

梨果实愈伤组织褐腐病菌感染过程cDNA-SRAP差异分析

孙朝霞, 侯思宇, 赵娟, 杨凤龙, 王玉国*

山西农业大学农学院生物技术系, 山西太谷030801

摘要: 梨果实褐腐病危害果实, 可造成果实运输和储藏过程中严重的经济损失。本研究构建了褐腐病菌感染梨果实愈伤组织离体系统, 对梨褐腐病菌感染梨果实愈伤组织不同时期进行细胞学观察分析, 基于cDNA-SRAP技术, 分析该过程中差异基因表达, 以期分离克隆与梨果实抗病反应过程相关的防卫基因。结果表明: 与未感染的梨果实愈伤组织相比, 感染12~60 h过程中梨果实褐腐病菌从表面逐渐深入到内部细胞; 30个SRAP引物组合共扩增出457条带, 其中差异回收条带数为16条, 差异比率为3.5%。最终获得5条差异基因表达条带。核酸序列同源性分析表明, 其中1条差异基因片段未搜索到任何同源蛋白, 2条差异基因片段经序列比对, 序列相似度一致, 与苹果属的肉桂醇乙酰脱氢酶(CAD)同源性为96%; 其他2条差异基因片段分别与DNA结合蛋白(DBP)和寡肽转运蛋白(OPT)基因序列同源, 其同源性为85%和78%, 因此暂将这3个基因命名为*PbCAD*、*PbDBP*和*PbOPT*。荧光定量PCR结果表明, *PbCAD*基因在褐腐病菌感染梨果实愈伤组织12和24 h时相对表达量最高, 为对照的2.94和2.66倍; *PbOPT*基因在褐腐病菌感染梨果实愈伤组织12~36 h时相对表达量明显升高, 为对照的2.17~2.46倍, 而其他时期表达量均与对照接近; *PbDBP*基因表达量在整个感染时期均与对照接近。因此我们推测*PbCAD*和*PbOPT*基因可能为梨褐腐病菌感染梨果实愈伤组织响应的相关防卫基因。

关键词: 梨; 愈伤组织; 褐腐病菌; cDNA-SRAP

Analysis of Differential Gene Expression Induced in Pear Fruit Callus by *Monilinia fructicola* Infection Using cDNA-SRAP

SUN Zhao-Xia, HOU Si-Yu, ZHAO Juan, YANG Feng-Long, WANG Yu-Guo*

Department of Biotechnology, School of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: *Monilinia fructicola* causes serious loss in pear fruit during transportation and storage. In order to clone defence-related genes during infection process, *in vitro* systems based on pear fruit callus infected by *M. fructicola* were constructed and gene expression levels were characterized by cDNA-SRAP (cDNA sequence-related amplified polymorphism) at different time point (control, 12, 24, 36, 48 and 60 h). We observed that 457 fragments were amplified from 30 SRAP primer groups, out of which 16 fragments (3.5% of the total) were differentially expressed in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) detection. Those 16 fragments were re-amplified for strip recovery by agarose gel electrophoresis. Only five were successfully recovered and subsequently sequenced. Sequence homology analysis of those fragments by Blastn showed that: one had no homology to any known sequences in the NCBI data base; two of them are of identical sequence; the three different sequences were of high similarity to cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), DNA binding-protein (DBP) and oligopeptide transporter protein (OPT), with the identity being about 96%, 85% and 78%, respectively. They were hence named as *PbDBP*, *PbOPT* and *PbCAT*. Differential expression patterns of *PbDBP*, *PbOPT* and *PbCAT* were observed at different time points (0–60 h) using qRT-PCR. *PbCAD* expression levels in callus co-cultured with *M. fructicola* for 12 and 24 hours were 2.94- and 2.66-fold higher than the control, respectively. The higher expression levels of *PbOPT* gene was observed after co-cultured with *M. fructicola* for 12–36 h, they were 2.46-, 2.17-, and 2.34-fold higher than the control, respectively. However, there were no significant higher expression levels detected for *PbDBP* at all infected period. These results suggested that *PbCAD* and *PbOPT* could be defence-related genes during the process of brown rot infection in pear fruit callus.

Key words: *Pvres bretschnederi*; callus; *Monilinia fructicola*; cDNA-SRAP

褐腐病致病菌 *Monilinia fructicola* 可寄生在桃、杏、李、樱桃、梨等核果类果树上, 可造成果实腐烂, 也可直接从柱头、蜜腺侵入花器造成花腐, 再蔓延到果柄和枝梢, 除在果园发生外, 在运输、贮藏期间也易发生, 果实自幼果期至成熟

收稿 2011-08-09 修定 2011-12-28

资助 山西省青年科技基金(2011021032-1)、山西农业大学引进人才基金(XB2009017)和山西省教育厅高新技术转化项目(410130)。

* 通讯作者(E-mail: tgwygn@126.com; Tel: 0354-6288692)。

期均可受害,越接近成熟期受害越重,从而造成严重的经济损失(Xu等2001)。目前国内外学者根据果树褐腐病害发生规律,利用栽培管理、化学(杀菌剂)、物理(控制温度和湿度)和生物防治方法等手段有效的减少了开花期和果实成熟病害的发生(van Leeuwen等2000)。国内外研究主要集中在褐腐病菌侵染果实的发病机理以及防治措施,但梨果实如何响应褐腐病菌侵染以及侵染过程中相互作用的分子机制尚未见报道。经典的激发子-受体模型是按照基因对基因学说,从生物化学角度来解释植物病害中寄主抗病基因和病原物无毒基因的互作。在此模型中,病原物无毒基因编码的特殊信号分子(激发子)和寄主抗病基因编码的受体相识别,从而导致植物对病原物的侵入做出一定的防御反应(王金生1999)。近几年,基于转座子标签和图位克隆技术应用,使此领域已有突破性的进展。从番茄和叶霉菌互作模型研究中,分离到4个叶霉菌无毒基因和7个具有功能的番茄抗叶霉菌基因(王长春等2006)。水稻和稻瘟病菌互作模型研究中,有关信号传导途径和相关防御反应基因的诱导表达研究较多(乐关旺等2007)。利用功能基因组学手段,不少研究者还对小麦对赤霉病的抗性机制及相关抗性基因的分离开展了研究。在非亲和互作中,过敏反应(hypersensitive response, HR)是植物抵抗病菌侵染的一种反应机制,侵染部位伴随着大范围的防卫相关基因的转录激活及细胞壁的加强(Kong等2005)。本文首次构建褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织离体系统,基于cDNA-SRAP (cDNA sequence-related amplified polymorphism, SRAP)技术分析其侵染过程中差异表达基因,以期进一步揭示梨果实褐腐病菌侵染过程中植物对致病真菌防御作用的分子机制。

材料与amp;方法

1 材料

梨果实褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)菌种由山西农业大学植物病理实验室分离纯化。选取白梨(*Pvres bretschneideri* Rehd.)品种‘晋蜜’果实作为组织培养的材料。梨果实愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 4 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹,培养条件为光照30 μmol·m⁻²·s⁻¹,温度为26 °C,光暗周期为16/8 h。

将褐腐病菌菌种接种于培养20 d后的梨果实愈伤组织上表面,每个三角瓶中接种15个愈伤组织,分别观察梨果实愈伤组织接种褐腐病菌12、24、36、48和60 h后形态变化,并在每个时期混合取材15份,液氮速冻后放置-70 °C冰箱备用。

2 方法

2.1 石蜡切片制作及染色

将各个时期褐腐病菌侵染的愈伤组织放置在FAA固定液中充分固定,采用快速石蜡切片方法(贺运春2002),经过脱水、浸蜡和包埋,切片机切成8 μm薄片,二甲苯脱蜡,番红-固绿对染,树脂封片,数码显微镜(Olympus BX46)视野放大600倍,拍照保存。

2.2 总RNA提取及反转录cDNA

提取每个时期15份混合材料的总RNA,1.4%琼脂糖电泳检测总RNA提取质量,Nanodrop 2000核酸定量仪分析总RNA浓度和纯度,取0.5 μg总RNA反转录为cDNA。植物总RNA提取试剂盒购于天泽基因公司,反转录试剂盒购于TaKaRa公司,SRAP引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2.3 cDNA-SRAP扩增反应及聚丙烯酰胺凝胶电泳分析谱带

实验中使用的SRAP引物序列见表1,5个正向引物和6个反向引物配对共计30个引物组合,引物组合编号按照上下游引物的编号表示,如:引物组合me1em1表示上游引物me1和下游引物em1进行配对扩增,依次类推。30个引物组合分别对CK(未处理)、侵染12、24、36、48和60 h共6个时期进行cDNA-SRAP扩增。PCR扩增反应体系包括2 μL 10×PCR缓冲液、1.6 μL dNTPs、正向引物和反向引物各1 μL、0.5 μL Taq 酶(2.5 U·μL⁻¹)、1 μL cDNA模板,补水至总体积20 μL。其扩增程序为:94 °C预变性5 min;40次循环94 °C变性30 s,50 °C退火30 s,72 °C延伸1 min;72 °C延伸5 min。聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测PCR扩增产物,用银染法显色,凝胶成像仪扫描统计差异特征谱带。

2.4 差异条带回收、再扩增及再回收测序分析

回收PAGE胶上的DNA片段,用相应的引物、反应体系和程序进行再次PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。其扩增产物经胶回收(少量)试剂盒回收,pMD18-T连接,挑取连接目的

表1 实验中使用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称	引物序列(5'-3')	引物名称	引物序列(5'-3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Pbactin2F	GGGTCAACTATGTTCCCTGGT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Pbactin2R	CCCTCCAATCCAGACACTGTA
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	PbOPT1F	TGTGCCAGACAAAACAAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	PbOPT1R	TTGACTGCGTACGAATTTGC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	PbDBP1F	AGGCCTAATCAGCCGTACAA
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	PbDBP1R	ATGGGGAGTGTGCTTATTG
em2	GACTGCGTACGAATTTGC	PbCAD1F	TCGTCTGCACACTTCTCTGG
em3	GACTGCGTACGAATTGAC	PbCAD1R	AAGGGAGCTCGAACATTTC
em4	GACTGCGTACGAATTTGA	Pbactin2F	GGGTCAACTATGTTCCCTGGT
em5	GACTGCGTACGAATTAAC	Pbactin2R	CCCTCCAATCCAGACACTGTA
em6	GACTGCGTACGAATTGCA		

DNA片段的阳性克隆,北京英骏公司测序。Blastn工具分析测序片段的核酸序列同源性,并提交NCBI网站GenBank数据库。胶回收(少量)试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司, pMD18-T载体购于TaKaRa公司。

2.5 基因荧光定量PCR分析

根据测序结果,分别设计已提交的基因特异引物和鸭梨(*Pyrus × bretschneideri*)的*Pbactin*基因(GenBank登录号为GU830958)引物(表1),以梨果实褐腐病菌侵染愈伤组织各个时期的cDNA模板进行PCR扩增,每个样品设置3个重复。实时荧光定量PCR扩增反应体系包含cDNA模板1 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各1 μL 、2×Ultra SYBR Mixture 12.5 μL ,补足纯水至25 μL 。实时荧光定量扩增反应程序为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min; 40次循环94 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸32 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。SYBR Green I染料购买于北京康为世纪生物科技有限公司,实时荧光定量PCR仪选用Stratagene公司的Mx-3000P。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法(侯思宇等2009)处理各个基因在各个侵染时期的愈伤组织之间相对表达的 C_t 值。

实验结果

1 梨果实褐腐病菌侵染过程不同时期愈伤组织形态及细胞学观察

整个梨果实褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织的过程中,不同时期受侵染的愈伤组织形态及细胞变化存在明显差异。接种12 h时(图1-B),与对照相比(图1-A)在接种的愈伤组织上表面发生局部白色

的腐烂组织;接种24 h(图1-C),与前者相比病菌由愈伤组织上表面向两侧扩散;接种36 h(图1-D),病菌侵染愈伤组织上表面已腐烂并向下部扩散;接种48 h(图1-E),与前者相比愈伤组织大部分腐烂萎缩;而接种60 h(图1-F)后,愈伤组织形态呈现出整个外部腐烂萎缩。石蜡切片经过番红-固绿对染后,愈伤组织细胞被染成绿色,而褐腐病菌孢子体被染成红色。细胞学观察表明:接种12 h后(图1-H),与对照相比(图1-G)褐腐病菌孢子分布在外周细胞的边缘;24 h时(图1-I),褐腐病菌孢子侵染的愈伤组织外周细胞出现消解现象;36 h时(图1-J),褐腐病菌孢子已布满了外周及内部愈伤组织细胞,愈伤组织外周及内部细胞逐渐消解;48 h时(图1-K),褐腐病菌分生孢子侵入愈伤组织内部,细胞发生大量消解;直至60 h(图1-L),子囊孢子不断分裂形成分生孢子堆,所侵染的愈伤组织已看不到完整外周及内部细胞形态。根据以上结果分析,褐腐病菌持续侵染梨果实愈伤组织的过程中,是从表面局部逐渐渗透到内部,持续侵染直至60 h时,受侵染的愈伤组织逐渐腐烂萎缩,外周细胞及内部细胞逐渐受褐腐病菌侵染而发生消解。

2 梨果实褐腐病菌侵染过程不同时期cDNA-SRAP扩增结果分析

30对引物组合分别对梨果实褐腐病菌未侵染和侵染不同时期(CK、12、24、36、48和60 h)的cDNA进行SRAP-PCR分析。图2为部分电泳结果,图中箭头所示条带为扩增的差异cDNA条带,4条差异cDNA条带扩增产物大小分别为230 bp、380 bp、500 bp和210 bp左右,均在侵染初期12 h检测

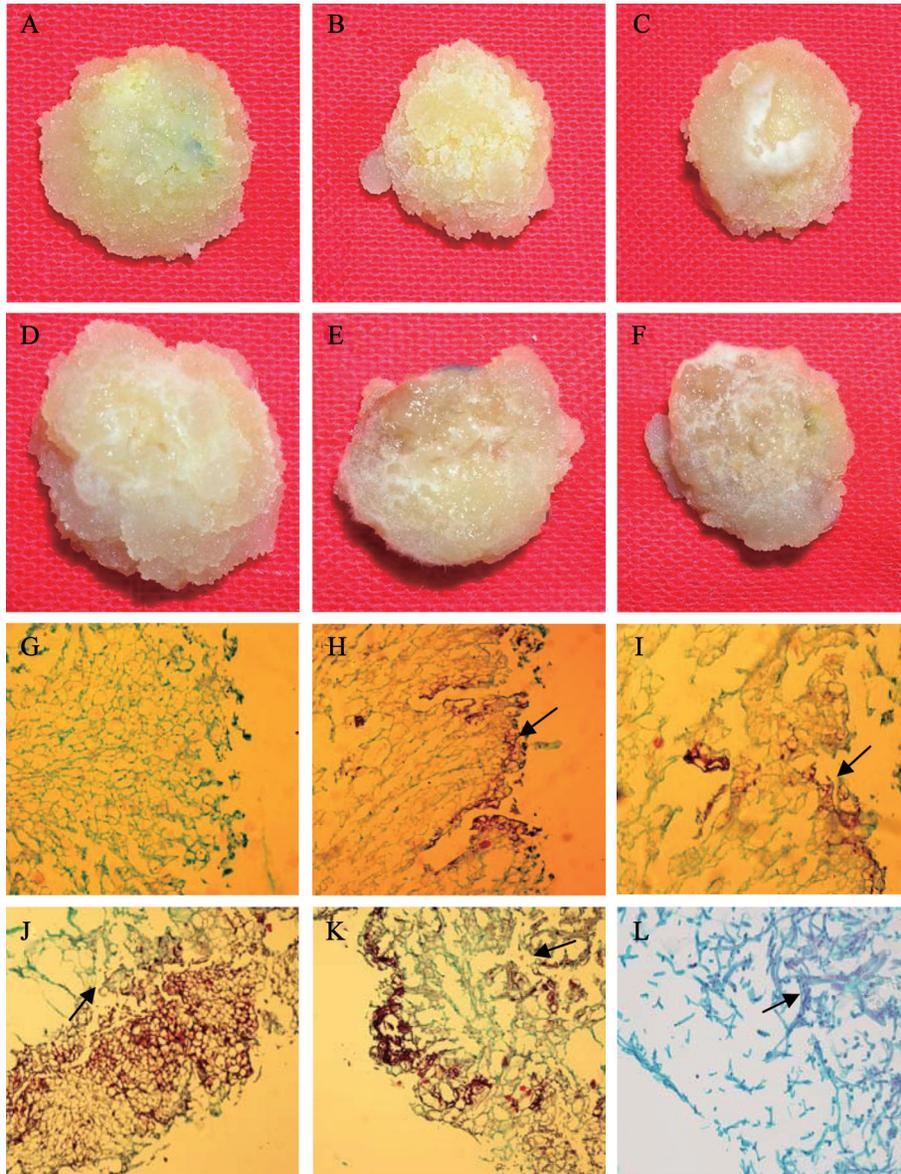


图1 梨果实褐腐病菌不同时期感染愈伤组织形态及细胞学观察

Fig.1 The shapes and the cytology observation of pear fruit callus infected by brown rot at different periods

A: 未处理愈伤组织; B~F: 褐腐病菌感染愈伤组织12~60 h; G: 未处理愈伤组织细胞切片; H~L: 褐腐病菌感染愈伤组织细胞切片; 箭头所指表示梨果实褐腐病菌感染部位。

到高表达, 而其他时期未检测到表达或低表达。根据电泳图谱进行差异条带统计分析, 结果显示: 总扩增条带数为457条, 其中16条为差异回收条带, 其片段大小范围在200~700 bp, 差异比率为3.5%, 均集中在12和24 h表达。再扩增后经琼脂糖凝胶电泳回收, 仅获得5条稳定重复回收的差异条带。这5条差异条带分别为me5em4扩增得到的200 bp, me5em3扩增得到的500 bp, me5em2扩增得到的200 bp, me4em2扩增得到的500 bp和me4em6扩增得到的300 bp条带。

3 差异片段序列同源性及荧光定量PCR分析

表2所示, 序列同源性分析表明: 所获5个差异基因片段中, 其中有1个基因片段未搜索到任何相似同源基因。由引物组合me5em4和me4em2扩增的2条差异基因序列, 片段大小分别为207和578 bp, 两序列比对核酸相似度为100%, 与苹果属肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)基因(登录号为AF053084.1)的核酸序列相似度均为96%, 暂将该基因命名为*PbCAD*, 长度为578 bp的序列已

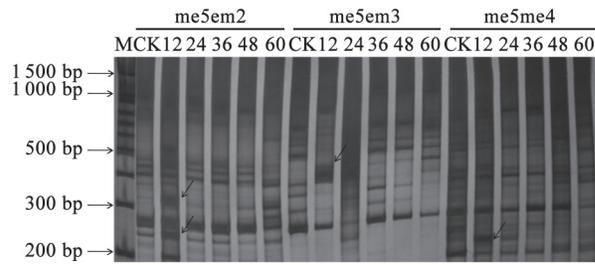


图2 梨果实褐腐病菌侵染不同时期cDNA-SRAP扩增结果
Fig.2 cDNA-SRAP amplification results of pear fruit callus infected by brown rot at different periods

M: DNA分子量标准; CK: 未处理愈伤组织cDNA-SRAP扩增; 12~60: 褐腐病菌侵染愈伤组织各个时期cDNA-SRAP扩增(单位: h); 箭头表示所扩增出得差异cDNA片段。

提交GenBank, 登录号为HQ239363。由引物组合me5em2扩增的差异基因序列, 片段大小为534 bp, 与蓖麻的DNA结合蛋白(DNA binding-protein, DBP)基因(登录号为XM_002516154)的核酸序列相似为85%, 暂将该基因命名为*PbDBP*, 于GenBank提交该基因序列, 登录号为HQ239362。由引物组合me5em2所扩增的差异基因序列, 片段大小为227 bp, 与毛果杨寡肽转运蛋白家族(oligopeptide transporter protein, OPT)基因(登录号为XM_002318436)核酸序列相似度为78%, 因此该基因暂命名为*PbOPT*, 于GenBank提交该基因序列, 登录号为HM587133。所获基因序列已于2011年10月1日公开释放。

表2 差异cDNA片段序列同源性分析

Table 2 Sequence identity analysis of difference cDNA fragments

引物组合	扩增片段/bp	推测基因名称	基因登录号	序列同源性基因和物种	序列相似度
me5em3	534	<i>PbDBP</i>	HQ239362	XM_002516154 [蓖麻(<i>Ricinus communis</i>)]	85%
me5em2	227	<i>PbOPT</i>	HM587133	XM_002318436 [毛果杨(<i>Populus trichocarpa</i>)]	78%
me4em2	578	<i>PbCAD</i>	HQ239363	AF053084.1 [苹果 (<i>Malus domestica</i>)]	96%
me5em4	207	<i>PbCAD</i>	HQ239363	AF053084.1 [苹果 (<i>Malus domestica</i>)]	96%
me4em6	262	No	No	Unkown	Unkown

对于*PbDBP* (图3-A), 褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织12~60 h, 基因相对表达量没有明显提高, 仅在侵染24 h及36 h, 相对表达量为对照(未侵染)组织的1.14和1.11倍, 侵染前期(12 h)及后期(48~60 h)该基因表达量均与对照接近。对于*PbOPT* (图3-B), 侵染12~36 h该基因相对表达量明显提高, 分别为对照的2.46、2.17和2.34倍, 当侵染时间延长到48~60 h时, 基因相对表达量下降, 为对照的0.96和0.81倍。对于*PbCAD* (图3-C), 侵染12~24 h该基因相对表达量表现出明显的上升趋势, 达到对照的2.94和2.66倍, 均高于相同侵染时期其他2个基因的相对表达量; 随着侵染时间的延长, *PbCAD*相对表达量迅速下降, 到达60 h基因相对表达量达到最低, 仅为对照的0.51倍。

讨 论

离体组织培养体系可以作为深入理解宿主和致病菌之间相互作用的有效研究体系(Ramesh 1968)。离体愈伤组织体系可以提供一个易受控环境, 使全天候任何时间研究某单一因素成为可能,

便于操作宿主和致病菌。研究者可利用愈伤组织与致病菌共培养快速筛选抗性宿主基因型或分离入侵的致病菌种(Diez和Gil 1998)。迄今为止, 基于愈伤组织和悬浮细胞培养构建的离体系统, 已经成功的应用于棉花黄萎病、烟草霜霉病、荷兰榆树病、杨树病等植物与致病菌之间相互作用的病理学、细胞学和生理生化的各项研究(Aoun等2009; Heist等2001; Wulff等2009)。而基于褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织体系进行宿主和致病菌互作的差异基因分析目前尚无报道。本文首次构建了梨果实褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织的离体共培养体系, 并通过细胞学研究揭示了梨果实褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织不同时期的细胞形态变化。为进一步通过分子生物学手段研究致病真菌与植物组织互作的机理奠定基础。

相关序列扩增多态性(SRAP)是一种新型的基于PCR的标记系统, 又称基于序列扩增多态性(sequence-based amplified polymorphism, SBAP)。该标记通过独特的双引物设计对基因的开放读码框(ORFs (open reading frames)的特定区域进行扩增,

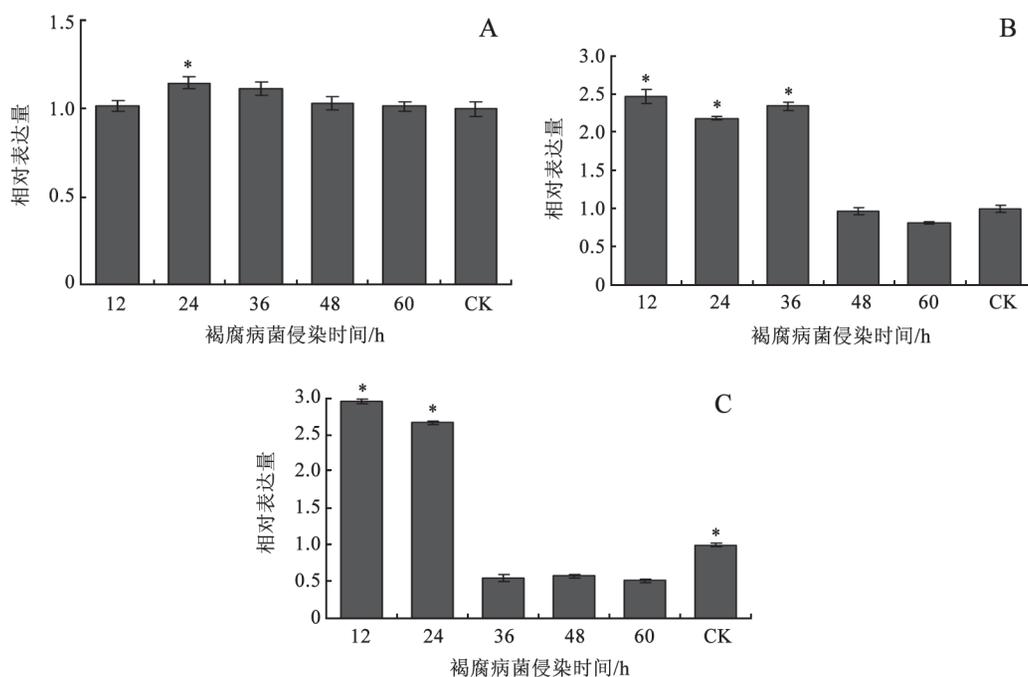


图3 荧光定量PCR检测差异基因相对表达量

Fig.3 Relative expression levels of *PbDBP* (A), *PbOPT* (B) and *PbCAD* (C) at different periods by brown rot using quantitative real-time PCR*表示 $P < 0.05$ 水平有显著差异。

以揭示基因序列的多态性,反应模板可以是基因组DNA,也可以是cDNA。cDNA-SRAP相比其他分离克隆表达差异基因的方法,具有操作简单、稳定重复性好、实验成本更低、能产生较丰富的条带和同时检测多个样本之间的表达差异等优点,并且能够检测到某些低水平表达的基因,相较于cDNA文库中得到的ESTs标签,cDNA-SRAP方法能更均一的检测到表达的基因(郭彩杰等2011)。

在植物抗病反应中,防卫基因产物是真正参与抵抗病原物侵染的因素。对防卫反应相关的基因的分离及表达调控方面已有很多报道(蓝海燕和陈正华2000)。主要包括以下几类:与植保素合成有关的基因,如苯丙氨酸裂解酶(PAL)、查尔酮合成酶(CHS)、脂氧合酶(LOX)等基因;与病程相关(pathogenesis-related, PR)基因,如:几丁酶(chitinase, CHI)、D-1,3-葡聚糖酶(glucanase, Glu)、 β -淀粉酶、溶菌酶等基因;与结构抗性有关的基因。如:富含羟脯氨酸糖蛋白(histadine-rich glycoprotein, HRGP)基因、木质素合成有关酶的基因;还有核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating pro-

teins, RIP)基因等。本研究中基于cDNA-SRAP分析梨褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织的5个时期中,3个差异基因出现在褐腐病菌侵染12和24 h。相对于其他时间点,在12和24 h时这些基因出现高表达,24 h后这些基因低表达或未检测到表达。实时荧光定量PCR结果进一步表明:除*PbDBP*基因,*PbCAD*和*PbOPT*基因在侵染初期(12~24 h)相对表达量明显升高,侵染后期48~60 h时,相对表达量接近于对照或明显低于对照。我们初步推测在褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织过程初期(12~24 h),梨果实相关防卫基因的表达可能已经激活响应。而直到褐腐病菌逐渐完全侵染植物组织(48~60 h),致病菌逐渐抑制了梨果实愈伤组织自身激活的防卫基因表达。

本研究所获得的3个差异基因,其中*PbCAD*基因,在其他物种中已有研究报道参与了植物木质素的合成,为苯丙烷类合成途径上的关键基因,在受到致病菌入侵或激发子激活时将强烈的激活该类基因的表达。已侵染的植物中苯丙烷类化合物加强部分细胞壁来限制致病菌的入侵(Maurice等

2010)。最近的研究表明,木质素生物合成途径可能在小麦白粉病入侵防御中起到关键的作用(Bhuiyan等2009)。而*PbOPT*基因,基于序列同源性和基因功能分为三大类,其中一类为最近报道的寡肽转运家族(oligopeptide transporter family, OPT),Gross (1991)的实验结果暗示植物多肽转运系统可能负责识别和转运多肽植物毒素进入植物细胞内。已有研究报道寡肽转运家族配合物可能涉及到调节激素活性、响应植物生长、发育和同时促进激素转运;所有的寡肽转运家族(植物和真菌)蛋白是具有12~14个跨膜结构域的内膜蛋白,暗示这些寡肽可能调节重要调节分子的转运(如:植物激素多肽配合物)(Koh等2002)。由于*PbOPT*基因在褐腐病菌侵染梨果实愈伤组织初期(12~24 h)高表达,我们推测该基因可能参与了调节植物组织自身防御相关信号分子,从而激活相关防御基因的表达。而*PbDBP*基因主要为转录因子一类的大家族,尽管cDNA-SRAP差异基因分析表明该基因前期出现表达,但实时荧光定量PCR结果表明该基因并没有像*PbCAD*和*PbOPT*基因的表达有明显差异,整个侵染过程基因相对表达量较低。综上所述,我们推测*PbCAD*和*PbOPT*基因在梨果实愈伤组织防御病原菌致病过程中时空响应了致病菌侵染的复杂过程。同时我们将进一步获得这些基因片段全长序列,并通过基因工程手段,增强或沉默这些基因的表达,以期为进一步探索梨果实愈伤组织褐腐病菌侵染的互作机理奠定基础。

参考文献

- 郭彩杰,侯丽霞,崔娜,韩明利(2011). 番茄耐低温相关基因的SRAP标记筛选. 植物生理学报, 47 (1): 102~106
- 贺运春(2002). 植物病害制片技术. 北京: 中国农业出版社, 54~66
- 侯思宇,张锐,郭三堆(2009). 棉花育性相关基因*GhPG2*的克隆与表达分析. 作物学报, 35 (11): 2008~2014
- 蓝海燕,陈正华(2000). 植物与病原真菌互作的分子生物学及其研究进展. 生物工程进展, 20 (4): 16~22
- 乐关旺,陈实,潘庆华,曾任森,刘迎湖,骆世明(2007). 水稻和稻瘟病菌互作中的信号传导及防御反应基因诱导表达的研究. 植物病理学报, 37 (1): 42~49
- 王长春,蔡新忠,徐幼平(2006). 番茄与叶霉菌互作的分子机理. 植物病理学报, 36 (5): 385~391
- 王金生(1999). 分子植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 27~29
- Aoun M, Rioux D, Simard M, Bernier L (2009). Fungal colonization and host defense reactions in *Ulmus americana* callus cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*. Phytopathol, 99: 642~650
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei YD, King J (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. J Exp Bot, 60 (2): 509~521
- Diez J, Gil L (1998). Effects of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on elm cultures from genotypes with different susceptibility to Dutch elm disease. Eur J For Pathol, 28: 399~407
- Gross DC (1991) Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Annu Rev Phytopathol, 29: 247~278
- Heist EP, Nesmith WC, Schardl CL (2001). Cocultures of *Peronospora tabacina* and *Nicotiana* species to study host-pathogen interactions. Phytopathol, 91: 1224~1230
- Koh S, Wiles AM, Sharp JS, Naider FR, Becker JM, Stacey G (2002). An oligopeptide transporter gene family in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 128: 21~29
- Kong LR, Anderson JM, Ohm HW (2005). Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. Genome, 48: 29~40
- Maurice T, Tronchet A, Balagué 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*. Mol Plant Pathol, 11 (1): 83~92
- Ramesh M (1968). Applications of plant tissue and cell culture in the study of physiology of parasitism. Plant Sci, 69 (3): 152~172
- van Leeuwen GCM, Stein A, Holb I, Jeger MG (2000). Yield loss in apple caused by *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, and spatio-temporal dynamics of disease development. Eur J Plant Pathol, 106 (6): 519~528
- Wulff BB, Chakrabarti A, Jones DA (2009). Recognition specificity and evolution in the tomato-cladosporium fulvum pathosystem. Mol Plant Microbe In, 22 (10): 1191~1202
- Xu XM, Robinson JD, Berrie AM, Harris DC (2001). Spatio-temporal dynamics of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple and pear. Plant Pathol, 50: 569~578