

不同来源黄瓜遗传亲缘关系的 RAPD 分析

刘殿林¹, 杨瑞环¹, 哈玉洁¹, 陈德富², 陈喜文², 夏立新²

(1. 天津市黄瓜研究所, 天津 300192; 2. 南开大学 生物化学与分子生物学系, 天津 300071)

摘要:用 RAPD 技术对黄瓜基因组 DNA 进行多态性研究, 分析了 39 份黄瓜材料的遗传差异。结果表明, 所采用的 172 条随机引物中, 有 49 条引物扩增谱带清晰且重复性较好, 扩增总片段数达 378 个, 单个引物的扩增片段数在 4~12 之间, 片段大小在 0.2~3.5 kb 之间。不同材料间的遗传距离(D)在 0.064~0.592 之间, 并根据遗传距离, 按 UWPGA 法进行了聚类分析。

关键词:黄瓜; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2003)03-0050-03

RAPD Analysis and Taxology Discussion on Cucumber Materials from Different Fountainhead Areas

LIU Dian-lin¹, YANG Rui-huan¹, HA Yu-jie¹, CHEN De-fu²,
CHEN Xi-wen², XIA Li-xin²

(1. Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Random amplified Polymorphic DNA(RAPD) was used to analyze the genetic diversity among cucumber inbred line. The genetic of 39 cucumber inbred line was studied. The result showed that 49 of 172 arbitrary primers could amplify clear and repeatable bands. 398 fragments were obtained. Each primer gave 4~12 bands. The length of the band was 0.2~3.5 kb. The genetic distance(D) value between different breeds of cucumber inbred line was 0.064~0.592. The D value was used to construct a dendrogram by UPGMA.

Key words: Cucumber; RAPD; Genetic diversity; Cluster analysis

RAPD^[1]是近 10 年发展起来的利用随机排列的寡聚核苷酸为引物, 对被研究的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增, 根据 PCR 产物的多态性分析研究对象基因组相应区域的 DNA 多态性。被认为是研究系统进化、分类学等问题的有效工具^[2~4], 并已成功用于遗传多样性检测、遗传图谱构建^[5]等诸多领域。生产中进行黄瓜优良品种的选育, 往往是利用大量的亲本进行随机配组, 然后在田间进行观察、筛选, 这样很有可能造成杂交一代的两个亲本间的遗传背景相同或极为相近, 很难选育出一个优良的品种。本研究是在已有研究工作的基础上, 选取不同

来源的 39 份黄瓜材料, 借助 RAPD 技术对样本总基因组 DNA 的遗传变异进行比较分析, 探讨不同来源黄瓜材料的鉴定和分类的可行性, 以及各材料间的遗传多样性, 不同性状间的基因连锁标记提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料 39 份取自天津市黄瓜研究所种质资源库及近年引进的国外品种(表 1)。

收稿日期: 2003-02-15

基金项目: 天津市重点攻关项目(993122511-2)

作者简介: 刘殿林(1971-), 男, 天津人, 硕士, 助理研究员学士, 主要从事农业分子生物学的研究工作。



1.2 方法

1.2.1 黄瓜基因组 DNA 的提取 黄瓜材料来源于天津市黄瓜所试验基地春大棚,以生长点处幼嫩叶片为材料提取基因组 DNA^[6]。

1.2.2 RAPD 及其产物的检测 为了保证结果的重复性,每个 RAPD 扩增重复 2 次以上。反应体系为 25 μ L: 反应液包括 1 \times PCR Buffer (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris - HCl, pH 8. 0), 1. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 1 mmol/L dNTP, 1 U Taq 酶 (上海 Sangon 产品), 30 ng 的引物 (上海 Sangon 产品) 和 40 ng 的模板 DNA。扩增反应在 PTC - 200 型热循环仪 (MJ Research Inc.) 上进行, 程

序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 37 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 105 s, 经 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物在 1. 6% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳介质为 1 \times TAE 缓冲液, 电泳完毕以 0. 5 μ g/mL 浓度的 EB 染色 30 min, 用蒸馏水振荡洗涤凝胶 15~30 min, 紫外透射仪上观察照相。

1.2.3 数据处理 对扩增产物的电泳图谱进行数据编码。在图谱上相对迁移率的位置上, 对应每一材料如有清晰可辨的扩增带则标记为 1, 否则为 0。利用 NTSYS - pc 软件的 Nei 和 Li^[7] 的遗传相似性公式计算各自交系间的分子遗传距离, 然后按 UWP - GA 进行遗传距离的聚类。

表 1 不同来源的黄瓜自交系材料

编号	自交系	来源	编号	自交系	来源	编号	自交系	来源
1	48	荷兰	14	172	日本	27	222	东北
2	180	荷兰	15	B20	华北	28	A16 刺	华北
3	207	华南	16	A7	多亲分离	29	唐山秋瓜	华北
4	K20	华北	17	B8231	华北	30	A5	华北
5	C20	华北	18	206	华南	31	P18	东北
6	81	华北	19	8231	华北	32	A1	多亲分离
7	114	华北	20	230	东北	33	213	华北
8	162	山东	21	8681	华北	34	A37	多亲分离
9	K196	华北	22	WP	华北	35	A36	多亲分离
10	C196	华北	23	P4	华北	36	P36	东北
11	66	华南	24	A35	多亲分离	37	193	韩国
12	A6	华南	25	204	韩国	38	242	东北
13	A33	多亲分离	26	A16 光	多亲分离	39	A34	多亲分离

2 结果与分析

2.1 黄瓜材料间的多态性

采用 Sangon 公司合成的 172 条 10 mer 随机引物进行 RAPD 分析, 均能产生扩增带, 有 96 个随机

引物的扩增带有差异, 其中 49 个随机引物的扩增带清晰而稳定, 大小为 200~3 500 bp。49 个随机引物共产生 378 个扩增产物, 其中 137 个具有多态性, 占 36.24%, 各引物获得的扩增带数从 4 条到 12 条不等。产生稳定的多态性扩增产物及其频率见表 2。

表 2 产生 RAPD 多态性带的随机引物

引物号	序列	扩增带数	多态性带数	频率 (%)	引物号	序列	扩增带数	多态性带数	频率 (%)
S24	AATCGGGCTG	11	3	27.27	S168	TTTGCCCGGT	8	3	37.50
S28	GTGACGTAGG	5	2	40.00	S182	OCTCTGACTG	5	2	40.00
S30	GTGATGCGAG	9	2	22.22	S184	CACCCCCTG	7	5	71.43
S32	TCGGCGATAG	12	6	50.00	S187	TCCGATGCTG	6	2	33.33
S38	AGGTGACCGT	6	2	33.33	S189	TOCTGGTCCC	4	1	25.00
S52	CACCGTATCC	8	2	25.00	S197	TGGGGAACCAC	12	6	50.00
S53	GGGGTGACGA	6	2	33.33	S201	GGGCACTCA	7	3	42.86
S61	TTCGAGCCAG	5	1	20.00	S206	CAAGGGCAGA	5	1	20.00
S67	GTCCCGACGA	11	6	54.55	S208	AACGGCGACA	8	2	25.00
S69	CTCACCGTCC	9	4	44.44	S209	CACCCCTGAG	12	7	58.33
S73	AAGCCTGCTC	8	2	25.00	S222	AGTCACTCCC	9	1	11.11
S92	CAGCTCACGA	8	3	37.50	S224	CCCTCAACGA	8	2	25.00
S94	GGATGAGACC	6	2	33.33	S226	ACGCCAGGT	6	2	33.33
S97	ACGACCGACA	10	2	20.00	S234	AGATCCCGCC	6	3	50.00
S103	AGAAGTCCAC	11	2	18.18	S353	CCACACTACC	4	1	25.00
S152	TTATCGCCCC	10	1	10.00	S431	TGCGCGCAAA	9	4	44.44
S153	CCCGATTGGG	10	6	60.00	S432	CACAGACACC	6	4	66.67
S154	TGCGGCTGAG	7	1	14.29	S1042	TCGCACAGTC	11	7	63.64
S156	GGTGACTGTG	7	1	14.29	S1043	AGCACTCGT	8	6	75.00
S157	CTACTGCCGT	7	2	28.57	S1044	GAATGGGACC	5	2	40.00
S158	GGACTGCAGA	9	6	66.67	S1048	GTGCTCCCTC	5	1	20.00
S159	ACGGCGTATG	11	2	18.18	S1293	CTGACTTCCC	9	2	22.22
S161	ACCTGGACAC	8	3	37.50	S2037	ACAACGTGCC	8	2	25.00
S166	AAGGCGGCAG	6	2	33.33	S2136	TGCTTGGGTG	4	2	50.00
S167	CAGCGACAAG	6	1	16.67					

2.2 供试材料间的遗传关系分析

将 49 条引物扩增的多态性片段数据化后,用 Nei 和 Li 遗传距离公式求得 39 份黄瓜材料的遗传距离矩阵。21 和 22(自交系编号,下同)遗传距离最小,为 0.0645;而 18 和 8 遗传距离最大,为 0.5922;39 个自交系材料的遗传距离在 0.0645~0.5922。

根据 39 个黄瓜材料的遗传距离矩阵,按 UWP-GA 进行聚类,得到聚类分析图(图 1)。

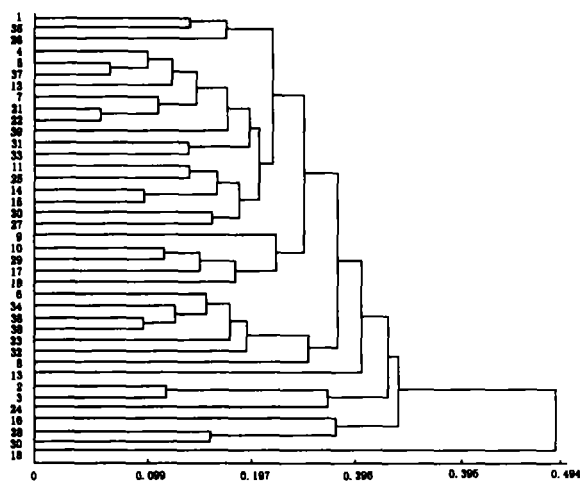


图 1 39 个试验材料的 RAPD 分类表

如图 1 所示,在遗传距离值 0.31 处,39 个黄瓜材料可分为 I, II, III, IV, V 组。在遗传距离值 0.24 处, V 组又可分为 6 个亚组;其中 V-5 亚组中当遗传距离为 0.21 时,又可分为 V-5A 和 V-5B 两个亚亚组,具体聚类结果为 I 组中的 18 单独为一类,与其他所有材料的遗传距离均较大,接近野生的驯化栽培类型,这与其形态特征也相符; II 组中的 16, 28, 30 聚为一类,基本表现光滑型或小刺瘤特征; III 组中的 2, 3, 24 聚为一类,来源看基本取自荷兰型或多亲后代的分离; IV 组中的 13 单独为一类。V-1 亚组只有 8 号自交系; V-2 亚组包括 6, 34, 36, 38, 23, 32 号自交系,从其田间表现来看基本属于耐低温较强的类型; V-3 亚组包括 10, 29, 17, 19 自交系,其田间表现基本属于密刺系统; V-4 亚组只有 9 号自交系; V-5A 亚组包括 4, 5, 37, 12, 7, 21, 22, 39, 31, 33 自交系,这一类材料田间表现耐热性较强; V-5B 亚组包括 11, 25, 14, 15, 20, 27 自交系,表现光滑型或少刺瘤,接近日本型; V-6 亚组

包括 1, 35, 26 自交系。

3 讨论

本试验从 172 个随机引物中筛选出 49 个多态性引物,通过品种生态型及田间表现证明,对 39 份黄瓜材料进行的聚类分析结果看是可靠的。从对遗传距离的聚类分析图看,大部分自交系分类趋势基本符合其形态生理特征,但仍有少数自交系分类情况有差异,由于 DNA 是遗传的本质,不象形态生理学分类指标那样易受环境影响, RAPD 标记位点数又远大于形态学分类指标,所以分子水平上的分类比形态生理学上的分类更具可靠性。

结合 RAPD 的聚类分析与田间形态特征、瓜条性状、对温度的耐性、抗病性等可以看出, RAPD 聚类分析只要采用一定数量的多态性引物不仅可以将来不同来源黄瓜材料生态型进行准确分类,而且还可以进行多种不同性状的分类,如耐高温耐低温能力,抗霜霉病等。当然,这要求我们育种工作者对材料的田间表现及抗逆性有一个基本的认识。在本试验中我们初步进行了耐高温、耐低温性状材料与聚类图的结合,从中不难看出表现耐高温的材料基本聚为一类,耐低温材料聚为另一类,这个结论在供试的 39 份材料中是可行的,但要验证对其准确程度还需扩大试验材料的范围,并且对材料的性状必须有明确的了解。

参考文献:

- [1] 黎 裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999, (4): 19-22.
- [2] 陈德富, 陈喜文, 侯志波, 等. 黄瓜随机扩增多态 DNA(RAPD)研究初报[J]. 南开大学学报(自然科学报), 1999, 32 (4): 47-50.
- [3] Nei M, Li W A. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [4] 高之仁. 数量遗传学[M]. 成都: 四川大学出版社, 1986. 310-313.