

# 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位\*

潘俊松\*\* 王刚\*\* 李效尊 何欢乐 吴爱忠 蔡润\*\*\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101

**摘要** 在由黄瓜自交系 S06 与 S52 杂交产生的  $F_2$  群体中, 应用 SRAP(sequence-related amplified polymorphism) 标记构建黄瓜的分子遗传连锁图谱. 使用了 64 个多态性引物组合, 共得到 108 个多态性条带, 单对引物组合最多的产生 5 个多态性条带, 平均 1.7 个. 在  $F_2$  群体中对这些多态性位点进行连锁分析, 并用 Mapmaker 3.0 构建连锁群, 77 个标记位点进入 9 个连锁群 ( $LOD \geq 3.0$ ), 总长 1114.2 cM, 标记平均间距 14.5 cM, 标记均匀分布于整个连锁群. 同时将始花节位性状控制基因 *ffn*(first flower node) 定位在第 IX 连锁群上, 与两侧标记 DC1EM5 和 ME7EM2A 的距离分别为 10.3 和 12.1 cM.

**关键词** 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 相关序列扩增多态分析 (SRAP) 连锁图 始花节位

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 起源于喜马拉雅山南麓的热带雨林地区, 是葫芦科 (Cucurbitaceae) 一年蔓生草本植物. 黄瓜作为一种重要的蔬菜作物, 在世界上的栽培面积仅次于番茄<sup>[1]</sup>, 但其遗传学研究明显落后于番茄, 经典的遗传图谱仅由一百多个颜色、形态和抗病性等基因组成 6 个连锁群<sup>[2]</sup>. 虽然分子标记早已用于黄瓜的遗传作图, 但进展缓慢. 1994 年, Kennard 等<sup>[3]</sup> 利用限制性片段长度多态分析 (RFLP)、随机扩增多态 DNA (RAPD)、同工酶、形态和抗病性所产生的标记, 构建了黄瓜遗传图谱, 包含 58 个位点, 分属 10 个连锁群, 总长约 766 cM, 标记平均间距约 13 cM. Serquen 等<sup>[4]</sup> 利用重组近交系构建了由 77 个 RAPD 标记和 3 个基因组成的 80 个位点的黄瓜遗传图谱, 分属 9 个连锁群, 覆盖约 600 cM. Park 等<sup>[5]</sup> 利用重组自交系构建黄瓜连锁图, 含 353 个标记, 12 个连锁群, 总长 815.8 cM, 标记平均间距 4.2 cM. Bradeen 等<sup>[6]</sup> 构

建了两张黄瓜连锁图, 其中之一由 255 个标记构成 10 个连锁群, 总长 538.6 cM, 标记平均间距 2.1 cM; 另一张含 197 个标记, 15 个连锁群, 覆盖 450.1 cM, 标记平均间距 2.3 cM. 近年, Fazio 等<sup>[7]</sup> 构建了包含 131 个标记, 覆盖 706 cM, 平均间距 5.6 cM 的遗传图谱. 黄瓜有 7 对染色体, 由于染色体小且难以观察, 加之黄瓜本身的细胞遗传学研究落后, 所以迄今黄瓜的分子标记连锁群仍未与其染色体相对应.

黄瓜遗传背景十分狭窄<sup>[8]</sup>, 品种间的遗传多态性远远低于番茄等蔬菜作物. 一般通用的分子标记如 RAPD 在黄瓜的品种间所能揭示的多态性十分有限, 且 RAPD 标记在构建图谱时分布常常不够均匀<sup>[3-5]</sup>; 共显性的 RFLP 和 SSR (simple sequence repeat) 标记的多态性也不高, 而且可利用的分子标记数目有限<sup>[3, 5, 7]</sup>. 因此应用新的标记技术对于标记黄瓜的重要性状和构建饱和的遗传图

2004-07-06 收稿, 2004-08-19 收修改稿

\* 上海市科委 (批准号: 033107019) 和上海市农业委员会 (批准号: 沪农科攻字 (2003) 第 2-1-2 号) 资助项目

\*\* 为共同第一作者

\*\*\* 通讯作者, E-mail: cairun@sjtu.edu.cn

谱十分必要. Li和Quiros<sup>[9]</sup>于2001年发展了一种新型分子标记SRAP(sequence-related amplified polymorphism). 该标记通过独特的引物设计优先扩增基因组内的开放阅读框(ORF), 引物由核心序列和3个选择性碱基组成, 其中核心序列含非特异性填充序列(filler sequence)和特异性序列两部分. 上游引物长17 bp(10 bp填充序列+CCGG+3个选择碱基), 下游引物长18 bp(11 bp填充序列+AATT+3个选择碱基), 可分别与外显子和启动子(或内含子)区域配对. SRAP标记可以因个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性扩增产物, 具有简便、稳定、产率高、广泛适用和便于克隆目标片段的优点<sup>[10]</sup>, 已经在甘蓝(*Brassica oleracea*)<sup>[9, 11]</sup>、西葫芦(*Cucubita pepo*)<sup>[12]</sup>和棉花<sup>[10]</sup>等植物研究中使用, 应用于图谱构建、比较基因组学和遗传多样性分析.

在瓜类育种中, 始花节位性状与品种早熟性有关. 培育早熟品种, 要求始花节位低, 开花早, 使商品瓜能提早上市. 植株始花节位低, 是由于花芽分化早, 这可能与内源激素、营养状况和环境(如温度)等因素有关. 分析始花节位性状及其基因定位可为黄瓜花芽分化及其调控研究打下基础. 本研究利用始花节位高的黄瓜自交系S06(欧洲温室型)和始花节位低的自交系S52(来源于大别山区农家品种)的F<sub>2</sub>代分离群体, 以SRAP标记技术构建黄瓜分子遗传框架图谱, 并对始花节位基因进行了定位.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在本研究中, 遗传分析、基因定位和作图所用材料为始花节位高的自交系S06(欧洲温室型)和始花节位低的自交系S52(来源于大别山区农家品种)及其杂交产生的F<sub>2</sub>代.

### 1.2 方法

**1.2.1 F<sub>2</sub>分离群体的建立** 由母本S06和父本S52杂交获得的F<sub>1</sub>代植株再经自交获得F<sub>2</sub>代. 将F<sub>2</sub>代的200单株于2003年6月种植于上海交通大

学农业与生物学院温室, 各单株袋装吊式栽培, 使用统一配制的基质, 统一肥水管理, 随机挑选其中的93株作为作图群体.

**1.2.2 始花节性状的调查与统计** 在始花期(定植后27 d)开始调查亲本(各15株)和作图群体中每个单株的始花节位性状. 参照两亲本和群体的始花节位高低, 将始花节位数 $\geq 10$ 的单株记录为始花节位高, 始花节位数 $< 6$ 的单株记录为始花节位低,  $6 \leq$ 始花节位数 $< 10$ 为中等.

**1.2.3 总DNA提取** 采黄瓜两片真叶展开时的子叶, 用CTAB法<sup>[13]</sup>分别提取亲本及群体的总DNA.

**1.2.4 SRAP分析** 引物参照Li等<sup>[9, 11]</sup>、Ferriol等<sup>[12]</sup>及林忠旭等<sup>[10]</sup>发表的引物, 并自行设计5个引物(表1). 引物由上海生物工程技术有限公司合成. PCR体系为: 60 ng模板DNA, 引物各30 ng, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 1  $\times$  Taq缓冲液, 1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U Taq DNA聚合酶(上海Promega公司产品), 总反应体系为20  $\mu\text{L}$ . PCR程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 37 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  90 s, 8个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 48 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  90 s, 32个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  7 min. 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶(4%, 含8  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素)电泳分离. 电泳缓冲液为1  $\times$  TBE. 电泳时使用70 W恒功率, 电泳1.5—2 h. 电泳后银染, 程序参照朱正歌等<sup>[14]</sup>的方法.

**1.2.5 标记命名** 采用引物组合的方法<sup>[10]</sup>对标记进行命名, 如ME9EM2表示引物组合ME9和EM2. A, B, C分别表示该引物组合的第1, 2, 3个位点.

**1.2.6 连锁分析** 用Mapmaker 3.0(由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供)对108个标记位点及始花节性状进行连锁分析, 在构建黄瓜分子标记连锁图时, 设置LOD $\geq 3.0$ , 最大图距为37.2 cM, 并利用Kasambi函数将重组率转化成遗传图距.

表1 本实验中所用的SRAP引物

上游引物 5'→3'					
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	ME5	TGAGTCCAAACCGGAAG	ME6	TGAGTCCTTTCCGGTAA
ME7	TGAGTCCTTTCCGGTCC	ME8	TGAGTCCTTTCCGGTGC	ME9	TGAGTCCAAACCGGTAG
ME10 <sup>a)</sup>	TGAGTCCAAACCGGCAT	ME11 <sup>a)</sup>	TGAGTCCAAACCGGTCT	DC1	TAAACAATGGCTACTCAAG
PM8	CTGGTGAATGCCGCTCT				
下游引物 5'→3'					
EM1	GACTGCGTACGAATTAAT	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
EM4	GACTGCGTACGAATTTGA	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
EM7 <sup>a)</sup>	GACTGCGTACGAATTCOA	EM8	GACTGCGTACGAATTCTG	EM9 <sup>a)</sup>	GACTGCGTACGAATTGAT
EM14	GACTGCGTACGAATTCAG	EM18 <sup>a)</sup>	GACTGCGTACGAATTCCT	OD3	CCAAAACCTAAAACCAGGA
SA4	TTCTTCTTCTGGACACAAA	GA18	GGCTTGAACGAGTGACTGA		

a) 自行设计的引物

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本间多态性标记的筛选

用182个引物组合(表1)对亲本S06与S52进行筛选,得到64个多态性好的引物组合.每对组

合平均得到20—30条清晰可辨的条带,条带主要分布在100—800bp之间,其中强带占80%以上,如图1所示.用这些引物组合进行群体分析,共得到108条多态性条带,单对引物组合最多的产生5个多态性条带,平均1.7个.

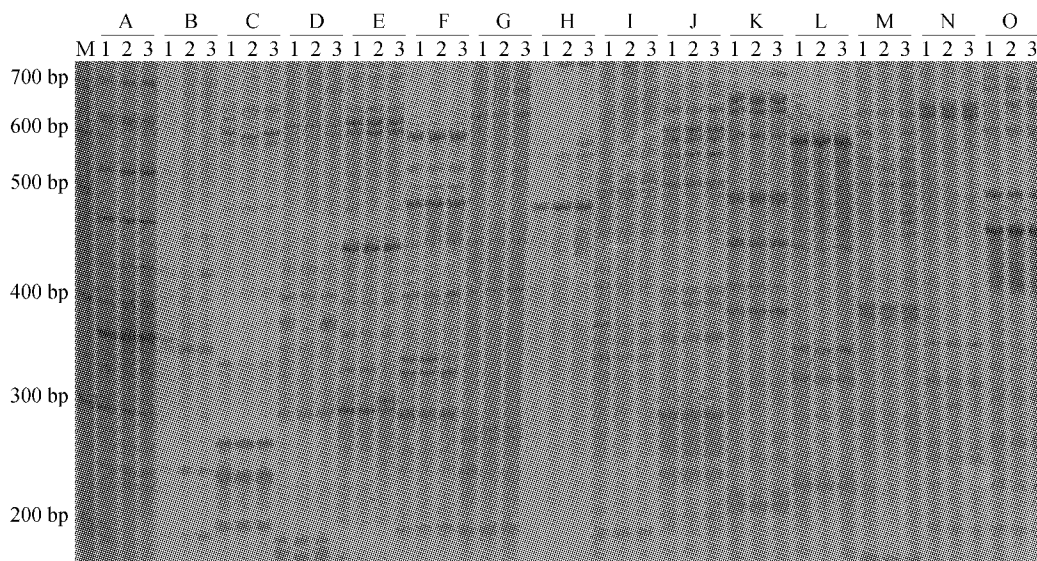


图1 以S06和S52两个亲本为模板进行多态性引物筛选

A-O分别为引物组合 ME2EM6, ME3+EM1—6, ME4+EM1—6, ME5EM1和 ME5EM2. M, 100 bp DNA 标准参照; 1, S94; 2, S06; 3, S52

### 2.2 黄瓜SRAP分子标记连锁图谱的构建

对获得的108个标记位点进行 $X^2$ 适合性测验,有12个标记位点不符合3:1分离,占11.1%.用Mapmaker 3.0对这108个标记位点进行连锁分析,构建遗传连锁图.其中77个标记进入9个大的连锁

群( $LOD \geq 3.0$ ),总长1114.2 cM(图2).最长的连锁群为220.1 cM,最短的32.2 cM.每个连锁群有3—14个标记,标记平均间距14.5 cM,标记间最大间距36.2 cM,最小0.5 cM.标记在整个连锁群中分布比较均匀,没有聚集在某一个区域的现象.

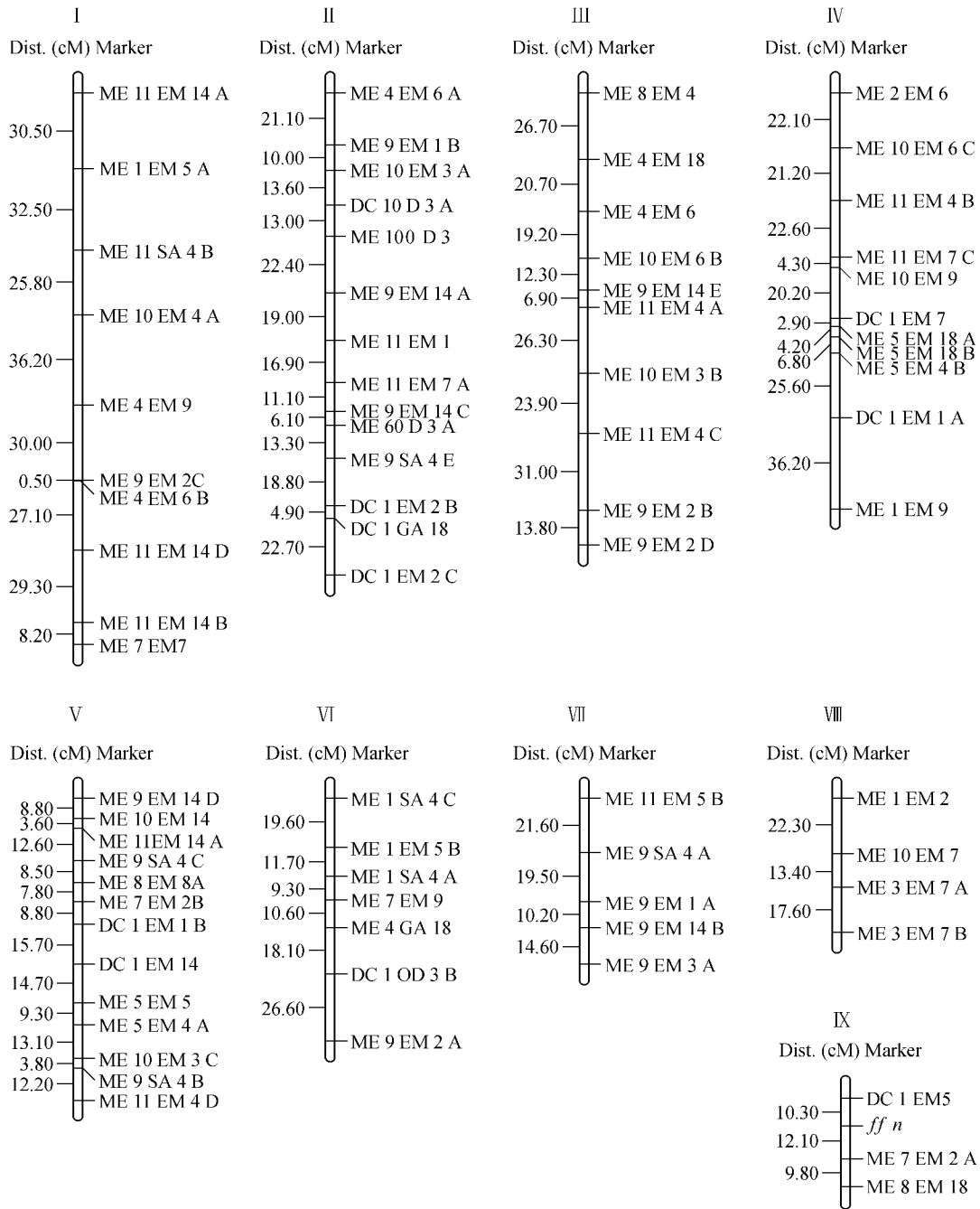


图 2 黄瓜 SRAP 分子标记连锁图

I-IX 表示连锁群数目, 连锁群左边 Dist. 表示标记间距(cM), 右边 Marker 表示 SRAP 标记, 图中 *ffn* 表示始花节位基因, 连锁群按图距从大到小排列

### 2.3 始花节位性状的遗传分析

始花期时调查亲本和 F<sub>2</sub> 群体各单株的始花节位(图 3)表明, 亲本 S06 始花节位平均为 15.7±1.9, 亲本 S52 始花节平均为 3.8±0.7, 亲本间差异

非常明显. F<sub>2</sub> 群体表现出明显的分离, 相对集中于第 5, 7(最多)和 12 节, 在这 3 个峰间的峰谷为第 6 和第 10 节. 综合分析亲本和 F<sub>2</sub> 群体, 定出以下标准: 始花节位数 < 6 为始花节位低, 6 ≤ 始花节位数

<10 为中等, 始花节位数 ≥10 为高. 根据这个标准统计, F<sub>2</sub> 群体始花节位性状分离比为 22 :45 :26 (高 : 中 : 低), X<sup>2</sup> 测验符合 1 :2 :1, 为单基因不完

全显性遗传. 因此可以利用 F<sub>2</sub> 群体对控制该性状的基因进行遗传定位. 我们将该基因定名为 *fn* (first flower node).

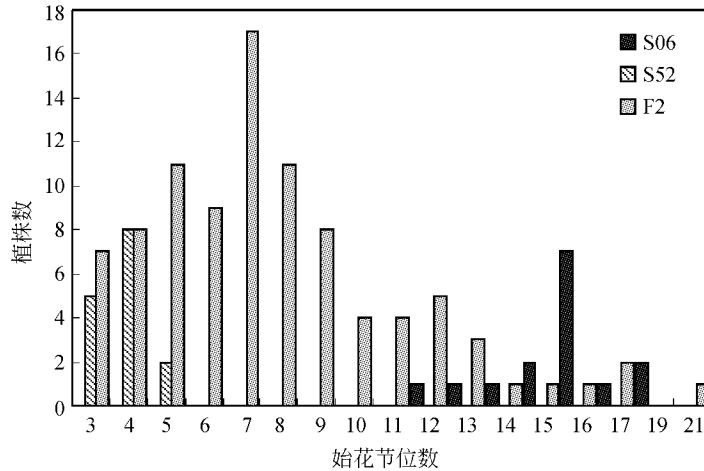


图3 黄瓜始花节位性状的调查

S06, S52 和 F<sub>2</sub> 群体植株数分别为 15, 15 和 93 株

### 2.4 始花节位基因(*fn*)的定位

将作图群体始花节性状的数据与 SRAP 标记位点一起用 Mapmaker 3.0 进行分析, *fn* 被定位于第 IX 连锁群, 与两侧标记(DC1EM5 和 ME7EM2A)距离分别为 10.3 和 12.1 cM, 小于本连锁图的平均距离.

### 3 讨论

SRAP 作为一种新的标记技术已经使用于芸蓿属<sup>[9,11]</sup>、西葫芦<sup>[12]</sup>和棉花<sup>[10]</sup>等植物的研究, 这类标记在基因组中分布均匀, 适合于基因定位、分子标记遗传图谱及转录图谱<sup>[11]</sup>的构建, 迄今国内外还没有关于 SRAP 用于黄瓜研究的报道. 黄瓜遗传背景狭窄, 其 RFLP, RAPD 和 SSR 等标记的多态性比率均不高. 本研究中 SRAP 分析基本参照 Li 等<sup>[9]</sup>, 并适当修改, 获得较好的扩增效果. 平均每对引物从黄瓜基因组中扩增出 20—30 条清晰条带, 低于棉花的 50—100 条<sup>[10]</sup>, 用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳达到较好的分离效果. 从 182 对 SRAP 引物中, 筛选出 64 对多态性引物, 并获得 108 个多态性位点. 每对引物平均产生 1.7 个多态性条带. 本实验室曾用 650 个 RAPD 引物对 S06 和 S52 进行分析, 筛出 120 个多态性引物, 其中 109 个引物能稳定扩增出 140 个多态性条带, 平均每个引物产生 1.3 个多态

性条带<sup>[15]</sup>. 不论是多态性引物的比率, 还是每个引物组合产生的多态性条带数目, SRAP 均高于 RAPD. 由于 SRAP 操作简便且扩增结果稳定, 今后可用更多的引物组合构建饱和度高的连锁图.

在 F<sub>2</sub> 群体中, 对 108 个多态性位点的分离进行 X<sup>2</sup> 测验, 发现有 12 个标记(占 11.1%)不符合 3 :1 分离, 其中有 8 个偏向 S52, 4 个偏向 S06. 偏分离可能是配子选择的结果. 这些偏分离标记在连锁分析时虽然没有去除, 但均未进入得到的 9 个连锁群中. 据 Li 等<sup>[9]</sup>报道, 在甘蓝(*B. oleracea*)中部分的 SRAP 标记呈共显性, 但本研究没有发现有共显性分离的 SRAP 标记. 本文获得的黄瓜 SRAP 连锁群总长 1114.2 cM, 平均图距与 *B. oleracea*<sup>[9]</sup>和棉花<sup>[10]</sup>的 SRAP 图谱相近.

黄瓜有 7 对染色体, 应该只有 7 个连锁群. 国际上现有的几个连锁图(Kennard 等<sup>[3]</sup>, Serquen 等<sup>[4]</sup>, Park 等<sup>[5]</sup>, Bradeen 等<sup>[6]</sup>, Fazio 等<sup>[7]</sup>)中, 只有 Fazio 等构建的连锁群为 7 个, 但该图谱覆盖距离为 706 cM, 小于估计的黄瓜基因组总长<sup>[7]</sup>. 本研究经过连锁分析得到 9 个连锁群, 这可能与作图群体不够大和标记数目不够多有关. 黄瓜单株占地面积大, 需要更多的人力与土地, 因条件限制, 使用更大的 F<sub>2</sub> 群体存在一定的难度. 在得到的 96 个

符合 3:1 分离的多态性标记中, 只有 77 个标记整合到 9 个较大的连锁群, 这也可能是由于分离群体不够大. 如果增大作图群体, 会使小的连锁群整合到大的连锁群上, 并可以整合更多的标记进入连锁群. 若进一步增加标记数目并整合不同的标记种类, 会提高连锁图的标记密度.

早花(第一朵花出现所需天数)、第一雌花着生节位、果实发育速度等是构成黄瓜早熟性的重要性状<sup>[16]</sup>. 早熟性与早期产量直接相关. 早花与始花节位有一定区别, 但后者可在很大程度上反应前者. 黄瓜始花节位性状是一个复杂的农艺性状, 它与花芽分化和生长发育相关, 涉及植株营养状况、内源激素和环境(特别是温度)等方面, 国内外对其研究很少. 在夏季高温条件下栽培, 两亲本 S06 和 S52 的始花节性状表现极显著的高低差异; 其 F<sub>2</sub> 群体也有明显的分离规律, 有 3 个相对集中的节位(5, 7 和 12)区域, 可由两峰谷区分. 综合两亲本情况, 将两峰谷节位定为始花节位的两个阈值, 形成统计的标准. 结果表明, 始花节性状符合 1:2:1 的单基因不完全显性遗传规律. 这与早先的研究认为早花是不完全显性的结论<sup>[16]</sup>相一致. 在我们分析 F<sub>2</sub> 分离群体的当年, 由于夏季高温条件, 以及亲本 S06(全雌性)和 S52(强雄性)的性型差异, 使 F<sub>2</sub> 群体的大部分植株始花节的花为雄花, 始花节为雌花的植株(18 株)的始花节位集中于 8 和 13 节, 其中 16 株为雌性株. 这也说明始花节性状与性型有一定联系.

我们也注意到黄瓜的始花节位性状也具有数量性状的特征. 前人的研究表明, 在有些场合一个性状的数量性和质量性与实验者对性状调查时采用的标准有关<sup>[17]</sup>, 通过将数量性状作为质量性状进行定位的基因往往是控制这个数量性状的主效基因. 本研究将始花节位性状作为质量性状进行分析, 并将 *ffn* 定位在第Ⅸ连锁群, 但并不排除其他微效基因及环境因素对始花节位这一性状的修饰效应. *ffn* 基因与两侧标记(DC1EM5 和 ME7EM2A)距离分别为 10.3 和 12.1 cM. 从分子辅助育种的目的来看, 标记与 *ffn* 的连锁距离还比较大, 但是利用其两侧的标记同时进行选择, 选择效率仍可达到 98% 以上, 因此在黄瓜的育种上有一定的应用价值. 今后可以利用增加标记数目和种类来增加图谱的密度, 以期得到连锁距离更小的标记.

## 参 考 文 献

- 1 李怀智. 我国黄瓜栽培的现状及其发展趋势. 蔬菜, 2003, 8; 3—4
- 2 Pierce L K, Whener T C. Review of genes and linkage groups in cucumber. HortScience, 1990, 26; 605—615
- 3 Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, 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—48
- 4 Serquen F C, Bacher J, Staub J E. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. Molecular Breeding, 1997, 3(4); 257—268
- 5 Park Y H, Sensoy S, Wye C, et al. A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses. Genome, 2000, 43(6); 1003—1010
- 6 Bradeen J M, Staub J E, Wye C, et al. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Genome, 2001, 44(1); 111—119
- 7 Fazio G, Staub J E, Stevens M R. Genetic mapping and QTL analysis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines. Theor Appl Genet, 2003, 107; 864—874
- 8 Dijkhuizen A, Kennard W C, Havey M J, et al. RFLP variability and genetic relationships in cultivated cucumber. Euphytica, 1996, 90; 79—87
- 9 Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple RCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor Appl Genet, 2001, 103; 455—461
- 10 Lin Z, Zhang X, Nie Y, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(19); 2063—2067
- 11 Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. Theor Appl Genet, 2003, 107; 168—180
- 12 Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucubita pepo* using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet, 2003, 107; 271—282
- 13 Clark M S. Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual. Heidelberg; Springer-Verlag, 1997, 4—6
- 14 朱正歌, 贾继增, 孙宗修. 水稻 AFLP 指纹银染法显带研究. 中国水稻科学, 2002, 16(1); 71—73
- 15 李效尊, 潘俊松, 王刚, 等. 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. 自然科学进展, 2004, 14(11); 1225—1229
- 16 侯锋, 吕淑珍, 马德华, 等. 黄瓜. 天津: 天津科学技术出版社, 1999, 32—76
- 17 盖钧镛, 章元明, 王建康. 植物数量性状遗传体系. 北京: 科学出版社, 2003, 1—7