Vol. 47 No. 5

DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2025.05.004

王艳花, 邵伟兴, 方莎, 等. 埃塞俄比亚芥菜中 *BcMYB28* 基因调控硫苷代谢分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(5): 38-52.

# 埃塞俄比亚芥菜中 BcMYB28 基因 调控硫苷代谢分析

王艳花<sup>1</sup>, 邵伟兴<sup>2</sup>, 方莎<sup>1</sup>, 安冬燕<sup>1</sup>

1. 西南大学 园艺园林学院/长江上游农业生物安全与绿色生产教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 重庆市农业科学院, 重庆 401329

摘要:埃塞俄比亚芥菜(Brassica carinata, BBCC 2n=34)具有诸多优良的农艺性状,包括苗期长势旺、耐旱、 广谱抗病性、抗裂角等,但这些优良特性的利用受限于其高硫苷的特性。为揭示 BcMYB28 基因在埃塞俄比 亚芥菜硫苷代谢中的功能,并找到硫苷代谢的关键调节基因,本研究从埃塞俄比亚芥菜中克隆到 BcMYB28 基因,通过比对分析获得 6 个同源基因(BcMYB28.1~BcMYB28.6),其与芸薹属作物 MYB28 基因家族成员相似 性达 74.6%~84.9%;利用 CRISPR/Cas9 敲除 BcMYB28,获得 T<sub>1</sub> 代编辑株系,编辑株系叶片表现出蜡质层缺失 等表型变化,qRT-PCR表明 BcMYB28 基因表达显著降低;利用 UHPLC-MS 技术鉴定出 1 843 种次级代谢物, 与埃塞俄比亚株(编号 WT)相比,编辑株系中存在 247 个上调和 132 个下调代谢物,甘氨酸、丝氨酸和苏氨 酸代谢途径显著富集;通过转录组测序,以甘蓝型/芥菜型油菜为参考种,分别获得 5 495 和 5 104 个差异表 达基因,GO 富集分析显示 20 个 GO terms 被显著富集,对差异表达基因进行聚类分析,鉴定到 10 个与硫苷 合成相关的关键基因。

关 键 词:埃塞俄比亚芥菜; BcMYB28;转录组;代谢组
中图分类号: S635.9 文献标志码: A
文章编号: 1673-9868(2025)05-0038-15



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

# **BcMYB28** Involved in the Regulation of Glucosinolate Metabolism in *Brassica carinata* L.

## WANG Yanhua<sup>1</sup>, SHAO Weixing<sup>2</sup>, FANG Sha<sup>1</sup>, AN Dongyan<sup>1</sup>

- 1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Agricultural Biosafety and Green Production of Upper Yangtze River Ministry of Education, Chongging 400715, China;
- 2. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

收稿日期: 2024-11-19

基金项目:重庆市基础研究与前沿探索博士后基金项目(cstc2019jcyj-bsh010);西南大学实验技术研究重点项目(SYJ2025009);重庆市博士后留渝资助基金项目(7820100745);高等学校学科创新引智基地项目("111"项目)(B12006)。

作者简介: 王艳花, 博士, 实验师, 主要从事甘蓝生物育种研究。

Abstract: Ethiopian mustard (Brassica carinata, BBCC 2n=34) has many excellent agronomic traits, including vigorous growth in the seedling stage, drought tolerance, broad-spectrum disease resistance, cracking resistance, etc. However, the utilization of the above-mentioned excellent features is limited by its high glucosinolate characteristics. To reveal the potential function of the BcMYB28 gene in the biosynthetic pathway of glucosinolates in Ethiopian mustard and find the key regulatory genes of glucosinolate metabolism. In this study, the BcMYB28 gene was cloned from Ethiopian mustard, and six homologous genes (BcMYB28. 1-BcMYB28. 6) were obtained through comparison analysis. The similarity between them and the MYB28 gene family members of Brassica crops is 74. 6% -84. 9%. CRISPR/Cas9 was used to knock out BcMYB28 to obtain a T<sub>1</sub> generation of edited line. The leaves of the edited line showed phenotypic changes such as loss of wax layer. RT-qPCR showed that BcMYB28 gene expression was significantly reduced. 1 843 species of secondary metabolites were identified using UHPLC-MS technology. Compared with wild type, there were 247 up-regulated and 132 down-regulated metabolites in the edited lines. The glycine, serine and threonine metabolic pathways were significantly enriched. Through transcriptome sequencing, using B. oleracea and B. napus as the reference species, 5 495 and 5 104 differentially expressed genes (DEGs) were obtained, respectively. GO and KEGG enrichment analysis revealed 20 GO terms were significantly enriched. Cluster analysis was performed on DEGs, and 10 key genes related to glucosinolate synthesis were identified.

Key words: Brassica carinata; BcMYB28; transcriptome; metabolome

埃塞俄比亚芥菜属于十字花科芸薹属作物,由黑芥和甘蓝天然杂交,自然加倍进化而来[1-3]。埃塞俄 比亚芥菜的幼苗生长旺盛,并且具有抗寒、抗虫、抗旱、抗裂角等优异性状,具有较大的生产应用前 景[4-6]。埃塞俄比亚芥菜的种子可用作调味品(芥末),也可用于制作药品、化妆品、塑料等。在育种中, 可将埃塞俄比亚芥菜与现有品系进行杂交,转移单个优异性状,目前已成功转移黄籽基因、抗黑胫病基 因、抗白粉病基因等[7]。通过埃塞俄比亚芥菜和芸薹属其他作物杂交会产生一些中间多倍体品系,利用 这些多倍体品系可对目标性状进行改良,从而丰富遗传多样性<sup>[8-11]</sup>。通过将白菜型油菜的 A 基因组(Ar) 与埃塞俄比亚芥菜的 C 基因组(Cc)进行种间杂交,成功培育出具有显著生物量和产量优势的新型甘蓝 型油菜(ArCc)。研究显示,随着外源 ArCc 含量的增加,这些优势呈现出增强的趋势<sup>[12-13]</sup>。构建芸薹属异 源六倍体(ArArBcBcCcCc)的种质库,运用高通量技术比较了人工合成芸薹属六倍体与其亲本之间的转录 组差异,共得到 35 644 409 条清洁读段,匹配到的基因数为 32 642,其中在父本白菜型油菜、母本埃塞俄 比亚芥菜和六倍体植物中分别有 29 260、29 060 和 29 697 个基因被检测到[14]。通过对异源六倍体的染色 体稳定性、基因组稳定性和育性的分析表明,异源六倍体比例和稳定性随着自交代数的增加而增强,且花 粉育性接近正常<sup>[15]</sup>。利用该异源六倍体种质库与甘蓝型油菜杂交产生五倍体(ArAnBcCcCn),自交多代产 生新型甘蓝型油菜,与传统甘蓝型油菜相比,新型甘蓝型油菜具有更丰富的变异[15]。然而埃塞俄比亚芥菜 这些优良特性的利用受限于其硫苷含量较高,通过对埃塞俄比亚芥菜品质进行改良,可满足人们对其食用 品质、饲用品质以及工业用途的不同需求。

硫苷是一组含氮、硫的植物次生代谢物,对植株的长势、耐旱性、广谱抗病性等方面具有显著影响。在 十字花科芸薹属作物中共发现了约 30 种硫苷<sup>[16]</sup>。硫苷及其降解产物具有抵御草食动物、抗病虫及抗病原 微生物的能力,在植物的防卫反应中发挥重要的作用。如硫苷降解产物烯丙基异硫氰酸酯、2-苯乙基异硫 氰酸酯等对芸苔属专食性昆虫具有致死作用。当植株中 2-苯乙基硫苷含量增加时,蚜虫数量减少,植株抗 虫性增强。此外,硫苷还参与调节植物的耐旱性,在干旱胁迫下,某些油菜品种的硫苷含量会发生变化,而 这种变化可能与植物的抗旱机制相关联。然而,对于某些作物如油菜而言,过高的硫苷含量会影响其品质, 如硫苷及其降解产物是油菜籽饼粕中主要的抗营养因子,会影响菜籽饼粕的饲用安全。因此,降低硫苷含 量成为油菜品质育种的一个重要目标。油菜种子中的硫代葡萄糖苷,由于其水解产物的毒性被认为具有抗 营养作用。2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷酸酯转变为促甲状腺激素产物,而 3-丁烯基和 4-戊烯基硫代葡萄 糖苷可以转变为异硫氰酸酯,这会降低牛、猪和家禽对饼粕的适口性<sup>[17]</sup>。研究者通过 RNAi 抑制硫代葡萄糖苷路径中 R2R3-MYB转录因子 MYB28 的表达来生产低硫苷的芥菜型油菜品种,该基因是脂肪族硫代葡萄糖苷生物合成的主要调节剂<sup>[18]</sup>。此外,通过基于乙基磺酸盐的 TILLING 方法破坏硫苷转运蛋白可获得低硫苷白菜型油菜<sup>[19]</sup>。但是,该方法难以应用于具有多基因拷贝的埃塞俄比亚芥菜品种。研究发现,埃塞俄比亚芥菜种子富含硫代葡萄糖甙和芥酸、油酸等多种脂肪酸,相对于低硫苷的甘蓝型油菜,埃塞俄比亚芥菜种子中硫代葡萄糖苷的含量仍然很高,其中丙烯基硫苷占种子总硫苷含量的 95%以上<sup>[20]</sup>。大量的链式烯基硫代葡萄糖苷严重影响了埃塞俄比亚芥菜饼粕作为动物饲料的使用,研究者通过尝试化学诱变和种间杂交等方法减少硫苷特别是种子中链式烯基硫代葡萄糖苷的含量,但由于硫代葡萄糖苷复杂的生物合成过程和相关的遗传控制,收效甚微。

本研究通过克隆及数据库比对共得到 6 个 *BcMYB28* 同源基因,对 *BcMYB28* 同源基因的序列特征进行分析,利用 CRISPR/Cas9 创制 *BcMYB28* 基因敲除植株,采用代谢组分析 *BcMYB28* 敲除植株的代谢组分变化,结合转录组测序和 qRT-PCR 筛选埃塞俄比亚芥菜中硫苷合成途径的关键基因。研究结果为低硫苷埃塞俄比亚芥菜品质改良提供了理论依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 埃塞俄比亚芥菜 DNA 提取及序列分析

试验材料为埃塞俄比亚芥菜种子,由西南大学油菜工程中心提供。选取埃塞俄比亚芥菜籽粒饱满的种子,用纸盘发苗,温度在 22~25 ℃,浇足水分,暗光培养 2~3 d,以减少幼苗的徒长现象,待种子萌发后 再移到光照培养室;幼苗长出 4 片叶子时,选取单株嫩叶,采用 CTAB 法提取 DNA,紫外分光光度计检测 每个单株的 DNA 浓度,并稀释至 50 ng/µL,于-20 ℃保存备用。采用 TA 克隆的方法获得目的基因序列 信息<sup>[21]</sup>。

采用 Geneious 软件进行基因序列比对,利用 MEGA6.0 软件分析目的基因与十字花科芸薹属其他作物同源基因的亲缘关系,并构建系统进化树。

#### 1.2 RNA 提取与文库构建

取埃塞俄比亚芥菜籽粒饱满的种子,用纸盘发苗,待长出4片叶子后移入土壤中,放于光照培养箱培养。光照培养箱的生长条件为:光培16h/暗培8h,温度为22℃,光照强度为10000Lx。取埃塞俄比亚芥菜授粉后10d、20d、30d的种子(编号WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF),设置3个生物学重复,取样后放入-80℃冰箱备用,采用NEB柱式小量植物总RNA抽提试剂盒提取。利用Nanodrop 2000对RNA的浓度和纯度进行检测,琼脂糖凝胶电泳测RNA完整性,Agilent 2100测定RIN值。单次建库要求RNA总量为大于10 $\mu$ g,浓度≥100 ng/ $\mu$ L,OD260/280=1.8~2.2,OD260/230≥2.0,RIN≥6.5,28S:18S≥1.0。将RNA进行冻干处理后,送往上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。以甘蓝型和芥菜型油菜作为参考种,对埃塞俄比亚芥菜的RNA进行测序比对分析。

#### 1.3 qRT-PCR 荧光定量分析

采集 WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF 新鲜组织,用液氮冷冻后,保存于-80 ℃超低温冰箱备用。待所有不同发育时期的样品取样完成后,将各组织材料反转录合成的 cDNA 第一链进行 qRT-PCR 分析,qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,包含 10  $\mu$ L 2× Promega GoTaq © qPCR Master Mix、1  $\mu$ L 20  $\mu$ mol L1 正向引物、1  $\mu$ L 20  $\mu$ mol L1 反向引物、100 ng cDNA 第一链,添加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。使用 StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)进行扩增,反应程序为 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 3 s, 60 ℃ 30 s, 40 循环; 60~95 ℃,熔解曲线分析。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的表达量<sup>[22]</sup>。

#### 1.4 CRISPR/Cas9 载体构建及埃塞俄比亚芥菜的遗传转化

对埃塞俄比亚芥菜硫苷生物合成路径中关键调节因子的候选基因设计靶点(http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/),构建 CRISPR/Cas9 双元载体,方法按照 Ma 等<sup>[23]</sup>CRISPR/Cas9 载体构建方法将得到的重 组载体用液氮冻融法转化农杆菌菌株 GV3101,构建载体所用引物包括通用引物信息(表1)。以子叶为外植体,转化埃塞俄比亚芥菜。

引物名称	序列信息				
T1-F	gtcaTCGGAGAAGGGCTGAAGAA				
T1-R	aaacTTCTTCAGCCCTTCTCCGA				
T2-F	gtcaACGAACATGGAGAAGGTGGC				
T2-R	aaacGCCACCTTCTCCATGTTCGT				
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG				
gR/-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC				
PB-L	GCGCGCgGTctcGCTCGACTAGTATGG				
PB-R	GCGCGCggtctcTACCGACGCGTATCC				
Pps-GGL	TTCAGAggteteTetegACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG				
Pgs-GG2	AGCGTGggtctcGtcagggTCCATCCACTCCAAGCTC				
Pgs-GGR	AGCGTGggtctcGaccgACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC				
DM942	TCTAGAATGGAGTCCATTTCTGCTAG				
DM943	CTTGGCATTTTGGTGGTGGTGG				
M28-F	ATGTCAAGAAAACCGTGTTGTGTCG				
M28-R	GGATCCTCATATGATTTGCTTATCGAAG				

#### 表 1 用于载体构建的引物序列

#### 1.5 非靶向代谢物测定

选择埃塞俄比亚芥菜和 T<sub>1</sub> 代遗传转化株授粉后的种子(分别编号 CR、WT),用液氮速冻后,将样品 送至上海美吉生物医药科技有限公司完成 UHPLC-MS 测定。采用 AB Sciex Triple TOF 5600 高分辨质谱 仪与 Agilent 1290 超高效液相色谱仪。ESI 离子源参数设置如下:雾化气压(GS1)60 Pa,辅助气压 60 Pa, 气帘气压 35 Pa,温度 650 ℃,喷雾电压+5 000 V(正离子模式)。流动相包括溶剂 A(25 mmol/L 醋酸铵和 25 mmol/L 氨水)和溶剂 B(乙腈)。将上机的代谢物参数矫正和比对之后再与数据库进行比对和物质鉴定, 用 ESI+模式进行。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 BcMYB28 的克隆及序列分析

本研究从埃塞俄比亚芥菜的 DNA 材料中克隆 BcMYB28 基因,所用引物 M28-F/-R 见表 1,利用 PCR 扩 增及 TA 克隆获得埃塞俄比亚芥菜 BcMYB28 的基因序列,将该序列提交至埃塞俄比亚芥菜测序数据库(该数 据库由 Agricultural & Agri-Food Canada, AAFC 提供),通过序列比对分析,埃塞俄比亚芥菜一共得到 6 个 BcMYB28 同源 基因,分别为 BcMYB28.1、BcMYB28.2、BcMYB28.3、BcMYB28.4、BcMYB28.5、Bc-MYB28.6。在 BRAD(http://brassicadb.org/brad/)及 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库下载获 取芸薹属作物 MYB28 同源基因的家族成员共 17 个,进一步将 BcMYB28.1~BcMYB28.6 与同源基因进行相 似度分析(表 2),结果表明,BcMYB28.1、BcMYB28.3、BcMYB28.4、BcMYB28.6 与同源基因进行相 似度分析(表 2),结果表明,BcMYB28.1、BcMYB28.3、BcMYB28.4、BcMYB28.5、BcMYB28.6 分别与 Bo-MYB28.3、BoMYB28.2、BoMYB28.1、BriMYB28.2、BniMYB28.1 的相似度最高,相似度分别为 95.8%、 92.2%、95.5%、93.2%、95.0%;而BcMYB28.2 与各同源基因的相似度在 74.6%~84.9%。该结果证明 Bc-MYB28.1、BcMYB28.3、BcMYB28.4 可能起源于 C 染色体组的甘蓝,而 BcMYB28.5、BcMYB28.6 可能起源 于 B 染色体组的黑芥。将拟南芥 AtMYB28、17 个已知的芸薹属作物中 MYB28 同源基因以及埃塞俄比亚芥菜 中 6 个 BcMYB28 共 24 个同源基因进行进化分析(图 1)。BcMYB28.1 与 BcMYB28.2 聚为第一大类,且 Bc-MYB28.1 与甘蓝型油菜 BnMYB28.1 和甘蓝中 BoMYB28.3 基因聚为同一亚类; BcMYB28.4 与 BcMYB28.6 聚为第 2 大类,且 BcMYB28.4 与甘蓝 中 BoMYB28.1 基因聚为同一亚类,BcMYB28.6 与芥菜型油菜 BjMYB28.1 和黑芥中 BniMYB28.1 基因聚为同一亚类; BcMYB28.5 聚为第 3 大类,该结果 与序列分析结果相一致。

表 2 埃塞俄比亚芥菜中 BcMYB28 与芸薹属作物各同源基因相似度分析

来源	基因	BcMYB28. 1	BcMYB28. 2	BcMYB28. 3	BcMYB28. 4	BcMYB28. 5	BcMYB28. 6
芥菜型油菜	BjMYB28. 1	81.8	77.7	79.2	84.6	80.2	94.4
芥菜型油菜	BjMYB28. 2	81.8	79.4	88.5	80.1	93.2	79.8
芥菜型油菜	BjMYB28. 3	81.8	75.4	78.4	91.5	79.6	85.9
芥菜型油菜	BjMYB28. 4	93.6	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
甘蓝型油菜	BnMYB28. 1	90.4	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
甘蓝型油菜	BnMYB28. 2	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9
甘蓝型油菜	BnMYB28. 3	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1
甘蓝型油菜	BnMYB28. 4	86.3	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
黑芥	BniMYB28. 1	81.8	77.8	79.3	84.7	80.3	95.0
黑芥	BniMYB28.2	81.8	79.6	88.8	80.4	93. 2	80.1
甘蓝	BoMYB28. 1	81.8	74.6	77.7	95.5	78.7	84.7
甘蓝	BoMYB28. 2	81.8	78.5	92. 2	78.7	87.9	77.8
甘蓝	BoMYB28. 3	95.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
甘蓝	BoMYB28. 4	79.7	79.7	79.7	79.7	79.7	79.7
白菜	BrMYB28. 1	93.5	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8
白菜	BrMYB28. 2	81.9	81.9	81.9	81.9	81.9	81.9
白菜	BrMYB28. 3	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8



0.04

%

#### 2.2 CRISPR/Cas9 载体构建及埃塞俄比亚芥菜的遗传转化

根据埃塞俄比亚芥菜中 BcMYB28 各同源基因的序列信息,通过网站(http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/)设计 BcMYB28 基因靶点 T1-F/-R 和 T2-F/-R,构建 CRISPR/Cas9 双元表达载体。为确保 BcMYB28.1-BcMYB28.6 同时被敲除,在 BcMYB28 保守区域第一外显子处距 ATG 起始位点 23 bp 处 和 89 bp 处分别设计两个靶点,通过 Overlapping PCR 将两个表达盒与 AtU3d 启动子串联,最后连入 pYLCRISPR/Cas9PubiN 表达载体,将构建好的重组载体 pYLCRISPR/Cas9PubiN-MYB28 送测序,以确 保构建完整无误的双靶点载体 pYLCRISPR/Cas9PubiN-MYB28。构建好的重组载体 pYLCRISPR/ Cas9PubiN-MYB28 通过子叶为外植体的遗传转化方法转化埃塞俄比亚芥菜材料(图 2)。用引物 M28-F/-R 检测共得到 2 株 T。代阳性遗传转化株(图 3c),收获 T<sub>1</sub>代种子。将 T<sub>1</sub>代转化植株 CR 与埃塞俄比亚 芥菜 WT 种到西南大学 10 号温室。与 WT 相比(图 3a 右),CR 叶片呈现表面光亮、无蜡质层、无刺毛等 表型(图 3a 左)。取 WT、CR 生长期的茎秆、叶、花以及开花后 10 d、20 d、30 d的种子,通过 qRT-PCR 分析结果显示,WT 中 BcMYB28 在叶片、茎秆及种子形成早中期均有高量表达,CR 植株中 BcMYB28 的表达显著低于 WT(图 3b)。





a, b, c, d, e分别表示在 M0、M1、M2、M3、M4 培养基生长, f为 T0 代遗传转化植株(含假阳性株与阳性株)。

图 2 子叶为外植体的埃芥遗传转化

#### 2.3 UHPLC-MS代谢物的测定及差异代谢物筛选

为进一步研究埃塞俄比亚芥菜中 BcMYB28 转录因子在硫苷生物合成路径中的作用,寻找在埃塞俄比 亚芥菜种起重要作用的关键代谢物,从 T1 代遗传转化株、埃塞俄比亚芥菜授粉后 10 d、20 d、30 d 的种子 材料中共鉴定出 1 843 种次级代谢物(表 3)。在正向模式下,与埃塞俄比亚芥菜 WT 相比,CR 有 247 个代 谢物含量上调,132 个代谢物下调,其余 1 464 个代谢物无显著差异(图 4a);进一步对差异代谢物进行富集 分析,找到前 25 个显著富集的差异代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(Glycine, serine and threonine metabolism)被显著富集(图 4b),硫代葡萄糖苷的生物合成中半胱氨酸、丝氨酸具有重要作用,甘氨酸与苏氨 酸也可对代谢产生影响。



a 图左上、左下为 CR 生长株型及叶片表型, a 图右上、右下为 WT 生长株型及叶片表型; b 图为 BcMYB28 的 qRT-PCR 表达图; 图 c 中 1 ~3 为 CR 单株 pcr 检测电泳图, 4、5 为 WT 单株检测电泳图, M 为 maker。



#### 表 3 部分差异代谢物

二级质谱名称	二级质谱得分	质荷比中位数	保留时间中位数	类型
2-(4-羟基苯基)萘酸酐	1	196.209 5	291.069 117 7	正向
β-氨基丙腈	0.999 994 538	644.487	71.060 804 67	正向
2,3-二氢-2,3-二羟基-4-(4-甲氧基苯基)-1H-苯-1-酮	0.999 965 615	73.026 1	321.114 498 3	正向
2-羟基吡啶	0.999 952 692	810.186	96.044 534 86	正向
2', 3, 5-三羟基-5', 7-二甲氧基黄烷酮	0.999 939 462	259.925	333.096 632 7	正向
腺嘌呤	0.999 935 769	166.368 5	136.061 234 2	正向
蜜环菌内酯 M	0.999 901 231	488.153	453.166 465 5	正向
异落叶松脂素 9'-O-α-L-阿拉伯呋喃糖苷	0.999 867 462	342.133 5	493.203 350 5	正向
精氨酰天冬酰胺	0.999 853	267.633 5	289.161 181 9	正向
新亚麻毒素	0.999 850 692	206.539	446.161 806 6	正向
α-氨基-2,5-二氢-5-氧代-4-异噁唑丙酸 N2-葡萄糖苷	0.999 842 154	228.527	335.109 553 5	正向
梅素苷	0.999 794	227.57	391.156 287 3	正向
桃叶珊瑚素	0.999 765 846	319.402	485.197 127	正向
喹啉	0.999 732 154	352.358 5	130.064 713 5	正向
酪氨酰甲硫氨酸	0.999 724 154	250.138 5	313.125 155 8	正向
甲基 (3R, 10R)-二羟基-11-十二碳烯-6, 8-二炔酸 10-葡萄糖苷	0.999 687 615	284.204	399.160 706 4	正向
2-吡咯烷酮	0.999 670 615	862.411	86.060 315 67	正向





#### 2.4 转录组测序分析埃塞俄比亚芥菜硫苷代谢中的关键调节因子

为鉴定埃塞俄比亚芥菜中 BcMYB28 在硫苷生物合成路径中的调节作用并找到更多埃塞俄比亚芥菜硫 苷代谢中的关键调节因子,选取埃塞俄比亚芥菜开花后 10 d、20 d、30 d形成期种子编号 WT-10DAF、 WT-20DAF、WT-30DAF(图 5),然后进行转录组测序分析。WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF 中分 别得到 50644704、49413212、42434056 条清洁读段,所有样品的错误率低于 0.03%,质量为 Q20(正确碱 基识别率大于 99%)和 Q30(正确碱基识别率大于 99.9%)的清洁读段分别大于 98%和 94%。WT-10DAF、 WT-20DAF、WT-30DAF分别只有 55.21%、54.24%和 51.06%的清洁读段比对至甘蓝型油菜参考基 因组;分别有 69.6%、70.21%和 72.2%的清洁读段比对至芥菜型油菜参考基因组(表 4)。埃塞俄比亚 芥菜(BBCC, n=34)的清洁读段分别比对到 B01-B08 以及 C01 至 C09 的参考染色体上。C01 和 C03 在 C 染 色体组中的比对最高(图 6a),而 B05 在 B 染色体中的比对率最高(图 6b)。这可能归因于埃塞俄比亚芥菜 的染色体组构成主要源自 B、C 组,而甘蓝型油菜则来自 A、C 组,芥菜型油菜则仅包含 A、B 组染色体。 因此,埃塞俄比亚芥菜样品的清洁读段在比对时,其比对率为51.06%~72.2%。此外,当以芥菜作为参考 基因组时,其比对率普遍高于以甘蓝型油菜为参考基因组的比对结果。



a, b, c, d, e, f分别表示埃塞俄比亚芥菜从播种、移栽、抽薹、不同形成期的角果和种子, DAF表示开花后的天数。

图 5 埃塞俄比亚芥菜的农艺性状

汞 4 比灯 数 插 筑 计
----------------

样品	总读段	总比对数(比对率)	多重比对(比对率)	唯一比对(比对率)	参考基因组
WT-10DAF	50644704	27960912(55.21%)	3761141(7.43%)	24199771(47.78%)	B. na pus
WT-20DAF	49413212	26803865(54.24%)	4111971(8.32%)	22691894(45.92%)	B. na pus
WT-30DAF	42434056	21666479(51.06%)	6859188(16.16%)	14807291(34.89%)	B. napus
WT-10DAF	50644704	35250382(69.6%)	3697827(7.3%)	31552555(62.3%)	B. juncea
WT-20DAF	49413212	34691361(70.21%)	3641303(7.37%)	31050058(62.84%)	B. juncea
WT-30DAF	42434056	30639144(72.2%)	5355177(12.62%)	25283967(59.58%)	B. juncea
WT-20DAF WT-30DAF WT-10DAF WT-20DAF WT-30DAF	49413212 42434056 50644704 49413212 42434056	26803865(54.24%) 21666479(51.06%) 35250382(69.6%) 34691361(70.21%) 30639144(72.2%)	4111971(8.32%) 6859188(16.16%) 3697827(7.3%) 3641303(7.37%) 5355177(12.62%)	22691894(45.92%) 14807291(34.89%) 31552555(62.3%) 31050058(62.84%) 25283967(59.58%)	B. na pu B. na pu B. junce B. junce B. junce

#### 2.5 差异表达基因(DEGs)的检测及聚类分析

为了解埃塞俄比亚芥菜形成期种子中差异基因的表达情况,使用 DESeq2 对 WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF分别检测差异表达基因。以甘蓝型油菜为参考物种,共鉴定出 5 495 个 DEG,3 个时期均差异表达的基因有 60 个(图 7 a)。在每个阶段(WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF)下调表达的基因远超过了上调表达的基因,分别是 1 686:853、464:259、3 447:886;使用芥菜型油菜作为参考种,在种子发育的不同阶段共鉴定出 5 104 个 DEG,3 个时期均差异表达的基因有 78 个(图 7 b)。在每个阶段,下调表达的基因远超过上调表达的基因,分别是 1 420:787、566:294、3 240:785(表 5),分布于 B、C 染色体组的差异表达基因均表现为下调表达的基因数目显著多于上调表达基因。

分组	总差异表达基因	上调表达差异基因	下调表达差异基因	参考基因组
WT_20DAF vs WT_30DAF	2 539	853	1 686	B. na pus
WT_10DAF vs WT_20DAF	723	259	464	B. na pus
WT_10DAF vs WT_30DAF	4 333	886	3 447	B. na pus
WT_20DAF vs WT_30DAF	2 207	787	1 420	B. juncea
WT_10DAF vs WT_20DAF	860	294	566	B. juncea
WT_10DAF vs WT_30DAF	4 025	785	3 240	B. juncea

表 5 差异表达基因统计



图 7 WT-10DAF、WT-20DAF、WT-30DAF 中差异表达基因的韦恩图

#### 2.6 GO 和 KEGG 富集分析

以甘蓝型油菜为参考种共得到 5 495 个差异表达基因, GO 富集分析结果显示, 20 个 GO terms 被显著 富集 (*p* 值<0.05), 但并未检测到硫苷代谢相关的 GO terms 被显著富集(图 8 a); 对所有 740 个 GO terms 分析发现,其中 GO: 0019760 被富集到参与硫苷代谢,共包含 62 个差异表达基因。以芥菜型油菜为 参考种共得到 5 104 个差异表达基因,进一步 GO 富集分析,结果显示,共有 20 个 GO terms 被显著富集 (*p* 值<0.05),其中 GO: 0008152 富集了 1 718 个差异表达基因,参与代谢过程(图 8 b),但未检测到硫苷 代谢相关的 GO terms 被显著富集。



b. 以芥菜型油菜为参考基因组



#### 2.7 埃塞俄比亚芥菜种子中参与硫代葡萄糖苷合成的 DEGs 聚类热图分析

进一步对 GO 富集分析得到的埃塞俄比亚芥菜硫代葡萄糖苷合成路径中的差异表达基因进行聚类 热图分析(图 9),包括以甘蓝型油菜为参考种得到的 62 个差异表达基因及以芥菜型油菜为参考种得到 的 1 个差异表达基因,聚类结果显示参与硫代葡萄糖苷合成相关的 63 个差异表达基因聚为 3 个亚类, 即随种子成熟显著上调表达的差异表达基因、显著下调表达的差异表达基因以及差异不显著的部分差 异表达基因。其中仅有 10 个差异表达基因随种子成熟呈显著上调表达,分别为 BnaC07g47470D、 BnaC01g23800D、BnaC03g60280D、BnaC01g15060D、BnaA03g31890D、BnaCnng32000D、BnaCnng66500D、BnaC07g14870D、BnaC08g15350D、BnaC03g75340D。



图 9 埃塞俄比亚芥菜形成期种子中参与硫代葡萄糖苷合成代谢的差异表达基因的聚类热图分析

## 3 结论与讨论

MYB28 基因在调控植物次生代谢途径中发挥着重要作用,特别是与硫代葡萄糖苷的合成密切相关<sup>[24-26]</sup>。本研究通过 TA 克隆及测序,获得了 1 个 BcMYB28 序列。将该序列提交至埃塞俄比亚芥菜数据 库进行比对分析,鉴定出埃塞俄比亚芥菜中共有 6 个 BcMYB28 同源基因。这些基因序列与芸薹属作物中 已知的 MYB28 基因序列的相似度为 74.6%~95.8%,该发现揭示了 MYB28 基因在进化过程中的保守 性。本研究通过 CRISPR/Cas9 成功构建了 BcMYB28 基因的双靶点敲除载体,并转化至埃塞俄比亚芥菜 中,观察发现与埃塞俄比亚芥菜 WT 相比,T1 代转化植株(CR)的叶片呈现出表面光亮、无蜡质层、无刺 毛等显著表型变化。这些表型变化可能源于 MYB28 基因敲除后,其下游调控途径的紊乱。MYB28 转录因 子在植物体内扮演着重要的调控角色,它参与调控多种生物过程,包括芥子油苷代谢、蜡质合成以及抗病 抗虫作用等。芥子油苷是十字花科植物中一类重要的次生代谢产物,具有抗病虫害和抗癌等生物活性。 MYB28 通过调控芥子油苷合成途径中的关键酶基因来影响芥子油苷的合成水平。当 MYB28 基因被敲除 后,芥子油苷的合成将受到抑制<sup>[27]</sup>,从而影响植物对病虫害的防御能力以及相关信号转导途径的正常运 作。此外,MYB28 还参与调控植物蜡质层的合成,蜡质层是植物表面的一层重要屏障,可以保护植物免受 外界生物和非生物胁迫的侵害,MYB28 通过调控蜡质合成基因的表达来影响蜡质层的形成。当MYB28 基 因被敲除后,蜡质层的合成将受到影响,导致植物对病虫害的防御能力降低<sup>[28]</sup>。在小麦中,MYB28 还参与 调控韧皮部防卫反应,这是植物抵御系统性侵染的病原微生物的一种有效机制<sup>[29]</sup>。当 MYB28 基因被敲除 后, 韧皮部防卫反应将受到影响, 从而影响植物对病原微生物的抵御能力。

MYB28 基因在硫代葡萄糖苷合成途径中起着关键调控作用,通过调控与硫代葡萄糖苷合成相关的酶 基因(如侧链延长酶基因 BCAT4、MAM1,中心结构合成酶基因 CYP79F1 等)的表达,来影响硫代葡萄糖 苷的合成<sup>[30]</sup>。硫代葡萄糖苷与植物叶片表面蜡质层及刺毛的形成不受单个 SAM 细胞层的控制,而是受到 细胞层间相互作用的影响<sup>[31]</sup>。因此硫代葡萄糖苷合成减少导致了 SAM 细胞层的相互作用,形成叶片表面 光亮、无蜡质层、无刺毛等表型。此外,*MYB28* 基因参与调控水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)等激素的信号途 径,来影响植物的防御反应和生长发育<sup>[32-33]</sup>。当*MYB28* 基因被敲除后,这些信号途径可能受到干扰,从而 导致植物生长发育的异常。

半胱氨酸是硫代葡萄糖苷合成中的关键前体物质,其通过一系列酶促反应转化为硫代葡萄糖苷的核心 结构<sup>[16-17]</sup>。MYB28 基因的敲除可能影响了这些酶促反应的进行,从而导致半胱氨酸向硫代葡萄糖苷的转 化受阻。丝氨酸在硫代葡萄糖苷的侧链延长过程中具有重要作用<sup>[34]</sup>,虽然丝氨酸本身并不直接参与硫代葡 萄糖苷的合成,但其作为关键中间体的前体物质,对硫代葡萄糖苷的多样性和复杂性具有重要影响。本研 究通过差异代谢物富集分析,找到甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢被显著富集,MYB28 基因的敲除可能间接 影响了丝氨酸的代谢途径,进而影响了硫代葡萄糖苷的侧链结构和含量。甘氨酸和苏氨酸的代谢变化可能 通过影响植物体内的氨基酸平衡和能量代谢,间接影响硫代葡萄糖苷的合成和积累。

在对WT形成期种子进行转录组测序分析发现,埃塞俄比亚芥菜的清洁读段在比对到甘蓝型油菜和芥菜型油菜基因组时,比对率为51.06%~72.2%。埃塞俄比亚芥菜的染色体组构成主要源自B、C组染色体,通过其与甘蓝型油菜和芥菜型油菜的染色体比对,C01和C03在C染色体组中的比对率最高,而B05在B染色体中的比对率较高。芥菜型油菜的基因组被广泛用于与其他芸薹属植物的比较分析,尤其是与埃塞俄比亚芥的对比研究。这种比对率普遍较高,可能与两者在染色体组构成上的相似性有关<sup>[35]</sup>。由于埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜在基因组结构上的相似性,尤其是B基因组的共性,使得在进行基因组比对时能够找到更多的同源区域,从而导致较高的比对率。通过差异表达基因的聚类热图分析找到10个硫苷合成相关差异表达基因,揭示了这些基因在埃塞俄比亚芥菜种子发育过程中调节硫苷代谢的潜在功能。

本研究采用 CRISPR/Cas9 技术成功建立了埃塞俄比亚芥菜的遗传转化体系,为后续的 DEGs 的功能 验证奠定了基础。通过运用差异表达基因的聚类热图分析方法,鉴定出与硫苷合成相关的差异表达基因, 揭示了这些基因在埃塞俄比亚芥菜种子发育过程中的潜在作用。这些研究成果进一步加深了对埃塞俄比亚 芥菜硫苷代谢途径的了解,然而,探索这些 DEGs 在改良埃塞俄比亚芥菜、提高抗逆性等方面的应用潜力, 尚需进一步深入研究以阐明。

#### 参考文献:

- [1] TEKLEHAYMANOT T, WANG H J, LIANG J L, et al. Variation in Plant Morphology and Sinigrin Content in Ethiopian Mustard (*Brassica carinata* L.) [J]. Horticultural Plant Journal, 2019, 5(5): 205-212.
- [2] KHEDIKAR Y, CLARKE W E, CHEN L F, et al. Narrow Genetic Base Shapes Population Structure and Linkage Disequilibrium in an Industrial Oilseed Crop, *Brassica carinata* A. Braun [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 12629.
- [3] 谢娜娜,黄伟,高国应,等.黑芥和埃塞俄比亚芥 PAP2 基因克隆及 B 基因组 PAP2 功能验证 [J].中国油料作物学报, 2024,46(2):274-283.
- [4] RAMAN R, QIU Y, COOMBES N, et al. Molecular Diversity Analysis and Genetic Mapping of Pod Shatter Resistance Loci in *Brassica carinata* L. [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1765.
- [5] ZHANG W S, HU D D, RAMAN R, et al. Investigation of the Genetic Diversity and Quantitative Trait Loci Accounting for Important Agronomic and Seed Quality Traits in *Brassica carinata* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 615.

- [6] SHARMA B B, KALIA P, SINGH D, et al. Introgression of Black Rot Resistance from Brassica carinata to Cauliflower (Brassica oleracea Botrytis Group) through Embryo Rescue [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1255.
- [7] 张双双,苏维,刘阳,等. 白菜与埃塞俄比亚芥远缘杂交种质创制及黑腐病抗性转育 [J]. 园艺学报, 2021, 48(7): 1304-1316.
- [8] WEI Z L, WANG M, CHANG S H, et al. Introgressing Subgenome Components from Brassica rapa and B. carinata to B. juncea for Broadening Its Genetic Base and Exploring Intersubgenomic Heterosis [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1677.
- [9] ZOU J, HU D D, MASON A S, et al. Genetic Changes in a Novel Breeding Population of Brassica napus Synthesized from Hundreds of Crosses between *B. rapa* and *B. carinata* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(2): 507-519.
- [10] HU D D, ZHANG W S, ZHANG Y K, et al. Reconstituting the Genome of a Young Allopolyploid Crop, Brassica napus, with Its Related Species [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(6): 1106-1118.
- [11] GONG Q, DAI C Y, ZHANG X H, et al. Towards Breeding of Rapeseed (Brassica napus) with Alien Cytoplasm and Powdery Mildew Resistance from Ethiopian Mustard (Brassica carinata) [J]. Breeding Science, 2020, 70(3): 387-395.
- [12] QIAN W, CHEN X, FU D, et al. Intersubgenomic Heterosis in Seed Yield Potential Observed in a New Type of Brassica Napus Introgressed with Partial Brassica rapa Genome [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(7): 1187-1194.
- [13] LI M T, CHEN X, MENG J L. Intersubgenomic Heterosis in Rapeseed Production with a Partial New-Typed Brassica napus Containing Subgenome A<sup>r</sup> from B. rapa and C<sup>e</sup> from Brassica carinata [J]. Crop Science, 2006, 46(1): 234-242.
- [14] 赵琴. 芸薹属多倍体植物进化及适应性的分子机制研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [15] TIAN E T, JIANG Y F, CHEN L L, et al. Synthesis of a Brassica Trigenomic Allohexaploid (B. carinata×B. rapa) de Novo and Its Stability in Subsequent Generations [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(8): 1431-1440.
- [16] ISHIDA M, HARA M, FUKINO N, et al. Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of Brassicaceae Vegetables [J]. Breeding Science, 2014, 64(1): 48-59.
- [17] BLAŽEVIC I, MONTAUT S, BURČUL F, et al. Glucosinolate Structural Diversity, Identification, Chemical Synthesis and Metabolism in Plants [J]. Phytochemistry, 2020, 169: 112100.
- [18] AUGUSTINE R, MUKHOPADHYAY A, BISHT N C. Targeted Silencing of BjMYB28 Transcription Factor Gene Directs Development of Low Glucosinolate Lines in Oilseed Brassica juncea [J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(7): 855-866.
- [19] NOUR-ELDIN H H, MADSEN S R, ENGELEN S, et al. Reduction of Antinutritional Glucosinolates in Brassica Oilseeds by Mutation of Genes Encoding Transporters [J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(4): 377-382.
- [20] WANG J, YU S H, REN X L, et al. Integrative Analyses of Metabolites and Transcriptome Reveal the Metabolic Pattern of Glucosinolates in Potherb Mustard (*Brassica juncea* Var. multiceps) [J]. Plants, 2024, 13(17): 2481.
- [21] LI J G, HAN G Y, LI X M, et al. Improvement of TA Cloning Method to Facilitate Direct Directional Cloning of PCR Products [J]. Applied Mechanics and Materials, 2014, 565: 3-8.
- [22] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [23] MA X L, LIU Y G. CRISPR/Cas9-Based Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants [J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2016, 115: 1-21.
- [24] GIGOLASHVILI T, YATUSEVICH R, BERGER B, et al. The R2R3-MYB Transcription Factor HAG1/MYB28 is a Regulator of Methionine-Derived Glucosinolate Biosynthesis in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Journal, 2007, 51(2): 247-261.

- [26] ZHOU H, WU L, HAN D, et al. Genome-Wide Association Study of Seed Glucosinolate Content in Brassica Napus [J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(1): 222.
- [27] HÖLZL G, REZAEVA B R, KUMLEHN J, et al. Ablation of Glucosinolate Accumulation in the Oil Crop Camelina Sativa by Targeted Mutagenesis of Genes Encoding the Transporters GTR1 and GTR2 and Regulators of Biosynthesis MYB28 and MYB29 [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(1): 189-201.
- [28] 卢一萱. 小麦 MYB28 激活蜡质基因 CER1 调控韧皮部防卫反应与对麦长管蚜的抗性 [D]. 南京:南京农业大学, 2020.
- [29] 吕青云. 小麦转录因子 MYB28 调控蜡质合成和抗病抗虫作用的研究 [D]. 泰安:山东农业大学,2022.
- [30] 刘蔚,姚敏,康郁,等. GWAS结合共表达网络分析挖掘影响油菜种子硫苷积累的作用位点 [J]. 农业生物技术学报, 2019,27(10):1729-1741.
- [31] LI J X, RAO L L, XIE H, et al. Morphology and Glucosinolate Profiles of Chimeric Brassica and the Responses of Bemisia tabaci in Host Selection, Oviposition and Development [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(9): 2009-2018.
- [32] GUO R F, SHEN W S, QIAN H M, et al. Jasmonic Acid and Glucose Synergistically Modulate the Accumulation of Glucosinolates in Arabido psis thaliana [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(18): 5707-5719.
- [33] YU Y T, WU Z, LU K, et al. Overexpression of the MYB Transcription Factor *MYB28* or *MYB99* Confers Hypersensitivity to Abscisic Acid in Arabidopsis [J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(2): 152-161.
- [34] LI L S, ZHANG H, CHAI X H, et al. Transcriptome and Proteome Conjoint Analysis Revealed that Exogenous Sulfur Regulates Glucosinolate Synthesis in Cabbage [J]. Plants, 2021, 10(10): 2104.
- [35] 解蓓. 埃塞俄比亚芥和芥菜型油菜全套染色体精确识别 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.

#### 责任编辑 王新娟