

基于 SLAF-seq 技术鉴定甘蓝型油菜叶缘裂刻性状候选基因

涂玉琴, 张 洋, 辛佳佳, 涂伟凤, 汤 洁, 戴兴临

(江西省农业科学院作物研究所 / 农业部作物基因资源与种质创制江西科学观测实验站, 南昌 330200)

摘要:叶缘裂刻性状是甘蓝型油菜遗传育种的理想形态标记。叶缘裂刻性状变异材料的创建对丰富甘蓝型油菜叶片形态和优良品种改良至关重要。本研究以甘蓝型油菜常规品种中双 11 和甘蓝型油菜叶缘裂刻新品系 Y176 为亲本(通过甘蓝型油菜与薹菜远缘杂交获得),从 F₂ 群体中分别挑选出叶缘裂刻和正常叶形的植株各 50 株,构建了两个极端性状混池 DNA 文库,借助 SLAF-seq-BSA 技术,挖掘甘蓝型油菜叶缘裂刻性状相关候选基因。共开发出 177941 个 SLAF 标签,通过分析 SLAF 标签的多态性,共获得 150168 个 SNP,其中亲本间共获得 128200 个 SNP。对 ED 方法和 SNP-index 方法得到的关联区域进行综合分析,获得 1 个与目标性状紧密关联的候选区域,位于甘蓝型油菜 A10 染色体上的 14528149~17353693 区域,总长度为 2.83 Mb,约有 666 个编码基因。与前人研究定位在同一染色体上,但本研究定位的区间与前人研究不同,说明本研究存在控制叶缘裂刻新基因的可能性大。并对该区域内基因进行功能注释,其中 666 个注释到 NR 数据库;517 个注释到 SwissProt 数据库;587 个注释到 GO 数据库;151 个注释到 KEGG 通路;258 个注释到 COG 数据库,对候选基因进行注释有助于进一步分离相关基因。

关键词:甘蓝型油菜;叶缘裂刻;SLAF-seq;候选基因

Identification of Candidate Genes for Lobed-leaf Trait in *Brassica napus* L. by SLAF-seq Method

TU Yu-qin, ZHANG Yang, XIN Jia-jia, TU Wei-feng, TANG Jie, DAI Xing-lin

(The Crops Institute of Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/Jiangxi Research Station of Crop Gene Resource & Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, P.R.China, Nanchang 330200)

Abstract: Lobed-leaf is widely known as an ideal morphological marker in rapeseed breeding. Genetic variation of lobed-leaf plays an important role in enriching the leaf shape diversity and improving genetic breeding of rapeseed. In this study, fifty plants with normal leaf and 50 plants with lobed-leaf were selected from the F₂ population respectively, which was derived from a cross of the normal leaf line Zhongshuang No.11 and the leaf-lobed new line Y176. Two bulked DNA pools were generated, which were subjected for SLAF-seq-BSA (specific-locus amplified fragment sequencing and bulked segregant analysis). A total of 177941 labels were obtained and 150168 SNPs were identified, including 128200 SNPs that were polymorphic between both parents. A physical interval expanding 2.83 Mb on chrA10 (14528149~17353693 bp) was tightly associated with lobed-leaf trait. Within that, 666 candidate genes was found. Since the

收稿日期: 2018-08-14 修回日期: 2018-09-21 网络出版日期: 2018-12-11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181210.1011.001.html>

第一作者主要从事油菜遗传育种及远缘杂交种质资源创新研究, E-mail: tuyuqin@aliyun

通信作者: 戴兴临, 主要从事油菜遗传育种及远缘杂交种质资源创新研究, E-mail: dxlgny@163.com

基金项目:国家重点研发计划子课题(2016FYD0100202-17);国家自然科学基金(3156100418);江西省重点研发计划(S2016NYZPF0201);江西省自然科学基金(20141513010002);江西油菜产业技术体系首席专家兼育种岗(JXARS-08)

Foundation project: Sub Projects of National Key R & D Projects (2016FYD0100202-17), National Natural Science Foundation of China (3156100418), Key R & D Programs in Jiangxi (S2016NYZPF0201), Jiangxi Natural Science Foundation (20141513010002), Chief Expert and Breeding Post of Rape Industry Technology System in Jiangxi (JXARS-08)

genetic confidence interval of this locus differed to the physical positions of previously reported genes, there might be a new gene controlling leaf margin cleavage. Furthermore, 666, 517, 587, 151 and 258 genes in this region were annotated by NR, Swiss-Prot, GO, KEGG and COG databases, respectively. Thus, this information might be helpful in future map-based gene isolation of lobed-leaf in *Brassica napus* L..

Key words: *Brassica napus* L.; leaf-lobed; SLAF-seq; candidate gene

叶片是植物进行光合作用的主要场所,能为植物的生长制造足够的养分,对维持植物生命活动至关重要^[1]。叶缘作为植物叶片形态的重要组成部分,其形态的变异是植物叶片形状多样性的重要因素^[2]。油菜的叶缘分为全缘、波状、锯齿和缺刻等种类,根据其形状,可将甘蓝型油菜的叶形分为圆叶、半花叶和花叶3种。其中,花叶是指由裂刻基因导致的叶缘锯齿状突起的形态。由于叶缘裂刻性状易识别,可在苗期用肉眼观察到且能稳定遗传,常在油菜育种中作为理想的形态标记^[3]。然而,目前对于油菜叶缘裂刻性状的遗传规律的研究较少,尤其是对相关基因的定位的报道更少。研究表明,油菜叶缘裂刻性状是由一对不完全显性基因控制^[4-5]。晏仲元^[6]利用 SSR 和 BSA 方法初步定位了一个控制花叶性状的主效基因 *BnML*,但标记与目标基因相距较远;倪西源^[7]对花叶基因 *BnLL1* 进行精细定位,将其定位在甘蓝型油菜 A10 染色体上 *Bna10g26280D* 和 *BnaA1026330D* 两基因之间,该区间物理距离为 32.10 kbp;郎丽娜等^[4]利用 BSA 法筛选与花叶基因紧密连锁的 SSR 标记,最终在 A10 染色体 15.7 Mb 下游处发现 1 个花叶相关基因 *Bra009510*。因此,进一步缩小标记与目标基因的距离,挖掘油菜叶缘裂刻性状相关基因对于油菜育种至关重要。

甘蓝型油菜全基因组测序的完成,为研究相关性状的遗传机制提供了丰富的生物信息学研究平台。SLAF-seq 技术作为一种高通量 SNP 挖掘和基因型鉴定技术,在开发分子标记上具有效率高、成本低、测序要求低、数量丰富等优势,近年来该项技术已被用于高通量分子标记开发、高密度遗传图谱构建、关联分析及植物目标性状的基因定位等领域^[8-12]。Sun 等^[9]利用 SLAF-seq 技术对大豆进行了初步分析,共获得 76000 个 SLAF 标签。Qi 等^[11]利用 SLAF-seq 构建了大豆高密度遗传图谱。Geng 等^[13]利用 SLAF-Seq 技术进行甘蓝型油菜粒重候选基因的挖掘,获得粒重性状相关候选基因 91 个,通过基因注释,获得 4 个可能与粒重高度相关的候

选基因。因此,利用 SLAF-Seq-BSA 技术可有效应用于油菜相关性状候选基因的挖掘。BSA (Bulked-segregant analysis) 技术是一种基于表型鉴定与目标基因紧密相关的 DNA 标记的传统方法。然而,利用 SLAF-Seq 技术和 BSA 相结合,在油菜相关性状候选基因的挖掘上应用较少。本研究中,SLAF-Seq-BSA 技术被首次应用于鉴定甘蓝型油菜叶缘裂刻性状的候选基因。通过构建甘蓝型油菜普通品种和叶缘裂刻新品系的 F₂ 性状分离群体,基于 SLAF-Seq 和 BSA 技术,利用 2 个亲本与 2 个极端性状混池 DNA 文库对甘蓝型油菜叶缘裂刻性状进行关联分析,通过目标性状与分子标记的关联分析,获得目标基因的候选区域,并结合候选基因的功能注释与富集分析,预测可能的功能基因,旨在为甘蓝型油菜叶缘裂刻性状相关基因的精细定位和克隆提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的材料为母本中双 11 (样品编号 M)、Y69 (遗传稳定的优良株系) 和父本 Y176 (样品编号 P) 及其构建的 F₂ 群体。其中,中双 11 为甘蓝型油菜普通品种,由中国农业科学院油料作物研究所提供;Y176 为甘蓝型油菜叶缘裂刻新品系,该新品系通过甘蓝型油菜与青菜的属间杂交,获得一株叶缘裂刻性状的 F₁ 杂种植株,并经过多代自交、纯化,最后获得该遗传稳定的叶缘裂刻新品系。

1.2 试验方法

1.2.1 叶缘裂刻性状的遗传分析 以 Y176 和中双 11、Y69 为亲本,通过人工去雄授粉杂交方式进行正反交、回交。F₁ 观察记载表型性状及套袋自交, F₂ 和 BC₁ 分离群体采用单粒播种法,成苗后调查统计表型性状,记录叶缘裂刻和正常形状的分离比。

1.2.2 SLAF-Seq 测序 亲本及 F₂ 群体的测序由北京百迈客生物科技有限公司完成,参照 Geng

等^[13]和 Zhao 等^[14]的方法。以完成测序的甘蓝型油菜基因组作为参考基因组(下载地址为: <http://www.genoscope.cns.fr/brassicnapus/data/>), 通过序列拼接软件获得 645.398 Mb, GC 含量为 35.91%。

1.2.3 DNA 提取及混池的构建 从 F₂ 群体中筛选出叶缘裂刻和正常形状的植株, 采用 CTAB 法提取单株的基因组 DNA。经纯度和完整性检测合格后, 挑选出叶缘裂刻和正常形状的植株各 50 株, DNA 等量混合成叶缘裂刻性状 DNA 混池(编号: aa)和正常形状性状 DNA 混池(编号: ab)。

1.2.4 SLAF 标签和 SNP 标记开发 利用 Dual-index 法^[15]进行原始数据处理, 通过相似性聚类、基因型纠错后, 将亲本与混池测序文库中的 reads 与参考基因组进行比对, 获得 SLAF 标签, 分别在亲本中获得存在多态性的 SLAF 标签和有一定数量 reads 支持区域的 SNP。再利用得到的 SLAF 标签和 SNP 标记位点对甘蓝型油菜叶缘裂刻性状进行关联分析, 获得与性状紧密关联的位点。

1.2.5 ED (Euclidean Distance) 关联分析 通过欧氏距离(ED)算法, 寻找混池间存在显著差异的标记, 并以此评估所获得的分子标记与目标性状紧密关联的区域^[16]。ED 方法的计算公式如下:

$$ED = \sqrt{\frac{(A_{mut} - A_{wt})^2 + (C_{mut} - C_{wt})^2 + (G_{mut} - G_{wt})^2 + (T_{mut} - T_{wt})^2}{(C_{mut} - C_{wt})^2 + (T_{mut} - T_{wt})^2}}$$

其中, A_{mut} 、 C_{mut} 、 G_{mut} 、 T_{mut} 分别表示 A、C、G、T 碱基在 aa 混池中的频率; A_{wt} 、 C_{wt} 、 G_{wt} 、 T_{wt} 分别表示 A、C、G、T 碱基在 ab 混池中的频率。ED 值越大表

明该标记在混池间的差异越大。参考 Hill 等^[16]的方法, 利用混池间基因型存在差异的 SNP 位点, 统计各个碱基在不同混池中的深度, 并计算每个位点 ED 值。

1.2.6 SNP-index 关联分析 通过 SNP-index 关联分析计算混池间的基因型频率^[17], 获得混池间存在显著差异的基因型频率, 记为 Δ (SNP-index), 计算方法如下:

$$\text{SNP-index}(\text{aa}) = \text{Maa} / (\text{Paa} + \text{Maa});$$

$$\text{SNP-index}(\text{ab}) = \text{Mab} / (\text{Pab} + \text{Mab});$$

$$\Delta(\text{SNP-index}) = \text{SNP-index}(\text{aa}) - \text{SNP-index}(\text{ab}).$$

其中, Maa 表示 aa 池来源于母本深度; Paa 表示 aa 池来源于父本深度; Mab 表示 ab 池来源于母本深度; Pab 表示 ab 池来源于父本深度。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜叶缘裂刻性状的遗传分析

通过中双 11、Y69 分别与叶缘裂刻品系 Y176 进行正反杂交, 观察 F₁ 表型, F₁ 均表现为叶缘裂刻性状。而在 F₂ 及 BC₁ 分离群体中表现出两种叶缘形状, 即叶缘裂刻和普通甘蓝型油菜叶缘形状。其中, F₂ 分离群体叶缘裂刻与正常叶缘形状比例分别是 2.94:1 (中双 11 × Y176)、2.87:1 (Y176 × 中双 11)、3.02:1 (Y69 × Y176) 和 3.13:1 (Y176 × Y69) (表 1)。在 BC₁ 分离群体中叶缘裂刻与正常比为 0.94:1 (Y69/Y176/Y69) 和 1.04:1 (Y176/Y69/Y69)。对分离群体数据进行卡方检验后, 其 F₂ 分离比例完全符合 3:1 分离比例, BC₁ 群体完全符合

表 1 F₂ 和 BC₁ 分离群体叶片表型调查数据统计分析

Table 1 Phenotypic data of F₂ and BC₁ segregation populations

F ₂ /BC ₁ 群体来源 F ₂ /BC ₁ population origin	表型株数 Plants of different leaf phenotype		总株数 Total plants	理论比率 Theoretical ratio	χ^2	P
	裂叶 Lobed leaf	正常 Normal leaf				
中双 11 × Y176	265	90	355	3:01	0.0235	>0.05
Y176 × 中双 11	198	69	267	3:01	0.1011	>0.05
Y69 × Y176	1031	341	1372	3:01	0.0155	>0.05
Y176 × Y69	722	231	953	3:01	0.2942	>0.05
(Y69 × Y176) × Y69	74	79	153	1:01	0.1634	>0.05
(Y176 × Y69) × Y69	87	84	171	1:01	0.0526	>0.05

Y176 为叶缘裂刻材料, 其余为普通甘蓝型油菜; 卡方检测 $\chi^2 = \sum [(O-E)/E]$ 自由度 = 2-1 $\chi^2_{0.05} = 3.84$

Y176 is the leaf-lobed line, the rest are *B. napus* L. cultivar, chi-square test $\chi^2 = \sum [(O-E)/E]$ $\nu = 2-1$ $\chi^2_{0.05} = 3.84$

1:1 分离,可见该叶缘裂刻性状主要受 1 对显性基因控制。

2.2 SLAF 标签和 SNP 标记的开发

通过 SLAF-seq 技术对亲本和极端混合池进行了测序分析,经过酶切成 464~514 bp 片段后,获得 39.26 M reads 数据,其中,4589500 reads 来自父本 Y176,5437667 reads 来自母本中双 11,aa 和 ab 混池的 read 数分别为 13550536 和 15686003(表 2)。本研究选择 Q30 作为评估测序质量的指标,其值越高,则表明碱基测序错误率越低。本研究中,Q30 的范围为 83.99%~85.19%,平均为 84.51%,表明测序碱基错误率较低。测序获得的平均 GC 含量为 39.68%(表 2)。

表 2 测序数据整体质量与统计表
Table 2 Statistics and quality of sequencing reads

样品 Sample	编号 ID	序列数 Number of reads	Q30 (%)	GC 含量 (%) GC content
Y176	P	4589500	84.83	39.81
中双 11 Zhongshuang No.11	M	5437667	84.01	39.00
叶缘裂刻性状混池 Lobed leaf bulked poor	aa	13550536	83.99	40.24
正常形状性状混池 Normal leaf bulked poor	ab	15686003	85.19	39.66
合计 Total		39263706	84.51	39.68

Q30 表示质量值大于等于 30 的碱基占总碱基数的百分比
Q30 indicates the percentage of bases with mass value greater than or equal to 30

本研究共获得 177941 个 SLAF 标签,SLAF 标签亲本与子代混池平均测序深度分别为 28.44 和 59.22。其中,119200 个 SLAF 标签来自中双 11,124958 个来自 Y176,中双 11 和 Y176 的平均测序深度分别为 31.62 和 25.26;aa 和 ab 两个混池的 SLAF 标签数分别为 160983 和 167406,平均测序深度分别为 55.77 和 62.66(表 3)。

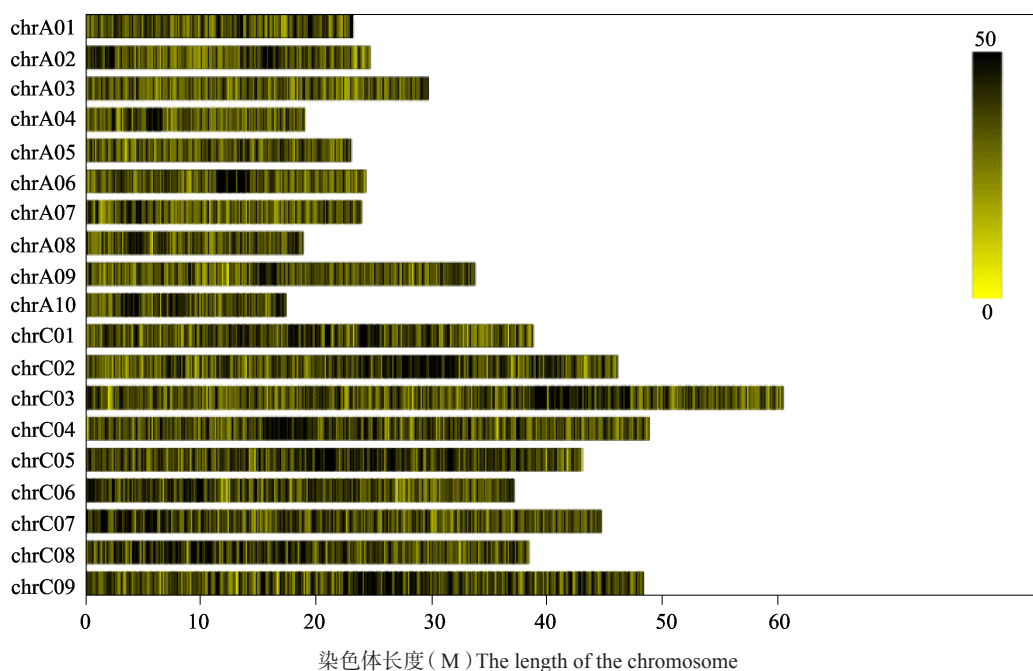
使用 GATK 工具包检测 SNP 位点^[16]完成,共获得 150168 个 SNP 位点,其中亲本间与混池间共分别获得 128200 和 290577 个 SNP。不同染色体上 SLAF 标签和 SNP 标记的分布情况详见表 4,SLAF 标签和 SNP 标记均匀分布于 19 条染色体上(图 1、图 2)。

表 3 SLAF 分子标记开发
Table 3 Development of SLAFs

样品 Sample	编号 ID	SLAF 标签数 SLAF number	测序深度 Depth	
			总计 Total	平均 Average
中双 11 Zhongshuang No.11	M	119200	3769557	31.62
Y176	P	124958	3156293	25.26
叶缘裂刻性状混池 Lobed leaf bulked poor	aa	160983	8978348	55.77
正常形状性状混池 Normal leaf bulked poor	ab	167406	10490071	62.66

表 4 不同染色体上 SLAF 标签和 SNP 标记的分布情况
Table 4 Distribution of SLAF labels and SNPs on each chromosome

染色体 Chromosome	SLAF 标签 SLAF number	SNP 数量 SNP number
chrA01	6112	5965
chrA02	6463	6584
chrA03	7160	5389
chrA04	4965	5804
chrA05	5845	6415
chrA06	6641	7105
chrA07	6012	4693
chrA08	5153	5078
chrA09	8689	7143
chrA10	4955	5288
chrC01	10797	11953
chrC02	13124	11120
chrC03	16686	12494
chrC04	13684	12436
chrC05	12949	8465
chrC06	10502	7071
chrC07	12754	11037
chrC08	11412	7887
chrC09	14038	8241
合计 Total	177941	150168



每一个黄色条带代表一条染色体,图中颜色越深的区域即 SLAF 标签分布越集中的区域,下同
Each yellow strip represents a chromosome, the darker the color area is SLAF label concentrated distribution area, the same as below

图 1 不同染色体上 SLAF 标签的分布情况

Fig.1 Distribution of SLAFs in each chromosome

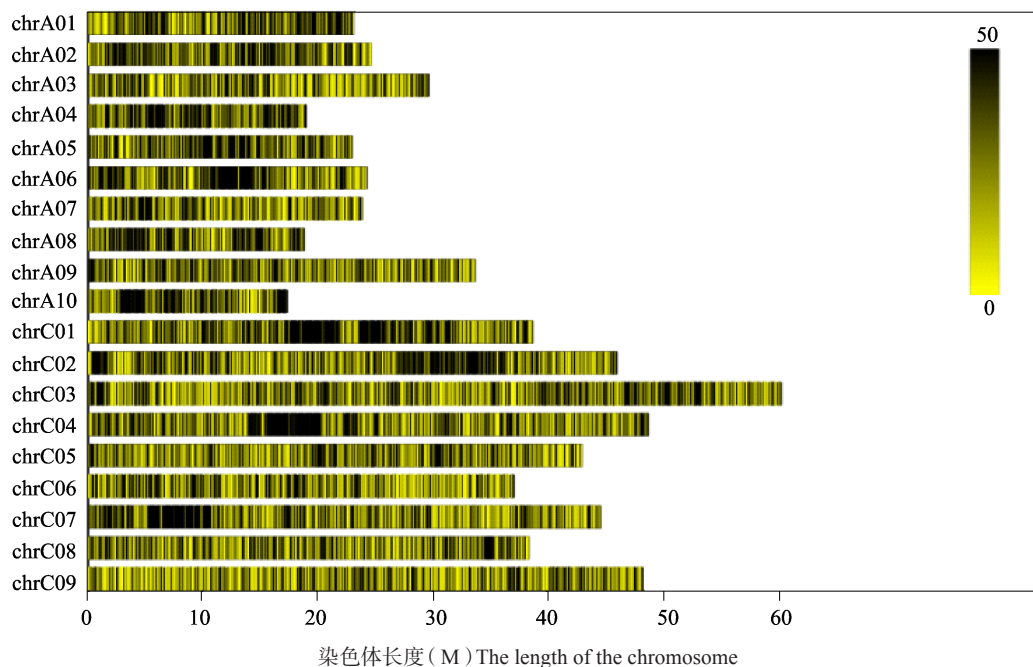


图 2 不同染色体上 SNP 标记的分布

Fig.2 Distribution of SNPs in each chromosomegenome

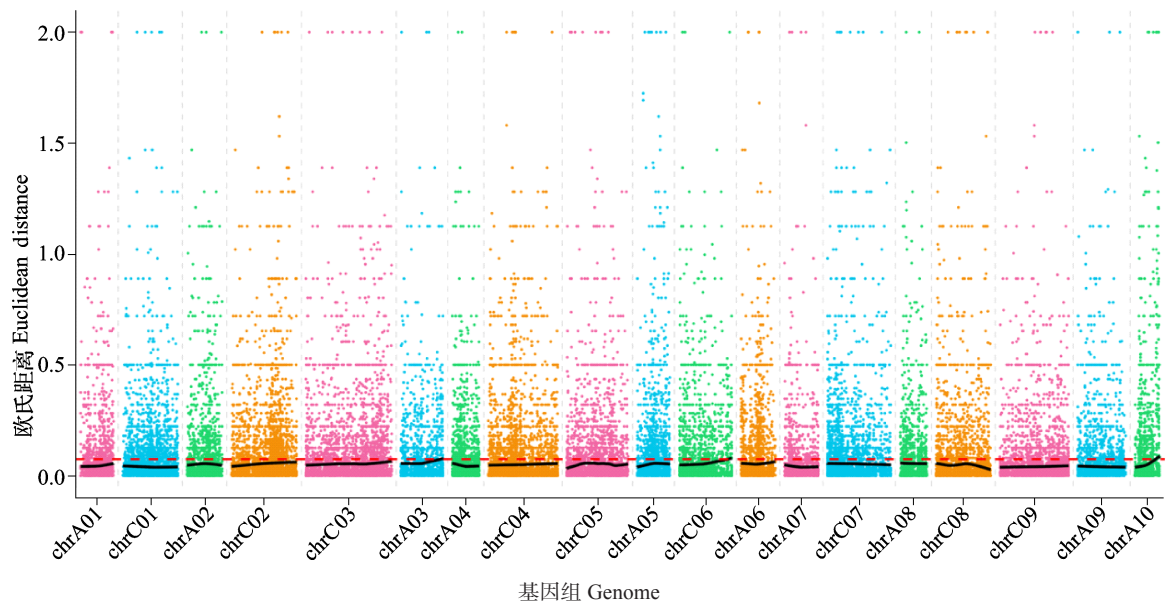
为筛选高质量的 SNP,在进行关联分析前,需对所得到的 150168 个 SNP 进行过滤。首先将 365 个多个基因型的 SNP 位点过滤掉,然后将 91970 个 read 支持度小于 4 的 SNP 位点过滤掉,再根据

通过亲本的 SNP 信息过滤掉与同表型亲本不同的位点 5319 个,最终得到高质量的可信 SNP 位点 52514 个,利用这 52514 个 SNP 位点进行后续的分析。

2.3 叶缘裂刻性状的关联分析

2.3.1 ED 方法关联 根据 ED 方法, 利用 52514 个 SNP 位点进行叶缘裂刻性状的关联分析。ED 关联值在染色体上的分布如图 3, 根据 Hill 等^[16]的

方法, 计算得到关联阈值为 0.07。根据该阈值, 获得 3 个关联区域, 总长度为 9.43 Mb, 共包含 1684 个基因, 其中非同义突变 SNP 位点的基因 18 个 (表 5)。



彩色的点代表每个 SNP 位点的 ED 值, 黑色的线为拟合后的 ED 值, 红色的虚线代表显著性关联阈值, ED 值越高, 代表该点关联效果越好
The color dots represent the ED value of each SNP locus, the black line is the fitted ED value, the red dotted lines represent the significant correlation threshold, and the higher the ED value, the better the correlation effect

图 3 ED 方法关联分析
Fig.3 Euclidean distance correlated analysis

表 5 ED 方法关联区域信息统计表
Table 5 Information on the association region by Euclidean distance

染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End	大小 (Mb) Size	基因数量 Gene number
chrA03	27043523	29735500	2.69	282
chrA10	14528149	17393097	2.86	675
chrC06	33340904	37218236	3.88	727
合计 Total	—	—	—	1684

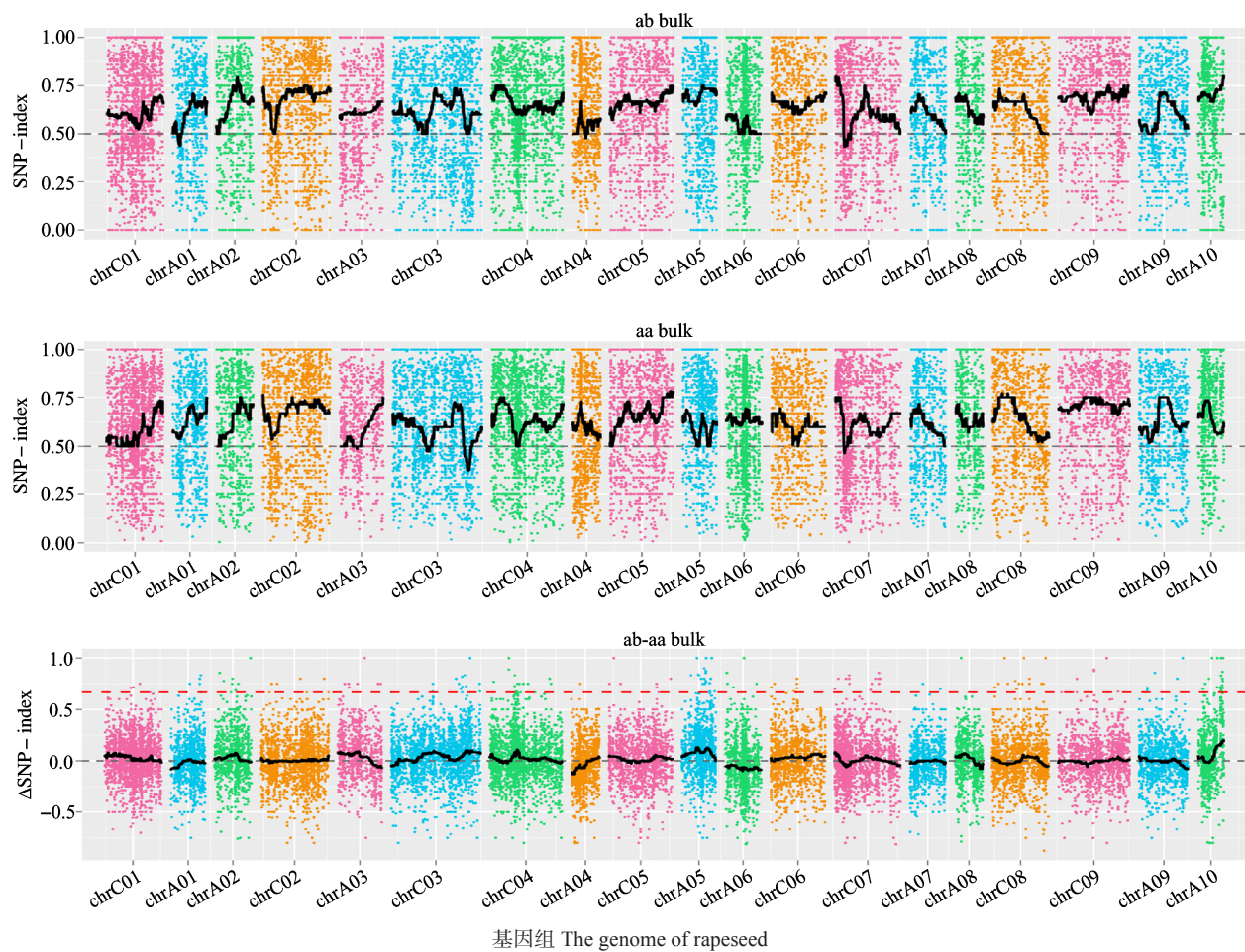
2.3.2 SNP-index 方法关联分析 利用 SNP-index 方法, 计算关联值, 并采用 SNPNUM 方法对 Δ (SNP-index) 进行拟合, 通过计算, 取 0.667 为关联阈值 (图 4)。结果表明, 没有超过理论阈值的区域, 说明本试验中没有发现显著的定位结果。因此, 进一步将阈值降低以寻找比较可能的定位区域, 取拟合后 SNP-index 值, 即 0.1246 为关联阈值, 共得到 7 个关联区域, 总长度为 6.24 Mb, 共包含 1276 个基因, 其中非同义突变的基因共 13 个 (表 6)。但由于

未达到理论阈值, 该区域很可能是假阳性区域, 需要进一步验证。

2.3.3 候选区域筛选 对 ED 方法和 SNP-index 方法得到的关联区域进行综合分析, 取其交集。结果表明, SLAF-seq 将控制油菜叶缘裂刻性状的基因定位在 A10 染色体上的 14528149~17353693 区域, 该区域总长度为 2.83 Mb, 约有 666 个编码基因。与郎丽娜等^[4]、晏仲元^[6]、Nikovics 等^[1]定位在同一染色体上, 但本研究定位的区间与郎丽娜等^[4]定位的区间只有小部分重叠区域, 与晏仲元^[6]、倪西源^[7]没有重叠区域 (图 5), 说明本研究存在控制叶缘裂刻新基因的可能性很大。

2.4 候选区域的功能注释

在样品间进行候选区域内的 SNP 注释, 结果表明, 亲本间存在非同义突变的 SNP 共 11 个, 这些 SNP 很有可能与性状直接相关。进一步利用 BLAST 软件对候选区间内的编码基因进行多个数据库 (NR^[18]、Swiss-Prot^[19]、GO^[17]、KEGG^[20]、COG) 的深度注释 (表 7)。结果表明, 候选区域内

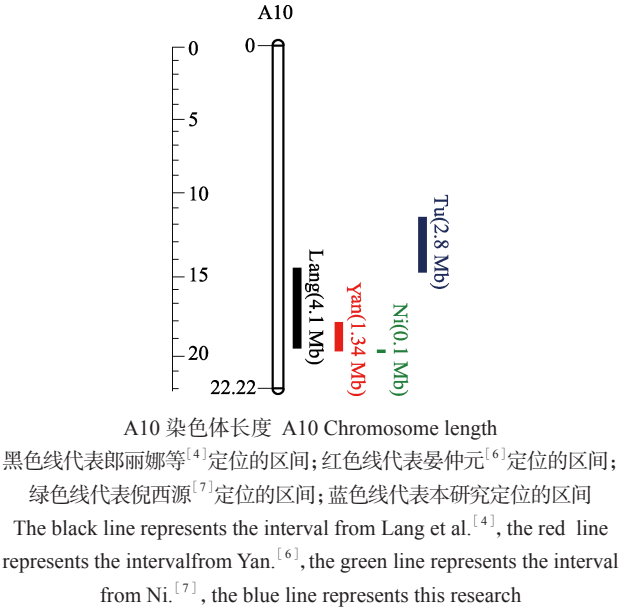


基因组 The genome of rapeseed
彩色的点代表算出来的 SNP-index (或 Δ SNP-index) 值, 黑色的线代表拟合后的 SNP-index (或 Δ SNP-index) 值
The color dots represent the calculated SNP-index (or Δ SNP-index) values,
and the black lines represent the fitted SNP-index (or Δ SNP-index) value

图 4 SNP-index 关联分析
Fig.4 SNP-index correlated analysis

表 6 SNP-index 方法关联区域信息统计
Table 6 Information on the association region by SNP-index

染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End	大小 (Mb) Size	基因数量 Gene number
chrA05	10479227	10555892	0.08	4
chrA05	10643947	11249105	0.61	56
chrA05	16924144	16956611	0.03	10
chrA05	17324244	17353492	0.03	4
chrA05	17498218	17540643	0.04	5
chrA05	9769807	10033170	0.26	20
chrA10	12167033	17353693	5.19	1177
合计 Total	—	—	—	1276



A10 染色体长度 A10 Chromosome length
黑色线代表郎丽娜等^[4]定位的区间; 红色线代表晏仲元^[6]定位的区间;
绿色线代表倪西源^[7]定位的区间; 蓝色线代表本研究定位的区间
The black line represents the interval from Lang et al.^[4], the red line
represents the interval from Yan.^[6], the green line represents the interval
from Ni.^[7], the blue line represents this research
图 5 候选基因的定位区间
Fig.5 Chromosomal location of candidate gene

表 7 候选区域内基因功能注释结果统计

Table 7 Gene function annotation of candidate region

功能注释数据库 Annotated databases	候选区域基因数 Gene number	非同义突变基因数 Non-synonymous gene number
NR	666	8
SwissProt	517	8
GO	587	6
KEGG	151	0
COG	258	2

共注释到 666 个基因, 其中在亲本间存在非同义突变基因共注释到 8 个。在这些候选基因中, 666 个注释到 NR 数据库, 517 个注释到 SwissProt 数据库, 587 个注释到 GO 数据库, 151 个注释到 KEGG 通路, 258 个注释到 COG 数据库。对候选基因进行注释有助于进一步分离相关基因^[13]。

3 讨论

3.1 甘蓝型油菜叶缘裂刻性状的遗传分析

叶缘裂刻性状是油菜育种中理想的形态标记性状^[4]。国内外有很多研究学者利用不同的遗传群体, 对油菜叶缘裂刻性状进行遗传研究。有研究表明, 叶缘裂刻性状受 1~2 对主效基因控制, 通过观察亲本及 F_1 的苗期的叶形便可辨别真假杂种, 可大大提高大田种子纯度, 为杂种优势利用提供便利^[4, 6, 20]。本研究通过叶缘裂刻品系 Y176 和普通甘蓝型油菜品种(系)中双 11、Y69 进行了正反杂交和回交, 其 F_1 植株均表现为叶缘裂刻性状, F_2 及 BC_1 分离群体表现出叶缘裂刻和正常形状等两种叶缘形状, 不同杂交组合中 F_2 分离群体叶缘裂刻与正常叶缘形状比例完全符合 3:1 分离。在 BC_1 分离群体中叶缘裂刻与正常叶缘形状比例完全符合 1:1 分离。可知, 该叶缘裂刻性状表现为质量性状, 主要受 1 对显性基因控制。这与前人的研究结果类似^[4]。

3.2 SLAF-Seq 技术在候选基因挖掘上的应用

SLAF-Seq 技术是结合 RRL (reduced representation library) 技术和高通量测序技术开发大规模 SNP 标记及基因分型的新技术^[9]。近年来, 国内外已有不少学者利用 SLAF-Seq 技术和 BSA 在不同的植物上取得显著成果, 获得了与目标性状显著相关的分子标记及其候选基因^[21-22]。Zhao 等^[14]利用

SLAF-Seq 技术进行棉花细胞质雄性不育基因的候选基因筛选, 获得 20 个候选基因, 定位于 D05 染色体上; Geng 等^[13]利用 SLAF-Seq 技术进行甘蓝型油菜粒重候选基因的挖掘, 获得粒重性状相关候选基因 91 个, 定位于 A09 染色体上。可见, SLAF-Seq 技术能广泛应用于分子标记的开发, 可快速获得遍布基因组的海量信息, 以实现相关性状候选基因的预测, 可为基因的精细定位和克隆奠定基础。

本研究利用 SLAF-Seq 技术甘蓝型油菜的油菜叶缘裂刻性状进行关联分析, 共获得 177941 个 SLAF 标签, 每个 SLAF 标签的亲本测序深度为 31.62x 和 25.26x, 混池测序深度为 55.77x 和 62.66x; 亲本间共获得 128200 个 SNP, 其中非同义突变的 SNP 共 1018 个, 混池间共获得 290577 个 SNP, 引起非同义突变的 SNP 共 1404 个; SNP-index 关联方法和 ED 关联方法获得的关联区域取交集获得 1 个与性状相关的候选区域, 总长度为 2.83 Mb, 位于 A010 染色体上。关联区域内注释到 666 个基因, 其中非同义突变 SNP 位点的基因共 8 个。已有学者定位了油菜叶缘裂刻性状相关基因, 也都将控制该性状的基因定位在油菜 A10 染色体上。如晏仲元^[6]以甘蓝型油菜圆叶品系和甘蓝型油菜花叶(叶缘裂刻)恢复性构建的群体为研究对象, 利用 SSR 和 BSA 方法, 将花叶主效基因 BnML 定位于甘蓝型油菜 A10 染色体; 倪西源^[7]利用“花叶”型油菜品系羽叶 87 与圆叶型油菜品系浙油 50 构建的 F_2 群体, 最终将“花叶”基因 BnLL1 定位在甘蓝型油菜 A10 染色体上 Bna10g26280D 和 Bna1026330D 两基因之间; 郎丽娜等^[4]以甘蓝型油菜品系 2205(圆叶)、1423(花叶)为亲本, 构建了 3 个世代群体: F_1 、 BC_1 、 F_2 , 利用分子标记技术对花叶基因进行定位, 利用 BSA 法筛选与花叶基因紧密连锁的 SSR 标记, 最终在 A10 染色体 15.7Mb 下游处发现 1 个花叶相关基因 Bra009510。而本研究经过测序筛选的叶缘裂刻性状相关候选基因定位于 A10 染色体上的 14528149~17353693 区域, 与郎丽娜等^[4]定位的区间部分重合, 而与晏仲元^[6]、倪西源^[7]没有重叠区域, 说明本研究定位的区域可能存在控制叶缘裂刻的新基因。本研究叶缘裂刻材料的特殊性可能是导致存在新基因的重要原因, 我们使用的叶缘裂刻材料是通过常规油菜与野生近缘植物—蔊菜远缘杂交获得的遗传稳定的后代群体。在远缘杂交过程中, 由于外源基因的渗入, 远缘杂交过

程中出现的染色质消除导致染色体片段的丢失,以及同源染色体交换导致受体基因组发生基因组重排^[23-24]往往会造成受体基因组结构和部分碱基序列出现变化,这种情况可能导致叶缘裂刻基因的交换或者重排,导致出现控制叶缘裂刻的新基因。另外,蕹菜具有叶缘裂刻的性状,也很可能通过远缘杂交的途径将外源的蕹菜叶缘裂刻基因插入到油菜基因组的某个染色体区间,进而造成控制叶缘裂刻性状的新基因。最后,蕹菜基因组与油菜基因组互作过程中,很可能造成油菜控制叶缘发育的相关基因出现变异,进而形成叶缘裂刻的表型性状。有关该叶缘裂刻性状基因的精细定位有待进一步研究。

本研究利用由甘蓝型油菜与蕹菜属间杂交获得的遗传稳定的叶缘裂刻新品系为材料,与普通甘蓝型油菜(正常叶型)正反交,构建 F_2 和 BCF_1 群体,其 F_2 群体分离比例完全符合3:1分离比例, BC_1 群体完全符合1:1分离,说明该叶缘裂刻性状主要受1对显性基因控制。并通过SLAF-seq-BSA技术,共开发出177941个SLAF标签,经多态性筛选获得150168个SNP,其中亲本间共获得128200个SNP。利用ED方法和SNP-index方法对关联区域进行综合分析,获得1个与目标性状紧密关联的候选区域,位于甘蓝型油菜A10染色体上的14528149~17353693区域,总长度为2.83 Mb,约有666个编码基因。该结果与郎丽娜等^[4]定位的区间部分重合,而与晏仲元^[6]、倪西源^[7]没有重叠区域,说明本研究定位的区域可能存在控制叶缘裂刻的新基因,可为候选基因进一步筛选和分离提供参考依据。

参考文献

- [1] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls Leaf Margin Serration in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2006, 18 (11): 2929-2945
- [2] Blein T, Pulido A, Guiraud A V, Nikovics K, Morin H, Hay A, Johansen I E, Tsiantis M, Larfs P. A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science*, 2008, 322 (5909): 1835-1839
- [3] 祝朋芳,冯馨,程明明,潘志超.羽衣甘蓝裂叶相关性状遗传分析.西北植物学报,2016,36(2):288-295
Zhu P F, Feng X, Cheng M M, Pan Z C. Genetic analysis of feathered-leaved related traits in *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36 (2): 288-295
- [4] 郎丽娜,赵娜,马兵,刘亚萍,田正书,刘璐,卢虹,刘霞,王阳,徐爱遐,黄镇.甘蓝型油菜花叶性状的遗传及基因定位.华北农学报,2016,31(4):39-43
Lang L N, Zhao N, Ma B, Liu Y P, Tian Z S, Liu L, Lu H, Liu X, Wang Y, Xu A X, Huang Z. Inheritance and gene mapping of mosaic-leaf in *Brassica napus* L. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31 (4): 39-43
- [5] 浦惠明,傅寿仲,戚存扣,张洁夫,伍貽美,高建芹,陈新军.花叶性状的遗传及其在杂交油菜育种中的应用.中国油料作物学报,2001,23(3):60-62
Pu H M, Fu S Z, Qi C K, Zhang J F, Wu Y M, Gao J Q, Chen X J. Inheritance of divided leaf trait of rapeseed (*Brassica napus*) and application in hybrid breeding. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2001, 23 (3): 60-62
- [6] 晏仲元.甘蓝型油菜花叶性状的遗传及基因定位.武汉:华中农业大学,2011
Yan Z Y. Inheritance of mosaic-leaf in *Brassica napus* and its gene mapping. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011
- [7] 倪西源.甘蓝型油菜“花叶”基因的精细定位及其在杂种优势利用中的应用.杭州:浙江大学,2014
Ni X Y. Fine mapping of lobed-leaf gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) and its application in heterosis utilization. Hangzhou: Zhejiang University, 2014
- [8] Xu F, Sun X, Chen Y L, Huang Y, Tong C, Bao J S. Rapid identification of major QTLs associated with rice grain weight and their utilization. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e122206
- [9] Sun X W, Liu D W, Zhang X F, Li W B, Liu H, Hong W G, Jiang C B, Guan N, Ma C X, Zeng H P, Xu C H, Song J, Huang L, Wang C M, Shi J J, Wang R, Zheng X H, Lu C Y, Wang X W, Zheng H K. SLAF-seq: an efficient method of large-scale De Novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58700
- [10] Chen S Q, Huang Z F, Dai Y, Qin S W, Gao Y Y, Zhang L L, Gao Y, Chen J M. The development of 7E chromosome-specific molecular markers for *Thinopyrum elongatum* based on SLAF-seq technology. *PLoS One*, 2013, 8 (6): e6512
- [11] Qi Z M, Huang L, Zhu R S, Xin D W, Liu C Y, Han X, Jiang H W, Hong W G, Hu G H, Zheng H Z, Chen Q S. A high-density genetic map for soybean based on specific length amplified fragment sequencing. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e104871
- [12] Chao X, Chen L L, Rong T Z, Li R, Xiang Y, Wang P, Liu C H, Dong X Q, Liu B, Zhao D, Wei R J, Lan H. Identification of a new maize inflorescence meristem mutant and association analysis using SLAF-seq method. *Euphytica*, 2015, 202 (1): 35-44
- [13] Geng X, Jiang C, Yang J, Wang L, Wu X, Wei W. Rapid identification of candidate genes for seed weight using the SLAF-Seq method in *Brassica napus*. *PLoS One*, 2016, 11 (1): e147580
- [14] Zhao C, Zhao G, Geng Z, Wang Z, Wang K, Liu S, Zhang H, Guo B, Geng J. Physical mapping and candidate gene prediction of fertility restorer gene of cytoplasmic male sterility in cotton. *BMC Genomics*, 2018, DOI: 10.1186/S12864-017-4406-Y
- [15] Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, Highlander S K, Schloss

- P D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon dequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (17): 5112-5120
- [16] Hill J T, Demarest B L, Bisgrove B W, Bisgrove B G, Su Y C, Yost J. MMAPP: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq. *Genome Research*, 2013, 23 (4): 687-697
- [17] Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Urmura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kanoun S, Terauchi R. MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e68529
- [18] Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno 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. *The Plant Journal*, 2013, 74 (1): 174-183
- [19] Consortium U P. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (D1): D158-D169
- [20] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (17): 3398-3402
- [21] 倪西源, 黄吉祥, 柳寒, 潘兵, 赵坚义. 花叶性状在油菜杂交种纯度控制中的应用. *核农学报*, 2017, 31 (6): 1070-1075
- Ni X Y, Huang J X, Liu H, Pan B, Zhao J Y. Application of lobed-leaf trait in controlling hybrid purity of rapeseed. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2017, 31 (6): 1070-1075
- [22] Li R, Song W, Wang B Q, Wang J H, Zhang D M, Zhang Q G, Li X H, Wei J F, Gao Z Y. Identification of a locus conferring dominant resistance to maize rough dwarf disease in maize. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 3248
- [23] 葛贤宏. 人工合成芸薹属异源六倍体与诸葛菜属间杂种的细胞学及分子生物学研究. 武汉: 华中农业大学, 2007
- Ge X H. Molecular and cytogenetic characterizations on hybrids between synthetic *Brassica* allohexaploid and *Orychophragmus violaceus*. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007
- [24] 范成明, 田建华, 胡赞民, 王珏, 吕慧颖, 葛毅强, 魏珣, 邓向东, 张蕾颖, 杨维才. 油菜育种行业创新动态与发展趋势. *植物遗传资源学报*, 2018, 19 (3): 447-454
- Fan C M, Tian J H, Hu Z M, Wang J, Lv H Y, Ge Y Q, Wei X, Deng X D, Zhang L Y, Yang W C. Advances of oilseed rape breeding. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19 (3): 447-454