

叶锈菌侵染的小麦叶片转录组数据分析

刘娜¹, 乔妹¹, 孙嘉伟², 陈琰¹, 侯春燕¹, 韩胜芳¹, 王冬梅¹

(¹河北省植物生理与分子病理学重点实验室 / 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001;

²北京诺禾致源科技股份有限公司, 北京 100012)

摘要: 选取小麦近等基因系 TcLr26 与其轮回亲本 Thatcher (Tc), 与叶锈菌生理小种 260 分别组成不亲和及亲和组合, 通过 Illumina/Solexa 平台的 HiSeqTM2000 高通量测序技术对接种叶锈菌后的小麦转录组进行测序, 利用 Trinity 软件将数据组装形成转录本, 对所有转录本进行 COG、GO 和 KEGG 分类和功能注释、Pathway 注释以及蛋白编码区的预测。结果表明, 转录组测序片段经 *de novo* 拼接共得到 87291 条平均长度 866 bp 的 Unigenes; 通过功能聚类, 分别获得 25 个 COG 分类、55 个 GO 功能亚类和 128 条 KEGG 通路; 差异表达基因分析显示, 相对于亲和组合, 不亲和组合在接种叶锈菌后 8 h 上调 Unigenes 4037 条, 下调 Unigenes 1949 条; 接种后 24 h, 上调 Unigenes 2122 条, 下调 Unigenes 3248 条。其中植物与病原物互作过程中的钙信号通路、活性氧爆发及 SA 信号通路相关基因在不同时间有差异表达, 在接种后 8 h 所表达的差异基因可能与基础防卫反应诱发密切相关, 而在接种后 24 h 的差异表达基因可能与 Lr26 介导的过敏性防卫反应表达有紧密联系。这为深入分析和发掘小麦抗叶锈病相关基因及系统研究小麦抗锈病分子机制奠定了坚实基础。

关键词: 小麦; 叶锈菌; 转录组

Transcriptome Analysis of Wheat Leaves Infected by *Puccinia triticina*

LIU Na¹, QIAO Mei¹, SUN Jia-wei², CHEN Yan¹, HOU Chun-yan¹,
HAN Sheng-fang¹, WANG Dong-mei¹

(¹Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology/

Hebei Agricultural University, College of Life Sciences, Baoding 071001; ²Novogene Co., LTD, Beijing 100012)

Abstract: In order to shed light the transcriptional reprogramming of wheat upon *Puccinia triticina* infection, the wheat near isogenic line TcLr26 (incompatible, resistance) and its recurrent parent Thatcher (Tc) (compatible, susceptibility) were inoculated by physiological race 260, and then harvested for RNA-seq analysis using HiSeqTM 2000 high-throughput sequencing technology. The assembled transcripts were subjected to analyze COG, GO and KEGG classification and functional annotation, pathway annotation and *in silico* prediction of coding genes. Total 87291 Unigenes were obtained after *de novo* assembly, with an average length of 866 bp. The functional clustering analysis revealed 25 COG classifications, 55 GO functional subclasses and 128 KEGG paths. By analyzing the differentially expressed genes (DEGs) between compatible and incompatible combinations, a total of 4037 up-regulated and 1949 down-regulated Unigenes were identified at 8 h, and 2122 up-regulated

收稿日期: 2018-10-23 修回日期: 2019-01-24 网络出版日期: 2019-03-05

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181023001>

第一作者研究方向为植物抗病分子机制, E-mail: liuna_hbu@163.com

通信作者: 韩胜芳, 研究方向为植物抗病分子机制, E-mail: hansf123@163.com

王冬梅, 研究方向为植物抗病分子机制, E-mail: dongmeiwang63@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31171472, 31871548); 高等学校博士学科点专项科研基金 (优先发展领域, 20111302130001); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目 (12967149D)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31171472, 31871548), Special Research Funds for Doctoral Disciplines in Universities (priority areas of development, 20111302130001), Hebei Key Basic Research Project of Applied Basic Research Report (12967149D)

and 3248 down-regulated Unigenes were identified at 24 h. The genes, which residue to the calcium signaling pathway, active oxygen burst and SA signaling pathway, were found to be differentially expressed at different time point. The DEGs at 8 h and 24 h after inoculation were assumed to be closely related to the induction of basic defense response and *Lr26*-mediated HR defense response, respectively. Taken together, the generated datasets would be useful for further analysis and evaluation of wheat resistance related genes against *Puccinia triticina*.

Key words: wheat; *Puccinia triticina*; transcriptome

小麦叶锈病是世界上分布范围最广的真菌病害,同时也是威胁我国小麦生产的重要病害之一。该病害由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)侵染引起,流行年份可造成严重减产甚至绝收^[1]。随着全球气候变暖,气象条件更加适合小麦叶锈病的发生和流行,未来可能会造成更大的危害。传统的化学防治虽然见效快,但是污染环境,各种药物的使用使叶锈菌的抗药性增加,因此选育抗叶锈小麦品种是最经济有效的措施。随着生物技术的迅猛发展,运用新的技术手段筛选抗病基因,为抗病育种开辟了新的研究途径^[2-4]。

转录组测序(RNA-Seq)是指通过新一代高通量测序技术,对样品中的所有RNA及整个转录组进行整体测序,利用统计相关片段数计算出不同mRNA的表达量,从而发现转录水平的SNP,新的转录本等。RNA-seq技术的大规模应用,使得非模式生物在基因组层面基因表达变化的研究有了快速的发展^[5-8]。在小麦与病原物互作方面的首次应用是小麦接种禾谷镰刀菌后进行的转录组学分析,该研究全面揭示了禾谷镰刀菌侵染后的小麦基因表达特征^[9],发现JA防卫反应信号通路在抗病反应中被激活,乙烯、活性氧和钙信号通路被抑制,而水杨酸通路没有被激活。曾庆东^[10]通过对接种了条锈菌的含有*Yr26*基因的近等基因系小麦叶片进行转录组测序,共鉴定到了14449个显著差异表达的基因,其中水杨酸通路被激活,而JA通路被抑制。除此之外,通过转录组测序已从野生大豆^[11]、拟南芥^[12]、玉米^[13]、草莓^[14]等植物中鉴定出大量的病原菌胁迫应答基因,并对其抗逆作用机理进行了探讨。Ma等^[15]通过转录组测序筛选得到5个由盐诱导的差异基因,并通过转化拟南芥证实这5个基因提高了植株的耐盐性;通过转录组测序发现小麦在干旱条件下,根系的生长需要激素、细胞耐性、细胞壁合成和活性氧代谢之间的相互协调作用^[16]。目前,运用转录组测序对植物抵御生物逆境和非生物逆境的分子机制进行研究已成为植物功能基因研究

领域的一个重要方向。

本课题组长期从事小麦抵抗叶锈菌侵染的分子机制研究。在小麦与叶锈菌的不亲和互作中,在侵染点处寄主细胞往往通过产生过敏反应(HR, hypersensitive reaction)来抵抗叶锈菌的侵染和扩展,并且HR的发生是受到严格控制的^[17]。小麦抵抗叶锈菌侵染的过程有2个关键时期,第1个时期是在小麦接种叶锈菌后8h左右,该时期叶锈菌形成附着胞和气孔下泡囊,寄主的气孔和气孔周围的细胞与叶锈菌接触,此时期是诱发基础防卫反应的关键时期;第2个时期是在接种后24h左右,此时叶锈菌形成吸器母细胞(HMC, haustorial mother cell)和吸器,吸器释放效应物与抗病R基因产物识别诱发防卫反应(ETI, effector triggered immunity)^[18],此时往往与吸器母细胞接触的寄主细胞发生HR^[19]。因此,研究小麦与叶锈菌互作过程中这2个时期转录组的表达特性和规律对揭示小麦抗叶锈机理具有重要意义,发现发掘抗叶锈新基因,将为利用基因工程手段培育抗叶锈病新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验植物材料选用小麦抗叶锈近等基因系TcLr26与其轮回亲本Thatcher(Tc),叶锈菌选用生理小种260,260与TcLr26和Tc分别组成不亲和组合及亲和组合。在7日龄Tc、TcLr26幼苗的第1片真叶完全展开时,使用毛笔蘸取叶锈菌生理小种260夏孢子悬浮液,分别涂抹在展开的叶片上,然后置于保湿箱中黑暗保湿12~16h,再移入培养室内继续培育。培养室条件为昼夜温度23℃/20℃,光照时间14h/d,日光型镓灯照射,光照强度为400W/m²。并在接种后0h、8h、24h,分别剪取接种叶片(约1g)置于液氮速冻,再转移置-80℃保存备用。TcLr26样品分别命名为L-0、L-8、L-24;Tc样品分别命名为T-0、T-8、T-24。

1.2 cDNA 文库的构建及转录组测序

高质量的样品 RNA 由华大基因制备, 获得的 RNA 通过 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪进行转录组测序。测序所得的原始片段 (raw reads) 经过过滤, 得到纯净片段 (clean reads)。纯净片段经 “Trinity” 软件进行 *de novo* 从头合成拼接, 得到 Unigenes。

1.3 Unigenes 功能注释和分类

将拼接得到的 Unigenes 通过 BlastX ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$) 依次与 Nr (NCBI 非冗余蛋白, NCBI non-redundant protein) 数据库、Swiss-Prot (瑞士蛋白序列, Swiss-Prot protein sequence) 数据库、KEGG (京都基因与基因组百科全书, Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库、COG (蛋白直系同源聚类, clusters of orthologous groups of proteins) 数据

库和 GO (基因本体论数据库, gene ontology) 数据库中的蛋白序列进行比对, 从而获得与 Unigenes 对应的蛋白功能注释及功能分类统计。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析 (RT-qPCR)

为验证小麦与叶锈菌互作转录组结果的准确性, 从数据库挑选 5 个基因, 用 Primer 5.0 设计引物 (表 1), 分析 RT-qPCR 结果是否与转录组结果相一致。在 *TcLr26* 与 Tc 分别接种 260 后 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、24 h、48 h 取接种叶片, 提取 RNA 并经反转录获得 cDNA, 以各样品的 cDNA 为模板, *GAPDH* 为内参, 用 SYBR Green 试剂, 通过罗氏 LightCycler® 96 SW 1.1 进行实时荧光定量 PCR 分析。每个样品进行 3 个技术重复, 按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法进行定量计算不同基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for RT-qPCR analysis

基因 ID Gene ID	正向引物 (5' → 3') Forward primer (5' → 3')	反向引物 (5' → 3') Reverse primer (5' → 3')
CL3239.Contig1_All	TCACCCCAAAGATAGGCACAC	TCTTGCTATCGTGTCTGT
CL9862.Contig3_All	CCTCTACTGTTCTACGACT	GGGAGGAACAAAGCTAGATC
CL1243.Contig2_All	GTGGTATACAAGGTTGCTGA	TTCTCCTCTTCCAGACAAGA
CL11079.Contig2_All	TATCACTTCACGGACCGAGT	GCTCGAGGCTCCTGTTCTAT
Unigene18912_All	CATATTCGGCAACCAGTTCG	CGATCTTCTTGATTGCCACC
<i>GAPDH</i>	CTGCATCATACGATGACATC	TGTCACCGACAAAGTCAGTG

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据分析

使用 Illumina/Solexa 平台的 HiSeq™ 2000 测序仪对 6 组样品转录组进行高通量测序, 将含有接头的、重复的、质量低的片段除去, 6 组样品各得到 52907600 条、51175658 条、55517344 条、51214286 条、54083574 条、55398606 条纯净片段 (clean reads)。使用 “Trinity” 软件对纯净片段进行 *de novo* 拼接, 将 6 组样品都含有的相同序列合并, 共得到 87291 条 Unigenes, 总长度为 75614264 bp, 平均长度为 866 bp, N50 值为 1344 bp (表 2)。长度大于 500 bp 的有 40724 条, 大于 1000 bp 的有 22291 条, 其中 5' → 3' 方向注释的 Unigenes 共 60495 条, 表明样品转录组测序和拼接的质量较好。

表 2 6 个小麦样品的组装质量统计
Table 2 Statistical analysis of the assembly quality in six wheat samples

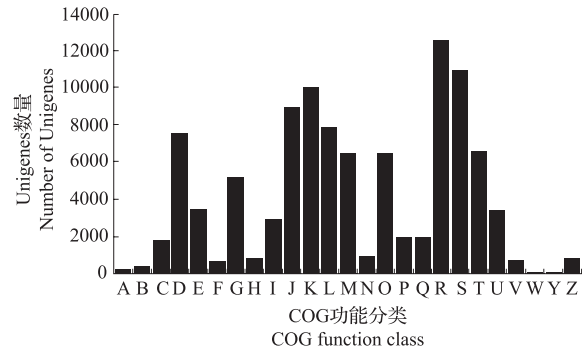
样品 Sample	总数量 Total number	总长度 (bp) Total length	平均长度 (bp) Mean length	N50
L-0	75031	42571330	567	928
L-8	73216	43766222	598	1021
L-24	75630	46042641	609	1032
T-0	65692	37123349	565	941
T-8	70812	41095091	580	957
T-24	75870	44117218	581	960
总计 Total	87291	75614264	866	1344

2.2 转录本的功能注释

将 87291 条 Unigenes 分别通过 Blastx ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$) 与 Nr、Nt 数据库、GO、COG、KEGG 数据库进行比对。根据不同数据库 Blastx 比对结果对所有 Unigenes 进行注释,其中 57823 条 Unigenes 注释到 Nr 数据库;66419 条 Unigenes 注释到 Nt 数据库;24885 条 Unigenes 注释到 COG 数据库,对应其中 25 个 COG 功能分类;39232 条 Unigenes 注释到 GO 数据库,对应其中 3 个大类、56 个亚类;37038 条 Unigenes 注释到 KEGG 数据库,进一步注释到其中 5 个大类 (level 1)、19 个亚类 (level 2) 和 128 条通路 (level 3) 上。所有注释上的 Unigenes 共有 71124 条。

2.2.1 Unigene 的 COG 分类 将经 Nr 数据库注释的 Unigenes 进行 COG 数据库比对,共有 24885 条注释到 COG 数据库,对应其中 25 个 COG 聚类 (图 1)。从图中可以看出,由于小麦是非模式作物,一般功能预测基因 (R) 和未知功能基因 (S) 所占比例较多;转录相关基因 (K) 所含 Unigenes 的数量排第 3 位,反映出转录因子在小麦抵抗叶锈菌感染过程中可能发挥重要作用;信号传导机制 (T) 相关 Unigenes 为 6641 条,占 Unigene 总数的 26.69%,说明在小麦抵抗叶锈菌感染过程中通过信号传导从而触发一系列防卫基因的表达;另外,与翻译 (J) 和复制 (L) 相关的基因数量较多,这反映出在小麦与叶锈菌互作过程中通过基因表达抵抗叶锈菌的感染。

2.2.2 Unigene 的 GO 功能注释 在被注释的 Unigenes 序列中有 55.16% 来自 GO 数据库,共有 39232 条 Unigenes 通过 Blast 匹配到 GO 数据库中的 3 个大类、55 个亚类中 (图 2)。其中“细胞组分 (Cellular component)”大类包含的 Unigenes 最多,共有 28422 条;其次是“生物过程 (Biological process)”大类,有 21295 条 Unigenes,再次是“分子功能 (Molecular function)”大类,有 19516 条 Unigenes。在生物过程中的应激反应 (response to stimulus)、信号转导 (signaling)、免疫系统过程 (immune system process) 相关基因,细胞成分中的膜蛋白基因 (membrane-enclosed lumen),分子功能中转录因子活性 (transcription factor activity)、抗氧化活性 (antioxidant activity) 基因可能参与小麦抵抗叶锈菌感染过程,是今后研究关注的重点。



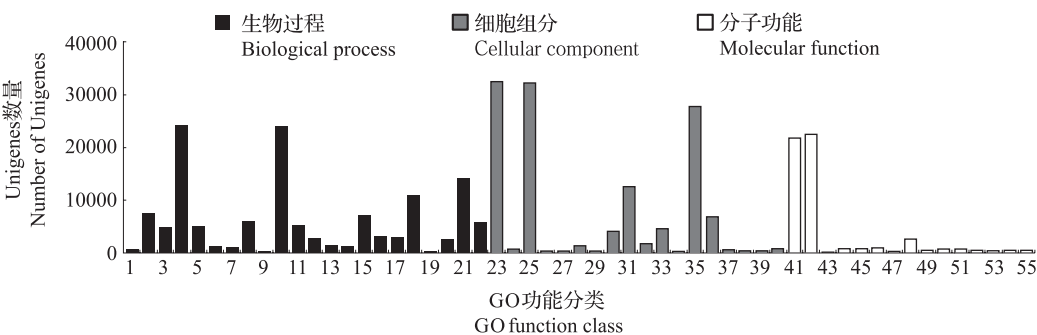
A: RNA 加工和修饰; B: 染色质结构和动力学; C: 能量生产与转换; D: 细胞周期调控, 细胞分裂, 染色体分区; E: 氨基酸运输和代谢; F: 核酸运输和代谢; G: 碳水化合物运输和代谢; H: 辅酶运输和代谢; I: 脂质转运和代谢; J: 翻译, 核糖体结构和生物合成; K: 转录; L: 复制, 重组和修复; M: 细胞壁/膜/被膜生物合成; N: 细胞运动; O: 翻译后修饰, 蛋白转运和分子伴侣; P: 无机离子运输和代谢; Q: 次生代谢产物的生物合成, 运输和代谢; R: 仅一般功能预测; S: 未知功能; T: 信号传导机制; U: 胞内运输, 分泌和囊泡运输; V: 防御机制; W: 胞外结构; Y: 核酸结构; Z: 细胞骨架

A: RNA processing and modification, B: Chromatin structure and dynamics, C: Energy production and conversion, D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, E: Amino acid transport and metabolism, F: Nucleotide transport and metabolism, G: Carbohydrate transport and metabolism, H: Coenzyme transport and metabolism, I: Lipid transport and metabolism, J: Translation, ribosomal structure and biogenesis, K: Transcription, L: Replication, recombination and repair, M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis, N: Cell motility, O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, P: Inorganic ion transport and metabolism, Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, R: General function prediction only, S: Function unknown, T: Signal transduction mechanisms, U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, V: Defense mechanisms, W: Extracellular structure, Y: Nuclear structure, Z: Cytoskeleton

图 1 小麦转录组 COG 功能注释

Fig.1 The functional classification using clusters of orthologous groups (COG)

2.2.3 Unigene 的 KEGG 通路分析 为了鉴定 Unigenes 在不同代谢途径中的生物学功能,进一步了解各基因间的相互关系,将拼接得到所有 Unigenes 进行 KEGG 数据库分析,总共有 37038 条 Unigenes 可以高度匹配到 KEGG 数据库中,并分配到 5 个大类 (level 1)、20 个亚类 (level 2) 以及 128 条代谢途径 (level 3) 中。其中富集在前 15 的通路如表 3 所示,富集最多 Unigenes 的通路为代谢通路 (Metabolic pathways),共有 13357 条 Unigenes 表达。在植物与病原体相互作用通路 (Plant-pathogen interaction) 中富集到的 Unigenes 有 3240 条 (图 3),为筛选小麦抗叶锈相关基因提供了丰富的候选基因序列数据。



1:生物粘附;2:生物调控;3:细胞组分组织或生物合成;4:细胞过程;5:发育过程;6:生长;7:免疫系统过程;8:定位;9:移动;10:代谢过程;11:多细胞组织过程;12:多元有机体过程;13:生物过程负调控;14:生物过程正调控;15:生物过程调控;16:生殖;17:生殖过程;18:应激反应;19:节律过程;20:信号转导;21:单一生物过程;22:重建定位;23:细胞;24:细胞连接;25:细胞部件;26:细胞外基质;27:细胞胞外基质部分;28:细胞胞外区域;29:细胞外区域部分;30:大分子复合物;31:膜;32:膜结合蛋白;33:膜部件;34:核状体;35:细胞器;36:细胞器部件;37:神经元突触;38:病毒体;39:病毒体部件;40:抗氧化活性;41:绑定;42:催化活性;43:金属伴侣活性;44:分子转导活性;45:核酸结合转录因子活性;46:结构分子活性;47:蛋白结合转录因子活性;48:转运活性;49:酶调节活性;50:受体活性;51:电子转运活性;52:蛋白标签;53:营养库活性;54:翻译调节活性;55:通道调节活性

1: Biological adhesion, 2: Biological regulation, 3: Cellular component organization or biogenesis, 4: Cellular process, 5: Developmental process, 6: Growth, 7: Immune system process, 8: Localization, 9: Locomotion, 10: Metabolic process, 11: Multicellular organismal process, 12 : Multiorganism process, 13: Negative regulation of biological process, 14: Positive regulation of biological process, 15: Regulation of biological process, 16: Reproduction, 17: Reproductive process, 18: Response to stimulus, 19: Rhythmic process, 20: Signaling, 21: Single-organism process, 22: Establishment of localization, 23: Cell, 24: Cell junction, 25: Cell part, 26: Extracellular matrix, 27: Extracellular matrix part, 28: Extracellular region, 29: Extracellular region part, 30: Macromolecular complex, 31: Membrane, 32: Membrane-enclosed lumen, 33: Membrane part, 34: Nucleoid, 35: Organelle, 36: Organelle part, 37: Synapse, 38: Virion, 39: Virion part, 40: Antioxidant activity, 41: Binding, 42: Catalytic ac-tivity, 43: Metallochaperone activity, 44: Molecular transducer activity, 45: Nucleic acid binding transcription factor activity, 46: Structural molecule activity, 47: Protein binding transcription factor activity, 48: Transporter activity, 49: Enzyme regulator activity, 50: Receptor activity, 51: Electron carrier activity, 52: Protein tag, 53: Nutrient reservoir activity, 54: Translation regulator activity, 55: Channel regulator activity

图 2 GO 功能注释

Fig.2 The functional annotation using GO analysis

表 3 Unigene 数量最多的 15 条代谢途径

Table 3 The metabolic pathways with top 15 number of Unigene

途径 Pathway	Unigene 数量 Number of Unigene	Unigene 百分比 (%) Percent of Unigene	ID
代谢途径 Metabolic pathway	13357	36.06	ko01100
RNA 转运 RNA transport	7432	20.07	ko03013
mRNA 监测途径 mRNA surveillance pathway	6351	17.15	ko03015
内吞作用 Endocytosis	5414	14.62	ko04144
脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	5277	14.25	ko00564
醚脂代谢 Ether lipid metabolism	5031	13.58	ko00565
次生代谢产物生物合成 Biosynthes is of secondary metabolites	4534	12.24	ko01110
植物 - 病原物互作 Plant-pathogen interaction	3240	8.75	ko04626
剪接体 Spliceosome	2157	5.82	ko03040
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	2002	5.41	ko04075
嘌呤代谢 Purine metabolism	1734	4.68	ko00230
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	1679	4.53	ko00240
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	1635	4.41	ko00500
RNA 聚合酶 RNA polymerase	1347	3.64	ko03020
戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化 Pentose and glucuronate interconversions	1287	3.47	ko00040

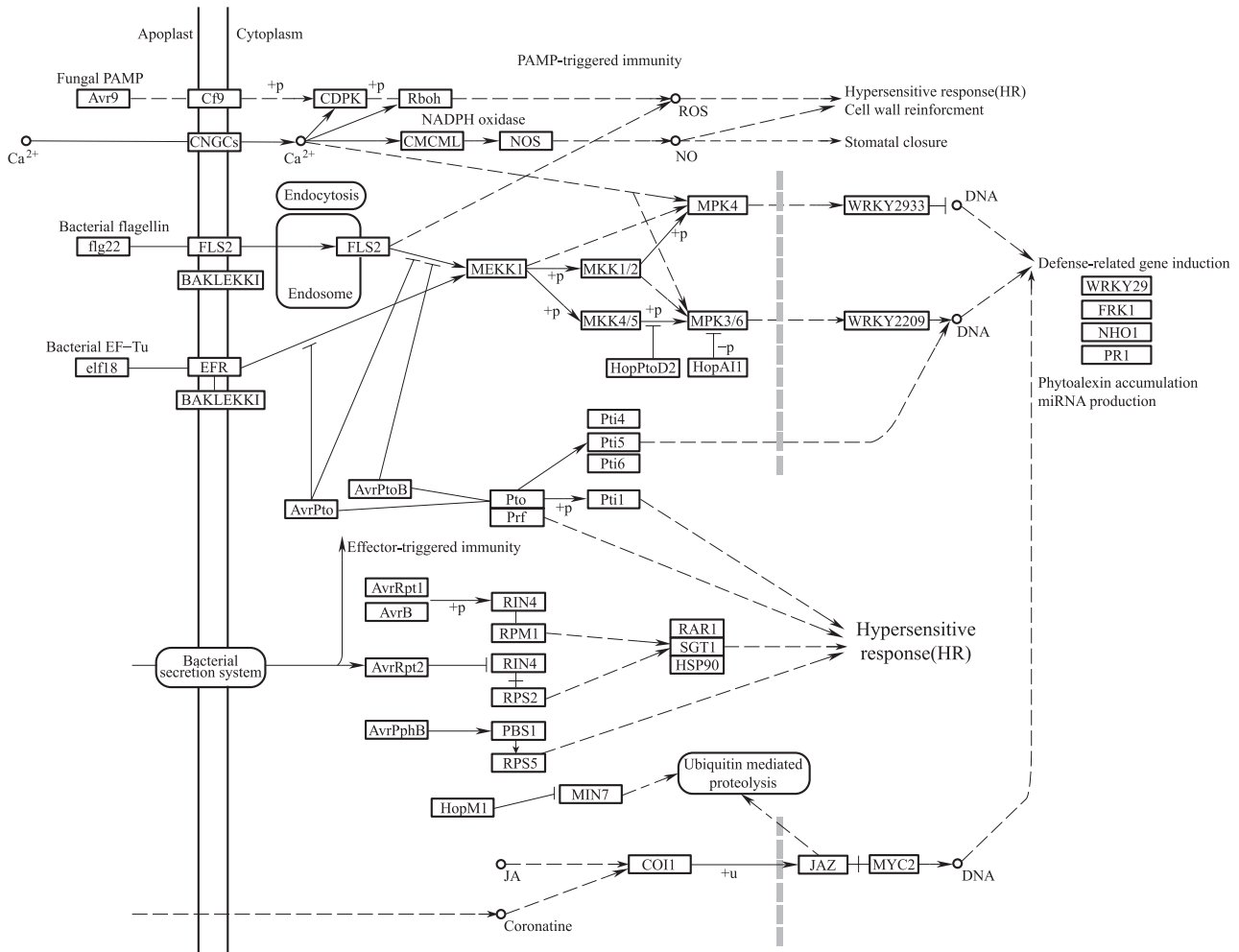


图3 植物-病原物互作代谢通路

Fig.3 Plant-pathogen interaction pathway

2.3 小麦与叶锈菌互作过程中差异表达基因分析

根据 FPKM 方法计算样本间的基因表达差异, 差异倍数在 2 倍以上即 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ 的基因定义为差异表达基因。在小麦与叶锈菌互作过程中, 接种后 8~12 h 是叶锈菌的附着胞和气孔下泡囊形成的时期, 此时是寄主与叶锈菌之间识别、诱发基础防卫反应的关键时期。接种后 16~24 h 是叶锈菌形成 HMC 和吸器的时期, 也是与 HMC 接触的寄主细胞发生 HR 的时期。将获得的转录组数据进行差异比较, 分析不同时期差异基因的表达情况 (图 4)。

在亲和组合中, 接种后 8 h 相对于接种后 0 h, 有 7655 条 Unigenes 上调表达, 5400 条 Unigene 下调表达, 在接种后 24 h 有 8220 条 Unigenes 上调, 2768 条 Unigenes 下调, 说明在小麦与叶锈菌互作过程中, 叶锈菌的侵染能够诱导或抑制寄主体内某些基因的表达, 从而利于自身的生长发育。

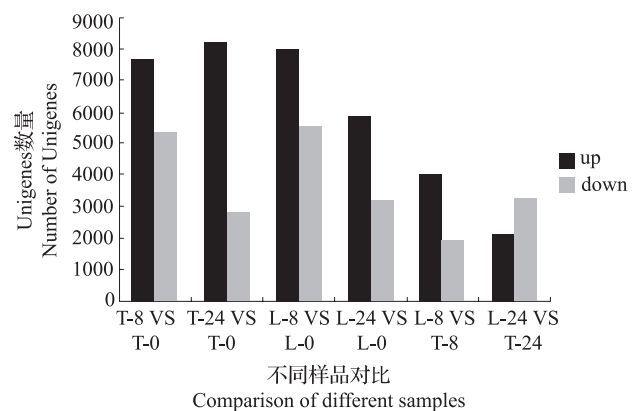


图4 差异表达基因统计

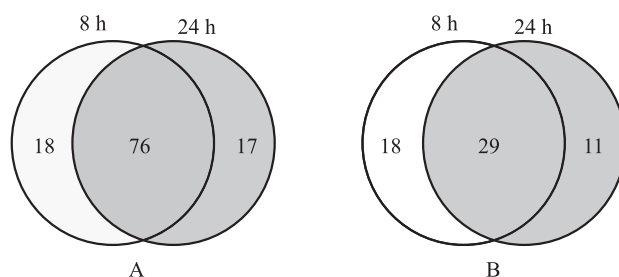
Fig. 4 Statistics of differentially expressed genes

在不亲和组合中, 接种后 8 h 相对于接种后 0 h, 有 7963 条 Unigenes 上调表达, 5585 条 Unigenes 下调表达。而相对于亲和组合接种后 8 h, 不亲和组合中上调 Unigenes 数量共有 4037 条, 下调 Unigenes 共有 1949 条, 这些在接种早期的差异

表达基因可能与基础防卫反应的诱发有关, 分别发挥正调控和负调控作用。在不亲和组合接种后 24 h 相对于接种后 0 h 有 5829 条 Unigenes 上调, 3202 条 Unigenes 下调; 而相对于亲和组合接种后 24 h, 不亲和组合中下调 Unigene 数量是 3248 条, 明显高于上调 Unigenes 数量 2122 条。此时基因表达量的变化可能与 *Lr26* 介导的 HR 的发生密切相关。这些基因的差异表达为深入分析和筛选小麦与叶锈菌互作过程中的抗病相关基因提供了丰富的信息与资源。

分析植物与病原体相互作用代谢通路, 其中与钙信号通路相关的差异表达 Unigenes 共有 149 条, 在不亲和组合中共有 111 条上调, 94 条 Unigenes 在 8 h 上调, 93 条 Unigenes 在 24 h 上调, 其中共上调基因 76 条, 将不亲和组合中上调基因与亲和组合相比, 发现 29 条属于共上调基因 (图 5)。据此推测钙信号通路不仅参与了基础防卫反应的诱发, 同时与 *Lr26* 介导的 HR 的发生密切相关。通过对参与活性氧爆发相关基因进行差异分析发现, 不亲和组合中与活性氧爆发相关基因表达量在接种后 8 h 和 24 h 持续高表达, 在亲和组合中即使某些基因表达量在 8 h 有上调表达, 但其表达量仍低于不亲和组合, 说明活性氧可能作为重要的信号分子即参与基础防卫反应的诱发也参与 *Lr26* 介导的 HR 的发生。在水杨酸 (SA) 介导的抗病途径中, 发现水杨酸受体蛋白 *NPR1* 基因 Unigenes 在接种后 8 h 上调表达, 有 5 条 Unigenes 在接种后 24 h 上调表达, 下游转录因子 TGA 中有 10 条 Unigenes 上调表达, 表明

SA 在基础防卫反应和 HR 诱发过程中发挥重要作用。通过转录组数据发现 JA 介导的相关基因的表达量没有发生变化, 意味着 JA 介导的信号途径可能没有参与小麦抵抗叶锈菌侵染诱发的防卫反应表达过程。



A: 不亲和组合中钙信号途径相关的上调基因;

B: 不亲和组合与亲和组合相比钙信号途径相关的上调基因

A: Calcium related up-regulated genes in incompatible combinations,

B: Calcium related up-regulated genes in incompatible and compatible combinations

图 5 钙信号通路相关差异基因统计

Fig. 5 Statistic of calcium signal pathway related differentially expressed genes

2.4 相关基因表达的 RT-qPCR 验证

为验证转录组数据库的准确性, 随机选取 5 个差异表达基因, 利用实时荧光定量 PCR 检测其在小麦接种叶锈菌后不同时间点的表达趋势 (图 6), 结果显示, 实时荧光定量 PCR 检测结果与转录组测序的结果 (图 7) 虽在基因表达变幅上有一定的差异, 但基因的表达趋势是一致的, 这说明转录组测序结果是可靠的。

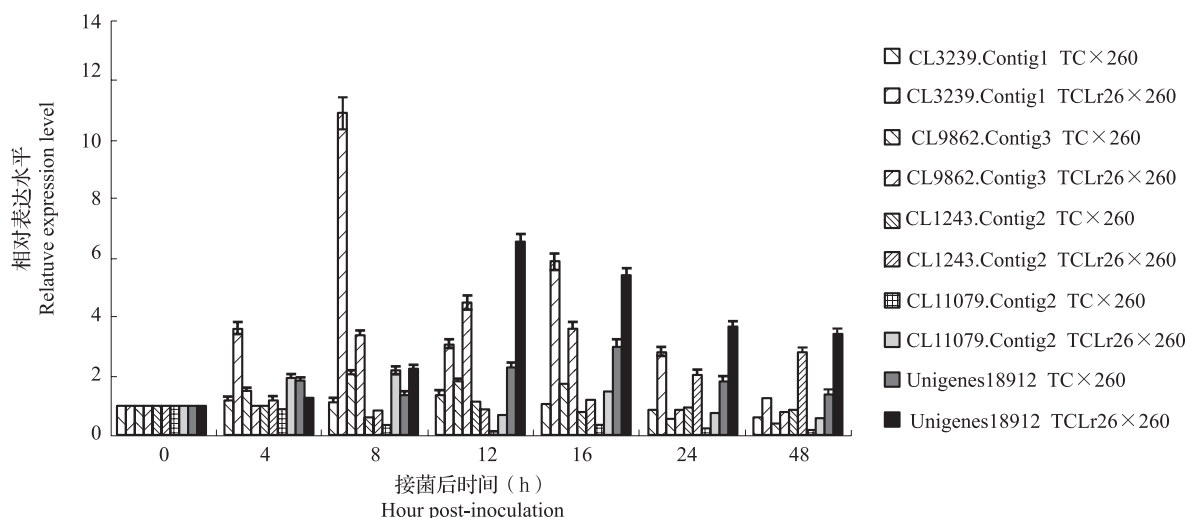


图 6 RT-qPCR 验证部分差异表达基因

Fig. 6 RT-qPCR analysis of selected differentially expressed genes

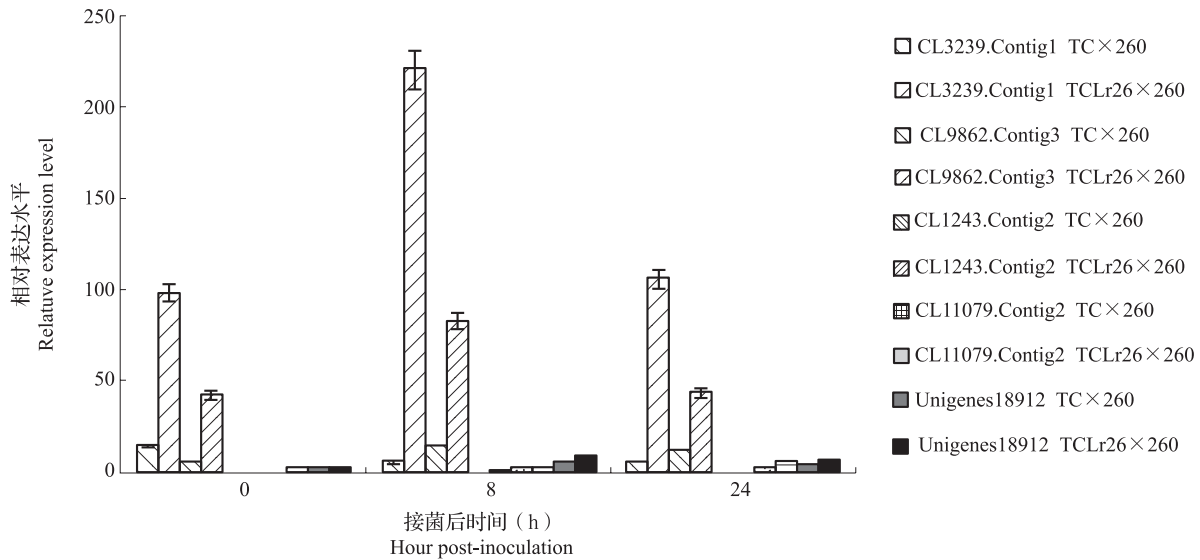


图7 转录组数据显示的部分基因表达水平

Fig.7 The Expression levels of selected genes revealed by the transcriptome datasets

3 讨论

经由二代测序支持的转录组测序技术,是发现与鉴定新基因的一种非常有效的手段。转录组学分析是了解细胞在某一特定环境和生理条件下的基因表达情况。植物,特别是非模式植物,由于其基因组庞大且复杂,而且是多倍体和多拷贝基因,使得整体测序研究非常困难。高通量 Illumina/Solexa 测序技术凭借其高效、快速、低成本、高可靠性的特点,已经成为广泛应用的转录组测序分析和非模式生物基因发掘的工具,并在各方面的研究工作中,尤其是在生物胁迫以及关于基因表达调控的研究方面发挥着重要的作用^[20-22],通过对基因功能及表达差异进行整体水平的分析研究,揭示植物在应答某些生物胁迫或非生物胁迫过程中的分子机理和特定生物学过程。

近年来,随着几种二代测序技术的应用,通过高通量测序手段来分析寄主与病原物互作的植物基因组学研究取得了飞速发展。通过对植物与病原物互作的转录组分析,可获知两者互作过程中较为详细的分子机制,为阐释抗病机理奠定基础。Xiao 等^[9]对小麦接种禾谷镰刀菌后的转录组学分析,发现 JA 介导的防卫反应信号通路被激活,而乙烯、活性氧和钙信号通路受到抑制,水杨酸信号通路没有被激活。Xu 等^[23]在棉花与黄萎病菌的互作转录组中筛选出 24 个差异表达基因,进一步研究表明在棉花抗病反应中,活性氧、水杨酸和茉莉酸信号通路均参与了棉花抗黄萎病菌的过程。曾庆东^[10]利用高通量的二

代测序技术,对接种条锈菌的小麦叶片进行多个时间点的转录组测序分析,探索了小麦与条锈菌互作的分子机制,初步解析了激素代谢及防卫反应相关基因对病菌侵染的响应,并发现参与光合作用的基因显著下调表达,为研究病害造成的小麦产量损失提供了理论基础。乔妹等^[24]利用转录组测序技术对小麦与叶锈菌互作过程中的信号转导机制进行研究,结果表明与 NO 和 H₂O₂ 产生相关的基因在叶锈菌侵染小麦后高度特异表达,而在注射 Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 后再接种叶锈菌其表达量均下调表达,说明在叶锈菌侵染诱发产生的过敏性反应过程中, Ca²⁺ 可能在 H₂O₂ 和 NO 的上游发挥作用,这与在该互作体系中所进行的药理学试验结果是一致的。Zhang 等^[25]在对小麦分别接种 2 种活体寄生真菌小麦条锈菌和白粉菌后进行 RNA-seq 分析,发现小麦在应对不同病原菌侵染时所激活的基因表达和信号通路具有明显差异。这些研究作为开展小麦转录组生物信息学分析以及抗病基因的筛选鉴定提供了重要的试验基础和参考数据。

本研究利用只含有抗叶锈基因 *Lr26* 的小麦单基因系 *TcLr26* 与叶锈菌生理小种 260 组成不亲和组合,其轮回亲本 *Tc* 与叶锈菌生理小种 260 组成亲和组合,分别于接种叶锈菌生理小种 260 后 0 h、8 h、24 h 进行转录组测序,对不同时间、不同组合的转录组数据比较分析。在接种叶锈菌后 8 h、24 h 与 0 h 相比,8 h 差异表达基因可能与基础防卫反应的诱发有关,24 h 基因差异表达的变化可能与 *Lr26*

介导的 HR 的发生密切相关,持续发生变化的差异表达基因可能不仅参与基础防卫反应的诱发,而且与 *Lr26* 介导的过敏反应有关;同时对不亲和组合与亲和组合同时期的表达基因进行比较,差异基因表达数量大大缩小,此表达差异为进一步筛选小麦抗叶锈重要相关基因提供了丰富的候选基因序列数据,同时为深入开展 *Lr26* 介导的抗叶锈机制奠定了坚实基础。

本实验室前期工作表明 Ca^{2+} 、 H_2O_2 、SA 参与小麦抵抗叶锈菌侵染过程^[26-30]。分析植物与病原物互作通路中的差异表达基因,不亲和组合中钙信号通路中的相关基因有 76 条 Unigenes 在 8 h 和 24 h 共上调表达,与亲和相比较,共上调表达基因下降至 29 条,将参与钙信号通路的基因数量大幅缩小,可以进一步确定和完善钙信号通路。实验室前期的研究结果表明,在小麦与叶锈菌不亲和组合中表现为 2 次 H_2O_2 爆发,而亲和组合中只有 1 次,将转录组数据库中参与活性氧爆发相关基因进行差异分析发现,不亲和组合中与活性氧爆发相关基因表达量在 8 h 和 24 h 持续高表达,在亲和组合中基因表达量在 8 h 上调表达,但低于不亲和组合。SA 作为植物系统获得性抗性过程的关键激素,与细胞质中 SA 受体 NPRs 结合,激活下游转录因子 TGA,进而激活下游大量的抗性相关基因的表达,抵制病原菌向未侵染部位的扩散^[31]。实验室前期通过检测小麦受叶锈菌侵染过程中 SA 含量的变化发现在不亲和组合中接种后 8 h 游离态 SA 含量较接种后 0 h 明显增加,而亲和组合及模拟接种的对照没有明显变化,初步证明 SA 参与小麦抵抗叶锈菌侵染的过程。在转录组中筛选 SA 下游基因发现,7 条 NPR/Unigenes 在 8 h 上调表达,5 条 Unigenes 在 24 h 上调表达;转录因子 TGA 中 10 条 Unigenes 上调表达,进一步确定 SA 参与小麦抵抗叶锈菌侵染的过程,并为其下游基因的确定奠定了基础。通过转录组数据发现 JA 介导的相关基因的表达量没有发生变化,推测在小麦抵抗叶锈菌侵染过程中,可能没有启动 JA 介导的抗病途径的参与。

综上所述,利用 Illumina/Solexa 平台对小麦与叶锈菌互作材料进行高通量测序,通过将 Unigenes 同 Nr、GO、COG、KEGG 等数据库进行比对,对其功能和所在通路进行了注释,发现在小麦与叶锈菌组成的不同组合中存在的大量差异表达基因,这为从转录组水平深入分析和筛选小麦与叶锈菌互作过程中的抗病相关基因提供了丰富的信息与资源。

参考文献

- [1] 李振崎,曾士迈,康振生. 中国小麦锈病. 北京: 中国农业出版社, 2000: 10
Li Z Q, Zeng S M, Kang Z S. Wheat rust in China. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 10
- [2] 杨华丽,张晓玲,赵艳博,徐新玉,姚占军. 小麦品种莱州 137 抗叶锈病鉴定及基因检测. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 289-295
Yang H L, Zhang X L, Zhao Y B, Xu X Y, Yao Z J. Identification and detection of leaf rust resistance genes on wheat cultivar laizhou 137. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 289-295
- [3] 师令智,朱琳,任志宽,康占海,李星,刘大群. 小麦品系 19HRWSN-76 的抗叶锈性研究. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 696-700
Shi L Z, Zhu L, Ren Z K, Kang Z H, Li X, Liu D Q. Study of leaf rust resistance gene in wheat line 19HRWSN-76. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(4): 696-700
- [4] 胡亚亚,孙一,张河山,魏学军,杜冬冬,杨文香,刘大群,陆和平. 8 个小麦育种亲本抗叶锈基因分析. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 802-809
Hu Y Y, Sun Y, Zhang H S, Wei X J, Du D D, Yang W X, Liu D Q, Lu H P. Wheat leaf rust resistance genes of eight wheat breeding parents. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(4): 802-809
- [5] Budak H, Khan Z, Kantar M. History and current status of wheat miRNAs using next-generation sequencing and their roles in development and stress. Briefings in Functional Genomics, 2014, 14(3): 189-198
- [6] Mizuno H, Kawahara Y, Sakai H, Kanamori H, Wakimoto H, Yamagata H, Oono Y, Wu J Z, Ikawa H, Itoh T, Matsumoto T. Massive parallel sequencing of mRNA in identification of unannotated salinity stress-inducible transcripts in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Genomics, 2010, 11(1): 683-695
- [7] Thatcher S R, Zhou W, Leonard A, Wang B, Beatty M, Zastrow-Hayes G, Zhao X, Baumgarten A, Li B. Genome-wide analysis of alternative splicing in *Zea mays*: landscape and genetic regulation. The Plant Cell, 2014, 26(9): 3472-3487
- [8] Hackenberg M, Huang P J, Huang C Y, Shi B J, Gustafson P, Langridge P. A comprehensive expression profile of microRNAs and other classes of non-coding small RNAs in barley under phosphorous deficient and sufficient conditions. DNA Research, 2012, 20(2): 109-125
- [9] Xiao J, Jin X, Jia X, Wang H, Cao A, Zhao W, Pei H, Xue Z, He L, Chen Q, Wang X. Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. BMC Genomics, 2013, 14(1): 1-19
- [10] 曾庆东. 小麦抗条锈病基因 *Yr26* 载体材料 BAC 文库构建及转录组测序. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
Zeng Q D. The BAC library construction and transcriptome analysis of wheat material which carry *Yr26* gene. Yangling: Northwest A & F University, 2016
- [11] Kim K H, Kang Y J, Kim D H, Yoon M Y, Moon J K, Kim M Y, Van K, Lee S H. RNA-Seq analysis of a soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and-susceptible alleles. DNA Research, 2011, 18: 483-497

- [12] Zhu Q, Stephen S, Kazan K, Jin G, Fan L, Taylor J, Dennis E S, Helliwell C A, Wang M B. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. *Gene*, 2013, 512: 259-266
- [13] Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta S L, Kebrom T H, Provart N, Patel R, Myers C R, Reidel E J, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell T P. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics*, 2010, 42: 1060-1067
- [14] Kang C, Darwish O, Geretz A, Shahan R, Alkharouf N, Liu Z. Genome-scale transcriptomic insights into early-stage fruit development in woodland strawberry *Fragaria vesca*. *The Plant Cell*, 2013, 25 (6): 1960-1978
- [15] Ma X, Gu P, Liang W, Zhang Y, Jin X, Wang S, Shen Y, Huang Z. Analysis on the transcriptome information of two different wheat mutants and identification of salt-induced differential genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473 (4): 1197-1204
- [16] Dalal M, Sahu S, Tiwari S, Rao A R, Gaikwad K. Transcriptome analysis reveals interplay between hormones, ROS metabolism and cell wall biosynthesis for drought-induced root growth in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 276-286
- [17] 孙嘉伟. 一个新的小麦富半胱氨酸受体激酶基因在抗叶锈病中的功能研究. 保定: 河北农业大学, 2016
Sun J W. Study on the function of a new wheat cysteine-rich receptor-like kinase gene involved in wheat resistance to *Puccinia triticina* infection. Baoding: Hebei Agricultural University, 2016
- [18] Jonathan D G, Jeffery L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444 (7117): 323-329
- [19] 白志英, 王冬梅, 侯春燕, 韩胜芳. 小麦与叶锈菌互作过程中细胞程序性死亡的生化证据. *实验生物学报*, 2004, 37 (4): 329-332
Bai Z Y, Wang D M, Hou C Y, Han S F. Histological observation on programmed cell death in wheat-leaf rust fungus interaction. *Journal of Experimental Biology*, 2004, 37 (4): 329-332
- [20] Shaik R, Ramakrishna W. Genes and co-expression modules common to drought and bacterial stress responses in *Arabidopsis* and Rice. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e77261
- [21] Lewis L A, Polanski K, de Torres-Zabala M, Jayaraman S, Bowden L, Moore J, Penfold C A, Dafyd J, Jenkins D J, Hill C, Baxter L, Kulasekaran S, Truman W, Littlejohn G, Prusinska J, Mead A, Steinbrenner J, Hickman R, Rand D, Wild D L, Sascha, Ott S, Buchanan-Wollaston V, Smirnov N, Beynon J, Denby K, Grant M. Transcriptional dynamics driving MAMP-triggered immunity and pathogen effector-mediated immunosuppression in *Arabidopsis* leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *The Plant Cell*, 2015, 27 (11): 3038-3064
- [22] Sham A, Moustafa K, Al-Ameri S, Al-Azzawi A, Iratni R, AbuQamar S. Identification of *Arabidopsis* candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. *PLoS One*, 2015, 10 (5): e0125666
- [23] Xu L, Zhang W, He X, Liu M, Zhang K, Shaban M, Sun L, Zhu J, Luo Y, Yuan D, Zhang X, Zhu L. Functional characterization of cotton genes responsive to *Verticillium dahliae* through bioinformatics and reverse genetics strategies. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65 (22): 6679-6692
- [24] 乔妹, 孙嘉伟, 陈琰, 韩胜芳, 侯春燕, 刘刚, 王冬梅. 小麦悬浮细胞应答激发子刺激的过敏性反应中 Ca^{2+} 和 NO 的动态变化及其相互作用. *植物学报*, 2015, 50 (1): 1-11
Qiao M, Sun J W, Chen Y, Han S F, Hou C Y, Liu G, Wang D M. Dynamics and Interaction of Ca^{2+} and nitric oxide in wheat suspension cells in the hypersensitive response. *Chinese Bulletin of Botany*, 2015, 50 (1): 1-11
- [25] Zhang H, Yang Y, Wang C, Liu M, Li H, Fu Y, Wang Y, Nie Y, Liu X, Ji W. Large-scale transcriptome comparison reveals distinct gene activations in wheat responding to stripe rust and powdery mildew. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 1-14
- [26] 刘刚, 党磊, 王冬梅. 激发子诱发小麦叶肉细胞原生质体微管骨架排列格局与 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 的变化. *分子细胞生物学报*, 2007, 40 (4): 217-225
Liu G, Dang L, Wang D M. The influence of elicitor on the distribution pattern of microtubule and the cytosolic calcium in mesophyll protoplast of wheat. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2007, 40 (4): 217-225
- [27] 祁艳, 刘刚, 侯春燕, 王冬梅. 小麦与叶锈菌互作过程中的 H_2O_2 与 HR. *分子细胞生物学报*, 2008, 41 (4): 245-254
Qi Y, Liu G, Hou C Y, Wang D M. The generation of H_2O_2 in wheat hypersensitive reaction induced by leaf rust fungus. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2008, 41 (4): 245-254
- [28] 任丽梅, 陈琰, 王冬梅. IWF 诱导小麦悬浮细胞 H_2O_2 迸发及其产生机制初探. *中国农业科学*, 2010, 43 (8): 1577-1584
Ren L M, Chen Y, Wang D M. Induction of H_2O_2 burst of wheat suspension cells by IWF and preliminary study on its productive mechanism. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 (8): 1577-1584
- [29] 陈阳辉, 刘静, 陈琰, 侯春燕, 王冬梅. IWF 诱导小麦悬浮细胞产生 NO 及其与 Ca^{2+} 的关系. *中国农业科学*, 2011, 44 (12): 2061-2067
Chen Y H, Liu J, Chen Y, Hou C Y, Wang D M. Induction of NO and the relationship between NO And Ca^{2+} in wheat suspension cells induced by IWF. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (12): 2061-2067
- [30] 李晖. 水杨酸在小麦抵抗叶锈菌侵染中的作用初探. 保定: 河北农业大学, 2015
Li H. To explore the role of salicylic acid during induced defense response of wheat to *Puccinia triticina*. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015
- [31] Nahar K, Kyndt T, Nzogela Y B, Gheysen G. Abscissic acid interacts antagonistically with classical defense pathways in rice-migratory nematode interaction. *New Phytologist*, 2012, 196 (3): 901-913