

三种黑籽南瓜 RAPD 分析

成晓静¹, 周楚奇¹, 周丽英¹, 卜璐璐¹, 洪健康², 杨正安¹

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省红河州农业科学研究所, 云南 蒙自 661100)

摘要:以“绿皮”、“白皮”、“绿皮花纹”3种云南黑籽南瓜为试验材料,采用 RAPD 技术分析了3种类型黑籽南瓜间的亲缘关系。结果表明:从38种随机引物中筛选出20种引物,选取扩增清晰、重复性好的6种引物分析,共产生43条谱带,多态谱带39条,多态性位点比率为90.70%;“绿皮”、“白皮”和“绿皮花纹”之间的平均遗传距离是0.94,“白皮”和“绿皮花纹”间的平均遗传距离为0.40;“绿皮”与“白皮”及“绿皮花纹”间的亲缘关系较远,而“白皮”与“绿皮花纹”间的亲缘关系较近。

关键词:黑籽南瓜;基因组 DNA;RAPD;亲缘关系

中图分类号:S 642.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0075-04

黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia*)属南瓜属一年生或多年生草本植物,原产中美洲至南美洲,是喜温不耐热的短日照作物,因种皮黑而得名。蔓性草本,生长势强,叶呈圆形,深裂,与无花果叶相似,因此又称无花果叶瓜。又因其成熟后瓜瓤很像米线或粉丝,云南农民又称之为“米线瓜”或“粉丝瓜”^[1]。黑籽南瓜现分布于世界各地,我国以云南丽江地区栽培最早,相传已有100多年的历史。黑籽南瓜具有极高的抗病性,同时耐寒、适应性广,生产上广泛采用嫁接的方法来提高瓜类的抗病及抗低温能力,可有效地防治枯萎病等瓜类土传病害,同时可大幅度提高产量和改善品质,具有很高的经济效益^[2-3]。

分子标记技术是指能够提供分子标记的分子生物学技术。20世纪90年代发展起来的 RAPD、RFLP 等技术已经普遍应用在植物遗传资源的评价、物种识别、进化关系的确立、种间遗传分化和全局生态学研究^[4]。RAPD 技术的全称是随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)。此技术建立于 PCR 基础之上,由美国科学家 WILLIAMS 等^[5]和 WELSH 等^[6]于 1990 年研究提出。RAPD 技术使用一

系列具有 10 个左右碱基的单链随机引物,对基因组的全部 DNA 进行 PCR 扩增,以作多态性分析^[7]。由于整个基因组存在众多反向重复序列,因此须对每一随机引物单独进行 PCR,单一引物与反向重复序列结合,使重复序列之间的区域得以扩增。引物结合位点 DNA 序列的改变以及 2 个扩增位点之间 DNA 碱基的缺失、插入或置换均可导致扩增片段数目和长度的差异,经琼脂糖凝胶电泳分离后通过 EB 染色以检测 DNA 片段的多态性。

在云南省不同地区的黑籽南瓜资源中,项目组经长期观察,发现其田间表现均为 3 种类型,即“绿皮”、“白皮”、“绿皮花纹”3 种,3 种类型有时是单一出现,有时是混杂出现,这样的混杂,给黑籽南瓜的应用带来了不便,它们之间的遗传关系是一个需要深入研究的问题。该试验对 3 种类型的黑籽南瓜采用了 $L_{16}(4^5)$ 正交体系进行了 RAPD-PCR 反应体系优化,最后,利用所优化的体系进行 RAPD 分析,阐明了 3 种黑籽南瓜的遗传关系,为黑籽南瓜优良品质资源的开发、引种和品种改良的应用提供参考,以期对黑籽南瓜种质资源的研究利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料及来源 分别取 3 种黑籽南瓜的种子 2~3 颗,先用 10% 的过氧化氢处理 1 h,然后再用纸杯种植,放于温箱中待出芽后,再置于试验室中室温培养,待株高长到 10 cm 左右,取幼叶作为样品提取基因组 DNA。黑籽南瓜的序号、特征及来源见表 1 和图 1。

第一作者简介:成晓静(1990-),女,山西霍州人,硕士研究生,研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail:154313767@qq.com.

责任作者:杨正安(1974-),男,云南昆明人,博士,副教授,研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail:454483788@qq.com.

基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2011FB049);国家自然科学基金资助项目(31260481,31460516)。

收稿日期:2015-03-20

表 1 3 种黑籽南瓜的序号、特征及来源

Table 1 The index, characteristic and origins of 3 *Cucurbita ficifolia* Bauche

指数 Index	特征 Characteristic	来源 Origin
1	“绿皮”	云南农业大学后山实验地
2	“白皮”	云南农业大学后山实验地
3	“绿皮花纹”	云南农业大学后山实验地



注:1“绿皮”, 2“白皮”, 3“绿皮花纹”。

Note: 1“Green peel”, 2“White peel”, 3“Green peel with white spot”.

图 1 3 种类型黑籽南瓜

Fig. 1 Three types of black seed pumpkin

1.1.2 试剂及仪器 RAPD 引物, dNTP, *Taq* 酶(购自昆明鼎国生物科技有限责任公司), RAPD 扩增在 Eppendorf Mastercycler PCR 仪上进行, 紫外分析仪为北京君意东方电泳设备有限公司生产的 JY02S 型。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用 CTAB 法^[8-9] 提取黑籽南瓜基因组 DNA。

1.2.2 RAPD-PCR 正交优化体系 该试验进行了 5 因素 4 水平的筛选, 对 RAPD-PCR 进行正交优化体系实验设计(表 2、3)。根据各处理要求制备总体积为 25 μL 的 RAPD-PCR 的反应体系, 同时各处理的体系中还含有 1 \times PCR 缓冲液, 其余用重蒸馏水补充, 最后滴加石蜡油覆盖, 以防止液体蒸发。

表 2 云南黑籽南瓜 RAPD-PCR 反应体系正交设计因素水平

Table 2 Factors-level of RAPD-PCR system with orthogonal design on *Cucurbita ficifolia* Bauche

水平 Level	dNTP 浓度 dNTP concentration /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物 Primer /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentration /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> enzyme /U	模板 DNA Template DNA /ng
1	50	240	1.0	0.5	20
2	100	320	1.5	1.0	40
3	150	400	2.0	1.5	60
4	200	480	2.5	2.0	80

1.2.3 RAPD-PCR 扩增程序 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

3 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 引物筛选, 引物名称及来源 该试验所用引物购自上海生工, 利用 38 个 RAPD 引物对全部材料进行 RAPD 分析, 筛选到有多态谱带的引物 20 个, 选取其中扩增效果较好的 6 个引物, 分别标记为 S151、OPO13、OPO15、R2、S358、S129。其序列见表 4。

表 3 黑籽南瓜 RAPD-PCR 反应体系正交优化实验设计

Table 3 The result of RAPD-PCR system with orthogonal design on *Cucurbita ficifolia* Bauche

水平 Level	dNTP 浓度 dNTP concentration /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	引物 Primer /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} 浓度 Concentration /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> enzyme /U	模板 DNA Template DNA /ng
1	50	240	1.0	0.5	20
2	50	320	1.5	1.0	40
3	50	400	2.0	1.5	60
4	50	480	2.5	2.0	80
5	100	240	1.0	0.5	20
6	100	320	1.5	1.0	40
7	100	400	2.0	1.5	60
8	100	480	2.5	2.0	80
9	150	240	1.0	0.5	20
10	150	320	1.5	1.0	40
11	150	400	2.0	1.5	60
12	150	480	2.5	2.0	80
13	200	240	1.0	0.5	20
14	200	320	1.5	1.0	40
15	200	400	2.0	1.5	60
16	200	480	2.5	2.0	80

1.2.5 电泳检测 在 25 μL PCR 反应终产物中, 取 10 μL 样品, 加 2 μL 6 \times 上样缓冲液混合, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。以 DL 2 000 作为分子量 Marker, 每孔上样 6 μL 。电泳缓冲液为 2 \times SB, 130 V 稳压电泳 1 h 左右, EB 染色, 在 JY02S 凝胶成像系统下观察拍照, 记录试验结果。

1.3 数据分析

统计扩增的条带数, 每一个条带看作一个遗传位, 谱带按 0/1 系统记录, 在相同迁移位置有带记为 1, 无带记为 0, 建立数据库。采用 NEI 等^[10] 相似系数法进行数据分析, 求遗传相似系数。利用 STATISTICA 软件进行 UPGMA 做聚类分析, 形成聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 正交优化结果

由图 2 可知, RAPD-PCR 反应中 5 个影响因素的最佳反应水平为体系 6, 即: dNTP 浓度 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 引物浓度 320 $\mu\text{mol}/\text{L}$, Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L , *Taq* 酶 1.0 U, 模板 DNA 40 ng。由于在试验操作过程中, 16 号样品蒸发, 故 16 号点样空缺。

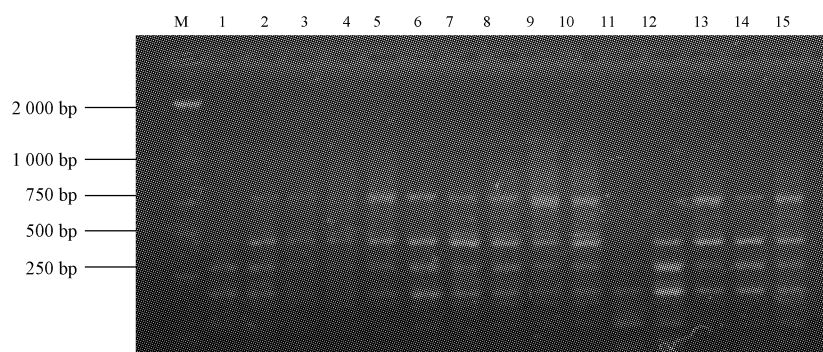


图2 RAPD-PCR 正交设计扩增结果

Fig. 2 The RAPD-PCR amplified result of the orthogonal design diagram

2.2 引物及 RAPD-PCR 扩增

6 个引物共扩增出 43 条谱带,多态谱带 39 条,多态性位点比率为 90.70%。每个引物可扩增出 5~9 条多态性谱带,平均每个引物产生 7 条,图 3 为引物 3 扩增的 3 种黑籽南瓜的 RAPD 电泳图。

表 4 RAPD 引物及其扩增结果

Table 4 RAPD primers and amplification results

引物	碱基序列	总谱带数	多态性带数	多态率
Peimer	Peimer sequence	Amplified	Polymorphic band	Polymorphic rate/%
SI51	GAGTCTCAGG	5	5	100.00
OPO13	GTCAGAGTCC	7	7	100.00
OPO15	TGGCGTCCTT	8	8	100.00
R2	TGGTCGCTGA	9	8	88.89
S358	GTCCATGCAG	8	6	75.00
SI29	CCATGCAGGT	6	5	83.33
Total		43	39	90.70

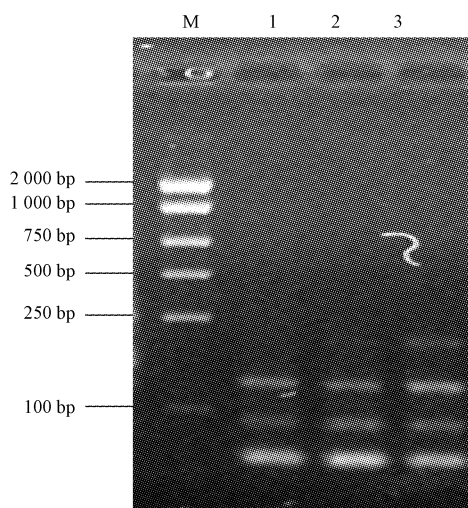


图3 用引物 SI29 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 3 The RAPD pattern amplified by primer SI29

2.3 遗传相似性的 RAPD 聚类分析

由图 4 可以看出,3 个黑籽南瓜的遗传距离在 0~0.94。在 $D=0.94$ 处,3 个黑籽南瓜明确地聚成 2 组。“绿皮”与“白皮”、“绿皮花纹”遗传距离较大,组成 I 组,说

明二者有一定的亲缘关系。“白皮”、“绿皮花纹”品种组成 II 组,这 2 个品种的遗传距离最近,为 0.40,说明这 2 种的亲缘关系很近。

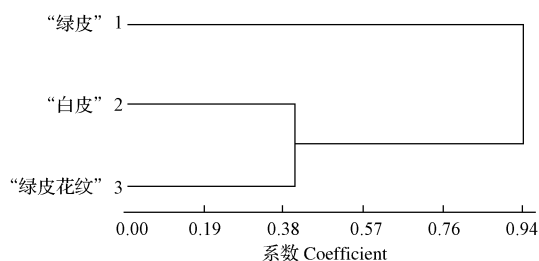


图4 根据 6 条 RAPD 构建的 3 种黑籽南瓜聚类图

Fig. 4 The dendrogram of *Cucurbita ficifolia* Bauche amplified by 6 primers

3 讨论与结论

运用 RAPD 技术反应结果会受很多因素的影响,如 Mg^{2+} 、dNTP、DNA 模板、*Taq* 酶、引物浓度、反应温度等,故寻找反应因素的合理搭配是获得有价值结果的前提。该试验进行了 5 因素 4 水平的筛选,对 RAPD 进行正交优化体系实验设计。通过正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验,按照正交表来安排试验,既能使试验点分布得很均匀,又能减少试验次数,能够清晰地阐明试验条件与指标之间的关系,从而使试验高效率、快速、经济。现在正交实验设计在很多领域的研究中已经得到广泛应用,但在黑籽南瓜中还未被引用,故对黑籽南瓜 RAPD 进行正交优化体系实验设计,是该试验的创新点。

RAPD 标记被广泛用于物种间亲缘关系的研究,是因为 RAPD 分析中供选用的随机引物较多,可对基因组进行地毯式多态性分析,能够充分展示个体间的细微差异,可以有效区分近缘物种^[12-17]。该试验选取了 3 种黑籽南瓜进行 RAPD 分析。从 38 种随机引物中筛选出 20 种,选取其中的 6 种分析,共产生 43 条谱带,多态谱带 39 条,多态性位点比率为 90.70%。该试验选择的 3 种不同形态的黑籽南瓜,虽其外观形态有所差异,但其亲缘关系很接近,说明其与外观形态无关,是具有相同的

起源。从而在 DNA 水平上验证了并揭示了云南黑籽南瓜品种间的亲缘关系,为今后在分子水平上进行黑籽南瓜品种鉴定、种质资源的育种及亲缘关系分析等提供了实用的科学依据。

在黑籽南瓜的种子生产中,同一块实验田里,黑籽南瓜长期田间表现为以下 3 种类型:“白皮”、“绿皮”、“绿皮花纹”。经项目组长期跟踪及观察发现,“绿皮花纹”有可能是“绿皮”和“白皮”品种的杂交后代。从其外观形态看,“绿皮花纹”为“绿皮”和“白皮”2 种颜色混合的颜色。经 RAPD 聚类分析图可看出,3 种黑籽南瓜品种间亲缘关系表现为:“绿皮”与“白皮”及“绿皮花纹”间的亲缘关系较远,而“白皮”与“绿皮花纹”间的亲缘关系较近。进一步证明,“绿皮花纹”成为“绿皮”和“白皮”品种的杂交后代的可能。而对于“绿皮花纹”的黑籽南瓜遗传性更接近“白皮”黑籽南瓜,这可能与遗传方式息息相关。之后,课题组将对“绿皮”与“白皮”间进行进一步的正反交实验分析,以探求其是否为母性遗传即细胞质遗传。进一步确定三者间的遗传关系。

黑籽南瓜有抗取类枯萎病的特性,用作砧木嫁接瓜类植物的亲和力强,成活率高。作为这样一种特殊的植物,近年来鲜有科学工作者对特定的黑籽南瓜种质资源进行深入的鉴定、评价及研究,使其优越性未能充分发挥,得到充分发掘利用。因此,对云南黑籽南瓜进行准确鉴定和分析尤为重要,RAPD 分子标记为其提供很好的平台,将有助于黑籽南瓜种质资源的开发利用。

参考文献

- [1] 赖众民. 黑籽南瓜优异的种质资源[J]. 云南农业科技, 1991(4): 42-44.
- [2] 蒋有条, 孙利祥, 张明方. 我国瓜类嫁接栽培的进展与展望[J]. 长江蔬菜, 1998(6): 1-4.
- [3] 缪珉. 黄瓜热伤害与热适应生理机制及耐热栽培技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.
- [4] 张菊平, 张长远. 碧绿 3 号苦瓜种子纯度的 RAPD 检测研究[J]. 广东农业科学, 2002(4): 18.
- [5] WILLIAMS J C, KUBELIK A R, JENNER C E, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18(6): 531-535.
- [6] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucl Acid Res, 1990, 18(7): 213-218.
- [7] SCOTT V T, JOSEPH P Del Tufo. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA makers[J]. Plant Physiol, 1993, 101: 349-352.
- [8] CHENG F S, BROWN S K, WEEDEN N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species[J]. Hort Science, 1997, 32(5): 921-922.
- [9] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [10] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [11] 胡润芳, 薛珠政, 唐永晖. 白灵侧耳菌株间的 RAPD 分析[J]. 福建农业学报, 2006, 21(4): 346-349.
- [12] 张建珍, 郭亚平, 张敏, 等. 云南三种稻蝗基因组 DNA 的 RAPD 多态性分析[J]. 动物分类学报, 2005, 30(3): 447-452.
- [13] CUI X M. Authentication of *Panax notoginseng* by 5S rRNA spacer domain and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis[J]. Planta Med, 2003, 69(6): 584-586.
- [14] PARK S Y, YOOK C S, NOHARA T, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic relationships among *Acanthopanax* species[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(12): 1270-1274.
- [15] HOSOKAWA K, MINAMI M, KAWAHARA K, et al. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers[J]. Planta Med, 2000, 66(3): 270-272.
- [16] ZHANG M, HUANG H R, LIAO S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum*[J]. China J Chin Med Mater, 2001, 26(7): 442-447.
- [17] WANG A M, JI S. Experiment briefing of two officinal *Dendrobium* by RAPD[J]. J Chin Med Mater, 2002, 25(5): 324-325.

RAPD Analysis on Three *Cucurbita ficifolia*

CHENG Xiaojing¹, ZHOU Chuqi¹, ZHOU Liying¹, BU Lulu¹, HONG Jiankang², YANG Zhengang¹

(1. College of Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 6502101; 2. Honghe Prefecture Agricultural Institute of Yunnan Province, Mengzi, Yunnan 661100)

Abstract: The genomic DNA of 3 *Cucurbita ficifolia* whose names were ‘Green peel’, ‘White peel’ and ‘Green peel with White peel’ respectively were extracted by CTAB and were used to analysis the genetic relationships by RAPD molecular markers. RAPD was affected by many factors, so this experiment was for improved RAPD method. 5 factors and 4 levels orthogonal design and screening of RAPD-PCR reaction system was used, the three kinds of black seed pumpkin relatedness were analyzed. The results showed that from 38 kinds of random primers selected 20 kinds of primers, 6 kinds of the primers’ analysis was clear amplification, and better repeatability. Total 43 bands were amplified, in which 39 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic band was 90.70%. The cluster analysis results were indicated as follows: the average genetic distance among ‘Green peel’, ‘White peel’ and ‘Green peel with white spot’ was 0.94. The genetic distance between ‘White peel’ and ‘green peel with white spot’ was 0.40. The results showed that the *Cucurbita ficifolia* varieties of relationships: ‘Green peel’ and ‘White peel’, ‘Green peel with white spot’ had far more distant relatives, and then ‘White peel’ and ‘Green peel with white spot’ had close genetic relationship.

Keywords: *Cucurbita ficifolia* Bauche; genome DNA; RAPD; genetic diversity