



园艺学报  
*Acta Horticulturae Sinica*  
ISSN 0513-353X, CN 11-1924/S

## 《园艺学报》网络首发论文

题目: 黄瓜的一个中短果突变体基因的初步定位  
作者: 程凤, 宋蒙飞, 曹蕾, 张孟茹, 杨志歌, 陈劲枫, 娄群峰  
DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2021-0194  
收稿日期: 2021-02-23  
网络首发日期: 2021-06-17  
引用格式: 程凤, 宋蒙飞, 曹蕾, 张孟茹, 杨志歌, 陈劲枫, 娄群峰. 黄瓜的一个中短果突变体基因的初步定位. 园艺学报.  
<https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2021-0194>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 黄瓜的一个中短果突变体基因的初步定位

程 凤, 宋蒙飞, 曹 蕾, 张孟茹, 杨志歌, 陈劲枫, 娄群峰\*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘 要:** 中短果 (medium short-fruit) 突变体 *msf* 黄瓜为种植 ‘长春密刺’ 黄瓜自交系的过程中发现的一株自然突变材料, 表现为果实长度以及果把长度相对野生型偏短, 还表现出植株偏矮, 侧枝发育异常, 以及主茎脆弱等表型。通过石蜡切片和扫描电镜观察发现突变体果实长度的差异是由于细胞变小引起的。遗传分析发现  $F_2$  分离群体中野生型表型长果与突变体表型中短果的分离比符合孟德尔 3:1 遗传定律, 表明 *msf* 突变性状为单基因控制的隐性性状。BSA-seq (Bulked Segregant Analysis Coupled with Whole-Genome Sequencing) 集团分离分析法结合全基因组测序分析将候选基因定位于黄瓜基因组 1 号染色体 26.7~30.9 Mb 区域内。利用新构建的 437 株中短果和 ‘hazerd’ (欧洲温室型短果) 杂交  $F_2$  群体将基因定位在 28.4~29.8 Mb 之间的 1.4 Mb 区间内。结合 dCAPS 标记验证将 *CsaV3\_IG044310* 作为候选基因, 该基因编码拟南芥 II 形肌醇多磷酸 5-磷酸酶 (II 型 5PTase) 同源蛋白。通过基因定量表达和内源激素生长素和赤霉素的测定进一步表明该突变体中 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶表达缺陷可能引起激素水平的变化从而影响植株的生长发育。

**关键词:** 黄瓜; 果实长度; 突变体; 基因定位; II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶

**中图分类号:** S 642.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2021) 07

## Genetic Mapping for a Medium Short-fruit Mutant of Cucumber

CHENG Feng, SONG Mengfei, CAO Lei, ZHANG Mengru, YANG Zhige, CHEN Jinfeng,  
LOU Qunfeng\*

(College of Horticulture, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** We isolated a natural mutant, *msf* (medium short- fruit), from the cucumber inbred line CCMC, a North China type with long fruits. The mutant showed the phenotype of shorter fruit length and fruit neck length than the wild type and also showed short plant, abnormal development of lateral branches and fragile main stem. Through paraffin section and scanning electron microscope observation, it was found that the difference of mutant fruit length was caused by the change of cell size. Genetic analysis showed that the segregation ratio of wild-type phenotype long fruit and mutant surface type medium short fruit in  $F_2$  segregation population conformed to Mendel’s 3 : 1 genetic law. This indicated that *msf* mutation was a recessive trait controlled by a single gene. BSA-seq analysis showed that the candidate gene was located in a 26.7 - 30.9 Mb region of chromosome 1 of cucumber genome. The *msf* gene was mapped to a

**收稿日期:** 2021 - 02 - 23; **修回日期:** 2021 - 05 - 06

**基金项目:** 国家 “十三五” 重点研发计划子课题 (2016YFD0100204-25); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (20) 2019]

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qflou@njau.edu.cn)

28.4 - 29.8 Mb region using a F<sub>2</sub> population containing 437 individuals from a cross between *msf* and 'hazerd' (a European greenhouse-type inbred line with short fruit). *CsaV3\_1G044310* was identified as the candidate gene by genome-wide screening combined with dCAPS marker verification, which encodes a homologous protein of *Arabidopsis* type II inositol polyphosphate 5-phosphatase (type II 5ptase). The quantitative expression of gene and the determination of endogenous hormones auxin and gibberellin the mutant may cause the change of hormone levels and affect the growth and development of plant.

**Keywords:** cucumber; fruit length; mutant; gene mapping; type II inositol polyphosphate 5-phosphatase

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 果实的大小是影响其产量和商品外观品质的重要农艺性状, 也是商品果实分类的主要参考标准 (Qi et al., 2013)。黄瓜在长期的进化过程中, 在种间和种内形成了多种多样的果形 (Weng et al., 2015)。培育果形多样化的黄瓜新品种可以满足不同消费者的需求, 果形各异的黄瓜种质资源也是进行果形多样化品质育种的重要前提和保障。

黄瓜果实大小的遗传、定位及相关基因克隆已有若干研究报道 (Liu et al., 2020; Gao et al., 2020; Xu et al., 2020)。早期报道中, 有 Weng 等 (2015) 通过不同的群体以及统计不同果实发育时期获得了调控果实大小及形状的 12 个 QTL, 也有 Wei 等 (2014) 利用果实长度差异较大的自交系材料 CC3 和 NC76 杂交自交后获得的 F<sub>2</sub> 群体, 对商品瓜长度和成熟瓜长度进行 QTL 定位分析发现 8 个与商品瓜和成熟瓜长度相关的 QTL 位点。近几年关于黄瓜果实大小及形态进一步精细定位研究报道中, 有 Pan 等 (2017) 通过标记连锁分析综合不同的作图群体定位到控制圆形黄瓜基因, 其为番茄 *SUN* 的同源基因; 有 Xu 等 (2020) 通过 QTL-seq 快速定位黄瓜瓜把长短主效基因 *CsFnl7.1*, 其编码胚胎晚育蛋白; 也有 Zhao 等 (2019) 通过 150 份不同黄瓜果长材料进行序列分析鉴定出编码 MADS-box 家族基因 *CsFUL1* 调控黄瓜果实长度。由此可见, 以往黄瓜果实大小的研究中主要是 QTL 初定位为主, 其精细定位及相关基因研究被陆续展开并成为目前研究的主要方向 (Colle et al., 2017; Qi et al., 2020)。目前果实大小基因精细定位主要还是通过突变体材料进行的。其中 Xin 等 (2019) 利用 EMS 诱变获得短果突变体材料 *short fruit1*, 通过 BSA 测序结合 dCAPS 标记筛选确定调控基因 *SF1* 是编码功能性葫芦特定 RING 型 E3 连接酶, 其通过调控乙烯来调控黄瓜果实伸长。Zhang 等 (2020) 利用黄瓜短果自然突变体材料 *short fruit2* 同样通过 BSA 测序结合 dCAPS 标记进行基因分型定位基因 *SF2* 为编码拟南芥组蛋白脱乙酰基酶复合物 1 (HDC1) 同源蛋白, 其通过调控细胞增殖来调控黄瓜果长。

本研究中利用一个稳定遗传的中短果自然突变体, 采用 BSA-seq 技术将控制中短果的基因定位在 1 号染色体 26.7 ~ 30.9 Mb 区域, 结合 InDel 标记将基因定位于 1.4 Mb 的区域内, 结合 dCAPS 标记和 qRT-PCR 分析, 筛选出其候选基因 *CsaV3\_1G044310*, 该基因编码 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶。本文所获得的黄瓜中短果突变体材料具有果形变异特性, 果实长度基因的克隆为进一步明确调控黄瓜果实大小的分子机制和深入研究肌醇多磷酸酶对植物生长发育的调控机制提供一定的基础和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

华北型黄瓜高代自交系 '长春密刺' 和突变体 *msf* 均来自南京农业大学葫芦科作物遗传与种质

创新实验室。‘长春密刺’生长势强，茎粗，分枝明显，表现出长侧枝和多侧枝性状；果实粗细均匀，棍棒形，棱不明显，白刺，刺瘤紧密，商品瓜长 30 ~ 40 cm，属长果表型。

2016 年田间种植华北型黄瓜‘长春密刺’自交系的过程中发现一株果实长度相对偏短的突变体单株，多代自交得到稳定遗传的中短果突变体自交系。将‘长春密刺’和突变体进行杂交，得到  $F_1$  代， $F_1$  表型与‘长春密刺’相似，商品瓜也属于长果形。 $F_1$  自交得到 447 株  $F_2$  代，进行表型数据统计和遗传分析。利用‘hazed’（欧洲温室型短果）和突变体进行杂交后自交构建  $F_2$  群体，用于标记筛选。所有材料均种植于南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室的白马实验基地。

## 1.2 性状观察及遗传分析

对野生型和突变体果实长度和横径进行动态测量。对  $F_2$  群开花当天 0 d，开花后 12 d，开花后 28d 中果实的长度和横径进行测量，筛选 3 个时期果实长度变化一致的数据用 SPSS 软件处理。根据数据进行统计分析  $F_2$  群体中野生型表型单株与突变表型单株的分离比并进行卡方测验。

## 1.3 石蜡切片和扫描电镜观察

用锋利的灭菌刀片切取突变体和野生型黄瓜开花当天 0 d、开花后 16 d 和 22 d 的果实用作石蜡切片观察。采用常规石蜡制片法，沿瓜长及瓜径方向，切取 1.0 cm × 1.5 cm × 0.5 cm 的果实切块，用 FAA 固定液（70% 乙醇 90 mL + 冰醋酸 5 mL + 福尔马林 5 mL）固定，然后抽真空放置两周时间，制作石蜡切片，切片厚度大约为 8  $\mu$ m，用 Haematoxylin-Eosin (HE) 染色。使用 OLYMPUS BX53 荧光显微镜观察并照相。

切取突变体和野生型黄瓜开花后 16d 的果实进行扫描电镜观察分析。将果实用甲醛冲洗干净，去除表面的蜡粉，取最中间果实沿瓜长及瓜径方向，切成 2 mm × 5 mm 大小（做 3 组重复），然后快速放入 4% 戊二醛磷酸缓冲液（pH 6.8）中，抽真空，固定 3 d。最后利用 Hitachi S-3500N 扫描电子显微镜观察拍照。

## 1.4 BSA-seq 混池测序

用 CTAB 法提取野生型和突变体以及 447 株  $F_2$  代分离群体植株幼叶 DNA，在  $F_2$  群体中选取 25 个果实长度表现为野生型长果的个体 DNA 等量混合作为 WT-pool 和 24 个中短果表型个体 DNA 等量混合作为 *msf*-pool，采用 Illumina HiSeq2500 测序平台对两个亲本以及两个极端池进行全基因组重测序。为了保证信息分析质量需要对原始数据进行过滤：(1) 去除带接头的 reads pair；(2) 当单端测序 read 中含有的 N 的含量超过该条 read 长度比例的 10% 时，需要去除此对 paired reads；(3) 当单端测序 read 中含有的低质量 ( $Q \leq 5$ ) 碱基数超过该条 read 长度比例的 50% 时，需要去除此对 paired reads，最终获得 clean reads，比对参考基因组后进行变异检测和分析。选择亲本‘长春密刺’作为参考亲本，分别计算野生和突变子代池的 SNP-index（即 SNP 指数），完全与亲本相同的 SNP 指数为 0；完全与其不同的 SNP 指数为 1。为了去除背景噪音、减少测序错误比对错误等造成的影响和提高定位的效率，对 SNP 和 SNP 指数进行筛选和过滤，筛选和过滤标准如下：(1) 对于两个亲本，筛选两个亲本间纯合差异的位点；(2) 两个子代中 SNP 指数都小于 0.3，并且 SNP 深度都小于 7 的位点，过滤掉；(3) 一个子代 SNP 指数缺失的位点，过滤掉。同样的方法，筛选 InDel。

## 1.5 候选基因的遗传定位、序列分析、注释和鉴定

在 1 号染色体候选区域开发 InDel 标记，在亲本间筛选多态标记。为了鉴定候选 SNP，进行



dCAPS 标记的开发与验证, 使用在线软件 dCAPS FINDER 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) 进行 dCAPS 标记的设计。

采集野生型和突变体的幼嫩果实进行液氮速冻, 用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 使用 Prime Script<sup>TM</sup> RT 试剂盒 (TaKaRa) 按照制说明书步骤合成 cDNA。对来自突变体和野生型的候选基因编码序列进行测序。使用软件 DNAMAN 比对全长 cDNA 序列和相应的蛋白质序列。候选基因的功能注释获自 Cucumber Genome Database (<http://cucurbitgenomics.org/>) 和 NCBI (国家生物技术信息中心) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

## 1.6 实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

选择的植物组织包括野生型和突变体植物在相同生长阶段的根、茎、叶、花和果实。根据候选基因编码序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物。在 Bio-Rad iQ1 实时 PCR 系统 (Bio-Rad) 中用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒 (TaKaRa) 进行定量实时 PCR, 设置 3 次重复。使用  $\Delta C_t$  方法分析相对 mRNA 表达数据。

## 1.7 内源激素生长素和赤霉素测定

开花后 12 d, 取种植在相同条件下的野生型和突变体材料的茎、叶、花和果实 (每个样本取 3 个重复), 利用酶联免疫法 (ELISA) 进行生长素和赤霉素激素含量的测定, 每组处理设置 3 个重复。

# 2 结果与分析

## 2.1 中短果突变体 *msf* 表型观察及测定

田间观察 (图 1) 发现, 中短果突变体 *msf* 相对于其 ‘长春密刺’ 野生型 (WT) 果实长度和果把长度都明显变短, 植株也表现出茎相对脆弱, 叶片相对厚实, 侧枝发育受到抑制, 特别是植株上部表现出无侧枝现象, 植株相对偏矮。



图 1 黄瓜 ‘长春密刺’ 野生型 (WT) 和中短果突变体 (*msf*) 果实表型特征

Fig. 1 Phenotypic characteristics of wild type and *msf* mutant

为了分析果实长度突变体的果形特征, 对 WT 和 *msf* 整个生长周期的果实长度和横径进行动态测定。由图 1 可见, 中短果 *msf* 在子房时期 (开花当天 0 d) 就短于野生型, 果实相对较粗, 呈椭圆形, 果把相对较短。由图 2 可见, 野生型和突变体果实长度和横径变化过程都呈现典型的 S 曲线, 开花前 4 d 到开花后 4 d 都增加非常缓慢, 开花后 4 ~ 12 d 增长快速, 野生型和突变体差距显著, 12 d 后增长速度趋向于平缓, 16 d 后更为缓慢, 22 d 左右呈现出野生型和突变体的最终差异。

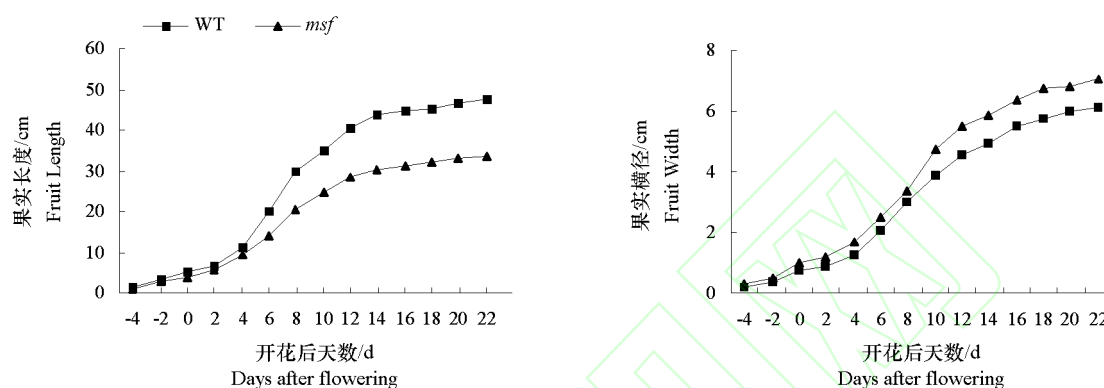


图 2 黄瓜 ‘长春密刺’ 野生型 (WT) 和中短果突变体 (*msf*) 果实长度和横径  
 Fig.2 Fruit length and width of wild type and *msf* mutant

## 2.2 石蜡切片观察

为了从细胞层面明确果实表型差异的原因, 分别对野生型 WT 和中短果突变体 *msf* 开花 0 d, 16 d 和 22 d 这 3 个有代表性的时期的果实进行石蜡切片观察和统计。由图 3 可见, 3 个时期果实纵切切片, 中短果突变体细胞相对于野生型较小; 统计单位面积细胞数, 开花当天 (0 d) 差异不明显, 但是花后 16 d 和 22 d 差异显著, 这与果实长度增长曲线结果相吻合; 3 个时期果实横切切片细胞大小与野生型差异并不显著。

## 2.3 扫描电镜观察

开花后 16 d (即果实生长基本停滞的时期), 对果实表皮细胞以及果肉横切面细胞进行扫描电镜观察。结果 (图 4) 显示, 野生型果实表皮细胞大小和突变体差异明显, 相同视野内突变体细胞数明显增多, 细胞相对较小, 说明果实长度的差异可能是由细胞大小决定的。同时也观察到突变体果肉横切面相同视野内突变体细胞数与野生型差异不显著, 该结果也与石蜡切片结果相一致。

## 2.4 遗传分析

为了明确中短果突变体的遗传特性, 将中短果突变体 *msf* 和野生型 WT 进行杂交, 得到  $F_1$  随后自交得到 447 株  $F_2$  代植株进行性状统计分析。如表 1 所示,  $F_1$  代 40 株个体均表现为长果, 与野生型相同。在 447 株  $F_2$  群体中, 339 株表现为长果表型, 108 株为中短果表型, 经卡方测验 ( $\chi^2 = 0.17$ ,  $P = 0.68$ ), 符合孟德尔的 3:1 遗传定律, 表明此中短果突变体受单个隐性基因控制。

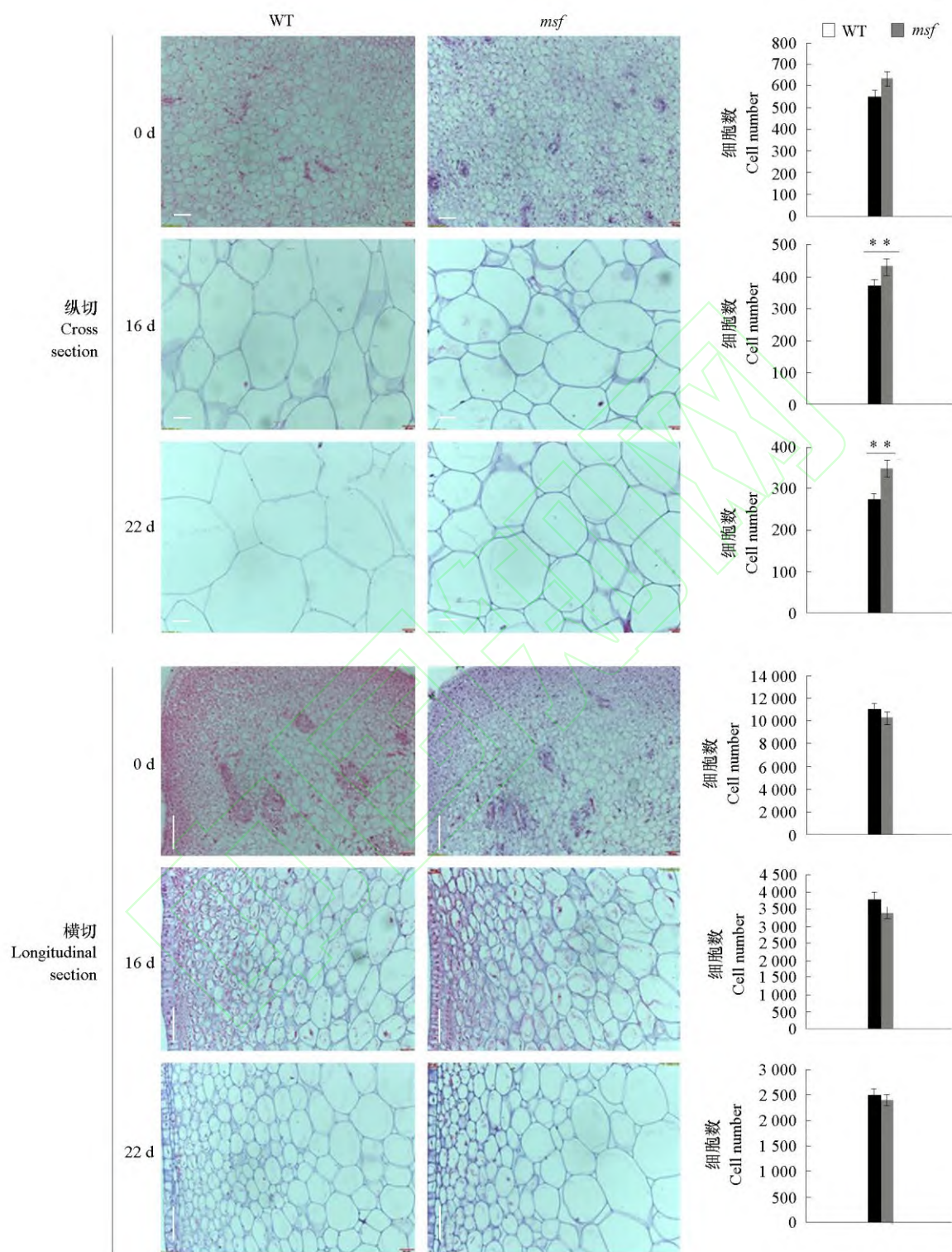


图3 黄瓜‘长春密刺’野生型(WT)和突变体(*msf*)开花后不同时期果实细胞大小的石蜡切片观察

\*\*\*表示与WT在0.01概率水平上的显著差异。比例尺为20  $\mu$ m。

Fig. 3 Observation of paraffin sections of fruit cell size in wild type (WT) and mutant (*msf*) at different stages after flowering

\*\*\* indicates significant difference from WT at the 0.01 probability level. Scale bars represent 20  $\mu$ m.



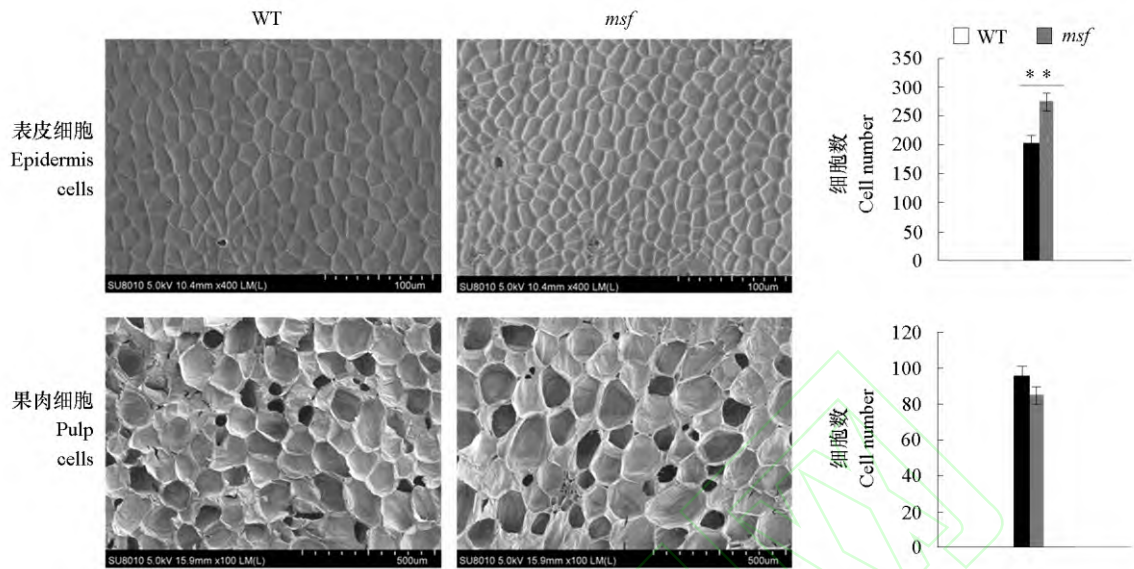


图 4 黄瓜 ‘长春密刺’ 野生型 (WT) 和突变体 (*msf*) 花后 16d 果实表皮和果肉细胞的扫描电镜观察  
Fig. 4 Scanning electron microscope observation of epidermis cells and pulp cells in wild type (WT) and mutant (*msf*) fruit at 16d after flowering

表 1 中短果突变体和野生型黄瓜的表型数据统计  
Table 1 Phenotypic data for short fruit mutant and wild-type cucumber

群体 Population	总株数 Total	长果株数 Long fruit	中短果株数 Medium Short fruits	期望比 Expected ratio	$\chi^2$ Chi-square	P P value
P1 (WT)	20	20	0			
P2 ( <i>msf</i> )	20	0	20			
F1	40	40	0			
F2	447	339	108	3: 1	0.17	0.68

2.5 中短果 *msf* 基因候选区间的确定

通过 BSA 混池测序,野生型和突变体 DNA pool 分别获得约 85 M reads 和 79 M reads。使用 9930 参考基因组 (V3.0) 序列作为参考序列,将子代混池数据与其进行比较获得全基因组范围内的 SNP 和 InDel, 共获得 495 508 个 SNPs 和 109 843 个 InDels。通过计算 SNP-index 值来进行性状定位,选择亲本 ‘长春密刺’ 作为参考亲本,分别计算野生子代和突变子代池的 SNP-index (即 SNP 的频率)。为了直观体现二者间差异的区域,计算两个子代 All-index 的差值:  $\Delta(\text{All-index}) = \text{Allindex}(\text{msf-pool}) - \text{Allindex}(\text{WT-pool})$ 。默认选择 1 Mb 为窗口,1 kb 为步长,计算每个窗口中  $\Delta(\text{All-index})$  的平均值来反应  $\Delta(\text{All-index})$  分布,选取 95% 和 99% 置信水平作为阈值线,置信水平以上的窗口为候选区间。根据两个子代 delta (All-index) 在 7 条染色体上的分布图 (图 5, A),初步确定中短果突变体 *msf* 基因的候选区间位于黄瓜基因组 1 号染色体 26.7 ~30.9 Mb 区域 (图 5, B)。通过构建的 ‘hazerd’ 与中短果杂交的 F<sub>2</sub> 群体进行标记筛选,最终将候选区域定位在标记 InDel-93 和标记 InDel-33 之间,也就是 28 455 439 和 29 870 851 之间的 1.4 Mb 区间内 (图 5, C)。



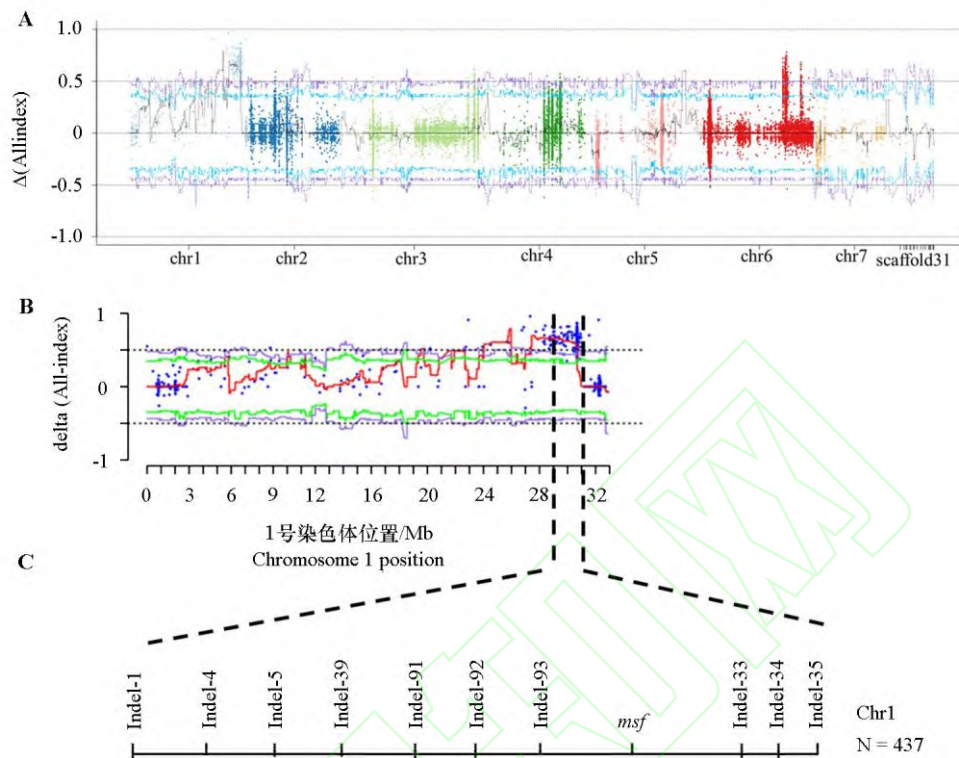


图 5 *msf* 基因定位

A: 两个子代混池 delta (All-index) 在 7 条染色体上的分布; (每一个点代表一个 SNP 位点, 不同染色体间用不同颜色区分; 黑色的线是 SNP-index 均值线, 蓝色的线为 95% 阈值线, 紫色的线为 99% 阈值线); B: 两个子代混池 delta (All-index) 在 1 号染色体上的分布; (每一个点代表一个 SNP 位点, 红色的线是 SNP-index 均值线, 绿色的线为 95% 阈值线, 紫色的线为 99% 阈值线); C: 利用 437 株 *msf* 和 ‘hazerd’ 构建的 F<sub>2</sub> 群体在 1 号染色体定位 *msf* 基因。

Fig. 5 Mapping of the *msf* gene

A: Distribution of delta (All-index) in two pools on seven chromosomes. (Each point represents a SNP site, and different chromosomes are distinguished by different colors; the black line is the SNP-index mean line, the blue line is the 95% threshold line, and the purple line is the 99% threshold line); B: Distribution of delta (All-index) in two pools on chromosome 1. (Each point represents a SNP site, the red line is the SNP-index mean line, the green line is the 95% threshold line, and the purple line is the 99% threshold line);

C: The *msf* gene was mapped to a region on chromosome 1 in an F<sub>2</sub> population containing 437 individuals from a cross between *msf* and ‘hazerd’.

## 2.6 候选基因的预测及鉴定

在候选区间挑选两个子代在 SNP-index 或 InDel-index 差异显著的 SNP 或 InDel 位点, 即挑选突变体池 SNP-index 或 InDel-index 大于等于 0.9, 且野生型池 SNP-index 或 InDel-index 小于等于 0.3 的位点, 结合两个亲本的重测序结果, 筛选候选区间内发生纯合变异的位点, 获得 13 个候选位点, 见 (表 2)。其中 SNP29567774 外显子区域的突变导致氨基酸从谷氨酰胺 (Q) 到谷氨酸 (E) 的变化, 该位点导致了非同义突变, 可作为本突变体的候选位点。为了进一步确定候选基因, 设计了 dCAPS 标记对 447 株 ‘长春密刺’ WT 与中短果突变体 *msf* 构建的 F<sub>2</sub> 群体进行基因分型。结果显示 SNP29567774 突变体位点与突变体表型共分离。

表 2 黄瓜 1 号染色体目标区域内的候选位点  
Table 2 Candidate loci in the target region on chromosome 1

位置/bp POS	参考基因组 REF	碱基		SNP 指数		类型 Category	氨基酸变化 Amino acid change
		野生型 WT	变异 ALT	野生池 WT-pool	突变池 <i>msf</i> -pool		
28 730 253	T	T	A	0.28	0.96	基因间 Intergenic	
28 790 458	A	A	T	0.28	0.91	上游 Upstream	
29 026 627	G	G	C	0.25	1	基因间 Intergenic	
29 045 423	G	G	A	0.23	0.93	基因间 Intergenic	
29 057 944	C	C	T	0.21	0.96	基因间 Intergenic	
29 114 093	T	T	G	0.29	0.97	基因间 Intergenic	
29 380 231	G	G	A	0.26	0.92	基因间 Intergenic	
29 440 371	C	C	G	0.25	0.9	内含子 Intronic	
29 501 452	G	G	A	0.19	1	内含子 Intronic	
29 567 774	G	G	C	0.27	1	外显子 Exonic	谷氨酰胺到谷氨酸 Q to E
29 647 321	G	G	A	0.26	0.9	基因间 Intergenic	
29 765 691	G	G	A	0.25	0.96	内含子 Intronic	
29 825 348	A	A	C	0.24	0.95	基因间 Intergenic	

2.7 候选基因的定量表达和结构分析

根据黄瓜基因组数据库和基因注释结果 SNP29567774 位于基因 *CsaV3\_1G044310* 中, 其编码 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶。在突变体 *msf* 和 WT 相同生长阶段的根、茎、叶、花和果实中进行候选 *CsaV3\_1G044310* 基因的 qRT-PCR 分析 (图 6), 该基因在野生型和突变体中差异表达, 特别是在茎、花、果实和根中突变体的该基因表达量显著低于野生型。

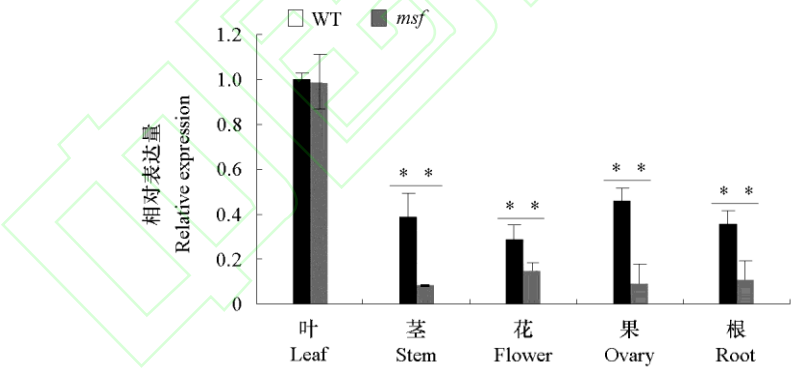


图 6 黄瓜 ‘长春密刺’ 野生型 (WT) 和突变体 (*msf*) 不同组织中候选基因 *CsaV3\_1G044310* 的相对表达量  
Fig. 6 Relative expression level of *CsaV3\_1G044310* in different tissues of WT and *msf* plant

\*\*  $P < 0.01$ .

对野生型和突变体中的候选基因 *CsaV3\_1G044310* 进行测序以及序列比对, 如图 7 所示, 突变体在第 9 个外显子上发生了一个碱基突变 (图 7, A), 导致第 845 位氨基酸从谷氨酰胺 (Q) 到谷氨酸 (E) 的变化, 该突变是发生在肌醇多磷酸 5-磷酸酶的催化结构域上 (图 7, B)。

2.8 内源激素含量的测定

由图 8 可知, 突变体 *msf* 茎、叶、花、果实中生长素含量明显高于野生型 WT, 其中果实中含量的差异更大。突变体各组织中赤霉素的含量相对低于野生型, 其中茎中含量的差异更大。说明突

变体中 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶的缺陷表达可能导致植物组织中激素的变化从而造成表型缺陷特别是茎和果实。

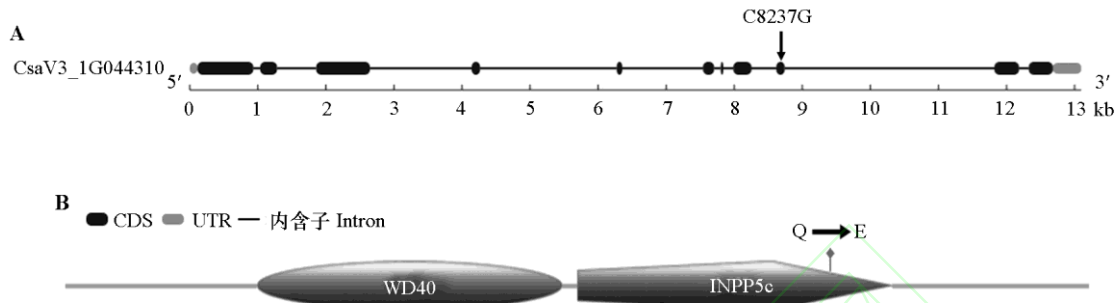


图7 候选基因结构图(A)和蛋白结构域(B)

箭头为突变位置。

Fig. 7 Candidate gene structure (A) and protein domain (B)

The arrow is the position of mutation.

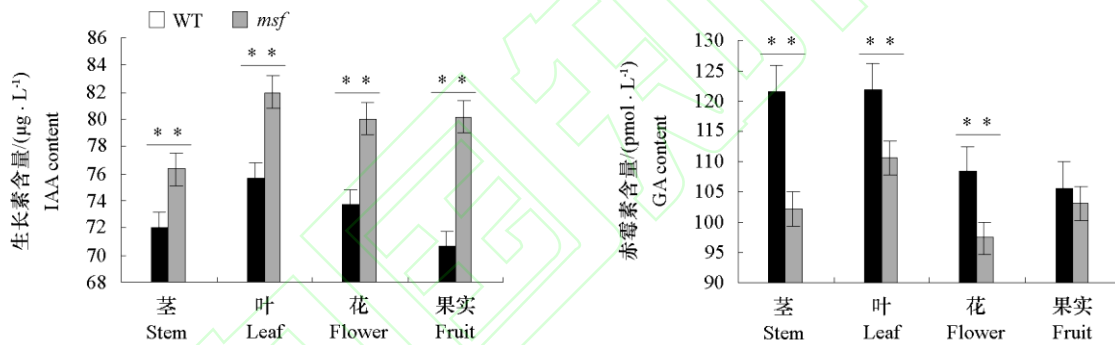


图8 黄瓜‘长春密刺’野生型(WT)和突变体(*msf*)不同组织中生长素和赤霉素的含量

Fig. 8 Endogenous IAA and GA content in different tissues of WT and mutant *msf* plants

\*\*  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

本研究中利用黄瓜自然中短果突变体材料,通过BSA混池测序将控制突变的基因定位到1号染色体上,结合相关的标记、基因序列比对以及基因定量表达的相关结果将 *CsaV3\_1G044310* 作为其候选基因,是拟南芥编码编码 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶 FRAGILE FIBER3 (FRA3) 的同源基因。

已知酵母和动物中的 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶 (5PTase) 可调节磷酸肌醇的水平,磷酸肌醇影响多种细胞活动,是重要的信号分子,可调节多种细胞功能例如信号转导、囊泡运输、肌动蛋白组织、细胞膨大和增殖 (Whisstock et al., 2002; Chen et al., 2017)。但是在植物中,关于参与磷酸肌醇水解的磷酸酶知之甚少。在拟南芥中已鉴定出 *FRAGILE FIBER3* (FRA3) 基因编码 II 型 5PTase,在纤维细胞和木质部血管的次生壁合成中起重要作用。该 *FRA3* 突变中断肌动蛋白的组织 and 次级壁的合成而导致次生壁厚显着减少,茎秆强度随之降低 (Zhong et al., 2004)。本研究中黄瓜中短果突变体也表现出茎秆脆弱,这与拟南芥 *fra3* 突变表型相似。在水稻中 *DWARF50* 编码 II 型 5PTase 的

突变会诱导 IM 薄壁细胞中细胞壁果胶的不规则积累和异常细胞分裂导致节间变短的矮化表型 (Sato-Izawa et al., 2012)。在玉米中 *brevis plant1* (*BV1*) 编码 II 型 5PTase, 调节玉米茎伸长导致节间缩短 (Avila et al., 2016)。本研究中根据组织细胞的观察可知突变体果实长度的变短可能是由细胞变小导致的, 而在玉米及水稻突变体中 II 型 5PTase 的突变也是通过调控茎的细胞分裂和细胞伸长最终导致了植株节间变短的矮化表型。

近些年植物多磷酸肌醇激酶及磷酸肌醇信号通路的研究揭示了植物磷酸肌醇信号通路中的许多组分及代谢产物参与了生长素信号的传导, 从而调控植物生长发育。在拟南芥中, At5PTase13 通过调节生长素稳态来调节拟南芥子叶维管发育, 突变体改变了植物生长素的积累和分布以及几个植物生长素生物合成和运输相关基因的表达 (Lin et al., 2005)。玉米 *bv1* 突变体相对于野生型, 节间可能具有不同的磷酸肌醇丰度, 而且有生物活性的生长素可能分布不均, 持平或超过野生型水平, 并且转录组分析中也发现生长素应答基因上调 (Avila et al., 2016)。而在本研究中也发现, 在突变体中 II 型肌醇多磷酸 5-磷酸酶 (5PTase) 表达缺陷后, 植株各组织中生长素的含量却相对于野生型升高, 这也说明 II 型 5PTase 可能也影响了生长素的分布和极性运输从而影响生长素相关的细胞扩增, 最终产生突变体在茎、侧枝和果实发育上的缺陷。赤霉素 (GA) 是最重要的植物激素之一, 在整个生命周期中调节着植物的发育, 包括种子发芽, 枝条和根系伸长, 开花时间和花粉成熟 (Daviere & Achard, 2013)。GA 突变体在发育的早期就已经使其生长发育受到阻碍, 并且这些突变会影响器官的大小 (Wang et al., 2013; Chen et al., 2014)。赤霉素相关缺陷更多的是导致植株变矮。本研究中突变体各组织中赤霉素的含量相对野生型有所降低, 特别是茎中, 这可能说明肌醇多磷酸或磷酸肌醇信号传导可能对于赤霉素调控植物生长发育中特别是茎伸长具有一定作用。

II 型 5PTase 在植物上的研究偏少, 在黄瓜果实发育上相关研究更是鲜有报道。本研究相关结果对于进一步明确调控黄瓜果实大小的分子机制和深入研究肌醇多磷酸酶对植物生长发育的调控机制提供一定方向性和理论依据。

## References

- Avila L M, Cerrudo D, Swanton C, Lukens L. 2016. *Brevis plant1*, a putative inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for internode elongation in maize. *Journal of Experimental Botany*, 67 (5): 1577 - 1588.
- Che G, Zhang X. 2019. Molecular basis of cucumber fruit domestication. *Current Opinion in Plant Biology*, 47: 38 - 46.
- Chen Y, Hou M, Liu L, Wu S, Shen Y, Ishiyama K, Kobayashi M, McCarty D R, Tan B C. 2014. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiology*, 166 (4): 2028 - 2039.
- Chen Y, Yang Q, Sang S, Wei Z, Wang P. 2017. Rice Inositol Polyphosphate Kinase (*OsIPK2*) Directly Interacts with *OsIAA11* to Regulate Lateral Root Formation. *Plant Cell Physiology*, 58 (11): 1891 - 1900.
- Colle M, Weng Y, Kang Y, Ophir R, Sherman A, Grumet R. 2017. Variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit size and shape results from multiple components acting pre-anthesis and post-pollination. *Planta*, 246 (4): 641 - 658.
- Daviere J M, Achard P. 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140: 1147 - 1151.
- Gao Zhihui, Zhang Haiyang, Cao Chenxing, Han Jing, Li Hao, Ren Zhonghai. 2020. QTL Mapping for Cucumber Fruit Size and Shape with Populations from Long and Round Fruited Inbred Lines. *Horticultural Plant Journal*, 6 (3): 132 - 144.
- Lin W H, Wang Y, Mueller-Roeber B, Brearley C A, Xu Z H, Xue H W. 2005. *At5PTase13* modulates cotyledon vein development through regulating auxin homeostasis. *Plant Physiology*, 139 (4): 1677 - 1691.
- Liu Xing-wang, Zhai Xu-ling, Zhang Ya-qi, Yin Shuai, Feng Zhong-xuan, Ren Hua-zhong. 2020. A Review on Genetic and Molecular Biology of



- Fruit Morphogenesis in Cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (9): 1793 – 1809. (in Chinese)
- 刘兴旺, 翟许玲, 张亚琦, 尹帅, 冯钟萱, 任华中. 2020. 黄瓜果实形态建成的遗传及分子基础研究进展. *园艺学报*, 47 (9): 1793 – 1809.
- Pan Y, Liang X, Gao M, Liu H, Meng H, Weng Y, Cheng Z. 2017. Round fruit shape in WI7239 cucumber is controlled by two interacting quantitative trait loci with one putatively encoding a tomato *SUN* homolog. *Theoretical and Applied Genetics*, 130 (3): 573 – 586.
- Qi J, Liu X, Shen D, Miao H, Xie B, Li X, Zeng P, Wang S, Shang Y, Gu X, Du Y, Li Y, Lin T, Yuan J, Yang X, Chen J, Chen H, Xiong X, Huang K, Fei Z, Mao L, Tian L, Staller T, Renner S S, Kamoun S, Lucas W J, Zhang Z, Huang S. 2013. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature Genetics*, 45 (12): 1510 – 1515.
- Qi Xiaohua, Zhu Yamei, Li Shuifeng, Zhou Hanxi, Xu Xuewen, Xu Qiang, Chen Xuehao. 2020. Identification of Genes Related to Mesocarp Development in Cucumber. *Horticultural Plant Journal*, 6 (5): 293 – 300.
- Sato-Izawa K, Nakaba S, Tamura K, Yamagishi Y, Nakano Y, Nishikubo N, Kawai S, Kajita S, Ashikari M, Funada R, Katayama Y, Kitano H. 2012. *DWARF50(D50)*, a rice (*Oryza sativa* L.) gene encoding inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for proper development of intercalary meristem. *Plant Cell Environ*, 35 (11): 2031 – 2044.
- Wang Y, Deng D, Ding H, Xu X, Zhang R, Wang S, Bian Y, Yin Z, Chen Y. 2013. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant *Dwarf11 (D11)* mutant phenotype: physiological and transcriptomic evidence. *PLoS One*, 12;8 (6): e66466.
- Wei Q, Wang Y, Qin X, Zhang Y, Zhang Z, Wang J, Li J, Lou Q, Chen J. 2014. An SNP-based saturated genetic map and QTL analysis of fruit-related traits in cucumber using specific-length amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Genomics*, 15 (1): 1158.
- Weng Y, Colle M, Wang Y, Yang L, Rubinstein M, Sherman A, Ophir R, Grumet R. 2015. QTL mapping in multiple populations and development stages reveals dynamic quantitative trait loci for fruit size in cucumbers of different market classes. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (9): 1747 – 1763.
- Whisstock J C, Wiradajaja F, Waters J E, Gurung R. 2002. The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life*, 53 (1): 15 – 23.
- Xu Jing, Pan Yu-peng, Chen Zhi-hui. 2020. Mechanism analysis of fruit size regulating genes *CsSUN* and *CsLNG1* in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (11): 53 – 62. (in Chinese)
- 徐婧, 潘玉朋, 程智慧. 2020. 黄瓜 *CsSUN* 和 *CsLNG1* 调控果实大小的机理分析. *园艺学报*, 47 (11): 53 – 62.
- Xin T, Zhang Z, Li S, Zhang S, Li Q, Zhang Z H, Huang S, Yang X. 2019. Genetic Regulation of Ethylene Dosage for Cucumber Fruit Elongation. *The Plant Cell*, 31 (5): 1063 – 1076.
- Xu X, Wei C, Liu Q, Qu W, Qi X, Xu Q, Chen X. 2020. The major-effect quantitative trait locus *Fnl7.1* encodes a late embryogenesis abundant protein associated with fruit neck length in cucumber. *Plant Biotechnology Journal*, 18 (7): 1598 – 1609.
- Zhang Z, Wang B, Wang S, Lin T, Yang L, Zhao Z, Zhang Z, Huang S, Yang X. 2020. Genome-wide Target Mapping Shows Histone Deacetylase Complex1 Regulates Cell Proliferation in Cucumber Fruit. *Plant Physiology*, 182 (1): 167 – 184.
- Zhao J, Jiang L, Che G, Pan Y, Li Y, Hou Y, Zhao W, Zhong Y, Ding L, Yan S, Sun C, Liu R, Yan L, Wu T, Li X, Weng Y, Zhang X. 2019. A functional allele of *CsFUL1* regulates fruit length through repressing *CsSUP* and inhibiting auxin transport in Cucumber. *The Plant Cell*, 31 (6): 1289 – 1307.
- Zhong R, Burk D H, Morrison WH 3rd, Ye Z H. 2004. FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *The Plant Cell*, 16 (12): 3242 – 3259.