

Cucumis 属植物种间正反杂交差异的研究

陈劲枫 庄飞云 姜群峰 徐玉波 钱春桃 任刚 罗向东

(作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学园艺学院蔬菜系, 南京 210095)

摘要: 在形态和分子两个水平上对栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n = 14$) 与酸黄瓜 (*C. hystrix* Chakr., $2n = 24$) 正反杂交而成的双单倍体 ($2n = 19$)、双二倍体 ($2n = 38$) 植株的形态和育性差异进行了比较研究。结果表明: 在形态上植株的分枝数、第 1 朵雌花节位偏向于父性遗传, 主蔓节间长则偏向于母性遗传, 另外一些性状如主蔓直径呈中间型。通过 RAPD 标记分析表明, 在所选的 21 条随机引物中, 15 条引物 (占 71%) 显示出正反交之间的差异; 其中一些条带表现出父性遗传现象。在育性上, 正反交植株的表现截然不同。当以黄瓜为母本时, 杂种植株呈现雌雄高度不育; 而以酸黄瓜为母本时, 雌雄育性在染色体加倍后均得到恢复。

关键词: *Cucumis* 属; 种间杂交; 正反交; RAPD

中图分类号: S 642 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 05-0483-03

1 目的、材料与方法

许多研究表明, 小麦、番茄、棉花等作物的远缘正反杂交后代, 在形态和育性上表现出巨大差异, 但类似研究在 *Cucumis* 属方面还未见报道。作者以栽培黄瓜‘北京截头’、野生种酸黄瓜 (*C. hystrix* Chakr.) 正反交双单倍体 (HC, CH) 及双二倍体 (HHCC, CCHH) 为试材, 比较正反交及不同倍性杂种在形态、育性及分子水平上的差异。

杂种植株是通过胚胎培养获得的。再生杂种植株在小拱棚中驯化 1 周后定植于田间, 按常规方法进行管理。观测正反杂交种和亲本的第 1 朵花的形态, 花梗、萼筒、花冠和子房的长度, 第 1、5、10、15 和 20 节的株径和节间长及 20 节的叶柄长, 每处理 5 株, 采用重量法测定叶面积。选取盛开的雄花, 每处理 50 朵, 通过醋酸洋红染色, 统计花粉活力 (可染色花粉粒的平均百分率)。

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。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 四甲基氯化铵 0.1%, 4 种核苷酸各为 150 μ mol/L (大连宝生物产), 引物 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 20 ng, 1.0 U 的 Tag DNA 聚合酶 (上海生工产), 在 Hybaid PCR 仪 (英国) 中进行。反应程序为: 94 4 min; 94 15 s, 35 15 s, 72 75 s, 循环 3 周; 94 15 s, 40 15 s, 72 75 s, 循环 40 周; 72 延伸 7 min, 4 下保存。选用上海生工的 70 条随机引物和 Operon 公司的 20 条随机引物。扩增产物在含有 EB 的 1.4% 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。

2 结果与分析

2.1 正反杂交种的形态特征和育性比较

正反交双单倍体植株的主蔓直径、叶柄长、第 1 朵雄花萼筒和花冠长度、叶形状和大小较相似,

收稿日期: 2002-01-22; 修回日期: 2002-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170644); 国家高技术研究发展计划项目 (863 计划, 2001AA241123); 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资助项目

都介于双亲之间而呈中间型。而其它一些性状呈偏亲遗传,如密棕茸毛(尤其是在花瓣和雌蕊上)、桔黄色花冠及卵圆形果实等特征与野生种酸黄瓜相似;植株的分枝数、第1朵雌花节位偏向父本(酸黄瓜的雌花节位一般在20节以上),而主蔓节长则偏向于母本(表1)。正反交双二倍体植株在形态上表现出一些独特的性状,如叶缘弯曲度大,缺刻多,节间较短而壮,两种类型的植株较相似。

4种类型杂种植株结果习性及其育性差异较大,其中以酸黄瓜为母本,双二倍体植株的花粉平均可染率达到25.4%,最高为40.0%,而且其自然坐果率高,可形成具有育性的种子;双单倍体植株也有8.7%花粉可染,植株自然坐果率较高,但果实中无籽。两者果形不同,双二倍体果形粗短,呈棒状,而双单倍体果实较长,呈纺锤形。相反以黄瓜作为母本,双单倍体植株几乎不能形成花粉,双二倍体植株能形成少量花粉,但可染率极低,且含有结晶体,两种类型植株坐果率也很低。这与富贞夫、木原均等人的研究结果一致,以染色体组数较多的为母本,易获得可育的种子^[1,2]。

表1 栽培黄瓜与野生种亲本、正反杂交 F_1 代及加倍 F_1 代的形态特征和育性比较

Table 1 Morphological characteristics and fertilities differentiating parents and their reciprocal F_1 and chromosome-doubled F_1 progenies

材料 Materials	茎 Stem			叶 Leaf		雄花 Male flower				雌花 Female flower		
	直径 Diameter (cm)	节长 Internode length (cm)	侧枝数 No. of lateral branches	叶柄长 Petiole length (cm)	叶面积 Leaf size (cm ²)	第1朵花 节位 Appearance of first flower	花梗长 Length of pedicle (cm)	萼筒长 Calyx tube length (cm)	花冠长 Corolla length (cm)	第1朵花 节位 Appearance of first flower	子房长× 直径 Ovary length ×Diameter (cm)	花冠长 Corolla length (cm)
HH	0.3 ±0.1	4.8 ±2.7	12.0 ±2.0	7.0 ±1.0	102.1 ±13.9	15.0 ±4.0	0.5 ±0.2	0.5 ±0.1	0.9 ±0.1	—	1.0 ×0.4	1.0 ±0.1
CC	0.6 ±0.2	10.6 ±2.4	2.6 ±1.4	12.6 ±1.4	321.5 ±34.5	3.8 ±1.3	2.4 ±0.8	0.8 ±0.1	2.5 ±0.2	4.2 ±1.8	3.8 ×0.7	2.6 ±0.2
HHCC	0.5 ±0.1	4.8 ±1.2	5.8 ±1.4	8.8 ±3.2	276.4 ±36.2	5.6 ±1.6	0.5 ±0.2	0.7 ±0.2	1.2 ±0.2	4.4 ±0.5	1.6 ×0.7	1.5 ±0.2
HC	0.4 ±0.2	5.7 ±1.4	5.4 ±1.2	9.8 ±5.2	191.2 ±27.8	6.8 ±1.2	0.5 ±0.1	0.6 ±0.2	1.2 ±0.1	5.2 ±2.0	1.5 ×0.4	1.3 ±0.4
CCHH	0.4 ±0.3	6.0 ±1.4	8.4 ±2.7	—	—	—	—	—	—	16.8 ±2.4	—	—
CH	0.4 ±0.1	8.1 ±2.4	8.2 ±1.8	9.6 ±5.4	190.7 ±26.1	6.8 ±1.2	0.8 ±0.1	0.6 ±0.1	1.4 ±0.1	14.5 ±1.5	1.5 ×0.5	1.8 ±0.2

* HH: 野生种, CC: 栽培种, HHCC: 正交双二倍体, HC: 正交二倍体, CCHH: 反交双二倍体, CH: 反交二倍体。

* HH: *C. hystrix*, CC: *C. sativus*, HHCC: Doubled F_1 (*C. hystrix* × *C. sativus*), HC: F_1 (*C. hystrix* × *C. sativus*), CCHH: Doubled F_1 (*C. sativus* × *C. hystrix*), CH: F_1 (*C. sativus* × *C. hystrix*).

2.2 RAPD 结果

本试验通过对90条随机引物的筛选,有21条引物的扩增条带较好,以再次扩增的重复性好的条带进行分析,其中15条引物的扩增产物在4种类型杂种间存在差异,占总数的71%。大多数扩增反应中,亲本的条带基本上在正反杂交种中获得了表达,但在一些引物中出现亲本条带的“偏表达”或缺失现象。

从图1可看出,野生种的OP1-18/850 bp、N-20/750 bp两条带仅在反交种中扩增出,而黄瓜的

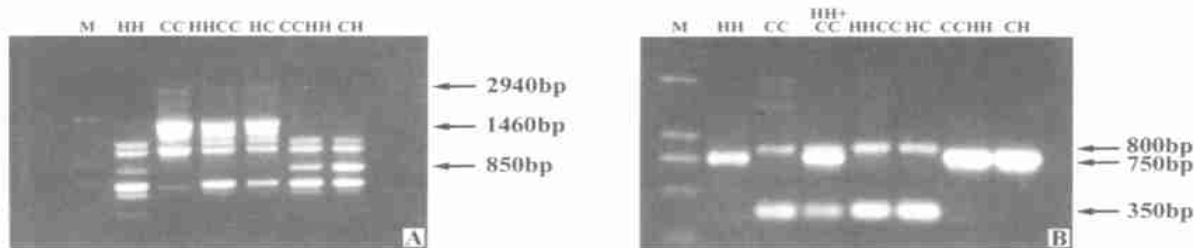


图1 亲本及正反杂交种的 RAPD 电泳图谱

A: 引物 OP1-18; B: 引物 N-20; M: 标准分子量, HH: 野生种, CC: 栽培种, HH+CC: 亲本混合模板, HHCC: 正交双二倍体, HC: 正交二倍体, CCHH: 反交双二倍体, CH: 反交二倍体。

Fig. 1 Electrophoresis patterns of RAPD products in parents and their reciprocal F_1 hybrids

A: Primer OP1-18; B: Primer N-20; M: Marker, HH: *C. hystrix*, CC: *C. sativus*, HH+CC: *C. hystrix* + *C. sativus* = 1 + 1, HHCC: Doubled F_1 (*C. hystrix* × *C. sativus*), HC: F_1 (*C. hystrix* × *C. sativus*), CCHH: Doubled F_1 (*C. sativus* × *C. hystrix*), CH: F_1 (*C. sativus* × *C. hystrix*).

OPI-18/2940 bp、OPI-18/1460 bp、N-20/800 bp 和 N-20/350 bp 四条带仅在正交种中扩增出, 这些条带呈现父性遗传现象。有研究表明黄瓜的线粒体 DNA 主要为父性遗传^[3], 本试验以 CTAB 法提取总基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 其中包含有来自叶绿体和线粒体的 DNA。因此, 这些条带可能是以线粒体 DNA 为模板扩增出的, 但还需进一步研究才能定论。

亲本条带的缺失可能是不同亲本染色体组上随机引物结合位点的竞争能力不同引起的^[4]。为了进一步验证此方面问题, 我们同时以酸黄瓜和黄瓜的 DNA 按 1:1 混和作为模板进行扩增。从图 1B 可看出, N-20/800 bp、750 bp 和 350 bp 在混和模板 (HH + CC) 中得到了很强的扩增, 但黄瓜中的其他条带则未扩出。

参考文献:

- 1 华北农业大学, 中国科学院遗传研究所, 广东农林学院, 等编. 植物遗传育种学. 北京: 科学出版社, 1976. 279 ~ 301
- 2 梁正兰著. 棉花远缘杂交的遗传与育种. 北京: 科学出版社, 1999. 1 ~ 17, 34 ~ 42
- 3 Havey MJ. Predominant paternal transmission of the cucumber mitochondrial genome. J. Hered., 1997, 88: 232 ~ 235
- 4 Halldén C, Hansen M, Nilsson N O, et al. Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor. Appl. Genet., 1996, 93: 1185 ~ 1192

Studies on Reciprocal Differences in Interspecific Hybridization in *Cucumis*

Chen Jinfeng, Zhuang Feiyun, Lou Qunfeng, Xu Yubo, Qian Chuntao, Ren Gang, and Luo Xiangdong

(State Key Lab of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Vegetable Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A set of reciprocal crosses with different chromosome level made between *Cucumis sativus* and *C. hystrix* as the experiment system was used to investigate the difference of morphology, fertility and DNA. The diameter of stem, the length of petiole, the shape and size of leaves were intermediated when compared to parents. The branching number and the appearance of first female flower showed paternal transmission while the length of inter-node of main stem showed maternal transmission in all of hybrids. The RAPD results indicated fifteen arbitrary primer band patterns were different among the four types of hybrids, and only six were the same. Some fragments obviously showed the paternal expression in the reciprocal cross. The fertility of reciprocal plants were great different. When *C. hystrix* used as female, the tetraploid ($2n = 38$) / diploid ($2n = 19$) plants had the higher fruit sets, and even the amphidiploidy plants could produce viable seeds. However, when the cucumber used as female, both tetraploid/ diploid plants were highly sterile and had very low fruit sets.

Key words: *Cucumis*; Interspecific hybridization; Reciprocal differences; RAPD

新书推荐

《细胞实验指南》

由美国冷泉港实验室邀请 125 位专家共同研讨和撰稿, 是一部最新、最权威的综合性细胞实验技术操作指南。本书汇总了被细胞生物学家们证明行之有效的众多的技术和方法, 它们由三大主体组成: 细胞的培养及其生物化学分析、光学显微镜及细胞结构和基因及其产物的亚细胞定位。本书与备受称赞的冷泉港实验室出版社的《分子克隆实验指南》和《抗体》两本实验指南具有同样的特点, 对即使具有多年工作经验的研究者也极其有用。定价: 244 元 (上、下册, 含邮资)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

