植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2007, **24** (2): 168–172, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

黄瓜果瘤的遗传及SSR标记

王桂玲[1,2], 秦智伟[1*], 周秀艳[1], 赵咫云[1]

[1] 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; [2] 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150080

摘要 通过对以荷兰温室无瘤黄瓜(*Cucumis sativus*)品种Z1和Z3为母本(tutu), 有瘤黄瓜品系东农129为父本(TuTu)的杂交后代F_1和F_2的统计分析, 结果表明: 在F_1代, 2个组合果实都有果瘤, 有果瘤为显性; F_2代果实有瘤与无瘤呈现分离, 其比例分别是2.92:1和2.95:1, 表明*Tu*基因是独立遗传的, 即有瘤(Tu)对无瘤(tu)为显性。为了获得与黄瓜果瘤基因连锁的SSR(simple sequence repeat)标记, 从129×Z3 F_2群体中选取有瘤、无瘤单株的DNA各10个, 构建有瘤、无瘤近等基因池。用86对SSR引物在亲本及DNA混合池之间进行筛选, 并对F_2群体的75个单株进行验证。筛选得到了5对与果瘤相关的SSR引物, 经MAPMAKER/EXP version 3.0b软件分析, 其中CSWGATT01B、CSWGATT01C、CSCT335和CSWGATT01A四个标记位于同一连锁群上, *Tu*基因位于这4个标记构建的连锁群中, 具体位置为CSWGATT01C-Tu-CSCT335, 距离两侧标记的遗传距离分别为20.0 cM和14.1 cM。

关键词 黄瓜, 遗传, 分子标记, SSR, 果瘤

王桂玲, 秦智伟, 周秀艳, 赵咫云 (2007). 黄瓜果瘤的遗传及SSR标记. 植物学通报 **24,** 168–172.

黄瓜(*Cucumis sativus*)又称胡瓜、王瓜, 为葫芦科甜瓜属一年生草本蔓生攀缘植物。黄瓜是重要的蔬菜作物之一, 一年四季均可食用, 与大众生活密切相关。随着人民生活水平的提高, 对黄瓜品质的要求越来越高, 首先关心的是外观品质, 外观品质是引起消费者购买欲望的直接因素。外观品质包含果色深绿均匀、无黄色条纹、平滑少刺、果柄短。外形光滑的黄瓜污染少, 清洗方便, 食用卫生, 是无公害蔬菜的理想品种。经检测表明: 无瘤无刺黄瓜果肉农药残留量比有刺黄瓜低27%, 果皮农药残留量低18%, 同时耐运输、耐储藏。黄瓜果皮有瘤一般是美国品种的性状, 是由Tu基因控制的, 对欧洲品种光皮(tu)为显性(Wellington, 1913; Strong, 1931; Poole, 1944; Andeweg and Debruyn, 1959)。在黄瓜形态学基因连锁图上, Tu基因被定位在第4连锁组上(Pierce and Wehner, 1990)。

然而, 在我国传统的黄瓜品质育种中, 对果瘤性状的选择是通过表现型间接对基因型进行选择的, 这需要等果实发育到成熟期才能进行。近年来, 分子生物学技术的发展为植物遗传育种提供了基于DNA多态性的分子标记, 利用分子标记不仅可以定位目标基因, 还可利用与目标基因紧密连锁的分子标记追踪目标基因, 进行分子标记辅助育种。本试验利用有果瘤和无果瘤的纯合材料, 采用先进的SSR分子标记技术, 建立与黄瓜果瘤基因Tu/tu紧密连锁的DNA分子标记, 从而可在苗期准确筛选无果瘤的黄瓜材料, 缩短育种周期, 加快育种进程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以荷兰温室黄瓜(*Cucumis sativus*)品种Z1和Z3为母本, 东农黄瓜品系129为父本, 亲本间亲缘关系较远, 性状差异较大。于2003年进行2对组合的杂交得到杂种F_1, 2004年2月种植F_1单株自交得到F_2代种子。同年秋天在园艺站大棚内加代种植亲本、F_1和F_2后代, 亲本和F_1各20株, F_2代2个群体分别为158和100株。

收稿日期: 2006-06-21; **接受日期**: 2006-08-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(No.C0311)和黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目(No.1055HQO26)

* 通讯作者。E-mail: qzw303@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-206

1.2 群体构建

本实验用于SSR分子标记研究的是(Z3×129)的F_2代分离群体, 于同一日期摘取同一节位上的成熟商品瓜, 将黄瓜纵切为 4 份, 记录 1/4 瓜上的果瘤个数。参照Michelmore等(1991) 的BSA法, 从F_2群体中选取有瘤、无瘤单株的 DNA 各 10 个构建有瘤、无瘤近等基因池。

1.3 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; 再用这18对SSR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F_2群体158个单株进行扩增检测。本实验所用引物是根据国外文献上发表的 SSR 引物序列(Fazio et al., 2002) , 由上海生物工程公司合成的, 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)①, 扩增产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳、银染, 记录带型。

1.4 数据分析

检验所选择到的SSR 标记在 F_2 群体中的分离比例, 利用MAPMAKER/EXP version 3.0b作图软件(Lander et al., 1987)构建连锁群, LOD 值最小为 3.0, 最大遗传距离为 50 cM。再利用 MapChart 2.1 版本软件绘制连锁图 谱 。

2 结果与分析

2.1 黄瓜果瘤的遗传规律

在F_1代 2 个组合果实都有果瘤, 有果瘤为显性; F_2代果实有瘤与无瘤呈现分离, 其比例分别是 2.92∶1 和 2.95∶1, 表明 Tu 基因是独立遗传的, 即有瘤(Tu)对无瘤(tu)为显性。

2.2 亲本的SSR多态性分析

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%。进一步对基因池筛选, 得到 5 个 SSR 多态性标记 CSWGATT01A、CSWGATT01B、CSWGATT01C、CSWTA04 和 CSCT335(图 1)。

2.3 连锁群的构建与果瘤基因的SSR标记

利用5个在基因池间有多态性的引物对黄瓜F_2群体进行SSR分析(图2), 结果5个SSR标记在F_2群体中的分离均符合 1∶2∶1 的分离比例(表 2), 因此该群体可用于构建连锁图谱。在分析果瘤基因与 SSR 标记之间的连锁关系时, 将果瘤性状的表形数字化, 其方法与上述标记带型的统计方法一致。

连锁分析表明, 5个多态性标记中的4个位于同一连锁群上, Tu基因位于这4个标记构建的连锁群中, 具体位置为CSWGATT01C-Tu-CSCT335, 距离两侧标记的

表 1 亲本及 F_1 和 F_2 群体果瘤分离情况

Table 1 Tu segregation of three inbred lines and their F_1 and F_2

Population		Tuberculate	No tuberculate	Total plants	Expect ratio	Fact ratio	x^2Chi-square
Parents	129	20		20			
	Z1		20	20			
	Z3		20	20			
F_1	129 × Z1	20		20			
	129 × Z3	20		20			
F_2	129 × Z1	38	13	51	3 : 1	2.92 : 1	0.0021
	129 × Z3	56	19	75	3 : 1	2.95 : 1	0.0008

$X^2_{0.05,1} = 3.841$, $X^2_{0.01,1} = 6.635$

①王桂玲 (2005). 黄瓜果瘤与果柄基因 SSR 标记. 博士论文. 哈尔滨:东北农业大学. pp. 29-30.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-206

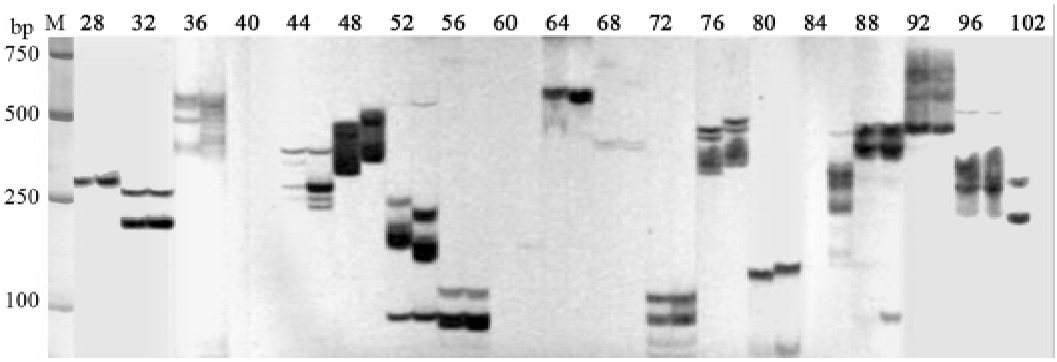


图1 SSR引物在亲本中的多态性

6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,图上数字为引物编号; M: DL2000DNA标准

Figure 1 Polymorphisms of SSR markers in their parents

Detecting in 6% denaturing polyacrylamid, number repents primer; M: DL2000DNA marker

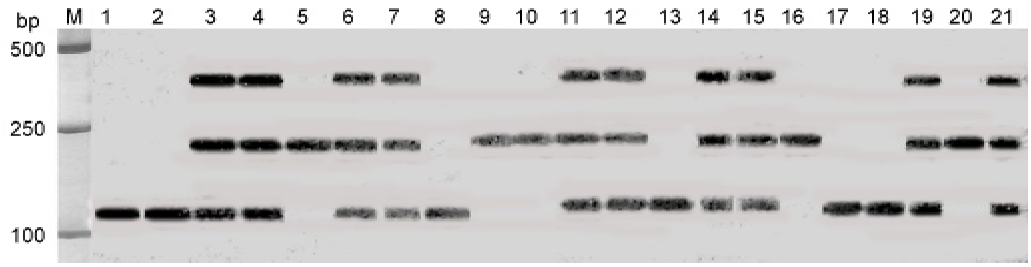


图2 引物CSWGATT01B在F_2群体中SSR扩增产生的带型

M: DL2000DNA标准; 1-21: F_2群体

Figure 2 SSR profiles generated by primer CSWGATT01B in the F_2 population

M: DL2000DNA marker; 1-21: F_2 lines

表2 F_2群体SSR标记数据分析

Table 2 Analysis of SSR data form F_2 population

	Genotype					
Marker	A	H	B	-	Total	x^2Chi-square
CSWGATT01A	21	31	21	2	73	1.658
CSWGATT01B	21	34	20	0	75	0.680
CSWGATT01C	20	37	16	2	73	0.452
CSW TA04	20	37	17	1	74	0.243
CSCT335	19	35	18	3	72	0.083

A: 父本基因型; H: 杂合型; B: 母本基因型。 $X^2_{0.05,2} = 5.991$; $X^2_{0.01,2} = 9.210$

A: father genotype; H: hater genotype; B: mother genotype. $X^2_{0.05,2} = 5.991$; $X^2_{0.01,2} = 9.210$

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-206

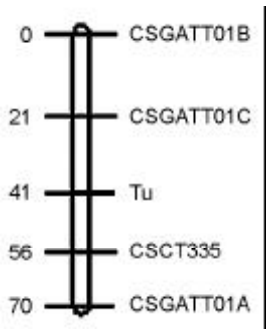


图3 新建黄瓜部分连锁群

Figure 3 New instructive cucumber partial linkage group

遗传距离分别为20.0 cM和14.1 cM, 连锁图谱见图3。

3 讨论

亲本的选择直接影响到构建连锁图谱的难易程度及所建图谱的适用范围。用于作图的两亲本间必须具有较高的多态性。黄瓜是异花授粉作物, 遗传背景较窄(张海英等, 1998; Horejsi and Staub, 1999), 品种之间或不同材料之间很难表现出分子多态性, 但2个品种之间杂种的分子多态性就丰富得多, 这就是许多研究者在黄瓜分子遗传作图或分子标记研究时, 实验材料多采用杂种的原因所在。但亲本间差异不能过大, 否则会导致连锁座位间的重组率偏低, 并导致严重的偏分离现象, 甚至不能作图。华北型黄瓜和欧洲温室型黄瓜都是我国主要的黄瓜栽培品种, 均具有2n = 14条染色体。本研究采用华北型和欧洲温室型2个黄瓜亲本构建75个单株的F_2分离群体, 这2个亲本的外观品质性状差异较大, SSR引物在亲本间的多态性频率为24%; 5个多态性SSR标记在F_2群体中的分离数据均符合1∶2∶1的分离规律, 未发生偏分离。实验结果找到了与果瘤基因(Tu)连锁的SSR标记: CSWGATT01C-(20.0)Tu-(14.1)-CSCT335, 进一步说明两亲本选配的正确性。

SSR数量丰富, 覆盖整个基因组, 信息含量高, 表现为共显性遗传, 可用PCR进行分析, 且重复性好。总之, SSR兼具RFLP和RAPD的优点, 并克服了它们的不足, 成为目前分子标记技术的热点(Senior and Heun, 1993; Yang et al., 1994; Roder et al., 1998)。目前, SSR技术被认为是构建真核生物高度饱和遗传图谱的标准分子标记(Beckman and Soller, 1990; Katzir et al., 1996), 是基因组遗传图谱和物理图谱的理想界标(刘榜等, 1997), 被公认为是分析遗传多样性、确定品种间亲缘关系以及个体识别的最理想分子标记。目前, SSR在图谱构建上还未得到充分利用, 这主要是因为其引物开发成本太高。不过, 许多物种已有现成的商品化的SSR引物, 利用GenBank提供的信息也可以设计获得大量的引物。对一般实验室而言, 只需利用现成的SSR引物进行PCR扩增, 即可进行多态性分析和图谱构建工作。所以, SSR非常适合用于图谱构建。

与其它作物相比, 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。此外, 黄瓜的遗传背景狭窄, 多态性较差, 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, 给标记基因带来一定的难度。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., 2003), 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。关于标记与目标性状的连锁程度, 应以小于5 cM为最佳距离, 而本试验得到的2个SSR标记与黄瓜果瘤基因连锁的距离分别为14.1 cM和20.0 cM, 距离较远的原因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。

参考文献

刘榜, 张庆德, 李奎, 彭中镇, 喻传洲 (1997). 微卫星DNA作为遗传标记的优点及前景. 湖北农业科学 **2**, 49-51.

王关林, 方宏筠 (2002). 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社. pp. 743-744.

张海英, 王永建, 许勇, 欧阳新星, 康国斌 (1998). 黄瓜种质资源遗传亲缘关系的RAPD分析. 园艺学报 **25**, 345-349.

Andeweg JM, Debruyn JW (1959). Breeding of non-bitter cucumbers. *Euphytica* **8**, 13-20.

Beckman JS, Soller M (1990). Toward a unified approach to

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-206

genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellites sites. *Biotechnology* **8**, 930-932.

Danin PY, Reis N, Baudracco-Amas S, Pitrat M, Staub JE, 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 JE, Chung SM (2002). Development and characterization of PCR markers in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Am Soc Hortic Sci* **127**, 545-557.

Fazio G, Staub JE, Stevens MR (2003). Genetic mapping and QTL analysis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L) using recombinant inbred lines.*Theor Appl Genet* **107**, 864-874.

Horejsi T, Staub JE (1999). Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genet Resour Crop Evol* **46**, 337-350.

Katzir N, Danin-Poleg Y, Tzuri G, Karchi Z, Lavi U, Cregan PB (1996). Length polymorphism and homologies of microsatellites in several cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* **93**, 1282-1290.

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987). Mapmarker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 9828-9832.

Pierce LK, Wehner TC (1990). Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortScience* **25,** 605-615.

Poole CF (1944). Genetics of cultivated cucurbits. *J Hered* **35**, 122-128.

Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998). A microsatellite mapping in wheat. *Genetics* **149**, 2007-2023.

Strong WJ (1931). Breeding experiments with the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci Agr* **11**, 333-346.

Senior ML, Heun M (1993). Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* **36**, 884-889.

Wellington R (1913). Mendelian inheritance of epidermal characters in the fruit of *Cucumis sativus*. *Science* **38**, 61-61.

Yang GP, Maroof MA, Xu CG, Zhang Q, Biyashev RM (1994). Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol Gen Genet* **245**, 187-194.

Genetic Analysis and SSR Markers of Tuberculate Trait in *Cucumis sativus*

Guiling Wang[1,2], Zhiwei Qin[1*], Xiuyan Zhou[1], Zhiyun Zhao[1]

[1]*Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;* [2]*Harbin Normal University, Harbin 150080, China*

Abstract To analyze the heredity of tuberculate trait in *Cucumis sativus*, we constructed 2 populations. Female parents were 2 varieties without tuberculate, Z1 and Z3, derived from Dutch species, and planted in a greenhouse. The male parent was Dongnong 129, a variety with tuberculate. The fruit of the F_1 family from the 2 crosses had tuberculate, which indicated that the tuberculate trait was dominant. The tuberculate trait and no tuberculate trait segregated in the F_2 family. The segregation ratios were 2.92 ∶ 1 and 2.95 ∶ 1 for the 2 families, respectively, which revealed that the gene *Tu* played a role in independent inheritance. A total of 86 pairs of simple sequence repeat primers were screened in 2 near-isogenic pools created by mixing DNA of 10 individuals randomly chosen from the F_2 family according to tuberculate or no tuberculate trait. Five separate amplification products obtained by use of 5 pairs of the primers and 4 products — CSWGATT01B, CSWGATT01C, CSCT335, and CSWGATT01A — were mapped to the same linkage group by use of MAPMAKER/EXP, version 3.0b. *Tu* in the linkage group located between CSWGATT01C and CSCT335 at 20.0 cM and 14.1 cM from the markers, respectively.

Key words *Cucumis sativus*, inheritance, molecular marker, SSR, tuberculate

Wang GL, Qin ZW, Zhou XY, Zhao ZY (2007). Genetic analysis and SSR markers of tuberculate trait in *Cucumis sativus*. *Chin Bull Bot* **24**, 168–172.

* Author for correspondence. E-mail: qzw303@126.com

(**责任编辑**: **白羽红**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-206