

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04136

甘蓝型油菜千粒重全基因组关联分析

张春^{1,2} 赵小珍^{1,2} 庞承珂^{1,2} 彭门路^{1,2} 王晓东² 陈锋²
张维² 陈松² 彭琦² 易斌³ 孙程明^{2,3,*} 张洁夫^{2,*}
傅廷栋³

¹ 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; 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 / 中国江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210014; ³ 华中农业大学植物科学技术学院 / 作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070

摘要: 千粒重是油菜产量构成的重要因素之一。本研究利用高通量 SNP 芯片对 496 份具有代表性的油菜种质资源进行基因型分析, 考察群体在 3 个环境(14NJ、15TZ、16TZ)中的千粒重表型, 利用混合线性模型(mixed linear model, MLM)和一般线性模型(general linear model, GLM)进行全基因组关联分析。结果表明, 本群体在 3 个环境中千粒重的广义遗传力为 63.12%。MLM 模型检测到 6 个显著位点, 解释 28.92% 的表型变异; GLM 模型检测到 61 个显著位点, 解释 47.08% 的表型变异。合并共同位点后得到 62 个显著位点, 联合解释 47.31% 的表型变异。这些位点分布在基因组所有染色体上, 在 A07、A03 和 C06 染色体上分别检测到数目最多的 9、8 和 7 个位点。其中效应最大的位点 Bn-scaff_17526_1-p1066214 位于 C09 染色体, 在 MLM 和 GLM 模型中表型贡献值分别为 5.55% 和 15.26%。21 个位点与前人报道的 QTL 重叠, 其中 8 个位点得到至少 2 个群体的验证。其余 41 个位点为新鉴定的位点, 其中多个位点效应高且在多环境中被检测到, 如位点 Bn-A03-p560769、Bn-scaff_15743_1-p599416 和 Bn-scaff_15743_1-p590955 等。在 11 个位点附近找到 DGAT、EOD3、AGL61、WR11、DA2、RAVI 等拟南芥已报道千粒重基因的同源基因。本研究结果有助于解析甘蓝型油菜千粒重的遗传基础, 为研究千粒重的调控机制、指导千粒重的遗传改良奠定基础。

关键词: 甘蓝型油菜; 千粒重; 产量; 关联分析; SNP 标记

Genome-wide association study of 1000-seed weight in rapeseed (*Brassica napus* L.)

ZHANG Chun^{1,2}, ZHAO Xiao-Zhen^{1,2}, PANG Cheng-Ke^{1,2}, PENG Men-Lu^{1,2}, WANG Xiao-Dong², CHEN Feng², ZHANG Wei², CHEN Song², PENG Qi², YI Bin³, SUN Cheng-Ming^{2,3,*}, ZHANG Jie-Fu^{2,*}, and FU Ting-Dong³

¹ Nanjing Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, Jiangsu, China; ² Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Cotton and Rapeseed (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210014, Jiangsu, China; ³ National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Thousand-seed weight (TSW) is one of the important component of seed yield. In this study, a collection of 496

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD0100602), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12), 国家自然科学基金项目(32001581), 江苏省农业科技自主创新基金(CX(19)3055), 江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK20190260)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(2662016PY063)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0100602), the China Agriculture Research System (CARS-12), the National Natural Science Foundation of China (32001581), the Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund (CX(19)3055), the Natural Fund Project of Jiangsu Basic Research Program (BK20190260), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662016PY063).

* 通信作者(Corresponding authors): 张洁夫, E-mail: jiefu_z@163.com; 孙程明, E-mail: suncm8331537@gmail.com

第一作者联系方式: E-mail: 15662020807@163.com

Received (收稿日期): 2020-06-22; Accepted (接受日期): 2020-09-13; Published online (网络出版日期): 2020-09-22.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200922.1143.006.html>

representative rapeseed accessions were genotyped by the high-throughput 60K SNP array for TSW in three environments (14NJ, 15TZ, 16TZ). The genome-wide association study (GWAS) of TSW was performed via the MLM (Mixed linear model) and GLM (General linear model). The results showed that the broad sense heritability of TSW was 63.12% in three environments. Six and 61 loci were detected with MLM and GLM, which explained 28.92% and 47.08% of the phenotypic variance, respectively. Combining the common loci between two models, 62 significant loci were obtained and accounted for 47.31% of the phenotypic variance. These loci were distributed on all chromosomes of the genome, with the largest number of 9, 8, and 7 loci detected on Chromosome A07, A03, and C06, respectively. The most significant locus Bn-scaff_17526_1-p1066214 was detected on C09, and accounted for 5.55% and 15.26% of the phenotypic variance in MLM and GLM, respectively. Among them, 21 loci overlapped with previously reported QTLs, of which 8 loci were verified by at least two populations. The remaining 41 loci were newly detected, and many of them had high effects and were detected in multiple environments, such as Bn-A03-p560769, Bn-scaff_15743_1-p599416 and Bn-scaff_15743_1-p590955. Besides, 11 candidates orthologous to documented *Arabidopsis* seed weight genes, like *DGAT*, *EOD3*, *AGL61*, *WR11*, *DA2*, and *RAV1*, were found near our GWAS loci. The results are helpful for analyzing the genetic basis of TSW of rapeseed and lay a foundation for studying the regulation mechanism and guiding the genetic improvement of TSW.

Keywords: *Brassica napus* L.; 1000-seed weight; yield; GWAS; SNP

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L., 2n = 38, AACC)是世界上广泛种植的油料作物，也是我国重要的植物油来源之一，占总食用植物油 40%以上。然而我国植物油料自给率不足四成，且缺口仍呈扩大趋势，提高油菜产量、保障油料供给安全已迫在眉睫^[1]。千粒重是构成油菜产量的三因素之一，提高油菜千粒重是增产的直接途径，因此解析粒重遗传基础和分子机理对油菜产量乃至国家油料供给安全具有重要意义。

千粒重是由多基因控制的数量性状，受基因型和环境条件共同作用^[2]。从细胞学水平看，种子器官的发育主要受细胞增殖和细胞膨大调节，两者又分别决定着细胞数目和细胞大小^[3]，Breuninger 等^[4]研究认为，细胞增殖(细胞数目)对种子等器官大小的影响更大。从种子发育进程看，胚、胚乳及胚珠的协同生长关系着种子重量及大小，同时发育过程又与母体植株密不可分，种子大小与母体组织间存在某种内在联系。朱军等^[5]研究认为，粒重遗传模型为胚、胚乳、细胞质和母体基因型的效应，其中细胞质和母体基因型效应属母体效应。李娜等^[6]通过对遗传背景广泛的油菜大小粒种质进行遗传分析，证明了油菜种子大小主要由母体基因型效应调控，母体效应值达 0.93。母体组织可从多种途径对种子大小产生影响：一是转录因子调控途径，如 *AP2* 通过限制种皮细胞的延伸控制种子生长^[7]；二是泛素化途径，如泛素受体 *DA1* 和 *DA2* 通过限制种皮细胞增殖影响籽粒大小^[8-9]；三是 G 蛋白途径，如 G 蛋白复合物由异源三聚体的 G α 、G β 和 G γ 3 个亚基组成，超表达 G γ (*AGG3*) 的拟南芥通过细胞增殖促进种子生长发育^[10]；四是激素途径，如 *BZR1* 通过油菜素内酯途径影响种子大小^[11]；五是其他类型生长物质，

如 *EOD3* 编码细胞色素 P450 单加氧酶，通过促进种子株被或种皮细胞的延伸增加种子大小^[12]。

分子标记、SNP 芯片等技术的出现大大推进了对复杂数量性状如千粒重基因的定位。多数科研工作者利用遗传差异大的双亲构建连锁群体，进行千粒重 QTL 定位。Quijada 等^[13]利用 2 个 DH 群体定位到 3 个千粒重 QTL 位点，分别位于 A07、C07 和 C09 染色体上。Basunanda 等^[14]同样利用 DH 群体，结合 SSR 标记和 AFLP 标记，检测到 34 个千粒重 QTL，表型变异贡献率范围为 2.4%~23.0%，其中 7 个位点能重复检测到。Yang 等^[15]考察 186 个 RIL 群体在 2 环境下的表型，检测到 9 个与千粒重相关的 QTL，分布在 5 个连锁群 A01、A06、A07、A09 和 C03，其中贡献率最大的 QTL *cqSW.A9* 位于 A09 染色体，解释 28.2% 的表型变异。Zhao 等^[16]考察 DH 群体在 5 个环境下的表型，定位到 40 个千粒重 QTL 位点，其中位于 A06 的主效 QTL *qSN.A6* 贡献率为 20.1%。Fan 等^[17]考察 DH 和 F2 两群体在 2 环境下的表型，共检测到 9 个千粒重 QTL，分别位于在 A01、A02、A05、A07、A10 和 C04，解释的表型变异范围为 27.6%~37.9%。Sun 等^[18]利用高密度 SNP 图谱，考察 189 个 RIL 群体在 5 个环境下的表型，定位到 25 个千粒重相关的 QTL，其中 QTL *uqC2-1* 解释 6.6%~7.6% 的表型变异。目前甘蓝型油菜中已精细定位的粒重基因很少，Liu 等^[19]成功克隆了第 1 个影响千粒重的基因 *ARF18*，该基因是控制角果长和千粒重的双效调控因子，通过延长角果皮细胞长度促进角果伸长，增加角果皮光合面积，促进千粒重增加。Shi 等^[20]利用图位克隆得到 1 个影响千粒重的基因 *BnaA9.CYP78A9D*，该基因编码 1 个 P450 单加氧酶，通过促进角果瓣中的细胞伸长来调节角果长

度, 影响种子大小。

随着高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)基因分型芯片和全基因组测序等技术的发展, 全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)已广泛应用于油菜复杂性状的遗传结构解析^[21-22]。本研究选用 496 份具有代表性的油菜种质资源为关联群体, 利用 60K SNP 芯片对群体进行基因型分析, 结合 3 个环境考察的千粒重表型数据, 对该性状进行全基因组关联分析, 基于检测到的显著 SNP 位点挖掘候选基因。本研究中筛选出千粒重大的优异种质资源, 为今后的性状改良提供材料; 基于检测到的显著位点, 为开发粒重分子标记提供信息; 挖掘候选基因, 为千粒重基因克隆和调控机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

496 份甘蓝型油菜为国内外的地方品种、育成品种及高世代育种材料(附表 1)。其中国内资源 444 份, 主要来自湖北、重庆、江苏、湖南、四川、陕西等油菜主产省市; 国外资源 52 份, 主要来自德国、瑞典、朝鲜、加拿大等国家。所有材料均由华中农业大学国家油菜工程技术研究中心提供。

1.2 田间试验与表型调查

试验材料于 2014 年在江苏南京(14NJ)以及 2015 年、2016 年在泰州(15TZ 和 16TZ)种植。采用完全随机区组设计, 设置 3 个重复, 单个材料每重复种 2 行, 每行 15 株, 行宽 1.5 m, 行距 40 cm, 株距 15~17 cm。每年 10 月上旬大田直播, 田间管理按当地常规方式进行。田间材料均是自然成熟时收获, 每小区选择具有代表性的 6 个单株, 在挂藏室内自然阴干后进行考种分析。千粒重具体测量方法为: 单株全株脱粒后, 随机选择其中 500 粒种子称重, 重复取样 3 次, 保证 3 次称重结果差异小于 0.1 g (5%以内)为有效的 3 个数据, 取平均数后加倍即为测量值。利用 RStudio 软件对各个环境的千粒重表型进行统计分析和相关性分析, 并计算广义遗传力和最佳线性无偏预测值(best linear unbiased prediction, BLUP)^[23-25]。

1.3 基因型检测与分析

利用 Illumina 60K SNP 芯片对 496 份甘蓝型油菜资源进行基因型分析。在 Genome Studio 软件中对 SNP 进行质量控制。将过滤后的 33,218 个 SNP

序列比对至油菜 Darmor-*bzh* 基因组, e-value 阈值设为 10^{-12} , 得到 19,167 个单拷贝且位置清楚的 SNP 标记用于关联分析^[26]。

1.4 全基因组关联分析

利用软件 Structure 2.3.4 基于贝叶斯模型进行群体结构, 得到 Q 矩阵^[27], 利用软件 SPAGeDi 计算不同材料间的亲缘关系, 得到 K 矩阵^[28], 在软件 Tassel 5.0 中导入基因型、表型、Q 矩阵和 K 矩阵数据文件。以 Q 矩阵和 Q+K 矩阵作协变量, 分别进行 MLM 和 GLM 2 种模型的全基因组关联分析^[29]。对 MLM 模型设置的显著性阈值(bonferroni threshold)为 1/总标记数, 即 $-\lg(P) = 4.28$; 对 GLM 模型设置更为严格的显著性阈值为 0.05/总标记数, 即 $-\lg(P) = 5.58$ 。当 1 Mb 区间内存在多个显著 SNP 时, 若两两间的 $r^2 > 0.1$, 则将这些 SNP 归为 1 个关联位点, 以最小 P 值的 SNP 作为显著性位点代表。用 RStudio 软件包 qqman 绘制曼哈顿图和 QQ (Quantile-Quantile) 图。用 RStudio 软件 lm 功能分析关联位点解释的总表型变异。

1.5 已报道 QTL 的信息整理

目前有 4 篓千粒重关联分析研究, 4 个群体分别包含 157、192、427 和 521 份油菜资源^[30-33], 整理其检测到的显著位点并与本研究结果进行比较。针对利用 SNP 芯片进行基因分型的连锁群体, 将检测到的 QTL 两侧的 SNP 探针序列比对至油菜 Darmor-*bzh* 参考基因组, 以确定 QTL 的物理区间^[34]。对于以 SSR 和 AFLP 等传统标记进行基因分型的研究, 搜集 QTL 两侧标记的引物序列并将其比对至参考基因组, 以确定 QTL 的物理区间。

1.6 候选基因挖掘

对于显著关联位点, 以 $r^2 = 0.1$ 作为衰减阈值, 用软件 Tassel 5.0 计算显著关联位点的 LD 衰减距离作为置信区间, 提取置信区间内的基因 CDS 序列, 与模式植物拟南芥中已报道的千粒重相关基因 CDS 进行 BLAST 比对, 设 e-value 阈值为 10^{-10} , 以相似度最高的拟南芥基因信息来注释油菜基因。

2 结果与分析

2.1 千粒重表型统计分析

496 份油菜种质资源表型千粒重在 3 个环境中具有广泛的变异, 单个环境的千粒重极差范围为 4.63~5.36 g。单个环境表型平均值范围为 (3.51 ± 0.64) ~ (4.27 ± 0.88) g, 变异系数范围为 0.16~0.21 (表 1 和图 1)。

表1 关联群体千粒重性状的统计分析

Table 1 Statistical analysis of 1000-seed weight of the association panel

年份/环境 Year/Environment	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值±标准差 Average ± SD	变异系数 Coefficient of variation
2013/2014 南京 Nanjing	2.27	7.63	4.27±0.88	0.21
2014/2015 泰州 Taizhou	1.64	5.77	3.65±0.58	0.16
2015/2016 泰州 Taizhou	1.50	6.13	3.51±0.64	0.18

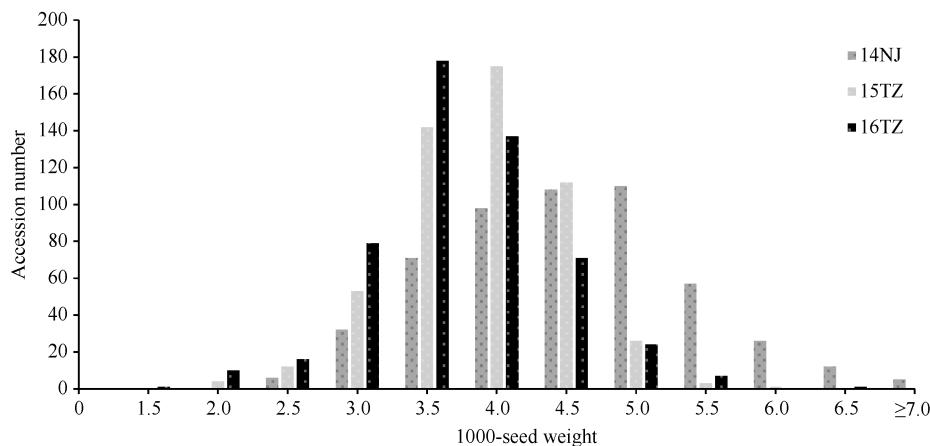


图1 关联群体在3个环境(14NJ、15TZ、16TZ)中的千粒重分布

Fig. 1 1000-seed weight of the association panel in three environments (14NJ, 15TZ, 16TZ)

3个环境间的相关系数为0.55, 达到极显著水平($P=0.001$)。这表明本研究考察的表型数据具有较高的可靠性和重复性。利用RStudio软件包lme4计算, 油菜千粒重在3个环境下的广义遗传力为63.12%。

2.2 千粒重全基因组关联分析

利用MLM模型对千粒重BLUP值进行关联分析, 显著性阈值为 $-\lg(P)=4.28$ 时, 共检测到8个显著位点。合并存在连锁不平衡的SNP($r^2=0.1$), 得到6个显著位点, 分布在A01、A02、A03、C06和C09染色体(表2和图2)。6个显著位点的 $-\lg(P)$ 值范围是4.33~5.38, 可解释4.86%~6.06%的表型变异。利用一个简单加性模型计算, 6个位点联合解释28.92%的表型变异。与单环境的关联结果比较, 5个位点被重复检测到。

利用GLM模型对千粒重BLUP值进行关联分析, 显著性阈值为 $-\lg(P)=5.58$ 时, 共检测到226个显著位点。合并存在连锁不平衡的SNP($r^2=0.1$), 得到61个显著位点, 分布在全基因组所有染色体(表3和图2)。其中显著性最高位点Bn-scaff_17526_1-p1066214的 $-\lg(P)=15.98$, 对表型变异的贡献率为15.26%。其余位点的 $-\lg(P)$ 值范围是5.58~11.57, 可解释4.89%~11.31%的表型变异。利用一个简单加性模型计算, 61个位点联合解释47.08%的表型变异。与单环境的关联结果比较, 47个位点被检测到, 13个

位点在2环境中重复检测到, 7个位点在3个环境中被检测到。

综合2个模型关联结果, 5个MLM模型的显著位点与GLM重叠, 合并重叠位点后共得到62个显著位点, 联合解释47.31%的表型变异。这些位点分布在全基因组所有染色体上, 其中A07染色体上检测到的数目最多, 达9个位点, A03和C06染色体上分别检测到8个和7个位点。分析显著位点的分布, 58.06%的位点分布在A亚基因组, 41.94%位于C亚基因组(表2和表3)。

2.3 与前人报道 QTL 的比较

综合MLM和GLM模型检测结果, 与已报道的千粒重QTL结果比较, 本研究中21个显著位点与前人研究结果重叠, 其中有8个位点得到至少2个群体的验证(表2和表3)。位于A02染色体的位点Bn-A02-p6564861位置为3.78 Mb, 与Shahid等^[32]通过关联分析检测到的位点Bn-A02-p6564861和Luo等^[35]通过DH群体定位到的千粒重QTLqSW.A2-4(位置:3.78~3.83 Mb)重叠。位于A07染色体的位点Bn-Scaffold002856-p361位置为0.59 Mb, 与Cai等^[31]、Fan等^[17]和Shi等^[36]采用不同策略检测到位点BrGMS3983、QTL TSWA7b和qSW.A7-2(位置:0.83 Mb)重叠。位于A09染色体的位点Bn-A09-p7329993位置为5.54 Mb, 与Basunanda等^[14]定位到

QTL *TH-tsm07*、*TH-tsm06* 和 Shahid 等^[32]检测到位点 Bn-A09-p7327691 (位置: 5.54~5.74 Mb)重叠。位于 C06 染色体的位点 Bn-scaff_16874_1-p411591 位置为 31.82 Mb, 与 Dong 等^[30]、Shi 等^[36]和 Li 等^[37]通过不同策略检测到的位点(位置: 31.18 Mb)重叠。

GLM 模型中效应最大的位点 Bn-scaff_17526_1-p1066214 位于 C09 染色体 1.49 Mb, $-\lg(P) = 15.98$, 解释 15.26% 的表型变异, 与 Shahid 等^[32]检测

到的效应最大位点 Bn-scaff_17526_1-p1063974 (位置: 1.49 Mb)一致。该模型中效应次高的位点 Bn-scaff_16064_1-p938130 位于 C06 染色体 24.70 Mb, $-\lg(P) = 11.57$, 解释 11.31% 的表型变异, 与 Luo 等^[35]定位到的千粒重 QTL *qSW.C6-3* (位置: 24.52 Mb)重叠。此外有 16 个位点与前人检测的 QTL 位点重叠或相邻(表 3), 以上 QTL 比较验证了本研究结果的可靠性。

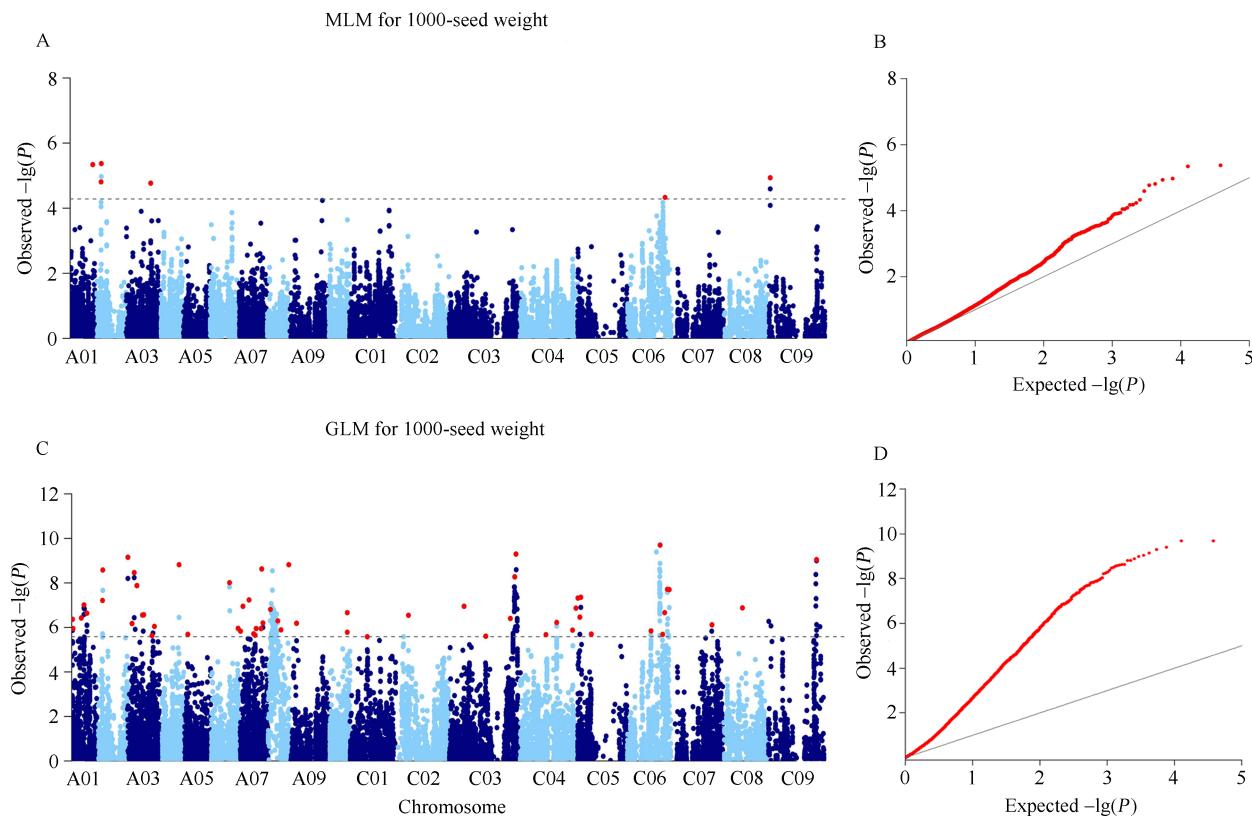


图 2 油菜千粒重全基因组关联分析(BLUP)

Fig. 2 Genome-wide association study of 1000-seed weight in rapeseed (BLUP)

A: 千粒重 MLM 曼哈顿图; B: 千粒重 MLM QQ 图; C: 千粒重 GLM 曼哈顿图; D: 千粒重 GLM QQ 图。

A: Manhattan plot of MLM for 1000-seed weight; B: quantile-quantile plot of MLM for 1000-seed weight; C: Manhattan plot of GLM for 1000-seed weight; D: quantile-quantile plot of GLM for 1000-seed weight.

表 2 MLM 千粒重显著关联位点(BLUP)

Table 2 Significant GWAS loci of 1000-seed weight in MLM (BLUP)

标记 Marker	染色体 Chr.	位置 Position (bp)	$-\lg(P)$	表型变异 R^2 (%)	环境 Environment	已报道 QTL Reported QTL
Bn-A01-p23472380	A01	19,346,196	5.34	6.03	16TZ	
Bn-A02-p6300284	A02	3,473,319	4.81	5.41	15TZ	
Bn-A02-p6564861	A02	3,784,981	5.38	6.06	14NJ	[32]
Bn-A03-p22125583	A03	20,956,967	4.77	5.36		[32,35]
Bn-scaff_16874_1-p411591	C06	31,817,621	4.33	4.86	16TZ	[30,36,37]
Bn-scaff_17526_1-p1066214	C09	1,488,283	4.93	5.55	16TZ	[32]

缩写同图 1。Abbreviations are the same as those given in Fig. 1.

表3 GLM 千粒重显著关联位点(BLUP)

Table 3 Significant GWAS loci of 1000-seed weight in GLM (BLUP)

标记 Marker	染色体 Chr.	位置 Position (bp)	-lg (P)	表型变异 R^2 (%)	环境 Environment	已报道 QTL Reported QTL
Bn-A01-p1156979	A01	760,656	6.37	5.61	15TZ	[35]
Bn-A01-p1440009	A01	1,036,032	5.96	5.21		
Bn-A01-p9621623	A01	8,234,343	6.43	5.66		[17,30,36]
Bn-A01-p12222806	A01	10,407,989	7.02	7.03	14NJ	
Bn-A01-p15496639	A01	12,941,394	6.64	6.67	16TZ	
Bn-A02-p6300284	A02	3,473,319	7.22	7.23	14TZ	
Bn-A02-p6564861	A02	3,784,981	8.59	8.53	14NJ/16TZ	[32,35]
Bn-A03-p560769	A03	445,706	9.16	9.08	14NJ/16TZ	
Bn-A03-p4352837	A03	3,885,180	6.18	6.22		
Bn-A03-p6586436	A03	5,884,508	8.47	8.43	16TZ	
Bn-A03-p8851142	A03	8,156,299	7.88	7.86	14NJ/15TZ/16TZ	[32]
Bn-A03-p13758392	A03	12,893,544	6.56	6.60	15TZ	
Bn-A03-p14747263	A03	13,916,047	6.57	6.60	14NJ	[35]
Bn-A03-p22125583	A03	20,956,967	5.64	5.60		[32,35]
Bn-A03-p24494224	A03	22,999,825	6.05	6.10		[32]
Bn-A04-p13705636	A04	14,344,669	8.84	8.77	15TZ	[35]
Bn-A05-p2610006	A05	2,720,763	5.69	5.75		
Bn-scaff_27198_1-p445589	A06	15,593,147	8.01	7.99	14NJ/15TZ	
Bn-A06-p23759352	A06	22,715,814	5.97	6.01		
Bn-Scaffold002856-p361	A07	592,982	5.84	5.89	14NJ/16TZ	[14,17,31,36]
Bn-A10-p11601681	A07	2,573,087	6.95	6.15	16TZ	[33]
Bn-A07-p5877587	A07	7,824,442	7.24	6.42	14NJ/15TZ	[13,32]
Bn-A07-p10557557	A07	11,738,166	5.71	5.77	16TZ	
Bn-A02-p305007	A07	12,930,679	5.66	4.93	14NJ/15TZ/16TZ	
Bn-A07-p11611255	A07	13,756,170	5.95	6.00		[35]
Bn-A07-p16095589	A07	17,996,553	5.96	6.01		
Bn-scaff_15743_1-p590955	A07	18,512,786	8.64	8.58	14NJ/15TZ/16TZ	
Bn-A07-p17804261	A07	19,646,053	6.20	5.45		[32,38]
Bn-A08-p2675098	A08	2,098,808	6.81	6.83	16TZ	
Bn-A08-p10443959	A08	8,372,628	6.30	6.34		[32]
Bn-A08-p13284369	A08	11,051,828	5.89	5.94		
Bn-A08-p20343735	A08	17,811,886	8.82	7.90	15TZ	
Bn-A09-p7329993	A09	5,542,361	6.20	6.24	14NJ/15TZ	[14,32]
Bn-A10-p15021776	A10	14,967,128	5.78	5.83	15TZ	
Bn-A10-p15167470	A10	15,100,392	6.67	6.69	15TZ	
Bn-scaff_15803_1-p837307	C01	14,780,320	5.58	5.64	14NJ	
Bn-scaff_20942_1-p52095	C02	11,201,048	6.54	6.58	14NJ	
Bn-scaff_16002_1-p1803014	C03	12,573,756	6.95	6.97	15TZ	
Bn-scaff_26320_1-p269450	C03	30,924,988	5.61	4.89		
Bn-scaff_16182_1-p296671	C03	51,992,967	6.41	6.44	14NJ	
Bn-scaff_15794_3-p89166	C03	55,716,441	8.28	7.39	14NJ/15TZ	
Bn-scaff_17119_1-p148890	C03	56,814,587	9.28	9.19	14NJ/15TZ	[35]
Bn-scaff_16217_1-p597569	C04	21,919,412	5.68	4.96	14NJ	
Bn-scaff_18062_1-p229981	C04	31,112,520	6.23	5.47	14NJ/16TZ	

(续表 3)

标记 Marker	染色体 Chr.	位置 Position (bp)	-lg (P)	表型变异 <i>R</i> ² (%)	环境 Environment	已报道 QTL Reported QTL
Bn-scaff_15585_1-p1089867	C04	44,500,243	5.88	5.14	16TZ	
Bn-scaff_18903_1-p371596	C04	47,531,676	6.87	6.89	16TZ	
Bn-scaff_16414_1-p1774629	C05	279,059	7.33	7.33	14NJ	
Bn-scaff_20901_1-p2029631	C05	1,973,973	6.47	6.50	14NJ/16TZ	
Bn-scaff_20901_1-p1279675	C05	2,707,564	7.36	7.36	14NJ	
Bn-scaff_15763_1-p596396	C05	11,699,136	5.71	4.98	16TZ	
Bn-scaff_15763_1-p588874	C06	20,160,298	5.85	5.90	16TZ	
Bn-scaff_16064_1-p938130	C06	24,703,441	11.57	11.31	14NJ/15TZ/16TZ	[35]
Bn-scaff_15743_1-p599416	C06	27,808,971	9.80	8.80	14NJ/15TZ/16TZ	
Bn-scaff_18807_1-p747016	C06	30,110,394	5.69	4.96		[36]
Bn-scaff_16874_1-p411591	C06	31,817,621	6.66	6.69	14NJ/16TZ	[30,36,37]
Bn-scaff_17799_1-p2391172	C06	34,110,582	7.71	6.87	14NJ/16TZ	
Bn-scaff_17799_1-p853567	C06	35,737,877	7.70	7.69	14NJ	[35]
Bn-scaff_15705_1-p2279820	C07	35,285,037	6.12	6.16	16TZ	
Bn-A08-p10452462	C08	16,678,522	6.88	6.08	14NJ/15TZ/16TZ	
Bn-scaff_17526_1-p1066214	C09	1,488,283	15.98	15.26	14NJ/15TZ/16TZ	[32]
Bn-scaff_15576_1-p614226	C09	41,707,720	9.03	8.96	14NJ/16TZ	

缩写同图 1。Abbreviations are the same as those given in Fig. 1.

2.4 候选基因挖掘

基于油菜基因组的注释信息, 在 Bn-A03-p22125583 位点下游 244 kb 处找到候选基因 *BnaA03g41350D*, 该基因的拟南芥同源基因 *DGAT* 编码二酰甘油酰基转移酶, 其过表达促进种子中甘油三酯含量和种子重量增加^[39] (表 4)。在 Bn-A03-p8851142 位点下游 118 kb 处找到候选基因 *BnaA03g17130D*, 该基因的拟南芥同源基因 *TTG2* 编码 WRKY 转录因

子, 通过增加种皮细胞延伸促进种子粒重增加^[40]。在 Bn-A05-p2610006 位点下游 7.5 kb 处找到候选基因 *BnaA05g36830D*, 该基因的拟南芥同源基因 *AGL61* 编码 I 型 MADS 结构域蛋白, 在中央细胞发育过程和种子胚乳形成过程中起调节作用, 影响种子大小^[41]。在 Bn-A07-p11611255 位点上游 115 kb 处找到候选基因 *BnaA07g16350D*, 该基因的拟南芥同源基因 *WRI1* 调节编码糖酵解途径和脂肪酸相关

表 4 千粒重关联位点候选基因信息

Table 4 Information of candidate genes of 1000-seed weight GWAS loci

标记 Marker	油菜基因 Rapeseed gene	染色体 Chr.	位置 Position	拟南芥同源基因 <i>Arabidopsis</i> homolog gene	
				基因名称 Gene name	基因号 Gene ID
Bn-A01-p15496639	<i>BnaA01g20420D</i>	A01	12,306,073	<i>NPC6</i>	<i>AT3G48610</i>
Bn-A03-p22125583	<i>BnaA03g41350D</i>	A03	20,713,211	<i>DGAT</i>	<i>AT3G51520</i>
Bn-A03-p8851142	<i>BnaA03g17130D</i>	A03	8,038,181	<i>TTG2</i>	<i>AT2G37260</i>
Bn-A05-p2610006	<i>BnaA05g36830D</i>	A05	2,713,236	<i>AGL61</i>	<i>AT5G60440</i>
Bn-A07-p11611255	<i>BnaA07g16350D</i>	A07	13,870,810	<i>WRI1</i>	<i>AT3G54320</i>
Bn-A09-p7329993	<i>BnaA09g12210D</i>	A09	6,402,925	<i>GW5</i>	<i>AT1G64500</i>
Bn-scaff_20942_1-p52095	<i>BnaA08g15580D</i>	C02	12,923,783	<i>CLV3</i>	<i>AT2G27250</i>
Bn-scaff_18903_1-p371596	<i>BnaC04g50960D</i>	C04	48,343,005	<i>EOD3</i>	<i>AT2G46660</i>
Bn-scaff_18062_1-p229981	<i>BnaC04g33070D</i>	C04	31,436,211	<i>RAV1</i>	<i>AT1G13260</i>
Bn-scaff_17799_1-p853567	<i>BnaC06g38800D</i>	C06	36,244,755	<i>GRF2</i>	<i>AT1G78300</i>
Bn-scaff_17799_1-p853567	<i>BnaC06g38900D</i>	C06	36,295,477	<i>DA2</i>	<i>AT1G78420</i>
Bn-A08-p10452462	<i>BnaC08g12050D</i>	C08	17,299,420	<i>SHB1</i>	<i>AT4G25350</i>

酶基因的表达, *WRII* 通过增大种子体积引起种子重量增加^[42]。在 Bn-scaff_18062_1-p229981 位点上游 323 kb 找到候选基因 *BnaC04g33070D*, 该基因的拟南芥同源基因 *RAVI* 是植物生长的负调控因子, 其高表达的转基因植株表现出异常胚珠, 导致种子大小、重量和数量减少^[43]。此外, 本研究还找到其他 6 个候选基因, 包括拟南芥已知调控粒重相关基因 *NPC6*^[44]、*CLV3*^[45]、*GRF2*^[46]、*EOD3*^[12]、*GW5*^[47]、*DA2*^[9]、*SHB1*^[48] 等在油菜中的同源拷贝。

3 讨论

本研究对 496 份油菜资源千粒重进行考察, 分析其在 3 个环境下的千粒重表型, 其中材料 2012-8998、甲 904、WH-59 和 CY19PXW-65 等千粒重大且稳定, 其平均千粒重分别为 5.63、5.59、5.09 和 5.06 g, 上述材料值得作为改良千粒重的优良亲本。比较 MLM 和 GLM 模型的关联分析, MLM 将群体结构 Q 矩阵作为固定效应, 亲缘关系 K 矩阵作为随机效应, 很好地控制了假阳性, 位点可靠性更高。MLM 模型检测到 6 个显著位点, 联合解释了 28.92% 的表型变异, 其中 4 个位点得到前人验证。但 MLM 检测功效偏低, 容易造成假阴性。因此, 引入了检测功效高, 同时假阳性更高的模型 GLM; 但对 GLM 模型设置更为严格的显著性阈值为 0.05/总标记数, 以减小 GLM 中可能存在的假阳性位点。GLM 检测到 61 个显著位点, 联合解释了 47.08% 的表型变异, 其中 21 个位点得到前人验证。合并两模型位点后共得到 62 个显著位点, 联合解释 47.31% 的表型变异。21 个位点与前人定位的 QTL 重叠, 包括 Bn-scaff_17526_1-p1066214 和 Bn-scaff_16064_1-p938130 等大效应位点, 其中 Bn-A01-p9621623、Bn-Scaffold 002856-p361 和 Bn-scaff_16874_1-p411591 等位点得到多个群体的验证。在后续研究中值得对上述可靠性高的位点可进行精细定位和基因克隆, 为油菜千粒重的改良提供基因资源。

本研究共收集了 26 篇已发表的油菜千粒重 QTL 信息, 包含了 3~159 个 QTL, 分布在 19 条染色体上, 解释的表型变异范围为 2.40%~41.46%。与前人 QTL 位点比较, 本研究中 41 个显著位点尚未得到验证(表 2 和表 3)。多个位点效应值较高且在多环境中被检测到, 如位点 Bn-A03-p560769、Bn-scaff_15743_1-p599416 和 Bn-scaff_15743_1-p590955 的表型贡献值分别为 9.08%、8.80% 和 8.58%, 以上位点

在 3 个单环境中均被检测到。此外, 在多个新位点附近找到候选基因, 如在 Bn-A01-p15496639、Bn-A05-p2610006 和 Bn-A08-p10452462 等位点附近分别找到拟南芥粒重已知基因 *NPC6*、*AGL61* 和 *SHB1* 等的同源基因。这些新位点可靠性高, 值得进一步研究与验证。鉴于千粒重是受多基因调控的复杂数量性状, 在育种上可针对上述位点设计分子标记, 通过分子标记辅助选择聚合有利等位基因, 选育出高产油菜新品种。

此外, 本研究在 11 个显著位点附近找到千粒重相关的候选基因及其拟南芥同源基因(表 4), 根据基因功能注释, 多数候选基因归类于转录因子, 如 *TTG2*、*AGL61*、*WRII*、*RAVI* 和 *GRF2* 等。这些基因还影响除粒重外的其他性状, 如 *EOD3* 功能缺失后对粒重和角果长均有抑制作用^[12]; *DGAT* 编码二酰甘油酰基转移酶, 对籽粒含油量和籽粒均有重要调节作用^[39]; *CLV3* 双突变产生多室角果, 每角粒数和千粒重均增加^[45], 这些基因调控范围广, 利用价值大, 后期可重点关注。目前很多研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术改良油菜的性状, 如改良抗裂角^[49]、株高和分枝数^[50]、高油酸^[51]等。本研究在 Bn-scaff_18062_1-p229981 位点附近找到候选基因 *BnaC04g33070D*, 其拟南芥同源基因 *RAVI* 为负调控因子, 可与 *MINI3* 和 *IKU2* 的启动子直接结合, 导致后者表达受抑制, 进而影响粒重, 后续研究可通过 CRISPR/Cas9 敲除提高油菜的千粒重。

4 结论

本研究利用 496 份油菜种质资源对千粒重进行全基因组关联分析, 群体在 3 个环境中千粒重的广义遗传力为 63.12%。MLM 模型检测到 6 个显著位点, GLM 模型检测到 61 个显著位点, 合并共同位点后得到 62 个显著位点, 联合解释 47.31% 的表型变异。此外, 21 个位点与前人研究定位的 QTL 重叠, 其中 8 个位点得到至少 2 个群体验证, 其余 41 个为新检测到的位点。在 11 个位点附近发现拟南芥粒重基因 *DGAT*、*EOD3*、*AGL61*、*WRII*、*DA2* 和 *RAVI* 等的同源拷贝。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.china-crops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望. 中国油料作物学报, 2010, 32: 300–302.
- Wang H Z. Review and future development of rapeseed industry in China. *Chin J Oil Crop Sci*, 2010, 32: 300–302 (in Chinese with English abstract).
- [2] 易斌, 陈伟, 马朝芝, 傅廷栋, 涂金星. 甘蓝型油菜产量及相关性状的 QTL 分析. 作物学报, 2006, 32: 676–682.
- Yi B, Chen W, Ma C Z, Fu T D, Tu J X. Mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2006, 32: 676–682 (in Chinese with English abstract).
- [3] Horiguchi G, Ferjani A, Fujikura U, Tsukaya H. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*, 2006, 119: 37–42.
- Breuninger H, Lenhard M. Control of tissue and organ growth in plants. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 91: 185.
- [5] 朱军, 许馥华. 胚乳性状的遗传模型及其分析方法. 作物学报, 1994, 20: 264–270.
- Zhu J, Xu F H. A genetic model and analysis methods for endosperm traits. *Acta Agron Sin*, 1994, 20: 264–270 (in Chinese with English abstract).
- [6] 李娜. 甘蓝型油菜粒重母体调控机理解析. 中国农业科学院博士学位论文, 北京, 2015.
- Li N. Maternal Control of Seed Weight in Rapeseed (*Brassica napus* L.). PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [7] Jofuku K D, Pamela K, Omidyar Z G. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3117–3122.
- [8] Li Y H, Zheng L Y, Corke F, Smith C, Bevan M W. Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 2008, 22: 1331–1336.
- [9] Tian X, Li N, Jack D, Li J, Andrei K, Bevan M W, Gao F, Li Y H. The ubiquitin receptor *DA1* interacts with the E3 ubiquitin ligase *DA2* to regulate seed and organ size in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 3347–3359.
- [10] Li S, Liu Y, Zheng L, Chen L, Li N, Corke F, Lu Y, Fu X, Zhu Z, Bevan M W, Li Y H. The plant-specific G protein γ subunit *AGG3* influences organ size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 2012, 194: 690–703.
- [11] Song X J. Crop seed size: BR matters. *Mol Plant*, 2017, 10: 668–669.
- [12] Fang W J, Wang Z B, Cui R F, Li J, Li Y H. Maternal control of seed size by *EOD3/CYP78A6* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2012, 70: 929–939.
- [13] Quijada P A, Udall J A, Lambert B, Osborn T C. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring rapeseed (*Brassica napus* L.): 1. Identification of genomic regions from winter germplasm. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 549–561.
- [14] Basunanda P, Radoev M, Ecke W, Friedt W, Becker H, Snowdon R. Comparative mapping of quantitative trait loci involved in heterosis for seedling and yield traits in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 271–281.
- [15] Yang P, Shu C, Chen L, Xu J S, Wu J S, Liu K D. Identification of a major QTL for siliques length and seed weight in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 285–296.
- [16] Zhao W, Wang X, Wang H, Tian J, Li B, Chen L, Chao H, Long Y, Xiang J, Gan J, Liang W, Li M. Genome-wide identification of QTL for seed yield and yield-related traits and construction of a high-density consensus map for QTL comparison in *Brassica napus*. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 17.
- [17] Fan C C, Cai G Q, Qin J, Li Q Y, Yang M G, Wu J, Zhou Y M. Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 2019, 121: 1289–1301.
- [18] Sun L J, Wang X D, Yu K J, Li W J, Peng Q, Chen F, Zhang W, Fu S X, Xiong D Q, Chu P, Guan R Z, Zhang J F. Mapping of QTLs controlling seed weight and seed-shape traits in *Brassica napus* L. using a high-density SNP map. *Euphytica*, 2018, 214: UNSP 228.
- [19] Liu J, Hua W, Hu Z, Yang H, Zhang L, Li R, Deng L, Sun X, Wang X, Wang H. Natural variation in *ARF18* gene simultaneously affects seed weight and siliques length in polyploid rapeseed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 5123–5132.
- [20] Shi L L, Song J R, Guo C C, Wang B, Guan Z L, Yang P, Chen X, Zhang Q H, Graham J K, Wang J, Liu K D. A *CACTA*-like transposable element in the upstream region of *BnaA9.CYP78A9* acts as an enhancer to increase siliques length and seed weight in rapeseed. *Plant J*, 2019, 98: 524–539.
- [21] Sun C M, Wang B Q, Yan L, Hu K N, Liu S, Zhou Y M, Guan C Y, Zhang Z Q, Li J N, Zhang J F, Chen S, Wen J, Ma C Z, Tu J X, Shen J X, Fu T D, Yi B. Genome-wide association study provides insight into the genetic control of plant height in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1102.
- [22] Lu K, Wei L, Li X, Wang Y, Wu J, Liu M, Zhang C, Chen Z, Xiao Z, Jian H. Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement. *Nat Commun*, 2019, 10: 1154.
- [23] 孙程明, 陈锋, 陈松, 彭琦, 张维, 易斌, 张洁夫, 傅廷栋. 甘蓝型油菜每角粒数的全基因组关联分析. 作物学报, 2020, 46: 147–153.
- Sun C M, Chen F, Chen S, Peng Q, Zhang W, Yi B, Zhang J F, Fu T D. Genome-wide association study of seed number per siliques in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 147–153 (in Chinese with English abstract).
- [24] Ihaka R, Gentleman R. R: a language for data analysis and graphics. *J Comp Graph Stat*, 1996, 5: 299–314.
- [25] Merk H L, Yarnes S C, Van Deynze A, Tong N, Menda N, Mueller L A, Mutschler M A, Loewen S A, Myers J R, Francis D M. Trait diversity and potential for selection indices based on variation among regionally adapted processing tomato germplasm. *J Am Soc Hortic Sci*, 2012, 13: 427–437.
- [26] 孙程明, 陈松, 彭琦, 张维, 易斌, 张洁夫, 傅廷栋. 甘蓝型油菜角果长度性状的全基因组关联分析. 作物学报, 2019, 45: 1303–1310.
- Sun C M, Chen S, Peng Q, Zhang W, Yi B, Zhang J F, Fu T D. Genome-wide association study of siliques length in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1303–1310 (in Chinese with English abstract).

- [27] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 2005, 14: 2611–2620.
- [28] Hardy O J, Vekemans X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 618–620.
- [29] 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: 2633–2635.
- [30] Dong H L, Tan C D, Li Y Z, He Y, Wei S, Cui Y X, Chen Y G, Wei D Y, Fu Y, He Y G, Wan H F, Liu H, Xiong Q, Lu K, Li J N, Qian W. Genome-wide association study reveals both overlapping and independent genetic loci to control seed weight and siliques length in *Brassica napus*. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 921.
- [31] Cai D F, Xiao Y J, Yang W, Ye W, Wang B, Muhammad Y, Wu J S, Liu K D. Association mapping of six yield-related traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 85–96.
- [32] Shahid U K, Jiao Y M, Liu S, Zhang K P, Muhammad H U K, Zhai Y G, Amoo O, Fan C C, Zhou Y M. Genome-wide association studies in the genetic dissection of ovule number, seed number, and seed weight in *Brassica napus* L. *Ind Crops Prod*, 2019, 142: UNSP111877.
- [33] Li F, Chen B, Xu K, Wu J, Wu X. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of seed weight and seed quality in rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Res*, 2014, 21: 355–367.
- [34] Atwell S, Huang Y S, Vilhjálmsson B J, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone A M, Hu T T, Jiang R, Mulyati N W, Zhang X, Amer M A, Baxter I, Brachi B, Chory J, Dean C, Debieu M, Meaux J, Ecker J R, Faure N, Kniskern J M, Jones J D, Michael T, Nemri A, Roux F, Salt D E, Tang C, Todisco M, Traw M B, Weigel D, Marjoram P, Borevitz J O, Bergelson J, Nordborg M. Genome-wide association study of 107 phenotypes in a common set of *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*, 2010, 465: 627–631.
- [35] Luo Z L, Wang M, Long Y, Huang Y J, Shi L, Zhang C Y, Liu X, Bruce D L F, Xiang J X, Mason A S, Snowdon R J, Liu P F, Meng J L, Zou J. Incorporating pleiotropic quantitative trait loci in dissection of complex traits: seed yield in rapeseed as an example. *Theor Appl Genet*, 2017, 130: 1569–1585.
- [36] Shi J Q, Li R Y, Qiu D, Jiang C C, Long Y, Morgan C. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus*. *Genetics*, 2009, 182: 851–861.
- [37] Li N, Shi J Q, Wang X H, Liu G H, Wang H Z. A combined linkage and regional association mapping validation and fine mapping of two major pleiotropic QTLs for seed weight and siliques length in rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 114.
- [38] Zhao W, Wang X, Wang H, Tian J, Li B, Chen L, Chao H, Xiang J, Gan J. Genome-wide identification of QTL for seed yield and yield-related traits and construction of a high-density consensus map for QTL comparison in *Brassica napus*. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 17.
- [39] Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton D L, Giblin E M, Covello P S, Taylor D C. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol*, 2001, 126: 861–874.
- [40] Johnson C S, Ben K, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 2002, 14: 1359–1375.
- [41] Steffen J G, Kang I, Portereiko M F, Lloyd A, Drews G N. *AGL61* interacts with *AGL80* and is required for central cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148: 259–268.
- [42] An D, Suh M C. Overexpression of *Arabidopsis* WRI1 enhanced seed mass and storage oil content in *Camelina sativa*. *Plant Biotechnol Rep*, 2015, 9: 137–148.
- [43] Hyun-Young S, Hee N K. *RAV1* negatively regulates seed development by directly repressing *MINI3* and *IKU2* in *Arabidopsis*. *Mol Cells*, 2018, 41: 1072–1080.
- [44] Cai G Q, Fan C C, Liu S, Yang Q Y, Liu D, Wu J, Li J W, Zhou Y M, Guo L, Wang X M. Nonspecific phospholipase C6 increases seed oil production in oilseed *Brassica ceae* plants. *New Phytol*, 2020, 226: 1055–1073.
- [45] Yang Y, Zhu K Y, Li H L, Han S Q, Meng Q W, Shahid U K, Fan C C, Xie K B, Zhou Y M. Precise editing of *CLAVATA* genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular siliques development. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1322–1335.
- [46] Liu J, Hua W, Yang H, Li Z, Han Z. The *BnGRF2* gene (*GRF2*-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *J Exp Bot*, 2012, 63: 3727–3740.
- [47] Weng J F, Gu S H, Wan X Y, Gao H, Guo T, Su N, Lei C L, Zhang X, Cheng Z J, Guo X P, Wang J L, Jiang L, Zhai H Q, Wan J M. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res*, 2008, 18: 1199–1209.
- [48] Zhou Y, Zhang X, Kang X, Zhao X, Zhang X, Ni M. *SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1* associates with *MINISEED3* and *HAIKU2* promoters *in vivo* to regulate *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell*, 2009, 21: 106–117.
- [49] Zhai Y G, Cai S G, Hu L M, Yang Y, Amoo O, Fan C C, Zhou Y M. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals differences in the contribution of INDEHISCENT homologues to pod shatter resistance in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet*, 2019, 132: 2111–2123.
- [50] Zheng M, Zhang L, Tang M, Liu J L, Liu H F, Yang H L, Fan S H, Terzaghi W, Wang H Z, Hua W. Knockout of two BnaMAX1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 644–654.
- [51] 高谢旺, 谭安琪, 胡信畅, 祝孟洋, 阮颖, 刘春林. 利用CRISPR/Cas9技术创制高油酸甘蓝型油菜新种质. 植物遗传资源学报, 2020, 21: 1002–1008.
- Gao X W, Tan A Q, Hu X C, Zhu M Y, Ruan Y, Liu C L. Creation of new germplasm of high-oleic rapeseed using CRISPR/Cas9. *J Plant Genetic Res*, 2020, 21: 1002–1008 (in Chinese with English abstract).