



引用格式: 贺风英, 白露超. 基于转录组测序的黄果梨干腐病发病机理初探[J]. 西北植物学报, 2025, 45(2): 0000-0000. [HE F Y, BAI L C. Preliminary study on pathogenesis of Huangguo pear dry rot disease using transcriptome sequencing[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2025, 45(2): 0000-0000.] DOI:10.7606/j.issn.1000-4025.20240353

基于转录组测序的黄果梨 干腐病发病机理初探

贺风英, 白露超

(青海大学 农牧学院, 西宁 810016)

摘要 【目的】由镰刀菌侵染引起的黄果梨干腐病严重影响黄果梨的产量和品质, 阻碍其产业的发展。分析黄果梨响应干腐病病原菌侵染过程中关键基因的表达情况, 为揭示其发病机理提供理论依据。【方法】以病原菌接种枝干为发病组(HG), 以空白处理为对照组(HK), 通过 RNA-seq 技术对黄果梨进行转录组测序。【结果】(1) 6 个样本共获得 34.62 Gb 有效数据, 共筛选到 1 137 个 DEGs, 其中 548 个 DEGs 上调, 589 个 DEGs 下调。(2) KEGG 显著富集到植物病原互作、淀粉和蔗糖代谢、光合作用-天线蛋白、苯丙氨酸生物合成等通路。(3) 对 10 个 DEGs 进行 RT-qPCR 表达量检测, RT-qPCR 与 RNA-seq 基因相对表达量趋势一致。【结论】病原菌侵染引起植物病原互作、淀粉和蔗糖代谢、光合作用-天线蛋白、植物激素信号转导、苯丙氨酸生物合成等通路积极响应。

关键词 转录组; 黄果梨; 干腐病; 发病机理

中图分类号 Q945.8; S432 **文献标志码** A

Preliminary study on pathogenesis of Huangguo pear dry rot disease using transcriptome sequencing

HE Fengying, BAI Luchao

(College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract [Objective] The dry rot disease of Huangguo pears caused by *Fusarium* infestation severely affects the yield and quality as well as industrial development of Huangguo pears. This study aims to analyze the expression of key genes in Huangguo pears in response to dry rot pathogen, in order to provide theoretical basis for the understanding of the pathogenesis. [Methods] Illumina RNA-seq technique was used to sequence the transcriptome of Huangguo pears with the pathogenic stem as the disease group (HG) and the PDA (potato dextrose agar) medium as the control (HK). [Results] (1) A total of 34.62 Gb of the valid data was obtained for six samples, and identified 1 137 DEGs, among which 548 were up-regulated and 589 were down-regulated. (2) KEGG was enriched to pathways such as plant pathogen interaction, starch and sucrose metabolism, photosynthesis-antenna protein, and phenylalanine biosynthesis. (3) Expression of 10 DEGs was detected by RT-qPCR, and RT-qPCR and RNA-seq analysis shared a similar trend in gene expression. [Conclusion] The dry rot pathogen causes positive response in many pathways in

收稿日期: 2024-06-20; 修改稿收到日期: 2024-10-28

基金项目: 青海省创新平台建设专项(2023-ZJ-T01)

作者简介: 贺风英(1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事林木病理研究。E-mail: 204015040@qq.com

通信作者: 白露超, 教授, 博士生导师, 主要从事林木病理学研究。E-mail: 250861678@qq.com

Huangguo pears, including plant pathogen interaction, starch and sucrose metabolism, photosynthesis-antenna protein, phytohormone signaling, and phenylalanine biosynthesis.

Key words transcriptome; *Pyrus bretschneideri* Rehd; dry rot; pathogenesis

梨属于蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae)落叶乔木,梨树根系深且分布广,适应性强,是世界性被广泛种植的果树之一^[1]。基于梨的原生分布将其分为东方梨与西方梨,东方梨主要分布在中国、日本、朝鲜半岛,包括白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd)、砂梨(*Pyrus pyrifolia*)、杜梨(*Pyrus betulae-folia*)、新疆梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu)等。西方梨主要分布在欧洲、北非、伊朗等地^[2]。黄果梨作为白梨系统的地方品种,种植于青海省黄南藏族自治州同仁市隆务河谷地区,具有营养价值丰富、降压止咳、化痰利肺的特点,是同仁市的地方特色果品^[3]。据青海统计年鉴统计,青海省梨树种植面积逐年增加,2021年梨总产量达5 124 t,占总水果产量的34.15%。同仁市共种植黄果梨面积约1 645.68 hm²,年产量611.16 t,占青海省梨总产量的11.93%,成为青海省同仁市地方特色支柱产业,带动当地经济发展提高农民收入^[4]。近年来,随着黄果梨园面积的扩大,种植、管理技术粗放和基础设施落后,黄果梨病虫害发生严重。其中干腐病严重影响黄果梨的产量和品质,阻碍其产业的发展。该病害主要发生在梨树根颈部及枝干部,发病初期感病部位形成褐色不规则病斑,后期病部失水凹陷,枝干鳞片状龟裂,韧皮部褐化,叶片发黄,最终导致整株萎焉枯死。目前,针对该病害的防治主要集中于农业措施、化学防治、生物防治^[5]。而化学防治与联合国可持续发展维护生态系统目标相悖^[6],且3R问题的出现迫切需要制定环保策略。因此,培育抗病品种是防治该病害最经济有效的措施。

利用转录组测序技术揭示植物受病原菌胁迫后不同时期转录本的表达信息,有助于解析寄主植物应答病原菌侵染的分子机制^[7]。目前转录组技术在果树方面被广泛应用于枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)、‘秋容’梨(*Pyrus pyrifolia*)、百香果(*Passiflora edulis*)^[8]、马蜂柑(*Citrus hystrix*)^[9]、苹果(*Malus domestica*, Borkh.)^[10]、猕猴桃(*Actinidia Lindl*)^[11]、芒果(*Mangifera indica* Linn.)^[12]、葡萄(*Vitis Vinifera* L.)^[13]等方面。滕彩玲等利用转录组测序技术分析马蜂柑(*Citrus hystrix*)感染黄龙病后不同时期各个基因的表达模式,发现马蜂柑感病前期和后期的差异表达基因(differentially ex-

pressed genes, DEGs)主要涉及细胞壁代谢、防御反应、淀粉与蔗糖代谢、胍胍质合成以及信号转导等方面^[14]。张舒仪等发现枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)感染枣疯病植原体后诱导激素合成和抗氧化保护酶相关基因的表达发生改变,导致部分内源激素含量和保护酶活性的变化,从而引起枣树丛枝、花变叶等症状^[15]。Liu等为研究‘秋容’梨(*Pyrus pyrifolia*)水心病的发病机制,对‘秋容’梨花后125 d发生水心病的果肉与健康果肉进行了转录组和代谢组分析,研究结果表明山梨醇和蔗糖代谢紊乱导致植物激素(脱落酸和乙烯)和厌氧呼吸增加,从而加剧果实腐烂和苦味物质的形成^[16]。本研究基于转录组测序技术分析黄果梨感病材料与健康材料基因表达量差异,筛选出黄果梨干腐病相关DEGs,并将这些DEGs注释到GO(gene ontology) term与KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路,分析差异基因的功能,解析黄果梨干腐病可能的发病机理,为后期科学环保地防治该病害提供新思路。

1 材料和方法

1.1 病样采集

2023年7月在青海省黄南藏族自治州同仁市尕沙日村随机选取发病果园,采集树皮龟裂、带有黑色不规则病斑的黄果梨枝干,带回青海大学农牧学院植保实验室用于分离培养。

1.2 病原菌的分离与纯化及致病性测定

采用组织分离法分离病原菌,挑选带有典型病斑的枝干,用灭菌手术刀切取病健交界处组织块5 mm²,依次置于0.1%的升汞、75%酒精、4%的次氯酸钠中浸2 min,然后用无菌水漂洗。选择马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)在25℃恒温培养箱培养7 d后进行纯化保存。

挑选长势一致的无菌扦插苗,移栽至花盆中,待树苗生长健康后进行活体接种,方法参照文献^[17]。将黄果梨枝干韧皮部用灭菌手术刀切开,使用5 mm打孔器在活化后的菌落边缘和空白培养基打孔。将菌饼贴紧枝干伤口后,用无菌纱布包扎,以接种空白培养基菌饼作为对照组,每天用无菌水保湿接种部位,处理组与对照组各接种3株,将接种后的梨树盆栽置于温室,拍照并记录发病情况。植株发

病后再次分离培养鉴定。

1.3 病原菌的形态学鉴定

将纯化后的菌株置于 25 °C 下恒温培养 3~5 d, 观察记录菌落的形状、颜色等生长状况, 然后从菌落边缘挑取少量菌丝制成玻片, 用电子显微镜观察。

1.4 病原菌的分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 方法参照文献[18]。以 *ITS* 基因引物对(*ITS1/ITS3*)和 *EF-1 α* 基因引物对(*EF1 α -728F/EF1 α -986R*)进行 PCR 扩增。扩增产物送至生物公司进行测序, 在 GenBank 进行 BLAST 检索进行同源性对比。用 MEGA 软件构建系统发育树。

1.5 转录组样品处理

接种方法同 1.2 节, 挑选长势一致的无菌扦插苗 6 株, 移栽至花盆进行活体接种。其中 3 株接种菌饼作为发病组(HG), 3 株接种空白培养基作为对照组(HK)。接种第 7 天后, 截取每株黄果梨包含接种部位 5 cm 长的枝干, 共收集 6 个枝干, 用锡纸包好放入液氮速冻, 送至北京百迈克生物科技有限公司测序。

1.6 转录组测序及分析

首先利用 trimmomatic^[19] 软件对原始数据(raw data)进行过滤, 去除低质量、N 的占比大于 10%、带有接头的 reads, 过滤后通过 fastqc 软件进行质控, 获得有效数据(clean data); 然后用 Trinity2.14.0 软件对 clean data 组装拼接得到转录本, 挑选最长转录本(unigene)作为功能基因; 接着用软件 Bowtie2 将 clean data 比对到 unigene, 采用 RSEM 进行基因表达定量, 得到基因在不同样本中的表达量值, FRKM 作为表达定量指标^[20]。将拼接得到的 unigene 与 GO、KEGG 数据库比对, 获得 unigene 的注释信息。

采用 DEseq 软件分析基因差异表达情况, 以错误发现率与差异倍数衡量差异基因, 设置阈值为: 错误发现率(false discovery rate, R_{FD}) <0.05 且差异倍数 $|\log_2 \alpha_{FC}| \geq 2$, 得到 DEGs 进行功能富集分析。

1.7 差异表达基因荧光定量 PCR 分析

基于转录组分析结果, 分别挑选出与植物病害相关的 5 个上调 DGEs 和 5 个下调 DGEs。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)为内参基因, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。分析目的基因在 RT-qPCR 与 RNA-seq 中基因的表达量, 验证转录组数据的可靠性。

表 1 差异基因引物设计

Table 1 Designing of primers for the differential genes

基因编号 Gene number	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段长度/bp Fragment length
20368	20368R	GTTCTTCCCAAACCACAATG	228
	20368F	GGATTGGGTTGTCTGAGAAG	
101775	101775R	TGGATGTTTCTTTTCGAAGAG	187
	101775F	AATCGAGTATCAAGAGCCAG	
101910	101910R	AAGTGCATTTCGAAGCTCAAG	226
	101910F	AGGAAGCTAATATCGAAAGG	
102109	102109R	TTTCATTCCATGAAGTCAGG	197
	102109F	GGGATGGGGTTTTACAACCTC	
481422	481422R	CTGATCATCAGCGATATCTC	160
	481422F	CCCCTTCCCTAGTAACTTC	
98006	98006R	AAAGCTAGCAGATAAGGCAG	211
	98006F	TACACAAGCAATGCATCTTC	
133105	133105R	TCTAGGGTTTGGGAAAGATG	200
	133105F	CTTAATGGAACTTGAGGCTG	
138606	138606R	TTGAGAAGTTGAAGGAGTTG	190
	138606F	TGGTTAAAAAGTGCCTGTCC	
139075	139075R	ACCCAAAAAACAAATCCCC	170
	139075F	AAGTTTTTAGTGCCACCAG	
139154	139154R	TGTGCATAACCTTCTATCCG	186
	139154F	TTAATTCCCCCAGAAACAAG	
GAPDH	GAPDH-R	CCTTCTGACTCCCTTGATAGC	101
	GAPDH-F	GTGCCCACTGTTGATGTTTCC	

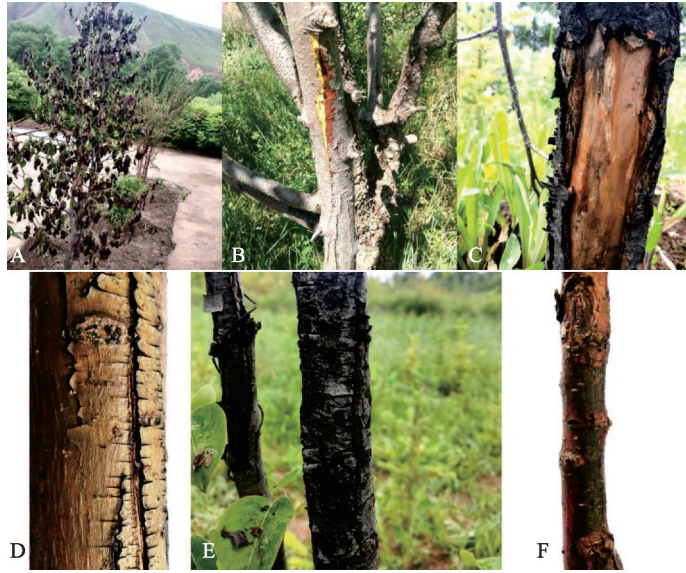
2 结果与分析

2.1 黄果梨干腐病症状

在青海省黄南藏族自治州同仁市尕沙日村果园中发现大片黄果梨出现干腐病症状, 该病害侵染黄果梨根颈部及枝干部, 发病初期感病部位韧皮部褐化, 形成不规则病斑; 后期病部失水凹陷, 枝干鳞片状或纵横龟裂, 造成树皮大片剥落, 影响植物体水分及营养物质运输, 叶片变褐, 最终导致整株萎焉枯死(图 1)。

2.2 致病性测定结果

对患病材料分离培养, 得到 2 株菌落形态不同的菌株, 通过致病性测定发现只有 1 种菌株(HNH-GL)能成功侵染黄果梨枝干; 接种第 7 天后发现对照植株生长正常, 无腐烂现象, 但接种病原菌植株接种部位韧皮部褐化, 易与木质部分离, 病斑向周围延伸(图 2); 接种第 25 天发现植株叶片发黄萎焉(图 3), 与田间症状一致。取回植株病健交界处材料再次分离, 得到的菌株与之前分离得到的病原菌一致, 将其再接种至健康黄果梨树苗枝干部, 引起发病。完成柯赫氏法则验证, 证明该菌株(藤仓镰刀菌)为黄果梨干腐病致病菌。

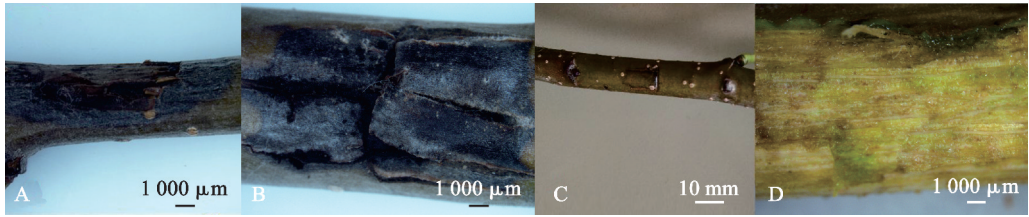


A. 整株;B. 枝干韧皮部;C. 枝干木质部;D-F. 枝干。

图 1 田间症状

A. Whole plant. B. Bast of branches. C. Xylem of branches. D-F. Branches.

Fig.1 Field symptoms

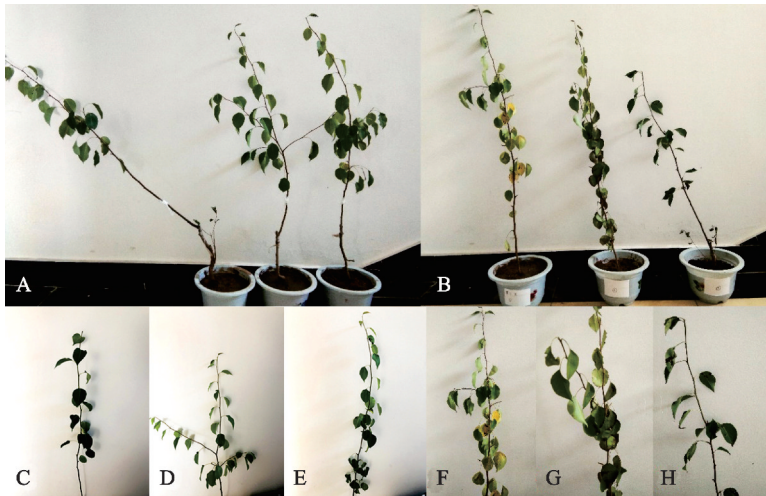


A,B. 接菌处理;C,D. 对照。

图 2 接种症状

A, B. Inoculation treatment. C, D. Control.

Fig.2 Inoculation symptoms



A,C,D,E. 对照处理;B,F,G,H. 接菌处理;C为 A 中的第 1 株(将倾斜的树苗扶正后拍摄);D 为 A 中的第 2 株;E 为 A 中的第 3 株(打侧枝后拍摄);F 为 B 中的第 1 株;G 为 B 中的第 2 株;H 为 B 中的第 3 株。

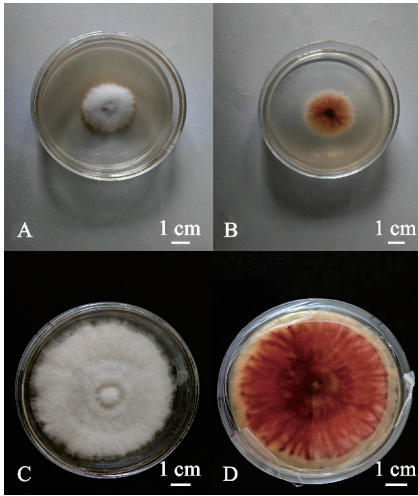
图 3 黄果梨生长状态

A, C, D, E. Control. B, F, G, H. Inoculation treatment. C shows plant 1 in A (taken after righting the leaning tree). D shows plant 2 in A. E shows plant 3 in A (taken after hitting a side branch). F shows plant 1 in B. G shows plant 2 in B. H shows plant 3 in B.

Fig.3 Growth status of Huangguo pears

2.3 病原物形态学观察结果

菌落初期淡粉色,后期白色。等径生长,气生菌丝绒毛状,边缘呈毛刷状。菌丝致密,不易观察到底部色素,背面有放射状红色色素生成(图4)。



A. 生长初期菌落正面;B. 生长初期菌落背面;
C. 生长后期菌落正面;D. 生长后期菌落背面。

图4 藤仓镰刀菌的菌落形态

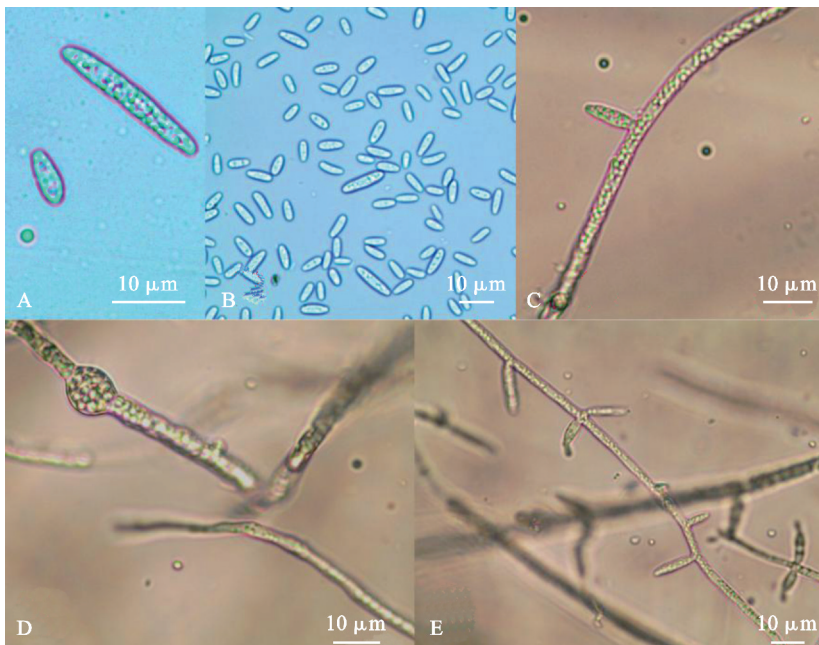
- A. The front of the colony in early growth stages.
B. The back of the colony in early growth stages.
C. The front of the colony in late stages of growth.
D. The back of the colony in late stages of growth.

Fig. 4 Colony morphology of *Fusarium fujikuroi*

小型分生孢子较多,卵形或棍棒状,0~1隔,大小为 $(4.12\sim 8.78)\mu\text{m}\times(1.68\sim 3.96)\mu\text{m}$ 。大型分生孢子镰刀形,无明显弯曲,通常3~5隔,大小为 $(30.15\sim 45.23)\mu\text{m}\times(3.01\sim 4.56)\mu\text{m}$ 。厚垣孢子单生或串生,球形(图5)。

2.4 分子生物学鉴定结果

用 *ITS1/ITS3* 和 *EF1 α -728F/EF1 α -986R* 2对引物扩增菌株(HNHGL),测序结果显示:菌株HNHGL(GenBank登录号为OQ740670)的ITS序列全长为349 bp,菌株HNHGL(GenBank登录号为OQ780976)的Tef序列全长为964 bp。将rDNA-ITS序列与GeneBank上的序列进行对比,发现与*Fusarium fujikuroi*(GenBank登录号为MT603295)、*Fusarium fujikuroi*(GenBank登录号为MN955527)的相似率均在99%以上,基于ITS基因建立的系统发育树(图6),发现与*Fusarium fujikuroi*(GenBank登录号为MT603295)、*Fusarium fujikuroi*(GenBank登录号为MN955527)聚于同一分支。基于*EF1 α* 基因建立的系统发育树(图7),发现与*Fusarium fujikuroi*(GenBank登录号为MH828026)聚于同一分支。因此通过形态学与分子鉴定结果可以确定病原菌为藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)。



A、B. 型分生孢子和小型分生孢子;D. 厚垣孢子;C、E. 分生孢子梗。

图5 藤仓镰刀菌的显微形态

- A, B. Large conidium and small conidium. D. Chlamydospore. C, E. Conidium stalk.

Fig. 5 Microscopic morphology of *Fusarium fujikuroi*

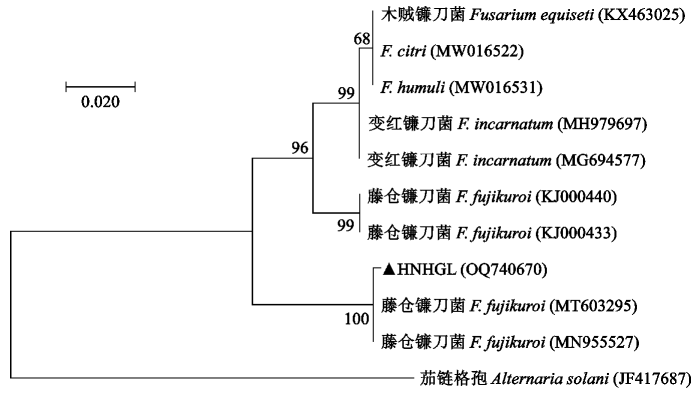
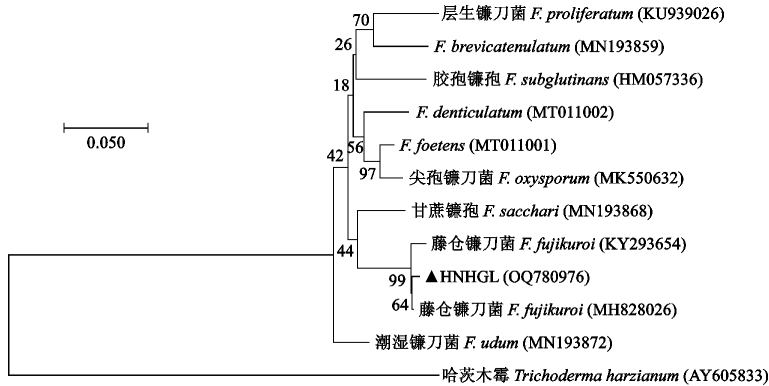


图 6 基于 ITS 基因建立的系统发育树

Fig. 6 A phylogenetic tree based on ITS genes

图 7 基于 EF1 α 基因建立的系统发育树Fig. 7 A phylogenetic tree based on EF1 α genes

2.5 转录组数据质量评估

研究以接菌和对照处理后 7 d 的黄果梨枝干建库测序,6 个样本共获得 135 039 829 个 raw reads,经过过滤获得 135 039 633 个 clean reads, clean reads 占总 reads 数 99% 以上。 Q_{30} 为 94.20%~95.11%, GC 为 46.87%~47.39% (表 2), 表明转录组测序质量高, 可进行后续转录组拼接组装。组装过滤后得到 485 291 个转录本, 其中包含 99 996 个 unigene。Unigene 的 GC 含量为 43.44%, N50 为 1 776 bp, 能够满足后续相关生物信息分析。重复样本间的系数在 0.96~0.98 之间, 表明样本生物学重复良好。

表 2 各样本测序数据统计

Table 2 Statistics of the sequencing data of each sample

样本 Sample	原始数据 Raw reads	有效数据 Clean reads	比率/% Ratio	Q_{30} / %	GC 含量/% GC content
HG_1	20 630 914	20 630 883	99	94.20	46.93
HG_2	20 575 874	20 575 844	99	94.50	46.92
HG_3	20 283 567	20 283 547	99	94.42	47.35
HK_1	23 754 602	23 754 558	99	94.47	46.87
HK_2	28 555 650	28 555 606	99	95.11	47.02
HK_3	21 239 222	21 239 195	99	94.89	47.39

2.6 差异基因表达分析

研究通过 DESeq 软件筛选健康组 (HG) 与发病组 (HK) 之间的差异表达基因, 从图 8 可以看出, 共筛选得到 1 137 个差异表达基因, 其中 548 个差异基因上调, 589 个差异基因下调。表明黄果梨感病后, 可能这些基因参与相应的抗(感)病机制。

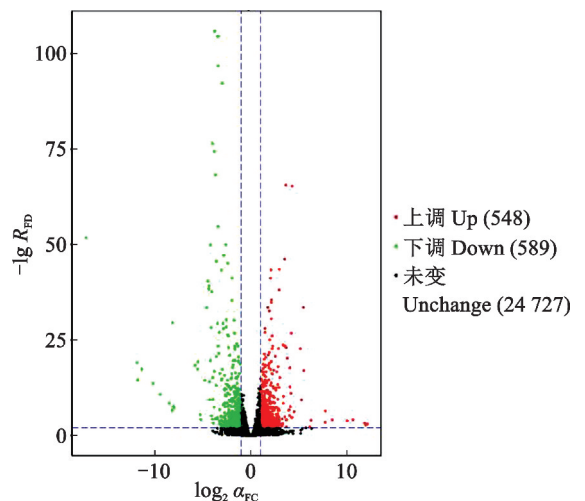


图 8 差异表达基因火山图

Fig. 8 Volcano plot of differentially expressed genes

2.7 差异基因 GO 和 KEGG 功能分析

将 1 137 个 DEGs 比对到 GO 数据库,发现有 912 个 DEGs 成功注释到 58 个 GO terms 中,包括生物学过程部分 22 个,细胞组部分 20 个,分子功能部分 16 个(图 9)。生物学过程参与代谢过程、细胞过程、生物调控、刺激应答等过程,分别占

39.14%、34.76%、17.98%、11.95%。在细胞组部分中差异基因主要富集到膜、膜部分、细胞、细胞部分、细胞器等亚类,分别占 33.33%、31.03%、25.11%、25.11%、19.85%。在分子功能过程中差异基因主要富集到结合、催化活性、转运体活动等亚类,分别占 49.67%、43.42%、6.4%。

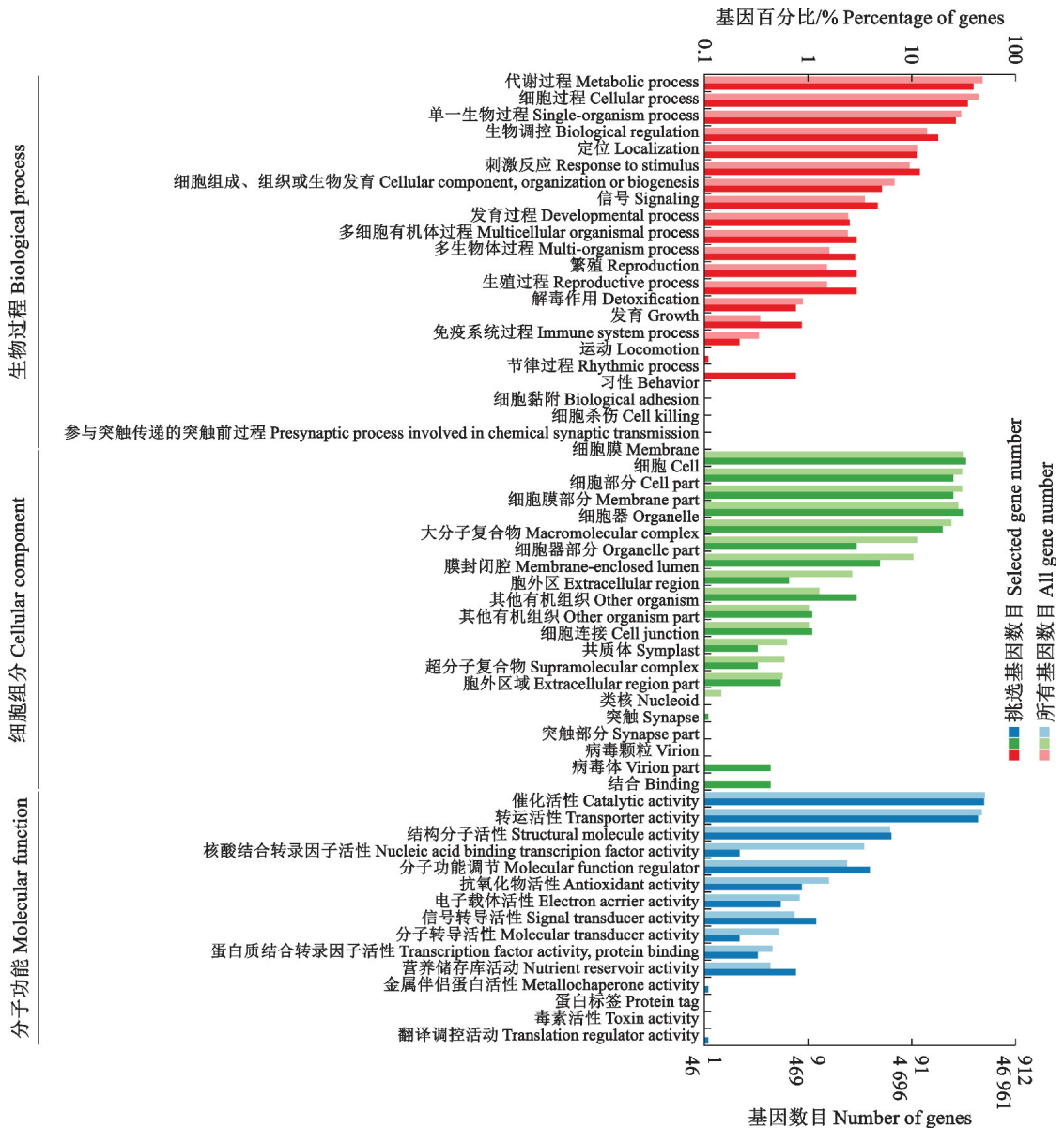


图 9 差异表达基因 GO 分析

Fig. 9 GO analysis of the differentially expressed genes

比对到 KEGG 数据库的 1 137 个 DEGs 中有 391 个 DEGs 富集到 112 条通路,富集程度较高的通路包括植物病原互作、植物昼夜节律、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、内质网蛋白加工、光合作用-天线蛋白等(图 10)。其中富集到异黄酮生物合

成、光合作用-天线蛋白通路的 DEGs 显著下调,推测藤仓镰刀菌侵染植株抑制了光合作用,通过多种信号传导途径激活下游防御基因的表达;富集到硝酸盐和烟酰胺代谢、类固醇生物合成通路的 DEGs 显著上调。

2.8 RT-qPCR 验证

从植物病原互作、淀粉和蔗糖代谢、光合作用-天线蛋白、植物激素信号转导等通路挑选 10 个 DEGs 进行 RT-qPCR 验证,其中差异上调的基因分别为 20368(莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶基因, *HCT*)、101775(海藻糖 6-磷酸合成酶/磷酸酶基因, *TPS*)、101910(体细胞胚发生受体类激酶基因, *SERKs*)、102109(LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶基因, *EFR*)、481422(β -葡萄糖苷酶基因, *bg1B*)。差异下调基因为 98006(生长素应答蛋白基因, *IAA*)、133105(捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 2 基因, *LHCA2*)、138606(镁螯合酶亚单位 H 基因, *chlH*)、139075(乙烯受体, *ETR*)、139154(丝裂原活化蛋白激酶 1 基因, *MEKK1*)。根据 RT-qPCR 与 RNA-seq 中基因相对表达量绘图,结果(图 11)显示这 10 个基因的表达量趋势几乎一致,说明转录组数据可靠。

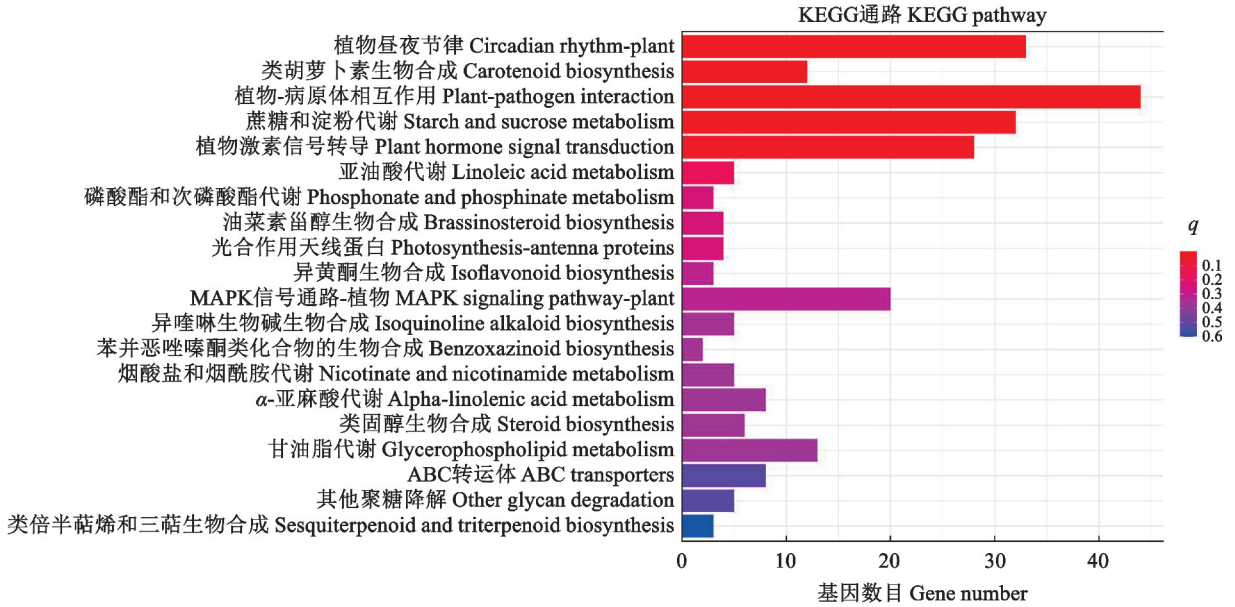


图 10 差异表达基因 KEGG 注释

Fig. 10 KEGG annotations of the differentially expressed genes

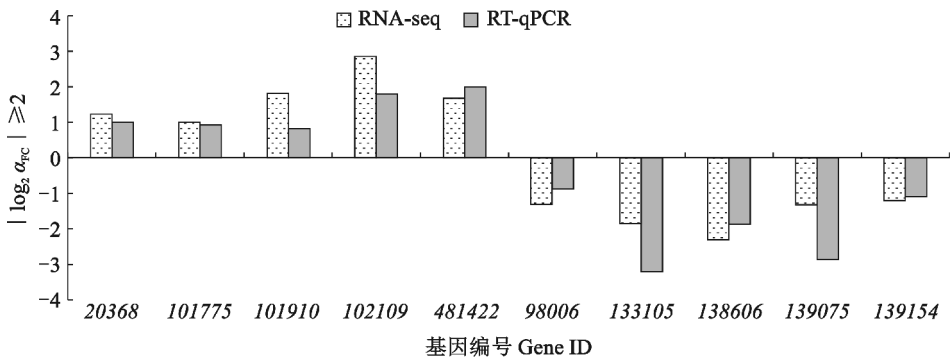


图 11 RT-qPCR 表达分析

Fig. 11 Expression analysis of RT-qPCR

3 讨论

本试验对青海省黄南藏族自治州同仁市尕沙日村黄果梨园区干腐病病原菌进行分离鉴定,确定藤仓镰刀菌为梨树干腐病病原菌。藤仓镰刀菌是世界上常见的农作物致病菌之一,且其寄主范围广泛^[21],可以引起水稻恶苗病^[22]、花椒茎腐病^[23]、核

桃干腐病^[24]、烟草根腐病^[25]、茶树根茎枯萎病^[26]等病害。

早在 1863 年国外学者首次提出引起干腐病的主要病原菌为葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*) 真菌^[27]。而在中国,报道葡萄座腔菌属真菌为梨树干腐病的主要致病菌^[28],该菌属作为死体营养型致病真菌,分布广泛,据调查,可危害 150 多种木本植

物^[29],该病害引起梨树枝干韧皮部腐烂,树皮剥落、果实产生轮纹病斑^[30]。本研究确定了藤仓镰刀菌也能引起该病害,明确了多种病原菌引起梨树干腐病,将为病害的有效防治提供理论参考。目前转录组测序技术被广泛应用于梨树的生理机制方面,而在生物胁迫方面的研究较少^[31-33]。本研究对黄果梨健康组和发病组通过转录组测序得到高质量数据,基于各样本基因表达量筛选差 DEGs,注释 DEGs 功能信息并进行 RT-qPCR 验证数据的可靠性,为初步揭示梨树与病原物互作的分子机理提供基础。相关研究表明,植物受到生物胁迫时产生 2 层先天免疫系统,第一层是模式识别受体 (PRRs) 感知病原物相关分子模式 (PAMPs) 引发的免疫反应 (PTI),第二层是植物产生 R 蛋白特异性识别病原物产生的效应子引发的免疫反应 (ETI)^[34]。当植物受到病原物侵染会激活 PTI 免疫进行防御,而病原物会产生效应子来抵抗植物的 PTI 免疫,植物感知到病原物的无毒蛋白会释放 R 蛋白激活 ETI 免疫^[35]。本研究注释到植物-病原互作通路和 MAPK 信号通路-植物中的差异基因较多,其中 PTI 免疫中体细胞胚胎发生受体激酶 4 基因 (*PAKIPKKI*)、LRR 受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *EFR* 基因 (*EFR*)、WRKY 转录因子 22 (*WRKY22*)、衰老诱导的受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (*FRK1*) 均上调表达,而 ETI 免疫中 *RPS2*、*HSP90*、*RRS1-R*、*KCS1/10* 基因均下调表达,表明黄果梨受藤仓镰刀菌侵染后首先积极响应 PTI 免疫诱导植物的基本抗性,之后藤仓镰刀菌产生效应子抑制植物的免疫反应促进病害发生。因此推测 *RPS2*、*HSP90*、*RRS1-R*、*KCS1/10* 基因在黄果梨发病过程中发挥重要作用。

光合作用是植物维持生命活动的能量来源,当植物受到胁迫时,光合作用也会受到影响。有学者发现,病原菌侵染植物会引起叶绿素紊乱,出现叶片黄化、萎焉等症状^[36]。而叶绿素紊乱与叶绿素合成和降解的动态平衡有关^[37-38]。Zhang 等敲除玉米的 *ZmGT-3b* 基因后发现叶绿素含量与光合速率降低导致植株生长缓慢^[39]。玉米类病斑材料具有广谱抗性,Qiu 等对野生型、未出现类病斑和出现类病斑的 *les30* 突变体材料进行转录组测序分析,发现叶绿素降解后会激活相关抗病防御基因表达^[40]。本研究中参与光合作用(卟啉和叶绿素代谢、光合作用-天线蛋白)的多数 DEGs 下调表达。其中注释到卟啉和叶绿素代谢通路中镁整合酶亚单位 H (*chlH*)、叶绿素加氧酶 (*CAO*) 基因下调表达,导致

叶绿素 a 与叶绿素 b 合成受阻。光合作用-天线蛋白通路中的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 2 (*LHCA2*)、捕光叶绿素 a/b 结合蛋白 3 (*LHCA3*) 基因表达量下调。捕光叶绿素 a/b 结合蛋白位于叶绿体类囊体膜上,与叶绿素分子结合形成捕光色素蛋白复合体捕获光能^[41]。而叶绿素与捕光叶绿素 a/b 结合蛋白合成减少,导致植物的捕光能力减弱,从而影响植物的光合作用。

糖作为光合作用的产物,是一切生命活动的基础^[42]。糖代谢是生物体最基本的代谢,其中间产物为植物防卫反应蛋白提供碳骨架与能量,且作为信号分子参与细胞识别、防御、免疫等过程。本研究参与到糖代谢(淀粉与蔗糖代谢、糖酵解、磷酸戊糖途径)的 DEGs 表达量显著变化,其中淀粉与蔗糖代谢通路中,淀粉分解途径中的差异基因 α -葡糖苷酶 (*malZ*) 上调表达,蔗糖分解途径中的差异基因葡聚糖磷酸化酶 (*glgp*)、内切葡聚糖酶 (*KOR*)、 β -葡萄糖苷酶 (*bglB*) 均上调表达,淀粉合成途径中的差异基因葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶 (*glgc*) 下调表达。推测植物面对胁迫时积累可溶性糖改变细胞渗透势,造成植物源-库分配体系紊乱、叶片黄化萎焉、光合作用减弱。这与郜新强等发现的结果^[43]吻合。而糖酵解与磷酸戊糖途径富集到大量下调 DEGs。糖酵解与磷酸戊糖途径分解葡萄糖所产生的 ATP 为植物体生命活动提供能量,而这 2 条途径受到抑制说明植物受到藤仓镰刀菌侵染后糖代谢途径紊乱,抗逆性减弱。

植物次生代谢物对生命过程是非必需的,主要参与植物与环境之间的相互作用。植物会利用次生代谢物对病原微生物产生特定的抗性,提高抗病性^[44]。植物次级代谢产物分为植物组成性次级代谢物和诱导性次级代谢物。前者通过毒害作用或形成物理屏障阻止病原菌侵入,如单宁酸、木质素、角质、胍胍质等。后者通过识别激发刺激植物合成植保素抑制病原菌生长,如异黄酮、生物碱等。木质素是细胞壁中的骨架物质,使细胞壁加厚、促进水分运输、增强对生物胁迫的防御能力。本研究参与次级代谢物(苯丙氨酸生物合成、异黄酮生物合成)的 DEGs 表达量显著变化。其中苯丙氨酸生物合成通路中木质素途径中的莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶基因 (*HCT*)、肉桂醇脱氢酶基因 (*CAD*)、过氧化物酶基因 (*POD*)、松柏醇乙醇葡糖基转移酶基因 (*UGT72E*) 表达上调。研究表明 *HCT* 催化合成的羟基肉桂酰奎宁酸酯与 *CAD* 具有增强植物防御的

功能^[45-46]。异黄酮物质是黄酮合成代谢途径的一个分支,研究表明豆科植物中的异黄酮是植物常用的抗毒素^[47]。异黄酮生物合成途径中 *H1DH*、*IF7MAT*、*CYP81E* 基因差异下调。推测藤仓镰刀菌侵染黄果梨后,植物通过合成大量木质素形成物理屏障阻止病原菌入侵,而诱导性次级代谢物异黄酮减少,暗示植物分泌抗毒素途径受到抑制,从而诱导植物发病。异黄酮作用黄果梨是否能产生抗毒素有待进一步验证。

植物激素不仅调节植物生长发育,还在植物免疫反应中起重要作用。研究表明生长素与植物抗病性呈现负相关关系^[48]。Yin 等发现生长素增加了小麦对锈菌的易感性^[49]。苏培森通过荧光定量 PCR 分析小麦接种禾谷镰刀菌 *TIR1* 基因的表达量。结果表明,与健康材料相比接种病原菌小麦中 *TIR1* 基因表达量下调 2 倍,*TIR1* 在抵抗病原菌侵

染中起重要作用^[50]。本研究 IAA 信号转导途径中生长素受体转运抑制响应蛋白(*TIR1*)、转录抑制因子(*AUX/IAA*)、*SAUR* 家族蛋白(*SUAR*)下调。推测藤仓镰刀菌的侵入阻止了 *AUX/IAA* 蛋白的降解,抑制植物生长素响应基因表达,被植物防御能力减弱。

4 结 论

通过转录组技术比较黄果梨发病组与健康组之间的差异,发现病原菌侵染植物后,差异表达基因富集到植物-病原互作、淀粉和蔗糖代谢、光合作用-天线蛋白、植物激素信号转导、苯丙氨酸生物合成等通路。诱导黄果梨叶绿素、激素和木质素合成相关的基因表达发生改变,引起感病植株内光合作用减弱,代谢紊乱,而木质素活性的升高激发植物抗病防卫反应。

参考文献:

- [1] 宋勇义, 赵霞, 都兴政. 根据梨树特性科学进行栽培管理[J]. 烟台果树, 2013(1): 30-31.
SONG Y Y, ZHAO X, DU X Z. Cultivation management according to pear characteristics science[J]. *Yantai Fruits*, 2013 (1): 30-31.
- [2] 滕元文. 梨属植物系统发育及东方梨品种起源研究进展[J]. 果树学报, 2017, 34(3): 370-378.
TENG Y W. Advances in the research on phylogeny of the genus *Pyrus* and the origin of pear cultivars native to East Asia [J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(3): 370-378.
- [3] 魏海斌, 刘小利, 顾文毅, 等. 黄果梨种苗高效嫁接繁育技术研究[J]. 青海大学学报, 2021, 39(4): 49-57.
WEI H B, LIU X L, GU W Y, et al. Study on the efficient grafting technology of Huangguo pear seedlings[J]. *Journal of Qinghai University*, 2021, 39(4): 49-57.
- [4] 孙迎荷. 青海省黄南州黄果梨产业发展现状、问题与改进措施简述[J]. 农业工程技术, 2019, 39(26): 27.
SUN Y H. Brief introduction to the present situation, problems and improvement measures of Huangguo pear industry in Huangnan Prefecture of Qinghai Province[J]. *Agricultural Engineering Technology*, 2019, 39(26): 27.
- [5] 张传清, 徐志宏, 孙品雷, 等. 基于侵染特性的山核桃干腐病防治技术[J]. 中国森林病虫, 2011, 30(3): 43-45.
ZHANG C Q, XU Z H, SUN P L, et al. Control technique against *Carya* tree canker caused by *Botryosphaeria dothidea* based on characteristics of infection cycle[J]. *Forest Pest and Disease*, 2011, 30(3): 43-45.
- [6] CREPPS G, GOTSCHALK E, CHILDS-GLEASON L M, et al. Integrating NASA earth observations into the global indicator framework for monitoring the united nations' sustainable development goals[C]. AGU Fall Meeting Abstracts, 2016.
- [7] ZHU B Z, YANG Y F, LI R, et al. RNA sequencing and functional analysis implicate the regulatory role of long non-coding RNAs in tomato fruit ripening[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4483-4495.
- [8] 孙嘉曼, 陈格, 罗海玲, 等. 百香果响应烟草霉菌侵染的分子机制及基因挖掘[J]. 南方农业学报, 2024, 55(3): 589-600.
SUN J M, CHEN G, LUO H L, et al. Molecular mechanism and gene mining of passion fruit (*Passiflora edulis*) in response to infection of *Phytophthora nicotianae* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2024, 55(3): 589-600.
- [9] HU Y, ZHONG X, LIU X L, et al. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189229.
- [10] 靳纪洋, 刁雨菲, 于成明, 等. 苹果黑腐皮壳菌侵染苹果枝干过程的转录组分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(2): 187-193.
JIN J Y, DIAO Y F, YU C M, et al. Transcriptome analysis during apple stem infected by *Valsa mali* [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2021, 52(2): 187-193.
- [11] 宋雅林. 猕猴桃应答溃疡病菌侵染的转录组研究及抗性相关基因挖掘[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [12] 周思思, 王露露, 胡芳丽, 等. 基于转录组测序芒果抗细菌

- 性角斑病 SNP/In Del 分析[J]. 西北农业学报, 2024, 33(1): 148-155.
- ZHOU S S, WANG L L, HU F L, *et al.* SNP/In del analysis of mango bacterial black spot disease based on transcriptome sequencing[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2024, 33(1): 148-155.
- [13] 陈展, 赵艳卓, 牛早柱, 等. 葡萄霜霉菌感染葡萄的表观特征及转录组分析[J]. 华北农学报, 2022, 37(增刊 1): 324-332.
- CHEN Z, ZHAO Y Z, NIU Z Z, *et al.* Epidemiological characteristics and transcriptome analysis of grape infected by grape downy mildew[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2022, 37(Suppl. 1): 324-332.
- [14] 滕彩玲, 钟晰, 吴昊娣, 等. 马蜂柑响应黄龙病菌不同侵染时期的生物学和转录组学分析[J]. 中国农业科学, 2020, 53(7): 1368-1380.
- TENG C L, ZHONG X, WU H D, *et al.* Biologic and transcriptomic analysis of *Citrus hystrix* responses to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ at different infection stages[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(7): 1368-1380.
- [15] 张舒怡, 张钟, 张春梅, 等. 基于转录组水平的枣疯病发病机理研究[J]. 园艺学报, 2017, 44(7): 1287-1298.
- ZHANG S Y, ZHANG Z, ZHANG C M, *et al.* Transcriptomic analysis on pathogenesis of witches’ broom disease in *Ziziphus jujuba* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(7): 1287-1298.
- [16] LIU X, FAN H M, LIU D H, *et al.* Transcriptome and metabolome analyses provide insights into the watercore disorder on “Akibae” pear fruit[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4911.
- [17] 方泰军, 侯璐, 白露超. 基于转录组测序的柴达木地区枸杞根腐病发病机理研究[J]. 干旱区资源与环境, 2022, 36(11): 133-140.
- FANG T J, HOU L, BAI L C. Analysis of pathogenesis to *Lycium barbarum* root rot on transcriptome sequencing[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2022, 36(11): 133-140.
- [18] 孙正巧. 烟草根腐病病原鉴定及防治药剂筛选[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- [19] 吴建辉. 基于 BSR-Seq 和芯片技术的抗条锈基因 *Yr26* 候选基因分析及普通小麦成株期抗条锈 QTL 定位[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [20] 谢冬梅, 俞年军, 黄璐琦, 等. 基于高通量测序的药用植物“风丹”根皮的转录组分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2954-2961.
- XIE D M, YU N J, HUANG L Q, *et al.* Next generation sequencing and transcriptome analysis of root bark from *Paeonia suffruticosa* cv. Feng Dan[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(15): 2954-2961.
- [21] HSUAN H M, SALLEH B, ZAKARIA L. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(10): 6722-6732.
- [22] TADASANAHALLER P S, BASHYAL B M, YADAV J, *et al.* Identification and characterization of *Fusarium fujikuroi* pathotypes responsible for an emerging bakanae disease of rice in India[J]. *Plants*, 2023, 12(6): 1303.
- [23] LUO F Y, LI S Y, ZOU X Y, *et al.* First report of *Fusarium fujikuroi* causing black stem rot of *Zanthoxylum bungeanum* in China[J]. *Plant Disease*, 2020; 105(2): 492.
- [24] HAN S, LI Y Y, WANG M, *et al.* Stem rot disease of *Juglans sigillata* dode caused by *Fusarium fujikuroi* in China [J]. *Plant Disease*, 2021; 105(7): 2019.
- [25] SHEN H F, DENG H B, YANG Q Y, *et al.* First report of *Fusarium* root rot of tobacco caused by *Fusarium fujikuroi* in Guangdong Province, China[J]. *Plant Disease*, 2023; 107(10): 3294.
- [26] TANG Z Y, ZHU J, SONG Q J, *et al.* Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tea wilt in Zhejiang Province, China[J]. *BMC Microbiology*, 2024, 24(1): 38.
- [27] CESATI V, DE N G. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri: più o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli dal Persoon[M]. *Commentario Società Crittogamologica Italiana*, 1863: 177-240.
- [28] 潘佳亮. 苦参碱对山核桃干腐病原真菌(*Botryosphaeria dothidea*)抑菌机制研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [29] MORAL J, MORGAN D, TRAPERO A, *et al.* Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives caused by Botryosphaeriaceae fungi in California and Spain[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(8): 1809-1827.
- [30] 李丽芬. 梨树干腐病的发生与防治[J]. 云南农业, 2023(8): 65-67.
- LI L F. Occurrence and control of pear dry rot[J]. *Yunnan Agriculture*, 2023(8): 65-67.
- [31] JIAO Y R, GONG X, QI K J, *et al.* Transcriptome analysis provides new ideas for studying the regulation of glucose-induced lignin biosynthesis in pear calli[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 310.
- [32] QI K J, WU X, GAO X, *et al.* Metabolome and transcriptome analyses unravel the inhibition of embryo germination by abscisic acid in pear[J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 292: 110652.
- [33] PREMATHILAKE A T, NI J B, SHEN J Q, *et al.* Transcriptome analysis provides new insights into the transcriptional regulation of methyl jasmonate-induced flavonoid biosynthesis in pear calli[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 388.
- [34] LI C, WU J, HU K D, *et al.* *PyWRKY26* and *PybHLH3*

- cotargeted the *PyMYB114* promoter to regulate anthocyanin biosynthesis and transport in red-skinned pears[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 37.
- [35] YUAN M H, NGOU B P M, DING P T, *et al.* PTI-ETI crosstalk; An integrative view of plant immunity[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2021, 62: 102030.
- [36] 陈英, 谭碧玥, 黄敏仁. 植物天然免疫系统研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(1): 129-136.
CHEN Y, TAN B Y, HUANG M R. Recent advances in plant immune system[J]. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Sciences Edition), 2012, 36(1): 129-136.
- [37] 胡燕. 野生柑橘响应韧皮部杆菌亚洲种侵染的生物学和转录组学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [38] YU M, HU C X, WANG Y H. Effects of molybdenum on the intermediates of chlorophyll biosynthesis in winter wheat cultivars under low temperature[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(9): 670-677.
- [39] ZHANG Q Q, ZHONG T, LIZHU E, *et al.* GT factor ZmGT-3b is associated with regulation of photosynthesis and defense response to *Fusarium graminearum* infection in maize seedling[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 724133.
- [40] QIU B L, CHEN H J, ZHENG L L, *et al.* An myb transcription factor modulates *Panax notoginseng* resistance against the root rot pathogen *Fusarium solani* by regulating the jasmonate acid signaling pathway and photosynthesis[J]. *Phytopathology*, 2022, 112(6): 1323-1334.
- [41] 孔杰, 刘文文, 蒋学乾, 等. 苜蓿叶绿素合成酶(*CHLG*)编码基因的表达及对生物量的影响[J]. 西北植物学报, 2021, 41(7): 1079-1090.
KONG J, LIU W W, JIANG X Q, *et al.* Expression of chlorophyll synthase (*CHLG*) encoding gene and its effect on biomass in *Medicago*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(7): 1079-1090.
- [42] RUAN Y L. Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 33-67.
- [43] 郜新强, 王小艳, 焦伟, 等. 金丝楸幼苗响应盐碱胁迫的生理和转录组分析[J]. 林业科学研究, 2023, 36(1): 166-178.
GAO X Q, WANG X Y, JIAO W, *et al.* Physiological and transcriptomic analysis of *Catalpa bungei* seedlings in response to saline-alkali stresses[J]. *Forest Research*, 2023, 36(1): 166-178.
- [44] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
WANG L, SHI L L, ZHANG Y X, *et al.* Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2007, 25(5): 500-508.
- [45] NIGGEWEG R, MICHAEL A J, MARTIN C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(6): 746-754.
- [46] KIEDROWSKI S, KAWALLECK P, HAHLBROCK K, *et al.* Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus[J]. *EMBO Journal*, 1992, 11(13): 4677-4684.
- [47] PETRUSSA E, BRAIDOT E, ZANCANI M, *et al.* Plant flavonoids: Biosynthesis, transport and involvement in stress responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 14950-14973.
- [48] MUTKA A M, FAWLEY S, TSAO T, *et al.* Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses[J]. *Plant Journal*, 2013, 74(5): 746-754.
- [49] YIN C T, PARK J J, GANG D R, *et al.* Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(3): 227-235.
- [50] 苏培森. 小麦抗赤霉病相关基因的分离和功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.