

史建磊, 娄群峰, 钱春桃, 等. 黄瓜染色体片段导入系的构建与遗传评价 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 20-24

黄瓜染色体片段导入系的构建与遗传评价

史建磊, 娄群峰, 钱春桃, 万红建, 周晓慧, 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, 江苏 南京 210095)

摘要: 以综合性状优良的栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) 北京截头为受体亲本, 以携带有多种抗性性状的黄瓜珍稀野生种酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr., $2n=24$) 为供体亲本, 在本实验室前期获得种间杂交异源四倍体的基础上, 通过多代回交和自交, 结合 SSR 标记辅助选择构建了以北京截头为遗传背景的黄瓜野生种染色体片段导入系, 并对其导入片段的数目、分布、大小和覆盖率等进行了评价。结果表明: 该导入系群体携带的 38 个供体片段不均匀地分布于黄瓜 7 条染色体上, 其长度介于 1.1~14.9 cM, 平均长度为 5.3 cM, 总长度为 201.9 cM, 在黄瓜基因组上的覆盖率为 23.5%。

关键词: 黄瓜; SSR 标记; 染色体片段导入系; 评价

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2011)01-0020-05

Construction and genetic evaluation of chromosome segment introgression lines in cucumber

SHI Jian-lei, LOU Qun-feng, QIAN Chun-tao, WAN Hong-jian, ZHOU Xiao-hui, CHEN Jin-feng*

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

Abstract The cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) Beijingjietou with comprehensive good traits and precious rare wild sour cucumber (*Cucumis hystrix* Chakr., $2n=24$) carrying a variety of resistance traits were used as receptor parent and donor parent respectively in the present study. Chromosome segment introgression lines (CSILs) were developed on the basis of interspecific allotetraploid by multiple generational backcrossing and selfing combined with SSR marker-assisted selection (MAS), with the genetic background of Beijingjietou. By evaluating of the number, distribution, segment size and coverage rate, it showed that the 38 donor segments of CSILs existed unevenly in the seven chromosomes. Their lengths were between 1.1-14.9 cM, the average length was 5.3 cM, the total length was 201.9 cM and the coverage rate in the cucumber genome was 23.5%.

Key words cucumber; SSR markers; chromosome segment introgression lines (CSILs); evaluation

作物的抗性、产量和品质等重要育种目标性状多数为多基因控制的数量性状, 遗传方式复杂, 数量性状位点 (quantitative trait loci QTL) 鉴定难度较大, 因此, 准确鉴定和定位 QTL 一直是农业领域的研究热点。利用传统定位群体进行 QTL 定位时, 由于大量基因位点同时分离, 会造成遗传背景效应或“遗传噪声”, 难以检测出低效应值的位点, 限制了对 QTL 的精确定位^[1]。染色体片段导入系 (chromosome segment introgression lines CSILs), 又称代换系或渐渗系, 是指通过连续多代回交、自交并结合分子标记辅助选择 (marker-assisted selection MAS), 在受体亲本基因组中导入供体片段的永久性群体, 其与受体亲本间只有导入片段的差异。与传统定位群体相比, 它具有遗传背景清楚、群体遗传稳定、QTL 定位及遗传效应分析准确等优点。目前, 染色体片段导入系在水稻、番茄、玉米、小麦等多种作物上得到了广泛研究和应用^[2-5]。

黄瓜是我国及世界上重要的蔬菜作物。由于其遗传基础狭窄, 栽培种间多态性低^[6], QTL 定位研究相对落后。目前, 仅有少数 QTL 定位^[7-9], 且主要基于初级定位群体, 定位精度较低, 而染色体片段导入系的相关研究还未见报道。鉴于此, 本研究利用黄瓜唯一种间远缘杂交新种^[10]经多代回交和自交, 结合 SSR 标记辅助选择构建以栽培黄瓜为遗传背景的野生种染色体片段导入系, 对黄瓜重要农艺性状的 QTL 定位, 转移利用野生优异基因进行品种改良、拓宽栽培黄瓜遗传基础, 以及促进其分子育种进程具有重要意义。

收稿日期: 2009-11-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671419, 30700541); 国家自然科学基金重点项目 (30830079); 国家高技术研究发展计划专项经费 (2008AA10Z150, 2006AA10Z1A8, 2006AA100108); 作物遗传与种质创新国家重点实验室开放基金项目 (ZW 2007010)

作者简介: 史建磊, 硕士研究生。* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

供体亲本酸黄瓜 (*Cucumis hystrix* Chakr, $2n = 24$) 是甜瓜属珍稀野生种, 携带有多种优良性状, 采集于云南西双版纳^[11]。受体亲本为栽培黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n = 14$) 北京截头, 其综合性状优良, 是华北型黄瓜新品种选育中的骨干亲本, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所臧章春研究员提供, 经本实验室多代自交保存。供、受体亲本经远缘杂交及染色体加倍获得异源四倍体^[10]后, 再以受体黄瓜为轮回亲本进行 2 代回交和 3~5 代自交, 获得黄瓜染色体片段导入系 (表 1 图 1)。

表 1 试验材料

Table 1 Gemplasm s used in the study

代号 Code	品种 (系) Cultivars or lines	类型 Type	染色体数目 Chromosome number
S1	酸黄瓜 <i>Cucumis hystrix</i>	近缘野生种 Wild species	$2n = 2x = 24$
CC3	北京截头 <i>C. sativus</i> 'Beijingjiebu'	华北型 Northern China	$2n = 2x = 14$
1~17	不同导入系 Different introgression lines	遗传改良型 Genetically-enhanced cucumber	$2n = 2x = 14$

1.2 基因组 DNA 提取

植株新叶刚展开时单株取样, 采用 CTAB 法^[12]提取黄瓜总基因组 DNA。加入 RNase A (终浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 温育 20 min) 去除 RNA, 利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭显色进行 DNA 浓度的定量。 -20°C 保存备用。

1.3 SSR 分析

SSR 标记引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。PCR 扩增程序按照 Katzir 等^[13]的方法进行优化。总反应体积 $20 \mu\text{L}$, 其中 $10 \times \text{Buffer } 2.0 \mu\text{L}$, $\text{Mg}^{2+} 1.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{dNTP } 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 正反向引物各 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 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。整个 PCR 反应在 PTC-100TM PCR 仪 (MJ Research Inc., USA) 上完成。PCR 产物在 7.2% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 采用 Charters 等^[14]的银染方法检测。

1.4 导入片段的筛选鉴定

根据 Ren 等^[15]构建的黄瓜分子遗传图谱, 平均每 5.0cM 选取 1 个 SSR 标记, 共 121 个。在筛选获得供体、受体亲本间引物多态性的基础上, 对黄瓜种间杂种多代回交、自交群体进行标记辅助选择, 鉴定染色体片段导入系。进一步利用相应的分子标记遗传图谱对黄瓜染色体片段导入系进行评价, 研究导入片段的长度、在染色体或每个连锁群上的分布特征及在基因组中的覆盖率。

利用 Young 等^[16]的方法计算导入片段的长度, 不考虑两个相邻标记间发生的双交换事件。当相邻标记的基因型相同时, 认为它们之间的区段由相同的标记基因型组成; 当相邻标记基因型不同时, 认为这两个标记基因型分别组成这个区间的一半^[17]。基于分子标记的遗传背景回复率计算方法采用公式 $G(g) = [L + X(g)] / (2L)$, 理论分析的遗传背景回复率计算方法采用公式 $E[G(g)] = 1 - (1/2)^{g+1}$ 。其中: g 指回交代数; $X(g)$ 指在回交 g 代表为受体亲本带型的分子标记数量; L 指所参与分析的分子标记数^[18-19]。

2 结果与分析

2.1 黄瓜染色体片段导入系的构建

利用 121 个 SSR 标记在供体亲本野生酸黄瓜和受体亲本栽培黄瓜北京截头间进行筛选, 获得 84 对亲

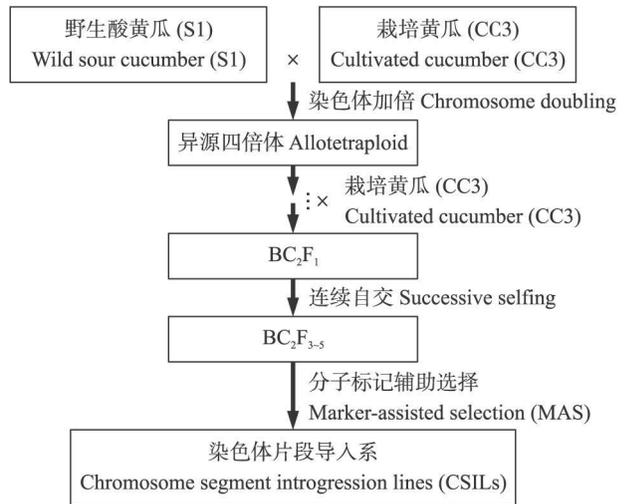


图 1 黄瓜染色体片段导入系的构建

Fig 1 The construction of CSILs in cucumber

本间多态性引物,多态率为 69.4%。用这些标记进一步分析片段导入系群体,其中有 32 对引物(26.4%) 在 17 个导入系中获得供体酸黄瓜特异条带。借助图谱分析,共得到 129 个导入片段,平均每个导入系 7~8 个片段。不同导入系的片段数目存在较大差异,最多的 3 号导入系有 18 个,而 5 号、10 号、17 号较少,为 1~2 个;片段均长相差不大,约 5.0 dM;染色体覆盖率为 0.8%~19.1%,平均为 6.6% (表 2)。另外,多达 91 个(70.5%) 导入片段是存在于不同导入系间的相同片段,剩余的 38 个不同片段用作导入系群体的评价分析。

表 2 不同导入系供体片段的导入情况

Table 2 The introgression of donor segments in different introgression lines

导入系 Introgression lines	片段数目 No. of segments	片段均长 / dM Average length of segments	片段总长 / dM Total length of segments	覆盖率 % Coverage rate	导入系 Introgression lines	片段数目 No. of segments	片段均长 / dM Average length of segments	片段总长 / dM Total length of segments	覆盖率 % Coverage rate
1	12	5.4	65.0	11.3	10	1	4.7	4.7	0.8
2	5	4.3	21.4	3.7	11	14	4.5	62.3	10.9
3	18	6.1	109.7	19.1	12	4	4.4	17.5	3.1
4	16	6.0	95.2	16.6	13	4	3.9	15.5	2.7
5	2	3.9	7.9	1.4	14	10	4.1	40.6	7.1
6	5	4.0	19.9	3.5	15	6	4.4	26.4	4.6
7	3	4.2	12.5	2.2	16	6	4.1	24.5	4.3
8	13	5.9	76.7	13.4	17	2	3.9	7.9	1.4
9	8	4.7	37.9	6.6	平均 Average	7.6	5.0	38.0	6.6

2.2 导入系的遗传背景回复率

在片段导入系构建过程中随着回交世代的增加,背景回复率不断提高。利用基于分子标记的遗传背景回复率公式计算得到 BC₂F₃ 群体 17 个导入系的背景回复率为 50.0%~76.4%,平均为 61.9%,低于理论遗传背景回复率的 87.5%。

2.3 导入片段的遗传评价

黄瓜基因组导入的 38 个供体片段总长度为 201.9 dM,平均长度为 5.3 dM。其中,5 号染色体导入片段的总长最小,为 10.4 dM;1 号染色体导入片段的总长最大,为 81.6 dM (表 3)。大多数导入片段的长度为 3.0~6.0 dM,片段 m22862 长度最小,为 1.1 dM,在 4 号染色体上;片段 m190-m160 长度最大,为 14.9 dM,在 1 号染色体上 (图 2)。

这 38 个供体片段在黄瓜基因组 7 条染色体上呈不均匀分布 (图 2),各染色体平均导入 5~6 个片段。其中,1 号染色体导入 13 个,数目最多;其次是 6 号染色体,为 8 个;5 号染色体导入片段数目最少,为 2 个,其他各染色体导入的片段数目为 3~5 个 (表 3)。

导入片段在黄瓜基因组 7 条染色体上覆盖了 134.4 dM 的距离,覆盖率为 23.5%。各染色体覆盖率不同,但均未超过 50%,其中 1 号染色体覆盖率最高,为 41.4%;其次是 4 号染色体,覆盖率为 33.5%;2 号和 3 号染色体覆盖率最低,分别为 13.4% 和 13.8% (表 3)。全部导入片段在黄瓜基因组中的覆盖长度 (134.4 dM) 小于其总长度 (201.9 dM),其原因是有些片段相互重叠。重叠区全长 54.3 dM,占导入片段总长度的 26.9%,其中 2、3 和 5 号染色体无重叠区;1 号染色体的重叠区最长,为 32.3 dM,占重叠区全长的 59.5% (图 2)。

表 3 黄瓜染色体片段导入系的遗传评价

Table 3 Genetic evaluation on CSILs in cucumber

染色体 Chromosomes	片段均长 / dM Average length of segments	片段总长 / dM Total length of segments	片段数目 No. of segments	覆盖率 % Coverage rate	染色体 Chromosomes	片段均长 / dM Average length of segments	片段总长 / dM Total length of segments	片段数目 No. of segments	覆盖率 % Coverage rate
1	6.3	81.6	13	41.4	5	5.2	10.4	2	17.4
2	4.4	13.4	3	13.4	6	5.0	40.3	8	26.3
3	5.2	15.5	3	13.8	7	6.2	24.7	4	24.6
4	3.2	16.1	5	33.5	合计 Total 平均 Mean	5.3	201.9	38	23.5

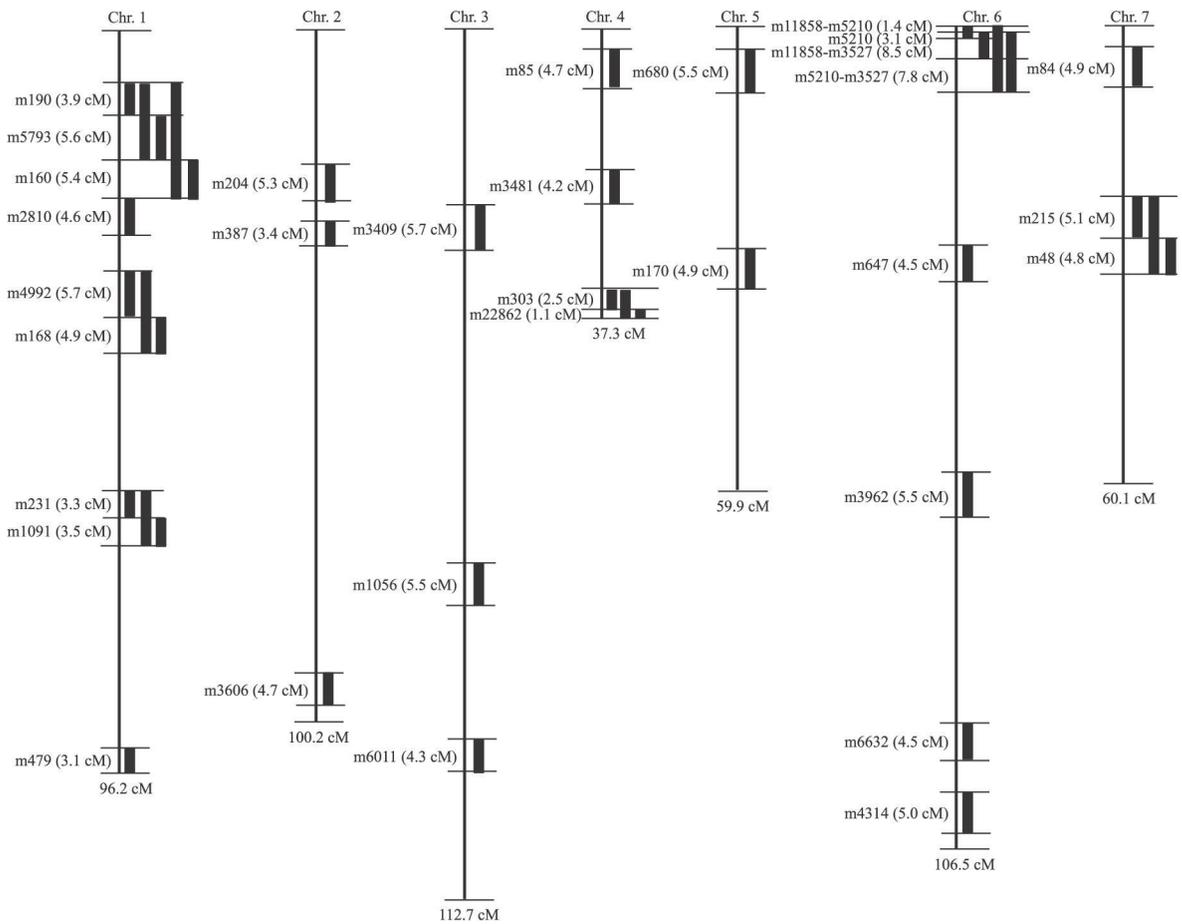


图 2 导入片段在黄瓜基因组中的分布

Fig 2 The distribution of introgressed segments in cucumber genome

竖线代表染色体, 粗线区段代表供体片段; 竖线左侧数据代表片段长度, 下方数据代表染色体长度。

Vertical lines indicate chromosomes, solid black regions indicate donor segments; the dates on the left and down indicate segment length and chromosome length respectively.

3 讨论

染色体片段导入系尤其是单片段导入系较传统 F_2 、 BC_1 、 $RILs$ 等定位群体有诸多优势, 如 QTL 定位准确, 可研究杂交优势、QTL 互作效应、环境效应及利用图位克隆获得基因等。同时, 其育性较远缘杂交其他群体 (如 F_2 、 BC_1 群体等) 有较大提高, 可直接应用于育种, 甚至是基因聚合育种。本研究供体亲本抗耐各种病虫害和逆境伤害, 受体亲本综合性状优良, 但抗耐性差, 两者形成优势互补, 用其构建的黄瓜首个种间染色体片段导入系群体由 17 个导入系组成, 覆盖黄瓜全基因组的 23.5%, 各导入系的基因组覆盖率为 0.8% ~ 19.1%。

在分子标记辅助选择下, 回交可以明显减少供体片段数量, 减小片段长度^[20]。本研究所得黄瓜导入系多数含有多个片段 (平均 7.6 个), 回交世代较少是一个重要原因。另外, 导入片段长度均较小 (约 5.0 cM), 可能与亲本间遗传差异及用以确定片段大小的参考图谱有关^[1], 本研究双亲染色体基数不同、亲缘关系较远且参考图谱仅 572.9 cM; 同时, 较小的片段长度也证明本研究多代自交同回交一样, 能明显降低导入片段的长度^[21]。覆盖同一染色体区域或有一定片段重叠的不同导入系可大大提高 QTL 鉴定的可靠性; 但若同一导入系含多个片段, 由于互作效应反而不利于 QTL 的精确定位。如果导入的片段过长, QTL 定位范围较大, 定位就不够准确, 因此适度的小片段是必要的。

本研究构建的片段导入系含 54.3 cM 的片段重叠区, 有助于 QTL 定位^[22]。借助分子标记计算得到的遗传背景回复率明显低于理论值, 这可能和回交世代较少引起的重组交换不充分有关, 也可能是栽培黄瓜与野生酸黄瓜远缘杂交重组整合过程中发生的序列消除所致^[23]。38 个导入片段覆盖黄瓜基因组仅为 23.5%, 还有许多未被覆盖的空白区段。一方面可能是远缘杂交过程中, 染色体异质性导致供体片段丢

失;另一方面与参考图谱 SSR 标记在黄瓜基因组常染色质非重复区的集中分布和某些区域多态性标记的漏检有关;同时检测群体较小也是重要原因之一。

本研究首次构建了以栽培黄瓜为遗传背景的野生种染色体片段导入系,并对其进行了遗传评价,为研究黄瓜重要农艺性状的 QTL 奠定了基础。尽管该导入系还不是覆盖黄瓜全基因组的单片段导入系,但本实验室正在对其继续回交,并且扩大植株选择范围,以获得外源片段数尽可能少的导入系,同时衔接式导入系已着手构建,即借助分子标记跟踪目标片段,在回交中进行前景和背景筛选,直到选出目标导入系。这些工作的进行有望对黄瓜 QTL 精细定位、克隆和功能分析及新品种选育发挥积极作用。

参考文献:

- [1] 王立秋,赵永锋,薛亚东,等. 玉米衔接式单片段导入系群体的构建和评价 [J]. 作物学报, 2007, 33(4): 663- 668
- [2] Ghesquière A, Séquier J, Second G, et al First steps towards a rational use of African rice *Oryza glaberrima*, in rice breeding through a 'contig line' concept [J]. Euphytica 1997, 96 31- 39
- [3] Bemacchi D, Beck-Bunn T, Emmatty D, et al Advanced backcross QTL analysis of tomato II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. peruvianum* [J]. Theor Appl Genet 1998, 97: 170- 180
- [4] 张丽霞,刘丕庆,刘学义. 染色体单片段代换系的构建及应用于 QTL 精细定位 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 743- 746
- [5] 吴新儒,刘树兵,刘爱峰,等. 小麦重要农艺性状 QTL 近等基因导入系的选育 [J]. 麦类作物学报, 2007, 27(4): 583- 588
- [6] Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A, et al Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber [J]. Theor Appl Genet 1994, 89 42- 48
- [7] Fazio G, Staub J E, Stevens M R. Genetic mapping and QTL analysis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines [J]. Theor Appl Genet 2003, 107: 864- 874
- [8] 王刚,潘俊松,李效尊,等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因定位 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2004, 34(6): 510- 516
- [9] 潘俊松,王刚,李效尊,等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位 [J]. 自然科学进展, 2005, 15(2): 167- 172
- [10] Chen J F, Kirkbride J. A new synthetic species of *Cucumis* (Cucurbitaceae) from inter-specific hybridization and chromosome doubling [J]. Brittonia 2000, 52(4): 315- 319
- [11] Chen J F, Staub J E, Tashiro Y, et al Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystris* Chakr [J]. Euphytica 1997, 96 413- 419
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucl Acids Res 1980, 8(19): 4321- 4325
- [13] Katzir N, Danin-Poleg Y, Tzur G, et al Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species [J]. Theor Appl Genet 1996, 93 1282- 1290
- [14] Chartès Y M, Robertson A, Wilkinson M J et al PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers [J]. Theor Appl Genet 1996, 92 442- 447
- [15] Ren Y, Zhang Z H, Liu J H, et al An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome [J]. PLoS One 2009, 4(6): e5795
- [16] Young N D, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes [J]. Theor Appl Genet 1989, 77: 95- 101
- [17] 何风华,席章营,曾瑞珍,等. 利用高代回交和分子标记辅助选择建立水稻单片段代换系 [J]. 遗传学报, 2005, 32(8): 825- 831
- [18] Hospital F, Chevalet C, Mulsant P. Using markers in gene introgression breeding programs [J]. Genetics 1992, 132(4): 1199- 1210
- [19] 夏军红,郑用璉. 玉米 RB 近等基因系的分子标记辅助回交选育与效益分析 [J]. 作物学报, 2002, 28(3): 339- 344
- [20] 李文涛,曾瑞珍,张泽民,等. 水稻 F₁ 花粉不育性近等基因系导入片段的分析 [J]. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 95- 99
- [21] 赵明辉,陈温福,徐正进,等. 水稻单片段代换系群体的构建及研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(1): 8- 12
- [22] 廖长见,王颖姬,潘光堂. 作物染色体导入系的构建及其应用 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(6S): 139- 144
- [23] 陈龙正,陈劲枫,娄群峰,等. 野黄瓜与栽培黄瓜正反交异源四倍体序列消除的初步研究 [J]. 植物分类学报, 2006, 44(5): 481- 487

责任编辑: 范雪梅