



苹果和梨抗病相关基因的诱导与表达分析

孙 娥¹, 闫文萍², 余宏强¹, 赵 丹¹, 朵 虎¹, 左存武^{1*}

(1 甘肃农业大学 园艺学院, 兰州 730070; 2 临泽县林业和草原局, 甘肃张掖 734200)

摘 要: 该研究结合蔷薇科数据库, 经多序列比对、表达分析和验证, 筛选了苹果和梨抗病反应 Marker 基因及其检测引物, 并以腐烂病抗性资源杜梨和东北山荆子悬浮细胞为材料, 经 20% 腐烂病菌 (Vp) 代谢物处理, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 Marker 基因对腐烂病信号响应的表达模式, 为苹果、梨抗病反应的快速检测和杜梨抗腐烂病机理的系统研究奠定基础。结果显示: (1) 经检索比对共筛选出水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA)、乙烯 (ET)、系统获得型抗性 (SAR) 反应、病原相关分子模式激发的免疫反应 (PTI)、植保素和防御相关等信号的 15 个 Marker 基因及其对应引物。 (2) 各处理 cDNA 浓度采用 100 ng · μL⁻¹ 时 C_q 值均介于 18~25, 且 PCR 扩增效率高, 表明所选的 15 个 Marker 基因的引物均可准确反映抗性反应的激活状况, 可作为各自信号通路的 Marker 基因。 (3) 与对照相比, Vp 代谢物处理后杜梨悬浮细胞中 ROS 的积累随处理时间的延长呈逐渐显著上升的趋势, 并于处理 6 h 时, ROS 信号值达到对照的 3.2 倍, 表明 Vp 代谢物会激活体内的免疫反应 (PTI), 进而导致植物体内 ROS 的爆发。 (4) RT-qPCR 验证分析显示, Vp 代谢物处理后, 杜梨悬浮细胞中 SA、JA、PTI、SAR、R 基因、植保素、防御相关等信号通路的 Marker 基因都呈上调表达趋势, 其中, SA、JA 和 SAR 通路的 Marker 基因 *ChiV* (Chitinase class V)、*LOX1* (Lipoxygenase 1) 和 *PR4* (Pathogenesis-Related 4) 及防御相关基因 *PAL1* (Phe Ammonia Lyase 1) 的表达上调最为明显, 最高分别可上升至对照的 1718、691、6369 和 1072 倍, 表明杜梨受到 Vp 代谢物胁迫时, 主要激活了植物体内的 SA、JA、SAR 和防御相关信号通路的基因, 进而能够抵御病原的进一步入侵。研究发现, SA、JA、SAR 和防御反应等信号参与了杜梨对腐烂病胁迫的响应, 进而提高其抗病性。

关键词: 腐烂病; Marker 基因; 植物免疫; 差异表达

中图分类号: Q786; Q789 **文献标志码:** A

Induction and Expression Analysis of the Disease Resistance Related Genes in Apple and Pear

SUN E¹, YAN Wenping², YU Hongqiang¹, ZHAO Dan¹, DUO Hu¹, ZUO Cunwu^{1*}

(1 College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2 Forestry and Grassland Bureau, Linze County, Zhangye Gansu 734200, China)

Abstract: In this study, combined with Rosaceae database, through multiple sequence alignment, expression analysis and validation, we screened the defense-related Marker genes and corresponding primers in the genome of apple (*Malus domestica*) and pear (*Pyrus bretschneideri*). We took the suspension cells of Duli and DongbeiShanjingzi as materials, treated with 20% metabolites of *Valsa canker* (Vp), and analyzed the expression patterns of marker genes in response to Vp signal by real-time fluorescent quantitative PCR (RT qPCR), which lays a foundation for the rapid detection of disease resistance reaction of apple and pear and systematic study of resistance mechanism to Vp of Duli. The results showed that: (1) a total of

收稿日期: 2022-02-24; 修改稿收到日期: 2022-06-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31860545); 甘肃省教育厅产业支撑引导项目

作者简介: 孙 娥 (1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事苹果、梨腐烂病抗病机制。E-mail: se107332002se@126.com

* 通信作者: 左存武, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事苹果、梨腐烂病抗病机制。E-mail: zuocw@gsau.edu.cn

15 Marker genes and corresponding primers for salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), ethylene (ET), systemic acquired resistance (SAR) response, pathogen-associated molecular pattern-primed immune response (PTI), phycocyanin and defense-related signals were screened by search and comparison. (2) The Cq values ranged from 18 to 25 at the cDNA concentration of $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for each treatment, and the PCR amplification efficiency was high, which indicated that the primers of the 15 Marker genes could accurately reflect the activation of the resistance response and could be used as Marker genes for the respective signaling pathways. (3) Compared with control, the accumulation of ROS in suspension cells of Duli after Vp metabolite treatment showed a significant increase with the treatment time, and the value of ROS signal reached 3.2 times of the control at 6 h, show that Vp metabolite activates the plant immune response (PTI), which induce the burst of ROS. (4) RT qPCR analysis showed that Marker genes of SA, JA, PTI, SAR, R-gene, phytoalexin and defense-related signaling pathways were up-regulated in Duli suspension cells after Vp metabolite treatment, among which, expression of SA, JA and SAR related genes *ChiV* (Chitinase class V), *LOX1* (Lipoxygenase 1), *PR4* (Pathogenesis-Related 4), and defense response related gene *PAL1* (Phe Ammonia Lyase 1) were robustly induced, the highest levels climbed to 1718-, 691-, 1072- and 6369-fold of the control, respectively. The results shown that it mainly activated genes of SA, JA, SAR and defense-related signaling pathways when Duli subjected to Vp metabolite, and then resist the further invasion of pathogens which in turn were able to resist further invasion of the pathogen. It was found that SA, JA, SAR and defense response signals were involved in the response of Duli to Vp, thereby improving its disease resistance.

Key words: *Valsa* canker; Marker gene; plant immune response; differential expression

腐烂病俗称“烂皮病”、“臭皮病”,由腐生真菌黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)引起,是苹果和梨生产中的重大真菌性病害^[1]。腐烂病病原菌是苹果和梨树上的习居菌,主要以菌丝、子座及孢子角在田间病株(病斑)及病残体上越冬;从分生孢子器渗出的分生孢子可持续一年,甚至在冬季树皮潮湿时也会发生,分生孢子感染果树后可在一年中的不同时间诱发树体腐烂病变,特别是在冬季。故初冬修剪可能会促进果树被黑腐皮壳菌感染,加速该病害在田间的传播^[2]。生产中常采用刮除发病组织并涂抹化学药剂来防治该病,但在大面积推广应用时该方法仍存在劳动力投入成本高等限制因素故无法有效防治。此外,因病斑皮层外缘木质部带菌深度可达 1.5 cm 致防治过程中刮除不干净导致复发^[3],增大防控难度。目前抗性育种已成为苹果和梨育种中最为有效且环保的方法,但育种进程仍受限于育种周期长、抗性育种材料稀缺和抗病机理研究不深入等因素。

长期进化的过程中,植物为抵御病原微生物入侵在体内形成了复杂的免疫系统。首先,当植物遭遇病原侵袭后,病原体相关的分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)可被植物细胞膜上的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRRs)所识别,激发第一层免疫反应,即 PAMP 激发的免疫反应(PAMPs triggered immunity, PTI)^[4]。为有效侵染植物,病原物可分泌寄主特异

效应子(effectors)抑制植物 PTI 反应,其信号可被位于寄主胞质的抗性基因识别,引发效应子激发的免疫反应(effector triggered immunity, ETI)^[5-6]。此后,诱发植物整体的抗性反应,称为系统获得抗性(systemic acquired resistance, SAR)反应^[7]。正常情况下,植物需要依靠 PTI 和 ETI 共同作用来检测入侵病原菌并激活植物体内防御机制,且 PTI 和 ETI 反应的进行都需要 PTI 和 ETI 中的重要成分来实现更强的植物防御^[8]。除此之外,植物激素、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、钙离子等多种信号分子也参与调控植物的免疫反应。其中,水杨酸(salicylic acid, SA)和 ROS 分别是启动植物 SAR 和局部细胞超敏反应(hypersensitivity reaction, HR)的重要信号物质,贡献于植物对寄生菌的抗性^[9]。腐生致病菌侵染植物过程中,茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(Ethylene, ET)信号及 WRKY 转录因子也被激活,调控植物对腐生菌的免疫反应^[10-11]。近年来还发现植保素、胍胍质等多种具有物种特异性的次生代谢产物都具有广谱抑菌活性并积极参与植物的生物防御响应^[12]。

模式植物中,已陆续鉴定出多种免疫信号通路的 Marker 基因,为研究寄主对特定病原菌的抗性机制提供了极大的方便。*NPR1*(nonexpressor of pathogenesis related genes 1)蛋白和 *PR*(Pathogenesis-Related)蛋白作为 SAR 信号传导途径上的关

键调控因子,是调节植物抗病性的重要基因,故在判断植物体内 SAR 反应是否被激活时可通过检测 *NPR1*、*PR1*、*PR2*、*PR4* 和 *PR5* 等 Marker 基因的表达量来判断^[13-15]。此外,陆续发现免疫反应中多种信号分子的 Marker 基因,如 *PR1*(或 *PR5*)、*ACS1* 或 *ACS6*(*arabidopsis* cysteine synthase 1 or 6)、*LOX1*、*EDS1*(enhanced disease susceptibility 1)和 *RboHD*(respiratory burst oxidase homologue D)分别可作为 SA、ET、JA、抗性基因和 ROS 的 Marker 基因^[16-18]。但 Marker 基因在非模式植物中的应用仍不够广泛。本研究结合同源序列检索、保守区域筛选和表达验证筛选了免疫反应中重要信号通路的 Marker 基因,并对上述基因在抗性资源杜梨和东北山荆子响应腐烂病过程中的表进行达分析。

1 材料和方法

1.1 材料

杜梨和东北山荆子悬浮细胞为本实验室经愈伤组织诱导后悬浮培养获得。苹果和梨腐烂病原菌株 *Vm-A-003*、*Vp-P-002* 均由本实验室分离获得,经分子鉴定确定为典型的苹果和梨腐烂病菌^[19]。将菌株分别接种至 PDA(*potato dextrose agar*)培养基,活化培养 4 d 后,各菌株分别取 10 个菌饼接种至 100 mL PDB(*potato dextrose broth*)液体培养基,黑暗、静置培养 3 d,经离心和过滤除菌,获得菌株代谢物。

收集杜梨和东北山荆子悬浮细胞,利用 40 目细胞过滤去除大细胞团,收集并取 500 μ L 小细胞团(细胞密实体积)转入至 16 mL MS 液体培养基,黑暗、25 $^{\circ}$ C、120 r/min 悬浮培养 48 h 备用。激素处理:悬浮细胞中分别加入 JA 和 SA 溶液,终浓度为 50 μ mol/L。腐烂病菌代谢物处理:取 *Vm* 和 *Vp* 代谢物原液各 4 mL,分别加入至东北山荆子和杜梨悬浮细胞,终浓度为 20%(V/V)。对照组细胞中,用 MS 液体培养基代替腐烂病菌代谢物原液或激素溶液。于处理 1、3 和 6 h 后,收集对照和处理组细胞用于基因表达分析。以上试验设 3 次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 序列检索及多序列比对 通过查阅文献,确定拟南芥、烟草等模式植物中抗性反应关键通路的 Marker 基因。根据基因登录号在拟南芥在线信息资源(*Arabidopsis* information resource, TAIR, <http://www.arabidopsis.org>)或美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,

NCBI)下载目标基因的 CDS 序列。将序列依次输入至蔷薇科基因组在线数据资源(Genome database of rosaceae species, GDR, <https://www.rosaceae.org/>)进行序列比对,获得各候选基因在苹果(*Malus domestica*)、山荆子(*Malus baccata*)、西洋梨(*Pyrus communis*)和杜梨(*Pyrus betulifolia*)基因组中的同源基因。将各目标基因在以上 4 个物种中的同源基因进行多序列比对,获得保守区域。将各目标基因同源序列的保守区域输入至在线软件 Primer 3(<http://primer3.ut.ee/>)进行实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)引物设计。

1.2.2 表达分析 样品 RNA 提取采用 RNAout 试剂盒(160906-50, Tiandz, 北京),凝胶电泳和超微量分光光度计进行 RNA 质量检测。取 1 μ g RNA,采用试剂盒 Prime S-cript TM RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047, TaKaRa, 大连)进行 cDNA 合成。利用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒在实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)仪(Mx3005p, Stratagene, 美国)上进行基因表达的定量分析。内参基因 Actin 引物参考 Zuo 等^[20]的报道,反应结束后分析荧光值变化曲线及溶解曲线,并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量。

1.2.3 ROS 测定 取对照和不同处理细胞,分别用 10 μ mol/L 的 ROS 特异荧光染料 H2DCFDA 溶液在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中孵育 10 min,然后对标记后的细胞利用多功能酶标仪(TECAN, Spark, 瑞士)对 ROS 进行定量分析。测定激发波长和发射波长分别为 488 和 525 nm。

1.3 统计分析

原始数据用 Excel 整理,差异显著性分析用 T-test($P < 0.05$)法,图形可视化采用软件 OriginPro 8.0 进行,所有数值均表示为平均数 $\pm$ 标准差。

2 结果与分析

2.1 序列筛选及保守区域确定

经检索文献^[16-18,21-22]初步确定来自拟南芥、烟草等模式植物共 15 个基因,涉及 SA、ET、JA、PTI、SAR、ROS、R 基因、防御相关和植保素等 9 个免疫反应相关的信号通路(表 1)。通过多序列比对和保守结构域分析从苹果、山荆子、西洋梨和杜梨基因组中均获得以上基因的同源基因,序列相似性均在 71.53%~96.00%之间,且含有相同的保守结构域。

2.2 序列比对和引物设计

为获得在苹果和梨中通用的引物,将来自 4 个

物种的同源基因进行多序列比对,在保守区域设计备用引物 2 对。对来自各处理样品不同浓度的 cDNA 进行了荧光定量发现,各基因在 5 倍稀释液($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)时 C_q 值均介于 18~25(图 1),以 cDNA 5 倍稀释液($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)为模板,对所有引物进行了扩增,确定扩增效率较高的引物 15 对(图 2,表 2)。

2.3 SA 和 JA 通路 Marker 基因表达

图 3 显示,JA 和 SA 诱导后,各处理均可诱导各自通路 Marker 基因上调表达。SA 处理后,该通路 Marker 基因 *CHN50* 和 *ChiV* 在杜梨和东北山荆子悬浮细胞均为上调表达(图 3,A、B),且随着处理时间的增加,*CHN50* 和 *ChiV* 在 2 个物种中的相对表达模式都为上调表达趋势。杜梨细胞中,SA 处理可致 *CHN50* 和 *ChiV* 的表达量上调至对照的 8 和 5 倍(图 3,B)。JA 处理后该通路 Marker 基因都为上调表达。其中,*PR1b* 在东北山荆子中上调最为明显,最高可至对照的 181 倍(图 3,C)。*LOX1* 和 *PDF1.2*(Plant Defensin 1.2)在杜梨中上调最为明显,最高可上调至对照的 585 和 5 699 倍(图 3,D),且在杜梨中上述基因的表达远高于在东北山荆子中的表达。以上结果表明,如上 2 个信号通路候选 Marker 基因的表达均可被外源信号激活,

可作为各自信号通路的 Marker 基因,同时为其余通路 Marker 基因的表达提供了可靠性。

2.4 SA 处理后 SAR 通路和 R 基因的表达模式

由图 4 可知,外源 SA 处理下 SAR 通路关键基因 *PR4* 和 *R* 基因 *EDS1*、*PAD4*(Phytoalexin Deficient 4)在杜梨(图 4,A)和东北山荆子(图 4,B)中相对表达量都呈显著上升,且表达趋势几乎趋于一致。其中,*PR4* 在东北山荆子中的表达量在 6 h 达到了对照的 1 538 倍,在杜梨中仅上调了 7.6 倍。杜梨中 *PAD4* 的表达量在处理 6 h 时其表达量达到对照的 387 倍,而在东北山荆子中其表达量最高仅上调至对照的 2.7 倍。*EDS1* 在杜梨和东北山荆子中的表达几乎一致,最大上调倍数分别是对照的 3.4 倍和 3.5 倍。综上,所选的 SA 信号及相关通路基因的表达可被 SA 激活,进一步说明所选的 Marker 基因引物可反映该信号通路是否被激活。

2.5 ROS 含量测定及通路基因表达验证

与对照相比,Vp 代谢物处理后杜梨悬浮细胞中 ROS 的积累呈逐渐上升的趋势。处理 1 h、3 h 和 6 h 时,其信号值分别由对照时的 1 689 上升至 2 313、4 524.8 和 5 443.8(图 5,A)。此外,Vp 代谢物处理还增加了在杜梨细胞 ROS 响应基因的表达水平。其中,*OXI1*(oxidative signal-inducible1)的最高表达量达到了对照的 25.2 倍,*APX1*(ascorbate peroxidase 1)和 *TANOX*(triticum aestivum NADPH Oxidase)的表达最高仅上调了对照的 5.6 和 6.3 倍(图 5,B)。表明杜梨在受到 Vp 代谢物胁迫时,会激活体内 PTI 反应,进而导致植物体内 ROS 的爆发。

2.6 杜梨响应腐烂病信号的免疫反应相关基因表达模式

为了解高抗资源杜梨响应腐烂病信号的抗性机制,进一步测定了各通路 Marker 基因在杜梨悬浮细

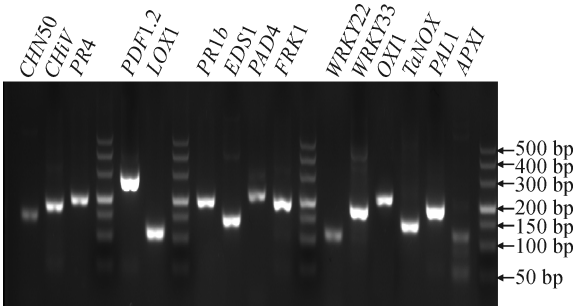


图 2 Marker 基因 PCR 扩增胶图

Fig. 2 Marker gene PCR amplification gel map

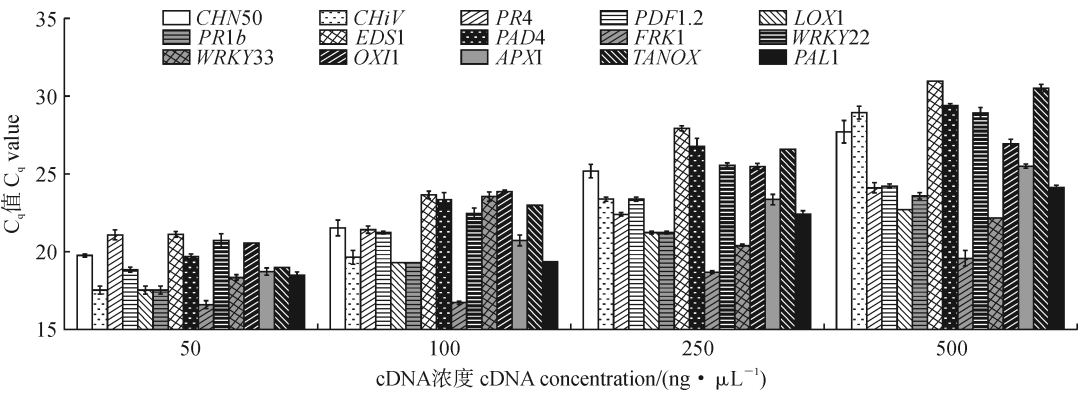


图 1 不同 cDNA 浓度下 Marker 基因的表达

Fig. 1 Expression of marker genes at different cDNA concentrations

表 1 目标基因的同源基因
Table 1 Homologs of target genes

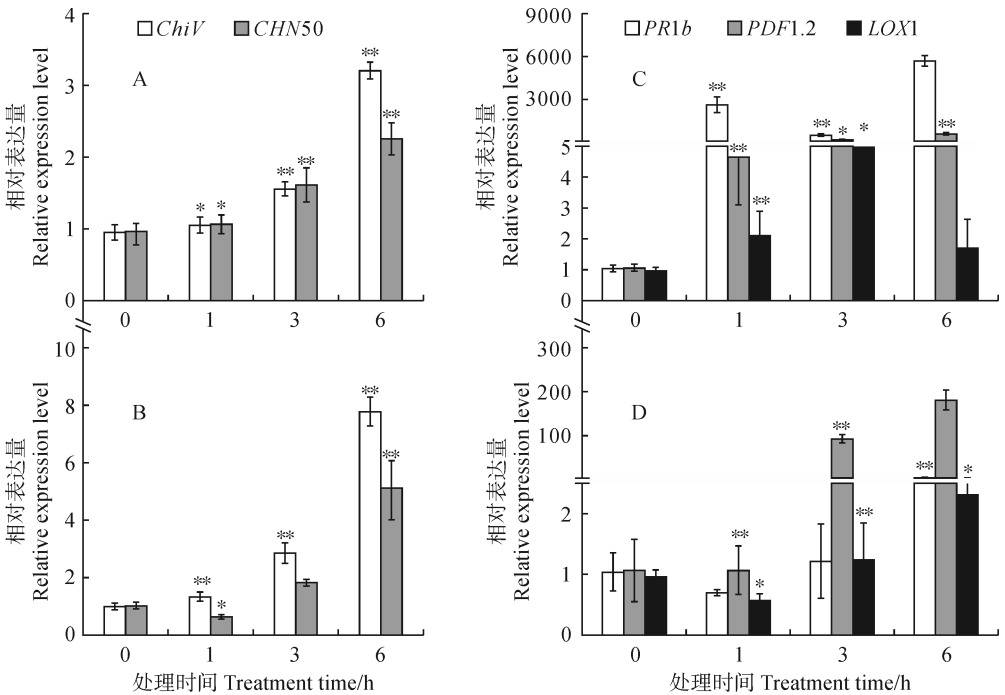
同源基因 Homolog gene												
基因号 Gene ID	基因名 Gene name	物种 Species	响应信号 Response signal	保守结构域 Conserved domain	苹果 <i>Malus domestica</i>		山荆子 <i>Malus baccata</i>		西洋梨 <i>Pyrus communis</i>		杜梨 <i>Pyrus betulifolia</i>	
					基因 ID Gene ID	序列相似性 Sequence similarity /%	基因 ID Gene ID	序列相似性 Sequence similarity /%	基因 ID Gene ID	序列相似性 Sequence similarity /%	基因 ID Gene ID	序列相似性 Sequence similarity /%
M15173.1	CHN50	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L	SA	Glyco_hydro_19	MD02G1120200	79.19	MABA008254	71.53	pycom15g20880	84.15	Chr2. g42087	71.55
X77110.1	ChiV	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L	SA	Glyco_hydro_18	MD02G1011100	86.54	MABA028390	86.54	pycom02g01000	87.04	Chr2. g41204	87.04
AT3G04720	PR4	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	ET/SAR	Barwin	MD04G1225400	73.39	MABA012195	72.81	pycom04g19860	72.51	Chr4. g40685	73.52
AT5G44420	PDF1.2	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	JA/ET	Gamma-thionin	MD08G1027500	95.24	MABA032601	87.88	pycom08g02150	92.00	Chr15. g04736	92.00
AT1G55020	LOX1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	JA	Lipoxygenase,PLAT	MD12G1218300	74.71	MABA034796	76.32	pycom12g20390	75.1	Chr12. g35510	75.1
X66942.1	PR1b	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L	JA	CAP_PR-1	MD05G1109100	86.79	MABA036449	81.08	pycom05g10520	81.08	Chr5. g08127	82.43
AT3G48090	EDS1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	R 基因 R gene	EDS1_EP_Li	MD14G1188700	77.22	MABA028213	77.22	pycom06g16150	96.00	Chr6. g51323	96.00
AT3G52430	PAD4	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	R 基因 R gene	EDS1_EP_Lipase_3	MD15G1028700	93.33	MABA024371	93.33	pycom15g03090	93.33	Chr9. g44911	93.33
AT2G19190	FRK1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	PTI	Malectin_like,Pkinase,PK_Tyr_Ser-Thr	MD17G1179300	72.16	MABA043068	74.24	pycom17g18840	71.82	Chr17. g26606	71.99
AT4G01250	WRKY22	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	PTI	WRKY	MD07G1131400	82.82	MABA013075	78.73	pycom01g10030	79.48	Chr7. g33338	79.48
AT2G38470	WRKY33	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	植保素 Phytoalexin	WRKY	MD03G1057400	84.46	MABA037770	83.47	pycom12g17060	84.27	Chr3. g20414	84.06
AT3G25250	OXI1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	ROS	Pkinase,PK_Tyr_Ser-Thr,	MD05G1164900	76.32	MABA002027	75.66	pycom05g15350	76.32	Chr5. g07536	76.32
AT1G07890	APX1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	ROS	peroxidase	MD11G1121400	77.34	MABA015221	85.57	pycom03g08820	76.33	Chr3. g19939	86.6
AY561153	TANOX	小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	ROS	NAD_binding_6,NOX_Duox_like_FAD_NADP	MD14G1113700	80.98	MABA039779	80.98	pycom06g08880	74.72	Chr14. g49159	81.6
AT2G37040	PAL1	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	防御相关 Defense-associated	Lyase_aromatic	MD12G1116700	73.76	MABA001202	74.56	pycom12g11580	74.17	Chr12. g36529	73.73

注:SA.水杨酸;JA.茉莉酸;ET.乙烯;SAR.系统获得型抗性;PTI.病原相关模式分子触发的免疫;ROS.活性氧

Note: SA. Salicylic acid; JA. Jasmonic acid; ET. Ethylene; SAR. Systemically acquired resistance; PTI. Pathogen-associated model molecules triggered Immunity; ROS. Reactive oxygen species

表 2 目标基因所用引物
Table 2 Primers used for target gene

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>CHN50</i>	CTCAAACCTCTCATGAGACTACTGG	GTAGGTAAGTTGGATGGGTCCTCTG
<i>ChiV</i>	CTACAGCATAAACTACCCCTTCCAG	CGTTCCTATACCGGATCCATTAGC
<i>PDF1.2</i>	GTCAGGGTTTTGTGCAAACACC	TGAAGTAGCAGAAGCAAGCAACTC
<i>PR4</i>	GGTGAGAATTGTTGATCAGTGCGAG	GTAGTTGACAATAAGGTGGCCTTG
<i>LOX1</i>	GCTTATGTGGCTGTAAATGACTCTG	GAGGATGCAGAAAGTTGTAAATTGG
<i>PR1b</i>	GACACACCCCAAGACTACCTCAAG	GTCACCAGTGCTCATGGCAAG
<i>EDS1</i>	GCAATGGAACATTTTTCTGTGTGAC	AATTTGGATCGAAGAAGGGGAG
<i>PAD4</i>	TGGGTGTAAGAGCATAAGCAGAG	ATAACATTCAAGCTTGTGGCTTTG
<i>FRK1</i>	TCGAGTCCAAAAACGACAGTTTAC	GCTGAGTCCAAACCTCTCATGAGAC
<i>WRKY22</i>	CATATCCAAGGGGATATTACAGATG	GTGACTATAAAAAATATTCGGGTCGG
<i>WRKY33</i>	GGATGATGGCTTCAATTGGAG	ACTGAGGCTTAGGATGGTTGTGA
<i>OXI1</i>	CAACTTGGA AAACTCCGAGAAGTC	TTGTCAGTATCCGATAAAAACGTCTC
<i>APX1</i>	CCCTATTCTCTCTTACGCTGACTTC	GCCGAAGACATCCCTCAAATG
<i>TaNOX</i>	TTGGAGTTGTTGATGCGTTG	TCTTGTCACCATGTGCGAAGAAG
<i>PAL1</i>	TTGTCAATGACTTTTACAACAATGG	GGAACAATAAGATGCCATGGC



* P < 0.05, ** P < 0.01 表示同时期处理相对于对照的差异显著水平,下同

图 3 外源 SA(A,B)和 JA(C,D)处理对不同通路 Marker 基因在东北山荆子(A,C)和杜梨(B,D)中的表达特征

* P < 0.05, ** P < 0.01 indicates significant difference between treatments relative to the control in the same period, the same as below

Fig. 3 Expression of different pathway marker genes in DongbeiShanjingzi (A, C) and Duli (B, D)

胞响应 V_p 代谢物过程中的表达模式,发现各通路 Marker 基因都呈不同程度上调表达(图 6)。其中,JA 通路中 Marker 基因 *PDF1.2* 和 *LOX1* 上调最为显著,最高上调倍数分别达到对照的 369 和 6 916 倍(图 6,A)。防御相关基因 *PAL1* 在处理 1 h 后表达水平达到了对照的 1 072 倍,随后又缓慢降

低。SAR 通路基因 *PR4* 在处理 6 h 后达到了对照的 6 369 倍,其表达量相比其他信号通路 Marker 基因更为显著(图 6,B)。SA 通路中 Marker 基因 *ChiV* 上调最为明显,最高表达量在处理 3 h 后达到了对照的 1 718 倍(图 6,C)。此外,在 V_p 代谢物处理下 PTI 通路 Marker 基因、R 基因和植保素相关 Marker 基因也

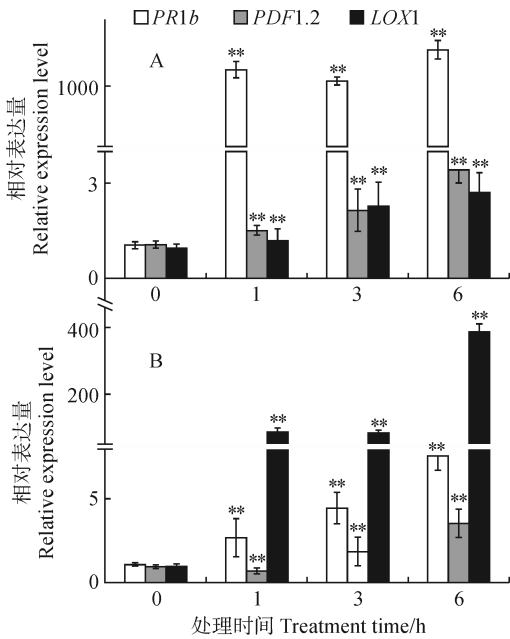


图 4 外源 SA 处理下 SAR 和 R 基因在东北山荆子 (A) 和杜梨 (B) 中的表达

Fig. 4 Expression of SAR and R- genes in Dongbei Shanjingzi (A) and Duli (B) under exogenous SA treatment

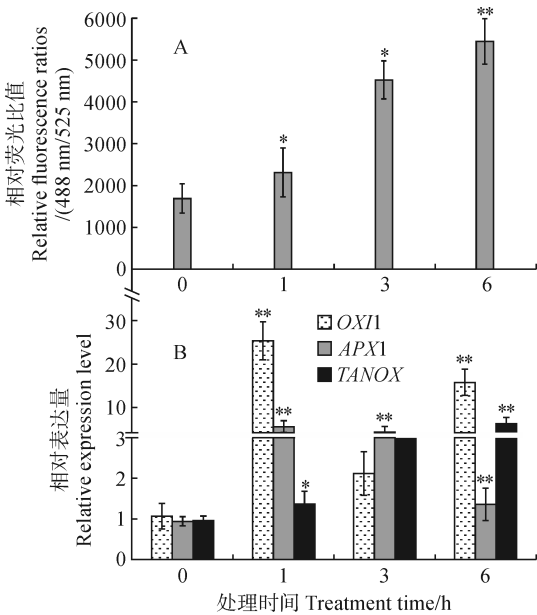


图 5 腐烂病菌 (Vp) 代谢物处理下 ROS 含量测定 (A) 及通路相关基因在杜梨中的表达 (B)

Fig. 5 Determination of ROS content under Vp metabolite treatment (A) and expression of pathway-related genes in Duli (B)

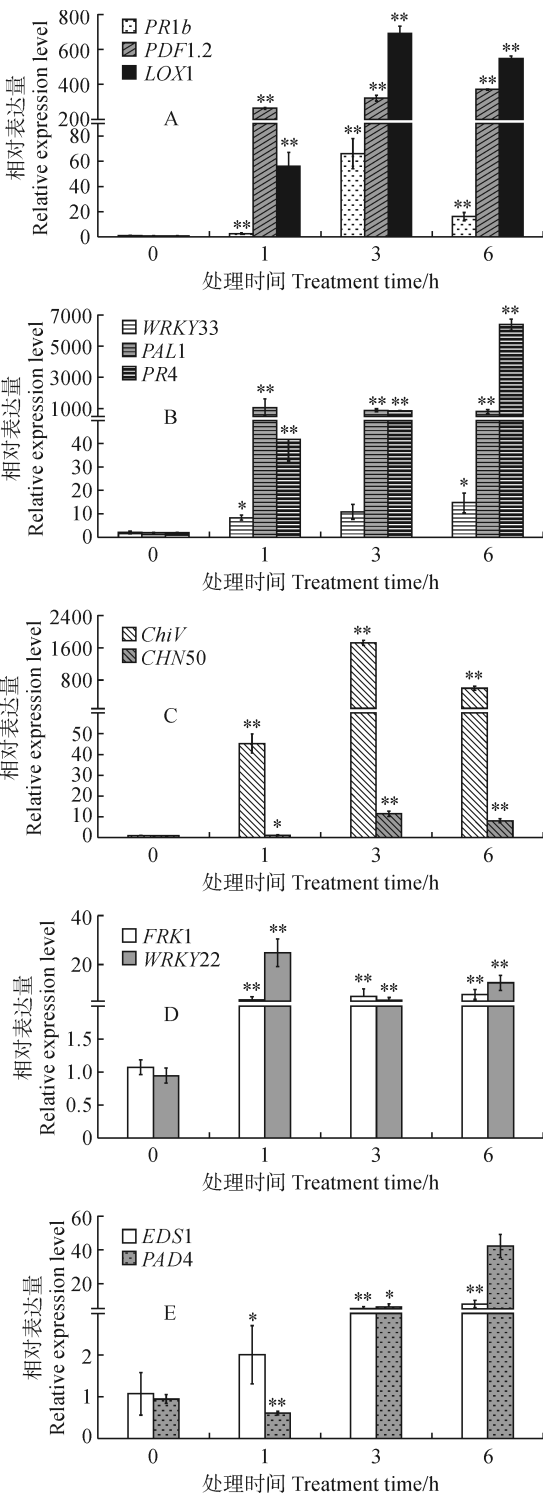


图 6 腐烂病菌 (Vp) 代谢物处理下病程相关基因在杜梨中的表达

Fig. 6 Expression of Pathogenesis-related genes in Duli under Vp metabolite treatment

呈上调表达,但表达量相比其他通路 Marker 基因相差甚大(图 6, D、E)。以上结果表明在受到病原微生物侵袭后,主要激活了植物体内的 SA、JA、SAR 和防御相关信号,继而抵御病原的进一步入侵。

3 讨 论

本研究结合同源比对和基因表达分析,筛选出苹果和梨抗性反应相关信号中的 Marker 基因及检

测其表达模式的引物。同时,利用如上 Marker 基因,研究了高抗砧木杜梨对腐烂病菌的防卫机制,发现多个抗性反应信号参与其抗病性,且在响应腐烂病的过程中呈上调表达,其中表达量较高的基因有: *ChiV*、*LOX1*、*PR4* 和 *PAL1*。

植物在应对病原真菌的过程中,许多防御相关信号通路的 Marker 基因都参与了植物的抗性反应。JA 通路防御标记基因 *PDF1.2* 可增强拟南芥对病原体的抗性^[23],腐生型病原真菌或共生真菌可通过抑制茉莉素途径、降低茉莉素介导的植物抗性,进而促进腐生型病原真菌的侵染或共生真菌与植物共生^[21];与此同时,茉莉素可通过调控次生代谢产物的合成和诱导防御基因的表达来调控植物对腐生真菌的抗性反应^[24]。烟草在疫霉菌侵染后可诱发 ROS 的迸发和 PTI 反应相关基因 *WRKY33* 和 *FRK1* (Flg22-induced Receptor-like Kinase 1) 的表达^[25],ROS 在植物与腐生型真菌相互作用过程中也起着关键作用^[26]。SAR 信号通路基因 *PR4* 能够编码具有抗真菌活性的蛋白,特别是对镰刀菌活性的蛋白^[27]。*EDS1* 在植物的 2 层免疫防线中均发挥着非常重要的作用,尤其在第 2 层免疫防线中,植物大多数 TIR-NB-LRR (Toll-Interleukin1 Receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat) 类抗病基因功能的正常发挥都需要 *EDS1* 的参与^[28]。*EDS1* 不仅可以与病原菌效应蛋白发生相互作用,还可以与植物体内 TIR-NB-LRR 类蛋白形成复合体,从而实现抗病信号通路的正常传递^[29]。此外,*EDS1* 和 *PAD4* 可通过 SA 依赖性和非依赖性机制对白粉病的抗性做出重大贡献^[30]。本研究对同源性较低的基因 (*CHN50*、*PR4*

和 *FRK1* 等)进行了表达验证,发现了其与模式植物中相似的表达模式。同时,发现随着 ROS 含量上升,相关 Marker 基因的表达量也随着上升。因此,本实验所得的基因及相关引物可准确反应抗性反应是否被激活,可作为各自通路的 Marker 基因。

SA 和 JA 作为植物防御反应中的重要信号分子,在植物防御中有着很大的贡献,且因入侵病原体的不同防御机制不同。研究发现外源施用防御激素 SA 或其合成类似物可诱导植物 SAR 反应^[31]。本研究结果显示当外源施加 SA 后东北山荆子和杜梨中 *PR4* 的表达量都呈显著上调。另有研究表明,SA 信号途径和 JA 信号途径既存在协同作用,也存在拮抗作用^[32],JA 能够抑制依赖 SA 途径标志基因 *PR1* 的表达^[33]。然而,在田间实验中观察到,由细菌性枯萎病菌诱导黄瓜产生 JA 介导的 ISR 并不影响 SAR 标志基因 *PR1* 的表达^[34]。此外,JA 作为 MeSA 上游的信号分子与其协同激发 SAR 反应^[35]。本实验结果显示,腐烂病菌胁迫时 SA 通路基因和 JA 基因表达都呈显著上调,并未受到相互抑制。由此可推测,JA 和 SA 在抗病过程中由于它们含量变化的异时性可能产生相互依赖,未发生 JA 对 SA 的抑制作用。

综上所述,本研究所获得的 15 个抗性反应 Marker 基因的引物可用于抗性反应的快速分析。此外,响应腐烂病信号过程中,抗性砧木杜梨中 SA、JA、PTI、SAR、R 基因、防御相关和植保素等多个免疫反应被激活,推断这些信号通路可相互作用共同调节杜梨对腐烂病的抗性响应,但仍需要对这些信号通路基因的生物学功能及相互间的调控关系进行进一步的详细研究。

参考文献:

- [1] WANG X L, SHI C M, GLEASON M L, *et al.* Fungal species associated with apple *Valsa* canker in East Asia[J]. *Phytopathology Research*, 2020, **2**: 35.
- [2] WANG S T, HU T L, WANG Y N, *et al.* New understanding on infection processes of *Valsa* canker of apple in China[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, **146**(3): 531-540.
- [3] YIN Z Y, KE X W, KANG Z S, *et al.* Apple resistance responses against *Valsa mali* revealed by transcriptomics analyses[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2016, **93**: 85-92.
- [4] COUTO D, ZIPFEL C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, **16**(9): 537-552.
- [5] 杨 俊, 吕东平. 植物 PTI 天然免疫信号转导研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2018, **26**(10): 1 585-1 592.
- [6] YANG J, LÜ D P. Advances in signal transduction of PAMP-triggered immunity in plants[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2018, **26**(10): 1 585-1 592.
- [7] 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**: 102 030.
- [8] STAHL E, BELLWON P, HUBER S, *et al.* Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance[J]. *Molecular Plant*, 2016, **9**(5): 662-681.
- [9] CHANG M, CHEN H, LIU F Q, *et al.* PTI and ETI: Convergent pathways with diverse elicitors[J]. *Trends in Plant Science*, 2022, **27**(2): 113-115.
- [10] CHAKRABORTY N, GHOSH S, CHANDRA S, *et al.* Abiotic elicitors mediated elicitation of innate immunity in tomato: An *ex vivo* comparison[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2016, **22**(3): 307-320.

[10] MENGISTE T. Plant immunity to necrotrophs[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2012, **50**: 267-294.

[11] 王自娥, 邓 婕, 梁婷婷, 等. 岷江百合 *WRKY* 转录因子基因的克隆与功能分析[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(12): 1 983-1 993.

WANG Z E, DENG J, LIANG T T, *et al.* Cloning and functional analysis of *WRKY* transcription factor gene from *Lilium regale* Wilson[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(12): 1 983-1 993.

[12] 李 珂, 马 良, 杜鹏飞, 等. 玉米萜类植保素代谢关键基因对小斑病侵染的防御响应分析[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(9): 1 776-1 780.

LI K, MA L, DU P F, *et al.* Gene expression of maize terpenoid phytoalexin metabolism in response to southern leaf blight[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(9): 1 776-1 780.

[13] WANG C G, HUANG X E, LI Q, *et al.* Extracellular pyridine nucleotides trigger plant systemic immunity through a lectin receptor kinase/BAK1 complex[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**: 4 810.

[14] SPOEL S H, MOU Z L, TADA Y, *et al.* Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity[J]. *Cell*, 2009, **137**(5): 860-872.

[15] 陈培雯, 张 立, 陈学进, 等. 中国南瓜 *CmNPR1* 基因的克隆和表达分析[J]. 西北植物学报, 2021, **41**(12): 2 038-2 045.

CHEN P W, ZHANG L, CHEN X J, *et al.* Cloning and expression analysis of *CmNPR1* gene in *Cucurbita moschata* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(12): 2 038-2 045.

[16] ZHANG C, CHEN H, *et al.* Overexpression of the peanut CLAVATA 1-like leucine-rich repeat receptor-like kinase AhRLK1 confers increased resistance to bacterial wilt in tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, **70**(19): 5 407-5 421.

[17] BI D L, CHENG Y T, LI X, *et al.* Activation of plant immune responses by a gain-of-function mutation in an atypical receptor-like kinase[J]. *Plant Physiology*, 2010, **153**(4): 1 771-1 779.

[18] ZHANG Q, BERKEY R, BLAKESLEE J J, *et al.* *Arabidopsis* phospholipase Dα1 and Dδ oppositely modulate EDS1- and SA-independent basal resistance against adapted powdery mildew[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(15): 3 675-3 688.

[19] ZUO C W, MAO J, CHEN Z J, *et al.* RNA sequencing analysis provides new insights into dynamic molecular responses to *Valsa mali* pathogenicity in apple ‘Changfu No. 2’ [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2018, **14**(5): 1-10.

[20] ZUO C W, LIU H, LÜ Q Q, *et al.* Genome-wide analysis of the apple (*Malus domestica*) cysteine-rich receptor-like kinase (CRK) family: Annotation, genomic organization, and expression profiles in response to fungal infection[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2020, **38**(1): 14-24.

[21] SUN A Q, YU B, *et al.* MYC₂-activated TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE37 acetylates cell walls and enhances herbivore resistance[J]. *Plant Physiology*, 2020, **184**(2): 1 083-1 096.

[22] LONG Q, DU M X, LONG J H, *et al.* Transcription factor WRKY22 regulates canker susceptibility in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) by enhancing cell enlargement and CsLOB₁ expression[J]. *Horticulture Research*, 2021, **8**(10, 1038): s41438-21.

[23] 吴德伟, 汪姣姣, 谢道昕. 茉莉素与植物生物胁迫反应[J]. 生物技术通报, 2018, **34**(7): 14-23.

WU D W, WANG J J, XIE D X. Jasmonate action and biotic stress response in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, **34**(7): 14-23.

[24] GIMENEZ-IBANEZ S, CHINI A, SOLANO R. How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers[J]. *Plants* (Basel, Switzerland), 2016, **5**(1): 9.

[25] KOORNNEEF A, RINDERMAN K, GATZ C, *et al.* Histone modifications do not play a major role in salicylate-mediated suppression of jasmonate-induced *PDF1. 2* gene expression [J]. *Communicative & Integrative Biology*, 2008, **1**(2): 143-145.

[26] WEN Q J, SUN M L, *et al.* The novel peptide NbPPI₁ identified from *Nicotiana benthamiana* triggers immune responses and enhances resistance against *Phytophthora* pathogens[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, **63**(5): 961-976.

[27] TIAN S, TORRES R, BALLESTER A R, *et al.* Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: Virulence and resistance[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, **122**: 11-21.

[28] ALI S, GANAI B A, KAMILI A N, *et al.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance[J]. *Microbiological Research*, 2018, 212-213: 29-37.

[29] VOSS M, TOELZER C, BHANDARI D D, *et al.* *Arabidopsis* immunity regulator EDS1 in a PAD4/SAG101-unbound form is a monomer with an inherently inactive conformation[J]. *Journal of Structural Biology*, 2019, **208**(3): 107 390.

[30] RIETZ S, STAMM A, MALONEK S, *et al.* Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in *Arabidopsis* immunity [J]. *New Phytologist*, 2011, **191**(1): 107-119.

[31] HOWLADER P, BOSE S K, JIA X C, *et al.* Oligogalacturonides induce resistance in *Arabidopsis thaliana* by triggering salicylic acid and jasmonic acid pathways against Pst DC3000[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, **164**: 4 054-4 064.

[32] ZHANG N L, ZHOU S, *et al.* Revealing shared and distinct genes responding to JA and SA signaling in *Arabidopsis* by meta-analysis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 908.

[33] PIETERSE C M J, LEON-REYES A, VAN DER ENT S, *et al.* Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, **5**(5): 308-316.

[34] ZEHNDER G W, MURPHY J F, SIKORA E J, *et al.* Application of rhizobacteria for induced resistance[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, **107**(1): 39-50.

[35] TRUMAN W, BENNETT M H, KUBIGSTELTIG I, *et al.* *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(3): 1 075-1 080.

(编辑:宋亚珍)