植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources
ISSN 1672-1810,CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：基于 BSA-seq 和 RNA-seq 挖掘西瓜抗蔓枯病候选基因
作者：张曼，陈一帆，刘金秋，娄丽娜，徐建，朱凌丽，徐锦华
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20250717001
收稿日期：2025-07-17
网络首发日期：2025-11-24
引用格式：张曼，陈一帆，刘金秋，娄丽娜，徐建，朱凌丽，徐锦华．基于 BSA-seq 和 RNA-seq 挖掘西瓜抗蔓枯病候选基因[J/OL]．植物遗传资源学报．https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250717001

植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources　DOI:10.13430/j.cnki.jpgr.20250717001

基于 BSA-seq 和 RNA-seq 挖掘西瓜抗蔓枯病候选基因

张　曼，陈一帆，刘金秋，娄丽娜，徐　建，朱凌丽，徐锦华*
（江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室，南京 210014）

摘要：蔓枯病是危害西瓜生产的主要病害之一，发掘和利用抗蔓枯病基因对西瓜抗病种质创新及品种选育具有重要意义。本研究以蔓枯病抗病材料 PI189225 和感病材料 K3 为亲本构建的重组自交系（RIL）群体为材料，采用混池分组分析法（BSA，bulked segregant analysis）对亲本和抗感混池进行全基因组重测序，开展西瓜蔓枯病抗性基因定位研究，鉴定抗病基因的候选区域，同时结合转录组测序（RNA-seq）数据，挖掘西瓜抗蔓枯病候选基因。结果显示，基于 BSA-seq 分析在西瓜 5 号染色体和 10 号染色体上鉴定到与西瓜蔓枯病抗性显著关联的基因组区域，总长度为 8.18 Mb，包含 681 个基因。功能分析显示这些基因主要参与植物-病原体互作和苯丙烷类生物合成等代谢通路。进一步利用 InDel 标记和重组单株分析，将西瓜蔓枯病抗性区间缩小到 10 号染色体 Chr10_30103333 和 Chr10_32554279 标记之间，该区间大小为 2.45 Mb。结合西瓜响应蔓枯病菌侵染的差异表达基因，在 10 号染色体上鉴定到 6 个候选基因。qRT-PCR 结果表明，6 个候选基因的表达均受到蔓枯病菌的诱导，*Cla97C10G200140* 和 *Cla97C10G202140* 在感病材料中高表达，*Cla97C10G200100*、*Cla97C10G201690*、*Cla97C10G202570* 和 *Cla97C10G201940* 在抗病材料中高表达。本研究结果为西瓜抗蔓枯病分子标记辅助选择及抗病品种选育提供重要的理论依据和基因资源。

关键词：西瓜；蔓枯病；BSA-seq；RNA-seq；候选基因

Mining Candidate Genes for Gummy Stem Blight Resistance by BSA-seq and RNA-seq in Watermelon (*Citrullus lanatus*)

ZHANG Man，CHEN Yifan，LIU Jinqiu，LOU Lina，XU Jian，ZHU Lingli, XU Jinhua
（*Institute of Vegetable，Jiangsu Academy of Agricultural Sciences /Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement，Nanjing 210014*）

Abstract：Gummy stem blight is one of the major diseases threatening watermelon production. Identifying and utilizing resistance genes to gummy stem blight is of great significance for the innovation of disease resistant watermelon germplasm and breeding of resistant watermelon varieties. In this study, a recombinant inbred line (RIL) population derived from the cross between the gummy stem blight resistant germplasm PI189225 and the susceptible germplasm K3 was used as the experimental materials. Bulked segregant analysis (BSA) combined with whole genome resequencing of the parents and resistant and susceptible bulks was performed to identify candidate genomic regions associated with gummy stem blight resistance. Additionally, transcriptome sequencing (RNA-seq) data were integrated to mine candidate genes. The results showed that BSA-seq analysis identified genome

收稿日期：2025-07-17
第一作者研究方向为西瓜抗病分子育种，E-mail：mzhang@jaas.ac.cn
通信作者：徐锦华，研究方向为西瓜育种及栽培技术，E-mail：xjhyznj88@163.com
基金项目：江苏省现代农业重点及面上项目（BE2022339）；江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目（JBGS[2021]069）；江苏省自然科学基金（BK20231387）
Foundation projects: Jiangsu Key Research and Development Program (BE2022339); Jiangsu Province Seed Industry Revitalization “Unveiling the List of Commanding Officers” Project (JBGS[2021]069); Jiangsu Natural Science Foundation (BK20231387)

regions significantly associated with gummy stem blight resistance on chromosome 5 and 10, with a total length of 8.18 Mb containing 681 genes. Functional analysis revealed that these genes are primarily involved in biological processes such as Plant-pathogen interaction and Phenylpropanoid biosynthesis. Further analysis using InDel markers and recombinant individuals narrowed down the resistance interval to a 2.45 Mb region on chromosome 10, flanked by the markers Chr10_30103333 and Chr10_32554279. Combined with differentially expressed genes in watermelon responding to gummy stem blight infection, six candidate genes were identified on chromosome 10. qRT-PCR analysis indicated that the expression of all six candidate genes was induced by gummy stem blight pathogen. Among them, *Cla97C10G200140* and *Cla97C10G202140* were highly expressed in susceptible parent, whereas *Cla97C10G200100, Cla97C10G201690, Cla97C10G202570,* and *Cla97C10G201940* were highly expressed in the resistant parent. The findings of this study provide important theoretical basis and genetic resources for marker assisted selection and breeding of gummy stem blight resistant watermelon varieties.

Key words：watermelon; gummy stem blight; BSA-seq; RNA-seq; candidate genes

西瓜[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai]是葫芦科的重要作物，广泛种植于全球温带和热带地区。其不仅甘甜爽口，是夏季消暑佳品，更富含多种维生素、矿物质和植物活性成分，具有显著的营养价值[1-2]。随着消费需求的持续增长，提高西瓜产量和品质已成为产业发展的关键。然而，蔓枯病（GSB，gummy stem blight）等病害给西瓜生产造成重大损失，提高对蔓枯病的抗性是西瓜育种的重要目标，挖掘和鉴定抗病基因从分子水平上提供了提高西瓜抗病性的基因资源，具有重要的实践价值。

蔓枯病是由 *Stagonosporopsis* spp.属真菌（包含 *S. cucurbitacearum*、*S. caricae* 和 *S. citrulli* 等 3 种病原菌）引起的毁灭性病害[3-4]。该病害在温暖潮湿的环境下易爆发流行，典型症状为茎部溃疡、叶片出现病斑及胶状分泌物，最终导致落叶、藤蔓枯萎和果实品质下降，降低产量和市场价值。化学防治是主要的防治方法，但环境安全问题的日益凸显和抗真菌剂菌株的发展，促使研究者转向开发绿色可持续的防控策略[5-8]。病原体在作物残体和土壤中的持久存活使得蔓枯病管理更加复杂，同时，对西瓜抗蔓枯病品种的开发受到抗性数量性状和西瓜遗传复杂性的阻碍，因而需要对西瓜蔓枯病抗性进行进一步研究[4]。

目前，西瓜蔓枯病抗性研究主要集中在抗性遗传和基因定位方面[9]。通过构建西瓜抗、感蔓枯病群体结合重测序技术，Gimode 等[10]将西瓜蔓枯病抗性基因定位在 3 号、5 号和 7 号染色体上，鉴定出 3 个与蔓枯病抗性相关的 QTL。其中，位于 5 号染色体的基因座 ClGSB5.1 包含一个具有典型 NBS-LRR 结构的抗病基因 *ClCG05G019540*，而 7 号染色体的基因座 ClGSB7.1 表型变异最高，其候选基因 *ClCG07G013230* 包含一个与蔓枯病抗性显著相关的非同义突变 SNP。Ren 等[11]和 Lee 等[12]将西瓜蔓枯病抗性基因定位在 6 号和 8 号染色体上。在 8 号染色体上各鉴定到 1 个主效 QTL *Qgsb8.1*[11]和

qSB8.1[12]。*Qgsb8.1* 位点位于 KASP_JS9383 和 KASP_JS9168 之间，物理距离为 571.27 kb，包含 19 个候选基因，其中 *Cla001017* 和 *Cla001019* 为抗病基因[11]。*qSB8.1* 位点位于 chr8_WGRS240 和 chr8_WGRS(3)185 之间，跨度为 0.87 Mb，包含 83 个候选基因，其中 *Cla022133*、*Cla022184*、*Cla022195* 和 *Cla022196* 为抗病基因[12]。此外，6 号染色体上的 QTL *qSB6.1* 位点也被证实与蔓枯病抗性相关[12]。在最近的研究中，Hong 等[13]利用测序基因分型（GBS，genotyping by sequencing）技术鉴定到 3 个蔓枯病抗性相关的 QTL 位点 *ClGSB1.1*, *ClGSB10.1* 和 *ClGSB11.1*。Adams 等[14]利用 QTL-seq 技术在 2 号、5 号、9 号和 11 号染色体上定位到蔓枯病抗性相关 QTL。Natarajan 等[9]在 1 号、2 号、3 号、5 号、7 号、10 号和 11 号染色体上发现了与蔓枯病抗性相关的显著关联位点，其中编码脂肪酶 3 家族蛋白核糖体休眠因子的 *CaU02G00010*、编码泛素特异性蛋白酶的 *CaU03G04260* 和编码具有 CCCH 锌指结构域的蛋白 15 的 *CaU03G10970* 基因，均具有较高的 ΔSNP 值，是蔓枯病抗性候选基因[9]。尽管这些研究为西瓜蔓枯病抗性机制解析提供了重要线索，但西瓜蔓枯病抗性基因挖掘及作用机制仍有待充分阐明，需要进一步研究。

本研究以蔓枯病抗病西瓜材料 PI189225 和蔓枯病感病西瓜材料 K3 为亲本，构建了包含 150 个家系的重组自交系群体（RIL，recombinant inbred lines）。基于该群体的蔓枯病抗病表型鉴定结果，选取极端抗感单株分别构建抗、感极端混池，利用 BSA 重测序分析方法进行西瓜蔓枯病抗性基因定位，鉴定与蔓枯病抗性显著关联的基因组区域，筛选关键抗病候选基因，为西瓜抗病分子育种提供重要的基因资源和分子标记，为西瓜分子标记辅助育种和抗病品种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以蔓枯病抗病西瓜材料 PI189225 和蔓枯病感病西瓜材料 K3 为亲本配置杂交组合，通过单粒传法杂交构建了包含 150 个家系的 F_{10} 重组自交系群体。所有材料种植于江苏省农业科学院科研温室，每份材料种植 3 株，株行距 0.4 m×1.0 m，常规田间管理。在幼苗三叶一心期，采用喷雾接种蔓枯病菌孢子液（浓度为 10^6 孢子/mL），接种后使用塑料薄膜覆盖，保持温度 25℃、相对湿度 100%，两天后揭去覆膜常规管理。植株发病后参照 Ren 等[11]的方法进行蔓枯病抗病表型鉴定。根据抗性鉴定结果，选取 30 个抗蔓枯病家系等量混合构建抗病混池（MK-R），30 个感蔓枯病家系等量混合构建感病混池（MK-S）。同时，分别取 5 株抗蔓枯病材料 PI189225 及感蔓枯病材料 K3 等量混合构建抗亲本池（PI）、感亲本池（K3）。所有样本 DNA 均采用 NanoDrop 2000 分光光度计（Thermo Scientific）进行定量。

1.2 文库构建及 BSA-seq 测序

文库构建及基因组测序委托北京百迈克生物科技有限公司实施。具体操作流程如下：首先对符合质量

标准的基因组 DNA 进行超声打断，随后依次进行片段纯化、末端修复、3′端加 A 尾及接头连接等操作。利用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小筛选，经 PCR 扩增后完成测序文库制备。最终，通过质检的文库在 Illumina 高通量测序平台上进行测序分析。亲本池与子代混池测序深度均为 30×。以西瓜 97103 参考基因组（http://cucurbitgenomics.org/）为参考进行序列比对分析。

1.3 变异检测与关联分析

利用 samtools (v1.9)对 Clean reads 进行比对结果过滤，去除冗余序列。使用 GATK(v3.8)的 HaplotypeCaller 算法进行 SNP 和 InDel 变异位点检测。使用 SNP-index、InDel-index 和欧氏距离（ED，euclidean distance）算法统计混池之间基因型频率的差异。使用 Δ(SNP-index)和 Δ(InDel-index) 统计混池之间基因型频率的显著差异，以 99%置信水平为筛选阈值，采用 SNPNUM 方法对 ED 值进行拟合，以 0.15 为筛选阈值，通过交集分析确定蔓枯病抗性相关基因组区域。利用 BLAST 软件从序列特征、蛋白功能、代谢通路等多个角度对候选区间内的编码基因进行系统解析，采用 GOATools 和 QuanterProfiler 软件分别进行差异表达基因的 GO 富集和 KEGG 通路富集分析。

1.4 InDel 标记开发与基因分型

为了进一步缩小定位区间，在 BSA-seq 初步确定的区间内，基于重测序数据开发 InDel 分子标记（表 1）。具体步骤为：提取 InDel 位点侧翼 100 bp 序列，从中筛选缺失或插入片段长度在 3~10 bp 之间的差异位点，并利用 Primer Premier 5.0 设计相应引物。随后，以抗病和感病双亲为模板进行 PCR 扩增，选取具有共显性多态性且扩增条带清晰的标记，进一步对 150 株 RIL 群体进行 PCR 扩增。使用植物 DNA 提取试剂盒（上海皓嘉科技发展有限公司，中国）提取单株 DNA。PCR 反应体系为 PCR Master Mix 7.5 μL，引物共 1.0 μL，DNA 50 ng，ddH_2O 补充至 15 μL。PCR 扩增程序为：预变性 95℃ 10 min；变性 95℃ 10 s，退火 58℃ 20 s，延伸 72℃ 20 s，35 个循环；充分延伸 72℃ 5 min。。扩增产物通过聚 8%丙烯酰胺凝胶电泳进行基因分型，将与感病母本 K3 带型一致的单株记为 A，与抗病父本 PI189225 带型一致的记为 B，杂合带型则标记为 H。通过 Excel 2016 对带型数据进行统计。

表 1 基因定位和 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for gene mapping and qRT-PCR

引物名称 Primer name	正向引物（5’-3’） Forward primer (5’-3’)	反向引物（5’-3’） Reverse Primer (5’-3’)	用途 Purpose
Chr10_30103333	GAAAAGCCTCGATGAAATAC	ATAGGTGCGCATTGAGATGC	基因定位
Chr10_32554279	GATCTGCTCCAACATGTGTCC	GGAAAGACCCAAAATTGACCTGA	基因定位
Cla97C10G200100	CAACTCTCCCACCACTACCA	TGATGATCGTGTGGGGCTAA	qRT-PCR
Cla97C10G200140	AGAGATCGGCGAAGAGGAAG	TTCTCTCTCCTCGCTCGTTC	qRT-PCR
Cla97C10G201690	ACCACTTCTCTCCTGGCTTC	CGTATTGCTTGGGGATGACG	qRT-PCR
Cla97C10G202570	GAAATGGGTTCGATCCGTGG	TTCTGTGGTGGCTAGGGAAG	qRT-PCR
Cla97C10G201940	CCGCAAGTGGATCTGGAAAC	TGTCACCTCCCTGTTCTCAC	qRT-PCR

Cla97C10G202140	CTCATCGACAGTATTGCGGC	GAGGCTGCCATCCAATTCAA	qRT-PCR
18sRNA	AGCAAGCCTACGCTCTGT	CTGGTCGGCATCGTTTAT	qRT-PCR

1.5 RNA-seq 测序

以蔓枯病抗病西瓜材料 PI189225 和感病西瓜材料 K3 为材料，种植于江苏省农业科学院科研温室，常规管理。在幼苗三叶一心期参照 Ren 等[11]的方法进行蔓枯病菌侵染。分别于蔓枯病菌侵染后 0、12 h 从同一叶位采集叶片[15]，每个时间点设置 3 个生物学重复。转录组测序由北京百迈克生物科技有限公司完成。RNA 提取使用 FastPure Plant Total RNA Kit（南京诺唯赞生物科技有限公司，中国），并通过 NanoDrop 2000 分光光度计（Thermo Scientific）和 1%琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 样品的完整性、纯度和浓度。使用 NEB Next Ultra Nondirectional RNA Library Prep Kit（新英格兰生物实验室，美国）构建 RNA-seq 文库，然后在 Illumina Novaseq 6000 平台进行双端测序。将测序数据比对至西瓜 97103 参考基因组（http://cucurbitgenomics.org/）。利用 Stringtie v2.2.0 计算 FPKM 值，通过 DESeq 2 软件包鉴定差异表达基因（DEG，differentially expression gene），以 FDR≤0.05 且 $\log_2$(FoldChang)≥1 为筛选标准。采用 QuanterProfiler 软件包进行差异表达基因的 KEGG 通路富集分析。

1.6 qRT-PCR 分析

使用 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒（天根生化科技北京有限公司，中国）进行 cDNA 合成。qRT-PCR 检测使用 SYBR Green with SuperReal PreMix Plus（天根生化科技北京有限公司，中国）试剂，在 Bio-Rad CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪（加利福尼亚，美国）上完成。反应条件设置为：预变性 95 ℃ 15 min；95 ℃ 10 s，58 ℃ 30 s，40 个循环。以 *18sRNA* 为内参基因，参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法[16]计算目标基因相对表达量。试验所用引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 测序数据质控

为了鉴定与西瓜蔓枯病抗性相关的基因，对抗感亲本及两个极端子代混池的DNA样本进行了基于BSA的测序分析。测序共获得46.04 Gb原始数据数据（Raw data），去除低质量序列后，获得45.71 Gb高质量Clean reads。测序质量评估显示，测序样本的 Q20≥99.72%，Q30≥98.29%，表明测序数据质量高，GC含量分布在36.22%～36.76%之间。所有测序样本与参考基因组的比对率达到99.21%～99.48%，平均覆盖深度在41×～46×之间。基因组覆盖率分析表明，1×基因组覆盖率超过92.42%，5×基因组覆盖率超过86.63%，10×基因组覆盖率达到80.86%（表2）。综上所述，样品测序数据质量可靠，满足后续变异检测和基因定位分析的要求。

表 2 测序数据与参考基因组比对统计

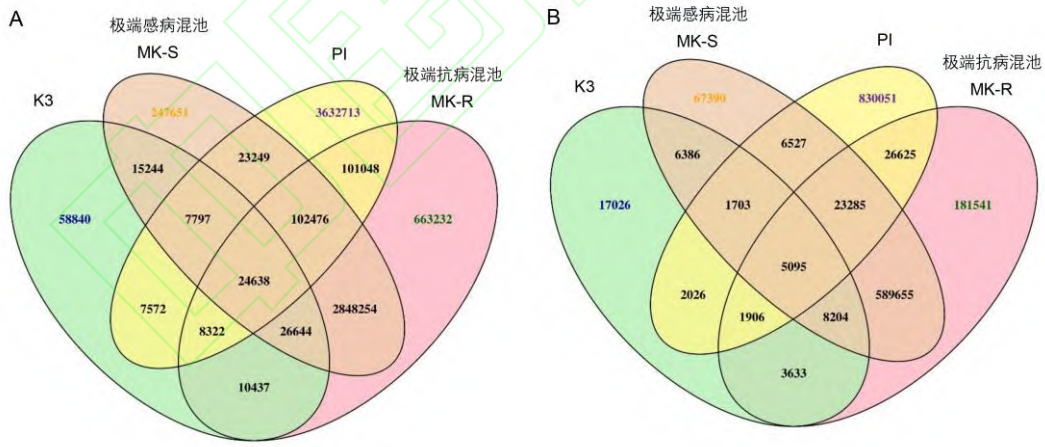
Table 2 Alignment and Statistics of sequencing clean reads with reference genome

样品	过滤后序列数	GC 含量	Q20（%）	Q30（%）	比对率（%）	平均覆盖深度	覆盖率(%)

Sample	Clean reads	（%） GC content			Mapped ratio	（×） Average coverage depth	Cover ratio		
							1×	5×	10×
K3	116444138	36.26	99.74	98.40	99.35	46	99.58	98.31	95.48
极端抗病混池 MK-R	104770250	36.40	99.72	98.31	99.47	41	99.68	97.92	93.24
极端感病混池 MK-S	109688380	36.22	99.72	98.29	99.48	43	99.74	98.57	95.63
PI	111531646	36.76	99.72	98.30	99.21	44	92.42	86.63	80.86

2.2 SNP及InDel变异检测与注释

对4个样品进行全基因组变异分析，共鉴定出4227793个SNP和974950个InDel。其中，74118个SNP引起编码基因发生非同义突变。如图1所示，SNP和InDel在不同样品间的分布呈现明显差异。进一步对变异位点进行功能注释（表3）发现，绝大多数变异位于基因间区、内含子、基因上游区域和基因下游区域。在基因编码区的变异主要有同义编码突变、非同义编码突变、剪切位点区域变异、以及基因的5’UTR内和基因的3’UTR内的序列变异，为后续关键候选基因的筛选提供了重要依据。



数字分别表示SNP（A）和InDel（B）数量

The numbers represent the number of SNP (A) and InDel (B), respectively

图1 SNP（A）and InDel（B）数量韦恩图

Fig. 1 Veen diagram of SNP (A) and InDel (B) numbers

表 3 变异位点基因组位置及功能注释统计表

Table 3 Genome location and annotation statistical table of variation sites

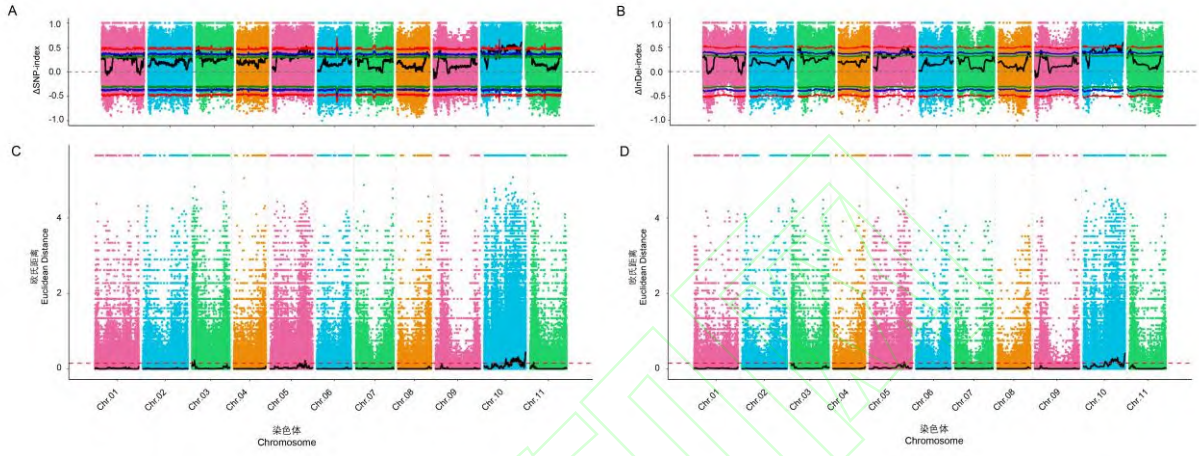
SNP 变异位点信息 Information of variation	K3	极端抗病混池	极端感病混池	PI		InDel 变异位点信息 Information of variation site	K3	极端抗病	极端感病	PI

site		MK-R	MK-S				混池 MK-R	混池 MK-S	
基因间区 Intergenic	9852	158406	136988	165810	基因间区 Intergenic	1833	25626	21535	27909
	9	4	1	0		1	8	1	1
基因内 Intragenic	0	0	0	0	基因内 Intragenic	5	73	66	74
内含子 Intron	1621	646380	574489	655850	内含子 Intron	8235	17584	15153	18372
	2						5	4	6
基因上游区域 Upstream	2271	800232	689768	824314	基因上游区域 Upstream	1085	22483	18704	24065
	8					0	0	5	1
基因下游区域 Downstream	1666	577915	501677	593073	基因下游区域 Downstream	7729	16477	13830	17508
	6						6	6	8
基因的 5’UTR 内 UTR 5 prime	118	6392	5662	6484	基因的 5’UTR 内 UTR 5 prime	112	2203	1900	2296
基因的 3’UTR 内 UTR 3 prime	378	14536	13040	14548	基因的 3’UTR 内 UTR 3 prime	215	4961	4313	5072
剪切受体突变 Splice site acceptor	19	602	537	600	剪切受体突变 Splice site acceptor	6	205	180	208
剪切供体突变 Splice site donor	19	572	504	583	剪切供体突变 Splice site donor	15	238	211	243
剪切位点区域突变 Splice site region	197	8380	7632	8392	剪切位点区域突变 Splice site region	91	1860	1653	1879
起始密码子丢失 Start lost	6	188	172	190	起始密码子丢失 Start lost	2	57	52	61
同义的起始密码子突变 Synonymous start	0	0	0	0	移码突变 Frame shift	221	4924	4339	5067
非同义的起始密码子突变 Non synonymous start	0	0	0	0	密码子删除 Codon deletion	41	916	849	928
同义编码突变 Synonymous coding	2095	73693	66954	73645	外显子删除 Exon deleted	0	2	2	2
非同义编码突变 Non synonymous coding	2471	70267	63993	70180	密码子插入 Codon insertion	55	1471	1282	1499
同义终止密码子突变 Synonymous stop	3	135	119	137	密码子改变+密码子删除 Codon change plus codon deletion	31	628	561	625
终止密码子获得 Stop gained	50	1249	1121	1263	密码子改变+密码子插入 Codon change plus codon insertion	19	488	430	503
终止密码子丢失 Stop lost	9	214	195	219	终止密码子获得 Stop gained	16	130	114	141
其他 Other	0	0	0	0	终止密码子丢失 Stop lost	5	69	57	64
					其他 Other	0	0	0	0

2.3关联分析及候选区域筛选

2.3.1 基于SNP-index的关联分析结果 测序数据经质控过滤后共获得3428069个高质量SNP位点用于关联分析（图2A、C）。首先，基于ΔSNP-index算法对同一染色体上的标记值进行拟合，以超过99%置信水平的显

著值为候选区间，最终在3号、5号、10号和11号染色体上鉴定出61个显著关联区域，总长度为14.76 Mb。进一步采用ED算法进行关联分析，采用SNPNUM方法对ED值进行拟合，超过显著性关联阈值0.15的区间为候选区间，在3号、5号、10号、11号染色体上获得37个显著关联区域，总长度为12.27 Mb。最后，整合两种关联分析方法的结果，取交集后确定40个高置信度的西瓜蔓枯病抗性候选区间，分布于3号、5号、10号和11号染色体，总覆盖12.08 Mb。



A：SNP-index；B：InDel-index；C：SNP-ED；D：InDel-ED。A、B图中横坐标为染色体名称，黑色线为拟合后的Δ SNP-index和Δ InDel-index值，红色线表示0.99置信度阈值。C、D图中横坐标为染色体名称，黑色线为拟合后的ED值，红色线代表0.15显著性关联阈值。

A: SNP-index; B: InDel-index; C: SNP-ED; D: InDel-ED. The horizontal axis in A and B represents the chromosome name, the black line represents the fitted Δ SNP index and Δ InDel index values, and the red line represents the 0.99 confidence threshold. The horizontal axis in C and D represents the chromosome name, the black line represents the fitted ED value, and the red line represents the 0.15 significance association threshold

图2 基于SNP-index和InDel-index的关联分析结果

Fig. 2 Association analysis results based on SNP-index and InDel-index

2.3.2 基于InDel-index方法关联结果 测序数据经质控过滤后共得到744347个高质量InDel变异位点（图2B、D）。对这些位点采用与SNP分析相同的关联定位方法。首先基于InDel-index方法，通过拟合同一染色体标记的ΔInDel-index值，以99%置信水平作为显著值，在5号和10号染色体上鉴定出15个显著关联区域，总长度为8.24 Mb。随后采用ED算法进行关联分析，通过SNPNUM方法拟合ED值并设定0.15为显著性关联阈值，在5号和10号染色体上共检测到9个显著关联区域，总长度为10.53 Mb。最后对两种关联分析方法的关联结果进行整合，最终在5号和10号染色体上确定了17个高置信度的西瓜蔓枯病抗性候选区间，总长度为8.24 Mb。

2.3.3 西瓜蔓枯病抗性候选区域筛选 对SNP-index和InDel-index两种分析方法获得的关联区域进行整合分析，鉴定到17个与蔓枯病抗性显著关联的候选区域（表4），分布于5号染色体上（1个区域）和10号染色体（16个区域），总长度为8.18 Mb，该关联区域内共注释到681个基因。其中，10号染色体呈现出明显的抗病关联区域富集现象，暗示该染色体可能包含调控西瓜蔓枯病抗性的关键基因组区段。

表4 西瓜抗蔓枯病基因的候选区域

Table 4 Candidate region of gummy stem blight resistance genes of watermelon

染色体 Chromosome	起始位置(bp) Start position	终止位置(bp) End position	区域大小 (Mb) Interval size	基因数量 Gene number
5	29383470	29599175	0.22	29
10	17911820	18009954	0.1	2
10	18025796	18040171	0.01	0
10	18041782	18074768	0.03	1
10	18115804	18122415	0.01	0
10	18140805	18853944	0.71	30
10	18910116	18950869	0.04	1
10	22351648	22372683	0.02	1
10	22394617	22414795	0.02	0
10	22428518	22438268	0.01	2
10	23231018	27824711	4.59	366
10	27940144	27952583	0.01	0
10	27958856	29054845	1.1	94
10	29148394	29387229	0.24	19
10	29454930	29508526	0.05	5
10	29529516	29595417	0.07	7
10	34141736	35096439	0.95	124
合计 Total			8.18	681

2.4 候选基因的筛选与功能分析

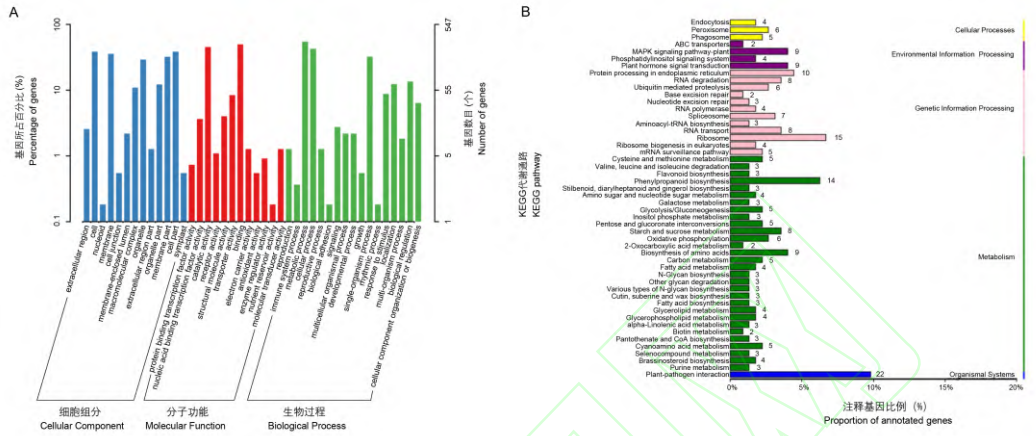
基于多个数据库对候选区间内的基因进行了深度注释，共注释到631个基因，其中包括512个非同义突变基因和85个移码突变基因（表5）。为了进一步解析候选基因功能，对其进行了GO富集分析和KEGG通路分析。GO功能富集分析结果显示（图3A），候选基因可被系统分类为3个主要功能类别：分子功能（436个）、细胞组成（346个）和生物过程（243个）。在二级功能分类中，代谢过程（Metabolic process, GO:0008152）和结合（Binding, GO:0005488）功能是最显著富集的功能类别。KEGG通路分析进一步揭示了候选基因的协同作用机制（图3B）。其中，植物-病原体互作（Plant-pathogen interaction, ko04626）和苯丙烷类生物合成（Phenylpropanoid biosynthesis, ko00940）通路呈现显著富集。这两个通路分别涉及植物免疫防御的关键信号转导过程和次生代谢产物的合成，为解析西瓜蔓枯病抗性分子机制提供了重要线索。

表5 候选区域内SNP及InDel中基因功能注释

Table 5 Gene function annotation of SNP and InDel in candidate region

功能注释数据库 Annotated_Database	注释基因数 Annotation gene number	非同义突变基因数 Non-synonymous gene number	移码突变基因数 Frame shift gene number
NR	629	511	85
trEMBL	628	511	85

SwissProt	473	384	57
GO	547	446	73
KEGG	465	378	64
COG	225	181	30
合计 Total	631	512	85



A：GO富集分类图；B：KEGG基因通路富集分析，数字为注释到该通路下的基因数量

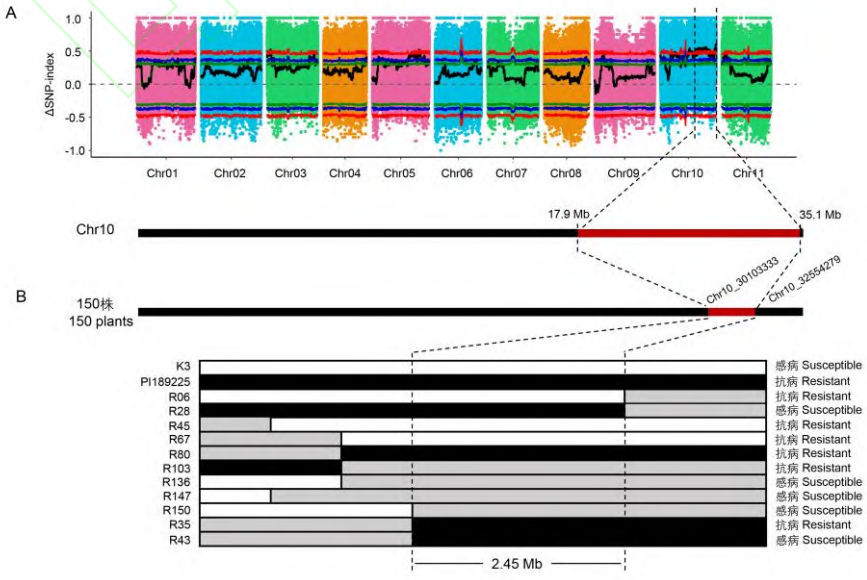
A: GO enrichment classification chart; B: KEGG gene pathway enrichment analysis, the number is genes number annotated to each pathway

图3 定位区间内候选基因GO（A）和KEGG（B）富集分析

Fig. 3 GO（A）and KEGG（B）enrichment analysis of candidate genes within the localization interval

2.5 蔓枯病抗性候选基因定位

为缩小西瓜蔓枯病抗性定位区间，在BSA-seq候选区域开发了120对InDel标记，其中筛选到12对分子标记具有多态性。对150株RIL群体进行基因分型，结合分型结果与对应单株蔓枯病抗性表型，鉴定出17个重组单株，将西瓜蔓枯病抗性候选区域缩小至标记Chr10_30103333和Chr10_32554279之间，物理距离为2.45 Mb（图4），共包含230个注释候选基因。



A：BSA-seq基因定位分析；B：部分重组单株的基因型和表型

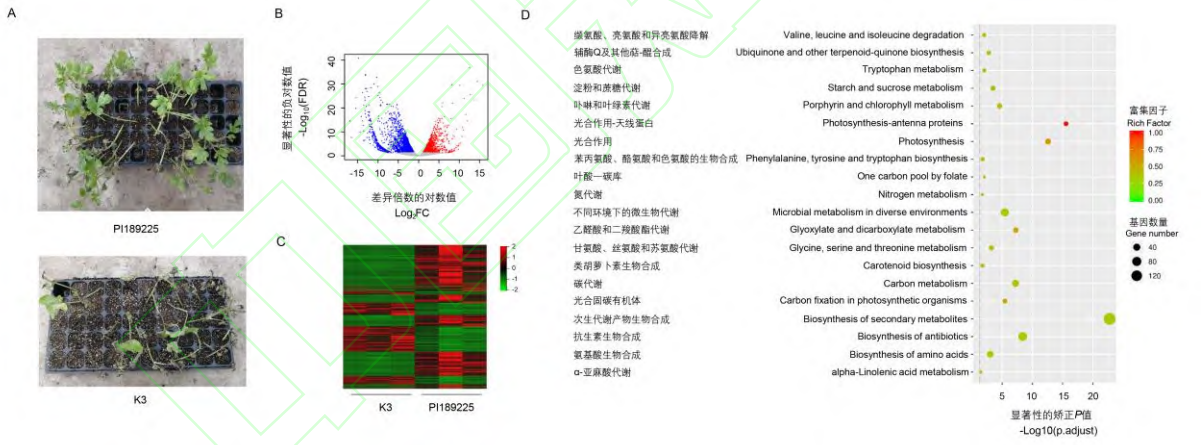
A: BSA-seq gene mapping analysis; B: Genotype and phenotype of recombinant plants (partial)

图4 西瓜蔓枯病抗性基因定位

Fig. 4 Mapping of the gummy stem blight resistant gene in watermelon

2.6 蔓枯病菌侵染诱导的西瓜基因表达谱分析

为了系统地鉴定与蔓枯病抗性相关的基因，对蔓枯病菌侵染0 h和12 h的西瓜叶片组织进行了转录组测序分析。结果显示，抗病材料PI89225和感病材料K3抗病表型差异明显（图5A），RNA-seq分析在PI189225和K3中分别检测到18246和18273个表达基因。进一步采用DESeq2软件进行基因表达差异显著性分析，以FDR≤0.05且$\log_2$(FoldChang)≥1为筛选标准，在蔓枯病菌侵染后的PI189225和K3之间共鉴定到4220个差异表达基因，其中1532个基因显著上调，2688个基因显著下调（图5B）。这些基因在PI189225和K3材料间具有显著差异（图5C）。进一步对这些差异表达基因进行了KEGG通路分析，结果显示，这些差异基因在多种途径中表现出富集，其中在次生代谢产物生物合成途径（Biosynthesis of secondary metabolites, ko01110）显著富集（图5D），表明这些基因可能显著影响西瓜对蔓枯病抗性的形成，在西瓜抗蔓枯病过程中发挥重要调控作用。



A：亲本表型；B：差异表达基因的火山图，图中蓝色的点代表下调差异表达基因，红色的点代表上调差异表达基因；C：差异表达基因的聚类热图；D：差异表达基因KEGG通路富集分析

A: The phenotype of parents; B: Volcano plot of differential expression genes, the blue dots in the figure represent downregulated differentially expressed genes, the red dots represent upregulated differentially expressed genes; C: Heat map cluster of differential expression genes; D: KEGG gene pathway enrichment analysis of differential expression genes

图5 蔓枯病菌诱导的差异表达基因分析

Fig. 5 Analysis of differential expression genes response to gummy stem blight pathogen

2.7 关联区间内候选基因筛选

将BSA-seq定位区间的候选基因与蔓枯病菌诱导的转录组差异表达基因进行比较分析，有6个基因在转录组数据中呈现差异表达（表6）。其中*Cla97C10G200100*编码锌指蛋白，可能在植物激素信号转导和防御相关的次生代谢调控中发挥重要作用。*Cla97C10G200140*编码bHLH转录因子，是植物免疫中最大的家族之

一，在植物防御中发挥重要作用。*Cla97C10G201690*编码含TF-B3结构域蛋白。*Cla97C10G202570*编码LRR类受体蛋白激酶，这些基因均已被报道参与植物抗病反应。*Cla97C10G201940*和*Cla97C10G202140*为未知蛋白。综上所述，这些候选基因可能通过转录调控在西瓜抗蔓枯病过程中发挥重要作用。

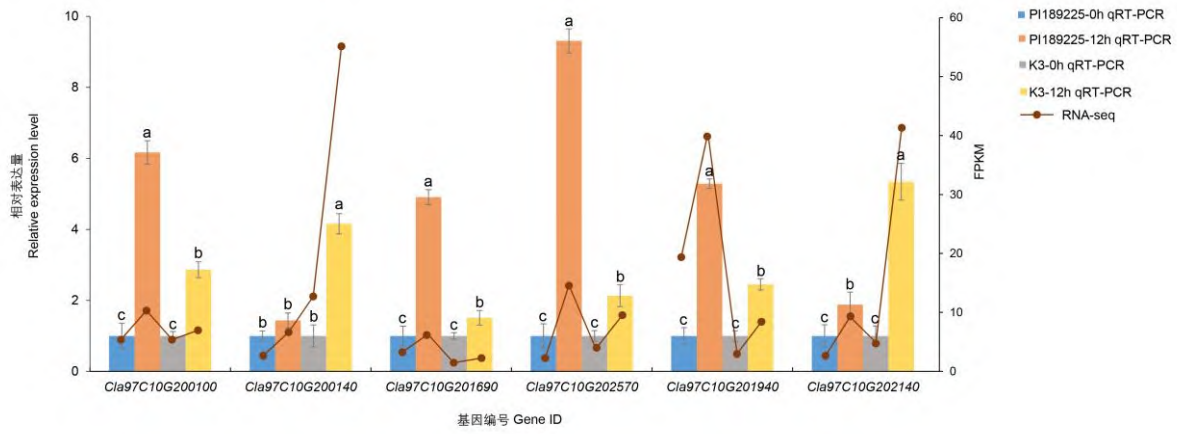
表6 候选基因功能注释

Table 6 Functional annotation of the candidate genes

基因编号 Gene ID	染色体 Chromosome	起始位点(bp) Start position	终止位点(bp) End position	功能注释 Gene function
Cla97C10G200100	10	30168414	30171018	锌指蛋白
Cla97C10G200140	10	30208262	30213624	bHLH 转录因子
Cla97C10G201690	10	31730254	31732143	含 TF-B3 结构域蛋白
Cla97C10G202570	10	32440367	32454995	LRR 类受体蛋白激酶
Cla97C10G201940	10	31927552	31928415	未知蛋白
Cla97C10G202140	10	32053279	32061867	未知蛋白

2.8 qRT-PCR验证候选基因的表达

为验证转录组数据的可靠性并探究候选基因在抗病过程中的作用，本研究利用qRT-PCR进一步分析了6个候选基因在PI189225和K3响应蔓枯病菌侵染后的表达模式，结果显示（图6），蔓枯病菌侵染12 h，6个基因的表达在两个材料中均被显著诱导，但在两个材料中呈差异性表达，表明其在西瓜抗蔓枯病调控过程中均具有一定的功能。其中，2个基因（*Cla97C10G200140*和*Cla97C10G202140*）在侵染后感病材料K3中的诱导表达量高于抗病材料PI189225，说明这些基因在感病材料的防御反应中发挥重要作用。相反，其他4个基因（*Cla97C10G200100*、*Cla97C10G201690*、*Cla97C10G202570*和*Cla97C10G201940*）在侵染后抗病材料中的表达量高于感病材料，表明这些基因可能参与调控抗病材料的特异性防御机制。这些基因的qRT-qPCR验证结果与转录组测序结果一致，进一步验证了本研究中RNA-seq数据的可靠性，为解析西瓜抗蔓枯病的分子机制提供了重要的基因资源。



不同字母代表基因在不同样品中表达差异显著（$P<0.05$）

Different letters represent significant statistically different expression levels among different samples ($P<0.05$)

图6 候选基因表达分析

Fig. 6 Expression analysis of candidate genes

3 讨论

蔓枯病是严重危害西瓜生产的重要病害。由于蔓枯病由 3 种不同的但形态上难以区分的病原体侵染引起，加之当前西瓜品种抗蔓枯病种质缺乏，以及主要致病菌对杀菌剂产生系统抗性，使得蔓枯病的防控面临严峻挑战[4]。因此，鉴定蔓枯病抗性遗传决定因子对于西瓜抗蔓枯病品种选育十分重要。目前已报道 PI189225 等西瓜种质携带蔓枯病抗性位点[17-18]。前期研究认为瓜类对蔓枯病的抗性为单基因显性、单基因隐性或多基因遗传[10,12]。例如，Norton 等[19]发现 PI189225 中的蔓枯病抗性由单基因 *db* 控制。然而，Gusmini 等[20]研究表明，西瓜对蔓枯病的抗性可能涉及多个基因的协同调控，且与环境因素有关。本研究利用 PI189225 衍生的重组自交系群体对西瓜蔓枯病抗性进行基因定位，在 5 号和 10 号染色体上鉴定到与蔓枯病抗性显著相关的区域，这一研究结果与近期多项研究结果一致[10,13,20]，为蔓枯病抗性的复杂遗传特性提供了新的证据，进一步支持了蔓枯病抗性受多基因协同调控的性质。

国内外学者对西瓜蔓枯病抗性基因的定位开展了大量研究工作。Hong 等[13]鉴定出位于 1、10 和 11 号染色体的 3 个蔓枯病抗性相关 QTL。Adams 等[14]通过 QTL-seq 技术在 2、5、9 和 11 号染色体上鉴定出蔓枯病抗性相关 QTL。Gimode 等[10]发现抗性基因分布于 3、5 和 7 号染色体。Ren 等[11]与 Lee 等[12]则将抗性位点定位在 6 号和 8 号染色体。Natarajan 等[9]进一步在 1、2、3、5、7、10 及 11 号染色体上发现多个与蔓枯病抗性显著关联的位点，表明这些染色体很可能携带抗性遗传因子。本研究将西瓜蔓枯病抗性基因定位在 5 号和 10 号染色体上。具体比较显示，本研究在 5 号染色体上定位的区间（29383470~29599175 bp）与 Adams 等[14]（25968975~26536280 bp）及 Natarajan 等[9]（位于 3475336 bp 的 QTN）均不相同，但比 Gimode 等[10]所报道的 24750910~33962797 bp 区间更小，有助于提高基因挖掘的精确性。在 10 号染色体上，本研究定位区间为 17911820~35096439 bp，与 Hong 等[13]的结果（17952517~33750422 bp，含 1225 个基因）存在

重叠，但候选范围更小，提高了抗病基因定位的准确性。

对候选区域中的基因注释揭示了与西瓜响应蔓枯病菌侵染的复杂分子生物学途径。根据 BSA 基因定位结合转录组数据分析，本研究筛选出 6 个西瓜蔓枯病抗性候选基因，这些基因可能通过转录调控、次生代谢、信号转导等多种途径协同作用，共同参与调控西瓜对蔓枯病的抗性。在候选基因中，锌指蛋白（*Cla97C10G200100*）、bHLH（*Cla97C10G200140*）和含 TF-B3 结构域蛋白（*Cla97C10G201690*）均为转录因子家族成员。大量研究表明，转录因子是调控植物生长发育和对环境刺激反应的关键因子，其作为分子开关识别启动子区的顺式作用元件，激活或抑制下游靶基因，最终协调从发育到逆境适应的生物学过程[21-22]。草莓锌指蛋白基因 *FvZFP 1* 在烟草中过表达增强了水杨酸应答相关基因的表达，并促进了在烟草花叶病毒和番茄假单胞菌致病变种 DC 3000（Pst DC 3000）侵染后水杨酸的积累[23]。过表达 *NbZFP 1* 的烟草对烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒和马铃薯 Y 病毒表现出显著的抗性[24]。在水稻中，*bHLH6* 调节茉莉酸信号在细胞核和细胞质之间的穿梭，使其能够在病原体感染的不同阶段调节植株抗病性[25]。棉花防御相关受体样激酶 GbSOBIR1 通过与 GbbHLH171 相互作用并使其磷酸化，从而增强棉花对大丽轮枝菌的抗性[26]。*OsRAV 15* 通过与茉莉酸信号传导的关键组分 OsMYC 2-OsJAZ 复合物结合，激活茉莉酸介导的广谱抗病毒免疫，增强水稻对多种病毒的抗性[27]。本研究在蔓枯病候选区域鉴定到 3 个转录因子，暗示这些基因很可能在西瓜抗蔓枯病过程中发挥重要作用，具有重要的分子育种应用价值。推测这些转录因子可能通过调控植物激素信号转导和次生代谢通路参与西瓜对蔓枯病的抗性反应，具体分子机制尚需通过基因编辑、功能互补等试验手段进行深入验证。

候选基因中*Cla97C10G202571*编码LRR型类受体蛋白激酶，其在植物防御信号转导中发挥重要作用，是目前研究较为深入的蛋白激酶家族[28]。最新研究表明，富含亮氨酸重复序列的类受体激酶通过磷酸化修饰调控底物蛋白的活性、亚细胞定位和蛋白互作，在植物代谢调控和信号转导等关键生物学过程中发挥核心作用[29-30]。特别是在植物免疫反应中，这类激酶参与调控多种抗病信号通路[28]。本研究鉴定到*Cla97C10G202570*在蔓枯病菌侵染的抗感亲本中差异表达，进一步开展该基因的功能解析，有助于阐明西瓜抗病机制，也将为类受体蛋白激酶家族基因的功能研究提供新的理论依据。综上分析，这些候选基因的发掘为深入解析西瓜蔓枯病抗性调控机制提供了基因资源，未来将采用基因编辑技术，结合分子生物学和生物化学方法，深入开展这些基因的功能研究，系统揭示西瓜抗蔓枯病的分子机制，为西瓜抗病育种提供理论支撑。

参考文献

[1] 王晓婷, 沈琦, 勿吉斯古冷, 康琪, 盘菊秀, 何伟忠, 王成. 5 省份西瓜特征元素营养水平的分析与评价. 西南大学学报：自然科学版, 2025, 47(4): 90-100

Wang X T, Shen Q, Wujisiguleng, Kang Q, Pan J X, He W Z, Wang C. Analysis and evaluation of nutritional levels of characteristic elements of

watermelons from 5 province. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 2025, 47(4):90-100

[2] Maoto M M, Beswa D, Jideani A I. Watermelon as a potential fruit snack. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1):355-370

[3] Stewart J E, Turner A N, Brewer M T. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. Fungal Biology, 2015, 119(5):370-382

[4] Seblani R, Keinath A P, Munkvold G. Gummy stem blight: One disease, three pathogens. Molecular Plant Pathology, 2023, 24(8):825-837

[5] Mao X W, Wu Z W, Bi C W, Wang J X, Zhao F F, Gao J, Hou Y P, Zhou M G. Molecular and biochemical characterization of pydiflumetofen-resistant mutants of *Didymella bryoniae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(34):9120-9130

[6] 孙东晗，陈悦，田文学，白庆荣，赵廷昌.吉林省西瓜蔓枯病菌对咪鲜胺和苯醚甲环唑敏感基线的建立和抗性监测. 植物保护，2021，47(6):260-264

Sun D H, Chen Y, Tian W X, Bai Q R, Zhao T C. Establishment of baseline sensitivity and monitoring of resistance of *Stagonosporopsis citrulli* on watermelon to prochloraz and difenoconazole in Jilin province. Plant Protection, 2021, 47(6):260-264

[7] 孙东晗，陈悦，田文学，白庆荣，杨丽娜，赵廷昌. 吉林省西瓜蔓枯病菌对吡唑醚菌酯的抗性监测及抗性风险评估. 植物保护学报，2022，49(6):1663-1672

Sun D H, Chen Y, Tian W X, Bai Q R, Yang L N, Zhao T C. Monitoring and risk evaluation of the resistance to pyraclostrobin in gummy stem blight pathogen *Stagonosporopsis citrulli* from watermelon in Jilin province. Journal of Plant Protection, 2022, 49(6):1663-1672

[8] Tran T X P, Ngo T Q H, Tran D H. Biological control of gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* (Auersw.) on watermelon by *Bacillus* sp. strains. Legume Research, 2024, 47(6): 1052-1056

[9] Natarajan P, Rathnagiri A, Rivera-Burgos L A, Lopez-Ortiz C, Tomason Y, Padma Nimmakayala P, Sari N, Wehner T C, Levi A, Reddy U K. Exploring the genomic landscape of gummy stem blight resistance in watermelon through QTL-Seq. BMC Plant Biology, 2024, 24:1129

[10] Gimode W, Bao K, Fei Z, McGregor C. QTL associated with gummy stem blight resistance in watermelon. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134:573-584

[11] Ren R S, Xu J H, Zhang M, Liu G, Yao X F, Zhu L L, Hou Q. Identification and molecular mapping of a gummy stem blight resistance gene in wild watermelon (*Citrullus Amarus*) germplasm PI189225. Plant Disease, 2020, 104(1):16-24

[12] Lee E S, Kim D S, Kim SG, Huh Y C, Back C G, Lee Y R, Siddique M I, Han K, Lee H E, Lee J. QTL mapping for gummy stem blight resistance in watermelon (*Citrullus spp*). Plants, 2021, 10(3):500

[13] Hong J E, Hossain M R, Jung H J, Nou IS. QTL associated with Gummy Stem Blight (GSB) resistance in watermelon. BMC Genomics. 2022, 23(1):632

[14] Adams L, McGregor C. QTL associated with resistance to *Stagonosporopsis citrulli* in *Citrullus Amarus*. Scientific Reports, 2022, 12(1):19628

[15] Ren R S, Yang X P, Xu J H, Zhang K Y, Zhang M, Liu G, Yao X F, Lou L N, Xu J, Zhu L L, Hou Q. Genome-wide identification and analysis of promising GDSL-type lipases related to gummy stem blight resistance in watermelon (*Citrullus lanatus*). Scientia Horticulturae, 2021, 289:110461

[16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4):402-408

[17] Sowell G J. Additional source of resistance to gummy stem blight in watermelon. Plant Disease Reporter, 1975, 59: 413-415

[18] Gusmini G, Song R, Wehner T C. New sources of resistance to gummy stem blight in watermelon. Crop Science, 2005, 45(2):582-588

[19] Norton J DInheritance of resistance to gummy stem blight in watermelon. HortScience, 1979, 14(5):630-632

[20] Gusmini G, Rivera-Burgos L A, Wehner T C. Inheritance of resistance to gummy stem blight in watermelon. HortScience, 2017, 52(11):1477-1482

[21] Liu Y H, Khan A R, Azhar W, Wong C E, Li Y L, Huang Y, Cao X, Liu Z N, Gan Y B. Cys2/his2-type zinc finger proteins regulate plant growth and development. Critical Reviews in Plant Sciences, 2022, 41: 351-363

[22] Fu Y Q, Qiao Z S, Zhao Y M, Zhou J C, Huang X Y, Du C H, Sheng F, Du X Z. Identification of RAV transcription factors (B3-domain-containing) and functional analysis of OsRAV2 in rice blast and drought stress. Journal of Plant Physiology, 2025, 314:154605

[23] Rui P, Yang X, Xu S, Wang Z, Zhou X, Jiang L, Jiang T. FvZFP1 confers transgenic *Nicotiana benthamiana* resistance against plant pathogens and improves tolerance to abiotic stresses. Plant Science, 2022, 316:111176

[24] Wang Y F, Hu T, Li M X, Yin X D, Song L. Overexpression of the *NbZFP1* encoding a C3HC4-type zinc finger protein enhances antiviral activity of *Nicotiana benthamiana.* Gene, 2024, 908:148290

[25] Meng F W, Yang C, Cao J D, Chen H, Pang J H, Zhao Q Q, Wang Z Y, Fu Z Q, Liu J. A bHLH transcription activator regulates defense signaling by nucleo-cytosolic trafficking in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62 (10):1552-1573

[26] Zhou Y, Sun L Q, Wassan G M, He X, Shaban M, Zhang L, Zhu L F, Zhang X L. GbSOBIR1 confers *Verticillium* wilt resistance by phosphorylating the transcriptional factor GbbHLH171 in *Gossypium barbadense*. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(1):152-163

[27] Zhang C W, Jia X, Han X, Cheng Y, Jiao X C, Fan G Y, Ren T C, Ren X L, Cai Y Y, Zhang X M, Li L, Pang H G, Shang Z L. Comparison of tomato yellow leaf curl virus-induced gene expression pattern in tomato and tobacco plants. The Plant Pathology Journal, 2025, 41(3):293-310

[28] de Oliveira Silva A, Fernando Devasahayam B R , Aliyeva-Schnorr L, Glienke C, Deising, H B. The serine-threonine protein kinase Snf1 orchestrates the expression of plant cell wall-degrading enzymes and is required for full virulence of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*. Fungal Genetics and Biology, 2024, 171:103876

[29] 郭铭, 司二静, 王燕绣, 姚立蓉, 汪军成, 张宏, 李葆春, 孟亚雄, 马小乐, 王化俊. 泛素化调控植物免疫反应研究进展. 植物遗传资源学报, 2025, 26(08):1516-1530

Guo M, Si E J, Wang Y X, Yao L R, Wang J C, Zhang H, Li B C, Meng Y X, Ma X L, Wang H J. Advances in ubiquitination-mediated regulation of plant immune responses. Journal of Plant Genetic Resources, 2025, 26(8):1516-1530

[30] Ren T L, Qi W N, Wang D, Guan Y C, Jiang Y S, Du Q Z, Zhang D Q, Quan M Y. Calcium-dependent protein Kinases: Bridging growth and stress responses in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 2025, 228:110256