

黄瓜侧枝基因(*lb*)和全雌基因(*f*)的定位 及 RAPD 遗传图谱的构建^{*}

李效尊^{1**} 潘俊松^{1**} 王刚¹ 田丽波² 司龙亭²
吴爱忠^{1,3***} 蔡润^{1***}

1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161;
3. 上海农业科学院 上海 201106

摘要 利用侧枝长势强、全雌性黄瓜自交系 S06(欧洲温室型)和侧枝长势极弱、强雄性自交系 S52(来源于大别山农家品种)的杂交 F₂ 代群体, 构建了黄瓜的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子遗传框架图谱, 并定位了侧枝性状基因(*lb*)和全雌基因(*f*)。图谱中共包括 79 个 RAPD 标记, 分属 9 个连锁群, 总长度 1110.0cM, 平均间距为 13.7cM。侧枝基因(*lb*)定位在一个大的连锁群上, 其两侧标记是 OP-Q5-1 和 OP-M-2-2, 与 *lb* 的间距分别是 9.3cM 和 15.9cM。全雌性基因(*f*)定位在一个小的连锁群上, 其两侧标记是 OP-Q5-2 和 BC151, 与 *f* 的间距分别是 13.8cM 和 13.6cM。图谱的构建为进一步研究侧枝和全雌性状及黄瓜的其他性状的基因打下了基础。

关键词 黄瓜 侧枝 全雌性 RAPD 定位

黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 属葫芦科, 是世界上主要的蔬菜作物之一, 同时黄瓜也是葫芦科典型的代表植物, 具有性型多样、侧枝长势区别明显等方面的遗传特点, 一直受到育种家和遗传学家们的重视^[1~5]。侧枝的长势是黄瓜的一个重要农艺性状, 侧枝长势过强, 影响主蔓生长, 同时也给黄瓜生产管理带来诸多不便, 因此目前国内倾向于利用侧枝长势较弱的品系。国外为了便于利用机器人采收, 也有特别选用和培育侧枝长势极强的品系的报道^[6,7]。黄瓜的另一个重要的生物学特征是具有几种不同性别的表达类型, 全雌性黄瓜因其具有每节都开雌花, 并且单性结实产量较高的特点, 在生产上备受青睐。因此, 对侧枝性状基因(*lb*)和全雌性基因(*f*)分子标记的筛选和定位研究有重要的意义。

分子标记辅助选择(MAS)是近年来发展起来的

一种新的育种选择手段。它是对目标性状在基因组水平的连锁标记的选择, 不受环境影响, 不受等位基因显隐性关系干扰, 选择结果可靠; 同时 MAS 还可以在育种早期进行选择, 从而大大缩短育种周期, 提高育种效率^[8]。高密度的遗传图谱也可用于图谱定位克隆。1987 年 Fanourakis 等^[9] 利用表型标记首先建立了黄瓜的连锁群。1990 年, Pierce 等^[4] 对自 20 世纪 30 年代以来发现的黄瓜的已知性状的基因进行了总结和分类, 并根据相关文献数据又构建了一张含有 43 个黄瓜标记性状的遗传连锁图。1992 年, Vakalounakis 发现了一个隐性叶型突变基因, 并与其他表型标记进行连锁分析构建了一个相应的连锁群^[10]。稍后, Knerred 等及 Meglic 等分别利用同工酶标记和同工酶加表型标记构建了黄瓜的连锁群^[11,12]。近年来限制性酶切片段长度多态性

2004-05-08 收稿, 2004-06-25 收修改稿

* 上海市科委资助项目(批准号: 033107019 02JC14036)

** 为共同第一作者

*** 通讯作者, E-mail: cairun@situ.edu.cn

(RFLP)和随机扩增多态性 DNA (RAPD)等分子标记的出现,使黄瓜分子遗传图谱的构建成为可能.迄今已经报道的标记位点超过 58 的分子连锁图谱(不包括 Bradeen 等^[5]的整合图谱)共有 3 张.其中, Kennard 等^[13]采用 RFLP, RAPD 和同工酶标记及近缘和远缘两个不同的 F₂ 群体分别构建了两张图谱,所含的分子标记数分别是 58 和 70.而后, Serquen 等^[9]又利用 RAPD 分子标记构建一张含 80 个位点的分子连锁图谱,他们均对全雌基因(*f*)进行了定位,但因为所用的标记类型不同,没有可比性,尚不能用于对国内品种的标记辅助选择. Serquen 等还对侧枝性状的数量性状位点(QTL)进行了分析.由于黄瓜染色体小且难以观察,加之黄瓜本身的细胞学研究落后,所以到目前为止还没有一张分子连锁图谱和黄瓜染色体组对应起来.

为了进行侧枝性状基因(*lb*)和全雌基因(*f*)的定位,本研究利用侧枝长势弱和强雄性自交系 S52(来源于大别山农家品种)与侧枝长势强和全雌性自交系 S06(欧洲温室型)的杂交 F₂ 代分离群体,构建了黄瓜的 RAPD 分子标记遗传框架图谱,并定位了侧枝基因(*lb*)和全雌基因(*f*).

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜自交系 S06(欧洲温室型,侧枝长势强,全雌)和 S52(来源于大别山农家品种,侧枝长势弱,强雄)由本实验室培育. *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 购自上海 Promega 公司, RAPD 引物序列参照 QIAGEN Operon 和加拿大 British Columbia 大学 NAPS Unit 的序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 作图群体的构建 侧枝长势强、具有全雌性的欧洲温室型黄瓜 S06 品系作为母本,侧枝长势极弱、强雄性的 S52 品系作为父本,于 2002 年秋季和 2003 年夏季做杂交和自交,得到 F₂ 群体.

1.2.2 田间实验和性状调查 田间实验于 2003 年秋季进行.种植 F₂ 群体 200 个单株于上海交通大学农业与生物学院温室(从法国 Richel 公司引进).随机选取 93 株的性状统计数据用于作图,为严格控

制实验误差,基质匀拌后,等量装入不同栽培袋中,并采用滴漏式浇水和施肥.

侧枝性状调查于定植后 30 d 左右进行,此时亲本 S52 侧枝尚未长出,而亲本 S06 侧枝均已长出,平均长度为 2 cm.以侧枝长度 2 cm 作为标准,凡有侧枝长度大于 2 cm 的记为侧枝长势强;凡没有侧枝或侧枝长度小于 2 cm 的记为侧枝长势弱.

全雌性状调查从始花期开始,统计亲本和 F₂ 群体 40 节内的雌花率.雌花率为 90%~100%的为全雌,没有雌花的为强雄,其他范围的为中间类型.

1.2.3 基因组 DNA 的提取 采黄瓜两片真叶展开时的子叶,用 CTAB 法^[14]提取亲本及群体的总 DNA.

1.2.4 RAPD 反应 优化后的 PCR 反应体系为:引物 12.5 pmol, *Taq* 酶 0.6 U, dNTPs 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 10× 缓冲液 2 μL, 基因组 DNA 40 ng, 总体积 20 μL.在 PCR 仪上按如下程序进行扩增: 94℃ 预变性, 3 min; 94℃ 变性, 30 s; 37℃ 复性, 30 s; 72℃ 延伸 1.5 min, 40 个循环后于 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1.5%~2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离.

1.2.5 数据的采集和分析 标记命名与引物序列名称一致,若引物有多条多态性条带,按大小分别在后面加数字,中间用“-”隔开.如 OP-H6-1 代表引物 OP-H6 产生的第一个多态性标记.为了便于计算机分析,首先根据 RAPD 标记在双亲中的表现进行归类,将 S06 品系呈现的标记类型记为 1, S52 品系呈现的标记类型记为 2,群体中根据其标记类型分别记为 1 或 2,缺失的数据计为 0.设置最小 LOD 值为 4.5,最大图距为 37.2 cM,用 Mapmaker/Exp. version 3.0 软件构建连锁图谱.

2 结果与分析

2.1 亲本引物筛选

本实验共选用了 640 条 GC 含量为 60%~70% 的 RAPD 引物,(其中 Operon RAPD 引物 400 条, NAPS Unit 引物 240 条),筛选出多态性引物 120 条,占 18.8%.其中有 109 条引物 PCR 扩增产物带型清晰稳定,重复性好,被用于对群体进行统计分

析和连锁图谱构建. 109 条引物共计产生 140 个标记(平均每个引物产生 1.3 个标记), 其中有 15 个引物产生了 2 个标记带型; 有 5 个引物(OP-H6, OP-M6, OP-D7, OP-T14 和 OP-S13) 产生了 3 个标记带型; 有 1 个引物(OP-E1) 产生了 4 个标记带型. 140 个多态性标记中, 来自亲本 S06 标记带型的占 45.2%, 来自亲本 S52 的占 54.8%.

2.2 侧枝和全雌基因的遗传分析

侧枝性状调查于定植 30 d 后进行. 田间调查发现, 亲本 S52 侧枝当时尚未长出, 而亲本 S06 和 F₁ 侧枝均已长出, 最长侧枝的平均长度为 2 cm. 以 2 cm 作为标准, 凡有不小于 2 cm 的侧枝的记为有侧枝, 其余记为无侧枝, F₂ 代中有侧枝的 87 株, 没有侧枝的 26 株. 经卡方检验, 符合 3:1 的 Mendel 遗传分离比例. 说明侧枝性状在这一时期可以按照质量性状进行分析和基因定位.

按照前面方法中介绍的标准, 对全雌性调查后发现, F₁ 代表现为中间类型. F₂ 代中表现全雌性的有 28 株, 强雄的有 20 株, 中间类型 47 株. 经卡方检验, 符合 1:2:1 的单基因共显性遗传分离比例. 说明全雌性也可以按照质量性状进行分析和基因定位.

2.3 连锁图谱的构建

在统计的 140 个多态性标记中, 大小范围在 100~3000 bp 之间, 经过适合性检验, 有 132 个标记符合 3:1 的分离比例, 偏离 3:1 分离比例的有 8 个, 占 5.7%. 去除偏分离标记, 将其余 132 个 RAPD 标记另加侧枝和全雌性 2 个形态标记用于连锁图谱构建.

构建的图谱包含 9 个连锁群, 包括 79 个 RAPD 标记, 和定位的侧枝基因(*lb*)和全雌基因(*f*), 总长度为 1110.0 cM, 平均间距为 13.7 cM (表 1, 图 1). 其中, 有 4 个大的连锁群, 5 个小的连锁群. 最大的连锁群(LG-1)有 17 个标记, 覆盖 293.6 cM, 平均间距为 17.3 cM; 标记最多的连锁群(LG-2)有 18 个标记, 覆盖 229.9 cM, 平均间距为 12.8 cM; 平均间距最小的连锁群(LG-4)有 16 个标记, 覆盖 153.1 cM, 平均间距为 9.6 cM. 小的连锁群均有 4 个标记, 长度从 43.6~68.4 cM, 平均间距从 11.1

表 1 黄瓜 RAPD 连锁图谱各连锁群参数

连锁群	标记数	连锁群长度/cM	最大间距/cM	最小间距/cM	平均间距/cM
LG-1	17	293.6	23.7	4.7	17.3
LG-2	18	229.9	22.2	0.0	12.8
LG-3	8	175.2	30.4	21.0	21.9
LG-4	16	153.1	18.5	3.3	9.6
LG-5	4	68.4	27.7	15.3	17.1
LG-6	4	54.4	21.0	16.6	13.6
LG-7	4	47.3	24.7	9.3	11.8
LG-8	4	44.4	17.4	13.4	11.1
LG-9	4	43.6	24.8	4.6	14.5
总计	81	1110.0	-	-	13.7

2.4 侧枝和全雌基因的定位

侧枝基因(*lb*)定位在一个大的连锁群上, 其两侧标记分别是 OP-Q5-1, 和 OP-M-2-2, 与 *lb* 的间距分别是 9.3 和 15.9 cM (图 1, LG-2). 全雌基因(*f*)定位在一个小的连锁群上(图 1, LG-8), 其两侧标记分别是 OP-Q5-2 和 BC151, 与 *f* 的间距分别是 13.8 和 13.6 cM.

3 讨论

3.1 RAPD 多态性

RAPD 能随机扩增基因组的 DNA 序列, 具有信息量大, 操作简单, 成本较低等优点, 常常被用作遗传框架图谱的构建. RAPD 标记的多态性取决于两亲本材料之间的亲缘关系的远近. 另外, 反应条件的优化程度和电泳时琼脂糖的浓度也会影响到多态性的揭示. 本研究中, RAPD 标记的多态性引物比例为 18.8%. 图谱中呈现正常分离的引物有 70 个, 占 10.9%, 这个比例远高于 Kennard 等^[13] 用近缘材料 GY-14×P1432860 和 Serquen 等^[6] 用黄瓜的近缘材料 G421×H-19 得到的结果. 他们的多态性引物的比例分别为 5.5% 和 4.8%. 这是因为本研究所用的材料一个来源于中国大别山农家品种, 一个是欧洲温室型的, 两者遗传差异大. 另外, 在实验过程中对 PCR 反应条件进行了优化, 使绝大多数反应能产生清晰的条带, 其中最大的为 3000 bp, 最小的有 100 bp. 电泳过程中, 根据多态性条带的不同情况, 使用不同质量分数的琼脂糖 (1.5%~2.5%), 这些措施也有助于提高 RAPD 的多态性.

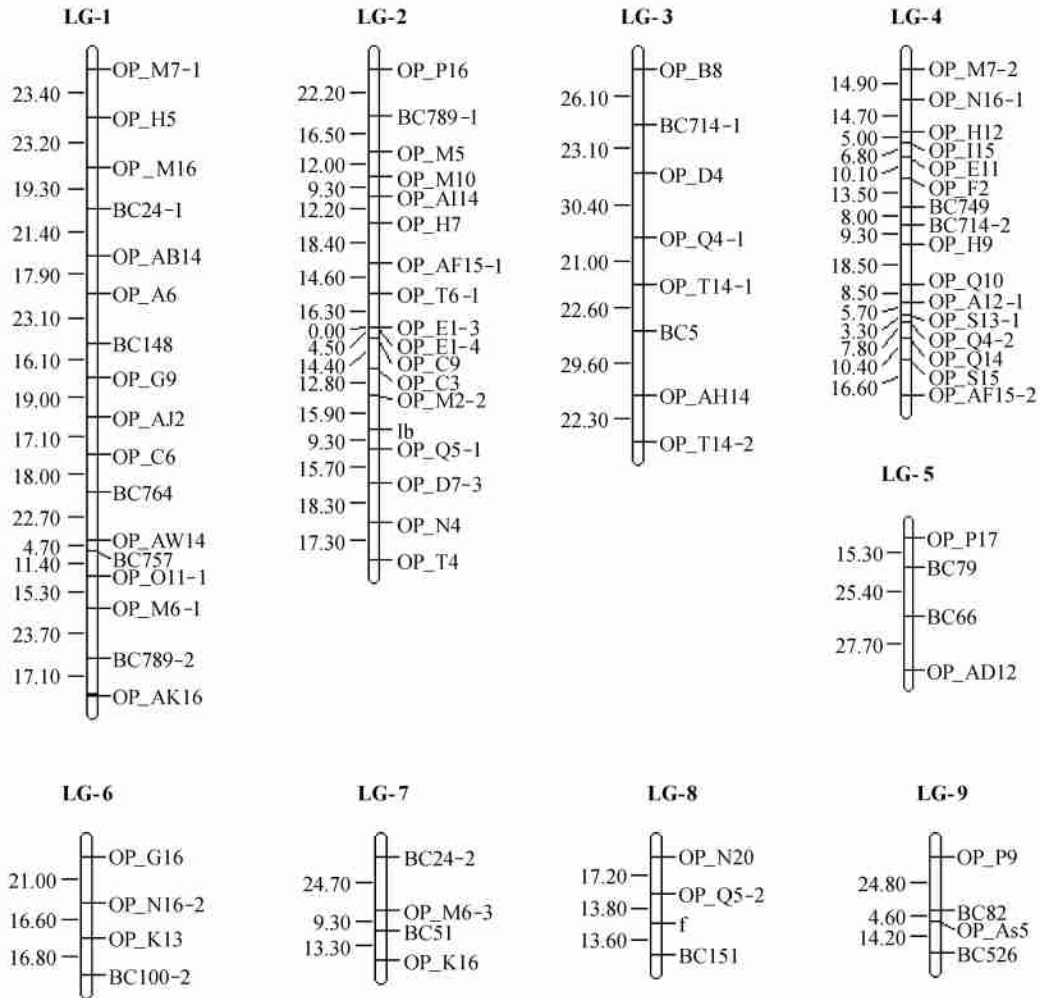


图 1 用 F_2 群体建立的黄瓜 RAPD 遗传图谱

右侧符号代表 RAPD 分子标记; 左侧数字为标记之间的遗传图距(单位: cM)

3.2 RAPD 分子图谱

本研究构建的黄瓜图谱共有 9 个连锁群, 包括 79 个 RAPD 标记和侧枝、全雌性两个表型性状座位, 覆盖总长度为 1110.0 cM, 大于 Kennard 等^[13]和 Serquen 等^[6]得到的黄瓜基因组总长度(分别是 480, 766 和 599.6 cM), 并和根据 Beckman 和 Soller^[13]的估计方法得出的黄瓜基因组 800 ~ 1000 cM 的总长度相接近. 图谱中标记间平均间距 13.7 cM, 大于 Serquen 等的数值. 但是本研究构建的图谱中标记的分布相对比较均匀, 没有出现过于密集和过于稀疏的情况, 这是该图与 Serquen 等^[6]用同类标记所作图的显著区别之一.

黄瓜共有 7 对染色体, 应该有 7 个连锁群, 本

文构建的图谱却是 9 个连锁群, 与 Serquen 等^[6]的结果相同. 这说明现有的连锁图谱饱和度还不够, 随着新的分子标记数目的增加和作图群体的扩大, 连锁群之间可能逐步整合, 最终会达到 7 个. 实际上我们在分析过程中也发现, 当 LOG 值适当放低时, 连锁群 LG-1 和 LG-4 会形成一个较大的连锁群.

3.3 侧枝基因和全雌性基因的定位

侧枝长势和全雌性状都是非常重要的农艺性状, 一直受到育种家和遗传学家的重视, 其中全雌性基因研究较早. 最初有人用经典遗传学的方法对决定黄瓜全雌性的主效基因进行粗略定位^[16, 4]. 利

用分子标记则可以更精确地定位全雌性和侧枝基因并应用于分子育种. 本研究中, 全雌基因(*f*)被定位在一个较小的连锁群上, 其离较近的 RAPD 标记 BC151 的距离是 13.6 cM, 离另一侧标记 OP-Q5-2 的距离是 13.8 cM, 而 Serquen 等用 RAPD 标记定位的全雌基因两侧的标记的距离分别是 31.2 和 43.9 cM^[6]. 这说明我们所用的亲本和分离群体比较有利于全雌基因的定位. 但由于受高温天气的影响, 亲本 S52 和 F₂ 代中部分个体呈现出了全雄的特征, 这可能与正常气候条件下获得的数据有些差别. 侧枝基因(*lb*)被定位在连锁群 LG-2 上, 离最近的 RAPD 标记 OP-Q5-1 的距离是 9.3 cM.

对于侧枝基因作为质量性状进行定位研究是前人没有进行过的. 多数农艺性状一般都呈现数量性状的特点, 但在一定的条件下取决于实验者采用的性状调查标准可以将数量性状作为质量性状来进行遗传分析^[7]. 以侧枝性状为例, 在黄瓜生长发育的早期按照我们的标准可以作为质量性状进行遗传分析和基因定位. 但到侧枝伸长以后, 又表现出数量性状的特征. 许多实验表明将某些性状作为质量性状进行研究定位的基因往往是决定这个性状的主效 QTL.

分子辅助选择可以提高育种效率, 在其他蔬菜如番茄等作物上已经进行了较为深入的研究. 在黄瓜上, Fazio 等也进行了初步的尝试, 证实了分子辅助选择的可行性^[8]. 本研究定位的侧枝基因和全雌性基因, 离其两侧分子标记的距离还较大, 尚不能采用单标记辅助选择. 但如果采用两侧双标记法对侧枝性状和全雌性性状进行选择, 则可以大大提高选择的准确率, 分别为 98.5% 和 97.4%, 所以有望将分子辅助选择应用到黄瓜的育种实践中去.

分子图谱的构建为进一步研究侧枝和全雌性的遗传基因打下了基础. 为了更全面精确的研究决定侧枝性状和全雌性状的基因(包括 QTL), 构建 F₃ 家系, 增加新的标记种类, 加大图谱的饱和度将是下一步的主要目标. 另外, RAPD 是一种非固定的分子标记, 为了有利于分子辅助选择和对侧枝基因和全雌基因的进一步研究, 将 RAPD 标记回收克隆, 转化成序列特征性扩增区域(SCAR)这种固定标记也是必要的.

参 考 文 献

- 1 Peterson C E, et al. Induction of staminate flowers on gynococious cucumbers with gibberellin A3. *Science*, 1960, 131: 1673
- 2 Atsmon D, et al. Comparative effects of gibberellin, silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine on sexual tendency and ethylene evolution in the cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Plant & Cell Physiol*, 1979, 20: 1547
- 3 Malepszy S, et al. Sex determination in cucumber(*Cucumis sativus* L.) as a model system for molecular biology. *Plant Sci*, 1991, 80: 39
- 4 Pierce L K, et al. Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortScience*, 1990, 25(6): 605
- 5 Bradeen J M, et al. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genome*, 2001, 44: 111
- 6 Serquen F C, et al. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 257
- 7 van Henten E J, et al. An autonomous robot for harvesting cucumbers in greenhouses. *Autonomous Robots*, 2002, 13(3): 241
- 8 李梅芳, 等. 水稻生物技术育种. 北京: 中国农业科学出版社, 2001
- 9 Fanourakis N E, et al. Analysis of genetics linkage in cucumber. *J Hered*, 1987, 78: 238
- 10 Vakalounakis D J. Heart leaf: A recessive leaf shape marker in cucumber; Linkage with disease resistance and other traits. *J Hered*, 1992, 83: 217
- 11 Knerr L D, et al. Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 1996, 84: 217
- 12 Meglic V, et al. Inheritance and linkage relationships of allozyme and morphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 865
- 13 Kennard W C, et al. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 42
- 14 Clark M S. 著. 顾红雅, 等译. 植物分子生物学-实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998
- 15 Beckman J S, et al. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement; Methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet*, 1983, 67: 35
- 16 Galun E. Study of the inheritance of sex expression in the cucumber; The interaction of major genes with modifying genetic and non-genetic factors. *Genetica*, 1961, 32: 134
- 17 盖钧镒, 等. 数量性状遗传体系. 北京: 科学出版社, 2003
- 18 Fazio G. Comparative analysis of response to phenotypic and marker-assisted selection for multiple lateral branching in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 875