

利用 QTL-seq 定位番茄果实质量 QTL

魏凯¹, 刘晓燕^{1,2}, 曹雪¹, 刘晓林¹, 王晓甜¹, 杨孟霞¹, 王净¹,
王孝宣¹, 国艳梅¹, 杜永臣¹, 李君明¹, 刘磊¹, 舒金帅¹, 秦勇²,
黄泽军^{1,*}

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业农村部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081; ²新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 为了分析樱桃番茄 ‘VFNT Cherry’ (syn. LA1221) 和加工番茄 ‘Heinz1706’ 组配的 F₁ 代果实质量超亲杂种优势的遗传基础, 利用其 F₂ 群体, 通过 QTL-seq 和单标记分析法进行了果实质量 QTL 定位, 共检测到 10 个果实质量位点, 其中 8 个位点的大果等位基因为显性, 包括部分显性位点 5 个 [*QTL for Fruit Weight 2.1* (*qFW2.1*), *qFW5.2*, *qFW7.1*, *qFW8.1*, *qFW9.1*] 和超显性位点 3 个 (*qFW1.1*, *qFW5.1*, *qFW6.1*)。而且 *qFW2.1*, *qFW5.1*, *qFW7.1*, *qFW8.1*, *qFW9.1* 的大果等位基因来自 ‘Heinz1706’, *qFW1.1*, *qFW5.2*, *qFW6.1* 的大果等位基因来自 ‘VFNT Cherry’。因此 F₁ 代番茄果实质量出现超亲现象可能是由于其聚合了来自双亲的显性大果等位基因。上述 8 个显性位点中 *qFW9.1* 的表型变异贡献率最高, 达到 12.19%。通过交换单株后代鉴定进一步验证了 *qFW9.1* 位点并将其定位区间缩小到 4.5 Mb。

关键词: 番茄; 果实质量; QTL-seq; 单标记分析

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 03-0571-10

Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Tomato Fruit Weight by QTL-seq

WEI Kai¹, LIU Xiaoyan^{1,2}, CAO Xue¹, LIU Xiaolin¹, WANG Xiaotian¹, YANG Mengxia¹, WANG Jing¹,
WANG Xiaoxuan¹, GUO Yanmei¹, DU Yongchen¹, LI Junming¹, LIU Lei¹, SHU Jinshuai¹, QIN Yong²,
and HUANG Zejun^{1,*}

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The fruit weight of F₁ generation derived from the cross between cherry tomato ‘VFNT Cherry’ (syn. LA1221) and processed tomato ‘Heinz1706’ was over parents, showing obvious heterosis. In order to analyze the genetic basis of this phenomenon, using F₂ population obtained from the above F₁ generation self-crossing, the QTL mapping of tomato fruit weight was carried out by QTL-seq and single marker analysis. A total of ten fruit weight QTLs were identified, and eight of which were dominant. Among the eight dominant QTLs, five QTLs were incomplete dominant [*QTL for Fruit Weight 2.1* (*qFW2.1*), *qFW5.2*, *qFW7.1*, *qFW8.1*, *qFW9.1*], and three QTLs were over-dominant [*qFW1.1*, *qFW5.1*,

收稿日期: 2019-11-14; **修回日期:** 2019-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471889, 31672154); 农业农村部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huangzejun@caas.cn)

qFW6.1]. Moreover, the big fruit alleles of *qFW2.1*, *qFW5.1*, *qFW7.1*, *qFW8.1*, and *qFW9.1* were from 'Heinz1706', and the big fruit alleles of *qFW1.1*, *qFW5.2*, *qFW6.1* were from 'VFNT Cherry'. Therefore, the heterosis of tomato fruit weight in the above F₁ generation may be due to its aggregation of dominant large fruit alleles from both parents. Among the eight dominant QTLs, *qFW9.1* had the highest contribution rate of phenotypic variation, reaching 12.19%. The *qFW9.1* locus was further validated and narrowed to a 4.5 megabase pair by recombinant progeny testing.

Keywords: tomato; fruit weight; QTL-seq; single marker analysis

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是最早利用分子标记定位数量性状的植物, 其中果实质量是研究较多的性状之一 (Tanksley et al., 1982; Paterson et al., 1988; Grandillo et al., 1999)。多年来, 利用双亲群体 (bi-parental population)、多亲本高代互交系 (multi-parent advanced generation intercross, MAGIC) 群体、自然群体等, 采用 QTL 作图、全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS)、QTL-seq 等方法, 发现控制番茄果实质量的 QTL 至少有 28 个。这 28 个 QTL 表型变异贡献率大小不一, 大于 20% 的位点有 6 个, 介于 10% ~ 20% 之间的有 16 个, 小于 10% 的位点有 6 个 (Grandillo et al., 1999; Lin et al., 2014; Illa-Berenguer et al., 2015; Pascual et al., 2015; 王绍会等, 2015; 周慧等, 2015; Bauchet et al., 2017; Liu et al., 2017)。

目前已经被图位克隆的番茄果实质量主效基因有 3 个: *FW2.2* (Frery et al., 2000)、*FW3.2* (Chakrabarti et al., 2013) 和 *FW11.3* (Mu et al., 2017)。*FW2.2* 是第 1 个被图位克隆的控制植物数量性状的基因, 其编码 1 个细胞数量调节因子, 对心皮中的细胞分裂起负调控作用 (Frery et al., 2000)。*FW3.2* 编码 1 个 P450 蛋白质, 其启动子中的 1 个单核苷酸多态性 (single-nucleotide Polymorphism, SNP) 使其转录表达量提高, 从而增加果实中细胞数量、增加果实质量、延迟果实成熟等 (Chakrabarti et al., 2013)。*FW11.3* 编码 1 个功能未知蛋白质, 其中 1 个 1.4 kb 片段的缺失使该蛋白质的 C 端丢失了 194 个氨基酸, 从而使果实细胞体积变大、果实增大 (Huang & van der Knaap, 2011; Mu et al., 2017)。除了细胞数量增加和细胞体积增大外, 番茄果实心室数增多也可以增加果实质量 (Lippman & Tanksley, 2001; Tanksley, 2004)。*LC* (*locule number*) 和 *FAS* (*fasciated*) 是控制心室数的两个主效基因, 均已被图位克隆。*LC* 为 *WUSHEL* 基因, 其编码区下游 2 个 SNP 可能使其转录表达发生变化从而导致心室数量的增加 (Munos et al., 2011; Chu et al., 2019)。最近研究表明 *FAS* 编码 *CLAVATA3* 蛋白, 其启动子被约 294 kb 的倒位打断, 导致其转录表达量降低, 从而使心室数增多 (Xu et al., 2015)。

这 5 个已被克隆的影响番茄果实质量的主效基因中, 仅有 *FW3.2* 和 *FW11.3* 的大果等位基因对小果表现为部分显性, 而 *FW2.2* 的大果等位基因对小果表现为隐性, *LC* 和 *FAS* 的多心室等位基因对少心室表现为隐性。因此, 有必要定位更多表型变异贡献率高的显性果实质量相关 QTL 位点, 最终为番茄高产杂交组合的亲本选择提供参考。

传统 QTL 定位方法需要高密度的分子标记图谱, 而分子标记开发及基因型鉴定会耗费大量的人力物力。Takagi 等 (2013) 结合集团分离分析法 (bulked-segregant analysis, BSA) 和全基因组重测序技术 (whole-genome resequencing), 提出了高效快速定位 QTL 的方法——QTL-seq, 并成功定位了水稻抗稻瘟病、幼苗活力 QTL。目前 QTL-seq 技术已成功应用于多种作物, 例如黄瓜开花时间、抗蔓枯病 QTL (Lu et al., 2014; 张旭等, 2018), 鹰嘴豆种荚数与质量 QTL (Das et al., 2015, 2016; Singh et al., 2016), 番茄果实质量、心室数量、开花时间及花序分枝 QTL (Illa-Berenguer et

al., 2015; Ruangrak, 2015; Giang, 2016; Zheng & Kawabata, 2017), 水稻千粒质量、胚轴延长 QTL (Daware et al., 2016; 李亚南 等, 2017), 玉米矮秆 QTL (Chen et al., 2018), 花生抗晚叶斑病 QTL (Clevenger et al., 2018), 甘蓝型油菜硼高效 QTL (华营鹏, 2017), 甘蓝开花时间 QTL (Shu et al., 2018) 等。

本课题组先前利用多个亲本配制了 F_1 , 发现绝大部分亲本组配的 F_1 代果实质量小于中亲值, 而 ‘Heinz1706’ 和 ‘VFNT Cherry’ 组配的 F_1 代果实质量平均值大于中亲值, 表现出明显的杂种优势。除此之外, ‘Heinz1706’ 为番茄参考基因组测序品种, 其基因组序列信息非常完整, 便于日后进一步的研究。因此选择这对亲本组配的 F_2 群体, 采用 QTL-seq 和单标记分析法 (吴道斌 等, 2011) 进行番茄果实质量 QTL 定位, 共检测出 10 个果实质量相关 QTL。其中 8 个位点的大果等位基因为部分显性或超显性。随后利用交换单株后代鉴定将 *qFW9.1* 位点缩小到 4.5 Mb 的区段内。通过试验结果推测 F_1 代聚合了来自双亲的显性大果等位基因是造成杂种优势的原因。本研究结果为 *qFW9.1* 基因的进一步精细定位及克隆奠定了基础, 同时为番茄利用杂种优势进行高产育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 植物材料及性状调查

杂交亲本加工番茄 ‘Heinz1706’ 和樱桃番茄 ‘VFNT Cherry’ (syn. LA1221) 果实大小差异显著 (图 1)。亲本的种子来自美国加利福尼亚州戴维斯番茄遗传资源中心。用于 QTL-seq 和单标记分析的 F_2 群体 (由 152 个单株构成) 于 2017 年春季、用于后代鉴定的 F_3 群体 ‘18N491’ 于 2018 年春季、 F_4 群体 ‘18N622’ 于 2018 年秋季、 F_5 群体 ‘19N595’、‘19N597’ 于 2019 年春季定植在中国农业科学院试验基地 (北京) 大棚内。番茄果实红熟期进行果实质量调查, 每株挑选 10 个大小均匀具有代表性的果实称质量, 取平均值作为该植株的单果质量。

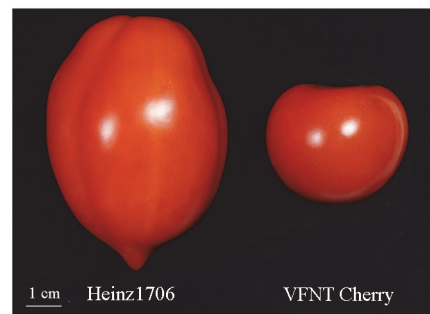


图 1 亲本果实表型
Fig. 1 Parental fruit phenotype

1.2 DNA 的提取及混池测序

取幼嫩的番茄叶片, 冷冻抽干 48 ~ 72 h, 用高通量组织研磨器 (Qiagen TissueLyser II, Retsch Technology GmbH, Haan, Germany) 将叶片粉碎, 利用 CTAB 法 (Fulton et al., 1995; Boiteux et al., 1999) 提取 DNA。用 1% 的琼脂糖 (V900510, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) 凝胶电泳检测 DNA 的质量。 F_2 群体植株按照单果质量由小到大进行排序, 选取排序前 20 株及排序后 20 株, 分别将其叶片 DNA 等量混合, 构成小果 DNA 混合池 (简称小果池) 和大果 DNA 混合池 (简称大果池)。基因组重测序由长春伯利恒生物技术有限公司完成, 亲本 ‘VFNT Cherry’ 测序深度为 30 \times , DNA 混合池样品测序深度为 20 \times 。

1.3 分子标记的开发与基因型分析

根据 QTL-seq 结果, 在 $\Delta(\text{SNP-index})$ 绝对值 ≥ 0.3 的峰值附近区域, 比对亲本 ‘VFNT Cherry’ 和 ‘Heinz1706’ 的序列差异, 筛选出 88 个具有多态性的分子标记。利用上述标记进行基因型分析。主要分子标记信息见表 1。

表 1 重要分子标记信息

Table 1 Information of important molecular makers used in this study

分子标记 Marker	染色 体 Chr.	物理位置/bp Position on SL3.0	标记类别 Category	引物序列 (5' - 3')	
				正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
WK1	1	96 107 424	CAPS (<i>Hinf</i> I)	TACCAAAGATCCAAACCACGC	AAACGTCATAGTCGGAAGCAAAG
HP677	2	39 810 900	InDel	CAAAACTTGACTTGGTTTCTTC	GCTGTTGTTTCAGCAGTTGC
HP4953	3	1 538 546	InDel	TTCAACAGATACGTATATCTCGC	GTGAGAGTGATATGAAACCTGC
WK3	5	3 401 992	CAPS (<i>Bcl</i> I)	GCGAAGGGAGGGTCTGAAA	GGGCGAACAAAAAGAGAAAAA
HP4995	5	63 103 134	InDel	AATGTAGTAAAACATTCACCTTCG	CAGGTATACTTCATTTTGCCC
HP1839	6	45 142 560	InDel	GCAACAAAATGAAGTTTCTCTCCTC	TGTGAACGGATGTTTACACGA
HP5513	7	65 099 453	InDel	CTTATCTTGGGAAGGCGGTG	ATTACATATTGCTTCCTTTGCCTC
HP3157	8	55 545 603	InDel	GAATGATTTATCGGATAAAAATT AGC	GTCTAGTAGAGAGGTGTTTTTAAGG
HP5625	9	62 401 997	InDel	GTACCTCGCTTGGATACTTGC	ATCACCAAGTTGCTGAAGGC
HP5627	9	62 623 521	InDel	ACCATCTCTCTCTTTGCCC	GGCTTAGTAGTAAATGGAAGATAACTG
HP59	9	63 659 271	InDel	GTTCTTTGGGTATAGAGTCC	CTCACAAAACAAAGCCTCAC
HP63	9	65 670 047	InDel	CGTACACAGTGAAGTGAAAC	GGATTTTGTACGATGACCAC
HP67	9	66 927 102	InDel	GAGGTGAAAGCTAGAGTCAG	GTTCTCTTATCTCTGCTTG
HP1893	10	64 617 781	InDel	TCTCATATGTATAGGTAAGAGTG AA	AGTTACATGTGGGAATCGTG

分子标记采用 10 μL 体系进行扩增: DNA 模板 1 μL ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、正向及反向引物各 0.2 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $2\times \text{ Taq}$ master Mix 5 μL ($2\times \text{ M5 HiPer Taq HiFi PCR mix}$, MF002-01, 北京聚合美生物科技有限公司)、 ddH_2O 3.6 μL 。

PCR 扩增运行程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。

InDel 标记直接利用 3%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, CAPS 标记其 PCR 产物经过酶切后 再用 3%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。15 μL 酶切体系: PCR 产物 10 μL 、内切酶 0.2 μL ($10\,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, New England Biolabs, MA, USA)、 $10\times$ 缓冲液 1.5 μL 、 ddH_2O 3.3 μL , 在最适反应温度下酶切 2 h。

1.4 数据处理

QTL-seq: 重测序数据处理及分析由长春伯利恒生物技术有限公司完成。将亲本重测序得到的短序列与番茄参考基因组 (SL3.0 版本, <https://solgenomics.net>) 比对, 利用 BWA (Li & Durbin, 2009) 等软件获得两亲本之间的 SNP。将两个 DNA 混池重测序得到的短序列分别与参考基因组 ‘Heinz1706’ 序列进行比对, 以 ‘Heinz1706’ 的碱基为标准分别计算大果池和小果池的 SNP-index (DNA 混合池中某一 SNP 位点的碱基与 ‘Heinz1706’ 全部一致时, 则该 SNP 的 index 为 1, 反之为 0)。为了减少测序深度低及 SNP 分布不均匀等因素对结果分析的干扰, 过滤掉在两个混池中 SNP-index 均 < 0.3 或测序深度 < 7 的 SNP 位点; 以 1 Mb 为滑动窗口大小, 10 kb 为步长计算窗口内 SNP-index 的平均值, 并将该值作为该窗口中点位置的 SNP-index。根据滑窗得出的数据, 用大果池的 SNP-index 减去小果池中对应物理位置的 SNP-index, 得到 $\Delta(\text{SNP-index})$, 并根据上述数据进行折线图的绘制 (Takagi et al., 2013)。详细说明可通过开发者网站链接获得: <http://>

//genome-e.ibrc.or.jp/home/bioinformatics-team/mutmap。

单标记分析及后代鉴定: 利用 SPSS 进行独立样本 t 检验评估 QTL 等位基因之间果实质量平均值差异的显著性。通过 d/a 值来评估 QTL 位点的显性度, $d = Aa - (AA + aa) / 2$, 称为显性效应, $a = (AA - aa) / 2$, 称为加性效应 (Illa-Berenguer et al., 2015)。其中 AA、aa 分别代表 F_2 群体中 QTL 位点大果基因型、小果基因型的平均果实质量, Aa 为杂合基因型的 F_2 平均果实质量。表型变异贡献率用 PVE (phenotypic variance explained) 值表示, 由软件 QTL IciMapping 4.0 (Meng et al., 2015) 计算得出。

2 结果与分析

2.1 F_2 群体果实质量的遗传分析

亲本 ‘Heinz1706’ 的平均单果质量为 43.6 g, ‘VFNT Cherry’ 的平均单果质量为 19.5 g。杂交后代 F_1 平均果实质量为 45.2 g, 中亲优势值达 43.2%, 表现出明显的杂种优势。 F_2 群体果实质量呈现连续性变化 (图 2), 最小值为 8.3 g, 最大值为 71.0 g, 平均值为 30.7 g。经 SPSS 单样本 K-S 检验 (何清和王震坤, 2014), $P = 0.20 > 0.05$, 因此说明该 F_2 群体果实质量近似正态分布。据此可推测该群体中番茄果实质量是受多基因控制的数量性状。

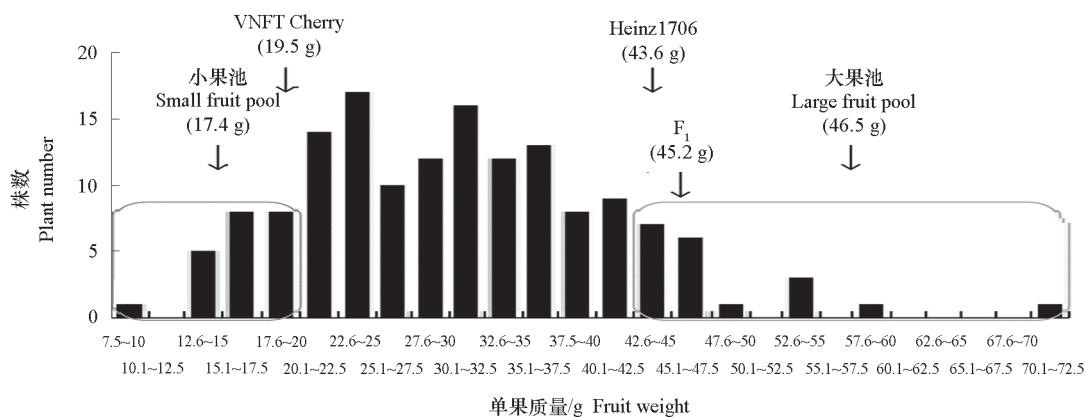


图 2 F_2 群体果实质量频率分布直方图
Fig. 2 Frequency distribution of fruit weight in F_2 population

2.2 F_2 群体的 QTL-seq 分析

选取 F_2 群体中极端果实质量的植株各 20 株, 将其 DNA 等量混合分别构成小果池和大果池, 小果池植株的平均果实质量为 17.4 g, 大果池植株的平均果实质量为 46.5 g (图 2)。对亲本 ‘VFNT Cherry’、小果池和大果池分别进行重测序。通过重测序数据的处理和分析绘制了 Δ (SNP-index) 的折线图 (图 3)。

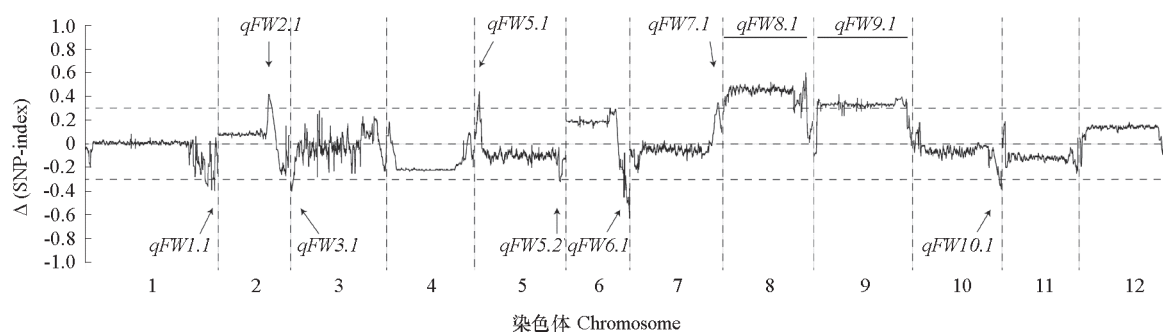


图3 F₂群体的Δ(SNP-index)折线图

箭头和线段指示可能含有果实质量 QTL 的区域。

Fig. 3 The Δ(SNP-index) line chart of F₂ population

Arrows and lines indicate the regions that may contain fruit weight QTLs.

根据 Takagi 等(2013)的报道, Δ(SNP-index) 绝对值 ≥ 0.3 的染色体区域则推测含有果实质量 QTL, 最终得到 Δ(SNP-index) 绝对值 > 0.3 的染色体区域 10 个(图 3), 分布在除 4、11、12 号染色体外的其它染色体上。

上述染色体区域的物理位置见表 2。

2.3 F₂群体的单标记分析

利用 Δ(SNP-index) 峰值附近 88 个分子标记对 F₂ 群体全部植株进行基因型分析, 然后结合果实质量数据进行单标记分析, 证明上述

10 个染色体区域均含有果实质量相关 QTL, 分别命名为 *qFW1.1*、*qFW2.1*、*qFW3.1*、*qFW5.1*、*qFW5.2*、*qFW6.1*、*qFW7.1*、*qFW8.1*、*qFW9.1*、*qFW10.1* (图 3, 表 3)。

表 2 可能含有果实质量 QTL 的染色体区域

Table 2 Chromosomal regions that may contain QTLs for fruit weight

染色体 Chromosome	物理位置/kb Position on SL3.0
1	88 890 ~ 96 100
2	38 200 ~ 41 130
3	0 ~ 2 210
5	2 490 ~ 3 700, 62 260 ~ 63 150
6	42 770 ~ 46 680
7	64 980 ~ 66 270
8	660 ~ 61 740
9	3 580 ~ 69 240
10	63 700 ~ 65 380

表 3 与果实质量 QTL 连锁的分子标记

Table 3 Markers associated with fruit weight QTLs

位点名称 QTL	染色体 Chromosome	分子标记 Marker	F ₂ 平均单果质量/g Average fruit weight of F ₂			P 值 P-value	表型变异贡献率/% PVE	显性度 d/a
			Heinz1706	杂合型 Heterozygote	VFNT Cherry			
<i>qFW1.1</i>	1	WK1	28.23	33.01	32.36	0.01946	4.04	1.316
<i>qFW2.1</i>	2	HP677	33.66	32.94	27.08	0.00028	8.87	0.781
<i>qFW3.1</i>	3	HP4953	27.31	30.16	35.49	0.00028	10.61	-0.303
<i>qFW5.1</i>	5	WK3	32.01	32.64	28.19	0.03870	2.55	1.329
<i>qFW5.2</i>	5	HP4995	26.68	30.80	32.41	0.00895	4.18	0.439
<i>qFW6.1</i>	6	HP1839	26.70	34.03	32.83	0.00021	9.93	1.393
<i>qFW7.1</i>	7	HP5513	32.54	32.46	26.95	0.00292	6.47	0.973
<i>qFW8.1</i>	8	HP3157	34.22	31.72	27.34	0.00066	6.91	0.273
<i>qFW9.1</i>	9	HP59	33.47	32.11	24.16	3.3E-07	12.19	0.573
<i>qFW10.1</i>	10	HP1893	28.81	31.12	33.44	0.01456	3.91	-0.005

上述 10 个位点的表型变异贡献率介于 2.55% ~ 12.19%, 其中 *qFW5.1* 最低, *qFW9.1* 最高; 这 10 个位点的大果等位基因分别来自于两个亲本, *qFW2.1*、*qFW5.1*、*qFW7.1*、*qFW8.1*、*qFW9.1* 的来自 ‘Heinz1706’, *qFW1.1*、*qFW3.1*、*qFW5.2*、*qFW6.1* 和 *qFW10.1* 的来自 ‘VFNT Cherry’; 这些位

点的大果等位基因对于小果等位基因, 有的为显性, 有的为隐性, 由 d/a 值可知, $qFW1.1$ 、 $qFW5.1$ 和 $qFW6.1$ 的大果等位基因为超显性, $qFW2.1$ 、 $qFW5.1$ 、 $qFW7.1$ 、 $qFW8.1$ 、 $qFW9.1$ 的为部分显性, $qFW3.1$ 和 $qFW10.1$ 的为部分隐性。

2.4 $qFW9.1$ 位点交换单株后代鉴定

$qFW9.1$ 为部分显性位点, 在本试验检测到的所有位点中表型变异贡献率最高, 达 12.19% (表 3)。通过 QTL-seq, $qFW9.1$ 被定位在 9 号染色体 3 ~ 69 Mb 之间约 66 Mb 的范围内, 此区间覆盖 9 号染色体约 90% 的区域 (图 3)。为了进一步缩小 $qFW9.1$ 的定位区间, 选取其定位区间内发生交换, 而其他 PVE > 5% 的主效果实质量位点 $qFW2.1$ 、 $qFW3.1$ 、 $qFW6.1$ 、 $qFW7.1$ 和 $qFW8.1$ 为纯合的植株进行后代鉴定。通过 F_3 、 F_4 、 F_5 后代鉴定群体的表型及基因型分析, 目前已将 $qFW9.1$ 的定位区间缩小到 HP5625 与 HP67 之间约 4.5 Mb 的范围内 (表 4)。

表 4 $qFW9.1$ 位点交换单株后代鉴定
 Table 4 Progeny test of $qFW9.1$ recombinants

群体编号 Population number	系谱信息 Pedigree information	分子标记 Molecular marker					植株数 Plant number	平均单果质量/g Average fruit weight	P 值 P-value
		HP5625	HP5627	HP59	HP63	HP67			
18N491 (F_3)	17N495-135	A	A	A	A	A	12	42.8 ± 3.4	7.1E-07
		B	B	B	B	B	12	32.4 ± 3.9	
18N622 (F_4)	18N491-4	A	A	A	A	A	11	39.7 ± 7.9	1.7E-03
		A	B	B	B	B	10	29.4 ± 4.1	
19N597 (F_5)	18N622-8	A	A	A	A	A	12	42.2 ± 2.0	4.9E-09
		A	B	B	B	B	11	32.2 ± 3.0	
19N595 (F_5)	18N622-39	A	A	A	A	A	12	37.5 ± 3.3	9.5E-06
		A	B	B	B	A	12	30.7 ± 2.6	

注: A 表示基因型与 ‘Heinz1706’ 相同; B 表示基因型与 ‘VFNT Cherry’ 相同。

Note: A homozygous for ‘Heinz1706’; B homozygous for ‘VFNT Cherry’.

3 讨论

‘Heinz1706’ 和 ‘VFNT Cherry’ 杂交后代 F_1 果实质量中亲优势值达 43.2%, 表现出明显的杂种优势。本研究中共检测到 10 个果实质量 QTL 位点, 其中 $qFW2.1$ 、 $qFW5.1$ 、 $qFW7.1$ 、 $qFW8.1$ 、 $qFW9.1$ 的大果等位基因来自亲本 ‘Heinz1706’; $qFW1.1$ 、 $qFW3.1$ 、 $qFW5.2$ 、 $qFW6.1$ 和 $qFW10.1$ 的大果等位基因来自亲本 ‘VFNT Cherry’。这 10 个位点中仅有 $qFW3.1$ 和 $qFW10.1$ 的大果等位基因为部分隐性, 剩下的 8 个显性大果等位基因中 $qFW1.1$ 、 $qFW5.1$ 、 $qFW6.1$ 为超显性, $qFW2.1$ 、 $qFW5.1$ 、 $qFW7.1$ 、 $qFW8.1$ 、 $qFW9.1$ 为部分显性。故推测在 F_1 植株中, 聚合了这些来自双亲的显性大果等位基因, 从而使 F_1 果实质量表现杂种优势。随着番茄果实质量 QTL 表型变异贡献率高低、等位基因之间显隐性关系以及 QTL 之间互作关系的明晰, 通过分析双亲所含的果实质量 QTL 及其特点, 可以估算其杂交后代的果实大小, 从而对番茄高产育种杂交组合的选配提供参考。

本研究中检测到的 QTL 位点 $qFW1.1$ 、 $qFW2.1$ 、 $qFW3.1$ 、 $qFW5.1$ 、 $qFW5.2$ 、 $qFW6.1$ 、 $qFW7.1$ 、 $qFW8.1$ 、 $qFW9.1$ 、 $qFW10.1$ 分别与先前报道的 $fw1.3$ 、 $fw2.5$ 、 $fw3.b$ 、 $fw5.1$ 、 $fw5.2$ 、 $fw6.3$ 、 $fw7.3$ 、 $fw8.1$ 、 $fw9.3$ 、 $fw10.b$ 区域 (Grandillo et al., 1999; van der Knaap & Tanksley, 2003; Lin et al., 2014) 部分重叠, 因此推测本研究中检测到的位点可能与先前报道过的位点相同, 但是并不包含已被克隆的番茄果实质量基因 $FW2.2$ 、 $FW3.2$ 和 $FW11.3$ 。先前的研究表明 $fw5.2$ 为隐性位点, 但本研究中为

显性。

传统的 QTL 定位方法主要包括：单标记分析法、区间作图法、复合区间作图法、多重区间作图法（蒋锋 等，2009）。其中区间作图法、复合区间作图法和多重区间作图法通常需要完整的分子标记连锁图谱，需要大量的基因型分析工作，大大的消耗了人力、物力。而单标记分析虽然不需要完整的分子标记图谱，但是单标记分析无法确定 QTL 的准确位置、无法确定标记与 1 个 QTL 连锁还是与几个 QTL 连锁，检测效率低。而通过 QTL-seq 的结果，可以知道 QTL 的位置及数量，从而有针对性的进行基因型分析的工作，减少了基因型分析的工作量，大大提高了工作效率。根据 Takagi 等（2013）的报道，F₂ 群体中，当测序深度为 20×、DNA 混合池个体分别占总体比例约为 15% 时， Δ (SNP-index) 绝对值 ≥ 0.3 可以作为含有 QTL 的标准。基于该标准，本试验中通过 QTL-seq 得到 10 个可能含有 QTL 的染色体区域，并通过单标记分析法证实了这些染色体区域的确含有果实质量 QTL。因此，QTL-seq 与单标记分析法相结合是一个高效、可靠的进行 QTL 定位的方法。主效 QTL 的精细定位通常需要构建近等基因系以排除其他 QTL 的干扰，构建近等基因系通常需要多代回交或自交、周期较长。而通过 QTL-seq，可以快速高效地鉴别出果实质量 QTL，同时结合单标记分析结果，可以在 F₂ 群体中挑选出目标 QTL 位点为杂合或发生交换、其他主效位点均为纯合的植株进行下一步的研究。本试验中选取 *qFW2.1*、*qFW3.1*、*qFW6.1*、*qFW7.1*、*qFW8.1* 等 5 个 PVE > 5% 的主效果实质量位点为纯合而 *qFW9.1* 位点定位区间发生交换的植株进行后代鉴定，进一步验证了 *qFW9.1* 位点并且将其定位区间缩小到 4.5 Mb 的范围内。

References

- Bauchet G, Grenier S, Samson N, Bonnet J, Grivet L, Causse M. 2017. Use of modern tomato breeding germplasm for deciphering the genetic control of agronomical traits by Genome Wide Association study. *Theor Appl Genet*, 130 (5): 875 - 889.
- Boiteux L S, Fonseca M E N, Simon P W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *J Am Soc Hortic Sci*, 124: 32 - 38.
- Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, Munos S, Blanca J, Canizares J, Diez M J, Schneider R, Mazourek M, McClead J, Causse M, van der Knaap E. 2013. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (42): 17125 - 17130.
- Chen Q, Song J, Du W P, Xu L Y, Jiang Y, Zhang J, Xiang X L, Yu G R. 2018. Identification and genetic mapping for *rht-DM*, a dominant dwarfing gene in mutant semi-dwarf maize using QTL-seq approach. *Genes Genomics*, 40 (10): 1091 - 1099.
- Chu Y H, Jang J C, Huang Z, van der Knaap E. 2019. Tomato locule number and fruit size controlled by natural alleles of *lc* and *fas*. *Plant Direct*, 3 (7): e00142.
- Clevenger J, Chu Y, Chavarro C, Botton S, Culbreath A, Isleib T G, Holbrook C C, Ozias-Akins P. 2018. Mapping late leaf spot resistance in peanut (*Arachis hypogaea*) using QTL-seq reveals markers for marker-assisted selection. *Front Plant Sci*, 9: 83.
- Das S, Upadhyaya H D, Bajaj D, Kujur A, Badoni S, Laxmi, Kumar V, Tripathi S, Gowda C L, Sharma S, Singh S, Tyagi A K, Parida S K. 2015. Deploying QTL-seq for rapid delineation of a potential candidate gene underlying major trait-associated QTL in chickpea. *DNA Res*, 22 (3): 193 - 203.
- Das S, Singh M, Srivastava R, Bajaj D, Saxena M S, Rana J C, Bansal K C, Tyagi A K, Parida S K. 2016. mQTL-seq delineates functionally relevant candidate gene harbouring a major QTL regulating pod number in chickpea. *DNA Res*, 23 (1): 53 - 65.
- Daware A, Das S, Srivastava R, Badoni S, Singh A K, Agarwal P, Parida S K, Tyagi A K. 2016. An efficient strategy combining SSR markers- and advanced QTL-seq-driven QTL mapping unravels candidate genes regulating grain weight in rice. *Front Plant Sci*, 7: 1535.
- Frery A, Nesbitt T C, Frery A, Grandillo S, Knaap E V D, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K B, Tanksley S D. 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289: 85 - 88.

- Fulton T M, Chunwongse J, Tanksley S D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13: 207 - 209.
- Giang T V. 2016. Development of InDel markers and fine-mapping of *locule number 2.2* in tomato [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences.
- Giang T V. 2016. 番茄 InDel 分子标记的开发与果实心室数量主效 QTL *lcn2.2* 的精细定位 [博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Grandillo S, Ku H M, Tanksley S D. 1999. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet*, 99: 978 - 987.
- He Qing, Wang Zhen-kun. 2014. Discussion on the application of normality test method in teaching research. *Higher Education of Sciences*, (116): 18 - 21. (in Chinese)
- 何 清, 王震坤. 2014. 正态性检验方法在教学研究中的应用. *高等理科教育*, (116): 18 - 21.
- Hua Ying-peng. 2017. Map-based cloning of boron efficient qtl and analysis of expression profiling in responses to boron stresses in *Brassica napus* [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 华营鹏. 2017. 甘蓝型油菜硼高效 QTL 的图位克隆与响应胁迫的表达谱分析 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Huang Z, van der Knaap E. 2011. Tomato *fruit weight 11.3* maps close to fasciated on the bottom of chromosome 11. *Theor Appl Genet*, 123 (3): 465-474.
- Illa-Berenguer E, Van Houten J, Huang Z, van der Knaap E. 2015. Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theor Appl Genet*, 128 (7): 1329 - 1342.
- Jiang Feng, Liu Peng-fei, Du Shi-zhou, Wang Xiao-ming. 2009. Research progress on crop QTL mapping method. *J Anhui Agri Sci*, 37 (26): 12496 - 12497. (in Chinese)
- 蒋 锋, 刘鹏飞, 杜世州, 王晓明. 2009. 作物 QTL 定位方法研究进展. *安徽农业科学*, 37 (26): 12496 - 12497.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 (14): 1754 - 1760.
- Li Ya-nan, Yan Ming, Feng Fang-jun, Wu Jin-hong, Xu Xiao-yan, Fan Pei-qing, Mei Han-wei. 2017. Identification of chromosomal regions influencing mesocoty elongation by bulked segregation analysis based on genome resequencing in rice. *Acta Agriculturae Shanghai*, 33 (4): 10 - 15. (in Chinese)
- 李亚南, 严 明, 冯芳君, 吴金红, 徐小艳, 范佩清, 梅捍卫. 2017. 利用重测序和集团分离分析鉴定水稻中胚轴延长相关染色体区域. *上海农业学报*, 33 (4): 10-15.
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni J J, Chetelat R T, Zamir D, Stadler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S. 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet*, 46 (11): 1220 - 1226.
- Lippman Z, Tanksley S D. 2001. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158: 413 - 422.
- Liu X, Geng X, Zhang H, Shen H, Yang W. 2017. Association and genetic identification of loci for four fruit traits in tomato using indel markers. *Front Plant Sci*, 8: 1269.
- Lu H, Lin T, Klein J, Wang S, Qi J, Zhou Q, Sun J, Zhang Z, Weng Y, Huang S. 2014. QTL-seq identifies an early flowering QTL located near *Flowering Locus T* in cucumber. *Theor Appl Genet*, 127 (7): 1491 - 1499.
- Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*, 3: 269 - 283.
- Mu Q, Huang Z, Chakrabarti M, Illa-Berenguer E, Liu X, Wang Y, Ramos A, van der Knaap E. 2017. Fruit weight is controlled by *Cell Size Regulator* encoding a novel protein that is expressed in maturing tomato fruits. *PLoS Genet*, 13 (8): e1006930.
- Munos S, Ranc N, Botton E, Berard A, Rolland S, Duffe P, Carretero Y, Le Paslier M C, Delalande C, Bouzayen M, Brunel D, Causse M. 2011. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiol*, 156 (4): 2244 - 2254.

- Pascual L, Desplat N, Huang B E, Desgroux A, Bruguier L, Bouchet J P, Le Q H, Chauchard B, Verschave P, Causse M. 2015. Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant Biotechnol J*, 13 (4): 565 - 577.
- Paterson A H, Lander E S, Hewitt J D, Peterson S, Lincoln S E, Tanksley S D. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, 335: 721 - 726.
- Ruangrak E. 2015. Fine mapping of major QTL controlling early flowering in tomato [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences.
- Ruangrak E. 2015. 番茄控制早开花的主效 QTL 的精细定位 [博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Shu J, Liu Y, Zhang L, Li Z, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H. 2018. QTL-seq for rapid identification of candidate genes for flowering time in broccoli \times cabbage. *Theor Appl Genet*, 131 (4): 917 - 928.
- Singh V K, Khan A W, Jaganathan D, Thudi M, Roorkiwal M, Takagi H, Garg V, Kumar V, Chitkineni A, Gaur P M, Sutton T, Terauchi R, Varshney R K. 2016. QTL-seq for rapid identification of candidate genes for 100-seed weight and root/total plant dry weight ratio under rainfed conditions in chickpea. *Plant Biotechnol J*, 14 (11): 2110 - 2119.
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 74 (1): 174 - 183.
- Tanksley S D. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell*, 16 (Supplement): S181 - S189.
- Tanksley S D, Medina-Filho H, Rick C M. 1982. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*, 49: 11 - 25.
- van der Knaap E, Tanksley S D. 2003. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *Theor Appl Genet*, 107 (1): 139 - 147.
- Wang Shao-hui, Wang Xiao-xuan, Huang Ze-jun, Gao Jian-chang, Guo Yan-mei, Du Yong-chen. 2015. QTLs mapping for tomato fruit weight and fruit shape in *Solanum lycopersicon* \times *S. galapagense* recombinant inbred line. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (5): 863 - 871. (in Chinese)
- 王绍会, 王孝宣, 黄泽军, 高建昌, 国艳梅, 杜永臣. 2015. 利用 *Solanum galapagense* 番茄重组自交系对控制单果质量及果形的 QTL 定位分析. *园艺学报*, 42 (5): 863 - 871.
- Wu Dao-bin, Li Ming-li, Lu Li-gang, Lu Shao-xiong. 2011. Efficiencies of QTL detection under BC₁ and F₂ design by using single marker information. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 26 (5): 621 - 624. (in Chinese)
- 吴道斌, 李明丽, 鲁志刚, 鲁绍雄. 2011. BC₁ 和 F₂ 设计下利用单标记信息检测 QTL 的效率. *云南农业大学学报*, 26 (5): 621 - 624.
- Xu C, Liberatore K L, MacAlister C A, Huang Z, Chu Y H, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, van Eck J, Matsubayashi Y, van der Knaap E, Lippman Z B. 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nat Genet*, 47 (7): 784 - 792.
- Zhang Xu, Xu Jian, Li Ji, Lou Qun-feng, Chen Jin-feng. 2018. QTL Mapping and Identification of candidate gene for resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus/hystrix* introgression line 'IL77'. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2141 - 2152. (in Chinese)
- 张旭, 徐建, 李季, 娄群峰, 陈劲枫. 2018. 黄瓜/酸黄瓜渐渗系 'IL77' 抗蔓枯病主效 QTL 定位及候选基因鉴定. *园艺学报*, 45 (11): 2141 - 2152.
- Zheng H, Kawabata S. 2017. Identification and validation of new alleles of *FALSIFLORA* and *COMPOUND INFLORESCENCE* genes controlling the number of branches in tomato inflorescence. *Int J Mol Sci*, 18 (7): 1 - 12.
- Zhou Hui, Wang Xiao-xuan, Huang Ze-jun, Gao Jian-chang, Guo Yan-mei, Du Yong-chen, Hu Hong. 2015. Identification of the genetic loci for tomato fruit and plant height using a *Solanum pennellii* introgression line population. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (10): 1953 - 1964. (in Chinese)
- 周慧, 王孝宣, 黄泽军, 高建昌, 国艳梅, 杜永臣, 胡鸿. 2015. 利用潘那利番茄渐渗群体对单果质量和株高相关 QTL 的遗传定位分析. *园艺学报*, 42 (10): 1953 - 1964.