

黄瓜栽培种、近缘野生种、种间杂种及其回交后代的 RAPD 分析

庄飞云 陈劲枫*

(作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学蔬菜研究所, 南京 210095)

摘 要: 以黄瓜栽培种、黄瓜野生变种、近缘野生种、种间杂种及其与黄瓜回交自交的后代以及甜瓜为试材, 采用 RAPD 方法探讨其亲缘关系。对 23 份试材进行扩增, 筛选出 31 条随机引物的扩增产物进行结果分析, 共产生 375 个位点, 具多态性位点占 90.0%, 平均每条扩增出 6.3 条。通过 UPGMA 聚类分析, 以遗传距离 0.37 为阈值, 可将 23 份试材归为黄瓜、近缘野生种、种间杂种及甜瓜亚属种 4 类。

关键词: 黄瓜; 种间杂交; 亲缘关系; RAPD

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2003) 01-0047-04

在现行分类系统下, *Cucumis* 属被分为甜瓜亚属 (subgen. *Melo*) 和黄瓜亚属 (subgen. *Cucumis*), 主要是依据地理起源和染色体基数关系理论^[1]。根据这一理论, 甜瓜亚属由起源于非洲, 并且染色体基数为 $x=12$ 的 29 个种组成; 而黄瓜亚属仅由起源于亚洲, 并且染色体基数为 $x=7$ 的一个种组成^[2]。对于 *Cucumis* 属物种亲缘关系及分类研究已有较多报道, 但对野生种 *C. hystrix* Chakr. 研究较少。Kirkbride 只是依据其 (植物干标本) 形态与黄瓜很相似, 将其归入黄瓜亚属中^[2]。陈劲枫等通过染色体计数发现 *C. hystrix* 染色体数与甜瓜亚属物种相同, $2n=24$, 而不是黄瓜亚属的 $2n=14$; 然而进一步的同工酶及杂交亲和性研究却证明其与栽培黄瓜 (*C. sativus* L., $2n=14$) 有较近的亲缘关系, 与甜瓜 (*C. melo* L., $2n=24$) 较远^[3,4]。这些研究无疑对 Jeffery 的染色体基数理论^[1]及 Kirkbride 的 *Cucumis* 属分类系统^[2]提出了质疑。作者在上述研究基础上进行本研究, 旨在以不同类型栽培黄瓜、黄瓜野生变种 (*C. sativus* var. *hardwickii*)、近缘野生种、种间杂种 (*C. ×hytivus* Chen & Kirkbride, $2n=38$) 及其后代, 以及甜瓜为试材, 通过 RAPD 分析探讨各种试材间的亲缘关系, 为 *C. hystrix* 及种间杂种 *C. ×hytivus* 在分类系统中精确定位提供理论依据。

1 材料与方法

参试材料及其代号见表 1。H1-2、H3-4 和 H6 来自于原始种间杂种 3 个不同株系的自交后代, C1-1-14, C1-3-15, C1-1-17 为种间杂种与栽培黄瓜回交一代 (BC_1) 后, 再自交二代获得的不同单株 (BC_1S_2)。M1 和 M3 为两种栽培甜瓜, 作为外源群体。各试材于 2001 年 2 月 20 日在南京农业大学蔬菜试验地育苗, 3 月 25 日定植于大田, 5 月底取材。

各种类型植株分别选取 15 株, 取刚展开叶 5 g, 采用 CTAB 法提取总基因组 DNA, 用氯化锂 (终浓度为 2.5 mol/L) 沉淀 RNA 进行初步纯化, 加入 RNase A (至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min) 进行再纯化, 将 DNA 浓度稀释至 20 ng/ μL 进行 PCR 扩增。

选用上海生工的 11 组随机引物 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, K, 和 N)。每个反应体系为

收稿日期: 2002-01-23; 修回日期: 2002-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170644); 国家高技术研究发展计划项目 (2001AA241123, 2002AA241251, 2002AA207012); 教育部跨世纪优秀人才培养计划项目; 教育部科学技术研究重点项目 (重点 01097); 教育部留学回国人员科研启动基金项目

*通讯作者 (Author for correspondence)

20 μL , 包括 Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl_2 2.5 mmol/L, 4 种核苷酸各为 150 $\mu\text{mol/L}$ (大连宝生物产品), 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 40 ng, 1.0 U 的 Tag DNA 聚合酶 (上海生工产品)。在 PTC-100 PCR 仪 (MJ, 美国) 中进行, 反应程序参照 Staub^[6] 的条件进行。

反应产物在含有 EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 紫外灯下检测拍照, 并用 SX-100 图像摄像系统 (上海四星) 进行扫描, 估算条带的分子量。以 “0” 和 “1” 统计各位点条带, 应用 Jaccard 公式 $J_{ij} = a / (a + b)$, a 为两种共同拥有的条带数, b 为仅在一个种中出现的条带数总和, 计算各试材间的相似系数, 遗传距离为 $D = 1 - J_{ij}$, 采用 PHYLIP 3.5c 版本软件对群体进行 UPGMA 聚类分析。

表 1 不同参试材料及其编号

Table 1 Cucumis species and varieties in the study

代号 Assigned code	品种或类型 Name	类型 Type	来源 * Source	染色体数 Chromosome number
AC1	A309	美国盐渍型 American pickling	1	$2n = 2x = 14$
AC2	GY14	美国雌性系 American gynocious	1	$2n = 2x = 14$
AC3	PI22289	美国盐渍型 American pickling	1	$2n = 2x = 14$
CC1	二早子 Erzhaizi	华南型 Southern China	2	$2n = 2x = 14$
CC2	白丝条 Baisitiao	华南型 Southern China	2	$2n = 2x = 14$
CC3	北京截头 Beijing jietou	华北型 Northern China	2	$2n = 2x = 14$
CC4	津研 4 号 Jinyan No. 4	华北型 Northern China	2	$2n = 2x = 14$
CC5	西双版纳黄瓜 1 var. <i>xishuangbannensis</i> sample 1	西南型 Southwestern China	2	$2n = 2x = 14$
CC6	西双版纳黄瓜 2 var. <i>xishuangbannensis</i> sample 2	西南型 Southwestern China	2	$2n = 2x = 14$
CC7	西双版纳黄瓜 3 var. <i>xishuangbannensis</i> sample 3	西南型 Southwestern China	2	$2n = 2x = 14$
EC1	戴多星 Deltastar	欧洲温室型 European greenhouse	3	$2n = 2x = 14$
EC2	荷蒙 Harmonie	欧洲盐渍型 European pickling	3	$2n = 2x = 14$
EC3	康德 Condesa	欧洲温室型 European greenhouse	3	$2n = 2x = 14$
WC1	var. <i>hardwichi</i>	野生黄瓜变种 Wild cucumber variety	1	$2n = 2x = 14$
C1-1-14	回交自交株系 1 <i>C. ×hytivus</i> × <i>C. sativus</i> line 1	遗传改良型 Genetically-improved cucumber	4	$2n = 2x = 14$
C1-3-15	回交自交株系 2 <i>C. ×hytivus</i> × <i>C. sativus</i> line 2	遗传改良型 Genetically-improved cucumber	4	$2n = 2x = 14$
C1-1-17	回交自交株系 3 <i>C. ×hytivus</i> × <i>C. sativus</i> line 3	遗传改良型 Genetically-improved cucumber	4	$2n = 2x = 14$
H1-2	种间杂交种株系 1 <i>C. ×hytivus</i> line 1	种间杂交种 Interspecific hybrid	4	$2n = 4x = 38$
H3-4	种间杂交种株系 2 <i>C. ×hytivus</i> line 2	种间杂交种 Interspecific hybrid	4	$2n = 4x = 38$
H6	种间杂交种株系 3 <i>C. ×hytivus</i> line 3	种间杂交种 Interspecific hybrid	4	$2n = 4x = 38$
S1	野生种酸黄瓜 <i>C. hystrix</i>	近缘野生种 Wild species	4	$2n = 2x = 24$
M1	灯瓜 Denggua	甜瓜变种 Melo variety	4	$2n = 2x = 24$
M3	黄河蜜 Huanghe mi	栽培甜瓜 Cultivated melon	2	$2n = 2x = 24$

*1. 美国威斯康辛大学园艺系; 2. 中国农科院蔬菜花卉所; 3. 荷兰瑞克斯旺种子; 4. 南京农业大学蔬菜研究所。

*1. Department of Horticulture, University of Wisconsin-Madison, USA; 2. Institute of Vegetable Crops and Flowers, the Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. Rijkswaanz Seed Company, Holland; 4. Vegetable Research Institute, Nanjing Agricultural University.

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记结果

从 220 条随机引物中初选出 80 条引物, 对 23 份供试材料进行再扩增, 筛选出 31 条引物 (A-01, A-02, A-03, A-09, A-11, A-15, B-01, B-10, C-05, D-07, D-11, D-20, E-01, E-03, E-07, E-14, E-19, E-20, F-04, G-04, G-05, G-08, G-09, G-11, G-15, G-16, F-01, F-17, K-02, K-06 和 N-15) 进行结果分析, 平均每条引物扩增出 6.3 条。其中 9 条引物 (A-11、A-15、E-03、E-19、F-04、G-05、G-16、F-01、和 K-06) 产生 11 条 *C. hystrix* 特征带, 两条引物 A-15 和 N-15 产生 3 条 *C. ×hytivus* 特征带。图 1 为引物 A-15 扩增的图谱, 2 000 bp 和 480 bp 条带为种间杂种的特征带。

在供试材料中, 共扩出 375 个 RAPD 位点, 其中具多态性位点达到 90.0%。而以黄瓜栽培种、黄瓜野生变种及 BC₁S₂ (种间杂种与栽培黄瓜回交 1 代再自交 2 代) 等 17 份材料统计, 共有 251 个位

点, 其中多态性位点 120 个, 占 47.8%, 高于前人仅以不同类型栽培黄瓜统计的 36.0% 的结果^[6]。

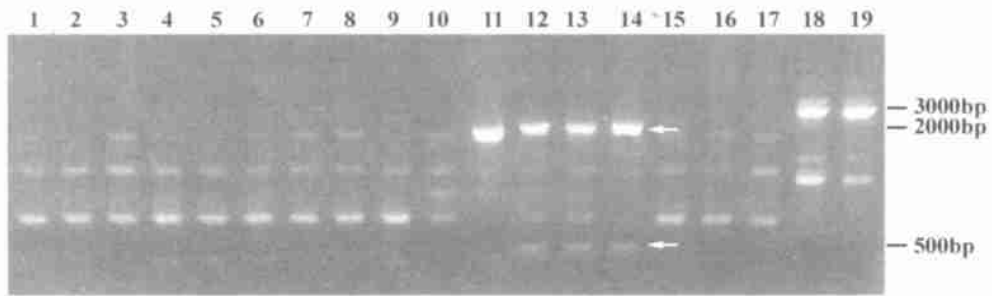


图 1 引物 A-15 以部分模板扩增的 RAPD 图谱

2 000 bp 和 480 bp 箭头所指为种间杂种 *C. xhytivus* 的两条特征带

Fig. 1 The primer of A-15 RAPD pattern with party of templates

1: AC1; 2: AC2; 3: CC1; 4: CC2; 5: CC3; 6: CC5; 7: CC6; 8: EC1; 9: EC2; 10: WC1; 11: S1; 12: HI-2; 13: H3-4; 14: H6; 15: CI-1-14; 16: CI-3-15; 17: CI-1-17; 18: MI; 19: M3。

The arrows indicate the specific fragments of *C. xhytivus* at 2 000 bp and 480 bp

从表 2 可看出, 野生种 *C. hystrix* 与黄瓜栽培种及野生黄瓜变种间的平均距离 D 值为 0.56 (变化范围为 0.54~0.58), 而与甜瓜栽培种间的平均 D 值 0.69, 黄瓜与甜瓜之间的平均 D 值为 0.71 (范围为 0.69~0.74), 这说明三者之间遗传距离都较远, 但 *C. hystrix* 与 *C. sativus* 之间的亲缘关系稍近, 与以前同工酶研究结果^[3]一致。种间杂种 *C. xhytivus* 与黄瓜栽培种及野生黄瓜变种间的平均 D 值为 0.35 (0.31~0.40), 比其后代 BC₁S₂ 与黄瓜间的平均 D 值 0.28 (0.22~0.34) 相对较大, 但两者都显著比黄瓜栽培种内的平均 D 值 0.18 (0.06~0.25) 高。

表 2 不同试材间的遗传距离

Table 2 The genetic distance among different cultigens

Code	AC1	AC2	AC3	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6	CC7	EC1	EC2	EC3	WC1	CI-1-14	CI-3-15	CI-1-17	HI-2	H3-4	H6	S1	MI	M3
AC1	0.00																						
AC2	0.19	0.00																					
AC3	0.16	0.19	0.00																				
CC1	0.18	0.19	0.20	0.00																			
CC2	0.15	0.21	0.18	0.10	0.00																		
CC3	0.17	0.21	0.19	0.13	0.09	0.00																	
CC4	0.17	0.21	0.20	0.14	0.09	0.07	0.00																
CC5	0.20	0.25	0.19	0.17	0.19	0.20	0.18	0.00															
CC6	0.18	0.25	0.18	0.17	0.19	0.19	0.20	0.09	0.00														
CC7	0.19	0.24	0.19	0.15	0.14	0.16	0.17	0.11	0.06	0.00													
EC1	0.14	0.17	0.14	0.18	0.17	0.18	0.18	0.18	0.17	0.19	0.00												
EC2	0.14	0.14	0.13	0.19	0.17	0.17	0.17	0.21	0.19	0.20	0.05	0.00											
EC3	0.16	0.17	0.15	0.18	0.17	0.16	0.16	0.17	0.20	0.18	0.14	0.13	0.00										
WC1	0.27	0.29	0.25	0.23	0.24	0.24	0.23	0.25	0.26	0.25	0.27	0.25	0.24	0.00									
CI-1-14	0.27	0.28	0.28	0.27	0.25	0.24	0.25	0.28	0.31	0.28	0.27	0.27	0.26	0.31	0.00								
CI-3-15	0.25	0.30	0.27	0.27	0.22	0.22	0.23	0.27	0.29	0.26	0.24	0.24	0.27	0.31	0.08	0.00							
CI-1-17	0.26	0.30	0.26	0.29	0.27	0.27	0.25	0.26	0.30	0.28	0.25	0.24	0.25	0.34	0.17	0.13	0.00						
HI-2	0.33	0.35	0.36	0.35	0.33	0.34	0.31	0.33	0.33	0.34	0.35	0.34	0.35	0.35	0.31	0.30	0.33	0.00					
H3-4	0.34	0.34	0.37	0.35	0.34	0.34	0.31	0.35	0.35	0.34	0.36	0.34	0.37	0.38	0.30	0.30	0.33	0.10	0.00				
H6	0.37	0.36	0.38	0.36	0.36	0.37	0.34	0.37	0.36	0.35	0.36	0.36	0.39	0.40	0.31	0.30	0.35	0.17	0.13	0.00			
S1	0.56	0.58	0.57	0.56	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.54	0.56	0.56	0.59	0.41	0.40	0.42	0.00		
MI	0.70	0.71	0.70	0.71	0.70	0.71	0.70	0.70	0.71	0.72	0.70	0.71	0.69	0.70	0.71	0.71	0.70	0.68	0.68	0.70	0.67	0.00	
M3	0.71	0.72	0.73	0.72	0.71	0.71	0.70	0.72	0.73	0.74	0.72	0.72	0.69	0.72	0.73	0.73	0.72	0.70	0.70	0.69	0.71	0.21	0.00

注: 材料编号的品种名见表 1。Note: For assigned code see table 1.

2.2 聚类结果分析

通过聚类分析,以 0.37 为阈值,可将 23 份试材分为 4 类(图 2):两个栽培甜瓜品种归为第 1 类;野生种 *C. hystrix* 为第 2 类;种间杂种 *C. ×hytivus* 为第 3 类;黄瓜栽培种、黄瓜野生变种 *hardwichii* 及杂种后代均为第 4 类。

3 讨论

C. hystrix 是在我国云南省首次发现的具有 24 条染色体的甜瓜属野生种。根据研究我们认为,在分类上,由于 *C. hystrix* 染色体基数与甜瓜相同 ($x=12$),不应将其归入黄瓜亚属 ($x=7$),又因其在形态学、同工酶、DNA 及杂交亲和性等方面表现出与甜瓜亚属植物更远的距离,也不能归入甜瓜亚属,而将其作为 *Cucumis* 属中的一个独立亚属更为准确。如果这一假说成立,由

subgen. *Cucumis* 的黄瓜和 subgen. *Hystrix* 的 *C. hystrix* 所形成的杂交新种将成为新的亚属。这样,甜瓜属植物就由四个亚属构成,即 subgen. *Cucumis*, subgen. *Hytivus*, subgen. *Hystrix*, subgen. *Melo*。当然,要构建一个完整的甜瓜属新的分类体系,需要采用更多的材料,做更多的实验。

种间杂交种 *C. ×hytivus* 以及与黄瓜回交的后代拥有野生种 *C. hystrix* 的抗根结线虫^[7]、高营养价值^[5]、耐低温和耐弱光等优良性状,对甜瓜属作物品种改良具有重要价值。通过与 *C. ×hytivus* 回交扩大了普通栽培黄瓜的遗传基础。

参考文献:

- Jeffrey C. A review of the Bot. J. Linn. Soc., 1980, 81: 233~247
- Kirkbride J H Jr. Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae). Parkway Publ., Boone, N. C., 1993, 14: 86~88
- Chen J F, Isshiki S, Tashiro Y, et al. Biochemical affinities between *Cucumis hystrix* Chakr. and two cultivated *Cucumis* species (*C. sativus* L. and *C. melo* L.) based on isozyme analysis. Euphytica, 1997, 97: 139~141
- Chen J F, Staub J E, Tashiro Y, et al. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *Cucumis hystrix* Chakr. Euphytica, 1997, 96: 413~419
- Chen J F, Staub J E, Adelberg J, et al. Synthesis and preliminary characterization of a new species (amphidiploid) in *Cucumis*. Euphytica, 2002, 123: 315~322
- Staub J E, Danir-Poleg Y, Fazio G, et al. Comparative analysis of cultivated melon groups (*C. melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica, 2000, 115: 225~241
- 陈劲枫, 林茂松, 钱春桃. 甜瓜属野生种及其与黄瓜种间杂交后代抗根结线虫初步研究. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 21~24
- 张海英, 王永健, 许 勇, 等. 黄瓜种质资源遗传亲缘关系的 RAPD 分析. 园艺学报, 1998, 25 (4): 345~349

RAPD Analysis of Cultivated Cucumber, Wild Cucumis Species, Interspecific Hybrid and Its Progenies from Backcrossing

Zhuang Feiyun and Chen Jinfeng

(National Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Vegetable Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Cultivated cucumber and its wild varieties, wild *Cucumis* species (*C. hystrix* Chakr.), interspecific hybrids and the BC₁S₂, and melon cultivars were used to study the relationship by RAPD markers. 31 arbitrary primers were screened to detect polymorphism among the total 23 cultigens used. Of the 375 sites produced, 90.0% were polymorphic. Each primer amplified an average of 6.3 fragments. The results from UPGMA cluster analysis suggested that 23 cultigens could be classified into four groups, they are: cultivated cucumber and its wild variety, *C. hystrix*, *C. ×hytivus*, and melons.

Key words: *Cucumis*; Interspecific hybridization; Phylogeny; RAPD

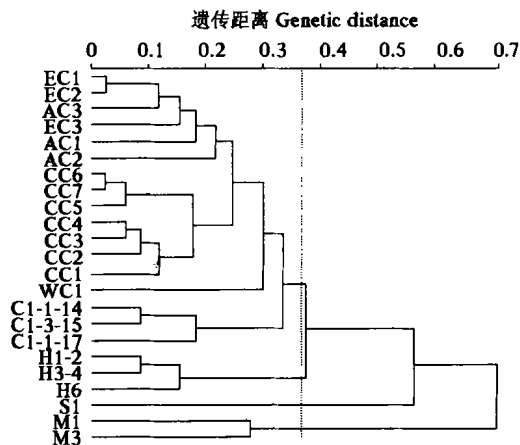


图 2 23 份甜瓜属试材的 RAPD 聚类分析树状图
材料编号的品种名见表 1。

Fig. 2 The cluster dendrogram of RAPD in 23 *Cucumis* species
For assigned code see table 1.