

# 利用 SSR 标记技术构建黄瓜遗传连锁图谱

王军辉<sup>1</sup>, 崔兴华<sup>2</sup>, 张桂华<sup>2</sup>, 杜胜利<sup>2</sup>, 张 显<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192)

**摘 要:** 利用抗黄瓜花叶病毒病(CMV)的黄瓜材料 F-3 和感 CMV 的黄瓜材料 HZL04-1 为亲本, 构建包含 190 个 F<sub>2</sub> 后代的遗传作图群体。结果表明: 采用 SSR、EST-SSR 和 SCAR 3 种分子标记技术对该群体进行遗传连锁分析, 获得 1 个包含 170 个 SSR 标记, 6 个 EST-SSR 标记, 3 个 SCAR 标记的黄瓜遗传连锁图谱, 该图谱涉及 7 个连锁群, 总长度为 862.886 cM, 平均图距为 4.79 cM。该图谱的构建为黄瓜抗 CMV 的 QTL 定位奠定了基础, 并确定了连锁群与染色体之间的对应关系。

**关键词:** SSR; EST-SSR; SCAR; 遗传连锁图谱; 黄瓜

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)22-0115-04

自 1987 年 Fanourakis 等<sup>[1]</sup> 构建了第一张黄瓜连锁图谱以来, 至今已有多张黄瓜的遗传连锁图谱<sup>[2-12]</sup>。其中, 分子标记技术应用于黄瓜遗传图谱的构建始于 1994 年 Kennard<sup>[3]</sup> 构建的遗传图谱。SSR (Simple Sequence Repeats) 标记技术由于共显性遗传、位点特异性、高多态性、试验程序简单和高通量等优势, 已经逐步替代其它标记技术而成为遗传图谱构建的标准标记。

现应用 SSR 等分子标记技术, 以在黄瓜花叶病毒病抗性上表现极大差异的黄瓜材料为亲本, 开展黄瓜遗传图谱构建研究, 旨在为黄瓜抗 CMV 的 QTL 定位鉴定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 作图群体的构建

以抗 CMV 的黄瓜材料 F-3 为父本, 感 CMV 的黄瓜材料 HZL04-1 为母本进行杂交获得 F<sub>1</sub> 代, 然后再将 F<sub>1</sub> 进行单株自交获得 F<sub>2</sub> 群体, 该 F<sub>2</sub> 群体由 190 个单株构成。

### 1.2 黄瓜基因组 DNA 提取

选取苗期的黄瓜嫩叶, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

### 1.3 SSR 和 SCAR 分析

SSR 反应体系 (10  $\mu$ L) 包括: 基因组 DNA (50 ng/ $\mu$ L)

0.8  $\mu$ L; PCR Buffer (10  $\times$ ) 1.0  $\mu$ L; dNTP (10 mM) 0.2  $\mu$ L; 上游引物 (50 ng/ $\mu$ L) 0.12  $\mu$ L; 下游引物 (50 ng/ $\mu$ L) 0.12  $\mu$ L; *Taq*E (5 U/ $\mu$ L) 0.1  $\mu$ L。SSR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 3 min, 1 个循环; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。

SCAR 反应体系 (10  $\mu$ L) 包括: DNA (50 ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L; 上游引物 (100 ng/ $\mu$ L) 0.15  $\mu$ L; 下游引物 (100 ng/ $\mu$ L) 0.15  $\mu$ L; dNTP (10 mM) 0.2  $\mu$ L; PCR buffer (10 $\times$ ) 1.0  $\mu$ L; *Taq*E (5 U/ $\mu$ L) 0.1  $\mu$ L。

SCAR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 94  $^{\circ}$ C 1 min, X  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min (X 为不同 SCAR 引物的退火温度)。

扩增产物在 5.0% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 (电泳缓冲液 1 $\times$  TBE, 功率 100 W, 时间 30 min), 1% AgNO<sub>3</sub> 染色, 然后进行观察、照相、读带。

### 1.4 数据记录与标记命名

在记录数据时, 基因型的判断以带型为基础。带型和母本 HZL04-1 一样的记作 a, 带型和父本 F-3 一样的记作 b, 杂合类型记作 h, 缺失记作“-”。根据 320 bp ladder 来估算多态性条带的分子量大小。标记命名采用引物组合加多态性片段大小的方式。

### 1.5 图谱构建与连锁分析

应用计算机软件 Joinmap 3.0 (Van Ooijen 和 Voorrips 2001) 构建连锁图谱。采用 Kosambi 函数 (Kosambi 1944) 进行图谱距离计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本间差异引物的筛选

利用抗、感 CMV 亲本进行了大量的引物筛选, 共筛选到有差异的 SSR 引物 342 对。其中从 1 003 对黄瓜 SSR 引物中筛选到有差异的引物 331 对, 多态性比例为

第一作者简介: 王军辉 (1982-), 男, 硕士, 现主要从事园艺植物遗传与育种研究工作。E-mail: yuanyiyi2008@126.com。

通讯作者: 张桂华 (1972-), 女, 博士, 副研究员, 现主要从事黄瓜生物技术育种研究工作。E-mail: zgh319@126.com.cn。

基金项目: 天津市应用基础研究计划资助项目 (07JCYBJC12200); “十一五”国家“863”计划资助项目 (2006AA10Z1A8)。

收稿日期: 2010-08-30

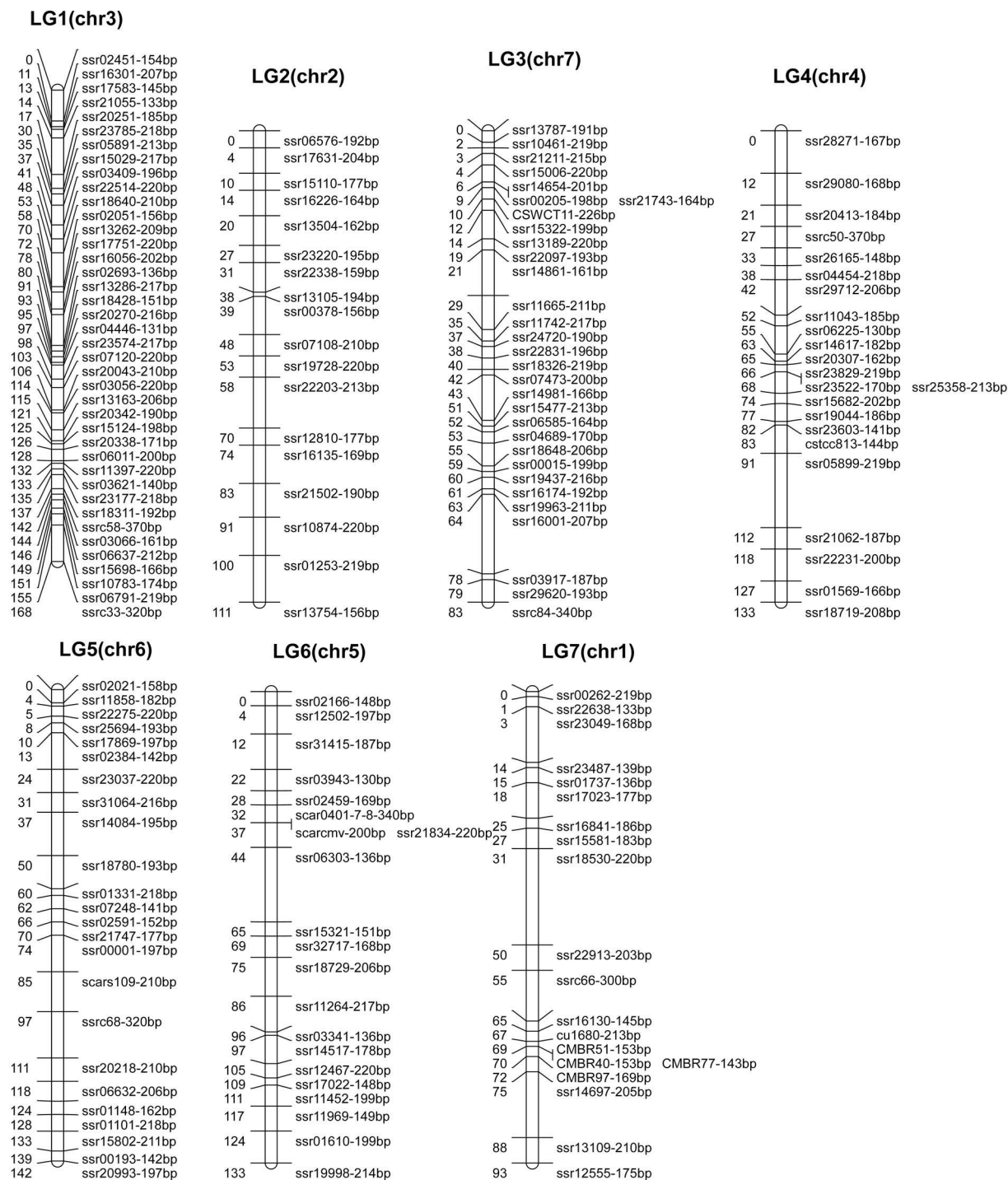


图 1 黄瓜遗传连锁图谱

33%; 从 58 对黄瓜 EST-SSR 引物中筛选到有差异的引物 7 对, 多态性比例为 12.1%; 从 30 对甜瓜 SSR 引物中筛选到差异引物 4 对, 多态性比例为 7.5%。

## 2.2 偏分离分析

利用群体分析, 对得到的 180 个多态性标记位点, 其中包括 170 个 SSR 位点, 3 个 SCAR 位点 7 个 EST-

SSR 位点, 进行  $\chi^2$  ( $P \leq 0.05$ ) 适合性测验, 有 17 个位点不符合 1:2:1 的分离比例, 表现为偏分离, 偏分离比例是 9.4%。17 个偏分离标记中, 有 8 个 (47%) 偏向母本 HZL04-1, 3 个偏向父本 F-3 (17.6%), 5 个偏向杂合体 (29.4%), 1 个同时偏向双亲 (5.9%), 见表 1。

表 1 标记的偏分离情况

标记类型	标记数	偏分离数	偏分离比例 %	连锁标记数	未连锁标记数
SSR	170	15	9.4	170	0
EST-SSR	7	1		6	1
SCAR	3	1		3	0
总计	180	17		179	1

2.3 黄瓜遗传图谱构建

研究中应用 F<sub>2</sub> 群体分离得到的 170 个 SSR 标记, 3 个 SCAR 标记, 7 个 EST-SSR 标记 用 Joinmap 3.0 软件进行连锁分析, 得到 1 张包含 7 个连锁群的遗传图谱 (表 2 图 1), 其中, 包括 170 个 SSR 标记, 6 个 EST-SSR 标记和 3 个 SCAR 标记, 该图谱覆盖基因组 862.886 cM, 平均图距为 4.79 cM。每个连锁群上标记数在 18~40 之间, 长度在 82.684~167.757 cM 之间。最大的连锁群为第 1 连锁群 含有的标记数最多, 为 40 个标记, 覆盖 167.757 cM, 平均间距 4.19 cM, 最小的连锁群为第 2 连锁群 含有 18 个标记 覆盖 110.911 cM, 平均间距 6.16 cM。平均间距最大的连锁群是第 6 连锁群, 为 6.43 cM。平均间距最小的是第 3 连锁群, 为 2.68 cM。

表 2 7 个连锁群的数据统计

连锁群	标记数/个	长度/cM	平均间距/cM
1	40	167.757	4.19
2	18	110.911	6.16
3	31	82.684	2.67
4	23	133.128	5.79
5	24	142.399	5.93
6	21	133.065	6.34
7	20	92.942	4.65

2.4 连锁群与染色体的对应关系

研究中得到了 7 个连锁群, 通过与 Ren Y 等<sup>[12]</sup> 所获得的黄瓜遗传连锁图谱相比较, 得到了连锁群与染色体之间的对应关系, 如表 3 所示。

表 3 连锁群与染色体之间的对应关系

连锁群	染色体
第 1 连锁群	第 3 染色体
第 2 连锁群	第 2 染色体
第 3 连锁群	第 7 染色体
第 4 连锁群	第 4 染色体
第 5 连锁群	第 6 染色体
第 6 连锁群	第 5 染色体
第 8 连锁群	第 1 染色体

3 讨论

偏分离是生物界普遍存在的一种现象, 也是全部生物进化的动力之一。植物遗传学上的自交不亲和性, 染色体重组和倒位, 遗传变异效应等都会导致偏分离现象

的发生。此外, 人为数据整理的混乱导致带型的丢失、试验过程中产生的误差、作图群体数量太小、DNA 的断裂严重等一系列因素也会引起偏分离现象。该研究利用 F<sub>2</sub> 群体进行分析, 180 个多态性标记位点的 X<sup>2</sup> ( $P \leq 0.05$ ) 适合性测验结果表明 有 17 个位点不符合 1:2:1 的分离比例, 表现为偏分离, 偏分离比例是 9.4%。其中有 8 个偏向母本(47%), 3 个偏向父本(17.6%), 5 个偏向杂合体(29.4%), 1 个同时偏向双亲(5.9%)。

通常认为好的遗传连锁图谱的连锁群数和该植物实际的染色体的数是相等的。因此, 对于黄瓜 (2n=14) 来说比较理想的遗传图谱要包括 7 个连锁群。到目前为止获得的黄瓜遗传连锁图已有 20 多张, 但大多多于 7 个连锁群。该研究利用全基因组范围内获得的 SSR 标记进行构图, 覆盖了基因组 95% 的水平, 所以该图谱基本上反映染色体的真实情况, 只是在某些染色体上标记位点之间的间距还比较大, 有待于进一步增加图谱的饱和度。

参考文献

[ 1 ] Fanourakis N E, Simon P W. Analysis of genetic linkage in the cucumber [ J ]. Heredity, 1987, 78(4): 238-242.

[ 2 ] Pierce L K, Wehner T C. Review of genes and linkage groups in cucumber [ J ]. Horticultura 1990, 25(6): 605-615.

[ 3 ] Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, et al. Linkages among RAPD, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber [ J ]. Theor. Appl. Genet, 1994, 89: 42-48.

[ 4 ] Melic V, Staub J E. Inheritance and linkage relationships of isozyme and morphological loci in cucumber [ J ]. Theor. Appl. Genet, 1996, 92: 865-872.

[ 5 ] Serquen F C, Bacher J, Staub J E. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber using random-amplified polymorphic DNA markers [ J ]. Mol. Breed, 1997, 3(4): 257-268.

[ 6 ] Park Y, Sensory S, Wye C. A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs and loci conditioning resistance to papaya rings pot and zucchini yellow mosaic viruses [ J ]. Genome 2000, 43(6): 1003-1010.

[ 7 ] Bradeen J M, Staub J E, Wye C, et al. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber [ J ]. Genome 2001, 44(1): 111-119.

[ 8 ] 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 [ J ]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(5): 864-874.

[ 9 ] 张海英, 葛风伟, 王永健 等. 黄瓜分子遗传图谱的构建 [ J ]. 园艺学报, 2004, 31(5): 617-622.

[ 10 ] 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 [ J ]. 自然科学进展, 2004, 14(11): 1225-1229.

[ 11 ] 徐晴, 张桂华, 韩毅科, 等. 黄瓜远缘群体分子遗传连锁图谱的构建和分析 [ J ]. 华北农学报 2008, 23(1): 45-49.

[ 12 ] Ren Y, Zhang Z, Liu J, et al. An Integrated Genetic and Cytogenetic Map of the Cucumber Genome [ J ]. PLoS ONE, 2009, 4(6): 5795.

# 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 分析

李 晴, 张学时, 张广臣, 韩玉珠, 王 宇

(吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:** 采用 11 个 RAPD 随机引物对 37 份辣椒材料进行 PCR 扩增。共扩增出 51 条谱带, 其中多态性条带 36 条, 多态性检测率占 70.6%, 不同引物扩增的条带在 3~7 条不等。结果表明: 通过聚类分析 37 份辣椒种质供分为 5 个类群, 每类群的种质亲缘关系较近, 但遗传关系与地域距离并无明显的相关性。

**关键词:** 辣椒; RAPD; 遗传多样性; 亲缘关系

**中图分类号:** S 641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)22-0118-05

辣椒品种资源在全世界范围内分布广泛, 品种繁多, 在我国的栽培历史悠久, 不同的气候条件及栽培制度, 也逐渐形成了丰富的辣椒品种<sup>[1]</sup>。1980 年召开的“辣椒遗传资源会议”, 已将辣椒属已驯化的栽培种分为 5 个种 *Capsicum annuum* L. 1 a 生辣椒、*Capsicum frutescens* L. 灌木状辣椒、*Capsicum baccatum* L. 浆果状辣椒、*Capsicum chinense* 中国辣椒、*Capsicum pubescens* 绒毛辣椒<sup>[2,3]</sup>。我国的辣椒栽培种大部分都属于 *C. annuum*, 包括辣椒、甜椒、簇生椒等。我国大多数关于辣椒种质资源的遗传多样性研究都属于对 *Capsicum annuum* 种内不同变种的研究, 应用不同的分析鉴定方

法从多个水平上研究辣椒的遗传变异性<sup>[4-7]</sup>。种质资源的遗传多样性是物种改良、生态适应性、新品种选育的基础。分子标记方法能够从分子水平上对辣椒种质的遗传多样性进行鉴定。RAPD 标记已广泛地应用于植物系统学、遗传变异分析、亲缘关系分析、品种鉴定、基因定位、绘制遗传连锁图谱等<sup>[8]</sup>。该研究应用 RAPD 技术, 对 37 份辣椒种质资源的遗传多样性和亲缘关系进行分析, 加强辣椒种质资源遗传多样性的研究, 了解种质资源的遗传基础, 掌握种质资源的亲缘关系, 是辣椒新品种选育上新台阶的一个重要途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以 37 份辣椒种质资源为供试材料进行 RAPD 分析, 品种名称如表 1 所示。全部试材于 2008 年 3 月 21 日, 在吉林农业大学园艺学院蔬菜基地进行播种, 5 月 21 日定植大田。RAPD 试验于园艺学院分子实验室进行。

## Construction of Genetic Linkage Map of Cucumber by SSR Technology

WANG Jun-hui<sup>1</sup>, CUI Xing-hua<sup>2</sup>, ZHANG Gui-hua<sup>2</sup>, DU Sheng-li<sup>2</sup>, ZHANG Xian<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Tianjin Kemei Cucumber Research Institute, Tianjin 300192)

**Abstract:** With a CMV-resistant line (F-3) and a CMV-susceptible line (HZL04-1) as parents, an F<sub>2</sub> genetic mapping population containing 190 F<sub>2</sub> progenies was constructed. The results showed that 1 cucumber genetic linkage map containing 7 linkage groups was constructed using 170 SSR, 6 EST-SSR, and 3 SCAR markers, and the map covered 862.886 cM with an average marker interval of 4.79 cM. It was the basis of QTL locating of CMV resistant gene. The correspondence between the linkage groups and chromosomes was determined by comparing with the previous study.

**Key words:** SSR; EST-SSR; SCAR; genetic linkage map; cucumber