

甘薯茎线虫病抗扩展性遗传特性分析与QTL定位

闫会, 张成玲, 张允刚, 马居奎, 马猛, 孙厚俊, 李强

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业部甘薯生物学与遗传育种重点实验室/江苏徐州甘薯研究中心, 徐州 221131)

摘要: 甘薯茎线虫病由马铃薯腐烂线虫引起, 是严重影响甘薯产量和品质的检疫性病害。挖掘抗茎线虫病基因并通过分子设计育种培育抗病品种是防控茎线虫病的有效途径。本研究前期以抗茎线虫病甘薯品种美国红为父本, 感病品种徐紫薯8号为母本, 通过控制授粉有性杂交方式构建了包含274个F₁子代的分离群体。以该F₁群体为材料, 利用室内人工接种法对F₁子代的茎线虫病抗扩展性进行鉴定, 结果表明, 甘薯茎线虫病抗扩展性呈连续性偏峰态分布, 甘薯茎线虫病发病体积比与扩展直径和扩展长度呈极显著正相关, 与薯块直径、薯块长度和薯块长宽比无相关性, 说明薯块的大小和薯形对抗扩展性鉴定结果无影响。甘薯茎线虫病抗扩展性遗传力为75.7%, 表明抗扩展性主要受遗传因素控制。基于前期构建的甘薯SNP遗传图谱对抗扩展性进展QTL定位, 获得与抗扩展性紧密连锁的QTL 10个, 解释6.6%~10.7%的表型变异。候选基因功能注释表明, 苯丙素生物合成、植物激素信号转导、植物病原互作代谢等通路参与抗病胁迫。筛选5个关键候选基因进行荧光定量表达分析, 在接种茎线虫后候选基因*itf13g19570*表达量显著增高。研究结果为甘薯茎线虫病抗病基因挖掘和抗病机理解析提供了重要参考。

关键词: 甘薯茎线虫病; F₁群体; 遗传力; QTL定位; 候选基因注释

Analysis of Resistance Inheritance and QTL Mapping of Sweet Potato Stem Nematode Disease

YAN Hui, ZHANG Chengling, ZHANG Yungang, MA Jukui, MA Meng, SUN Houjun, LI Qiang

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai District/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweetpotato, Ministry of Agriculture/Jiangsu Xuzhou Sweetpotato Research Center, Xuzhou 221131)

Abstract: Sweet potato stem nematode disease (SPSND), caused by the *Ditylenchus destructor* Thorne, is a quarantine disease that seriously affects the yield and quality of sweet potato. Identifying resistance genes and breeding resistant varieties through molecular design is an effective way to control SPSND. In this study, the resistant sweet potato variety 'American Red' (male parent) was pollinated with the susceptible variety 'Xuzishu8' (female parent) to generate a segregating population of 274 F₁ progenies. The F₁ progenies were evaluated for their resistance to SPSND using an artificial inoculation method. The resistance to SPSND was observed showing continuously distribution a skewed peak. The relative incidence volume ratio of SPSND was significantly positively correlated with the expansion diameter and expansion length, but not correlated with the tuber diameter, tuber length, and length-width ratio. That indicated that the size and shape of the tuber were uncorrelated with the resistance severity. The heritability of the relative incidence volume ratio of SPSND resistance was 75.7%, indicating that resistance was mainly controlled by genetic factors. Based on the previously-published genetic map, QTL mapping for resistance was performed, identifying 10 tightly linked QTLs, each of which might explain 6.6%-10.7% of the phenotypic variation. The candidate gene functional annotation revealed

收稿日期: 2023-04-20 修回日期: 2023-05-17 网络出版日期: 2023-07-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230420002>

第一作者研究方向为甘薯遗传育种, E-mail: yanhui_sweetpotato@163.com; 张成玲为共同第一作者

通信作者: 李强, 研究方向为甘薯遗传育种, E-mail: instrong@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(32301842); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(22)3150); 国家甘薯产业技术体系(CARS-10); 徐州农科院基金(XM2021004)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32301842); Jiangsu Agriculture and Technology Innovation Fund (CX(22)3150); China Agriculture Research System of MOF and MARA -Sweetpotato (CARS-10); Xuzhou Academy of Agricultural Sciences Research Fund Projects (XM2021004)

that pathways such as phenylpropanoid biosynthesis, plant hormone signal transduction, and plant-pathogen interactions were likely involved in disease resistance stress. Out of five key candidate genes that were analyzed for quantitative expression analysis, the expression level of the candidate gene *itf13g19570* was significantly increased after inoculation with stem nematode. Collectively, this study provided a basis for future identification of SPSND resistance genes and the analysis of their resistance mechanisms.

Key words: sweetpotato stem nematode disease; F₁ population; heritability; QTL mapping; functional annotation of candidate genes

甘薯是重要的粮食、饲料、工业原料和新型能源植物,其地位尤为重要^[1]。甘薯茎线虫病(SPSND, sweetpotato stem nematode disease)是国内外重要的检疫性病害^[2],其病原马铃薯腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor* Thorne)属迁移性植物内寄生线虫,主要为害甘薯块根,造成薯肉呈褐白相间的糠心干腐,导致甘薯产量和品质下降,近年来已上升为北方薯区最严重的病害^[3-5]。

目前甘薯茎线虫病的遗传基础尚不明确,多基因和单基因遗传控制两种观点均有论据支撑。谢逸萍等^[6]研究表明,甘薯茎线虫病抗性遗传力高且具有明显的超亲遗传特点;柳哲胜等^[7]和揭琴等^[8]研究表明,甘薯茎线虫病性状为单基因控制性状。Gao等^[9]和王飞兵^[10]利用根癌农杆菌介导法分别将蛋白酶抑制剂基因谷胱甘肽基因 *Ory-1* 和肌醇-1-磷酸合成酶基因 *IbMIPSI*、甲羟戊酸焦磷酸脱梭酶基因 *IbMVD* 导入甘薯感病品种的愈伤组织,结果表明,转基因甘薯植株外源基因表达量和茎线虫病抗性均显著提高。上述研究为甘薯茎线虫病抗病基因的利用提供了重要参考。

优异抗性种质资源是挖掘抗性基因和创制抗病种质的前提及基础。张允刚等^[11]和王庆美等^[12]分别对国家甘薯资源种质库 1496 份和 727 份国内外种质进行资源的鉴定,筛选出美国红、徐 781 和济薯 10 号等高抗甘薯茎线虫病品种,为抗性基因的挖掘提供重要的基因来源。

栽培甘薯为同源六倍体(2x=6n=90)作物,染色体的高度杂合以及甘薯种内杂交不亲和严重阻碍了甘薯种质资源的利用和抗病基因的挖掘^[13-15]。为高效挖掘抗性基因,江苏徐淮地区徐州农业科学研究所甘薯遗传育种课题组前期从我国甘薯种质资源圃中筛选出甘薯茎线虫病抗感材料并构建了包含 274 个子代的 F₁ 群体,进而利用 SLAF-seq 技术开发 SNP 标记,构建了覆盖基因组总长度为 2233.66 cM、标记间距离为 0.71 cM 的甘薯 SNP 遗传图谱^[16],为开展甘薯茎线虫病抗性遗传分析和抗性基因挖掘

提供重要支撑。

本研究拟利用室内人工接种法鉴定甘薯 F₁ 群体茎线虫病抗扩展性,并基于构建的甘薯 SNP 遗传图谱挖掘与茎线虫病抗性紧密连锁的 QTL,为抗性候选基因的挖掘和功能解析奠定基础,同时为高抗种质创制和茎线虫病分子标记辅助选择育种提供材料和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

课题组前期以抗茎线虫病甘薯品种美国红为父本,感茎线虫病品种徐紫薯 8 号为母本,通过控制授粉有性杂交方式构建了包含 274 个 F₁ 的分离群体^[16],各品系以‘年份+阿拉伯数字’编号。本研究以 274 个甘薯 F₁ 子代及其亲本为材料,分别于 2020 年、2021 年和 2022 年在徐州现代农业示范基地的健康、无病地块种植亲本、F₁ 分离群体、感病对照品种栗子香, F₁ 群体、亲本及对照品种均单行栽插薯苗 10 株, 3 行区种植。试验设置 3 次重复,栽插行距为 85 cm, 株距 25 cm, 其他管理措施同甘薯田常规管理。栽插 130 d 左右收获薯块备用。

1.2 试验方法

1.2.1 甘薯 F₁ 群体人工打孔接种 每个品系选取 3 块薯形均匀且无虫眼的健康薯块洗净并晾干,挑选的薯块重量为 300~400 g。用 75% 酒精擦拭薯块表面进行消毒处理,然后将薯块按测序编号顺序整齐排列在方形塑料筐内,试验设置 3 次重复,每重复接种 1 块薯块,每筐放置 2 块对照品种栗子香。

从甘薯茎线虫病发病地块收集带病甘薯薯块,采用贝曼漏斗法分离和收集甘薯茎线虫^[17-18]。将收集的甘薯茎线虫配制成 1000 条/mL 的悬浮液备用。采用室内人工打孔接种法向薯块内接种 200 μL 线虫悬浮液,用薯条封住孔口并用融化的石蜡密封。将接种的薯块置于消毒的收纳筐然后置于培养室内暗处理培养,培养条件为相对湿度 80%~90%、温度 26~28℃。参照感病对照品种栗子香的发病情况,

人工接种培养40~45 d后调查薯块发病情况。

1.2.2 甘薯茎线虫病抗扩展性鉴定 参照《DB 32/T 3863-2020 甘薯抗茎线虫病鉴定技术规程》^[19],将薯块横切两刀,纵切一刀,测定薯块长度、扩展长度、薯块直径和扩展直径,通过薯块长度和直径的比值计算薯块长宽比。根据测定的扩展长度和扩展直径,计算 F_1 群体、亲本和对照的发病体积比以及相对发病体积比(VR, relative incidence volume ratio)。各品系统计3块薯块并取平均值。

发病体积比=扩展直径²×扩展长度/(薯块直径²×薯块长度)×100%

相对发病体积比=(对照体积比-处理体积比)/对照体积比×100%

根据相对发病体积比,将待测甘薯品种划分为5个抗性等级(RI, resistance level),分别为高抗(HR, 80% < VR ≤ 100%)、抗病(R, 60% < VR ≤ 80%)、中抗(MR, 40% < VR ≤ 60%)、感(S, 20% < VR ≤ 40%)和高感(HS, VR ≤ 20%)。根据抗性等级评价不同品系的甘薯茎线虫病抗扩展性。

1.2.3 甘薯茎线虫病抗扩展性相关性状方差及遗传力分析 为分析品系间薯形和薯块大小等因素对鉴定结果的影响,本研究对薯块直径、扩展直径、薯块长度、扩展长度、薯块长宽比和相对发病体积比等性状进行方差分析、遗传力分析和相关性分析。采用QTL IciMapping软件^[20]的ANOVA模块对抗扩展性相关性状进行遗传力分析。采用IBM SPSS Statistics 25软件进行正态分布检验、Q-Q检验和性状相关性分析。

1.2.4 甘薯茎线虫病抗扩展性QTL定位 基于 F_1 群体的相对发病体积比和抗性等级鉴定结果,分别对相对发病体积比和抗性等级进行QTL定位。相对发病体积比和抗性等级来源于同一测定数据,前者是根据扩展直径和扩展长度等测定指标计算出的具体数值,表现为连续性变化,可作为数量性状

分析,后者是根据相对发病体积比数值划分的5个抗性等级,可作为质量性状分析。

基于前期构建的甘薯SNP遗传图谱^[16],根据遗传图距、 F_1 群体抗性等级,对甘薯茎线虫病抗性性状相关QTL进行定位。作图函数采用Kosambi函数完成,采用R/qtl软件进行QTL定位,利用Permutation test ($P < 0.05$)的方式确定LOD阈值≥2.5。然后利用LOD阈值通过复合区间作图方法(CIM)检测与目标性状显著相关的QTL,并扫描每个连锁群中每1 cM区间的QTL,并计算其贡献率。QTL命名规则为q+目标性状(英文缩写)+所在连锁群代号+“-”+流水号。

1.2.5 甘薯茎线虫病抗扩展性QTL区间候选基因功能注释 根据甘薯茎线虫病抗扩展性QTL定位区间定位结果,提取亲本QTLs区域的序列信息获得基因信息。利用BLAST软件对基因序列通过基因本体(GO, gene ontology)、直系同源基因簇(COG, clusters of orthologous groups)和京都基因与基因组百科全书(KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行序列比对和功能注释。其中GO数据库从生物过程、分子功能和细胞组分3个方面对候选基因进展富集分析;COG数据库可对候选基因产物进行直系同源分类;KEGG数据库用于基因的代谢通路分析。

1.2.6 候选基因荧光定量表达分析 根据候选基因注释结果,初步筛选5个基因进行荧光定量表达分析。根据候选基因ID号,通过*Ipomoea trifida*参考基因组在线下载候选基因CDS序列,利用Primer3 plus在线设计候选基因的荧光定量PCR引物(表1)。

根据甘薯茎线虫病抗扩展性鉴定结果,从 F_1 分离群体筛选抗性等级为高抗的抗病品系18-35,参照1.2.1方法利用室内人工接种法接种甘薯茎线虫,分别于接种后0 h、6 h、1 d、3 d、7 d、15 d、35 d、45 d

表1 候选基因荧光定量PCR引物

Table1 qRT-PCR primers of candidate genes

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物大小(bp)
Gene ID	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	Product size
<i>itf13g19400.t1</i>	GGGTTCCCGATTGGATGGT	ATCCCCGGTAGACAACCTCGA	137
<i>itf13g19480.t1</i>	TGCTCTCGGTGTTGCATCTT	TGTGAGGGCCGAGATACAGA	74
<i>itf13g19570.t1</i>	AGCCGTTTGTGAATTGGTGC	ACAATGGAGAGCGCTTCACA	119
<i>itf13g19580.t1</i>	CCTGGCATCAGACCCAATGT	GCTCCACCATGTCCATCACA	135
<i>itf13g19620.t1</i>	GAGATCATCCCTGCCTCAGC	AAGCTGAACCTCGGTGGATG	137

取样;采用植物RNA提取试剂盒(Takara RNA提取试剂盒)提取接种后不同时期薯肉的mRNA,使用1%的琼脂糖凝胶电泳验证RNA完整性;使用逆转录试剂盒Goldenstar RT6 cDNA Synthesis Mix(上海擎科生物科技有限公司)进行逆转录扩增将RNA反转录为cDNA,利用特异性SYBRGreenI染料进行qRT-PCR检测(ABI StepOne plus 荧光定量PCR仪),通过测定候选基因在抗病甘薯中不同接种时期的表达量,分析候选基因表达模式。qRT-PCR反应体系如下:SYBR Green实时荧光定量PCR混合物10 μ L,cDNA 20 ng,浓度为10 mM的正向和反向引物各1 μ L,最后加入6 μ L去离子水补充反应体系至20 μ L。以甘薯中的*Tublin*为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算候选基因的相对表达量,每个样品设置3个重复。反应程序如下:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,循环数40次。

2 结果与分析

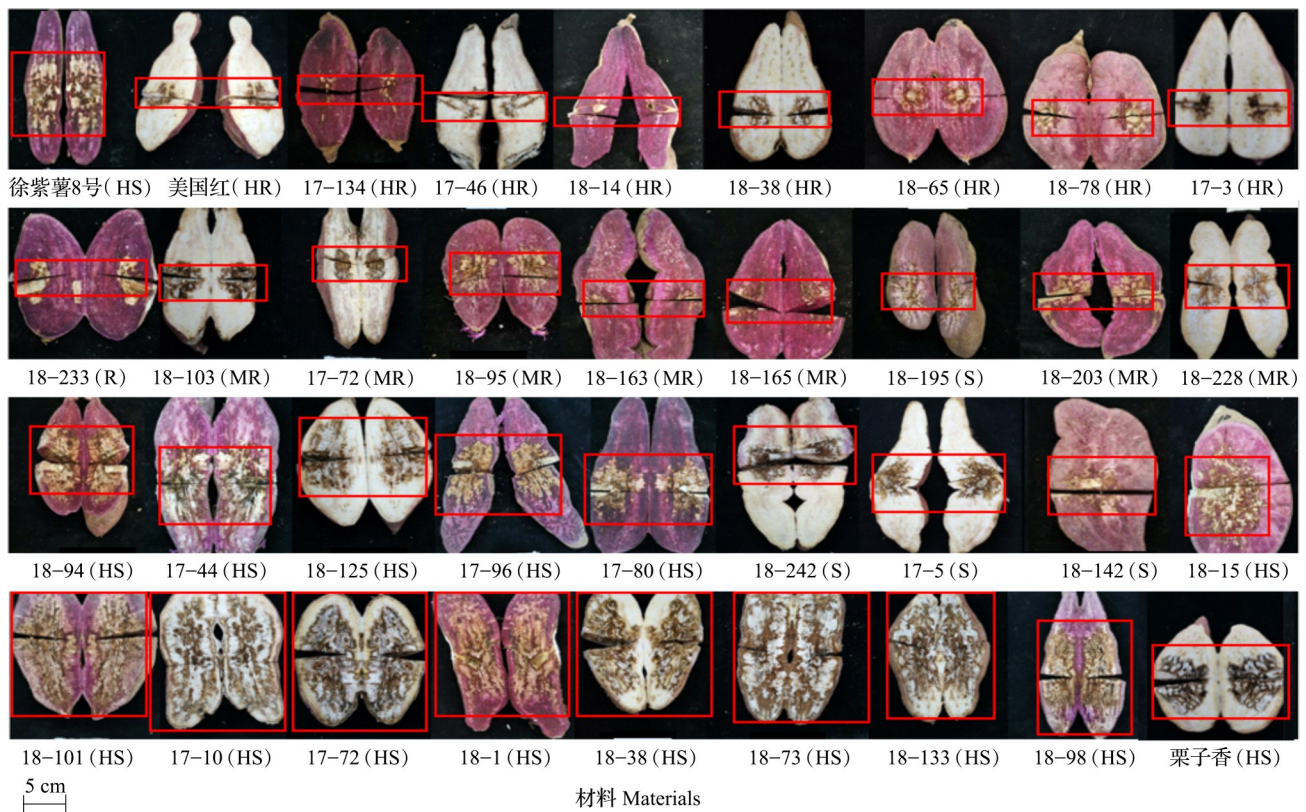
2.1 甘薯F₁群体茎线虫病抗扩展性遗传特性分析

F₁分离群体抗扩展性鉴定结果表明,F₁的

相对发病体积比从0到98.53%不等,F₁表现出丰富变异且产生超亲遗传,部分鉴定结果如图1所示。

根据相对发病体积比将F₁划分为5个抗性等级。因部分F₁品系结薯性较差,收获期未收获到薯块或薯块较小无法进行接种鉴定,2020-2022年抗病鉴定的品系数分别为171、195和176个。2020年和2021年高抗品系分别为15和20个,占F₁群体的8.77%和10.26%。2022年冬季气温显著下降,室内温度未达到预期,F₁群体整体发病较轻导致高抗品系数达34个,占比达19.65%(图2)。

利用Q-Q图、直方图和柯尔莫戈洛夫-斯米诺夫检验(K-S检验)对不同年份间F₁分离群体的甘薯茎线虫病相对发病体积比进行正态分布检验。根据K-S检验,3个生长周期的相对发病体积比的鉴定结果显著性均小于0.05,说明数据不服从正态分布。Q-Q图和直方图结果也表明,不同年份的甘薯茎线虫病相对发病体积比均不符合正态分布(图3)。因此,甘薯茎线虫病抗性可能由单个或少数几个主效基因控制。



括号内为抗性等级;红色方框内为发病部位

The capital letter in the brackets are resistance level; The area within the red box is the affected area

图1 甘薯茎线虫病抗扩展性鉴定结果

Fig. 1 Identification results of resistance to extension of SPSND

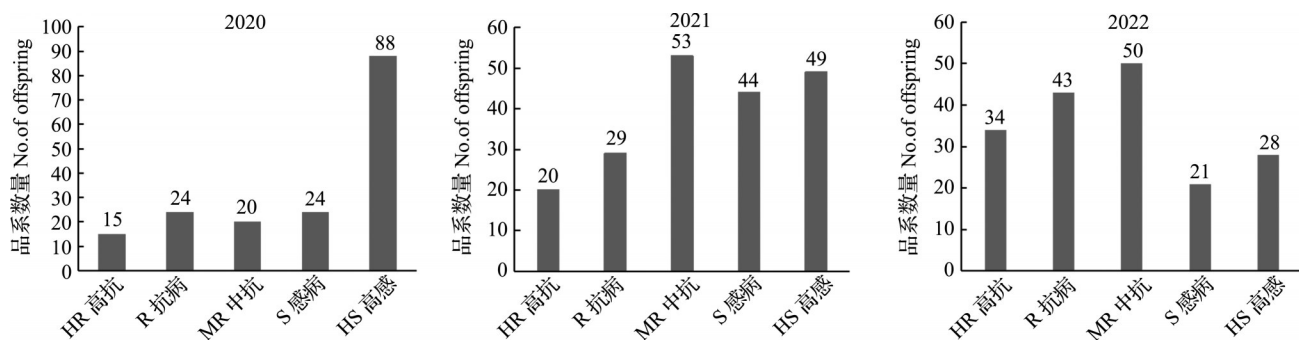
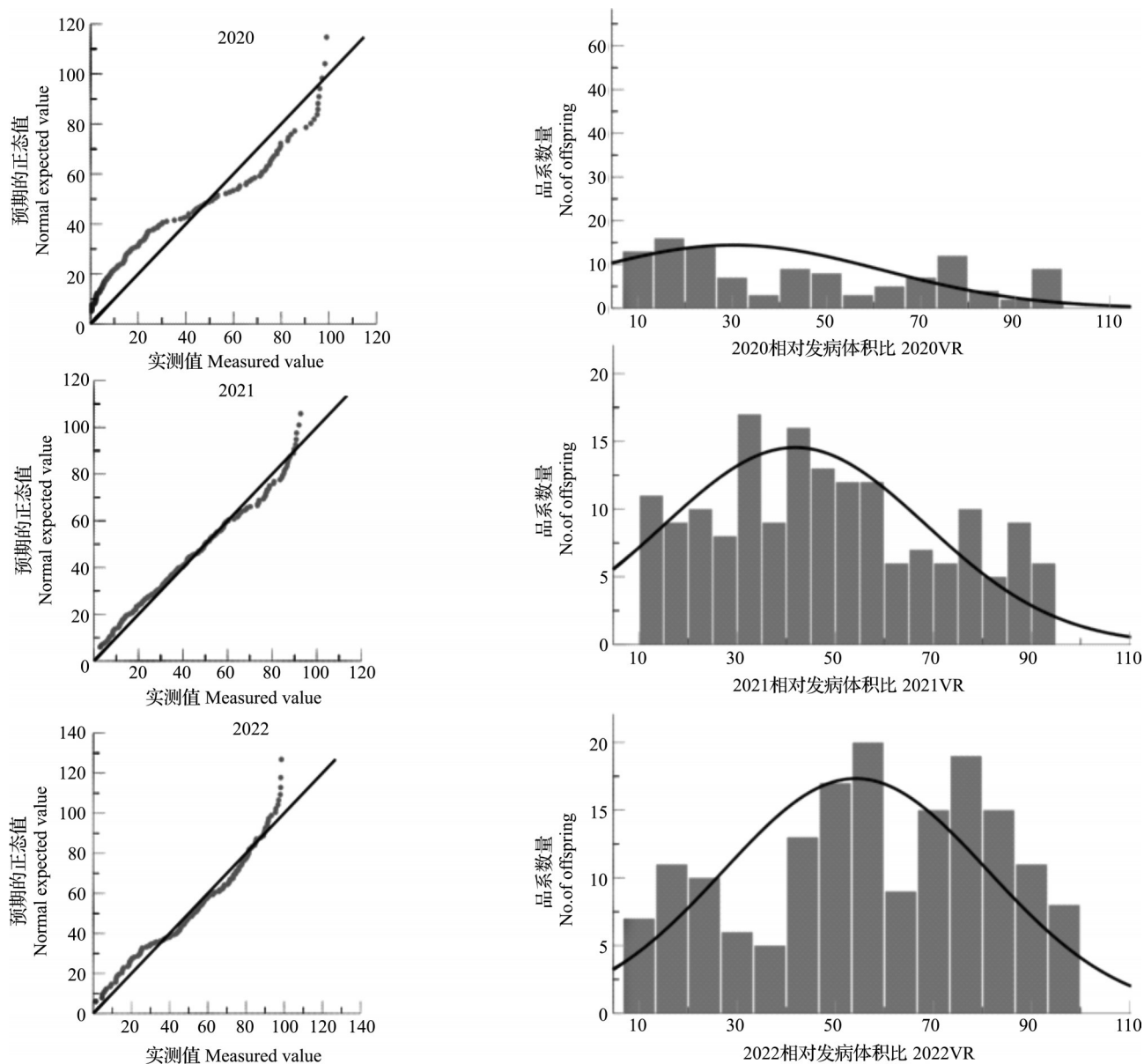


图2 2020-2022年F₁分离群体甘薯茎线虫病抗扩展性抗性等级分布

Fig. 2 Distribution of resistance to expansion of SPSND in F₁ segregation population from 2020 to 2022



左侧为Q-Q图;右侧为直方图

The figure on the left is the Q-Q diagram, the right is the histogram; VR: Relative incidence volume ratio, the same as below

图3 2020-2022年甘薯茎线虫病相对发病体积比正态分布检验

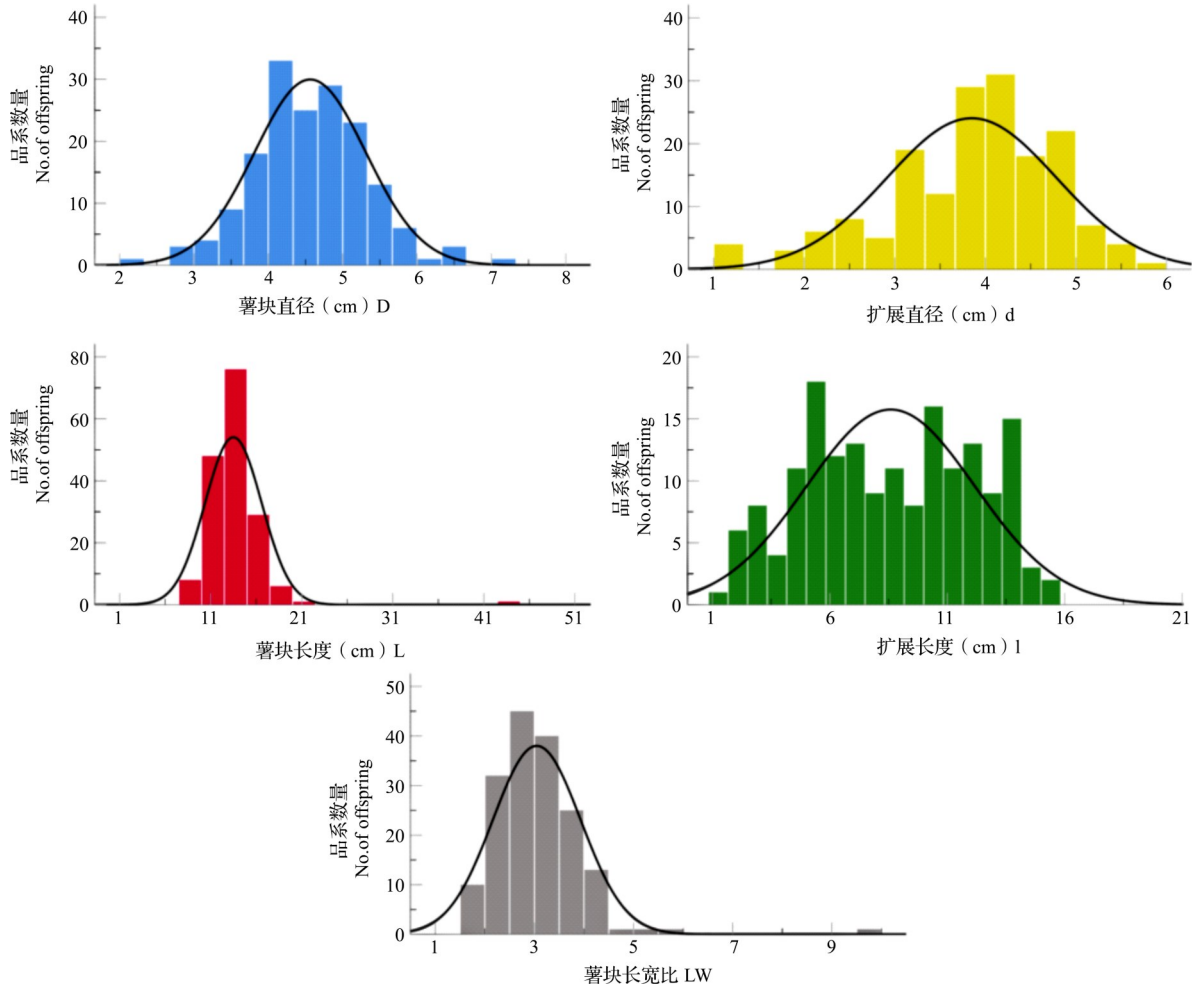
Fig. 3 The normal distribution test for relative incidence volume ratio of SPSND was performed in 2020, 2021 and 2022

2.2 甘薯茎线虫病抗扩展性遗传力及性状相关性分析

对甘薯茎线虫病抗扩展性相关性状进行正态分布检验,包括薯块直径、扩展直径、薯块长度、扩展长度和薯块长宽比。结果表明,薯块长度、薯块长宽比不符合正态分布,为非连续型随机变量;薯块直径、扩展直

径和扩展长度符合正态分布(图4)。

对上述与抗扩展性相关的性状进行相关性分析,结果表明,甘薯茎线虫病相对发病体积比与扩展直径、扩展长度呈极显著正相关,与薯块直径、薯块长度和薯块长宽比无相关性(表2),说明薯块的大小和薯形对抗扩展性鉴定结果无影响。



D: Diameter of tuber; d: Infection diameter; L: Length of tuber; l: Infection length; LW: Length-width ratio; The same as below

图4 甘薯茎线虫病抗扩展性相关性状正态分布分析

Fig. 4 Normal distribution analysis of traits related to resistance to expansion of SPSND

表2 甘薯茎线虫病抗扩展性相关性状遗传力及相关性分析

Table 2 Correlation and heritability analysis of traits related to SPSND resistance

性状 Traits	薯块直径 D	扩展直径 d	薯块长度 L	扩展长度 l	相对发病体积比 VR	薯块长宽比 LW	遗传力 Heritability
薯块直径D	1.000***	0.530***	-0.062	-0.022	-0.063	-0.605***	0.505
扩展直径d		1.000***	0.131	0.614***	0.661***	-0.228**	0.618
薯块长度L			1.000***	0.247**	0.094	0.806***	0.399
扩展长度l				1.000***	0.926***	0.181*	0.812
相对发病体积比VR					1.000***	0.089	0.757
薯块长宽比LW						1.000***	0.541

*, **, ***分别表示在0.05, 0.01, 0.001水平上差异显著

***, **, * respectively indicate significant differences at the 0.05, 0.01 and 0.001 levels

遗传力分析结果表明,相对发病体积比的遗传力为75.7%,而甘薯茎线虫病抗扩展性强弱主要与相对发病体积比高低相关,表明抗扩展性主要受遗传因素影响(表2)。

2.3 甘薯茎线虫病抗扩展性QTL定位

基于2020-2022年3个生长周期的甘薯茎线虫病抗扩展性鉴定结果,分别对甘薯茎线虫病相对发病体积比和抗性等级进行QTL定位。结果表明,各

个生长周期的相对发病体积比和抗性等级定位结果一致或具有共定位区间(表3)。其中相对发病体积比共定位到5个QTL,分别为qVR13-1、qVR13-2、qVR06-1、qVR12-1和qVR15-1,解释6.6%~9.5%的表型变异(图5)。抗性等级共定位到5个QTL位点,解释7.6%~10.7%的表型变异(表3)。该结果为抗扩展性相关候选基因的筛选、鉴定及基因的克隆提供重要依据。

表3 甘薯茎线虫病抗扩展性QTL定位结果

Table 3 QTL mapping of resistance to SPSND

性状 Traits	年度 Year	QTL名 QTL name	连锁 群 LG	位置(cM) Position	区间大小 (cM) Interval	物理位置 (bp) Physical position	物理区间 (cM) Physical interval	LOD 值 LOD	贡献 率 (%) PVE	区间内 标记数 No. of markers within the interval	注释基因 数 Annotated genes
抗性等级 RI	2020	qRI13-1	LG13	59.556~59.556	0	20845451~20845451	0	3.08	8.00	1	1
		qRI13-2	LG13	60.658~60.658	0	20689476~20832718	0.14	3.08	8.10	2	21
	2021	qRI06-1	LG06	6.406~12.320	5.91	1882576~2123962	0.24	3.30	7.60	7	12
	2022	qRI12-1	LG12	25.360~31.462	6.10	18742954~20579797	1.84	3.34	8.50	19	264
		qRI15-1	LG15	107.230~142.460	35.24	2994038~4475375	1.48	4.26	10.70	16	272
相对发病 体积比 VR	2020	qVR13-1	LG13	59.556~59.556	0	20845451~20845451	0	2.52	6.60	1	1
		qVR13-2	LG13	60.658~60.658	0	20689476~20832718	0.14	2.53	6.70	2	21
	2021	qVR06-1	LG06	6.406~11.213	4.81	1882576~2123962	0.24	4.13	9.40	6	12
	2022	qVR12-1	LG12	20.757~31.462	10.70	18742954~21011728	2.27	3.43	8.70	28	349
		qVR15-1	LG15	108.598~127.496	18.90	2994038~4436635	1.44	3.79	9.50	12	268

LG : Linkage group; PVE: Phenotypic variation explained; The same as below

2.4 甘薯茎线虫病抗扩展性QTLs候选区域内的基因功能注释

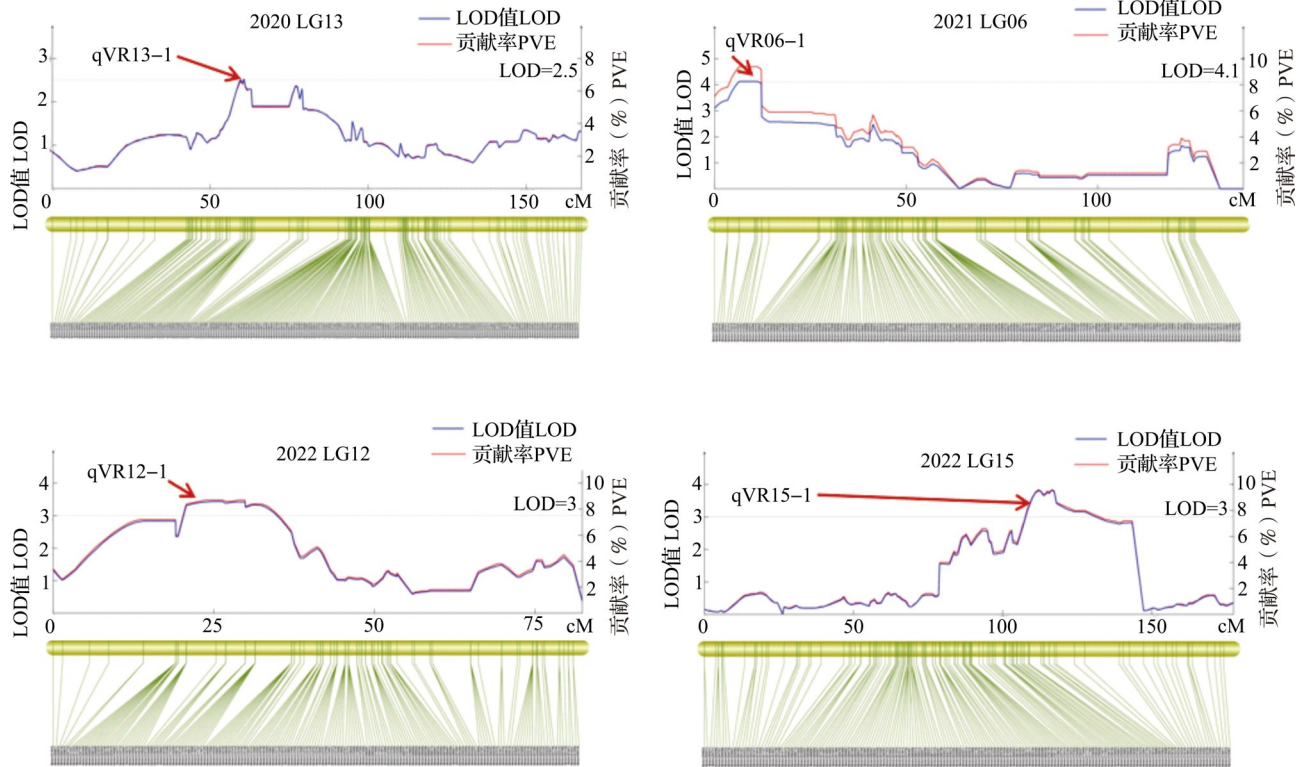
2020和2021年甘薯茎线虫病抗扩展性定位的QTL区间较小,注释到的候选基因数量非常少。2022年甘薯茎线虫病抗扩展性定位区间注释到较多的候选基因,因此基于2022年的相对发病体积比相关QTL定位结果,对区域内候选基因进行功能注释。在qVR12-1和qVR15-1两个QTL候选区域内,COG分别注释到207个和230个Unigene。对每一类的基因数量进行统计(图6a、b),两个QTL候选区域注释结果相似,其中主要功能预测(R)的Unigene数量最多。qVR12-1和qVR15-1两

个QTL候选区域内与复制、重组和修复(L)、转录(K)、翻译、核糖体结构和生物合成(J)和信号转导机制(T)相关的unigene数量较多,分别合计为95个和103个。

在qVR12-1和qVR15-1两个QTL候选区域内,GO数据库中分别注释到967个和770个Unigene,根据其功能划分为分子功能、生物学过程和细胞组分3大类,分别归类于33个(图6c)和34个(图6d)亚类。qVR15-1候选区域注释结果中,分子功能中催化活性和结合类基因数分别为68个和58个;细胞组分中与细胞、细胞膜、细胞器和细胞部分相关的基因分别为46、35、36和46个;生物学过程中与代

谢过程、细胞过程、单一生物过程、刺激物响应和生物调节相关的基因分别为84、72、82、36和23个。在qVR12-1候选区域中,分子功能中催化活性和结合类基因数分别为86个和79个;在细胞组分中与细胞、细胞膜、细胞器和细胞部分相关的基因分别

为75、41、59和75个;在生物学过程中,与代谢过程、细胞过程、单一生物过程、刺激物响应和生物调节相关的基因分别为122、106、66和31个。深入研究这些基因将有助于挖掘甘薯茎线虫病抗病基因并解析抗病机理。



绿色线条代表不同标记在连锁群的位置

Green lines represent the positions of different markers in the linkage group

图5 2020-2022年甘薯茎线虫病相对发病体积比QTL定位结果

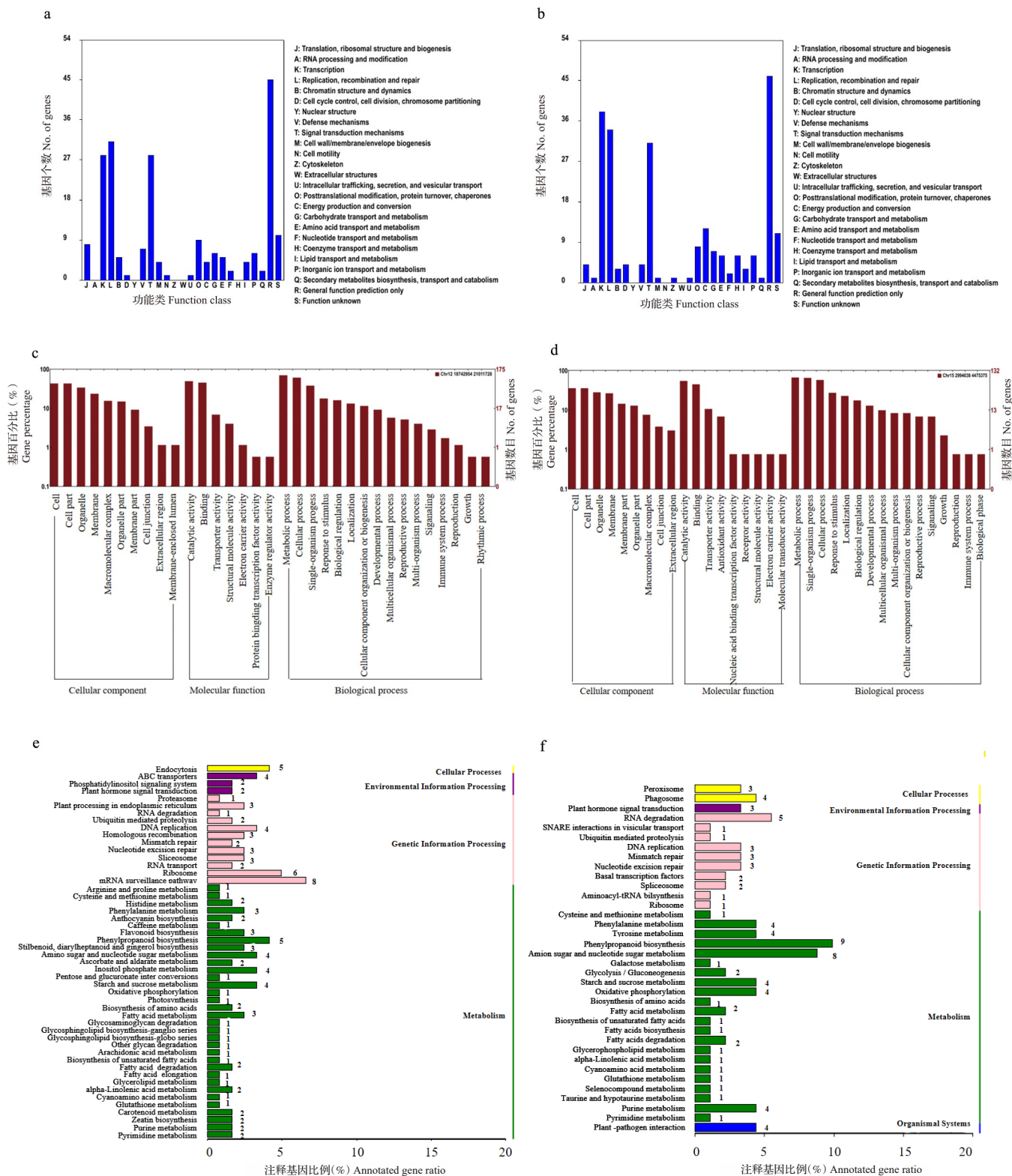
Fig. 5 QTL mapping of VR of SPSND from 2020 to 2021

在qVR12-1候选区域内,通过KEGG分别注释到121个基因,共涉及细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理和新陈代谢4大类55个子类(图6e);在qVR15-1候选区域内,注释到91个基因Unigene,共涉及细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、新陈代谢和生物体系统5大类36个子类(图6f)。其中,代谢大类注释到的Unigene数量较多,qVR12-1和qVR15-1分别为65和55个,主要包括苯丙素生物合成、植物激素信号转导、植物病原互作、类黄酮生物合成、碳水化合物代谢和脂质代谢和氨基酸代谢等通路。该结果为解析甘薯茎线虫病抗病机制提供了重要参考。

2.5 候选基因荧光定量表达分析

qVR13-2区间较小,注释的候选基因数目21个,且多个基因注释结果与逆境胁迫相关,初步选择该区间的基因进行验证。根据qVR13-2区间候选基因功能注释结果(表4),参考已报道的候选基因相关研究结果^[21-22],初步筛选响应逆境胁迫的5个基因进行表达量分析。

抗病品系18-35在接种甘薯茎线虫后,候选基因表达量出现不同程度的变化(图7)。其中*itf13g19400*和*itf13g19620*接种后的表达量显著降低;*itf13g19570*接种30d时表达量显著高于未接种前,为接种前的1.7倍,说明*itf13g19570*基因可能具有正向调控甘薯茎线虫病抗性的功能,后续将该基因进行克隆并进一步验证其功能。



a, c 和 e 分别为 qVR12-1 QTL 候选区域 COG, GO 和 KEGG 注释结果; b, d 和 f 分别为 qVR15-1 候选区域 COG, GO 和 KEGG 注释结果

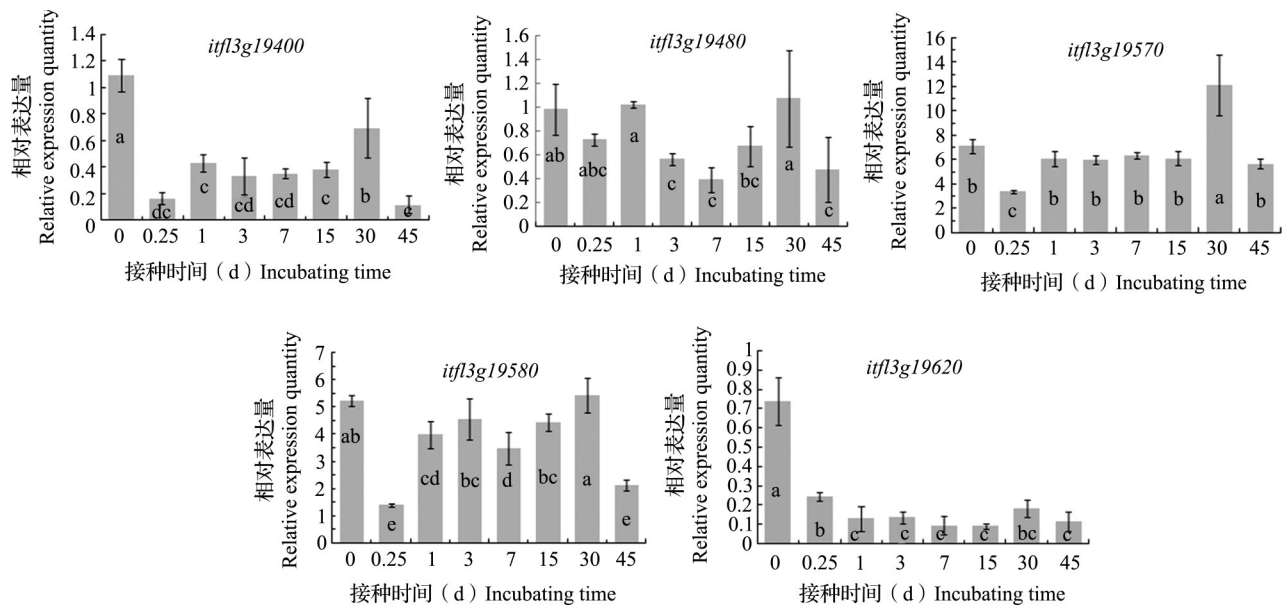
a, c and e are the COG, GO and KEGG annotation results of qVR12-1 respectively; b, d and f were the COG, GO and KEGG annotation results of qVR15-1 respectively

图 6 甘薯茎线虫病抗扩展性 QTLs 候选区域功能注释
Fig. 6 Functional classification of QTLs of SPSND

表 4 QTL 区间关键候选基因 NR 注释列表

Table 4 NR annotation results of genes in QTL interval

基因 ID Gene ID	NR 基因注释 NR annotation
<i>itf13g19400.t1</i>	预测:未知蛋白 LOC102598761 [马铃薯]
<i>itf13g19420.t1</i>	预测:CAR1 转录因子[芝麻]
<i>itf13g19430.t1</i>	预测:有丝分裂原活化蛋白激酶激酶[马铃薯]
<i>itf13g19450.t1</i>	预测:转录中介体复合物亚基MED10b [番茄]
<i>itf13g19460.t1</i>	预测:液泡膜蛋白KMS1 [芝麻]
<i>itf13g19470.t1</i>	预测:转录中介体复合物亚基MED10b [番茄]
<i>itf13g19480.t1</i>	预测:液泡膜蛋白KMS1 [芝麻]
<i>itf13g19510.t1</i>	预测:液泡膜蛋白KMS1 [芝麻]
<i>itf13g19520.t1</i>	假设蛋白MIMGU_mgv1a005012mg [猴面花]
<i>itf13g19530.t1</i>	假设蛋白MIMGU_mgv1a005012mg [猴面花]
<i>itf13g19540.t1</i>	预测:长链酰基辅酶A合成酶 [马铃薯]
<i>itf13g19550.t1</i>	预测:细胞周期蛋白T1-3异构体X1 [烟草]
<i>itf13g19560.t1</i>	预测:可能为受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶At1g67720 [烟草]
<i>itf13g19570.t1</i>	Ran GTP 酶激活蛋白2 [马铃薯]
<i>itf13g19580.t1</i>	预测:蛋白磷酸酶2C 70 [烟草]
<i>itf13g19590.t1</i>	预测:FANTASTIC FOUR 3蛋白[烟草]
<i>itf13g19620.t1</i>	ADP 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基4 [甘薯]



不同小写字母表示 0.05 水平下差异显著

Lower case alphabet represent a significant difference at the 0.05 level

图 7 候选基因表达模式分析

Fig. 7 Analysis of expression patterns of candidate genes

3 讨论

3.1 甘薯茎线虫病抗扩展性遗传特性分析

甘薯茎线虫病的遗传基础复杂,其抗性鉴定结果极易受环境影响,利用室内人工接种法鉴定甘薯茎线虫病抗性具有环境稳定、鉴定可靠和周期短等优点,本研究采用该方法对甘薯茎线虫病抗扩展性进行鉴定。谢逸萍等^[6]和马代夫等^[23]研究表明甘薯茎线虫病抗性遗传以加性效应为主且具有明显的超亲遗传特点,甘薯茎线虫病抗性的广义遗传力为90.9%,遗传变异系数为73.01%。本研究中甘薯F₁群体的抗扩展性表现出丰富变异且产生超亲遗传,其遗传力为75.7%,分析结果与谢逸萍等^[6]和马代夫等^[21]的研究结果相符。研究结果为甘薯茎线虫病遗传特性研究提供重要参考。

3.2 甘薯茎线虫病抗扩展性候选基因功能注释

本研究基于甘薯SNP图谱定位到与甘薯茎线虫病抗扩展性相对发病体积比和抗病等级相关的QTL各5个,二者QTL区间高度一致,但是未检测到3个年份共有QTL,可能是目前所用F₁群体的规模较小或受环境因素影响。利用GO、COG和KEGG数据库对qVR12-1和qVR15-1两个QTL候选区域进行基因功能注释,qVR12-1和qVR15-1区间均注释到与苯丙素生物合成、植物激素信号转导和植物病原互作等与逆境胁迫相关的代谢通路,研究结果与黄宁^[24]、王卓^[25]、周桦楠等^[26]和杜朝金等^[27]结果相符。此外,Qiao等^[28]对两个甘薯品种(抗性品种15正红22和感病品种龙薯9)在茎线虫感染后不同时期的转录组和代谢组进行了测序和比较,结果表明感染后薯块内与乙烯、脱落酸和玉米素等激素合成相关的基因表达量变化显著,说明茎线虫病感染激活了植物激素信号转导途径,本研究的候选基因注释结果与该结果相符。本研究候选基因的注释和筛选为甘薯茎线虫病抗性基因的挖掘提供了重要支撑。

参考文献

- [1] 马代夫,刘庆昌,张立明. 中国甘薯. 南京:江苏凤凰科学技术出版社, 2021:555-565
Ma D F, Liu Q C, Zhang L M. Sweetpotato of China. Nanjing: Jiangsu Phoenix Scientific and Technical Publisher, 2021: 555-565
- [2] Okada Y, Kobayashi A, Tabuchi H, Kuranouchi T. Review of major sweetpotato pests in Japan, with information on resistance breeding programs. *Breeding Science*, 2017, 67(1): 73-82
- [3] Haraguchi S, Yoshiga T. Potential of the fungal feeding

nematode *Aphelenchus avenae* to control fungi and the plant parasitic nematode *Ditylenchus destructor* associated with garlic. *Biological Control*, 2020, 143: 1-7

- [4] 马娟,高波,李秀花,王容燕,李焦生,陈书龙. 马铃薯腐烂茎线虫 *Dtaqp like* 基因的功能分析. 江苏师范大学学报:自然科学版, 2021, 39(3): 20-25, 71
Ma J, Gao B, Li X H, Wang R Y, Li J S, Chen S L. Functional analysis of *Dtaqp like* gene in *Ditylenchus destructor*. *Journal of Jiangsu Normal University: Natural Science Edition*, 2021, 39(3): 20-25, 71
- [5] Li Y Q, Huang L Q, Jiang R, Han S M, Chang Q, Li Y M, Chen Z J, Peng H, Huang W K, Guo J M, Li H X, Li S M, Peng D L. Molecular characterization of internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal RNA gene, haplotypes and pathogenicity of potato rot nematode *Ditylenchus destructor* in China. *Phytopathol Research*, 2022, 4(22): 1-12
- [6] 谢逸萍,朱崇文. 甘薯F₁抗茎线虫病特性遗传变异趋势. 江苏农业科学, 1995(3): 25-27
Xie Y P, Zhu C W. Genetic variation trend of stem nematode resistance in F₁ population of sweet potato. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 1995(3): 25-27
- [7] 柳哲胜,刘庆昌,翟红,王玉萍. 用改进的SSAP方法克隆抗甘薯茎线虫病相关的RGA. 分子植物育种, 2005, 3(3): 369-374
Liu Z S, Liu Q C, Zhai H, Wang Y P. Cloning of RGA related to stem nematode resistance of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with modified SSAP. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(3): 369-374
- [8] 揭琴,姜伟,李华,翟红,马代夫,谢逸萍,刘庆昌. 甘薯抗茎线虫病基因的遗传分析及SCAR标记. 分子植物育种, 2008, 6(3): 523-526
Jie Q, Jiang W, Li H, Zhai H, Ma D F, Xie Y P, Liu Q C. Inheritance analysis and SCAR marker of the gene for stem nematode resistance in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(3): 523-526
- [9] Gao S, Yu B, Zhai H, He S Z, Liu Q C. Enhanced stem nematode resistance of transgenic sweetpotato plants expressing *Oryzacystatin-I* gene. *Journal of Integrative Agriculture*, 2011, 10(4): 519-525
- [10] 王飞兵. 过表达 *IbMIPSI* 和 *IbMVD* 基因甘薯植株的获得及特性鉴定. 北京:中国农业大学, 2015
Wang F B. Production and characteristic identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) plants overexpressing *IbMIPSI* and *IbMVD* genes. Beijing: China Agricultural University, 2015
- [11] 张允刚,郭小丁. 抗甘薯茎线虫病优异种质资源的筛选与评价. 作物品种资源, 1998(2): 39-41
Zhang Y G, Guo X D. Screening and evaluation of excellent germplasm resources resistant to sweet potato stem nematode disease. *Crop Variety Resources*, 1998(2): 39-41
- [12] 王庆美,常彩霞. 甘薯品种资源抗茎线虫病鉴定. 作物品种资源, 1995(2): 36-37
Wang Q M, Chang C X. Identification of resistance to stem

- nematode disease of sweetpotato variety resources. *Crop Germplasm Resources*, 1995(2): 36-37
- [13] Wu S, Lau K H, Cao Q H, Hamilton J P, Sun H H, Zhou C X, Eserman L, Gemenet D C, Olukolu B A, Wang H Y, Crisovan E, Godden G T, Jiao C, Wang X, Kitavi M, Norma M C, Brienne V, Krystle W R, Yang X S, Bao K, Schaff J, Kreuze J, Gruneberg W G, Khan A, Fei Z J. Genome sequences of two diploid wild relatives of cultivated sweetpotato reveal targets for genetic improvement. *Nature Communications*, 2018, 9: 4580
- [14] 高闰飞,李强,苏在兴,后猛,唐维,杨强强,刘旋旋,闫会,王欣,刘亚菊,张允刚,马代夫. 基于 SSR 标记的 76 份紫心甘薯品种的遗传多样性分析. *分子植物育种*, 2020, 18(11): 3775-3785
Gao R F, Li Q, Su Z X, Hou M, Tang W, Yang Q Q, Liu X X, Yan H, Wang X, Liu Y J, Zhang Y G, Ma D F. Genetic diversity of 76 purple fleshed sweetpotato cultivars revealed by SSR Markers. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(11): 3775-3785
- [15] Pablo M R, Tom C, John R I, Bethany R M, Kevin W, Brent K, Zoe G, Alex S, Noelle L A, Denis F, David H, Mark D R, Steven K, Aaron L, Robert W S. A taxonomic monograph of *Ipomoea* integrated across phylogenetic scales. *Nature Plants*, 2019(5): 1136-1154
- [16] Yan H, Ma M, Ahmad M Q, Arisha M H, Tang W, Li C, Zhang Y G, Kou M, Wang X, Gao R F, Song W H, Li Z Y, Li Q. High-density single nucleotide polymorphisms genetic map construction and quantitative trait locus mapping of color-related traits of purple sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 1-12
- [17] 陈晶伟,马居奎,张成玲,杨冬静,唐伟,谢逸萍,孙厚俊. 徐淮地区 7 个甘薯茎线虫群体的形态学及分子生物学鉴定. *江苏农业学报*, 2021, 37(6): 1409-1416
Chen J W, Ma J K, Zhang C L, Yang D J, Tang W, Xie Y P, Sun H J. Morphological and molecular biology identification of seven stem nematode populations of sweet potato in Xuhuai area. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 37(6): 1409-1416
- [18] 乔月静,刘琪,曾昭海,胡跃高,高志强. 轮作方式对甘薯根际土壤线虫群落结构及甘薯产量的影响. *中国生态农业学报(中英文)*, 2019, 27(1): 20-29
Qiao Y J, Liu Q, Zeng Z H, Hu Y G, Gao Z Q. Effect of rotation on nematode community diversity in rhizosphere soils and yield of sweet potato. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2019, 27(1): 20-29
- [19] 孙厚俊,谢逸萍,张成玲,杨冬静,徐振,赵永强,马居奎,谢睿寰,唐伟,孙井康. DB 32/T 3863-2020 甘薯抗茎线虫病鉴定技术规程. 江苏: 江苏省市场监督管理局, 2020
Sun H J, Xie Y P, Zhang C L, Yang D J, Xu Z, Zhao Y Q, Ma J K, Xie R H, Tang W, Sun J K. DB 32/T 3863-2020 Technical regulations for identification of sweet potato resistance to stem nematode disease. Jiangsu: Jiangsu provincial market supervision administration, 2020
- [20] Meng L, Li H H, Zhang L Y, Wang J K. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in bi-parental populations. *The Crop Journal*, 2015, 3(3): 269-283
- [21] 宋姗姗,张欣婷,王琦,芦远景,侯春燕,王冬梅. *TaRanGAP2* 在小麦抵抗叶锈菌侵染中的作用. *华北农学报*, 2022, 37(1): 158-164
Song S S, Zhang X T, Wang Q, Lu Y J, Hou C Y, Wang D M. The role of *TaRanGAP2* in wheat resistance to *Puccinia triticina* infection. *Acta Agriculturae Borealis-Sinica*, 2022, (37)1: 158-164
- [22] 杜驰,张富春. 植物蛋白磷酸酶 2C 在非生物胁迫信号通路中的调控作用. *生物技术通讯*, 2014(8): 16-22
Du C, Zhang F C. Protein phosphatases II C in plants are involved in abiotic stress tolerance of several signaling pathways. *Biotechnology Bulletin*, 2014(8): 16-22
- [23] 马代夫,李洪民,谢逸萍. 甘薯抗茎线虫病品种的选育. *作物杂志*, 1997(2): 15-16
Ma D F, Li H M, Xie Y P. Breeding of sweet potato varieties resistant to stem nematode disease. *Crops*, 1997(2): 15-16
- [24] 黄宁. 基于表达谱芯片分析甘蔗与黑穗病菌互作机制. 福州: 福建农林大学, 2018
Huang N. Transcription profile analysis of intercation mechanism between sugarcane and *Sporisorium scitamineum* using microarray. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018
- [25] 王卓. 香蕉易感枯萎病和水杨酸诱导抗枯萎病的分子机理研究. 海口:海南大学, 2013
Wang Z. The molecular mechanism of susceptibility and salicylic acid-induced resistance to *Fusarium wilt* in banana. Haikou: Hainan University, 2013
- [26] 周桦楠,潘家荃,刘冠求,万博,王凯,于涛. 甘薯响应冷胁迫的转录组分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4): 1202-1212
Zhou H N, Pan J Q, Liu G Q, Wan B, Wang K, Yu T. Transcriptome analysis of sweetpotato under low temperature stress. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4): 1202-1212
- [27] 杜朝金,李贻沛,尹拓,杨娜,杨秀瑶,张梦洁,韩沛辰,奚登贤,刘小珍,张汉尧. 低温胁迫下四倍体黄肉中华猕猴桃转录组分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 296-306
Du C J, Li Y P, Yin T, Yang N, Yang X Y, Zhang M J, Han P C, Xi D X, Liu X Z, Zhang H Y. Transcriptome analysis of cold-treated tetraploid yellow-fleshed actinidia chinensis planch. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1): 296-306
- [28] Qiao S C, Ma J K, Wang Y N, Chen J W, Kang Z H, Bian Q Q, Chen J J, Yin Y M, Cao G Z, Zhao G R, Yang G H, Sun H J, Yang Y F. Integrated transcriptome and metabolome analyses reveal details of the molecular regulation of resistance to stem nematode in sweet potato. *Plants*, 2023, 12(10): 1-17