



芒果胶孢炭疽病菌应答菌丝机械损伤产生无性孢子的分子机制

王丽妍¹, 卢梦瑶¹, 童悦¹, 徐祥斌¹, 张正科¹, 孟兰环¹, 史学群^{1*}, 宋海超^{2*}

¹海南大学食品科学与工程学院, 海口 570228; ²海南大学生命科学与药学院, 海口 570228

摘要 胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引发芒果(*Mangifera indica*)炭疽病的主要病原体。室内平板培养胶孢炭疽菌不产生或产生很少分生孢子的情况时有发生, 但菌丝在机械损伤后24–48小时会产生大量分生孢子。胶孢炭疽菌应答机械损伤诱导产孢的核心基因及关键代谢通路尚未见报道。基于转录组测序(RNA-seq)技术检测了芒果胶孢炭疽菌菌丝在机械损伤处理后2小时内5个时间点的基因表达变化, 对差异表达基因进行GO富集和KEGG代谢通路富集分析, 并对菌丝响应胁迫的基因动态表达数据进行分析。基于常微分方程ODE模型结合变量选择技术, 构建了动态基因调控网络。结果表明, 有417个差异表达基因参与应答胶孢炭疽菌菌丝机械损伤, 分属12个聚类模块, 有4条通路存在显著富集, 分别是丙酮酸代谢、硫代谢、黄曲霉素合成途径和二萜合成途径。结合功能注释筛选出12个应答菌丝损伤胁迫的核心基因。研究结果为后续深入开展芒果胶孢炭疽菌产孢和致病机理研究奠定了重要基础。

关键词 芒果, 胶孢炭疽菌, 损伤胁迫, RNA-seq, 动态表达

王丽妍, 卢梦瑶, 童悦, 徐祥斌, 张正科, 孟兰环, 史学群, 宋海超 (2020). 芒果胶孢炭疽病菌应答菌丝机械损伤产生无性孢子的分子机制. 植物学报 55, 551–563.

芒果(*Mangifera indica*)属漆树科植物, 是热带和亚热带地区广泛种植的名贵水果, 被誉为“水果之王”(Jahurul et al., 2015)。但芒果在生长过程中极易发生真菌性病害(如炭疽病、蒂腐病)(吴振麟, 2011)从而引起果实腐烂。多年来, 国内外学者对芒果的采后处理、贮藏保鲜及生理生化变化进行了研究(Perumal et al., 2017)。邹日娥(1995)用水杨酸或氯化钙结合全美梅氏酵母悬浮液处理采后台农芒果可有效增强多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸酶(PAL)及几丁质酶(CT)的活力, 延长芒果的保质期。也有研究表明, 对芒果施用海洋细菌嗜根寡养单胞菌可以有效降低炭疽病的发病率, 及时控制病害发生及蔓延(Shao et al., 2019)。

胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引起芒果炭疽病的主要病原菌, 该病菌是一种丝状真菌, 其寄主范围广, 可潜伏侵染果实的多个部位, 严重影响芒果的产量和品质, 危害极大(Reyes-Perez

et al., 2019)。通过无性繁殖产生分生孢子是胶孢炭疽菌的主要繁殖方式。研究表明, 丝状真菌的产孢过程涉及多个生物学过程(Adams et al., 1988), 如基因时空表达的特异性、细胞特化及细胞间相互关系。随着基因组测序技术的发展以及测序成本的降低, 研究者在转录组和全基因组水平对胶孢炭疽病原菌功能基因进行了研究。黄华平(2016)利用新一代高通量测序平台Illumina RNA-seq对高致病力胶孢炭疽菌菌株的全基因组和转录组进行测序及功能注释, 筛选了疑似致病相关基因CgALS, 并通过基因敲除实验验证其致病性。张丽勃等(2017)利用Pfam数据库对草莓(*Fragaria ananassa*)胶孢炭疽菌全基因组进行搜索, 鉴定并分析了22个CFEM (common in fungal extra-cellular membrane)蛋白及其中8个分泌蛋白在不同侵染阶段的转录组数据, 为深入研究病原真菌CFEM效应子提供了理论依据。

许多丝状真菌通过分生孢子进行侵染和传播, 产

收稿日期: 2020-02-22; 接受日期: 2020-05-08

基金项目: 海南省科技厅创新团队(No.2019CXTD399)

* 通讯作者。E-mail: shixuequn@163.com; songhaichao@sohu.com

生大量分生孢子是其进行侵染和扩散的前提(李伟, 2002)。在实验室培养胶孢炭疽菌时, 我们发现在培养早期, 菌丝营养生长状况良好但孢子数量少或不产孢, 如果打断菌丝, 24–48小时后会产生大量分生孢子, 说明机械损伤对该病原真菌生殖生长有诱导和促进作用。研究表明, 木霉在机械损伤后其损伤细胞附近同样会产生大量无性孢子, 利用RNA-seq结合基因敲除实验, 发现可能存在与活性氧和脂质代谢途径相关的一系列保守的损伤防御机理(Hernández-Oñate et al., 2012)。然而, 尽管有报道显示损伤会诱导产生无性孢子, 但这一动态生物学过程的反应机制及机械损伤过程中的一系列信号转导及代谢通路等科学问题尚未见报道, 有待深入研究。

本研究将芒果胶孢炭疽菌菌株于28°C液体培养基摇菌培养, 15小时后通过机械损伤打断菌丝, 并于不同时间点收集取样, 测定转录组数据。通过差异表达基因筛选、功能富集分析、聚类分析及调控网络构建, 初步揭示胶孢炭疽菌机械损伤胁迫下的基因表达模式, 筛选出响应损伤胁迫产孢的关键基因。研究结果可为阐明芒果胶孢炭疽菌产孢和致病的分子机理以及研发作用于炭疽菌具有靶标位点的新农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

实验所用菌株为芒果胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.&Sacc.), 该病菌从自然发病且具有典型芒果炭疽病症状的芒果果皮上分离得到(于海英等, 2012), 经纯化培养后进行单孢分离和鉴定, 并将菌种保存在4°C冰箱中备用。

1.2 机械损伤处理菌丝转录组样品制备方法

将芒果胶孢炭疽菌菌株于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养6天后, 取10个直径约8 mm的菌块, 接种于含有200 mL马铃薯葡萄糖(PDB)培养基的250 mL锥形瓶中, 28°C, 每分钟180转摇床培养。用无菌的菌铲用力搅拌PDB培养基中已生长15小时的胶孢炭疽菌, 以顺时针和逆时针方向交替搅拌, 搅拌时间大于30秒, 使菌块破碎, 菌丝损伤, 严重干扰PDB培养基中胶孢炭疽菌正常的生长状态。分别在处理后0分钟、

15分钟、30分钟、1小时和2小时取样。取样时用Miracloth滤膜过滤除去滤液, 收集菌丝样品。所有样品经液氮速冻2小时后置于-70°C保存备用。

1.3 RNA提取及高通量测序文库构建

使用天根(TIANGEN)植物RNA提取试剂盒(RNA-simple总RNA提取试剂盒; Cat No.DP419)提取真菌样品RNA, 具体步骤参考说明书。总RNA经质检合格后, 使用连接有Oligo (dT)的磁珠富集真核生物mRNA。用六碱基随机引物合成一链cDNA; 随后用dNTPs、RNaseH和DNA Polymerase I进行二链cDNA合成。双链产物经AMPure XP beads纯化后进行片段选择, 最后进行PCR扩增获得最终测序文库。利用Illumina Novaseq™ 6000对质检合格的文库进行测序。文库的构建和测序在杭州联川生物科技有限公司完成。

1.4 序列分析及注释

利用Illumina平台将测序所得的原始序列文件进行质量评估和可信度分析(Garcia-Mas et al., 2012), 去除3'端接头序列、低质量和不确定的序列(Q<20)。利用Trinity软件通过序列之间的Overlap获得Contig序列, 将Contig连接成转录本序列, 对拼接序列进行组装和拼接, 取最长的转录本为Unigene (Trapnell et al., 2010)。使用Blast2-Go软件对Unigene序列与NCBI非冗余蛋白公共数据库(Nr)、SwissProt和PFAM数据库进行比对, 取相似性大于30%、E-value小于 10^{-5} 进行注释(Conesa et al., 2005), 获得Unigene比对的E-value分布以及序列相似度分布(The Gene Ontology Consortium, 2015); 根据注释所含GO (Gene Ontology)信息, 从生物过程(BP)、分子功能(MF)以及细胞组分(CC) 3个方面对序列进行GO注释(Xie et al., 2011)。使用KOBAS软件对Unigene进行KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)注释(Langmead and Salzberg, 2012)。整理所有注释信息, 搜索胶孢炭疽菌响应损伤胁迫关键基因和代谢途径。

1.5 差异基因筛选与功能富集分析

芒果胶孢炭疽菌参考基因组下载自美国国家生物技

术信息中心数据库 (NCBI), 将每个样品的 clean reads 与参考基因组进行比对 (Jin et al., 2014)。使用 RSEM 软件对 bowtie 的比对结果进行统计, 获得每个样品比对到每个基因上的 readcount 数目。使用 Cuffdiff v2.1.1 软件对其进行 FPKM (fragments per kilo-base of exon per million fragments mapped) 标准化转换, 从而得到基因在不同样本中的表达丰度值。比较不同处理组文库中的基因表达水平。采用 R 软件中 edgeR 包进行差异表达分析 (Robinson et al., 2010)。该软件使用的负二项分布符合 RNA-seq 基因表达数据方差大于平均值的性质, 能够区别生物本身和技术因素所导致的基因表达的改变 (McCarthy et al., 2012)。对不同时间点所有基因的表达量进行箱线图的绘制, 并利用斯皮尔曼相关系数 (Spearman correlation coefficient, SCC) 对所有样本的相关性进行分析, 将所有基因的 FPKM 值加 1, 然后进行对数转换, 计算所有样本之间的 SCC, 以判断测序数据的可靠性和样本间的相关性。

利用 GO 和 KEGG 富集进一步分析差异表达基因, 差异基因的富集采用超几何分布检测, 对所有富集的功能类别以 $P\text{-value} < 0.05$ 作为筛选标准。

1.6 聚类分析

为了初步解析芒果胶孢炭疽病菌在损伤胁迫下 mRNA 的动态表达模式, 基于实验设计对 RNA-seq 差异表达数据进行聚类分析 (Si et al., 2013), 使具有相似表达模式的差异基因分组归类后以基因聚类图展示。图中每列代表一个实验条件, 每行代表基因表达量。

1.7 调控网络构建

基因调控网络可以很好地分析胁迫中重要的分子过程或代谢通路 (Wilczynski and Furlong, 2010)。损伤

胁迫响应是一个动态的生物学过程, 受到许多基因及其产物组成的复杂调控网络的调节。本研究采用一种常微分方程 ODE 模型, 同时联合 ODE 参数估计和 Adaptive group LASSO 方法构建胶孢炭疽菌全基因组动态 GRN, 通过微分方程刻画基因之间动态复杂的关系, 构建机械损伤后芒果胶孢炭疽菌全基因组动态基因调控网络。

1.8 实时荧光定量 PCR 分析

随机选择 5 个基因进行实时荧光定量 PCR 分析。使用天根总 RNA 提取试剂盒提取胶孢炭疽菌菌丝 RNA, 采用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (全式金) 逆转录合成 cDNA。以反转录产物为模板, *Actin* 为内参, 采用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 天根荧光定量试剂盒, 在 ABI 7500 PCR 仪中进行实时荧光定量检测。扩增程序如下: 95°C 2 分钟; 95°C 10 秒, 60°C 1 分钟, 45 个循环。所有反应均进行 3 个生物学重复。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行相对定量分析 (Livak and Schmittgen, 2001)。所用引物见表 1。

1.9 数据分析

实验数据均使用 Excel 2016 软件处理。采用 Duncan 多重比较法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 测序结果和统计

通过 HiSeq2500 测序获得 210 438 160 条测序读段 (31.56 Gb)。对 Raw reads 进行质量控制后获得 201 473 676 个 reads (30.22 Gb)。所有样本 Q20 值均大于 99.98%, Q30 值均大于 97.7%, GC 含量为 56%。

表1 实时荧光定量PCR所用引物

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

Transcript	Upstream primer sequence (5'-3')	Downstream primer sequence (5'-3')
<i>ELA27200</i>	CCTCAAACCTTCGCAGATG	GGCTGTCGTGTAGAACTG
<i>ELA31518</i>	ACTGCGAATCACATCATCTCA	TAAGAGGTCGGCGTCAGA
<i>ELA26856</i>	CAGCAGATGGTCAAGAGG	GAGGAGACGAAGGAAGGA
<i>ELA23533</i>	TCAGCCTTGTTGGACCTTAG	CGTAGCATCGGACCTTGT
<i>ELA34567</i>	GAGCAGGTATCAGAAGACA	CCAGTTCGTAAGCCAGAT
<i>Actin</i>	ACGCTTCTCATCTCCAAGATCCGT	AGAGAGCCTCGTTGTCAATGCAGA

经用Trinity软件进行拼接, 获得9 958条Unigenes。

箱线图(图1A)显示各样本相对于中值长度近似相等, 无明显偏斜。说明数据分布均匀, 表明测序数据质量较为可靠。通过对所有样本的相关性进行分析, 显示不同样本之间的相关系数均大于0.83 (图1B), 说明不同样本间相关性较高, 进一步表明不同样本间基因的表达在应答损伤处理这一动态机制下具有较高的稳定性。

2.2 差异基因筛选与富集

使用edgeR软件对损伤处理条件下芒果胶孢炭疽菌

的时间序列基因表达数据进行分析, 以1为标准($\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$), $P\text{-value} < 0.05$, 获得417个差异基因。其中 $\log\text{FC} > 1$ 的基因数量为116个, $\log\text{FC} < -1$ 的基因数量为69个, 说明在机械损伤后, 许多基因上调表达。利用超几何分布统计, 计算显著差异表达基因相对全部基因的富集情况, 显示417个基因富集在127个GO条目中。其中, 具有显著性富集的GO条目有21个($P < 0.05$) (图1C)。细胞组分(CC)分类中, 跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity)富集较多的差异基因(15个)且表达水平最高; 在分子功能(MF)分类中, 大部分基因富集于氧化还原过程(oxidation-

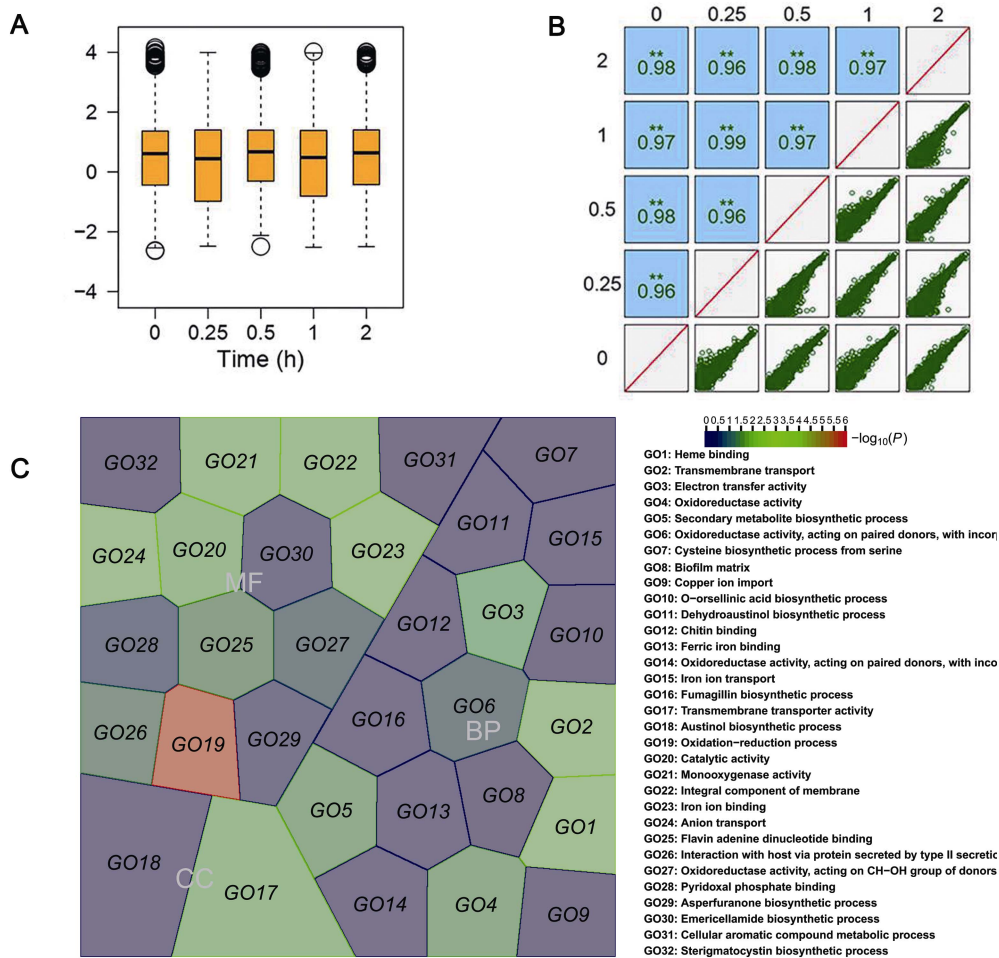


图1 不同处理样品基因表达数据和差异表达基因GO富集结果

(A) 不同样本基因表达数据的分布; (B) 不同样本间的相关性; (C) 差异表达基因的GO富集分析。MF: 分子功能; BP: 生物过程; CC: 细胞组分

Figure 1 Gene expression data and GO enrichment for differentially expressed genes under different treatments

(A) Gene expression in different samples; (B) Correlation between different samples; (C) GO enrichment for differentially expressed genes. MF: Molecular function; BP: Biological process; CC: Cell components

reduction process)及催化活性(catalytic activity); 在生物过程(BP)层面上, 显著富集的GO条目主要集中于生物过程, 富集较多的条目有跨膜转运过程(trans-membrane transport)及氧化酶活性(oxidoreductase activity)等。上述结果表明, 芒果采后胶孢炭疽菌在响应损伤胁迫过程中发生了一系列生理变化。

为了进一步筛选胶孢炭疽菌响应胁迫损伤期间被显著调控的代谢通路, 我们将差异表达基因进行KEGG富集分析。结果显示, 417个差异表达基因能与KEGG中的67个不同的通路匹配, 但只有4条通路存在显著富集($P<0.05$) (表2)。通路主要富集到丙酮酸代谢和硫代谢(表2), 这进一步表明部分差异表达基因参与物质能量代谢, 以保证胶孢炭疽菌在响应损伤胁迫过程中的能量消耗。此外, 显著富集的代谢通路还包括黄曲霉素和二萜合成途径, 两者在真菌发育中具有重要作用。

2.3 基因表达模式解析

为了精确解析胶孢炭疽菌相关差异基因的动态表达模式, 进而筛选候选基因, 我们使用基于模型的聚类方法对具有相似表达模式的基因进行分组(Qiu et al., 2011)。结果显示, 417个损伤胁迫响应基因可分成12个聚类模块, 并获得不同基因动态表达数据的聚类结果和每个聚类内的基因数量(图2)。不同聚类模式的表达趋势不同。

聚类2、4、7、8、9和10在机械损伤后0小时开始, 0到2小时整体表现先下降后上升、再下降后又上升的表达趋势, 但不同时间点变化程度差异较大。处理后0–1小时, 聚类2、5、8、9和10表现出相同的趋势, 处理后15分钟内基因表达水平迅速下降, 处理后15–30分钟基因表达呈直线上升趋势, 且在处理后1

小时基因表达量与15分钟时的表达量基本一致; 聚类4和7在处理1小时基因表达量显著高于处理15分钟时; 聚类11在处理1小时内变化趋势相对较小且在处理后1小时的基因表达量显著低于处理15分钟时。处理后1–2小时内, 各聚类内基因表达水平变化趋势相对平缓, 聚类2、4、7、8、9、10和11基因表达水平缓慢上升; 而聚类5的基因在处理1小时后保持其表达水平。综上, 损伤处理胶孢炭疽菌后1小时内, 聚类2、4、5、7、8、9、10和11均有大量基因响应胶孢炭疽菌的瞬时应激, 这8个聚类的基因数量占总基因数量的66.43%。

聚类6与12的基因表达趋势相似, 即2小时内都呈缓慢下降趋势。但聚类6在15分钟内基因表达水平稍有上升, 后缓慢下降, 2小时后基因表达量几乎为0。聚类12基因表达水平虽然同样缓慢下降, 但是一直保持较高的水平, 且整体表达较稳定。聚类3包含60个基因, 占基因总数的14.39%, 与其它聚类相反, 表达水平整体呈现缓慢上升趋势。聚类1在15分钟内基因表达水平迅速降低至表达量几乎为0。由上可知, 聚类3、6和12基因可能在处理后1–2小时内响应损伤应激。

2.4 聚类模块的生物学富集

分析每个聚类模块中富集的生物学功能是理解该模块在整个调控网络中所起作用的关键。为了寻找处理后不同时间不同聚类内响应的基因, 我们对每个聚类进行差异基因GO和KEGG功能富集分析(图3), 对聚类内基因功能及其调控关系进行了初步解析。

处理后1小时, 聚类2、4、5、7、8、9和10的基因表达趋势相似(先下降后上升)。对其中19个GO富集显著的条目进行分析, 结果(图3A)显示, 聚类4中

表2 差异表达基因KEGG富集结果

Table 2 KEGG enrichment result for differentially expressed genes

Description	Gene ratio	Bg ratio	P-value	Gene ID	Count
Aflatoxin biosynthesis	6/113	46/2826	0.009071	CGGC5_14023/CGGC5_13120/CGGC5_13638/CGGC5_13456/CGGC5_10453/CGGC5_9572	6
Pyruvate metabolism	7/113	72/2826	0.023327	CGGC5_14045/CGGC5_7569/CGGC5_3411/CGGC5_10319/CGGC5_11829/CGGC5_3455/CGGC5_5764	7
Sulfur metabolism	3/113	19/2826	0.037811	CGGC5_5794/CGGC5_12200/CGGC5_15291	3
Diterpenoid biosynthesis	3/113	21/2826	0.048998	CGGC5_1921/CGGC5_15293/CGGC5_11451	3

Bg ratio: 背景基因比例 Bg ratio: Background gene ratio

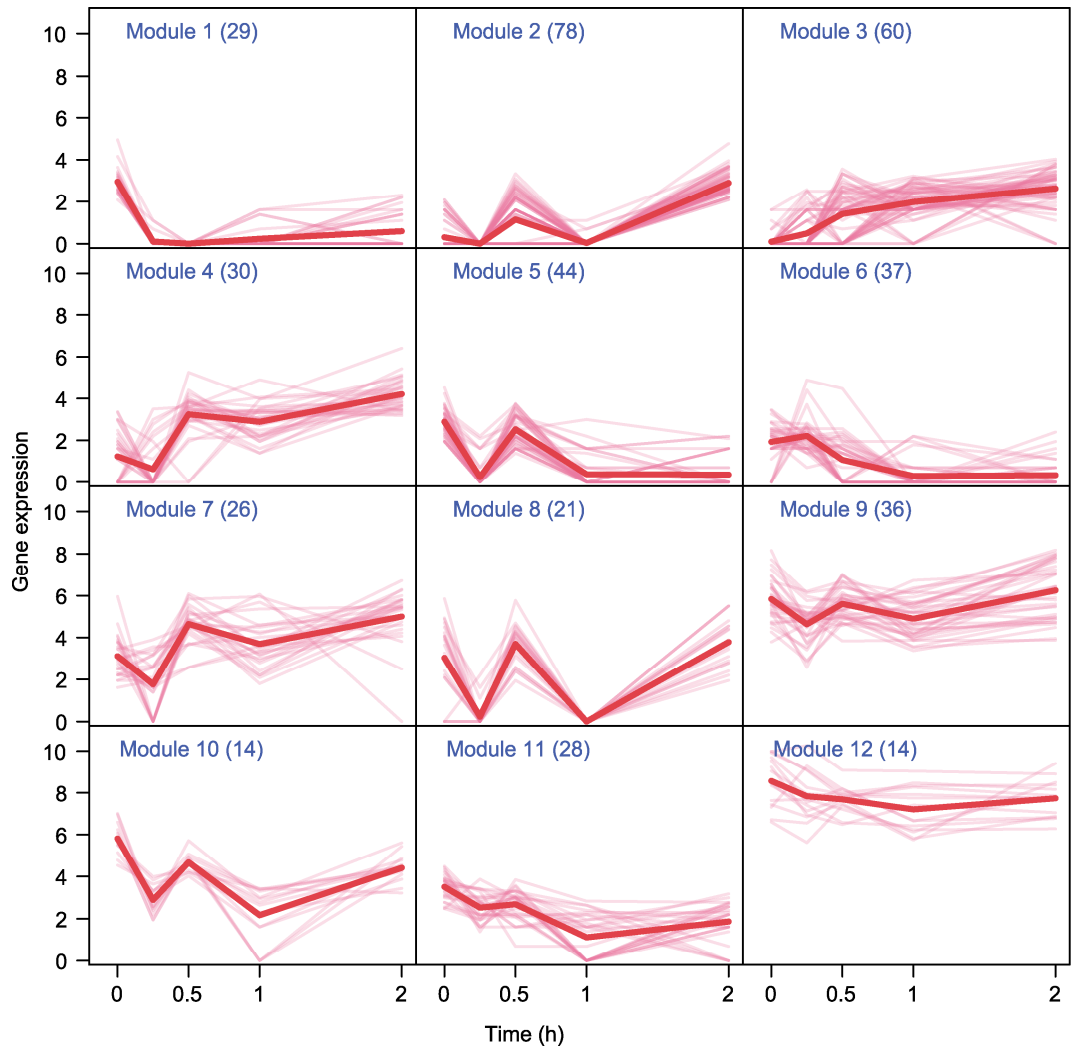


图2 损伤胁迫条件下差异表达基因聚类模式

Figure 2 Expression profiles for each cluster of differentially expressed genes

的基因参与氧化还原过程(oxidation-reduction process), 其中包含LysM结构域蛋白相关基因。LysM结构域蛋白通过调节氨基酸和核苷酸糖代谢响应真菌病原体的防御信号转导。GO富集结果显示, 聚类7与氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)相关, 在此聚类内发现短链脱氢酶还原酶家族(short-chain dehydrogenase reductase family)基因。聚类10的富集功能主要集中于催化活性(catalytic activity)和黄素腺嘌呤二核苷酸结合(flavin adenine dinucleotide binding)。其中, 发现具有调控转录功能的C6转录因子(C6 transcription factor)参与调控真菌子实体发育。此外, 聚类5中部分基因参与烟曲霉素的生物合成过程(fumagillin biosynthetic process)及铁离子结合

(iron ion binding)等。

处理后1–2小时, 聚类3、6和12的基因总体呈缓慢下降趋势。GO富集分析显示聚类6和12的基因具有相似的功能, 如跨膜转运(transmembrane transport)和氧化还原过程(oxidation-reduction process)。GO功能富集分析显示, 聚类3与膜的组成成分(integral component of membrane)有关, 其聚类内的主要促进者超家族转运蛋白MFS (major facilitator superfamily transporter)代表了最大的二级转运家族, 为特定物质穿过疏水性脂质提供通道。

本研究对每个聚类下富集的162条通路进行了分析, 并对其中29个富集最为显著的条目进行展示。差异基因的KEGG富集散点图(图3B)显示, 基因富集最

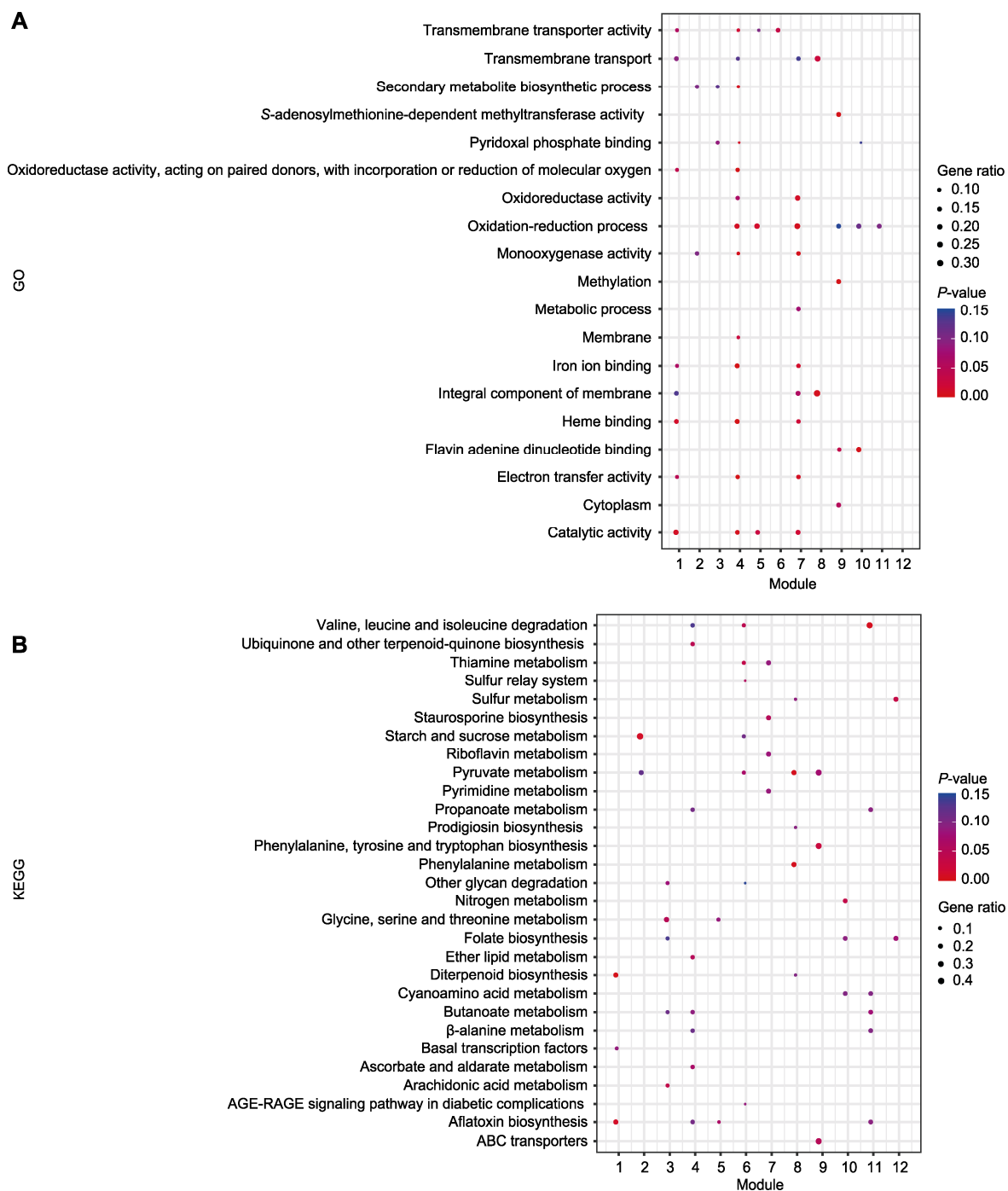


图3 差异表达基因聚类模块的富集分析

(A) GO富集分析; (B) KEGG富集分析。图中横坐标表示不同聚类, 纵坐标表示富集通路的名称。不同颜色的点代表不同 P -value值, 点的大小表示该通路下差异表达基因的多少。 P -value取值范围为0–0.15, 数值越接近0, 表示富集越显著。

Figure 3 Enrichment analysis for each gene cluster of differentially expressed genes

(A) GO enrichment analysis for each cluster; (B) KEGG enrichment analysis for each cluster. The x-axis represents the different cluster and the y-axis is the name of enrichment pathway. Different P -value are represented by dots with different colors, while the number of differentially expressed genes in each pathway are displayed for the size of the dots. P -value ranges from 0–0.15. The closer the value to 0, the more significant the enrichment is.

显著的代谢通路主要聚集在聚类2、8、9和11上, 分别为淀粉和蔗糖代谢(starch and sucrose metabolism)、ABC转运子(ABC transporters)及丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)。其中富集差异基因个数最多的为淀粉和蔗糖代谢途径。聚类4富集显著的代谢通路最多, 其差异基因分布个数也最为平均。聚类模块的功能富集结果表明, 不同聚类间的生物学特性不同(图3B)。

2.5 胁迫响应基因调控网络

为了挖掘芒果胶孢炭疽菌损伤胁迫响应过程中的关键基因, 我们基于ODE模型构建基因间的动态调控网络并筛选关键的聚类模块。结合网络拓扑结构和基因注释信息, 我们发现12个胶孢炭疽菌响应损伤胁迫核心基因(表3), 分布于聚类模块1、2、6和11中, 基因间的调控网络较为稀疏(图4)。在12个聚类模块中, 调控关系主要集中在聚类模块1和2, 即核心模块。这表明核心模块中的基因在损伤胁迫的调控网络中起重要作用。

将功能注释与基因调控网络的拓扑结构相结合, 发现聚类模块1中基因参与了转录和二萜类生物合成过程。其中核心基因包括pep1和细胞色素P450(cytochrome p450, CYP)编码基因(表3)。研究发现, CYP参与真菌体内多种代谢过程, 并且通过参与细胞结构和激素等物质的生物合成调节真菌的生长(Rendic and Guengerich, 2015)。

表3 差异表达基因12个聚类模块中的12个核心基因

Table 3 Twelve core genes identified in 12 cluster modules of differentially expressed genes

Module	Gene numbers	Transcript	Gene description
1	1	ELA23757	Pep1
1	6	ELA25282	Cytochrome p450
1	16	ELA23240	Nad-dependent epimerase dehydratase
2	20	EFCGT00000013177	5.8S_rRNA
2	25	ELA35632	Polyketide synthase
2	44	ELA25574	Integral membrane protein
2	49	ELA24193	Short chain dehydrogenase reductase family
2	57	ELA35820	Ankyrin repeat-containing protein
2	189	ELA25228	Ankyrin repeat protein
2	26	ELA33919	Laccase
6	76	ELA24504	Major facilitator superfamily transporter
11	232	ELA37190	Catalase

聚类模块2是瞬时响应损伤胁迫的代表模块。GO富集分析表明, 其基因主要参与电子转移活性、血红素结合过程和次生代谢产物的生物合成过程, 共包含74个差异表达基因。结合基因间的调控网络和聚类富集结果, 我们筛选到7个核心基因。典型核心基因如聚酮化合物合酶PKSS (polyketide synthase)及含锚蛋白重复序列蛋白AKR2A (ankyrin repeat-containing protein)编码基因在细胞代谢中起重要作用。研究表明, PKSS参与调控真菌体内气生菌丝的生长与融合(Shimizu et al., 2016), 并在真菌体内诱导各种小分子信号过程, 从而诱导细胞的分化和再生(Bhetariya et al., 2016)。AKR2A调控由抗病性和应激反应共同参与的抗氧化作用, 是植物生长发育中不可或缺的蛋白(Yan et al., 2002)。这些模块间的调控网络表明模块内的基因协同作用响应损伤胁迫。

2.6 应答损伤胁迫基因的动态表达模式验证

为了验证测序结果的可靠性和应答损伤胁迫基因的动态表达模式, 我们随机选取5个mRNAs基因进行实时定量PCR检测。结果表明, 尽管基因表达水平有差异, 但从5个基因的表达趋势来看, 所选基因具有瞬时动态表达模式(图5A-E)。此外, qRT-PCR与RNA-seq数据在损伤后的时间点内线性相关系数为0.816 3(图5F), 说明两组数据的相关性很高。本研究利用转录组测序获得的基因表达结果较为准确, 可为后续研究提供可靠的数据来源。

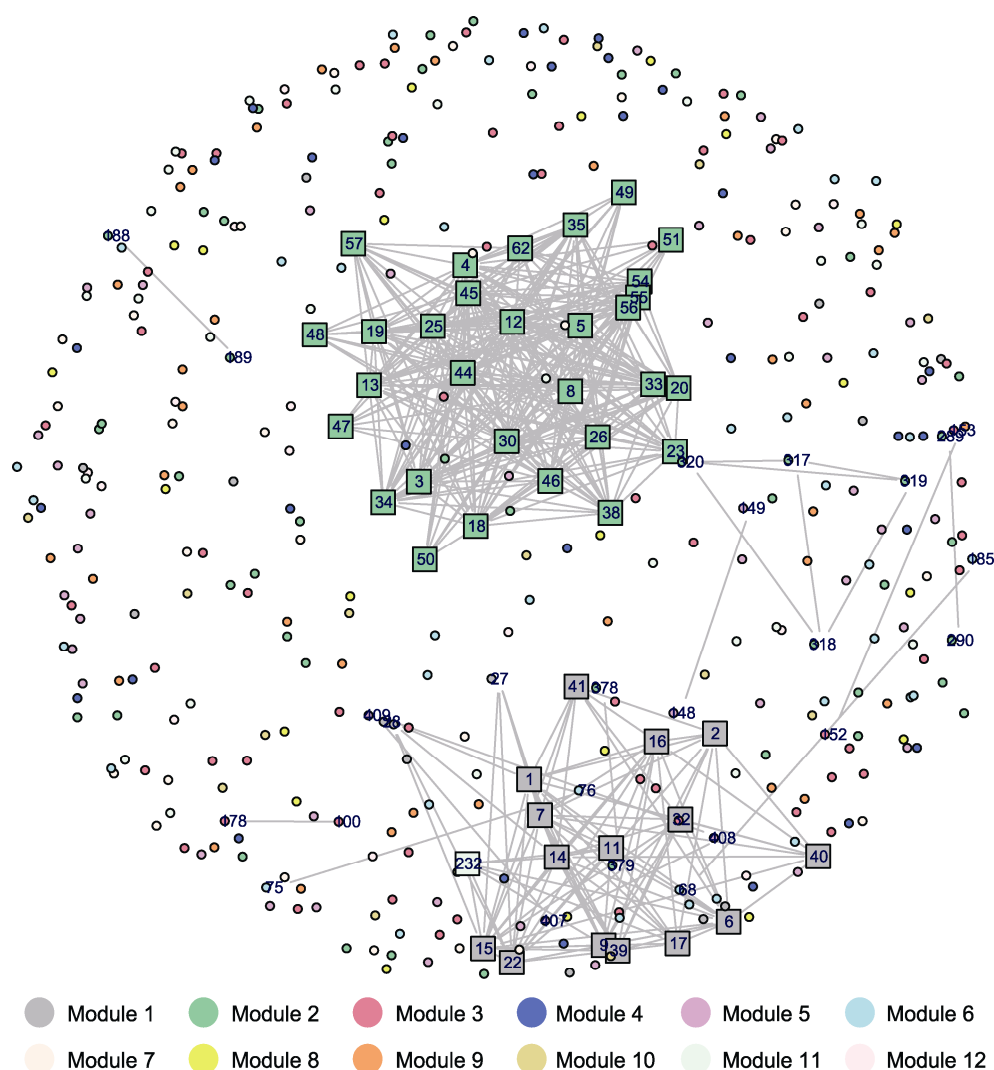


图4 差异表达基因聚类模块内基因间调控网络重建

不同颜色对应不同的聚类模块。方框中的数字代表核心模块中相互作用的基因编号, 12个核心基因包含其中。

Figure 4 Inter-module regulatory network reconstruction of differentially expressed genes

Different colors correspond to different clustered modules. The numbers in the boxes represent the interacting gene numbers in core modules. The 12 core genes are included.

2.7 讨论

应答机械损伤的相关研究多与组织的再生和修复有关(Chang et al., 2009)。目前关于丝状真菌对损伤应答的认知仅限于损伤后子实体上隔膜气孔的封闭, 以防止细胞质内含物过度流失和细胞死亡(Jedd, 2011)。而真菌的损伤胁迫响应是一个动态过程, 单个时间点的静态数据很难描述这一复杂的生物学过程。

目前, 对生物较长时间响应胁迫过程的研究已经较为深入(Sun et al., 2009), 而对胁迫后几分钟至数小时内生物体的瞬时生理变化正逐渐受到重视。

Munns (2010)认为植物在盐胁迫下数小时已经开始产生变化, 包括细胞壁的改变、信号转导以及生长速率减慢等瞬时响应。周韬(2014)发现与长时间(60天)胁迫相比, 胁迫后6小时胡杨(*Populus euphratica*)叶片中SOD酶活性和根部ABA含量显著升高。Hernández-Oñate等(2012)对丝状真菌木霉菌菌丝体损伤后15、30、60分钟获得的RNA样品进行RNA-seq分析, 结果表明, 损伤会引起细胞内钙浓度升高, 激活参与氧化应激反应的基因, 其中16个编码ROS清除蛋白的基因在损伤后短时间内被强烈抑制。在信号转导方

面, 范玲玲等(2010)探讨了星星草(*Puccinellia tenuiflora*)在响应 NaHCO_3 胁迫中 Ca^{2+} 浓度和 Ca^{2+} -ATPase活性的变化。对损伤胁迫下瞬时反应机制和生理变化的研究有助于全面理解胶孢炭疽菌产孢和生长发育中存在的通路(章树桃等, 2017)。本实验选取损伤2小时内的5个时间点进行转录组分析。聚类结果表明, 除聚类模块3和6, 其它模块基因表达量在处理前先表现为下降, 这可能是由于在胁迫开始时, 真菌中大部分生理功能会下降, 如生长受抑制或代谢活性降低, 偏离正常状态以适应多变的环境。在损伤后1–2小时, 真菌在逆境条件下继续生长, 尽管生长速度变

缓慢, 但仍非常重要。网络关系拓扑图显示, 基因间的调控关系主要集中在聚类模块1和2中, 其中涉及一些与分生孢子生长、信号传递、细胞增殖分化、损伤防御及抗逆性相关的基因和代谢途径。

真菌在生长发育过程中受到逆境胁迫时, 会启动自身防御机制, 重新建立新的稳态条件并恢复生长, 这期间所发生的系列反应都是真菌生存的关键。逆境胁迫可大幅增加ROX的积累, 引起氧化应激, 从而抑制生长甚至诱导生物体死亡(Wakabayashi et al., 2012)。差异基因分析结果表明, 编码Pep1和锚蛋白重复序列蛋白的基因在激活自身抗氧化防御系统中

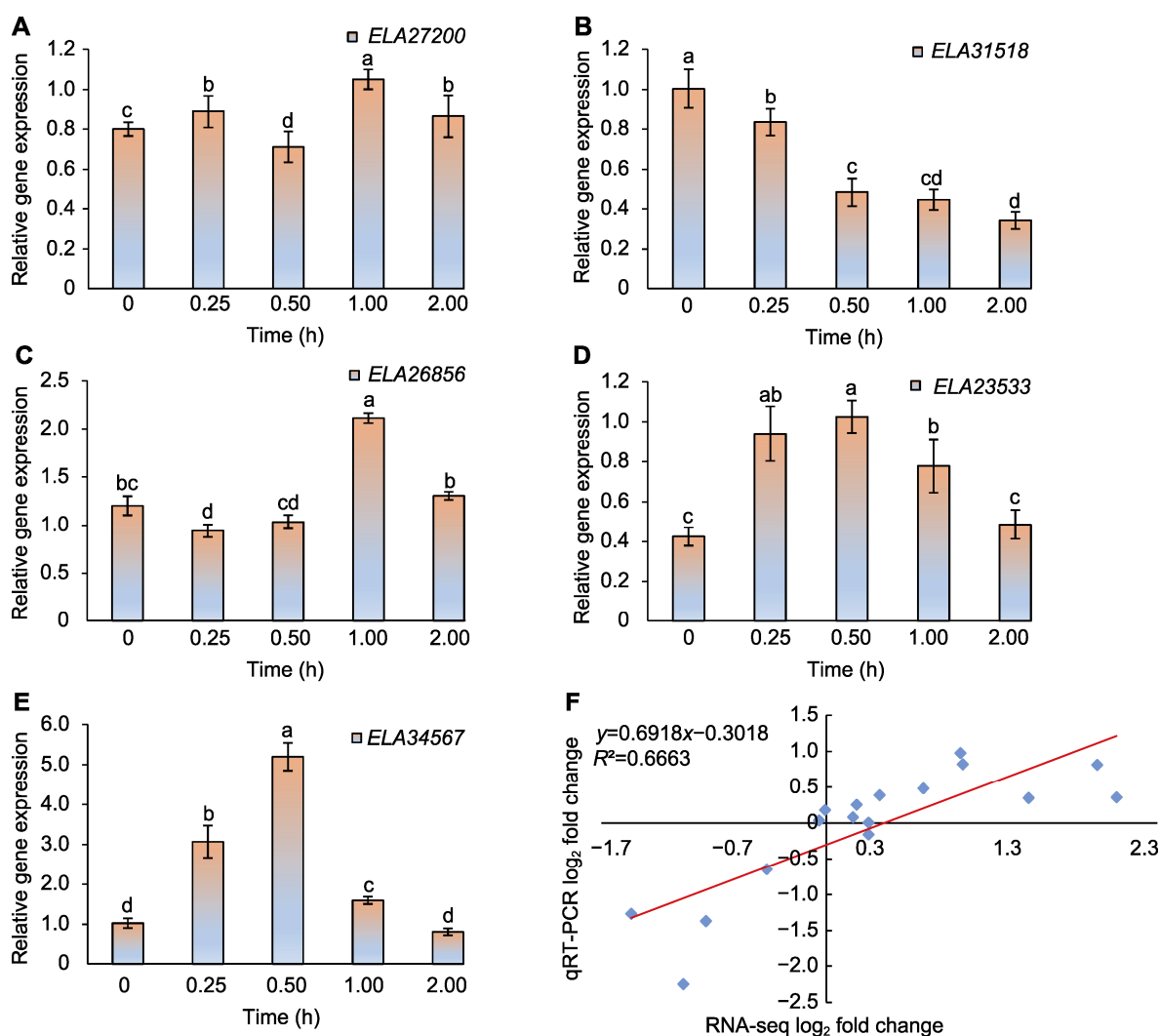


图5 5个核心基因的动态表达模式及数据相关性
不同小写字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5 The dynamic expression patterns and data correlation of five core genes
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

发挥关键作用, 诱导细胞间信号转导(Sakamoto et al., 2008; Yamaguchi et al., 2010)。过氧化氢酶(catalase, CAT)是细胞防御活性氧的第一道防线。研究表明, 丝状真菌绿僵菌中*cat1*基因的过表达可增强过氧化氢酶活性, 加快分生孢子萌发和菌丝生长(Hernandez et al., 2010)。

富集分析结果表明, 在分子功能、细胞组分及生物学过程中占较高比重的注释有氧化还原酶活性、膜整体组分和跨膜转运蛋白活性。从这些功能注释中可以看出分生孢子生长发育过程中涉及一系列物质代谢相关途径。例如, 短链脱氢酶还原酶家族(SDR)具有功能折叠特性, 在脂质、氨基酸等物质代谢和氧化还原机制中起关键作用(Persson et al., 2008)。胶孢炭疽菌菌丝在损伤后2小时内SDR表达量呈上升趋势, 推测其可能通过传递代谢信号对损伤细胞进行修复, 从而控制代谢平衡(Kavanagh et al., 2008)。

在核心基因中也发现了很多参与真菌菌丝生长分化、细胞壁合成重塑及黑色素合成相关的基因, 包括响应胁迫过程中负责细胞壁合成和重塑的NAD脱水酶(nad-dependent epimerase dehydratase)(Zeng et al., 2014)。5.8s-rRNA突变可抑制细胞生长, 影响体外蛋白质合成(Elela and Nazar, 1997)。漆酶(LAC)在菌丝营养生长、分生孢子萌发、附着体形成和附着体的穿透性方面起重要作用(Chi et al., 2009)。内膜蛋白(integral membrane protein)负责真菌细胞壁的构建和子囊壁的组装。此外, 一些基因也调控真菌体内分子信号和大分子物质的传递。在丝状真菌中, 主要促进超家族转运蛋白MFS (major facilitator superfamily transporters)将包括糖、氨基酸、离子载体、有机物及无机阴离子在内的多种底物跨膜转运, 被称为二级活性转运蛋白(Saier et al., 2013)。

综上所述, 通过对转录组测序结果中的差异表达基因和基因间调控网络进行分析, 本研究共筛选到12个胶孢炭疽菌瞬时响应损伤胁迫核心基因, 这些核心基因不仅为芒果胶孢炭疽菌产孢和致病机理研究奠定了基础, 也为后续解析胶孢炭疽菌应答外源胁迫和诱导产孢的分子机理提供了重要参考。

致谢 北京林业大学姜立波老师在转录组数据分析方面给予了指导, 海南大学热带作物学院安邦老师和张贝同学在实验方案设计及方法探索上提供了帮助, 特此致谢。

参考文献

- 范玲玲, 陈刚, 陈义芳, 周卫东, 戴绍军, 孙国荣 (2010). NaHCO₃胁迫下星星草根中Ca²⁺与Ca²⁺-ATPase的超微细胞化学定位. *植物学报* **45**, 337–344.
- 黄华平 (2016). 柱花草胶孢炭疽菌基因组、转录组测序及致病相关基因*CgALS*分析研究. 博士论文. 海口: 海南大学. pp. 1–115.
- 李伟 (2004). 芒果胶孢炭疽病菌遗传转化体系的建立. 硕士论文. 海口: 华南热带农业大学. pp. 1–55.
- 吴振麟 (2011). 芒果采后生理及贮藏保鲜技术研究进展. *安徽农学通报* **17**(19), 82–84, 135.
- 于海英, 兰建强, 王晓燕, 彭磊, 吴佳, 刘云龙 (2012). 芒果胶孢炭疽菌致病性的初步研究. 见: 中国植物病理学会2012年学术年会论文集. 青岛: 中国植物病理学会. pp. 186–189.
- 张丽勃, 段可, 邹小花, 何成勇, 高清华 (2017). 草莓胶孢炭疽菌CFEM候选效应子的生物信息学鉴定及其侵染过程中的转录分析. *植物保护* **43**(5), 43–51.
- 章树桃, 陈春, 解廷娜 (2017). 新蚜虫病霉菌丝和孢子阶段的转录组学分析. *农业生物技术学报* **25**, 1489–1499.
- 周韬 (2014). 盐胁迫下胡杨的生理响应及miRNA表达动态变化. 博士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 1–138.
- 邹日娥 (1995). 芒果采后生理生化的变化. *东南园艺* (2), 9–12.
- Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**, 353–362.
- Bhetariya PJ, Prajapati M, Bhaduri A, Mandal RS, Varma A, Madan T, Singh Y, Sarma PU (2016). Phylogenetic and structural analysis of polyketide synthases in *Aspergilli*. *Evol Bioinform* **12**, 109–119.
- Chang C, Wu P, Baker RE, Maini PK, Alibardi L, Chuong CM (2009). Reptile scale paradigm: evo-devo, pattern formation and regeneration. *Int J Dev Biol* **53**, 813–826.
- Chi MH, Park SY, Kim S, Lee YH (2009). A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. *PLoS Pathog* **5**, e1000401.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676.
- Elela SA, Nazar RN (1997). Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. *Nucleic Acids Res* **25**, 1788–1794.
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L,

- Lowy E, Alioto T, Capella-Gutiérrez S, Blanca J, Cañizares J, Ziarsoolo P, Gonzalez-Ibeas D, Rodríguez-Moreno L, Droege M, Du L, Alvarez-Tejado M, Lorrente-Galdos B, Melé M, Yang LM, Weng YQ, Navarro A, Marques-Bonet T, Aranda MA, Nuez F, Picó B, Gabaldón T, Roma G, Guigó R, Casacuberta JM, Arús P, Puigdomènech P (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 11872–11877.
- Hernandez CEM, Guerrero IEP, Hernandez GAG, Solis ES, Guzman JCT (2010). Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 1033–1044.
- Hernández-Oñate MA, Esquivel-Naranjo EU, Mendoza-Mendoza A, Stewart A, Herrera-Estrella AH (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 14918–14923.
- Jahurul MHA, Zaidul ISM, Ghafoor K, Al-Juhaimi FY, Nyam KL, Norulaini NAN, Sahena F, Mohd Omar AK (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: a review. *Food Chem* **183**, 173–180.
- Jedd G (2011). Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. *Trends Cell Biol* **21**, 12–19.
- Jin JP, Zhang H, Kong L, Gao G, Luo JC (2014). PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Res* **42**, D1182–D1187.
- Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3895–3906.
- Langmead B, Salzberg SL (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357–359.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- McCarthy DJ, Chen YS, Smyth GK (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* **40**, 4288–4297.
- Munns R (2010). Approaches to identifying genes for salinity tolerance and the importance of timescale. In: Sunkar R, ed. *Plant Stress Tolerance*. New York: Humana Press. pp. 25–38.
- Persson B, Hedlund J, Jörnvall H (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3879–3894.
- Perumal AB, Sellamuthu PS, Nambiar RB, Sadiku ER (2017). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Food Bioprocess Technol* **10**, 1131–1141.
- Qiu Q, Ma T, Hu QJ, Liu BB, Wu YX, Zhou HH, Wang Q, Wang J, Liu JQ (2011). Genome-scale transcriptome analysis of the desert poplar, *Populus euphratica*. *Tree Physiol* **31**, 452–461.
- Rendic S, Guengerich FP (2015). Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem Res Toxicol* **28**, 38–42.
- Reyes-Perez JJ, Hernandez-Montiel LG, Vero S, Noa-Carrazana JC, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G (2019). Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *J Food Sci Technol* **56**, 4992–4999.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140.
- Saier MH Jr, Reddy VS, Tamang DG, Västermark Å (2014). The transporter classification database. *Nucleic Acids Res* **42**, D251–D258.
- Sakamoto H, Matsuda O, Iba K (2008). *ITN1*, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **56**, 411–422.
- Shao YZ, Zeng JK, Tang H, Zhou Y, Li W (2019). The chemical treatments combined with antagonistic yeast control anthracnose and maintain the quality of post-harvest mango fruit. *J Integr Agric* **18**, 1159–1169.
- Shimizu Y, Ogata H, Goto S (2017). Type III polyketide synthases: functional classification and phylogenomics. *Chembiochem* **18**, 50–65.
- Si YQ, Liu P, Li PH, Brutnell TP (2014). Model-based clustering for RNA-seq data. *Bioinformatics* **30**, 197–205.
- Sun J, Chen SL, Dai SX, Wang RG, Li NY, Shen X, Zhou XY, Lu CF, Zheng XJ, Hu ZM, Zhang ZK, Song J, Xu Y (2009). NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiol* **149**, 1141–1153.

- The Gene Ontology Consortium** (2015). Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* **43**, D1049–D1056.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L** (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* **28**, 511–515.
- Wakabayashi K, Soga K, Hoson T** (2012). Phenylalanine ammonia-lyase and cell wall peroxidase are cooperatively involved in the extensive formation of ferulate network in cell walls of developing rice shoots. *J Plant Physiol* **169**, 262–267.
- Wilczynski B, Furlong EEM** (2010). Challenges for modeling global gene regulatory networks during development: insights from *Drosophila*. *Dev Biol* **340**, 161–169.
- Xie C, Mao XZ, Huang JJ, Ding Y, Wu JM, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei LP** (2011). KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res* **39**, W316–W322.
- Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, Tax FE, Ryan CA** (2010). *PEPR2* is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 508–522.
- Yan JQ, Wang J, Zhang H** (2002). An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J* **29**, 193–202.
- Zeng FR, Wu XJ, Qiu BY, Wu FB, Jiang LX, Zhang GP** (2014). Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress. *Planta* **240**, 291–308.

Molecular Mechanism of the Generation of Asexual Spores of the Mango Fungal Pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) Induced by Mechanical Injuries

Liyan Wang¹, Mengyao Lu¹, Yue Tong¹, Xiangbin Xu¹, Zhengke Zhang¹
Lanhuan Meng¹, Xuequn Shi^{1*}, Haichao Song^{2*}

¹College of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China; ²School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract *Colletotrichum gloeosporioides* is a prevalent pathogen that causes anthracnose in mango (*Mangifera indica*). Mycelium of *C. gloeosporioides* will accumulate a large number of conidia in 24–48 hours after mechanical injuries. However, it often accumulates none or few conidia during indoor culture, and the gene regulatory networks of the response to injury for a short-time (ST), or the key metabolic pathways involved in the response has not been explored. In this study, RNA-seq was carried out on RNA samples obtained at 5 time points within 2 hours after mechanical injuries. The differentially expressed genes were enriched by GO enrichment and KEGG metabolic pathway. The expression dynamics of mycelia in response to ST injury stress was analyzed. Based on a nonlinear ordinary differential equation model coupled with variable selection techniques, inter-module networks were constructed. The results showed that 417 differentially expressed genes were obtained, which belong to 12 clustered modules. KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes was enriched in the process of pyruvate metabolism, sulfur metabolism, aflatoxin biosynthesis, diterpenoid biosynthesis. Combined with functional annotation, 12 core genes were identified that significantly correlated with ST injury-induced expression. These results provide valuable references for further research on asexual development and pathogenicity in *C. gloeosporioides*.

Key words mango, *Colletotrichum gloeosporioides*, injury stress, RNA sequencing, expression dynamics

Wang LY, Lu MY, Tong Y, Xu XB, Zhang ZK, Meng LH, Shi XQ, Song HC (2020). Molecular mechanism of the generation of asexual spores of the mango fungal pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) induced by mechanical injuries. *Chin Bull Bot* **55**, 551–563.

* Authors for correspondence. E-mail: shixuequn@163.com; songhaichao@sohu.com

(责任编辑: 白羽红)