

小麦响应白粉菌侵染的表型特征、生理应答和免疫信号传导通路分析

白双宇, 崔原瑗, 王昭懿, 何俊涛, 刘彩霞, 刘凤楼, 王掌军, 李清峰
(宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘要: 了解植物应对病原物入侵的反应对挖掘抗性基因具有重要意义。通过白粉菌侵染小麦中作9504幼苗, 观察侵染后0 h、6 h、1 d、4 d和7 d小麦叶片生长、生理代谢相关指标和基因表达变化, 揭示白粉菌侵染对小麦生长、渗透调节物质及活性氧的响应机制。结果表明, 随着侵染时间的增加, 小麦叶片死细胞数目、过氧化物酶活性和超氧阴离子数量呈上升趋势, 白粉菌在7 d后生长出成熟的分生孢子。苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶分别在4 d和1 d后发挥作用, 可溶性蛋白含量随侵染时间增加基本呈上升趋势, 叶绿素含量在7 d时显著下降, 进而影响植物生长, 过氧化氢含量在整个侵染时期变化不大。转录组分析发现侵染初期(0 h到6 h)PTI信号传导部分受抑制下调, 侵染前中期(6 h到1 d和1 d到4 d)PTI信号传导积极响应, ETI出现在侵染前期, 侵染后期(4 d到7 d)由于白粉菌已经完全定殖于叶片表面, 影响小麦的光合作用, PTI和ETI信号传导通路均有下调的趋势。研究结果为进一步了解小麦响应白粉菌侵染的防御机制提供一定参考。

关键词: 小麦; 白粉菌; 活性氧; 信号传导; 转录组分析

Analysis of Phenotypic Characteristics, Physiological Responses, and Immune Signaling Pathways in Wheat in Response to *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*

BAI Shuangyu, CUI Yuanyuan, WANG Zhaoyi, HE Juntao, LIU Caixia,
LIU Fenglou, WANG Zhangjun, LI Qingfeng
(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: Understanding plant responses to pathogen invasion is important for identifying resistance genes. In this experiment, the seedlings of wheat variety Zhongzuo 9504 were inoculated by powdery mildew, in order to observe the changes of growth, physiological metabolism-related indexes and gene expression in wheat leaves at 0 h, 6 h, 1 d, 4 d and 7 d after infestation. This study attempted to reveal the response mechanism of powdery mildew inoculation on the growth, osmoregulatory substances and reactive oxygen species in wheat. The results showed that with the increase of inoculation time, the number of dead cells, and the activity of peroxidase and superoxide anion in wheat leaves tended to increase. The powdery mildew produced mature secondary conidia 7 days post inoculation. Phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase functioned at different infestation times. Soluble protein content basically showed an increasing trend, chlorophyll content decreased significantly at 7 d, which in turn affected plant growth. No significant changes on hydrogen peroxide content was observed

收稿日期: 2023-08-22 修回日期: 2023-10-29 网络出版日期: 2023-11-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230822001>

第一作者研究方向为小麦遗传育种, E-mail: bsy0512@163.com

通信作者: 李清峰, 研究方向为小麦遗传育种, E-mail: liqingfeng2017@nxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(32260467); 宁夏重点研发计划(引才专项)(2021BEB04070); 宁夏自然科学基金(2022AAC03031); 宁夏大学研究生创新项目(CXXM202346)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32260467); Ningxia Key Research and Development Program (Special Talents) (2021BEB04070); Natural Science Foundation of Ningxia (2022AAC03031); Postgraduate Innovation Foundation of Ningxia University (CXXM202346)

throughout the inoculation period. Transcriptome analysis revealed that PTI signaling was partially inhibited and down-regulated at the initial stage of inoculation (0 h to 6 h). PTI signaling responded positively in the early and middle stages (6 h to 1 d and 1 d to 4 d), while ETI appeared in the early stage. In the late stage of infestation (4 d to 7 d), there was a down-regulation tendency on both the PTI and ETI signaling pathways, as powdery mildew had colonized the surface of the leaf completely, thus compromising photosynthesis in wheat.

Key words: wheat; *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*; reactive oxygen species; signal transduction; transcriptome analysis

小麦作为重要的主粮作物,在世界上许多地区广泛种植,其生产安全在全球具有重要的意义^[1]。由专性生物营养真菌禾布氏白粉菌小麦专化型(*Bgt*, *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*)引起的小麦白粉病是最具破坏性的小麦病害之一,对小麦生产造成了严重的经济损失,可导致10%~40%的产量损失,严重时可导致颗粒无收^[2]。为了减少白粉菌造成的损害,科研人员投入了大量的精力研究小麦抗白粉病的遗传分子机制,以便制定有效的控制措施^[3-5]。

在植物与病原菌长期协同进化的过程中,植物形成了先天免疫信号传导通路和后天免疫信号传导通路,先天免疫机制病原体相关分子模式激发的免疫反应(PTI, PAMP-triggered immunity)和效应子激发的免疫反应(ETI, effector-triggered immunity)分别充当植物防御病原菌侵染的第一道和第二道防线,分别发生在效应子转运之前和转运之后^[6]。植物在识别病原物相关分子模式(PAMP, pathogen-associated molecular pattern)后,引起了包括Ca²⁺内流、K⁺外流的反应,从而激活下游的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinase)级联反应,诱导活性氧(ROS, reactive oxygen species)爆发、胼胝质沉积及相关免疫基因的表达^[7-9]。为使得植物细胞生理代谢水平趋于正常,活性氧稳态维持是必不可少的,其偏离可能使细胞增殖受到抑制。过多的活性氧分子可以被抗氧化防御成分清除以维持基础无毒水平和生理稳态^[10]。研究表明,植物产生病程相关蛋白(PR, pathogenesis-related protein)是为了抵御病原菌,PR蛋白在感染组织内部和未感染组织周围积聚,限制病原菌向未感染组织蔓延。此外,乙烯、水杨酸也能诱导PR蛋白的产生^[11]。有研究表明苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)和多酚氧化酶(PPO, polyphenol oxidase)随着病原菌的感染而增加,过表达苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶基因能使植物对病原菌的抗性增加^[12-14],同时苯丙氨酸解氨酶也是苯丙烷代谢的关键酶,有助于合成次级代谢物,如

香豆素、类黄酮、酚类衍生物和木质素等,这些代谢物可以参与对病原菌的防御。

小麦对真菌感染的反应非常复杂,涉及一系列生物反应和生理过程。以感病品种中作9504为材料,研究中作9504对白粉菌的响应变化情况,了解白粉菌不同侵染阶段表型特征、生理生化的响应和免疫信号传导的动态变化,为解析小麦对白粉菌侵染的防御机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

普通小麦品种中作9504为感白粉病材料,白粉菌(*Bgt*, *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*)由宁夏大学实验农场采集的分生孢子经分离纯化而来,用灭菌牙签从单个病斑挑取少量孢子在中作9504叶段划线接种,培养5 d后挑取长有单个菌落的叶片的新鲜孢子进行划线接种,反复5次纯化后长出的菌株为单孢子堆菌株。并在宁夏大学农学院作物遗传育种实验室进行繁殖和保存。

1.2 病原菌接种及表型观察

选发芽均匀一致的中作9504种子种于直径10 cm、高8 cm的花盆,每盆种植30株,罩以保鲜袋,在小麦幼苗长至一叶一心完全展开时,在叶片中间叶段采取抖落法高密度均匀的接种*Bgt*分生孢子,接种完成后用保鲜膜罩保湿,放于人工气候培养箱中培养(温度20℃/18℃,光照14 h/黑暗10 h)。在接种后0 h、6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d和7 d共9个时间点剪取接种叶段,每个时间点取3株,每株选取一个叶片的叶片中部,将其分为3段,共9次重复。组织观察:主要观察不同侵染时期叶片和白粉菌的生长状况,将叶片正面用玻片压平后拍照观察表型;将台盼蓝染色的叶片置于玻片上压平,盖上盖玻片,在10×40倍光学显微镜下观察白粉菌在不同时间点的生长状态。在接种后0 h、6 h、1 d、4 d和7 d共5个时间点,对叶段中部进行取样,每个时间点3个重复,样本用液氮速冻后放于-80℃冰箱保存。

1.3 白粉菌侵染下小麦生理生化特征观察

1.3.1 小麦叶片观察 对接种0 h、6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d和7 d共9个时间点的叶段进行染色观察。台盼蓝染色:将叶片用脱色液脱色完全,使用固定液固定,滴加0.4%台盼蓝染色5 min后显微镜观察。二氨基联苯胺(DAB, 3,3'-diaminobenzidine)染色:将叶片放入配制好的1 mg/mL二氨基联苯胺反应液中,避光处理6 h,将叶片取出冲洗,放入90%乙醇70℃沸水浴脱色,显微镜观察。NBT染色:用pH7.8的磷酸缓冲液配制0.5 mg/mL氮蓝四唑(NBT, nitroblue tetrazolium)反应液,叶片放入反应液中处理1 h,用90%乙醇70℃沸水浴脱色,显微镜观察。

1.3.2 生理指标测定 对接种0 h、6 h、1 d、4 d和7 d共5个时间点的叶片进行生理指标测定。苯丙氨酸解氨酶活性:参照Zucker^[15]的方法测定苯丙氨酸解氨酶活性,在290 nm处测定吸光度,酶活力为每分钟每克样吸光度变化0.01为一个活力单位。多酚氧化酶活性:参照González等^[16]的方法测定多酚氧化酶活性,在410 nm波长下测定吸光度值,2 min后记录吸光度值,酶活力以每分钟每克样吸光度变化0.01为一个活力单位。可溶性蛋白质(SP, soluble protein)含量:参照Bradford^[17]的方法用考马斯亮蓝G-250染色法测定可溶性蛋白含量,在595 nm处测定其吸光度。过氧化氢(H₂O₂, hydrogen peroxide)含量采用试剂盒测定(金克隆生物技术有限公司);叶绿素(CHL, chlorophyll)含量参照Arnon^[18]的方法测定663 nm、645 nm波长下的吸光度。

1.4 数据分析

数据采用SPSS 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)进行单因素方差分析(ANOVA, one-way analysis of variance),以检测不同侵染时间的差异显著性($P < 0.05$)。使用R的cor()函数计算相关性系数,使用corrplot包进行pearson相关系数的可视化。

1.5 转录组测序

将收集到的15个样本(0 h、6 h、1 d、4 d和7 d每个时间点各3个重复)送至广州基迪奥生物科技有限公司(中国广东)。使用Omega Bio-Tek公司的Omega Plant RNA kit试剂盒(R6827)提取RNA,在测试样品后,使用Illumina平台构建cDNA文库并测序。参考基因组和基因组注释文件于ensembl plants数据库(http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index)下载。测序所得的Raw reads经过质量处理后得到高质量Clean reads。利用DEGseq2^[19]软件统计检验FDR值与差异倍数

log₂FC筛选差异基因,默认阈值为校正后pvalue值(FDR) < 0.05, |log₂FC| ≥ 1。将差异表达基因(DEG, differentially expressed gene)的转录本映射到KEGG数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)中,对差异基因进行富集归类,找出与整个基因组背景相比,在差异基因中显著富集的通路,选择Qvalue ≤ 0.05的通路定义为显著富集的通路^[20]。使用z-score对基因FPKM值进行标准化,不同时间点3个重复取平均,使用R语言的pheatmap和ggplot2包绘制可视化热图,并对这些基因的FPKM值进行了聚类分析。

2 结果与分析

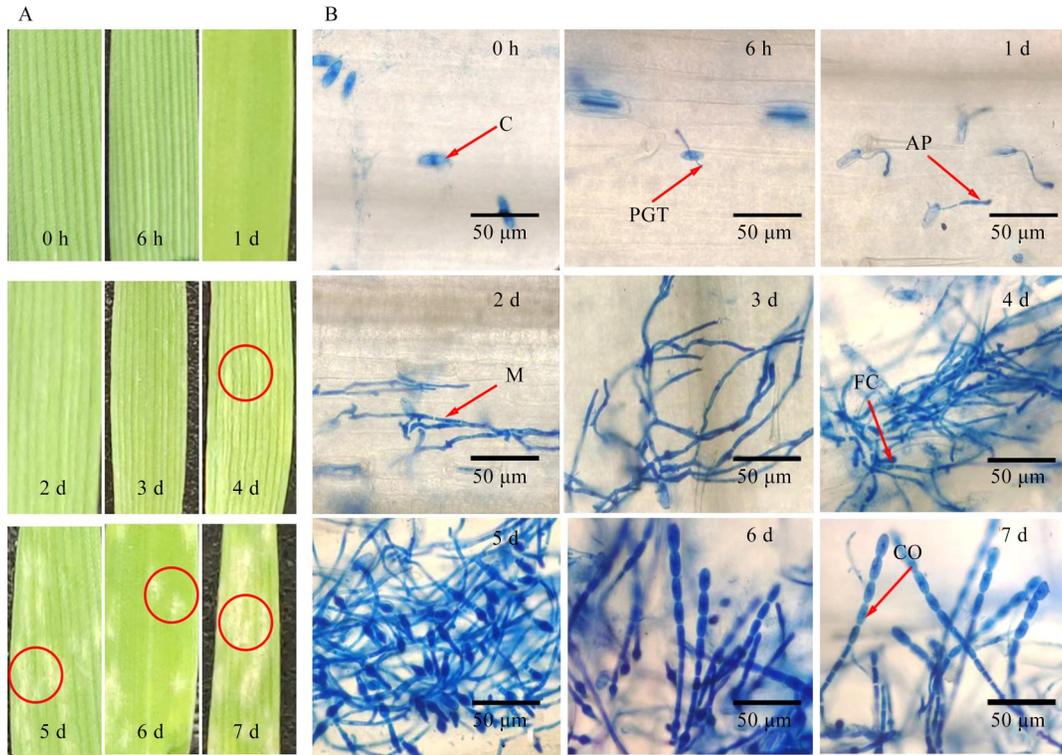
2.1 白粉菌侵染对小麦叶片生长的影响

与对照(侵染0 h)相比,小麦叶片在接种白粉菌4 d表现出现肉眼可见的变化,接种7 d表面出现大量成熟的菌丝和白粉菌分生孢子(图1A)。通过观察白粉菌在不同侵染时期(9个时间点)的生长状态可以看出,在6 h出现初生芽管,1 d出现附着胞,4 d菌丝分支越来越多形成菌落,且可以观察到一些膨大的细胞(足细胞),7 d形成大量的分生孢子梗,成熟的分生孢子从顶端不断释放,从而产生大量的分生孢子(图1B)。0 h、6 h、1 d、4 d和7 d这5个时间点为小麦-白粉菌相互作用的重要时期。

台盼蓝染色表明随着侵染时间增加,死细胞与白粉菌数目越来越多,在4 d时出现明显变化(图2A)。过氧化物酶可以分解H₂O₂生成H₂O和O₂,DAB可以被O₂氧化形成棕褐色沉淀。DAB染色表明随着侵染时间的增加,过氧化物酶随之增加(图2B)。超氧阴离子属于活性氧的一种,可以将NBT还原成不溶于水的蓝色化合物,从而定位组织中的超氧阴离子。NBT染色表明随着侵染时间的增加,蓝色越来越深,组织中的超氧阴离子越来越多(图2C)。

2.2 白粉菌侵染对小麦叶片防御酶、可溶性蛋白、过氧化氢和叶绿素含量的影响

由图3A可知,与0 h相比,6 h的苯丙氨酸解氨酶活性显著降低,降幅达到18.25%,之后持续上升,1 d比6 h、4 d比1 d、7 d比4 d的活性分别增加了10.43%、8.46%和0.11%,其中6 h的苯丙氨酸解氨酶活性显著低于其他侵染时间。对于多酚氧化酶活性(图3B),1 d的多酚氧化酶活性显著高于0 h、6 h、4 d和7 d;6 h比0 h、4 d比1 d、7 d比4 d的活性降低了15.63%、15.16%和11.5%,1 d比6 h活性显著上升了37.5%。结果发现苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶分别在4 d和1 d后发挥作用。

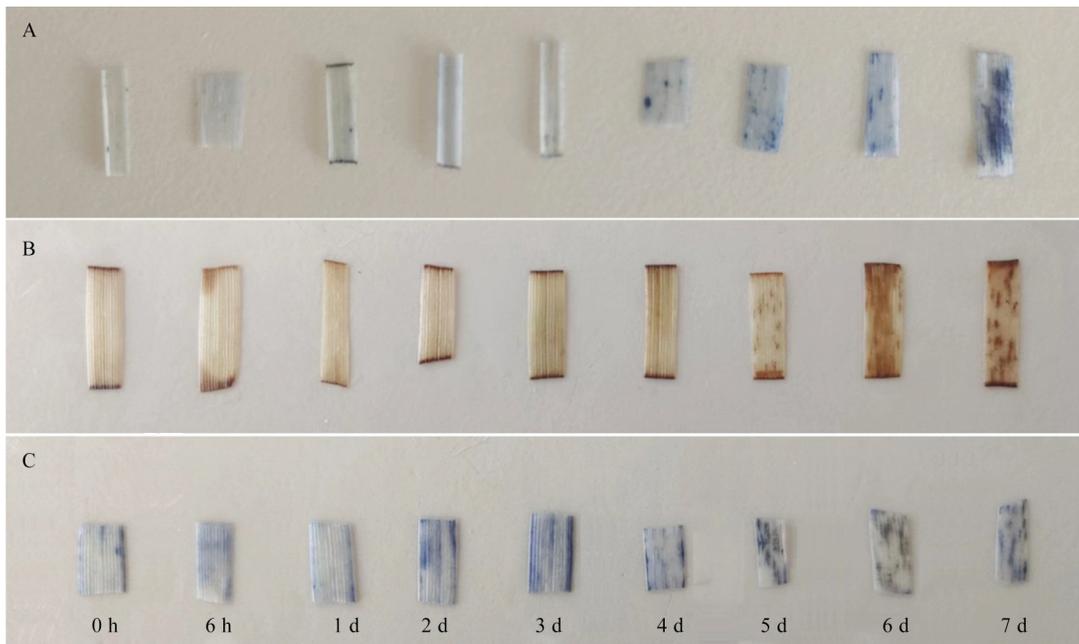


A: 不同侵染时间的叶片表型; B: 不同侵染时间白粉菌生长状态; C: 分生孢子; PGT: 初生芽管; AP: 附着胞; M: 菌丝; FC: 足细胞; CO: 分生孢子梗; 红圈内表示可以看见的白粉菌

A: Leaf phenotypes at different infestation times; B: Growth status of powdery mildew at different infestation times; C: Conidium; PGT: Primary germ tube; AP: Appressorium; M: Mycelium; FC: Foot cell of conidiophores; CO: Conidiophores; Red circles indicate visible powdery mildew

图1 白粉菌侵染后的小麦叶片表型观察

Fig.1 Phenotypic observation of wheat leaves infested with powdery mildew

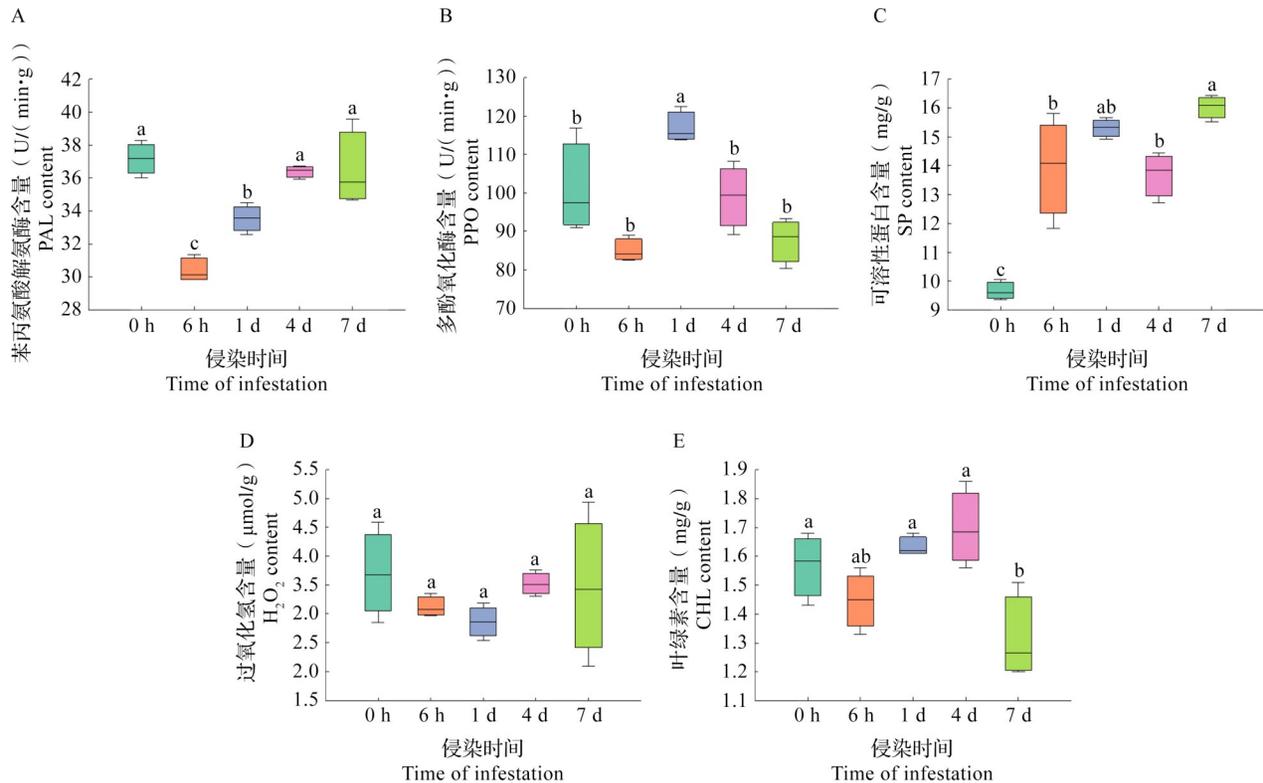


A: 台盼蓝染色; B: DAB 染色; C: NBT 染色

A: Taipan blue staining; B: DAB staining; C: NBT staining

图2 小麦叶片染色观察

Fig.2 Observation of wheat leaf staining



PAL: 苯丙氨酸解氨酶; PPO: 多酚氧化酶; SP: 可溶性蛋白; H₂O₂: 过氧化氢; CHL: 叶绿素; 下同; 不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 水平上差异显著
PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; PPO: Polyphenol oxidase; SP: Soluble protein; H₂O₂: Hydrogen peroxide; CHL: Chlorophyll; The same as below; Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level

图3 白粉菌侵染小麦叶片的生理变化

Fig.3 Physiological changes in wheat leaves infected with powdery mildew

由图3C可知,可溶性蛋白含量呈上升趋势,0 h的可溶性蛋白含量显著低于6 h、1 d、4 d和7 d,6 h比0 h、7 d比4 d的含量显著上升,增幅分别达到44.33%和16.99%,1 d比6 h含量上升了9.72%,4 d比1 d含量下降了10.38%。H₂O₂的含量先降低后上升,整体无显著差异(图3D),说明白粉菌侵染后植物会通过一些措施来维持H₂O₂的稳定,6 h比0 h、1 d比6 h和7 d比4 d含量分别降低15.68%、8.33%和1.42%;4 d比1 d含量上升了23.08%。叶绿素含量呈先降低后上升再下降趋势,只有4 d和7 d的叶绿素含量差异显著,7 d比4 d显著下降了22.94%,6 h比0 h含量下降了7.64%,1 d比6 h、4 d比1 d含量分别上升了12.41%和4.29%。

2.3 白粉菌侵染下小麦生理指标的相关性

在侵染0 h的小麦叶片中,H₂O₂与多酚氧化酶两者表现出正相关,可溶性蛋白、叶绿素和苯丙氨酸解氨酶三者两两之间表现正相关(图4A);侵染6 h的小麦叶片两种防御酶苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶表现正相关,此时H₂O₂与这两种防御酶均表现负相关(图4B);1 d时H₂O₂依然与两种防御酶表现负相关(图4C),4 d时H₂O₂与两种防御酶表现正

相关(图4D),7 d时H₂O₂与苯丙氨酸解氨酶表现正相关,与多酚氧化酶表现负相关(图4E)。与0 h相比,6 h的可溶性蛋白与叶绿素正相关性增加;与6 h相比,1 d的可溶性蛋白与叶绿素正相关性降低;与1 d相比,4 d的可溶性蛋白与叶绿素相关性由正变负;与4 d相比,7 d的可溶性蛋白与叶绿素相关性再由负转正。总体而言,0 h和6 h各个指标都有不同程度的正或负相关(图4A、B),1 d时大部分指标呈负相关,而到4 d时,除可溶性蛋白外其余4个指标之间呈正相关,到7 d时只有H₂O₂与可溶性蛋白和多酚氧化酶呈负相关,其余指标都呈正相关(图4C~E)。1 d到4 d是大部分指标从负相关到正相关的标志时期,说明1 d到4 d可能是小麦抵抗白粉菌的关键时期。

2.4 转录组数据分析

转录组数据表明白粉菌侵染后的小麦叶片植物-病原菌相互作用通路、MAPK信号通路和植物激素信号转导通路在不同时间被明显富集(图5)。植物-病原菌相互作用通路包括PTI和ETI,其中PTI信号通路的特征性反应是细胞质MAPK信号级联传导,底物被磷酸化后传导免疫信号进而诱导一系列免疫反应。对植物-病原菌相互作用通路进行主要分析。

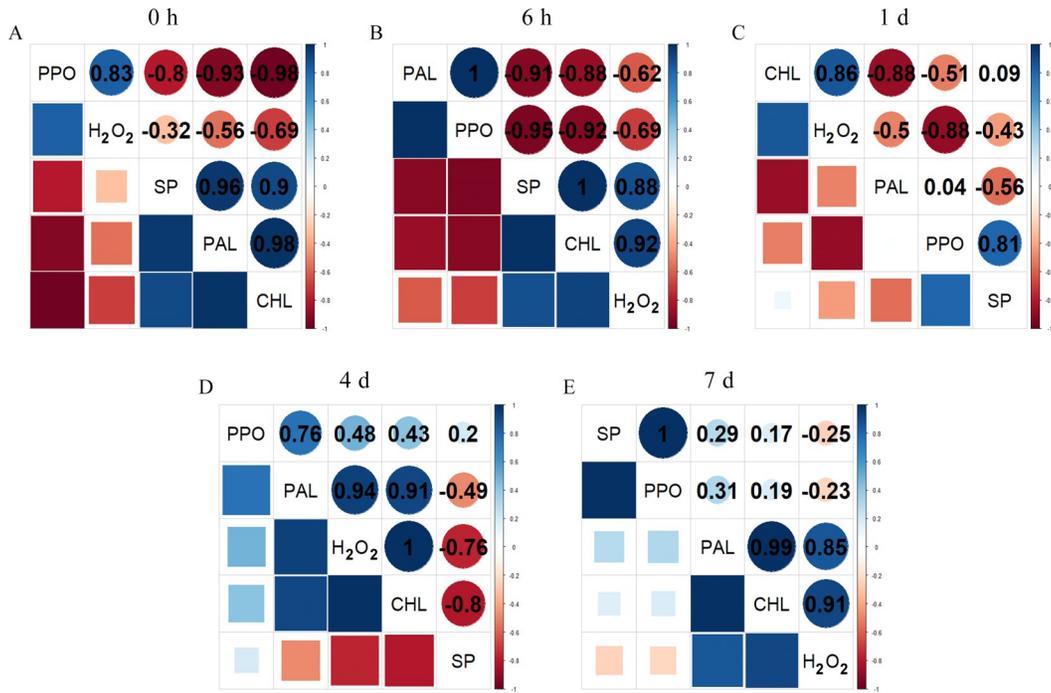
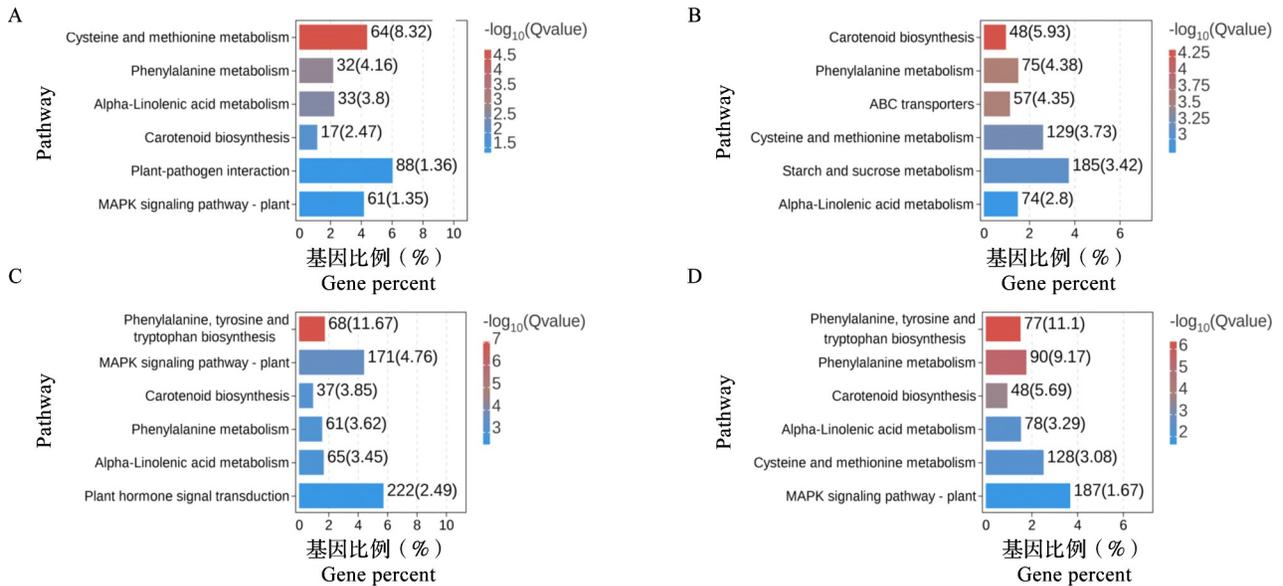


图4 叶片中不同时期各指标相关性分析

Fig.4 Correlation analysis of various indicators in leaves



A: 6 h 相比于 0 h; B: 1 d 相比于 6 h; C: 4 d 相比于 1 d; D: 7 d 相比于 4 d; 图片展示部分显著富集结果, 括号前数字代表富集到通路内的差异基因个数, 括号内数字代表通路的富集显著程度, 横坐标代表通路中差异基因占总差异基因的比例

A: 6 h compared to 0 h; B: 1 d compared to 6 h; C: 4 d compared to 1 d; D: 7 d compared to 4 d; The pictures show some significant enrichment results, the number before parentheses represents the number of differentially expressed genes enriched within the pathway, the number within parentheses represents the significance of pathway enrichment, and the horizontal axis represents the proportion of differentially expressed genes in the pathway to the total differentially expressed genes

图5 叶片差异表达基因的KEGG富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in leaves

转录组分析了免疫信号传导通路中9类基因在 6 h-vs-0 h(6 h 相比于 0 h)、1 d-vs-6 h(1 d 相比于 6 h)、4 d-vs-1 d(4 d 相比于 1 d)、7 d-vs-4 d(7 d 相比于 4 d)不同侵染时期差异表达情况,将植物-病原相

互作用通路中的差异基因注释结果汇总,分别保留这9类基因的FPKM值,供后续统计分析。6 h-vs-0 h 的差异表达基因主要是 *CDPK* (Calcium-dependent protein kinase) 基因, 10 个基因中 8 个基因表达下

调,其中 *CPK4*(*TraesCS6B02G111800*)下调最多,表达量下调了5倍。1 d-vs-6 h的差异表达基因主要是 *CDPK* 和 *PR* 基因,其中22个 *CDPK* 基因中15个基因上调,18个 *PR* 基因全部上调,并且有16个 *PR* 基因的 $\log_2FC \geq 2$ ($FC \geq 4$), *PR* 基因的表达可以诱导系统获得性抗性,远离侵染部位的组织产生抗菌物质,抵御白粉菌进一步侵染。4 d-vs-1 d的差异基因数目较多的是 *CDPK* 和 *PR* 基因,其中13个 *CDPK* 基因中7个基因上调6个基因下调,13个 *PR* 基因中5个基因上调8个基因下调,但此时通路整体是上调

的。7 d-vs-4 d的差异基因大部分表达上调,其中 *CDPK* 和 *Rboh* (*Respiratory burst oxidase homolog*) 差异基因数目较多,15个 *CDPK* 基因中7个基因上调8个基因下调,11个 *Rboh* 基因中5个基因上调6个基因下调。总体而言,*CDPK* 和 *PR* 基因在各个侵染时期差异基因均较多;6 h-vs-0 h差异基因数目较少,1 d-vs-6 h差异基因数目逐渐增多且大部分表达上调,4 d-vs-1 d和7 d-vs-4 d差异基因数目分别为52个和57个,与1 d-vs-6 h的81个差异基因数目相比有所减少(表1)。

表1 不同侵染时期免疫信号传导通路的差异基因分析

Table 1 Differential gene analysis of immune signaling pathways at different infection stages

差异表达基因 Differential expression gene	6 h-vs-0 h		1 d-vs-6 h		4 d-vs-1 d		7 d-vs-4 d	
	基因总数 Total number of genes	上下调 基因数 Number of up- and down- regulated genes	基因总数 Total number of genes	上下调 基因数 Number of up- and down- regulated genes	基因总数 Total number of genes	上下调 基因数 Number of up- and down- regulated genes	基因总数 Total number of genes	上下调 基因数 Number of up- and down- regulated genes
<i>CNGCs</i>	6	6 ↑ 0	10	5 ↑ 5 ↓	6	5 ↑ 1 ↓	8	1 ↑ 7 ↓
<i>CDPK</i>	10	2 ↑ 8 ↓	22	15 ↑ 7 ↓	13	7 ↑ 6 ↓	15	7 ↑ 8 ↓
<i>Rboh</i>	5	1 ↑ 4 ↓	14	8 ↑ 6 ↓	5	4 ↑ 1 ↓	11	5 ↑ 6 ↓
<i>WRKY25/33</i>	2	0 2 ↓	2	2 ↑ 0	4	4 ↑ 0	2	2 ↑ 0
<i>WRKY29/22</i>	1	0 1 ↓	0	0 0	3	3 ↑ 0	3	3 ↑ 0
<i>PR</i>	5	0 5 ↓	18	18 ↑ 0	13	5 ↑ 8 ↓	10	9 ↑ 1 ↓
<i>RIN4</i>	0	0 0	7	7 ↑ 0	5	5 ↑ 0	4	4 ↑ 0
<i>CEBiP</i>	0	0 0	2	2 ↑ 0	0	0 0	0	0 0
<i>CERK1</i>	0	0 0	6	6 ↑ 0	3	0 3 ↓	4	4 ↑ 0

6 h-vs-0 h 表示6 h相比于0 h; 1 d-vs-6 h 表示1 d相比于6 h; 4 d-vs-1 d 表示4 d相比于1 d; 7 d-vs-4 d 表示7 d相比于4 d; ↑为表达上调, ↓为表达下调

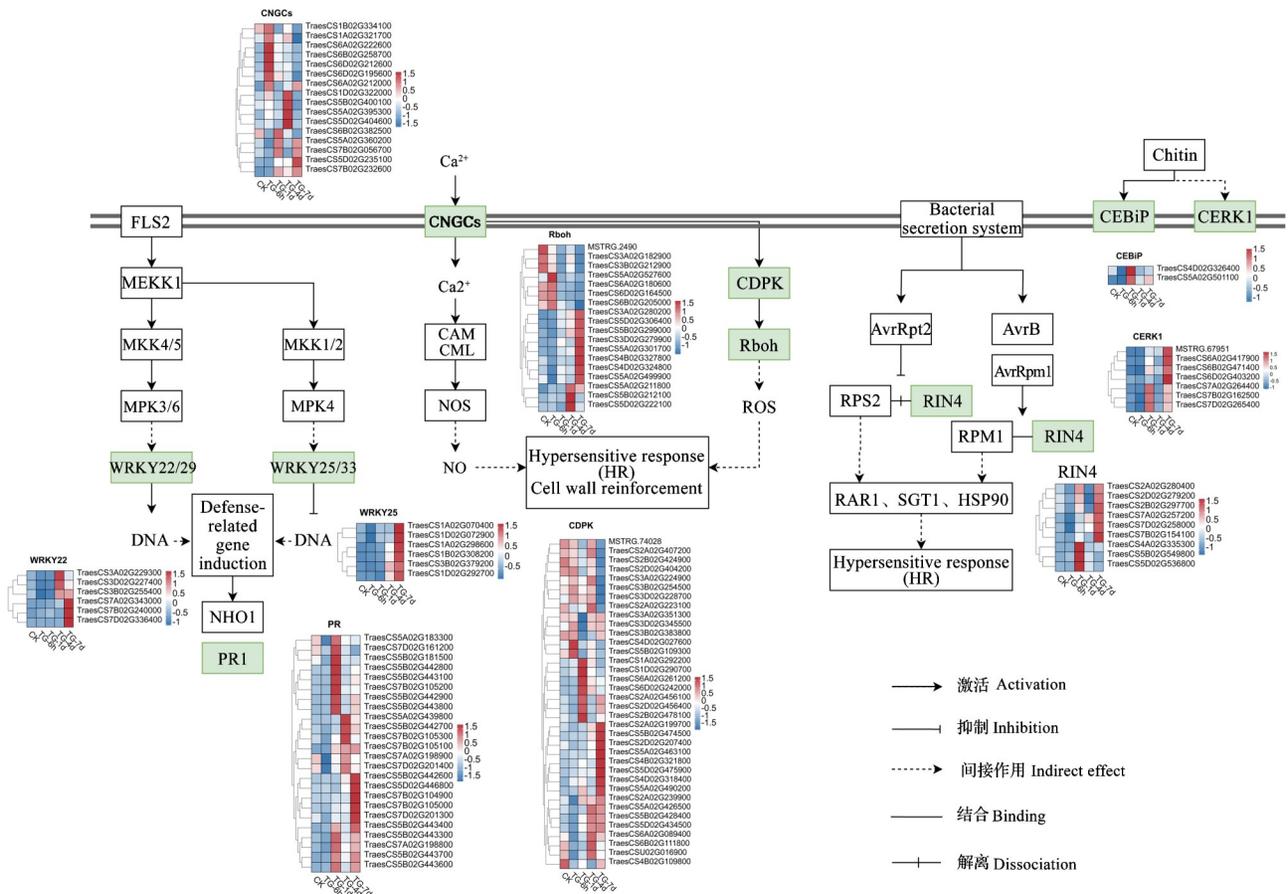
6 h-vs-0 h represents 6 h compared to 0 h; 1 d-vs-6 h represents 1 d compared to 6 h; 4 d-vs-1 d represents 4 d compared to 1 d; 7 d-vs-4 d represents 7 d compared to 4 d; ↑ is up-regulated expression, ↓ is down-regulated expression

结合表1和图6可以看出,6 h与0 h相比,小麦防御相关基因有1个 *WRKY22* 和5个 *PR* 基因有差异且表达下调,其中1个 *PR* 基因(*TraesCS7A02G198800*, *PR-1-14*)下调了8倍,产生活性氧路径的10个

CDPK 基因中8个下调,5个 *Rboh* 基因中4个基因下调,通路最上游的6个环核苷酸门控通道(*CNGCs*, cyclic nucleotide-gated channels)基因有差异且表达上调,整体而言,0 h到6 h植物-病原相互作用通路

是被抑制的。6 h到1 d核内防御相关基因 *WRKY* 和 *PR* 基因被诱导表达,18个 *PR* 基因上调表达,此时为 *PR* 基因最活跃时期,2个 *WRKY25* 基因 (*TraesCS1A02G070400* 和 *TraesCS1D02G072900*) 表达上调了3倍,并且与活性氧产生相关的大部分 *CDPK* 和 *Rboh* 基因上调表达;几丁质激发子结合蛋白基因 (*CEBiP*, chitin elicitor-binding protein)、几丁质激发子受体激酶基因 (*CERK1*, chitin elicitor receptor kinase 1) 和 *RPM1* 相互作用蛋白基因 (*RIN4*, *RPM1*-interacting protein 4) 在此侵染时期开始出现差异且上调表达,分别有2个、6个和7个差异基因;2个 *CEBiP* 基因 (*TraesCS4D02G326400* 和 *TraesCS5A02G501100*) 只在1 d-vs-6 h表现出显著差异,3个 *RIN4* 基因 (*TraesCS4A02G335300*、*TraesCS5B02G549800* 和 *TraesCS5D02G536800*) 在1 d时表达达到顶峰,1 d后表达下调趋于稳定。*RIN4* 是PTI的负调节剂,*RIN4* 出现差异表明此时ETI信号传导通路可能被

激活。1 d到4 d,PTI信号传导通路的大部分基因表达继续上调,5个 *RIN4* 基因 (*TraesCS2A02G280400*、*TraesCS2D02G279200*、*TraesCS4A02G335300*、*TraesCS5B02G549800* 和 *TraesCS5D02G536800*) 全部表达下调,核内 *PR* 基因出现下调,3个 *WRKY22* 基因 (*TraesCS3A02G229300*、*TraesCS3B02G255400* 和 *TraesCS3D02G227400*) 特异性的在4 d-vs-1 d时被诱导表达上调,此时PTI信号传导达到高水平。4 d到7 d,PTI信号传导通路大部分基因表达下调,而核内防御相关基因 (*WRKY22*、*WRKY25*) 都表达上调,其中3个 *WRKY22* 基因 (*TraesCS7A02G343000*、*TraesCS7B02G240000* 和 *TraesCS7D02G336400*) 特异性的在7 d-vs-4 d时被诱导表达上调;10个 *PR* 基因中9个基因上调,其中1个 *PR* 基因 (*TraesCS7B02G104900*) 表达上调了10倍,且特异性的在7 d-vs-4 d显著上调;*RIN4* 表达上调,说明此时ETI依然发挥着重要作用。



CK表示侵染0h;TG-6h表示侵染6h;TG-1d表示侵染1d;TG-4d表示侵染4d;TG-7d表示侵染7d;绿色方块表示绘制热图的一类基因
CK indicates infestation 0 h; TG-6h indicates infestation 6 h; TG-1d indicates infestation 1 d; TG-4d indicates infestation 4 d; TG-7d indicates infestation 7 d; Green squares indicate a class of genes for which a heat map was drawn

图6 植物-病原菌相互作用通路及其差异基因表达分析

Fig.6 Analysis of plant pathogen interaction pathway and differential gene expression

总体而言,0 h到6 h信号传导通路被抑制,6 h到4 d小麦做出积极的响应,PTI发挥着主要作用,大量的*Rboh*、*PR*基因被诱导表达,6 h到1 d出现ETI,4 d到7 d时信号传导通路表达趋于稳定,大部分基因相比4 d表现出下调表达,但此时PTI和ETI依然发挥着重要的作用。

3 讨论

3.1 白粉菌侵染下小麦叶片表型及生理差异

白粉菌侵染小麦叶片后会启动抗病防御机制,植物体内发生一系列的信号传递和生理生化变化^[21-22]。人们对植物白粉病的研究越来越多^[23-24],不同的植物对白粉菌的应答程度有所差异。本研究对白粉菌侵染小麦过程中的组织学特征和生理应答变化进行了测定,表型观察发现侵染4 d时出现肉眼可见的菌丝,7 d形成了成熟的分生孢子。染色发现随着侵染时间的增加,组织当中的死细胞数目、过氧化物酶和超氧阴离子也随之增加。秦宏坤等^[25]在南瓜白粉病中也发现了同样的现象,并且抗病品种中活性氧积累更多、更快。本研究结果表明,苯丙氨酸解氨酶在0 h、4 d和7 d有较高的活性,而多酚氧化酶则在1 d有较高的活性,说明这两种防御酶在不同侵染时间协同抵御白粉菌的侵入。田丽波等^[26]发现苦瓜接种白粉菌后多酚氧化酶活性达到峰值较晚,且酶活降低速度较快,而本研究显示小麦在接种白粉菌后多酚氧化酶活性在6 h达到峰值,随后活性显著下降,说明小麦协调代谢系统的能力要比苦瓜强。董文科等^[27]发现抗病和感病草地早熟禾接种白粉菌9 d后可溶性蛋白含量都下降,田丽波等^[26]发现苦瓜接种白粉菌后抗病和感病的品种可溶性蛋白含量均呈先上升后下降的趋势,而本研究发现小麦只有在4 d下降,整体为上升趋势,说明不同物种对白粉菌的生理响应情况有时间差异,这也表明可溶性蛋白在抵御白粉菌侵染过程中发挥重要作用。叶绿素在0 h-4 d这段侵染时期无明显差异,直到7 d时叶绿素含量下降且差异显著,这与韩庆典等^[28]发现的结果所一致,4 d后叶绿素含量迅速降低说明此时小麦生长受到了一定程度的影响。 H_2O_2 的含量整体无显著差异,说明小麦在白粉菌侵染后会采取一系列平衡措施来维持 H_2O_2 的稳态,从而避免过量活性氧引起氧化应激、DNA损伤和其他细胞成分损伤。综上所述,白粉菌侵染可以使小麦叶片产生大量菌丝和白粉菌分生孢子,体内活性氧呈上升趋势, H_2O_2 水平基本维持

不变,叶绿素含量在白粉菌分生孢子形成后受到影响。而小麦可以通过提高可溶性蛋白含量,增加防御酶的活性来刺激小麦植株的自身免疫系统,从而维持活性氧代谢稳态平衡,避免植物膜进一步氧化损伤^[29-30]。

3.2 白粉菌侵染过程中的免疫信号传导

本研究结果表明,0 h到6 h为侵染初期,此时大部分通路中的基因表达下调,侵染前期6 h到1 d时大量*PR*基因被诱导表达,此时出现ETI信号传导,侵染中期1 d到4 d时PTI信号传导上调,*PR*基因部分下调。张露露^[31]等发现抗病小麦Brock的PTI早在2 h就被触发,ETI在12 h也开始响应。而本研究使用的感病品种则在6 h后PTI发挥作用,6 h到1 d出现ETI,说明抗病品种对白粉菌的响应要早于感病品种,这可能意味着抗病品种的通路基因数目更多、表达量更高、基因的响应程度也更快。侵染后期4 d到7 d时PTI信号传导下调,整体上植物-病原菌相互作用通路下调,此时大量的白粉菌已经定殖在小麦叶片表面,对小麦的免疫防御系统进行干扰,小麦光合作用被严重扰乱,生长受到抑制。CNGC作为 Ca^{2+} 的转运通道,对钙吸收转运有重要作用,也参与植物抗病过程,识别PAMP后可以诱导 Ca^{2+} 内流^[32-33], Ca^{2+} 受体蛋白CDPK可以磷酸化DADPH氧化酶促进活性氧的产生^[34],同时也伴随着胍脂质沉积和抗菌化合物的生成^[35-36]。研究表明CDPK的差异基因数目是最多的,1 d与6 h相比的差异表达基因数目最多有22个,这说明CDPK在活性氧稳态中有重要的作用。侵染中期作为小麦抵御白粉菌侵染的关键时期,大部分基因上调,*CERK1*全部表达下调,*CERK1*作为植物病原菌相互作用的关键受体^[37-38],可能会让病原菌有机可乘,进而表现出侵染后期免疫信号传导通路有下调的趋势。

综上所述,侵染初期白粉菌可能通过释放效应子干扰小麦内部免疫系统,大部分免疫防御基因下调,前期和中期整体上小麦通过诱导*PR*等相关防御基因进行积极防御,而侵染后期因叶片表面布满大量分生孢子严重干扰其光合作用,白粉菌完全定殖于小麦细胞,释放的毒素破坏了小麦的组织和细胞,从而影响小麦正常生长。本研究以白粉病感病品种为材料,为掌握白粉菌侵染过程中感病品种的表型变化、生理反应和免疫信号通路的差异基因的表达情况等奠定基础。今后可对相应抗病品种和感病品种联合分析以明确抗病和感病品种间的表型、生理和免疫信号通路的差异,从而确定不同抗

感性品种的白粉病抗性差异。

参考文献

- [1] Alam M A, Hongpo W, Hong Z, Ji W Q. Differential expression of resistance to powdery mildew at the early stage of development in wheat line N0308. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(2): 4289-4301
- [2] Mapuranga J, Chang J Y, Yang W X. Combating powdery mildew: Advances in molecular interactions between *Blumeria graminis* f. sp. tritici and wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1102908
- [3] Chen G, Wei B, Li G, Gong C, Fan R, Zhang X. TaEDS1 genes positively regulate resistance to powdery mildew in wheat. *Plant Molecular Biology*, 2018, 96(6): 607-625
- [4] Zheng H, Dong L, Han X, Jin H, Yin C, Han Y, Li B, Qin H, Zhang J, Shen Q, Zhang K, Wang D. The TuMYB46L-TuACO3 module regulates ethylene biosynthesis in einkorn wheat defense to powdery mildew. *The New Phytologist*, 2020, 225(6): 2526-2541
- [5] Li S, Lin D, Zhang Y, Deng M, Chen Y, Lv B, Li B, Lei Y, Wang Y, Zhao L, Liang Y, Liu J, Chen K, Liu Z, Xiao J, Qiu J, Gao C. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature*, 2022, 602 (7897): 455-460
- [6] Kaur S, Samota M K, Choudhary M, Choudhary M, Pandey A K, Sharma A, Thakur J. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2022, 28(2): 485-504
- [7] Heller J, Tudzynski P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49: 369-390
- [8] Andersen E J, Ali S, Byamukama E, Yen Y, Nepal M P. Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 2018, 9 (7): 339
- [9] Wang Y, Ji D, Chen T, Li B, Zhang Z, Qin G, Tian S. Production, signaling, and scavenging mechanisms of reactive oxygen species in fruit-pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 2994
- [10] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver D J, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2005, 17 (1):268-281
- [11] Herrera-Vásquez A, Salinas P, Holuigue L. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6:171
- [12] Khodadadi F, Tohidfar M, Vahdati K, Dandekar A M, Leslie C A. Functional analysis of walnut polyphenol oxidase gene (JrPPO1) in transgenic tobacco plants and PPO induction in response to walnut bacterial blight. *Plant Pathology*, 2020, 69 (4):756-764
- [13] You X, Fang H, Wang R, Wang GL, Ning Y. Phenylalanine ammonia lyases mediate broad-spectrum resistance to pathogens and insect pests in plants. *Science Bulletin*, 2020, 65(17): 1425-1427
- [14] Zhang H, Huang Q, Yi L, Song X, Li L, Deng G, Liang J, Chen F, Yu M, Long H. PAL-mediated SA biosynthesis pathway contributes to nematode resistance in wheat. *The Plant Journal*, 2021, 107(3): 698-712
- [15] Zucker M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 1965, 40(5): 779-784
- [16] González E M, de Ancos B, Cano M P. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(10): 4068-4072
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254
- [18] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 1949, 24(1): 1-15
- [19] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12):550
- [20] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. Kegg for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51: D587-D592
- [21] Gao H, Niu J, Zhao W, Zhang D, Li S, Xu Y, Liu Y. The effect and regulation mechanism of powdery mildew on wheat grain carbon metabolism. *Starch-Starke*, 2022, 74: 19
- [22] Yadav V, Wang Z, Guo Y, Zhang X. Comparative transcriptome profiling reveals the role of phytohormones and phenylpropanoid pathway in early-stage resistance against powdery mildew in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1016822
- [23] 刘慧青, 谢丽琼, 王贤磊, 李群, 宁雪飞. 精细定位甜瓜白粉病抗性基因 *Pm-M*. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(1):217-225
- [23] Liu H Q, Xie L Q, Wang X L, Li Q, Ning X F. Fine mapping of a powdery mildew resistance gene *Pm-MRI 12.1* in melon. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(1):217-225
- [24] 延荣, 耿妙苗, 李晓静, 安浩军, 温树敏, 刘桂茹, 王睿辉. 河北省小麦品种和种质资源抗白粉病鉴定与抗病基因分子标记检测. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(3):683-705
- [24] Yan R, Geng M M, Li X J, An H J, Wen S M, Liu G R, Wang R H. Phenotyping and marker-assisted gene identification of powdery mildew resistance in wheat commercial varieties and germplasm resources from Hebei province. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (3) : 683-705
- [25] 秦宏坤, 李帅, 马冬, 郭卫丽. 南瓜侵染白粉菌后的活性氧

- 爆发观察. 中国农学通报, 2020, 36(25): 121-128
- Qing H K, Li S, Ma D, Guo W L. Active oxygen outbreaks of pumpkin infected with powdery mildew. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(25): 121-128
- [26] 田丽波, 杨衍, 商桑, 司龙亭. 不同苦瓜品系的抗白粉病能力及其与防御酶活性的相关性. *沈阳农业大学学报*, 2015, 46(3): 284-291
- Tian L B, Yang Y, Shang S, Si L T. Correlation of bitter melon's resistance to powdery mildew and activities of defense enzymes. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2015, 46(3): 284-291
- [27] 董文科, 马祥, 毛春晖, 邓婧慧, 贾秀秀, 张顺萍, 郭珊珊, 马晖玲. 10个草地早熟禾品种对白粉病的抗性评价及生理特性分析. *草原与草坪*, 2020, 40(3): 47-56
- Dong W K, Ma X, Mao C H, Deng J H, Jia X X, Zhang S P, Guo S S, Ma H L. Resistance evaluation and physiological characteristic analysis of ten *Poa pratensis* varieties to powdery mildew. *Grassland and Turf*, 2020, 40(3): 47-56
- [28] 韩庆典, 杨美娟, 黄择祥, 闫丽, 胡晓君. 小麦白粉病菌对小麦幼苗光合生理特性的影响. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10): 4373-4379
- Han Q D, Yang M J, Huang Z X, Yan L, Hu X J. Effects of wheat powdery mildew on the photosynthetic physiological characteristics of wheat seedlings. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(10): 4373-4379
- [29] Chi Y H, Koo S S, Oh H T, Lee E S, Park J H, Phan K A T, Wi S D, Bae S B, Paeng S K, Chae H B, Kang C H, Kim M G, Kim W Y, Yun D J, Lee S Y. The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 750
- [30] Wang C, He X, Li Y, Wang L, Guo X, Guo X. The cotton mapk kinase ghmpk20 negatively regulates resistance to *Fusarium oxysporum* by mediating the mkk4-mpk20-wrky40 cascade. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(7): 1624-1638
- [31] 张露露, 卞云迪, 张驰, 刘晓颖, 范宝莉, 王振英. 小麦 Brock 抗白粉菌侵染早期防御应答基因分析. *天津师范大学学报: 自然科学版*, 2021, 41(3): 40-46
- Zhang L L, Bian Y D, Zhang C, Liu X Y, Fan B L, Wang Z Y. Expression profiling of the early response genes against powdery mildew in resistant wheat Brock. *Journal of Tianjin Normal University: Natural Science Edition*, 2021, 41(3): 40-46
- [32] Xu G, Moeder W, Yoshioka K, Shan L. A tale of many families: Calcium channels in plant immunity. *The Plant Cell*, 34(5): 1551-1567
- [33] Zhang W, Dong C, Zhang Y, Zhu J, Dai H, Bai S. An apple cyclic nucleotide-gated ion channel gene highly responsive to *Botryosphaeria dothidea* infection enhances the susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to bacterial and fungal pathogens. *Plant Science*, 2018, 269: 94-105
- [34] Schulz P, Herde M, Romeis T. Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 523-530
- [35] DeFalco T A, Zipfel C. Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Molecular Cell*, 2021, 81(17): 3449-3467
- [36] Macho A P, Zipfel C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 2014, 54(2): 263-272
- [37] Rebaque D, Del Hierro I, López G, Bacete L, Vilaplana F, Dallabernardina P, Pfrengle F, Jordá L, Sánchez-Vallet A, Pérez R, Brunner F, Molina A, Mélida H. Cell wall-derived mixed-linked beta-1, 3/1, 4-glucans trigger immune responses and disease resistance in plants. *The Plant Journal*, 2021, 106(3): 601-615
- [38] Yang C, Wang E, Liu J. Cerkl, more than a co-receptor in plant-microbe interactions. *The New Phytologist*, 2022, 234(5): 1606-1613