

杨冬静, 高方园, 陈晶伟, 等. 长喙壳菌侵染甘薯的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7): 1320-1331.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.008

长喙壳菌侵染甘薯的转录组分析

杨冬静, 高方园, 陈晶伟, 马居奎, 唐伟, 梁昭, 张成玲, 孙厚俊, 谢逸萍
(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131)

摘要: 甘薯黑斑病是由长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted) 侵染引起的, 该病害是甘薯重要病害之一, 在田间生产和贮藏期均可发生, 严重影响甘薯的产量和品质。为了明确长喙壳菌对甘薯黑斑病的致病机理, 本研究以甘薯黑斑病抗病品种南京 92 和感病品种徐薯 18 为试验材料, 采用针刺接种孢子悬浮液的方法人工接种甘薯长喙壳菌, 分别于接种当天与接种后第 1 d、第 3 d、第 7 d 取样, 利用转录组测序技术进行测序分析。转录组测序结果显示, 与接种当天相比, 长喙壳菌接种至南京 92 薯块后第 1 d、第 3 d 和第 7 d 上调差异表达基因(DEGs) 分别为 1 124 个、1 713 个和 2 032 个, 下调 DEGs 分别为 869 个、1 042 个和 1 005 个; 长喙壳菌接种至徐薯 18 薯块后第 1 d、第 3 d 和第 7 d 上调 DEGs 分别为 901 个、1 625 个和 1 957 个, 下调 DEGs 分别为 1 017 个、976 个和 1 032 个。GO 功能富集分析结果表明, 差异表达基因主要富集于生物过程类别的生物进程、代谢进程、单一生物进程以及细胞组分类别的细胞、细胞部分、细胞器等。KEGG 通路富集的主要通路为代谢途径。维恩图分析结果表明, 长喙壳菌接种至南京 92 薯块后不同时间点共有 DEGs 为 1 545 个, 接种至徐薯 18 薯块后不同时间点共有 DEGs 为 1 116 个, 对这些 DEGs 进行交互分析, 发现接种至 2 个甘薯品种薯块后在各时间点共有的 DEGs 有 925 个。对 925 个共有 DEGs 进行 KEGG 聚类分析, 结果表明, 这些 DEGs 主要被富集到代谢通路中, 如碳水化合物代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、辅因子和维生素代谢以及能量代谢等途径中, 进一步对这些 DEGs 进行筛选, 得到相对表达量高于 1.00、持续上调表达并且差异表达倍数达到 40 倍以上的关键致病基因共 20 个。本研究结果为深入研究长喙壳菌致病分子机理奠定了重要基础。

关键词: 甘薯; 长喙壳菌; 转录组测序; 差异表达基因; 致病机理

中图分类号: S435.311 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)07-1320-12

Transcriptomic analysis of sweet potato infected by *Ceratocystis fimbriata*

YANG Dongjing, GAO Fangyuan, CHEN Jingwei, MA Jukui, TANG Wei, LIANG Zhao, ZHANG Chengling, SUN Houjun, XIE Yiping

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Key Laboratory of Sweetpotato Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China)

Abstract: Sweet potato black rot is caused by the infection of *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted. As one of the important diseases of sweet potato, it can occur during field production and storage, seriously affecting the yield and quality of sweet potato. To clarify the pathogenic mechanism of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, this study used Nanjing 92 (a resistant variety to sweet potato black rot) and Xushu 18 (a susceptible variety) as test materials. The method of needle prick inoculation with spore suspension was adopted to artificially inoculate *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato. Samples were collected at 0 d, 1 d, 3 d and 7 d after inoculation, and transcriptome sequencing technology was used for sequencing analysis. The results of transcriptome sequencing showed that compared with the day of inoculation, the num-

收稿日期: 2024-10-11

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-10); 国家自然科学基金青年基金项目(32001599)

作者简介: 杨冬静(1983-), 女, 四川射洪人, 博士, 副研究员, 主要从事植物病理学研究。(E-mail) njnd831215@126.com

通讯作者: 谢逸萍, (E-mail) xieyiping6216@163.com

ber of differentially expressed genes increased significantly. GO enrichment analysis results showed that differentially expressed genes were mainly enriched in biological process categories such as biological process, metabolic process, and single biological process, as well as cell categories such as cell, cell part, and organelle. KEGG pathway enrichment analysis showed that the main pathway was metabolic pathway. Venn diagram analysis results showed that after inoculation with *Ceratocystis fimbriata* on Nanjing 92 sweet potato tubers at different time points, there were 1 545 common DEGs, and after inoculation on Xushu 18 sweet potato tubers at different time points, there were 1 116 common DEGs. After interaction analysis of DEGs on 2 sweet potato varieties, there were 925 common DEGs at different time points. KEGG cluster analysis results showed that these DEGs were mainly enriched in metabolic pathways, such as carbohydrate metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, nucleotide metabolism, cofactor and vitamin metabolism, and energy metabolism, etc. Further screening of these DEGs showed that 20 key pathogenic genes with relative expression levels above 1.00, continuous up-regulation, and fold change reaching 40 times or more were identified. The results of this study provide an important basis for in-depth research on the pathogenic mechanism of *Ceratocystis fimbriata*.

bers of up-regulated differentially expressed genes (DEGs) at 1 d, 3 d and 7 d after inoculation of *Ceratocystis fimbriata* on Nanjing 92 tubers were 1 124, 1 713 and 2 032, respectively, and the numbers of down-regulated DEGs were 869, 1 042 and 1 005, respectively. For Xushu 18 tubers, the numbers of up-regulated DEGs at 1 d, 3 d and 7 d after inoculation were 901, 1 625 and 1 957 respectively, and the numbers of down-regulated DEGs were 1 017, 976 and 1 032 respectively. The results of GO functional enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes were predominantly enriched in biological process categories such as biological process, metabolic process and single-organism process, as well as in cellular component categories including cell, cell part and organelle. The main pathways enriched by KEGG pathway were metabolic pathways. Venn diagram analysis showed that the common DEGs at different time points after inoculation of *Ceratocystis fimbriata* on Nanjing 92 tubers were 1 545, and those on Xushu 18 tubers were 1 116. Through interactive analysis of these DEGs, it was found that there were 925 common DEGs in the two sweet potato varieties at each time period. KEGG cluster analysis of the 925 common DEGs showed that these DEGs were mainly enriched in metabolic pathways, such as carbohydrate metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, nucleotide metabolism, cofactor and vitamin metabolism, and energy metabolism. Further screening of these DEGs identified 20 key pathogenic genes with relative expression levels higher than 1.00, continuous up-regulation and a fold change of more than 40 times. The results of this study lay an important foundation for the in-depth study of the molecular pathogenic mechanism of *Ceratocystis fimbriata*.

Key words: sweet potato; *Ceratocystis fimbriata*; transcriptome sequencing; differentially expressed genes (DEGs); pathogenic mechanism

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 作为重要的粮食、饲料及能源作物,广泛分布于全球 100 多个国家和地区。中国是世界上最大的甘薯生产国,其耐贫瘠、超高产特性对保障国家粮食安全意义重大。随着生活水平提升,甘薯保健价值日益凸显,产业格局逐步演变^[1-2]。然而,甘薯在田间种植及贮藏阶段易受多种病原菌侵害,其中长喙壳菌 (*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted) 引发的甘薯黑斑病是主要病害之一,严重制约甘薯生产^[3-4]。现有研究表明,目前尚无完全免疫黑斑病的甘薯品种^[5]。中国登记用于防治甘薯黑斑病的药剂目前仅有多菌灵、甲基硫菌灵、代森铵、乙蒜素和大蒜素 5 种。受药剂残留、使用技术及防治效果等因素限制,化学防治难以有效解决黑斑病的预防和控制难题^[6]。

随着高通量测序技术的快速发展,基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等技术已被广泛用于研究生物体的特定生物学过程和分子机制。转录组测序技术 (RNA-Seq) 由于通量大、时间短、灵敏度高等优势在植物病害研究领域得到广泛应用,它可以用于特定条件下的基因表达研究,在解析植物和病原菌互作的分子机制中发挥重要作用。近年来,转录组测序技术在甘薯抗生物和非生物胁迫的分子机制研究中得到广泛应用,大大丰富了转录组学在甘薯上的研究成果^[7-9]。Onofua^[10] 以高抗蔓割病甘薯品种金山 57 和高感蔓割病甘薯品种新种花为材

料,用致病性强的蔓割病菌株 Fob-07 和非致病菌株 Fob-04 分别侵染甘薯茎蔓,然后分别提取各样品的 RNA,利用高通量测序平台进行转录组测序,高抗品种金山 57 经 Fob-07 侵染后,有 6 454 个差异表达基因,其中 3 843 个为上调表达基因,2 611 个为下调表达基因;高感品种新种花经 Fob-07 侵染后,有 6 826 个差异表达基因,其中 5 552 个为上调表达基因,1 274 个为下调表达基因,此外,还发现如 *CERKI* 基因、*MAPK* 基因、信号转导相关基因以及 NAC 等转录因子、PR 蛋白和 R 蛋白等与抗病相关。罗勤川^[11] 对不同时间点接种腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) 的甘薯样本进行取样和转录组测序分析,结果表明,在接种 6 h、24 h、3 d 和 5 d 后,分别检测到 1 056 个、995 个、737 个和 935 个显著差异表达基因 (DEGs)。GO 功能富集分析结果表明,这些 DEGs 主要参与生物过程、分子功能和细胞组分。KEGG 富集的通路多属于代谢、有机体系统、细胞进程、遗传信息进程。梅玉琴^[12] 通过对甘薯根腐病抗病品种和感病品种进行转录组分析,结果发现抗病品种鄂薯 11 在根腐病病菌侵染 7 d 和 13 d 时分别有 10 665 个和 10 171 个 DEGs,感病品种胜利百号在根腐病病菌侵染 7 d 和 13 d 时分别有 10 050 个和 9 972 个 DEGs,并由此推测鄂薯 11 更快速响应根腐病病菌胁迫从而有利于增强甘薯对根腐病的抗性。Bednarek 等^[13] 对甘薯病毒病 (SPVD) 敏感品种

Beauregard 中的 mRNA 和 sRNA 群体进行深度测序,发现应激反应和信号转导途径相关基因显著受病毒感染影响,同时鉴定到几种对病毒感染有反应的新型 microRNA,其中一些被预测为靶向核苷酸结合位点编码富含亮氨酸重复序列(NBS-LRR)的抗病基因,此外病毒感染导致水杨酸介导的防卫反应途径相关基因表达下调,这在一定程度上也解释了 Beauregard 品种对 SPVD 易感。

目前,关于长喙壳菌引起的甘薯黑斑病报道较少,其致病机理尚不明确。本研究拟对两个接种长喙壳菌的甘薯品种不同时期取样并进行互作转录组测序,分析接种后不同时期长喙壳菌中存在的 DEGs 以及共有 DEGs 的 GO 功能和 KEGG 通路,结合关键通路和差异表达倍数筛选关键致病因子,以期研究长喙壳菌侵染甘薯的致病分子机理奠定基础,为甘薯黑斑病的预防和控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试甘薯选择相对抗黑斑病的南京 92 和相对感黑斑病的徐薯 18,甘薯长喙壳菌采用 PDA 培养基(马铃薯 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 16 g/L)继代培养。长喙壳菌和甘薯薯块均由江苏徐淮地区徐州农业科学研究所提供。

1.2 病原菌接种及取样方法

选择健康、大小一致的薯块洗净晾干后用 75% 酒精喷雾消毒,备用。长喙壳菌在 PDA 平板上培养 5~7 d,采用灭菌水洗涂平板获得分生孢子悬浮液,在显微镜下将孢子液含孢子量调整为 1×10^5 CFU/mL,用灭菌针头吸取孢子悬浮液针刺薯块,每针刺 1 次需要吸取 1 次孢子悬浮液,每个薯块接种 3 排,每排均匀接种 5 个点,分别在接种当天与接种后 1 d、3 d 和 7 d 取少量发病部位位于液氮中速冻后再置于 -70 °C 冰箱中,南京 92 薯块上的各样品分别命名为 R1、R2、R3 和 R4;徐薯 18 薯块上的各样品分别命名为 S1、S2、S3 和 S4,样品寄送至广州基迪奥生物科技有限公司进行测序。

1.3 总 RNA 提取检测及转录组文库构建

采用植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取样品总 RNA,进一步通过琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop 微量分光光度计和 Agilent 2100 检测 RNA 的完整性、浓度和纯度,转录

组文库构建和质量检测方法参考文献[14]。

1.4 转录组测序、差异表达基因筛选及通路富集分析

采用 Illumina HiSeq 4000 平台进行转录组测序,下机的原始测序数据(Raw reads)采用 Fastp^[15]进行质量控制,过滤后得到清洁读数(Clean reads),从而保证数据质量。序列比对分析方面,针对核糖体序列的比对采用短 reads 比对软件 Bowtie 2^[16]去除比对上核糖体的 reads 后再进行分析,采用 HISAT 2 软件比对测序序列和参考基因组[*Ceratocystis fimbriata* CBS 114723 (assembly Cfm 3.0)]^[17],采用 Stringtie 软件^[18]重构转录本,并计算每个样本所有基因的表达量。基于表达量信息,采用 R 语言(<http://www.r-project.org/>)开展主成分分析。差异表达基因采用 DESeq 2^[19]进行分析,以错误发现率(FDR) < 0.05 且 $|\log_2 FC| > 1$ 为标准进行 DEGs 筛选(FC:变化倍数)。将 DEGs 向 GO 数据库各 term 进行映射,计算每个 term 的基因数,从而得到具有某个 GO 功能的基因列表及基因数目,进一步比对检验,找出 DEGs 显著富集的 GO 条目。将测序结果与 KEGG 数据库进行比对分析^[20],并对 DEGs 进行通路富集分析、功能分类和注释。对差异表达倍数显著提升的基因采用 Excel 软件筛选并进行功能预测和分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据

将 raw reads 中低质量数据过滤掉后,每个样品获得的 clean reads 数量均大于 62 529 524 个。碱基测序错误率 Q20 碱基百分比(错误率 < 1.00%) 和 Q30 碱基百分比(错误率 < 0.10%) 分别在 97.51% 和 92.87% 以上,G+C 含量均在 56.40% 以上,说明测序数据的质量较高,可用于后续的数据分析。将转录组测序数据和参考基因组(assembly Cfm 3.0)进行比对分析,结果如表 1 所示,比对到参考基因组的比值介于 0.54%~25.60%;比对到参考基因外显子区域序列占比 69.19%~84.23%,比对到参考基因内含子区域序列占比 0.69%~1.19%,基因间隔区占比 14.87%~30.12%。

基于每千个碱基的转录本每百万映射读取的片段数(FPKM)来统计基因的表达量,选择任意两个样本的表达量,计算它们之间的皮尔逊相关系数(图 1),从图 1 可以看出,每个样品的 3 次生物学重

复间具有较好的重复性,表明样品达到重复性试验的标准,说明结果是可靠的。此外,同一品种薯块接种长喙壳菌后随时间点延长基因表达量与接种当天的基因表达量相关性逐渐降低,如 R2 基因表达量和 R1 基因表达量的相关性系数均高于 0.689 6, R3 基因表达量与 R1 基因表达量的相关性系数为

0.664 5~0.690 5, R4 基因表达量与 R1 基因表达量的相关性系数为 0.613 8~0.636 0, 总体而言,接种后不同时间点的基因表达量与接种当天的基因表达量相关性较强,相关系数均超过 0.600 0; 两个甘薯品种接种后各时间点基因表达量与接种当天基因表达量相关性系数变化呈现相似的规律。

表 1 转录组测序数据与参考基因组的比对分析

Table 1 Alignment and analysis of transcriptome sequencing data with the reference genome

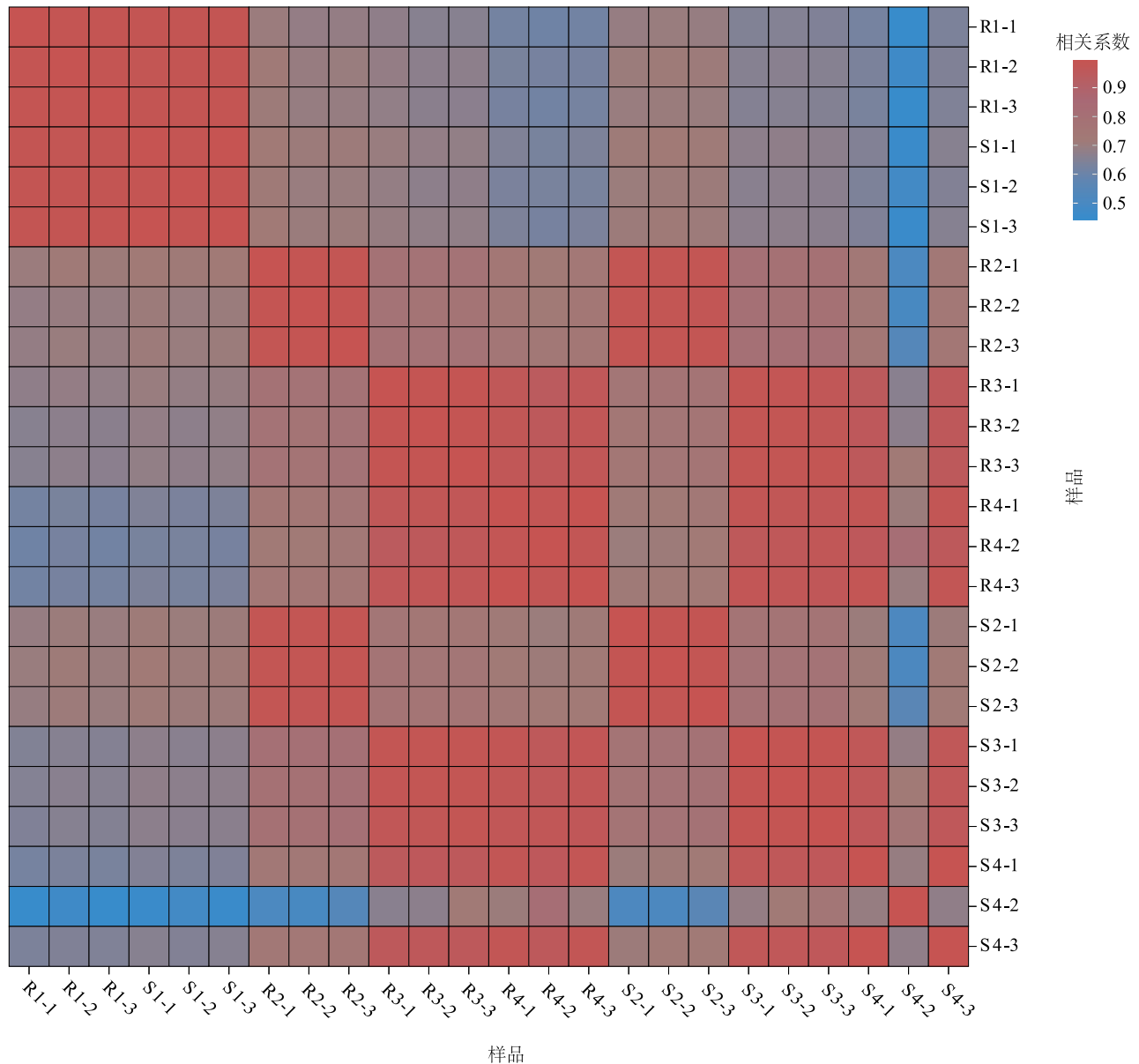
样品	重复	序列总数 (个)	未比对到参考基因组上的序列		比对到参考基因组上的序列		比对到参考基因外显子上的序列		比对到参考基因内含子上的序列		基因间隔区序列	
			数量	占比(%)	数量	占比(%)	数量	占比(%)	数量	占比(%)	数量	占比(%)
R1	1	65 316 024	63 535 923	97.27	1 780 101	2.73	1 475 135	82.87	20 085	1.13	284 881	16.00
	2	66 689 230	65 069 423	97.57	1 619 807	2.43	1 312 000	81.00	18 067	1.12	289 740	17.89
	3	87 055 496	84 930 468	97.56	2 125 028	2.44	1 738 898	81.83	24 013	1.13	362 117	17.04
S1	1	63 789 526	60 892 657	95.46	2 896 869	4.54	2 339 985	80.78	33 917	1.17	522 967	18.05
	2	65 957 666	62 766 609	95.16	3 191 057	4.84	2 574 333	80.67	36 960	1.16	579 764	18.17
	3	65 380 506	62 366 116	95.39	3 014 390	4.61	2 443 050	81.05	35 831	1.19	535 509	17.77
R2	1	66 744 590	65 931 757	98.78	812 833	1.22	669 198	82.33	6 866	0.84	136 769	16.83
	2	67 220 934	66 432 573	98.83	788 361	1.17	643 762	81.66	6 922	0.88	137 677	17.46
	3	69 197 262	68 484 811	98.97	712 451	1.03	550 681	77.29	6 398	0.90	155 372	21.81
R3	1	77 512 448	72 328 498	93.31	5 183 950	6.69	4 366 641	84.23	46 282	0.89	771 027	14.87
	2	62 147 598	58 591 600	94.28	3 555 998	5.72	2 888 110	81.22	32 909	0.93	634 979	17.86
	3	78 383 228	73 869 072	94.24	4 514 156	5.76	3 647 653	80.80	41 367	0.92	825 136	18.28
R4	1	65 429 400	52 832 629	80.75	12 596 771	19.25	10 259 122	81.44	132 338	1.05	2 205 311	17.51
	2	61 750 148	49 985 876	80.95	11 764 272	19.05	9 405 522	79.95	122 637	1.04	2 236 113	19.01
	3	64 102 604	51 893 897	80.95	12 208 707	19.05	9 913 097	81.20	130 442	1.07	2 165 168	17.73
S2	1	73 198 168	72 805 061	99.46	393 107	0.54	285 860	72.72	2 870	0.73	104 377	26.55
	2	68 485 100	68 029 726	99.34	455 374	0.66	343 479	75.43	3 225	0.71	108 670	23.86
	3	81 559 538	81 071 373	99.40	488 165	0.60	337 758	69.19	3 352	0.69	147 055	30.12
S3	1	63 339 852	59 858 019	94.50	3 481 833	5.50	2 857 211	82.06	33 642	0.97	590 980	16.97
	2	63 532 014	60 263 728	94.86	3 268 286	5.14	2 652 371	81.15	30 866	0.94	585 049	17.90
	3	70 912 860	67 349 068	94.97	3 563 792	5.03	2 867 701	80.47	34 590	0.97	661 501	18.56
S4	1	88 241 722	66 396 438	75.24	21 845 284	24.76	17 791 905	81.45	243 561	1.11	3 809 818	17.44
	2	63 387 806	47 971 335	75.68	15 416 471	24.32	11 595 924	75.22	157 353	1.02	3 663 194	23.76
	3	77 547 170	57 692 608	74.40	19 854 562	25.60	16 313 681	82.17	222 000	1.12	3 318 881	16.72

R1~R4: 分别表示南京 92 薯块接种长喙壳菌分生孢子悬浮液当天与接种后第 1 d、第 3 d、第 7 d 的发病部位样品; S1~S4: 分别表示徐薯 18 薯块接种长喙壳菌分生孢子悬浮液当天与接种后第 1 d、第 3 d、第 7 d 的发病部位样品。

2.2 接种后不同时间点长喙壳菌中的 DEGs

基于差异分析结果,本研究筛选 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 的基因为显著差异表达基因。从图 2 可以看出,随着接种后时间延长,抗病品种南京 92 中长喙壳菌的上调基因数量逐渐增加,感病品种徐薯 18 中也呈现相似的规律(图 2A~图 2F)。分别对接种后不同时间点(R2~R4)抗病品种南京 92 中长喙壳菌的转录组数据与 R1 进行比较分析可以看

出,接种后 1 d 差异表达基因有 1 993 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 1 124 个和 869 个;接种 3 d 时差异表达基因有 2 755 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 1 713 和 1 042 个;接种 7 d 时差异表达基因有 3 037 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 2 032 个和 1 005 个。分别对接种后不同时间点感病品种徐薯 18 中长喙壳菌的转录组数据与 S1 进行比较分析可以看



R1~R4 和 S1~S4 见表 1 注。R1-1~R1-3 分别表示 R1 样品的 3 次生物学重复,R2-1~R2-3 分别表示 R2 样品的 3 次生物学重复,R3-1~R3-3 分别表示 R3 样品的 3 次生物学重复,R4-1~R4-3 分别表示 R4 样品的 3 次生物学重复;S1-1~S1-3 分别表示 S1 样品的 3 次生物学重复,S2-1~S2-3 分别表示 S2 样品的 3 次生物学重复,S3-1~S3-3 分别表示 S3 样品的 3 次生物学重复,S4-1~S4-3 分别表示 S4 样品的 3 次生物学重复。

图 1 样本相关性热图

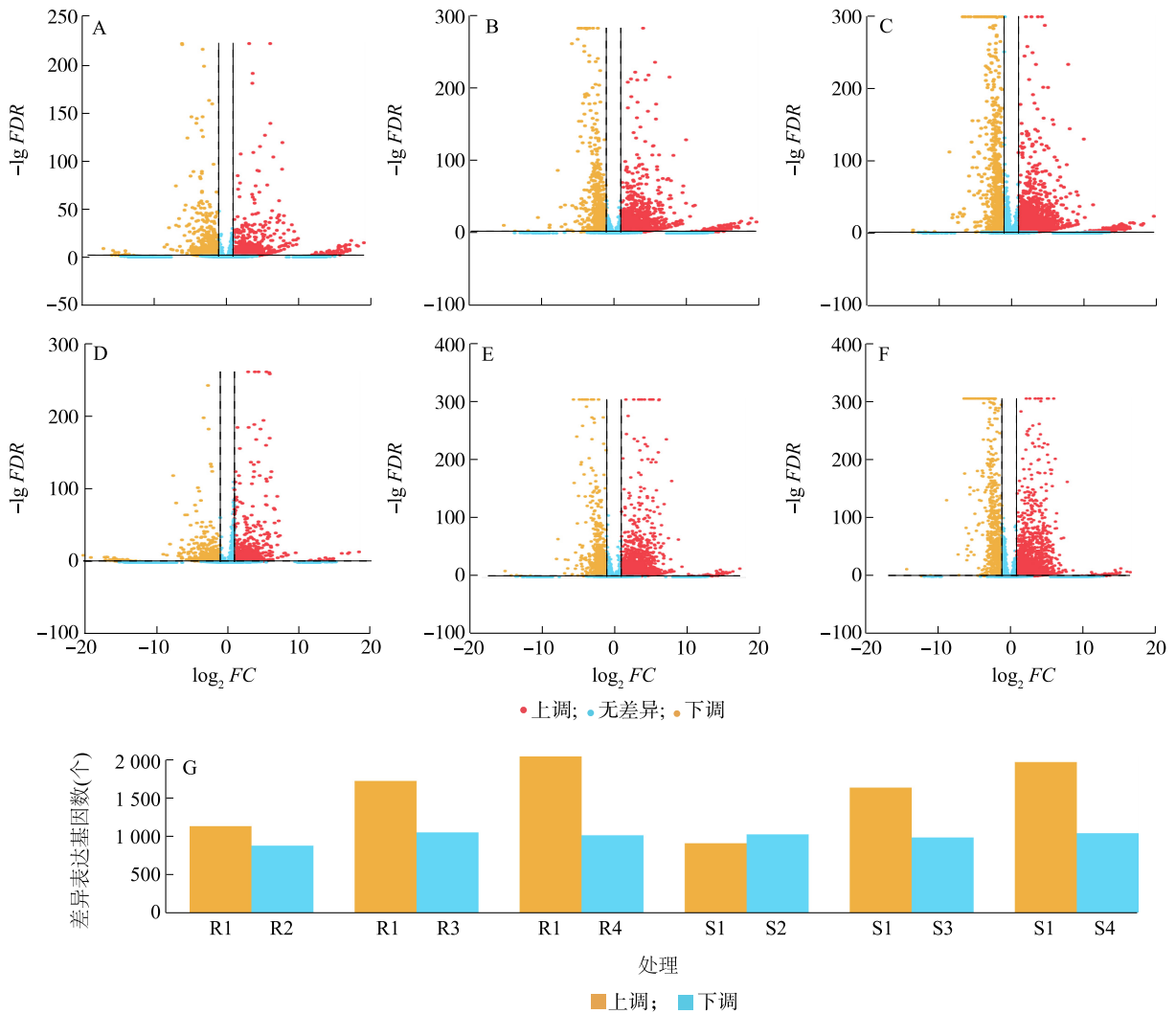
Fig.1 Sample correlation heat map analysis

出,接种 1 d 时差异表达基因有 1 918 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 901 和 1 017 个;接种 3 d 时差异表达基因有 2 601 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 1 625 和 976 个;接种 7 d 时差异表达基因有 2 989 个,其中上调 DEGs 和下调 DEGs 的数量分别为 1 957 个和 1 032 个(图 2G)。

2.3 DEGs 的 GO 功能富集

GO 功能富集分析结果发现,长喙壳菌接种至南京

92 薯块后第 1 d、第 3 d 和第 7 d,生物过程(BP)类别分别富集了 630 个、782 个和 818 个 DEGs;在分子功能(MF)类别中,分别富集了 532 个、670 个和 687 个 DEGs;在细胞组分(Cellular component,CC)类别中,分别富集了 462 个、579 个和 595 个 DEGs。长喙壳菌接种至徐薯 18 薯块后第 1 d、第 3 d 和第 7 d,BP 类别分别富集到 556 个、697 个和 766 个 DEGs;MF 类别分别富集到 458 个、588 个和 648 个 DEGs;CC 类别分别富集



R1~R4 和 S1~S4 见表 1 注。A、B、C 分别代表与 R1 相比, R2、R3 和 R4 差异表达基因火山图; D、E、F 分别代表与 S1 相比, S2、S3 和 S4 差异表达基因火山图; G 代表不同处理间差异表达基因统计结果。FDR: 错误发现率; FC: 变化倍数。

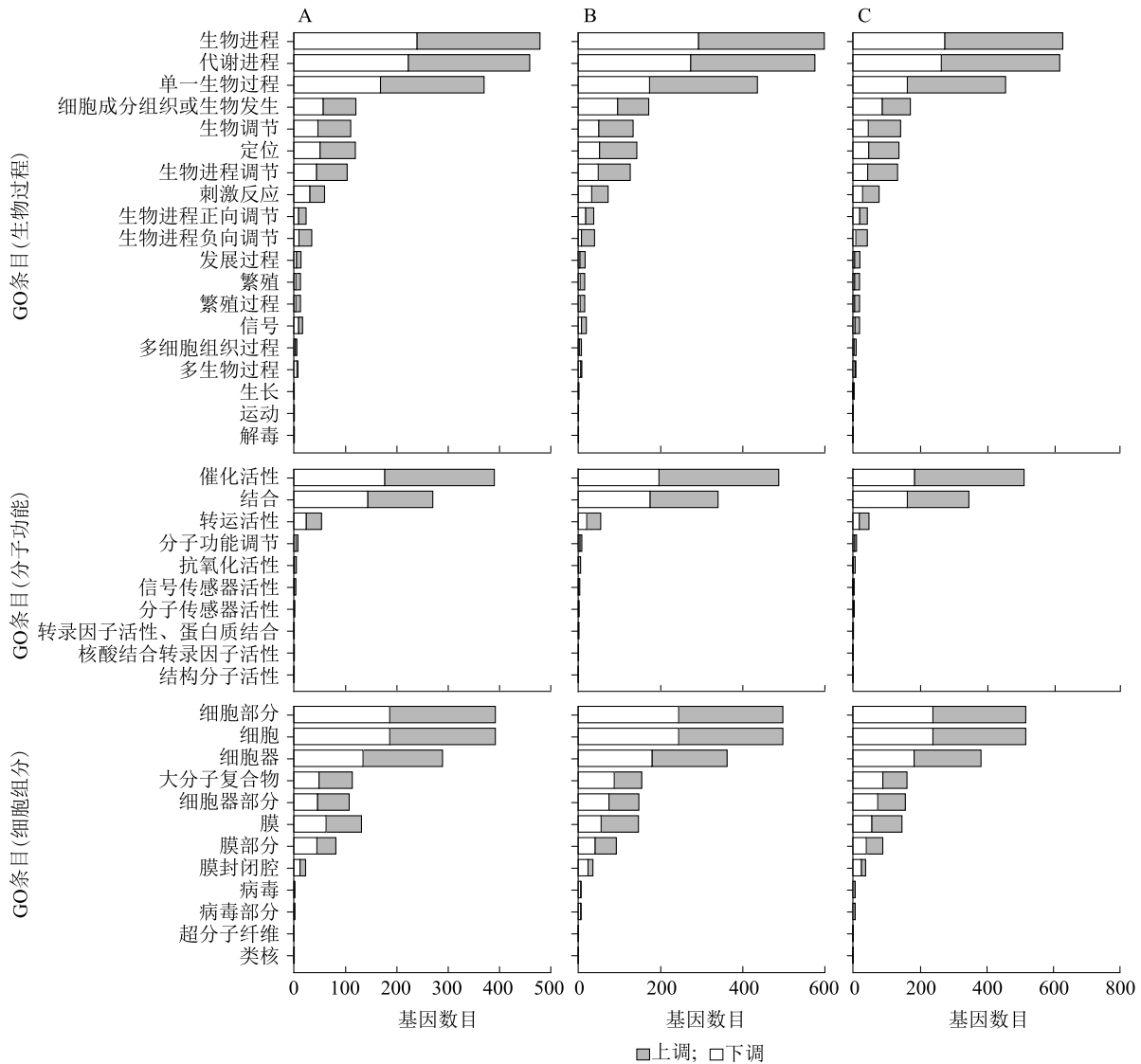
图 2 差异表达基因火山图以及不同处理间差异表达基因统计结果

Fig.2 Volcano diagram of differentially expressed genes and the statistical results of differentially expressed genes between different treatments

到 406 个、507 个和 541 个 DEGs。这些 DEGs 在 GO 功能分类中, BP 类别主要包含生物进程 (Cellular process)、代谢进程 (Metabolic process) 和单一生物进程 (Single-organism process) 等, MF 类别主要涉及催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding), 而 CC 类别中主要包括细胞 (cell)、细胞部分 (cell part) 和细胞器 (organelle) 等条目, 且长喙壳菌接种至徐薯 18 薯块后这些差异表达基因的隶属类别与长喙壳菌接种至南京 92 薯块后具有相似性, 但是也存在一定的差异, 比如属于 BP 类别的细胞进程的 DEGs 在接种至抗病品种薯块上上调数目和下调数目相当, 而在接种至感病品种薯块上下调数目高于上调数目 (图 3、图 4)。

2.4 DEGs 的 KEGG 通路富集

为深入探讨 DEGs 的功能, 本研究对 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析, 总体来看, 富集最多的是代谢途径, 其次是遗传信息加工途径, 然后是细胞加工途径。图 5 分别为富集最显著的 10 条 KEGG 通路, 长喙壳菌接种至抗病品种南京 92 薯块后第 1 d 富集的主要通路有代谢途径、次生代谢物的生物合成、抗生素生物合成、真核生物核糖体的生物合成以及淀粉和糖代谢等 (图 5A), 接种后第 3 d 富集到的通路主要有代谢途径、次生代谢物的生物合成、真核生物核糖体的生物合成以及嘧啶代谢等 (图 5B), 接种后第 7 d 富集到的通路主要有代谢途径、真核生物核



A: R2 与 R1 相比 GO 功能富集的 DEGs; B: R3 与 R1 相比 GO 功能富集的 DEGs; C: R4 与 R1 相比 GO 功能富集的 DEGs。

图 3 与 R1 相比 R2、R3、R4 的 GO 功能富集分类二级柱状图

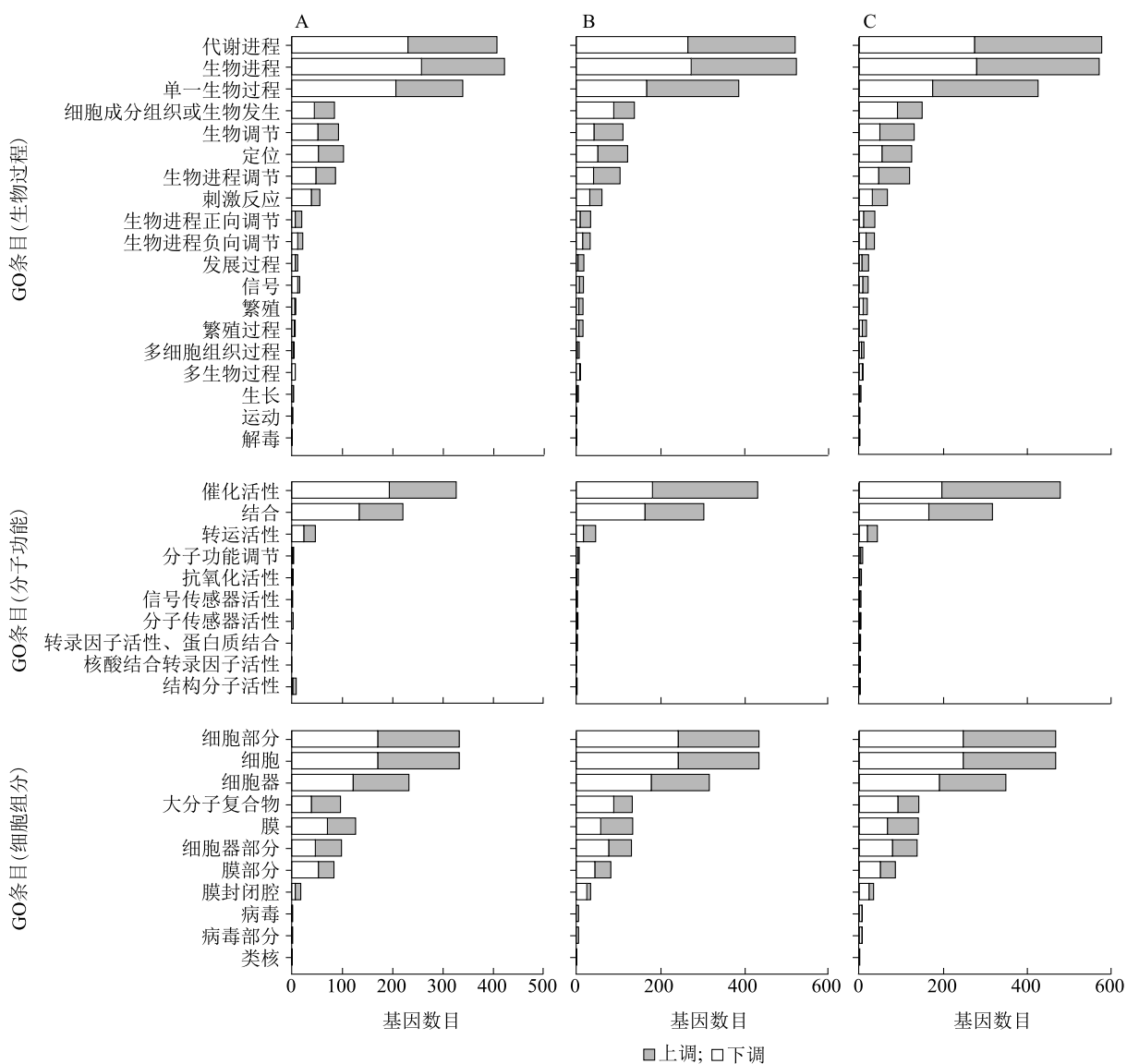
Fig.3 Comparative GO functional enrichment bar charts at level-2 subcategories for R2, R3 and R4 versus R1

糖体的生物合成、嘧啶代谢、蛋白酶体等(图 5C);长喙壳菌接种至感病品种徐薯 18 薯块后第 1 d 富集的主要通路有代谢途径、次生代谢物的生物合成和抗生素的生物合成等(图 5D),第 3 d 富集到的通路主要是代谢途径、真核生物核糖体的生物合成等(图 5E);第 7 d 富集到的通路主要为代谢途径,但次生代谢物的生物合成的差异表达基因数量比第 3 d 明显增多(图 5F)。总体来讲,这些通路主要为碳水化合物、氨基酸、核苷酸代谢以及遗传信息加工等,与长喙壳菌自身的生长发育和繁殖以及侵染薯块的过程中破除寄主防御系统等密切相关。此外,

本研究还分别比较分析了长喙壳菌接种至不同品种薯块相同时间点之间的差异表达基因及富集到的通路差异,结果表明,长喙壳菌接种至两个品种薯块的相同时间点,差异表达基因非常少,据此推测,长喙壳菌在抗黑斑病甘薯品种和感黑斑病甘薯品种中侵染过程和机理相对一致。

2.5 长喙壳菌致病关键基因的筛选和分析

通过维恩图分析,筛选到长喙壳菌接种至南京 92 薯块不同时间点共有 DEGs 为 1 545 个(图 6A),接种至徐薯 18 薯块不同时间点的共有 DEGs 有 1 116 个(图 6B),进一步将这两组基因集进行维恩



A: S2 与 S1 相比 GO 功能富集的 DEGs; B: S3 与 S1 相比 GO 功能富集的 DEGs; C: S4 与 S1 相比 GO 功能富集的 DEGs。

图 4 与 S1 相比 S2、S3、S4 的 GO 功能富集分类二级柱状图

Fig.4 Comparative GO functional enrichment bar charts at level-2 subcategories for S2, S3 and S4 versus S1

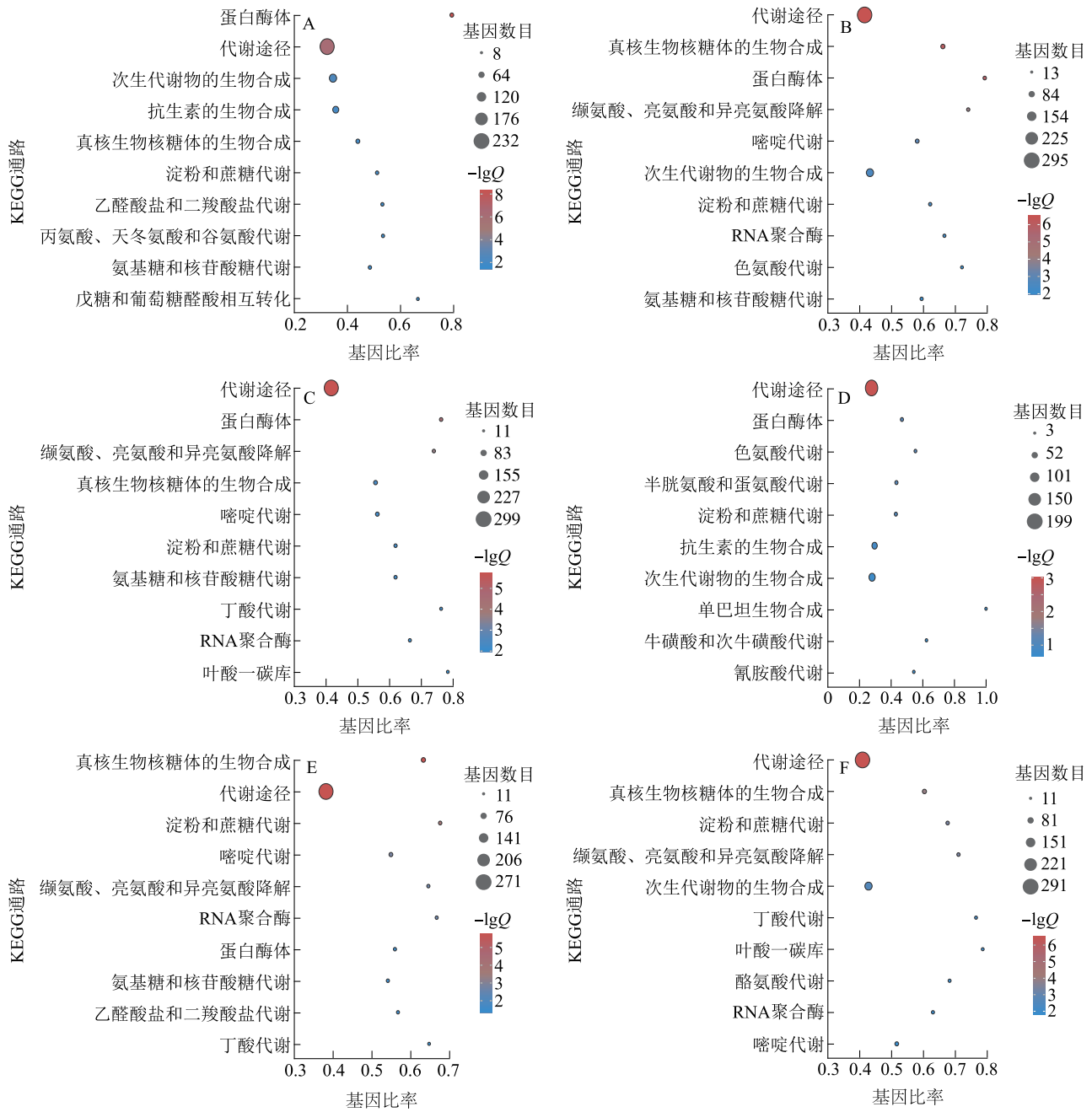
图分析,得到 925 个共有 DEGs(图 6C),对这 925 个共有 DEGs 进行 KEGG 聚类分析,发现这些 DEGs 主要富集到代谢通路中,如碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂质代谢、辅因子和维生素代谢、核苷酸代谢以及能量代谢等途径中(图 7)。

将这 925 个共有 DEGs 进一步筛选,得到相对表达量高于 1.00、持续上调表达并且差异表达倍数达到 40 倍以上的关键致病相关基因共有 20 个(表 2),这些基因主要涉及与转座酶相关、CF-IPO 蛋白质、MFS 单羧酸转运蛋白、核糖核酸酶 Z1、维西考林还原酶、ATP 酶家族、6-磷酸葡萄糖酸磷酸酶、糖原-

1、木质素酶 LG5、L-氨基酸氧化酶、铁转运多铜氧化酶 FET3、二氢吡啶甲酸合成酶家族蛋白质、果胶裂解酶以及一些假定蛋白质。

3 讨论

长喙壳菌侵染甘薯引起的黑斑病严重影响甘薯的产量和品质,然而其致病机理至今尚不明确。本研究以抗甘薯黑斑病的南京 92 和感甘薯黑斑病的徐薯 18 两个甘薯品种为试验材料,采用人工接种长喙壳菌并于不同时间取样,采用转录组测序技术进行测序分析,结果发现,与 R1 相比,R2、R3、R4 长喙



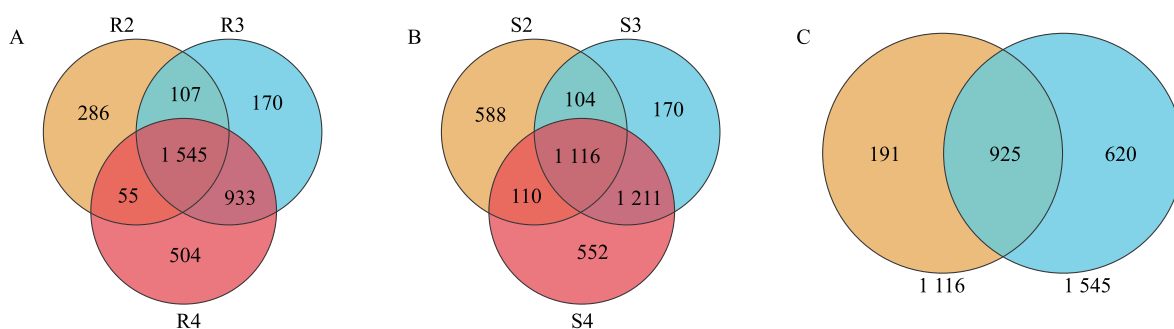
A、B、C 分别代表与 R1 相比,R2、R3、R4 排名前 10 的 KEGG 通路富集分析结果;D、E、F 分别代表与 S1 相比,S2、S3、S4 排名前 10 的 KEGG 通路富集分析结果;Q:校正后的 P 值。

图 5 差异表达基因显著富集排名前 10 的 KEGG 通路

Fig.5 The top 10 KEGG pathways significantly enriched by differentially expressed genes

壳菌中上调表达的 DEGs 分别有 1 124 个、1 713 个、2 032 个,下调的 DEGs 分别有 869 个、1 042 个、1 005 个;与 S1 相比,S2、S3、S4 长喙壳菌中上调的 DEGs 分别有 901 个、1 625 个、1 957 个,下调 DEGs 分别为 1 017 个、976 个、1 032 个,对这些差异表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,

结果发现,GO 功能富集分析结果表明,差异表达基因主要富集于生物过程类别的生物进程、代谢进程、单一生物过程等;KEGG 通路富集的主要通路为代谢途径,这与罗勤川^[11]的研究结果较为一致,表明病原菌侵染植物过程中,破除寄主植物的防御系统、侵入寄主体内以及在寄主体内定殖增殖等环节具有



A:长喙壳菌接种至南京92薯块不同时间点差异表达基因的维恩图;B:长喙壳菌接种至徐薯18薯块不同时间点差异表达基因的维恩图;C: A与B中共有差异表达基因的维恩图。

图6 差异表达基因维恩图分析结果

Fig.6 Venn diagram analysis of differentially expressed genes (DEGs)

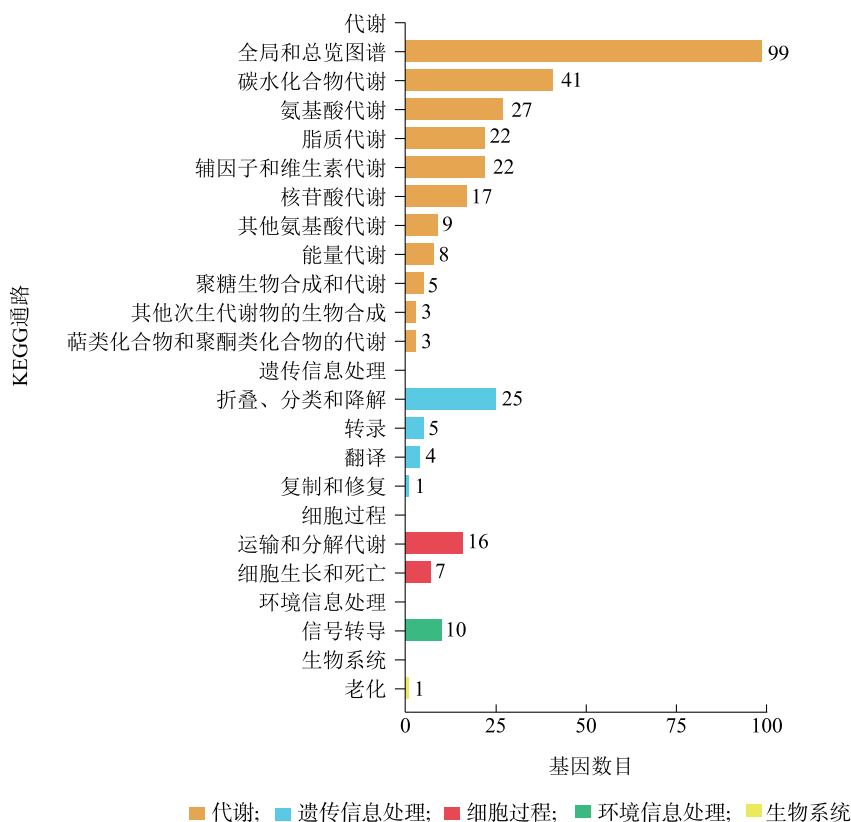


图7 925个共有差异表达基因(DEGs)的KEGG通路富集分析

Fig.7 KEGG pathway enrichment analysis of 925 common differentially expressed genes (DEGs)

相似性。

植物细胞壁是植物应对病原菌侵染的第一道屏障,病菌分泌大量细胞壁降解酶协助病原菌侵入植物组织^[21]。果胶裂解酶是细胞壁降解酶之一,具有软化和分解植物细胞壁和组织等功能^[22-23],果胶裂解酶作为毒力因子,在侵染植物的过程中发挥关键作用。许春景等^[24]采用qRT-PCR技术检测苹果树

腐烂病菌果胶裂解酶基因 *Vmpl4* 在野生菌株与寄主互作过程中的表达水平,结果表明, *Vmpl4* 基因在病菌侵染过程中呈上调表达;王嘉欣^[25]研究发现,接种胶孢炭疽菌至柰果果实后胶孢炭疽菌 *PL* 基因表达均在接种后第3 d、第5 d显著上调。本研究中, *PlyA* 基因在长喙壳菌侵染甘薯过程中持续上调表达,且接种第7 d,与接种当天相比 *PlyA* 的表达量

上调高达 40.64 倍,与前人研究结果一致。此外,姜明等^[26]研究发现,敲除大丽轮枝菌的果胶裂解酶基因 *VdPLI-4*,棉花黄萎病发病率显著下降;闫森等^[27]研究发现,分别敲除甜瓜枯萎病菌果胶裂解酶基因 *FopLb*、*FopLe*、*FopL1* 和 *FopL2*,突变体菌株 $\Delta FopLb$ 和 $\Delta FopL1$ 几乎不产生孢子,致病力明显降低;洪坤奇等^[28]研究发现,敲除苹果轮纹病菌果胶裂

解酶基因 *Bdpl1* 后,对离体苹果枝条致病力没有减弱。这些研究结果表明,不同的果胶裂解酶基因家族成员在功能上存在差异,对寄主的致病性也存在差异。本研究中长喙壳菌 *PlyA* 基因在侵染甘薯的过程中持续显著上调表达,该基因是否参与致病力调控有待进一步深入研究。

表 2 筛选出长喙壳菌关键致病基因及功能描述

Table 2 Screened key pathogenicity-associated genes in *Ceratocystis fimbriata* and their functional annotations

基因	与 R1 相比 R2 中 基因表达倍数	与 R1 相比 R3 中 基因表达倍数	与 R1 相比 R4 中 基因表达倍数	描述
<i>MSTRG.10580</i>	628.63	1 416.33	1 120.99	与转座酶相关(杧果镰孢菌)
<i>CEPL</i>	73.35	971.18	1 019.95	CF-IPO 蛋白质(纤孢长喙壳菌)
<i>CFIMG_003357RA</i>	324.93	393.22	503.76	假定蛋白 CFO_g5218(悬铃木长喙壳菌)
<i>apdF_3</i>	58.18	361.68	465.36	MFS 单羧酸转运蛋白(淡紫紫孢菌)
<i>LAC2</i>	44.08	318.99	370.58	核糖核酸酶 Z1(悬铃木长喙壳菌)
<i>arp2_1</i>	8.65	201.43	229.69	维西考林还原酶(悬铃木长喙壳菌)
<i>tal</i>	61.53	94.12	227.02	
<i>CFIMG_004371RA</i>	35.63	120.68	126.18	假定蛋白(纤孢长喙壳菌)
<i>CFIMG_006224RA</i>	22.82	81.72	122.21	ATP 酶家族 AAA 结构域
<i>CFIMG_007714RA00001</i>	17.47	73.00	117.09	假定蛋白 CFO_g5195(悬铃木长喙壳菌)
<i>CFIMG_003874RA</i>	35.92	76.16	107.89	6-磷酸葡萄糖酸磷酸酶(悬铃木长喙壳菌)
<i>CFIMG_004308RA</i>	4.53	106.67	107.29	假定蛋白 SAP10_CDS10002(阿氏丝孢酵母)
<i>gyg-1_1</i>	24.00	68.24	99.09	糖原-1(悬铃木长喙壳菌)
<i>PER</i>	39.93	69.68	80.05	木质素酶 LG5(悬铃木长喙壳菌)
<i>lox</i>	29.08	70.15	77.89	L-氨基酸氧化酶(悬铃木长喙壳菌)
<i>CFIMG_004142RA</i>	32.48	57.07	65.68	假定蛋白 CFO_g3581(悬铃木长喙壳菌)
<i>CFIMG_005032RA</i>	46.90	48.78	61.91	gpi 锚定蛋白质(淡紫紫孢菌)
<i>FET3_0</i>	12.62	51.99	56.63	铁转运多铜氧化酶 FET3
<i>gaaC</i>	30.67	49.21	54.36	二氢吡啶甲酸合成酶家族蛋白质(克拉维格罗斯曼尼亚菌 kw1407)
<i>plyA</i>	24.27	39.56	40.64	糖原-1(悬铃木长喙壳菌)

R1~R4 见表 1 注。

本研究筛选出致病关键基因共 20 个,除了上述讨论的果胶裂解酶基因之外,还涉及与转座酶相关基因、CF-IPO 蛋白基因、MFS 单羧酸转运蛋白基因、核糖核酸酶 Z1 基因、维西考林还原酶基因、ATP 酶家族基因、6-磷酸葡萄糖酸磷酸酶基因、糖原-1 基因、木质素酶 LG5 基因、L-氨基酸氧化酶基因、铁转运多铜氧化酶 FET3 基因、二氢吡啶甲酸合成酶家族蛋白质基因,这些关键基因在长喙壳菌侵染甘薯的过程中均是持续显著高表达,特别是与转座酶相

关基因和 CF-IPO 蛋白基因在接种第 7 d 上调表达超过 1 000 倍,有可能是非常关键的致病基因,后续将进一步明确其功能。

4 结论

本研究对长喙壳菌侵染的甘薯块根进行转录组测序和分析,发现长喙壳菌接种至薯块后不同时间的 DEGs,通过 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,初步明确了长喙壳菌侵染甘薯的致病分子调

控网络;同时筛选出与接种当天相比表达量高于1.00、持续上调表达并且差异表达倍数在40倍以上的关键致病基因20个。后续将进一步结合通路和基因注释,对关键致病基因进行分子克隆和功能研究,并对相应的蛋白质功能以及调控网络进行深入研究,从而明确其致病分子机制。

参考文献:

- [1] XING K, LI T J, LIU Y F, et al. Antifungal and eliciting properties of chitosan against *Ceratocystis fimbriata* in sweet potato [J]. Food Chemistry, 2018, 268: 188-195.
- [2] LIU M Y, GONG Y, SUN H J, et al. Characterization of a novel chitinase from sweet potato and its fungicidal effect against *Ceratocystis fimbriata* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(29): 7591-7600.
- [3] ZHANG M, LIU M, PAN S Y, et al. Perillaldehyde controls post-harvest black rot caused by *ceratocystis fimbriata* in sweet potatoes [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1102.
- [4] DOS SANTOS A F, FERREIRA M A, AUER C G, et al. First report of yerba mate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Brazil [J]. Plant Disease, 2018, 102(11): 2381.
- [5] 贾赵东, 谢一芝, 尹晴红, 等. 甘薯抗黑斑病种质资源的研究及育种利用[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 424-427, 432.
- [6] 张德胜, 乔奇, 白瑞英, 等. 甘薯长喙壳菌对咯菌腈的敏感基线及咯菌腈对甘薯黑斑病的防治效果[J]. 农药学报, 2022, 24(6): 1402-1408.
- [7] ARISHA M H, ABOELNASR H, AHMAD M Q, et al. Transcriptome sequencing and whole genome expression profiling of hexaploid sweetpotato under salt stress [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 197.
- [8] LAU K H, DEL ROSARIO HERRERA M, CRISOVAN E, et al. Transcriptomic analysis of sweet potato under dehydration stress identifies candidate genes for drought tolerance [J]. Plant Direct, 2018, 2(10): 00092.
- [9] JI C Y, CHUNG W H, KIM H S, et al. Transcriptome profiling of sweetpotato tuberous roots during low temperature storage [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 112: 97-108.
- [10] ONOFUA D. 甘薯响应蔓割病菌侵染的转录组分析及抗病相关基因挖掘[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [11] 罗勤川. 腐皮镰刀菌侵染甘薯转录组分析及其柠檬酸合酶基因功能初探[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023.
- [12] 梅玉琴. 甘薯根腐病抗性资源筛选及抗、感品种转录组与代谢组分析[D]. 海口: 海南大学, 2023.
- [13] BEDNAREK R, DAVID M, FUENTES S, et al. Transcriptome analysis provides insights into the responses of sweet potato to sweet potato virus disease (SPVD) [J]. Virus Research, 2021, 295: 198293.
- [14] 杨冬静, 马居奎, 唐伟, 等. 甘薯块根响应长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata*)侵染的转录组测序分析[J]. 江西农业学报, 2022, 34(7): 60-69.
- [15] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): 884-890.
- [16] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
- [17] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [18] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290-295.
- [19] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [20] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [21] KIKOT G E, HOURS R A, ALCONADA T M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review [J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 231-241.
- [22] LIN Y X, HE H, WEN Y L, et al. Comprehensive analysis of the pectate lyase gene family and the role of *FaPLI* in strawberry softening [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(17): 13217.
- [23] MARÍN-RODRÍGUEZ M C, SMITH D L, MANNING K, et al. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(6): 851-857.
- [24] 许春景, 孙迎超, 吴玉星, 等. 苹果树腐烂病菌果胶裂解酶基因 *Vmpl4* 的致病功能研究 [J]. 果树学报, 2017, 34(1): 19-25.
- [25] 王嘉欣. 多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶在胶孢炭疽菌致病中的作用及 DNA 甲基化调控机制研究 [D]. 海口: 海南大学, 2021.
- [26] 姜明, 谭明琪, 王丹, 等. 大丽轮枝菌果胶裂解酶 *PLI* 家族基因 *VdPLI-4* 的致病功能研究 [J]. 植物保护, 2023, 49(3): 19-31.
- [27] 闫森, 王豪杰, 熊韬, 等. 甜瓜枯萎病菌果胶裂解酶基因的功能分析 [J]. 植物生理学报, 2024, 60(6): 928-936.
- [28] 洪坤奇, 赵莹, 尹新明, 等. 苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 果胶裂解酶基因 *Bdpl1* 的致病功能分析 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(3): 314-325.

(责任编辑: 黄克玲)