

# 月季响应黑斑病的早期差异表达基因分析

刘瑞峰<sup>1,2</sup>, 刘 强<sup>1</sup>, 张非亚<sup>1</sup>, 袁晓娜<sup>1</sup>, 贾桂霞<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>北京林业大学园林学院, 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083;  
<sup>2</sup>中南林业科技大学林学院, 长沙 410004)

**摘 要:** 为了获得月季抗黑斑病的相关基因, 探究月季抗病分子机制, 以月季高抗黑斑病品种‘粉和平’叶片为材料, 采用单孢子离体接种法对其接种黑斑病菌, 以接种 24、48 和 72 h 的 cDNA 等量混合样为检测子, 以相应对照的 cDNA 混合样为驱动子, 构建抑制差减杂交文库。挑选 200 个阳性克隆进行测序、BLASTx 比对分析, 获得 37 条非冗余 EST 序列, 其中 32 条序列在蛋白数据库中具有同源序列。将获得的 EST 序列导入相应样本的转录组测序数据库, 以其在两个样本中的 RPKM 比值作为基因相对表达量。结果表明, 接种病原菌后, 上调表达基因涉及信号识别、离子转运、活性氧清除、光呼吸途径及苯丙烷代谢等方面, 其中以活性氧清除、光呼吸途径和苯丙烷代谢途径的基因数最多。这一结果说明月季抗病是通过多基因的协同作用实现的, 活性氧清除、光呼吸途径和苯丙烷代谢途径在月季抵抗黑斑病菌过程中发挥重要作用。

**关键词:** 月季; 黑斑病; 抑制差减杂交; 活性氧清除; 光呼吸; 苯丙烷途径

**中图分类号:** S 685.12

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 04-0731-10

## The Analysis of Differential Expression Genes for Rose Early Responding to Black-spot Disease

LIU Rui-feng<sup>1,2</sup>, LIU Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Fei-ya<sup>1</sup>, YUAN Xiao-na<sup>1</sup>, and JIA Gui-xia<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants, Germplasm Innovation and Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Flowers, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

<sup>2</sup>College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** Black-spot disease is the most serious disease for roses. In order to isolate the genes related with the rose resistance and further to explore the interaction molecule mechanism between rose and *Diplocarpon rosae* Wolf. ‘Pink Peace’ as the high resistance variety in the preliminary screening was selected as the material, the cDNA of its inoculated leaves in 24 h, 48 h and 72 h were mixed equivalently, and the mixture was regarded as the tester, the cDNA mixture of non-inoculated leaves corresponding hours were used as the driver. Based on these, the subtracted cDNA library were built. A total of 200 positive clones were picked and sequenced, and 37 non-redundant sequences were obtained. Among them, 32 ESTs showed similarity to known sequences in GenBank. Then, all 37 EST sequences were imported to the database of transcriptome sequencing built with the samples of the same two mixtures, and their RPKM ratios of the inoculated samples to non-inoculated ones were regarded as the gene relative

收稿日期: 2014-11-18; 修回日期: 2015-03-27

基金项目: 国家‘863’计划项目 (2011AA100208)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: gxjia@bjfu.edu.cn)

expression. The results showed that the genes including ion transport, reactive oxygen removal, photorespiration and phenylpropanoid pathway and so on were up-regulated in the inoculated samples, and the genes involved in photorespiration, reactive oxygen removal and phenylpropanoid pathway were more, which suggested that multiple genes involved in the rose defending system. Among of them, reactive oxygen removal, photorespiration and phenylpropanoid pathway are playing important roles in rose's resistance to black spot pathogen.

**Key words:** rose; black-spot disease; suppression subtractive hybridization; reactive oxygen removal; photorespiratory; phenylpropanoid pathway

月季黑斑病 (*Diplocarpon rosae* Wolf.) 是一种危害性极大的世界性病害, 多发生于温暖潮湿的季节, 以月季叶片、花瓣、茎部出现黑色斑点为主要特征, 常引起叶片黄化、落叶、生活力降低, 植株死亡等问题, 严重影响月季的观赏价值和商品价值, 限制了其推广和应用。

目前对月季抗黑斑病机制的研究主要集中在垂直抗性方面。前人通过染色体加倍 (Byrne et al., 1995; Khosravi et al., 2008)、图位克隆 (Kaufmann et al., 2003)、分子标记 (Yan et al., 2005; Hattendorf & Debener, 2007; Biber et al., 2010; Spiller et al., 2011)、杂交及抗病表型分离 (Whitaker et al., 2007, 2010; Whitaker & Hokanson, 2009) 等多种方法对月季黑斑病抗病机制进行了研究, 克隆得到了个别抗病基因 (*Rdr1* 和 *Rdr3*) (Biber et al., 2010; Whitaker et al., 2010), 选育出了少量的抗病材料, 但是, 对月季这种垂直抗性机制所介导的抗病信号途径的认识并不清楚, 也很少从转录层面对月季抗病性进行综合性的研究分析。

月季抗病性的最终体现是通过一系列基因的表达调控实现的, 是多基因协同作用的结果。月季—黑斑病菌早期互作基因体现了月季对病原菌效应子的识别、抗病信号级联传递及抗病防御系统的激活等关键信息, 获得这些信息能够有助于全面深入了解月季的抗病机制。本研究中利用抑制消减杂交技术获得高抗品种‘粉和平’参与响应黑斑病菌的早期差异表达基因及上调表达基因, 并根据差异基因的注释分析、功能分类及相对表达量分析结果, 分析月季早期抗病响应的相关分子机制, 为月季黑斑病抗病育种及黑斑病的综合防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

月季‘粉和平’是前期以单孢子离体接种法筛选获得的高抗黑斑病品种。‘粉和平’在筛选的 60 份材料当中, 发病潜伏期为 13~15 d, 发病率为 2%, 病情指数 2.3, 表现出较强的抗病能力。

### 1.2 病菌培养及接种

黑斑病菌 (*Diplocarpon rosae* Wolf.) 来自中国林业科学院微生物研究所菌种保藏中心, 编号为 cfcc87205 的单一小种。接种孢子采用菌种复活后培养 20 d 的二代孢子 (PAD 培养基, 23 °C 下, 80% RH)。选择返青后生长 4~6 周健康无病植株 3 株, 采集生长一致中等成熟的健康叶片, 用湿报纸包裹放入冰盒迅速带回实验室。先在自来水下轻柔冲净叶片表面尘土, 再将其置于 2% 的 NaClO 水溶液中灭菌 4 min, 无菌水冲洗 3 次。在无菌接种盘内铺两层用无菌水浸润的滤纸, 将叶片置于接种盘中 (叶柄用湿润的无菌棉包裹)。采用  $1 \times 10^5$  的孢子悬浮液全叶片喷施接种。接种后用透明的保

鲜膜将接种盘密封, 置于 23 °C, 80% 相对湿度的人工气候箱中 (Yokoya et al., 2000)。分别于接种后 24、48、72 h 取样 (取样时间根据前期病菌侵入观测确定)。对照喷施无菌水。

### 1.3 总 RNA 的提取及 mRNA 纯化浓缩

取接种及对照叶片各 0.2 g, 放入液氮中冷冻研磨。采用北京艾德莱生物科技有限公司 (Aidlab Biotechnologies Co., Ltd) RNA38 试剂盒提取样品总 RNA。检测总 RNA 浓度及完整性, 分别将 3 个时间点的接种及对照样品的总 RNA 等量混合。采用 Oligotex mRNA mini Kit (Qiagen, 德国) 获得 mRNA, 并保证其含量不低于 2 µg, 真空冷冻仪干燥仪 (Eppendorf 5301, 美国) 浓缩, -80 °C 保存备用。

### 1.4 抑制差减文库的构建及插入片段鉴定

依照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) 的说明书进行 SSH 操作。以对照叶片 cDNA 为驱动子 (Driver), 以接种叶片 cDNA 为检测子 (Tester) 进行两次消减杂交和两次 PCR。将富含差异表达序列的第 2 次 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy Vector (Promega, 北京) 上并转入感受态 *E. coli* top10 (Promega, 北京) 中进行氨苄抗性和蓝白斑筛选。随机挑取白色饱满的克隆于 96 孔细胞培养板中, 加入含 50 mg · L<sup>-1</sup> Amp 的 LB 液体培养基 150 µL, 37 °C 过夜, 取 1 µL 菌液为模板, 用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) 试剂盒给定的巢式引物 (nested primer 1: 5'-TCGAGCGG CCGCCCGGGCAGGT-3' 和 nested primer 2R: 5'-AGCGTGGTTCGCGCCGAGGT-3') 进行菌落 PCR 并电泳检测。其余菌液加入甘油后液氮速冻, -80 °C 保存。抑制差减文库构建完成 (乔金莲 等, 2011; 王家保 等, 2013)。

### 1.5 差异克隆 Blastx 分析、GO 注释及相对表达量分析

挑选差减杂交目标克隆送北京诺赛生物工程公司进行测序。所获序列去除载体和接头获得 EST。在 E 值小于等于 1e<sup>-10</sup> 条件下, 采用 NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) 的 Blastx 在线序列比对工具进行 Blast 分析。根据 the Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) 进行基因 GO 注释。基因表达量依据 Mortazavi 等 (2008) 的方法, 将获得的 EST 序列带入相同样本的转录组测序数据库计算获得, 以 RPKM<sub>接种</sub>/RPKM<sub>对照</sub> 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 及 mRNA 提取结果

琼脂糖电泳及微量核酸定量仪测定, 提取的总 RNA 28S 条带比 18S 条带亮两倍以上 (图 1), 清晰完整, 未发生降解。经 Nano Drop<sup>TM</sup> 2000c 测定, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.90 ~ 2.15 之间, 质量符合试验要求。mRNA 纯化后 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 2.1, mRNA 总含量为 2.4 ~ 2.6 µg (> 2 µg), 可以用于下一步试验。

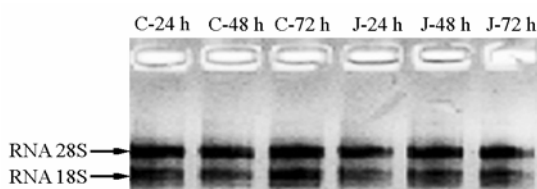


图 1 总 RNA 电泳检测

C: 对照; J: 接种。

Fig. 1 The electrophoretogram of total RNA

C: Non-inoculation (Control); J: Inoculation.

2.2 抑制差减杂交阳性克隆的重组子鉴定

挑取正向杂交 480 个菌斑进行菌落 PCR 筛选，发现差减的基因片段多数在 100 ~ 500 bp 之间，集中在 100 ~ 400 bp 区段（图 2），考虑到片段太小会影响序列比对时的特异性及准确性，去除电泳结果小于 150 bp 的克隆和无带克隆（占克隆总数的 58.33%），最终选择正向差减杂交 200 个阳性克隆进行测序。

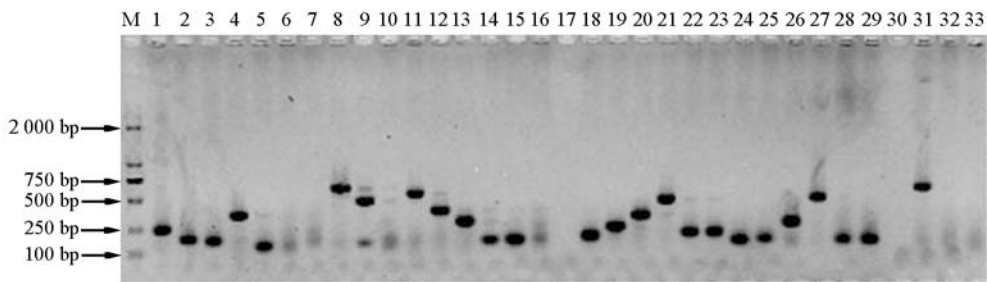


图 2 菌落 PCR 电泳检测  
Fig. 2 The electrophoresis detection of colony

2.3 EST 序列 Blastx 分析和 GO 功能归类及相对表达量分析

对测序获得的序列进行 Blastx 比对，共获得 81 条 EST 序列，去除重复序列，最终获得已知功能 EST 序列 32 条和未知功能 EST 5 条，获得的 37 条 EST 序列中，仅有 9 条 EST 的长度大于 500 bp，而 500 bp 以下的序列占 75.67%（表 1）。

表 1 差异 EST 序列的 Blastx 比对  
Table 1 Blastx alignment of differential EST clone

克隆编号 Clone No.	同源基因 Matching sequence from database	登录号 Accession No.	长度/bp Length	种属 Source of matching sequence	E 值 E value
YR1	类金属硫蛋白 Metallothionein-like protein	AAW52725.1	593	草莓 <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	4e <sup>-20</sup>
YR2	类 TSJT1 蛋白 Stem-specific protein TSJT1-like	XP_004291659.1	494	草莓亚种 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	2e <sup>-62</sup>
YR3	叶绿体结合蛋白 a/b Chlorophyll a/b binding protein 3, chloroplastic	XP_007049480.1	493	可可树 <i>Theobroma cacao</i>	4e <sup>-43</sup>
YR4	葡萄糖转运蛋白 Putative glucose transport protein STP1	BAC81184.1	395	粳稻组 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group	1e <sup>-52</sup>
YR5	叶绿体双半乳糖基甘油二酯 Digalactosyldiacylglycerol synthase 1, chloroplastic-like	XP_004303377.1	229	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	2e <sup>-27</sup>
YR6	过氧化物酶体(S)-2-羟基酸氧化酶 Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase-like	XP_004294094.1	296	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	7e <sup>-49</sup>
YR7	Cysteine proteinase 15A-like 类半胱氨酸蛋白酶 15A	XP_004291404.1	497	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	8e <sup>-84</sup>
YR8	类 β-葡萄糖苷酶 24-假蛋白 Beta-glucosidase 24-like hypothetical protein	XP_004151252.1	528	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	3e <sup>-59</sup>
YR9	果糖-二磷酸醛缩酶细胞质同工酶 Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	EMS58841.1	389	乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	1e <sup>-39</sup>

续表 1

克隆编号	同源基因	登录号	长度/bp	种属	E 值
Clone No.	Matching sequence from database	Accession No.	Length	Source of matching sequence	E value
YR10	V - 型质子腺苷三磷酸 E (未被命名的蛋白产物) V-type proton ATPase subunit E unnamed protein product	XP_002274995.1	397	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	1e <sup>-83</sup>
YR11	保守 C - 末端区域 2 同工酶 Evolutionarily conserved C-terminal region 2 isoform 2	EOY32242.1	633	可可树 <i>Theobroma cacao</i>	8e <sup>-43</sup>
YR12	泛素结合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme	ABQ41977.	222	白海桑 <i>Sonneratia alba</i>	3e <sup>-27</sup>
YR13	控制肿瘤变化蛋白同系物 Translationally-controlled tumor protein homolog	XP_004296846.1	448	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	2e <sup>-42</sup>
YR14	丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶 SRK2I Serine/threonine-protein kinase SRK2I-like	XP_004232055.1	495	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	6e <sup>-91</sup>
YR15	14-3-3 蛋白 14-3-3 protein 1-like	XP_004250139.1	432	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	1e <sup>-44</sup>
YR16	钾离子转运体 Potassium transporter	XP_003629906.1	744	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	1e <sup>-97</sup>
YR17	腺苷三磷酸 H <sup>+</sup> 转运酶 H <sup>+</sup> -transporting ATPase	AAQ19041.1	261	尖叶菜豆 <i>Phaseolus acutifolius</i>	1e <sup>-35</sup>
YR18	Ribulose-1,5 - 二磷酸羧化/加氧酶 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	AEA48975.1	285	缙丝花 <i>Rosa roxburghii</i>	6e <sup>-34</sup>
YR19	叶绿体多酚氧化酶 Polyphenol oxidase F, chloroplastic-like	XP_004246033.1	562	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	1e <sup>-73</sup>
YR20	(E) - 橙花叔醇合成酶 (E)-nerolidol synthase	AGB14626.1	197	苹果 <i>Malus domestica</i>	3e <sup>-20</sup>
YR21	肉桂醇脱氢酶 Cinnamyl alcohol dehydrogenase	ADK63098.1	346	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2e <sup>-79</sup>
YR22	谷胱甘肽氧化酶 Glutathione peroxidase	AGT80153.1	439	三浅裂叶牵牛 <i>Ipomoea trifida</i>	2e <sup>-117</sup>
YR23	HLH 超家族 DNA 结构域 Putative HLH DNA-binding domain superfamily protein	NP_001146644.1	689	玉米 <i>Zea mays</i>	6e <sup>-39</sup>
YR24	叶绿体碳酸酐酶 2 Carbonic anhydrase 2, chloroplastic-like	XP_004290540.1	425	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	3e <sup>-12</sup>
YR25	同型半胱氨酸甲基转移酶 2 同工酶 2, 部分 Homocysteine methyltransferase 2 isoform 2, partial	EOX94688.1	250	可可树 <i>Theobroma cacao</i>	1e <sup>-21</sup>
YR26	果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶 Putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase	CAD12665.1	715	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	3e <sup>-61</sup>
YR27	腺苷二磷酸核糖基化表达因子 ADP-ribosylation factor, putative, expressed	ABF99503.1	151	粳稻组 <i>Oryza sativa Japonica</i> Group	7e <sup>-27</sup>
YR28	聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 Polygalacturonase inhibitor protein	AAK43439.1	371	火棘 <i>Pyracantha fortuneana</i>	2e <sup>-28</sup>
YR29	N - 羧甲酰 - L - 氨基酸水解酶类 N-carbamoyl-L-amino acid hydrolase-like	XP_002535756.1	586	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	5e <sup>-25</sup>
YR30	叶绿体 ATP 蛋白水解酶亚基 ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	AFX67013.1	228	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	8e <sup>-78</sup>
YR31	线粒体烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (泛醌) 黄素蛋白 1 NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, mitochondrial	EMT32185.1	329	山羊草 <i>Aegilops tauschii</i>	1e <sup>-38</sup>
YR32	渗透胁迫激活蛋白 Osmotic stress-activated protein kinase	AAL89456.1	324	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	2e <sup>-54</sup>
YR33	假设蛋白 PRUPE_ppa015953mg Hypothetical protein PRUPE_ppa015953mg	EMJ26301.1	604	碧桃 <i>Prunus persica</i>	4e <sup>-13</sup>
YR34	假设蛋白 PRUPE_ppa025539mg, 部分的 Hypothetical protein PRUPE_ppa025539mg, partial	EMJ04478.1	265	碧桃 <i>Prunus persica</i>	1e <sup>-22</sup>
YR35	非特异膜蛋白 C2G11.09 Uncharacterized membrane protein C2G11.09-like	XP_004293515.1	265	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	5e <sup>-18</sup>
YR36	非特异蛋白 LOC101313290 Uncharacterized protein LOC101313290	XP_004294478.1	413	野草莓 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	6e <sup>-63</sup>
YR37	非特异 LOC101312647 同工蛋白酶 2 Uncharacterized protein LOC101312647 isoform 2	XP_004302320.1	437	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> 野草莓	1e <sup>-34</sup>

GO 功能分类表明, 已知功能的 32 条 EST 中, 参与生物过程有 8 条 EST, 占 25.00%, 组成细胞成分构成的 EST 有 4 条, 占 12.50%, 解释分子功能的 EST 有 20 条, 占 62.50% (表 2)。

表 2 差异 EST GO 注释及相对表达量 (RPKM)  
Table 2 GO annotation and relative expression (RPKM) of differential EST clone

克隆编号 Clone No.	基因相对表达量 (RPKM <sub>接种</sub> /RPKM <sub>对照</sub> ) Relative expression (RPKM <sub>inoculation</sub> / PPKM <sub>non-inoculation</sub> )	GO 注释 GO Annotation	
		GO No.	功能 Function
YR1	1.5290	GO: 0005575	细胞成分 Cellular component
YR2	1.0050	GO: 0005575	细胞成分 Cellular component
YR3	1.2340	GO: 0009503	细胞成分 Cellular component
YR4	0.9750	GO: 0005575	细胞成分 Cellular component
YR5	0.5200	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR6	1.7897	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR7	0.9658	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR8	1.3023	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR9	无限 Infinity	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR10	无限 Infinity	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR11	无限 Infinity	GO: 0071894	生物过程 Biological process
YR12	1.2570	GO: 0008150	生物过程 Biological process
YR13	1.3890	GO: 0003674	分子功能 Molecular function
YR14	无限 Infinity	GO: 0004674	分子功能 Molecular function
YR15	4.1690	GO: 0071889	分子功能 Molecular function
YR16	1.6580	GO: 0003674	分子功能 Molecular function
YR17	无限 Infinity	GO: 0000260	分子功能 Molecular function
YR18	1.9365	GO: 0046863	分子功能 Molecular function
YR19	无限 Infinity	GO: 0004097	分子功能 Molecular function
YR20	1.6823	GO: 0097008	分子功能 Molecular function
YR21	无限 Infinity	GO: 0045551	分子功能 Molecular function
YR22	无限 Infinity	GO: 0004602	分子功能 Molecular function
YR23	无限 Infinity	GO: 0043398	分子功能 Molecular function
YR24	1.6700	GO: 0004089	分子功能 Molecular function
YR25	无限 Infinity	GO: 0008898	分子功能 Molecular function
YR26	1.7160	GO: 0004332	分子功能 Molecular function
YR27	2.1760	GO: 0030306	分子功能 Molecular function
YR28	1.0000	GO: 0090353	分子功能 Molecular function
YR29	无限 Infinity	GO: 0050538	分子功能 Molecular function
YR30	无限 Infinity	GO: 0003824	分子功能 Molecular function
YR31	0.9630	GO: 0003955	分子功能 Molecular function
YR32	无限 Infinity	GO: 0016909	分子功能 Molecular function
YR33	1.4860	-	-
YR34	2.9220	-	-
YR35	0.8680	-	-
YR36	0.4230	-	-
YR37	0.4690	-	-

将所得到的序列带入相应样本的转录组测序数据库中获得其 RPKM 值, 基因相对表达量表示为 RPKM<sub>接种</sub>/RPKM<sub>对照</sub> 的比值并对其进行分析, 结果表明: 月季在接种黑斑病菌后, 获得的多数 EST 的相对表达量发生明显上调, 主要涉及信号识别, 包括 YR14 (Serine/threonine-protein kinase SRK2I-like)、YR15 (14-3-3 蛋白) 和 YR17 (H<sup>+</sup>-transporting ATPase); 活性氧产生和清除, 包括 YR31 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, mitochondrial], YR1 (Metallothionein-like protein)、YR19 (Polyphenol oxidase F, chloroplastic-like) 和 YR22 (Glutathione peroxidase); 光呼吸途径, 包括 YR5 (digalactosyldiacylglycerol synthase 1, chloroplastic-like), YR6 [Peroxisomal(S)-2-hydroxy-acid oxidase-like]、YR18 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase bisphosphate); 苯丙烷代谢途径, 包括 YR19 (Polyphenol oxidase F, chloroplastic-like)、YR20 [(E)-nerolidol synthase] 和 YR21 (Cinnamyl

alcohol dehydrogenase)。此外, 离子转运蛋白 YR16 (Potassium transporter), 渗透胁迫蛋白 YR32 (Osmotic stress-activated protein kinase), YR23 (putative HLH DNA-binding domain superfamily protein) 等在月季感病叶片中也显著上调表达。

这一结果说明众多基因参与了月季对黑斑病菌的响应, 病原菌的侵入引起的是植物体内代谢活动的连锁改变。植物首先通过信号识别和传导系统, 识别病原菌释放的激发子并将信号传导出, 活性氧的产生是月季受到病原菌胁迫的所发出的反应信号, 而活性氧清除系统, 光呼吸途径及苯丙烷代谢途径的相关基因在此次差减中出现较多、且全部上调表达则表明其在月季抗黑斑病菌过程中可能发挥着重要作用。

### 3 讨论

本试验中发现, 差减试剂盒给定的限制性内切酶在月季 cDNA 中的酶切位点较多, 得到的酶切片段偏小。由于太短的差异片段在 Blastx 比对中的特异性和准确性较低, 为了提高比对的特异性和准确度, 舍弃了近 60% 的小片段信息, 这在一定程度上减少了获得的差异基因的信息量。尽管通过序列拼接软件可以补充部分信息, 但同时也增加了试验的成本。因此, 采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) 对月季乃至蔷薇属植物进行抑制差减杂交试验时, 有必要考虑替换给定的内切酶 *Rsa* I 或缩短酶切时间, 从而提高抑制差减杂交效率。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族是细胞膜上的主要受体蛋白, 参与植物激素传导与植物—病原菌互作响应 (郭泽建和蒋冬花, 2005)。相关研究表明, 丝氨酸/苏氨酸保守结构域在部分抗病同源序列 RGA 中承担对病原菌的识别功能 (Xu & Deng, 2010; Morel et al., 2014)。Chen 等 (2013) 通过试验证明丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在高抗番茄中上调表达, 而在敏感型番茄中下调表达。本试验中, YR14 (serine/threonine-protein kinase SRK2I-like) 在病原菌诱导后上调表达, 暗示着其可能承担着月季对黑斑病菌激发子的识别功能。

病原菌激发子与植物细胞质膜上的受体专化识别后, 首先引起植物受感染部位细胞质膜的去离子化与细胞内外的离子交换, 由此产生跨膜离子流, 钙信号等, 激发下游的抗病反应。K 是植物的大量元素, 细胞内  $K^+$  浓度的改变极易导致细胞质膜内外产生电势差, 细胞质膜内外的电势差异直接调控细胞膜上钙离子信号通道, 影响钙信号途径以及下游的抗病反应 (Amtmann et al., 2008)。同样, 质膜  $H^+$ -ATPase 也是质膜上的质子泵, 研究发现  $H^+$ -ATPase 参与植物对病原菌的识别反应, 并且动态调节植物—病原相关分子模式 PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) (Elmore & Coaker, 2011)。14-3-3 蛋白在真核生物中高度保守, 作为大多数蛋白质磷酸化和脱磷酸化的接头蛋白, 参与植物细胞凋亡, 细胞信号传导及逆境调节等众多生理功能 (文彬和王小菁, 2004)。14-3-3 蛋白与  $H^+$ -ATPase 的结合能抑制  $H^+$ -ATPase C - 末端的自我抑制功能, 提高  $H^+$ -ATPase 的转运活性。同时, 14-3-3 蛋白够提高植物体  $K^+$  通道蛋白的活性, 进而提高  $K^+$  离子的转运能力 (Roberts et al., 2002)。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶也是 14-3-3 蛋白的靶蛋白, 在 14-3-3 蛋白作用下, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性提高 (Tzivion & Avruch, 2002)。月季经黑斑病菌诱导后, YR14 (serine/threonine-protein kinase SRK2I-like), YR15 (14-3-3 protein), YR16 (Potassium transporter) 及 YR17 ( $H^+$ -ATPase) 均上调表达, 这可能暗示了它们在月季响应黑斑病菌过程中的协同作用。

半乳糖二酰基甘油 (DGDG) 是叶绿体类囊体膜的组成成分, 半乳糖二酰基甘油合成酶 (digalactosyldiacylglycerol synthase) 负责催化 DGDG 的合成, 并稳定类囊体膜上光合系统 II (PS

II)放氧复合体,提高植物在逆境下的光合能力(Sakurai et al., 2007)。YR6[Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase-like]是植物光呼吸途径的催化酶, Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase-like 能够增强 Rubisco 的加氧活性而抑制其羧化反应,从而起到反馈调节着植物的光合途径(<http://www.uniprot.org/uniprot/B8AKX6>)。本试验中 YR5 (digalactosyldiacylglycerol synthase 1, chloroplastic-like) 在月季响应黑斑病菌过程中下调表达,这说明黑斑病菌的入侵在一定程度上对月季的 PS II 具有抑制作用。叶绿体的 PS I 和 PS II 是植物体内活性氧的产生中心 (Apel & Hirt, 2004)。黑斑病菌对月季叶绿体光合系统的破坏,极易造成叶绿体光合系统中的电子传递链被抑制,引起了电荷重组和电子渗漏,最终导致了叶绿体活性氧 (ROS) 爆发 (Kangasjärvi et al., 2012)。植物光合系统受到抑制,植物对 CO<sub>2</sub> 的同化能力能力减弱,叶绿体内 Rubisco 加氧能力提高,植物光呼吸作用加强,在光呼吸及过氧化物酶体的协同作用下,植物产生大量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Takahashi & Murata, 2008)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 具有双重作用,一方面能够引起植物细胞膜脂过氧化,造成植物细胞损伤,另一方面能够杀死病菌并激发植物的抗病防御系统 (Mittler et al., 2004; Kangasjärvi et al., 2012)。徐强 (2007) 发现光呼吸在刺梨抵抗白粉病入侵中发挥重要作用。本试验中 YR5 (digalactosyldiacylglycerol synthase 1, chloroplastic-like) 在感病叶片样本中下调表达,而 YR6[Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase-like] 和 YR18 (ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase biphosphate) 在感病叶片上调表达,表明黑斑病菌对月季的光合系统具有抑制作用,光呼吸途径可能参与了月季对黑斑病菌的防御反应。

金属硫蛋白 (metallothionein protein) 是植物体内富含半胱氨酸的金属离子转运和结合蛋白,其主要功能是调节植物体内金属离子的平衡和清除植物体内的活性氧。金属硫蛋白在清除活性氧的过程中会释放一定量的金属离子,这些金属离子很可能在植物信号的级联传递中起作用 (Hassinen et al., 2011)。除 YR1 (metallothionein protein) 外, YR22 (Glutathione peroxidase) 和 YR19 (Polyphenol oxidase F, chloroplastic-like) 在受黑斑病菌诱导后上调表达,这些现象表明黑斑病菌的侵入引起了月季体内的氧爆发,激活了月季的抗氧化酶系统。

苯丙烷代谢途径负责植物木质素及次生代谢产物的合成,在植物抗病防御反应中发挥着重要的作用 (Dixon et al., 2002)。YR21 (cinnamyl alcohol dehydrogenase) 是控制木质素合成的一个关键酶 (Tronchet et al., 2010; Cheng et al., 2013)。苯丙烷的次生代谢会产生很多萜类、半萜类及酚类物质,这些物质的生成能够在一定程度上抵御和限制病原菌的入侵。YR19 (polyphenol oxidase F, chloroplastic-like) 能够催化苯丙烷途径中产生的酚类物质转化为对病原菌有毒害的醌类物质,限制病原菌的生长 (Vaughn & Duke, 1984)。YR20[(E)-nerolidol synthase]主要负责催化(E)-4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯的合成,研究发现这种挥发性萜类化合物的生成和释放可能是植物自我保护的一种机制,且主要受茉莉酸信号途径调控 (Bouwmeester et al., 1999; Degenhardt & Gershenzon, 2000; Kappers et al., 2005)。YR19、Y20、Y21 同时在感病月季中上调表达,说明了苯丙烷代谢途径在月季响应黑斑病菌入侵中发挥着重要,茉莉酸信号可能参与了月季对黑斑病的响应。

YR23(putative HLH DNA-binding domain superfamily protein)属 MYB 和 BHLH(helix-loop-helix) 转录因子家族。植物体中 MYB 和 BHLH (helix-loop-helix) 转录因子家族成员数量庞大,在功能上也形成了不同的分支。在抗病调控方面, MYB 和 BHLH 主要参与细胞壁建成,木质素合成,苯丙烷代谢途径的调控以及抑制或者诱导激素调控的抗病防御反应 (Feller et al., 2011)。Deluc 等 (2006) 在葡萄中过量表达 VvMYB5a 转录因子,结果发现 VvMYB5a 对苯丙烷代谢有正调控作用,转基因葡萄中苯丙烷代谢产物——酚类、木质素及丹宁酸等含量增加。YR23 的上调表达很可能是通过正向调控苯丙烷代谢途径来抑制黑斑病菌的入侵。然而, Song 等 (2013) 发现病原菌的无毒基



因可以通过激活 MYB 和 BHLH (helix-loop-helix) 转录因子家族的部分成员, 抑制植物茉莉酸信号途径调控的抗性防御系统。月季黑斑病菌属于半活体营养型病原菌, 植物对这类病原菌的主要抗性途径因植物——病原菌物的互作形式不同而发生改变 (Achuo et al., 2004)。如果茉莉酸信号途径参与了月季抗黑斑病反应, MYC 和 MYB 转录因子的上调表达很可能是病原菌侵入植物的一种策略。依靠目前的数据暂不能断定 YR23 在月季抗病反应中担任何种角色, 茉莉酸信号途径很可能参与了月季对黑斑病菌的响应, 但其扮演的角色及具体功能还有待确定。

## References

- Achuo E A, Audenaert K, Meziane H, Höfte M. 2004. The salicylic acid - dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53: 65 - 72.
- Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P. 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum*, 133: 682 - 691.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373 - 399.
- Biber A, Kaufmann H, Linde M, Spiller M, Terefe D, Debener T. 2010. Molecular markers from a BAC contig spanning the Rdr1 locus: A tool for marker-assisted selection in roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 765 - 773.
- Bouwmeester H J, Verstappen F W, Posthumus M A, Dicke M. 1999. Spider mite-induced. 3S.-E.-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiology*, 121: 173 - 180.
- Byrne D H, Black W, Ma Y, Pemberton H B. 1995. The use of amphidiploidy in the development of blackspot resistant rose germplasm. *Acta Horticulturae*, 424: 269 - 272.
- Chen T, Lü Y, Zhao T, Li N, Yang Y, Yu W, He X, Liu T, Zhang B. 2013. Comparative transcriptome profiling of a resistant vs. susceptible tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar in response to infection by *Tomato yellow leaf curl virus*. *PLoS ONE*, 8 (11): e80816.
- Cheng H, Li L, Xu F, Cheng S, Cao F, Wang Y, Yuan H, Jiang D, Wu C. 2013. Expression patterns of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene involved in lignin biosynthesis and environmental stress in *Ginkgo biloba*. *Molecular biology reports*, 40: 707 - 721.
- Degenhardt J, Gershenzon J. 2000. Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: A herbivore-inducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. *Planta*, 210: 815 - 822.
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde J, Mérillon J, Hamdi S. 2006. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*, 140: 499 - 511.
- Dixon R A, Achnine L, Kota P, Liu C J, Reddy M S, Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. *molecular. Plant Pathology*, 3: 371 - 390.
- Elmore J M, Coaker G. 2011. The role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in plant - Microbe interactions. *Molecular Plant*, 4: 416 - 427.
- Feller A, Machemer K, Braun E L, Grotewold E. 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, 66: 94 - 116.
- Guo Ze-jian, Jiang Dong-hua. 2005. Plant pathogen elicitors and mechanisms of signal recognition. *Journal of Zhejiang Normal University: Nat Sci*, 26 (1): 1 - 7. (in Chinese)
- 郭泽建, 蒋冬花. 2005. 植物病原菌激发子与信号识别机理. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 26 (1): 1 - 7.
- Hassinen V H, Tervahauta A I, Schat H, Kärenlampi S O. 2011. Plant metallothioneins - Metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, 13 (2): 225 - 232.
- Hattendorf A, Debener T. 2007. Molecular characterization of NBS - LRR - RGAs in the rose genome. *Physiologia Plantarum*, 129: 775 - 786.
- Kangasjärvi S, Neukermans J, Li S, Aro E, Noctor G. 2012. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 63: 1619 - 1636.
- Kappers I F, Aharoni A, van Herpen T W, Luckerhoff L L, Dicke M, Bouwmeester H J. 2005. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 309: 2070 - 2072.
- Kaufmann H, Mattiesch L, Lörz H, Debener T. 2003. Construction of a BAC library of *Rosa rugosa* Thunb. and assembly of a contig spanning *Rdr1*,

- a gene that confers resistance to blackspot. *Molecular Genetics and Genomics*, 268: 666 - 674.
- Khosravi P, Kermani M J, Nematzadeh G A, Bihamta M R, Yokoya K. 2008. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica*, 160: 267 - 275.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9 (10): 490 - 498.
- Morel A, Teyssier C, Trontin J F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, Mett   C L, Belal Bessai L. 2014. Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: Transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152 (1): 184 - 201.
- Mortazavi A, Williams B A, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5: 621 - 628.
- Qiao Jin-lian, Zhang Ya-ting, Zhu Xiao-pei, Yang Hui-min, Zeng Wei, Zhao Qin, Yuan Hong-yu. 2011. Identification of genes up-regulated by *Ectropis obliqua* feeding in tea seedlings. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (4): 783 - 789. (in Chinese)
- 乔金莲, 张娅婷, 朱小佩, 杨会敏, 曾 威, 赵 勤, 袁红雨. 2011. 从茶树幼苗中分离茶尺蠖取食诱导的基因. *园艺学报*, 38 (4): 783 - 789.
- Roberts M R, Salinas J, Collinge D B. 2002. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Molecular Biology*, 50: 1031 - 1039.
- Sakurai I, Mizusawa N, Wada H, Sato N. 2007. Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiology*, 145: 1361 - 1370.
- Song S, Qi T, Fan M, Zhang X, Gao H, Huang H, Wu D, Guo H, Xie D. 2013. The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate - Mediated plant defense and development. *PLoS Genetics*, 9: e1003653.
- Spiller M, Linde M, Hibrand-Saint Oyant L, Tsai C, Byrne D H, Smulders M J, Foucher F, Debener T. 2011. Towards a unified genetic map for diploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 489 - 500.
- Takahashi S, Murata N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13: 178 - 182.
- Tronchet M, Balague C, Kroj T, Jouanin L, Roby D. 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases - C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 11: 83 - 92.
- Tzivion G, Avruch J. 2002. 14-3-3 proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 3061 - 3064.
- Vaughn K C, Duke S O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 60: 106 - 112.
- Wen Bin, Wang Xiao-jing. 2004. Advance in 14-3-3 proteins. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 16 (4): 226 - 230. (in Chinese)
- 文 彬, 王小菁. 2004. 14-3-3 蛋白研究进展. *生命科学*, 16 (4): 226 - 230.
- Wang Jia-bao, Jin Zhi-qiang, Li Mei-ying, Zhang Xin-chun. 2013. Analysis of genes differentially expressed during pericarp browning of postharvest litchi fruit using suppression subtractive hybridization technology. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (11): 2144 - 2152. (in Chinese)
- 王家保, 金志强, 李美英, 张新春. 2013. 荔枝采后果皮褐变过程中差异表达基因的 SSH 分析. *园艺学报*, 40 (11): 2144 - 2152.
- Whitaker V M, Bradeen J M, Debener T, Biber A, Hokanson S C. 2010. *Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose: Genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 573 - 585.
- Whitaker V M, Hokanson S C. 2009. Partial resistance to black spot disease in diploid and tetraploid roses: General combining ability and implications for breeding and selection. *Euphytica*, 169: 421 - 429.
- Whitaker V M, Zuzek K, Hokanson S C. 2007. Resistance of 12 rose genotypes to 14 isolates of *Diplocarpon rosae* Wolf. rose blackspot collected from eastern North America. *Plant Breeding*, 126: 83 - 88.
- Xu Q, Deng X. 2010. Cloning and phylogenetic analyses of serine/threonine kinase class defense-related genes in a wild fruit crop 'Chestnut Rose'. *BMC Research Notes*, 3: 202.
- Xu Qiang. 2007. The molecular mechanism of powdery mildew resistance in *Rosarox burghii* Tratt.[Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 徐 强. 2007. 刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt.) 抗白粉病的分子机制[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A, Dolstra O, Debener T, Stam P, Visser P B. 2005. Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 766 - 777.
- Yokoya K, Kandasamy K I, Walker S, Mandegaran Z, Roberts A V. 2000. Resistance of roses to pathotypes of *Diplocarpon rosae*. *Annals of Applied Biology*, 136: 15 - 20.