

耿鑫鑫,曾 焕,黄伊雪,等. 甘蓝型油菜主花序有效角果数 QTL 定位和候选基因筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):38-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.010

# 甘蓝型油菜主花序有效角果数 QTL 定位 和候选基因筛选

耿鑫鑫,曾 焕,黄伊雪,徐 飞

(武汉生物工程学院应用生物技术研究中心,湖北武汉 430415)

**摘要:**以 DH-7-9 (角果数多) × DH-G-42 (角果数少) 杂交后代连续自交的重组自交系 (RIL) 的 190 个家系为材料,在西宁和武汉 2 个环境下进行主花序有效角果数性状分析。结果表明,该 RIL 群体的主花序有效角果数表现出连续变异并且符合正态分布。利用已构建的遗传连锁图,结合 2 个年份 2 个环境下主花序有效角果数性状表型数据,采用 WinQTL Cartographer 2.5 软件的复合区间作图法 (composite interval mapping, 简称 CIM) 进行 QTL 定位和效应估计。结果在 2 个环境下共检测到 6 个与主花序有效角果数、性状相关的 QTL, 单个 QTL 可解释的表型变异范围为 7.9% ~ 24.39%。其中 *qESN-W-C5* 的贡献率达到 24.39%, LOD 值为 12.97, 位于 C5 染色体上, 因此视其为该主花序有效角果数性状的主效 QTLs。将拟南芥中已发表的角果数相关的 3 个基因与主效 QTL 置信区间对应的油菜基因组上 104 个基因进行同源比较分析, 结果主效 QTL 区域内 1 个候选基因 *BnaC05g32840D* 与拟南芥角果数基因 *AT3G19820* 具有较高的同源性, 推测其为油菜主花序有效角果数候选基因。

**关键词:**甘蓝型油菜;主花序有效角果数;QTL 定位;候选基因

**中图分类号:** S634.303.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0038-03

油菜是世界上分布最广、种植历史悠久的重要油料作物之一。甘蓝型油菜品质优、产量高,是我国油菜生产上的主要栽培类型<sup>[1]</sup>。菜籽油现在是国产食用植物油的第一大来源,在我国食用油市场中具有举足轻重的地位。目前,国内油料作物仅提供植物油消费总量的 40% 左右,约 60% 需进口,可见我国对国外的依存度越来越高,自给总量上严重不足<sup>[2]</sup>。双低菜籽饼粕每年为畜牧业提供超过 600 万 t 的饲料蛋白<sup>[3]</sup>。加拿大、澳大利亚、韩国、德国、法国、瑞典、奥地利等国确立为优势替代生物质能源(生物柴油)原料作物,其中欧盟目前生产的生物柴油 80% 来自油菜原料(生产的油菜籽 60% 用于生产生物柴油)<sup>[4]</sup>。因此,提高油菜的产量成为了现在油菜育种的重要目标。

高产是作物育种的主要目标,产量性状是由微效多基因控制的数量性状,表现为连续变异,受环境的影响较大<sup>[5-6]</sup>。常规密度种植的油菜产量是由单株有效角果数、每角粒数以及千粒质量所构成,而这 3 个因素间既相互协同又相互制约。单株有效角果数是所有主要农作物产量构成的要素之一,其性状相对稳定。近年来随着农业机械化的发展,已经打破了常规密度人工种植油菜的传统观念,渐渐转向了机械化密植油菜的生产过程。机械化种植的油菜往往是密度高、分枝少,所以密植油菜主要是通过提高群体有效角果数来实现增

产<sup>[7]</sup>。已有研究表明,适当增加密度可使主序在产量中的比例增加,在 75 万株/hm<sup>2</sup> 时主序产量占单株产量的 73.05%<sup>[8]</sup>。而且油菜主序的 2 个主要性状主花序长度和主花序有效角果数一直以来都是影响单株产量的主要因素<sup>[9]</sup>。

综上所述,单株主花序有效角果数是影响油菜产量的重要因素。然而,目前为止,关于单株角果数数量性状基因座 (quantitative trait locus, 简称 QTL) 等方面的研究却严重不足。张书芬等在双低油菜细胞质雄性不育保持系 1141B 和双高恢复系垦 C1 构建的 F<sub>2</sub> 作图群体中检测出的 3 个单株角果数 QTLs *nsp4*、*nsp12* 和 *nsp2* 分别位于第 4、第 12 和第 2 连锁群上,分别解释变异方差的 28.22%、11.97% 和 7.73%<sup>[5]</sup>。易斌等利用中油 821 和保 604 为亲本材料,在相应 DH 系群体中将 1 个单株角果数 QTL 定位在第 4 连锁群上,可解释 17.42% 的表型变异<sup>[10]</sup>。孙美玉等以 ZY036 × 51070 杂交构建的双单倍体 (DH) 为材料,在武汉、阳逻、青海和襄阳 3 年 4 点 5 个试验点共检测到 10 个与主花序有效角果数相关的 QTLs, 表型变异是 9.33% ~ 31.60%, 在染色体 A1、A5、C1 和 C9 上的 4 个 QTLs 都可以在 2 个不同的试验中重复检测到<sup>[11]</sup>。目前有关油菜单株角果数的研究基本停留在 QTL 定位分析水平,由于甘蓝型油菜基因组 (AACC, 异源四倍体) 的复杂性,单株角果数相关基因的克隆与功能研究成果数量甚少。

本研究以甘蓝型油菜重组自交系 (recombinant inbred lines, 简称 RIL) 为材料,对油菜主花序有效角果数性状进行 QTL 定位。根据 QTL 置信区间对应的甘蓝型油菜基因组序列,找出该区间的全部基因,与拟南芥角果数相关基因进行同源比对并筛选候选基因。随着白菜、甘蓝及甘蓝型油菜全基因组序列陆续组装完成<sup>[12]</sup>,后续精细定位和图位克隆相关基因及有关产量调控的分子机制研究必将达到一个全新的水平。

收稿日期:2017-12-04

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划指导性项目(编号: B2017292)。

作者简介:耿鑫鑫(1985—),女,湖北十堰人,博士,讲师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:creamxinlin111@sina.com。

通信作者:徐 飞,博士,副教授,主要从事植物抗逆分子育种研究。E-mail:feixu666@hotmail.com。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以甘蓝型油菜品种 DH-7-9(主花序有效角果数多年多点至少 80 个)和 DH-G-42(主花序有效角果数为多年多点至多 58 个)为材料进行杂交得到 F<sub>1</sub> 植株,构建了包含 190 个株系的重组自交系群体。本试验利用该群体进行田间试验、主花序有效角果数性状统计和 QTL 分析。

### 1.2 田间试验与主花序有效角果数性状考察

将重组自交系群体于 2013 年 9 月种植于中国农业科学院油料作物研究所武汉市武昌区试验田,2013 年 5 月及 2014 年 5 月种植于青海省西宁市青海大学油菜繁育中心试验田。所有田间试验均按 3 个重复分区种植,每小区 3 行,行距 40 cm,株距 20 cm。按常规生产方式进行田间管理。2014 年 4 月(武汉)、2013 年 10 月(西宁)和 2014 年 10 月(西宁)收获时期从每个小区内随机选取 5~10 株,用于主花序有效角果数性状的测定(每 1 株油菜植株主花序上能够结 1 粒及以上饱满种子的角果数)。

### 1.3 主花序有效角果数的 QTL 定位

在利用 F<sub>2</sub> 代群体已构建好的遗传连锁图谱<sup>[6]</sup>的基础上,进行主花序有效角果数 QTL 定位。该连锁图包含 228 个标记,20 个连锁群,图谱总长为 1 546.6 cM。用 WinQTL Cartographer 2.5 软件,采用复合区间作图(CIM)的方法<sup>[13-14]</sup>定位该重组自交系群体的主花序有效角果数 QTL。选取 1 cM 的步长,在  $\alpha=0.05$  的水平上,利用 Permutation 检验法重复检验 1 000 次。将 LOD 阈值设定为 2.5 来确定 QTL 在染色体上的位置及数目。QTL 命名参照 McCouch 等文献报道的相关规则<sup>[15]</sup>,用 SPSS 16.0 软件(SPSS, Chicago, IL, USA)统计分析表型数据。

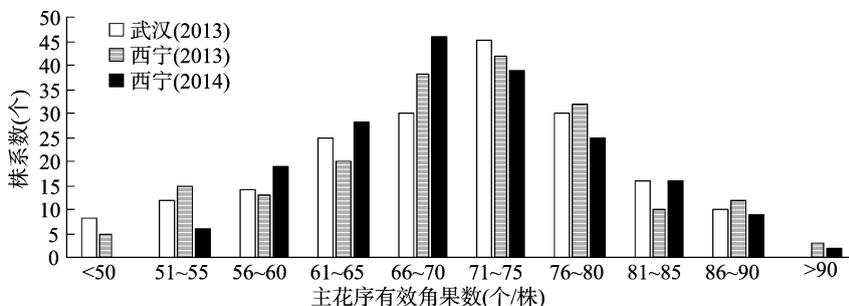


图1 RIL 群体的主花序有效角果数在不同环境(西宁、武汉)不同时间(2013年、2014年)的表型变异

### 2.2 主花序有效角果数性状 QTL 定位

通过 QTL Cartographer 2.5 复合区间作图法进行 QTL 分析,在武汉和西宁 2 个环境下共检测到 6 个 QTLs 与油菜主花序有效角果数性状相关,分别位于 A4、A5、A9、C1、C5 以及 C8 染色体上(表 2),分别命名为 *qESN-W-A4*、*qESN-W-A5*、*qESN-W-C1*、*qESN-W-C5*、*qESN-X-A9* 和 *qESN-X-C8*。3 个 QTLs(分别为 *qESN-W-A5*、*qESN-W-C5* 和 *qESN-X-C8*)的贡献率都大于 10%,其中 *qESN-W-C5* 的贡献率达到 24.39%,LOD 值为 12.97,因此视其为该主花序有效角果数性状的主效 QTL(图 2)。

### 2.3 候选基因筛选

通过生物信息学分析,将该主效 QTL 置信区间(约

### 1.4 候选基因筛选

通过对 TAIR 网站(<http://www.arabidopsis.org/>)以及已发表的文章<sup>[16]</sup>中拟南芥相关基因功能信息进行分析共获得了 3 个角果数相关基因。在 NCBI 上将此 3 个拟南芥角果数相关基因序列进行下载,然后与检测到的主效 QTL 置信区间对应的甘蓝型油菜基因组序列<sup>[12]</sup>进行 BlastN 比对,并进行候选基因的筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 双亲和 RIL 群体主花序有效角果数的表型统计及与其他农艺性状的相关性

对双亲和 RIL 群体主花序有效角果数表型进行统计,结果表明,DH-G-42-8 和 DH-7-9-6 主花序有效角果数差异很大,并且两亲本间具有极显著性差异(表 1)。统计分析表明,主花序有效角果数在重组自交系群体中呈现超双亲分离和连续性分布并且符合正态分布(图 1),说明主花序有效角果数是由多个基因控制的数量性状,适合于 QTL 分析。

表 1 亲本 DH-G-42-8 和 DH-7-9-6 主花序有效角果数性状差异平均值

品种	主花序有效角果数(个/株)
DH-G-42-8 <sup>(X)</sup>	53.42 ± 2.68A
DH-G-42-8 <sup>(Y)</sup>	56.85 ± 1.34A
DH-G-42-8 <sup>(Z)</sup>	54.78 ± 2.74A
DH-7-9-6 <sup>(X)</sup>	80.29 ± 6.33B
DH-7-9-6 <sup>(Y)</sup>	82.66 ± 5.76B
DH-7-9-6 <sup>(Z)</sup>	83.45 ± 3.99B

注:(X)表示 2013 年 10 月在西宁环境下统计的结果;(Y)表示 2014 年 10 月在西宁环境下统计的结果;(Z)表示 2014 年 4 月在武汉环境下统计的结果。同列不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

0.94 Mb)与甘蓝型油菜基因组序列比对,得到共 104 个注释基因。将这些基因与已知的拟南芥 3 个角果数相关基因(*AT1G68725*、*AT2G33150* 和 *AT3G19820*)进行同源比对,结果发现主效 QTL 置信区间内有 1 个基因(*BnaC05g32840D*)与拟南芥角果数基因具有很高的同源性(88.8%)。拟南芥同源角果数基因为 *AT3G19820*,编码 *DWF1/DIM*,在油菜素类固醇(BR)的生物合成中催化早期 BR 前体 24-亚基的合成。油菜素类固醇会影响细胞的伸长,其突变体具有矮化表型,而 *DWF1* 是 1 个 Ca<sup>2+</sup> 依赖性钙调素结合蛋白。

## 3 讨论与结论

本研究所选用的 2 个亲本材料主花序有效角果数表型存

表2 西宁和武汉环境下主花序有效角果数性状 QTL 分析

QTL	连锁群	位置 (cM)	标记区间	距两侧标记距离 (cM)	置信区间 (cM)	LOD 值	贡献率 (%)
<i>qESN-W-A4</i>	A4	57.51	BRAS061 ~ Me4EM30-4	2.0;0.5	55.5 ~ 58.0	6.03	9.69
<i>qESN-W-A5</i>	A5	2.01	Me7EM28-3 ~ BRAS063	2.0;6.7	0 ~ 8.7	3.53	11.92
<i>qESN-W-C1</i>	C1	43.01	Me4EM19-2 ~ BnGMS299-1	0.4;0.6	42.6 ~ 43.6	10.89	7.90
<i>qESN-W-C5</i>	C5	21.91	Me4EM30-2 ~ Ra12-G12	0.4;2.2	21.5 ~ 24.1	12.97	24.39
<i>qESN-X-A9</i>	A9	45.91	O112-D05-3 ~ Ra14-C12	0.5;2.2	45.4 ~ 48.1	10.12	9.14
<i>qESN-X-C8</i>	C8	79.71	O112-.D05-2 ~ Me4EM33-2	2.0;2.2	77.7 ~ 81.9	12.19	15.99

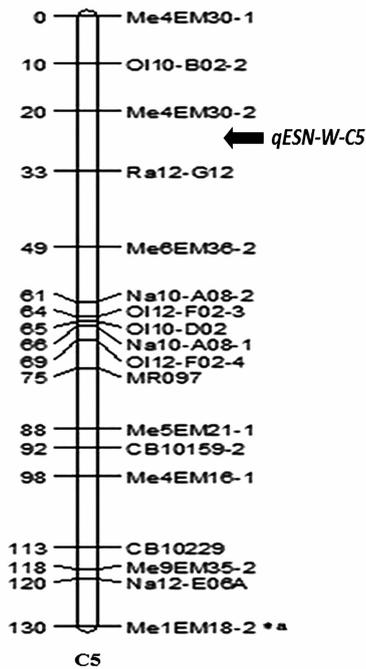


图2 C5 连锁群上主效 QTL 位置

在极显著差异, RIL 群体表型呈现连续分布, 所选用的甘蓝型油菜遗传图谱总长 1 546.6 cM, 标记间的平均图距为 6.78 cM, 图谱质量可靠。因此, 这 2 个亲本材料及图谱适合研究主花序有效角果数相关遗传分析。

在国内外的报道中, 孙美玉等以 ZY036 × 51070 杂交构建的 DH 群体为材料, 3 年 4 点 5 个试验共检测到 10 个与主花序有效角果数相关的 QTLs, 分别位于 A1、A3、A5、C1、C4、C6、C9, 解释性状表型变异是 9.33% ~ 31.60%<sup>[11]</sup>。高必军利用中双 4 号 × H228 构建 RIL 群体, 共检测到主花序有效角果数 5 个 QTLs, 分别位于 A6、C2、C3 连锁群, 解释性状表型变异是 11.2% ~ 25%<sup>[17]</sup>。吴建忠检测到 3 个与主花序有效角果数相关的 QTLs, 分别位于 A8 和 C4 上, 解释性状表型变异 5.07% ~ 9.45%<sup>[18]</sup>。本研究一共检测到 6 个主花序有效角果数 QTLs, 分别位于 A4、A5、A9、C1、C5 和 C8 上, 贡献率在 7.9% ~ 24.39% 之间, LOD 值为 3.53 ~ 12.97。跟前人的研究结果相比, 本研究在 A4、A9、C5 和 C8 新发现了主花序有效角果数 QTLs。一般认为, 贡献率在 10% 以上的 QTL 为主效 QTL, LOD 值越大, QTL 的准确率越高。其中 *qESN-W-C5* 的贡献率达到 24.39%, LOD 值为 12.97, 为所定位的 6 个 QTLs 中的最大值, 因此视其为主花序有效角果数性状的主效 QTL。

QTL 与环境之间存在密切的关系。本研究中共检测到的

6 个 QTLs 是在 2 个年份 2 个环境中检测到的, 并没有可以在 2 年相同环境下同时检测到, 产生这些结果的原因: 一是油菜主花序有效角果数性状在不同环境条件下的不稳定表达; 二是不能重复检测到有可能代表了该环境条件下的特异表达基因; 三是群体中的个体可能受到环境条件的影响程度不一造成的误差。

通过对 QTL 置信区间与基因组序列比对进行候选基因预测, 可以比较简便快速地验证 QTL 定位的准确性。在 C5 染色体上的候选区域与报道的拟南芥角果数相关基因进行比对, 发现了 1 个同源性较高的候选基因 *BnaC05g32840D*, 其编码 *DWF1/DIM*, 在油菜素类固醇 (BR) 的生物合成中催化早期 BR 前体 24-亚基的合成。油菜素类固醇会影响细胞的伸长, 其突变体具有矮化表型, 从而调控植株的有效角果数数量。后续将对该候选基因进行相关功能验证, 并同时利用主花序有效角果数主效 QTL 附近的分子标记逐步构建目的基因的近等基因系, 通过精细定位和图位克隆最终获得控制该性状的主效基因。

#### 参考文献:

- [1] 张亚宏, 雷建明, 张岩, 等. 浅析强冬性甘蓝型油菜的生产与发展潜力[J]. 农业科技通讯, 2010(1): 103-106.
- [2] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 300-302.
- [3] 沈金雄, 傅廷栋, 涂金星, 等. 中国油菜生产及遗传改良潜力与油菜生物柴油发展前景[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 894-899.
- [4] 徐桂转, 张百良. 生物柴油的研究与进展[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(6): 644-650.
- [5] 张书芬, 傅廷栋, 朱家成, 等. 甘蓝型油菜产量及其构成因素的 QTL 定位与分析[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1135-1142.
- [6] 朱恒星, 闫晓红, 方小平, 等. 甘蓝型油菜千粒质量性状的 QTL 初步定位研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 843-850.
- [7] 李孟良. 不同密度对直播油菜生长及产量的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2011, 25(1): 23-26.
- [8] 张宇文, 郭亚茹. 油菜主序优势及其利用初析[J]. 西北植物学报, 1996, 16(6): 126-131.
- [9] 宋稀, 刘凤兰, 郑普英, 等. 高密度种植专用油菜重要农艺性状与产量的关系分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1800-1806.
- [10] 易斌, 陈伟, 马朝芝, 等. 甘蓝型油菜产量及相关性状的 QTL 分析[J]. 作物学报, 2006, 32(5): 676-682.
- [11] 孙美玉, 华玮, 刘静, 等. 甘蓝型油菜主花序有效角果数 QTL 定位[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(1): 1-7.
- [12] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S Y, et al. Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome[J]. Science,

张宁,尹美强,谭青青,等. 苦参转录组 SSR 位点及基因功能注释分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):41-44.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.011

# 苦参转录组 SSR 位点及基因功能注释分析

张宁<sup>1</sup>,尹美强<sup>1</sup>,谭青青<sup>2</sup>,温银元<sup>1</sup>,王玉国<sup>1</sup>,王金荣<sup>1</sup>

(1. 山西农业大学农学院,山西太谷 030801; 2. 西北大学生命科学学院,陕西西安 710069)

**摘要:**分析苦参转录组中的简单重复序列(SSR)位点信息,为开发分子标记奠定基础。利用 Fastqc 软件对苦参转录组测序的原始读长(reads)进行质量评估,再用 Trimmomatic 软件对 reads 质量较差的碱基进行过滤,利用 Trinity 软件对 Trimmomatic 处理后的 reads 进行序列组装,之后使用基因组完整性评估(BUSCO)软件对转录组组装的序列进行质量评估,并分析组装的 contig 序列的开放阅读框(open reading frame,简称 ORF);利用 MicroSatellite(MISA)软件对无冗余独立基因(unigene)进行 SSR 搜索。利用 Trinity 软件最终筛选得到 23074 条 ORF 信息;使用 MISA 软件从 unigenes 序列中发现 8 798 个 SSR 位点,分布于 7 339 条 unigene 中,总体上 unigenes 序列中 SSR 占比为 2.16%,SSR 位点平均间隔是 5.28 bp,其中占比最高的是单核苷重复基序,为 50.53%;其次是出现频率分别为 22.28%、24.73% 的二、三核苷酸。苦参转录组中 SSR 类型众多,出现频率高,在后续的苦参遗传性状分析,及次生代谢(苦参碱和黄酮等次生代谢产物)途径等相关基因定位等方面具有很好的应用潜力。

**关键词:**苦参;转录组;SSR;位点信息;基因功能;分子标记

**中图分类号:**R285 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)07-0041-04

苦参(*Sophora flavescens* Ait.)是豆科槐属植物,以其干燥根入药,味苦,性寒,具有清热除燥湿、杀虫和利尿等药效。其主要药用成分是生物碱类和黄酮类化合物,已从苦参中分离出生物碱类 39 个,黄酮类 122 个成分<sup>[1]</sup>。苦参主产于山西、陕西、河南、河北等地,在医学临床、农业、畜牧业和日用品等中有广泛的应用<sup>[2]</sup>。气候的变化和人为过度的采挖造成野生苦参资源数量急剧减少<sup>[3]</sup>。因此,保护和利用好野生苦参资源是当务之急,势在必行。

分子标记开发可对制定合理有效的种质资源保护策略提供科学依据,但目前还缺乏能够应用于苦参种质鉴定、遗传图谱构建、功能基因定位等研究的简便、高效、稳定且具有种属特异性的分子标记体系。简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)是由核苷酸构成的重复序列,在真核生物和原核生物基因中都有存在。SSR 位点标记具有在生物中分布

广泛、重复类型多样、出现频度高等特点<sup>[4]</sup>,主要应用于分子育种优良基因定位、生物多样性分析、遗传图谱绘制、突变体单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,简称 SNP)位点分析辅助等。传统寻找基因组中 SSR 标记的方法存在位点开发成本高、步骤较多、操作繁琐等问题<sup>[5]</sup>。转录组 SSR 位点开发具有方便快捷、效率高等特点,且成本低廉。SSR 开发引物能够直接快速地定位基因信息。随着苦参研究的深入,目前还未发现有关苦参转录组 SSR 开发的报道。本研究通过分析苦参转录组中的 SSR 位点信息,为苦参遗传性状分析、次生代谢(苦参碱和黄酮等次生代谢产物)途径、分子标记辅助育种及苦参遗传多样性研究提供依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 转录组数据来源

从 NCBI(美国国家生物技术中心)数据共享平台获得苦参转录组数据,从 SRA(Sequence Read Archive)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>)获得苦参叶片 RNA-Seq 原始测序数据,下载编号是 SAMD00029896,使用 Illumina HiSeq1000 对苦参组织进行建库测序,原始数据 reads 为 90 bp,采取双端(paired-end sequencing)测序,获得 1.3 GB 转录组数据,下载网址是 <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov> 中的 DRR031281<sup>[6]</sup>。

2014,345(6199):950-953.

[13] Zeng Z B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(23):10972-10976.

[14] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci [J]. Genetics, 1994, 136(4):1457-1468.

[15] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL

nomenclature [J]. Rice Genet News, 1997, 14(11):11-13.

[16] Shi J, Li R, Qiu D, et al. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus* [J]. Genetics, 2009, 182(3):851-861.

[17] 高必军. 甘蓝型油菜 *napin* 基因启动子的克隆与几个重要农艺性状的初步 QTL 定位 [D]. 雅安:四川农业大学, 2007:1-121.

[18] 吴建忠. 甘蓝型油菜结实相关性状分析及 QTL 定位 [D]. 武汉:华中农业大学, 2010:1-60.