

盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期下胚轴和根长的全基因组关联分析

张蕊¹, 邓文亚¹, 杨柳¹, 王亚萍¹, 肖芳枝², 禾健², 卢坤¹

(¹西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715; ²西南大学神农班, 重庆 400715)

摘要:【目的】解析甘蓝型油菜发芽期根和下胚轴发育及耐盐性的调控位点, 筛选油菜耐盐性相关的候选基因, 可为油菜耐盐性改良提供依据。【方法】以 317 份具有代表性的甘蓝型油菜自交系为材料, 在正常生长和盐胁迫条件下进行沙培鉴定, 利用芸薹属 60K SNP 芯片和全基因组关联分析鉴定正常生长与盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期根和下胚轴长度显著关联的 SNP, 并确定其连锁不平衡区间。通过区间内基因的功能注释及盐胁迫下油菜幼苗根和叶片转录组差异表达基因筛选连锁不平衡区间内的重要候选基因, 并以实时荧光定量 PCR 分析候选基因的组织特异性和盐胁迫诱导表达模式, 提高候选基因筛选的准确性。【结果】正常生长和盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期下胚轴和根长在不同材料间变异较大, 频次分布表明目标性状均为数量性状, 受多基因调控。全基因组关联分析模型比较表明, MLM+P+K 模型为最优模型。以此模型对目标性状进行全基因组关联分析, 检测到 45 个显著关联 SNP, 其中 40 个与下胚轴长度显著关联, 5 个与根长显著关联, 单个 SNP 解释的表型变异分别为 9.12%—14.46%和 7.67%—8.93%。重复检测的显著相关 SNP 中, 值得注意的是 C04 染色体的 rs8970, 同时与 4 个性状显著关联, 表型贡献率为 7.67%—12.35%, 是唯一在下胚轴长和根长间重复检测到的显著关联 SNP。11 个重要关联 SNP 中有 6 个位于 10—442 kb 的连锁不平衡区块中。转录组分析表明, 11 个连锁不平衡区间共包含 447 个基因, 其中 15 个受盐胁迫诱导表达。转录组和基因功能注释综合分析表明, *BnaSRO1*、*BnaPAGR2*、*BnaNPH3*、*BnaMYB124*、*BnaSAM-Mtase*、*BnaBIN2*、*BnaUMAMIT11*、*BnaEXPA7*、*BnaRPT3*、*BnaEF-hand* 和 *BnaF3H* 很可能为各自区间的候选基因。实时荧光定量 PCR 结果证实除 *BnaNPH3* 外, 其他基因均在根或下胚轴中受盐胁迫诱导上调表达。组织特异性分析还发现 *BnaUMAMIT11*、*BnaPAGR2* 和 *BnaEXPA7* 主要在萌发的根和下胚轴中特异表达, *BnaRPT3*、*BnaBIN2* 和 *BnaMYB124* 虽然呈组成型表达, 但在萌发阶段的下胚轴中表达量最高, 证实这些基因很可能参与油菜发芽期根和下胚轴生长发育及耐盐性的调节。【结论】全基因组关联分析共鉴定出 45 个控制油菜发芽期根和下胚轴发育及耐盐性的显著关联 SNP。连锁不平衡、转录组和基因功能注释综合分析初步鉴定出 11 个重要候选基因。

关键词: 甘蓝型油菜; 萌发; 耐盐性; 全基因组关联分析; 转录组

Genome-Wide Association Study of Root Length and Hypocotyl Length at Germination Stage Under Saline Conditions in *Brassica napus*

ZHANG Rui¹, DENG WenYa¹, YANG Liu¹, WANG YaPing¹, XIAO FangZhi², HE Jian², LU Kun¹

(¹ College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715; ² Shennong Class, Southwest University, Chongqing 400715)

收稿日期: 2016-07-01; 接受日期: 2016-09-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31571701)、高等学校学科创新引智计划 (B12006)、中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2012A009 和 XDJK2014D011)、国家级大学生创新创业训练计划 (201410635040)、西南大学本科科技创新基金 (20153701002)

联系方式: 张蕊, E-mail: 2593709868@qq.com。邓文亚, E-mail: 1534159333@qq.com。张蕊和邓文亚为同等贡献作者。通信作者卢坤, Tel: 023-68251264; E-mail: drlukun@swu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 Identification of the regulatory loci and candidate genes governing salt stress tolerance in *Brassica napus* at germination stage could lay the foundation for improvement of *B. napus* salt resistance. 【Method】 In this study, 317 representative *B. napus* inbred lines were genotyped under normal and salt-stressed conditions in a sand culture system. Significant SNPs associated with root length and hypocotyl length in *B. napus* under normal and saline stress conditions and their linkage disequilibrium (LD) were determined by genome-wide association studies (GWAS), based on the *Brassica* 60 K SNP array. Candidate genes were selected based on the combination analyses results of functional annotation of genes within the LD blocks and transcriptome analyses of seedling roots and leaves in *B. napus* under saline stress treatments. Accuracy of candidate gene selection was improved by real-time quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). 【Result】 Hypocotyl length and root length of *B. napus* showed large variation among accessions at germination stage under normal and salt-stressed conditions, and frequency distribution revealed that all the target traits were quantitative traits and controlled by polygenic genes. Comparison of different models showed that MLM+P+K model was the optimal model. Based on this model, GWAS identified 45 loci significantly associated with target traits, including 40 and 5 SNPs associated with hypocotyl length and root length, and each of SNP explained 9.12%-14.46% and 7.67%-8.93% of phenotypic variation, respectively. Among the significantly associated SNPs, rs8970 on chromosome C04 was the most notable, since it was the only SNP, which could be repeatedly detected between root length and hypocotyl length, and associated with four traits simultaneously, explaining 7.67%-12.35% of observed phenotypic variation. Of the 11 important significantly associated SNPs, 6 SNPs were distributed in 10 to 442 kb of linkage disequilibrium (LD) blocks. By combining differentially expressed genes detected by transcriptome analysis with LD block identification, 447 genes were identified within the 11 important LD intervals, of which 15 were activated by salt stress. *BnaSRO1*, *BnaPAGR2*, *BnaNPH3*, *BnaMYB124*, *BnaSAM-Mtase*, *BnaBIN2*, *BnaUMAMIT11*, *BnaEXPA7*, *BnaRPT3*, *BnaEF-hand* and *BnaF3H* were most likely the candidate genes within their LD blocks. Results of qRT-PCR detection showed that 10 candidate genes were induced by salt stress treatment in root or hypocotyl at germination stage, except for *BnaNPH3*. In addition, tissue-specificity detection of candidate genes also showed that *BnaUMAMIT11*, *BnaPAGR2* and *BnaEXPA7* mainly expressed in the root and hypocotyl at germination stage, and *BnaRPT3*, *BnaBIN2* and *BnaMYB124* possessed the highest expression in hypocotyl, confirmed that these genes might be involved in development of root and hypocotyl and salt resistance of *B. napus* at germination stage. 【Conclusion】 A total of 45 significantly associated SNPs controlling development and salt resistance in root and hypocotyl of *B. napus* at germination stage were identified by GWAS. By combined LD block identification, transcriptome analyses and functional annotation, 11 important candidate genes were screened within different LD blocks.

Key words: *Brassica napus*; germination; salt tolerance; genome-wide association study; transcriptome

0 引言

【研究意义】盐害是危害农业生产的主要因素之一。作为典型的非生物胁迫，盐害会破坏作物的离子平衡，引起离子毒性、高渗和氧化胁迫等，从而影响种子萌发和幼苗生长，导致产量和品质下降^[1]。诸多研究表明，甘蓝型油菜耐盐能力较强，因此，挖掘油菜耐盐调控位点和基因，培育耐盐油菜品种，以开发利用盐碱地，对缓解中国植物油供应压力、维护国家食品安全具有重要意义^[2]。【前人研究进展】目前，油菜耐盐性的遗传和分子机制报道较少^[3-4]。龙卫华等^[5]对芥菜型油菜 (*Brassica juncea*)、白菜型油菜 (*Brassica rapa*) 和甘蓝型油菜 (*B. napus*) 共 203 份种质资源进行盐胁迫比较研究，筛选出 1 份白菜型油菜和 2 份甘蓝型油菜材料用于培育耐盐油菜品种。刘国红等^[2]发现盐胁迫对油菜光合作用的抑制主要来自气孔因素，但在长期高盐条件下，非气孔因素对光合

抑制的贡献也很明显。在遗传定位方面，荐红举等^[6]利用高世代重组自交系群体和 SNP 遗传图谱定位到 11 个盐胁迫下油菜种子发芽率相关的 QTL。YONG 等^[7]对 85 个油菜自交系开展了基于多样性芯片技术 (diversity arrays technology, DArT) 和 DArTseq 基因型分析的研究，利用 GWAS 检测到 62 个耐盐性、地上部生物量及离子平衡相关的 QTL，并鉴定出可能的候选基因 *TSN1*。【本研究切入点】尽管甘蓝型油菜耐盐相关 QTL 有少量报道，但盐胁迫下油菜发芽期根长和下胚轴长度的 GWAS 研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】为解析控制油菜发芽期根和下胚轴发育及耐盐性的关键位点和候选基因，本研究采用 GWAS 鉴定目标性状显著关联 SNP，结合转录组分析，筛选连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 区间内的盐胁迫诱导差异表达基因，初步确定控制性状变异的候选基因。以实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析候选基因的组织特异性和盐胁迫

胁迫诱导表达模式, 提高候选基因筛选的准确性。本研究将为分子标记辅助选择和基因工程改良等方式培育耐盐油菜新品种提供理论依据和新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料共 317 份(电子附表 1), 均为国内外广泛收集的代表性油菜资源, 其中, 国内材料 283 份, 主要来自重庆、湖北和湖南等地, 国外材料 34 份, 主要来自德国和加拿大。所有材料均由重庆市油菜工程技术研究中心保存。2015 年收获的当年自交种用于本研究。

1.2 胁迫处理和性状调查

试验于 2015 年在西南大学油菜培养间进行, 整个试验重复 2 次, 生长条件为昼夜温度 25℃, 光照/黑暗时间 16 h/8 h, 光照强度 5 000 lx。从供试材料中挑选大小均匀、健康饱满的种子各 120 粒, 将种子浸泡 24 h 后分为 2 份, 分别播种在 100 mmol·L⁻¹ NaCl 和对照蒸馏水充分浸润的蛭石上, 覆盖保鲜膜。播种 5 d 后, 选取长势一致的 10 株幼苗测定根长(root length, RL)和下胚轴长(hypocotyl length, HL), 正常萌发条件下的 RL 和 HL 以 RLW 和 HLW 表示, 盐胁迫下萌发的 RL 和 HL 以 RLN 和 HLN 表示。两性状差值(RLD 和 HLD)为对照与盐胁迫环境测定值之差。以 SPSS 20.0(美国 IBM 公司)软件对表型数据进行描述性统计分析和 Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验。利用 R 脚本(www.eXtension.org/pages/61006)对 2 次重复试验的性状值进行基于线性模型的最佳线性无偏预测。

1.3 基因型分析及 SNP 标记定位

参考 QU 等^[8]的方法, 利用芸薹属 60K SNP 芯片进行 SNP 检测, 去除最小基因型频率(minor allele frequency, MAF)低于 0.05 和 SNP 得率(call frequency)小于 80%的标记。为确定 SNP 在染色体上的位置, 利用探针序列与基因组进行 BLASTN 比对^[9-10], E-value 设为 1e-5。去除 Bit-Score 相同的 SNP, 最终获得 31 468 个在基因组上具有唯一位置的高质量 SNP 用于后续分析。

1.4 群体结构分析与全基因组关联分析

在 TASSEL 5^[11]中进行主成分分析(PCA 矩阵), 计算亲缘关系矩阵(K)。群体结构 Q 值矩阵采用 QU 等^[8]的结果。以 K、Q 和 PCA 矩阵为协变量, 采用基于一般线性模型(general linear model, GLM)的

GLM+P 和 GLM+Q 模型及混合线性模型(mixed linear model, MLM)的 MLM+K 和 MLM+P+K 和 MLM+Q+K 共 5 种模型进行 GWAS。显著关联 SNP 宽松阈值设为 1/31468=3.18e-5, 严谨阈值设为 0.05/31468=1.59e-6。根据所有 SNP 的 $-\log_{10}(P)$ 观察值和期望值, 以 ggplot2^[12]绘制 Quantile-Quantile 散点图, 确定 GWAS 最佳模型。基于最优模型的关联分析结果, 利用 qqman^[13]绘制曼哈顿图。

1.5 LD 区间确定及候选基因分析

以 Haploview 4.2^[14]计算显著关联 SNP 所在染色体的 LD, HW 阈值(Hardy Weinberg P-value cutoff)设定为 0.001; 非缺失标记的比例为 75%, MAF 设定为 0.05; 单倍型块(haplotype block)分析采用 Four Gamete Rule 算法, 第 4 配子频率(4th gamete frequency) > 0.1。将显著关联 SNP 所在单倍型块作为候选基因所在 LD 区间。若显著关联 SNP 不属于任何单倍型块, 则以 SNP 标记上下游各 100 kb 侧翼序列区间作为 LD 区间。候选基因筛选利用 YONG 等^[15]的转录组数据, 将 LD 区间内的盐胁迫诱导表达基因作为候选基因。主要分析流程为利用 STAR 2.4.2a 将 reads 比对至油菜参考基因组^[16], 采用 Cufflinks 中的 cuffdiff 筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)^[17], 筛选标准为差异表达倍数大于 2, 错误发现率(false discovery rate, FDR) *q*-value 小于 0.05。

1.6 候选基因组织特异及诱导表达模式

为分析候选基因组织特异性及盐胁迫诱导表达模式, 于 2015 年盛花期取常规品种中双 11 的根、茎、成熟叶片和蕾, 灌浆期取花后 7、14、21、30 和 40 d 种子和角果皮。按照 1.2 的方法进行砂培, 并分别取正常和盐胁迫处理 72 h 的根和下胚轴。总 RNA 提取参照卢坤等^[18]的方法。cDNA 模板采用 PrimeScript RT reagent Kit(宝生生物工程有限公司, 大连)合成。利用 SYBR Premix Ex Taq(宝生生物工程有限公司, 大连)在 CFX96 定量 PCR 系统(美国 Bio-Rad 公司)上按照 MIQE 国际化标准进行 qRT-PCR^[19], 内参为 *BnaACTIN7* 和 *BnaUBC21*^[20]。引物采用 Geneious Pro 8.1.5 设计(表 1)。为保证扩增片段特异性, 所有引物与同源基因至少相差 2—3 个碱基。

2 结果

2.1 油菜萌发相关性状表型数据

正常和盐胁迫条件下, 幼苗平均根长分别为 4.92 和 3.94 cm, 变异系数为 16.86%和 42.48%(表 2),

表 1 本研究采用的 qRT-PCR 鉴定引物

Table 1 qRT-PCR primers used in this study

基因名	基因编号	引物序列	扩增长度
Gene name	Gene ID	Sequence of primer (5'-3')	Amplification length (bp)
<i>BnaSRO1</i>	BnaC04g44420D	F: ATATCGCGAGAGGGATTCTCGAAG R: GGTTCATTTCACAGCAGTGTGTG	116
<i>BnaPAGR2</i>	BnaA05g11130D	F: TACTCTCTTTAGAACAAAGATCATTCTGGCCT R: CGAAGAGCGCCGCTCCTAAAT	182
<i>BnaNPH3</i>	BnaA06g35230D	F: GGAATCATCAGAAAAGTGTATAGATTCTATAGTAG R: GATAATACAGCGGAATAAGTCCAAGTCGA	183
<i>BnaMYB124</i>	BnaA06g09160D	F: GGCAACCTGATCTCCATGATTAC R: CCCGAGGTGGGCATATTCTCTT	196
<i>BnaSAM-Mtase</i>	BnaA07g03510D	F: GGAATCTCAGCAAAAATCCGACAAT R: CTGTCTCGAGGAAGAACACGACTA	165
<i>BnaBIN2</i>	BnaC03g62810D	F: GCTTCAGCTGATGCGCGTCA R: GACAAGAGGCATTCTCTGGTTGG	175
<i>BnaUMAMIT11</i>	BnaC03g22990D	F: GGAAAGCACGTAGACGATATCGG R: GATTCTTCTCAGCTGCCTGAACT	167
<i>BnaEXPA7</i>	BnaA08g24690D	F: CATGGCCGTGAAAAGGTAGTCG R: GCACTACTCTGTGAAGTCATGCCAG	195
<i>BnaRPT3</i>	BnaC03g49850D	F: AGCCCTTACCTCGCCG R: GTTGCTGCTCTGAGGAGGC	136
<i>BnaEF-hand</i>	BnaA06g37340D	F: GTGAGGATCTGTGCGAGTTATCC R: CATGGATCGTTAGGAGGAGGC	169
<i>BnaF3H</i>	BnaC08g22640D	F: CTCGAGAAAGAGGCACTCACCA R: CTCGTGTGGCTTGTAACCACCAA	175
<i>BnaUBC21</i>	BnaA06g27860D/ BnaA09g04490D	F: CCTCTGCAGCCTCCTCAAGT R: CATATCTCCCCTGTCTGAAATGC	77
<i>BnaACTIN7</i>	BnaA03g55890D/ BnaC02g00690D/ BnaA10g22340D	F: CCCTGGAATTGCTGACCGTA R: TGGAAAGTGCTGAGGGATGC	141

表 2 盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期幼苗根长和下胚轴长的统计分析

Table 2 Statistical analysis of RL and HL of *B. napus* seedlings at germination stage under salt stress treatment

表型	材料数	均值±标准差	最小值	中位数	最大值	Kolmogorov-Smirnov		相关系数
						Z	P 值 P-value	
Phenotype	Number of accessions	Mean±SD	Minimum	Median	Maximum	Z	P 值 P-value	Correlation coefficient
RLW1	295	4.928±0.819	2.692	4.937	8.012	0.722	0.674	0.879**
RLW2	281	4.916±0.803	2.572	4.841	8.025	0.676	0.751	
RLN1	295	3.942±1.669	0.483	4.563	7.058	2.874	0.000	0.936**
RLN2	281	3.936±1.693	0.481	4.499	7.163	2.834	0.000	
RLD1	295	1.016±2.014	-3.446	0.238	6.150	2.746	0.000	0.926**
RLD2	281	1.010±2.064	-3.469	0.411	6.531	2.389	0.000	
HLW1	295	4.463±1.136	1.592	4.463	7.188	0.919	0.367	0.925**
HLW2	281	4.500±1.196	1.725	4.508	7.643	0.548	0.925	
HLN1	295	3.005±0.926	0.475	3.025	5.300	0.616	0.843	0.915**
HLN2	281	3.059±0.990	0.452	3.096	5.835	0.603	0.860	
HLD1	295	1.495±0.973	-0.913	1.463	4.138	0.889	0.408	0.934**
HLD2	281	1.482±1.063	-1.089	1.458	4.201	0.703	0.705	

RLW 和 HLW: 正常萌发的根长和下胚轴长; RLN 和 HLW: NaCl 处理条件的根长和下胚轴长; RLD 和 HLD: 处理前后根长和下胚轴长的差值; “1”和“2”表示同一性状的第 1 和第 2 次试验; **表示在 0.01 水平差异显著

RLW and HLW: RL and HL under normal germination conditions; RLN and HLW: RL and HL under salt stress germination conditions; RLD and HLD: Difference between trait value under normal condition and salt stress condition; “1” and “2” Represent experiment replicate 1 and replicate 2 of the same trait; ** Indicates significance level at 0.01

胁迫处理前后根长差值平均为 1.01 cm，变异系数为 199.57%。正常萌发条件下，下胚轴平均长 4.48 cm，变异系数为 25.75%；盐胁迫处理后降至 3.03 cm，变异系数为 31.41%；胁迫处理前后下胚轴长差值平均为 1.49 cm，变异系数为 67.07%。结果表明，不同材料间的萌发性状差异较大，为 GWAS 分析奠定基础。

正态分布检验表明（表 2），RLW、HLW、HLN 和 HLD 的 P -value 大于 0.05，符合正态分布。RLN 和 RLD 的 P -value 为 0，但其频次分布呈单峰偏态或双峰分布，表现为主基因+多基因的数量遗传特征（图 1）。上述结果表明，本研究目标性状均为数量性状，受多基因调控。

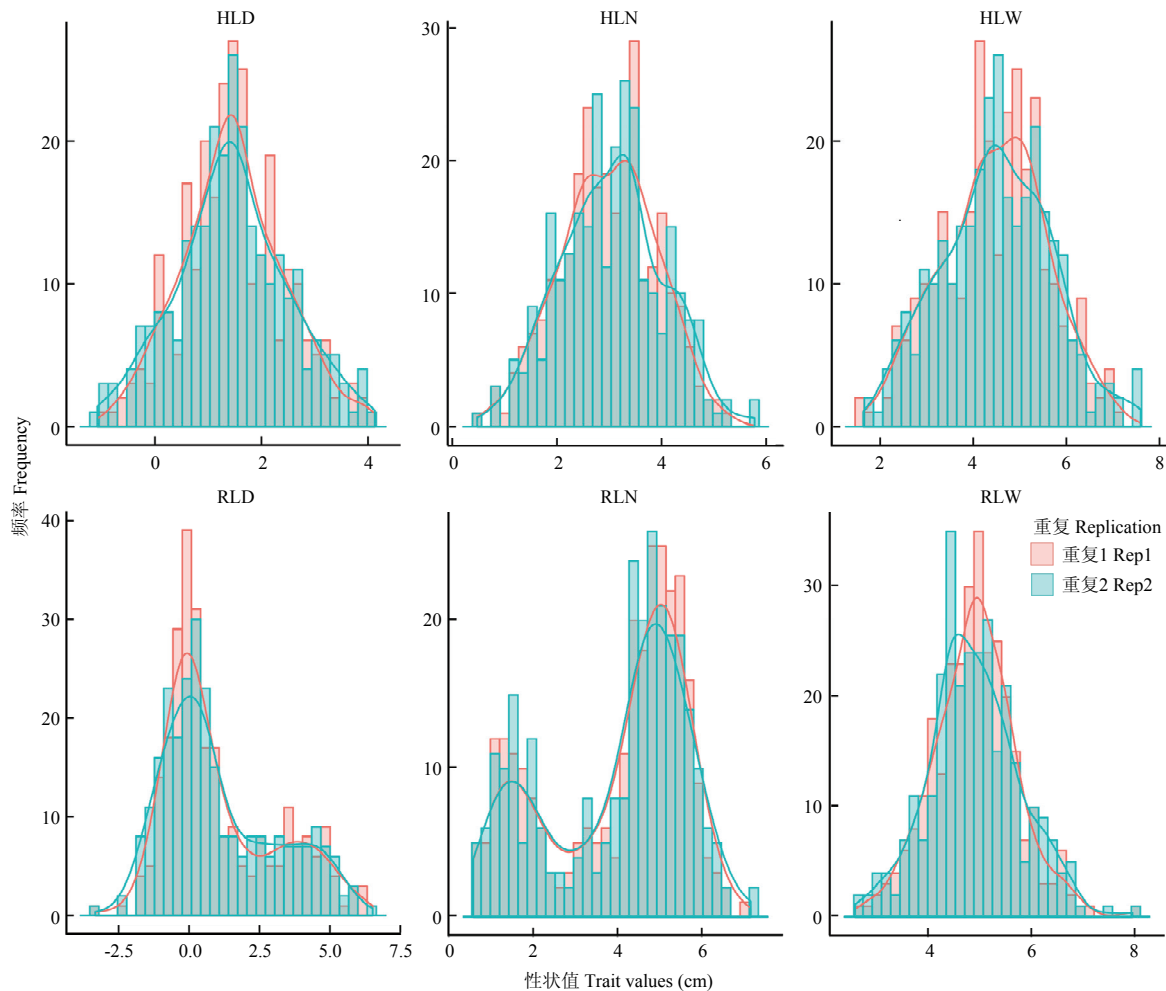


图 1 盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期幼苗根长和下胚轴长的频次分布

Fig. 1 Frequency distribution of HL and RL of *B. napus* seedlings at germination stage under salt stress treatment

2.2 关联分析模型选择

GWAS 最优模型分析表明，GLM 模型控制假阳性的能力较差，与 MLM 模型相比，GLM+P 和 GLM+Q 模型均严重偏离期望值。3 种 MLM 模型对根长的解析能力差别不大，但在下胚轴长的 GWAS 分析中，MLM+P+K 模型检测到的 P -value 较其他模型更接近期望值，能更好地控制假阳性（图 2），因此，采用 MLM+P+K 模型进行 GWAS 分析。

2.3 萌发性状的全基因组关联分析

利用 MLM+P+K 模型对目标性状进行 GWAS 分析。由于 HLW 和 HLN 检出位点较多，筛选显著关联 SNP 时采用严谨阈值，其他 4 个性状采用宽松阈值（表 3 和图 3）。结果表明，共检测到 45 个显著关联 SNP，其中独立 SNP 36 个，重复检测 SNP 7 个。与 HL 显著关联 SNP 共 40 个，其中 HLW 和 HLN 存在 17 和 21 个显著相关 SNP，C03 染色体紧密相邻的

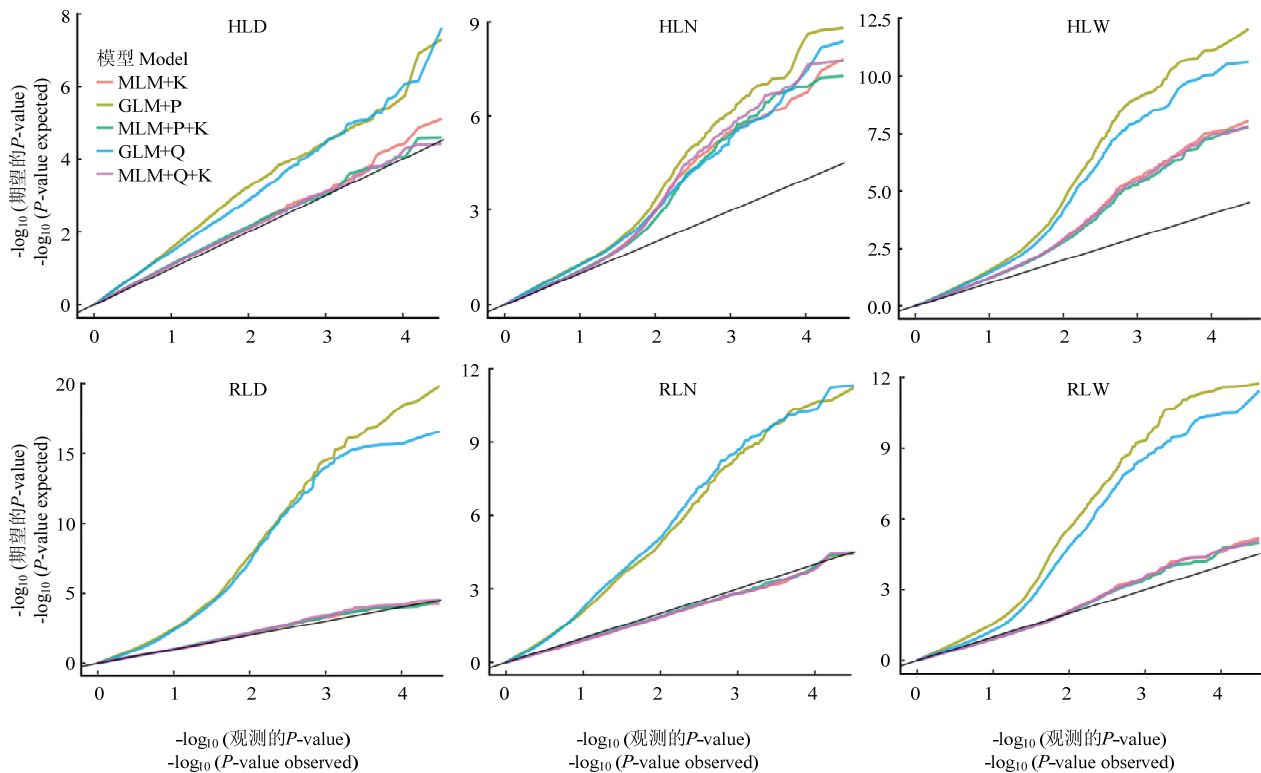


图2 不同性状5种模型比较的QQ图

Fig. 2 Quantile-quantile plots of estimated $-\log_{10}(p)$ from association analysis using five methods for different traits

2个SNP与HLD显著关联。与RLW、RLN和RLD显著关联的SNP各有3个、1个和1个。HL和RL的单一SNP表型贡献率分别为9.12%—14.46%和7.67%—8.93%。

重复检测的显著相关SNP中,6个为HLW和HLN间的重复,位于A05、A06、A07和C03染色体,其很可能与控制下胚轴发育的基因紧密连锁。A08染色体上分别与HLN和HLW显著关联的rs18442和rs18448为相邻SNP,其可能同时与HLN和HLW紧密连锁。值得注意的是C04染色体的rs8970,其同时与HLW、HLN、RLW和RLD4个性状显著关联,表型贡献率为7.67%—12.35%,是唯一在HL和RL间重复检测到的显著关联SNP。

2.4 盐胁迫下油菜幼苗叶片和根部差异表达基因分析

转录组分析表明,盐胁迫处理12h后幼叶和根部有大量基因诱导表达,其中上调表达基因分别为1304和1334个,下调表达基因为220和336个。在叶片和根部同时上调和下调表达的基因分别为202和12个,而在叶片和根部特异上调表达的基因

分别为1125和1097个。

2.5 LD区间内候选基因的筛选

利用Haploview 4.2^[41]分析各性状贡献率最高或性状间重复检测到的显著关联SNP所在LD区块。结果表明,11个重要的显著关联SNP中有6个位于LD区块中,长度分别为10—442kb(表4)。GWAS与差异表达基因比较分析发现,在11个LD区间的447个基因中有15个受盐胁迫诱导表达,但无显著关联SNP位于这些基因内。此外,分析与HLW和HLN相关的6个LD区段时,重点关注苗期发育调控基因。剩余区段重点选择与非生物胁迫相关基因。最终初步筛选的候选基因中*BnaSRO1*与盐胁迫和发育调控相关,*BnaPAGR2*、*BnaNPH3*、*BnaMYB124*、*BnaSAM-Mtase*、*BnaBIN2*、*BnaUMAMIT11*和*BnaEXPA7*与发芽阶段的发育过程有关,*BnaRPT3*、*BnaEF-hand*和*BnaF3H*可能与油菜发芽期的盐胁迫适应性相关。

2.6 候选基因的组织特异和诱导表达模式

qRT-PCR检测结果表明(图4),11个基因均在萌发后72h的根和下胚轴中有不同程度表达,

表 3 盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期幼苗下胚轴长和根长的显著关联 SNPs

Table 3 Significant associated SNPs of HL and RL of *B. napus* seedlings at germination stage under salt stress treatment

性状 Trait	SNP 探针号 SNP probe number	染色体 Chr.	位置 Position (bp)	等位基因 Allele	最小等位基因频率 MAF	P 值 P-value	贡献率 R ²
HLW	rs37979	A02	3131494	C/T	0.312	1.57E-07	12.638
HLN	rs6186	A03	19247585	A/G	0.325	1.11E-07	13.498
HLN	rs9466	A04	1752487	A/G	0.128	1.63E-07	13.174
HLN	rs12473	A05	6205280	A/G	0.343	6.86E-07	11.976
HLW	rs12473	A05	6205280	A/G	0.343	6.07E-08	13.400
HLW	rs11476	A05	18651193	G/T	0.339	4.71E-07	11.761
HLN	rs14494	A06	4964207	C/T	0.435	1.92E-07	13.038
HLW	rs14494	A06	4964207	C/T	0.435	1.64E-08	14.458
HLW	rs14751	A06	6091946	A/G	0.270	1.01E-06	11.159
HLW	rs13546	A06	15512773	C/T	0.492	6.13E-07	11.552
HLN	rs14037	A06	23444533	A/C	0.410	2.65E-07	12.769
HLW	rs14037	A06	23444533	A/C	0.410	1.53E-06	10.825
HLN	rs14147	A06	24366028	G/A	0.435	5.21E-08	14.136
HLN	rs22322	A07	3477622	A/G	0.434	3.56E-07	12.521
HLW	rs22322	A07	3477622	A/G	0.434	8.48E-07	11.295
HLN	rs15434	A07	14975988	T/C	0.499	3.57E-07	12.521
RLW	rs16139	A07	19310174	C/T	0.161	1.45E-05	8.932
HLN	rs16427	A07	22517611	A/G	0.296	1.03E-06	11.641
HLN	rs18707	A08	2513455	G/A	0.439	5.84E-08	14.039
HLN	rs18038	A08	13575343	A/G	0.391	9.94E-07	11.668
HLN	rs18442	A08	17007108	T/C	0.260	1.04E-06	11.634
HLW	rs18448	A08	17026237	A/C	0.280	4.30E-07	11.833
HLW	rs8570	A10	4047120	T/C	0.469	1.11E-06	11.078
HLN	rs23615	A10	9082874	T/C	0.271	1.54E-06	11.308
HLW	rs48171	C01	30305788	T/C	0.291	4.53E-07	11.792
HLN	rs38255	C02	42483650	C/T	0.473	1.13E-07	13.482
HLN	rs27904	C03	12839150	G/T	0.297	1.47E-06	11.343
HLW	rs27904	C03	12839150	G/T	0.297	1.71E-07	12.570
HLD	rs40823	C03	34607618	G/A	0.091	2.59E-05	9.148
HLD	rs40822	C03	34607739	T/C	0.185	2.67E-05	9.124
HLW	rs38161	C03	37040348	T/C	0.387	7.31E-07	11.412
HLW	rs29836	C03	51969206	T/C	0.263	1.46E-07	12.697
HLN	rs24406	C03	52357539	A/C	0.254	1.08E-06	11.597
HLW	rs24406	C03	52357539	A/C	0.254	2.61E-08	14.081
HLN	rs39277	C04	9129425	A/C	0.311	1.91E-07	13.043
HLN	rs8970	C04	44583867	G/A	0.293	1.53E-06	10.130
HLW	rs8970	C04	44583867	G/A	0.293	4.88E-08	12.345
RLD	rs8970	C04	44583867	G/A	0.293	3.47E-05	7.674
RLW	rs8970	C04	44583867	G/A	0.293	1.01E-05	8.160
HLN	rs47181	C05	4305731	A/G	0.369	1.41E-07	13.297
HLW	rs35157	C05	35242768	C/A	0.255	1.51E-06	9.711
HLN	rs37430	C06	8299084	A/C	0.243	6.14E-07	12.069
RLN	rs35083	C08	25295395	G/A	0.364	3.62E-05	8.594
HLN	rs32417	C08	35812498	G/A	0.360	9.13E-07	11.739
RLW	rs39358	C09	15755706	A/C	0.415	1.68E-05	8.818

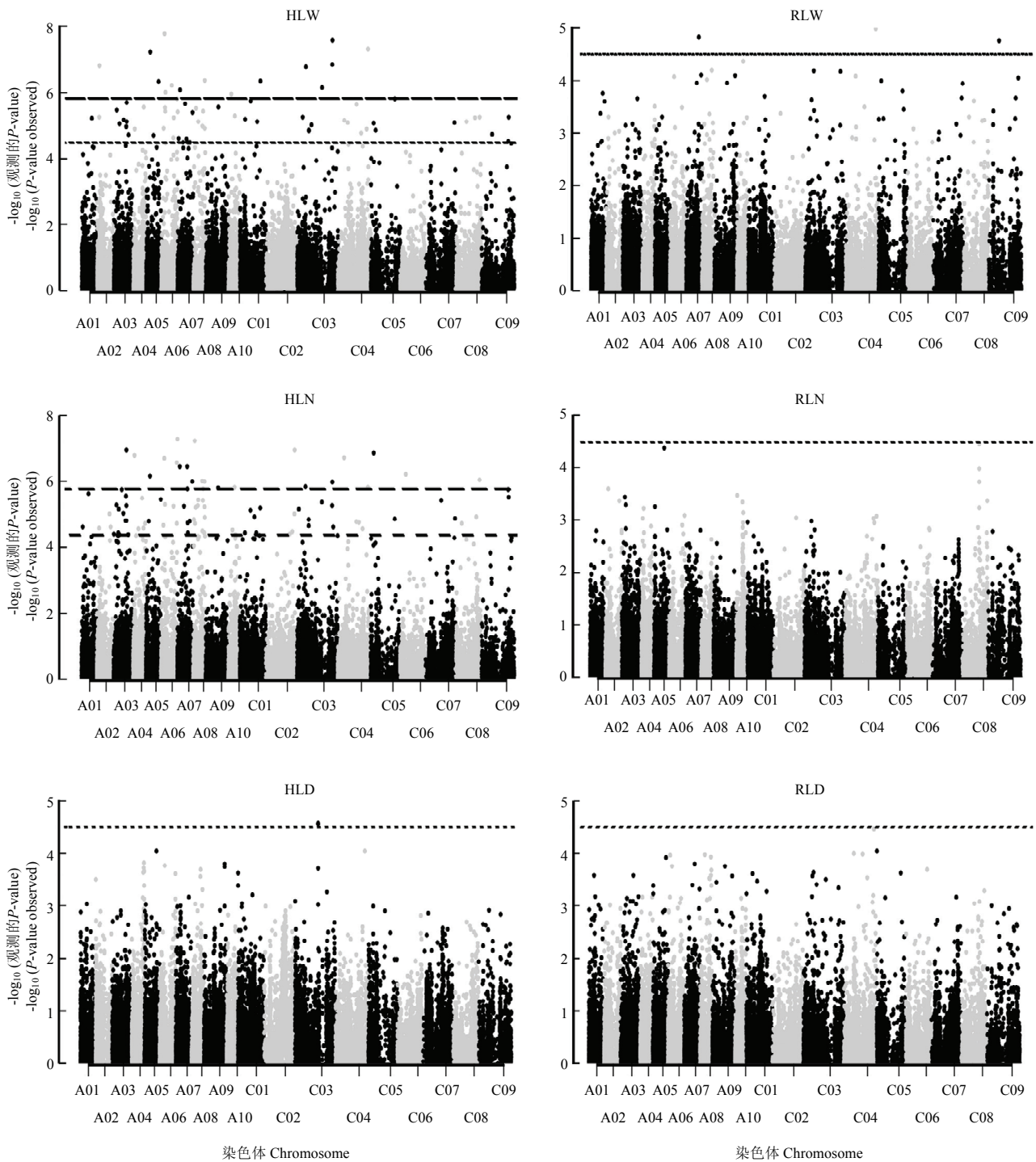
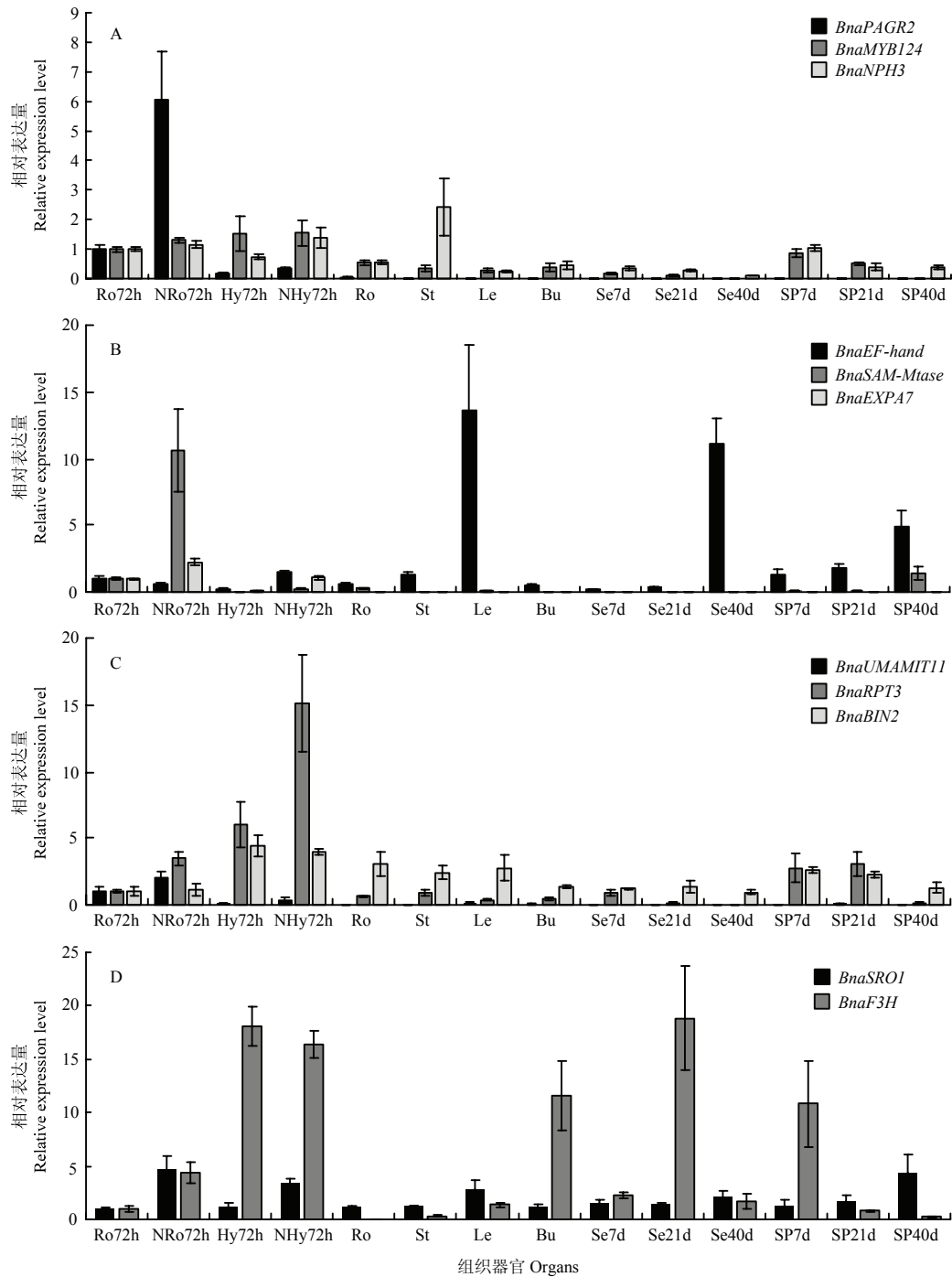


图 3 盐胁迫下甘蓝型油菜发芽期下胚轴长和根长全基因组关联分析的曼哈顿图

Fig. 3 Manhattan plots of GWAS for HL and RL of *B. napus* seedlings at germination stage under salt stress treatment

BnaPAGR2、*BnaEF-hand*、*BnaSAM-Mtase* 和 *BnaEXPA7* 在萌发后 72 h 根的表达量高于下胚轴，而 *BnaMYB124*、*BnaRPT3*、*BnaBIN2* 和 *BnaF3H* 则刚好相反。盐胁迫处理后，*BnaPAGR2*、*BnaSAM-Mtase*、*BnaRPT3*、

BnaBIN2、*BnaSRO1* 和 *BnaF3H* 在根部显著上调表达，*BnaEF-hand*、*BnaEXPA7*、*BnaUMAMIT11*、*BnaRPT3* 和 *BnaSRO1* 在下胚轴中显著上调表达。此外，*BnaUMAMIT11*、*BnaPAGR2* 和 *BnaEXPA7* 在萌发的



A: *BnaPAGR2*、*BnaMYB124* 和 *BnaNPH3* 的表达模式；B: *BnaEF-hand*、*BnaSAM-Mtase* 和 *BnaEXPA7* 的表达模式；C: *BnaUMAMIT11*、*BnaRPT3* 和 *BnaBIN2* 的表达模式；D: *BnaSRO1* 和 *BnaF3H* 的表达模式；Ro72h: 发芽 72 h 的根；NRo72h: 盐胁迫下发芽 72 h 的根；Hy72h: 发芽 72 h 的下胚轴；NHy72h: 盐胁迫下发芽 72 h 的下胚轴；Ro: 花期的根；St: 花期的茎；Le: 花期成熟叶片；Bu: 蕾；Se7d: 花后 7 d 种子；Se21d: 花后 21 d 种子；Se40d: 花后 40 d 种子；SP7d: 花后 7 d 荚果皮；SP21d: 花后 21 d 荚果皮；SP40d: 花后 40 d 荚果皮。误差线表示平均值的标准差 ($n=3$)

A: Expression patterns of *BnaPAGR2*, *BnaMYB124* and *BnaNPH3*; B: Expression patterns of *BnaEF-hand*, *BnaSAM-Mtase* and *BnaEXPA7*; C: Expression patterns of *BnaUMAMIT11*, *BnaRPT3* and *BnaBIN2*; D: Expression patterns of *BnaSRO1* and *BnaF3H*; Ro72h: root of 72 h after germination; NRo72h: Root of 72 h after germination under salt stress condition; Hy72h: hypocotyl of 72 h after germination; NHy72h: hypocotyl of 72 h after germination under salt stress condition; Ro: root at flowering stage; St: stem at flowering stage; Le: mature leaf at flowering stage; Bu: bud; Se7d: seed of 7 d after flowering; Se21d: seed of 21 d after flowering; Se40d: seed of 40 d after flowering; SP7d: silique pericarp of 7 d after flowering; SP21d: silique pericarp of 21 d after flowering; SP40d: silique pericarp of 40 d after flowering. Error bars in qRT-PCR detection results represent the standard error of the mean ($n = 3$)

图 4 荧光定量 PCR 检测 11 个候选基因的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of 11 candidate genes by qRT-PCR

表 4 显著关联标记所在 LD 区间及候选基因

Table 4 LD intervals and candidate genes of significant association markers

关联性状 Associated trait	SNP 探针 SNP probe	染色体 Chr.	LD 区间 LD interval (kb)	单倍型块大小 Haplotype block size (kb)	候选基因 Candidate genes	对应拟南芥基因 Corresponding <i>Arabidopsis</i> genes
HLN、HLW、RLD、RLW	rs8970	C04	44439943—44796243	356	<i>BnaSRO1</i>	AT2G35510
HLW、HLN	rs12473	A05	6105280—6305280		<i>BnaPAGR2</i>	AT2G31865
HLW、HLN	rs14037	A06	23213061—23444533	231	<i>BnaNPH3</i>	AT5G47800
HLW、HLN	rs14494	A06	4864207—5064207		<i>BnaMYB124</i>	AT1G14350
HLW、HLN	rs22322	A07	3040896—3477622	436	<i>BnaSAM-Mtase</i>	AT3G44840
HLW、HLN	rs24406	C03	51969206—52357539	388	<i>BnaBIN2</i>	AT4G18710
HLW、HLN	rs27904	C03	12739150—12939150		<i>BnaUMAMIT11</i>	AT2G40900
HLW、HLN	rs18442/rs18448	A08	17007108—17449913	442	<i>BnaEXPA7</i>	AT1G12560
HLD	rs40822/rs40823	C03	34507618—34707739		<i>BnaRPT3</i>	AT5G64330
HLN	rs14147	A06	24355445—24366028	10	<i>BnaEF-hand</i>	AT4G38810
RLN	rs35083	C08	25195395—25395395		<i>BnaF3H</i>	AT3G51240

根和下胚轴中特异表达,表明其可能与油菜萌发阶段根和下胚轴的发育调控有关。*BnaRPT3*、*BnaBIN2*和*BnaMYB124*虽然呈组成型表达,但在下胚轴中表达量最高。*BnaSAM-Mtase*在萌发阶段的根和花后40 d种子中表达量较高,说明该基因同时参与种子成熟及萌发。*BnaEF-hand*、*BnaSRO1*和*BnaF3H*在除萌发阶段的根和下胚轴外的其他组织器官中也有较高的转录水平,表明其除了在萌发阶段发挥功能以外,还参与油菜叶片、蕾、种子和角果皮的发育调控。

3 讨论

甘蓝型油菜基因组序列的公布及 SNP 芯片的开发促进了油菜重要数量性状的定位研究^[9]。目前,有学者已开展了油菜种子重量和品质^[21]、干旱胁迫抗性^[22]、种子萌发和活力^[23]、收获指数^[24]、株高、一次分枝数^[25]、单株产量、生物产量和开花时间^[26]等性状的 GWAS 分析,鉴定了大量控制油菜重要性状的位点。本研究利用砂培试验,对正常和盐胁迫萌发条件下幼苗下胚轴长和根长性状进行 GWAS 分析,鉴定出 45 个显著关联的 SNP,分布在油菜基因组的 16 条染色体,其中 A03 染色体上的 rs6816 与荐红举等^[6]利用重组自交系群体检测到的控制盐胁迫下油菜种子发芽率的 QTL 位点 *qD4-A03-1* 非常接近,

仅相距 348 kb,很可能为同一 QTL 区间。ZHANG 等^[22]对模拟干旱胁迫条件下油菜萌发的根长、茎长、根茎长度比和鲜重进行了 GWAS 分析,鉴定出的显著关联标记 Bn-A10-p3063220、Bn-scaff_16394_2-p1222322、Bn-scaff_17623_1-p657238 和 Bn-scaff_16445_1-p1834116 与笔者在相同染色体发现的显著关联 SNP 均在 1 Mb 范围内。由于 ZHANG 等^[22]的 GWAS 群体仅包含 66 个自交系,表型数据较少,关联分析准确性受影响,因此,其鉴定的位点与本研究结果可能一致,但还需要进一步比较研究。HATZIG 等^[23]利用 GWAS 对油菜种子萌发和种子活力进行了解析,其中 A05 和 C08 染色体的显著关联 SNP 与本研究定位结果一致。虽然,本研究检测到的位点与前人定位 QTL 部分重叠,但仍有多个显著关联标记无法与其他研究对应,可能与鉴定方法及调查性状不同有关,这些位点可作为新的候选基因区域作进一步研究。

不同油菜品种对盐胁迫的抗(耐)性存在显著差异^[2],这是解析油菜耐盐性关键遗传因子和耐盐基因的基础。本研究利用 GWAS 和转录组综合分析方法,最终确定了 11 个重要 LD 区间的候选基因。其中,显著关联 SNP rs22322 所在 LD 区间的候选基因 *BnaSAM-Mtase* (*BnaA07g03510*) 位于 A07 染色体,编码 S-腺苷基甲硫氨酸依赖的甲基转移酶(S-

adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase), 其被证实对维持细胞功能, 提高植株抗氧化胁迫能力具有重要作用^[27]。本研究中 *BnaA07g03510* 在根和下胚轴均受盐胁迫显著上调表达, 提示其可能也以类似的方式提高油菜发芽期下胚轴和根部的耐盐性。而 rs18442 和 rs18448 标记 LD 区间的候选基因 *BnaA08g24690D* 编码 α -扩张蛋白 7 (*BnaEXPA7*), 在根和下胚轴中特异表达, 并在下胚轴中受盐胁迫诱导上调表达, 由于 α -扩张蛋白家族主要具有松弛细胞壁, 决定器官大小和形态建成的作用, 因此其对油菜下胚轴伸长和盐胁迫适应性可能也起到了重要作用^[28]。*BnaSRO1* (*BnaC04g44420D*) 是最值得关注的候选基因, 其位于显著关联 SNP rs8970 的 LD 区段内, 与 HLN、HLW、RLD 和 RLW 4 个性状均紧密连锁, 编码具有多聚 (ADP-核糖) 聚合酶催化结构域和 WWE 蛋白互作结构域的 RCD1 类蛋白 (SIMILAR TO RCD ONE1, SRO1)。有研究表明, RCD1 能与 AP2/ERF、NAC 和 bHLH (basic helix-loop-helix) 转录因子互作, 调节植物的发育和胁迫响应^[29]。此外, RCD1 还能质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 SOS1 互作, 提高拟南芥氧化胁迫适应能力^[30]。本研究发现, *BnaSRO1* 在根和下胚轴中受盐胁迫诱导表达, 其转录水平在叶和花后 40 d 角果皮中也具有较高的转录水平, 提示其不仅对油菜发芽期下胚轴的发育及盐胁迫适应性具有重要作用, 可能也参与叶片和角果皮的发育调控。类黄酮合成途径的关键蛋白黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase gene, F3H) 具有提高植物抵抗干旱、盐胁迫和紫外辐射的能力^[31]。位于显著关联标记 rs35083 LD 区间内的 *BnaF3H* (*BnaC08g22640D*) 在油菜发芽期根部受盐胁迫诱导上调表达, 提示其可能对油菜发芽期根部的盐胁迫适应也具有重要作用。除上述 4 个基因外, 基因表达模式和基因功能注释分析显示另外 7 个候选基因很可能也参与了油菜发芽阶段根和下胚轴的发育调节或与苗期盐胁迫适应相关。因此, 深入开展上述候选基因的基因功能研究将有助于准确揭示油菜发芽期根和下胚轴的发育及盐胁迫适应机制, 为提高油菜耐盐性和选育耐盐品种奠定基础。

4 结论

GWAS 分析检测到 45 个与油菜发芽期根和下胚

轴发育及盐胁迫适应性显著关联的 SNP, 其中 40 个和 5 个分别与下胚轴长和根长显著关联。重要显著关联 SNP 的 11 个 LD 区间共含 447 个基因, 转录组分析和基因功能注释综合分析进一步筛选出 11 个重要候选基因。除 *BnaNPH3*, 其余 10 个候选基因均在根或下胚轴中受盐胁迫诱导上调表达, 部分基因具有根或下胚轴特异表达特性, 说明这些基因很可能参与油菜发芽期根和下胚轴生长发育及耐盐性的调节。

References

- [1] YAMAGUCHI T, BLUMWALD E. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 615-620.
- [2] 刘国红, 姜超强, 刘兆普, 梁明祥, 殷祥贞, 郑青松. 盐胁迫对油菜幼苗生长和光合特征的影响. *生态与农村环境学报*, 2012, 28(2): 157-164.
LIU G H, JIANG C Q, LIU Z P, LIANG M X, YIN X Z, ZHENG Q S. Effects of salt stress on growth and photosynthetic traits of canola seedlings. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2012, 28(2): 157-164. (in Chinese)
- [3] ASHRAF M, MCNEILLY T. Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2004, 23(2): 157-174.
- [4] ZHANG X, LU G, LONG W, ZOU X, LI F, NISHIO T. Recent progress in drought and salt tolerance studies in *Brassica* crops. *Breeding Science*, 2014, 64(1): 60-73.
- [5] 龙卫华, 浦惠明, 陈松, 张洁夫, 戚存扣, 张学昆. 油菜 3 个栽培种发芽期耐盐性评价. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(1): 32-37.
LONG W H, PU H M, CHEN S, ZHANG J F, QI C K, ZHANG X K. Evaluation for salt tolerance of three cultivated species of rapeseeds at germination stage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(1): 32-37. (in Chinese)
- [6] 荐红举, 肖阳, 李加纳, 马珍珍, 魏丽娟, 刘列钊. 利用 SNP 遗传图谱定位盐、旱胁迫下甘蓝型油菜种子发芽率的 QTL. *作物学报*, 2014, 40(4): 629-635.
JIAN H J, XIAO Y, LI J N, MA Z Z, WEI L J, LIU L Z. QTL mapping for germination percentage under salinity and drought stresses in *Brassica napus* L. using a SNP genetic map. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(4): 629-635. (in Chinese)
- [7] YONG H Y, WANG C, BANCROFT I, LI F, WU X, KITASHIBA H, NISHIO T. Identification of a gene controlling variation in the salt

- tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Planta*, 2015, 242: 313-326.
- [8] QU C M, LI S M, DUAN X J, FAN J H, JIA L D, ZHAO H Y, LU K, LI J N, XU X F, WANG R. Identification of candidate genes for seed glucosinolate content using association mapping in *Brassica napus* L.. *Genes (Basel)*, 2015, 6: 1215-1229.
- [9] CHALHOUB B, DENOEUDE F, LIU S, PARKIN I. A. P, TANG H, WANG X, CHIQUET J, BELCRAM H, TONG C, SAMANS B, CORREA 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, 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, GOLICZ A A, MANOLI S, LEE T H, THI V H D, CHALABI S, HU Q, FAN C, TOLLENAERE R, LU Y, BATTAIL C, SHEN J, SIDEBOTTOM C H D, CANAGUIER A, CHAUVEAU A, BERARD A, DENIOT G, GUAN M, LIU Z, SUN F, LIM Y P, LYONS E, TOWN C D, BANCROFT I, 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*, 345(6199): 950-953.
- [10] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN D J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 3389-3402.
- [11] BRADBURY P J, ZHANG Z, KROON D E, CASSTEVENS T M, RAMDOSS Y, BUCKLER E S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 2007, 23(19): 2633-2635.
- [12] GINESTET C. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A*, 2001, 174: 245-246.
- [13] TURNER S D. qqman: An R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *BioRxiv*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1101/005165>
- [14] BARRETT J C, FRY B, MALLER J, DALY M J. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 263-265.
- [15] YONG H Y, ZOU Z, KOK E P, KWAN B H, CHOW K, NASU S, NANZYO M, KITASHIBA H, NISHIO T. Comparative transcriptome analysis of leaves and roots in response to sudden increase in salinity in *Brassica napus* by RNA-seq. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 467395.
- [16] DOBIN A, DAVIS C A, SCHLESINGER F, DRENKOW J, ZALESKI C, JHA S, BATUT P, CHAISSON M, GINGERAS T R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15-21.
- [17] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, PERTEA G, KIM D, KELLEY D R, PIMENTEL H, SALZBERG S L, RINN J L, PACHTER L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 7: 562-578.
- [18] 卢坤, 张琳, 曲存民, 梁颖, 唐章林, 李加纳. 利用 RNA-Seq 鉴定甘蓝型油菜叶片干旱胁迫应答基因. *中国农业科学*, 2015, 48(4): 630-645.
- LU K, ZHANG L, QU C M, LIANG Y, TANG Z L, LI J N. Identification of drought stress-responsive genes in leaves of *Brassica napus* using RNA sequencing technology. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(4): 630-645. (in Chinese)
- [19] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL M W, SHIPLEY G L. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [20] QU C, FU F, LIU M, ZHAO H, LIU C, LI J, LU K. Comparative transcriptome analysis of recessive male sterility (RGMS) in sterile and fertile *Brassica napus* lines. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0144118.
- [21] LI F, CHEN B, XU K, WU J, SONG W, BANCROFT I, HARPER A L, TRICK M, LIU S, GAO G, WANG N, YAN G, QIAO J, LI J, LI H, XIAO X, ZHANG T, WU X. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of seed weight and seed quality in rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Research*, 2014, 21: 355-367.
- [22] ZHANG J, MASON A S, WU J, LIU S, LIU S, ZHANG X, LUO T, REDDEN R, BATLEY J, HU L, YAN G. Identification of putative candidate genes for water stress tolerance in canola (*Brassica napus*). *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1058.
- [23] HATZIG S V, FRISCH M, BREUER F, NESI N, DUCOURNAU S, WAGNER M H, LECKBAND G, ABBADI A, SNOWDON R J. Genome-wide association mapping unravels the genetic control of

- seed germination and vigor in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 221.
- [24] LUO X, MA C, YUE Y, HU K, LI Y, DUAN Z, WU M, TU J, SHEN J, YI B, FU T. Unravelling the complex trait of harvest index in rapeseed (*Brassica napus* L.) with association mapping. *BMC Genomics*, 2015, 16: 379.
- [25] LI F, CHEN B, XU K, GAO G, YAN G, QIAO J, LI J, LI H, LI L, XIAO X, ZHANG T, NISHIO T, WU X. A genome-wide association study of plant height and primary branch number in rapeseed (*Brassica napus*). *Plant Science*, 2016, 242: 169-177.
- [26] LI L, LONG Y, ZHANG L, DALTON-MORGAN J, BATLEY J, YU L, MENG J, LI M. Genome wide analysis of flowering time trait in multiple environments via high-throughput genotyping technique in *Brassica napus* L.. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): 1-18.
- [27] KUNSTMANN B, OSIEWACZ H D. Over-expression of an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase leads to an extended lifespan of *Podospora anserina* without impairments in vital functions. *Aging Cell*, 2008, 7: 651-662.
- [28] SAMPEDRO J, COSGROVE D J. The expansin superfamily. *Genome Biology*, 2005, 6: 1.
- [29] JASPERS P, BLOMSTER T, BROSCHE M, SALOJÄRVI J, AHLFORS R, VAINONEN J P, REDDY R A, IMMINK R, ANGENENT G, TURCK F, OVERMYER K, KANGASJÄRVI J. Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors. *The Plant Journal*, 2009, 60: 268-279.
- [30] KATIYAR-AGARWAL S, ZHU J, KIM K, AGARWAL M, FU X, HUANG A, ZHU J K. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 18816-18821.
- [31] WALIA H, WILSON C, CONDAMINE P, LIU X, ISMAIL A M, ZENG L, WANAMAKER S I, MANDAL J, XU J, CUI X, CLOSE T J. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiology*, 2005, 139: 822-835.

(责任编辑 李莉)

附表 1 本研究所用的植物材料

Supplementary Table 1 Plant materials used in this study

材料编号	Accession number	材料名	Accession name	国家, 地区	Country, region	亚群	Sub-population
B1		Ganyou5		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B2		Nonglin42		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B4		Huaiyou6		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B5		Yan81-2		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B6		28887		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B7		Qianyou4		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B8		Qianyou331		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B10		Niuerduo		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B14		SWU43		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B16		SWU45		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B17		SWU46		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B18		SWU47		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B19		SWU48		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B20		SWU52		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B21		SWU53		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B23		SWU59		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B24		SWU65		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B25		SWU82		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B26		SWU83		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B27		SWU92		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B28		SWU101		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B29		SWU106		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B30		SWU108		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B31		Chuanyou20		中国四川	Sichuan, China	P1	
B33		CY12NY-7		中国四川	Sichuan, China	P1	
B35		CY12Q8-7		中国四川	Sichuan, China	P1	
B36		CY12QSZ06		中国四川	Sichuan, China	P1	
B38		CY12Q95108		中国四川	Sichuan, China	P1	
B39		CY12Q21535-N3		中国四川	Sichuan, China	P1	
B40		CY12PWX-4		中国四川	Sichuan, China	P1	
B41		CY12PWX-6		中国四川	Sichuan, China	P1	
B43		CY13PWX-17		中国四川	Sichuan, China	P1	
B44		CY14PWX-18		中国四川	Sichuan, China	P1	
B45		CY15PWX-31		中国四川	Sichuan, China	P1	
B46		CY16PWX-35		中国四川	Sichuan, China	P1	
B47		CY17PWX-58		中国四川	Sichuan, China	P1	
B49		CY19PWX-65		中国四川	Sichuan, China	P1	
B52		CY12GJ-1		中国四川	Sichuan, China	P1	
B53		wx1025		中国湖南	Hunan, China	P1	
B54		wx10213		中国湖南	Hunan, China	P1	

材料编号 Accession number	材料名 Accession name	国家, 地区 Country, region	亚群 Sub-population
B55	wx10296	中国湖南 Hunan, China	P1
B56	wx10315	中国湖南 Hunan, China	P1
B57	10-1043	中国湖南 Hunan, China	P1
B60	10-1070	中国湖南 Hunan, China	P1
B61	10-804	中国湖南 Hunan, China	P1
B62	10-1358	中国湖南 Hunan, China	P1
B64	Xiangyou13	中国湖南 Hunan, China	P1
B65	Xiangyou15	中国湖南 Hunan, China	P1
B66	Xiangyou11	中国湖南 Hunan, China	P1
B67	740	中国湖南 Hunan, China	P1
B69	613	中国湖南 Hunan, China	P1
B70	783	中国湖南 Hunan, China	P1
B71	782	中国湖南 Hunan, China	P1
B72	YB3	中国湖南 Hunan, China	P1
B73	1360	中国湖南 Hunan, China	P1
B75	WX10329	中国湖南 Hunan, China	P1
B76	santana	中国湖南 Hunan, China	P1
B77	1281	中国湖南 Hunan, China	P1
B79	1368	中国湖南 Hunan, China	P1
B80	1322	中国湖南 Hunan, China	P1
B81	1252	中国湖南 Hunan, China	P1
B82	1321	中国湖南 Hunan, China	P1
B84	07094	中国湖北 Hubei, China	P1
B85	07016	中国湖北 Hubei, China	P1
B86	9F087	中国湖北 Hubei, China	P1
B87	97096	中国湖北 Hubei, China	P1
B88	97097	中国湖北 Hubei, China	P1
B90	07191	中国湖北 Hubei, China	P1
B91	07037	中国湖北 Hubei, China	P1
B92	RQ011	中国湖北 Hubei, China	P1
B97	96063	中国湖北 Hubei, China	P1
B98	01111	中国湖北 Hubei, China	P1
B99	01570	中国湖北 Hubei, China	P1
B102	02354	中国湖北 Hubei, China	P1
B105	93205	中国湖北 Hubei, China	P1
B106	93210	中国湖北 Hubei, China	P1
B107	Nca	中国湖北 Hubei, China	P1
B108	Zhongshuang4	中国湖北 Hubei, China	P1
B109	Zhongshuang9	中国湖北 Hubei, China	P1
B110	Zhongshuang11	中国湖北 Hubei, China	P1
B111	2011-6200	中国湖北 Hubei, China	P1

材料编号	Accession number	材料名	Accession name	国家, 地区	Country, region	亚群	Sub-population
B115			2012-3448	中国湖北	Hubei, China		P2
B116			2012-3546	中国湖北	Hubei, China		P1
B118			2012-5086	中国湖北	Hubei, China		P1
B119			2012-5113	中国湖北	Hubei, China		P1
B120			2012-8327	中国湖北	Hubei, China		P1
B121			2012-8355	中国湖北	Hubei, China		P1
B122			2012-8380	中国湖北	Hubei, China		P1
B124			2012-9323	中国湖北	Hubei, China		P1
B127			2012-9478	中国湖北	Hubei, China		P1
B128			2012-9542	中国湖北	Hubei, China		P1
B129			2012-K8053	中国湖北	Hubei, China		P1
B130			R2	中国湖北	Hubei, China		P1
B131			Xiwang106	中国湖北	Hubei, China		P1
B132			Yangguang198	中国湖北	Hubei, China		P1
B133			Yangguang2009	中国湖北	Hubei, China		P1
B134			Zhongshuang10	中国湖北	Hubei, China		P1
B135			Zhongshuang12	中国湖北	Hubei, China		P1
B136			Zhongshuang4	中国湖北	Hubei, China		P1
B137			Zhongshuang6	中国湖北	Hubei, China		P1
B138			Zhongshuang7	中国湖北	Hubei, China		P1
B139			Zhongyou589	中国湖北	Hubei, China		P1
B140			Zhongyou821	中国湖北	Hubei, China		P1
B141			Huayou2	中国湖北	Hubei, China		P1
B142			Major	中国湖北	Hubei, China		P1
B143			Huashuang2	中国湖北	Hubei, China		P1
B144			Aurora	中国湖北	Hubei, China		P1
B145			Huayou13	中国湖北	Hubei, China		P1
B146			Rucabo	中国湖北	Hubei, China		P2
B147			Huayou3	中国湖北	Hubei, China		P1
B149			Ningyou1	中国湖北	Hubei, China		P1
B151			11-9-700	中国湖北	Hubei, China		P1
B153			11-9-702	中国湖北	Hubei, China		P1
B154			11-9-703	中国湖北	Hubei, China		P1
B155			11-9-704	中国湖北	Hubei, China		P1
B156			11-9-705	中国湖北	Hubei, China		P1
B157			11-9-706	中国湖北	Hubei, China		P1
B158			11-9-707	中国湖北	Hubei, China		P1
B159			11-P63-5	中国湖北	Hubei, China		P1
B160			11-P63-8	中国湖北	Hubei, China		P1
B163			09-P64-1	中国湖北	Hubei, China		P1
B164			10-Cong23	中国湖北	Hubei, China		P1

材料编号 Accession number	材料名 Accession name	国家, 地区 Country, region	亚群 Sub-population
B165	10-Cong24	中国湖北 Hubei, China	P1
B166	10-Cong25	中国湖北 Hubei, China	P1
B167	10-Cong29	中国湖北 Hubei, China	P1
B168	10-Cong32	中国湖北 Hubei, China	P1
B169	10-Cong33	中国湖北 Hubei, China	P1
B170	10-Cong34	中国湖北 Hubei, China	P1
B171	10-Jiangpeng2	中国湖北 Hubei, China	P1
B172	10-Jiangpeng3	中国湖北 Hubei, China	P1
B173	11-7-103	中国湖北 Hubei, China	P1
B174	11-7-117	中国湖北 Hubei, China	P1
B175	11-7-125	中国湖北 Hubei, China	P1
B178	7-7766-74	中国湖北 Hubei, China	P1
B180	64Peng-10	中国湖北 Hubei, China	P1
B181	Shengguang77	中国湖北 Hubei, China	P1
B182	Jiayu17	中国湖北 Hubei, China	P1
B183	Jiayu25	中国湖北 Hubei, China	P1
B184	Jiayu16	中国湖北 Hubei, China	P1
B185	Jiayu31	中国湖北 Hubei, China	P1
B186	Huashuang5	中国湖北 Hubei, China	P1
B187	Huashuang4	中国湖北 Hubei, China	P1
B188	Jia972	中国湖北 Hubei, China	P1
B189	Huashuang128	中国湖北 Hubei, China	P1
B190	Jia904	中国湖北 Hubei, China	P1
B192	JiaPF190	中国湖北 Hubei, China	P1
B195	Jia951	中国湖北 Hubei, China	P1
B196	Jia917	中国湖北 Hubei, China	P1
B197	Jia923	中国湖北 Hubei, China	P1
B198	Jia931	中国湖北 Hubei, China	P1
B200	Jia963	中国湖北 Hubei, China	P2
B201	Huyou17	中国上海 Shanghai, China	P1
B202	Huyou15	中国上海 Shanghai, China	P1
B204	Ningyou18	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B206	Ningyou14	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B209	Shilifeng	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B211	Yangyou5	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B212	Zhenyou3	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B213	Hongyou3	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B215	Zheyou18	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B216	Zheshuang72	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B217	Zheshuang8	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B218	Zheyou758	中国浙江 Zhejiang, China	P1

材料编号	Accession number	材料名	Accession name	国家, 地区	Country, region	亚群	Sub-population
B219		Huyou14		中国上海	Shanghai, China	P1	
B220		Huyou18		中国上海	Shanghai, China	P1	
B221		Huyou19		中国上海	Shanghai, China	P1	
B222		Zheyou19		中国浙江	Zhejiang, China	P1	
B223		Zheyou21		中国浙江	Zhejiang, China	P1	
B224		Zheshuang6		中国浙江	Zhejiang, China	P1	
B226		Wanyou16		中国安徽	Anhui, China	P1	
B227		Wanyou20		中国安徽	Anhui, China	P1	
B228		Wanyou29		中国安徽	Anhui, China	P1	
B241		Weijie		加拿大	Canada	P2	
B243		Zhizun		加拿大	Canada	P1	
B244		Haisheng		加拿大	Canada	P2	
B245		D2		丹麦	Denmark	P2	
B262		P310		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B263		P312		中国陕西	Shanxi, China	P2	
B264		P668		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B265		P685		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B266		A117		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B267		A172		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B268		B250		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B269		B265		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B271		B285		中国陕西	Shanxi, China	P2	
B273		GY270		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B274		GY282		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B275		GY284		中国陕西	Shanxi, China	P1	
B279		B414		中国新疆	Xinjiang, China	P1	
B291		11-P30		中国湖北	Hubei, China	P1	
B303		03LF1		中国甘肃	Gansu, China	P2	
B313		SWU01		中国湖北	Hubei, China	P1	
B326		Nonglin43		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B327		SWU25		中国西藏	Tibet, China	P1	
B328		Youyan2		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B330		SWU41		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B333		SWU57		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B334		SWU60		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B337		SWU63		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B339		SWU66		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B340		SWU67		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B341		SWU68		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B342		SWU69		中国重庆	Chongqing, China	P1	
B343		SWU70		中国重庆	Chongqing, China	P1	

材料编号 Accession number	材料名 Accession name	国家, 地区 Country, region	亚群 Sub-population
B345	SWU74	中国重庆 Chongqing, China	P1
B346	SWU75	中国重庆 Chongqing, China	P1
B349	SWU80	中国重庆 Chongqing, China	P1
B350	SWU81	中国重庆 Chongqing, China	P1
B351	SWU84	中国重庆 Chongqing, China	P1
B354	SWU88	中国重庆 Chongqing, China	P1
B357	SWU93	中国重庆 Chongqing, China	P1
B358	SWU94	中国重庆 Chongqing, China	P1
B360	SWU96	中国重庆 Chongqing, China	P1
B361	SWU99	中国重庆 Chongqing, China	P1
B362	SWU100	中国重庆 Chongqing, China	P1
B363	SWU102	中国重庆 Chongqing, China	P1
B365	SWU104	中国重庆 Chongqing, China	P1
B366	SWU105	中国重庆 Chongqing, China	P1
B367	SWU107	中国重庆 Chongqing, China	P1
B368	SWU110	中国重庆 Chongqing, China	P1
B369	SWU111	中国重庆 Chongqing, China	P1
B370	SWU112	中国重庆 Chongqing, China	P1
B371	SWU113	中国重庆 Chongqing, China	P1
B373	Zhongshuang10	中国湖北 Hubei, China	P1
B375	Zhongshuang7	中国湖北 Hubei, China	P1
B376	Zhongshuang12	中国湖北 Hubei, China	P1
B377	Zhongyou589	中国湖北 Hubei, China	P1
B378	Fuyou4	中国湖北 Hubei, China	P1
B380	Zhen2609	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B381	HX0352	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B382	Yangguang2009	中国湖北 Hubei, China	P1
B383	Huyou21	中国上海 Shanghai, China	P1
B384	Zheshuang3	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B385	Zheyou21	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B386	Wanyou20	中国安徽 Anhui, China	P1
B387	Wanyou12	中国安徽 Anhui, China	P1
B389	Hongyou3	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B390	Zhenyou5	中国湖北 Hubei, China	P1
B391	Yangyou4	中国湖北 Hubei, China	P1
B392	Huyou15	中国上海 Shanghai, China	P1
B393	Huyou16	中国上海 Shanghai, China	P1
B395	Huyou18	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B396	Zheshuang72	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B397	Zheshuang8	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B398	Zheyou50	中国浙江 Zhejiang, China	P1

材料编号	Accession number	材料名	Accession name	国家, 地区	Country, region	亚群	Sub-population
B399		Suyou1		中国江苏	Jiangsu, China		P1
B400		Zhongshuang4		中国湖北	Hubei, China		P1
B401		Zhongshuang11		中国湖北	Hubei, China		P1
B402		Yangguang198		中国湖北	Hubei, China		P1
B403		Huahang901		中国湖北	Hubei, China		P1
B404		YangJ6711		中国江苏	Jiangsu, China		P1
B406		Yangjian8		中国江苏	Jiangsu, China		P1
B407		Xiwang106		中国湖北	Hubei, China		P1
B408		Zheyu17		中国浙江	Zhejiang, China		P1
B409		Zhongshuang5		中国湖北	Hubei, China		P1
B410		Zhongyou821		中国湖北	Hubei, China		P1
B411		Qinyou1		中国湖北	Hubei, China		P1
B412		Weilong88		中国湖北	Hubei, China		P1
B414		Qinyou5		中国湖北	Hubei, China		P1
B415		Suyou4		中国江苏	Jiangsu, China		P1
B416		Fengyou9		中国湖北	Hubei, China		P1
B424		Ningyou10		中国湖北	Hubei, China		P1
B425		Helios		中国湖北	Hubei, China		P1
B427		Mian96-203		中国青海	Qinghai, China		P1
B428		Qing662A		中国湖北	Hubei, China		P1
B429		699		中国湖北	Hubei, China		P1
B430		Canada2		中国湖北	Hubei, China		P1
B432		Zhongshuang9		中国湖北	Hubei, China		P1
B433		WH-12		中国湖北	Hubei, China		P1
B435		WH-17		中国湖北	Hubei, China		P1
B436		WH-19		中国湖北	Hubei, China		P1
B437		WH-20		中国湖北	Hubei, China		P1
B438		WH-23		中国湖北	Hubei, China		P1
B439		WH-24		中国湖北	Hubei, China		P1
B440		WH-25		中国湖北	Hubei, China		P1
B442		WH-27		中国湖北	Hubei, China		P1
B443		WH-28		中国湖北	Hubei, China		P1
B445		WH-30		中国湖北	Hubei, China		P1
B446		WH-31		中国湖北	Hubei, China		P1
B447		WH-33		中国湖北	Hubei, China		P1
B451		WH-42		中国湖北	Hubei, China		P2
B452		WH-43		中国湖北	Hubei, China		P2
B453		WH-45		中国湖北	Hubei, China		P2
B454		WH-49		中国湖北	Hubei, China		P1
B455		WH-50		中国湖北	Hubei, China		P2
B458		WH-57		中国湖北	Hubei, China		P1

材料编号 Accession number	材料名 Accession name	国家, 地区 Country, region	亚群 Sub-population
B459	WH-58	中国湖北 Hubei, China	P1
B460	WH-59	中国湖北 Hubei, China	P1
B466	WH-83	中国湖北 Hubei, China	P1
B475	NY7	中国湖北 Hubei, China	P1
B479	Cubs root	中国湖北 Hubei, China	P1
B482	Shengli	中国湖北 Hubei, China	P1
B486	Daichousen	中国湖北 Hubei, China	P1
B487	comet	中国湖北 Hubei, China	P2
B488	Niklas	中国湖北 Hubei, China	P2
B491	WESBROOK	中国湖北 Hubei, China	P2
B492	Suigenshu	中国湖北 Hubei, China	P1
B493	Huayou4	中国湖北 Hubei, China	P1
B494	Y1	中国上海 Shanghai, China	P1
B499	Shaoyeqing	中国上海 Shanghai, China	P1
B501	Hujizao	中国上海 Shanghai, China	P1
B504	Fengding 240	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B506	Dahuaqiu	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B508	Ningyou 10	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B509	Ningyou 8	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B510	Ningyou 6	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B511	Duoyou 1	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B513	Huaiyou 12	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B514	Peixuan 170	中国江苏 Jiangsu, China	P1
B516	Guangde 8104	中国安徽 Anhui, China	P1
B517	Dangyouzao 1	中国安徽 Anhui, China	P1
B518	Guangde 761	中国安徽 Anhui, China	P1
B521	Chu 107	中国安徽 Anhui, China	P1
B526	Jie 65-1	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B527	Shenhuang1	中国上海 Shanghai, China	P1
B528	Zheyou 601	中国浙江 Zhejiang, China	P1
B529	Sangao rapeseed	中国浙江 Zhejiang, China	P1