

黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系群体的构建及果实相关数量性状基因的定位

孟佳丽, 娄群峰, 周晓慧, 史建磊, 陈劲枫

(南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】以栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n = 14$) ‘北京截头’为受体亲本, 以野生酸黄瓜 (*C. hystrix* Chakr., $2n = 24$) 为供体亲本, 采用 SSR 标记辅助选择法构建黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系群体。初步定位控制黄瓜果实外形的数量性状基因。【方法】首先通过种间杂交-回交-自交获得大量的染色体片段导入系株系。然后选择均匀分布在黄瓜染色体组上的 298 对 SSR 标记对亲本进行多态性检测, 使用检测出的亲本间差异引物对染色体片段导入系株系进行检测, 筛选含有野生酸黄瓜染色体片段的植株。对该群体果实外形进行初步调查, 利用 *t* 测验与轮回亲本比较, 鉴定 QTL。【结果】本研究构建了由 50 个株系组成的染色体片段导入系群体。在该群体中共检测到 149 个染色体导入片段, 包含 61 个不同的导入片段, 不同导入片段的总长度为 259.95 cM, 基因组覆盖率为 45.37%。导入片段的长度在 1.65—15.4 cM, 平均长度为 5.41 cM, 分布于黄瓜的 7 条染色体上。利用该导入系群体初步定位了控制黄瓜果型的 13 个 QTL。【结论】构建了一套以栽培黄瓜为背景, 野生酸黄瓜为前景的染色体片段导入系群体, 并利用该导入系初步定位了控制黄瓜果型的 QTL, 为开发利用野生酸黄瓜的优良基因提供了新的种质资源, 也为今后定位黄瓜的数量性状遗传位点奠定了材料基础。

关键词: 野生酸黄瓜; 染色体导入系; 分子标记辅助选择; 数量性状位点

Construction of Cucumber-Sour Cucumber Chromosome Introgression Lines and Location of Fruit Related QTLs

MENG Jia-li, LOU Qun-feng, ZHOU Xiao-hui, SHI Jian-lei, CHEN Jin-feng

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University /State Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】 A set of cucumber-sour cucumber chromosome introgression lines were constructed by using cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) cultivar ‘Beijingjietou’ as recurrent parent and the wild ‘sour cucumber’ (*C. hystrix* Chakr., $2n = 24$) as donor parent by the way of marker-assisted selection, and QTL controlling cucumber fruit shape was detected initially. 【Method】 Firstly, through interspecific-backcrossing-selfing approach, a lot of cucumber-sour cucumber chromosome introgression lines were obtained. Then polymorphism of the parents was detected by 298 pairs of SSR markers which uniformly distributed in the cucumber genome. And then the cucumber-sour cucumber chromosome introgression lines which contained the wild sour cucumber chromosome segments from the strains were screened by using the detected differences between parents SSR markers. QTL analysis of three main traits affecting cucumber fruit shape (fruit length, fruit diameter, fruit length/diameter ratio) was conducted using *t*-test compared with the recurrent parent. 【Result】 A set of 50 cucumber-sour cucumber chromosome introgression lines was constructed. There are 149 chromosome introgression segments containing 61 different introgression segments were

收稿日期: 2011-09-07; 接受日期: 2012-01-19

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830079)、国家自然科学基金项目 (30972007、31070801)、国家“973”项目 (2009CB119000、2012CB113900)、教育部博士点基金项目 (20050307009)、江苏省科技支撑计划项目 (BE2009310)、国家“863”专项经费项目 (2010AA10A108)

联系方式: 孟佳丽, Tel: 13512504187; E-mail: 2009104058@njau.edu.cn. 通信作者陈劲枫, Tel: 025-84396279; E-mail: jfchen@njau.edu.cn

identified in the lines. The total length of the different segments was 259.95 cM, and the coverage was 45.37% in the cucumber genome. The length of the introgression segments ranged from 1.65 cM to 15.4 cM with an average of 5.41 cM. They distributed in 7 chromosomes of cucumber. A total of 13 QTL affecting cucumber fruit shape were detected in CSIL population initially.

【Conclusion】 In this research, a set of cucumber-sour cucumber introgression lines were created and QTL affecting cucumber fruit shape was detected initially. It provided new resources for utilization of genes from *C. hystrix* and also the material basis for fine mapping of quantitative traits in cucumber.

Key words: wild sour cucumber; chromosome introgression lines; marker-assisted selection; quantitative trait locus

0 引言

【研究意义】 染色体片段导入系 (chromosome segment introgression lines, CSILs), 又称为染色体片段代换系 (chromosome segment substitution lines, CSSLs)。染色体片段导入系的每一个株系的染色体组中携带了至少一个供体种染色体片段, 其它部分的染色体均来自轮回亲本。导入系与受体亲本相比, 其染色体组之间的差异在于导入系中导入的外源染色体片段。理论上染色体片段导入系与受体亲本的任何差异都是由导入片段中的不同基因造成的。染色体片段导入系显著地降低了植物遗传背景的干扰, 有利于数量性状遗传位点 QTL 的定位和分析^[1]。目前已经有研究人员利用染色体片段导入系材料对植物的数量性状位点进行了分析鉴定和精细定位, 还克隆了一些重要性状的 QTL。因此, 染色体片段导入系是进行植物的基因组分析, 特别是 QTL 定位的良好材料, 建立一套完整的染色体片段导入系对研究植物功能基因组学意义重大。**【前人研究进展】** 构建染色体片段导入系的关键是利用轮回亲本多代回交 (及自交) 后, 通过染色体重组, 获得携带少量供体染色体区段的重组后代, 然后利用覆盖全基因组的分子标记辅助选择, 筛选鉴定出携带 1 个或少数几个供体染色体区段的导入系^[2]。目前, 已建成的导入系群体主要集中在番茄和水稻上。在番茄上, Eshed 等在番茄 M82-1-8 的遗传背景上构建了 120 个带有 1—7 个导入片段的导入系^[3], 这些导入系为更好地利用野生番茄中的有用基因奠定了基础。Chetelat 等用 139 个 RFLP 标记筛选到 110 个带有单个杂合或纯合导入片段的番茄导入系, 所有导入片段覆盖番茄野生种基因组的 66%^[4]。在水稻上, Aida 等使用 87 个 RFLP 标记筛选到 70 个供体亲本为粳稻品种 Asominori, 受体亲本为籼稻栽培种贵朝 2 号的导入系植株, 这个导入系群体的导入片段覆盖率很高, 共覆盖水稻基因组的 92.7%^[5]。Tian 等使用 126 个多态标记对以中国野生稻 *O. rufipogon* 为前景的一套导入系群体进行分析, 共选出覆盖水稻基因

组 67.5% 的 159 个染色体片段导入系, 并且他们还使用这套导入系分析了水稻产量相关的 QTL 位点^[6]。在小麦的相关研究中, 利用构建野生种-人工合成六倍体小麦染色体片段导入系, 从而发掘有用的等位基因变异的研究起步则较迟缓。已经有报道表明, 人工合成的小麦中存在改善小麦农艺性状和品质性状的等位基因变异^[7]。**【本研究切入点】** 陈劲枫等^[8]利用胚胎拯救结合体细胞变异获得了国际上首例栽培黄瓜与同属野生种 *C. hystrix* 之间的种间双二倍体, 该种间杂种的创制为利用野生资源改良栽培黄瓜建立了桥梁。通过多代回交转育及自交分离, 已从后代中分离出携带抗霜霉病、枯萎病、蔓枯病等性状的导入系, 并且对这些性状优良的导入系进行了深入研究^[9-10]。在黄瓜-酸黄瓜导入系群体的构建上, 史建磊等进行了初步探究, 构建了一个包含有 17 个染色体片段导入系株系的群体, 导入片段在黄瓜基因组上的覆盖率为 23.5%^[11]。本试验在前人研究的基础上, 进一步扩大导入系植株的入选范围, 构建覆盖率更高的导入系群体。**【拟解决的关键问题】** 利用均匀分布在黄瓜染色体组上的 298 对 SSR 标记对亲本进行多态性检测, 然后在亲本间表现出多态性的标记对自交和回交后代进行单株检测, 以获得含有野生酸黄瓜染色体片段的导入系材料。进一步根据导入系株系中导入片段的分布和覆盖情况, 选择覆盖率高、片段少的导入系构建群体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供体亲本: 野生酸黄瓜 (*C. hystrix* Chakr, 2n = 24), 具有叶片小, 分枝性强, 果实小, 抗病抗逆性强的特点, 来自云南西双版纳^[12]。

受体亲本: 栽培黄瓜 (*C. sativus* L., 2n = 14) ‘北京截头’, 叶片较大, 果型细长优美, 是中国华北密刺型黄瓜中的优秀品种。

待筛选的导入系材料: 供体亲本与受体亲本通过远缘杂交和染色体加倍技术获得异源四倍体之后, 用

受体亲本‘北京截头’作为轮回亲本进行回交,经过多代回交和3—5代自交后,获得染色体片段导入系的待筛选植株材料。

1.2 染色体导入系材料的创制过程

构建染色体片段导入系的方案如图1所示。供体亲本和受体亲本远缘杂交后,获得远缘杂交种,对其进行染色体加倍后获得双二倍体,再用受体亲本‘北京截头’作为轮回亲本进行多代回交。2008年3月,从染色体加倍后获得的双二倍体材料中,选择163个 BC_1 株系种植,这批材料和‘北京截头’回交得到后代 BC_1F_1 群体。对 BC_1F_1 群体的染色体条数进行细胞学观察,选择染色体条数 $2n=14$ 的后代。2009年3月,

从 BC_1F_1 群体中选择78个株系共234株播种,并与‘北京截头’进一步回交,以减少导入的染色体片段数目和长度,获得 BC_2F_1 群体。2009年8月,在 BC_2F_1 群体中每个株系选择5株共390株,种植于江浦农场,进行自交留种并采取叶片进行SSR分子标记检测,选择含有野生酸黄瓜染色体组片段的导入系,共筛选出107份含有野生酸黄瓜染色体片段的导入系。2010年3月,将107份材料的自交后代 BC_2F_2 每株系取5株种植,继续自交和利用SSR分子标记进行选择,选择的标是挑选出SSR检测条带为纯合的株系,保存材料。2010年8月,种植 BC_2F_2 群体中非纯合株系的自交后代,继续进行筛选,直至 BC_2F_5 代。

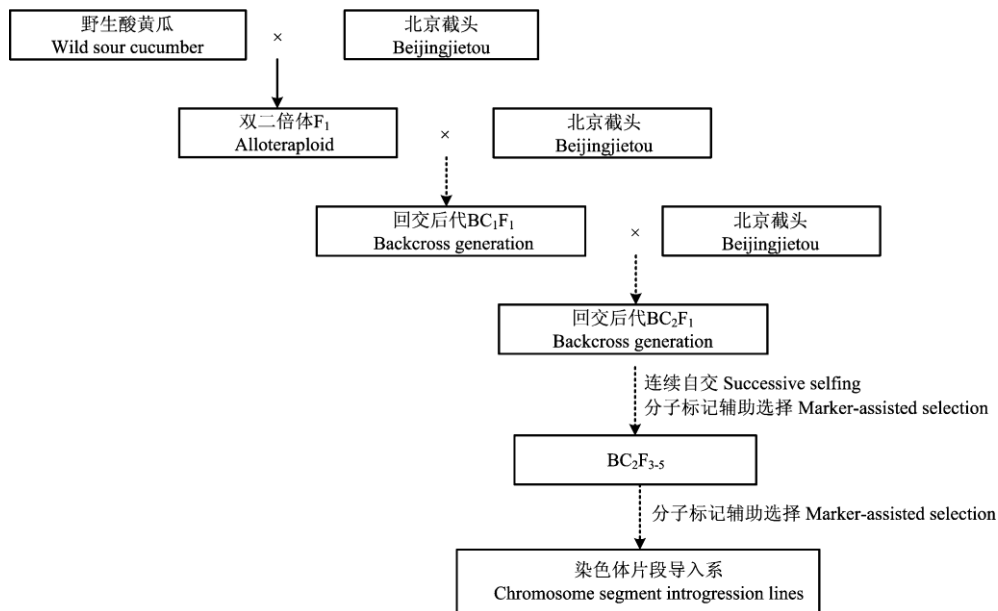


图1 黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系的构建

Fig. 1 The construction of CSILs

1.3 基因组DNA提取

黄瓜植株长成后,取各单株新叶2—3片,液氮速冻保存,然后利用CTAB提取DNA的方法^[13]提取黄瓜的基因组DNA后,加入RNaseA(终浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)在 37°C 温育20min去除RNA,最后利用1.0%琼脂糖凝胶进行DNA电泳,并用溴化乙锭显色法对DNA浓度进行定量。纯化后的DNA于 -20°C 保存备用。

1.4 SSR分析

首先根据Ren等^[14]构建的微卫星标记图谱,选择较均匀分布于黄瓜染色体组上的298对SSR标记。引

物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

PCR扩增体系:总反应体积为 $20\mu\text{L}$,其中包含 $10\times\text{Buffer}$ $2.0\mu\text{L}$, Mg^{2+} $1.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP $150\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 正向引物和反向引物各 $0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板DNA 40ng , Taq DNA聚合酶 1.0U 。扩增的程序为: 94°C 5min; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 80s, 35个循环; 72°C 延伸7min, 4°C 保存。PCR反应采用的仪器为PTC-100™ PCR仪(MJR research Inc., USA)。

1.5 多态性的检测

PCR扩增产物使用7.2%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,利用Charters等^[15]的银染方法对电泳结果进行

检测。

在 PCR 扩增产物中, 带型表现与受体亲本‘北京截头’一致记为“a”, 与供体亲本野生酸黄瓜一致记为“b”, 缺失条带记为“u”, 新带型记为“n”, 杂合带型记为“h”。

1.6 片段导入系的筛选规则

首先利用在亲本间表现出多态性的 SSR 标记对待筛选植株进行检测, 去除不含野生种酸黄瓜染色体片段的株系。然后根据 SSR 标记在黄瓜基因组上的位置, 统计各单株中导入片段的大小和导入片段的数目, 利用 GGT 基因型作图软件绘制全部单株的基因型图示, 分析各导入系株系中导入片段的大小及其在黄瓜基因组中所占比例, 尽量保留含有单片段导入系的株系和含有惟一特定导入片段的株系, 在此基础上去掉含有片段较多且片段重复的株系。

1.7 代换片段长度的计算

按 Young 等^[16]的方法计算导入的染色体片段长度。不考虑两个相邻标记区间发生的双交换事件, 当染色体上相邻标记的基因型相同时, 认为这两个标记之间的染色体区段由相同的标记基因型组成; 当相邻标记的基因型不同时, 认为这两个标记基因型分别组成这个区间的 1/2。

1.8 利用导入系群体鉴定果实形状 QTL

2011 年秋, 将该套导入系群体 50 个株系和亲本‘CC3’、野生酸黄瓜种植于南京农业大学园艺学院试验站, 每个株系均种植 2 行, 每行 8 株, 2 次重复。采用常规的栽培管理方法。

在黄瓜的结果盛期, 从每个试验小区随机采摘 10 条达到商品成熟度的正常瓜, 测量每条瓜瓜蒂至瓜顶的长度, 单位为 cm, 精确到 0.1 cm, 记为瓜长。并测量每个瓜距瓜顶 1/3 处的横径, 单位为 cm, 精确到 0.1 cm, 记为瓜横径。果型指数=瓜长/瓜横径, 简称果指。

进行 QTL 的初步定位时, 每个黄瓜株系的上述 3 个性状均与轮回亲本 CC3 进行 *t* 测验, 以 $\alpha=0.001$ 作为导入系与 CC3 差异显著性的检测标准, 如果 $P<0.001$, 说明此染色体片段导入系上存在控制相关性状的量性状座位。

2 结果

2.1 利用 SSR 标记检测亲本间的差异

选择较均匀分布于 7 条染色体上的 298 对 SSR 标记对受体亲本‘北京截头’和供体亲本野生酸黄瓜分

别进行多态性检测, 获得了 109 对在亲本间具有多态性的标记, 多态率为 36.58%。标记在染色体上的具体位置见图 2。109 对标记之间的平均距离为 5.26 cM, 相对于参考的黄瓜基因组, 标记共覆盖黄瓜染色体组 353.3 cM, 覆盖率为 61.7%。其中标记间最小间距为 0.8 cM, 位于 5 号染色体 SSR21918 和 SSR00556 之间; 最大间距为 17.4 cM, 位于 3 号染色体 SSR00311 和 SSR14725 之间。大部分标记间距在 3—6 cM。第 1、2、3、4、5、6 和 7 号染色体上分布的标记分别有 19、19、17、7、12、22 和 13 个。

2.2 黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系群体的构建

利用 109 对 SSR 标记对 BC₂F₃₋₅ 世代进行分析, 其中有 53 对标记在导入系群体中检测到了野生酸黄瓜的特异条带。选择含有供体染色体片段尽可能少, 同时覆盖率较高的材料, 组建了 50 个黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系。50 份导入系材料分别携带 1—7 个导入片段, 其中有 11 份为单片段导入系材料。这些导入系共携带了 149 个野生酸黄瓜的导入片段, 其中有 61 个不同的导入片段, 总长度为 259.95 cM, 基因组覆盖率为 45.37%。黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系材料的导入片段在基因组上的覆盖情况见图 3。在图 3 中, 编号 1—50 的横向线条分别代表 IL1—IL50 的染色体组。在每个染色体组中, 蓝色 (a) 代表栽培黄瓜的染色体片段, 可以看出导入系的大部分染色体均来自于栽培黄瓜; 整条蓝色线段上的红色部分 (b) 代表来源于野生酸黄瓜的染色体片段, 每个导入系中仅包含少量的野生种导入系片段; 黑色部分 (u) 则表示在对应的 SSR 位点上, 此导入系的条带是缺失的; 而出现的绿色片段 (n) 为导入系在对应的 SSR 位点检测中表现出的与供体亲本和轮回亲本均不一致的特异条带。染色体片段的缺失和新带的出现可能与远缘杂交有关。

2.3 导入片段在黄瓜基因组上的分布及导入片段的长度

在 50 份导入系材料中, 共检测到 149 个导入片段, 平均每个导入系包含 3 个导入片段, 片段平均长度为 5.41 cM, 染色体平均覆盖率为 2.82% (表)。7 条黄瓜染色体上所导入的染色体片段数目不等, 其中 1 号染色体上的导入片段数目最多, 有 34 个; 其次是 2 号染色体, 有 33 个; 7 号染色体上的导入片段数目最少, 有 14 个, 平均每条染色体上 21 个导入片段。导入片段的长度在 1.65—15.4 cM, 其中最短的导入片段位于 2 号染色体上, 长度为 1.65 cM; 最长的导入片

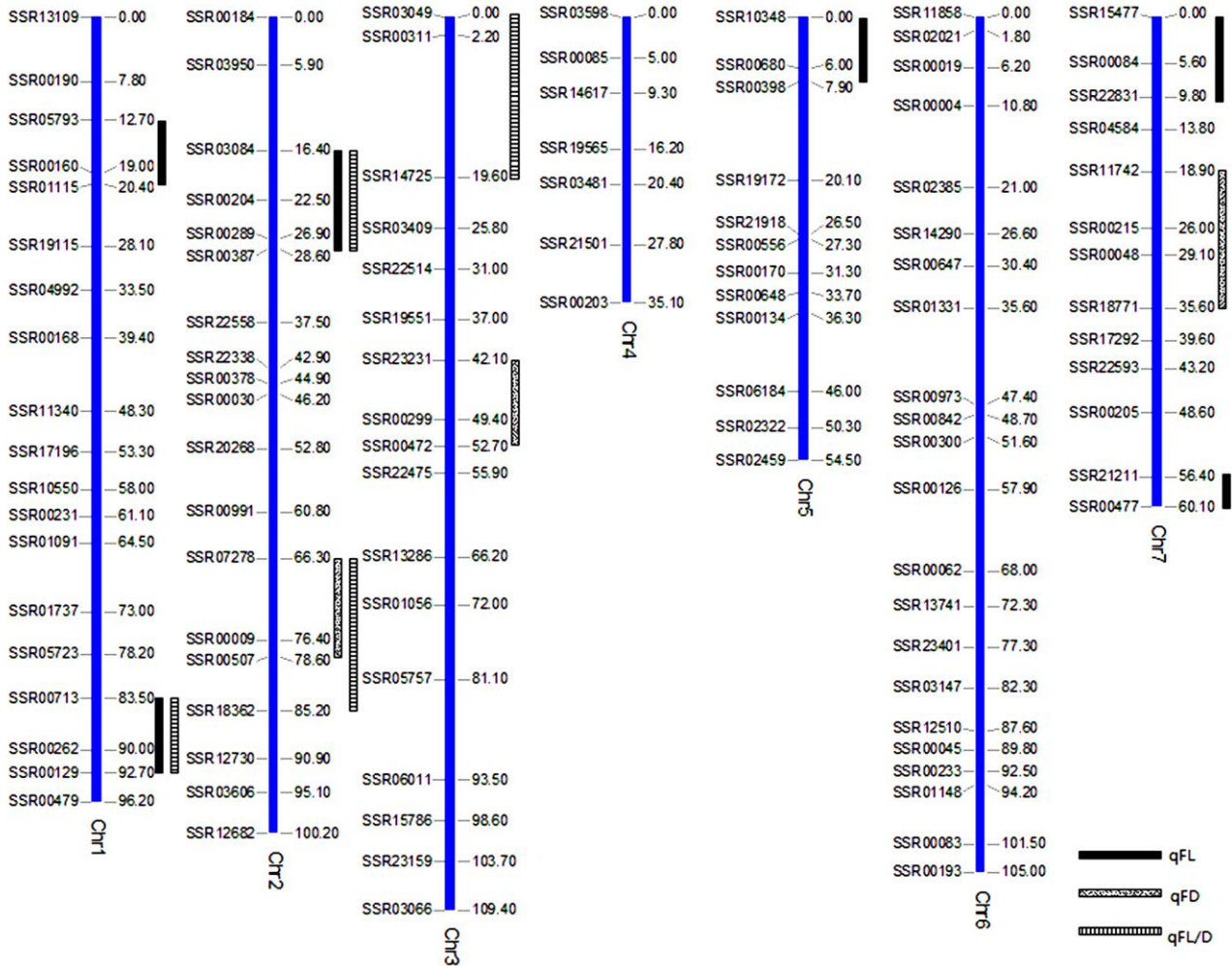


图2 果实外形相关 QTL 在染色体上的分布

Fig. 2 Distribution of 13 QTLs for cucumber fruit traits on chromosomes

段为 15.4 cM，位于 6 号染色体上。导入片段长度的分布见图 4。

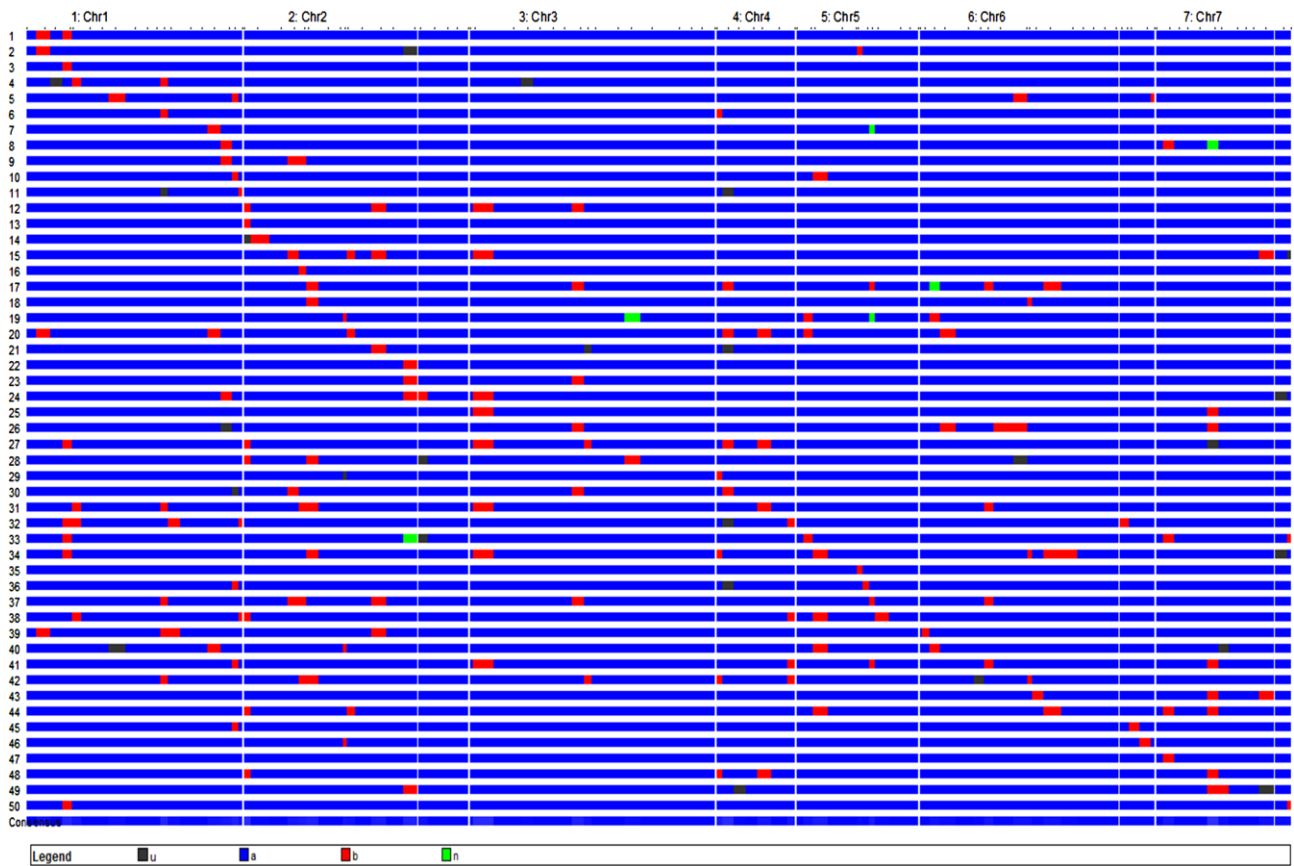
在 50 份导入系材料中，编号为 CSIL3、CSIL7、CSIL11、CSIL13、CSIL14、CSIL16、CSIL21、CSIL22、CSIL29、CSIL35 和 SCIL47 的 11 份导入系为单片段导入系。CSIL3、CSIL7 和 CSIL11 上导入的单片段位于 1 号连锁群上，片段长度分别为 3.75、5.90 和 1.75 cM；CSIL13、CSIL14、CSIL16、CSIL21 和 CSIL22 中的单片段位于 2 号连锁群上，导入片段长度分别为 2.95、8.20、3.05、6.75 和 6.15 cM；剩下的 3 个单片段导入系 CSIL29、CSIL35 和 CSIL47 中的单片段分别位于 4 号、5 号和 7 号连锁群上。由上可知，在 2 号连锁群上发现的单片段导入系最多，在 3 号和 6 号连锁群中没有检测到单片段导入系。

2.4 果实相关性状 QTL 的定位

在检测的 3 个果实相关性状中，在导入系群体中一共鉴定出 13 个 QTL（图 2）。

鉴定出的 6 个瓜长相关的 QTL，分别是位于 1 号染色体中间的标记 SSR05793 和 SSR01115 之间的 qFL-1、标记 SSR00713 和 SSR00129 之间的 qFL-2，位于 2 号染色体上标记 SSR03084 和 SSR00387 之间的 qFL-3，位于 5 号染色体上端的标记 SSR10348 和 SSR00398 之间的 qFL-4，位于 7 号染色体上游的标记 SSR15477 和 SSR22831 之间的 qFL-5、末端标记 SSR21211 和 SSR00477 之间的 qFL-6。导入系中包含这 6 个 QTL 的野生酸黄瓜片段都降低了果实的长度。

鉴定出的 3 个和瓜横径相关的 QT 分别为：位于 2 号染色体上标记 SSR07278 和 SSR00507 之间的



蓝色 (a) 代表栽培黄瓜的染色体片段，红色 (b) 代表来源于野生酸黄瓜的染色体片段，黑色 (u) 代表缺失，绿色 (n) 为导入系中出现的新带
 Blue bar(a) represents the cultivated cucumber genome; Red bar(b) represents wild cucumber genomic segments; Black bar(u) represents the part of missing data; Green bar(n) represents new segments of CSILs

图 3 50 份导入系的导入片段在黄瓜基因组上的具体位置

Fig. 3 Genomic positions of the 50 chromosome segment introgression lines

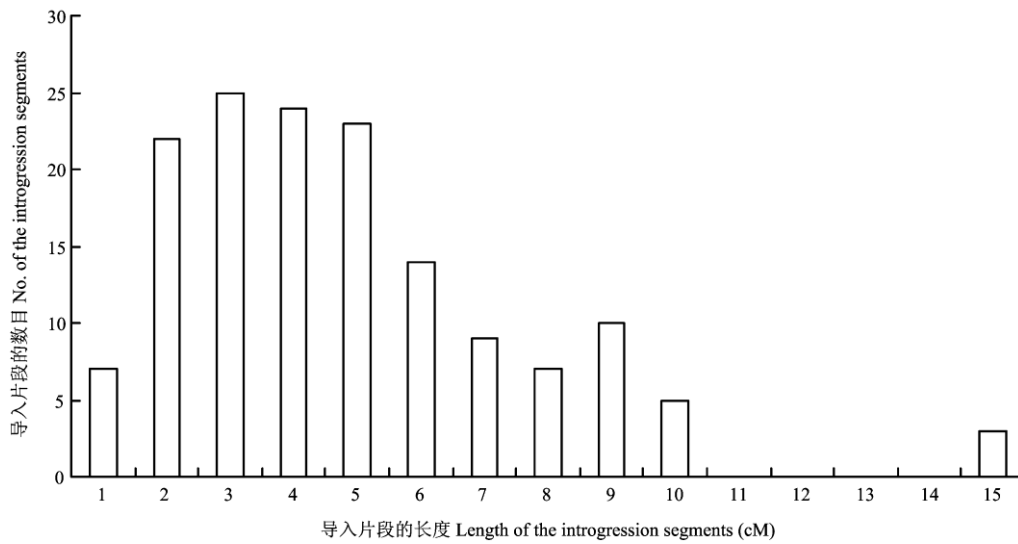


图 4 导入系中导入片段长度的分布

Fig. 4 Distribution of the length of introgression segments in the CSILs

表 染色体导入片段在导入系上的分布

Table Distribution of chromosome introgression segments in CSILs

导入系编号 Code of CSILs	导入片段数目 Number of introgression segments	导入片段总长度(cM) Total Length of introgression segments	导入片段平均长度(cM) Average length of introgression segments	基因组覆盖率 (%) Percentage of coverage
CSIL1	2	10.10	5.05	1.76
CSIL2	2	8.75	4.38	1.53
CSIL3	1	3.75	3.75	0.65
CSIL4	2	7.80	3.90	1.36
CSIL5	4	19.55	4.89	3.41
CSIL6	2	5.75	2.88	1.00
CSIL7	1	5.90	5.90	1.03
CSIL8	2	9.50	4.75	1.66
CSIL9	2	12.9	6.45	2.25
CSIL10	2	10.15	5.08	1.77
CSIL11	1	1.75	1.75	0.30
CSIL12	3	24.80	8.27	4.33
CSIL13	1	2.95	2.95	0.51
CSIL14	1	8.20	8.20	1.43
CSIL15	4	32.35	8.09	5.65
CSIL16	1	3.05	3.05	0.53
CSIL17	6	30.45	5.08	5.32
CSIL18	2	7.40	3.70	1.29
CSIL19	3	10.10	3.37	1.76
CSIL20	5	38.00	7.60	6.63
CSIL21	1	6.75	6.75	1.18
CSIL22	1	6.15	6.15	1.07
CSIL23	2	11.45	5.72	2.00
CSIL24	3	24.95	8.32	4.36
CSIL25	2	14.90	7.45	2.60
CSIL26	4	32.85	8.21	5.73
CSIL27	5	30.20	6.04	5.27
CSIL28	3	15.70	5.23	2.74
CSIL29	1	2.50	2.50	0.44
CSIL30	3	15.20	5.07	2.65
CSIL31	6	36.25	6.04	6.33
CSIL32	5	25.40	5.08	4.43
CSIL33	4	14.45	3.61	2.52
CSIL34	7	45.90	6.56	8.01
CSIL35	1	2.40	2.40	0.42
CSIL36	2	6.30	3.15	1.10
CSIL37	6	30.60	5.10	5.34
CSIL38	6	27.20	4.53	4.75
CSIL39	4	25.40	6.35	4.43
CSIL40	4	19.10	4.78	3.33
CSIL41	6	29.75	4.96	5.19
CSIL42	6	24.20	4.03	4.22
CSIL43	2	16.30	8.15	2.84
CSIL44	5	32.15	6.43	5.61
CSIL45	2	7.60	3.80	1.33
CSIL46	2	7.05	3.52	1.23
CSIL47	1	4.90	4.90	0.86
CSIL48	4	16.35	4.09	2.85
CSIL49	2	16.05	8.02	2.80
CSIL50	2	5.60	2.80	0.98
平均 Mean	3	16.14	5.41	2.82
总计 Total	149	806.80		

qFD-1, 位于 3 号染色体上标记 SSR23231 和 SSR00472 之间的 qFD-2 和位于 7 号染色体上标记 SSR11742 和 SSR18771 之间的 qFD-3。包含这 3 个 QTL 的野生酸黄瓜导入片段都增加了瓜横径。

鉴定出了 4 个瓜指相关的 QTL, 分别位于 1 号染色体上标记 SSR00713 和 SR00129 之间的 qFL/D-1, 位于 2 号连锁群上标记 SSR03084 和 SSR00387 之间的 qFL/D-2、标记 SSR07278 和 SSR18362 之间的 qFL/D-3, 和 3 号染色体上游标记 SSR03049 和 SSR14725 之间的 qFL/D-4。包含有这 4 个 QTL 的野生酸黄瓜导入片段的作用都是降低了果型指数。

在检测到的 13 个 QTL 中, 位于 1 号染色体上标记 SSR00713 和 SSR00129 之间的 QTL 和位于 2 号染色体上标记 SSR03084 和 SSR00387 之间的 QTL, 同时控制了瓜长和果型指数两个性状。而位于 2 号染色体上的 qFD-1 和 qFL/D-3 也有部分重叠。

3 讨论

3.1 染色体片段导入系的重要意义

本文所构建的染色体片段导入系群体在黄瓜的育种工作上具有重要的应用前景。因为染色体导入系是在相同的遗传背景下对数量性状位点进行研究, 所以排除了植株遗传背景的干扰, 提高了 QTL 定位的准确度和灵敏度, 也可以检测出更多的 QTL 位点, 尤其是微效 QTL, 这些理论在水稻的相关研究中已有很好的证明^[17-19]。同时利用含有杂合的外源导入片段的染色体片段导入系植株自交, 构建后代分离群体, 因为后代只在导入片段上存在基因分离, 从而排除了遗传背景的干扰, 将 QTL 简单化为一个孟德尔因子, 对 QTL 进行精细定位^[20]。除此之外, 还可以利用染色体片段导入系对 QTL 效应进行更进一步的分析, 如加性效应、显性效应、上位性效应以及生理生化的特性等^[21]。因为染色体片段导入系只含有少量并且短小的代换片段, 利用染色体片段导入系克隆 QTL 位点, 将会大大减少工作量^[22]。

染色体片段导入系只是染色体组上的单个或者少数几个染色体区段, 与受体亲本有所不同, 利用含有特定片段的导入系来研究特定片段的遗传效应将会变得更加轻松和有针对性。如果鉴定出了某一特定的染色体片段含有杂种优势的相关基因, 就可以利用特定的片段进行新品种的改良工作。作者所在的课题组已经从黄瓜-酸黄瓜导入系群体的材料中选育出若干份高抗霜霉病^[23]、枯萎病^[24]和耐低温^[25]的新型黄瓜材

料, 并且已经应用于黄瓜新品种的选育中^[26]。

3.2 染色体片段导入系群体的评价

在染色体片段导入系的相关研究中, Eshed 早期构建的 120 个番茄导入系中, 经过两次选择后, 导入片段的平均长度为 38 cM; 刘冠明等^[27]构建的 29 个以台中 65 为受体, 低脚乌尖或窄叶青为供体的水稻亚种间单片段代换系株系, 代换片段的平均长度为 22.19 cM, 覆盖率为 23.47%。与之相比, 本研究通过高代回交的方法, 共获得 149 个导入片段, 这些导入片段的长度介于 1.65—15.4 cM, 平均长度为 5.41 cM。理论上基因之间的距离能够跨越 1—50 cM, 这一数值越小, 两个基因在染色体上的位置就越近。1 cM 表示基因间的距离紧密连锁, 它们在一条染色体上的位置相对地紧密连结在一起; 相反, 50 cM 意味着两个基因是不连锁的, 很有可能是位于不同的染色体上。所以染色体片段导入系的导入片段越短, 越有利于 QTL 的精细定位, 在此期间找到的多态性标记才有可能与目标基因紧密连锁。

本研究构建的 50 个黄瓜-酸黄瓜导入系群体的导入片段在黄瓜全基因组的覆盖率仅为 45.37%。造成覆盖率低的原因可能是野生酸黄瓜和栽培黄瓜之间亲缘关系较远, 在远缘杂交时由于各种原因导致了杂交不亲和, 双受精过程障碍, 幼胚在发育的过程中死亡, 杂种不萌发, 幼苗夭亡^[28]。目前, 笔者正致力于继续利用远缘杂交的方法和染色体加倍技术创造更多的黄瓜-酸黄瓜染色体片段导入系待筛选植株, 进一步完善该群体。

3.3 果实相关 QTL 的初步定位

利用导入系群体来进行 QTL 定位, 既可以排除遗传背景的干扰, 还能检测到微效 QTL, 使定位更加精确, 同时还可以把目标性状的 QTL 和导入片段联系起来, 快速构建含有目标性状的近等基因系, 便于今后研究工作的深入开展。

本研究初步定位了控制黄瓜果型的 13 个 QTL, 此结果与 Kennard 和 Havey^[29]的结果比较接近, 他们发现了 5 个瓜长 QTL、3 个瓜横径 QTL 和 4 个瓜指 QTL。Lower 和 Edwards^[30]及 Owens 等^[31]曾经根据经验估计过控制黄果实性状的基因个数: 瓜长是 4 个基因控制, 瓜指为 4—5 个基因控制。这种估计和本试验的结果一致, 从而为进一步的精细定位提供了参考依据。但是由于供体亲本野生酸黄瓜和受体亲本 CC3 的亲缘关系较远, 导入系可能发生不育, 因此笔者得到的导入系群体中导入片段的覆盖率不高, 可能遗漏

了某些目的片段。此外,本研究只是在同一环境下鉴定了果实相关的 QTL,没有考虑该 QTL 是否受生长环境的影响。因此本研究的下一步工作是将该导入系在不同的生长环境中(如露地和大棚),再次鉴定相应的 QTL,以增加定位结果的可信度。

4 结 论

采用分子标记辅助选择技术构建了一套供体亲本为野生酸黄瓜,受体亲本为栽培黄瓜‘北京截头’的染色体片段导入系群体,该群体由 50 个株系组成,共含有 149 个染色体导入片段,包含 61 个不同的导入片段,不同导入片段的总长度为 259.95 cM,基因组覆盖率为 45.37%。导入片段的长度在 1.65—15.4 cM,平均长度为 5.41 cM,分布于黄瓜的 7 条染色体上。利用该导入系群体定位了 13 个果实相关的 QTL。这套黄瓜-酸黄瓜染色体导入系群体为开发利用野生酸黄瓜的优异基因提供了良好的种质资源,也为今后更加精确地定位黄瓜的数量性状遗传位点奠定了坚实的材料基础。

References

- [1] Howell P M, Marshall D F, Lydiat D G. Towards developing intervarietal substitution lines in *Brassica napus* using marker-assisted selection. *Genome*, 1996, 39(2): 348-358.
- [2] Eshed Y, Zamir D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 1995, 141: 1147-1162.
- [3] Eshed Y, Abu-Abied M, Saranga Y, Zamir D. *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83: 1027-1034.
- [4] Chetelat R T, Meglic V. Molecular mapping of chromosome segments introgressed from *Solanum lycopersicoides* into cultivated tomato(*Lycopersicon esculentum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 232-241.
- [5] Aida Y, Tsunematsu H, Doi K, Yoshimura A. Development of a series of introgression lines of japonica in the background of indica rice. *Rice Genetics Newsletter*1997, 14: 41-43.
- [6] Tian F, Li D J, Fu Q, Zhu Z F, Fu Y C, Wang X K, Sun C Q. Construction of introgression lines carrying wild rice(*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice(*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 570-580.
- [7] Huang X Q, Coster H, Ganai M W, Roder M S. Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 1379-1389.
- [8] Chen J F, Kirkbride J H. A new synthetic species of *Cucumis* (Cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling. *Brittonia*, 2000, 52(4): 315-319.
- [9] 陈劲枫, 林茂松, 钱春桃 庄飞云, Lewis S. 甜瓜属野生种及其与黄瓜种间杂交后代抗根结线虫初步研究. *南京农业大学学报*, 2001, 24 (1): 21-24.
Chen J F, Lin M S, Qian C T, Zhuang F Y, Lewis S, Identification of *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood resistance in *Cucumis hystrix* Chakr. and the progenies of its interspecific hybrid with cucumber (*C. sativus* L.). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(1): 21-24.(in Chinese)
- [10] Zhou X H, Wan H J, Qian C T, Chen J F. Development and characterization of *Cucumis sativus-hystrix* introgression lines exhibiting resistance to downy mildew. *Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, 2008, posters: 353-358.
- [11] 史建磊, 姜群峰, 钱春桃, 万红建, 周晓慧, 陈劲枫. 黄瓜染色体片段导入系的构建与遗传评价. *南京农业大学学报*, 2011, 34(1): 20-24.
Shi J L, Lou Q F, Qian C T, Wan H J, Zhou X H, Chen J F. Construction and genetic evaluation of chromosome segment introgression lines in cucumber. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(1): 20-24. (in Chinese)
- [12] Chen J F, Staub J E, Tashiro Y, Isshiki S, Miyazaki S. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica*, 1997, 96: 413-419.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [14] Ren Y, Zhang Z H, Liu J H, Staub J E, Han Y H, Cheng Z C, Li X F, Lu J Y, Miao H, Kang H X, Xie B Y, Gu X F, Huang S W. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. *PLoS ONE*, 2009, 4(6): e5795.
- [15] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, Ramsay G. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat(SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 442-447.
- [16] Young N D, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77: 95-101.
- [17] Yano M, Kojima S, Takahashi Y, Lin H, Sasaki T. Genetic control of

- flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1425-1429.
- [18] Lin S Y, Sasaki T, Yano M. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96(8): 997-1003.
- [19] Yamamoto T, Lin H X, Sasaki T, Yano M. Identification of heading date quantitative trait locus Hd6 and characterization of its epistatic interactions with Hd2 in rice using advanced backcross progeny. *Genetics*, 2000, 154:885-891.
- [20] Yamamoto T, Kuboki Y, Lin S Y, Sasaki T, Yano M. Fine mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2 and Hd-3, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(1/2): 37-44.
- [21] Eshed Y, Zamir D. Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics*, 1996, 143: 1807-1817.
- [22] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2473-2483.
- [23] 曹清河, 陈劲枫, 钱春桃. 黄瓜抗霜霉病异源易位系 CT-01 的筛选与鉴定. *园艺学报*, 2005, 32(6): 1098-1101.
- Cao Q H, Chen J F, Qian C T. Identification and characterization of a cucumber alien translocation line CT-01 possessing resistance to downy mildew. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(6): 1098-1101. (in Chinese)
- [24] 钱春桃, 陈劲枫, 罗向东. 黄瓜抗枯萎病异源易位植株 AT-04 的鉴定筛选. *南京农业大学学报*, 2006, 29(2): 20-24.
- Qian C T, Chen J F, Luo X D. identification and characterization of cucumber alien translocation plant AT-04 with resistance to fusarium wilt. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2006, 29(2): 20-24. (in Chinese)
- [25] 庄飞云, 陈劲枫, 钱春桃, 李式军, 任刚, 王志军. 甜瓜属种间杂交新种及其后代对低温的适应性反应. *南京农业大学学报*, 2002, 25 (2): 27-30.
- Zhuang F Y, Chen J F, Qian C T, Li S J, Ren G, Wang Z J. Responses of seedlings of *Cucumis* × *hytivus* and progenies to low temperature. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(2): 27-30. (in Chinese)
- [26] 陈龙正, 陈劲枫, Jack Staub, 钱春桃. 通过种间杂交选育加工黄瓜新品种宁佳 1 号. *中国蔬菜*, 2005(3): 4-6.
- Chen L Z, Chen J F, Staub J, Qian C T. A new variety processed cucumber NingJia 7 breeding through interspecific hybridization. *China Vegetables*, 2005(3): 4-6. (in Chinese)
- [27] 刘冠明, 李文涛, 曾瑞珍, 张桂权. 水稻亚种间单片段代换系的建立. *中国水稻科学*, 2003, 17(3): 201-204.
- Liu G M, Li W T, Zeng R Z, Zhang G Q. Development of single segment substitution lines (SSSLs) of subspecies in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2003, 17(3): 201-204. (in Chinese)
- [28] 景士西. 园艺植物育种学总论. 北京: 中国农业出版社, 2001: 209-219.
- Jing S X. *Remarks of Horticultural Plant Breeding*. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 209-219. (in Chinese)
- [29] Kennard W C, Havey M J. Quantitative trait analysis of fruit quality in cucumber, QTL detection, confirmation, and comparison with mating-design variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 53-61.
- [30] Owens K W, Bliss F A, Peterson C E. Genetic analysis of fruit length and weight in two cucumber populations using the inbred backcross line method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1985, 110: 431-436.
- [31] Lower R L, Edwards M D. Cucumber breeding// Bassett M J (ed). *Breeding Vegetable Crops*. AVI. Westport, Connecticut, USA, 1986: 173-207.

(责任编辑 曲来娥)