

芒果可可毛色二孢咪鲜胺抗药性菌株的转录组分析

刘锦霖^{1,2}, 李鹏声^{1,2}, 杨 叶^{1,2*}

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572022; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘 要: 为探析芒果可可毛色二孢对咪鲜胺的解毒代谢分子机制, 挖掘相关功能基因。本研究使用 RNA-seq 技术对咪鲜胺处理和未处理的可可毛色二孢菌株进行转录组测序。结果表明: 咪鲜胺对敏感菌株具有显著的抑制活性, 半数有效浓度 EC_{50} 值为 0.12 mg/L, 2 个抗性菌株的 EC_{50} 值分别为敏感菌株的 7.67 倍和 32.67 倍。对咪鲜胺敏感菌株 (DF04) 和抗性菌株 (HL02、M108) 间差异表达基因 (DEG) 进行 GO 功能富集和 KEGG 信号通路富集分析显示: 与未用咪鲜胺处理 (CK) 相比, 10 mg/L 咪鲜胺处理后的 DF04、HL02、M108 菌株分别有 5342、1148、2568 个 DEGs; 其中, 3 个菌株之间共有 566 个 DEGs 重叠。与敏感菌株相比, 抗性菌株分别有 2078 和 3096 个 DEGs 上调表达, 1527 和 1793 个 DEGs 下调表达。通过 GO 富集结果显示, 咪鲜胺处理后的抗性和敏感菌株之间富集到细胞过程和代谢过程的 DEGs 最多, 在 HL02 和 M108 中分别占比 18% 和 16%、17% 和 15%。KEGG 富集结果显示, 咪鲜胺处理后抗性和敏感菌株之间 DEGs 显著富集在代谢通路中, HL02 和 M108 中分别占比 64.98% 和 63.39%。针对解毒代谢相关的 DEGs 的分析发现, 抗性菌株中具有显著差异的细胞色素 P450 (Cytochrome P450)、谷胱甘肽转移酶 (GST) 和 ABC 转运蛋白 (ABC transporter) 基因分别为 27、17、59 个。随机筛选 8 个基因进行实时荧光定量验证, 结果证实这些基因的相对表达量的变化趋势与转录组数据一致。根据抗敏菌株之间差异表达基因明显上调表达, 共筛选出 7 个 P450s 基因、8 个 GSTs 基因、11 个 ABC 转运蛋白基因, 可能与可可毛色二孢对咪鲜胺的代谢抗性机制有关。本研究结果为杀菌剂抗性机制提供新见解, 也为深入探析咪鲜胺代谢抗性的分子机制奠定基础。

关键词: 芒果; 可可毛色二孢; 咪鲜胺; 转录组; 解毒代谢酶

中图分类号: S436.67 文献标志码: A

Transcriptome Analysis of Prochloraz Resistant Strains of *Lasiodiplodia theobromae* from Mango

LIU Jinlin^{1,2}, LI Pengsheng^{1,2}, YANG Ye^{1,2*}

1. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572022, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: The study was aimed to explore the molecular mechanism of detoxification of prochloraz by *Lasiodiplodia theobromae* from mango and to screen related functional genes. In this study, RNA-seq technology was used to analyze the transcriptome sequencing and functional annotation of prochloraz-treated and untreated strains of *L. theobromae*. Prochloraz had significant inhibitory activity against the sensitive strain with an EC_{50} value of 0.12 mg/L. The EC_{50} value of the two resistant strains was 7.67 and 32.67 times higher than that of the sensitive strain, respectively. GO functional enrichment and KEGG signaling pathway enrichment analyses were performed for differentially expressed genes (DEGs) between prochloraz-sensitive strains (DF04) and -resistant strains (HL02 and M108). Compared with the untreated (CK) with prochloraz, there were 5342, 1148, and 2568 DEGs in DF04, HL02, and M108, respectively, after 10 mg/L prochloraz treatment. Among them, a total of 566 DEGs were overlapped among the three strains. Compared with the sensitive strains, the resistant strains had 2078 and 3096 DEGs up-regulated and 1527 and 1793 down-regulated

收稿日期 2024-02-06; 修回日期 2024-03-04

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32160653)。

作者简介 刘锦霖 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物保护。*通信作者 (Corresponding author): 杨 叶 (YANG Ye), E-mail: yyyzi@tom.com。

expression, respectively. GO enrichment showed that the highest number of genes were involved in cellular process and metabolic process between resistant and sensitive strains after prochloraz treatment, accounting for 18% and 16%, 17% and 15% in HL02 and M108, respectively. KEGG enrichment showed that DEGs were significantly enriched in metabolic pathways between resistant and sensitive strains after prochloraz treatment, with 64.98% and 63.39% in HL02 and M108, respectively. The analysis for DEGs related to detoxification metabolism identified 27, 17 and 59 cytochrome P450 (Cytochrome P450), glutathione transferase (GST) and ABC transporter protein (ABC transporter) genes, respectively. Eight genes were randomly screened for quantitative real-time PCR validation, and the results confirmed that the trends in the relative expression of these genes were consistent with the transcriptome data. Based on the significantly up-regulated expression of DEGs in the resistant strains, the final screening of 7 P450s genes, 8 GSTs genes and 11 ABC transporter protein genes may be related to the metabolic resistance mechanism of *L. theobromae* to prochloraz. The results would provide new insights into the mechanism of fungicide resistance and lay the foundation for in-depth analysis of the molecular mechanism of metabolic resistance to prochloraz.

Keywords: mango; *Lasiodiplodia theobromae*; prochloraz; transcriptome; metabolic enzymes

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.005

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是我国重要的热带经济作物, 海南地区的芒果产量和种植面积均位居我国前列。芒果果肉香味浓郁, 除鲜食外还可制作果酱和饮品, 深受消费者喜爱。芒果蒂腐病是危害芒果品质、导致采后果实严重腐烂的重要病害。可可毛色二孢 (*Lasiodiplodia theobromae*) 是引发芒果蒂腐病的主要病原菌之一^[1]。该病原菌是一种全球性病原真菌, 能够在芒果等多种热带果树及林木作物上侵染为害, 造成采后果实蒂腐病和田间树木、枝干的枯死等病害^[1]。此外, 该菌具有潜伏侵染的特性, 病菌可在幼果期侵染并在果实中潜伏, 果实成熟后病斑迅速扩展, 发生褐变并散发出酸臭味, 在芒果采后贮藏和运输的过程中爆发, 严重影响芒果的品质和经济价值^[2]。目前防治芒果病害的方法主要包括物理防治、生物防治与化学防治, 其中化学防治是最常用的方式, 异菌脉、多菌灵、咪鲜胺等杀菌剂能够有效防治芒果蒂腐病^[3-4]。然而, 随着药剂施用量持续增加, 使得病原菌的选择压力持续增大, 单一靶标位点的杀菌剂已经产生了严重的抗药性。据报道, 芒果可可毛色二孢对多菌灵、啞菌酯抗性已经达到十分严重的水平^[5-6]。

大量研究表明, 害虫、杂草及病原菌对农药的抗性机制主要包括靶标抗性机制和非靶标抗性机制^[6]。靶标抗性主要是杀菌剂靶标基因发生突变所致, 致使药剂与作用位点酶的亲和性降低。而非靶标抗性主要是增加药剂外排作用、解毒作用和对药剂的通透性下降所致, 又称为代谢抗性, 增加药剂外排与代谢解毒常常协同发挥作用^[7]。以细胞色素 P450 介导的微粒体多功能氧化酶、谷

胱甘肽转移酶等代谢酶系为主体的解毒系统能够把农药分解成毒性更低、亲水性更强的物质, 便于排出体外^[8]。代谢抗性的发生不仅会提升抗药性水平, 也有可能导致交互抗性及多药抗性的发生^[9]。目前, 代谢抗性的研究主要集中在害虫及杂草抗药性的产生机制, 病原真菌的代谢抗性研究尚处于初步阶段。本研究拟在芒果上分离获得的咪鲜胺抗药性菌株为供试材料, 通过转录组测序及差异表达基因的分析, 挖掘与代谢抗性相关的基因, 对代谢抗性的机制进行初步探析, 为后续代谢抗性机制的深入研究提供依据。研究芒果可可毛色二孢抗药性产生机制, 是延缓田间抗药性发展的关键所在, 对提升芒果蒂腐病防治效果及提高芒果产量和品质具有重要指导价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试 3 株芒果蒂腐病可可毛色二孢菌株 HL02、M108 和 DF04 由海南大学植物保护学院杀菌剂生物学实验室分离鉴定并保存。将菌株接种到马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上, 于 28 °C 黑暗中培养 3 d 后备用。

1.1.2 供试药剂 97% 咪鲜胺购自海南正业中农高科股份有限公司; 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; DL2000 DNA Marker、RNA 逆转录试剂盒、ChamQ Universal qPCR SYBR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 1000 assay Kit 购自安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 咪鲜胺敏感性测定 采用菌丝生长速率法

测定 3 株可可毛色二孢菌株对咪鲜胺的敏感性。咪鲜胺用少量丙酮溶解并配制成 1×10^3 mg/L 的母液备用。在 PDA 培养基中加入不同量的杀菌剂母液，配制得到不同浓度的含药培养基平板，最终试验浓度为 0、0.2、0.8、3.2、12.8、51.2 mg/L。对照培养基中加入等量的溶剂。每处理 3 个重复，试验重复 3 次。从培养 3 d 的菌落边缘取菌饼（直径 5 mm）转移到含药 PDA 平板上，28 ℃ 培养 36 h 后，测量菌落直径并计算抑制率。将供试浓度转换为浓度对数，抑制率转换为几率值，使用 Probit 分析求回归方程 $y=a+bx$ ，计算半数有效浓度 EC_{50} 值。

1.2.2 可可毛色二孢的 RNA 提取及转录组测序 从培养 3 d 的菌落边缘取菌饼（直径 5 mm）转移到 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养（PDB），每瓶培养液接种 5 个菌饼，于 145 r/min 震荡培养 24 h；然后加入咪鲜胺使其终浓度为 10 mg/L，再培养 12 h 后取出每个样品的菌丝，使用总 RNA 提取试剂盒，严格按照说明书提取样品的总 RNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳及微量紫外分光光度计检测其纯度和浓度。每个处理 3 个重复样品，将质检合格的样品混合，然后设 3 个生物学重复。用 Oligo(dT)磁珠从上述 RNA 样品中富集 mRNA 并进行超声处理，以片段化的 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链，随后用 RNaseH 降解 RNA 链，并在 DNA polymerase I 体系下，在第二链合成时加入 dNTPs 补齐双链 DNA 的末端。在纯化后的双链 DNA 的两端各加上 1 个 A 碱基后与末端带有 T 碱基的接头进行连接，使用 AMPure XP beads 磁珠筛选 200 bp 左右的 cDNA，进行 PCR 扩增并再次纯化后获得 cDNA 文库，选择 DNA 1000 assay Kit 对文库进行质检合格后，使用 Illumina HiSeq TM 2500 测序仪测序。利用 HISAT2 将双端测序得到的序列比对到参考基因组（NCBI_ASM982982v1）。

1.2.3 转录组数据分析和差异表达基因筛选 测序原始数据 raw reads 利用 fastp 过滤和质控得到 clean reads^[10]。使用短 reads 比对工具 Bowtie 2 将 clean reads 比对到可可毛色二孢的核糖体数据库^[11]，在不允许错配情况下去除比对上核糖体的 reads，将保留下来的 unmapped reads 用于后续转录组分析。利用 DESeq2 软件比较不同处理的样品与对照样品，从而鉴定差异基因^[12]。以 $FDR<0.05$ 且 $|\log_2(FC)|>1$ 为标准筛选识别显著变化的差异表达

基因（DEG），并对差异基因进行 GO（<http://www.geneontology.org/>）功能分析和 KEGG（<http://www.genome.jp/kegg/>）通路富集分析。另外，使用 HMMER3.0 软件和 BLASTP 程序比对含有细胞色素 P450 蛋白结构域、谷胱甘肽转移酶蛋白结构域和 ABC 转运蛋白结构域的序列，筛选后比对到转录组差异基因筛选结果中，结合差异基因功能和通路富集分析结果筛选与抗药性相关的解毒代谢基因。

1.2.4 差异表达基因的定量验证 3 个菌株分别设 10 mg/L 咪鲜胺处理组和未处理组（对照），每个样品设置 3 个独立的生物学重复。提取芒果可可毛色二孢菌株总 RNA 并使用 RNA 逆转录试剂盒合成 cDNA，使用 ChamQ Universal qPCR SYBR Master Mix 配制荧光定量检测体系，以 *actin* 基因作为内参基因测定差异基因表达量。使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物（表 1），所有引物均由楠山科技有限公司（海南）合成。qPCR 反应体系：2×ChamQ Universal qPCR SYBR Master Mix 10 μL、10 μmol/L 上/下游引物各 0.4 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O 8.2 μL。反应程序：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火 30 s，循环 42 次。每个处理 3 个生物学重复和 3 个技术性重复。

表 1 本研究所用引物	
Tab. 1 Primers used in this study	
引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequences (5'-3')
ppoC-F	CGCACACTATCCGATGACGA
ppoC-R	CTTTGCGCCAACGTAAGAGG
ascG-F	TTGACTCGTTCTCTGCGTCC
ascG-R	TTCACGAGCCGTTTCATGGT
pkfkb-F	TCATTTCCGAGGTCGGCTTT
pkfkb-R	GCCATGATGCCGAAAGGAAC
AgnL6-F	CATGCAGCTCAACGTGAAGG
AgnL6-R	TCGAGAAATGGCAGACGGAC
gst3-F	GATCATGCTTGC GGAATCGG
gst3-R	GATCTGGCCTTCCTTGCCCTT
gedE-F	GACAATGACAGCTTCCCCGT
gedE-R	ACAGATCCTTCGGGTCTCTCA
abcC-F	GCCAGAAGTCGAAGGGTGA
abcC-R	TGAATGATGGCAGCCGAGTT
abcA-F	AAACGTAGTCGTTGCGTTGCG
abcA-R	TCGGCGATGCTGACTCTTTT
LtACTIN-rtF	GGAGATGAGGCACAGTCG
LtACTIN-rtR	GCGGTGGTGGAGAAAGAGT

1.3 数据处理

使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因相对表达量^[13]。使用 GraphPad Prism 软件进行数据分析,采用 LSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 咪鲜胺处理对菌株的作用

供试 3 个菌株对咪鲜胺的 EC_{50} 值在 0.12~3.92 mg/L 之间,与敏感菌株 DF04 相比,抗性菌株 HL02 和 M108 的抗性倍数分别为 7.67 倍和 32.67 倍(表 2)。咪鲜胺敏感菌株的菌丝生长受药剂的抑制,除了菌落大小的差异,菌丝也较抗性菌株稀薄。

表 2 源自芒果蒂腐病的 3 株可可毛色二孢对咪鲜胺的敏感性

Tab. 2 Sensitivity of three *L. theobromae* isolates from mango stem-end rot to prochloraz

菌株 Strain	回归方程 Regression equation	R^2	EC_{50} /(mg·L ⁻¹)	抗性倍数 Resistance ratio /(R·S ⁻¹)
DF04	$y=5.4648+0.5138x$	0.9956	0.12	
HL02	$y=5.0304+0.8024x$	0.9893	0.92	7.67
M108	$y=4.6901+0.5224x$	0.9521	3.92	32.67

2.2 转录组测序数据质量分析

3 个菌株分别设 10 mg/L 咪鲜胺处理组和未处理组,共 6 个样品,每个样品设置 3 个独立的生物学重复。过滤低质量数据后,从 8 个文库中生成了超过 50 亿个 clean reads,3 个重复的平均 Q_{20} 介于 97.10%~97.443%之间, Q_{30} 介于 92.375%~93.09%之间,GC 含量介于 58.46~58.71 之间(表 3)。质控后的 clean reads 数超过 3500 万条,其中超过 90.81% (unique map) 比对到参考基因组唯

一位置上,全部的可以定位到基因组上的 reads 数量及占有有效 reads 比例 (total mapped) 超过 91.40%。以上结果表明转录组测序数据质量高,可用于后续生物信息学分析。

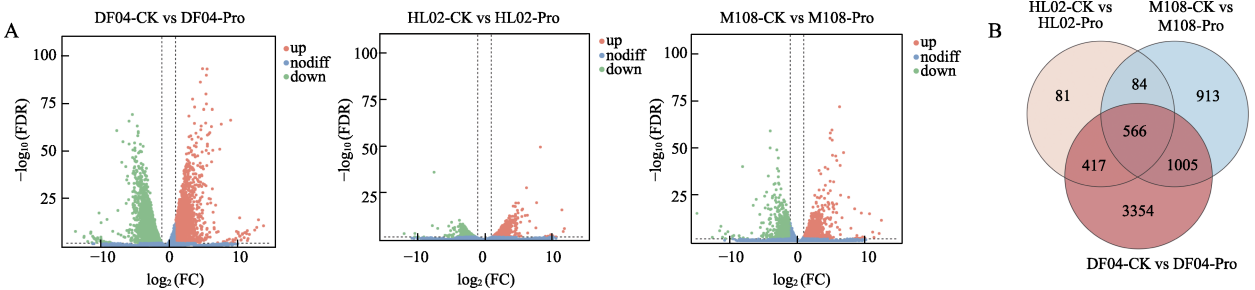
表 3 咪鲜胺抗敏菌株各处理样品转录组测序质量评估
Tab. 3 Quality assessment of transcriptome sequence reads on the prochloraz-resistant and-sensitive isolates

样品 Sample	原始数据 Raw reads/bp	有效数据 Clean reads/bp	$Q_{20}/\%$	$Q_{30}/\%$	GC/%
HL02-CK	60 9548 3900	601 600 5933	97.26	92.80	58.66
HL02-Pro	61 3261 9600	60 5480 2704	97.23	92.70	58.46
M108-CK	66 5245 0000	65 7682 0482	97.29	92.74	58.61
M108-Pro	65 7457 9900	64 9784 8658	97.35	92.92	58.44
DF04-CK	73 6927 7400	72 6050 2181	97.44	93.09	58.71
DF04-Pro	58 7120 8300	57 9917 4867	97.10	92.37	58.67

2.3 差异表达基因表达分析

以 $FDR<0.05$ 且 $|\log_2(FC)|>1$ 为条件进行差异表达基因的筛选。差异基因火山图数据显示(图 1A),10 mg/L 咪鲜胺处理 (Pro) 与未处理 (CK) 样品间的基因表达水平及差异基因数量存在差异:经 10 mg/L 咪鲜胺处理后的抗性菌株 HL02、M108 分别有 609、1570 个显著上调表达基因,539、998 个显著下调表达基因;而敏感菌株 DF04 有 2026 个显著上调表达基因,3316 个显著下调表达基因,敏感菌株的差异基因数量显著高于抗药菌株。韦恩图显示(图 1B),3 个菌株添加咪鲜胺处理前、后共有 566 个差异表达基因。

针对咪鲜胺处理后抗性菌株与敏感菌株之间的差异表达基因进行分析,结果表明,抗性菌株 HL02、M108 分别有 2078、3096 个上调表达基因,1527、1793 个下调表达基因(图 2),上调表达基因数量远大于下调表达基因。



A: 火山图; B: 韦恩图。

A: Volcano plot; B: Venn diagram.

图 1 可可毛色二孢差异表达基因分析

Fig. 1 Analysis on differentially expressed genes of *L. theobromae*

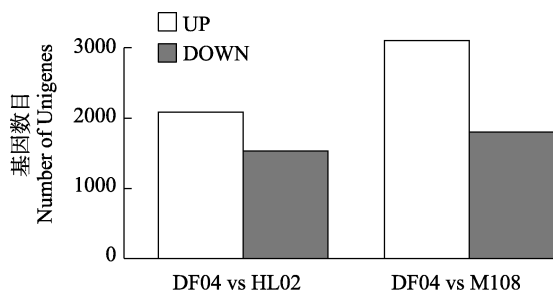


图 2 咪鲜胺处理后抗敏菌株之间差异表达基因的分析

Fig. 2 Analysis on differentially expressed genes of on the prochloraz-resistant and -sensitive isolates after prochloraz treatment

2.4 咪鲜胺处理后的差异表达基因 GO 富集分析

GO 功能富集分析发现,咪鲜胺处理后的抗性和敏感菌株的差异表达基因分别集中在生物学进程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 及细胞组分 (cellular component) 方面,其中,基因功能主要集中在 27 个 term 中,它们的差异表达基因数均大于 100。生物学进程中富集的差异基因数量最多,主要富集在细胞过程 (cellular process) 和代谢过程 (metabolic process),其中,DF04 vs HL02 中分别有 2249 (18%)、2005 (16%) 个 DEGs, DF04 vs M108 中分别有 3073 (17%)、2683 (15%) 个 DEGs。分子功能进程中差异表达基因主要富集在结合 (binding)、催化活性 (catalytic activity), DF04 vs HL02 中分别有 1774 (38%)、1606 (35%) 个 DEGs, DF04 vs M108 中分别有 2422 (38%)、2095 (33%) 个 DEGs。细胞组分进程中的差异表达基因显著富集在细胞结构体 (cellular anatomical entity) 和含蛋白质复合物 (protein-containing complex) 中, DF04 vs HL02 中分别有 1846 (67%)、899 (32%) 个 DEGs, DF04 vs M108 中分别有 2573 (65%)、1354 (34%) 个 DEGs (图 3)。2 个抗性菌株 HL02、M108 与敏感菌株 DF04 之间的差异表达基因分类趋势表现一致,但 DF04 vs M108 比对的差异表达基因高于 DF04 vs HL02。

2.5 咪鲜胺处理后差异表达基因 KEGG 信号通路富集

KEGG 信号通路富集分析结果显示,咪鲜胺处理后的差异表达基因集中在代谢 (metabolism)、遗传信息处理 (genetic information processing)、细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing) 及

有机系统 (organismal systems) 通路, DF04 vs HL02 和 DF04 vs M108 中 DEGs 分别为 1479、1961 个 DEGs。抗性菌株与敏感菌株之间差异表达基因显著富集在代谢通路中,代谢通路差异基因在 DF04 vs HL02 和 DF04 vs M108 比对中分别占 64.98%和 63.39%;其中,位于前五的分别是全局和总览图 (global and overview maps)、碳代谢 (carbon metabolism)、氨基酸代谢 (amino acids metabolism)、脂质代谢 (lipid metabolism) 和辅助因子和维生素的代谢 (metabolism of cofactors and vitamins) (图 4)。

2.6 与代谢抗性相关基因的筛选及表达分析

使用细胞色素 P450 蛋白结构域、谷胱甘肽转移酶蛋白结构域和 ABC 转运蛋白结构域比对到参考基因组后,结合转录组数据分别筛选出 46 个细胞色素 P450 (Cytochrome P450) 差异表达基因、19 个谷胱甘肽转移酶 (GST) 差异表达基因和 84 个 ABC 转运蛋白 (ABC transporter) 差异表达基因。其中,抗敏菌株间基因表达水平存在明显差异,被注释为显著差异表达基因的有:细胞色素 P450 差异表达基因 27 个、谷胱甘肽转移酶差异表达基因 17 个和 ABC 转运蛋白差异表达基因 59 个。聚类热图分析表明,与敏感菌株相比,2 个抗性菌株的差异表达基因基本一致。DF04 vs HL02 和 DF04 vs M108 比对中,呈现上调表达 P450s 基因分别有 14 和 15 个 (图 5A),呈现上调表达 GSTs 基因分别有 12 和 11 个 (图 5B),呈现上调表达 ABC 转运蛋白基因分别有 46 和 47 个 (图 5C)。

基于转录组数据,随机选取 4 个细胞色素 P450 基因 (56011963、56011911、56015966、56023668)、2 个谷胱甘肽转移酶基因 (56016123、56022618) 和 2 个 ABC 转运蛋白基因 (56013411、56014441) 进行 qPCR 验证 (图 6),结果表明差异表达基因变化趋势与转录组数据一致,说明该转录组数据可靠。

代谢抗性相关的基因中,与敏感菌株相比,在 2 个抗性菌株中均呈现显著上调表达的基因包括:7 个 P450s 基因、8 个 GSTs 基因和 11 个 ABC 转运蛋白基因 (表 4)。上述基因在芒果可可毛色二孢对咪鲜胺的解毒代谢中可能发挥重要作用,抗性菌株表达水平的变化很可能与可可毛色二孢菌株抗药性相关。

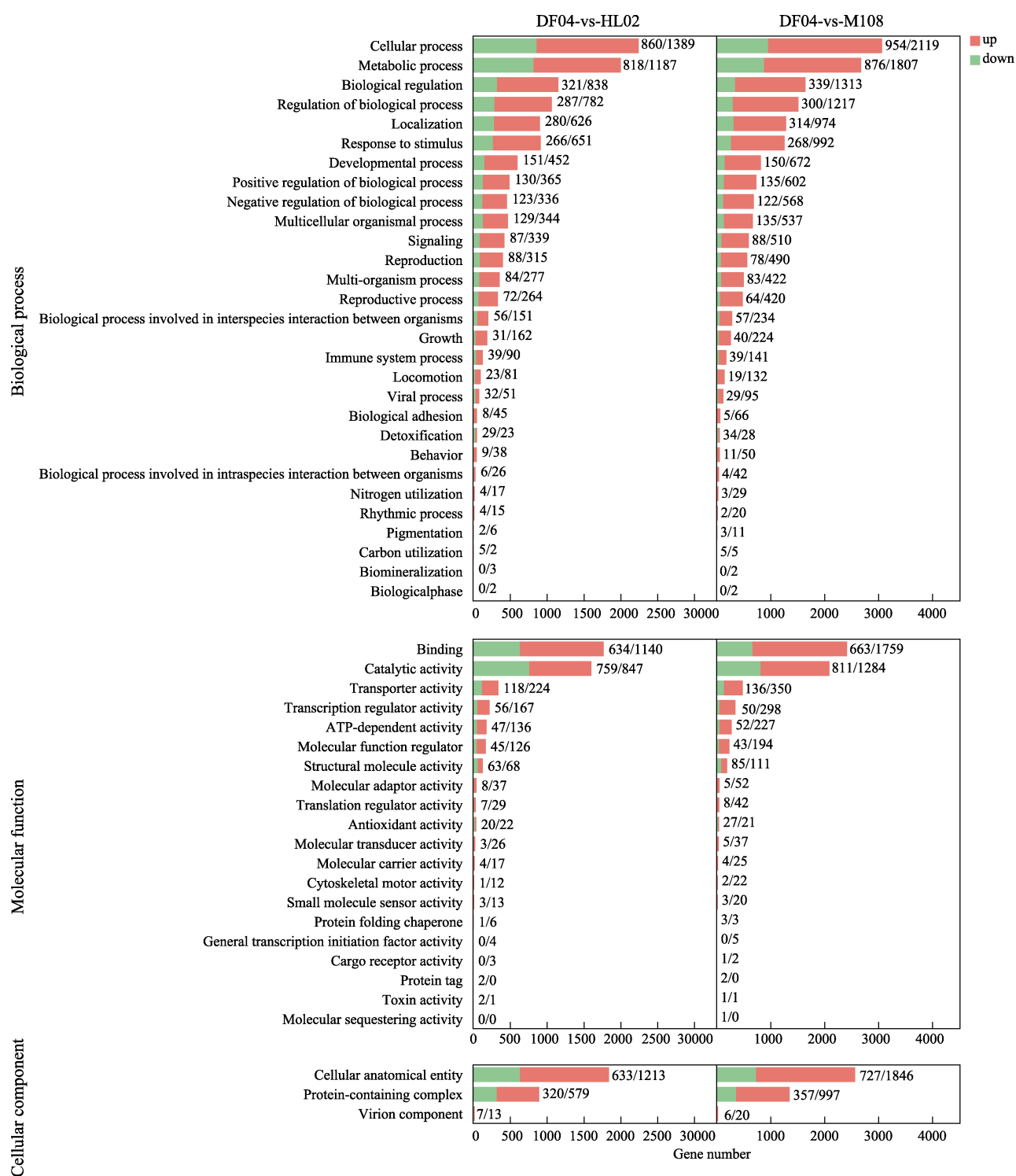


图 3 咪鲜胺处理可可毛色二孢抗敏菌株差异表达基因的 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis on differentially expressed genes between prochloraz-resistant and -sensitive isolates of *L. theobromae* after prochloraz treatment

3 讨论

苯并咪唑类及甲氧丙烯酸酯类均为高抗性风险的杀菌剂，在国内的海南及国外的阿曼均有发现。芒果蒂腐病菌可可毛色二孢对苯并咪唑类多

菌灵、甲基硫菌灵和甲氧丙烯酸酯类吡唑醚菌酯、啞菌酯等已经产生严重抗药性，在田间形成了具有较高抗性水平的抗药性亚种群^[14-17]；此外，在木瓜上有报道蒂腐病菌可可毛色二孢对甲基硫菌

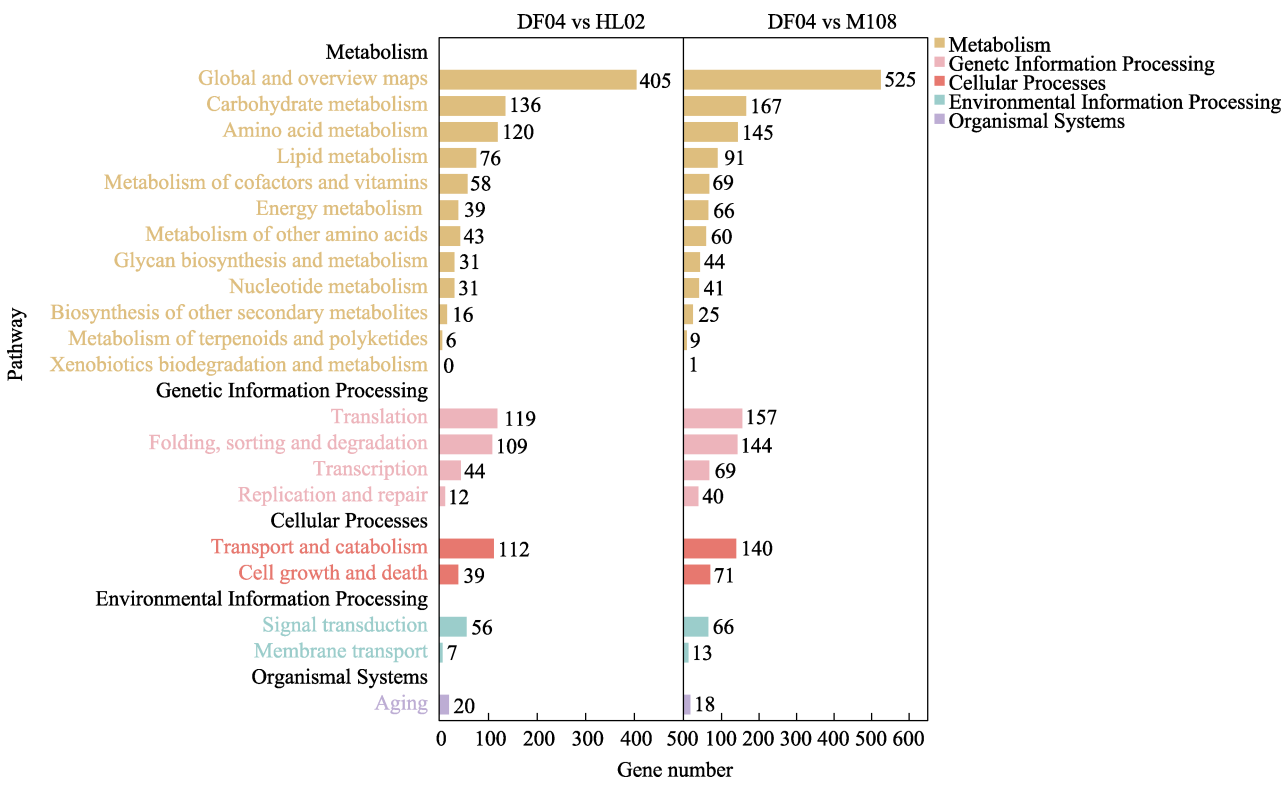


图 4 咪鲜胺处理可可毛色二孢抗敏菌株差异表达基因的 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis on differentially expressed genes (DEGs) between prochloraz-resistant and-sensitive isolates of *L. theobromae* after prochloraz treatment

灵和噻菌酯产生抗药性^[18]。被划分为中等抗性风险的甾醇脱甲基抑制剂类（DMIs）如咪鲜胺、苯醚甲环唑等，单用或者作为复配制剂广泛应用于芒果病害防治，但目前生产上已经出现敏感性下降或药效降低的现象。咪鲜胺主要通过抑制植物病原真菌细胞膜上麦角甾醇的生物合成从而抑制菌丝生长，作为内吸性杀菌剂同样存在作用位点单一的缺点，长期使用同样具有产生抗药性的潜在危险。WANG 等^[19-20]发现我国海南芒果可可毛色二孢对 DMI 类杀菌剂苯醚甲环唑和咪鲜胺存在敏感性下降，并发现抗药性菌株与戊唑醇存在正交互抗性。

据报道，已有许多植物病原真菌对 DMI 类杀菌剂产生抗药性，如桃褐腐病菌（*Monilinia fructicola*）^[21-22]，苹果黑星病菌（*Venturia inaequalis*）^[23]。DMI 类杀菌剂的抗药性机制较为复杂，抗药性菌株除了存在靶标抗性，即杀菌剂靶标 14 α -脱甲基酶 CYP51 基因突变和过表达导致病原菌产生抗药性^[19, 24-26]；还包括外排转运和解毒代谢酶的变化导致代谢抗性。研究指出，DMI

类药剂的靶标基因 CYP51 的点突变、ABC 转运蛋白基因 *AtrD* 和 MFS 转运蛋白基因 *Mfs1* 的诱导表达，均有可能介导灰葡萄孢（*Botrytis cinerea*）高抗突变体对啉菌唑的抗药性^[27]。研究发现 ABC-G 转运蛋白基因的过量表达是导致草坪草币斑病病菌（*Sclerotinia homoeocarpa*）对丙环唑产生抗药性的原因^[28]。ABC 转运蛋白能够将亲脂性药物和代谢产物排出体外，ABC 转运蛋白基因 AG11A_06082 的过表达能够增强立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）对杀菌剂 SYP-14288 的外排作用从而导致病原菌对杀菌剂的抗药性^[29]。WANG 等^[20]的研究发现，芒果可可毛色二孢咪鲜胺抗性菌株 CYP51 基因及 ABCG 基因的过表达与抗药性的产生有关。这些研究说明抗药性产生的机制不是单一的，可能存在多种机制。有研究表明解毒代谢相关基因的特异性表达与病原菌抗药性有关，如细胞色素 P450，这是一类由含铁血红素蛋白组成的超家族单加氧酶，具有广泛的底物特异性，能够催化多种氧化和还原反应^[30]。此外，谷胱甘肽转移酶（GST）通过催化谷胱甘肽与各

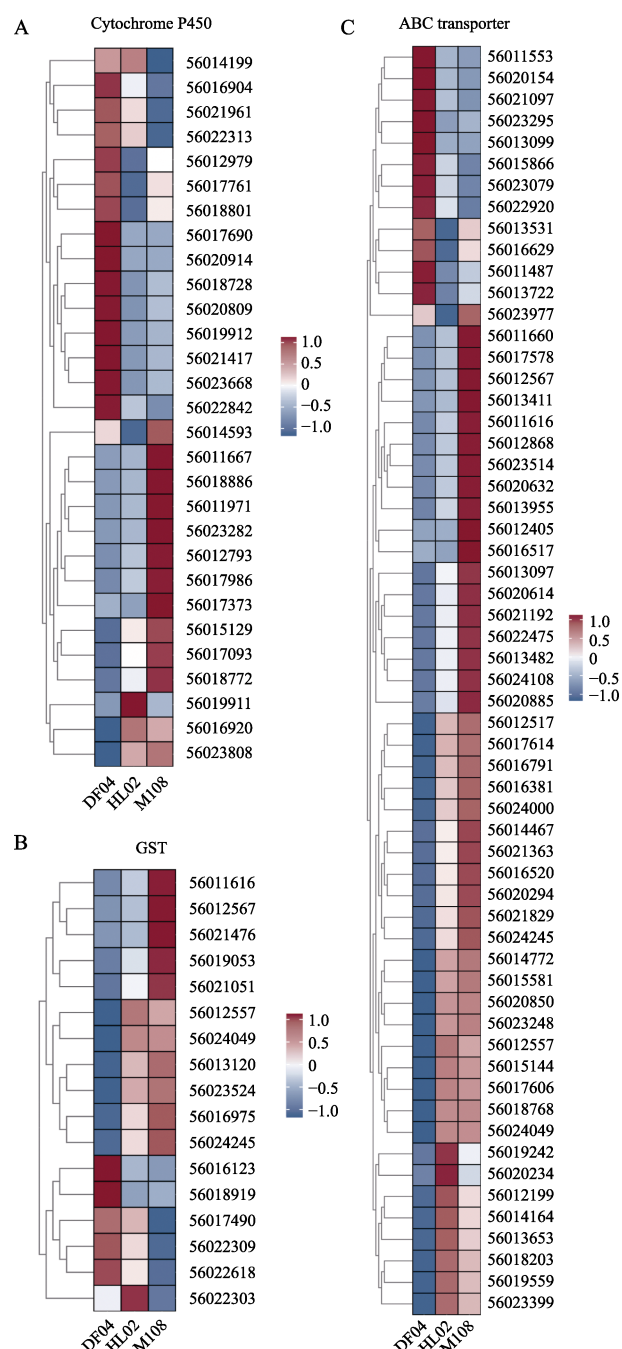


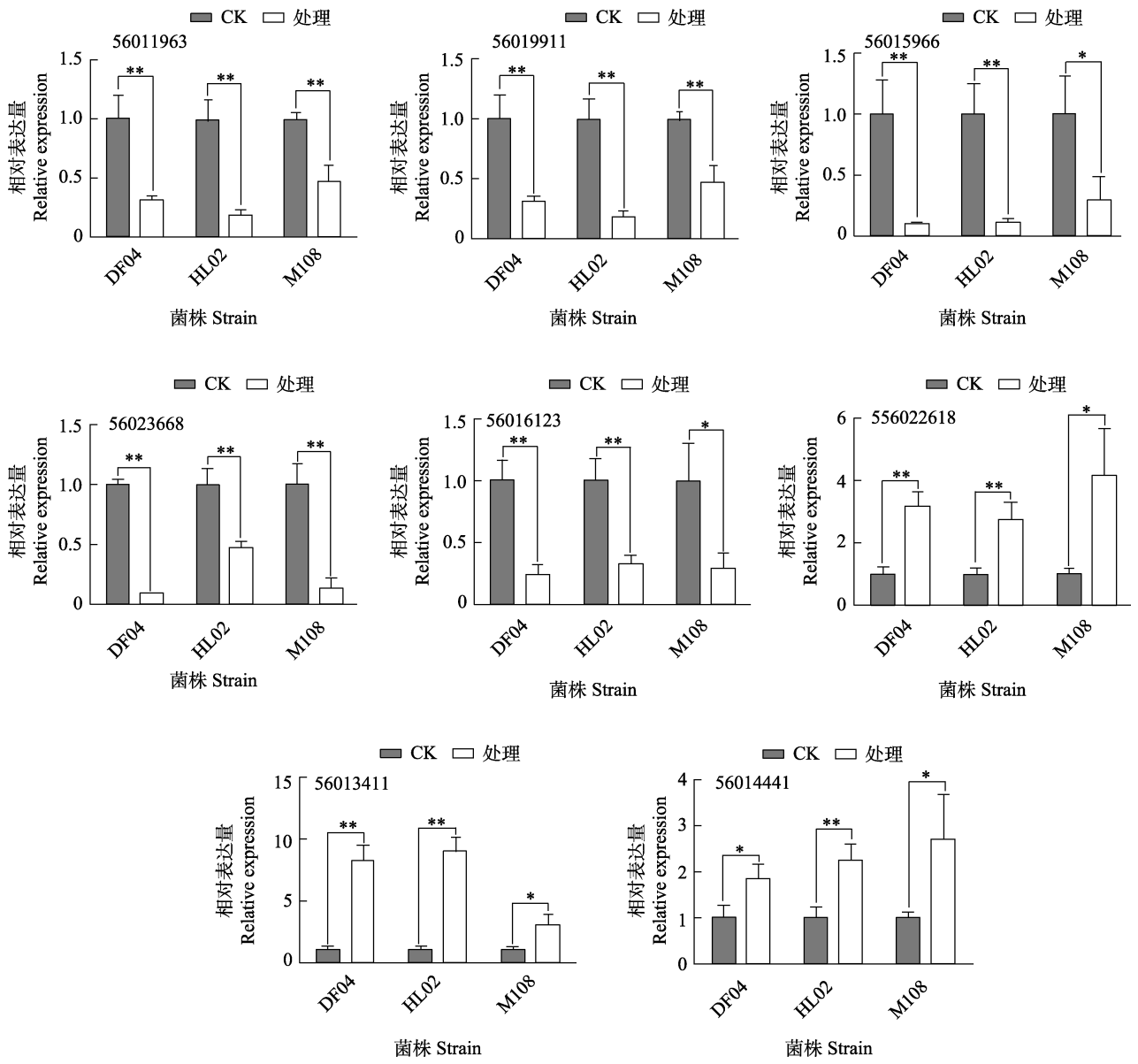
图 5 咪鲜胺处理后与解毒代谢相关的差异表达基因的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of differentially expressed genes related to detoxification metabolism after prochloraz treatment

种疏水性和亲电性基团的结合参与解毒代谢^[31]。细胞色素 P450 基因 *AG1IA_05136* 和谷胱甘肽转移酶基因 *AG1IA_07383* 过表达增强立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 的解毒代谢, 与病原菌对解偶联剂 SYP-14288、百菌清和苯醚甲环唑的多药

抗性有关^[32]。上述研究表明, ABC 转运蛋白基因、细胞色素 P450 基因和谷胱甘肽转移酶基因过表达均与病菌抗药性密切相关。

大量文献报道转录组测序 (RNA-seq) 可以筛选及挖掘抗药性相关基因, 如 HELLIN 等^[33]通过转录组测序发现 *Fusarium culmorum* 在经过戊唑醇处理后, 抗性菌株 *ABC1* 基因的表达量明显高于敏感菌株的表达量。ZHANG 等^[34]通过 RNA-seq 发现 ABC 转运蛋白基因和 MFS 转运蛋白基因参与了 *Penicillium italicum* 对咪鲜胺的抗药性。目前尚未有代谢酶参与可可毛色二孢抗药性的研究报道。因此, 本研究采用 RNA-seq 技术分析对芒果可可毛色二孢咪鲜胺的抗敏菌株进行转录组测序, 对咪鲜胺处理后抗敏菌株之间差异表达基因的分析发现, 2 个抗性菌株的差异表达基因主要集中在代谢通路中。根据 GO 分析和 KEGG 信号通路富集分析, 将筛选出的与解毒代谢相关的细胞色素 P450 基因、谷胱甘肽转移酶基因和 ABC 转运蛋白基因进行进一步比较, 发现 2 个抗性菌株的表达模式基本一致。本研究从转录组数据中筛选出的 7 个细胞色素 P450 基因、8 个谷胱甘肽转移酶基因和 11 个 ABC 转运蛋白基因在咪鲜胺抗敏菌株间显著上调表达。其中, ABC 转运蛋白基因 56017578 和 56024245 在 GO 功能注释上被认为是编码多药耐药转运蛋白的基因, 在灰葡萄孢上发现 ABC 转运蛋白基因 *BcatrB* 敲除突变体对植物抗毒素白藜芦醇和杀菌剂拌种咯的敏感性均增加^[35], 烟曲霉中 ABC 转运蛋白基因 *atrF* 的过表达被证明与伊曲康唑耐药性相关^[36]。已有研究报道烟曲霉和白色念珠菌 ABC 转运蛋白家族的多药耐药转运蛋白基因过表达可能导致真菌的多药抗性^[37]。其它差异表达基因并没有相关文献报道与杀菌剂抗药性相关, 推测这些基因很可能与芒果可可毛色二孢菌株对咪鲜胺的抗药性有关, 但这些基因是否真正参与病原菌抗药性还需要采用基因过表达、基因敲除和 RNAi 等方法进一步验证。本研究首次对可可毛色二孢进行代谢抗药性的研究, 并发现部分细胞色素 P450、谷胱甘肽转移酶和 ABC 转运蛋白基因在咪鲜胺处理芒果可可毛色二孢后显著上调表达, 表明芒果可可毛色二孢对咪鲜胺的抗药性可能与多种代谢途径相关。



*表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 6 咪鲜胺处理后与解毒代谢相关的差异基因的相对表达量
Fig. 6 Expression of differentially expressed genes related to detoxification metabolism after prochloraz treatment

表 4 与代谢抗药性相关差异基因

Tab. 4 Differentially expressed genes (DEGs) related to detoxification metabolism

基因功能 Gene function	基因 ID Gene ID	蛋白 ID Protein ID	基因长度 Length of gene/bp	氨基酸数量 Numbers of amino acid	log ₂ (FC)	
					DF04 vs HL02	DF04 vs M108
细胞色素 P450	56016920	KAF4534497.1	1626	504	3.66	3.41
	56023808	KAF4540033.1	1815	533	2.40	2.62
	56018772	KAF4545714.1	3294	1044	1.72	2.65
	56013120	KAF4537087.1	3084	985	1.70	2.00
	56017986	KAF4546268.1	2335	761	1.14	2.58
	56023282	KAF4541230.1	1618	502	1.07	3.34
	56015129	KAF4537503.1	1282	285	1.07	1.55

续表 4 与代谢抗药性相关差异基因
Tab. 4 Differentially expressed genes (DEGs) related to detoxification metabolism (continued)

基因功能 Gene function	基因 ID Gene ID	蛋白 ID Protein ID	基因长度 Length of gene/bp	氨基酸数量 Numbers of amino acid	log ₂ (FC)	
					DF04 vs HL02	DF04 vs M108
谷胱甘肽转移酶	56012557	KAF4538004.1	3310	1063	2.35	2.16
	56023524	KAF4540579.1	1361	434	2.34	2.57
	56013120	KAF4537087.1	3084	985	1.70	2.00
	56024245	KAF4539782.1	1824	459	1.25	1.68
	56024049	KAF4539912.1	1541	443	1.23	1.21
	56019053	KAF4545392.1	1562	410	1.2	2.21
	56021051	KAF4543290.1	2297	725	1.15	1.89
ABC 转运蛋白	56011616	KAF4539350.1	3303	1083	1.06	2.38
	56012868	KAF4537785.1	4024	1323	3.01	4.98
	56019242	KAF4544985.1	2543	570	2.86	1.91
	56018768	KAF4543798.1	4038	1281	2.23	2.23
	56016520	KAF4534971.1	4223	1291	1.92	2.56
	56014772	KAF4539018.1	848	196	1.18	1.30
	56020614	KAF4543964.1	2758	822	1.72	2.70
	56020294	KAF4544224.1	4882	1587	1.64	2.22
	56016791	KAF4543620.1	5168	1541	1.53	1.84
	56017578	KAF4546591.1	4099	1345	1.43	3.36
	56024245	KAF4539782.1	1824	459	1.25	1.68
	56012517	KAF4538145.1	3378	1072	1.13	1.35

参考文献

[1] 陈小莉, 王萌, 杨叶, 李雨龙. 杧果蒂腐可可球二孢菌致病力测定及杧果主要品种抗病性评价[J]. 果树学报, 2015(3): 481-486.
CHEN X L, WANG M, YANG Y, LI Y L. Evaluation of pathogenicity of *Botryodiplodia theobromae* and resistance to stem-end rots on the main varieties of mango[J]. Journal of Fruit Science, 2015(3): 481-486. (in Chinese)

[2] ÚRBEZ-TORRES J R, LEAVITT G M, GUERRERO J C, GUEVARA J, GUBLER W D. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico[J]. Plant Disease, 2008, 92(4): 519-529.

[3] 蒲金基, 周文忠. 芒果病虫害的监测化学防治指标和化学防治技术[J]. 中国热带农业, 2012(6): 45-48.
PU J J, ZHOU W Z. Chemical control indicators and techniques for monitoring mango diseases and insect pests[J]. China Tropical Agriculture, 2012(6): 45-48. (in Chinese)

[4] 胡美姣, 高兆银, 李敏, 杨凤珍, 郑服丛. 热水和 1-MCP 处理对杧果贮藏效果的影响[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 243-246.
HU M J, GAO Z Y, LI M, YANG F Z, ZHENG F C. Effect of hot water and 1-MCP treatments on storage of mango fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(3): 243-246. (in Chinese)

[5] 杨叶, 何书海, 张淑娟, 胡美姣. 海南芒果炭疽菌对多菌灵的抗药性测定[J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 73-77.
YANG Y, HE S H, ZHANG S J, HU M J. Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* from mango in Hainan to carbendazim[J]. China Journal of Tropical Crops, 2008, 29(1): 73-77. (in Chinese)

[6] 叶滔, 马志强, 毕秋艳, 牛芳胜, 韩秀英, 张小风, 王文桥, 张利辉. 植物病原真菌对甾醇生物合成抑制剂类 (SBIs) 杀菌剂的抗药性研究进展[J]. 农药学报, 2012, 14(1): 1-16.
YE T, MA Z Q, BI Q Y, NIU F S, H X Y, ZHANG X F, WANG W Q, ZHANG L H. Research advances on the resistance of plant pathogenicfungi to SBIs fungicides[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2012, 14(1): 1-16. (in Chinese)

[7] MIAH M A, ELZAKI M E A, HUSNA A, HAN Z J. An overexpressed cytochrome P450 CYP439A1v3 confers deltamethrin resistance in *Laodelphax striatellus* Fallén (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2019, 100(2): e21525.

[8] PAVLIDI N, VONTAS J, VAN L T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors[J]. Current Opinion in Insect Science,

- 2018, 27: 97-102.
- [9] SANG H, HULVEY J P, GREEN R, XU H, IM J, CHANG T, JUNG G. A xenobiotic detoxification pathway through transcriptional regulation in filamentous fungi[J]. MBio, 2018, 9(4): 1110-1128.
 - [10] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, GU J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
 - [11] LANGMEAD B, SALZBERG S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
 - [12] LOVE M I, HUBER W G, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 1-21.
 - [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [14] YANG Y, DI Z G, ZHANG Y, XUE R, HU Y J. Molecular and biochemical characterization of carbendazim-resistant *Botryodiplodia theobromae* field isolates[J]. Plant Disease, 2019, 103(8): 2076-2082.
 - [15] YANG Y, DONG G R, WANG M, XIAN X W, WANG J, LIANG X Y. Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields[J]. Crop Protection, 2021, 145(5): 105611.
 - [16] HE R, YANG Y, HU Z Z, XUE R, HU Y J. Resistance mechanisms and fitness of pyraclostrobin-resistant isolates of *Lasiodiplodia theobromae* from mango orchards[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e253659.
 - [17] AL-JABRI M K, AL-SHAILI M, AL-HASHMI M, NASEHI A, AL-MAHMOOLI I H, AL-SADI A M. Characterization and evaluation of fungicide resistance among *Lasiodiplodia theobromae* isolates associated with mango dieback in Oman[J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 4(3): 753-759.
 - [18] LI Y, TSUJI S S, HU M J, CÂMARA MARCOS P S, MICHEREFF S J, SCHNABEL G, CHEN F P. Characterization of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya in Brazil[J]. Pest Management Science, 2020, 76(4): 1344-1352.
 - [19] WANG C G, XU L X, LIANG X Y, WANG J, XIAN X W, ZHANG Y, YANG Y. Molecular characterization and over-expression of the difenoconazole resistance gene *CYP51* in *Lasiodiplodia theobromae* field isolates[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 24299.
 - [20] WANG C G, XU L X, LIANG X Y, ZHANG Y, ZHENG H Y, CHEN J L, YANG Y. Biochemical and molecular characterization of prochloraz resistance in *Lasiodiplodia theobromae* field isolates[J]. Plant Disease, 2023, 107(1): 177-187.
 - [21] CHEN S N, SCHNABEL G, YUAN H Z, LUO C X. LAMP detection of the genetic element 'Mona' associated with DMI resistance in *Monilinia fructicola*[J]. Pest Management Science, 2019, 75(3): 779-786.
 - [22] LESNIAK K E, PENG J Y, PROFFER T J, OUTWATER C A, ELDRED L I, ROTHWELL N L, SUNDIN G W. Survey and genetic analysis of demethylation inhibitor fungicide resistance in *Monilinia fructicola* from Michigan orchards[J]. Plant Disease, 2021, 105(4): 958-964.
 - [23] HOFFMEISTER M, ZITO R, BOEHM J, STAMMLER G. Mutations in *Cyp51* of *Venturia inaequalis* and their effects on DMI sensitivity[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2021, 128(6): 1467-1478.
 - [24] LICHTENBERG P S F, LUO Y, MORALES R G, MUEHLMANN-FISCHER J M, MICHAILIDES T J, LOUISE L, MIO M D. The point mutation G461S in the *MfCYP51* gene is associated with tebuconazole resistance in *Monilinia fructicola* populations in Brazil[J]. Phytopathology, 2017, 107(12): 1507-1514.
 - [25] KUMAR R, MAZAKOVA J, ALI A, SUR V P, SEN M K, BOLTON M D, MANASOVA M, RYSANEK P, ZOUHAR M. Characterization of the molecular mechanisms of resistance against DMI fungicides in *Cercospora beticola* populations from the Czech Republic[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(12): 1062.
 - [26] ZHANG Y, ZHOU Q, TIAN P Y, LI Y, DUAN G H, LI D L, ZHAN J S, CHEN F P. Induced expression of *CYP51* associated with difenoconazole resistance in the pathogenic *Alternaria* sect. on potato in China[J]. Pest Management Science, 2020, 76(5): 1751-1760.
 - [27] CHEN L, SUN B X, ZHAO Y, MIAO Z Y. Molecular mechanisms and biological characteristics of *Botrytis cinerea* field isolate resistance to pyrisoxazole in Liaoning province[J]. Plant Disease, 2024, 108(4): 866-876.
 - [28] SANG H, HULVEY J, POPKO JR J T, LOPES J, SWAMINATHAN A, CHANG T Y, JUNG G H. A pleiotropic drug resistance transporter is involved in reduced sensitivity to multiple fungicide classes in *Sclerotinia homoeocarpa* (FT Bennet)[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(3): 251-261.
 - [29] CHENG X K, ZHANG J T, LIANG Z Y, WU Z C, LIU P F, HAO J J, LIU X L. Multidrug resistance of *Rhizoctonia solani* determined by enhanced efflux for fungicides[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2023, 195: 105525.
 - [30] LU K, SONG Y Y, ZENG R S. The role of cytochrome P450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics[J]. Current Opinion in Insect Science, 2021, 43: 103-107.
 - [31] SEVASTOS A, LABROU N E, FLOURI F, MALANDRAKIS A. Glutathione transferase-mediated benzimidazole-res-

- istance in *Fusarium graminearum*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2017, 141: 23-28.
- [32] CHENG X, DAI T, HU Z, CUI T S, WANG W, HAN P, HU M, HAO J, LIU P, LIU X. Cytochrome P450 and glutathione S-transferase confer metabolic resistance to SYP-14288 and multi-drug resistance in *Rhizoctonia solani*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 806339.
- [33] HELLIN P, KING R, URBAN M, HAMMOND-K K E, LEGRÈVE A. The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (*FcABC1*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1385.
- [34] ZHANG Y C, ZHANG B, LUO C X, FU Y P, ZHU F X. Fungicidal actions and resistance mechanisms of prochloraz to *Penicillium digitatum*[J]. Plant Disease, 2021, 105(2): 408-415.
- [35] SCHOONBEEK H, SORBO G D, WAARD M A D. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(4): 562-571.
- [36] SLAVEN J W, ANDERSON M J, SANGLARD DQ, DIXON GK, BILLE J, ROBERTS I S, DENNING D W. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate[J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 199-206.
- [37] WANG Q, CUI Z F. Pleiotropic drug resistance ABC transporters in fungi[J]. Yi Chuan, 2011, 33(10): 1048-1056.