Table of Contents

<!DOCTYPE HTML>

转博工作报告-新.md

<h1>禾谷镰孢菌-小麦穗部互作转录组研究</h1>

<p class=“author”>2016级硕博连读生 魏万千　导师 唐威华研究员</p>

### (一) 个人简介

我叫魏万千，男，生与1993年5月30日，中国科学院分子植物科学卓越创新中心2016级遗传学专业硕士研究生。我准备申请本专业植物-真菌相互作用及植物生殖发育生物学方向的研究生。现分别就个人的道德修养、科研能力、外语水平等方面做出个人陈述。

作为一名党员，我时刻以党员的标准严格要求自己，努力提高自身政治素养。在生活方面为人真诚，待人友善，尊敬师长，团结同学。在个人素质方面，我性格沉稳，学习认真，有很强的求知欲和上进心，做事耐心细致，掌握了丰富的学习方法，具备了较强的学习能力。在科研上我具备旺盛的好奇心，对探索生物现象背后的本质具有充分的热情，能直面实验不顺的挫折。外语水平已过CET-6，专业词汇丰富，能熟练阅读相关英文文献。

### (二) 摘要

### (三) 背景及意义

<p class=“para”>禾谷镰孢菌(<em>Fusarium graminearum</em>)是一种禾谷类植物易感的病原真菌，它会引发小麦(<em>Triticum aestivum</em> L.)的穗腐病、冠腐病、苗枯萎病，大麦(<em>Hordeum vulgare</em> L.)和燕麦(<em>Avena sativa</em> L.)的穗腐病，玉米(<em>Zea mays</em>)的穗腐病、茎腐病、苗枯萎病、顶梢枯死病<sup>[1-4]</sup>，对农业生产的危害极大，其中穗腐病是一个世界性问题<sup>[5]</sup>。小麦是主要的粮食作物之一，中国小麦播种总面积约3.6亿亩，面临着严重的赤霉病危害，2005～2010年年均赤霉病发生面积6000万亩左右(16%)，2011～2016年均发生面积8000万亩以上(22%)，2017年得到有效控制，实际发生面积4355万亩。</p>

<p class=“para”>被禾谷镰孢菌侵染的小麦粒会积累一种呕吐毒素，叫做脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)，人畜误食被污染的小麦粒会引发呕吐、腹泻等症状，危害极大。尽管杀菌剂使用和栽培技术的提高能在中低烈度感染年份减少禾谷镰孢菌侵染，但在流行易感年份，只有禾谷镰孢菌抗性品种才能防止灾难性损失以及减少粮食中霉菌毒素的污染。</p>

<p class=“para”>小麦穗部是禾谷镰孢菌天然感染部位，而赤霉病又与粮食产量和食品安全密切相关，因此研究禾谷镰孢菌与小麦穗部相互作用具有重要的实践意义。在理解病原菌与宿主交互作用的遗传基础上，转录组分析具有优势，它能从整体角度分析病原菌或宿主对环境变化的反应策略，这些信息能为后续的遗传学研究提供具有指向性的线索。</p>

<p class=“para”>然而小麦穗部结构复杂，包括雄蕊、雌蕊、内桴、外桴和颖片等组织，不同组织细胞类型间具有很大差异性，倘若不加以区分，那么不同组织间的差异性会相互干扰，基因表达的差异被平均掉，阻碍进一步的转录组分析。在植物与真菌相互作用中引入激光显微切割技术，获取在宿主体内生长的真菌以及宿主不同类型的组织细胞，能在很大程度上提高信噪比<sup>[6]</sup>，而且该技术在本课题组研究禾谷镰孢菌侵染小麦胚芽鞘和玉米茎秆等工作中得到了很好的应用<sup>[7, 8]</sup>。</p>

<p class=“para”>张晓伟<sup>[7]</sup>等人运用激光显微切割和芯片杂交技术获得禾谷镰孢菌在宿主体内不同时期的表达谱，通过与体外培养的真菌表达谱的比较发现，禾谷镰孢菌在侵染进程中伴随着侵染策略的变化，并对在宿主体内上调表达的几个真菌基因进行了功能验证。在对具有共表达趋势的基因簇进行分析时发现，包含编码非核糖体多肽合成酶基因的 8 个串联排列的基因 ( 命名为 FG3\_54 基因簇 ) 具有极高的共表达趋势，在侵染后期特异性高表达。通过对 FG3\_54 基因簇中的 3 个基因进行突变，检测到下降的致病力，预示着 FG3\_54 可能编码一种对小麦胚芽鞘有毒性的次生代谢产物。</p>

<p class=“para”>这些工作与该领域内其他转录组研究都单独聚焦在病原菌或者宿主上，但同时研究相同条件下病原菌与宿主的转录组能揭示出两者交互作用的更多信息。尽管在小麦穗部进行转录组研究具有挑战，理解真菌病原体从感染、定殖到越冬的整个生命循环，对控制病害有效方法的发展具有促进作用。</p>

###(四) 研究思路

####1. 研究目标

\* 观察禾谷镰孢菌侵染小麦穗部的细胞进程，确定激光显微切割的策略；

\* 获得并分析禾谷镰孢菌在侵染期间的基因表达谱；

\* 获得并分析小麦穗部组织抵抗侵害时的基因表达谱；

\* 找出禾谷镰孢菌潜在的效应因子，通过遗传学手段验证其功能

\* 找出小麦穗部组织参与防御反应的基因，通过遗传学手段验证其功能

####2. 研究内容

<p class=“para”>在进行激光显微切割取材之前，需要先观察荧光标记的禾谷镰孢菌野生型侵染玉米穗部的整个细胞进程，总结出真菌在植物体内生长的特征，确定可能发生交互作用的组织细胞类型作用于激光显微切割的靶点。FG3\_54基因簇中编码NRPS5蛋白的基因在禾谷镰孢菌侵染包含赤霉病抗性数量性状基因座Fhb1的小麦苏麦3号的小穗时，出现非常高的表达量，而在侵染缺乏Fhb1基因座的近等基因系小麦小穗时几乎不表达<sup>[9]</sup>。因此观察Δ<em>FG3\_54</em>侵染苏麦3号的细胞进程，有助于确定其作用机理。另外，<em>TRI5</em>基因是禾谷镰孢菌中合成DON的关键基因，它的缺失会导致DON合成的丧失，因此Δ<em>FG3\_54</em> & Δ<em>TRI5</em> 双突变体致病力是否会完全丧失，也是值得探究。</p>

<p class=“para”>小麦穗部结构复杂，不同组织细胞对真菌侵染的反应也不同，而随着单细胞扩增技术的发展，只需要切割少量相同类型或处于相同状态的细胞就足够进行RNA-seq分析。从真菌角度考虑，设置禾谷镰孢菌在培养基上生长对照组通过与植物体内生长的进行比较转录组分析，就能发现究竟哪些基因与致病有关。从宿主角度看，通过Mock接种对照组与病原菌野生型或突变体接种实验组之间的分析，可以观察到小麦防御反应的概貌。</p>

<p class=“para”>转录组分析能提供禾谷镰孢菌侵染策略的线索，也能揭示小麦穗部防御反应的特征，但这些具有指向性的线索都需要遗传学实验进行验证。对禾谷镰孢菌来说，已经有简单稳定的遗传转化体系<sup>[10]</sup>，但小麦遗传背景复杂、生长周期漫长，遗传转化具有难度。最近几年在禾本科植物中发展起来的大麦条纹花叶病毒介导的基因沉默是一个非常有用的工具，除此之外大麦条花叶病毒还能用于过表达限定长度的基因产物，这些工具都有助于转录组分析的后续基因功能验证工作。 </p>

#### 3. 关键技术

\* **激光显微切割的技术与策略**：激光显微切割技术可用于获取被真菌侵染的植物组织中的单细胞类型样品，同样也可用于获取真菌RNA高富集的样品。将真菌和植物组织分开，植物组织不同类型细胞分开，甚至真菌侵染前端和后端分开都有助于提高真菌-植物交互转录组数据的信噪比。制约数据质量的是激光显微切割的策略，在真正理解禾谷镰孢菌侵染小麦穗部的细胞进程上，确定真菌与宿主交互作用的前沿，才能通过激光显微切割技术获得正在发生交互作用的真菌或者宿主细胞。

\* **单细胞全cDNA扩增**：尽管在植物真菌相互作用转录组研究中不需要真正取单细胞，而是取单细胞类型。但通过激光显微切割所获得的样本数量很少，其mRNA总量是不足以进行测序分析的，所以也需要进行全cDNA扩增，以获得足够的量，这里可以选用Smart-Seq2<sup>[11]</sup>流程进行转录组测序与分析。

\* **BSMV-VIGS/VOX**：大麦条纹花叶病毒在自然条件下能侵染两种主要的单子叶作物，小麦和大麦，它能引起轻微最多不过中等程度的病斑。在实验条件下，BSMV能通过擦拭接种传播到玉米、燕麦、短柄草数等超过250个物种上<sup>[12]</sup>。BSMV的遗传背景清楚，接种操作容易，引起的病斑轻微，因此很适合用来在小麦穗部、种子和根上面做VIGS研究。

#### 4. 拟采用的研究方法

\* <strong>细胞学观察</strong>

利用细胞壁定位的KatG2:GFP和细胞质定位p615，通过有性杂交得到的菌株来实现荧光标记，在共聚焦显微镜下观察真菌在小麦穗部生长的进程，总结出真菌在植物体内生长的特征，确定可能发生交互作用的组织细胞类型作用于激光显微切割的靶点。

\* **激光显微切割**

利用激光显微切割技术获取小麦穗部与真菌互作的单细胞类型，以及侵染前沿的禾谷镰孢菌菌丝。甚至可以考虑利用空间转录组研究方法，记录细胞切割的空间位置。

\* **转录组测序与数据分析**

单细胞类型转录组扩增，选用Smart-Seq2流程，选择测序公司。数据可视化，总结禾谷镰孢菌侵染策略、小麦防御反应特征，寻找差异表达基因。

\* **实时荧光定量PCR**

利用Realtime-PCR验证转录组测序的结果，样品依然是扩增后的cDNA产物。

\* **同源重组基因敲除**

利用Split-Marker重组技术构建禾谷镰孢菌缺失突变体。

\* **BSMV-VIGS/VOX**

BSMV具有三分体基因组，包括RNAα、RNAβ以及RNAγ，其中γ链可插入异源核酸片段，如果插入植物转录本短片段，便可用于VIGS。与VIGS的原理类似，RNAγ链能插入一个小片段RNA，大小限制在650bp以下，很适合用来研究真菌效应因子等小蛋白。

#### 5.技术路线

#### 6. 可行性分析

<p class=“para”>细胞学观察、激光显微切割以及同源重组基因敲除，都是本课题组成熟并得到验证的技术。转录组扩增技术日新月异，扩增结果的好坏取决于采用的试剂盒，因此挑选可靠的供应商也是值得留意的。转录组数据分析涉及个人编程、数据挖掘水平的制约，如果仅仅依赖于测序公司提供的分析流程，会忽略掉很多有价值的信息，因此学习和掌握数据分析手段是很有必要的。BSMV介导的VIGS以及VOX等小麦遗传操作技术对课题组来说是全新的技术，这些体系需要一定时间的摸索与建立。总体而言，虽然整个实验规划具有一定的挑战性，但仍然是具备可行性的。</p>

#### 7. 预期的研究成果

\* 通过细胞学观察可以得到禾谷镰孢菌侵染小麦穗部的生长模式，也可以进一步了解小麦穗部复杂的结构和细胞类型。在FG3\_54突变体侵染过程中，可以看到小麦防御反应在细胞层面的表现，了解FG3\_54基因簇作用模式。

\* 获得高信噪比的禾谷镰孢菌营养生长、侵染过程等转录组数据，可分析出禾谷镰孢菌侵染策略。

\* 获得高信噪比的小麦穗部特定细胞类型防御反应表达谱，总结出防御反应的特征。

\* 通过遗传学手段验证差异表达基因可以找出禾谷镰孢菌致病因子。

\* 通过遗传学手段验证差异表达基因可以发现小麦参与防御反应的基因，为小麦抗性育种提供线索。

#### 8. 创新性

\* 基于激光显微切割的RNA-seq技术：高信噪比。

\* 利用不同禾谷镰孢菌突变体侵染不同基因型的宿主。

\* 探究结构复杂的*F. graminearum* 天然感染部位，而且小麦穗部外桴是禾谷镰孢菌侵染起始的组织。

\* 为大量工作提供有价值的线索：为实验室后续课题进展提供了大量线索。

\* 小麦遗传操作VIGS/VOX：利用病毒表达相关蛋白，探究基因功能。

### 5  研究进展

#### 5.1 已有的工作基础

<p class=“para”>本课题组已在小麦胚芽鞘、玉米茎秆等组织上利用激光显微切割和基因芯片等技术研究过真菌侵染宿主转录组或者真菌宿主交互作用转录组研究，根据这些数据提供的线索挑选出许多致病因子候选基因。我对一部分基因进行了同源重组敲除实验，以观察禾谷镰孢菌表型或验证该基因功能。</p>

##### 5.1.1 真菌效应因子寻找、表型观察与功能推测

<p class=“para”>任何能够调节真菌与宿主交互作用的分泌分子都能被叫做真菌效应因子（Fungal effector）。植物能被从共生型到腐生型等各种不同生命方式的真菌定殖，这种定殖由成百上千个真菌分泌的效应因子所支配。这些效应因子能够抑制植物的防御反应，还能调节植物生理机能使宿主能容纳作为入侵者的真菌并为它停供营养。蛋白效应因子大部分是通过内质网-高尔基途径分泌，要进入这个途径，蛋白效应因子必须在N端含有分泌信号肽，我们可以根据这个特征通过生物信息学手段将禾谷镰孢菌中未知的效应因子候选基因从基因组中鉴定出来。另外一些类型的蛋白效应因子拥有保守的功能结构域并在真菌种属之外是无直系同源的，因此也可以根据这个特征来推断禾谷镰孢菌中潜在的蛋白效应因子。尽管通过保守的功能结构域去鉴定蛋白效应因子的功能不是问题，但这种结构域的分类是受不同生物信息学手段和标准影响，并不能用于直接的比较。</p>

<p class=“para”>效应因子通常是在病原菌与植物接触之后才开始表达，它们的表达谱是与不同的感染阶段及不同受感染的组织细胞类型高度协调的。因此，我们收集了已发表的禾谷镰孢菌在不同条件下的转录组数据，挑选了一些在体外培养阶段不表达，但在小麦胚芽鞘或者玉米茎秆侵染过程中特异性表达的分泌蛋白基因，这些基因的表达谱被做出了热图(图1A)。在小麦胚芽鞘接种禾谷镰孢菌孢子悬液并于人工气候箱培养七天后，观察侵染状况，拍照记录并用ImageJ测量小麦胚芽鞘上病斑长度。我们发现 <em>ΔFGSG\_03064</em> 及 <em>ΔFGSG\_10617</em> 突变体在胚芽鞘上显示出了显著的致病力下降(图1EF)，并且 <em>ΔFGSG\_10617</em> 侵染玉米茎秆时也出现了致病力下降表型(图1D)，而 <em>ΔFGSG\_03064</em> 在侵染小麦穗部时致病力也下降(图1G)。</p>

<p class=“para”><em>FGSG\_03064</em> 基因编码产物可能是一种视蛋白GzCarO，与<em>Fusarium fujikuroi</em> 中的CarO序列<sup>[13]</sup>一致性达到74%。视蛋白(Opsins)是细胞膜上的光感受器，它的功能包括光驱动的离子泵和光探测，它利用脱辅基类胡萝卜素视黄醛作为辅基来吸收光。有研究报道<sup>[14]</sup>CarO的表达能被光诱导，与类胡萝卜素合成基因分享一个共同的转录调节，它的合成是也是受光诱导，黑暗条件下几乎不合成。另外，CarO突变体的类胡萝卜素产量不变，也不影响fusarin产量（高温黑暗条件大量合成），也不影响菌落形态，即突变体在光反应上没有显著表型。<em>F. graminearum</em> 中的GzCarO也曾被报道不影响类胡萝卜合成<sup>[15]</sup>。而另外一项研究表明，CarO是绿光驱动的定位在细胞膜上的外向质子泵，然而土豆/苹果组织侵染分析没有显示出CarO<sup>-</sup>和CarO<sup>+</sup>显著的差异，作者推测<em>Fusarium fujikuroi</em> 在侵染其自然宿主水稻时会有不同。</p>

<p class=“para”><em>FGSG\_10617</em> 可能编码了一种单模块类NRPS，NRPS的基本结构域是ATC三个，而单模块类NRPS通常会缺少缩合结构域。通过保守结构域分析推测，<em>FGSG\_10617</em> 可能编码了一种单模块的NRPS。它与已报道过的线性短杆菌肽合酶亚基D的结构域很相似，包含一个A结构域、一个T结构域以及一个R结构域。在线性短杆菌肽合酶亚基D中，A结构域识别氨基乙二酸将之转变为氨基乙醛缩二乙醇添加到并添加到线性短杆菌肽C端。而与之类似一种MxcG非核糖体多肽合酶也有着相似的催化活性。</p>

##### 5.1.2 小麦胚芽鞘应对<em>ΔFG3\_54</em> 突变体侵染的转录组分析

<p class=“para”>在之前的研究中，我们曾提出FG3\_54 次生代谢产物合成基因簇对禾谷镰孢菌侵染小麦的过程来说是很重要的。通过TLC获得该基因簇产物部分纯化物N1，当施加到<em>ΔFG3\_54</em> (C75 strain)突变体侵染位点时，该突变体恢复了致病力。为了调查N1代谢物是怎么影响宿主基因表达，我们分别对MOCK接种、PH-1接种、C75接种以及施加N1等四组小麦胚芽鞘进行了RNA-seq分析。</p>

<p class=“para”>从总体角度看，主成分分析表明这四组样品差异明显(图2A)，前三个成分解释了93.75%的样品差异。在利用edgeR寻找到差异表达基因后，利用UpSet来对不同实验组间比较的交集进行可视化(图2B)，在那些只被FG3\_54代谢产物抑制表达的基因中，发现糖类转运、胞间连丝、糖基转移酶等基因在这个交集中出现富集(图2C)。最后通过Realtime-PCR挑选一些基因进行了表达验证(图2D)。</p>

#### 5.2 近期工作进展

##### 5.2.1 禾谷镰孢菌突变体荧光菌株构建

<p class=“para”>在观察禾谷镰孢菌侵染小麦穗部的过程中，将 <em>Fg</em> 突变体用荧光标记上将有助于显微观察。我们可以利用禾谷镰孢菌有性杂交的方式将突变体与已有荧光菌株杂交，从而使突变体基因组中带上荧光基因。</p>

<p class=“para”>有性杂交过程大致如此下：将胡萝卜培养基上铺满皿的禾谷镰刀菌菌丝使用吐温浸润并用玻棒压倒后，在黑光灯下诱导，此时单倍体的菌丝开始融合形成二倍体，24 h 时二倍体细胞形成并开始原子囊壳的形成，48 h 的时候产自囊细胞开始形成，大约 3 天的时候就原子囊壳就开始成熟形成子实体（子囊壳），4 天的时候子囊开始形成，6 ~ 7 天之后成熟的子囊壳便形成，此时的子囊壳中已经形成子囊并且每个子囊中含有 8 个整齐排列的子囊孢子，12 天的时候形成成熟的含有四个细胞的子囊孢子。</p>

<p class=“para”>在本课题组已发表的文献中曾报道 FG3\_54 基因簇中编码 NRPS5 蛋白的基因在禾谷镰孢菌侵染包含赤霉病抗性数量性状基因座 Fhb1 的小麦苏麦3号的小穗时，出现非常高的表达量，而在侵染缺乏 Fhb1 基因座的近等基因系小麦小穗时几乎不表达。因此观察利用荧光标记的 <em>ΔFG3\_54</em> 侵染苏麦3号的细胞进程，有助于确定其作用机理。<em>C75×pNR2-ZsGreen</em> 菌株的鉴定结果见图3A-D。</p>

<p class=“para”>另外在本课题组前期工作研究中发现，禾谷镰孢菌中的 <em>KatG2</em> 基因是细胞壁定位，而且在敲入 mRFP 基因后，菌丝呈现出红色的细胞壁荧光。为了利用 <em>KatG2:mRFP</em> 的细胞壁荧光将菌丝的轮廓标出，我们将孢子绿色荧光标记的 <em>p615</em> 与 <em>KatG2:mRFP</em> 两个菌株进行有性杂交以获得双荧光。菌株鉴定结果见 图4 AB </p>

这些可视化效果很理想的菌株对理解禾谷镰孢菌侵染小麦穗部侵染进程的帮助非常大，并且优秀的荧光菌株也有助于激光显微切割时对宿主和真菌细胞进行定位。

##### 5.2.2 小麦幼胚愈伤组织形成实验

小麦基因组庞大而复杂，组织再生能力低下，不同小麦品种之间转化效率差异较大。尽管小麦遗传转化困难，但依然有成熟的遗传转化方案。在对转化方式的选择上，基因枪是主流，而小麦幼胚的再生能力最强，但也最难获取。各个品种的小麦中，Bobwhite是最常用的品种，但也有其他高效率瓶中，比如Kenong199。小麦的转化效率在5%左右，这需要大量的工作才能达到期望的突变体。

这里我们选择Bobwhite作为遗传转化的品种，并利用农杆菌介导的遗传转化体系作为工具，用以验证将来小麦穗部互作转录组分析找出的差异基因。为了测试Bobwhite的幼胚愈伤组织形成能力，为以后遗传转化打下基础，我们进行了一些测试(图4 C-F)。

这些实验结果说明小麦品种Bobwhite的幼胚能成功形成愈伤组织，并且能够再分化为一个完整植株，该品种非常适合于遗传转化。

##### 5.2.3 禾谷镰孢菌侵染小麦穗部进程观察

为了确定激光显微切割的策略，同时需要获得对禾谷镰孢菌侵染穗部早期事件的整体理解，小麦易感品种中原98-68、Bobwhite以及中等抗性品种苏麦3号被用来对比研究。小麦穗部小穗结构复杂，包括雄蕊、雌蕊、内桴、外桴和颖片等组织，在人工侵染禾谷镰孢菌时，孢子悬液被滴加在小穗内桴外桴之间，这中间包含着柱头、花柱和子房(图5E)。

对禾谷镰孢菌侵染易感品种来说，在3DPI(Days Post Inoculation, DPI)后菌丝基本长满了整个苞片组织，在此时间段之前禾谷镰孢菌的侵染主要有三个阶段：穿透宿主表皮细胞进入体内、快速地胞间生长以及胞内生长。

1 DPI 时禾谷镰孢菌在外稃內桴内表面萌发，尝试这穿透表皮细胞，这种行为激发了宿主地局部防御反应，紧邻这菌丝地表皮细胞壁开始自发荧光(图5A)。同时那些未直接接触菌丝地细胞出现自发荧光的颗粒(图5B)，这可能是小麦的全局防御反应，这种表型在邻接接种处小穗的苞片组织上都能发现。小麦柱头呈羽状，在 1 DPI 时能发现大量菌丝在羽状柱头上生长，并且菌丝能在柱头内生长，但此时菌丝还尚未进入花柱(图5C)。

2 DPI 时禾谷镰孢菌以及进入苞片组织内部，并且呈现放射形状的病斑，这些菌丝前沿快速的进行胞间生长，并且通过胞间连丝横向穿壁，此时菌丝前沿的宿主细胞出现自发荧光的颗粒物(图6A)。在菌丝相对较少的內桴，大量的自发荧光颗粒物出现在细胞内，这些颗粒物的形状浑圆大小不一(图6B)，这种表型是菌丝侵染所诱导的，很可能与防御反应有关。菌丝在进入柱头后，又快速地进入了花柱，并且顺着花柱生长穿入子房内(图6C)。

3 DPI 时禾谷镰孢菌基本已经长满了整个外稃(图7A)，而內桴的自发荧光颗粒物的数量也达到一个高峰(图3B)。苞片组织间包裹的雌蕊已经枯萎，并且被大量菌丝占据(图7C)。所以，在 3 DPI 时禾谷镰孢菌已经完成侵染的早期事件，在 5 DPI 时已经可以看见菌丝顺着小穗轴维管束周围的薄壁细胞进入穗节甚至穗轴间节。

苏麦3号对禾谷镰孢菌具有中等程度的抗性，观察禾谷镰孢菌抗病品种的进程对理解抗病机制具有重要意义。与侵染易感品种相比，禾谷镰孢菌侵染苏麦3号的进程出现一定程度的减缓。

在 1 DPI 时，菌丝主要呈气生状态，宿主细胞出现自发荧光颗粒物(图8A)。而在 2 DPI 时大量宿主细胞自发荧光，但菌丝仍然以气生状态为主，进入组织内部的菌丝很少(图8 B-C)，而花柱细胞也出现了自发荧光的颗粒物(图8D)。

3 PDI时菌丝的侵染程度受苏麦3号子房发育程度不同而有所差别(图9A)。在子房已发育侧，禾谷镰孢菌侵染进程被限制在气生菌丝阶段，棕色病斑小菌丝数量少。在子房未发育侧，整个外稃都被禾谷镰孢菌菌丝占满，大量菌丝处于横向穿壁生长模式(图9B)，小穗轴与穗节连接处能看见明显的病斑(图9A)。

禾谷镰孢菌侵染小麦易感品种穗部的早期事件在 3 DPI 时已经接近结束，而侵染抗性品种时整个进程减慢了。在整个早期事件观察过程中，有五个值得关注的现象：

### (六) 工作展望

#### 2. 存在的问题及解决方法

#### 3. 工作重心及计划安排

 <div class=“page-break”></div>

###(七) 参考文献

[1] Cook R J. FUSARIUM ROOT AND FOOT ROT OF CEREALS IN PACIFIC NORTHWEST[J]. Phytopathology, 1968, 58(2): 127-131.

[2] Dal Bello G, Monaco C, Simon M. Biological control of seedling blight of wheat caused by Fusarium graminearum with beneficial rhizosphere microorganisms[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(7): 627-636.

[3] O’donnell K, Ward T J, Geiser D M, et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade[J]. Fungal genetics and biology, 2004, 41(6): 600-623.

[4] Asran M, Amal M E. Aggressiveness of certain Fusarium graminearum isolates on wheat seedlings and relation with their trichothecene production[J]. Plant Pathology Journal, 2011.

[5] Dubin H, Gilchrist L, Reeves L, et al. Fusarium head blight: global status and prospects[J]. CIMMYT, Mexico City, 1997.

[6] Tang W-H, Zhang Y, Duvick J. The application of laser microdissection to profiling fungal pathogen gene expression in planta[M]. //  Plant Fungal Pathogens. Springer, 2012: 219-236.

[7] Zhang X-W, Jia L-J, Zhang Y, et al. In planta stage-specific fungal gene profiling elucidates the molecular strategies of Fusarium graminearum growing inside wheat coleoptiles[J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 5159-5176.

[8] Zhang Y, He J, Jia L-J, et al. Cellular Tracking and Gene Profiling of Fusarium graminearum during Maize Stalk Rot Disease Development Elucidates Its Strategies in Confronting Phosphorus Limitation in the Host Apoplast[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(3): e1005485.

[9] Hofstad A N, Nussbaumer T, Akhunov E, et al. Examining the Transcriptional Response in Wheat Fhb1 Near-Isogenic Lines to Fusarium graminearum Infection and Deoxynivalenol Treatment[J]. Plant Genome, 2016, 9(1).

[10]   袁婷露, 张彦, 於新建, et al. 禾谷镰孢转化体系的优化[J]. 植物生理学通讯, 2008, (2): 251-256.

[11]   Deng Q, Ramsköld D, Reinius B, et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells[J]. Science, 2014, 343(6167): 193-196.

[12]   Kurstak E, Kurstak E. Handbook of plant virus infections: comparative diagnosis[M]. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981: 565-625.

[13]   Garciamartinez J, Brunk M, Avalos J, et al. The CarO rhodopsin of the fungus Fusarium fujikuroi is a light-driven proton pump that retards spore germination[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 7798-7798.

[14]   Prado M M, Prado-Cabrero A, Fernández-Martín R, et al. A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of Fusarium fujikuroi[J]. Current genetics, 2004, 46(1): 47-58.

[15]   Jin J-M, Lee J, Lee Y-W. Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete Gibberella zeae[J]. FEMS microbiology letters, 2010, 302(2): 197-202.