DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04115

GBS 高密度遗传连锁图谱定位甘蓝型油菜粉色花性状

周新桐^{1,2,**} 郭青青^{1,2,**} 陈 雪^{1,2} 李加纳^{1,2} 王 瑞^{1,2,*}

¹ 西南大学现代农业科学院, 重庆 400715; ² 西南大学农学与生物科技学院 / 重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400715

摘 要: 甘蓝型油菜花瓣颜色是重要的观赏性状, 花瓣颜色的选育和改良已成为材料创制的主要研究方向。目前对甘蓝型油菜粉色花性状定位研究未见报道。本研究以甘蓝型油菜纯系黄花 62 和甘蓝型油菜纯系粉花 77 为亲本构建双单倍体(doubled haploid, DH)群体。利用简化基因组测序技术(genotyping-by-sequencing, GBS)筛选出 3253 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)标记, 构建了全长 1766.06 cM 甘蓝型油菜连锁图谱, 标记间平均遗传距离为 0.54 cM; 使用 WinQTL Cartographer 复合区间作图方法对粉色花性状进行数量性状座位(quantitative trait locus, QTL)定位, 检测到位于 A07 和 C03 染色体上各 1 个 QTL; 将定位区间内基因与甘蓝和白菜同源基因进行线性比对, 在这些区间中找到了一些存在于 3 个物种的同源基因; 对粉色花定位区间内基因进行可变剪切分析发现, 2 个花色相关基因 *BnaA07g15980D* 和 *BnaA07g17500D* 在亲本粉色花瓣中发生内含子保留可变剪切。上述研究结果为甘蓝型油菜粉色花相关基因精细定位和分子连锁标记开发提供了更多线索。

关键词: 甘蓝型油菜; 粉色花性状; 遗传连锁图谱; QTL 定位

Construction of a high-density genetic map using genotyping by sequencing (GBS) for quantitative trait loci (QTL) analysis of pink petal trait in *Brassica napus* L.

ZHOU Xin-Tong^{1,2,**}, GUO Qing-Qing^{1,2,**}, CHEN Xue^{1,2}, LI Jia-Na^{1,2}, and WANG Rui^{1,2,*}

¹ Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University / Chongqing Engineering Research Center for Rapeseed, Chongqing 400715, China

Abstract: Petal color is an important ornamental trait in *B. napus*, and the breeding and improvement of petal color have become the main goal in breeding and genetic research. To date, the research about interval location of pink petal trait in *B. napus* is very less yet. In this study, the genetic basis of petal phenotype was examined in the 62 (yellow petal) and 77 (pink petal) parents as well as 114 individuals comprising the doubled haploid (DH) mapping population. This DH population was examined using genotyping by sequencing (GBS) with 6065 high-density polymorphism single nucleotide polymorphism (SNP) markers to construct a genetic linkage map comprised of 3253 polymorphic markers. The genetic map spanned 1766.06 cM, with an average distance of 0.54 cM between markers. The complete interval mapping method identified two quantitative trait loci (QTL) for petal color located on chromosomes A07 and C03, respectively. Synteny analysis showed that some homologous genes in the interval of *B. napus* were located in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. Also, eight genes related to flower color were analyzed between inbred line 77 and inbred line 62, the splice junctions of *BnaA07g15980D* and *BnaA07g17500D* were belong to intron retention type in pink petal of 77 parent. This study lays a foundation for further research on fine mapping of pink petal trait and molecular marker-assisted selection in *Brassica napus* L.

Keywords: *Brassica napus* L.; pink petal trait; genetic linkage map; QTL mapping

油菜属于十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*) 植物, 在中国古代被称为“芸薹”, 是一种栽培历史

本研究由西南大学校创项目(106352020478)资助。

This study was supported by the Innovation Project of Southwest University Students (106352020478).

* 通信作者(Corresponding author): 王瑞, E-mail: ruiwang71@163.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 周新桐, E-mail: wjzxt22@163.com; 郭青青, E-mail: 1833266719@qq.com

Received (收稿日期): 2020-05-30; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-12-01.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201201.1534.002.html>

悠久、适应性强、用途广、经济价值高的油料作物。油菜在世界油料作物生产中产量仅次于大豆,居第 2 位,是中国重要油料作物^[1]。近几年随着油菜不同花色品种的示范与推广,带动了乡村观光旅游,促进了农民增收。目前已知的油菜花色主要有金黄色、粉色、柠檬黄色、鲜黄色、乳黄色、土黄色、红黄色、桃红色、橘红色、粉白色、粉红色、乳白色、纯白色、微紫丝白花以及黄白嵌合体等。因此,构建花色分子育种策略和选育不同花色新品种尤为重要,而对油菜花色性状基因进行定位是最主要的研究内容。

已有一些文献对花色性状基因做了定位研究。早期 Chen 等^[2]利用白花芥蓝与白菜杂交获得甘蓝型油菜白花品系“*No 7076*”发现,控制白花性状基因位于 C 组染色体上。戚存扣等^[3]也推测控制白花性状基因位于 C 组染色体上。分子连锁标记辅助选择花色是选育花色新材料的重要手段,同时也可以用来验证花色性状基因所在区间。董育红等^[4]利用集团分离分析法(bulked segregant analysis, BSA)发现与甘蓝型油菜白花基因连锁的随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 标记。通过 RAPD 标记又发现白花性状基因与高芥酸性状基因具有连锁关系^[5]。Huang 等^[6]证实 1 个扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记和 2 个简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记与甘蓝型油菜白花基因连锁。利用试验获得的 6 对 AFLP 引物扩增 151 个单株,确定了离白花基因两侧最近的 2 个分子标记^[7]。张豹^[8]结合 SSR 技术和 QTL 分析,将甘蓝型油菜白花基因定位到了 C03 染色体上。之后又有研究将白花基因定位在了白菜参考基因组 A02 染色体约 162 kb 物理区间内^[9]。基于二代测序的 BSA 分析技术为质量性状或主效基因快速准确定位提供了强大工具。淡亚彬^[10]推测桔红花基因 HS1 位于甘蓝型油菜 A9 连锁群上,而 Yao 等^[11]用 BSA 重测序方法将桔红花基因精细定位在甘蓝型油菜 C09 染色体 151 kb 区间。利用 BSA 和全基因组重测序技术,甘蓝型油菜橙花性状隐性基因 *BrOF* 定位到 A09 染色体 41.5 kb 区间^[12]。桔黄花性状基因定位在 C09 染色体区域^[13],并获得了 2 个连锁的分子标记 BnaC09_19 和 BnaC09_34;白花性状基因定位在 C03 染色体 52 Mb~55 Mb 区间^[14],在此区间 760 kb 范围内筛选出 6 个与白花性状基因紧密连锁共分离的 SSR 标记。尽

管甘蓝型油菜花色定位研究较多,但对于粉色花性状相关基因定位还未见研究报道。

随着高通量测序技术的发展,测序方法不断更新,测序成本不断降低。近年来发展的简化 GBS 测序方法通过与参考组比对获得海量 SNP 标记,此类标记易于进行频率估计和基因分型,已经在柑橘^[15]、烟草^[16]、玉米^[17]、棉花^[18]、枣树^[19]等植物中应用于聚类分析和基因定位研究。但 GBS 在甘蓝型油菜图谱构建和基因定位中的应用报道很少。因此,本研究利用花色分离 DH 群体,采用二代简化测序 GBS、转录组数据可变剪切、共线性与传统 QTL 分析方法交叉结合,期望为甘蓝型油菜粉色花性状相关基因定位与分子标记辅助选择提供新的视角和思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄花亲本 62 和粉花亲本 77 都是小孢子加倍后的纯系材料。DH 群体为(黄花 62×粉花 77) F₁ 花粉小孢子加倍成功的 114 个基因型株系。2018 年 9 月至 2019 年 5 月将亲本和 DH 群体种植于重庆市北碚区歇马镇西南大学油菜生物学团队育种基地。每个材料种植 3 行,每行 8 株,行距 40 cm,株距 30 cm,田间管理按常规方式进行。

1.2 DH 群体 GBS 测序和数据处理

2018 年 12 月采集亲本和 DH 群体植株嫩叶,−20℃ 保存备用。2019 年 1 月送北京诺禾致源生物信息科技有限公司测序。2 个亲本 DNA 建库类型为 DNA-350 bp,以 Illumina HiSeq PE150 方法测序,测序深度为 30×。DH 子代进行 GBS 简化基因组测序。利用 GBS-SNP-CROP^[20]分析流程通过 barcode 文件一步得到 114 个 DH 子代系的双末端测序文件。以法国甘蓝型油菜 Darmor-bzh 为参考组, BWA-mem 软件比对测序 reads 到参考组, SAMtools 软件参数 mpileup 获得 114 个 DH 子代系的 SNP 数据。

1.3 花色性状考察和数据分析

油菜盛花期采用分光测色仪(YS3060)测定 DH 群体花瓣颜色(flower color, FC)。DH 群体中每个基因型株系测量 5 株,每株测量 3 次。采用 SPSS 统计花色性状基本参数。采用 R3.6.1 制作花色表型数据密度分布直方图。

1.4 连锁图谱构建和花色 QTL 定位

结合甘蓝型油菜 62 和 77 两亲本之间变异 SNP

位点,对 DH 群体的 SNP 位点过滤,统计 DH 群体子代 SNP 多态型并进行基因分型。利用 JoinMap 4.0^[21] 计算 DH 群体内 SNP 位点间遗传距离,perl SVG 模块绘制遗传连锁图谱。使用 WinQTL Cartographer 2.5 (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) 复合区间作图法对花色进行 QTL 定位。具体参数如下: LOD 阈值设置为 2.5,扫描步长设置为 1 cM,Permutation 设置为 1000,Significance 为 0.01。QTL 的命名标准为: q+性状名称英文缩写-染色体编号-QTL 个数。如 *qFC-*chr7-1** 表示甘蓝型油菜 A07 染色体上检测到的第 1 个花色性状 QTL。

1.5 共线性分析

使用 Python 版 MCScan (JCVI 包)(<https://github.com/tanghaibao/jcvi/Mcscan>)对甘蓝型油菜花色定位区间内基因与白菜、甘蓝的同源基因进行共线性分析。

1.6 转录组测序与可变剪切分析

于初花期采集甘蓝型油菜纯系粉花77和甘蓝型油菜纯系黄花62这2个亲本花瓣样品,装入2 mL无RNA酶的离心管并迅速置于液氮中,取样后保存于-80 备用。提取样品总RNA送北京诺禾致源生物信息科技

有限公司,在Illumina HiSeq 2000平台上完成转录组测序。利用bwa软件将转录组测序数据与法国甘蓝型油菜参考组 Darmor-bzh 比对,获得sam文件,启动 Splicing Grapher^[22]分析流程,依据法国甘蓝型油菜基因序列文件和注释文件构建剪切位点模型,结合R包绘制花色定位区间内花色相关基因的可变剪切视图。

2 结果与分析

2.1 遗传图谱构建

过滤筛选后获得 3253 个作图 SNP 标记(表 1),利用 JoinMap 软件构建花色 DH 群体遗传连锁图谱。19 个遗传连锁群总遗传距离为 1766.06 cM,平均每个标记的覆盖范围为 0.54 cM,标记在 A 和 C 染色体组上都有分布,但分布不均匀。lg14 (chrC04)上有最多的 410 个 SNP 标记,平均遗传距离为 0.29 cM;lg19 (chrC09)上标记数目最少,仅含有 33 个 SNP 标记,平均遗传距离为 0.60 cM。lg2 (chrA02) 42.469 cM~60.984 cM 处出现了 18.52 cM 最大间距。大区域的标记缺失,增加了标记的平均遗传距离。SNP 标记连锁群分布如图 1。

表 1 遗传连锁群信息统计
Table 1 Information statistics of genetic linkage groups

连锁群 Linkage groups	标记数量 Number of markers	遗传距离 Genetic distance (cM)	平均遗传距离 Average genetic distance (cM)	标记间最大间隔 Maximum spacing between markers (cM)
lg1	69	93.50	1.36	15.24
lg2	217	97.00	0.45	18.52
lg3	146	150.84	1.03	9.17
lg4	153	99.61	0.65	6.43
lg5	220	141.07	0.64	6.66
lg6	256	101.53	0.40	5.51
lg7	160	131.66	0.82	18.37
lg8	275	133.58	0.49	6.73
lg9	222	77.51	0.35	10.69
lg10	78	84.29	1.08	13.89
lg11	63	76.21	1.21	12.50
lg12	349	42.19	0.12	5.53
lg13	214	88.18	0.41	4.97
lg14	410	118.09	0.29	11.33
lg15	72	57.28	0.80	16.00
lg16	147	97.54	0.66	9.47
lg17	103	102.42	0.99	6.44
lg18	66	53.73	0.81	16.87
lg19	33	19.83	0.60	9.65
总计 Total	3253	1766.06	0.54	18.52

图 1 连锁群标记分布图

Fig. 1 Distribution map of linkage group markers

X 轴表示连锁群; Y 轴表示遗传距离(单位: cM); 蓝色为有效 SNP 标记。

X-axis represents linkage groups; Y-axis represents genetic distance (cM); blue is a valid SNP marker.

2.2 亲本 62、77 和 DH 群体花瓣色泽表型观察

甘蓝型油菜纯系黄花 62 和甘蓝型油菜纯系粉花 77 花瓣色泽如图 2, 62 为鲜黄色, 77 粉色花瓣上脉络明显。由于是小孢子加倍材料, 62 和 77 自交仍保持鲜黄色和粉色, 花瓣色泽不会发生分离, 花色相关基因为高度纯合状态。62×77 杂交组合 F_1 花瓣颜色为粉白色。粉色花对黄花为部分显性。 F_1 植株

花粉小孢子培养秋水仙碱加倍, DH 群体花瓣颜色发生了各种分离(图 3), 表现为桔红、桔黄、鲜黄、淡黄、暗黄、纯白、淡白、粉白等多种花色表型, 但 DH 群体中每种基因型都为纯合状态, 自交后花瓣颜色没有出现分离。与亲本 62 纯黄色花瓣颜色一样的 DH 株系比例极少。没有和亲本 77 粉色花瓣颜色一样的 DH 株系, 有部分株系表现出粉白色。因而本研究用分光测色仪对 DH 群体花瓣颜色表型进行数据化采集。

2.3 DH 群体花色表型数据分析

对 DH 群体花色性状进行统计分析(表 2), 使用 R 包制作概率密度曲线频率直方图(图 4)。通过 Kolmogorov-Smirnov 方法检验花色(flower color)表型数据, 花色变异范围为 6.21~53.04, 平均数为 24.47, 中位数为 22.89; 四分位距、偏斜度和峰度分别为 12.78、0.85 和 0.09。显著性 Sig 值<0.05, 结果显示花色表型偏正态分布, 表明花色受多个主效基因控制。

2.4 花色性状 QTL 定位

采用 WinQTL Cartographer 复合区间作图法对花色性状进行 QTL 定位分析(图 5)。当 LOD 值>2.5 时, 共检测到 2 个 QTL, 分别位于 chrA07 (chr7)和 chrC03 (chr13) 2 条染色体上(表 3)。 $qFC\text{-}chr7\text{-}1$ 所在定位区间内包含 287 个基因, LOD 值最高为 6.62, 位点的加性效应为 4.58, 解释表型贡献率为 14.29%。

图 2 甘蓝型油菜亲本花瓣表型观察

Fig. 2 Parental phenotype of pink petal and yellow petal in *B. napus*

A1 与 A2: 母本 62; B1 与 B2: 父本 77。

A1 and A2: female parent 62; B1 and B2: male parent 77.

图 3 甘蓝型油菜 DH 群体花色表型

Fig. 3 Phenotype of doubled haploid population for petal color in *B. napus*

表 2 甘蓝型油菜花色性状统计参数

Table 2 Statistical parameters of petal color (PC) trait in *B. napus*

性状 Trait	平均数 Average	中位数 Median	标准偏差 Standard deviation	最小值 Minimum	最大值 Maximum	范围 Range	四分位距 Interquartile range	偏斜度 Skewness	峰度 Kurtosis	显著性 Significance
花色 PC	24.47	22.89	11.28	6.21	53.04	46.83	12.78	0.85	0.09	0.00

图 4 花色性状分布密度直方图

Fig. 4 Density distribution histogram of petal color trait

X 轴代表花色表型组中值, Y 轴代表分布密度。
X-axis represents the petal color phenotype; Y-axis represents the distribution density.

表 3 WinQTL 复合区间作图花色 QTL 结果

Table 3 QTLs related to petal color trair by WinQTL CIM in *B. napus*

QTL	LOD 峰值 LOD peak	位置 Position (cM)	左端标记 Left marker	右端标记 Right marker	99%置信 区间范围 99% CI (cM)	加性效应 Additive effect	贡献率 R^2 (%)	区间基因数量 Number of genes
<i>qFC-chr7-1</i>	6.62	23.8	mk2056	mk2036	8.383–42.019	4.58	14.29	287
<i>qFC-chr13-1</i>	14.01	30.8	mk4000	mk3898	20.305–41.353	6.61	34.02	308

而 *qFC-chr13-1* 所在定位区间内含有 308 个基因, LOD 峰值最高为 14.01, 位点加性效应为 6.61, 解释表型变异为 34.02%。

2.5 甘蓝型油菜粉色花定位区间基因与甘蓝、白菜同源基因共线性分析

WinQTL Cartographer 复合区间作图法确定的 QTL 区间为遗传图谱区间。GBS 测序数据与参考组比对获得的 SNP 标记具有准确的染色体物理位置, 花色 QTL 区间两端的 SNP 标记比对到法国甘蓝型油菜参考组和注释文件上, SNP 标记区间内就能得到参考组对应的注释基因。根据基因序列同源性, Python (<https://gsthub.com/tanghaibao/jcvi/Mcscan>)流程对花色定位区间内基因与甘蓝、白菜同源基因进行共线性分析。1 个花色 QTL 区间比对到甘蓝型油

图 5 WinQTL 复合区间方法确定花色 QTL 连锁群位置

Fig. 5 Chromosomal location of QTL for petal color by WinQTL CIM

图 A 中, X 轴表示 19 条染色体, Y 轴分别表示 LOD 值和加性效应 $a(H1)$; 横线表示 LOD 阈值线。图 B、图 C 分别表示在 7 号染色体和 13 号染色体检测到的一个花色 QTL 位点; X 轴表示对应染色体上的遗传距离, Y 轴分别表示 LOD 值和加性效应 $a(H1)$; 横线表示 LOD 阈值线。

X-axis represents 19 chromosomes, and Y-axis represents the LOD value and the additive effect $a(H1)$ in Figure A; the horizontal line represents the LOD threshold line. Figure B, there is a represent QTL of petal color in figure C detected on chromosome 7 and chromosome 13, respectively; X-axis represents the genetic distance on the corresponding chromosome, and is marked with the corresponding linkage marker position, Y-axis represents the LOD value and the additive effect $a(H1)$, respectively; the horizontal line indicates the LOD threshold line.

菜 A07 染色体 13.27 Mb~14.95 Mb 区间共有 287 个注释基因, 244 个同源基因共线性比对到白菜 A02 染色体 17.39 Mb~22.05 Mb 区间, 183 个同源基因共线性比对到甘蓝 C06 染色体 0.65 Mb~12.85 Mb 区间。另一个花色 QTL 区间比对到甘蓝型油菜 C03 染色体 51.00 Mb~54.25 Mb 区间, 共 308 个注释基因, 113 个同源基因共线性比对到白菜 A08 染色体 55.10 Mb~57.89 Mb 区间, 230 个同源基因共线性比对到甘蓝 C03 染色体 10.58 Mb~14.99 Mb 区间(图 6)。

白菜和甘蓝进行种间杂交可以人工合成甘蓝型油菜, 3 个物种基因共线性分析反映了花色定位区间内基因由二倍体物种到四倍体物种的同源进化关系。

图 6 甘蓝型油菜 WinQTL 复合区间花色 QTLs 物理区间与甘蓝、白菜同源基因共线性分析
Fig. 6 Synteny analysis of candidate interval for petal color between *B. napus* and *B. oleracea* or *B. rapa* by WinQTL CIM

2.6 亲本花色定位区间内基因可变剪切比较

利用 hisat2 软件处理亲本 77 粉色花瓣和亲本 62 黄色花瓣转录组测序数据, 整理成 sam 文件, 使用 SpliceGrapher 分析流程, 统计两亲本花色定位区间内基因转录本的剪切情况(表 4)。在 A07 染色体花色定位区间内共有 287 个基因, 亲本 77 和 62 发生可变剪切的基因数都为 26 个, 亲本 77 比亲本 62 内含子保留、外显子跳跃、3'端可变剪接都多 1 个, 5'端可变剪接少 2 个; 在 C03 染色体花色定位区间内共有 308 个基因, 亲本 77 有 14 个基因发生可变剪切, 而亲本 62 有 11 个基因可变剪切。亲本 77 内含子保留出现 10 次, 3'端可变剪接出现 5 次, 5'端可变剪接仅出现 1 次。亲本 62 共有 11 个基因发生可变剪切, 其中内含子保留出现 8 次, 3'端可变剪接出现 5 次, 5'端可变剪接出现 2 次; 这些结果显示花色定位区间内的基因转录本在 2 个亲本花瓣中多数为正常剪切, 基因转录本可变剪切所占的比例约为 10%~20%, 多种可变剪切类型并存。

已有研究表明, 花色素苷的合成代谢受到转录因子的调控^[9], 目前已鉴定了 MYB 家族成员、bHLH 蛋白和 WD40 因子 3 类转录因子参与花色素苷代谢合成。花色定位区间内基因 *BnaC03g62830D*、*BnaC03g64160D*、*BnaA07g16010D* 与转录因子 MYB 有关; *BnaC03g62910D*、*BnaC03g62920D* 和 *BnaC03g62930D* 为 3 个 WD40 重复蛋白基因; 基因 *BnaA07g17500D* 参与转录因子 bHLH 调控; 基因 *BnaA07g15980D* 参与类胡萝卜素合成途径。花色定位区间内的 8 个花色相关基因在 2 个亲本花瓣中有 6 个基因转录本都是正常剪切。而 *BnaA07g15980D* 基因在亲本 62 黄色花瓣中正常剪切(图 7-A)、在亲本 77 粉色花瓣中为 1 个内含子保留可变剪切(图 7-B);

表 4 甘蓝型油菜亲本花色定位区间内基因可变剪切类型
Table 4 Types of gene alternative splicing in location interval for petal color among parents in *B. napus*

方法 Method	亲本 Parent	染色体 Chromosome	定位区间内基因总数 Total number of genes in location interval	发生可变剪切基因总数 Number of genes with alternative splicing	可变剪切出现次数 Number of the alternative splicings				
					IR	ES	A3SS	A5SS	总计 Total
WinQTL Cart	77	A07	287	26	26	2	5	0	33
	62	A07	287	26	25	1	4	2	32
	77	C03	308	14	10	0	5	1	16
	62	C03	308	11	8	0	5	2	15

IR: 内含子保留; ES: 外显子跳跃; A3SS: 3'端可变剪接; A5SS: 5'端可变剪接。
IR: intron retention; ES: exon skipping; A3SS: alternative 3' splice site; A5SS: alternative 5' splice site.

BnaA07g17500D 基因在亲本 62 黄色花瓣中正常剪切(图 7-C)、在亲本 77 粉色花瓣中为 2 个内含子保留可变剪切(图 7-D)。因此,考察花色定位区间内花色相关基因的转录状态和剪切类型可为分析推定花色候选基因提供更多线索和信息。

3 讨论

本研究采用 GBS 技术对 DH 花色分离群体进行

简化测序,与全基因组重测序比较,GBS 测序操作简单、成本低廉、省工省时。通过 barcode^[20]接头文件从总测序数据中一次分出 114 个 DH 子代株系测序数据,将这些数据与法国甘蓝型油菜参考组序列比对,结合亲本重测序之间 SNP 变异位点,快速获得具有染色体物理位置的 SNP 基因型分型数据。GBS 与 SNP 芯片相比较,芯片设计开发成本相对较高并且检测位点固定,部分 SNP 无法被检测导致检

(图 7)

图 7 两亲本花瓣中花色相关基因可变剪切视图

Fig. 7 Splice graphs for genes related to petal color between 77 and 62

A: *BnaA07g15980D* 在黄花亲本 62 花瓣中转录本剪切视图; B: *BnaA07g15980D* 在粉花亲本 77 花瓣中转录本剪切视图; C: *BnaA07g17500D* 在黄花亲本 62 花瓣中转录本剪切视图; D: *BnaA07g17500D* 在粉花亲本 77 花瓣中转录本剪切视图。灰色五边形为外显子, 白色区域为内含子, 连线表示不同剪接方式。图片包含 4 个区域, 第 1 部分为注释文件基因模型, 第 2 部分是测序结果, 第 3 部分为测序结果与注释文件比较基因剪切模型(带有代表性的 isoform 同源蛋白异构体), 第 4 部分为测序文件中支持外显子 reads 数目。左下角、右下角数字为该基因的起始位点和终止位点。

A: splice graph for *BnaA07g15980D* in 62 petals; B: splice graph for *BnaA07g15980D* in 77 petals; C: splice graph for *BnaA07g17500D* in 62 petals; D: splice graph for *BnaA07g17500D* in 77 petals. The gray pentagons represent exons, the white region represent introns, the lines between them represent different ways of splicing. The picture is split into four parts, the first part is the gene model from the annotation file, the second part is the sequencing result, the third part is the gene splicing model between the sequencing result and the annotation file (with a representative protein isoform), the fourth part is the number of reads supporting each exon in the sequencing file. The numbers in the lower left and right corners represent the start and stop sites of the gene, respectively.

测位点过少。但是 GBS 测序也存在一些局限性,如酶切反应有一定偏好性,一种限制性内切酶进行酶切时只能识别特定核苷酸序列,测序覆盖范围受到一定程度影响。GBS 测序过程聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)可能产生非特异性扩增使测序错误增多;接头二聚体过滤不完全也会在测序中造成一定损失^[23]。然而在遗传图谱构建和 QTL 定位分析研究中,通过 GBS 测序获得的 SNP 标记完全能够满足要求。

Landry 等^[24]用 103 个限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱。Mahmood 等^[25]用 108 个插入缺失标记(Insertion-Deletion, InDel)和 89 个 SSR 标记,刘雪平^[26]用 255 个 SSR、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)和 RAPD 标记, Wang 等^[27]用 11,458 个 SNP 和 57 个 SSR 标记分别构建了甘蓝型油菜标记连锁图谱。而本研究应用 GBS 简化测序技术避免了以往人工全染色体设计引物跑标记计算标记遗传距离构建连锁图谱的繁琐弊端,且 GBS 测序数据与法国甘蓝型油菜参考组比对获得的 SNP 标记有准确的染色体对应物理位置,定位 QTL 更为准确直观,定位区间可以直接利用法国甘蓝型油菜参考组注释文件基因染色体物理位置信息。

WinQTL Cartographer 是美国北卡罗来纳州立大学开发的一款软件,在 DH、F₂ 群体基因定位中广泛应用。结合连锁图谱 SNP 标记染色体物理位置,此方法通过复合区间作图定位 1 个花色 QTL 区间在甘蓝型油菜 A07 染色体 13.27 Mb~14.95 Mb,另一个花色 QTL 区间在甘蓝型油菜 C03 染色体 51.00 Mb~54.25 Mb。很多研究者已将甘蓝型油菜白花基因定位于 C03 染色体上。刘雪平^[26]将甘蓝型油菜白花基因定位于 C03 染色体; Zhang 等^[28]通过图位克隆在甘蓝型油菜 C03 染色体上鉴定到一个白花性状 QTL; 陈雪等^[14]应用二代测序技术把白花基因定位在甘蓝型油菜 C03 染色体 52 Mb~55 Mb 区间内。本研究利用 WinQTL Cart 复合区间作图法定位 1 个花色主效 QTL 在 C03 染色体的结果与陈雪等^[14]一致,且区间部分重合。

根据基因序列同源性,对花色定位区间内基因进行甘蓝型油菜、白菜、甘蓝 3 个物种之间共线性分析。白菜 A02 染色体 17.39 Mb~22.05 Mb 区间与甘蓝型油菜 A07 染色体花色 QTL 区间具有基因同源共线

性,与杨晓刚^[29]定位的白菜白花基因位于 A02 染色体 20.99 Mb~22.97 Mb 区间存在重合,与赵君伟^[9]定位的白菜白花基因位于 A02 染色体 21.69 Mb~21.86 Mb 区间也部分重合。甘蓝 C03 染色体 10.58 Mb~14.99 Mb 区间与甘蓝型油菜 C03 染色体花色 QTL 区间具有基因同源共线性。而杨茹涵等^[30]将白花基因定位于甘蓝 C03 染色体 48.08 Mb~48.92 Mb 区间。本课题组利用重测序 BSA 方法将甘蓝型油菜桔红花基因定位于 A07 染色体 19 Mb~20 Mb 区间(结果待发表),与 WinQTL Cartographer 定位另一个花色 QTL 区间在甘蓝型油菜 A07 染色体 13.27 Mb~14.95 Mb 结果十分相近。因此,粉色花性状主效基因 QTL 染色体定位区间与已报道的文献基本一致,定位区间部分重叠以及芸薹属共线性区间展示了花色定位区间内基因由二倍体物种到四倍体物种的基因同源关系。尤其是 C03 染色体上的粉色花主效基因 QTL 与前人定位的甘蓝型油菜白花基因 C03 染色体区间基本一致,因此猜测 C03 染色体粉色花主效基因和前人定位的白花基因是同一个基因。

田间花色育种实践中,甘蓝型油菜粉色花纯系自交不分离。但粉色花与甘蓝型黄花杂交构建 F₂ 群体或 DH 群体时,花瓣色会有纯白和桔红 2 种主要花色的分离,还有大量的淡红、淡黄、粉白等中间色,花色表型数据呈多峰特点,表现出主效-微效基因控制的数量性状遗传特点。而通过 WinQTL Cartographer 定位 2 个粉色花 QTL 分别分布在 C03 和 A07 染色体上,推测甘蓝型油菜粉色花性状至少有 2 个主效基因,粉色花与黄花杂交分离世代中,2 个主效基因分离,多个微效基因作用,从而导致 F₂ 和 DH 群体呈现多种花瓣颜色的分离。

对甘蓝型油菜亲本 77 粉色花瓣和亲本 62 黄色花瓣转录组数据进行可变剪切事件分析发现,花色定位区间 6 个花色相关基因 *BnaC03g62830D*、*BnaC03g64160D*、*BnaC03g62910D*、*BnaC03g62920D*、*BnaC03g62930D*、*BnaA07g16010D* 的转录本在亲本 62 黄色花瓣和亲本 77 粉色花瓣中都为正常剪切。而花色相关基因 *BnaA07g15980D* 和 *BnaA07g17500D* 在亲本粉色花瓣中都发生内含子保留可变剪切。*BnaA07g15980D* 直接参与类胡萝卜素合成,*BnaA07g17500D* 参与花色苷代谢。转录本的可变剪切增加了基因表达的复杂程度与蛋白质功能的多样性,可能是影响甘蓝型油菜发育过程中花瓣颜色发生改变的因素之一。

传统 QTL 区间定位方法和二代简化测序、共线性比对、转录组测序和可变剪切等分析技术相结合,有助于进一步缩小和锁定甘蓝型油菜粉色花相关基因的范围,为粉色花候选基因精细定位和开发甘蓝型油菜花色基因分子连锁标记提供更多信息。

4 结论

GBS 测序技术分析 DH 群体筛选出 3253 个 SNP 标记,构建了全长 1766.06 cM 甘蓝型油菜连锁图谱,标记间平均遗传距离为 0.54 cM; 粉色花性状 2 个 QTL 分别定位到 A07 和 C03 染色体上; 定位区间内基因与甘蓝和白菜线性比对,找到一些存在于 3 个物种的同源基因; 定位区间花色相关基因可变剪切分析发现,2 个花色相关基因在粉花亲本花瓣中发生内含子保留可变剪切。

References

- [1] 王汉中, 殷艳. 我国油料产业形势分析与发展对策建议. 中国油料作物学报, 2014, 36: 414–421.
Wang H Z, Yin Y. Analysis and strategy for oil crop industry in China. *Chin J Oil Crop Sci*, 2014, 36: 414–421 (in Chinese with English abstract).
- [2] Chen B, Heneen W, Jonsson R. Independent inheritance of erucic acid content and flower colour in the C-genome of *Brassica napus* L. *Plant Breed*, 1988, 100: 147–149.
- [3] 戚存扣, 傅寿仲. 甘蓝型油菜白花性状的遗传. 中国油料作物学报, 1992, 1(3): 60–62.
Qi C K, Fu S Z. Genetic studies of white petals in *Brassica napus* L. *Chin J Oil Crop Sci*, 1992, 1(3): 60–62 (in Chinese with English abstract).
- [4] 董育红, 田建华, 李殿荣. 甘蓝型油菜白花基因的 RAPD 标记. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(10): 57–61.
Dong Y H, Tian J H, Li D R. RAPD markers linked to white-petal gene in *Brassica napus* L. *J Northwest A&F Univ*, 2005, 33(10): 57–61 (in Chinese with English abstract).
- [5] 刘雪平, 涂金星, 刘志文, 陈宝元, 傅廷栋. 甘蓝型油菜遗传图谱的构建及芥酸含量的 QTL 分析. 作物学报, 2005, 31: 275–282.
Liu X P, Tu J X, Liu Z W, Chen B Y, Fu T D. Construction of a molecular marker linkage map and its use for QTL analysis of erucic acid content in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2005, 31: 275–282 (in Chinese with English abstract).
- [6] Huang Z, Ban Y Y, Bao R, Zhang X X, Xu A X, Ding J. Inheritance and gene mapping of the white flower in *Brassica napus* L. *New Zealand J Crop Hortic Sci*, 2014, 42: 111–117.
- [7] 黄镇, 许婷, 班元元, 刘欢, 范胜桐, 杨丽, 徐爱遐. 甘蓝型油菜白花性状的遗传及 AFLP 标记. 华北农学报, 2012, 27(1): 98–101.
Huang Z, Xu T, Ban Y Y, Liu H, Fan S X, Yang L, Xu A X. Genetic studies of white petals and AFLP markers linked to white petal gene in *Brassica napus* L. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2012, 27(1): 98–101 (in Chinese with English abstract).
- [8] 张豹. 甘蓝型油菜导入系构建、重要农艺性状 QTL 分析和白花基因克隆. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2015.
Zhang B. Development of Chromosome Segment Substitution Lines for QTL Analysis of Important Agronomic Traits and Cloning the White-Flowered Gene in *Brassica napus* L. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [9] 赵君伟. 白菜型油菜花色遗传及花色基因精细定位. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2017.
Zhao J W. Genetic Analysis and Fine Mapping of the Flower Color Gene in *Brassica napus* L. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [10] 淡亚彬. 甘蓝型油菜桔红花色基因和心叶紫色基因的初步定位. 青海大学硕士学位论文, 青海西宁, 2016.
Dan Y B. Primary Mapping of the Orange Flower Gene and Central Leaf Color Gene in *Brassica napus* L. MS Thesis of Qinghai University, Xining, Qinghai, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [11] Yao Y M, Li K X, Liu H D, Duan R W, Guo S M, Xiao L, Du D Z. Whole-genome re-sequencing and fine mapping of an orange petal color gene (*Bnpe 1*) in spring *Brassica napus* L. to a 151-kb region. *Euphytica*, 2017, 213: 165.
- [12] Zhang N, Zhang H M, Ren Y J, Chen L, Zhang J, Zhang L G. Genetic analysis and gene mapping of the orange flower trait in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Mol Breed*, 2019, 39: 1–11.
- [13] 丁戈, 陈伦林, 邹小云, 李书宇, 熊洁, 邹晓芬, 宋来强. 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. 分子植物育种, 2019, 17: 3983–3992.
Ding G, Chen L L, Zou X Y, Li S Y, Xiong J, Zou X F, Song L Q. QTL-seq genetic analysis and InDel marker development of orange petal colour gene in *Brassica napus*. *Mol Plant Breed*, 2019, 17: 3983–3992 (in Chinese with English abstract).
- [14] 陈雪, 王瑞, 井付钰, 张胜森, 贾乐东, 段谋正, 吴宇. 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. 中国农业科学, 2020, 53: 1108–1117.
Chen X, Wang R, Jing F Y, Zhang S S, Jia L D, Duan M Z, Wu Y. Location and linkage markers for candidate interval of the white petal gene in *Brassica napus* L. by Next Generation Sequencing. *Sci Agric Sin*, 2020, 53: 1108–1117 (in Chinese with English abstract).
- [15] 王小柯, 江东, 孙珍珠. 利用 GBS 技术研究 240 份宽皮柑橘的系统演化. 中国农业科学, 2017, 50: 1666–1673.
Wang X K, Jiang D, Sun Z Z. Study on phylogeny of 240 mandarin accessions with genotyping-by-sequencing technology. *Sci Agric Sin*, 2017, 50: 1666–1673 (in Chinese with English abstract).
- [16] 蔡露, 杨欢, 王勇, 李廷轩, 陈光登. 利用 GBS 技术开发烟草 SNP 标记及遗传多样性分析. 中国烟草科学, 2018, 39(5): 17–24.
Cai L, Yang H, Wang Y, Li Y X, Chen G D. Analysis of genetic diversity of tobacco germplasm resources based on SNP markers via genotyping-by-sequencing technology. *Chin Tob Sci*, 2018, 39(5): 17–24 (in Chinese with English abstract).
- [17] 刘作铭. 基于 GBS 测序的玉米苗期耐旱相关性状 QTL 定位.

- 四川农业大学硕士学位论文, 四川雅安, 2017.
- Liu Z M. QTL Mapping of Maize Drought Tolerance Related Traits at Seeding Stage by Genotyping-by-Sequencing. MS Thesis of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [18] Hai K Q, Ning W, Wen Q Q, Qing H X, Hong Z, Jian B S, Gen T Y, Qun H. Construction of a high-density genetic map using genotyping by sequencing (GBS) for quantitative trait loci (QTL) analysis of three plant morphological traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 2017, 213: 1–17.
- [19] Zhong Z, Tian J W, Ying Z, Xin G L, Jian H. Construction of a high-density genetic map of *Ziziphus jujuba* Mill. using genotyping by sequencing technology. *Tree Genet Genomes*, 2016, 12: 76–80.
- [20] Melo A T O, Bartaula R, Hale I. GBS-SNP-CROP: a reference-optional pipeline for SNP discovery and plant germplasm characterization using variable length, paired-end genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinf*, 2016, 17: 29–33.
- [21] Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *Plant J*, 1993, 3: 739–744.
- [22] Rogers M F, Julie T, Anireddy S N R, Asa B. SpliceGrapher: detecting patterns of alternative splicing from RNA-Seq data in the context of gene models and EST data. *Genome Biol*, 2012, 13: 1–17.
- [23] 罗昕. 基于下一代测序的玉米高通量 SNP 开发及关联分析. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2015.
- Luo X. High-Throughput SNP Development and Genome-Wide Association Study in Maize Based on Next-Generation Sequencing. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [24] Landry B S, Hubert N, Etoh T, Harada J J, Lincoln S E. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome*, 1991, 34: 543–552.
- [25] Mahmood S, Li Z, Yue X P, Wang B, Chen J, Liu K D. Development of INDELs markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using re-sequencing data. *Mol Breed*, 2016, 36: 79–84.
- [26] 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. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2005.
- Liu X P. Inheritance of Seed Colour, Erucic, Acid Content and Flower Colour in Artificially Resynthesized *Brassica napus* L. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2005 (in Chinese with English abstract).
- [27] Wang X D, Yu K J, Li H, Peng Q, Chen F, Zhang W, Chen S, Hu M L, Zhang J F. High-density SNP map construction and QTL identification for the apetalous character in *Brassica napus* L. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1164.
- [28] Zhang B, Liu C, Wang Y Q, Yao X, Wang F, Wu J S, King G J, Liu K D. Disruption of a CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 gene converts flower colour from white to yellow in *Brassica* species. *New Phytol*, 2015, 206: 1513–1526.
- [29] 杨晓刚. 大白菜遗传图谱的构建及花色性状基因的遗传定位. 曲阜师范大学硕士学位论文, 山东曲阜, 2018.
- Yang X G. Construction of Genetic Map of Chinese Cabbage and Genetic Location of Flower Color Trait Gene. MS Thesis of Qufu Normal University, Qufu, Shandong, China, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [30] 杨茹涵, 刘进, 李加纳, 钱伟, 梅家琴. 甘蓝花色性状 QTL 定位及候选基因变异分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20: 1271–1277.
- Yang R H, Liu J, Li J N, Qian W, Mei J Q. QTL mapping and variation analysis of candidate gene for flower color in *Brassica oleracea* L. *J Plant Genet Resour*, 2019, 20: 1271–1277 (in Chinese with English abstract).