

全基因组重测序助力探寻调控农作物高矮的“神秘因子”

基于华大智造DNBSEQ平台绘制高密度遗传图谱确定油菜中控制高度的一个主效QTL位点

中国农业科学院油料作物研究所和华中农业大学国家油菜改良中心团队利用全基因组测序对油菜进行QTL-seq和遗传分析，在油菜株高的研究中取得新进展，华大智造测序平台助力部分测序工作。

成果“Mapping of a major QTL controlling plant height using a high-density genetic map and QTL-seq methods based on whole-genome sequencing in *Brassica napus*”已于2021年发表于国际知名期刊*Genes Genomes Genetics*¹。

推荐应用：分子育种

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 高效准确的测序

独有的DNBSEQ技术具有高准确性、低数据冗余和低标签跳跃等特性。

• 提供实验流程全套产品组合

基于自主研发的自动化建库和高效的数据分析软件，通过优化实验流程简化客户手动操作步骤，实现了样品到结果输出的全套独家产品。



背景介绍

植物株高是影响作物产量的一个重要因素¹。20世纪60年代，植物育种史的一个重大成功案例就是将矮秆基因全方位地导入农作物中。在农作物中应用矮秆基因使其抗倒伏、易于收割和显著增加产量，这一进程也被称为“绿色革命”²。油菜是世界上最重要的油料作物之一，其相对性状“高，矮”不仅影响油菜的产量，也影响油菜的抗倒伏性和易于收割等多个重要农艺性状，因此油菜株高的研究具有重要的现实意义³。

近年来，科学家在油菜中共鉴定到183个与高度相关的数量性状位点（Quantitative trait locus, QTL），这些QTL位点可以解释3%-70%油菜株高的表型变异⁴。株高是由环境和多个基因共同控制的数量性状，而传统的QTL遗传定位方法耗时耗力，因此油菜株高的研究迫切需要一种新方法⁵。

随着全基因组测序技术（whole genome sequencing, WGS）的发展和油菜参考基因组的公布以及连锁图谱中分子标记密度增加，QTL定位更加准确⁶。全基因组关联分析及QTL-seq等方法应用于作物的遗传育种中。全基因组范围内提供丰富的SNPs可以克服使用传统分子标记的工作量大，精确度不高等问题。因此，高精度度、高测序深度的测序平台便成为农业遗传育种的利器⁷。

研究描述

本研究使用QTL-seq和全基因组重测序的研究方法，鉴定到一个控制油菜株高的QTL位点。综合基因变异和表达量变化信息，在QTL区间内鉴定了调控油菜株高的候选基因，为油菜的品种改良和遗传育种贡献了一份重要力量。其中华大智造测序平台承担了全基因组重测序和RNA-seq相关工作。

实验方法

材料

使用高株材料 ZS11-HP 和矮株材料 *sdw-e* 作为亲本杂交构建 F₂ 分离群体，种植 200 株 F₂ 代植株作为遗传分析株系并选取株高最高和最矮的 20 株植物构建了 2 个株高极端池(图 1)。

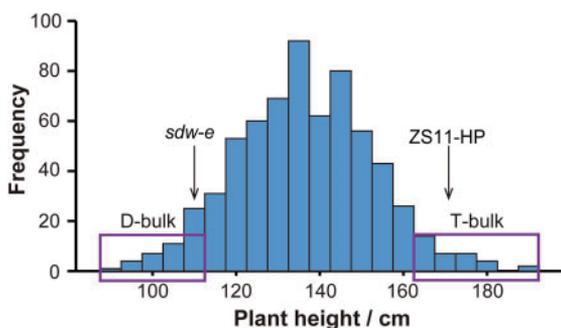


图1. F₂分离群体的表型分布和极端池的选择标准

文库制备与测序

收取两个亲本和F₂代群体的苗期新鲜叶片进行高质量DNA提取和DNA文库构建。收取两个生物学重复的两个亲本植物抽苔期茎尖分生组织 (shoot

apical meristem, SAM) 进行RNA提取和RNA文库制备。使用A供应商平台对2个亲本和F₂代群体中选出的2个极端池植株进行QTL-seq。使用华大智造平台对200个F₂群体植株进行全基因组重测序和两个亲本的油菜茎尖分生组织进行RNA-seq。

文库构建推荐使用MGIEasy通用DNA文库制备试剂套装 (16 RXN) 和MGIEasy RNA文库制备试剂套装 (16 RXN)。提取建库过程可以使用华大智造自动化平台进行，有效提高实验效率。测序推荐使用MGISEQ-2000RS测序仪，搭配MGISEQ-2000RS高通量测序试剂套装 (FCL PE150) 进行测序。

QTL-seq、遗传图谱构建和基因定位

QTL-seq分析使用BWA进行参考基因组比对，使用SAMtools将比对上的reads转变为SAM/BAM文件。使用GATK软件从双亲本中发现同源SNPs。200个F₂代群体基因组重测序数据与QTL-seq使用相同方法进行基因组比对和过滤，使用Sentieon Genomics工具进行SNP鉴定，GATK软件进行错误SNP位点过滤。使用HighMap和R/qtl软件进行高密度遗传图谱构建和QTL定位。

转录组分析

使用SOAPnuke和HISAT软件对RNA-seq测序数据进行过滤和比对到参考基因组。使用Bowtie2软件将clean reads比对到参考基因组并计算基因比对率，RSEM软件用于计算每个基因或者转录本的表达水平，然后使用DEseq2软件鉴定差异表达基因。使用ClusterProfiler和ggplot软件进行KEGG功能富集分析。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
<p>高株材料ZS11-HP和矮株材料swd-e杂交以构建F₂分离群体，种植200株F₂代植株作为遗传分析株系并构建2个株高极端池</p>	 <p>MGIEasy 通用DNA文库制备试剂套装 MGIEasy RNA文库制备试剂套装</p>  <p>MGISEQ-2000基因测序仪</p>	<p>SAMtools Sentieon Genomics GATK HighMap R/qtI SOAPnuke HISAT Bowtie2 RSEM DEseq2 ClusterProfiler ggplot</p>	<p>QTL-seq分析及连锁图谱的构建 遗传定位 基因表达量分析</p>

实验结果

QTL-seq分析及高密度遗传图谱的构建

根据双亲和极端池的测序结果将结果比对到参考基因组，全基因组获得了936,889个多态性的标记，用于计算两个极端池的等位基因变异频率(SNP-index)。

对用于高密度遗传图谱构建的200株F₂代群体进行全基因组重测序，共获得1841.29 Gb的clean data

数据，其Q20平均质量超过96.89%，GC含量为37.20%，平均测序深度为7.67x，最终共677,649 SNPs被鉴定出来，393,214 SNPs被用于遗传图谱的构建(表1)。4323个bin标记用于200个个体的基因分型，最终构建了19个连锁群和总遗传距离为2026.52 cM的遗传图谱，相邻标记之间的平均距离为0.47cM，最长的连锁群为C02，长达175.64 cM，最短的是A01，只有62.59 cM(图2)。

Sample Name	Clean Reads	Clean Base	Read Length	Q20(%)	GC(%)
18ZT332-45A	68689280	10303392000	150	97.25	36.83
18ZT332-47A	65634172	9845125800	150	97.08	37.36
18ZT332-48A	68913330	10336999500	150	97.45	37.23
18ZT333-01A	65750152	9862522800	150	97.54	36.47
18ZT333-02A	71433436	10715015400	150	97.53	35.78
18ZT333-03A	63931548	9589732200	150	97.34	37.42
18ZT333-04A	56973952	8546092800	150	96.82	36.73
18ZT333-05A	62668678	9400301700	150	97.08	37.28
18ZT333-06A	61168774	9175316100	150	97.13	36.63
18ZT333-08A	54397162	8159574300	150	96.99	36.17
18ZT333-09A	54159854	8123978100	150	96.7	36.5
18ZT333-10A	63361192	9504178800	150	97	36.72
18ZT333-11A	61498332	9224749800	150	96.84	36.94
18ZT333-12A	60636214	9095432100	150	96.71	37.4
18ZT333-13A	65356366	9803454900	150	97.33	36.57
18ZT333-14A	74944962	11241744300	150	97.42	36.3
18ZT333-15A	65111186	9766677900	150	97.21	36.43
18ZT333-16A	67963740	10194561000	150	97.03	36.35
18ZT333-18A	62715008	9407251200	150	97.01	36.68
18ZT333-19A	60755716	9113357400	150	97.15	35.73

表1. 200份F₂分离群体重测序质量的部分展示

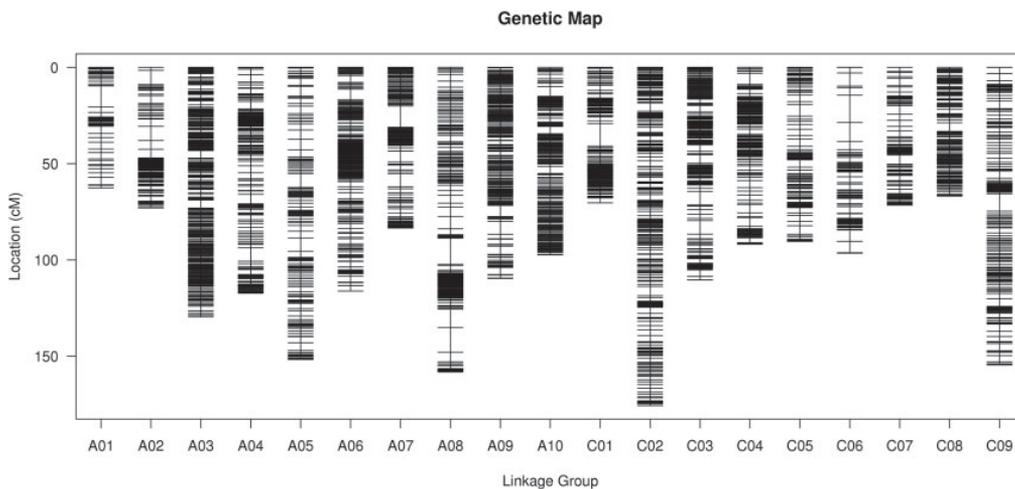


图2. 油菜高密度遗传图谱

QTL遗传定位

利用R/qtl软件的区间作图法 (interval mapping IM) 和复合区间作图法 (composite interval mapping, CIM) 定位油菜株高的QTL区间，并结合

QTL-seq分析结果，最终在10号染色体上鉴定到1个控制油菜株高的主效QTL位点 (图3)。

基因表达量分析

双亲本（ZS11-HP和sdw-e）转录组测序共获得47.72 Gb clean data的数据，每一个样本的Q30值都大于95.48%， R^2 值分析结果表明转录组数据是可靠的。在分析确定的QTL区间内，共鉴定到11个表达上调和14个表达下调的候选基因。通过WGS和QTL-seq的数据分析发现，QTL区间内共有

1226个纯合SNPs和InDels，最后综合两个亲本的基因变异情况和表达量信息锁定*BnaA10g08290D*、*BnaA10g09290D*和*BnaA10g08230D*三个基因是控制油菜株高的候选基因，这些基因在两亲本间均含有错义突变，并且表达量具有显著差异(图4)。

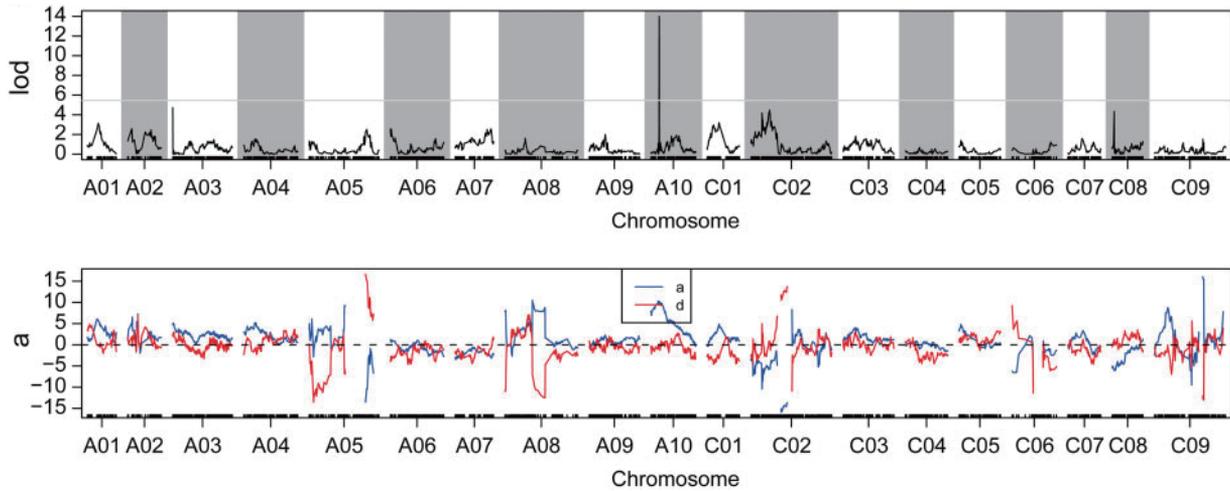


图3. QTL定位结果

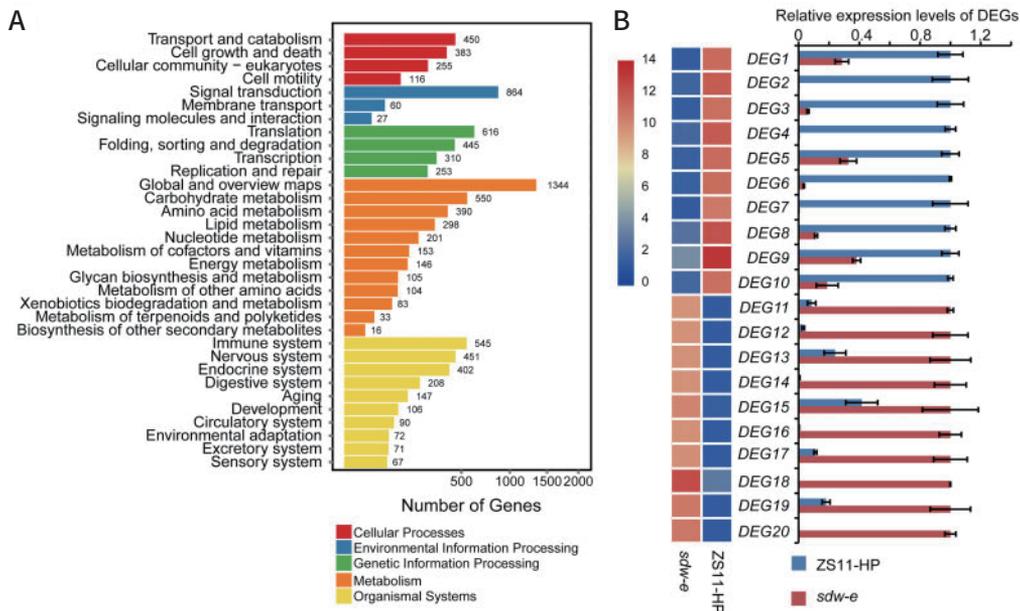


图4. 差异表达基因的KEEG功能富集分析和定量PCR验证

总结

本研究使用华大智造测序平台，进行200份油菜F₂分离群体的全基因组重测序和油菜特定部位的转录组测序，获得了高质量、高精度的测序数据。通过数据分析最终在油菜的10号染色体鉴定到控制油菜株高的关键QTL，并通过转录组数据和基因变异分析，确定了相应的候选基因，为油菜分子标记辅助育种提供新标记。

华大智造DNBSEQ测序平台，基于自主研发的DNBSEQ™技术，具有高准确度、低冗余度、低标签跳跃等优势，可应用于油菜的矮化育种，增加油菜产量，改善油菜的株型等相关候选基因的鉴定，助力油菜分子标记辅助育种。



基因测序仪MGISEQ-2000

参考文献

1. Dong Z, Alam M K, Xie M, et al. Mapping of a major QTL controlling plant height using a high-density genetic map and QTL-seq methods based on whole-genome resequencing in *Brassica napus*. *G3 (Bethesda)*, 2021, 11(7):jkab118.
2. Khush G S. Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 815-22.
3. Bin Y I, Wei C, Chao-Zhi M A, et al. Mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica*, 2006.
4. Huang C, Yang M, Shao D, et al. Fine mapping of the BnUC2 locus related to leaf up-curling and plant semi-dwarfing in *Brassica napus*. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 530.
5. Salvi S, Tuberosa R. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(6): 297-304.
6. Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, et al. Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345(6199): 950-3.
7. Hua Y, Zhang D, Zhou T, et al. Transcriptomics-assisted quantitative trait locus fine mapping for the rapid identification of a nodulin 26-like intrinsic protein gene regulating boron efficiency in allotetraploid rapeseed. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(7): 1601-18.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT生信分析加速器（工作站式服务器）	970-000085-00
建库试剂	MGIEasy通用DNA文库制备试剂套装（16 RXN）	1000006985
	MGIEasy RNA文库制备试剂套装（16 RXN）	1000006383
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL PE150）	1000012555

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

4000-688-114

www.mgi-tech.com

MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2023年8月版

撰稿：侯照科 刘文秀

责任编辑：王其伟

审稿：江遥