

黄瓜嫩果皮色基因 QTL 定位分析

窦文文, 沈 镒, 麦尔旦·努尔阿伍提, 董洪霞, 邱 杨, 李锡香

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘要:以黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 嫩果皮绿色自交系 1613 (P1) 和嫩果皮白色自交系 JD7 (P2) 为试验材料构建重组自交系 (RIL) 群体 (142 个株系), 对各株系嫩果皮色进行表型鉴定, 利用重测序技术对各自交系进行基因分型, 结合表型和基因型数据进行 QTL 定位研究。结果表明 F₁ 黄瓜嫩果皮颜色表现为绿色, 并将控制嫩果皮颜色的基因定位到黄瓜第 3 号染色体上, 在 3 号染色体 35511129~39711114 区段内定位到成簇分布的 3 个位点, 它们在连锁图谱上的位置分别为 1.01 cM、3.31 cM 和 6.01 cM 处, 与两翼标记的连锁距离分别为 1.01 cM/0.09 cM, 0.21 cM/0.29 cM, 0.11 cM/0.19 cM。通过生物信息学分析预测出 16 个候选基因, 其中 *Csa3G904080*、*Csa3G904100*、*Csa3G903500* 和 *Csa3G902950* 极有可能是调控黄瓜果实颜色的关键基因。

关键词: 黄瓜; RIL; 嫩果皮色; 重测序; QTL 定位

QTL Mapping of Immature Fruit Basal Color in *Cucumis sativus* L.

DOU Wen-wen, SHEN Di, NUERAWUTI Maierdan, DONG Hong-xia, QIU Yang, LI Xi-xiang

(Vegetable and Flower Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Creation, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

Abstract: By taking use of 142 recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross of green immature fruit inbred line (female parent, 1613, P1) and white immature fruit inbred line (male parent, JD7, P2), we performed the quantitative mapping of traits that control the immature fruit skin color. F₁ plants showed green peel in immature fruit. By sequencing technology, three QTLs controlling the immature fruit color were allocated to the physical interval of 35511129-39711114 on chromosome 3. These loci were located at 1.01 cM, 3.31 cM and 6.01 cM, with the flanking genetic distance of 1.01 cM/0.09 cM, 0.21 cM/0.29 cM and 0.11 cM/0.19 cM, respectively. By gene annotation, 16 candidate genes were found in the target region, including the genes *Csa3G904080*, *Csa3G904100*, *Csa3G903500* and *Csa3G902950*, which are assumed to be the key genes that regulate the color of cucumber fruit.

Key words: cucumber; RIL; immature fruit color; resequencing; QTL mapping

黄瓜是我国露地和设施栽培的主要蔬菜之一, 因其风味清香、口感脆爽、营养丰富, 深受广大消费者的喜爱。黄瓜以嫩果作为食用器官, 炒食或生食凉拌均宜。因此, 其商品果的颜色不仅是吸引消费者的主要因素, 也是育种家着力研究和改良的主要目标性状。

前人对园艺作物果色的诸多研究表明, 果皮颜色属于数量性状, 并且果色的遗传会随着作物及其杂交配组的不同而表现出不同的显隐性^[1]。由于

类胡萝卜素、叶绿素和花青素的含量不同, 黄瓜果皮颜色表现出多样性, 主要表现有深绿色、绿色、黄绿色和白色^[2]。孙小镒等^[3]对雌花开放后 7~10 d 的嫩果研究发现, 黄瓜嫩果果皮色素总含量随绿色的加深而增加, 其中叶绿素 b 对果实颜色影响较大。利用主基因 + 多基因 6 世代联合分析方法对黄瓜嫩果皮叶绿素含量进行研究分析, 得出嫩果皮叶绿素含量由 2 对主基因 + 多基因共同控制^[4]。王建科等^[5]利用色彩色差仪对目测标准皮色及过渡皮色

收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-02-17 网络出版日期: 2018-06-28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180628.0916.001.html>

基金项目: 国家科技支撑计划 (2013BAD01B04); 国家重点研发计划 (2016YFD100204)

第一作者研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: wwdou39@163.com

通信作者: 李锡香, 研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: lixixiang@caas.cn

进行测定,绿色对白色为不完全显性。 F_2 各植株嫩果皮色 L 值和 C 值均呈双峰偏正态分布,说明黄瓜嫩果皮色属于数量性状,且不完全符合经典的数量性状遗传,推测其可能受主基因和多基因共同影响。申晓青等^[6]采用深绿色与黄白色亲本构建 6 世代遗传群体(P_1, P_2, F_1, B_1, B_2 和 F_2),通过目测与色差仪相结合的方法对 6 世代各单株的黄瓜嫩果皮颜色性状进行观察和分级处理,遗传分析表明,黄瓜嫩果果色遗传符合 2 对主基因的加性-显性-上位性遗传模型(B-1 模型)。孙晓丹等^[7]对绿色果皮和白色果皮构建的 F_2 群体果皮表现型进行统计,发现各表现型分离比率绿色:浅绿色:白色为 9:3:4,并非符合典型孟德尔遗传比率 9:3:3:1,存在基因之间的互作,互作类型为隐性上位。

目前已报道的控制黄瓜嫩果果皮颜色的基因有白色果皮(w)、深绿色果皮(Dg)、绿色果皮(dg)、黄绿色果皮(yg)和暗色果皮(D)^[8-10]。Lawrence 等^[11]认为黄瓜嫩果黄绿色由基因 yg 控制,相对深绿色为隐性,且对浅绿色基因具有上位作用。孙晓丹等^[7]利用 F_2 群体、AFLP 标记和群体分离分析法(BSA, bulk segregation analysis)对黄瓜嫩果白色进行研究,结果表明标记 E43M61 和 E34M59 与控制白色果皮的隐性基因 w 连锁,遗传距离分别为 5.2 cM 和 5.6 cM。董邵云等^[2]利用 6 世代遗传群体分析发现,嫩果白皮色由隐性单基因(w)控制,绿色对白色为显性,符合质量性状遗传的特点;利用 F_2 群体和 BSA 法,筛选得到 14 个与 w 基因相关的 SSR 分子标记,将白色果皮性状基因 w 定位到第 3 染色体上,标记 SSR23517 和 SSR23141 作为 w 基因的 2 个侧翼标记,遗传距离分别为 4.9 cM 和 1.9 cM。刘书林等^[12]利用 F_2 群体,应用 BSA 法筛选得到 SSR 分子标记,将黄瓜种瓜红皮色 R 基因定位在第 4 染色体上,并获得与其紧密连锁的两侧翼标记 UW019319(0.8 cM)和 UW019203(0.7 cM)。

育种实践中可以明显看出,果色遗传常常表现出连续变异的特点,分离后代呈现出许多中间型的过渡色,类似数量性状的连续变异,不是简单的质量性状。本研究采用黄瓜嫩果果皮颜色差异较大的 1613 和 JD7 为亲本,配制杂交组合,通过单粒传代的方法构建重组自交系(RIL, F_{13}),结合重测序技术对黄瓜嫩果果皮颜色进行定位,探讨了黄瓜嫩果果皮颜色的遗传规律,以期黄瓜果色分子育种实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究以高代自交系 1613 为母本(为中国华北型黄瓜地方品种与欧洲保护地黄瓜品种杂交创新的高代自交系),属强雌性,果皮绿色,刺瘤中密,刺白色,瓜棒形、较长。以高代自交系 JD7 为父本(为华南型黄瓜品种四川短籽的高代自交系),其属强雄性,果皮白色,刺瘤稀疏,瓜圆筒形、较短。两亲本杂交获得 F_1 ,单粒传代的方法构建重组自交系(RIL, F_{13}),试验群体共包含 142 个株系。材料于 2016 年春季种植于中国农业科学院南口试验基地日光温室内,父母本和每个株系各种植 6 株。

1.2 RIL 群体性状调查及数据统计

根据《黄瓜种质资源描述规范和数据标准》^[13],将黄瓜嫩果颜色分为黄白、白绿、浅绿、绿和深绿 5 种颜色,调查供试材料亲本及 RIL 群体各株系嫩果颜色,对不同颜色进行赋值,将黄白、白绿、浅绿、绿色和深绿分别赋予 1、3、5、7 和 9。使用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据统计分析,利用 SAS 9.0 软件对结果进行卡方测验。

1.3 RIL 群体重测序和 QTL 定位分析

采取 RIL 群体各株系新鲜叶片,用 CTAB 法提取植物基因组 DNA,质量合格无降解的 DNA 用于构建测序文库。亲本平均测序深度 35X, RIL 株系平均测序深度 6X。对测序数据进行严格过滤,获得高质量的 Clean data,将测序数据与参考基因组进行比对,比对结果正常,并进行 SNP 变异检测和基因分型分析。使用 MapQTL 中的 PT(Permutation test)确定每个表型的 LOD 值阈值,使用 WinQTL 软件中的 CIM 算法进行 QTL 定位,依据前面置换检验获得的阈值确定每个表型对应的 QTL 区段。

1.4 ANNOVAR 基因注释

应用 ANNOVAR 软件,将 SNP 检测结果比对黄瓜参考基因组,查找相关基因,进行基因功能注释,对目标基因初步定位区域的候选基因进行预测和分析。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 RILs 群体嫩果果皮颜色表型鉴定结果

经表型鉴定,亲本 1613 和 JD7 嫩果果皮颜色分别表现为绿色和黄白(图 1); F_1 群体表现为绿色,说明黄瓜嫩果果皮颜色绿色由主效基因控制。在 RIL 群体中,黄白果皮为 27 株,白绿果皮为 27 株,浅绿

果皮为 24 株,绿色果皮为 34 株,深绿果皮为 30 株,频数分布如图 2 所示,经卡方检验符合 1:1:1:1:1 (卡方值为 2.0141, P 值为 0.7332 > 0.05), RILs 株

系间果皮颜色表现为连续变异性,说明嫩果颜色可能是由多个基因调控,并且基因之间可能存在互作效应。

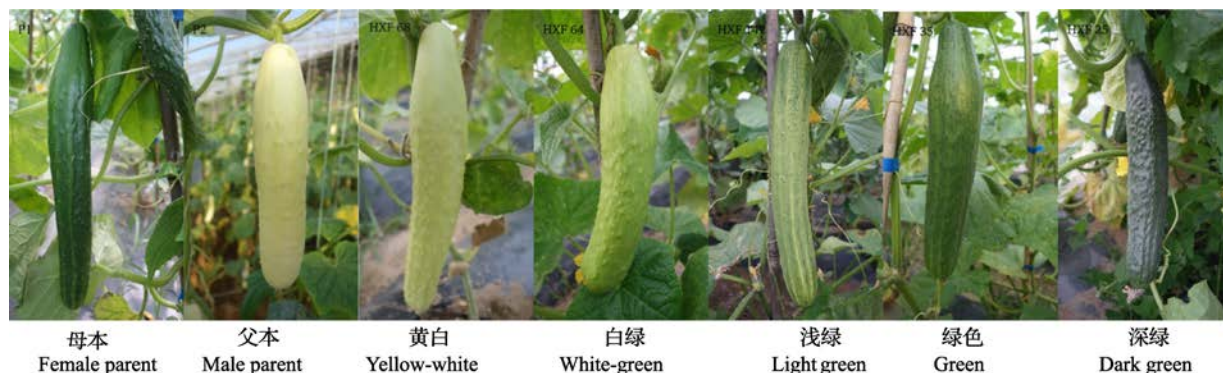


图 1 亲本材料及 RIL 群体代表性单株的嫩果

Fig. 1 Fruit colors of parental lines and representative RILs

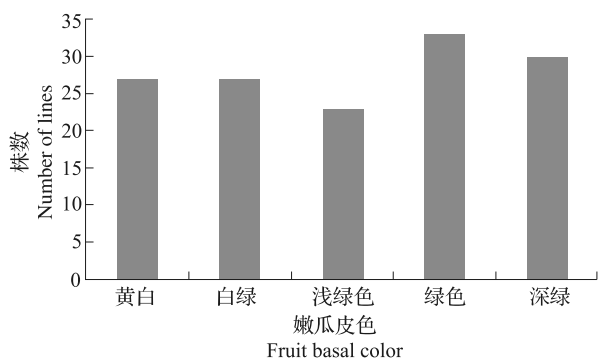


图 2 黄瓜 RIL 群体嫩瓜果皮颜色的分布

Fig. 2 Segregation of fruit basal color in RILs population

2.2 嫩果皮颜色的 QTL 定位结果

2.2.1 亲本和子代基因分型和有效 SNP 标记开发 基于黄瓜亲本基因型检测结果,进行亲本间 SNP 多态性标记开发。过滤掉亲本信息缺失的位点,筛选父母本都为纯合且亲本间具有多态性的位点,共获得 SNP 位点 543611 个,其中 RIL 群体可用标记类型为“aa × bb”型,多态性标记 302710 个。基于

亲本间标记开发,提取 142 个子代在上述 302710 个多态性标记位点的基因型。对分型后的子代标记分别进行异常碱基检查、偏分离标记过滤和 Bin 标记筛选,最终得到有效 Bin 标记共 1495 个,进入连锁性分析。

对筛选后得到的 bin 标记,采用 Joinmap 4.0 软件遗传图谱构建,连锁群划分,LOD 值设置为 2 ~ 10;对每个连锁群采用回归算法进行排序;采用 Kosambi 计算标记间的遗传距离。去掉严重不能连锁的标记,最终获得 bin 标记 1423 个。

2.2.2 黄瓜嫩果皮 QTL 定位 利用 RIL 群体构建的遗传连锁图,结合对黄瓜嫩果果皮颜色的表型调查结果进行 QTL 定位分析。LOD 阈值 3.3,分别在第 1、3 和 4 号染色体上,检测到 6 个与黄瓜嫩果果皮颜色性状相关的 QTLs (图 3)。在检测到的 6 个 QTLs 中,1 号染色体上 QTL 位点贡献率 2.68%,4 号染色体 2 个 QTLs 位点贡献率分别为 4.06% 和 4.39%,3 号染色体的 3 个 QTLs 位点贡献率分别为 67.18%、65.11% 和 57.81%,贡献率均大于 50%。

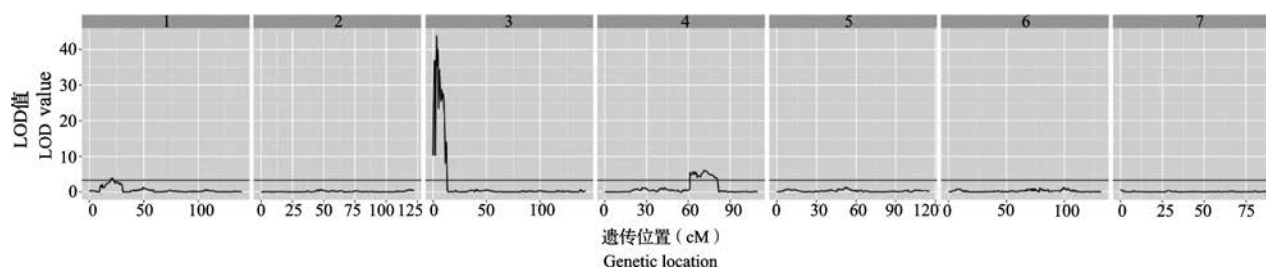


图 3 黄瓜 RIL 群体嫩果皮颜色 QTL 位点

Fig. 3 The QTLs of fruit basal color in RILs population in cucumber

3 号染色体上,3 个 QTLs 位点成簇聚集在约 4.2 M 的区间。位点 Fbc3.1 在连锁图谱上的位置为 1.01 cM,与右翼标记 mk718 的遗传距离为 0.09 cM,贡献率最大;位点 Fbc3.2 在连锁图谱上的

位置为 3.31 cM,与左翼标记 mk713 的遗传距离为 0.21 cM,贡献率其次;位点 Fbc3.3 在连锁图谱上的位置为 6.01 cM,与左翼标记 mk707 的遗传距离为 0.11 cM,贡献率居第 3 位(表 1)。

表 1 黄瓜嫩瓜果皮颜色的 QTLs 及其贡献率

Table 1 QTL controlling fruit basal color and their effect in cucumber

数量性状位点 QTLs	染色体 Chr.	位置(cM) Position	遗传图谱位置(cM) Location of genetic map	物理位置(pos) Physical position	LOD	加性效应 Additive_effect	贡献率(%) R ²
Fbc1.1	1	20.61	18.7 ~ 22.7	3389999 ~ 4625515	3.86	0.50	2.68
Fbc3.1	3	1.01	0 ~ 1.1	35511129 ~ 39711114	36.95	2.49	67.18
Fbc3.2	3	3.31	3.1 ~ 3.6	38840843 ~ 39043539	43.79	2.46	65.11
Fbc3.3	3	6.01	5.9 ~ 6.2	38158740 ~ 36702497	34.31	2.35	57.81
Fbc4.1	4	65.21	64.3 ~ 66.1	7308394 ~ 6640628	5.57	0.61	4.06
Fbc4.2	4	71.31	69.6 ~ 74.5	5924339 ~ 5111685	6.08	0.62	4.39

搜索黄瓜基因组数据库(<http://cucurbitgenomics.org/organism/2>),在 3 号染色体 35511129 ~ 39711114 区间内发现了 570 个基因,其中包括 16 个与叶绿体结构相关蛋白合成以及转运有关的基因,其编号与功能如表 2。

表 2 黄瓜嫩果皮色相关 QTL 的候选基因

Table 2 The candidate genes controlling fruit basal color in cucumber

基因编号 Gene ID	功能注释 Functional annotation
Csa3G899830	丝氨酸 tRNA 连接酶
Csa3G889840	叶绿体类囊体内腔 29 kD 蛋白
Csa3G889940	假定的,核糖核蛋白,叶绿体
Csa3G889160	天门冬氨酸氨基转移酶
Csa3G881660	隐花色素 DASH,叶绿体/线粒体
Csa3G891650	琥珀酸裂解酶
Csa3G902950	k02639 铁氧还蛋白
Csa3G912370	叶绿体 Dom3z 同源蛋白;K14845 RAT1-interacting protein
Csa3G904080	丙酮酸激酶同工酶 G
Csa3G904100	磷酸核糖焦磷酸激酶 1
Csa3G903500	叶绿体 ABCI7 蛋白;K09015 Fe-S cluster assembly protein SufD
Csa3G900970	叶绿体 3-磷酸甘油酰基转移酶
Csa3G895790	叶绿体支链氨基酸氨基转移酶蛋白 3
Csa3G895120	氨基咪唑核苷酸羧化酶
Csa3G894540	谷氨酰 tRNA (Gln) 酰胺转移酶亚基 C、 叶绿体/线粒体
Csa3G859690	鸟氨酸氨甲酰转移酶、叶绿体

3 讨论

嫩果果皮颜色是黄瓜果实重要的外观品质性状。尽管国内外研究者通过对不同遗传群体的黄瓜嫩果皮色进行了遗传研究,但由于所用的试验材料不同,得出的结论也不尽相同。从质量性状角度,本研究中,F₁代表现为绿色,表明白色果皮对绿色果皮为隐性,这点与前人研究结果相符合^[2,7,14]。在子代群体中发现嫩果皮颜色除有亲本表现型外(白色和绿色),还出现了重组类型(白绿、浅绿和深绿色),表现出连续变异性,这表明控制果皮颜色基因并非是由一对基因控制的简单质量性状遗传,而可能存在多个基因和基因之间的互作^[7,11]。

前人研究表明,黄瓜嫩果实颜色与类胡萝卜素、叶绿素和花青素含量有关,叶绿素含量与果皮着色相关^[2-3,15]。高等植物中,叶绿素的生物合成是以谷氨酸和酮戊二酸作为原料的,然后合成氨基酮戊酸,经过一系列生物反应最终生成叶绿素。叶绿素的生物合成前期和后期的催化步骤,中间代谢产物在质体膜、基质和类囊体膜之间运输,存在复杂的调控网络^[16]。前人通过 AFLP、SSR 标记多从质量性状的角度对黄瓜嫩果皮色进行遗传分析^[2,5-7],虽然获得了紧密连锁的单一标记,但是大多标记距离较远,且并未预测相关基因。本研究中通过基因注释预测得到 16 个候选基因,其大多涉及叶绿素合成中间代谢反应,这表明黄瓜果皮颜色与叶绿素生物合成相关,这点与前人研究结果基本一致^[3-4]。董绪^[17]发现 *Csa3G904080* 基因在果皮颜色不同的亲本材料间存

在碱基突变导致 3 个氨基酸变异,且表达量存在显著差异,并指出 *Csa3G904080* 很可能是导致黄瓜嫩果颜色差异的关键基因。*Csa3G904080* 编码丙酮酸激酶同工酶 G。本研究定位和预测的 *Csa3G904080*、*Csa3G904100*、*Csa3G903500*、*Csa3G902950* 基因与前人研究结果相互印证,这进一步证明了基因 *Csa3G904080*、*Csa3G904100*、*Csa3G903500* 和 *Csa3G902950* 极可能是共同参与调节果皮颜色的关键基因。

此外,Zhou 等^[18]对利用 EMS 诱变得到的黄瓜浅绿色果皮突变体进行研究,定位到 7 号染色体的 *Csa7G051430* 基因,指出 *Csa7G051430* 基因中一个非同义 SNP 突变,导致其保守区域 GTP 酶域氨基酸改变,最终黄瓜嫩果皮呈现浅绿色。Lun 等^[19]对绿果皮和突变体(浅绿色果皮)植株 DNA 进行 MutMap 分析,发现 6 号染色体 *Csa6G133820* 基因中存在与浅绿色表型紧密连锁的 SNP 位点。*Csa6G133820* 基因编码 Ycf54 蛋白,Ycf54 与叶绿素生物合成酶相关,是腺苷酸环化酶复合膜的一个组成部分。这些证据进一步证明,黄瓜果皮色与叶绿素生物合成过程相关,但在本研究中并未定位到 *Csa7G051430* 和 *Csa6G133820* 基因,这可能与研究材料的遗传背景不同和叶绿素生物合成途径复杂有关。

参考文献

- [1] 徐丽丽,申晓青,单素兰,李许真,陈书霞. 园艺作物果实皮色遗传研究进展. 分子植物育种,2015,13(11):2655-2662
- [2] 董邵云,苗晗,张圣平,刘苗苗,王烨,顾兴芳. 黄瓜白色果皮基因遗传规律及定位研究. 西北植物学报,2012,32(11):2177-2181
- [3] 孙小镭,王冰,顾三军,王志峰. 黄瓜嫩果皮色与色素含量的关系. 园艺学报,2003,30(6):721
- [4] 孙小镭,王永强,王冰,顾三军,王志峰. 黄瓜嫩果皮叶绿素含量的遗传. 园艺学报,2004,31(2):327-331
- [5] 王建科,方小雪,李雪红,陈瑶,万正杰,徐跃进. 黄瓜嫩果皮颜色的遗传研究. 园艺学报,2013,40(3):479-486
- [6] 申晓青,陈书霞,潘玉朋,万旭花,陈为峰,成思琼,张然然,孟焕文. 黄瓜嫩果皮颜色的遗传研究. 农业生物技术学报,2014,22(1):37-46
- [7] 孙晓丹,商庆梅,秦智伟. 黄瓜嫩果白色果皮颜色遗传规律及其 AFLP 标记研究. 北方园艺,2011(3):135-140
- [8] Pierce L W, Wehner T C. Review of genes and linkage groups in cucumber. HortScience,1990,25(6):605-615
- [9] Wehner T C, Staub J E. Gene list for cucumber. Cucurbit Genetics Cooperative Report,1997,20(30):66-68
- [10] 顾兴芳,张圣平,池秀蓉. 黄瓜叶色突变、苦味与其他 5 个性状的基因间连锁遗传关系. 园艺学报,2005,32(1):108-110
- [11] Lawrence K P, Todd C W. Review of genes and linkage groups in cucumber. Hort Science,1990,25(6):610
- [12] 刘书林,顾兴芳,苗晗,王敏,王烨,Wehner T C,张圣平. 成熟黄瓜果皮红色性状的遗传分析及其基因定位. 园艺学报,2014,41(2):259-267
- [13] 李锡香,朱德蔚. 黄瓜种质资源描述规范和数据标准. 北京:中国农业出版社,2005
- [14] Cochran F D. Breeding cucumbers for resistance to downy mildew. Proceedings of the American Society for Horticultural Science,1938,35:541-543
- [15] 张修德,安秀红,李壮,李敏,厉恩茂,程存刚. 苹果叶绿素合成关键酶基因 *MdHEMA1* 生物信息学和表达分析. 植物遗传资源学报,2016,17(2):348-355
- [16] 吴自明,张欣,万建民. 叶绿素生物合成的分子调控. 植物生理学通讯,2008,44(6):1064-1070
- [17] 董绪. 黄瓜嫩果皮白色基因的精细定位及果实硬度的遗传分析. 武汉:华中农业大学,2015
- [18] Zhou Q, Wang S, Hu B, Chen H, Zhang Z, Huang S. An ACCUMULATION AND REPLICATION OF CHLOROPLASTS 5 gene mutation confers light green peel in cucumber. Journal of Integrative Plant Biology, 2015,57(11):936-942
- [19] Lun Y Y, Wang X, Zhang C Z, Yang L, Gao D L, Chen H M, Sanwen Huang S W. A CsYcf54 variant conferring light green coloration in cucumber. Euphytica,2016,208:509-517