

黄瓜瓜把长度 QTL 定位的研究

王桂玲, 秦智伟*, 周秀艳, 赵咫云

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 利用长瓜把的黄瓜自交系 129 与短瓜把的 Z3 杂交衍生的 F_2 株系, 检测与瓜把长度相关的 QTL。DNA 从 F_2 株系提取, 并且利用 SSR 引物对其进行扩增。总共有 5 个呈现清晰、可重复的多态性分子标记用于 QTL 检测。结合瓜把数据, 利用 Mapmaker 3.0b 构建基因连锁图谱, 运用 Windows QTL Cartographer V2.0 检测 QTL。LOD 大于 2 作为 QTL 存在的阈值。4 个来自于同一个连锁群的分子标记 CSW GATT01B、CSW GATT01C、CSCT335 和 CSW GATT01A 与瓜把长度显著相关。*Qchl1* 与分子标记 CSW GATT01B、CSW GATT01C 紧密连锁, 与二者分别相距 3.4 cM 和 18.0 cM, 且变异贡献率为 18.49%。

关键词: 黄瓜; 瓜把长度; SSR; QTL

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 04-0543-04

Mapping Quantitative Trait Loci Influencing Cucumber Carpopodium Length Using Simple Sequence Repeat Markers

WANG Gui-ling, QIN Zhi-wei*, ZHOU Xiu-yan, and ZHAO Zhi-yun

(Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A F_2 population derived from 129, a cucumber inbred line with long carpopodium, and Z3, a cultivar with short carpopodium, was used to identify quantitative trait loci (QTL) associated with cucumber carpopodium length. DNA was extracted from F_2 plants and amplified using simple sequence repeat (SSR) marker. Five polymorphic SSR markers were used for QTL detection and construct the genetic linkage map using Mapmaker 3.0b. QTLs were detected with Windows QTL Cartographer V2.0. Four markers CSW GATT01B, CSW GATT01C, CSCT335 and CSW GATT01A that came from one linkage group significantly associated with carpopodium length. *Qchl1* was linked with SSR markers CSW GATT01B and CSW GATT01C by 3.4 cM and 18.0 cM, respectively. It explained 18.49% of phenotypic variation.

Key words: *Cucumis sativus*; carpopodium length; SSR; QTL

黄瓜瓜把的长短是其重要的商品性状之一。国外的黄瓜优良品种瓜把极短或无, 而国内品种变化很大。国家‘九五’科技攻关对黄瓜品质指标要求瓜把长度小于瓜全长的 1/7。马德华等 (1994) 进行了黄瓜主要品质性状的配合力分析, 发现瓜长、瓜把长和瓜粗等均为数量性状遗传。顾兴芳等 (1994) 研究了黄瓜瓜把长度的遗传规律, 认为其遗传以加性效应为主, 受环境影响较小。然而, 在传统的黄瓜品质育种中, 对瓜把性状的选择是通过表现型间接对基因型进行选择, 需要果实发育到成熟才能进行, 并且瓜把长度是数量性状, 表现型与基因型之间缺乏明确的对应关系, 选择效率不高。

本研究采用 SSR 分子标记技术, 对黄瓜瓜把长度的 QTL 进行定位, 以期得到控制主效 QTL 的分子标记, 从而用来对苗期黄瓜材料进行筛选, 缩短育种周期, 加快黄瓜品质育种进程。

收稿日期: 2007 - 12 - 10; 修回日期: 2008 - 03 - 07

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目 (GA06B103-8); 黑龙江省博士后基金项目 (LBH-Z05032)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qzw303@126.com)

1 材料与方法

1.1 群体构建

用亲缘关系较远的黄瓜自交系 129 (长瓜把) 和荷兰温室黄瓜 Z3 (短瓜把) 作为亲本, 构建 (Z3 ×129) F₂代分离群体。于同一日期摘取同一节位上的成熟商品瓜, 将黄瓜纵切, 测量近瓜把处不含心腔部分的长度 (顾兴芳 等, 1994)。参照 Michemore 等 (1991) 提出的 BSA 法, 从 F₂群体中选取长瓜把、短瓜把各 10个单株, 构建近等基因池。

1.2 SSR分子标记筛选

黄瓜叶片总 DNA 提取采用 SDS法 (王关林和方宏筠, 2002); 用 86对 SSR引物首先对亲本进行筛选, 得到 18对有差异的引物; 用这 18对引物对所建立的 DNA 混合池筛选, 共得到 5对有差异的引物; 再用这 5对 SSR多态性引物对所有 F₂群体 158个单株进行扩增检测。SSR引物 (Fazio et al, 2002) 由上海生工生物工程公司合成, 对黄瓜整个基因组有较好的代表性。SSR反应条件和试剂参见文献 (王桂玲, 2005), 扩增产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳、银染, 记录带型。

1.3 数据分析

检验所选择到的 SSR标记在 F₂群体中的分离比例, 利用 Mapmaker/EXP version 3.0b (Lander et al, 1987) 作图软件构建连锁群, LOD值最小为 3.0, 最大遗传距离为 50 cM; 利用 MapChart 2.1 软件绘制连锁图谱; 利用 Windows QTL Cartographer V2.0 进行复合区间作图扫描农艺性状的 QTLs, 以似然比 LR (likelihood ratio) 大于 11.5, 对应 LOD值大于 2.5为 QTLs存在的阈值。

2 结果与分析

2.1 遗传分析

2004年和 2005年分别对 F₂群体瓜把长度进行遗传分析, 偏度和峰度检验表明, 瓜把性状比较符合正态分布, 偏度绝对值均小于 0.5。从图 1和表 1可以看出, 在 2004年的 158株 F₂群体和 2005年的 195株 F₂群体中, 瓜把长度均表现为正态分布, 这对连锁分析和 QTL发现是至关重要的。

表 1 黄瓜 129和 Z3的瓜把长度及 F₂群体的部分遗传参数

Table 1 The carpopodium length of cucumber 129 and Z3, and some genetic parameters of F₂ population

年份 Year	亲本 Parents		F ₂ 群体 F ₂ population				
	Z3	129	平均值 Mean	范围 Range	标准误 Stdev	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
2004	2.0	6.5	4.02	1.7 ~ 6.8	0.14	0.14	- 0.56
2005	2.1	6.6	4.14	1.9 ~ 6.9	0.07	0.42	- 0.10

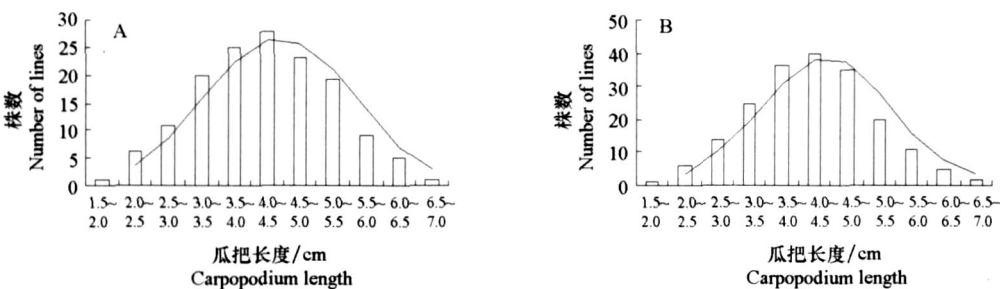


图 1 2004 (A) 和 2005 (B) 年黄瓜 F₂群体的瓜把长度分布

Fig. 1 Carpopodium length of F₂ population in 2004 (A) and 2005 (B)

2.2 连锁分析

选用 86对 SSR引物对父本 129和母本 Z3进行分析，结果 75对引物具有扩增产物，其中 18对引物在双亲间表现多态性，多态性频率为 24%。进一步利用这 18对引物对基因池筛选，得到 5个多态性标记。利用 5个在基因池间有多态性的引物对黄瓜 F₂群体进行 SSR分析（图 2），结果 5个 SSR标记在 F₂群体中的分离均符合 1 2 1的分离比例（表 2），基本符合 F₂群体的遗传特征。分离群体中标记的偏分离现象普遍存在，群体的偏分离标记比例较小，因此该群体可用于连锁图谱构建。

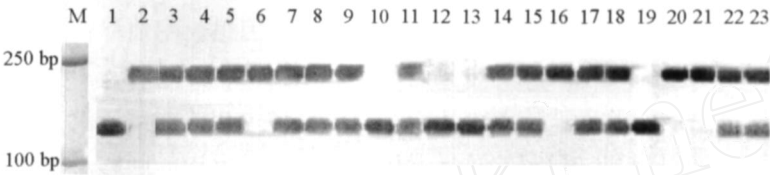


图 2 引物 CSW GATT01B在 F₂ 群体中 SSR扩增产生的带型

M: DL2000 DNA 标准；1, 2: 亲本；3~23: F₂ 群体。

Fig 2 SSR profiles generated by primer CSW GATT01B in the F₂ population

M: DL2000 DNA marker; 1, 2: Parents; 3 - 23: F₂ lines

表 2 SSR座位在黄瓜 158个供试单株中的分布

Table 2 Distribution of SSR seats in 158 cucumber plants studied in the experiment

座位 Locus	父本型条带数 Father type quantity	母本型条带数 Mother type quantity	杂合型条带数 Hybrid type quantity	杂合率 / % Hybrid percentage	χ^2
CSW GATT01B	40	39	79	51.04	0.9936
CSW GATT01C	42	37	79	46.35	0.9289
CSCT335	39	39	80	47.92	0.9874
CSW GATT01A	39	39	80	48.96	0.9874
CSW TA04	37	39	81	52.08	0.8937

$\chi^2_{0.05} = 5.99; \chi^2_{0.01} = 9.21.$

2.3 QTLs分析

利用 Windows QTL Cartographer V2.0进行复合区间作图扫描瓜把性状的 QTLs，结果表明，与瓜把长度相关的 QTL *_Qchl1* 位于遗传图谱 CSW GATT01A-CSW GATT01B 连锁群上，具体位于 CSW GATT01B-*Qchl1* - CSW GATT01C引物之间。*Qchl1* 距离两侧标记的遗传距离分别为 3.4 cM和 18.0 cM（对应 LOD值为 3.48），可解释 18.49%的遗传变异，加性效应为 0.84。

3 讨论

3.1 群体与分子标记的选择

SSR分子标记是共显性的，遗传规律符合孟德尔分离比率。通过分子标记检测 QTL就是寻找性状与分子标记之间的关联，目前最常用的方法是复合区间作图法，而该方法要求所用的群体的表型数据符合正态分布。本研究中瓜把长度符合正态分布（图 1，表 1）。

群体的遗传组成应该根据其个体的基因型组成（也即双亲对所有个体的遗传贡献率）进行估计，对于 DH、RL和 F₂群体，理论上双亲遗传贡献率都是 0.5。以 5个 SSR标记分析 F₂分离群体中 158个单株的基因型组成，用 χ^2 测验检测群体中来自亲本 Z3和 129的标记位点数之比，其基因型比为 1 2 1（Z3 杂合型 129）， χ^2 拟合度检验表明该群体各家系基因型近似符合正态分布。

3.2 SSR标记与黄瓜分子图谱

与其他作物相比, 黄瓜已开发的 SSR 引物数量较少, 目前所能查到的不超过 150 对, 对黄瓜整个基因组的覆盖不完整。现有黄瓜遗传图谱上仅有 14 个 SSR 标记位点 (Danin et al, 2000; Fazio et al, 2002), 图谱上现有的标记多为 RFLP 标记和 RAPD 标记。前者操作复杂, 后者稳定性差, 已定位的分子标记多还没有和表型性状相关联。

本试验中只找到了瓜把的 1 个 QTL, 这与引物数量太少有关。因此, 应加大引物密度, 进一步筛选引物, 找到与目标性状紧密连锁的标记。

黄瓜有 7 对染色体, 完整的黄瓜连锁组应该有 7 个, 基因组长度估计在 750 ~ 1 000 cM (Staub & Meglic, 1993), 但现有黄瓜图谱中最长的也只有 766 cM (Kennard et al, 1994), 因此现有的黄瓜遗传图谱是不饱和的。高密度的黄瓜遗传图谱还没有完成, 各个相关图谱还没有整合在一起, 这给标记基因带来一定的难度, 构建饱和、稳定的黄瓜遗传图谱是亟待解决的问题。构建饱和的遗传图谱主要有两方面的工作, 一是利用多态性高、经济实用的分子标记技术, 如 SSR、AP-PCR、SCAR 等; 二是在适当的作图群体中检查共有标记, 然后利用相关计算机软件合并现有图谱以得到更饱和的黄瓜分子连锁图谱。

References

- Danin P Y, Reis N, Baudracco-Amas S, Pitrat M, Staub J E, Oliver M, Arus P, Vicente CM, Katzir N. 2000. Simple sequence repeats in *Cucumis* mapping and map merging. *Genome*, 43: 963 - 974.
- Fazio G, Staub J E, Chung SM. 2002. Development and characterization of PCR markers in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Am Soc Hort Sci*, 127: 545 - 557.
- Gu Xing-fang, Fang Xiu-juan, Han Xu. 1994. Cucumber fruit handle length heredity regulation research beginning report. *Chinese Vegetable*, (2): 33 - 34. (in Chinese)
- 顾兴芳, 方秀娟, 韩旭. 1994. 黄瓜瓜把长度遗传规律研究初报. *中国蔬菜*, (2): 33 - 34.
- Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, Meglic V, Staub J, Havey M. 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor Appl Genet*, 89: 42 - 48.
- Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174 - 181.
- Ma De-hua, Lü Shu-zhen, Shen Wen-yun, Huo Zhen-rong, Li Shu-ju. 1994. Combining ability analysis of cucumber quality characteristics. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 9 (4): 65 - 68. (in Chinese)
- 马德华, 吕淑珍, 沈文云, 霍振荣, 李淑菊. 1994. 黄瓜主要品质性状配合力分析. *华北农学报*, 9 (4): 65 - 68.
- Michele R W, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 9828 - 9832.
- Staub J E, Meglic V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivars discrimination: A case study in cucumber. *Hort Technology*, (3): 291 - 300.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. *Plant gene engineering*. 2nd. Beijing: Science Press: 743 - 744. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. *植物基因工程*. 第 2 版. 北京: 科学出版社: 743 - 744.
- Wang Gui-ling. 2005. SSR molecular marker of tuberculate gene and stem gene in cucumber [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 王桂玲. 2005. 黄瓜果瘤与瓜把基因 SSR 标记 [博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.