

黄瓜中导入野生酸黄瓜外源 DNA 片段的分子验证

史建磊, 陈劲枫, 娄群峰, 隋益虎, 吴志明, 张淑霞

(南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要: 【目的】对栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., 2n=14) 与野生酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr., 2n=24) 经远缘杂交和多代回交、自交而来的渐渗系进行分子标记分析和表型鉴定, 旨在为黄瓜导入酸黄瓜外源 DNA 片段提供相应依据。【方法】从分子标记分析、DNA 序列比对和农艺性状表现上对各渐渗系和双亲进行研究。【结果】渐渗系与栽培黄瓜存在 13.2% 的遗传多态性, 包括供体特异带、缺失带和产生的新带。利用 RAPD 引物 D-11 和 SSR 引物 06632 在渐渗系中分别扩增出约 310 bp 和 150 bp 的酸黄瓜特异带, 序列分析表明其与酸黄瓜相应 DNA 片段的相似性分别为 92.93% 和 96.48%, 碱基差异分别为 41 个和 9 个, 包括碱基转换、颠换和缺失。表型鉴定发现其呈现出酸黄瓜的遗传特性。【结论】野生酸黄瓜 DNA 已渐渗进入栽培黄瓜基因组, 同时发生了少量不同类型的变异。

关键词: 黄瓜; 野生酸黄瓜; 渐渗系; DNA 序列; 农艺性状

Molecular Verification of DNA Flow from Wild Sour Cucumber to Cultivated Cucumber

SHI Jian-lei, CHEN Jin-feng, LOU Qun-feng, SUI Yi-hu, WU Zhi-ming, ZHANG Shu-xia

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】Introgression lines were researched by molecular markers and the phenotypic identification in order to proof DNA flow from wild sour cucumber to cultivated cucumber, which were obtained by interspecific hybridization between the cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L., 2n=14) and wild sour cucumber (*Cucumis hystrix* Chakr., 2n=24), and multiple generational backcrossing and selfing followed. 【Method】Molecular markers, DNA sequences and agronomic traits were used in the study to analyze and contrast introgression lines and their parents. 【Result】The results showed that the genetic polymorphism between introgression lines and cultivated cucumber was 13.2%, including donor specific bands, missing bands and new bands. The sour cucumber specific bands in introgression lines were obtained by RAPD primer D-11 and SSR primer 06632, with the size of 310 bp and 150 bp respectively. Sequence analysis showed that the identity was 92.93% and 96.48%, respectively, though there were 41 and 9 different base pairs, respectively, including the base pairs transition, transversion and deletion. And the genetic characteristics of sour cucumber were found in introgression lines. 【Conclusion】These results confirmed that a few mutations of different types occurred with DNA segments of wild sour cucumber being introgressed into cultivated cucumber.

Key words: *Cucumis sativus* L.; wild sour cucumber; introgression lines; DNA sequence; agronomic traits

0 引言

【研究意义】黄瓜 (*Cucumis sativus* L., 2n=14) 是中国及世界上重要的蔬菜作物, 但因其栽培种间多态性低^[1], 种内优异资源非常有限, 极大限制了其育种进程。因此, 通过远缘杂交转移利用野生种外源优

异基因, 不失为黄瓜品种改良、种质创新的一条有效途径。而综合应用两种标记技术、结合表型鉴定, 尤其是从 DNA 结构上对外源片段进行分子验证, 更能为黄瓜野生种质利用提供直接依据。【前人研究进展】在已报道的分子验证方法中, RAPD 技术作为一种有效手段已广泛应用在水稻、大豆、棉花、小麦、高粱、

收稿日期: 2010-03-29; 接受日期: 2010-09-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830079)、国家自然科学基金项目 (30700541)、博士点基金项目 (20070307034)

作者简介: 史建磊, 硕士研究生。E-mail: 2007104051@njau.edu.cn. 通信作者陈劲枫, 教授, 博士。E-mail: jfchen@njau.edu.cn

玉米等作物外源 DNA 的验证上^[2-7], 同时新的分子验证手段也逐渐使用。柴建芳等^[8]利用减法 AFLP 技术成功对小麦中的外源染色体片段进行了标记。赵炳然等^[9]经 SSR 分析, 发现水稻变异系与其受体存在遗传多态性, 并含有供体特异的分子标记带型, 从分子水平上证明通过导入外源 DNA 可获得水稻新种质。但是, 多数研究者只是获得变异系与供体同时具有而受体没有的扩增特异带, 其是否具有相同 DNA 序列或是否同源不得而知。赵炳然等^[10]进一步将变异系与供体共同扩增的特异 DNA 片段分别回收、克隆和测序, 发现两者核苷酸序列极为相似, 进一步证明了远缘资源特异 DNA 片段向水稻的转移。王松文等^[11]和张连全等^[12]也分别在水稻和小麦上获得了类似结果。在黄瓜作物上, Chen 和 Kirkbride^[13]利用胚胎拯救结合体细胞变异在国际上首次实现了栽培黄瓜与同属野生酸黄瓜间的杂交, 随后在其后代群体中发现导入了酸黄瓜特异条带^[14-15], 但并未对其 DNA 结构作进一步研究。【本研究切入点】根据“片段杂交”假说^[16], 供、受体间存在同源 DNA 片段, 可以通过远缘杂交导入外源遗传物质, 但其导入涉及诸多变异性状, 分子验

证较为复杂。因此, 研究 DNA 结构变化为从分子水平上探讨外源遗传物质导入引起变异的机制提供了可能。【拟解决的关键问题】本研究通过对黄瓜渐渗系外源 DNA 片段核苷酸序列的比对和表型分析, 旨在进一步证明供体酸黄瓜 DNA 已导入受体栽培黄瓜, 这对探究黄瓜导入外源物质变异机制、转移利用外源优异基因具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供体亲本酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr., $2n = 24$) 为甜瓜属珍稀野生种, 携带有多种优良性状, 采集于云南西双版纳^[17]。受体亲本栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) ‘北京截头’综合性状优良, 是北方型黄瓜新品种选育中的骨干亲本材料, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所戚章春研究员提供, 经本实验室多代自交保存。供、受体亲本经远缘杂交及染色体加倍获得异源四倍体^[13]后, 再以受体黄瓜为轮回亲本进行 1—2 代回交和 3—5 代自交, 获得黄瓜渐渗系(待发表)。供试材料列于表 1。

表 1 不同试验材料及其编号

Table 1 Different experimental materials and the code used in the study

代号 Code	品种(系) Cultivars or lines	类型 Type	染色体数目 Chromosome number
S1	酸黄瓜 <i>C. hystrix</i>	近缘野生种 Wild species	$2n=2x=24$
CC3	栽培黄瓜‘北京截头’ <i>C. sativus</i> var. <i>Beijingjietou</i>	华北型 Northern China	$2n=2x=14$
IL1—IL12	不同渐渗系 Different introgression lines	遗传改良型 Genetically-enhanced cucumber	$2n=2x=14$

1.2 基因组 DNA 提取

取刚展开的健康嫩叶, 采用 CTAB 法^[18]提取总基因组 DNA。加入 RNaseA (终浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37°C 温育 20 min) 去除 RNA, 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭显色进行 DNA 浓度的定量, -20°C 保存备用。

1.3 RAPD 分析

选用 59 条随机引物先在亲本间进行筛选, 经重复扩增, 最终选出 9 条引物进行各试材的多态性分析。PCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$, 其中 $10\times$ Buffer (含 Mg^{2+}) $2.0 \mu\text{L}$, dNTPs $0.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 引物 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 DNA $20\text{—}40 \text{ng}$, 1.0U 的 Taq DNA 聚合酶。扩增程序为: 94°C 4 min; 93°C 15 s, 36°C 90 s, 72°C 2 min, 50 个循环; 最后 72°C 延伸 6 min, 4°C 保存。整个 PCR

反应在 PTC-100TMPCR 仪上完成。扩增产物在含有 EB 的 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 紫外灯下检测拍照, 并用 JS-380B 全自动数码凝胶成像分析仪进行扫描, 估算条带的分子量。

1.4 SSR 分析

SSR 标记引物^[19]由上海生工公司代理合成。PCR 扩增程序按照 Katzir 等^[20]的方法进行优化。优化后总反应体积 $20 \mu\text{L}$, 其中 $10\times$ Buffer $2.0 \mu\text{L}$, Mg^{2+} $1.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTPs $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 正反向引物各 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 DNA 40ng , 1.0U 的 Taq DNA 聚合酶。整个扩增反应在 PTC-100TMPCR 仪上完成, 条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 80 s, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min, 4°C 保存。PCR 产物在 7.2% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 采用 Charters 等^[21]的

银染方法检测。

1.5 PCR 产物的回收、克隆及测序

用干净的锋利刀片从 7.2%聚丙烯酰胺凝胶上切取渐渗系和供体酸黄瓜扩增的特异条带, 双蒸水冲洗后用滤纸吸干残留水分, 分别置 1.5 mL 离心管中, 然后加入 200 μ L 双蒸水, 室温放置 30 min, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后吸取上清液置 500 μ L 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。经重复扩增, 用 1.2%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。

同样方法从琼脂糖凝胶上切取目的条带, 用 Gene Clean Kit 按产品说明书回收、纯化。回收产物连接于 pMD19-T Simple Vector 上, 反应体系为 10 μ L, 其中 5 μ L 缓冲液 Solution I, 0.5 μ L pMD19-T 质粒载体, 4.5 μ L 纯化的 DNA, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。再转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 14—16 h 后, 每培养皿挑取 10 个单克隆在含有 100 mg \cdot mL $^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜, 经 PCR 扩增检测含有目的片段的单克隆。

鉴定为含目的片段的单克隆由金思特科技(南京)有限公司测序。利用 BioXM2.2 和 DNAMAN4.0 软件对获得的 DNA 序列进行分析, 比较渐渗系与供体酸黄瓜特异 DNA 片段全部核苷酸序列的异同。

1.6 农艺性状调查

各试验材料分别取 5 株进行农艺性状调查, 包括第一雌花节位 (first female flower node, FFFN)、分枝数 (No. of lateral branches, LBN)、节间长 (inter-node length, INL)、主蔓粗 (main stem diameter, MSD)、叶片大小 (leaf size, LS)、花冠长 (corolla length, CL)、商品果长径比 (fruit length/diameter ratio, LDR) 等。

在植株结果初期, 调查主蔓上第一雌花着生的节

位; 结果盛期, 以分枝长度大于或等于 5 cm、其上有两片真叶完全展开为准调查一级侧枝的总数, 测量主蔓中部最大叶片的基部至叶先端的长度和最宽处的宽度、正常商品瓜瓜蒂至瓜顶的长度和距瓜顶 1/3 处的横径; 结果末期, 测量主蔓中部最粗节间的横径。具体参照李锡香等^[22]的方法进行, 采用 SPSS16.0 进行数据分析。

2 结果

2.1 导入酸黄瓜外源 DNA 片段的渐渗系的性状表现

对导入酸黄瓜外源 DNA 片段的 5 个渐渗系进行方差分析, 利用 LSD 法进行各株系与受体亲本‘北京截头’间多重比较 (表 2)。在统计的 7 个性状中, 除 IL1 的分枝数、IL12 的花冠长与黄瓜差异不显著外, 其它均存在显著差异。与受体亲本相比, 各渐渗系表现出高节位、多分枝、小叶小果、短节间等酸黄瓜的遗传特性, 进一步证明经种间远缘杂交, 黄瓜已导入酸黄瓜外源遗传物质。

2.2 不同渐渗系与受体栽培黄瓜 RAPD 扩增多态性分析

59 个 RAPD 引物中有 9 个 (B10CTGCTGGGAC, D11AGCGCCATTG, E19ACGGCGTATG, E20AACGGTGACC, F04GGTGATCAGG, K06CACCTTTC CC, N20GGTGCTCCGT, AF11ACTGGGCCTC, AI19GGCAAAGCTG) 在渐渗系与供、受体亲本间可稳定扩增出产物多态性, 占 15.3%。多态性表现为带的缺失或增加, 增加带分为来自供体的特异带及在供、受体中均不存在的新带两种类型。不同渐渗系的多态性带分布见表 3, 其在各引物中总的扩增带数为 512 条, 受体栽培黄瓜‘北京截头’扩增总带数为 37 条,

表 2 渐渗系相关农艺性状表现

Table 2 Analysis of related agronomic traits of introgression lines

渐渗系	FFFN	LBN	LS	LDR	INL	MSD	CL
Introgression lines							
CC3(CK)	5.8	1.2	731.7	9.29	12.6	0.83	5.2
IL1	12.6**	2.4	480.2**	3.51**	7.6**	0.64**	4.2**
IL3	19.6**	10.2**	400.3**	3.13**	9.3**	0.55**	3.8**
IL4	26.2**	11.4**	352.5**	2.92**	7.9**	0.48**	3.4**
IL10	9.6**	6.2**	454.8**	6.88**	10.5**	0.60**	4.6*
IL12	14.0**	3.2*	492.7**	5.09**	10.4**	0.64**	4.8

FFFN: 第一雌花节位; LBN: 分枝数; LS: 叶片大小; LDR: 果长径比; INL: 节间长; MSD: 主蔓粗; CL: 花冠长。*和**分别表示差异显著 (5% 水平) 和极显著 (1% 水平)

FFFN: First female flower node; LBN: No. of lateral branches; LS: Leaf size; LDR: Fruit length/diameter ratio; INL: Inter-node length; MSD: Main stem diameter; CL: Corolla length. *and** indicate significant difference (5% level) and very significant difference (1% level) respectively

表 3 不同渐渗系的扩增多态性

Table 3 Polymorphic amplification of different introgression lines

渐渗系 Introgression lines	增加带数 No. of increased bands		缺失带数 No. of missing bands	多态性带总数 No. of polymorphic bands	扩增总带数 No. of bands	多态性比率 Polymorphic rate (%)
	供体特有带数					
	No. of donor-specific bands	No. of new bands				
IL1	4	6	7	17	40	22.1
IL2	6	5	8	19	40	24.7
IL3	5	8	1	14	49	16.3
IL4	6	7	2	15	48	17.6
IL5	0	5	1	6	41	7.7
IL6	0	0	0	0	37	0
IL7	1	0	1	2	37	2.7
IL8	1	1	0	2	39	2.6
IL9	7	7	3	17	48	20.0
IL10	5	6	3	14	45	17.1
IL11	2	5	1	8	43	10.0
IL12	6	4	2	12	45	14.6
Total	43	54	29	126	512	13.2

两者差异带共 126 条, 占其扩增总带数的 13.2%。126 条多态性带中缺失条带 29 条, 占 23.0%; 增加条带 97 条, 其中新带 54 条, 占 42.9%; 供体特异带 43 条, 占 34.1%。上述数据表明外源遗传物质的导入引起了黄瓜自身基因组结构的丰富变异。

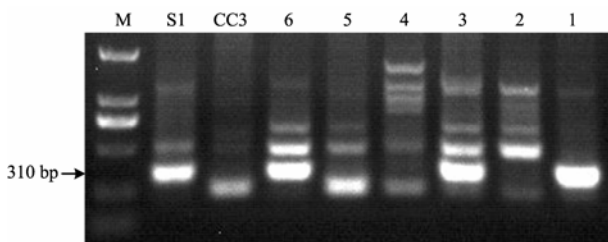
2.3 黄瓜导入酸黄瓜特异片段的 DNA 序列分析

2.3.1 黄瓜导入酸黄瓜外源 DNA 片段的 RAPD 序列分析 利用 RAPD 引物 D-11 分别在渐渗系 IL1、IL3、IL12 中扩增得到供体酸黄瓜特异条带, 大小 310 bp 左右 (图 1)。各特异片段经试剂盒回收、克隆和测序 (图 2)。从中可以看出, 渐渗系 IL3、IL12 (IL1

没有筛选到目的克隆) 扩增的供体特异片段均含 302 对碱基, 而供体酸黄瓜扩增的特异片段含 315 对碱基, 两者序列相似性为 92.93%。除渐渗系缺失一段 CTCACTAAGTCCG 序列外, 其与供体还存在分散于不同位置上 28 个碱基的差异, 其中包括碱基转换和颠换。在上述 3 类碱基突变中, 以转换最多, 占 20 个 (AG 转换 7 个, GA 转换 5 个, CT 和 TC 转换各 4 个), 其次是缺失, 为 13 个, 碱基颠换 8 个 (TA 颠换 3 个, AT、CA、AC、GT、TG 颠换各 1 个), 突变碱基位置的分布是不均匀的。以上分析发现碱基转换、缺失和颠换突变频次呈递减排列, 同时高的 DNA 序列相似性表明经远缘杂交渐渗系 IL3、IL12 已导入野生酸黄瓜外源 DNA 片段。

2.3.2 黄瓜导入酸黄瓜外源 DNA 片段的 SSR 序列分析 图 3-A 为 SSR 引物 06632 [序列: 上游 TCAGATGT TGATTGGCTCTCA, 下游 AGGCGCAACATTAAG GGTC; 重复: (TC)₁₄] 在部分渐渗系中经 PCR 扩增在 7.2% 聚丙烯酰胺凝胶上的检测结果, IL3、IL4、IL10 分别扩增出 1 条供体酸黄瓜特异条带, 大小 150 bp 左右。回收后经重复扩增, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到了和图 3-A 大小相同的供体特异带, 如图 3-B。

图 3-B 中 4 条供体特异带经回收、克隆和测序, 发现渐渗系 IL4、IL10 (IL3 没有筛选到目的克隆) 扩增的供体特异片段均含 138 对碱基, 而供体酸黄瓜扩增的特异片段含 141 对碱基, 两者序列相似性为 96.48%。



1: IL1; 2: IL2; 3: IL3; 4: IL9; 5: IL10; 6: IL12; CC3: 栽培黄瓜; S1: 野生酸黄瓜; M: Marker。箭头所示为供体特异带
1: IL1; 2: IL2; 3: IL3; 4: IL9; 5: IL10; 6: IL12; CC3: Cultivated cucumber; S1: Wild sour cucumber; M: Marker. Arrow shows the introduction of donor-specific bands

图 1 RAPD 引物 D-11 在部分渐渗系的扩增图谱

Fig. 1 The amplification pattern of RAPD primer D-11 in some introgression lines

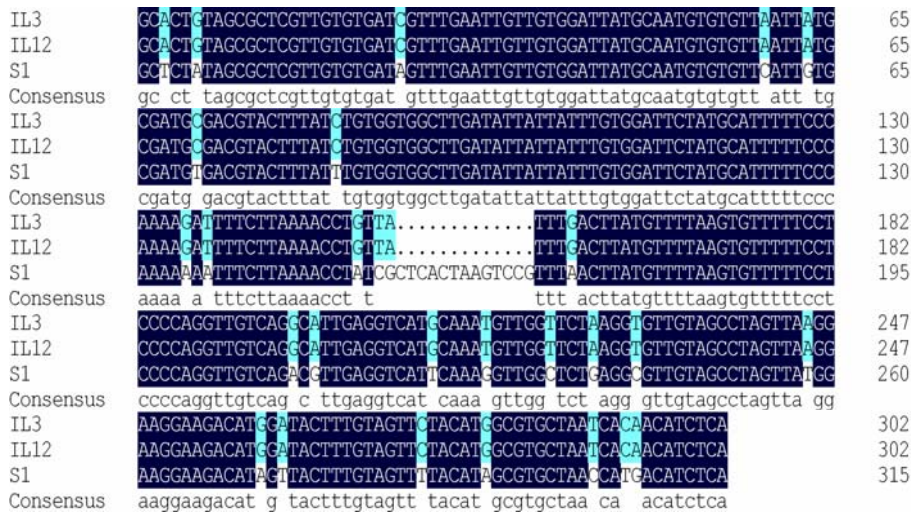
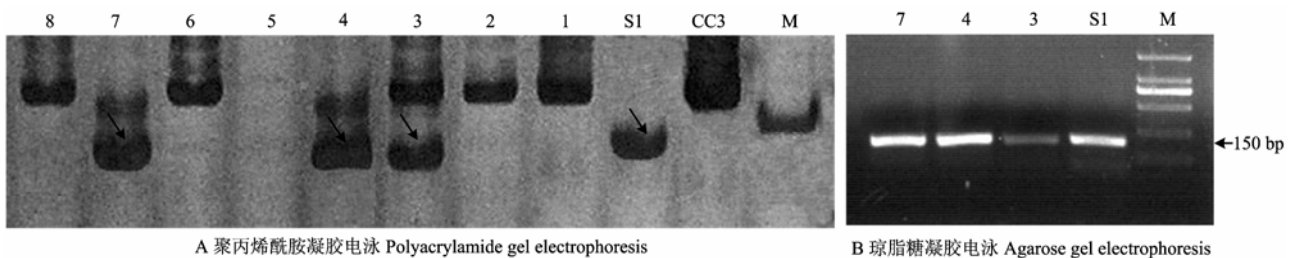


图 2 渐渗系 IL3、IL12 与供体野生酸黄瓜 S1 特异 DNA 片段的核苷酸序列比对

Fig. 2 Nucleotide sequence alignment of specific DNA fragments in introgression lines IL3, IL12 and donor-wild sour cucumber S1



A 聚丙烯酰胺凝胶电泳 Polyacrylamide gel electrophoresis

B 琼脂糖凝胶电泳 Agarose gel electrophoresis

M: Marker (200 bp 带); CC3: 栽培黄瓜; S1: 野生酸黄瓜; 1: IL1; 2: IL2; 3: IL3; 4: IL4; 5: IL8; 6: IL9; 7: IL10; 8: IL12。箭头所示为导入供体特异带
M: Marker(200 bp band); CC3: Cultivated cucumber; S1: Wild sour cucumber; 1: IL1; 2: IL2; 3: IL3; 4: IL4; 5: IL8; 6: IL9; 7: IL10; 8: IL12. Arrow shows the introduction of donor-specific bands

图 3 SSR 引物 06632 在部分渐渗系的扩增图谱

Fig. 3 The amplification pattern of SSR primer 06632 in some introgression lines

另外还存在分散于不同位置上 9 个碱基的差异，包括碱基转换和缺失。其中转换 6 个（TC 转换 3 个，AG 转换 2 个，CT 转换 1 个），缺失 3 个（TTT）。在含 141 个碱基的这段 DNA 片段中，也有长达含 48 个碱基的一段 DNA 没有发生任何碱基突变，占碱基总数的 34%（图 4）。上述结果发现碱基转换多于缺失，但没有出现颠换，其高的 DNA 序列相似性表明经远缘杂交渐渗系 IL4、IL10 同样已导入野生酸黄瓜外源 DNA 片段。

3 讨论

本研究发现黄瓜渐渗系导入了野生酸黄瓜供体特

异带，同时还出现供、受体均不存在的新带和受体缺失带，说明受体栽培黄瓜在供体 DNA 导入整合过程中自身 DNA 序列发生了变化。其可能是亲本染色体组间重组交换的结果^[23-25]，或是不同亲本染色体组上随机引物结合位点的竞争能力不同所致^[26]，RAPD 的这种变化还可能部分与转座子活动有关^[11]。序列测定和比对表明，渐渗系与供体特异片段的核苷酸序列存在高度相似性（92.93%和 96.48%），同时也发生了一定数量（41 个和 9 个）的碱基突变，且碱基转换、缺失、颠换 3 种突变类型概率递减。但并非都是单碱基突变，也没发现碱基插入现象，这不同于前人在其它作物上的结果^[10-11]，可能和野生酸黄瓜的遗传特点和

IL4	ATTTACCCCATTTTAAATTCTAATCTTC...TATATATATATTATATTAT	47
IL10	ATTTACCCCATTTTAAATTCTAATCTTC...TATATATATATTATATTAT	47
S1	ATTTACCCCATTTTAAATTCTAATCTTTT...TATATATATATTATATTAT	50
Consensus	atttaccatcttttaattctaa tt tatatatattatattat	
IL4	TGGGGTCACTATCCTAAGTAAATTATATCTTACAATTTTTCATCTTTTAT	97
IL10	TGGGGTCACTATCCTAAGTAAATTATATCTTACAATTTTTCATCTTTTAT	97
S1	TGGGGTCACTATCCTAAGTAAATTATATATTACAATTTTTCATCTTTTAT	100
Consensus	tggggtcactatcctaagtaaattatat ttacaatttttcacatctttat	
IL4	ATTAGAAAAATATGTTTAACTTTTATTCGTATTATTATTAG	138
IL10	ATTAGAAAAATATGTTTAACTTTTATTCGTATTATTATTAG	138
S1	ATTAGAAAAATATGTTTAACTTTTATTCGTATTATTATTAG	141
Consensus	attagaaaaatattgt taaccttta ttcgtatttatttag	

图 4 渐渗系 IL4、IL10 与供体野生酸黄瓜 S1 特异 DNA 片段的核苷酸序列比对

Fig. 4 Nucleotide sequence alignment of specific DNA fragments in introgression lines IL4, IL10 and donor-wild sour cucumber S1

序列保守性有关（酸黄瓜与栽培黄瓜染色体基数不同）。在 NCBI 中经 BLAST 检索，未发现与导入片段较高同源的核苷酸序列，表明渐渗系中的特异 DNA 片段确实来自酸黄瓜。

碱基突变为生物“基因库”提供了新的基因源，是生物多态性和遗传进化的物质基础和动力。本文中渐渗系与酸黄瓜特异片段核苷酸序列存在碱基差异，其原因可能是外源 DNA 导入引起异源多倍体在遗传进化过程中的 DNA 同质化，这有助于物种的快速进化和遗传稳定^[27-28]。同时，PCR 扩增过程不像体内 DNA 复制那样，存在多种校正和修复系统，故可能出现一定数量的碱基错配。转换多为基因编码区不引起氨基酸替换的同义突变，而颠换则多为引起氨基酸替换的非同义突变^[29]，因此较少的碱基颠换利于生物遗传进化的快速稳定。碱基缺失作为一种移码突变，不仅可以像转换和颠换那样造成基因组的多态性，甚至还可以使基因结构发生变化，导致基因组中新基因的产生^[30]。同时，各种突变频次的差异还可能与生物进化过程中蛋白质的结构特性和功能代谢相关，以达到与环境的相互协调和长期的生存繁衍。如果渐渗系中的外源 DNA 确实发生了结构变异，相应外源基因的表达就有两种可能：一是多肽功能仍保持不变，供体特异性状得以表达；二是多肽功能发生改变，出现供受体均不具有的新性状^[11]。根据万文举等^[31]提出的双重作用假说，酸黄瓜外源 DNA 片段的导入在性状表现上会出现两种情况，即特异性状的转移及诱变新性状的产生。经表型鉴定发现黄瓜渐渗系在多个性状表现上偏向于酸黄瓜，进一步说明外源 DNA 导入可使受体基因组产生丰富变异，并获得远缘资源遗传信息。

分子标记以多态性高、不受环境和季节等影响而

被广泛用于外源遗传物质鉴定，RAPD 是最常用的一种标记，但有必要将之转化为更为稳定的共显性标记 SCAR，同时应结合其它分子标记及荧光原位杂交技术进行互补验证。“片段杂交”假说^[16]认为，整体上远缘亲本间的染色体结构不亲和，但从进化上部分基因间的结构又有一定亲和性，远缘基因组进入受体后被分解成片段，大部分片段被降解，保存下来的某些 DNA 片段有可能被整合进受体染色体，使子代出现遗传变异。本研究通过 DNA 结构分析及表型鉴定进一步证明，远缘杂交可将野生酸黄瓜外源 DNA 片段导入栽培黄瓜，但对导入 DNA 片段情况、导入变异机制等还需进一步深入研究。笔者认为，今后应分离和克隆这些特异片段，应用基因工程技术将之导入原受体，综合运用分子、细胞和生化等手段对之验证，观察和分析其后代表现及变异情况，进一步揭示外源 DNA 导入的变异机制，推动黄瓜等作物外源优异基因的利用。

4 结论

黄瓜与野生酸黄瓜在第一雌花节位、叶片、果实大小、节间长短、主蔓粗细等性状表现上偏向于酸黄瓜。渐渗系中的供体特异片段尽管发生了少量碱基突变，但其与酸黄瓜相应片段仍存在很高的核苷酸序列相似性。说明外源 DNA 已渐渗进入黄瓜基因组，这为转移利用野生优异基因改良栽培黄瓜奠定了基础。

References

- [1] Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, Meglic V, Staub J E, Havey M J. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and

- morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89: 42-48.
- [2] 赵炳然, 贾建航, 阳和华, 李传友, 詹庆才, 王 斌, 周坤炉, 袁隆平. 水稻孕穗期茎注射野生稻 DNA 变异株系的 RAPD 分析. 作物学报, 2000, 26(4): 424-430.
- Zhao B R, Jia J H, Yang H H, Li C Y, Zhan Q C, Wang B, Zhou K L, Yuan L P. RAPD analysis of new rice strains developed through the method of spike-stalk-injecting DNA from wild relative. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(4): 424-430. (in Chinese)
- [3] 雷勃钧, 钱 华, 李希臣, 卢翠华, 周思君, 韩玉琴, 刘昭军, 刘广阳, 杨兴勇, 董全中, 赵 凯, 赫世涛. 通过直接引入外源 DNA 育成高产、优质、高蛋白大豆新品种黑生 101. 作物学报, 2000, 26(6): 725-730.
- Lei B J, Qian H, Li X C, Lu C H, Zhou S J, Han Y Q, Liu Z J, Liu G Y, Yang X Y, Dong Q Z, Zhao K, He S T. Breeding of a high-yielding, high-quality and high-protein content soybean cultivar-Heisheng 101 through direct introduction of alien DNA. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(6): 725-730. (in Chinese)
- [4] 周平兰, 梁满中, 高 健, 陈良碧. 花粉管通道法转柱头外露棉 DNA 及转化体 RAPD 分析. 湖南师范大学自然科学学报, 2004, 27(3): 81-86.
- Zhou P L, Liang M Z, Gao J, Chen L B. Transgenic cotton obtained through introducing open bud via the pollen tube pathway method and their RAPD analysis. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2004, 27(3): 81-86. (in Chinese)
- [5] 刘 萍, 康振生. 燕麦 DNA 导入普通小麦变异观察及 RAPD 分子验证. 干旱地区农业研究, 2006, 24(3): 100-103.
- Liu P, Kang Z S. Oat (*Avena sativa* L.) exogenous DNA introduction into common wheat and PAPD analysis. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2006, 24(3): 100-103. (in Chinese)
- [6] 王黎明. 外源 DNA 导入高粱的叶部病害变异及其分子验证. 黑龙江农业科学, 2007(3): 1-3.
- Wang L M. Leaf diseases resistance variation and its PAPD check of sorghum transferred progenies by exogenous DNA introduction. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2007(3): 1-3. (in Chinese)
- [7] 刘 芳, 刘晓鑫, 高树仁, 袁 英, 孔祥梅, 刘德璞, 李晓辉. 分子标记结合田间观察快速鉴定外源 DNA 导入玉米的变异后代. 分子植物育种, 2008, 6(4): 664-668.
- Liu F, Liu X X, Gao S R, Yuan Y, Kong X M, Liu D P, Li X H. Rapid identification of exogenous DNA introduction maize variant offspring through molecular markers and field investigation. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(4): 664-668. (in Chinese)
- [8] Chai J F, Wu Z M, Zhao H, Laroche A, Wang H B. Using subtracted AFLP to efficiently mark an alien chromosome fragment in wheat background. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(4): 379-383.
- [9] 赵炳然, 夏红爱, 阳和华, 唐家斌, 周 成, 朱立煌, 袁隆平. 远缘物种 DNA 导入水稻保持系的种质创新及 SSR 分析. 杂交水稻, 2004, 19(4): 47-50.
- Zhao B R, Xia H A, Yang H H, Tang J B, Zhou C, Zhu L H, Yuan L P. SSR analysis of the variants from rice maintainer lines transferred exogenous DNA. *Hybrid Rice*, 2004, 19(4): 47-50. (in Chinese)
- [10] 赵炳然, 贾建航, 王 倩, 王 斌, 袁隆平. 总 DNA 导入水稻后变异系及供体特异带 DNA 片段的核苷酸序列比较. 杂交水稻, 2001, 16(2): 46-49.
- Zhao B R, Jia J H, Wang Q, Wang B, Yuan L P. Comparison of the nucleotide sequence of the specific DNA fragments between the variant line and its donor. *Hybrid Rice*, 2001, 16(2): 46-49. (in Chinese)
- [11] 王松文, 赵炳然, 邢全华, 阳和华, 金德敏, 刘 霞, 王 斌. 野生稻 DNA 片段存在于高世代水稻变异系进一步的分子验证. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2170-2177.
- Wang S W, Zhao B R, Xing Q H, Yang H H, Jin D M, Liu X, Wang B. Molecular verification of DNA flow from wild rice (*O. minuta*) to cultivated rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(11): 2170-2177. (in Chinese)
- [12] 张连全, 刘登才, 颜泽洪, 郑有良. 远缘杂交早代稳定小麦导入了外源 DNA 片段并发生了 DNA 重排. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35(4): 318-325.
- Zhang L Q, Liu D C, Yan Z H, Zheng Y L. DNA rearrangement occurred in exogenous DNA fragments introduced by distant hybridization in early generations stable wheat. *Science in China Series C Life Sciences*, 2005, 35(4): 318-325. (in Chinese)
- [13] Chen J F, Kirkbride J J R. A new synthetic species of *Cucumis* (Cucurbitaceae) from interpecific hybridization and chromosome doubling. *Brittonia*, 2000, 52(4): 315-319.
- [14] 庄飞云, 陈劲枫, Wolucau J, 娄群峰, 钱春桃, 罗向东. 甜瓜属人工异源四倍体与栽培黄瓜渐渗杂交及其后代遗传变异研究. 园艺学报, 2006, 33(2): 266-271.
- Zhuang F Y, Chen J F, Wolucau J, Lou Q F, Qian C T, Luo X D. Introgressive hybridization between the synthetic allotetraploid in *Cucumis* and cultivated cucumber and assessment of the genetic variation in the progenies. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(2): 266-271. (in Chinese)
- [15] 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. 园艺学报, 2005, 32(6): 1098-1101.
- Cao Q H, Chen J F, Qian C T. Identification and characterization of a

- cucumber alien translocation line CT-01 possessing resistance to downy mildew. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(6): 1098-1101. (in Chinese)
- [16] 周光宇, 陈善葆, 黄骏麒. 农业分子育种研究进展. 北京: 中国农业科技出版社, 1993.
- Zhou G Y, Chen S B, Huang J Q. *Advances in Molecular Breeding Research of Agriculture*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1993. (in Chinese)
- [17] Chen J F, Staub J E, Tashiro Y, Isshiki S, Miyazaki S. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica*, 1997, 96: 413-419.
- [18] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [19] Ren Y, Zhang Z H, Liu J H, Staub J E, Han Y H, Cheng Z C, Li X F, Lu J Y, Miao H, Kang H X, Xie B Y, Gu X F, Wang X W, Du Y C, Jin W W, Huang S W. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. *PLoS ONE*, 2009, 4(6): e5795.
- [20] Katzir N, Danin-Poleg Y, Tzuri G, Karchi Z, Lavi U, Cregan P B. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 1282-1290.
- [21] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, Ramsay G. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 442-447.
- [22] 李锡香, 朱德蔚. 黄瓜种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2005: 57-66.
- Li X X, Zhu D W. *Cucumber Germplasm Description Specifications and Data Standards*. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 57-66. (in Chinese)
- [23] Dou Q W, Chen P D, Xie J F. Cytological and molecular identification of alien chromatin in giant spike wheat germplasm. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(9): 1109-1115.
- [24] Pooler M R, Riedel L G H, Bentz S E, Townsend A M. Molecular markers used to verify interspecific hybridization between hemlock (*Tsuga*) species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2002, 127(4): 623-627.
- [25] Scheepers D, Eloy M C, Briquet M. Identification of larch species (*Larix decidua*, *Larix kaempferi* and *Larix eurolepis*) and estimation of hybrid fraction in seed lots by RAPD fingerprints. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 71-74.
- [26] Halldén C, Hansen M, Nilsson N O, Hjerdin A, Säll T. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 1185-1192.
- [27] Wendel J F. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 225-249.
- [28] Ma X F, Gustafson J P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 109: 236-249.
- [29] 陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 田大成. 突变在基因组进化中的意义. 遗传, 2006, 28(5): 631-638.
- Chen L L, Peng G Z, Zhang W L, Tian D C. The significance of mutations in genomic evolution. *Hereditas*, 2006, 28(5): 631-638. (in Chinese)
- [30] Long M, Betrán E, Thornton K, Wang W. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(11): 865-875.
- [31] 万文举, 邹冬生, 彭克勤. 论生物诱变-外源 DNA 导入的双重作用. 湖南农业大学学报, 1992, 18(4): 886-891.
- Wan W J, Zou D S, Peng K Q. On biotagen-induced mutation-double function of exogenous DNA introduction. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1992, 18(4): 886-891. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)