

基于 CAPS 标记的甜瓜种子 相关性状 QTL 分析

叶伟震^{1,2}, 刘 识^{1,2}, 马鸿艳^{1,2}, 刘宏宇^{1,2}, 李桂英^{1,2}, 栾非时^{1,2}

(1. 东北农业大学 农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学 园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:以种子相关性状差异显著的甜瓜品系 MR-1 和 M1-15 为试材, 构建 BC₁P₁ 回交群体, 利用 2 个亲本材料全基因组重测序数据发掘 SNP 位点并将其转化为 CAPS 标记, 构建遗传连锁图谱并对种子相关性状进行 QTL 分析。结果表明: 获得了一张包含 197 个 CAPS 标记、12 个连锁群的甜瓜遗传连锁图谱。检测到与种子相关性状紧密连锁的 QTL 位点 6 个, 分布在 1、2、5、8 号染色体上, 可解释 9.86%~13.52% 的表型变异率, 贡献率 >10% 的 QTL 位点 5 个。

关键词:甜瓜; 种子性状; SNP; CAPS; 遗传连锁图谱; QTL

中图分类号:S 652.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0119-10

甜瓜(*Cucumis melo* L. 2n=24)属葫芦科甜瓜属一年生蔓性草本植物, 是典型的种子植物。种子是种子植物的繁殖体系, 对延续物种起着重要作用^[1], 种子大小与营养物质的储存以及种子的萌发具有密切联系^[2]。因此, 研究及定位控制甜瓜种子相关性状的基因, 对甜瓜遗传育种及其种子相关生物学研究具有重要意义。

在葫芦科作物中(如南瓜、西瓜、黄瓜)关于种子相关性状基因定位的研究已有较多报道。毛晓微^[3]以印度南瓜自交系 SQ026 和 Rimu 为亲本, 杂交获得由 186 个单株组成的 F₂ 群体, 利用该群体对印度南瓜粒长、粒宽进行 QTL 分析, 检测出 3 个控制粒长的主效 QTL, 分别位于第 1、3 和 10 号连锁群上, 检测到 3 个同粒宽性状相关联的 QTL, 分别位于第 3、5 和 10 号连锁群上, 命名为 *qWms1*、*qWms2*、*qWms3*, 可解释表型变异为 5.78%、9.58% 及 8.23%。陈璐璐等^[4]以黄瓜长种子自交系 D06157 和短种子自交系 D0603 为亲本, 构建 F₂ 群体, 采用 SSR 标记, 共获得 6 个与黄瓜种子长度相关的 QTL,

其中 QTL5 和 QTL6 距离最近标记的图距分别为 2.1、4.3 cM, 可解释遗传变异分别为 6.07%、6.08%, 加性效应值分别为 39.12%、37.21%。同时指出黄瓜种子长度属于数量性状, 以显性效应为主, 存在加性效应, 广义遗传力及狭义遗传力较低, 分别为 28.7% 与 10.8%。周慧文等^[5]利用西瓜野生品种 PI 186490 和西瓜普通栽培种 LSW-177 杂交的 F₂ 代群体定位到与西瓜种子长度、宽度、厚度、百粒质量和种形指数相关的 23 个 QTL 位点, 分别位于 7 个不同的连锁群上, LOD 值为 2.52~36.08, 可解释 2.014%~28.895% 的表型变异率, 贡献率 >15% 的 QTL 位点 4 个, 其中定位最近距离 0.45 cM。在种腔宽度的定位方面, 孙洪涛等^[6]以杂交组合 D0435-3-1×D07171 构建 F₂ 群体, 对黄瓜果实横径进行 QTL 分析, 利用 SSR 标记在 CSWCT25 - CSWCT29 - CSWTA03 连锁群上检测到 1 个与黄瓜果实横径相关的 QTL, 距离标记 CSWTA03 较近, 为 1.98 cM, 对应的 LOD 值为 3.22, 可解释 7.19% 的遗传变异。苗晗等^[7]利用华北保护地类型黄瓜材料 9930 和欧洲温室类型黄瓜材料 9110Gt 构建的 F₂ 代重组自交系分别在 1、5、6 号连锁群上检测到 1 个与种腔大小相关 QTL 位点, LOD 值为 3.53~42.21, 可解释 8.4%~73.1% 的表型变异率, 目前利用 CAPS 分子标记对甜瓜种子相关性状的基因定位研究尚鲜见报道。

第一作者简介:叶伟震(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为西甜瓜分子遗传育种。E-mail: 714859401@qq.com

责任作者:栾非时(1964-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为西甜瓜分子遗传育种。

收稿日期:2017-02-03

基于 SNP 的 CAPS 分子标记已经被广泛应用于作物遗传育种及重要性状相关基因的精细定位研究中。LING 等^[8]利用 CAPS 标记(*caps-2*)判断西瓜 F_2 和 BC_1P_1 群体对小西葫芦黄花叶病毒的易感程度。KIM 等^[9]利用大豆简易基因组序列构建了一张紧密连锁的关于大豆抗蚜虫基因的遗传连锁图谱,并在 2 个 SNP 标记 *Satt435* 和 *ss107918249* 之间的特定区段检测到 SNP 位点,用于基因定位分析。

该研究以甜瓜品系 MR-1^[10] 和 M1-15^[11] 为试验材料,配制 BC_1P_1 群体。利用 2 个亲本材料的全基因组重测序数据开发 CAPS 分子标记,并构建甜瓜遗传连锁图谱,对甜瓜种子相关性状进行 QTL 分析,以期从分子角度探究甜瓜种子性状的遗传规律,为培育甜瓜优良品种及分子辅助育种提供参考依据,为控制甜瓜种子性状相关基因的挖掘与克隆奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试甜瓜双亲材料(MR-1 及 M1-15)均由东北农业大学园艺学院西甜瓜分子育种团队提供,其中 MR-1 为厚皮甜瓜栽培品系,种子为宽长型(长度均值为 (10.63 ± 0.54) mm,宽度均值为 (4.57 ± 0.24) mm),百粒质量平均值为 (2.39 ± 0.03) g;M1-15 为薄皮甜瓜栽培品系,种子为短窄型(长度均值为 (6.35 ± 0.22) mm,宽度均值为 (3.59 ± 0.21) mm),百粒质量平均值为 (1.00 ± 0.05) g。该研究以 MR-1 为母本、 F_1 为父本进行回交,获得 BC_1P_1 ,收获 BC_1P_1 群体内各单株的成熟种子,调查种子相关性状。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验设计 田间试验于 2015 年 2—11 月分别在东北农业大学园艺实验站和向阳农场进行。2015 年 2—6 月,在园艺实验站播种父母本及 F_1 代种子, F_1 与母本回交,严格套袋授粉,收获 BC_1P_1 种子,晒干后,2015 年 6 月直接在向阳农场播种 BC_1P_1 250 株并依次编号,株行距 $35\text{ cm} \times 50\text{ cm}$,小区面积 40 cm^2 。进行统一田间管理,双蔓整枝,将主蔓第二雌花作为结实花,进行授粉,授粉后 30 d 收获成熟甜瓜,最终收获 199 份种子,统一风干后,进行数据调查及遗传分析。

1.2.2 甜瓜基因组 DNA 提取 采集供试材料生长点附近嫩叶用于基因组 DNA 提取,父母本及 F_1 代,各 10 株分别混合取样,回交群体每株单独编号并取样。采用改良的 CTAB 法提取植物基因组 DNA,具

体参考张晓祥等^[13]的方法,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳及超微量紫外分光光度计 SMA3000 检验 DNA 的纯度和质量。亲本及 F_1 代植株 DNA 用于 CAPS 标记的多态性筛选,回交群体单株 DNA 用于群体基因分型及遗传连锁分析。

1.2.3 分子标记开发与多态性引物筛选 2 个亲本材料的基因组重测序数据,按严格标准过滤掉测序质量低及包含有测序接头读段(Raw reads)。下载已经公布的甜瓜参考基因组数据(<https://www.melonomics.net>),使用 BWA 软件过滤后的高质量读段(Clean reads)比对回帖到参考基因组,利用 SAMTOOLS 和 VCFTOOLS 软件在基因组范围内寻找 2 个亲本之间 SNP 位点,采用东北农业大学西甜瓜分子育种研究室自编的 Perl 语言脚本提取位于 SNP 位点前后约 1 000 bp 的片段序列作为候选 SNP 位点序列。根据 7 种限制性内切酶(*EcoRI*、*HindIII*、*PstI*、*BamHI*、*XbaI*、*HinfI*、*XhoI*)酶切位点信息,结合 SNP2CAPS 软件对序列进行分析,在候选 SNP 序列中筛选存在 CAPS 突变的位点,在酶切位点上下游 100 bp 以外范围内设计引物。在甜瓜全基因组的 12 条染色体上平均选取 250 个存在 CAPS 位点的序列,利用 Primer 6 软件进行引物设计,退火温度 $55 \sim 60\text{ }^\circ\text{C}$,GC% 在 $40\% \sim 60\%$,引物长度为 $19 \sim 25\text{ bp}$ 。利用亲本材料及 F_1 代 DNA 样品对已开发的 CAPS 标记进行多态性筛选,筛选流程主要分为 PCR 扩增、酶切反应及琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增体系: $2\text{ }\mu\text{L}$ 模板 DNA, $2\text{ }\mu\text{L}$ 引物(上下游各 $1\text{ }\mu\text{L}$), $0.1\text{ }\mu\text{L}$ *Taq* 酶, $0.15\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs, $1\text{ }\mu\text{L}$ *Taq* 酶缓冲液, $6.75\text{ }\mu\text{L}$ 超纯水。采用降落式 PCR (Touchdown PCR)。扩增程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 7 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s, 30 个循环,每个循环降 $0.5\text{ }^\circ\text{C}$; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min, $45\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 终止延伸 7 min。酶切体系为: $1\text{ }\mu\text{L}$ 限制性内切酶缓冲液, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 限制性内切酶 ($10\text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, THERMO), $9\text{ }\mu\text{L}$ 超纯水, PCR 扩增产物 $5\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。记录电泳条带结果。

1.3 项目测定

调查父母本及 BC_1P_1 群体中每个单株的甜瓜种子相关性状(种子长度、宽度、种腔宽度及百粒质量)。种子长度及宽度采用电子游标卡尺进行测量,每次重复测量 10 粒,取平均值作为结果;百粒质量用分析天平测量每 100 粒种子的质量,随机取样,3 次重复,取平均值作为结果;种腔宽度则采用直尺进

行测量。甜瓜种子农艺性状描述及测量标准参照马双武等^[12]编写的《甜瓜种质资源描述规范和数据标准》。

种子长度(mm):种子喙部边缘到尾部边缘之间的最大距离;种子宽度(mm):种面弓种子纵轴垂直方向两边缘之间的最大距离;种子百粒质量(g):100粒种子的群体质量;种腔宽度(cm):果实宽度减去两侧的果实厚度。

1.4 数据分析

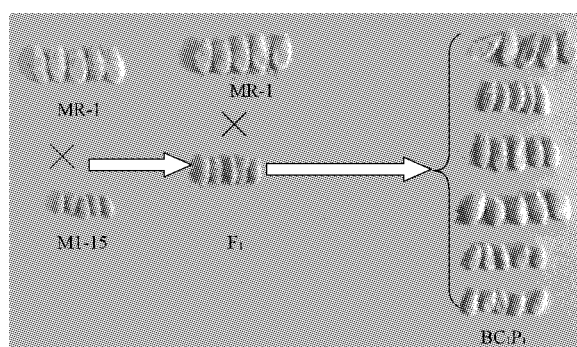
1.4.1 田间数据统计分析 使用 Microsoft Excel 2003 软件进行田间数据统计,利用 SPSS 19 统计软件对种子相关性状的表型数据进行统计分析,分析内容包括均值、标准差、频次分布以及相关分析。

1.4.2 遗传图谱构建及 QTL 数据分析 选择在 2 个亲本及 F_1 代材料中具有共显性多态性且表现稳定的 CAPS 分子标记对 BC_1P_1 群体内各单株进行基因分型。根据 1% 琼脂糖凝胶电泳图像条带结果,用“a”“b”分别表示母本和父本的带型,用“h”表示杂合带型,用“-”表示数据缺失。利用 Joinmap 4.0 软件对基因分型数据进行遗传图谱构建。QTL 分析使用 WinQTL Cart 2.5 (Windows QTL Cartographer V2.5) 软件,通过 1 000 次重复置换测验,估算基因组范围内 $\alpha=0.05$ 水平上的 LOD 阈值。以 $LOD>3.0$ 为可检测 QTL 位点存在的阈值。采用复合区间作图法,以 1.0 cM 步行速度在全基因组内进行扫描。QTL 命名方式为性状英文缩写+连锁群号+QTL 编号。

2 结果与分析

2.1 种子相关性状表型分析

从表 1 和图 1、2 可以看出,2 个亲本 MR-1 和 M1-15 种子性状差异明显,母本 MR-1 种子长度、种子宽度、种腔宽度和百粒质量均明显大于父本 M1-15。 F_1 代各性状均介于父本和母本之间。在 199 个 BC_1P_1 代分离群体中种子长度、宽度、种腔宽度和百粒质量均值介于双亲之间,存在超亲分离现象,变异幅度较大。各个性状的峰度和偏度均小于 1, BC_1P_1 代群体中各个性状均符合正态分布(图 2),为数量性状,可进一步进行 QTL 分析。各性状的相关性分析结果表明,除种子宽度与种子百粒质量是显著相关外,其余各种子性状之间均存在极显著相关性(表 2)。



注: BC_1P_1 每行 5 粒种子代表 1 个株系。

Note: The seed of each row in BC_1P_1 represents one lines.

图 1 亲本、 F_1 及 BC_1P_1 种子的分离情况

Fig. 1 Seed of the parents, F_1 and BC_1P_1 generation

表 1

亲本、 F_1 及 BC_1P_1 群体的表型性状

Table 1

Segregation of seed traits among the parental materials, F_1 and BC_1P_1 population

性状 Trait	MR-1	M1-15	F_1	平均值 Mean	标准差 SD	方差 Variance	BC_1P_1 峰度 Kurtosis	偏度 Skewness	置信度(95.0%) Confidence level(95.0%)
种腔宽度 Width of seed cavity/cm	7.90±0.66	4.25±0.71	6.36±0.79	6.43	1.11	1.22	0.48	0.85	0.16
种子长度 Seed length/mm	10.63±0.54	6.35±0.22	7.39±0.58	8.13	0.72	0.52	0.32	-0.21	0.11
种子宽度 Seed width/mm	4.57±0.24	3.59±0.21	3.76±0.31	3.88	0.31	0.10	0.02	0.41	0.05
百粒质量 100 seed weight/g	2.39±0.03	1.00±0.05	1.54±0.05	1.47	4.61	21.25	-0.32	0.23	0.70

表 2

种子性状的相关性分析

Table 2

Correlation analysis of the seed traits

性状 Trait	种子百粒质量 100 seed weight	种子长度 Seed length	种子宽度 Seed width	种腔宽度 Width of seed cavity
种子百粒质量 100 seed weight	1.000			
种子长度 Seed length	0.419 **	1.000		
种子宽度 Seed width	0.171 *	0.470 **	1.000	
种腔宽度 Width of seed cavity	0.309 **	0.469 **	0.260 **	1.000

注: ** 表示 $P<0.01$ 为极显著, * 表示 $P<0.05$ 为显著。

Note: ** mean $P<0.01$, * mean $P<0.05$.

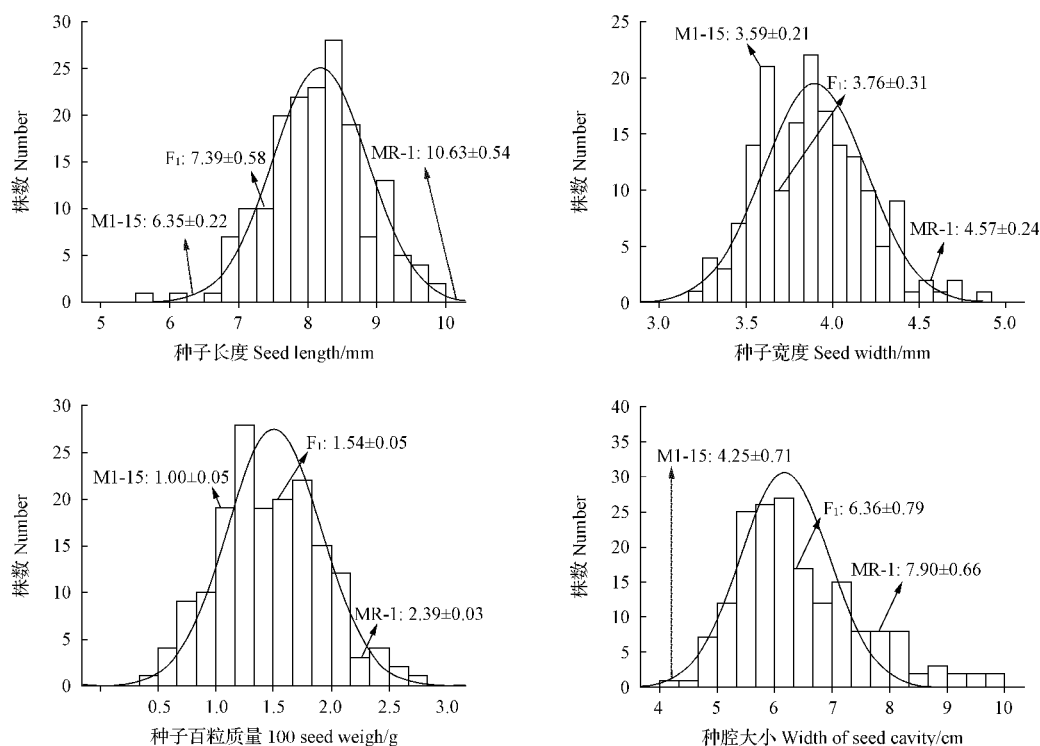


图2 种子相关性状频次分布直方图

Fig. 2 Distribution map of seed related traits

2.2 SNP位点的分布特征

对2个亲本MR-1和M1-15进行全基因组重测序后,获得的高质量读段数量为75 773 463和75 599 046。分别有69 361 903(约为总数的91.5%)及69 990 399(约为总数的92.3%)比对到参考基因组上,约覆盖参考基因组的80.1%和81.2%,平均测序深度为 $19\times$ 和 $20\times$ 。经序列对比,在1~12号染色体上共检测出2 664 816个SNP位点。SNP位点在各染色体的分布密度情况如表3及图3所示。甜瓜亲本材料SNP位点的密度范围为 $4\,059\sim 10\,244$ 个 $\cdot (10^3\text{kb})^{-1}$ 。其中,10号染色体SNP位点最少(102 940个),1号染色体SNP位点最多(362 461个)。

SNP的类型分析如表4所示,碱基的颠换、转换数量分别为844 185、1 819 186。其中碱基颠换数量最多为AT→TA(260 364;30.8%),数量最少为CG→GC(138 012;16.3%)。转换为CT→TC(909 516;50.0%),AG→GA(909 670;50.0%)。

表3 SNP位点在各染色体中的平均分布

Table 3 Average SNP density on each chromosome

染色体 Chromosome	基因位点 Loci/(个 $\cdot (10^3\text{kb})^{-1}$)	总数 Total/(个 $\cdot (10^3\text{kb})^{-1}$)
1	10 244	362 461
2	8 996	235 643
3	6 668	195 957
4	7 036	233 063
5	7 781	220 498
6	8 366	300 667
7	6 786	181 696
8	6 038	196 322
9	8 783	211 725
10	4 059	102 940
11	7 627	239 813
12	6 968	183 948
总计 Total	—	2 664 816

表4 SNP类型分析

Table 4 Analysis of the candidate SNP types

类型 Type	数量 Amount	比率 Ratio/%	总数 Total
颠换 Transversions	AT→TA	30.8	844 185
	AC→CA	26.5	
	TG→GT	26.3	
	CG→GC	16.3	
转换 Transitions	CT→TC	50.0	1 819 186
	AG→GA	50.0	

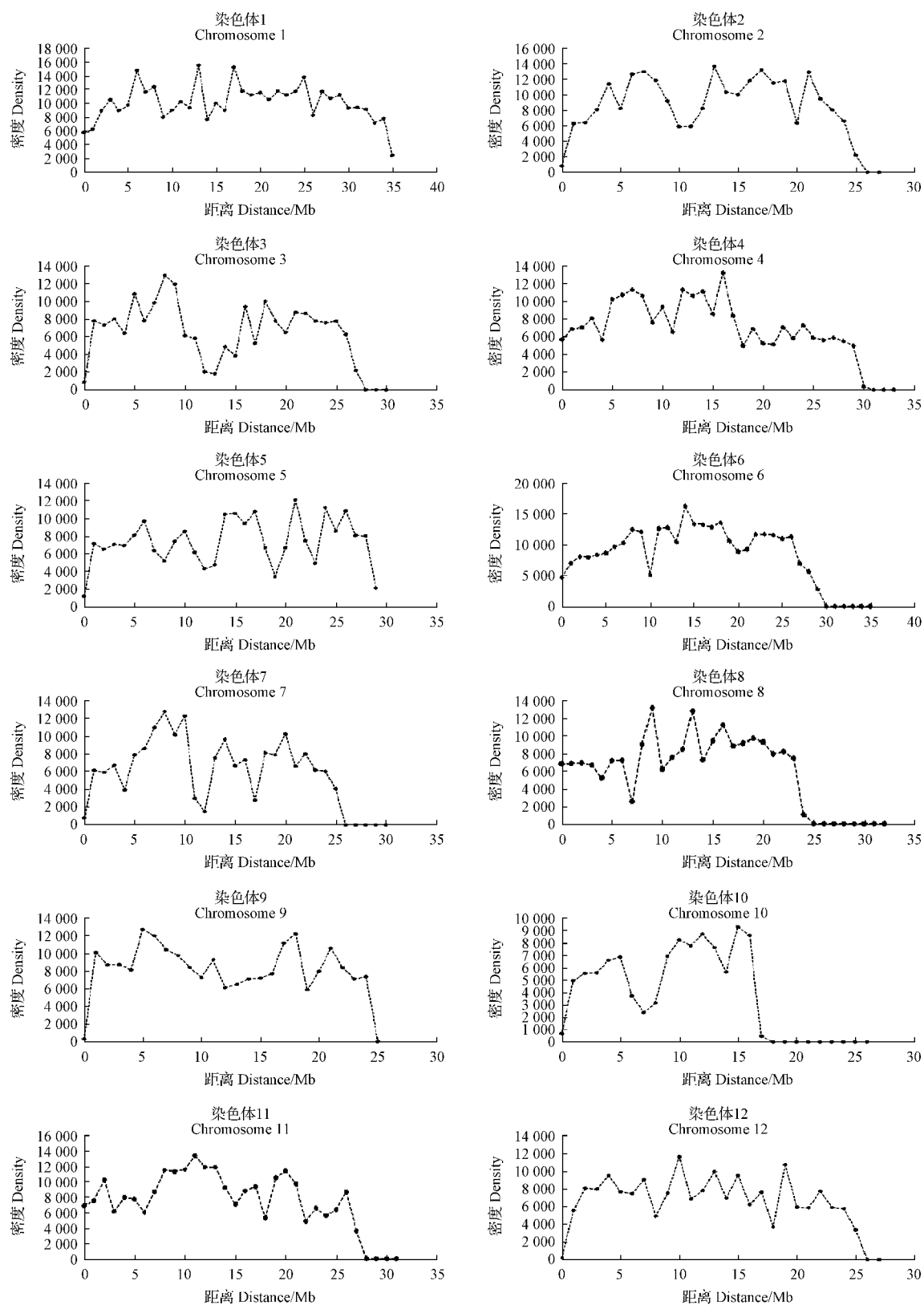


图3 SNP位点在各染色体中的分布密度

Fig. 3 The density of SNPs on each chromosome

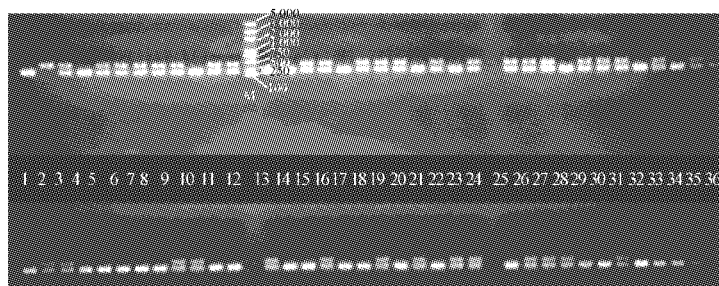
2.3 CAPS 分子标记的筛选和遗传连锁图谱的构建

该试验共设计了 600 对 CAPS 引物,通过筛选获得具有多态性引物 240 对,多态率 40%。利用 240 对多态性引物对 BC₁P₁ 群体内各单株进行基因分型(图 4 为标记 M9-13 的基因分型情况),构建遗传连锁图谱。利用 Joinmap 4.0 软件构建了拥有 197 对分子标记(有 43 对由于在图谱构建中未能和其它标记拼接在一起或者与大部分标记的遗传距离较远而删除)的甜瓜遗传连锁图谱。如表 5、图 5 所示,遗传图谱共包含 12 个连锁群(分别对应甜瓜的 12 对染色体),覆盖基因组长度 2 231.09 cM。

表 5 CAPS 标记在遗传连锁图谱中的分布

Table 5 Distribution of CAPS markers in genetic linkage map

染色体 Chromosome	标记数目 No. of markers	长度 Genetic distance of linkage groups/cM	标记间平均距离 Average distance of linkage groups/cM
1	15	139.16	9.27
2	17	326.50	19.20
3	16	318.39	19.89
4	19	178.88	9.41
5	17	120.49	7.08
6	20	166.72	8.34
7	14	299.32	21.38
8	19	143.88	7.57
9	15	119.60	7.97
10	11	166.51	15.13
11	15	131.75	8.78
12	19	119.89	6.31
总计 Total	197	2 231.09	11.32



注: M: Marker, Marker 为 D 2 000 plus, 前 3 个泳道分别为母本、父本和 F₁。

Note: Lane M was DL 2 000 plus DNA Marker, Lane 1 to 3 were the results of enzyme digestion reaction for M1-15, MR-1 and F₁ generation.

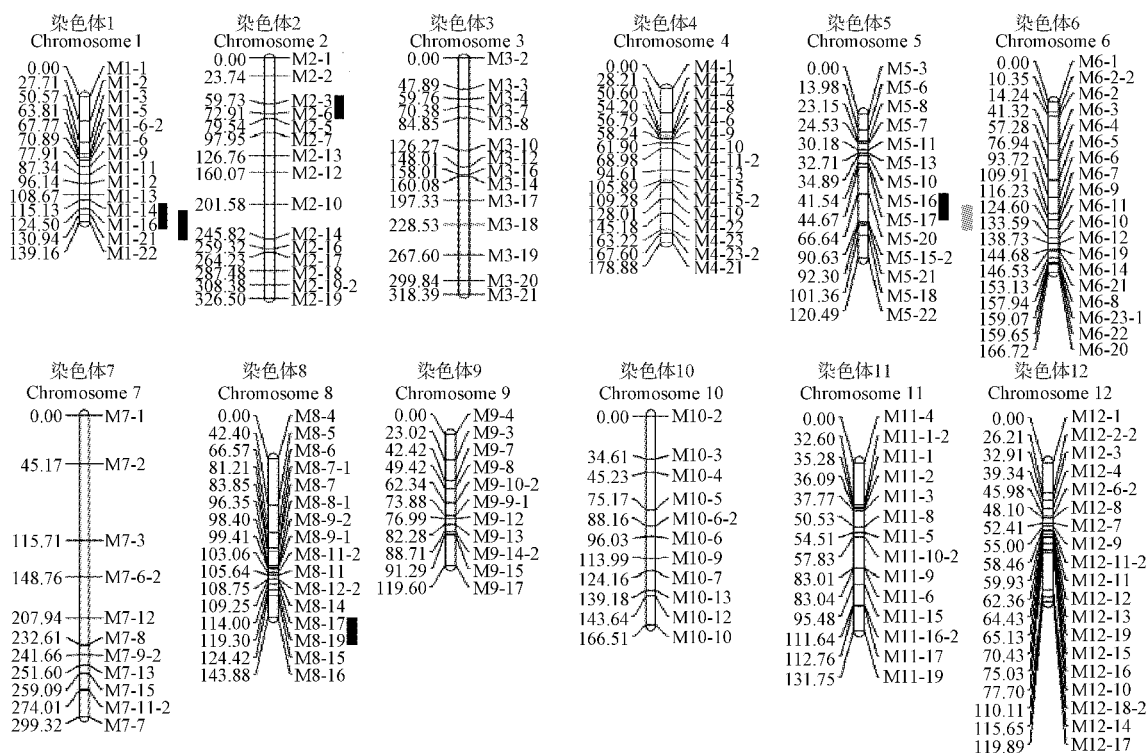
图 4 CAPS 标记 M9-13 在 BC₁P₁ 群体各单株中的基因分型情况Fig. 4 Genotyping results in the different plants of BC₁P₁ generation with CAPS markers M9-13

图 5 甜瓜遗传连锁图谱及 QTL 分析

Fig. 5 Genetic linkage map and QTL analysis in melon

对各染色体 CAPS 标记间物理图谱与遗传图谱进行共线性分析后(图 6)可以看出,甜瓜 12 条连锁群上各标记物理距离与连锁距离均有较高的共线性,但不同染色体中标记的物理距离与遗传距离的共线性也存在差异,其中第 1、2、3、4、9 号染色体的物理图谱和遗传图谱共线性关系均较高, R^2 值在 0.90 以上,表明这几条染色体的 CAPS 标记与参考基因组测序数据有很高的一致性。第 5、6、10 号染色体的共线性关系 R^2 值均在 0.80 左右。7、8、11、12 号染色体中物理距离与遗传距离在线性分析中 R^2 值较低,在 0.69 左右,共线性关系相对较低,原因可能是这些染色体上的 CAPS 标记较远、分布不均,或是物理图谱组装不完整,需要开发更多的基于重测序

数据的 CAPS 标记对遗传图谱进行补充。

2.4 种子相关性状 QTL 分析

采用复合区间作图法结合遗传连锁图谱及回交群体各单株的田间表型数据,对 BC_1P_1 群体的种子长度、宽度、百粒质量及种腔宽度进行 QTL 分析,结果如表 5 所示,共获得 6 个 QTL 位点,分布于 1、2、5、8 号染色体上,其中 1 号和 5 号各包含 2 个 QTL 位点。定位结果在不同性状 QTL 存在成簇分布的现象,1 号染色体 M1-14 和 M1-16 2 个标记之间同时存在分别和种子长度及种子百粒质量相关的 2 个 QTL 位点(SL1.1 和 TGW1.2);与种子宽度、种子长度相关的 2 个 QTL 位点 SD5.1 和 SL5.1 均位于 5 号染色体上,在标记 M5-16 与 M5-17 之间。

表 5 甜瓜种子性状相关 QTL 及其效应分析

Table 5 QTLs and genetic effects analysis related seed traits in melon

性状 Trait	位点 QTL	染色体 Chromosome	位置 Position	相邻标记 Adjacent markers	定位距离 Location distance/cM	LOD 值 LOD score	贡献率 R^2 / %	加性效应 Additive
种子宽度 Seed width	SD5.1	5	84.31	M5-16、M5-17	1.12	5.38	11.12	0.21
种子长度 Seed length	SL1.1	1	123.31	M1-14、M1-16	1.19	6.89	13.52	0.56
种子百粒质量 100 seed weight	SL5.1	5	84.31	M5-16、M5-17	1.12	5.14	9.86	0.47
种子百粒质量 100 seed weight	TGW1.2	1	122.11	M1-14、M1-16	2.39	4.36	10.65	3.24
种腔宽度 Width of seed cavity	SCD2.1	2	68.71	M2-3、M2-6	4.20	3.58	10.63	0.92
种腔宽度 Width of seed cavity	SCD8.1	8	223.51	M8-17、M8-19	2.59	5.19	11.13	0.75

2.4.1 种子长度 QTL 分析 共获得 2 个与种子长度紧密连锁的 QTL 位点(SL1.1 及 SL5.1),分别位于 1 号和 5 号染色体上,其加性效应值分别为 0.56 和 0.47,对种子长度均表现为增效加性效应。其中 SL1.1 位于 1 号染色体的 M1-14 和 M1-16 2 个标记之间,距两侧标记最近的遗传距离为 1.19 cM,可解释表型变异为 13.52%,为主效 QTL 位点;SL5.1 位于 5 号染色体的 M5-16 和 M5-17 2 个标记之间,与两端标记的最近遗传距离为 1.12 cM,可解释表型变异为 9.86%。

2.4.2 种子宽度 QTL 分析 在种子宽度方面,只标记到一个 QTL 位点 SD5.1,加性效应为 0.21,表现为增效加性效应,且 LOD 值在 5.0 以上。该位点位于 5 号染色体上的 M5-16 和 M5-17 2 个标记之间,与两侧翼标记的最近遗传距离为 1.12 cM,可解释表型变异为 11.12%。

2.4.3 种子百粒质量 QTL 分析 对于种子百粒质量的定位,只标记到一个 QTL 位点 TGW1.2,加性效应为 3.24,对种子百粒质量表现为增加效应,LOD 值为 4.36。该位点位于 1 号染色体上的 M1-14 和 M1-16 2 个标记之间,距离两端标记的最近遗传距离

为 2.39 cM,可解释表型变异为 10.65%。

2.4.4 种腔宽度 QTL 分析 种腔宽度共获得 2 个 QTL 位点 SCD2.1 和 SCD8.1,其加性效应分别为 0.92 和 0.75,均表现为增效加性效应,LOD 值分别为 3.58 和 5.19。位于 2 号染色体标记 M2-3 和 M2-6 以及 8 号染色体标记 M8-17 和 M8-19 之间,其中 SCD2.1 距离侧翼标记的最近遗传距离为 4.20 cM,可解释表型变异为 10.63%;SCD8.1 距离侧翼标记的最近距离为 2.59 cM,可解释表型变异为 11.13%。

3 讨论

3.1 SNP 位点挖掘及 CAPS 标记转化

该研究中共设计了 600 对 CAPS 引物,经引物筛选后共获得多态性 CAPS 标记 240 对,多态率达 40%,证明了利用基因重测序结果来推断 CAPS 标记多态性的可行性与易用性。在前人的研究中,基于重测序结果挖掘 CAPS 标记已在水稻、大豆、西瓜等多种作物育种中得到应用,多态率从 39.5%到 56.83%不等^[14-16]。POOTAKHAM 等^[17]报道了基于高通量测序技术的橡胶树 SNP 位点在 27 个 SNP 标记中,有 10 个标记在 28 份材料中检测出多态性。束永俊等^[18]基于大豆重测序数据共设计 139 个

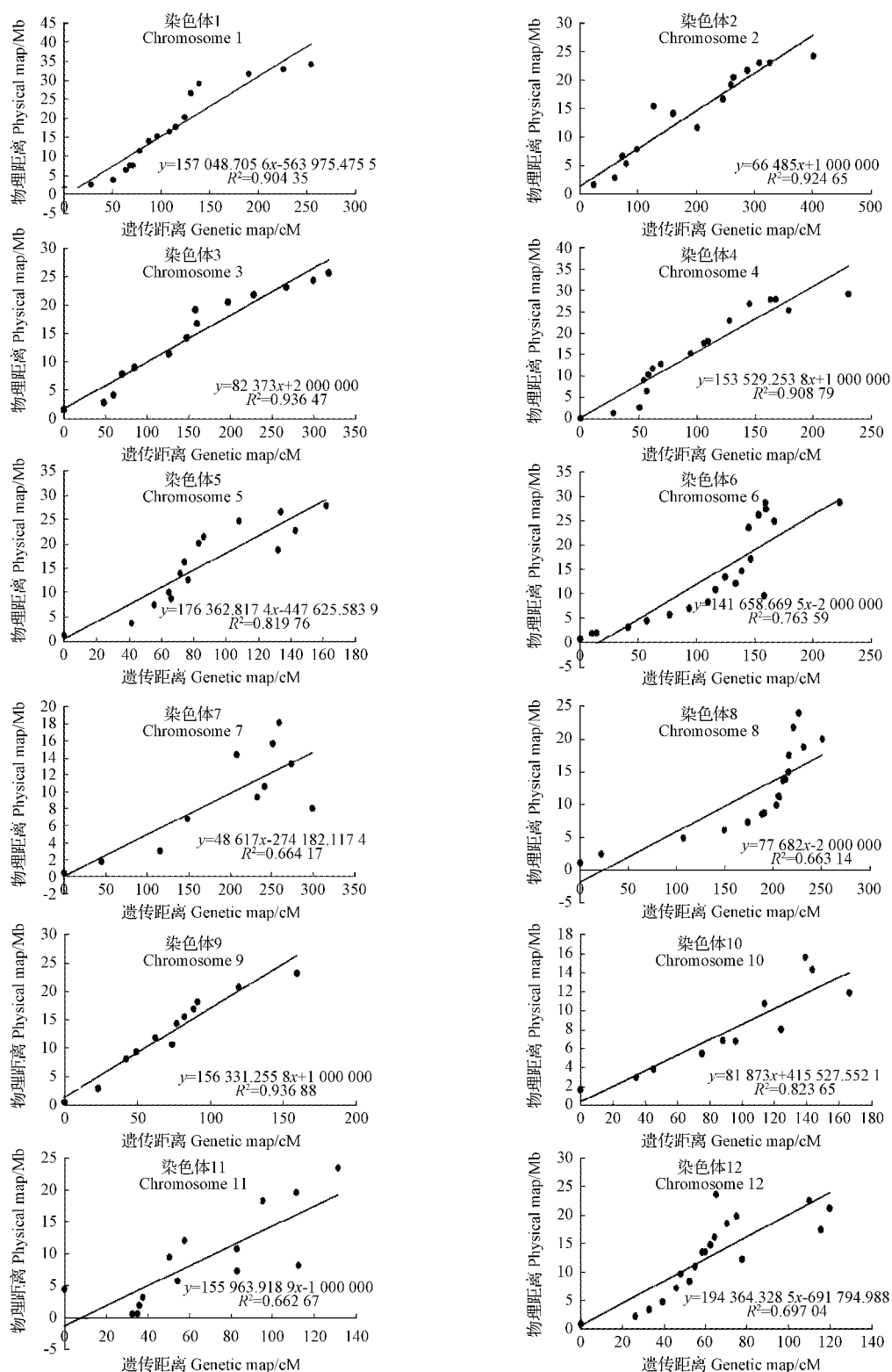


图6 甜瓜各染色体物理距离与遗传距离的共线性分析

Fig. 6 Colinearity analysis between the genetic map and physical map in different chromosomes of melon

CAPS 标记,其中 79 对引物具有酶切多态性,多态率为 56.83%。由于 CAPS 标记可以通过简单的 PCR、酶切以及琼脂糖电泳即可完成,将 SNP 标记转化为 CAPS 标记可提升 SNP 标记在甜瓜分子遗传育种中的应用范围。明确 SNP 位点的分布情况,可以更加高效精确的进行遗传图谱构建及基因精细定位。

3.2 基于亲本基因组重测序分子标记的开发及遗传图谱的构建

近年来利用重测序结果开发 CAPS 标记的技术虽然已经在大多数作物育种中得到广泛应用^[19-21],但是基于 CAPS 标记构建遗传连锁图谱的数量还非常有限,尤其是在甜瓜分子遗传育种方面。DIAZ 等^[22]首次建立了一张整合的甜瓜高密度图谱,图谱总长度为 1 150 cM,共 12 个连锁群,其中包括 1 592 个标记(640 个 SSR、330 个 SNP、252 个 AFLP、239 个 RFLP、89 个 RAPD、15 个 IMA、16 个 indels 和 11 个形态标记),标记间平均遗传距离为 0.72 cM,这是甜瓜第一张整合高密度遗传图谱。该研究是基于 CAPS 标记开发利用 199 个 BC₁P₁ 群体构建的遗传连锁图谱,利用重测序结果开发的 197 个 CAPS 标记平均分布在甜瓜的 12 条染色体上,连锁图谱上的标记可直接反映出标记的物理位置,更便于与基因组物理图谱进行比对。

遗传连锁图谱是否能准确标记所覆盖基因组长度是影响甜瓜重要性状基因挖掘及定位的重要因素,物理距离与遗传距离共线性分析是遗传图谱构建的重要参考点。该研究还对遗传连锁图谱进行了连锁图谱与物理图谱的共线性分析。大部分染色体的物理距离和遗传距离表现出较高的共线性,这也为今后相关基因的精细定位及挖掘提供了重要参数。

3.3 甜瓜种子相关性状 QTL 分析

该研究对甜瓜 BC₁P₁ 群体的种子长度、宽度、百粒质量及种腔宽度等 4 个性状开展了 QTL 分析,共获得 6 个 QTL 位点,贡献率从 9.86%到 13.52%,对 4 个性状均具有增效效应。在前人的研究中王贤磊等^[23]利用遗传性状差异较大的甜瓜材料杂交所得的 F₂ 代为作图群体,构建了以 AFLP 与 SSR 分子标记为主的甜瓜遗传图谱,并将甜瓜种子长度、宽度、形状与质量等性状进行了遗传定位与分析,在 C5 连锁群上检测到 3 个与种子大小相关的 QTL 位点,但是其构建的连锁群并非与染色体一一对应,因此与该研究定位到的 5 号染色体上的相关位点并不能直接进行比较,另一方面也说明该研究的定位结果较明确,定位到染色体的具体位置上,为后期研究提供了重

要的参考依据。

在甜瓜种腔宽度与果实宽度方面,张雪娇等^[24]以厚皮甜瓜和薄皮甜瓜为亲本获得 124 个重组自交系群体,利用 150 对 SSR 引物构建了包含 17 个连锁群的遗传连锁图谱,对甜瓜果实的相关性状进行了定位,共检测到 15 个 QTL,分别分布在第 1、4、5、6、8、10、13、14、15、17 连锁群上,其中 13 个 QTL 和果实形状有关,6 个贡献率超过 10%,位于第 14 连锁群的 QTL 是 F₁/14.1,贡献率最大为 16.66%,由于该研究应用的是早期的分子标记技术,因此与该研究相应位置的比较,还需要进一步验证。

该研究利用自行开发的 197 对 CAPS 标记,构建甜瓜连锁图谱,获得了与种子长度、种子宽度、种子百粒质量和种腔宽度性状紧密连锁的 QTL 位点。在今后研究中,有必要在构建饱和遗传图谱的基础上,对控制种子大小性状的相关基因或主效 QTL 开展精细定位,从而为开展种子性状相关基因的精细定位与克隆奠定基础,也为种子性状分子标记辅助育种提供理论依据。

参考文献

- [1] 徐恒恒,黎妮,刘树君,等.种子萌发及其调控的研究进展[J].作物学报,2014,40(7):1141-1156.
- [2] 武高林,杜国祯.植物种子大小与幼苗生长策略研究进展[J].应用生态学报,2008,19(1):191-197.
- [3] 毛晓微.印度南瓜主要园艺性状的 QTL 定位[D].邯郸:河北工程大学,2016.
- [4] 陈璐璐,秦智伟,周秀艳,等.黄瓜种子长度的遗传分析及分子标记[J].中国农学通报,2012,28(16):165-170.
- [5] 周慧文,卢丙洋,马鸿艳,等.西瓜种子大小形状相关 QTL 分析[J].园艺学报,2016,43(4):715-723.
- [6] 孙洪涛,秦智伟,周秀艳,等.黄瓜果实横径的遗传分析及分子标记[J].中国农学通报,2010,26(20):38-42.
- [7] 苗晗,顾兴芳,张圣平,等.黄瓜果实相关性状 QTL 定位分析[J].中国农业科学,2011,44(24):5031-5040.
- [8] LING K S, HARRISK R, MEYER A, et al. Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon *eIF4E* gene are closely associated with resistance to zucchini yellow mosaic virus[J]. Theor Appl Genet, 2009, 120:191-200.
- [9] KIM K S, BELLENDIR S, HUDSON K A, et al. Fine mapping the soybean aphid resistance gene *Rag1* in soybean[J]. Theor Appl Genet, 2010, 120:1063-1071.
- [10] 艾子凌.甜瓜遗传图谱的构建及白粉病抗病基因的初步定位[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [11] 宋燕妮,杜黎黎,王学征,等.甜瓜突变体库的构建及 M2 群体表型变异的研究[J].植物遗传资源学报,2015,16(6):1338-1344.
- [12] 马双武,刘君璞.甜瓜种质资源描述规范和数据标准[M].北京:中国农业出版社,2005:83.
- [13] 张晓祥,王玲,寿路路.一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法[J].中国农学通报,2012,28(36):46-49.
- [14] GANAL M W, ALTMANN T, RÖDER M W. SNP identification

in crop plants[J]. Plant Biol, 2009(12): 211-217.

[15] HENRY R J. Plant genotyping II: SNP technology[J]. Wallingford in Watermelon, 2008, 186: 329-342.

[16] KOLE C, ABBOTT A G. Principles and practices of plant genomics[J]. Principles & Practices of Plant Genomics, 2010(1): 131.

[17] POOTAKHAM W, CHANPRASERT N, JOMCHAI D, et al. Single nucleotide polymorphism marker development in the rubber tree [J]. Hevea Brasiliensis (Euphorbiaceae), 2011, 98: e337-e338.

[18] 束永俊, 李勇, 吴娜拉胡, 等. 大豆 EST-SNP 的挖掘、鉴定及其 CAPS 标记的开发[J]. 作物学报, 2010, 36(4): 574-579.

[19] BACHLAVA E, TAYLOR C A, TANG S, et al. SNP discovery and development of a highdensity genotyping array for sunflower[J]. PLoS ONE, 2012(7): e29814.

[20] GUJARIA N, KUMAR A, DAUTHAL P, et al. Development and

use of genic molecular markers (GMMs) for construction of a transcript map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122: 1577-1589.

[21] LIU B, WANG Y, ZHAI W, et al. Development of indel markers for Brassica rapa based on whole-genome re-sequencing[J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 231-239.

[22] DIAZ A, FERGANY M, FORMISANO G, et al. A consensus linkage map for molecular markers and Quantitative Trait Loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Bmc Plant Biology, 2010, 11(2): 121-136.

[23] 王贤磊, 高兴旺, 李冠, 等. 甜瓜遗传图谱的构建及果实与种子的 QTL 分析[J]. 遗传, 2011, 33(12): 1398-1408.

[24] 张雪娇, 高鹏, 栾非时. 甜瓜果实相关性状 QTL 分析[J]. 中国蔬菜, 2013(18): 35-41.

QTL Analysis on Related Seed Traits in Melon Based on CAPS Markers

YE Weizhen^{1,2}, LIU Shi^{1,2}, MA Hongyan^{1,2}, LIU Hongyu^{1,2}, LI Guiying^{1,2}, LUAN Feishi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops(Northeast Region) Ministry of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Two melon inbred lines MR-1 and M1-15 with a significant difference in the seed traits were used as materials, to make a cross for BC₁P₁ genetic population. The SNP loci was developed and converted into CAPS markers based on the whole genome re-sequencing data of the two parental materials to construct genetic linkage map and QTL analysis of seed related traits. The results showed that a genetic linkage map containing 197 CAPS markers was obtained with 12 linkage groups and 6 QTLs for the seed related traits were detected and distribution in chromosome 1, 2, 5 and 8. The value range of phenotypic variation was from 9.86% to 13.52% and the value of five QTLs were more than 10%.

Keywords: melon; seed traits; SNP; CAPS; genetic linkage map; QTL

欢迎订阅 2017 年《北方园艺》

全国自然科学(中文)核心期刊

中国农业核心期刊

中国北方优秀期刊

2015、2016 年期刊数字影响力 100 强

美国化学文摘社(CAS)收录期刊

全国优秀农业期刊

黑龙江省优秀科技期刊

黑龙江省农家书屋推荐目录

本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生, 各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。邮发代号: 14-150; 半月刊, 每月 15、30 日出版; 单价: 15.00 元, 全年: 360.00 元。

地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

电话: 0451-86674276

信箱: bfybjb@163.com

邮编: 150086

网址: www.haasep.cn