

PEG 模拟干旱下甘蓝型油菜萌发期耐旱性全基因组关联分析

张天瑶¹, 李鸿洋¹, 杜媛媛¹, 赵飞雪¹, 徐佳丽¹, 徐爱遐¹, 李施蒙², 龙卫华³, 黄镇¹, 李可琪¹

(¹ 西北农林科技大学农学院/干旱地区作物胁迫生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; ² 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 拉萨 850032; ³ 江苏开放大学, 南京 210036)

摘要: 甘蓝型油菜是我国获取食用植物油的主要来源, 对我国食用油供给安全具有重要作用, 干旱严重制约我国油菜的生产。挖掘甘蓝型油菜萌发期的耐旱基因位点及候选基因, 将为培育耐旱油菜新品种提供帮助。本研究以145份甘蓝型油菜种质资源为材料, 分别在正常和15% PEG6000 模拟干旱条件下进行种子萌发, 调查不同材料的发芽势、成苗率和发芽指数等数据, 筛选甘蓝型油菜萌发期耐旱指标, 并进行全基因组关联分析。结果表明: 发芽指数可以作为油菜萌发期耐旱性指标, 以发芽指数为基础, 筛选到17 份极端耐旱和9份极度敏感的种质。用混合线性模型(MLM)对发芽指数进行GWAS分析, 共检测到2个与油菜耐旱性显著关联的主效位点, 分布于C07和C09两条染色体, 其中C07染色体上有11显著关联SNP, C09染色体上有3个显著关联SNP。结合显著关联SNP 区间内候选基因的功能注释及其在不同胁迫下的表达量数据, 发现 *BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS* 和 *BnaC07G0290700ZS* 受干旱胁迫诱导, 表达量发生显著变化, 推测 *BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS* 和 *BnaC07G0290700ZS* 三个基因为调控甘蓝型油菜萌发期耐旱性的关键候选基因。

关键词: 甘蓝型油菜; 耐旱; 全基因组关联分析; 发芽势; 发芽指数

Genome-Wide Association Analysis of Drought Tolerance in

Brassica Napus During Germination under PEG Simulated Drought

ZHANG Tianyao¹, LI Hongyang¹, DU Yuanyuan¹, ZHAO Feixue¹, XU Jiali¹, XU Aixia¹, LI Shimeng²,
LONG Weihua³, HUANG Zhen¹, LI Keqi¹

(¹ College of Agronomy, Northwest A&F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas Yangling, 712100, Shaanx;² Institute of Agriculture, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa850032;³ Jiangsu Open University, Nanjing 210036)

Abstract: *Brassica napus* is the main source of edible vegetable oil in China, which plays an important role in the security of edible oil supply, and drought has seriously constrained the production of *B. napus* in China. Mining drought tolerance loci and candidate genes in *B. napus* germination will provide theoretical basis and technical support for breeding new drought-tolerant *B. napus* varieties. In this study, 145 *B. napus* germplasm resources were used for seed germination under normal and 15%

收稿日期: 2024-02-24 网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为甘蓝型油菜耐逆性分子遗传育种, Email: zty2859024074@nwfau.edu.cn

通信作者: 李可琪, 研究方向为甘蓝型油菜耐逆性分子遗传育种, Email: likeqi1218@sina.com

黄镇, 研究方向为甘蓝型油菜耐逆性分子遗传育种, Email: huang_zhen.8@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1200400), 拉萨市重点科技计划项目 (LSKJ202430)

Foundation projects: the National Key Research and Development Program (2022YFD1200400), the Lhasa Key Science and Technology Project (LSKJ202430)

PEG6000 conditions, respectively. The data of germination potential, seedling formation rate and germination index of different materials were investigated. The drought tolerance indicators were screened during germination and genome-wide association analysis was performed. The results showed that germination index could be used as an indicator of drought tolerance during the germination stage of *B. napus*. Total of 17 extreme drought-resistant and 9 extreme drought-sensitive germplasm were screened on the basis of germination index. A total of 2 major effect loci significantly associated with drought tolerance were detected by GWAS analysis of germination index using MLM (mixed linear model) in *B. napus*, which were distributed on two chromosomes, C07 and C09, with 11 SNP on chromosome C07 and 3 SNP on chromosome C09. Combining with the functional annotation of the candidate genes in the significantly associated SNP intervals and

their expression data under different stresses, *BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS* and *BnaC07G0290700ZS* were significantly induced by drought stress, and it was hypothesized that *BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS* and *BnaC07G0290700ZS* are the key genes regulating drought tolerance in *B. napus* during germination stage.

Key words: *Brassica napus*; drought tolerance; GWAS; germination potential; germination index

干旱严重影响油菜正常生长和产量，培育具有高产潜力的油菜耐旱新品种已经成为育种家的主要目标^[1]。目前，油菜耐旱育种也在逐步发展，Wang等^[2]构建了由干旱诱导型rd29A启动子驱动的*ERAI* (*Enhanced response to ABA 1*)的甘蓝型油菜转基因植株，其在干旱胁迫下表现为气孔导度和水分蒸腾显著降低，对脱落酸敏感性增强和籽粒产量增加。Lu等^[3]在甘蓝型油菜中过表达拟南芥磷脂酶基因 (*Phospholipase Dα1*)，转基因植株在高盐和干旱胁迫条件下表现出水分散失减少、生物产量和籽粒产量增加。加拿大转基因油菜技术发展成熟，其转基因油菜种植面积位于世界第一^[4]，我国对转基因技术的态度较为保守，发展较为缓慢^[5]。为了保障粮食安全，挖掘优质基因、培育新品种已经成为育种工作者的重要任务。

在油菜萌发过程中干旱对油菜生长发育具有重要影响，干旱不仅抑制萌发期油菜的根长、苗高和单株鲜重等，还导致植物细胞内活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 含量增多，进而使植物细胞内超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase) 和过氧化物酶 (POD, peroxidase) 等抗氧化物酶含量升高，抗氧化物酶基因的表达量也有所上升^[6]。在干旱胁迫下，植物细胞内渗透压失衡，萌发期油菜细胞内的脯氨酸 (Pro, proline) 含量显著升高从而维持细胞内渗透压的平衡^[6]。总的来说，油菜在萌发期遭遇干旱胁迫时，自身生长发育会受到一定程度的影响，但是，本身也会进行代谢活动来减少干旱带来的影响。

在油菜耐旱性全基因组分析方面，许多学者在油菜不同生育时期都筛选过不同的耐旱指标并进行全基因组关联分析，挖掘到与耐旱性显著关联的SNP位点。洪双^[7]以107份甘蓝型油菜微核心种质为材料，用地上部鲜重胁迫指数、植株总鲜重胁迫指数和旱害指数来评价油菜苗期的耐旱性，并综合应用这3个指标进行GWAS分析，共鉴定到36个与耐旱显著关联的SNP，并在关联区域挖掘到*BnaC09g32050D*等21个耐旱候选基因。Khanzada等^[8]利用15%PEG6000模拟干旱处理，获得228份油菜材料的耐逆指数和敏感指数，通过全基因组关联分析鉴定出与耐旱相关的85个候选基因。

种子萌发是作物生长周期的起始阶段，也是作物适应干旱胁迫的关键时期，其萌发阶段的生理进程直接关乎油菜后期的营养生长和生殖生长^[9]。干旱对农作物不同生育时期均会造成影响，尤其是种子萌发期易受干旱胁迫，影响作物的萌发及其后期的品质和产量，进而导致生产受到限制^[10]。因此，研究甘蓝型油菜萌发期的耐旱性具有重要意义。前人多在油菜苗期进行耐旱性全基因组关联分析，在油菜萌发期

开展的研究较少。PEG6000模拟干旱条件是实验室常用的方法之一，主要原理是惰性、非离子型的渗透调节剂聚乙二醇（PEG, polyethylene glycol）自身不能通过植物细胞壁渗入细胞内，且无毒性，可人为模拟水分胁迫条件^[11]。本研究以145份甘蓝型油菜种质资源为材料，采用PEG6000模拟干旱条件，在萌发阶段鉴定145份油菜种质的耐旱性,并通过全基因组关联分析对油菜耐旱性进行QTL定位，以期获得与耐旱性相关的关联位点和候选基因，为油菜耐旱性新品种的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以145份甘蓝型油菜种质资源组成的自然群体为材料，所有材料均由西北农林科技大学油菜种质创新和遗传育种课题组提供。

1.2 油菜萌发期耐旱表型调查

每份材料分别取大小均匀、饱满、无病虫害的30粒种子灭菌后置于90 mm×15 mm的培养皿中，其中放置已灭菌的两层滤纸作为芽床，加入3 mL 15%的PEG6000 溶液进行萌发，对照加等量蒸馏水，置于16h/8h的光/暗条件的25℃恒温光照培养箱中培养7 d，每天记录发芽数及成苗数（将子叶展开成为正常幼苗记为成苗），3次生物学重复，最后计算发芽势、成苗率、相对发芽势、相对成苗率和发芽指数。各指标采用如下公式计算^[12-13]：

发芽势（Germination potential）=第3天发芽种子数/供试种子数×100%^[14]；

成苗率（Seeding Ppercentage）=第7天成苗数（子叶展开）/供试种子数×100%；

发芽指数（GI）= $\sum (Gt/Dt)$ ，其中Gt为在不同时间的发芽数，Dt为发芽天数；

相对发芽势（Relative permination potential）=处理组发芽势/对照组发芽势×100；

相对成苗率（Relative seeding rate）=处理组成苗率/对照组成苗率×100%。

1.3 表型数据分析

利用Excel软件进行发芽势、成苗率和发芽指数的计算，利用SPSS26软件进行统计分析，并用R语言进行频率分布直方图、相关性图和饼图的绘制。

1.4 全基因组关联分析

以Zhang等^[15]对这145份油菜自然群体开发的35765个SNP为基因型数据，利用TASSEL软件的MLM模型对145份油菜在干旱胁迫下的发芽指数进行全基因组关联分析，当 $-\log_{10}(p)$ 值大于4的SNP可以被认为是与耐旱性显著关联的位点。

1.5 候选基因预测

根据甘蓝型油菜Darmor-bzh参考基因组^[16]，将与耐旱性显著相关的SNP位点上下游100 kb范围作为候选区间，获得候选基因。并进一步通过BLAST比对查找Darmor-bzh基因组上耐旱相关基因所对应的ZS11号参考

基因组的基因编号，在BnIR数据库中检索候选基因在不同胁迫下的根和叶片的转录组信息^[17]。用R包pheatmap进行热图的绘制，没有处理的根和叶片作为对照。

2 结果与分析

2.1 不同种质耐旱性分析

油菜种子在正常对照组中发芽势和成苗率均大于92%，说明该试验所使用的种子种胚发育良好，生命力强，可以用来进行发芽试验^[14]。与对照相比，在15%的PEG6000处理下萌发，发现145份油菜种质资源的相对发芽势、相对成苗率和发芽指数均呈现出明显变异，平均变异系数分别为13.79%、29.54%和31.04%，除相对发芽势之外，发芽指数和相对成苗率均呈正态分布（表1，图1）。发芽指数、相对发芽势和相对成苗率之间极显著正相关（图2），其中发芽指数与相对发芽势和相对成苗率的相关性明显高于相对发芽势与相对成苗率的相关性；并且相对发芽势和相对成苗率各重复之间的变异系数差异较大，这表明相对发芽势和相对成苗率受外界因素影响，产生了较大的误差，而发芽指数则在一定程度上避免了误差所带来的影响。综上分析，发芽指数与相对发芽势和相对成苗率比，能够较好的反应油菜萌发期的耐旱性，因此本研究选用发芽指数作为评价油菜萌发期耐旱性的指标。

表1 PEG6000处理下145份甘蓝型油菜种质的统计数据
Table 1 Statistical data of 145 *Brassica napus* germplasm under PEG6000 treatment

指 标	处理重复	平均值±	变异系数				偏 度	遗 传 力
Indicator	Repeat treatment	标准差	最 小 值	最 大 值	(%)	峰 度	Skewness	H ²
		Mean±SD			CV			
相对发芽势 Relative germination potential	重复 1	0.94±0.09	0.57	1.00	9.57	4.022	-2.027	0.85
	重复 2	0.93±0.11	0.30	1.00	11.83	9.881	-2.846	
	重复 3	0.74±0.24	0.10	1.00	32.43	-0.199	-0.742	
	平均值	0.87±0.12	0.34	1.00	13.79	3.253	-1.601	
相对成苗率 Relative seedling success	重复 1	0.22±0.15	0	0.73	68.18	0.032	0.723	0.85
	重复 2	0.52±0.24	0.03	1.00	46.15	-0.696	-0.348	
	重复 3	0.59±0.19	0.13	1.00	32.20	-0.606	-0.177	
	平均值	0.44±0.13	0.12	0.72	29.54	-0.533	0.034	
发芽指数 germination index	重复 1	25.18±11.7	4.83	52.00	46.50	-0.612	0.537	0.87
	重复 2	24.95±9.17	1.95	42.62	36.75	-0.126	-0.809	
	重复 3	29.23±9.22	3.22	45.00	31.54	-0.028	-0.718	
	平均值	26.45±8.21	5.48	41.84	31.04	-0.429	-0.241	

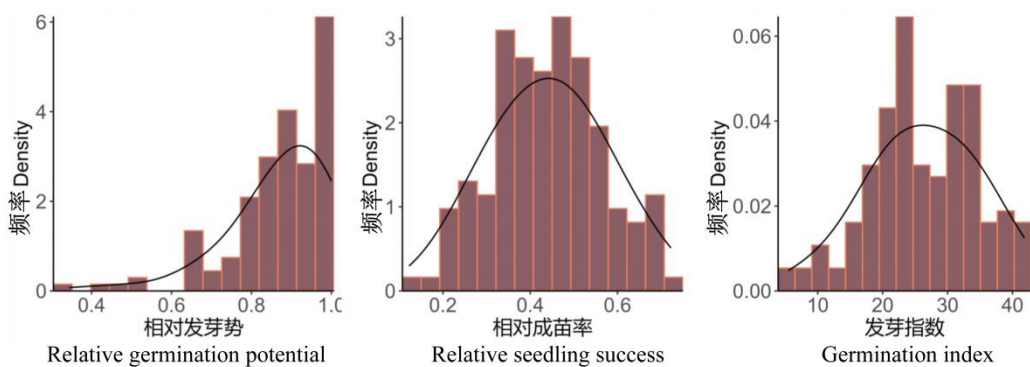
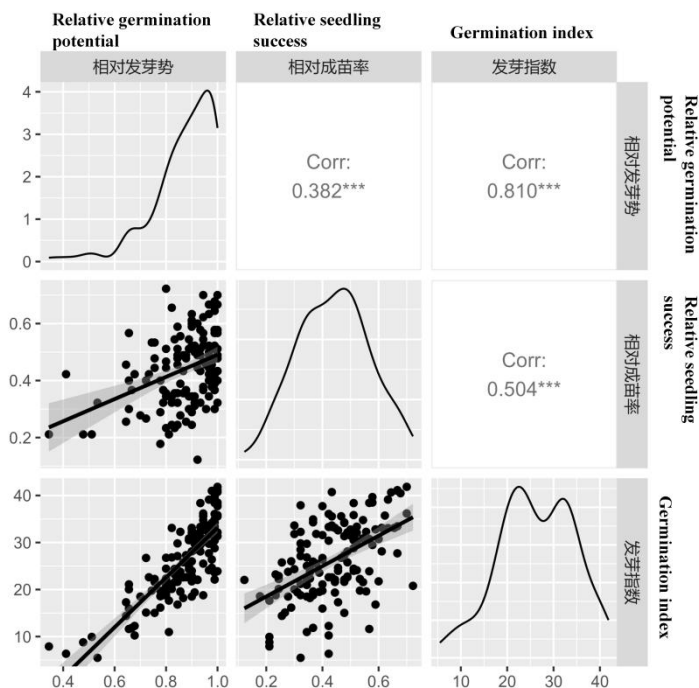


图1 PEG6000处理下的发芽指数、相对发芽势和相对成苗率频率分布

Fig.1 Histogram of frequency distribution of germination index, relative germination potential and relative seeding rate under PEG6000 treatment



Corr指相关性; ***: 在0.001水平上相关性显著

Corr refers to correlation; ***:significant correlation at 0.001 level

图2 发芽指数、相对发芽势和成苗率的相关性

Fig. 2 The correlation of germination index, relative germination potential and relative seeding rate

将PEG6000胁迫处理的油菜种质的平均发芽指数按照从0~12.00（极度敏感）、12.01~24.00（中度敏感）、24.01~36.00（中度耐旱）和36.01~48.00（极端耐旱）分为4组（图3）。其中极度敏感的种质9份，中度敏感的种质52份，中度耐旱的种质67份，极端耐旱的种质17份（表2）。结果表明，大部分种质表现为中度敏感和中度耐旱性，少数种质表现为极度敏感和极端耐旱。

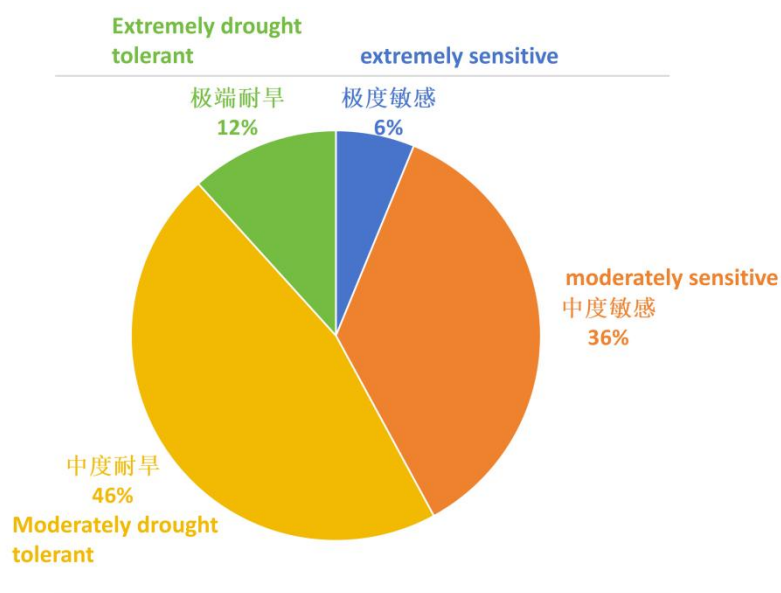


图3 油菜自然群体中萌发期耐旱等级分布

Fig.3 Drought tolerance grade distribution of rapeseed natural population at germination stage

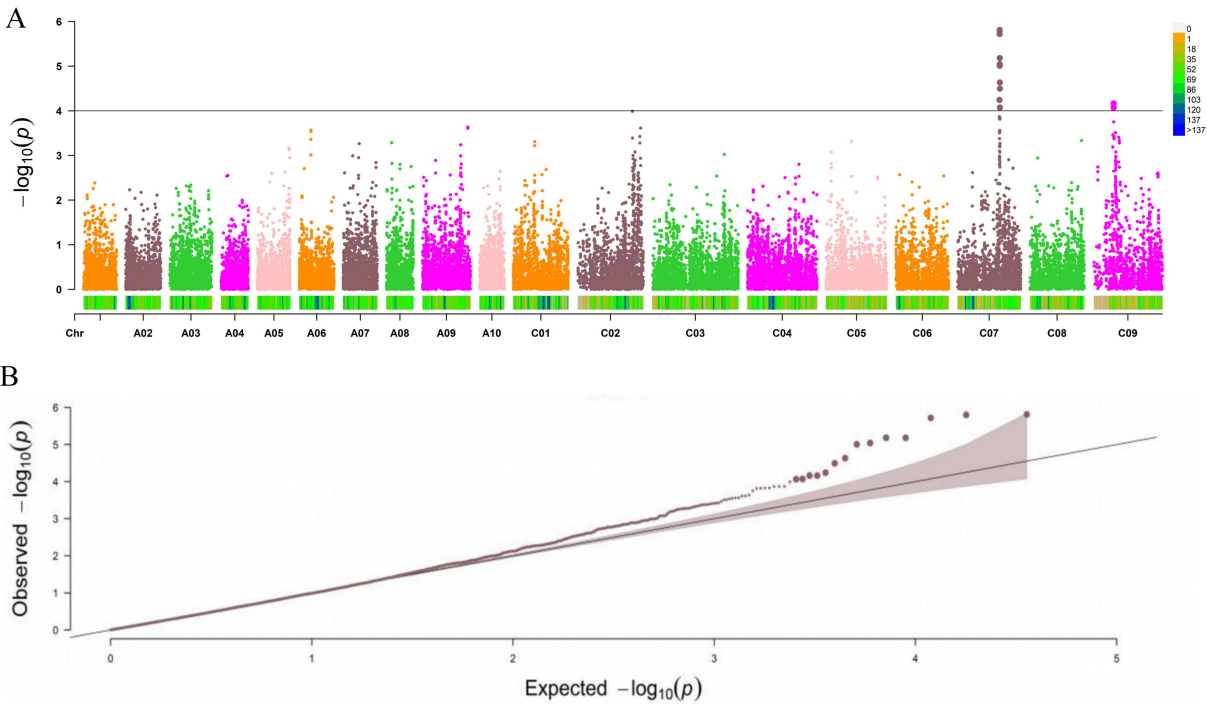
表2 极端耐旱材料各项统计数据

Table 2 Statistics for extreme drought tolerant materials

材料编号 Material number	发芽指数 Germination index	相对发芽势 Relative germination potential	相对成苗率 Relative seeding rate
L3	36.07	0.99	0.42
L116	36.17	0.94	0.70
L62	37.73	0.83	0.40
L72	37.92	1.00	0.32
L7	38.38	0.93	0.51
L136	38.42	1.00	0.57
L20	38.49	1.00	0.58
L145	39.12	0.94	0.63
L52	39.12	0.97	0.63
L76	39.66	0.99	0.58
L57	40.48	0.99	0.68
L73	40.66	0.99	0.64
L144	40.68	1.00	0.72
L24	40.73	1.00	0.43
L16	40.99	0.98	0.67
L135	41.13	1.00	0.67
L2	41.84	1.00	0.70

2.2 甘蓝型油菜耐旱性全基因组关联分析

通过MLM模型对145份油菜种质在干旱胁迫下的发芽指数进行全基因组关联分析，共检测到14个与油菜发芽指数显著相关的SNP位点，划分为两个主效QTL位点，分别位于C07、C09染色体上，其中C07染色体上显著关联的SNP位点最多，有11个（图4、表3）。根据油菜基因组的连锁不平衡及关联SNP位点两侧100 kb的区间为候选区间，候选区间内共有35个候选基因，如表4所示。



A: 发芽指数全基因组关联分析曼哈顿图；B: 发芽指数全基因组关联分析Q-Q图；当 $-\log_{10}(p)$ 值大于4的SNP可以被认为是与耐旱性显著关联的位点
A:Manhattan plot of GWAS for germination index; B: Q-Q plot of GWAS for germination index; SNPs with a $-\log_{10}(p)$ greater than 4 can be considered as loci significantly associated with drought tolerance

图4 抗旱条件下发芽指数全基因组关联分析
Fig. 4 Genome-wide association analysis of germination index under drought-resistant conditions

表3 与发芽指数显著关联的SNPs位点
Table 3 SNPs loci significantly associated with germination index

关联位点 SNP	染色体 Chromosome	$-\log_{10}(p)$	表型贡献率(%) R^2
C07: 29403943	C07	4.24	8.77
C07: 29526454	C07	5.80	11.63
C07: 29526503	C07	5.72	11.44
C07: 29526531	C07	5.81	12.76
C07: 29654163	C07	5.04	9.48
C07: 29654197	C07	5.01	9.31
C07: 29654215	C07	5.18	10.70

C07: 29654235	C07	5.18	10.10
C07: 29724045	C07	4.07	7.39
C07: 29725644	C07	4.50	6.88
C07: 29725703	C07	4.63	8.87
C09: 14235875	C09	4.16	7.27
C09: 14235894	C09	4.16	7.18
C09: 14235922	C09	4.07	7.34

表4 与甘蓝型油菜芽期发芽指数显著关联SNP 标记区间内的候选基因

Table 4 Candidate genes related with germination index in the intervals of significant associated SNP markers

基因 ID Gene ID	ZS11 基因编号 ZS11 gene ID	染色体 Chr	位置 (bp) Position(bp)	拟南芥基因 <i>Arabidopsis</i> gene ID	拟南芥基因 <i>Arabidopsis</i> alias
<i>BnaC07g22840D</i>	<i>BnaC07G0290100ZS</i>	C07	29375462~29380040	<i>AT3G25690.2</i>	<i>CHUP1</i>
<i>BnaC07g22850D</i>	<i>BnaC07G0290200ZS</i>	C07	29382225~29383581	<i>AT3G25700.1</i>	—
<i>BnaC07g22860D</i>	<i>BnaC07G0290300ZS</i>	C07	29412127~29413807	<i>AT3G25710.1</i>	<i>BHLH32</i>
<i>BnaC07g22870D</i>	<i>BnaC07G0290500ZS</i>	C07	29486216~29487654	<i>AT3G25730.1</i>	<i>EDF3</i>
<i>BnaC07g22880D</i>	<i>BnaC07G0290600ZS</i>	C07	29487726~29489679	<i>AT3G25740.1</i>	<i>MAP1C</i>
<i>BnaC07g22890D</i>	<i>BnaC07G0290600ZS</i>	C07	29491098~29491407	<i>AT3G25740.1</i>	—
<i>BnaC07g22900D</i>	<i>BnaC07G0290700ZS</i>	C07	29491639~29492573	<i>AT3G25770.1</i>	<i>AOC2</i>
<i>BnaC07g22910D</i>	<i>BnaC07G0290700ZS</i>	C07	29503475~29504453	<i>AT3G25770.1</i>	<i>AOC2</i>
<i>BnaC07g22920D</i>	—	C07	29513424~29515594	<i>AT1G28430.1</i>	<i>CYP705A24</i>
<i>BnaC07g22930D</i>	<i>BnaC07G0290800ZS</i>	C07	29515705~29516634	<i>AT3G25780.1</i>	<i>AOC3</i>
<i>BnaC07g22940D</i>	<i>BnaC07G0290900ZS</i>	C07	29529284~29532482	<i>AT3G25790.1</i>	<i>HHO1</i>
<i>BnaC07g22950D</i>	<i>BnaC07T0291100ZS</i>	C07	29538790~29541043	<i>AT1G45688</i>	<i>NLP1</i>
<i>BnaC07g22960D</i>	<i>BnaA10G0155900ZS</i>	C07	29582570~29584174	—	—
<i>BnaC07g22970D</i>	<i>BnaC07T0291400ZS</i>	C07	29597144~29599957	—	—
<i>BnaC07g22980D</i>	<i>BnaC07G0291600ZS</i>	C07	29630838~29633910	<i>AT3G25830.1</i>	<i>TPS27</i>
<i>BnaC07g22990D</i>	<i>BnaC07T0291700ZS</i>	C07	29634044~29637565	<i>AT4G22100.1</i>	<i>BGLU3</i>
<i>BnaC07g23000D</i>	<i>BnaC07G0291600ZS</i>	C07	29651509~29654378	<i>AT3G25830.1</i>	<i>TPS27</i>
<i>BnaC07g23010D</i>	<i>BnaC07T0292300ZS</i>	C07	29656031~29660449	<i>AT3G25840.1</i>	<i>PRP4KA</i>
<i>BnaC07g23020D</i>	<i>BnaC07G0292400ZS</i>	C07	29665201~29665641	<i>AT3G25855.1</i>	<i>ATHMP28</i>
<i>BnaC07g23030D</i>	<i>BnaC07G0292500ZS</i>	C07	29665965~29668282	<i>AT3G25860.1</i>	<i>LTA2</i>
<i>BnaC07g23040D</i>	—	C07	29668405~29668755	—	—
<i>BnaC07g23050D</i>	<i>BnaC07G0292600ZS</i>	C07	29672086~29672689	<i>AT3G25870.1</i>	—
<i>BnaC07g23060D</i>	<i>BnaC07G0292700ZS</i>	C07	29683438~29683576	—	—
<i>BnaC07g23070D</i>	<i>BnaC07G0292800ZS</i>	C07	29708307~29708899	<i>AT3G25882.1</i>	<i>NIMIN-2</i>
<i>BnaC07g23080D</i>	<i>BnaC07G0292900ZS</i>	C07	29726649~29727918	<i>AT3G25890.2</i>	<i>CRF11</i>
<i>BnaC07g23090D</i>	<i>BnaC07G0293000ZS</i>	C07	29738806~29741086	<i>AT3G25900.3</i>	<i>HMT-1</i>
<i>BnaC07g23100D</i>	<i>BnaC07G0293100ZS</i>	C07	29745969~29746212	<i>AT3G25905.1</i>	<i>CLE27</i>
<i>BnaC07g23110D</i>	<i>BnaC07T0117800ZS</i>	C07	29748172~29749071	<i>AT3G23600.1</i>	—
<i>BnaC07g23120D</i>	<i>BnaC07G0293200ZS</i>	C07	29755250~29756610	<i>AT3G25910.1</i>	<i>SIZ1</i>

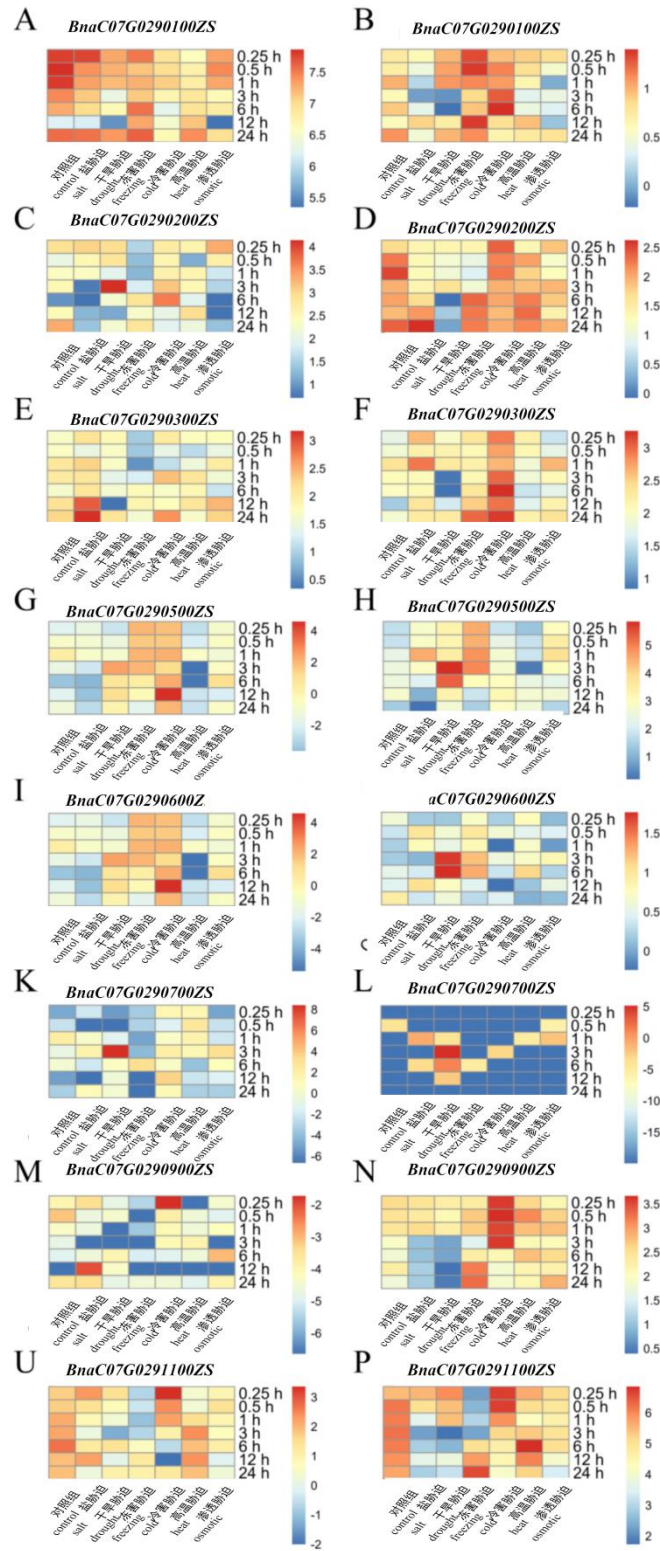
<i>BnaC07g23130D</i>	<i>BnaC07G0293300ZS</i>	C07	29756676~29757961	<i>AT3G25920.1</i>	<i>RPL15</i>
<i>BnaC07g23140D</i>	<i>BnaC07G0293400ZS</i>	C07	29760095~29761037	<i>AT3G25930.1</i>	—
<i>BnaC07g23150D</i>	<i>BnaC07G0293500ZS</i>	C07	29766652~29767390	<i>AT3G25950.1</i>	<i>LAG1</i>
<i>BnaC09g17510D</i>	<i>BnaC09G0219200ZS</i>	C09	14225601~14227580	<i>AT5G43360.1</i>	<i>PHT1-3</i>
<i>BnaC09g17520D</i>	<i>BnaA09G0190300ZS</i>	C09	14227709~14229865	<i>AT5G43370.2</i>	<i>PHT1-2</i>
<i>BnaC09g17530D</i>	—	C09	14246756~14247048	—	—

—表示未查找到相关信息

— indicates that no relevant information was found

2.3 耐旱性候选基因预测

为了进一步锁定关键候选基因，对这些候选基因在不同胁迫下的表达量进行分析。根据这些基因对应的中双11号参考基因组的基因编号，在BnIR数据库检索候选基因在不同胁迫下的转录组数据^[17]。发现候选区间内的大部分基因在干旱胁迫下的表达量相较于对照组无显著变化，部分基因在叶和根中的表达量无论在对照组还是试验组均为0。但是C07染色体上的8个候选基因（*BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290200ZS*、*BnaC07G0290300ZS*、*BnaC07G0290500ZS*、*BnaC07G0290600ZS* 和*BnaC07G0290700ZS*、*BnaC07G0290900ZS* 和*BnaC07G0291100ZS*）在干旱胁迫处理下，其处理组与对照组在叶和根中的表达量有明显差异（图5），并且在其他逆境胁迫下，如盐胁迫与低温胁迫，候选基因的表达量也有明显变化。由此可以判断C07上的与耐旱显著关联的SNP 是甘蓝型油菜萌发期抗逆境胁迫的关键位点。



A、C、E、G、I、K、M和U 表示基因在叶片中的表达量数据，B、D、F、H、J、L、N和P 表示基因在根中的表达量数据
A, C, E, G, I, K, M and U indicate gene expression data in leaves, and B, D, F, H, J, L, N and P indicate gene expression data in roots

图5 不同胁迫下的叶片和根中候选基因的表达量

Fig. 5 Expression heatmap of candidate genes in leaves and roots under different stress conditions

其中基因*BnaC07G0290100ZS*在干旱处理1h后，其叶片中的表达量相对于对照组急剧减少，之后仍然保持着表达量低于对照组的状态。*BnaC07G0290500ZS*在干旱处理后，其在根部的表达量始终维持在高于对照组的状态，并且在第3h时表达量急剧上升，达到对照组的10倍。*BnaC07G0290700ZS*基因在干旱胁迫处理后两个小时几乎和对照组相同，但在第3h时，其表达量迅速升高至原来的330倍。据报道*BnaC07G0290100ZS*在拟南芥中的同源基因*CHUP1*（*Chloroplast unusual positioning 1*）是叶绿体运动系统的重要组成部分，蓝光受体FKF1通过与*CHUP1*发生物理相互作用来调节叶绿体重定位，从而提高光合作用^[18]。在萌发阶段，当植株受到干旱胁迫时，油菜可能会通过叶绿体重定位调节光合作用，从而减少干旱所带来的影响。*BnaC07G0290500ZS*在拟南芥中的同源基因*EDF3*（*Ethylene response DNA binding factor 3*）主要参与拟南芥的转录调控生物学过程，参与控制拟南芥维管束发育^[19]，在油菜受到干旱胁迫时，推测其可能通过调控维管束的发育来增强对干旱的抗性。*BnaC07G0290700ZS*在拟南芥中的同源基因*AOC2*（*Allene oxide cyclase 2*）在拟南芥面对低温时可能会参与调控对低温逆境的适应能力，在拟南芥对低温适应过程中产生了新的蛋白质，这些蛋白质可能与拟南芥抗逆性相关^[20]。由此推断*BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS*和*BnaC07G0290700ZS*这3个基因是甘蓝型油菜萌发期耐旱性关键候选基因。

3 讨论

目前，人工模拟自然环境下的干旱条件主要有两种方法，一种是土壤干旱法，另一种是高渗透溶液模拟干旱法，后者由于省时省力而被广泛应用^[21]。然而，自然环境下的干旱条件相比于实验室模拟的干旱条件更加复杂，且植物对自然干旱环境的响应还会受到各种不同的环境因素所影响，从而引发进一步的代谢反应。因此，通过PEG溶液可以通过调节PEG浓度来精确控制溶液的渗透势，从而对植物造成渗透胁迫，可以模拟不同程度的干旱胁迫。这种胁迫相对于田间的干旱胁迫来说影响因素比较单一，是用来进行遗传研究的有效方式^[22]。

本研究以145份甘蓝型油菜种质资源为材料，采用PEG6000模拟干旱条件进行种子萌发，每天统计油菜种子数和最后的成苗数，统计分析获得发芽指数、发芽势和成苗率等数据，发现在3个生物学重复中发芽指数的相关性最高，并且发芽指数综合了发芽势和成苗率，可以更加综合的评价种子的萌发情况。利用前期开发的35765个SNP标记^[15]，采用MLM模型对甘蓝型油菜萌发期耐旱性进行全基因组关联分析，共检测到14个与甘蓝型油菜芽期发芽指数显著关联的SNP位点，分别位于C07（11个）和C09（3个）染色体上，通过显著关联的SNP位点筛选候选基因，并通过公布的转录组数据，最终确定了位于C07染色体上的*BnaC07G0290100ZS*、*BnaC07G0290500ZS*和*BnaC07G0290700ZS*这3个基因作为甘蓝型油菜萌发期耐旱性关联候选基因。显著关联SNP位点候选区间与李阳阳^[23]在甘蓝型油菜苗期通过全基因组关联分析得到的耐旱候选区间完全不同，为新的耐旱关键位点。这3个候选基因与朱维卓^[24]以油菜苗期地上部含水量和叶片气孔密度为基础所挖掘到的耐旱候选基因不同，初步判定本研究所挖掘的基因为新的耐旱候选基因。

本研究共挖掘到3个甘蓝型油菜萌发期耐旱候选基因，有关其在拟南芥中同源基因的研究也被多位学者报道。*BnaC07G0290100ZS*在拟南芥中的同源基因*CHUP1*，主要参与叶绿体重定位等生物学过程^[25]，并

在叶绿体外膜中表达较为活跃，最新的研究表明*CHUPI*是一种植物特异性肌动蛋白聚合因子，它在进化过程中聚合cp-肌动蛋白丝，并使叶绿体的光核反应得以进行，并实现叶绿体的光定位运动^[26]。*CHUPI*基因的缺失会使叶绿体受损，影响拟南芥在低温驯化过程中的光适应能力和碳水化合物代谢的调节^[27]，并且降低其生长速度，延迟其繁殖过程^[28]。*BnaC07G0290500ZS*在拟南芥中的同源基因*EDF3*主要参与拟南芥的DNA转录调控，主要定位在细胞核^[29]，研究表明，*EDF3*是拟南芥根系对高浓度二氧化碳反应调控网络中的调控因子，在高浓度二氧化碳环境下能够刺激其生长^[30]。*BnaC07G0290700ZS*在拟南芥中的同源基因*AOC2*，主要参与茉莉酸的合成过程和对低温胁迫的过程中^[31]，茉莉酸盐是植物逆境响应和植物发育的重要信号，*AOC2*可以和*AOC1*、*AOC3*和*AOC4*相互作用，在植物不同组织中通过差异化表达和异聚化对植物茉莉酸形成时间上和空间上的微调^[32]。3个候选基因的功能注释虽然未直接表明其与耐旱性相关，但通过转录组数据分析表明其可能是甘蓝型油菜耐旱的关键候选基因，接下来仍需通过在油菜中敲除和过表达这些基因来对候选基因的功能进行验证。

参考文献

- [1] 蔡东芳, 张书芬, 何俊平, 朱家成, 王建平, 文雁成, 曹金华, 赵磊, 王东国. 甘蓝型油菜抗旱机制及育种研究进展. 河南农业科学, 2017, 46 (3): 8-28
- Cai D F, Zhang S F, He J P, Zhu J C, Wang J P, Wen Y C, Cao J H, Zhao L, Wang D G. Research progress on drought resistance mechanism and breeding in rapeseed(*Brassica napus* L.). Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(3):8-28
- [2] Wang Y, Ying J, Kuzma M, Chalifoux M, Sample A, McArthur C, Uchacz T, Sarvas C, Wan J, Dennis D T, McCourt P, Huang Y. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. The Plant Journal, 2005, 43(3):413-424
- [3] Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X I. Increased expression of *phospholipase Da1* in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. Plant Biotechnology Journal, 2012, 11(3):380-389
- [4] 李浩辉, 刘彩月, 张海文, 王旭静, 唐巧玲, 王友华. 2022 年度全球转基因作物产业化发展现状及趋势分析. 中国农业科技导报, 2023, 25 (12): 6-16
- Li H H, Liu C Y, Zhang H W, Wang X J, Tang Q L, Wang Y H. Global genetically modified crop industrialization trends in 2022. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(12):6-16
- [5] 游淳惠, 俞露, 林暄. 全球化发展下我国转基因技术的风险评估与风险管理分析. 今日科苑, 2021, (3): 75-84
- You C H, Yu L, Lin X. Risk assessment and risk management analysis of China's genetically modified technology under the development of globalization. Modern Science, 2021, (03):75-84
- [6] 方玉洁, 李剑, 夏凌君, 孙念礼, 王幼平. PEG 胁迫下油菜种子萌发期生理及基因表达研究. 分子植物育种, 2016, 14 (10): 2812-2822
- Fang YJ, Li J, Xia L J, Sun N L, Wang Y P. Physiological and antioxidant enzyme gene expression analysis of *Brassica napus* during seed germination stage under PEG Stress. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(10):2812-2822
- [7] 洪双. 全基因组关联分析挖掘甘蓝型油菜耐旱候选基因. 北京: 中国农业科学院, 2018
- Hong S. Genome-wide association study identifies candidate genes for drought tolerance in *Brassica napus*. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018
- [8] Khanzada H, Wassan G M, He H, Mason A S, Keerio A A, Khanzada S, Faheem M, Solangi A M, Zhou Q, Fu D, Huang Y, Rasheed A. Differentially evolved drought stress indices determine the genetic variation of *Brassica napus* at seedling traits by genome-wide association mapping. Journal of Advanced Research, 2020, 24: 447-461
- [9] Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants:Recent advances. Biotechnol Advance, 2010, 28(1) : 169—183
- [10] 孔佳茜, 赵铭森, 孟晓康, 高金虎, 冯旭平, 薛红丽, 康红梅. PEG 模拟干旱胁迫对大麻种子萌发的影响. 种子, 2020, 39 (9): 26-52
- Kong J Q, Zhao M S, Meng X K, Gao J H, Feng X P, Xun H L, Kang H M. Effect of PEG-modeled drought stress on the germination of *cannabis* seeds. Seed, 2020, 39(9): 26-52

- [11] 宋鑫玲, 田玉杰, 曹洪勋, 钱海霞, 高树仁. PEG 模拟干旱胁迫对纤维用亚麻种子萌发的影响. 黑龙江科学, 2013, (9): 79-82
- Song X L, Tian Y J, Cao H X, Qian H X, Gao S R. Effect of PEG-modeled drought stress on seed germination of *linum usitatissimum* for fibers. Heilongjiang Science, 2013, (9):79-82
- [12] 胡承伟, 张学昆, 邹锡玲, 程勇, 曾柳, 陆光远. PEG 模拟干旱胁迫下甘蓝型油菜的根系特性与抗旱性. 中国油料作物学报, 2013, 35(1): 48-53
- Hu C W, Zhang X K, Zou X L, Cheng Y, Zeng L, Lu G Y. Root structure and drought tolerance of *Brassica napus* under PEG imposed drought. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(1):48-53
- [13] 杨春杰, 张学昆, 邹崇顺, 程勇, 郑普英, 李桂英. PEG-6000模拟干旱胁迫对不同甘蓝型油菜品种萌发和幼苗生长的影响. 中国油料作物学报, 2007(4): 425-430
- Yang C J, Zhang X K, Zou C S, Cheng Y, Zheng P Y, Li G Y. Effects of drought simulated by PEG-6000 on germination and seedling growth of rapeseed(*Brassica napus* L.). Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007(4):425-430
- [14] 张慧珂, 吴潞梅, 马甜甜, 叶沈华, 万何平, 赵伦, 易斌, 沈金雄, 傅廷栋, 文静. 不同作物种子耐热性评价及油菜种子耐热性全基因组关联分析. 中国油料作物学报, 2023, 45(5): 923-934
- Zhang H K, Wu L M, Ma T T, Ye S H, Wan H P, Zhao L, Yi B, Shen J L, Fu T D, Wen J. Evaluation of seed heat tolerance in different crops and genome-wide association analysis of seed heat tolerance in *Brassica napus*. Chinese Journal of Oil Crop sciences, 2023, 45(5):923-934
- [15] Zhang Y, Li P, Zhang J, Li Y, Xu A, Huang Z. Genome-wide association studies of salt tolerance at the seed germination stage and yield-related traits in *Brassica napus* L. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24):15892
- [16] Chalhou 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 Clairche I, Bernard M, Bento P, Noel B, Labadie K, Alberti A, Charles M, Arnaud D, Guo H, Daviaud C, Alamery 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, Golice 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. Plant genetics. early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. Science, 2014, 345(6199):950-953
- [17] Yang Z, Wang S, Wei L, Huang Y, Liu D, Jia Y, Luo C, Lin Y, Liang C, Hu Y, Dai C, Guo L, Zhou Y, Yang Q Y. BnIR: A multi-omics database with various tools for *Brassica napus* research and breeding. Molecular Plant, 2023, 16(4):775-789
- [18] Yuan N, Mendu L, Ghose K, Witte CS, Frugoli J, Mendu V. FKF1 interacts with *CHUP1* and regulates chloroplast movement in *Arabidopsis*. Plants-Basel, 2023, 12(3):542
- [19] Smit M E, McGregor S R, Sun H, Gough C, B  gman A M, Soyars C L, Kroon J T, Gaudinier A, Williams C J, Yang X, Nimchuk Z L, Weijers D, Turner S R, Brady S M, Etchells J P. A PXY-Mediated transcriptional network integrates signaling mechanisms to control vascular development in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2020, 32(2):319-335
- [20] Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski L A, Gardestr  m P, Schr  der W, Hurry V. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature . The Plant Journal, 2006, 47(5):720-734
- [21] 刘翔, 左凯峰, 许伟, 郭娜, 秦梦凡, 徐宇, 马宁, 李青青, 张淼, 李浩东, 王茸茸, 黄镇, 徐爱遐. PEG6000 模拟干旱胁迫下甘蓝型油菜芽期及苗期抗旱指标筛选. 干旱地区农业研究, 2021, 39(5): 66-83
- Liu X, Zuo K F, Xu W, Guo N, Qin M F, Xu Y, Ma N, Li Q Q, Zhang M, Li H D, Wang R R, Huang Z, Xu A X. Screening of drought tolerance indexes at shoot and seedling stages of *Brassica napus* under simulated drought stress by PEG6000. Agricultural Research in Arid Areas, 2021, 39(5): 66-83
- [22] 杨旭东. PEG 模拟干旱胁迫对向日葵种子活力影响的研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017
- Yang X D. Effects of PEG-modeled drought stress on seed viability of sunflower (*Helianthus annuus*). Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017
- [23] 李阳阳. 甘蓝型油菜苗期耐旱候选基因筛选及干旱适应性机制研究. 重庆: 西南大学, 2021

Li Y Y. Screening of candidate genes for seedling drought tolerance and drought adaptation mechanism in *Brassica napus*. Chongqing: Southwest University, 2021

[24] 朱维卓. 甘蓝型油菜苗期耐旱基因型差异及耐旱基因挖掘. 杭州: 浙江大学, 2021

Zhu W Z. Genotypic differences in response to drought stress at seedling stage and identification of the genes responsible for the tolerance in *Brassica napus*.

Hangzhou: Zhejiang University, 2021

[25] Oikawa K, Yamasato A, Kong SG, Kasahara M, Nakai M, Takahashi F, Ogura Y, Kagawa T, Wada M. Chloroplast outer envelope protein *CHUPI* is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiology*, 2008, 148(2):829-842

[26] Kong SG, Yamazaki Y, Shimada A, T Kijima S, Hirose K, Katoh K, Ahn J, Song H G, Han J W, Higa T, Takano A, Nakamura Y, Suetsugu N, Kohda D, Uyeda T Q P, Wada M. *CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1* is a plant-specific actin polymerization factor regulating chloroplast movement. *Plant Cell*, 2023, 36(4): 1159-1181

[27] Kitashova A, Schneider K, Fürtauer L, Schröder L, Scheibenbogen T, Fürtauer S, Nägele T. Impaired chloroplast positioning affects photosynthetic capacity and regulation of the central carbohydrate metabolism during cold acclimation. *Photosynthesis Research*, 2021, 147(1):49-60

[28] Howard M M, Bae A, Pirani Z, Van N, Königer M. Impairment of chloroplast movement reduces growth and delays reproduction of *Arabidopsis thaliana* in natural and controlled conditions. *American Journal of Botany*, 2020, 107(9):1309-1318

[29] Li B, Gaudinier A, Tang M, Taylor-Teeple M, Nham N T, Ghaffari C, Benson D S, Steinmann M, Gray J A, Brady S M, Kliebenstein D J. Promoter-based integration in plant defense regulation. *Plant Physiology*, 2014, 166(4):1803-1820

[30] Cassan O, Pimparé L L, Dubos C, Gojon A, Bach L, Lèbre S, Martin A. A gene regulatory network in *Arabidopsis* roots reveals features and regulators of the plant response to elevated CO₂. *New Phytologist*, 2023, 239(3):992-1004

[31] He Y, Fukushige H, Hildebrand D F, Gan S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *The Plant Physiology*, 2002, 128(3): 876-884

[32] Stenzel I, Otto M, Delker C, Kirmse N, Schmidt D, Miersch O, Hause B, Wasternack C. *ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC)* gene family members of *Arabidopsis thaliana*: Tissue and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *Journal of experimental botany*. 2012, 63(17):6125-38