

切花菊耐寒性相关 SNP 位点挖掘与候选基因分析

范宏虹, 徐婷婷, 苏江硕, 孙 炜, 种昕冉, 管志勇, 房伟民, 陈发棣, 张 飞*

(南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘 要: 以 58 份切花菊为试验材料, 调查了脚芽期、现蕾期和盛花期叶片以及盛花期舌状花低温半致死温度 (LT_{50}), 利用全基因组关联分析挖掘耐寒性相关优异等位变异和候选基因。结果表明, 切花菊品种不同时期叶片或盛花期舌状花耐寒性变异较大, 变异系数均大于 25%; 通过主效可加互作可乘 (AMMI) 模型的双标图分析筛选出抗寒性强且稳定性较好的品种 ‘天使’。基于 36 737 个高质量 SNP 位点和混合线性模型的关联分析, 共挖掘出 24 个与耐寒性显著关联的 SNP 位点 ($P < 0.001$), 其中有 5 个、11 个和 5 个 SNP 位点分别与脚芽期、现蕾期、盛花期叶片耐寒性相关, 3 个 SNP 位点与盛花期舌状花耐寒性相关; 5 个 SNP 位点的表型效应值小于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 为优异等位变异位点。通过显著性 SNP 位点所在的 SLAF 标签序列与菊花转录组数据库进行比对分析, 筛选得到 5 个候选基因, 其中 *CL2042.Contig4_All* 和 *Unigene40993_All* 可能与冷胁迫有一定关联。

关键词: 菊花; 耐寒性; 全基因组关联分析; 候选基因

中图分类号: S 682.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 11-2201-12

Identification of SNP Alleles and Candidate Genes for Cold Tolerance of Cut Chrysanthemum

FAN Honghong, XU Tingting, SU Jiangshuo, SUN Wei, CHONG Xinran, GUAN Zhiyong, FANG Weimin, CHEN Fadi, and ZHANG Fei*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, the low semi-lethal temperature (LT_{50}) was investigated for leaves at rhizome stage (RS), budding stage (RS), and flowering stage (FS), and ray florets at flowering stage (RFS) of 58 cut chrysanthemum accessions, and elite alleles and candidate genes relevant to cold tolerance were examined using genome-wide association analysis. The results showed that, the cold tolerance varied widely for leaves at different stages and ray florets at the flowering stage in the investigated cut chrysanthemums, with coefficients of variation larger than 25%. Statistical analysis by the additive main effects and multiplicative interaction effects (AMMI) model revealed that several accessions showed stronger

收稿日期: 2019-09-02; **修回日期:** 2019-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572152); 江苏省重点研发计划项目 (BE2018426); 江苏省优势学科建设工程项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangfei@njau.edu.cn)

cold tolerance and expressed stably across different stages. The genome-wide association analysis based on 36 737 high-quality SNPs and mixed linear model (MLM) identified a total of 24 SNPs that are significantly associated with cold tolerance, each five for RS and FS, 11 for BS, and three for RFS. Among which, five SNPs showing a phenotypic effect $< -4\text{ }^{\circ}\text{C}$ should be elite alleles for cold tolerance. Blasting the SLAF tags harboring the cold tolerance-associated SNPs with the transcriptomes of chrysanthemum, *CL2042.Contig4_All* and *Unigene40993_All* might function in tolerance to cold stress.

Keywords: chrysanthemum; cold tolerance; genome-wide association analysis; candidate genes

在观赏植物中, 低温胁迫不仅影响花形、花色等观赏性状, 降低观赏品质 (李崇晖 等, 2008; 张洁 等, 2011), 而且因其生长发育受到限制影响周年生产 (Ao et al., 2019)。现有文献表明, 植物耐寒性是一个复杂的数量性状 (Wang et al., 2016; Zhang et al., 2018)。关于菊花耐寒性的评价体系 (许瑛和陈发棣, 2008)、生理生化机制 (李娜 等, 2010; Chen et al., 2014)、关键基因挖掘 (Chen et al., 2012; Ren et al., 2014) 和种质创新 (Chen et al., 2012; 迟天华 等, 2018) 等方面已有相关报道。近年来, 徐婷婷等 (2019) 通过基于 SRAP 和 SSR 等分子标记的关联分析挖掘到与菊花耐寒性相关的优异等位变异; 马杰等 (2018) 通过连锁分析解析了菊花舌状花耐寒性的 QTL 效应; Ao 等 (2019) 通过连锁分析解析了菊花不同生长阶段叶片耐寒性的 QTL 效应。尽管如此, 目前关于菊花耐寒性遗传机制仍不十分明确。

本研究中调查了 58 份切花菊种质材料脚芽期、现蕾期和盛花期叶片以及盛花期舌状花低温半致死温度 (semi-lethal temperature, LT_{50}) 的遗传变异, 利用基于高通量 SNP 标记的全基因组关联分析挖掘耐寒性相关等位变异和候选基因, 以期为菊花耐寒性育种和分子标记辅助选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其耐寒性测定

供试材料为保存于南京农业大学中国菊花种质资源保存中心的 58 个切花菊品种。于 2016 年 7 月采取插穗进行扦插, 8 月下旬定植于南京市江宁区湖熟现代农业示范园, 进行常规管理。

于脚芽期 (越冬后 90% 植株长出脚芽)、现蕾期和盛花期 (张飞 等, 2011) 取 58 个切花菊品种的第 4~5 片叶 (位置与大小基本相同), 每个时期取 15~30 片。于盛花期根据舌状花大小取 1 朵、3 朵或 6 朵花序的舌状花, 用去离子水漂洗 3 次, 再用去离子水浸润的纱布包裹并放于试管中, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜备用。次日使用低温循环仪 (Polyscience 公司, 9610 型) 进行低温循环处理: 现蕾期叶片为 3 、 0 、 -3 、 -6 和 $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$, 盛花期叶片和舌状花为 0 、 -3 、 -6 、 -9 和 $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, 脚芽期叶片为 -3 、 -6 、 -9 、 -12 和 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 各温度处理 1 h, 匀速降温 30 min。每个低温处理结束后, 取出置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱解冻。将每个低温处理的叶片和花瓣分装于试管, 再加入 25 mL 去离子水浸泡约 15 h, 使用电导率测定仪 (上海雷磁仪器, DDS-307 型) 测定叶片煮沸前电导率, 沸水浴 15 min 后冷却至室温并测定其煮沸后电导率, 计算相对电导率。3 次重复, 取平均值。

参照许瑛和陈发棣 (2008) 方法, 利用 Logistic 方程计算半致死温度 (LT_{50}), 评价耐寒性。用 R 语言 agricolae 软件包进行主效可加互作可乘 (AMMI) 模型的双标图分析, 以检测不同品种抗寒性及其稳定性。

1.2 SNP 基因分型和群体结构分析

利用 Chong 等 (2016) 前期报道的 SNP 分型数据, 基于次要基因型频率 (MAF) 大于 0.05 和 SNP 完整度大于 80% 的标准过滤掉低质量的 SNP 后, 共获得 36 737 个高质量 SNP 用于遗传变异和种群结构研究。最佳 K 值、群体结构分析、主成分分析 (PCA) 以及系统发育树的构建参照 Su 等 (2019) 的方法。

1.3 全基因组关联分析

应用 GAPIT 软件中的混合线性模型 (mixed linear model, MLM) 同时将主成分和亲缘关系矩阵作为协变量计入模型中进行叶片和舌状花 LT_{50} 与分子标记的全基因组关联分析。基于关联分析结果, 根据 Su 等 (2016) 报道的计算方法分析与目标性状显著相关的 SNP 等位基因位点。基于叶片和舌状花低温半致死温度的平均值, 通过比较具有有利等位基因种质与含有不利等位基因种质的平均表型值, 估计在不同时期叶片或舌状花中检测到的每个 SNP 等位基因位点的表型效应, 即有利等位基因种质的平均表型值 - 不利等位基因种质的平均表型值。本研究中有利 LT_{50} 表型效应值为负数。

1.4 候选基因的筛选

将检测到的与切花菊耐寒性显著相关的 SNP 位点所在 SLAF 序列与菊花 ‘优香’ 和 ‘神马’ 转录组数据库进行 BLASTX 比对 ($E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$), 并对 Nr 和 Swiss-Prot 数据库进行功能注释, 筛选潜在的候选基因。

2 结果与分析

2.1 切花菊耐寒性的遗传变异

58 个切花菊品种各时期耐寒性 (LT_{50}) 数据见表 1。脚芽期、现蕾期、盛花期叶片以及舌状花 LT_{50} 范围分别为 $-15.74 \sim -1.03$ 、 $-5.26 \sim 5.68$ 、 $-8.99 \sim 3.01$ 和 $-6.97 \sim 1.53$ °C, 平均值分别为 -9.04 、 -2.15 、 -4.22 和 -4.25 °C, 现蕾期叶片的 LT_{50} 相对较高, 脚芽期较低 (表 2)。

各时期叶片和盛花期舌状花 LT_{50} 的变异系数均大于 25%, 说明各时期耐寒性离散程度较大; 尤其是现蕾期叶片的变异系数超过 100%, 变异极大。 LT_{50} 在各时期偏度和峰度范围在 0.05 ~ 1.31 和 1.03 ~ 2.75 之间 (表 2), 密度分布曲线 (图 1) 显示脚芽期和盛花期叶片呈连续性较好的正态分布趋势, 现蕾期叶片呈现出双峰曲线分布趋势, 而盛花期舌状花略呈偏态分布, 表明菊花耐寒性是由多基因控制的复杂数量性状。

基于 AMMI 模型将 $G \times E$ 进行多个维度的分解, 可以分析品种各种性状的稳定性和适应性。以 58 份切花菊各时期叶片和盛花期舌状花 LT_{50} 为 X 轴, 以 $G \times E$ 分解的 IPCA1 (第一主成分) 为 Y 轴, 以 IPCA1 值为 0 做一条水平线, 其中水平方向, 横坐标越小, 抗逆性越强; 垂直方向, 越靠近水平线, 品种越稳定。从 AMMI 双标图 (图 2) 上可以看出 ‘天使’ (bl) 耐寒性和稳定性较好, ‘草莓菊’ (db) 耐寒性较好但稳定性一般。

表 1 切花菊脚芽期、现蕾期、盛花期叶片和盛花期舌状花的低温半致死温度

Table 1 LT₅₀ of leaf at rhizome stage, budding stage, flowering stage and ray floret at flowering stage of cut chrysanthemum °C

编号 Code	品种 Cultivar	叶片 Leaf			盛花期舌状花 Ray floret at flowering stage
		脚芽期 Rhizome stage	现蕾期 Budding stage	盛花期 Flowering stage	
ad	香槟红 Biarritz Red	- 7.22	- 0.25	- 4.18	- 2.76
ae	Q2-17	- 7.25	- 2.63	- 4.01	- 3.72
aj	紫红托桂 Zihong Tuogui	- 8.50	- 3.43	- 4.45	- 5.61
am	Q4-1	- 8.04	- 4.19	- 3.05	- 3.72
an	憩风车 Xifengche	- 8.75	- 3.37	- 4.73	- 4.28
ao	一品黄 Yipinhuang	- 9.21	- 4.06	- 6.07	- 4.93
au	粉沙姆 Samos Dark	- 8.42	- 0.97	- 4.09	- 6.63
ay	红黄复色 Honghuangfuse	- 11.43	- 3.85	- 7.04	- 2.57
bc	史泰白 Stallion White	- 12.57	- 1.47	- 5.11	- 2.10
be	粉安娜 Anastasia Pink	- 6.83	- 4.24	- 3.97	- 2.04
bg	玛丽 Marimo	- 11.33	- 4.07	- 5.59	- 5.46
bh	Q1-57	- 9.87	1.27	- 4.27	- 4.25
bj	小丽 Xiaoli	- 6.62	- 4.68	- 4.49	- 2.92
bl	天使 Angelina	- 13.21	- 4.09	- 8.99	- 6.97
bm	馒头菊 Cayman	- 8.96	- 2.81	- 3.13	- 4.75
bn	QD3-6	- 9.98	- 0.84	- 6.60	- 4.05
bo	香槟黄 Biarritz Yellow	- 1.03	2.65	- 3.88	- 3.51
cc	蒙淡黄 Monalis Cream	- 13.87	- 3.38	- 4.92	- 4.47
cf	秀幔戴花 Xiuman Daihua	- 9.47	- 1.39	- 5.09	- 6.84
co	Q1-22	- 12.04	- 2.92	- 3.50	- 3.65
cp	Wembley	- 8.14	- 1.04	- 3.30	- 3.60
cs	南农紫唇 Nannong Zichun	- 7.70	- 4.35	0.35	- 5.69
db	草莓菊 Finch	- 15.74	- 0.30	- 7.46	- 7.83
dd	红小 Hongxiao	- 8.20	0.72	- 4.51	- 3.25
dk	黄天赞 Zembla Sunny	- 6.87	- 4.67	- 4.64	- 3.25
dm	Q1-17	- 10.35	- 0.49	- 8.30	- 4.48
dq	黄玉 Huangyu	- 7.08	- 0.94	- 5.33	- 4.62
dr	清露 Puma Sunny	- 9.04	- 4.02	2.08	- 2.99
du	黄切菊 Huangqieju	- 10.84	- 4.11	- 3.06	- 3.84
dv	南农菲紫 Nanong Feizi	- 8.22	- 3.42	0.71	- 5.64
dy	蒙白 Monalisa	- 9.68	- 4.25	- 8.45	- 4.58
ee	顺发 Shunfa	- 11.21	- 6.08	- 3.23	- 3.81
eh	Q1-65	- 9.85	1.27	- 1.13	- 2.63
ek	Isis	- 8.68	- 2.81	- 3.10	- 4.96
en	翠心 Cuixin	- 8.30	- 7.13	- 7.76	- 5.33
eq	Q1-18	- 8.16	- 4.15	- 4.44	- 5.85
ev	Q2-5	- 9.71	- 3.98	- 3.38	- 4.24
fb	Statesman	- 9.26	- 3.92	- 3.87	- 6.64
fg	Q2-16	- 10.04	- 3.95	- 3.14	- 5.22
fh	南农功勋 Nanong Gongxun	- 7.36	- 4.66	- 4.52	- 6.11
fl	Q5-4	- 5.56	- 4.08	- 4.00	- 3.26
fm	紫冠 Ziguan	- 6.52	- 3.90	- 3.83	- 3.92
fp	黄绿乒乓 Huanglü Pingpang	- 9.53	- 3.45	- 3.16	- 5.74
fr	诺亚 Noa	- 13.28	0.78	- 3.78	- 3.17
fw	Q1-3	- 9.35	- 2.70	- 8.17	- 2.66
fx	神马 Jinba	- 8.91	- 4.26	- 0.57	- 4.60
fz	QD1-4	- 10.09	- 4.21	- 2.02	- 3.53
ge	Q3-2	- 8.09	- 3.93	- 2.18	- 6.11
gg	南农雪峰 Nannong Xuefeng	- 9.47	- 4.54	- 7.07	- 4.50
gh	阿里格斯 Aliques	- 8.47	- 2.40	- 4.28	- 3.51
gi	Q4-3	- 10.97	- 5.26	- 5.76	- 4.38
gj	绿心小菊 Puma White	- 8.22	- 0.78	- 4.88	- 5.54
go	Q1-16	- 7.47	0.31	- 5.61	- 3.84
gx	南农红霞 Nannong Hongxia	- 8.84	- 3.88	- 5.48	- 2.65
hb	经典 Classic	- 9.47	- 3.95	- 5.13	- 4.31
hd	Grand Rose	- 4.83	- 4.30	- 5.42	- 6.19
he	绿安娜 Anastasia Dark Green	- 7.85	- 3.64	- 4.62	- 5.99
hr	Q1-15	- 8.46	- 0.30	- 4.21	- 2.26

表 2 58 个切花菊品种脚芽期、现蕾期、盛花期的叶片和盛花期舌状花耐寒性 (LT₅₀) 统计

Table 2 Descriptive statistics of cold tolerance (LT₅₀) of leaf at rhizome stage, budding stage, flowering stage and ray floret at flowering stage among 58 cut chrysanthemum cultivars

时期 Stage	部位 Part	最小值/°C Minimum	最大值/°C Maximum	平均值/°C Mean	标准偏差/°C Standard deviation	变异系数/% CV	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
脚芽期 Rhizome stage	叶片 Leaf	-15.74	-1.03	-9.04	2.29	25.33	0.05	2.75
现蕾期 Budding stage	叶片 Leaf	-5.26	5.68	-2.15	2.63	122.32	1.31	1.03
盛花期 Flowering stage	叶片 Leaf	-8.99	3.01	-4.22	2.34	55.45	0.68	1.67
	舌状花 Ray floret	-6.97	1.53	-4.25	1.50	35.29	0.76	2.53

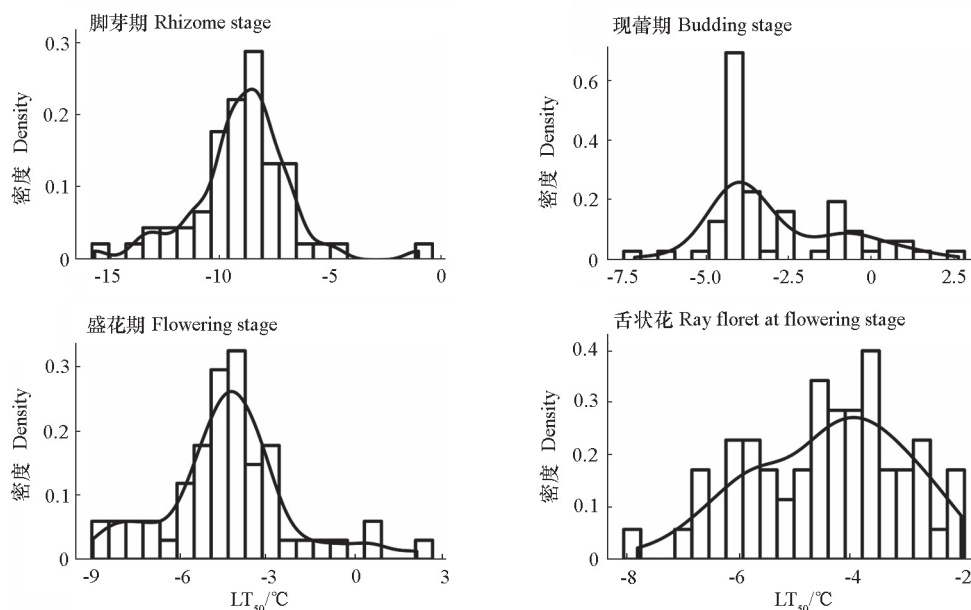


图 1 58 个切花菊品种脚芽期、现蕾期、盛花期的叶片和盛花期舌状花耐寒性 (LT₅₀) 的分布图

Fig. 1 Density distributions of cold tolerance (LT₅₀) of leaf at rhizome stage, budding stage, flowering stage and ray floret at flowering stage among the 58 cut chrysanthemum cultivars

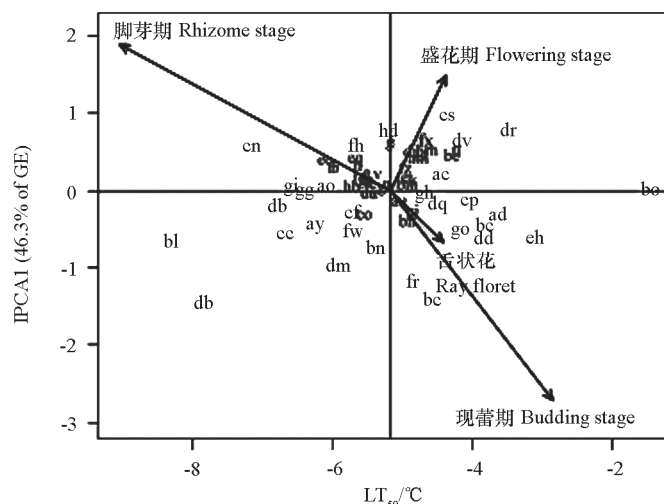


图 2 切花菊不同时期耐寒性的 AMMI 模型双标图

Fig. 2 Biplot of AMMI model for the cold tolerance of cut chrysanthemums at different growth stages

2.2 群体遗传结构分析

基于 36 737 个高质量 SNP 标记进行群体结构、主成分 (PCA) 和聚类分析。根据最小交叉验证误差值, 确定最佳分群 K 值为 3 (图 3), 将 58 个菊花品种分为 3 个亚群 Q1、Q2、Q3 (图 4), PCA 结果 (图 5) 与群体结构的划分基本一致。聚类分析 (图 6) 将 58 个菊花品种主要分为三大类, 第一类包括全部的 Q1 亚群和大部分 Q3 亚群, 第二类 and 第三类主要由 Q2 和 Q3 亚群组成。第二类中有 14 个品种为切花小菊 (87.5%), 其中 85.7% 的资源来源欧洲。脚芽期、现蕾期、盛花期叶片和盛花期舌状花的 LT_{50} , Q1 亚群分别为 -10.21、-4.05、-4.96 和 -4.63 °C; Q2 亚群分别为 -9.68、-2.99、-5.26 和 -4.84 °C; Q3 亚群分别为 -8.70、-2.68、-4.00 和 -4.24 °C, 可见 3 个亚群间的 LT_{50} 无显著差异。

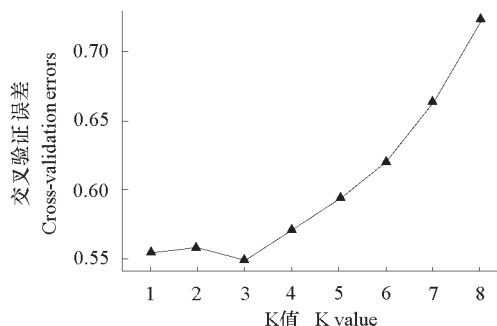


图 3 58 个切花菊品种的最佳 K 值
 Fig. 3 K value of the 58 cut chrysanthemum cultivars

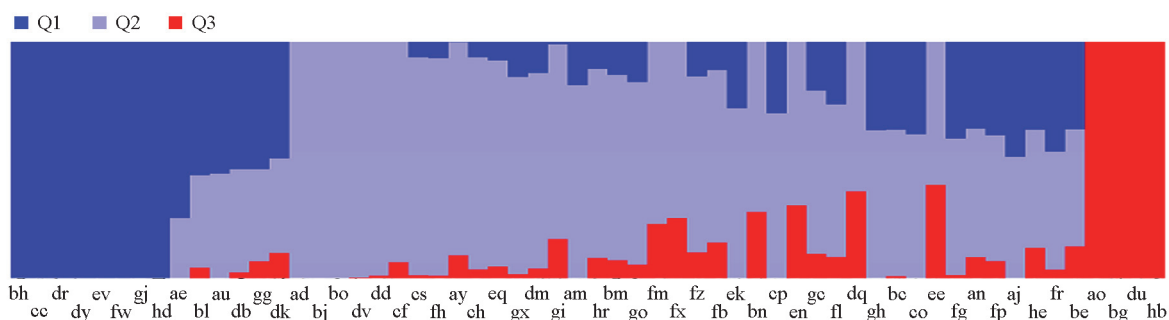


图 4 58 个切花菊品种的群体结构
 Fig. 4 Population structure of the 58 cut chrysanthemum cultivars

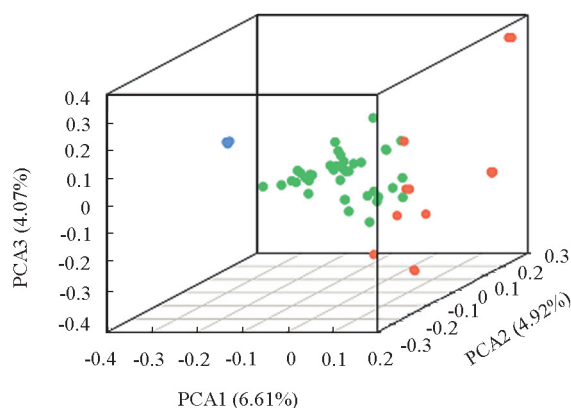


图 5 58 个切花菊品种的 PCA 图
 Fig. 5 PCA of the 58 cut chrysanthemum cultivars

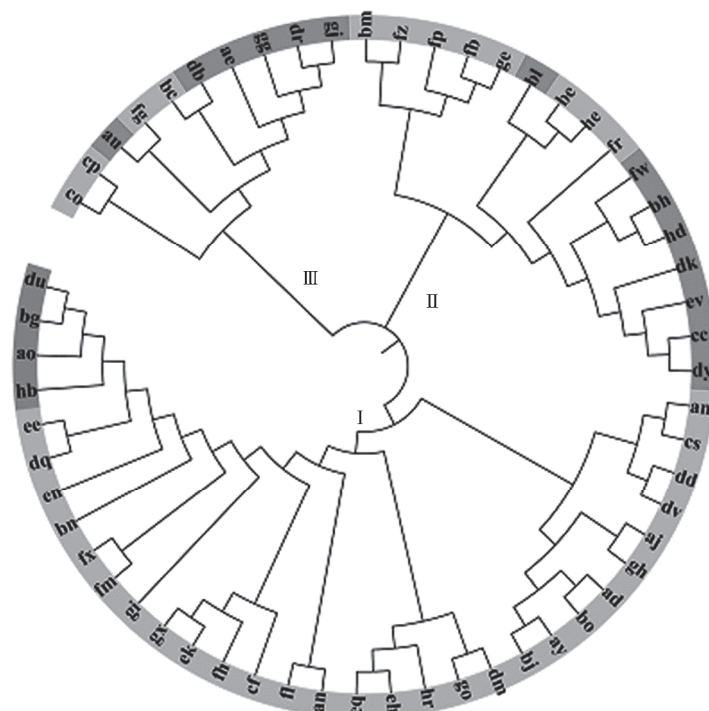


图 6 58 个切花菊品种邻接法系统发育树

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic tree of the 58 cut chrysanthemum cultivars

2.3 全基因组关联分析

通过 GAPIT 的 MLM 方法对 58 份切花菊脚芽期、现蕾期、盛花期叶片和盛花期舌状花耐寒性 (LT_{50}) 进行关联分析, 在 $P < 0.001$ 的阈值下共检测到 24 个与耐寒性显著关联的 SNP 位点 (表 3), 其中与脚芽期、现蕾期、盛花期叶片 LT_{50} 相关的分别有 5 个、11 个和 5 个, 与盛花期舌状花 LT_{50} 相关的有 3 个。在这 24 个 SNP 位点中, Marker1039053 (48 bp)、Marker18607 (162 bp)、Marker9452 (61 bp)、Marker10609 (69 bp) 和 Marker5277 (51 bp) 等 5 个 SNP 位点具有较小的表型效应值 (< -4), 在携带有利和不利等位点变异的切花菊品种之间 LT_{50} 的差异达到显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 水平, 为优异等位变异 (表 3, 图 7)。

表 3 与切花菊耐寒性相关的显著 SNP 位点

Table 3 Significant SNP loci associated with cold tolerance in cut chrysanthemum

时期 Stage	SNP 位点 (bp) SNP position (bp)	P 值 P value	优异等位点 (粗体) Favorble alleles (bold)	等位基因效应估计 Allelic effect estimate	表型效应值 Phenotypic effect
脚芽期 Rhizome stage	Marker1039053 (48 bp)	3.06E-04	A/G/R	-2.41	-6.44**
	Marker26602 (126 bp)	6.57E-04	G/A/R	1.74	-3.80**
	Marker18607 (162 bp)	6.81E-04	C/T/Y	1.79	-4.84**
	Marker9452 (61 bp)	8.22E-04	G/A/R	2.21	-4.93**
	Marker387963 (21 bp)	9.59E-04	C/A/M	-2.25	-2.97**
现蕾期 Budding stage	Marker50841 (23 bp)	2.41E-04	T/C/Y	-1.60	-3.28**
	Marker15186 (14 bp)	2.71E-04	A/G/R	-2.31	-1.61
	Marker10255 (22 bp)	2.86E-04	G/T/K	-2.22	-1.16
	Marker18525 (29 bp)	3.49E-04	G/R	-2.12	-2.40**
	Marker10609 (69 bp)	3.78E-04	T/C/Y	2.71	-4.99*
	Marker15186 (6 bp)	5.37E-04	C/T/Y	-2.24	-1.67

续表 3

时期 Stage	SNP 位点 (bp) SNP position (bp)	P 值 P value	优异等位位点 (粗体) Favorable alleles (bold)	等位基因效应估计 Allelic effect estimate	表型效应值 Phenotypic effect
盛花期 Flowering stage	Marker19825 (86 bp)	5.40E-04	T/Y	-2.36	-1.67*
	Marker27458 (120 bp)	6.34E-04	A/G/R	1.75	-2.01
	Marker27458 (171 bp)	6.34E-04	G/A/R	1.75	-2.01
	Marker5277 (51 bp)	6.56E-04	G/T/K	-1.85	-5.75*
	Marker5041 (206 bp)	9.06E-04	T/Y	-2.75	-2.13**
	Marker13229 (156 bp)	2.51E-04	A/G/R	-2.29	-2.34**
	Marker6603 (205 bp)	5.10E-04	G/A/R	2.16	-2.17
	Marker14732 (53 bp)	6.45E-04	G/A/R	-1.83	-3.71**
	Marker384075 (152 bp)	8.82E-04	C/T/Y	-1.26	-2.30**
盛花期 (舌状花) Flowering stage (Ray floret)	Marker6606 (58 bp)	9.34E-04	C/A/M	-1.61	-2.47**
	Marker20556 (17 bp)	3.88E-04	C/T/Y	1.16	-1.31
	Marker7493 (185 bp)	4.56E-04	C/T/Y	1.24	-1.42
	Marker4043 (62 bp)	4.59E-04	G/R	1.39	-1.15

R: A/G, Y: C/T, M: C/A, K: G/T; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

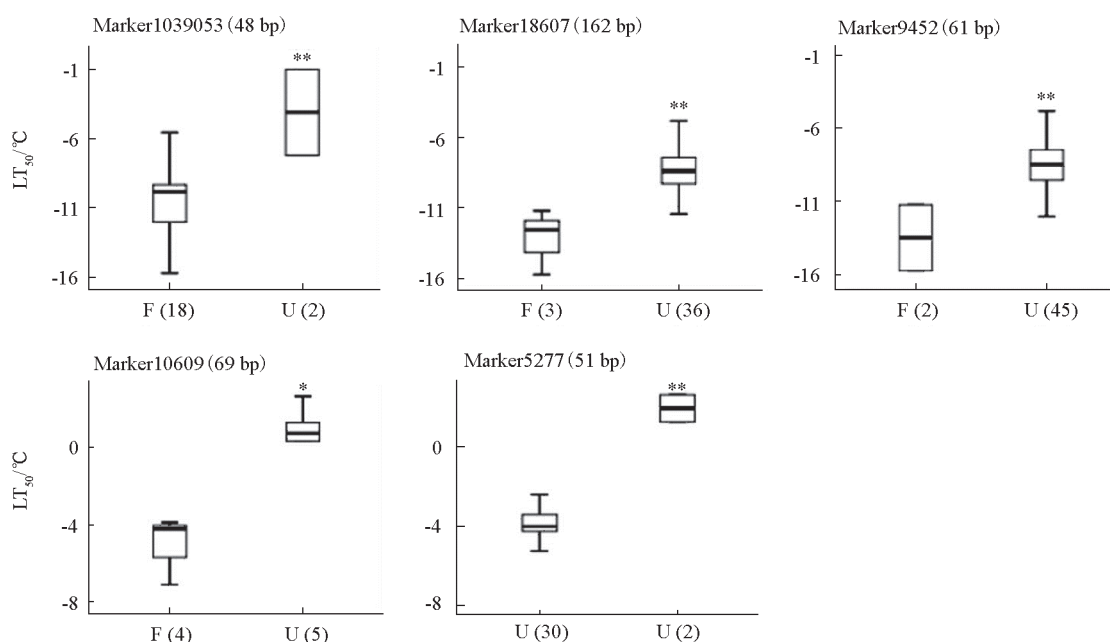


图 7 携带有利 (F) 和不利 (U) 等位位点变异的切花菊品种 LT_{50} 差异分布

括号内数值为对应的个体数; *, ** 分别代表 Student's t test 检验在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上有显著差异。

Fig. 7 Box plots indicating the variation of LT_{50} between the cut chrysanthemum accessions carrying favorable (F) and unfavorable (U) allele

The number of individuals for each allele is given in parenthesis; *, ** means different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, as calculated by Student's t test.

2.4 候选基因分析

将显著 SNP 位点所在 SLAF 标签序列与菊花‘优香’和‘神马’转录组数据库进行 BLASTX 比对, 挖掘到 5 个候选基因, 其功能注释见表 4。在‘优香’转录组库中筛到 4 个 SLAF 标签。其中两个与脚芽期叶片耐寒性相关: Marker1039053 (48 bp) 定位到的候选基因为 *Unigene35739_All*, 编码羧基末端加工肽酶 3、D1 C - 末端处理蛋白酶 3、光系统 II D1 蛋白加工肽酶 3; Marker26602

(126 bp)定位到的候选基因为 *CL2978.Contig39_All*, 编码丝氨酸/苏氨酸 - 蛋白激酶 11 - 互作蛋白。一个与盛花期叶片耐寒性相关的 SLAF 标签 Marker6606- (58 bp) 定位到的候选基因为 *CL2042.Contig4_All*, 编码囊泡相关膜蛋白 727, 与 *AtVAMP727* 基因有关。另一个与盛花期舌状花耐寒性相关的 SLAF 标签 Marker7493 (185 bp) 定位到 *CL6358.Contig1_All* 候选基因, 编码转座子 Ty3-G Gag-Pol 多聚蛋白、转座子 Ty3-1 TYA-TYB 多聚蛋白。

在‘神马’转录组库中筛到 1 个 SLAF 标签 Marker18607 (162 bp) 定位到的候选基因为 *Unigene40993_All*, 可能与 *AtMg00810* 相关, 编码非典型线粒体蛋白。据报道该线粒体蛋白的相关水平与耐寒性具有一定的关联。

表 4 与切花菊耐寒性相关的候选基因列表

Table 4 List of candidate genes associated with cold tolerance

SLAF 标签 SLAF tag	候选基因 Candidate gene	E - value ^a	功能注释 Functional annotation
Marker18607 (162 bp)	<i>Unigene40993_All</i>	2.00E-46	非典型线粒体蛋白 AtMg00810 Uncharacterized mitochondrial protein AtMg00810
Marker7493 (185 bp)	<i>CL6358.Contig1_All</i>	8.00E-32	转座子 Ty3-G Gag-Pol 多聚蛋白, 转座子 Ty3-1 TYA-TYB 多聚蛋白 Transposon Ty3-G Gag-Pol polyprotein, transposon Ty3-1 TYA-TYB polyprotein
Marker6606 (58 bp)	<i>CL2042.Contig4_All</i>	7.00E-26	囊泡相关膜蛋白 727 AtVAMP727 Vesicle-associated membrane protein 727 AtVAMP727
Marker1039053 (48 bp)	<i>Unigene35739_All</i>	4.00E-24	羧基末端加工肽酶 3, D1 C - 末端处理蛋白酶 3, 光系统 II D1 蛋白加工肽酶 Carboxyl-terminal-processing peptidase 3, D1 C-terminal processing protease 3, Photosystem II D1 protein processing peptidase 3
Marker26602 (126 bp)	<i>CL2978.Contig39_All</i>	1.00E-12	丝氨酸/苏氨酸 - 蛋白激酶 11 互作蛋白 Serine/threonine-protein kinase 11-interacting protein

注: a 表示基于 E 值 < 10⁻⁵ 的‘神马’和‘优香’转录组文库中显著相关的 SLAF 序列。

Note: a indicates the significantly associated SLAF sequences blast with transcriptome library of ‘Jinba’ and ‘Yuuka’ respectively based on E-value < 10⁻⁵.

3 讨论

菊花许多重要性状受多基因控制并且易受环境因素的影响, 通过常规育种方法选择效率低, 因此, 很有必要开发与目标性状紧密连锁的标记并用于分子标记辅助育种。以往在菊花主要性状相关的分子标记挖掘中, 主要利用 SRAP、SSR、SCoT 等基于凝胶电泳的分子标记类型 (Wang et al., 2014; Su et al., 2016; Fu et al., 2018; Yang et al., 2019), 扩增多态性有限, 且由于缺乏菊花基因组很难挖掘相关候选基因。与这些传统分子标记相比, SNP 分子标记具有高丰度、高稳定性和高通量等特点 (Isaksson et al., 2000; Gupta et al., 2001), 目前已用于菊花连锁作图 (van Geest et al., 2017a, 2017b) 和重要观赏性状以及耐涝性关联分析 (Chong et al., 2016, 2019; Su et al., 2019), 进一步推动了菊花分子标记辅助育种研究。

目前关于菊花耐寒性的分子标记研究主要是基于传统分子标记 (马杰 等, 2018; Ao et al., 2019; 徐婷婷 等, 2019), 帮助理解相关数量遗传机制, 但是用于分子标记辅助育种的潜力有限。本研究在前 SNP 分子标记开发 (Chong et al., 2016) 和耐寒性鉴定 (徐婷婷, 2018) 的基础上, 利用全基因组关联分析挖掘到 24 个 SNP 位点与脚芽期、现蕾期、盛花期叶片以及盛花期舌状花耐寒性显著相关。但是, 不同时期的 SNP 位点不一致, 可能的原因是切花菊耐寒性是由多基因控制的数量遗传性状, 受环境因素影响较大。另外, 本研究中有 5 个优异 SNP 位点表型效应均在 - 4 °C 以下, 这些耐寒性优异 SNP 位点的挖掘为今后 CAPS/dCAPS 分子标记开发和育种研究奠定重要基础

(Chong et al., 2019; Su et al., 2019)。

本研究中在‘优香’转录组库和‘神马’转录组库中筛选到5个候选基因。‘优香’数据库中的候选基因 *CL6358.Contig1_All* 与 Ty3 元件具有一定的联系。据报道, Ty3 是与 tRNA 基因相关的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 反转录转座子 (Hansen & Sandmeyer, 1990), TYA3-1 和 TYB3-1 是该转座子感受态 Ty3 元件 Ty3-1 的两个重叠的开放阅读框, 其编码蛋白分别与逆转录病毒 *gag* 和 *pol* 基因的蛋白产物具有同源性。*CL2042.Contig4_All* 候选基因编码囊泡相关膜蛋白 727 (VAMP727), VAMP 家族是一类 SNARE (可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感性因子附着蛋白受体) 蛋白。Zhang 等 (2015) 研究发现, 拟南芥中 *VAMP721* 可与 KAT1 和 KC1 的 K⁺通道相互作用以在质膜中中和 K⁺ 电流; Leshem 等 (2007) 的研究表明, 抑制 *AtVAMP7C* 的表达以及促进突变体基因的表达能够抑制含 H₂O₂ 的囊泡与液泡膜的融合, 通过维持 ΔpH 改善液泡功能, 减少从液泡中释放 Ca²⁺, 而 Ca²⁺ 的释放可触发干旱胁迫、盐胁迫和冷胁迫等各种应激相关的信号传导途径 (Knight et al., 1996, 2010)。*Unigene35739_All* 基因参与编码羧基末端加工肽酶 3、D1 C-末端处理蛋白酶 3、光系统 II D1 蛋白加工肽酶 3。这些蛋白酶参与光系统 II 叶绿体 D1 蛋白的 C 末端加工, 该蛋白的水解加工对于光合放氧复合物四核锰簇的组装是必要的。在‘神马’转录组库中筛选得到的候选基因 *Unigene40993_All* 可能与编码非典型线粒体蛋白 AtMg00810 有相关联系。Gołębiewska-Pikania 等 (2017) 分析了冬大麦中受冷锻炼诱导的蛋白质丰度的变化, 发现 AtMg00810 的相对水平与冷耐受性显著相关。因此, 本研究中挖掘的候选基因 *CL2042.Contig4_All* 和 *Unigene40993_All* 可能与冷胁迫具有一定关联, 今后可作进一步鉴定。

现有文献表明关联分析的准确性与标记数量、样本大小、目标表型准确性和统计方法等因素密切相关 (Long & Langley, 1999; Zhu et al., 2008; Su et al., 2019)。本研究中虽然 SNP 标记数量 (36 737) 较大, 但是切花菊品种样本 (58) 较小, 可能影响关联分析结果的精确度。本研究中, 24 个耐寒性显著关联 SNP 位点 ($P < 0.001$) 在通过 Bofferni 矫正后 ($P \leq 0.05/36\ 737 = 1.36E-6$) 均未达显著水平。事实上, 目前绝大多数关联分析均达不到 Bofferni 矫正后的显著水平, 而常采用 $P < 0.01$ 或 0.001 等作为阈值用于显著分子标记位点的挖掘 (Soltani et al., 2017; Aynana et al., 2018; Su et al., 2019), 而且本研究中获得的 SNP 位点在耐寒表型效应方面差异较大, 说明本研究结果可靠性强。尽管如此, 在今后研究中应进一步增加样本规模以提高优异等位变异位点的检出率。

References

- Ao N, Ma J, Xu T, Su J, Yang X, Guan Z, Fang W, Chen F, Zhang F. 2019. Genetic variation and QTL mapping for cold tolerance in a chrysanthemum F₁ population at different growth stages. *Euphytica*, 215: 88.
- Ayana G T, Ali S, Sidhu J S, Gonzalez H J L, Turnipseed B, Sehgal S K. 2018. Genome-wide association study for spot blotch resistance in hard winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9: 926.
- Chen Y, Jiang J, Chang Q, Gu C, Song A, Chen S, Dong B, Chen F. 2014. Cold acclimation induces freezing tolerance via antioxidative enzymes, proline metabolism and gene expression changes in two chrysanthemum species. *Molecular Biology Reports*, 41(2): 815 - 822.
- Chen L, Chen Y, Jiang J, Chen S, Chen F, Guan Z, Fang W. 2012. The constitutive expression of *Chrysanthemum dichrum ICE1* in *Chrysanthemum grandiflorum* improves the level of low temperature, salinity and drought tolerance. *Plant Cell Reports*, 31: 1747 - 1758.
- Chi Tian-hua, Xu Ting-ting, Liu Ying-xin, Ma Jie, Guan Zhi-yong, Fang Wei-min, Chen Fa-di, Zhang Fei. 2018. Genetic variation for cold tolerance in an interspecific *C. dichrum* × *C. nankingense* population. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 32 (12): 2298 - 2304. (in Chinese)
- 迟天华, 徐婷婷, 刘颖鑫, 马杰, 管志勇, 房伟民, 陈发棣, 张 飞. 2018. 异色菊 × 菊花脑种间杂交后代耐寒性的遗传变异. *核农学报*, 32 (12): 2298 - 2304.

- Chong X, Zhang F, Wu Y, Yang X, Zhao N, Wang H, Guan Z, Fang W, Chen F. 2016. A SNP-enabled assessment of genetic diversity, evolutionary relationships and the identification of candidate genes in chrysanthemum. *Genome Biology and Evolution*, 8 (12): 3661 - 3671.
- Chong X, Su J, Wang F, Wang H, Song A, Guan Z, Fang W, Jiang J, Chen S, Chen F, Zhang F. 2019. Identification of favorable SNP alleles, dCAPS markers and candidate genes responsible for inflorescence-related traits in chrysanthemum. *Plant Molecular Biology*, 99 (4 - 5): 407 - 420.
- Fu X, Su J, Yu K, Cai Y, Zhang F, Chen S, Fang W, Chen F, Guan Z. 2018. Genetic variation and association mapping of aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*) resistance in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Euphytica*, 214: 21.
- Gołębiewska-Pikania G, Kopeć P, Surówka E, Krzewska M, Dubas E, Nowicka A, Rapacz M, Wójcik-Jagła M, Malaga S, Żur I. 2017. Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Proteomics*, 169: 58 - 72.
- Guo Hai-lin, Liu Jian-xiu, Zhu Xue-hua, Guo Ai-gui. 2006. Evaluation of cold resistance of *Zoysia* hybrids. *Acta Agrestia Sinica*, 14 (1): 24 - 28. (in Chinese)
- 郭海林, 刘建秀, 朱雪花, 郭爱桂. 2006. 结缕草属杂交后代抗寒性评价. *草地学报*, 14 (1): 24 - 28.
- Gupta P K, Roy J K, Prasad M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science*, 80 (4): 524 - 535.
- Hansen L J, Sandmeyer S B. 1990. Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein. *Journal of Virology*, 64 (6): 2599 - 2607.
- Isaksson A, Landegren U, Syvänen A C, Bork P, Stein C, Ortigao F, Brookes A J. 2000. Discovery, scoring and utilization of human single nucleotide polymorphisms: a multidisciplinary problem. *European Journal of Human Genetics*, 8 (2): 154 - 156.
- Knight H, Trewavas A J, Knight M C. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell*, 8 (3): 489 - 503.
- Knight H, Trewavas A J, Knight M C. 2010. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 12 (5): 1067 - 1078.
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A. 2007. Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (3): 18008 - 18013.
- Li Chong-hui, Wang Liang-sheng, Shu Qing-yan, Xu Yan-jun, Zhang Jie. 2008. Pigments composition of petals and floral color change during the blooming period in *Rhododendron mucronulatum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1023 - 1030. (in Chinese)
- 李崇晖, 王亮生, 舒庆艳, 徐彦军, 张 洁. 2008. 迎红杜鹃花色色素组成及花色在开花过程中的变化. *园艺学报*, 35 (7): 1023 - 1030.
- Li Na, Fang Wei-min, Chen Fa-di, Chen Su-mei, Chen Yu. 2010. Physiological indexes in florets of two winter cut chrysanthemum cultivars under low temperature and their cold tolerance. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 30 (4): 741 - 746. (in Chinese)
- 李 娜, 房伟民, 陈发棣, 陈素梅, 陈 煜. 2010. 切花寒菊小花对低温胁迫的生理响应及其抗寒性分析. *西北植物学报*, 30 (4): 741 - 746.
- Long A D, Langley C H. 1999. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Research*, 9 (8): 720 - 731.
- Ma Jie, Xu Ting-ting, Su Jiang-shuo, Yang Xin-cheng, Fang Wei-min, Chen Fa-di, Zhang Fei. 2018. Genetic variation and QTL mapping for cold tolerance of ray florets in an F₁ population of *Chrysanthemum morifolium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (4): 717 - 724. (in Chinese)
- 马 杰, 徐婷婷, 苏江硕, 杨信程, 房伟民, 陈发棣, 张 飞. 2018. 菊花 F₁ 代舌状花耐寒性的遗传变异与 QTL 定位. *园艺学报*, 45 (4): 717 - 724.
- Ren L, Sun J, Chen S, Gao J, Dong B, Liu Y, Xia X, Wang Y, Liao Y, Teng N, Fang W, Guan Z, Chen F, Jiang J. 2014. A transcriptomic analysis of *Chrysanthemum nankingense* provides insights into the basis of low temperature tolerance. *BMC Genomics*, 15: 844.
- Soltani A, MafiMoghaddam S, Walter K, Restrepo-Montoya D, Mamidi S, Schroder S, Lee R, McClean P E, Osorno J M. 2017. Genetic architecture of flooding tolerance in the dry bean middle-American diversity panel. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1183.

- Su J, Zhang F, Chong X, Song A, Guan Z, Fang W, Chen F. 2019. Genome-wide association study identifies favorable SNP alleles and candidate genes for waterlogging tolerance in chrysanthemums. *Horticulture Research*, 6: 21.
- Su J, Zhang F, Li P, Guan Z, Fang W, Chen F. 2016. Genetic variation and association mapping of waterlogging tolerance in chrysanthemum. *Planta*, 244 (6): 1241 - 1252.
- van Geest G, Bourke P M, Voorrips R E, Marasek-Ciolakowska A, Liao Y, Post A, van Meeteren U, Visser R G F, Maliepaard C, Arens P. 2017a. An ultra-dense integrated linkage map for hexaploid chrysanthemum enables multi-allelic QTL analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 130: 2527 - 2541.
- van Geest G, Voorrips R E, Esselink D, Post A, Visser R G F, Arens P. 2017b. Conclusive evidence for hexasomic inheritance in chrysanthemum based on analysis of a 183k SNP array. *BMC Genomics*, 18 (1): 585 - 597.
- Wang C, Zhang F, Guan Z, Chen S, Jiang J, Fang W, Chen F. 2014. Inheritance and molecular markers for aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*) resistance in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Scientia Horticulturae*, 180: 220 - 226.
- Wang D, Liu J, Li C, Kang H, Wang Y, Tan X, Liu M, Deng Y, Wang Z, Liu Y, Zhang D, Xiao Y, Wang G. 2016. Genome-wide association mapping of cold tolerance genes at the seedling stage in rice. *Rice*, 9 (1): 61 - 71.
- Xu Ting-ting. 2018. Genetic variation and association analysis for cold tolerance of cut chrysanthemum at different growth stages [M. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
徐婷婷. 2018. 切花菊不同生长期耐寒性的遗传变异和关联分析 [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学.
- Xu Ting-ting, Ma Jie, Chi Tian-hua, Ye Dan, Guan Zhi-yong, Fang Wei-min, Chen Fa-di, Zhang Fei. 2019. Genetic variation and molecular markers for cold tolerance of cut-chrysanthemum cultivars at seedling stage. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 33 (1): 199 - 207. (in Chinese)
徐婷婷, 马杰, 迟天华, 叶丹, 管志勇, 房伟民, 陈发棣, 张飞. 2019. 切花菊苗期抗寒性评价及相关的分子标记挖掘. *核农学报*, 33 (1): 199 - 207.
- Xu Ying, Chen Fa-di. 2008. The LT_{50} and cold tolerance adaptability of chrysanthemum during a natural drop in temperature. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (4): 559 - 564. (in Chinese)
许瑛, 陈发棣. 2008. 菊花 8 个品种的低温半致死温度及其抗寒适应性. *园艺学报*, 35 (4): 559 - 564.
- Yang X, Wu Y, Su J, Ao N, Guan Z, Jiang J, Chen S, Fang W, Chen F, Zhang F. 2019. Genetic variation and development of a SCAR marker of anemone-type flower in chrysanthemum. *Molecular Breeding*, 39 (3): 48.
- Zhang B, Karnik R, Wang Y, Wallmeroth N, Blatt M, Grefen C. 2015. The *Arabidopsis* R-SNARE VAMP721 interacts with KAT1 and KCl K⁺ channels to moderate K⁺ current at the plasma membrane. *The Plant Cell*, 27 (6): 1697 - 1717.
- Zhang Fei, Chen Fa-di, Fang Wei-min, Chen Su-mei. 2011. QTL mapping for flowering duration stage of chrysanthemum. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1557 - 1564. (in Chinese)
张 飞, 陈发棣, 房伟民, 陈素梅. 2011. 菊花开花持续期的 QTL 定位. *园艺学报*, 38 (8): 1557 - 1564.
- Zhang Jie, Wang Liang-sheng, Gao Jin-ming, Li Sheng-bo, Xu Yan-jun, Li Chong-hui, Yang Rui-zhen. 2011. Identification of anthocyanins involving in petal coloration in *Chaenomeles speciosa* cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (3): 527 - 534. (in Chinese)
张 洁, 王亮生, 高锦明, 李圣波, 徐彦军, 李崇晖, 杨瑞珍. 2011. 贴梗海棠花青苷组成及其与花色的关系. *园艺学报*, 38 (3): 527 - 534.
- Zhang M, Ye J, Xu Q, Feng Y. 2018. Genome-wide association study of cold tolerance of Chinese *indica* rice varieties at the bud burst stage. *Plant Cell Reports*, 37 (3): 529 - 539.
- Zhu C, Gore M, Buckler E, Yu J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1: 5 - 20.