

## 甜瓜属种间杂交质体 DNA 多态性遗传分析

魏跃<sup>1,2</sup> 颜志明<sup>2</sup> 王全智<sup>2</sup> 薄凯亮<sup>1</sup> 吴志明<sup>1</sup> 陈劲枫<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学 南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 南京 2100951;

2. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

**摘要** 为研究甜瓜属种间杂交质体 DNA 的遗传规律, 利用 PCR 直接测序法对甜瓜属异缘四倍体新种 (*Cucumis* × *hytivus* Chen and Kirkbride.) S<sub>5</sub> 自交后代及其杂交母本甜瓜属野生种 (*Cucumis hystrix* Chakr.) 和父本栽培黄瓜 ‘北京截头’ (*Cucumis sativus* cv. ‘Beijingjietou’) 叶绿体基因 *Matk-trnK* 和 *rbcL-accD* 区域的部分 DNA 序列进行比较分析。结果显示在长度为 2 036 bp *Matk-trnK* 区域中存在着 18 个多态性位点, 其中有 16 个多态性位点的碱基子代与母本相同, 只有 2 个位点与父本相同; 在长度为 945 bp 的 *rbcL-accD* 区域中存在着 19 个多态性位点, 其中有 18 个多态性位点的碱基子代与母本相同, 只有 1 个多态性位点与父本相同。这表明甜瓜属 *hystrix* × *sativus* 种间杂交中质体 DNA 遗传主要表现为母系遗传。

**关键词** 甜瓜; 质体; 多态性位点; 母系遗传

**中图分类号** S 642.2

**文章编号** 1007-4333(2013)06-0143-05

**文献标志码** A

## Polymorphic inheritance analysis of plastid DNA in interspecific crossing of Genus *Cucumis*

WEI Yue<sup>1,2</sup>, YAN Zhi-ming<sup>2</sup>, WANG Quan-zhi<sup>1</sup>, BO Kai-liang<sup>1</sup>, WU Zhi-ming<sup>1</sup>, CHEN Jing-feng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetics Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Polytechnical College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

**Abstract** To investigate the inheritance of plastid DNA in the interspecific crossing of Genus *Cucumis*, the DNA sequences in partial region of chloroplast *Matk-trnK* and *rbcL-accD* gene from *cucumis* allotetraploid (*Cucumis* × *hytivus* Chen and Kirkbride.) S<sub>5</sub> selfing progeny, cultivated cucumber ‘BeijingJietou’ (*C. sativus* L.) the paternal parents and the wild *Cucumis* species (*C. hystrix* Chakr.) the maternal parents, were comparatively analysed, using PCR sequencing method. Eighteen polymorphic loci were detected in 2 036 bp length *Matk-trnK* gene region, sixteen polymorphic loci in allotetraploid as the its maternal parents, two as its paternal parents. Nineteen polymorphic loci were detected in 945 bp length *rbcL-accD* gene region, eighteen polymorphic loci in allotetraploid as its maternal parents, only one as its paternal parents. The result demonstrated that plastid genomes was maternal inheritance pattern in *hystrix* × *sativus* in species crossing among Genus *Cucumis*.

**Key words** *Cucumis*; plastid; polymorphic loci; maternal inheritance

质体遗传已成为当前研究细胞质遗传的一个重要方面, 对研究植物核互作关系, 起源与进化关系等具有重要意义。高等植物中被子植物质体主要表

现为母系遗传<sup>[1-2]</sup> 和少数双亲遗传<sup>[3-4]</sup>, 自 20 世纪 80 年代应用核酸限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术陆续在被子植物中发现只有少数植物如紫苜

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830079); 教育部‘111’项目(B08025); 江苏省三项工程项目(SXGC(2012)373); 江苏省青蓝工程项目资助

第一作者: 魏跃, 副教授, 博士, 主要从事为园艺植物遗传育种与分子生物学研究, E-mail: wyue12170059@yahoo.cn

通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博士生导师, 主要从事园艺蔬菜遗传育种与分子生物学研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn

蓆<sup>[5-6]</sup>、胡萝卜<sup>[7]</sup>、牵牛属<sup>[8]</sup>质体表现为父系遗传,而裸子植物中则普遍存在父系质体遗传<sup>[9]</sup>。关于葫芦科甜瓜属植物质体遗传也有报道,Havey等<sup>[10]</sup>证实甜瓜属中甜瓜(*Cucumis melo* L.)和葫芦科其他属如南瓜属中西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)、西瓜属中西瓜(*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsam and Nakai.)一样,质体都为母系遗传。而甜瓜属黄瓜由于相对狭窄的遗传背景试验材料之间没有多态性酶切差异片断出现,无法判断其质体遗传特征<sup>[11-12]</sup>。Corriveau等<sup>[13]</sup>应用DAPI荧光法观察到精细胞和受精卵中雄性质体受到清除和排斥,从而间接推断出黄瓜质体为母系遗传,而甜瓜属不同种之间杂交质体的遗传规律由于生殖隔离目前尚无报道。

陈劲枫等<sup>[14-18]</sup>以甜瓜属野生种(*Cucumis hystrix* Chakr.,  $2n=24$ )为母本,栽培黄瓜品种‘北京截头’(*Cucumis sativus* cv. ‘Beijingjietou’,  $2n=14$ )为父本进行远缘杂交,再通过胚拯救和无性系变异染色体加倍而形成甜瓜属异源四倍体新种(*Cucumis hytivus* Chen and Kirkbride.,  $2n=38$ )。该种的育成对将野生种的抗病<sup>[19]</sup>和抗虫<sup>[20]</sup>等优良基因导入栽培黄瓜中具有重要的意义,同时对研究甜瓜属种间杂交质体的遗传研究提供了良好材料。

早期研究质体遗传主要采用遗传学和细胞学的方法<sup>[21-22]</sup>。近年来随着分子生物学技术的发展,一些新的方法如限制性片段长度多态性(RFLP)方法等被广泛使用<sup>[8, 10-11, 23-24]</sup>。而PCR扩增并进行DNA测序分析的方法快速、准确、可靠,能准确地反映出杂交种和亲本之间的遗传关系。本试验参考前人选择叶绿体 $matK-trnK$ <sup>[25-26]</sup>和 $rbcL$ <sup>[26]</sup>基因作为分子标记,运用PCR直接测序法,旨在对甜瓜属不同种 $hystrix \times sativus$ 杂交质体DNA的遗传规律进行研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以南京农业大学黄瓜课题组提供的黄瓜栽培品种‘北京截头’(*Cucumis sativus* cv. ‘Beijingjietou’,  $2n=14$ , CC)、甜瓜属野生种(*Cucumis hystrix* Chakr.,  $2n=24$ , HH)和人工合成的异源四倍体新种(*Cucumis hytivus* Chen and Kirkbride.,  $2n=38$ , HHCC)为试验材料,其中异源四倍体新种为经过5代连续自交的 $S_5$ 后代, $S_0$ 初代为以甜瓜属野生种为母本、‘北京截头’为父本进行远缘杂交再通过胚

拯救和无性系变异染色体加倍而形成。种子播种于灭菌基质中并放置于人工气候箱中培养,温度为28℃,每日光照为14 h,幼苗4~5片真叶时取嫩叶。PMD19-T载体、*Taq*酶均为TaKaRa公司产品,大肠杆菌TOP<sub>10</sub>为本实验室保存。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 DNA的提取

叶片总DNA提取采用CTAB法<sup>[27]</sup>。

#### 1.2.2 叶绿体 $MatK$ 、 $RbcL$ 基因片段的扩增

根据NCBI公布的黄瓜叶绿体完全基因序列(NC\_007144)中 $maturase K$ ( $matK$ )和相邻 $tRNA-Lys$ ( $trnK$ )基因序列设计一对上下游引物, $matKS$ : 5'-TTTAACACAAGAAAGGCGAAGT-3',  $matKA$ : 5'-AACTCAATGGTAGAGTACTCGG-3',扩增序列涵盖 $matK$ 、 $trnK$  intron和 $trnK$ 基因。分别以上述3个种总DNA为模板,水为阴性对照,PCR扩增反应条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,48℃ 30 s,72℃ 2.5 min,35个循环;72℃ 10 min,4℃保存。

同样根据叶绿体 $ribulose-1,5-bisphosphate$   $carboxylase/oxygenase$ ( $rbcL$ )和相邻 $acetyl-CoA$   $carboxylase$   $\beta$   $subunit$ ( $accD$ )基因序列设计一对上下游引物, $rbcLS$ : 5'-GACTACTTAACA-GGTGGATTCA-3',  $rbcLA$ : 5'-AGAAGAAGTT-GTGATACTTGGC-3'。扩增序列涵盖 $rbcL$ 基因和 $rbcL-accD$  intergenic spacer( $rbcL-accD$  IGS)。PCR扩增反应条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,49℃ 30 s,72℃ 1.5 min,35个循环;72℃ 10 min,4℃保存。

#### 1.2.3 PCR产物的回收、克隆及序列分析比较

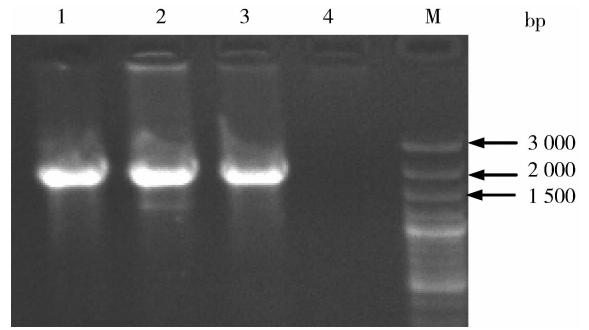
回收的目的片段连接到PMD19-T载体上,连接产物转化感受态大肠杆菌TOP<sub>10</sub>,进行蓝白斑筛选,挑取白斑接种于1 mL LB(含100 mg/L氨苄青霉素)液体培养基中。温度37℃振荡频率150 r/min培养过夜。在相同条件下进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小。序列测定由上海生工生物科技公司完成,利用DNAMAN软件进行多序列比对及同源性分析。

## 2 结果与分析

甜瓜属3个种 $matK-trnK$ 区域所测序列长度为2 035~2 036 bp与预测相符(图1),经测序其中‘北京截头’为2 035 bp,新种、野生种都为2 036 bp。利用DNAMAN软件对DNA测序结果进行比对,

对其中的多态性位点(3 个种同一位点上的碱基类型不完全相同)及其碱基组成进行分析统计,结果如表 1 所示:*matK-trnK* 区域中总长 2 036 个碱基位点中共有 18 个多态性位点,其中只有第 143 位点为碱基插入或缺失(Insertion-deletion)类型,其余 17 个位点都为碱基替代类型。有 12 个多态性位点分布在 1 291 bp 长度的 *matK* 基因内,另 6 个多态性位点分布在 716 bp 长度的 *trnK* intron 内,长度 29 bp 的 *trnK* 无多性位点存在。18 个多态性位点中有 16 个位点异源四倍体新种子代与母本野生种完全相同,占多态位点总数的 88.9%;另 2 个多态性位点第 521、544 位点与父本‘北京截头’相同,占多态位点总数 11.1%。

对 3 个种 *rbcL-accD* 区域进行 PCR 扩增(图 2),测序发现三者长度差异相对较大,其中‘北京截头’



M, DL 3 000 DNA 标准分子量;1. 野生种;2. 异源四倍体新种;3. 黄瓜‘北京截头’;4. 阴性对照(水)  
M, DL 3 000 Marker; 1. Wild species; 2. Allotetraploid; 3. Cucumber ‘BeijingJietou’; 4. Negative control(water)

图 1 以 3 个种 DNA 为模板 *matK-trnK* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis results of *matK-trnK* gene PCR products using DNA of three species as template

表 1 *matK-trnL* 区域多态性位点位置及碱基类型

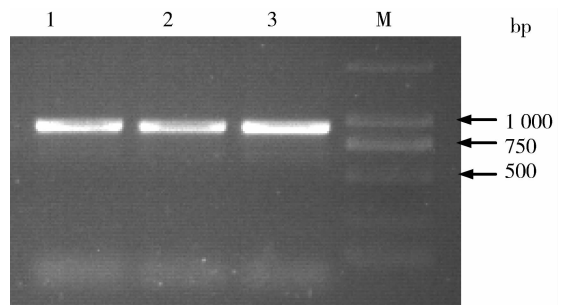
Table 1 Polymorphic loci and base types of *matK-trnL* gene region

样品 Sample	多态性碱基位置及类型 Polymorphic loci and base type <i>matK</i>											
	143	432	476	521	544	618	644	667	835	868	989	1 054
北京截头“Beijingjietou”	—	C	T	G	G	G	C	C	C	T	G	G
新种 Allotetraploid	C	T	C	G	G	A	T	G	G	G	A	A
野生种 Wild species	C	T	C	T	T	A	T	G	G	G	A	A

样品 Sample	多态性碱基位置及类型 Polymorphic loci and base type <i>trnK</i> 内含子 <i>trnK</i> intron					
	1 302	1 489	1 528	1 792	1 827	1 832
北京截头“Beijingjietou”	G	A	C	G	C	A
新种 Allotetraploid	T	G	T	C	A	C
野生种 Wild species	T	G	T	C	A	C

为 944 bp,新种为 936 bp、野生种为 935 bp。利用 DNAMAN 软件进行比对,经过统计分析结果如表 2 所示:总长为 945 个位点中共有 19 个多态性位点,其中有 11 个属于碱基插入或缺失(Insertion-deletion)类型,其余 8 个为碱基替换类型。19 个多态性位点中有 10 个位点分布在 633 bp 长度的 *rbcL* 基因内,占 *rbcL* 长度的 1.58%;另 9 个位点分布在 312 bp 长度的 *rbcL-accD* IGS 内,占 IGS 长度的 2.88%,IGS 多态性位点比率高于 *rbcL* 基因。19 个多态性位点中有 18 个位点新种与母本野生种相同,占多态性位点总数的 94.7%;只有第 771 位点新种与父本‘北京截头’相同,占多态性位点总数的 5.3%。



M, DL 2 000 DNA 标准分子量;1. 野生种;2. 异源四倍体新种;3. 黄瓜‘北京截头’。  
M, DL 2 000 Marker; 1. Wild species; 2. Allotetraploid; 3. Cucumber ‘BeijingJietou’.

图 2 以 3 个种 DNA 为模板 *rbcL-accD* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Electrophoresis results of *rbcL-accD* gene PCR products using DNA of three species as template

表2 *rbcL-accD* 区域多态性位点位置及碱基类型Table 2 Polymorphic loci and base types of *rbcL-accD* gene region

样品 Sample	多态性碱基位置及类型 Polymorphic loci and base type												
	<i>rbcL</i>										<i>rbcL-accD</i> IGS		
	138	566	571	572	573	574	579	580	581	591	674	680	681
北京截头“Beijingjietou”	A	T	G	T	G	A	G	A	G	T	G	G	C
新种 Allotetraploid	C	—	T	G	—	—	—	—	T	—	—	—	—
野生种 Wild species	C	—	T	G	—	—	—	—	T	—	—	—	—

样品 Sample	多态性碱基位置及类型 Polymorphic loci and base type					
	<i>rbcL-accD</i>		基因间隔区域 <i>rbcL-accD</i> IGS			
	703	771	782	794	879	903
北京截头“Beijingjietou”	C	A	A	G	G	—
新种 Allotetraploid	T	A	C	C	T	T
野生种 Wild species	T	—	C	C	T	T

### 3 讨论

3个种多态性位点在 *matK* 基因出现频率为 0.93%，在相邻的 *trnK* intron 出现频率为 0.83%，差异不明显，表明内含子虽然没有参与 *trnK* 基因编码，但可能对外显子序列的识别与正确剪切等具有重要的功能而保守性较强；3个种多态性位点在 *rbcL* 基因内出现频率为 1.58%，而在相邻的 *rbcL-accD* IGS(基因间隔区域)出现频率为 2.88%，表明 IGS 区域在进化上具有选择压力小和进化速率较快的特点。同时也可以看出不同基因之间的保守性相差较大。

在本试验叶绿体 *matK-trnK* 和 *rbcL-accD* 的 2 个区域中，分别存在着 18 和 19 个多态性位点，其中多态性位点碱基新种子代与母本野生种的相同而与父本‘北京截头’不同的比率分别为 88.9% 和 94.7%，根据子代多态性碱基位点与父母本双亲的相似性，推断甜瓜属 *hystrix* × *sativus* 种间杂交质体 DNA 主要表现为母系遗传。出现少部分多态性位点碱基与父本‘北京截头’相同，可能主要是由于新种 S<sub>0</sub> 无性系变异染色体加倍和经 5 代连续自交积累 DNA 随机突变而造成的，当然也不排除有少量父本叶绿体基因片断渗入到杂交后代中，尚需要进一步试验证明。

本研究表明甜瓜属 *hystrix* × *sativus* 种间杂交中质体 DNA 遗传表现为母系遗传，结合前人关于

甜瓜属中的甜瓜<sup>[10]</sup>和黄瓜<sup>[13]</sup>质体为母系遗传研究报道，推断甜瓜属植物质体遗传可能和绝大多数植物一样表现为母系遗传，因此在甜瓜属作物遗传育种试验中当目标性状由质体基因控制时，应选用具有目标性状的个体作母本对杂交后代选育可能会更加有利。

在细胞器遗传研究中，前人<sup>[10-11,24]</sup>多采用 RFLP 和 PCR-RFLP 技术<sup>[27-29]</sup>。RELP 操作较为复杂，由于采用放射性同位素探针对人还具有一定危害性，RFLP 和 PCR-RFLP 都采用限制性内切酶进行酶切再进行条带的差异分析，而酶切完全程度容易受到 DNA 甲基化、模板和酶浓度及反应温度、时间等外界环境的影响而不十分可靠。此外限制性内切酶只能显示识别位点碱基的差异，识别的碱基位点十分有限。而 PCR 直接测序法则无上述缺点，通过测序和分析就能够显示每个位点碱基的差异，其他植物已进行过类似研究，如 Ferris 等<sup>[30]</sup>通过比较叶绿体 *tRNA<sup>Leu1</sup>* 内含子片断中碱基序列差异，袁长春等<sup>[31]</sup>通过对叶绿体 DNA *trnL-trnF* 区域进行序列测定和差异比较，都对自然杂交种的父母本进行了成功确认，显示该法具有简单、快捷、灵敏的优点。

### 参 考 文 献

- [1] Sears B B. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom[J]. *Plasmid*, 1980(4): 233-255

- [2] Whatley J M. Ultrastructure of plastid inheritance: Green algae to angiosperms[J]. Biol Rev, 1982, 57: 527-569
- [3] Smith S E. Biparental inheritance of organelle and implication in crop improvement[J]. Plant Breed Rev, 1988(6): 361-393
- [4] Gillham N W. Organelle Heredity [M]. New York: Raven Press, 1978
- [5] Schumarm C M, Hancock J F. Paternal inheritance of plastids in *Madicago sativa* [J]. Theor Appl Genet, 1989, 78: 862-866
- [6] Masoud S A, Johnson L B, Sorensen E L. High transmission of paternal plastid DNA in *alfalfa* plants demonstrated by restriction fragment polymorphic analysis [J]. Thero Appl Genet, 1990, 79: 49-55
- [7] Boblenz K, Thomas N, Michael M. Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucas* [J]. Mol Gen Genet, 1990, 220: 489-491
- [8] Hu Zun min, Hu Shi yi. Paternal inheritance of plastid DNA in genus *Pharbitis* [J]. Acta Bot Sin, 1996, 38: 253-256
- [9] Hagemann R. Plastid Genetics in Higher Plants Cell Organelles [M]. Vienna: Springer, 1992
- [10] Havey M J, McCreight J D, Rhodes B, et al. Differential transmission of the *Cucumis* organellar genomes [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 122-128
- [11] Havey M J. Predominant paternal transmission of the mitochondrial genome in cucumber [J]. J Hered, 1997, 88(3): 232-235
- [12] Perl-Treves R, Galun E. The *Cucumis* plastome: Physical map, intragenetic variation, and phylogenetic relationships [J]. Theor Appl Genet, 1985, 71: 417-429
- [13] Corriveau J L, Coleman A W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species [J]. Amer J Bot, 1988, 75: 1443-1458
- [14] Chen J F, Staub J E, Tashiro Y. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L and *Chystrix* Chakr [J]. Euphytica, 1997, 96: 413-419
- [15] Chen J F, Adelberg J, Staub J E, et al. A new synthetic amphidiploid in *Cucumis* from *C sativus* × *Chystrix* Chakr F1 interspecific hybrid [C] // McCreight J D. Cucurbitaceae 98-evaluation and enhancement of cucurbit germplasm. Alexandria, Va(USA): ASHS press, 1998: 336-339
- [16] Chen J F, Adelberg J. Interspecific hybridization in *Cucumis*-progress, problem, and perspectives [J]. Hortscience, 2000, 35(1): 11-15
- [17] Chen J F, Joseph H, Kirkbride J. A new synthetic species *Cucumis* (Cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling [J]. Brittonia, 2000, 52(4): 315-319
- [18] Chen J F, Staub J E, Adelberg J W. Synthesis and preliminary characterization of a new species (amphidiploid) in *Cucumis* [J]. Euphytica, 2002, 123(3): 315-322
- [19] 曹清河, 陈劲枫, 钱春桃. 黄瓜抗霜霉病异源易位系 CT-01 的筛选与鉴定 [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1098-1101
- [20] 陈劲枫, 林茂松, 钱春桃, 等. 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 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 21-24
- [21] Neale D B, Wheeler N C, Allard R W. Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas fir [J]. Can J For Res, 1986, 16: 1152-1154
- [22] Hagemann R, Schroder M B. The cytological basis of plastid inheritance in angiosperms [J]. Protoplasma, 1989, 152: 57-64
- [23] Hu S Y. A cytological study of plastid inheritance in angiosperms [J]. Acta Bot Sin, 1997, 39(4): 363-371
- [24] Matsuursa S. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in cucumber (*Cucumis sativus* L) [J]. Rep Cucurbit Genet Coop, 1995, 18: 31-33
- [25] 施苏华, 杜稚青, David Bufford, 等. 用 cpDNA matK 基因和 nrDNA ITS 区序列确定我国特有植物四棱草属的系统位置 [J]. 科学通报, 2003, 48(11): 1176-1180
- [26] 李晓贤, 周浙昆. 单子叶植物高级分类阶元系统演化: matK、rbcL 和 18S rDNA 序列的证据 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(2): 113-133
- [27] Chat J, Chalak L, Petie R J. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 314-322
- [28] Vaillancourt R E, Petty A, Mckinnon G E. Maternal inheritance of mitochondria in *Eucalptus globulus* [J]. Journal of Heredity, 2004, 95(4): 353-355
- [29] Erickson L, Kemble R. Paternal inheritance of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Mol Gen Genet, 1990, 222: 135-139
- [30] Ferris C, King R A, Gray A J. Molecular evidence for the maternal parentage in the hybrid origin of *Spartina anglica* C E Hubbard [J]. Molecular Ecology, 1997, 6(2): 185-187
- [31] 袁长春, 何雪宝, 袁秋梅, 等. 绿绒蒿自然杂交种及其亲本 cpDNA *trnL-trnF* 基因的遗传学分析 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(1): 103-108