



# 内生真菌印度梨形孢诱导小麦抗根腐病作用研究

郝瑞颖<sup>1</sup>, 李亮<sup>1\*</sup>, 杨秀荣<sup>2</sup>, 马皓轩<sup>1</sup>, 史硕<sup>1</sup>, 冯宇<sup>1</sup>

1 河北工业大学化工学院, 天津 300401

2 天津市农业科学院植物保护研究所, 天津 300384

郝瑞颖, 李亮, 杨秀荣, 马皓轩, 史硕, 冯宇. 内生真菌印度梨形孢诱导小麦抗根腐病作用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3292-3309.

HAO Ruiying, LI Liang, YANG Xiurong, MA Haoxuan, SHI Shuo, FENG Yu. Endophytic fungus *Piriformospora indica* induces wheats against root rot[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3292-3309.

**摘要:**【目的】明确印度梨形孢(*Piriformospora indica*)诱导小麦对根腐病产生抗性的作用机制。【方法】用印度梨形孢悬液浸种,以无菌培养液为对照,用病原菌禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)侵染小麦,对其相关生理生化指标及转录组变化进行分析。【结果】禾谷镰孢菌能诱导小麦产生过氧化氢,降低细胞内水含量,破坏细胞膜的稳定性;根部定殖印度梨形孢的小麦细胞内抗氧化酶活性增强,活性氧自由基含量降低,胞内水含量提高,细胞膜稳定性增强;印度梨形孢定殖能改变由于病原菌引起的 mRNA 转录组变化,抗性相关基因的表达增强。综合表明印度梨形孢定殖能有效地提高小麦对禾谷镰孢菌的抗性。【结论】研究结果为深入理解植物与微生物互作、开发新型高效环保抗根腐病生物制剂提供理论和实验依据。

**关键词:** 小麦; 根腐病; 印度梨形孢; 诱导抗性

资助项目: 国家自然科学基金(31801948); 河北省省级科技计划资助(19226505D); 河北省自然科学基金(C2021202005)  
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801948), the S&T Program of Hebei Province (19226505D), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2021202005).

\*Corresponding author. E-mail: liangli@hebut.edu.cn

Received: 2022-12-13; Accepted: 2023-02-24; Published online: 2023-03-07

# Endophytic fungus *Piriformospora indica* induces wheats against root rot

HAO Ruiying<sup>1</sup>, LI Liang<sup>1\*</sup>, YANG Xiurong<sup>2</sup>, MA Haoxuan<sup>1</sup>, SHI Shuo<sup>1</sup>, FENG Yu<sup>1</sup>

1 School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China

2 Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300384, China

**Abstract:** [Objective] To clarify the mechanism of *Piriformospora indica* in inducing wheats against root rot. [Methods] Seeds were soaked in the suspension of *P. indica*, and the medium without *P. indica* was used as control. After *Fusarium graminearum* infecting wheats, this study analyzed the physiological and biochemical indexes and transcriptome changes. [Results] The pathogen *F. graminearum* induced the production of hydrogen peroxide in wheats, reduced the intracellular water content, and destroyed the stability of the membrane. The colonization of *P. indica* increased the activity of intracellular antioxidant enzymes and reduced the accumulation of oxygen free radicals in cells. Intracellular water content was further maintained, and the stability of membranes was enhanced. The colonization of *P. indica* also reprogrammed the mRNA transcriptome changes caused by *F. graminearum*. The expression of resistance-related genes was enhanced. Based on the above results, *P. indica* effectively improved the resistance of wheats to *F. graminearum*. [Conclusion] The implementation of the work will provide theoretical basis and experimental basis for in-depth understanding of plant-microbe interaction and development of new efficient and environmentally friendly root rot agents.

**Keywords:** wheats; root rot; *Piriformospora indica*; induced resistance

小麦是全球重要粮食作物, 中国是世界最大的小麦生产国和消费国, 小麦产量的稳定对于保障全国乃至世界粮食安全具有重要意义<sup>[1]</sup>。近年来, 受全球温度升高及耕作栽培措施的影响, 小麦根腐病发病范围逐渐扩大并多次流行。由禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)引起的小麦根腐病是影响小麦生长发育的真菌病害之一<sup>[2]</sup>, 在小麦的全生育期都可以发病<sup>[3]</sup>, 可危害小麦各个部位, 抑制种子发芽, 造成根系腐烂死亡、茎弯曲、叶枯萎死亡, 降低小麦籽粒饱满度, 导致小麦减产 30%–70%<sup>[4]</sup>。目前, 防治根腐病害主要采用化学防治法, 但该法带来的环境污染、农药残留问题日益严峻。随着人们对食品安全和环境保护意识的增强, 生物防治法因

其成本低、效率高、环境友好、无药物残留等优势, 成为当前的研究热点<sup>[5]</sup>。

印度梨形孢(*Piriformospora indica*)于1998年由印度科学家 Verma 等<sup>[6]</sup>从印度西北部地区塔尔沙漠的灌木根际分离而得。该真菌可以定殖于大麦、小麦、水稻、玉米、拟南芥、烟草等 200 多种植物根部<sup>[7]</sup>。*P. indica* 在植物根部定殖能够协助寄主植物更有效地吸收和利用磷、氮等营养物质<sup>[8]</sup>, 促进植物生长, 提高植株生物产量<sup>[9]</sup>。Taghinasab 等<sup>[10]</sup>证实了 *P. indica* 能够在富磷条件下增加小麦的磷吸收能力, 促进生长, 提高产量。此外, *P. indica* 在植物根部定殖能够增强植物对生物胁迫的抗性, 如 *P. indica* 能够有效地提高拟南芥对大丽轮枝菌

(*Verticillium dahliae*)的抗性<sup>[11]</sup>, 可以通过激活大麦根系的抗氧化酶活性增强抗病性, 降低根腐病的发病率<sup>[12]</sup>; 还能增强烟草<sup>[13-15]</sup>、水稻<sup>[16]</sup>、番茄<sup>[17]</sup>、洋葱<sup>[18]</sup>、鹰嘴豆<sup>[19]</sup>等植物对病原菌的抗性。本研究从生理、生化以及转录组水平分析评价了 *P. indica* 预先定殖小麦根部, 诱导小麦抗 *F. graminearum* 的综合作用效果, 以期为小麦病害的生物防治、绿色可持续发展提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

印度梨形孢(*P. indica*)由德国吉森大学 Karl-Heinz Kogel 教授惠赠; 小麦品种为对禾谷镰孢菌无抗性的津农 6 号, 小麦种子及禾谷镰孢菌株由天津农业科学院提供。

### 1.2 真菌的培养

将 *P. indica* 接种到完全培养基(complete medium, CM)上, 23 °C 培养 3 周; 向培养基上倒入 5 mL 无菌 0.05%吐温-20 溶液, 用无菌玻璃棒轻轻刮动菌落, 收集孢子悬液, 重复该操作 3 次, 获得的孢子液用无菌 Miracloth 过滤; 用血球计数板检测孢子密度, 稀释孢子液浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL。禾谷镰孢菌用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养。

#### 1.2.1 *P. indica* 在小麦根部定殖、检测及 *F. graminearum* 侵染

小麦种子经 15% (体积比)次氯酸钠溶液杀

菌 8 min, 用灭菌的蒸馏水冲洗干净; 种子分为 4 种处理: 对照组(CK)、*P. indica* 处理组(PI)、*F. graminearum* 处理组(FG)和 *P. indica*+*F. graminearum* 处理组(PI+FG)。实验设计见表 1, 对于 CK 和 FG 组, 将表面消毒的种子置于润湿纱布, 待发芽后转至灭菌的 1:1 (体积比)沙土混合物, CK 每天浇灌清水, FG 浇灌 14 d 清水后, 实施 *F. graminearum* 侵染。对于 PI 和 PI+FG 组, 23 °C 条件下将表面消毒种子浸入 *P. indica* 悬液中(浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL), 每 8 h 换 1 次新鲜孢子液至种子发芽, 转至灭菌的 1:1 (体积比)沙土混合物, 用 20 mL *P. indica* 孢子悬液浇灌 14 d, 之后 PI 组浇灌清水, PI+FG 组实施 *F. graminearum* 侵染。具体为用破碎机将培养 *F. graminearum* 的固体培养基打碎, 用水稀释后浇灌于植物根部, 再培养 14 d; 温室湿度 85%、温度 23 °C。PI 组培养 7 d 后, 用台盼蓝染色法对小麦根部进行染色, 在显微镜下观察定殖情况。

#### 1.2.2 *P. indica* 与 *F. graminearum* 的对峙实验

将直径 5 mm 的 *P. indica* 菌片置于 CM 培养基的一侧, 于 23 °C 培养 5 d 后, 在培养皿另一侧放置同等大小的 *F. graminearum* 菌片, 观察 2 个真菌共培养 5 d 和 10 d 后的状态。

### 1.3 生理生化指标测定

#### 1.3.1 小麦根长及生物量测定

依照表 1 所述实验设计对小麦植株进行不同处理, 28 d 后对不同处理的 100 株小麦根长和根鲜重进行统计。

表 1 样品处理

Table 1 Respective treatments for different sample

No.	Treatments	Abbreviation	Repeats	<i>P. indica</i> pre-inoculation	Harvest at the day
1	Mock (CK)	Mock	3	-	14 <sup>0</sup> +14 <sup>0</sup>
2	<i>P. indica</i> (PI)	Piri	3	+	14 <sup>pi</sup> +14 <sup>0</sup>
3	<i>F. graminearum</i> (FG)	Fg	3	-	14 <sup>0</sup> +14 <sup>fg</sup>
4	<i>P. indica</i> + <i>F. graminearum</i> (PI+FG)	Piri+Fg	3	+	14 <sup>pi</sup> +14 <sup>fg</sup>

14<sup>0</sup> stands for days irrigation with water; 14<sup>pi</sup> stands for days pre-inoculation of *P. indica*; 14<sup>fg</sup> stands for *F. graminearum* infection for 14 days.

### 1.3.2 小麦叶片相对含水量(relative water content, RWC)测定

当对 FG 组和 PI+FG 组实施 *F. graminearum* 侵染 7 d 和 14 d 后, 测定各组小麦第一叶的鲜重(fresh weight, FW); 将叶片浸入蒸馏水中 24 h, 称重为饱和鲜重(turgid weight, TW), 将叶片于 70 °C 干燥 48 h, 称重为干重(dry weight, DW)。用如下公式计算小麦叶片 RWC:  $RWC = (FW - DW) / (TW - DW)$ 。

### 1.3.3 小麦叶片相对电导率测定

当对 FG 组和 PI+FG 组实施 *F. graminearum* 侵染 7 d 和 14 d 后, 测定各组电导率。取小麦叶片 0.1 g, 用蒸馏水清洗 3 次; 在 25 mL 蒸馏水中浸泡 24 h, 用电导率仪测定浸泡液电导率 C1; 沸水浴 15 min, 冷却至室温后测浸泡液电导率 C2。计算其相对电导率( $C1/C2 \times 100\%$ )。

### 1.3.4 小麦叶片丙二醛含量测定

当对 FG 组和 PI+FG 组实施 *F. graminearum* 侵染 7 d 和 14 d 后, 进行丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定。取各组小麦叶片 0.1 g, 利用硫代巴比妥酸比色法<sup>[20]</sup>测定 MDA 含量。

### 1.3.5 抗氧化酶活性分析

当对 FG 组和 PI+FG 组实施 *F. graminearum* 侵染 12、24、36、48、72、84 h 后, 进行抗氧化酶活性测定。取各组叶片 0.1 g, 加入 3 mL PBS 缓冲液, 将叶片研磨成匀浆, 于 14 000×g、4 °C 离心 20 min, 取上清液即为粗酶液; 采用氮蓝四唑光化还原法<sup>[21]</sup>测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 紫外吸收法<sup>[22]</sup>测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性, 愈创木酚法<sup>[23]</sup>测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性, 紫外吸收法<sup>[24]</sup>测定谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidases, GPX)活性。

## 1.4 转录组数据的获取

用十六烷基三甲基溴化铵

(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法<sup>[25]</sup>对各处理组的小麦根部提取 RNA, 由深圳华大基因科技有限公司测序。转录组数据使用华大基因的 BGI Seq500 系统测序获取。所有的单个基因都由序列拼接得出, 这是一种基于序列聚类软件的冗余消除方法, 然后将单基因与数据库进行比较, 对单基因进行功能标记和聚类分析。

## 1.5 荧光定量 PCR 检测基因表达

对不同处理的实验材料提取 RNA (1 μg), 利用 M-MLV 逆转录酶获得 cDNA 第一链。cDNA 用作实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)的模板, 用特异的 mRNA 引物扩增。采用 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 检测方法, 具体参考文献<sup>[26]</sup>。反应体系包含: 2×Ultra SYBR 混合物 10 μL, 100 ng cDNA 模板, 10 μmol/L 正向和反向引物。PCR 仪器为 Light Cycler96 快速实时 PCR 系统。PCR 程序: 95 °C 5 min; 95 °C 20 s; 56 °C 35 s, 72 °C 35 s, 65 °C 20 s, 30 个循环。以小麦肌动蛋白为内参, 实验重复 3 次。

## 1.6 数据处理

每个实验组设置 3 个平行实验, 采用 SPSS 26.0 的多重比较法对数据进行统计分析, 使用字母标注差异, 并用 Excel 2021 绘图。使用 R 软件(version 4.2.1)对转录组测序分析所得的差异表达基因、基因本体论(gene ontology, GO)功能聚类、KEGG 功能聚类进行可视化。

# 2 结果与分析

## 2.1 *P. indica* 对 *F. graminearum* 的拮抗作用分析

为了说明 *P. indica* 是否对病菌产生抗性, 本研究实施了体外对峙试验, 将 2 种菌块共培养于 CM 培养基上, 发现 *F. graminearum* 的生长速度明显快于 *P. indica*, 且 *P. indica* 对

*F. graminearum* 的生长无影响(图 1A、1B), 说明 *P. indica* 不能分泌抑制 *F. graminearum* 生长的物质。

## 2.2 *P. indica* 对小麦根及生物量的影响

实验通过浸种及根际浇灌的方式实施 *P. indica* 的定殖。对 *P. indica* 悬液浇灌 7 d 的

小麦根部进行台盼蓝染色, 发现根系表皮细胞及细胞间隙出现椭圆形厚垣孢子(图 2A), 表明 *P. indica* 已在小麦根部定殖。由图 2B、2C 可知, *F. graminearum* 感染小麦植株 14 d 后, 与对照相比, PI 处理小麦的根长提高至 12 cm, 而 FG 处理的小麦根长减少了 46%, 甚至出现腐烂现象;

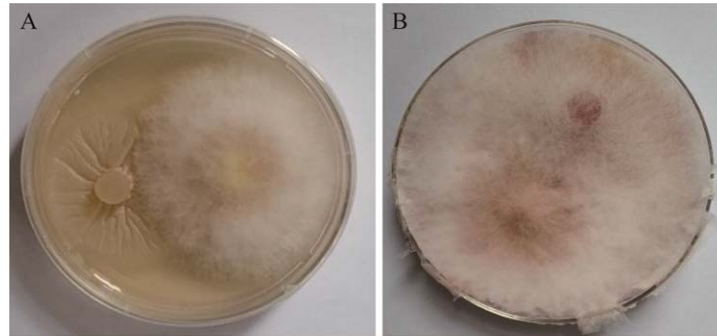


图 1 *Piriformospora indica* 与 *Fusarium graminearum* 的体外对峙

Figure 1 Resistance of *Piriformospora indica* to *Fusarium graminearum* in vitro. A: *P. indica* and *F. graminearum* co-culture for 5 d. B: *P. indica* and *F. graminearum* co-culture for 10 d.

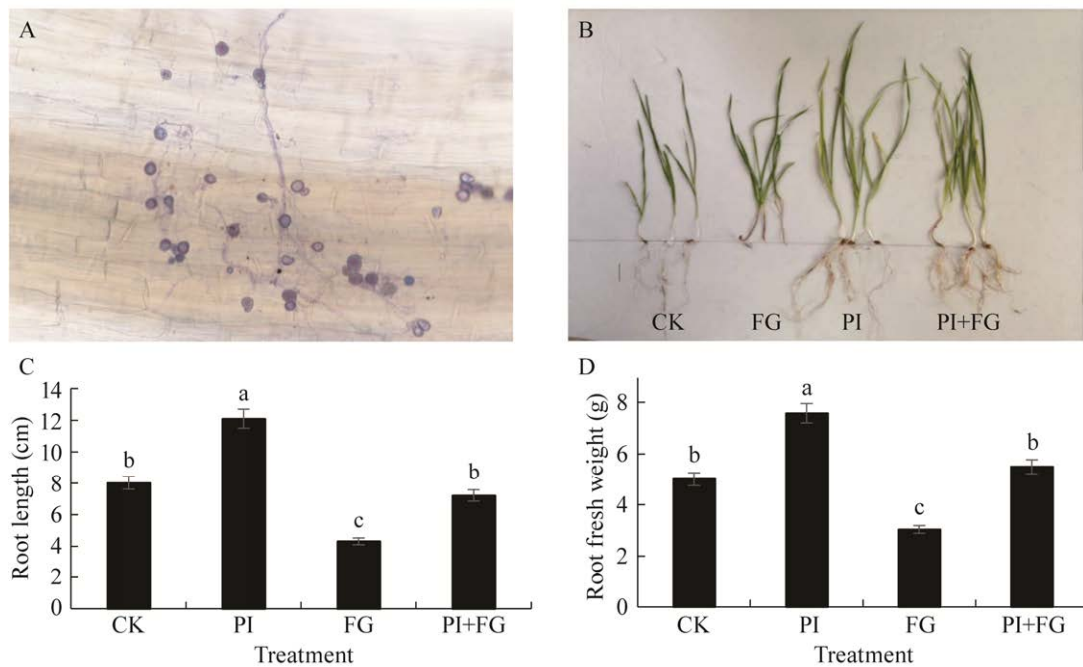


图 2 不同处理对小麦根腐病的影响

Figure 2 Symptoms of root rot caused by *Fusarium graminearum* on wheat roots under different treatment. A: *P. indica* colonization in wheat roots, scale bar=30  $\mu\text{m}$ . B: Symptoms of root rot after 14 d infected with *F. graminearum*, scale bar=5 cm. C: Average length of 100 wheat roots. D: Average fresh weight of 100 wheat roots. Different small letters above the columns represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

PI+FG 较 FG 处理小麦的根系劣化程度轻,根长较其高 75%,根鲜重降低程度明显降低(图 2D)。这说明 *P. indica* 在小麦根部定殖可以有效缓解 *F. graminearum* 引起的根腐病症。

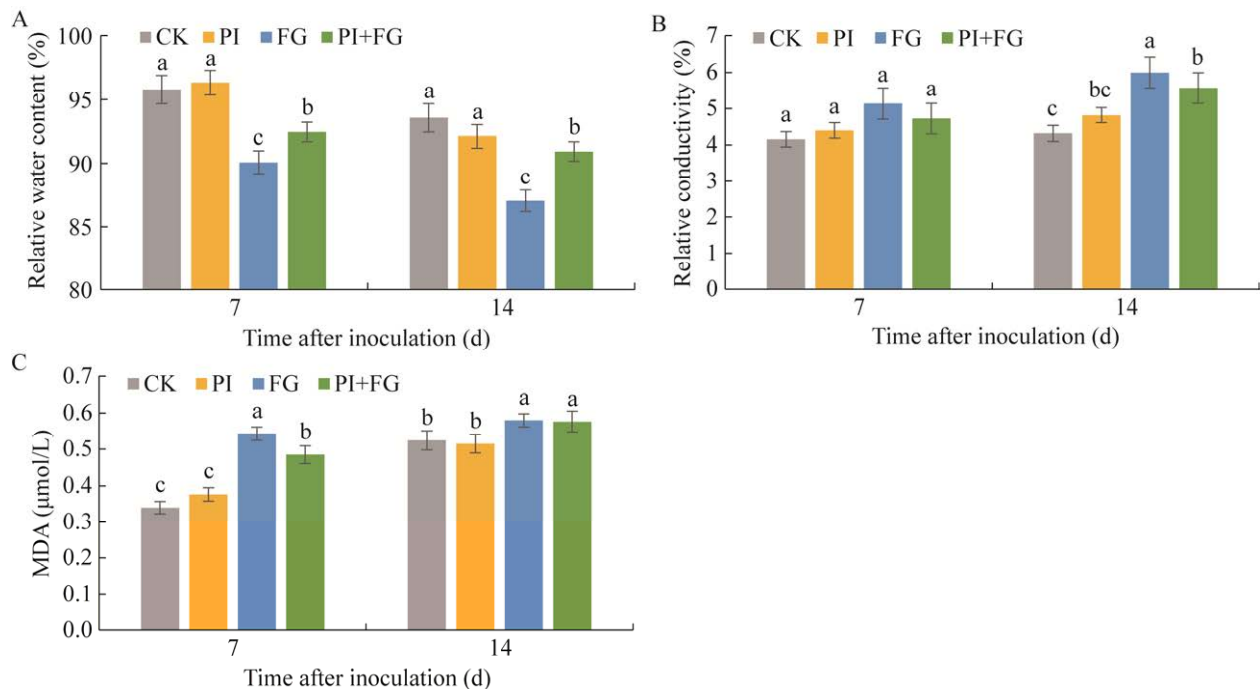
### 2.3 *P. indica* 对小麦相对含水量、相对电导率、丙二醛含量的影响

实验进一步测定了各个处理组的小麦叶片相对含水量和相对电导率。在 *F. graminearum* 侵染 7 d 和 14 d 时,FG 组的 RWC 分别比对照降低了 5.9%和 6.9%,而 PI+FG 组分别降低了 3.4%和 2.8% (图 3A)。对于相对电导率,在 *F. graminearum* 侵染 7 d 和 14 d 时,FG 组的相对电导率分别比对照升高了 23%和 38%,而 PI+FG 组分别升高了 13%和 29%。*P. indica* 定殖缓解了 *F. graminearum* 侵染引起的相对含水量降低和电导率升高(图 3B)。

在 FG 组和 PI+FG 组侵染 *F. graminearum* 7 d 时,FG 组小麦的 MDA 含量较对照升高了 60%,而 PI+FG 组较 FG 组的 MDA 积累减少了 10%。侵染 *F. graminearum* 14 d 后,PI 处理小麦的 MDA 含量与 CK 无明显差异,但明显低于 FG 和 PI+FG 处理的小麦;PI+FG 处理与 FG 处理的 MDA 含量相近,无明显差异(图 3C)。结果表明 *F. graminearum* 侵染的小麦叶片质膜被破坏,膜透性增大,稳定性降低,造成电解质外溢,细胞脱水,MDA 大量积累。而 *P. indica* 在小麦根部定殖可以缓解致病菌引起的膜损伤,提高膜稳定性。

### 2.4 *P. indica* 定殖对小麦叶片抗氧化酶含量的影响

为了研究不同处理对小麦幼苗过氧化氢酶、



**图 3** *Piriformospora indica* 定殖下 *Fusarium graminearum* 对小麦叶片 RWC、相对电导率及 MDA 的影响  
Figure 3 Effects of *Fusarium graminearum* infection on RWC, relative conductivity and MDA of wheat leaves under *Piriformospora indica* colonization. A: Effects of *P. indica* colonization on RWC in wheat leaves. B: Effects of *P. indica* colonization on relative conductivity in wheat leaves. C: Effects of *P. indica* colonization on MDA in wheat leaves. Different small letters above the columns represent significant differences ( $P < 0.05$ ).



过氧化物酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响,对 *F. graminearum* 侵染 12、24、36、48、72、84 h 后的各组小麦叶片进行酶活性测定。PI 处理的小麦 SOD、CAT、POD 及 GPX 含量显著高于对照组(图 4)。FG 处理的小麦 SOD、CAT、POD 及 GPX 含量均呈现先升后降的趋势,并在侵染 72 h 时达到峰值。PI+FG 处理的小麦 SOD、CAT、POD 及 GPX 含量也均呈先升后降的趋势, CAT、POD 及 GPX 在侵染 48 h 后达到峰值, SOD 在侵染 72 h 后达到峰值,且始终高于 FG 处理。这表明 *P. indica* 的定殖可以通过提高抗氧化酶的含量,缓解活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起的损伤,从而减轻 *F. graminearum* 对小麦的损害。

## 2.5 差异基因表达分析

通过华大基因 BGI Seq500 转录组测序,获得了 CK、PI、FG 及 PI+FG 四组的转录组数据。在  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 、 $Q \text{ value} \leq 0.05$  的筛选条件下, PI vs. CK 比较组有 641 个差异基因(其中上调 147 个,下调 494 个)(图 5A),而 FG vs. CK 比较组有 31 355 个差异基因(其中上调 17 859 个,下调 13 496 个),说明 *F. graminearum* 的侵染对小麦的转录组影响极为显著(图 5B);进一步发现,PI+FG vs. CK 比较组有 27 516 个差异基因(其中上调 11 467 个,下调 9 290 个),相较于 FG vs. CK 组表达上调和表达下调的差异基因分别减少了 35.8%和 31.2%(图 5C),转录组数据初步表明 *P. indica* 定殖可以减少 *F. graminearum* 引起的差异基因数量(图 5D)。

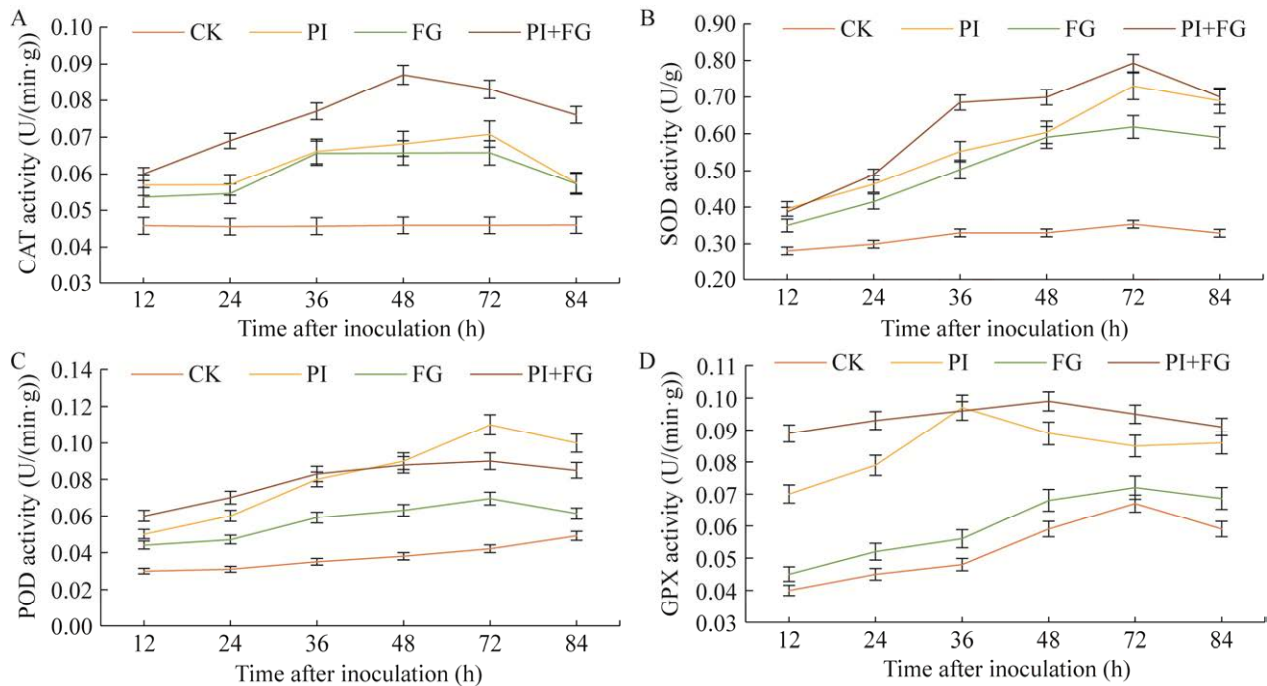


图 4 *Piriformospora indica* 定殖下 *Fusarium graminearum* 对小麦叶片抗氧化酶含量的影响

Figure 4 Effects of *Fusarium graminearum* infection on antioxidant enzymes of wheat leaves under *Piriformospora indica* colonization. A: Effects of *P. indica* colonization on SOD in wheat leaves. B: Effects of *P. indica* colonization on CAT in wheat leaves. C: Effects of *P. indica* colonization on POD in wheat leaves. D: Effects of *P. indica* colonization on GPX in wheat leaves. Error bars represent standard error of the samples.

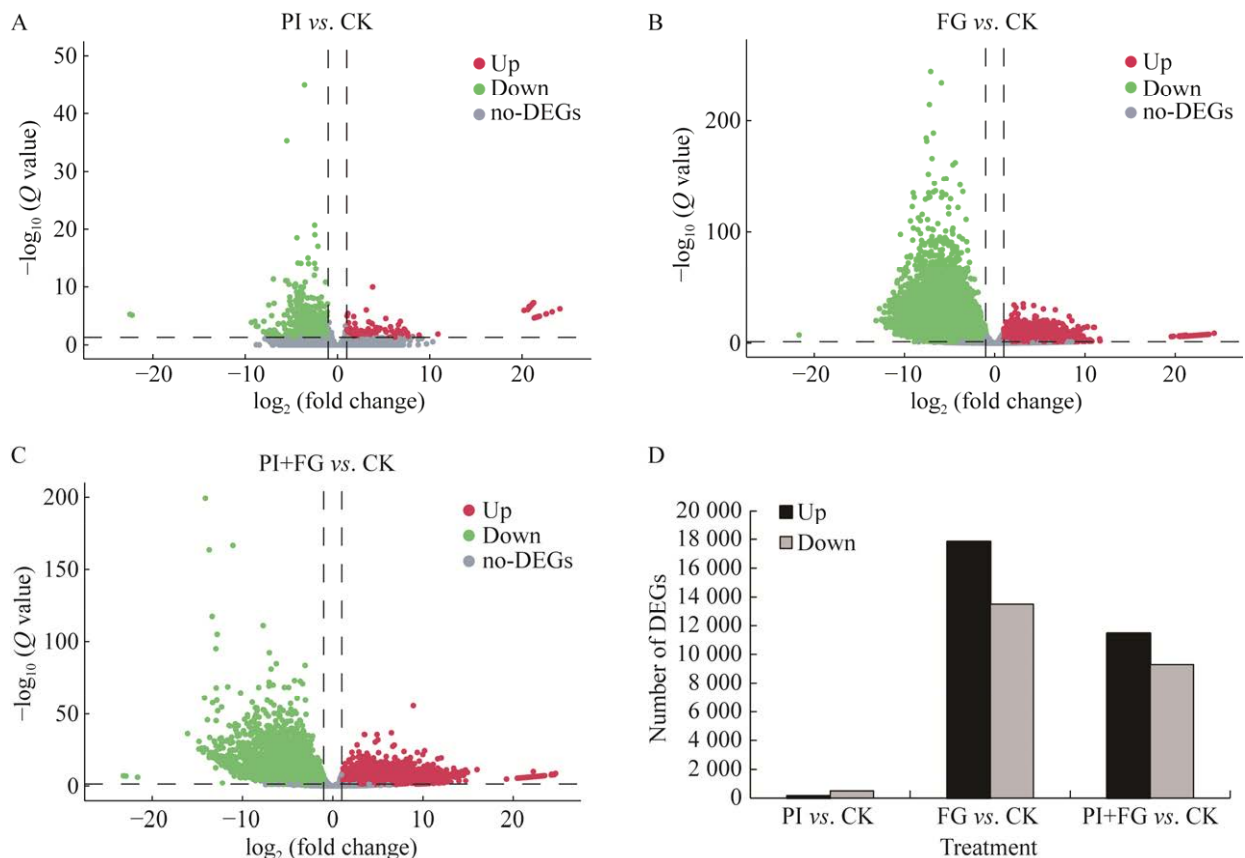


图 5 差异基因火山图

Figure 5 Volcano plot of DEGs. A: Volcano plot of DEGs in PI vs. CK. B: Volcano plot of DEGs in FG vs. CK. C: Volcano plot of DEGs in PI+FG vs. CK. D: Number of DEGs.

## 2.6 差异基因 GO 分析

为了进一步研究差异基因的功能, 本研究对 3 个比较组的差异基因在基因本体论(gene ontology, GO)数据库进行显著性富集分析。GO 富集分为生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF) 3 个一级分类。PI vs. CK 比较组中的差异基因主要富集于 BP 的 20 个条目、CC 的 12 个条目以及 MF 的 8 个条目中; FG vs. CK 比较组中的差异基因主要富集于 BP 的 27 个条目、CC 的 14 个条目以及 MF 的 13 个条目中; PI+FG vs. CK 比较组中的差异基因主要富集于 BP 的 27 个条目、CC 的 16 个条目以

及 MF 的 13 个条目中。3 个比较组的差异基因均主要富集于细胞过程、代谢过程、刺激反应等, CC 中的细胞、细胞组分等, MF 中的结合、催化活性等。此外, 在受 *F. graminearum* 侵染的 2 个比较组中差异基因参与了更多的通路, 且参与通路相同(图 6)。

## 2.7 差异基因 KEGG 分析

为研究差异基因参与的主要代谢途径, 将差异基因根据 KEGG 数据库进行富集。从 KEGG 富集气泡图中可以发现 PI vs. CK 比较组中的差异基因主要富集在植物病原菌互作、MAPK 信号通路-植物和苯丙烷生物合成通路。FG vs. CK 比较组中的差异基因在苯丙烷生物

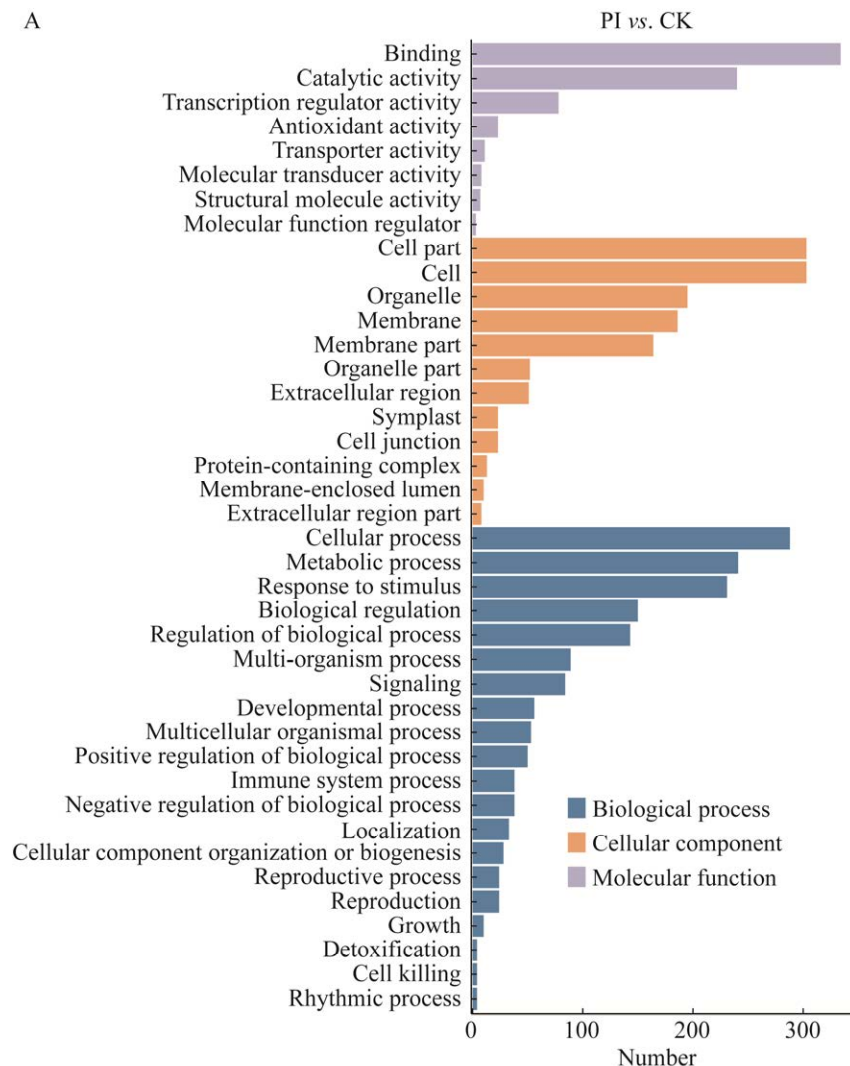


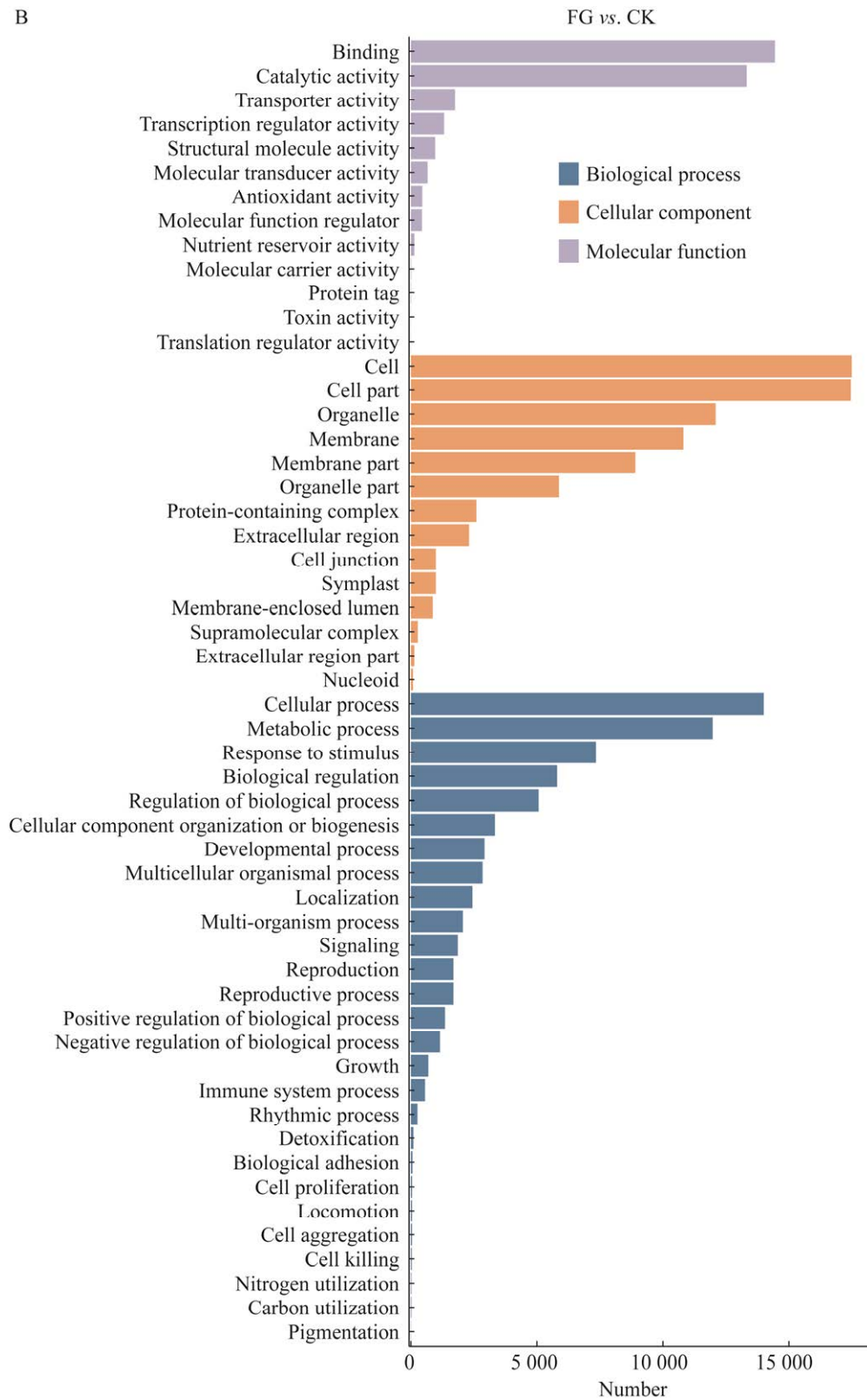
合成通路大量富集,在淀粉和蔗糖代谢、卟啉和叶绿素代谢、碳代谢、谷胱甘肽代谢、类胡萝卜素生物合成等通路富集。PI+FG vs. CK 比较组中的差异基因在苯丙烷生物合成和 MAPK 信号通路-植物上有大量富集,在淀粉和蔗糖代谢、碳代谢、谷胱甘肽代谢、光合作用天线蛋白等通路也有富集(图 7A–7C)。显然,在 FG vs. CK 和 PI+FG vs. CK 比较组中,差异基因大多富集在光合作用天线蛋白、卟啉和叶绿素代谢、碳固定和光合作用、类胡萝卜素生物代谢等光合作用相关通路,说明 *F. graminearum* 通过影响小麦光合作用相关基因表达,导致光合作用强度改变,从而对

小麦生长产生影响。通过对 FG vs. CK 和 PI+FG vs. CK 两组的比较,发现有 5 885 个差异基因是由于 *P. indica* 的定殖引起的,其参与的 KEGG 通路主要有苯丙烷生物合成、MAPK 信号通路-植物、淀粉和蔗糖代谢、不饱和脂肪酸生物合成、半乳糖代谢等(图 7D)。

## 2.8 重要差异基因功能及表达量鉴定

结合 2.7 KEGG 富集分析,综合考虑差异基因的功能、表达量、差异显著程度等条件,筛选出了富集于光合作用路径、转录因子、MAPK 信号通路、植物病原体相互作用以及植物激素信号转导等路径的关键基因,通过





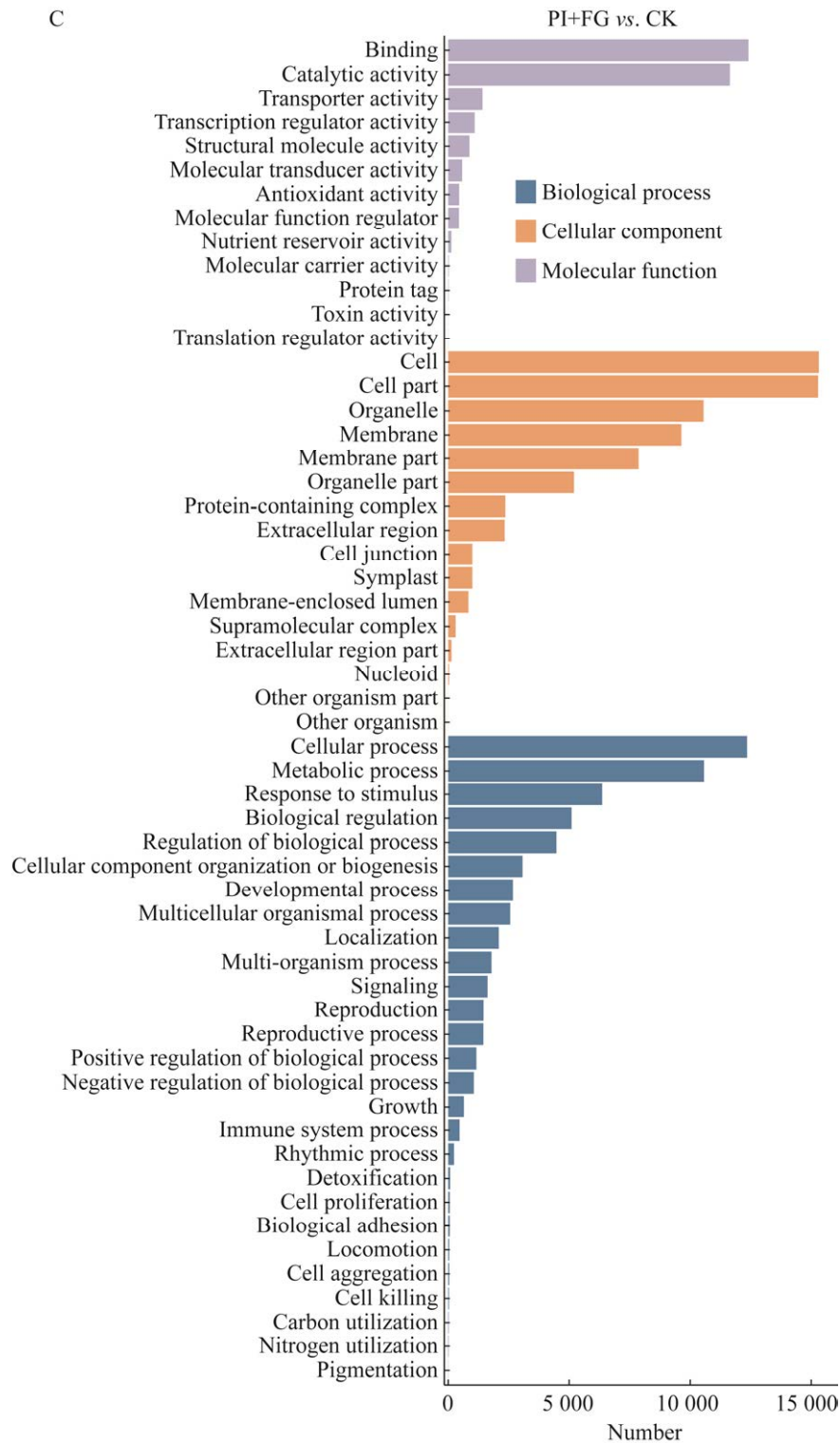


图 6 差异基因 GO 富集图

Figure 6 GO enrichment map of DEGs. A: GO enrichment map of DEGs in PI vs. CK. B: GO enrichment map of DEGs in FG vs. CK. C: GO enrichment map of DEGs in PI+FG vs. CK.

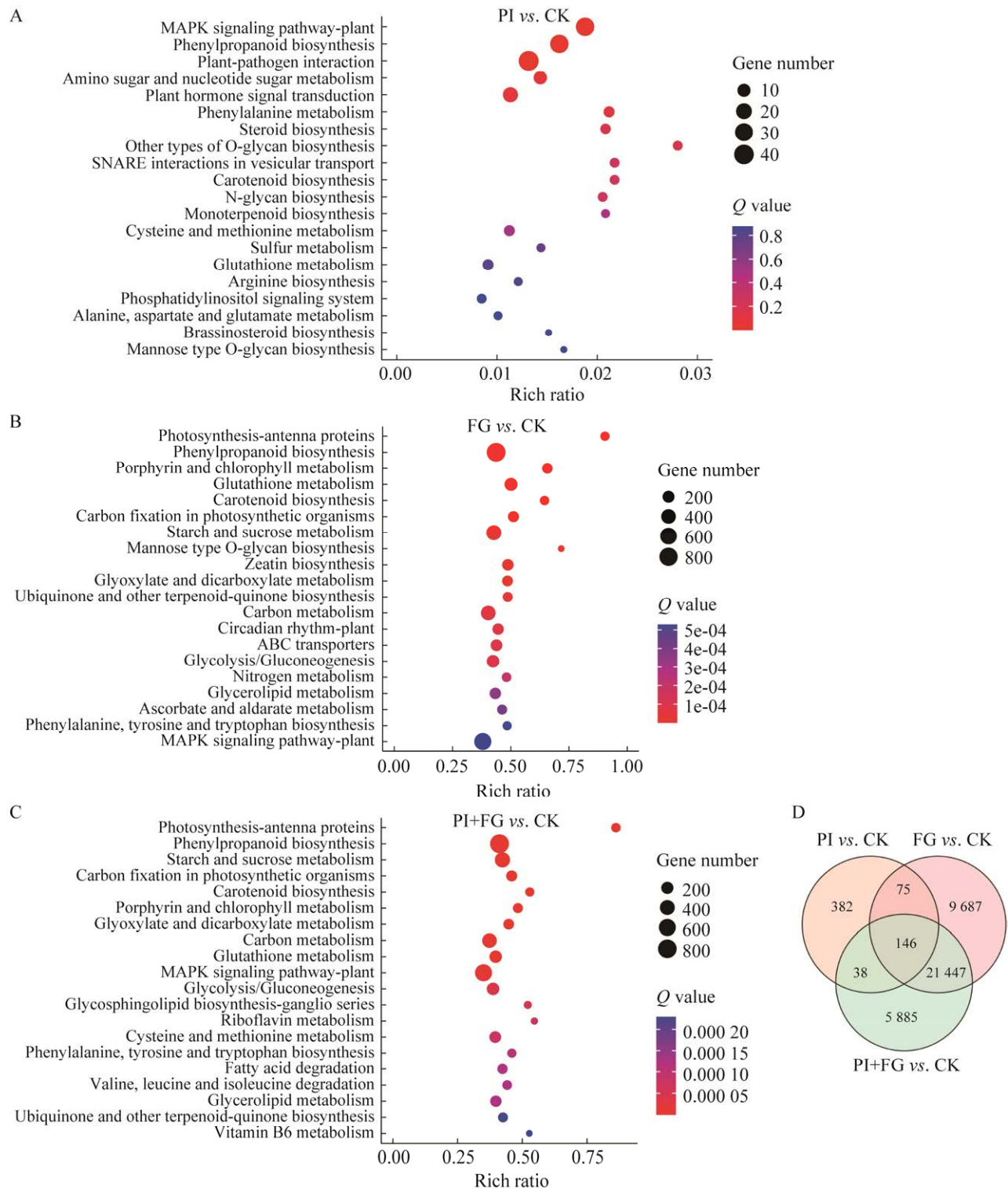


图 7 差异基因 KEGG 富集图及韦恩图

Figure 7 KEGG pathway enrichment map of DEGs and Venn diagram. A: KEGG pathway enrichment map of DEGs in PI vs. CK. B: KEGG pathway enrichment map of DEGs in FG vs. CK. C: KEGG pathway enrichment map of DEGs in PI+FG vs. CK. D: Venn diagram of PI vs. CK, FG vs. CK and PI+FG vs. CK.

NCBI 的 BLAST 分析, 预测了所编码蛋白的功能。如表 2 所示, 几个重要的和抗病相关基因 *TraesCS6B02G107700* (disease resistance protein RGA2-like)、*TraesCS6B02G100000* (disease resistance protein RGA4-like)、*TraesCS5B02G229200* (disease resistance protein RGA1) 和转录因子基因 *TraesCS7A02G376300* (ethylene-responsive transcription factor WIN1-like)、*TraesCS1A02G301100* (transcription factor WRKY19-like)、*TraesCS2B02G517400* (WRKY transcription factor 70) 对 *P. indica* 的定殖做出了响应。此类 WRKY transcription factor like 转录因子参与了赤霉素(gibberellic acid, GA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene, ET)以及植物病原体相互作用等信号通路的调控。本研究对上述关键基因进行表达量检测, 荧光定量 PCR 结果显示上述关键基因在 PI+FG 处理组的表达量均显著高于其他处理组, 表明上述关键基因受 *P. indica* 定殖诱导表达(图 8), 推测此类基因在介导小麦抗病反应中发挥重要作用。

### 3 讨论与结论

目前利用 *P. indica* 作为生物防治方法, 诱导植物抗病性已在番茄、大麦、拟南芥和水稻中得到证实。本文进一步研究了 *P. indica* 定殖小麦介导其抗根腐病 *F. graminearum* 的综合作用效果。研究显示尽管 *P. indica* 在体外对 *F. graminearum* 无直接的拮抗作用, 但预先定殖 *P. indica* 的小麦能明显减轻由于感染 *F. graminearum* 造成的根及茎基部腐烂程度, 说明 *P. indica* 可通过定殖植物体内间接助力小麦对病原菌的抵抗。

病原菌感染植物根部后, 除了引起根部腐烂外, 也会对植物地上部分产生影响, 如叶斑、

叶枯等症状。为了进一步证明根损伤对叶片的影响, 实验测定了叶片的相对含水量、电导率以及 MDA。数据显示, *P. indica* 的定殖能显著缓解由于 *F. graminearum* 感染造成的叶片电导率和 MDA 含量升高, 并提高叶片的相对含水量(图 3)。MDA 是膜脂过氧化的产物, 常被作为判断膜脂过氧化程度的一个重要标准, 膜损伤同时 MDA 含量升高, 研究结果表明印度梨形孢定殖在维持细胞膜的稳定性方面具有重要作用。

另外, 病原菌的感染导致植物体内的活性氧自由基  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $^1O_2$  大量积累, ROS 产生与消耗的平衡被破坏, 造成 ROS 暴发, 导致植物细胞坏死<sup>[27]</sup>。抗氧化酶作为植物内维持这一平衡的物质, 在保持细胞平衡过程中发挥重要作用。有研究表明 *P. indica* 可以保护大麦根系由于 *Fusarium culmorum* 菌引起的抗氧化酶损失<sup>[12]</sup>。本研究发现预先定殖 *P. indica* 不仅能增强根部对病菌的抵抗能力, 还能有效提高叶片 SOD、CAT、POD、GPX 的活性, 从而有助于染病植株清除 ROS。另外, 有理由推测, 抗氧化酶活性的增强可能是 *P. indica* 诱导植物免疫系统的信号, 从而增强植物对病原体的抵抗力。

本研究发现预先定殖 *P. indica* 再接种 *F. graminearum* 的小麦差异基因比直接接种 *F. graminearum* 的差异基因少, 说明 *P. indica* 的定殖降低了植物的发病程度, 减少了由于病原菌 *F. graminearum* 造成的病害胁迫, 因此降低了差异基因的表达数量。另外, 差异基因主要集中在转录因子及激素响应路径(表 2), 且大部分 WRKY 家族基因表达上调(图 8)。Molitor 等<sup>[28]</sup>发现 *P. indica* 定殖诱导大麦防御相关基因 *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 的高水平表达, 从而提高大麦对布氏白粉病菌(*B. lumeria graminis* f. sp. *hordei*)

表 2 PI+FG vs. CK 比较组中重要的差异基因

Table 2 The significant DEGs of PI+FG vs. CK

Gene ID	Reference sequence at NCBI database	Description	Gene ontology
<i>TraesCS7A02G376300</i>	XM_044567539.1	<i>Triticum aestivum</i> ethylene-responsive transcription factor WIN1-like	0009873 ethylene-activated signaling pathway
<i>TraesCS7A02G077000</i>	XM_044569903.1	<i>Triticum aestivum</i> auxin-responsive protein SAUR50-like	0009734 auxin-activated signaling pathway
<i>TraesCS1A02G301100</i>	XM_044576808.1	<i>Triticum aestivum</i> transcription factor WRKY19-like	0000302 response to reactive oxygen species 0009682 induced systemic resistance 0009864 induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway 0010104 regulation of ethylene-activated signaling pathway 0010200 response to chitin 0042742/0050832 defense response to bacterium/ fungus 0080151 positive regulation of salicylic acid mediated signaling pathway 2000022 regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway
<i>TraesCS6B02G107700</i>	XM_044555243.1	<i>Triticum aestivum</i> disease resistance protein RGA2-like	0006952 defense response
<i>TraesCS6B02G100000</i>	XM_044555207.1	<i>Triticum aestivum</i> disease resistance protein RGA4-like	0009626 plant-type hypersensitive response 0009870 defense response signaling pathway, resistance gene-dependent 0010942 positive regulation of cell death 0042742 defense response to bacterium
<i>TraesCS5B02G229200</i>	XM_044533072.1	<i>Triticum aestivum</i> putative disease resistance protein RGA1	0009816 defense response to bacterium, incompatible interaction 0042742 defense response to bacterium
<i>TraesCS4D02G322700</i>	XM_044520955.1	<i>Triticum aestivum</i> catalase-1-like	0042744 hydrogen peroxide catabolic process 0045454 cell redox homeostasis 0009617 response to bacterium 0009737 response to abscisic acid 0042542 response to hydrogen peroxide
<i>TraesCS7D02G161200</i>	XM_044587903.1	<i>Triticum aestivum</i> pathogenesis-related protein PRB1-3	0009607 response to biotic stimulus 0006952 defense response
<i>TraesCS5B02G544900</i>	XM_044535791	<i>Triticum aestivum</i> probable LRR receptor-like protein kinase At1g51890	0004674 protein serine/threonine kinase activity 0042742 defense response to bacterium
<i>TraesCS2B02G517400</i>	XM_044470399.1	<i>Triticum aestivum</i> probable WRKY transcription factor 70	0009742 brassinosteroid mediated signaling pathway 0009864 induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway 0010104 regulation of ethylene-activated signaling pathway 0050832 defense response to fungus 0080151 positive regulation of salicylic acid mediated signaling pathway 1900457 regulation of brassinosteroid mediated signaling pathway 0000302 response to reactive oxygen species 0009682 induced systemic resistance 0010200 response to chitin



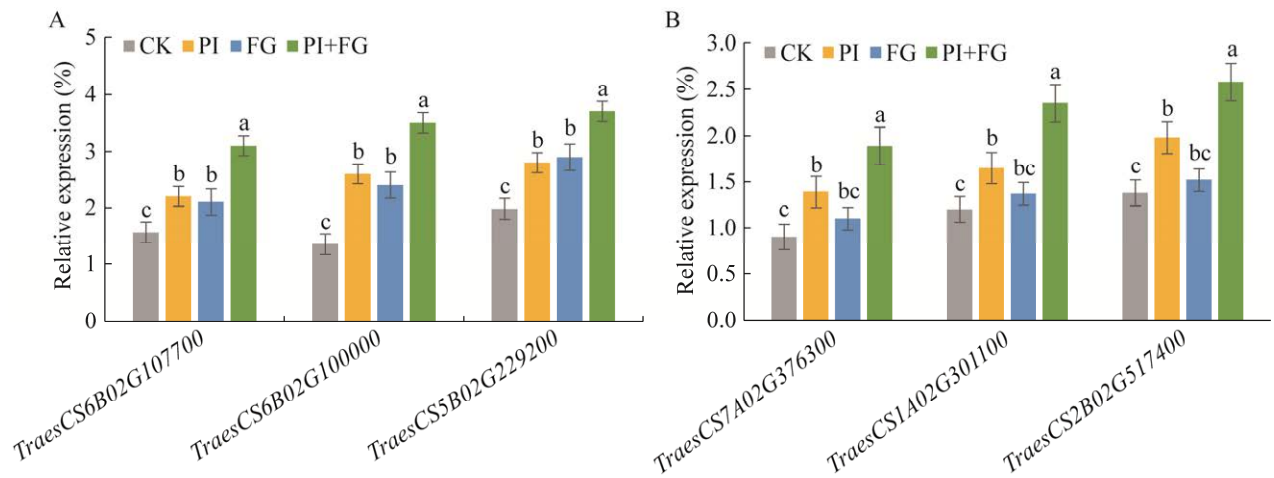


图 8 荧光定量 PCR 检测关键基因的表达

Figure 8 Identification of the critical genes by qPCR. A: Disease resistance genes identification by qPCR including *TraesCS6B02G107700* (disease resistance protein RGA2-like), *TraesCS6B02G100000* (disease resistance protein RGA4-like), and *TraesCS5B02G229200* (disease resistance protein RGA1). B: Transcription factor gene identification by qPCR including *TraesCS7A02G376300* (ethylene-responsive transcription factor WIN1-like), *TraesCS1A02G301100* (transcription factor WRKY19-like), and *TraesCS2B02G517400* (WRKY transcription factor 70). Different small letters above the columns represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

的抗性。然而也有研究表明，预先接种 *P. indica* 降低了黄萎病菌引起的防御基因上调现象<sup>[11,29]</sup>，说明 *P. indica* 引起的其他信号参与调节免疫反应。Lin 等<sup>[30]</sup>发现 *P. indica* 在诱导植物叶片 *PR1* 和 *PR5* 表达的同时，茉莉酸(jasmonic acid, JA)含量也显著增长并激发了依赖于 JA 的系统抗性(induced systemic resistance, ISR)，这说明 *P. indica* 的定殖调控了 JA 介导的信号通路。更多研究表明，*P. indica* 通过调控多种植物激素，如 SA、ET、GA、ABA、生长素(auxin, IAA)从而参与控制植物对病害的抵抗。当然，不同植物对 *P. indica* 定殖的反应存在差异，对激素的调节也不尽相同<sup>[31]</sup>。

另外，本研究分析对比 3 个比较组差异基因参与的 KEGG 通路，发现预先定殖 *P. indica* 的染病小麦中，MAPK 信号通路以及苯丙烷信号通路都有显著差异基因富集，转录因子

WRKY、MYB、bZIP 等也受到诱导表达，ET、IAA、JA、ABA 等激素信号通路也有显著差异基因富集。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应是植物中参与逆境应答的重要信号途径<sup>[32]</sup>。已有报道显示内生菌蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)可以通过 JA/ET 信号通路激活 MAPK 信号和 *WRKY53* 基因的表达，参与病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)触发的免疫反应(PAMP-triggered immunity, PTI)<sup>[33]</sup>。因此，有理由相信，*P. indica* 能够上调 MAPK 信号通路的基因表达，进而调节 MAPK 级联相关的转录因子 WRKY、MYB、bZIP，激活与之有相互作用的 ET、IAA、JA、ABA 等激素介导的信号通路，从而触发机体免疫反应，其深入机制还有待进一步研究。

本研究通过对生理及生化参数的测定，明

确了 *P. indica* 的定殖对 *F. graminearum* 引起的根腐病具有抑制效果。预先定殖 *P. indica* 能缓解由于病原菌感染导致的细胞相对水含量降低及细胞膜的破坏, 能降低丙二醛含量; 能提高小麦抗氧化酶含量, 降低氧自由基对小麦的伤害。小麦转录组测序结果显示, 印度梨形孢定殖对转录组的影响不显著, 却能显著降低由于病原菌造成的转录组重排。通过影响 MAPK 信号通路、植物病原体相互作用以及植物激素信号转导等途径提高植物对病原菌的抵抗。本研究也挖掘到了一些在 *P. indica* 介导抗病过程的关键路径的调控基因包括转录因子、抗性基因等, 为后续的基因功能挖掘研究奠定了基础, 也暗示着今后的基因功能挖掘研究任重道远。

## 参考文献

- [1] 武威, 刘涛, 陈瑛瑛, 孙成明, 陈雯, 杨秉臻. 小麦苗情诊断指标及其监测方法研究进展[J]. 农机化研究, 2016, 38(1): 6-11, 27.  
WU W, LIU T, CHEN YY, SUN CM, CHEN W, YANG BZ. Research progress of diagnostic indicator and monitoring method in wheat seedlings[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2016, 38(1): 6-11, 27 (in Chinese).
- [2] WANG Q, GOTTWALD S. Wheat root-dip inoculation with *Fusarium graminearum* and assessment of root rot disease severity[J]. Bio-protocol, 2017, 7(6): e2189.
- [3] 刘东海, 张学江, 王鹏, 胡诚, 乔艳, 张智, 李双来. 不同施肥处理对小麦根际土壤真菌多样性及根腐病的影响[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(21): 30-34, 50.  
LIU DH, ZHANG XJ, WANG P, HU C, QIAO Y, ZHANG Z, LI SL. Effects of different fertilization treatments on wheat root rot and the diversity of fungi in rhizosphere soil[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(21): 30-34, 50 (in Chinese).
- [4] 张延梅, 王璐, 刘清瑞. 小麦根茎病害诊断及防治方法[J]. 种业导刊, 2018(10): 24-26.  
ZHANG YM, WANG L, LIU QR. Diagnosis and treatment of wheat rhizome disease[J]. Journal of Seed Industry Guide, 2018(10): 24-26 (in Chinese).
- [5] 李兴龙, 李彦忠. 土传病害生物防治研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 204-212.  
LI XL, LI YZ. Research advances in biological control of soil-borne disease[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(3): 204-212 (in Chinese).
- [6] VERMA S, VARMA A, REXER KH, HASSEL A, KOST G, SARBHOY A, BISEN P, BUTEHORN B, FRANKEN P. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus[J]. Mycologia, 1998, 90(5): 896.
- [7] QIANG XY, WEISS M, KOGEL KH, SCHÄFER P. *Piriformospora indica*-a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(5): 508-518.
- [8] KHALID M, RAHMAN SU, HUANG DF. Molecular mechanism underlying *Piriformospora indica*-mediated plant improvement/protection for sustainable agriculture[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2019, 51(3): 229-242.
- [9] JISHA S, SABU KK, MANJULA S. Multifunctional aspects of *Piriformospora indica* in plant endosymbiosis[J]. Mycology, 2019, 10(3): 182-190.
- [10] TAGHINASAB M, IMANI J, STEFFENS D, GLAESER SP, KOGEL KH. The root endophytes *Trametes versicolor* and *Piriformospora indica* increase grain yield and P content in wheat[J]. Plant and Soil, 2018, 426(1): 339-348.
- [11] SUN C, SHAO YQ, VAHABI K, LU J, BHATTACHARYA S, DONG SQ, YEH KW, SHERAMETI I, LOU BG, BALDWIN IT, OELMÜLLER R. The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 268.
- [12] HARRACH BD, BALTRUSCHAT H, BARNA B, FODOR J, KOGEL KH. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2013, 26(5): 599-605.
- [13] 惠非琼, 马杰, 刘剑, 聂长春, 高其康, 楼兵干. 印度梨形孢诱导烟草的抗病性分析[J]. 烟草科技, 2014, 47(11): 74-79.  
HUI FQ, MA J, LIU J, NIE CC, GAO QK, LOU BG. Disease resistance analysis of *Nicotiana tabacum* induced by *Piriformospora indica*[J]. Tobacco Science & Technology, 2014, 47(11): 74-79 (in Chinese).

- [14] 彭兵, 刘剑, 惠非琼, 王玉平, 高其康, 楼兵干. 印度梨形孢诱导烟草对黑胫病的抗性及其机理的初步研究[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(4): 432-440.  
PENG B, LIU J, HUI FQ, WANG YP, GAO QK, LOU BG. *Piriformospora indica* inducing tobacco resistance to black shank and its preliminary mechanism[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(4): 432-440 (in Chinese).
- [15] 曹以衬. 印度梨形孢诱导烟草对青枯病的抗病性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016.  
CAO YC. Study on resistance of tobacco bacterial wilt induced by *Piriformospora indica*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [16] 吴金丹. 印度梨形孢诱导水稻促生、抗逆、抗病作用及其机理的初步研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2014.  
WU JD. Growth promotion, stress tolerance and disease resistance in rice conferred by *Piriformospora indica* and the preliminary study of mechanisms[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
- [17] FAKHRO A, ANDRADE-LINARES DR, von BARGEN S, BANDTE M, BÜTTNER C, GROSCH R, SCHWARZ D, FRANKEN P. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens[J]. Mycorrhiza, 2010, 20(3): 191-200.
- [18] ROYLAWAR P, KHANDAGALE K, RANDIVE P, SHINDE B, MURUMKAR C, ADE A, SINGH M, GAWANDE S, MORELLI M. *Piriformospora indica* primes onion response against *Stemphylium* leaf blight disease[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2021, 10(9): 1085.
- [19] NARAYAN OP, VERMA N, SINGH AK, OELMÜLLER R, KUMAR M, PRASAD D, KAPOOR R, DUA M, JOHRI AK. Antioxidant enzymes in chickpea colonized by *Piriformospora indica* participate in defense against the pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 13553.
- [20] 王宝增, 钟珺珩, 江俊涛, 孔红, 秘树青. 干旱胁迫对两个玉米品种耐旱性的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2020(11): 20-23.  
WANG BZ, ZHONG JH, JIANG JT, KONG H, BEI SQ. Effect of drought stress on drought tolerance of two maize varieties[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2020(11): 20-23 (in Chinese).
- [21] 曲敏, 秦丽楠, 刘羽佳, 范宏臣, 朱姝, 王金凤. 两种检测 SOD 酶活性方法的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(10): 3318-3323.  
QU M, QIN LN, LIU YJ, FAN HC, ZHU S, WANG JF. The comparison of two methods of testing superoxide dismutase activity[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(10): 3318-3323 (in Chinese).
- [22] 田寿乐, 周俊义. 不同贮藏温度与鲜枣果实中保护酶及脂氧合酶活性变化的关系[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(1): 46-49.  
TIAN SL, ZHOU JY. Relationship between different storage temperature and changes of protective enzyme or LOX in fresh Chinese Jujube[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2006, 29(1): 46-49 (in Chinese).
- [23] ZHANG QM, ZHU LS, WANG J, XIE H, WANG JH, HAN YN, YANG JH. Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(1): 201-208.
- [24] CHANCE B, MAEHLI AC. Assay of catalases and peroxidases[M]//Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 1955: 764-775.
- [25] LIAO ZH, CHEN M, GUO L, GONG YF, TANG F, SUN XF, TANG KX. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2004, 34(3): 209-214.
- [26] LI L, GUO NN, FENG Y, DUAN MM, LI CH. Effect of *Piriformospora indica*-induced systemic resistance and basal immunity against *Rhizoctonia cerealis* and *Fusarium graminearum* in wheat[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 836940.
- [27] DEHGHANPOUR-FARASHAH S, TAHERI P, FALAHATI-RASTEGAR M. Effect of polyamines and nitric oxide in *Piriformospora indica*-induced resistance and basal immunity of wheat against *Fusarium pseudograminearum*[J]. Biological Control, 2019, 136: 104006.
- [28] MOLITOR A, ZAJIC D, VOLL LM, PONS-KHNEMANN J, SAMANS B, KOGEL KH, WALLER F. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2011, 24(12): 1427-1439.
- [29] VAHABI K, SHERAMETI I, BAKSHI M,

- MROZINSKA A, LUDWIG A, OELMÜLLER R. Microarray analyses during early and later stages of the *Arabidopsis/Piriformospora indica* interaction[J]. Genomics Data, 2015, 6: 16-18.
- [30] LIN HF, XIONG J, ZHOU HM, CHEN CM, LIN FZ, XU XM, OELMÜLLER R, XU WF, YEH KW. Growth promotion and disease resistance induced in *Anthurium* colonized by the beneficial root endophyte *Piriformospora indica*[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 40.
- [31] XU L, WU C, OELMÜLLER R, ZHANG WY. Role of phytohormones in *Piriformospora indica*-induced growth promotion and stress tolerance in plants: more questions than answers[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1646.
- [32] 尹兵兵, 潘凌云, 付畅. 逆境下植物 MAPK 级联途径基因的表达调控[J]. 分子植物育种, 2022, 20(10): 3257-3265.
- YIN BB, PAN LY, FU C. Regulation of gene expression of plant MAPK cascade pathway under environmental stresses[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(10): 3257-3265 (in Chinese).
- [33] NIE PP, LI X, WANG SE, GUO JH, ZHAO HW, NIU DD. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 238.