

宋波,陈龙正,徐海,等. 有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的 ISSR 分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):42-44.

有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的 ISSR 分析

宋波¹, 陈龙正¹, 徐海¹, 郑涛², 袁希汉¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 四川省成都市新津县农村发展局, 四川成都 611400)

摘要:应用 ISSR 技术对有棱丝瓜 [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.] 与普通丝瓜 [*Luffa cylindrica* (L.) Roem.] 及其种间杂种 F₁、F₂ 代的遗传差异性进行了研究。结果表明:供试材料基因组 DNA 间具有很高的多态性,双亲的遗传相似系数仅为 0.395,F₁ 的条带主要表现为双亲互补带型,F₁、F₂ 并没有明显向双亲任何一方遗传的倾向,F₂ 的遗传变异较大。

关键词:有棱丝瓜;普通丝瓜;种间杂种;ISSR

中图分类号:S642.403.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0042-03

有棱丝瓜 [*Luffa acutangula* (L.) Roxb.] 与普通丝瓜 [*Luffa cylindrica* (L.) Roem.] 是我国普遍种植的 2 个丝瓜栽培种。有棱丝瓜与普通丝瓜在花色、花期以及果实性状等农艺性状方面存在较大差异,同时二者具有许多互补的优良性状,如普通丝瓜的果皮摩擦后或果肉烹饪后均易变褐,而有棱丝瓜的果肉在烹饪后不变色,保持翠绿,口感清香。有棱丝瓜开花对日照长度要求严格,早熟性较差,产量不高,普通丝瓜一般早熟性好,产量高,可通过种间杂交,利用彼此的优良性状对二者进行有目的的改良^[1-2]。目前国内外关于丝瓜种间杂交研究集中在杂交技术、农艺性状等方面^[1-4],关于分子层面的研究未见报道。本研究对有棱丝瓜与普通丝瓜及其种间杂种 F₁、F₂ 进行 ISSR 分析,从 DNA 分子水平分析亲本及杂交后代间的遗传差异性,旨在为揭示丝瓜种间杂交后代的遗传特性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为有棱丝瓜(P₁)、有棱丝瓜×普通丝瓜(F₁)、普通丝瓜(P₂)、20 个 F₂ 单株,共 23 份材料。3 叶期取幼苗嫩叶,用 CTAB 法提取基因组 DNA。

收稿日期:2013-10-23

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2012323);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(11)1002]。

作者简介:宋波(1981—),男,四川乐山人,硕士,助理研究员,从事十字花科和瓜类蔬菜研究。E-mail: anybody119@sina.com。

通信作者:袁希汉,研究员,从事十字花科和瓜类蔬菜研究。E-mail: xhyuan258@163.com。

1.2 ISSR 分析

ISSR 反应体系共 20 μL。在灭菌的 0.2 mL PCR 薄壁管中依次加入下列组分:双蒸水 11.8 μL,10×Buffer 溶液 2 μL,25 mmol/L MgCl₂ 溶液 2 μL,2 mmol/L dNTPs 2.5 μL,10 mmol/L 20 碱基随机引物 0.5 μL,TaqDNA 聚合酶 1 U,20~40 ng 模板 DNA 1 μL(以上各反应组分均购于上海生工生物工程技术服务有限公司)。稍加离心混匀后,在 PTC-100 PCR 仪中扩增。反应程序:预变性 94℃,5 min;94℃,30 s,55.8℃,45 s,72℃,2 min,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离 1.5 h,电压为 5 V/cm,0.5 μg/L 溴化乙锭染色,用上海培青凝胶成像系统进行拍照分析。扩增片段的分子大小标记是 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus。从 70 个引物中筛选出重复性好、适宜于各供试材料的 6 个引物(ISSR17、ISSR22、ISSR23、ISSR26、ISSR33、ISSR59)进行 ISSR 分析。

1.3 数据处理

每个样品的扩增条带按有或无记录,有带赋值为 1,无带赋值为 0,按 Nei 的方法^[5]计算材料间的相似系数(genetic similarity):

$$GS(i,j) = 2N(i,j) / [N(i) + N(j)]。$$

式中:GS(i,j)是遗传相似系数,N(i,j)是材料 i,j 共同具有的带数;N(i)是材料 i 的带数,N(j)是材料 j 的带数。

2 结果与分析

2.1 供试材料的 ISSR 分析

筛选出的 6 个 ISSR 引物能够获得清晰条带,反应稳定,能够用于扩增试验。23 份供试材料扩增的带数总计 652 条,ISSR 片段长度为 500~2 900 bp,共产生 38 条扩增带,其中 34

[7]Gallerne C,Touat Z,Chen Z X,et al. The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010,42(5):623-629.

[8]兰春慧,房殿春,樊丽琳,等. 线粒体内膜蛋白 ANT 在幽门螺杆菌致胃癌细胞凋亡中的表达[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(2):100-102.

[9]Zamora M,Granell M,Mampel T,et al. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells[J]. FEBS Letters,2004,563(1/2/3):155-160.

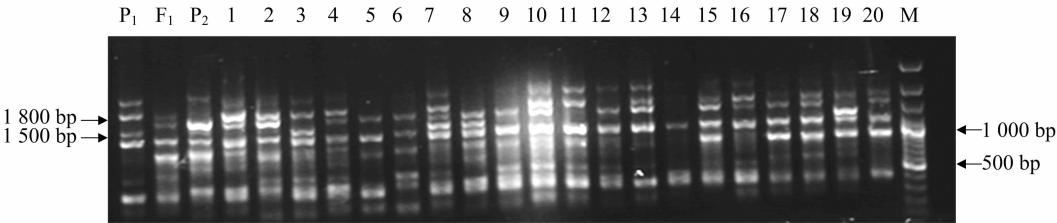
[10]崔秀玉,吕国蔚. 脑缺氧和脑缺氧适应时能量代谢的变化[J]. 首都医科大学学报,1996,17(2):153-155.

[11]李丽,赵成萍,李宏,等. 质粒制备绝对定量 PCR 标准曲线方法的建立[J]. 农业生物技术学报,2011,19(6):1157-1162.

条具有多态性,多态率达 89.5%。各供试材料扩增的 ISSR 总带数变幅为 22~35 条,扩增的片段数因引物不同存在差异,变幅为 1~8 条(表 1)。

表 1 供试材料的 ISSR 扩增带统计结果

材料	扩增 总带数 (条)	亲本特异带数目及比例			
		有棱丝瓜 特异带条 数(条)	比例 (%)	普通丝瓜 特异带条 数(条)	比例 (%)
有棱丝瓜(P ₁)	30	15	50.0		
有棱丝瓜×普通丝瓜(F ₁)	35	12	34.3	8	22.9
普通丝瓜(P ₂)	23			8	34.8
F ₂ -1	30	12	40.0	6	20.0
F ₂ -2	34	12	35.3	8	23.5
F ₂ -3	28	10	35.7	5	17.9
F ₂ -4	27	9	33.3	6	22.2
F ₂ -5	24	6	25.0	6	25.0
F ₂ -6	25	6	24.0	6	24.0
F ₂ -7	33	12	36.4	7	21.2
F ₂ -8	28	8	28.6	6	21.4
F ₂ -9	26	6	23.1	7	26.9
F ₂ -10	29	9	31.0	7	24.1
F ₂ -11	30	10	33.3	6	20.0
F ₂ -12	24	5	20.8	6	25.0
F ₂ -13	32	10	31.3	8	25.0
F ₂ -14	22	7	31.8	3	13.6
F ₂ -15	31	12	38.7	6	19.4
F ₂ -16	28	8	28.6	7	25.0
F ₂ -17	26	6	23.1	7	26.9
F ₂ -18	32	10	31.3	8	25.0
F ₂ -19	25	9	36.0	3	12.0
F ₂ -20	30	11	36.7	5	16.7



M为Marker, 编号1~20为F₂的20个单株

图1 有棱丝瓜×普通丝瓜的双亲、F₁、F₂的 ISSR33 引物扩增的带型

3 结论与讨论

本研究表明,有棱丝瓜与普通丝瓜之间的遗传相似系数较低,很好地解释了二者农艺性状差异较大的原因。这一结果与夏军辉对有棱丝瓜、普通丝瓜的 RAPD 分析结果^[6]相一致。

本研究对丝瓜种间杂交后代进行了初步的 ISSR 分析,结果表明,杂种 F₁ 的条带主要表现为双亲互补带型,F₂ 的条带全部来源于双亲,未出现新的条带,说明在继承双亲共有条带上具有较高稳定性。从理论上讲,经过减数分裂,F₂ 应该会产生新的条带,这可能与本试验采用的引物较少有关。ISSR 分子标记技术在丝瓜上具有较高的多态性,能很好地运用于丝瓜分子标记研究中,这为果肉褐变等分子标记开发研究奠定了基础。

2.1.1 双亲和杂种 F₁ 的 ISSR 分析 由表 1 可知,6 个引物在有棱丝瓜、普通丝瓜 2 个亲本中分别扩增出 30、23 条带,2 个亲本的特异带分别为 15、8 条,各占 50.0%、34.8%,因而很容易将有棱丝瓜与普通丝瓜区别开来。6 个引物在 F₁ 中共扩增出 35 条带,其中与有棱丝瓜特异带相同的有 12 条,占 34.3%;与普通丝瓜特异带相同的有 8 条,占 22.9%。F₁ 丢失了 3 条有棱丝瓜特异带,未丢失普通丝瓜特异带。从图 1 可看出,F₁ 同时具有 ISSR33-1500、ISSR33-1800 两条双亲的互补条带,说明杂种 F₁ 的条带主要表现为双亲互补带型。

2.1.2 F₂ 群体的 ISSR 分析 从表 1 可知,6 个引物在 F₂ 群体中共扩增出 22~34 条带,F₂-14 仅扩增出 22 条带,其中丢失 8 条有棱丝瓜特异带,5 条普通丝瓜特异带,3 条父母本共有条带。F₂-2 扩增出 34 条带,仅丢失 3 条有棱丝瓜特异带,并全部继承普通丝瓜的特异条带,丢失 1 条父母本共有条带。F₂ 与有棱丝瓜特异带相同的有 5~12 条,占扩增总带数的 20.8%~40.0%。F₂ 与普通丝瓜特异带相同的有 3~8 条,占扩增总带数的 12%~26.9%。F₂ 继承父母本共有条带有 12~14 条,说明在继承父母本共有条带上具有一定稳定性,但在 F₂ 群体中并未扩增出新的条带。

2.2 双亲与种间杂种后代的遗传相似系数比较

由表 2 可知,有棱丝瓜、普通丝瓜的遗传相似系数为 0.395,表明双亲的遗传差异较大。有棱丝瓜与 F₁ 遗传相似系数为 0.711,普通丝瓜与 F₁ 遗传相似系数为 0.684,差异不显著。F₂ 与有棱丝瓜的遗传相似系数为 0.524~0.737,F₂ 与普通丝瓜的遗传相似系数为 0.553~0.763,说明 F₁、F₂ 并没有明显向双亲任何一方遗传的倾向。F₂ 株系间的遗传相似系数为 0.500~0.895,表明 F₂ 的遗传变异较大。

参考文献:

[1] 宋 波,苏小俊,陈 洁,等. 普通丝瓜与有棱丝瓜亚种间杂交的正反交效应分析[J]. 江苏农业科学,2008(5):139-142.

[2] 宋 波. 有棱丝瓜与普通丝瓜种间杂种后代的遗传分析[D]. 南京:南京农业大学,2008.

[3] 袁希汉,苏小俊,高 军,等. 低温贮藏对丝瓜花粉活力和结实的影响[J]. 江苏农业科学,2008(2):122-124.

[4] 谢文军. 不同类型丝瓜杂种优势及性状遗传特性的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2003.

[5] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1979,76(10):5269-5273.

[6] 夏军辉. 丝瓜种质资源遗传多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

表 2 供试丝瓜材料间的遗传相似系数

供试材料	遗传相似系数																					
	P ₁	F ₁	P ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
P ₁	1.000																					
F ₁	0.711	1.000																				
P ₂	0.395	0.684	1.000																			
1	0.684	0.763	0.553	1.000																		
2	0.684	0.868	0.658	0.790	1.000																	
3	0.684	0.711	0.605	0.579	0.684	1.000																
4	0.605	0.737	0.632	0.658	0.816	0.711	1.000															
5	0.526	0.711	0.711	0.579	0.632	0.579	0.553	1.000														
6	0.553	0.737	0.737	0.605	0.763	0.658	0.737	0.711	1.000													
7	0.711	0.895	0.632	0.658	0.763	0.711	0.684	0.605	0.684	1.000												
8	0.632	0.763	0.711	0.579	0.632	0.684	0.500	0.790	0.763	0.763	1.000											
9	0.524	0.763	0.763	0.632	0.684	0.579	0.553	0.737	0.763	0.711	0.842	1.000										
10	0.605	0.737	0.684	0.711	0.763	0.605	0.632	0.605	0.684	0.684	0.605	0.605	1.000									
11	0.684	0.868	0.658	0.632	0.790	0.684	0.711	0.684	0.711	0.816	0.737	0.790	0.658	1.000								
12	0.526	0.711	0.763	0.579	0.632	0.684	0.605	0.684	0.763	0.711	0.790	0.895	0.605	0.737	1.000							
13	0.632	0.868	0.711	0.737	0.842	0.684	0.711	0.737	0.711	0.816	0.737	0.737	0.711	0.790	0.737	1.000						
14	0.632	0.658	0.605	0.579	0.526	0.632	0.658	0.684	0.763	0.658	0.684	0.632	0.605	0.632	0.684	0.632	1.000					
15	0.711	0.895	0.579	0.816	0.763	0.605	0.632	0.605	0.684	0.842	0.711	0.763	0.632	0.816	0.711	0.763	0.605	1.000				
16	0.579	0.816	0.711	0.684	0.684	0.737	0.658	0.790	0.711	0.763	0.737	0.684	0.711	0.737	0.790	0.842	0.790	0.711	1.000			
17	0.526	0.658	0.763	0.632	0.684	0.632	0.553	0.790	0.711	0.553	0.737	0.790	0.711	0.632	0.790	0.684	0.684	0.553	0.790	1.000		
18	0.632	0.868	0.711	0.684	0.895	0.632	0.763	0.684	0.763	0.763	0.737	0.737	0.711	0.790	0.632	0.790	0.579	0.763	0.684	0.684	1.000	
19	0.711	0.632	0.579	0.500	0.711	0.763	0.684	0.553	0.737	0.632	0.711	0.605	0.526	0.711	0.605	0.605	0.605	0.579	0.605	0.605	0.763	1.000
20	0.737	0.816	0.605	0.684	0.790	0.684	0.711	0.684	0.816	0.763	0.737	0.684	0.658	0.737	0.684	0.737	0.684	0.816	0.737	0.684	0.842	0.710