作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2024, 50(4): 820–835 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2024.34144

基于 QTL 和转录组测序鉴定甘蓝型油菜耐旱候选基因

李阳阳[1,2,3] 吴 丹[2,3] 许军红[2,3] 陈倬永[1,2,3] 徐昕媛[1,2,3] 徐金盼[1,2,3]
唐钟林[1,2,3] 张娅茹[1,2,3] 朱 丽[1,2,3] 严卓立[1,2,3] 周清元[1,2,3] 李加纳[1,2,3]
刘列钊[1,2,3] 唐章林[1,2,3,*]

[1] 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 重庆 401329; [2] 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715; [3] 西南大学农业科学研究院, 重庆 400715

摘 要: 干旱胁迫严重限制了甘蓝型油菜种植面积的扩大和产量的提升。耐旱性是由多基因控制的复杂数量性状, 将 QTL 定位与转录组测序相结合, 是鉴定甘蓝型油菜耐旱候选基因的有效手段。本研究对甘蓝型油菜干旱敏感品系三六矮和耐旱品系科里纳-2 构建的 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群体幼苗进行正常灌溉和干旱胁迫处理, 测定地上部鲜重、地上部干重、叶片相对含水量、丙二醛和可溶性糖含量, 利用 SSR 和 SNP 多态性分子标记构建遗传连锁图谱, 鉴定耐旱相关 QTL 和候选区间, 结合耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 的转录组测序, 筛选耐旱相关候选基因。研究结果表明: 干旱胁迫使甘蓝型油菜幼苗地上部鲜重、地上部干重和叶片相对含水量下降, 使叶片丙二醛和可溶性糖含量上升; 耐旱相关 QTL 和候选区间分布于 A01、A02、A06、A08、A09、A10、C02、C03、C04、C06 和 C09 染色体; 对耐旱材料和干旱敏感材料正常灌溉、干旱 24 h、36 h 和 48 h 进行转录组分析, 主要差异表达基因显著富集到光合作用、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、植物激素信号转导、核糖体、昼夜节律及角质、木栓素和蜡质的生物合成等相关途径; 将 QTL 与转录组测序相结合, 鉴定到 28 个耐旱相关候选基因, 主要编码 FLC、bHLH105、TGA4、TEM1、ERF003、ACO3、CHLI1、LHCB6 和 PORC 等, 具有转录因子活性、乙烯产生和信号传导、叶绿素生物合成与结合、叶绿素氧化还原酶以及编码核糖体相关蛋白等功能。这些结果可为揭示甘蓝型油菜耐旱机理及分子标记辅助选育耐旱新品种奠定基础。

关键词: 甘蓝型油菜; 耐旱; QTL; 转录组; 候选基因

Identification of candidate genes associated with drought tolerance based on QTL and transcriptome sequencing in *Brassica napus* L.

LI Yang-Yang[1,2,3], WU Dan[2,3], XU Jun-Hong[2,3], CHEN Zhuo-Yong[1,2,3], XU Xin-Yuan[1,2,3], XU Jin-Pan[1,2,3], TANG Zhong-Lin[1,2,3], ZHANG Ya-Ru[1,2,3], ZHU Li[1,2,3], YAN Zhuo-Li[1,2,3], ZHOU Qing-Yuan[1,2,3], LI Jia-Na[1,2,3], LIU Lie-Zhao[1,2,3], and TANG Zhang-Lin[1,2,3,*]

[1] Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Chongqing 401329, China; [2] College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China; [3] Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Drought stress severely limits planting promotion and yield increase in *Brassica napus* L. Drought tolerance is a complex quantitative trait controlled by multiple genes. Combining QTL and transcriptome is an effective method for identifying candidate genes associated with drought tolerance in *B. napus*. In this study, the seedlings of $F_{2:6}$ and $F_{2:8}$ recombinant inbred lines,

本研究由国家重点研发计划项目(2022YFD1201600)和重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(cstc2021jscx-cylhX0003)资助。
This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201600) and the Chongqing Technology Innovation and Application Development Key Project (cstc2021jscx-cylhX0003).

* 通信作者(Corresponding author): 唐章林, E-mail: tangzhlin@swu.edu.cn
第一作者联系方式: E-mail: yyli1993swu@163.com

Received (收稿日期): 2023-08-24; Accepted (接受日期): 2023-10-23; Published online (网络出版日期): 2023-11-13.
URL: https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20231110.1316.008

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

constructed by Sanliu'ai (drought sensitivity line) and Kelina-2 (drought tolerance line), were treated with drought stress and well watering at seedling stage. Shoot fresh weight, shoot dry weight, leaf relative water content, malondialdehyde content, and soluble sugar content were measured. The QTL and candidate intervals were identified based on genetic linkage maps, which were constructed using SSR and SNP markers with polymorphism. Subsequently, candidate genes associated with drought tolerance were screened by combining transcriptome sequencing of No11 (drought tolerance material) and No28 (drought sensitivity material). Drought stress decreased shoot fresh weight, shoot dry weight, and leaf relative water content, and increased the contents of malondialdehyde and soluble sugar. QTL and candidate intervals related to drought tolerance were distributed on chromosome A01, A02, A06, A08, A09, A10, C02, C03, C04, C06, and C09. By transcriptome analysis of drought tolerance and sensitivity materials under well water, drought stress for 24, 36, and 48 h, the major different expression genes were enriched in the pathways associated with photosynthesis, fatty acid metabolism, amino acid metabolism, plant hormone signal transduction, ribosome, circadian rhythm and biosynthesis of keratin, cork and wax. A total of 28 candidate genes related to drought tolerance were identified by combining QTL and transcriptome. They coded FLC, bHLH105, TGA4, TEM1, ERF003, ACO3, CHLI1, LHCB6, PORC, etc., which had transcription factor activity, ethylene production and signal transduction, chlorophyll biosynthesis and binding, chlorophyll oxidoreductase and encoding ribosome proteins. These results could provide a basis for revealing drought tolerance mechanism and molecular breeding of drought tolerance variety in *B. napus*.

Keywords: *Brassica napus* L.; drought tolerance; QTL; transcriptome; candidate genes

油菜是世界主要的油料作物之一, 也是我国食用植物油的主要来源[1-2]。长江流域是我国油菜主产区[3], 但年内降雨分布不均, 秋、冬季降雨较少, 季节性干旱严重[4], 致使油菜苗期常遭受干旱胁迫。干旱胁迫导致气孔关闭, 蒸腾速率降低, 光合速率下降, 严重影响有机物的积累, 导致苗小叶少, 难以形成壮苗越冬, 影响后期生长发育导致产量下降[5]。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)因产量和含油量高且稳定被广泛种植, 而干旱胁迫的频发严重限制了其产量的提高和种植面积的扩大。

甘蓝型油菜耐旱性是非常复杂的数量性状, 由多基因控制[6]。前期, 较多报道用 AFLP 或 SSR 标记构建遗传连锁图谱, 定位到多个甘蓝型油菜耐旱相关的 QTL。例如, 李真[7]基于双单倍体(doubled haploid, DH)群体, 利用 183 个 SSR 标记和 157 个 AFLP 标记构建遗传连锁图谱, 在正常灌溉和干旱胁迫两种水分条件下定位到 50 个 QTL, 利用耐旱系数定位到 19 个 QTL。王丹丹[8]利用重组自交系(recombinant inbred line, RIL)群体, 构建了一张包含 120 个 SSR 标记的遗传连锁图谱, 定位到 8 个耐旱相关 QTL。但是, 大部分研究未鉴定到耐旱相关候选基因。近年来, 随着甘蓝型油菜基因组测序的完成, SNP、Indel 等标记相继被开发, 通过 QTL 定位、全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)方法, 鉴定到一些耐旱候选基因。Gad 等[9]基于 DH 群体, 利用 SNP 和 Indel 标记鉴定到 39 个甘蓝型油菜种子萌发期耐旱相关 QTL 和 256 个候选基因。Shahzad 等[10]通过甘蓝型油菜 GWAS, 鉴定到 139 个失水速率相关 SNP 位点和 4 个候选基因。Khanzada 等[11]对 228 份甘蓝型油菜种质资源幼苗进行 PEG 模拟干旱胁迫处理, 通过 GWAS 鉴定到 314 个显著关联 SNP 标记和 85 个候选基因。Tan 等[12]对甘蓝型油菜盐胁迫和 PEG-6000 模拟干旱胁迫下种子发芽率和发芽指数进行 GWAS, 鉴定到 43 个显著关联 SNP 标记和 37 个候选基因。通过转录组测序, 可获得物种在某种状态下的所有转录本信息[13], 已被广泛应用于甘蓝型油菜耐旱相关研究。Liu 等[14]对正常灌溉和干旱胁迫下甘蓝型油菜根和叶进行转录组测序, 在根和叶中分别发现 6018 个和 5377 个差异表达基因。Wang 等[15]通过甘蓝型油菜耐旱和干旱敏感材料转录组测序, 筛选到 169 个差异表达基因。

已有 QTL 或 GWAS 研究所用群体及种植环境或胁迫处理方式不同, 检测到的 QTL 和候选基因不尽相同; 转录组测序结果差异表达基因数量庞大, 难以筛选出进一步开展功能验证的目标基因。因此, 将 QTL 或 GWAS 与转录组测序相结合, 可提高特定性状候选基因的鉴定效率, 已成为预测候选基因的有效手段。Zhou 等[16]将 GWAS 和转录组分析相结合, 鉴定出甘蓝型油菜耐铝性候选基因。Jian 等[17]结合 QTL 与转录组分析, 鉴定了甘蓝型油菜花期相关候选基因。Guo 等[18]通过 GWAS 和转录组揭示了干旱胁迫下与玉米幼苗根长相关的候选基因。Sevanthi 等[19]通过干旱和长期缺氮双胁迫下转录组测序和主效 QTL 整合挖掘到水稻关键胁迫响应基因。但截至目前, 尚未见有关于将 QTL 定位与转录组测序相结合用于鉴定甘蓝型油菜耐旱候选基因的报道。

本研究基于甘蓝型油菜干旱敏感品系三六矮与耐旱品系科里纳-2 构建的 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群

体, 利用多态性 SSR 和 SNP 标记分别构建遗传连锁图谱, 对耐旱相关性状进行 QTL 定位, 获得候选区间。对实验室筛选的甘蓝型油菜耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 进行转录组测序和差异表达基因分析, 结合 QTL 定位候选区间筛选出耐旱相关候选基因, 以期为进行功能验证揭示甘蓝型油菜耐旱机理和分子标记辅助选育耐旱新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

本研究以盆钵(直径 25 cm, 高 30 cm)方式将甘蓝型油菜干旱敏感品系三六矮和耐旱品系科里纳-2 构建的 105 个 $F_{2:6}$ 重组自交系家系种植于西南大学 7 号温室, 126 个 $F_{2:8}$ 重组自交系家系种植于重庆市油菜工程技术研究中心歇马油菜基地旱棚。以均匀一致的大田表层土作为种植土, 定期间苗, 保持幼苗长势一致。当幼苗长至四叶一心时, 进行干旱胁迫(drought stress, DS)处理, 以正常灌溉为对照(control check, CK)。干旱胁迫组土壤含水量保持在 9%~12%, 正常灌溉组土壤含水量保持在 22%~27%, 利用浙江托普仪器有限公司的多参数土壤水分记录仪, 每隔 3~5 d 测定土壤含水量, 仪器探针入土深度为 7 cm, 每盆测量 3 个不同位置取平均值, 根据装盆土壤干重计算应浇水量, 用烧杯均匀浇于盆钵表面。

甘蓝型油菜耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 以盆栽(长 5 cm, 宽 5 cm, 高 5 cm)方式种植于 RDN-300C-4 (宁波东南)人工气候箱, 腐植土和蛭石按照 3∶1 比例混合均匀后作为种植土, 每盆种植 3 株幼苗。正常灌溉期间, 光合有效辐射为 270 μmol m^{-2} s^{-1}, 光照和黑暗时长分别为 16 h 和 8 h, 温度分别为 24℃和 22℃, 湿度为 70%~80%。待幼苗长至三叶一心时, 选取长势一致的盆钵进行正常灌溉和干旱胁迫处理。干旱胁迫处理期间, 湿度参数为 30%, 其他培养条件与正常灌溉相同。

1.2 取材与性状测定

干旱处理 28 d 后, 调查正常灌溉和干旱胁迫下甘蓝型油菜重组自交系各家系地上部鲜重(shoot fresh weight, SFW)、地上部干重(shoot dry weight, SDW)、叶片相对含水量(relative water content, RWC)、可溶性糖(soluble sugar, SUG)含量和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。$F_{2:6}$ 重组自交系调查 2 个生物学重复, $F_{2:8}$ 重组自交系调查 3 个生物学重复。对耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 正常灌溉及干旱后 24 h、36 h 和 48 h 进行 RWC 测定, 并取材进行 SUG 和 MDA 含量测定以及转录组测序。

1.2.1 地上部鲜重和干重测定 将植株从子叶节处剪开, 称其地上部鲜重, 然后于 110℃杀青 30 min 后 75℃烘至恒重, 称其地上部干重。

1.2.2 叶片相对含水量测定 随机选取植株倒数第 3 片叶, 称叶片鲜重($W_{鲜}$), 然后将叶片浸入蒸馏水中浸泡 8 h, 称饱和重($W_{饱}$), 再将叶片于 75℃烘至恒重后称干重($W_{干}$), 用下式计算叶片相对含水量:

$$RWC(\%)=\frac{W_{鲜}-W_{干}}{W_{饱}-W_{干}}\times 100\%$$

1.2.3 可溶性糖和丙二醛含量测定 选取新鲜倒数第 2 片叶, 采用荆蓉蓉[20]所用的蒽酮-硫酸法和硫代巴比妥酸法分别测定可溶性糖和丙二醛含量, 略有改动。

1.3 表型数据处理

利用 R-4.3.1 (https://cloud.r-project.org/)进行方差分析, Microsoft Excel 2016 进行性状描述统计分析, 用下式计算各耐旱相关性状的耐旱系数(drought resistance index, DRI):

$$耐旱系数(DRI)=\frac{各家系干旱胁迫下性状平均值}{各家系正常灌溉下性状平均值}$$

1.4 SSR 标记带型及 SNP 标记基因型分析

本研究所采用的 SSR 引物均由西南大学重庆市油菜工程技术研究中心实验室保存提供, 先对亲本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 将带型清晰且有多态性的引物对 $F_{2:6}$ 重组自交系群体进行电泳检测, 将 SSR 引物于 BnTIR (https://yanglab.hzau.edu.cn/BnTIR)网站以 Darmor. v4.1 为参考基因组进行序列比对, 获取 SSR 标记物理位置; 以 Darmor. v4.1 为参考基因组序列, 采用中玉金标记生物有限公司(北京) 6K SNP 芯片对亲本及 $F_{2:8}$ 重组自交系群体进行检测和带型分析。用“a”代表与母本三六矮相同的带型(基因型), “b”代表与父本科里纳-2 相同的带型(基因型), “h”代表杂合带型(基因型), “-”代表缺失[8]。

1.5 遗传连锁图谱构建及 QTL 定位

采用 JoinMap 4[21]分别进行 SSR 标记和 SNP 标记遗传连锁图谱构建, 采用 MapQTL 6[22]对耐旱相关性状在正常灌溉和干旱胁迫下的表型值及耐旱系数进行 QTL 定位(取 LOD 值≥2.5), 利用 MapChart 2.0[23]软件绘制 QTL 在各连锁群(染色体)的分布图。QTL 命名以斜体 *q* 加性状的英文缩写加处理组或耐

旱系数英文缩写再加染色体命名，例如“*qRWCDS-C02*” [24]。

根据李阳阳等[25]连锁不平衡分析的甘蓝型油菜各染色体的衰减距离，将 QTL 包含标记物理位置减去所在染色体衰减距离作为候选区间上游位点，加上衰减距离作为候选区间下游位点，以此获得候选区间。

1.6　转录组分析

由广州基迪奥生物科技有限公司完成叶片 RNA 提取和质量检测、文库制备、文库质检、上机测序、序列比对分析及基因表达量分析，参考基因组为法国油菜(*Brassica_napus*_v5)。

对基因表达量进行两两差异表达基因分析，保留 *P* 值≤0.01 和| $\log_2$ (FC) |≥1 的基因。使用 OmicShare 云平台韦恩图在线软件(https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/venn)绘制韦恩图，采用百迈客云平台(https://www.biocloud.net/) GO、KEGG 分类富集软件进行 KEGG 富集分析，使用 OmicShare 云平台热图在线软件(https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/heatmap)绘制热图。采用百迈客云平台(https://www.biocloud.net/) WGCNA 在线分析软件进行 WGCNA 分析。

2　结果与分析

2.1　表型数据分析

对甘蓝型油菜 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群体的 5 个耐旱相关性状进行方差分析和描述统计分析发现，各性状在水分间、家系间以及水分×家系互作间均达到极显著差异(表 1)；干旱处理后，叶片相对含水量、地上部鲜重和地上部干重较对照极显著降低，可溶性糖含量和丙二醛含量极显著升高(表 2)。频数分布直方图显示各性状均呈连续近似正态分布(图 1)。

表 1　甘蓝型油菜 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群体耐旱相关性状的方差分析

Table 1　Variance analysis of traits relation to drought tolerance in rapeseed $F_{2:6}$ and $F_{2:8}$ RIL populations

群体	变异来源	RWC		SFW		SDW		SUG		MDA	
Population	Source of variation	DF	*F*-value	DF	*F*-value	DF	*F*-value	DF	*F*-value	DF	*F*-value
$F_{2:6}$	水分间 Water	1	11.18**	1	850.03**	1	214.32**	1	30.86**	1	91.75**
	家系间 Line	103	4.64**	104	14.41**	104	14.96**	104	15.29**	104	552.39**
	水分×家系 Water×Line	103	3.10**	104	10.55**	104	5.98**	104	9.96**	104	392.10**
	误差 Error	208		210		210		210		210	
$F_{2:8}$	水分间 Water	1	3175.43**	1	2237.27**	1	389.89**	1	1490.35**	1	1139.48**
	家系间 Line	125	2.36**	125	6.25**	125	6.21**	125	15.72**	125	21.62**
	水分×家系 Water×Line	125	2.30**	124	3.65**	124	1.76**	124	13.32**	123	11.86**
	误差 Error	446		426		414		462		471	

RWC: 叶片相对含水量; SFW: 地上部鲜重; SDW: 地上部干重; SUG: 可溶性糖含量; MDA: 丙二醛含量; DF: 自由度; *F*-value: *F* 值; **: $P < 0.01$。

RWC: the relative water content; SFW: shoot fresh weight; SDW: shoot dry weight; SUG: soluble sugar content; MDA: malondialdehyde content; DF: degree of freedom; *F*-value: *F*-value of *F*-test; **: $P < 0.01$.

表 2　甘蓝型油菜亲本及 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群体耐旱相关性状描述统计分析

Table 2　Descriptive statistics of traits relation to drought tolerance in rapeseed parental, $F_{2:6}$ and $F_{2:8}$ RIL populations

性状	群体	处理	亲本 Parent		群体 Population				
Trait	Population	Treatment	三六矮 Sanliu'ai	科里纳-2 Kelina-2	平均值 Average	标准误差 SE	变幅 Range	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
RWC (%)	$F_{2:6}$	CK	91.72	93.35	86.51	0.54	68.96–96.55	0.95	–0.76
		DS	83.98	86.24	85.16	0.58	61.78–96.87	2.27	–1.19
	$F_{2:8}$	CK	88.00	86.84	89.74	0.28	72.10–95.14	7.26	–1.64
		DS	65.46	76.11	71.27	0.42	60.83–82.91	–0.55	–0.06
SFW (g)	$F_{2:6}$	CK	20.18	10.78	16.55	0.46	4.79–30.27	0.01	0.21
		DS	15.67	9.00	11.71	0.36	4.79–23.90	0.15	0.71
	$F_{2:8}$	CK	44.78	27.06	36.79	1.02	11.84–75.42	1.57	1.04
		DS	19.22	22.70	14.36	0.38	6.58–25.85	–0.03	0.62

(续表 2)

性状 Trait	群体 Population	处理 Treatment	亲本 Parent		群体 Population				
			三六矮 Sanliu'ai	科里纳-2 Kelina-2	平均值 Average	标准误差 SE	变幅 Range	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
SDW (g)	$F_{2:6}$	CK	1.27	0.72	1.18	0.04	0.41–2.34	0.06	0.64
		DS	0.95	0.61	0.95	0.03	0.37–1.92	0.47	0.87
	$F_{2:8}$	CK	3.80	2.65	2.72	0.08	0.89–5.90	0.85	0.74
		DS	2.30	2.10	1.81	0.05	0.59–3.48	0.90	0.59
SUG (μg g^{-1})	$F_{2:6}$	CK	1496.20	542.03	2744.17	226.85	186.82–16219.47	12.23	2.83
		DS	6485.20	1081.01	3271.71	249.66	222.49–12447.88	3.50	1.69
	$F_{2:8}$	CK	3888.00	4581.34	5349.75	131.73	2144.61–10444.09	0.82	0.75
		DS	6265.26	7643.01	7278.97	131.53	3370.63–10742.93	0.17	0.15
MDA (μmol g^{-1})	$F_{2:6}$	CK	7.49	13.97	9.80	0.44	3.43–34.67	8.58	2.26
		DS	12.77	17.70	10.04	0.34	5.28–23.09	1.81	1.31
	$F_{2:8}$	CK	41.18	20.43	29.26	0.97	9.34–64.77	0.54	0.83
		DS	50.15	50.63	41.03	1.04	23.76–71.73	–0.63	0.51

CK: 正常灌溉; DS: 干旱胁迫。其他缩写同表 1。

CK: well water; DS: drought stress. The other abbreviations are the same as those given in Table 1.

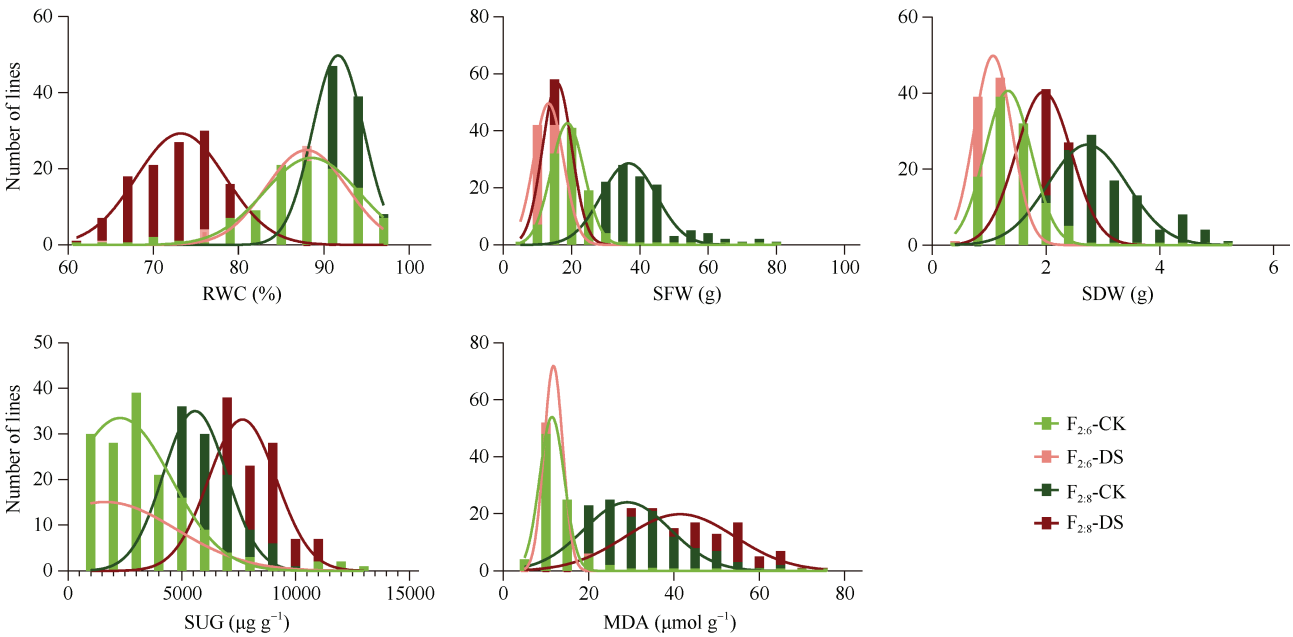


图 1 甘蓝型油菜 $F_{2:6}$ 和 $F_{2:8}$ 重组自交系群体耐旱相关性状的频数分布图

Fig. 1 Distribution of traits relation to drought tolerance in rapeseed $F_{2:6}$ and $F_{2:8}$ RIL populations

缩写同表 1 和表 2。Abbreviations are the same as those given in Tables 1 and 2.

测定耐旱和干旱敏感材料(No11 和 No28)叶片相对含水量、丙二醛和可溶性糖含量发现，干旱 24 h、36 h 和 48 h，干旱敏感材料叶片相对含水量极显著低于耐旱材料；干旱 36 h 和 48 h，干旱敏感材料丙二醛含量极显著高于耐旱材料，而干旱 24 h 两材料间差异不显著；干旱 24 h 和 48 h，干旱敏感材料可溶性糖含量极显著高于耐旱材料，而干旱 36 h 差异未达到显著水平(图 2)。说明干旱敏感材料较耐旱材料有更严重的失水和膜脂过氧化，也积累了更多的渗透调节物质。

2.2 遗传连锁图谱构建及 QTL 定位

本研究对亲本及 $F_{2:6}$ 重组自交系群体进行 SSR 多态性标记检测，共获得 301 个多态性 SSR 标记，对其进行遗传连锁图谱构建，获得了包含 14 个连锁群和 181 个多态性 SSR 标记的甘蓝型油菜遗传连锁图谱，该图谱总长 717.88 cM，平均密度为 5.69 cM

(图 3)。利用 6K SNP 芯片对亲本及 $F_{2:8}$ 重组自交系群体进行检测, 得到 1074 个多态性 SNP 位点, 构建了总长为 2577.03 cM 的甘蓝型油菜遗传连锁图谱, 该图谱覆盖 19 条染色体, 包含 1041 个多态性 SNP 位点, 平均密度为 2.48 cM (图 4)。

利用 SSR 标记遗传连锁图谱对 $F_{2:6}$ 重组自交系群体的耐旱相关性状进行 QTL 检测, 共获得 6 个 QTL。其中正常灌溉下地上部干重检测到 1 个 QTL, 包含 2 个 A02 染色体的 SSR 标记; 正常灌溉下丙二醛含量和干旱处理下叶片相对含水量检测到置信区间重叠的 2 个 QTL, 包含 1 个 A09 染色体的 SSR 标记; 干旱处理下叶片相对含水量、叶片相对含水量耐旱系数和干旱处理下丙二醛含量检测到置信区间重叠的 3 个 QTL, 包含 4 个 SSR 标记, 其中 3 个位于 C02 染色体, 另 1 个位于 C02 或 A02 染色体(图 3 和表 3)。

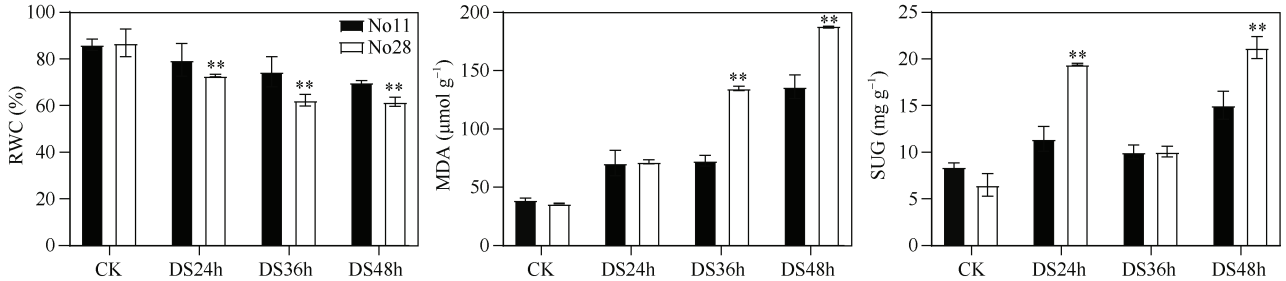


图 2　甘蓝型油菜耐旱和干旱敏感材料耐旱相关性状

Fig. 2　Traits associated with drought tolerance in drought resistance and sensitivity rapeseed

: $P < 0.01$。缩写同表 1。: $P < 0.01$. Abbreviations are the same as those given in Table 1.

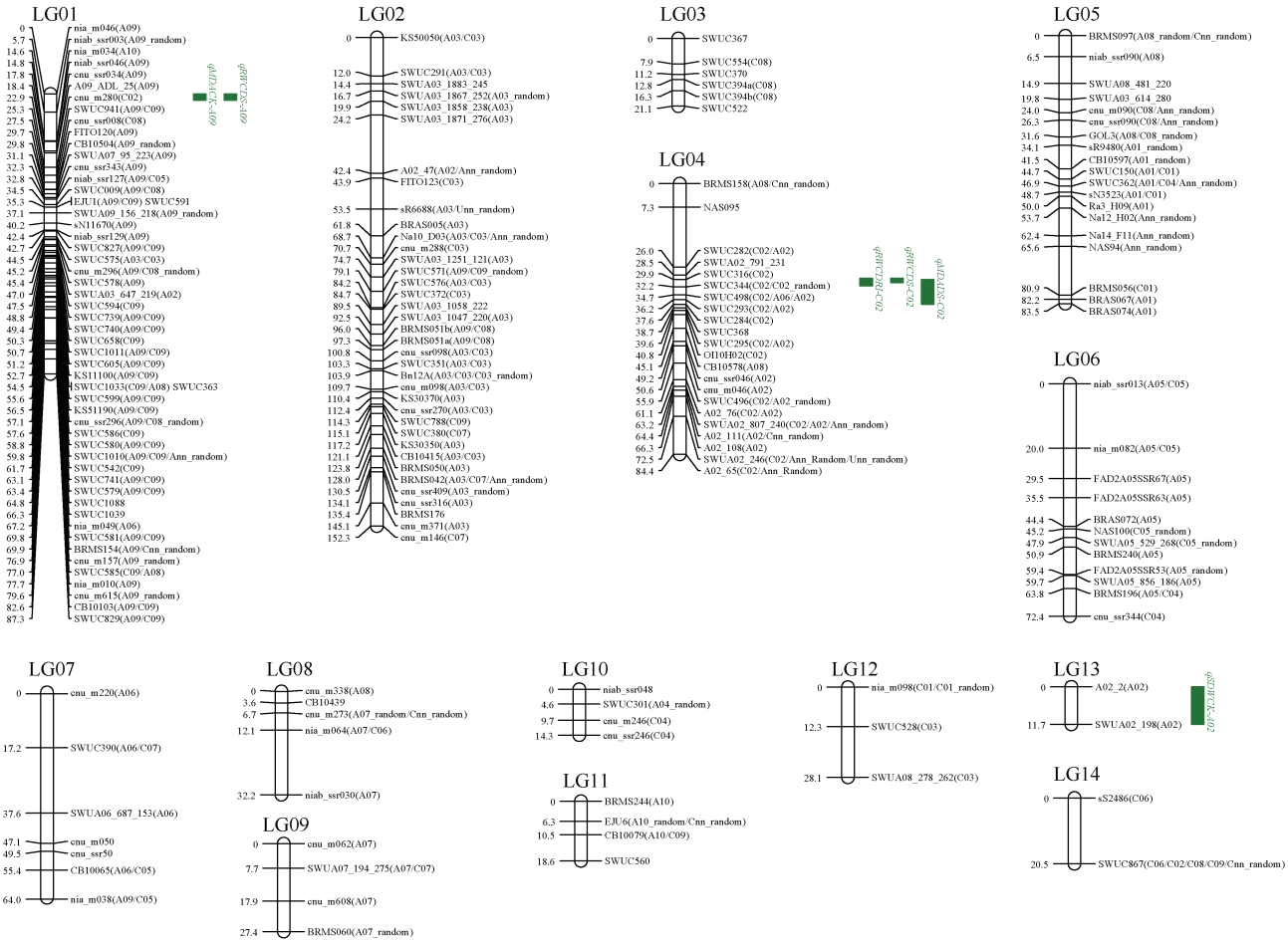


图 3　SSR 标记遗传连锁图谱及 QTL 分布

Fig. 3　Genetic linkage map based on SSR and QTL distribution

DRI: 耐旱系数。其他缩写同表 1 和表 2。

DRI: drought resistance index. The other abbreviations are the same as those given in Tables 1 and 2.

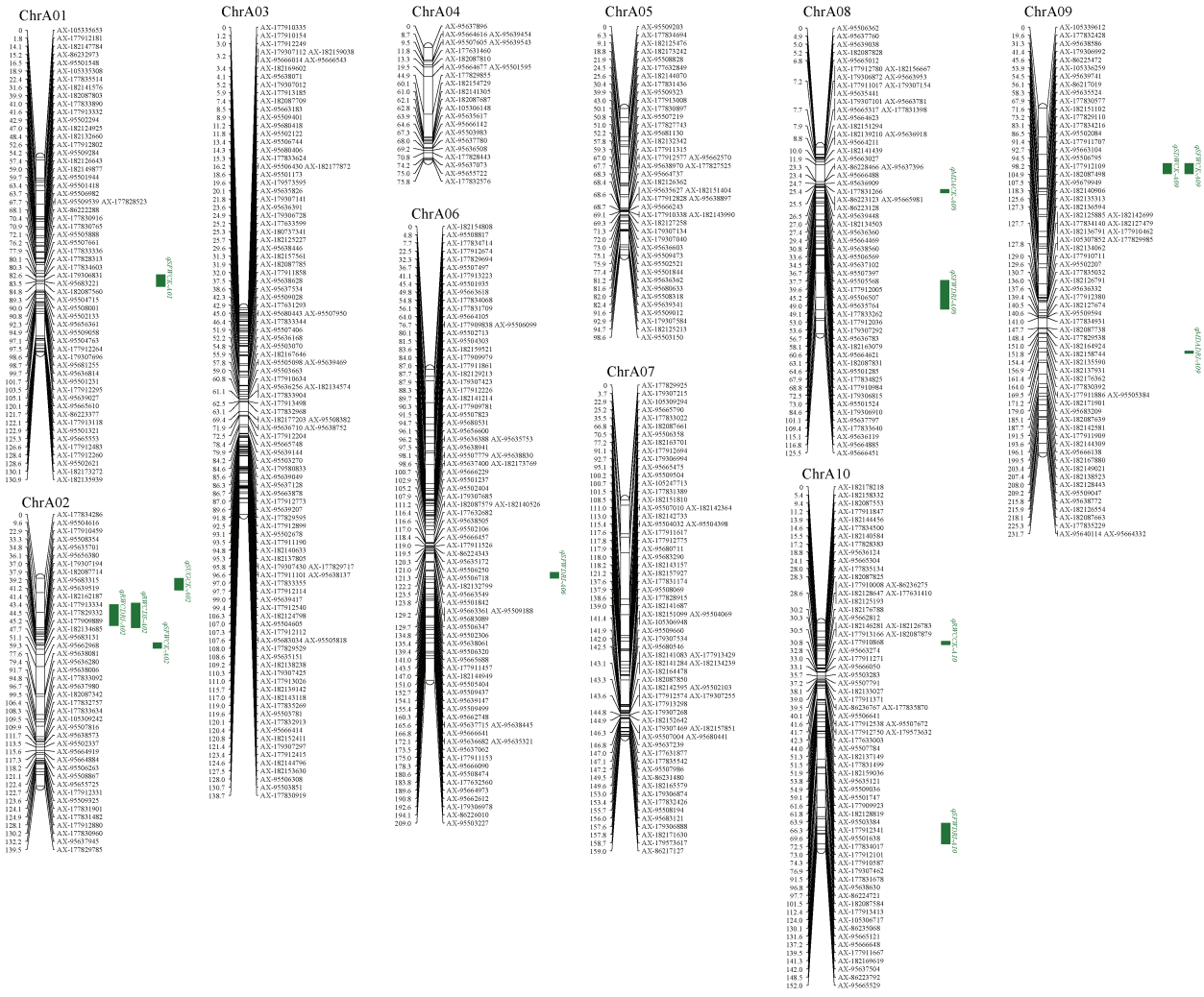


图 4 SNP 标记遗传连锁图谱及 QTL 分布

Fig. 4 Genetic linkage map based on SNP and QTL distribution

表 3　甘蓝型油菜耐旱相关性状 QTL 及候选区间
Table 3　QTL and candidate range of traits associated with drought tolerance in rapeseed

群体 Population	QTL	置信区间 Confidence interval (cM)	邻近标记 Marker	物理位置 Physical position (bp)	阈值 LOD	染色体 Chr.	候选区间 Candidate range (bp)
$F_{2:6}$	*qSFWCK-A01*	78.85–86.82	AX-95683221	4227188	3.04	A01	4047188–4407188
			AX-179306831	4399498	2.89	A01	4219498–4579498
$F_{2:8}$	*qRWCDRI-A02*	17.64–31.87	AX-177910459	262823	3.07	A02	82823–442823
$F_{2:8}$	*qRWCDS-A02*	16.64–33.30	AX-177910459	262823	2.99	A02	82823–442823
$F_{2:8}$	*qSFWCK-A02*	43.41–47.22	AX-177829332	4692035	2.53	A02	4512035–4872035
$F_{2:8}$	*qSUGCK-A02*	0.00–8.00	AX-177834286	20489037	3.20	A02	20309037–20669037
$F_{2:6}$	*qSDWCK-A02*	0.00–11.74	SWUA02_198	893419–893684	3.14	A02	713419–1073684
			A02_2	893423–893813	3.47	A02	713423–1073813
$F_{2:8}$	*qSFWDRI-A06*	136.38–140.39	AX-95506320	20609909	2.50	A06	20429909–20789909
$F_{2:8}$	*qMDACK-A08*	28.40–30.85	AX-95638560	11831251	2.58	A08	11331251–12331251
$F_{2:8}$	*qSFWDRI-A08*	89.56–109.10	AX-95637797	16969405	3.04	A08	16469405–17469405
$F_{2:6}$	*qSDWCK-A09*	37.27–44.43	AX-179306992	2292222	2.59	A09	1912222–2672222
$F_{2:6}$	*qSFWCK-A09*	37.27–44.43	AX-179306992	2292222	2.70	A09	1912222–2672222
$F_{2:8}$	*qMDADRI-A09*	163.36–165.01	AX-177830392	26135201	4.09	A09	25755201–26515201
$F_{2:6}$	*qMDACK-A09*	0.00–2.00	nia_m046	21769576–21769946	2.91	A09	21389576–22149946
$F_{2:6}$	*qRWCDS-A09*	0.00–2.00	nia_m046	21769576–21769946	2.87	A09	21389576–22149946
$F_{2:8}$	*qRWCCK-A10*	12.22–14.56	AX-182144456	885133	3.06	A10	675133–1095133
$F_{2:6}$	*qSFWDRI-A10*	134.63–148.54	AX-177911667	16025485	3.04	A10	15815485–16235485
			AX-95637504	16164216	3.08	A10	15954216–16374216
			AX-182169619	16167478	3.04	A10	15957478–16377478
$F_{2:8}$	*qSUGCK-C02*	7.00–45.13	AX-182158861	16526368	2.58	C02	15326368–17726368
			AX-95636960	16803922	3.01	C02	15603922–18003922
			AX-182136799	24120437	2.99	C02	22920437–25320437
			AX-182139036	28872169	3.49	C02	27672169–30072169
			AX-182125192	33288173	2.98	C02	32088173–34488173
			AX-105306912	34988363	2.58	C02	33788363–36188363
			AX-95505280	41712868	2.96	C02	40512868–42912868
$F_{2:6}$	*qRWCDRI-C02*	29.49–31.89	SWUC316	33799496–33799694	3.36	C02	32599496–34999694
$F_{2:6}$	*qRWCDS-C02*	29.49–30.89	SWUC316	33799496–33799694	2.77	C02	32599496–34999694
$F_{2:6}$	*qMDADS-C02*	29.89–37.57	SWUC316	33799496–33799694	3.35	C02	32599496–34999694
			SWUC344	40102848–40103191	2.53	C02	38902848–41303191
			SWUC284	43919221–43919418	2.54	C02	42719221–45119418
			SWUC293	36909045–36909237	3.00	C02	35709045–38109237
				19357230–19357429		A02	19177230–19537429
$F_{2:8}$	*qSFWDRI-C03*	153.23–157.21	AX-95636893	9150013	2.71	C03	8750013–9550013
$F_{2:6}$	*qSUGDRI-C04*	103.69–108.02	AX-95506064	7272757	7.10	C04	6682757–7862757
$F_{2:8}$	*qSUGDS-C06*	74.57–101.32	AX-105336545	29172287	3.04	C06	28772287–29572287
			AX-95665032	29186383	2.66	C06	28786383–29586383
			AX-86230901	29308911	3.04	C06	28908911–29708911
			AX-95665273	29401522	3.04	C06	29001522–29801522
			AX-95664947	29433854	3.04	C06	29033854–29833854
			AX-105310203	29489446	3.04	C06	29089446–29889446
			AX-105308711	29627549	3.04	C06	29227549–30027549

(续表 3)

群体 Population	QTL	置信区间 Confidence interval (cM)	邻近标记 Marker	物理位置 Physical position (bp)	阈值 LOD	染色体 Chr.	候选区间 Candidate range (bp)
			AX-86230806	29710301	3.04	C06	29310301–30110301
			AX-182145054	29797943	3.04	C06	29397943–30197943
			AX-86215830	30202409	3.04	C06	29802409–30602409
			AX-86230835	30204371	2.92	C06	29804371–30604371
			AX-105308457	30304436	3.04	C06	29904436–30704436
			AX-95665820	30314052	3.04	C06	29914052–30714052
			AX-105310125	30791904	3.04	C06	30391904–31191904
			AX-182087795	31059928	3.04	C06	30659928–31459928
			AX-95635741	31183285	3.04	C06	30783285–31583285
			AX-86230832	31264725	3.11	C06	30864725–31664725
			AX-177912717	31340640	2.95	C06	30940640–31740640
$F_{2:8}$	*qSDWDRI-C09*	19.55–37.10	AX-95509234	35782323	2.70	C09	35072323–36492323
			AX-86236963	37494562	2.68	C09	36784562–38204562
			AX-182158558	46574561	2.68	C09	45864561–47284561

利用 SNP 标记遗传连锁图谱对 $F_{2:8}$ 和 $F_{2:6}$ 重组自交系群体进行 QTL 检测, 共检测到 18 个 QTL, 分布于 A01、A02、A06、A08、A09、A10、C02、C03、C04、C06 和 C09 染色体, 包含 44 个 SNP 位点。其中, 基于 $F_{2:6}$ 重组自交系群体正常灌溉下地上部干重和地上部鲜重在 A09 染色体检测到相同的 QTL 位点, 基于 $F_{2:8}$ 重组自交系群体叶片相对含水量耐旱系数和干旱胁迫下叶片相对含水量在 A02 染色体检测到的 QTL 位点置信区间相重合(图 4 和表 3)。

根据各染色体衰减距离, 共获得 52 个候选区间, 其中 QTL 位点 *qSFWCK-A01*、*qSDWCK-A02*、*qSFWDRI-A10*、*qSUGCK-C02*、*qSUGDS-C06* 所鉴定到的多个候选区间存在重叠(表 3)。基于 SSR 标记遗传连锁图谱定位到的 QTL 位点 *qRWCDRI-C02*、*qRWCDS-C02* 和 *qMDADS-C02* 与基于 SNP 标记遗传连锁图谱定位到的 QTL 位点 *qSUGCK-C02* 存在候选区间重叠。

2.3 转录组分析及候选基因鉴定

对耐旱和干旱敏感材料正常灌溉及干旱 24 h、36 h、48 h 的幼苗进行转录组测序发现, 2 个材料的干旱处理与对照间均存在至少 7000 个差异表达基因(图 5-A); 其中干旱 48 h 时, 两材料间差异表达基因最多, 耐旱材料较干旱敏感材料上调和下调表达的基因分别有 4631 个和 5825 个(图 5-B)。在所有干旱处理条件下, 两材料间均存在的表达差异基因有 1723 个(图 5-C), 2 个材料的 3 个干旱时期均与对照存在表达差异的基因有 1459 个(图 5-D), 对此 3182 个核心差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 显著富集在赖氨酸降解及角质、木栓素和蜡质的生物合成途径(图 5-E)。在核心差异表达基因的转录因子编码基因和显著富集的 KEGG 通路基因中, 有 8 个位于 QTL 定位鉴定的候选区间, 可认定为耐旱相关候选基因。其中, 编码 ERF003 的 *BnaA09g04650D* 和 *BnaC02g40810D* 在干旱处理下较正常灌溉下调表达; 干旱胁迫下, 耐旱材料的 *BnaA10g25310D* (*SUVH1*)、*BnaA09g28670D* (*TEM1*)和 *BnaC09g46500D* (*FLC*)基因表达水平低于干旱敏感材料, *BnaC03g18600D* (*PXG3*)和 *BnaA02g27940D* (*bHLH105*)基因表达水平高于干旱敏感材料; *BnaA08g25090D* (*E2-OGDH*)在干旱处理 24 h 和 36 h, 耐旱材料表达水平低于干旱敏感材料, 在干旱处理 48 h 高于干旱敏感材料(图 5-F)。

基于耐旱和干旱敏感材料的表型和差异基因表达水平进行 WGCNA 分析(图 6)发现, 各差异表达基因被分为 14 个模块, 与丙二醛含量最为正相关的模块为 MEfirebrick2, 最为负相关的模块为 MEdeeppink1; 与可溶性糖含量最为正相关的模块为 MEplum, 最为负相关的模块为 MEdeeppink1; 与叶片相对含水量最为正相关的模块为 MEindianred4, 最为负相关的模块为 MEfirebrick2。

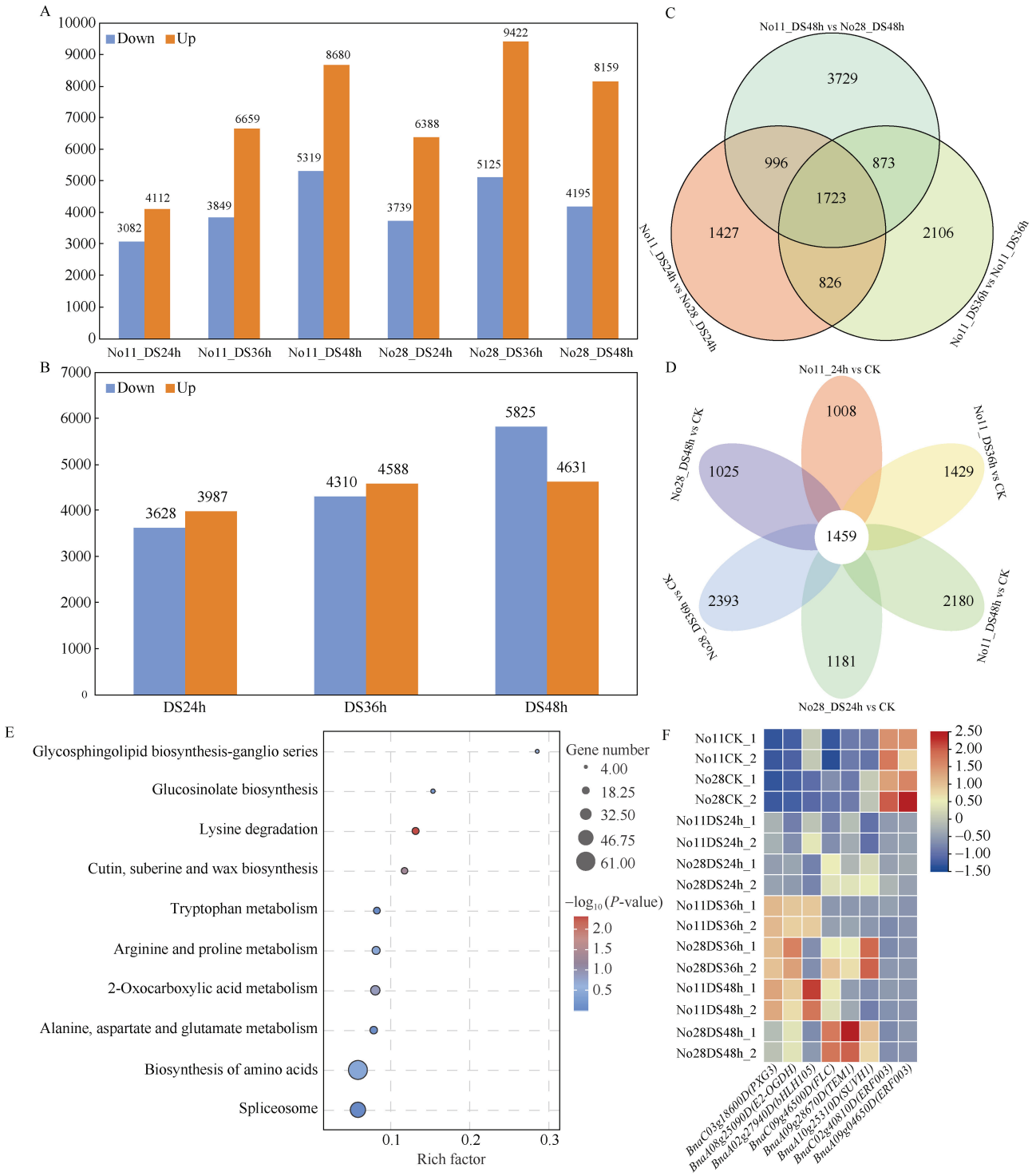


图 5　正常灌溉与干旱胁迫处理下甘蓝型油菜耐旱和干旱敏感材料差异表达基因分析

Fig. 5　Analysis of differentially expressed genes of drought-tolerance and drought-sensitivity materials in rapeseed under well water and drought stress

A 和 D：两材料各个干旱处理时期与对照间的差异基因数目和韦恩图；B 和 C：各处理时期 2 个材料间的差异基因数目和韦恩图；E：核心差异表达基因 KEGG 富集分析；F：耐旱相关候选基因表达水平热图；No11：耐旱材料；No28：干旱敏感材料；CK：正常灌溉；DS24h：干旱处理 24 h；DS36h：干旱处理 36 h；DS48h：干旱处理 48 h。

A and D: the number of differentially expressed genes and Venn diagram between each time under drought stress and well water in two materials; B and C: the number of differentially expressed genes and Venn diagrams between two materials; E: KEGG enrichment pathway of core differentially expressed genes; F: heatmap of candidate genes related to drought tolerance; No11: drought resistance material; No28: drought sensitivity material; CK: well water; DS24h: 24 h under drought stress; DS36h: 36 h under drought stress; DS48h: 48 h under drought stress.

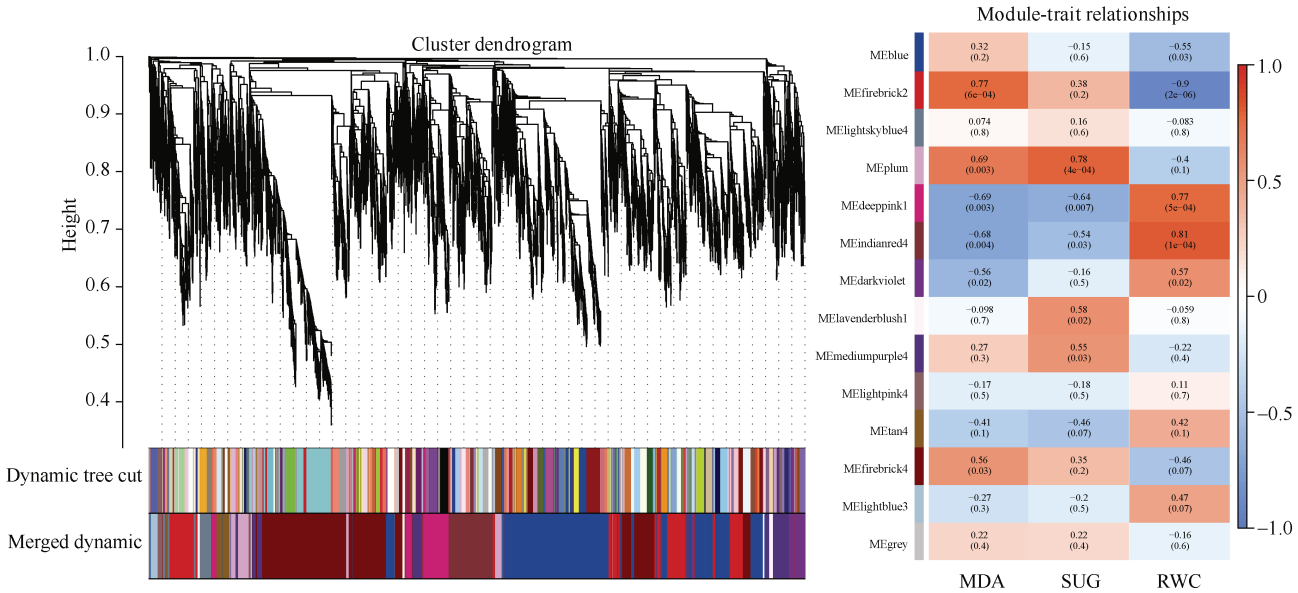


图 6 WGCNA 模块聚类树状图和各模块与性状的相关性

Fig. 6 Cluster dendrogram and module-trait relationships of WGCNA

缩写同表 1。Abbreviations are the same as those given in Table 1.

对 MEdeeppink1、MEfirebrick2、MEindianred4 和 MEplum 模块差异表达基因进行 KEGG 富集分析，MEdeeppink1 模块显著富集到戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、光合作用-天线蛋白、柠檬烯和松萜降解、氨基酸生物合成、淀粉和蔗糖代谢以及角质、木栓素和蜡质的生物合成途径(图 7-A)；MEfirebrick2 模块显著富集到自噬调节、脂肪酸降解、脂肪酸代谢及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径(图 7-B)；MEindianred4 模块显著富集到光合作用、光合作用-天线蛋白、卟啉与叶绿素代谢、植物激素信号转导、核糖体和光合生物固碳作用途径(图 7-C)；MEplum 模块显著富集到昼夜节律和萜类骨架生物合成途径(图 7-D)。

4 个模块所包含的转录因子编码基因和显著富集的 KEGG 通路基因中，有 23 个基因位于 QTL 定位鉴定的候选区间，可认定为耐旱相关候选基因(图 7-E)。其中，*BnaC09g46500D* (*FLC*)、*BnaA09g28670D* (*TEM1*)、*BnaA01g08750D* (*MYC4*)、*BnaA09g05170D* (*RUP2*)和 *BnaC02g40790D* (*KNAT3*)在干旱胁迫下较正常灌溉下调表达，且在干旱敏感材料中表达水平更高，其余基因随干旱胁迫下调表达。*BnaA02g27860D* (*CYP71B22*)、*BnaC03g17780D* (*AIP1*)、*BnaC03g17470D* (*FRK1*)、*BnaA08g25130D* (*ADT1*)、*BnaC02g20870D* (*HPA1*)和 *BnaA08g14220D* (*ACO3*)表达水平在正常灌溉下，耐旱材料显著高于干旱敏感材料；*BnaA01g09270D* (*CHLI1*)、*BnaA08g23760D* (*LHCB6*)、*BnaA09g04650D* (*ERF003*)、*BnaA10g01420D* (*EL22Z*)表达水平在正常灌溉下，耐旱材料低于干旱敏感材料；*BnaC09g45770D* (*RPL37B*)、*BnaA02g01690D* (*RPL10*)、*BnaA02g09540D* (*RPL24*)、*BnaA09g29410D* (*PRE6*)、*BnaA10g02050D* (*PORC*)、*BnaA08g13440D* (*RPL28C*)、*BnaA02g00310D* (*TGA4*)和 *BnaA09g36380D* (*RR9*)表达水平在正常灌溉和干旱胁迫处理下，耐旱材料低于干旱敏感材料，且正常灌溉和干旱胁迫 48 h 最为明显(图 7-E)。

综上所述，将 3182 个核心差异表达基因以及 MEdeeppink1、MEfirebrick2、MEindianred4 和 MEplum 模块差异表达基因视为耐旱材料 No11 与干旱敏感材料 No28 响应干旱胁迫的主要差异表达基因，显著富集到光合作用、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、植物激素信号转导、核糖体、昼夜节律及角质、木栓素和蜡质的生物合成等相关途径。基于 3182 个核心差异表达基因和 WGCNA 分析，分别鉴定到 8 个和 23 个候选基因，其中位于 *qSDWCK-A09* 和 *qSFWCK-A09* 重叠 QTL 区间的 *BnaA09g04650D* (*ERF003*)、位于 *qMDACK-A09* 和 *qRWCDS-A09* 重叠 QTL 区间的 *BnaA09g28670D* (*TEM1*)和位于 *qSDWDRI-C09* 区间的 *BnaC09g46500D* (*FLC*)被重复检测到(表 4)。

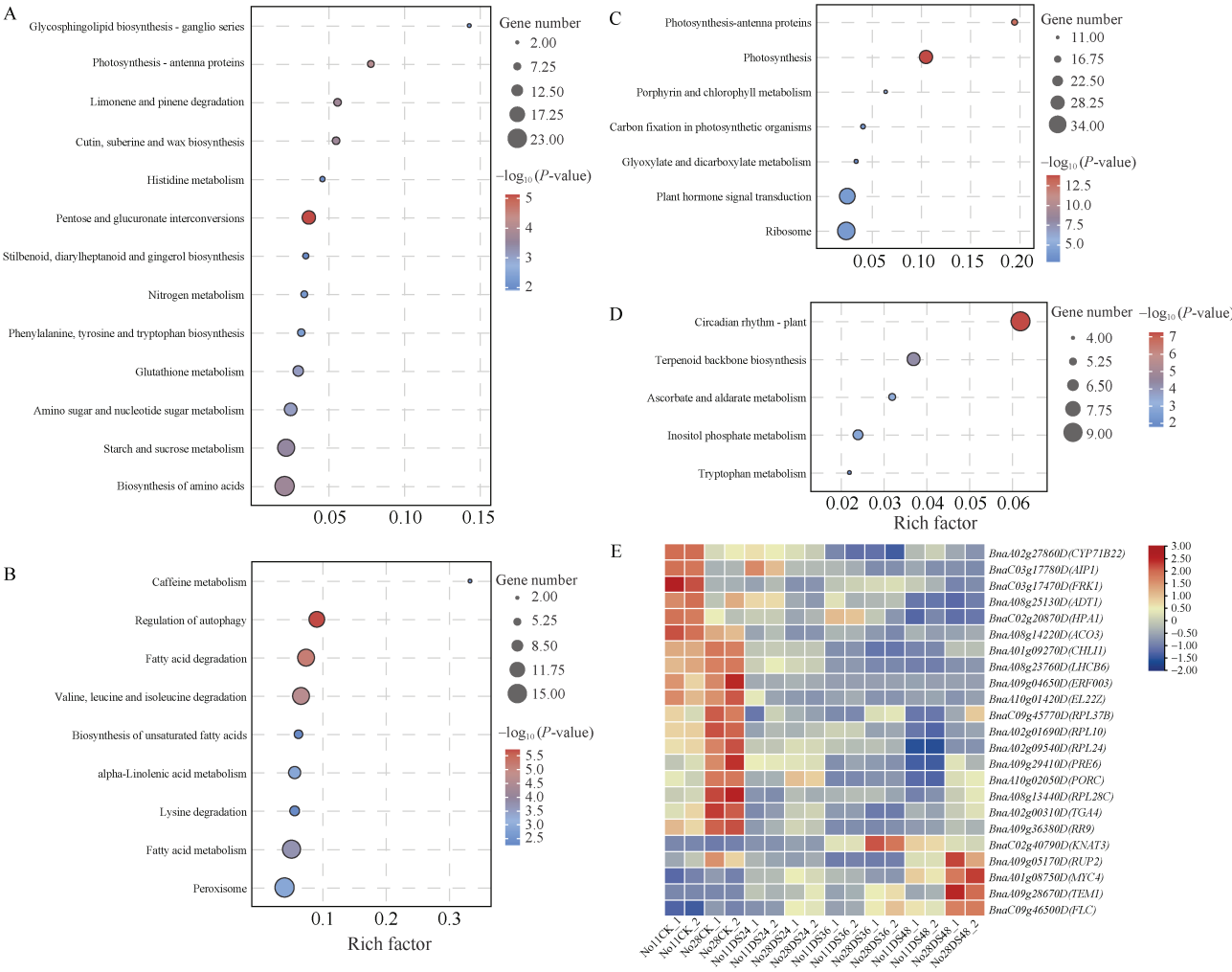


图 7　各性状显著相关模块的 KEGG 富集分析和耐旱相关候选基因表达量热图

Fig. 7　KEGG enrichment pathway in module significant associated with each trait and heatmap of candidate genes related to drought tolerance

A: MEdeeppink1 模块; B: MEfirebrick2 模块; C: MEindianred4 模块; D: MEplum 模块; E: 热图。缩写同图 5。

A: MEdeeppink1; B: MEfirebrick2; C: MEindianred4; D: MEplum; E: heatmap. Abbreviations are the same as those given in Fig. 5.

表 4　甘蓝型油菜耐旱相关候选基因

Table 4　Candidate genes associated with drought tolerance in rapeseed

QTL	候选基因 Candidate gene	QTL	候选基因 Candidate gene
qSFWCK-A01	*BnaA01g08750D* (*MYC4*) *BnaA01g09270D* (*CHLI1*)	*qMDADRI-A09*	*BnaA09g36380D* (*RR9*)
qRWCDRI-A02	*BnaA02g00310D* (*TGA4*)	*qMDACK-A09*	*BnaA09g28670D* (*TEM1*) *BnaA09g29410D* (*PRE6*)
qRWCDS-A02	*BnaA02g00310D* (*TGA4*)	*qRWCDS-A09*	*BnaA09g28670D* (*TEM1*) *BnaA09g29410D* (*PRE6*)
qSFWCK-A02	*BnaA02g09540D* (*RPL24*)	*qRWCCK-A10*	*BnaA10g01420D* (*EL22Z*) *BnaA10g02050D* (*PORC*)
qSUGCK-A02	*BnaA02g27860D* (*CYP71B22*) *BnaA02g27940D* (*bHLH105*)	*qSFWDRI-A10*	*BnaA10g25310D* (*SUVH1*)
qSDWCK-A02	*BnaA02g01690D* (*RPL10*)	*qSUGCK-C02*	*BnaC02g20870D* (*HPA1*)
qMDACK-A08	*BnaA08g13440D* (*RPL28C*) *BnaA08g14220D* (*ACO3*)	*qMDADS-C02*	*BnaC02g40790D* (*KNAT3*) *BnaC02g40810D* (*ERF003*)

(续表 4)

QTL	候选基因 Candidate gene	QTL	候选基因 Candidate gene
qSFWDRI-A08	*BnaA08g23760D* (*LHCB6*) *BnaA08g25090D* (*E2-OGDH*) *BnaA08g25130D* (*ADT1*)	*qSFWDRI-C03*	*BnaC03g17470D* (*PRK1*) *BnaC03g17780D* (*AIP1*) *BnaC03g18600D* (*PXG3*)
qSDWCK-A09	*BnaA09g04650D* (*ERF003*) *BnaA09g05170D* (*RUP2*)	*qSDWDRI-C09*	*BnaC09g45770D* (*RPL37B*) *BnaC09g46500D* (*FLC*)
qSFWCK-A09	*BnaA09g04650D* (*ERF003*) *BnaA09g05170D* (*RUP2*)		

3 讨论

王瑞霞等[26]研究发现干旱胁迫使芥菜型春油菜地上部干重显著下降, 丙二醛含量显著上升。王丹丹[8]和石鹏程[27]对甘蓝型油菜进行干旱胁迫处理, 发现地上部鲜重和干重及叶片相对含水量显著下降, 丙二醛和可溶性糖含量显著上升。谢小玉等[28]研究发现, 随着干旱胁迫时间延长和胁迫程度增加, 丙二醛和可溶性糖含量上升, 叶片相对含水量下降。本研究中, 干旱胁迫下地上部鲜重、地上部干重和叶片相对含水量显著低于正常灌溉, 丙二醛和可溶性糖含量显著高于正常灌溉, 与前人研究结果一致。

本研究通过 SSR 和 SNP 构建的甘蓝型油菜遗传连锁图谱, 定位到的耐旱相关 QTL 和候选区间分布于 A01、A02、A06、A08、A09、A10、C02、C03、C04、C06 和 C09 染色体。蒙姜宇等[6]和 Gad 等[9]定位到的甘蓝型油菜干旱胁迫相关 QTL, 主要分布在 A01、A02、A03、A05、A06、A07、A09、A10、C01、C02、C03 和 C09 染色体; 洪双[29]、吴金锋[30]、石鹏程[27]和 Khanzada 等[11]通过 GWAS, 在 A01、A02、A03、A04、A05、A07、A08、A09、A10、C01、C02、C03、C04、C05、C06、C07 和 C09 染色体检测到与甘蓝型油菜耐旱性状相关的 SNP 位点。由此可见, 甘蓝型油菜耐旱性是由多基因控制的复杂数量性状, 候选基因分布于 A、C 亚组的多条染色体。

Zhu 等[31]对两种钾水平下耐旱材料和干旱敏感材料进行转录组比较分析, 差异基因主要富集到光合作用、谷胱甘肽生物合成、生长素信号转导、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及硫代葡萄糖苷生物合成途径; Fang 等[32]对严重干旱和正常培养条件下甘蓝型油菜差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 植物激素信号转导、脂肪酸降解、次生代谢产物生物合成和代谢、光合作用、卟啉和叶绿素代谢、碳代谢、氮代谢以及角质、木栓和蜡的生物合成等途径被显著富集到; Xiong 等[33]研究发现, 干旱胁迫下秦优 8 号较对照下调的基因富集到核糖体途径, 上调的基因富集到次生代谢产物生物合成和植物激素信号转导途径; 本研究与上述研究结果基本一致, 对耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 进行转录组测序和分析, 主要差异表达基因显著富集到光合作用、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、植物激素信号转导、核糖体、昼夜节律及角质、木栓素和蜡质的生物合成途径。

本研究基于 QTL 定位和转录组数据分析, 鉴定到的甘蓝型油菜耐旱候选基因涉及多种类型, 包括转录因子 FLC、bHLH105、TGA4 和 TEM1 编码基因, 乙烯产生和信号转导相关的 ACO3 和 ERF003 编码基因, 叶绿素相关蛋白 CHLI1、LHCB6 和 PORC 编码基因, CYP 家族蛋白 CYP71B22 编码基因, E2 亚基 E2-OGDH 编码基因以及核糖体相关蛋白编码基因等。Chen 等[34]的研究结果揭示了拟南芥 FRIGIDA 在干旱胁迫下通过 P5CS1 途径增强耐旱性, 且依赖于靶标基因 FLC; Sun 等[35]认为玉米 bHLH105 可能通过调节抗氧化机制介导的活性氧清除和 Mn/Fe 相关转运蛋白的表达提高锰胁迫耐受性, 可用于开发耐旱玉米新品种。Zhong 等[36]发现过表达 bZIP 转录因子编码基因 *TGA4* 可提高拟南芥耐旱性。拟南芥 *TEM1* 基因是 RAV 转录因子亚家族成员, 过表达 *TEM1* 转基因拟南芥表现出相对电导率和丙二醛含量增加和脯氨酸含量降低, 而 *tem1* 突变体植株耐旱性增强[37]。乙烯在非生物胁迫耐受机制中起着关键的信号传导作用, 编辑 *PhACO1* 和 *PhACO3* 的矮牵牛突变体乙烯的产生降低, 对盐和干旱胁迫更敏感[38]。乙烯响应因子包含单一 AP2/ERF 结构域, 在植物发育和生物与非生物胁迫响应中发挥着重要作用, 在盐和干旱胁迫下, 16 个刚毛怪柳乙烯响应因子编码基因均在叶、茎或根中存在差异表达[39]。在小麦中, TaERF3 通过激活胁迫相关基因积极调控

对盐和干旱胁迫的响应[40]。光捕获叶绿素 *a/b* 结合蛋白(LHCB)在保护细胞对 ABA 的信号传导中发挥积极作用, *LHCB6* 的过表达可增强气孔对 ABA 的敏感性[41]。当暴露于强光下时, *PORC* 过表达植物中单线态氧和丙二醛的产生均最少[42]。*chli1* 突变体表现出部分 ABA 不敏感[43]。Condori-Apfata 等[44]研究表明 E2 亚基亚型 2-OGDH 功能缺失使植物生长加快, 暗呼吸降低, 碳水化合物代谢改变。Niu 等[45]发现苹果 MdSUVH1 是耐旱性正调控因子, Seraj 等[46]发现 *PXG3* 在乳蓟干旱胁迫下上调表达, Pandian 等[47]认为 CYP 在植物非生物和生物胁迫响应中发挥着重要作用, Pal 等[48]认为核糖体蛋白编码基因在生物和非生物胁迫下发挥着重要作用。由此可见, 本研究鉴定的甘蓝型油菜耐旱相关候选基因具有可靠性, 但还需进一步开展功能验证。

4　结论

干旱胁迫下, 甘蓝型油菜地上部鲜重、地上部干重和叶片相对含水量显著低于正常灌溉, 丙二醛和可溶性糖含量显著高于正常灌溉。通过 SSR 和 SNP 构建的甘蓝型油菜遗传连锁图谱, 在 A01、A02、A06、A08、A09、A10、C02、C03、C04、C06 和 C09 等 11 条染色体定位到耐旱相关 QTL 和候选区间。对耐旱材料 No11 和干旱敏感材料 No28 进行干旱胁迫处理和转录组测序分析, 主要差异表达基因显著富集到光合作用、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、植物激素信号转导、核糖体、昼夜节律及角质、木栓素和蜡质的生物合成等相关途径。基于 QTL 定位和转录组数据分析, 鉴定到转录因子、乙烯产生和信号转导、叶绿素生物合成与结合、叶绿素氧化还原酶以及核糖体相关蛋白编码基因等 28 个耐旱候选基因, 编码 FLC、bHLH105、TGA4、TEM1、ERF003、ACO3、CHLI1、LHCB6 和 PORC 等。这些候选基因可为进一步进行基因功能验证、揭示甘蓝型油菜耐旱机制奠定基础, 将有助于耐旱新品种的培育。

References

[1] Batool M, El-Badri A M, Wang Z K, Mohamed I A A, Yang H Y, Ai X Y, Salah A, Hassan M U, Sami R, Kuai J, Wang B, Zhou G S. Rapeseed morpho-physio-biochemical responses to drought stress induced by PEG-6000. *Agronomy*, 2022, 12: 579.

[2] 周广生, 王晶, 蒯婕, 汪波. 专辑导读: 加强大田经济作物栽培措施与环境/资源配置的互作研究、推动产业高效优质发展. 作物学报, 2021, 47: 1633–1638.
Zhou G S, Wang J, Kuai J, Wang B. Editorial: strengthening the research on the interaction between cultivated measures and environment/resource allocation of field economic crops to promote the development of industry with high efficiency and high quality. *Acta Agron Sin*, 2021, 47: 1633–1638 (in Chinese with English abstract).

[3] 宁宁, 莫娇, 胡冰, 李大双, 娄洪祥, 王春云, 白晨阳, 蒯婕, 汪波, 王晶, 徐正华, 李晓华, 贾才华, 周广生. 长江流域不同生态区油菜籽关键品质比较研究. 作物学报, 2023, 49: 3315–3327.
Ning N, Mo J, Hu B, Li D S, Lou H X, Wang C Y, Xiang C Y, Kuai J, Wang B, Wang J, Xu Z H, Li X H, Jia C H, Zhou G S. Comparative study on the processing quality of winter rape in different ecological zones of the Yangtze River valley. *Acta Agron Sin*, 2023, 49: 3315–3327 (in Chinese with English abstract).

[4] 张佳运, 马淑梅, 余常兵, 王淑彬, 魏亚凤, 杨文钰, 王小春. 长江流域旱地多熟模式水分供需平衡特征与水分生产效益. 作物学报, 2022, 48: 2891–2907.
Zhang J Y, Ma S M, Yu C B, Wang S B, Wei Y F, Yang W Y, Wang X C. Characteristics of water supply-demand equilibrium and water production benefits of the dryland multiple cropping patterns in the Yangtze Rive basin. *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 2891–2907 (in Chinese with English abstract).

[5] 万林, 李张开, 李素, 刘丽欣, 马霓, 张春雷. 外源独脚金内酯对油菜苗期干旱胁迫的缓解效应. 中国油料作物学报, 2020, 42: 461–471.
Wan L, Li Z K, Li S, Liu L X, Ma N, Zhang C L. Alleviation effects of exogenous strigolactone on growth of *Brassica napus* L. seedling under drought stress. *Chin J Oil Crop Sci*, 2020, 42: 461–471 (in Chinese with English abstract).

[6] 蒙姜宇, 梁光伟, 贺亚军, 钱伟. 甘蓝型油菜耐盐和耐旱相关性状的 QTL 分析. 作物学报, 2021, 47: 462–471.
Meng J Y, Liang G W, He Y J, Qian W. QTL mapping of salt and drought tolerance related traits in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2021, 47: 462–471 (in Chinese with English abstract).

[7] 李真. 甘蓝型油菜苗期耐湿性和抗旱性相关 QTL 分析. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2008. pp 46–48.
Li Z. Study on QTL Associated with Waterlogging Tolerance and Drought Resistance during Seedling Stage in *Brassica napus* L. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2008. pp 46–48 (in Chinese with English abstract).

[8] 王丹丹. 甘蓝型油菜遗传图谱构建及苗期耐旱相关性状的 QTL 定位. 西南大学硕士学位论文, 重庆, 2013. pp 32–33.
Wang D D. Mapping and QTL Analysis of Genes to Drought Tolerance in *Brassica napus* L. MS Thesis of Southwest University, Chongqing, China, 2013. pp 32–33 (in Chinese with English abstract).

[9] Mahmoud G, Chao H B, Li H X, Zhao W G, Lu G Y, Li M T. QTL mapping for seed germination response to drought stress in *Brassica napus*. *Front Plant Sci*, 2021, 11: 629970.

[10] Shahzad A, Qian M C, Sun B Y, Mahmood U, Li S T, Fan Y H, Chang W, Dai L S, Zhu H, Li J N, Qu C M, Lu K. Genome-wide association study identifies novel loci and candidate genes for drought stress tolerance in rapeseed. *Oil Crop Sci*, 2021, 6: 12–22.

[11] Khanzada H, Wassan G M, He H H, Mason A S, Keerio A A,

Khanzada S, Faheem M, Solangi A M, Zhou Q H, Fu D H, Huang Y J, Rasheed A. Differentially evolved drought stress indices determine the genetic variation of *Brassica napus* at seedling traits by genome-wide association mapping. *J Adv Res*, 2020, 24: 447–461.

[12] Tan M, Liao F, Hou L T, Wang J, Wei L J, Jian H J, Xu X F, Li J N, Liu L Z. Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. *Euphytica*, 2017, 213: 40.

[13] 王浩. 基于 GWAS 和转录组测序鉴定谷子硒响应相关候选基因. 山西农业大学硕士学位论文, 山西太原, 2022. p 9.
Wang H. Identification of Selenium-Responsive Candidate Genes in Foxtail Millet Based on GWAS and Transcriptome Sequencing. MS Thesis of Shanxi Agricultural University, Taiyuan, Shanxi, China, 2022. p 9 (in Chinese with English abstract).

[14] Liu C Q, Zhang X K, Zhang K, An H, Hu K N, Wen J, Shen J X, Ma C Z, Yi B, Tu J X, Fu T D. Comparative analysis of the *Brassica napus* root and leaf transcript profiling in response to drought stress. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 18752–18777.

[15] Wang P, Yang C L, Chen H, Song C P, Zhang X, Wang D J. Transcriptomic basis for drought-resistance in *Brassica napus* L. *Sci Rep*, 2017, 7: 40532.

[16] Zhou H W, Xiao X J, Asjad A, Han D P, Zheng W, Xiao G B, Huang Y J, Zhou Q H. Integration of GWAS and transcriptome analyses to identify SNPs and candidate genes for aluminum tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol*, 2022, 22: 130.

[17] Jian H J, Zhang A X, Ma J Q, Wang T Y, Yang B, Shuang L S, Liu M, Li J N, Xu X F, Paterson A H, Liu L Z. Joint QTL mapping and transcriptome sequencing analysis reveal candidate flowering time genes in *Brassica napus* L. *BMC Genomics*, 2019, 20: 21.

[18] Guo J, Li C H, Zhang X Q, Li Y X, Zhang D F, Shi Y S, Song Y C, Li Y, Yang D G, Wang T Y. Transcriptome and GWAS analyses reveal candidate gene for seminal root length of maize seedlings under drought stress. *Plant Sci*, 2020, 292: 110380.

[19] Sevanthi A M, Sinha S K, Sureshkumar V, Rani M, Saini M R, Kumari S, Kaushik M, Prakash C, Venkatesh K, Singh G P, Mohapatra T, Mandal P K. Integration of dual stress transcriptomes and major QTL from a pair of genotypes contrasting for drought and chronic nitrogen starvation identifies key stress responsive genes in rice. *Rice*, 2021, 14: 49.

[20] 荆蓉蓉. 甘蓝型油菜苗期耐湿相关性状的全基因组关联分析. 西南大学硕士学位论文, 重庆, 2017. p 16.
Jing R R. Genome-wide Assocaiton Mapping of Water Logging Traits in *Brassica napus* L. MS Thesis of Southwest University, Chongqing, China, 2017. p 16 (in Chinese with English abstract).

[21] Van Ooijen J W. JoinMap 4: Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps in Experimental Populations, 2006. Wageningen: Kyazma B V. pp 1–63.

[22] Van Ooijen J W. MapQTL 6: Software for the Mapping of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations of Diploid Species, 2009. Wageningen: Kyazma B V. pp 1–64.

[23] Voorrips R E, MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTL. *J Hered*, 2002, 93: 77–78.

[24] 李星, 杨会, 骆璐, 李华东, 张昆, 张秀荣, 李玉颖, 于海洋, 王天宇, 刘佳琪, 王瑶, 刘风珍, 万勇善. 栽培种花生单仁重 QTL 定位分析. 作物学报, 2023, 49: 2160–2170.
Li X, Yang H, Luo L, Li H D, Zhang K, Zhang X R, Li Y Y, Yu H Y, Wang T Y, Liu J Q, Wang Y, Liu F Z, Wan Y S. QTL mapping for single-seed weight of cultivated peanut. *Acta Agron Sin*, 2023, 49: 2160–2170 (in Chinese with English abstract).

[25] 李阳阳, 荆蓉蓉, 吕蓉蓉, 石鹏程, 李欣, 王芹, 吴丹, 周清元, 李加纳, 唐章林. 甘蓝型油菜湿害胁迫响应性状的全基因组关联分析及候选基因预测. 作物学报, 2019, 45: 1806–1821.
Li Y Y, Jing R R, Lyu R R, Shi P C, Li X, Wang Q, Wu D, Zhou Q Y, Li J N, Tang Z L. Genome-wide association analysis and candidate genes prediction of waterlogging-responding traits in *Brassica napus*. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1806–1821 (in Chinese with English abstract).

[26] 王瑞霞, 杜海平, 田宏先. 干旱胁迫对不同生育期芥菜型春油菜幼苗生长的影响. 南方农业, 2019, 13(26): 140–143.
Wang R X, Du H P, Tian H X. Effects of drought stress on the growth of seedlings at different growth stages in spring *Brassica juncea*. *South China Agric*, 2019, 13(26): 140–143 (in Chinese).

[27] 石鹏程. 甘蓝型油菜苗期干旱及旱后复水相关性状的全基因组关联分析. 西南大学硕士学位论文, 重庆, 2019. p 15.
Shi P C. Genome-wide Association Mapping for Drought and Rewatering Related Traits at Seedling Stage in *Brassica napus* L. MS Thesis of Southwest University, Chongqing, China, 2019. p 15 (in Chinese with English abstract).

[28] 谢小玉, 张霞, 张兵. 油菜苗期抗旱性评价及抗旱相关指标变化分析. 中国农业科学, 2013, 46: 476–485.
Xie X Y, Zhang X, Zhang B. Evalution of drought resistance and analysis of variation of relevant parameters at seedling stage of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Sci Agric Sin*, 2013, 46: 476–485 (in Chinese with English abstract).

[29] 洪双. 全基因组关联分析挖掘甘蓝型油菜耐旱候选基因. 中国农业科学院硕士学位论文, 北京, 2018. pp 31–32.
Hong S. Genome-wide Association Study Identifies Candidate Genes for Drought Tolerance in *Brassica napus*. MS Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2018. pp 31–32 (in Chinese with English abstract).

[30] 吴金锋. 甘蓝型油菜 SNP 与 SSR 分析及耐旱性状的全基因组关联分析. 中国农业科学院博士学位论文, 北京, 2014. pp 27–28.
Wu J F. SNP and SSR Analysis and Genome-wide Association Mapping of Drought Tolerance Trait in *Brassica napus*. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2014. pp 27–28 (in Chinese with English abstract).

[31] Zhu B, Xu H X, Guo X, Lu J X, Liu X Y, Zhang T. Comparative analysis of drought responsive transcriptome in *Brassica napus* genotypes with contrasting drought tolerance under different potassium levels. *Euphytica*, 2023, 219: 25.

[32] Fang S, Zhao P M, Tan Z D, Peng Y, Xu L T, Jin Y T, Wei F, Guo L, Yao X. Combining physio-biochemical characterization and transcriptome analysis reveal the responses to varying degrees of drought stress in *Brassica napus* L. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 8555.

[33] Xiong J L, Dai L L, Ma N, Zhang C L. Transcriptome and physiological analyses reveal that AM1 as an ABA-mimicking ligand improves drought resistance in *Brassica napus*. *Plant*

Growth Regul, 2018, 85: 73–90.

[34] Chen Q, Zheng Y, Luo L D, Yang Y P, Hu X Y, Kong X X. Functional FRIGIDA allele enhances drought tolerance by regulating the P5CS1 pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495: 1102–1107.

[35] Sun K L, Wang H Y, Xia Z L. The maize bHLH transcription factor bHLH105 confers manganese tolerance in transgenic tobacco. *Plant Sci*, 2019, 280: 97–109.

[36] Zhong L, Chen D D, Min D H, Li W W, Xu Z S, Zhou Y B, Li L C, Chen M, Ma Y Z. AtTGA4, a bZIP transcription factor, confers drought resistance by enhancing nitrate transport and assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457: 433–439.

[37] Luo G Y, Liu A L, Zhou X Y, Zhang X W, Peng Y, Chen X B. *Arabidopsis* TEMPRANILLO1 transcription factor AtTEM1 negatively regulates drought tolerance. *Plant Growth Regul*, 2017, 83: 119–127.

[38] Naing A H, Campol J R, Kang H, Xu J P, Chung M Y, Kim C K. Role of ethylene biosynthesis genes in the regulation of salt stress and drought stress tolerance in *Petunia*. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 844449.

[39] Liu W J, Wang Y C, Gao C Q. The ethylene response factor (ERF) genes from *Tamarix hispida* respond to salt, drought and ABA treatment. *Trees*, 2013, 28: 317–327.

[40] Rong W, Qi L, Wang A Y, Ye X G, Du L P, Liang H X, Xin Z Y, Zhang Z Y. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 468–479.

[41] Xu Y H, Liu R, Yan L, Liu Z Q, Jiang S C, Shen Y Y, Wang X F, Zhang D P. Light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 1095–1106.

[42] Pattanayak G K, Tripathy B C. Overexpression of protochlorophyllide oxidoreductase C regulates oxidative stress in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2011, 6: e26532.

[43] Tomiyama M, Inoue S I, Tsuzuki T, Soda M, Morimoto S, Okigaki Y, Ohishi T, Mochizuki N, Takahashi K, Kinoshita T. Mg-chelatase I subunit 1 and Mg-protoporphyrin IX methyltransferase affect the stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 2014, 127: 553–563.

[44] Condori-Apfata J A, Batista-Silva W, Medeiros D B, Vargas J R, Valente L M L, Pérez-Díaz J L, Fernie A R, Araújo W L, Nunes-Nesi A. Downregulation of the E2 subunit of 2-Oxoglutarate dehydrogenase modulates plant growth by impacting carbon-nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2021, 62: 798–814.

[45] Niu C D, Jiang L J, Cao F G, Liu C, Guo J X, Zhang Z T, Yue Q Y, Hou N, Liu Z Y, Li X W, Tahir M M, He J Q, Li Z X, Li C, Ma F W, Guan Q M. Methylation of a MITE insertion in the MdRFNR1-1 promoter is positively associated with its allelic expression in apple in response to drought stress. *Plant Cell*, 2022, 34: 3983–4006.

[46] Seraj R G M, Tohidfar M, Irani M A, Esmaeilzadeh-Salestani K, Moradian T, Ahmadikhah A, Behnamian M. Metabolomics analysis of milk thistle lipids to identify drought-tolerant genes. *Sci Rep*, 2022, 12: 12827.

[47] Pandian B A, Sathishraj R, Djanaguiraman M, Prasad P V V, Jugulam M. Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response. *Antioxidants*, 2020, 9: 454.

[48] Pal G, Bakade R, Deshpande S, Sureshkumar V, Patil S S, Dawane A, Agarwal S, Niranjan V, PrasannaKumar M K, Vemanna R S. Transcriptomic responses under combined bacterial blight and drought stress in rice reveal potential genes to improve multi-stress tolerance. *BMC Plant Biol*, 2022, 22: 349.