

黄瓜核心种质幼苗耐热性评价及 GWAS 分析

魏爽, 张松, 薄凯亮, 王伟平, 苗晗, 董邵云, 顾兴芳, 张圣平
(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 为研究黄瓜苗期耐热性及筛选耐热核心种质材料, 本试验选取 86 份核心种质, 在夏季利用日光温室, 采用开关风口方式控制高温环境 (50 ± 4 °C), 对三叶一心的幼苗进行耐热性处理及鉴定。以幼苗受害症状划分热害等级, 以相应的热害指数为指标进行黄瓜苗期耐热性评价。结合核心种质重测序结果, 进行幼苗耐热性全基因组关联分析。结果表明, 供试黄瓜核心种质耐热性差异显著, 两次调查变异系数分别为 21.9% 和 22.5%。利用热害指数为指标进行聚类分析, 把 86 份黄瓜核心种质划分为四大类群。全基因组关联分析共检测到 7 个与苗期耐热性相关位点 *gHII4.1*、*gHII5.1*、*gHII5.2*、*gHII6.1*、*gHII7.1*、*gHII4.2*、*gHII6.2*。其中位于 4 号染色体的 *gHII4.1* 和 *gHII4.2*, 与幼苗耐热性关联最大, 在此区段预测到 67 个候选基因。

关键词: 黄瓜; 核心种质; 幼苗; 耐热性; GWAS

Evaluation and Genome-wide Association Study (GWAS) of Seedling Thermotolerance in Cucumber Core Germplasm

WEI Shuang, ZHANG Song, BO Kai-liang, WANG Wei-ping, MIAO Han,
Dong Shao-yun, GU Xing-fang, ZHANG Sheng-ping

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: To investigate the cucumber thermotolerance at seedling stage and identify heat-tolerant accessions, this study analyzed 86 cucumber core germplasm at three-mature-leaves seedlings stage under greenhouse conditions (temperature: 50 ± 4 °C). Scoring for heat damage was conducted based on heat injury symptoms, and the heat injury index (HII) was deployed to evaluate the thermotolerance of cucumber at seedling stage. Taking advantage of the whole genome re-sequencing datasets, the genome-wide association study (GWAS) was employed to identify the genetic loci that associated to the thermotolerance. The significant differences in HII were detected among tested materials, while the coefficient of variation under two environmental conditions were 21.9% and 22.5% respectively. By deploying HII, 86 cucumber germplasms were clustered into four groups: heat-resistant, medium heat-resistant, medium heat-sensitive and heat-sensitive group. The preliminary GWAS analysis suggested seven loci, including *gHII4.1*、*gHII5.1*、*gHII5.2*、*gHII6.1*、*gHII7.1*、*gHII4.2* and *gHII6.2*, which were associated to the heat resistance. Among them, two loci *gHII4.1* and *gHII4.2* on chromosome 4, were found to be mostly relevant, and 67 candidate genes within this region were found.

Key words: cucumber; core germplasm; seedling; thermotolerance; GWAS

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 原产于温暖湿润的喜马拉雅山南麓及印度北部地区, 是一种喜温但不耐热作物, 温度超过 35 °C 会导致热害, 出现幼苗徒

长、花打顶、畸形瓜等问题^[1-2]。黄瓜作为一种世界性的主要蔬菜作物, 在全球范围内得到广泛栽培。然而, 随着温室效应的不断加剧, 高温天气对黄瓜的

收稿日期: 2018-12-26 修回日期: 2019-01-15 网络出版日期: 2019-02-01

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181226001>

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种, E-mail: 731252757@qq.com

通信作者: 张圣平, 研究方向为黄瓜遗传育种, E-mail: zhangshengping@caas.cn

顾兴芳, 研究方向为黄瓜遗传育种, E-mail: guxingfang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2018YFD0100702)

Foundation project: National Key R&D Program of China (2018YFD0100702)

生长和产量造成了严重的影响^[3]。黄瓜耐热性研究已成为抗逆育种的重要课题。种质资源是黄瓜新品种选育的物质基础,核心种质代表了大多数种质的变异。因此,对黄瓜核心种质进行耐热性鉴定是筛选不同类型耐高温种质的有效途径,可以为耐热品种选育奠定基础,也可为耐热基因的挖掘与耐热机制的探究提供参考。

目前,许多学者就耐热胁迫温度、处理时期等黄瓜苗期耐热性鉴定条件进行了研究。主要可归纳为3种,分别为田间直接鉴定法、人工模拟气候鉴定法和间接鉴定法^[4]。如李锡香等^[5]在光照培养箱以4叶1心为处理时期,采用8h光照、30℃18h/40℃6h条件胁迫72h,根据幼苗受害症状分级并进行热害指数的计算;杨寅桂等^[6]同样在光照培养箱中培养幼苗至两叶一心,以42℃高温处理24h后,在25℃光照14h、黑暗10h的条件下恢复生长,并根据整株受害情况分别进行了叶片、下胚轴及整株3个角度划分等级,计算热害指数。也有学者以间接鉴定法对黄瓜苗期耐热性进行鉴定评价,以电导率为指标最为广泛^[7-11]。膜保护系统因子如SOD(超氧化物歧化酶)含量变化^[10,12]也可作为耐热性鉴定指标。此外,还有以田间自然高温条件进行鉴定的报道。如徐强等^[13]在幼苗2叶1心时,开始高温胁迫,利用温室进行高温处理,控制温度在(50±2)℃,处理8h,观察子叶真叶和心叶的热害症状,进行热害分级;汪祖程^[14]在幼苗3~4片真叶时期,进行了大棚(38℃)和玻璃温室(42℃)两次处理,进行田间热害指数调查。这3种方法可相互补充,均在黄瓜苗期耐热性鉴定中具有一定的意义,可作为客观的耐热性评价方法。由于SOD(超氧化物歧化酶)含量变化等生理生化指标受胁迫条件影响较大,在操作过程中易引入误差,因而不适用于大量群体的鉴定;此外,人工模拟气候鉴定法也因场地限制,同样无法有效地进行群体耐热性鉴定,因此本研究利用夏季高温环境,控制温室温度达到黄瓜耐热极限温度,从而进行黄瓜群体苗期耐热性研究。另外,黄瓜耐热性的分子生物学研究较少,耐热性全基因组关联分析的研究尚未见报道。

本试验使用的黄瓜核心种质来自世界各地的3342份种质中筛选得到^[15],并已完成了重测序^[16]。以86份黄瓜核心种质为材料,进行苗期耐热性鉴定及耐热性差异评价,结合重测序结果,进行全基因组关联分析,以期对黄瓜耐热性基因挖掘及耐热品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为86份黄瓜核心种质,来源于中国农业科学院蔬菜花卉研究所黄瓜课题组。供试材料的来源信息见表1。

1.2 试验方法

借助夏季高温条件,于2017年6月和7月(June 2017, July 2017)分两批播种,将供试核心种质材料播种在中国农业科学院蔬菜花卉研究所顺义试验基地的温室中,用营养钵育苗,每份材料3次重复,每个重复10粒,随机区组排列。常规管理,按时浇水,光照较强时适当遮光。待幼苗长至3叶1心,关闭温室的风口和进出口,进行高温闷棚。在温室的不同位置均匀放置温湿度记录仪,每隔10min观察温室内温度,通过开关风口的方式控制温度在50±4℃左右,连续处理3~4h后,开风口通风降温(表2),恢复生长3d后观察整株的热害状况,划分热害等级(图1)。参照李锡香等^[5]和杨寅桂等^[4]的方法进行叶片及整株受害情况的调查、分级和热害指数的计算。热害等级分级如下:

0级:无热害症状;1级:真叶部分干枯且干枯面积不足1片,心叶正常,子叶正常,下部茎正常;2级:真叶有1~2片干枯,心叶正常,子叶正常,下部茎正常;3级:真叶有2~3片干枯,心叶干枯,子叶正常,下部茎正常;4级:所有叶片干枯,下部茎正常;5级:整株干枯。按照热害指数计算公式进行热害指数计算:热害指数(HII, high-temperature injury index)=[(0×S0+1×S1+2×S2+3×S3+4×S4+5×S5)/5×N]×100。

S0~S5: 0~5级症状的植株数;N: 总植株数。

1.3 数据处理

使用Microsoft Excel 2010软件进行数据的处理和计算。聚类分析采用SPSS 22.0软件,聚类方法为离差平方和(Ward)法,以欧氏距离平方法进行测量。全基因组关联分析使用emmax软件进行分析,采用混合线性模型(MLM),经过主成分分析(PCA),并绘制曼哈顿图。

2 结果与分析

2.1 苗期耐热性鉴定结果

对2017年6月和7月两批次核心种质幼苗进行耐热性鉴定,处理前后幼苗差异明显,热害指数统计分析结果见表3。两个批次中多数材料重复性较好,表现比较一致。耐热材料如CG10、

表 1 供试核心种质地理来源

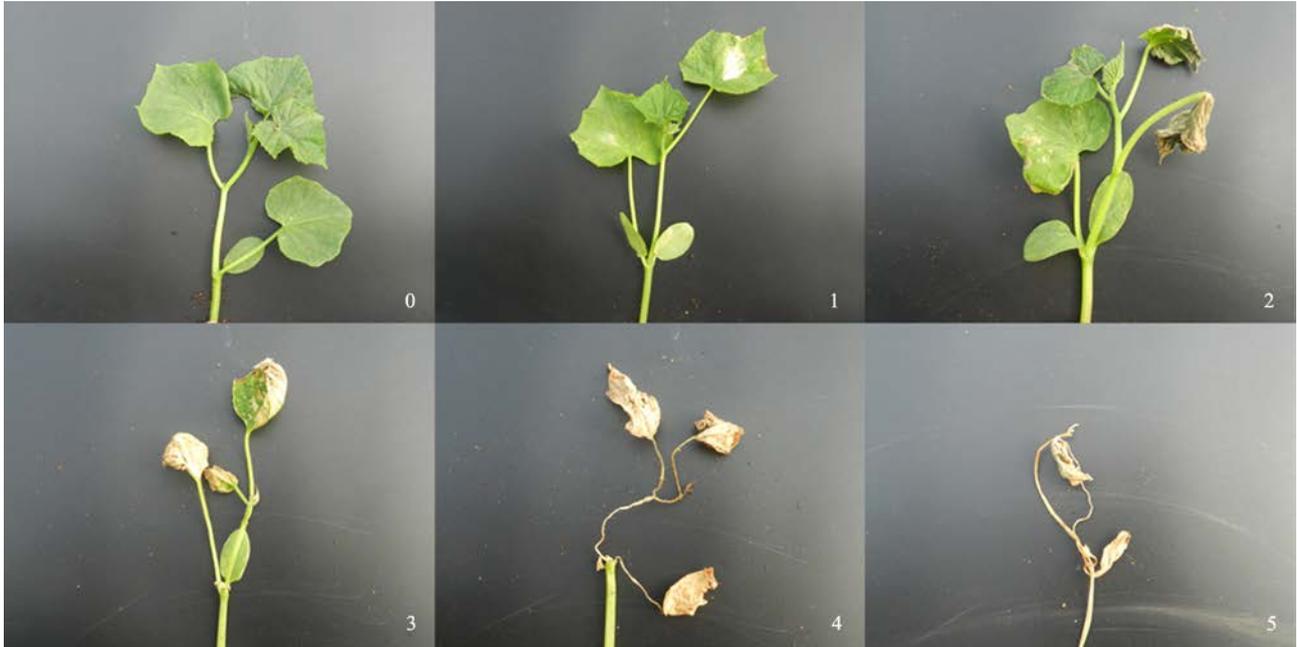
Table 1 Name and geographic origin of tested germplasms

编号 Code	种质名称 Accession name	种质代号 Germplasm code	地理起源 Origin	编号 Code	种质名称 Accession name	种质代号 Germplasm code	地理起源 Origin
CG1	A-C-3	PI 512596	西班牙特鲁埃尔	CG57	Yuanmi	G15	中国
CG2	USM 307	PI 605943	印度拉贾斯坦邦	CG58	You 3 xuan	G16	中国
CG3	Tsuda	PI 504563	日本	CG59	Ji Zao	G17	中国吉林
CG5	M 5	CGN19677	荷兰	CG60	9930	9930	中国
CG6	Klinsky Mestnyj	CGN21670	前苏联	CG61	185	185	日本
CG7	1972 B-2	CGN19579	美国	CG62	Bai Ye San	G6	中国
CG8	National Pickle	CGN21626	美国	CG63	Marketmore76	PI 561148	美国纽约
CG9	Spartan Garden MSU-C7-63	CGN21627	美国	CG64	11621	PI 183967	印度梅加拉亚邦
CG10	Rasht	CGN21616	伊朗	CG69	Yuan Xing Huang Pi Huang Gua	BN21	中国西双版纳
CG11	WJR2930	CGN21692	伊朗	CG70	Bai Chang Yuan Huang Gua	PI 267945	日本大阪
CG12	TGR 580	PI 482412	津巴布韦	CG71	Yuan Bai Huang Gua	BN31	中国西双版纳
CG13	N2/81	CGN21691	刚果	CG72	Bai Pi Yuan Huang Gua	BN32	中国西双版纳
CG14	Inyangu	PI 500361	赞比亚中部	CG77	Ban Na Huang Gua 51	BN51	中国西双版纳
CG15	ZM 1065	PI 500359	赞比亚中部	CG78	Ban Na Huang Gua 53	BN53	中国西双版纳
CG16	Chibimbi	PI 500365	赞比亚铜带	CG84	Yuan Zong Huang Di Huang Gua	BN66	中国西双版纳
CG19	Small Green	PI 504570	印度	CG85	Di Huang Gua	BN68	中国西双版纳
CG21	Poona Kheera	PI 606033	印度中央邦	CG88	VIR 3147	PI 504564	印度
CG23	USM 321	PI 605957	印度拉贾斯坦邦	CG89	CM8537-1-2-1-1-0-1-1-1	II 5A1269	中国吉林
CG25	Xin Tai Mi Ci	G1135	中国	CG90	Qing Pi Ba Cha	II 5A0152	中国吉林
CG26	02245	G1203	中国	CG91	Da Qing7314-2-6-1-1	II 5A0156	中国吉林
CG27	Cus124/71	CGN20243	中国	CG92	Khira	PI 163213	巴基斯坦旁遮普
CG28	Kaga Fushinari	CGN19829	日本	CG94	Liao Yang Ye San	II 5A0614	中国辽宁
CG29	Sagami Hanpaku Fushinari Kyuri	CGN20853	日本	CG95	He Cha Huang Gua	II 5A1008	中国河北
CG30	Aonaga Suyu Kyuri	CGN20854	日本	CG96	Qian Qi Li Huang Gua	II 5A1087	中国河北
CG31	Cgn19828	CGN19828	日本	CG97	Da Ci Huang Gua	II 5A0386	中国四川
CG32	Hok	CGN20266	荷兰	CG98	Fu Song Ye San	II 5A0594	中国吉林
CG33	151G	G12	中国	CG99	Ye San Bai	II 5A0108	中国河北
CG35	752	CGN20512	荷兰	CG101	Jia Huang Gua	QT127	中国山东
CG36	Gy 3 (S4)	CGN20515	波兰	CG102	Jin Yan Er Hao	II 5A0173	中国山东
CG37	Muromskij	CGN23617	俄罗斯联邦	CG103	Qing Dao Qiu Ye Er San	PI 227210	日本
CG39	65G	G5	中国	CG104	Honshu Aibai	PI 267942	日本大阪
CG40	G8	G8	中国	CG105	Sekino No. 2 (Ochiai No.	II 5A1135	中国广东
CG42	NCG042	NCG042	美国	CG106	Qiu Huang Gua	II 5A0061	中国湖南
CG43	SC 53-B (6)	CGN19655	美国	CG107	Leng Lu Huang Gua	II 5A1482	中国重庆
CG44	2163	CGN19924	美国	CG108	71 Hao Huang Gua	II 5A0771	中国山东
CG45	SC 50	CGN20898	美国	CG109	Huang Gua	PI 288995	匈牙利
CG49	JL-14 Dhillon	CGN23002	印度	CG110	Nemet Kigyo	PI 326594	匈牙利
CG50	Ketimun Tjarang/Putih	CGN20890	印度尼西亚	CG112	Ames 1208	PI 338236	土耳其开塞里
CG51	Yellow 1	CGN20517	斯里兰卡	CG113	8181	PI 172923	土耳其马尔丁
CG52	9110Gt	9110Gt	中国	CG114	Puerta-Rico #6	Ames 21698	波多黎各
CG53	09G10	09G10	中国	CG117	Khira	PI 175120	印度
CG54	Ban Na Huang Gua	BN1000	中国西双版纳	CG118	Pradesh Khira	PI 173892	印度北方邦
CG55	Si Chuan Bai Gua	G13	中国四川	CG120	Huang Tie Wu Ci Gua(Da Ci Huang Gua)	II 5A0197	中国山西

表2 供试核心种质处理情况

Table 2 Experimental environment of tested germplasms

处理 Treatment	苗龄 Seedling age	时间 Date	平均温度(°C) Average temperature	地点 Site
June 2017	3叶1心	2017年6月26日	53.3	温室
July 2017	3叶1心	2017年7月30日	46.7	温室



0~5: 热害等级 0~5级 0-5: HII grade 0-5

图1 热害分级标准

Fig.1 Grade scale of thermotolerance

表3 核心种质苗期两次耐热性鉴定热害指数统计分布

Table 3 Distribution and statistics parameters of HII in the seedling stage of germplasm

处理 Treatment	最大评级 Max. score	最小评级 Min. score	平均值 Mean	标准差 SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	变异系数 (%) CV	正态性分布检验(P值) P value
June 2017	65.51587302	25.05291005	41.36167676	9.052716448	0.522	-0.218	21.9	0.163>0.05
July 2017	72.5	22.23544974	42.03124685	9.443051222	0.321	0.680	22.5	0.200>0.05

CG58、CG104、CG112等在极端高温天气下伤害较小,表现为耐高温的特性;而热敏材料如CG11、CG14、CG28、CG39、CG84等较早出现叶片萎蔫、干枯变黄,甚至整株枯死。也有少部分中耐或中感材料在两次处理中表现不稳定,可能与处理条件、天气状况及温室内苗子排布方式等有关。两次调查变异系数分别为21.9%和22.5%。

2.2 核心种质苗期耐热性聚类分析

根据热害指数对86份种质进行聚类分析,聚类方法采用Ward法,以欧氏距离平方法进行测量,生成供试材料的树状图(图2)。

在平方欧氏距离为5时,将86份核心种质分为4类,其中第I类群耐热组包含CG58、CG104

等20份种质,来自中国、日本、印度、美国、土耳其、伊朗等地区;第II类群中耐热组包含CG13、CG109、CG61等48份种质,来源于刚果、印度、匈牙利、日本、中国西双版纳等地区;第III类群较耐热组种质包括CG69、CG70、CG14三份种质,来源于中国西双版纳、日本大阪、赞比亚中部;第IV类群热敏组包括CG15、CG37、CG28、CG11等15份种质,来源于赞比亚中部、俄罗斯联邦、日本、伊朗等地区。

从聚类结果可以看出,印度和中国西双版纳类型种质多为耐热类型,但也有少数为不耐热类型;来源于中国和日本的的核心种质在四大类群中均有分布。

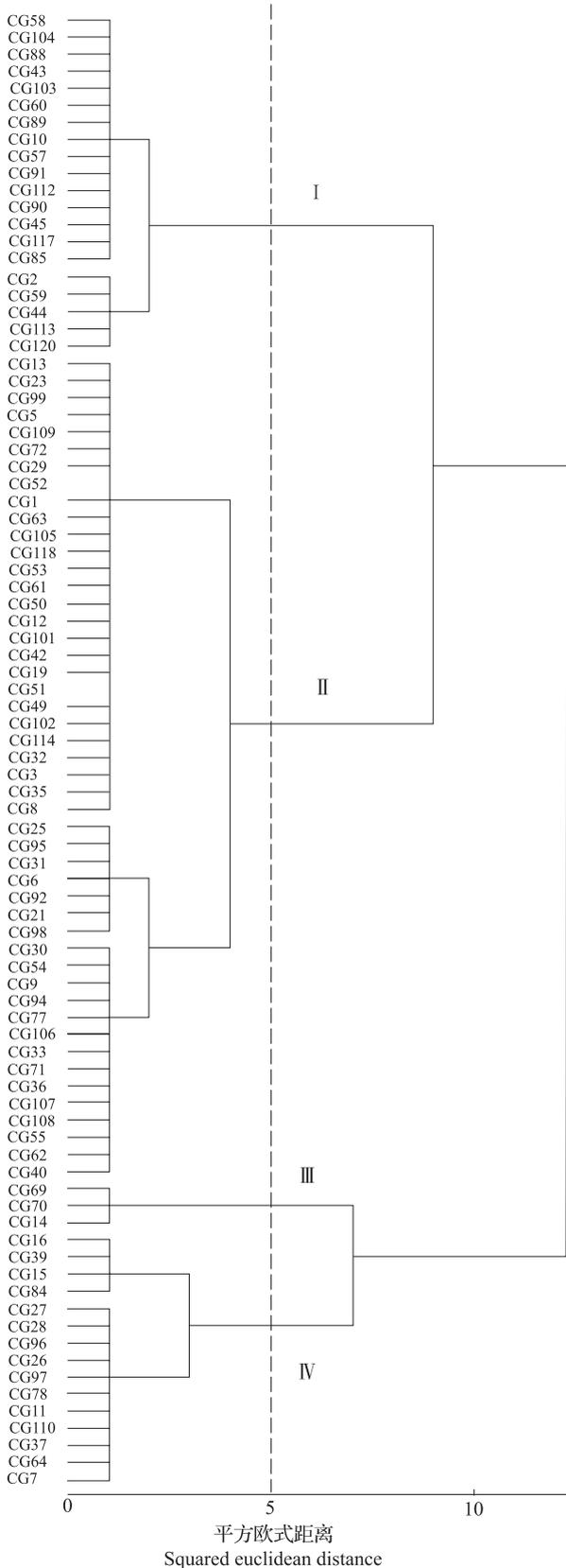


图 2 核心种质以热害指数为指标的
苗期耐热性聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of thermotolerance at seedling stage for germplasm based on HII value

2.3 核心种质苗期与发芽期耐热性相关分析

基于本实验室已有的发芽期耐热性试验结果^[17], 经过发芽期和苗期两个时期耐热处理, 分别得到了 D 值和 HII 值代表发芽期和苗期的耐热性, 通过比较二者之间的相关性(图 3), 发现 D 值和 HII 值之间没有显著相关性 ($R^2 = 0.0144$), 说明发芽期和苗期的耐热性是不同的, 可能由不同基因控制。因此, 发芽期和苗期耐热性应区别对待, 分开评价。

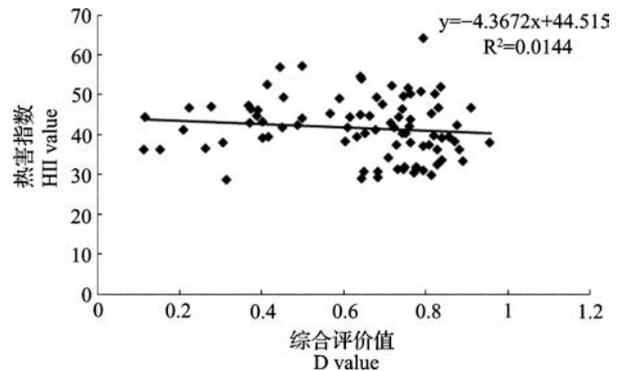


图 3 苗期热害指数与发芽期 D 值相关性分析

Fig.3 Correlation analysis between the HII value and D value

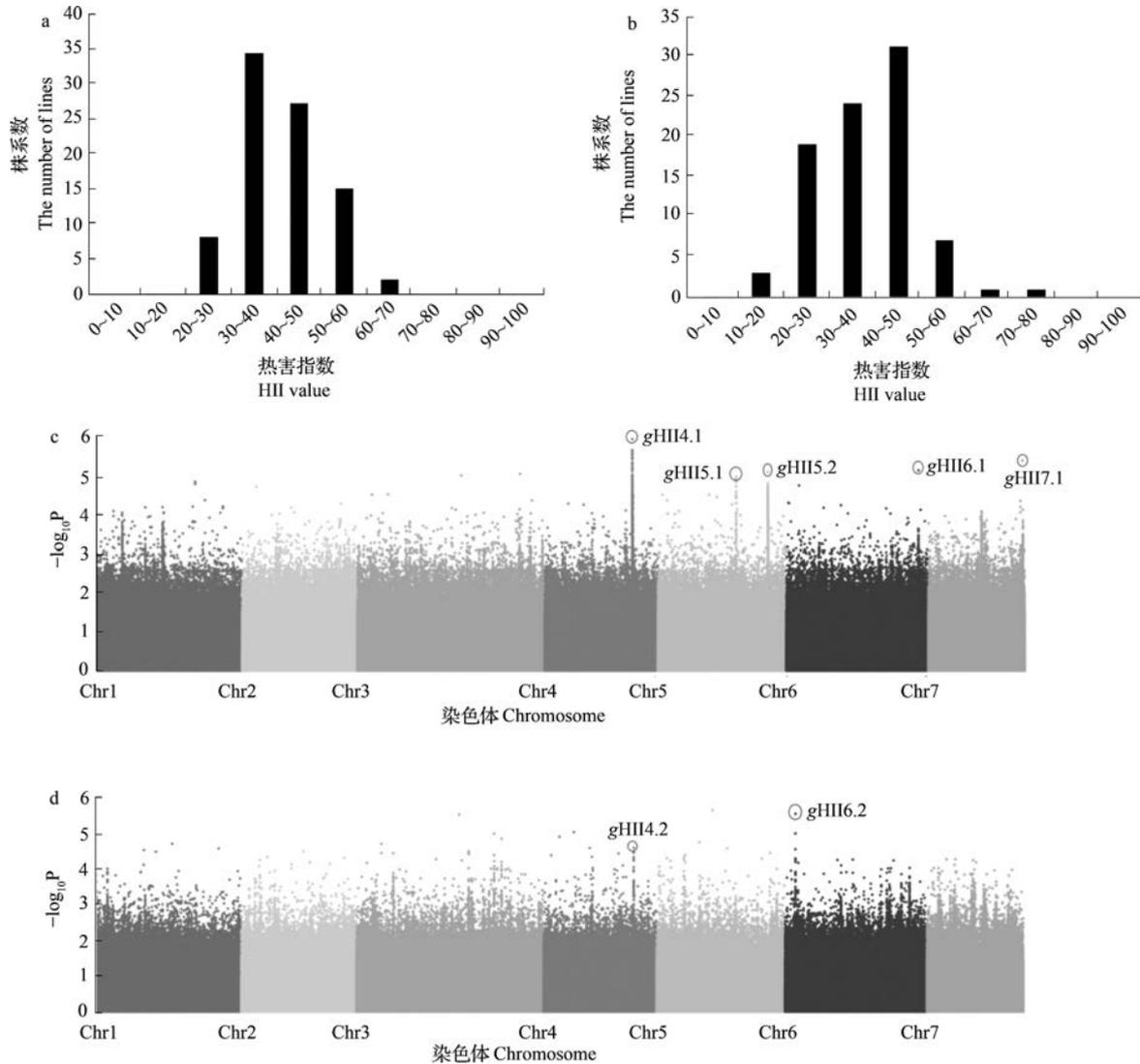
2.4 核心种质苗期耐热性全基因组关联分析

耐热性处理前后幼苗差异明显, 热害指数频数分布如图 4。经正态性分布检验, 两个批次热害指数均呈正态分布(表 3)。两个批次中多数材料表现比较一致, 集中表现为中抗和中感。耐热材料如 CG10、CG58、CG104、CG112 等在极端高温天气下伤害较小, 表现为耐高温的特性; 而热敏材料如 CG11、CG14、CG28、CG39、CG84 等较早出现叶片萎蔫、干枯变黄, 甚至整株枯死。少部分材料在两次处理中表现不稳定, 可能与处理条件、天气状况及温室内苗子排布方式等有关。

对黄瓜核心种质苗期耐热性进行全基因组关联分析, 两次处理检测到的 GWAS 信号位点如图 4, 其中, 在第 1 批次 (June 2017) 中检测到 5 个位点, 分别位于第 4、5、6、7 号染色体; 在第 2 批次 (July 2017) 中检测到 2 个位点, 分别位于第 4、6 号染色体上, 以每个信号区域内 $-\log_{10}P$ 值最高的 SNP 物理位置代表位点区段(表 4)。

2.5 核心种质苗期耐热性全基因组关联位点候选基因分析

在 GWAS 分析检测到的 7 个位点中, *gHII4.1* 与 *gHII4.2* 的 $-\log_{10}P$ 值最高的 SNP 物理位置接近,



a: June 2017 频数分布图; b: July 2017 频数分布图; c: June 2017 曼哈顿图; d: July 2017 曼哈顿图

a: Frequency distribution of June 2017, b: Frequency distribution of July 2017, c: Manhattan plots of June 2017, d: Manhattan plots of July 2017

图 4 核心种质苗期耐热性两次处理频数分布图及 GWAS 曼哈顿图

Fig. 4 Frequency distribution and Manhattan plots of core germplasms at seedling stage in two treatment

表 4 GWAS 检测到的信号位点与 SNP 标记信息

Table 4 Information of GWAS signal sites and corresponding SNP markers

处理 Treatment	GWAS 信号位点 GWAS signal sites	SNP 标记 SNP markers	染色体 Chr.	物理位置 (bp) Physical position	$-\log_{10}P$ 值 $-\log_{10}P$ value
June 2017	<i>gHII4.1</i>	SNP2039108	4	177 946 15	5.94
	<i>gHII5.1</i>	SNP2433739	5	170 123 58	4.96
	<i>gHII5.2</i>	SNP2553907	5	241 933 53	5.09
	<i>gHII6.1</i>	SNP3126674	6	266 055 90	5.14
	<i>gHII7.1</i>	SNP3521714	7	185 625 31	5.39
July 2017	<i>gHII4.2</i>	SNP204857	4	182 442 78	4.58
	<i>gHII6.2</i>	SNP266364	6	200 882 5	5.54

物理距离为 449 kb。结合全基因组测序结果可知, *gHII4.1* 与 *gHII4.2* 物理位置分别为 17794615 bp 及 18244278 bp。对 *gHII4.1* 两侧各 500kb 的区段 (17294615~18294615 bp) 进行候选基因分析, 共包含 67 个候选基因, 其中与耐热相关的基因有 14 个, 为参与植物抗逆反应与激素信号转导的植物抗毒素、硫氧还蛋白、MYB 家族蛋白、F-BOX 家族蛋白、锌指结构蛋白、结瘤素蛋白家族、E3 泛素连接酶、丝氨酸 / 苏氨酸蛋白家族、磷酸 -1- 鞘氨醇蛋白和 RING finger 蛋白。其中与高温胁迫直接相关的基因注释信息有硫氧还蛋白、RING finger 蛋白及 MYB 蛋白家族。

3 讨论

3.1 黄瓜苗期耐热性鉴定及耐热指标研究进展

近年来对黄瓜苗期耐热性鉴定方法和耐热指标筛选的研究较多, 集中在以幼苗受害症状划分等级及生化指标的测定等方面。但忠等^[18]在人工气候下以 42 °C 胁迫 2 h 处理欧洲型黄瓜幼苗, 之后测定相关生理指标, 发现不同欧洲型黄瓜幼苗对高温胁迫反应差异显著, 建立了耐热性评价模型来客观预测和评价欧洲型黄瓜幼苗耐热性; 杨寅桂等^[6]以耐热品种 Poinsett97 和热敏品种 Boothbys Blonde 为试验材料, 同样以 42 °C 的人工模拟高温条件对黄瓜幼苗进行胁迫处理, 依据黄瓜不同部位分别进行症状分级, 并讨论了人工模拟环境与田间处理条件下幼苗受害症状的差异。前人基于黄瓜苗期耐热鉴定指标、耐热种质的筛选及耐热遗传规律等方面讨论较多, 关于耐热基因的研究较少。本试验对苗期黄瓜核心种质进行耐热性鉴定及种质筛选, 在温室中控制温度为 50 °C 左右对幼苗进行短期 (3~4h) 高温胁迫, 核心种质耐热性表现出明显差异。筛选出苗期耐热材料 CG10、CG58、CG104、CG112 等, 对耐热胁迫耐能力较强, 表现为极少叶片叶缘变黄干枯、整株生长健壮的特点。此类材料来源于中国、日本、土耳其、伊朗等地区; 热敏材料 CG11、CG14、CG28、CG39、CG84 等, 较早出现干枯萎蔫及日灼伤害, 严重者整株萎蔫枯死。此类材料来源于日本、赞比亚、伊朗等地区。此外, 结合黄瓜核心种质重测序信息, 进行全基因组关联分析, 在全基因组范围内检测与耐热相关的候选位点, 属于首次进行的黄瓜苗期耐热相关 SNP 位点的挖掘。

3.2 黄瓜核心种质苗期耐热性聚类分析

聚类分析在种质资源评价、分类及遗传多样性

研究上应用广泛, 在多种作物中有大量报道。李慧琴等^[19]对 270 份陆地棉进行农艺性状和品质性状的聚类分析, 将其分为 6 类, 根据不同的农艺性状可加以利用; 崔杰印等^[20]对野生大豆抗旱力进行评价, 将 30 份供试材料分为 5 类, 为干旱地区抗旱大豆的种植提供基础材料; 韩飞等^[21]进行了 63 份谷子种质的耐盐性评价并筛选耐盐碱的谷子品种, 按照耐盐能力分为 4 组, 并得到 5 份耐盐谷子种质; 在耐高温鉴定中, 有学者以大豆发生差异的主要农艺性状转化的综合指数 C 值进行聚类分析, 筛选出 2 份高温敏感品种和 2 份耐高温品种^[22]; 姜建福等^[23]以叶绿素荧光参数法对葡萄属种质进行耐热评价, 将其分为 3 种类型, 筛选出 48 份耐热的葡萄种质。本试验聚类分析结果表明, 在平方欧氏距离为 5 时, 核心种质群体被分为耐热种质组、中等耐热种质组及不耐热种质组。比较各组种质来源信息及生态类型, 发现印度和中国西双版纳类型种质多为耐热类型, 但也有少数为不耐热类型, 如不耐热分组合来源于中国西双版纳的 CG70、CG78 和 CG84; 来源于中国和日本的核心种质在四大类群中均有分布, 可能与中国和日本地区均包含华南型与华北型种质相关。如来源于中国吉林的黄瓜种质, 多聚类于耐热及中等耐热种质组; 来源于日本的黄瓜种质, 多属于中等耐热类型。孟令波^[7]认为华南型黄瓜比华北型黄瓜更耐热, 但本研究结果表明, 耐热组及中等耐热组有相当数量的种质 (10 份) 来自华北类型, 而杨寅桂等^[24]发现北京截头耐热性较强而二早子耐热性较弱, 支持本研究结论; 另外, 还有一些材料并没有按理想的生态类型及来源信息归类为一组, 这都说明黄瓜种质资源在长期演化及引种交流过程中出现基因渗透, 耐热基因的分布变得更加随机。因此, 在进行黄瓜耐热性研究及苗期耐热性材料选配时, 要注意其材料类型及来源信息。

3.3 黄瓜核心种质苗期耐热性全基因组关联分析

全基因组关联分析 (GWAS, Genome-Wide Association Study) 以基因组中数量巨大的 SNP 作为遗传标记进行分型, 结合性状变异信息, 进行全基因组水平的关联分析, 从而检验 SNP 标记与表型之间的联系^[25-26]。随着高通量测序技术的发展, 全基因组关联分析 (GWAS) 越来越多地运用到植物中, 目前就有学者在甘蓝型油菜籽粒着生密度等性状的研究中进行了 GWAS 分析, 检测到 10 个相关 SNP 位点, 并筛选了相应的候选基因^[27]。在黄瓜定位研究中的应用也越来越普及, 鲁宏伟^[28]用 GWAS 进

行白粉病抗性基因挖掘,检测到3个位点,且其中2个与前人研究结果吻合;张松^[17]对黄瓜核心种质芽期耐热性进行全基因组关联分析,检测到2个与发芽期耐热相关的候选区域。本研究对黄瓜苗期耐热性相关基因进行挖掘,在两次处理中共检测到7个位点,其中位于4号染色体17794615 bp的 *gHII4.1* 及18244278 bp的 *gHII4.2* 这两个 SNP 位点相距较近,是较为可信的候选区域。对 *gHII4.1* 两侧各500 kb的区段(17294615~18294615 bp)进行候选基因分析,共包含67个候选基因,其中有14个参与黄瓜逆境抗病过程,有3个基因与耐热相关,分别是硫氧还蛋白、RING finger 蛋白及 MYB 蛋白家族。黄瓜耐热性遗传机制复杂,苗期耐热是一个复杂的数量性状,相较前人的研究结果^[29-30],我们在全基因组范围内检测到7个与苗期耐热性相关的 SNP 位点,且位于4号染色体的位点较为可信,可在今后的工作中结合 QTL 定位结果,继续挖掘候选基因。

3.4 存在问题及展望

罗少波等^[31]表明以电导率测定为代表的生理生化指标同人工模拟气候鉴定及田间自然鉴定方法有一定的相关性,均可作为鉴定作物耐热性强弱的相对可靠的方法。黄瓜生产中保护地栽培及夏季露地栽培易遭受高温条件,因而利用夏季自然高温条件对黄瓜核心种质进行耐热鉴定及种质筛选具有一定的实际应用价值。由于田间高温环境难以持续较长时间,故本研究采用黄瓜幼苗耐受极限高温(50℃左右)进行耐热性鉴定,相较需维持较长时间的亚高温(38~45℃)的处理条件,极限高温(50℃)环境更容易实现,且能较好地体现各种质材料的耐热差异。本试验由于在田间进行鉴定的环境较为复杂,可能导致病菌侵害、生物性病害的发生,因而已在调查热害症状时对引起干扰的单株剔除,能够从一定程度上排除非试验因素的干扰。此外,由于两次处理湿度、温度等环境条件难以控制,因此两次处理进行的 GWAS 分析结果重复性较差,较难检测到重复性好的位点。本试验供试材料能够代表大多数黄瓜遗传变异信息,包含了黄瓜主要生态类型,因而结果更为客观,可为今后耐热性亲本选配及耐热基因挖掘提供科学参考。

参考文献

- [1] Malepszy S. Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1988, 6: 277-293
- [2] 吴攀建,袁波,陈清华,黄艳芳,黄坚勇. 黄瓜耐热性研究进展. *中国瓜菜*, 2015, 28(1): 5-9, 22
- [3] Lobell D B, Schlenker W, Costa-Roberts J. Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 2011, 333: 616-620
- [4] 杨寅桂,李为观,娄群峰,陈劲枫. 黄瓜耐热性研究进展. *中国瓜菜*, 2007(5): 30-34
Yang Y G, Li W G, Lou Q F, Chen J F. Advances in the research of high temperature injury and heat tolerance in cucumbers. *China Cucurbits and Vegetables*, 2007(5): 30-34
- [5] 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: 78-79
Li X X, Zhu D W. Descriptors and data standard for cucumber. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 78-79
- [6] 杨寅桂,李为观,娄群峰,陈劲枫. 黄瓜苗期热害症状及其发生发展规律研究. *中国瓜菜*, 2007(5): 1-3
Yang Y G, Li W G, Lou Q F, Chen J F. Occurrence and development of heat injure symptom in cucumber at seedling stage. *China Cucurbits and Vegetables*, 2007(5): 1-3
- [7] 孟令波. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)耐高温种质资源筛选及耐高温特性的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002
Meng L B. Studies on high temperature tolerance character and selection of temperature tolerance germplasm in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Harbin: Northeast Agricultural University, 2002
- [8] 林毓娥,于远,黄河勋,梁肇均,周向阳,王瑞,程志学. 黄瓜耐热种质筛选试验. *广东农业科学*, 2009(1): 39-41
Lin Y E, Yu Y, Huang H X, Liang Z J, Zhou X Y, Wang R, Cheng Z X. Selection of heat tolerant germplasm in cucumber. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2009(1): 39-41
- [9] 李为观,杨寅桂,魏跃,孟佳丽,陈劲枫. 热胁迫下黄瓜幼苗生理生化指标变化及 *CSSHSP₇₀* 基因表达. *南京农业大学学报*, 2010, 33(3): 47-50
Li W G, Yang Y G, Wei Y, Meng J L, Chen J F. Expression of *CSSHSP₇₀* gene changes of some physiological characters in cucumber seedlings during heat stress. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(3): 47-50
- [10] 孟焕文,张彦峰,程智慧,苏菁,崔洪文. 黄瓜幼苗对热胁迫的生理反应及耐热鉴定指标筛选. *西北农业学报*, 2000(1): 96-99
Meng H W, Zhang Y F, Cheng Z H, Su J, Cui H W. The physiological reaction to hot stress and screening of hot tolerance index in cucumber. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2000(1): 96-99
- [11] 余炳伟,董日月,雷建军,陈长明,周火燕,曹必好. 黄瓜耐热材料的筛选与鉴定. *分子植物育种*, 2017, 15(11): 4695-4705
Yu B W, Dong R Y, Lei J J, Chen C M, Zhou H Y, Cao B H. Screening and identification of heat resistance cucumber. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(11): 4695-4705
- [12] 马德华,庞金安,李淑菊,霍振荣. 温度逆境锻炼对高温下黄瓜幼苗生理的影响. *园艺学报*, 1998(4): 39-44
Ma D H, Pang J A, Li S J, Huo Z R. Effects on temperature stress exercise on the physiology of cucumber seedlings under high temperature. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998(4): 39-44
- [13] 徐强,庄影,卢俊成,齐晓花,陈学好. 黄瓜苗期耐热性状的

- 遗传效应研究. 分子植物育种, 2017, 15(12): 5128-5133
- Xu Q, Zhuang Y, Lu J C, Qi X H, Chen X H. Genetic effect study on heat tolerance in cucumber seedlings. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(12): 5128-5133
- [14] 汪祖程. 黄瓜耐热耐渍性指标鉴定及抗性材料筛选的研究. 武汉: 华中农业大学, 2008
- Wang Z C. Studys on method for identification of heat and waterlogging tolerance of cucumber and selection of tolerance germplasm. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008
- [15] Lv J, Qi J J, Shi Q X, Shen D, Zhang S P, Shao G J, Li H, Sun Z Y, Weng Y Q, Shang Y, Gu X F, Li X X, Zhu X G, Zhang J Z, Treuren R V, Dooijeweert W V, Zhang Z H, Huang S W. Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *PLoS One*, 2012, 7: 1-9
- [16] Qi J J, Liu X, Shen D, Miao H, Xie B Y, Li X X, Zeng P, Wang S H, Shang Y, Gu X F, Du Y C, Li Y, Lin T, Yuan J H, Yang X Y, Chen J F, Chen H M, Xiong X Y, Huang X, Fei Z J, Mao L Y, Tian L, Stadler T, Renner S S, Kamoun S, Lucas W J, Zhang Z H, Huang S W. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature Genetics*, 2013, 45: 1510-1515
- [17] 张松. 黄瓜发芽期和幼苗期耐热性遗传定位研究. 北京: 中国农业科学院, 2017
- Zhang S. Genetic mapping of thermotolerance for cucumber in germination period and seedling stage. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017
- [18] 但忠, 木万福, 龙洪进, 苏银玲, 杨长楷, 杨龙, 麻继仙, 李易蓉. 不同欧洲型黄瓜苗期耐热性综合评价. 热带作物学报, 2016, 37(12): 2312-2318
- Dan Z, Mu W F, Long H J, Su Y L, Yang C K, Yang L, Ma J X, Li Y R. Comprehensive evaluation on heat tolerance of different Europe-type cucumber germplasm at seeding stage. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2016, 37(12): 2312-2318
- [19] 李慧琴, 于娅, 王鹏, 刘记, 胡伟, 鲁丽丽, 秦文强. 270 份陆地棉种质资源农艺性状与品质性状的遗传多样性. 植物遗传资源报, 2019, 20(4): 903-910
- Li H Q, Yu Y, Wang P, Liu J, Hu W, Lu L L, Qin W Q. Genetic diversity analysis of the main agronomic and fiber quality characteristics in 270 upland cotton germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(4): 903-910
- [20] 崔杰印, 武婷婷, 宋雯雯, 贾鸿昌, 吴纪安, 韩天富. 黑龙江中上游地区早熟野生大豆种质资源的抗旱性鉴定. 植物遗传资源学报, 2018, 19(6): 1073-1082
- Cui J Y, Wu T T, Song W W, Jia H C, Wu J A, Han T F. Drought tolerance evaluation of the early-maturing annual wild soybeans from the upper and middle reaches of Heilongjiang river. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(6): 1073-1082
- [21] 韩飞, 诸葛玉平, 娄燕宏, 王会, 张乃丹, 何伟, 晁赢. 63 份谷子种质的耐盐综合评价及耐盐品种筛选. 植物遗传资源学报, 2018, 19(4): 685-693
- Han F, Zhuge Y P, Lou Y H, Wang H, Zhang N D, He W, Chao Y. Evaluation of salt tolerance and screening for salt tolerant accessions of 63 foxtail millet germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(4): 685-693
- [22] 汪明华, 李佳佳, 陆少奇, 邵文韬, 程安东, 张文明, 王晓波, 邱丽娟. 大豆品种耐高温特性的评价方法及耐高温种质筛选与鉴定. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 891-902
- Wang M H, Li J J, Lu S Q, Shao W T, Cheng A D, Zhang W M, Wang X B, Qiu L J. Construction of evaluation standard for tolerance to high-temperature and screening of heat-tolerant germplasm resources in Soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(4): 891-902
- [23] 姜建福, 马寅峰, 樊秀彩, 张颖, 孙海生, 王利军, 刘崇怀. 196 份葡萄属 (*Vitis* L.) 种质资源耐热性评价. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 70-79
- Jiang J F, Ma Y F, Fan X C, Zhang Y, Sun H S, Wang L J, Liu C H. Evaluation of 196 *Vitis* L. germplasm resources to heat tolerance. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(1): 70-79
- [24] 杨寅桂, 李为观, 娄群峰, 陈劲枫. 黄瓜耐热材料筛选. 中国瓜菜, 2008(1): 1-3.
- Yang Y G, Li W G, Lou Q F, Chen J F. Selection of heat tolerant germplasm in cucumber. *China Cucurbits and Vegetables*, 2008(1): 1-3
- [25] Pearson T A, Manolio T A. How to interpret a genome-wide association study. *The Journal of American Medical Association*, 2008, 299(11): 1335
- [26] Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 2012, 34(4): 567-580
- [27] 任义英, 崔翠, 王倩, 徐新福, 林呐, 殷家明, 唐章林, 李加纳, 周清元. 甘蓝型油菜籽粒着生密度及其相关性状全基因组关联分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 314-325
- Ren Y Y, Cui C, Wang Q, Xu X F, Lin N, Yin J M, Tang Z L, Li J N, Zhou Q Y. Genome-wide association analysis of seed density within per silique and its related traits in *Brassica napus* L. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(2): 314-325
- [28] 鲁宏伟. 黄瓜白粉病抗性基因挖掘. 北京: 中国农业科学院, 2015
- Lu H W. Minging of the resistance gene for powdery mildew in cucumber. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015
- [29] 庄影. 黄瓜耐热性遗传及 QTL 初步定位. 扬州: 扬州大学, 2014
- Zhuang Y. Genetic analysis and preliminary QTL mapping of heat tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Yangzhou: Yangzhou University, 2014
- [30] 杨迪菲. 黄瓜耐热性 QTL 定位的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006
- Yang D F. Mapping quantitative traits loci for the heat tolerance in cucumber. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006
- [31] 罗少波, 周微波, 罗剑宁, 龚浩, 飞驒健一, 藤野雅丈, 森下昌三. 黄瓜品种耐热性强度鉴定方法比较. 广东农业科学, 1997(6): 23-24
- Luo S B, Zhou W B, Luo J N, Gong H, Feituo J Y, Tengye Y Z, Senxia C S. Comparison of identification methods for heat-tolerance intensity of cucumber varieties. *Guangdong Agricultural Sciences*, 1997(6): 23-24