

• 研究报告 •

梁英梅 博士，北京林业大学教授、博士生导师。主要从事重要林木病害的致病机制及病原真菌分子系统研究。先后主持国家自然科学基金、“十三五”重点研发计划等9项课题，目前主持开展十四五重点研发项目专题研究工作。副主编或参编出版专著3部，在国内外核心期刊发表论文80多篇，其中SCI收录50多篇，获得省级科技进步二、三等奖各一项，授权国家发明专利4项。



山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的比较转录组分析

翁涵¹，刘霞¹，陶思齐¹，梁英梅^{1,2}

1 北京林业大学 林学院 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室，北京 100083

2 北京林业大学 博物馆，北京 100083

翁涵，刘霞，陶思齐，梁英梅. 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的比较转录组分析. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3825-3843.

WENG H, LIU X, TAO SQ, LIANG YM. Comparative transcriptomic analysis of the haustoria of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3825-3843.

摘要：为防止锈病的传播，培育抗病品种以及减少产量损失，基于山田胶锈菌 (*Gymnosporangium yamadae*) 和亚洲胶锈菌 (*Gymnosporangium asiaticum*) 吸器阶段的转录组差异分析揭示了胶锈菌侵染寄主植物时的专业化选择机制。对山田胶锈菌和亚洲胶锈菌担孢子侵染寄主时形成的吸器进行转录组测序，分别获得了 21 213 条和 13 015 条单基因 (unigenes); 从山田胶锈菌和亚洲胶锈菌中分别选择 5 个基因进行实时荧光定量 PCR 验证，显示其表达情况与转录组分析结果基本一致，表明转录组分析结果可靠; 用 Nr、GO、KEGG、KOG 等 7 个数据库进行基因功能注释和富集分析，发现两种胶锈菌的基因主要富集在细胞进程、翻译、代谢相关通路; 使用 SignalP 和 TMHMM 在线网站以及 dbCAN、BLAST、HMMER 等软件分析显示山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器中的候选效应蛋白分别有 343 个 (2.51%) 和 175 个 (2.79%)，其中分别含有 14 个和 5 个蛋白酶，10 个和 3 个脂酶; 利用 OrthoFinder、BLSAT 和 KaKs Calculator 软件分析了两种胶锈

Received: May 10, 2022; Accepted: August 4, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31870628)

Corresponding author: LIANG Yingmei. E-mail: liangym@bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31870628)

菌的进化关系, 在一对一同源基因中, 比对率大于 82% 的基因对被认为处于保守选择, 有 12.37% 的基因对处于正向选择, 在亚洲胶锈菌中有 5 个效应子处于进化选择, 其中 1 个为脂酶。山田胶锈菌和亚洲胶锈菌表达基因富集中没有发现显著差异, 表明虽然其种间存在典型的寄主选择性, 但吸器所涉及的生物学过程相对保守, 而两个物种之间存在较低的蛋白相似性, 说明它们受到较大的寄主选择压力而产生了明显的进化分歧, 这可能与对寄主的特异性选择机制相关。在吸器阶段, 胶锈菌可能可以利用植物的脂质作为能量来源, 而效应子的主要目的可能是调控植物的生理进程等而不是直接攻击寄主。

关键词: 锈菌; 转录组; 吸器; 物种进化; 效应子

Comparative transcriptomic analysis of the haustoria of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*

WENG Han¹, LIU Xia¹, TAO Siqu¹, LIANG Yingmei^{1,2}

1 The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Museum of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: To provide a theoretical basis for controlling the spread of rust disease, cultivating disease-resistant varieties and reducing yield losses, we investigated the transcriptome differences between *Gymnosporangium yamadae* and *Gymnosporangium asiaticum* at the haustorial stage and revealed a specialized selection mechanism for *Gymnosporangium* species to infect host plants. We sequenced the transcriptomes of the haustoria in rust-infected leaves when basidiospores of *G. yamadae* and *G. asiaticum* infected their hosts, and obtained 21 213 and 13 015 unigenes, respectively. Real-time fluorescence quantitative PCR validation of five genes selected from *G. yamadae* and *G. asiaticum*, respectively, showed that their expression profiles were generally consistent with the results of transcriptome analysis, demonstrating the reliability of the transcriptome data. We used seven databases such as Nr, GO, KEGG, and KOG to perform gene function annotation and enrichment analysis, and found that the genes from both rusts were mainly enriched in cellular processes, translation, and metabolism-related pathways. Moreover, we used SignalP, TMHMM online website and other software such as dbCAN, BLSAT, HMMER to show that there were 343 (2.51%) and 175 (2.79%) candidate effector proteins containing 14 and 5 proteases and 10 and 3 lipases in the haustoria of *G. yamadae* and *G. asiaticum*, respectively. Furthermore, we used OrthoFinder, BLAST and KaKs Calculator software to analyze the evolutionary relationship of the two fungi. Among one-to-one homologous genes, gene pairs with >82% alignment were considered to be under conservative selection, and 12.37% under positive selection. Five effectors of *G. asiaticum* were under positive selection, and one of which was a lipase. No significant differences were found in the enrichment of expressed genes between *G. yamadae* and *G. asiaticum*, indicating the biological processes involved in haustoria were relatively conserved, despite the typical host selectivity between species. The low protein similarity between the two species suggested that they were under greater host selective pressure and there was significant evolutionary divergence, which might be related to

the host-specific selection mechanism. In the haustorial, the main purpose of the effectors might be to regulate physiological processes in the plants rather than attacking the host directly, and *G. yamadae* and *G. asiaticum* might use plant lipids as energy sources.

Keywords: rust fungi; transcriptome; haustoria; species evolution; effectors

苹果和梨产业是中国水果的支柱^[1-2],但其产量和品质会受到由山田胶锈菌 (*Gymnosporangium yamadae* Miyabe ex G. Yamada) 和亚洲胶锈菌 (*Gymnosporangium asiaticum* Miyabe ex G. Yamada) 所致锈病的影响。这两种胶锈菌不仅在亚洲地区广泛分布^[3],还被欧洲和地中海植物保护组织 (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) 列入防疫名单^[4]。虽然山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的冬孢子阶段能寄生于同一株圆柏上,但冬孢子萌发后产生的担孢子却只能分别侵染各自的转主寄主,不能发生交叉侵染^[5],即山田胶锈菌寄生于苹果属植物,亚洲胶锈菌寄生于皱皮木瓜、槭栎属和梨属植物^[6],并分别在各自寄主的叶片上产生性孢子,再发育形成锈孢子去侵染圆柏,从而完成整个生活史循环^[7],这可能暗示两种胶锈菌与寄主形成了某种特殊的专化性选择机制。然而,目前仍缺乏对这两种胶锈菌致病机理及其寄主专化性选择机制的深入研究。

作为专性寄生病原体,胶锈菌的担孢子经气流传播到达寄主植物表面,在适宜条件下萌发产生芽管,芽管生长延伸通过气孔进入寄主植物,在植物表皮细胞下形成胞间菌丝,进一步形成一种称为“吸器”的复杂细胞结构^[8],使植物细胞壁和细胞膜凹陷从而从活细胞中吸收营养^[9],并通过吸器分泌大量效应蛋白以调控寄主细胞各项生命活动,从而促进锈菌定殖^[10]。吸器作为病原菌直接与寄主接触的结构,对其进行研究能有效破译病原菌的致病机制。早期

对吸器和效应子进行分离研究较为困难^[11],而伴刀豆球蛋白 A 能吸附锈菌吸器的发现使分离提取锈菌吸器成为了可能^[12]。随后,蚕豆单胞锈菌 [*Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schroet.]^[13]、亚麻栅锈菌 [*Melampsora lini* (Ehrenb.) Lév.]^[14]、条锈菌 (*Puccinia striiformis* Westend.)^[15]、大豆层锈菌 (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.) 和菜豆单胞锈菌 (*Uromyces appendiculatus* F. Strauss)^[16]等多种锈菌的吸器被成功分离,并通过转录组测序研究了吸器在锈菌早期侵染阶段的生物学功能。通过分析小麦条锈菌吸器的转录组数据发现,吸器吸收宿主营养物质,为生物合成途径产生大量能量并最终产生孢子^[17]。与萌发的担孢子相比,编码分泌蛋白的基因大部分在吸器中上调表达,说明锈菌在吸器形成时期与寄主植物的互作更为强烈,同时暗示了吸器产生的分泌蛋白是解析锈菌与寄主协同进化机制的关键因子^[18]。从蚕豆单胞锈菌的吸器和未产生吸器的侵染结构中分别鉴定得到 62 个和 42 个分泌蛋白,在吸器形成时期,许多与发病机制相关的分泌蛋白被上调表达并靶向了寄主植物细胞^[19-20]。分泌蛋白中属于蛋白酶的类别往往与致病机制相关,而除了协助锈菌侵染寄主植物外,吸器的部分分泌蛋白能够协助锈菌利用寄主植物体内的营养物质,例如专性寄生菌依赖吸器和胞间菌丝吸收氨基酸,依赖吸器吸收糖分^[21],除此之外还发现丝状真菌能够利用脂质^[22]。然而分泌蛋白在锈菌的不同孢子阶段、不同侵染时期及侵染结构吸器的表达呈现阶段特异性^[23],而吸器中表达的分泌蛋白可

能是决定锈菌寄主专化性选择的重要因素^[24]。迄今为止, 尚未有木本植物锈菌的吸器转录组学相关研究的报道。

本课题组前期对山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的冬孢子进行了比较转录组学分析^[25], 发现冬孢子阶段的基因表达模式及功能分布趋势相对一致, 且分泌蛋白的数量及种类大致相同, 这从一定程度上解释了这两种胶锈菌在冬孢子阶段能够寄生于同一个寄主植物的原因。而吸器作为山田胶锈菌和亚洲胶锈菌选择分别侵染苹果叶片和梨叶片时形成的关键侵染结构, 可能是解析这两种胶锈菌实现对寄主专化性选择的关键因素。因此本研究基于前期建立的山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器提取体系, 成功获得了二者的吸器并进行了转录组测序, 旨在解析山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的致病机理及其寄主专化性选择分子机制, 为锈病有效防控提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试用 3 年生嘎啦苹果苗和水晶梨苗各 20 株 (株高 80 cm, 直径 1-1.5 cm)。

供试的山田胶锈菌 (*G. yamadae*, GY) 冬孢子采自北京海淀公园, 亚洲胶锈菌 (*G. asiaticum*, GA) 冬孢子采自山东省枣庄市。

1.2 方法

1.2.1 接种及吸器样本收集

将山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的冬孢子角分别放在无菌水中浸泡约 12 h, 用接种针将部分膨胀的冬孢子置于玻片上, 在显微镜下观察, 当萌发率高于 65%时, 参照刘霞等^[5]的方法接种。接种后叶片产生大量花斑时分别采集苹果和梨的发病叶片, 分别提取山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的吸器^[5], 每个吸器样品各收集 3 个重复 (分别为 GY1, GY2, GY3 和 GA1, GA2, GA3)。

1.2.2 RNA 的提取、质检、文库构建和测序

使用 Trizol 法 (Trizol 试剂来自 Invitrogen, Carlsbad) 分别提取各样本的 RNA^[26]。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳、NanoPhotometer[®] 分光光度计 (IMPLEN)、Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Life Technologies) 和 Agilent Bioanalyzer 2100 系统 (Agilent Technologies) 检测 RNA 的质量并评估完整性。确认 RNA 质量满足建库要求后, 用 NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit for Illumina[®] (NEB) 生成测序文库。文库片段用 AMPure XP 系统 (Beckman Coulter) 纯化, 由北京诺禾致源科技股份有限公司在 Illumina HiSeq 2000 平台进行测序。用 Hisat2^[27]获得并计算 clean reads 的 Q20、Q30、GC 含量和序列重复水平。

1.2.3 转录本从头组装、基因筛选及编码蛋白预测

使用 Trinity^[28]默认参数分别进行山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器转录组的组装。用寄主苹果 [*Malus domestica* (Suckow) Borkh.] 和梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehder) 的基因组及蛋白质组数据与该实验中的转录组数据进行比对 (BLAST, E -value $<10^{-5}$) 以去除寄主序列的影响, 用桃金娘锈菌 (*Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken)、栎柱锈 (*Cronartium quercuum* (Berk.) Miyabe ex Shirai)、小麦秆锈菌 (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Pers.)、小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend.)、小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina* Erikss.)、落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina* Kleb.)、大豆层锈菌 (*Ph. Pachyrhizi*)、咖啡驼孢锈菌 (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome) 和双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor* (Maire) P. D. Orton) 9 种真菌的基因组及蛋白质组数据以及 Pucciniales 的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST)

与转录组数据进行同源序列比对 (BLAST, $E\text{-value} < 10^{-5}$) 以确定目标物种的基因序列。上述数据均来自 JGI (<https://jgi.doe.gov/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

通过 RSEM^[29]默认参数估计每个重复的映射率和基因表达水平, 以及计算每个样品的 FPKM (fragments per kilobase million)。使用 TransDecoder v5.5.0 默认参数分别预测山田胶锈菌和亚洲胶锈菌 unigenes 的开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 和蛋白质编码区 (coding sequence, CDS)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 验证基因表达

为了验证转录组测序数据的准确性, 在山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器转录组数据中分

别随机选取了 5 个基因进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 验证, 并分别以 *EF1* (translation elongation factor EF-1 alpha/Tu, KOG id 为 KOG0052) 和 *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, KOG id 为 KOG0657) 为内参基因。使用 Primer3 在线网站 (<https://primer3.ut.ee/>) 的默认参数设计特异性引物, 引物由睿博兴科 (北京) 生物技术有限公司合成 (表 1)。采用 FastKing RT Kit (with gDNase) cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 分别将山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的总 RNA 反转录合成 cDNA, 将其作为模板, 利用 2×HQ SYBR qPCR Mix (without ROX) 试剂盒 (北京

表 1 用于 qRT-PCR 验证的引物信息

Table 1 Primers used for qRT-PCR validation

| Primer name | Primer sequence (5'→3') | Size (bp) |
|-----------------|---|-----------|
| 1086_c0_g1_i7 | F: ACCAGAAACCCTAACCCGAG R: AGTGGAAGTGTGGTGGTGA | 94 |
| 28430_c0_g4_i7 | F: TCCATCAACTACCGCCTCTC R: TGATTACGTCCCTGCCCTTT | 131 |
| 50_c1_g1_i2 | F: CCTCGGAAGCACAACCTTTC R: GACGTTGAGGAGAAGTTCGC | 158 |
| 22244_c0_g1_i5 | F: ATGTTCCCCGAGAGCTTTGA R: TCCCATTCAGTCTCTGCTT | 80 |
| 666_c0_g1_i9 | F: TGGCTTCTTGGTCTCGGTTT R: GTGGTCAGCGCATGTCTAAC | 112 |
| 517_c0_g1_i18 | F: CACTTTTCCCTCACGGTACT R: ACCTTTGATCTCCCGAGTGG | 133 |
| 25850_c0_g1_i1 | F: TCGTATTCCCCGTGTCCAAA R: CCGTAAGCAACAGCCTCATC | 93 |
| 2089_c1_g1_i1 | F: TACTTGACCGCTTCCACTGT R: TGTCTCCCCAGTCATTGAC | 119 |
| 512_c0_g2_i4 | F: CATCCCGCTGAAGAATCGC R: TGGCTCTCGATATTGGCTT | 85 |
| 293480_c0_g1_i1 | F: TGTTTCGTGTTGGTCAAGCTG R: AGGGGAAGTATGCGTTTGGA | 85 |
| <i>EF1</i> | F: AGGAGGCTCAATAGCGTCAA R: CAACATGCAATGGTTCAAGG | 97 |
| <i>GAPDH</i> | F: TCCTGCCTTTGAAATTTTGG R: TTGCTTTACGCTTGATGTGC | 101 |

庄盟国际生物基因科技有限公司) 在 CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 中进行 qRT-PCR 检测。每次检测包含 3 次生物与技术重复, 在检测结果中利用内参基因校正目的基因的相对表达量。使用 SPSS 16.0 通过 Kolmogorov-Smirnov 检验 ($P>0.05$) 判断基因的 qRT-PCR 数据和转录组测序数据是否符合正态分布, 如不符合则对数据进行转化, 随后使用 Pearson 相关性分析计算 P 值和相关系数 r 。

1.2.5 基因功能注释

使用 BLAST 程序 ($E\text{-value}<10^{-5}$) 将蛋白编码基因与国家生物技术信息中心非冗余蛋白数据库 (NCBI-Nr; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、基因本体论数据库 (GO; <http://geneontology.org>)、蛋白质序列数据库 (Swiss-prot; <http://www.expasy.ch/sprot>)、蛋白质原核/真核同源数据库 (COG/KOG; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)、蛋白质序列数据库 (Uniprot-Swiss-prot; <https://www.uniprot.org>) 进行同源性比对; 使用 KofamKOALA^[30] 默认设置将蛋白编码基因注释到京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg>) 以获取 KO 编号; 使用 dbCAN2 程序^[31] 默认设置将蛋白编码基因注释到碳水化合物活性酶数据库 (CAZymes; <http://www.cazy.org/>) 以判断是否为水解酶; 使用 HMMER 程序^[32] 将蛋白编码基因注释到蛋白质家族数据库 (Pfam; <https://pfam.xfam.org/>) 以判断是否存在结构域。

下载菜豆单胞锈菌^[16]、小麦条锈菌^[17]和大麦布氏白粉菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* M. Liu & Hambl.)^[33] 的吸器转录组数据, 获取其基因对应的 KO 编号, 随后与山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的转录组数据比较功能富集通路及富集比例的差异。

对山田胶锈菌和亚洲胶锈菌 KEGG 占比最

高的 4 条通路中的基因进行表达量化, 将各个基因的 FPKM 值依次从高到低排序, 并绘制曲线图。FPKM $>1\ 000$ (即 $\lg\text{FPKM}>3$) 的基因被视为高表达基因, 而 FPKM <10 (即 $\lg\text{FPKM}<1$) 的基因被视为低表达基因。

1.2.6 候选效应子预测

剔除 FPKM 低于所选阈值 (50%) 的基因, 根据效应子的一般特征^[34] 使用 SignalP v3.0^[35] 预测编码蛋白是否存在信号肽, 用 TMHMM v2.0^[36] 排除具有跨膜结构域的蛋白, 删除氨基酸数量 (amino acids, aa) ≥ 300 和冗余的蛋白序列。

由于碳水化合物活性酶和蛋白酶可能与致病相关, 脂酶可能与营养吸收利用相关, 因此分别使用 dbCAN2 程序^[31]、BLAST 程序、HMMER 程序^[32] (均默认 $E\text{-value}<10^{-5}$) 将效应子比对到碳水化合物活性酶数据库、蛋白酶数据库 (Merops; <https://www.ebi.ac.uk/merops/>) 和脂酶数据库 (lipase engineering databases; <http://www.led.uni-stuttgart.de/>)。

1.2.7 序列聚类、同源群分析与物种进化

使用 OrthoFinder^[37] 对山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的蛋白质组进行同源性分析, 将包含两个物种蛋白的聚类视为同源群, 并根据系统发育关系鉴定出山田胶锈菌和亚洲胶锈菌之间的一对一直系同源基因。使用 BLAST 程序以 40% 为阈值计算山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的同源基因序列相似性, 同时存在直系同源基因和旁系同源基因的基因被单独列出计算。使用 KaKs Calculator^[38] 计算一对一直系同源基因的非同义替换率 (nonsynonymous substitution rate, Ka) 与同义替换率 (synonymous substitution rate, Ks) 的比值: $Ka/Ks>1$ 的基因被认为是正选择, $Ka/Ks=1$ 的基因为中性选择, $Ka/Ks<1$ 的基因为纯化选择^[39]。

2 结果与分析

2.1 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器转录组的组装与编码蛋白预测

分别对获得的山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器各 3 个重复构建相应的 cDNA 文库 (NCBI 登录号为 SRR17660644–SRR17660646 和 SRR17652436–SRR17652438)。山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的 clean reads 分别约为 8 200 万和 4 300 万条。主成分分析发现 GY1 存在显著偏差, 因此在后续的分析中将 GY1 剔除, 转录组组装结果见表 2。为了确保约 50% 的基因被

定义为表达, 选择 FPKM>0.3 作为阈值。每个样本的平均映射率 (mapped rates) 为 73.3%, 表明转录组组装对于没有基因组的非模式生物是相对可靠的。

山田胶锈菌和亚洲胶锈菌分别获得 553 420 条和 469 905 条 unigenes, N50 分别为 272 和 294, 平均长度为 309 bp 和 325 bp。此外, 获得了 1 055 746 个山田胶锈菌的转录本 (平均长度为 410 bp), N50 为 469, 以及 607 956 个亚洲胶锈菌的转录本 (平均长度为 357 bp), N50 为 355 (表 3)。吸器阶段的转录本和 unigenes 平均

表 2 山田胶锈菌 (GY) 和亚洲胶锈菌 (GA) 的转录组测序数据

Table 2 Statistics of the RNA-Seq data of *G. yamadae* (GY) and *G. asiaticum* (GA)

| Samples | Raw reads | Clean reads | Q20 (%) | Q30 (%) | Mapped reads | Expressed unigenes (FPKM>0.3) |
|---------|------------|-------------|---------|---------|---------------------|-------------------------------|
| GY2 | 88 291 610 | 86 875 518 | 93.00 | 87.72 | 52 261 672 (60.16%) | 13 541 (63.83%) |
| GY3 | 78 319 004 | 77 042 716 | 96.00 | 91.20 | 60 354 304 (78.34%) | 16 046 (75.64%) |
| GA1 | 46 114 474 | 45 963 146 | 98.50 | 95.57 | 34 084 841 (74.16%) | 6 119 (47.01%) |
| GA2 | 43 108 202 | 42 965 560 | 98.50 | 95.54 | 32 924 754 (76.63%) | 7 038 (54.08%) |
| GA3 | 41 630 708 | 41 497 642 | 98.47 | 95.48 | 32 032 000 (77.19%) | 6 635 (50.98%) |

表 3 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌转录组的转录本和 unigenes 数据

Table 3 Transcripts and unigenes data from the transcriptomes of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*

| Parameter | | <i>G. yamadae</i> | <i>G. asiaticum</i> |
|-----------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Transcripts | Number | 1 055 746 | 607 956 |
| | Max length (bp) | 27 461 | 26 613 |
| | Average length (bp) | 410 | 357 |
| | N50 | 469 | 355 |
| | Total residues | 433 239 086 | 217 273 590 |
| Unigenes | Number | 553 420 | 469 905 |
| | Max length (bp) | 27 461 | 26 612 |
| | Average length (bp) | 309 | 325 |
| | N50 | 272 | 294 |
| | Total residues | 171 079 823 | 152 803 226 |
| Full-length CDS | Number | 13 677 | 6 273 |
| | Max length (bp) | 11 355 | 4 464 |
| | Average length (bp) | 263 | 188 |

长度较短, N50 较低, 但两个物种间的差异不大。经序列比对筛选后分别获得 21 213 条和 10 315 条 unigenes, 最后分别预测到山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的全长 CDS 序列 13 677 个 (64.47%) 和 6 273 个 (48.20%), 分别对应 12 210 条和 6 018 条 unigenes。

2.2 基因的 qRT-PCR 验证

山田胶锈菌和亚洲胶锈菌各 5 个基因的转录组测序结果与 qRT-PCR 验证结果的相关性分析 (图 1) 表明, 其相关性均约等于 0.9, 即 RNA-seq 测序结果与 qRT-PCR 扩增结果存在显著的线性关系, 表明转录组测序结果可靠 ($P<0.05$), 可用于后续的生物信息学分析。

2.3 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌基因功能注释

从各数据库的注释结果 (表 4) 发现: 在

山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的蛋白编码序列中, 255 条 (2.09%) 和 90 条 (1.50%) 序列均能在 7 个数据库中得到注释, 11 738 个 (96.13%) 和 5 826 个 (96.81%) 基因在至少 1 个数据库中被注释。

在 7 个数据库中选择了具有代表性的 4 个数据库注释结果以进一步分析。在 Nr 数据库中, 二者注释最多的类群是柄锈菌亚门 (Pucciniomycotina)、银耳目 (Tremellales) 和座囊菌亚纲 (Dothideomycetidae), 将注释到柄锈

菌亚门的序列进一步解析 (图 2), 发现山田胶锈菌注释比例最多的物种从高到低依次是禾柄锈菌 (*Puccinia graminis* Pers.)、小麦叶锈菌和禾冠柄锈菌 (*Puccinia coronata* Corda), 而亚洲胶锈菌则依次是禾柄锈菌、落叶松-杨栅锈菌和紫萁混合菌 (*Mixia osmundae* (Nishida) C.L. Kramer)。山田胶锈菌有约 80% 的序列都能注释到柄锈菌纲 (Pucciniomycetes), 而亚洲胶锈菌仅为 60%, 这种差异体现了二者进化关系上的不同。

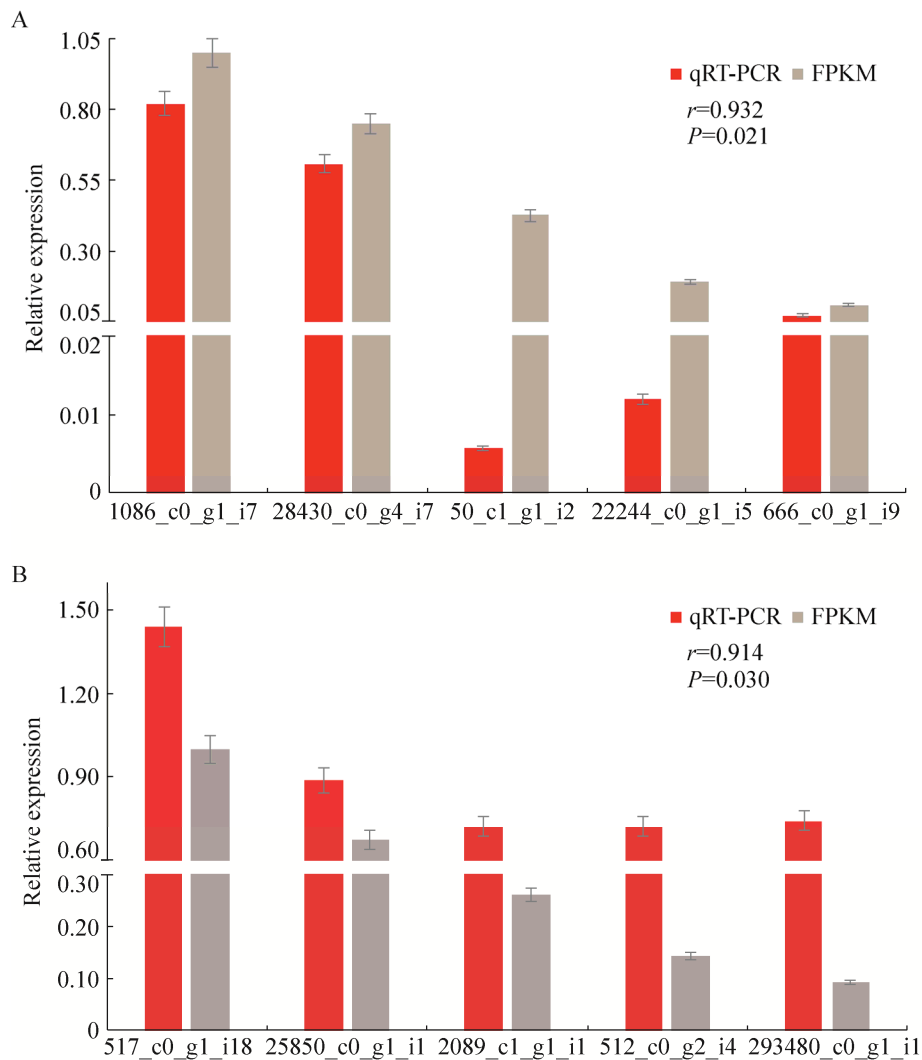


图 1 山田胶锈菌 (A) 和亚洲胶锈菌 (B) 基因的 qRT-PCR 验证结果

Figure 1 qRT-PCR verification results of *G. yamadae* (A) and *G. asiaticum* (B) genes.

表 4 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的 unigenes 注释结果

Table 4 Annotation of the unigenes of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*

| No. of unigenes annotated to the database respectively | <i>G. yamadae</i> | <i>G. asiaticum</i> |
|--|-------------------|---------------------|
| Annotated in Nr | 11 758 (96.30%) | 5 817 (96.66%) |
| Annotated in GO | 9 533 (78.08%) | 4 914 (81.66%) |
| Annotated in KO | 10 197 (83.51%) | 5 470 (90.89%) |
| Annotated in UniProt | 8 662 (70.94%) | 4 625 (76.85%) |
| Annotated in CAZy | 329 (2.69%) | 123 (2.04%) |
| Annotated in KOG | 10 917 (89.41%) | 5 427 (90.18%) |
| Annotated in Pfam | 10 786 (88.34%) | 5 415 (89.98%) |
| Annotated in all databases | 208 (1.70%) | 88 (1.46%) |
| Annotated in at least one database | 11 805 (96.68%) | 5 864 (97.44%) |
| Total unigenes | 12 210 (100.00%) | 6 018 (100.00%) |

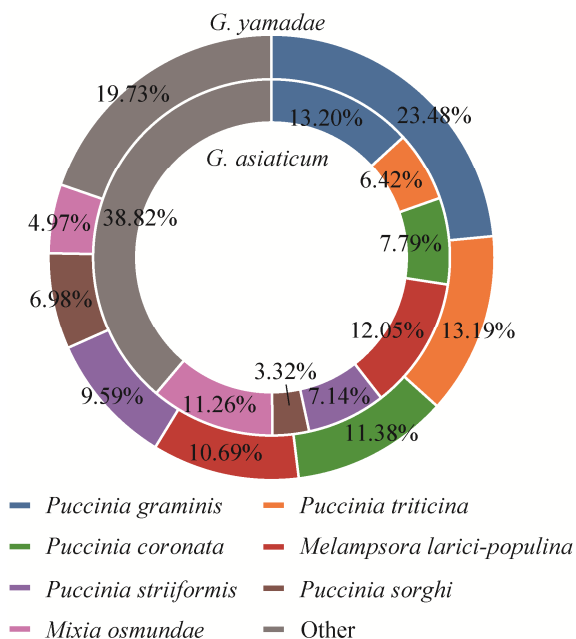


图 2 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌与 Nr 数据库匹配的物种分布

Figure 2 Species distribution of *G. yamadae* and *G. asiaticum* matched with Nr database.

KOG 富集分析 (图 3) 表明, 山田胶锈菌有 19.2% 的 unigenes 富集在翻译、核糖体结构和生物发生的类别, 而亚洲胶锈菌为 26.23%, 说明亚洲胶锈菌比山田胶锈菌蛋白质生物合成更为活跃; 其次, 二者富集到的类别为翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣, 所占比例相差不大。在 GO 功能注释上 (图 4), 两者注释的类别及比例都没有表现出明显的差异。生物进程中, 山田胶锈菌

97.5% 和 88.4% 的 unigenes 都能注释到细胞过程和代谢过程, 亚洲胶锈菌则为 96.4% 和 89.9%; 细胞组分中则是细胞内解剖结构、细胞质、细胞器的富集程度最高; 分子功能中, 富集到连接、催化活性类别占比最多。KEGG 通路中, 注释到“核糖体” (ko03010) 的基因分别为 2 354 个 (23.09%) 和 1 672 个 (30.57%), 注释到“内质网中的蛋白质加工” (ko04141) 的基因则分别为 762 个 (7.47%) 和 455 个 (8.32%), 以及在山田胶锈菌中有 661 个 (6.48%) 基因被注释到“剪接体” (ko03040) 中, 在亚洲胶锈菌中有 386 个 (7.06%) 基因被注释到“氧化磷酸化” (ko00190)。整体来看, 二者在二级通路中富集程度类似 (图 5), 但亚洲胶锈菌在遗传信息相关途径的富集要略大于山田胶锈菌。

与冬孢子阶段相比, KOG 注释中, 吸器阶段与翻译相关的类别明显比例大幅增加; GO 注释中, 吸器阶段的生物进程和分子功能相差不大, 但细胞组分相差较大, 吸器阶段更多集中于细胞内结构和细胞质中; KEGG 注释中, 吸器阶段与冬孢子阶段富集“氨基酸的生物合成”的表现存在差异, 更注重蛋白质的合成与加工, 这也与一般锈菌吸器阶段的规律相符。

与其他活养寄生真菌的吸器阶段对比发现 (图 5), 山田胶锈菌、亚洲胶锈菌与大麦布氏白

粉菌的富集情况较为相似,其在信号、细胞进程及翻译途径的富集比例远超小麦条锈菌和大豆层锈菌,为2-3倍,但其余通路例如蛋白质家族:基因信息进程、蛋白质家族:代谢等相差不大。而山田胶锈菌和亚洲胶锈菌富集占比前四的通

路中的基因表达情况(图6)显示,虽然山田胶锈菌和亚洲胶锈菌各通路的高表达基因比例相似,但山田胶锈菌的低表达基因的比例远超亚洲胶锈菌,证明山田胶锈菌虽然在通路中的基因数量很多,但其中有大量基因表达量较低。

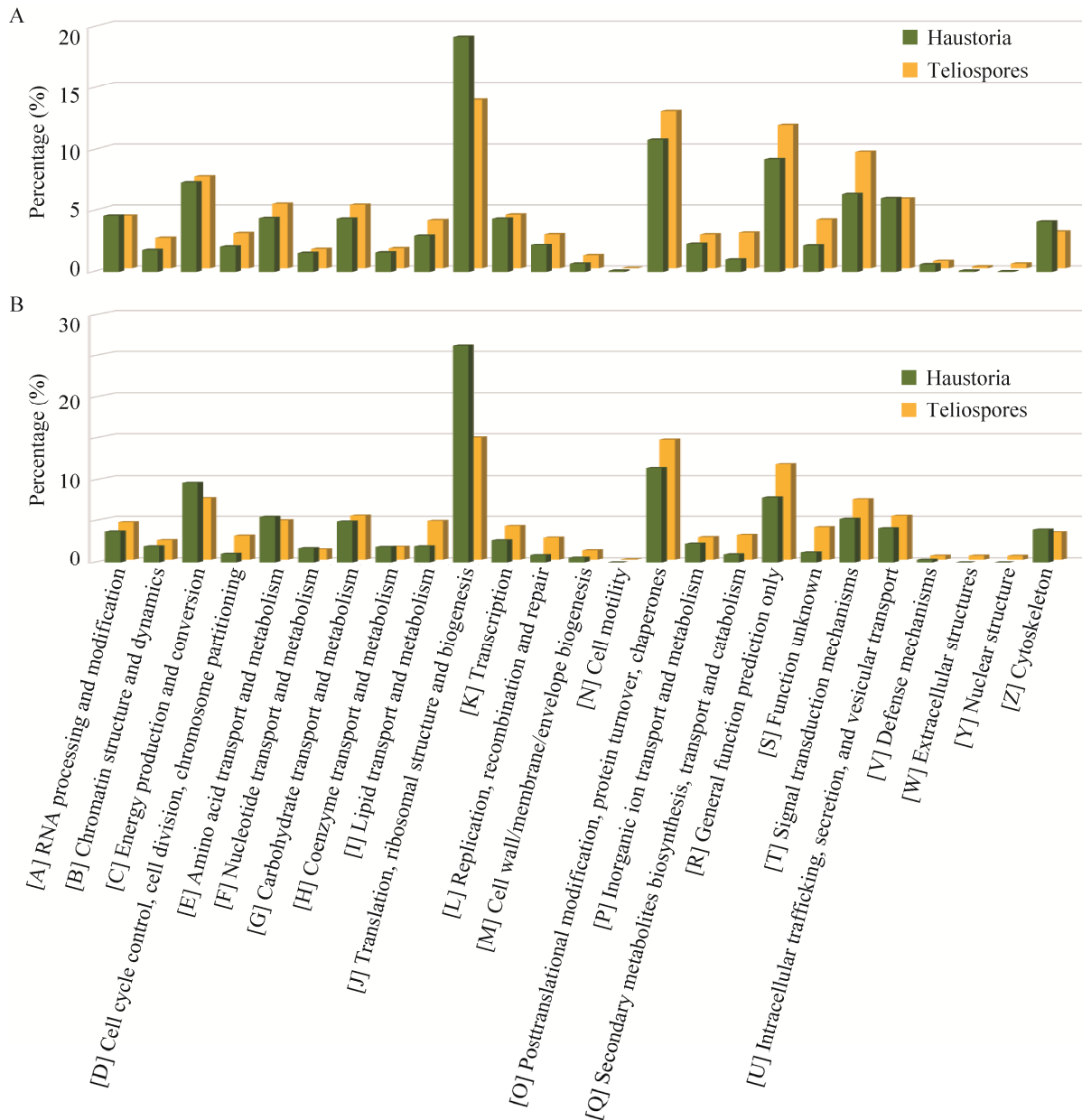


图3 山田胶锈菌(A)和亚洲胶锈菌(B)的吸器阶段分别与冬孢子阶段的KOG富集比较

Figure 3 Comparison of KOG enrichment at the haustorial stage and teliospores stage of *G. yamadae* (A) and *G. asiaticum* (B), respectively.

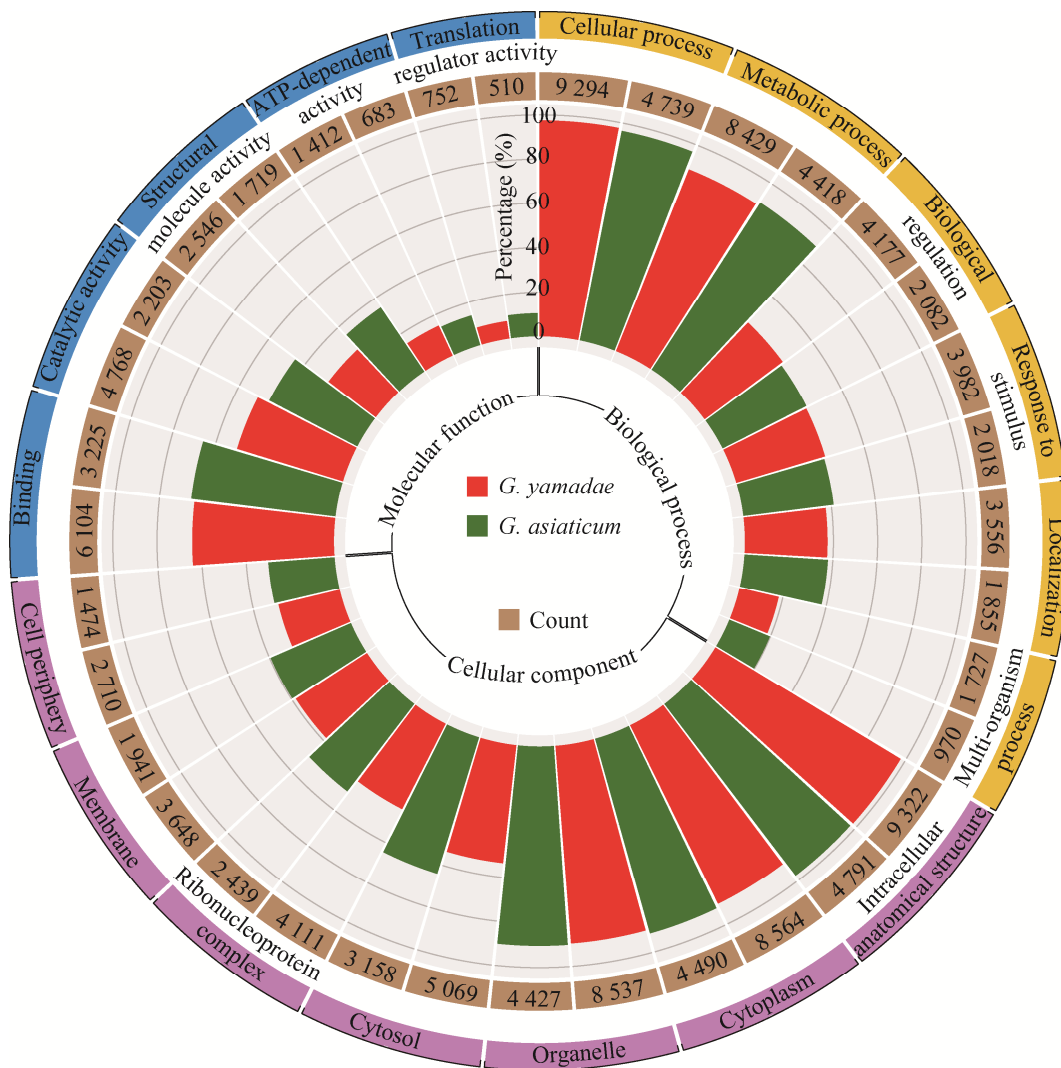


图 4 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的 GO 富集比较

Figure 4 Comparison results of GO database annotations of *G. yamadae* and *G. asiaticum*.

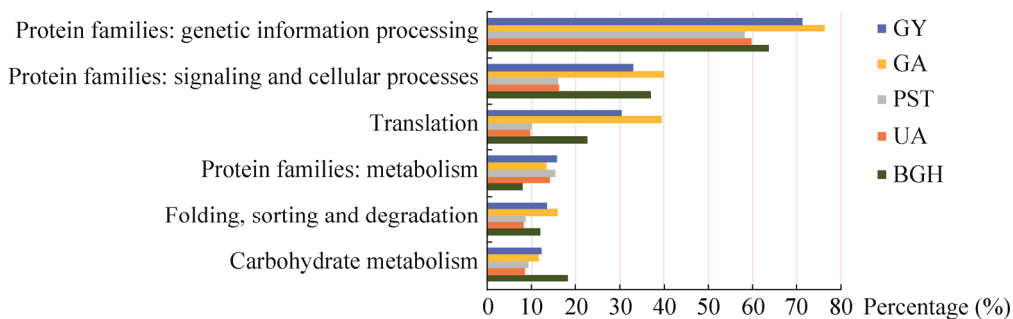


图 5 山田胶锈菌 (GY)、亚洲胶锈菌 (GA) 与小麦条锈菌 (PST)、大豆层锈菌 (UA) 和大麦布氏白粉菌 (BGH) 的 KEGG 富集比较

Figure 5 Comparison of KEGG enrichment in *G. yamadae* (GY), *G. asiaticum* (GA), *P. striiformis* f. sp. *tritici* (PST), *U. appendiculatus* (UA) and *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (BGH).

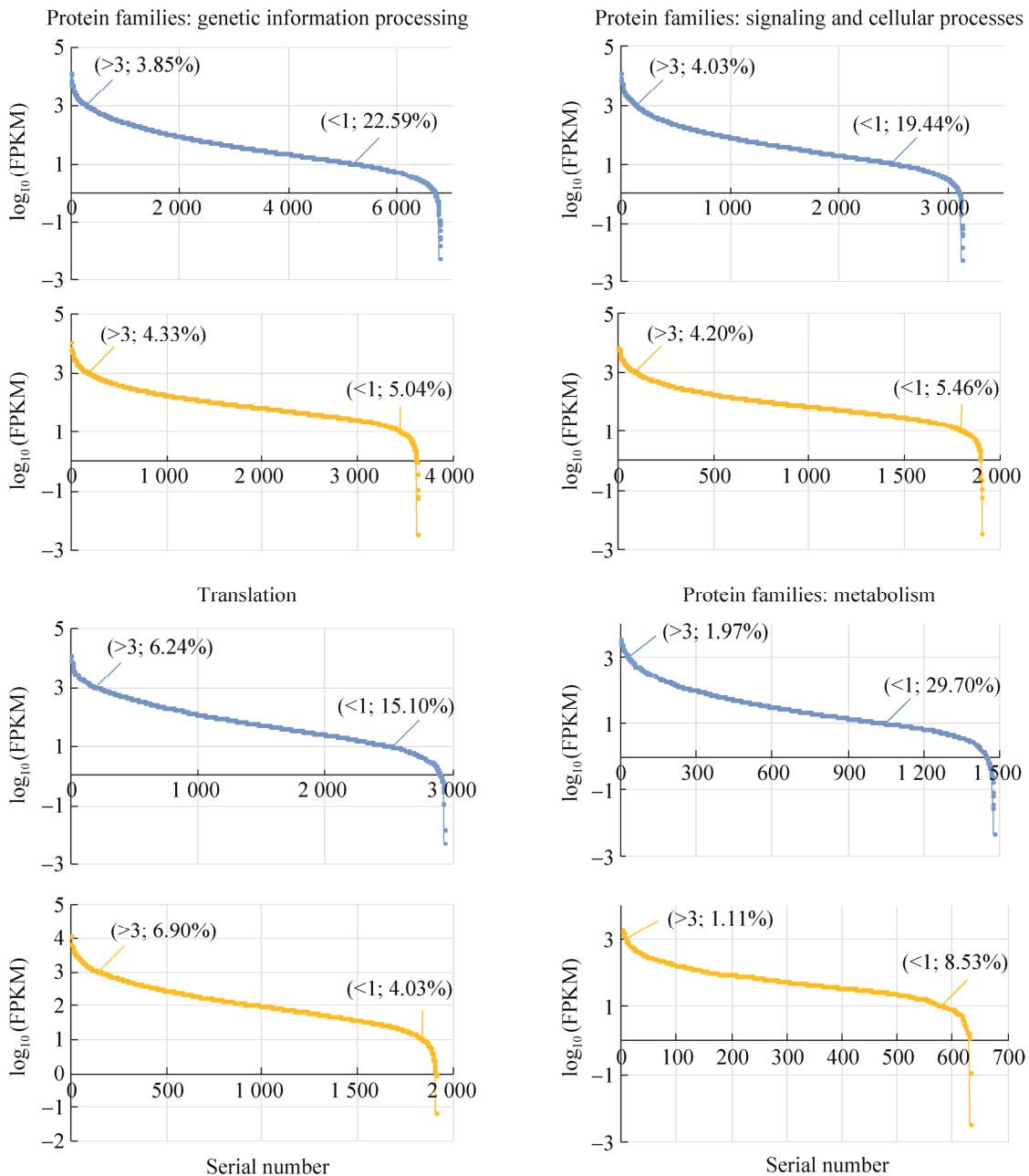


图 6 山田胶锈菌 (蓝色) 和亚洲胶锈菌 (黄色) KEGG 通路所对应的基因表达分布

Figure 6 Gene expression distribution of *G. yamadae* (blue) and *G. asiaticum* (yellow) in the corresponding KEGG pathways.

2.4 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的候选效应子预测

使用 FPKM>0.3、aa≥300、存在信号肽、不存在跨膜结构域 4 个指标最终得到山田胶锈

菌 343 个 (2.51%) 和亚洲胶锈菌 175 个 (2.79%) 候选分泌蛋白。在山田胶锈菌的候选效应子中, 发现了 14 个蛋白酶和 10 个脂酶, 亚洲胶锈菌则为 5 个和 3 个。比较两种胶锈菌

从初始 unigenes 到最终预测出效应蛋白过程中的序列数量变化 (图 7), 可以发现从筛选 unigenes 后开始, 二者的数量一直呈现 2:1, 但是相对比例基本没有改变。

与冬孢子阶段的分泌蛋白相比, 亚洲胶锈菌中的蛋白酶比例显著减少 (冬孢子阶段为 5.26%, 吸器阶段为 2.84%), 但山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的脂酶比例显著增加 (冬孢子阶段分别为 0%和 0.55%, 吸器阶段为 2.92%和 1.71%)。其中, 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌均含有脂酶家族 abH01.06 (羧酸酯酶下的 alpha 酯酶) 和 abH33 (抗原 85) 的成员, 而脂酶家族 abH01 (羧酸酯酶) 在山田胶锈菌中分布最多, 其次为 abH34 家族 (类溶酶体保护蛋白) (表 5)。

2.5 山田胶锈菌与亚洲胶锈菌的蛋白聚类及物种进化

将去冗余后的山田胶锈菌的 5 743 条和亚洲胶锈菌的 3 271 条蛋白质序列通过 OrthoMCL 方法进行聚类, 聚合了 1 917 个直系同源群, 其中 497 个为单系群, 包含 1 491 个蛋白。未聚类的 2 019 条蛋白序列中包括 761 对一对一

直系同源基因和 513 对单拷贝直系同源基因, 但属于同一家族的直系同源基因较少。最大的直系同源群为 F 型 ATP 酶家族, 其次为多聚泛素家族和 ATP 依赖性 RNA 解旋酶, 表明这是满足二者基本生命需求的共同成分; 山田胶锈菌最大的单系群为线粒体载体蛋白和泛素 C, 亚洲胶锈菌为内质网 ATP 酶和泛素小亚基核糖体蛋白 Rps27a, 说明二者在蛋白转运、降解、修饰等方面存在各自的独特性。

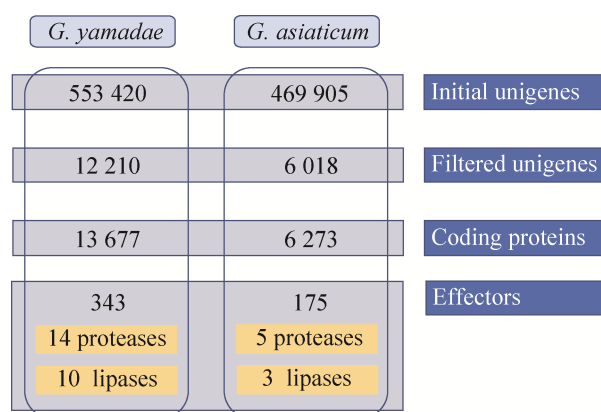


图 7 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌 unigenes 中预测的蛋白质组和效应子

Figure 7 Predicted proteomes and effectors from *G. yamadae* and *G. asiaticum* unigenes.

表 5 山田胶锈菌 (GY) 和亚洲胶锈菌 (GA) 效应子中的脂酶注释结果

Table 5 Lipase annotation in the effectors of *G. yamadae* (GY) and *G. asiaticum* (GA)

| Species | Protein ID | Target family name | Description | E-value |
|---------|---------------------|--------------------|--|-----------|
| GY | 1086_c0_g1_i7.p1 | abH01.05 | <i>Bacillus</i> esterases | 0.002 3 |
| GY | 177983_c0_g1_i4.p1 | abH01.06 | Alpha esterases | 1.20E-59 |
| GY | 177983_c0_g1_i10.p2 | abH01.06 | Alpha esterases | 9.30E-06 |
| GY | 136799_c0_g2_i1.p1 | abH34.01 | Lysosomal protective protein like | 6.60E-24 |
| GY | 22244_c0_g1_i5.p1 | abH34.02 | Serine carboxypeptidase II like | 1.30E-104 |
| GY | 3056_c0_g1_i3.p1 | abH22.09 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> proteins | 0.000 14 |
| GY | 114837_c0_g1_i1.p1 | abH36 | Cutinases | 0.001 |
| GY | 28430_c0_g4_i7.p1 | abH03 | <i>Candida rugosa</i> lipase like | 4.70E-86 |
| GY | 145247_c0_g1_i1.p2 | abH33 | Antigen 85 | 0.007 8 |
| GY | 21970_c0_g1_i1.p1 | abH08.06 | Miscellaneous | 0.008 |
| GA | 374_c0_g1_i3.p2 | abH01.06 | Alpha esterases | 1.50E-76 |
| GA | 710465_c0_g1_i1.p2 | abH07.02 | <i>Moraxella</i> lipase 3 like | 0.003 6 |
| GA | 205323_c0_g2_i2.p1 | abH33 | Antigen 85 | 0.002 7 |

在一对一的直系同源基因对中，山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的蛋白质相似率具有双峰分布 (图 8; 谷值对应的比率为 82%, 峰值对应的比率为 62% 和 95%), 其他蛋白 (即存在旁系同源物的蛋白) 则呈现单峰, 峰值对应的比率为 97%。由于保守蛋白和其他蛋白出现峰值时的蛋白比率十分接近, 说明二者的进化速度相似; 进化蛋白和保守蛋白的分界线所对应的比率为 82%, 即序列相似性超过 82% 才能将该蛋白对定义为保守, 说明山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的基因序列差异很大。

同时, Ka/Ks 结果 (图 9) 显示, 有 80 对基因每个同义位点的同义取代数 ≥ 0.75 , 15 对基因的 $Ka/Ks > 1$, 这些基因对 (共 95 对, 占比 12.48%) 被认为是正选择, 其余 666 对基因的 $Ka/Ks < 1$, 被认为是纯化选择, 表明有相当一部分基因近期正在快速进化。吸器阶段进化的基因比例也远高于冬孢子阶段 (2.34%), 表明该阶段环境选择压力较大。

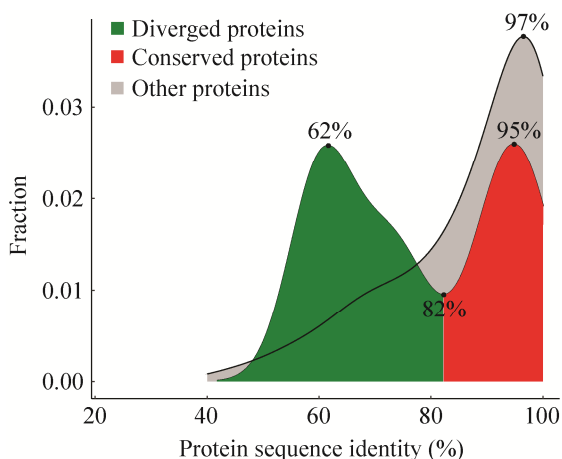


图 8 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的一对一直系同源物的序列相似性分布

Figure 8 Distribution of protein sequence identity between one-to-one orthologs of *G. yamadae* and *G. asiaticum*.

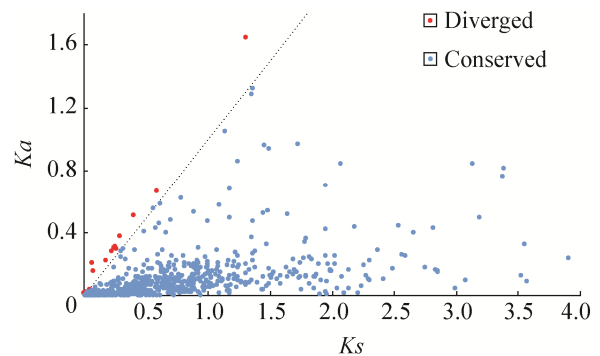


图 9 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌一对一直系同源基因的 Ka 和 Ks 值分布

Figure 9 Scatter plots of Ka and Ks values of one-to-one orthologs of *G. yamadae* and *G. asiaticum*.

在亚洲胶锈菌效应子中发现 5 个蛋白处于正选择, 其中一个为脂酶 abH07.02 (类 *Moraxella* 脂酶 3) 的家族成员, 其余 4 个蛋白没有注释。在山田胶锈菌中暂未发现处于正选择的效应子。

3 讨论

本研究利用高通量测序技术得到了山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器的转录组数据, 发现筛选后山田胶锈菌的 unigenes 约为亚洲胶锈菌的两倍。这种转录组 unigenes 数目因物种不同而存在显著差异可能是二者本身的生理特性或者进化机制所导致的。组装的序列平均较短表明该阶段可能更多地生成较小的分泌蛋白。

众所周知, 对基因进行分类是很困难的, 因为它们编码的蛋白质可能具有多种功能和/或与其生物学的各个方面有关。然而, 对转录组数据进行注释通常无法识别大多数 unigenes。在小麦条锈菌的吸器转录组中, 约 60% 的基因与 $E\text{-value} < 10^{-25}$ 水平的已知基因不相似^[17], 但我们发现通过使用近缘种的数据进行注释的方法可以排除无法识别的序列, 以保持较高的注

释率。

大多数山田胶锈菌和亚洲胶锈菌序列都能被注释到柄锈菌亚门、银耳目和座囊菌亚纲。由于锈菌冬孢子产生担孢子的过程类似于子囊的形成过程,因此一些真菌学家认为锈菌是由子囊菌门进化而来的,也有学者指出锈菌来源于担子菌门的木耳目,因为木耳目和锈菌目的结构和担孢子的形成方式之间具有显著的相似性^[40]。事实上,本研究的 Nr 注释也证明了锈菌目和银耳目、木耳目之间潜在的遗传关系。在注释到柄锈菌亚门的序列中,山田胶锈菌有约 80% 被注释到了柄锈菌纲,而亚洲胶锈菌为 60%,这意味着山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的亲缘关系相对存在较大差异。

从 GO、KOG 和 KEGG 的结果来看,山田胶锈菌和亚洲胶锈菌之间没有发现显著差异,表明不同锈菌的吸器期所涉及的生物学过程相对保守,而此时的致病表型也是相似的。在主要的富集通路中,虽然二者的高表达基因占比差异不大,但山田胶锈菌的低表达基因占比显著多于亚洲胶锈菌,这表明虽然山田胶锈菌的基因数量较多,但是有相当一部分基因处于低表达的状态,这可能表示亚洲胶锈菌发挥生物功能的基因模式更为精简。当寄主叶片上形成斑点时,吸器可能已经定殖,因此与寄主植物的“斗争”可能发生在担孢子侵染早期。一旦成功入侵宿主,两种锈菌进入相同的营养吸收阶段,它们与植物的免疫相互作用将大大降低。与冬孢子阶段对比发现,两者都富集于核糖体途径。先前研究发现,编码核糖体 RNA 和蛋白质的基因在大麦布氏白粉菌穿透寄主植物后总体上相对增加,与叶表面菌丝的增殖和分生孢子开始产生的时机一致^[41]。本研究也发现大量相应的基因在山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的吸器阶段表现出高表达。而且冬孢子阶段作为“非互

作”的休眠阶段,更偏向氨基酸合成,但吸器阶段在“内质网中的蛋白质加工”相关类别上富集,说明此时锈菌处于与寄主互作阶段,可能需要大量的调控蛋白。与其他真菌的吸器阶段对比发现,山田胶锈菌、亚洲胶锈菌与大麦布氏白粉菌的富集情况较为相似,锈菌的部分途径具有与白粉菌类似的收缩现象^[22],整体呈现出极不均衡的状态,且代谢相关途径相对富集较少,由此推测胶锈菌在能量利用上效率较低,这也与其吸器更为原始、侵染策略更简单、特化程度不高的推论相符^[42-43]。

胶锈菌中的大多数效应子都无法注释到已知蛋白,也不包含任何与已知致病相关的结构域或基序,很难推测它们的功能。一些被认为是相对保守的效应因子,如 RTP 等^[44]虽然存在于冬孢子阶段,但并没有在胶锈菌的吸器阶段中发现。蛋白酶中的很多家族都被证明与致病相关^[45],例如蛋白酶是十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*) 的主要毒力因子^[46],而向日葵锈菌 (*P. helianthi*) 胞外分泌的蛋白酶通过破坏寄主细胞组织结构成分促进其侵染^[47]。在冬孢子阶段,锈菌需要通过萌发而突破寄主表皮,可能蛋白酶在其中起到了降解细胞壁的作用,但不清楚为何吸器阶段蛋白酶比例减少。由于山田胶锈菌和亚洲胶锈菌寄生在活体植物上,它们不会产生太多直接攻击性的效应子^[48-49],所以胶锈菌效应子的主要目的应该是调控寄主的生理进程,而不是对寄主的组织进行直接破坏,这可能解释了山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器阶段效应子很多,但几乎很少发现功能已知的致病相关蛋白。

不同活体寄生菌的吸器都具有特殊的代谢功能^[24]。在真菌中,糖是最常见的碳源,山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的碳代谢途径非常简洁,缺失了许多相关基因,但仍然可以与植物保持

长期共生状态,这与大麦布氏白粉菌类似,可能存在另一种策略以便在能量供应小于其他物种的情况下维持生存^[22]。越来越多的研究发现,脂质在真菌侵染的过程中发挥了能量来源的作用,并观察到脂质从植物中转移到寄生病原菌中^[50]。因此推测随着糖代谢途径的收缩,脂质可能是另一个潜在的能量来源,并且真菌可以直接吸收代谢的脂肪酸,这也许可以解释为什么吸器阶段需要大量脂酶的原因。虽然山田胶锈菌和亚洲胶锈菌可以合成脂肪酸,但是其脂肪酸延伸、脂肪酸降解途径都不完整,因此推测山田胶锈菌和亚洲胶锈菌可以同时使用碳水化合物和脂质,但是由于通路的收缩,利用效率非常低。

蛋白聚类表明山田胶锈菌和亚洲胶锈菌均含有 F 型 ATP 酶,也有大量的氧化磷酸化相关基因高表达,而 F 型 ATP 酶直接参与 ATP 水解,是线粒体供能的最后一步^[51],可能意味着吸器的生理活动需要大量的能量。泛素家族在同源群和单系群中均高度富集,其蛋白质丰度随着 DNA 复制压力的增加而增加^[52],表明这些真菌可能面临更高的进化压力。从单系群来看,山田胶锈菌富集线粒体载体蛋白,可能意味着其比亚洲胶锈菌更需要能量;有趣的是,亚洲胶锈菌富含的 RPS27a,在小麦条锈菌研究中发现其在侵染后被诱导高表达,预示其可能是候选致病基因,推测 RPS27a 可能通过影响吸器的发育或功能参与小麦条锈菌的侵染和致病性,但遗憾的是其具体功能尚不清楚^[53]。

可以发现,两个物种的同源蛋白相似性较低。在玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis* (D.C.) Corda.) 和玉米丝黑穗病菌 (*Sporisorium reilianum* (J.G. Kuhn) Langdon & Full.) 的蛋白质比较中,进化基因和保守基因的分界线所对应的比对率仅为 53%^[54],且两种真菌不在同一属中,说明山田

胶锈菌和亚洲胶锈菌的蛋白质序列存在大量变异。同时, Ka/Ks 结果显示大部分位点存在同义突变,序列差异较大,进化距离较长。由于单拷贝直系同源基因是物种中最保守的^[55],它们大多是结构基因,表达要求很少,因此在实际情况中, Ka/Ks 比值远小于 1,因为一般非同义替换会带来有害性状,只有少数情况会导致进化优势^[56],但胶锈菌吸器阶段进化的基因远高于冬孢子阶段,这也说明这两个物种在吸器阶段的进化方向完全不同,且在该阶段受到的选择压力较大,这可能和频繁的寄主互作相关。 Ka/Ks 指标已广泛用于测定氨基酸水平选择压力^[57],然而,氨基酸序列并不是基因在进化过程中经历选择压力的唯一特征,其他选择过程也可以作用于基因并影响其进化速度^[58]。最近对 RNA 剪接的研究表明,在真核生物基因组中存在广泛的 RNA 选择压力^[59],因此除了氨基酸水平上的选择压力差异,二者在其他尺度上的进化选择方向也有待研究。

在受到正选择的基因中,编码效应蛋白的基因仅有 5 个,并且全部集中于亚洲胶锈菌中。病原菌与寄主植物均在无休止的斗争中不断进化^[18],因此认为直接与寄主互作的效应子可能更容易处于进化选择,由此看来吸器阶段虽然受到自然条件下相对较高的选择压力,但效应子可能并不是其用于应对的主要手段。其中一个效应子为脂酶 abH07.02 的家族成员,是潜在的毒力因子^[60],但目前该家族在植物病原真菌致病性中的作用仍旧未知。

4 结论

本研究主要对山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器阶段进行了转录组测序并分析,对基因进行了功能注释,从中预测获得了候选效应子,并分析了两种锈菌的序列聚类和物种进化关系。

从基因功能注释结果来看,山田胶锈菌和亚洲胶锈菌侵染寄主植物后的基本策略相似,其作为定殖后保守的营养吸收阶段在形态和分子层面的差异不明显,尽管种间存在典型的寄主选择性,但吸器所涉及的生物学过程相对保守。

山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的效应子与植物病原真菌中已知的大部分效应子没有相似性,且缺少已知功能的致病相关蛋白,因此其功能应该是调控寄主植物的某些生理进程,或者避开寄主的识别机制等,而不是直接对其进行攻击。山田胶锈菌和亚洲胶锈菌的脂酶比例显著增加,推测可能是山田胶锈菌和亚洲胶锈菌同时还利用植物的脂质作为碳源来提供能量。蛋白酶中的很多家族都被证明与致病相关,亚洲胶锈菌吸器阶段蛋白酶比例减少,证实了大部分效应子并非直接破坏寄主组织,这可能与锈菌是活体寄生菌相关,锈菌需要维持寄主的生命以持续吸收营养。

直系同源基因的 Ka/Ks 分布和蛋白质序列的相似性揭示了山田胶锈菌和亚洲胶锈菌在吸器阶段受到较大的进化选择压力而存在较大分化。尽管吸器阶段受到自然条件相对较高的选择压力,但效应子并不是其用于应对的主要手段。

致谢

感谢西北农林科技大学康振生院士团队在吸器提取方面给予的支持,感谢西北农林科技大学黄丽丽教授、北京林业大学田呈明教授给予的建设性意见。

REFERENCES

- [1] 韩爱华,贺雪娇,张放. 2007—2016 年全球苹果、梨与桃生产变动分析. 中国果业信息, 2018, 35(5): 21-35.
Han AH, He XJ, Zhang F. Analysis of changes in global

- apple, pear and peach production from 2007 to 2016. China Fruit News, 2018, 35(5): 21-35 (in Chinese).
- [2] 张放. 2019 年我国进出口苹果与梨鲜果统计分析. 中国果业信息, 2020, 37(6): 21-31.
Zhang F. Statistical analysis of China's import and export of fresh apples and pears in 2019. China Fruit News, 2020, 37(6): 21-31 (in Chinese).
- [3] Cummins GB, Hiratsuka Y. Illustrated genera of rust fungi// Cummins G B, Hiratsuka Y, eds. Illustrated genera of rust fungi. St. Paul, USA: American Phytopathological Society (APS Press), 2003: 240.
- [4] European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 8/2 (3) Coniferae. EPPO Bulletin, 2018, 48(3): 463-494.
- [5] 刘霞,陶思齐,翁涵,等. 山田胶锈菌和亚洲胶锈菌吸器提取体系建立. 菌物学报, 2019, 38(9): 1430-1439.
Liu X, Tao SQ, Weng H, et al. Construction of haustorial isolation systems of *Gymnosporangium yamadae* and *G. asiaticum*. Mycosystema, 2019, 38(9): 1430-1439 (in Chinese).
- [6] 曹宾. 中国胶锈菌属的分类及系统发育研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
Cao B. Taxonomy and phylogeny of *Gymnosporangium* in China[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018 (in Chinese).
- [7] Kern FD. A revised taxonomic account of *Gymnosporangium*. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press, 1991.
- [8] Szabo LJ, Bushnell WR. Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants. PNAS, 2001, 98(14): 7654-7655.
- [9] Chong J, Harder DE, Rohringer R. Ontogeny of mono- and dikaryotic rust haustoria: cytochemical and ultrastructural studies. Phytopathology, 1981, 71(9): 975-983.
- [10] Garnica DP, Nemri A, Upadhyaya NM, et al. The ins and outs of rust haustoria. PLoS Pathog, 2014, 10(9): e1004329.
- [11] Varden FA, De La Concepcion JC, Maidment JH, et al. Taking the stage: effectors in the spotlight. Curr Opin Plant Biol, 2017, 38: 25-33.
- [12] Hahn M, Mendgen K. Isolation by ConA binding of haustoria from different rust fungi and comparison of their surface qualities. Protoplasma, 1992, 170(3/4): 95-103.
- [13] Hahn M, Mendgen K. Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. Mol Plant Microbe

- Interact, 1997, 10(4): 427-437.
- [14] Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, et al. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 243-256.
- [15] 汤春蕾. 条锈菌与小麦互作中效应蛋白及诱导寄主细胞坏死基因的鉴定与功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- Tang CL. Characterization and functional analyses of effectors and host cell death inducing genes in wheat and *Puccinia striiformis* interactions[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2013 (in Chinese).
- [16] Link TI, Lang P, Scheffler BE, et al. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15(4): 379-393.
- [17] Garnica DP, Upadhyaya NM, Dodds PN, et al. Strategies for wheat stripe rust pathogenicity identified by transcriptome sequencing. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67150.
- [18] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [19] Link TI, Voegelé RT. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Mol Plant Pathol*, 2008, 9(1): 59-66.
- [20] Jakupović M, Heintz M, Reichmann P, et al. Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43(1): 8-19.
- [21] Voegelé RT, Mendgen KW. Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? *Euphytica*, 2011, 179(1): 41-55.
- [22] 梁鹏. 白粉菌以糖类代谢途径收缩和效应分子多样化适应专性活体营养生活方式[D]. 海口: 海南大学, 2018.
- Liang P. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle[D]. Haikou: Hainan University, 2018 (in Chinese).
- [23] Hacquard S, Delaruelle C, Legué V, et al. Laser capture microdissection of uredinia formed by *Melampsora larici-populina* revealed a transcriptional switch between biotrophy and sporulation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(10): 1275-1286.
- [24] 范学锋, 张河山, 杨文香. 植物专性寄生菌吸器功能研究现状. *微生物学报*, 2016, 56(8): 1222-1233.
- Fan XF, Zhang HS, Yang WX. Advances in haustoria function of plants obligate parasite—a review. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(8): 1222-1233 (in Chinese).
- [25] Tao SQ, Cao B, Tian CM, et al. Comparative transcriptome analysis and identification of candidate effectors in two related rust species (*Gymnosporangium yamadae* and *Gymnosporangium asiaticum*). *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 651.
- [26] 杨楠, 徐正进, 周永力. 改良 TRIZOL 法提取真菌 RNA 的方法. *黑龙江科技信息*, 2008(24): 20.
- Yang N, Xu ZJ, Zhou YL. Modified TRIZOL method for the extraction of fungal RNA. *Heilongjiang Sci Technol Inf*, 2008(24): 20. (in Chinese)
- [27] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [28] Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644-652.
- [29] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [30] Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, et al. KofamKOALA: KEGG ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 2020, 36(7): 2251-2252.
- [31] Zhang H, Yohe T, Huang L, et al. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W95-W101.
- [32] Mistry J, Finn RD, Eddy SR, et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(12): e121.
- [33] Lambertucci S, Orman KM, Das Gupta S, et al. Analysis of barley leaf epidermis and extrahaustorial proteomes during powdery mildew infection reveals that the PR5 thaumatin-like protein TLP5 is required for susceptibility towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1138.
- [34] Reid AJ, Jones JT. Bioinformatic analysis of expression data to identify effector candidates. *Methods Mol Biol*, 2014, 1127: 17-27.
- [35] Dyrlov Bendtsen J, Nielsen H, Von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783-795.
- [36] Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 2001, 305(3): 567-580.

- [37] Emms DM, Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 238.
- [38] Zhang Z, Li J, Zhao XQ, et al. KaKs_Calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging. *Genom Proteom Bioinform*, 2006, 4(4): 259-263.
- [39] Koonin EV, Rogozin IB. Getting positive about selection. *Genome Biol*, 2003, 4(8): 331.
- [40] 庄剑云. 中国真菌志: 锈菌目. 北京: 科学出版社, 2012: 157-195.
Zhuang JY. Chinese Fungi: Pucciniales. Beijing: Science Press, 2012: 157-195 (in Chinese).
- [41] Both M, Eckert SE, Csukai M, et al. Transcript profiles of *Blumeria graminis* development during infection reveal a cluster of genes that are potential virulence determinants. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18(2): 125-133.
- [42] Gold RE, Mendgen K. Cytology of basidiospore germination, penetration, and early colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. *Can J Bot*, 1984, 62(10): 1989-2002.
- [43] 周世国. 梨胶锈菌性孢子和锈孢子阶段吸器的超微结构研究. *真菌学报*, 1992, 11(4): 289-293, 337-339.
Zhou SG. Ultrastructural studies on the haustorium of *Gymnosporangium haraeianum* in the pycnio-and aeciostage. *Mycosystema*, 1992, 11(4): 289-293, 337-339 (in Chinese).
- [44] Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, et al. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005, 18(11): 1130-1139.
- [45] 董章勇, 王振中. 植物病原真菌细胞壁降解酶的研究进展. *湖北农业科学*, 2012, 51(21): 4697-4700.
Dong ZY, Wang ZZ. Research progress of fungal cell wall-degrading enzyme. *Hubei Agric Sci*, 2012, 51(21): 4697-4700 (in Chinese).
- [46] Dow JM, Clarke BR, Milligan DE, et al. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(10): 2994-2998.
- [47] 李鑫淳. 向日葵锈菌金属蛋白酶基因的生物信息学分析及其原核表达[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
Li XC. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of metalloproteinase gene from *Puccinia helianthi* Schw[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [48] Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *PNAS*, 2011, 108(22): 9166-9171.
- [49] Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, et al. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 2010, 330(6010): 1543-1546.
- [50] Luginbuehl LH, Menard GN, Kurup S, et al. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 2017, 356(6343): 1175-1178.
- [51] Cross RL, Müller V. The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H^+ /ATP coupling ratio. *FEBS Lett*, 2004, 576(1/2): 1-4.
- [52] Gemayel R, Yang Y, Dzialo MC, et al. Variable repeats in the eukaryotic polyubiquitin gene *ubi4* modulate proteostasis and stress survival. *Nat Commun*, 2017, 8: 397.
- [53] 庄华, 成玉林, 康振生. 小麦条锈菌泛肽-核糖体蛋白 S27a 基因的鉴定与表达分析. *西北农业学报*, 2016, 25(12): 1775-1779.
Zhuang H, Cheng YL, Kang ZS. Identification and expression analysis of an ubiquitin-ribosomal protein S27a gene from *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Acta Agric Boreali Occidentalis Sin*, 2016, 25(12): 1775-1779 (in Chinese).
- [54] Depotter JRL, Zuo WL, Hansen MK, et al. Effectors with different gears: divergence of *Ustilago maydis* effector genes is associated with their temporal expression pattern during plant infection. *J Fungi (Basel)*, 2020, 7(1): 16.
- [55] Kristensen DM, Wolf YI, Mushegian AR, et al. Computational methods for gene orthology inference. *Brief Bioinform*, 2011, 12(5): 379-391.
- [56] Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.
- [57] Hurst LD. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet*, 2002, 18(9): 486.
- [58] Xing Y, Lee C. Can RNA selection pressure distort the measurement of Ka/Ks ? *Gene*, 2006, 370: 1-5.
- [59] Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet*, 2004, 5: 389-396.
- [60] Looi HK, Toh YF, Yew SM, et al. Genomic insight into pathogenicity of dematiaceous fungus *Corynespora cassiicola*. *PeerJ*, 2017, 5: e2841.

(本文责编 陈宏宇)