DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04236

甘蓝型油菜桔红花显性基因候选区域的 NGS 定位及 InDel 标记开发

郭青青^{1,2,**} 周蓉^{1,2,**} 陈雪^{1,2} 陈蕾^{1,2} 李加纳^{1,2} 王瑞^{1,2,*}

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

摘要: 甘蓝型油菜花色的选育和改良已成为种质资源鉴定和材料创制的重要研究方向。目前为止, 甘蓝型油菜桔红花显性基因定位的研究还未见报道。本研究以甘蓝型油菜双单倍体(doubled haploid, DH)纯系黄花 Y05 和桔红花 R08 杂交, 分析桔红花性状遗传模式。在 F₂ 群体中选取 30 株极端桔红花和 30 株极端纯黄花构建叶片 DNA 子代池和花瓣 RNA 子代池, 对亲本和 DNA 子代池进行 30×重测序, 对 RNA 子代池进行 6G 测序。以法国甘蓝型油菜 Darmor-bzh 为参考序列, QTL-seq 流程和 MMAPP 流程相结合鉴定桔红花基因候选区间。利用 IGV 软件可视化分析候选区间内插入缺失(InDel)变异位点, 根据候选区间信息设计 InDel 引物。结果表明, 桔红花性状受 1 对显性主效基因控制, 全基因组重测序定位桔红花性状基因候选区间结果与转录组测序定位结果高度一致, 均位于法国甘蓝型油菜 Darmor-bzh A07 染色体 18~19 Mb。聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选到 3 个与桔红花性状紧密连锁共分离的 InDel 标记。这些研究为精细定位桔红花显性候选基因以及分子标记辅助选育甘蓝型油菜桔红花新材料提供新思路。

关键词: 甘蓝型油菜; 桔红花性状; 基因定位; 测序; 分子标记

Location and InDel markers for candidate interval of the orange petal gene in *Brassica napus* L. by next generation sequencing

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

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

Abstract: The petal color has been one of the major goals of breeding and genetic research in *Brassica napus* L. To date, there have been no reports about interval location of dominant orange petal gene trait in *B. napus* L. In this study, we constructed an F₂ mapping population with 458 individuals from the cross between DH Y05 (yellow petal) and DH R08 (orange petal). Whole-genome re-sequencing of DNAs and transcriptome sequencing of RNAs were from two populations each composed of 30 individuals showing extreme opposite trait for a given phenotype in a segregating progeny. Then we performed 30× and 6G of sequencing. Darmor-bzh as the reference genome was aligned to sequence data from the two bulks and parents. QTL-seq and Mutation Mapping Analysis Pipeline for Pooled RNA-seq (MMAPP) workflow were applied to identify the candidate region of the orange petal gene. The insertion-deletion (InDel) sites can be visualized in candidate interval by Integrative Genomics Viewer (IGV). Based on these InDel variations, we used Vector and Blast to design InDel primers. The results indicated that the orange petal trait was controlled by a dominant major gene. A major candidate region was identified on chromosome A07 (18–19 Mb) of Darmor-bzh. Three InDel markers linked to the orange petal gene were screened by Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). This study may provide a novel idea for fine mapping dominant orange petal gene as well as marker assisted selection.

Keywords: *Brassica napus* L.; orange petal; gene mapping; sequencing; molecular marker

本研究由西南大学校创项目(X202010635478)和国家重点研发计划项目“七大作物育种”(2016YFD0101300)资助。

This study was supported by the Innovation Project of Southwest University Students (X202010635478) and the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101300).

* 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: 郭青青, E-mail: 1833266719@qq.com; 周蓉, E-mail: 1822701415@qq.com

Received (收稿日期): 2020-10-31; Accepted (接受日期): 2021-01-13; Published online (网络出版日期): 2021-02-18.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210216.1539.008.html>

甘蓝型油菜属于十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)植物,是食用植物油、蛋白质饲料和能源的原料作物。近几年,油菜花观光旅游已成为发展油菜产业和促进农民增收的重要内容^[1]。因此,加快选育创制不同遗传背景的油菜花色新品种具有重要的理论和现实意义。

油菜花色是指其成熟花瓣的颜色,栽培油菜花色主要表现为黄色、白色及其中间衍生色。对油菜白花性状的研究已取得一系列成果^[2-4],由于不同学者所用材料、方法不尽相同,得出的花色遗传模式结论也有多种。部分学者认为,甘蓝型油菜白花性状由单个显性基因控制^[5-6],也有不少学者发现,白花性状由 1 对不完全显性基因控制,表现为质量性状^[4,7-10]。而董育红等^[11]、黄萌等^[12]、田露申等^[13-14]和柳丽^[15]均发现白花性状受 1 对不完全显性基因控制,但表现出数量性状的遗传特点。而白菜型油菜白花性状由单个隐性基因控制^[16],芥菜型油菜白花性状由 2 对隐性基因控制^[17]。与白花性状相比,其他花色的遗传研究结果相对较少。李莓等^[18]、淡亚彬^[19]、Yao 等^[20]均发现甘蓝型油菜桔红色由 2 对隐性核基因控制,Yao 等^[20]进一步将隐性基因确定为 *Bnpc1* 和 *Bnpc2*。李莓等^[18]还证实大白菜桔红色花由 1 对隐性基因控制。Zhang 等^[21]以黄花和桔红花大白菜为材料作遗传分析发现,大白菜桔红花性状由单隐性基因 *BrOF* 控制。

至今已有多位学者进行了花色相关基因染色体定位,并开发出多个与花色紧密连锁的分子标记。刘雪平等^[22]利用 RAPD 标记发现白花基因与高芥酸基因具有连锁关系,并筛选到 1 个与黄花和低芥酸基因均连锁的标记 S92-1400。Huang 等^[23]以甘蓝型白花和黄花油菜为材料,获得了与白花基因连锁的 3 个 AFLP 和 2 个 SSR 标记,其中位于白花基因两侧的标记 EA06MG08 和 EA11MG12 遗传距离分别为 3.0 cM 和 3.2 cM。张豹等^[6]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。随着二代测序技术的发展以及 SNP 标记的开发,集团分离分析法(bulked segregant analysis, BSA)广泛应用于目标性状的基因定位。赵君伟^[16]通过集团分离分析法以及 SNP 和 InDel 标记分析 2330 个单株,将花色基因定位在白菜参考基因组 A02 染色体 162 kb 区间,且 SNP 标记与白花基因共分离。陈雪等^[24]利用二代测序技术和构建混池的原理将甘蓝型油菜白花性状基因定位在 C03 染色体 52~55 Mb,并在此

区间 760 kb 内筛选出 6 个与该基因紧密连锁共分离的 SSR 标记。

甘蓝型油菜桔色花基因定位方面文献很少,仅有 Yao 等^[20]将甘蓝型油菜隐性桔红花基因 *Bnpc1* 定位在 C09 染色体 1.000~5.464 Mb 区间;将 *Bnpc2* 基因锁定在 1.86 cM 区间,同时筛选出 1 个共显性标记 BnA09-22 与 *Bnpc2* 紧密连锁。目前为止,关于甘蓝型油菜桔红花显性基因定位的研究还未见报道。本研究基于 BSA 的原理,利用甘蓝型油菜 F₂ 花色分离群体,分别进行叶片重测序和花瓣转录组测序,定位桔红花显性基因候选区间,同时通过 IGV 软件可视化候选区间 InDel 变异,开发 InDel 连锁标记,以期精细定位桔红花显性基因以及分子标记转育甘蓝型油菜桔红花新材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甘蓝型油菜纯系黄花 Y05 和纯系桔红花 R08 是由西南大学李加纳油菜生物学团队通过小孢子加倍选育的双单倍体(DH)纯系材料。2018 年将纯系黄花 Y05 与纯系桔红花 R08 杂交获得 F₁, 次年获得 F₂。观察 F₁ 和 F₂ 群体的花色分离。从 F₂ 群体中选取极端桔红花和极端黄花构建桔红花子代池和黄花子代池,用于桔红花基因候选区间定位。

1.2 田间试验和性状调查

2019 年 3 月花期, F₁ 单株自交获得 F₂。2019 年 9 月对亲本和 F₂ 进行育苗播种, 10 月将单株移栽到西南大学歇马油菜基地试验田, 行距为 0.2 m, 株距为 0.2 m。2020 年 1 月苗期对 F₂ 群体 458 个单株挂牌编号。2020 年 3 月记录 458 个单株的盛花期花色。

1.3 子代池构建

2020 年 1 月苗期, 对亲本及 F₂ 群体每个单株挂牌编号, 取幼嫩叶 0.2 g。使用 OMEGA HP Plant DNA 试剂盒提取 2 个亲本以及 F₂ 代的 30 株极端黄花和 30 株极端桔红花单株幼嫩叶 DNA。等量混合 F₂ 代单株幼嫩叶 DNA, 构建桔红花叶片 DNA 子代池和黄花叶片 DNA 子代池。初花期时, 在 F₂ 群体中选取极端纯桔红花和极端纯黄花各 30 株, 取每株刚张开的花瓣 0.15 g, 使用 EZ-10 Total RNA Mini-Preps Kits 试剂盒提取 RNA。等量混合 RNA, 构建桔红花花瓣 RNA 子代池和黄花花瓣 RNA 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×。2 个花瓣 RNA 子代池建库类型为 DNA-300 bp, 以 illumina HiSeq PE125 方法测序, 测序数据量为 6 G。

1.4 数据处理

启动 QTL-seq 流程^[25], 过滤低质量 reads; 将过滤后的亲本 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, 构建亲本参考组, 再将亲本 reads 比对到新构建的亲本参考基因组上, 找出错配造成的 SNP, 用于后续排除和过滤。将质控过滤后的 2 个 DNA 子代池 reads 分别与亲本参考基因组比对。使用 Coval Refine 过滤, Coval Call 检测变异位点, 计算 2 个叶片 DNA 子代池 SNP-index 及 2 个子代池 SNP-index 的差值 delta (SNP-index)。利用 R 包制作 delta (SNP-index)滑动窗分析图, 鉴定桔红花显性基因候选区间。

利用 Bwa 软件将 2 个花瓣 RNA 子代池测序数据与法国甘蓝型油菜参考基因组 Darmor-bzh 比对, 得到 sam 文件后进行 sort 排序, 去除 PCR 重复, 建立索引文件。用 GATK 软件确定重新比对区域, 最大限度降低 InDel 附近比对错误率, 获得 2 个花瓣 RNA 子代池的 bam 文件(<http://www.broadinstitute.org/gatk/>)。启动 MMAPPR 分析流程^[26], 计算 SNP 频率、欧氏距离 Loess fit of ED⁴检测峰值和鉴定桔红花基因候选区间。

1.5 引物设计与电泳

使用 GATK 软件获得 2 个亲本叶片和 2 个子代池叶片 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, 寻找桔红花基因候选区间 InDel, 锁定起始和终止物理位置, 使用 Vector 和 Blast 设计 InDel 引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成引物序列。随机选取 F₂ 群体极端黄花和桔红花各 11 株幼嫩叶的 DNA 作为模板用于 PCR 扩增。PCR 体系包含 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 Mg²⁺), 最后补充 ddH₂O 至 8.90 μL。PCR 程序为 94℃ 5 min;

94℃ 30 s, 52~60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 5 min; 4℃保存。8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 最后用银染法进行显影。

2 结果与分析

2.1 黄花 Y05 和桔红花 R08 组合后代表型观察和遗传分离

甘蓝型油菜黄花纯系 Y05 与桔红花纯系 R08 正反交 F₁ 代均为桔红花, F₂ 代纯桔红花和纯黄花分离明显(图 1), 呈显著的质量性状或主效基因分布特点。并且桔红花的花药呈现桔红色, 与黄花的黄色花药有明显区别。

2 年田间试验数据显示, 桔红花单株和黄花单株的实际值分别为 108 41 和 333 125, 接近 3 1 的分离比例, 按 1 对基因的控制模式进行 χ^2 测验, χ^2 值分别为 0.37 和 1.16, 符合理论预测, 即桔红花和黄花性状分离比符合 3 1 的分离规律(表 1), 推测桔红花性状受 1 对显性基因或主效基因控制。

2.2 重测序 DNA 子代池数据分析

对亲本和子代池叶片重测序质控过滤后的数据进行测序深度和覆盖度分析(图 2)发现, 19 条染色体上测序深度平均为 20×, 覆盖度和 SNP 检出率达到饱和。因此所有样本数据量足够, 测序质量合格, 测序数据与法国甘蓝型油菜参考组 Darmor-bzh 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。

过滤掉桔红花和黄花 2 个子代池中 SNP-index 均小于 0.3 的位点, 分别计算每个子代池的 SNP-index 和 2 个子代池之间的 delta (SNP-index)。以滑动窗口法(窗口大小为 2 Mb, 滑动步长为 50 kb)对 delta (SNP-index)在 19 条染色体上作图。置信区间设置为 95%和 99%, 置信水平以上窗口作为候选区间(图 3)。除 chrA07 染色体外, 其余 18 条染色体 delta (SNP-index)红线都在置信区间范围内。Darmor-bzh A07 染色体 18~19 Mb 区间 delta (SNP-index)峰值达到极显著水平, 显示甘蓝型油菜桔红花显性基因在此候选区间之内。

表 1 黄花 Y05 与桔红花 R08 杂交 F₂ 群体花色分离比例
Table 1 Segregation ratio of F₂ population between yellow petal Y05 and orange petal R08

群体 Population	总株数 Total plants	桔红花 Orange petal	黄花 Yellow petal	期望比 Expected ratio	χ^2	P
2019	149	108	41	3:1	0.37	> 0.05
2020	458	333	125	3:1	1.16	> 0.05

图 1 甘蓝型油菜黄花 Y05 和桔红花 R08 花瓣形态比较

Fig. 1 Morphology comparison of yellow petal Y05 and orange petal R08 in *Brassica napus* L.

A1 与 A2: 黄花 Y05; B1 与 B2: 桔红花 R08.

A1 and A2: yellow petal Y05; B1 and B2: orange petal R08.

图 2 甘蓝型油菜 19 条染色体上重测序平均深度和覆盖度

Fig. 2 Average depth of re-sequencing and coverage of bases on 19 chromosomes in *Brassica napus* L.

黑线: 利用滑动窗口计算得到的平均测序深度曲线。

Black lines: refer to the average sequencing depth curve using a sliding window.

2.3 转录组子代池数据分析

更改参考组 Darmor-bzh 基因序列染色体名称 (chrA01~chrA10, chrC01~chrC09 更改为 chr1~chr19), 使用 GATK 软件处理黄花花瓣子代池和桔红花花瓣子代池 RNA 测序数据, 获得 2 个 RNA 子代池 bam

文件。启动 MMAPPR 流程, 利用 2 个子代池 SNP 频率计算 ED^4 (Loess fit), 以 0.6 为阈值, 桔红花显性基因定位在 chr7(A07)染色体 18~19 Mb (图 4)。花瓣转录组测序定位桔红花显性基因染色体区域与叶片 DNA 重测序定位结果高度一致。

图 3 甘蓝型油菜 19 条染色体上 Δ (SNP-index) 分布

Fig. 3 Δ (SNP-index) on 19 chromosomes in *Brassica napus* L.

蓝点: Δ (SNP-index) 位点; 红线: 利用滑动窗口数计算的 Δ (SNP-index) 的变化趋势; 绿线: 显著性为 95% 的阈值; 橘线: 显著性为 99% 的阈值。

Blue dot: Δ (SNP-index); Red line: sliding window average of Δ (SNP-index); Green lines: sliding window average of 95%-confidence interval upper/lower side; Orange line: sliding window average of 99%-confidence interval upper/lower side.

图 4 甘蓝型油菜 19 条染色体上 ED^4 (Loess fit) 和 A07 染色体上 ED^4 (Loess fit)

Fig. 4 ED^4 (Loess fit) on 19 chromosomes and A07 chromosome in *Brassica napus* L.

区间找到 3 个遗传稳定的 small InDel。亲本之间的 InDel 差异在 2 个子代池中稳定表现和遗传。

2.5 InDel 引物设计和聚丙烯酰胺电泳

3 个 InDel 均位于 A07 染色体 18~19 Mb, IGV 软件锁定其物理位置, 结合使用 Vector 和 Blast 设计

InDel 引物(表 2)。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 3 个 InDel 标记均能准确区分 F₂ 极端黄花和极端桔红花单株, 仅图 6-C 中 24 桔红花单株条带为交换株(图 6), 推断桔红花性状候选基因与这 3 个 small InDel 标记紧密连锁共分离。

表 2 基于候选区间设计的 InDel 引物序列
Table 2 InDel primer sequences designed in candidate intervals

引物名称 Primer name	InDel 位点 InDel site	InDel	正向引物序列 Positive Primer sequence (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')
InDel-65	18,968,634-18,968,641	D7	GGGTCGAGATACGGTTACGG	CGTCGGTAAGTCTTCTCACC
InDel-69	18,949,999-18,950,007	D8	TACCGAGCTCCAGGTCTCTC	TGCGCAACTGTAACCATTCT
InDel-56	18,789,060-18,789,066	D6	ACAAGCAAGGCCTATATTTTGC	TCGGGTGAAGCAAATGTGGA

图 6 黄花和桔红花亲本及 F₂ 代单株电泳
Fig. 6 Electrophoretic bands of parents and individuals of F₂ population
M: 20 bp ladder; A: InDel-65; B: InDel-69; C: InDel-56; 1: 黄花亲本; 2: 桔红花亲本; 3~13: F₂ 群体 11 个黄花单株; 14~24: F₂ 群体 11 个桔红花单株。
1: parents with yellow petal; 2: parents with orange petal; 3~13: 11 yellow petal plants in F₂ population; 14~24: 11 orange petal plants in F₂ population.

3 讨论

芸薹属中甘蓝型油菜桔红花研究报道文献较少, 仅有李莓等^[18]、淡亚彬^[19]、Yao 等^[20]发现甘蓝型油菜桔红花性状由 2 对隐性基因控制。而本研究所用甘蓝型油菜桔红花材料性状表现为 1 对显性基因或主效基因遗传特点, 表型观察发现, 除花瓣颜色为桔红色外, 花药颜色同时为桔红色, 与黄花的黄色花药明显不同, 且能稳定遗传。因而, 本研究材料的桔红花基因应与前人所研究的甘蓝型油菜桔红花基因在功能和位点上有所区别。

对有参考序列物种进行全基因组重测序, 在全基因组水平扫描并检测碱基突变位点, 通过计算 SNP 变异和频率, 可以快速进行正向遗传学性

状定位。近年来基于二代测序的 BSA 分析技术成为快速准确定位质量性状或主效基因的有力工具。因其不需构建复杂定位群体, 不依赖遗传图谱和大量分子标记, 且周期短、效率高, 目前已在多种作物中用于定位质量性状或主效基因, 快速筛选靶基因以获得紧密连锁分子标记^[27-32]。在利用 QTL-seq 重测序定位甘蓝型油菜桔色花文献中, Yao 等^[20]将甘蓝型油菜桔红花隐性基因定位于 C09 染色体 1.00~5.46 Mb 区间。丁戈等^[33]将控制桔黄花隐性基因定位在 C09 染色体区域 4.64~8.28 Mb。QTL-seq 原理是基于 F₂ 群体或重组自交系 (RIL) 群体开发的代码流程, 但这 2 篇文献中作者均以后代较为复杂的回交群体作为研究对象, 会在一定程度上使 SNP 频率偏分离, 导致定位区间

显示较大, delta (SNP-index)信号不明显。

本研究对甘蓝型油菜桔红花显性基因 F_2 花色分离群体进行叶片 DNA 重测序和花瓣 RNA 转录组测序, 在 DNA 水平和 RNA 转录本表达量水平分别使用 QTL-seq 和 MMAPP 鉴定桔红花显性基因候选区间。MMAPP 实际上是欧式距离算法的 BSR 分析, 其优势是检测到的信号均在基因区域, 根据样品表达量可以初步验证候选位点或候选基因。但 RNA-seq 外显子拼接成转录本, 与参考组比对检测基因组变异位点时存在 gap, 导致部分区域 SNP 鉴定不准确。另外, RNA 水平上有时会出现 RNA 编辑现象, 造成非 DNA 水平上的 SNP 突变。因此, MMAPP 方法检测 SNP 的准确性没有 QTL-seq 高, 并且 RNA 转录本测序时, 由于每条基因表达量不均一, 会对后续 SNP 鉴定造成干扰。同时, 同源染色体等位基因表达量的不均衡还可能会出现低估杂合位点的情况。

传统分子标记的应用多集中在 RAPD、AFLP 标记等, 由于其稳定性、重演性差, 现已很少用于作物标记开发。SSR 串联重复序列具有一定的物种稳定性, 可以通过 NGS 测序批量化设计某一物种的 SSR 引物数据库。此类重复序列一般分布在基因间区, 开发的 SSR 标记也位于基因间区。不过 SSR 位点易发生突变, 导致后续结果分析模棱两可。而 InDel 作为高通量分子标记, 具有各类遗传标记的优点, 且开发成本随测序技术的发展不断降低。InDel 标记的开发完全基于序列差异, 开发过程中存在较少的无多型位点。相比于其他分子标记, 基因组同一位点仅有极小概率发生相同长度大小的 InDel 变异, 避免了特异性和复杂性带来的后续分析模糊^[34]。

以往在水稻^[35]、玉米^[36]、棉花^[37]、大麦^[38]、油菜^[39]等农作物中开发 InDel 标记时, 均以所用材料的测序数据与参考组比对, 鉴定 InDel 变异, 根据插入缺失序列, 在全基因组上开发 InDel 引物公共数据库。全基因组上的 InDel 引物数量丰富, 即使在染色体某一区域选择 InDel 引物筛选验证标记, 工作量也很大。而本研究通过对分离群体进行重测序, 结合使用 QTL-seq 和 MMAPP 分析流程, 以法国甘蓝型油菜 Darmor-bzh 序列为参考组, 叶片 DNA 重测序和花瓣 RNA 转录组测序相互验证, 快速鉴定出甘蓝型油菜桔红花显性基因位于 A07 染色体 18~19 Mb 候选区间。同时利用 IGV 软件对亲本、子代池 bam 文件实现桔红花显性基因候选区间 InDel 变异

的可视化, 直观地展示了 InDel 所处染色体物理区间以及来源于亲本之间的 InDel 差异在两子代池中的表现和遗传情况。在可视化直接查看两亲本和两子代池染色体特定区域 InDel 变异的基础上设计 InDel 引物, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳在 F_2 花色分离群体高效开发桔红花显性候选基因连锁 InDel 分子标记, 可为桔红花显性基因精细定位奠定研究基础, 同时为开发农作物质量性状或主效基因连锁标记提供一种快速有效的解决思路。

4 结论

甘蓝型油菜桔红花性状由 1 对显性基因或主效基因控制。桔红花性状显性基因候选区间定位于 A07 染色体 18~19 Mb 区间, 在此区间开发和验证了 3 个与桔红花显性基因紧密连锁共分离的 InDel 标记。

References

- [1] 王汉中. 以新需求为导向的油菜产业发展战略. 中国油料作物学报, 2018, 40: 613–617.
Wang H Z. New-demand oriented oilseed rape industry developing strategy. *Chin J Oil Crop Sci*, 2018, 40: 613–617 (in Chinese with English abstract).
- [2] 刘后利. 油菜的遗传和育种. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. pp 76–77.
Liu H L. Heredity and Breeding of Rape. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985. pp 76–77 (in Chinese).
- [3] Chen B Y, Heneen W K, 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.
- [4] 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).
- [5] Pearson O H. A dominant white-flowered mutant of *Brassica oleracea* L. *Am Nat*, 1929, 63: 561–565.
- [6] 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).
- [7] 王翊, 景尚友, 吴刚, 任丽杰. 甘蓝型油菜白花性状在杂交油菜育种中的应用. 黑龙江农业科学, 2003, (6): 13–14.
Wang Y, Jing S Y, Wu G, Ren L J. Application of the character of white flower of *Brassica napus* L. in hybrid breeding. *Heilongjiang Agric Sci*, 2003, (6): 13–14 (in Chinese with English abstract).
- [8] 文雁成, 张书芬, 王建平, 朱家成, 赵磊. 甘蓝型油菜白花性状的遗传学研究和白花胞质雄性不育系的选育. 中国农学通报, 2010, 26(1): 95–97.
Wen Y C, Zhang S F, Wang J P, Zhu J C, Zhao L. Genetic studies of white petals and selection of cytoplasmic male sterile line with

- white petals in *Brassica napus* L. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, 26(1): 95–97 (in Chinese with English abstract).
- [9] 黄镇, 许婷, 班元元, 刘欢, 范胜栩, 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).
- [10] 邓昌蓉, 赵志刚, 余青兰. 人工合成甘蓝型油菜花色变异后代的遗传研究. *北方园艺*, 2014, (18): 14–17.
Deng C R, Zhao Z G, Yu Q L. The genetic studies of the flower color variation's offsprings in artificial synthesis of *Brassica napus*. *Northern Hortic*, 2014, (18): 14–17 (in Chinese with English abstract).
- [11] 董育红, 田建华, 李殿荣, 郭蔼光, 孔建, 赵小萍. 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, Guo A G, Kong J, Zhao X P. 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).
- [12] 黄萌, 张建栋, 陈培峰, 宋英, 孙华. 甘蓝型油菜白花性状的遗传规律. *江苏农业科学*, 2017, 45(20): 83–84.
Huang M, Zhang J D, Chen P F, Song Y, Sun H. Genetic law of white flower traits in *Brassica napus* L. *Jiangsu Agric Sci*, 2017, 45(20): 83–84 (in Chinese with English abstract).
- [13] 田露申, 牛应泽, 余青青, 郭世星, 柳丽. 甘蓝型油菜白花性状的主基因+多基因遗传分析. *中国农业科学*, 2009, 42: 3987–3995.
Tian L S, Niu Y Z, Yu Q Q, Guo S X, Liu L. Genetic analysis of white flower color with mixed model of major gene plus polygene in *Brassica napus* L. *Sci Agric Sin*, 2009, 42: 3987–3995 (in Chinese with English abstract).
- [14] 田露申, 闫朝选, 余青青, 郭世星, 牛应泽. 花瓣色素定量法对甘蓝型油菜白花性状的质量-数量遗传模型分析. *中国油料作物学报*, 2010, 32: 337–344.
Tian L S, Yan C X, Yu Q Q, Guo S X, Niu Y Z. Analysis of the qualitative-quantitative genetic models of white flower color with petal pigments quantification in *Brassica napus* L. *Chin J Oil Crop Sci*, 2010, 32: 337–344 (in Chinese with English abstract).
- [15] 柳丽. 甘蓝型油菜遗传连锁图谱的构建及花色基因的 QTL 初步定位. 四川农业大学硕士学位论文, 四川雅安, 2009.
Liu L. Construction of a SSR Genetic Linkage Map and Primary Location of the QTLs for the Petal Color Trait in *Brassica napus* L. MS Thesis of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China, 2009 (in Chinese with English abstract).
- [16] 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).
- [17] 张向向. 芥菜型油菜白花基因的定位及候选基因分析. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2017.
Zhang X X. Mapping and Candidate Gene Analysis of the White-flowered Gene in *Brassica juncea*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [18] 李莓, 陈卫江, 易冬莲. 甘蓝型油菜桔红花色恢复系 R18 的遗传分析. *作物研究*, 1999, (4): 14–16.
Li M, Chen W J, Yi D L. Inheritance of orange flower colour in restore line R18 of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Crop Res*, 1999, (4): 14–16 (in Chinese with English abstract).
- [19] 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. 青海大学农林科学院硕士学位论文, 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 Academy of Agriculture and Forestry, Xining, Qinghai, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [20] Yao Y M, Li K X, Liu H D, Duncan R W, Guo S M, Xiao L, Du D Z. Whole-genome re-sequencing and fine mapping of an orange petal color gene (*Bnpc 1*) in spring *Brassica napus* L. to a 151-kb region. *Euphytica*, 2017, 213: 165.
- [21] 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: 76.
- [22] 刘雪平, 涂金星, 陈宝元, 傅廷栋. 人工合成甘蓝型油菜中花色与芥酸含量的遗传连锁分析. *遗传学报*, 2004, 31: 357–362.
Liu X P, Tu J X, Chen B Y, Fu T D. Identification of the linkage relationship between the flower colour and the content of erucic acid in the resynthesized *Brassica napus* L. *Acta Genet Sin*, 2004, 31: 357–362 (in English with Chinese abstract).
- [23] 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, 111: 117.
- [24] 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).
- [25] Takagi H, Abe A, Yoshida A K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takumo S, Innan H, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 2013, 74: 174–183.
- [26] Jonathon T H, Bradley L D, Brent W B, Bushra G, Yi C S, Yost H J. MMAPPR: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq. *Genome Res*, 2013, 23: 687–697.
- [27] Mithra S V A, Kar M K, Mohapatra T, Robin S, Sarla N, Seshashayee M, Singh K, Singh N K, Sharma R P. DBT propelled national effort in creating mutant resource for functional genomics in rice. *Curr Sci*, 2016, 110: 543–548.
- [28] Henry I M, Nagalakshmi U, Lieberman M C, Ngo K J, Krasileva K V, Vasquez-gross H, Akhunova A, Akunov E, Dubcovsky J, Tai T H, Comai L. Efficient genome-wide detection and cataloging of EMS-induced mutations using exome capture and next-generation sequencing. *Plant Cell*, 2014, 26: 1382–1397.
- [29] Lin T, Wang S H, Zhong Y, Gao D L, Cui Q Z, Chen H M, Zhang

- Z H, Shen H L, Weng Y Q, Huang S W. A truncated F-box protein confers the dwarfism in cucumber. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 223–226.
- [30] Wei F J, Droc G, Guiderdoni E, Hsing Y I C. International consortium of rice mutagenesis: resources and beyond. *Rice*, 2013, 6: 39.
- [31] Lun Y Y, Wang X, Zhang C Z, Yang L, Gao D L, Chen H M, Huang S W. A CsYcf54 variant conferring light green coloration in cucumber. *Euphytica*, 2016, 208: 509–517.
- [32] Zhou Q, Wang S H, Hu B W, Chen H M, Zhang Z H, Huang S W. An ACCUMULATION AND REPLICATION OF CHLOROPLASTS 5 gene mutation confers light green peel in cucumber. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 936–942.
- [33] 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 color gene in *Brassica napus*. *Mol Plant Breed*, 2019, 17: 3983–3992 (in Chinese with English abstract).
- [34] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 施恩, 杨文宇, 耿其芳, 王中生. InDel 标记的研究和应用进展. 生物多样性, 2016, 24(2): 237–243.
- Yang J, He J, Wang D B, Shi E, Yang W Y, Geng Q F, Wang Z S. Progress in research and application of InDel markers. *Biodiver Sci*, 2016, 24(2): 237–243 (in Chinese with English abstract).
- [35] 潘存红, 王子斌, 马玉银, 殷跃军, 张亚芳, 左示敏, 陈宗祥, 潘学彪. InDel 和 SNP 标记在水稻图位克隆中的应用. 中国水稻科学, 2007, 21: 447–453.
- Pan C H, Wang Z B, Ma Y Y, Yin Y J, Zhang Y F, Zuo S M, Chen Z X, Pan X B. InDel and SNP markers and their application in map-based cloning of rice genes. *Chin J Rice Sci*, 2007, 21: 447–453 (in Chinese with English abstract).
- [36] 胡坤. 玉米与大刍草 InDel 标记的开发及遗传连锁图谱的构建. 四川农业大学硕士学位论文, 四川雅安, 2014.
- Hu K. The Development of Maize and Teosinte InDel Markers and Genetic Linkage Map Construction. MS Thesis of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan, China, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [37] 吴迷, 汪念, 沈超, 黄聪, 温天旺, 林忠旭. 基于重测序的陆地棉 InDel 标记开发与评价. 作物学报, 2019, 45: 196–203.
- Wu M, Wang N, Shen C, Huang C, Wen T W, Lin Z X. Development and evaluation of InDel markers in cotton based on whole-genome re-sequencing data. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 196–203 (in Chinese with English abstract).
- [38] 徐婷婷, 汪巧玲, 邹淑琼, 狄佳春, 杨欣, 朱银, 赵涵, 颜伟. 基于高通量测序的大麦 InDel 标记开发及应用. 作物学报, 2020, 46: 1340–1355.
- Xu T T, Wang Q L, Zou S Q, Di J C, Yang X, Zhu Y, Zhao H, Yan W. Development and application of InDel markers based on high throughput sequencing in barley. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 1340–1355 (in Chinese with English abstract).
- [39] 岳晓鹏. 基于甘蓝型油菜基因组重测序开发 InDel 标记. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2014.
- Yue X P. Development of InDel Markers Based on Whole-genome Resequencing in *Brassica napus*. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2014 (in Chinese with English abstract).