

特早花甘蓝型油菜的开花特征及特早花候选基因鉴定

余华胜¹, 张冬青¹, 陈佳麒², 张尧锋¹, 傅鹰¹

(¹浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021; ²杭州市余杭区农业技术推广中心, 杭州 310021)

摘要: 开花是植物从营养生长进入生殖生长的重要阶段。油菜早花早熟, 可有效解决油菜与其他夏季作物的茬口矛盾。挖掘不同的早花油菜资源, 研究油菜早花性状形成的分子机理, 可促进利用分子技术快速选育早熟油菜的育种进程。本研究以 1 个新发现的稳定遗传的特早花油菜迎春一号为研究对象, 在覆盖全年 9 个月的时间中设计了 15 个不同的播种期, 调查其开花特性。结果显示, 迎春一号在不同季节播种均可顺利开花, 其对低温春化的温度需求更弱于普通春性油菜。将迎春一号与半冬性早花品系 FM4 和半冬性晚花品系 FM5 进行比较发现, 在 10 月播种于半冬性生态区种植环境下, 迎春一号既能快速进入花期, 又表现较好的耐寒性, 综合农艺性状表现较好。对迎春一号开展分子生物学试验发现, 在高温生长环境下, 位于油菜 A02、A03、C02 和 C03 染色体上的春化途径关键基因 *BnaFLC* 的 6 个同源拷贝在迎春一号的营养生长阶段均出现了多拷贝基因的同步下调。以半冬性早花品系 FM4 和半冬性晚花品系 FM5 为对照, 利用 50× 全基因组重测序技术检测得到与油菜全基因组 1064 个开花基因相关的 16229 个 SNPs 和 5842 个 InDels。其中, 迎春一号特异的且会导致开花基因编码蛋白变异的 SNPs 和 InDels 分别为 69 个和 34 个, 包含与 *BnaFLC* 基因具有正向调控关系的 14 个 SNPs 和 4 个 InDels, 最终获得 11 个潜在候选基因。除了 1 个 *BnaFLC* 基因本身以外, 其余基因均处于 *BnaFLC* 上游区域, 且对 *BnaFLC* 基因的表达起正向调控作用。

关键词: 甘蓝型油菜; 特早花; 春化作用; 全基因组重测序; 候选基因

Identification of the Flowering Characteristics and Candidate Genes for a Very-early-flowering Oilseed Rape

YU Hua-sheng¹, ZHANG Dong-qing¹, CHEN Jia-qi², ZHANG Yao-feng¹, FU Ying¹

(¹Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021;

²Agricultural Technology Promotion Center of Yuhang District, Hangzhou 310021)

Abstract: Flowering is a crucial step for the transition from vegetative to reproductive growth in plant's life cycle. The character of early-flowering and early-maturing of oilseed rape is the key to solve the conflict between oilseed rape and other summer crops in the multiple-cropping system. Identification of early-flowering oilseed rape and dissecting the basis of early-flowering are conducive to accelerating the procedures of molecular breeding of early-maturing varieties. A novel and stably inherited very-early-flowering oilseed rape Yingchun Yi Hao was evaluated for flowering characteristics in the present study, with 15 sowing stages distributed in nine different months. The results showed that Yingchun Yi Hao sown in the different dates successfully flowered, and unlike common spring type oilseed rapes, was not demanding of low temperature for vernalization. Compared with early-flowering semi-winter line FM4 and late-flowering semi-winter line FM5, Yingchun Yi Hao sown in semi-winter ecological environments in October more rapidly entered the flowering stage, and also was

收稿日期: 2020-06-08 修回日期: 2020-07-07 网络出版日期: 2020-09-25

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200608001>

第一作者研究方向为油菜遗传育种与栽培, E-mail: yuhuasheng-0@163.com

通信作者: 傅鹰, 研究方向为油菜遗传育种, E-mail: fy97@163.com

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ19C130002); 国家重点研发计划 (2018YFD0100602); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02050-8)

Foundation Projects: Youth Fund of the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ19C130002), National Key Research and Development Project (2018YFD0100602), The Major Scientific and Technological Novel Variety Breeding Project of Zhejiang Province (2016C02050-8)

superior in cold tolerance and in general agronomic traits. The molecular experiment revealed that six copies of vernalization key gene *BnaFLC* on chromosomes A02, A03, C02 and C03 synchronously down-regulated the expression in Yingchun Yi Hao grown in high temperature environment during the vegetative growth stage. 50 × whole genome sequencing was performed for Yingchun Yi Hao and two reference samples, line FM4 and FM5, which identified 16229 SNPs and 5842 InDels correlated to 1064 flowering time genes in *Brassica napus*, and screened out 69 SNPs and 34 InDels that caused the variation of flowering time genes encoding proteins specific to Yingchun Yi Hao, including 14 SNPs and 4 InDels that showed positive regulation with *BnaFLC*, and 11 genes were deduced to be candidate genes for very-early-flowering of Yingchun Yi Hao. These genes, except *BnaFLC* itself, are located upstream of *BnaFLC* and positively regulate the expression of *BnaFLC*.

Key words: *Brassica napus* L.; very-early-flowering; vernalization; whole genome resequencing; candidate genes

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 是我国种植面积最大的油料作物, 是确保我国油料市场平稳发展的必须基础。在当前国际新形势和新冠肺炎疫情的大背景下, 若能扩大油菜种植面积将极大地缓解我国食用植物油供不应求、严重依赖进口的局面。双季稻区是我国油菜面积潜力资源最大的区域, 然而, 双季稻收获后由于缺乏迟播早收的油菜品种, 导致大量冬闲田撂荒。选育特早熟甘蓝型油菜品种, 可以充分利用双季稻区冬闲田, 减轻我国食用油进口压力。早熟品种通常具有早花性状, 尽管目前有一些早花、早熟的油菜品种通过了国家区域试验, 但至今未有品种大面积推广应用。究其原因, 目前的早熟油菜品种中仍然缺乏兼顾产量性状又同时满足生育期要求的优良品种。

拟南芥中已经有超过 300 个开花相关基因被成功鉴定^[1-3]。甘蓝型油菜的基因组与拟南芥的基因组表现高度同源, 是拟南芥基因组六倍化的产物^[4-5]。前人利用 QTL 定位、全基因组关联分析等手段对油菜开花时间开展了一系列的研究, 但只有为数不多的开花调控基因, 如 *Bna10FLC*、*BnaA.FRI.a* 等得到了鉴定和验证^[6-8]。深入挖掘更多的早花早熟甘蓝型油菜资源对于解析甘蓝型油菜开花机制有重要意义。

本研究以一个新型的特早花甘蓝型油菜迎春一号为研究对象, 在不同环境下鉴定其开花特征, 并结合全基因组重测序和基因表达分析进行关键基因的筛选, 揭示这一特异材料的特早花性状候选基因。本研究中的特早花甘蓝型油菜迎春一号可以为更多早花、优质甘蓝型油菜品种选育提供重要资源, 也将为揭示更多的甘蓝型油菜特早花优势等位基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究鉴定得到一个稳定遗传的特早花甘蓝型油菜品种迎春一号, 由浙江省农业科学院经过多年选育获得 (8119-1/青杂 5 号 F₄ 可育株)。为了研究迎春一号的开花特性, 春性甘蓝型油菜品种鸿油 88 和冬性甘蓝型油菜品种 EXPRESS 在本研究中作为对照材料。在农艺性状比较、基因表达分析和全基因组重测序研究部分, 普通早花半冬性甘蓝型油菜品系 FM4 和晚花半冬性甘蓝型油菜品系 FM5 被用作对照材料。

1.2 田间试验和性状调查

上述材料分别于 2018 年 10 月 5 日种植于浙江省农业科学院试验田, 常规栽培管理。花期避开行两端的边株, 逐株挂牌并记录各单株开花日期。油菜开花标准参考伍晓明等^[9]以油菜主茎第一朵花开为标准, 并于成熟期考察了株高、一次分枝数、主花序长度、主花序角果数、单株角果数、分枝部位、角果长度、每果粒数、单株产量, 考察方法参照文献^[10]。此外, 为鉴定特早花油菜迎春一号的开花特征, 采用了覆盖全年的 15 个播种时期, 分别为 2018 年的 7 月 5 日、8 月 27 日、9 月 6 日、9 月 17 日、9 月 24 日、10 月 14 日、11 月 7 日、11 月 22 日、12 月 7 日、12 月 22 日和 2019 年的 1 月 6 日、1 月 23 日、2 月 18 日、3 月 7 日、3 月 26 日, 材料播种于花盆中, 每次播种 30 盆, 自然条件下采用常规管理方式, 记载开花日期。普通早花半冬性甘蓝型油菜品系 FM4 和冬性甘蓝型油菜品种 EXPRESS 与迎春一号同期播种, 作为对照材料。

1.3 全基因组重测序与候选基因筛选

2018 年 12 月苗期时, 对特早花品种迎春

一号、早花品系 FM4 和晚花品系 FM5, 取幼嫩叶 0.2 g, 利用 OMEGA HP Plant DNA 试剂盒提取 DNA。按照 Illumina 公司提供的标准流程检测样品质量、构建文库、检测文库质量, 并通过 illumina HiSeq™ PE150 对 3 个材料开展 50× 覆盖度的全基因组重测序。测序得到的原始序列去除接头和低质量序列, 得到最终的 reads 数。通过 BWA 软件^[11] (参数: mem-t4-k32-M) 将过滤后的 reads 比对到油菜参考基因组 (http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/data/Brassica_napus_v4.1.chromosomes.fa.gz), 统计各样品的测序深度、基因组覆盖度等信息。比对结果经 SAMTOOLS 的 rmdup 命令去除重复^[12]。采用 GATK3.3 软件的 UnifiedGenotyper 模块进行多个样本单核苷酸多态性 (SNPs) 标记和插入缺失 (InDels) 标记的检测, 使用 Variant Filtration 进行过滤^[13], 并利用 SnpEff 软件对 SNP 和 InDel 进行注释^[14]。根据变异位点在参考基因组上的位置以及参考基因组上的基因位置信息, 可以得到变异位点在基因组发生的区域以及变异产生的影响 (同义、非同义突变等)。

为了预测关联区间内的候选基因, 我们收集了拟南芥、油菜中与开花过程相关的基因^[15]。将这些基因的物理位置与 SNPs 和 InDels 的物理位置进行比较, 如果 SNPs 和 InDels 位于这些开花基因的编码区, 且会产生非同义编码突变, 并且是特早花油菜迎春一号特异的变异, 则认为该基因为候选基因。

1.4 迎春一号与普通早花品系的 *BnaFLC* 基因表达分析

在特早花品种迎春一号与普通早花半冬性品系 FM4 出苗后 25 d 取茎尖生长点组织, 液氮速冻、保存于 -80 °C 冰箱备用。采用天根生化科技公司的 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 使用 RNase-Free DNase I 去除总 RNA 中污染的基因组 DNA, 具体步骤参照试剂盒使用说明书。BIO-RAD 公司的 iScript™ cDNA Synthesis Kit 用于将 RNA 反转录成 cDNA。基因表达的引物序列参考已有文献^[16]。实时荧光定量 PCR 在 CFX96™ Real-Time System 荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD) 上进行, 试剂盒采用 BIO-RAD 公司的 SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix SYBR Premix 荧光定量试剂盒, 反应体系和程序参照说明书。Actin7 为内参基因。每个材料设 3 个重复, 最终取平均值作为基因表达量。

2 结果与分析

2.1 特早花油菜品种迎春一号的开花特征鉴定及其他农艺性状比较

为了准确鉴定迎春一号的开花特征, 设计了 15 个播种期, 分别覆盖全年的 1 月、2 月、3 月、7 月、8 月、9 月、10 月、11 月和 12 月, 共 9 个月, 统计其开花特性。数据表明, 在 7 月、8 月和 9 月的高温条件下, 迎春一号表现出无需低温春化即可开花的特征, 而同期播种的春性甘蓝型油菜、普通早花半冬性甘蓝型油菜及冬性甘蓝型油菜均无法正常开花 (图 1), 说明迎春一号开花没有低温需求。



A: 7 月 5 日播种条件下迎春一号与春性油菜、半冬性早花油菜和冬性油菜的开花特征比较; B: 8 月 27 日和 9 月 6 日播种条件下迎春一号开花特征

A: Comparison of flowering characteristics between Yingchun Yi Hao, spring type oilseed rape, semi-winter type oilseed rape, and winter type oilseed rape when sown on July 5, B: Flowering characteristics of Yingchun Yi Hao sown on August 27 and September 6

图 1 高温环境下特早花甘蓝型油菜品种迎春一号的开花特征

Fig.1 Flowering characteristics for very-early flowering variety Yingchun Yi Hao under high temperature environment

比较迎春一号在 15 个不同播种时期开花特征, 发现该品种在本试验涉及到的 1-3 月、7-12 月, 这些完全不同的阶段播种, 均可以实现开花。其中, 在气

温高的 7 月初至 9 月底,以及气温逐渐回升的 2 月中旬至 3 月底播种,迎春一号的营养生长期短,可以

在较短时间内开花,随着温度的降低,营养生长时间逐渐增加(图 2)。

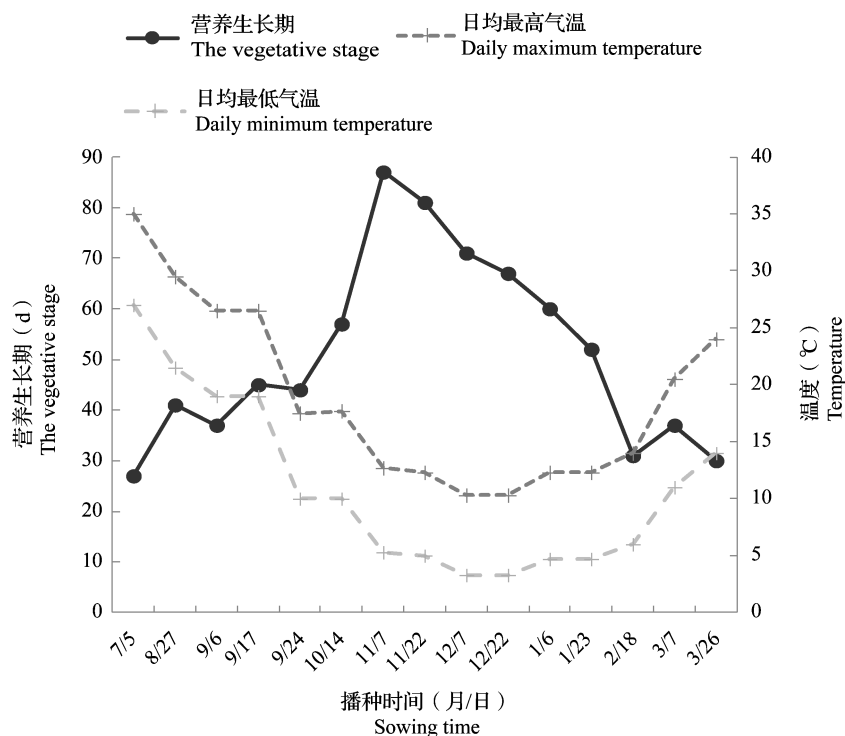


图 2 播种后不同的环境温度下特早花甘蓝型油菜品种迎春一号的营养生长期

Fig.2 Vegetative Period of very-early-flowering variety Yingchun Yi Hao sown at different times and grown under different ambient temperatures

在 2018 年 10 月中旬播种的条件下,迎春一号在 12 月中旬出现初花,随着气温的下降,花期持续到次年 4 月初,成熟期为 4 月底。为了鉴定迎春一号的其他农艺性状特征,以普通的半冬性早花油菜品系 FM4 和半冬性晚花品系 FM5 作为对照,考察了花期、株高、分枝部位、一次分枝数、主花序长度、主花序有效角果数、单株有效角果数、每果粒数、角果

长度共 9 项重要农艺性状表型(表 1)。数据显示,特早花半冬性油菜品种迎春一号在正季播种的条件下,可以更快进入花期,而成熟期的株高比普通的早花半冬性品系和晚花半冬性品系更矮、分枝部位更低、单株角果数与每果粒数更多、角果更长、单株产量更高,说明迎春一号虽然具有无需春化即可开花的特早花性状,但在半冬性环境下仍可顺利度过越冬期,耐

表 1 迎春一号与普通半冬性早花品系和半冬性晚花品系的产量关联性状比较

Table 1 Comparison of yield-related traits between Yingchun Yi Hao and semi-winter lines with early-flowering and late-flowering phenotypes

品种(系) Variety or line	花期 FT	株高 (cm) PH	分枝部位 (cm) BH	一次分枝数 BN	主花序长度 (cm) MFL	主花序角果数 MFS	单株角果数 PS	每果粒数 SN	角果长度 (cm) SL	单株产量 (g) PY
迎春一号 Yingchun Yi Hao	57	119.2	17.60	5.40	60.20	50.40	471.20	22.48	6.26	24.71
FM4	113	135.4	44.00	6.60	49.80	54.00	368.20	20.52	5.00	17.63
$P_{t\text{ test}}$	0	0.009	0.008	0.180	0.001	0.280	0.045	0.153	0	0
迎春一号 Yingchun Yi Hao	57	119.2	17.60	5.40	60.20	50.40	471.20	22.48	6.26	24.71
FM5	149	181.0	63.67	8.33	68.33	96.00	337.67	18.47	5.10	14.55
$P_{t\text{ test}}$	0	0	0	0.016	0.036	0	0.045	0.038	0.002	0

FT: Flowering time, PH: Plant height, BH: Branch height, BN: Branch number, MFL: Main inflorescence length, MFS: Main inflorescence siliques number, PS: Siliques number per plant, SN: Seed number per silique, SL: Silique length, PY: Plant yield

寒性较好,产量以及产量关联性状较为优秀。

2.2 春化途径关键基因 *BnaFLC* 的表达分析

根据前期试验数据,迎春一号在 7 月 5 日播种,8 月 1 日表现开花,无需低温春化条件。因此在基因表达试验设计时,将迎春一号与普通的半冬性早花品系 FM4 在 7 月 5 日播种,让其在高温环境下生长,播种后 15 d,选取生长点幼嫩组织检测春化途径关键基因 *BnaFLC* 的表达情况。已有文献报道,*BnaFLC* 在油菜中存在 9 个拷贝 (*BnaFLC.A02*、*BnaFLC.A03a*、*BnaFLC.A03b*、*BnaFLC.A10*、*BnaFLC.C02*、*BnaFLC.C03a*、*BnaFLC.C03b*、*BnaFLC.C09a* 和 *BnaFLC.C09b*),分别位于油菜的 A02、A03、A10、C02、C03 和 C09 染色体^[17]。根据

序列相似度,利用 4 对引物对 *BnaFLC* 这 9 个同源基因的表达情况进行检测^[17]。数据表明,迎春一号在高温生长环境下,播种后 15 d(开花前 10 d),除了位于 A10 和 C09 染色体上的 *BnaFLC* 基因的 3 个同源拷贝 (*BnaFLC.A10*、*BnaFLC.C09a* 和 *BnaFLC.C09b*) 外,*BnaFLC* 其余的 6 个同源拷贝 (*BnaFLC.A02*、*BnaFLC.A03a*、*BnaFLC.A03b*、*BnaFLC.C02*、*BnaFLC.C03a*、*BnaFLC.C03b*) 在迎春一号中的表达水平极显著低于普通早花半冬性品系 FM4(图 3)。由此可知,*BnaFLC* 多拷贝基因的下调表达是迎春一号在高温生长环境下仍可开花的内因,而 *BnaFLC* 上游调控基因的变异可能是导致 *BnaFLC* 多拷贝共同下调表达的关键。

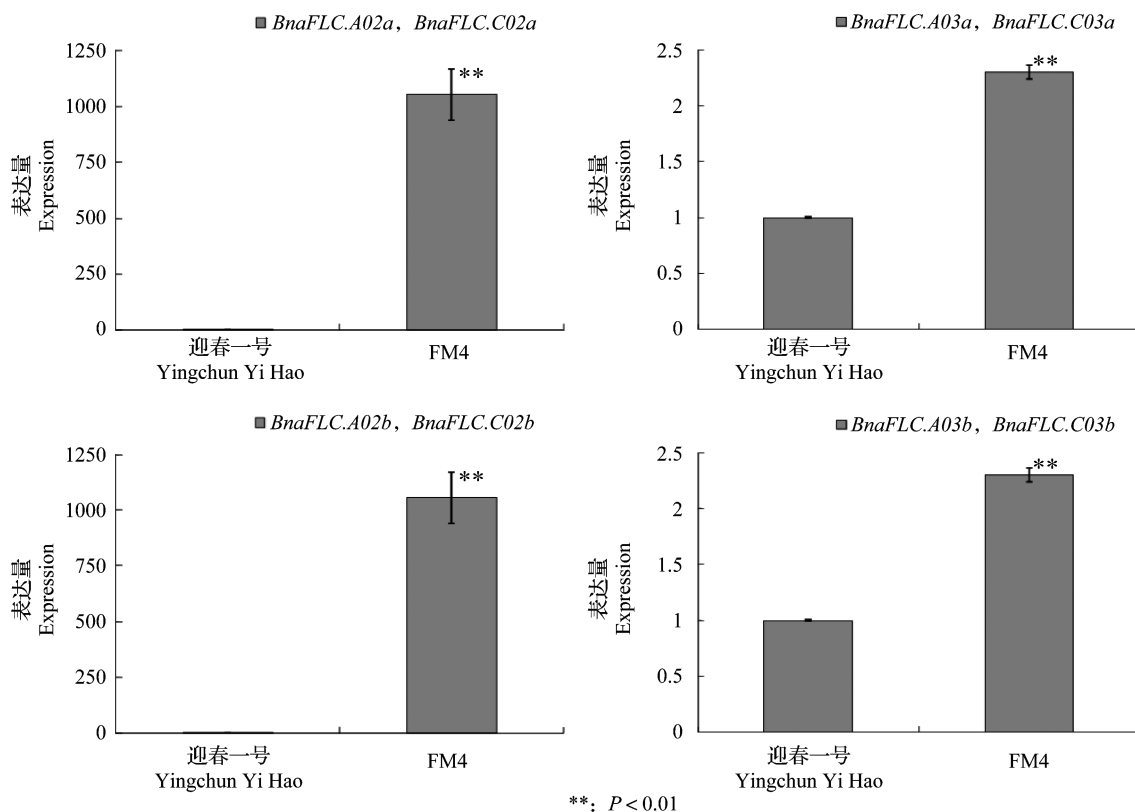


图 3 迎春一号与半冬性品系 FM4 的 *BnaFLC* 基因的表达比较

Fig.3 *BnaFLC* expression comparison between Yingchun Yi Hao and semi-winter type FM4

2.3 基于全基因组重测序的候选基因挖掘

对特早花品种迎春一号、普通半冬性早花油菜品系 FM4 和半冬性晚花品系 FM5 开展全基因组重测序,测序深度为 50×。从测序数据可知,96.95%~98.12% 的 reads 可比对到参考基因组,全基因组 88.90%~91.60% 的碱基达到了 10× 以上的覆盖深度(表 2)。由此可知,测序质量、测序深度和序列覆盖度均表现较好,可用于后续分析。

3 个材料在全基因组范围内总共检测到 3218373 个和 1206241 个 SNPs 和 InDels。为了鉴定与开花性状相关的 SNPs 和 InDels,我们搜集了文献报道的甘蓝型油菜中的 1064 个开花相关基因^[18],挖掘与这些基因相关的 SNPs 和 InDels。3 个材料检测到与开花基因相关的 16229 个 SNPs 和 5842 个 InDels(表 3)。

表 2 样品测序数据统计
Table 2 Statistics of sequencing data

样品 Sample	Reads 总数 Total reads	过滤后 reads Clean reads	定位到参考基因组的 reads 占比 (%) Mapped reads	覆盖深度 (×) Cover depth	10 × 覆盖度的碱基占比 (%) 10 × cover depth ratio
R01	465741176	232870588	98.12	59	91.60
R02	339037856	169518928	96.95	44	89.83
R03	353028456	176514228	97.67	43	88.90

表 3 全基因组范围内开花相关基因的 SNPs 和 InDels 变异情况统计
Table 3 Statistics of SNPs and InDels between samples for genome-wide flowering-related genes

类别 Type	SNPs	InDels
终止密码子获得 Stop gained	41	10
终止密码子丢失 Stop lost	38	5
内含子 Intron	2778	2449
基因下游区域 5K 以内 Downstream within 5K	7821	1406
基因上游区域 5K 以内 Upstream within 5K	3022	1454
非同义编码突变 Non synonymous coding	1309	0
同义编码突变 Synonymous coding	1179	0
基因内,无转录本信息 Intragenic, no transcriptional information	41	0
剪切位点区域突变 Splice site region	0	162
剪切供体突变 Splice site donor	0	19
剪切受体突变 Splice site acceptor	0	3
移码突变 Frame shift	0	106
密码子插入 Codon insertion	0	69
密码子删除 Codon deletion	0	74
密码子改变 + 密码子插入 Codon change plus codon insertion	0	31
密码子改变 + 密码子删除 Codon change plus codon deletion	0	54
总计 Total	16229	5842

为了鉴定迎春一号无需低温春化即可开花的候选基因,对 SNPs 和 InDels 进行筛选,获得迎春一号特异且产生编码蛋白变异的 SNPs 69 个和 InDels 34 个。由于迎春一号中开花关键基因 *BnaFLC* 出现了多拷贝的表达下调,在候选基因筛选时,参考这些 SNPs 与 InDels 所属基因注释信息以及开花调控途径中与开花关键基因 *BnaFLC* 的调控关系,最终获得 11 个潜在候选基因,其中涉及 14 个 SNPs 和 4 个 InDels (表 4)。

3 讨论

3.1 迎春一号是 1 个新型的无需低温春化的特早花突变体

开花是植物由营养生长向生殖生长转变的重要标志,是作物重要的农艺性状。油菜不同的开花时间决定了不同的生育期时间。为适应不同种植区显著差异的气候环境,油菜分化出了 3 种不同的生态

类型,分别为冬性、半冬性和春性。冬性油菜需要长时间的低温,一般需要经历 1 个月以上的低温春化才能顺利开花,半冬性油菜对春化过程的需求弱于冬性油菜,一般 15~20 d 的低温春化即可顺利开花,而春性油菜则对春化过程的需求更弱^[19]。通常来讲,油菜抗寒性与品种感温性有密切关系,因此,一般春性油菜的抗寒性最弱,冬性油菜的抗寒性最强。本研究发现了 1 个特早花迎春一号品种,其耐寒性强于普通春性油菜,在半冬性气候环境的长江下游区域依然可以顺利越冬,且农艺性状并未受到明显抑制。同时,该材料对低温春化的需求更弱于春性油菜,在 7 月高温环境下仍然可以顺利开花,而同期播种的春性油菜无法顺利开花。由此可知,本研究中的迎春一号油菜是 1 个新型的特早花突变材料,该材料可在全年不同季节播种,并顺利完成开花,进入生殖生长。甘蓝型油菜驯化历史短,导致遗传基础狭隘,优良资源较为缺乏。优良种质资源是品种

表 4 迎春一号特早花性状候选基因
Table 4 Candidate genes for very-early-flowering of Yingchun Yi Hao

变异类型 Type of variation	染色体 Chromosome	物理位置 Physical location	对照基因型 Reference genotype	迎春一号基因型 'Yingchun Yi Hao' genotype	基因编号 Gene number	基因名称 Gene name	开花调控途径 Pathway of flowering regulation	备注 Note
SNPs	chr_A05	19340719	A	C	BnaA05g26370D	<i>PIE1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_Cnn_random	22044731	T	G	BnaCnng23620D	<i>PIE1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_A01_random	1530509	G	T	BnaA01g36060D	<i>VIP5</i>	自主途径	非同义编码
	chr_Ann_random	6809109	A	C	BnaAnng06810D	<i>VIP4</i>	自主途径	非同义编码
	chr_Ann_random	6810864	T	C	BnaAnng06810D	<i>VIP4</i>	自主途径	非同义编码
	chr_Ann_random	6808973	T	A	BnaAnng06810D	<i>VIP4</i>	自主途径	非同义编码
	chr_C07	33991237	G	T	BnaC07g29060D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_C03	2354134	T	A	BnaC03g04840D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_C03	2353882	T	G	BnaC03g04840D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_A03	1647589	T	G	BnaA03g03410D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_A06	19181269	C	G	BnaA06g27890D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_C07	33989884	A	G	BnaC07g29060D	<i>EMF1</i>	自主途径	非同义编码
	chr_A03	6004269	C	T	BnaA03g13220D	<i>EMF2</i>	自主途径	非同义编码
	chr_C02	11515735	C	G	BnaC02g15870D	<i>EMF2</i>	自主途径	非同义编码
	chr_A06	19178806	AGAAGCT	A	BnaA06g27890D	<i>EMF1</i>	自主途径	密码子删除
	chr_A06	19181068	CAAG	C	BnaA06g27890D	<i>EMF1</i>	自主途径	密码子删除
InDels	chr_A06	19180429	CACA	C	BnaA06g27890D	<i>EMF1</i>	自主途径	密码子删除
	chr_A10	15002186	T	TA	BnaA10g22080D	<i>FLC</i>	开花调节关键因子	移码突变

选育的前提和基础,因此早熟油菜品种的选育首先要广泛创制和收集优异的早熟油菜种质资源。该新型的油菜特早花资源材料因其较优异的耐寒性和特早花特性,无论在双季稻种植区域还是单季稻种植区域,都可以产生更充裕的茬口时间,便于应对突发天气状况,保证后茬作物正常种植,具有广阔的应用前景,并且对于拓宽甘蓝型油菜的变异类型具有重要价值。

3.2 迎春一号特早花候选基因预测

甘蓝型油菜的基因组是模式植物拟南芥基因组六倍化过程的产物^[5]。拟南芥开花调控途径及其分子机理为迎春一号特早花性状的遗传研究提供了参考。基因表达结果显示,特早花甘蓝型油菜迎春一号中开花调控关键基因 *BnaFLC* 出现了多拷贝同步下调,暗示了 *BnaFLC* 上游调控基因可能产生了变异。根据迎春一号特异的开花基因 SNPs 和 InDels 以及这些基因与 *BnaFLC* 的遗传调控关系,总共预测得到 11 个潜在候选基因。在开花调控

网络中,这些基因对 *BnaFLC* 基因的表达具有正向调控作用^[18],因此后期有必要针对这些基因开展更加深入的功能验证。

参考文献

[1] Bouche F, Lobet G, Tocquin P, Perilleux C. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Research, 2016, 44: 1167-1171

[2] Fornara F, de Montaigu A, Coupland G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. Cell, 2010, 141 (3): 550

[3] Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68 (12): 2013-2037

[4] Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin I A, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, Wang X, Wang J, Lu K, Fang Z, Bancroft I, Yang T J, Hu Q, Wang X, Yue Z, Li H, Yang L, Wu J, Zhou Q, Wang W, King G J, Pires J C, Lu C, Wu Z, Sampath P, Wang Z, Guo H, Pan S, Yang L, Min J, Zhang D, Jin D, Li W, Belcram H, Tu J, Guan M, Qi C, Du D, Li J, Jiang L, Batley J, Sharpe A G, Park B S, Ruperao P, Cheng F, Waminal N E, Huang Y, Dong C, Wang L, Li J, Hu Z, Zhuang M, Huang Y, Huang J, Shi J, Mei D, Liu J, Lee T H,

- Wang J, Jin H, Li Z, Li X, Zhang J, Xiao L, Zhou Y, Liu Z, Liu X, Qin R, Tang X, Liu W, Wang Y, Zhang Y, Lee J, Kim H H, Denoeud F, Xu X, Liang X, Hua W, Wang X, Wang J, Chalhoub B, Paterson A H. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 2014, 5: 3930-3940
- [5] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin I A, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, Corr  a M, Da Silva C, Just J, Falentin C, Koh C S, Le Clainche I, Bernard M, Bento P, Noel B, Labadie K, Alberti A, Charles M, Arnaud D, Guo H, Daviaud C, Alamyery S, Jabbari K, Zhao M, Edger P P, Chelaifa H, Tack D, Lassalle G, Mestiri I, Schnel N, Le Paslier M C, Fan G, Renault V, Bayer P E, Golicz A A, Manoli S, Lee T H, Thi V H, Chalabi S, Hu Q, Fan C, Tollenaere R, Lu Y, Battail C, Shen J, Sidebottom C H, Wang X, Canaguier A, Chauveau A, B  rard A, Deniot G, Guan M, Liu Z, Sun F, Lim Y P, Lyons E, Town C D, Bancroft I, Wang X, Meng J, Ma J, Pires J C, King G J, Brunel D, Delourme R, Renard M, Aury J M, Adams K L, Batley J, Snowdon R J, Tost J, Edwards D, Zhou Y, Hua W, Sharpe A G, Paterson A H, Guan C, Wincker P. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345 (6199): 950-953
- [6] Raman H, Raman R, Coombes N, Song J, Prangnell R, Bandaranayake C, Tahira R, Sundaramoorthi V, Killian A, Meng J, Dennis E S, Balasubramanian S. Genome-wide association analyses reveal complex genetic architecture underlying natural variation for flowering time in canola. *Plant Cell Environment*, 2016, 39: 1228-1239
- [7] Xu L, Hu K, Zhang Z, Guan C, Chen S, Hua W, Li J, Wen J, Yi B, Shen J, Ma C, Tu J, Fu T. Genome-wide association study reveals the genetic architecture of flowering time in rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Research*, 2016, 23: 43-52
- [8] Wang N, Qian W, Suppanz I, Wei L, Mao B, Long Y, Meng J, M  ller A E, Jung C. Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the FRIGIDA homologue *BnaA.FRI.a*. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (15): 5641-5658
- [9] 伍晓明, 陈碧云, 陆远. 油菜种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2007: 51
- Wu X M, Chen B Y, Lu Y. Description and data standards for rape germplasm resources. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 51
- [10] Shi J, Li R, Zou J, Long Y, Meng J. A dynamic and complex network regulates the heterosis of yield-correlated traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). *PLoS ONE*, 2011, 6 (7): e21645
- [11] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25 (14): 1754-1760
- [12] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Abecasis G M, Duebin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2009, 25 (16): 2078-2079
- [13] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo M A. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research*, 2010, 20 (9): 1297-1303
- [14] Cingolani P, Platts A, Wang L L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land S J, Lu X, Ruden D M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly*, 2012, 6 (2): 80-92
- [15] Li H, Fan Y, Yu J, Chai L, Zhang J, Jiang J, Cui C, Zheng B, Jiang L, Lu K. Genome-wide identification of flowering-time genes in *Brassica* species and reveals a correlation between selective pressure and expression patterns of vernalization-pathway genes in *Brassica napus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19, 3632
- [16] Zou X, Suppanz I, Raman H, Hou J, Wang J, Long Y, Jung C, Meng J. Comparative analysis of FLC homologues in Brassicaceae provides insight into their role in the evolution of oilseed rape. *PLoS ONE*, 2012, 7: e45751
- [17] Hou J, Long Y, Raman H, Zou X, Wang J, Dai S, Xiao Q, Li C, Fan L, Liu B, Meng J. A Tourist-like MITE insertion in the upstream region of the *BnFLC.A10* gene is associated with vernalization requirement in rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biology*, 2012, 12 (1): 238-250
- [18] Bl  mel M, Dally N, Jung C. Flowering time regulation in crops-what did we learn from *Arabidopsis*?. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 121-129
- [19] 张晓梅, 姚艳梅, 徐亮, 杜德志. 青藏高原早熟甘蓝型春油菜遗传资源研究. *植物遗传资源学报*, 2011, 12 (3): 374-380
- Zhang X M, Yao Y M, Xu L, Du D Z. Genetic resources of *Brassica napus* L. strains with early maturity in Qinghai-tibet Plateau. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12 (3): 374-380