

引用格式:

戴丽, 谢芳玲, 陈雅倩, 谢玲玲, 刘峰. 辣椒抗炭疽病材料筛选及转录组分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(1): 40–50.

DAI L, XIE F L, CHEN Y Q, XIE L L, LIU F. Screening and transcriptome analysis of anthracnose resistant materials in *Capsicum*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(1): 40–50.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒抗炭疽病材料筛选及转录组分析

戴丽^{1,2,3}, 谢芳玲^{1,2,3}, 陈雅倩^{1,2,3,4}, 谢玲玲⁵, 刘峰^{1,2,3*}

(1.湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128; 2.园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程研究中心, 湖南 长沙 410128; 3.蔬菜生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 4.湖南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 5.湖南省蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要: 从田间自然发病辣椒果实中分离培养得到辣椒炭疽病原菌X, 并应用该炭疽病原菌对112份辣椒材料的离体果实和幼苗进行抗炭疽病抗性鉴定, 筛选抗病品种, 并对抗性品种进行转录组分析。结果表明: 病原菌X经形态学及分子生物学鉴定, 鉴定为果生刺盘孢炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*); 对112份辣椒离体果实材料进行筛选, 共获得3个抗性材料RX12-160、X-738-1、RX22-1016, 109个感病材料; 对3个抗病品种进行辣椒苗期活体抗性鉴定, 最后鉴定RX22-1016为良好的抗病品种, 并对其接种果生刺盘孢炭疽菌后的转录组进行了GO富集分析和KEGG通路富集分析; GO富集程度较高的过程为光系统I中的光合电子传递、NAD(P)H脱氢酶复合物的组装、光合作用及光系统I中的光收集等; KEGG富集程度较高的通路为苯丙素的生物合成、谷胱甘肽代谢、淀粉和蔗糖代谢、光合生物的固碳作用和糖酵解/糖异生等通路; 共有的表达差异基因主要集中在苯丙素生物合成和谷胱甘肽代谢等通路上; 在RX22-1016与炭疽菌互作中, *Caz03g16640*、*Caz01g15210*、*Caz04g07320*和*Caz04g01720*基因在互作初期均呈现上调趋势, 推测这4个基因可能参与调控与抗病相关的物质的合成。

关键词: 辣椒; 炭疽病; 抗病性; 转录组分析

中图分类号: 641.3; S436.418.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)01-0040-11

Screening and transcriptome analysis of anthracnose resistant materials in *Capsicum*

DAI Li^{1,2,3}, XIE Fangling^{1,2,3}, CHEN Yaqian^{1,2,3,4}, XIE Lingling⁵, LIU Feng^{1,2,3*}

(1.College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.ERC for Germplasm Innovation and New Variety Breeding of Horticultural Crops, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Key Laboratory for Vegetable Biology of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China; 4.Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 5. Hunan Vegetable Research Institutes, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: From naturally infected pepper fruits collected in the field, the pathogen X responsible for pepper anthracnose was isolated and cultured. This pathogen was used to assess anthracnose resistance for 112 commercial pepper varieties through in vitro fruit and seedling assays, with the goal of identifying resistant varieties. Transcriptome analysis was then conducted on the resistant varieties to further investigate their response to the pathogen. The morphological and molecular biological identification confirmed that the pathogen X was *Colletotrichum fructicola*. Among the 112 pepper varieties screened, three resistant materials, namely RX12-160, X-738-1, and RX22-1016, were identified, while the remaining 109 varieties were found to be susceptible materials. Further evaluation of the three resistant varieties at the seeding stage revealed that RX22-1016 exhibited strong resistance to anthracnose. Then, a serial

收稿日期: 2024-03-26

修回日期: 2025-01-17

基金项目: 岳麓山种业创新项目(2021NK1006); 岭南现代农业实验室项目(NT2021004); “十四五”国家重点研发项目(2023YFD1201502)

作者简介: 戴丽(1999—), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事辣椒炭疽病抗性研究, 273306907@qq.com; *通信作者, 刘峰, 博士, 教授, 主要从事辣椒种质资源重要性状功能基因挖掘及新种质创制研究, liufengrich@126.com

of analysis, including transcriptome analysis, GO and KEGG pathway enrichment analyses, were performed on the RX22-1016. The processes with higher GO enrichment levels included photosynthetic electron transport in photosystem I, assembly of the NAD(P)H dehydrogenase complex, and photosynthesis, as well as light harvesting in photosystem I. In the KEGG enrichment analysis, pathways with higher enrichment levels included phenylpropanoid biosynthesis, glutathione metabolism, starch and sucrose metabolism, carbon fixation in photosynthetic organisms, and glycolysis/gluconeogenesis. The commonly differentially expressed genes were mainly concentrated in pathways such as phenylpropanoid biosynthesis and glutathione metabolism. Among these, the genes *Caz03g16640*, *Caz01g15210*, *Caz04g07320*, and *Caz04g01720* showed upregulated expression during the early stages of interaction between RX22-1016 and the anthracnose pathogen. These genes were implicated in the synthesis of disease-resistance-related compounds, suggesting their potential role in the plant's defense response.

Keywords: pepper; anthracnose; disease resistance; transcriptional analysis

近年来辣椒病毒病、疫霉病、炭疽病、枯萎病等病害在我国普遍发生,危害严重,每年都造成巨大的经济损失,抗病育种已成为我国辣椒育种的重要目标^[1],尤其是辣椒炭疽病的频发,给辣椒生产带来严重影响,辣椒炭疽病的流行会造成辣椒减产 30%以上^[2]。

辣椒炭疽病是由半知菌亚门炭疽菌属 (*Colletotrichum*) 所引起的真菌病害^[3]。炭疽病主要为害辣椒的果实。虽然化学农药的防治效果好,杀菌范围广,但化学药剂的使用会对人类健康产生负面影响,对生态环境造成污染,且药剂长时间的使用也会产生耐药性。因此,培育抗炭疽病品种是目前最经济、有效的方法。为了选育抗炭疽病新品种,为 QTL 定位及分子标记的开发等提供材料,本研究采用离体果实接种及苗期活体抗性鉴定的方法,筛选抗性品种,以期发掘对炭疽菌有较强抗性的种质资源;采用 Illumina 方法进行转录组数据的测定,并对不同时间点与 0 h 数据比对的基因集进行 GO 富集和 KEGG 富集分析,旨在探究辣椒在应对炭疽菌诱导时的反应机制,以期研究辣椒抵御炭疽菌侵染的机制以及筛选具有关键功能的基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

112 个辣椒品种来自湖南省长沙市湘研种业公司。以感病品种 ST-8 为对照。

1.2 辣椒炭疽病病原菌的分离

待辣椒种子露白后播种于装有基质的穴盘内,并置于 28 °C、16 h 光照/8 h 黑暗条件的温室中培养。采摘具有辣椒炭疽病症状的辣椒果实,采用稀释分离的方法进行病原菌分离与纯化。在超净工作台中,在辣椒果实的病健交界处切取约为 1 cm² 的

辣椒组织;75%乙醇消毒处理 30 s,迅速放入 0.1% 升汞溶液中处理 1 min,使用无菌水清洗 3 次后置于无菌滤纸上,充分吸干表面水分后,将发病组织置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,于 28 °C、黑暗条件下培养。重复分离与纯化培养 2 代或 3 代,直至 PDA 培养基上出现单一菌落^[4]。

1.3 辣椒炭疽菌的鉴定

形态学鉴定:将经分离纯化得到的单一菌落的病原菌置于 28 °C、黑暗条件的培养箱中,连续 7 d 观察菌株菌落的形态特征,依据辣椒炭疽菌的形态鉴定标准进行鉴定。

分子生物学鉴定:首先采用粗提法提取炭疽病病原菌基因组 DNA;随后进行 PCR 扩增及序列测定。扩增的目的基因序列分别为内转录间隔区 (*ITS*)、 β -微管蛋白基因(*TUB*)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)。PCR 扩增反应体系为 12.5 μ L 2 \times Rapid Taq Master Mix,正反向引物各 1.0 μ L,1.0 μ L DNA,9.5 μ L H₂O。参考文献[5]的程序进行扩增。经过 PCR 扩增所得的 DNA 产物,经电泳检测后,送至擎科生物科技有限公司进行双向测序。获取菌株的 DNA 序列后,在 GenBank 中对其进行同源序列检索,得到与其相似性较高的序列。按照基因 *ITS-TUB-GAPDH* 的顺序进行拼接,使用邻接法 (NJ),得到菌株的系统发育树。

1.4 辣椒抗炭疽病材料的筛选

孢子悬浮液的制备:用血球计数板计数,用无菌水配制 1 \times 10⁶ 孢子/mL 的炭疽病病原菌孢子悬浮液,备用。

离体果实的接种及抗性评价:采用果实针刺点接法,参考文献[6]中的方法,用炭疽病病原菌接种 112 个品种的离体果实。于病原菌接种 9 d 后调查辣椒果实病情,采用十字交叉法测量果实病斑大小,并根据量表进行抗性分级^[6]。

苗期活体接种及抗性评价: 结合离体果实接种结果, 待抗病品种及对照品种 ST-8 幼苗长至 4~6 片真叶时期, 将上述孢子悬浮液喷至辣椒苗上, 使辣椒整株湿润。将接种病原菌的辣椒苗放于温室中保湿培养, 培养温度为 28 °C, 光照不少于 12 h/d, 相对湿度为 90%~95%^[7]。于病原接种 7 d 后对辣椒苗期病情进行调查, 参考高苇等^[7]的方法进行病情分级, 并计算病情指数。

1.5 转录组差异基因的分析

分别采集抗病品种苗期接种炭疽菌病原菌后 0、12、36、96 h 的叶子, 每个样本设 3 个生物学重复。使用 TransZol 试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司出品)提取 RNA。基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台, 采用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 构建文库(上海美吉生物有限公司)。利用 fastx_toolkit(Version 0.0.14)去接头, 过滤低质量 reads, 去除低质量的 3'和 5'端, 去除 N 端较多的 reads 后, 使用 TopHat(Version v2.1.1)将过滤掉的 reads 比对到辣椒参考基因组“Zhangshugang”(http://ted.bti.cornell.edu/ftp/pepper/genome/Zhangshugang/)上, 从而获得高质量 reads。在表达量定量结果的基础上, 使用 DESeq2 软件比较其组间差异基因, 设置 $|\log_2(FC)| \geq 1$ (FC 为差异倍数), $P < 0.05$ 。

1.6 差异表达基因富集分析

抗病品种与炭疽菌病原菌互作 12、36、96 h 后, 将其与 0 h 的差异表达基因序列提交到 GO 富集注释数据库(<http://www.geneontology.org>), 进行差异表达基因 GO 富集注释, 采用软件 Goatools 对集中的基因进行 GO 富集分析。

将抗病品种与炭疽菌病原菌互作 12、36、96 h 后, 将其与 0 h 的差异表达基因序列提交到 KEGG 路径富集注释数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>), 进行差异表达基因 KEGG 路径富集注释, 采用 R 脚本对集中的基因/转录本进行 KEGG 路径富集分析。

采用费舍尔算法进行精确检验, 当经过校正的 $P < 0.05$ 时, 认为此 GO 功能和 KEGG 路径存在显著富集情况。

1.7 实时荧光定量PCR分析

提取抗病品种苗期接种炭疽菌病原菌后 4 个时间段(0、12、36、96 h)的叶片中的 RNA, 使用 HiScript[®] IIQ RT SuperMix(+gDNAwiper)(Vazyme

Biotech Co. Ltd.)试剂盒反转录为 cDNA, 使用稀释至 100 ng/μL 的 cDNA 样品进行实时荧光定量 PCR。反应体系为: 10 μL SYBR qPCR Master Mix, 正反向引物各 0.4 μL, 2 μL cDNA, 加 ddH₂O 至 20 μL。利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 以 *Actin* 为内参基因, 使用罗氏 LightCycle[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪(Roche)进行 qRT-PCR 分析。设置 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 辣椒炭疽病原菌的分离及鉴定

采摘具有辣椒炭疽病症状的辣椒果实, 经分离纯化得到炭疽病病原菌 X, 炭疽病病原菌的菌落初期呈白色, 后期变为灰白色或深灰色, 圆形或近圆形, 菌丝为白色。根据亓政良等^[8]、吴文平等^[9]、王晓鸣等^[10]的病原菌形态分类方法及结果, 初步鉴定其为炭疽果生刺盘孢菌。

按照 *ITS-TUB2-GAPDH* 的固定顺序进行序列拼接, 以多个已知炭疽属菌株的相应基因序列为对照, 利用邻近法进行多序列聚类分析, 最终获得系统发育树(图 1)。系统发育树显示, 炭疽菌 X 与果生刺盘孢炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)聚集在一起, 结合形态学鉴定结果可知炭疽菌病原菌 X 为果生刺盘孢炭疽菌。

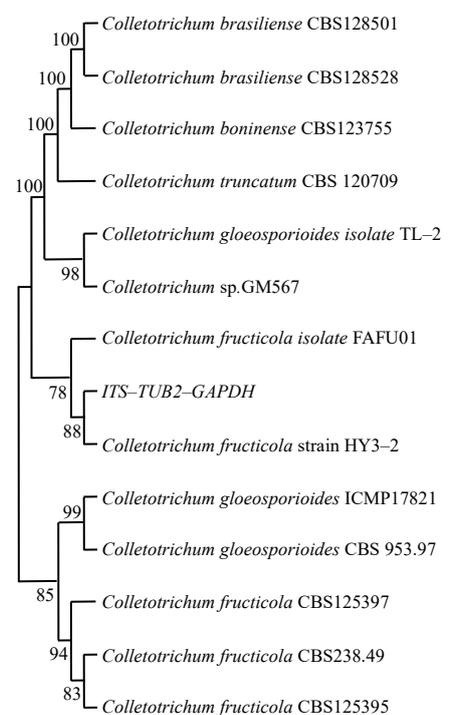


图 1 炭疽菌 X 的 NL 系统发育树

Fig.1 A phylogenetic tree of the NL system for anthracnose pathogen X

2.2 辣椒抗炭疽病材料筛选

2.2.1 辣椒果实抗性鉴定

对 112 个辣椒品种的果实进行离体果实接种, 根据文献[6]的量表确定其抗性, 其中抗病品种 3 个 (RX12-160、X-738-1、RX22-1016), 感病品种

109 个(表 1)。感病品种中, 大部分为高感, 仅少数为中感及感病。图 2 为 3 个抗性品种 RX12-160、X-738-1、RX22-1016 及部分高感感病品种的果实, 3 个抗性品种的辣椒果实表面几乎无明显病斑, 而高感感病品种的果实病斑非常明显。

表 1 112 个辣椒品种的抗性

Table 1 The resistance levels of the selected 112 pepper varieties

品种名	抗性	品种名	抗性	品种名	抗性
PC15-361	高感	XYZDJ	高感	YZYH	高感
1-CTJ-251	高感	1-CTJ-252	高感	YZSH-1	高感
CTJ-23	高感	YZBH	中感	YZLH	高感
CTJ-4	高感	CTJ-10	高感	YZSH-2	高感
CTJ-6	感病	CTJ-20	高感	XX	高感
XL-54	高感	XL-231	高感	XL-706	高感
XY-1	高感	XY-2	高感	XSL-3	高感
XL-57	高感	XL-595	高感	H18-811	高感
FHEH	高感	XL-53	高感	CTJ-1	高感
CTJ-5	高感	CTJ-21	高感	CTJ-26	中感
CTJ-49	中感	CTJ-9	感病	CTJ-13	高感
CTJ-15	高感	CTJ-28	高感	CTJ-2	高感
CTJ-11	中感	CTJ-32	高感	CTJ-7	高感
CTJ-12	高感	CTJ-14	高感	CTJ-16	感病
CTJ-24	感病	CTJ-29	高感	CTJ-17	中感
CTJ-18	高感	CTJ-22	高感	CTJ-27	高感
CTJ-31	高感	CTJ-33	高感	CTJ-35	高感
CTJ-37	高感	CTJ-38	高感	CTJ-39	高感
CTJ-3	高感	CTJ-41	高感	CTJ-47	高感
H20-456	高感	CTJ-25	中感	CTJ-46	高感
CTJ-42	高感	CTJ-44	高感	CTJ-48	高感
G38	高感	CTJ-43	高感	CTJ-34	高感
CTJ-38	高感	XL-702	高感	XL-762	高感
XL-708	高感	CTJ-45	高感	CJ21-276	高感
19-89-W6	感病	H20-4513	高感	XY-22-160	感病
XL-731	高感	XL-1193	高感	XL-1417	高感
FK21	高感	FY	高感	HHJ-1105	高感
HHJ-HX404	中感	XY21-89	高感	ZYEH	感病
XYan	高感	X014	高感	XY55	高感
XL-715	高感	XL-702	高感	XL-310	高感
XL-699	高感	XL-17	高感	1359	高感
H19-1148	高感	H211-1537	高感	RX22-1062	高感
XY21-15	感病	LFJ	高感	XL-107	高感
XX28	高感	CX	高感	XL-3406	中感
XL-1108	高感	XL919	高感	RPZX	高感
CT17-239	高感	JH	高感	H20-4761	高感
RP2307	高感	RX12-160	抗病	X-738-1	抗病
RX22-1016	抗病				



1 cm

a 为 RX12-160; b 为 X-738-1; c 为 RX22-1016; d 为 XX; e 为 XSL-3; f 为 XL-231; g 为 XL-706。

图2 抗病辣椒品种及部分感病品种的果实

Fig.2 Fruit of resistant varieties and some susceptible varieties

2.2.2 辣椒苗期抗性鉴定

对 3 个抗病品种 RX12-160、X-738-1、RX22-1016 进行苗期活体抗性鉴定,以感病品种 ST-8 为对照。从病情指数统计结果(表 2)可知,RX12-160 苗期感病,X-738-1 苗期抗性为中抗,

RX22-1016 苗期抗病。

表 2 辣椒苗期病情等级

品种	株数					抗性
	0级	1级	2级	3级	4级	
RX12-160	0	40	8	1	1	感病
X-738-1	11	36	1	1	1	中抗
RX22-1016	40	8	0	1	1	抗病
ST-8	2	2	1	0	45	感病

2.3 转录组测序数据质量控制

取接种了辣椒炭疽病原菌 X 后 0、12、36、96 h 的 RX22-1016 幼苗叶片,4 个分组(每个分组 3 个生物学重复),分别标记为 G0、G12、G36 和 G96,进行转录组测序。去掉低质量 reads 后,各样本过滤后平均 reads 为 51 837 507 个,reads 总碱基数为 $6.71 \times 10^9 \sim 9.11 \times 10^9$,平均为 7.71×10^9 。过滤后的数据 Q20 均大于 98%,Q30 均大于 96%,G+C 占比 42.19%~43.97%。

从表 3 可以看出,G36_3 与 G36_1、G36_2 的相关系数均低于 0.8;G96_1 与 G96_2 的相关系数低于 0.8;为确保数据的准确性,将 G36_3 和 G96_1 这 2 个样本的数据删除,剩余的 10 个样本数据各组内相关系数均在 0.8 以上,符合数据要求,可用于后续分析。

表 3 辣椒接种炭疽病原菌 4 个时间段样本间的相关系数

样本	相关系数											
	G0_3	G0_1	G0_2	G12_2	G12_1	G12_3	G36_1	G36_2	G36_3	G96_1	G96_2	G96_3
G0_3	1.000											
G0_1	0.972	1.000										
G0_2	0.976	0.997	1.000									
G12_2				1.000								
G12_1				0.964	1.000							
G12_3				0.964	0.982	1.000						
G36_1							1.000					
G36_2							0.885	1.000				
G36_3							0.697	0.774	1.000			
G96_1										1.000		
G96_2										0.538	1.000	
G96_3										0.804	0.822	1.000

使用基于负二项分布的 DESeq2 软件对 Raw Counts(原始计数)进行分析,基于一定的标准化处理和筛选条件获得组间表达差异的基因/转录本,默认参数为 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 1$,其中将 $\log_2(FC) \geq 1$

的基因定义为表达量上调基因, $\log_2(FC) \leq -1$ 的基因定义为表达量下调基因。将接种果生刺盘炭疽菌 12、36、96 h 的基因集与 0 h 基因集进行对比,分别对 G12 与 G0、G36 与 G0 以及 G96 与 G0 共 3

组差异表达基因(DEGs)进行统计(表 4), 共获得 13 021 个 DEGs, 其中, 6 186 个表达量上调基因, 6 835 个表达量下调基因。G12 与 G0 相比, 共获得 2 747 个 DEGs, 其中有 1 508 个 DEGs 表达量上调, 1 239 个 DEGs 表达量下调;G36 与 G0 相比, 共获得 3 928 个 DEGs, 其中有 2 021 个 DEGs 表达量上调, 1 907 个 DEGs 表达量下调;G96 与 G0 相比, 共获得 6 346 个 DEGs, 其中有 2 657 个 DEGs 表达量上调, 3 689 个 DEGs 表达量下调。

表 4 辣椒接种炭疽病病原菌 3 个时间点与接种 0 h 的差异表达基因

Table 4 The DEGs in pepper inoculated with anthracnose pathogen at three time points compared to the 0 h time point

组别	差异表达基因数/个	上调基因数/个	下调基因数/个
G12 与 G0	2 747	1 508	1 239
G36 与 G0	3 928	2 021	1 907
G96 与 G0	6 346	2 657	3 689
合计	13 021	6 186	6 835

2.4 差异基因的GO功能显著性富集分析

对基因集中的 DEGs 基于 GO 功能的生物过程 (biological process)、细胞组成 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 进行 GO 富集分析。

接种后 12 h 的 GO 富集分析结果(图 3)显示, 在接种炭疽菌 12 h 后与接种 0 h 的 DEGs 中, 2 329 个 DEGs 富集在 449 个 GO 分类条目上。其中富集到生物过程、细胞组成、分子功能上的 GO 条目数分别为 275、55、135。在 G12 与 G0 组中, 富集程度最高的 3 个 GO 条目分别为光系统 I 中的光合电子传递 (photosynthetic electron transport in photosystem I)、磷脂酶信号转导系统的负调控 (negative regulation of phosphorelay signal transduction system) 以及乙烯激活信号通路的负调控 (negative regulation of ethylene-activated signaling pathway), 定位到这 3 个功能的基因数分别为 9 个、10 个和 10 个。

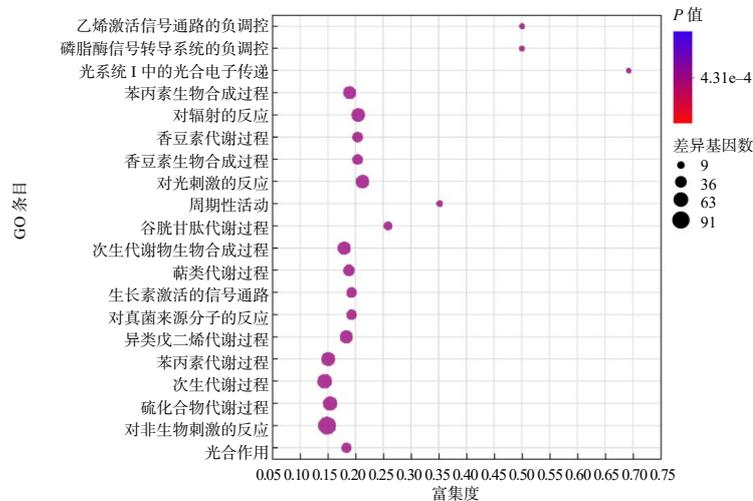


图 3 接种炭疽菌 12 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 GO 功能富集分析结果

Fig.3 GO functional enrichment analysis result of differentially expressed genes between 12 h post-inoculation with anthracnose and 0 h post-inoculation

接种后 36 h 的 GO 富集分析结果(图 4)显示, 在组别 G36 与 G0 中, 502 个 GO 分类条目上富集了 3 364 个 DEGs。其中富集到生物过程、细胞组成、分子功能上的 GO 条目数分别为 304、42、156 个。在整个 G36 与 G0 组中, 富集程度最高的 3 个 GO 条目分别为 NAD(P)H 脱氢酶复合物的组装(NAD(P)H

dehydrogenase complex assembly)、光系统 I 中的光合电子传递、光合作用及光系统 I 中的光收集 (photosynthesis, light harvesting in photosystem I), 定位到这 3 个功能的基因数分别为 6 个、10 个和 12 个。

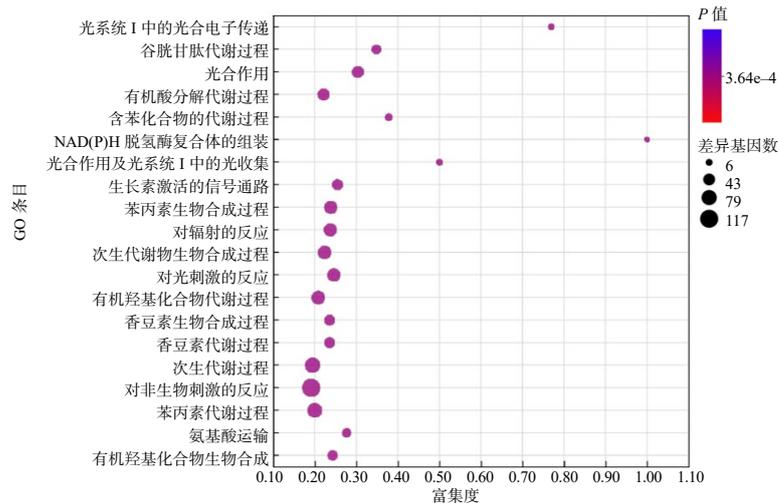


图 4 接种炭疽菌 36 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 GO 功能富集分析结果

Fig.4 GO functional enrichment analysis result of differentially expressed genes between 36 h post-inoculation with anthracnose and 0 h post-inoculation

接种后 96 h 的 GO 富集分析结果(图 5)显示, 在组别 G96 与 G0 中, 624 个 GO 分类条目上富集了 5 426 个 DEGs, 其中富集到生物过程、细胞组成、分子功能上的 GO 条目数分别为 374、70、180 个。在整个 G96 与 G0 组中, 富集程度最高的 3 个

GO 条目分别为光系统 I 中的光合电子传递、光合作用及光系统 I 中的光收集以及光合作用(photosynthesis), 定位到这 3 个条目的基因数分别为 11 个、18 个和 19 个。

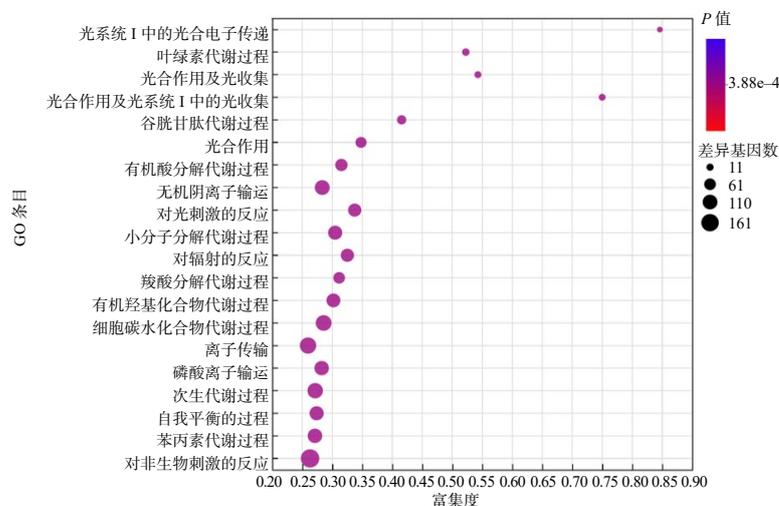


图 5 接种炭疽菌 96 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 GO 功能富集分析结果

Fig.5 GO functional enrichment analysis result of differentially expressed genes between 96 h post-inoculation with anthracnose and 0 h post-inoculation

2.5 差异基因KEGG功能显著性富集分析

将组别 G12 与 G0 的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析, 结果(图 6)显示显著富集于通路功能的 DEGs 共 1 046 个, 这些差异基因注释到 115 个通路上, 其中, 苯丙素的生物合成(phenylpropanoid biosynthesis)、淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose

metabolism)、光合作用(photosynthesis)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)、光合生物的固碳作用(carbon fixation in photosynthetic organisms)、糖酵解/糖异生(glycolysis/gluconeogenesis)以及半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)等为主要通路。

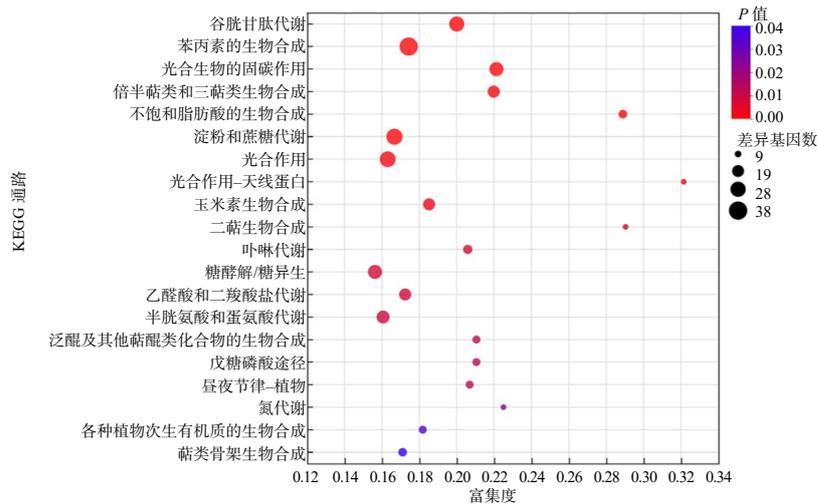


图 6 接种炭疽菌 12 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 KEGG 功能富集分析结果

Fig.6 KEGG functional enrichment analysis result of differentially expressed genes at 12 h post-inoculation with anthracnose compared to 0 h post-inoculation

将组别 G36 与 G0 的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析, 结果(图 7)显示显著富集于通路功能的 DEGs 共 1 517 个, 这些差异基因注释到 124 个通路上。这些差异表达基因主要参与的通路有苯丙素

的生物合成、光合作用、谷胱甘肽代谢、淀粉和蔗糖代谢、玉米素生物合成(zeatin biosynthesis)、光合生物的固碳作用和 ABC 转运蛋白(ABC transporter)等。

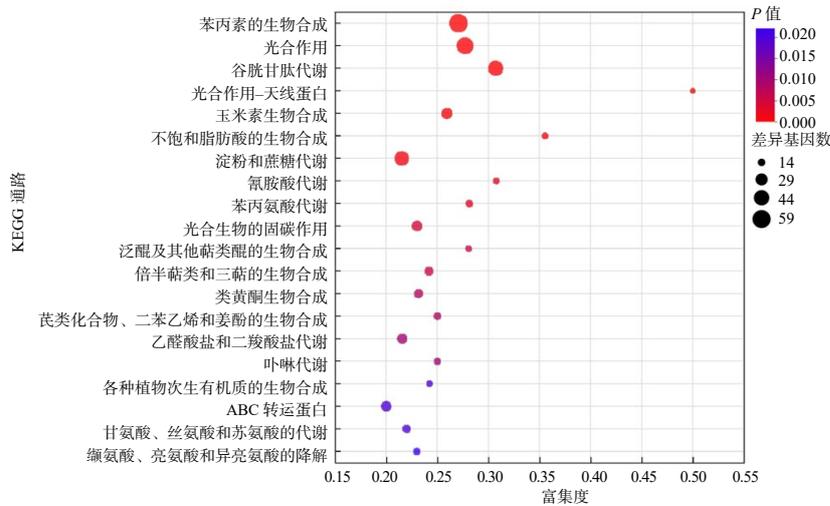


图 7 接种炭疽菌 36 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 KEGG 功能富集分析结果

Fig.7 KEGG functional enrichment analysis result of differentially expressed genes at 36 h post-inoculation with anthracnose and 0 h post-inoculation

将组别 G96 与 G0 的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析, 结果(图 8)显示, 显著富集于通路功能的 DEGs 共 2 452 个, 这些差异基因注释到 126 个通路上, 主要的通路有淀粉和蔗糖代谢、光合作用、苯

丙素的生物合成、谷胱甘肽代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢 (amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)和光合生物的固碳作用等。

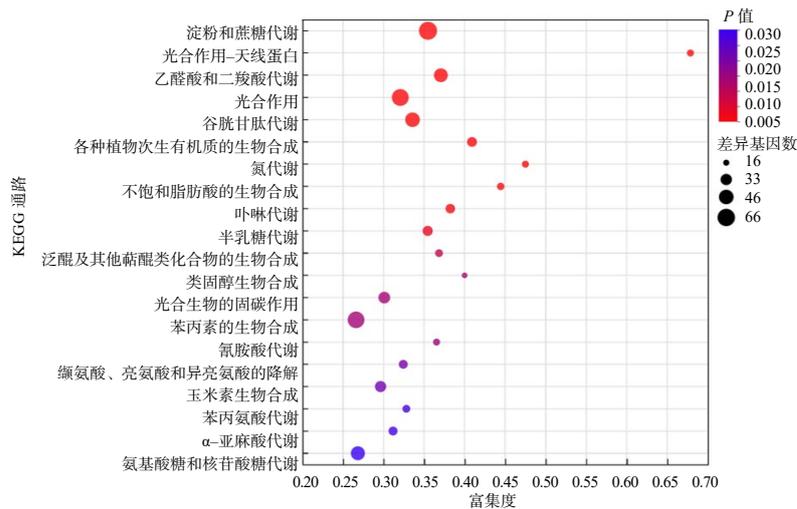


图 8 接种炭疽菌 96 h 后与接种 0 h 的差异表达基因 KEGG 功能富集分析结果

Fig.8 KEGG functional enrichment analysis result of differentially expressed genes at 96 h post-inoculation with anthracnose and 0 h post-inoculation

2.6 KEGG富集通路共有的差异表达基因

对组别 G12 与 G0、组别 G36 与 G0 和组别 G96 与 G0 在 KEGG 富集通路上富集程度比较高的通路中共有的 DEGs 进行分析, 结果如表 5 所示。在苯丙素的生物合成途径中, 共有 27 个 DEGs 表达量上调, 对其共有的 DEGs 进行基因功能注释分析, 发现差异表达基因 *Caz03g16640* 调控褪黑素的合成, 差异表达基因 *Caz01g15210* 调控木质素的合成。褪黑素和木质素在植物中皆能起到抵御病原菌的作用^[11-12]。

在光合生物的固碳作用通路和糖酵解/糖异生

表 5 富集程度较高的通路中共有的差异表达基因

Table 5 The DEGs commonly found in pathways with higher enrichment levels

通路	差异表达基因数/个	上调基因数/个	下调基因数/个
苯丙素的生物合成	27	27	0
光合作用	26	0	26
谷胱甘肽代谢	26	16	10
淀粉和蔗糖代谢	21	11	10
光合生物的固碳作用	20	5	15
氨基糖和核苷酸糖代谢	7	4	3
糖酵解/糖异生	16	9	7
玉米素生物合成	10	7	3
合计	153	79	74

通路中, 共有的差异表达基因 *Caz04g07320* 调控磷酸烯醇丙酮酸盐的合成, 脱去磷酸基后转化为丙酮酸。植物中的丙酮酸可抑制青枯菌在植物中的繁殖, 且与茉莉酸信号通路介导的植物抗逆反应密切相关^[13]。

糖酵解/糖异生通路、氨基糖和核苷酸糖代谢通路、淀粉和蔗糖代谢通路中共有的差异表达基因 *Caz04g01720* 参与调控果糖和葡萄糖的合成。糖类可调节植物体内渗透压, 除维持稳态外, 还具有一定的抗病作用^[14]。

2.7 qRT-PCR验证

为了验证测序结果的可靠性, 采用 qRT-PCR 测定 RX22-1016 接种果生刺盘孢炭疽菌后 *Caz03g16640*、*Caz01g15210*、*Caz04g07320* 和 *Caz04g01720* 等共有的差异表达基因在 0、12、36、96 h 的基因相对表达量, 结果(图 9)显示这 4 个抗病相关差异表达基因的相对表达量与转录组测序结果趋势基本一致, 在 RX22-1016 与炭疽菌互作中, *Caz03g16640*、*Caz01g15210*、*Caz04g07320* 和 *Caz04g01720* 基因在互作初期均呈现上调趋势, 证明测序结果可靠。

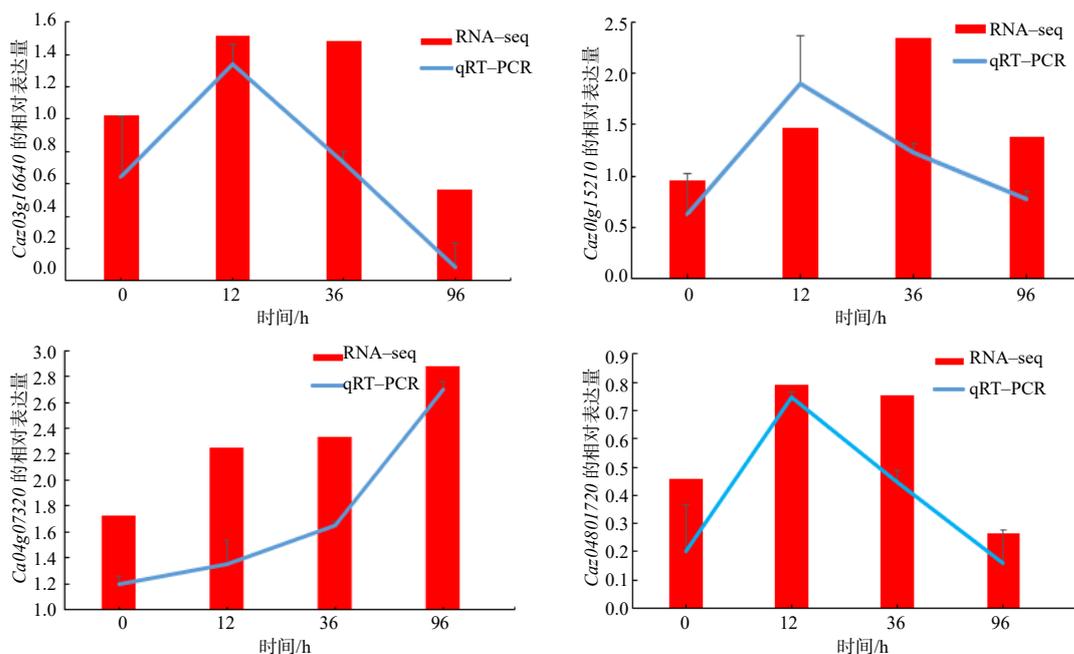


图 9 qRT-PCR 与 RNA-seq 测序中 4 个基因的相对表达量

Fig.9 Relative expression levels of four genes by qRT-PCR versus RNA-seq sequencing

3 结论与讨论

辣椒炭疽病菌容易在高温高湿的条件下为害成熟的辣椒果实。本研究中,选取了 112 份材料,经过离体果实接种,初步筛选到 3 个抗病品种 (RX12-160、X-738-1 及 RX22-1016),再经过苗期抗性鉴定,筛选到抗病品种 RX22-1016。

辣椒 RX22-1016 幼苗接种果生刺盘孢炭疽菌前后,共获得 13 021 个差异表达基因。其中,6 186 个基因上调表达,6 835 个基因下调表达。GO 富集结果显示,接种炭疽菌后,富集程度较高的过程为光系统 I 中的光合电子传递、磷脂酶信号转导系统的负调控、乙烯激活信号通路的负调控、NAD(P)H 脱氢酶复合物的组装以及光合作用及光系统 I 中的光收集,主要集中在光合作用相关的生物过程中。前人^[15]研究发现,抗病品种的光合生理活动受赤星病胁迫的危害程度较低,使光合作用能够维持在较强状态,从而表现出良好的抗病性。由此可见,光合作用在植物抗病与抗逆过程中起着重要的作用。

本研究中,KEGG 富集分析结果表明,参与主要通路共有的 DEGs 主要集中在苯丙素的生物合成通路、谷胱甘肽代谢通路、淀粉和蔗糖代谢通路、光合生物的固碳作用通路、糖酵解/糖异生通路、玉米素生物合成通路以及氨基糖和核苷酸糖代谢通路上。通过苯丙素代谢途径可以合成抗病物质,在

植物抗病防御反应中发挥重要作用^[16]。如 ALI 等^[17]发现褪黑素能诱导防御相关基因的转录,从而提高对病原体的抵抗力,并能增强对病原体的抵抗力,调节植物的生理活动;褪黑素能够增强防御相关酶的活性,如几丁质酶、4-香豆酸-CoA-连接酶和苯丙氨酸解氨酶,同时在体外和体内抑制炭疽病的发展^[11]。木质素沉积在植物次生细胞壁中,可以使植物细胞壁物质不易被真菌酶溶解,提高抗氧化性,从而减弱了病原菌对植物的侵害,让植物产生抗真菌性^[12]。LI 等^[18]发现印度梨形孢菌通过诱导苯丙素生物合成途径增加了小麦对假禾谷镰刀菌的抗性;HAN 等^[19]发现 MeJA 可能通过调节花椒叶中苯丙素的生物合成来激活花椒的抗锈病能力。谷胱甘肽在植物中具有抗逆保护因子、抗毒素和抗氧化等重要作用^[20]。HIRUMA 等^[21]发现谷胱甘肽生物合成所需的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH1)有助于抵抗胶孢炭疽菌的侵染。为了应对果生刺盘孢炭疽菌的侵染,辣椒调节各种酶及次级代谢产物的产生,从而形成了复杂的防御反应,以此来防御炭疽病菌的入侵。

根据 RX22-1016 接种炭疽菌前后的特异性差异表达基因,发现了 *Caz03g16640*、*Caz01g15210*、*Caz04g07320* 和 *Caz04g01720* 基因在 RX22-1016 与炭疽菌互作中,在与病原菌互作初期皆呈现上调趋势,推测这些基因可能参与调控与抗病相关的物质

的合成,可能在RX22-1016抗炭疽病中起到关键作用。在后续研究中,可在以RX22-1016为父母本的群体中,探究并挖掘辣椒抗炭疽病的关键基因,为抗炭疽病新品种选育、QTL定位及分子标记的开发以及辣椒响应炭疽菌诱导的分子机制解析和功能基因的筛选提供参考。

参考文献:

- [1] 丁自立,郭英,姚明华,等.湖北省辣椒种质资源的抗病性鉴定与评价[J].中国园艺文摘,2011,27(12):45-46,55.
- [2] 赖传雅,袁高庆.农业植物病理学:华南本[M].2版.北京:科学出版社,2008.
- [3] 高必达.园艺植物病理学[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [4] 李月.辣椒炭疽病病原菌分离及辣椒突变体炭疽病抗性筛选[D].武汉:华中农业大学,2021.
- [5] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, GUO L D, CAI L, et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 95-129.
- [6] DO SOCORRO BEZERRA DE ARAÚJO M, SUDRÉ C P, DA GRAÇA G A, et al. A new approach to quantify anthracnose symptoms in inoculated *Capsicum* spp. fruits[J]. Tropical Plant Pathology, 2022, 47(3): 386-401.
- [7] 高苇,杨利娟,王勇,等.一种辣椒炭疽病抗性活体鉴定方法及应用:CN114606292A[P].2022-06-10.
- [8] 亓政良,徐芳菲,王先洪,等.福建李叶斑病病原菌种类鉴定及致病性研究[J].果树学报,2023,40(11):2423-2434.
- [9] 吴文平,张志铭.炭疽菌属(*Colletotrichum* Cda.)分类学研究II.种的划分[J].河北农业大学学报,1994,17(2):31-37.
- [10] 王晓鸣,李建义.陕西省炭疽菌的研究[J].真菌学报,1987,6(4):211-218.
- [11] FAN S L, LI Q, FENG S J, et al. Melatonin maintains fruit quality and reduces anthracnose in postharvest Papaya via enhancement of antioxidants and inhibition of pathogen development[J]. Antioxidants, 2022, 11(5): 804.
- [12] SHARMA N K, YADAV S, GUPTA S K, et al. microRNA397 regulates tolerance to drought and fungal infection by regulating lignin deposition in chickpea root[J]. Plant, Cell & Environment, 2023, 46(11): 3501-3517.
- [13] 潘晓英,张振臣,袁清华,等.植物抗青枯病的分子机制研究进展[J].植物生理学报,2022,58(4):607-621.
- [14] 刘培培. 梔子叶枯病诱导的生理响应及转录调控研究[D].南昌:江西中医药大学,2020.
- [15] 杨志晓,王轶,谢升东,等.二个抗、感病烟草品种对赤星病胁迫的光合生理响应差异[J].植物生理学报,2022,58(3):565-576.
- [16] 左媛媛.桑树炭疽病抗性评价及抗病相关基因挖掘[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [17] ALI M, TUMBEH LAMIN-SAMU A, MUHAMMAD I, et al. Melatonin mitigates the infection of *Colletotrichum gloeosporioides* via modulation of the chitinase gene and antioxidant activity in *Capsicum annuum* L.[J]. Antioxidants, 2020, 10(1): 7.
- [18] LI L, HAO R Y, YANG X R, et al. *Piriformospora indica* increases resistance to *Fusarium pseudograminearum* in wheat by inducing phenylpropanoid pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): 8797.
- [19] HAN S, XU X, YUAN H, et al. Integrated transcriptome and metabolome analysis reveals the molecular mechanism of rust resistance in resistant(Youkang) and susceptible(Tengjiao) *Zanthoxylum armatum* cultivars[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(19): 14761.
- [20] 张寒玉,唐朝,冯光文,等.离子束重组异常汉逊酵母菌 Ar_Han0458 的转录组学分析及谷胱甘肽代谢途径富集[J].食品与发酵工业,2019,45(10):10-15.
- [21] HIRUMA K, FUKUNAGA S, BEDNAREK P, et al. Glutathione and tryptophan metabolites are key players in *Arabidopsis* nonhost resistance against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(9): e25603.

责任编辑:毛友纯

英文编辑:柳正