

陈元军, 马娟娟, 史睿, 等. 整合关联分析和共表达网络分析挖掘甘蓝型油菜籽粒质量候选基因[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 913-930.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.001

整合关联分析和共表达网络分析挖掘甘蓝型油菜籽粒质量候选基因

陈元军^{1,2}, 马娟娟^{2,3}, 史睿^{2,3}, 李伟龙^{1,2}, 王婷^{2,4}, 彭琦², 张维², 陈锋², 王晓东², 高建芹², 付三雄², 张洁夫², 孙程明², 季彪俊¹, 胡茂龙^{1,2,3,4}

(1. 福建农林大学农学院, 福建 福州 350002; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所/农业农村部长江下游棉花与油菜重点实验室/江苏省农业生物学重点实验室/江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏 南京 210014; 3. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 4. 江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212023)

摘要: 甘蓝型油菜是中国重要的油料作物, 籽粒质量是油菜产量构成的重要因素。本研究利用 A-D Test 模型对 496 份油菜的籽粒质量进行全基因组关联分析, 共检测到 19 个显著位点, 联合解释 34.1% 的表型变异。整合 A-D Test 及前期混合线性模型和一般线性模型结果后得到 71 个位点, 联合解释 50.1% 的表型变异。在 22 个位点置信区间内找到 *ARF2*、*NPC6*、*TTG2* 和 *WRI1* 等已被报道的拟南芥中的籽粒质量基因的同源基因。同时, 利用大粒品种中双 11 和中小粒品种中油 821 的籽粒和角果皮转录组数据进行加权基因共表达网络分析, 构建了 13 个共表达模块, 其中紫色 (purple) 和洋红色 (magenta) 模块与籽粒质量表型显著相关。GO 富集分析结果表明, 2 个模块在 L-苯丙氨酸氨基转移酶活性、硫双加氧酶活性、焦磷酸酶活性和 RNA 解旋酶活性等显著富集。2 个模块中的枢纽基因 *BnaA06g00850D*、*BnaA01g00990D*、*BnaC06g10000D* 和 *BnaC02g44260D* 等的同源基因为 *ETHE1*、*DAR1*、*GLN1*、*1* 和 *SMG7* 等拟南芥籽粒质量已知基因。整合全基因组关联分析和加权基因共表达网络分析的分析结果, 在 42 个显著位点的置信区间内找到 90 个属于 purple 和 magenta 模块的基因, 其中 *BnaA01g06210D*、*BnaA07g14990D* 和 *BnaA07g03030D* 等拟南芥同源基因已被报道参与种子发育进程调控。本研究整合 GWAS 与 WGCNA 2 种分析方法, 挖掘甘蓝型油菜的籽粒质量候选基因, 为研究籽粒质量的调控机制、指导籽粒质量的遗传改良提供参考。

关键词: 甘蓝型油菜; 籽粒质量; 产量; 全基因组关联分析; 共表达网络分析

中图分类号: S634.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)04-0913-18

Integrating genome-wide association study and weighted gene co-expression network analysis to explore candidate genes of seed weight in rapeseed (*Brassica napus* L.)

CHEN Yuan-jun^{1,2}, MA Juan-juan^{2,3}, SHI Rui^{2,3}, LI Wei-long^{1,2}, WANG Ting^{2,4}, PENG Qi², ZHANG Wei², CHEN Feng², WANG Xiao-dong², GAO Jian-qin², FU San-xiong², ZHANG Jie-fu², SUN Cheng-ming², JI Biao-jun¹, HU Mao-long^{1,2,3,4}

收稿日期: 2022-08-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32001581); 江苏省基础研究计划 (自然科学基金) 项目 (BK20190260); 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心专项 (HSXT3015); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 [JBGS(2021)061]

作者简介: 陈元军 (1996-), 男, 海南万宁人, 硕士研究生, 主要从事油菜遗传育种研究。 (E-mail) 953825642@qq.com

通讯作者: 孙程明, (E-mail) suncm8331537@gmail.com; 季彪俊, (E-mail) 307853347@qq.com; 胡茂龙, (E-mail) humolon@163.com

(1. College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton and Rapeseed (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Jiangsu Province for Agrobiotechnology/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210014, China; 3. Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 4. School of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212023, China)

Abstract: *Brassica napus* L. is one of the most important oil crops in China, and seed weight is one of the essential components of seed yield. In this study, we performed a genome-wide association study (GWAS) of seed weight in a collection of 496 rapeseed materials, and detected 19 significant loci via A-D Test model, which accounted for 34.1% of the phenotypic variance on the whole. Combining the common loci of A-D Test and previous mixed linear model (MLM) and general linear model (GLM), 71 loci were obtained and accounted for 50.1% of the phenotypic variance. Genes named *ARF2*, *NPC6*, *TTG2* and *WRI1* were found to be orthologous with reported *Arabidopsis* seed weight genes in confidence interval of 22 loci. Meanwhile, a total of 13 co-expression modules were constructed through weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) based on transcriptome data of seed and silique husk from big seed variety Zhongshuang11 and middle-small seed variety Zhongyou821. The purple and magenta modules were significantly correlated with the seed weight phenotype. Results of GO enrichment analysis showed that, the above two modules were enriched significantly at terms like L-phenylalanine aminotransferase activity, sulfur dioxygenase activity, pyrophosphatase activity and RNA helicase activity, etc. Hub genes from the purple and magenta modules like *BnaA06g00850D*, *BnaA01g00990D*, *BnaC06g10000D* and *BnaC02g44260D* were orthologous with the reported genes of seed weight in *Arabidopsis*, such as *ETHE1*, *DAR1*, *GLN1;1* and *SMG7*. By combining the results of GWAS and WGCNA, we identified 90 genes of purple module or magenta module in the confidence intervals of 42 significant loci, and the orthologous genes in *Arabidopsis* like *BnaA01g06210D*, *BnaA07g14990D* and *BnaA07g03030D* were reported to participate in seed development regulation. In this study, we integrated the analytical methods of GWAS and WGCNA to identify the candidate genes of seed weight in rapeseed, so as to lay a foundation for studying the regulation mechanism and guiding the genetic improvement of seed weight.

Key words: *Brassica napus* L.; seed weight; yield; genome-wide association study (GWAS); weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 是中国主要的食用油来源之一, 种植面积约 7.0×10^6 hm², 所产植物油量约占国产植物油总量的 55%。但中国菜籽油产量已连续十年低于消费量, 2020 年, 菜籽油产量为 6.36×10^6 t, 消费量为 8.25×10^6 t, 缺口达 1.89×10^6 t, 这对中国粮食安全构成了重大威胁^[1]。因此, 油菜产量的提高成为当今油菜育种工作中最为关键的目标。籽粒质量是油菜产量性状的重要组成部分, 相较于角果长、每角粒数等其他产量性状具有更高的遗传力^[2]。研究表明, 籽粒质量改良是近年来油菜产量提升的重要原因^[3]。因此, 解析籽粒质量遗传基础、挖掘有利基因可以提高油菜产量、保障中国油料供给安全。

甘蓝型油菜是双子叶植物, 油菜种子由胚、胚乳和种皮等部分组成, 分别由受精卵、受精中央细胞和珠被组织发育而成。基因型通过调控胚乳发育决定种子大小, 珠被组织决定了种子发育的空间, 受精卵发育成胚, 三者结合, 共同决定了种子的质量和大小^[4]。目前种子发育大小的主要形成机制分为 2 类, 一类是种子早期发育阶段胚乳增殖形成的空腔大小决定了种子体积, 随后胚乳细胞分裂促进种子质量增加; 另一类是种皮和角果皮等母体组织调控种子发育, 种子在发育过程中依赖母体的光合作用提供的养

分^[5]。目前, 一系列基因已被报道调控种子发育, 如 *IKU1* 通过调控胚乳生长影响种子籽粒质量^[6]; *STK* 通过控制种皮的结构和机械性能调节细胞分裂素水平来控制果实大小^[7]; *GW5* 通过泛素蛋白酶体途径调节种子细胞分裂, 控制种子粒宽和籽粒质量等^[8]。

甘蓝型油菜籽粒质量是由多基因控制的数量性状, 受基因型和环境共同作用^[9]。王瑞等^[10]利用 7 个黄籽油菜品系配制完全双列杂交组合, 利用 ADM (加性-显性-母体遗传效应) 遗传模型分析产量性状, 结果表明, 千粒质量的遗传主要由基因的加性和显性效应联合决定, 而母体效应比重小, 同时环境对各性状的遗传均有一定影响。崔嘉成等^[11]利用 11 个甘蓝型油菜亲本杂交得到 30 个组合, 对各组合及亲本角果性状的遗传模型的分析结果表明, 基因的加性效应控制千粒质量的遗传, 无显性效应。戚存扣等^[12]对 2 个遗传差异大的亲本构建的世代家系群体的分析结果表明, 该组合千粒质量主要受主基因的加性效应和多基因的加性和显性效应共同决定。李娜^[13]的研究结果表明, 油菜籽粒质量主要受母体基因型调控, 籽粒质量的自然变异由细胞数目的变异决定, 而非由种子密度决定。尽管油菜籽粒质量的遗传基础十分复杂, 但前人研究形成的共识是籽粒质量遗传力较高, 籽粒质量主要受到基因间加性效应的影响, 显

性效应影响较小,杂种优势不强。因此,可以通过聚合不同种质中的有利基因来增加油菜籽粒质量。

全基因组关联分析 (Genome-wide association study, GWAS) 是一种以位点间连锁不平衡为基础,用统计学分析检测遗传多态性与目标性状间关联的分析方法^[14]。如今 GWAS 已被广泛应用于解析油菜的重要产量性状。Lu 等^[15]对 520 份甘蓝型油菜种质资源的 7 个产量性状进行关联分析,共检测到 128 个显著位点,其中 93 个为新检测到的位点,结合 4 个产量差异极端材料的转录组数据,确定 14 个候选基因。Dong 等^[16]对 157 份甘蓝型油菜的籽粒质量进行关联分析,检测到 20 个籽粒质量显著位点,在 A09 染色体显著位点附近找到油菜籽粒质量和角果长已克隆基因 *BnaA.ARF18.a*。Khan 等^[17]对 521 份甘蓝型油菜品种的胚珠数、每角粒数和籽粒质量性状进行关联分析,利用多位点和单位点模型分别检测到 280 个和 31 个显著单核苷酸多态性 (SNP),并挖掘出 42 个产量性状候选基因。林升丽^[18]通过重测序对 505 份油菜种质资源进行基因分型,对关联群体 7 个环境的籽粒质量表型进行关联分析,检测到 127 个显著位点,找到 *BnaA07.KCR*、*BnaA07.EXPA1* 和 *BnaA10.GIF2* 等多个候选基因。

加权基因共表达网络分析 (Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 是利用大量表达谱数据对表达模式类似的基因进行聚类,挖掘与性状关联基因模块的分析方法。WGCNA 目前已被广泛应用于油菜重要性状的候选基因挖掘。Ma 等^[19]基于油菜感染黑根病病菌的转录组数据,对检测到的 1 892 个差异剪接基因进行 WGCNA,检测到 8 个共表达基因模块,并挖掘出属于 WRKY、AP2、HMG 和 C₂H₂ 等转录因子家族的枢纽基因。同时,越来越多的研究将 GWAS 与 WGCNA 相结合,找到一系列调控目标性状的候选基因。鲜小华等^[20]利用 GWAS 挖掘出 1 826 个黄籽名义候选基因,利用 WGCNA 找到 2 个黄籽相关基因模块,挖掘到 *BnF3H*、*BnANS* 等多个候选基因。刘景森^[21]利用 GWAS 检测到 14 个生物产量显著位点,利用叶片、种子和茎秆等组织的转录组数据构建油菜生物产量共表达网络,鉴定到 *BnA04g06420D*、*BnA09g35380*、*BnC03g73810D* 和 *BnC08g48810D* 等多个生物产量候选基因。田贵福等^[22]整合了油菜籽粒质量的 GWAS 和 QTL 定位结果,利用 71 份油菜的角果转

录组数据构建了共表达网络,挖掘出枢纽基因 *Bn-SWH1* 并验证了其对于种子籽粒质量的负调控作用。本研究采用整合 GWAS 和 WGCNA 的策略,挖掘控制籽粒质量的候选基因,为今后籽粒质量相关的基因克隆和调控机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与数据来源

本研究的关联群体包含 496 份国内外的地方品种、育成品种及高世代育种材料,其中有 444 份材料来源于国内油菜主产区,包括江苏、湖北、湖南和四川等,国外材料来自德国、瑞典和加拿大等国家。试验材料于 2014 年种植于江苏南京 (记作 14NJ), 2015 年、2016 年种植于江苏泰州 (记作 15TZ、16TZ)。在前期研究中,我们已利用 MLM (混合线性模型) 和 GLM (一般线性模型) 对该群体进行籽粒质量关联分析,本研究所使用的基因型和表型源于前期发表的论文^[23]。

本研究中用于 WGCNA 的转录组数据集来自国家基因组科学数据中心 (National Genomics Data Center, NGDC) 的生物项目数据库 BioProject (ID: PRJCA001246), 包含大粒品种中双 11 和中小粒品种中油 821 开花后第 7 d、第 10 d、第 14 d、第 45 d 的种子和开花后第 7 d、第 10 d、第 14 d 的角果皮共计 28 份转录组数据。

1.2 全基因组关联分析

本研究利用 A-D Test 模型对籽粒质量基因型和表型进行关联分析,显著性阈值 (P) 计算方法为 $0.01/\text{总标记数}$, 取对数为 $-\lg P = 6.28$ 。若 1 Mb 区间内存在较多的显著 SNP, 把两两间决定系数 (R^2) ≥ 0.1 的 SNP 视为 1 个关联位点, 选取其中 P 值最小的为代表, 利用 qqman 包绘制 QQ 图 (Quantile-quantile plot) 和曼哈顿图 (Manhattan plot)^[24]。

1.3 权重基因共表达网络分析

利用 WGCNA 包构建基因共表达网络^[25], 过滤变异系数 (CV) < 0.4 、表达量 (TPM) ≤ 1 和缺失样本比例超过 10% 的基因, 根据基因间的表达量数据对样品进行层次聚类分析, 采取逐步法聚类表达模式相近的基因, 绘制出聚类树和每个样品的表达图。为了使结果符合无尺度网络分布^[26], 选取拟合曲线 R^2 接近 0.9 时的权重参数 β , $power$ 值为 10。利用动态剪枝法识别共表达模块, 计算每个模块的特征向

量,合并距离较近的模块并选择相关系数绝对值大于 0.75 的模块作为研究的目标模块。使用 omicshare 在线分析平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 对目标模块进行 GO 富集,对富集结果进行柱状图、气泡图和圈图等图表的绘制和展示。将模块身份 (Module membership, KME) ≥ 0.90 的基因定义为枢纽基因,利用 Cytoscape 软件对籽粒质量相关模块进行网络可视化展示^[27]。

1.4 候选基因挖掘

以 $R^2=0.2$ 时的连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD) 衰减距离作为 GWAS 显著位点的置信区间,提取区间内的基因编码序列 (CDS),与模式植物拟南芥的基因 CDS 进行 BLAST 比对 ($E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-10}$),用相似比最大的拟南芥基因来标注油菜基因。同理,注释 WGCNA 中籽粒质量相关模块的基因。最终,将 2 个分析中找到的油菜籽粒质量已知基因和拟南芥籽粒质量已知基因的同源基因作为候选基因^[28]。

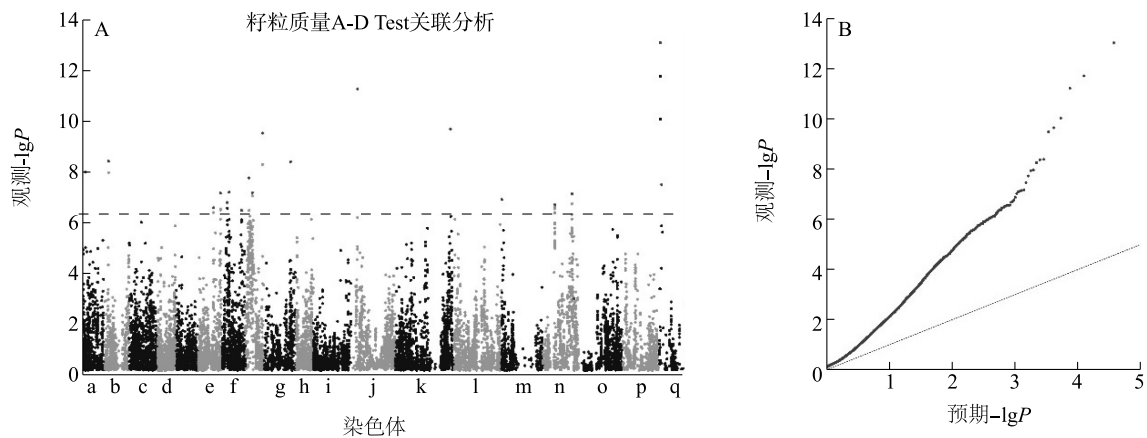
2 结果与分析

2.1 全基因组关联分析

利用 A-D Test 模型对籽粒质量最佳线性无偏预测值 (BLUP) 进行关联分析,设置显著性阈值为 $-\lg P=6.28$,共检测到 37 个显著 SNP;合并存在连锁不平衡的 SNP ($R^2 \geq 0.1$),得到 19 个显著 SNP,分布在 A01、A02、A06~A09、C02、C03、C05、C06、C09 等 11 条染色体上 (图 1、表 1)。利用一般线性模型计算,19 个位点联合解释 34.1% 的表型变异。显著性最高

位点 *Bn-scaff_17526_1-p1066214* 位于 C09 染色体 1.49 Mb 处, $-\lg P=13.06$ (表 2);显著性次高位点 *Bn-scaff_16804_1-p203519* 位于 C02 染色体 6.98 Mb 处, $-\lg P=11.24$;其余位点的 $-\lg P$ 值范围为 6.47~9.67。与单个环境的试验结果相比,14 个位点在至少 2 个环境中被重复检测到,其中,显著性排名前 4 的位点 *Bn-scaff_17526_1-p1066214*、*Bn-scaff_16804_1-p203519*、*Bn-scaff_17119_1-p148890* 和 *Bn-A08-p20343735* 在 3 个环境 (14NJ、15TZ 及 16TZ) 中均被重复检测到,证实了本研究结果的可重复性和可靠性 (表 2)。

比较前人 GLM 和 MLM 模型结果,8 个位点与 GLM 重叠,2 个位点与 MLM 重叠 (表 1)。位点 *Bn-scaff_17526_1-p1066214* 和 *Bn-A02-p6564861* 在 3 个模型中都被重复检测到。不仅如此,A-D test 还找到 11 个新位点,*Bn-scaff_16804_1-p203519* 分布在 C02 染色体 6.98 Mb 处, $-\lg P=11.24$,在 3 个环境中都被检测到。*Bn-A09-p29991443* 位于 A09 染色体 27.82 Mb 处, $-\lg P=8.39$,在 2 个环境 (15TZ、16TZ) 中都被检测到。位点 *Bn-A01-p3061223* 和位点 *Bn-A08-p4273091* 均在 14NJ 和 16TZ 中被检测到, $-\lg P$ 值分别为 7.98 和 7.75,此外还有 7 个新位点位于各染色体上,分别在 1~2 个环境中被检测到。合并 3 个模型的结果,得到 71 个显著位点,11 个分布在 A07 染色体上,9 个分布在 C06 染色体上,8 个分布在 A03 染色体上,其余染色体上分布 1~7 个位点。分析显著位点的分布,57.7% 的位点分布在 A 亚基因组,42.3% 的位点分布在 C 亚基因组。利用一般线性模型计算,发现 71 个位点联合解释 50.1% 的表型变异。



A:籽粒质量 A-D Test 曼哈顿图;B:籽粒质量 A-D Test QQ 图。a: A01;b: A02;c: A03;d: A04;e: A05;f: A06;g: A07;h: A08;i: A09;j: A10;k: C01;l: C02;m: C03;n: C04;o: C05;p: C06;q: C07。

图 1 油菜籽粒质量 A-D Test 全基因组关联分析

Fig.1 Genome-wide association study of seed weight in rapeseed by A-D Test model

表 1 籽粒质量显著关联位点

Table 1 Significant associated loci of seed weight

标记	染色体	位置 (Mb)	$-\lg P$	关联模型
<i>Bn-A01-p1156979</i>	A01	0.76	6.37	GLM
<i>Bn-A01-p1440009</i>	A01	1.04	5.96	GLM
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	7.98	A-D Test
<i>Bn-A01-p9621623</i>	A01	8.23	6.43	GLM
<i>Bn-A01-p12222806</i>	A01	10.41	7.02	GLM
<i>Bn-A01-p15496639</i>	A01	12.94	6.64	GLM
<i>Bn-A01-p23472380</i>	A01	19.35	5.34	MLM
<i>Bn-A02-p6564861</i>	A02	3.78	5.38~8.59	A-D Test、GLM、MLM
<i>Bn-A03-p560769</i>	A03	0.45	9.16	GLM
<i>Bn-A03-p8851142</i>	A03	8.16	7.88	GLM
<i>Bn-A03-p22125583</i>	A03	20.96	4.77~5.64	GLM MLM
<i>Bn-A03-p4352837</i>	A03	3.89	6.18	GLM
<i>Bn-A03-p6586436</i>	A03	5.88	8.47	GLM
<i>Bn-A03-p13758392</i>	A03	12.89	6.56	GLM
<i>Bn-A03-p14747263</i>	A03	13.92	6.57	GLM
<i>Bn-A03-p24494224</i>	A03	23.00	6.05	GLM
<i>Bn-A04-p13705636</i>	A04	14.34	8.84	GLM
<i>Bn-A05-p2610006</i>	A05	2.72	5.69	GLM
<i>Bn-A06-p19593266</i>	A06	15.59	6.57~8.01	A-D Test、GLM
<i>Bn-A06-p23674542</i>	A06	22.66	5.97~7.14	A-D Test、GLM
<i>Bn-Scaffold002856-p361</i>	A07	0.59	5.84	GLM
<i>Bn-A10-p11601681</i>	A07	2.57	6.95	GLM
<i>Bn-A07-p3599603</i>	A07	5.59	6.78	A-D Test
<i>Bn-A07-p5518604</i>	A07	7.38	7.19	A-D Test
<i>Bn-A07-p10557557</i>	A07	11.74	5.71	GLM
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	5.66	GLM
<i>Bn-A07-p11611255</i>	A07	13.76	5.95	GLM
<i>Bn-A07-p16095589</i>	A07	18.00	5.96	GLM
<i>Bn-scaff_15743_1-p590955</i>	A07	18.51	8.64	GLM
<i>Bn-A07-p17804261</i>	A07	19.65	6.20	GLM
<i>Bn-A07-p18196996</i>	A07	20.09	6.47	A-D Test
<i>Bn-A08-p2675098</i>	A08	2.10	6.81	GLM
<i>Bn-A08-p4273091</i>	A08	3.68	7.75	A-D Test
<i>Bn-A08-p8529251</i>	A08	7.38	7.17	A-D Test
<i>Bn-A08-p10443959</i>	A08	8.37	6.30	GLM
<i>Bn-A08-p13284369</i>	A08	11.05	5.89	GLM
<i>Bn-A08-p20343735</i>	A08	17.81	8.82~9.50	A-D Test、GLM
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	6.20	GLM
<i>Bn-A09-p29991443</i>	A09	27.82	8.39	A-D Test
<i>Bn-A10-p15021776</i>	A10	14.97	5.78	GLM
<i>Bn-A10-p15167470</i>	A10	15.10	6.67	GLM
<i>Bn-scaff_15803_1-p837307</i>	C01	14.78	5.58	GLM
<i>Bn-scaff_16804_1-p203519</i>	C02	6.98	11.24	A-D Test
<i>Bn-scaff_20942_1-p52095</i>	C02	11.20	6.54	GLM
<i>Bn-scaff_16002_1-p1803014</i>	C03	12.57	6.95	GLM
<i>Bn-scaff_26320_1-p269450</i>	C03	30.92	5.61	GLM

续表 1 Continued 1

标记	染色体	位置 (Mb)	$-\lg P$	关联模型
<i>Bn-scaff_16182_1-p296671</i>	C03	51.99	6.41	GLM
<i>Bn-scaff_15794_3-p89166</i>	C03	55.72	8.28	GLM
<i>Bn-scaff_17119_1-p148890</i>	C03	56.81	9.28~9.67	A-D Test, GLM
<i>Bn-scaff_16217_1-p597569</i>	C04	21.92	5.68	GLM
<i>Bn-scaff_18062_1-p229981</i>	C04	31.11	6.23	GLM
<i>Bn-scaff_15585_1-p1089867</i>	C04	44.50	5.88	GLM
<i>Bn-scaff_18903_1-p371596</i>	C04	47.53	6.87	GLM
<i>Bn-scaff_16414_1-p1774629</i>	C05	0.28	6.90~7.33	A-D Test, GLM
<i>Bn-scaff_20901_1-p2029631</i>	C05	1.97	6.47	GLM
<i>Bn-scaff_20901_1-p1279675</i>	C05	2.71	7.36	GLM
<i>Bn-scaff_15763_1-p596396</i>	C05	11.70	5.71	GLM
<i>Bn-scaff_18439_1-p315861</i>	C06	12.45	6.70	A-D Test
<i>Bn-scaff_15763_1-p588874</i>	C06	20.16	5.85	GLM
<i>Bn-scaff_16064_1-p938130</i>	C06	24.70	11.57	GLM
<i>Bn-scaff_15743_1-p599416</i>	C06	27.81	9.80	GLM
<i>Bn-scaff_18807_1-p678223</i>	C06	30.16	5.69~7.12	A-D Test, GLM
<i>Bn-scaff_16874_1-p411591</i>	C06	31.82	4.33~6.66	GLM, MLM
<i>Bn-scaff_16397_1-p625792</i>	C06	32.30	6.59	A-D Test
<i>Bn-scaff_17799_1-p2391172</i>	C06	34.11	7.71	GLM
<i>Bn-scaff_17799_1-p853567</i>	C06	35.74	7.70	GLM
<i>Bn-scaff_15705_1-p2279820</i>	C07	35.29	6.12	GLM
<i>Bn-A08-p10452462</i>	C08	16.68	6.88	GLM
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	4.93~15.98	A-D Test, GLM, MLM
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	7.48	A-D Test
<i>Bn-scaff_15576_1-p614226</i>	C09	41.71	9.03	GLM

表 2 各环境下 A-D Test 模型关联位点

Table 2 Associated loci of A-D Test model in three environments

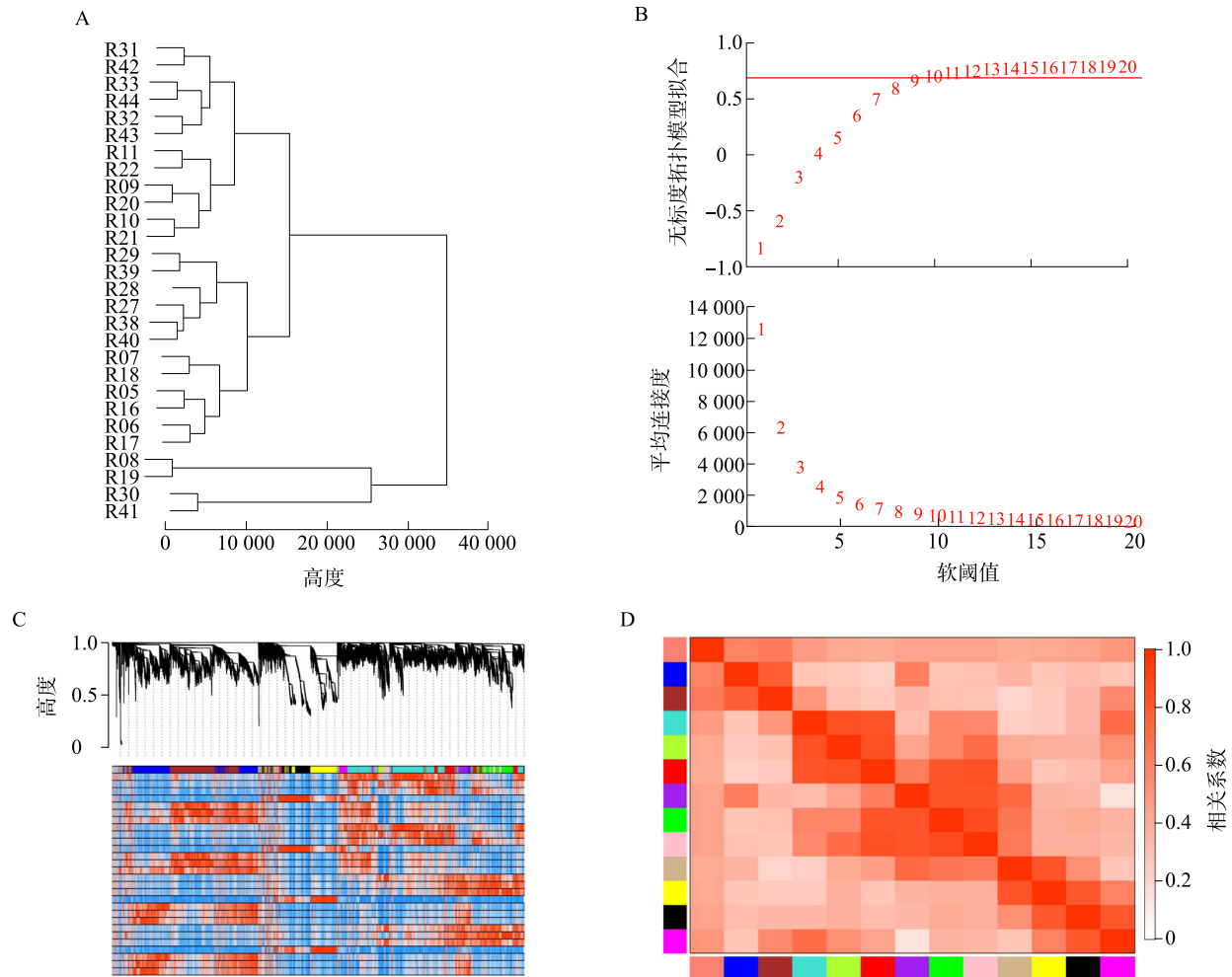
标记	染色体	位置 (Mb)	$-\lg P$	环境
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	13.06	14NJ, 15TZ, 16TZ
<i>Bn-scaff_16804_1-p203519</i>	C02	6.98	11.24	14NJ, 15TZ, 16TZ
<i>Bn-scaff_17119_1-p148890</i>	C03	56.81	9.67	14NJ, 15TZ, 16TZ
<i>Bn-A08-p20343735</i>	A08	17.81	9.50	14NJ, 15TZ, 16TZ
<i>Bn-A02-p6564861</i>	A02	3.78	8.41	14NJ, 16TZ
<i>Bn-A09-p29991443</i>	A09	27.82	8.39	15TZ, 16TZ
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	7.98	14NJ, 16TZ
<i>Bn-A08-p4273091</i>	A08	3.68	7.75	14NJ, 16TZ
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	7.48	16TZ
<i>Bn-A07-p5518604</i>	A07	7.38	7.19	14NJ
<i>Bn-A08-p8529251</i>	A08	7.38	7.17	14NJ, 16TZ
<i>Bn-A06-p23674542</i>	A06	22.66	7.14	14NJ, 15TZ
<i>Bn-scaff_18807_1-p678223</i>	C06	30.16	7.12	16TZ
<i>Bn-scaff_16414_1-p1774629</i>	C05	0.28	6.90	14NJ, 16TZ
<i>Bn-A07-p3599603</i>	A07	5.59	6.78	14NJ, 16TZ
<i>Bn-scaff_18439_1-p315861</i>	C06	12.45	6.70	14NJ, 16TZ
<i>Bn-scaff_16397_1-p625792</i>	C06	32.30	6.59	
<i>Bn-A06-p19593266</i>	A06	15.59	6.57	14NJ, 15TZ
<i>Bn-A07-p18196996</i>	A07	20.09	6.47	14NJ

14NJ 表示试验材料于 2014 年种植于江苏南京; 15TZ、16TZ 分别表示试验材料于 2015 年、2016 年种植于江苏泰州。

2.2 加权基因共表达网络分析

大粒品种中双 11 的千粒质量约为 4.6 g, 中小粒品种中油 821 的千粒质量约为 3.4 g。本研究下载了两者开花后第 7 d、10 d、14 d、45 d 的种子和开花后第 7 d、10 d、14 d 的角果皮转录组数据, 利用 R 软件中 WGCNA 包对 28 份转录组数据的 100 919 个基因进行分析, 过滤低表达 ($TPM \leq 1$) 和变异系数较低 ($CV < 0.4$) 的基因后, 保留了 35 540 个基因。通过层次聚类绘制样本树并构建无尺度网络 (图 2A、

图 2B), 采取逐步法聚类表达模式相近的基因 (图 2C), 最终得到 13 个共表达模块。不同模块间包含的基因数目差别大, turquoise 模块含有数量最多的基因, 包含 7 176 个基因; salmon 模块包含基因数目最少, 仅包含 108 个基因; 其余模块内基因数目范围为 185~6 189。根据模块间相关性绘制相关性热图, purple 与 green, purple 与 pink, magenta 与 yellow, magenta 与 black 等模块间相关性较高 (图 2D)。



A: 层次样本聚类; B: 基于连通性选择软阈值; C: 树状聚类图及每个样品的表达图; D: 模块间相关性热图。A 图中, 左侧编号为各转录组样品的代号。

图 2 样本聚类及基因模块的生成

Fig.2 Sample clustering and gene module generation

2.3 筛选目标模块及 GO 富集分析

计算模块特征向量与籽粒质量表型的相关系数, 结果显示, 模块系数绝对值范围为 0.004 9~0.820 0, 以 0.75 为阈值, 得到 2 个籽粒质量关联模块, 其中

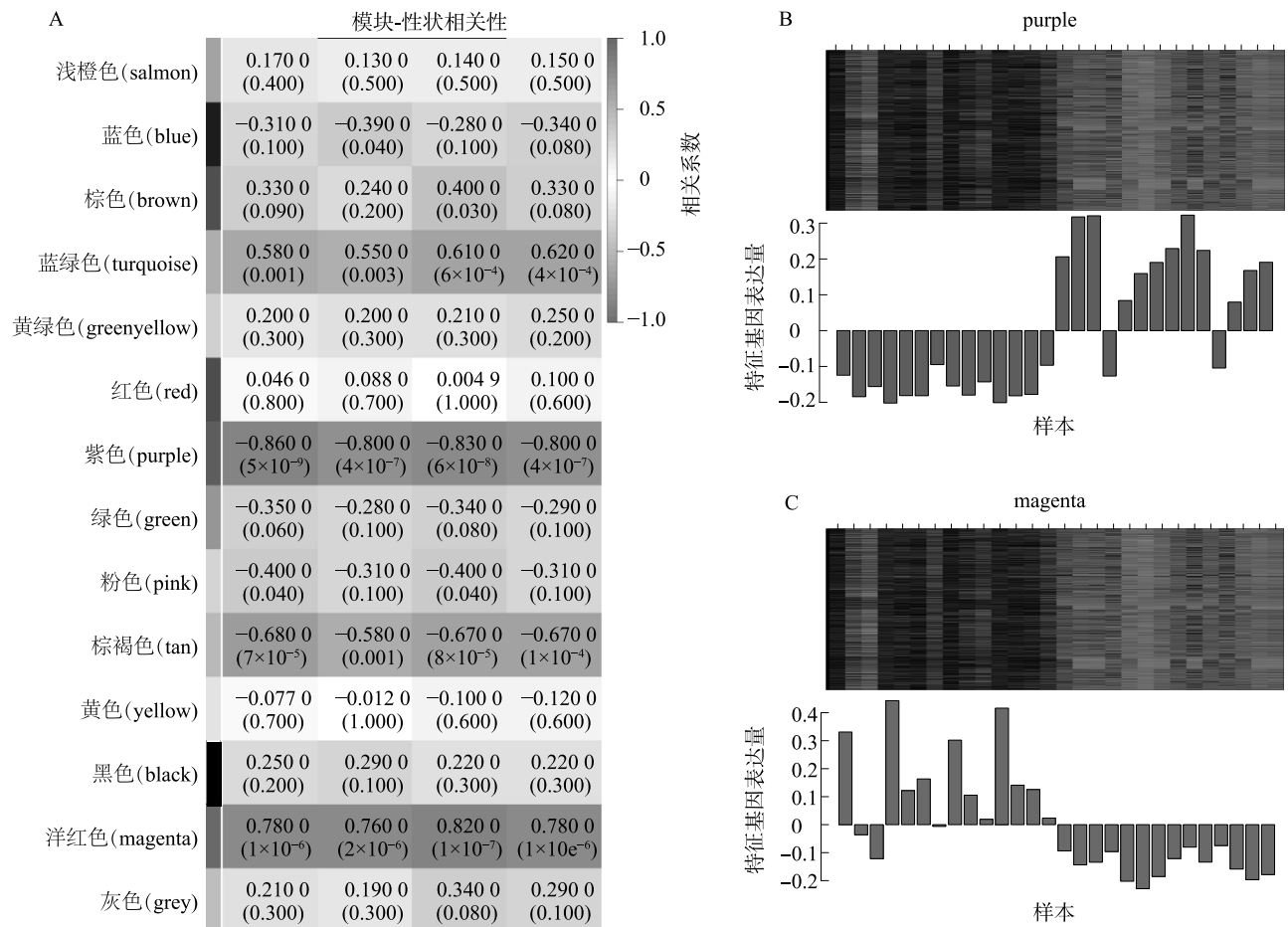
purple 模块系数最高 ($|r| > 0.80$, $P < 4 \times 10^{-7}$), magenta 模块次之 ($|r| > 0.76$, $P < 2 \times 10^{-6}$) (图 3A)。

purple 模块包含 1 109 个基因, 分布在 19 条染色体上, 各染色体基因数目为 25~92。比较 2 个品

种, purple 模块基因在大粒品种中双 11 种子和角果皮中表达量较低, 在中小粒品种中油 821 中表达量较高(图 3B)。对模块基因进行 GO 富集分析, 共富集到 108 个显著 GO 途径(图 4A), 包括苯丙氨酸氨基转移酶活性、天冬氨酸转氨酶活性、2-酮戊二酸转氨酶活性、硫双加氧酶活性和肉桂酸生物合成等(图 4B)。这些分子功能在控制种子的生长发育中有重要作用, 如苯丙氨酸参与幼苗早期细胞分裂生长和种子发育等重要过程^[29]; 天冬氨酸转氨酶(AAT)是合成氨基酸的一种关键酶, Zhou 等^[30]研究发现天冬氨酸转氨酶在水稻中过表达影响种子的氮代谢和氨基酸含量; 硫双加氧酶是拟南芥基因 *ETHE1* 编码的一种对种子胚胎和胚乳发育至关重要的酶类^[31]; Baleroni 等^[32]研究发现肉桂酸衍生物对甘蓝型油菜种子子叶的脂肪酸和总脂质积累有积

极作用。

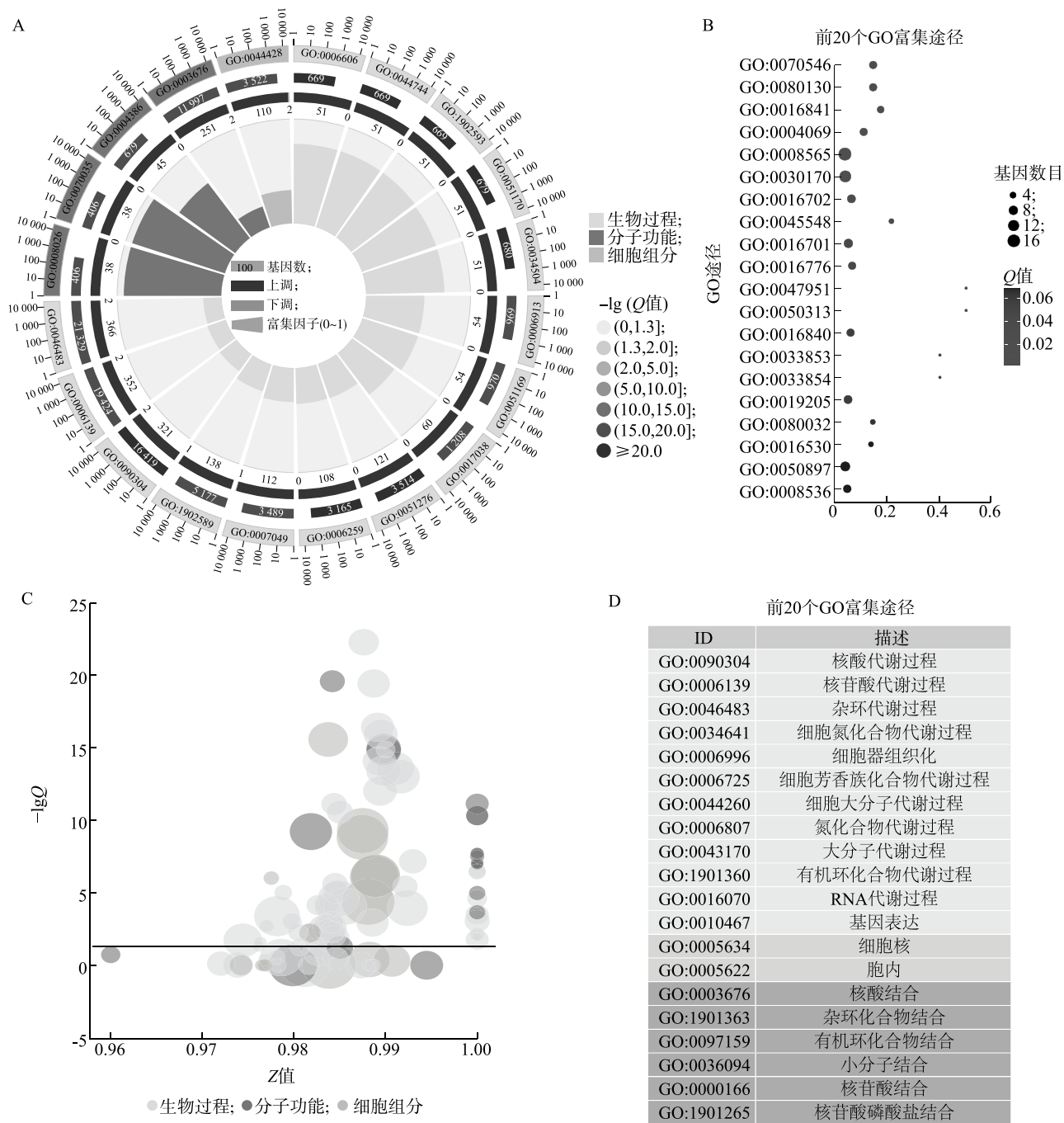
magenta 模块含有 1 114 个基因, 分布在 19 条染色体上, 各染色体基因数目为 23~127。与 purple 模块相反, magenta 模块基因在大粒品种中双 11 中表达丰度显著高于中油 821(图 3C)。对模块基因进行 GO 富集分析, 共富集到 521 个显著 GO term。图 4C 和图 4D 展示的是 magenta 模块中生物学过程、分子功能和细胞组分三大类 TOP 20 GO 通路气泡图, 其中核酸代谢过程、杂环代谢过程、细胞氮化合物代谢过程、细胞芳香族化合物代谢过程等代谢通路被显著富集。这些通路的基因参与了种子的发育过程, 如在模式植物拟南芥中, 焦磷酸酶的表达促进种子中蛋白质和油类物质的合成, *UPF1* RNA 解旋酶参与调控种子大小^[33-34]。



A: 模块与籽粒质量性状关联热图; B: purple 模块表达值热图与特征值条形图; C: magenta 模块表达值热图与特征值条形图。

图 3 基因共表达模块分析

Fig.3 Gene co-expression module analysis



A:紫色(purple)模块 GO 富集圈图;B:purple 模块 GO 富集分析中生物过程分类前 20 个 GO 富集途径;C:洋红色(magenta)模块 GO 富集气泡图。D:magenta 模块前 20 个 GO 富集途径。Z 值表示某个基因集合在特定生物过程或功能方面的显著性程度。

图 4 目标模块 GO 富集分析
Fig.4 Target module GO enrichment analysis

2.4 挖掘关联分析候选基因

基于中双 11 基因组注释信息,在 *Bn-A09-p29991443* 位点下游 0.17 Mb 和 0.18 Mb 处分别找到油菜角果长和籽粒质量已知基因 *ARF18* 和 *CYP78A9*。*ARF18* 编码 1 个生长素响应因子,

CYP78A9 编码 1 个细胞色素 P450 单加氧酶,两者均通过促进油菜角果伸长进而影响籽粒质量^[35-36]。

根据 Darmor 基因组的注释信息,在 *Bn-A02-p6564861* 位点上游约 0.100 Mb 处找到候选基因 *BnaA02g07770D*,其拟南芥同源基因 *AT5G58230*

(*MSII*) 为拟南芥的母性效应胚胎滞育基因,在植物胚乳和胚胎发生过程中起作用,直接影响后期种子的生长发育,从而导致籽粒质量改变^[37]。在位点 *Bn-A06-p19593266* 上游约 0.695 Mb 处找到候选基因 *BnaA06g21460D*,其拟南芥同源基因 *AT5G62000* (*ARF2*) 通过限制种皮细胞增殖影响籽粒大小^[38]。在 *Bn-A01-p15496639* 位点上游 0.635 Mb 处找到候选基因 *BnaA01g20420D*,其拟南芥同源基因 *AT3G48610* 编码 1 个非特异性磷脂酶 *NPC6*,过表达 *NPC6* 能显著提高亚麻荠的籽粒质量、含油量和单株产量^[39]。在 *Bn-A03-p8851142* 位点上游 0.122 Mb 处找到候选

基因 *BnaA03g17130D*,其拟南芥同源基因 *AT2G37260* (*TTG2*) 编码的 WRKY 转录因子表达于种皮中,通过增加种皮的细胞延伸从而促进种子的生长发育^[40]。在 *Bn-A07-p11611255* 位点上游 0.115 Mb 处找到候选基因 *BnaA07g16350D*,其拟南芥同源基因 *AT3G54320* (*WRI1*) 编码 1 个 AP2/ERWBP 类转录因子,通过增大种子体积和参与贮藏化合物的生物合成以增加种子质量^[41]。此外,还找到其他 16 个候选基因,包括拟南芥中已知籽粒质量调控基因 *CLV3*、*AHK4*、*FIS1*、*GLN1;1*、*TCTP1*、*FER*、*CKX1*、*EOD1*、*AHK2* 等在油菜中的同源拷贝(表 3)。

表 3 籽粒质量候选基因信息

Table 3 Information of candidate genes of seed weight

标记	候选基因	染色体	位置 (Mb)	基因-标记间距 (Mb)	拟南芥同源基因	
					基因名称	基因号
<i>Bn-A01-p15496639</i>	<i>BnaA01g20420D</i>	A01	12.94	0.635	<i>NPC6</i>	<i>AT3G48610</i>
<i>Bn-A01-p23472380</i>	<i>BnaA01g27710D</i>	A01	19.35	0.001	<i>TCTP1</i>	<i>AT3G16640</i>
<i>Bn-A02-p6564861</i>	<i>BnaA02g07770D</i>	A02	3.78	0.100	<i>MSII</i>	<i>AT5G58230</i>
<i>Bn-A03-p8851142</i>	<i>BnaA03g17130D</i>	A03	8.16	0.122	<i>TTG2</i>	<i>AT2G37260</i>
<i>Bn-A03-p22125583</i>	<i>BnaA03g41360D</i>	A03	20.96	0.243	<i>FER</i>	<i>AT3G51550</i>
<i>Bn-A06-p19593266</i>	<i>BnaA06g21460D</i>	A06	15.59	0.695	<i>ARF2</i>	<i>AT5G62000</i>
<i>Bn-A06-p23674542</i>	<i>BnaA06g34500D</i>	A06	22.66	0.135	<i>AHK4</i>	<i>AT2G01830</i>
<i>Bn-A07-p11611255</i>	<i>BnaA07g16350D</i>	A07	13.76	0.115	<i>WRI1</i>	<i>AT3G54320</i>
<i>Bn-A07-p17804261</i>	<i>BnaA07g26450D</i>	A07	19.65	0.198	<i>AT1G65030</i>	<i>AT1G65030</i>
<i>Bn-A09-p29991443</i>	<i>BnaA09G0559300ZS</i>	A09	57.33	0.166	<i>ARF18</i>	<i>AT3G61830</i>
	<i>BnaA09G0560100ZS</i>	A09	57.36	0.186	<i>CYP78A9</i>	<i>AT3G61880</i>
<i>Bn-scaff_20942_1-p52095</i>	<i>BnaC02g15230D</i>	C02	11.20	0.534	<i>CLV3</i>	<i>AT2G27250</i>
<i>Bn-scaff_16002_1-p1803014</i>	<i>BnaC03g23380D</i>	C03	12.57	0.449	<i>CKX1</i>	<i>AT2G41510</i>
<i>Bn-scaff_16217_1-p597569</i>	<i>BnaC04g20600D</i>	C04	21.92	0.223	<i>EOD1</i>	<i>AT3G63530</i>
<i>Bn-scaff_18062_1-p229981</i>	<i>BnaC04g29780D</i>	C04	31.11	0.335	<i>AHK2</i>	<i>AT5G35750</i>
<i>Bn-scaff_18903_1-p371596</i>	<i>BnaC04g50960D</i>	C04	47.53	0.811	<i>EOD3</i>	<i>AT2G46660</i>
<i>Bn-scaff_16414_1-p1774629</i>	<i>BnaC05g01310D</i>	C05	0.28	0.407	<i>FIS1</i>	<i>AT1G02580</i>
<i>Bn-scaff_18439_1-p315861</i>	<i>BnaC06g10000D</i>	C06	12.45	0.528	<i>GLN1;1</i>	<i>AT5G37600</i>
<i>Bn-scaff_17799_1-p2391172</i>	<i>BnaC06g36220D</i>	C06	34.11	0.691	<i>CKX5</i>	<i>AT1G75450</i>
<i>Bn-scaff_17799_1-p853567</i>	<i>BnaC06g38800D</i>	C06	35.74	0.507	<i>GRF2</i>	<i>AT1G78300</i>
<i>Bn-scaff_15705_1-p2279820</i>	<i>BnaC07g32270D</i>	C07	35.29	0.720	<i>DGAT</i>	<i>AT3G51520</i>
<i>Bn-A08-p10452462</i>	<i>BnaC08g12050D</i>	C08	16.68	0.621	<i>SHB1</i>	<i>AT4G25350</i>
<i>Bn-scaff_15576_1-p614226</i>	<i>BnaC09g38310D</i>	C09	41.71	0.499	<i>SMG7</i>	<i>AT5G19400</i>

2.5 挖掘 WGCNA 籽粒质量候选基因

利用软件 Cytoscape 对 purple 和 magenta 模块中的基因网络进行可视化表达(图 5)。在 purple 模块中,根据 $|KME| \geq 0.90$ 的标准筛选出 340 个枢纽基因。枢纽基因 *BnaA06g00850D* ($KME = 0.97$) 的拟南

芥同源基因 *AT1G53580* (*ETHE1*) 编码 1 个硫双加氧酶,调节种子中的硫化物水平,在种子胚胎和胚乳发育过程中发挥重要作用^[31]。枢纽基因 *BnaA01g00990D* ($KME = 0.92$) 的拟南芥同源基因为籽粒质量已知基因 *AT4G36860* (*DAR1*) (表 4), *DAR1*

包含拟南芥籽粒质量已知基因 *TTN5* 和 *SKP1* 等在油菜中的同源拷贝。基因表达量热图(图 6)显示,这些基因在中双 11 中表达量很低,而在中油 821 中表达量较高,特别是在开花后第 7 d、10 d 和 14 d 的籽粒和角果皮中,但在成熟的籽粒中表达量显著降低,表明它们在籽粒前期发育中发挥作用。



表 4 Purple 和 magenta 模块包含的籽粒质量已知基因

Table 4 Known seed weight genes in purple and magenta modules

油菜基因	染色体	位置 (Mb)	模块	KME	拟南芥同源基因
<i>BnaA01g00990D</i>	A01	0.55	purple(紫色)	0.92	<i>DAR1</i>
<i>BnaA01g14320D</i>	A01	7.24	purple	0.86	<i>HVA22D</i>
<i>BnaA03g58880D</i>	A03_random	1.95	magenta(洋红色)	0.81	<i>RPT2A</i>
<i>BnaA05g05220D</i>	A05	2.72	purple	0.93	<i>SKP1</i>
<i>BnaA05g14370D</i>	A05	8.85	magenta	0.72	<i>ARF2</i>
<i>BnaA06g00850D</i>	A06	0.60	purple	0.97	<i>ETHE1</i>
<i>BnaA06g14090D</i>	A06	7.56	magenta	0.77	<i>ARF2</i>
<i>BnaA07g36220D</i>	A07_random	0.21	purple	0.95	<i>TTN5</i>
<i>BnaA07g09480D</i>	A07	9.26	magenta	0.81	<i>GLN1;2</i>
<i>BnaAnnng16850D</i>	Ann_random	17.92	magenta	0.73	<i>LNG2</i>
<i>BnaC01g30750D</i>	C01	29.23	magenta	0.87	<i>ICE1</i>
<i>BnaC02g44260D</i>	C02_random	0.08	magenta	0.96	<i>SMG7</i>
<i>BnaC03g25530D</i>	C03	14.34	magenta	0.78	<i>BRM</i>
<i>BnaC03g61610D</i>	C03	50.80	purple	0.75	<i>SPATULA</i>
<i>BnaC06g10000D</i>	C06	11.92	purple	0.91	<i>GLN1;1</i>
<i>BnaC08g18690D</i>	C08	21.77	magenta	0.71	<i>DA1</i>
<i>BnaC09g05450D</i>	C09	3.20	magenta	0.75	<i>ARF2</i>

KME:模块身份。

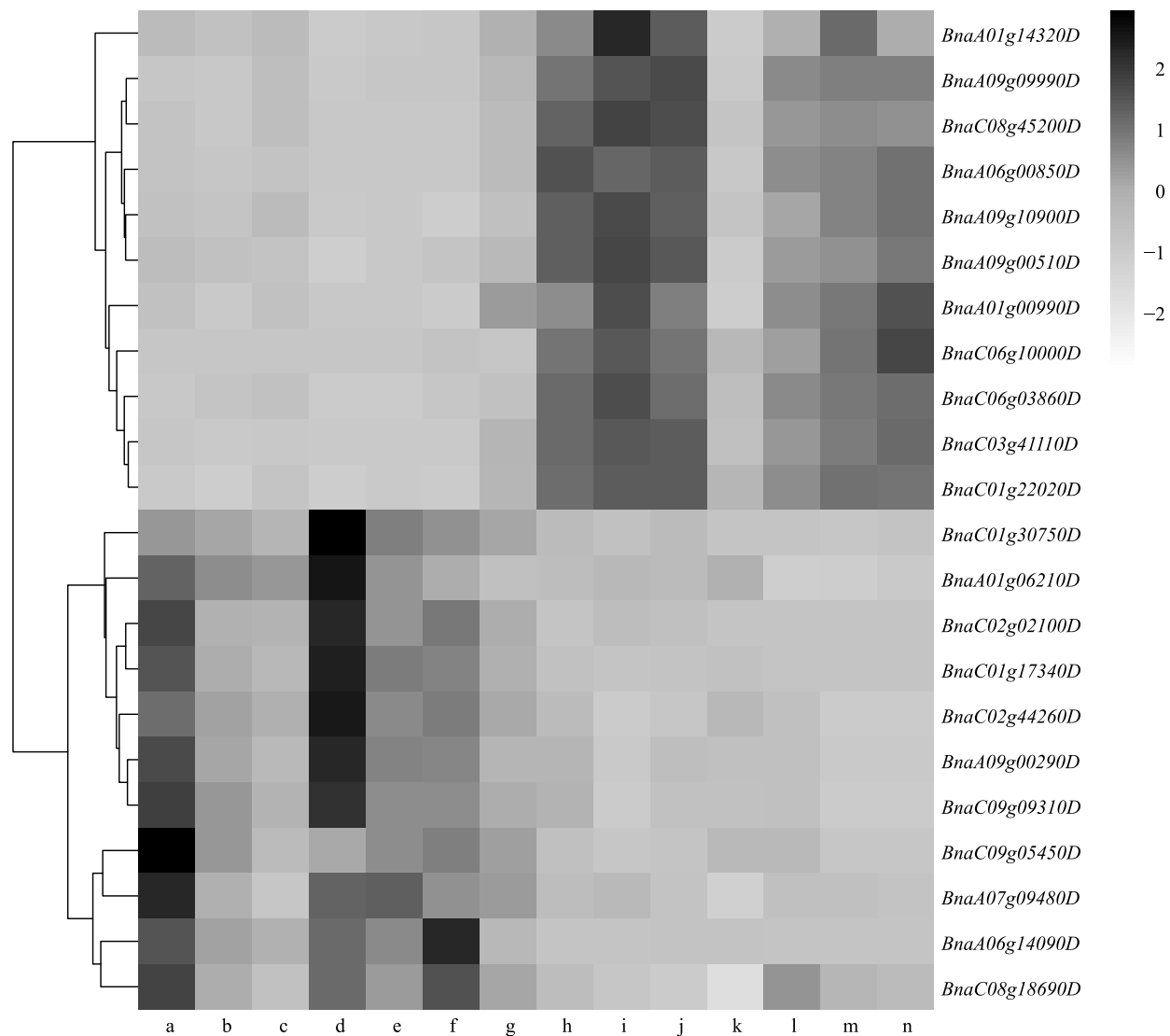
在 magenta 模块中,根据 $|KME| \geq 0.90$ 的标准共筛选到 149 个模块枢纽基因,其中枢纽基因 *BnaC02g44260D* ($KME = 0.96$) 的拟南芥同源基因为籽粒质量已知基因 *AT5G19400* (*SMG7*) (表 4),编码减数分裂所必需的蛋白质 *SMG7*, *SMG7* 的缺失会引起染色体去密集化和减数分裂纺锤体的异常重排,从而导致胚死亡,影响籽粒发育^[44], *BnaC02g44260D* 在 C09 染色体的同源基因 *BnaC9.SMG7b* 也已被报道影响油菜每角粒数、籽粒质量等性状^[45]。模块基因 *BnaC08g18690D* 的拟南芥同源基因为籽粒质量已知基因 *AT1G19270* (*DA1*),编码 1 个泛素受体,在调节胚乳种皮细胞再复制中发挥作用。在甘蓝型油菜中降低 *DA1* 的表达量可以提高种子产量和生物量^[46]。模块基因 *BnaA06g14090D*、*BnaA05g14370D* 和 *BnaC09g05450D* 共同对应的拟南芥同源基因为 *AT5G62000* (*ARF2*),通过限制种皮细胞增殖而影响籽粒大小^[38]。此外, magenta 模块还包含拟南芥籽粒质量已知基因 *GLN1;2*、*RPT2A* 和 *BRM* 等在油菜中的同源拷贝。基因表达量热图(图 6)显示,这些基因在中油 821 中表达量很低,而在中双 11 中表达量较高。在角果皮中,它们的表达量随着籽粒发育进程逐渐降低。在籽粒中,这些基

因在开花后第 7 d 和 45 d 表达量较高,而在第 10 d 和 14 d 表达量显著降低,这表明它们在籽粒的发育早期和末期发挥作用。

2.6 整合 2 种分析方法挖掘候选基因

整合 GWAS 和 WGCNA 2 种分析方法进行分析,结果表明,在 42 个显著关联位点的 LD 置信区间内找到 90 个与籽粒质量相关的模块基因,其中 49 个属于 magenta 模块,41 个属于 purple 模块(表 5)。对比它们的拟南芥同源基因功能注释,发现部分基因在种子的各项发育过程中起着决定性作用。在 A01 染色体位点 *Bn-A01-p3061223* 下游 0.120 Mb 处找到 magenta 模块基因 *BnaA01g06210D*,其拟南芥同源基因 *AT4G30930* (*NFD1*)编码 1 个定位在线粒体的核糖体蛋白质,基因突变后影响雌雄配子的发育^[47]。在 A07 染色体位点 *Bn-A02-p305007* 下游 0.170 Mb 处找到 magenta 模块基因 *BnaA07g14990D*,其拟南芥同源基因 *AT5G40480* (*EMB3012*)与胚发育缺陷相关,基因在种子和胚中表达量较高^[48]。在 A07 染色体位点 *Bn-A10-p11601681* 下游 0.06 Mb 处找到 purple 模块基因 *BnaA07g03030D*,其拟南芥同源基因 *AT2G17800* (*ROP3*)编码 1 个 GTP 结合蛋白质,参与生长素激活的 Aux/IAA 蛋白质水解途径,基因功能突变后导致胚发育异常^[49]。在 C03 染

色体位点 *Bn-scaff_26320_1-p269450* 下游 0.14 Mb 处找到 magenta 模块基因 *BnaC03g46120D*,其拟南芥同源基因 *AT3G01610(CDC48C)* 参与细胞分裂循环,与胚发育缺陷有关^[50]。



a:中油 821_角果皮_14 d;b:中油 821_角果皮_10 d;c:中油 821_角果皮_7 d;d:中油 821_种子_45 d;e:中油 821_种子_14 d;f:中油 821_角果皮_10 d;g:中油 821_种子_7 d;h:中双 11_角果皮_14 d;i:中双 11_角果皮_10 d;j:中双 11_角果皮_7 d;k:中双 11_种子_45 d;l:中双 11_种子_14 d;m:中双 11_种子_10 d;n:中双 11_种子_7 d。

图 6 Purple 和 magenta 模块内的基因表达量热图
Fig.6 Heatmap of gene expression in purple and magenta modules

表 5 显著关联位点置信区间内的 magenta 和 purple 模块基因

标记	染色体	位置 (Mb)	油菜基因	位置 (Mb)	模块
<i>Bn-A01-p1156979</i>	A01	0.76	<i>BnaA01g01170D</i>	0.62	洋红色 (magenta)
<i>Bn-A01-p1156979</i>	A01	0.76	<i>BnaA01g01520D</i>	0.81	magenta
<i>Bn-A01-p1440009</i>	A01	1.04	<i>BnaA01g02290D</i>	1.17	magenta
<i>Bn-A01-p1440009</i>	A01	1.04	<i>BnaA01g02330D</i>	1.19	magenta
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g05990D</i>	2.77	magenta

续表 5 Continued 5

标记	染色体	位置(Mb)	油菜基因	位置(Mb)	模块
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g06040D</i>	2.80	紫色 (purple)
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g06210D</i>	2.89	magenta
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g06240D</i>	2.89	magenta
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g06380D</i>	2.94	purple
<i>Bn-A01-p3061223</i>	A01	2.77	<i>BnaA01g06390D</i>	2.95	purple
<i>Bn-A01-p9621623</i>	A01	8.23	<i>BnaA01g16250D</i>	8.32	magenta
<i>Bn-A01-p12222806</i>	A01	10.41	<i>BnaA01g18800D</i>	10.30	magenta
<i>Bn-A01-p12222806</i>	A01	10.41	<i>BnaA01g18930D</i>	10.39	magenta
<i>Bn-A02-p6564861</i>	A02	3.78	<i>BnaA02g07720D</i>	3.67	magenta
<i>Bn-A03-p4352837</i>	A03	3.89	<i>BnaA03g08650D</i>	3.92	magenta
<i>Bn-A03-p4352837</i>	A03	3.89	<i>BnaA03g08910D</i>	4.03	purple
<i>Bn-A03-p6586436</i>	A03	5.88	<i>BnaA03g13100D</i>	5.95	purple
<i>Bn-A03-p6586436</i>	A03	5.88	<i>BnaA03g13310D</i>	6.05	purple
<i>Bn-A03-p8851142</i>	A03	8.16	<i>BnaA03g16980D</i>	7.97	purple
<i>Bn-A03-p8851142</i>	A03	8.16	<i>BnaA03g17260D</i>	8.10	purple
<i>Bn-A03-p8851142</i>	A03	8.16	<i>BnaA03g17360D</i>	8.15	magenta
<i>Bn-A03-p22125583</i>	A03	20.96	<i>BnaA03g41920D</i>	21.06	purple
<i>Bn-A03-p24494224</i>	A03	23.00	<i>BnaA03g45320D</i>	23.04	magenta
<i>Bn-A05-p2610006</i>	A05	2.72	<i>BnaA05g05220D</i>	2.72	purple
<i>Bn-A06-p19593266</i>	A06	15.59	<i>BnaA06g22170D</i>	15.49	purple
<i>Bn-A06-p19593266</i>	A06	15.59	<i>BnaA06g22180D</i>	15.49	purple
<i>Bn-A06-p19593266</i>	A06	15.59	<i>BnaA06g22190D</i>	15.49	purple
<i>Bn-A06-p23674542</i>	A06	22.66	<i>BnaA06g34020D</i>	22.53	magenta
<i>Bn-A06-p23674542</i>	A06	22.66	<i>BnaA06g34380D</i>	22.71	magenta
<i>Bn-A06-p23674542</i>	A06	22.66	<i>BnaA06g34550D</i>	22.83	magenta
<i>Bn-Scaffold002856-p361</i>	A07	0.59	<i>BnaA07g01030D</i>	0.72	magenta
<i>Bn-Scaffold002856-p361</i>	A07	0.59	<i>BnaA07g01040D</i>	0.73	magenta
<i>Bn-A10-p11601681</i>	A07	2.57	<i>BnaA07g03030D</i>	2.63	purple
<i>Bn-A07-p3599603</i>	A07	5.59	<i>BnaA07g05000D</i>	5.43	magenta
<i>Bn-A07-p3599603</i>	A07	5.59	<i>BnaA07g05180D</i>	5.54	magenta
<i>Bn-A07-p5518604</i>	A07	7.38	<i>BnaA07g07210D</i>	7.49	purple
<i>Bn-A07-p10557557</i>	A07	11.74	<i>BnaA07g13070D</i>	11.70	magenta
<i>Bn-A07-p10557557</i>	A07	11.74	<i>BnaA07g13250D</i>	11.78	magenta
<i>Bn-A07-p10557557</i>	A07	11.74	<i>BnaA07g13390D</i>	11.89	magenta
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	<i>BnaA07g14440D</i>	12.75	purple
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	<i>BnaA07g14740D</i>	12.95	magenta
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	<i>BnaA07g14870D</i>	13.03	purple
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	<i>BnaA07g14930D</i>	13.05	magenta
<i>Bn-A02-p305007</i>	A07	12.93	<i>BnaA07g14990D</i>	13.10	magenta
<i>Bn-A07-p11611255</i>	A07	13.76	<i>BnaA07g15870D</i>	13.61	magenta
<i>Bn-A07-p11611255</i>	A07	13.76	<i>BnaA07g16070D</i>	13.70	magenta
<i>Bn-A07-p18196996</i>	A07	20.09	<i>BnaA07g27830D</i>	20.19	magenta
<i>Bn-A08-p8529251</i>	A08	7.38	<i>BnaA08g07390D</i>	7.41	purple
<i>Bn-A08-p8529251</i>	A08	7.38	<i>BnaA08g07400D</i>	7.42	purple

续表 5 Continued 5

标记	染色体	位置(Mb)	油菜基因	位置(Mb)	模块
<i>Bn-A08-p13284369</i>	A08	11.05	<i>BnaA08g12420D</i>	11.06	purple
<i>Bn-A08-p20343735</i>	A08	17.81	<i>BnaA08g25730D</i>	17.63	magenta
<i>Bn-A08-p20343735</i>	A08	17.81	<i>BnaA08g25830D</i>	17.68	magenta
<i>Bn-A08-p20343735</i>	A08	17.81	<i>BnaA08g26270D</i>	17.83	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g10590D</i>	5.41	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g10630D</i>	5.43	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g10660D</i>	5.43	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g10810D</i>	5.55	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g10900D</i>	5.59	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g11000D</i>	5.67	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g11010D</i>	5.68	purple
<i>Bn-A09-p7329993</i>	A09	5.54	<i>BnaA09g11040D</i>	5.69	purple
<i>Bn-A10-p15021776</i>	A10	14.97	<i>BnaA10g22470D</i>	15.15	purple
<i>Bn-A10-p15167470</i>	A10	15.10	<i>BnaA10g22470D</i>	15.15	purple
<i>Bn-A10-p15167470</i>	A10	15.10	<i>BnaA10g22660D</i>	15.21	purple
<i>Bn-scaff_16002_1-p1803014</i>	C03	12.57	<i>BnaC03g22550D</i>	12.46	purple
<i>Bn-scaff_16002_1-p1803014</i>	C03	12.57	<i>BnaC03g22570D</i>	12.46	purple
<i>Bn-scaff_26320_1-p269450</i>	C03	30.92	<i>BnaC03g46120D</i>	31.06	magenta
<i>Bn-scaff_16217_1-p597569</i>	C04	21.92	<i>BnaC04g21090D</i>	22.04	magenta
<i>Bn-scaff_18062_1-p229981</i>	C04	31.11	<i>BnaC04g29550D</i>	31.11	purple
<i>Bn-scaff_16414_1-p1774629</i>	C05	0.28	<i>BnaC05g00760D</i>	0.40	purple
<i>Bn-scaff_20901_1-p2029631</i>	C05	1.97	<i>BnaC05g04170D</i>	2.04	magenta
<i>Bn-scaff_20901_1-p1279675</i>	C05	2.71	<i>BnaC05g05550D</i>	2.70	purple
<i>Bn-scaff_20901_1-p1279675</i>	C05	2.71	<i>BnaC05g05730D</i>	2.77	magenta
<i>Bn-scaff_18439_1-p315861</i>	C06	12.45	<i>BnaC06g10250D</i>	12.38	magenta
<i>Bn-scaff_16064_1-p938130</i>	C06	24.70	<i>BnaC06g22820D</i>	24.75	purple
<i>Bn-scaff_17799_1-p2391172</i>	C06	34.11	<i>BnaC06g34510D</i>	33.96	magenta
<i>Bn-scaff_17799_1-p2391172</i>	C06	34.11	<i>BnaC06g35240D</i>	34.30	purple
<i>Bn-scaff_17799_1-p853567</i>	C06	35.74	<i>BnaC06g37680D</i>	35.61	magenta
<i>Bn-scaff_17799_1-p853567</i>	C06	35.74	<i>BnaC06g37980D</i>	35.75	magenta
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	<i>BnaC09g02310D</i>	1.32	magenta
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	<i>BnaC09g02500D</i>	1.41	magenta
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	<i>BnaC09g02730D</i>	1.59	purple
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	<i>BnaC09g02810D</i>	1.64	magenta
<i>Bn-scaff_17526_1-p1066214</i>	C09	1.49	<i>BnaC09g02850D</i>	1.66	magenta
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	<i>BnaC09g04490D</i>	2.57	magenta
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	<i>BnaC09g04680D</i>	2.70	magenta
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	<i>BnaC09g04770D</i>	2.77	magenta
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	<i>BnaC09g04800D</i>	2.79	magenta
<i>Bn-scaff_19783_1-p279292</i>	C09	2.77	<i>BnaC09g05010D</i>	2.89	magenta
<i>Bn-scaff_15576_1-p614226</i>	C09	41.71	<i>BnaC09g38900D</i>	41.65	purple

3 讨论

A-D test 是一种非参数统计模型,利用中值替换均值,解决了关联分析中基因型分布不均匀造成的偏差,提高了检测精度^[51]。相较于其他模型,A-D test 模型对于效应小、数据非正态分布的基因尤其有效。本研究对 A-D Test 设置了严格的显著性阈值(阈值=0.01/总标记数),检测到 19 个显著位点,其中 14 个位点在至少 2 个环境中被重复检测到,4 个位点在 3 个环境中均被重复检测到。与另外 2 个模型的结果比较,8 个位点与 GLM 重叠,2 个位点与 MLM 重叠。同时,本研究在 6 个 A-D test 显著位点置信区间内找到 *ARF18*、*AHK4*、*FIS1*、*GLN1;1* 和 *ARF2* 等拟南芥已知籽粒质量基因的同源基因。这些结果证实了 A-D test 模型的准确性和可靠性。合并 3 个模型结果共得到 71 个显著位点,挖掘出 *ARF2*、*NPC6*、*TTG2*、*WR11* 和 *CLV3* 等 23 个拟南芥已知籽粒质量基因的同源基因。同时, *BnA06-p23674542* ($-\lg P=5.97\sim 7.14$) 等位点在多个环境和多个模型中被检测到,但置信区间内尚未找到籽粒质量已知基因,后续可作为研究重点进行深入探究。

随着测序技术的发展,利用共表达网络对转录组进行系统研究,是目前比较流行的分析方法。WGCNA 能够聚类表达模式相似的基因,构建与目标性状关联、具有生物学意义的共表达模块,进而挖掘共表达网络中的关键基因。在本研究中,我们利用大粒品种中双 11 和中小粒品种中油 821 的 28 份转录组数据进行 WGCNA,挖掘到 purple 和 magenta 2 个模块与籽粒质量表型显著相关。2 个模块基因显著富集条目包括苯丙氨酸氨基转移酶活性、硫双加氧酶活性、肉桂酸生物合成和焦磷酸酶活性等,这些酶活性在种子生长发育过程中都起到重要作用。2 个模块的枢纽基因如 *BnaA06g00850D*、*BnaA01g00990D*、*BnaA07g36220D* 和 *BnaC06g10000D* 等拟南芥同源基因 *ETHE1*、*DAR1*、*TTN5* 和 *GLN1;1* 等已被报道参与籽粒质量调控,magenta 模块枢纽基因 *BnaC02g44260D* 是油菜已克隆每角粒数、籽粒质量调控基因 *BnaC9.SMG7b* 在 C02 染色体的同源拷贝。这些结果证实了通过 WGCNA 挖掘油菜籽粒质量性状调控基因的可行性和可靠性。

GWAS 分析的难点之一是在显著位点置信区间内高效鉴定候选基因,而 WGCNA 能够特异地筛选出与目标性状关联的差异表达基因,2 种分析方法

具有很好的互补性。Farber^[52]首次结合 GWAS 和 WGCNA 挖掘调控骨密度的相关基因,对关联候选基因构建共表达网络,挖掘到 3 个与性状显著相关的基因模块。在油菜的研究中,越来越多的研究者也采取相同策略,如王艳花等^[53]结合 GWAS 和 WGCNA 2 种方法筛选出调控油菜生物产量的候选基因 *BnaA07g19320D*、*BnC03g33610D* 和 *BnC03g73810D* 等,鲜小华等^[20]结合 GWAS 和 WGCNA 2 种方法挖掘出甘蓝型油菜黄籽候选基因 *BnATCAD4*、*BnF3H* 和 *BnANS* 等。在本研究中,我们在 42 个显著位点的置信区间内找到 90 个属于 2 个目标模块(purple 模块和 magenta 模块)的基因。尽管这些基因尚未被报道直接参与籽粒质量调控,但它们在大粒品种中双 11 和中小粒品种中油 821 的籽粒中表达丰度不同,部分基因如 *BnaA01g06210D*、*BnaA07g14990D*、*BnaA07g03030D* 等直接或间接调节种子、胚胎等相关发育进程,后续工作可以深入挖掘这些基因在籽粒质量调控中的具体功能。

4 结论

本研究利用 A-D Test 模型对 496 份油菜的籽粒质量进行 GWAS 分析,共检测到 19 个显著位点。整合前期 MLM 和 GLM 模型结果后共得到 71 个位点,联合解释 50.1%的表型变异。在 21 个关联位点置信区间内找到 *SMG7*、*ARF2*、*NPC6*、*TTG2*、*WR11* 等油菜、拟南芥中已被报道的籽粒质量基因的同源基因。利用大粒品种中双 11 和中小粒品种中油 821 的 28 份转录组数据,构建了 13 个共表达模块,其中 magenta 和 purple 模块与籽粒质量表型相关性最高。在 2 个目标模块中挖掘出 *BnaA06g00850D*、*BnaA01g00990D*、*BnaC06g10000D*、*BnaC02g44260D* 和 *BnaC08g18690D* 等籽粒质量候选基因。整合 GWAS 和 WGCNA 的分析结果,在 42 个显著位点的置信区间内找到 90 个属于 2 个籽粒质量相关的模块基因,其中 *BnaA01g06210D*、*BnaA07g14990D* 和 *BnaA07g03030D* 等参与调控种子、胚胎等相关发育进程;同时,A-D Test 挖掘的多个大效应位点如 *BnA06-p23674542* 等置信区间内尚未找到与籽粒质量相关的已知基因,值得后续深入挖掘。

参考文献:

- [1] 何微,李俊,王晓梅,等. 全球油菜供需现状与我国油菜产

- 业问题、对策[J]. 中国油脂, 2022, 47(2): 1-7.
- [2] 王健胜, 韦世豪, 田建华, 等. 近年来中国冬油菜主要农艺性状的演变分析[J]. 西北农业学报, 2012, 21(11): 75-82.
- [3] 祝利霞, 张冬晓, 傅廷栋, 等. 20年来中国冬油菜新品种产量和抗病性状分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(24): 375-380.
- [4] 王浩. 甘蓝型油菜千籽粒质量的遗传分析和主效 QTL cqSW.A03-2 的精细定位[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [5] GALLARDO K, THOMPSON R, BURSTIN J. Reserve accumulation in legume seeds[J]. C R Biol, 2008, 331(10): 755-762.
- [6] SUN X, SHANTHARAJ D, KANG X, et al. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development[J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13(5): 611-620.
- [7] GREGORIO O, DARIO P, IGNACIO E, et al. Networks controlling seed size in *Arabidopsis*[J]. Plant Reprod, 2015, 28(1): 17-32.
- [8] WENG J F, GU S H, WAN X Y, et al. Isolation and initial characterization of GW5, a major QTL associated with rice grain width and weight[J]. Cell Research, 2008, 18(12): 1199-1209.
- [9] CHEN W, ZHAO K Q, ZHANG G J, et al. Extra-large seed germplasm of *Brassica napus* created through microspore culture[J]. J Environ Eng Sci, 2016, 5(2): 90-96.
- [10] 王瑞, 李加纳, 唐章林, 等. 甘蓝型黄籽油菜产量性状的遗传分析[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 37-38.
- [11] 崔嘉成, 刘佳, 梅德圣, 等. 甘蓝型油菜裂角相关性状的遗传与相关分析[J]. 作物学报, 2013, 39(10): 1791-1798.
- [12] 戚存扣, 盖钧镒, 傅寿仲, 等. 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 千籽粒重性状遗传体系分析[J]. 作物学报, 2004, 30(12): 1274-1277.
- [13] 李娜. 甘蓝型油菜籽粒重母体调控机理解析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [14] 杨小红, 严建兵, 郑艳萍, 等. 植物数量性状关联分析研究进展[J]. 作物学报, 2007, 33(4): 523-530.
- [15] LU K, PENG L, LU J H, et al. Genome-wide association and transcriptome analyses reveal candidate genes underlying yield-determining traits in *Brassica napus*[J]. Front Plant Sci, 2017, 15(8): 206-221.
- [16] DONG H L, TAN C D, LI Y Z, et al. Genome-wide association study reveals both overlapping and independent genetic loci to control seed weight and silique length in *Brassica napus* L.[J]. Front Plant Sci, 2018, 18(9): 921.
- [17] KHAN S U, YANGMIAO J, LIU S, et al. Genome-wide association studies in the genetic dissection of ovule number, seed number, and seed weight in *Brassica napus* L.[J]. Ind Crops Prod, 2019, 15(142): 111877.
- [18] 林升丽. 全基因组和全转录组关联分析解析油菜千籽粒重自然变异的遗传机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [19] MA J, WEI L J, LIN A, et al. The alternative splicing landscape of *Brassica napus* infected with *Leptosphaeria maculans*[J]. Genes, 2019, 10(4): 296-311.
- [20] 鲜小华, 王嘉, 徐新福, 等. 整合 GWAS 和 WGCNA 分析挖掘甘蓝型油菜黄籽微效作用位点[J]. 作物学报, 2018, 44(8): 1105-1113.
- [21] 刘景森. 整合 GWAS 和 WGCNA 筛选甘蓝型油菜生物产量候选基因[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [22] 田贵福, 刘依林, 唐欢, 等. 利用共表达分析挖掘控制籽粒重的候选基因及 *SWHI* 对种子籽粒重的初步验证[C]. 南京: 中国植物学会, 2022.
- [23] 张春, 赵小珍, 庞承珂, 等. 甘蓝型油菜千籽粒重全基因组关联分析[J]. 作物学报, 2021, 47(4): 650-659.
- [24] PRUIM R J, WELCH R P, SANNA S, et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results[J]. Bioinformatics, 2010, 26(18): 2336-2337.
- [25] PETER L, STEVE H. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9(1): 1-13.
- [26] REED W J. A stochastic model for the spread of a sexually transmitted disease which results in a scale-free network[J]. Math Biosci, 2006, 201(1/2): 3-14.
- [27] PAUL S, ANDREW M, OWEN O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [28] SUN C M, WANG B Q, YAN L, et al. Genome-wide association study provides insight into the genetic control of plant height in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1102-1115.
- [29] PERKOWSKI M C, WARPEHA K M. Phenylalanine roles in the seed-to-seedling stage: not just an amino acid[J]. Plant Sci, 2019, 289: 110223.
- [30] ZHOU Y, CAI H M, XIAO J H, et al. Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds[J]. Theor Appl Genet, 2009, 118(7): 1381-1390.
- [31] HOLDORF M M, OWEN H A, LIEBER S R, et al. *Arabidopsis* *ETHE1* encodes a sulfur dioxygenase that is essential for embryo and endosperm development[J]. Plant Physiol, 2012, 160(1): 226-236.
- [32] BALERONI C R S, FERRARESE M L L, SOUZA N E, et al. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives[J]. Biol Plantarum, 2000, 43(2): 313-316.
- [33] MASATO Y, TERUMI N, KENZO N. *Arabidopsis* *UPFI* RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(5): 572-580.
- [34] MEYER K, STECCA K L, EWELL HICKS K, et al. Oil and protein accumulation in developing seeds is influenced by the expression of a cytosolic pyrophosphatase in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2012, 159(3): 1221-1234.
- [35] 石柳柳. 甘蓝型油菜角果长和籽粒重主效 QTL qSLWA9 的克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.

- [36] 孙程明,陈松,彭琦,等. 甘蓝型油菜角果长度性状的全基因组关联分析[J]. 作物学报, 2019, 45(9):1303-1310.
- [37] 彭柳. 不同生境下影响甘蓝型油菜收获指数的相关产量性状基因定位[D]. 重庆:西南大学, 2016.
- [38] MARIE C S, MELISSA S, SUSHMA T, et al. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs[J]. Development, 2006, 133(2): 251-261.
- [39] GUANGQIN C, CHUCHUAN F, SHENG L, et al. Nonspecific phospholipase C6 increases seed oil production in oilseed *Brassicaceae* plants[J]. New Phytol, 2020, 226(4): 1055-1073.
- [40] JOHNSON C S, KOLEVSKI B, SMYTH D R. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. Plant Cell, 2002, 14(6): 1359-1375.
- [41] AN D, SUH M C. Overexpression of *Arabidopsis WRI1* enhanced seed mass and storage oil content in *Camelina sativa*[J]. Plant Biotechnol Rep, 2015, 9(3): 137-148.
- [42] LI N, LI Y. Signaling pathways of seed size control in plants[J]. Curr Opin Plant Biol, 2016, 33: 23-32.
- [43] GUAN M, MØLLER I S, SCHJOERRING J K. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in *Arabidopsis*[J]. J Exp Bot, 2015, 66(1): 203-212.
- [44] NINA R, SVETLANA A, JASNA P, et al. *Arabidopsis SMG7* protein is required for exit from meiosis[J]. J Cell Sci, 2008, 121(13): 2208-2216.
- [45] SHIPENG L, LEI C, LIWU Z, et al. *BnaC9.SMG7b* functions as a positive regulator of the number of seeds per silique in *Brassica napus* by regulating the formation of functional female gametophytes[J]. Plant Physiol, 2015, 169(4): 2744-2760.
- [46] WANG J L, TANG M Q, CHEN S, et al. Down-regulation of *BnDA1*, whose gene locus is associated with the seeds weight, improves the seeds weight and organ size in *Brassica napus*[J]. Plant Biotechnol J, 2017, 15(8): 1024-1033.
- [47] PORTEREIKO M F, SANDAKLIE-NIKOLOVA L, LLOYD A, et al. *NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1* encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization[J]. Plant Physiol, 2006, 141(3): 957-965.
- [48] MEINKE D W. Genome-wide identification of *EMBRYO-DEFECTIVE (EMB)* genes required for growth and development in *Arabidopsis*[J]. New Phytol, 2020, 226(2): 306-325.
- [49] HUANG J B, LIU H, CHEN M, et al. *ROP3* GTPase contributes to polar auxin transport and auxin responses and is important for embryogenesis and seedling growth in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2014, 26(9): 3501-3518.
- [50] AKER J, BORST J W, KARLOVA R, et al. The *Arabidopsis* thaliana AAA protein *CDC48A* interacts *in vivo* with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane[J]. J Struct Biol, 2006, 156(1): 62-71.
- [51] NING Y, YANLI L, XIAOHONG Y, et al. Genome wide association studies using a new nonparametric model reveal the genetic architecture of 17 agronomic traits in an enlarged maize association panel[J]. PLoS Genet, 2014, 10(9): e1004573.
- [52] FARBER C R. Systems-level analysis of genome-wide association data[J]. G3-Genes Genom Genet, 2013, 3(1): 119-129.
- [53] 王艳花,刘景森,李加纳. 整合 GWAS 和 WGCNA 筛选鉴定甘蓝型油菜生物产量候选基因[J]. 作物学报, 2021, 47(8): 1491-1510.

(责任编辑:陈海霞)