果 树 学 报 2022,39(10):1813-1823
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20220220

西瓜果皮覆纹调控基因的定位与候选基因分析

侯 冲[1],薛 洋[1],李文东[2],赵 平[3],李 杰[1],王方方[1],徐志红[1*],王平勇[1*]

([1]中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009;[2]潍坊创科种苗有限公司,山东昌乐 262400;[3]昌乐县农业农村局,山东昌乐 262400)

摘 要:【目的】精细定位调控西瓜果皮覆纹类型基因,开发分子标记。**【方法】**以选育的果皮覆齿条西瓜材料H2和覆网纹西瓜材料H9的2个高代自交系为亲本,构建F_1、BC_1P_1、BC_1P_2和F_2群体。利用两亲本和F_2群体中的果皮覆齿条单株和覆网纹单株分别构建2个亲本DNA混池和2个F_2混池,开展全基因组混池重测序分析。基于重测序数据,初步定位候选基因,之后在初定位区间内开发和筛选多态性InDel标记,利用F_2分离群体对候选基因进行进一步定位,筛选连锁标记,并分析区间内候选基因的序列。**【结果】**西瓜果皮覆纹性状是由1对显性基因控制的,西瓜果皮覆齿条对网纹为显性。通过混池重测序分析,初步将候选基因定位在6号染色体24.3~29.4 Mb的区间。在初定位区间内开发和筛选多态性InDel标记,利用全部368个F_2单株将*ClRs*(*Citrullus lanatus* rind stripe)基因定位在28 252 905 ~28 558 579 bp约305.7 kb的区间内,该区间内有35个基因,根据功能注释发现有4个基因(*Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126680*、*Cla97C06G126710*和*Cla97C06G126770*)的功能可能与果皮覆纹相关。通过克隆4个基因的CDS序列,发现*Cla97C06G126680*的CDS序列在两亲本中没有差异位点,其余3个基因均存在非同义突变位点。通过在F_2群体和自然群体材料中对这些突变位点的基因型进行鉴定,发现3个基因的非同义突变位点与目标性状是共分离的。**【结论】**将西瓜果皮覆纹调控基因定位在6号染色体305.7 kb区间内并开发了可用于辅助分子育种的标记InDel-93,*Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126680*、*Cla97C06G126710*、*Cla97C06G126770*可能是西瓜果皮覆纹候选调控基因。

关键词:西瓜;果皮覆纹;基因定位;候选基因

中图分类号:S651 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2022)10-1813-11

Genetic mapping and analysis of candidate genes regulating watermelon rind stripe

HOU Chong[1], XUE Yang[1], LI Wendong[2], ZHAO Ping[3], LI Jie[1], WANG Fangfang[1], XU Zhihong[1*], WANG Pingyong[1*]

([1]*Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China;* [2]*Weifang Chuangke Seedling Co. Ltd, Changle 262400, Shangdong, China;* [3]*Agricultural and rural Bureau of Changle County, Changle 262400, Shangdong, China*)

Abstract:【Objective】Watermelon is an important crop in China, which plays a great role in increasing farmers' income and meeting people's growing life needs. As one of the most important appearance traits of Cucurbitaceae crops, the rind stripe is one of the important traits that breeders, growers and consumers may concern, and has important research value. Several regulation genes in Cucurbitaceae crops have been discovered in recent years, which are of great significance for molecular marker-assisted breeding and for understanding their regulation mechanism. In this study, genes that regulate watermelon rind stripe types were mapped and markers to aid molecular breeding were developed.【Methods】F_1, BC_1P_1, BC_1P_2 and F_2 populations were constructed by crossing the inbred line H2 (rind pencil stripe,

收稿日期:2022-04-25 **接受日期:**2022-07-05

基金项目:中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2022-ZFRI);河南省科技攻关项目(212102110120);南疆重点产业创新发展支撑计划项目(2021DB013);河南省西瓜甜瓜产业技术体系(HARS-22-10-S);潍坊市种业创新团队建设项目;中国农业科学院郑州果树研究所协同创新专项(ZGS202102)

作者简介:侯冲,女,在读硕士研究生,主要从事西瓜分子生物学研究。Tel:0371-65330930,E-mail:houchong9756@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:xuzhihong@caas.cn;E-mail:wangpingyong@caas.cn

male) and inbred line H9 (netted stripe, female) to map the gene(s) controlling the rind stripe types of watermelon. All materials were grown in greenhouses in Xinxiang Experimental Base of Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. From F_2 segregation population, 7 plants for rind pencil trait and 13 plants for netted trait were selected. DNA was extracted by Cetyltriethylammnonium Bromide (CTAB) method, and two DNA mixing pools (dominant pool and recessive pool) were constructed separately. The constructed two DNA mixing pools of F_2 population and two parent DNA mixing pools were used for database construction and sequencing, and the whole genome resequencing data were obtained. Using Burrows-Wheeler-Alignment Tool (BWA) (http://bio-bwa.sourceforge.net/), reads were aligned to Watermelon reference genome [Watermelon (97103) v2]. The promising SNP loci were detected by Sequence Alignment/mapping (SAMtools) (http://www.htslib.org/). According to the initial positioning candidate interval, insertion-deletion (InDel) markers with good polymorphism were designed and selected to distinguish the genotype of F_2 single plant by polyacrylamide gel electrophoresis. The candidate interval was further narrowed. Candidate genes were selected based on the functional annotations and sequences. Using non-synonymous mutations of candidate genes, Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) and InDel markers were designed. Linkage relationship between these markers and target gene was verified by the F_2 populations and natural population materials.【Results】Genetic analysis indicated that the separation ratio of rind pencil stripe to netted stripe was 3∶1 ($\chi^2 = 0.13 < \chi^2_{0.05} = 3.841$). The separation ratio of rind pencil stripe to netted stripe in BC_1P_1 population was 1∶1 ($\chi^2 = 0.16 < \chi^2_{0.05} = 3.841$). The BC_1P_2 population were all rind pencil stripe. The genetic analysis showed that the rind pencil stripe was dominant to netted stripe and was controlled by a pair of dominant gene *ClRs* (*Citrullus lanatus* rind stripe). The resequencing and association analysis indicated the *ClRs* gene was preliminarily located in the interval of 24.3−29.4 Mb on chromosome 6. In order to further narrow the target interval, the polymorphic InDel markers were developed and screened in the initial interval, and all 368 F_2 individual plants were used to fine-map the *ClRs* gene. Finally, 21 markers were used to locate the *ClRs* gene between the markers Indel-128 and Indel-124, with genetic distances of 1.5 cm and 3.0 cm, respectively, within the region of 28 252 905 bp−28 558 579 bp on chromosome 6. There were 35 genes in this region. According to the functional annotation, four genes (*Cla97C06G126560*, *Cla97C06G126680*, *Cla97C06G126710* and *Cla97C06G126770*) have their functions related to the development of rind stripe. By cloning the CDS sequences of the four genes, the CDS sequences encoding the Myb transcription factor *Cla97C06G126680* were identical in the two parents, and the other three genes all had non-synonymous mutation sites. Two non-synonymous mutations caused by single base substitution were detected in the coding region of *Cla97C06G126560* gene; three non-synonymous mutations caused by single base substitution were detected in the coding region of *Cla97C06G126710* gene; there were 8 non-synonymous mutation sites caused by single base substitution and 1 tribase insertion deletion site in the coding region of *Cla97C06G126770* gene. Using non-synonymous mutations of three genes, dCAPS and InDel markers were designed. Linkage relationship between these markers and target gene was verified by the F_2 populations and the other 20 watermelon materials. By identifying the genotypes of these mutation sites in F_2 population and natural population materials, it was shown that the non-synonymous mutation sites of the three genes were co-segregated with the target trait. The developed molecular marker InDel-93 can be used for molecular assisted breeding.【Conclusion】F_1, BC_1P_1, BC_1P_2 and F_2 populations were constructed by crossing the inbred line H2 (rind pencil stripe, male) and inbred line H9 (netted pencil stripe, female) to map the gene (s) controlling the rind pencil stripe types of watermelon. The regulatory genes of watermelon rind stripe were

mapped to the 305.7 kb interval on chromosome 6. No recombination progeny was screened out after further expanding the F_2 population, which perhaps induced by the recombination inhibition in this chromosome region. According to the functional annotation, four genes (*Cla97C06G126560*, *Cla97C06G126680*, *Cla97C06G126710* and *Cla97C06G126770*) probably have functions related to the development of rind stripe. We also developed an InDel-93 marker with high recognition and obvious difference, which can be used in molecular assisted breeding.

Key words: Watermelon; Rind stripe; Genetic mapping; Candidate genes

西瓜（*Citrullus lanatus* L.）是葫芦科、西瓜属、1年生蔓生藤本植物，原产地为非洲，果肉味甜，能降温去暑，在我国是一种重要的水果型蔬菜作物，在促进农民快速增收和满足人民日益增长的生活需求方面发挥了巨大作用。分子标记辅助选择育种在现代育种过程中发挥重要作用，通过与常规育种相结合，能够准确、快捷地选择具有目标基因或性状的西瓜育种材料，可大大提高育种效率，加快育种进程[1-2]。果皮覆纹是葫芦科作物最为重要的外观品质之一，是育种家、种植者和消费者日益关注的重要性状，具有重要的研究价值。

近年来，多个葫芦科作物的果皮覆纹调控基因得到挖掘，对开展分子标记辅助育种和揭示其调控机制具有重要意义。研究表明，甜瓜果皮有覆纹对无覆纹是显性的，Liu等[3]利用绿皮有条纹材料和白皮无条纹材料构建F_2群体，将单显性基因*St3*定位在4号染色体172.8 kb区间内。Lü等[4]利用带斑点材料BIM16553和无斑点材料IM16559将控制甜瓜果皮斑点的单显性基因*CmSp-1*定位在2号染色体280.872 kb区间内。在黄瓜果皮覆纹性状的研究中，Song等[5]利用不规则条纹材料和均匀绿皮自交系材料构建F_2群体，将单隐性基因*ist*定位在黄瓜1号染色体144 kb区间内，候选基因*Csa1G005490*编码聚半乳糖醛酸酶-1非催化亚基β蛋白（PG1β）。

西瓜作为葫芦科重要作物之一，前人在果皮覆纹方面也开展了一些研究。Gusmini等[6]利用西瓜果皮表面不连续条纹材料和连续条纹材料为亲本构建六世代群体发现西瓜果皮表面不连续条纹是由隐性基因*ins*控制的。Yang等[7]利用西瓜绿色无条纹材料分别和绿色有条纹、黄色有条纹、深绿色有条纹材料进行杂交，通过构建3个不同的F_2群体，发现西瓜果皮条纹性状由单基因*S*控制，其中有条纹对无条纹为显性。Zhang等[8]研究表明西瓜果皮表面宽条纹受显性单基因控制，将控制西瓜果皮宽条纹性状的主效基因*RS8.1*定位在8号染色体上约2.3 cM。Yue等[9]通过遗传分析表明西瓜齿条对网纹为显性，将西瓜条纹基因*CISP*定位在6号染色体28.17~28.78 Mb约612 kb区间内。

在园艺作物中，不同类型的果皮条纹是由一些功能基因或转录因子调控导致果皮色素积累引起的，苹果和梨的果皮条纹被认为是由Myb10的甲基化调控的[10-11]。Avdeev等[12]研究表明番茄Karsten ex Farw果皮上的绿色条纹表型不稳定是受跳跃基因*gs*调控的。而Liu等[13]发现*TAGL1*启动子的甲基化差异导致番茄果皮色素沉着不均匀，红色条纹和黄色条纹随机分布在红色成熟果实果皮上。

笔者在本研究中以实验室选育的果皮覆齿条西瓜自交系材料H2和覆网纹西瓜自交系材料H9为亲本，构建F_1、BC_1P_1、BC_1P_2和F_2群体。对西瓜果皮覆纹性状进行遗传分析发现西瓜果皮覆齿条对网纹为显性，通过全基因组混池重测序分析和基因定位，最终将西瓜果皮覆纹调控基因*ClRs*（*Citrullus lanatus* rind stripe）定位在6号染色体305.7 kb区域内，初步预测了4个候选基因，同时开发了1个可用于辅助育种的分子标记。

1　材料和方法

1.1　试验材料及实验试剂

试验材料：以本实验室选育的高代自交系材料H9为母本（P_1，网纹），高代自交系材料H2为父本（P_2，齿条），利用2个亲本配制F_1、BC_1P_1、BC_1P_2和F_2群体。用于标记鉴定的自然群体材料由国家园艺种质资源库提供。所有材料均种植在中国农业科学院郑州果树研究所新乡试验基地大棚内，两亲本各定植20株、F_1群体定植50株，F_2群体定植368株、回交群体各定植100株。成熟期进行调查，将果皮覆纹类型分为齿条和网纹。

实验试剂：RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA

提取试剂盒（DP441，TIANGEN）、2×phanta Max Master Mix DNA聚合酶（P515，GenStar）、StarScript Ⅱ cDNA第一链合成预混试剂（含去基因组）（A224-10，GenStar）、StarPrep快速DNA胶回收试剂盒（D205-4，GenStar）、EZ-Blunt零背景pTOPO平末端克隆试剂盒（T181-100，GenStar）、DH5α感受态细胞（G6016，昂羽生物）、氯仿、异戊醇、异丙醇、70%乙醇等。

1.2 DNA提取和混池构建

从F_2分离群体中，挑选齿条性状单株15株，网纹性状单株15株，用CTAB方法提取DNA，分别构建2个DNA混池（显性池和隐性池），把构建的2个DNA混池和2个亲本DNA池送至湖南拓唯生物科技有限公司进行建库测序得到全基因组重测序数据。

1.3 分子标记开发与基因定位

分子标记开发：根据全基因组重测序数据，结合西瓜参考基因组数据和初定位结果，查找插入或缺失5个碱基以上的位点设计InDel标记，在位点的前后各截取150~200 bp作为参考序列，引物的长度一般为15~30 bp，GC含量适宜，上下游引物退火温度差值小于2 ℃。

基因定位：利用多态性较好的InDel标记通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对368个F_2单株的基因型进行鉴定，利用筛选出的重组单株进一步缩小候选区间。PCR反应体系：西瓜叶片DNA 1 μL，正、反向引物各0.5 μL，2×phanta Max Master Mix DNA聚合酶5 μL，用3 μL ddH_2O将总体积补齐至10 μL。扩增程序为：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，35个循环；72 ℃延伸8 min。对PCR产物用7%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、硝酸银染色后拍照观察记录。

1.4 候选基因的序列分析

将西瓜叶片在液氮中迅速研磨成粉末状后按照RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提供的方法提取总RNA。采用StarScript II cDNA第一链合成预混试剂（含去基因组）两步法合成cDNA用于后续试验。

基因扩增PCR体系：西瓜叶片cDNA 1 μL，正、反向引物各0.5 μL，2×phanta Max Master Mix DNA聚合酶12.5 μL，用10.5 μL ddH_2O将总体积补齐至25 μL。扩增程序：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火45 s，72 ℃延伸90 s，35个循环；72 ℃延伸8 min。

得到的扩增产物，根据其片段大小选择相应浓度的琼脂糖凝胶，电泳10 min之后，在紫外灯下迅速切出目的片段，采用StarPrep快速DNA胶回收试剂盒回收纯化DNA片段。利用EZ-Blunt零背景pTOPO平末端克隆试剂盒连接目的片段，将连接产物加入DH5α感受态细胞中，冰上静置25 min；42 ℃水浴热激45 s，迅速放回冰上并静置2 min；向离心管中加入700 μL不含抗生素的LB，混匀后37 ℃、200 r·min^{-1}复苏60 min；5000 r·min^{-1}离心1 min收菌，留取100 μL左右上清液轻轻吹打重悬菌块并涂布到含氨苄青霉素的LB培养基上；将平板倒置放于37 ℃培养箱过夜培养；向2 mL离心管中加入1 mL含氨苄青霉素的LB液体培养基，待培养基表面长出菌斑后，挑取单个菌斑到装有培养基的离心管中，37 ℃、150 r·min^{-1}振荡过夜培养；吸取少量菌液作为模板进行PCR扩增，琼脂糖凝胶电泳检测，选取阳性克隆的菌液由生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，所得序列用DNAMAN软件拼接比对。

2 结果与分析

2.1 西瓜果皮覆纹性状由一对显性基因控制

为研究西瓜果皮覆纹的遗传规律，以本实验室选育的高代自交系材料H9为母本（P_1，网纹），以高代自交系材料H2为父本（P_2，齿条）（图1），利用2个亲本配制得到F_1、BC_1P_1、BC_1P_2和F_2群体。所得F_1代的西瓜果皮覆纹均表现为齿条，证明齿条对网纹是显性的。368个F_2单株果皮覆纹为齿条与覆网纹的比例为279∶89，经卡方检验符合3∶1的孟德尔分离比（$\chi^2=0.13<\chi^2_{0.05}=3.841$），$BC_1P_1$群体中果皮覆纹为齿条与网纹的分离比符合1∶1的理论比（$\chi^2=0.16<\chi^2_{0.05}=3.841$），$BC_1P_2$群体中西瓜果皮覆纹全为齿条，结果表明，西瓜果皮齿条由一对显性基因控制（表1）。

2.2 果皮覆纹基因*ClRs*的初步定位

通过对双亲和2个F_2代DNA混池进行全基因组重测序，产生26.5 Gb的reads数据。利用BWA软件将reads比对到西瓜参考基因组［Watermelon（97103）v2，http://cucurbitgenomics.org/organism/21］上，通过SAMtools（http://www.htslib.org/）软件寻找

A. H_2; B. H_9; C. F_1

图 1　双亲和 F_1 果皮覆纹表型

Fig. 1　Parents and F_1 rind stripe phenotypic

表 1　西瓜果皮覆纹性状的遗传分析

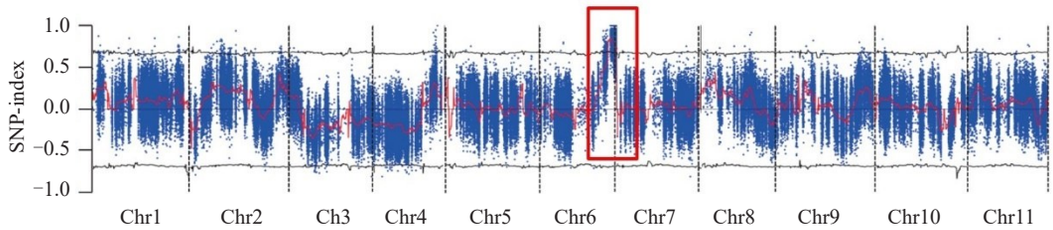
Table 1　Genetic analysis of watermelon rind stripe

群体 Populations	植株总数 Number of total plants	齿条植株数 Number of rind pencil stripe	网纹植株数 Number of netted stripe	理论分离比 Theoretical separation ratio	卡方值 Chi-square value
P_1	20	0	20		
P_2	20	20	0		
F_1	50	50	0		
F_2	368	279	89	3∶1	0.13
BC_1P_1	100	52	48	1∶1	0.16
BC_1P_2	100	100	0		

Note：$\chi^2_{0.05}$=3.841.

全基因组的SNP位点。显性亲本池、隐性亲本池、F_2群体显性池、F_2群体隐性池的测序深度分别为17×、12×、20×、18×，均覆盖全基因组序列的95%以上。碱基质量值≥30，mapping质量值≥30，碱基depth在双亲中≥2且≤80，同时满足碱基depth在2个F_2混池中≥2且≤80，共获得206 033个差异SNP。以1 Mb为窗口，100 kb为步长画图。

由于与目标性状相关联的SNP在染色体上与其周围的SNPs是连锁遗传，因此在隐性池与显性池的SNPindex差值应在0.5以上，或接近于1，而在没有性状关联的基因组区域ΔSNPindex显示在0.0上下随机分布。观察ΔSNPindex值分布，根据2个子代池的SNP-index在基因组上的分布，挑选出1个子代池中SNP-index接近于1，在另一个子代池中SNP-index接近为0，且两者差异在一定阈值之上的区域，笔者发现6号染色体上有个候选区间（24.3~29.4 Mb）（图2）。



横轴表示染色体长度；纵轴表示 SNP-index（SNP-index 表示隐性池 SNPindex 减去显性池 SNPindex）；红色方框表示初定位候选区间。

The horizontal axis represents chromosome length and the vertical axis represents SNP-index (SNP-index represents recessive pool SNPindex minus dominant pool SNPindex, The red box represents the initial positioning candidate interval.

图 2　西瓜果皮覆纹基因的初定位

Fig. 2　Initial location of watermelon rind stripe gene

2.3 果皮覆纹基因*ClRs*的进一步定位

为了进一步缩小定位区间，利用两亲本基因组重测序数据设计InDel标记并验证标记在亲本间的多态性。选用多态性较好的InDel标记和全部368个F_2单株进行基因定位。利用JoinMap软件和21个InDel标记，将*ClRs*基因定位在标记InDel-128和InDel-124之间，遗传距离分别为1.5 cM和3.0 cM，位于6号染色体28 252 905~28 558 579 bp之间（图3，表2）。

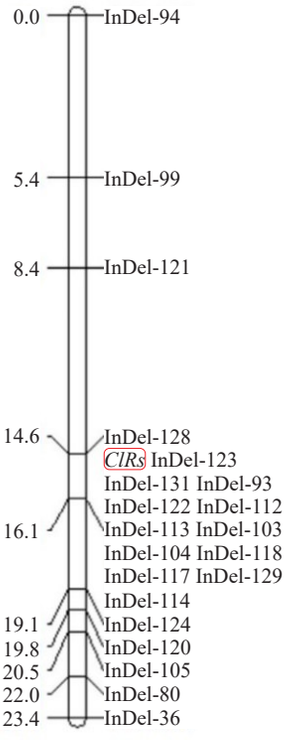


图3 西瓜果皮覆纹基因*ClRs*遗传图谱

Fig. 3 Genetic map of *ClRs* controlling watermelon rind stripe type

2.4 候选基因的筛选

根据基因定位结果，区间内有35个基因，结合西瓜基因组注释信息以及前人有关果皮覆纹调控基因的报道，初步筛选到4个可能与西瓜果皮覆纹相关的基因（表3）。*Cla97C06G126560*编码多聚半乳糖醛酸酶-1非催化亚基β蛋白（PG1β）；*Cla97C06G126680*为Myb家族转录因子*Cla97C06G126710*编码WD40蛋白；*Cla97C06G126770*编码MORC家族cw型锌指蛋白。通过克隆基因的编码区序列发现*Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126710*和*Cla97C06G126770* 3个基因的编码区序列在两亲

表2 基因定位所需引物序列及染色体位置

Table 2 Sequence of primers and chromosome position required for gene localization

标记 Marker name	位置 Position/bp	上游引物（5’-3’） Forward primer（5’-3’）	下游引物（5’-3’） Reverse primer（5’-3’）
InDel-94	27 722 998~27 723 190	AGTTGATGTGTCTCCCAACAA	CCACAAGCAAACATGGTGGT
InDel-99	27 731 628~27 731 874	TCCCCTGAAGGCTCAACA	ACCCCCTCCTTCAACCACA
InDel-121	28 107 940~28 108 289	TGCTCGTAATTCAACTACCACA	GTGTTAGAGTCCTTGATGTGC
InDel-128	28 252 856~28 253 105	GGAGTGTGTATAGAAGAGGG	GCAAGTGACGAGGAAAATG
InDel-123	28 539 985~28 540 284	ACTACGCTAAGCTCACTTTGA	CATGTTCCTACTTCCTAGGGTC
InDel-131	28 541,981~28 542 127	GGTAAGATAAAATTATAGTGTGAGGG	CAACCAAACAAAGTATTTCTTGATTTC
InDel-93	28 521 552~28 521 732	TCCACATTAGGGTCCAAACC	TGTCAGCTCAGGGATGTCA
InDel-122	28 286 621~28 286 824	GGTGTTCCCTTCCACCTTC	GAAAATGCTACCAAACACATATCTAG
InDel-112	28 340 589~28 340 820	TTTTGCCGTCCCCTCCAC	TCAGGCGGTGCAAGAACA
InDel-113	28 387 264~28 387 543	GAGCACCAAGGGGAAGCT	GCTTTTGTTGGCCTCATTCCT
InDel-103	28 485 414~28 485 657	CGTGGGTCGGGTCACTTT	GGGCGGCAATAGGACACC
InDel-104	28 511 051~28 511 330	CGGAGGCCCTACACTGGA	GGTCAGTGCCCTTTAGTTCTG
InDel-118	28 536 235~28 536 427	AGGCTGAAGGAAAGGAGGA	TGGATTGGCTTTAGGGTGGT
InDel-117	28 336 106~28 336 323	TGCAAACTTTGGTACGGCT	AGGTGCTTTAGGGTCTCCTCT
InDel-129	28 272 799~28 273 009	CATACAATACAATGATCTCCATCTTTC	GCATATAAATACACACTTCACCTC
InDel-114	28 404 010~28 404 230	AAACATGGTTCCAGAGCTGT	TTGAACCTAGGCGCGGTG
InDel-124	28 558 339~28 558 838	GGAGATAGGAGAAATGGTCGG	CAATGATGAGGTCAGCGAGAT
InDel-120	28 589 402~28 589 676	GCTTTTGCTGCATGCGACT	GGGAAACAGAATGGGGCCA
InDel-105	28 596 944~28 597 194	AGGTGCTATGAGGGGAGACT	ACCTAAATCGTCGCAATCCA
InDel-80	28 965 543~28 965 708	TGCCAAACTTTGCACGTAGG	ACGAAACAATCTACCAGCCA
InDel-36	29 061 118~29 061 324	TCCTCCTCGTCCTCCTCA	GGCAAGTGTTCACCGGGA

表3　定位区间内基因功能注释

Table 3　Annotation of gene function within localization interval

基因 Gene ID	基因注释 Gene annotation
Cla97C06G126530	Cyclic nucleotide-gated channel 16
Cla97C06G126540	Aldehyde dehydrogenase, putative
Cla97C06G126550	Protein kinase
Cla97C06G126560	Polygalacturonase-1 non-catalytic subunit beta
Cla97C06G126570	RING-finger ubiquitin ligase
Cla97C06G126580	protein EXECUTER 2, chloroplastic
Cla97C06G126590	CASP-like protein
Cla97C06G126600	Unknown protein
Cla97C06G126610	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
Cla97C06G126620	Exosome complex exonuclease RRP40
Cla97C06G126630	Peroxisomal membrane protein PEX14
Cla97C06G126640	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
Cla97C06G126650	DUF1645 family protein
Cla97C06G126660	prohibitin-3, mitochondrial
Cla97C06G126670	serine/threonine-protein kinase ATM-like
Cla97C06G126680	Myb family transcription factor
Cla97C06G126690	Phox domain-containing family protein
Cla97C06G126700	Unknown protein
Cla97C06G126710	WD40 repeat
Cla97C06G126720	transcription factor MYB98-like
Cla97C06G126730	Homeobox transcription factor KN4
Cla97C06G126740	Homeobox transcription factor KN4
Cla97C06G126750	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B
Cla97C06G126760	Unknown protein
Cla97C06G126770	MORC family CW-type zinc finger protein
Cla97C06G126780	Unknown protein
Cla97C06G126790	tRNA-processing ribonuclease BN
Cla97C06G126800	Embryo defective 2759 protein, putative
Cla97C06G126810	Protein MODIFIER OF SNC1 1-like protein
Cla97C06G126820	Unknown protein
Cla97C06G126830	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
Cla97C06G126840	Unknown protein
Cla97C06G126850	Protein of Unknown Function (DUF239)
Cla97C06G126860	JmjC domain
Cla97C06G126870	cell division cycle protein 48 homolog

本中存在差异：*Cla97C06G126560* 基因编码区序列存在2个由单碱基替换造成的非同义突变位点；*Cla97C06G126710* 基因编码区序列存在3个由单碱基替换造成的非同义突变位点；*Cla97C06G126770* 基因编码区序列存在8个由单碱基替换造成的非同义突变位点和1个三碱基插入缺失（表4）。利用3个基因的非同义突变位点设计dCAPS标记或InDel标记（表5），并利用F_2群体与由7个齿条材料和13个网纹材料构成的自然群体材料进行基因型鉴定。发现 *Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126710* 和 *Cla97C06G126770* 三个基因位于西瓜6号染色

表4　候选基因编码区非同义突变位点

Table 4　Candidate gene coding region non-synonymous mutation sites

基因 Gene ID	位置 Position/bp	突变位点在两亲本中的基因型 Genotype of mutation sites in two parents		突变位点在两亲本中的氨基酸类型 Amino acid type of mutation sites in two parents	
		H2	H9	H2	H9
Cla97C06G126560	28 281 451	G	C	A	G
	28 280 025	A	C	H	Q
Cla97C06G126710	28 453 738	C	G	R	G
	28 452 295	G	C	V	L
	28 452 256	G	A	E	K
Cla97C06G126770	28 488 152	T	G	S	A
	28 488 176	T	C	V	A
	28 489 294	C	T	P	S
	28 497 034	T	C	I	T
	28 497 438	T	A	L	M
	28 500 368	C	A	P	T
	28 500 594	−	AGG	−	G
	28 501 593	C	G	R	G
	28 501 603	G	T	R	M

注：− 表示碱基缺失。

Note: − indicates the deletion of the bases.

表5　利用候选基因编码区非同义突变位点设计分子标记

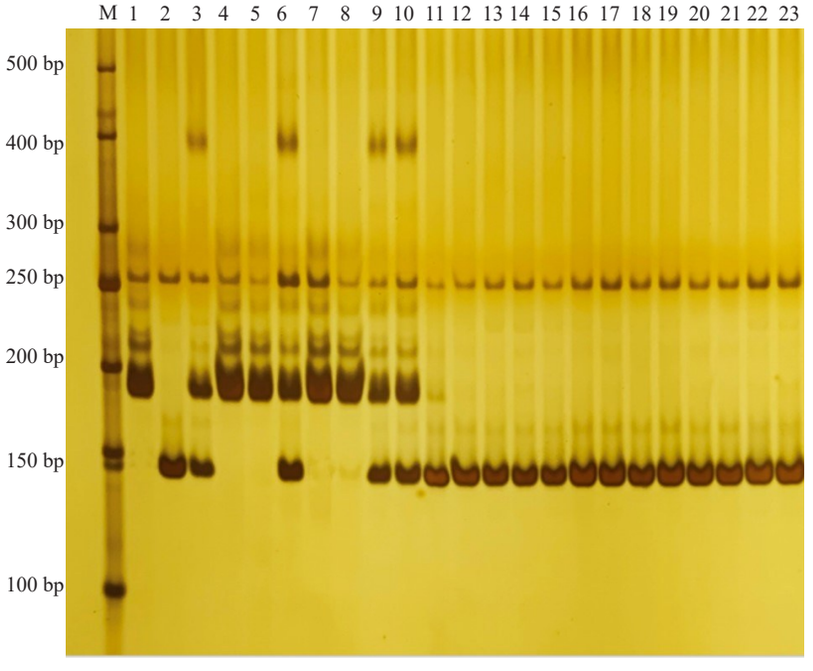
Table 5　The non-synonymous mutation sites in the coding region of candidate genes were used to design molecular markers

标记 Marker name	位置 Position/bp	引物序列 Primer sequence	限制性内切酶 Restriction endonuclease
126560-dCAPS	28 280 025	F-TCGGGTCGGGTCCGGGTGA R-GTGTCAGACCCAAAATGCACCCC	*Drd*I
126710-dCAPS	28 452 256	F-AAGTGGTTGAAACTTACGTC R-GTTGCAACAGCATACCTT	*Taq*I
126770-InDel	28 500 594	F-ATGTCCTCTTTCTCTAGTCCTAAAGC R-CCTCAAAGTGAGAGGTTTGA	

体28 280 025、28 452 256和28 500 594 bp的突变位点基因型与F_2群体和自然群体材料的表型完全一致，说明 *Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126710* 和 *Cla97C06G126770* 三个基因所处的染色体区段与目标基因是共分离的。

2.5 标记的开发及验证

通过进一步定位，在共分离区间内筛选到了12个与目的基因紧密连锁的InDel标记，其中InDel-93标记的可辨识度高、差异明显，便于利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行区分鉴定。标记InDel-93的基因型与F_2群体单株表型完全一致，表明该标记与条纹基因 *ClRs* 共分离。利用此标记对7个果皮覆齿条西瓜材料和13个果皮覆网纹西瓜材料构成的自然群体进行验证，标记基因型与20份西瓜材料的表型完全吻合（图4，表6），证明该标记可用于分子标记辅助育种。



M. 500 bp Marker；1. 齿条亲本 H2 基因型；2. 网纹亲本 H9 基因型；3. F_1 基因型；4~23. 20 个西瓜材料构成的自然群体材料（其中 4~10 是齿条材料，11~23 是网纹材料）。

M. 500 bp Marker; 1. Rind pencil stripe parent H2 genotype; 2. Netted parent H9 genotype; 3. F_1 genotype; 4-23. Natural population materials composed of watermelon material (of which 4-10 are rind pencil stripe materials and 11-23 are netted materials).

图 4 InDel-93 标记在双亲、F_1、自然群体材料中的基因型

Fig. 4 Genotypes of InDel-93 in parental, F_1, natural population materials

表 6 20 个西瓜自然群体材料的果皮覆纹类型

Table 6 Phenotype of rind stripe in 20 watermelon natural population materials

种质编号 Genebank number	种质名称 Accession name	覆纹类型 Rind stripe type	种质编号 Genebank number	种质名称 Accession name	覆纹类型 Rind stripe type
ZXG00114	火州 Huozhou	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00014	美丽托夫斯基 Meili Tuofusiji	网纹 Netted stripe
ZXG00330	广州花皮 Guangzhou Huapi	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00110	新绿宝 Xinlübao	网纹 Netted stripe
ZXG00348	宿县小籽 Xiuxian Xiaozi	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00129	洛菲林 Luofeilin	网纹 Netted stripe
ZXG00358	龙蜜 Longmi	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00135	法国西瓜 Faguo Xigua	网纹 Netted stripe
ZXG00450	新大和2号 Xindahe 2 hao	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00139	金都（中麻）Jindu (Zhongma)	网纹 Netted stripe
ZXG00523	新大和 Xindahe	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00217	克伦生 Kelunsheng	网纹 Netted stripe
ZXG00524	89花短-2选长蔓 89 Huaduan-2 Xuanchangman	齿条 Rind pencil stripe	ZXG00219	旭大和 Xudahe	网纹 Netted stripe
ZXG00002	吐白皮西瓜 Tubaipi Xigua	网纹 Netted stripe	ZXG00386	抚州瓜 Fuzhougua	网纹 Netted stripe
ZXG00012	小籽葫芦 Xiaozihulu	网纹 Netted stripe	ZXG00444	花皮短蔓 Huapi Duanman	网纹 Netted stripe
ZXG00013	昌蜜红 Changmihong	网纹 Netted stripe	ZXG00814	美国短蔓-1Meiguo Duanman-1	网纹 Netted stripe

3　讨　论

果皮条纹是一种重要的外观和品质性状，尤其对于以果实为食用器官的园艺作物来说，果实表面覆纹类型对其商品性影响很大。西瓜果皮表面多数都有覆纹，果皮覆纹形状可分级描述为：网条、齿条、条带、放射条、斑条[14-15]。本试验在表型鉴定过程中，将F_2群体中覆盖连续齿条和不连续齿条的单株均归为齿条类型；细网条归为网纹类型。将调控西瓜果皮覆纹基因定位在6号染色体305.7 kb区间内，侧翼标记为InDel-128和InDel-124，遗传距离分别为1.5 cM和3.0 cM。在后续的精细定位过程中，利用12个共分离标记进一步鉴定了568个F_2单株后，仍然没有发现该区段内的染色体交换，笔者推测该区段存在重组抑制现象。染色体的重组抑制现象在番茄抗根结线虫*Mi*基因所处染色体区域同样存在，产生原因是抗感病栽培番茄材料在该区段存在染色体区段的倒置现象[16-19]。笔者在本研究中发现的重组抑制现象将通过进一步实验进行验证。

有研究表明，果皮色泽发育的色素包括叶绿素、花青素、胡萝卜素和黄酮素等[20]。在定位区间内存在35个基因，结合西瓜基因组注释信息以及前人有关果皮覆纹调控基因的报道，初步筛选到3个可能与西瓜果皮覆纹相关的基因，通过序列比对发现*Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126710*和*Cla97C06G126770*三个基因的编码区序列在两亲本中存在差异，且差异位点与目标基因共分离。*Cla97C06G126560*编码多聚半乳糖醛酸酶-1非催化亚基β蛋白（PG1β），与调控黄瓜表皮不规则条纹的候选基因*Csa1G005490*高度同源[7]。研究表明PG1β蛋白在番茄果实成熟过程中引起果实的逐渐软化并伴随着果皮由绿色转为红色[21-24]。Sitrit等[25]认为*PG*基因的转录受乙烯调控，*PG*基因对乙烯十分敏感，低水平的乙烯即可诱导*PG*基因的大量表达，Yue等[9]通过转录组分析发现多个乙烯响应因子（ERFs）在网纹部位的表达量显著高于在齿条部位的表达量，推测乙烯可能与西瓜果皮条纹的发育有关，而*PG*基因对乙烯的高敏感性也导致其可能与西瓜果皮条纹的形成有关。*Cla97C06G126710*编码WD40蛋白，是一类高度保守的蛋白，一般含有4~16个串联重复的WD基元序列，每个WD基元由44~60个氨基酸残基组成，WD40主要功能是促进蛋白相互作用，酵母双杂交实验发现与其互作的蛋白主要是MYB和bHLH转录因子[26]。在拟南芥、玉米、矮牵牛等植物中，WD40蛋白与MYB以及bHLH转录因子相互作用，以MYB/bHLH/WD40复合物的调控模式调控花青素的生物合成[27-29]。拟南芥中*TTG1*突变导致*DFR*基因的表达量下调，影响花青素的下调，矮牵牛中*an11*的突变导致*DFR*基因的表达量下调，影响花色素的下调，在拟南芥中过表达*PFWD*可以增加花青素的含量[26, 30-31]。Guo等[32]通过全基因重测序分析也筛选出编码WD40蛋白的*Cla97C06G126710*基因可能与西瓜果皮条纹有关。*Cla97C06G126770*编码MORC家族cw型锌指蛋白，Brabbs等[33]发现MORC家族的成员*morc6*参与DNA甲基化导致的基因沉默。Liu等[13]发现在番茄中由于启动子的高度甲基化导致*TAGL1*基因表达受抑制，使得未成熟果实产生深绿色条纹，而低水平甲基化使得未成熟果实出现浅绿色条纹，在果实成熟后呈现红色和黄色条纹的随机分布。而*Cla97C06G126770*是否通过DNA甲基化调控西瓜果皮条纹的发育还需进一步试验验证。*Cla97C06G126680*为Myb家族转录因子，虽然其编码区序列在两亲本中没有差异，但有研究表明苹果和梨果皮条纹的形成是由MYB10的甲基化导致的，MYB10甲基化/去甲基化可以抑制/激活MYB10的转录，进而抑制/诱导花青素生物合成关键结构基因的表达[10-11]，因此*Cla97C06G126680*也有可能是调控西瓜果皮条纹的基因，后续将通过分析其表达调控模式和功能加以验证。

4　结　论

本研究利用果皮覆齿条材料H2和覆网纹材料H9 2个高代自交系为亲本将西瓜果皮覆纹基因*ClRs*定位在6号染色体305.7 kb区间内，推测该区间内可能存在重组抑制现象，结合基因组注释在该区间内筛选到4个候选基因（*Cla97C06G126560*、*Cla97C06G126680*、*Cla97C06G126710*、*Cla97C06G126770*）。还开发了1个可辨识度高、差异明显的InDel-93标记，经鉴定可用于分子辅助育种。后续工作中笔者将对候选基因的功能和调控机制进行研究。

参考文献 References：

[1] 张金鹏，金鑫，赵艳菲，陈莹，惠长敏 . 西瓜分子标记辅助育种研究与应用进展[J]. 中国瓜菜，2022，35（4）：1-7.
ZHANG Jinpeng，JIN Xin，ZHAO Yanfei，CHEN Ying，HUI Changmin. Research and application progress of watermelon molecular marker assisted breeding[J]. China Cucurbits and Vegetables，2022，35(4)：1-7.

[2] 李兵兵，刘文革 . 西瓜遗传图谱构建和基因定位研究进展[J]. 中国瓜菜，2019，32（2）：1-6.
LI Bingbing，LIU Wenge. Research progress on genetic map construction and gene mapping for watermelon[J]. China Cucurbits and Vegetables，2019，32(2)：1-6.

[3] LIU L，SUN T T，LIU X Y，GUO Y，HUANG X，GAO P，WANG X Z. Genetic analysis and mapping of a striped rind gene (*st3*) in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. Euphytica，2019，215 (2)：1-12.

[4] LÜ J C，FU Q S，LAI Y，ZHOU M D，WANG H S. Inheritance and gene mapping of spotted to non-spotted trait gene *CmSp-1* in melon (*Cucumis melo* L. var. *chinensis* Pangalo)[J]. Molecular Breeding，2018，38(8)：1-9.

[5] SONG M F，ZHANG M R，CHENG F，WEI Q Z，WANG J，DAVOUDI M，LOU Q F. An irregularly striped rind mutant reveals new insight into the function of *PG1β* in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics，2020，133(2)：371-382.

[6] GUSMINI G，WEHNER T C. Qualitative inheritance of rind pattern and flesh color in watermelon[J]. Journal of Heredity，2006，97(2)：177-185.

[7] YANG H B，PARK S W，PARK Y，LEE G P，KANG S C，KIM Y K. Linkage analysis of the three loci determining rind color and stripe pattern in watermelon[J]. Horticultural Science & Technology，2015，33(4)：559-565.

[8] ZHANG Z P，ZHANG Y N，SUN L，QIU G，SUN Y J，ZHU Z C，LUAN F S，WANG X Z. Construction of a genetic map for *Citrullus lanatus* based on CAPS markers and mapping of three qualitative traits[J]. Scientia Horticulturae，2017，233：532-538.

[9] YUE Z，MA R X，CHENG D H，YAN X，HE Y P，WANG C X，PAN X N，YIN L J，ZHANG X，WEI C H. Candidate gene analysis of watermelon stripe pattern locus *ClSP* ongoing recombination suppression[J]. Theoretical and Applied Genetics，2021，134 (10)：3263-3277.

[10] TELIAS A，LIN-WANG K，STEVENSON D E，COONEY J M，HELLENS R P，ALLAN A C，BRADEEN J M. Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10*[J]. BMC Plant Biology，2011，11(1)：1-15.

[11] QIAN M J，SUN Y W，ALLAN A C，TENG Y W，ZHANG D. The red sport of ‘Zaosu’ pear and its red-striped pigmentation pattern are associated with demethylation of the *PyMYB10* promoter[J]. Phytochemistry，2014，107：16-23.

[12] AVDEEV Y I，KIGASHPAEVA O P. Jumping gene *gs* of *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw[J]. Russian Journal of Genetics，2002，38(5)：496-500.

[13] LIU G Z，LI C X，YU H Y，TAO P W，YUAN L，YE J，CHEN W F，WANG Y，GE P F，ZHANG J H，ZHOU G L，ZHENG W，YE Z B，ZHANG Y Y. GREEN STRIPE，encoding methylated TOMATO AGAMOUS‐LIKE 1，regulates chloroplast development and Chl synthesis in fruit[J]. New Phytologist，2020，228 (1)：302-317.

[14] 尚建立，王吉明，马双武 . 西瓜种质资源若干性状描述与数据采集[J]. 中国瓜菜，2010，23（6）：39-41.
SHANG Jianli，Wang Jiming，MA Shuangwu. Characterization and data collection of watermelon germplasm resources[J]. China Cucurbits and Vegetables，2010，23(6)：39-41.

[15] 王铭，刘江，王长彪，郝科星，侯富恩，张涛，杨晋明 . 109 份西瓜育种材料果实性状的遗传多样性分析[J]. 中国瓜菜，2020，33（10）：23-28.
WANG Ming，LIU Jiang，WANG Changbiao，HAO Kexing，HOU Fuen，ZHANG Tao，YANG Jinming. Genetic diversity analysis of fruit characters in 109 watermelon breeding materials[J]. China Cucurbits and Vegetables，2020，33(10)：23-28.

[16] 唐为江 . 精细定位控制抽穗期、株高和每穗颖花数的 QTL 与图位克隆汕优 63 中控制胶稠度、糊化温度的基因[D]. 武汉：华中农业大学，2008.
TANG Weijiang. Fine mapping of QTLS controlling heading date，plant height and spikelet number per panicle and mapping of genes controlling gel consistency and gelatinization temperature in Shanyou 63[D]. Wuhan：Huazhong Agricultural University，2008.

[17] 赵统敏，王银磊，杨玛丽，赵丽萍，余文贵 . 番茄根结线虫病抗性基因的研究进展[J]. 江苏农业学报，2012，28（6）：1492-1497.
ZHAO Tongmin，WANG Yinlei，YANG Mali，ZHAO Liping，YU Wengui. Research progress on resistance genes of root knot nematode in tomato[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences，2012，28(6)：1492-1497.

[18] GANAL M W，TANKSLEY S D. Recombination around the *Tm2a* and *Mi* resistance genes in different crosses of Lycopersicon peruvianum[J]. Theoretical and Applied Genetics，1996，92 (1)：101-108.

[19] HO J Y，WEIDE R，MA H M，VAN WORDRAGEN M F，LAMBERT K N，KOORNNEEF M，WILLIAMSON V M. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato：Construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes[J]. The Plant Journal，1992，2(6)：971-982.

[20] 赵海娟，刘宁，张玉萍，刘威生，张玉君，徐铭，马小雪，刘家成，刘硕 . 李果皮颜色遗传多样性及其成色因子研究进展[J]. 果树学报，2022，39（8）：1479-1489.
ZHAO Haijuan，LIU Ning，ZHANG Yuping，LIU Weisheng，

ZHANG Yujun，XU Ming，MA Xiaoxue，LIU Jiacheng，LIU Shuo. Advances in genetic diversity of plum skin color and its color forming factors[J]. Journal of Fruit Science，2022，39(8)：1479-1489.

[21] 肖鑫丽 . 西瓜 *Rab18*、*BURP domain-containing protein 17* 基因的克隆、序列分析及表达研究[D]. 昆明：云南农业大学，2015.
XIAO Xinli. Cloning，sequence analysis and expression study of *Rab18* and *BURP domain-containing protein 17* genes in watermelon[D]. Kunming：Yunnan Agricultural University，2015.

[22] ZHENG L S，HEUPEL R C，DELLAPENNA D. The beta subunit of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme 1：Isolation，characterization，and identification of unique structural features[J]. The Plant Cell，1992，4(9)：1147-1156.

[23] WATSON C F，ZHENG L S，DELLAPENNA D. Reduction of tomato polygalacturonase beta subunit expression affects pectin solubilization and degradation during fruit ripening[J]. The Plant Cell，1994，6(11)：1623-1634.

[24] 饶俊，郑新欣，胡英考 . BURP 蛋白家族研究进展[J]. 生物技术通报，2009，25(7)：8-11.
RAO Jun，ZHENG Xinxin，HU Yingkao. Research progress of BURP protein family[J]. Biotechnology Bulletin，2009，25(7)：8-11.

[25] SITRIT Y，BENNETT A B. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene：A re-examination[J]. Plant Physiology，1998，116(3)：1145-1150.

[26] 郭凤丹，王效忠，刘学英，夏晗，王兴军 . 植物花青素生物代谢调控[J]. 生命科学，2011，23(10)：938-944.
GUO Danfeng，WANG Xiaozhong，LIU Xueying，XIA Han，WANG Xingjun. Regulation of anthocyanin metabolism in plants[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences，2011，23(10)：938-944.

[27] WALKER A R，DAVISON P A，BOLOGNESI-WINFIELD A C，JAMES C M，SRINIVASAN N，BIUNDELL T L，ESCH J J，MARKS M D，GRAY J C. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus，which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*，encodes a WD40 repeat protein[J]. The Plant Cell，1999，11(7)：1337-1349.

[28] QUATTROCCHIO F，WING J F，VAN DER WOUDE K，JOSEPH N M，KOES R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins：species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes[J]. The Plant Journal：For Cell and Molecular Biology，1998，13(4)：475-488.

[29] MORITA Y，SAITOH M，HOSHINO A，NITASAKA E，IIDA S. Isolation of cDNAs for R2R3-MYB，bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory[J]. Plant and Cell Physiology，2006，47(4)：457-470.

[30] DE VETTEN N，QUATTROCCHIO F，MOL J，KOES R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast，plants，and animals[J]. Genes & development，1997，11(11)：1422-1434.

[31] 闵远琴，闫海芳，李玉花 . 花青素合成中的 WD40 蛋白[J]. 植物生理学通讯，2010，46(9)：863-870.
MIN Yuanqin，YAN Haifang，LI Yuhua. WD40 protein in anthocyanin synthesis[J]. Plant Physiology Communications，2010，46(9)：863-870.

[32] GUO S G，ZHAO S J，SUN H H，WAN X，WU S，LIN T，REN Y，GAO L，DENG Y，ZHANG J，LU X Q，ZHANG H Y，SHANG J L，GONG G Y，WEN C L，HE N，TIAN S W，LI M Y，LIU J P，WANG Y P，ZHU Y C，JARRET R，LEVI A，ZHANG X P，HUANG S W，FEI Z J，LIU W G，XU Y. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits[J]. Nature Genetics，2019，51(11)：1616-1623.

[33] BRABBS T R，HE Z S，HOGG K，KAMENSKI A，LI Y，PASZKIEWICZ K H，MOORE K，O'TOOLE P，GRAHAM I，JONES L. The stochastic silencing phenotype of *Arabidopsis morc6* mutants reveals a role in efficient RNA-directed DNA methylation[J]. The Plant Journal：for Cell and Molecular Biology，2013，75(5)：836-846.