

黄瓜—酸黄瓜异附加系的创制与鉴定

胡 伟, 刘昱希, 赵勤政, 陈劲枫, 娄群峰*

(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: 异附加系是重要的种间材料, 可用于种间外源遗传物质的渐渗及基因定位等相关研究, 创制多种类型的异附加系对于栽培黄瓜 (*Cucumis sativus*) 的品种改良及相关研究均具有重要作用。本试验中以来源于酸黄瓜 (*Cucumis hystrix*) 和栽培黄瓜‘北京截头’杂交的种间异源四倍体为母本, 以‘北京截头’为轮回父本, 连续回交获得 22 株植株。利用基因组荧光原位杂交 (GISH) 技术确定 22 株 BC₂ 群体中附加有外源染色体的植株, 然后利用 oligo-FISH 技术和 12 个酸黄瓜染色体单拷贝序列标记准确识别外源染色体。共筛选出 4 种异附加系材料, 包括 3 种单体异附加系和 1 种双单体异附加系。其中 3 种单体异附加系分别附加酸黄瓜 6 号、10 号和 12 号染色体, 双单体异附加系同时附加了酸黄瓜 6 号和 10 号染色体。

关键词: 黄瓜; 酸黄瓜; 异附加系; oligo-FISH; 单拷贝序列标记

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 07-1349-10

Creation and Identification of *Cucumis sativus* – *C. hystrix* Alien Addition Lines

HU Wei, LIU Yuxi, ZHAO Qinzheng, CHEN Jinfeng, and LOU Qunfeng*

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

Abstract: Alien addition lines are important interspecific materials, which can be used for introgression of interspecific genetic material and gene mapping. Creating a variety of alien addition lines plays an important role in cultivar improvement and related research of cucumber. In this experiment, based on the allotetraploid *Cucumis hystrix* from the cross of *C. sativus* and *C. hystrix*, two backcrosses with diploid cultivar *C. sativus* were carried out to obtain 22 plants of BC₂. The plant containing alien chromosome in BC₂ population was identified by GISH technique. Further, oligo-FISH technology and 12 *C. hystrix* chromosome specific single-copy sequence markers were used to accurately identify the alien chromosomes. Finally, a total of four different alien additional lines were screened, including three monosomic alien addition lines (MAALs) which contained *C. hystrix* chromosomes H06, H10, and H12, respectively, and one double alien monosomic addition line containing H06 and H10.

Keywords: *Cucumis sativus*; *Cucumis hystrix*; alien addition line; oligo-FISH; single-copy sequence marker

收稿日期: 2021 - 02 - 22; 修回日期: 2021 - 05 - 18

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目 (2016YFD0100204); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (20) 2019]

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qflou@njau.edu.cn)

通过种间杂交转移利用野生资源的抗性基因是作物改良的重要方式, 由于近缘物种染色体组之间的同源性, 使得作物可以接受 1 条或数条近缘物种的染色体, 从而获得异附加系 (alien addition lines, AAL) 材料 (董邵云 等, 2020)。与携带整套外源染色体组的种间杂种相比, 异附加系携带的不利基因和非目的基因较少, 可通过进一步的回交, 实现特定染色体基因的易位或渐渗, 促进优良基因的育种利用。例如: Liu 等 (2017) 筛选出了具有抗赤霉病的附加长穗偃麦草 7E 染色体的硬粒小麦—长穗偃麦草附加系; Hechanova 等 (2018) 通过水稻—根茎稻异附加系创制出抗稻褐飞虱和绿叶蝉的渐渗系材料。近年来附加系材料在大田作物小麦和园艺作物芸薹属蔬菜中都有较为深入的研究。小麦中包括耐盐胁迫的小麦—大麦附加系材料 (Darko et al., 2015), 早熟特性的小麦—新麦草附加系 (Wang et al., 2015) 等各种优良性状材料; 芸薹属中包括大白菜—甘蓝单体异附加系 (郑宝智 等, 2008; 顾爱侠 等, 2009)、菜薹—芥蓝单体异附加系 (陈雪平 等, 2010)、花椰菜—黑芥异附加系 (王桂香 等, 2011) 等。

黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n = 2x = 14$) 栽培种经过长期驯化和人工栽培, 导致栽培黄瓜的遗传多样性较低, 对病虫害和高温、低温等生物和非生物胁迫较为敏感, 大多品种的多抗性较差。黄瓜的近缘野生种酸黄瓜 (*C. hystrix* Chakr., $2n = 2x = 24$) 具有抗线虫、霜霉病和蔓枯病, 耐低温弱光等优异特性, 通过种间杂交将酸黄瓜优良性状转移到栽培黄瓜中, 是品种改良的一种有效途径 (庄飞云和陈劲枫, 2003), Chen 和 Kirkbride (2000) 利用胚拯救的方法成功实现了黄瓜和酸黄瓜的种间杂交, 获得杂种 F_1 , 并通过染色体加倍获得了可育的异源四倍体黄瓜, 命名为 *Cucumis hytivus* Chen & Kirkbride ($2n = 4x = 38$)。陈劲枫等 (2003) 基于异源四倍体黄瓜与二倍体栽培黄瓜连续回交和自交, 首次获得了 2 株黄瓜单体异附加系, 但是没有对附加的染色体进行明确的鉴定。

Han 等 (2015) 基于黄瓜基因组序列合成的寡核苷酸 (oligo) 探针的应用为黄瓜单体异附加系的鉴定提供了新的思路。Li 等 (2020) 利用上述方法创制出单体异附加系材料, 利用覆盖黄瓜整条染色体的 oligo 探针并结合已构建的酸黄瓜染色体核型鉴定出了外源染色体来源, 通过单体异附加系的自交获得了附加两条来源于酸黄瓜 10 号染色体的二体异附加系。但是目前黄瓜异附加系的鉴定效率还是较慢, 根据黄瓜—酸黄瓜染色体同源关系 (Yang et al., 2012), 覆盖黄瓜整条染色体的 oligo 探针会涂染到不止 1 条酸黄瓜染色体上, 阻碍了黄瓜异附加系外源染色体的快速鉴定。随着荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术的快速发展, 其分辨率和灵敏度不断提高 (Jiang, 2019), 为快速准确鉴定黄瓜异附加系提供了技术支持; 另一方面, 本实验室对酸黄瓜全基因组测序的完成 (Qin et al., 2021), 可为酸黄瓜染色体单拷贝序列标记和探针的设计提供依据。本试验中利用黄瓜与种间异源四倍体多次回交创制出黄瓜异附加系材料, 通过黄瓜—酸黄瓜的同源关系设计的黄瓜染色体分段 oligo 探针可以特异地识别每条酸黄瓜染色体, 同时根据酸黄瓜基因组序列设计的染色体特异序列标记辅助鉴定酸黄瓜外源染色体, 大大提高了异附加系的鉴定效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄瓜的异源四倍体和栽培黄瓜 ‘北京截头’ 由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提供, 种植于南京农业大学白马科研教学基地。2019 年的 4—5 月和 9—10 月进行杂交得到 BC_1 和 22 株 BC_2 群体 (图 1), BC_2 群体利用胚拯救的方式得到。

材料的具体创建过程如图 1 所示:

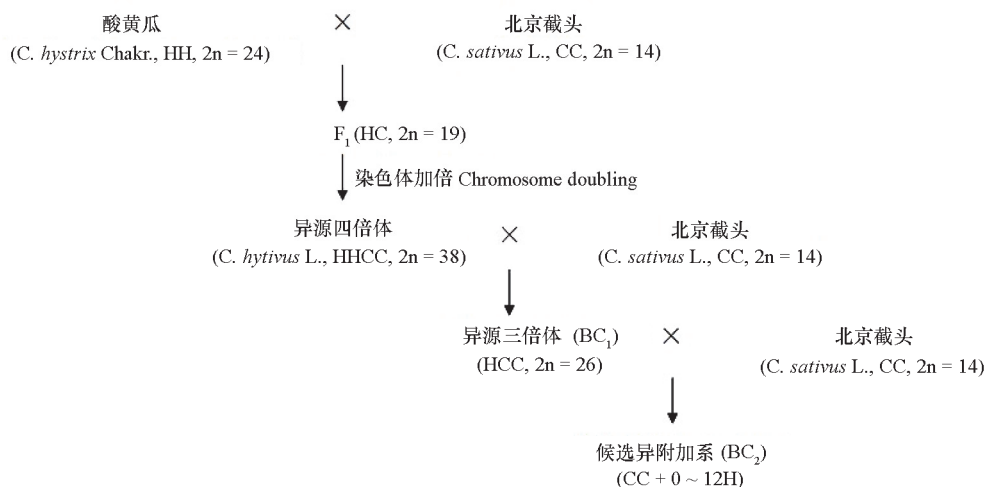


图 1 材料的创建过程

Fig. 1 The process of creating materials

1.2 染色体的制备

将植株置于光照培养箱中, 光照 16 h, 温度 25 °C, 相对湿度 70%; 黑暗 8 h, 温度 18 °C, 相对湿度 70%。在植株生长旺盛的上午取各材料有丝分裂旺盛的根尖, 参照 Lou 等 (2014) 的方法进行有丝分裂中期染色体的制备。取根尖置于 0.002 mol · L⁻¹ 的 8-羟基喹啉溶液中室温下暗处理 1.5 ~ 2.0 h, 然后置于卡诺固定液 (无水乙醇: 冰醋酸 = 3:1) 中固定至少 24 h。切取根尖约 1 ~ 2 mm 分生区部位, 放于 4% 纤维素酶 R-10 (Yakult, <http://www.yakult.co.jp>) 和 2% 果胶酶 (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com>) 组成的酶混合液中, 37 °C 酶解 45 ~ 55 min (视根尖大小而定)。酶解结束后吸干酶液, 加入蒸馏水并放在冰上 10 min 后吸干蒸馏水, 加入卡诺固定液中将根尖固定 10 min 以上, 火焰干燥法制片。在相差显微镜下选择染色体分散良好、形态清晰的切片保存备用。

1.3 探针的制备

1.3.1 酸黄瓜基因组探针和重复序列探针的制备

利用 CTAB 法 (Murray & Thompson, 1980) 提取酸黄瓜基因组 DNA (hy-gDNA), 黄瓜着丝粒序列 Type-III 参照 Han 等 (2009) 和 Lou 等 (2013) 的方法, 利用缺刻平移法进行探针标记, 使用 Digoxigenin-11-dUTP 和 Biotin-11-dUTP (购自 Roche 公司) 将探针标上红色或绿色的标记。

1.3.2 寡核苷酸探针的制备

已知酸黄瓜染色体与黄瓜染色体存在明确的同源对应关系 (Yang et al., 2012), 本研究中利用黄瓜基因组序列合成染色体特异的 oligo 探针, 鉴定附加系中附加的酸黄瓜染色体。黄瓜 1 ~ 7 号染色体分段 oligo 探针的制备参考 Bi 等 (2020) 的方法。设计时通过 chorus 软件基于黄瓜 ‘9930’ 基因组序列数据筛选所需的寡核苷酸文库, 根据黄瓜—酸黄瓜同源关系, 所设计的黄瓜 oligo 探针与酸黄瓜染色体的对应关系如表 1 所示。具体制备流程: 在 300 μL 无 DNA/RNA 水中溶解 300 ng MYcroarray 寡核苷酸文库形成 1 ng · μL⁻¹ 储备液, 将 26 和 2 μL 储备液混合制成寡核苷酸文库工作液, -20 °C 保存。PCR 引物用 FAM 和 TAMRA 在 5' 端修饰, PCR 程序为: 95 °C 下 3 min; 98 °C 下 20 s, 54 °C 下 15 s, 72 °C 下 30 s, 15 个循环; 98 °C 下 20 s, 56 °C 下 15 s, 72 °C 下 30 s, 25 个循环, 4 °C 保存。PCR 产物进行纯化后用作探针。

表 1 黄瓜 oligo 探针与酸黄瓜染色体对应关系

Table 1 Corresponding relationship between cucumber oligo probe and *Cucumis hystris* chromosome

黄瓜 oligo 探针 Cucumber oligo probe	酸黄瓜染色体 <i>Cucumis hystris</i> chromosomes	物理位置/Mb Physical positions
Oligo C7-a	H01	0 ~ 19
Oligo C1-a	H02	0 ~ 4/12.5 ~ 20/24 ~ 33
Oligo C2-a	H03	12.4 ~ 22.6
Oligo C3-a	H04	25.2 ~ 40.8
Oligo C2-b	H05	0 ~ 12.4
Oligo C3-b	H06	0 ~ 25.2
Oligo C4-a	H07	0 ~ 10.5/19.5 ~ 23.3
Oligo C4-b	H08	10.5 ~ 19.5
Oligo C5-a	H09	0 ~ 4/11 ~ 25
Oligo C5-b	H10	4 ~ 16.5/20 ~ 31.9
Oligo C6-a	H11	0 ~ 17.8
Oligo C1-b	H12	4 ~ 12.5/20 ~ 24

1.4 胚挽救

将异源三倍体与‘北京截头’回交获得的果实用清水洗净晾干，酒精擦拭后置于超净工作台紫外灭菌 0.5 h，用解剖刀解剖并挑出饱满的未成熟种子，接种于 MS 培养基（蔗糖 3%，MS 粉 0.44%，植物凝胶 0.28%，pH 为 5.8 ~ 6.0）上，2 周后长出植株，在光照培养箱中驯化栽培。

1.5 荧光原位杂交

荧光原位杂交主要参照 Lou 等（2013）的方法。在制备好待用的染色体制片上加入杂交混合液（50%的去离子甲酰胺、2×柠檬酸盐缓冲液、10%硫酸葡聚糖），盖上盖玻片后放置于杂交仪中 37 °C 过夜。次日上午将玻片取出进行洗片，洗净后将加有 oligo 探针的切片直接用 70%、90%、100% 的乙醇溶液梯度脱水各 5 min 后晾干；将加有 hy-gDNA 和重复序列探针的切片加入地高辛抗体和生物素抗体后杂交 40 min，后乙醇梯度脱水后晾干。在晾干后的片子上滴加 20 μL 的 DAPI (0.02 mg · L⁻¹) 复染后封片。在荧光显微镜（SenSys CCD）下观察杂交信号，使用 Olympus BX60 相机捕捉图像。

1.6 分子标记鉴定

利用酸黄瓜基因组测序数据筛选酸黄瓜染色体单拷贝序列标记（Qin et al., 2021），识别异附加系中酸黄瓜外源染色体。分别挑选 12 个分布在酸黄瓜 12 条染色体上的单拷贝序列，用于鉴定异附加系中的外源染色体（表 2）。PCR 扩增的反应程序：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，58 °C 复性 30 s，72 °C 延伸 30 s，32 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。经 2% 琼脂糖胶检测 PCR 扩增产物，恒压 120 V 的条件下电泳 35 min，在凝胶成像仪下拍照。

表 2 酸黄瓜染色体单拷贝序列标记引物

Table 2 The chromosomes single-copy sequence marker primers in *Cucumis hystris*

单拷贝序列标记 Single-copy sequences marker	前引物 (5' - 3') Primer forward	后引物 (5' - 3') Primer reverse
ss H01	AGCCTTTTCTACACCATAA	ATTCCTAGATCCCTTGACTG
ss H02	GTCTTTTACTCTTGGTTTCG	TAATCGTTCACCCATCACTA
ss H03	CAATAGAATCCATATCTTTGA	GTCATTCGTTTACTATCACAT
ss H04	GGGATTAAGCTTGTAGGTT	ATTTCCTGGGATCACTACTT
ss H05	GAATAGGAAAAAGTTGCCGTT	TGATGCTGTCAAGTCGAGTCA
ss H06	CGACAAGTTTGACGTTGATAT	CTAGTTTGAAGTGCCTGTATTA
ss H07	TATACCCAACCAACCGATTCC	ACTTGAGGGCTTGTGTCTCC
ss H08	ATCGTAGAAAGGAAAGGAGAC	GATCAATTGTTGGGAGTGACT
ss H09	AGAAAAATTTGGATGAAACTAGC	ATAGAGAAAACGAACACGACT
ss H10	TACATTCCAATAGGGTGCCGT	GCCGTACTCACAGATTAATAAAA
ss H11	ACTACACTAGCGAGCAAGGGC	ACAGTAATGGTTTGGAACCGG
ss H12	GGACCAACCTTACACCCTTA	TTCGAGTTCAATTCCTCACC

2 结果与分析

2.1 异附加系的获得

异源四倍体 *C. hystrix* 与栽培黄瓜‘北京截头’回交获得染色体数为 26 的黄瓜异源三倍体(BC₁)。分别使用 hy-gDNA 探针和黄瓜着丝粒 Type-III 探针进行细胞学分析, 图 2 显示异源三倍体包含 14 条整套黄瓜基因组染色体(红色信号)和 12 条酸黄瓜染色体(绿色信号)。异源三倍体再与‘北京截头’回交获得 93 个果实, 通过胚挽救后成活 22 株。

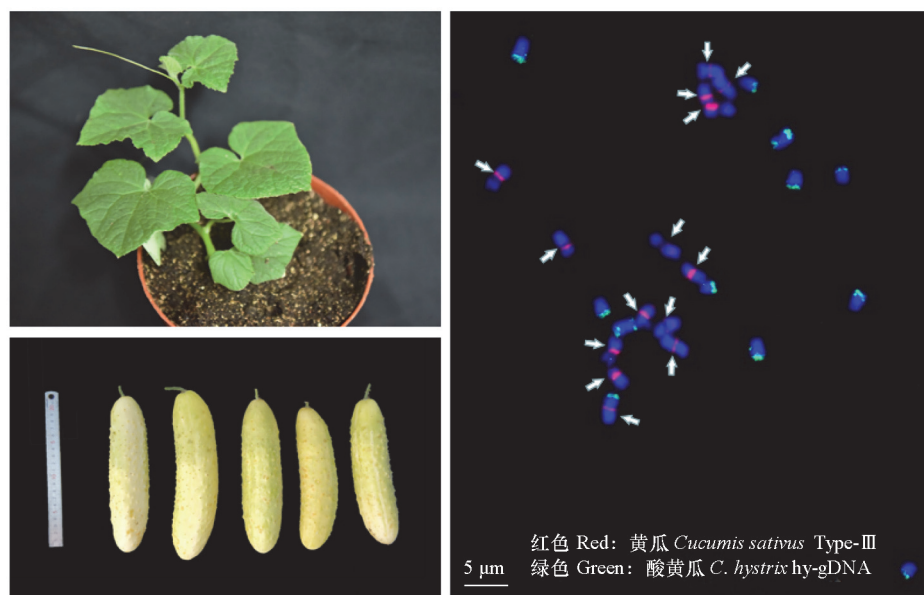


图 2 异源三倍体的植株形态和果实及体细胞染色体 GISH 分析

Fig. 2 *Cucumis* allotriploid plant morphology and fruit and chromosome GISH analysis

将成活的 22 株 BC₂ 植株编号为 CC-1 ~ CC-22, 以 hy-gDNA 为探针进行候选异附加系根尖染色体 GISH 分析, 确定候选异附加系中酸黄瓜外源染色体数(图 3)。候选异附加系材料中有 13 株未携带外源染色体, 占 59.09%, 剩下的 9 株为异附加系材料, 其中 7 株携带 1 条外源染色体, 编号分别为 CC-1、CC-4、CC-5、CC-7、CC-11、CC-15 和 CC-19, 为单体异附加系, 占 31.81%; 2 株携带 2 条外源染色体, 编号为 CC-9 和 CC-17, 为双单体异附加系, 占 9.09%。

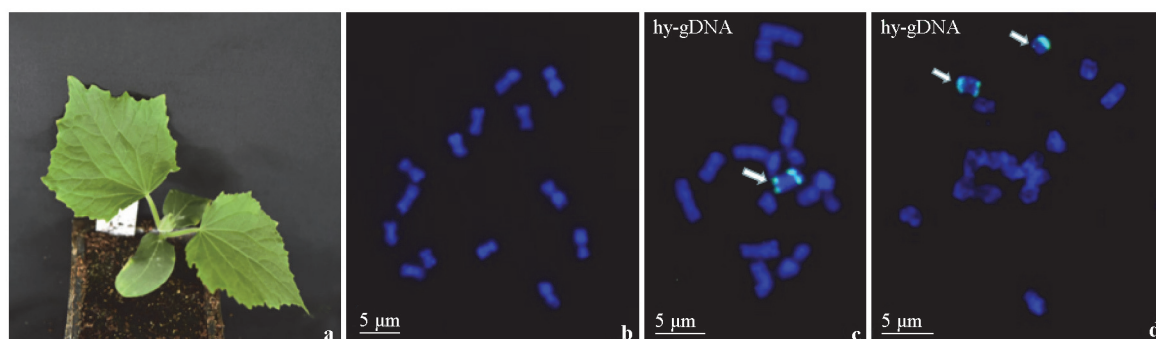


图 3 ‘北京截头’黄瓜 (a) 及其染色体 (b) 和利用 hy-gDNA 探针 (绿色) 分别筛选出的携带 1 条 (c) 和 2 条 (d) 酸黄瓜染色体的异附加系材料

Fig. 3 ‘Beijing Jietou’ cucumber (a) and its chromosomes (b) and alien addition lines carrying one (c) and two (d) *C. hystrix* chromosome

2.2 异附加系的细胞学鉴定

GISH 分析后, 取单体异附加系的根尖制备有丝分裂中期染色体, 利用黄瓜 oligo 探针分别进行 FISH 涂染 (图 4)。结果 (图 4) 发现: 编号为 CC-1、CC-7 和 CC-11 的单体异附加系涂染上了 oligo C3-b 探针, 确定这 3 个单体异附加系染色体组成为 CC-H06; 编号为 CC-4 和 CC-19 的单体异附加系涂染上了 oligo C5-b 探针, 确定这 2 个单体异附加系染色体组成为 CC-H10; 编号为 CC-5 和 CC-15 的单体异附加系涂染上了 oligo C1-b 探针, 确定了两个单体异附加系染色体组成为 CC-H12。

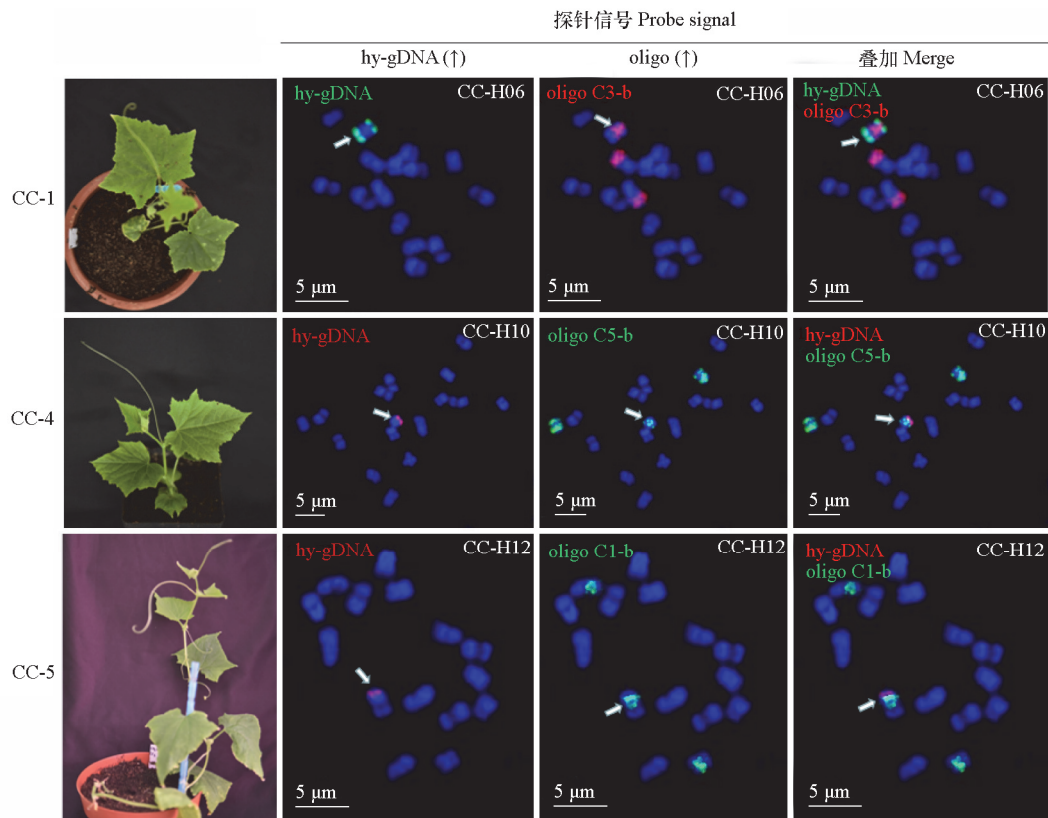


图 4 黄瓜—酸黄瓜单体异附加系 CC-1、CC-4 和 CC-5 中染色体的 FISH 鉴定

Hy-gDNA: 酸黄瓜基因组 DNA 探针; oligo: 黄瓜染色体探针。

Fig. 4 FISH identification of chromosomes in *Cucumis sativus*-*chystris* monosomic alien addition lines CC-1, CC-4 and CC-5

Hy-gDNA: *C. hystris* genome DNA probe; oligo: Cucumber chromosome probe.

取双单体异附加系的根尖制备有丝分裂中期染色体, 利用黄瓜 oligo 探针分别进行涂染。结果发现: 编号为 CC-9 和 CC-17 的双单体异附加系都涂染 ss 上了 oligo C3-b 和 oligo C5-b 探针, 确定这 2 个双单体异附加系染色体组成为 CC-H06+H10 (图 5)。

2.3 异附加系的分子标记鉴定

利用 1 ~ 12 号酸黄瓜染色体特异序列标记引物对酸黄瓜、BC₁ (异源三倍体)、“北京截头”和黄瓜异附加系进行扩增。如图 6 所示, 1 ~ 12 号酸黄瓜染色体特异序列标记引物 ssH01 ~ ssH12 在酸黄瓜和异源三倍体中均扩增出相同的特异性条带, 而在“北京截头”中未扩增出相应条带, 说明引物具有特异性。黄瓜单体异附加系扩增结果显示, CC-1 (图 7, A)、CC-7 和 CC-11 携带酸黄瓜的 6

号染色体; CC-4 (图 7, B) 和 CC-19 携带了酸黄瓜的 10 号染色体; CC-5 (图 7, C) 和 CC-15 携带了酸黄瓜的 12 号染色体; CC-9 和 CC-17 同时携带了酸黄瓜的 6 号和 10 号染色体 (图 7, D、E)。

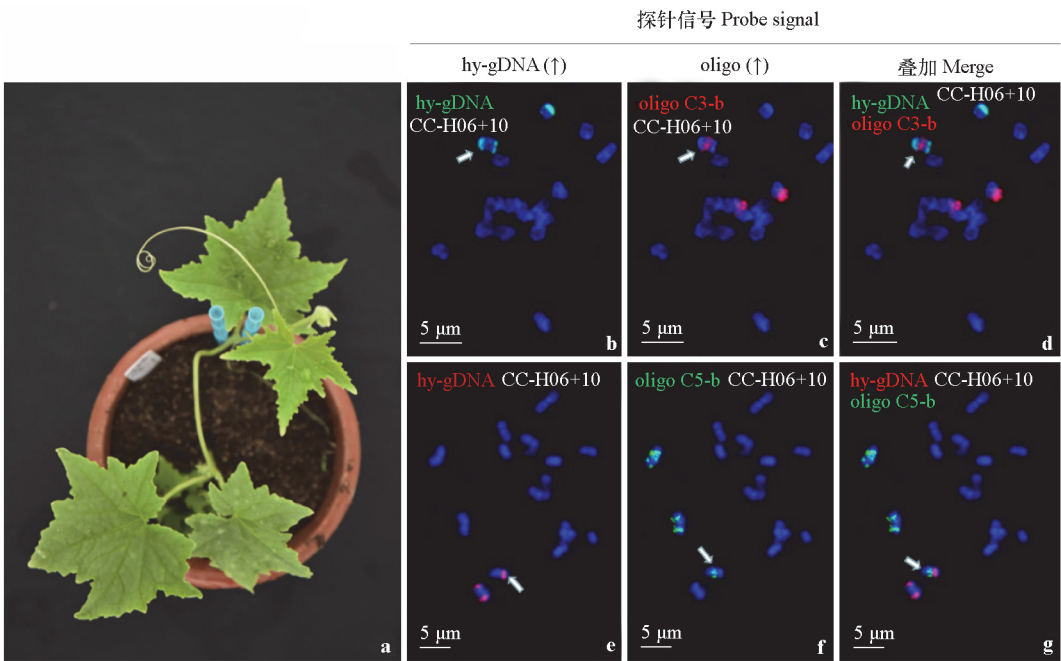


图 5 黄瓜—酸黄瓜双单体异附加系 CC-9 中染色体的 FISH 鉴定
a: CC-9 的植株形态; b ~ d: 1 条外源染色体被鉴定为酸黄瓜 6 号染色体 (H06); e ~ g: 1 条外源染色体被鉴定为酸黄瓜 10 号染色体 (H10)。
Hy-gDNA: 酸黄瓜基因组 DNA 探针; oligo: 黄瓜染色体探针。

Fig. 5 FISH identification of chromosomes in *Cucumis sativus-chystrix* double monosomic alien addition lines CC-9
a: Plant morphology of CC-9; b - d: One alien chromosome identified as H06; e - g: One alien chromosome identified as H10.
Hy-gDNA: *C. hystrix* genome DNA probe; oligo: Cucumber chromosome probe.

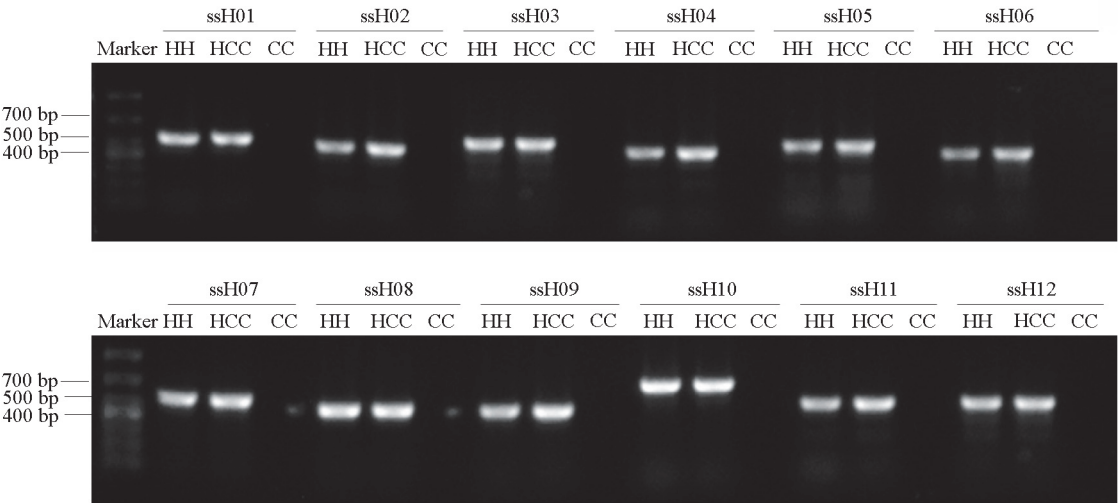


图 6 酸黄瓜染色体单拷贝序列标记引物 ssH01 ~ ssH12 的扩增结果
HH: 酸黄瓜; HCC: 异源三倍体; CC: ‘北京截头’ 黄瓜。
Fig. 6 Amplification results of single-copy sequence marker primers ss H01 - ss H12 for *Cucumis hystrix* chromosome
HH: *C. hystrix*; HCC: Allotriploid; CC: *C. sativus* ‘Beijing Jietou’ .

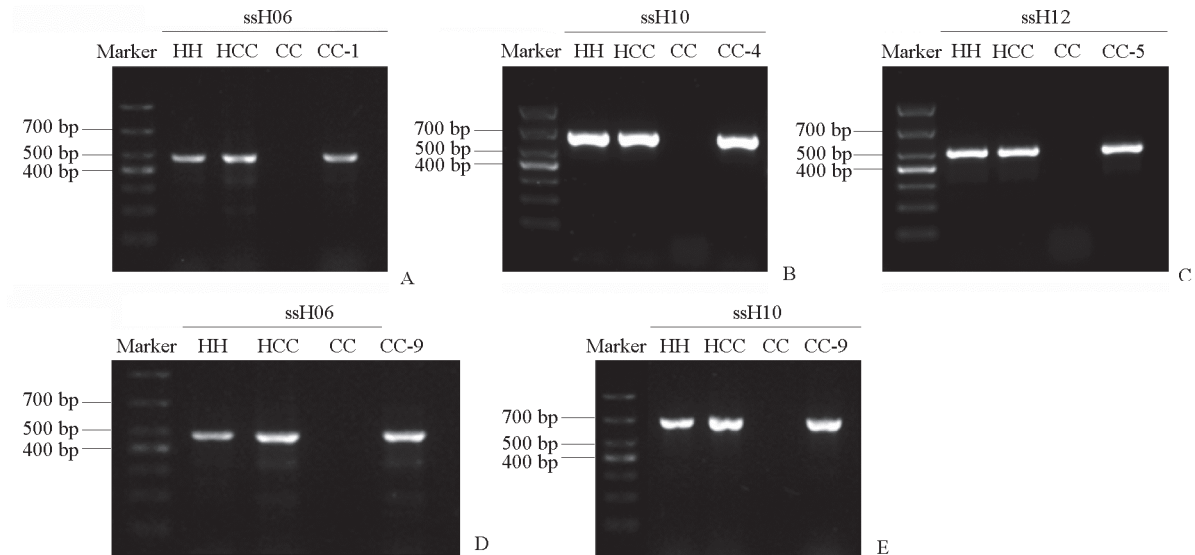


图 7 酸黄瓜染色体特异的单拷贝序列标记引物在黄瓜—酸黄瓜异附加系中的扩增结果

HH: 酸黄瓜; HCC: 异源三倍体; CC: ‘北京截头’ 黄瓜; ss H06、ss H10 和 ss H12 是酸黄瓜 6 号、10 号和 12 号染色体单拷贝序列。

Fig. 7 Amplification results of *C. hystrix* chromosome specific single-copy sequence marker primers in *Cucumis sativus* - *hystrix* MAALs

HH: *C. hystrix*; HCC: allotriploid; CC: *C. sativus*; ss H06, ss H10 and ss H12 were *C. hystrix* H06, H10 and H12 chromosome single-copy sequence markers.

3 讨论

在棉花、小麦和芸薹属等作物的异附加系的获得和鉴定过程中，主流方法是利用核型分析和 FISH 技术分析结合分子标记鉴定外源染色体 (Dong et al., 2018; 殷月辉 等, 2019)。本试验中利用黄瓜与种间异源四倍体多次回交创制出黄瓜异附加系材料，通过黄瓜—酸黄瓜的同源关系设计的黄瓜染色体分段 oligo 探针，可以特异的识别每 1 条酸黄瓜染色体，同时根据酸黄瓜基因组序列设计的染色体单拷贝序列标记辅助鉴定酸黄瓜外源染色体，从而快速鉴定出了附加酸黄瓜 6 号、10 号和 12 号染色体的单体异附加系植株和同时附加酸黄瓜 6 号和 10 号染色体的双单体异附加系植株，大大提高了黄瓜异附加系的鉴定效率，为扩大黄瓜—酸黄瓜异附加系材料的种类和规模提供了技术支持。本研究中染色体特异 oligo 探针的应用提供了一种直观而又准确的方式用于识别异附加系中外源染色体的身份，这为 oligo 探针在其他作物异附加系的相关研究提供了思路。

二体附加系除了作为重要的材料用于研究物种基因组之间的起源与进化以及优异基因的染色体定位外 (An et al., 2015; Kong et al., 2018)，相比于异附加系而言，二体附加系有利于维持减数分裂过程中的稳定性，是用于黄瓜遗传改良以及加速育种进程的理想桥梁材料，因此下一步将会对黄瓜双单体异附加系植株进行自交留种，以进一步获得黄瓜单体异附加系，同时对黄瓜单体异附加系植株进行自交以获得稳定遗传的黄瓜二体异附加系。通过对单体异附加系的表型等性状的观察与鉴定，与其转录组分析的差异表达基因进行关联分析，将表型或抗性等相关性状与染色体进行联系，进行性状的染色体定位，在功能上解析酸黄瓜染色体的特征。

此外，本次试验中只获得了出现酸黄瓜 6 号、10 号和 12 号染色体的异附加系，且外源染色体的传递率差别较大。研究表明，基因组间的同源性关系和染色体大小可能影响外源染色体传递率 (申

书兴 等, 2008; Tan et al., 2017)。异附加系的创制过程中, 异源三倍体成熟瓜的结实率极低, 这可能与异源三倍体产生了高比例不正常的配子相关, 为了获得更多种类的黄瓜单体异附加系, 在保持较高的外源染色体鉴定效率的前提下, 需要进一步扩大 BC₂ 群体的规模。

References

- An D G, Zheng Q, Luo Q L, An D, Zheng Q, Luo Q, Ma P, Zhang H, Li L, Han F, Xu H, Xu Y, Zhang X. 2015. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-rye 6R chromosome disomic addition line with powdery mildew resistance. *PLoS ONE*, 10 (8): 343 – 355.
- Bi Y F, Zhao Q Z, Yan W, Li M X, Liu Y X, Cheng C, Zhang L, Yu X, Li J, Qian C T, Wu Y, Chen J F, Lou Q F. 2020. Flexible chromosome painting based on multiplex PCR of oligonucleotides and its application for comparative chromosome analyses in *Cucumis*. *The Plant Journal*, 102 (1): 178 – 186.
- Chen J F, Kirkbride J H. 2000. A new synthetic species of *Cucumis* (Cucurbitaceae) from interspecific hybridization and chromosome doubling. *Brittonia*, 52 (4): 315 – 319.
- Chen Jin-feng, Luo Xiang-dong, Qian Chun-tao, Cao Qing-he. 2003. Production and characterization of monosomic alien addition lines of cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (6): 725 – 727. (in Chinese)
- 陈劲枫, 罗向东, 钱春桃, 曹清河. 2003. 黄瓜单体异附加系的筛选与观察. *园艺学报*, 30 (6): 725 – 727.
- Chen Xue-ping, Sheng Er-qiao, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Xuan Shu-xin, Sheng Shu-xing. 2010. Transmission of n + 1 gametes and obtaining of two bisomic addition lines of flowering chinese cabbage-chinese kale. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (23): 4871 – 4876. (in Chinese)
- 陈雪平, 申二巧, 张成合, 李晓峰, 轩淑欣, 申书兴. 2010. 菜薹—芥蓝单体异附加系 n + 1 配子传递及两个二体异附加系的获得. *中国农业科学*, 43 (23): 4871 – 4876.
- Darko E, Janda T, Majláth I, Szepkó D, Dulai S, Molnár I, Türkösi E, Molnár-Láng M. 2015. Salt stress response of wheat-barley addition lines carrying chromosomes from the winter barley “Manas”. *Euphytica*, 203 (3): 491 – 504.
- Dong Shao-yun, Miao Han, Bo Kai-liang, Zhang Sheng-ping, Gu Xin-fang. 2020. Research progress on wild relatives of cucumber. *Journal of Plant Genetic Resources*, 21 (6): 1446 – 1460. (in Chinese)
- 董邵云, 苗 晗, 薄凯亮, 张圣平, 顾兴芳. 2020. 黄瓜近缘野生资源的研究进展. *植物遗传资源学报*, 21 (6): 1446 – 1460.
- Dong T, Feng S, Li S, Yu C, Zhou B. 2018. Ten alien chromosome additions of *Gossypium hirsutum*-*Gossypium bickii* developed by integrative uses of GISH and species-specific SSR markers. *Molecular Genetics & Genomics* Mgg, 293 (4): 1 – 11.
- Gu Ai-xia, Zheng Bao-zhi, Wang Yan-hua, Xuan Shu-xin, Luo Shuang-xia, Shen Shu-xing. 2009. Obtaining and studies of Chinese cabbage monosomic alien addition line with chromosome 3 of cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (1): 39 – 44. (in Chinese)
- 顾爱侠, 郑宝智, 王彦华, 轩淑欣, 罗双霞, 申书兴. 2009. 附加甘蓝 3 号染色体的大白菜单体异附加系的获得与研究. *园艺学报*, 36 (1): 39 – 44.
- Han Y H, Zhang T, Thammaphichai Paradee, Weng Y Q, Jiang J M. 2015. Chromosome-specific painting in *Cucumis* species using bulked oligonucleotides. *Genetics*, 200 (3): 771 – 779.
- Han Y H, Zhang Z, Liu C, Liu J, Huang S. 2009. Centromere repositioning in cucurbit species: implication of the genomic impact from centromere activation and inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (35): 14937 – 14941.
- Hechanova S L, Prusty M R, Kim S R, Ballesfin L R, Ramos J, Prahalada G D, K. Jena K. 2018. Monosomic alien addition lines (MAALs) of *Oryza rhizomatis* in *Oryza sativa*: production, cytology, alien trait introgression, molecular analysis and breeding application. *Theoretical and Applied Genetics*, 131 (10): 2197 – 2211.
- Jiang J M. 2019. Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, 27 (3): 153 – 165.
- Kong L N, Song X Y, X Jin, H Sun, X Wang. 2018. Development and characterization of a complete set of *Triticum aestivum*-*Roegneria ciliaris* disomic addition lines. *Theor Appl Genet*, 131 (8): 1793 – 1806.
- Li M X, Zhao Q Z, Liu Y X, Qin X D, Hu W, Davoudi M, Chen J F, Lou Q F. 2020. Development of alien addition lines from *Cucumis hystris* in *Cucumis sativus*: cytological and molecular marker analyses. *Genome*, 63: 629 – 641.

- Liu H P, Dai Y, Chi D, Huang S, Li H F, Duan Y M, Cao W G, Gao Y, Fedak G, Chen J M. 2017. Production and molecular cytogenetic characterization of a durum wheat - *Thinopyrum elongatum* 7E disomic addition line with resistance to fusarium head blight. *Cytogenet Genome Res*, 153 (3): 165 - 173.
- Lou Q F, He Y, Cheng C, Zhang Z, Li J, Huang S, Chen J F. 2013. Integration of high-resolution physical and genetic map reveals differential recombination frequency between chromosomes and the genome assembling quality in cucumber. *PLoS ONE*, 8 (5): e62676.
- Lou Q F, Zhang Y, He Y, Li J, Jia L, Cheng C, W Guan, S Yang, J Chen. 2014. Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in cucumis. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 78 (1): 169 - 179.
- Murray M G, Thompson W F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8 (19): 4321 - 4325.
- Qin X D, Zhang Z, Lou Q, Xia L, Li J, Zhao X K, Yu X Q, Cheng C Y, Huang S W, Chen J F. 2021. Chromosome-scale genome assembly of *Cucumis hystris* - a wild species interspecifically cross-compatible with cultivated cucumber. *Horticulture Research*, 10.1038/s41438-021-00475-5.
- Shen Shu-xing, Hou Xi-lin, Luo Shuang-xia. 2008. Studies on the gamete formation and transmission rate of a set of primary trisomics in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (9): 1285 - 1290. (in Chinese)
- 申书兴, 侯喜林, 罗双霞. 2008. 大白菜初级三体的配子形成及传递率研究. *园艺学报*, 35 (9): 1285 - 1290.
- Tan C, Cui C, Xiang Y, Ge X H, Li Z Y. 2017. Development of Brassica oleracea-nigramonosomic alien addition lines: genotypic, cytological and morphological analyses. *Theor Appl Genet*, 130 (12): 2491 - 2504.
- Wang Gui-xiang, Yan Hong, Zeng Xing-ying, Sheng Xiao-guan, Tang Yu, Han Shuo, Zong Mei, Lu Kun, Liu Fan. 2011. New alien addition lines resistance to black rot generated by somatic hybridization between cauliflower and black mustard. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (10): 1901 - 1910. (in Chinese)
- 王桂香, 严红, 曾兴莹, 盛小光, 唐宇, 韩硕, 宗梅, 陆坤, 刘凡. 2011. 花椰菜-黑芥体细胞杂交获得抗黑腐病异附加系新材料. *园艺学报*, 38 (10): 1901 - 1910.
- Wang L, Liu Y, Du W, Jing F, Wang Z, Wu J, Chen X. 2015. Anatomy and cytogenetic identification of a wheat- *Psathyrostachys huashanica* Keng line with early maturation. *PLoS ONE*, 10 (10): e0131841.
- Yang L M, Dal - Hoe Koo, Li Y H, Zhang X J, Luan F, Michael J. Havey, Jiang J M, Weng Y Q. 2012. Chromosome rearrangements during domestication of cucumber as revealed by high - density genetic mapping and draft genome assembly. *The Plant Journal*, 71 (6): 895 - 906.
- Yin Yue-hui, Xu Qin-xing, Qi Fei, Bao Yin-guang, Wang Hong-gang, Li Xing-feng. 2019. Screening and identification of wheat - *Thinopyrum elongatum* alien chromosomes lines. *Shandong Agricultural Sciences*, 51 (4): 1 - 6. (in Chinese)
- 殷月辉, 徐勤省, 齐斐, 鲍印广, 王洪刚, 李兴锋. 2019. 小麦-长穗偃麦草异染色体系筛选与鉴定. *山东农业科学*, 51 (4): 1 - 6.
- Zheng Bao-zhi, Sheng Shu-xing, Wang Yan-hua, Chen Xue-ping, Zhang Cheng-he, Xuan Shu-xin, Luo Shuang-xia, Li Xiao-feng. 2008. Production and identification of head cabbage monosomic alien addition lines CO-9-1 in Chinese cabbage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (2): 239 - 242. (in Chinese)
- 郑宝智, 申书兴, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 轩淑欣, 罗双霞, 李晓峰. 2008. 大白菜-甘蓝单体异附加系 CO-9-1 的选育与鉴定. *植物遗传资源学报*, 9 (2): 239 - 242.
- Zhuang Fei-yun, Chen Jin-feng. 2003. RAPD analysis of cultivated cucumber, wild *Cucumis* species, Interspecific hybrid and its progenies from backcrossing. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 47 - 50. (in Chinese)
- 庄飞云, 陈劲枫. 2003. 黄瓜栽培种、近缘野生种、种间杂种及其回交后代的 RAPD 分析. *园艺学报*, 30 (1): 47 - 50.