



小麦隐匿柄锈菌与小麦互作不同阶段的基因差异表达分析

崔立平¹, 张瑞丰¹, 范学锋^{1,2}, 张维宏¹, 刘大群¹, 杨文香^{1*}

1 河北农业大学植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001

2 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100081

崔立平, 张瑞丰, 范学锋, 张维宏, 刘大群, 杨文香. 小麦隐匿柄锈菌与小麦互作不同阶段的基因差异表达分析. 微生物学报, 2022, 62(1): 90–102.

Cui Liping, Zhang Ruifeng, Fan Xuefeng, Zhang Weihong, Liu Daqun, Yang Wenxiang. Analysis of differentially expressed genes in *Puccinia triticina* at different stages of the interaction between wheat and wheat leaf rust pathogen. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 90–102.

摘要:【目的】小麦叶锈病是影响小麦生产主要病害之一, 其病原菌新小种的出现和劣势小种上升为优势小种导致抗病品种的抗病性不断被克服。小麦隐匿柄锈菌与小麦互作不同阶段差异表达谱分析对于揭示该病菌致病的分子机制, 进而有效防控小麦叶锈病具有重要意义。【方法】利用转录组分析小麦隐匿柄锈菌致病生理小种与感叶锈病小麦品种 MuTcLr19 亲和互作后期(6 d)与互作早期(6、12、24 h)差异基因表达谱, 实验以亲和互作早期(MIQ)为对照组, 亲和互作 6 d (MI6d)为实验组。【结果】测试结果表明, 上调表达基因 19 275 个, 下调表达基因 4 548 个。GO 富集分析发现, 差异表达基因功能主要涉及代谢过程、催化活性、细胞过程、单组织过程、细胞内的细胞器、核酸结合和水解酶活性、氮化合物代谢、细胞代谢过程等。KEGG 分析发现, 差异表达基因共参与了 109 条通路, 筛选出囊泡运输中 SNARE 的相互作用通路、卟啉和叶绿素代谢通路及 ABC 转运通路和病原菌的致病相关。随机取来自这 3 条通路的 5 个基因进行荧光定量分析, 结果表达趋势与转录组表达谱结果一致。【结论】小麦隐匿柄锈菌在早期表达的差异基因注释到的功能更多与小麦隐匿柄锈菌致病性有关, 后期表达的差异基因大部分与小麦隐匿柄锈菌的生长代谢

基金项目: 国家自然科学基金(31571956); 国家重点基础研究发展计划(2013CB127700); 河北省产业体系小麦创新团队基金(HBCT2018010204)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571956), by the Key Basic Research Program of China (2013CB127700) and by the Hebei Industrial System-Wheat Innovation Team Project (HBCT2018010204)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-312-7528585; E-mail: wenxiangyang2003@163.com

Received: 23 February 2021; Revised: 31 March 2021; Published online: 15 April 2021

有关, 早期与后期表达的基因存在明显的差异。研究结果为今后开展小麦隐匿柄锈菌致病机制研究奠定了基础。

关键词: 小麦隐匿柄锈菌; 差异表达分析; RNA-seq 分析; 致病性

Analysis of differentially expressed genes in *Puccinia triticina* at different stages of the interaction between wheat and wheat leaf rust pathogen

CUI Liping¹, ZHANG Ruifeng¹, FAN Xuefeng^{1,2}, ZHANG Weihong¹, LIU Daqun¹, YANG Wenxiang^{1*}

¹ College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, Hebei, China

² Plant Protection Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* (*Pt*) is one of the most damaging diseases in wheat production. The emergence of new races of *Pt* and the rise of inferior races led to the continuous overcoming of the resistance of varieties. Therefore, the analysis of differentially expressed genes of *Pt* in different infection stages is of great significance to reveal the pathogenic molecular mechanism of wheat leaf rust. [Methods] In this study, differentially expression genes in the interaction of pathogenic type THTT of *Pt* and the susceptible wheat (MU19) at the early interaction (inoculated after 6 h, 12 h, 24 h) and a later stage (6 d after inoculation) were analyzed with the RNA-seq transcriptome analysis method. Taking the early stage (MIQ) as the control group, and 6 d of affinity interaction (MI6d) as the experimental group to analysis the differentially expressed genes. [Results] 19 275 unigenes were up-regulated and 4 548 genes were down-regulated at 6 d. GO enrichment analysis found that the function of the differentially expressed unigenes were mainly involved in metabolic processes of catalytic activities, cellular formation processes, single-tissue synthesis, intracellular organelle formation, nucleic acid binding and hydrolase activities, nitrogen compound metabolism, cellular metabolic process, etc. KEGG analysis showed that differentially expressed genes were involved in 109 pathways. The SNARE interaction pathway, porphyrin and chlorophyll metabolism pathway and ABC transporter pathway in vesicle transport were found to be related with pathogenicity of the *Pt*. Five genes were randomly selected from these three pathways for qRT-PCR analysis, and their expression trends were shown consistent with the results of transcriptome expression profile. [Conclusion] The function of the differently expressed genes at the early stages of inoculation may be related to the pathogenicity of the pathogen, while most of the differently expressed genes in the later stage are related to the growth and metabolism in the pathogen. There are obvious differences between the genes expressed at early and later stages. These results are important and provide fundamental references for future studies on the pathogenic mechanism of wheat leaf rust.

Keywords: *Puccinia triticina*; differential expression analysis; RNA-seq transcription analysis; pathogenicity

小麦隐匿柄锈菌(*Puccinia triticina*, *Pt*)引起的叶锈病可严重影响小麦的安全生产^[1]。该病菌是一种专性寄生真菌,通过吸器从寄主细胞内吸取营养物质,与寄主建立相互关系,同时诱导寄主基因重新编程、细胞发生细胞骨架重组、核移动、染色质浓缩等细胞结构改变^[2],还能影响寄主细胞的新陈代谢^[3]。此外,病菌产生的吸器分泌效应蛋白,通过作用于寄主靶标行使其调控功能,进而利于病原菌的生长,抑制寄主的抗病性。由于在亲和互作早期病原菌开始了与寄主的激烈“斗争”,在接种 24 h 便已经产生吸器,接种后第 6 天已经大量形成吸器。因此,*Pt* 侵染早期及 6 d 的差异基因筛选对于揭示其致病机制、探寻防控新靶标具有重要的意义。

目前,基因组、转录组测序已成为挖掘锈菌效应蛋白的重要研究途径。基于测序基础的数字表达谱分析不仅可用于分析基因的表达差异,还利于挖掘控制某一性状的靶标基因。有研究报道,通过对小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Pst*)与 *Yr26* 基因互作文库的筛选,获得了一个编码特定小 GTP 结合蛋白的抗性相关基因 *TaRab18*^[4]。通过对休眠夏孢子、萌发夏孢子、附着胞形成、吸器形成阶段及与非亲和互作 24 h 后的 cDNA 文库分析,发现休眠孢子与萌发阶段存在很高的一致性基因,差异表达基因则较少。在该阶段选出 160 个差异基因,涉及能量代谢、硫代谢的负调节因子和脂类代谢等过程,同时发现 cAMP 依赖性蛋白激酶和 MAP 激酶可能与锈菌的致病性有关^[5]。对 *Pt* 夏孢子休眠阶段和萌发阶段进行分析,揭示出了该阶段的差异表达基因主要参与病菌的 109 条通路,包括 2 条与孢子萌发相关

的通路-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和囊泡运输中的 SNARE 蛋白交流^[6]。Bruce 等^[7]对 6 种不同生理小种的 *Pt* 分别接种于小麦感叶锈病品种 Thatcher 上,并在接种 6 d 后利用 Illumina 平台进行 RNA 测序,共获得了 222 571 条的序列。通过对 2 个不同致病类型 *Pt* Tc284 和 Tc361 进行数字表达谱测序,共得到 2 784 个差异基因,其中 45 个基因在 Tc361 小麦品种中特异表达,26 个基因在 Tc284 小麦品种中特异表达^[8]。然而,关于 *Pt* 的致病机制仍然是需要探索的重要问题。

本研究构建了 *Pt* 致病类型 THTT 与感病品种 MuTcLr19 亲和互作后期(6 d)与早期(6、12、24 h)样品的 cDNA 文库。通过对侵染早期和后期的基因表达进行比较,分析差异表达基因参与的相关通路,旨在找出致病过程中重要的差异基因,以更好地理解 *Pt* 的分子致病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用 *Pt* 单孢分离致病类型为强致病菌株 THTT,感叶锈病小麦品种为 MuTcLr19,均由河北农业大学小麦锈病研究中心提供。

1.2 RNA 准备以及文库的构建

本试验取长势相同、生长 10 d 的 MuTcLr19 小麦苗,接种等量 THTT 的新鲜夏孢子,(20±3) °C 温室培养,每个处理设置 3 个重复。采集接种后 6、12、24 h 和接种后 6 d 的小麦叶片,使用天根 RNA 提取试剂盒(RNeasy Plant Mini Kit, Tiangen, Beijing)提取 RNA,分别命名为 MIQ 和 MI6d,检测合格后委托诺禾致源科技公司进行 RNA-seq 测序。文库利用 Illumina HiSeqTM2000 平台测序构建,测序深度为 12G,

采用 Trinity^[9]拼接, 用 Corset 等^[10]方法比对到转录本的 reads 数和表达模式对转录本进行层次聚类。

1.3 数据分析

根据样品的测序数据, 采用 FPKM 算法 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)^[11]和阈值控制来筛选差异表达基因。FDR \leq 0.001, 并且差异表达倍数不小于 2 倍的基因为差异表达基因。为探求 *Pt* 在亲和互作早期与吸器大量形成的后期分子水平的变化, 本研究根据 *Pt* THTT 侵染寄主 6 d 与早期的差异表达基因进行比较, 通过 GO 注释或 KEGG 注释对差异基因功能进行预测。校正后 P-padj \leq 0.05。

1.4 实时定量 PCR 对差异基因进行分析

取 THTT 侵染 0、6、12、24、36、48、72、96、144、192 和 216 h 的感病小麦品种 MuTeLr19 幼苗, 用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒(TaKaRa)提取 RNA, 通过用 5 \times All-in-One RT MasterMix(abm)反转录得到 cDNA 模板, 以肌动蛋白 actin 为内参, 随机选取参与囊泡运输通路、叶脉和叶绿体代谢通路和 ABC 转运通路的 5 个差异基因进行荧光定量分析, 其中基因 *Cluster-19789.95340* 和 *Cluster-19789.92844* 参与囊泡运输通路, 基因 *Cluster-19789.96016* 和 *Cluster-19789.97955* 参与叶绿体代谢通路, 基因 *Cluster-19789.132267* 参与 ABC 转运蛋白通路。实时定量 PCR 在 20 μ L 反应体系中加入 2 \times TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μ L、基因的上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 补 ddH₂O 至 20 μ L; 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s。实时定量 PCR 结果根据 2^{- Δ C_T} 的方法计算目标序列的相对表达量, 所用引物见表 1。

表 1 用于实时荧光定量分析的引物序列

Unigene ID	Primer sequences (5'→3')
19789.97955-F	GAAACCGCTCCTCATCGTCCATAC
19789.97955-R	GGCAACGGCACGAGTGACAC
19789.132267-F	TGATTGGCTACGCACCTTCCTTTC
19789.132267-R	CTGCGGTGCCTAGCATGTTGG
19789.92844-F	GTTACAGGACCAACTCGGCACTC
19789.92844-R	GGTCGCCCAAGTTTCCCAAGATG
19789.96016-F	GCCCTTCATCGTTCACCTGTCTCG
19789.96016-R	ACCTCGGGATGGTCGGATTTCG
19789.95340-F	CTTCATGTGCATGTCCGAGGAGTC
19789.95340-R	GGTGTGAACGCCGTCAGTCC

2 结果与分析

2.1 基因表达水平分析与差异表达基因的筛选

为保证建库质量, 对原始测序序列(raw reads)进行分析, 其中 MIQ 中的 3 个重复去杂数据读数(clean reads)达到 91.18%、90.28%和 91.04%, 含有 adaptor 和含有未知核苷酸的低质量 reads 分别占 8.82%、9.72%和 8.96%。MI6d 中的 3 个生物学重复 clean reads 均达到 100%, 说明测序质量比较高, 可以用来进行后续的功能注释。本实验对侵染后 6 d (MI6 d)与早期 (MIQ)的差异基因进行分析, 结果发现早期表达的有 51 455 个基因, 而在后期表达的有 56 276 个基因, 这两个阶段中共同表达的基因有 47 837 个, 其中 6 d 特异表达的基因多达 8 439 个, 早期特异表达基因为 3 618 个 (图 1)。



图 1 接种 *Pt* 6 d 后(MI6 d)与早期(MIQ)的表达基因韦恩图

Figure 1 Venn diagram of expressed genes at 6 d (MI6 d) and early (MIQ) stages of infection after *Pt* inoculation.

2.2 差异基因的 GO 富集分析

用 goseq 方法^[12]对差异基因进行了 GO 富集分析, 差异基因分布于生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)这 3 类。侵染 6 d 与早期相比, 上调的 19 275 个差异基因中有 12 176 个基因注释到 GO 数据库, 下调基因中有 2 962 个注释到 GO 数据库。在上调表达的差异基因中代谢过程(metabolic process)、细胞组分(cell component)、核酸结合(nucleic acid binding)分别各占 BP、CC 和 MF 过程的比例最多。在下调表达的差异基因中所占各类别最高的过程有: 代谢过程(metabolic process)、细胞组分(cell component)、氧化还原活性(oxidoreductase activity)。其他大量表达的基因中涉及生物合成过程(biosynthetic process)、有机氮化合物代谢过程(organonitrogen compound metabolic process)、氮化合物代谢过程(nitrogen compound metabolic process)、细胞生物合成的过程(cellular biosynthetic process)、有机物生物合成过程(organic substance biosynthetic process)、单生物细胞过程(single-organism cellular process)、细胞内(intracellular part)等, 由此发现侵染 6 d 大部分上调表达的基因参与了代谢过程以及合成过程, 因此推测大部分基因可能参与了病原菌的生长代谢(图 2)。

在侵染早期特异表达的 3 618 个基因中, 有 2 398 个基因注释到了 GO 的功能注释, 涉及信号传导、转运活性、分子功能和催化活性等功能。基因 *Cluster-3694.0* 具有超氧化物歧化酶(SOD)活性, 而基因 *Cluster-19789.100570* 还参与了内吞作用的通路。另外有 5 个基因参与了 MAPK 信号通路, 其中基因 *Cluster-29416.1* 编码了 Ras 同源基因家族, *Cluster-19789.20697*、

Cluster-3353.0、*Cluster-7141.0* 和 *Cluster-26469.1* 编码了多功能伴侣。在 6 d 特异表达的差异基因中有 4 739 个基因注释到了 GO 的功能注释, 涉及生长因子的结合、RNA 代谢过程、细胞内氨基酸的代谢过程、细胞生物合成过程、有机氮化合物的代谢过程和核苷酸生物合成过程等, 其中有 121 个基因注释到蛋白质泛素化功能。

2.3 差异表达基因的 KEGG 分析

在 *Pt* THTT 侵染感病小麦 6 d 与早期阶段中, 有 4 980 个差异基因具有 KEGG 注释, 其中上调表达的有 4 332 个, 下调表达的有 648 个, 它们被注释到锈菌的 109 条代谢通路(pathways)。在上调表达的差异基因中, 参与核糖体代谢途径、氧化磷酸化、嘌呤代谢和内吞作用途径富集的差异基因较多, 下调表达的差异基因中, 参与内质网蛋白质加工、糖酵解和糖质新生富集的差异基因较多。其中 3 条通路可能与致病相关, 分别是囊泡运输中 SNARE 的相互作用通路、卟啉和叶绿素代谢通路和 ABC 转运蛋白通路。其中 SNARE 蛋白是囊泡运输过程中重要的蛋白, 此代谢通路中有 18 个差异表达基因(表 2), 其中上调表达基因有 16 个, 下调表达基因 2 个。基因 *Cluster-19 789.108 986*、*Cluster-19 789.953 40*、*Cluster-19 789.875 30*、*Cluster-19 789.688 92*、*Cluster-19 789.880 51*、*Cluster-19 789.105 492*、*Cluster-19 789.105 491* 参与了囊泡介导的运输。叶绿素代谢通路中上调差异表达的基因有 36 个, 且基因 *Cluster-19 789.979 55* 注释到的功能为参与叶绿素代谢过程。ABC 转运蛋白通路中富集了 21 个差异表达基因(表 3), 其中上调表达的有 13 个差异基因, 下调表达的有 8 个差异基因。ABC 转运通路中上调基因 *Cluster-19789.87233*、

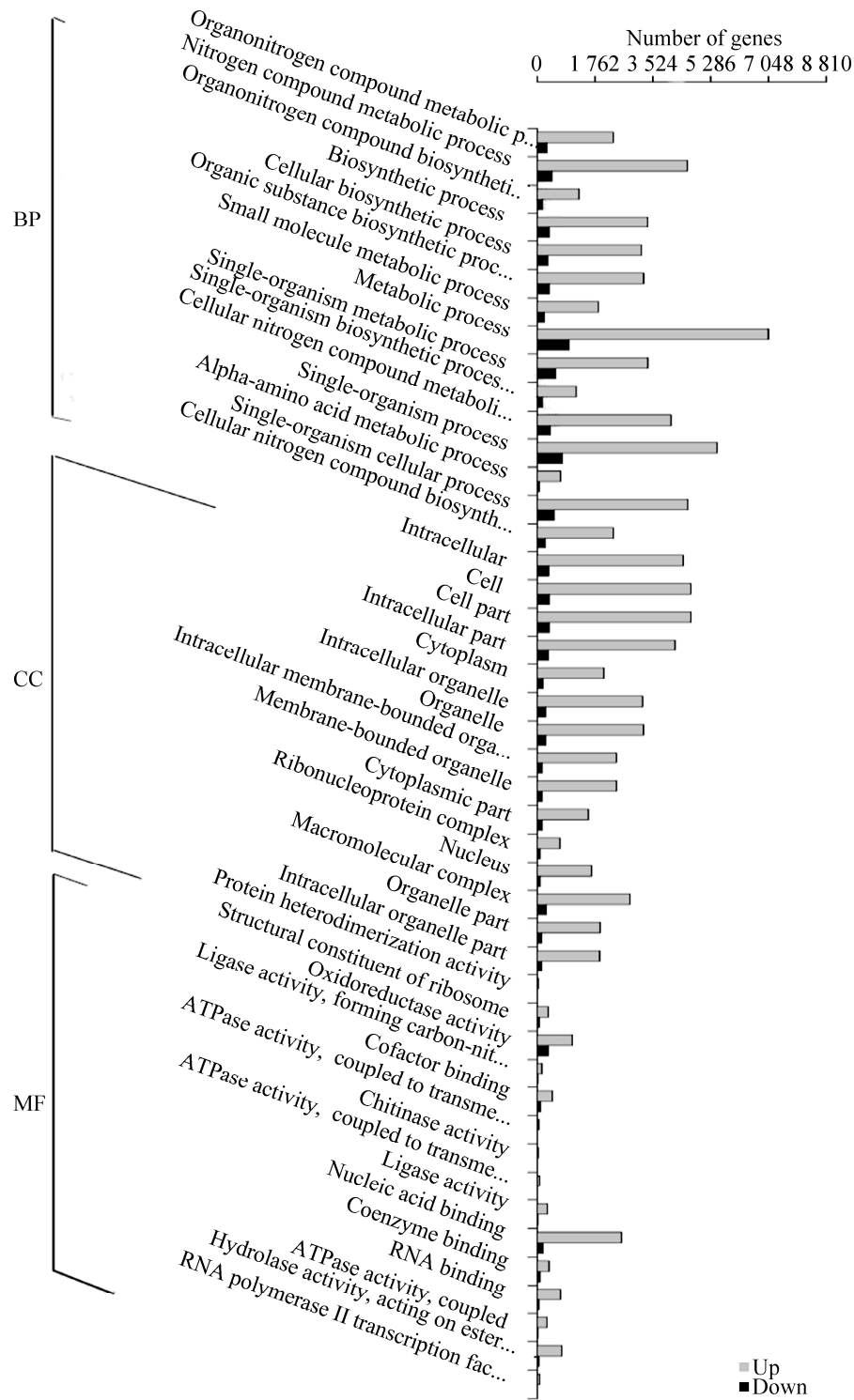


图 2 *Pt* 与小麦互作早期与后期上调基因及下调基因的 GO 富集图

Figure 2 GO enrichment map of up-regulated and down-regulated genes at the early and later stages of compatible interaction. BP-biological process, CC-cellular component, MF-molecular function. Each class is subdivided into different pathways. The vertical coordinate denotes the number of genes contained in each pathway.

表 2 参与囊泡运输中的 SNARE 蛋白交流的 18 个差异基因

Table 2 The 18 genes that participate in the pathway of SNARE interactions in vesicular transport

Gene ID	Up or down regulation	KOG ID	Description
Cluster-19789.108986	Up	KOG0809	SNARE protein TLG2/Syntaxin 16
Cluster-19789.92844	Up	KOG3251	Golgi SNAP receptor complex member
Cluster-19789.98553	Up	KOG0810	SNARE protein syntaxin 1
Cluster-19789.100503	Up	KOG0810	SNARE protein syntaxin 1
Cluster-19789.93377	Up	KOG0810	SNARE protein syntaxin 1
Cluster-19789.88572	Up	KOG3385	V-SNARE
Cluster-19789.91166	Up	KOG0809	SNARE protein TLG2/syntaxin 16
Cluster-19789.95340	Up	KOG0859	Synaptobrevin/VAMP-like protein
Cluster-19789.105492	Up	KOG0812	SNARE protein SED5/syntaxin 5
Cluster-19789.105491	Up	KOG0812	SNARE protein SED5/syntaxin 5
Cluster-19789.94438	Up	KOG0861	Synaptobrevin/SNARE protein YKT6
Cluster-19789.87530	Up	KOG0862	Synaptobrevin/VAMP-like protein SEC22
Cluster-19789.68892	Up	KOG0809	SNARE protein TLG2/Syntaxin 16
Cluster-19789.103749	Up	KOG3251	Golgi SNAP receptor complex member
Cluster-19789.88051	Up	KOG0809	SNARE protein TLG2/syntaxin 16
Cluster-19789.98017	Up	KOG0860	Synaptobrevin/VAMP-like protein
Cluster-19789.100677	Down	KOG0810	SNARE protein syntaxin 1
Cluster-6640.0	Down	-	-

表 3 ABC 转运蛋白通路中富集的 21 个差异表达基因

Table 3 The 21 differentially expressed genes enriched in the ABC transporter pathway

Gene ID	Up or down regulation	Description
Cluster-19789.87233	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.106683	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.98924	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.96978	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.96547	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.96905	Up	Sub-family D member
Cluster-19789.89145	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.89146	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.89147	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.106148	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.103655	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.107127	Up	Mitochondrial Fe/S cluster exporter, ABC superfamily
Cluster-19789.103653	Up	Heavy metal exporter HMT1, ABC superfamily
Cluster-19789.132267	Down	ABC transporter G family member
Cluster-19789.169725	Down	ABC transporter G family member
Cluster-19789.15304	Down	ABC transporter B family member
Cluster-3732.0	Down	ABC transporter B family member
Cluster-19789.15302	Down	ABC transporter B family member
Cluster-6937.0	Down	ABC transporter B family member
Cluster-19789.187339	Down	ABC transporter B family member
Cluster-19789.64926	Down	ABC transporter B family member

Cluster-19789.106683、*Cluster-19789.98924*、*Cluster-19789.96978*、*Cluster-19789.96547* 和 *Cluster-19789.96905* 主要编码 ABCD 亚组, 下调表达的基因 *Cluster-19789.64926*、*Cluster-19789.15304*、*Cluster-3732.0*、*Cluster-6937.0*、*Cluster-19789.187339* 和 *Cluster-19789.15302* 编码 ABCB 家族, *Cluster-19789.132267* 和 *Cluster-19789.169725* 编码 ABCG 家族。

2.4 差异基因荧光定量结果分析

本研究随机选取参与囊泡运输通路、叶绿体代谢通路和 ABC 转运蛋白通路中的 5 个基因进行荧光定量分析。RNA-seq 结果显示, *Cluster-19789.92844*、*Cluster-19789.95340*、*Cluster-19789.96016* 和 *Cluster-19789.97955* 均为后期表达, 而基因 *Cluster-19789.132267* 为早期表达。实时定量分析发现, *Cluster-19789.92844*、*Cluster-19789.95340*、*Cluster-19789.96016* 和 *Cluster-19789.97955* 在侵染过程中表现出相似

的表达趋势, 均在 144 h 出现表达高峰, 其中 *Cluster-19789.92844*、*Cluster-19789.95340* 在此时的相对表达量更高, 之后迅速下降。而 *Cluster-19789.132267* 在 48 h 到达表达高峰, 之后开始下降(图 3)。实时定量结果与转录组测序结果趋势一致。

3 讨论

3.1 *Pt* 侵染小麦早期和后期表达基因存在显著差异

本试验采用 HiSeq 对 *Pt* 转录组进行测序, 比较分析发现, 早期特异表达的基因有 3 618 个, 6 d 特异表达基因有 8 439 个。侵染 6 d 与早期相比差异基因主要涉及代谢过程、催化活性、细胞过程、单组织过程、高分子配合物、核酸结合和水解酶活性、氮化合物代谢、细胞代谢等过程。对这些差异基因进行功能分析发现, 上调表达的差异基因多被富集到有机

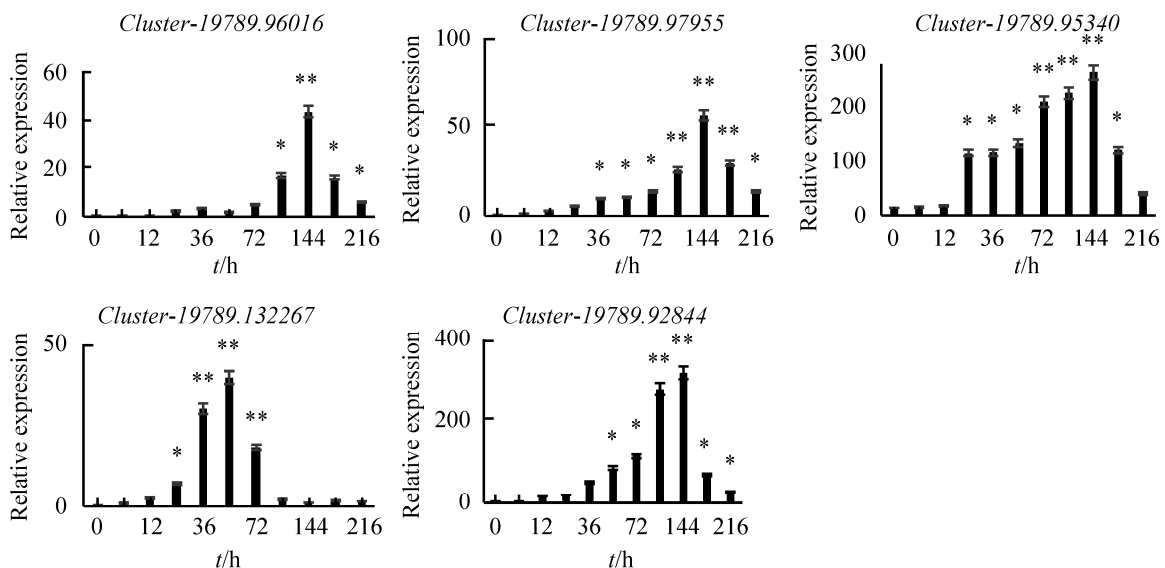


图 3 随机选择 5 个基因在不同时间点的实时荧光定量分析结果

Figure 3 qRT-PCR results of the randomly selected 5 genes at different time points; standard error shows the average fluctuation among three repeats; ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

氮化合物的代谢、核酸的结合以及连接酶活性等功能,其中有 2 313 个差异基因参与了有机氮化合物的代谢过程中,说明病原物在寄主中生长需要寄主的生化代谢提供能量。由于 6 d 是 *Pt* 侵染小麦组织产生大量菌丝、吸器并开始形成夏孢子时期,我们推测这些基因可能与菌丝生长、菌丝特化形成夏孢子并为之提供能量有关。

在早期特异表达的差异基因中,基因 *Cluster-19789.100570* 参与了内吞作用的通路。内吞是真核生物中普遍存在的一种现象,与多种生命活动有着密切的联系,如免疫应答、神经递质运输、细胞信号转导、细胞和组织代谢平衡等。基因 *Cluster-3694.0* 具有超氧化物歧化酶(SOD)活性, SOD 是一种能够清除细胞内 ROS 的金属蛋白酶,是细胞抵抗超氧自由基阴离子造成氧化损伤的第一个屏障。大量实验证明真菌 SOD 家族参与多种生物过程,例如,酵母和其他一些真菌中 SOD 的失活导致菌丝生长减少、分生孢子节律紊乱、萌发延迟^[13-15]。该基因在早期特异表达,推测其参与了病菌的致病作用。基因 *Cluster-29416.1* 参与了 MAPK 信号通路(mitogen-activated protein kinase signaling pathway)。MAPK 信号通路广泛存在于真核生物体中,是一类进化上十分保守的信号传导途径。将 *Pt* 的 MAPK1 同源互补到玉米瘤黑粉(*Ustilago maydis*),可以恢复玉米瘤黑粉 Kpp2 和 Kpp6 单突变体或 Kpp2/Kpp6 双突变在交配和致病性方面的缺陷^[16]。此外与酵母 MAPKKK STE11 同源的 PsKPP4 在营养菌丝和吸器中被敲除,导致 *Pst* 的致病性降低^[17]。因此,推测 *Cluster-29416.1* 参与了 *Pt* 的致病过程。在 6 d 特异表达的差异基因中涉及了生长因子的结合、细胞生物合成过程以及氨基酸代谢等功能。其中有 121 个基因注释到蛋白质泛素化

功能。泛素化在蛋白质的定位、代谢、功能、调节和降解都起着十分重要的过程,同时它也参与了细胞周期、增殖、基因表达、转录调节等过程。有研究报道稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)效应因子靶向 E3 泛素连接酶 APIP₆抑制水稻免疫反应的机制^[18]。因此推测我们筛选到的这 121 个基因参与了 *Pt* 的生长、孢子的分化和致病作用,具体相关的功能需在今后进行深入的研究,对了解 *Pt* 的致病机理极为重要。

3.2 叶绿体代谢通路中差异表达基因可能参与了 *Pt* 的致病过程

叶绿体代谢能为植物生长提供光合作用衍生的碳源和能量,通过调节防御分子的产生而在植物免疫中发挥重要作用。叶绿体是重要的光合作用细胞器,可为糖的合成提供能量并生成植物免疫的防御信号,例如活性氧(ROS),水杨酸(SA)和一氧化二氮(N₂O),且对于其他细胞器的功能、代谢反应和生长周期很重要。然而一些病原体直接靶向寄主叶绿体,从而改变类囊体膜结构并抑制 SA, N₂O 和 ROS 等防御信号的产生,促使病原菌在植物中快速定殖从而使植物感病^[19]。最近的研究发现, *Pst* 效应蛋白 Pst12806 靶向小麦的叶绿体代谢途径,此效应蛋白在感染早期被高度诱导并与小麦中 TaISP 相互作用,劫持植物运输系统以进入叶绿体并干扰叶绿体功能来抵御植物的基础防御作用^[19]。本研究筛选的叶绿体代谢通路的差异表达基因,全部为上调表达基因,其中基因 *Cluster-19789.96016* 和 *Cluster-19789.97955* 参与代谢过程、氧化还原酶活性、叶绿素代谢过程和血红素生物合成过程。实时荧光定量结果显示,这两个基因都在前期表达量较少,在 6 d 表达最高(图 3),因此推测叶绿体代谢通路中的差异表达基因可能参与了病原菌对 ROS 的抑制和菌丝的生长代谢过程。

3.3 ABC 转运子在 *Pt* 与小麦互作中具有重要作用

ABC 转运子, 是一类庞大而古老的蛋白家族, 普遍存在于从原生生物到人类之中^[20], ABC 转运子利用 ATP 结合和水解产生的能量参与到底物转运过程中, 这些过程包括 RNA 的翻译和 DNA 修复所需的跨膜过程等, 在真核生物中也可以将毒素或者药物泵到体外^[21]。ABC 转运蛋白由 4 个结构组成, 分别是 2 个 ATPase 结构域(形成底物运输通路并决定底物的特异性)和 2 个跨膜结构域(有 ATP 酶活性), 其运输底物包括肽、脂、重金属螯合物、多糖、生物碱、无机离子、类固醇、药物和细胞代谢产物等多种化合物^[22]。它是一类以主动运输方式完成分子转运的跨膜蛋白, 广泛参与调控植物的生长发育和应对逆境胁迫。本研究在此通路中筛选出 21 个差异表达基因, 分别属于 ABCD、ABCB 和 ABCD 这 3 种类型, 虽然这些差异表达基因目前在锈菌中尚无报道, 但是这一家族的基因在其他真菌致病性方面已经有了报道。白色念珠菌 CDR1 基因编码 ABC 转运子家族的一个成员, 该家族已被证明参与了唑类耐药性^[23]; 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)中的 ABC 转运基因 *BcatrB* 决定着灰霉病菌对植物防御化合物和杀菌剂的敏感性^[24]; 在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中 *ABC1* 的转录水平在代谢毒性反应中显著升高, *ABC1* 基因的插入突变和缺失都可导致稻瘟病菌(*M. oryzae*)对水稻或大麦表皮侵染能力显著下降^[25], 说明 *ABC1* 有降解寄主产生的对稻瘟病菌有毒物质的能力。据报道禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)基因组中有 62 个 ABC 蛋白, 基因功能分析发现 *FgArb1* 突变体对小麦的致病性完全丧失^[26]。本研究鉴定到的 *Pt* 基因 *Cluster-19789.96547* 注释到的功能有 ABC 转运体、过氧化物酶体长链酰基辅酶 A 转运蛋白,

编码 ABCD 亚组。ABCD 亚组蛋白可分为 2 个群组, 分别为 group-I 和 group-II, 在大多数真菌中均有发现^[27]。ABCD 家族在过氧化物酶体的长链脂肪酸转运过程中发挥着特异性功能, 但在真菌中过氧化物酶体转运子的研究还不多见。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)有 2 个过氧化物酶体转运蛋白 Pxa1 和 Pxa2, 它们参与长链脂肪酸的运输, 其敲除突变体不能在以脂肪酸或油酸盐为唯一碳源的培养基上生长^[28], 因此, 我们推测 *Pt* 与小麦互作过程中编码 ABCD 亚组基因可能与脂肪酸或油酸盐的利用有关。

基因 *Cluster-19789.187339* 编码 ABCB 家族, ABCB 转运蛋白广泛分布于真核细胞中, 功能多样, 与耐药性、抗原的合成、线粒体多肽和信息素的泵出以及 F/S 簇蛋白的产生及重金属耐性密切相关^[29-31]。注释到的功能有信号传导和物质的跨膜运输, 因此推测 *Cluster-19789.187339* 在 *Pt* 与寄主的互作早期过程中参与了信号传递过程。

另外基因 *Cluster-19789.132267* 编码 ABCG 家族, 在真菌中一般也是与药的抗性相关, 其可将药物分子泵出细胞外^[32]。注释到的功能有 ATP 酶活性、GTP 结合、SNQ2 和 GTPase 活性。其中 GTPase 是水解酶超家族, 能够和 GTP 结合, 结合和水解发生在蛋白酶的 G 结构域, 其中对黄瓜炭疽病菌(*Colletrichum orbiculare*)的研究结果表明, GTPase 在真菌细胞周期中有重要作用, 其缺失突变体表明, 此基因在侵染植物过程中是必须的^[33]。*Cluster-19789.132267* 荧光定量结果显示在早期表达量较高, 到后期表达量逐渐下降, 因此推测该基因在 *Pt* 侵染小麦早期过程中发挥了重要作用。

3.4 囊泡运输相关途径中差异表达基因可能参与物质运输和病菌的生长

囊泡运输是生命活动的基本过程, 它参与

细胞多项重要的生命活动, 涉及许多种类的蛋白质和调控因子, 经过囊泡运输过程中蛋白的加工、运输才会有活性, 保障了细胞内物质的正常有序的运输^[34]。在细胞内膜细胞器之间的物质(如蛋白质、脂类)运输主要是通过囊泡完成的, 蛋白质复合物 SNARE (可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白附着蛋白受体)在囊泡锚定和融合中发挥了关键的作用, 而且 SNARE 蛋白 Syn8 及其同源蛋白在不同的生物中发挥着多种作用。研究发现, FgSyn8 和定位于内质网(ER)的 SNARE 蛋白 FgSec22 是 *F. graminearum* 正常分生孢子发育、分生孢子形态和发病机制不可或缺的蛋白, 而且该蛋白在 *F. graminearum* 毒素脱氧雪腐镰刀菌醇(deoxynivalenol, DON)的生产中发挥了积极作用^[35-36]。本研究发现在囊泡运输中 SNARE 的相互作用代谢通路中包含 18 个差异表达基因(表 2), 其中部分基因编码细胞内蛋白转运 SNARE 蛋白 TLG2, 囊泡相关蛋白 7, 高尔基 SNAP 受体以及参与囊泡介导的转运。差异表达基因 *Cluster-19789.95340* 和 *Cluster-19789.92844* 均在接种后 6 d 高表达, 此时为夏孢子形成阶段, 推测其与夏孢子的形成过程有关。基因 *Cluster-19789.95340* 编码小突触泡蛋白和 VAMP 蛋白, 而基因 *Cluster-19789.92844* 编码高尔基体 SNAP 受体, SNAP 受体蛋白被认为可介导多数细胞膜融合活动, 不同蛋白家族成员分布在不同细胞膜中, 表明它们可能在囊泡转运期间的靶向过程中发挥作用, 而该类基因在病原菌侵染寄主后期表达量较高, 推测其可能参与了病原菌靶向寄主蛋白, 并帮助物质运转, 进而达到维持病原菌快速生长繁殖的目的。上述结果表明, 在病原菌与小麦互作过程中, 6 d 与早期的差异表达基因参与了复杂的代谢通路过程。

综上, 本研究利用转录组数据对 *Pt* 亲和互

作 6 d 及早期阶段差异表达基因进行了分析, 利用 GO 富集和 KEGG 筛选出大量参与致病与代谢相关通路的差异表达基因, 其中早期差异表达基因多为与致病性有关, 而后期表达的差异基因多为与代谢、生长、运输和繁殖等有关, 这些相关基因的具体功能还有待于今后进行深入研究, 但本研究获得相关信息为研究 *Pt* 致病机理奠定了基础。

参考文献

- [1] Huerta-Espino J, Singh RP, Germán S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj SC, Goyeau H. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, 2011, 179(1): 143–160.
- [2] Heath MC. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Annals of Botany*, 1997, 80(6): 713–720.
- [3] Voegelé RT, Mendgen K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 2003, 159(1): 93–100.
- [4] Jiang ZN, Wang H, Zhang GQ, Zhao RH, de Bie T, Zhang RQ, Gao DR, Xing LP, Cao AZ. Characterization of a small GTP-binding protein gene *TaRab18* from wheat involved in the stripe rust resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 113: 40–50.
- [5] Hu GG, Linning R, McCallum B, Banks T, Cloutier S, Butterfield Y, Liu J, Kirkpatrick R, Stott J, Yang G, Smailus D, Jones S, Marra M, Schein J, Bakkeren G. Generation of a wheat leaf rust, *Puccinia triticina*, EST database from stage-specific cDNA libraries. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(4): 451–467.
- [6] 张瑞丰, 范学锋, 韦杰, 张娜, 杨文香, 刘大群. 小麦叶锈菌休眠与萌发夏孢子的差异表达. *微生物学报*, 2020, 60(1): 81–94.
Zhang RF, Fan XF, Wei J, Zhang N, Yang WX, Liu DQ. Analysis of differently expressed genes between resting and germinated urediniospores of wheat leaf rust. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 81–94. (in Chinese)
- [7] Bruce M, Neugebauer KA, Joly DL, Migeon P, Cuomo CA, Wang SC, Akhunov E, Bakkeren G, Kolmer JA, Fellers JP. Using transcription of six *Puccinia triticina* races to identify the effective secretome during

- infection of wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 4: 520.
- [8] Wei J, Cui LP, Zhang N, Du DD, Meng QF, Yan HF, Liu DQ, Yang WX. *Puccinia triticina* pathotypes THTT and THTS display complex transcript profiles on wheat cultivar Thatcher. *BMC Genetics*, 2020, 21(1): 48.
- [9] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng QD, Chen ZH, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Palma FD, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652.
- [10] Davidson NM, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for *de novo* assembled transcriptomes. *Genome Biology*, 2014, 15(7): 1–14.
- [11] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621–628.
- [12] Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [13] Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology*, 2002, 148(11): 3705–3713.
- [14] Yoshida Y, Maeda T, Lee B, Hasunuma K. Conidiation rhythm and light entrainment in superoxide dismutase mutant in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2008, 279(2): 193–202.
- [15] Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge JP. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 910–923.
- [16] Hu GG, Kamp A, Linning R, Naik S, Bakkeren G. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust, *Puccinia triticina* homolog: potential for functional analyses of rust genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(6): 637–647.
- [17] Zhu XG, Guo J, He FX, Zhang Y, Tan CL, Yang Q, Huang CM, Kang ZS, Guo J. Silencing *PsKPP4*, a MAP kinase kinase kinase gene, reduces pathogenicity of the stripe rust fungus. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(12): 2590–2602.
- [18] Park CH, Chen SB, Shirsekar G, Zhou B, Khang CH, Songkumarn P, Afzal AJ, Ning YS, Wang RY, Bellizzi M, Valent B, Wang GL. The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP₆ to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *The Plant Cell*, 2012, 24(11): 4748–4762.
- [19] Xu Q, Tang CL, Wang XD, Sun ST, Zhao JR, Kang ZS, Wang XJ. An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5571.
- [20] Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(6): 682–699.
- [21] Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(2): 317–364.
- [22] Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000 Prime Reports*, 2015, 7: 14.
- [23] Hernández ML, Gil C, Pla J, Nombela C. Induced expression of the *Candida albicans* multidrug resistance gene *CDR1* in response to fluconazole and other antifungals. *Yeast*, 1998, 14(6): 517–526.
- [24] Schoonbeek H, Del Sorbo G, De Waard MA. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(4): 562–571.
- [25] Urban M, Bhargava T, Hamer JE. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *The EMBO Journal*, 1999, 18(3): 512–521.
- [26] Yin YN, Wang ZH, Cheng DN, Chen X, Chen Y, Ma ZH. The ATP-binding protein FgArb1 is essential for penetration, infectious and normal growth of *Fusarium graminearum*. *New Phytologist*, 2018, 219(4): 1447–1466.
- [27] Kovalchuk A, Driessen AJM. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics*, 2010, 11: 177.
- [28] Van Roermund CWT, IJlst L, Majczak W, Waterham HR, Folkerts H, Wanders RJA, Hellingwerf KJ. Peroxisomal fatty acid uptake mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(24): 20144–20153.

- [29] Kispaal G, Csere P, Prohl C, Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO Journal*, 1999, 18(14): 3981–3989.
- [30] ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *Journal of General Physiology*, 2014, 143(4): 419–435.
- [31] Lee JY, Yang JG, Zhitnitsky D, Lewinson O, Rees DC. Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science*, 2014, 343(6175): 1133–1136.
- [32] 曹冠华, 柏旭, 陈迪, 张晓蓉, 贺森. ABC 转运蛋白结构特点及在植物和真菌重金属耐性中的作用与机制. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10): 1617–1628.
Cao GH, Bai X, Chen D, Zhang XR, He S. Structure characteristics of ABC transporter protein and the function and mechanism on enhancing resistance of plants and fungi to heavy metals. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(10): 1617–1628. (in Chinese)
- [33] Fukada F, Kubo Y. *Colletotrichum orbiculare* regulates cell cycle G1/S progression via a two-component GAP and a GTPase to establish plant infection. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2530–2544.
- [34] Shoji JY, Kikuma T, Kitamoto K. Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 20: 1–9.
- [35] Adnan M, Islam W, Noman A, Hussain A, Anwar M, Khan MU, Akram W, Ashraf MF, Raza MF. Q-SNARE protein FgSyn8 plays important role in growth, DON production and pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140: 103948.
- [36] Adnan M, Fang WQ, Sun P, Zheng YL, Abubakar YS, Zhang J, Lou Y, Zheng WH, Lu GD. R-SNARE FgSec22 is essential for growth, pathogenicity and DON production of *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 2020, 66(2): 421–435.

(本文责编 张晓丽)