

大白菜抗 TuMV 显性位点 F₂ 的 QTL-seq 分析

李国亮, 张淑江, 钱 伟, 李 菲, 章时蕃, 张 慧, 方智远, 孙日飞*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 为了挖掘大白菜抗 TuMV 基因的多样性, 制定抗 TuMV 的遗传改良策略和综合防治措施, 对抗 TuMV 的显性位点进行 QTL 分析。以大白菜对 TuMV 高抗的‘89B’和高感的‘强势’为亲本, 构建 F₂ 群体。采用人工磨擦接种 TuMV 法对 F₂ 群体进行单株接种鉴定, 经卡平方测验 F₂ 群体抗、感植株分离比例不符合 3:1 ($\chi^2 = 4.8 > \chi_{0.05}^2 = 3.84$), 非单基因遗传, 为数量位点控制。选取表型高抗和高感的 F₂ 单株各 40 株进行混池, 对 2 个极端池以及 2 个亲本进行重测序分析。通过计算抗、感池与亲本间的 $\Delta(\text{SNP-index})$, 获得两个抗 TuMV 位点区域, 物理位置为 A07 染色体的 13.9 ~ 14.4 Mb 和 A08 染色体的 16.4 ~ 17.4 Mb。上述两个区域共筛选出具有多态性位点的基因 68 个, 其中 6 个基因与植物抗性有关, 其编号分别为 Bra028499、Bra028500、Bra016311、Bra016312、Bra016313 和 Bra016314, 其中 Bra028499 和 Bra028500 编码抗病蛋白, Bra016311、Bra016312、Bra016313 和 Bra016314 编码抗 TMV 蛋白。Bra028499、Bra028500、Bra016311 和 Bra016314 含有 TIR-NBS-LRR 特殊结构域。在已定位克隆的植物抗病基因中, 大约 80% 属于 NBS 基因家族, 因此推测这些基因可能与大白菜抗 TuMV 有关。

关键词: 大白菜; TuMV; 显性位点; QTL-seq; 遗传分析

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 02-0307-10

Genetic Analysis of Dominant Locus Involved in Resistance to *Turnip mosaic virus* by QTL-seq in Chinese Cabbage

LI Guoliang, ZHANG Shuijiang, QIAN Wei, LI Fei, ZHANG Shifan, ZHANG Hui, FANG Zhiyuan, and SUN Rifei*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to excavate the diversity of TuMV resistant genes and make the genetic improvement strategy and measures for the prevention and control in Chinese cabbage, QTL analysis of the dominant locus was conducted in the study, which would be helpful to cultivate the broad-spectrum resistance of Chinese cabbage varieties. The F₂ population was constructed from the parents ‘89B’ (resistant) and ‘Qiangshi’ (susceptible), which were the highly inbred Chinese cabbage lines. The F₂ population individuals were inoculated by TuMV C4 isolate, and the segregation from F₂ did not fit the expected segregation for a Mendelian model 3:1 ($\chi^2 = 4.8 > \chi_{0.05}^2 = 3.84$), so quantitative trait locus controlled the character, not a single gene. Choosing 40 highly resistant/susceptible individuals from F₂

收稿日期: 2018-08-08; **修回日期:** 2019-01-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0100204-06); 国家自然科学基金项目 (31772302); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sunrifei@caas.cn; Tel: 010-82109511)

population, respectively, to mix the pools, and the two parents and two pools were re-sequenced. By calculation analysis of $\Delta(\text{SNP-index})$ between parent and pools, two main regions were obtained (A07 chromosome: 13.9 - 14.4 Mb and A08 chromosome: 16.4 - 17.4 Mb). There were 68 genes in the above two regions, and 6 out of 68 were associated with resistance in plants (Bra028499, Bra028500, Bra016311, Bra016312, Bra016313 and Bra016314). In addition, Bra028499 and Bra028500 coded the disease-resistant proteins, and Bra016311, Bra016312, Bra016313 and Bra016314 coded TMV-resistant proteins. Bra028499, Bra028500, Bra016311 and Bra016314 contained the TIR-NBS-LRR domains. About 80% of the resistance genes cloned in plants belonged to the NBS gene families, indicating that these genes may be associated with Chinese cabbage resistance to TuMV.

Keywords: Chinese cabbage; TuMV; dominant locus; QTL-seq; genetic analysis

芜菁花叶病毒 (TuMV) 可以侵染多种十字花科植物 (Walsh et al., 1999), 且以芸薹属作物为主要寄主, 是唯一能侵染芸薹属植物的马铃薯 Y 病毒属病毒 (Walsh & Jenner, 2002; 王雪 等, 2005), 是中国大白菜生产的三大病害之一 (李巧云 等, 2012)。

在芸薹属植物中已经定位克隆了一些抗 TuMV 的基因, 其中显性抗病基因居多。已定位的大部分抗性基因位于 A 基因组上, 少部分定位于 C 基因组。*TuRB01* 是油菜中高抗 TuMV-UK1 株系的显性基因, 被定位在 A 基因组 N6 连锁群上 (Walsh et al., 1999); *TuRB01b* 是在大白菜中抗 TuMV-UK1 株系的显性基因, 位于 A06 染色体上 (Jenner et al., 2000); *TuRB02* 是数量性状基因, 定位于 C 基因组 N14 连锁群上, 控制 TuMV-CHN1 株系的侵染程度 (Walsh et al., 1999); *TuRB03* 定位于油菜 ‘Westar’ 的 A 基因组 N6 连锁群上, 为单显性基因, 对 TuMV-CDN1 株系的分离物表现为高抗 (Hughes et al., 2003); *TuRB04* 和 *TuRB05* 在 ‘Swede’ 品系中发现, 都为单显性基因, *TuRB04* 对 *TuRB05* 表现为上位, *TuRB04* 基因表现为抗 TuMV, *TuRB05* 对 TuMV 不起作用, 而是通过抑制病毒的传播, 从而使被侵染植株产生应答 (Jenner et al., 2002)。

宋洪元和曹必好 (2002) 以高抗 TuMV 自交不亲和的结球甘蓝为材料, 构建 cDNA 文库, 并利用两个与抗病基因相似度较高的基因片段作探针, 对所构建的 cDNA 文库进行筛选, 获得抗 TuMV 的单显性基因为 *TuR2*; Rusholme 等 (2007) 利用大白菜抗病亲本定位克隆了隐性抗病基因 *retr01* 和显性基因 *ConTR01*, 两个基因分别位于 A04 和 A08 染色体上, 共同控制对 TuMV 的抗性; 钱伟 (2013) 以大白菜感病材料 ‘极早春’ 和抗病材料 ‘BP8407’ 为亲本, 采用 BSA 法, 通过筛选 SSR 和 InDel 标记, 定位克隆隐性抗病基因 *retr02*, 同时揭示了该基因的抗病机制 (Qian et al., 2013; Nellist et al., 2014); Li 等 (2016) 在 *retr02* 基因上开发 dCAPS 和 KASP 标记, 可以高通量鉴定大白菜抗 TuMV 基因; Jin 等 (2014) 报道 *TuRB07* 基因定位于白菜基因组 A06 染色体的末端位置, 是显性抗性基因; Chung 等 (2014) 在大白菜 DH 群体中定位了一个 TuMV 显性抗病位点, 位于 A06 染色体上; Li 等 (2014) 定位了抗大白菜 TuMV 病毒基因 *TuRBCS01*, 该基因位于 A04 染色体上; 刘栓桃等 (2014) 采用同源克隆和 Tail-PCR 技术, 鉴定了 12 份大白菜 (抗/感 TuMV) 材料中 *eIF(iso)4E.a* 位点的多样性, 开发了鉴别完整基因与假基因的共显性标记; 李国亮等 (2017) 通过酵母双杂交和荧光双分子互补试验证明, *eIF(iso)4E.a* 仅与 TuMV C4 株系互作, 与 TuMV UK1 不互作, 揭示 *eIF(iso)4E* 与 TuMV 不同株系的互作关系。

近年来, 植物 QTL 研究取得了极大进展, 在多种作物中克隆了大量的重要农艺性状 QTL, 并从分子水平上剖析了其作用机理。Takagi 等 (2013) 在水稻的 RILs 群体和 F₂ 群体中选择两个极端

性状池, 进行重测序分析, 成功鉴定了具有重要农艺性状的 QTL, 并将这种方法命名为 QTL-seq 技术。Guo 等 (2017) 以高抗 CMV 的灌木状辣椒 PBC688 和不抗 CMV 的一年生辣椒 G29 为母本, 构建了含有 745 个单株的 F₂ 分离群体, 人工接种 CMV 鉴定单株抗性, 选取 10% 的抗感单株分别混合为抗/感池, 利用 QTL-seq 技术在两个池间定位了 2 个关联区域, 关联区域大小分别为 4.36 和 3.90 Mb。张旭等 (2018) 以黄瓜/酸黄瓜渐渗系 ‘IL77’ 进行了抗蔓枯病主效 QTL 定位及候选基因鉴定。

本研究中以高抗和高感 TuMV 的大白菜为亲本构建 F₂ 群体, 选取极端抗/感病 F₂ 单株进行 QTL-seq 分析, 发现两个主效 QTL 区域, 并对该区域内基因功能进行分析。以期为继续挖掘大白菜抗 TuMV 基因的多样性奠定基础, 同时为培育广谱抗性大白菜新品种提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大白菜材料为高抗 TuMV 的 ‘89B’ (30 株), 高感 TuMV 的 ‘强势’ (30 株), ‘89B’ × ‘强势’ 的 F₁ 代 (30 株) 和 F₂ 代材料 (550 株); 用于扩繁 TuMV-C4 的芥菜 ‘Tendgreen’ 由英国华威大学的 John A. Walsh 惠赠; 感 TuMV 大白菜对照为 ‘极早春’。2017 年 4 月种植在中国农业科学院蔬菜花卉研究所玻璃温室。

TuMV-ELISA 试剂盒购于美国 Agdia 公司; TuMV-C4 株系保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所白菜课题。

1.2 人工磨擦接种鉴定大白菜对 TuMV-C4 株系的抗性

在大白菜三叶期 (幼苗的第 3 片真叶充分展开) 时, 取扩繁 TuMV 的芥菜 ‘Tendgreen’ 新鲜病叶 1 g, 放入高温灭菌过的研钵中加入磷酸盐缓冲液 (0.05 mol · L⁻¹, pH 7.0) 5 mL 研磨成浆, 用双层纱布滤出病毒汁液立即用于接种。人工磨擦接种时, 先在待接种鉴定植株 (第 2 和第 3 片叶) 叶片正面均匀喷撒少许金刚砂, 用右手食指沾病毒汁液在叶面轻轻往返磨擦 2 ~ 4 次, 随后立即用清水冲洗叶面, 遮荫 24 h。温度控制白天 25 ~ 28 °C, 夜间 20 ~ 22 °C。接种 20 d 后进行抗/感病表型调查鉴定其对 TuMV 的抗性 (钱伟, 2013; 李国亮, 2016)。

接种 25 d 后, 利用由美国 Agdia 公司生产的 TuMV-ELISA 试剂盒, 对亲本 ‘89B’ (30 株)、‘强势’ (30 株)、F₁ 代 (30 株) 和 F₂ 代材料 (550 株) 进行病毒含量检测, 3 次重复。利用酶标仪在 405 nm 下进行样品吸光度测定 OD₄₀₅, $P/N = \text{被测样品的 OD}_{405} / \text{阴性对照平均 OD}_{405}$ 。分为 4 个等级, 即高抗 ($P/N \leq 1$)、中抗 ($1 < P/N \leq 2$)、中感 ($2 < P/N \leq 3$)、高感 ($P/N > 3$)。根据 ELISA 鉴定结果, 在 F₂ 代群体中选取极端抗病 40 个单株混为抗病池, 即 R 池; 选取极端感病 40 个单株混为感病池, 即 S 池。

1.3 重测序数据处理

重测序及其数据处理由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。亲本 ‘89B’、亲本 ‘强势’、R 池和 S 池进行 Illumina HiSeqTM PE150 测序, 亲本测序深度为 10×, 混池测序深度为 30×。

有效测序数据通过 BWA 软件 (参数: mem-t4-k32-M) 比对到参考基因组 (BWA Version: 0.7.10); 比对结果经 SAMTOOLS 去除重复 (参数: rmdup); 采用 GATK3.3 软件 (Version: 3.3.0) 的 UnifiedGenotyper 模块进行多个样本 SNP 的检测, 使用 VariantFiltration 进行过滤, 过滤参数为

--clusterWindowSize 4, --filterExpression “QD < 4.0 || FS > 60.0 || MQ < 40.0”, -G_filter “GQ < 20” ;
SNP 注释 (ANNOVAR Version: 2013.08.23) 。

1.4 候选区域及候选基因的筛选

利用白菜基因组序列信息及注释信息 (BRAD, <http://brassicadb.org/brad/>), 以及 TAIR 和 KEGG2 数据库信息, 对候选区域及候选基因进行功能分析, 寻找大白菜中与抗病相关基因。

2 结果与分析

2.1 大白菜抗 TuMV F₂ 群体遗传分析

大白菜亲本 ‘强势’ 与 ‘89B’ 杂交, 获得 F₁, 自交获得 F₂。大白菜三叶期时人工接种 TuMV-C4 株系, 20 d 后进行抗性鉴定。表型鉴定发现: 亲本 ‘89B’ 病情指数为 10, 表现为高抗 TuMV; 亲本 ‘强势’ 病情指数为 46, 表现为高感 TuMV; F₁ 代病情指数为 16, 表现为抗病; F₂ 代抗/感性状分离, 且不同单株抗/感程度存在较大差异。通过 ELISA 试验定量检测分析植株感染病毒的程度。亲本 ‘强势’ 和 ‘89B’ 检测结果与表型鉴定一致; F₁ 表现抗病, 但不同单株抗病程度不同 (表 1), F₂ 代高抗: 中抗: 中感: 高感 = 5: 17: 3: 2。经卡平方测验 F₂ 群体抗、感植株分离比例不符合 3: 1 ($\chi^2 = 4.8 > \chi_{0.05}^2 = 3.84$), 说明非单基因控制, 为数量位点基因控制。

表 1 ELISA 检测大白菜亲本、F₁、F₂ 接种 TuMV 后的抗病性
Table 1 TuMV resistance detection of the parents, F₁, F₂ individuals by ELISA

样品 Sample	高抗株数 High resistance	中抗株数 Medium resistance	中感株数 Medium susceptibility	高感株数 High susceptibility	合计 Total
强势 Qiangshi	0	0	0	30	30
89B	30	0	0	0	30
F ₁	10	20	0	0	30
F ₂	110	341	61	38	550

2.2 F₂ 群体极端抗/感单株 BSA 混池测序

本次测序共产生原始数据 57.291 Gb, 过滤后的标准数据 57.139 Gb, 各样本的原始数据在 8 238.602 ~ 20 171.526 Mb 之间, 测序质量高 (Q20 ≥ 94.77%、Q30 ≥ 90.78%), GC 含量在 38.72% ~ 41.56% 之间 (表 2)。所有样本的数据量足够, 测序质量合格, GC 分布正常, 建库测序成功。

表 2 测序数据质量情况汇总
Table 2 Statistics of the qualities of the sequencing data

样本名 Sample	原始数据产量/bp Raw base	过滤数据量/bp Clean base	过滤比值/% Effective rate	碱基错率/% Error rate	Q30/%	G/C/%
强势 Qiangshi	8 238 602 100	8 198 459 700	99.52	0.03	94.87	39.24
89B	8 887 550 400	8 863 268 100	99.72	0.03	94.00	39.22
R 池 R-pool	20 171 526 300	20 131 759 200	99.81	0.03	91.07	38.72
S 池 S-pool	19 993 234 500	19 945 140 600	99.76	0.04	90.78	41.56

注: Q30: Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比。
Note: Q30: The percentage of the base (the value of Phred more than 30) accounting for all the bases.

测序 Reads 与参考基因组比对, 所有样本的比对率在 92.8%~93.75%之间, 表明样本测序数据与参考基因组相似度高; 对参考基因组 (排除 N 区) 的平均覆盖深度在 22.42×至 48.52×之间, 1×覆盖度 (至少有 1 个碱基的覆盖) 在 91.54%以上, 覆盖深度和覆盖度能够直接反应测序数据的均一性及与参考序列的同源性 (表 3)。比对结果正常, 可用于后续的变异检测及相关分析。

表 3 测序深度及覆盖度统计
Table 3 Statistics of the mapping rate and coverage depth

样本名 Sample	比对读取数/条 Mapped reads	读取总条数 Total reads	比对率/% Mapping rate	测序深度/× Average depth	覆盖度/% Coverage	
					1×	4×
强势 Qiangshi	55 105 748	59 088 454	93.26	24.33	91.54	86.99
89B	51 239 570	54 656 398	93.75	22.42	91.66	88.18
R 池 R-pool	123 839 757	132 967 604	93.14	46.51	93.79	89.02
S 池 S-pool	124 545 947	134 211 728	92.80	48.52	95.74	94.26

注: 1×覆盖度, 1 个碱基覆盖的位点占基因组的百分比; 4×覆盖度, 4 个碱基覆盖的位点占基因组的百分比。
Note: Coverage 1×, the percentage of one base covering the genome; coverage 4×, the percentage of four bases covering the genome.

以白菜 Chiifu 基因组为参考进行比较分析, S 池和 R 池中不存在 1 706 576 个 SNP 位点。利用 ANNOVAR 对 SNP 进行注释 (表 4)。

表 4 SNP 检测及注释结果统计
Table 4 SNP detection and statistics of the annotation results

区域 Region	类别 Category	SNP 位点数 Number of SNPs
上游 1 kb 区域 Upstream		184 943
外显子 Exonic	获得终止密码 Stop gain	1 409
	丢失终止密码 Stop loss	297
	同义变异 Synonymous	240 885
	非同义变异 Non-synonymous	139 369
		281 276
内含子区域 Intronic		659
剪接位点区域 Splicing		160 161
基因下游 1 kb Downstream		41 544
基因上游 1 kb, 同时为另一基因下游 1 kb 区域 Upstream/downstream		656 033
基因间区域 Intergenic		973 219
转换 Ts		733 357
颠换 Tv		1.327
转换与颠换的比率 Ts/Tv		1 706 576
SNP 位点总数 Total		

2.3 主效 QTL 区间的筛选及分析

对 SNP-index 在染色体上的分布进行作图, 默认选择 1 Mb 为窗口, 1 kb 为步长, 计算每个窗口中 SNP-index 的平均值, 以此反映子代的 SNP-index 分布。计算 $\Delta(\text{SNP-index}) = \text{SNP-index}$ (极端抗病性状) - SNP-index (极端感病性状)。进行 1 000 次置换检验, 选取 95%置信水平作为筛选的阈值, 图中的曲线即为以窗口形式展现的 $\Delta(\text{SNP-index})$ 分布, 置信水平以上的窗口作为候选区间。但本研究中 $\Delta(\text{SNP-index})$ 均未超过置信水平, 通过 $\Delta(\text{SNP-index})$ 分析, 在 A07 和 A08 染色体上存在两个主峰 (图 1), 推测其为两个主效 QTL 区间, 即物理位置染色体 A07 的 13.9~14.4 Mb 和 A08 的 16.4~17.4 Mb。

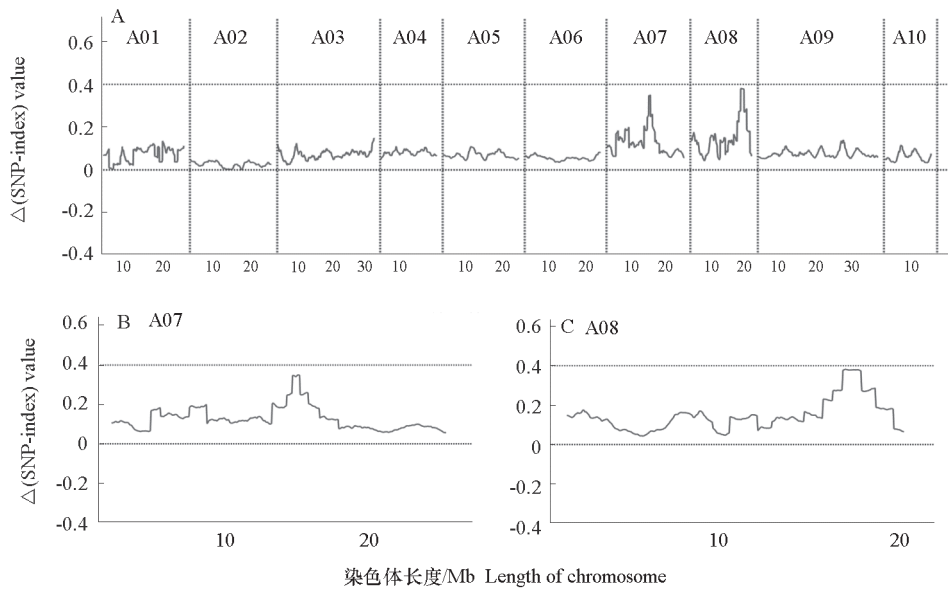


图1 全基因组 (A)、A07 染色体 (B) 和 A08 染色体 (C) 上抗/感病池间 Δ (SNP-index)分布计算
曲线: 染色体不同位置 Δ (SNP-index)值的集合。

Fig. 1 Calculation of the Δ (SNP-index) distribution in whole genome (A), A07 chromosome (B) and A08 chromosome (C)
Curve: The rally points of Δ (SNP-index) value in the different positions of the chromosome.

2.4 主效 QTL 区间内基因注释分析

选择 95%置信水平下, 在全基因组范围内挑选极端抗病池和极端感病池在 SNP-index 差异显著的 SNP 位点, 即挑选极端抗病 SNP-index 接近 1 (0.75), 且极端感病 SNP-index 接近 0 (0.3) 的位点。对于候选的 140 个多态性标记位点, 提取 ANNOVAR 的注释结果 (表 5), 优先挑选丢失终止密码、获得终止密码、非同义突变或可变剪接的位点所在基因作为候选基因。

表 5 候选多态性标记位点注释情况
Table 5 Annotation analysis of the candidate polymorphic SNPs

区域 Region	类别 Category	SNP 位点数 Number of SNPs
上游 1 kb 区域 Upstream		28
外显子 Exonic	获得终止密码 Stop gain	0
	丢失终止密码 Stop loss	0
	同义变异 Synonymous	1
	非同义变异 Non-synonymous	1
内含子区域 Intronic		15
剪接位点区域 Splicing		0
基因下游 1 kb Downstream		17
基因上游 1 kb, 同时为另一基因下游 1 kb 区域 Upstream/downstream		4
基因间区域 Intergenic		74
转换 Ts		86
颠换 Tv		54
转换与颠换的比率 Ts/Tv		1.592
SNP 位点总数 Total		140

利用白菜基因组网站 BRAD, 在染色体 A07 的 13.9~14.4 Mb 和 A08 的 16.4~17.4 Mb 区域内, 共筛选具有多态性位点基因 68 个 (表 6), 对这些基因进行功能注释及拟南芥同源基因分析, 其中 6 个基因与植物抗性有关, 其基因编号分别为 Bra028499、Bra028500、Bra016311、Bra016312、Bra016313

和 Bra016314, 其中 Bra028499、Bra028500、Bra016311 和 Bra016314 含有 TIR-NBS-LRR 特殊结构域, Bra016312 和 Bra016313 仅含有 TIR 结构域; Bra028499 和 Bra028500 编码抗病蛋白, Bra016311、Bra016312、Bra016313 和 Bra016314 为串联重复基因, 编码抗 TMV 蛋白。在已定位克隆的植物抗病基因中, 大约 80%属于 NBS 基因家族, 因此推测这些基因可能与大白菜抗 TuMV 有关。

表 6 定位区域内大白菜基因、拟南芥同源基因及注释信息

Table 6 <i>Brassica rapa</i> genes, the homologous genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> , and annotation information in the mapped regions		
大白菜基因 <i>Brassica rapa</i> gene	同源的拟南芥基因 Homologous gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	同源拟南芥基因注释信息 Annotation information of homologous gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Bra028477	AT5G40780	氨基酸跨膜转运 Amino acid transmembrane transporter
Bra028478	AT5G40890	氯化物转运通道 Voltage-gated chloride channel
Bra028479	AT5G40900	未知蛋白 Unknown protein
Bra028480	AT5G40970	未知蛋白 Unknown protein
Bra028481	AT5G41020	MYB 家族转录因子 Myb family transcription factor
Bra028482	AT5G41040	转移酶家族蛋白 Transferase family protein
Bra028483	AT5G41050	未知蛋白 Unknown protein
Bra028484	AT5G41060	锌指家族蛋白 Zinc finger family protein
Bra028485	AT5G41080	磷酸二酯酶家族蛋白 Phosphodiesterase family protein
Bra028486	AT3G56520	无顶端分生组织蛋白 No apical meristem (NAM) family protein
Bra028487	AT5G41100	分子功能未知 Molecular function unknown
Bra028488	AT5G41130	乙酰转移酶/催化 Acyltransferase/catalytic
Bra028489	AT5G41180	富亮氨酸重复蛋白激酶 Leucine-rich repeat protein kinase
Bra028490	AT5G41190	分子功能未知 Molecular function unknown
Bra028491	AT5G41210	谷胱甘肽转移酶 Glutathione transferase
Bra028492	AT5G41250	外生素家族蛋白 Exostosin family protein
Bra028493	AT5G41340	泛素蛋白连接酶 Ubiquitin-protein ligase
Bra028494	AT5G41350	锌指家族蛋白 Zinc finger family protein
Bra028495	AT5G55890	未知蛋白 Unknown protein
Bra028496	AT5G41370	结合 ATP 相关 ATP binding
Bra028497	AT5G41470	分子功能未知 Molecular function unknown
Bra028498	AT2G07760	锌指蛋白家族蛋白 Zinc knuckle family protein
Bra028499	AT5G41540	抗病蛋白 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR)
Bra028500	AT5G41540	抗病蛋白 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR)
Bra016291	AT1G26830	泛素蛋白连接酶 Ubiquitin-protein ligase
Bra016292	AT1G26840	结合 DNA 相关 DNA binding
Bra016293	AT1G26850	脱水应答家族蛋白 Dehydration-responsive family protein
Bra016294	AT1G26870	转录因子 Transcription factor
Bra016295	AT1G69620	核糖体结构组成 Structural constituent of ribosome
Bra016296	AT1G26920	未知蛋白 Unknown protein
Bra016297	AT1G26930	F-box 家族蛋白 F-box family protein
Bra016298	AT1G26940	顺反异构酶家族蛋白 <i>cis-trans</i> isomerase family protein
Bra016299	AT1G26945	转录调控器 Transcription regulator
Bra016300	AT1G26960	转录因子 Transcription factor
Bra016301	AT1G26970	蛋白激酶 Protein kinase
Bra016302	AT1G27000	bZIP 家族转录因子 bZIP family transcription factor
Bra016303	AT1G27020	未知蛋白 Unknown protein
Bra016304	AT1G27060	染色体冷凝家族蛋白 Chromosome condensation family protein
Bra016305	AT1G27090	富甘氨酸蛋白 Glycine-rich protein
Bra016306	AT1G27100	分子功能未知 Molecular function unknown
Bra016307	AT1G27110	结合 ATP 相关 ATP binding
Bra016308	AT1G27120	半乳糖基转移酶家族蛋白 Galactosyl transferase family protein
Bra016309	AT1G75950	泛素蛋白连接酶 Ubiquitin-protein ligase
Bra016310	AT1G27120	半乳糖基转移酶家族蛋白 Galactosyl transferase family protein
Bra016311	AT1G27170	抗 TMV 蛋白 TMV resistance protein (TIR-NBS-LRR)
Bra016312	AT1G27170	抗 TMV 蛋白 TMV resistance protein (TIR-Only)
Bra016313	AT1G27170	抗 TMV 蛋白 TMV resistance protein (TIR-Only)
Bra016314	AT1G27170	抗 TMV 蛋白 TMV resistance protein (TIR-NBS-LRR)
Bra016315	AT1G27200	未知蛋白 Unknown protein
Bra016316	AT1G27210	结合 DNA 相关 DNA binding
Bra016317	AT5G55670	RNA 识别 RRM 结构域蛋白 RNA recognition motif (RRM) -containing protein

续表 1

大白菜基因 <i>Brassica rapa</i> genes	同源的拟南芥基因 Homologous genes in <i>Arabidopsis thaliana</i>	同源拟南芥基因注释信息 Annotation information of homologous genes in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Bra016318	AT1G24160	未知蛋白 Unknown protein
Bra016319	AT1G24145	未知蛋白 Unknown protein
Bra016320	AT1G24120	热休克蛋白 Heat shock protein
Bra016321	AT2G35190	蛋白转移酶 Protein transferase
Bra016322	AT1G24000	过敏原家族蛋白 Bet v I allergen family protein
Bra016323	AT1G24000	过敏原家族蛋白 Bet v I allergen family protein
Bra016324	AT1G24000	过敏原家族蛋白 Bet v I allergen family protein
Bra016325	AT1G24000	过敏原家族蛋白 Bet v I allergen family protein
Bra016326	AT1G23965	分子功能未知 Molecular function unknown
Bra016327	AT1G23980	锌指家族蛋白 Zinc finger family protein
Bra016328	AT1G23870	海藻糖磷酸酶 Trehalose-phosphatase
Bra016329	AT1G23820	亚精胺合成酶 Spermidine synthase
Bra016330	AT1G23800	醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase (NAD)
Bra016331	AT1G23790	未知蛋白 Unknown protein
Bra016332	AT1G23780	F-box 家族蛋白 F-box family protein
Bra016333	AT4G08395	未知蛋白 Unknown protein
Bra016334	AT4G12640	RNA 识别 RRM 结构域蛋白 RNA recognition motif (RRM) -containing protein

3 讨论

二代测序技术（NGS）为植物育种以及植物基因组研究提供了更多的机会，比如开发基因标记，确定基因型，基因挖掘等。植物许多重要的经济性状或农艺性状，如产量、品质、病虫害抗性、抗逆性等都属于数量性状。将 NGS 与 QTL 进行有机结合，进行 QTL-seq，可以更高效的定位目标性状，加快育种进程。Lu 等（2014）利用早花黄瓜亲本 Muromskij 和晚花亲本 9930 杂交，构建 F₂ 群体，选取极端早花和极端晚花各 10 个单株，进行 QTL-seq 分析，经过全基因组 SNP 位点分析，定位了 1 个早花主效 QTL-*Efl.1*，位于两个 SSR 标记间，该基因与拟南芥中控制开花时间的 *FT* 基因高度同源。本研究中利用 QTL-seq 技术，在 F₂ 群体中定位抗 TuMV 的 QTL 位点，具有可行性；Parida 等（2017）采用多重 QTL-seq 技术，定位与鹰嘴豆株高相关的 QTLs，通过对两个重组自交系群体（RILs）进行重测序分析，可以增强与目标性状连锁的 QTL 信号，将与植株高度相关的 QTL 区间由 1.26 ~ 1.34 Mb 缩小到 653.2 ~ 756.3 kb。

在自然界中，植物为了抵制多种病原微生物的侵害，不断进化形成多种抗病机制，其中包括抗病基因（*R* 基因）介导的防御反应（刘登全 等，2016），*R* 基因编码的蛋白结构具有高度的保守性，其中最常见的一类 *R* 基因为 NBS-LRR 类抗病基因，由高度保守的核苷酸结合位点（Nucleotide-binding site, NBS）和富含亮氨酸重复域（Leucine rich repeat, LRR）两个主要部分组成，且含有 P-loop、Kinase-2、Kinase-3 和 GLPL4 个高度保守的结构域（Dangl & Jones, 2001；丁国华, 2004；Harris et al., 2013）；Meyers 等（2003）研究发现拟南芥基因组中包含 149 个 NBS-LRR 类抗病基因；Huang 等（2009）组装黄瓜基因组，发现 61 个含有 NBS 结构的抗性基因，且 75% 的基因以基因簇分布在黄瓜染色体基因组上；此外，在水稻中也发现了 600 个 NBSLRR 类抗病基因，占总基因数（40 000 个）的 1.5%（Azhar et al., 2011）；Wang 等（2011）组装白菜基因组，并鉴定白菜中存在 244 个 NBS 相关的抗病基因。

本研究中利用 F₂ 群体进行 QTL-seq 分析，筛选到两个抗 TuMV 的 QTL，即物理位置为 A07 染色体的 13.9 ~ 14.4 Mb 和 A08 的 16.4 ~ 17.4 Mb。对这两个区间内基因分析，具有多态性位点基因 68 个，功能注释分析发现 6 个基因与植物抗性有关，其中基因编号为 Bra028499、Bra028500、Bra016311

和 Bra016314 的含有 TIR-NBS-LRR 特殊结构域, Bra016312 和 Bra016313 含有 TIR 结构域。在已定位克隆的植物抗病基因中, 大约 80% 属于 NBS 基因家族, 因此推测这些基因可能与大白菜抗 TuMV 有关。该研究为继续挖掘大白菜抗 TuMV 基因的多样性, 制定抗 TuMV 的遗传改良策略和综合防治措施提供理论支撑, 同时为培育更多广谱抗性大白菜新品种奠定基础。

References

- Azhar M T, Amin I, Bashir A. 2011. Characterization of resistance gene analogs from *Gossypium arboreum* and their evolutionary relationships with homologs from tetraploid cottons. *Euphytica*, 178 (3): 351 - 362.
- Chung H, Jeong Y M, Mun J H, Lee S S, Chung W H, Yu H J. 2014. Construction of a genetic map based on high-throughput SNP genotyping and genetic mapping of a TuMV resistance locus in *Brassica rapa*. *Molecular Genetics & Genomics*, 289 (2): 149 - 160.
- Dangl J L, Jones J D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411 (6839): 826 - 833.
- Ding Guohua. 2004. Cucumber disease resistance gene cloning homologous sequence and the study of downy mildew resistance gene markers [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 丁国华. 2004. 黄瓜抗病基因同源序列的克隆及其对霜霉病抗病基因标记的研究 [博士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Guo G, Wang S, Liu J, Pan B, Diao W, Ge W, Snyder J C. 2017. Rapid identification of QTLs underlying resistance to *Cucumber mosaic virus* in pepper (*Capsicum frutescens*). *Theoretical and Applied Genetics*, 130 (1): 41 - 52.
- Harris C J, Slootweg E J, Goverse A. 2013. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proc Natl Acad Sci*, 110 (52): 21189 - 21194.
- Huang S W, Li R Q, Zhang Z H. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41 (12): 1275 - 2752.
- Hughes S L, Hunter P J, Sharpe A G, Kearsey M J, Lydiate D J, Walsh J A. 2003. Genetic mapping of the novel *Turnip mosaic virus* resistance gene *Turb03* in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (7): 1169 - 1173.
- Jenner C E, Sb S F N, Foster G D, Ponz F, Walsh J A. 2000. The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the *Brassica* resistance gene *Turb01*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (10): 1102 - 1108.
- Jenner C E, Wang X, Ponz F, Walsh J A. 2002. A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Research*, 86 (1): 1 - 6.
- Jin M, Lee S S, Ke L, Kim J S, Seo M S, Sohn S H. 2014. Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, *Turb07*, to *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127 (2): 509 - 519.
- Li G L, Qian W, Zhang S, Li F, Zhang S, Zhang H, Wu J, Wang X, Sun R F. 2016. Development of gene - based markers for the *Turnip mosaic virus* resistance gene *retr02* in *Brassica rapa*. *Plant Breeding*, 135 (4): 466 - 470.
- Li Guoliang. 2016. Investigation of interaction mechanism of the *eIF(iso)4E* gene to TuMV in *Brassica rapa* L. [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 李国亮. 2016. 白菜 *eIF(iso)4E* 基因对 TuMV 的抗性机制研究 [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Li Guoliang, Qian Wei, Zhang Shujiang, Li Fei, Zhang Shifan, Zhang Hui, Xie Lulu, Wu Jian, Wang Xiaowu, Sun Rifei. 2017. Analysis of the protein interaction of *eIF(iso)4E.a/c* with TuMV-C4/UK1 in *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (7): 1299 - 1308. (in Chinese)
- 李国亮, 钱 伟, 张淑江, 李 菲, 章时蕃, 张 慧, 谢露露, 武 剑, 王晓武, 孙日飞. 2017. 白菜翻译起始因子 *eIF(iso)4E.a/c* 与芜菁花叶病毒 TuMV-C4/UK1 蛋白互作分析. *园艺学报*, 44 (7): 1299 - 1308.
- Li Q, Zhang X, Zeng Q, Zhang Z, Liu S, Pei Y. 2014. Identification and mapping of a novel *Turnip mosaic virus* resistance gene *TURBCS01* in Chinese cabbage (*Brassica rapa*). *Plant Breeding*, 134 (2): 221 - 225.
- Li Qiaoyun, Zhang Zhigang, Liu Shuantao. 2012. Chinese cabbage *Turnip mosaic virus* disease resistance genetic analysis. *North China Agriculture Report*, 27 (4): 135 - 139. (in Chinese)
- 李巧云, 张志刚, 刘栓桃. 2012. 大白菜芜菁花叶病毒病抗性遗传分析. *华北农学报*, 27 (4): 135 - 139.
- Liu Dengquan, Wang Yuanxiu, Cui Chaoyu, Qin Shuanglin, Ouyang Hui, Jiang Junxi. 2016. Variety of Wenzhou mandarin NBS LRR-class

- disease-resistant gene cloning and analysis of homologous sequences. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 38 (1): 83 - 89. (in Chinese)
- 刘登全, 王园秀, 崔朝宇, 秦双林, 欧阳慧, 蒋军喜. 2016. 晚熟温州蜜柑 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆及分析. *江西农业大学学报*, 38 (1): 83 - 89.
- Liu Shuantao, Zhang Zhigang, Li Qiaoyun, Wang Shufen, Lu Jindong, Zhang Xiaoyan. 2014. Chinese cabbage *eIF(iso)4E.a* pseudogene mutant identification and development of related inspection tag. *China Agriculture Journal*, 30 (4): 101 - 107. (in Chinese)
- 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 王淑芬, 卢金东, 张晓燕. 2014. 大白菜 *eIF(iso)4E.a* 假基因突变体的鉴别及相关检测标记的开发. *中国农学通报*, 30 (4): 101 - 107.
- Lu H, Lin T, Klein J, Wang S, Qi J, Zhou Q. 2014. QTL-seq identifies an early flowering QTL located near flowering locus T in cucumber. *Theoretical & Applied Genetics*, 127 (7): 1491 - 1499.
- Meyers B C, Kozik A, Griego A. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (4): 809 - 834.
- Nellist C F, Wei Q, Jenner C E, Moore J D, Zhang S, Wang X, Briggs W H, Barker G C, Sun R, Walsh J A. 2014. Multiple copies of eukaryotic translation initiation factors in *Brassica rapa*, facilitate redundancy, enabling diversification through variation in splicing and broad-spectrum virus resistance. *The Plant Journal*, 77: 261 - 268.
- Parida S K, Srivastava R, Bajaj D. 2017. A genome-wide mQTL-seq scan identifies potential molecular signatures regulating plant height in chickpea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 35 (2): 273 - 286.
- Qian W, Zhang S J, Zhang S F, Li F, Zhang H, Wu J, Wang X W, Walsh J A, Sun R F. 2013. Mapping and candidate-gene screening of the novel *Turnip mosaic virus* resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 179 - 188.
- Qian Wei. 2013. TuMV *retr02* resistance gene cloning and resistance mechanism research in *Brassica rapa* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 钱 伟. 2013. 大白菜 TuMV 抗性基因 *retr02* 的克隆与抗性机制研究 [博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Rusholme R L, Higgins E E, Walsh J A, Lydiate D J. 2007. Genetic control of broad-spectrum resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *Journal of General Virology*, 88 (11): 3177 - 3186.
- Song Hongyuan, Cao Bihao. 2002. Head cabbage resistance to TuMV related gene cloning. *Journal of Genetics*, 29 (7): 646 - 652. (in Chinese)
- 宋洪元, 曹必好. 2002. 结球甘蓝抗 TuMV 相关基因的克隆. *遗传学报*, 29 (7): 646 - 652.
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Innan H. 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome re-sequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal*, 74 (1): 174 - 183.
- Walsh J A, Jenner C E. 2002. *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology*, 3 (5): 289 - 300.
- Walsh J A, Sharpe A G, Jenner C E, Lydiate D J. 1999. Characterization of resistance to *Turnip mosaic virus* in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of *TuRB01*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 (7): 1149 - 1154.
- Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, Huang S. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43: 1035 - 1039.
- Wang Xue, Liu Yumei, Li Hanxia, Zhang Yangyong, Fang Zhiyuan. 2005. Advance in research on TuMV-resistance breeding of *Brassica* crops. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 939 - 946. (in Chinese)
- 王 雪, 刘玉梅, 李汉霞, 张杨勇, 方智远. 2005. 芸薹属作物抗芜菁花叶病毒育种研究进展. *园艺学报*, 32 (5): 939 - 946.
- Zhang Xu, Xu Jian, Li Ji, Lou Qunfeng, Chen Jinfeng. 2018. QTL mapping and identification of candidate gene for resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus/hystrix* introgression line 'IL77'. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2141 - 2152. (in Chinese)
- 张 旭, 徐 建, 李 季, 娄群峰, 陈劲枫. 2018. 黄瓜/酸黄瓜渐渗系 'IL77' 抗蔓枯病主效 QTL 定位及候选基因鉴定. *园艺学报*, 45 (11): 2141 - 2152.