

# 黄瓜黄色子叶突变体遗传及相关 AFLP 标记

王惠哲 李淑菊 杨瑞环 管 炜

(天津科润黄瓜研究所,天津 300192)

**摘要:**以黄色子叶突变体 B180H 为母本,颜色正常子叶黄瓜 Q12 为父本,配制  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $BC_1$ ,并通过对 6 世代子叶叶色特征的观察和统计分析,研究该黄色子叶性状的遗传规律,并利用 BSA 法、AFLP 技术筛选与黄色子叶性状基因紧密连锁的分子标记。结果表明,黄瓜黄色子叶性状是由 1 对核基因控制的稳定遗传的隐性性状,绿色子叶相对于黄色为完全显性。通过 BSA 法和 AFLP 分子标记,应用 1 024 对引物组合 *EcoR* I-NN/*Mse* I-NNN 对黄色、绿色子叶亲本进行筛选,筛选到了 1 个与黄瓜黄色子叶性状相关的共显性标记 E-AG/M-AAG。测序结果表明,片段长度分别为 258 bp 和 257 bp,为发生插入/缺失或突变的同源序列;在黄色子叶个体中只扩增出了 258 bp 的特异片段,绿色子叶个体中扩增出了 257 bp 的特异片段或同时扩增出 258 bp 和 257 bp 两个特异片段。经组外其他  $F_2$  单株验证发现,鉴定结果符合率高达 96.74%,以 Mapmaker 3.0 软件分析,该标记与子叶黄色突变位点的连锁距离为 3.2 cM。该性状可作为苗期遗传标记性状,在杂交育种和品种纯度鉴定上有极大的利用价值。

**关键词:** 黄瓜;子叶;遗传规律;分子标记;AFLP

中图分类号:S642.2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)03-0050-05

## Genetic Analysis and AFLP Markers Associated to the Yellow Cotyledon Trait in Cucumber

WANG Hui-zhe, LI Shu-ju, YANG Rui-huan, GUAN Wei

(Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

**Abstract:** With a  $F_2$  and  $BC_1$  population derived from  $F_1$  of B180H (yellow cotyledon female) and Q12 (green cotyledon male) was used as materials to study the inheritance of yellow cotyledon color and molecular marker associated to the cotyledon yellow trait. The results indicated that the yellow cotyledon trait was controlled by a pair of recessive gene, and the green cotyledon trait was in the mode of incomplete dominant inheritance. The polymorphism between yellow and green cotyledon parents of cucumber were studied using BSA method and AFLP technology. 1 024 AFLP markers were screened, and a co-dominant marker E-AG/M-AAG was obtained. Sequencing of the polymorphic fragment indicated that their lengths were 258 bp and 257 bp, respectively, and they were orthologous sequences with an insertion/deletion or mutant of only one nucleotide. The yellow cotyledon  $F_2$  plant possessed the 258 bp fragments, and the green cotyledon  $F_2$  plants possessed the 257 bp fragments or possessed both two fragments. The marker was closely linked to the cucumber cotyledon yellow color trait-related gene, and the marker was confirmed to be 96.74% accurate by  $F_2$  individuals. The trait was a useful marker for hybridization and purity identification of  $F_1$  hybrids.

**Key words:** Cucumber; Cotyledon color; Inheritance; Molecular marker; AFLP

植物叶色突变是自然界比较普遍的突变现象<sup>[1-8]</sup>,其主要来源于自发突变、人工诱发突变、插入突变和基因沉默突变等<sup>[9]</sup>。叶色突变性状作为一种指示性标记在遗传育种中具有重要的利用价

值,可以用于简化良种繁育和杂交种生产,具有特殊优良性状的突变体还可为作物遗传育种提供优秀的种质资源<sup>[9]</sup>。

笔者于 2007-2008 年在华北类型黄瓜 B180-1-1

收稿日期:2012-03-18

作者简介:王惠哲(1978-),女,河北定州人,副研究员,硕士,主要从事黄瓜病害及抗病育种研究工作。

亲本自交系群体中先后发现若干株突变类型单株, 子叶黄色, 边缘渐渐转绿至斑驳状, 真叶绿色, 第 1 真叶比正常子叶绿色植株生长缓慢, 与正常株第 2 真叶生长同步, 之后与正常株无明显区别。将突变的黄色子叶类型植株全部自交, 后代一致, 无分离现象。以往对于黄瓜真叶叶色突变性状的生理学、遗传学等方面研究较多<sup>[10-12]</sup>, 对于黄瓜子叶颜色的研究则较少<sup>[13]</sup>, 对黄瓜叶色突变性状的分子机制研究也少有报道<sup>[14-15]</sup>。本研究以子叶黄色突变体 B180H 和正常株 Q12 为材料, 对其进行表型鉴定、遗传分析, 并利用 BSA 法和 AFLP 分子标记技术, 筛选与黄瓜黄色子叶性状相关的分子标记, 探明黄色子叶与绿色子叶之间的遗传关系, 以期在育种实践中加以利用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为自然突变的黄色子叶黄瓜自交系 B180H 和亲本自交系 Q12 及其  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $BC_1$  群体。AFLP 引物在上海生工生物工程公司合成, 所用 TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂均购自大连宝生物工程公司。

试验于 2008 年 3 月至 2010 年 12 月在天津科润黄瓜研究所进行。

### 1.2 方法

1.2.1 子叶叶色鉴定 2008 年春获得黄色子叶突变体 B180H × Q12 的  $F_1$  (正交) 和 Q12 × 黄色子叶突变体 B180H 的  $F_1$  (反交)。秋季  $F_1$  自交获得  $F_2$ ,  $F_1$  与双亲分别回交获得 2 个回交子代  $BC_1$ 。2009 年春将  $F_1$  (正反交)、 $F_2$  及回交子代  $BC_1$  种植在温室育苗钵里, 正常管理, 子叶展开即可进行鉴定。调查各世代黄色子叶及绿色子叶植株数。

1.2.2 黄色、绿色子叶组构建及 AFLP 分析 采用改良的 CTAB 法分别提取各单株基因组 DNA, 经紫外分光光度计检测合格后稀释至 50 ng/μL。根据 BSA

法原理, 在黄色、绿色子叶群体中选取典型的黄色和绿色子叶植株各 5 株组成黄色子叶组和绿色子叶组。

AFLP 分析参照 Vos 等<sup>[16-17]</sup>的方法。扩增产物在 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测。

1.2.3 标记的筛选及验证 采用在双亲间产生多态性的引物组合对抗病组和感病组单株进行 AFLP 扩增, 能在 2 组间扩增出差异条带的引物组合即初步认为与黄瓜黄色子叶相关基因连锁。用该引物组合分别对组外的其他  $F_2$  单株进行扩增, 计算扩增带型与子叶颜色的实际表现型的符合度。以 Mapmaker 3.0 软件分析标记与基因间的连锁距离。

1.2.4 特异条带的回收、测序及 SCAR 转化 目标片段的回收采用煮沸法, 回收片段由北京三博远志生物公司进行测序。根据测得的目标 DNA 序列以及引物设计的一般原则设计特异性引物 (由上海生工公司合成), 然后进行 SCAR 扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 50 ~ 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 然后再 72℃ 延伸 7 min。扩增完成后, 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 子叶叶色鉴定及遗传分析

将黄色子叶类型与绿色子叶类型黄瓜杂交, 正反交子一代均恢复绿色子叶性状 (表 1), 表明黄色子叶性状为细胞核基因控制。从表 1 可以看出, 黄色子叶 × 绿色子叶  $F_2$  代分离出绿色和黄色 2 种表现类型, 分别为 91 株和 33 株, 经  $\chi^2$  检验, 结果差异不显著, 符合孟德尔 3:1 的分离规律。与绿色子叶亲本回交, 后代均表现为绿色; 与黄色子叶亲本回交, 后代出现绿色和黄色 2 种类型, 分别为 42 株和 43 株, 经  $\chi^2$  检验差异不显著, 符合 1:1 分离比例。综上结果可以断定, 黄瓜子叶黄色的性状由 1 对核基因控制, 黄色为隐性, 绿色为显性。

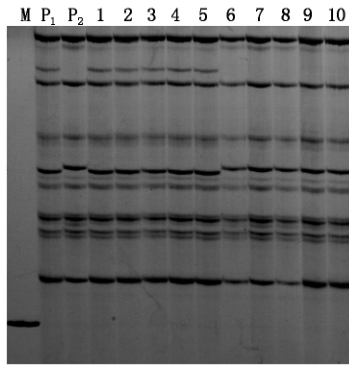
表 1 黄瓜黄色子叶和绿色子叶植株统计

Tab. 1 Statistics of cucumber green cotyledon plant and yellow cotyledon plant

交配方式 Mating type	总株数 No. of plants	绿色子叶株 No. of green cotyledon plants	黄色子叶株 No. of yellow cotyledon plants	卡方值 $\chi^2$	理论比例 Expected value	概率 Probability
$P_1$ B180H	30		30			
$P_2$ Q12	30	30				
$F_1$ B180H × Q12	76	76				
$F_2$ B180H × Q12	124	91	33	0.086	3:1	>0.05
$BC_1$ ( $F_1$ ) × B180H	85	42	43	0.011	1:1	>0.05
$BC_1$ ( $F_1$ ) × Q12	68	68				

注:  $\chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$ 。

Note:  $\chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$ .



M. DNA ladder; P<sub>1</sub>. 绿色子叶亲本; P<sub>2</sub>. 黄色子叶亲本;  
1~5. 绿色子叶组单株; 6~10. 黄色子叶组单株。

M. DNA ladder; P<sub>1</sub>. Green cotyledon parent; P<sub>2</sub>. Yellow cotyledon parent;  
1~5. Green cotyledon plants; 6~10. Green cotyledon plants.

图1 获得的共显性 AFLP 标记

Fig. 1 Co-dominant AFLP marker

## 2.2 AFLP 标记的筛选

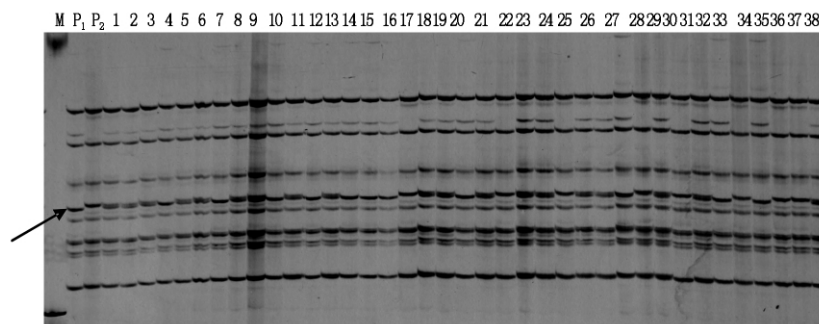
利用 1 024 对引物对 2 个亲本( Q12 和 B180H) 进行多态性筛选, 得到 110 对引物组合能在 2 亲本间扩增出多态性条带, 多态性引物比例为 10. 74%。对获得的 110 对引物进一步在 2 组间进行扩增, 其中, 在 2 个基因组之间有明显差异的有 14 对引物组合, 分别为 E12M32、E12M43、E13M33、E13M94、E14M88、E16M35、E16M78、E17M62、E17M87、E19M62、E21M88、E22M38、E24M82、E25M60。E13

(39) M33 引物组合在亲本和组之间表现出相同的多态性, 即绿色子叶亲本 Q12 和绿色子叶基因组有下带, 而黄色子叶亲本和黄色子叶基因组有上带, 这 2 条多态性片段长度大约为 260 bp( 图 1)。

用该标记进一步对组外其余 F<sub>2</sub> 后代单株进行检测, 结果显示, 91 个绿色子叶单株中有 2 株发生了交换, 扩增出了黄色子叶带型( 上带), 33 个黄色子叶单株中, 有 2 株同时扩增出了上下 2 条带( 图 2, 表 2)。据此推算, 所筛选到的标记与黄色子叶性状基因之间的遗传距离为 3. 2 cM, 表明该标记片段与黄瓜黄色子叶性状基因紧密连锁。

## 2.3 AFLP 标记片段的测序及 SCAR 转化

采用煮沸法将 2 个特异片段从银染胶上回收, 并测序。测序结果显示, 绿色子叶带大小为 257 bp, 黄色子叶带为 258 bp, 二者的差异在于 1 个碱基“ A ”的插入和缺失以及 2 个“ A↔G ”的碱基突变( 图 3 阴影部分, 相关内容已申报国家发明专利, 申请号为: 201110161299. 5)。根据序列特点设计了 2 对 SCAR 引物( 黑体字部分), 上游引物: 5'-CACGCAT-CATCTGTTTGA-3'; 下游引物 1: 5'-ACTTGTGGT-GAGTTTCGG-3' 和下游引物 2: 5'-TTGTCCAAC-TGTGGTGA-3'。



M. DNA ladder; P<sub>1</sub>. 绿色子叶亲本; P<sub>2</sub>. 黄色子叶亲本; 4, 7, 10, 12, 14~16, 20, 28, 33, 35: 绿色子叶单株; 17, 22, 25, 29, 31, 34, 36, 37. 黄色子叶单株; 1~3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 38. 绿色子叶杂合株。

M. DNA ladder; P<sub>1</sub>. Green cotyledon parent; P<sub>2</sub>. Yellow cotyledon parent; 4, 7, 10, 12, 14~16, 20, 28, 33, 35. Green cotyledon plants; 17, 22, 25, 29, 31, 34, 36, 37. Yellow cotyledon plants; 1~3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 38. Medium plants.

图2 标记在部分 F<sub>2</sub> 单株中的验证

Fig. 2 Validate of AFLP primer in some of F<sub>2</sub> plants

```
H 5' - GACTGCGTAC CAATTCAGAA CCAAAATGTT TCCACCCACG CATCATCTGT TTGAACACGT
L 5' - GACTGCGTAC CAATTCAGAA CCAAAATGTT TCCACCCACG CATCATCTGT TTGAACACGT
H 5' - TTGTCATGGT ACCATCTCAT GTAAGAAGAT CCTTCTTGCA ATACAAATAA GCGTTGTAGT
L 5' - TTGTCATGGT ACCATCTCAT GTAAGAAGAT CCTTCTTGCA ATACAAATAA GCGTTGTAGT
H 5' - TTTGGTGTC AAGAAAAGTG GCAAAATAC TTTATGCAAA AAAATTTCCT TCTGTTATTA
L 5' - TTTGGTGTC AAGAAAAGTG GCGCAATAC TTTATGCAAA AAAATTTCCT TCTGTTATTA
H 5' - GAACTAACCT TGTACCGAAA CTCACCACAA GTTGACAAA ACAATAAATC CTCAAACTCC
L 5' - GAACTAACCT TGTACCGAAA CTCACCACAA GTTGACAAA ACAATAAATC CTCAAACTCC
H 5' - TTTTACTCAG GACTCATC-3' 258 bp
L 5' - TTTTACTCAG GACTCATC-3' 257 bp
```

阴影部分为差异片段。

The different fragment are in the shadow.

图3 与黄瓜黄色、绿色子叶性状基因连锁的 AFLP 标记片段的碱基序列

Fig. 3 Sequence of the AFLP marker fragments associated to the cucumber cotyledon color

利用所设计的特异引物对 F<sub>2</sub> 单株的基因组 DNA 进行扩增鉴定,经 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,原来的多态性消失(图 4),表明并未成功地将该 AFLP 标记转化为 SCAR 标记。

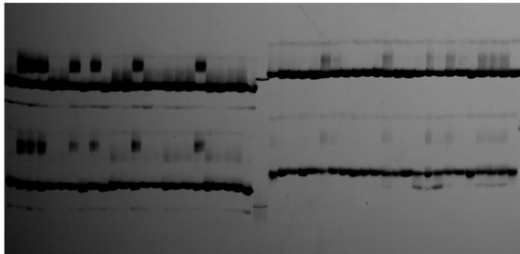


图 4 转化的 2 对 SCAR 标记多态性消失  
Fig. 4 SCAR marker polymorphism disappear

2.4 黄色子叶基因的初步定位

利用初步获得的连锁标记对 124 株 F<sub>2</sub> 群体进行 AFLP 分析(图 2),将获得的分离数据与苗期调查数据整合,通过 Mapmaker 3.0 软件进行连锁分析。结果(图 5)显示: E13(39) M33 这个标记与子叶黄色性状的遗传距离为 3.2 cM。

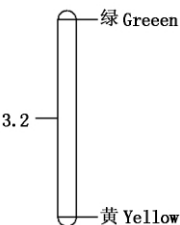


图 5 黄瓜子叶黄色基因的连锁标记

Fig.5 The linkage marker of yellow cotyledon gene in cucumber

表 2 F<sub>2</sub> 群体单株的表型和标记统计

Tab. 2 Statistics of F<sub>2</sub> populations phenotype and genotype

单株 编号 Code	表型 phenol- type	基因型 gene- type	单株 编号 Code	表型 phenol- type	基因型 gene- type	单株 编号 Code	表型 phenol- type	基因型 gene- type	单株 编号 Code	表型 phenol- type	基因型 gene- type	单株 编号 Code	表型 phenol- type	基因型 gene- type
1	H	上	26	L	M	51	L	M	76	L	M	101	L	M
2	H	上	27	H	上	52	L	M	77	L	M	102	L	M
3	L	下	28	L	M	53	L	M	78	L	下	103	L	M
4	L	M	29	L	下	54	H	上	79	L	M	104	L	M
5	L	M	30	L	M	55	L	M	80	L	M	105	L	M
6	L	M	31	H	上	56	L	M	81	L	下	106	L	M
7	L	下	32	L	下	57	L	M	82	L	下	107	L	M
8	L	下	33	H	上	58	L	下	83	H	上	108	H	上
9	L	M	34	L	M	59	L	下	84	H	上	109	L	M
10	L	M	35	L	下	60	H	上	85	L	下	110	L	M
11	L	M	36	H	上	61	L	M	86	L	下	111	H	M
12	L	M	37	L	M	62	L	下	87	L	下	112	H	上
13	L	下	38	H	上	63	L	M	88	H	上	113	H	上
14	L	M	39	H	上	64	H	上	89	L	M	114	L	下
15	L	M	40	L	M	65	L	M	90	L	下	115	L	下
16	L	M	41	H	上	66	L	上	91	L	下	116	H	上
17	L	M	42	L	M	67	H	上	92	H	上	117	L	M
18	L	M	43	H	上	68	H	M	93	L	M	118	H	上
19	H	上	44	L	M	69	H	上	94	L	上	119	L	下
20	L	下	45	L	下	70	H	上	95	L	M	120	H	上
21	L	下	46	L	M	71	L	M	96	L	M	121	L	下
22	L	下	47	H	上	72	L	M	97	L	下	122	L	M
23	L	下	48	L	下	73	L	M	98	L	M	123	L	M
24	L	M	49	L	下	74	H	上	99	L	下	124	H	上
25	L	M	50	L	M	75	L	M	100	H	上			

注: L 表示绿色子叶, H 表示黄色子叶; 上表示上带, 下表示下带, M 表示上下带均有。  
Note: L stand for green cotyledon, H stand for yellow cotyledon, Up stand for up band, Under stand for under band, M stand for up and under bands exist at the same time.

3 结论与讨论

黄瓜正常植株在出苗至第 1 真叶平展期子叶均

为绿色, 而子叶黄色突变体植株在出苗至第 1 真叶平展期子叶均为黄色直至萎蔫脱落, 黄色子叶边缘逐渐转绿至斑驳状, 区别明显。通过对黄瓜子叶黄

色与正常绿色性状的遗传分析表明,黄瓜黄色子叶性状是受 1 对隐性核基因控制,且在幼苗出土后子叶展平期即可与正常植株明显区别。通过症状描述和遗传规律研究,该性状与王玉怀<sup>[13]</sup>报道的可能为同一突变体。该性状可作为苗期遗传标记性状,用于黄瓜杂交育种及杂交一代种子纯度苗期鉴定。

在黄瓜上芽黄和叶色突变等方面已报道的有 8 种,即 g、lg-1、lg-2、v、vvi、yc-1、yc-2、yp<sup>[17-18]</sup>。其中, g: 黄瓜基部叶片为金黄色; lg-1: 黄瓜子叶和真叶初期均为浅绿色,随着生长逐渐转变为深绿色,雄蕊发育不良; lg-2: 黄瓜子叶和真叶颜色变化与 lg-1 相同,但子叶颜色转变速度比 lg-1 快,雄蕊发育正常; v: 芽黄突变体,苗期芽黄随生长期延长黄叶转绿; vvi: 斑驳芽黄,是 AbUd-Hayia Williams 于 1976 年发现的,黄色子叶慢慢转绿成斑驳的叶片,该突变体已经丢失; yc-1: 黄子叶 1,子叶是黄色的,然后转绿; yc-2: 黄子叶 2,子叶黄色,来自突变体 BurplessHybrid; yp: 黄色植物,淡黄绿色叶片生长缓慢,该突变体存在与否不明<sup>[12]</sup>。其中,突变体 g、lg-1、lg-2、v 和 yp 描述的表型与本试验发现的突变体不一致, vvi、yc-1、yc-2 与本试验发现的突变体在表型上相近,但本试验突变体属于哪一种突变,与 vvi、yc-1、yc-2 是否属于一个突变体有待研究。

池秀蓉<sup>[14]</sup>于 2006 年获得 1 个与黄瓜叶色突变基因 v-1 连锁的 AFLP 标记,王全等<sup>[15]</sup>2010 年经研究也获得 1 个与黄瓜叶色相关基因连锁的 AFLP 标记,但这 2 个标记均为显性标记,不能区分杂合株和纯合株,在应用上受到一定程度的限制,并且 2 人所采用的叶色突变体描述与本试验所用突变体表型也不太相同。本试验通过分子标记的筛选,初步获得 1 个连锁的共显性分子标记,利用筛选到的分子标记,可以实现黄瓜材料、品种纯度的快速、准确鉴定,为亲本选配和杂交组合配制提供可靠依据,可用于分子标记辅助育种;但所用分离群体相对较小,有待扩大群体进一步筛选,以获得更加精确的标记连锁距离。

#### 参考文献:

- [1] 王凤辰,王浩波.西瓜“芽黄”新突变体简报[J].中国西瓜甜瓜,1997(3):14-15.
- [2] 马志虎,颜素芳,胡志中,等.辣椒黄绿苗突变体生物学特性及生长动态研究[J].种子,2001(4):10-12.
- [3] 李梅,赵前程,孙德岭,等.花椰菜叶色突变的 RAPD 分析[J].天津农业科学,2004,10(4):10-12.
- [4] 郭明,张贺,李景富.番茄叶色黄化突变体的遗传分析及 SSR 分子标记[J].中国蔬菜,2010(14):31-35.
- [5] 张成合,刘传斌,任艳蕊,等.结球甘蓝叶色(紫/绿)的遗传分子和基因定位[J].中国农业科学,2010,43(2):346-350.
- [6] 苗晗,顾兴芳,张圣平,等.蔬菜叶色突变体研究进展[J].中国蔬菜,2007(6):39-42.
- [7] 何冰,刘玲珑,张文伟,等.植物叶色突变体[J].植物生理学通讯,2006,42(1):1-9.
- [8] 于有伟,张少颖,王向东.羽衣甘蓝中叶黄素的分布及稳定性研究[J].天津农业科学,2011,17(1):1-4.
- [9] 徐东辉,孙日飞,张延国,等.大白菜叶色相关性状的 QTL 定位与分析[J].园艺学报,2007,34(1):99-104.
- [10] 王家训,苏晓东,刘卫东.黄瓜黄绿叶突变性状的遗传分析[J].遗传,2000,22(5):313-315.
- [11] 陈远良,刘新宇,李树贤.黄瓜“芽黄”突变体的发现及其遗传分析[J].中国蔬菜,2000(3):35-36.
- [12] 国艳梅,顾兴芳,张春震,等.黄瓜叶色突变体遗传机制的研究[J].园艺学报,2003,30(4):409-412.
- [13] 王玉怀.黄瓜子叶颜色遗传规律的研究[J].东北农学院学报,1990,2(12):196-197.
- [14] 池秀蓉.黄瓜营养器官苦味和叶色突变性状的遗传分析及分子标记研究[D].北京:中国农业科学院,2006.
- [15] 王全,陈正武,邢嘉佳,等.黄瓜叶色突变体遗传及连锁的分子标记研究[J].中国瓜菜,2010,23(4):3-5.
- [16] Vos P, Hongers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21):4407-4414.
- [17] Walters S A, Shetty N V, Wehner T C. Segregation and linkage of several genes in cucumber[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(4):442-450.
- [18] Wehner T C, Xie J H. Gene list 2001 for cucumber[J]. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2001, 24: 110-136.