

广佛手响应柑橘锈螨为害的转录组分析^{*}雷梦英¹ 张 智² 刘 超¹ 林培华²
冼国雄² 李落叶¹ 郭健玲¹ 胡益波^{2,3}(1. 广东生态工程职业学院林业工程学院, 广东 广州 510520; 2. 德庆县农业技术推广中心, 广东 肇庆 526699;
3. 德庆县柑桔研究所, 广东 肇庆 526699)

摘要 为探究广佛手 *Citrus medica* 'Fingered' 响应柑橘锈螨 *Phyllocoptruta oleivora* 为害的分子机制, 研究采用 Illumina 测序技术对柑橘锈螨为害的广佛手果皮进行了转录组测序和分析。试验共获得 1 005 个差异表达基因, 其中 271 个基因表达上调, 734 个基因表达下调。GO 功能富集和 KEGG 代谢通路分析发现, 差异表达基因显著富集在代谢途径、次生代谢产物的生物合成、植物-病原体相互作用等通路。其中, 植物-病原体互作通路中有 42 个基因的表达显著变化, 大部分生长素早期响应蛋白基因和生长素响应因子被不同程度激活。81 个转录因子在柑橘锈螨为害后差异表达, 下调基因多于上调基因。利用实时荧光定量 PCR 验证了随机挑选的差异基因在柑橘锈螨为害的广佛手和正常广佛手果实的外果皮中的相对表达量, 与转录组测序结果的变化趋势一致。

关键词 广佛手; 柑橘锈螨; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S763.46 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2025) 02-0001-09

DOI: 10.20221/j.cnki.2096-2053.202502001

Transcriptome Analysis of *Citrus medica* 'Fingered' Response to
Phyllocoptruta oleivora InfestationLEI Mengying¹ ZHANG Zhi² LIU Chao¹ LIN Peihua²
XIAN Guoxiong² LI Luoye¹ GUO Jianling¹ HU Yibo^{2,3}(1. School of Ecological Engineering, Guangdong Eco-Engineering Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510520, China;
2. Deqing Agricultural Technology Extension Center, Zhaoqing, Guangdong 526699, China;
3. Deqing Citrus Research Institute, Zhaoqing, Guangdong 526699, China)

Abstract To explore the molecular response mechanism of *Citrus medica* 'Fingered' to *Phyllocoptruta oleivora* infestation, the *C. medica* 'Fingered' pericarps, inoculated either with or without *P. oleivora*, were collected for transcriptional sequencing and analysis based on Illumina sequencing platform. In total, the infection by *P. oleivora* caused the 1 005 differentially expressed genes (DEGs) in *C. medica* 'Fingered' fruits, including 271 up-regulated DEGs and 734 down-regulated DEGs. The analyses of GO functional enrichment and KEGG metabolic pathways revealed that these DEGs were significantly enriched in the pathways of metabolism, secondary metabolites biosynthesis, plant-pathogen interaction, among others. Of these, the expression of 42 genes in the plant-pathogen interaction pathway was significantly altered, most genes of early auxin response proteins and

^{*} 基金项目: 广州市科技计划项目 (2024E04J1247), 广东省普通高校创新团队项目 (2022KCXTD050)。

第一作者: 雷梦英 (1988—), 女, 讲师, 主要从事柑橘病害防治技术等研究工作。E-mail: 794803074@qq.com

通信作者: 胡益波 (1986—), 男, 高级农艺师, 主要从事柑橘栽培技术研究及示范工作。E-mail: 413051724@qq.com

auxin response factors were up-regulated at different degrees. Furthermore, a total of 81 transcription factors (TFs) were differentially expressed with significance, tending more towards being down-regulated. The relative expression levels of randomly selected differentially expressed genes in the exocarp of *C. medica* 'Fingered' fruits infested by *P. oleivora* and normal fruits were validated using real-time quantitative PCR, which were consistent with the trends observed in the transcriptome sequencing results.

Key words *Citrus medica* 'Fingered'; *Phyllocoptruta oleivora*; transcriptional sequencing; differentially expressed genes

广佛手 *Citrus medica* 'Fingered' 是重要的药食同源植物, 具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰等功效, 用于肝胃气滞、胸胁胀痛、胃脘痞满、食少呕吐、咳嗽痰多等症^[1]。除了药用价值外, 广佛手被广泛应用于食品、化妆品、保健品等领域, 产业发展前景广阔^[2-3]。广佛手在广东各地均有栽种, 全省种植面积 2 000 hm², 产量逾 60 000 t^[4-5]。近年来, 随着国家加大对中药材生产及产业发展的政策支持和资金投入, 各地再度掀起了扩种热潮, 广佛手种植面积和价格呈上升趋势。

柑橘锈螨 *Phyllocoptruta oleivora*, 又称柑橘皱叶刺瘿螨、柑橘锈壁虱、柑橘锈瘿螨、柑橘锈蜘蛛等, 隶属于蜱螨亚纲瘿螨科, 是柑橘属的主要虫害之一^[6]。柑橘锈螨主要危害柑橘嫩芽、叶片和果皮等部位, 通过自身口器吸食柑橘组织器官的营养物质^[7-8]。柑橘果实受到柑橘锈螨危害后, 果皮表面细胞受损破裂, 溢出的油脂进而被空气氧化, 最终导致果实木质素含量升高, 果实表面光洁度下降, 果实变小、变轻, 可溶性固形物含量显著减少, 严重影响柑橘果实的外观品质和内在品质, 降低果实的商品价值。柑橘锈螨为害严重时可引起柑橘大幅度减产, 严重时减产可达 70%^[9]。

近年来, 研究人员利用分子生物学技术对植物抗病、抗虫分子机制进行了解析, 鉴定出许多参与抗病、抗虫的基因^[10-11]。其中, 高通量测序技术有助于揭示植物响应病虫害过程中转录水平上的复杂变化, 挖掘未知功能的抗病、抗虫基因, 并通过基因工程技术改造其表达特性以提高植物的抗病性, 从而为植物抗病、抗虫新品种的培育提供了一条崭新而有效的途径^[12-13]。本研究以柑橘锈螨为害的广佛手为研究对象, 通过转录组学分析挖掘差异表达基因, 并对差异基因富集的生物学过程和信号转导途径进行初步研究。研究结果可为探究广佛手响应柑橘锈螨为害涉及的关键基因提供理论支持及参考, 同时也为抗病品种的培育提供思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以种植于肇庆市德庆县农业技术推广中心柑橘种质资源圃的广佛手为材料, 于晴天上午 (10:00 时) 选取柑橘锈螨为害的广佛手和正常广佛手果实的外果皮 (对照)。每个样品设置 3 个生物学重复, 每个重复取 5 个果实, 液氮速冻后于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.2 转录组测序

使用上海生工 Trizol 植物总 RNA 提取试剂盒分别提取各样品的总 RNA, 利用 Nanodrop2000 超微量分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 对 RNA 的浓度和纯度进行检测, 确保 RNA 质量符合测序要求。文库构建和测序工作委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 测序所用平台为 HiSeq 2500 (Illumina, 美国)。测序方式为双末端法, 测序长度为 150 bp。测序结果已上传国家基因库生命大数据平台, 索引号为 CNP0006447。

1.3 差异表达基因的功能注释与富集分析

使用 Fastp 对原始测序数据进行评估, 对低质量数据进行过滤, 获得高质量 Clean reads^[14]。以枸橼 *C. medica* 基因组数据 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_002013955.2/) 为参考基因组, 使用 Hisat2 进行基因比对注释^[15]。利用 RSEM (RNA-seq by expectation-maximization) 程序计算出每个转录本在各个样品中的表达量 FPKM (Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值^[16]。以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 FDR (False discovery rate) < 0.05 作为阈值, 利用 DESeq2 进行样品间基因差异表达分析^[17]。使用 Blast2GO 程序和 KOBAS 软件对差异表达基因分别进行 GO (Gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 代谢通路富集分析^[18-19]。2 种富集分析均基于 Fisher 精确检验

评估显著性，并通过 Benjamini-Hochberg 方法对多重检验进行校正，以校正后的 P 值 <0.05 判定为显著富集。

1.4 荧光定量 PCR 验证分析

选取 5 个差异表达基因进行荧光定量 PCR 分析，验证转录组测序分析结果的可靠性。试验材料和取样方法与 1.1 和 1.2 章节相同，按照翌圣生物 1st strand cDNA synthesis 试剂盒方法合成 cDNA。利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物（表 1）。以 Actin 为内参基因，利用 Roche Light-Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪（Roche，新西兰）按照翌圣生物 qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒的方法进行荧光定量 PCR。每个样品 3 次重复，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算差异基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据统计

采用 Illumina HiSeq 平台对柑橘锈螨为害的广佛手果实进行高通量测序，去除低质量碱基和接头序列后，共获得 63.75 Gb Clean data。其中，正常广佛手果皮样品分别获得 40 100 802、42 981 518 和 40 763 726 条 Clean reads，柑橘锈螨为害的广佛手果皮样品获得的 Clean reads 分别是 48 151 702、43 489 382 和 43 961 254 条，各样品 GC 含量约为 44%。Q20、Q30 分别达到 97%和 93%以上，碱基

表 1 用于荧光定量 PCR 验证分析的基因及引物序列

Table 1 Genes and primers for qRT-PCR	
基因 ID	引物序列 (5'-3')
Cm038200	F: CTCCTTCCGAATTGCCTCTTC
	R: GCCCTCTTTGTCTTCCTCCT
Cm082210	F: GACCTTACTACCACCACCTTGA
	R: CTTGTTGCCCATACCATACTG
Cm165270	F: TGGTAATGGAGTTGTGTTCAGG
	R: AGTTCTCAGGCTTCAAGTCTCT
Cm179350	F: TCTTGGACAGGTCAGGCATT
	R: CACGCTACGCACAATATCAAC
Cm238120	F: GGAGGCTGCGGTACATAGTG
	R: GCGACAACGCTGCCATCTT
Actin	F: CTGGAATTGCTGATCGGATGAG
	R: TCTGTTGGAAGGTGCTGAGAG

错误率为 0.02%~0.03%，与枸橼基因组的比对率为 97%以上（表 2）。各重复间相关系数均大于 0.99。综上，测序获得的数据及质量较好，可以用于后续分析。

2.2 差异表达基因的筛选

对转录组数据进行统计分析，以 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 作为筛选标准进行差异基因分析，结果如图 1 所示，共筛选获得 1 005 个差异表达基因，其中相对于正常广佛手果皮，柑橘锈螨为害的广佛手果皮样品有 271 个上调表达基因，734 个基因表达下调。

表 2 转录组测序数据质量和比对率分析

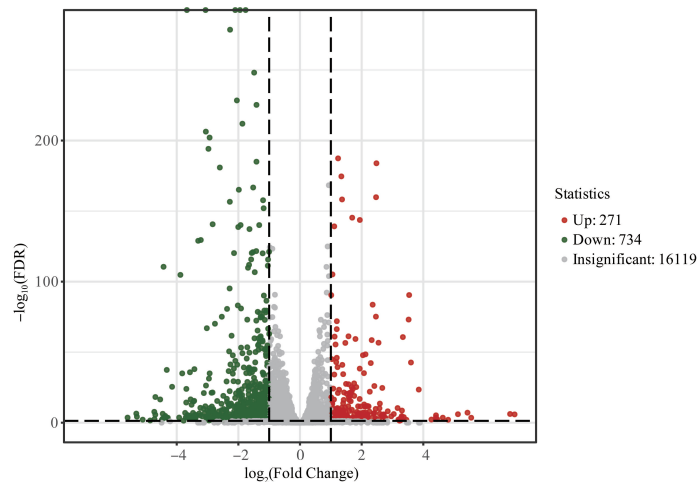
Table 2 Quality analyses and mapping statistics of transcriptome sequencing data

样品	重复	过滤后碱基/G	过滤后数据	错误率/%	Q20(质	Q30(质	GC 含量/%	总比对率/%	有唯一比	有多个比
					量值 ≥ 20 碱基百分	量值 ≥ 30 碱基百分			对位置的	对位置的
柑橘锈螨为害的广佛手外果皮	1	7.22	48 151 702	0.03	97.90	93.56	44.13	97.31	86.61	10.71
	2	6.52	43 489 382	0.03	97.84	93.34	44.06	97.55	86.94	10.60
	3	6.59	43 961 254	0.02	98.12	94.16	44.01	97.33	86.33	11.00
正常广佛手外果皮	1	6.02	40 100 802	0.02	98.13	94.14	44.03	97.36	86.32	11.04
	2	6.45	42 981 518	0.03	98.07	93.93	44.14	97.49	85.42	12.08
	3	6.11	40 763 726	0.03	98.00	93.83	44.27	97.26	84.99	12.27

2.3 差异表达基因 GO 功能富集分析

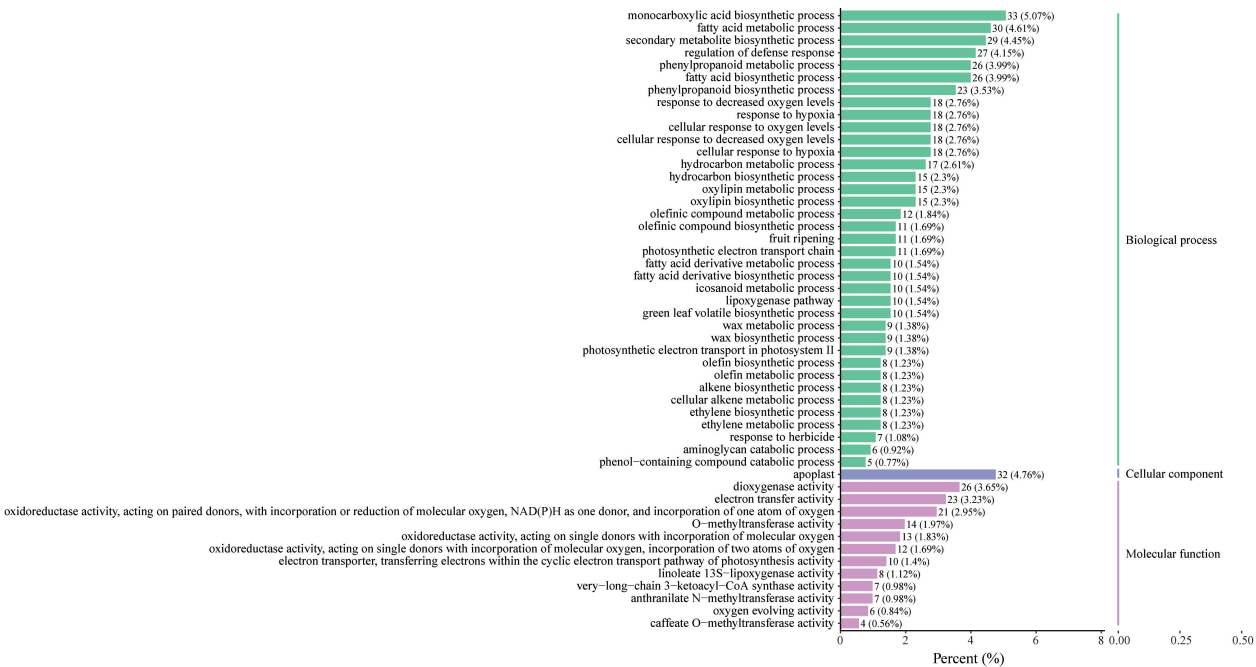
对差异表达基因进行 GO 功能富集分析，共富集到 2 044 个功能类别，其中 1 398 个属于生物过程，479 个属于分子功能，167 个属于细胞成分（图 2）。在生物过程类别中，差异基因在一元羧酸生物合成、脂肪酸代谢过程、对有机环状化合物的响应、次级代谢、防卫反应调控

等过程中显著富集；在细胞组分类别中，差异基因在外质体、叶绿体类囊体膜、质体类囊体膜、细胞器内膜、线粒体膜等细胞组分中显著富集；在分子功能类别中，差异基因主要富集在钙调蛋白结合、双加氧酶活性、酰基转移酶活性、甲基转移酶活性、电子传递活性、水解酶活性等功能。



注：检测部位为外果皮；每个点代表一个基因，红色、绿色和灰色分别表示其基因表达量上调、下调和无显著差异。

图 1 广佛手响应柑橘锈螨为害差异表达基因火山图
Figure 1 Volcano map of DEGs in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora* infestation



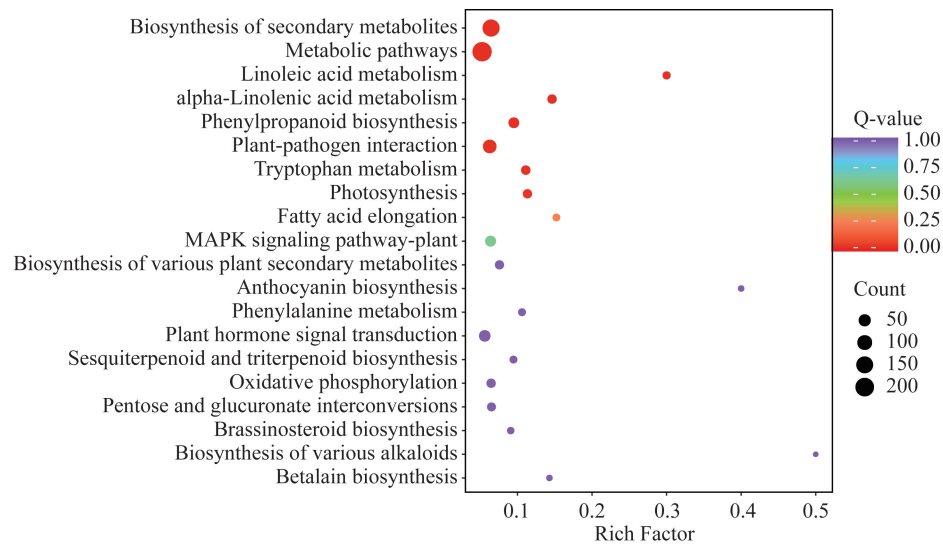
注：检测部位为外果皮。

图 2 广佛手响应柑橘锈螨为害差异表达基因在 GO 中的注释分类
Figure 2 Histogram of GO classification of DEGs in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora* infestation

2.4 差异表达基因 KEGG 功能富集分析

KEGG 功能富集分析结果显示，共有 397 个差异表达基因被注释到 KEGG 数据库中的 104 个代谢途径中（图 3）。其中，“代谢通路”是富集程度最高的代谢通路类别，有 13 条。代谢途径、次生代谢产物的生物合成、植物-病原相互作用、植物激素信号转导、MAPK 信号传导通路-植物和苯丙烷的生物合成包含的差异表达基因较多，分别为 222、158、76、42、34 和 33 个。

植物-病原体互作通路中有 76 个差异表达基因（表 3）。其中，环核苷酸门控阳离子通道基因 Cm211020、钙调蛋白基因 Cm017350、钙依赖蛋白激酶基因 Cm165270 和 Cm234970 下调表达，而鞭毛蛋白受体 FLS2 有 7 个同源基因表达下调，1 个同源基因表达上调。抗病蛋白 RPS2 有 1 个同源基因表达上调，2 个同源基因表达下调，3 个抗病蛋白 RPM1 同源基因表达下调，推测它们参与了植物免疫应答反应。



注：检测部位为外果皮。

图 3 广佛手响应柑橘锈螨为害差异表达基因 KEGG 显著富集分析
Figure 3 KEGG enrichment diagram of DEGs in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora* infestation

表 3 广佛手响应柑橘锈螨为害植物-病原体互作通路相关差异基因表达量的变化和功能注释
Table 3 Changes in expression levels and functional annotation of DEGs involved in plant-pathogen interaction in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora* infestation

基因名称	编码蛋白	基因编号	差异表达倍数	P 值
CDPK	钙依赖性蛋白激酶	Cm165270	-1.65	1.9E-16
		Cm234970	-1.12	0.00085
CNGCs	环核苷酸门控阳离子通道	Cm211020	-1.79	7.7E-06
CaM	钙调蛋白	Cm017350	-1.03	0.00037
FLS2	细菌鞭毛蛋白受体 FLS2	novel. 2145	1.17	0.00588
		Cm264690	-1.59	0.01238
		Cm082220	-1.56	1.1E-09
		Cm196570	-1.69	0.00441
		Cm082210	-3.12	2.3E-23
		Cm161120	-2.15	9.6E-06
		Cm109780	-1.24	3.2E-10
		Cm246050	-1.09	2.4E-22
		novel. 544	-1.90	2.6E-05
		novel. 1684	-1.21	5.6E-07
BAK1	油菜素内酯不敏感受体蛋白 1-BAK1	novel. 2144	-1.31	0.00085
		novel. 39	-1.45	0.00053
		novel. 2604	-1.98	9.7E-05
WRKY25	WRKY 转录因子 25	Cm172370	-1.11	1.6E-28
		Cm199430	-1.33	3.1E-17
		Cm101440	-1.51	1.8E-40
		Cm058090	-1.37	1.2E-13
		Cm039260	-1.57	0.00757
WRKY22	WRKY 转录因子 22	Cm027010	-1.15	0.00316
		Cm106450	-1.11	1.9E-51
		Cm206190	1.18	1.2E-11
WRKY29	WRKY 转录因子 29	Cm202480	-1.38	2.8E-68
		Cm051390	-1.90	5.9E-09
WRKY50	WRKY 转录因子 50	Cm086930	-1.54	1.2E-30
PTI1	Pto 互作蛋白 PTI1	Cm218130	-1.16	1E-07
RPM1	抗病蛋白 RPM1	Cm140210	-1.31	7.1E-07
		Cm260640	-1.28	0.00012

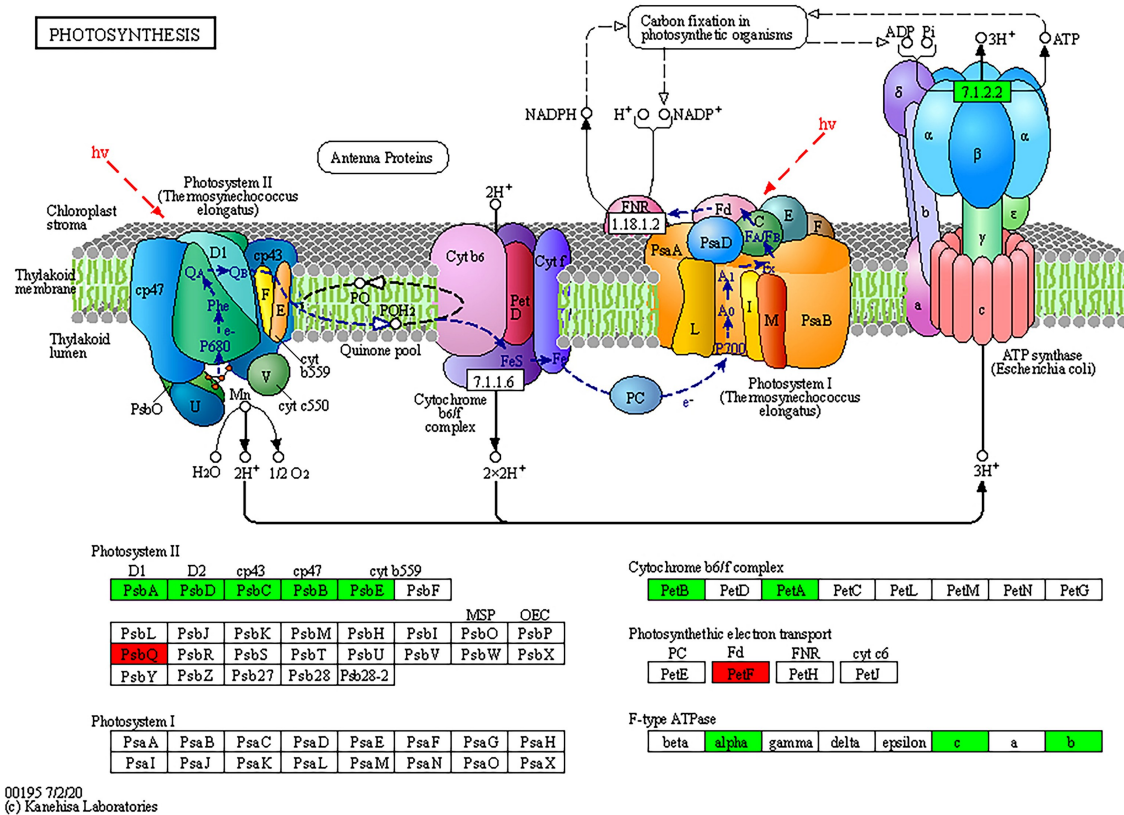
基因名称	编码蛋白	基因编号	差异表达倍数	P 值
RPM1	抗病蛋白 RPM1	Cm131530	-2. 43	0. 000 63
RPS2	抗病蛋白 RPS2	novel. 133	1. 33	0. 000 97
		Cm001430	-1. 01	0. 002 69
		Cm007260	-1. 14	9E-28
PBS1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PBS1	Cm026850	1. 93	1. 8E-05
		Cm022640	1. 31	3. 2E-05
		Cm238120	5. 55	3. 9E-05
		Cm251610	1. 62	2. 8E-21
		novel. 636	1. 59	0. 001 3
		Cm022750	3. 31	1. 4E-10
		Cm238130	5. 12	7. 8E-08
		Cm107210	-1. 63	1E-37
		Cm248360	-1. 12	0. 004 25
		Cm107220	-1. 25	2. 7E-14
		Cm307020	-1. 71	0. 004 5
		Cm025530	-1. 33	0. 004 51
		Cm064960	-1. 12	4. 8E-05
		Cm026800	-1. 14	0. 000 1
		novel. 2254	-1. 48	1. 1E-06
		novel. 1666	-1. 27	3. 5E-06
		Cm026710	-2. 87	1. 4E-23
		Cm251190	-1. 21	5. 8E-23
		Cm025510	-1. 15	1E-22
		Cm028640	-1. 38	6. 2E-13
		Cm230510	-1. 22	1. 1E-08
		Cm022700	-1. 11	1E-09
		Cm107620	-1. 27	5. 4E-08
		Cm243370	-1. 24	5. 9E-08
EIX1	EIX 受体	novel. 1091	1. 25	1. 6E-05
		novel. 2172	1. 34	3E-178
		novel. 1090	2. 30	5. 4E-45
		novel. 1092	2. 26	2. 4E-24
		Cm282110	-1. 10	3. 1E-08
		Cm169350	-1. 62	5. 9E-05
		Cm179520	-1. 15	0. 000 38
		Cm077130	-1. 26	0. 003 37
		novel. 1926	-1. 08	0. 005 57
KCS1	3-酮酯酰-CoA 合酶	Cm038200	-3. 67	0
		Cm060810	-3. 06	0
		Cm125990	-2. 93	6E-206
		Cm066980	-2. 97	6E-198
		Cm179350	-3. 88	5E-108
		Cm032050	-1. 30	1. 2E-80
		Cm154680	-1. 80	8. 8E-15

注：检测部位为外果皮。

在柑橘锈螨为害广佛手过程中，生长素、水杨酸、乙烯等防御相关的植物激素信号转导途径中 42 个基因表达出现差异（图 4）。生长素信号转导中，生长素内流载体 AUX1 是生长素信号的最上游，其同源基因 Cm109690 表达上调，而 Cm021640 和 Cm300880 表达下调，生长素响应蛋白编码基因 Cm026050 表达下调。4 个生长素早期响应蛋白基因 Cm214080、Cm125620、Cm001820 和 Cm015350 表达量升高，而同源基因 Cm026050 下降。生长素

响应因子 ARF 基因家族中的 Cm082550 和 Cm240150 表现为受锈螨诱导的正调控表达。在水杨酸信号转导途径中，病程相关基因非表达子 NPR1 编码基因 Cm196830 下调表达，而 2 个 TGA 转录因子 Cm188240 和 Cm180650 表达上调。

分析光合作用相关基因的表达（图 4），发现柑橘锈螨为害的广佛手果皮样品中参与光合作用通路的 15 个基因均较正常果皮下调表达。这些基因包括光系统 II 的 PsbA、PsbB、PsbC、PsbD 和



注：检测部位为外果皮。

Figure 4 DEGs involved in photosynthesis analyzed by KEGG in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora* infestation

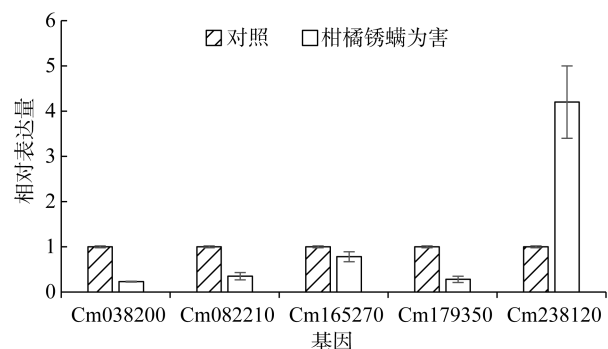
PsbE, PetA 和 PetB, 以及 F 型 ATP 合酶的 alpha 基因、b 亚基和 c 亚基基因。其中, PsbD 基因下调表达 5.29 倍, 其次是 PsbA 基因下调 3.92 倍。此外, 光系统 II 的 PsbQ 和光合系统电子传递 PetF 基因分别上调 1.04 倍和 4.26 倍。

在植物生长发育、细胞信号转导、胁迫反应等过程中, 转录因子在调控基因表达中发挥了重要作用。与对照相比, 共有 25 个家族的 81 条转录因子在柑橘锈螨为害的广佛手果皮样品中差异表达, 其中 27 个转录因子表达上调, 54 个转录因子表达下调, 这些转录因子主要包括 bHLH、AP2、MYB2 和 WRKY 等家族成员。WRKY29 (Cm051390) 等 8 个 WRKY 转录因子的编码基因表达下调, 可能影响了植保素的合成和早期防御反应。此外, JA 信号途径中 bHLH 家族转录因子 MYC2 的 4 个编码基因中 Cm170310 和 Cm071260 上调表达, 而 Cm031990 和 Cm050850 下调表达。

2.5 差异表达基因的荧光定量 PCR 分析

随机选取 5 个差异表达基因 (Cm038200、

Cm082210、Cm165270、Cm179350 和 Cm238120), 通过荧光定量 PCR 技术检测其表达水平。由图 5 可以看出, 荧光定量 PCR 检测到的基因表达变化与转录组测序分析的结果 (表 3) 一致, 表明转录组测序分析结果具有较高的可靠性。



注：检测部位为外果皮。

图 5 广佛手响应柑橘锈螨为害差异表达基因的
荧光定量 PCR 验证
Figure 5 Validation of DEGs by qRT-PCR in *Citrus medica* 'Fingered' response to *Phyllocoptruta oleivora*
infestation

3 结论与讨论

柑橘锈螨是柑橘类水果的重要虫害之一,其危害柑橘果实,导致果实表皮形成锈斑,影响果实外观品质和商品价值。柑橘锈螨个体小,繁殖速率快,容易爆发成灾,严重威胁广佛手等柑橘属植物产业的健康发展。筛选和培育抗柑橘锈螨的柑橘新品种是防控该虫害最为经济和有效的途径之一。

植物在受到机械伤害、病原微生物侵染、昆虫危害等外界伤害时,会产生一系列的防御反应。近年来,越来越多的研究从转录水平揭示植物响应生物胁迫、非生物胁迫的代谢通路及分子调控网络,不仅有助于挖掘关键抗性基因,揭示植物与病虫互作的分子机理,也为抗病育种提供了理论依据^[20-22]。唐科志等^[23]通过转录组学分析发现柑橘褐斑病菌 *Alternaria alternata* tangerine pathotype 的侵染引起红橘 *C. reticulata* 'Hongjiv' 的乙烯、水杨酸等寄主防御相关的植物激素信号转导途径中多个基因的表达水平出现异常,苯丙烷代谢途径相关基因表达出现显著差异,WRKY、bZIP 等抗逆相关的转录因子家族基因上调表达,推测这些基因的相互协同调控是红橘对柑橘褐斑病菌产生防御反应的重要机制^[23]。田帅等^[8]比较了柑橘锈螨为害沃柑 *C. reticulata* 'Orah' 果皮不同时段的基因差异表达,发现植物激素信号转导、植物病原互作通路、类黄酮生物合成、苯丙氨酸代谢等 5 条通路在沃柑响应柑橘锈螨胁迫过程中起到了重要的调控作用,并筛选出与之相关的差异基因。本研究利用高通量测序手段,在转录组水平分析了广佛手果实受到柑橘锈螨侵染时的差异表达基因,进一步进行 GO 和 KEGG 分析发现:差异表达基因主要富集在一元羧酸生物合成、次级代谢、防卫反应调控等 GO 类别中,KEGG 通路主要富集在代谢途径、次生代谢产物的生物合成、植物-病原相互作用等通路。进一步证实了植物对生物胁迫的防御反应由众多抗病基因、信号转导途径参与完成。

植物激素广泛存在于植物体内,不仅参与植物生长发育,而且在响应非生物胁迫、抗病过程中发挥重要作用。其中,水杨酸、乙烯、茉莉酸等植物激素介导的信号途径,是植物抗病反应的重要信号传导通路^[24-25]。马蜂柑 *C. hystrix* 在感染柑橘黄龙病菌后,茉莉酸合成相关的脂氧合酶 2 基因 (*LOX2*)、水杨酸合成相关的异分质酸合成酶

基因 (*ICS2*) 以及水杨酸下游信号转导相关的病程相关蛋白 1 基因 (*PR1*) 表达量均上调^[26]。唐科志等^[23]的研究证实了乙烯、水杨酸和生长素等寄主防御相关的植物激素信号转导途径在红橘响应褐斑病菌侵染中发挥了重要作用。其中,乙烯起主导作用,乙烯受体 ETR 的 3 个成员被不同程度激活,下游激酶和乙烯响应因子均上调,而生长素大部分关键信号基因、绝大部分生长素响应因子 ARF 和水杨酸合成途径的基因均下调表达。植物生长素在调控柑橘溃疡病菌引起的寄主侵染部位脓疱形成中起重要作用。在晚锦橙 *C. sinensis* 'Wanjincheng' 中超量表达生长素早期响应因子的编码基因 CsGH3.6 能够抑制生长素信号转导,从而调控茉莉酸和水杨酸的动态平衡,改变细胞和植株的形态,增强晚锦橙对溃疡病的抗性^[27]。本研究中,生长素、乙烯和水杨酸信号通路相关基因在广佛手响应柑橘锈螨为害过程中被诱导上调表达或下调表达。由此推测,生长素、乙烯和水杨酸信号通路在广佛手响应柑橘锈螨为害过程中发挥了重要的防御作用,共同调控着广佛手对柑橘锈螨为害的响应与抵抗能力。

植物类受体蛋白激酶 RLKs 是重要的蛋白激酶家族之一,参与介导了植物生长、发育以及逆境胁迫应答等多种生理过程。当植物受到病虫的侵害时,植物类受体蛋白激酶通过胞外结构域感知刺激,并通过其胞质激酶结构域传递信号,进行防御反应^[28-29]。例如,二化螟 *Chilo suppressalis* 啃食和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 口腔分泌物处理能强烈诱导水稻 *Oryza sativa* 受体激酶 OsLRR-RLK1 转录。进一步研究发现,OsLRR 作用于茉莉酸、水杨酸和乙烯信号的上游,并调节这些激素因昆虫取食而诱导的生物合成。此外,OsLRR-RLK1 也作用于丝裂原活化蛋白激酶 (MPK, mitogen-activated protein kinase) 级联的上游,并正调节防卫相关的 MPK 和 WRKY 转录因子表达^[30]。唐科志等^[23]通过对红橘感染褐斑病前后转录组比对,发现红橘在受到褐斑病胁迫时,富亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶的 LRR 类受体基因、LRK 受体激酶基因等能够响应柑橘褐斑病的侵染。但有关广佛手类受体蛋白激酶基因的研究尚无报道。本研究发现佛手响应柑橘锈螨为害的过程中,共有 37 个类受体蛋白激酶基因表达出现显著差异。其中,富亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶 LRR,

Cm026850 升高, Cm082210 等 9 个下降。类凝集素类受体蛋白激酶 Cm022640、Cm022750 升高, Cm107210 等 8 个下调。由此推测, 这些植物类受体蛋白激酶参与介导了广佛手响应柑橘锈螨为害的反应。本研究结果为深入研究广佛手响应柑橘锈螨为害的分子机制提供了数据基础, 对筛选获得的潜在抗病基因, 需要进一步进行转基因表达验证。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 185-186.
- [2] 金雯芳, 沈丽红, 任加惠, 等. 佛手精油及相关产品开发的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(5): 857-861.
- [3] 卿玲杉, 曾静, 童文, 等. 药食两用植物佛手历史沿革及栽培技术研究进展[J]. 农学学报, 2020, 10(7): 82-87.
- [4] 岳玲, 程轩轩, 杨全. 广佛手的资源调查研究[J]. 广东化工, 2018, 45(11): 34-36.
- [5] 詹若挺, 刘军民, 陈立凯, 等. 广东省南药生产发展现状调查[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(9): 1836-1843.
- [6] 蔡明段, 易干军, 彭成绩. 柑橘病虫害原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [7] REYNA M, EKESI S, SÉTAMOU M. Morphometric comparisons of citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), populations in Texas and Kenya[J]. Southwestern Entomologist, 2019, 44(3): 607-616.
- [8] 田帅, 邱发发, 葛聪聪, 等. 沃柑果皮响应柑橘锈螨危害的转录组分析[J]. 果树学报, 2021, 38(9): 1569-1578.
- [9] MATHEUS R, ODIMAR Z, DANIEL J. Biological and demographic parameters of *Tegolophus brunneus* (Acari: Eriophyidae) in citrus[J]. Experimental and Applied Acarology, 2019, 79(1): 35-46.
- [10] QI H, JIANG Z, ZHANG K, et al. PlaD: A transcriptomics database for plant defense responses to pathogens, providing new insights into plant immune system[J]. Genomics, Proteomics and Bioinformatics, 2018, 16(4): 283-293.
- [11] 张杰, 董莎萌, 王伟, 等. 植物免疫研究与抗病虫绿色防控: 进展, 机遇与挑战[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(11): 1479-1507.
- [12] 曲硕, 焦耀磊, 付加禹, 等. 抗病基因 PR1 在大豆中的遗传转化与多抗材料的培育[J]. 分子植物育种, 2023, 21(1): 174-184.
- [13] 许秀玉, 张勇, 甘先华, 等. 木麻黄青枯病抗性与 EST-SSR 标记的关联分析[J]. 林业与环境科学, 2020, 36(3): 10-17.
- [14] CHEN S, ZHOU Y, CHEN, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-890.
- [15] KIM D, PAGGI J, PARK C, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 907-915.
- [16] LI B, DEWEY C. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference, genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 1-16.
- [17] LOVE M, ANDERS S, HUBER W. Differential analysis of count data—the DESeq2 package[J]. Genome Biology, 2014, 15: 550.
- [18] ASHBURNER M, BALL C, BLAKE J, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [19] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic acids Research, 2008, 36: 480-484.
- [20] 谭志强, 黄炬峰, 李福明, 等. 药用植物猴耳环的转录组测序分析[J]. 林业与环境科学, 2021, 37(3): 15-21.
- [21] 张浩, 李海玉, 施松梅, 等. 2 种黑籽南瓜响应枯萎病菌侵染的转录组学研究[J]. 中国农学通报, 2023, 39(18): 107-116.
- [22] 刘勇, 王富荣, 王会良, 等. 桃响应葡萄座腔菌侵染的转录组学分析[J]. 分子植物育种, 2024, 22(6): 1842-1849.
- [23] 唐科志, 周常勇. 红橘响应褐斑病菌侵染的转录组学分析[J]. 中国农业科学, 2020, 53(22): 4584-4600.
- [24] 温汉平, 陈家裕, 钟雨庭, 等. 基于内源激素调控的木荷扦插生根研究[J]. 林业与环境科学, 2023, 39(3): 27-33.
- [25] YAO H, GAO S, SUN T, et al. Transcriptomic analysis of the defense response in "Cabernet Sauvignon" grape leaf induced by *Apolygus lucorum* feeding[J]. Plant Direct, 2024, 8(5): e590.
- [26] 滕彩玲, 钟晰, 吴昊娣, 等. 马蜂柑响应黄龙病菌不同侵染时期的生物学和转录组学分析[J]. 中国农业科学, 2020, 53(7): 1368-1380.
- [27] 邹修平, 龙俊宏, 彭爱红, 等. 超量表达 CsGH3.6 通过抑制生长素信号转导增强柑橘溃疡病抗性[J]. 中国农业科学, 2019, 52(21): 3806-3818.
- [28] ZHAO C, ZAYED O, YU Z, et al. Leucine-rich repeat extensin proteins regulate plant salt tolerance in Arabidopsis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(51): 13123-13128.
- [29] 王晓杰, 甘鹏飞, 汤春蕾, 等. 植物抗病性与病害绿色防控: 主要科学问题及未来研究方向[J]. 中国科学基金, 2020, 34(4): 381-392.
- [30] HU L, YE M, KUAI P, et al. OsLRR-RLK1, an early responsive leucine-rich repeat receptor-like kinase, initiates rice defense responses against a chewing herbivore[J]. New Phytologist, 2018, 219(3): 1097-1111.