

网络出版时间:2017-05-10 13:38

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.06.024

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170510.1338.048.html>

基于简化基因组测序技术的番茄雄性不育基因定位

王柏柯^{1,2}, 李 宁², 唐亚萍², 王 强², 杨 涛², 杨生保^{1,2},
帕提古丽², 余庆辉², 高 杰¹

(1 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2 新疆农业科学院 园艺作物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

[摘要] 【目的】获得番茄雄性不育基因的候选基因, 提高番茄雄性不育基因定位的准确性, 为该雄性不育基因的克隆及功能机制研究提供理论基础。【方法】以一个与苗期绿茎基因紧密连锁的花粉败育型材料为母本, 以一个苗期紫茎可育系为父本, 通过集群分离(BSA)法分别建立 30 个 F₂ 单株的不育和可育 DNA 池, 基于简化基因组测序(SLAF-Seq)技术检测足够量的简化基因组扩增片段, 通过关联分析, 获得目标雄性不育基因的候选区域, 并利用 GO 数据库对关联区域内的基因进行功能注释。【结果】通过 SLAF 测序共获得 20.27 Mb 的序列量; 共获得 103 250 个 SLAF 标签, 标签整体平均深度达 160.39 倍; 完成了 2 个混合池间 SLAF 标签标记的多态性分析, 共获得多态性标记 6 892 个; 利用 2 个混合池进行关联分析, 共得到 8 个与目标雄性不育基因相关的候选区域, 区域平均大小为 0.29 Mb, 区域内共有 27 个差异标记, 146 个候选基因。【结论】利用 SLAF 测序技术对番茄雄性不育基因进行了初步定位。

[关键词] 番茄; 雄性不育; 简化基因组测序; 基因定位

[中图分类号] S641.2; Q781

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)06-0177-08

Mapping male-sterile gene in tomato by specific length amplified fragment sequencing

WANG Baike^{1,2}, LI Ning², TANG Yaping², WANG Qiang², YANG Tao²,
YANG Shengbao^{1,2}, PATI Guli², YU Qinghui², GAO Jie¹

(1 College of Forestry & Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China;

2 Institute of Horticultural Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: 【Objective】 This study obtained candidates of male-sterile gene and improved the accuracy of locating male-sterile gene in tomato to provide theoretical basis for further cloning and revealing male-sterile mechanism. 【Method】 A pollen abortion tomato line closely linked to a green stalk Marker at seedling stage was used as the female parent and a male-fertility tomato line with purple stalk at seedling stage was used as the male parent. F₂ generation male-sterile and male-fertility DNA pools were constructed with thirty individuals by BSA method. The specific length amplified fragment sequencing (SLAF-Seq) technology was used to detect sufficient fragments. Then, the candidate regions of sterile male gene were obtained by association analysis, and the function of candidate regions genes were annotated by the GO library. 【Result】 A total of 20.27 Mb reads data were obtained by SLAF-sequencing and 103 250 SLAF Markers were obtained by SLAF exploiting with the average sequencing depth of 160.39 times. Then 6 892 polymorphism

[收稿日期] 2016-03-25

[基金项目] 公益性行业(农业)科研专项(201303115); 大宗蔬菜产业技术体系乌鲁木齐试验站项目(CARS-25-G-51); 新疆维吾尔自治区园艺学重点学科基金项目(2016-10758-3)

[作者简介] 王柏柯(1981—), 男, 甘肃通渭人, 在读博士, 主要从事蔬菜遗传学研究。E-mail: 46367247@qq.com

[通信作者] 高 杰(1963—), 男, 天津人, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: ofc111@163.com

Markers were obtained between two mixed DNA pools by polymorphism analysis and eight candidate regions were determined. The average length of the eight candidate regions was 0.29 Mb, containing 27 polymorphic Markers and 146 candidate genes. 【Conclusion】 The male sterile gene was preliminarily located by SLAF-Seq.

Key words: tomato; male-sterile; SLAF-Seq; gene mapping

花粉发育是作物整个生命周期中非常重要的环节^[1],作物只有通过花粉,才能将自己的遗传信息传递给下一代^[2],但花粉的发育要经历细胞分化及多个基因的精准调节才能完成^[1,3-4]。前人对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)的花粉囊及花粉发育已做了大量的研究。在拟南芥中,随着花器官的出现,花药细胞开始分化继而形成对称的四分体结构;孢子细胞在每个四分体中可产生 5 个特异的细胞层(从外到里依次是:表皮层、皮层、中间层、绒毡层和孢源细胞)^[1,5]。水稻花粉发育与拟南芥基本相似,在减数分裂期,造孢细胞经减数分裂后从绒毡层分离产生性母细胞,而绒毡层细胞产生空泡继而启动死亡降解程序^[1]。番茄(*Solanum lycopersicum*)的花粉发育与拟南芥和水稻十分相似^[1,6-7],其雄蕊原基由孢子细胞在花粉囊发育初期分化形成,造孢细胞和壁细胞由孢原细胞分化形成,经历减数分裂后分别形成了小孢子四分体和绒毡层,最终小孢子成熟形成花粉粒^[6,8]。在番茄中,目前已有 50 多种雄性不育突变体被报道,按各自发育的缺陷可将其划分为功能不育型、结构不育型和花粉败育型 3 种类型^[9]。其中,花粉败育型根据花粉败育时期不同,又可划分为减数分裂前期败育、减数分裂期败育、四分体期败育、小孢子期败育和尚未确定时期的败育 5 种类型。其中,减数分裂前期的花粉败育型如 *ms-3* 和 *ms-15* 是在减数分裂前期花粉母细胞就发生溶解或停止发育;而减数分裂期的花粉败育型如 *ms-5* 和 *ms-10*,其绒毡层组织发育就表现出不正常^[9-10]。

简化基因组测序(specific length amplified fragment sequencing, SLAF-Seq)最早应用于人类 SNP 图谱工程^[11-12],而现在在众多的物种中都已经有了广泛的应用;Baird 等^[13]通过简化基因组测序,确定了一个棘鱼 F_2 群体的基因型;也有人在野生大豆^[14]、甜瓜^[15]等物种上通过简化基因组测序发掘了大量的 SNP 标记并定位了一系列的功能基因。在番茄基因定位和突变体研究中,利用传统的遗传标记定位目标基因,工作量非常大,且周期长,难以精确定位^[16-17]。简化基因组测序则为从番茄基因组水

平开发单核苷酸多态性(SNP)分子标记提供了全新的技术条件^[18-19]。利用基于简化基因组测序的 SNP 识别、验证和基因型分析与传统分子标记相结合的方法,能快速挖掘导致番茄表型突变的候选基因及 SNP 位点^[20-21]。本研究以一个带苗期标记性状的核雄性不育系与一个普通的可育系杂交产生的 F_2 代分离群体为试材,通过集群分离(bulked segregant analysis, BSA)法选择雄性不育单株和雄性可育单株,构建不育、可育 DNA 池;再用简化基因组测序技术分别对两混池的特异 DNA 片段进行测序,通过检测两混池内特异 DNA 片段上的突变位点,筛选切实可用的雄性不育基因分子标记,以期提高选择的准确性和科学性,并为此雄性不育基因的克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为番茄的一个花粉败育型的核雄性不育系,该雄性不育基因与一个苗期绿茎基因紧密连锁。利用早期标记性状,能够有效地帮助育种者鉴定不育株与可育株,具有较高的利用价值。本研究以此材料为母本,以一个苗期紫茎可育的加工型番茄自交系 QT-2 为父本进行试验。

利用苗期紫茎可育的自交系(父本)与苗期绿茎的雄性不育系(母本)杂交产生 F_1 代, F_1 代再自交产生 F_2 分离群体,通过混合 BSA 法,从中分别随机选择 30 株绿茎不育株和 30 株紫茎可育株作为构建混合 DNA 池的样品。

1.2 不育和可育 DNA 池的构建

分别提取每个分离单株幼嫩叶片的基因组 DNA,检测每个 DNA 样品的纯度及浓度,按照等量原则将 30 个不育单株和 30 个可育单株的 DNA 分别混合在一起,构建成不育和可育 DNA 混池。同时提取父母本的基因组 DNA,建立父母本基因池。

提取 DNA 时,在 CTAB 原有配方基础上,添加体积分数 1.0% 的 β -巯基乙醇,防止一些酚类化合物的氧化,保证所获得的 DNA 质量。

1.3 样本制备及测序

利用酶切位点预测软件对番茄的参考基因组 (<http://solgenomics.net/>) 进行系统分析,根据基因组大小、GC含量、重复序列比例和基因结构特点等信息,设计候选酶切方案,保证分子标记在全基因组范围内开发的密度及均匀性。本试验采用 *Rsa* I 内切酶,酶切片段长度为 414~464 bp。

将 1.2 节处理好的样品进行精确定量,根据内切酶酶切末端自动添加与引物匹配的接头,然后在芯片表面进行 PCR,程序与一般 PCR 相同,DNA 片段扩增为单分子簇。单分子 DNA 簇完成后将芯片转入高通量测序中,开始测序。

1.4 SLAF 标记的开发

样品基因组经酶切处理后打断为多个小片段,每个片段相当于 1 个标记位点,同一位点测定的序列通过相似性聚类,形成一个组。一个组中一般存在 1~4 条高深度片段,其余均为低深度片段。本试验将高深度片段视为潜在的基因型,低深度片段则可能是由于测序错误导致,因此通过纠错策略将低深度片段的测序深度加到高深度片段上。

由于 SLAF 为同一位点的酶切片段,可根据 SLAF 酶切片段的深度确保 SLAF 的准确度,而随着测序的延伸,测定序列末端的质量值会降低,所以测序时,只使用序列的前 80 bp。

1.5 多态性分析

对测序获得的 SLAF 标签,依据等位基因数和基因型序列之间的差异性进行多态性分析。当基因型数高于物种等位基因数时,判断该标签为重复序列(Repeat);当基因型数为 1 或样品间基因型无差异时,则认为该 SLAF 标签无多态性;基因型序列间存在差异的标签为多态性标记,有 SNP、EPNSP 和

INDEL 3 类,统称为 Marker,其中 SNP 为单核苷酸突变,EPNSP 为酶切位点突变,INDEL 为插入缺失;未知类型标记(Unknown)可能为定位错误导致。

1.6 关联性分析

关联分析的目的是检测与性状关联的分子标记,关联分析的基础是连锁遗传,在发生连锁的前提下,与性状相关联的分子标记的分离情况与基因的分离比相关。若想得到多态性标记,首先需要根据亲本的性状及杂合类型选择相应的标记,其次由于两个混池中的子代为性状极端分离的群体,因此在每一个混池中都会出现与父母本基因型频率不一致的个体,由此获得与性状关联的分子标记。

根据番茄的参考基因组,通过差异标记确定性状相关的候选区域,若某一区域内出现多个(2 个以上)连续的差异标记,则说明此区域可能与控制性状的基因相关联,即将此区域定义为性状关联的候选区域。

1.7 关联区域内基因的功能注释

由于 GO 数据库适用于各个物种,能对基因、蛋白质进行限定和描述,所以对关联区域内的基因进行 GO 功能注释,并以所有基因为背景进行功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 番茄基因组 DNA 的提取

通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的浓度及纯度发现,所提取的 DNA 浓度较高,无蛋白质、RNA 等污染,其浓度和纯度都满足试验对 DNA 质量的要求(图 1)。

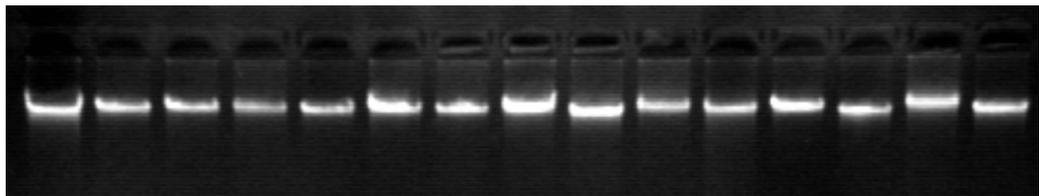


图 1 番茄基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of tomato DNA

2.2 番茄基因组测序结果的评估

测序质量值可用来评估碱基的测序错误率,碱基质量值越高,对应的碱基测序错误率越低,同时测序错误率还受测序仪本身、测序试剂、样品等多个因素的共同影响。通常测序序列 5' 端前几个碱基的错

误率相对较高,随着序列的延伸,3' 端的碱基错误率也会不断升高,这是由高通量测序的技术特点决定的。另外,SLAF 所测序列为基因组酶切后的 DNA 片段,由于酶切位点在基因组上的分布近似均匀,同时,G/C、A/T 含量也近似均匀。因此,根据大数定

理,在每个测序循环上,G/C、A/T 含量应当分别相等,且等于基因组的 G/C、A/T 含量。但是,受 SLAF-Seq 技术特点的影响,测定序列的前两个碱基都是酶切位点序列,因此在碱基分布中会出现前端波动较大的现象。

通过测序,从 4 种番茄 DNA 池中共获得 24.27 Mb 的测定序列。对各样品的测序数据进行评估,评估指标包括测定序列的长度、数量、总数据量、Q20 和 G/C 含量,结果见表 1。

表 1 番茄基因组测序数据的评估统计

Table 1 Statistics of sample sequencing data of genome in tomato

样品编号 ID	Read 长度/bp Read length	样品测定序列数 Read number	样品碱基数 Total nucleotides	G/C 含量/% G/C content	Q20 含量/% Q20 content
aa	101+101	7 500 012	1 515 002 424	37.20	87.59
ab	101+101	7 728 839	1 561 225 478	36.61	89.61
M	101+101	4 629 268	935 112 136	37.21	88.82
P	101+101	4 410 749	890 971 298	36.10	90.56

注:“aa”为可育 DNA 混池;“ab”为不育 DNA 混池;“M”为母本 DNA;“P”为父本 DNA。

Note:“aa” is DNA pool of male-sterile;“ab” is DNA pool of male-fertility;“M” is DNA of maternal line;“P” is DNA of paternal line.

2.3 番茄基因组 SLAF 标记的开发

由于番茄有参考基因组,因此首先使用 Soap 软件将测定序列的前 80 bp 比对到参考基因组上,并定位到同一个位置的序列,组成一个组,对组进行纠错,最终获得 SLAF 标记 103 250 个,整体平均深度

达 160.39 倍。

根据 SLAF 标记的基因组定位结果,统计 SLAF 标记在各染色体上的数量,结果见表 2。由表 2 可见,SLAF 标记在基因组各染色体上分布较均匀,说明基因组简化测序成功。

表 2 SLAF 标签在番茄基因组各染色体上的数量

Table 2 Number of SLAF Markers on each chromosome of genome in tomato

染色体编号 Chr. ID	SLAF 标签数 SLAF number	染色体编号 Chr. ID	SLAF 标签数 SLAF number
SL2.40ch00	2 408	SL2.40ch07	8 896
SL2.40ch01	12 283	SL2.40ch08	8 835
SL2.40ch02	6 549	SL2.40ch09	8 321
SL2.40ch03	8 459	SL2.40ch10	8 606
SL2.40ch04	8 558	SL2.40ch11	6 727
SL2.40ch05	8 616	SL2.40ch12	8 861
SL2.40ch06	6 131	合计 Total	103 250

2.4 番茄基因组 SLAF 标记的多态性分析

对从番茄基因组各染色体上得到的 103 250 个 SLAF 标记,根据等位基因数和基因序列之间的差异进行多态性分析,结果共得到 4 种 SLAF 标记,分别为 SNP、无多态性、未知及重复类型。其中 SNP 为开发得到的多态性标记,称之为 Marker。通过分析检测共获得 6 892 个 Marker。各类型 SLAF 标记结果如表 3 所示。

根据定位结果,统计 Marker 在各染色体上的数量,结果(表 4)发现,定位在 SL2.40ch05 和 SL2.40ch11 染色体上的 Marker 最多,分别为 2 534 个和 1 894 个;定位在 SL2.40ch02 和 SL2.40ch06 染色体上的 Marker 最少,均为 104 个。

表 4 番茄基因组各染色体上的 Marker 数量

Table 4 Statistical of Markers on each chromosome in tomato

染色体编号 Chr ID	标记数量 Marker number	染色体编号 Chr ID	标记数量 Marker number
SL2.40ch00	216	SL2.40ch07	240
SL2.40ch01	264	SL2.40ch08	160
SL2.40ch02	104	SL2.40ch09	251
SL2.40ch03	271	SL2.40ch10	389
SL2.40ch04	350	SL2.40ch11	1 894
SL2.40ch05	2 534	SL2.40ch12	115
SL2.40ch06	104	合计 Total	6 892

表 3 番茄基因组中各类型 SLAF 标记的统计结果

Table 3 Statistical of SLAF Markers of genome in tomato

类型 Type	数量 Amount	比例/% Percent
单核苷酸突变 SNP	6 892	6.67
无多态性 No polymorphism	93 299	90.36
未知类型 Unknown	2 686	2.60
重复 Repeat	373	0.36
总计 Total	103 250	100

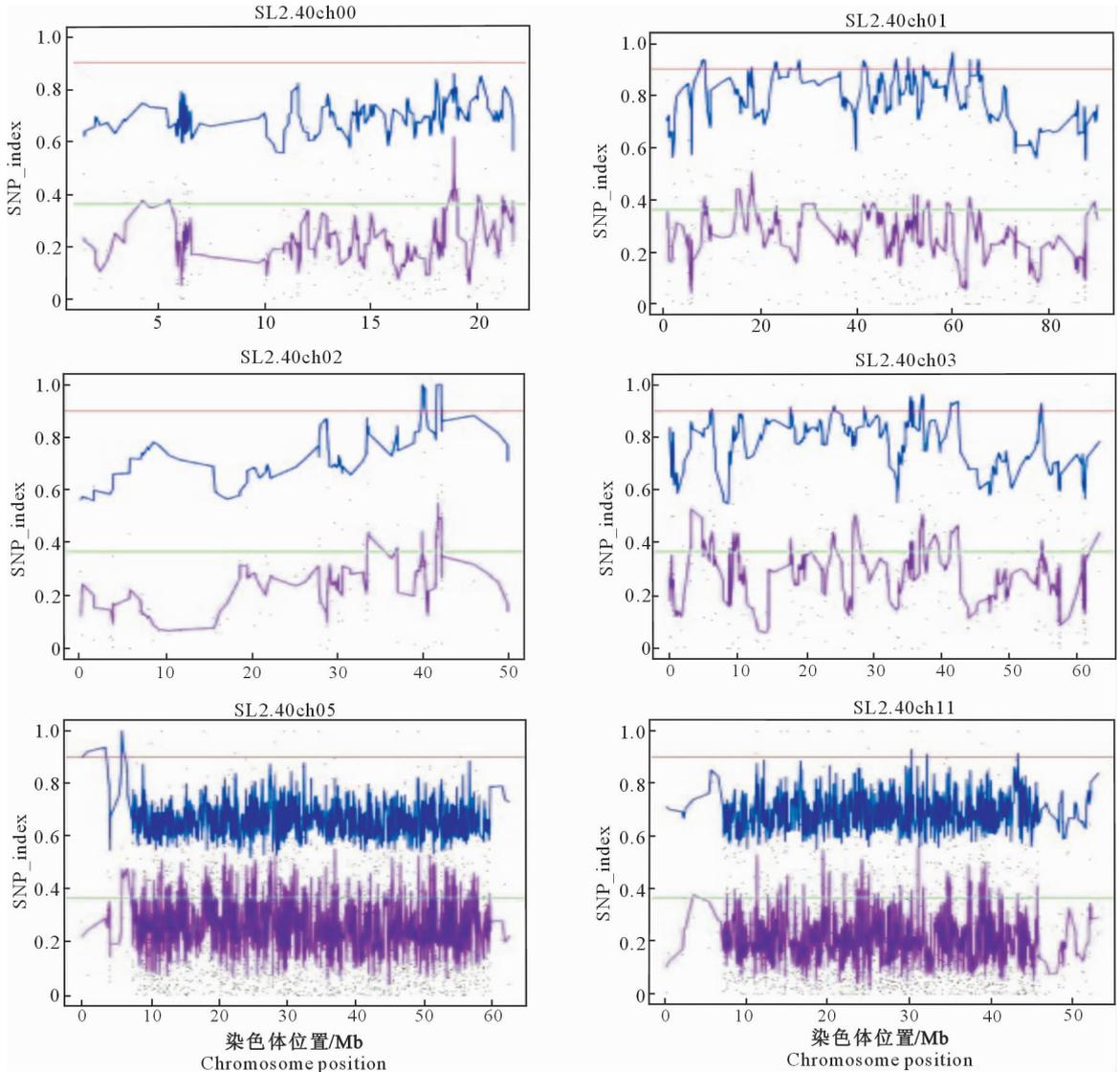
2.5 番茄基因组与雄性不育性状的关联性分析

对得到的 6 892 个番茄基因组 Marker,采用

SNP-index^[15] 关联方法进行检验分析。由于番茄为二倍体,所以每个 Marker 中有 2 个基因型序列,设 aa 群体为可育群体,ab 群体为不育群体,且不育为隐性性状。以 aa1 表示第 1 个基因型序列中 aa 样品的深度,aa2 表示第 2 个基因型序列中 aa 样品的深度;同理以 ab1 表示第 1 个基因型序列中 ab 样品的深度,ab2 表示第 2 个基因型序列中 ab 样品的深度,具体 SNP-index 计算公式及方法参考 Sun 等^[18] 的方法。

对得到的 Marker 分别计算两个混池的分值

(index),进而得到样品间的 SNP 分值(ΔSNP_{index})和最大分值 $[\max(ab_{index})]$,并对 SNP 分值和最大分值进行拟合。根据拟合后的值进行阈值的筛选发现,99% 的 Marker 最大分值拟合值小于 0.899 618,并且 90% 的 Marker SNP 分值拟合值小于 0.364 47,筛选拟合值同时在 2 个阈值以上的标记为差异标记^[18],如此共得到 37 个差异标记。这 37 个标记分布在 SL2.40ch01、SL2.40ch02、SL2.40ch03、SL2.40ch05、SL2.40ch11 号染色体上,数量分别为 8, 14,12,2,1 个(图 2)。



黑色散点表示计算得到的 ΔSNP_{index} 值;蓝色曲线表示 $\max(ab_{index})$ 拟合值;

红色线表示 99% $\max(ab_{index})$ 拟合值的阈值线;紫色曲线表示 ΔSNP_{index} 拟合值;绿色线表示 90% ΔSNP_{index} 拟合值的阈值线

Black scatter represents the value of ΔSNP_{index} ; blue curve line represents the value of $\max(ab_{index})$; red line represents the threshold of 99% of $\max(ab_{index})$; purple curve line represents the value of ΔSNP_{index} , and green line represents the threshold of 90% of ΔSNP_{index}

图 2 番茄基因组与雄性不育性状的各染色体拟合值分布图

Fig. 2 Distribution of SNP-index on each chromosome

同理,利用两个阈值筛选与该番茄雄性不育性状 相关的区域,将连续 2 个及 2 个以上的差异标记确定

为该番茄雄性不育性状的相关候选区域,最终共获得 146 个,信息统计结果见表 5。
与该雄性不育性状相关的差异标记 27 个,候选基因

表 5 番茄基因组与雄性不育性状的关联区域信息

Table 5 Information of associated candidate regions between the genome and male sterile in tomato

染色体编号 Chr ID	起始位置 Start	终止位置 End	区域大小/Mb Size	差异标记数量 Difference in marker number	基因数量 Gene number
SL2.40ch01	8 398 355	8 750 965	0.35	2	8
SL2.40ch01	63 713 116	63 725 562	0.01	2	2
SL2.40ch02	39 892 037	39 905 715	0.01	2	4
SL2.40ch02	41 537 763	42 122 150	0.58	11	82
SL2.40ch03	23 853 531	24 055 776	0.20	3	3
SL2.40ch03	37 219 076	37 258 846	0.04	2	0
SL2.40ch03	41 462 832	42 442 771	0.98	3	27
SL2.40ch05	5 973 774	6 130 437	0.16	2	20

2.6 番茄雄性不育性状关联区域内的基因注释

通过 GO 分析按照细胞组成(Cellular component)、分子功能(Molecular Function)、生化过程(Biological process)对番茄雄性不育性状关联基因进行分类,关联区域内基因 GO 分类统计结果见表 6。由表 6 可见,定位区内复杂大分子、细胞核、传感活性分子、接受体活性分子、发育进程、信号、生长、生物钟进程、

细胞增殖等类型基因聚集频率均高于番茄基因组内相关基因的平均值。其中,复杂大分子、细胞核、传感类活性分子、接受体活性分子和细胞增殖这类物质分子,一般直接或间接调控糖类等大分子代谢、细胞核形成、信号的传导接收以及细胞的增殖发育;而这类物质的合成代谢均与核雄性不育有一定的关联^[6-8]。

表 6 番茄雄性不育性状关联区域内基因的 GO 注释

Table 6 The GO classification of genes in associated regions of male sterile phenotype in tomato

基因类别 Gene classification	基因功能 Gene function	基因比例/% Percent of genes		基因数量 Number of genes	
		总比例 All gene	关联比例 Region gene	总数 All gene	关联数 Region gene
细胞组成 Cellular component	细胞部分 Cell part	94.51	91.26	24 120	94
	复杂大分子 Macromolecular complex	21.75	27.18	5 550	28
	膜包围内腔 Membrane-enclosed lumen	5.58	3.88	1 425	4
	细胞外区域成分 Extracellular region part	6.97	0.00	178	0
	细胞核 Nucleoid	0.30	0.97	77	1
分子功能 Genes of molecular function	结合分子 Binding	80.49	78.64	20 541	81
	转运活性分子 Transporter activity	8.65	6.80	2 207	7
	传感活性分子 Molecule transducer activity	3.93	6.80	1 003	7
	调节酶活性分子 Enzyme regulator activity	3.22	0.00	822	0
生化过程 Biological process	接受体活性分子 Receptor activity	2.69	6.80	687	7
	细胞加工 Cell process	92.18	90.29	23 525	93
	发育进程 Development process	70.11	78.64	17 891	81
	信号 Signaling	33.50	41.75	8 550	43
	生长 Growth	10.82	34.95	2 762	36
	生物钟进程 Rhythmic process	2.70	4.85	688	5
	细胞增殖 Cell proliferation	2.37	6.80	605	7
注释基因总数 Total of gene annotation				25 520	103

3 讨论

本研究选择的番茄不育母本是由栽培种突变

而来的,所以其遗传背景与栽培种父本基本相同。这导致在试验过程中进行 SLAF 标记筛选时其多态性效率较低,因此在 103 250 条 SLAF 标记中,仅有

6 892条为多态性标记,比率为 6.67%。这与王柏柯等^[22]、郭艳萍等^[23]关于雄性不育基因定位的研究结果一致。但多态性比率低的优点在于:由于不育母本与可育父本均为栽培种,其十分相似的遗传背景,对研究单位点的功能基因非常有效,可高效地避免假阳性位点。通过这种方法筛选出的多态性标记,一般均可用于候选基因的关联分析,其目标基因的候选区域也较窄,本研究最终分析的 8 个候选区域中,有 5 个候选区域的物理长度都在 0.20 Mb 内,其中 4 个候选区域内只有 4 个以下的候选基因。另外,从形态学角度分析,此番茄雄性不育性状与苗期绿茎性状紧密连锁,有利于此类雄性不育基因在制种生产中的应用。

基于简化基因组测序技术的候选基因定位,是集 BSA 技术、生物信息学和高通量测序技术为一体的一种简单高效的基因定位方法。应用这种方法,首先要构建足够多个体的 DNA 混合池,进行高密度基因组范围的扫描测序,以获得高覆盖的大量基因组序列信息,进而完成基因定位。目前,利用此类方法已定位的基因有甜瓜含糖量和酸度性状的候选基因^[21]、小麦高蛋白含量基因^[24]和水稻真菌稻瘟病候选基因^[21]。本研究利用简化基因组测序技术,通过番茄雄性不育系和雄性可育系的 F₂ 分离群体,构建分离群体的 DNA 混合池。经过扫描测序,开发出了足够的具有多态性的 SLAF 标记,通过不育表型与多态性 SLAF 标记的关联分析,最终将番茄雄性不育基因定位在 8 个候选区域内。

近年来关联分析方法在作物基因定位中的作用越来越重要^[25],且越来越多高效实用的群体结构统计方法被发掘应用,其中一个最重要的参数就是整个基因组连锁不平衡的强度。连锁不平衡就是等位基因的非随机关联,其非随机关联的强度决定了关联定位的可信度^[26]。本试验利用简化基因组测序获得的多态性 SLAF 标记,通过关联分析定位番茄雄性不育基因,将不育目标基因定位在番茄第 1、2、3 和 5 号染色体上的 8 个候选区域。其中最小候选区域为 0.01 Mb,最大候选区域为 0.98 Mb,候选区域最少只含 2 个候选基因(排除不含候选基因的 1 个候选区域),最多含 82 个候选基因。利用这些不育候选基因,可以通过进一步精细定位和反向遗传学验证,确定及克隆不育目标基因。

[参考文献]

[1] Wilson Z A, Zhang D B. From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(5):

1479-1492.

- [2] Deveshwar P, Bovill W D, Sharma R, et al. Analysis of anther transcriptomes to identify genes contributing to meiosis and male gametophyte development in rice [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 78.
- [3] Honys D, Twell D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *Genome Biology*, 2004, 5(11): R85.
- [4] Feng B, Lu D, Ma X, et al. Regulation of the *Arabidopsis* anther transcriptome by DYT1 for pollen development [J]. *The Plant Journal*, 2012, 72(4): 612-624.
- [5] Smyth D R, Bowman J L, Meyerowitz E M. Early flower development in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 1990, 2: 755-767.
- [6] Brukhin V, Hernould M, Gonzalez N, et al. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2003, 15: 311-320.
- [7] Xu J, Yang C, Yuan Z, et al. The aborted microspores regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(1): 91-107.
- [8] Rasmussen N, Green P B. Organogenesis in flowers of the homeotic green pistillate mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *American Journal of Botany*, 1993, 80: 805-813.
- [9] Gorman S W, McCormick S. Male sterility in tomato [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1997, 16: 31-53.
- [10] Rick C M, Butler L. Cytogenetics of the tomato [J]. *Advances in Genetics*, 1956, 8: 267-382.
- [11] Altshuler D, Pollara V J, Cowles C R, et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing [J]. *Nature*, 2000, 407: 513-516.
- [12] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt S C, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms [J]. *Nature*, 2001, 409: 928-933.
- [13] Baird N A, Etter P D, Atwood T S, et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3376.
- [14] Hyten D L, Cannon S B, Song Q, et al. High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 38.
- [15] 张红, 吴海波, 李寐华, 等. 基于 super-BSA 技术开发甜瓜含糖量和酸度性状的功能分子标记 [J]. *中国瓜菜*, 2015, 28(6): 21-25.
Zhang H, Wu H B, Li M H, et al. Super-BSA-based development of functional molecular markers of sugar content and acidity of melon [J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2015, 28(6): 21-25.
- [16] Bernaudo R. Molecular marker and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years [J]. *Crop Science*, 2008, 48(5): 1649-1664.
- [17] Fazio G, Staub J, Stevens M. Genetic mapping and QTL analysis of horticulture traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines [J]. *Theoretical and Applied*

- Genetics, 2003, 107(5): 864-874.
- [18] Sun X W, Liu D Y, Zhang X F, et al. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. PLoS One, 2013, 8(3): 1-9.
- [19] Jiao Y, Zhao H, Ren L, et al. Genome-wide genetic change during modern breeding of maize [J]. Nature Genetic, 2012, 44(7): 812-815.
- [20] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap [J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(2): 174-178.
- [21] Takagi H, Abe A, Yoshida K, et al. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked population [J]. Plant Journal, 2013, 74(1): 174-183.
- [22] 王柏柯, 杨生保, 余庆辉, 等. 加工番茄种质资源的 SSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 196-200.
Wang B K, Yang S B, Yu Q H, et al. Genetic analysis of processing tomato germplasm by SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(1): 196-200.
- [23] 郭艳萍, 张改生, 程海刚, 等. 小麦粘类 CMS 育性恢复基因 SSR 分子标记与定位 [J]. 核农学报, 2009, 23(5): 729-736.
Guo Y P, Zhang G S, Cheng H G, et al. Mapping of fertility restoring gene for male sterility with *Ae. kotschyi*, *Ae. Variabilis*, *Ae. ventricosa* cytoplasm by using SSR markers in wheat [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2009, 23(5): 729-736.
- [24] Trick M, Adamski N M, Mugford S G, et al. Combining SNP discovery from next-generation sequencing data with bulked segregant analysis (BSA) to fine-map genes in polyploidy wheat [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 14.
- [25] Zhu C S, Gore M, Edward S, et al. Status and prospects of association mapping in plants [J]. The Plant Genome, 2008, 1: 5-20.
- [26] Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(2): 94-100.

(上接第 176 页)

- [27] 夏宁. 桃设施栽培几个技术及其原理的研究 [D]. 山东泰安: 山东农业大学, 1997.
Xia N. Several technique and its principle of peach planting [D]. Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 1997.
- [28] Horvath D P, Anderson J V, Chao W S, et al. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy [J]. Trends Plant Sci, 2003, 8: 534-540.
- [29] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, et al. Molecular aspects of seed dormancy [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 387-415.
- [30] Luo X, Yi J, Zhong X H, et al. Cloning, characterization and expression analysis of key genes involved in ABA metabolism in *Gladiolus cormels* during storage [J]. Sci Hortic-Amsterdam, 2012, 143: 115-121.
- [31] Delrio L A, Sandalio L M, Altamare D A, et al. Mitochondria and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384): 923-933.
- [32] 刘波, 郑国生, 赵海军. 不同低温时数对花芽解除休眠的影响 [J]. 山东农业科学, 2004(2): 41-42.
Liu B, Zheng G S, Zhao H J. The influence of peony flower bud dormant release with different hours' low temperature [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2004(2): 41-42.
- [33] Sauter A, Abrams S R, Hartung W. Structural requirements of abscisic acid (ABA) and its impact on water flow during radial transport of ABA analogues through maize roots [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2002, 21(1): 50-59.
- [34] 陈新露, 韩劲, 王莲英, 等. 牡丹冬季室内催花过程中内源激素含量的变化 [J]. 植物资源与环境, 1999, 8(4): 42-46.
Chen X L, Han J, Wang L Y, et al. Changes of endogenous phytohormones in the course of forcing peony in greenhouse [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 1999, 8(4): 42-46.
- [35] 段成国, 刘焕芳, 李宪利. 内源激素对落叶果树芽休眠的调控 [J]. 河北果树, 2005(2): 1-2.
Duan C G, Liu H F, Li X L. The endogenous hormone regulation of bud dormancy about deciduous fruit trees [J]. Hebei Fruits, 2005(2): 1-2.