

黄瓜种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

张桂华¹, 韩毅科¹, 杨瑞环¹, 杜胜利¹, 王 鸣²

(1. 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

摘要:对 23 份不同来源的黄瓜材料进行了 AFLP 分析。18 对引物组合共扩增出 543 条谱带, 其中, 多态性带为 106 条, 多态率为 19.5%。UPGA 分类结果将 23 份黄瓜材料划分为三大类群: 第 1 类群为野生型黄瓜的聚类; 第 2 类群为美国类型黄瓜、荷兰类型黄瓜以及具有荷兰血统的黄瓜的聚类; 第 3 类群中包含所有中国类型黄瓜和 2 个前苏联类型黄瓜。遗传相似性分析和聚类结果表明: 野生黄瓜和栽培黄瓜之间的亲缘关系较远, AFLP 标记的分类结果与材料的主要性状特点基本一致。

关键词: 黄瓜; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: S642.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0021-04

AFLP Analysis of Genetic Diversity of Cucumber Germplasm

ZHANG Gui-hua¹, HAN Yi-ke¹, YANG Rui-huan¹, DU Sheng-li¹, WANG Ming²

(1. Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China;

2. Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The genetic diversity of 23 cucumber materials were analyzed by AFLP technique. 543 DNA bands were amplified by 18 pairs of AFLP primers, of which there were 106 polymorphic bands, and the percentage of polymorphic bands was 19.5%. The dendrogram of 23 cucumber materials was generated by UPGMA (Unweighed Pair-group Method Arithmetic Average) method, and was divided into 3 groups. The first group was the clustering of wild species, the second group included stateside type, Netherlandish type, and the type possessed the origin of Netherland. The third group included all of the Chinese type materials and two Russian type materials. The genetic similarity and cluster analysis showed that the relationship between wild germplasm and cultivars was far, and the classification result based on AFLP markers was basically consistent with that on their morphological characters.

Key words: Cucumber; AFLP; Genetic diversity

近 20 年来, 我国的黄瓜育种工作取得了突破性进展, 育成了大批优质、高产、抗病、适合多种栽培模式的黄瓜新品种。由于育种材料亲缘关系过分单一, 育种工作很难再取得突破^[1]。近年来, 植物基因组学的迅速发展, 分子标记技术成为分析生物遗传多样性的有力工具。本试验采用 AFLP 技术对不同生态型黄瓜的遗传多样性及亲缘关系进行研究, 为亲本选配、杂种优势预测等提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料及 DNA 提取

本试验共选用 23 份不同来源的黄瓜育种材料

进行遗传多样性研究(表 1)。黄瓜基因组 DNA 提取参照文献[2]的方法进行, 最后将各材料 DNA 浓度调整为 50 ng/μL 待用。

1.2 AFLP 分析

AFLP 的内切酶采用 *Mse*I 和 *Pst*I 双酶切组合, 内切酶购自 NEB 公司, T4 连接酶和 Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司, AFLP 接头、引物均由上海生工生物工程有限公司合成。各基因组 DNA 经酶切-连接、预扩增后, 稀释适当倍数用作选择性扩增的模板, 选择性扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 银染法染色。

收稿日期: 2006-11-29

基金项目: 国家“863”计划项目(2003AA207110); 天津市农业科学院院长基金项目(06009)

作者简介: 张桂华(1972-), 女, 河北冀州人, 副研究员, 博士, 主要从事黄瓜生物技术育种研究。

表1 供试黄瓜材料

Tab 1 Cucumber materials tested

编号 No.	材料名称 Materials	来源 Source	主要性状特点 Main character	编号 No.	材料名称 Materials	来源 Source	主要性状特点 Main character
1	H033-8-2	A	少刺、瓜条长	13	L8	前苏联	
2	Hm82-1	A	多刺、瓜条长	14	H1	美国	少刺、瓜条短
3	H9-13	A	多刺、瓜条长	15	U4	野生	
4	H14	A	多刺、瓜条长	16	U6	野生	
5	Hm84	B	少刺、瓜条短	17	S3	中国	多刺、瓜条长
6	H058-14	A	多刺、瓜条长	18	H2	美国	少刺、瓜条短
7	H064-1-2	A	多刺、瓜条长	19	通化密刺	中国	多刺、瓜条长
8	R6	天津	多刺、瓜条长	20	Hm62	B	少刺、瓜条短, 雌性系
9	R12	荷兰	无刺, 瓜条短, 雌性系	21	D	荷兰	无刺, 瓜条短, 雌性系
10	Hm169	B	无刺、瓜条短	22	Q9	天津	多刺、瓜条长
11	ML27	A	多刺、瓜条长	23	Q10	天津	多刺、瓜条长
12	L3	前苏联	多刺、瓜条长				

注: A. 代表中国华北类型黄瓜品种间杂交一代的未受精子房离体培养得来的加倍单倍体; B. 代表荷兰黄瓜与中国华北类型黄瓜的杂交一代的未受精子房离体培养得来的加倍单倍体

Note: A represent the doubled haploid from the culture of the unfertilized ovary of the hybrid between Huabei cucumber materials; B represent the doubled haploid from the culture of the unfertilized ovary of the hybrid between Huabei and mini cucumber materials

1.3 数据处理与分析

选择清晰可辨的电泳条带按条带的有无(有带计为“1”,无带计为“0”)进行数据统计。

采用聚类分析统计软件 MVSP312E: 进行遗传相似性分析, 根据欧式距离生成距离矩阵; 根据欧氏距离, 用UPGMA 法进行聚类分析, 构建树形图。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

共采用 18 对 AFLP 引物组合用于 23 份黄瓜材料的 AFLP 扩增, 均获得了较好的扩增结果, 条带清晰(图 1)。18 对引物共扩增出 543 条谱带, 其中多态性条带为 106 条, 多态位点比例为 19.5%。各引物对扩增的多态性条带数 1~ 13 条不等, 平均为 5.9 条。

表2 23个黄瓜材料间的相似系数

Tab 2 Similarity coefficients among 23 cucumber materials

材料 Materials	H033-82	Hm82-1	H9-13	H14	Hm84	H058-14	H064-1-2	R6	R12	Hm169	ML27	L3	L8	H1	U4	U6	S3	H2	通化密刺	Hm62	D	Q9	
Hm82-1	3.464																						
H9-13	1.732	3.317																					
H14	3.464	3.742	3.000																				
Hm84	4.583	5.196	4.472	5.000																			
H058-14	2.828	3.742	2.236	3.162	5.000																		
H064-1-2	4.690	4.690	4.583	5.099	6.083	4.690																	
R6	3.000	3.606	2.828	3.317	5.592	2.236	5.000																
R12	5.385	5.916	5.477	5.916	5.292	5.385	6.245	5.657															
Hm169	3.162	4.690	3.317	4.472	4.123	4.000	5.592	4.359	4.359														
ML27	3.606	3.873	3.464	4.123	5.292	3.606	4.359	4.000	6.000	4.583													
L3	4.123	4.359	3.742	3.606	5.477	3.873	4.796	3.472	6.164	5.000	4.243												
L8	2.646	3.317	2.828	3.873	5.099	3.606	4.796	3.162	5.831	3.873	4.000	4.000											
H1	4.000	4.472	3.873	4.690	4.359	4.243	5.292	4.583	5.385	4.000	4.123	5.196	4.583										
U4	6.782	7.071	6.708	7.348	7.280	6.928	7.348	7.141	7.416	6.633	6.856	7.416	6.708	6.633									
U6	6.557	6.856	6.481	7.141	7.071	6.708	7.141	6.928	7.211	6.403	6.782	7.211	6.481	6.403	2.646								
S3	3.317	3.873	3.162	3.606	5.477	3.000	5.000	2.828	5.831	4.583	4.000	4.243	3.742	4.359	7.280	6.928							
H2	5.477	6.000	5.568	6.000	5.745	5.477	6.325	5.916	4.796	4.472	5.916	6.245	5.916	5.292	6.928	6.856	5.916						
通化密刺	3.317	4.123	3.464	3.606	5.477	3.873	5.000	3.742	5.477	4.123	4.243	4.243	3.742	4.796	7.141	6.928	3.742	5.745					
Hm62	4.123	5.000	4.000	5.000	3.742	4.359	6.083	4.899	4.472	3.606	5.292	5.477	4.690	4.123	6.557	6.325	4.899	4.583	4.690				
D	4.899	5.831	5.000	5.831	4.796	5.099	6.481	5.568	3.606	4.000	5.745	6.083	5.385	5.099	6.782	6.557	5.745	4.690	5.385	3.317			
Q9	3.162	3.464	3.000	3.742	4.796	3.162	5.292	3.606	5.568	4.243	4.123	4.359	3.873	4.690	6.928	6.708	3.606	5.657	4.123	4.359	5.292		
Q10	2.828	4.000	3.000	4.243	5.000	3.742	4.899	3.373	5.568	4.000	3.873	4.359	3.317	4.472	6.633	6.403	3.873	6.000	3.873	4.583	5.292	3.162	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

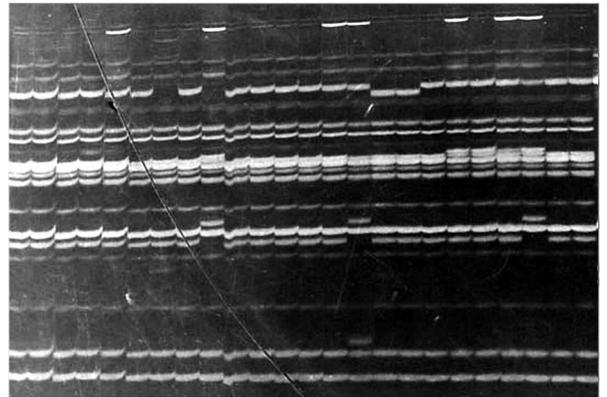


图1 23份黄瓜材料的 AFLP 扩增结果(P13M66)

Fig.1 The AFLP selective amplification result of 23 cucumber materials by primer combination PBM66

2.2 遗传相似性分析

根据欧式距离生成距离矩阵(表 2)。由表 2 可以看出,野生类型黄瓜(U4, U6)与栽培类型黄瓜之间的欧式距离在 6.403~7.416,表明亲缘关系较远;在栽培类型内部,华北类型黄瓜(多刺,中长条)各材

料之间的欧式距离在 1.732~5.292,无刺、短条黄瓜材料之间在 3.317~5.745。同时,笔者发现,在华北类型黄瓜材料之间, H064-1-2 与其他材料之间的距离较远,均在 4.359~5.292,若与其他材料组配,得到优势杂种一代的概率大。

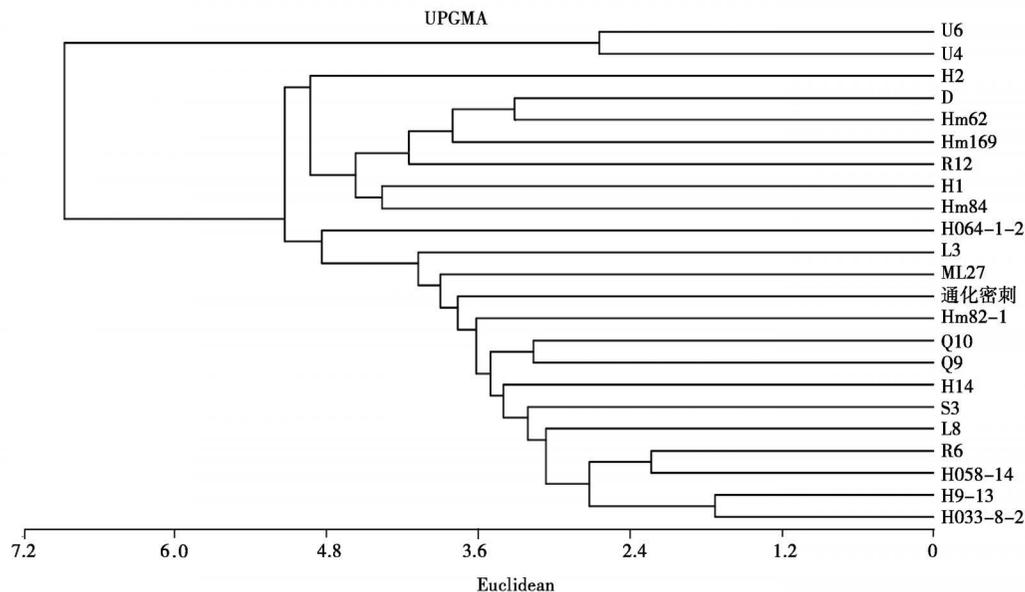


图 2 23 份黄瓜材料的 AFLP 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cucumber germplasm based on AFLP data

2.3 黄瓜遗传多样性分析

根据 18 条 AFLP 引物扩增条带的统计结果,根据欧氏距离,利用 UPGMA 法进行聚类分析,生成聚类图(图 2)。

取欧式距离 5 为阈值,23 份黄瓜材料被分为三大类群。第 1 类群中包含 2 份材料, U6 和 U4, 它们均为野生型黄瓜,在阈值约为 6.8 处,该类群材料(野生型)与其他 2 个类群(栽培型)聚在一起,表明野生型黄瓜与栽培类型之间亲缘关系非常远;第 2 类群包含了 2 份美国类型黄瓜(H1, H2),所有荷兰类型黄瓜(R12, D)以及具有荷兰血统的黄瓜(Hm84, Hm169, Hm62),主要为光滑型的短条黄瓜;第 3 类群中包含所有中国华北类型黄瓜(H033-8-2, Hm82-1, H9-13, H14, H058-14, H064-1-2, R6, ML27, S3, 通化密刺, Q9, Q10)和 2 个前苏联类型(L3, L8)黄瓜,主要为刺瘤型的中长条黄瓜,在该类群中,除 H064-1-2 外,其他所有材料之间的亲缘关系都比较近,这与栽培类型黄瓜是遗传背景狭窄的作物的说法相一致^[4]。

3 讨论

在黄瓜栽培种(*Cucumis sativus* L.)上,分子标记技术的应用使得人们对其基因组的了解越来越深入^[3-5],RAPD, SSR, AFLP 等标记技术相继用于作物

的遗传多样性研究。刘殿林等^[6]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,并按 UPGMA 法进行了聚类分析。顾兴芳等^[7]采用 AFLP 技术对 15 份黄瓜品种材料的遗传亲缘关系进行了初步研究。张海英等^[1]采用 RAPD 技术对黄瓜种质资源的遗传亲缘关系进行了研究,将供试材料分成了三大类群:华北类群、华南类群和欧洲温室类群。本研究中,UPGMA 聚类分析将 23 份黄瓜材料分为三大类群,即野生类型、欧洲温室型和华北类型。在第 2 类群中,2 个美国类型的黄瓜(H1, H2)与欧洲温室型黄瓜聚在一起,说明该美国类型黄瓜与欧洲温室型具有较近的亲缘关系,推测可能是相互种质引进造成了血缘的相互渗入;另外,该类群中包含中国华北类型黄瓜与荷兰类型黄瓜共同的后代,这些材料与荷兰类型黄瓜聚到一起,而与中国华北类型黄瓜的亲缘关系都很远,由此我们可以认为,与亲缘关系远的其他类型的材料杂交,是拓宽中国类型黄瓜遗传背景、丰富黄瓜基因资源的一条重要途径。

黄瓜是遗传基础比较狭窄的作物,尤其是栽培类型黄瓜, RFLP 显示的多态性水平仅为 3%~9%^[4]。从本研究也可以看出,栽培类型黄瓜之间的亲缘关系比较近。因此,分子标记技术用于黄瓜育种及品种鉴定仍然是一项耗时和繁琐的工作。相对

狭窄的遗传背景已经成为制约黄瓜育种取得重大突破的瓶颈。国内外各个育种单位都在加强种质资源的引进以丰富黄瓜基因库。据文献报道^[8],一些非洲类型的黄瓜具有独特的遗传变异,在拓宽黄瓜的遗传基础方面具有很大的应用潜力。同时,人们也一直尝试采用远缘杂交技术获得种质的创新,Nikolova等^[9]研究了在黄瓜属种质中采用远缘杂交技术丰富其遗传多样性的可能性,结果表明,不管采取何种授粉技术,黄瓜属野生种($2n=24$)资源中有价值的基因都未能转移入栽培种($2n=14$)的基因组中;远缘杂交仅仅在具有相同基因组的种内获得了成功。不断搜集和引进不同类型的黄瓜育种材料,进一步研究促进黄瓜属野生种资源与栽培种之间远缘杂交的技术和方法,将是进一步丰富黄瓜基因资源,拓宽其遗传背景的关键和有力手段。

参考文献:

- [1] 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[J]. 园艺学报, 1998, 25(4): 345-349.
- [2] 张桂华. 与黄瓜白粉病抗性相关基因紧密连锁的分子标记研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [3] Kennard W C, Havey M J. Quantitative trait analysis of fruit quality in cucumber: QTL detection, confirmation, and comparison with mating-design variation[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 53- 61.
- [4] Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, et al. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 42- 48.
- [5] Meglic V, Staub J E. Inheritance and linkage relationships of allozyme and morphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 865- 872.
- [6] 刘殿林,杨瑞环,哈玉洁,等. 不同来源黄瓜遗传亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 华北农学报, 2003, 18(3): 50- 54.
- [7] 顾兴芳,杨庆文. AFLP 技术在黄瓜种质资源鉴定及分类上的应用初探[J]. 中国蔬菜, 2000(1): 30- 32.
- [8] Ahmed Mliki, Staub J E, Sun Z Y, et al. Genetic diversity in African cucumber (*Cucumis sativus* L.) provides potential for gemplasm enhancement[J]. Genetic-Resource-and-Crop-Evolution, 2003, 50: 461- 468.
- [9] Nikolova V, Alexandrova M, Stoeva, et al. Possibilities for the use of remote hybridization in the genus *Cucumis* for the development of genetic diversity[C]// Proceedings of the Second Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Thessaloniki, Greece, 2000.