

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.06.009

利用 BSA-Seq 筛选甘蓝型油菜 菌核病抗性候选基因

夏吉春, 彭于洲, 王东, 李桐舟, 张凯, 徐新福

西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

摘要: 油菜菌核病居油菜 3 大病害之首, 它所引起的茎腐烂是导致油菜减产的重要原因之一, 因此筛选出调控菌核病的主效基因, 对利用分子辅助育种手段提高油菜产量具有重要意义. 该研究以甘蓝型油菜高抗材料 21Y490 为父本与高感材料 21Y689 杂交, 在 F₂ 分离群体终花期截取油菜茎秆进行核盘菌室内接种, 培养 3 d 后测量菌斑大小鉴定菌核病抗性. 筛选抗性极端表型个体构建 DNA 混池, 与亲本一起重测序提取差异 SNP, InDel 信息, 利用 BSA-seq 技术、ED 算法和 Δ -index 算法获得两个显著的关联区域, 分别位于 C09 号染色体的 17.8~21.2 Mb 和 31.6~39.1 Mb 区间, 区间内共有 399 个基因. 最后, 利用拟南芥和甘蓝型油菜基因组注释信息对关联候选区间对应的基因功能进行分析, 共筛选出与油菜菌核病抗性相关的 8 个候选基因 (*BnaC05g50540D*, *BnaC09g33900D*, *BnaA04g09130D*, *BnaA01g29170D*, *BnaC09g15640D*, *BnaC09g35310D*, *BnaA03g09220D*, *BnaCnng15460D*), 通过候选基因同源分析、代谢通路分析及共表达基因分析发现, 这些基因主要参与植物激素生长调控及免疫系统的信号转导, 为下一步抗性基因的克隆及功能研究奠定了基础.

关键词: 甘蓝型油菜; 核盘菌; 极端性状混池重测序; 功能注释

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)06-0085-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of Major Sclerotinia Resistance Genes by BSA-Seq of *Brassica napus*

XIA Jichun, PENG Yuzhou, WANG Dong,
LI Tongzhou, ZHANG Kai, XU Xinfu

School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: *Sclerotinia sclerotiorum* is ranked the first among the three major diseases of rapeseed, and stem rot caused by it is one of the important reasons for the reduction of rapeseed yield. Therefore, screening out the major genes regulating sclerotinia is very important for improving rapeseed yield with molecular as-

收稿日期: 2022-06-17

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-12).

作者简介: 夏吉春, 博士研究生, 主要从事油菜和棉花育种研究.

通信作者: 徐新福, 副研究员, 硕士研究生导师.

sisted breeding. In this study, the high-resistant material 21Y490 was crossed with the high-susceptible material 21Y689. The rape stalks of F2 population were cut at the final flowering stage for indoor inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum*. After culturing for 3 days, the size of the plaque was measured to identify the resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. DNA mixing pools were constructed with screened extreme resistant and susceptible individuals, respectively, and sequenced with parents to extract differential SNP and InDel information. Using BSA-seq, ED algorithm and Δ -Index algorithm, two significant association regions were identified in the 17.8-21.2 Mb and 31.6-39.1 Mb regions of chromosome C09, respectively. There were 399 genes in the region. Combined with gene annotation, 8 candidate genes related to *Sclerotinia sclerotiorum* resistance were screened out (*BnaC05g50540D*, *BnaC09g33900D*, *BnaA04g09130D*, *BnaA01g29170D*, *BnaC09g15640D*, *BnaC09g35310D*, *BnaA03g09220D*, *BnaCnng15460D*). The results of candidate genes homology analysis, metabolic pathway analysis and co-expression analysis showed that these 8 candidate genes are mainly involved in plant hormone growth regulation and signal transduction of the immune system, which laid a foundation for the cloning and functional research of resistance genes in the further work.

Key words: *Brassica napus*; *Sclerotinia sclerotiorum*; BSA-seq; function annotation

由核盘菌引发的油菜菌核病是油菜的第一大病害,近年来随着机械化和双低油菜的推广,该病害呈加重趋势。油菜菌核病的致病机理较为复杂,尚未有此方面系统全面的报道^[1-3]。

现有研究表明,多种水解酶及草酸等毒素在致病中起到了重要作用。核盘菌通过分泌释放纤维素酶、果胶酶、水解酶等裂解植物细胞壁^[4],从而获得孢子萌发及菌丝生长、扩散所需的营养成分^[5]。早在 19 世纪就有学者发现草酸在核盘菌侵染中起重要作用^[6]。在后续研究中发现草酸会酸化、腐败寄主植物组织,主要作用机理:①降低 pH 值,促进核盘菌分泌水解酶,同时抑制寄主中起抗病作用的酶^[7]。②结合细胞中的二价金属离子,破坏细胞结构与功能,如损坏细胞壁与核糖体、阻塞导管、阻碍叶绿素合成、改变膜的通透性、影响细胞信号转导等,致使细胞正常生理功能受到影响^[8-9]。③刺激保卫细胞对 K⁺ 的吸收,改变膜两侧的渗透压,使保卫细胞无法正常工作,致使气孔打开,叶片脱水,为核盘菌侵入创造有利条件^[10]。④调控寄主活性氧(ROS)代谢。侵入前期,抑制活性氧生成,阻止植物自身的防御进程;侵染中后期,诱导氧爆反应,诱发细胞程序性死亡(PCD),死亡细胞可作为营养源供病原菌生长、繁殖^[11]。

油菜通过多种途径响应来应对核盘菌的侵染。Wang 等^[12-13]发现油菜依次激活水杨酸(SA)途径、茉莉酸/乙烯(JA/ET)途径来产生对核盘菌的抗性,通过表达丝裂原活化蛋白激酶 BnMPK4,提高了油菜植株对菌核病的抗性,说明 MAPK 途径参与油菜抗菌核病反应。在次生代谢物方面,宋志荣等^[14]发现高硫苷的油菜菌核病抗性更高。另外,植保素、木质素、酚类化合物也参与了油菜的抗病响应^[15]。

当前,对油菜菌核病抗病基因的发掘主要从中心法则的 3 个方面开展研究。在 DNA 水平上,通常采用数量性状位点(QTL)定位进行研究。Zhao 等^[16]利用 107 个分子标记在甘蓝型油菜 128-F_{2,3} 家系群体中检测到 3 个与苗期叶片抗性相关的 QTL 和 3 个与成株期茎秆抗性相关的 QTL,马田田^[17]在 F₂ 群体中使用复合区间作图法检测到 3 个叶片抗性的 QTL 和 2 个茎秆抗性的 QTL。在这些研究中,苗期与成株期抗病 QTL 未检测出重合区域,说明油菜菌核病的抗性具有特异性,在不同时期或不同器官中可能存在不同的抗性位点。值得一提的是,梅家琴^[18]在甘蓝抗感分离的 F₂ 无性系群体中检测到了一个叶片抗性与茎秆抗性重叠的 QTL,这与之前的研究出现了差异。Wu 等^[19]2013 年鉴定出一个与茎秆相关的重要 QTL 位点,具有较高的遗传效应,并选定 *BnaC. IGMT5. a* 为候选抗病基因。

在 RNA 水平上,多数研究者利用 cDNA 芯片技术研究核盘菌侵染后诱导表达的基因,或不同抗性材

料在接种核盘菌后的基因表达差异. 除去指导合成各种抗性相关的蛋白质外, 相关研究主要集中于转录因子、信号转导及次生代谢物合成基因等^[20]. 张卡^[21]发现 *BnaA03.WRKY28* 和 *BnWRKY33* 两个转录因子均能结合 *BnWRKY33* 启动子, 前者为抗性负调控因子, 后者的大量表达可增强抗病反应. 许李明^[22]的研究表明, *BnEIN3* 是正向调控抗性的乙烯信号转导关键调节因子.

在蛋白质水平上, 早期学者们通过检测接种核盘菌前后植株体内防御酶的变化规律来研究抗性相关性, 王汉中等^[23]发现几丁质酶、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化物酶(PPO)、过氧化物酶(POD)等与菌核病抗性有关, 之后则采用蛋白组学的方法研究抗病基因. Wen 等^[24]采用蛋白组双向电泳技术, 根据蛋白质表达谱差异得到了甘蓝型油菜 20 个抗性相关蛋白. 此外, 对油菜菌核病病程蛋白(PR)的研究也具有广阔的发展前景, 石美娟等^[25]发现甘蓝型油菜类甜蛋白基因 *BnTLP1* 正调控菌核病抗性, 且 JA/ET 途径可能早期参与其抗性响应.

本研究是在极端抗性材料构建的 F2 分离群体基础上, 利用高通量测序方法筛选鉴定可能的甘蓝型油菜菌核病抗性基因, 为后续基因克隆、功能分析及油菜菌核病在分子机理层面的剖析奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所有材料均来源于重庆市油菜工程技术研究中心. 高抗父本 21Y490 发病率在 30% 左右, 相对于 ZY821 为中抗品种, 病情严重度为 1 级(病斑长 1~2 cm); 高感母本 21Y689 发病率高达 100%, 相对于 ZY821 为高感品种, 病情严重度在 3 级以上(病斑长 3 cm 以上). 将高抗父本 21Y490 与高感母本 21Y689 杂交, 杂种 F1 代自交后获得 F2 分离群体, 于 2021 年在重庆市武隆区仙女山种植.

将核盘菌在 PAD 培养基(20% 马铃薯、2% 葡萄糖及 1.5% 琼脂)平板上复苏后, 取平板边缘菌丝转接, 对第二轮转接后的菌丝进行暗培养 3 d, 待菌丝刚布满平板时用灭菌后的打孔器(内径 0.6 cm)沿平板边缘打孔, 获得的带菌丝琼脂块作为接种体, 用于接种^[26].

1.2 试验方法

1.2.1 茎秆离体接种鉴定

于终花期离地面 10 cm 处截取约 30 cm 长的茎段, 去除多余枝叶并将两端敷上浸过水的棉花球, 用保鲜膜封严保湿. 通过无菌打孔器(内径 0.6 cm)在茎秆距两端约 10 cm 处破坏表皮, 产生与接种体大小一致的伤口, 将接种体带菌面紧贴创伤处, 覆盖保鲜膜, 接种后置于培养箱内 72 h 测量菌斑长度^[26].

1.2.2 构建混池进行重测序

根据侵染菌斑长度从 F2 分离群体中挑选 30 株高抗植株和 30 株高感植株使用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法分别提取 DNA, 构建 DNA 混合池, 两混池、两亲本池均送北京百迈克生物科技有限公司利用 Illumina HiSeq 平台建库并进行全基因组重测序.

1.2.3 混合分组分析法(BSA)分析

由百迈克生物科技公司完成 BSA 分析, 主要步骤如下:

(1) 测序数据质控

根据碱基质量、类型等数据确认测序质量, 并删除原始测序序列中低质量 Reads(带接头、N 比例大于 10%、质量值 $Q \leq 10$), 过滤得到 Clean Reads.

(2) 参考基因组比对

利用 bwa 软件将 Clean Reads 与甘蓝型油菜参考基因组(ZS11 油菜参考基因组)比对^[27]. 通过比较确定了 Clean Reads 在参考基因组上的位置, 并统计测序深度和基因组覆盖度.

(3) SNP 和 InDel 的检测与注释:

SNP 和 InDel 检测使用 GATK 软件工具包, 根据前面比对定位的结果, 预处理后使用 GATK 进行 SNP 和 Small InDel 检测, 过滤后得到最终结果^[28]. 具体流程参考 GATK 官网: <https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/best-practices.php>. 根据比对结果, 将 4 个混池间所有差异的变异位点汇总, 统计出样品间的 SNP 和 InDel 位点.

SNP 和 InDel 注释使用 SnpEff 软件, 根据变异位点在参考基因组上的位置及信息, 可以得到变异位点在基因组发生的区域, 以及变异产生的影响^[29].

(4) 关联分析

对过滤后的 SNP 和 InDel, 分别用欧式距离(Euclidean Distance, ED)算法和 SNP-index 方法分析关联区域. 根据公式计算各位点的 ED 值后, 取 ED 值的 5 次方为关联值以消除背景噪音, 采用 DISTANCE 方法对 ED 值进行拟合^[30]. SNP-index 算法同样采用 DISTANCE 方法对 ΔSNP-index 进行拟合, 然后根据关联阈值, 选择阈值以上的区域作为与性状相关的区域.

$$ED = \sqrt{(A_{mut} - A_{wt})^2 + (C_{mut} - C_{wt})^2 + (G_{mut} - G_{wt})^2 + (T_{mut} - T_{wt})^2}$$

(1)

式(1)中: A_{mut} 为 A 碱基在突变混池中的频率, A_{wt} 为 A 碱基在野生型混池中的频率; C_{mut} 为 C 碱基在突变混池中的频率, C_{wt} 为 C 碱基在野生型混池中的频率; G_{mut} 为 G 碱基在突变混池中的频率, G_{wt} 为 G 碱基在野生型混池中的频率; T_{mut} 为 T 碱基在突变混池中的频率, T_{wt} 为 T 碱基在野生型混池中的频率.

$$SNP-index(aa) = Maa / (Maa + Paa)$$

(2)

式(2)中: Maa 表示 aa 池来源于母本的深度; Paa 表示 aa 池来源于父本的深度;

$$SNP-index(ab) = Mab / (Mab + Pab)$$

(3)

式(3)中: Mab 表示 ab 池来源于母本的深度; Pab 表示 ab 池来源于父本的深度;

$$\Delta SNP-index = SNP-index(aa) - SNP-index(ab)$$

(4)

(5) 候选区域筛选与功能注释

取两种算法的交集得到候选区域, 参考 NR^[31], GO^[32], KEGG^[33], COG^[34]等数据库, 通过 BLAST^[35]软件对候选区间内的编码基因进行注释.

1.2.4 菌核病抗性基因预测

本研究主要通过基因注释文件, 根据蛋白质结构域和同源基因等信息, 结合油菜抗性机制进行抗性基因预测.

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜抗菌核病表型鉴定

于 2021 年 9 月 1 日在重庆市武隆区仙女山收取 F2 分离群体材料, 接种核盘菌培养后每个材料量得两个菌斑长度, 取平均值. 由统计结果可得, F2 分离群体菌核病抗性表型符合正态分布规律, 也符合微效多基因控制的数量性状遗传规律(图 1). 其中, 最大的菌斑长 9.5 cm, 最小为 1 cm. 选取菌斑平均值最大和最小各 30 株材料构建混池. 图 2 为极端材料表型对照图片.

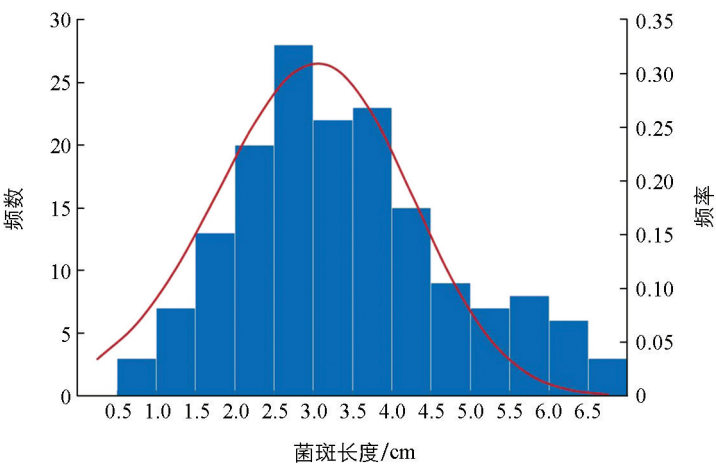


图 1 菌核病表型数据统计



图 2 极端材料对比

2.2 BSA 分析

2.2.1 测序数据质控

测序得到的原始测序序列(Sequenced Reads), 里面含有带接头的、低质量的 Reads, 为了保证信息分析质量, 对数据进行过滤, 得到过滤后数据, 用于后续信息分析(表 1).

表 1 样品数据评估

样品	Clean-Reads	Clean-Base	Q20/%	Q30/%	GC/%
R01	72 504 684	21 664 185 030	97.55	93.47	37.68
R02	62 044 117	18 544 946 240	98.17	94.58	37.60
R03	161 077 257	47 777 216 246	97.78	93.60	37.62
R04	181 245 825	53 770 695 790	97.90	93.88	38.12

注: R01 为父本池, R02 为母本池, R03 为高感池, R04 为高抗池; Clean_Reads: 过滤后的 Reads 对数, 即 Read1 和 Read2 记为 1 条 Reads; Clean_Base: 过滤后的碱基数, Clean Reads 数乘以序列长度; Q20/%: 质量值大于等于 20 的碱基占总碱基数的百分比; Q30/%: 质量值大于等于 30 的碱基占总碱基数的百分比; GC/%: 样品 GC 含量, 即 G 和 C 类型的碱基占总碱基的百分比.

2.2.2 与参考基因组比对统计

参考基因组为 Brassica_napus; Bra_napus_v2.0(基因组大小为 979 Mb, GC%含量为 36.47%). 4 个样品同参考基因组的比对效率在 98.82%以上, 将 Reads 定位至参考基因组, 统计碱基覆盖情况, 亲本池覆盖深度为 13 X, 16 X, 抗病池、感病池覆盖深度为 31 X, 34 X, 平均覆盖深度约为 23.50 X, 基因组至少覆盖 1 X 的比率约为 95.12%. 以上结果表明, 测序正常且随机性好(表 2).

表 2 比对结果统计

样品	Total_Reads	Mapped/%	Properly_Mapped/%
R01	145 009 368	98.61	92.20
R02	124 088 234	98.82	93.01
R03	322 154 514	99.43	90.63
R04	362 491 650	99.47	89.40

注: R01 为父本池, R02 为母本池, R03 为高感池, R04 为高抗池; Total_Reads: 该样本总的 Clean Reads 数, 双端分别统计, 即 Read1 和 Read2 记为 2 条 Reads; Mapped/%: 定位到参考基因组的 Clean Reads 数占有所有 Clean Reads 数的百分比; Properly_mapped/%: 双端测序序列均定位到参考基因组上且距离符合测序片段的长度分布.

2.2.3 SNP 和 InDel 的检测与注释

亲本间获得基因间区 SNP 531 100 个, 基因内 SNP 627 个, 非同义突变 SNP 101 340 个, 总计获得 1 879 742 个 SNP. 混池间获得基因间区 SNP 160 720 个, 基因内 SNP 149 个, 非同义突变 SNP 16 850 个, 总计获得 440 478 个 SNP(表 3).

亲本间获得移码突变 Small InDel 6 768 个，基因间区 Small InDel 95 392 个，基因内 Small InDel 601 个，总计获得 502 652 个 Small InDel. 混池间获得移码突变 Small InDel 1 958 个，基因间区 Small InDel 32 569 个，基因内 Small InDel 127 个，总计 129 915 个 Small InDel(表 4).

表 3 SNP 注释统计

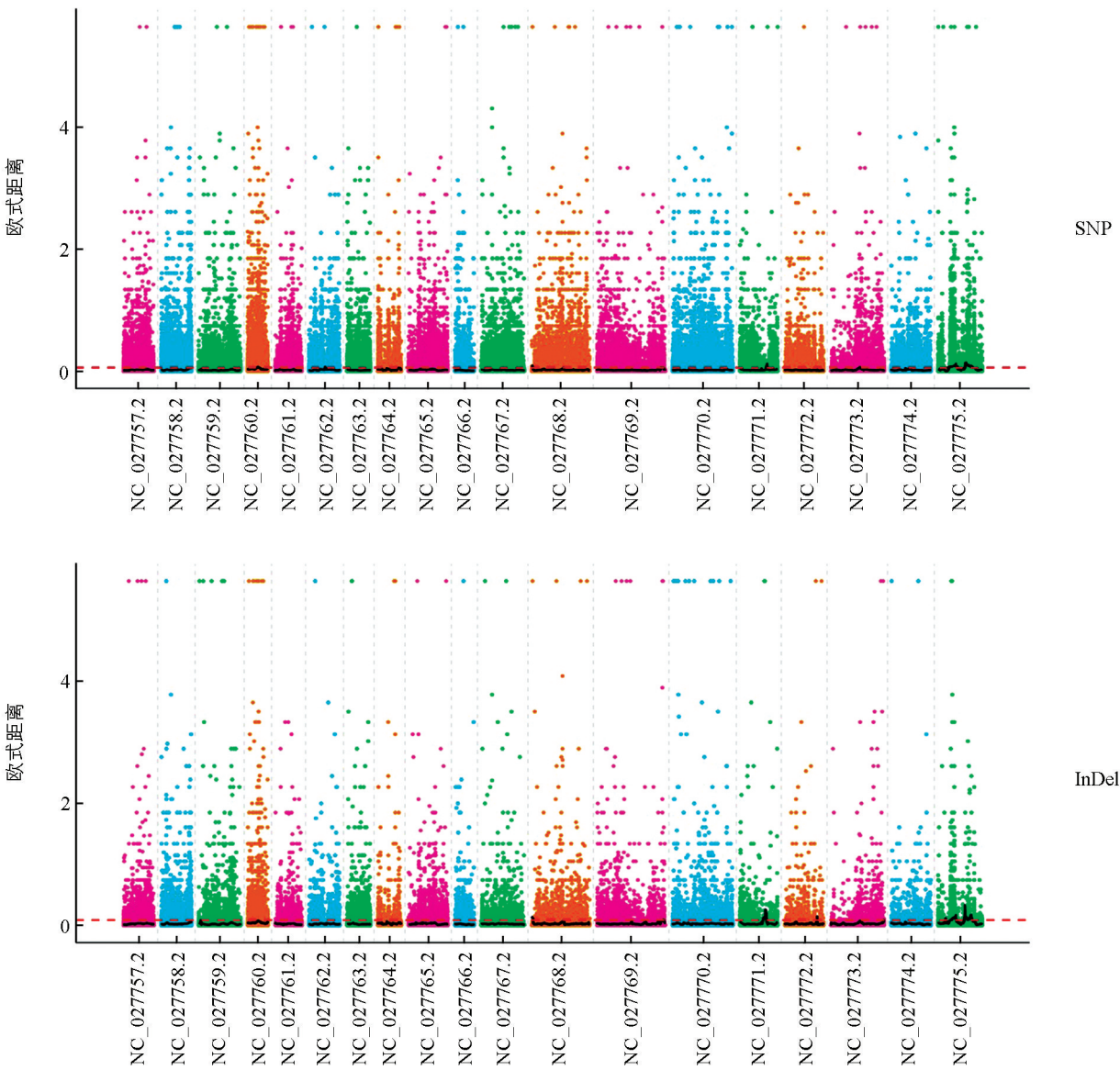
类型	R01 vs R02	R03 vs R04
INTERGENIC	531 100	160 720
INTRAGENIC	627	149
INTRON	173 845	30 477
UPSTREAM	459 104	105 669
DOWNSTREAM	358 928	84 138
UTR_5_PRIME	26 014	3 930
UTR_3_PRIME	36 073	5 588
SPLICE_SITE_ACCEPTOR	343	48
SPLICE_SITE_DONOR	270	55
SPLICE_SITE_REGION	12 687	2 056
START_GAINED	772	138
START_LOST	163	26
SYNONYMOUS_CODING	176 798	30 242
NON_SYNONYMOUS_CODING	101 340	16 850
SYNONYMOUS_STOP	177	31
STOP_GAINED	1 188	305
STOP_LOST	313	56
其他	0	0
总计	1 879 742	440 478

表 4 InDel 注释统计

类型	R01 vs R02	R03 vs R04
INTERGENIC	95 392	32 569
INTRAGENIC	601	127
INTRON	95 725	19 831
UPSTREAM	144 439	37 495
DOWNSTREAM	104 466	27 173
UTR_5_PRIME	17 575	3 218
UTR_5_DELETED	2	1
UTR_3_PRIME	20 415	3 931
SPLICE_SITE_ACCEPTOR	421	98
SPLICE_SITE_DONOR	684	180
SPLICE_SITE_REGION	7 389	1 470
START_LOST	146	23
FRAME_SHIFT	6 768	1 958
EXON_DELETED	1	1
CODON_INSERTION	2 942	627
CODON_DELETION	2 520	487
CODON_CHANGE_PLUS_CODON_INSERTION	1 071	255
CODON_CHANGE_PLUS_CODON_DELETION	1 787	358
STOP_GAINED	190	93
STOP_LOST	118	20
其他	0	0
总计	502 652	129 915

2.2.4 关联分析

SNP 的 ED 法分析, 关联阈值为 0.06, 共得到 18 个区域, 位于 A04,A06,C02,C03,C05,C07,C09 共 7 条染色体上, 总长度为 28.64 Mb, 其中最长区段大小为 9.95 Mb, 包含 615 个基因, 最短区段大小为 0.07 Mb, 包含 3 个基因, 具有非同义突变位点的基因 550 个. InDel 的 ED 法分析, 关联阈值为 0.09, 共得到 13 个区域, 位于 C02,C03,C05,C06,C09 共 5 条染色体上, 总长度为 24.46 Mb, 其中最长区段大小为 9.05 Mb, 包含 616 个基因, 最短区段大小为 0.1 Mb, 包含 1 个基因, 具有移码突变位点的基因 87 个(图 3).



NC_027757.2-NC_027775.2 依次为甘蓝型油菜 A01-A10、C01-C09 染色体.

图 3 ED 关联值在染色体上的分布

对于 SNP(InDel)-index 的计算结果, 当置信度为 0.99 时, 并没有关联到区域. 为了最大限度地利用这些数据, 本文将阈值调整为 0.24, 共得到 14 个区域, 全部位于 C09 染色体上, 总长度为 8.40 Mb, 最长区段大小为 2.33 Mb, 包含 123 个基因, 最短区段大小为 0.03 Mb, 包含 1 个基因, 具有非同义突变位点的基因 124 个. InDel 共得到 8 个区域, 也同样全部位于 C09 染色体上, 总长度为 8.58 Mb, 最长区

段大小为 2.30 Mb，包含 122 个基因，最短区段大小为 0.02 Mb，包含 1 个基因，具有移码突变位点的基因 25 个(图 4)。

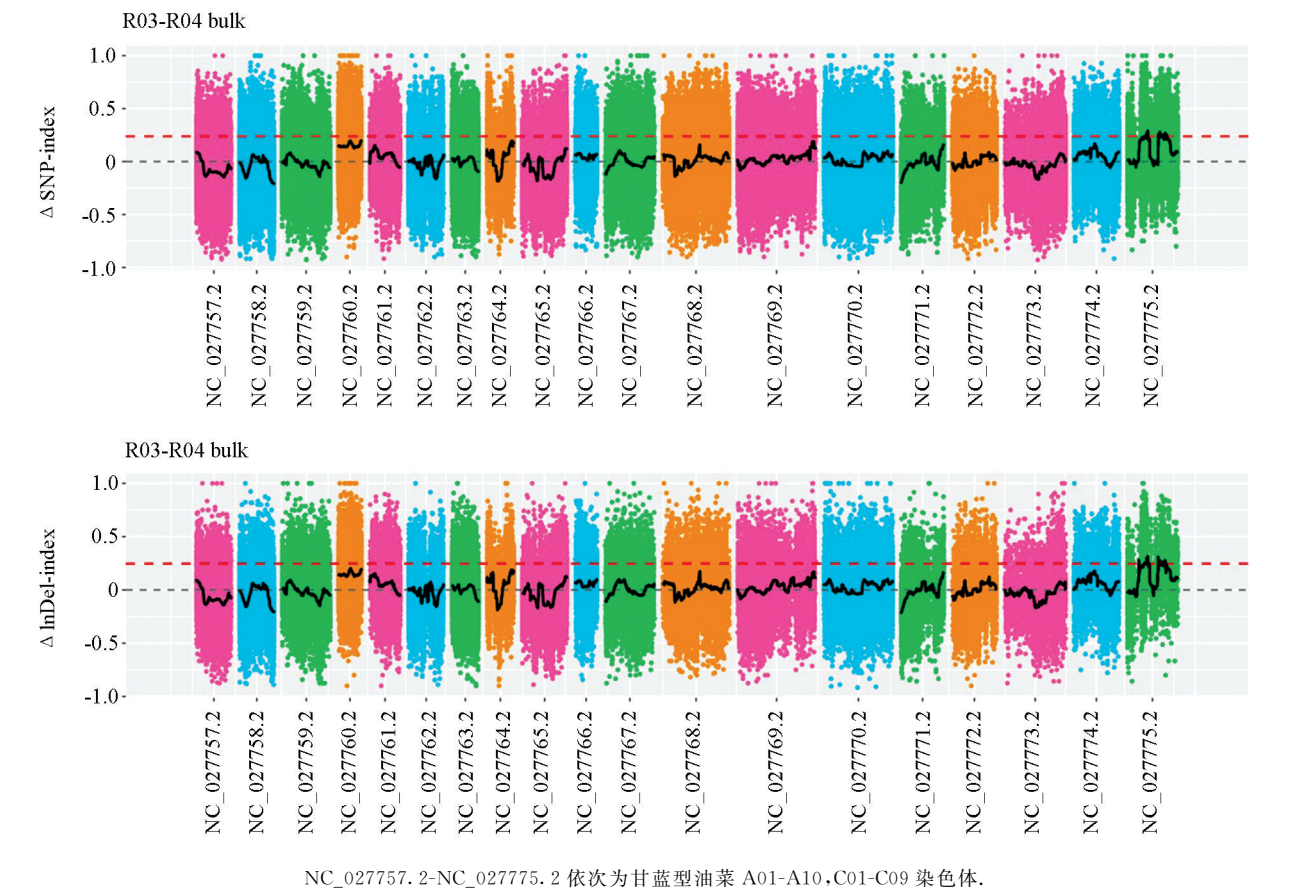


图 4 SNP(InDel)-index 关联值在染色体上的分布

2.2.5 候选区域筛选与功能注释

取以上 4 个部分的交集得到 8 个候选关联区域，全部位于甘蓝型油菜 C09 染色体上，主要分布在该染色体上 17.8~21.2 Mb 及 31.6~39.1 Mb 两个区间内(表 5)。

表 5 候选关联区域统计

染色体编号	起始位置	终止位置	区域大小/Mb	基因数量
BnaC09	17 840 000	17 870 000	0.03	1
BnaC09	18 070 000	18 390 000	0.32	8
BnaC09	18 410 000	18 450 000	0.04	1
BnaC09	19 770 000	21 270 000	1.50	88
BnaC09	31 640 000	31 720 000	0.08	7
BnaC09	32 120 000	34 420 000	2.30	122
BnaC09	35 200 000	36 910 000	1.71	104
BnaC09	38 450 000	39 170 000	0.72	68
总计	—	—	—	399

参考 NR,GO,KEGG,COG 等数据库，注释结果表明候选基因主要集中在代谢及遗传信息进程，而富集分析表明在二萜生物合成、硫代谢、萜类骨架生物合成等通路中富集程度较高(图 5)。

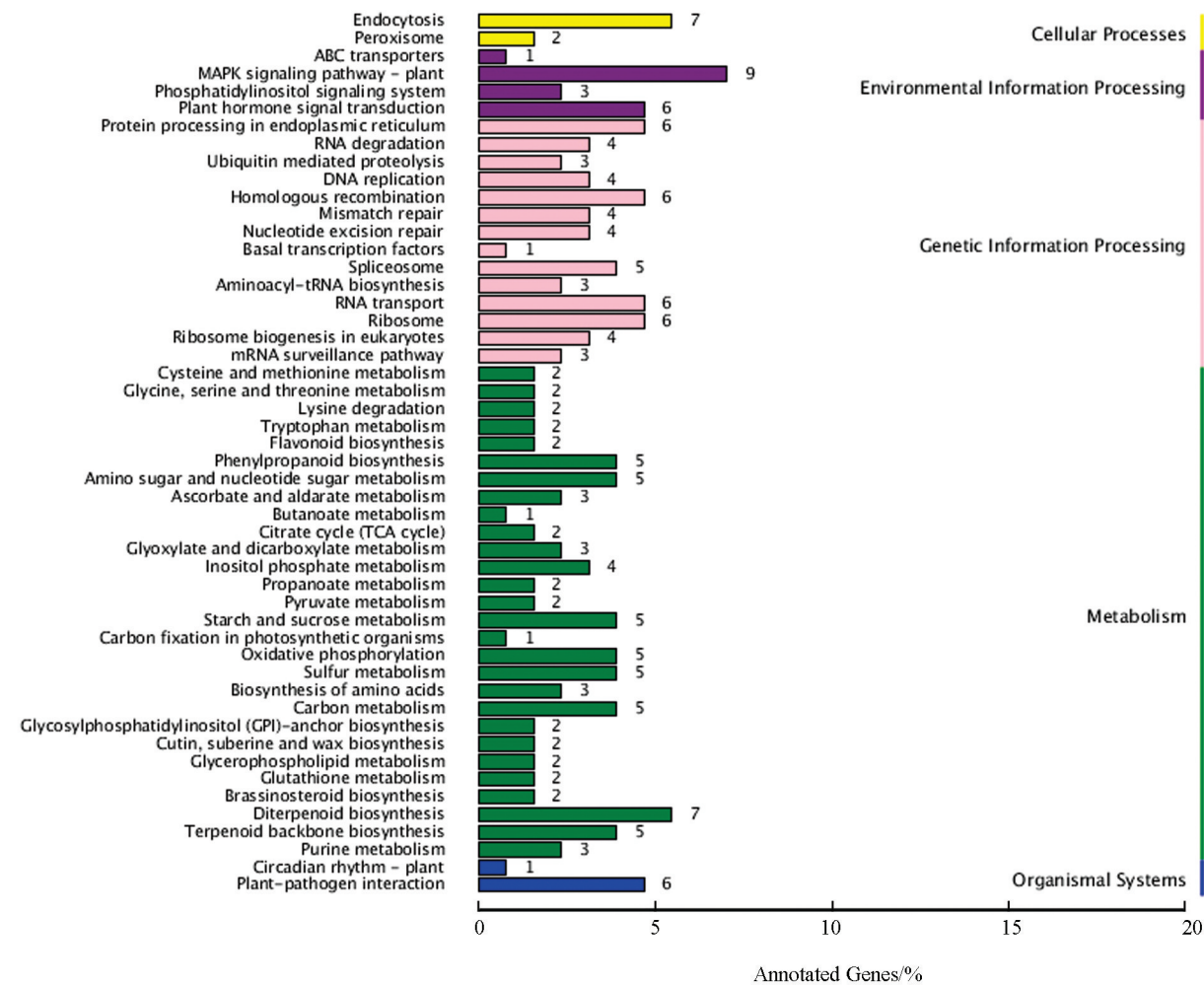


图 5 候选区域内基因的通路分布图

2.3 抗病基因预测

在获得的 C09 染色体上 8 个关联区域中重点筛选 111 个非同义突变或移码突变基因, 根据基因注释文件, 结合油菜菌核病抗性机制, 预测 8 个基因为油菜菌核病抗性候选基因(表 6), 分别是: *BnaC05g50540D*, *BnaC09g33900D*, *BnaA04g09130D*, *BnaA01g29170D*, *BnaC09g15640D*, *BnaC09g35310D*, *BnaA03g09220D*, *BnaCnng15460D*.

表 6 候选基因功能注释、同源分析及参与的调控途径

基因	拟南芥同源基因	基因注释	代谢网络
<i>BnaC05g50540D</i>	<i>AT3G28220 (ATUBP12)</i>	MATH domain and coiled-coil domain-containing protein	integral component of membrane
<i>BnaC09g33900D</i>	<i>AT1G07150 (ATMAPKKK17)</i>	mitogen-activated protein	ATP binding
<i>BnaA04g09130D</i>	<i>AT3G42170</i>	F-box and leucine-rich repeat protein	protein dimerization activity
<i>BnaA01g29170D</i>	<i>AT3G42170</i>	Zinc finger BED domain-containing protein	protein dimerization activity
<i>BnaC09g15640D</i>	<i>AT5G51470 (ATGH3. 12)</i>	auxin responsive GH3 gene family protein	
<i>BnaC09g35310D</i>	<i>AT5G59980 (ATGAF1)</i>	ribonuclease P/MRP protein	ribonuclease P activity
<i>BnaA03g09220D</i>	<i>AT5G59845 (ATGASA10)</i>	Gibberellin regulated protein	
<i>BnaCnng15460D</i>	<i>AT3G56780</i>	Putative F-box/FBD/LRR-repeat protein	

3 讨论

随着现代分子生物学技术的快速发展,以二代测序技术为背景衍生出的 BSA-seq 技术凭借其高效的优势成为目前基因定位的热门方法.本研究利用 BSA-seq 技术定位油菜菌核病茎秆抗性基因,发现关联区域全部位于 C09 染色体上,而此前定位的油菜菌核病 QTL 大多出现在 A 基因组上,且与 Mei 等^[36]的研究相互印证,证实了油菜 C 基因组对菌核病抗性研究的重要价值.

本研究在候选区间共筛选出 8 个候选基因,其中 *BnaC05g50540D* 基因包含 MATH 结构,有研究表明该结构域与植物同真菌的共生效应、抵抗病毒有关,对信号转导也会产生影响^[37],其在拟南芥中的同源基因 *USP12* 也参与了茉莉酸反应及脱落酸信号转导.已有研究表明,茉莉酸(jasmonic acid, JA)、水杨酸(salicylic acid, SA)及活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是植物体内抵杀病原菌的重要信号途径,其中 JA 为植物创伤反应调节子,能根据植物与病原菌相互作用的特异类型促使症状朝正或负的方向发展,以控制病害程度^[38-39]. *BnaC09g15640D* 的同源基因 *GH3.12* 也与茉莉酸调节有关,且其 *GH3* 基因家族被证实在水稻抗白叶枯病中起正向调节作用^[40]. *BnaC09g33900D* 是拟南芥 *MAPKKK17* 的同源基因,MAPK 途径参与了油菜菌核病的抗性响应,超表达 *BnMAPK4* 能促进茉莉酸抗病信号转导途径中重要基因 *PDF1.2* 的表达^[13]. *BnaA04g09130D* 和 *BnaA01g29170D* 都含有植物 NLR 免疫受体具有的 ZF-BED 结构域,该结构域在水稻白叶枯病和小麦条锈病对抗性方面起重要作用,而在油菜中有关 ZF-BED 结构域还未有报道.预测其可能在油菜对抗核盘菌入侵过程中发挥作用,并为油菜抗病育种提供新的方向^[41]. *BnaC09g35310D* 的同源基因 *GA1*^[42] 及 *BnaA03g09220D* 的同源基因 *GASA10* 都与赤霉素调节有关,说明赤霉素可能在油菜菌核病抗性方面发挥重要作用,值得更深入地研究. *BnaCnng15460D* 含有 FBD 结构域,属于 *F-box* 基因家族,而该家族 C 端结构域能和许多蛋白特异性结合,导致其功能多样性.左蓉等^[43] 已对油菜 *F-box-LLR* 基因家族进行了研究,表明该基因家族与植物抗病响应有紧密的联系,且极大可能具有菌核病抗性功能.值得注意的是, *BnaA04g09130D* 同样属于 F-BOX 蛋白,这可能暗示 ZF-BED 结构域和 FBD/LLR 结构域存在相互作用关系,且可能在植物抗病系统中起重要作用.

油菜对于菌核病的抗性是一个复杂的过程,由多基因协同调控.在对候选基因的挖掘中发现大多数基因都参与了茉莉酸信号转导,表明油菜在面对核盘菌侵染时,通过调节茉莉酸通路来获得植物对病原菌的抗性,从而形成自我保护.同时,菌核病抗性基因还和其他植物激素及信号转导相关,也可能同植物自身免疫体系有着紧密的联系,往后在油菜菌核病的研究中可以更加关注植物激素和免疫体系两个方面.后续对候选基因功能验证等研究值得期待,可能会对油菜抗菌核病育种起到极大的推动作用.

4 结论

将甘蓝型油菜高抗父本 21Y490 与高感母本 21Y689 杂交,对 F₂ 群体室内接种核盘菌并进行表型鉴定,筛选极端表型.利用 BSA-seq 技术关联到两个显著区域,即 C09 染色体的 17.8~21.2 Mb 和 31.6~39.1 Mb 区域,共 399 个基因,包含 111 个非同义突变或移码突变基因,从中预测了 8 个候选基因,这些基因主要参与植物激素生长调控及免疫系统的信号转导.

参考文献:

- [1] 刘成,冯中朝,肖唐华,等.我国油菜产业发展现状、潜力及对策[J].中国油料作物学报,2019,41(4):485-489.
- [2] 左叶信,秦虎强,聂峰杰,等.陕西省油菜菌核病调查初报[J].植物保护,2011,37(2):116-119.
- [3] ABAWI G S. Infection of Bean by Ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum* [J]. Phytopathology, 1975, 65(6): 673-678.
- [4] BOLTON M D, THOMMA B P H J, NELSON B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen [J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(1): 1-16.
- [5] 冯韬.油菜菌核病理与防治研究进展[J].作物研究,2014,28(3):316-320.
- [6] DE BARY A, GARNSEY H E F, BALFOUR I B. Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetoza and Bacteria [M]. Oxford: Clarendon Press, 1887.
- [7] 毛玮,侯英敏,刘志文.核盘菌和草酸诱导下的油菜几种酶活力的变化分析[J].大连工业大学学报,2011,30(1):39-42.
- [8] DUTTON M V, EVANS C S. Oxalate Production by Fungi: Its Role in Pathogenicity and Ecology in the Soil Environment [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(9): 881-895.
- [9] 李玉芳,官春云.油菜菌核病菌侵染的组织病理学、致病及抗病机制的研究[J].作物研究,2005,19(S1):327-331.
- [10] GUIMARÃES R L, STOTZ H U. Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection [J]. Plant Physiology, 2004, 136(3): 3703-3711.
- [11] WILLIAMS B, KABBAGE M, KIM H J, et al. Tipping the Balance: *Sclerotinia sclerotiorum* Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(6): e1002107.
- [12] WANG Z, TAN X L, ZHANG Z Y, et al. Defense to *Sclerotinia sclerotiorum* in Oilseed Rape is Associated with the Sequential Activations of Salicylic Acid Signaling and Jasmonic Acid Signaling [J]. Plant Science, 2012, 184: 75-82.
- [13] WANG Z, MAO H, DONG C H, et al. Overexpression of Brassica Napus MPK4 Enhances Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Oilseed Rape [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2009, 22(3): 235-244.
- [14] 宋志荣,官春云.甘蓝型油菜硫苷特性与对菌核病抗性关系[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2008,34(4):462-465.
- [15] EYNCK C, KOOPMANN B, KARLOVSKY P, et al. Internal Resistance in Winter Oilseed Rape Inhibits Systemic Spread of the Vascular Pathogen *Verticillium Longisporum* [J]. Phytopathology, 2009, 99(7): 802-811.
- [16] ZHAO J W, MENG J L. Genetic Analysis of Loci Associated with Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(4): 759-764.
- [17] 马田田.甘蓝型油菜抗菌核病 QTL 定位及相关基因表达分析[D].南京:南京农业大学,2012.
- [18] 梅家琴.甘蓝与甘蓝型油菜 C 亚基因组遗传关系调查及甘蓝抗菌核病 QTL 定位[D].重庆:西南大学,2011.
- [19] WU J, CAI G Q, TU J Y, et al. Identification of QTLS for Resistance to *Sclerotinia* Stem Rot and BnaC. IGMT5. a as a Candidate Gene of the Major Resistant QTL SRC6 in *Brassica napus* [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67740.
- [20] 汪雷,刘瑶,丁一娟,等.油菜菌核病研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(10):85-93.
- [21] 张卡. BnaA03. WRKY28 和 BnWRKY33 参与油菜菌核病抗性的分子机理[D].武汉:华中农业大学,2021.
- [22] 许李明.油菜菌核病抗性相关基因 EIN3 及 3A06 和 6C02 的功能研究[D].武汉:中南民族大学,2009.
- [23] 王汉中,刘贵华,郑元本,等.抗菌核病双低油菜新品种中双 9 号选育及其重要防御酶活性变化规律的研究[J].中国农业科学,2004,37(1):23-28.
- [24] WEN L, TAN T L, SHU J B, et al. Using Proteomic Analysis to Find the Proteins Involved in Resistance Against *Sclerotinia sclerotiorum* in Adult Brassica Napus [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 137(3): 505-523.
- [25] 石美娟,左蓉,刘杰,等.甘蓝型油菜 BnTLP1 基因的菌核病抗性研究[J].中国油料作物学报,2021,43(5):752-761.
- [26] 万华方,刘瑶,梅家琴,等.人工合成高抗菌核病甘蓝型油菜几种关键酶编码基因的表达与其抗性的关系[J].中国农业科学,2012,45(22):4543-4551.

- [27] LI H, DURBIN R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows Wheeler Transform [J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [28] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce Framework for Analyzing Next-Generation DNA Sequencing Data [J]. Genome Research, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [29] CINGOLANI P, PLATTS A, WANG L L, et al. A Program for Annotating and Predicting the Effects of Single Nucleotide Polymorphisms, SnpEff: SNPs in the Genome of Drosophila Melanogaster Strain W1118; Iso-2; Iso-3 [J]. Fly, 2012, 6(2): 80-92.
- [30] HILL J T, DEMAREST B L, BISGROVE B W, et al. MMAPPR: Mutation Mapping Analysis Pipeline for Pooled RNA-Seq [J]. Genome Research, 2013, 23(4): 687-697.
- [31] DENG Y, LI J, WU S, et al. Integrated nr Database in Protein Annotation System and Its Localization [J]. Computer Engineering, 2006, 32(5): 71-74.
- [32] ASHBURNER M, BALL C, BLAKE J, et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium [J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [33] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG Database: a Tool for Genome_Scale Analysis of Protein Functions and Evolution [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 33-36.
- [34] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, et al. The KEGG Resource for Deciphering the Genome [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32: 277-280.
- [35] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [36] MEI J, QIAN L, DISI J O, et al. Identification of Resistant Sources Against *Sclerotinia sclerotiorum* in Brassica Species with Emphasis on B. Oleracea [J]. Euphytica, 2011, 177(3): 393-399.
- [37] 陈吉杨, 阮颖, 刘博宇. 甘蓝型油菜含 MATH 结构域基因 BnaM154 过表达载体的构建与转化 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(13): 4377-4382.
- [38] JEONG J S, JUNG C, SEO J S, et al. The Deubiquitinating Enzymes UBP12 and UBP13 Positively Regulate MYC₂ Levels in Jasmonate Responses [J]. The Plant Cell, 2017, 29(6): 1406-1424.
- [39] LIU G C, LIANG J X, LOU L J, et al. The Deubiquitinases UBP12 and UBP13 Integrate with the E3 Ubiquitin Ligase XBAT35. 2 to Modulate VPS23A Stability in ABA Signaling [J]. Science Advances, 2022, 8(14): eabl5765.
- [40] HUI S G, HAO M Y, LIU H B, et al. The Group I GH3 Family Genes Encoding JA-Ile Synthetase Act as Positive Regulator in the Resistance of Rice to Xanthomonas Oryzae P. oryzae [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 508(4): 1062-1066.
- [41] CHEN C H, JOST M, CLARK B, et al. BED Domain-Containing NLR from Wild Barley Confers Resistance to Leaf Rust [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(6): 1206-1215.
- [42] FUKAZAWA J, MORI M, WATANABE S, et al. DELLA-GAF₁ Complex is a Main Component in Gibberellin Feedback Regulation of GA20 Oxidase 2 [J]. Plant Physiology, 2017, 175(3): 1395-1406.
- [43] 左蓉, 吴姗, 刘杰, 等. 油菜 F-box-LRR 基因全基因组鉴定与核盘菌诱导应答分析 [J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(3): 503-514.