

与黄瓜 *M* 基因连锁的三个共显性标记

时秋香¹, 刘世强², 李 征³, 曹辰兴¹, 李 颖², 黄三文^{2*}

(¹山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ³上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘 要: 利用黄瓜近等基因系纯雌株 W II983G (基因型为 *FFMM*) 与两性花株 W II983H (基因型为 *FFMM*) 为亲本, 以 W II983H 为回交亲本构建了 BC₁ 代分离群体, 采用 SSR 及 SCAR 分子标记技术, 获得了 3 个与 *M* 基因紧密连锁的标记 SSR23487、SCAR123 和 SSR19914, 它们与 *M* 基因的遗传距离分别为 0.28、0.94 和 3.20 cM, 两侧标记 SSR23487 和 SCAR123 将 *M* 基因定位在 1.22 cM 的遗传区间内。这 3 个分子标记的获得不仅可以用于分子标记辅助选择育种, 而且为最终 *M* 基因的克隆打下了基础。

关键词: 黄瓜; 分子标记; 性别表达; SSR

中图分类号: S 642.2; Q 786 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 05-0737-06

Three Co-dominant Markers Linked to *M* Gene in *Cucumis sativus*

SHI Qiu-xiang¹, LU Shi-qiang², LI Zheng³, CAO Chen-xing¹, LI Ying², and HUANG San-wen^{2*}

(¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: A segregating cucumber BC₁ population was developed using the nearly isogenic lines W II983G (gynoecious, *FFMM*) as donor and W II983H (hemaphroditic, *FFMM*) as recurrent parent. With screening of polymorphism of one SCAR and 2112 SSR markers, three polymorphic co-dominant markers SSR23487, SCAR123 and SSR19914 were found to be tightly linking to the *M/m* gene, with a distance of 0.28, 0.94 and 3.20 cM, respectively. The interval between SSR23487 and SCAR123, which locate on each side of the *M/m* gene, was 1.22 cM. These markers not only could be useful in markers-assisted selection for gynoecious plant, but also provide a solid basis for isolation of the sex-determining *M/m* gene in cucumber.

Key words: *Cucumis sativus* L.; molecular marker; sex expression; SSR

性别分化是具有重要经济意义的植物发育过程, 因为作物的性别表达类型决定了其育种和栽培的方式。黄瓜具有非常丰富的性别表现类型, 是研究性别表达的模式植物 (Galun, 1961; Roy & Saran, 1990; Bai et al., 2004; Tanurdzic & Banks, 2004)。目前已经明确控制黄瓜性别表达的基因位点有 *A*、*F*、*Gy*、*In-F*、*M*、*M-2* 和 *Tr* (Galun, 1961; Kubicki, 1969a; 陈惠明和刘晓虹, 1999; 陈惠明等, 2005)。

激素在黄瓜的性别表达中起重要作用。经过严格的生理学试验, Yin 和 Quinn (1995) 提出了黄瓜性别表达的乙烯控制模型, 认为乙烯是黄瓜的“性激素”, 它既促进雌性的表达, 也同时抑制雄性的表达, 推断 *F* 基因的产物控制乙烯在黄瓜植株分布的部位和浓度, 促进雌性的表达, 而 *M* 基因的产物则控制乙烯信号的识别, 在乙烯浓度高于阈值时抑制雄蕊的发育。近年来, *F* 基因已被克隆, 为乙

收稿日期: 2008-12-22; 修回日期: 2009-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871707); 农业部 '948' 项目 (2008-Z42)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: huangsanwen@mac.com)

烯合成酶基因家族成员之一 (Knopf & Trebitsh, 2006), 符合其控制乙烯浓度功能的预测。

Yamasaki等 (2001) 的研究表明 *M* 位点介导了乙烯诱导的雄蕊不育。*M* 基因分子标记的获得始于 2003 年波兰科学家 Witkiewicz 的研究, 但没有确定其连锁距离 (Witkiewicz et al, 2003)。邓思立等 (2006) 运用 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 技术获得了一个与 *M* 基因连锁的标记 ME23SA4, 但距离较远, 为 17.8 cM (邓思立等, 2006)。2008 年, Li 等及 Liu 等几乎同时获得了与 *M* 基因共分离的分子标记 S_ME8SA7 和 CsEL1 (Li et al, 2008; Liu et al, 2008), 但由于受群体种类和大小、标记类型等因素的限制, 分别将 *M* 基因定位于 6.1 cM 和 2.5 cM 遗传区间内, 远远未达到图位克隆 *M* 基因的目的。

作者采用从美国威廉康辛大学 Jack Staub 实验室引进的近等基因系为研究材料, 采用 SSR 及 SCAR 标记技术, 获得了 3 个与 *M* 基因紧密连锁的分子标记, 最终将 *M* 基因定位在 1.22 cM 的遗传区间内。

1 材料与方法

1.1 材料

从美国威斯康辛大学 Jack Staub 实验室引进了近等基因系 W II983G 和 W II983H。W II983G 为纯雌株, 为 W I5821 和 W I5822 (Peterson et al, 1986) 杂交后代系统选育的高代自交系, 基因型为 *FFMM*。W II983H 为两性花株, 由雄花两性花株 W II983A (*ffmm*) 作为供体与 W II983G 经 5 代回交及 3 代自交获得的自交系, 基因型为 *FFmm*。

1.2 方法

1.2.1 BC₁分离群体的构建

以 W II983G 为母本, W II983H 为父本配制杂交组合得到 F₁, F₁ 与 W II983H 回交得到 BC₁ 群体。BC₁ 群体的 751 个单株于 2008 年 3 月种植于中国农业科学院廊坊基地温室内, 统一肥水管理。

1.2.2 花性型的调查与统计

从植株开花后调查花的性型, 植株主蔓和侧枝上全开两性花的植株记为两性花株, 主蔓和侧枝上全开雌花的植株记为纯雌株。计算两性株与纯雌株的数量, 通过卡方测验计算其显著性。

1.2.3 总 DNA 提取

采黄瓜各单株嫩叶, 用 CTAB 法 (Jones & Walker, 1963), 结合高通量的 Retsch 细胞破碎仪 (Retsch Inc, Haan, Germany) 和 96 孔 COSTAR 深孔板 (Coming Inc, New York) 进行 DNA 快速提取。提取的 DNA 加水溶解, 于 -20℃ 保存。

1.2.4 标记来源和反应条件

PCR 标记引物序列中 SSR 引物来自张忠华博士根据黄瓜基因组设计的 2 112 对引物, 由上海生物工程服务有限责任公司合成; SCAR123 引物序列由上海交通大学农业与生物学院蔡润教授研究室提供。

15 μL PCR 反应体系为: 10 × buffer 1.5 μL, dNTPs (10 mol · L⁻¹) 0.2 μL, 每条引物 (5 pmol · μL⁻¹) 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 (2.5 U · μL⁻¹) 0.2 μL, DNA (3 ng · μL⁻¹) 5 μL, H₂O 7.1 μL。扩增程序为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 20 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 5 min。扩增反应在 9700PCR (Applied Biosystem 公司) 仪上进行。

PCR 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶在北京市六一仪器厂的垂直电泳槽上进行, 160 V 恒电压下电泳 2~2.5 h, 电泳后参照乐晓萍等 (2001) 的方法银染。水洗后用保鲜膜包胶, 晾干后照相并统计数据。

1.2.5 数据统计和标记命名

根据 SSR 和 SCAR 标记在双亲中的表现进行归类, 将 W II983G 呈现的带型记为 a, W II983H 呈现的带型记为 b, F_1 呈现的带型记为 h, 群体中根据其带型分别记为 b 或 h, 缺失的数据记为 u。采用引物组合的方法对标记进行命名, 如 SSR23487。

1.2.6 连锁分析

应用 JoinMap3.0 (Stam, 1993) 对标记位点进行连锁分析, 采用 Kosambi (1944) 函数将重组率转化成遗传图距。

2 结果与分析

2.1 花性型的遗传分析

对亲本纯雌株 W II983G 与两性花株 W II983H、 F_1 (各 4 株) 和 BC_1 群体 (751 株) 中各单株花性型的调查结果显示, 母本 W II983G 的 4 个单株有花节位均为雌花, 全为纯雌株; 父本 W II983H 的 4 个单株有花节位均为两性花, 全为两性花株。 F_1 代的植株全是纯雌株。 BC_1 群体中有两种性型, 纯雌株和两性花株, 751 个 BC_1 群体植株中, 有 373 个纯雌株和 378 个两性花株, 经 χ^2 验证 ($\chi^2 = 0.03$, $P < 0.05$), 符合 1:1 的分离比例, 说明黄瓜单性花性型对两性花性型为完全显性, 由一对核基因控制, 与以往报道 (Shifriss, 1961; Kubicki, 1969b; Kenigsbuch, 1990) 一致, 可利用该 BC_1 群体对控制目标性状的 *M* 基因进行遗传定位。

2.2 亲本间多态性标记的筛选

通过 2 112 对 SSR 引物组合的筛选, 两亲本间具多态性的引物组合为 2 对 (23487 和 19914), 其多态性率仅约为 0.1%。其主要原因可能有两方面: 第一, 2 112 对 SSR 引物采用全基因组设计, 除 *M* 基因所在的染色体外, 其余染色体上的 SSR 引物组合肯定没有多态性; 第二, 2 112 对 SSR 引物当中, *M* 基因附近两侧标记较少, 较远部位的 SSR 标记被近等基因系近乎相同基因组背景所消除掉。

另外一个 SCAR 引物组合 123 采用类似 SSR 的方法进行检测, 发现在两亲本间同样具有多态性, 并且两者条带的大小差别为 4 bp, 其分离效果在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶中不如 SSR 引物组合 23487 和 19914。

3 个标记 SSR23487、SCAR123 和 SSR19914 的引物序列见表 1。

表 1 多态性引物序列

Table 1 Sequences of the polymorphism primers

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5' - 3') | 引物长度 /bp Primer length | 扩增片段长度 /bp Length of amplified fragment |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|
| SSR23487-L | TGTTTCAAAGGTGCTGACCTG | 20 | 139/147 (M /m) |
| SSR23487-R | CCACAACAACAAAA GAA TGTGAA | 23 | |
| SCAR123-L | GAAACCAAGATTCACCAACAC | 23 | 227/223 (M /m) |
| SCAR123-R | GCA TGA TGTTCCTCTCAAA GC | 22 | |
| SSR19914-L | ATGGTCCACCAACAAA TGG | 20 | 172/160 (M /m) |
| SSR19914-R | GCTGTACTTGGAATCACTTCCC | 22 | |

注: L. 上游引物; R. 下游引物。

Note: L. Left primer; R. Right primer

2.3 连锁遗传图

用亲本纯雌株 W II983G 与两性花株 W II983H 间有多态性的引物组合 23487、123 和 19914 分析 751 株 BC_1 分离单株, 用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行带型分析, 结果都具多态性, 如 SSR23487 (图 1)。

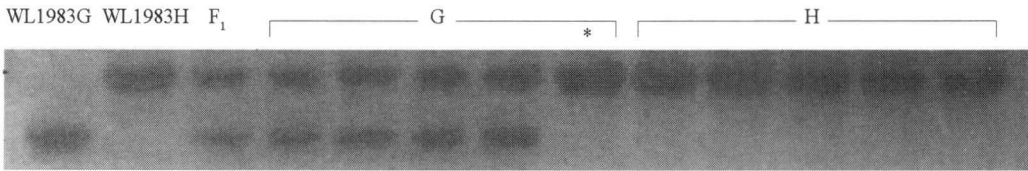


图 1 亲本、F₁、BC₁单株的 SSR23487分析

W 11983G为母本，W 11983H为父本，F₁为 W 11983G ×W 11983H杂交后代；

G: BC₁群体中纯雌株；H: BC₁群体中两性花株；*表示重组单株。

Fig 1 SSR23487 analysis of the parents, F₁ and BC₁ individuals

W 11983G and W 11983H are parental lines; F₁ was derived from a cross between W 11983G and W 11983H lines;

G: BC₁ progenies with bearing only pistillate flowers; H: BC₁ progenies with bearing only bisexual flowers;

Asterisks (*) shows recombinant

引物组合 23487在 BC₁分离群体当中，373个纯雌株和 378个两性株中各有 1株为交换类型（将该标记命名为 SSR23487），而引物组合 123在 BC₁群体中，纯雌株和两性花株中的重组单株分别为 4株和 3株（将该标记命名为 SCAR123），并且后者的重组单株并不包含前者的两个重组单株，由此可得这两个标记位于 *M* 基因的两侧。

采用类似的方法还获得了另外一个标记 SSR19914，结合 JoinMap3.0软件作图分析，从而获得了 *M* 基因的遗传连锁图（图 2）。

由图 2可以看出，SCAR123和 SSR19914位于 *M* 基因的同侧，SSR23487和 SCAR123位于 *M* 基因的两侧，与 *M* 基因的遗传距离分别为 0.28 cM和 0.94 cM，最终将 *M* 基因定位在 1.22 cM的遗传区间内。

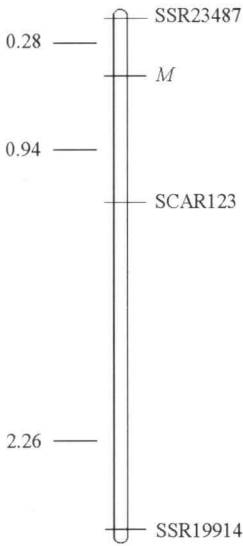


图 2 *M* 基因的遗传连锁图

Fig 2 Genetic map of the *M* locus

3 讨论

本研究在材料、方法和结论上具有独特的优势。

第一，近等基因系的基因组背景几乎完全相同，其差异仅局限于控制目标性状基因两侧的极小区域，凡是在这对近等基因系间有多态性的引物组合，极有可能与该基因紧密连锁。通过亲本间的引物

筛选, 消除假阳性, 大大减轻假阳性带来的工作量。

第二, 与其它标记相比, SSR 标记不仅具有 DNA 需量少, 质量要求不高和基因组中分布广泛等优点, 而且该标记呈共显性遗传, 可以区分纯合与杂合植株, 可直接用于分子标记辅助育种。

第三, 根据标记遗传距离小于 5 cM 即可用于 MAS 的原则, 本研究中的 3 个标记 SSR23487、SCAR123 和 SSR19914 都可以直接应用到分子标记辅助育种领域。与此同时, 两标记 SSR23487 和 SCAR123 将 *M* 基因定位于 1.22 cM 的遗传区间内, 与前人的最小遗传距离 2.5 cM 相比, 有了很大进步。最近的标记 SSR23487 与 *M* 基因间的遗传距离仅为 0.28 cM, 根据黄瓜基因组 367 Mb 约 1 000 cM 计算 (Koo et al, 2005), 平均估计 0.1 cM 的物理距离约为 40 kb, 而 BAC 文库克隆平均大小约为 100 kb。由此可见, 以 SSR23487 为起点进行染色体步移构建物理图谱乃至克隆 *M* 基因极其可行。

尽管本试验中经过 2 112 对 SSR 引物的筛选获得了 3 个与 *M* 基因紧密连锁的共显性标记, 并构建了该基因的局部遗传连锁图谱, 但受近等基因系及 SSR 位点全基因组扫描进行引物设计等因素的限制, 所得的分子标记偏少, 下一步我们将限定于 *M* 基因两侧的基因组信息设计 SSR 引物并结合高通量 AFLP 技术进行分析, 以寻求连锁更紧密的标记, 为 *M* 基因的精细定位乃至克隆奠定基础。

References

- Bai S L, Peng Y B, Cui J X, Gu H T, Xu L Y, Li Y Q, Xu Z H, Bai S N. 2004. Developmental analyses reveal early arrests of the spore-bearing parts of reproductive organs in unisexual flowers of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Planta*, 220 (2): 230 - 240.
- Chen Huiming, Liu Xiao-hong. 1999. A study on the inheritance of sex expression in the cucumber. *Journal of Hunan Agriculture University*, 25: 40 - 43. (in Chinese)
- 陈惠明, 刘晓虹. 1999. 黄瓜性型遗传规律的研究. *湖南农业大学学报*, 25: 40 - 43.
- Chen Huiming, Lu Xiang-yang, Xu Liang. 2005. Sex determination genes and sex expression mechanism in cucumber. *Plant Physiology Communications*, 41: 7 - 13. (in Chinese)
- 陈惠明, 卢向阳, 许亮. 2005. 黄瓜性别决定相关基因和性别表达机制. *植物生理学通讯*, 41: 7 - 13.
- Deng Si-li, Pan Jun-song, He Huan-le, Hao Ai-zhong, Cai Run. 2006. SRAP molecular marker linked to *M* gene in cucumber. *Journal of Shanghai JiaoTong University*, 24: 240 - 244. (in Chinese)
- 邓思立, 潘俊松, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润. 2006. 黄瓜 *M* 基因连锁的 SRAP 分子标记. *上海交通大学学报*, 24: 240 - 244.
- Galun E. 1961. Study of the inheritance of sex expression in the cucumber, the interactions of major genes with modifying genetic and non-genetic factors. *Genetica*, 32: 134 - 163.
- Jones A S, Walker R T. 1963. Isolation and analysis of the deoxyribonucleic acid of *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. *Nature*, 198: 588 - 589.
- Kenigsbuch D C. 1990. The inheritance of gynoccy in muskmelon. *Genome*, 33: 317 - 327.
- Knopf R R, Trebitsh T. 2006. The female-specific *CsACS1G* gene of cucumber: A case of gene duplication and recombination between the non-sex-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene and a branched-chain amino acid transaminase gene. *Plant Cell Physiol*, 47 (9): 1217 - 1228.
- Koo D H, Choi H W, Cho J, Hur Y, Bang J W. 2005. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'WinterLong') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, 48: 534 - 540.
- Kosambi D D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*, 12: 172 - 175.
- Kubicki B. 1969a. Investigation of sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genet Pol*, 10: 5 - 22.
- Kubicki B. 1969b. Investigation of sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genet Pol*, 10: 101 - 121.
- Le Xiao-ping, Du Peng, Zhang Qin-xian, Ding Yi, Jin Hui. 2001. An advanced technique for silver staining of polyacrylamide gel. *Journal of Henan Medical University*, 36 (4): 395 - 396. (in Chinese)
- 乐晓萍, 杜鹏, 张钦宪, 丁一, 金辉. 2001. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术改良. *河南医科大学学报*, 36 (4): 395 - 396.
- Li Zheng, Pan Jun-song, Guan Yuan, Tao Qian-yi, He Huan-le, Si Long-ting, Cai Run. 2008. Development and fine mapping of three co-dominant SCAR markers linked to the *M* gene in the cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 117: 1253 - 1260.
- Liu Shi-qiang, Xu Liang, Jia Zhi-qi, Xu Yong, Yang Qing, Fei Zhang-jun, Lu Xiang-yang, Chen Huiming, Huang San-wen. 2008. Genetic association of ETHYLENE-SENSITIVE-3-like sequence with the sex-determining *M* locus in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl*

- Genet, 117: 927 - 933.
- Peterson C E, Staub J E, Williams P H, Palmer M J. 1986. Wisconsin 1983 cucumber. HortScience, 25: 605 - 615.
- Roy R P, Saran S. 1990. Sex expression in the Cucurbitaceae. Bates D M, Robinson R W, Jeffry C. Biology and utilization of the Cucurbitaceae. NY, Cornell University.
- Shifriss O. 1961. Sex control in cucumbers. J Hered, 52: 5 - 12.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. The Plant Journal, 3 (5): 739 - 744.
- Tanurdzic M, Banks J A. 2004. Sex-determining mechanisms in land plants. Plant Cell, 16 (Suppl): S61 - 71.
- Witkowicz J, Urbanczyk-Wochniak E, Przybecki Z. 2003. AFLP marker polymorphism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) near isogenic lines differing in sex expression. Cell Mol Biol Lett, 8 (2): 375 - 381.
- Yamasaki S, Fujii N, Matsuura S, Mizusawa H, Takahashi H. 2001. The *M* locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants. Plant Cell Physiol, 42 (6): 608 - 619.
- Yin T, Quinn J A. 1995. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). Am J Bot, 82: 1537 - 1546.

纪念全国西瓜甜瓜科研生产协作 50周年暨第 12次 全国西瓜甜瓜科研与生产协作会议纪要

会议于 2009 年 4 月 24 ~ 27 日在河南省开封市召开。会议由中国园艺学会西瓜甜瓜专业委员会、中国农业科学院郑州果树研究所主办, 河南省开封市农林科学研究院、河南省农业科学院园艺研究所承办, 来自全国 27 个省市区 108 个单位的 190 多位代表出席了会议。中国园艺学会名誉理事长、中国农业科学院原常务副院长朱德蔚先生; 农业部全国农技中心李莉处长; 河南省农业厅薛豫宛副厅长、杜冠华处长; 河南省开封市政府王成法秘书长; 中国园艺学会西瓜甜瓜专业委员会主任、中国农业科学院郑州果树研究所刘君璞所长; 中国园艺学会副理事长、湖南省瓜类研究所孙小武所长; 中国园艺学会常务理事、河南省农业科学院园艺研究所徐小利所长; 河南省开封市农业科学院姚清志院长等领导同志出席会议开幕式。

中国园艺学会西瓜甜瓜协会王坚副理事长就全国科研与生产协作 50 年历程做了回顾总结。全国西瓜甜瓜科研与生产协作自 1959 年秋在甘肃兰州召开首次全国会议, 奠定协作基础延续到现在, 形成了包括科研、教学、农技推广、生产企业等单位数百位专家参与跨专业跨区域的大协作模式, 已成为我国农业科技协作促进产业发展的成功典范。刘君璞所长作了题为“协作, 创新, 共求发展 2003 ~ 2008 年总结”的报告, 充分肯定了全国协作活动适应市场与生产发展形势, 以民间科技协作交流为主, 开展了大量卓有成效的科研与生产协作, 对促进西瓜甜瓜产业发展起到了重要作用, 并总结了存在问题和提出今后工作设想。

会议经过评审对 2003 ~ 2008 年期间在全国西瓜甜瓜科研、生产、经营工作中做出显著成绩的 28 个省、区、市的 46 个先进集体和 93 位先进个人颁发荣誉证书, 同时表彰了 50 多位老专家。会议主办单位编印了《全国科研生产学术交流论文摘要集》, 共收录摘要 210 多篇, 同时收集约 50 幅反映我国西瓜甜瓜科研生产历程的部分照片。

与会代表分组进行了交流。中国园艺学会副秘书长、西瓜甜瓜专业委员会秘书长、全国西瓜甜瓜科研与生产协作办公室主任马跃进行了会议总结。总结着重提出了突出全国科研生产协作的公益性、学术性、民间性特点, 进一步加强交流与协作, 创新共赢, 为推动行业科技进步发展而不懈努力。

会议组织了开封、中牟的露地及设施西瓜栽培现场考察。此次会议的规模 and 影响都超过了以往的全国协作会议, 对推动今后全国西瓜甜瓜的科研与生产协作及产业可持续发展具有重要的意义。

全国西瓜甜瓜科研与生产协作办公室

2009 年 4 月 30 日