

网络出版时间:2020-11-25 16:54 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2021.05.012
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20201125.1136.009.html

黄瓜白化突变体分析与突变基因 *al* 的精细定位

牛玉倩,李 征

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对黄瓜白化叶片突变体进行生理和遗传分析,并对该突变基因 *al* 进行精细定位,为阐明影响黄瓜叶绿体发育的重要代谢或调控机制提供参考。【方法】以 2 个不同背景的黄瓜材料 Gy14 和 9930 为亲本,分别与携带白化突变基因的杂合材料 649 构建 F_2 群体。对 F_2 群体中的野生型和白化突变体进行光合色素含量测定及叶绿体结构观察,同时筛选多态性分子标记引物,结合基因组重测序技术,对突变基因 *al* 进行精细定位。【结果】对 *al* 突变体进行表型观察,发现刚出土时其子叶颜色浅黄,之后逐渐白化,确定该白化突变为致死突变性状。与野生型相比,*al* 突变体光合色素含量均极显著低于野生型,且叶绿素 a、叶绿素 b 含量平均降低了 90% 以上。通过透射电镜对叶肉细胞内叶绿体结构进行观察发现,与野生型相比,*al* 突变体子叶叶肉细胞中几乎无法观察到叶绿体的存在。对 *al* 突变体进行遗传分析发现,该白化性状是由一对隐性核基因控制的质量性状。通过 BSA、分子标记定位、基因组重测序和染色体步移等方法,最终将 *al* 基因定位于黄瓜第 7 号染色体上约 66 kb 区间内。【结论】黄瓜白化突变的形成与叶绿体的形成密切相关,由单基因突变产生,定位于黄瓜第 7 号染色体上。

【关键词】 黄瓜育种;白化突变体;光合色素;叶绿体;精细定位

【中图分类号】 S642.203.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)05-0088-08

Characteristic and fine-mapping of *albino cotyledons* (*al*) mutant in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

NIU Yuqian, LI Zheng

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Physiological and genetic analysis as well as fine-mapping of a cucumber *albino cotyledons* (*al*) mutant were conducted to provide reference for elucidating important metabolic or regulatory mechanisms affecting chloroplast development. 【Method】Two cucumber materials Gy14 and 9930 with different backgrounds were used as parents to develop two F_2 populations with heterozygous material 649 carrying *al* mutant gene, respectively. Photosynthetic pigment content and chloroplast structure of wild-type and *al* mutants in the F_2 population were analyzed, and polymorphic molecular markers were screened for mapping. 【Result】Phenotypic observation of the *al* mutant showed that cotyledons were pale yellow and then gradually changed to albino before slowly withering and dying. The albino mutation was identified as a fatal mutation. Content of photosynthetic pigment of mutant was significantly lower than that of wild type, and contents of chlorophyll a and chlorophyll b decreased by more than 90% on average. The chloroplast structure in mesophyll cells was observed by transmission electron microscopy. Compared with wild type, chloroplast was hardly observed in cotyledon cells. Genetic analysis of the *al* mutant revealed that albino trait was a quality trait controlled by a pair of recessive nuclear genes. After BSA, ge-

【收稿日期】 2020-05-10

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31672150,31872111)

【作者简介】 牛玉倩(1995—),女,黑龙江大庆人,在读硕士,主要从事黄瓜育种研究。E-mail:316025894@qq.com

【通信作者】 李 征(1982—),男,辽宁朝阳人,教授,博士生导师,主要从事黄瓜育种研究。E-mail:lizheng82@nwsuaf.edu.cn

nome re-sequence, and chromosome walking, the *al* gene was finally located in a 66 kb interval in cucumber chromosome 7. 【Conclusion】 The formation of this cucumber albino mutation was closely related to formation of chloroplast, resulting in a single gene mutation located in chromosome 7.

Key words: cucumber breeding; albino mutation; photosynthetic pigment; chloroplast; fine mapping

经过长期的栽培与驯化,黄瓜(*Cucumis sativus* L.)已经成为最主要的蔬菜作物之一,广泛分布于世界各地。作为第一个进行基因组测序的蔬菜作物,黄瓜基因组较小,约为 367 Mb,是研究葫芦科的模式作物,也是研究叶色突变的理想植物。叶色突变在自然界普遍存在,由于叶色突变植株是研究叶绿素合成代谢、叶绿体发育结构及光合作用系统的理想材料,随着分子生物学的进一步发展,对于叶色突变体的研究日渐深入。

植物白化突变体的形成大多是因为叶绿素缺失、叶绿体发育受阻、叶绿体内部结构异常或光合作用受阻而产生的。突变体植株在缺乏叶绿素后不能进行正常的光合作用,导致苗期就表现出致死效应。目前,叶色白化突变体在许多植物中都有发现,如水稻^[1-2]、拟南芥^[3]等。黄瓜叶色突变体方面的报道甚少,迄今为止发现的叶色突变体的表现也不尽相同,其中已报道的致死突变体有 4 个:*al*、*cd*、*gc* 和 *p*^[4],非致死突变体有 8 个:*g*、*lg-1*、*lg-2*、*v*、*vvi*、*yc-1*、*yc-2* 和 *yp*^[5]。随着基因组学及分子育种的发展,我国关于黄瓜叶色突变体的研究也逐渐深入,如国艳梅等^[6]和苗晗^[7]在黄瓜雌性系 9110Gt 中发现了能够稳定遗传的黄色突变体。进一步研究发现该突变体中叶绿体发育异常且受温度影响较大,其由位于黄瓜 6 号染色体(Chr6)上的隐性位点 *v-1* 控制,最终将 *CsaCNGCs* 确定为候选基因^[6-8]。李万青等^[9]和 Gao 等^[10]利用 EMS 诱变获得黄瓜叶绿素缺陷突变体 C528,其叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素及叶绿素总量相对于野生型均显著降低,利用图谱克隆技术最终将 *CsChlI* 确定为候选基因。李燕^[11]发现的黄瓜黄绿叶色突变体 Z3t 的子叶表现为黄色,叶绿体结构异常,超氧化物歧化酶活性显著高于对照,并由隐性核基因 *yl* 控制。胡亮亮等^[12]对黄绿叶突变体 C777 进行光合特性分析发现,突变体的光合色素质量分数相对于野生型降低,导致其净光合速率显著降低。董翔宇^[13]通过 BSA 法结合分子标记技术将自然突变叶色突变体 *yf* 的候选基因定位在第 7 条染色体 *Cucs.a.099260* 基因上。

在前期研究中,本研究小组使用黄瓜野生型材料 649 经 EMS 诱变后获得携带白化基因的杂合突

变个体,在分别与黄瓜材料 Gy14 和 9930 构建的 2 个 F₂ 群体中均出现了白化致死突变个体。因其植株不能正常发育真叶,与已报道的黄瓜叶色突变体均不同,因此将其命名为白化 *albino cotyledons* (简称 *al*) 突变体。初步观察其表型发现突变植株子叶白化,苗期致死。本试验通过对白化突变体的研究,以期发现调控叶绿素合成和叶绿体建成的关键基因,为进一步阐明影响黄瓜叶绿体发育的重要代谢或调控机制及光合作用机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜亲本材料 Gy14、9930 均来自西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组,黄瓜野生型材料 649 经 EMS 诱变后获得携带白化基因的杂合突变材料,与 Gy14、9930 分别构建 F₂ 群体。试验所用 Gy14×649、9930×649 的 F₁ 代种子来自西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组,2017 年秋季种植于温室中,用于自交并获得 F₂ 分离群体,进行生理和遗传分析。2018 年春季扩大 F₂ 群体种植,进行基因精细定位研究。

1.2 试验方法

1.2.1 光合色素含量的测定 光合色素含量的测定方法参照《植物生理生化实验原理与技术》(第 3 版)^[14]并略有更改。分别取 Gy14×649、9930×649 F₂ 群体子叶展平期 5 和 9 d 苗龄的野生型及 *al* 植株各 3 株,各称取新鲜叶片组织 0.2 g,加入约 5 mL 体积分数 80% 丙酮充分研磨,避光放置至叶片无色,过滤、定容至 10 mL,摇匀备用。以体积分数 80% 丙酮为空白对照,分别在 663 和 646 nm 波长下测定其 OD 值,重复 3 次。按下式对植株子叶所含光合色素含量进行计算^[15-16]:

$$C_a = (12.21A_{663} - 2.81A_{646}) \times V \times N \div (W \times 1\ 000);$$

$$C_b = (20.13A_{646} - 5.03A_{663}) \times V \times N \div (W \times 1\ 000);$$

$$C_{a+b} = C_a + C_b。$$

式中: A_{663} 、 A_{646} 分别为植物叶绿体色素提取液在 663 和 646 nm 波长下的 OD 值, C_a 、 C_b 分别为叶绿

素 a、叶绿素 b 的含量(mg/g), C_{a+b} 为总叶绿素含量(mg/g), V 为提取液体积(mL), N 为稀释倍数, W 为样品鲜质量(g)。

1.2.2 叶绿体结构的观察 分别选取 9930×649 F_2 群体野生型及突变体的子叶和真叶(突变体因无法长出真叶,故选取同时期生长点处新生嫩芽),切取条状、截面约 1 mm×1 mm 且体积不大于 1 mm³ 的叶片组织,放置于预冷固定液(2.5%戊二醛磷酸缓冲液,4℃冰箱保存)中,抽真空 30 min,4℃保存备用。每组材料重复 3 次,固定 6 h 后可送制样。制样试剂和样品制备方法参考 Leica 公司提供的《常规生物透射电镜样品制备概要》(<http://www.leica-microsystems.com>)。用透射电镜对细胞中的叶绿体进行观察,透射电镜的操作方法由西北农林科技大学北校区公共实验平台提供。

1.2.3 黄瓜白化表型的遗传分析与精细定位 随机选取 Gy14×649、9930×649 F_2 群体扩繁的种子,统计白化个体和野生型个体数,并对统计结果进行 χ^2 分析。用 BSA 法对目标突变基因进行初步定位,在 Gy14×649、9930×649 F_2 分离群体中分别随机选取野生型和突变体表型植株各 10 株,用 CTAB 法提取 DNA 后稀释至 50 ng/ μ L,构建野生型基因

池和突变体基因池,利用这两个池进行黄瓜白化突变基因的初定位,同时对这两个基因池进行全基因组 Bulk-seq 测序,测序由诺禾致源生物科技有限公司完成。初定位所用黄瓜染色体引物由西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组提供。黄瓜染色体基因组 SSR 标记引物^[17-19]由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系为:2×Dining Mix (北京,Dining)5 μ L,ddH₂O 3 μ L,上、下游引物(10 ng/ μ L)各 0.5 μ L,DNA 模板(50 ng/ μ L)1 μ L。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 20 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,28 个循环;72℃终延伸 5 min,终止温度 10℃保存。PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色后统计带型,从而进一步筛选多态性引物。

在 SSR 分子标记的基础上,基于黄瓜基因组数据库网站(<http://cucurbitgenomics.org/>)信息,结合重测序结果开发了单核苷酸多态性(SNP)和缺失/插入(InDel)标记。标记与目标基因的连锁分析使用 MAPMARKER/EXP 3.0 程序,应用 Kosambi 函数将其转化为遗传图距^[20]。本研究使用的 PCR 引物信息见表 1。

表 1 本研究用到的黄瓜基因定位 PCR 引物
Table 1 Cucumber gene mapping related primers used in this study

引物名称 Primer name	上游引物序列(5'→3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'→3') Reverse primer sequence
SSR7016	GGTCTTCCTTTTCAAATCATTG	AAAAATTCCTAAGACGACGATCA
SSR7020	TCTCCGGCAGAAAGAAAAGA	TGCGTCTCCTTCTTCCTCAT
SSR7026	CGAGTGTGGACATTTTAGAGGG	TTGACTTTCCTCATTCTTTTAATGC
SSR7027	CGGCGCCACTCAGTTAGAT	AAAACCATTAAATTGGAATGATAAA
UW048441	GAGAGGACAGGCAAGTTGTTG	CCGTCCTATGTTTGTTCCATC
UW048446	TGATTTCCCTCTCAAACGCT	GGAAGGCAATGGAAATGAGA
UW048449	AAAATCGGTGGTTTGAGAA	TCTTATTCAAATGTGGTTTCGG
UW048465	CGAAGCAGAGTACGGTGACA	TGGATTTTTCTGGGTTTTCTG
UW048542	AATTTTGATTGCTATGGCGG	GGCTTGGGAGTGTGTTTGTT
UW048595	ACGTGGAATTTAGCTGACGC	GAGCCAAAAATGGAGGATGA
SNP4730918	TGTATGAAGGCAAAGGAGCA	CACTGTGCCGAGGTATTAGG
SNP4733568	ATACTTGAACGGACATAGGG	AAATGGGTGATTTCGTTGC
InDel5235596	AAGGAGTGAATGAGCTGATCATAAA	ATTTTAAATGGATAGTAAATGATAT
InDel5029382	ATTGTGACACCAAGGGATT	TTATGTCTTTCTTGGTGCTT
InDel5155588	CCAGTACAATCAAACCTTATAGCAT	AATAACCCAAATACACCAATACCA
InDel5177313	GAGACGAGTATTTAATTCCTTCA	CCAACCCATAAAGTGAATAAAC
InDel5044706	TTCAAAGAAATCATCGAATGTT	CCAACCCATAAAGTGAATAAAC
InDel5118521	AAGAGTTTAGTTATGGAGGGTT	GTCGTTACGTAGACTTTTCG

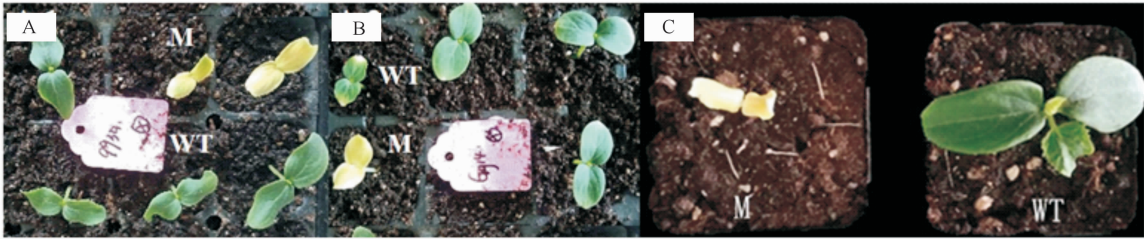
2 结果与分析

2.1 黄瓜 al 突变体的表型观察与分析

由于 al 突变体具有苗期致死性,因此最初该突

变体是从 Gy14×649 和 9930×649 F_2 分离群体中鉴定获得的。对黄瓜 al 突变体表型进行观察发现,与野生型相比,al 突变体刚出土时子叶颜色浅黄,之后逐渐白化(图 1-A,B)。突变体在子叶期正常生

长,在野生型进入真叶期的相同时段,突变体慢慢枯萎死亡(图 1-C)。对 *al* 突变体的观察表明,该突变为致死突变性状。



A,B. 分别为 9930×649、Gy14×649 F₂ 群体 *al* 突变体与野生型植株;C. 同时播种后野生型长出真叶时, *al* 突变体逐渐萎蔫死亡。WT. 野生型;M. *al* 突变植株

A,B. *al* mutant plants and wild type in two F₂ populations of 9930×649, Gy14×649, respectively;B. At the first-leaf period, the *al* mutant wilted and died. WT. Wild-type plants;M. *al* mutant

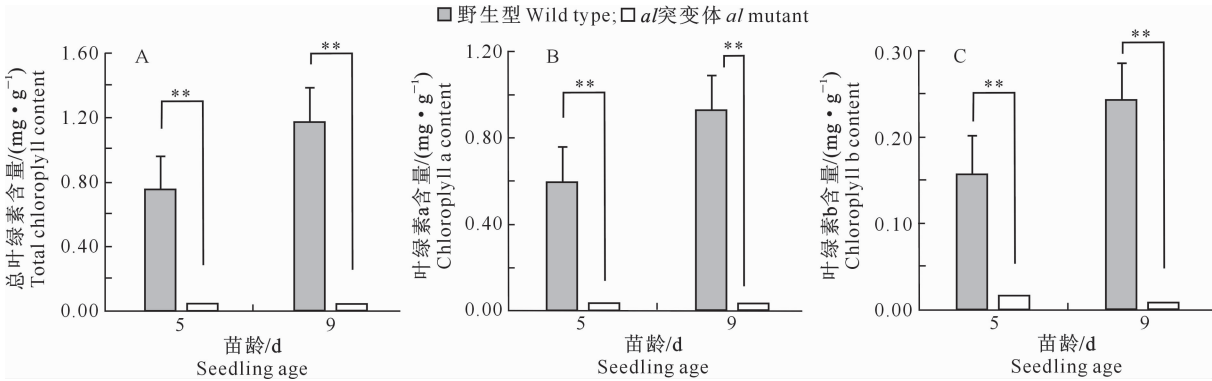
图1 黄瓜 *al* 突变体与野生型植株的表型观察

Fig. 1 Observation of phenotypes of cucumber *al* mutant and wild type

2.2 黄瓜白化突变体光合色素含量的测定

与野生型相比,Gy14×649 和 9930×649 两个 F₂ 分离群体中的 *al* 突变体叶色呈浅黄或白色。分别对 5 和 9 d 苗龄的野生型及 *al* 突变体子叶的叶绿素含量进行测定,结果表明,9930×649 F₂ 群体中, *al* 突变体的总叶绿素含量极显著低于野生型植株

(图 2-A)。相较于野生型,5 d 苗龄(即子叶展平期)时,*al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 94.18%,叶绿素 b 含量降低了 90.44%;9 d 苗龄时,*al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 97.65%,叶绿素 b 含量降低了 92.01%(图 2-B 和图 2-C)。



* * 表示同一苗龄野生型与 *al* 突变体间差异极显著($P<0.01$)。下同

* * indicates significant difference between *al* mutant and wild type at same seedling age ($P<0.01$). The same below

图2 不同苗龄下黄瓜 9930×649 F₂ 群体中 *al* 突变体子叶光合色素含量的变化

Fig. 2 Changes in photosynthetic pigment content in cotyledon of cucumber *al* mutant in 9930×649 F₂ populations at different seedling ages

在 Gy14×649 F₂ 群体中,*al* 突变体的总叶绿素含量均极显著低于野生型植株(图 3-A)。与野生型相比,5 d 苗龄时 *al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 92.31%,叶绿素 b 含量降低了 88.13%;9 d 苗龄时 *al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 98.93%,而叶绿素 b 含量几乎无法测到(图 3-B 和图 3-C)。

2.3 黄瓜白化突变体叶绿体结构的观察

利用透射电镜对野生型及 *al* 突变体子叶和真叶的叶绿体结构分别进行观察,结果发现野生型子

叶中的叶绿体形态正常,呈椭球形,有正常堆叠的基粒片层结构(图 4-A,B)。但 *al* 突变体子叶叶肉细胞中未观察到规则的叶绿体,偶尔会有几个呈细长条形的异常叶绿体结构(图 4-C,D)。野生型真叶中的叶绿体相对于子叶中的叶绿体发育更为完全,形状规则,排布整齐,可观察到正常堆叠的基粒片层、淀粉粒等完整结构(图 4-E,F)。在 *al* 突变体真叶(即同时期生长点处新生嫩芽)的叶肉细胞中几乎不能观察到叶绿体(图 4-G,H)。

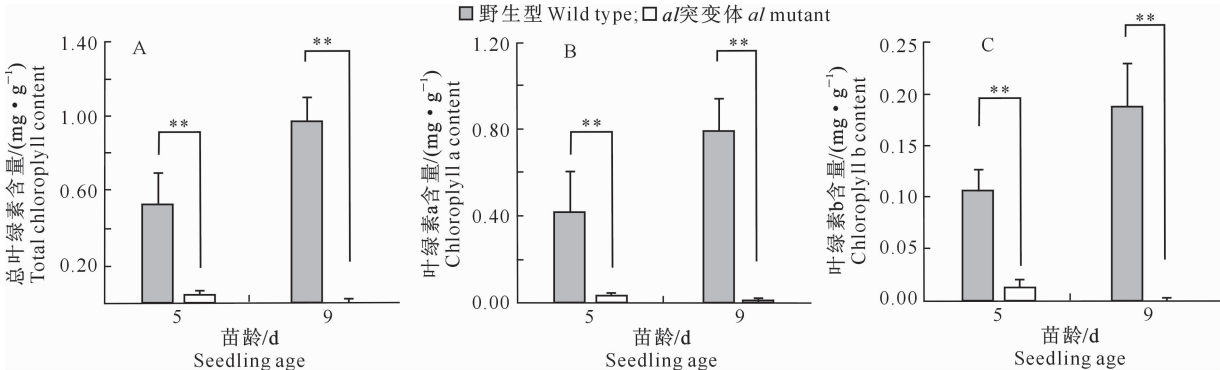
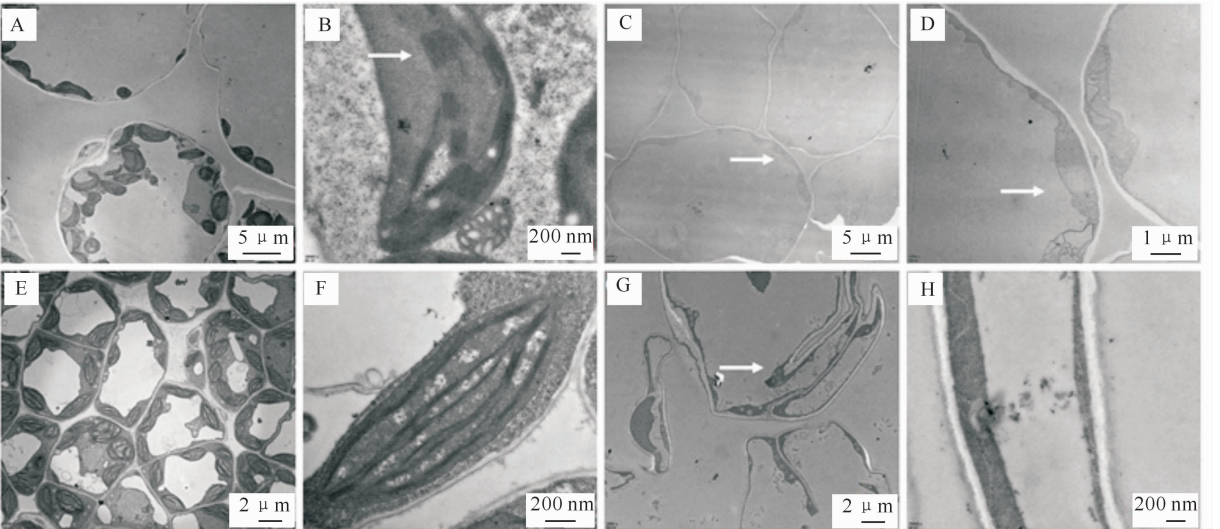


图 3 不同苗龄下黄瓜 Gy14×649 F₂ 群体中 *al* 突变体子叶光合色素含量的变化
Fig. 3 Changes in photosynthetic pigment content in cotyledon of cucumber *al* mutant in Gy14×649 F₂ populations at different seedling ages



A,B. 野生型子叶;C,D. *al* 突变体子叶; E,F. 野生型真叶;G,H. *al* 突变体真叶。箭头示叶绿体或叶绿体类囊体
A,B. Wild-type cotyledon;C,D. *al* mutant cotyledon;E,F. Wild-type true leaf;G,H. *al* mutant true leaf.
Arrows indicate chloroplasts or chloroplast thylakoids

图 4 黄瓜野生型和 *al* 突变体子叶及真叶的叶绿体形态观察

Fig. 4 Morphology of cucumber wild-type and *al* mutant cotyledons and true leaves

2.4 黄瓜白化表型的遗传分析与精细定位

对黄瓜 Gy14×649 和 9930×649 两个杂交组合的 F₁、F₂ 群体进行表型观察发现,F₁ 个体表型均正常。利用 Gy14×649、9930×649 F₂ 群体出现的分离表型进行遗传分析,发现Gy14×649、9930×

649 F₂ 群体中野生型与突变型植株数的比值分别为 76 : 25 和 69 : 21,χ² 测验结果 P>0.05(表 2),表明分离群体符合孟德尔遗传定律 3 : 1 分离比,即突变个体的表型是由单基因控制的隐性性状,因此可使用 F₂ 群体对 *al* 基因进行定位和克隆。

表 2 黄瓜 *al* 突变体 F₁ 和 F₂ 群体的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of cucumber *al* mutants in F₁ and F₂ populations

群体 Population	植株总数 Total plants	野生型与突变型的株数比值 Ratio of wild type to mutant type plants	期望值 Expected ratio	χ ²	P 值 Probability value
F ₁ (Gy14×649)	61	61 : 0	1 : 0	—	—
F ₁ (9930×649)	60	60 : 0	1 : 0	—	—
F ₂ (Gy14×649)	101	76 : 25	3 : 1	1.42	0.23
F ₂ (9930×649)	90	69 : 21	3 : 1	0.55	0.46

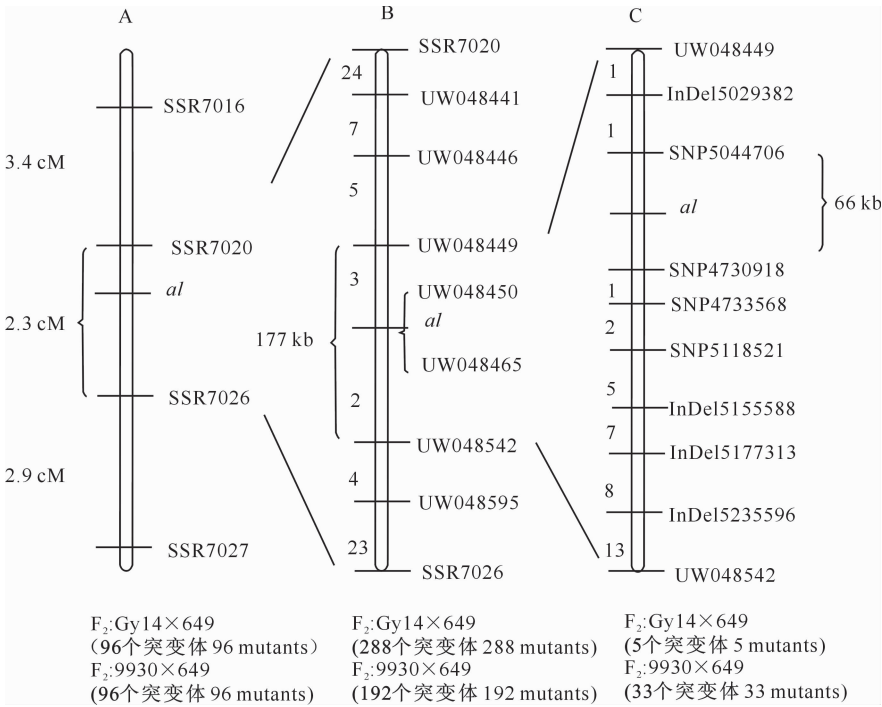
利用课题组原有的 7 条黄瓜染色体上的 SSR 分子标记,用 Gy14×649、9930×649 的 F₂ 分离群

体分别混合构建的野生型基因池(AL₋)和突变型基因池(*alal*)进行筛选,以每对标记组合均能在两基

因池中扩增出相应的清晰主带为准,最终在 7 号染色体上筛选出连续多态性 SSR 标记 12 对 (SSR7001、SSR7011、SSR7012、SSR7013、SSR7014、SSR7016、SSR7020、SSR7025、SSR7026、SSR7027、SSR7029、SSR7031),故将目的基因初步定位于 7 号染色体上。

对 Gy14×649、9930×649 F₂ 分离群体中分别混合构建的野生型基因池 (AL₋) 和突变型基因池 (*alal*) 进行全基因组 Bulk-seq 测序。根据池间 ΔSNP index 的结果,在黄瓜 7 号染色体上发现一个潜在的差异连锁区间,与初定位结果相同,可在 7 号染色体上对目标基因 *al* 进行进一步定位。

选用 Gy14×649 F₂ 群体中的 96 个 *al* 突变体单株对目的基因进行进一步定位分析发现,SSR7016、SSR7026 距离目的基因位点最近,分居 *al* 两侧,两标记间距离约为 5.7 cM;同时选用 9930×649 F₂ 群体中 96 个 *al* 突变体单株进行定位,发现 SSR7020、SSR7027 距离目的基因位点最近,分居 *al* 两侧,两标记间距离约为 5.2 cM (图 5-A)。综合标记 SSR7016、SSR7026、SSR7020、SSR7027 在基因组上的位置分布及交换事件数量变化情况,将 *al* 基因定位于 SSR7020 和 SSR7026 之间,遗传距离约为 2.3 cM (图 5-A)。



A. 利用小群体将突变基因 *al* 初步定位于标记 SSR7020 与 SSR7026 之间;B. 扩大群体将突变基因 *al* 定位于标记 UW048449 与 UW048542 之间,而 UW048450 和 UW048465 与 *al* 共分离;C. 开发标记,最终将突变基因 *al* 定位于标记 SNP5044706 与 SNP4730918 之间
A. Using primary populations, *al* gene was mapped between marker SSR7020 and SSR7026; B. Using enlarged populations, *al* gene was mapped between marker UW048449 and UW048542, and co-segregated with UW048450 and UW048465;
C. After developing markers, *al* gene was finally mapped between marker SNP5044706 and SNP4730918

图 5 黄瓜白化突变基因 *al* 的精细定位

Fig. 5 Fine mapping of cucumber *al* gene

在初步定位的多态性标记 SSR7020 和 SSR7026 之间继续设计 SSR 分子标记,利用亲本 9930、Gy14 及 Gy14×649、9930×649 的 F₁ 杂合个体和 F₂ 突变个体的 DNA 对开发标记进行多态性筛选,发现 7 个 SSR 分子标记 (UW048441、UW048446、UW048449、UW048450、UW048465、UW048542、UW048595) 对 Gy14×649 F₂ 群体存在多态性,而 9930×649 F₂ 群体只有 1 个多态性分子

标记 UW048595。在 Gy14×649 F₂ 群体中,使用 *al* 基因两侧标记 SSR7016 和 SSR7026 筛选出 288 个交换株,并在上述 7 个多态性标记中进行分析,结合其表型观察,将包含 *al* 基因的物理区间缩小到 UW048449 与 UW048542 之间,约 177 kb 的区间内,包含 5 个交换单株,而标记 UW048450 和 UW048465 与 *al* 位点共分离。在 9930×649 F₂ 群体中,使用 *al* 基因两侧标记 SSR7020 和 SSR7027

筛选出 192 个交换单株,并用多态性标记 UW048595 分析交换单株,结合其表型最终将目的基因定位于 SSR7020 与 UW048595 之间,包含 33 个交换单株。因该群体定位区间远大于 $Gy14 \times 649$ F_2 群体定位区间,故以 UW048449 与 UW048542 定位区间为准(图 5-B)。

根据上述定位结果,由于标记 UW048450 和 UW048465 与 *al* 位点呈共分离,故根据黄瓜基因组数据库信息和全基因组 Bulk-seq 测序结果,在 UW048449 和 UW048542 两个 SSR 分子标记间继续开发具有多态性的 SNP 和 InDel 标记,用于进一步缩小目的区间。在 UW048542 侧继续向内开发标记,分别以两个 F_2 分离群体的突变体及 F_1 杂合个体为对照,在标记位置附近设计引物,扩增包含标记在内的序列,测序确定其是否具有多态性。用获得的多态性标记 InDel5235596 继续筛选 9930×649 F_2 群体的交换单株,将交换事件缩减至 13 个。以此标记为基础,继续开发多态性标记并对剩余群体的交换单株进行筛选,其中在 9930×649 F_2 群体中筛选出具有多态性的标记为 InDel5177313、InDel5155588、SNP5118521、SNP4733568、SNP4730918,在 $Gy14 \times 649$ F_2 群体中筛选出具有多态性的标记仅有 SNP4730918。经过筛选,在 9930×649 F_2 群体中,InDel5177313 标记获得 8 个交换单株,InDel5155588 标记筛选到 7 个交换单株,SNP5118521 标记筛选到 5 个交换单株,SNP4733568 标记筛选到 2 个交换单株;在 $Gy14 \times 649$ F_2 群体中,SNP4730918 标记筛选到 1 个交换单株。根据标记在基因组上所在位置以及不同标记上交换株的数目变化,可推断目的基因现定位于标记 SNP4730918 与 UW048449 之间。同时在 UW048449 侧筛选到多态性标记 InDel5029382 和 SNP5044706,以 F_2 群体突变体及 F_1 杂合个体为对照,在 2 个标记上各得到 1 个交换单株。根据标记间位置信息及交换数目,最终将 *al* 基因定位于 SNP5044706 与 SNP4730918 标记之间,区间大小为 66 kb(图 5-C)。

3 讨 论

已有研究表明,由于控制叶绿素生物合成或叶绿体发育的基因沉默或失活,直接或间接影响叶绿素的合成与降解,从而导致突变体叶片中的各色素含量发生变化,最终形成叶色突变体^[21]。除此之外,叶绿体结构发育异常也是形成叶色突变体的重

要因素,如水稻^[22-23]、小麦^[24]等。故对叶色突变体的研究可从叶绿素合成与降解途径、叶绿体结构等方面进行。

本试验对黄瓜 *al* 突变体和野生型的光合色素含量及叶绿体结构分别进行了测定与观察,结果表明 *al* 突变体的光合色素含量相对于野生型极显著降低,其叶绿体结构形态异常且数量大幅度减少,可以预测其候选基因与控制叶绿素合成或叶绿体结构发育相关。因白化突变体苗期致死,不能进行正常的生长发育,故本试验通过构建 $Gy14 \times 649$ 、 9930×649 两个 F_2 群体获得分离群体中的白化突变个体,从而保证了分子标记定位过程中隐性群体的数目。同时统计群体后代野生型与突变体数量进行遗传分析,结果表明该白化突变性状符合孟德尔遗传定律 3:1 分离比,证明该性状是由单隐性核基因控制的。本试验将两个分离群体 $Gy14 \times 649$ 、 9930×649 通过 BSA 混池法结合基因组重测序,准确地将黄瓜白化突变基因定位于 7 号染色体上。之后根据黄瓜基因组数据库预测信息及全基因组重测序结果,进一步开发标记并进行定位,最终将候选基因定位于 SNP5044706 与 SNP4730918 标记之间约 66 kb 的区间内。之后在此区间内继续扩大筛选突变个体数量,但不能筛选出更多的交换单株,可能是突变体基因组在这一区段发生交换重组事件的概率较低所致。

现有黄瓜叶色突变体相关报道表明,控制叶色突变性状的基因多参与编码叶绿素合成途径或与控制叶绿体结构的正常发育相关,如李万青等^[9]和 Gao 等^[10]发现,黄瓜叶绿素缺陷突变体 C528 的最终候选基因 *CsChlI* 参与编码 Mg-螯合酶的 CHLI 亚基;朱伟伟等^[25]研究认为,黄瓜芽黄突变体的形成与 CLpP 相关,且 CLpP 参与调控叶绿体发育、相关蛋白积累及光形态建成。故后期对定位区段内候选基因进行预测时,可以根据该基因功能是否与叶绿素合成、叶绿体结构相关进行分析确定。董翔宇^[13]研究发现,黄瓜叶黄突变体 *yf* 的形成,同负责编码与类囊体合成途经蛋白的基因 *CucsA*.099260 发生突变相关,该基因与本研究预测基因均位于黄瓜 7 号染色体上,但经过基因定位区间比对发现,该突变基因并不存在于本研究最终定位的 66 kb 区间内,说明本研究的目的基因与上述定位基因并非同一基因,后续试验需进一步对区间内候选基因功能进行分析,从而确定目的基因。

本试验利用共同亲本 649 与不同背景的两个黄

瓜测序品种 Gy14、9930 分别构建群体,同时对同一候选基因进行定位,可观察到在不同背景下获得的多态性标记不尽相同,且即使有相同的多态性标记,两群体在同一位点的交换单株数量也存在差异,这可能是亲本遗传背景不同导致的遗传效应不同,也有可能是等位基因间存在一定程度的互作效应,具体原因需进一步探究。在结合基因组位置信息的情况下,使用多背景材料进行基因定位,可以提供更多的多态性分子标记,有助于加快基因定位工作,具有较高的应用价值。

4 结 论

本试验对黄瓜白化 *al* 突变体进行了光合色素含量测定和叶绿体结构观察,发现 *al* 突变体叶绿素含量极显著降低,且叶肉细胞中几乎不能观察到叶绿体。通过构建 Gy14×649、9930×649 两个 F₂ 群体对突变体进行扩繁,同时利用 SSR 分子标记技术结合重测序结果开发标记对突变基因 *al* 进行精细定位,最终将候选基因定位于黄瓜第 7 号染色体上约 66 kb 的区间内。

[参考文献]

[1] Zhang T, Feng P, Li Y, et al. VIRESCENT-ALBINO LEAF 1 regulates leaf color development and cell division in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(20): 4791-4804.

[2] Zheng H, Wang Z R, Tian Y L, et al. Rice albino 1, encoding a glycyl-tRNA synthetase, is involved in chloroplast development and establishment of the plastidic ribosome system in rice [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 139: 495-503.

[3] 李南南. 拟南芥子叶白化突变体 *sca1* 的筛选及鉴定 [D]. 河南开封: 河南大学, 2019.

Li N N. Screening and identification of cotyledon albino mutant *sca1* in *Arabidopsis* [D]. Kaifeng, Henan: Henan University, 2019.

[4] Pierce L, Wehner T. Review of genes and linkage groups in cucumber [J]. Horticultural Science, 1990, 25(6): 605-615.

[5] 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.

[6] 国艳梅, 顾兴芳, 张春霞, 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.

Guo Y M, Gu X F, Zhang C Z, et al. Genetic mechanism of the cucumber leaf mutant [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(4): 409-412.

[7] 苗 晗. 黄瓜叶色突变体 9110Gt 转色机理研究 [C]//中国园艺学会, 中国工程院农业学部. 中国园艺学会十届二次理事会暨学术研讨会论文摘要集. 北京: 中国园艺学会, 2007: 168.

Miao H. Research on the mechanism of the leaf colour transformation of yellow leaf colour mutant 9110Gt in cucumber (*Cuc-*

umis sativus L.) [C]// Ministry of Agriculture, Chinese Horticulture Society and Chinese Academy of Engineering. Abstract of the paper of the second council and academic seminar of the 10th chinese horticultural society. Beijing: Chinese Horticultural Society, 2007: 168.

[8] Miao H, Zhang S, Wang M, et al. Fine mapping of virescent leaf gene *v-1* in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1602.

[9] 李万青, 高 波, 杨 俊, 等. 一个新的黄瓜叶色黄化突变体的生理特性分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24(7): 98-103.

Li W Q, Gao B, Yang J, et al. Physiological characteristic analysis of a new leaf color yellow mutant in cucumber [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24(7): 98-103.

[10] Gao M, Hu L, Li Y, et al. The chlorophyll-deficient golden leaf mutation in cucumber is due to a single nucleotide substitution in *CsChlI* for magnesium chelatase I subunit [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(10): 1-13.

[11] 李 燕. 黄瓜叶色突变体的生理生化及遗传特性研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2016.

Li Y. Physiological characteristics and genetic analysis of leaf color mutant in cucumber [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2016.

[12] 胡亮亮, 赵子瑶, 张海强, 等. 一个新的黄瓜叶色突变体的光合特性分析 [J]. 西北农业学报, 2018, 27(11): 1622-1628.

Hu L L, Zhao Z Y, Zhang H Q, et al. Analysis of photosynthetic characteristics of a new cucumber leaf color mutant [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2018, 27(11): 1622-1628.

[13] 董翔宇. 黄瓜叶色黄化突变基因 *yf* 的精细定位及候选基因分析 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.

Dong X Y. Fine mapping and candidate gene analysis of a cucumber leaf yellowing mutant gene *yf* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.

[14] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2015: 131-132.

Wang X K, Huang J L. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, 2015: 131-132.

[15] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in beta vulgaris [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.

[16] 舒 展, 张晓素, 陈 娟, 等. 叶绿素含量测定的简化 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 399-402.

Shu Z, Zhang X S, Chen J, et al. The simplification of chlorophyll content measurement [J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(4): 399-402.

[17] Cavagnaro P F, Senalik D A, Yang L, et al. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 569.

[18] Ren Y, Zhang Z, Liu J, et al. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome [J]. PLoS ONE, 2009, 4(6): e5795.

Lu X X,Guo W T,Sun Y,et al. Growth and physiological re-
sponse of tissue culture plantlets of *Limonium sinense* to NaCl
stress [J]. Northern Horticulture,2016(18):154-159.

[35] Dhanyalakshmi A K H,Vijayalakshmi A C,Boominathan A R.
Evaluation of physiological and biochemical responses of rice
(*Oryza sativa* L.) varieties to salt stress [J]. Indian Journal
of Agricultural Research,2013,47(2):91-99.

[36] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends in Plant Science,
2001,6(2):66-71.

[37] Mark T,Romola D. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in high-
er plants [J]. Annals of Botany,2003(5):5.

[38] Rivero R M,Mester T C,Mittler R,et al. The combined effect
of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemi-
cal and molecular response in tomato plants [J]. Plant Cell &
Environment,2014,37(5):1059-1073.

[39] Chakraborty K,Bose J,Shabala L,et al. Difference in root K⁺
retention ability and reduced sensitivity of K⁺-permeable
channels to reactive oxygen species confer differential salt tol-
erance in three *Brassica* species [J]. Journal of Experimental
Botany,2016,67(15):4611-4625.

[40] Flowers T J,Munns R,Colmer T D. Sodium chloride toxicity
and the cellular basis of salt tolerance in halophytes [J]. An-
nals of Botany,2015,115(3):419-431.

[41] Chen T,Wang W,Xu K,et al. K⁺ and Na⁺ transport contrib-
ute to K⁺/Na⁺ homeostasis in *Pyropia haitanensis* under hy-
persaline stress [J]. Algal Research,2019,40:101526.

[42] Abid M,Zhang Y J,Li Z,et al. Effect of salt stress on growth,
physiological and biochemical characters of four kiwifruit gen-
otypes [J]. Scientia Horticulturae,2020,271:109473.

[43] Eerahim F,Arzani A,Rahimmalek M,et al. Salinity tolerance
of wild barley *Hordeum vulgare* ssp. Spontaneum [J]. Plant
Breeding,2020,139(2):304-316.

(上接第 95 页)

[19] Yang L,Koo D H,Li Y,et al. Chromosome rearrangements
during domestication of cucumber as revealed by high-density
genetic mapping and draft genome assembly [J]. Plant Jour-
nal,2012,71(6):895-906.

[20] 李 征. 黄瓜单性花控制 *M/m* 基因的克隆与功能分析 [D].
上海:上海交通大学,2010.

Li Z. Cloning and characterization of unisexual flower-controlling
M/m gene in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [D].
Shanghai:Shanghai Jiaotong University,2010.

[21] Motohashi R,Ito T,Kobayashi M,et al. Functional analysis of
the 37 ku inner envelope membrane polypeptide in chloroplast
biogenesis using a Ds-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant
[J]. Plant Journal,2003,34(5):719-731.

[22] 梁艳玲. 一个水稻白穗突变体 *wp(t)* 的鉴定及基因定位 [D].
重庆:西南大学,2019.

Liang Y L. Identification and gene mapping of a white panicle
mutant *wp(t)* in rice [D]. Chongqing:Southwest University,
2019.

[23] Qiu Z,Chen D,He L,et al. The rice white green leaf 2 gene
causes defects in chloroplast development and affects the plas-
tid ribosomal protein S9 [J]. Rice,2018,11(1):1-12.

[24] 蒋宏宝. 小麦叶绿素缺失突变体 *B23* 的鉴定及基因定位
[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.

Jiang H B. Identification and gene mapping of chlorophyll-de-
ficient mutant *B23* in wheat [D]. Yangling,Shaanxi:North-
west A&F University,2018.

[25] 朱伟伟,陈远良,陈 芳,等. 黄瓜芽黄突变相关基因 *ClpP* 克
隆及植物表达载体构建 [J]. 中国农学通报,2011,27(16):
146-150.

Zhu W W,Chen Y L,Chen F,et al. The clone of *ClpP* rela-
ting to virescent mutant in cucumber and the construction of
plant expression vector [J]. Chinese Agricultural Science Bul-
letin,2011,27(16):146-150.

(上接第 112 页)

[29] 要晓玮,梁银丽,曾 睿,等. 不同有机肥对辣椒品质和产量的
影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39
(10):157-162.

Yao X W,Liang Y L,Zeng R,et al. Effects of different organic
fertilizers on the yield and quality of pepper [J]. Journal of
Northwest A&F University(Nat Sci Ed),2011,39(10):157-
162.

[30] 辛 鑫,贾 琪,李 琦,等. 不同电导率的有机营养液种植番
茄效果分析 [J]. 西北农业学报,2019,28(10):1632-1638.

Xin X,Jia Q,Li Q,et al. Effect of organic nutrient solution
with different conductivity tomato growth and fruit quality
[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2019,28
(10):1632-1638.

[31] 范兵华,马乐乐,任瑞丹,等. 有机营养液灌溉频次和灌水量对
设施甜瓜产量、品质及肥水利用效率的影响 [J]. 应用生态学
报,2019,30(4):1261-1268.

Fan B H,Ma L L,Ren R D,et al. Effects of irrigation frequen-
cy of organic nutrient solution and irrigation amount on yield,
quality,fertilizer and water use efficiency of melon in facility
[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2019,30(4):1261-
1268.

[32] 辛 鑫,贾 琪,牟孙涛,等. 不同有机营养液水培番茄效果分
析 [J]. 西北农业学报,2019,28(8):1294-1301.

Xin X,Jia Q,Mou S T,et al. Effect analysis of hydroponic to-
mato with different organic nutrient solution [J]. Acta Agri-
culturae Boreali-occidentalis Sinica,2019,28(8):1294-1301.