

# 黄瓜果实苦味 *Bt* 基因的 AFLP 分子标记

顾兴芳<sup>1</sup> 张素勤<sup>1,2</sup> 张圣平<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 运用 AFLP 技术, 采用集群分析法 (BSA) 进行与黄瓜果实苦味基因连锁的分子标记的研究, 找到了与苦味基因连锁的两个显性 AFLP 标记: E23M66-101 和 E25M65-213。这两个标记与 *Bt* 基因的遗传距离分别为 5 cM 和 4 cM, 分别位于 *Bt* 基因的两侧。该标记可用于无苦味黄瓜的分子标记辅助育种。

**关键词:** 黄瓜; 果实苦味 *Bt* 基因; AFLP 标记

**中图分类号:** S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0140-03

## The AFLP Markers Linked with the Bitter Fruit Gene (*Bt*) in Cucumber

Gu Xingfang<sup>1</sup>, Zhang Suqin<sup>1,2</sup>, and Zhang Shengping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup> College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** AFLP biotechnology was applied to identify the markers linked to *Bt* gene based on BSA method. Two dominant AFLP markers E23M66-101 and E25M65-213 were screened firstly in home and abroad. The bitter fruit  $F_2$  plants possessed 101 bp and 213 bp fragments, but the bitterfree  $F_2$  plants not. The genetic distance of E23M66-101 and E25M65-213 was 5 cM and 4 cM respectively, and two markers were two sides of *Bt* gene. The AFLP markers can be used for marker-assisted selection.

**Key words:** Cucumber; *Bt* gene; AFLP marker

### 1 目的、材料与方法

目前检测黄瓜苦味的方法多为感官品尝和化学检测。化学检测虽可检测大批材料但较为繁琐, 其结果也不够准确; 感官品尝仅适于少量材料的检测, 并且无法进行精确定级<sup>[1]</sup>。本研究中采用集群分析法 (bucked segregant analysis, BSA) 和高通量的 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分析技术, 筛选与黄瓜苦味紧密连锁的 AFLP 标记, 可在苗期或直接用种子进行鉴定, 简工节本, 大大缩短育种进程, 为分子标记辅助育种和基因克隆奠定基础。

供试黄瓜材料 931 和 932 来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 931 含果实苦味显性 *Bt* 基因, 是从荷兰温室品种与国内杂交种杂交后代自交分离选育出的纯合自交系, 932 含其隐性无苦味 *bt* 基因, 是从国内华北型杂交种中自交分离而成的纯合自交系, 以 931 为母本, 932 为父本配制  $F_1$ , 自交获得  $F_2$  群体。

AFLP 引物、接头由上海生工生物工程公司合成; Taq DNA polymerase 购自 Shanghai Promega 公司; *Mse* 和 *EcoR* 购自 NEW ENGLAND BioLabs 公司; dNTP 购自 TOYOBO 公司; T4 DNA Ligase、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; pBR322 DNA /  $\Phi$  Markers、克隆试剂盒购自北京天为时代科技有限公司。

试验于 2003~2004 年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验温室及农业部“蔬菜遗传与生理重点开放实验室”完成。将亲本、 $F_1$  和  $F_2$  播种于温室中, 亲本和  $F_1$  各 30 株,  $F_2$  129 株。苗期常规管

收稿日期: 2005-06-30; 修回日期: 2005-07-28

基金项目: 国家“863”计划项目 (2002AA207012、2001AA241121); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助项目

理, 定植后前期夜温控制在 12℃ 以下, 后期昼温高于 32℃, 整个生长期控水, 并增施氮肥, 诱使苦味基因充分表达。采用口尝的方法鉴定果实中是否含有苦味素, 每株从根瓜开始直到拉秧, 由 3 位苦味敏感者品尝。

AFLP 分析 DNA 用量少, 采用快速少量 DNA 提取方法。选取果实有苦味和无苦味的  $F_2$  单株 DNA, 组成苦味组和无苦味组, 每组内以单株为单位进行 AFLP 分析。在 Vos 等<sup>[2]</sup>的 AFLP 分析基础上优化。黄瓜基因组的酶切采用 *Mse* 和 *EcoR* 内切酶, 选择性扩增结束后加入 6  $\mu$ L 的载样缓冲液, 95℃ 变性 5 min 后迅速置于冰上, 在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 银染法进行染色。

分子标记筛选及验证: 先用两个亲本筛选引物, 然后分别以 6 株苦味组和不苦组单株 DNA 为模板, 用两亲本间产生多态性的引物进行果实苦味基因标记的筛选, 只要组内 5 株单株带型一致, 即初步认为该标记与果实苦味基因连锁, 接着用该引物对整个  $F_2$  群体和群体之外的黄瓜材料进行验证, 统计条带的分离情况, 计算标记与苦味基因间的连锁距离。

目标条带的回收纯化、克隆与测序: 从聚丙烯酰胺凝胶上挖下目标条带, 放入 1.5 mL 的离心管中, 用 30~50  $\mu$ L 超纯水常温浸泡 24 h, 接着 95℃ 水浴锅里煮 30 min, 5 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 3  $\mu$ L 做模板, 采用选扩体系和程序进行扩增。目的片段的纯化、与载体的连接和转化参照 TaKaRa 的 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 和北京天为时代克隆试剂盒说明书进行。任意挑选两个目的片段的白色单菌落克隆各 10 个, 进行 LB 液体培养基 (100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素) 摇荡菌液过夜培养, 同时用灭菌枪头蘸取少许对应的克隆菌液放入 PCR 扩增体系中进行扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 挑选与插入片段大小一致的克隆, 送上海生工生物工程技术有限公司测序。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 黄瓜果实苦味的遗传分析

129 株  $F_2$  单株中苦味的 100 株, 不苦的 29 株, 经适合性测验符合 3:1 的分离比例 ( $\chi^2_c = 0.313 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$ ), 说明黄瓜果实苦味是由单基因控制, 苦味相对不苦为显性, 进一步证实了原有研究结果<sup>[3]</sup>的正确性。

### 2.2 黄瓜果实苦味基因分子标记的筛选

筛选了 272 对引物组合, 选出在双亲产生多态性的 34 对引物组合, 对苦味组和不苦组的各 6 株单株进行检验, 获得了两个显性标记: E23M66-101 和 E25M65-213。这两个标记与黄瓜果实苦味 *Bt* 基因共分离, 其碱基序列为, E23: 5'-GACTGCG-TACCAA TTCTA-3'; M66: 5'-GATGAGTCTGAGTA-AGAT-3'; E25: 5'-GACTGCGTACCAA TTCTG-3'; M65: 5'-GATGAGTCTGAGTAAGAG-3'。

### 2.3 分子标记的验证

用 E23M66-101 和 E25M65-213 对组外其它  $F_2$  单株进行验证, 在 129 株  $F_2$  单株中均有 7 株发生了交换, 并且 E23M66-101 和 E25M65-213 两标记在相同的两株上同时发生了交换, 此结果表明这两个标记是连锁的。经 JO NMAP 3.0 计算, E23M66-101 和 E25M65-213 与苦味基因的遗传距离分别为 5 cM 和 4 cM, 并且分别位于苦味基因的两侧。经适合性测验, E23M66-101 和 E25M65-

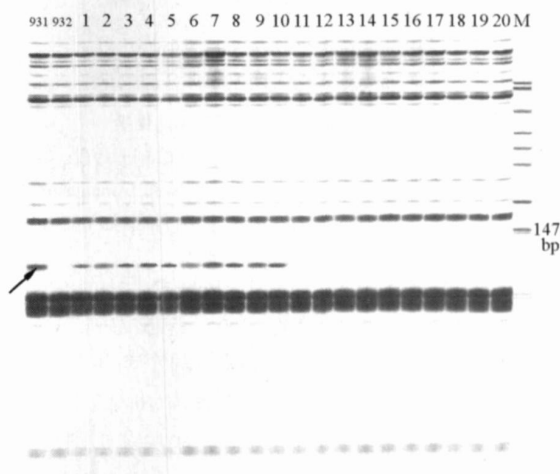


图 1 E23M66-101 在部分  $F_2$  单株中的验证

931: 苦味亲本; 932: 不苦亲本; 1~10: 苦味单株;

11~20: 不苦单株; M: marker, 箭头指示标记带。

Fig. 1 Verification of primer E23M66-101 in  $F_2$  Plants

931: bitter parent; 932: non-bitter parent; 1-10: bitter plants;

11-20: non-bitter plants; M: marker, arrow indicates

the marker band

213 两标记在  $F_2$  群体中均符合 3:1 的分离比。该结果从分子水平上进一步验证了根据表型进行遗传分析结果的正确性。图 1 和图 2 分别是 E23M66-101 和 E25M65-213 在亲本和部分  $F_2$  单株中的 AFLP 验证。

为了进一步验证标记的可靠性,接着将标记对  $F_2$  群体之外的 30 份黄瓜材料进行了验证。两标记在 931×932 的杂交一代中均有带,在 30 份材料中, E23M66-101 的正确率是 86.67%, E25M65-213 的正确率高达 100%。由于 E23M66-101 和 E25M65-213 分别位于苦味基因的两侧,若同时用这两个标记联合检测,鉴定的准确率可达到 99.8%,此标记对于黄瓜的分子标记辅助育种将发挥重要的作用。

## 2.4 目标条带的回收纯化、克隆与测序

由图 3 可知,两个目的回收片段是单一条带,无杂带污染,分别约为 100 bp 和 200 bp。目标条带与载体连接和转化后,进行菌落 PCR 检测(图 4),结果表明,两个转化菌株的插入片段和目标片段大小一致,说明所得克隆是目标片段。测序结果显示, E23M66-101 和 E25M65-213 的片段大小分

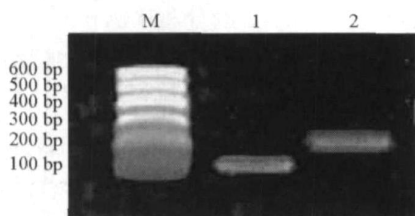


图 3 目标片段纯化的琼脂糖电泳结果

M: DNA marker; 1: 101 bp 片段; 2: 213 bp 片段。

Fig. 3 Purification of target fragments derived from agarose gel

M: DNA marker; 1: Fragment of 101 bp; 2: Fragment of 213 bp.

别为 101 bp 和 213 bp。采用 Blast 软件在 GeneBank 数据库中进行查询,未发现与该两标记片段相似性高于 20% 的序列,说明这两个片段为新发现的黄瓜 DNA 序列。

本研究在国内外首次获得了两个与黄瓜果实苦味 *Bt* 基因连锁的 AFLP 标记,这两个标记可以在 DNA 水平上鉴定黄瓜材料是否含有 *Bt* 基因,可用于黄瓜分子标记辅助育种,提高育种效率和育种过程的预见性,对加快选育果实无苦味黄瓜将发挥较大作用。

## 参考文献:

- 顾兴芳, 方秀娟, 张孟玉, 张天明. 黄瓜苦味研究进展. 园艺学报, 2000, 27 (增刊): 504~508  
Gu X F, Fang X J, Zhang M Y, Zhang T M. Review of the advances in research on the bitterness of cucumber. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27 (suppl): 504~508 (in Chinese)
- Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407~4414
- 顾兴芳, 张圣平, 国艳梅. 黄瓜苦味遗传分析. 园艺学报, 2004, 31 (5): 613~616  
Gu X F, Zhang S P, Guo Y M. Inheritance of bitterness in cucumber. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (5): 613~616 (in Chinese)

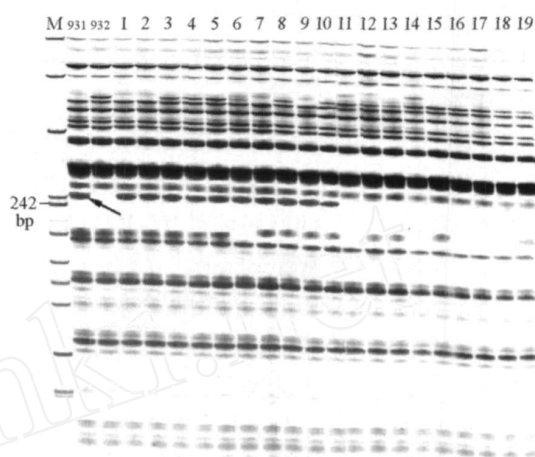


图 2 E25M65-213 在部分  $F_2$  单株中的验证

931: 苦味亲本; 932: 不苦亲本; 1~10: 苦味单株;  
11~19: 不苦单株; M: marker; 箭头指示标记带。

Fig. 2 Verification of primer E23M66-101 in  $F_2$  Plants

931: bitter parent; 932: non-bitter parent; 1~10: bitter plants;  
11~19: non-bitter plants; M: marker; arrow indicates the marker band.

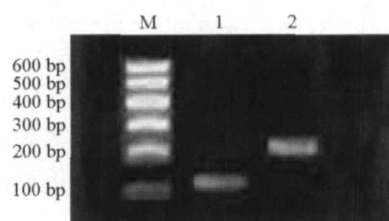


图 4 目标片段转化菌株的 PCR 产物电泳检测

M: DNA marker; 1: 101 bp 片段; 2: 213 bp 片段。

Fig. 4 Electrophoresis results of target fragments transformed TOP10 PCR products

M: DNA marker; 1: 101 bp fragment transformed TOP 10 PCR products; 2: 213 bp fragment transformed TOP 10 PCR products.