

甘蓝 NLR 家族全基因组鉴定、进化分析及在不同病害胁迫下的表达分析

邢苗苗, 刘 星, 孔枳枳, 杨丽梅, 庄 木, 张扬勇, 王 勇, 方智远*, 吕红豪*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘 要: 从全基因组水平鉴定了 87 个甘蓝 NLR 基因家族成员, 并对其进行了进化分析和表达分析。基因结构和 motif 组成分析表明, 87 个基因可分为 5 个亚类: NB-LRR (34 个)、CC-NB-LRR (6 个)、TIR-NB-LRR (45 个)、RPW8-NB-LRR (1 个) 和 CC-TIR-NB-LRR (1 个); 染色体定位分析表明, 该家族基因在 9 条染色体上呈不均匀地单一或成簇分布; 进化分析表明, 甘蓝 35 个 NLR 基因与白菜 NLR 基因存在同源关系, 其余 52 个基因为甘蓝特有; 利用转录组数据分析了参与甘蓝枯萎病、黑腐病、根肿病、霜霉病、白粉病等抗性应答相关的差异表达基因, 发现参与不同病害胁迫抗性应答反应的 NLR 基因差异较大, 这可能与不同 NLR 基因对不同病原特异性识别有关。

关键词: 甘蓝; NLR 家族基因; 抗病; 表达分析

中图分类号: S 635

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 04-0723-15

Whole-genome Identification and Evolutionary Analysis of Cabbage NLR Family Genes and Their Expression Profiles in Response to Various Disease Stress

XING Miaomiao, LIU Xing, KONG Congcong, YANG Limei, ZHUANG Mu, ZHANG Yangyong, WANG Yong, FANG Zhiyuan*, and LÜ Honghao*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

Abstract: In this study, based on the reference genome we identified 87 NLR family genes in *Brassica oleracea* and performed evolution, comparative, and expression analysis. Gene structures and motif composition analysis indicated that the 87 NLR genes were assigned to five subclasses: NB-LRR (34), CC-NB-LRR(6), TIR-NB-LRR(45), RPW8-NB-LRR(1) and CC-TIR-NB-LRR(1). Chromosome location analysis revealed that the NLR genes were unevenly distributed in single or in clusters on nine chromosomes. Evolution analysis showed that 35 NLR genes were homologous with Chinese cabbage, while the other 52 genes were specific to cabbage. Expression profiling of NLR genes identified several

收稿日期: 2018-11-26; **修回日期:** 2019-04-02

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0101804); 国家自然科学基金项目 (31701927); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (Y2018YJ04); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (nycyt-35-gw01)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fangzhiyuan@caas.cn, lvhonghao@caas.cn)

differential expression genes related to resistance to *Fusarium* wilt, black rot, clubroot, downy mildew and powdery mildew in *Brassica oleracea*, and results showed that expression of NLR genes participating in resistance response to various diseases exhibited significant difference, which may indicate the specific recognition of NLR genes for diverse pathogens.

Keywords: *Brassica oleracea*; NLR family gene; resistance; expression profiling

R 基因 (Resistant gene) 在调控植物抗性应答反应中起关键作用 (van der Hoorn & Kamoun, 2008)。常见的 R 基因类型有核苷酸结合位点-富亮氨酸重复 (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat, NB-LRR, 简称 NLR)、激酶 (kinase)、富亮氨酸重复-激酶 (LRR kinase) 类型、胞外富亮氨酸重复 (extracellular LRRs, eLRRs) 类型等, 其中 NLR 约占 80%, 根据其 N-端结构 NLR 又可分为卷曲螺旋 CC (Coiled coil)-NB-LRR 类型和果蝇 Toll 蛋白/白细胞介素受体 1 (Toll Interleukin 1 Receptor, TIR)-NB-LRR, 以及缺少 N 端结构域的 NB-LRR 等亚类 (Jones & Dangl, 2006)。

鉴定植物中 NLR 基因对于抗病品种的选育及抗性机制的研究具有重要的作用。根据基因对基因假说, 植物中 NLR 基因可识别微生物效应物, 从而启动植物抗病反应。NLR 基因是抗病基因中最大的一类, 并且在保护植物免受病原体侵害方面发挥着关键作用 (van der Hoorn & Kamoun, 2008)。鉴定、分离 R 基因是探索其作用机制和将其应用于抗病育种的前提条件。至今为止, 已通过图位克隆、生物信息学等手段鉴定了 200 个左右的 R 基因, 其中多数为 NLR 类型。如烟草抗花叶病毒基因 *N* (TIR-NBS-LRR 类型) (Whitham et al., 1994)、番茄抗枯萎病基因 *I-2* (CC-NBS-LRR 类型) (Ori et al., 1997)、甜瓜抗枯萎病基因 *Fom-2* (NB-LRR 类型) (Joobeur et al., 2004)、白菜抗根肿病基因 *CRa*, *Crr1a* 和 *CRb* (TIR-NBS-LRR 类型) (Ueno et al., 2012; Hatakeyama et al., 2013; 张腾, 2015)、甘蓝抗枯萎病基因 *FOCI* (TIR-NBS-LRR 类型) (Pu et al., 2012; Lv et al., 2014) 等。目前在多个物种的全基因组范围内鉴定分析了 NBS 家族基因, 如番茄、拟南芥、白菜、甘蓝 (Meyers et al., 2003; Mun et al., 2009; Yu et al., 2014), 这些研究为揭示植物抗病机理和选育抗病品种提供了基础 (Dangl et al., 2013)。

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 简称甘蓝, 是世界各地广泛种植的十字花科芸薹属蔬菜作物, 在中国的年栽培面积已达到 90 万 hm^2 (方智远, 2008)。近年来, 随着栽培面积的逐渐增加和栽培方式的变化 (如高密度、连作等), 甘蓝枯萎病、黑腐病、根肿病等病害也日趋严重, 迫切需要培育抗病品种 (李明远 等, 2006; Jensen et al., 2010; Liu et al., 2017a; 孔枏枏 等, 2018)。基于已公布的甘蓝基因组, 本研究中拟利用生物信息学和组学分析等手段, 从甘蓝全基因组范围鉴定 NLR 基因家族成员, 研究其结构、进化等, 并在多种病害相关转录组中研究其表达特性, 以期为这些基因分子机制的研究以及在抗病育种中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 转录组数据

本试验于 2017 年 9—11 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所进行。

枯萎病接种参考吕红豪等 (2011) 的方法, 采用浸根法。菌液制备: 用 CM (complete medium) 液体培养基摇菌 (28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、72 h), 4 层纱布过滤除去菌丝后调孢子浓度至 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。接种: 将三叶期甘蓝幼苗拔起洗掉根部泥土, 在孢子悬浮液中浸根 15 min, 然后将幼苗移栽

到装有灭菌土的培养钵中, 于温室培养 (白天 28 °C, 夜间 23 °C)。分别取接菌后 3 和 6 d 的抗病材料 ‘96-100’ 的根样品 (R3、R6) 及感病材料 ‘01-20’ 的根样品 (S3、S6) (表 1)。

黑腐病接种参考孔枳枳等 (2018) 的方法, 采用幼苗期喷雾法, 制备黑腐病菌液: 用营养肉汤培养基 (Nutrient broth medium, NBM) 摇菌 (28 °C、200 r · min⁻¹、24 h), 无菌水调至浓度 1 × 10⁸ cfu · mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0.2) 备用。接种: 将长至 4 ~ 6 片真叶的幼苗 (约苗龄 30 d) 移入鉴定室内, 浇透水并盖塑料膜保湿 12 ~ 24 h (15 ~ 20 °C), 第 2 天早上用医用喉头喷雾器将菌液均匀喷洒到植株叶片上, 以叶片无液滴滴落为度。接种后继续保湿, 24 h 后除去薄膜, 于 20 ~ 25 °C 室温下培养。接种 11 d 后, 取黑腐病抗性材料 ‘20-2-5’ 的发病叶和正常叶 (KB2-11k、KB2-11g) 及感病材料 ‘01-20’ 的发病叶和正常叶 (KB7-11k、KB7-11g) (表 1)。

调查结球期甘蓝发病情况, 分别取结荚期 ‘D157’ 的白粉病发病叶 (QBF_S) 和正常叶 (QBF_R), 取结球期 ‘01-20’ 的霜霉病叶 (SMB) 和正常叶 (120-WY), 取结球期 ‘01-20’ 的黑斑病叶 (BR) 和正常叶 (120-QY)。

表 1 本研究中用到的转录组信息
Table 1 Transcriptome information used in this study

转录组数据来源 Source of transcriptome data	病害名称 Disease name	取样时期 Sampling time	取样部位 Different analysis groups	样品名称 Sample name
本研究 This research	枯萎病 Fusarium wilt	接种后 3 d 和 6 d 3 d and 6 d after inoculation	抗/感材料的根 Root of resistant/susceptible varieties	R3、R6、S3、S6
	黑腐病 Black rot	接种后 11 d 11 d after inoculation	抗/感材料的发病和正常叶片 Disease and undiseased leaves of resistant/susceptible varieties	KB2-11K、KB2-11g、KB7-11K、KB7-11g
	白粉病 Powdery mildew	结荚期 Pod bearing period	发病/正常叶片 Diseased/undiseased leaf	QBF_S、QBF_R
	霜霉病 Downy mildew	结球期 Heading stage	发病/正常叶片 Diseased/undiseased leaf	SMB、120-WY
	黑斑病 Black spot	结球期 Heading stage	发病/正常叶片 Diseased/undiseased leaf	BR、120-QY
	NCBI (SRR955313/14)	根肿病 Clubroot		抗/感材料的叶片 Leaf of resistant/susceptible varieties

1.2 甘蓝 NLR 家族基因成员的全基因组鉴定

所有与甘蓝基因组数据相关的文件在甘蓝数据库中下载 (<http://www.ocri-genomics.org/bolbase/index.html>)。用 HMM (hidden markov model, 隐马尔科夫模型) HMMER 3.0 对甘蓝的蛋白数据进行扫描 (NB-ARC PF00931) (<http://Pfam.sanger.ac.uk>) (Punta et al., 2012), 根据 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-20}$ 进行初步筛选。获取第 1 部分候选基因, 提取其蛋白序列, 利用 HMMER 3.0 进行本物种特有的隐马尔科夫模型建立。建立完成后再次进行扫描, 根据 $E\text{-value} < 0.01$ 进行初步筛选, 获取候选基因。同时利用 TIR (PF01582)、RPW8 (PF05659) 和 LRR (PF00560、PF07723、PF07725 和 PF12799) 6 个模型对这些蛋白的其他结构域进行分析扫描, 获取初步 NLR 候选基因并根据结构域进行分类。从 NCBI 下载植物的 NLR 蛋白序列作为 query (blast 使用序列), 同时利用蛋白序列作为库文件进行 BLASTP 比对。对结果进行筛选, 获取第 2 部分候选基因, 筛选标准为 E 值 $< 10e^{-10}$, 比对长度 > 100 。将以上两部分候选基因合并去重复, 利用 NCBI-CDD search (NCBI-CDD domain 分析) 扫描候选基因的蛋白序列, 根据结构域进一步确定家族成员, 根据其在染色体上的位置进行命名 (家族

成员命名)。

采用同样的方法预测出大白菜 (<http://brassicadb.org/>) NLR 基因并用于进化分析。

1.3 甘蓝 NLR 家族基因染色体定位和复制分析

分别从 Bolbase (Yu et al., 2013) 和 BRAD (Cheng et al., 2011) 数据库下载蛋白序列 GFF (general feature format) 文件, 获得 NLR 基因在甘蓝和白菜染色体上的物理位置, 绘制 NLR 基因在染色体上的分布图 (Ferraiolo et al., 2003), 用 BLAST 程序 (Altschul et al., 1997) 鉴定串联复制基因, 筛选条件为 E 值 $\leq 1e^{-20}$ 。

1.4 甘蓝 NLR 家族基因的 motif 分析和结构分析

利用 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme3/meme.html>) 进行家族基因的分析, 设定 motif 最大数为 20, motif 最宽 ≥ 50 。用 InterProScan 在 InterPro 数据库对 MEME motifs 进行搜索 (Quevillon et al., 2005)。利用 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 根据基因组注释数据进行家族基因的基因结构分析, 并结合进化树进行作图。

1.5 甘蓝 NLR 家族基因的同源分析

利用 MCscanX 软件 (Tang et al., 2008) 并根据基因 CDS 序列相似性 Blast 查找串联重复和加倍基因 (比对长度 > 两条序列中最长的 75%, 对齐序列相似性 > 75% 的同源序列), 得到的串联重复和加倍基因根据染色体文件利用 circos 软件绘制圈图 (Krzywinski et al., 2009)。利用 DNASP v5 (Rozas et al., 2003) 计算串联基因的非同义突变数 (Ka) 和同义突变数 (Ks), 并计算 Ka/Ks 比值以推论选择模式及复制事件的时间。根据每年每同义突变位点的 Ks 值换成百万年复制时间 (T), 公式为 $T = Ks/2\lambda \times 10^{-6}$ Mya, 其中 $\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$ (Gaut et al., 1996)。

1.6 甘蓝 NLR 家族基因的进化分析

根据家族基因的蛋白序列中的保守区域, 利用 Clustal W (Thompson et al., 1994) 进行联配, 同时利用 MEGA (Tamura et al., 2011) 根据联配结果进行 NJ (Neighbor join) 进化树作图 (bootstrap = 1 000), 并结合白菜的数据进行进化树分析。

1.7 甘蓝 NLR 家族基因的表达分析

根据转录组结果找到所有基因的表达量值即 FPKM, 筛选出 NBS 基因的 FPKM。删除表达量在所有样品中均为 0 的基因, 并利用 heatmap 绘制 FPKM 聚类热图 (Eisen et al., 1998)。

1.8 相关 NLR 基因的 qRT-PCR 验证分析

为了验证转录组数据中分析的差异表达基因, 随机挑选基因做 qRT-PCR 分析, 取甘蓝叶片提取 RNA, 每基因 3 个生物学重复, 重复 3 次。引物用 primer 3 在线设计 (<http://primer3.ut.ee/>), 内参基因为甘蓝 *actin*, RNA 提取试剂盒为 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), 反转录试剂盒为 PrimeScript RT reagent Kit with GDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa), 荧光定量试剂盒为 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)。荧光定量仪器为 Bio-Rad CFX96TM Real-Time System。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算, 作图数据为以 2 为底基因相对表达量的对数值。

2 结果与分析

2.1 甘蓝 NLR 家族基因的全基因组鉴定

为了鉴定甘蓝中 NLR 家族基因, 用 HMM 分析了 LRR、NBS、TIR、RPW8、CC 功能域并进行了序列 Blast 比对分析。共鉴定出 87 个 NLR 家族基因, 包括 34 个 NB-LRR、6 个 CC-NB-LRR、45 个 TIR-NB-LRR、1 个 RPW8-NB-LRR 和 1 个 CC-TIR-NB-LRR。与 Yu 等 (2014) 报道的拟南芥、白菜和甘蓝相似, TIR-NB-LRR 基因数远大于 CC-NB-LRR, 可能是由于 TIR-NB-LRR 基因复制较多或者 CC-NB-LRR 基因缺失而导致 (表 2)。

表 2 NLR 基因在甘蓝、白菜和拟南芥中的统计
Table 2 Statistics of predicted NLR genes in *B. oleracea*, *B. rapa* and *Arabidopsis*

来源 Source	材料 Material	TIR-NB-LRR	CC-NB-LRR	RPW8-NB-LRR	NB-LRR	CC-TIR-NB-LRR	合计 Total
本研究 This research	甘蓝 <i>B. oleracea</i>	45	6	1	34	1	87
Yu et al., 2014	甘蓝 <i>B. oleracea</i>	40	6	—	24	—	70
	白菜 <i>B. rapa</i>	93	19	—	27	—	139
	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	79	17	—	20	—	116

根据基因组注释文件, 分析了 87 个 NLR 基因在 9 个染色体上的位置, 根据染色体长度信息及 87 个基因信息构建了染色体位置图 (图 1)。由于参考基因组组装尚不完善, 87 个基因中有 23 个基因 (26.4%) 未锚定。每条染色体都包含了一些 NLR 基因, 出现在染色体的端粒末端、近着丝粒区和中间区域等, 但分布不均, 其中定位在染色体上的 64 个 (73.6%) 基因中有 37 个 (55%) 基因成簇存在, 27 个单独存在。Yu 等 (2014) 研究发现在 7 号染色体上基因分布最多, 77.1% 的基因定位在染色体上, 22.9% 未锚定, 成簇存在的基因占 60.3%。本研究中 NLR 基因分布与 Yu 等 (2014) 的结果相近。

2.2 甘蓝 NLR 家族基因的 motif 和结构分析及进化分析

分析鉴定出甘蓝 NLR 家族基因的 10 个保守的 motif。大部分基因均包含 motif 5 基序 (图 2), 其是 NLR 比较重要的基序, 其保守氨基酸序列为: RIEESRIAIVIFSSRYTESTWC LDKLVKI。利用 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 根据基因组注释数据进行了家族基因的基因结构分析, 根据 NLR 进化树, 基因 motif 结果和基因结构信息, 绘制进化树图 (图 3)。由图 3 可知大多数亲缘关系近的基因拥有相似的 motif 组分, 表明 NLR 同一分组内的基因具有相似的功能。其中有些基因没有注释到 motif (浅蓝、粉红和绿色背景)。浅蓝色和绿色背景的基因除了 BoNLR80 外均为 NB-LRR 类型, 进化分析也表明基因 BoNLR80 (RPW8-NB-LRR) 与 NB-LRR 亲缘关系更近, 粉红色背景的 7 个基因中除 BoNLR30 外均属于 CC-NB-LRR 类型基因, BoNLR18 的基因类型为 CC-TIR-NB-LRR, 但归类到 TIR-NB-LRR 基因类型内, 说明该基因与 TIR-NB-LRR 功能更相近。其余未标注的分组均为 TIR-NB-LRR 或者 NB-LRR 类型的基因。进化分析结果表明, 本研究中鉴定出的所有 6 个 CC-NB-LRR 基因 BoNLR15、BoNLR60、BoNLR31、BoNLR32、BoNLR2 和 BoNLR46 都聚到一起, BoNLR30 基因跟这 6 个基因聚在一起, 表明 BoNLR30 与 CC-NB-LRR 更近, 即使 HMM 及 Blast 比对分析结果为 BoNLR30 属于 NB-LRR 类型; 另外 NB-LRR 类型基因主要聚类在绿色框标注的分支, 其余未用框标注的大部分基因都为 TIR-NB-LRR 类型。

甘蓝 *Brassica oleracea*

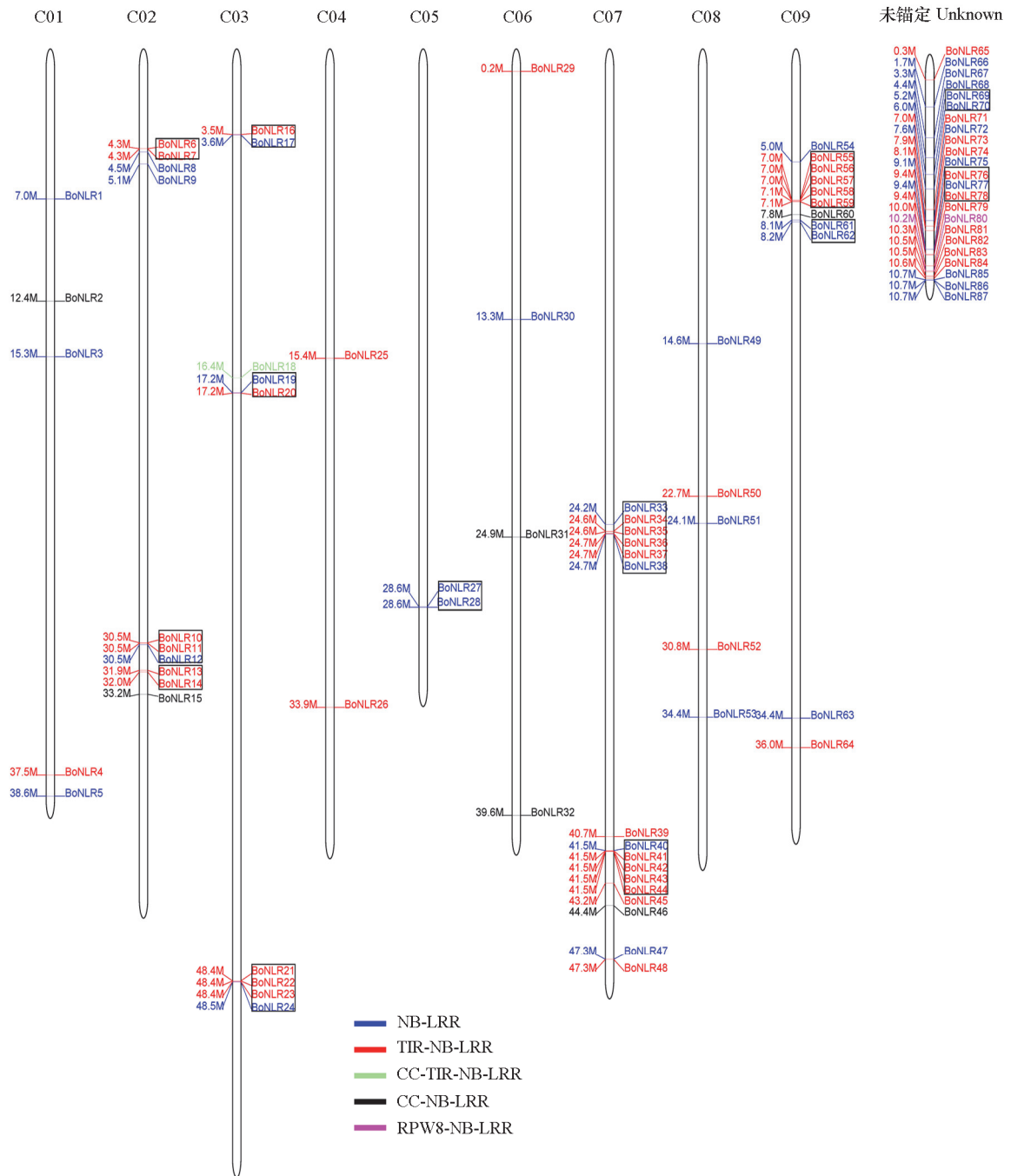


图 1 甘蓝 NLR 家族基因在染色体上的分布

黑色方框表示成簇存在的基因。

Fig. 1 Chromosome distribution of NLR genes in *Brassica oleracea*

The black box refer to clustered genes.

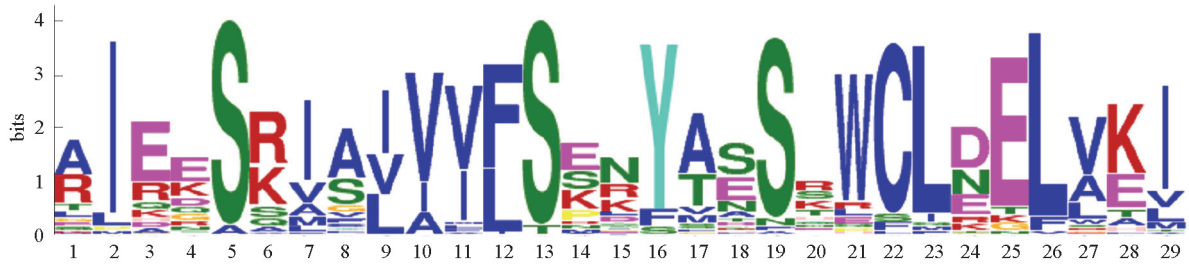


图2 Motif 5 中的氨基酸组成
 Fig. 2 Amino acid composition of motif 5

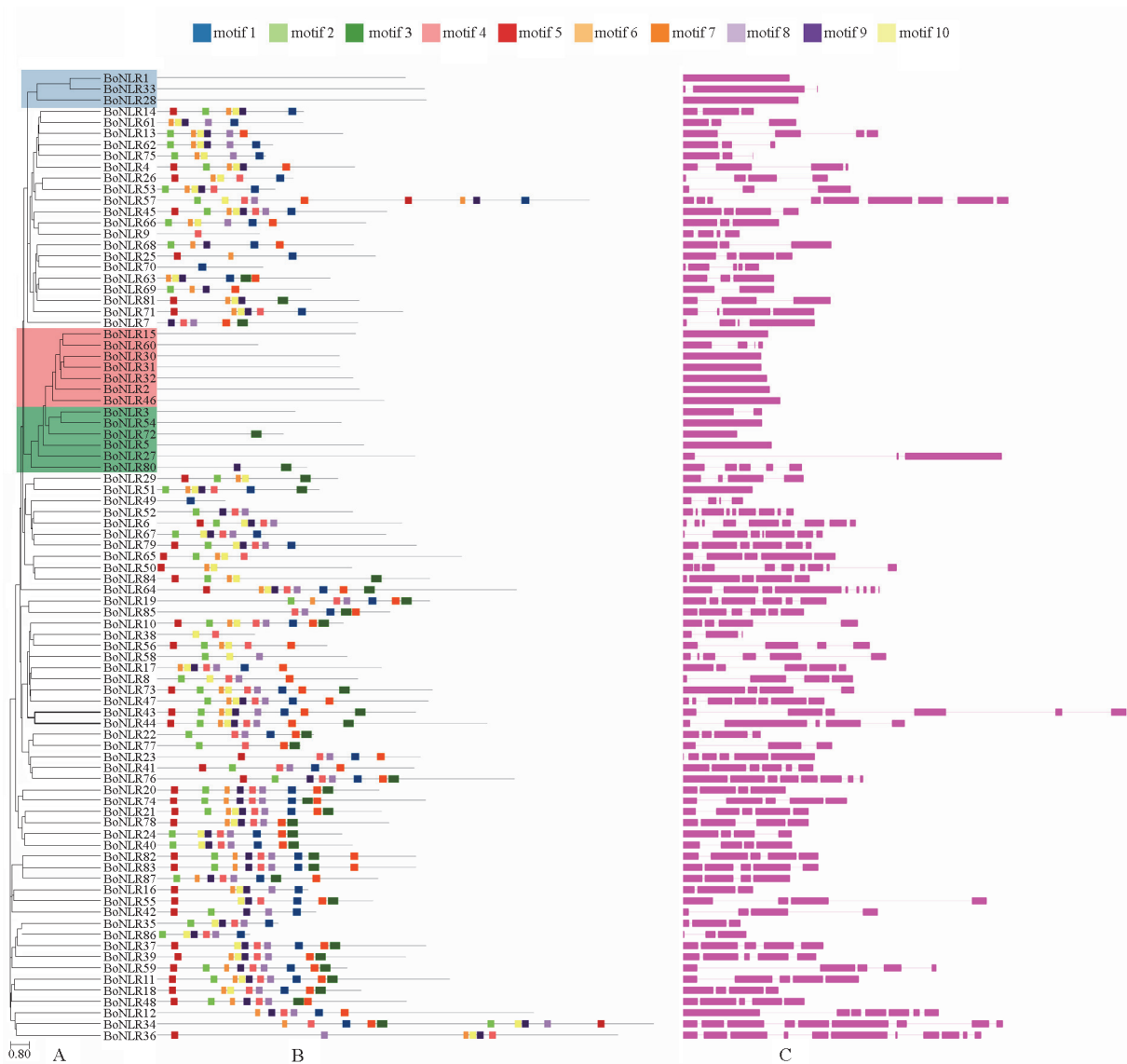


图3 甘蓝 NLR 家族基因进化树 (A), motif 组成 (B), 基因结构 (C)

外显子用紫色条带表示; 内含子用紫色横线表示。浅蓝色、粉色、绿色背景为未注释到 motif 的基因。

Fig. 3 The phylogenetic tree of NLR genes (A), motif composition (B), gene structure (C)

The exons are shown in purple band; Introns are shown in purple line. Boxed areas of light blue, pink, green indicate genes without motif annotated.

2.3 甘蓝 NLR 家族基因的 Ka/Ks 分析

利用 DNASPv5 进行了家族的 Ka/Ks 分析, 共筛选出 4 对基因 (表 3), 9 条染色体中只有 6 号染色体上存在加倍基因 (片段复制基因), 即 BoNLR30 和 BoNLR31, 而其余重复基因 BoNLR82、BoNLR83、BoNLR87 未锚定到染色体, 表明有些基因是由于复制产生的, 片段重复事件可能对于推动 NLR 基因进化具有重要的作用。为了分析串联重复和加倍基因的选择压模式, 估算了每对 NLR 复制基因的非同义突变 (Ka) 与同义突变 (Ks) 的比率 Ka/Ks。一般而言, Ka/Ks < 1 表明通过纯化选择或者功能制约, 氨基酸变化的固定率降低, 当 Ka/Ks = 1 表明为中性选择, 而 Ka/Ks > 1, 表明这些基因经历了正向选择, 该选择利于适应性遗传变异的积累。同时根据每年每个位点 6.5×10^{-9} 的突变频率, 预估了复制时间 (Gaut et al., 1996; Quraishi et al., 2011), 4 对基因的复制事件发生于 0.0000469 到 70.012 百万年。位于染色体 6 上的一对基因 BoNLR30 和 BoNLR31 的 Ka/Ks 为 $0.8940 < 1$, 表明这两个基因经历了纯化选择, 功能趋于同化, 其余的未锚定到染色体上的 3 对基因的 Ka/Ks 均大于 1, 表明这些基因经历了正向选择, 尤其基因 BoNLR82 和 BoNLR83 的 Ka/Ks 为 50, 表明这两个复制基因的功能发生了很大的分化。

表 3 甘蓝 NLR 基因中复制基因的 Ka/Ks 分析及预估分化年限
Table 3 Ka/Ks analysis and estimated divergence time for segmental duplicated NLR genes

NLR 同源基因对 Paralogous NLR pairs	染色体定位 Chromosome location	NLR 类型 NLR group	非同义突变 Ka	同义突变 Ks	Ka/Ks	选择压模式 Selection pressure	复制时间 (百万年) Date (MYA)
BoNLR30/BoNLR31	C06	NB-LRR/CC-NB-LRR	0.5467	611544	0.8940	纯化 Purifying	43.923
BoNLR82/BoNLR83	Scaffold000482/ Scaffold000488	TIR-NB-LRR	0.0003	0.00000625	50	正选择 Positive	0.0000469
BoNLR82/BoNLR87	Scaffold000482/ Scaffold001201	TIR-NB-LRR/NB-LRR	1.0060	0.9774	1.0292	正选择 Positive	70.012
BoNLR83/BoNLR87	Scaffold001201/ Scaffold001201	TIR-NB-LRR/NB-LRR	1.0060	0.9774	1.0292	正选择 Positive	70.012

2.4 甘蓝和白菜 NLR 家族基因的进化分析

全基因组复制事件是许多基因家族进化的来源, 为了分析 NLR 家族基因在甘蓝和白菜的进化关系, 根据序列保守性用 Clustal W 比对构建了家族基因进化树 (图 4), 其中 6 个 CC-NB-LRR 类基因聚在一个分支内, 其余的为 NB-LRR 或者 TIR-NB-LRR。由图 4 可看出, 35 个 NLR 基因与白菜中的基因存在同源关系, 表明这些 NLR 基因可能来源于同一祖先。其中有 11 个 NB-LRR 基因, 3 个 CC-NB-LRR 基因, 1 个 RPW8-NB-LRR 基因, 其余 20 个为 TIR-NB-LRR 基因。分布在 9 号染色体上的有 4 个, 8 号染色体 1 个, 7 号染色体 5 个, 6 号染色体 3 个, 3 号染色体 2 个, 2 号染色体 6 个, 1 号染色体上 1 个, 其余 13 个未锚定到染色体组上。另外的 52 个 NLR 基因为甘蓝所特有, 白菜也有特有的基因, 这些可能是甘蓝和白菜物种分化后功能特异化的基因。

2.5 甘蓝 NLR 家族基因的表达分析

为了分析本研究中鉴定出的 NLR 基因在甘蓝不同病害胁迫下的应答反应, 通过测序及 NCBI 数据库下载获得了甘蓝常见病害, 如枯萎病、黑腐病、根肿病、霜霉病、白粉病、黑斑病等的转录组数据, 分析了 NLR 基因的表达情况。

首先去除在所有抗感材料中表达均为 0 的基因, 共获得了 42 个 NLR 基因的表达谱 (图 5)。接种枯萎病菌 3 和 6 d 后, BoNLR18、BoNLR42、BoNLR43、BoNLR20、BoNLR60 和 BoNLR7 基因

在抗病材料 R3 和 R6 中高表达, 在感病材料 S3 和 S6 中表达量低, 其中 BoNLR20 和 BoNLR42 在感病材料 S3 和 S6 中不表达, 而在抗病材料中表达高, BoNLR59 仅在 R3 中高表达, 而在其他处理中不表达, 说明 BoNLR20、BoNLR42 和 BoNLR59 在甘蓝抗枯萎病中起作用。对黑腐病而言, 接菌 11 d 后, 相比感病材料 KB7-11g, 基因 BoNLR36、BoNLR58、BoNLR47 和 BoNLR48 在抗病材料 KB2-11k 中高表达, 其中 BoNLR47 和 BoNLR48 在 KB7-11g 中不表达, 说明这些基因可能参与甘蓝抗黑腐病反应。对根肿病而言, 相比感病材料 C1176, 基因 BoNLR20、BoNLR13、BoNLR30 在抗病材料 C1220 中高表达。这些结果表明甘蓝中不同的 NLR 基因参与不同的抗病过程, 这些差异表达基因的鉴定有助于甘蓝抗病机制的研究以及抗病品种的选育。

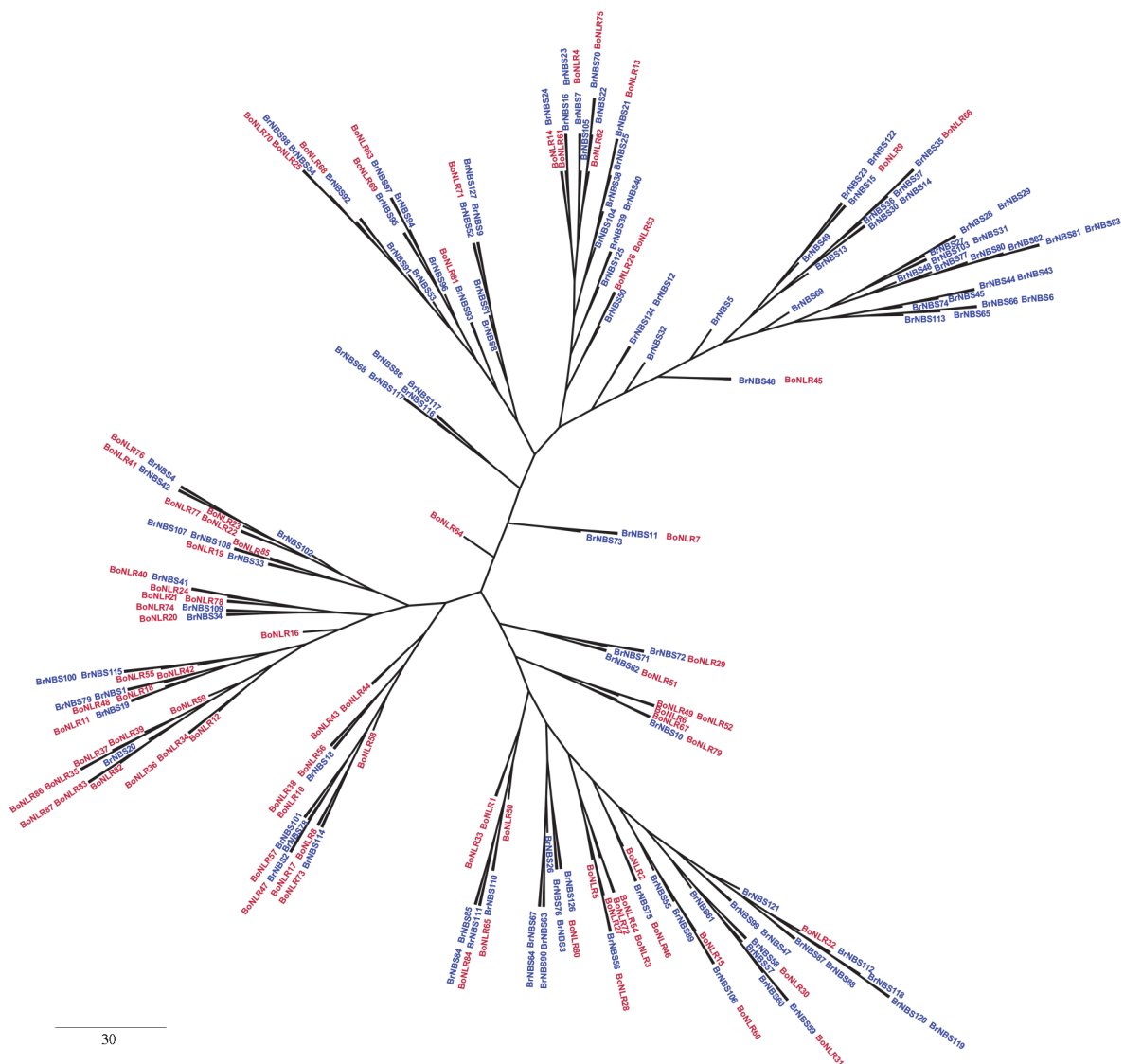


图 4 甘蓝和白菜 NLR 家族基因进化树

红色字体为甘蓝基因, 蓝色字体为白菜基因。

Fig. 4 Phylogenetic analysis of NLR genes in *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. The red represents the genes of *B. oleracea* and the blue represents the genes of *B. rapa*.

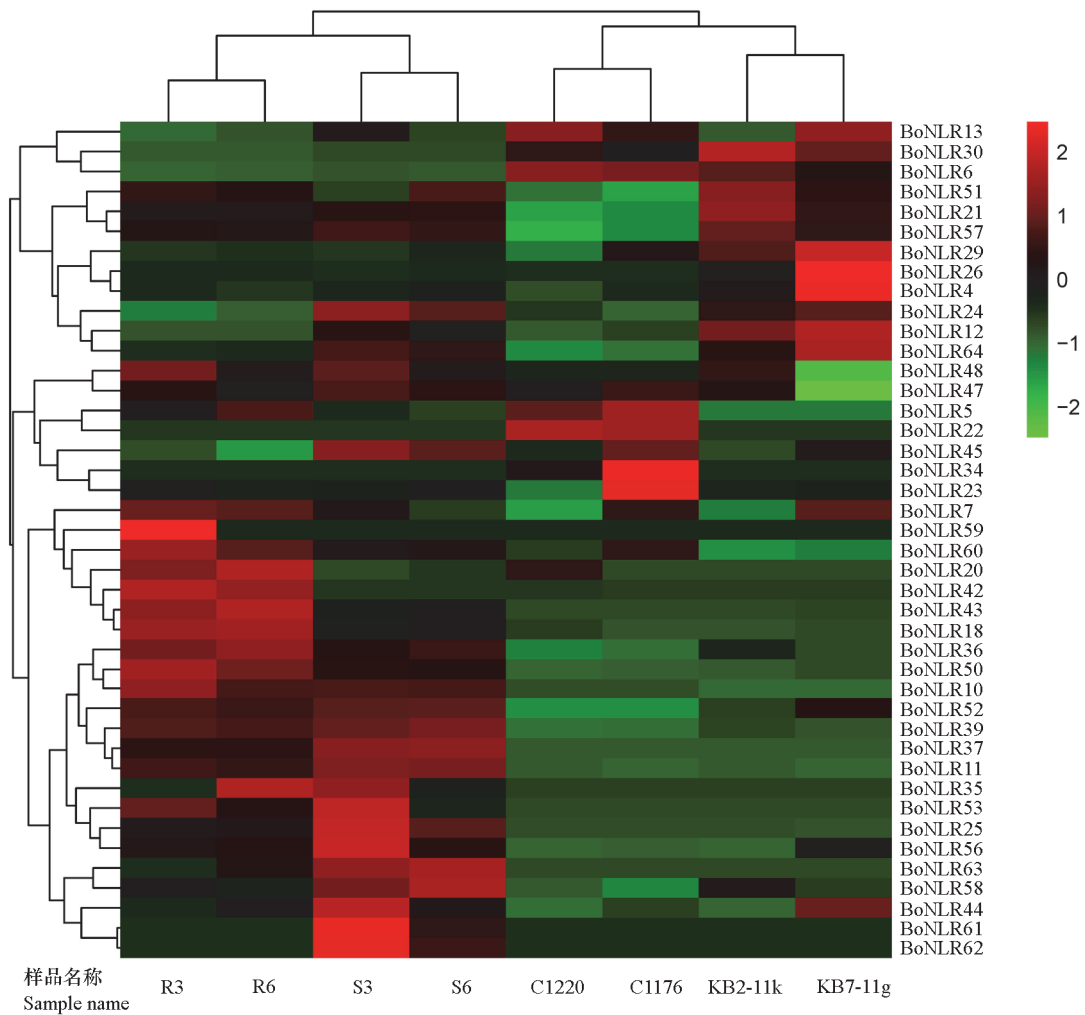


图 5 甘蓝枯萎病、黑腐病和根肿病抗、感材料中 NLR 基因的表达聚类图
 Fig. 5 Expression patterns of selected NLR genes in resistance and susceptible Chinese cabbage to *Fusarium* wilt, black rot and clubroot

为了分析 NLR 基因在甘蓝黑腐病、白粉病、霜霉病和黑斑病胁迫时的响应表达情况，去除在所有发病和正常叶片中表达均为 0 的基因，共获得了 37 个 NLR 基因的表达谱（图 6）。接种黑腐病菌 11 d 后，基因 BoNLR21、BoNLR63、BoNLR51、BoNLR52、BoNLR25、BoNLR4、BoNLR12、BoNLR50、BoNLR53 和 BoNLR64 在发病叶片 KB2-11g 中高表达，而在正常叶片 KB2-11k 中几乎不表达；11 个基因 BoNLR44、BoNLR26、BoNLR4、BoNLR12、BoNLR50、BoNLR53、BoNLR64、BoNLR29、BoNLR63、BoNLR56 和 BoNLR39 在发病叶片 KB7-11g 中高表达，在正常叶片 KB7-11k 中几乎不表达。其中抗、感材料黑腐病发病叶片中共有的基因为 BoNLR4、BoNLR12、BoNLR50、BoNLR53 和 BoNLR64。对于白粉病而言，有 12 个基因 BoNLR21、BoNLR37、BoNLR29、BoNLR26、BoNLR48、BoNLR60、BoNLR5、BoNLR11、BoNLR18、BoNLR45、BoNLR36 和 BoNLR57 在发病叶片 (QBF_S) 中高表达，在正常叶片 (QBF_R) 中几乎不表达。对于黑斑病而言，基因 BoNLR6、BoNLR63、BoNLR62 和 BoNLR7 在发病叶片 BR 中高表达，而在正常叶片 120-QY 中不表达。基因 BoNLR25、BoNLR52、BoNLR62、BoNLR51、BoNLR45、BoNLR43、BoNLR63 和 BoNLR18 在霜霉病叶 SMB 中高表达，

在正常叶 120-WY 中几乎不表达。

从结果可看出在同一病害发生过程中, 会有一系列不同的 NLR 基因响应表达, 说明 NLR 基因在甘蓝中发挥协同作用。另外同一基因也会在不同病害发生时做出应答反应, 如 BoNLR63 在黑腐病、黑斑病和霜霉病发病叶中均有表达, 而在不同病株正常叶中不表达。

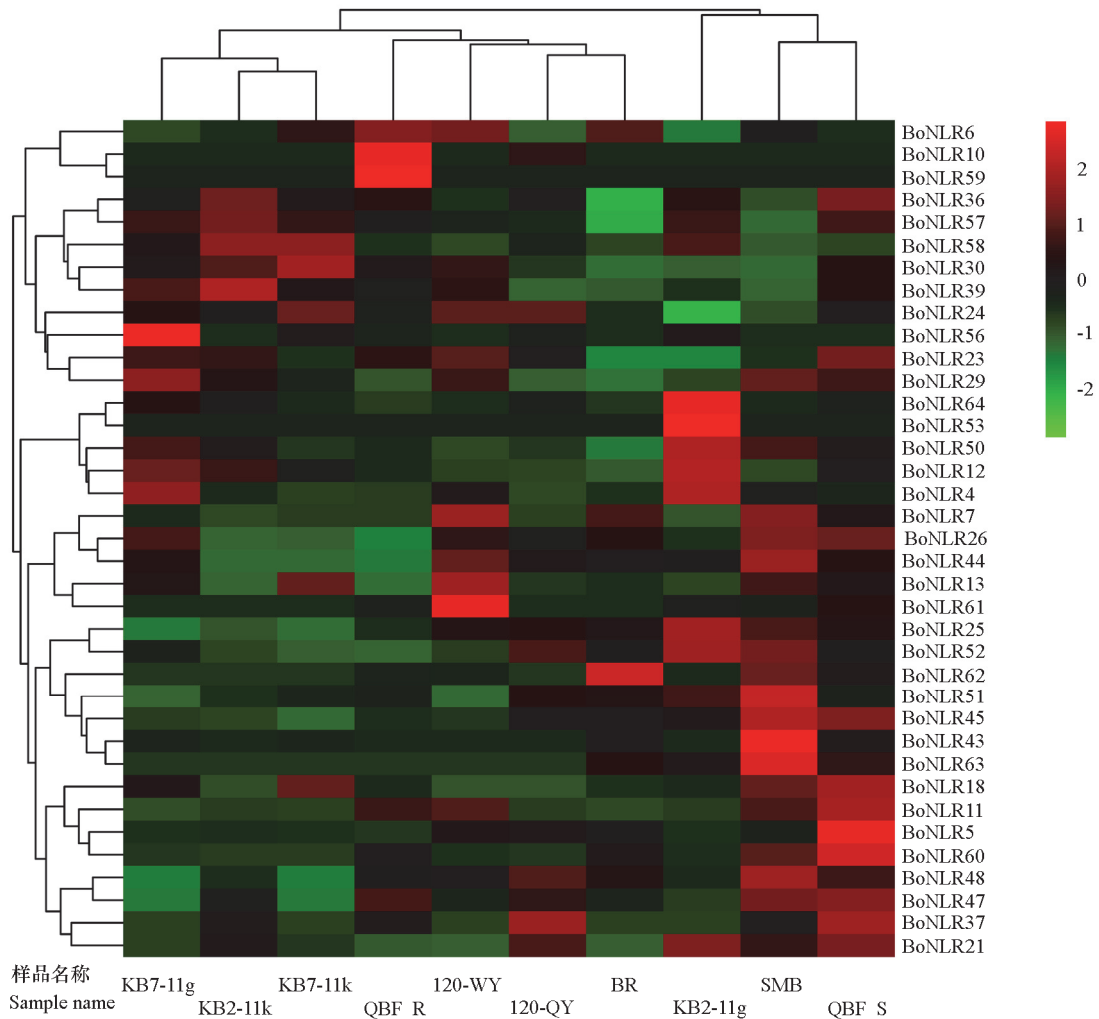


图 6 甘蓝黑腐病、霜霉病、白粉病和黑斑病发病叶和正常叶样品中 NLR 基因的表达聚类图
Fig. 6 Expression patterns of selected NLR genes in diseased and undiseased leaves in Chinese cabbage
of black rot, downy mildew, powdery mildew and blackspot

2.6 相关 NLR 基因的 qRT-PCR 验证分析

为了验证转录组数据中分析的不同病害抗性应答差异表达基因, 挑选一些基因做了 qRT-PCR 验证分析, 如图 7 所示: 枯萎病 (R3/S3、R6/S6)、黑腐病 (KB2-11g/KB2-11k)、霜霉病 (SMB/120-WY) 相关基因在两种分析方法中的表达模式基本一致。

根肿病相关差异表达的 3 个基因在 qRT-PCR 验证时与 NCBI 下载的转录组数据表达模式相反(未在图中展示), 这可能与不同材料及不同取样时期有关, 也说明了甘蓝中抗病机制的复杂性。

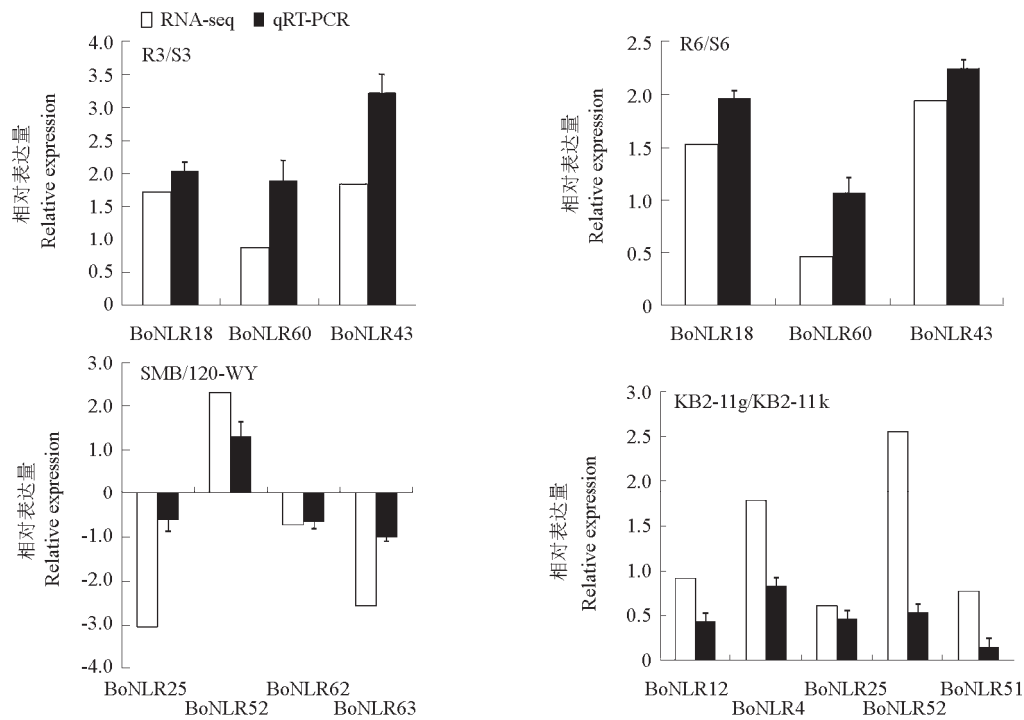


图 7 相关 NLR 基因的 qRT-PCR 及 RNA-seq 表达验证分析
 Fig. 7 Expression of the selected NLR genes inferred by RNA-seq and qRT-PCR

3 讨论

根据 motif 组成以及跨膜结构域的不同,抗病(R)基因可以分为多种类型,其中 NLR(NB-LRR)类型是植物基因组中最大的基因家族之一(Mchale et al., 2006)。NB 结构域可通过结合 ADP 或 ATP 来调节植物抗病蛋白的构象变化,从而调节下游抗病信号的传导;LRR 结构域具有识别病原菌及调控信号传导的功能(尹玲等, 2017; Wang et al., 2018)。鉴于 NLR 类基因在植物抗病中的重要作用,本研究中鉴定分析了甘蓝含有 NB 和 LRR 结构域的 NLR 家族基因,与之前研究的甘蓝 NLR 家族基因及其亚家族 TNL 和 CNL 数基本一致,且与前人研究的拟南芥和白菜的亚家族 TNL 比 CNL 数多的趋势一致(Yu et al., 2013)。相比拟南芥中鉴定出的 116 个及白菜中鉴定出的 139 个 NLR 基因而言,本研究中鉴定出的甘蓝只有 87 个 NLR 基因,数目少的原因可能有以下几方面:(一)相较于拟南芥和白菜而言,甘蓝基因组组装不完善,导致基因鉴定及注释有缺失;(二)大部分基因在芸薹属基因组三倍化事件后迅速丢失了,且因选择压力及驯化目的不同,一部分 NLR 基因在不同物种中沉默,缺失或者异化(Mun et al., 2009);(三)随着结构域数据库的更新,家族基因的结构注释会有相应的变化,造成了数量差异。

结合转录组数据分析家族基因是研究 R 基因表达特异性的重要手段。甘蓝类参考基因组有两个版本:结球甘蓝‘02-12’(Liu et al., 2014)和芥蓝‘TO1000’(Parkin et al., 2014),由于本研究中转录组所用材料均为结球甘蓝,所以用‘02-12’作为参考基因组。甘蓝 NLR 家族基因的表达分析结果表明,甘蓝中不同的 NLR 基因会参与不同的抗病过程,且同一病害发生时,会有一系列不同

的 NLR 基因协同发挥作用, 这也与 Hammond-Kosack 和 Kanyuka (2007) 及施阳 (2016) 的结论一致, 即在植物抗病反应中往往需要多个抗病基因共同作用。另外同一基因也会在不同病害发生时做出应答反应, 这些基因可能与寄主的水平抗性密切相关。甘蓝抗枯萎病候选基因 *FOCI* (BoI037156) (Lv et al., 2014) 未在此次 NLR 基因家族分析中鉴定出来, 原因是由于该基因结构在参考基因组中预测错误, 功能域没有得到很好的注释, 仅 NB 和 TIR 功能域有注释。这也说明参考基因组的质量影响目标基因的鉴定与注释, 参考基因组组装质量的提高, 将为甘蓝中 NLR 家族基因的鉴定及进化分析打下良好的基础。在白菜中克隆出 3 种抗根肿病基因 *Crr1a*、*CRa* 和 *Crb*, 与 *Crr1a* 同源的甘蓝基因 BoI024282 及与 *Crb* 同源的甘蓝基因 BoI024376 和 BoI029866 在本研究中未鉴定出, 与 *CRa* 同源的甘蓝基因为 BoI042121 (BoNLR45), 可能在甘蓝中与根肿病抗性相关 (孙超 等, 2016), 但该基因并未在根肿病抗、感材料中表现出转录水平差异, 这与 *FOCI* 的情况相似 (Xing et al., 2016): 在抗、感材料中存在序列差异, 而没有表达差异。另一个与 *Crb* 同源的甘蓝基因 BoI024375 (BoNLR41) 在根肿病抗、感材料中均未检测到表达。甘蓝鉴定出的参与抗黑腐病反应的基因 BoNLR36 (BoI004493、AT5G45200)、BoNLR58 (BoI032056、AT5G20720)、BoNLR47 (BoI018676、AT4G36140) 和 BoNLR48 (BoI018675、AT4G36150), 除了 BoNLR58, 其余 3 个基因 GO 功能注释都是抗病防御反应, 本试验中鉴定出来的抗黑腐病相关基因与 Afrin 等 (2018) 鉴定出来的抗病相关基因不同, 说明可能不同取样时间点及不同材料中参与病害的抗病基因不同, 这也说明了甘蓝中抗病机制的复杂性。

目前, 在甘蓝 R 基因的应用方面, 仅有枯萎病抗性基因 *FOCI* 在分子育种中得到了实际应用 (Liu et al., 2017b), 黑腐病、根肿病等主要病害抗性基因亟待挖掘和利用。本研究中鉴定出的在抗病材料中表现出差异表达的基因将为甘蓝抗病机制研究提供理论依据, 分析获得的响应病菌入侵的高表达基因也将对甘蓝与病害间的互作研究具有指导意义。

References

- Afrin K S, Rahim M A, Park J I, Natarajan S, Kim H T, Nou I S. 2018. Identification of NBS-encoding genes linked to black rot resistance in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Molecular Biology Reports*, 45 (5): 773 - 785.
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389 - 3402.
- Cheng F, Liu S, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B, Li P, Hua W, Wang X. 2011. BRAD, the genetics and genomics database for *Brassica* plants. *BMC Plant Biology*, 11: 136.
- Dangl J L, Horvath D M, Staskawicz B J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341 (6147): 746 - 751.
- Eisen M B, Spellman P T, Brown P O, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS*, 95 (25): 14863 - 14868.
- Fang Zhiyuan. 2008. Cultivation technologies of cabbage. Beijing: The Jindun Publishing House: 1 - 7. (in Chinese)
- 方智远. 2008. 甘蓝栽培技术. 北京: 金盾出版社: 1 - 7.
- Ferraiolo J, Jun F, Jackson D. 2003. Scalable vector graphics (SVG) 1.1 Specification. <http://www.w3.org/TR/SVG11/>.
- Gaut B S, Morton B R, McCaig B C, Clegg M T. 1996. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *PNAS*, 93: 10274 - 10279.
- Hammond-Kosack K, Kanyuka K. 2007. Resistance genes (*R* genes) in plants. *Encycl Life Sci*, 40: 1 - 21.
- Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita R N, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S. 2013. Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *PLoS ONE*, 8 (1): e54745.
- Jensen B D, Vicente J G, Manandhar H K, Roberts S J. 2010. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable

- Brassica* fields in Nepal. *Plant Dis*, 94: 298 - 305.
- Jones J D, Dangl J L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323 - 329.
- Joobeur T, King J J, Nolin S J, Thomas C E, Dean R A. 2004. The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant J*, 39 (3): 283 - 297.
- Kong Congcong, Liu Xing, Xing Miaomiao, Yang Limei, Zhuang Mu, Zhang Yangyong, Wang Yong, Fang Zhiyuan, Lü Honghao. 2018. Identification and screening of cabbage accessions with resistance both to black rot and *Fusarium* wilt. *China Vegetables*, (6): 22 - 31. (in Chinese)
- 孔枳枳, 刘星, 邢苗苗, 杨丽梅, 庄木, 张扬勇, 王勇, 方智远, 吕红豪. 2018. 甘蓝黑腐病和枯萎病兼抗材料的鉴定筛选. *中国蔬菜*, (6): 22 - 31.
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones S J, Marra M A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 19: 1639 - 1645.
- Li Mingyuan, Ma Yongjun, Yao Jinliang. 2006. Vigilance the spreading of wilt in cruciferous plants in China. *China Plant Protection*, 26 (1): 21 - 22. (in Chinese)
- 李明远, 马永军, 姚金亮. 2006. 警惕十字花科蔬菜枯萎病在我国蔓延. *中国植保导刊*, 26 (1): 21 - 22.
- Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin I A P, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, Wang X, Wang J, Lu K, Fang Z, Bancroft I, Yang T J, Hu Q, Wang X, Yue Z, Li H, Yang L, Wu J, Zhou Q, Wang W, King G J, Pires J C, Lu C, Wu Z, Sampath P, Wang Z, Guo H, Pan S, Yang L, Min J, Zhang D, Jin D, Li W, Belcram H, Tu J, Guan M, Qi C, Du D, Li J, Jiang L, Batley J, Sharpe A G, Park B S, Ruperao P, Cheng F, Waminal N E, Huang Y, Dong C, Wang L, Li J, Hu Z, Zhuang M, Huang Y, Huang J, Shi J, Mei D, Liu J, Lee T H, Wang J, Jin H, Li Z, Li X, Zhang J, Xiao L, Zhou Y, Liu Z, Liu X, Qin R, Tang X, Liu W, Wang Y, Zhang Y, Lee J, Kim H H, Denoeud F, Xu X, Liang X, Hua W, Wang X, Wang J, Chalhoub B, Paterson A H. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 5 (5): 3930.
- Liu X, Han F, Kong C, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Zhuang M, Liu Y, Li Z, Lv H. 2017b. Rapid introgression of the *Fusarium* wilt resistance gene into an elite cabbage line through the combined application of a microspore culture, genome background analysis, and disease resistance-specific marker assisted foreground selection. *Front Plant Sci*, 8: 354.
- Liu X, Ling J, Xiao Z, Xie B, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Lv H, Yang Y. 2017a. Characterization of emerging populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causing cabbage wilt in China. *Journal of Phytopathology*, 165: 11 - 12.
- Lü Honghao, Fang Zhiyuan, Yang Liwei, Xie Bingyan, Liu Yumei, Zhuang Mu, Zhang Yangyong, Yang Yuhong. 2011. Research on screening of resistant resources to *Fusarium* wilt and inheritance of the resistant gene in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 875 - 885. (in Chinese)
- 吕红豪, 方智远, 杨丽梅, 谢丙炎, 刘玉梅, 庄木, 张扬勇, 杨宇红. 2011. 甘蓝枯萎病抗源材料筛选及抗性遗传研究. *园艺学报*, 38 (5): 875 - 885.
- Lv H, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Wang Q, Liu Y, Zhuang M, Yang Y, Xie B, Liu B, Liu J, Kang J, Wang X. 2014. Mapping and analysis of a novel candidate *Fusarium* wilt resistance gene *FOCI* in *Brassica oleracea*. *BMC Genomics*, 15 (1): 1094.
- Mchale L, Tan X, Koehl P, Michelmore R W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7 (4): 1 - 11.
- Meyers B C, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore R W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR - encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (4): 809 - 834.
- Mun J H, Yu H J, Park S, Park B S. 2009. Genome-wide identification of NBS-encoding resistance genes in *Brassica rapa*. *Molecular Genetics & Genomics*, 282 (6): 617 - 631.
- Ori N, Eshed Y, Paran I, Presting G, Aviv D, Tanksley S, Zamir D, Fluhr R. 1997. The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*, 9: 521 - 532.
- Parkin I A, Koh C, Tang H, Robinson S J, Kagale S, Clarke W E, Town C D, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell S L, Denoeud F, Belcram H, Links M G, Just J, Clarke C, Bender T, Huebert T, Mason A S, Pires J C, Barker G, Moore J, Walley P G, Manoli S, Batley J, Edwards D, Nelson M N, Wang X, Paterson A H, King G, Bancroft I, Chalhoub B, Sharpe A G. 2014. Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology*, 15 (6): R77.

- Pu Z J, Shimizu M, Zhang Y J, Nagaoka T, Hayashi T, Hori H, Matsumoto S, Fujimoto R, Okazaki K. 2012. Genetic mapping of a *Fusarium* wilt resistance gene in *B. oleracea*. *Mol Breeding*, 30: 809 - 818.
- Punta M, Coggill P C, Eberhardt R Y, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer E L L, Eddy S R, Bateman A, Finn R D. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40: 290 - 301.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33: W116 - W120.
- Quraishi U M, Abrouk M, Murat F, Pont C, Foucrier S, Desmaizieres G, Confolent C, Rivière N, Charmet G, Paux E, Murigneux A, Guerreiro L, Lafarge S, Le Gouis J, Feuillet C, Salse J. 2011. Cross-genome map based dissection of a nitrogen use efficiency ortho-meta QTL in bread wheat unravels concerted cereal genome evolution. *Plant Journal*, 65: 745 - 756.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio J C, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescence and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496 - 2497.
- Shi Yang. 2016. To identify candidate genes with LRR domain governing powdery mildew resistance based on whole genome re-sequencing in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [M. D. Dissertation]. Yangzhou: Yangzhou University. (in Chinese)
- 施 阳. 2016. 基于全基因组重测序获得的具有 LRR 结构域基因的抗黄瓜白粉病功能鉴定[硕士论文]. 扬州: 扬州大学.
- Sun Chao, Ma Jian, Lei Lei, Liu Jie, Xie Jianming, Kang Jungun. 2016. Identification of cabbage germplasm resources with resistance to clubroot and sequence analysis of *CRa* and *Crr1a* homologous genes from cabbage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 17 (6): 1058 - 1064.
- 孙 超, 马 建, 雷 蕾, 刘 洁, 谢建明, 康俊根. 2016. 甘蓝种质资源根肿病抗性鉴定及 *CRa*、*Crr1a* 同源基因分析. *植物遗传资源学报*, 17 (6): 1058 - 1064.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Tang H, Wang X, Bowers J E, Ming R, Alam M, Paterson A H. 2008. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. *Genome Research*, 18 (12): 1944 - 1954.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673 - 4680.
- Ueno H, Matsumoto E, Aruga D, Kitagawa S, Matsumura H, Hayashida N. 2012. Molecular characterization of the *CRa* gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol*, 80: 621 - 629.
- van der Hoorn R, Kamoun S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20 (8): 2009 - 2017.
- Wang Ketao, Su Xiaomei, Cui Xia, Du Yongchen, Zhang Shuaibin, Gao Jianchang. 2018. Identification and characterization of microRNA during *Bemisia tabaci* infestations in *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *Horticultural Plant Journal*, 4 (2): 62 - 72.
- Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. 1994. The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78 (6): 1101 - 1115.
- Xing M, Lv H, Ma J, Xu D, Li H, Yang L, Kang J, Wang X, Fang Z. 2016. Transcriptome profiling of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in cabbage (*Brassica oleracea*) roots. *PLoS ONE*, 11 (2): e0148048.
- Yin Ling, Fang Hui, Huang Yu, Lu Jiang, Qu Jun-jie. 2017. Research progress on domains of plant TIR-NB-LRR resistance genes. *Guihaia*, 37 (2): 186 - 190. (in Chinese)
- 尹 玲, 方 辉, 黄 羽, 卢 江, 曲俊杰. 2017. 植物 TIR-NB-LRR 类型抗病基因各结构域的研究进展. *广西植物*, 37 (2): 186 - 190.
- Yu J, Tehrim S, Zhang F, Tong C, Huang J, Cheng X, Dong C, Zhou Y, Qin R, Hua W, Liu S. 2014. Genome-wide comparative analysis of NBS-encoding genes between *Brassica* species and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 15 (1): 3.
- Yu J, Zhao M, Wang X, Tong C, Huang S, Tehrim S, Liu Y, Hua W, Liu S. 2013. Bolbase: a comprehensive genomics database for *Brassica oleracea*. *BMC Genomics*, 14 (1): 664.
- Zhang Teng. 2015. Isolation and functional identification of *CRb* gene conferring resistance to clubroot disease in *Brassica rapa* [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 张 腾. 2015. 大白菜抗根肿病基因 *CRb* 的分离克隆与功能鉴定[博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.