

黄瓜性别控制基因 *CsACSlG* 的分子标记及其快速检测

张西露, 刘峰, 戴雄泽, 马艳青, 袁祖华, 李雪峰, 陈惠明*

(湖南省蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要: 根据黄瓜性别控制基因 *CsACSlG*、*CsACSl* 及 *BCAT* 基因DNA差异序列, 设计 *CsACSlG* 基因特异标记引物 G1/G2, 采用碱处理法, 快速提取黄瓜品种 WI1983G、95、98-17、S-2-98 及 95×WI1983G 的 F₁、F₂ 群体植株DNA, 并以此为模板进行PCR扩增. 为了验证特异引物对检测 *CsACSlG* 基因的准确性, 在黄瓜开花期间进行田间调查, 结果表明, 以快速提取的黄瓜DNA为PCR模板, 特异引物 G1/G2 能稳定、准确扩增出 *CsACSlG* 基因特异片段, 电泳检测结果与田间调查结果一致.

关键词: 黄瓜; 性别控制基因; 雌性; DNA提取

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0512-04

Identification of *CsACSlG* gene DNA markers and DNA rapid detection in cucumber

ZHANG Xi-lu, LIU Feng, DAI Xiong-ze, MA Yan-qing, YUAN Zu-hua, LI Xue-feng, CHEN Hui-ming*

(Institute of Vegetables, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Based on the sequences of *CsACSlG*, *CsACSl* and *BCAT*, the specific PCR primers were designed to identify *CsACSlG* gene using DNA markers in Cucumber (*Cucumis sativus* L.), and genome DNA was rapidly extracted from cucumber WI1983G, 95, 98-17, S2-98 and offspring 95×WI1983G with the method of NaOH. Field surveys were conducted in the flowering period so as to confirm stability of the primers. The results showed that DNA molecular marker can amplify a specific fragment of *CsACSlG* gene when the resultant DNA was used as PCR template. So, identification of *CsACSlG* gene DNA molecular markers and the method of DNA rapid extraction in cucumber would provide the conditions to accelerating breeding of gynoecium's cucumber.

Key words: cucumber; *CsACSlG* gene; gynoecium; DNA rapid extraction

选育黄瓜纯雌性系或强雌性系是提高产量的前提和基础, 应用传统方法, 从表型上进行雌性基因的选择, 效率较低, 而运用分子标记进行辅助育种可直接从基因型上对后代单株进行准确选择, 提高育种效率. 黄瓜植株的性别表现主要分为雌雄异花同株、全雌株、两性株、雄花和两性花同株、雄花和雌花及两性花同株(又称三性株)等几种表达类型^[1], 主要受到3类基因 *F*、*m*、*a* 的控制^[2-7], 其中 *mm*

纯合基因型表现为两性花, *a* 基因控制雄性表达, *F* 基因控制雌性表达, *A* 基因上位于 *F* 基因^[8]. Trebitsh 等^[9]发现, 黄瓜性别控制基因 *CsACSlG* 和雌性系存在相关关系, 可能是黄瓜雌性系的分子标记; 而 Mibus H^[10]提出, *CsACSlG* 基因为雌性系和亚雌性系特有, 并证实 *CsACSlG* 基因是显性的 *F* 等位基因. Ronit Rimon Knopf 等^[11]证实, *CsACSlG* 基因决定黄瓜雌性性别. 但 *CsACSlG* 基因和雌性系之

收稿日期: 2010-03-23

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADB1B05); 湖南省自然科学基金项目(09JJ3045)

作者简介: 张西露(1975—), 女, 湖南华容人, 硕士研究生, 经济师, 从事植物栽培生理研究, 165084577@qq.com; *通讯作者,

huimingm@163.com

间的关系还存在一些争议,陈惠明等^[8]证实,*CsACSIG* 基因和*F*位点确实存在相关关系.叶波平等^[12]报道,*CsACSIG* 基因和雌性系之间存在“有”和“无”的关系.程立宝等^[13]证实,*CsACSIG* 基因中1 013 bp 基因片段为雌性系特有,但邹晓艳等^[14]对已经获得的ACC合酶基因*CsACSIG*,通过特异引物PCR检测,发现这个性别决定相关基因均存在于所有供试的不同性型黄瓜材料中,不具有性型特异性.到目前为止,能用于黄瓜全雌性辅助育种实践的分子标记很少,笔者利用生物信息学方法设计其特异标记,尝试使用碱处理法批量快速提取样本DNA,以实现黄瓜全雌性状的标记辅助育种,提高黄瓜全雌性品种的选育效率.

1 材料与与方法

1.1 材料

试验于2008年在湖南省蔬菜研究所进行.供试材料包括:① 黄瓜WI1983G纯雌株系(*FFMM*),所有的节位均为雌花;② 95雌雄同株系(*ffMM*),雌花率21%~35%,末端不表现连续的雌花节;③ 98-17强雌性系(*ffMM*),其低节位有一段较长的雄花节,随后是一段雌雄混合的节位,末端出现连续的雌花节;④ S-2-98强雌性系(*ffMM*),其第1~7节多数为雄花,8~11节以上为连续雌花节,雌花率平均61%~63%,末端出现连续的雌花节;⑤ 95×WI1983G F_1 纯雌系(*EfMM*);⑥ 95×WI1983G F_2 代(*F-MM*, *ffMM*),自交群体,表型纯雌花株或雌雄同株.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取

黄瓜幼叶DNA快速提取采用碱处理改良法^[15].

取黄瓜幼嫩心叶5 mg,置于96孔PCR板中,样孔中加30 μ L 0.25 mol/L NaOH,在沸水中煮30 s后,用带有一次性tip头的8通道移液器将样孔中的幼叶捣碎,随后加入30 μ L 0.25 mol/L HCl和30 μ L 0.25 mol/L Tris-HCl (pH=8),沸水煮2 min,取上清液做PCR模板.

1.2.2 引物设计及PCR扩增

通过CLUSTALW 2程序,对NCBI中已公布

的黄瓜 *BACT* 基因序列、*CsACSI* 基因和 *CsACSIG* 基因序列进行序列多重比对.用Primer引物软件设计最佳引物,并使上下游引物位于 *CsACSI* 与 *BACT* 重组位点的两端.G1:5'-TCGGACGGGCATAGTTATGAGCA-3';G2:5'-AAAGAGGTGGTTTGTATTGGTTG-3'.

PCR反应体系:上下游引物G1、G2(10 μ mol/L)各1 μ L, dNTP(2 mmol/L)1 μ L, 黄瓜基因组DNA 1 μ L (上清液), *Taq* DNA 聚合酶(1 U/ μ L)1 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 25 mmol/L 2 μ L, ddH₂O 14.5 μ L, 总体积为25 μ L. PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 53 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 共35个循环, 10 $^{\circ}$ C终止反应,在1.0%琼脂糖凝胶电泳电压为150 V电泳分离40 min.

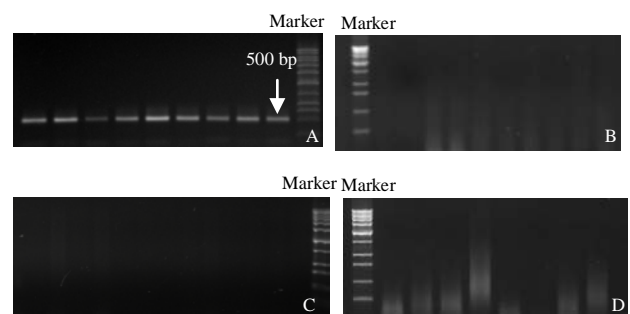
1.2.3 *CsACSIG* 基因特异片段测序

PCR产物的连接、转化、酶切鉴定及测序:PCR产物经过1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度与目标片段大小相符,利用生物公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收产物,连接PMD18-T载体、转化、蓝白斑鉴定,提取质粒后经过*Eco*R I和*Hind*III 酶切,检测重组质粒插入目的片段的情况.选取PCR检测及酶切检测均为阳性的菌落送英骏生物技术公司测序.

2 结果与分析

2.1 特异引物在不同性型植株间的扩增

用引物G1/G2对不同性型的亲本进行检测,结果表明,只具有*F*基因的品种能稳定扩增出1条约500 bp 特异片段(图1-A),而*ff*基因型均没有这条带(图1-B,C,D),与预期结果一致.为了验证PCR



A WI1983G; B 95; C 98-17; D S2-98.

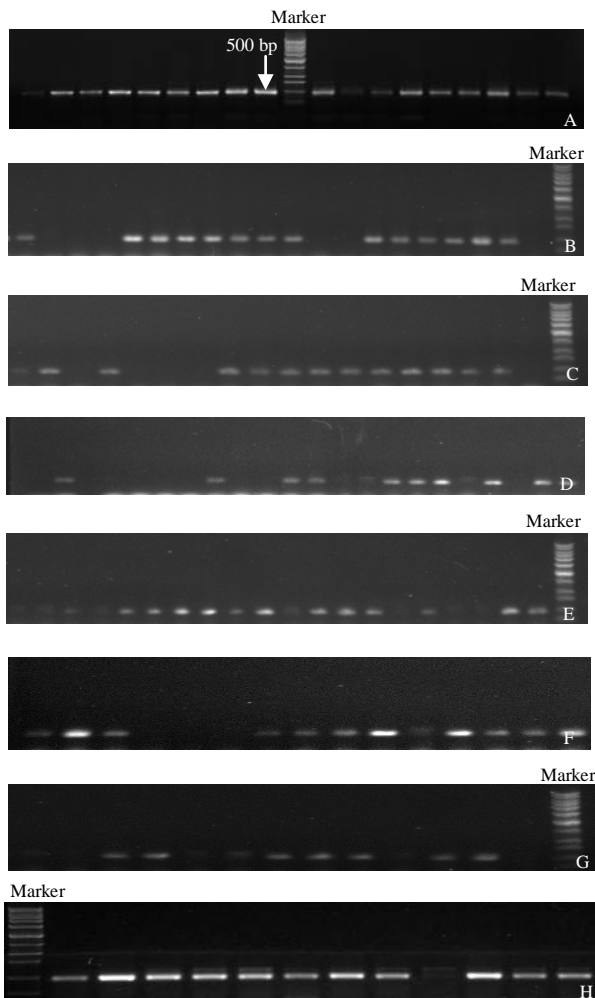
图1 引物在不同性型黄瓜品种中的扩增结果

Fig.1 PCR product of primer in different sex type of cucumber

扩增产物确实为 *CsACSI*G 基因特异序列, 回收了雌性品种中的扩增片段并测序, 测序结果经 BLAST 分析, 发现该片段与 *CsACSI*G 序列的同源性为 99%, 说明目的片段来自 *CsACSI*G 基因。

2.2 引物在 95×WI1983G 杂交后代群体中的扩增

如图2-A所示, 引物在95×WI1983G F₁群体中能稳定扩增出约500 bp的*CsACSI*G基因特异序列。为了进一步验证引物的可靠性, 对95×WI1983G F₂大群进行*CsACSI*G基因特异序列检测。结果(图2-B~H)显示, 特异扩增片段在F₂群体中发生了分离, χ^2 测验($P=0.05$)表明, 扩增片段阳性率符合3:1 ($P=0.05$), 与*CsACSI*G 基因在F₂群体中的理论分离比一致。为了验证电泳结果的真实性和在F₂ 群体植株开花后进行调查, 结果所有植株性型表现与其对应的电泳结果一致。由此说明引物G1/G2是*CsACSI*G



A F₁ (95×WI1983G); B~H F₂ (95×WI1983G).

图2 引物在95×WI1983G后代群体中的扩增结果
Fig.2 PCR product of primer in offspring of 95×WI1983G

基因稳定的分子标记。

3 讨论

1997年, Kamachi等^[16]首次从黄瓜中扩增的*CsACS3*基因, 被认为可能是*CsACSI*G 基因。随后Trebitch等^[9]从雌性系黄瓜中克隆到1个受IAA诱导表达的特异片段, 证实此片段与黄瓜遗传分析中的*F*基因紧密连锁。2004年, Mibus和Tatlioglu^[10]克隆了*CsACSI*G基因部分序列, 第一次证实*CsACSI*G基因是显性的*F* 等位基因。直到2006年Ronit Rimon Knopf 等^[11]详细阐明了*CsACSI*G与*CsACSI*之间的关系, 证实*F*-、*ff*基因型黄瓜品种基因组DNA中均存在*CsACSI*、*BCAT*基因序列, 并认为*CsACSI*G就是*F*基因, 且起源于*CsACSI*基因与*BCAT*基因之间的重复、重组事件。笔者对*CsACSI*G基因序列进行分析, 发现*CsACSI*G DNA序列是由*BCAT* 基因反义序列插入*CsACSI*基因启动子上游形成, 就公布的序列来看, *CsACSI*G与*CsACSI*之间的序列差异就在*BCAT* 基因反义序列(如图1)。但由于*CsACSI*、*BCAT* 基因序列均存在于*F*-、*ff* 基因型黄瓜品种中, 因此, 仅在*CsACSI* 或*BCAT* 基因反义序列上设计引物不能将*CsACSI*G 基因检测出, 邹晓艳等^[14]的试验结果证明了这一点。根据上述原则, 在*CsACSI*和*BCAT* 重组位点设计了*CsACSI*G基因特异标记引物G1/G2, 并对不同性型品种和杂交后代群体进行了验证。结果表明, G1/G2在具有*CsACSI*G 基因的黄瓜材料中均能扩增出1条500 bp的条带, 对检测*F*基因具有高度特异性。

本试验采用碱处理法, 快速提取黄瓜基因组DNA, 这种方法具有经济、快速、简单等特点, 同时避免了使用氯仿、异戊醇和异丙醇等毒性及挥发性较强的试剂。虽然提取的DNA中蛋白质和杂质含量较高, 但并不影响特异引物对样本DNA的特异扩增^[17]。

参考文献:

- [1] 金晓霞, 秦智伟, 董延龙. 黄瓜性别分化研究进展[J]. 中国蔬菜, 2007(2): 38-42.
- [2] Galun E. Study of the inheritance of sex expression in the cucumber: The interaction of major genes with modifying

- genetic and non-genetic factors[J]. *Genetica*, 1961, 32(1): 134-163.
- [3] Shifriss O. Sex control in cucumbers[J]. *J Hered*, 1961, 52(1): 5-12.
- [4] Kubicki B. Investigations of sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.)IV. Multiple alleles of locus *Acr*[J]. *Genetica Polonica*, 1969(10): 23-68.
- [5] Kubicki B. Investigations of sex determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.)V. Genes controlling intensity of femaleness[J]. *Genetica Polonica*, 1969(10): 69-86.
- [6] Kubicki B. New sex types in cucumber and their uses in breeding work [J]. *Proc XI th Intl Hort Congr*, 1974(3): 475-485.
- [7] 陈惠明, 卢向阳, 许亮, 等. 黄瓜性别决定相关基因和性别表达机制[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(1): 7-13.
- [8] 陈惠明, 许亮, 卢向阳, 等. 黄瓜雌性性状主控基因 *CsACS1G* 的分析及其定位[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(4): 520-524.
- [9] Trebitsh T, Staub J E, O' Neill S D. Identification of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female (F) locus that enhance female sex expression in cucumber[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(3): 987-995.
- [10] Mibus H, Tatlioglu T. Molecular characterization and isolation of the *F/f* gene for femaleness in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(8): 1669-1676.
- [11] Knopf R R, Trebitsh T. The female-specific *CsACS1G* gene of cucumber. A case of gene duplication and recombination between the non-sex-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene and a branched-chain amino acid transaminase gene[J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(9): 1217-1228.
- [12] 叶波平, 吉成均, 杨玲玲, 等. 不同性别表型黄瓜基因组中雌性系特异的 ACC 合酶基因[J]. *植物学报*, 2000, 42(2): 164-168.
- [13] 程立宝, 秦智伟, 李淑艳, 等. 与黄瓜雌性性状连锁的 *cs-acs1g* 基因特异片段克隆与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2545-2550.
- [14] 邹晓艳, 李锡香, 沈镒, 等. 黄瓜性别决定相关基因在不同性别型黄瓜种质基因组中的分布[J]. *中国蔬菜*, 2008(1): 10-13.
- [15] 楼巧君, 陈亮, 罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(5): 749-752.
- [16] Kamachi S, Sekimoto H, Kondo N, et al. Cloning of a cDNA for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase that is expressed during development of female flowers at the apices of *Cucumis sativus* L.[J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(11): 1197-1206.
- [17] 赫然, 黄小乐, 刘秋云, 等. 快速制备水稻基因组DNA PCR模板的煮沸法[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1): 41-42.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平