

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.04.001

王瑞, 郭青青, 徐新福, 等. 甘蓝型黄籽油菜粒色基因候选区间的 QTL-Seq 定位及连锁标记开发 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(4): 2-12.

# 甘蓝型黄籽油菜粒色基因候选区间的 QTL-Seq 定位及连锁标记开发

王瑞, 郭青青, 徐新福, 卢坤, 李加纳, 曲存民

西南大学 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 重庆 400715

**摘要:** 甘蓝型油菜黄籽性状遗传来源较为复杂且易受环境条件影响, 基因定位和分子标记开发难度大. 相比于传统 QTL 定位, 结合二代深度测序等生信方法直接对甘蓝型油菜黄籽基因进行染色体定位、基因挖掘和标记开发, 将有助于黄籽遗传机理的研究. 利用甘蓝型油菜黄籽临保系 63-2 和黑籽 67-1 配制杂交组合, 构建 F<sub>2</sub> 粒色分离群体. 遗传分析表明: 该群体中黄籽性状受 1 对隐性主效基因控制; 以法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 基因组为参考, 利用集团分离分析法和全基因组重测序将黄籽性状基因定位于 C03 染色体 6.1~9.0 Mb 置信区间内, 同时基于基因组变异和聚丙烯酰胺凝胶电泳验证获得与粒色基因紧密连锁的 SSR 标记 4 个和 InDel 标记 5 个.

**关键词:** 甘蓝型油菜; 黄籽性状; 二代测序; 定位; 分子标记

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)04-0002-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## QTL-Seq Mapping and Linkage Markers Development of Candidate Interval of Yellow-seed Genes in *Brassica napus* L.

WANG Rui, GUO Qingqing, XU Xinfu,

LU Kun, LI Jiana, QU Cunmin

Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** The genetic inheritance of yellow-seed trait is complex and easily affected by environmental factors in *Brassica napus*. The gene mapping and linked markers developing are very difficult for yellow-seeded rapeseed. Compared with traditional QTL mapping, we carried out the next generation deep sequen-

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272150, 32072093); 重庆市研究生科学创新项目(CYS21124).

作者简介: 王瑞, 博士研究生, 主要从事油菜遗传育种研究.

通信作者: 曲存民, 博士, 教授.

cing to perform the gene mapping and identification of chromosome, and marker developing for yellow-seed gene, which will be helpful to reveal the genetic mechanism of yellow-seed trait in rapeseed. In this study, we constructed a  $F_2$  mapping population from the cross between yellow-seeded line 63-2 and black-seeded line 67-1. Genetic analysis showed that yellow-seed trait was controlled by a pair of recessive major genes. The bulked segregant analysis (BSA) combining with whole-genome resequencing was employed to mine the candidate region of the chromosome for controlling the yellow-seed trait, which was anchored on chromosome C03 (6.1~9.0 Mb) based on the *Darmor-bzh* reference genome. Eventually, four SSR markers and five InDel markers closely linked with the yellow-seed trait were screened and further confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis.

**Key words:** *Brassica napus* L.; yellow trait; next generation sequencing; location; linked markers

黄籽油菜与遗传背景一致的黑籽油菜相比, 具有种皮厚度薄、油分含量高和蛋白质含量丰富等多种优点, 因而引起了广大育种家的关注<sup>[1]</sup>, 成为油菜品质育种的目标之一. 研究者们通过不断创新黄籽种质资源, 在甘蓝型黄籽油菜的遗传研究、基因定位、分子标记等方面开展了大量的工作.

甘蓝型油菜(AACC,  $2n=38$ )是由芸薹属白菜(AA,  $2n=20$ )和甘蓝(CC,  $2n=18$ )自然杂交后加倍形成的异源四倍体物种<sup>[2]</sup>. 目前已有的甘蓝型黄籽油菜均是先通过异源杂交后经人工选育而来, 最早由 Olsson<sup>[3]</sup>于 1960 年合成黄籽单株, 之后陆续有研究者利用突变、人工强制杂交等多种手段不断拓宽甘蓝型油菜的遗传基础, 创造出了新的更有价值的黄籽种质资源<sup>[4]</sup>. Chen 等<sup>[5]</sup>用芥蓝与黄籽白菜型油菜、Rashid 等<sup>[6]</sup>用芥菜型油菜与埃塞俄比亚芥获得甘蓝型油菜黄籽品系, 而 Meng 等<sup>[7]</sup>则是用白菜代替芥菜型油菜提供黄籽基因. 这些甘蓝型油菜黄籽基因的来源途径基本源于芸薹属植物内部, 成功转入属外黄籽基因的相关报道仍较为少见<sup>[8]</sup>.

在甘蓝型油菜黄籽基因定位和分子标记方面, Van Deynze<sup>[9]</sup>用 DH 群体发现 1 个粒色连锁 RFLP 标记位于 C 连锁群上. 刘雪平<sup>[10]</sup>通过不同年份粒色性状的 QTL 扫描, 发现在甘蓝型油菜 LG18 连锁群 Me4em5e-BS28-400 区间存在 1 个种皮颜色主效 QTL. 肖数数<sup>[11]</sup>通过对黄籽甘蓝型油菜 No. 2127-17 的黄籽基因分析发现, 连锁 K-C 定位于甘蓝型油菜第 9 连锁群. Rahman 等<sup>[12]</sup>以 5 个甘蓝型油菜黑籽品系和 3 个纯黄品系的  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$  和回交后代为材料, 利用序列相关扩增多态性(SRAP)技术在  $F_2$  和回交群体中开发了 1 个与种皮颜色基因共分离的 SRAP 标记 SA12BG18388, 位于甘蓝型油菜 A09 连锁群上, 同时利用染色体步移技术在 C03 连锁群上鉴定出 1 个 SRAP 标记 SA7BG29245. Zhang 等<sup>[13]</sup>在甘蓝型油菜 HZ-1, HZ-2 群体中均检测到 3 个种皮色泽相关 QTL, 前者位于 N18, N5 和 N3 连锁群, 后者位于 N9, N18 和 N3 连锁群. Fu 等<sup>[14]</sup>用 2 个重组自交系群体在 A09 染色体上检测出 1 个稳定主效 QTL, 该区间与拟南芥第 5 号染色体同源性较高, 包含 *TT10* 基因, 推测是该 QTL 的重要候选基因. Liu 等<sup>[15]</sup>利用甘蓝型油菜重组自交系获得了 1 个位于 A09 染色体上显著影响籽粒颜色的主效 QTL. 洪美艳<sup>[16]</sup>和李霞<sup>[17]</sup>均利用甘蓝型纯黄油菜 No. 2127-17 和黑籽油菜 94570 构建近等基因系, 将黄籽基因定位于甘蓝型油菜 A09 连锁群上. 刘福青<sup>[18]</sup>用 SSR 标记鉴定来自同一杂交组合自交 8 代的甘蓝型油菜黄籽、麻黄籽和褐籽, 发现 9 对引物在 100~200 bp 时出现 3 个材料的特征条带, 回收测序特征性差异片段, 结合使用 BLASTn 同源性分析推测 *TT7* 基因可能与黄籽形成有关. Somers 等<sup>[19]</sup>用 DH 群体获得 8 个粒色连锁 RAPD 标记. 董艳珍等<sup>[20]</sup>以甘蓝型油菜黄黑籽近等基因系筛选鉴定到 6 个特异片段可能是甘蓝型油菜黄籽基因的 RAPD 标记. 刘志文<sup>[21]</sup>以甘蓝型油菜纯黄品系 No. 2127-17 为材料, 筛选到 2 个 RAPD 标记和 8 个 AFLP 标记. 梅德圣<sup>[22]</sup>用渝黄 1 号鉴定到显性黄籽基因连锁 AFLP 标记 E35M52180 和 SSR 标记 P039230. 曲存民等<sup>[23]</sup>利用 20 对 SSR 标记对 20 份黄籽甘蓝型油菜核心种质的遗传多样性进行了分析.

尽管通过遗传图谱和关联分析在甘蓝型油菜黄籽性状主效 QTL 定位和关联标记筛选方面开展了大

量的研究工作,但由于甘蓝型油菜黄籽基因来源不同,且存在母性效应、多基因遗传、环境条件的影响等,遗传机理较为复杂,至今还未见黄籽主效 QTL 被克隆,且关联标记也缺乏通用性,限制了其在育种中的应用.因此,基于传统的表型选择和遗传图谱构建进行黄籽 QTL 定位和连锁标记开发难以满足实际育种的需求.近年来,随着基因组测序技术的发展,利用二代测序技术进行作物重要农艺性状基因的快速定位及连锁标记开发,效果显著<sup>[24-26]</sup>.本研究以构建甘蓝型油菜粒色 F<sub>2</sub> 群体为材料,基于 BSA 方法对基因组高通量测序进行分析,从基因组水平上对黄籽性状基因进行快速定位并开发紧密连锁分子标记,研究结果将有助于实现黄籽基因的精细定位,对甘蓝型油菜黄籽材料的准确鉴定与选育具有重要指导意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

甘蓝型油菜黄籽 63-2 和甘蓝型油菜黑籽 67-1 均为小孢子培养加倍获得的 DH 纯系材料.2018 年 3 月将黄籽亲本和黑籽亲本杂交,获得 F<sub>1</sub> 代种子同时夏繁加代收获 F<sub>2</sub> 种子.2019 年和 2020 年将亲本、F<sub>1</sub> 代、F<sub>2</sub> 代种于西南大学重庆市油菜工程技术研究中心歇马油菜基地,行距、株距均为 20 cm.2019 年从 F<sub>2</sub> 群体中选取极端黄籽和极端黑籽构建黄籽子代池和黑籽子代池,用于粒色基因候选区间定位.

### 1.2 田间试验和性状调查

本研究分别于 2019 年 10 月和 2020 年 10 月播种两个亲本和 F<sub>2</sub> 群体,12 月对苗期 F<sub>2</sub> 单株插牌编号,取单株幼嫩叶装于 2 mL 离心管中,存于 -80 °C 冰箱备用;2021 年 1 月苗期对 F<sub>2</sub> 群体 460 个单株插牌编号,6 月单株收获记录 460 个单株的粒色.

### 1.3 子代池构建

2021 年 1 月苗期,对亲本及 F<sub>2</sub> 群体每个单株插牌编号,取幼嫩叶 0.2 g.然后用 OMEGA HP Plant DNA 试剂盒提取 2 个亲本以及 F<sub>2</sub> 代的 30 株极端黄籽和 30 株极端黑籽单株幼嫩叶 DNA.等量混合 F<sub>2</sub> 代单株幼嫩叶 DNA,构建黄籽叶片 DNA 子代池和黑籽叶片 DNA 子代池.2 个叶片 DNA 子代池和 2 个亲本叶片 DNA 建库类型为 DNA-350 bp,以 illumina HiSeq PE150 方法测序,测序深度为 30×.

### 1.4 数据处理

启动 QTL-seq 流程<sup>[26]</sup>,用 fastq\_quality\_filter 软件提取高质量 reads;将过滤后亲本 reads 与法国甘蓝型油菜参考组 Darmor-bzh Brassica\_napus. v4. 1. fa(<http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>) 比对并替换 SNP,构建亲本参考基因组;再将亲本 reads 比对到新构建的亲本参考基因组上,重排 InDel 旁错配的 reads,使错配碱基数减少或去除错配数目超过阈值的 reads 等;利用 coval call 软件分析亲本与参考组间的 SNP 和 InDel 变异,计算 2 个叶片 DNA 子代池 SNP-index 及 2 个子代池 SNP-index 的差值 Δ(SNP-index);利用 R 包制作 Δ(SNP-index)滑窗分析图,鉴定粒色基因候选区间.

### 1.5 引物设计与电泳检测

利用 GATK 软件获得 2 个亲本和 2 个子代池 bam 文件,samtools 截取 4 个 bam 文件候选区间,IGV 软件查看 2 个亲本和 2 个子代池截取文件,找出粒色基因候选区间的 InDel,锁定起始和终止物理位置,用 Vector 和 Blast 设计 InDel 引物.利用 MISA(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)进行粒色基因候选区间内的重复序列鉴定并使用 Primer3 在候选区间进行 SSR 引物设计,引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成.随机选取 F<sub>2</sub> 群体极端黄籽和极端黑籽各 11 株幼嫩叶的 DNA 作为模板用于 PCR 扩增.PCR 体系为 2.2 μL 模板,0.25 μL dNTP,前后引物各 0.36 μL,0.31 μL Taq 酶(2.5 U/μL),1.9 μL 10×PCR buffer(含 Mg<sup>2+</sup>).PCR 程序为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,52~60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 35 个循环;72 °C 5 min;4 °C 保存.8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,最后通过银染法显影记录分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 DH系黄籽63-2和黑籽67-1杂交后代表型观察和遗传分析

以黄籽63-2和黑籽67-1为亲本配制杂交组合,  $F_1$ 代均表现为黑籽,与黑籽亲本67-1的籽粒颜色一致,初步推断黑籽为显性性状(图1)。  $F_1$ 自交获得  $F_2$ 群体,通过考察  $F_2$ 群体的粒色性状进一步确定粒色遗传规律。统计数据并进行卡方拟合优度检验,两年卡方检验值均小于  $\chi^2(0.05, 1) = 3.84$ (表1),说明黑籽和黄籽符合3:1的分离比,推测甘蓝型油菜黄籽性状受1对隐性主效基因控制。

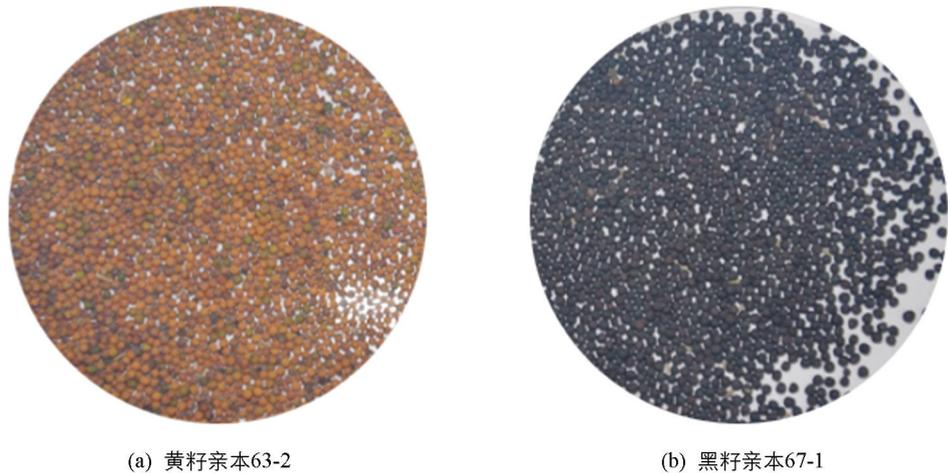


图1 甘蓝型油菜黄籽63-2和黑籽67-1籽粒色泽

表1 黄籽63-2与黑籽67-1杂交  $F_2$  粒色分离比例

年份/年	总株数/株	黑籽/株	黄籽/株	期望比	卡方值( $\chi^2$ )
2020	151	109	42	3:1	0.497
2021	460	334	126	3:1	1.278

### 2.2 测序及数据质量分析

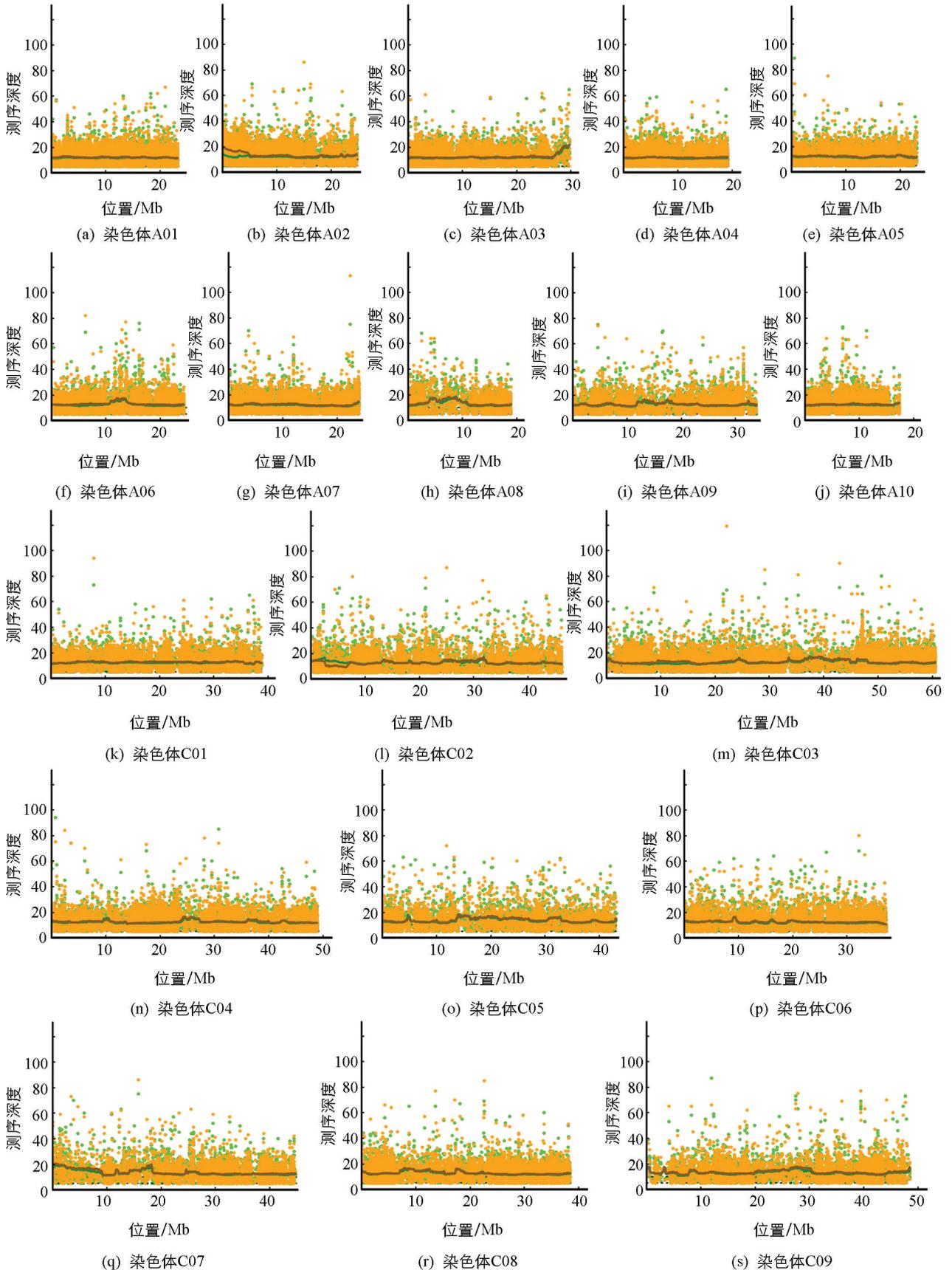
将亲本和子代池重测序数据质控过滤后进行碱基平均测序深度及基因组覆盖率分析(图2),结果显示,甘蓝型油菜的A01-C09染色体上平均测序深度均达  $15\times$ 以上,多数接近  $20\times$ ,说明覆盖度和SNP检出率基本饱和。基于法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 基因组为参考,测序数据与其比对结果正常,可用于变异分析和鉴定目标性状基因候选区间。

### 2.3 极端黄黑籽混合池QTL-Seq分析

亲本黑籽67-1测序数据与法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 比对并替换SNP构建亲本参考基因组,然后将黄籽和黑籽子代池测序数据再与亲本参考基因组比对计算出每个子代池的SNP-index。以0.3为阈值,过滤小于0.3的SNP-index位点后,计算黄黑籽2个子代池之间的  $\Delta(\text{SNP-index})$ 。基于滑动窗口法(滑动窗口大小为2 Mb,步长为50 kb),利用R-3.2.0软件制作  $\Delta(\text{SNP-index})$ 在19条染色体上的分布图。结果显示  $\Delta(\text{SNP-index})$ 数值沿其他染色体分布趋势在0附近波动,仅C03染色体在6.1~9.0 Mb区间内  $\Delta(\text{SNP-index})$ 超过95%截断水平(图3),但  $\Delta(\text{SNP-index})$ 信号未超过99%截断水平。根据QTL-Seq方法原理,C03染色体6.1~9.0 Mb区间可作为粒色基因候选区间。

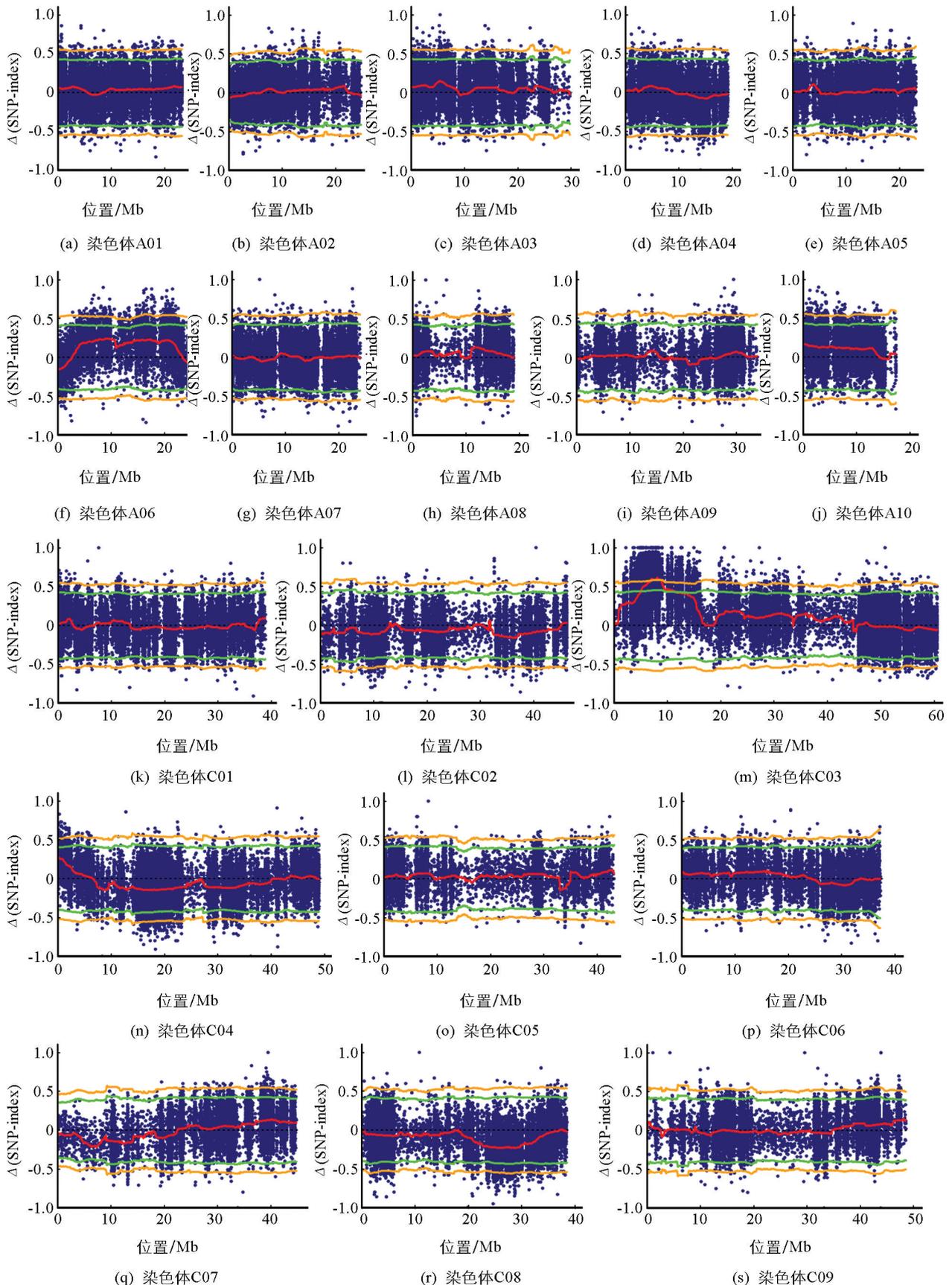
### 2.4 SSR连锁标记开发

依据法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 参考序列,在C03染色体6.1~9.0 Mb区间运用MISA和Primer3,结合进行SSR引物设计,先用两个亲本进行SSR引物初步筛选,再用  $F_2$ 群体中的11株极端黄籽和11株极端黑籽单株完成关联SSR引物验证,结果共筛选到4个能明显区分亲本和  $F_2$ 群体极端黄籽单株和极端黑籽单株的SSR标记(表2)。本研究筛选出的4个标记反应用亲本及  $F_2$ 群体中极端黄籽单株和极端黑籽单株进行测试,发现电泳带型在黄黑籽中存在一致稳定的差异(图4),推测粒色性状主效候选基因与这4个SSR标记存在连锁关系。



黑线为统计窗口内的平均覆盖深度, 黄点为黄籽混池, 绿点为黑籽混池.

图 2 甘蓝型油菜 19 条染色体上平均测序深度及覆盖度



蓝点为  $\Delta(\text{SNP-index})$  位点, 红线为利用滑动窗口数计算  $\Delta(\text{SNP-index})$  的变化趋势, 绿线为显著性 95% 的阈值, 橘线为显著性 99% 的阈值。

图 3 甘蓝型油菜 19 条染色体  $\Delta(\text{SNP-index})$  分布情况

表 2 黄籽基因候选区间的紧密连锁 SSR 标记

引物名称	Chr. C03/bp	SSR	正向引物序列	反向引物序列
SSR14	7970035-7970046	(AT) <sub>6</sub>	ACGCACTTTACACATGAAACAT	ACACAAGTCGTCCGTTTGAAAC
SSR17	8003386-8003457	(TTC) <sub>6</sub>	TTTTTCGCCGCGCTCTCCATTG	GGCTTGAATGGTGGCTTTCCTT
SSR8	7017959-7017968	(A) <sub>10</sub>	ACGGGCTTCTTCTCTCCTTAGC	AAGCAGGGGTGATTAGCAATTC
SSR16	7990149-7990162	(GA) <sub>7</sub>	CCTTGCGGGCTTCATCTTCTTT	AAACTCACTGCTGGTCTAAGA

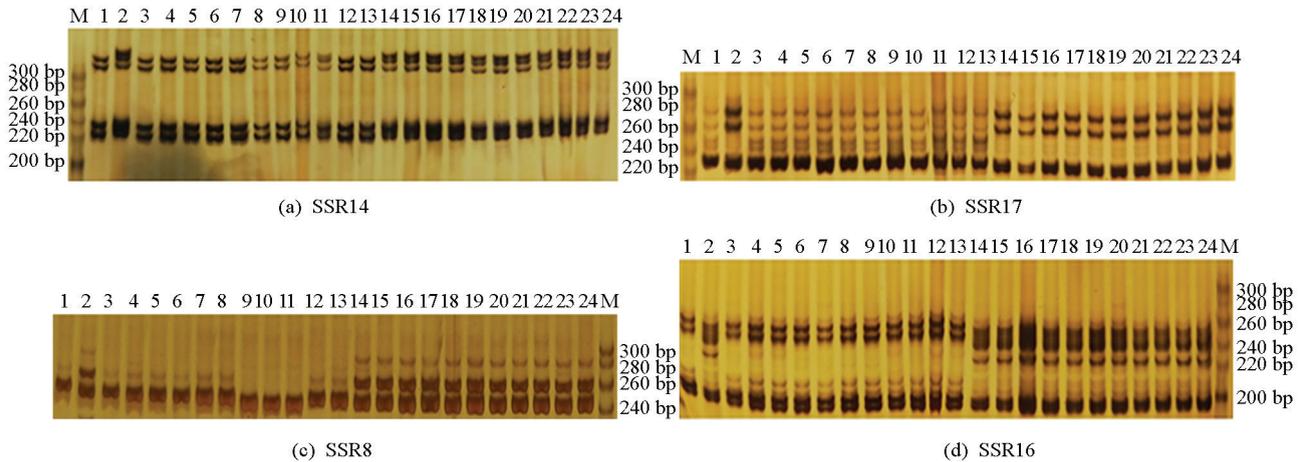
1 为黄籽亲本 63-2, 2 为黑籽亲本 67-1, 3~13 为 F<sub>2</sub> 群体 11 个黄籽单株, 14~24 为 F<sub>2</sub> 群体 11 个黑籽单株, M 为 DNA 分子量标准。

图 4 黄籽和黑籽单株 SSR 引物多态性 PAGE 图

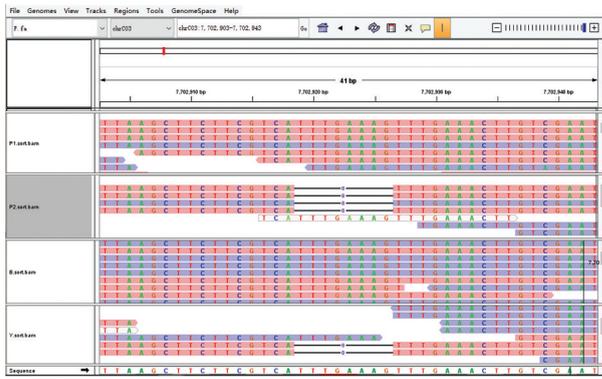
## 2.5 InDel 连锁标记开发

利用 samtools 软件 view 参数提取 2 个亲本和 2 个子代池 BAM 文件中 C03 染色体 6.1~9.0 Mb 区间序列, 然后将提取的 BAM 文件排序建立索引导入 IGV 软件, 可视化分析黑籽亲本 67-1(P1)、黄籽亲本 63-2(P2)以及黑籽子代池 B 和黄籽子代池 Y 中 C03 染色体 6.1~9.0 Mb 区间内存在的 InDel 变异, 结果在该区间内获得 5 个遗传稳定的 InDel 标记位点(图 5)。这些 InDel 差异在黑籽亲本 67-1(P1)和黄籽亲本 63-2(P2)之间、黑籽子代池 B 和黄籽子代池 Y 中均被稳定检测到, 表明亲本之间的差异 DNA 小片段遗传到了 F<sub>2</sub> 代中, 其中 InDel-11 和 InDel-18 缺失序列分别为 8 bp 和 10 bp, 而 InDel-16, InDel-17 和 InDel-20 插入序列分别为 20 bp, 27 bp 和 20 bp(图 5)。

以法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 基因组为参考, 利用 IGV 软件锁定 5 个 InDel 的起始和终止物理位置, 用 Vector 和 Blast 结合设计 InDel 引物(表 3), 随后利用黑籽亲本 67-1(P1)和黄籽亲本 63-2(P2)以及 F<sub>2</sub> 群体中随机选取的 11 株极端黑籽和 11 株极端黄籽单株对其进行验证分析。结果显示, 这 5 对 InDel 引物可扩增出 1 至多条带, 扩增产物长度不等, 扩增带型清晰且重演性好(图 6), 说明这些标记位点在不同黄、黑籽株系间多态性稳定。另外, 利用 5 个 InDel 标记主带能区分出 F<sub>2</sub> 群体中黄、黑籽极端单株, 并且与亲本带型高度一致, 推断黄籽主效基因与这 5 个 InDel 标记存在连锁关系。

表 3 黄籽基因候选区间的 InDel 引物序列

引物名称	Chr. C03	InDel	正向引物序列	反向引物序列
InDel-11	7702719-7703119	D8	GATCCGGATTTTTCTTCGGT	CATTGATGGCAAGATATCCG
InDel-16	7937594-7938100	I20	TACCAAGACCTTCTGGCTCC	ATCCGGCGAAGCTAAGGTTT
InDel-17	7958581-7959081	I27	TCCGAATCGAACCTGCAATGA	TCCCTTCAACCATGTCCAAGA
InDel-18	8043937-8044347	D10	AGTCTTTTGTCTCAGAAGCTCGT	TTAGGGTTTTTCGGACCGTGG
InDel-20	8051076-8051676	I20	TCCCTCAGTCCGTCTGTGAT	AGTGTCTCTACTCTTCATGGT



(a) InDel-11



(b) InDel-16



(c) InDel-17



(d) InDel-18

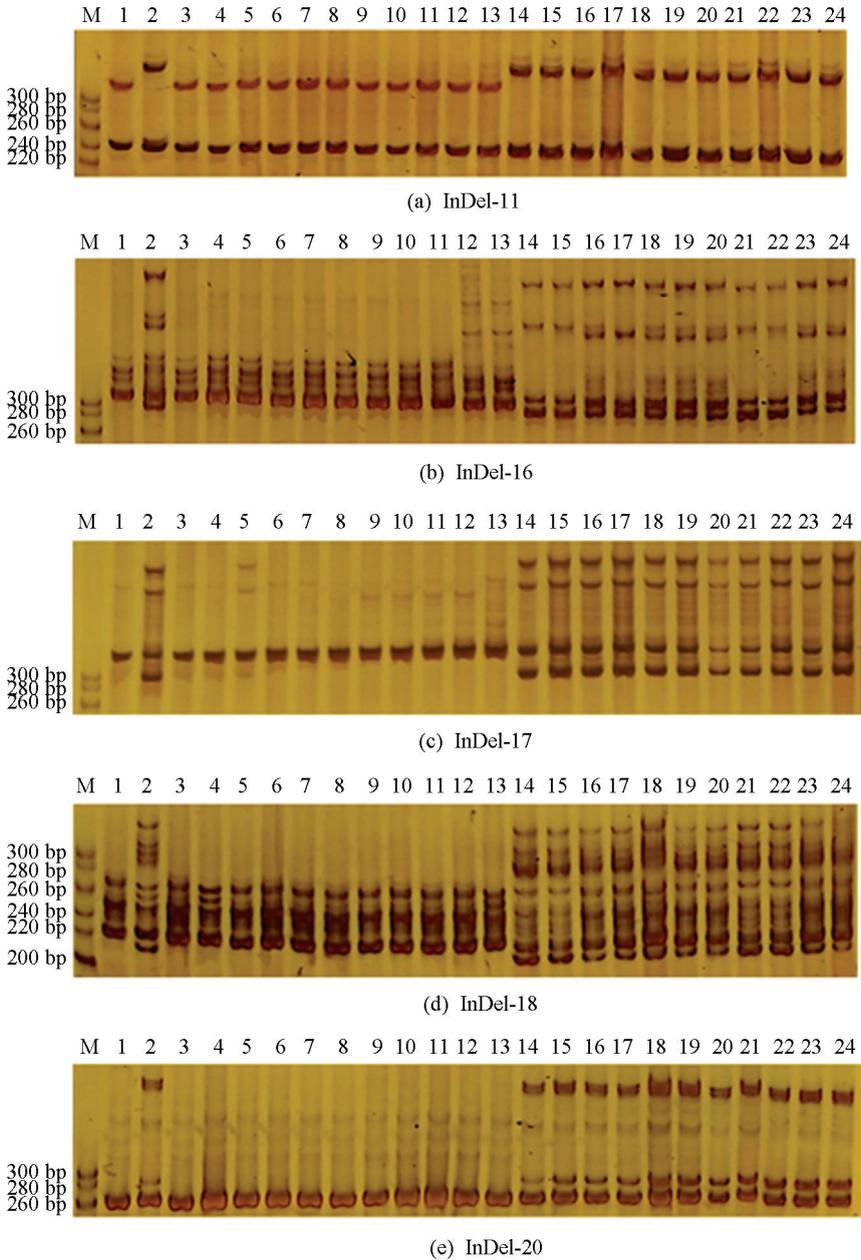


(e) InDel-20

图 5 IGV 可视化黄籽基因候选区间 InDel 变异

### 3 讨论

目前研究表明,甘蓝型油菜黄籽基因主要来自芸薹属不同种间杂交,遗传背景有一定差异,所带的黄籽基因也可能不同。多数学者认为由 3 对隐性基因控制,且胚乳或者胚基因型也会对种皮色泽产生一定影响<sup>[27]</sup>,因此关于黄籽基因的遗传模式较为复杂<sup>[28-29]</sup>。本研究利用甘蓝型油菜黄籽临保系 63-2 和黑籽 67-1 配制杂交组合发现,黄籽由 1 对隐性主效基因控制。此外,Chen 等<sup>[5]</sup>发现芸薹属的 A 和 C 染色体组控制籽粒颜色的机理可能并不相同。目前在 A 和 C 染色体组上均定位到了甘蓝型油菜黄籽基因,其中位于 A9 连锁群的相关报道较多,如肖数数<sup>[11]</sup>将标记 K-C 定位于第 9 连锁群;洪美艳<sup>[16]</sup>发现种皮颜色基因 D 位于 A9 染色体 27.65~32.73 Mb 中;Rahman 等<sup>[12]</sup>不仅鉴定到 1 个 SRAP 标记在甘蓝型油菜 A9 连锁群,还利用染色体步移技术鉴定出了位于 C3 连锁群上的第 2 个 SRAP 标记 SA7BG29245。本研究将甘蓝型油菜黄籽基因定位在 C03 染色体上,区间为 6.1~9.0 Mb,与 Rahman 等<sup>[12]</sup>定位结论有一些相似之处,推测来源于



1 为黄籽亲本 63-2, 2 为黑籽亲本 67-1, 3~13 为  $F_2$  群体 11 个黄籽单株, 14~24 为  $F_2$  群体 11 个黑籽单株, M 为 DNA 分子量标准.

图 6 黄籽和黑籽单株 InDel 位点多态性 PAGE 图

白菜 A 组染色体上的粒色基因在甘蓝 C 组染色体上有对应的同源基因, 由于二倍体基本种白菜和甘蓝与异源四倍体甘蓝型油菜间的多态性变异, 种子颜色的着色途径可能存在差异<sup>[5]</sup>. 另外, 根据法国甘蓝型油菜 *Darmor-bzh* 基因组注释信息, 在该区间内共有 430 个注释基因, 其中也包含了 *MYB*, *WD40* 和 *CAH* 等一些重要的候选基因, 但由于定位的区间比较大, 后续我们将针对该候选区间继续开发标记进行黄籽基因的精细定位.

甘蓝型油菜黄籽表现质量和数量性状特征由少数主效基因控制, 同时受微效基因和环境因素影响<sup>[19]</sup>. 借助正向遗传学手段可以有效地将甘蓝型油菜表型与其潜在的基因联系起来, 在二代测序推广以及法国甘蓝型油菜参考基因组公布之前, 利用正向遗传学对甘蓝型油菜重要性状定位主要是基于遗传分离群体构建连锁图谱实施 QTL 定位, 但该过程步骤较为繁琐、费时费力, 并且在很多情况下得到的定位结果精确度较低、区间范围较大<sup>[30]</sup>, 不利于后续分析. 随着二代测序成本的降低, 加上三代测序和 Hi-C 技术的发展, 使得多种作物参考基因组序列得以破译和释放<sup>[31]</sup>, 为基于 NGS 测序进行 BSA 分析提供了极大的便

利,也为高效定位农作物主效基因及快速进行作物育种提供了新的思路。QTL-seq最早应用于水稻数量性状的定位<sup>[26]</sup>,该方法将两个表型上具有明显差异的品种杂交形成一个定位群体,在定位群体中构建两个混池进行全基因组重测序,省去了传统QTL分析中耗时、昂贵的DNA标记开发和基因分型过程,可以快速识别和分析植物的QTL位点。本研究正是基于BSA原理执行QTL-seq分析流程开展甘蓝型油菜黄籽主效基因定位分析,具有简便、高效、成本低廉等优点。

甘蓝型油菜黄籽基因来源不同,也缺乏通用性标记,因此选择准确有效的分子标记并加以开发利用显得尤为重要。SSR和InDel标记均是基于生物基因组序列的共显性标记,在选择隐性性状时较有优势<sup>[22]</sup>。甘蓝型油菜基因组序列的公布使得SSR标记的开发变得简单易行。SSR是一种简单串联重复序列,通常包含2~6个碱基。相较于其他常用的分子标记,SSR标记所受的影响因素相对较少,多态性和灵敏度高于RFLP,稳定性和重复性优于RAPD,技术成本又低于AFLP,且适合不同研究者合作开发。高通量测序技术的发展极大地促进了InDel标记的开发,InDel标记依据序列差异得以开发,在基因组中的数目和分布密度远大于SSR,仅居于SNP之后<sup>[32]</sup>。InDel是一种准确性高、变异稳定、通用性高、带型清晰简单的多态性标记,能避免分析模糊,适于全基因组标记开发<sup>[33]</sup>。本研究利用重测序分析定位粒色基因候选区间并获得粒色基因连锁的SSR和InDel标记,通过随机选用F<sub>2</sub>粒色分离群体中的极端单株对其进行验证分析,为甘蓝型油菜黄籽基因的精细定位提供了有效的标记信息,也为甘蓝型油菜黄籽性状的辅助选择育种提供了有效的分子标记。

#### 参考文献:

- [1] MAHMOOD T, RAHMAN M H, STRINGAM G R, et al. Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) for Oil and Protein Contents and Their Relationships with other Seed Quality Traits in *Brassica juncea* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113(7): 1211-1220.
- [2] 刘后利. 油菜的遗传和育种 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [3] OLSSON G. Species Crosses within the Genus *Brassica*. II. Artificial *Brassica napus* L. [J]. *Hereditas*, 1960, 46: 351-396.
- [4] 刘雪平, 涂金星, 陈宝元, 等. 甘蓝型黄籽油菜研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 2005, 27(2): 87-91.
- [5] CHEN B Y, HENEEN W K, JONSSON R. Resynthesis of *Brassica napus* L. through Interspecific Hybridization between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with Special Emphasis on Seed Colour [J]. *Plant Breeding*, 1988, 101(1): 52-59.
- [6] RASHID A, RAKOW G, DOWNEY R. Development of Yellow Seeded *Brassica napus* through Interspecific Crosses [J]. *Plant Breeding*, 1994, 112(2): 127-134.
- [7] MENG J L, SHI S W, GAN L, et al. The Production of Yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through Crossing Interspecific Hybrids of *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus* [J]. *Euphytica*, 1998, 103(3): 329-333.
- [8] 李爱民, 张永泰, 蒋金金, 等. 芸苔属主要油料作物黄籽性状分子遗传研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2009, 7(2): 407-412.
- [9] VAN DEYNZE A. The Inheritance of Seed Colour and Vernalization Requirement in *Brassica napus* Using Doubled Haploid Populations [J]. *Euphytica*, 1993, 74(1): 77-83.
- [10] 刘雪平. 人工合成甘蓝型油菜种皮色泽、芥酸含量和花色的遗传研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [11] 肖数数. 甘蓝型黄籽油菜 No. 2127-17 黄籽基因的遗传分析及定位 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [12] RAHMAN M, LI G Y, SCHROEDER D, et al. Inheritance of Seed Coat Color Genes in *Brassica napus* L. and Tagging the Genes using SRAP, SCAR and SNP Molecular Markers [J]. *Molecular Breeding*, 2010, 26: 439-453.
- [13] ZHANG Y, LI X, CHEN W, et al. Identification of Two Major QTL for Yellow Seed Color in Two Crosses of Resynthesized *Brassica napus* Line No. 2127-17 [J]. *Molecular Breeding*, 2011, 28: 335-342.
- [14] FU F Y, LIU L Z, CHAI Y R, et al. Localization of QTLs for Seed Color using Recombinant Inbred Lines of *Brassica napus* in Different Environments [J]. *Genome*, 2007, 50(9): 840-854.
- [15] LIU L Z, QU C M, WITTKOP B, et al. A High-density SNP Map for Accurate Mapping of Seed Fibre QTL in *Brassi-*

- ca napus* L. [J]. PLoS One, 2013, 8(12): 83-95.
- [16] 洪美艳. 甘蓝型油菜种皮颜色基因的精细定位与种皮转录组分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [17] 李霞. 人工合成甘蓝型黄籽油菜粒色基因的精细定位 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [18] 刘福青. 甘蓝型黄籽油菜分子标记与种皮相关基因同源性比较 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009.
- [19] SOMERS D J, RAKOW G, PRABHU V K, et al. Identification of a Major Gene and RAPD Markers for Yellow Seed Coat Colour in *Brassica napus* [J]. Genome, 2001, 44(6): 1077-1082.
- [20] 董艳珍, 李宇, 胥婷, 等. 甘蓝型油菜黄籽基因 RAPD 标记的初步研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(5): 529-531.
- [21] 刘志文. 人工合成甘蓝型黄籽油菜的分子标记和利用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [22] 梅德圣. 甘蓝型油菜株高和开花时间的 QTL 定位及黄籽性状的分子标记 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004.
- [23] 曲存民, 卜海东, 刘晓兰, 等. 黄籽甘蓝型油菜核心种质的 SSR 标记分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(1): 1-6.
- [24] 陈雪, 王瑞, 井付钰, 等. 基于二代测序的甘蓝型油菜白花基因候选区间定位及连锁标记验证 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(6): 1108-1117.
- [25] 丁戈, 陈伦林, 邹小云, 等. 甘蓝型油菜桔黄花色基因的 QTL-seq 遗传分析及 InDel 分子标记开发 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(12): 3983-3992.
- [26] 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 Bulk Populations [J]. The Plant Journal, 2013, 74(1): 174-183.
- [27] LIU H L, HAN J, HU X. Studies on the Inheritance of Seed Coat Color and other Related Characteristics of Yellow Seeded *Brassica napus* [C]. Proceedings of the 8 th International Rapeseed Congress, vol 5. Saskatoon, 1991: 1438-1444.
- [28] LI J, CHEN L, LIANG Y. Research and Commercial Application of the Complete Dominance Yellow-seeded Gene in *Brassica napus* L. [C]. Proceedings of the 11th international rapeseed congress, vol 1, Copenhagen, Denmark, 2003: 202-204.
- [29] 李加纳, 张学昆, 谌利, 等. 不同遗传背景的甘蓝型黄籽油菜粒色遗传初步研究 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(4): 16-19, 42.
- [30] 陆才瑞, 邹长松, 宋国立. 高通量测序技术结合正向遗传学手段在基因定位研究中的应用 [J]. 遗传, 2015, 37(8): 765-776.
- [31] 宋驰. 第二代测序技术在植物基因组研究中的应用 [C] //第十届全国药用植物及植物药学术研讨会论文摘要集. 昆明, 2011.
- [32] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 等. InDel 标记的研究和应用进展 [J]. 生物多样性, 2016, 24(2): 237-243.
- [33] GAO Q, YUE G, LI W. Recent Progress Using High-throughput Sequencing Technologies in Plant Molecular Breeding [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54: 215-227.

责任编辑 周仁惠