标记技术获得品种的指纹图谱是目前品种鉴定技术的主要手段。由于不同的分子标记具有各自的特点,因此选择合适的分子标记或将不同标记结合使用是进行品种指纹图谱构建时应考虑的首要问题<sup>[14]</sup>。与 ISSR、RAPD 等标记相比,SRAP 标记具有稳定性高、特异性好、多态性丰富和费用相对低廉等优点<sup>[13]</sup>,已广泛应用到多种作物的指纹图谱绘制研究上<sup>[22-24]</sup>。本研究采用 35 对多态性 SRAP 引物对 88 份南瓜属种质资源进行分析,结果表明,所有引物均为有效引物,平均每对多态性引物可获得 29 个品种的 DNA 指纹。多态性最好的引物可同时鉴别 72 份资源,多态性最低的引物亦可同时鉴别 11 份资源,而且 88 份资源最少用 5 对 SRAP 多态性引物即可全部区别开来。而利用分子标记构建 DNA 指纹图谱,遵循的原则之一是可重复和简单,以降低成本和提高检测效率<sup>[19]</sup>。由上可见,SRAP 技术是绘制南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱的有效方法。值得注意的是,近年来,由于测序技术的发展,促进了基于序列变异基础上的单核苷酸多态性

(SNP)分子标记的开发<sup>[25]</sup>。由于 SNP 标记具有更加丰富、准确和稳定的特点,因此已成为目前更有效的遗传标记方法<sup>[26-27]</sup>。但截止到 2016 年 3 月份,在 NCBI 上发表的南瓜属 EST 序列仅 1542 条,远少于同为葫芦科的黄瓜属的 140590 条及西瓜属的 12617 条,因此根据南瓜基因组序列所开发的引物较少,限制了 SNP 分子标记在南瓜属上的应用<sup>[28]</sup>。鉴于 SNP 等新型分子标记独特的优点,今后应加强其引物开发的研究,在构建南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱时,结合包括 SNP 等第三代新型标记在内的多种分子标记进行,以便为南瓜属遗传资源的鉴定和保护利用等提供全面的分子水平上的信息。

DNA 指纹图谱的绘制不仅可为品种鉴别提供有效方法,而且能为研究作物的遗传多样性与亲缘关系提供科学依据。一般来说,DNA 指纹图谱差异较大的种质资源分子水平上的遗传差异较大,亲缘关系较远,反之亦然。本研究中 88 份南瓜属资源 DNA 指纹图谱的差异性和多样性,揭示出供试南瓜属资源具有较丰富的遗传多样性。同时,本研究还表明,基因源的遗传关系与其地理分布有一定的相关性。本研究中 DNA 指纹图谱与其他种质差异较大的供试材料,其来源地和生态环境亦相差较大。一般来说,生态环境不同、经纬度相差较大、地理分布不同的地区或国家,其资源群体间遗传差异较大,这与前人在其他作物上的研究结果一致<sup>[29]</sup>。另外,我们发现 DNA 指纹图谱差异较小的种质资源大部分来源于相同的地区,推断这一现象与地域性自然选择或自然杂交有关。但是,也有少数指纹图谱差异较小的供试种质来源地不同,推测这一现象可能由引种利用及人工驯化等人为因素引起。

综上所述,本研究采用 SRAP 标记方法成功绘制了 88 份南瓜属品种资源的 DNA 指纹图谱,得到了其独特的分子身份证,完善了南瓜属种质资源 DNA 指纹图谱数据库,为南瓜属品种资源的鉴定、品种权保护和遗传多样性分析等提供了有效方法和可靠依据。

### 参考文献

- [1] Gong L, Paris H S, Stift G, et al. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita* as viewed with simple sequence repeat polymorphisms: the centrality of *C. okeechobeensis* [J]. Genet Resour Crop Ev, 2013, 60(4): 1531-1546
- [2] Whitaker T W, Bemis W P. Origin and evolution of the cultivated *Cucurbita* [J]. Bull Torrey Bot Club, 1975, 102: 362-368
- [3] 刘星, 祁建民, 朱忠南, 等. 应用 SRAP 标记分析金丝瓜 (*Cucurbita pepo* L.) 种质资源遗传多样性与亲缘关系 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1172-1178

- [4] 梅洪娟,马瑞君,庄东红. 指纹图谱技术及其在植物种质资源中的应用[J]. 广东农业科学,2014(3):159-164
- [5] 李莉,王俊峰,颜廷进,等. 基于 SSR 标记的山东省小麦 DNA 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(3):537-541
- [6] 武文,邓启云,周丽洁,等. 利用 SSR 分子标记构建 Y58S 及部分重要两系杂交水稻亲本的 DNA 指纹图谱[J]. 杂交水稻,2008(3):52-56
- [7] 余花娣. 基于 SSR 标记的玉米品种 DNA 指纹图谱的构建[D]. 保定:河北农业大学,2004
- [8] 匡猛,杨伟华,许红霞,等. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(1):20-27
- [9] 张婉,崔继哲,于拴仓,等. 白菜品种的 SSR 指纹图谱数据库的构建[J]. 分子植物育种,2013,11(6):843-857
- [10] 宋海斌,崔喜波,马鸿艳,等. 基于 SSR 标记的甜瓜品种(系) DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学,2012,45(13):2676-2689
- [11] 汪斌,祁伟,兰涛,等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报,2011,37(6):1116-1123
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*,2001,103(2-3):455-461
- [13] 华树妹,贺佩珍,陈芝华,等. 应用 SRAP 标记构建山药种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):597-603
- [14] 齐兰,王文泉,张振文,等. 利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报,2010,36(10):1642-1648
- [15] Wu Y G, Guo Q S, He J C, et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers [J]. *Biochem System Ecol*,2010,38(1):63-72
- [16] Liu L J, Peng D X, Wang B. Genetic relation analysis on ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud.) inbred lines by SRAP markers [J]. *Agric Sci China*,2008,7(8):944-949
- [17] Gao L X, Liu N, Huang B H, et al. Phylogenetic analysis and genetic mapping of Chinese *Hedychium* using SRAP markers [J]. *Sci Hort*,2008,117(4):369-377
- [18] 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
- [19] 云天海,郑道君,谢良商,等. 中国南瓜海南农家品种间的遗传特异性分析和 DNA 指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(4):679-685
- [20] 刘泽发. 印度南瓜 (*C. maxima* L.) 品种指纹图谱及其在种子纯度检测中的应用[D]. 长沙:湖南农业大学,2009
- [21] 徐建堂,祁建民,陈涛,等. 适合于胞质基因组扩增的红麻成熟叶片 DNA 提取改良方法[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):347-351
- [22] 王晓飞,陈建华,栾明宝,等. 苧麻种质资源分子身份证构建的初步研究[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(6):802-805
- [23] 徐宗大,赵兰勇,张玲,等. 玫瑰 SRAP 遗传多样性分析与品种指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2011,44(8):1662-1669
- [24] Liu L W, Zhao L P, Cong 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(3):240-247
- [25] Hyten D L, Cannon S B, Song Q, et al. High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence [J]. *BMC Genomics*,2010,11(1):38
- [26] Troggo M, Malacarne G, Coppola G, et al. A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs [J]. *Genetics*,2007,176(4):2637-2650
- [27] Liu J, Huang S, Sun M, et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application [J]. *Plant Methods*,2012,8(1):34
- [28] 葛宇,韩文昊,刘大伟. 南瓜属作物育种研究回顾和展望[J]. 中国蔬菜,2016(4):12-21
- [29] 巫桂芬,徐鲜钧,徐建堂,等. 利用 SRAP, ISSR, SSR 标记绘制黄麻基因源分子指纹图谱[J]. 作物学报,2015,41(3):367-377