

不同性别类型黄瓜 ACC 合酶基因的 单核苷酸多态性标记和酶切扩增长度多态性标记 *

向太和 ** 王利琳 庞基良 胡江琴 申屠连峰 吴 锴

(杭州师范学院生命科学院, 杭州 310036)

摘要 黄瓜的性别分化与乙烯密切相关, 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合酶是乙烯生物合成过程中的关键酶. 根据 ACC 合酶基因家族的保守序列设计 PCR 引物, 从 8 个不同性别类型 (雌雄同株、强雌性和全雌性) 黄瓜品种中克隆了长度为 1 188 bp 的 ACC 合酶基因 (*CS-ACS2*) 片段 (GenBank 登记号为: DQ115884~DQ115886 和 DQ115875~DQ115879). 经测序分析, 3 个雌雄同株性别类型品种的序列完全相同. 与之相比, 5 个强雌性和全雌性品种中存在 8 个单核苷酸多态性 (SNPs) 标记, SNPs 标记为 4 个 A↔G 和 4 个 T↔C 之间的转换. 在 8 个 SNPs 中, 有 1 个 SNP 位于内含子区域, 其余 7 个 SNPs 都位于外显子区域. 在 7 个位于外显子区域的 SNPs 中, 有 3 个为非编码区的 SNPs, 4 个为 cSNPs. 而在 4 个 cSNPs 中, 有 3 个导致了编码的氨基酸序列改变. 研究结果表明, 与雌雄同株性别类型相比, 雌性系中均存在单核苷酸的变异, 这提示 ACC 合酶基因 *CS-ACS2* 的单核苷酸变异可能与黄瓜雌性系的发生形成有关. 另一方面, 根据 SNP 多态性还发展了一个酶切扩增长度多态性 (CAPS) 标记 C-MT700. 利用 CAPS 标记 C-MT700 能将强雌性优良品种 MT-705 与其他黄瓜品种相区别, 该标记在黄瓜育种生产上具有一定的应用价值. 此外, 研究获得的 SNPs 标记和 CAPS 标记丰富了黄瓜的分子标记种类.

关键词 黄瓜, 性别类型, 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合酶基因, 单核苷酸多态性 (SNP), 酶切扩增长度多态性 (CAPS)
学科分类号 Q943.2, S642.2

黄瓜不仅是重要的蔬菜作物, 而且黄瓜性别表现复杂多样, 也是研究植物性别决定和分化的良好实验材料. 黄瓜性别类型主要有雌雄同株异花 (monoecious)、全雌株 (gynoecious)、全雄株 (androdioecious)、两性株 (hermaphroditic)、雄花两性花同株 (andromonoecious)、雄花、雌花及两性花同株 (trimonoecious) 等不同的性别表现类型^[1,2].

据证实, 黄瓜的性别决定与乙烯密切相关, 乙烯被称为黄瓜的“性激素”, 因此研究乙烯的合成和乙烯信号转导途径对黄瓜性别控制有非常重要的意义^[3,4]. 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合酶是乙烯生物合成过程中的关键酶, 其控制基因是一个基因家族^[5]. 1997 年 Trebitsh 等^[6]首次从黄瓜中克隆了 ACC 合酶基因 *CS-ACS1*. 随后, Kamachi 等和 Shiomi^[7,8]报道利用简并引物从黄瓜中扩增出另外 3 个 ACC 合酶基因——*CS-ACS2*、*CS-ACS3* 和 *CS-ACS4*. 对于 *CS-ACS1* 基因, Trebitsh 等^[6]和叶波平等^[9,10]分别报道从雌性系中扩增出的 *CS-ACS1G* 是黄瓜雌性系的标记基因, 并认为 *CS-ACS1* 基因

与黄瓜性别决定位点 *F* 紧密连锁. Mibus 和 Tatlioglu^[11]进一步研究发现 *F* 位点编码一个单独的 *CS-ACS1G* 拷贝, 并且 *CS-ACS1G* 与 *CS-ACS1* 的差别主要在启动子区域. 对于 *CS-ACS2* 基因, Kamachi 等^[7]研究发现, 与雌雄同株性别类型相比, *CS-ACS2* 在雌性系中的表达强度要强、时间要早. Mathooko 等^[9]通过 Northern 杂交表明 *CS-ACS2* 基因的表达量和表达时间与乙烯诱导纯雌株的第一雌花出现密切相关. Yamasaki 等^[12]认为, *CS-ACS2* 可能与黄瓜性别决定的另一位点 *M* 紧密连锁, 但目前人们对 *CS-ACS2* 在黄瓜雌雄花中表达的差异还无法给出合理的解释.

在生产上, 黄瓜雌花节位的多少和高低是影响产量的主要因素. 黄瓜雌性系具有丰产、瓜密等优点. 并且, 利用雌性系制备杂种一代无需人工除雄和授粉, 节约劳动力、降低制种成本、且杂种纯度

*浙江省自然科学基金资助项目 (Y304083).

** 通讯联系人. Tel: 0571-28865327, E-mail: xthcn@163.com

收稿日期: 2005-10-31, 接受日期: 2005-11-30

高.但在种子生产和经营中，不同性别类型黄瓜品种种子外形十分相似，肉眼难以区别，只有到开花期方能从花的形态上对雌性系进行判断和鉴定^[13,14].

综上所述，在理论上，有必要进一步明确和探讨 ACC 合酶基因与黄瓜雌花决定的相关性.在生产实践中，有必要寻找快速精确鉴定不同性别、尤其是雌性系黄瓜品种的分子标记方法.

本研究选择了我国生产上应用的 8 个不同性别类型 (雌雄同株、强雌性和全雌性) 黄瓜品种，依据前人报道的 ACC 合酶基因保守序列设计引物，从 8 个不同性别类型黄瓜品种基因组 DNA 克隆

ACC 合酶基因，并进行序列分析，寻找与 ACC 合酶基因相关的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 标记，为进一步探讨 ACC 合酶基因与黄瓜性别决定之间的相关性，揭示黄瓜性别决定分子机理提供基础，并丰富黄瓜的分子标记种类，同时，获得鉴定黄瓜雌性系的分子标记.现将研究结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的黄瓜品种及性别类型见表 1.

Table 1 Cultivars and sexual phenotypes of cucumber in the experiment

Number	Cultivar	Sexual phenotype	Origin
1	Jinchun No.4	Monoecious	Tianjin Cucumber Research Institute
2	Zaofeng No.1	Monoecious	Dalian Vegetable Seed Company
3	Zhongnong No.8	Monoecious	Shanghai Vegetable Seed Company
4	Qiuci No.1	Subgynoecious	Hangzhou Hangfeng Vegetable Research Institute
5	MT705	Subgynoecious	J & V Company in USA
6	MT700	Gynoecious	J & V Company in USA
7	Zhongnong No.5	Subgynoecious	Institute of Vegetable Crops and Flowers of CAAS
8	Zhongnong No.203	Gynoecious	Institute of Vegetable Crops and Flowers of CAAS

1.2 DNA 的提取

黄瓜基因组 DNA 的提取参照向太和等的方法^[15].

1.3 PCR 扩增

下载 GenBank 中 ACC 合酶基因家族序列 (GenBank 登记号：U59813、AB006803、AB032938 和 AB006804.1 等)，通过 Blastn 分析确定保守序列，再根据保守序列用 Primer3 软件设计 2 组引物分别用于扩增 CS-ACS1 和 CS-ACS2 基因. 2 组引物序列是 P-ACS1：5′ GGAATTATGCA-GATGGGTCTTG 3′ 和 5′ AGAGCGAAGCTGG-ACATTTT 3′ 以及 P-ACS2：5′ CACTCGGAACG-GTTTACGAT 3′ 和 5′ AGCCCCTTAAGTTTCCCA-AA 3′，引物由上海 Sangon 公司合成. PCR 扩增反应体积为 100 μl，其中包括 0.2μl 10 mmol/L 的 dNTP 混合物 (美国 Promega 公司产品)，2 μl 0.1 μmol/L 的 PCR 引物，5 U Easy-A High-fidelity PCR cloning enzyme (美国 Stratagene 公司产品) 和约 0.2 μg 基因组 DNA.用美国 PE9600 型 DNA 扩增仪进行扩增反应. PCR 反应程序为：94℃ 5 min

变性后，按 94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 90 s 的设置进行 30 个循环，反应结束后在 72℃ 下延伸 10 min，随后于 4℃ 保存备用.扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V/cm)，溴化乙锭(EtBr) 染色，用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录.

1.4 PCR 产物的克隆和测序

PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳后，用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海 Sangon 公司产品)提取和纯化.纯化后的 DNA 连接到测序载体 pMD18-T (日本 TaKaRa 公司产品).采用冻融法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，将转化后的菌液在含 50 mg/L Amp 和 X-gal 及 IPTG 的 LB 筛选平板上筛选阳性克隆.用无菌牙签挑取白色单菌落接种于含 50 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中繁殖，碱裂解法提取质粒，质粒用 EcoR I 和 Sal I 双酶切电泳鉴定.阳性克隆用 UNIQ-10 柱式质粒抽提试剂盒 (上海 Sangon 公司产品) 提取质粒 DNA 后送交上海华诺生物技术有限公司，用 ABI377 型 DNA 测序仪测定序列.首先利用 M13 正反向通用引物测定克

隆的序列. 为了确保测定序列的正确, 根据测定的序列再设计引物 5' AGTTTCTAATCCTGGTGATG 3'对克隆的序列进行验证测定, 最后重叠拼接成完整序列.

1.5 SNP 分析和 CAPS 标记的获得

与国际核酸数据库联网, 对测定的序列进行 Blastn 和 Blastx 分析; 利用 ORFinder 软件分析测定序列的开放阅读框(ORF); 利用 ClustalW 软件对测定的 DNA 序列和 DNA 编码的氨基酸序列进行分析, 获得 SNP 标记; 利用 DNASTar 软件分析 DNA 序列含有的限制性核酸内切酶位点, 根据分析结果选用相关的内切酶对 PCR 产物进行酶切和电泳分析, 获得酶切扩增长度多态性 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 标记.

2 结果与分析

2.1 ACC 合酶基因的克隆和序列测定

引物 P-ACS2 对 8 个不同性别类型黄瓜品种基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 均能扩增出非常清晰的单一条带, 并且 8 个条带大小相同, 经 3 次重复, 结果稳定一致 (图 1). 而引物 P-ACS1 虽然经过多达 5 次条件优化的 PCR 扩增, 但均未扩增出任何条带.

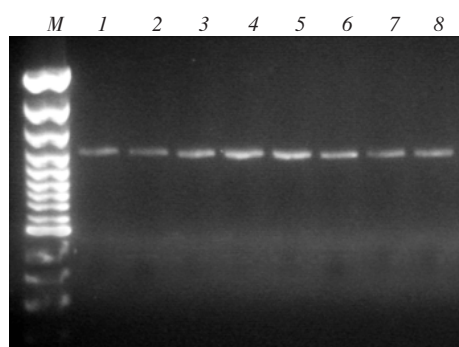


Fig. 1 Results of PCR amplification from genomic DNA of different sexual phenotype of cucumber

M: 100 bp ladder plus DNA molecular mass marker; 1: Jinchun No.4; 2: Zaofeng No.1; 3: Zhongnong No.8; 4: Qiuci No.1; 5: MT705; 6: MT700; 7: Zhongnong No.5; 8: Zhongnong No.203.

将 PCR 产物纯化并连接到测序载体 pMD18-T 上, 经过蓝白斑筛选获得了白色单菌落克隆, 提取单克隆质粒 DNA, 经过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定为阳性克隆 (图 2).

经过序列测定, 8 个 PCR 产物长度均为 1 188 bp, 并且, PCR 扩增所用的引物全部在两端被正确测出. 来源于津春 4 号、早丰 1 号、中农 8

号、秋雌 1 号、MT705、MT700、中农 5 号和中农 203 号的 8 条序列已提交 GenBank 并被收录, 序列登记号依次为 DQ115884 ~DQ115886 和 DQ115875~DQ115879.

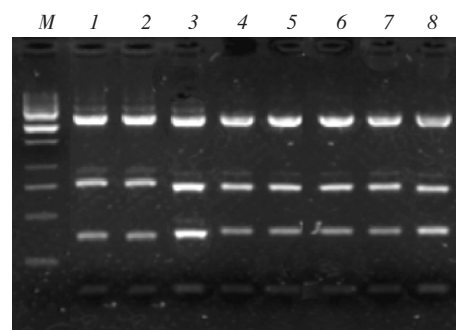


Fig. 2 Results of plasmid DNA of clones digested by *EcoR* I and *Sal* I

M: 1 kb ladder DNA molecular mass marker; 1: Jinchun No.4; 2: Zaofeng No.1; 3: Zhongnong No.8; 4: Qiuci No.1; 5: MT705; 6: MT700; 7: Zhongnong No.5; 8: Zhongnong No.203.

2.2 ACC 合酶基因序列的 SNP 标记和特性分析

对测定的 8 条序列进行 Blastn、Blasntx 以及 ORFinder 分析, 结果表明, 本研究克隆的序列与 Kamachi 等报道的 *CS-ACS2* 基因 DNA 序列 (GenBank 登记号 AB032938) 中第 4 562 bp ~ 3 375 bp 以及 Shiomi 等报道的 *CS-ACS2* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登记号 AB006804.1) 中第 1 798 bp ~ 706 bp 的基因片段一致, Blastn 比较的分值 (score) 高达 2 339, 即本研究克隆的基因为 *CS-ACS2*. 此外, 克隆的基因第 1 186 bp ~ 270 bp 区段编码 274 个氨基酸, 其中第 763 bp ~ 669 bp 是 95 bp 的内含子, 内含子的两端序列符合典型的 “GT-AG” 规则.

通过对克隆的 DNA 序列进行 ClustalW 分析发现, 从 3 个雌雄同株性别类型品种克隆的序列全部相同, 而与雌雄同株性别类型相比, 5 个强雌性和全雌性品种共存在 8 个 SNPs 标记 (表 2). 8 个 SNPs 标记为 4 个 A ↔ G 和 4 个 T ↔ C 之间的转换. 在 8 个 SNPs 中, 第 719 bp 处的 1 个 SNP 位于内含子区域, 其余 7 个 SNPs 均在外显子区域. 在 7 个位于外显子区域的 SNPs 中, 第 104 bp、147 bp 和 213 bp 处为 3 个非编码区的 SNPs, 第 329 bp、335 bp、342 bp 和 532 bp 处为 4 个编码 SNPs (coding SNPs, cSNPs). 有意义的是, 与雌雄同株性别类型品种相比, Kamachi 等^[7]从雌性系品种 Higan-fushinari 中克隆的 *CS-ACS2* 基因 (GenBank

登记号：AB032938) 也存在 2 个 SNPs，分别位于外显子编码区和非编码区域(表 2)。

通过对克隆基因编码的氨基酸序列进行 ClustalW 分析，结果显示，与雌雄同株性别类型品种相比，强雌性和全雌性品种中 4 个 cSNPs 有 3 个导致了编码的氨基酸序列的改变，而 MT-700 中的 1 个 cSNP 为同义突变。与雌雄同株性别类型品种氨基酸序列相比，Kamachi 等^[7]报道的雌性系品种

中的 1 个 cSNP 也导致了氨基酸序列组成的改变。具体情况是，中农 203 号第 402 位氨基酸为亮氨酸(Leu)替代丝氨酸(Ser)，MT705 第 468 位氨基酸为甘氨酸(Gly)替代精氨酸(Arg)，秋雌 1 号第 470 位氨基酸为赖氨酸(Lys)替代谷氨酸(Glu)，Kamachi 等报道的雌性系品种(GenBank 登记号 BAA33375.1)第 485 位氨基酸为组氨酸(His)替代亮氨酸(Leu) (表 3)。

Table 2 Single nucleotide polymorphisms of CS-ACS2 from different sexual phenotype of cucumber

Cultivar or accession number	The 104th bp	The 147th bp	The 213th bp	The 252th bp*	The 283th bp*	The 329th bp	The 335th bp	The 342th bp	The 532th bp	The 719th bp
Jinchun No.4	A	A	A	A	A	C	T	T	G	T
Zaofeng No.1	A	A	A	A	A	C	T	T	G	T
Zhongnong No.8	A	A	A	A	A	C	T	T	G	T
Qiuci No.1	A	A	A	A	A	T ⁱ	T	T	G	C ⁱ
MT705	A	G ^{nc}	A	A	A	C	C ^c	T	G	T
MT700	A	A	G ^{nc}	A	A	C	T	C ^c	G	T
Zhongnong No.5	G ^{nc}	A	A	A	A	C	T	T	G	T
Zhongnong No.203	A	A	A	A	A	C	T	T	A ^c	T
AB032938	A	A	A	G ^{nc}	T ^c	C	T	T	G	T

*: The number of base pairs is based on DNA sequence in this study; i: intron region; c: coding region in exon; nc: non-coding region in exon.

Table 3 Changes of amino acid encoded by ACC synthase gene (CS-ACS2) in difference sexual phenotypes of cucumber

Cultivar or accession number	The 402th amino acid*	The 468th amino acid*	The 470th amino acid*	The 485th amino acid*
Jinchun No.4	Ser	Arg	Glu	Leu
Zaofeng No.1	Ser	Arg	Glu	Leu
Zhongnong No.8	Ser	Arg	Glu	Leu
Qiuci No.1	Ser	Arg	Lys	Leu
MT705	Ser	Gly	Glu	Leu
MT700	Ser	Arg	Glu	Leu
Zhongnong No.5	Ser	Arg	Glu	Leu
Zhongnong No.203	Leu	Arg	Glu	Leu
BAA33375.1	Ser	Arg	Glu	His

*: The number of amino acid is based on BAA33375.1.

2.3 ACC 合酶基因的 CAPS 标记

利用 DNASTar 软件对测定的 DNA 序列进行限制性核酸内切酶位点的分析，结果表明从强雌性系品种 MT705 克隆的基因序列第 335 bp 处有 Xho I 酶切位点。将引物 P-ACS2 从 8 个不同性别类型品

种中扩增的 PCR 产物经过 Xho I 酶切后电泳，其中 MT705 得到长度为 335 bp 和 853 bp 的 2 条谱带，其他品种均为长度为 1 188 bp 的 1 条谱带，即强雌性系品种 MT705 具有 1 个 CAPS 标记(该标记命名为 C-MT705) (图 3)。此外，在 8 条 DNA 序列

中, 第 701 bp 和 833 bp 处分别有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点, 这与 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定阳性克隆出现 4 条谱带相吻合 (图 2)。

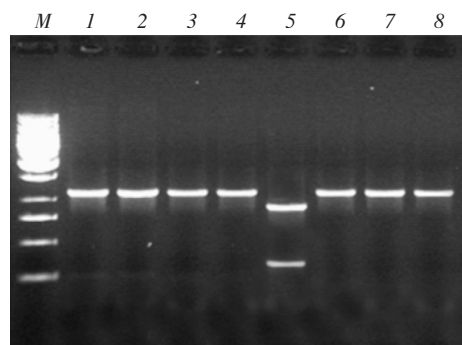


Fig. 3 CAPS marker of C-MT705

M: 1 kb ladder DNA molecular mass marker; 1: Jinchun No.4; 2: Zaofeng No.1; 3: Zhongnong No.8; 4: Qiuci No.1; 5: MT705; 6: MT700; 7: Zhongnong No.5; 8: Zhongnong No.203.

3 讨 论

大量研究表明, 乙烯的释放与黄瓜雌花的形成密切相关, 研究乙烯的合成和乙烯的信号转导途径对黄瓜性别决定有非常重要的意义, ACC 合酶是乙烯生物合成过程中的关键酶^[12-5]. 本研究根据前人报道的 ACC 合酶基因的保守序列设计 PCR 引物, 从 8 个不同性别类型黄瓜品种中克隆了长度 1 188 bp 的 ACC 合酶基因 *CS-ACS2* 片段 (GenBank 登记号为: DQ115884~DQ115886 和 DQ115875~DQ115879). 虽然从不同性别类型品种中所克隆的基因长度未见差异, 但通过对克隆基因的序列测定和生物信息学分析表明, 与 3 个雌雄同株性别类型品种相比, 5 个强雌性和全雌性品种存在 8 个 SNPs 标记, 并且, 与 3 个雌雄同株性别类型品种相比, Kamachi 等^[7]从雌性系品种中克隆的 *CS-ACS2* 基因 (GenBank 登记号: AB032938) 也存在 2 个 SNPs. 综合我们的研究结果和 Kamachi 等的研究结果可以看出, 与雌雄同株性别类型相比, 雌性系中 *CS-ACS2* 基因均存在 SNP 多态性. 在黄瓜 ACC 合酶基因家族中, Mibus 和 Tatlioglu^[11]通过序列分析发现雌性系特有的 *CS-ACS1G* 标记与 *CS-ACS1* 的差别主要在启动子区域. 而对于 *CS-ACS2* 基因, 虽然 Kamachi 等^[7]早在 1997 年就报道指出, 与雌雄同株性别类型相比, *CS-ACS2* 在雌性系中的表达强度要强、时间要早, 并推测雌花的发育可能也受到 *CS-ACS2* 基因的调控, 但目前

人们对 *CS-ACS2* 在黄瓜雌雄花中表达的差异还无法给出合理的解释. 本研究结果显示, 与雌雄同株性别类型相比, 雌性系中均存在 SNP 多态性. 因此, 这种 SNP 多态性提示黄瓜雌性系的发生形成过程中可能存在 *CS-ACS2* 基因的单核苷酸突变事件. 另外, 在 4 个 cSNPs 中, 有 3 个导致了 ACC 合酶基因 *CS-ACS2* 编码氨基酸的改变, 这些 ACC 合酶个别氨基酸的改变是否与黄瓜雌性系雌花决定基因的表达直接有关, 我们尚不清楚, 有待进一步研究.

值得一提的是, 陈劲枫等^[16]报道利用 ACC 合酶基因的 PCR 特异性引物分析黄瓜不同性别类型的单株, 结果没有发现多态性标记. 这可能是由于他们所采用的分析方法为普通的 PCR, 不能分辨出单个核苷酸的差异, 而 SNP 标记技术能够获得其他分子标记技术不能显示的更加丰富的多态性^[17]. 由于黄瓜的遗传背景十分狭窄, 品种间的遗传多态性远远低于其他作物, 一般的分子标记在黄瓜的品种间所能揭示的多态性十分有限^[18]. 目前, 美国 Wisconsin 大学 Staub 实验室构建了同工酶、RFLP、SSR 和 AFLP 等最丰富的黄瓜分子标记图谱 (<http://www.hort.wisc.edu/usdavr/staub/default.htm>), 但尚未见 SNPs 标记的报道. 因此, 本研究获得的 SNPs 标记也丰富了黄瓜分子标记的种类.

另一方面, 根据获得的 SNPs 多态性成功地发展了一个 CAPS 标记 C-MT700. 该标记能将从国外引进的强雌性优良品种 MT705 (<http://www.mantianseeds.com.cn>) 与其他性别类型品种相区别, 从而实现在分子水平上快速精确定鉴定黄瓜优良品种 MT705 的目的, 因此, 标记 C-MT700 在黄瓜的种子上具有一定的应用价值.

参 考 文 献

- Pierce L K, Wehner T C. Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortSci*, 1990, **25** (6): 605~615
- Malepszy S, Niermirowicz-Szczytt K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. *Plant Sci*, 1991, **80** (1): 39~47
- Yamasaki S, Nobuharu F, Takahashi H. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants. *Sex Plant Reprod*, 2003, **16** (3): 103~111
- Yamasaki S, Fujii N, Takahashi H. The ethylene-regulated expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* genes in cucumber plants and their possible involvement with sex expression in flowers. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41** (5): 608~616
- Mathooko F M, Mwaniki M W, Nakatsuka A, et al. Expression characteristics of *CS-ACS1*, *CS-ACS2* and *CS-ACS3*, three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit under carbon dioxide stress.

- Plant Cell Physiol, 1999, **40** (2): 164~172
- 6 Trebitsh T, Staub J E, O'Neill D. Identification of a laminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene linked to the female locus that enhances female sex in cucumber. *Plant Physiol*, 1997, **113** (3): 987~995
 - 7 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. *Plant Cell Physiol*, 1997, **38** (11): 1197~1206
 - 8 Shiomi S, Yamamoto M, Ono T, *et al.* cDNA cloning of ACC synthase and ACC oxidase genes in cucumber fruit and their differential expression by wounding and auxin. *J Japan Soc Hort Sci*, 1998, **67** (5): 685~692
 - 9 叶波平, 吉成均, 杨玲玲, 等. 不同性别类型黄瓜基因组中雌性系特异的 ACC 合酶基因. *植物学报*, 2000, **42** (2): 164~168
Ye B P, Ji C J, Yang L L, *et al.* *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(2): 164~168
 - 10 叶波平, 白书农, 曹宗巽. ACC 合酶基因(ACSG)可能是黄瓜雌性系的分子标记. *植物学报*, 2000, **42** (7): 765~766
Ye B P, Bai S N, Cao Z X. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7): 765~766
 - 11 Mibus H, Tatlioglu T. Molecular characterization and isolation of the *F1f* gene for femaleness incucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 2004, **109** (8): 1669~1676
 - 12 Yamasaki S, Fujii N, Matsuura S, *et al.* The M locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber. *Plant Cell Physiol*, 2001, **42** (6): 608~619
 - 13 陈惠明, 刘晓虹. 黄瓜性型遗传规律的研究. *湖南农业大学学报*, 1999, **25** (1): 40~43
Chen H M, Liu X H. *J Hunan Agric Univ*, 1999, **25** (1): 40~43
 - 14 亢秀萍, 刑国明, 薛亚明, 等. 黄瓜雌性系的育种利用. *山西农业大学学报*, 2000, **20** (3): 257~258
Kang X P, Xing G M, Xue Y M, *et al.* *J Shanxi Agric Univ*, 2000, **20** (3): 257~258
 - 15 向太和, 王利琳, 胡江琴, 等. 不同性别类型黄瓜品种基因组 DNA 的提取及 RAPD 标记的初步研究. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2005, **4** (2): 122~123, 141
Xiang T H, Wang L L, Hu J Q, *et al.* *J Hangzhou Teachers College (Natural Science Edition)*, 2005, **4** (2): 122~123, 141
 - 16 陈劲枫, 姜群峰, 余纪柱, 等. 黄瓜性别基因连锁的分子标记筛选. *上海农业学报*, 2003, **19** (4): 11~14
Chen J F, Lou Q F, Yu J Z, *et al.* *Acta Agriculturae Shanghai*, 2003, **19** (4): 11~14
 - 17 Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, **5** (2): 94~100
 - 18 Pan J S, Wang G, Li X Z, *et al.* Construction of a genetic map with SRAP markers and localization of the gene responsible for the first-flower-node trait in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Progress in Natural Science*, 2005, **15** (5): 407~413

Development of SNP Marker and CAPS Marker Linked to ACC Synthase Gene in Different Sexual Phenotypes of Cucumber*

XIANG Tai-He**, WANG Li-Lin, PANG Ji-Liang, HU Jiang-Qin, SHENTU Lian-Feng, WU Kai
(School of Life Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

Abstract Ethylene regulates sex expression in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). ACC synthase is a key factor during the ethylene biosynthesis. Pairs of PCR primers were synthesized corresponding to the conserved sequences of ACC synthase gene family. The 1 188 bp DNA fragment of ACC synthase gene (*CS-ACS2*) was amplified from genomic DNA of 8 different sexual phenotypes of cucumber respectively (GenBank accession number is DQ115884~DQ115886 and DQ115875~DQ115879). 8 SNPs have been identified by sequences analysis between 3 monoecious lines and 5 subgynoecious lines and gynoecious lines, which including 4 A $\leftrightarrow$ G and 4 T $\leftrightarrow$ C transition. Of these 8 SNPs, one locus is in intron and 7 loci in exons. Of the 7 SNPs located in exons, 3 SNPs are non-coding SNPs and 4 SNPs are coding SNPs (cSNPs) of which 3 induced changes of encoding amino acid of ACC synthase. The results of SNPs from subgynoecious lines and gynoecious lines suggest that single nucleotide mutation events of *CS-ACS2* might be correlated with the development of subgynoecious lines and gynoecious lines in cucumber. Furthermore, CAPS marker C-MT705 was developed for identifying elite subgynoecious cultivar MT-705, which could be valuable in cucumber breeding. Besides, the SNPs and CAPS markers obtained in the study enriched molecular markers of cucumber.

Key words cucumber (*Cucumis sativus* L.), sexual phenotype, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase gene, single nucleotide polymorphism (SNP), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y304083).

**Corresponding author. Tel: 86-571-28865327, E-mail: xthcn@163.com

Received: October 31, 2005 Accepted: November 30, 2005