

# 西瓜全雌基因连锁的 SRAP 分子标记

朱小茜<sup>1</sup>, 孙治强<sup>1</sup>, 李晓慧<sup>2</sup>, 徐小利<sup>2\*</sup>

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 园艺所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 采用 SRAP 技术探寻与西瓜全雌基因连锁的分子标记。以全雌母本和弱雌父本为双亲杂交获得 F<sub>1</sub>, 自交获得 F<sub>2</sub> 群体, 用分离群体分组分析法(bulked segregant analysis, BSA) 构建全雌和弱雌 2 个基因池, 筛选 957 对引物。结果发现, 只有引物 me16-em20 能在两池之间扩增得到 2 条特异带。经 F<sub>2</sub> 代单株验证, 结果表明该特异带能稳定出现。以 MAPMAKER (Version 3.0) 软件分析, 2 个标记与全雌性位点的连锁距离分别为 18.4cM 和 11.4cM。

**关键词:** 西瓜; 全雌; 分子标记; 相关序列扩增多态性

**中图分类号:** S651      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2011)03-0105-04

## Identification of SRAP Molecular Markers Linked to Gynoecious Loci in *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld

ZHU Xiao-qian<sup>1</sup>, SUN Zhi-qiang<sup>1</sup>, LI Xiao-hui<sup>2</sup>, XU Xiao-li<sup>2\*</sup>

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In this paper, SRAP technique was used to study the molecular markers related to gynoecious gene of watermelon. Gynoecious watermelon and monoecious watermelon were used as parents to get F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> was obtained by self-pollination of F<sub>1</sub>. 2 DNA pools of Gynoecious and monoecious were built by Bulk Segregant Analysis (BSA) and 957 pairs of primers were screened. The results showed that 2 characteristic bands were obtained only by primer me16-em20. By the test of which primer was used to amplify the individual DNAs of the F<sub>2</sub> population, the result indicated that this marker could appear steadily. Linkage analysis by the software of MAPMAKER (Version 3.0) indicated that their genetic distance to the gynoecious loci was 18.4cM and 11.4cM respectively.

**Key words:** Watermelon; Gynoecious; Molecular marker; SRAP

西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) 属葫芦科(Cucurbitaceae)、西瓜属(*Citrullus*), 为 1a 生蔓生草本植物。西瓜的杂种优势明显, 生产上大都采用杂种一代品种。应用与目的基因相连锁的分子标记进行辅助育种能提高准确率, 从而提高育种效率。另外, 在大规模的制种中采用人工授粉, 西瓜雌性系育种材料的应用能够有效降低成本, 因此, 在生产上具有重要意义。目前, 与植物性别决定基因

连锁的分子标记研究主要集中在雌雄异株植物中, 如大麻(*Cannabis sativa* L.)、石刁柏(*Asparagus officinalis* L.)、银杏(*Ginkgo biloba* L.) 等<sup>[1]</sup>。Jiang 等报道, 西瓜全雌性是来自于强雌性系的突变类型, 其性状遗传受全雌性基因 gy 的控制<sup>[2]</sup>。张秦英等对强雌性性状进行了遗传分析, 并找到了 1 个与强雌性性状相关的 RAPD 标记<sup>[3]</sup>。SRAP 作为一种新型的分子标记, 具有简便、稳定、中等产率、

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 国家现代产业技术体系建设专项项目(CARS-26)

作者简介: 朱小茜(1984-), 女, 河南孟津人, 在读硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种。E-mail: lyxixigua@163.com

\*通讯作者: 徐小利(1963-), 男, 河南郑州人, 硕士, 研究员, 主要从事西瓜瓜育种栽培研究。E-mail: xuxiaoli63@126.com

在基因组中分布均匀、测序方便、引物利用率高、成本较低等优点<sup>[4]</sup>。故而近年来在植物遗传多样性分析<sup>[5]</sup>、遗传连锁图的构建<sup>[6]</sup>、种质鉴定<sup>[7]</sup>、基因连锁标记与基因定位<sup>[4]</sup>、比较基因组学研究<sup>[8]</sup>、杂种优势预测<sup>[9]</sup>等方面得到广泛应用。鉴此,研究与西瓜性别基因连锁的标记,旨在获得与其连锁的SRAP标记,为全雌性状在西瓜育种和制种中的应用,以及西瓜遗传图谱的构建、基因定位和克隆奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

父本 QC,青皮长圆形,普通花型。母本 HC,黑皮长圆形,纯合全雌型。父母本杂交后代 F<sub>1</sub> 群体,共 6 株,自交得到 F<sub>2</sub> 群体,共 114 株。田间调查统计时,以 25 节以内全部为雌花的记为全雌,雌花占总花数 50% 以上的记为强雌,雌花占总花数 50% 以下的记为弱雌。

1.2 SRAP 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和 DNA 池的构建 基因

组 DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>。用紫外分光光度计分别在波长 260 nm 和 280 nm 处测所提取基因组 DNA 的 OD 值,检测其纯度及浓度。用 TE 缓冲液稀释 DNA 样品至约 50ng/ $\mu$ L,备用。F<sub>2</sub> 群体中单株 DNA 提取后,利用 BSA 法<sup>[11]</sup>各取 5 个全雌和弱雌单株 DNA 等量混合,构建成全雌和弱雌 DNA 池用于 SRAP 引物的多态性筛选。

1.2.2 PCR 反应体系 PCR 反应体系含: 10 $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 3  $\mu$ L、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 1.0 U、dNTPs (10 mmol/L) 0.2  $\mu$ L、正反向引物 (17 pmol/L) 各 0.3  $\mu$ L、DNA 模板 80 ng, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 33  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min。5 个循环; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 扩增产物于 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增反应在 Biometro RS232 PCR 仪上进行。所用预扩增和选择性扩增引物序列见表 1。

表 1 扩增和选择性扩增引物序列

名称	正向引物	名称	反向引物
me1	TGAGTC CAA ACC GG ATA	em1	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
me2	TGAGTC CAA ACC GG AGC	em2	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
me3	TGAGTC CAA ACC GG ACC	em3	GAC TGC GTA CGA ATT AGC
me4	TGAGTC CAA ACC GG TAG	em4	GAC TGC GTA CGA ATT TAG
me5	TGAGTC CAA ACC GG TGT	em5	GAC TGC GTA CGA ATT GGT
me6	TGAGTC CAA ACC GG TAA	em6	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
me7	TGAGTC CAA ACC GG TCC	em7	GAC TGC GTA CGA ATT CGA
me8	TGAGTC CAA ACC GG TGC	em8	GAC TGC GTA CGA ATT CCA
me9	TGAGTC CAA ACC GG GCT	em9	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
me10	TGA GTC CAA ACC GG ATG	em10	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
me11	TGA GTC CAA ACC GG ACA	em11	GAC TGC GTA CGA ATT ATT
me12	TGA GTC CAA ACC GG AAG	em12	GAC TGC GTA CGA ATT ATG
me13	TGA GTC CAA ACC GG GAT	em13	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
me14	TGA GTC CAA ACC GG GCT	em14	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
me15	TGA GTC CTT TCC GG TAA	em15	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
me16	TGA GTC CTT TCC GG TCC	em16	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
me17	TGA GTC CTT TCC GG TGC	em17	GAC TGC GTA CGA ATT GAT
me18	TGA GTC CAA ACC GG CAT	em18	GAC TGC GTA CGA ATT CCT
me19	TGA GTC CAA ACC GG TCT	em19	CCAAAACCTAAA ACC AGG A
me20	TGA GTC GTA TCC GG TCT	em20	GCG AGG ATG CTA CTG GTT
me21	TGA GTC GTA TCC GG AGT	em21	GTTAG TATCAAGGTTAGAGTT
me22	TGA GTC GTA TCC GG TAG	em22	GAC TGC GTA CGA ATT CAT
me23	TAAACA ATG GCT ACTCAA G	em23	CGC AAG ACC CAC CAC AA
me24	CTG GTG AAT GCC GCT CT	em24	TTACCTTGGTCATACAACATT
me25	TGA GTC CAA ACC GG AAA	em25	ATA AGA ATC AGC AGA CGC AT
me26	TGA GTC CAA ACC GG AAC	em26	ACG AGT TGC GGA AGT GG
me27	TGA GTC CAA ACC GG ATT	em27	TTG AAC TGG CAG AAA GGG T
me28	TGA GTC CAA ACC GG ATC	em28	GCG TTG AAC GAG TGA CTG A
me29	TGA GTC CAA ACC GG ACT	em29	GTT ATG GGA AAT TAG GTG AG
me30	TGA GTC CAA ACC GG ACG		
me31	TGA GTC CAA ACC GG AGA		
me32	TGA GTC CAA ACC GG AGT		
me33	TGA GTC CAA ACC GG AGG		

1.3 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 SRAP-PCR 扩增产物电泳分析检测在北京君意东方电泳设备有限公司生产的 JY600C 电泳仪上进行。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(40%PAGE 4 mL、蒸馏水 14 mL、10%TBE 2 mL、TEMED 20 $\mu$ L、20%APS 200 $\mu$ L)分离,电泳缓冲液为 0.5 $\times$  TBE。于 200 W 功率下电泳 120min 左右,使二甲苯氰移动到胶板底部停止电泳。

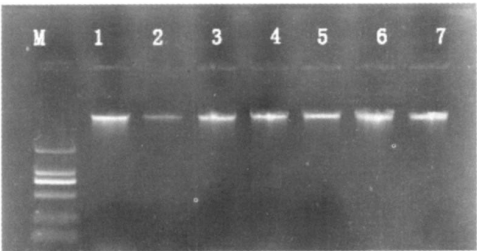
1.3.2 银染检测 固定(10%乙醇溶液,0.5%乙酸溶液)12 min,蒸馏水漂洗 1min,染色(0.133 3%Ag-NO<sub>3</sub>溶液)12min,蒸馏水漂洗 5 s 左右,显色(1% NaOH 溶液,0.5%甲醛溶液),至谱带清晰时停止显色,蒸馏水漂洗 1 min,固影(10%的乙醇溶液,0.5%乙酸溶液)3 min,在成像系统内拍照。

1.3.3 连锁性分析 利用 MAPMAKER (Version 3.0)软件对 F<sub>2</sub>代分离群体单株的标记和性型表现数据进行连锁分析<sup>[13]</sup>。

2 结果与分析

2.1 西瓜叶片 DNA 抽提结果

对以改良的 CTAB 法提取的西瓜叶片 DNA 紫外检测发现,大部分样品的 OD<sub>260/280</sub> 值在 1.85 ~ 2.0,质量浓度为 400ng/ $\mu$ L 左右,表明纯度和产量较高。从图 1 可以看出,没有杂带和弥散,条带清晰整齐,完全达到用于分析的要求。



泳道 1-7: 不同单株基因组 DNA; M: 2000bp marker

图 1 西瓜基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 利用分离群体进行西瓜全雌性遗传规律分析

以全雌性母本 HC 和弱雌性父本 QC 杂交获得 F<sub>1</sub>代。观察 F<sub>1</sub>代单株,均表现弱雌性,说明西瓜全雌性对弱雌性为隐性。对 F<sub>2</sub>代共 114 个单株进行性型统计,统计时将全雌株和强雌株合并作为雌性株,统计结果为雌性株 30 株、弱雌性株 84 株。经  $\chi^2$  测验, F<sub>2</sub>代雌性株与弱雌株分离比例完全符合 1 : 3 的比例( $P$  值= 0.104),以上结果可以说明,西瓜全雌性状是由单隐性基因控制的质量性状。

2.3 SRAP 引物在亲本间的多态性

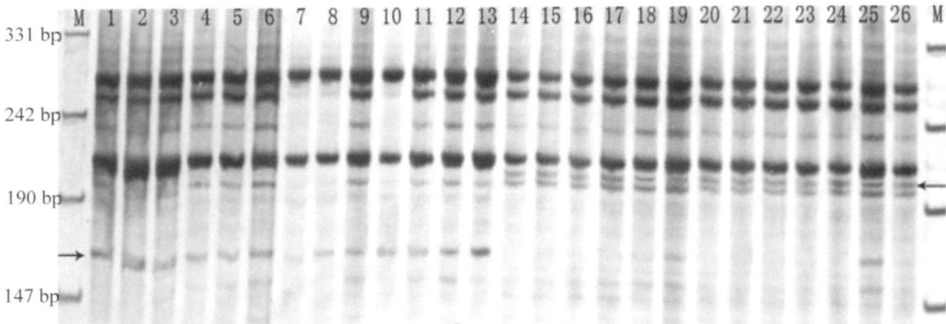
用 33 条正向和 29 条反向随机引物逐一组合成的 957 对引物对父母本进行 SRAP 扩增, 957 对引物共扩增出 20 655 条带,平均每对引物扩增出 21.6 条带。筛选出在父本和母本间表现多态的标记共 36 个。

2.4 SRAP 引物在全雌和弱雌 DNA 池间的多态性

用在父母本之间表现出多态性的 36 对引物组合分别对由 5 株 F<sub>2</sub>单株构建的全雌和弱雌基因池进行 SRAP 扩增,筛选结果表明,在全雌和弱雌 DNA 池间表现多态的标记共 8 个。

2.5 多态性标记在 F<sub>2</sub>代单株中的检测及连锁距离的确定

利用上述具有多态性条带的 8 对引物组合对 F<sub>2</sub>代单株进行 PCR 验证。结果发现,其中只有引物 mel6-em20 与西瓜全雌性表型存在连锁关系,绝大多数全雌株上扩增出一条约为 160bp 的特异条带,在弱雌株上未出现,在弱雌株上扩增出一条约为 205 bp 的特异条带,在全雌株上未出现(图 2)。用 F<sub>2</sub>代单株对这对引物进行检测,共有全雌株 30 株,弱雌株 84 株。对于全雌株上出现的标记,检测表明全部全雌单株中有 24 株出现该标记,6 株未见该标记。弱雌株中,有 15 株出现该标记,69 株未出现该标记。利用 Mapmaker (Version 3.0) 计算出标记与全雌性位点的连锁距离为 18.4cM。对于弱雌株上出



1-13: 全雌性单株; 14-26: 弱雌性单株; M: 500bp ladder。箭头指示特异带

图 2 mel6-em20 引物组合扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

现的标记,检测表明全部全雌单株中有 3 株出现该标记,27 株未见该标记。弱雌株中,有 74 株出现该标记,10 株未出现该标记。利用 Mapmaker (Version 3.0) 计算出标记与全雌性位点的连锁距离为 11.4 cM,连锁较为紧密。

### 3 讨论

对植物性别的研究在国内外一直受到很大的关注,但对西瓜全雌性状的研究相关报道较少。本研究通过对西瓜全雌性状进行的遗传分析表明西瓜全雌性状受一对隐性基因控制。此结论与 Jiang 等<sup>[2]</sup>报道的西瓜全雌性状受一对隐性核基因 *gy* 控制相一致。本研究中采用了 BSA 法进行分子标记筛选,在引物筛选时,考虑到由于 F<sub>2</sub> 代单株存在着姐妹染色体的交换,同时在田间调查时可能出现人为误差,选择 F<sub>2</sub> 单株构建基因池时可能使基因池之间的目标性状混杂,从而不能找出可以标记目标性状的引物对。先在父母本之间筛选,选择能表现父母本之间多态性的引物进行下一步的 F<sub>2</sub> 基因池筛选,这样有效地提高了试验效率。本研究共利用 957 对引物进行筛选,结果只有 1 对引物 me16-em20 在西瓜全雌株上扩增出特异条带。这是目前国内首次报道的与西瓜全雌基因紧密连锁的分子标记,对全雌性状在西瓜育种和制种中的应用,以及西瓜遗传图谱的构建、基因定位和克隆具有重要意义。

本试验的后续工作即将进行,通过进一步克隆与测序,有望设计一个表现性别特异性的 PCR 引物,从而建立一个操作简便、表现稳定的 SCAR 标记,为西瓜遗传图谱的构建以及基因定位和克隆奠定基础。

### 参考文献:

[1] 娄群峰,陈劲枫,陈龙正,等. 黄瓜全雌性基因连锁的

AFLP 和 SCAR 分子标记[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 256-261.

- [2] JIANG Xiang-tao, LIN De-pei. Discovery of watermelon gynocious gene *gy*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(1): 141-142.
- [3] 张秦英,刘军伟,刘莉,等. 西瓜强雌性性状的遗传分析及分子标记研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 138-142.
- [4] 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.
- [5] 张书芬,傅廷栋,李媛媛,等. SRAP 标记分析甘蓝型油菜多态性[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 50-54.
- [6] 李媛媛,沈金雄,王同华,等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126.
- [7] 刘泽发,孙小武,董亚静. SRAP 标记鉴定西瓜种子纯度方法研究[J]. 中国瓜菜, 2009, 22(1): 5-7.
- [8] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(1): 168-180.
- [9] 谭祖猛,李云昌,胡琼,等. 通过分子标记估算遗传距离预测甘蓝型油菜的杂种优势[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2): 20-26.
- [10] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of higher weight DNA[J]. Nucl Acids Res, 1980, 8: 4321.
- [11] Michelmore I R W. Identification of marker linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method detect marker in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.
- [12] Lander E S, Green J, Abrahamson A. Mapmaker: An interactive package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations[J]. Genomics, 1987(1): 174-181.