

密级：

论文编号：

中国农业科学院 硕士学位论文

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

**Genetic Dissection and AFLP Analysis of Forlige Bitterness Trait
and Yellow Leaf Mutantation in Cucumber(*Cucumis sativus* L.)**

硕士研究生： 池秀蓉
指导教师： 顾兴芳 研究员
申请学位类别： 农学硕士
专 业： 蔬菜学
研 究 方 向： 黄瓜遗传育种
培 养 单 位： 中国农业科学院研究生院
中国农业科学院蔬菜花卉研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**Genetic Dissection and AFLP Analysis of Forlige Bitterness Trait
and Yellow Leaf Mutantation in Cucumber(*Cucumis sativus* L.)**

Master candidate: Chi Xiurong

Supervisor: Professor Gu Xingfang

Major: Vegetable Science

Speciality: Cucumber Genetics and Breeding

Graduate School

Chinese Academy of Agricultural Sciences:

Institute of Vegetables and Flowers

Submitted Date: June 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘 要

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是葫芦科重要的一年生作物, 我国是世界上黄瓜栽培面积最广、总产量最高的国家。品质性状是影响黄瓜经济效益的重要方面, 深入研究黄瓜苦味等品质性状的遗传规律, 利用分子标记技术筛选含有 *bi* 基因的无苦味黄瓜材料, 有利于加快我国无苦味黄瓜品种的育种进程; 研究叶色突变性状的遗传规律, 采用分子标记技术, 可将其作为指示性标记用于种子纯度检测等育种实际工作。本试验以含有营养器官不苦基因 *bi*、叶色突变基因 *v-1* 的纯合雌性系 9110GT 和含有营养器官苦味基因 *Bi*、绿色叶片基因 *V-1* 的普通花性自交系 03828 为试材, 进行营养器官苦味性状、叶色突变性状的遗传规律及分子标记方面的研究, 结果如下:

1、通过对田间栽培的亲本、 F_1 、 F_2 及 BC_1 分离后代的营养器官苦味、果实苦味等性状的详细调查, 计算分析后发现 *Bi* 与 *bi* 在 F_2 代的分离比例符合 3:1, 回交后代为 1:1, *bi* 基因为独立遗传, 杂合状态 *Bibi* 时营养器官与果实都会出现苦味。

2、分析亲本、 F_1 、 F_2 及 BC_1 的叶色分离情况, F_1 均为中间色, F_1 与正常株的回交后代分离为绿色和中间色, 分离比例接近 1:1; F_1 与突变株的回交后代分离为黄色与中间色, 分离比例接近 1:1。 F_2 代分离为绿色、中间色及黄色, 分离比例接近 1:2:1, 经适合性测验差异不显著, 表明叶色突变性状为细胞核遗传, 由隐性基因控制, 并且绿色对黄色为不完全显性。

3、两对基因在 F_2 、 BC_1 代分离结果表明控制黄瓜营养器官无苦味的 *bi* 基因与叶色突变基因 *v-1* 有连锁关系, 连锁距离是 31.7cM。 *bi* 基因、*v-1* 基因与 *F*、*D*、*u*、*Tu* 等性状之间没有连锁关系, 后代独立分离。

4、采用 AFLP 标记技术, 首次获得一个与黄瓜营养器官无苦味 *bi* 基因紧密连锁的 AFLP 标记 TG/GCT₁₅₀, 连锁距离为 6.43cM, 并成功地将其转化为 SCAR 标记 SC₈₇。经 148 株重组自交系单株验证, 两个标记的检测准确率分别达到 91%和 84.8%。

5、通过实验首次获得一个与叶色突变性状紧密连锁的 AFLP 标记 TG/CTT₁₂₀, 与 *V-1* 位点的连锁距离是 6.29cM。通过 148 株重组自交系单株验证, 91 株叶色正常的单株中, TG/CTT₁₂₀ 出现在 90 个单株中, 准确率达到 98.9%。该标记可作为一种指示性标记, 与杂种鉴定等实际育种工作结合。

关键词: 黄瓜(*Cucumis sativus* L.), 营养器官苦味, 叶色突变, 遗传分析, 分子标记

Abstract

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is an important annual crop belonging to the Cucurbit family. China is the widest area of growing cucumber and the highest total yield in the world. The quality trait is one of the important characteristics. In order to accelerate the application of our Non-bitterness cucumber breeding and use the yellow leaf mutation as a useful marker to identify purity of F₁ hybrids, we plan to further our study of the genetic mechanism of forlige bitterness trait and yellow leaf mutation, get the molecular markers linkage to *bi* gene and yellow leaf mutation with AFLP technique. In our study, the Homozogous gynocious line 9110GT and Common floral sex selfed line 03828 were used as parental materials for further study on genetic analysis and molecular markers in cucumber. The main results were as follows:

By tasting the leave、fruits of F₁, F₂, BC₁P₁ and BC₁P₂, the progeny segregation frequency of Bi and bi fit a ratio of 3:1, the backcross segregation frequency fit a ratio 1:1, the *bi* gene is independence inheritance ,the fruits were also bitter when the gene Bi and bi was heterozygous,.

By observing the phenotype of F₁, F₂, BC₁P₁ and BC₁P₂, the result concluded the yellow leaf mutant is controlled by one pair of recessive gene, and green color is incomplete dorminace to yellow color.

By investigating the parents, F₁, F₂, BC₁P₁ and BC₁P₂, loosen linkage was found between *v*-1 and *bi*, while no linkage was detected between *v*-1, *bi* with *F*, *u*, *D*, *Tu* respectively.

Amplied fragment length polymorphism(AFLP) technique with 256 primer combinations were employed to find the polymorphisms between bitterness DNA pool and nonbitterness DNA pool, and in Non-bitterness DNA pool a 150 bp specific fragment was amplified in the primer combination of TG+GCT. This marker was testified with individual DNA of the F₂ population and the band could only be amplified in the Non-bitterness plants. Linkage analysis using the software of JoinMap 3.0 indicated its genetic distance to the Non-bitterness loci was 6.43 cM, and this AFLP marker was designed as TG/GCT₁₅₀. This band was collected and sequenced to synthesize a sequence-characterized amplified region (SCAR) primer. The primer was used to amplify the individual DNAs of the F₂ population and obtained a specific band of 87bp in the Non-bitterness plants, indicating a successful conversion of a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker from AFLP one. The SCAR marker was designed as SC₈₇, and has been practically useful to the marker-assisted selection in our cucumber breeding program. With 148 RIL individuals has been used for identifying two markers, predicted precision were 95.95% and 93.24%.

Based on BSA method, AFLP technique was employed to identify marker linked to cucumber yellow leaf mutation . E₂₅M₆₂₋₁₂₀ marker correlated to the *V*-1 locus was detected. The AFLP marker was designed as TG/CTT₁₂₀.With 148 RIL individuals has been used for identifying the marker, the marker was testified in 90 individuals which have *V*-1 locus, predicted precision were 99.3%.The mutant is a useful marker to identify purity of F₁ hybrids.

Key word: Cucumber (*Cucumis sativus* L.), Forlige bitterness, Yellow leaf mutation, Genetic analysis, Molecular marker

目 录

第一章 文献综述

1.1 苦味研究概况.....	1
1.1.1 苦味素的化学组成、分布与鉴定	1
1.1.2 黄瓜营养器官苦味基因的遗传研究	2
1.1.3 营养器官苦味性状与病虫害	2
1.1.4 营养器官苦味基因在连锁图中的定位及与其他性状的连锁关系	3
1.2 叶色突变性状的研究概况.....	3
1.2.1 叶色突变的遗传及分子机制	3
1.2.2 黄瓜叶色突变性状的研究进展	4
1.3 分子标记技术.....	5
1.3.1 AFLP 分子标记技术.....	5
1.3.2 SCAR 标记技术	7
1.3.3 分离群体混合分析法	8
1.4 AFLP 标记技术在植物育种中的应用.....	8
1.4.1 遗传作图	8
1.4.2 基因定位	9
1.4.3 分子辅助育种	9
1.4.4 遗传多样性及分类进化学研究	10
1.5 黄瓜分子生物学研究现状.....	10
1.5.1 种质资源方面的研究	10
1.5.2 快速寻找与目的基因紧密连锁的分子标记	11
1.5.3 分子标记辅助育种	11
1.5.4 遗传作图	11
1.5.5 黄瓜基因工程研究进展	12
1.6 本实验的研究目的、意义及主要内容.....	13

第二章 遗传规律分析

2.1 材料.....	14
2.2 遗传分析方法.....	14
2.3 营养器官苦味性状的遗传规律分析.....	15
2.4 叶色突变性状的遗传规律分析.....	15
2.5 材料中各性状之间的遗传规律分析.....	16
2.6 小结.....	18

第三章 黄瓜营养器官无苦味 bi 基因的分子标记研究

3.1 材料和方法.....	19
3.1.1 DNA 的提取(CTAB 法)	19
3.1.2 AFLP 分析方法.....	19
3.1.3 分子标记的筛选及检测	21
3.1.4 AFLP 银染检测目的片段的挖带回收、纯化及测序.....	21
3.1.4 SCAR 分析方法	22
3.2 结果与分析.....	23
3.2.1 基因组 DNA 的提取.....	23
3.2.2 标记的初步筛选	24
3.2.3 标记的获得	25
3.2.4 苦味标记 E25M70 的回收、纯化	25
3.2.5 克隆	26
3.2.6 重组质粒的 PCR 检测.....	27
3.2.7 SCAR 标记的引物设计	28
3.2.8 SCAR 标记的群体验证	28
3.2.9 与 bi 基因紧密连锁的分子标记在重组自交系中的验证	28
3.3 小结.....	29
第四章 与叶色突变基因 v-1 连锁的分子标记研究	
4.1 材料与方法.....	30
4.2 结果与分析.....	30
4.2.1 标记的初步筛选	30
4.2.2 标记的验证	31
4.2.3 与叶色突变性状连锁的 AFLP 标记在重组自交系中的验证.....	32
4.3 小结.....	32
第五章 讨论与结论	
5.1 讨论.....	33
5.2 结论.....	34
参考文献	35
附录	42
致谢	51
作者简历	52

第一章 文献综述

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是葫芦科黄瓜属一年生攀缘性草本植物,别名王瓜、胡瓜,起源于喜马拉雅山南麓的印度北部和锡金等地。我国黄河流域早在二千年前就开始栽培黄瓜(周长久等, 1996)。黄瓜供应期长,类型和品种十分丰富,在我国蔬菜生产和供应上占有重要的地位。我国是世界上黄瓜生产面积最大、总产量最高的国家。据统计 2004 年,我国的黄瓜栽培面积为 93.01 万 hm^2 , 占全国蔬菜面积的 10%左右,其中 45%左右为设施栽培。主要的种植地区为山东、河南、河北、辽宁、甘肃、江苏、广东、广西等省。

自 20 世纪 30 年代,Wellington 发现黄瓜第一个控制果刺颜色的 B 基因以来,不断有新的黄瓜基因被发现或鉴定。在九十年代之前,主要是形态学基因的研究,研究者对其特征进行了详细描述,并将部分基因定位在不同的连锁组中(Pierce, 1990)。随着分子生物学的发展,大量的基因通过分子标记技术鉴定,其中包括数量性状座位(QTL),新的基因或基因位点之间以及它们与形态学基因之间的连锁关系的研究有很大进展。对黄瓜苦味性状的研究表明含有纯合 *bi* 基因的黄瓜材料是无苦味的,目前未见关于 *bi* 基因的分子标记技术的报道。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,而黄瓜叶色突变性状的研究主要集中在生理学、遗传学方面。

1.1 苦味研究概况

1.1.1 苦味素的化学组成、分布与鉴定

瓜类植物的苦味是由一类称为苦味素或葫芦素(Cucurbitacins)的物质引起,这类物质是紧密相关的四环列三萜类化合物,多以配糖体或葡萄糖甙的形式存在于植物体内,依分子式的不同,分为苦味素 A、B、C、...N 等 14 种(Andeweg 等, 1959; Rice 等, 1981)。黄瓜植株中的苦味素主要为 B 和 C, B 的分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_8$, C 为 $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_8$ 。黄瓜幼苗根中含苦味素 B,未展开的子叶中含 B 和 C,完全展开的子叶及植株中只有苦味素 C。

苦味素的含量随着植株的生长而增加,叶片叶位越高苦味素含量越多。苦与不苦的叶片中氮含量不同,苦味叶片的含氮量和氨基酸中的氮含量要高于不苦的叶片,硝酸盐的含量要低于不苦的叶片。植株上部的叶片比下部的苦,果实和叶片苦味的程度取决于总的含氮量及氨基酸中的含氮量。在苦果果皮中氨态 N 和蛋白的含量也高于不苦果的果皮,有研究指出子叶中苦味素的含量至叶片完全展开是稳定增长的。一般叶中苦味素含量为 0.13~1.13 mg/g 鲜重(Van Keulen, 1981),苦味素在果实中的含量则随着幼果的成熟而逐渐减少(Kano 等, 1997)。

黄瓜苦味素的感官鉴定有子叶期检测法(Andeweg 等, 1959),化学鉴定方法包括:色层和广谱层析法、薄层色谱层析法(TLC)、高压液相色谱法(Rice 等, 1981; Van Keulen, 1981)等,这些方法都有其局限性。人类的味觉对苦味很敏感,当苦味素含量低于 10^{-9} 时仍可分辨。若仅需鉴定是否有苦味,植株数量又不多,并有足够的品尝者,采用感官品尝的方法效率较高。因此,感官品尝一直是育种家用来判断苦味素存在与否的主要方法,需注意的是幼苗稍大时进行检测最好,可确保准确性。

1.1.2 黄瓜营养器官苦味基因的遗传研究

已报道的控制黄瓜营养器官的苦味基因有 Bi/bi 、 $Bi-2/bi-2$ 。发现无苦味黄瓜突变体之前的所有黄瓜材料都含苦味素，为寻找完全无苦味的黄瓜材料，Andeweg 和 DeBruyn 于 1959 年在苗期对 89 个品种和 15000 株自交系单株子叶进行品尝，从美国改良长绿品种中发现黄瓜无苦味突变体，将该突变体与植株含苦味素的品系杂交、自交，其杂交一代子叶均有苦味， F_2 代苦与不苦的比例为 3:1，证明该突变体是由一对隐性基因控制的，将该基因定名为 bi ，由该基因控制的黄瓜植株不含苦味素，果实在任何条件下都不苦。该基因的发现使得苗期筛选无苦味植株成为可能；此后 Inggamer 和 Ponti 又发现另一无苦味品系 Jiwika，控制无苦味的基因与美国改良长绿品种一致。 bi 属于隐性的抑制果实与叶片中苦味的产生，能使叶片无苦味并阻止果实在逆境条件下变苦，用来抵抗环境诱导的苦味(Inggamer, 1981 等)。

Wenher 和刘进生用 NCG-093 无苦味品系与 WI2757(含纯合 bi 基因的无苦味品系)杂交，又发现控制黄瓜植株无苦味的另一基因。 F_1 代均含苦味素， F_2 代苦与不苦的比例为 9:7，回交一代的比例为 1:1；用 NCG-093 无苦味品系与苦味品系杂交、回交、自交，无苦味的遗传符合单隐性基因模式。因而他们推论 NCG-093 中抑制苦味素形成的基因与 bi 基因不同，后代表现符合两隐性基因控制的上位作用模式。两隐性基因都抑制苦味，但彼此独立。只要植株中含有两隐性基因中的任何一对，苦味素的合成将被抑制。他们将 NCG-093 中的无苦味基因定名为 $bi-2$ (Wenher, 1998)。

国内以三种不同苦味类型(营养器官与果实均苦 $BiBiBtBt$ ，仅营养器官苦 $BiBibtbt$ 及营养器官与果实均不苦 $bibibtbt$)的纯合黄瓜自交系为试材，通过对其后代 F_1 、 F_2 、 BC_1 表现型分离比例的分析，认为控制黄瓜植株营养器官苦与不苦的基因 Bi 和 bi 在后代表现为独立遗传，不受控制果实苦味基因 Bt 的影响，纯合基因型 $bibi$ 对 Bt 存在隐性上位作用；当为杂合状态 $Bibi$ 时，即使控制果实苦味的基因 Bt 不存在，果实也会出现苦味，但苦的程度较含 Bt 基因的轻，出现苦味瓜的比例也低(顾兴芳等，2004)。

目前控制黄瓜果实苦味的基因有 Bt/bt 、 $Bt-2/bt-2$ 。关于 Bt 、 bi 二者的关系，Walters 和 Wehner 在研究果实苦味时用品系 WI2757 与 LJ90430 杂交 F_2 代分离比例为苦味 9:不苦 7，首次报道当 Bt 、 bi 在同一个遗传背景时二者的互作关系，但并未做详细报道(Walters 等, 1998)。但 Walters 和 Wehner 研究表明 LJ90430 中控制苦味的基因为 $Bt-2$ ，并且 bi 与 Bt 间存在连锁关系，并处于第一连锁群。

1.1.3 营养器官苦味性状与病虫害

国外的报道大多认为苦味素是黄瓜甲虫进食的引诱剂。早在 1971 年 Da costa 和 Jones 通过对 Bi 位点黄瓜近等位基因系研究发现含有 $bibi$ 基因型的黄瓜植株抗十一星瓜叶甲(*Diabrotica undecimpunctata howardi*)、黄瓜色条叶甲(*Acalymma vittata*)和黄瓜条叶甲(*Acalymma balteata*)，这 3 种甲虫对苦味素的反应相似(Da costa 等, 1971)。1991 年 Dehneer 等人也证实无苦味黄瓜品系($bibi$)抗黄瓜十一星瓜叶甲虫幼虫，苦味素是该黄瓜甲虫的引诱剂(Dehneer 等, 1991)。

Da costa 和 Jones 还发现无苦味品系较苦味品系抗细菌性萎焉病(Da costa 等, 1971)。通过研究黄瓜甲虫虫口密度与黄瓜细菌性萎焉病发病率之间的关系，结果发现二者之间存在高度线性正相关，进一步证实黄瓜甲虫是黄瓜细菌性萎焉病的主要传播媒介(Yao 等, 1996)。

关于苦味素与红蜘蛛 (*Tetranychus urticae* Koch) 之间的研究结果不尽相同。有报道认为含 $BiBi$ 基因型的黄瓜比含 $bibi$ 基因型的无苦味黄瓜品系抗红蜘蛛(Kaoistra, 1971; Soans, 1973;

Could, 1978)。De Ponti 经过几年对数百个不同的黄瓜材料、含苦味基因的改良长绿品系及近等位无苦味突变系的研究表明,黄瓜对红蜘蛛的抗性植株中是否含苦味素无绝对关系,黄瓜对红蜘蛛的抗性是由多基因控制的,他认为控制苦味的基因与抗红蜘蛛的基因之间可能存在一定的连锁关系(De Ponti, 1978; De Ponti, 1979; De Ponti, 1980)。Dhillon 认为苦味与抗红蜘蛛的基因之间没有连锁关系(Dhillon 等, 1992)。最新的研究结果通过品尝子叶,发现苦味与抗红蜘蛛之间有完全的连锁。用于试验的不苦双单倍体群体材料均是高感病,苦的群体均显示抗病(Backema-Boomstra 等, 2003)。

Haynes 和 Jones 研究了苦味素与黄瓜南方根结线虫的关系,发现从根结指数和植株活力来看,根结线虫对植株的危害程度与植株中是否含苦味素关系不大,但无苦味植株根际产生显著多的虫卵,因此他们推论苦味素对根结线虫有排斥性(Haynes 等, 1976)。

Bar-Nun 和 Mayer 及 Viterbo 等研究认为植株中含有苦味素 B、D、E 或 I 可保护黄瓜免受灰霉病(*Botrytis cinerea*)的侵染,其原理是苦味素阻止介入感染过程和真菌毒性漆酶的形成(Bar-Nun 等, 1990)。

1.1.4 营养器官苦味基因在连锁图中的定位及与其他性状的连锁关系

根据标记对表型的影响,将黄瓜已发现的标记分为七大类,六个连锁群(Pierce, Wehner, 1990)。*bi* 基因在最大的第一连锁群上,该连锁群含有 12 个基因,*bi* 与控制雌性表达的 *F* 基因有微弱连锁,重组率是 0.37 (Wehner 等, 1998), *wmv-1-1* 基因连锁,与 *Bt* 连锁并处于一个连锁群,*Bt-2* 与第四连锁群中的 *U*(果色一致)、*Tu*(果皮有刺瘤)、*D*(暗色果皮)及 *SS*(薄嫩果皮)连锁,与处于第一连锁群的 *de*(有限生长)有微弱连锁,表明第一与第四连锁群可能有连锁关系(Pierce, Wehner, 1990, Walters, Shetty, Wehner, 2001)。基因 *bi* 与 *F*、*d*、*u*、*ss*、*dg* 基因之间没有连锁(Cowen, 1983; Vakalounakis, 1992; 顾兴芳等, 2005)。*bi-2* 与 *Sp*(短叶柄)以 11cM 连锁(Wehner, Liu, 1998)。

1.2 叶色突变性状的研究概况

叶色突变是自然界比较普遍的突变现象,一般在苗期表达,生育后期发生的较少。引发突变的基因通常直接或间接地影响叶绿素的合成、降解、改变叶绿素含量。叶色突变体的来源广泛,包括自发突变、人工诱发突变、插入突变和基因沉默突变。

叶色发生变异会影响植株的光合效率,造成作物减产,甚至导致植株死亡,过去常认为是无意义突变。近年来,叶色突变体的利用价值备受关注。育种工作中,叶色变异作为标记性状用于简化良种繁育和杂交种生产;某些叶色突变体具有特殊的优良性状,为作物遗传育种提供了优秀的种质资源(Gan 等, 1995)。在基础研究中,此类突变体是研究光合作用(Fambrini 等, 2004)、光形态建成(Parks 和 Quail, 1991)、激素生理(Agrawal 等, 2001)以及抗病机制(Singh 等, 2000)等一系列生理代谢过程的理想材料;还可分析鉴定基因功能(Hansson 等, 1999),了解基因间互作(Lopez-Juez 等, 1998)。

1.2.1 叶色突变的遗传及分子机制

不同叶色突变体的遗传规律相差很大,可能是数量性状,也可能是质量性状;会是细胞核遗传,也会因细胞质遗传引起。例如,芽黄突变体大多受单一隐性核基因控制,少数受两对核基因

控制(肖松华等, 1995), 在胡萝卜一个栽培种群中发现的黄色叶突变体, 其外型表现是由单一隐性核基因控制(Nothnagel 等, 2003)。与细胞核遗传的叶色突变体相比, 细胞质突变体较少, 仅在小麦(王保莉等, 1996)、大豆(马国荣等, 1994)、烟草(Monde 等, 2000)等作物中有少量报道。这与植物细胞中含有多个细胞器(叶绿体、线粒体)有关。

叶色突变的分子机制较为复杂, 多种途径中的基因突变会引发变异。目前, 对突变发生机制的推测主要有以下几种观点:

1、叶绿素生物合成途径中的基因突变。目前, 被子植物叶绿素合成途径中所有的关键酶都已被鉴定, 该途径中任何基因发生突变都可能阻碍叶绿素形成、改变各种色素的比例, 引起叶色变异。以叶色突变体为研究对象, 不仅可分离、鉴定参与叶绿素合成的基因, 还可验证前人对叶绿素合成的种种假说。已鉴定出 CHLH (Petersen 等, 1999)、CAO (Oster 等, 2000)、CHLH (Jung 等, 2003)、等对叶绿素合成起决定作用的基因, 还验证了叶绿素合酶(Gaubier 等, 1995)、谷氨酰-tRNA 还原酶(Kumar 和 Soll, 2000)、原叶绿素酸酯氧化还原酶(Frick 等, 2003)等关键酶在叶绿素合成过程中的功能。

2、血红素 光敏色素生色团生物途径中基因突变。叶绿素生物合成和血红素生物合成是四吡咯生物合成途径的两个分支。叶绿素合成速率受细胞内血红素含量影响, 若血红素 光敏色素生色团途径受阻、细胞内血红素含量上升, 过剩的血红素将反馈抑制叶绿素合成, 引起突变体叶色变异(Terry 和 Kendrick, 1999)。缺乏光敏色素生色团的叶色突变体是研究血红素对叶绿素合成的调节作用的理想材料, 也是研究高等植物光形态建成的理想材料。

3、编码叶绿体蛋白的基因突变。叶绿体蛋白由叶绿体和细胞核基因共同编码, 其中叶绿体基因组编码蛋白不足 100 种, 大量的蛋白质由核基因编码在细胞质中合成, 而后借助叶绿体外套(chloroplast envelope)上的异位子(translocon)转入叶绿体(Sato 等, 1999)。现已借助大量这类突变体, 分离、鉴定得到大量与叶片衰老(Vincentini 等, 1995)、质体翻译(Schultes 等, 2000)、质体发育和分化(Babiychuk 等, 2003)、光合功能(Motobashi 等, 2003)、蛋白输入(Reinbothe 等, 2005)有关的位点。

4、与光合系统无直接关系的基因突变。光合系统以外基因的突变也会引起叶色变异, 但突变机制未彻底阐明。Kushnir 等(2001)认为这可能与细胞内核-质间信号传导有关。Robson 等(2004)推测细胞分裂素会改变合成代谢和分解代谢之间的平衡, 叶绿素含量上升和稳定性增强可能是突变体新陈代谢过程变异的结果。

1.2.2 黄瓜叶色突变性状的研究进展

国内外关于黄瓜叶色突变的报道不多。国外已报道的非致死黄瓜幼苗叶色突变体有 8 个: g、lg-1、lg-2、v、vvi、yc-1、yc-2、yp, 其中 g 基因控制的黄瓜基部叶片为金黄色; lg-1 基因控制的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 基因控制的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 基因控制的黄瓜叶片颜色逐渐由黄转绿; vvi 基因控制的黄瓜子叶颜色与 v 相同, 叶片花斑; yc-1 和 yc-2 基因控制的黄瓜子叶初期为黄色, 随后转绿; yp 基因控制的黄瓜所有叶片均呈浅黄色(Wehner 等, 2001)。

我国也发现了 4 种非致死黄瓜幼苗叶色突变体。1984 年, 通过 Co^{60} 辐射长春密刺的干种子

诱变,王玉怀等发现 1 株黄色子叶突变体,连续 3 代自交,其性状表现稳定,研究认为属细胞核遗传,由一对隐性基因控制(王玉怀等,1990)。1994 年,陈远良等从新泰密刺的后代中发现具有“芽黄”性状的突变体,连续多代自交,该突变体表现性状稳定。研究表明,“芽黄”性状为细胞核遗传,由一对隐性基因控制。由于认为“芽黄”性状和前面所述的黄瓜幼苗叶色突变体表现型不同,将发现的控制“芽黄”性状的基因命名为 *yh*(陈远良等,2000)。1990 年,从中农 5 号的后代中陈远良等发现 1 株黄绿色叶片的黄瓜突变体,连续多代自交,该突变体表现性状稳定。研究者认为该性状为细胞核遗传,由一对隐性基因控制,这一突变体与 *yp* 控制的性状和遗传规律基本一致,控制黄绿色叶片的基因可能就是 *yp*(陈远良等,2000)。1990 年,在深绿色叶的“地串”黄瓜品种单株自交后代群体中,分离出性状稳定的黄绿色叶突变株系。遗传分析结果表明,突变株系的黄绿色叶性状受一对隐性核基因控制。该性状在幼苗期表现,突变株能正常生存、繁殖,对控制此性状的基因符号暂定名为 *ysl*(王家训等,2000)。

本所育种工作者于 2001 年从黄瓜雌性系 9110G 中发现能稳定遗传的金黄色叶色突变体与 *vvi*、*yc-1*、*yc-2*、*yp* 在表型上均不同,*lg-2* 与本所发现的突变体在表型上不一致,突变体 *g* 描述的表型与该突变体相近,但 *g* 的存在不明,因此无法得知本所发现的突变体与 *g*、*v* 是否属于同一个突变体,突变体 *v* 描述的表型与本所发现的突变体相近,但 *v* 已经丢失。与国内以往的报道也不同,本所发现的叶色突变株开始子叶和第 1、2 片真叶是金黄色,叶色的主要变化主要发生在幼苗期,通过叶绿素测定发现,突变植株与正常植株的子叶、第 1、2 片真叶叶绿素含量差异均达到 1%显著水平。通过肉眼观察突变株与正常植株,发现两者只在叶色方面有差异。只是突变体黄化影响光合作用导致植株始终比正常植株生长缓慢,而其他农艺性状并不受影响。通过对亲本、 F_1 、 BC 及 F_2 代观察和叶绿素测定,证明该突变体是细胞核遗传,由单一隐性基因控制,正常叶表现为不完全显性(国艳梅等,2003)。因与以往报道的叶色突变体不同,所以将该叶色突变基因暂定名为 *v-l*。并发现 *v-l* 基因与控制黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 存在连锁但不紧密,连锁距离为 33.9cM,说明 *v-l* 与 *bi* 在同一连锁群(顾兴芳等,2005)。

1.3 分子标记技术

1.3.1 AFLP 分子标记技术

遗传标记是指可以明确反映遗传多态性的生物特征。在现代分子育种研究中,遗传标记的应用已成为基因定位和辅助选择的主要手段。随着科学的发展,由表及里,由浅入深,由宏观到微观,遗传标记可分为四个层次和水平,它们是:形态标记(morphological marker)、细胞学标记(cytological marker)、生化标记(biochemical marker)和分子标记(molecular marker)。遗传标记是生物分类学,育种学,遗传学和物种进化等研究领域的重要技术之一。

分子标记与其他三类遗传标记相比,有明显的优势:(1) 直接以 DNA 的形式表现,在生物体的各个组织、各个发育阶段均可检测到,不受季节、环境限制,不存在表达与否等问题;(2)数量极多,遍布整个基因组,可检测座位几乎无限;(3) 多态性高;(4) 表现为中性,不影响目标性状表达的影响;(5) 许多标记表现为共显性,能区别纯合体和杂合体。

根据对 DNA 多态性的检测原理和手段,分子标记可大致分为以下四大类:

第一类为基于 DNA-DNA 杂交的分子标记。该标记技术是利用限制性内切酶酶解及凝胶电泳分离不同生物体的 DNA 分子,然后用经标记的特异 DNA 探针与之杂交,通过放射性自显影或非

同位素技术来提示 DNA 的多态性。其中最具代表性的是发现最早的 RFLP 标记。

第二类为基于 PCR 的分子标记。这类标记技术可以在短时间内将少量的 DNA 样品快速扩增, 经过电泳并通过 EB 染色、银染、荧光标记或同位素标记或地高辛标记等多种方法进行检测其多态性的差异。根据所用引物的特点, 这类标记可分为随机引物 PCR 标记和特异引物 PCR 标记。随机引物 PCR 标记包括 RAPD 标记、ISSR 标记等, 其中 RAPD 标记使用较广泛。随机引物 PCR 扩增的 DNA 区段是事先未知的, 带有随机性和任意性, 因此随机引物 PCR 标记技术可用于对任何未知基因组的研究。特异引物 PCR 标记包括 SSR 标记、SCAR 标记、STS 标记等。特异引物 PCR 所扩增的 DNA 区段是事先已知的、明确的, 具有特异性, 因此特异引物 PCR 标记技术依赖于对各个物种基因组信息的了解。

第三类为基于 PCR 和限制性酶切技术相结合的分子标记。这类标记可分为两种类型, 一种是通过限制性酶切片段的特异性扩增来显示限制性片段长度的多态性, 主要包括 AFLP 标记。另一种是通过 PCR 扩增片段的限制性酶切来显示扩增区段的多态性, 如 CAPS 标记。

第四类为基于单个核苷酸多态性的分子标记。它是由 DNA 序列中因单个碱基的变异而产生的遗传多态性, 如 SNP 标记。目前, SNP 标记一般通过 DNA 芯片技术进行分析。

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)标记是基于 PCR 和限制性酶切技术相结合的一种分子标记。由 Zabeau 等于 1992 年发明, Vos 等(1995)发展起来的检测 DNA 多态性的一种新方法。结合了 RFLP 和 RAPD 的技术优势, 它兼具稳定性强和灵敏度高的特点, 同时也因丰富的多态信息量(polymorphism information contents, PIC)和易操作性而被广泛用于 DNA 指纹分析、遗传图谱构建、品种资源鉴定、标记辅助育种和基因鉴定和克隆等方面, 是近几年发展最快的 DNA 分子标记技术之一。

该方法的基本原理是选择性扩增基因组 DNA 的酶切片段而产生多态性, 选择性扩增是通过在引物末端加上选择性核苷酸实现的(见图 1)。基因组 DNA 经两种可产生粘性末端的限制性内切酶切割形成大小不同的限制性片段, 然后针对限制性内切酶设计的双链接头(adapter)连接到限制性片段的末端, 已知的接头序列和相邻的限制性位点修饰序列成为专用引物的结合位点。引物由三部分组成: 一为核心碱基序列(core sequence, CORE)。该碱基序列与人工接头互补; 二为特异性酶切序列(enzyme specific sequence, ENZ); 三为引物 3'端的选择性碱基延伸序列(selective extension, EXT), 该序列由几个(1-3bp)碱基组成。选择性碱基延伸到酶切片段区, 只有那些能与选择性碱基配对的两端限制性酶切片段被扩增。PCR 反应产物最终经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分辨。

AFLP 显示的 DNA 多态性取决于采用的内切酶及引物 3'端选择碱基的种类、数目和所研究的基因组的复杂性。通过改变限制性酶的种类以及 3'端的选择性碱基种类和数目, 就可以调节 AFLP 产物的条带特异性和数量。在不需要知道 DNA 序列的前提下, 可在一次单个反应中扩增得到大量的片段。AFLP 产物需使用同位素或非同位素标记(如荧光标记)来检测。银染方法是目前很普遍的检测方法。

AFLP 技术流程主要包括三个步骤: (1) 经限制性内切酶酶解后的 DNA 限制性片段, 与双链多聚核苷酸接头(adapter)连接; (2) 利用 PCR 方法, 通过变性、退火、延伸循环, 选择性扩增成套的限制性片段, 经过多次循环, 可使目的序列扩增到 0.5 - 1 μ g; (3) 使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测扩增的 DNA 片段。

由于将 RFLP 和 PCR 技术的优势有机地结合, AFLP 技术具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性, 可以在一个反应内检测大量限制性片段, 典型的 AFLP 分析每次反应的产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测到 50~100 条谱带, 多态性好的酶切引物组合, 一次可以检测到 20 个以上的多态性, 是检测多态性的一个非常有用的技术; 它另一个优点是其引物在不同物种之间具有通用性, 可应用于没有任何分子生物学研究基础的物种。因而非常适合于遗传多样性研究、品种指纹图谱的绘制、连锁遗传图的构建以及基因定位等领域。具体优势表现在: (1) 理论上, AFLP 可以产生的标记数目是无限的; (2) 扩增效率高, 多态性比例高; (3) AFLP 呈典型的孟德尔方式遗传, 可作为物理图谱和遗传图谱的桥梁, 用于构建基因组高密度图谱; (4) AFLP 标记稳定可靠, 不受基因组来源和复杂度的影响, 没有种属特异性; (5) AFLP 对模板浓度不敏感, 允许一定程度的共扩增。

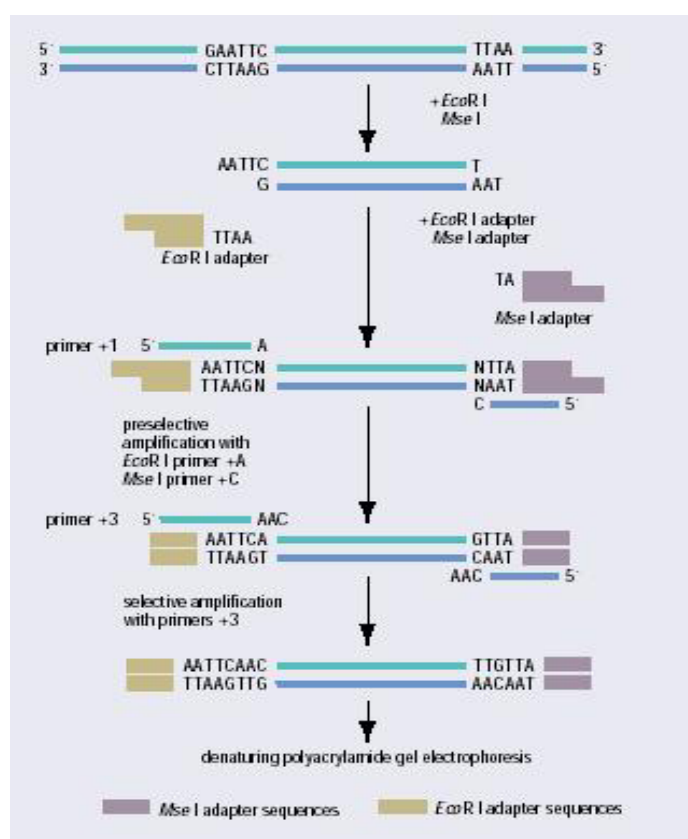


图 1 AFLP 标记技术的原理示意图

Fig.1 the principle of Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP 标记技术的主要不足是, 要使用同位素或非同位素标记引物, 相对比较费时耗财。同时进行 AFLP 实验的步骤多, 流程长, 优化每一步的条件十分重要, 在分子标记辅助选择中进行大量样品 DNA 的 AFLP 分析, 操作较为繁琐。

1.3.2 SCAR 标记技术

SCAR(Sequence Characterized Amplified Region)由 Paran 和 Michelmore(1993)首次提出并应用。它是在对多态性 RAPD 产物测序的基础上, 设计一对新的引物特异地扩增一个位点的 DNA 片段, 一般在原 RAPD 引物的 3'与 5'端延长 14 个碱基, 利用两端各 24 个碱基的引物进行特异扩

增。与 RAPD 相比, SCAR 方法具有以下优势: (1) 由于使用长引物和高退火温度, 具有高稳定性。(2) 具有转化显性 RAPD 标记为共显性的 SCAR 标记的可能性。(3) 如果为显性的话, 可以直接染色检测。

SCAR 是一种典型的特异扩增反应, 是目前能将 RAPD 标记转化为稳定标记的较少方法之一。基于上述优点, SCAR 标记成为目前分子标记在育种实践中能直接应用的首选标记。在近几年开展的抗病基因标记研究中, 许多研究者均将 RAPD 或 AFLP 标记转化为 SCAR 标记, 并在转育后代中得到了较好的验证(许勇, 1999; Williamson 等, 1994)。

1.3.3 分离群体混合分析法

现在主要有四种方法用于分子标记的筛选, 分别是: 作图法、分离群体混合分析法、近等基因系法、选择性基因型分析。

分离群体混合分析或分群分析法(Bulked segregant analysis, BSA)是 Michelmore 等(1991)建立起来的一种快速的连锁标记分析方法, 它是从近等基因系(Near-isogenic lines, NIL)分析法演变而来的, 克服了许多作物没有或者难以创建相应 NIL 的限制, 在自交和异交物种中均有广泛的应用前景。对于尚无连锁图或连锁图饱和程度比较低的植物, 利用 BSA 法可以快速获得与目标基因连锁的分子标记。其基本原理是: 从某一杂交组合的分离群体中建立两个混合的 DNA 池, 每一个池由特定性状或基因组区域相同而非连锁区域完全随机的同类个体组成。两个混合样品池具有完全相对的性状(如一个表现为抗病, 另一个表现为感病), 因此这两个混合样品池在所选择的区域内遗传上是相异的, 而在其它区域则只是混合的。可以针对不同的基因组区域或利用不同的分离群体来组成这类混合体, 然后利用 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等标记分析, 在两个混合池间寻找有差异的分子标记, 两类混合池间表现出多态性的分子标记在遗传上可能与构建该混合体所用性状的基因座位相连锁。最后可以通过对分离群体的分析, 验证其连锁关系, 并确定与目标性状基因的连锁距离。

Michelmore 利用 BSA 法, 在莠苣中获得 3 个与霜霉病抗性基因相连锁的 RAPD 标记(Michelmore 等, 1991)。利用 BSA 法, 水稻抗瘠瘠基因(Mohan 等, 1994)、水稻抗稻瘟病基因(朱立煌, 1994)也已定位。BSA 法需要的分离群体易构建, 不需要长期的育种基础。所以它在广泛应用于各种作物抗病基因、育性相关基因及许多重要质量性状基因的分子标记研究中。

Johan Peleman 验证了 BSA 法也适用于多基因控制的数量性状。以油菜 F_2 群体(2500 多个单株)为试材, 采用 BSA 法研究了油菜 glucosinolate 和芥子酸含量有关的分子标记, 所筛选到的候选标记经 200 个 F_2 随机单株验证, 表明有 3 个不同位点与 glucosinolate 含量有关, 有 2 个 QTL 和芥子酸含量有关。他的这些研究结果与 Toroser 等、Jourden 等对该两个性状的 RFLP 作图结果是一致的。这说明 BSA 法同样适用多基因控制的数量性状分子标记研究。

1.4 AFLP 标记技术在植物育种中的应用

1.4.1 遗传作图

AFLP 是目前构建基因组特定区段高密度遗传连锁图谱最为有效的方法。Macheswaran 等利用 20 对 AFLP 引物检测到水稻中 208 个多态性标记, 结合已有的水稻 RFLP 遗传图谱, 将这些多态性标记全部定位于基因组特定染色体上, 大大增加了原有图谱的标记密度, 遗传图距由 13.4cM

降至 8.9cM, 遗传图谱长度也由原来的 1811cM 增至 3058cM, 同时还填补了 8 号染色体上 RFLP 标记 RG20PRZ143 和 RG478 之间的空隔区(Gap)(Macheswaran 等, 1997)。Qi 和 Lindhout 从 96 对引物组合中筛选出 48 对用于 16 种大麦的基因组 DNA 研究, 得到大量标记(Qi 等, 1997)。Qi 等利用 25 个 AFLP 引物组合构建了高密度的大麦分子图谱, 包括 561 个 AFLP 标记、3 个形态学标记、1 个抗病基因和 1 个 STS 标记(Qi 等, 1998; 吴晓梅等, 2000)。宋国立等利用 AFLP 银染技术对中棉所 2 号、中棉所 3 号、中棉所 10 号等 8 个陆地棉品种进行初步研究, 结果得出 8 个品种的扩增带一般在 60~140 条之间, 远远比 RFLP、RAPD、SSR 等丰富(宋国立等, 1999)。Margues 等利用 AFLP 标记技术, 作图群体为细叶桉(*Eucalyptus tereticornis*) × 蓝桉(*E. globules*)的 F_1 群体, 按照拟测交的作图策略, 分别构建了细叶桉和蓝桉的分子标记连锁图谱(Margues 等, 1998)。到目前为止, 已有几十种植物通过 AFLP 技术得到大量的 DNA 标记, 包括向日葵、莴苣、棉花、食松(*Pinus edulis*)、油松(*Elaeagnus neensis*)、可可、胡椒、大麦、玉米、甜菜、番茄、油菜、马铃薯、小麦、水稻、菜豆、木薯、桦树、棕榈、橡树和兰花等(相宁等, 2000)。

1.4.2 基因定位

遗传图谱的建立为数量性状和质量性状基因的定位奠定了基础。通过质量性状的标记分析, 能将质量性状的基因定位到相关的染色体区段上。目前, 利用 AFLP 标记常对一些抗性基因进行定位。Meksem 等在马铃薯 RFLP 图谱上添加 AFLP 标记, 利用分离群体和 108 个引物组合, 从 3200 个 AFLP 片段中发现有 29 个与马铃薯第 5 染色体 R1 基因(R1 基因是 *Phytophthora infestans* 特异小种的基因)连锁的 AFLP 标记, 并将其定位在第 5 染色体上(Meksem 等, 1995)。Thomas 等利用 AFLP 技术结合 BSA 法检测与番茄抗叶霉病基因 cf9 紧密连锁的标记, 在 78 对引物所产生的 42000 个 AFLP 片段中, 发现了 3 个标记与 cf9 基因表现共显性, 通过转座子标记法分离 cf9 基因, 分析含此基因的质粒克隆, 将其中 2 个 AFLP 标记定位于 cf9 基因位点两侧约 15.9kb 的区域内(Thomas 等, 1995)。Cervear 等利用 AFLP 标记对美洲黑杨的抗病基因进行研究, 根据 BSA 法建立抗病基因池和感病基因池, 通过 AFLP 分析找到与抗病基因紧密连锁的分子标记, 得到 3 个与抗病基因紧密连锁的 AFLP 标记(Cervear, 1996)。Cho 等利用一套近等基因系, 只用两个引物组合在水稻上就找到两个 AFLP 标记, 并分别将它们定位到第 1 和第 9 染色体上(Cho, 1996)。Van der Vorrt 等利用 733 个 AFLP 标记的基因位点作图, 并将马铃薯抗线虫基因位点 Gpa2 定位至第 12 条染色体上(Van der Vorrt, 1997)。

1.4.3 分子辅助育种

传统育种是通过表型对基因进行选择, 这种选择无论对质量性状还是数量性状, 都会因表型的测量难度较大或因误差较大造成选择困难。

利用 AFLP 技术有助于克服育种早期选择的盲目性。Vantoai 等利用 AFLP 技术研究了大豆轮回选择过程中, 亲本基因组 DNA 对子代的贡献。实验表明, 根据 AFLP 标记可以进行轮回选择, 可以跟踪基因的转移情况, 如果 AFLP 标记与要选择的基因紧密连锁, 这样就可以在早期筛选植物分离群体中含目的基因的植株(Vantoai, 1996)。王泽立等以 1 对近等基因系(NIL)及其回交群体(BC_1)为材料, 利用 AFLP 技术结合 BSA 法, 筛选与玉米 S 组育性恢复基因(Rf3)连锁的分子标记。在筛选的 128 个 AFLP 引物组合中, 有 2 个能在 NIL 及其可育池、不育池间扩增出多态性条带

RR6 和 RR7。100 个 BC₁ 个体验证结果表明, AFLP 标记 RR6 扩增产物中仅出现 2 个重组体, 重组率 2%, 由此估测 RR6 距 Rf3 基因约 2.0cM; 并成功地将此标记转化为 SCAR 标记, 进行了 NIL 和 BC₁ 个体的特异性扩增, 为玉米 CMS2S 的 Rf3 基因的早期辅助选择和加快回交转育的育种进程奠定了基础(王泽立, 2001)。

1.4.4 遗传多样性及分类进化学研究

AFLP 标记多态性强, 利用放射性标记在变性的聚丙烯酰胺电泳上可检测到 50 ~ 100 个扩增片段。Mackill 等分别利用 RAPD、微卫星及 AFLP 标记分析 14 个水稻品种的基因组, 18 对 AFLP 引物检测到 529 条带, 其中有 14 条为多态带(Mackill 等, 1996)。与 RAPD 和微卫星相比, AFLP 标记的多态性表现中等, 但每一次它的凝胶分析所获得的多态标记数最多。Paul 等利用 AFLP 技术检测来自肯尼亚和印度不同地理生态区的 32 个茶树品种的遗传多样性, 用 5 对引物产生了 73 个多态标记位点(Paul 等, 1997)。

1.5 黄瓜分子生物学研究现状

黄瓜是葫芦科一个重要的种, 其许多特点有利于对葫芦科进行遗传学研究。黄瓜的染色体数目较少($n=7$), 便于进行连锁研究; 生活周期短, 一年可以生长几代; 容易种植, 既可进行有性生殖, 也可通过切段或不定芽培养进行无性繁殖; 植株花期长, 不同生长期的植株均可进行杂交; 虽是雌雄同株, 但为单性花, 人工授粉时不需去雄; 黄瓜种子量大, 寿命较长。随着分子生物学的发展, 黄瓜中大量的基因被鉴定, 分子标记技术的出现及广泛应用使得黄瓜分子辅助育种成为可能。其中包括数量性状座位(QTLs), 新的基因或基因位点之间以及它们与形态学基因之间的连锁关系的研究有很大进展。2001 年公布的黄瓜基因列表中包括了 10 个种类的基因突变体: 幼苗突变体、茎突变体、叶突变体、花突变体、果型突变体、果色突变体、抗性突变体(主要是抗病方面)、蛋白质(同工酶)标记共 158 个, DNA 标记 111 个(包括 91 个 RFLP 标记, 20 个 RAPD 标记)(Wehner 等, 2001), 目前为止, 已公布发现的黄瓜基因有 167 个。

1.5.1 种质资源方面的研究

种质的遗传多样性是作物育种研究的重要组成部分。遗传变异是植物品种改良的基础, 对所掌握的种质资源的遗传多样性进行准确的评价可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性的指导。过去, 人们主要是通过一些肉眼可见的形态标记即田间表现性状进行选择。分子标记技术的诞生, 为生物遗传多样性的评估提供了有力的工具。

张海英等采用 RAPD 技术对黄瓜种质资源的遗传亲缘关系进行了研究, 将供试材料分成了 3 大类群: 华北类群、华南类群和欧洲温室类群, 并对利用 RAPD 技术进行亲缘控制的可能性进行了探讨(张海英等, 1998)。Staub 等利用同工酶和 RAPD 标记评价了 38 个黄瓜品系的多态性(Staub 等, 1985)。Seiji Matsuura 等利用 RFLP 技术分析日本黄瓜品种的 DNA 特征带(Seiji Matsuura 等, 1995)。Katzir 等用 SSR 技术对葫芦科不同的蔬菜品系的多态性进行检测, 7 个 SSR 中的 4 个可检测出 11 个黄瓜品系的多态性(Katzir 等, 1996)。顾兴芳等用 AFLP 技术对国内外多个生态型的 15 份黄瓜品种进行遗传亲缘关系的分析(顾兴芳等, 2000)。李锡香利用形态标记和分子标记(AFLP 和 RAPD)对 70 份黄瓜种质的遗传多样性进行的系统评价和分类研究证明: 中国黄瓜是黄瓜基因多样性的中心之一, 不同来源的种质具有其特异性(李锡香等, 2002)。Patricia Silva Ritschel 等利

用 SSR 技术对葫芦科的六种瓜类进行了遗传分析,设计了 144 对引物,共检测出 700 个条带,67 个 SSR 标记中有 65 个在各种瓜之间显示出 DNA 多态性,其中有超过 50% 的标记可用于黄瓜多态性的分析,大大节省了标记的筛选成本(Patricia 等,2004)。

1.5.2 快速寻找与目的基因紧密连锁的分子标记

Kennard 等用 RFLP 技术对黄瓜的一些数量遗传性状,如果实直径、长度和果重等方面进行检测(Kennard 等,1995)。Serquen 等发现与黄瓜小叶(*ll*)基因连锁的 2 个 RAPD 标记,二者分别位于其两侧 3.4cM 和 12.2cM 处;他们还找到了与黄瓜有限生长型(*de*)基因连锁的 RAPD 标记,该标记与 *de* 的连锁距离为 16 cM(Serquen 等,1998)。Thomas Hirejsi 等获得了 5 个与黄瓜霜霉病抗性基因连锁 RAPD 标记,其中 BC519₁₁₀₀ 和 G14₈₀₀ 分别位于霜霉病抗性基因两侧 9.9cM 和 16.5cM 处,而且标记与目标基因处于相斥相,这与单个连锁标记和标记与目标基因处于相引相相比,更易于提高分子标记辅助育种中目标性状的挖掘(Thomas Hirejsi 等,1999)。Young Hoon Park 发现黄瓜对 PRSV-W 的抗性基因和对 ZYMV 的抗性基因紧密连锁(2.2 cM),且找到了一个 AFLP 标记与 ZYMV 抗性基因共分离(Young Hoon Park 等,2000)。张桂华找到了一个与黄瓜白粉病抗性相关基因 AFLP 标记,并将其转换为共显性的 SCAR 标记(张桂华,2003)。陈劲枫运用 AFLP 技术筛选出一个与黄瓜全雌性性状连锁的标记,并转化为 SCAR 标记,准备将该标记用于苗期检测黄瓜全雌性单株(陈劲枫等,2004)。张素勤利用 AFLP 技术结合并改良 BSA 法,找到一个与控制黄瓜霜霉病和白粉病某个数量感病基因均紧密连锁的 AFLP 标记,进一步从分子水平验证了黄瓜霜霉病和白粉病某个数量感病基因位点是相连锁的,同时它们分别相对应的抗病基因位点也是连锁的(张素勤,2005)。

1.5.3 分子标记辅助育种

近 10 余年来黄瓜分子辅助育种有了很大的发展,但与重要农作物相比,尤其是禾本科作物和茄科作物分子辅助育种的发展相比还有不少差距。对于数量性状进行选择的表现值选择模型(刘福来等,1984)、标记值选择模型、指数选择模型(Lande 等,1990)和基因型选择模型(Hospital 等,1997)等选择体系已经建立,但这些在蔬菜分子辅助选择中应用较少。黄瓜分子辅助育种还处在技术模仿和资源积累的阶段,将分子标记技术和黄瓜育种的实践紧密结合起来,在建立研究群体的时候就注意应用那些品质优良的材料作亲本,使新构建的群体既是研究群体,又是育种群体;选择应用多态性高而且稳定、经济的标记技术;建立适于黄瓜生长发育和遗传特点的分子辅助选择的模型等方面是黄瓜育种家今后努力的方向。

1.5.4 遗传作图

遗传图谱包括连锁图、物理图、基因图和序列图。连锁图能确定等位基因或标记位点在染色体的相对位置和排列顺序,是研究和利用物理图、基因图、序列图的基础和桥梁。现代分子连锁图已广泛应用于基因定位、分子辅助选择、基因图位克隆、物种进化及亲缘关系研究等基因组研究领域。

黄瓜有 7 对染色体,高饱和的黄瓜连锁图应具有 7 个连锁群,总长度为 750~1000 cM 之间(Staub 等,1993)。国外公布的黄瓜连锁图有七个,1987 年 Fanourakis 等利用形态学标记构建的图谱总长为 168 cM(Fanourakis NE 等,1987);1992 年 Knerr 等利用同工酶标记构建的图谱总长

166 cM(Knerr 等, 1992); 1994 年 Kennard 等利用 RFLP、RAPD、同工酶、形态和抗病性所产生的标记构建图谱, 获得包括 58 个位点的遗传图谱, 分属 10 个连锁群, 覆盖总长为 766 cM, 标记间平均距离约为 21 cM(Kennard, 1994); 1995 年 Lee 等公布利用 RAPD 技术在黄瓜的杂交 F_2 群体中发展分子标记, 获得具有 28 个 RAPD 标记的图谱(Lee 等, 1995); Serquen 等利用重组近交系构建了由 77 个 RAPD 标记和三个基因组成的 80 个位点的黄瓜遗传图谱, 分属 9 个连锁群, 覆盖 600 cM(Serquen 等, 1997); Bradeen 等将已公布的各类遗传图谱(包括形态位点、同工酶位点、抗病位点、RFLPs、RAPDs、SSRs、AFLPs)整合起来, 构建了一张综合连锁图谱, 迈出了构建高密度遗传连锁图谱至关重要的第一步(Bradeen 等, 2001)。Staub 等构建了一个包括 62 个 RAPD 标记、24 个 SCAR 标记、27 个 AFLP 标记、14 个 SSR 标记、1 个 SNP 标记共 131 个标记, 及三个在形态学上很重要的基因(雌性 F 基因、有限生长型 de 基因、小叶 ll 基因) 得遗传图谱, 七个连锁群覆盖 706 cM, 标记间平均距离为 5.6 cM(Staub 等, 2003)。我国科研工作者已构建 2 张黄瓜遗传图谱, 其一是张海英等利用黄瓜重组自交系为作图群体, 构建的包含 9 个连锁组群, 共有 234 个分子标记的连锁图谱, 其中包括 141 个 AFLP 标记、4 个 SSR 标记和 89 个 RAPD 标记, 覆盖基因组长度 727.5 cM, 平均图距 3.1 cM。对控制黄瓜耐弱光的数量性状基因(QTL)进行了研究, 共定位了 5 个叶面积增长量的 QTL(张海英等, 2004); 其二为潘俊松、李效尊等利用 F_2 代群体, 采用 SRAP 和 RAPD 技术, 构建的包含 77 个 SRAP 标记和 79 个 RAPD 标记的遗传图谱, 分属 4 个大的连锁群和 5 个小的连锁群, 总长度 1110.0cM, 平均间距为 13.7cM。同时将控制侧枝性状的基因定位在第 ii 连锁群上(潘俊松等, 2004)。

与其它异花传粉植物相比, 黄瓜更接近于自花传粉植物, 因此栽培黄瓜的多态性水平较低。到目前为止, 已发表的多张黄瓜遗传图谱大多不饱和, 而且, 检测到的标记与重要经济性状的连锁不紧密, 使这些图谱在黄瓜遗传改良上的应用受到了限制, 因此, 构建饱和的黄瓜遗传连锁图谱就成为今后分子标记辅助育种的一个重要方面。

1.5.5 黄瓜基因工程研究进展

基因工程为黄瓜育种及种质定向改良开辟了一条崭新的途径。利用农杆菌介导和花粉管通道法可成功地将胞外表达的几丁质酶基因(*Chi*)和 β -1, 3-葡聚糖酶基因(*Glu*、*GCE*)及葡萄糖氧化酶基因(*Go*)转入黄瓜, 以获得对某些真菌性病害有一定抗性的植株, 经分子杂交验证, 其转化率可高达 19.2% (张猛, 2000)。王慧中等以黄瓜子叶切段为外植体, 通过叶盘转化法与根癌农杆菌进行共培养建立了黄瓜的转基因系统, 转基因植株经 PCR 检测和 Southern blot 杂交, 外源 *WMV-2 CP* 基因确实导入黄瓜细胞且能稳定地遗传到子一代。获得的转基因子一代植株对 *WMV-2* 表现较强的抗性, 可以延迟发病时间, 减轻发病程度(王慧中等, 2000)。何铁海等用农杆菌介导法将 *CMV-CP* 基因导入黄瓜细胞, 在含有卡那霉素和羧苄青霉素的 MS 培养基上诱导子叶分化, 获得一批转化处理的黄瓜再生苗, 分化率为 23%左右, 转基因黄瓜试管苗移栽到蔬菜种植土:沙:有机质为 5:4:1 的混合土中, 其移栽成活率可达 56%; 对转基因再生植株进行 *CMV* 抗性接种鉴定, 结果表明: 7 号株系高抗, 2、4 株系为中抗(何铁海等, 2001)。李远新等进行了黄瓜授粉后 DNA 直接导入技术的研究, 建立了高效的黄瓜子房注射转化系统, 获得了不同的转基因植株。结果表明子房注射法的坐果率和结种率最低, 但其转化率最高; 黄瓜授粉后 12h 注入外源基因的转化率最高; 外源 DNA 溶液的浓度、pH 值和注射体积是影响黄瓜坐果结实及基因转化率的重要因素。经

GUS 组织化学染色及 Southern 杂交检验, 获得了转基因黄瓜植株(李远新等, 2000)。

基因工程实现了蔬菜遗传性状的定向改良, 大大提高了育种的目标性和准确性; 扩大了黄瓜育种对种质资源利用的范围; 分子水平的重组打破了物种之间有性杂交的隔离, 可以将丰富的外源基因转移到所需改良的黄瓜品种上, 从而大大缩短了育种年限。

1.6 本实验的研究目的、意义及主要内容

随着生活水平的提高, 人们对黄瓜品质提出更高的要求, 同时, 气候的变化、各类病害的发展、连作障碍等不利因素的存在都给黄瓜的科研及生产带来许多新的课题。利用常规育种的方法, 已很难在育种上实现突破。随着植物生物技术的发展, 可以对育种中所需性状的基因型进行直接选择。

黄瓜无苦味果实的筛选需要在结果期判断, 需种植于易产生苦味的条件下, 筛选工作极为繁琐。因此解决黄瓜苦味问题的最好方法就是培育完全无苦味的品种, 即含有纯合 *bi* 基因。运用传统的育种方法将国内品种与国外无苦味品种杂交、回交、自交, 至少要进行 6~10 个不同世代的选择才能选育出稳定的无苦味自交系。寻找与 *bi* 基因紧密连锁的分子标记, 可以在育种早期对较大群体进行选择, 为克服由环境条件和感官误差引起的选择困难、提高育种效率。

叶色突变是自然界发生的一种重要突变, 可在苗期作为指示性状鉴定杂交种纯度, 同时也是研究光合效率的良好资源。对本所发现的金黄色叶突变体进行遗传分析及分子标记研究, 不仅可以丰富黄瓜连锁图谱、为定位目的基因奠定基础, 还可从分子角度进一步揭示叶色突变基因与黄瓜植株不苦基因 *bi* 的连锁关系, 并将叶色突变性状运用于黄瓜杂交制种方面来鉴定杂种纯度, 加快分子标记辅助育种在黄瓜上的应用。

本试验的研究内容: 以含有营养器官不苦基因 *bi*、叶色突变基因 *v-1* 的纯合雌性系与含有营养器官苦味基因 *Bi*、绿色叶片基因 *V-1* 的普通花性自交系材料为亲本进行杂交回交, 根据其 F_1 、 BC_1 和 F_2 后代的苦味、叶色突变分离情况, 研究营养器官苦味性状和叶色突变性状的遗传规律。以 F_2 代分离群体为试材, 采用 AFLP 技术结合 BSA 分析方法, 筛选与黄瓜营养器官苦味性状、叶色突变性状连锁的 AFLP 标记, 为黄瓜分子标记辅助育种奠定一定基础。

第二章 遗传规律分析

黄瓜目前已有 167 个基因公布, 仅有 44 个被定位在 6 个基因连锁群上。黄瓜苦味性状的研究在上世纪 50 年代已有报道, 但关于营养器官苦味性状, 及其与其他主要性状间的连锁遗传关系的研究结论不尽相同(Wehner 等, 1998) (Cowen, 1983; Vakalounakis, 1992; 顾兴芳等, 2005)。已报道的黄瓜叶色突变基因国外有 8 个, 国内有 5 个。本所黄瓜组发现的金黄色叶色突变体与以往报道的叶色突变体, 控制该性状的叶色突变基因 *v-1* 与黄瓜基因列表上已有的也有所不同。

本试验通过对亲本、 F_1 、 F_2 及 BC_1 分离后代的调查, 研究控制黄瓜营养器官无苦味基因 *bi*、叶色突变基因 *v-1* 的遗传规律, 及两者与雌性 *F* 基因、暗色果皮基因 *D*、果色一致基因 *u*、果瘤基因 *Tu* 等之间的关系, 为分子标记研究提供可靠的田间数据, 为丰富黄瓜基因连锁群、合理利用基因提供理论依据。

2.1 材料

纯合雌性系 9110GT(简称 P_1)含有营养器官不苦基因 *bi*、叶色突变基因 *v-1*; 普通花性自交系 03828(简称 P_2)含有营养器官苦味基因 *Bi*、绿色叶片基因 *V-1*。亲本有关性状和基因型见下表:

基因名称	基因符号	表现型 显性	表现型 隐性	亲本基因型 P_1	亲本基因型 P_2
营养器官不苦	<i>bi</i>	营养器官苦	营养器官不苦	<i>bi</i>	<i>Bi</i>
金黄色叶片	<i>v-1</i>	绿色	金黄色	<i>v-1</i>	<i>V-1</i>
雌性	<i>F</i>	雌性	普通花性	<i>F</i>	<i>f</i>
果色一致无花纹	<i>u</i>	有花纹	果色一致	<i>u</i>	<i>U</i>
果瘤有无	<i>Tu</i>	有瘤	果皮表面光滑	<i>tu</i>	<i>Tu</i>
暗色果皮(无光泽)	<i>D</i>	果皮暗	有光泽	<i>d</i>	<i>D</i>



图 2 亲本材料果实对比图, 母本(左), 父本(右)
Fig.2 Fruit of parents, P_1 (Left) P_2 (Right)

2.2 遗传分析方法

2005 年春季在大棚内种植亲本和 F_1 各 12 株、自交获得的 F_2 代 180 株及 BC_1 代 84 株左右。采

用口尝的方法鉴定营养器官及果实的苦味情况，苗期品尝子叶 1 次，成株期品尝真叶或卷须 1~2 次，以验证与苗期品尝的一致性，若不一致增加品尝次数。果实的品尝从根瓜开始直至拉秧，若每株有 3 次果实出现苦味，该株即定为果实苦，可不再品尝，否则继续品尝，尤其是未出现苦味的单株，需品尝植株上所有的果实，一般每株品尝 7 条瓜以上。每次由对苦味敏感者 2 人以上同时品尝，以确保试验结果的准确性。

苗期采用肉眼详细观察记载各分离后代叶色的分离情况。自结果期开始调查性型，植株上全部为雌花或仅有 1~2 个雄花即定为雌型株，否则为普通株。果实有无光泽、果面花纹、果瘤有无等果实表面调查也在结果期进行。由于 F₂ 群体会出现个别单株坐果不好，所以总株数会略有不同。

首先用 χ^2 测验各性状在 F₂ 代的显隐性情况，按照孟德尔基因独立分配与连锁遗传规律的原理及公式，确定这些性状是否符合显隐性单基因的遗传特点。再统计每 2 对基因在后代各基因型的植株比例，用 χ^2 测验确定是否符合独立遗传，若推断存在连锁关系，需进一步计算每对基因间的重组率。计算基因重组率 R 和标准误 SE 的公式依照刘进生等(2000)的方法，公式如下：BC₁(仅相引相)： $R=(b+c)/n$ ； $SE= \sqrt{R(1-R)/n}$ ^{1/2}，其中 b、c 分别是基因型 A-bb，aaB-在 BC₁ 代的分离比率。

2.3 营养器官苦味性状的遗传规律分析

以营养器官、果实均不苦的纯合雌性系 P₁ 为母本，与仅营养器官苦的普通花性自交系 P₂ 杂交获得的 F₁ 植株营养器官是苦的，果实也有苦味；F₂ 植株群体中，营养器官苦与不苦的遗传分离比例符合 3:1，营养器官苦:果实与营养器官均苦:果实与营养器官均不苦的比例为 1:2:1；与 P₁ 回交的后代果实和营养器官均苦与均不苦的比例为 1:1，与 P₂ 回交的后代果实和营养器官均苦与只营养器官苦的比例为 1:1(见表 1)。通过品尝，果实的苦味大多出现在近瓜把部。

表 1 黄瓜亲本及其 F₁、BC₁、F₂ 群体苦味株数分离情况
Table 1 The separate ratios of bitterness in parents,F₁,BC₁ and F₂ generation

世代 Progeny		营养器官 果实均苦 Bitterness in foliage and fruits	营养器官 苦 Bitterness In foliage	均不苦 No bitter	总数 Total plants	期望比 Theoretical ratio	X ²	显著性 Significance	X ² _{0.05}
亲本 Parents	P ₁			12	12				
	P ₂		12		12				
F ₁	P ₁ ×P ₂	12			12				
F ₂	P ₁ ×P ₂	64	33	43	140	1:2:1	1.028	不显著 No significance	5.991
BC ₁	(P ₁ ×P ₂)×P ₁	39		45	84	1:1	0.428	不显著 No significance	3.841
	(P ₁ ×P ₂)×P ₂	37	44		81	1:1	0.604	不显著 No significance	3.841

2.4 叶色突变性状的遗传规律分析

对所有植株在苗期进行叶色观察，F₁ 代均为中间色，F₁ 与正常株的回交后代分离为绿色和中间色(见图 3、4)，分离比例接近 1:1；F₁ 与突变株的回交后代分离为黄色与中间色，分离比例接近

1:1。F₂ 代分离为绿色、中间色及黄色，分离比例接近 1:2:1(见表 2)。



图 3 亲本及 F₁ 的叶片颜色对比，P₁(左)P₂ (右)F₁(中)
Fig.3 Leaf color of parents and F₁ hybrid progeny, Mutant parent(Left),Normal parent(Right),F₁(Middle)



图 4 F₂ 代的叶色分离
Fig.4 Leaf color of F₂ plants

表 2 黄瓜正常株系及金黄色叶色突变株系的杂交后代分离情况
Table 2 Separation proportion of hybrid of mutant plant and normal plant

世代 Progeny		黄色 Yellow	中间色 Intermediate	绿色 Green	总数 Total plants	期望比 Theoretical ratio	X ²	显著性 Significance	X ² _{0.05}
亲本 Parents	P ₁	12			12				
	P ₂			12	12				
F ₁	P ₁ ×P ₂		12		12				
F ₂	P ₁ ×P ₂	40	92	54	186	1:2:1	2.130	不显著 No significance	5.991
BC ₁	(P ₁ ×P ₂) ×P ₁	49	40		89	1:1	0.910	不显著 No significance	3.841
	(P ₁ ×P ₂) ×P ₂		43	53	96	1:1	1.042	不显著 No significance	3.841

2.5 材料中各性状之间的遗传规律分析

田间调查中对材料的性型(*F*)、果皮有无光泽(*D*)、果面花纹(*u*)、刺瘤(*Tu*)等性状进行记载，分析单基因测验结果认为：以上性状在 F₂ 代显隐性分离比例接近 3:1，回交后代分离比例接近 1:1(见表 3)。基因独立遗传的分析结果表明黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 与叶色突变基因 *v*-1 有连锁关系，而与 *F*、*D*、*u*、*Tu* 无连锁关系，后代独立分离(见表 4、5)。根据公式计算得出 *bi* 与 *v*-1 重组率 *R*

为 31.7% , SE 为 0.051。

表 3 单个基因在 F_2 、 BC_1 代分离株数的分析
Table 3 Separation proportion of each single gene in F_2 plants and BC_1 plants

基因型	$BC_1 P_2$ 分离情况		总株数	期望比	X^2	显著性	$X^2_{0.05}$
	A-	aa					
Ff	44	40	84	1:1	0.540	不显著	3.841
Uu	84		84				
Tutu	84		84				
Dd	84		84				

基因型	F_2 分离情况		总株数	期望比	X^2	显著性	$X^2_{0.05}$
	A-	aa					
Ff	108	31	139	3:1	0.540	不显著	3.841
Uu	79	28	107	3:1	0.038	不显著	3.841
Tutu	78	29	107	3:1	0.126	不显著	3.841
Dd	86	33	119	3:1	0.236	不显著	3.841

基因型	$BC_1 P_1$ 分离情况		总株数	期望比	X^2	显著性	$X^2_{0.05}$
	A-	aa					
Ff	84		84				
Uu	47	37	84	1:1	0.190	不显著	3.841
Tutu	43	41	84	1:1	0.047	不显著	3.841
Dd	39	45	84	1:1	0.429	不显著	3.841

表 4 两对基因与其他性状在 F_2 代分离株数的分析
Table 4 Separation proportion of two pairs of gene in F_2 plants

基因型	F_2 分离情况				总数 Total plants	期望比 Theoretical ratio	X^2	显著性 Significance	$X^2_{0.05}$
	A-B-	A-bb	aa-B-	aabb					
BibiFf	78	21	34	6	139	9:3:3:1	4.231	不显著 No significance	7.815
BibiDd	63	25	19	10	117	9:3:3:1	1.929	不显著 No significance	7.815
BibiTutu	58	22	20	8	108	9:3:3:1	0.510	不显著 No significance	7.815
BibiV1v1	85	13	19	22	139	9:3:3:1	28.948	显著 significance	7.815
VlVlFf	78	25	31	2	136	9:3:3:1	6.196	不显著 No significance	7.815
VlVlDd	66	26	14	9	115	9:3:3:1	4.049	不显著 No significance	7.815
VlVlUu	66	29	16	8	119	9:3:3:1	3.846	不显著 No significance	7.815
VlVlTutu	62	24	16	5	107	9:3:3:1	2.077	不显著 No significance	7.815

表 5 两对基因与其他性状在 BC₁ 代分离株数的分析
Table 5 Separation proportion of two pairs of gene in BC₁ plants

基因型	BC ₁ 分离情况				总数 Total plants	期望比 Theoretical ratio	X ²	显著性 Significance	X ² _{0.05}
	A-B-	A-bb	aa-B-	aabb					
BibiFf	40			46	86	1:1:1:1	0.419	不显著 No significance	7.815
BibiDd	13	24	15	26	78	1:1:1:1	6.409	不显著 No significance	7.815
BibiUu	15	16	15	20	67	1:1:1:1	1.030	不显著 No significance	7.815
BibiTutu	19	15	25	15	77	1:1:1:1	3.598	不显著 No significance	7.815
BibiV1v1	23	15	11	33	82	1:1:1:1	13.805	显著 significance	7.815
VlviFf	39		50		89	1:1	1.360	不显著 No significance	3.841
VlviDd	13	22	15	28	78	1:1:1:1	7.231	不显著 No significance	7.815
VlviUu	13	15	15	18	61	1:1:1:1	0.836	不显著 No significance	7.815
VlviTutu	20	13	23	15	71	1:1:1:1	3.550	不显著 No significance	7.815

2.6 小结

1、单基因测验结果

以 χ^2 值测验黄瓜营养器官苦味性状、性型(*F*)、果皮有无光泽(*D*)、果面花纹(*u*)、刺瘤(*Tu*)等五种性状在 F₂、BC₁ 代的分离情况,表明五种参试性状在各杂交后代群体中的表现皆符合显隐性单基因所支配的遗传特点。

对营养器官苦味性状的调查结果,计算分析后发现 Bi 与 bi 在 F₂ 代的分离比例符合 3:1,回交后代为 1:1, *bi* 基因为独立遗传,杂合状态 Bibi 时营养器官与果实都会出现苦味。

叶色突变性状 F₁ 代均为中间色, F₁ 与正常株的回交后代分离为绿色和中间色,分离比例接近 1:1; F₁ 与突变株的回交后代分离为黄色与中间色,分离比例接近 1:1。F₂ 代分离为绿色、中间色及黄色,分离比例接近 1:2:1,该性状为细胞核遗传,由隐性基因控制,并且绿色对黄色为不完全显性。

2、独立遗传的分析结果

基因独立遗传的分析结果表明,基因 *bi* 与 *F*、*D*、*u*、*Tu* 间,基因 *v-1* 与 *F*、*D*、*u*、*Tu* 间分别为独立遗传,它们在各杂交后代群体中的基因型分离比例,符合独立遗传的 9:3:3:1 或 1:1:1:1 的比例。

3、基因连锁遗传分析结果

分析结果表明黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 与叶色突变基因 *v-1* 有连锁关系,按基因重组率的计算公式,算得重组率 *R* 为 31.7%, *SE* 为 0.051,将重组率转换为图距单位 cM(厘摩)(1%=0.01cM),两基因的遗传距离为 31.7cM。

第三章 黄瓜营养器官无苦味 *bi* 基因的分子标记研究

黄瓜在不良的栽培条件下,果实易出现苦味。通过国内外多年的研究表明:由 *bi* 基因控制的黄瓜植株不含苦味素,果实在任何条件下都不苦,该基因的发现使得苗期筛选无苦味植株成为可能;*bi* 属于隐性的抑制果实与叶片中苦味的产生,能使叶片无苦味并阻止果实在逆境条件下变苦,用来抵抗环境诱导出现苦味。目前,对于黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 还没有分子生物学方面的研究报道,本试验利用 AFLP 技术筛选与 *bi* 基因紧密连锁的分子标记,并将其转化为 SCAR 标记。旨在将筛选到的与 *bi* 基因紧密连锁的 AFLP 分子标记用于育种早期对较大群体进行苦味性状的筛选,避免由环境条件和感官品尝带来的困难和误差,为我国培育无苦味黄瓜品种工作提供强有力的技术支持。

3.1 材料和方法

用于分子标记研究的植株材料与第二章遗传规律分析中所用材料相同,用于验证标记的群体是中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄瓜组 8 代自交得到的重组自交系。这个群体包括 148 个单株。

亲本 1(P_1): 纯合雌性系 9110GT, 营养器官与果实都不苦, 基因型为 *bibibtbt*

亲本 2(P_2): 普通花性系 03828, 仅营养器官有苦味, 基因型为 *BiBibtbt*

3.1.1 DNA 的提取(CTAB 法)

- (1) 2.0 ml 的离心管中加入离心管口大小的新鲜幼嫩叶片一片;
- (2) 加入 600 μ l CTAB 提取缓冲液, 研磨 3 min 至叶片粉碎;
- (3) 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;
- (4) 冷至室温, 加入 600 μ l 的氯仿:异戊醇(24:1), 上下轻轻颠倒混匀 10 min;
- (5) 13000 rpm 离心 10 min;
- (6) 吸取上清液 380 μ l, 放入预先加好 600 μ l 异丙醇的 1.5 ml 离心管中, 轻轻上下颠倒混匀;
- (7) 13000 rpm 离心 10 min;
- (8) 弃上清, 加入 1 ml 75% 乙醇清洗 DNA 沉淀, 室温放置 5~10 min, 7500 rpm 离心 5 min, 弃上清;
- (9) 加入 100 μ l 0.1 \times TE(内含 0.43 μ l 10 mg/ml RNaseA), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;
- (10) 取出 2 μ l DNA, 用 1.0 % 琼脂糖电泳检测所提 DNA 纯度和浓度;
- (11) 把 DNA 的浓度调到 50 ng/ μ l。取出 2 μ l 放入 0.2 ml PCR 管中, 用于 DNA 的酶切与接头的连接;
- (12) 将 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

3.1.2 AFLP 分析方法

采用黄瓜组已摸索成熟的黄瓜 AFLP 反应体系。黄瓜基因组的酶切采用 *Mse*I 和 *Eco*RI 内切酶, 基因组 DNA 的酶切--连接、预扩增、选择性扩增的体系总体积均是 20 μ l(见表 6、7、9)。37 $^{\circ}$ C 酶切连接 10h 以上。酶切--连接完成后的 DNA 样品即可作为 AFLP 预扩增的模板。

预扩增反应程序 :94 3 min ;94 30 sec ;56 30 sec ;72 1 min ,29 times to 2 ;72 7 min ;
END。反应结束后,将预扩增产物稀释 40 倍,作选择性扩增的模板。

选择性扩增反应程序 :94 5 min ;94 30 sec ;65 30 sec , -0.7 /cyc ;72 1 min ;12 times
to 2; 94 30 sec ; 56 30 sec ; 72 1 min +1 s/cyc ; 25 times to 6 ; 72 5 min ; END。

表 6 AFLP 酶切连接体系
Table 6 the reaction system of digestion and ligation

成分	原浓度	用量	来源
DNA	50ng/μl	2.00μl	
EcoRI	20U/μl	0.12μl	Biolabs 公司
MseI	10U/μl	0.24μl	Biolabs 公司
EcoRIadapter	5pmol/μl	0.40μl	上海生工
MseIadapter	50pmol/μl	0.40μl	上海生工
ATP	10mM	0.40μl	Promega 公司
NEB uffer2	10×	2.00μl	Biolabs 公司
BSA	100×	0.10μl	Biolabs 公司
T ₄ DNA ligase	2.5U	0.40μl	TaKaRa 公司
MilliQ H ₂ O		13.44μl	

Mse I adapter 和 EcoR I adapter 的序列见表 8。

表 7 预扩增反应体系
Table 7 the reaction system of preamplification

成分	浓度	用量	来源
酶切连接产物		5.0μl	
E ₀₀	50ng/μl	0.6μl	上海生工
M ₀₀	50ng/μl	0.6μl	上海生工
dNTP	2mMEach	2.0μl	TOYOBO 公司
PCR buffer	10×	2.0μl	Promega 公司
Mgcl ₂	25mM	1.2μl	Promega 公司
Taq polymerase	5U/μl	0.1μl	Promega 公司
MilliQ H ₂ O		9.5μl	

E₀₀ 和 M₀₀ 的序列见表 8 所示。

表 8 酶切连接接头序列及预扩增用引物序列
Table 8 Sequences of adapters and primers used in preamplification

酶切连接		预扩增	
名称	序列	名称	序列
ADEtop	5-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3	E ₀₀	5-GAC TGC GTA CCA ATT C-3
ADEbottom	5-CTG ACG CAT GGT TAA-3	M ₀₀	5-GAT GAG TCC TGA GTA A-3
ADMtop	5-GAC GAT GAG TCC TGA G-3		
ADMbottom	5-TA CTC AGG ACT CAT-3		

表 9 选择性扩增体系
Table 9 the selective amplification system used for detection by silver dyeing

成分	浓度	用量	来源
预扩产物稀释液		3.0μl	
EcoR I primer	50ng/μl	1.0μl	上海生工
Mse I primer	50ng/μl	1.0μl	上海生工
dNTP	2mMEach	2.0μl	Sunbio 公司
PCR buffer	10×	2.0μl	Promega 公司
MgCl ₂	25mM	1.0μl	Promega 公司
Taq polymerase	5 U/μl	0.2μl	Promega 公司
MilliQ H ₂ O		9.8μl	

选择性扩增反应结束后，在产物中加入 6 μl 变性凝胶加样缓冲液，95 °C 变性 5 min 后，进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，70 W 恒功率电泳至溴酚兰刚刚到达凝胶的另一端。电泳结束后采用银染技术进行染色。然后在 KANGRIDE 可见灯箱上观察记录银染结果。

3.1.3 分子标记的筛选及检测

由 16 个 E 引物 (E11、E12、E13、E14、E23、E24、E25、E26、E32、E33、E35、E36、E37、E38、E40、E41) 和 16 个 M 引物 (M47、M48、M49、M50、M59、M60、M61、M62、M63、M64、M65、M66、M67、M68、M69、M70) 组成 256 对引物组合，先用两个亲本筛选引物，选出两亲本之间的多态性引物组合。营养器官苦味性状、叶色突变性状是利用 BSA 法分别进行下一步筛选的。从 F₂ 群体选出营养器官苦与不苦的单株各 6 株(其 F₃ 家系的每个单株均不发生性状分离)DNA，组成苦味组和无苦味组；从 F₂ 群体选出叶色发生突变和叶色正常的单株各 6 株(其 F₃ 家系的每个单株均不发生性状分离)DNA，组成叶色突变组和叶色未突变组，每组内以单株为单位进行 AFLP 分析。分别以苦味组和无苦味组单株 DNA；叶色突变组和叶色未突变组单株 DNA 为模板，用两亲本间产生多态性的引物组合进行营养器官苦味性状、叶色突变性状相关标记的筛选，只要组内 5 棵单株带型一致，即初步认为该标记与两种性状相关基因连锁，接着，用筛选到的引物在整个 F₂ 群体材料中进行验证，统计条带的分离情况。

为了进一步检测获得标记的可靠性，采用与引物筛选相同的反应体系和反应条件，将筛选到的特异引物用 148 个重组自交系单株进行验证。

3.1.4 AFLP 银染检测目的片段的挖带回收、纯化及测序

1、目的片段的回收

采用煮沸法。具体操作为：先从银染胶板上将目标条带挖下来装入 1.5 ml 的 Eppendorf 管内，向管内加入 100μl 超纯水，加水量视胶带颜色深浅而定；常温下浸泡 24 h，转入 95 度水浴锅(或 PCR 仪)中煮 30 min 后，5000 rpm 离心 3 min。产物即可取上清 3 μl 做模板进行 PCR 扩增，剩余产物置-20 °C 保存备用。

2、目的片段的纯化

用 PCR 产物直接纯化方法。在 PCR 产物中加入 2 倍体积的 95%无水乙醇，-20 °C 过夜放置，

12000rpm 离心 5min 就可以得到纯化产物。

3、目的片段与载体的连接

反应体系为 10 μ l :

PMD18-T Vector	1	μ l
Ligation buffer	5	μ l
目的 DNA 片段	4	μ l

在超净工作台上加样，混匀反应物，短暂离心，16℃ 连接约 1h，过夜也不影响连接效率。

4、连接产物的转化

- (1) 取出感受态细胞，SolutionA，SolutionB，置于冰上融化；
- (2) 感受态(50 μ l)+5 μ l SolutionA +4 μ l SolutionB +46 μ l 预冷去离子水；
- (3) 用冷却的无菌枪头将上述悬浮液分装到 1.5 ml 离心管，每管加入 105 μ l，再加入 5 μ l 的目的 DNA，轻旋混匀；
- (4) 42℃ 水浴热激 90 s，注意不要晃动离心管；
- (5) 快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却 3~5 min；
- (6) 加入 500 μ l LB 液体培养基。在 37℃ 150 rpm 摇床上预培养 1 h；
- (7) 将菌液涂布到含有 100 μ g \cdot ml⁻¹ Amp、25 μ g \cdot ml⁻¹ IPTG 和 40 μ g \cdot ml⁻¹ X-GAL 的 LB 固体培养基上，用一无菌的弯头玻棒轻轻的将菌液均匀涂开，置于室温直至液体被吸收；
- (8) 倒置平板，37℃ 培养 12~16 h。

5、重组质粒的蓝白斑筛选

经 37℃ 培养后，在涂布 X-Gal/IPTG 的 LB 平板上出现少量蓝色菌落和较多的白色菌落，其中白色菌落为重组克隆子。挑取白色单菌落涂抹在划好方格的 LB 液体培养基中，37℃ 150 rpm 过夜培养。

6、菌落 PCR 的检测

吸取 1 μ l 菌液作为模板进行 PCR，采用选择性扩增体系和程序进行扩增。取 4 μ l PCR 产物，经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，与 PCR Marker 标准分子量相比较检测插入片段的大小，与插入目的片段大小一致的克隆即为阳性克隆。

7、克隆后载体的测序

取 3 个阳性克隆菌液在甘油 (330 μ l 甘油中加入 1000 μ l 菌液) 中各保存两份，一份-20℃ 保藏，一份送三博远志生物技术有限公司测序。

3.1.4 SCAR 分析方法

根据测序后去除接头的全序列，利用 Primer Premier5.0 软件设计 SCAR 引物，由北京三博生物技术有限公司合成引物。

根据所设计的 SCAR-PCR 引物计算引物 Tm 值，根据 Tm 值设计退火温度及整个反应程序。扩增条件为 94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 1 min，退火温度退火 1 min，72℃ 延伸 2 min，30-35 个循环，然后再 72℃ 延伸 7 min。扩增完成后，琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测。得到 SCAR 标记后，需要对所得的标记进行 F₂ 群体检测以验证其正确性。

3.2 结果与分析

3.2.1 基因组 DNA 的提取

DNA 的质量是 AFLP 分析成败的关键，劣质的 DNA 会导致酶切不完全甚至不能酶切，易造成假阳性或假阴性现象，不能真实地反映多态性；有时会导致强烈的背景而无法进行分析。DNA 样品中含有蛋白、RNA 及多糖等物质时，会直接影响聚合酶的活性，进而影响实验结果。因此，在制备 DNA 过程中要特别注意避免核酸酶及各种失活物质的污染。

针对 AFLP 分析 DNA 用量少的特点，本试验采用 CTAB 小量法提取 DNA。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，DNA 主带清晰，带型整齐一致，无降解现象，无杂带污染，所以提取的 DNA 不同样品间浓度均匀一致，没有 RNA 的污染，DNA 纯度高，质量好(图 5)

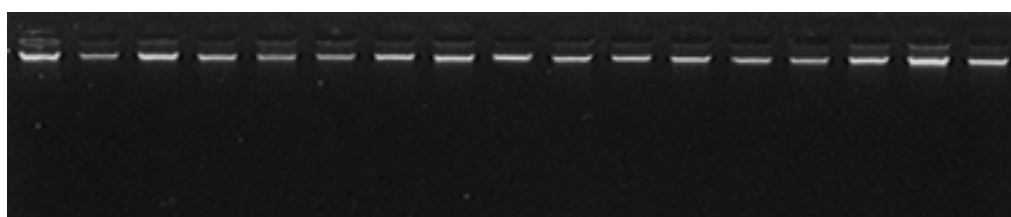


图 5 黄瓜基因组 DNA 的电泳检测

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis result of cucumber genomic DNA

AFLP 技术对 DNA 模板质量的要求相当严格，不但要提取高质量的基因组 DNA，而且在试验过程中要严格操作，把模板(包括酶切和预扩增产物)分装或集中时间连续做试验，以尽量减少模板反复冻溶的次数，这对于获得清晰，重复性好的扩增结果是至关重要的。

预扩增引物一般只含有一个选择性碱基或不含选择性碱基，预扩增的目的是为选择性扩增提供大量的模板，同时对模板起到选择性纯化的作用。预扩增引物的选择是由试验材料决定的，如果所用材料的基因组简单，就选择不带选择性碱基的引物；黄瓜有 7 条染色体，基因组较小，因此采用不含选择性碱基的引物进行预扩增以得到清晰，条带数量适中的结果。预扩增的大量的扩增产物在琼脂糖凝胶中往往形成连续的一片，即通常所说的“弥散状”(smear)。一般预扩增产物的分子量大小应在 100~600 bp 之间。

预扩增结果的琼脂糖检测，同时可以看出基因组的酶切是否完全以及接头连接的情况。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，预扩增产物呈 smear 状，且预扩增产物分子量大小在 100~600 bp 之间(见图 6)，符合 AFLP 分析的要求。

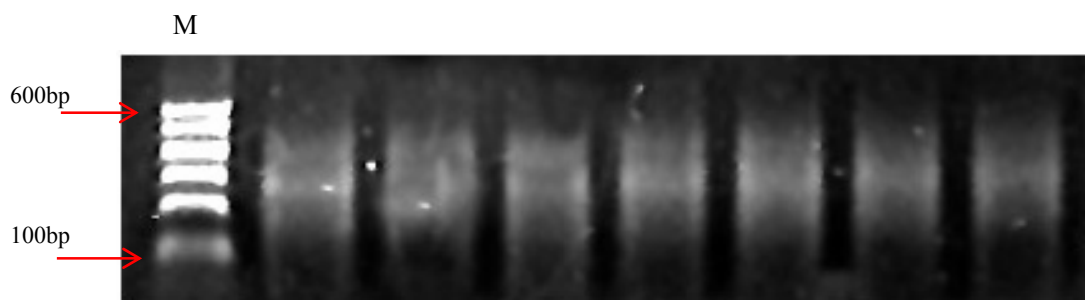


图 6 AFLP 反应体系的预扩增结果；M: DNA MarkerI

Fig. 6 Pre-amplification results of AFLP system ; M: DNA MarkerI

3.2.2 标记的初步筛选

目前有系统 I、系统 II 两套引物用于 AFLP 指纹分析。系统 I 是为分析 $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^9$ bp 的植物基因组而设计的, 这个范围的基因组包括番茄、玉米、莴苣、大麦、棉花、油菜、土豆、辣椒和芸苔等。系统 II 是为了分析 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ bp 较小的植物基因组, 例如拟南芥、水稻与黄瓜等设计的。本试验采用系统 I 和系统 II 的部分引物进行与黄瓜营养器官苦味、叶色突变性状相关的分子标记筛选。

先用亲本 P_1 和 P_2 筛选引物, 对 256 对引物组合进行筛选, 组合在亲本间多态性情况(见图 7、8)。在利用不同引物组合对亲本进行差异筛选时, 个别引物组合由于谱带太少或由于强带的影响使得其他条带非常弱, 不适合在黄瓜作物中使用; 有的引物组合则出现单一的强带, 这是由于在其模板中存在高拷贝数目的特异酶切片段所致。每对引物组合平均扩增的条带为 24.3 条, 256 对引物组合中, 96 对引物组合在双亲间表现多态性, 多态性引物比率为 37.5%。

P_1 P_2

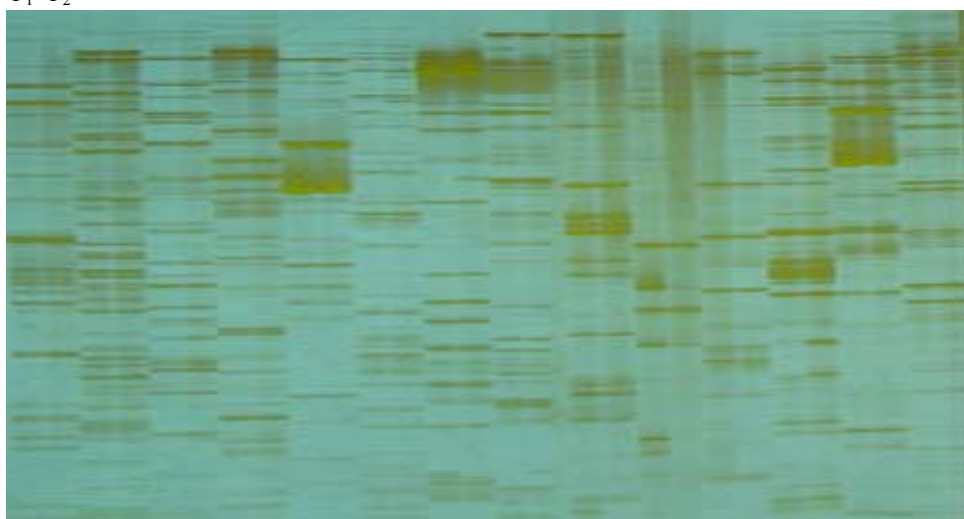


图 7 双亲间筛选引物($M_{48}+E_{11}-E_{38}$), P_1 : 无苦味亲本; P_2 : 苦味亲本
Fig.7 screening primers with parents, P_1 : Non-bitterness parent; P_2 Bitterness parent;

P_1 P_2

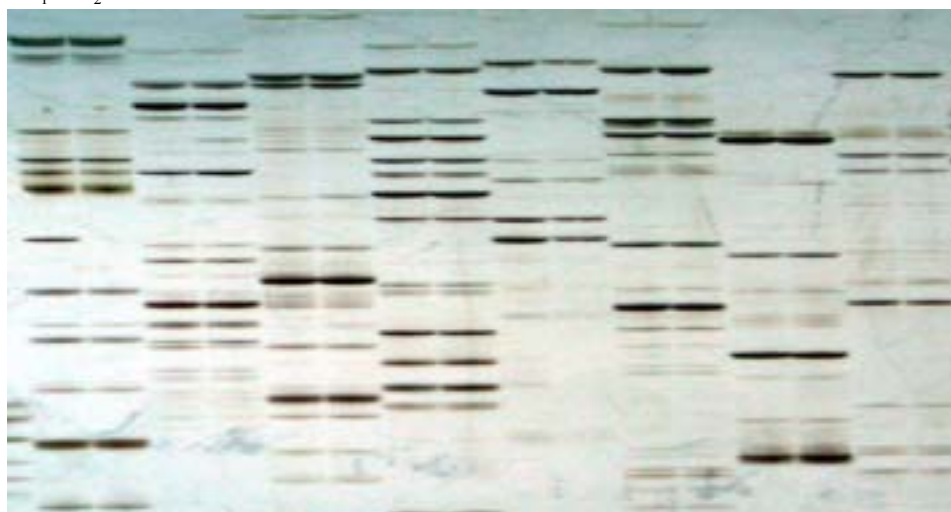


图 8 双亲间筛选引物($M_{60}+E_{11}, E_{14}-E_{33}$), P_1 : 无苦味亲本; P_2 : 苦味亲本
Fig.8 screening primers with parents, P_1 : Non-bitterness parent; P_2 Bitterness parent;

3.2.3 标记的获得

采用 BSA 法,从 F_2 群体选出营养器官苦和不苦的各 6 个单株 DNA,组成无苦味组和苦味组,以两组内的单株 DNA 为模板,用两亲本间产生多态性的引物组合进行相关标记的筛选,要求组内 5 棵单株带型一致,即初步认为该标记与相关基因连锁,用该引物在整个 F_2 群体进行验证,统计条带的分离情况。

将 96 对组合通过苦味和无苦味组间的扩增,初步获得一个与黄瓜营养器官无苦味 *bi* 基因连锁的 AFLP 标记: $E_{25}M_{70-150}$,这个标记与控制黄瓜营养器官无苦味 *bi* 基因共分离,在营养器官无苦味的植株中有带,在营养器官有苦味的植株中无带(见图 9)。该引物组合的碱基序列如下:

E_{25} : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CTG-3'; M_{70} : 5'-GAT GAG TCC TGA GTAA GCT-3'。

通过对 F_2 代 140 个单株的验证,在其中 43 个无苦味单株中有 40 株出现该标记,3 株未出现,苦味的 97 株有 91 株未出现该标记,6 株出现该标记。利用 JoinMap3.0 软件分析,该标记与营养器官无苦味位点的连锁距离在 6.43cM。命名该连锁标记为 TG/GCT₁₅₀,连锁较为紧密。

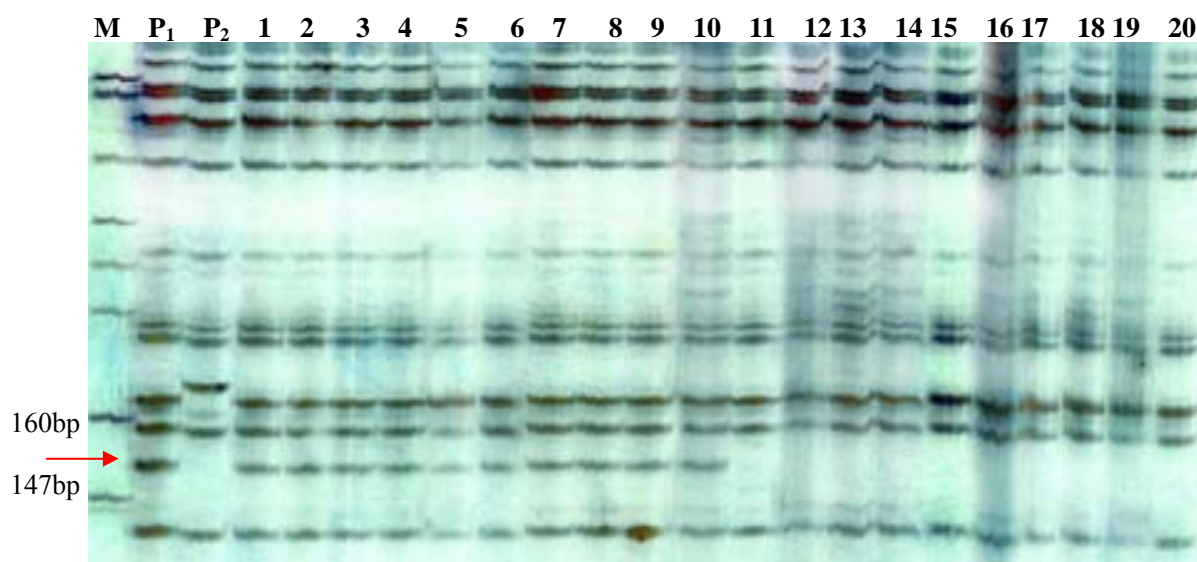


图9 $E_{25} M_{70}$ 引物组合在部分 F_2 单株中的验证

P_1 : 无苦味亲本; P_2 : 苦味亲本; 1~10: 无苦味单株; 11~20: 苦味单株; M: pBR322 DNA/Msp I 分子量标准
箭头示无苦味单株中出现的特异带。

Fig. 9 Validation of $E_{25} M_{70}$ in some F_2 plants

P_1 : Non-bitterness parent; P_2 : Bitterness parent; 1-10: Non-bitterness plants; 11-20: Bitterness plants; M: pBR322 DNA/MspI marker

The arrow showing the specific band from Nonbitterness plants.

3.2.4 苦味标记 TG/GCT₁₅₀ 的回收、纯化

差异带的回收可采用水煮法、高盐溶液法或回收试剂盒进行。水煮法只需从聚丙烯酰胺凝胶上切下目标条带置于离心管中,加入 50 μ l 的 ddH₂O,室温放置 24 h,然后 95 $^{\circ}$ C 煮 30 min,5000 rpm 离心 3 min 后就可以直接取上清液做模板进行 PCR 扩增。采用水煮法回收 DNA,操作简便易行,费用低,并且回收 DNA 效率高。可用 1.5%的琼脂糖凝胶检测回收片段的大小、亮度及杂带的有无。经检测,本试验中回收的目标片段是单一条带,无杂带污染,片段大小约为 150 bp,所以,回收产物正是特异标记片段(见图 10)。

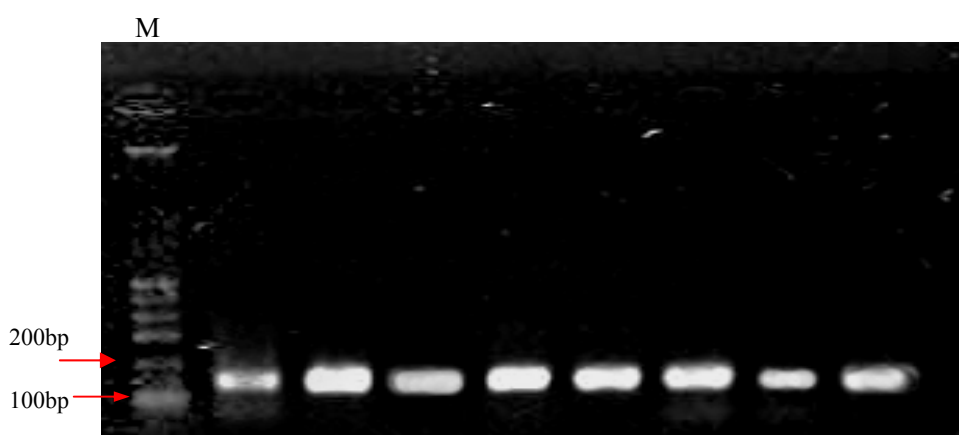


图 10 从银染胶上回收的目标片段再扩增后的琼脂糖电泳分离

M: DNA MarkerI

Fig.10 Amplification of target fragment derived from silver-stained gel

M: DNA MarkerI

纯化目标条带可以用纯化试剂盒,也可以用 PCR 产物直接纯化方法。本试验采用后一种方法,在 PCR 产物中直接加入 2 倍体积的 95%无水乙醇, -20℃ 过夜放置, 12000rpm 离心 5min 就可以得到纯化产物(见图 11)。直接纯化方法适用较小的片段, 不仅降低成本, 而且回收效率较高。

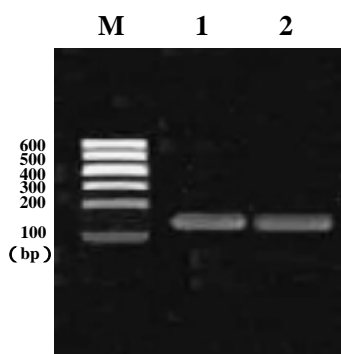


图 11 目标片段纯化的琼脂糖电泳结果

M: DNA MarkerI; 1 ~ 2: 150 bp 片段

Fig.11 Purification of target fragment derived from agarose gel

M: DNA MarkerI; 1 ~ 2: 150 bp fragment

3.2.5 克隆

PMD18-T Vector 的双链 3'末端有单个碱基 T, Taq 酶在 PCR 反应产物的末端可自动渗入碱基 A, 因而可用“T-A 策略”将特异片段插入载体的多克隆位点(MCL), 进行克隆。

回收片段连接到 PMD18-T Vector, 转化于 TOP10 大肠杆菌菌株, 在涂布有 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上培养, 蓝白斑筛选显示有大量的白色阳性克隆出现(图 12), 说明目标片段已插入载体, 并获得了重组克隆。

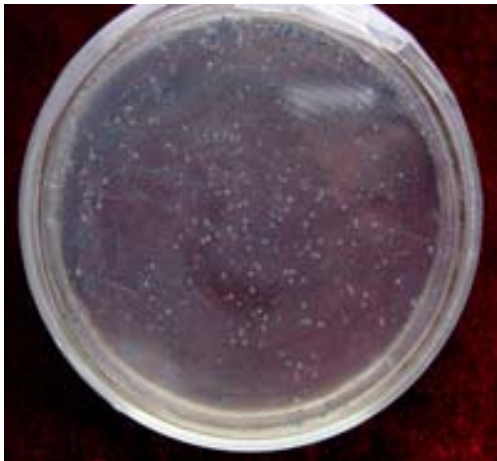


图 12 重组质粒的蓝白斑筛选
Fig.12 Identification of recombinant plasmids with white/blue screening

3.2.6 重组质粒的 PCR 检测

目标条带与载体连接和转化后，进行菌落 PCR 以检测插入片段的有无和大小。结果表明，转化菌株的插入片段约 150 bp，和目标片段大小一致，说明所得克隆是目标片段(见图 13)。

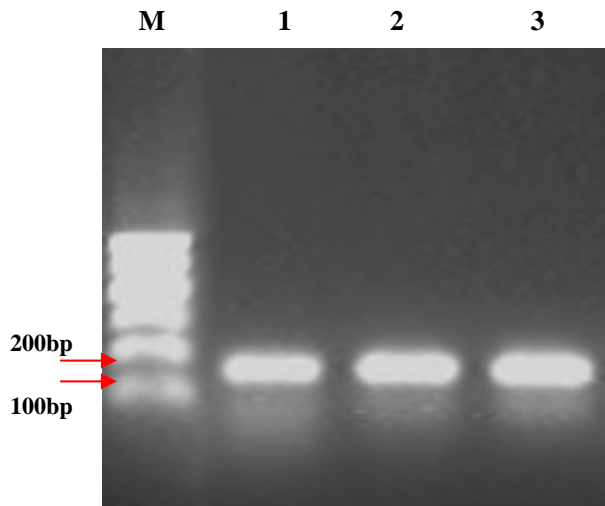


图 13 重组质粒的 PCR 电泳检测
M: DNA Marker; 1 ~ 2: 150 bp 片段
Fig.13 Identification of recombinant plasmids by PCR agarose gel electrophoresis

选取菌落检测中带型较亮的两个单菌落克隆测序，去除接头部分序列后，所得特异片段长度为 121bp(见图 14)。2 个克隆的测序结果完全一致，其中都插入了 121 bp 的 DNA 片段，而且在片段的两侧分别有 E₂₅ 和 M₇₀ 的引物结合位点。所以，E₂₅ 和 M₇₀ 两引物之间的序列正是标记 DNA 片段，测序结果显示，E25M70 的片段大小为 121 bp。

GCTCATGAGTTCAAATGTTTGGGTCCAATAAGTTTTTTTTTATCACCAGAAGCAACGGTTTCT
CCTTGGTAAAAAAGTTTTTCATCTTCCAAGACAATTTGGATGCAAATCAAGTCCCAGA

图 14 黄瓜无苦味标记 TG/GCT₁₅₀ 全序列
Fig. 14 DNA sequence of the AFLP fragment TG/GCT₁₂₁

3.2.7 SCAR 标记的引物设计

根据 Primer Premier 5.0 软件设计了两对 SCAR 引物。引物对 1 为 67bp, 序列为：

5'-ACGGTTTCTCCTTGGTAA-3'; 5'-TCTGGGACTTGATTTGCA-3'

引物对 2 为 87bp, 序列为

5'-TTTTTTTATCACCAGAAG-3'; 5'-TCTGGGACTTGATTTGCTA-3'

3.2.8 SCAR 标记的群体验证

利用设计合成的特异引物对 F_2 代单株的基因组 DNA 进行扩增鉴定。经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表明,在无苦味单株中扩增出 87bp 长的片段,而在苦味植株中并未见到该标记(图 15),表明已成功地将该 AFLP 标记转化为 SCAR 标记。并将该标记命名为 SC_{87} 。

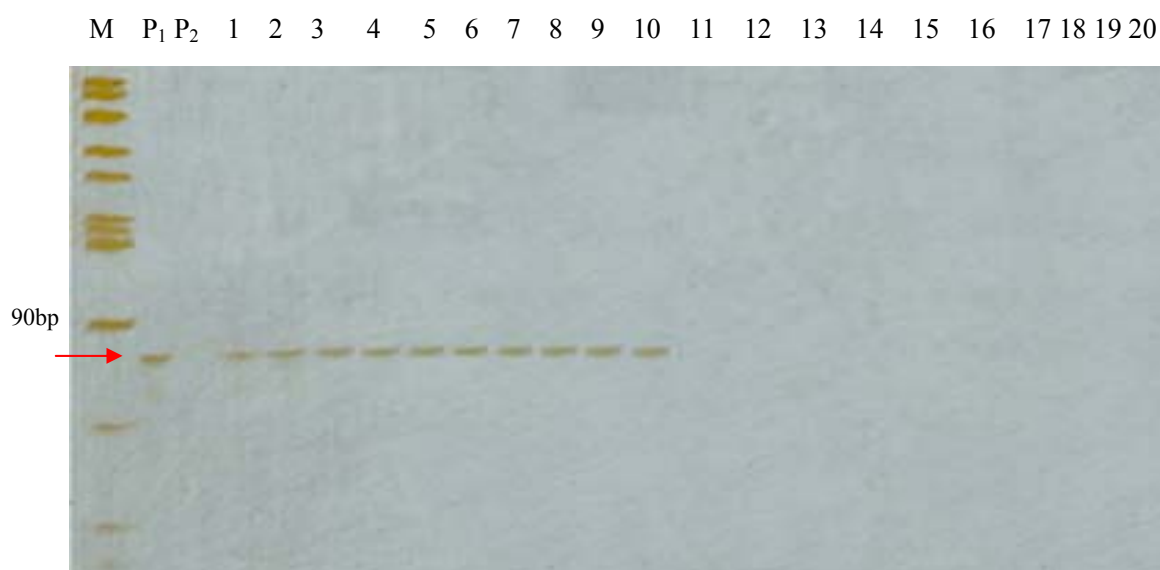


图 15 SCAR 标记 SC_{87} 在部分 F_2 单株中的验证

P_1 : 无苦味亲本; P_2 : 苦味亲本; 1~10. 无苦味单株. 11~20. 苦味单株; M: pBR322 DNA/Msp I 分子量标准
箭头示特异带位置

Fig. 15 Validation of the some F_2 plants with the specific primer SC_{87}

P_1 : Nonbitterness parent; P_2 : Bitterness parent; 1-10: Nonbitterness plants; 11-20: Bitterness plants
M: pBR322 DNA/MspI marker ;The arrow showing the specific band from Nonbitterness plants.

3.2.9 与 *bi* 基因紧密连锁的分子标记在重组自交系中的验证

通过田间鉴定, 148 个重组自交系单株中有 66 株无苦味单株, 82 株苦味单株, 提取 148 个重组自交系单株的 DNA 用于检测与 *bi* 基因紧密连锁的 AFLP 标记 TG/GCT₁₅₀、SCAR 标记 SC_{87} 的有效性, TG/GCT₁₅₀ 标记在 60 株无苦味单株上有带, 82 株苦味单株中无带, 准确率达 95.95%(图 16), SC_{87} 在 56 株无苦味单株中有带, 82 株苦味单株中无带, 准确率为 93.24%。

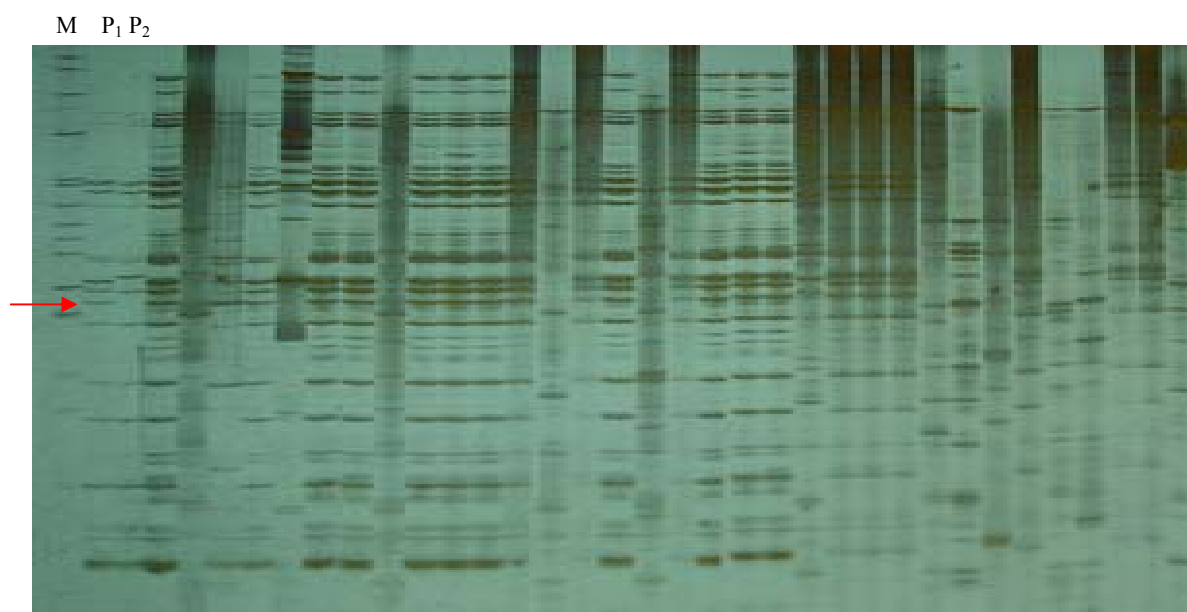


图16 $E_{25}M_{70}$ 引物组合在重组自交系单株中的验证

P_1 : 无苦味亲本; P_2 : 苦味亲本; M: pBR322 DNA/Msp I分子量标准; 箭头示无苦味单株中出现的特异带。

Fig. 16 Validation of $E_{25}M_{70}$ in RIL plants

P_1 : Non-bitterness parent; P_2 : Bitterness parent; M: pBR322 DNA/MspI marker; The arrow showing the specific band from Nonbitterness plants.

3.3 小结

利用 AFLP 分子标记技术结合 BSA 法, 筛选了 256 对通过以往实验证明对黄瓜较为适用的 AFLP 选择性引物组合: EcoRI-NN 和 MseI-NNN 组合, 发现 EcoRI-TG 和 MseI-GCT 引物组合在无苦味组中扩增出一条分子量约为 150bp 的特异带。经 F_2 代单株验证, 该特异条带能在无苦味单株中稳定出现。以 JoinMap3.0 软件分析, 该标记与营养器官无苦味位点的连锁距离在 6.43cM。命名该连锁标记为 TG/GCT₁₅₀。将该特异条带回收纯化、克隆、测序、设计特异 SCAR 引物, 并对亲本及 F_2 代单株 DNA 进行扩增, 仅在无苦味的单株中扩增出 1 条分子量为 87bp 的特异带, 表明已成功地将与黄瓜营养器官无苦味基因连锁的 AFLP 标记转化为操作简便、表现稳定的 SCAR 标记, 该标记命名为 SC₈₇。经 148 株重组自交系单株验证, TG/GCT₁₅₀ 标记在 60 株无苦味单株上有带, 82 株苦味单株中无带, 准确率达 91%, SC₈₇ 在 56 株无苦味单株中有带, 82 株苦味单株中无带, 准确率为 84.8%。

第四章 与叶色突变基因 $v-1$ 连锁的分子标记研究

关于植物叶色基因突变的研究已有不少报道，主要集中于“芽黄”突变，棉花、水稻、小麦、甘蓝都有报道，并已用于育种。黄瓜上也有“芽黄”和其他叶色突变类型的报道，但大多侧重生理生化方面的研究。本所黄瓜组于 2001 年从黄瓜雌性系 9110G 中发现的能稳定遗传的金黄色叶色突变体，在表型上与已报道的黄瓜叶色突变体均不同，将其命名为 $v-1$ 。

本试验利用 AFLP 技术筛选与 $v-1$ 基因紧密连锁的分子标记，该标记可用于黄瓜杂交制种中鉴定杂交纯度，还可用于 $v-1$ 基因的基因定位，真正实现分子标记辅助育种。

4.1 材料与方法

本试验中的 DNA 材料及 AFLP 分析方法与第三章的材料与方法相同。

4.2 结果与分析

4.2.1 标记的初步筛选

采用 BSA 法，从 F_2 群体选出叶色正常和叶色发生突变的单株各 6 个单株 DNA，组成叶色正常组和叶色突变组，分别以正常组和突变组的单株 DNA 为模板，用两亲本间产生多态性的引物组合进行标记的筛选，组内 5 棵单株带型一致，即初步认为该标记与黄瓜金黄色叶叶色突变基因 $v-1$ 连锁，接着，用该引物在整个 F_2 群体中进行验证，统计条带的分离情况。

将 256 对引物组合在双亲间筛选，平均每对引物组合扩增的条带为 24.3 条，最终有 96 对在双亲间体现多态性。图 17、18 是部分引物在双亲间的筛选图：



图 17 双亲间筛选引物($M_{62}+E_{13}-E_{35}$), P_1 : 叶色突变亲本; P_2 : 叶色正常亲本
Fig.17 screening primers with parents, P_1 : Mutant parent; P_2 : Normal parent;



图 18 双亲间筛选引物(M₅₀+E₁₁—E₄₁, M₅₉+E₂₅—E₃₅), P₁: 叶色突变亲本; P₂: 叶色正常亲本
Fig.18 screening primers with parents, P₁: Mutant parent; P₂:Normal parent

4.2.2 标记的验证

将 96 对组合通过分别由 6 个单株混合组成的叶色正常组和叶色突变组间的扩增,初步获得一个与黄瓜叶色突变基因连锁的 AFLP 标记: E₂₅M₆₂₋₁₂₀, 这个标记与黄瓜正常叶色 *V-1* 位点共分离, 在叶色正常的植株中有带, 在叶色发生突变的植株中无带(见图 9) 该引物组合的碱基序列如下:

E₂₅: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CTG-3'; M₆₂: 5'- GAT GAG TCC TGA GTAA CTT-3'.

通过对 F₂ 代 169 个单株的验证, 在其中 40 个叶色突变单株中有 6 株出现该标记, 叶色正常的 129 个单株中有 4 株未出现该标记。利用 JoinMap3.0 软件分析, 该标记与正常叶色 *V-1* 位点的连锁距离在 6.29cM。命名该连锁标记为 TG/CTT₁₂₀, 连锁较为紧密。

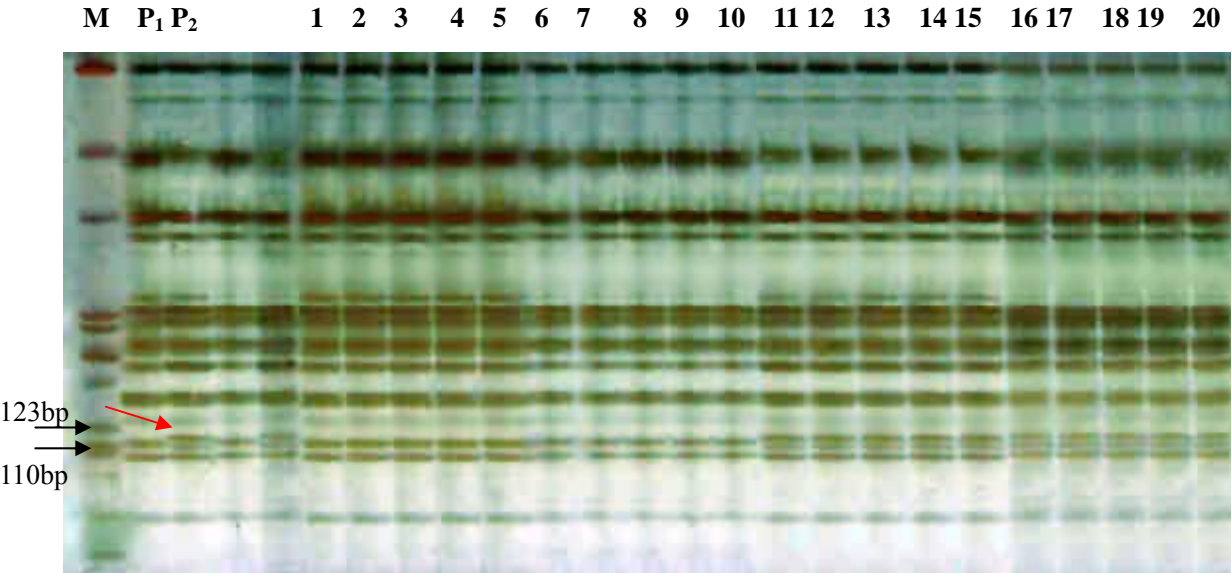


图 19 TG/CTT₁₂₀在部分F₂单株中的验证
P₁: 叶色突变亲本; P₂: 叶色正常亲本; 1~10: 叶色突变单株; 11~20: 叶色正常单株; M:pBR322 DNA/MspI分子
量标准; 箭头示叶色正常单株中出现的特异带。

Fig. 19 Validation of E-TG /M-CTT in some F₂ plants
P₁: Mutant parent; P₂:Normal parent; 1-10:Mutant plants; 11-20:Normal plants; M:pBR322DNA/MspI marker
The arrow showing the specific band from Normal plants

4.2.3 与叶色突变性状连锁的 AFLP 标记在重组自交系中的验证

通过田间鉴定, 148 个重组自交系单株中有 91 株叶色正常, 提取单株 DNA 用于检测与叶色突变性状连锁的标记 TG/CTT₁₂₀ 的有效性, TG/CTT₁₂₀ 在 90 个单株中均出现, 准确率达到 99.3%。图 20 是验证图片:

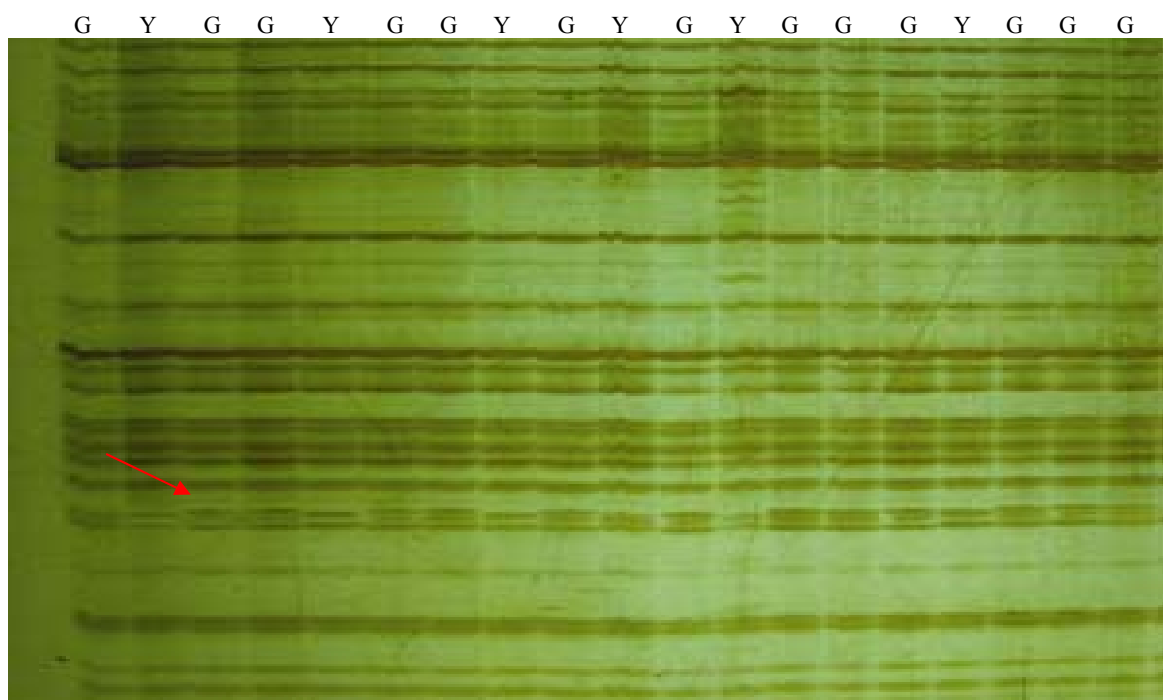


图20 $E_{25}M_{62}$ 引物组合在重组自交系单株中的验证
箭头示叶色正常单株中出现的特异带, G: 叶色正常单株; Y: 叶色突变单株。
Fig. 20 Validation of $E_{25}M_{62}$ in RIL plants
The arrow showing the specific band from Normal plants. G: Normal plants; Y: Mutant plants

4.3 小结

利用 AFLP 分子标记技术结合 BSA 法, 筛选了 256 对通过以往实验证明对黄瓜较为适用的 AFLP 选择性引物组合 EcoRI-NN 和 MseI-NNN 组合, 发现 EcoRI-TG 和 MseI-CTT 引物组合在叶色正常的单株中扩增出一条分子量约为 123bp 的特异带。经 F_2 代单株验证, 该特异条带能在叶色正常的单株中稳定出现。以 JoinMap3.0 软件分析, 该标记与叶色未突变位点的连锁距离在 6.29cM。命名该连锁标记为 TG/CTT₁₂₃。该标记对深入研究黄瓜叶色突变基因调控具有重要的价值。经 148 株重组自交系单株验证, 在其中 91 株含有 *V-1* 基因的单株中, 90 株均出现该标记, 准确率达到 99.3%。

第五章 讨论与结论

5.1 讨论

1、以营养器官、果实均不苦的纯合雌性系 P_1 为母本，与仅营养器官苦的普通花性自交系 P_2 杂交获得的 F_1 植株营养器官是苦的，果实也有苦味； F_2 代植株中，营养器官苦与不苦的遗传分离比例符合 3:1，营养器官苦:果实与营养器官均苦:果实与营养器官均不苦的比例为 1:2:1；与 P_1 回交的后代果实和营养器官均苦与均不苦的比例为 1:1，与 P_2 回交的后代果实和营养器官均苦与只营养器官苦的比例为 1:1。通过品尝，果实的苦味大多出现在近瓜把部。表明在杂合状态 *Bibi* 时营养器官与果实都会出现苦味，表现型与双亲中任何一种纯合体均不同。此结果在理论上解释了父母本的果实均不苦而子代却苦的现象，也是用欧洲含 *bibi* 基因型果实不苦的材料与我国含 *BiBi* 基因型果实不苦的材料杂交后， F_1 代果实会苦的原因。这种等位基因间的互补现象，类似顺反子之间的互补，可见对于 *bi* 而言杂合等位基因间的作用大于纯合基因间的作用，*Bibi* 异质等位基因的互作导致了来源于双亲的新陈代谢功能的互补或生化反应能力的加强。至于是否还有其他基因参与共同作用，尚需进一步研究。

2、两对基因在 F_2 、 BC_1 代分离情况分析，控制黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 与叶色突变基因 *v-1* 有连锁关系，遗传距离为 31.7cM。*bi* 基因、*v-1* 基因与雌性 *F* 基因、暗色果皮 *D* 基因、果色一致 *u* 基因、果瘤 *Tu* 基因之间无连锁关系，后代独立分离。这与顾兴芳等(2005)的结果基本一致，但本研究增加了回交世代，因此结论更为可靠。1998 年 Wehner 等的研究认为 *bi* 与控制雌性表达的 *F* 基因有微弱连锁，0.37 的重组率，而本文的研究认为 *bi* 与雌性 *F* 基因没有连锁关系，这也许与研究材料的不同有关。

3、利用本研究获得的与 *bi* 基因紧密连锁的 AFLP 标记 TG/GCT₁₅₀ 可以在当代鉴定出无苦味的黄瓜植株，与常规鉴定方法相比，省时省工。虽然 AFLP 标记方法较为复杂，在实际育种中大规模应用仍然有一定困难，但在没能得到实际操作较方便度量的 SCAR、CAPS 或 SNP 等标记的情况下，直接利用 AFLP 标记进行黄瓜苦味的鉴定仍不失为一种经济、高效的检测手段。

为了进一步简化标记的应用，本研究将 AFLP 标记 TG/GCT₁₅₀ 转化为 SCAR 标记 SC₈₇。但由于片段较短，转化后的 SCAR 标记需要用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，不能用更为简便的琼脂糖电泳检测。试验中对 $MgCl_2$ 等 PCR 反应中的重要因素进行反复调整，最终摸索出能稳定扩增的 SCAR 标记体系。因此，获得操作更为简便的与黄瓜无苦味基因 *bi* 紧密连锁的 SCAR 标记需要进一步的研究。

4、SCAR 标记是一种十分稳定的分子标记，在应用上具有迅速、简便、成本低的特点，非常适合于样品的大量分析，在植物分子标记辅助育种方面已得到初步应用。SCAR 标记一般是由 RFLP、RAPD、AFLP 等标记转化而来，其基本原理是根据已得标记片段的序列信息，设计一对长度为 20 bp 左右的特异引物，然后通过普通的 PCR 手段来揭示多态性。

将 AFLP 标记转化成 SCAR 成功率相对较低。一般来说，在转化过程中，根据标记片段本身的序列设计引物，只有在原 AFLP 标记的多态性是由 PCR 引物结合位点之间部分片段的插入或缺失产生的情况下，此 SCAR 标记才能转化成功。SCAR 标记有可能掩盖个别碱基的差异集中在引物 5'端的多态性 AFLP 标记。AFLP 标记可以检测到个别碱基变化产生的多态性，5'端的个别碱基的差别也可能导致多态性的 AFLP。但由于 3'端添加碱基强烈地增强引物的扩增。延长引物对 5'

端的碱基差别变得相对不敏感,有可能掩盖这类多态性标记。对于 PCR 多态性消失的情况,也有借助于限制性酶切 PCR 产物的办法未重新揭示多态性,这也是一种快速简便的方法。

另一个影响 SCAR 标记转化的重要因素是 AFLP 标记片段的长度。AFLP 标记片段长度通常在 150-300bp 甚至更短,即便是设计了合适长度的特异引物,过短的片段仍不利于 DNA 聚合酶的结合,不能实现成功的 PCR 扩增。这种情况就需要借助一些方法,如通过 PCR 步行法扩增到 AFLP 标记的侧翼序列,然后根据侧翼序列序列信息设计合适的 SCAR 引物。以上两个因素也是本文中叶色突变性状紧密连锁的 AFLP 标记 TG/CTT₁₂₃ 没有转化为 SCAR 标记的主要原因。

5.2 结论

1、对黄瓜营养器官苦味性状的遗传规律分析得出:*Bi* 与 *bi* 在 F₂ 代的分离比例符合 3:1,回交后代为 1:1,*bi* 基因为独立遗传,杂合状态 Bibi 时营养器官与果实都会出现苦味。

2、本所黄瓜组发现的黄瓜金黄色叶色突变体属于自然突变,叶色变化主要发生在幼苗期。与黄瓜基因列表中公布的叶色突变体不同,也区别于国内其他的通过辐射诱变产生的突变体、具有“芽黄”性状的突变材料及黄绿色叶突变体。对其进行遗传分析,结果表明该性状为细胞核遗传,由隐性基因控制,并且绿色对黄色为不完全显性。

3、为丰富黄瓜基因连锁群,在育种工作中更为有效的利用基因,对黄瓜营养器官无苦味基因 *bi*、叶色突变基因 *v-1* 与雌性 *F* 基因、暗色果皮 *D* 基因、果色一致 *u* 基因、果瘤 *Tu* 基因之间的独立或连锁关系进行探讨,通过基因独立连锁分析结果认为黄瓜营养器官无苦味基因 *bi* 与叶色突变基因 *v-1* 有连锁关系,遗传距离为 31.7cM。*bi* 基因、*v-1* 基因与雌性 *F* 基因、暗色果皮 *D* 基因、果色一致 *u* 基因、果瘤 *Tu* 基因之间无连锁关系,后代独立分离。

4、采用 AFLP 标记技术结合银染方法,首次获得了与黄瓜营养器官无苦味 *bi* 基因紧密连锁的 AFLP 标记 TG/GCT₁₅₀,连锁距离为 6.43cM,并成功地将其转化为 SCAR 标记 SC₈₇。通过 148 株重组自交系单株验证,66 株无苦味单株中,TG/GCT₁₅₀ 标记在 60 株上有带,82 株苦味单株中无带,准确率达 95.95%,SC₈₇ 在 56 株无苦味单株中有带,82 株苦味单株中无带,准确率为 93.24%

该标记可以在苗期对黄瓜的植株苦味进行有效选择,这对黄瓜无苦味品种的选育具有重要意义。

5、通过实验首次获得的与叶色突变性状紧密连锁的 AFLP 分子标记 TG/CTT₁₂₀,与叶色未突变位点的连锁距离在 6.29cM。通过 148 株重组自交系单株验证,在其中 91 株含有 *V-1* 基因的单株中,90 株均出现该标记,准确率达到 99.3%。该标记可作为一种指示性标记,与杂种鉴定等实际育种工作结合。

参考文献

1. 陈劲枫等. 黄瓜全雌性基因连锁的AFLP和SCAR分子标记. 蔬菜分子育种讨论会论文集, 2004, 172~179
2. 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. 中国蔬菜, 2000(3): 35~36
3. 陈远良, 刘新宇, 李树贤. 黄瓜黄绿色叶片颜色遗传规律分析. 北方园艺, 2000(3): 3~4
4. 成浩, 李素芳. 安吉白茶特异性状的生理生化本质. 茶叶科学, 1999, 19(2): 87~92
5. 盖钧镒主编, 作物育种学各论. 1997, 北京: 中国农业出版社, 440~443
6. 龚红兵, 陈亮明, 刁立平, 盛生兰, 林添资, 杨图南, 张荣铨, 曹树青, 翟虎渠. 水稻叶绿素 b 减少突变体的遗传分析及其相关特性. 中国农业科学, 2001, 34(6): 686~689
7. 顾兴芳, 张圣平, 国艳梅, 徐彩清. 黄瓜苦味遗传分析. 园艺学报, 2004, 31(5): 613~616
8. 顾兴芳, 张圣平, 池秀蓉. 黄瓜叶色突变基因、苦味基因与其他 5 个主要性状基因的连锁遗传. 园艺学报, 2005, 32(1): 108~110
9. 顾兴芳, 杨庆文. AFLP技术在黄瓜种质资源鉴定及分类上的应用初探. 中国蔬菜, 2000(1): 30~32
10. 国艳梅, 顾兴芳, 张春震, 方秀娟, 张圣平, 徐彩清. 黄瓜叶色突变体遗传机制的研究. 园艺学报, 2003, 30(4): 409~412
11. 何铁海, 应成波, 钱剑锐等. 抗 CMV 病毒外壳蛋白 CP 基因导入黄瓜的研究. 河南技术师范学院学报, 2001, 3: 27~31
12. 李锡香. 黄瓜种质遗传多样性的形态和分子评价及亲缘关系研究. 中国农业科学院博士学位论文, 2002
13. 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. 自然科学选展, 2004, 14(11): 1225~1229
14. 刘来福, 毛盛贤, 董远樟. 作物数量遗传. 北京: 农业出版社, 1984
15. 李远新, 王关林, 葛晓光. 黄瓜授粉后外源基因直接导入技术研究. 华北农学报, 2000, 2: 89~94
16. 陆朝福, 朱立煌. 植物育种中的分子标记辅助选择. 生物工程进展, 1995, 15(4): 11~17
17. 马德伟. 甜瓜幼果苦味性状遗传的研究. 园艺学报, 1996, 23(3): 255~258
18. 马国荣, 刘佑斌, 盖钧镒. 大豆细胞质遗传芽黄突变体的发现. 作物学报, 1994, 20(3): 334~337
19. 陶抵辉. 西瓜野生性状的遗传及同工酶研究. 中国西瓜甜瓜, 1994, (3): 17~20
20. 宋国立, 张春庆, 贾继增等. 棉花 AFLP 银染技术及品种指纹图谱应用初报. 棉花学报, 1999, 11(6): 281~283
21. 王玉怀. 黄瓜子叶颜色遗传规律的研究. 东北农学院学报, 1990, 2(12): 196~197
22. 王家训, 苏晓东, 刘卫东. 黄瓜黄绿叶突变性状的遗传分析. 遗传, 2000, 22(5): 313~315
23. 吴晓梅, 孙志栋, 王学德. AFLP 标记在植物研究上应用. 浙江万里学院学报, 2000, 13(2): 24~26
24. 王慧中, 赵培洁, 周晓云. 转 WMV-2CP 基因黄瓜的再生. 植物生理学报, 2000, 26(3): 267~272

25. 王泽立, 王鲁昕, 戴景瑞等. 运用近等基因系(NIL)、AFLP、RFLP 和 SCAR 标记对玉米 S 组育性恢复基因(Rf3)的研究. 遗传学报, 2001, 28(5): 465~470
26. 王保莉, 郭蔼光, 汪沛洪. 小麦突变体返白系返白阶段叶绿素代谢的变化. 植物学报, 1996, 38(7): 557~562
27. 相宁, 洪焰. 扩增片段长度多态性技术及其在植物研究中的应用. 植物生理学通讯, 2000, 36(3): 236~240
28. 肖松花, 张天真, 潘家驹. 陆地棉芽黄突变体的遗传及在杂种优势上的利用. 南京农业大学学报, 1995, 18(3): 28~33
29. 许勇, 欧阳新星, 张海英等. 与西瓜野生种质抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记. 植物学报, 1999, 41(9): 952~955
30. 尹佟明, 黄敏仁. AFLP分子标记及其在植物育种上的应用. 生物工程进展, 1997, 17(1): 6~11
31. 尹佟明. 杨树和马尾松遗传图谱构建研究. 南京林业大学学报, 1998, 22(1): 66
32. 周长久, 王鸣, 吴定华等. 现代蔬菜育种学. 北京: 科学技术文献出版社, 1996
33. 朱立煌, 徐吉臣, 陈英等. 用分子标记定位一个未知的抗稻瘟病基因. 中国科学(B 辑), 1994, 24: 1048~1052
34. 张应华, 刘荣, 许彬. 分子标记在蔬菜作物上的应用. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 287~290
35. 张海英等. 黄瓜种质资源遗传亲缘关系的 RAPD 分析. 园艺学报, 1998, 25(4): 345~349
36. 张海英, 陈青君, 王永健等. 黄瓜耐弱光性状的 QTL 定位. 分子植物育种, 2004, 2(6): 795~799
37. 张桂华. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)白粉病抗性相关基因的分子标记研究. [博士学位论文]. 陕西: 西北农林科技大学, 2003
38. 张素勤. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)霜霉病和白粉病抗性遗传机制及其分子标记研究. [博士学位论文]. 西北农林科技大学, 2005
39. 张猛. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)遗传转化体系的建立及 *Go* 和 *Chi /Glu* 基因的导入. [博士学位论文]. 西北农林科技大学, 2000
40. Agrawal G.K., Yamazaki M., Kobayashi M., et al. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* Gene. Plant Physiol, 2001, 125: 1248~1257
41. Balkema-boomstra A.G., Zijlstra S., Verstappen F.W.A., et al. Role of cucurbitacin C in resistance to spider mite(*Tetranychus urticae*) in cucumber(*Cucumis sativus* L.). Journal of Chemical Ecology, 2003, 29(1): 225~235
42. Andeweg J.M., DeBruyn J.W., Breeding of non-bitter cucumbers. Euphytica, 1959, 8: 13~20
43. Babiychuk E., Muller F., et al. *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. Plant J., 2003, 33(5): 899~909
44. Bachem Christian W.B., Van der Hoeven R.S., et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA finger printing based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant Journal, 1996, 9(5): 745~753.

45. Bar-Nun N., Mayer A.M., Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis Cinerea*. *Phytochemistry*, 1990, 29(3): 781~791
46. CHO Y.G, Blair M.W., Panand O., Cloning and mapping of variety specific rice genomic DNA sequences amplified fragment length polymorphisms(AFLP)from silver stained polyacrylamide gel . *Genome* , 1996 ,39: 373~378.
47. Cervera M.T., Steenackers M., Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora latic populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.* , 1996 , 93: 733~737.
48. Cowen N.M, Helsel D.B., Inheritance of two genes for spine color and linkages in a cucumber cross. *J Hered.* 1983,74: 308~309
49. DaCosta C.P, Jones C.M., Cucumber beetle resistance and mite susceptibility controlled by the bitter gene in *Cucumis Sativus* L. *Science*, 1971, 172: 1145~1146
50. DaCosta C.P, Jones C.M., Resistance in Cucumber(*Cucumis Sativus* L.) to three species of cucumber beetles. *Hortscience*, 1971, 6: 340~342
51. De Ponti O.B.M., Resistance in *Cucumis Sativus* L. to *Tetranychus urticae* koch.3. Search for sources of resistance. *Euphytica*, 1978, 27(1): 167~176
52. De Ponti O.B.M., Resistance in *Cucumis Sativus* L. to *Tetranychus urticae* koch.5.Raising the resistance level by the exploitation of transgression. *Euphytica*, 1979, 28(3): 569~577
53. De Ponti O.B.M., Resistance in *Cucumis Sativus* L. to *Tetranychus urticae* koch.6. Comparison of near isogenic bitter and non-bitter varieties for resistance. *Euphytica*, 1980, 29(2): 261~265
54. Deheer C.J., Tallamy D.W., Affinity of spotted cucumber beetle larvae to cucurbitacins. *Environmental entomology*, 1991, 20(1): 1174~1175
55. Dhillon, Non-linkage of bitterness and resistance to red spider mite in cucumber. Report-Cucurbit-Genetics-Cooperative. 1992, 15, 31~32; 7 ref.
56. Fambrini M., Castagna A.,Vecchia F.D., Characterization of a pigment-deficient mutant of sunflower(*Helianthus annuus* L.) with abnormal chloroplast biogenesis, reduced PS II activity and low endogenous level of abscisic acid. *Plant Sci*,2004, 167: 79~89
57. Frick G, Su Q.X., Apel K., Armstrong GA., An Arabidopsis porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyllII-deficient and developmentally arreste. *Plant J*, 2003, 35(2): 141~153
58. Gan S., Amasino R.M., Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 1995, 270: 1986~1988
59. Gaubier P., Wu HJ, Laudie M., Delseny M, Grellet F., A chlorophyllII synthetase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1995, 249: 58~64
60. Gould F., Resistance of cucumber varieties to *Tetranychus urticae*: genetic and environmental determinants. *J. Econ. Entomol.*, 1978, 71(2): 680~683
61. Hansson A, Kannangara C.G, von Wettstein D., Hansson M., Molecular basis for semidominance of missense mutations in the XANTHA-H(42-kDa) subunit of magnesium chelatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1744~1749

62. Haynes R.L., Tones C.M., Effects of the *Bi* locus in cucumber on reproduction, attraction, and response of the plant to infection by the southern root-knot nematode. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1976, 101(4): 422~424
63. Horejsi T., Box M.J., Staub E.J. Efficiency of randomly amplification polymorphic DNA to sequence characterized amplified region marker conversion and their comparative polymerase chain reaction sensitivity in cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1999, 124(2): 128~135
64. Hospital F., Charcosset A. Marked-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetic*, 1997, 147: 1469~1485
65. Inggamer H., De Ponti O.B.M., A second source of non-bitterness in cucumber. *Report. Cucurbit Genetics Cooperative*, 1981, 4:11
66. Kano Y., Yamabe M., Ishimoto K., The occurrence of bitter cucumber in relation to pruning, fruit size, plant age, leaf nitrogen content and rootstock. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 1997, 66(2): 321~329.
67. Katzir N., Danin-Poleg, Tzuri Y., et al. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Thero Appl Genet*, 1996, 93: 1282~1290
68. Kennard W.C., Havey M.J. Quantitative trait analysis of fruit quality in cucumber: QTL detection, confirmation, and comparison with mating-design variation. *Theor Appl Genet*. 1995,91:53~61
69. Kooistra E., Red spider mite tolerance in cucumber. *Euphytica*, 1971, 20:47~50
70. Kumar A.M., Soll D., Antisense HEMAI RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 2000, 122: 49~55
71. Lande R., Thompson R., Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 1990, 124: 743~746
72. Pierce L.K., Wehner T.C., Review of Genes and Linkage Groups in Cucumber *Hortscience*, 1990, 25: 605~615
73. Lopez-Juez E, Jarvis R.P., Takeuchi A., Page A.M., Chory J., New *Arabidopsis* cue mutants suggest a close connection between plastid and phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol*, 1998, 118: 803~815
74. Macheswaran M., Subudhi P.K., Nandi S., Polymorphism, distribution and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet*, 1997, 94 :39~45.
75. Mackill D.J., Zhang Z., Redona E.D., Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 1996, 93 :969~977.
76. Margues C.M., Araujo J.A., Ferreira J.G., AFLP genetic maps of *Eucalyptus globules* and *E. tereticornis*. *Theor. Appl. Genet*, 1998, 96 : 727~737.
77. Meksem K., Leister D., Peleman J., et al. A high resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol.Gen.Genet.*, 1995, 249(1) :74~81.
78. Michelmore R.W., Paranand I., Kessali R.V., Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9829~9832

79. Monde R.A., Zito F., Olive J., Wollmen F.A., Stem D.B., Postranscriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b6/f complex. *Plant J.*, 2000, 21(1):61~72
80. Mohan M., Nair S., Bentur J.S., et al. RFLP and RAPD mapping of the rice Gm2 gene that confers resistance to biotype 1 of a gall midge (*Orseolia oryzae*). *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 782~788
81. Nothnagel T., Straka P., Inheritance and mapping of a yellow leaf mutant of carrot (*Daucus carota*). *Plant Breeding*, 2003, 122:339~342
82. Oster U, Tanaka R, Tanaka A, Rudier W., Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2000, 21(3): 305~310
83. Parks B.M., Quail P.H., Phytochrome-deficient hy1 and hy2 long hypocotyls mutants of *Arabidopsis* are defective in phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant Cell*, 1991, 3:1177~1186
84. Patricia Silva Ritschel, et al. Development of microsatellite from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*. 2004, 4~9
85. Paul S., Wachira F.N., Powell W., et al. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet*, 1997, 94 :255~263.
86. Petersen B.L., Moller M.G., Jensen P.E., Henningsen K.W., Identification of the Xan-g gene and expression of the Mg-chelatase encoding genes Xan-f, g and -h in mutant and wild type barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, 1999, 131: 165~170
87. Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23, (21): 4407~4414
88. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R., Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997, 15, 8~15.
89. Qi X, Lindhout P., Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet*, 1997, 254 : 330~336.
90. Qi X, Stam P., Lindhout P. Use of locus specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet*, 1998, 96 : 376~384.
91. Reinbothe S., Pollmann S., et al. Role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH: POR A. *Plant J.*, 2005, 42(1):1~12
92. Rice C.A., Rymal K.S., Chambliss O.L., et al. Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three *Cucumis sativus* cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29:194~196
93. Walters S.A., Wehner T.C., Independence of the mj Nematode Resistance gene from 17 Gene Loci in Cucumber. *Hortscience*, 1998, 33(6):1050~1052
94. Sato S., Nakamura Y., et al. Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.*, 1999, 6:283~290
95. Schultes N.P., Sawyer R.J.H., et al. Maize high chlorophyll fluorescent 60 mutation is caused by an Acdisruption of the gene encoding the chloroplast ribosomal small subunit protein 17. *Plant J.*, 2000, 21(4):317~327

96. Seiji Matsuura, Yokio Fjita., RFLP in Japanese cucumber varieties Japan Breeding Science ,1995, 91~95
97. 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. Molecular Breeding, 1997, 3(4): 257~268
98. Singh U.P., Prithiviraj B., Sarma B.K., Development of Erysiphe pisi (powdery mildew) on normal and albino mutants of pea (*Pisum sativum* L.). J Phytopathol, 2000, 148 (11-12):591-595
99. Soans A.B., Pimentel D., Soans J.S., Cucumber resistance to the two-spotted spider mite. J. Econ. Entomol., 1973, 66:380~382
100. Staub J.E., Kupper R.S., Schuman D., et al. Electrophoretic variation and enzyme storage stability in cucumber. J. Am. Soc. Hort. Sci., 1985, 110: 426~431
101. Terry M.J., Kendrick R.E., Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. Plant Physiol, 1999,119:143~152
102. Thomas C.M, Vos P., Zakeau M, et al. Identification of amplified restriction fragment polymorphism(AFLP) markers tightly linked to the tomato *cf9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. The Plant Journal , 1995 , 8(5) :785~794
103. Vakalounakis D.J., Heart leaf a recessive leaf shape marker in cucumber linkage with disease resistance and other traits. J Hered., 1992,83: 217~221
104. Van der Vorst J.R., Wolters P., Folkertsma R., et al. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. Theor. Appl. Genet , 1997 ,95 :874~880.
105. Van Keulen H.A. Fluorodensitometric estimation of cucurbitacin-C in leaves of *Cucumis sativus* L. Qual Plant Foods Hum Nutr., 1981, 31:129~137
106. Vantoai T.T., Jiqing Peng , Steve St . Martin. Optimization of silver staining AFLP technique for soybean. Soy Gen. News , 1996 , 23:206~209.
107. Vincentini F., Hortensteiner S., et al. Chlorophyll breakdown in senescent leaves; identification of biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. New Phytol, 1995,129: 247~252
108. Vos P., Hogers R., Bleeker M., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 1995, 23: 4407~4414
109. Walters S.A., Shetty N.V., Wehner T.C., Segregation and linkage of several genes in cucumber. J. Amer.Soc.Hort.Sci. 2001, 126(4): 442~450
110. Wehner T.C. , Liu J S. Two-gene interaction and linkage for bitterfree foliage in cucumber. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1998, 123(3): 401~403
111. Wehner T.C, Xie JH., Gene list 2001 for cucumber . Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2001, 24: 110~136
112. Yao C.B., Zehnder C., Bauske E, et al. Relationship between cucumber beetle density and incidence

- of bacterial wilt of cucurbits. J. Econ. Entomol., 1996, 89(2): 510~514
113. Young Hoon Park, Suat Sensoy, et al. A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses. Genome, 2000, 43: 1003~1010

附录

一、英文缩略词

缩略词	英文全称	中文全称
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	扩增片段长度多态性
Amp	ampinclin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
BSA	bulkied segregant analysis	分离群体混合分析
CAPs	cleaved amplified polymorphic sequence	扩增酶切多态性序列
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
cM	centimorgan	厘摩尔根
DH	doubled haploid	双单倍体
DI	Disease index	病情指数
EDTA	ethlenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸二钠盐
EST	expressed sequence tag	表达序列标签
HR	hypersensitive response	过敏反应
IPTG	isoprophthio- β -D-glucuronidase	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
MAS	molecular assisted selection	分子辅助选择
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
QTL	quantitative trait loci	数量性状位点
RAPD	randomly amplified polymerphic DNA	随机扩增多态性 DNA
RFLP	restriction fragment length polymerphism	限制性酶切片段长度多态性
RGA	resistance gene analogs	抗病基因同源序列
rpm	revolution per minite	每秒转速
SAR	systemic acquired resistance	系统获得性抗性
SCAR	sequence characterized amplified region	特征序列扩增区
SNP	single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SSR	single sequence repeaters	简单重复序列
STS	sequence tagged site	序列标签位点
TE-AFLP	Three Endonuclease Amplified Fragment Length Polymorphism	三内切酶扩增的限制性片段长度多态性
TEMED	N, N, N', N'-tetra methyl ethylene diamine	N, N, N', N'-四甲基乙二胺
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane	三 (羟甲基) 氨基甲烷
X-gal	5-bromo-1-chloro-3-indolyl-D-galactoside	5-溴-1-氯-3 吲哚-D-半乳糖苷

二、药品的配制

2%CTAB 的配制：

药品名称	终浓度	母液浓度	母液体积或固体大克数
Tris•Hcl	100mM	1MTris•Hcl	100 ml
EDTA	20mM	0.5M EDTA	40 ml
NaCl	1.4M	/	81.90 g
CTAB	2%	/	20 g
BME	0.4%	/	4 ml
PVP	0.2%	/	2 g
H ₂ O	/	/	定容至 1000 ml

1M Tris•Hcl 的配制：

药剂	用量
Tris	60.5 g
dd H ₂ O	定容至 500 ml

调 PH 值至 8.0

0.5M EDTA 的配制：

药剂	用量
EDTA•Na ₂ •2H ₂ O	186.12 g
dd H ₂ O	800 ml
用 NaOH 调节 PH 至 8.0	约 20 g
dd H ₂ O	定容至 1000 ml

1×TE 的配制：

药品名称	终浓度	体积
1M Tris•Hcl	10mM	10 mM
0.5M EDTA	1mM	2 ml
dd H ₂ O	/	定容至 1000 ml

氯仿/异戊醇(24:1)的配制: 500ml 氯仿中加入 20.8ml 异戊醇即可

10×TBE 配制：

药品	用量
Tris•Hcl	216 g
硼酸	110 g
0.5M EDTA	80 ml
dd H ₂ O	定容至 2000ml

6% PA 胶配制：

药品	用量
尿素	420.42 g
甲叉	3 g
丙烯酰胺	57 g
10×TBE	100 ml
dd H ₂ O	定容至 1000 ml

6×Loading buffer 变性剂的配制：

药品	用量
甲酰胺	49 ml
0.5M EDTA	1 ml
溴酚蓝	125 mg
二甲苯菁	125 mg

6×Loading buffer 染色剂的配制：

药品	用量
溴酚蓝	0.125 g
蔗糖	20 g
dd H ₂ O	定容至 50 ml

RNase (10 mg/ml)的配置：

取 250 μ l 缓冲液加入 ddH₂O 2250 μ l (稀释 10 倍)。加入 25 mg RNase 中充分溶解，在沸水中煮 15 min，室温冷却，分装于 0.5 ml 离心管中，-20℃ 保存备用。

10%过硫酸铵 20 ml：

取超纯过硫酸铵 2 g，加 ddH₂O 18 ml 水，充分溶解后，分装于 0.5 ml 的离心管中备用。

10 mg/ml 硫代硫酸钠 100 ml：

称取硫代硫酸钠 1g，溶于 100 ml 超纯水中，用 2.0 ml 离心管分装，-20℃ 冰箱保存备用。

粘合硅烷的配置：无水乙醇 3 ml；冰醋酸 10 μ l；粘合硅胶 10 μ l

剥离硅烷的配置：无水乙醇 3 ml；剥离硅胶 300 μ l

LB 培养基的制备：在 950 ml 蒸馏水中加入胰化蛋白胨 10 g；酵母提取物 5g；NaCl 10g。用磁力搅拌器使其充分溶解，用 1 N 的 NaOH 调其 pH 至 7.0，用蒸馏水定容到 1 L，分装成 50 ml，在 1.05 kg/cm² 高压下蒸汽灭菌 15 min，高压灭菌后，室温下可保存一周，4℃ 下可保存 1 个月。

接头、引物的稀释：EcoR I 接头稀释到 5 pmol/L；Mse I 接头的稀释 50 pmol/L

本实验合成的接头为 1 OD/管，将离心管离心 1 min，然后轻轻打开管盖，上链和下链接头分别加入 643.65 μ l 和 602.41 μ l 的 ddH₂O，混合均匀，95℃ 变性 5 min，室温缓慢冷却使其复性。

引物的稀释 50 ng/ μ l：

本实验合成的引物为 1 OD/管，将离心管离心 1min，然后轻轻打开管盖，加入 660 μ l ddH₂O，混合均匀。

三、AFLP 选择性扩增引物序列与编号对应表

EcoR I:

Primer00: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
E ADAPTOR 1: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
E ADAPTOR 2: 3'-CTG ACG CAT GG TTAA -5'

1 个选择碱基		2 个选择碱基		3 个选择碱基							
序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号
E00+A	E01	E00+AA	E11	E00+AAA	E31	E00+CAA	E47	E00+GAA	E63	E00+TAA	E79
E00+C	E02	E00+AC	E12	E00+AAC	E32	E00+CAC	E48	E00+GAC	E64	E00+TAC	E80
E00+G	E03	E00+AG	E13	E00+AAG	E33	E00+CAG	E49	E00+GAG	E65	E00+TAG	E81
E00+T	E04	E00+AT	E14	E00+AAT	E34	E00+CAT	E50	E00+GAT	E66	E00+TAT	E82
		E00+CA	E15	E00+ACA	E35	E00+CCA	E51	E00+GCA	E67	E00+TCA	E83
		E00+CC	E16	E00+ACC	E36	E00+CCC	E52	E00+GCC	E68	E00+TCC	E84
		E00+CG	E17	E00+ACG	E37	E00+CCG	E53	E00+GCG	E69	E00+TCG	E85
		E00+CT	E18	E00+ACT	E38	E00+CCT	E54	E00+GCT	E70	E00+TCT	E86
		E00+GA	E19	E00+AGA	E39	E00+CGA	E55	E00+GGA	E71	E00+TGA	E87
		E00+GC	E20	E00+AGC	E40	E00+CGC	E56	E00+GGC	E72	E00+TGC	E88
		E00+GG	E21	E00+AGG	E41	E00+CGG	E57	E00+GGG	E73	E00+TGG	E89
		E00+GT	E22	E00+AGT	E42	E00+CGT	E58	E00+GGT	E74	E00+TGT	E90
		E00+TA	E23	E00+ATA	E43	E00+CTA	E59	E00+GTA	E75	E00+TTA	E91
		E00+TC	E24	E00+ATC	E44	E00+CTC	E60	E00+GTC	E76	E00+TTC	E92
		E00+TG	E25	E00+ATG	E45	E00+CTG	E61	E00+GTG	E77	E00+TTG	E93
		E00+TT	E26	E00+ATT	E46	E00+CTT	E62	E00+GTT	E78	E00+TTT	E94

Mse I:

M ADAPTOR 1: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
M ADAPTOR 2: 5'-TA CTC AGG ACT CAT-3'

1 个选择碱基		2 个选择碱基		3 个选择碱基							
序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号
M00+A	M01	M00+AA	M11	M00+AAA	M31	M00+CAA	M47	M00+GAA	M63	M00+TAA	M79
M00+C	M02	M00+AC	M12	M00+AAC	M32	M00+CAC	M48	M00+GAC	M64	M00+TAC	M80
M00+G	M03	M00+AG	M13	M00+AAG	M33	M00+CAG	M49	M00+GAG	M65	M00+TAG	M81
M00+T	M04	M00+AT	M14	M00+AAT	M34	M00+CAT	M50	M00+GAT	M66	M00+TAT	M82
		M00+CA	M15	M00+ACA	M35	M00+CCA	M51	M00+GCA	M67	M00+TCA	M83
		M00+CC	M16	M00+ACC	M36	M00+CCC	M52	M00+GCC	M68	M00+TCC	M84
		M00+CG	M17	M00+ACG	M37	M00+CCG	M53	M00+GCG	M69	M00+TCG	M85
		M00+CT	M18	M00+ACT	M38	M00+CCT	M54	M00+GCT	M70	M00+TCT	M86
		M00+GA	M19	M00+AGA	M39	M00+CGA	M55	M00+GGA	M71	M00+TGA	M87
		M00+GC	M20	M00+AGC	M40	M00+CGC	M56	M00+GGC	M72	M00+TGC	M88

1 个选择碱基		2 个选择碱基		3 个选择碱基							
序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号
		M00+GG	M21	M00+AGG	M41	M00+CGG	M57	M00+GGG	M73	M00+TGG	M89
		M00+GT	M22	M00+AGT	M42	M00+CGT	M58	M00+GGT	M74	M00+TGT	M90
		M00+TA	M23	M00+ATA	M43	M00+CTA	M59	M00+GTA	M75	M00+TTA	M91
		M00+TC	M24	M00+ATC	M44	M00+CTC	M60	M00+GTC	M76	M00+TTC	M92
		M00+TG	M25	M00+ATG	M45	M00+CTG	M61	M00+GTG	M77	M00+TTG	M93
		M00+TT	M26	M00+ATT	M46	M00+CTT	M62	M00+GTT	M78	M00+TTT	M94

四、药品来源及使用仪器

AFLP 引物、接头由上海生工生物工程技术有限公司合成；Tag DNA polymerase 购自上海 Promega 公司；Mse 和 EcoR 是 NEW ENGLAND BioLabs 公司的；dNTP 是 TOYOBO 公司的；T4 DNA Ligase、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 和 PMD18-T Vector 试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司的；pBR322 DNA/Msp Markers 购自北京天根生物科技有限公司。

叶片研磨仪是 Mixer Mill MM300 德国产；PCR 仪为 MJ Research Inc. 的 PTC-100™ programmable Thermal Controller 型；测序电泳电源为 Bio - Rad Power Pac 3000 型，测序胶电泳槽为 Bio - Rad Sequencing Cell 型，电泳垂直板 BIO-RAD 192 型；琼脂糖电泳槽为 BIO-RAD MINI-SUB CELL GT 型；紫外凝胶成像仪为 UVP GDS-8000 型；纯水仪为 Milli-Q 型；台式低温高速离心机为 224 HERMLE Z323 型。

致谢

本论文是在导师顾兴芳研究员的悉心指导下完成的。恩师宽阔的胸怀、渊博的知识、敏锐的学术思想、严谨的治学态度和对人宽厚朴实的作风是我今后人生的目标。临毕业之际，向恩师三年来在学习、研究和生活等方面给予的教诲、指导、鼓励及宽容表示衷心的感谢！

感谢中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄瓜组全体成员三年来对我工作的支持，张圣平老师对学习和试验、论文撰写方面给予了无私的帮助；徐彩青老师、王烨老师和李素云大姐对试验提供了大力的帮助。感谢苗晗硕士、穆生奇硕士对我的鼎力相助。

论文大部分内容都是在蔬菜花卉所生物技术室完成的，论文的每一部分都得到生物技术室全体研究生朋友的帮助。感谢生物技术室分子遗传课题组王晓武博士，营造了实验室浓厚的学术氛围。在这里的两年中，无论从科研态度、动手能力，还是做人做事等方面我都学到了很多。感谢张延国老师、李颖老师的大力支持与帮助。

在这里我要向张素勤师姐表示我最衷心的感谢，师姐从试验到生活给予我最大的帮助，热情朴实的做人风格、耐心细致的做事习惯是我学习的榜样。

我能顺利完成硕士研究生学业，离不开最亲爱的父母，没有他们一直以来的细心呵护、耐心教导就没有我的今天。

再次对所有给予我指导和帮助的老师、同学、朋友和家人表示深深的谢意！

作者简介

池秀蓉，女，1981 年 6 月出生于山西省太原市。1999 年考入山西农业大学园艺系，2003 年毕业，获园艺专业农学学士学位。2003 年至今，中国农业科学院蔬菜花卉研究所攻读硕士学位，师从顾兴芳研究员，论文题目为《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》。

