

基于 BSA-seq 和 GWAS 技术的豇豆花色基因定位分析

胡格格, 朱妹萌, 苏晓佳, 康 研, 刘明慧, 郭 瑞, 潘 磊

(江汉大学生命科学学院/湖北省食用豆类植物自然资源中心/湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心, 武汉 430056)

摘要: 豇豆 (*Vigna unguiculata*) 是主要豆科农作物之一, 广泛分布在全球的热带和亚热带地区, 我国各地均有种植。豇豆花色是一种重要农艺性状, 在其繁殖过程中发挥着重要作用, 但是豇豆花色变异的分子遗传基础尚不清楚。为此, 本研究采用基于重组自交系 (RILs) 群体花色的 BSA-seq 分析与豇豆自然群体 (271 份) 花色的全基因组关联分析 (GWAS) 相结合, 将控制花色的基因定位于第九号染色体上 31.9 Mb 至 32.3 Mb 之间 (0.4 Mb 区域)。分析表明该 0.4 Mb 区域包含 30 个基因, 其中 TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (*TTG1*) 基因位于 SNP-index 峰值附近, 且在拟南芥中参与调控花青素的生物合成。进一步采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 分析发现, 紫色和白色的旗瓣在 *TTG1* 的基因表达存在显著差异。此外, 在该区域内筛选出 2 对多态性 SSR 引物, 能够区分 RIL 群体中紫色和白色旗瓣个体。本研究结果可为豇豆花色遗传变异和分子育种提供一定的理论依据。

关键词: 豇豆; 花色; BSA-seq; 全基因组关联分析; 分子标记

Localisation analysis of cowpea flower color genes based on BSA-seq and GWAS techniques

HU Gege, ZHU Shumeng, SU Xiaojia, KANG Yan, LIU Minghui, GUO Rui, PAN Lei

(School of Life Sciences, Jiangnan University/Hubei Province Natural Science Resource Center of Edible Legume/Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants, Wuhan 430056)

Abstract: Cowpea (*Vigna unguiculata*) is one of the major legume crops, widely distributed in tropical and subtropical regions of the world, and grown throughout China. Cowpea flower color is an important agronomic trait that plays an important role in its reproduction, but the molecular genetic basis of cowpea flower color variation is not known. To this end, this study used a combination of BSA-seq analysis based on flower color in a population of recombinant inbred lines (RILs) and genome-wide association analysis (GWAS) of flower color in a natural population of cowpea (271 accessions), which located the gene controlling flower color between 31.9 Mb and 32.3 Mb on chromosome IX (0.4 Mb region). The analysis showed that this 0.4-Mb region contains 30 genes, among which the TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (*TTG1*) gene is located near the peak of SNP-index and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. Further analysis using real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) revealed that

收稿日期: 2024-12-10 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为豆类蔬菜基因发掘与应用, E-mail: 18782396755@163.com

通信作者: 潘 磊, 研究方向为豆类蔬菜种质资源与分子育种, E-mail: leipan@jhun.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501369); 湖北省科技计划自然科学基金面上项目 (2017CFB442); 湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心开放基金项目 (2019-01); 湖北省科技创新基地(平台)计划 (2024CFA018)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31501369); Natural Science Foundation of Hubei province (2017CFB442); Open Fund Project of Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants (2019-01); Hubei Province Science and Technology Innovation Base (Platform) Program (2024CFA018)

there was a significant difference in gene expression of *TTG1* between purple and white flag petals. In addition, two pairs of polymorphic SSR primers were screened within this region and were able to distinguish between purple and white flag petal individuals in the RIL population. The results of this study can provide some theoretical basis for cowpea flower color genetic variation and molecular breeding.

Key words: Cowpea; Flower color; BSA-seq; Genome-wide association analysis; Molecular marker

豇豆 (*Vigna unguiculata*) 是世界范围内重要的豆科作物之一, 起源于非洲, 广泛分布于热带和亚热带地区^[1]。当前, 豇豆主要的栽培亚种为普通豇豆 (*ssp. unguiculata*) 和长豇豆 (*ssp. sesquipedalis*)。普通豇豆以食用干种子为主, 具有耐旱、耐贫瘠等生长特性, 且经济价值高, 在粮食和营养安全方面占据独特地位^[2]。长豇豆因其嫩荚长而肉厚作为蔬菜, 富含蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质等营养成分, 在东南亚和中国深受欢迎^[3]。

花色作为植物的重要性状和主要视觉信号, 在植物繁殖过程中发挥着关键作用^[4-5]。在漫长的进化历程中, 植物可以利用花色吸引传粉昆虫进行授粉, 从而获得了显著的竞争优势, 这种特性使得被子植物在植物中占据了主导地位, 极大地丰富了这一类群的生物多样性^[6]。花色不仅能作为视觉线索吸引昆虫传粉, 还能够帮助它们准确识别花朵。昆虫对不同花色的偏好存在显著差异^[7], 例如熊蜂偏好紫色花朵, 而蜜蜂则偏好豆科植物中的白色花朵^[8]。另一方面, 花朵中的色素也可参与植物的抗病防御和抵御光氧化损伤^[9-11], 某些花色的变化还具有驱虫作用^[12-13]。花色的多样性提高了昆虫辨识的效率和准确性^[14], 从而促进了植物与传粉者之间复杂的生态关系, 并为植物育种工作奠定了重要基础^[15]。

目前, 豇豆中花色变异较少, 主要有三种花色类型: 紫色、白色和淡紫色^[16]。据报道普通豇豆中花色的遗传表现为质量性状遗传模式, 其中紫色花表型对白色花表型为显性^[17], 紫色花表型对淡紫色花表型也呈显性^[18]。也有研究认为, 普通豇豆中的花色 (紫色花与白色花) 可能由两个基因的相互作用所控制^[19]。在普通豇豆亚种中, 已将一个与花色相关的 QTL (CFcol7) 定位于第 7 号染色体上^[20]。然而, 关于影响长豇豆中花色的基因组区域, 包括插入/缺失、碱基替换和染色体重排等方面的研究仍知之甚少^[21]。

随着全基因组测序技术的不断发展, BSA-seq 技术已成为定位与性状相关 QTL 区域的快速有效手段^[22-23]。在此 BSA-seq 分析方法中, 两个群体样本分别由具有明显或相反极端性状的两组群体 DNA 混合而成, 形成两个混合样本。混合样本在 NGS 平台上进行测序, 从而便于比较两者之间的等位基因频率。除了与相反极端表型相关的区域外, 大多数基因组区域在两个混合样本中的等位基因频率大致相同^[24]。两个混合样本之间等位基因频率显著差异的基因组位置揭示了与性状相关的 QTL。利用生物信息学进行统计分析, 可以确定相关 QTL 位置的置信区间^[25]。BSA-seq 技术发展迅速, 应用广泛。例如, 该技术已被用于精确定位水稻 (*Oryza sativa* L.) 中导致叶片淡绿和半矮秆性状的遗传位点^[26], 定位控制大豆 (*Glycine max* L.) 子叶颜色的基因^[27]以及黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 中抗白粉病的基因^[28]。

全基因组关联分析（GWAS, genome-wide association study），是基于连锁不平衡（LD, linkage disequilibrium）原理，通过对大样本群体中的表型变异与多态性标记进行关联分析，从而计算出与复杂性状相关的基因或基因组区域^[29]。GWAS 因其耗时较短、成本较低且遗传信息来源广泛等优势，已成为基因组学研究的主要方法之一，并广泛应用于多种作物不同性状的基因发掘^[30-32]。在长豇豆中，Xu 等^[33]通过 GWAS 揭示了 72 个与荚长紧密相关的 SNP(单核苷酸多态性)分子标记；Pan 等^[34]通过对来自非洲和亚洲不同亚种的豇豆种质资源全基因组分析，发现多个控制荚长、荚宽的关键候选基因。

本研究拟联合 BSA-seq 和 GWAS 技术，定位控制豇豆花色的候选区段，初步筛选豇豆花色相关候选基因，并分析豇豆花色遗传基础，为豇豆分子育种提供参考依据和理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

长豇豆花朵分为三种结构：旗瓣、翼瓣和龙骨瓣，本研究中仅以旗瓣的颜色为研究目标。选用紫花品种 A111G (*V. unguiculata* ssp. *unguiculata*) 为母本，白花品种 A147 (*V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) 为父本进行杂交并获得 F₁，通过单粒传法选育得到 RIL 群体，共计 303 个株系，观察并记录每个株系的旗瓣颜色（详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241210001>，附表 1）。试验材料种植于湖北省武汉市汉南区（113°25'E, 30°11'N）。大棚种植，采用常规日常管理，每棚 4 行，每行长 30 米，宽 1.5 米，行距 0.8 米，株距 0.8 米。本研究中所有长豇豆材料均由湖北省食用豆类自然资源中心和湖北省豆类（蔬菜）植物工程技术研究中心提供。

1.2 BSA-seq 试验方法

1.2.1 混池测序 选取亲本及 RIL 群体中 27 个白花豇豆和 31 个紫花豇豆材料分别用于混池测序分析。所有样本种子使用 75%乙醇消毒 1 分钟，随后用无菌水清洗，再在 26°C 恒温培养箱（光照 16 小时/黑暗 8 小时周期，相对湿度 60%）中进行培养。采用 CTAB 法^[35]从样本嫩叶中提取总 DNA。混池中母本“A111G”编号为“R01”，父本“A147”编号为“R02”，白花 DNA 混池（WF-pool）编号为“R03”，紫花 DNA 混池（PF-pool）编号为“R04”，使用 Nanodrop 2000 分光光度计（Thermo Scientific, USA）测定样本 DNA 的浓度。将白花材料 DNA 和紫花材料 DNA 分别等量混合，构建得到 R03 和 R04 两个 DNA 混池。利用 Bioruptor Pico System（Diagenode, Belgium）将两个亲本和两个混合池的 DNA 超声处理为 350 bp 片段。剪切后的 DNA 片段进行末端修复，使用 T4 DNA 连接酶连接测序接头，并进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后，通过 Illumina HiSeq 2500 进行测序。

1.2.2 测序数据分析 原始测序数据通过北京百迈客生物科技有限公司提供的内部 Perl 脚本进行过滤，该脚本去除低质量 reads（质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整条 read 50%及以上），以及含模糊序列（“N”）超过 10% 的 reads。随后，将质量合格的测序序列与豇豆基因组（<http://tree-bio.hzau.edu.cn/>）比对。使用 Picard 软件（<https://sourceforge.net/projects/picard/>）标记重复序列。利用 GATK 的默认参数检测单核苷酸多态性（SNP）和插入缺失（InDel）标记^[36]。过滤出高质量 SNPs 和 InDels^[37]后，采用欧式距离（Euclidean Distance, ED）算法做关联分析（SNP-index），统计每条 scaffold 上两混池间差异的 SNP 数目，以及候选的关联位点数目，通过超几何分布计算每条 scaffold 上富集关联位点的概率，计算筛选出包含显著富集关联位点的 scaffold（ $FDR < 0.01$ ），利用 R 软件（版本 4.0.5）中的 Fisher.test 函数检测豇豆花色变异的相关性。

1.3 全基因组关联分析（GWAS）

选取 271 份具有代表性的豇豆种质资源（详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241210001>，附表 2），针对其花色表型特征，结合全基因组单核苷酸多态性（SNP）分子标记^[34]，进行花色 GWAS 分析。最佳线性无偏预测（BLUP）采用 R 4.0.5（<https://www.r-project.org/>）中的“lme4”软件包进行分析。采用基因组高效混合模型关联算法（GEMMA）进行 GWAS 分析，设置 LMM 参数为 1^[38]。利用 PLINK 程序确定标签 SNP 的数量，并将 GWAS 的阈值设定为标签 SNP 数量的 0.05 倍和 0.01 倍。通过 R 软件中的 CMplot 程序包将 GWAS 分析结果可视化为曼哈顿图和 Q-Q 图。

1.4 荧光定量 PCR

选取 20 份豇豆材料（紫花白花各 10 份）进行荧光定量 PCR 分析。所有供试材料均从田间取样，将旗瓣迅速置于液氮中冷冻，并储存于 -80°C 冰箱中备用。使用 Plant RNA Extraction Kit（Takara, Japan）提取旗瓣 RNA，并使用分光光度计（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）测量 260/280 nm 处的吸光度，选择吸光度 A260/A280 比值接近 2.0 的样本用于后续的 cDNA 合成。将白花材料 RNA 和紫花材料 RNA 分别等量混合，取 $1\mu\text{g}$ RNA，使用 SuperMix cDNA（北京全式金生物技术有限公司）和 oligo（dT）引物进行反转录，生成 cDNA。基于 RT-qPCR 引物设计原则，利用 NCBI Primer-BLAST 和 Oligo7.0 软件设计 *TTGI* 基因的 RT-qPCR 引物。*TTGI* 基因的正向引物序列为 5'-ATGTTCCATCCCCGCAAACC-3'，反向引物序列为 5'-TCAAACCTTCAAAAGCTGCAC-3'，以 *GAPDH* 基因为内参进行相对表达量归一化^[39]。所有 RT-qPCR 操作均在 96 孔板上进行，使用 Quant-StudioTM Real-Time PCR 软件（Applied Biosystems, Waltham, MA, USA）和 SuperReal PreMix Plus Mix（天根生化科技有限公司）。每个 $20\mu\text{L}$ 反应体系包含： $10\mu\text{L}$ $2\times$ SuperReal PreMix Plus Mix， $0.4\mu\text{L}$ 正反引物（ $10\mu\text{M}$ ）， $2\mu\text{L}$ cDNA，以及 $7.2\mu\text{L}$ RNase-free H_2O 。RT-qPCR 采用两步法进行，第一步 95°C 预变性 5 min；第二步 95°C 变性 5 s， 60°C 退火 30 s，共 40 个循环。每个样本设置 3 个生物学

重复，3 个技术重复。

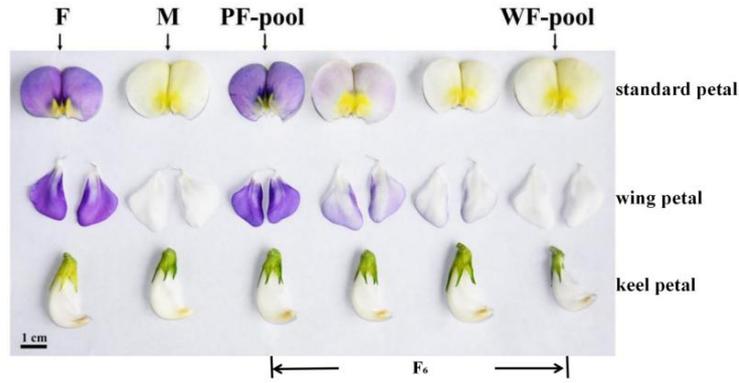
1.5 开发 SSR 分子标记

利用 MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa>) 和 Primer6.0 软件设计 SSR (Simple Sequence Repeat) 引物。设计参数设定如下：引物长度为 19-27 bp，GC 含量为 45%-60%，重复单元长度为 2-3 bp，核苷酸重复次数至少 6 次，引物退火温度控制在 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 范围内，产物大小介于 150-300 bp 之间。设计的引物送至公司合成（北京擎科生物科技股份有限公司）。选取 RIL 群体子代材料 45 份（15 份白花样品、15 份紫花样品、15 份淡紫花色样品）及亲本材料（A111G、A147）作为供试样本，用于筛选多态性 SSR 标记。PCR 反应体系总体积为 20 μL ，包含 1 μL 模板 DNA (100 ng/ μL)、1 μL 正向引物 (10 μM)、1 μL 反向引物 (10 μM)、10 μL 2 \times E-Taq PCR Master Mix 和 7 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s，共 32 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。筛选出扩增条带清晰、重复性好、具有多态性的引物，以 47 份材料的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳检测，并进行拍照记录。6% PAGE 电泳检测采用银染试剂盒（兰杰柯科技有限公司）进行染色。

2 结果与分析

2.1 基于 BSA-seq 技术的豇豆花色基因定位

2.1.1 测序质量评估 利用 Illumina 高通量测序技术，从白花混池 (WF-pool) 和紫花混池 (PF-pool) 中分别获得了 83919653 和 91641677 个的短序列，且两个 DNA 混池中超过 88% 的序列都成功比对到豇豆参考基因组上^[40]，这些比对位置确保后续检测分析的准确性 (图 1)。WF-pool 和 PF-pool 的 Q30 值分别为 94.53% 和 94.40%，母本和父本的有效测序深度分别达到基因组覆盖率的 12 \times 和 14 \times (表 1)。原始读段数据已上传至 NCBI SRA，包括四个编号：SAMN16491723、SAMN16491724、SAMN16491725 和 SAMN16491726。根据该参考基因组，共获得 70.77 Gbp 的高质量读段 (Q30 > 80%)，平均测序深度为 30.23 \times 。样本与参考基因组之间的平均比对效率为 90.42%，平均覆盖深度为 26.00 \times ，且基因组覆盖率达到 95.88% (至少有一个碱基覆盖)。测序覆盖均匀，变异检测精确，随机性好，利于后续检测筛选。



F: A111G(母本); M: A147 (父本); PF-pool: 紫花样品; WF-pool: 白花样品; standard petal: 旗瓣; wing petal: 翼瓣; keel petal: 龙骨瓣

F: A111G(Female); M: A147(Male); PF-pool: purple flower samples; WF-pool: white flower samples

图 1 RIL 群体亲本及子代花色

Fig.1 Parental and progeny flower color of RIL population

表 1 样品测序数据评估统计

Table 1 Sample sequencing data evaluation statistics

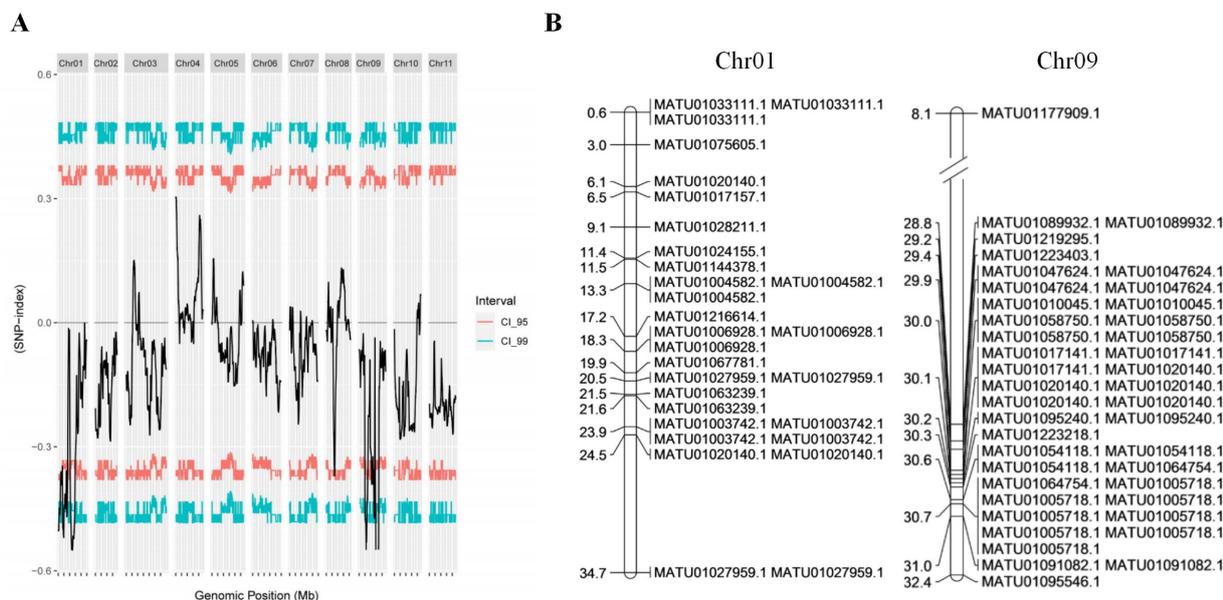
样品编号	过滤后的 reads 数	过滤后的	测序质量值百分比	GC 含量 (%)	测序深度 (×)	比对率 (%)
Sample ID	Clean Reads	碱基数	The percentage of Q30	GC(%)	Depth(×)	Mapped reads ratio (%)
		Clean Base				
R01	29383726	8801965578	94.01	34.38	12	89.68
R02	31322732	9381394058	94.22	34.5	14	91.47
R03	83919653	25135015124	94.53	34.14	37	89.9
R04	91641677	27453060388	94.40	34.06	41	90.62

注: 编号中, 母本“A111G”为“R01”, 父本“A147”为“R02”, 白花DNA混池 (WF-pool) 为“R03”, 紫花DNA混池 (PF-pool) 为“R04”

Note: In the numbering, female “A111G” is “R01”, male “A147” is “R02”, white-flower DNA pool (WF-pool) is “R03”, purple-flower DNA pool (PF-pool) is “R04”

2.1.2 SNP 和 InDel 关联分析 基于 SNP 标记, 采用 ED 关联算法筛选出 818 个与花色性状相关的 scaffold, 运用 SNP-index 关联分析筛选出 179 个与花色性状相关的 scaffold, 通过对比上述两种关联算法的结果, 取交集得到 105 个与花色性状相关的共同 scaffold; 基于 InDel 关联分析, 采用 ED 关联算法筛选出 202 个性状相关的 scaffold, 运用 InDel-index 关联分析筛选出 48 个与花色性状相关的 scaffold, 通过对比上述两种

关联算法的结果，取交集得到 19 个与花色性状相关的共同 scaffold。综合 SNP 和 InDel 分析结果，得出 12 个与花色性状相关的共同 scaffold（详见 <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241210001>，附表 3），进一步筛选出四个 SNP 频率存在显著差异的区域，作为候选的 QTL 区域（图 2）。其中，一个主要控制花色的 QTL 定位区域位于第九号染色体上，具体位于 28.8 Mb 至 32.4 Mb 之间（区间长度为 3.6 Mb）。



A为花色BSA-seq基因组定位分析结果图；B为控制长豇豆花色的候选QTL区域。A图中横坐标为染色体名称，CI_95 和 CI_99 分别代表 95% 和 99% 的置信区间。B图中分别代表第1号染色体和第9号染色体

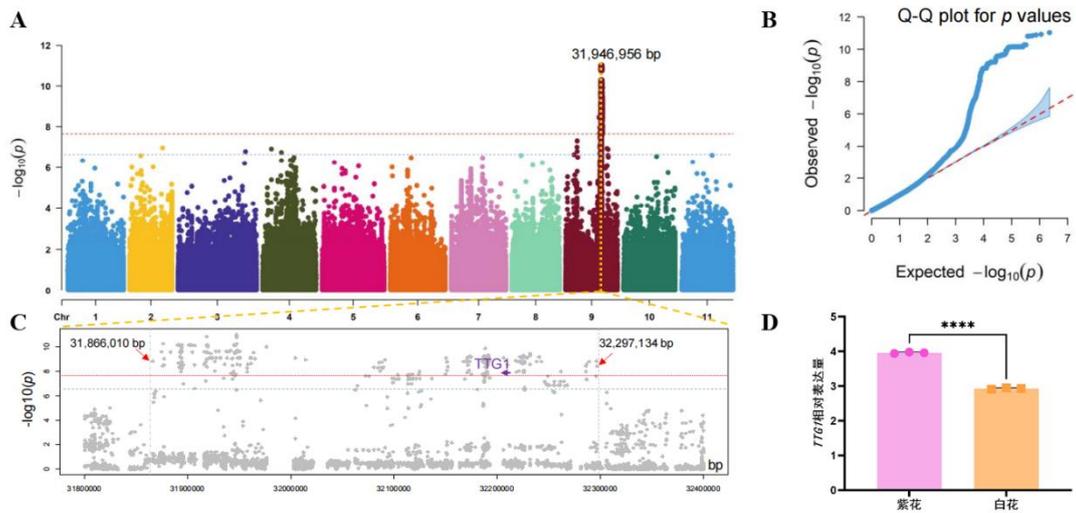
A:Map of the results of the genomic localization analysis of floral BSA-seq; B:Candidate QTL regions controlling flower colour in cowpea.Horizontal coordinates are chromosome names, and CI_95 and CI_99 represent 95% and 99% confidence intervals, respectively, in Figure A. Chromosome 1 and chromosome 9 are represented in Figure B, respectively.

图 2 豇豆花色 BSA 测序分析结果图及其候选区间

Fig.2 Map of the results of BSA sequencing analysis of cowpea flower color and its candidate intervals

2.2 花色全基因组关联分析

花色全基因组关联分析结果揭示出多个显著 SNP 位点，其中第九号染色体上 31946956bp 是主要 QTL 区域（图 3A）。Q-Q 图表明，这些 QTL 具有高度可信度（图 3B）。根据 P 值的分布，将该 QTL 的基因组区域设定为第九号染色体上 31866010-32297134bp（图 3C）。同时，进一步分析发现，基于 BSA-seq 的花色 QTL（28.8 Mb 至 32.4 Mb）与基于 GWAS 鉴定的花色 QTL（31.9 Mb 至 32.3 Mb），两个区域存在重叠。因此，这些数据表明，本研究定位的长豇豆花色 QTL 的区间结果可靠。



A为花色GWAS结果的曼哈顿图；B为A中结果的QQ图；C为位于第九号染色体上与花色有关QTL的放大基因组区域；D为*TTG1*在紫花和白花中的表达量

A:Manhattan plot of the GWAS results of FC; B:Quantile-Quantile plot for the P values in A; C:The magnified genomic regions for the FC QTL at Chr9; D:The expression of *TTG1* in purple and white flowers

图 3 豇豆花色的全基因组关联分析结果和定量分析

Fig.3 Genome-wide association analysis results and quantitative analysis of flower color in cowpea

2.3 花色候选基因挖掘及 *TTG1* 定量分析

通过对花色 QTL 区域内 (Chr09: 31866010-32297134) 进行分析, 揭示出 4 个连锁不平衡 (LD) 区块和 30 个候选基因 (表 2)。在 SNP-index 峰值附近, 发现了编码 TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (*TTG1*) 基因的位点 (evm.model.Chr09.2264) (图 3C)。已有的报道表明 *TTG1* 基因与花色合成功能相关, 在拟南芥中, *TTG1* 负责调控花青素的生物合成, 从而导致种皮和幼苗呈现红色^[41]。同时选取 20 份豇豆材料对 *TTG1* 基因进行荧光定量 PCR 分析, 结果显示紫花材料的表达量显著高于白花材料 (图 3D), *TTG1* 基因可能是长豇豆花色有关的候选基因。

表 2 花色 QTL 区域候选基因功能注释 (第 9 号染色体)

Table 2 Functional annotation of candidate genes in the flower color QTL region (chromosome 9)

起始位置-终止位置	基因 ID	基因功能注释	起始位置-终止位置	基因 ID	基因功能注释
Start-End	Gene ID	Gene function annotation	Start-End	Gene ID	Gene function annotation
31879068-31886773	evm.model.Chr09.2235	未知功能蛋白	32067443-32072471	evm.model.Chr09.2250	结构蛋白 CID12

31888038-31890347	evm.model.Chr09.2236	生长调节互作因子	32084261-32089855	evm.model.Chr09.2251	结构蛋白 CID12
31899927-31900388	evm.model.Chr09.2237	植物转化酶超家族	32104385-32110166	evm.model.Chr09.2252	SR 蛋白家族 SRp34a
31901467-31902892	evm.model.Chr09.2238	果胶甲酯酶	32132091-32143290	evm.model.Chr09.2253	植物胚珠发育基因
31928673-31931041	evm.model.Chr09.2239	未知功能蛋白	32151318-32152762	evm.model.Chr09.2254	60S 酸性核糖体蛋白家族
31948572-31951741	evm.model.Chr09.2240	生长调节因子 GRF2	32158202-32160779	evm.model.Chr09.2255	未知功能蛋白
31953114-31956252	evm.model.Chr09.2241	蛋白激酶家族蛋白	32167229-32177541	evm.model.Chr09.2256	未知功能蛋白
31970537-31972599	evm.model.Chr09.2242	锌指结构酰基辅酶 A	32178196-32181038	evm.model.Chr09.2257	未知功能蛋白
31973537-31976542	evm.model.Chr09.2243	蛋白激酶家族蛋白	32206696-32210296	evm.model.Chr09.2258	未知功能蛋白
32005466-32008558	evm.model.Chr09.2244	蛋白激酶家族蛋白	32214355-32216301	evm.model.Chr09.2259	转录活性蛋白 PTAC15
32016083-32016407	evm.model.Chr09.2245	未知功能蛋白	32221086-32223324	evm.model.Chr09.2260	30S 核糖体蛋白
32020250-32021071	evm.model.Chr09.2246	未知功能蛋白	32239928-32245153	evm.model.Chr09.2261	未知功能蛋白
32035824-32036836	evm.model.Chr09.2247	热休克蛋白 HSP21	32248794-32249426	evm.model.Chr09.2262	晚期胚胎发育蛋白家族
32037394-32037804	evm.model.Chr09.2248	未知功能蛋白	32253651-32255178	evm.model.Chr09.2263	未知功能蛋白
32051874-32054226	evm.model.Chr09.2249	RNA 结合蛋白	32259203-32260405	evm.model.Chr09.2264	重复蛋白家族 TTG1

2.4 花色 QTL 区间多态性 SSR 分子标记筛选

在控制花色 QTL 目标区域（第九号染色体上 31.9 Mb 至 32.3 Mb 之间）内进行 SSR 分子标记发掘，对每个 SSR 位点设计其对应引物，利用亲本材料（A111G 和 A147）进行多态性检测，筛选出条带清晰且多态性较好的 2 个 SSR 位点（VuFC9-4、VuFC9-7），其中 VuFC9-4 的起始位置为 31939870bp，重复基元为(TA)₃₆，正向引物序列为 5'-TGTTGCAAGGAAGTTGTTATTTT-3'，反向引物序列为 5'-TCCGCATTTGGAAAGAGAAG-3'，退火温度 T_m 为 57℃，产物预期大小为 236 bp；VuFC9-7 的起始位置为 32252460bp，重复基元为(AT)₃₇，正向引物序列为 5'-AATTGCCAAACCAAAGGTG-3'，反向引物序列为 5'-TGAAAATATCATAAATGCACAAAAGA-3'，退火温度 T_m 为 57℃，产物预期大小为 233 bp。在亲本和 RIL 子代不同花色个体的 PAGE 电泳检测中，可以看出亲本间条带有明显差异，紫花母本 A111G 和紫花子代个体位于同一条带附近，白花父本 A147 和白花子代个体位于同一条带附近，淡紫花色子代个体则条带位置不一，这 2 个 SSR 位点均能够清晰地区分长豇豆中紫花和白花两种表型（图 4）。



A为VuFC9-4引物胶图；B为VuFC9-7引物胶图；M:20bp ladder；♂:A147；♀:A111G；P:紫花；W:白花；D:过渡花色（淡紫色）

A:Primer VuFC9-4; B:Primer VuFC9-7; M:20bp ladder; ♂:A147; ♀:A111G; P:Purple flower; W:White flower; D:Transition color

图 4 通过 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 47 个豇豆花色样品中的 SSR 多态性标记

Fig.4 SSR polymorphism markers in 47 samples of *V. unguiculata* detected by 6% polypropylene gel amide electrophoresis

3 讨论

随着 BSA-seq 和 GWAS 技术的广泛应用，促进了农作物重要农艺性状相关的 QTL 研究。严昕等^[42]应用豌豆紫花亲本 G0004562 和白花亲本 G0002930 进行杂交构建 F₂ 分离群体，运用 BSA-seq 和 InDel 分子标记，通过基因注释推测出 Psat6g060480.1 为豌豆花色候选基因；袁翠平等^[43]利用大豆籽粒蛋白含量差异较大的 RIL 群体构建混池，采用 BSA-seq 技术关联分析，将其定位在 20 号染色体区间（Chr20:3100000-33360000）；李文佳等^[44]采用 390 份花生自然群体栽培种进行 GWAS 分析，最终在候选区间中预测出 7 个与花生开花时间相关的候选基因。本研究选取的 A111G、A147 两个豇豆品种经过多年培育，遗传稳定且花色差异性大，适用于 BSA-seq 进行分析，且采用 GWAS 技术进行联合分析，同时对控制豇豆花色区间进行定位，进一步确保结果的可靠性。

在豇豆遗传育种研究中，花色是具有重要意义的农业性状，但关于豇豆花色 QTL 的分子基础报道甚少。Xu 等^[16]认为豇豆花色的遗传模式依赖于基因型，控制花色的基因位于连锁群 LG8 的远端区域，与控制种皮颜色区域紧密连锁；Lo 等^[45]构建 215 个普通豇豆重组自交系，通过构建高密度遗传图谱，挖掘出与普通豇豆 9 个性状（单荚籽粒数、叶片长度、花色等）相关的 16 个 QTL，最终将控制花色 QTL 定位于第 7 号染色体上。本研究结果显示与花色相关的 QTL 位于第 9 号染色体上，这与 Lo 等^[45]报道研究存在不同，这一差异可能是由于采用豇豆亚种间基因型不同所导致，本研究采用是长豇豆亚种进行分析，因此基因组上在花色基因位点可能已经存在差异。

花色主要是由于花瓣组织内花青素的积累所导致。花青素是黄酮类代谢途径中特定分支的终产物，在玉米^[46]、矮牵牛^[47]和葡萄^[48]等植物中，其合成途径具有保守性。然而，关于豇豆花瓣颜色调控的相关途径

和机制仍不明确。本研究中鉴定的候选基因 *TTG1* (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1) 已经发现在植物生长发育过程中具有多种功能, 能参与调控花青素积累、种皮着色、种皮粘液^[49-50]、表皮毛和根毛形成^[51-52]等多种途径。目前, *TTG1* 基因已在多种植物中被证实参与花青素调控表达^[53-55]。在拟南芥中, *ttg1* 突变体因缺失 *TTG1* 基因而无法合成花青素, 导致种子仅呈现黄色^[49], 过表达 *PaTTG1.1* 和 *PaTTG1.2* 基因可恢复 *ttg1* 突变体种子缺乏花青素的表型^[56]。Wei 等^[57]发现 *TTG1* 与 R2R3MYB (如 PAP1、PAP2、MYB113、MYB114、TT2) 和 bHLH (如 GL3、EGL3、TT8) 转录因子形成 MBW 蛋白复合物, 结合到 TT2 和 TT8 等基因的启动子区域, 从而调控花青素的产生。

综上所述, 本研究定位了豇豆花色 QTL 区间, 并初步分析该区间与花色相关的候选基因 (*TTG1*), 检测筛选出花色区间内的多态性 SSR 分子标记 (VuFC9-4、VuFC9-7), 加深了对豇豆基因组学的认识, 有助于揭示豇豆花色的遗传变异机制, 可为豇豆花色分子育种提供理论依据, 为深入开展豇豆花色调控机理研究奠定坚实基础。

参考文献

- [1] Watcharatpong P, Kaga A, Chen X, Somta P. Narrowing down a major QTL region conferring pod fiber contents in yardlong bean (*Vigna unguiculata*), a vegetable cowpea. *Genes*, 2020, 11(4):363
- [2] Boukar O, Belko N, Chamathi S, Togola A, Batiemo B J, Owusu E, Haruna M, Diallo S, Umar M, Olufajo O, Fatokun C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): genetics, genomics and breeding. *Plant Breeding*, 2019, 138:415-424
- [3] 吴健,汪宝根,陈小央,吴晓花,李潇,韩磊,汪颖,王尖,鲁忠富,杨易,张艳,李国景,吴新义. 豇豆抗锈病全基因组关联分析. *植物遗传资源学报*, 2024,25(11):1907-1922
Wu J, Wang B G, Chen X Y, Wu X H, Li X, Han L, Wang Y, Wang J, Lu Z F, Yang Y, Zhang Y, Li G J, Wu X Y. Genome-wide association analysis of cowpea rust resistance. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25(11):1907-1922
- [4] Kantsa A, Raguso R A, Dyer A G, Sgardelis S P, Petanidou T. Community-wide integration of floral color and scent in a Mediterranean scrubland. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(10):1502-1510
- [5] Xu X M, Luo W, Guo J, Chen H, Akram W, Xie D. Fine mapping and candidate gene analysis of the yellow petal gene *ckpc* in Chinese kale (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra* Bailey) by whole-genome resequencing. *Molecular Breeding*, 2019, 39:96
- [6] Nadot S, Carrive L. The colourful life of flowers. *Botany Letters*, 2020, 168(1):120-130
- [7] Brunet J, Flick A, Bauer A. Phenotypic selection on flower color and floral display size by three bee species. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 11:587528
- [8] 曾拓,李伽文,周黎,李进进,史安琪,付瀚森,罗靖,郑日如,王媛媛,王彩云. 观赏植物花色与授粉昆虫相互适应关系的研究进展. *园艺学报*, 2021,48(10):2001-2017
Zeng T, Li G W, Zhou L, Li J J, Shi A Q, Fu H S, Luo J, Zheng R R, Wang Y Y, Wang C Y. Advances in the relationship between flower colour and pollinating insects in ornamental plants. *Journal of Horticulture*, 2021, 48(10):2001-2017
- [9] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57:761-780
- [10] Koes R, Quattrocchio F, Mol J N. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 1994, 16:123-132
- [11] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 2005, 7:581-591
- [12] Irwin R E, Strauss S Y, Storz S, Emerson A, Guibert G. The role of herbivores in the maintenance of a flower color polymorphism in wild radish. *Ecology*, 2003, 84:1733-1743
- [13] Simms E L, Bucher M A. Pleiotropic effects of flower-color intensity on herbivore performance on *Ipomoea purpurea*. *Evolution*, 1996, 50(2):957-963
- [14] Reverté S, Retana J, Gómez J M, Bosch J. Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of Botany*, 2016, 118:249-257
- [15] Shen Y, Rao Y, Ma M, Li Y, He Y, Wang Z, Liang M, Ning G. Coordination among flower pigments, scents and pollinators in ornamental plants. *Horticulture Advances*, 2024, 2:6
- [16] Xu P, Hu T, Yang Y, Wu X, Wang B, Liu Y. Mapping genes governing flower and seedcoat color in Asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) based on single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat markers. *Hortscience*, 2011, 46:1102-1104
- [17] Sangwan R, Lodhi G. Inheritance of flower and pod color in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica*, 1998, 102:191-193
- [18] Jindla L N, Singh K B. Inheritance of flower colour, leaf shape and pod length in cowpea (*Vigna sinensis* L.). *Indian Journal of Heredity*, 1970, 45-49
- [19] Padi F K. Genetic analyses of pigmentation in cowpea. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2003, 6:1655-1659
- [20] Lo S, Fatokun C, Boukar O, Gepts P, Muñoz-Amatriaín M. Identification of QTL for perenniality and floral scent in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *PLOS ONE*, 2020, 15:e0229167
- [21] Nishihara M, Higuchi A, Watanabe A, Tasaki K. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*, 2018, 18:331
- [22] Watanabe S, Xia Z, Hideshima R, Tsubokura Y, Sato S, Yamanaka N. A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics*, 2011, 188:395-407
- [23] Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant Journal*, 2013, 74(1):174-183
- [24] Magwene P M, Willis J H, Kelly J K. The statistics of bulk segregant analysis using next generation sequencing. *PLOS Computational Biology*, 2011, 7:e1002255

- [25] 黄婉婷,王茜,张泽燕,朱慧珺,闫虎斌,张耀文.基于 BSA-seq 技术定位绿豆种皮颜色基因.植物遗传资源学报, 2023,24(03):790-800
Huang W T, Wang X, Zhang Z Y, Zhu H J, Yan H B, Zhang Y W. Localisation of mung bean seed coat colour genes based on BSA-seq technology. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(03):790-800
- [26] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Satoshi N, Hiroki T, Hiroyuki K. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. Nature Biotechnology, 2012, 30:174-178
- [27] Song J, Li Z, Liu Z, Guo Y, Qiu L. Next-generation sequencing from bulked-segregant analysis accelerates the simultaneous identification of two qualitative genes in soybean. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:919
- [28] Zhang C, Badri A M, Win K T, Begum S, Lee S. QTL-seq analysis of powdery mildew resistance in a Korean cucumber inbred line. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134(2):435-451
- [29] 席甜甜,吴倩,杨建光,马新,陈彦竹,李煜,王军卫,马守才.337 份小麦品种籽粒相关性状的全基因组关联分析.麦类作物学报, 2024,44(05):547-558
Xi T T, Wu Q, Yang J G, Ma X, Chen Y Z, Li Y, Wang J W, Ma S C. Genome-wide association analysis of 337 wheat varieties for grain-related traits. Journal of Wheat Crops, 2024, 44(05):547-558
- [30] 刘阳,杜怀东,孙志勇,于雪然,李培富.水稻籽粒锌含量全基因组关联分析及候选基因筛选.植物遗传资源学报, 2024,25(09):1516-1523
Liu Y, Du H D, Sun Z Y, Yu X R, Li P F. Genome-wide association analysis and screening of candidate genes for zinc content in rice seeds. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(09):1516-1523
- [31] 董舒超,洪骏,凌嘉怡,谢紫欣,张胜军,赵丽萍,宋刘霞,王银磊,赵统敏.番茄抗旱性的全基因组关联分析.园艺学报, 2024,51(02):229-238
Dong S C, Hong J, Ling J Y, Xie Z X, Zhang S J, Zhao L P, Song L X, Wang Y L, Zhao T M. Genome-wide association analysis of drought resistance in tomato. Journal of Horticulture, 2024, 51(02):229-238
- [32] 李岩哲,熊雅文,许亚男,唐威,张红梅,张威,刘晓庆,王琼,许文静,张群,陈华涛.大豆低聚糖优异种质鉴定及 GWAS 分析.植物遗传资源学报, 2023,24(03):780-789
Li Y Z, Xiong Y W, Xu Y N, Tang W, Zhang H M, Zhang W, Liu X Q, Wang Q, Xu W J, Zhang Q, Chen H T. Identification of excellent germplasm of soybean oligosaccharides and GWAS analysis. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(03):780-789
- [33] Xu P, Wu X, Muñoz-Amatriaín M, Wang B, Wu X, Hu Y, Huynh B L, Close T J, Roberts P A, Zhou W, Lu Z, Li G. Genomic regions, cellular components and gene regulatory basis underlying pod length variations in cowpea (*V. unguiculata* L. Walp). Plant biotechnology journal, 2017, 15(5):547-557
- [34] Pan L, Liu M H, Kang Y, Mei X, Hu G G, Bao C, Zheng Y, Zhao H X, Chen C Y, Wang N. Comprehensive genomic analyses of *Vigna unguiculata* provide insights into population differentiation and the genetic basis of key agricultural traits. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21:1426-1439
- [35] Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12:13-15
- [36] Mckenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kerytsky A. The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next generation DNA sequencing data. Genome Research, 2010, 20:1297-1303
- [37] Singh V K, Khan A W, Saxena R K, Sinha P, Kale S M, Parupalli S. Indel-seq: a fast-forward genetics approach for identification of trait-associated putative candidate genomic regions and its application in pigeonpea (*Cajanus cajan*). Plant Biotechnology Journal, 2017, 15:906-914
- [38] Zhou X, Stephens M. Efficient multivariate linear mixed model algorithms for genome-wide association studies. Nature Methods, 2014, 11:407-409
- [39] Villet G R, Carmo L S, Silva L P, Fontes W, Grynberg P, Saraiva M, Brasileiro A C, Carneiro R M, Oliveira J T, Grossi-de-Sá M F, Mehta A. Cowpea-Meloidogyne incognita interaction: Root proteomic analysis during early stages of nematode infection. Proteomics, 2015, 15(10):1746-1759
- [40] Muñoz-Amatriaín M, Mirebrahim H, Xu P, Wanamaker S, Luo M, Alhakami H. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. Plant Journal, 2017, 89(5):1042-1054
- [41] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. Plant Journal, 2008, 53(5): 814-827
- [42] 严昕,项超,刘荣,李冠,李孟伟,李正丽,宗绪晓,杨涛.基于 BSA-seq 技术对豌豆花色基因的精细定位.作物学报, 2023,49(04):1006-1015
Yan X, Xiang C, Liu R, Li G, Li M W, Li Z L, Yang T. Fine mapping of flower colour gene in pea (*Pisum sativum* L.) based on BSA-seq technique. Journal of Crops, 2023, 49(04):1006-1015
- [43] 袁翠平,孙国金,齐广勋,刘晓冬,董岭超,王玉民,王英男,赵洪锬,杨佳慧,董英山.基于 BSA-seq 定位野生大豆籽粒蛋白含量 QTL.中国油料作物学报, 2024, 1-8
Yuan C P, Sun G J, Qi G X, Liu X D, Dong L C, Wang Y M, Wang Y N, Zhao H K, Yang J H, Dong Y S. QTL mapping of seed protein content in wild

soybean based on BSA-seq. Chinese Journal of Oil Crop Sciences. 2024, 1-8

- [44] 李文佳,廖泳俊,黄璐,鲁清,李少雄,陈小平,金晶炜,王润风.花生开花时间的全基因组关联分析及候选基因筛选.作物学报, 2024, 1-20
Li W J, Liao Y J, Huang L, Lu Q, Li S X, Chen X P, Jin J W, Wang R F. Genome-wide associate analysis of flowering traits and identification of candidate genes in peanut. Journal of Crops, 2024, 1-20
- [45] Lo S, Maria M, Boukar O, Herniter I, Close T J. Identification of QTL controlling domestication-related traits in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Scientific Reports, 2018, 8:6261
- [46] Qin L M, Sun L, Wei L, Yuan J R, Kong F F, Zhang Y, Miao X, Xia G M, Liu S W. Maize SRO1c represses anthocyanin synthesis through regulating the MBW complex in response to abiotic stress. Plant Journal, 2021, 105:1010–1025
- [47] Albert N W, Lewis D H, Zhang H, Schwinn K E, Jameson P E, Davies K M. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in Petunia are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. Plant Journal, 2011, 65:771–784
- [48] He F, Mu L, Yan G L, Liang N N, Pan Q H, Wang J, Reeves M J, Duan C Q. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. Molecules, 2010, 15:9057–9091
- [49] Allen P J, Napoli R S, Parish R W, Li S F. MYB-bHLH-TTG1 in a Multi-tiered Pathway Regulates Arabidopsis Seed Coat Mucilage Biosynthesis Genes Including PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR14 Required for Homogalacturonan Demethylesterification. Plant cell physiology, 2023, 64(8):906-919
- [50] Liu K G, Qi S H, Li D, Jin C Y, Gao C H, Duan S W, Feng B L, Chen M X. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 ubiquitously regulates plant growth and development from Arabidopsis to foxtail millet (*Setaria italica*). Plant Science, 2017, 254:60-69
- [51] Yun L, John S. Novel *TTG1* Mutants Modify Root-Hair Pattern Formation in *Arabidopsis*. Frontiers in plant science, 2020, 11:383
- [52] Tian H N, Wang S C. TRANSPARENT TESTA GLABRA1, a Key Regulator in Plants with Multiple Roles and Multiple Function Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(14):4881
- [53] Zhao W J, Li X J, Wen J Q, Li Q H, Bian S L, Ren Y J. *BrTTG1* regulates seed coat proanthocyanidin formation through a direct interaction with structural gene promoters of flavonoid pathway and glutathione S-transferases in *Brassica rapa* L. Frontiers in Plant Science, 2024, 15:1372477
- [54] Simiyu D C, Bayaraa U, Jang J H, Lee O R. The R2R3-MYB transcription factor PgTT2 from Panax ginseng interacts with the WD40-repeat protein PgTTG1 during the regulation of proanthocyanidin biosynthesis and the response to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 214:108877
- [55] Yang S Y, Wang Y, Wang W X, Wang N, Yan R, Li S Y, Zhang T L, Liu J L, Zeng X F, Zhao S N, Zhang X M, Dong Q L, Luan H A, Guo S P, Qi G H, Jia P. Analysis of WD40 genes in kiwifruit reveals the key role of the light-induced AcTTG1-AcMYB75-AcbHLH2 complex in anthocyanin accumulation. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 12:139758
- [56] Qi M X, Tian X Y, Chen Y Q, Lu Y K, Zhang Y P. WD40 proteins PaTTG1 interact with both bHLH and MYB to regulate trichome formation and anthocyanin biosynthesis in *Platanus acerifolia*. Plant Science, 2025, 352:112385
- [57] Wei Z L, Cheng Y L, Zhou C C, Li D, Gao X, Zhang S X, Chen M X. Genome-wide identification of direct targets of the TTG1-bHLH-MYB complex in regulating trichome formation and flavonoid accumulation in *Arabidopsis Thaliana*. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20):5014

附表 1 重组自交系群体 (303 个株系) 的花色

Supplementary table 1 Flower color of the RIL population(303 lines)

编号 Code	旗瓣颜色 standard petal color								
AF6-1-1	白色	AF6-14-3	白色	AF6-29-2	紫色	AF6-44-1	紫色	AF6-59-2	紫色
AF6-1-2	紫色	AF6-15-1	紫色	AF6-29-3	紫色	AF6-44-2	白色	AF6-59-3	紫色
AF6-1-3	紫色	AF6-15-2	紫色	AF6-29-4	紫色	AF6-44-3	紫色	AF6-60-1	紫色
AF6-2-1	紫色	AF6-16-1	紫色	AF6-30-3	紫色	AF6-45-1	白色	AF6-60-2	紫色
AF6-2-2	白色	AF6-16-2	紫色	AF6-31-1	紫色	AF6-45-2	紫色	AF6-60-3	紫色
AF6-2-3	紫色	AF6-16-3	紫色	AF6-31-2	紫色	AF6-45-3	白色	AF6-61-2	紫色
AF6-3-1	紫色	AF6-17-1	紫色	AF6-31-3	紫色	AF6-46-2	白色	AF6-61-3	紫色
AF6-3-2	紫色	AF6-17-2	紫色	AF6-31-4	紫色	AF6-46-3	紫色	AF6-62-2	紫色
AF6-3-3	紫色	AF6-17-3	白色	AF6-32-1	紫色	AF6-47-1	紫色	AF6-63-1	紫色
AF6-3-4	紫色	AF6-18-1	紫色	AF6-32-2	紫色	AF6-47-3	白色	AF6-63-2	紫色
AF6-4-1	紫色	AF6-18-2	紫色	AF6-32-3	紫色	AF6-48-1	紫色	AF6-63-3	紫色
AF6-4-2	紫色	AF6-18-3	紫色	AF6-33-1	紫色	AF6-48-2	紫色	AF6-64-1	紫色
AF6-4-3	紫色	AF6-19-1	白色	AF6-33-2	紫色	AF6-48-3	白色	AF6-64-2	紫色
AF6-4-4	紫色	AF6-19-3	紫色	AF6-33-3	紫色	AF6-49-1	紫色	AF6-64-3	紫色
AF6-5-1	白色	AF6-20-1	紫色	AF6-34-1	白色	AF6-49-3	紫色	AF6-65-1	白色
AF6-5-2	紫色	AF6-20-2	紫色	AF6-34-2	紫色	AF6-50-1	紫色	AF6-65-2	白色
AF6-5-3	紫色	AF6-20-3	紫色	AF6-35-1	白色	AF6-50-2	紫色	AF6-66-2	紫色
AF6-6-1	紫色	AF6-21-1	白色	AF6-35-2	紫色	AF6-50-3	紫色	AF6-67-1	白色
AF6-6-3	白色	AF6-21-2	白色	AF6-35-3	紫色	AF6-51-2	白色	AF6-67-2	紫色
AF6-6-4	紫色	AF6-21-3	白色	AF6-35-4	白色	AF6-51-3	白色	AF6-68-1	紫色
AF6-7-3	白色	AF6-22-3	紫色	AF6-36-1	紫色	AF6-52-1	紫色	AF6-68-2	紫色
AF6-8-1	白色	AF6-23-1	白色	AF6-36-3	紫色	AF6-52-2	紫色	AF6-68-3	白色
AF6-8-2	紫色	AF6-23-2	紫色	AF6-36-4	紫色	AF6-52-3	紫色	AF6-69-1	紫色
AF6-8-3	紫色	AF6-24-2	紫色	AF6-37-1	紫色	AF6-53-1	紫色	AF6-69-2	白色
AF6-8-4	白色	AF6-24-3	紫色	AF6-37-3	紫色	AF6-53-2	紫色	AF6-69-3	白色
AF6-9-1	紫色	AF6-24-4	紫色	AF6-38-1	紫色	AF6-54-1	白色	AF6-70-1	白色
AF6-9-2	紫色	AF6-25-1	紫色	AF6-38-2	紫色	AF6-54-2	白色	AF6-70-2	白色
AF6-9-3	白色	AF6-25-2	白色	AF6-38-3	白色	AF6-55-1	紫色	AF6-70-4	紫色
AF6-10-2	紫色	AF6-25-3	紫色	AF6-38-4	白色	AF6-55-2	白色	AF6-71-1	紫色
AF6-10-3	白色	AF6-25-4	紫色	AF6-39-1	紫色	AF6-56-1	紫色	AF6-71-3	紫色
AF6-11-1	白色	AF6-26-1	紫色	AF6-39-3	紫色	AF6-56-2	紫色	AF6-72-1	白色
AF6-11-2	紫色	AF6-26-2	紫色	AF6-40-1	白色	AF6-56-3	紫色	AF6-72-3	紫色
AF6-11-3	紫色	AF6-26-3	紫色	AF6-40-3	紫色	AF6-57-1	紫色	AF6-73-1	紫色
AF6-12-1	紫色	AF6-27-1	紫色	AF6-40-4	白色	AF6-57-2	紫色	AF6-73-2	紫色
AF6-12-2	紫色	AF6-27-2	紫色	AF6-41-1	紫色	AF6-58-1	紫色	AF6-74-1	紫色
AF6-12-3	紫色	AF6-28-1	紫色	AF6-41-2	紫色	AF6-58-2	紫色	AF6-74-2	紫色
AF6-13-1	白色	AF6-28-2	紫色	AF6-41-3	紫色	AF6-58-3	紫色	AF6-75-1	紫色
AF6-14-1	紫色	AF6-28-3	白色	AF6-42-1	紫色	AF6-58-4	紫色	AF6-75-2	白色
AF6-14-2	紫色	AF6-29-1	紫色	AF6-43-3	紫色	AF6-59-1	紫色	AF6-75-3	紫色

AF6-76-1	紫色	AF6-84-2	白色	AF6-93-4	紫色	AF6-104-4	紫色	AF6-114-2	紫色
AF6-76-2	紫色	AF6-85-1	白色	AF6-94-2	紫色	AF6-105-1	紫色	AF6-114-3	紫色
(绿莢)									
AF6-76-3	紫色	AF6-85-2	紫色	AF6-94-3	紫色	AF6-105-2	白色	AF6-115-1	紫色
AF6-77-1	紫色	AF6-85-3	白色	AF6-95-1	紫色	AF6-107-1	紫色	AF6-115-2	白色
AF6-77-2	紫色	AF6-86-1	白色	AF6-96-1	紫色	AF6-108-1	紫色	AF6-115-3	紫色
AF6-77-3	紫色	AF6-86-2	紫色	AF6-96-2	紫色	AF6-108-2	紫色	AF6-116-1	紫色
AF6-78-2	紫色	AF6-87-2	紫色	AF6-96-3	紫色	AF6-108-3	紫色	AF6-116-2	白色
AF6-78-3	紫色	AF6-87-3	紫色	AF6-96-4	紫色	AF6-109-1	白色	AF6-116-3	紫色
AF6-79-1	紫色	AF6-88-1	紫色	AF6-97-1	白色	AF6-109-2	紫色	AF6-117-1	紫色
AF6-79-2	紫色	AF6-88-2	紫色	AF6-97-2	白色	AF6-109-3	紫色	AF6-117-2	白色
AF6-79-3	紫色	AF6-88-3	紫色	AF6-97-3	紫色	AF6-110-1	白色	AF6-118-1	白色
AF6-80-1	紫色	AF6-89-2	紫色	AF6-98-2	白色	AF6-110-2	白色	AF6-118-2	白色
AF6-80-2	紫色	AF6-90-1	白色	AF6-98-3	紫色	AF6-110-3	白色	AF6-119-1	紫色
AF6-80-3	紫色	AF6-90-2	白色	AF6-99-1	紫色	AF6-110-4	紫色	AF6-119-2	紫色
AF6-81-1	紫色	AF6-91-1	紫色	AF6-99-2	白色	AF6-111-1	白色	AF6-119-3	紫色
AF6-81-2	紫色	AF6-91-2	白色	AF6-100-1	紫色	AF6-112-1	紫色	AF6-121-1	白色
AF6-81-3	紫色	AF6-91-3	白色	AF6-100-2	紫色	AF6-112-2	紫色	AF6-121-2	白色
AF6-82-1	紫色	AF6-92-1	紫色	AF6-101-1	紫色	AF6-112-3	紫色	AF6-121-3	紫色
		(绿莢)							
AF6-82-3	紫色	AF6-92-1	紫色	AF6-101-2	白色	AF6-113-1	紫色	AF6-122-1	紫色
		(白菜)							
AF6-83-1	紫色	AF6-93-1	白色	AF6-102-1	紫色	AF6-113-2	紫色	AF6-122-2	紫色
AF6-83-2	紫色	AF6-93-2	紫色	AF6-103-2	紫色	AF6-113-3	紫色		
AF6-84-1	紫色	AF6-93-3	紫色	AF6-104-3	紫色	AF6-114-1	白色		

附表 2 271 份豇豆样本花色

Supplementary table 2 Flower color of the 271 *V. unguiculata* samples

编号 Code	2021 年春季花色 Flower color in spring 2021	2021 年秋季花色 Flower color in autumn 2021	编号 Code	2021 年春季花色 Flower color in spring 2021	2021 年秋季花色 Flower color in autumn 2021	编号 Code	2021 年春季花色 Flower color in spring 2021	2021 年秋季花色 Flower color in autumn 2021
JD-0001	紫色	紫色	JD-0055	紫色	紫色	JD-0122	紫色	紫色
JD-0002	紫色	紫色	JD-0056	紫色	紫色	JD-0124	紫色	紫色
JD-0003	紫色	紫色	JD-0057	白色	淡紫	JD-0125	紫色	紫色
JD-0004	紫色	紫色	JD-0058	紫色	紫色	JD-0126	紫色	紫色
JD-0005	白色	白色	JD-0060	紫色	紫色	JD-0127	紫色	紫色
JD-0006	紫色	紫色	JD-0061	白色	白色	JD-0128	紫色	紫色
JD-0007	紫色	紫色	JD-0062	紫色	紫色	JD-0129	紫色	紫色
JD-0008	紫色	紫色	JD-0063	紫色	紫色	JD-0130	白色	白色
JD-0009	紫色	紫色	JD-0064	紫色	紫色	JD-0131	白色	白色
JD-0010	紫色	紫色	JD-0065	紫色	紫色	JD-0132	紫色	紫色
JD-0013	白色	白色	JD-0066	淡紫	淡紫	JD-0133	紫色	紫色
JD-0014	紫色	紫色	JD-0067	紫色	紫色	JD-0134	紫色	紫色
JD-0015	白色	白色	JD-0070	紫色	紫色	JD-0137	紫色	淡紫
JD-0017	紫色	紫色	JD-0071	紫色	紫色	JD-0138	紫色	紫色
JD-0018	紫色	紫色	JD-0074	紫色	紫色	JD-0140	紫色	紫色
JD-0019	白色	白色	JD-0075	紫色	紫色	JD-0141	紫色	紫色
JD-0020	紫色	紫色	JD-0076	紫色	紫色	JD-0143	紫色	紫色
JD-0021	紫色	紫色	JD-0077	紫色	紫色	JD-0144	紫色	紫色
JD-0023	紫色	紫色	JD-0086	紫色	紫色	JD-0145	紫色	紫色
JD-0025	紫色	紫色	JD-0090	紫色	紫色	JD-0148	紫色	紫色
JD-0026	紫色	紫色	JD-0092	紫色	紫色	JD-0150	白色	白色
JD-0027	紫色	紫色	JD-0093	紫色	紫色	JD-0151	紫色	紫色
JD-0028	白色	白色	JD-0094	紫色	紫色	JD-0152	紫色	紫色
JD-0031	淡紫	淡紫	JD-0095	紫色	紫色	JD-0153	紫色	紫色
JD-0032	紫色	紫色	JD-0096	紫色	紫色	JD-0154	紫色	紫色
JD-0034	紫色	紫色	JD-0098	白色	紫色	JD-0155	紫色	紫色
JD-0037	紫色	紫色	JD-0099	紫色	紫色	JD-0156	紫色	紫色
JD-0039	紫色	紫色	JD-0100	白色	白色	JD-0157	紫色	紫色
JD-0041	紫色	紫色	JD-0101	紫色	紫色	JD-0159	紫色	紫色
JD-0042	紫色	紫色	JD-0102	紫色	紫色	JD-0163	紫色	紫色
JD-0043	紫色	紫色	JD-0103	紫色	紫色	JD-0164	紫色	紫色
JD-0044	紫色	紫色	JD-0104	紫色	紫色	JD-0165	紫色	紫色
JD-0045	紫色	紫色	JD-0105	紫色	紫色	JD-0167	紫色	紫色
JD-0048	白色	白色	JD-0110	紫色	紫色	JD-0169	紫色	紫色
JD-0049	白色	白色	JD-0111	紫色	紫色	JD-0170	紫色	紫色
JD-0050	紫色	紫色	JD-0112	紫色	紫色	JD-0176	紫色	紫色
JD-0052	紫色	紫色	JD-0114	紫色	紫色	JD-0177	紫色	紫色
JD-0053	白色	淡紫	JD-0115	紫色	紫色	JD-0179	紫色	紫色
JD-0054	紫色	紫色	JD-0117	紫色	紫色	JD-0180	紫色	紫色

JD-0181	紫色		JD-0261	紫色	紫色	JD-0566	紫色	紫色
JD-0187	白色	白色	JD-0263	紫色	紫色	JD-0567	紫色	紫色
JD-0189	白色		JD-0265	紫色	紫色	JD-0569	白色	白色
JD-0193	白色	白色	JD-0268	紫色	紫色	JD-0570	紫色	紫色
JD-0194	紫色	紫色	JD-0270	紫色	紫色	JD-0571	紫色	紫色
JD-0195	紫色	紫色	JD-0272	紫色	紫色	JD-0572	紫色	紫色
JD-0196	白色	白色	JD-0273	紫色	紫色	JD-0575	紫色	紫色
JD-0197	紫色	紫色	JD-0274	紫色	紫色	JD-0577	紫色	紫色
JD-0200	紫色	紫色	JD-0275	紫色	淡紫	JD-0579	淡紫	淡紫
JD-0201	紫色	紫色	JD-0279	紫色	紫色	JD-0580	淡紫	淡紫
JD-0206	紫色	紫色	JD-0280	紫色	紫色	JD-0582	紫色	紫色
JD-0211	白色	白色	JD-0282	紫色	紫色	JD-0586	白色	白色
JD-0212	白色	白色	JD-0283	紫色	紫色	JD-0587	白色	白色
JD-0213	紫色	紫色	JD-0285	紫色	紫色	JD-0715	紫色	紫色
JD-0215	紫色	紫色	JD-0286	紫色	紫色	JD-0716	紫色	紫色
JD-0216	紫色	紫色	JD-0287	紫色	紫色	JD-0726	紫色	紫色
JD-0218	紫色	紫色	JD-0288	紫色	紫色	JD-0727	紫色	紫色
JD-0219	紫色	紫色	JD-0289	紫色	紫色	JD-0728	白色	白色
JD-0220	紫色	深紫	JD-0290	紫色	紫色	JD-0730	白色	白色
JD-0222	紫色	淡紫	JD-0291	紫色	紫色	JD-0731	紫色	紫色
JD-0223	紫色	紫色	JD-0292	紫色	紫色	JD-0804	紫色	紫色
JD-0224	紫色	深紫	JD-0296	淡紫	淡紫	JD-0805	紫色	紫色
JD-0225		紫色	JD-0302	紫色	紫色	JD-0806	紫色	紫色
JD-0227	紫色	紫色	JD-0303	紫色		JD-0807		紫色
JD-0228	紫色	紫色	JD-0307	紫色	紫色	JD-0808	紫色	淡紫
JD-0229	紫色	紫色	JD-0308	紫色	紫色	JD-0809	淡紫	淡紫
JD-0232	紫色	紫色	JD-0310	白色	白色	JD-0810	紫色	紫色
JD-0233	紫色	紫色	JD-0311	紫色	紫色	JD-0811	紫色	紫色
JD-0234	紫色	紫色	JD-0312	紫色	紫色	JD-0812	紫色	紫色
JD-0235	紫色	紫色	JD-0426	紫色	紫色	JD-0813	紫色	紫色
JD-0236	紫色	紫色	JD-0437		紫色	JD-0814	紫色	紫色
JD-0238	紫色	紫色	JD-0438		紫色	JD-0815	紫色	紫色
JD-0243	紫色	紫色	JD-0450		紫色	JD-0817	紫色	紫色
JD-0245	紫色	紫色	JD-0455	紫色	紫色	JD-0818	紫色	紫色
JD-0246	紫色	紫色	JD-0475		紫色	JD-0819	紫色	紫色
JD-0247	紫色	紫色	JD-0481		白色	JD-0820	淡紫	淡紫
JD-0249	紫色		JD-0483		白色	JD-0821	紫色	紫色
JD-0258	白色	白色	JD-0522	紫色	紫色	JD-0822	紫色	紫色
JD-0259	紫色	紫色	JD-0524	白色	白色	JD-0823	紫色	紫色
JD-0260	白色	白色	JD-0526	紫色	紫色	JD-0824	紫色	紫色
JD-0825	紫色	紫色	ZYZ-4936	紫色	紫色	ZYZ-4992	紫色	紫色
JD-0827	紫色	紫色	ZYZ-4939	紫色		ZYZ-5486	紫色	紫色
JD-0828	紫色	紫色	ZYZ-4941	紫色	紫色	ZYZ-5490	紫色	紫色
JD-0829	紫色	紫色	ZYZ-4943	紫色	紫色	ZYZ-5491	紫色	紫色

JD-0830	紫色	紫色	ZYZ-4944	紫色	紫色	ZYZ-5493	紫色	紫色
JD-0831	紫色	紫色	ZYZ-4947	紫色	紫色	ZYZ-5498	紫色	紫色
JD-0833	紫色	紫色	ZYZ-4948	紫色	紫色	ZYZ-5499	紫色	紫色
JD-0837	紫色	紫色	ZYZ-4949	白色	白色	EJD14	紫色	紫色
JD-0838	淡紫	淡紫	ZYZ-4950	白色	白色	ZJ19	紫色	紫色
JD-0914	白色	白色	ZYZ-4951	白色	白色	A111G	紫色	紫色
JD-0915	紫色	紫色	ZYZ-4958	紫色	紫色			
ZYZ-49	紫色	紫色	ZYZ-4978	紫色	紫色			
35-1								

附表 3 与花色相关的 scaffold 及其染色体位置

Supplementary table 3 Scaffolds associated with flower color and their chromosomal positions

Scaffold 编号	染色体位置	起始序列(bp)	终止序列(bp)	
Scaffold No.	Chromosome location	Sequence start	Sequence end	
MATU01005718.1	9	30712290	30709256	
	9	30708259	30706589	
	9	30697815	30696179	
	9	30697160	30696181	
	9	30709288	30708524	
	9	30706595	30706137	
	9	30702819	30702458	
	9	30702964	30702612	
MATU01017141.1	9	30067756	30068530	
	9	30072131	30072560	
	9	30072643	30072974	
MATU01020140.1	9	30113110	30111817	
	9	30117245	30116402	
	9	30118082	30117273	
	9	30108776	30108075	
	9	30104698	30104294	
	contig_122	490409	491509	
	contig_122	496490	497272	
	6	23290161	23289142	
MATU01024155.1	1	24509361	24508652	
	1	24502619	24501911	
	1	6059521	6059937	
	1	11396939	11394556	
	MATU01047624.1	9	29879855	29879211
		9	29879221	29878482
9		29878759	29878265	
9		29880135	29879827	
10		14224860	14224466	
MATU01058750.1	9	30029180	30027705	
	9	30032330	30031549	
	9	30019970	30019447	
	9	30024124	30023685	
MATU01064754.1	9	30651314	30650392	
	9	30646114	30645297	
MATU01089932.1	9	28802898	28800697	
	9	28806233	28805454	
MATU01091082.1	9	31038110	31038906	
	9	31038690	31039251	
MATU01095546.1	9	32384177	32378973	

MATU01177909.1	9	8095016	8094532
MATU01223218.1	9	30321942	30325351
