

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2014.01914

## 黄黑籽甘蓝型油菜类黄酮途径基因 SNP 位点检测分析

曲存民<sup>1,\*\*</sup> 卢坤<sup>1,\*\*</sup> 刘水燕<sup>1</sup> 卜海东<sup>1</sup> 付福友<sup>2</sup> 王瑞<sup>1</sup>  
徐新福<sup>1</sup> 李加纳<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 西南大学重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400716; <sup>2</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre, 107 Science Place, S7N 02X, Saskatoon Saskatchewan, Canada

**摘要:** 类黄酮物质在植物花、叶、果实和种子颜色变化的过程中起着至关重要的作用, 本研究以不同黄黑籽种皮材料为研究对象, 采用基因同源克隆方法, 获得 17 个类黄酮基因全长 ORF 序列, 在核酸和蛋白水平上分别序列差异比较表明, 这些基因在不同黄黑籽材料中共存在 41 个不同拷贝成员。在核苷酸水平上, 检测到 *BnTT3*、*BnTT18*、*BnTTG1* 和 *BnTTG2* 的单核苷酸位点数目介于 16~52 之间, 且 *BnTTG2* 在 3 个不同的位置上还存在多个碱基的连续性缺失现象(119~121 bp、183~189 bp 和 325~330 bp), 但在蛋白水平上仅存在 2~16 个氨基酸位点差异, 说明 *BnTT3*、*BnTT18*、*BnTTG1* 和 *BnTTG2* 在不同甘蓝型黄黑籽材料中存在单核苷酸位点差异, 而单核苷酸位点突变不一定导致氨基酸位点的变异。在不同黄黑籽材料中仅 *BnTT3* 和 *BnTT18* 存在一致性的氨基酸突变位点(252 和 87), 推测 *BnTT3* 和 *BnTT18* 可能在黄黑籽甘蓝型油菜种皮颜色差异形成过程中发挥至关重要的作用。通过这些位点的等位特异 PCR 可以区分材料间透明种皮基因, 为特异基因芯片的开发及阐明甘蓝型油菜种皮色泽性状的基因及其作用位点奠定基础。

**关键词:** 甘蓝型油菜; 类黄酮途径; 单核苷酸位点多态性; 黄黑籽; 透明种皮基因

## SNP Detection and Analysis of Genes for Flavonoid Pathway in Yellow- and Black-Seeded *Brassica napus* L.

QU Cun-Min<sup>1,\*\*</sup>, LU Kun<sup>1,\*\*</sup>, LIU Shui-Yan<sup>1</sup>, BU Hai-Dong<sup>1</sup>, FU Fu-You<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, XU Xin-Fu<sup>1</sup>, and LI Jia-Na<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Chongqing Rapeseed Technology Research Center of Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre, 107 Science Place, S7N 02X, Saskatoon Saskatchewan, Canada

**Abstract:** Flavonoids as the secondary metabolites play a crucial role in colour changing process of flower, leaf, fruit and seed. In this research, primers for amplifying full-length ORF sequences of the genes involved in the flavonoid biosynthesis pathways were designed according to conserved nucleotide regions from the public databases. Using the homology-based cloning strategy, 41 gene copies were obtained from 13 genes using 17 pairs of specific primers in different yellow- and black-seeded seed coats of *B. napus*. Each of full-length ORF sequences was sequenced and analyzed in the levels of both nucleic acid and protein. The results showed that the SNPs in four flavonoid pathway genes (*BnTT3*, *BnTT18*, *BnTTG1*, and *BnTTG2*), ranged from 16 to 52, but there were only 2 to 16 amino acid mutations detected in the protein level, indicating that the mutation of SNPs may not be involved in the mutation of amino acid. In addition, continuous bases deletion existed in different positions of sequence of *BnTTG2* (119 to 121 bp, 183 to 189 bp, and 325 to 330 bp), and two consistent amino acid mutation sites were detected in *BnTT3* and *BnTT18* among different materials, inferring that *BnTT3* and *BnTT18* may play an important role in difference of seed coat colour formation in yellow- and black-seeded *B. napus*. Therefore, these genes involved in flavonoid pathway could be distinguished by the allelic-specific PCR in yellow- and black-seeded *B. napus*. These results could help to develop specific seed coat gene chips and

本研究由国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2011AA10A104, 2013AA102602), 国家自然科学基金项目(U1302266, 31401412), 111人才引智基地建设项目(B12006), 重庆市主要农作物良种创新工程项目(cstc2012ggB80008), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-13), 国家科技支撑计划项目(2013BAD01B03-12)和西南大学博士基金(SWU112036)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 李加纳, E-mail: ljn1950@swu.edu.cn, Tel: 023-68251950

第一作者联系方式: E-mail: lion4302@163.com; E-mail: drlukun@swu.edu.cn \*\*同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2014-04-14; Accepted(接受日期): 2014-09-16; Published online(网络出版日期): 2014-10-08.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20141008.0954.007.html>

elucidate the genes and their action sites for the seed coat colour in *B. napus*.

**Keywords:** *Brassica napus* L.; Flavonoid pathway; Single nucleotide polymorphism (SNP); Yellow- and black-seeded; *Transparent testa*

油菜是世界四大油料作物(大豆、向日葵、油菜、花生)之一,在世界油料作物中占有重要地位<sup>[1]</sup>。国内外大量研究表明,在相同的遗传背景下,黄籽油菜具有种皮薄、木质素、纤维素和多酚含量低<sup>[2-4]</sup>,榨取后饼粕中蛋白质含量高、纤维素和色素等有毒物质含量低等优点<sup>[5-6]</sup>。近年来,随着菜籽油逐渐被用作生物柴油的原料油<sup>[7]</sup>,且黄籽菜油比黑籽菜油更易于合成高质量的生物柴油,制作成本也比较低。因此,黄籽油菜品种的选育是油菜育种的一个重要主攻方向。

甘蓝型油菜与其他芸薹属作物不同,在自然界中并不存在天然的黄籽种质资源,其遗传模式也较为复杂。随着分子标记技术的发展,研究人员通过构建遗传图谱和关联分析对甘蓝型油菜种皮色泽及相关性状进行了 QTL 定位分析,先后报道了多个主效 QTL 可控制性状 40%~60% 变异,并找到了一些紧密连锁标记<sup>[3,8-13]</sup>。但由于其基因来源不同,且存在多基因遗传、异源四倍性、母性效应、受环境条件等诸多因素影响<sup>[6,14]</sup>。因此,这些连锁标记也缺乏一定的通用性,也就限制了在育种中的辅助选择。目前,高通量 SNP 芯片检测技术已在玉米、小麦、高粱和大豆中应用<sup>[15-16]</sup>,由于油菜基因组来自于白菜(AA)和甘蓝(CC),含有大量的复等位基因,油菜 SNP 分析仅针对于具体基因或转录组分析水平上<sup>[17-18]</sup>。目前,在拟南芥中,已有 17 个基因被克隆和验证功能,包括 8 个参与编码类黄酮途径中的一些酶类的合成的结构基因(*TT3-TT7*、*FLS1*、*LDOX* 和 *BAN*)、6 个在类黄酮途径中编码一些起调控作用酶类的调控基因(*TT1*、*TT2*、*TT8*、*TTG1*、*TTG2* 和 *TT16*); 3 个参与编码与色素转运和积累相关的蛋白的转录因子(*TT12*、*TT19* 和 *AHA10*),这些基因所编码的关键酶及本身突变是造成突变体种皮颜色不同程度变异的主要原因<sup>[19-27]</sup>。尽管油菜与拟南芥同属十字花科,亲缘关系比较近,其基因组编码序列的保守性达 86%<sup>[28]</sup>,但这些基因在甘蓝型油菜中具体的作用机制尚不明确。因此,本研究根据已知 GenBank 数据库中类黄酮途径相关基因序列设计引物,以不同来源的甘蓝型油菜黄、黑籽种皮总 RNA 为对象,克隆到类黄酮代谢途径重要相关基因的全长 ORF 序列,比较这些基因在黄黑籽甘蓝型油菜中序列的差异,

寻找其单核苷酸多态性位点,为探讨甘蓝型油菜中苯丙烷-类黄酮途径基因的结构、功能、多态性及与种皮色泽差异形成的关系奠定基础,同时,为分析黄黑籽甘蓝型油菜控制类黄酮合成的表达差异提供探针和引物,可开发出能够识别透明种皮基因来源的 SNP 标记,并为特异基因芯片的开发及阐明甘蓝型油菜种皮色泽性状的基因及其作用位点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

(1)甘蓝型油菜(*B. napus*)重组自交系的 2 个亲本,黄籽品系 GH06 ( $Y_1$ )和黑籽品系中油 821 ( $B_1$ )分别具有典型黄籽和黑籽遗传背景, GH06 具有显性黄籽主效基因<sup>[29-30]</sup>,黄籽度达到 90%,而黑籽品系中油 821 为定向自交选择后代,性状表现稳定;(2)选取重组自交系中部分极端黄籽与黑籽表型材料混合分别构成黄籽基因池  $Y_2$  与黑籽基因池  $B_2$ ;(3)不同遗传来源黄黑籽材料 L267( $Y_3$ )与 L257( $B_3$ );(4)黄黑籽近等基因系材料 572( $Y_4$ )与 571( $B_4$ )。分别用  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$  和  $Y_4$  代表黄籽,  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$  和  $B_4$  代表黑籽。于 2012 年秋在西南大学北碚歇马试验基地种植上述材料,按正常生产条件进行田间管理。在油菜盛花期从每个株系随机选 6 株正常生长的植株标记主花序开花时间,青荚期分别取花后 30 d 的种皮,用液氮冷冻后,置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  由本课题组保存,克隆载体 pMD19-T 购自大连 TaKaRa 公司。

### 1.2 核酸提取

用植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取不同黄黑籽材料花后 30 d 种皮的总 RNA,用 DNaseI (宝生生物工程有限公司,大连)消化 RNA 样品中的基因组 DNA,然后以 Oligo dT-Adaptor Primer 反转录[TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0]成 cDNA 后作为 PCR 反应模板,具体操作说明见试剂盒说明书。

### 1.3 类黄酮途径关键基因同源克隆引物设计

从 NCBI 数据库中下载公开发表的参与拟南芥、白菜、甘蓝和甘蓝型油菜类黄酮途径相关基因的序列,用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)软件

进行序列多重比对,用引物设计软件 Primer Primer 名称对引物命名(表 1),引物均由上海英骏生物技术  
5 设计特异性扩增引物,以甘蓝型油菜(Bn)加基因 有限公司合成。

表 1 基因同源克隆的引物  
Table 1 Primers used in homology-based gene cloning

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	AGI 登录号 AGI number	GenBank 登录号 GenBank number
BnTT1	F: ATGGATTGCGGGATCTACTCAAGCT R: TTA AAAAGAGCGTTTCAGAGACAGAAAGATATG	AT1G34790	AF190299
BnTT2	F: ATGAGAAAGAGAGAAAGTAGTAAGGTGAAG R: CTAACAATTAAAGTCCCAGAGACAATCTTC	AT5G35550	DQ778646
BnTT3	F: ATGGTAGCTCACAAAGAGACCGTG R: CTAAGCACAGATCTGCTGTGCC	AT5G42800	DQ767950
BnCHSA1	F: ATGGTGATGAGTAGGCCGTCATCA R: TCAAACAGGAACGCTGTGCAAGACA	AT5G13930	DQ767948
BnCHSA2	F: ATGGTGATGTGTACACCGTCTTCG R: TCAAACAGGAACGCTGTGCAAGACA	AT5G13930	AF076334
BnCHI-1	F: ATGTCTTCTTCCCACTGTCCAACAC R: TCAGTTCTCTTTGGCCAACCTATCTC	AT3G55120	EU402416
BnCHI-2	F: ATGTTTTCTTCCGGCTCTCAGTTACC R: TCATGTCTTTGTTGCATCTTCTTCGACC	AT3G55120	EU402417
BnTT6	F: ATGGCTCCAGGAACCTAACTGAG R: CTAAGCGATGATTTGGTCTAGAGGC	AT3G51240	DQ513329
BnTT7	F: ATGACTAATCTTTACCTCACAATCCTTCTCC R: TTAAGCCGATCCGAGTCCGTAAG	AT5G07990	DQ324379
BnTT8	F: ATGGATGAATTAAGTATTATACCGTTATGGAAAGTG R: CTAGAGTTTATTATTATATATGATTTGATGGATGGC	AT4G09820	EU192027
BnTT10	F: ATGTCACATCCTTTGTTCACTTTCTAATCTCTC R: TTAGTAACAAGGAGGCAAGTCAGGAG	AT5G48100	HM805059
BnTT12	F: ATGAGCTCCACAGAGACATACGAG R: TTAGACTCCTTCGGTAGCCATCTC	AT3G59030	EU818785
BnTT15	F: ATGGCGAGTGATGTAGCTACTCATC R: TCACACGCCCCACATGGA	AT1G43620	BT005834
BnTT16	F: ATGGGAAGAGGGAAGAT(A/C)GAGATAAAG R: TTAATCAACCTTGGTGATCGTTGGATCGT	AT5G23260	HM449989
BnTT18	F: ATGGTTGAAGTGAAAGAGTCGAGAATTT R: TCAGACTTCATCCTTTTCTCAGTTACCAAC	AT4G22880	GQ120562
BnTT19	F: ATGGTTGTGAACTATACGGACAGGT R: TCAGAAACCAGCCATCTTCATAAGCTT	AT5G17220	AB117793
BnTTG1	F: ATGGACAACCTCAGCTCCGGAC R: TCAAACCTCTGAGGAGCTGCATTTTG	AT5G24520	EF175930
BnTTG2	F: ATGGAGGTGAAAGAGAGTAAGAGAGTG R: T(C/T)AAATGGCTTGATTAGAATGTTGTGGGGAGC	AT2G37260	FJ012168
BnBAN	F: ATGGCAACCGTTGATCAGACCG R: TTAAGGTTTGATCAATCCTTTTGACTCGAAGTAC	AT1G61720	FJ938339

同源克隆的 PCR 反应体系含模板 cDNA 0.5 μL、10×TransStart *Taq* 缓冲液 2.5 μL、2.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs 2 μL、10 μmol L<sup>-1</sup> 上下游引物各 0.5 μL、5 U μL<sup>-1</sup> TransStart *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 扩增反应程序为 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 57 退火 30 s, 72 延伸 1 min,

35 个循环; 最后 72 延伸 10 min, 16 保存。

1.4 基因扩增片段与 pMD19-T 克隆载体连接

利用胶回收试剂盒(北京全式金生物技术有限 公司)电泳回收上述 PCR 产物,并与 TA 克隆载体 pMD19-T (TaKaRa, 大连)连接。连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,加 900 μL LB, 37 复苏培养

90 min 后, 取 100  $\mu\text{L}$  转化产物涂布于 LB [80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  氨苄青霉素(AMP), 涂布 X-gal, IPTG]平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置恒温培养 12~16 h, 挑取白色单菌落, 接种于 AMP 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 12~16 h, PCR 检测为阳性单克隆者送华大基因测序。

1.5 序列结果拼接与比对分析

序列测定由华大基因完成, 采用 M13F/M13R 引物双向测定, 结果使用 Geneious 4.8.5 软件进行序列拼接。拼接后的序列用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)软件在 DNA 和蛋白质水平上进行同源性比较。

2 结果与分析

2.1 黄黑籽甘蓝型油菜中类黄酮途径基因的 SNP 位点分析

分别以甘蓝型油菜黄籽 Y<sub>1</sub>~Y<sub>4</sub> 与黑籽 B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub> 种皮为材料, 采用同源克隆分析了 17 个类黄酮代谢途径基因, 并获得了其完整的 ORF 序列。从每个材料

样品随机选取 5~10 个阳性克隆子菌液, 经序列拼接获得目的基因全长 ORF 的序列, 同源性比较结果表明, 大部分基因在甘蓝型油菜中均存在多个拷贝序列, 各基因家族成员之间也具有较高的同源性(表 2)。另外, 序列比对结果显示, 在不同材料中部分基因家族各成员之间存在多个单核苷酸多态性位点, 但它们之间的特异性差异位点较少。在 4 对不同黄黑籽材料中, 仅 *BnTT3*、*BnTT18*、*BnTTG1* 和 *BnTTG2* 基因在核苷酸水平上呈现一定的规律性差异, 但部分单核苷酸位点在不同材料间同一位点上也存在差异性。统计结果表明, 4 个基因产生的单核苷酸位点数目介于 16~52 之间, *BnTT3* 产生单核苷酸突变位点数目最少, 在 16 个不同位置上被检测到, *BnTTG2* 还在 3 个不同的位置上存在碱基的连续性缺失现象 (119~121 bp、183~189 bp 和 325~330 bp, 表 3), 说明在不同材料间同一基因在核苷酸水平上存在差异, 这些突变位点的存在可能会导致基因功能的变化, 从而影响种皮色泽, 还需要进一步的研究证实。

表 2 甘蓝型油菜类黄酮途径基因的同源克隆分析  
Table 2 Analysis of gene characteristics for flavonoid biosynthesis pathway in *Brassica napus*

基因 Gene	序列长度 Length	同源性 Homology (%)	拷贝数 Copy number	SNP 个数 Number of SNPs	氨基酸长度 Length	同源性 Homology (%)
<i>BnBAN</i>	1029	99.6	2	0	343	99.1
<i>BnTT1</i>	864	100.0	1	0	288	100.0
<i>BnTT2</i>	786	100.0	1	0	259	100.0
<i>BnTT3</i>	1158	97.7	3	16	386	99.0
<i>BnCHSA1</i>	1191	96.1	3	0	397	99.5
<i>BnCHSA2</i>	1188	96.7	3	0	396	99.2
<i>BnCHI-1</i>	759	98.6	2	0	253	99.0
<i>BnCHI-2</i>	705	99.7	2	0	235	99.6
<i>BnTT6</i>	1077	97.8	2	0	359	99.3
<i>BnTT7</i>	1536	99.1	1	0	512	100.0
<i>BnTT8</i>	1566	96.7	2	0	522	95.4
<i>BnTT15</i>	412	100.0	1	0	137	100.0
<i>BnTT16</i>	738	99.4	2	0	246	99.5
<i>BnTT18</i>	1077	98.0	3	48	359	99.2
<i>BnTT19</i>	642	89.5	2	0	214	89.6
<i>BnTTG1</i>	1014	98.2	3	35	338	99.2
<i>BnTTG2</i>	1263~1269	93.8	3	52	421~445	69.3
<i>BnTT10</i>	1692	99.1	3	0	364	99.7
<i>BnTT12</i>	1431	99.4	2	0	477	97.1

表 3 黄黑籽甘蓝型油菜中类黄酮途径基因的 SNP 位点

Table 3 Sites of SNPs identified between the yellow- and black-seeded *B. napus* in the exon region of the flavonoid gene

基因 Gene	编号 Code	SNP 位点及位置 Sites of single nucleotide polymorphism (bp)																		
		90	246	255	276	282	306	332	687	699	711	726	754	774	813	928	1013	1032	1098	1109
<i>BnTT3</i>	B <sub>1</sub>	C	T	T	A	T	A	C	G	C	T	T	A	G	C	A	G	C	G	T
	Y <sub>1</sub>	T	C	A	T	C	G	T	C	T	C	C	G	A	T	G	A	T	A	C
	B <sub>2</sub>	C	C/T	T	A	T	A	C	G/C	T/C	T/C	T/C	A	A/G	C	A	G	—	G	T/C
	Y <sub>2</sub>	T	T/C	A	T	C	G	T	G	C	C	T	A/G	G	T	G	A	—	A	C
	B <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	A	G	C	G/A	A/G	C	G	T/C
	Y <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	G	A	T	A/G	G/A	T	A	C/T
	B <sub>4</sub>	C	T	T	A	T	A	—	G	T	C	T	A	G	C	A	G	C	G	T
	Y <sub>4</sub>	T	C	A	T	C	G	—	C	C	T	C	G	A	T	G	A	T	A	C
		33	42	47	51	59	120	153	259	264	315	321	356	357	381	393	408			
<i>BnTT18</i>	B <sub>1</sub>	G	G	—	T	A	A	C	G	G	A	—	—	—	C	T	G			
	Y <sub>1</sub>	A	A	—	A	G	G	T	A	T	G	—	—	—	T	C	A			
	B <sub>2</sub>	G	G	—	T	A	A	C	G	G	A	—	—	—	C	T	G			
	Y <sub>2</sub>	A	A	—	A	G	G	T	A	T	G	—	—	—	T	C	A			
	B <sub>3</sub>	—	—	G	T	—	—	—	G	T/G	—	G	G	C	—	—	A			
	Y <sub>3</sub>	—	—	A	C	—	—	—	A	G	—	T	A	G	—	—	G			
	B <sub>4</sub>	—	—	G	T	—	—	—	G	T	—	G	G	C	—	T	A			
	Y <sub>4</sub>	—	—	A	C	—	—	—	A	G	—	T	A	G	—	C	G			
		432	441	465	504	600	606	609	613	627	642	645	648	654	684	699	712			
<i>BnTT18</i>	B <sub>1</sub>	C	T	A	T	A	T	T	—	C	A	—	T	G	C	A	—			
	Y <sub>1</sub>	T	G	C	A	T	G	C	—	T	C	—	C	A	G	C	—			
	B <sub>2</sub>	C	T	A	T	A	T	T	—	C	A	—	T	G	C	A	—			
	Y <sub>2</sub>	T	G	C	A	T	G	C	—	T	C	—	C	A	G	C	—			
	B <sub>3</sub>	T/C	—	—	—	—	—	—	T	T	A	C	—	—	—	—	—			
	Y <sub>3</sub>	C	—	—	—	—	—	—	A	G	C	T	—	—	—	—	—			
	B <sub>4</sub>	T	—	—	—	—	—	—	T	—	A	C	T	G	—	—	C			
	Y <sub>4</sub>	C	—	—	—	—	—	—	A	—	C	T	C	A	—	—	T			
		744	753	756	772	810	825	837	840	845	879	930	948	954	1029	1035	1036			
<i>BnTTG1</i>	B <sub>1</sub>	C	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	G	—	—	—			
	Y <sub>1</sub>	T	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	T	—	—	—			
	B <sub>2</sub>	C	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	G	—	—	—			
	Y <sub>2</sub>	T	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	T	—	—	—			
	B <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	T	C	G	T	T	G	—	T	C	A			
	Y <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	C	T	A	C	A	A	—	C	T	G			
	B <sub>4</sub>	—	G	C	A	T	A	T	C	G	T	T	G	—	T	C	A			
	Y <sub>4</sub>	—	T	T	G	C	G	C	T	A	C	A	A	—	C	T	G			
		24	63	69	78	129	195	243	270	348	354	417	558	685	696	726	735	756	762	
<i>BnTTG1</i>	B <sub>1</sub>	T	G	—	G	—	A	—	G	A	C	G	G	—	—	—	C	—	—	
	Y <sub>1</sub>	C	T	—	C	—	G	—	C	C	T	C	C	—	—	—	T	—	—	
	B <sub>2</sub>	—	—	C	—	—	—	C	—	—	—	—	G	A	G	G	—	T	G	
	Y <sub>2</sub>	—	—	G	—	—	—	T	—	—	—	—	C	C	C	C	—	G	C	
	B <sub>3</sub>	T	G	G	G	G	A	—	G	A	C	G	—	—	—	C	C	G	C	
	Y <sub>3</sub>	C	T	C	C	A	G	—	C	C	T	C	—	—	—	G	T	T	G	

(续表 3)

基因 Gene	编号 Code	SNP 位点及位置 Sites of single nucleotide polymorphism (bp)																	
		24	63	69	78	129	195	243	270	348	354	417	558	685	696	726	735	756	762
	B <sub>4</sub>	T	G	G	G	G	A	T	G	A	C	G	G	—	—	—	C	—	—
	Y <sub>4</sub>	C	T	C	C	A	G	C	C	C	T	C	C	—	—	—	T	—	—
		768	771	772	792	801	807	840	885	903	904	905	906	940	951	952	957	958	
<i>BnTTG1</i>	B <sub>1</sub>	T	A	A	C	G	G	—	—	G	T	C	A	T	G	G	T	C	
	Y <sub>1</sub>	G	G	C	T	T	C	—	—	T	A	T	G	C	T	T	G	T	
	B <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	A	G	T	—	A	—	—	—	—	—	
	Y <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	G	C	A	—	G	—	—	—	—	—	
	B <sub>3</sub>	T	A	A	C	G	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Y <sub>3</sub>	G	G	C	T	T	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	B <sub>4</sub>	T	A	A	C	G	G	G	—	G	T	—	A	T	G	G	T	C	
	Y <sub>4</sub>	C	G	C	T	T	C	T	—	T	A	—	G	C	T	T	G	T	
		68	85	112	119–121	135	168	171	177	183–189	237	239	261	264	291	303	309	325–330	
	B <sub>1</sub>	A/G	G/A	T	CCC	T/C	A	G	G	-----	T	A	T	A	C	C/T	C	CTTCAG	
	Y <sub>1</sub>	G	A	C	---	C	G	A	A	GGCAGC	C	T	C	T	T	T	T	-----/CTTCAG	
	B <sub>2</sub>	A	G	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	C	—	—	—	
	Y <sub>2</sub>	G	A	—	—	C	—	—	—	GGCAGC	—	—	—	—	T	—	—	—	
	B <sub>3</sub>	—	—	—	CCC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CTTCAG	
	Y <sub>3</sub>	—	—	—	---/CCC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-----/CTTCAG	
	B <sub>4</sub>	—	—	T	CCC	—	A	G	G	—	T	A	T	A	C	—	C	CTTCAG	
	Y <sub>4</sub>	—	—	C	---	—	G	A	A	—	C	T	C	T	T	—	T	-----/CTTCAG	
		339	377	414	471	537	609	624	639	672	681	706	718	742	755	758	777	807	
<i>BnTTG2</i>	B <sub>1</sub>	C	C/G	T/C	A/G	C	A/G	C/T	T	A	T/C	C	C/T	T	A/G	T	C/T	G/A	
	Y <sub>1</sub>	T	G	C	G	T	G	T	C	G	C	G	T	C	A	A	T	A	
	B <sub>2</sub>	—	C	T	G	—	A	—	—	—	T	—	—	—	A	—	C	—	
	Y <sub>2</sub>	—	G	C	A	—	G	—	—	—	C	—	—	—	G	—	T	—	
	B <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	A	T	C	—	T	—	T	C	—	
	Y <sub>3</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	G	C	A	—	C	—	A	T	—	
	B <sub>4</sub>	C	—	—	A	C	—	—	T	A	—	C	—	T	G	T	—	—	
	Y <sub>4</sub>	T	—	—	G	T	—	—	C	G	—	A	—	C	A	A	—	—	
		822	840	853	860	864	867	873	1044	1059	1062	1077	1083	1122	1143	1203	1239	1242	1243
	B <sub>1</sub>	G	T/A	A/G	A/G	G	A/G	G	G	G/A	C/G	G	A/G	T/A	G/T	G	C/G	T/C	A/C
	Y <sub>1</sub>	C	A	G	G	A	G	T	A	A	G	A	A	T	G	A	C	C	C
	B <sub>2</sub>	—	A	A	A	—	A	—	—	G	C	—	A	T	G	—	C	C	C
	Y <sub>2</sub>	—	T	G	G	—	G	—	—	A	G	—	G	A	T	—	G	T	A
	B <sub>3</sub>	G	T	A	A	G	A	G	G	G	C	G	—	—	—	—	—	—	—
	Y <sub>3</sub>	C	A	G	G	A	G	T	A	A	G	G/A	—	—	—	—	—	—	—
	B <sub>4</sub>	G	—	—	—	G	—	G	G	—	—	G	G	A	T	—	G	T	A
	Y <sub>4</sub>	C	—	—	—	A	—	T	A	—	—	A	A	T	G	—	C	C	C

—: 碱基无差异; ---: 3 个碱基缺失; -----: 6 个碱基缺失。

—: no base differences; ---: three consecutive bases deletion; -----: six consecutive bases deletion.

## 2.2 甘蓝型油菜中类黄酮途径基因的氨基酸位点分析

将获得的目的基因全长 ORF 序列用 Geneious 4.8.5 软件翻译为氨基酸序列, 同源性比较结果表明, 在不同材料间, 4 个基因仅存在 2~16 个氨基酸位点的差异(表 4), 其蛋白水平上差异远小于其对应的核苷酸水平上的差异, 说明基因中单核苷酸位点突变并不一定导致氨基酸位点的差异, 即对基因的功能不起决定性作用。另外, 在不同材料间, 2 个结构基

因 *BnTT3* 和 *BnTT18* 在同一位置上还存在一致性的突变位点(252 和 87, 表 4), 在黑籽材料中氨基酸为缬氨酸(V), 黄籽中为异亮氨酸(I), 而剩余的所有位点在 4 组材料中均未能同时被检测到, 说明在不同材料中同一基因在蛋白水平上也存在一定的差异性, 而 2 个结构基因 *BnTT3* 和 *BnTT18* 可能直接参与调控甘蓝型油菜种皮色泽的变化, 且受材料遗传背景的影响较小, 但具体功能及作用机制仍需要进一步深入研究。

表 4 黄黑籽甘蓝型油菜中类黄酮途径基因的氨基酸突变位点

Table 4 Sites of amino acid identified between the yellow- and black-seeded *B. napus* in the exon region of the flavonoid gene

编号	<i>BnTT3</i>					<i>BnTT18</i>										<i>BnTTG1</i>	
Code	111	252	310	338	370	16	20	87	104	119	200	258	282	310	346	302	318
B <sub>1</sub>	M	V	D	K	A	—	K	V	—	—	K	—	—	—	—	S	A
Y <sub>1</sub>	T	I	N	R	V	—	R	I	—	—	N	—	—	—	—	M	S
B <sub>2</sub>	M	V	D	K	A/V	—	K	V	—	—	K	—	—	—	—	L	—
Y <sub>2</sub>	T	I/V	N	R	V	—	R	I	—	—	N	—	—	—	—	M	—
B <sub>3</sub>	M	V	—	—	—	S	—	V	—	S	—	—	R	D	K	—	—
Y <sub>3</sub>	T	I	—	—	—	N	—	I	—	K	—	—	K	E	E	—	—
B <sub>4</sub>	—	V	—	—	A	S	—	V	S	S	K	I	R	D	K	L	A
Y <sub>4</sub>	—	I	—	—	V	N	—	I	G	K	N	V	K	E	E	M	S

  

编号	<i>BnTTG2</i>															
Code	23	29	38	59-60	80	108-109	126	236	240	248	252	253	274	285	287	416
B <sub>1</sub>	N/S	D/N	S	--/AA	D	ML	A/G	R	P/S	S	Y/C	F	E	I/V	K/R	T/P
Y <sub>1</sub>	S	N	—	AA	V	--/ML	G	G	S	P	Y	Y	D	V	R	P
B <sub>2</sub>	N	D	—	--	—	--/ML	A	—	—	—	Y	—	—	I	K	P
Y <sub>2</sub>	S	N	—	AA	—	ML	G	—	—	—	C	—	—	V	R	T/P
B <sub>3</sub>	N	D	S	—	—	ML	—	—	—	S	-	F	E	I	K	—
Y <sub>3</sub>	N/S	D/N	-/S	—	—	--/ML	—	—	—	S/P	-	Y/F	D/E	I/V	K/R	—
B <sub>4</sub>	—	—	S	—	D	—	—	—	—	S	C	F	E	—	—	T
Y <sub>4</sub>	—	—	—	—	V	—	—	—	—	P	Y	Y	D	—	—	T/P

—: 氨基酸位点无差异; —/: 缺失 1 个氨基酸位点; --/: 缺失 2 个氨基酸位点。

—: no differences among the sites of amino acid; —/: one site of amino acid deletion; --/: two sites of amino acid deletion.

## 3 讨论

利用近缘种基因序列进行同源基因克隆是基因克隆的一条重要有效途径。拟南芥作为模式植物, 与芸薹属作物同属于十字花科, 亲缘关系较为接近, 因此其完整的基因组信息、较短的生育周期和成熟的遗传转化体系, 对芸薹属作物复杂的多倍化、基因组特征结构及可能的遗传进化过程的研究具有重要理论指导意义。另外, 根据 GenBank 数据库检索结果发现在模式植物拟南芥中参与类黄酮途径的基因仅存在 1 个拷贝, 而由于甘蓝型油菜是由白菜和

甘蓝杂交、加倍形成的异源四倍体, 含有 A 和 C 染色体组, 推断每个同源基因至少应存在 2 个或更多个拷贝, 且已有的研究表明, 在甘蓝型油菜中 *BAN* 基因存在 4 个拷贝<sup>[31]</sup>, *TT2* 基因只有 3 个拷贝<sup>[32]</sup>, 而 *TT3* 与 *TT12* 只有 2 个拷贝<sup>[33-34]</sup>, *TT1*、*TT4* 和 *TT5* 至少存在 4 个以上拷贝等<sup>[35]</sup>, 因此, 试验中根据数据库中已知基因的序列信息分别设计了 1~2 对引物对其进行同源克隆分析, 通过比对结果分析发现所克隆的 17 个基因至少存在 1~3 个拷贝(表 2), 本研究尽管未能获得所有基因整个基因家族成员, 但在一定程度上反映出甘蓝型油菜基因组中基因及其家族成员

的复杂性。另外, 本研究所检测到的 SNP 位点在不同黄黑籽材料中存在一些差异, 在一定程度上反映出拟南芥透明种皮基因在甘蓝型油菜不同材料间会存在特异性差异位点。严明理等<sup>[36]</sup>以黄黑籽芥菜型油菜为材料, 在 *TTI* 基因中发现 8 个单核苷酸位点, 而本研究在不同黄黑籽甘蓝型油菜中并未重复检测到 *TTI* 基因单核苷酸突变位点, 说明这些基因在不同物种间存在核苷酸序列的差异, 这些差异可能在一定程度上影响了甘蓝型油菜种皮颜色。本研究获得的 SNP 位点可以通过等位特异 PCR 来区分不同材料及种群中的透明种皮基因, 对深入研究揭示其分子机制也具有重要意义。

在模式植物拟南芥中, 研究学者对种皮发育解剖结构及色素生物合成的代谢途径研究表明, 一些编码类黄酮生物合成的关键酶和蛋白质基因的突变致使植物体内类黄酮次生代谢物质或终产物的积累量发生变化, 从而引起种皮颜色不同程度的变异。现已经鉴定出 23 个 *TT* 位点, 其中包括 12 个编码参与类黄酮生物合成的酶的结构基因位点, 6 个编码控制类黄酮生物合成的调控基因位点以及 5 个未知的基因位点<sup>[37]</sup>。在甘蓝型油菜中, 很多苯丙烷-类黄酮途径基因也陆续被克隆并进行了相关研究<sup>[31-33, 38-40]</sup>。付福友等<sup>[12]</sup>通过对主效 QTL 侧翼引物的 BLASTn 序列比对, 认为该 QTL 主效区间与拟南芥第 5 染色体的部分区段同源, 该区域包含 *TT10* 基因, 推测是该 QTL 的重要候选基因。Zhang 等<sup>[41]</sup>通过反义抑制对 *BnTT10* 基因的功能鉴定证明, *TT10* 基因影响甘蓝型油菜的种皮着色, 与种皮色素的形成有关, Chai 等<sup>[34]</sup>研究认为黄籽性状的形成可能与 *TT12* 基因相关。最近研究分析认为在白菜型油菜中, *TTG1* 基因与多毛和粒色性状的形成有关<sup>[42]</sup>, 而 *BrTT8* 则主要调控种皮中原花青素的累积, 参与调控类黄酮途径后期基因的表达, 自身转座子导致 *BrTT8* 功能缺失可能是引起黄籽的主要原因<sup>[43]</sup>; 而在芥菜型油菜中, *TT8* 基因 2 个成员(*BjuA.TT8* 和 *BjuB.TT8*)与种皮颜色呈高度共分离, 在黄籽中能够抑制后期合成基因的转录<sup>[44]</sup>; 而在甘蓝型油菜中, 通过标记连锁分析发现透明种皮基因 *AHA10* 位于主效 QTL 区间, 对种皮颜色和木质素合成可能有重要作用<sup>[45]</sup>, 但上述研究尚未确定这些基因在甘蓝型油菜主要网络调控代谢途径中作用节点与调控机制, 也不能揭示种皮色泽与基因间具体的调控关系。本研究同时对类黄酮途径中 17 个基因同源克隆及比较分析表明, 在获得的

*BnTT8*、*BnTT10* 和 *BnTT12* 基因的 2~3 个成员中并没有检测到核苷酸序列与对应的氨基酸序列特异性差异位点的存在, 说明这些基因可能不是引起黄黑籽差异的源头基因。然而在 2 个结构基因(*BnTT3* 和 *BnTT18*)与 2 个调控基因(*BnTTG1* 和 *BnTTG2*)的拷贝中普遍存在单核苷酸位点的突变现象, 且在拟南芥中, *TT3* 主要编码 DFR, 其突变体主要阻断种皮中花青素和原花色素的合成, 从而形成透明种皮。另外, 在埃塞俄比亚芥的叶片和种皮<sup>[46]</sup>、番茄种子<sup>[47]</sup>和水稻胚乳<sup>[48]</sup>中, *TT3* 基因均为颜色形成的关键基因, 且在芥菜型油菜中, *TT3* 和 *TT18* 是参与种皮色泽性状遗传调控网络中的关键基因<sup>[36]</sup>, 另外, 在类黄酮-原花青素途径中, *TTG1* 和 *TTG2* 基因不仅参与调控种皮颜色的转变, 还与植株表面毛状体的发育有关<sup>[42, 49]</sup>; 且 *TTG2* 基因是 WRKY 类型的转录因子, 唯一一个参与类黄酮途径调控的 WRKY 家族成员, 能够影响下游的 *TTG1* 基因<sup>[49-50]</sup>; 而 *TTG2* 在类黄酮-原花青素途径中也要受到 *TTG1-TT2-TT8* 的调控<sup>[51-52]</sup>。在甘蓝型油菜中, 最初的研究结果认为色素化合物及相关酶类是影响甘蓝型油菜种子发育过程中色泽变化重要的影响因素, 原花色素、多酚和木质素等也是影响种皮颜色的重要物质组分<sup>[33, 53-55]</sup>。本研究重点讨论的 4 个基因中所有 SNP 突变并未全部导致氨基酸水平上的差异, 且在不同材料间也存在一定的差异, 在不同材料间, 同一位置上仅 *BnTT3* 和 *BnTT18* 存在一致性的突变位点(252 和 87, 表 4), 在黑籽材料中的氨基酸为缬氨酸(V), 而黄籽中为异亮氨酸(I), 而剩余位点在 4 组材料中均未能同时被检测到差异, 说明同一基因编码的氨基酸在不同材料中也存在差异性, 从而导致材料的差异性。本研究获得的单核苷酸多态性位点有助于透明种皮基因来源的 SNP 标记的开发, 为甘蓝型油菜特异基因芯片的开发及研究类黄酮途径基因在种皮色泽差异形成中的结构、功能奠定了基础。

## 4 结论

甘蓝型油菜与芸薹属其他油菜中透明种皮基因位点存在差异, 且不同来源黄黑籽甘蓝型油菜的 *BnTT3*、*BnTT18*、*BnTTG1* 和 *BnTTG2* 基因中检测到多个单核苷酸差异位点, 在同一位置上 *BnTT3* 和 *BnTT18* 还存在一致性的氨基酸差异位点, 可能导致这 2 个基因在黄黑籽甘蓝型油菜种皮差异形成过程中发挥至关重要的作用。



## References

- [1] 王晶, 孟金陵. 芸薹属作物基因组研究进展及其在育种中的意义. 分子植物育种, 2010, 8: 837–845  
Wang J, Meng J L. Progress on genome research of Brassica crops and its significance for breeding. *Mol Plant Breed*, 2010, 8: 837–845 (in Chinese with English Abstract)
- [2] Theander O, Aman P, Miksche G E, Yasuda S. Carbohydrate polyphenols and lignin in seed hulls of different colours from tumip rapeseed. *J Agric Food Chem*, 1977, 25: 270–273
- [3] Somers D J, Rakow G, Prabhu V K, Friesen K R D. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome*, 2001, 44: 1077–1082
- [4] Rahman M H, Joersbo M, Poulsen M H. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality. *Plant Breed*, 2001, 120: 473–478
- [5] 肖达人, 刘后利. 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)种皮颜色与种子含油量的相关分析. 作物学报, 1982, 8: 245–254  
Xiao D R, Liu H L. Correlation analysis of seed colour and seed oil in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 1982, 8: 245–254
- [6] Shirzadegan M, Rbbelen G. Influence of seed color and hull proportion on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1985, 87: 235–237
- [7] Sensoz S, Angin D, Yorgun S. Influence of particle size on the pyrolysis of rapeseed (*Brassica napus* L.): fuel properties of bio-oil. *Biomass Bioenergy*, 2000, 19: 271–279
- [8] Badani A G, Snowdon R G, Wittkop B, Lipsa F D, Baetzel R, Horn R, Haro A D, Font R, Lühns W, Friedt W. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 2006, 49: 1499–1509
- [9] Rahman M, Li G, Schroeder D, McVetty P. Inheritance of seed coat color genes in *Brassica napus* (L.) and tagging the genes using SRAP, SCAR and SNP molecular markers. *Mol Breed*, 2010, 26: 439–453
- [10] Xiao S S, Xu J S, Li Y, Zhang L, Shi S J, Shi S W, Wu J S, Liu K D. Generation and mapping of SCAR and CAPS markers linked to the seed coat color gene in *Brassica napus* using a genome-walking technique. *Genome*, 2007, 50: 611–618
- [11] Zhang Y, Li X, Chen W, Yi B, Wen J, Shen J, Ma C, Chen B, Tu J, Fu T. Identification of two major QTL for yellow seed color in two crosses of resynthesized *Brassica napus* line No. 2127-17. *Mol Breed*, 2011, 28: 335–342
- [12] Fu F Y, Liu L Z, Chai Y R, Chen L, Yang T, Jin M Y, Ma A F, Yan X Y, Zhang Z S, Li J N. Localization of QTLs for seed color using recombinant inbred lines of *Brassica napus* in different environments. *Genome*, 2007, 50: 840–854
- [13] Liu Z W, Fu T D, Tu J X, Chen B Y. Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 303–310
- [14] Van Deynze A E, Landry B S, Pauls K P. The identification of restriction fragment length polymorphisms linked to seed colour genes in *Brassica napus*. *Genome*, 1995, 38: 534–542
- [15] Yan J, Yang X, Shah T, Sánchez-Villeda H, Li J, Warburton M, Zhou Y, Crouch J H, Xu Y. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Mol Breed*, 2010, 25: 441–451
- [16] Akhunov E, Nicolet C, Dvorak J. Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 507–517
- [17] Westermeier P, Wenzel G, Mohler V. Development and evaluation of single-nucleotide polymorphism markers in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 1301–1311
- [18] Trick M, Long Y, Meng J, Bancroft I. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the polyploid *Brassica napus* using Solexa transcriptome sequencing. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7: 334–346
- [19] Albert S, Delseny M, Devic M. *BANYULS*, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant J*, 1997, 11: 289–299
- [20] Baudry A, Caboche M, Lepiniec L. *TT8* controls its own expression in a feedback regulation involving *TTG1* and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2006, 46: 768–779
- [21] Chiu L W, Zhou X, Burke S, Wu X, Prior R L, Li L. The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1470–1480
- [22] Devic M, Guillemot J, Debeaujon I, Bechtold N, Bensaude E, Koornneef M, Pelletier G, Delseny M. The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J*, 1999, 19: 387–398
- [23] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell*, 2000, 12: 1863–1878
- [24] Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L. The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, 2001, 13: 2099–2114
- [25] Xie D Y, Sharma S B, Paiva N L, Ferreira D, Dixon R A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 2003, 299: 396–399
- [26] Shikazono N, Yokota Y, Kitamura S, Suzuki C, Watanabe H, Tano S, Tanaka A. Mutation rate and novel *tt* mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions. *Genetics*, 2003, 163: 1449–1455
- [27] Routaboul J M, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2006, 224: 96–107
- [28] Meinke D W. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 1998, 282: 662–682

- [29] 马爱芬, 李加纳, 谌利, 钱伟, 付福友, 刘列钊. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示. 作物学报, 2008, 34: 526–529
- Ma A F, Li J N, Chen L, Qian W, Fu F Y, Liu L Z. Differential display of related genes to seed-coat color by cDNA-SRAP in *Brassica napus* L.. *Acta Agron Sin*, 2008, 34: 526–529 (in Chinese with English Abstract)
- [30] 曲存民, 付福友, 刘列钊, 王家丰, 毛丽佳, 原小燕, 谌利, 李加纳. 甘蓝型油菜胚色素成分的 QTL 定位. 作物学报, 2009, 35, 286–294
- Qu C M, Fu F Y, Liu L Z, Wang J F, Mao L J, Yuan X Y, Chen L, Li J N. QTL Mapping of Embryonic Pigment Components in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 286–294 (in Chinese with English Abstract)
- [31] Auger B, Baron C, Lucas M O, Vautrin S, Bergès H, Chalhoub B, Fautrel A, Renard M, Nesi N. *Brassica* orthologs from *BANYULS* belong to a small multigene family, which is involved in procyanidin accumulation in the seed. *Planta*, 2009, 230: 1167–1183
- [32] Wei Y L, Li J N, Lu J, Tang Z L, Pu D C, Chai Y R. Molecular cloning of *Brassica napus* *TRANSPARENT TESTA 2* gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Mol Biol Rep*, 2007, 34: 105–120
- [33] Akhova L, Ashe P, Tan Y, Datla R, Selvaraj G. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase. *Botany*, 2009, 87: 616–625
- [34] Chai Y R, Lei B, Huang H L, Li J N, Yin J M, Tang Z L, Wang R, Chen L. *TRANSPARENT TESTA12* genes from *Brassica napus* and parental species: cloning, evolution, and differential involvement in yellow seed trait. *Mol Genet Genom*, 2009, 281: 109–123
- [35] Lotz T, Snowdon R, Horn R, Dewal G, Weissshaar B, Friedt W, Caboche M, Chalhoub B. Molecular Analysis of *Arabidopsis thaliana* tt-genes in *Brassica napus*. In: Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress, 2003. pp 109–111
- [36] 严明理, 刘显军, 刘忠松, 官春云, 袁谋志, 熊兴华. 芥菜型油菜 4-二氢黄酮醇还原酶基因的克隆和表达分析. 作物学报, 2008, 34: 1–7
- Yan M L, Liu X J, Liu Z S, Guan C Y, Yuan M Z, Xiong X H. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in *Brassica juncea*. *Acta Agron Sin*, 2008, 34: 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [37] Sharma S B, Dixon R A. Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2005, 44: 62–75
- [38] Chen A H, Chai Y R, Li J N, Chen L. Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*). *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 247–260
- [39] Lu K, Chai Y R, Zhang K, Wang R, Chen L, Lei B, Lu J, Xu X F, Li J N. Cloning and characterization of phosphorus starvation inducible *Brassica napus* *PURPLE ACID PHOSPHATASE12* gene family, and imprinting of a recently evolved MITE-minisatellite twin structure. *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 963–975
- [40] Xu B B, Li J N, Zhang X K, Wang R, Xie L L, Chai Y R. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus*. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 350–363
- [41] Zhang K, Lu K, Qu C, Liang Y, Wang R, Chai Y, Li J. Gene silencing of *BnTT10* family genes causes retarded pigmentation and lignin reduction in the seed coat of *Brassica napus*. *PLoS One*, 2013, 8: e61247
- [42] Zhang J, Lu Y, Yuan Y, Zhang X, Geng J, Chen Y, Cloutier S, McVetty P B, Li G. Map-based cloning and characterization of a gene controlling hairiness and seed coat color traits in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 553–563
- [43] Li X, Chen L, Hong M, Zhang Y, Zu F, Wen J, Yi B, Ma C, Shen J, Tu J. A large insertion in bHLH transcription factor *BrTT8* resulting in yellow seed coat in *Brassica rapa*. *PLoS One*, 2012, 7: e44145
- [44] Padmaja L K, Agarwal P, Gupta V, Mukhopadhyay A, Sodhi Y S, Pental D, Pradhan A K. Natural mutations in two homoeologous *TT8* genes control yellow seed coat trait in allotetraploid *Brassica juncea* (AABB). *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 339–347
- [45] Stein A, Wittkop B, Liu L, Obermeier C, Friedt W, Snowdon R J. Dissection of a major QTL for seed colour and fibre content in *Brassica napus* reveals colocalization with candidate genes for phenylpropanoid biosynthesis and flavonoid deposition. *Plant Breed*, 2013, 132: 382–389
- [46] Marles M, Gruber M Y, Scoles G J, Muir A D. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. *Phytochemistry*, 2003, 62: 663–672
- [47] Park K I, Ishikawa N, Morita Y, Choi J D, Hoshino A, Iida S. A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation. *Plant J*, 2007, 49: 641–654
- [48] Furukawa T, Maekawa M, Oki T, Suda I, Iida S, Shimada H, Takamure I, Kadowaki K I. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *Plant J*, 2007, 49: 91–102
- [49] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. *TRANSPARENT TESTA GLABRA 2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell Online*, 2002, 14: 1359–1375
- [50] Dilkes B P, Spielman M, Weizbauer R, Watson B, Burkart-Waco D, Scott R J, Comai L. The maternally expressed WRKY transcription factor *TTG2* controls lethality in interploidy crosses of *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2008, 6: 2707–2720
- [51] Ishida T, Hattori S, Sano R, Inoue K, Shirano Y, Hayashi H, Shibata D, Sato S, Kato T, Tabata S. *Arabidopsis* *TRANSPARENT*

- TESTA GLABRA2* is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of *GLABRA2* transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell*, 2007, 19: 2531–2543
- [52] 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 J*, 2008, 53: 814–827
- [53] Marles M, Gruber M Y. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the *Brassicaceae*. *J Sci Food Agric*, 2004, 84: 251–262
- [54] 叶小利, 李加纳, 唐章林, 梁颖, 谌利. 甘蓝型油菜种皮色泽及相关性状的研究. 作物学报, 2001, 27: 550–556  
Ye X L, Li J N, Tang Z L, Liang Y, Chen L. Study on seedcoat color and related characters of *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 2001, 27: 550–556 (in Chinese with English abstract)
- [55] 叶小利, 李学刚, 李加纳. 甘蓝型油菜种皮黑色素形成机理的研究. 作物学报, 2002, 28: 638–643  
Ye X L, Li X G, Li J N. Mechanism of melanin synthesis in seed coat of *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2002, 28: 638–643 (in Chinese with English abstract)

## 欢迎订阅 2015 年《中国油料作物学报》

《中国油料作物学报》是由中国农业科学院油料作物研究所主办, 科学出版社出版, 全国唯一的一种有关油料作物专业学术期刊。主要刊登油菜、大豆、花生、芝麻、向日葵、胡麻及其他特种油料作物有关品种资源、遗传育种、栽培生理、土肥植保、综合加工利用以及品质测试技术等方面的首创性研究论文、综述专论等。主要供农业科研、教学和农业技术人员查阅和参考。

《中国油料作物学报》2008 年被列入首届中国精品科技期刊(全国仅遴选出 323 种), 多次被评为全国优秀农业期刊和湖北省优秀期刊。载文被国内外 18 家重要数据库收录, 如 CAB Abstract、CA、WTI、AgrisInternational、中国科技论文统计源期刊、CEPS 中文电子期刊(中国台湾)等。2013 年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》公布的影响因子为 1.037。载文已受到同行专家的广泛关注, 是展示油料作物科研的重要窗口, 欢迎国内外油料作物科技工作者踊跃投稿。请登陆本刊网站在线投稿。

《中国油料作物学报》双月出版, 刊号: ISSN 1007-9084, CN 42-1429/S; 邮发代号: 38-13, 每册定价 25 元; 国外发行: 中国国际图书贸易有限公司, 国外代号: BM6551, 每册定价 20 美元。也可直接向本刊编辑部订阅。

地址: 湖北武昌徐东二路 2 号中国农科院油料作物研究所学报编辑部, 邮编: 430062

电话: 027-86813823; 传真: 027-86813823

网址: <http://www.jouroilcrops.cn/>; E-mail: [ylxb@oilcrops.cn](mailto:ylxb@oilcrops.cn)