

马秀奇, 张晓娟, 孙晓敏, 等. 甘蓝型油菜 *P5CR* 同源基因的克隆表达及其多态性分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (6): 727–733.
MA X Q, ZHANG X J, SUN X M, et al. Cloning, Expression, and Polymorphism of Homologous *Brassica napus* *P5CR* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (6): 727–733.

甘蓝型油菜 *P5CR* 同源基因的克隆表达及其多态性分析

马秀奇¹, 张晓娟^{1*}, 孙晓敏², 陈 乔³, 张 羽¹, 何开罡¹, 权 莹¹, 宋建民⁴

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 汉中市农业技术推广与培训中心, 陕西 汉中 723001; 3. 汉中职业技术学院, 陕西 汉中 723001; 4. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘 要:【目的】克隆油菜菌核病抗性相关基因, 进一步为油菜抗病分子标记开发以及通过分子标记辅助育种途径选育抗菌核病油菜新品种提供理论基础。【方法】以高抗、高感菌核病油菜为研究材料, 对甘蓝型油菜 A03、C03 染色体上的 *P5CR* (Pyrroline-5-carboxylate reductase, 吡咯林-5-羧酸还原酶) 同源基因进行特异 PCR 扩增, 克隆和测序及表达分析。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列比对, 寻找抗、感材料中的差异 SNP 位点, 并分析这些位点与油菜菌核病抗性的关系。利用 qPCR 技术分析 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 同源基因在抗、感菌核病油菜材料中接种核盘菌前及接种后 6 h、12 h、24 h、48 h 的表达。【结果】C03 染色体上的 *P5CR* 同源基因全长 1457 bp, 该基因在抗、感菌核病油菜材料中共有 7 个 SNP 位点, 其中 3 个 SNP 位点可能与抗病性相关; A03 染色体上的 *P5CR* 同源基因全长 1526 bp, 在抗、感菌核病油菜材料中该基因共有 15 个 SNP 位点, 其中 2 个 SNP 位点可能与抗病性相关。A03 及 C03 染色体上的 *P5CR* 基因在抗病材料接种后 24 h 表达量显著升高。【结论】油菜 *P5CR* 基因上存在多个可能与菌核病抗性相关的位点且在抗病材料接种后表达升高, 表明 *P5CR* 可能参与油菜对菌核病的抗性反应。本研究为进一步揭示甘蓝型油菜菌核病抗病机理及油菜抗菌核病分子标记开发奠定基础。

关键词: *P5CR*; 菌核病; 甘蓝型油菜; 抗病性

中图分类号: S 562

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 06-0727-07

Cloning, Expression, and Polymorphism of Homologous *Brassica napus* *P5CR*

MA Xiuqi¹, ZHANG Xiaojuan^{1*}, SUN Xiaomin², CHEN Qiao³, ZHANG Yu¹,
HE Kaigang¹, QUAN Ying¹, SONG Jianmin⁴

(1. School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China;
2. Hanzhong Agricultural Technology Extension and Training Center, Hanzhong, Shaanxi 723001, China; 3. Hanzhong Vocational and Technical College, Hanzhong, Shaanxi 723001, China; 4. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biological Resources, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: 【Objective】The gene related to *Sclerotinia*-resistance in *Brassica napus* was cloned and studied to provide information for the development of disease-resistant rapeseed cultivars by means of molecular marker-assisted breeding.

【Method】Using the rapeseed plants known to be either highly resistant or highly susceptible to *sclerotinia* stem rot, the homologous *P5CR* (pyrroline-5-carboxylate reductase) on A03 and C03 chromosomes were amplified, cloned, sequenced, and expression analyzed. DNAMAN software was used to compare the sequencing results to locate the relevant SNP sites. Expressions of *P5CR* before and 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h after inoculation into rapeseed plants were detected by qPCR.

【Result】The *P5CR* on C03 chromosome was 1457 bp in length with 7 SNP loci, of which, 3 might be related to the disease resistance. The gene on A03 chromosome was 1526 bp in length with 15 SNP sites, of which, two might be associated with the disease resistance. The expressions of *P5CR* on A03 and C03 chromosomes significantly increased 24 h after inoculation.

【Conclusion】Multiple loci in the *P5CR* of *B. napus* could be associated with the plant resistance to *sclerotinia* stem rot. The significant increase on the gene expression after inoculation suggested a close relationship between *P5CR* and the disease

收稿日期: 2022-03-08 初稿; 2022-04-27 修改稿

作者简介: 马秀奇 (2000-), 男, 硕士研究生, 主要从事油菜分子遗传研究 (E-mail: mxq20000308@163.com)

* 通信作者: 张晓娟 (1982-), 女, 副教授, 博士, 主要从事油菜分子遗传研究 (E-mail: zxxj12162001@163.com)

基金项目: 陕西省科技计划项目 (2020NY-068); 陕西理工大学人才启动项目 (SLGRCQD2115); 陕西理工大学 2020 年大学生创新创业训练计划项目 (S202010720022); 陕西省教育厅科研项目 (11JS034)

resistance. Further investigation is needed to unveil the underline mechanism.

Key words: *P5CR*; sclerotinia stem rot; *Brassica napus*; disease resistance

0 引言

【研究意义】油菜作为重要的油料作物，是我国乃至世界范围内食用油供给的主要来源。油菜除了油用，还可作为蔬菜、饲料、观赏作物及蜜源，具有重要的经济价值。我国油菜种植面积及分布居油料作物之首^[1]。因此，油菜安全生产对国民经济意义重大。由真菌-核盘菌引起的菌核病给油菜生产带来严重威胁，引起油菜产量及品质大幅度降低^[2,3]。我国长江中下游地区气候湿润，加之近些年油菜种植密度增加，加重了该病害的发生^[4]。克隆油菜抗菌核病基因，研究油菜抗菌核病分子机理，对通过分子设计育种途径选育性状优良的抗病油菜新品种意义重大^[5]。【前人研究进展】吡咯林-5-羧酸还原酶（Pyrroline-5-carboxylate reductase, *P5CR*）是真核生物中重要的一种管家蛋白，催化脯氨酸生物合成的最后一步反应，负责在细胞质中将脯氨酸、精氨酸、鸟氨酸和谷氨酸中间代谢产物吡咯林-5-羧酸（ $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate, *P5C*）还原成为脯氨酸，在氨基酸代谢的调节中发挥重要作用。实验室前期通过大豆菌核病全基因组关联分析得出 *P5CR* 基因与菌核病抗性强关联^[6]，推测该基因可能与油菜菌核病抗性有关。Senthil-Kuma 等研究表明鸟氨酸氨基转移酶（ δ OAT）和脯氨酸脱氢酶（ProDH1 和 ProDH2）通过调控 *P5C* 代谢诱导的超敏反应进而参与非寄主抗性^[7]。周婉莹等对甘蓝型油菜 A10、C09 上的 *P5CR* 同源基因进行克隆及多态性分析，结果得出，A10 染色体中的 *P5CR* 同源基因上的多态性位点与菌核病抗性没有显著关联，C09 染色体上 *P5CR* 同源基因在感病材料中存在一段 A10 染色体上 *P5CR* 同源基因片段的插入，导致前者 ORF 改变，进而可能造成该基因抗病性丧失。推测 C09 染色体中的 *P5CR* 同源基因与油菜对菌核病的抗性相关^[8]。【本研究切入点】目前，关于 *P5CR* 基因与油菜抗菌核病关系研究报道较少。甘蓝型油菜 A03、C03 染色体上的 *P5CR* 同源基因与油菜菌核病抗性关系及抗性相关多态性位点尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究以对菌核病具有较好抗性的中油 821、沪 16 油菜以及感病油菜川秦 6R 及南 12R 为研究材料，设计特异引物，对甘蓝型油菜 C03、A03 染色体上的 *P5CR* 同源基因进行 PCR 扩增、克隆测序及表达研究，分析 *P5CR* 基因中的 SNP 位点及其与油菜菌核病抗性

的相关性，为油菜菌核病抗性基因克隆、油菜抗菌核病机制揭示及通过分子标记辅助育种选育抗病油菜新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选用高抗、高感菌核病油菜为试验材料（表 1），抗病材料记为 R，感病材料记为 S。油菜材料于 2021 年种植于汉中勉县黄沙镇试验田（106°7'91.26"E，33°13'77.72"N）。大肠杆菌 DH5 α （TaKaRa，中国大连）由本实验室保存。核盘菌（*Sclerotinia sclerotiorum*）由汉中市农业技术推广与培训中心惠赠。TransStart fast Pfu fly DNA polymerase（全式金公司，北京）、植物总 RNA 提取试剂盒（庄萌生物，北京）、EvoM-MLV 反转录试剂盒 II（艾科瑞生物，湖南）、CTAB、琼脂糖、异丙醇、无水乙醇、Goldview 核酸染料购自西安沃尔森公司。

表 1 油菜样品的编号、品种名称和表现型
Table 1 Codes, variety names, and phenotypes of *B. napus* samples

编号 Number	样本 Sample	抗性 Resistance
Y4	川秦6R Chuanqin 6R	S
Y7	南12R Nan 12R	S
Y8	中油821 Zhongyou 821	R
Y12	沪16 Hu 16	R

1.2 油菜基因组 DNA 提取及检测

采集供试油菜材料幼嫩叶片。采取改良 CTAB 法^[9]提取油菜基因组 DNA。通过 1% 的琼脂糖凝胶检测基因组 DNA 完整性。

1.3 引物设计、PCR 扩增及克隆测序

从拟南芥基因组数据库（<https://www.arabidopsis.org/>）中下载拟南芥 *P5CR* 基因（*AT5G14800*）蛋白序列，通过 NCBI 数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>）中的 Blast 软件，在甘蓝型油菜数据库中进行同源基因比对（比对指标为序列覆盖度达 90% 以上，同源性大于 80%，e-value 小于 1e-5）。针对甘蓝型油菜 C03 及 A03 染色体上 *P5CR* 同源基因设计特异引物（表 2）。引物由西安沃尔森科技有限公司合成。

表 2 甘蓝型油菜 C03 及 A03 染色体上 *P5CR* 同源基因引物序列信息

Table 2 Primer sequence of *P5CR* on chromosomes C03 and A03 of *B. napus*

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	产物大小 Product length/bp
P5CRC03F2	GCCTTGTAAGCGAATGG	1 879
P5CRC03R2	TCGTACCCTGTGACGATTCA	
P5CRA03F1	TGTGTTGGGCCCTTTGTAAAACAAT	1 977
P5CRA03R1	TGCAATTGGTCGTACCCTTTAAC	
qP5CR A03 F1	GGAAGTGGACCAGCATACG	197
qP5CR A03 R1	GCTATTGTAGTCCCGCCA	
qP5CR C03 F1	TCGGAACAGCGCAAGTGA	257
qP5CR C03R1	CTTCCCTGTCTTGCTCACCAT	
Ubc21F2	TCCCGAACCGTATCCTCTGC	156
Ubc21R2	GGTTACCTGAGTCGCAGTTGAG	

PCR 反应体系共 25 μL ，其中 TransStart fast Pfu fly DNA polymerase 0.5 μL ， $5\times$ TransStrat Fast Pfu Fly buffer 5 μL ，2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL ，50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 0.5 μL ，ddH₂O 17 μL 。PCR 预变性采取 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min，接着 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min，然后 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min，循环 35 次，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后胶回收目标产物，并与 PMD19-T 载体（TaKaRa）连接，转化大肠杆菌 DH5 α ，将转化体系涂布于 LB 固体培养基上（含 IPTG 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，X-Gal 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ）37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜，进行菌落 PCR 鉴定，将阳性克隆送测序。

1.4 序列分析

高抗、高感菌核病油菜材料 *P5CR* 同源基因测序结果通过 DNASTAR Lasergene 中的 Megalign 软件进行序列比对，分析抗、感材料之间的多态性位点。同时，从 NCBI 网站中甘蓝型油菜数据库中下载甘蓝型油菜 C03 及 A03 染色体上 *P5CR* 基因的参考序列，与测序结果进行多重序列比对。利用 DNAMAN 软件将 *P5CR* 基因翻译成蛋白序列，并对抗、感油菜材料中 *P5CR* 基因编码蛋白序列进行比对分析。

1.5 核盘菌培养、接种及样品采集

将核盘菌菌核置于马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基上 22 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 4 d。接着，将边缘的菌丝转移至新的 PDA 培养基上生长。2 d 后，菌丝体直径约为 6 mm，用于接种试验。于油菜初花期，采集抗菌核病油菜材料中油 821 及感病材料南 12R 相同部位相同大小的叶片，通过叶片离体接种法对其进行核

盘菌接种^[10]。分别采集接种前（即接种 0 h）及接种后 6 h、12 h、24 h 及 48 h 抗、感菌核病油菜叶片，迅速放入液氮中速冻后保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，每个样品取 3 个重复。

1.6 RNA 提取及反转录

总 RNA 提取采用植物总 RNA 试剂盒提取（提取步骤参照试剂盒说明书），通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，采用 Nanodrop 核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度。采取 Evo M-MLV 反转录试剂盒 II 进行反转录。用 ddH₂O 将合成的 cDNA 稀释 10 倍，冷冻保存备用。

1.7 qPCR 检测 *P5CR* 基因表达

根据 A03 及 C03 上 *P5CR* 同源基因序列分别设计特异引物，通过定量 PCR 分析 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 基因在抗、感菌核病油菜材料接种前及接种后 6 h、12 h、24 h、48 h 的表达量。本研究中的内参基因为 *Ubc21*。*P5CR* 基因及内参引物序列信息见表 2。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 同源基因的扩增

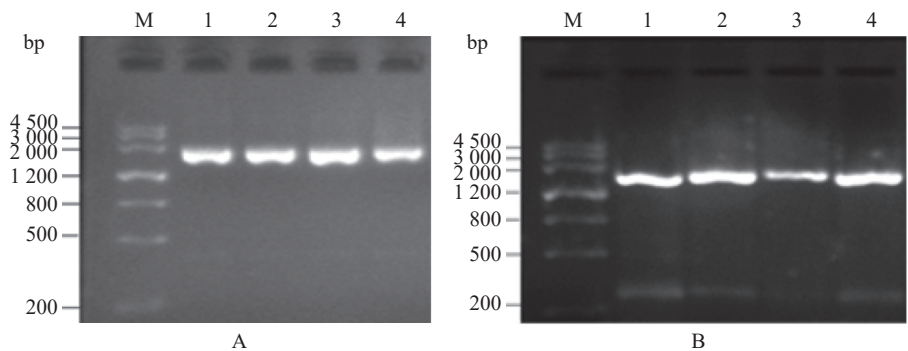
将拟南芥 *P5CR* 基因在甘蓝型油菜基因组数据库中比对，共得到 4 个 *P5CR* 同源基因，分别位于 A10、C09、C03 及 A03 染色体上（基因序列号分别为 106372121、106416421、106417090、106431715）。课题组前期已对 A10、C09 染色体上 *P5CR* 同源基因进行了克隆^[8]，本研究对 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 基因进行克隆及序列分析。

在抗、感菌核病油菜材料中，利用引物 P5CRA03F1/P5CRA03R1 对 A03 染色体上的 *P5CR* 同源基因进行扩增，得到一条 2000 bp 左右的特异性条带，与预期条带大小（1977 bp）相符（图 1A）。接着，对 PCR 产物进行胶回收、克隆及测序。

利用引物 P5CRC03F2/P5CRC03R2 对抗、感菌核病油菜材料 C03 染色体上 *P5CR* 同源基因进行扩增，扩增产物为大小介于 1200~2000 bp 的特异性条带（图 1B），与本研究预期扩增产物大小（1889 bp）相符。对 PCR 产物进行胶回收、克隆测序。

2.2 抗、感菌核病油菜 *P5CR* 基因多态性分析

抗、感菌核病油菜材料 A03 染色体上 *P5CR* 基因扩增产物经克隆测序、序列分析得出，该基因全长 1526 bp，有 6 个内含子，7 个外显子。该基因在抗、感菌核病油菜材料中共存在 15 个多态性位点，分别位于 A03 染色体上 *P5CR* 同源基因的 21、34、70、130、153、234、235、580、631、736、766、803、841、1546



A、B 分别为 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 基因扩增电泳结果。Marker 各条带分子量见图左侧标注。M, Marker III; 1, 川秦 6R; 2, 南 12R; 3, 中油 821; 4, 沪 16。

A & B: Amplified electrophoretic diagram of *P5CR*s on chromosome A03 and C03, respectively. Molecular weight of band of marker shown on left. M: Marker III; 1: Chuanqin 6R; 2: Nan 12R; 3: Zhongyou 821; 4: Hu 16.

图 1 甘蓝型油菜 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 同源基因扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic map of amplified products of *P5CR* on chromosome A03 and C03 of *B. napus*

及 1574 位。其中，234 位在感病油菜材料中为 C、与参考基因序列一致，在抗病油菜中突变为 T。推测在抗病油菜材料中为 A，235 位在感病油菜中为 C，这 2 个多态性位点与油菜菌核病抗性相关（图 2）。

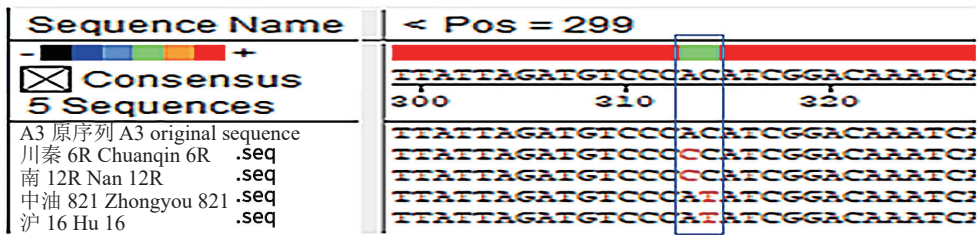


图 2 甘蓝型油菜 A03 染色体上 *P5CR* 基因与菌核病抗性相关的多态性位点

Fig. 2 Polymorphic sites of *P5CR* on A03 chromosome of *B. napus* related to *Sclerotinia*-resistance

抗、感菌核病油菜材料 C03 染色体上 *P5CR* 基因扩增产物经克隆测序、序列分析得出，该基因全长 1457 bp，有 6 个内含子，7 个外显子。抗、感材料中该基因共存在 7 个多态性位点，分别位于该基因的 564、579、636、671、673、676、679 位。其中 3 个多态性位点与材料的抗、感性状相关（图 3），即抗病材料中该基因 564、636 及 679 位由 C 突变为 T，推测这三个位点与油菜抗病性相关。

A03 染色体上 *P5CR* 基因编码蛋白序列分析得出，该基因编码蛋白质含 276 个氨基酸。在抗、感菌核病油菜中存在多态性的位点 234 及 235 均位于该基因第一个内含子中，不引起编码氨基酸序列改变。抗、感菌核病油菜材料 C03 染色体上 *P5CR* 基因编码蛋白序列分析得出，该基因编码蛋白质含 144 个氨基酸。分析抗、感材料中可能与油菜菌核病抗性相关的位点得出，抗性材料的 *P5CR* 基因 564 位 SNP 为同义突变，不引起编码氨基酸改变，其余两个 SNP 位点（636 及 679 位）位于内含子中，不编码蛋白质。

2.3 qPCR 分析抗、感菌核病油菜中 *P5CR* 基因表达

为进一步分析 *P5CR* 基因是否参与油菜对菌核病的抗性，通过 qPCR 分析 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 基因在抗、感菌核病油菜材料中接种核盘菌前及接种后不同时间的表达。结果显示，A03 上的 *P5CR* 基因在接种前后的抗、感菌核病油菜材料中表达模式不同。抗病油菜材料中，A03 上的 *P5CR* 基因在接种前后变化明显，在接种后 24 h 该基因的表达量最高，达到未接种时的 2 倍多。感病材料中，A03 上的 *P5CR* 基因在接种前后表达量差异不大（图 4A）。C03 染色体上的 *P5CR* 基因在接种前后抗、感菌核病油菜材料中同样存在不同的表达模式，其在抗病材料中接种后 24 h 表达量最高，为未接种时的 3 倍多。感病材料中，C03 染色体上的 *P5CR* 基因在接种后 6 h、12 h 表达量相对于未接种时略有所提高（图 4B）。综上，A03 及 C03 染色体上的 *P5CR* 基因在抗病材料接种后 24 h 表达量显著升高，说明该基因可能参与了油菜对菌核病的抗性。感病材料中，C03 染色体

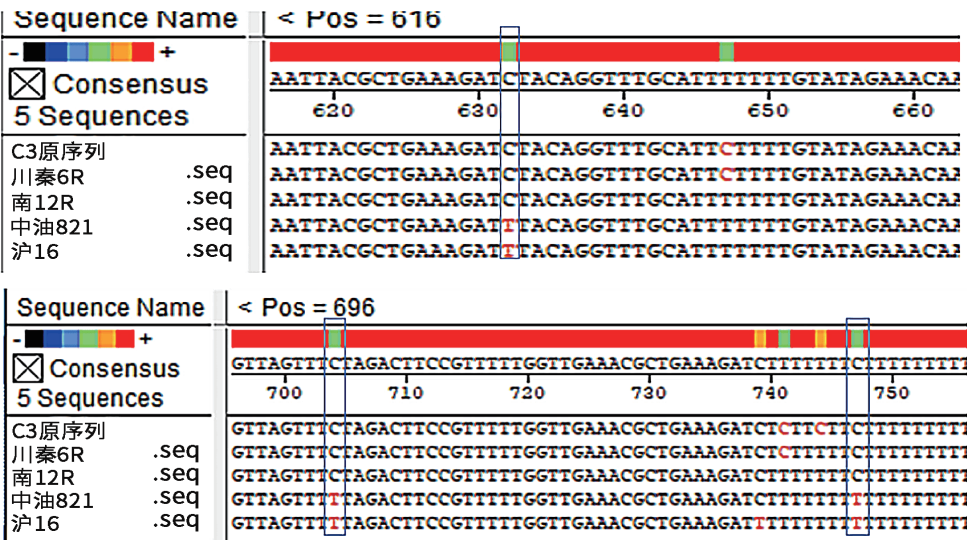
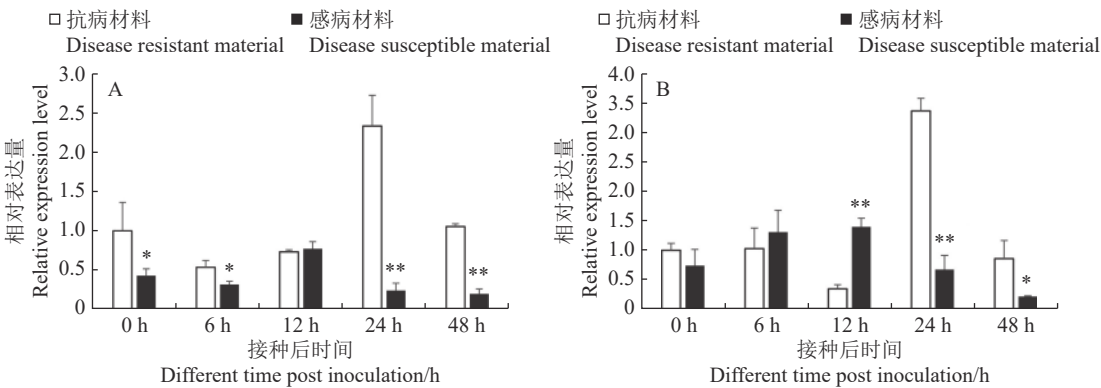


图 3 甘蓝型油菜 C03 染色体上 *P5CR* 基因多态性分析

Fig. 3 Polymorphism of *P5CR* on C03 chromosome of *B. napus*

上的 *P5CR* 基因虽然在接种后 6 h、12 h 表达量相对于未接种时略有所提高，但整体变化不大，导致其

对菌核病未能表现出较好的抗性。



A、B 分别为 A03、C03 染色体上 *P5CR* 基因的 qPCR 结果图。对同一时间不同材料中 *P5CR* 基因的表达量进行差异性分析（*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ）。

A & B: qPCR data on *P5CRs* on A03 and C03 chromosomes, respectively. Expressions of *P5CR* gene in different materials at the same time (* indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$).

图 4 qPCR 分析 A03 及 C03 染色体上 *P5CR* 基因在抗、感菌核病油菜材料中的表达结果

Fig. 4 Expressions of *P5CRs* on A03 and C03 chromosomes in sclerotia-resistant and susceptible rapeseed materials detected by qPCR

3 讨论

油菜是世界范围内广泛种植的油料作物。油菜菌核病是世界范围内尤其是温带地区普遍发生的一种严重的油菜病害。我国的东南沿海地区及长江流域，该病的田间发病率较高，导致油菜产量降低 10%~30%，甚至高达 80%，给油菜生产造成很大损失^[11]。近年来，由于油菜机械化高密度种植，该病有不断加重的趋势。克隆油菜抗菌核病基因，开发抗病基因分子标记，通过分子标记辅助育种方式选育抗病油菜新品种是防治油菜菌核病最根本有效的途径。

P5CR 是脯氨酸生物合成途径的关键酶。脯氨酸作为一种抗渗透胁迫调节剂，在植物渗透调节中发挥重要作用。研究表明，脯氨酸的积累是植物对各种胁迫（包括盐和渗透胁迫）的普遍反应，脯氨酸积累量与植物的胁迫耐受能力呈正相关^[12,13]。首个 *P5CR* 基因在大豆中被克隆到，该基因全长 1.2 kb，编码蛋白为单体蛋白^[14]。之后相继在拟南芥、水稻、黑麦草、木薯等植物中分离到 *P5CR* 基因^[15-18]。付莉莉等（2016）克隆了木薯中 *P5CR* 基因，对该基因在干旱胁迫下的表达分析表明，*P5CR* 基因表达受胁迫调控。*P5CR* 基因还响应低温、盐和 ABA 等胁

迫条件^[19]。在低温胁迫条件下, *AtP5CR* 的表达量显著提高^[20]。拟南芥中, *P5CR* 基因表达受盐胁迫调控^[21]。Cao 等(2015)克隆了黑麦草(*Lolium perenne* L.) *P5CR* 基因, 其全长 1047 bp, 受盐、PEG、低温和 ABA 处理诱导^[15]。

目前, 关于 *P5CR* 基因与植物抗病性的研究报道较少。甘蓝型油菜基因组中共有 4 个 *P5CR* 同源基因, 课题组前期克隆了 C09、A10 上 *P5CR* 同源基因。本研究对 C03、A03 染色体上的 *P5CR* 同源基因进行克隆测序及多态性分析, 研究得出甘蓝型油菜 C03 染色体上 *P5CR* 同源基因全长 1457 bp, 抗、感油菜材料中, C03 染色体上 *P5CR* 同源基因共存在 7 个多态性位点, 其中 3 个多态性位点(564、636 及 679 位)推测与油菜抗病性相关。A03 染色体上的 *P5CR* 同源基因全长 1526 bp, 其在抗、感菌核病油菜材料中共存在 15 个多态性位点, 其中, 234、235 位 2 个多态性位点推测与油菜菌核病抗性相关。进一步, *P5CR* 基因编码蛋白质预测分析显示, 抗性材料中 C03 染色体上 *P5CR* 基因 564 位 SNP 为同义突变, 不引起编码氨基酸改变, 其余两个 SNP 位点(636 及 679 位)位于内含子中。A03 上与菌核病抗性相关的两个位点 234、235 位均位于内含子中。通过 qPCR 分析 A03、C03 染色体上 *P5CR* 在抗、感油菜接种前及接种后不同时间的表达量。结果显示, 在抗病材料中, A03 及 C03 染色体上的 *P5CR* 基因在接种后 24 h 表达量均明显提高, 说明 A03、C03 染色体上的 *P5CR* 基因均可能与油菜菌核病抗性相关。结合基因测序及定量 PCR 结果, 本研究得出 *P5CR* 基因可能是通过基因表达水平的变化参与油菜抗菌核病反应。下一步, 研究将扩大样本量, 筛选出更多的高抗、高感菌核病油菜材料, 对 *P5CR* 基因进行克隆及测序, 从而进一步验证抗、感菌核病油菜材料中 *P5CR* 基因上的多态性位点与油菜菌核病抗性相关性。同时, 研究将通过转基因、RNA 干扰等实验对 *P5CR* 基因进行功能验证。

本研究为揭示油菜抗菌核病分子机理、油菜抗菌核病分子标记开发及油菜抗病新品种选育奠定基础。

参考文献:

- [1] 周颖. 中国冬油菜籽供给反应模型及实证分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [2] ZHOU Y. Study on the supply response model of Chinese winter rapeseed and its empirical analysis[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [3] WANG Z R, WAN L L, ZHANG X H, et al. Interaction between *Brassica napus* polygalacturonase inhibition proteins and *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase: Implications for rapeseed resistance to fungal infection [J]. *Planta*, 2021, 253 (2): 34.
- [4] 雷蕾, 梁龙兵, 秦信蓉, 等. 抗菌核病甘蓝型油菜种质的筛选与鉴定 [J]. 种子, 2020, 39 (3): 29–33.
- [5] LEI L, LIANG L B, QIN X R, et al. Screening and identification of *Sclerotinia*-resistant germplasm of *Brassica napus* L [J]. *Seed*, 2020, 39 (3): 29–33. (in Chinese)
- [6] WU J, CAI G Q, TU J Y, et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia* stem rot and BnaC. IGMT5. a as a candidate gene of the major resistant QTL SRC6 in *Brassica napus* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e67740.
- [7] 张羽, FRANCOIS BELZILE. 大豆抗菌核病的全基因组关联研究 [J]. 华北农学报, 2020, 35 (1): 205–213.
- [8] ZHANG Y, BELZILE F. Genome-wide association study for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance of soybean [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35 (1): 205–213. (in Chinese)
- [9] SENTHIL-KUMAR M, MYSORE K S. Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35 (7): 1329–1343.
- [10] 周婉莹, 张晓娟, 孙晓敏, 等. 油菜P5CR基因克隆及其多态性分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39 (12): 5678–5683.
- [11] ZHOU W Y, ZHANG X J, SUN X M, et al. Cloning and polymorphism analysis of P5CR in rapeseed(*B. napus*) [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39 (12): 5678–5683. (in Chinese)
- [12] 蓝碧秀, 王凛, 吴子恺, 等. 利用改良CTAB法快速微量提取微胚乳玉米基因组DNA [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34 (1): 190–194.
- [13] LAN B X, WANG L, WU Z K, et al. Rapid miniprep extraction of genomic DNA from micro-endosperm maize with modified CTAB method [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34 (1): 190–194. (in Chinese)
- [14] MEI J, QIAN L, DISI J O, et al. Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* species with emphasis on *B. oleracea* [J]. *Euphytica*, 2011, 177 (3): 393–399.
- [15] DING L N, LI M, GUO X J, et al. *Arabidopsis* GDSL1 overexpression enhances rapeseed *Sclerotinia sclerotiorum* resistance and the functional identification of its homolog in *Brassica napus* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (5): 1255–1270.
- [16] LEBRETON S, CABASSA-HOURTON C, SAVOURÉ A, et al. Appropriate activity assays are crucial for the specific determination of proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase activities [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 602939.
- [17] FUNCK D, WINTER G, BAUMGARTEN L, et al. Requirement of proline synthesis during *Arabidopsis* reproductive development [J].

- BMC Plant Biology*, 2012, 12: 191.
- [14] DELAUNEY A J, VERMA D P. A soybean gene encoding delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated [J]. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1990, 221 (3): 299–305.
- [15] CAO L, WEI S Q, HAN L, et al. Gene cloning and expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase gene of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2015, 1 (2): 113–120.
- [16] SRIPINYOWANICH S, KLOMSAKUL P, BOONBURAPONG B, et al. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP₅CS₁ and OsP5CR gene expression during salt stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 86: 94–105.
- [17] 王丽媛, 丁国华, 黎莉. 脯氨酸代谢的研究进展 [J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2010, 26 (2): 84–89.
- WANG L Y, DING G H, LI L. Progress in synthesis and metabolism of proline [J]. *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 2010, 26 (2): 84–89. (in Chinese)
- [18] MOLINARI H B C, MARUR C J, DAROS E, et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress [J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 130 (2): 218–229.
- [19] 付莉莉, 韩冰莹, 谭德冠, 等. 木薯MeP5CS和MeP5CR基因克隆及其干旱胁迫下的表达分析 [J]. *湖北农业科学*, 2016, 55 (15): 4024–4028.
- FU L L, HAN B Y, TAN D G, et al. Gene cloning of me *P5CS* and me *P5CR* in cassava and their expression analysis under drought stress [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55 (15): 4024–4028. (in Chinese)
- [20] XUE Y, PENG R H, XIONG A S, et al. Yeast heat-shock protein gene *HSP26* enhances freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166 (8): 844–850.
- [21] DE RONDE J A, CRESS W A, KRÜGER G H J, et al. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* *P5CR* gene, during heat and drought stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161 (11): 1211–1224.

(责任编辑: 于洪杰)