

与薄皮甜瓜单性花基因有关的 SRAP 标记研究

曹 虹,陈柏杰,金荣荣,刘 英,汪 磊,尹春花

(哈尔滨市农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:用甜瓜单性花即雌雄同株异花的多代自交系 T912 作母本,两性花即雄全同株多代自交系哈甜一号作父本,配制杂交 F_2 群体,采用相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记结合离体分组混合分析法(BSA)筛选与甜瓜单性花有关的基因标记,在 64 对组合引物中,找到 1 个能在单性花和两性花中扩增出特异条带的标记,并在 F_2 群体中得到验证,命名为 Sme1em5,计算出其遗传距离为 8.9 cM。

关键词:甜瓜;单性花;SRAP 标记

中图分类号:S652

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)06-0001-04

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属于葫芦科甜瓜属甜瓜种。目前种子市场上的甜瓜品种均为 F_1 的杂交种,而杂种一代又大都通过父母亲本杂交授粉得到,为了得到纯度较高的杂种一代,必须进行严格的人工授粉。薄皮甜瓜常见的花性型是雄全同株型,由于结实花是两性花,因而在杂交授粉前必须进行人工去雄,需要大量的人力和物力,而且人工授粉经常会伤到雌蕊,造成授粉率低,结实率下降,产量减少。又或者人工去雄不彻底造成串粉,难以保证种子的纯度^[1-2]。因此,进行甜瓜单性花的选育可以有效地简化杂种一代制种途径,再结合分子标记辅助育种就可间接地从基因型上筛选种质资源,极大地提高育种效率。目前分子标记辅助育种已经被大量应用到实践中,取得较好的效果。

控制薄皮甜瓜花性型的遗传基因主要有 3 种:A/a,G/g 和 M/m。当 G/g 基因处于显性时,A/a 基因就作显性基因,从而决定是雌雄异花同株(A_GG)还是雄全同株($aaGG$)。当 G 基因和 A 基因均为隐性时,表现为两性花株($aagg$);而基因型为 A_ggmm 时,表现为全雌株^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

母本材料为单性花即雌雄同株异花多代自交纯系 T912,父本材料为两性花即雄全同株多代自交纯系哈甜一号。二者均为哈尔滨市农业科学院西甜瓜课题组多年选育的品种。

1.2 方法

1.2.1 F_2 分离群体的构建 以 T912 为母本,哈甜一号为父本配制杂交组合得到 F_1 种子, F_1 种植后严格人工自交授粉获得 F_2 群体。 F_2 群体的 224 个单株定植于大棚内,统一管理。

1.2.2 花性型的调查与统计 从植株长到第 5 节后正式统计结实花性型的分化情况,结实花全部表现单性雌花的为单性花株,结实花全部表现雌雄两性花的为两性花株。根据亲本及其植株的花性型分化数据,对群体采用 χ^2 测验和适合性检验进行花性型分类和统计分析。

1.2.3 基因组提取 采取甜瓜开花期茎尖嫩叶,用改良 CTAB 法^[4]提取其基因组 DNA。

1.2.4 BSA 法建池 参照 Michelmores 等^[5]人提出的 BSA(Bulked Segregant Analysis)方法,从 F_2 中选雌雄同株异花单株和两性花即雄全同株单株各 10 株,分别提取 DNA 后,检测所提 DNA 浓度和质量,然后按同一浓度混合各株所提 DNA,建成单性花和两性花基因池。

1.2.5 SRAP 标记分析 SRAP 引物参考 Li、Ferriol 及林忠旭等^[6-8]设计的引物,正反向引物各 8 个,构成 64 对引物组合,由上海生物工程技术服务有限公司合成,引物序列见表 1。

收稿日期:2010-03-18

基金项目:哈尔滨市科学技术计划资助项目(GJ2007GG002536)

第一作者简介:曹虹(1982-),女,黑龙江省牡丹江市人,硕士,助理农艺师,从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:caohong20082002@yahoo.com.cn。

通讯作者:陈柏杰(1963-),男,黑龙江省双鸭山人,硕士,研究员,从事西甜瓜育种研究。

表 1 SRAP 标记引物序列

序号	上游引物	序号	下游引物
me1	3'-ATAGGCCAAACCTGAGT-5'	em1	3'-TAATTAAGCATGCGTCAG-5'
me2	3'-CGAGGCCAAACCTGAGT-5'	em2	3'-CGTTTAAGCATGCGTCAG-5'
me3	3'-TAAGGCCAAACCTGAGT-5'	em3	3'-CAGTTAAGCATGCGTCAG-5'
me4	3'-CCAGGCCAAACCTGAGT-5'	em4	3'-AGTTTAAGCATGCGTCAG-5'
me5	3'-GAAGGCCAAACCTGAGT-5'	em5	3'-CAATTAAGCATGCGTCAG-5'
me6	3'-AATGGCCAAACCTGAGT-5'	em6	3'-ACGTTAAGCATGCGTCAG-5'
me7	3'-CCTGGCCAAACCTGAGT-5'	em7	3'-AACTTAAGCATGCGTCAG-5'
me8	3'-CGTGGCCAAACCTGAGT-5'	em8	3'-GTCTTAAGCATGCGTCAG-5'

反应体系参考瓜类 SRAP-PCR 扩增反应体系 and 反应条件^[9-11]。

反应体系 25 μL; ddH₂O 14.5 μL; 10× Buffer 2.5 μL; 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 2.0 μL; 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 2.5 μL; 10 pmol · μL⁻¹ 上游引物 1.0 μL; 10 pmol · μL⁻¹ 下游引物 1.0 μL; 5 U · μL⁻¹ Taq DNA 聚合酶 0.5 μL; 50 ng · μL⁻¹ 模板 DNA 1.0 μL。

反应程序: 参考 Li 等试验程序^[6]。

第一阶段: 预变性 94℃ 5 min

变性 94℃ 1 min

第二阶段: 退火 35℃ 1 min

延伸 72℃ 1 min

5 个循环

变性 94℃ 1 min

第三阶段: 退火 50℃ 1 min

延伸 72℃ 1 min

35 个循环

第四阶段: 72℃ 10 min

1.2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 配制 6% 的

变性聚丙烯酰胺凝胶进行染色, 具有较好的分离效果, 具体染色方法参考 Sanguinetti 银染方法^[12]。

1.2.7 数据统计与连锁分析 根据 SRAP 标记筛选出的特异标记在单性花株和两性花株各单株中的分离情况, 结合田间调查的数据分析该特异标记与单性花基因的连锁关系, 并且计算出与田间花性型分化鉴定的吻合率。其中: 重组率 $r = \text{重组型植株数} / (\text{雌雄同株异花型植株数} + \text{雄全同株型植株数}) \times 100$, 应用 Kosambi 作图函数: $x = (1/4) \ln 1 + 2r / (1 - 2r)$ 算出与单性花基因连锁的遗传距离^[13-14]。分子标记数据采用 Mapmaker 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 单性花遗传特性分析

调查研究不同亲本、杂交组合以及回交组合的结实花性型分化, 获得统计结果 (见表 2, 表 3)。

表 2 亲本和 F₁ 花性型的表现型和比例

品种	表型株数/株		总株数/株	单性花率/%	两性花率/%
	单性花/株	两性花/株			
亲本	T912	48	0	48	100
	哈甜一号		60	0	100
F ₁ 组合	T912 × 哈甜一号	124	0	124	100

表 3 F₂ 和 BC₁ 结实花性型的表现型和比例

组合	表型株数/株		总株数/株	理论比例	实际比例	χ^2_c	P
	单性花/株	两性花/株					
F ₂	T912 × 哈甜一号	167	57	224	3 : 1	2.93 : 1	0.012
BC ₁	(T912 × 哈甜一号) × 哈甜一号	50	58	108	1 : 1	0.86 : 1	0.296

注: $\chi^2_c = \sum [(O-E)^2/E]$; 自由度 $d = 2 - 1$; $\chi^2_{0.05} = 3.84$ 。

由表 2 和表 3 可以看出, 单性花与两性花亲本杂交得到 F₁ 全部表现为单性花, F₂ 及雄花两性花亲本作为父本回交的 BC₁ 代, 经卡方 χ^2 测

验, $\chi^2 < \chi^2_{0.05} = 3.84$ 。可确定 F₂ 单性花株与两性花株比例符合 3 : 1 分离规律, BC₁ 单性花株与两性花株比例符合 1 : 1 分离规律。由此可看出, 该

甜瓜材料的单性花性状是由一对核基因控制的质量性状,是由显性基因所控制的独立遗传,和前人研究结果一致,符合孟德尔遗传规律。

2.2 SRAP 多态性分析

该研究用 64 对引物组合对两个亲本进行筛选,初步筛选得到 30 对引物组合能在单性花亲本 T912 中扩增出区别于两性花亲本哈甜一号的多态型特征条带,多态性引物比例为 47.9%。每对引物组合可从甜瓜基因组中扩增出 6~10 条清晰条带,条带主要分布在 100~1 000 bp。

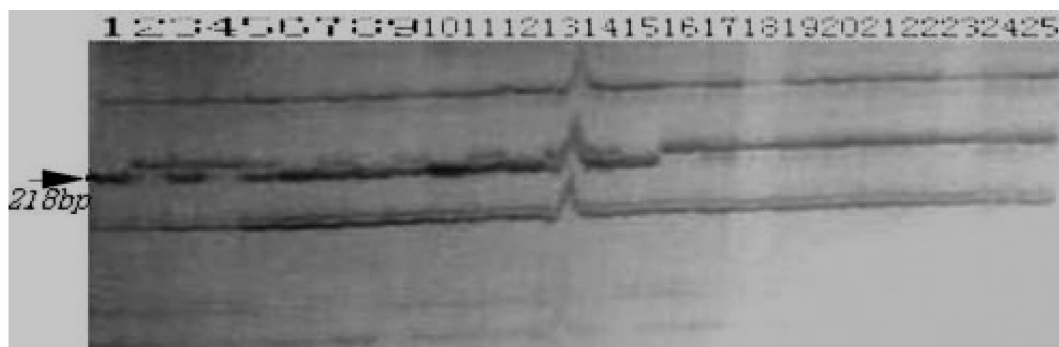


图1 引物 melem5 在亲本、F₁ 和 F₂ 单性花、两性花中的 SRAP 扩增谱带(箭头所指即为该特异带)

1: T912, 2: 哈甜一号, 3: F₁, 4: 两性花基因池, 5: 单性花基因池, 6~15: F₂ 单性花单株, 16~25: 两性花株

2.3 连锁分析

引物 melem5 在 F₂ 的 179 个单株上进行 PCR 扩增,聚丙烯酰胺电泳后进行银染,结合田间调查的花性型分离的表型性状,计算其吻合度。发现结实花为单性花的有 12 株未扩增出特异带,结实花表型为两性花中有 4 个扩增出此条带。吻合度为 84%。将 F₂ 植株田间调查表型统计结果和 SRAP 分子标记结果分别编码后,用 Mapmaker 3.0 程序、重组率和 Kosambi 作图函数计算,该标记与单性花性状的连锁距离为 8.9 cM。

3 讨论

目前,各国的育种家对瓜类性型分化研究取得了很大的成果,Mibus 和 Tatlioglu 等于 2005 年在黄瓜中找到了与 *f* 基因有关的标记,并克隆转化了 1 个稳定的 SCAR 标记可以筛选雌性单株与雄株^[15]。Noguera F J 等在 2005 年利用 BSA 基因池方法筛选得到与甜瓜基因连锁的 AFLP 标记,遗传距离为 3.3 cM,并成功地转化为 SCAR 标记,用 500 株回交群体作图算出该 SCAR 标记与 A 基因的距离为 5.5 cM^[16]。于蓉利用 738 个 RAPD 随机引物对与甜瓜单性花基

选择能够在亲本中可以稳定重复扩增出特异性条带的引物组合在 F₂ 代单性花与两性花基因池中进行进一步的筛选,发现其中 2 对引物组合在它们之间能扩增出多态性条带,它们是 melem5、me3em2,其多态性比例为 6.6%,然后利用构建基因池里 10 株单性花和 10 株两性花进行小群体的 PCR 验证,发现只有 melem5 能稳定地扩出特异性条带。并且在 F₁ 中扩增出了母本和父本共有的条带。将这个特异条带进行测序分析,该序列为 218 bp 的核苷酸(见图 1)。

因有关的基因进行筛选,与筛选得到的 RAPD 随即引物在 F₂ 中进行 PCR 验证,首次在国内获得了与甜瓜单性花基因相关的标记 S128. 1180,与单性花性状的遗传距离为 7.0 cM,与甜瓜两性花基因连锁的标记 S493. 930,与两性花性状的遗传距离为 5.8 cM^[17]。张小波等利用 SSR-BSA 发现 2 个与甜瓜单性花基因连锁的标记 cmmcca14, cmct50, 遗传距离分别为 7.0 和 29.5 cM^[18]。李征用 SRAP 标记在黄瓜中获得 8 对引物与黄瓜 M 基因连锁,并成功地将标记 melem24、melem26、melem23 和 me8sa7 转化成 SCAR 标记^[19]。

由于 SRAP 具有简便、产率高、引物不需要特别设计,也不需要预知物种的序列信息,目前被广泛应用在植物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图的构建、基因连锁标记的寻找与基因定位和比较基因组学研究中。SRAP 标记已在黄瓜、辣椒、番茄、花椰菜等多种蔬菜作物中有所应用,但是到目前为止仍未见该标记方法在甜瓜单性花基因上的研究。

该研究所得到的 melem5 标记,由于用于

研究的后代株数较少,加上 SRAP 的相对不稳定性,因此得到标记的与单性花基因的遗传距离仍较大。要想更准确地寻找与甜瓜单性花基因紧密连锁的标记,丰富甜瓜的基因图谱就得增加群体中单株数量,改变研究群体,例如双单倍体、回交一代群体,或者采用与 AFLP、SSR 等其它标记相结合的方法筛选出与甜瓜单性花基因距离更近的标记。尽管该研究与甜瓜单性花基因连锁不是特紧密,但是所筛选的 SRAP 标记与田间鉴定的结果吻合度较高,说明该标记仍可在育种实践中发挥作用。该标记应用于辅助选择育种仍具有较好的实用价值,也为以后克隆稳定的 SCAR 标记打下了基础。

参考文献:

[1] Jin W, Palmer R G, Horner H T. Molecular mapping of a male-sterile gene in soybean [J]. *Crop Sci.*, 1998, 38: 1681-1685.

[2] Creight J D, Elmstron G W. A third muskmelon male sterility gene[J]. *HortScience*, 1984, 19: 268-270.

[3] Kenigsbuch D, Cohen Y. The inheritance of gynocy in muskmelon[J]. *Genome*, 1990, 33: 317-327.

[4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 598-602.

[5] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. *Natl Acad Sci., USA*, 1991, 88(21): 9828-9832.

[6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.

[7] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucubita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282.

[8] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F₂ 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J]. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622-626.

[9] 潘俊松, 王刚, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J]. *科学通报*, 2005, 15(2): 167-172.

[10] 邓思立, 潘俊松, 何欢乐, 等. 黄瓜 M 基因连锁的 SRAP 分子标记[J]. *上海交通大学(农业科学版)*, 2006, 24 (3): 240-244.

[11] 李晓慧, 王从彦, 张四普, 等. 西瓜二倍体及同源多倍体 SRAP 多态性分析[J]. *分子植物育种*, 2007, 5 (S1): 61-63.

[12] Sanguinett J, Dias N E, Simpdon A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 914-921.

[13] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[14] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values[J]. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172-175.

[15] Mibus H, Tatlinglu T. Molecular characterization and isolation of the F/f gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1669-1676.

[16] Noguera F J, Capel J, Alvarez J I, et al. Evelopment and mapping of a codominant SCAR marker linked to the andromonoecious gene of melon [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 714-720.

[17] 于蓉. 甜瓜单性花形状遗传规律及分子标记研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.

[18] 张小波. 甜瓜雌雄异花同株性状的遗传特征及 SSR 分子标记的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006.

[19] 李征. 黄瓜 M 基因分子标记精细定位和图位克隆初探[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.

SRAP Marker of the Unisexual Flower Gene in Pellicle Melon

CAO Hong, CHEN Bai-jie, JIN Rong-rong, LIU Ying, WANG Lei, YIN Chun-hua
(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: The objective of this study was indentify SRAP marker for monoecious characteristic on pellicle melon. BSA(Bulked Segregant Analysis) was used to search for SRAP marker linked to monoecious gene, using F₂ segregating population derived from a cross of T912(unisexual flower.) and 1-4(hermaphrodite flower). The subject found a maker sme1em5 which was related to monoecious characteristic from 64 pairs of SRAP primers.

Key words: melon; unisexual flower; SRAP marker