



论文

石果衣真菌(*Endocarpon pusillum*)比较转录组分析揭示其抗旱特性

王延延^{①②}, 张新宇^①, 周启明^①, 张晓灵^①, 魏江春^{①③*}^① 中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101;^② 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;^③ 西北农林科技大学, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 杨凌 712100

* 联系人, E-mail: weijc2004@126.com

收稿日期: 2014-09-02; 接受日期: 2014-10-13; 网络版发表日期: 2015-01-05

国家自然科学基金(批准号: 31270018)、中国科学院知识创新项目(批准号: KSCX2-EW-J-6)和西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室资助项目

摘要 从沙漠地区地衣石果衣中分离得到的地衣型真菌(*Endocarpon pusillum*)具有极强的抗旱能力. 为了研究石果衣真菌的抗旱机制, 本研究利用转录组测序和荧光定量的方法分别对纯培养和共生状态的真菌进行分析和比较. 比较转录组分析是针对纯培养的石果衣真菌, 比较其在正常培养和胁迫培养条件下的 2 个样品, 得到 1781 个差异表达基因. 以抗旱植物和非地衣型真菌的抗旱机制作为参照, 一些普遍存在机制中所涉及的基因在石果衣真菌中也是差异表达的. 然而不同的是, 石果衣真菌的抗旱机制中不涉及有关渗透压调节基因的差异表达, 这一特点为揭示石果衣真菌为干旱适应物种提供了证据. 此外, 石果衣真菌不同于其他生物, 还有一系列差异基因被归类于其特有的干旱适应机制. 为了确定共生与纯培养状态下的石果衣真菌的抗旱机制是否一致, 本研究挑选了 23 个候选基因, 利用荧光定量的方法在脱水地衣体中进行验证. 本研究为下一步地衣型真菌的研究提供有价值的数据支持, 同时也会有助于抗旱基因的功能研究.

关键词地衣
共生菌
脱水
干旱适应性
干旱抗性

地衣是由地衣型真菌(共生菌)和光合生物(光合共生生物)组成的共生生态系统. 每种地衣是由一种共生菌和至少 1 种光合共生生物组成, 其中光合共生生物可能是藻类或蓝细菌. 地衣的生境分布广泛, 从寒冷地区到炎热荒漠等极端环境都适合其生长. 与维管束植物不同, 地衣体缺少有效控制体内水分的机制. 所以, 其体内的水分含量会随环境中相对湿度的变化而发生极大变化^[1]. 当环境中相对湿度较低时, 地衣

体会快速失水; 当环境中相对湿度加大时, 地衣体也会迅速复水^[2]. 尤其是它能够在含水量低于 5% 的条件下存活相当长的时间, 而维管束植物则不能^[3,4]. 由于在地衣体复水时, 其体内水分含量迅速恢复, 因而其细胞生理代谢活动(如光合作用和呼吸作用)也随之迅速恢复正常^[5,6]. 已知的研究表明, 一些地衣体在低水分含量条件下仍然会维持较活跃的代谢活动^[7].

引用格式: 王延延, 张新宇, 周启明, 等. 石果衣真菌(*Endocarpon pusillum*)比较转录组分析揭示其抗旱特性. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 43–55

英文版见: Wang Y Y, Zhang X Y, Zhou Q M, et al. Comparative transcriptome analysis of the lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* elucidates its drought adaptation mechanisms. Sci China Life Sci, 2015, 58: 89–100, doi: 10.1007/s11427-014-4760-9

迄今为止,已有不少研究报道水分含量对地衣体形态、生理和存活能力等方面的影响^[1,6,8-13],然而,在分子生物学方面研究其抗性机制的报道尚少。不过,在植物和非地衣型真菌的抗旱研究中,分子生物学方面的报道较多。从其他生物中已知的抗逆机制是否适用于地衣生物有待进一步研究。在其他抗旱真核生物中,干旱胁迫会导致一些细胞内的胁迫,如渗透压胁迫、氧化胁迫、高离子浓度胁迫及蛋白错误折叠和聚集^[14]。因此,生物体能够在干旱环境中存活就必然具有对干旱胁迫而导致细胞损伤的抗性机制。在抗旱时起主要作用的已知 3 个最主要的抗逆通路包括:渗透压调节机制(调节细胞内离子浓度)、DNA 和蛋白损伤修复机制(防止 DNA 损伤和蛋白的错误折叠和降解)和抗氧化机制(清除活性氧物质(reactive oxygen species, ROS))^[15,16]。目前,对地衣抗逆分子机制了解甚少,主要是由于缺少遗传背景和技术。但是,随着基因组学技术的发展以及有关地衣型真菌及其光合共生生物基因组和转录组信息的获得,将会极大地推动地衣抗旱机制的研究^[17,18]。

由于地衣是 2 种生物体组成的共生生态系统,它的大部分生物学特性都是这 2 种共生生物体相互作用的结果。然而,在地衣的抗逆方面,一些研究认为,共生菌在地衣体中起主要作用^[19-21],这主要是由于共生藻被菌丝紧紧缠绕包裹在地衣体中,这种结构为共生藻在干旱等恶劣环境中提供了机械保护。并且,有关石果衣抗干旱存活能力的实验也证明石果衣真菌(*Endocarpon pusillum*)的抗旱能力远超过其共生藻柯氏复球藻(*Diplosphaera chodatii*)^[22]。因此,为探明荒漠地衣石果衣的抗干旱机制,很必要对石果衣真菌的基因组和转录组进行分析研究。

在石果衣真菌基因组数据发表之后^[18],对其转录组的测序与比较分析以揭示其抗旱特性为本研究的主要内容。此外,为了探明其共生菌在分离和共生状态下的抗旱机制是否一致,对一些有代表性的差异表达基因在石果衣地衣体脱水过程中的表现也进行了验证。

1 材料与方法

1.1 材料与干旱胁迫处理

石果衣真菌分离自宁夏腾格里沙漠沙坡头地区

(37.40°N, 105.00°E)采集的石果衣标本 Z07020。分离的共生菌在 1.5%的水琼脂培养基上培养 1~2 周,然后转接到马铃薯葡萄糖浸汁(potato dextrose broth, PDB)培养基中室温培养。人工干旱胁迫模拟采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG),它是一种能够制造严重缺水胁迫的非透性渗透物^[23]。PEG 诱导的干旱胁迫被广泛地应用于植物和真菌的抗性研究中^[24,25]。

本研究将分离培养的石果衣真菌培养在含有 20% PEG 6000 的 PDB 培养基中;每 3 周打碎菌丝转接于新鲜培养基。取等量正常 PDB(对照组)培养和含有 20% PEG 的 PDB(胁迫组)培养的样品提取 RNA 作为转录组测序的材料。

地衣体自然脱水实验所使用的材料采自与标本 Z07020 同产地的石果衣地衣体。在实验室条件下,将新鲜采集的地衣体浸入无菌水中充分复水 5 min 后用滤纸将其体表水分吸干并置于室温条件下自然干燥;按照下列 5 个时间:0, 40, 60, 150, 240 min 分别取样迅速用液氮冷冻,之后提取 RNA,反转录成 cDNA 作为荧光定量(qRT-PCR)的模板。

1.2 cDNA 文库构建和 DNA 测序

总 RNA 的提取采用 TRIzol 法(Invitrogen, 美国),从 40 µg 总 RNA 中通过 oligo-dT 耦联珠将 mRNA 分离后用随机引物和 Superscript II 反转录酶合成 cDNA。将 cDNA 随机打断并加上 3'-dA 以后,连入 Illumina paired-end 接头,通过胶纯化选择 200 bp 的片段。使用 Illumina GAIIx(Illumina, 美国)测序平台进行测序。

1.3 转录组数据装配和差异表达分析

去掉接头序列后将转录组数据利用 PASA 程序装配到基因组数据中^[26],并预测出可读框。基因预测使用 Augustus^[27], GeneID^[28]和 GeneMark-ES^[29],并用 EVM^[30]进行整合。所有的预测基因通过 GO(gene ontology)^[31], KOG(eukaryotic orthologous groups)^[32], FunCat^[33]和 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)^[34]数据库进行分析。比较 2 个样品的转录组初级数据,使用 ARRAYSTAR 软件(DNAStar, 美国)进行标准化。利用 NOISeq^[35]统计方法鉴定在 2 个样品中差异表达的基因,将可能性值(*P* 值)高于 0.8 的基因定义为差异基因。

1.4 荧光定量分析

分别从纯培养和共生状态下的石果衣真菌中提取总 RNA. cDNA 合成按照反转录试剂盒说明 (Promega, 美国) 进行. ABI 7500 荧光定量仪 (Applied Biosystems, 美国) 用于荧光定量, $2^{-\Delta C_t}$ 方法分析数据^[36].

2 结果

2.1 石果衣真菌干旱胁迫转录组数据的功能分类

本研究从胁迫组 (20% PEG) 与对照组 (0% PEG) 的转录组数据中找到 1781 个差异表达基因 ($P > 0.8$), 占石果衣真菌 37.5 Mb 基因组中 9285 个总基因的 19.18%^[18]. 在这些差异基因中, 有 1004 个在胁迫状态上调表达, 777 个下调表达. 其中, 620 个基因 (35%) 未注释出功能.

使用 Blast2GO 程序^[37]将差异基因按照其功能进行 GO 分类 (图 1). 在上调基因中, “转移酶活性”、“细胞代谢过程”、“初级代谢过程”、“大分子代谢过程”和“细胞内组分”等所占的比例最多. 在下调基因中, “膜组分”所占的比例最多, 这是因为干旱胁迫条件会对细胞膜的完整性有影响. 然而, 仅有少量差异基因 (51 个基因中只有 3 个上调表达, 4 个下调表达) 属于“胁迫响应”, 这是石果衣真菌的抗旱特性不同于其他生物之处, 所以推测有可能存在某些新的抗旱机制.

使用 Blast2GO 程序将差异基因按照其所属的代谢通路进行 KEGG 分类 (图 2). 有最显著差异变化 ($P \leq 0.0001$) 的基因属于“核糖体”和“氧化磷酸化”通路. 大部分通路中的基因都是上调表达的, 包括“维生素 B6 代谢”、“合成和降解酮体”、“萜类化合物生物合成”、“氧化磷酸化”、“类固醇生物合成”、“嘧啶代谢”和“嘌呤代谢”. 在这些通路中, 前 5 个代谢通路中的上调基因占全部差异基因的 30% 以上. 然而, 在通路“氮代谢”和“半乳糖代谢”中, 只有少数下调基因, 而无显著上调基因 ($P \geq 0.1$). 由此得知, 大部分代谢通路在干旱胁迫下是活跃的, 尤其是那些维持细胞基本功能的通路, 如“核糖体”、“氧化磷酸化”、“嘧啶代谢”和“嘌呤代谢”.

2.2 涉及真核生物普遍存在抗旱机制的基因的表达变化

生物体持续暴露在干旱条件下会导致细胞内的

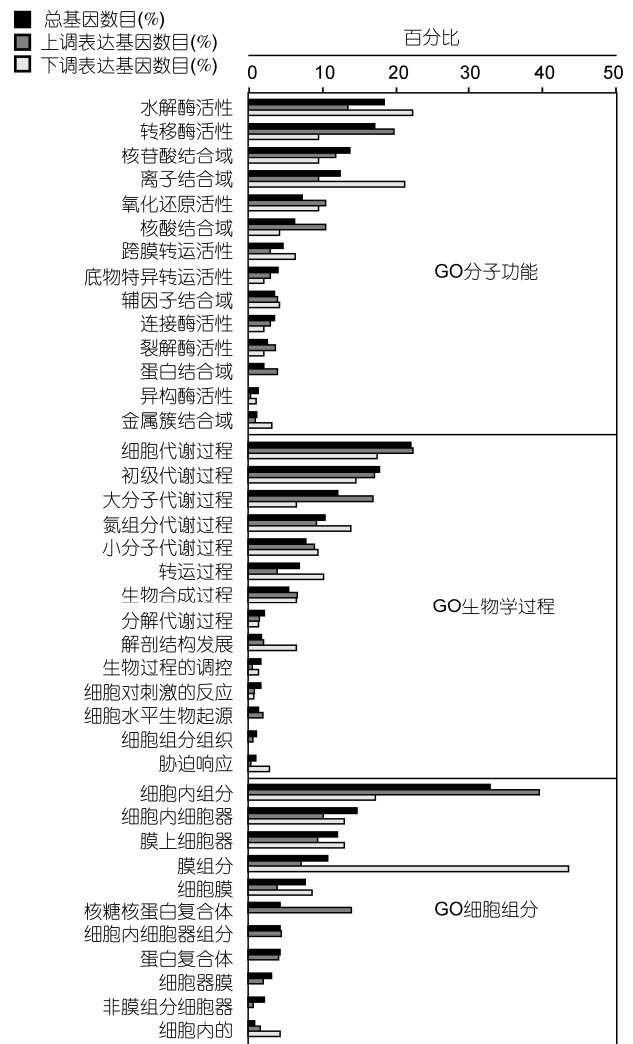


图 1 石果衣真菌抗旱差异基因按照 GO 中分子功能、生物学过程和细胞组分的分类

每组分类中总基因数目、上调基因数目和下调基因数目占所有差异基因总数的百分比分别标记为黑色、灰色和白色

氧化胁迫, 从而会诱导体内抗氧化机制来清除体内产生的大量 ROS; 同时, 干旱胁迫还会造成细胞内外的渗透压胁迫. 因此, 生物体在抗旱过程中还需要通过积累渗透剂来维持渗透压^[38]. 另外, 在干旱胁迫条件下, 细胞缺水会增加胞外溶质浓度, 从而导致蛋白的错误折叠和聚合^[39], 这种变化会限制细胞对干旱胁迫的响应^[40]. 所以, 为了更清楚地了解石果衣真菌的抗旱响应机制, 首先参照其他生物中普遍存在的抗旱机制, 研究了石果衣真菌相关基因的差异变化, 这些抗旱机制包括抗氧化机制、渗透压调节机制和转录后加工过程.

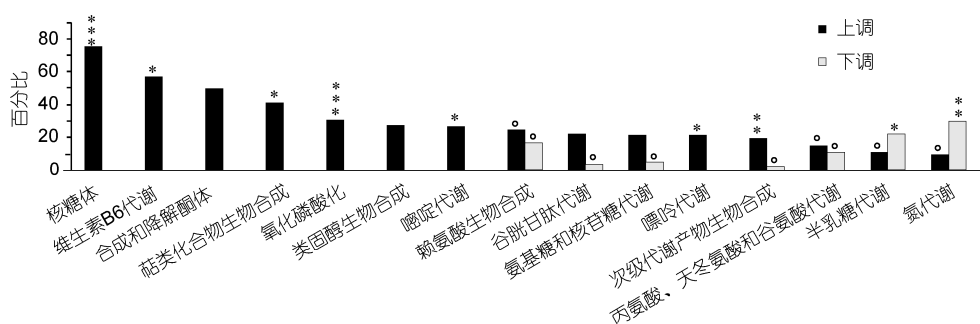


图2 石果衣真菌抗旱基因按照 KEGG 分类

黑色和白色柱体分别代表每个 KEGG 通路中上调和下调基因。*: $P \leq 0.01$; **: $P \leq 0.001$; ***: $P \leq 0.0001$; °: $P \geq 0.1$

有关抗氧化机制的研究表明,一般的抗旱物种可以通过一系列的抗氧化酶和小分子量抗氧化物来清除 ROS. 常见的抗氧化物酶包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶、过氧化物酶等; 抗氧化物包括谷胱甘肽(glutathione, GSH)和抗坏血酸盐等^[16,41,42]. 在石果衣真菌中,有 3 个基因编码抗氧化物酶(1 个 SOD 酶基因和 2 个过氧化物酶基因)在胁迫条件下上调表达(网络版附表 1). 然而,属于小分子抗氧化物的上调表达基因较多,包括硫氧还蛋白、谷胱甘肽和维生素 B6(网络版附表 1). 其中,7 个高表达量的硫氧还蛋白基因显著上调. 另外,在谷胱甘肽代谢通路中有 5 个谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)在胁迫条件下上调表达. 这一结果说明,石果衣真菌在响应干旱诱导的氧化胁迫条件下调控体内谷胱甘肽的代谢. 需要指出的是,在石果衣真菌中只发现有 3 个海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)基因(网络版附表 2),并且这 3 个基因都不是显著差异表达基因($P < 0.8$). 同样的,没有其他渗透压调节剂相关基因在石果衣真菌中差异表达. 此外,对分子伴侣和蛋白酶体基因的表达变化进行了研究. 结果表明,有 11 个分子伴侣,包括热激蛋白(heat shock protein, HSP)、热休克蛋白(GroEL)和伴侣蛋白(chaperonins)、以及 10 个蛋白酶体基因在石果衣真菌处于胁迫状态下显著上调表达(网络版附表 3).

生物能够在恶劣环境生存主要在于其细胞能够对恶劣环境做出迅速而有效的反应. 生物体需要有效的信号转导途径以搭建细胞与外界环境的信息交流. 因此,在胁迫条件下信号转导相关基因的表达被认为是极为多变的. 在石果衣真菌中,共有 40 个基因被注释为与信号转导相关,它们分别属于钙离子

介导信号通路、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路、TOR(target of rapamycin)信号通路、mTOR(mammalian target of rapamycin)信号通路和 G 蛋白耦联受体信号通路. 其中,有 4 个基因(1 个属于钙离子介导信号通路,3 个属于 MAPK 信号通路)是差异表达的(网络版附表 4),并且全部为下调表达.

转录因子是细胞响应外界胁迫以后主要调控某些基因转录的调控因子. 在石果衣真菌中,共有 25 个转录因子基因在胁迫条件下差异表达. 这 25 个转录因子分属于 15 个种类,包括 zinc finger, TFIIA(transcription initiation factor II A), heat shock, MADS(MCM1, agamous, deficiens, serum response factor), P53, NAC(NAM, ATAF, and CUC), DIP2(disco-interaction protein 2), MYB, bZIP(basic-leucine zipper), Nus A, CBF, FOX, MEIS1, GATA 和 Cmr1. 其中有些转录因子已经在植物和真菌中被报道参与抗非生物胁迫^[43-47]. 其中,7 个基因上调表达,18 个基因下调表达(网络版附表 5). 这些差异表达的转录因子将会对今后研究地衣型真菌基因的表达调控提供重要信息.

2.3 石果衣真菌中其他抗旱机制揭示其干旱适应机制

除了以上提到的在真核生物中普遍存在的抗旱机制以外,在石果衣真菌中还有其他差异基因被注释(图 2). 这些差异基因可以被归类成以下几种: (i) 核糖体蛋白. 如图 2 所示,最显著上调表达的基因是核糖体蛋白,超过 70%的核糖体蛋白是上调的; (ii) 嘌呤和嘧啶代谢. 其中一些基因的上调表达(网络版附表 6)说明,在干旱胁迫下石果衣真菌合成 DNA 和

RNA 的速度加大; (iii) 氧化磷酸化. 氧化磷酸化是最具显著性差异的表达通路之一. 在石果衣真菌胁迫样品中, 编码腺苷三磷酸酶(ATPase), NADH-泛醌氧化还原酶(NADH-ubiquinone oxidoreductase), Fe-S 蛋白(Fe-s protein)和细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase)的全部基因都是上调表达的, 并且氧化磷酸化通路中没有下调表达的基因(网络版附表 7); (iv) 氮代谢. 石果衣真菌中, 氮代谢中的差异基因都是显著下调的(网络版附表 8), 其中的下调表达基因标记在氮代谢简图中(图 3). 谷氨酸盐(glutamate)作为细胞内代谢的重要组分, 在氮代谢通路中是由铵(ammonium)通过谷氨酸盐合成酶(glutamate synthase, EC 1.4.1.13)和精氨酸合成酶(asparagine synthase, EC 6.3.5.4)的作用合成的; 铵是由甲酰胺(formamide)和硝烷基(nitroalkane)通过乙酰胺酶/甲酰胺酶(acetamidase/formamidase, EC 3.5.1.49)和硝基丙烷双加氧酶(2-nitropropane dioxygenase, EC 1.13.12.16)的催化作用产生的, 而这些酶都是下调表达的(网络版附表 8). 这一结果说明, 在 PEG 胁迫处理条件下细胞通过抑制氮代谢通路来减少谷氨酸盐的产生. 然而, 上调表达谷胱甘肽代谢中相关基因, 会通过谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, EC 2.5.1.18)的催化来回补氮代谢减少的谷氨酸盐(图 3, 网络版附表 8). 尽管有些研究证实其他生物中氮代谢会受到一些胁迫的影响^[48,49], 但是关于氮代谢在抗逆境机制中起到的作用尚不清楚. 在石果衣真菌中, 氮代谢中差异表达基因可能是由于抗旱机制——谷胱甘肽代谢活跃的反馈抑制作用; (v) 碳代谢, 包括半乳糖和核苷糖代谢(网络版附表 8). 在半乳糖进入糖酵解途径之前, 需要通过半乳糖激酶(galactokinase, EC 2.7.1.6)、半乳糖氧化酶(galactose oxidase, EC 1.1.3.9)和半乳糖脱氢酶(galactonate dehydrogenase, EC 4.2.1.6)的催化作用转换成三磷酸甘油醛(glyceraldehydes-3P). 其中, 作为半乳糖代谢中不可缺少的酶——半乳糖氧化酶和半乳糖脱氢酶都显著下调表达(网络版附表 8). 这 2 个酶的差异表达将会导致半乳糖的积累, 而积累的半乳糖则会通过氨基酸和核苷糖代谢转变成核苷半乳糖. 在核苷糖代谢通路中(图 4), 各种糖类会通过一个模式的途径在激酶(kinases, EC 2.7.1.-)、磷己糖变位酶(α -D-phosphohexomutase, EC 5.4.2.-)和核苷酸转移酶(nucleotidyl transferase, EC 2.7.7.-)的催化作用下转变成核苷糖.

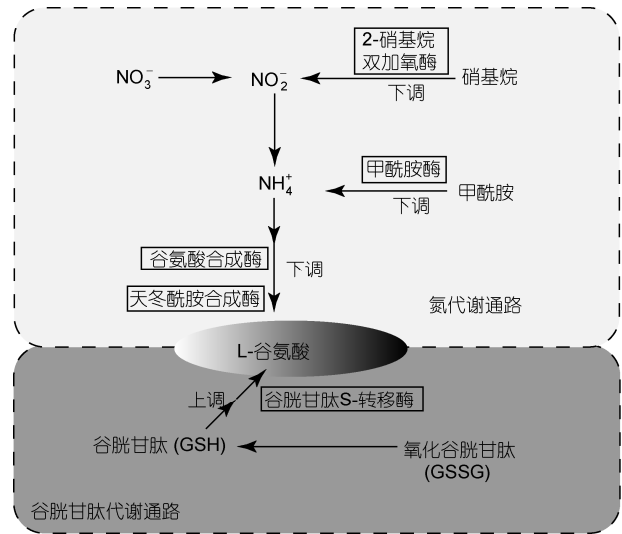


图 3 氮代谢和谷胱甘肽代谢通路

上调和下调表达的基因编码的蛋白所参与的反应分别在图中标记

其中, 后 2 种酶在胁迫样品的转录组数据中是上调表达的(网络版附表 8), 这表明, 在石果衣真菌抗旱过程中会产生大量的核苷糖. 而且, 几丁质合成酶基因的上调表达说明会大量合成几丁质, 由此可能会增加细胞壁的厚度从而防止细胞内水分流失.

2.4 荧光定量分析差异基因在地衣体脱水过程中的转录水平

地衣型真菌在自然环境中是处于共生状态的, 而转录组测序所用的材料是分离培养的地衣型真菌. 为了验证石果衣真菌在共生和分离状态下的抗旱机制是否一致, 在转录组中选取 23 个差异基因(表 1), 用荧光定量的方法进行研究. 选取的 23 个基因来自转录后调控机制、渗透压调节机制、能量供应、损伤修复(包括核糖体蛋白、嘌呤和嘧啶代谢)和碳氮代谢(包括核苷糖和半乳糖代谢).

由于生长在自然环境中地衣体的含水量难以测定, 本研究将地衣体含水量的测定移至室内进行: (i) 对于采集的新鲜地衣体在实验室条件下进行完全复水; (ii) 将其置于室温下进行自然脱水处理; (iii) 按不同时间段记录其随时间变化的相对含水量. 结果如图 5 所示. 地衣体在脱水处理后的前 120 min 脱水速度明显较快, 而在 150 min 以后其相对含水量无明显变化且趋于零. 表明在该时间点地衣体的游

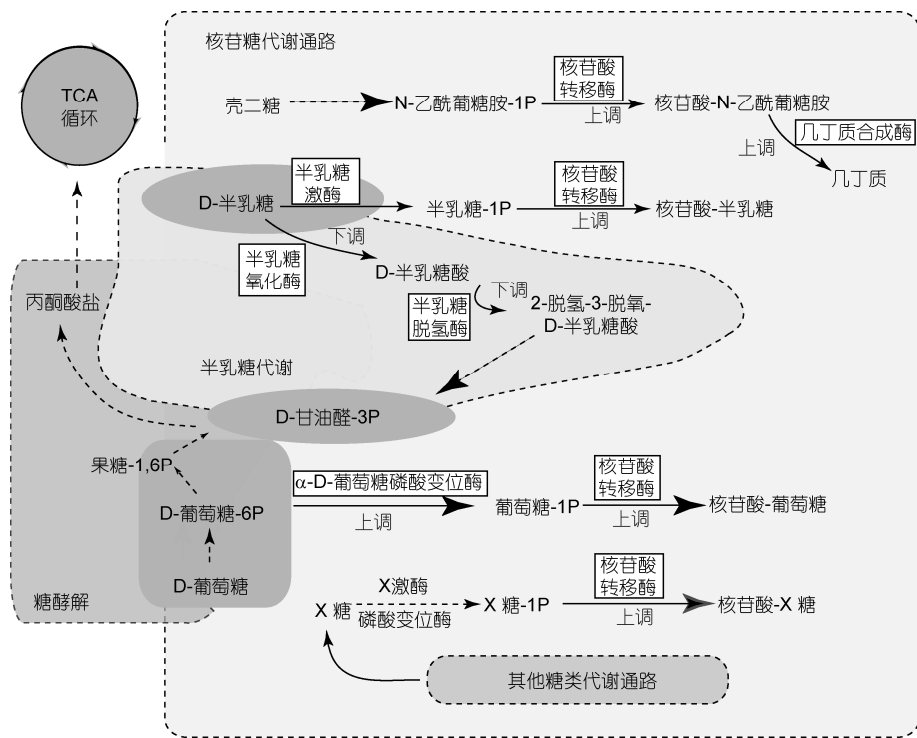


图 4 核苷酸和半乳糖代谢通路

上调和下调表达基因编码的蛋白所参与的反应分别在图中标记

表 1 qRT-PCR 实验所选择的验证基因

代谢通路	基因号	注释	胁迫转录组中表达量	对照转录组中表达量
核糖体	F481_05528	40S 核糖体蛋白 S3Ae	739.98	193.08
	F481_05538	核糖体蛋白 S10	1380.97	257.81
嘌呤和嘧啶代谢	F481_00996	二磷酸核苷激酶	4654.23	209.72
	F481_02100	dUTP 焦磷酸激酶	108.25	17.32
过氧化物酶	F481_03410	Dyp-type 过氧化物酶	111.81	16.58
谷胱甘肽代谢	F481_02789	谷氨酸 S-转移酶, C 端结构域	227.39	69.51
	F481_06421	硫氧还蛋白	1736.00	241.98
维生素 B6 代谢	F481_00322	磷酸吡哆醛合成酶	1206.83	91.60
	F481_02092	吡哆醛激酶	15.00	3.74
氧化磷酸化	F481_04003	复合物 1 LYR 蛋白	242.52	49.53
	F481_02166	ATP 酶, F0 复合物, 亚基 B	815.06	121.74
	F481_01557	细胞色素 C 氧化酶, 亚基 VIb	1274.81	329.34
蛋白酶体	F481_04061	蛋白酶体, 亚基 α/β	399.41	62.11
	F481_03276	蛋白酶体, 亚基 $\beta, 3$ 型	552.61	69.64
分子伴侣	F481_05773	GroES-like	1284.79	178.94
	F481_07753	热激蛋白 70 kD	314.87	63.86
海藻糖 6-磷酸合成酶	F481_01316	海藻糖 6-磷酸合成酶	61.13	37.70
氮代谢	F481_06302	谷氨酸合成酶亚基 α	14.40	124.63
	F481_07075	亚硝酸盐合成酶	3.41	158.61
半乳糖代谢	F481_03176	D-半乳糖脱氢酶	10.09	159.01
	F481_05966	半乳糖氧化酶, 中心结构域	7.79	31.83
核苷酸代谢	F481_07291	核苷酸转移酶	145.63	29.90
	F481_00358	N-乙酰转移酶	238.40	64.84

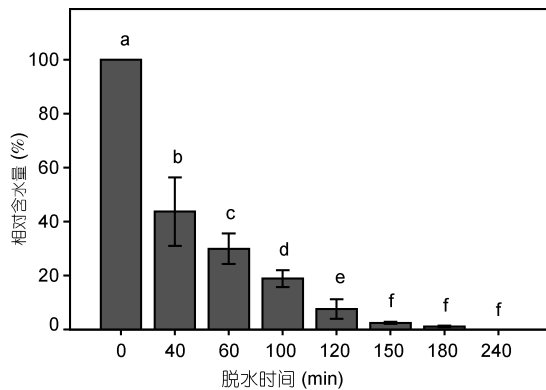


图5 石果衣地衣体在自然脱水过程中的相对含水量变化 ($n=3$)

不同字母代表具有显著性差异

离水已被全部脱去, 细胞在该时间点感受到脱水所造成的胁迫. 因此, 在荧光定量实验中将 150 min 的相对表达量设置为 1. 选择脱水 0, 40, 60, 150, 240 min 5 个时间点分析候选基因的转录水平, 并将 150 和 240 min 2 个时间点视作脱水胁迫点. 为了比较随着脱水时间相对表达量的变化, 利用相对表达量的 $\log_2$ 值绘制 heat-map 图.

结果如图 6 所示, cluster 分析将验证基因按照其

转录变化趋势分为 4 类. 在第(1)组中(标记为蓝色), 基因的转录水平在脱水过程的前 60 min 为上调, 在脱水 60~150 min 为显著下调. 值得注意的是, 在 150 min 以后这些基因的转录水平又有明显的回升, 并且在脱水 240 min 时的转录水平高于刚开始脱水的值. 这种结果表明, 这些基因很可能是在地衣体抗旱过程中起作用的基因. 属于这一组的基因是选自抗氧化机制(维生素 B6 和谷胱甘肽)、HSP、氧化磷酸化和糖类代谢(核苷糖代谢和半乳糖代谢). 在第(2)组中(标记为黄色), 基因的转录水平在 150 min 时间点略微低于其他时间点, 但是在整个脱水过程中却没有显著波动. 属于这一组中的基因有嘌呤和嘧啶代谢中的基因、蛋白酶体、海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)和 GroES 基因. 这些基因的转录水平变化说明, 它们在地衣体自然脱水条件下的转录水平相对恒定. 形成这种现象可能的原因是, 在时间点 0 min 以前, 细胞在自然条件下已经处于长期的干旱胁迫状态, 这些基因的表达量有可能还没有回落就又经历了脱水胁迫. 这些基因在地衣体干、湿 2 种状态下都有很高的表达量, 可被视为持家基因. 在第(3)组中(标记为

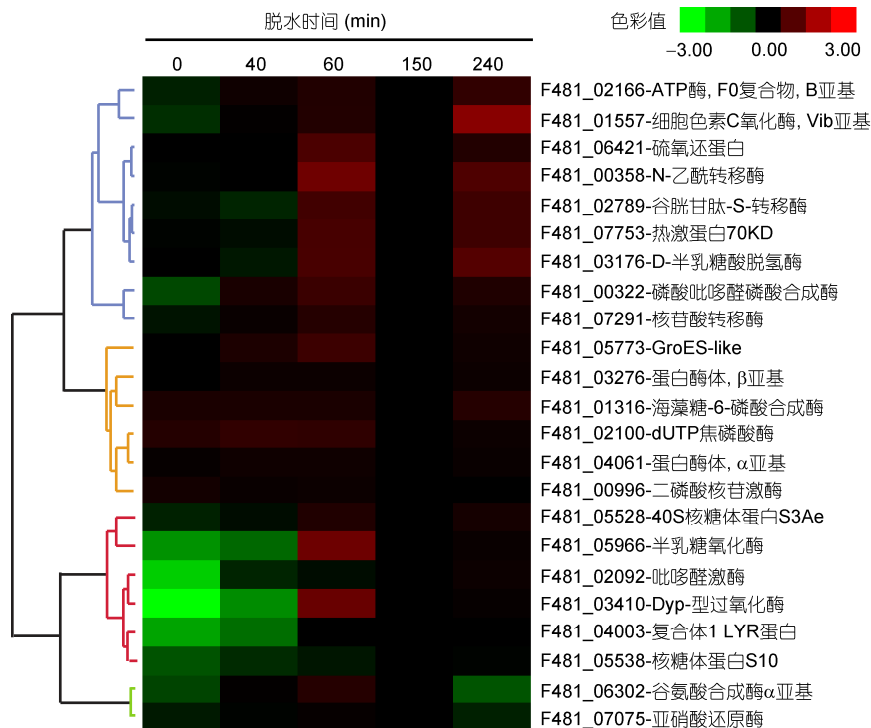


图6 石果衣地衣体在脱水过程中差异基因的转录水平变化

红色), 基因在前 3 个时间点的转录水平变化与第(1)组中的基因相同, 但是上调趋势更为显著; 并且在后 2 个时间点的相对表达量明显高于前 3 个时间点. 因此, 可以将这一组中的基因定义为石果衣真菌抗旱机制相关基因, 因为在脱水胁迫条件下, 这些基因的相对表达量反而更高. 属于这一组的基因有编码核糖体蛋白的基因、半乳糖代谢酶类和抗氧化机制中的基因(维生素 B6 代谢和过氧化物酶). 在第(4)组中(标记为绿色), 基因的转录水平在整个脱水过程中呈现钟形曲线, 与前 3 组中基因的不同在于低含水量时, 这些基因的转录水平明显下调. 属于这一组的基因不属于典型的抗旱机制基因, 在本研究中的氮代谢基因便属此类.

综上所述, 供试的 23 个基因的转录水平均于脱水 60 min 时达到最大值, 这说明, 地衣型真菌基因的转录在复水以后需要一段时间来开启. 转录组数据中的抗旱相关基因的转录变化在共生状态样品中呈现多种形式. 前 3 组中的基因可被定义为抗旱相关基因, 因为它们在含水量较低时(脱水 150 min 以后)仍能有很高的转录水平. 尽管第(2)组中的基因在脱水过程中并未展现出明显的差异变化, 但是, 由于它们在含水量较低时仍能维持同样的转录水平, 因此, 也可被列为抗旱相关基因.

3 讨论

本研究采用分离自沙漠地区的优势地衣——石果衣真菌, 通过 PEG 胁迫处理进行转录组测序, 共找到 1781 个差异基因, 这些信息为今后对地衣型真菌抗旱机制和功能基因组的研究奠定基础.

如图 1 所示, 大部分差异表达基因与代谢相关. 这一现象说明, 石果衣真菌在 PEG 诱导的干旱胁迫状态下有相对活跃的代谢过程, 这是荒漠地衣石果衣真菌与其他抗旱生物之间的重要区别之一. 因为在干旱胁迫条件下, 抗旱生物的代谢活动会受到抑制^[50-52]. 这一结果表明, 石果衣真菌可能是一种干旱适应型物种.

3.1 石果衣真菌中涉及真核生物中普遍存在的抗旱机制的基因

真核生物中普遍存在的抗旱机制包括: 抗氧化胁迫、渗透压调节和翻译后加工. 本研究结果显示,

石果衣真菌具有上述整套的抗氧化机制.

维生素 B6 有 3 种形式: 吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺, 参与多种生化反应^[53]. 近期的研究表明, 维生素 B6 在抗氧化胁迫中, 起重要作用. 例如, 在丝状真菌 *Cercospora nicotianae* 中, 维生素 B6 可以防止 ROS 导致的细胞死亡^[54]; 在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 沉默吡哆醇合成酶基因 *pdx1* 会导致细胞对渗透和氧化胁迫的敏感性^[55]. 因此, 可以解释石果衣真菌中维生素 B6 生物合成基因的显著上调表达(网络版附表 1, 图 2). 有关地衣抗氧化机制的研究, 仅 SOD 和谷胱甘肽的作用见过报道^[56]. 然而, 本研究展示出比较全面的石果衣真菌的抗氧化机制, 而且, 也是首次报道小分子量抗氧化剂和维生素 B6 参与地衣型真菌的抗氧化机制.

分子伴侣可以直接指导蛋白的折叠和装配, 其作用机制包括重新折叠胁迫条件导致的变性蛋白. 分子伴侣包括多个家族, 如 HSP, GroEL 和 chaperonins, 每个家族中的蛋白以不同的方式指导蛋白的折叠. 比如, HSP 家族中蛋白主要在高温和细胞内损伤胁迫条件下上调表达; 而 GroEL 主要参与协调由大分子聚合导致的折叠效率低下现象. 蛋白酶体的主要作用是降解不必要的蛋白和损伤蛋白^[57,58], 而且在其他生物受到胁迫时被诱导上调表达^[59,60]. 上调分子伴侣基因的表达水平表明, 石果衣真菌在干旱胁迫下可以通过上调分子伴侣基因来解决蛋白错误折叠和聚合所出现的问题, 并且蛋白酶体的上调表达说明石果衣真菌体内也开启了清除无用蛋白的能力^[61].

目前对调节渗透压的了解主要参考对抗旱植物的研究报道^[62], 已经被报道的渗透剂有糖类、脯氨酸、丙二醛和钾^[63,64]. 其中, 在真菌中海藻糖被认为是最重要的渗透压调节剂^[65,66]. 没有渗透压调节相关基因的差异表达表明, 这些在其他抗旱生物中普遍存在的渗透调节剂在石果衣真菌经历 PEG 介导的干旱胁迫时未被诱导, 这意味着在石果衣真菌中, 可能存在其他种类的渗透压调节剂, 或者那些已知的调节剂在地衣型真菌中有恒定的转录水平.

近期研究表明, 真菌在受到非生物胁迫时会诱导一系列信号转导基因的差异表达, 如环腺苷酸信号通路(cAMP signaling pathway)、钙离子依赖的蛋白激酶(Ca^{2+} -dependent protein kinases, CDPKs)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)、蛋白激酶 C(protein kinase

C, PKC)和 Hog1 MAPK 通路^[67~70]. 在石果衣受到 PEG 诱导胁迫时, 1 个钙调信号相关基因和 3 个 MAPK 信号通路相关基因的差异表达表明, 在外界干旱胁迫时至少有 2 个信号通路参与响应信息, 所涉及的差异基因有进一步研究的价值.

3.2 石果衣真菌的干旱适应机制

考虑到石果衣极强的抗旱能力, 有理由认为在其真菌中会存在一些不同于其他生物的干旱响应机制.

核糖体是一类复杂的核糖核蛋白复合物, 在生物体的细胞中负责多肽的合成, 因此, 核糖体蛋白的表达变化直接影响细胞内蛋白质的翻译过程. 一般来说, 编码核糖体蛋白的基因是随环境和细胞内需求的改变而改变的, 例如, 增加营养、热胁迫和饥饿(氨基酸/氮缺乏)胁迫等^[71~73]. 核糖体基因的表达还与细胞是否处于不同生长阶段有关, 在生长指数期一般上调表达, 在平稳期一般下调表达. 近期有研究表明, 核糖体亚基作为调控原件或过滤器控制一些特定 mRNA, 从而参与翻译过程的分子间互作, 控制某些特定基因的翻译过程^[74]. 由此可以推断, 由于干旱胁迫的诱导, 石果衣真菌上调表达核糖体基因以表达大量特定抗旱相关蛋白, 以应对干旱胁迫. 这种现象也发生在其他抗旱生物中^[75~77]. 分析表明, PEG 介导的干旱胁迫影响并加速石果衣真菌细胞内转录和翻译过程, 说明它的抗旱反应机制非常活跃, 通过上调核糖体基因和嘌呤、嘧啶代谢相关基因来修复损伤的 DNA、RNA 和蛋白质.

几乎所有的需氧生物都需要 ATP 来提供生命体正常代谢所需要的能量, 而 ATP 主要是由线粒体内氧化磷酸化通路所提供的. 在其他真菌和植物中, ATP 酶和 ATP 合成酶基因的转录情况都是在胁迫处理条件下被抑制的^[78,79]. 然而, 在石果衣真菌中却相反, 表明石果衣真菌不同于干旱敏感物种, 更适应干旱环境.

半乳糖代谢和核苷糖代谢中的基因差异表达说明石果衣真菌在干旱胁迫条件下能够调节糖类物质的存在形式——减少单糖, 增加多糖的合成. 目前已有许多有关糖类代谢受到干旱胁迫影响的研究报道^[80~82], 但是, 在大部分生物体内, 糖代谢基因的差

异表达都是为了调节细胞内外的渗透压. 然而, 几乎没有研究报道核苷糖代谢与抗旱机制之间的联系. 核苷糖是一类常见的糖基供体, 可以形成多糖、糖蛋白、糖脂和糖基化的次级代谢产物^[83], 核苷糖代谢中的基因之所以重要是因为这个通路可以控制细胞壁的成分^[84]. 在植物中, 糖基化的激素和次级代谢产物在细胞遭受生物和非生物胁迫时起到重要作用^[85,86]. 在地衣中, 共生菌通过产生一些有光吸收能力的次级代谢产物来防止其共生藻在干旱条件下受到光损伤^[87]. 由此可以推测出石果衣真菌中糖类代谢基因差异表达的原因. 不过, 这一推测尚需进一步的实验证据来证明石果衣中糖基化的次级代谢产物是否有光保护的作用.

综上所述, 这些差异基因代表了石果衣真菌一系列的干旱适应机制, 包括损伤修复、能量供应和碳、氮代谢的变化. 因此, 得出石果衣真菌为干旱适应物种的结论.

3.3 比较候选差异基因在 PEG 诱导胁迫和地衣体脱水胁迫中的转录水平

转录组数据中的抗旱相关基因在地衣体脱水胁迫实验中也进行了验证: 由荧光定量在地衣体脱水过程中得到的结果与转录组得到的结果大体一致. 然而, 半乳糖代谢基因在共生和分离培养的 2 种材料中结果不同, 主要是因为 2 种条件下共生菌的营养不同. 地衣体脱水实验是在实验室条件下进行的, 石果衣共生藻的光合作用比较微弱, 所以提供给共生菌的糖类也很有限; 相反, 分离培养的共生菌是培养在 PDB 培养基中, 其中含有丰富的碳源. 因此, 地衣体脱水实验其实相当于对共生菌进行脱水和饥饿双胁迫, 而转录组材料只是 PEG 诱导的干旱胁迫. 所以, 2 个实验中半乳糖代谢相关基因不一致的结果, 只是反映了不同胁迫处理的影响. 综上所述, 除了由饥饿胁迫导致的半乳糖代谢不同以外, 石果衣真菌在共生状态下脱水胁迫与分离培养的 PEG 诱导胁迫的抗旱机制和干旱适应机制本质上是一致的.

在转录组的差异基因中, 还有一部分基因是未知功能的, 这些基因可能参与地衣型真菌一些特殊的抗旱机制, 值得进一步研究.

参考文献

- 1 Brown D, Rapsch S, Beckett A, et al. The effect of desiccation on cell shape in the lichen *Parmelia sulcata* Taylor. *New Phytol*, 1987, 105: 295–299
- 2 Bewley J D. Physiological-aspects of desiccation tolerance. *Annu Rev Plant Physiol*, 1979, 30: 195–238
- 3 Oliver M J, Derek Bewley J. Desiccation-tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. *Hortic Rev*, 1997, 18: 171–213
- 4 Kappen L. Response to Extreme Environments. New York: Academic Press, 1973. 311–380
- 5 Aubert S, Juge C, Boisson A M, et al. Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta*, 2007, 226: 1287–1297
- 6 Kranner I. Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens. *New Phytol*, 2002, 154: 451–460
- 7 Lange O L. Experimentell-Ökologische Untersuchungen an Flechten der Negev-Wüste. I. CO₂-Gaswechsel von *Ramalina maciformis* (Del.) Bory unter kontrollierten Bedingungen im Laboratorium. *Flora*, 1969, 158: 324–359
- 8 Ascaso C, Brown D, Rapsch S. The ultrastructure of the phycobiont of desiccated and hydrated lichens. *Lichenologist*, 1986, 18: 37–46
- 9 Kranner I, Cram W J, Zorn M, et al. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3141–3146
- 10 Nash T, Reiner A, Demmig-Adams B, et al. The effect of atmospheric desiccation and osmotic water stress on photosynthesis and dark respiration of lichens. *New Phytol*, 1990, 116: 269–276
- 11 Tuba Z, Csintalan Z, Proctor M C. Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis*, ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: a baseline study at present-day CO₂ concentration. *New Phytol*, 1996, 133: 353–361
- 12 Calatayud A, Deltoro V I, Barreno E, et al. Changes in *in vivo* chlorophyll fluorescence quenching in lichen thalli as a function of water content and suggestion of zeaxanthin-associated photoprotection. *Physiol Plantarum*, 1997, 101: 93–102
- 13 Weissman L, Garty J, Hochman A. Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* and their response to rehydration. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 6508–6514
- 14 França M B, Panek A D, Eleutherio E C A. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperon*, 2005, 10: 167
- 15 Jiang M Y, Zhang J H. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J Exp Bot*, 2002, 53: 2401–2410
- 16 Kranner I, Birtic S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr Comp Biol*, 2005, 45: 734–740
- 17 Junttila S, Laiho A, Gyenesei A, et al. Whole transcriptome characterization of the effects of dehydration and rehydration on *Cladonia rangiferina*, the grey reindeer lichen. *BMC Genomics*, 2013, 14: 870
- 18 Wang Y Y, Liu B, Zhang X Y, et al. Genome characteristics reveal the impact of lichenization on lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* Hedwig (Verrucariales, Ascomycota). *BMC Genomics*, 2014, 15: 34
- 19 Veerman J, Vasil'ev S, Paton G D, et al. Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: the origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiol*, 2007, 145: 997–1005
- 20 Scheidegger C, Schroeter B, Frey B. Structural and functional processes during water vapour uptake and desiccation in selected lichens with green algal photobionts. *Planta*, 1995, 197: 399–409
- 21 Holder J, Wynn-Williams D, Rull Perez F, et al. Raman spectroscopy of pigments and oxalates *in situ* within epilithic lichens: *Acarospora* from the antarctic and mediterranean. *New Phytol*, 2000, 145: 271–280
- 22 张涛, 魏江春. 分离自石果衣的共生菌藻在干燥饥饿胁迫下存活能力分析. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 238–248
- 23 Lagerwer J, Eagle H E, Ogata G. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*, 1961, 133: 1486–1487
- 24 Caruso A, Chedford F, Carpin S, et al. Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 932–941
- 25 Vivas A, Marulanda A, Ruiz-Lozano J M, et al. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza*, 2003, 13: 249–256
- 26 Haas B J, Delcher A L, Mount S M, et al. Improving the *Arabidopsis* genome annotation using maximal transcript alignment assemblies.

- Nucleic Acids Res, 2003, 31: 5654–5666
- 27 Stanke M, Morgenstern B. Augustus: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. Nucleic Acids Res, 2005, 33: W465–W467
 - 28 Parra G, Blanco E, Guigó R. GeneID in *Drosophila*. Genome Res, 2000, 10: 511–515
 - 29 Ter-Hovhannisyan V, Lomsadze A, Chernoff Y O, et al. Gene prediction in novel fungal genomes using an ab initio algorithm with unsupervised training. Genome Res, 2008, 18: 1979–1990
 - 30 Haas B J, Salzberg S L, Zhu W, et al. Automated eukaryotic gene structure annotation using EVIDENCEModeler and the program to assemble spliced alignments. Genome Biol, 2008, 9: R7
 - 31 Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet, 2000, 25: 25–29
 - 32 Sonnhammer E L L, Koonin E V. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. Trends Genet, 2002, 18: 619–620
 - 33 Ruepp A, Zollner A, Maier D, et al. The funcat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Res, 2004, 32: 5539–5545
 - 34 Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome. Nucleic Acids Res, 2004, 32: D277–D280
 - 35 Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, et al. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. Genome Res, 2011, 21: 2213–2223
 - 36 Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. Nat Protoc, 2008, 3: 1101–1108
 - 37 Gotz S, Garcia-Gomez J M, Terol J, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2Go suite. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 3420–3435
 - 38 Bray E A. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol, 1993, 103: 1035–1040
 - 39 Ben-Zvi A P, Goloubinoff P. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. J Struct Biol, 2001, 135: 84–93
 - 40 Welch A Z, Gibney P A, Botstein D, et al. TOR and RAS pathways regulate desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2013, 24: 115–128
 - 41 Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol, 2002, 30: 620–650
 - 42 Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, et al. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. Physiol Plantarum, 2007, 129: 185–195
 - 43 Tamai K T, Liu X D, Silar P, et al. Heat-shock transcription factor activates yeast metallothionein gene-expression in response to heat and glucose starvation via distinct signaling pathways. Mol Cell Biol, 1994, 14: 8155–8165
 - 44 Damveld R A, Arentshorst M, Franken A, et al. The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. Mol Microbiol, 2005, 58: 305–319
 - 45 Guo M, Chen Y, Du Y, et al. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathog, 2011, 7: e1001302
 - 46 Voitsik A M, Muench S, Deising H B, et al. Two recently duplicated maize NAC transcription factor paralogs are induced in response to *Colletotrichum graminicola* infection. BMC Plant Biol, 2013, 13: 85
 - 47 Nicholls S, Traffon M, Enjalbert B, et al. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot Cell, 2004, 3: 1111–1123
 - 48 Debouba M, Maâroufi-Dghimi H, Suzuki A, et al. Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. Ann Bot, 2007, 99: 1143–1151
 - 49 Planchet E, Rannou O, Ricoult C, et al. Nitrogen metabolism responses to water deficit act through both abscisic acid (ABA)-dependent and independent pathways in *Medicago truncatula* during post-germination. J Exp Bot, 2011, 62: 605–615
 - 50 Dittami S M, Scornet D, Petit J L, et al. Global expression analysis of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae) reveals large-scale reprogramming of the transcriptome in response to abiotic stress. Genome Biol, 2009, 10: R66
 - 51 Foito A, Byrne S L, Shepherd T, et al. Transcriptional and metabolic profiles of *Lolium perenne* L. genotypes in response to a PEG-induced water stress. Plant Biotechnol J, 2009, 7: 719–732
 - 52 Gulez G, Dechesne A, Workman C T, et al. Transcriptome dynamics of *Pseudomonas putida* KT2440 under water stress. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 676–683
 - 53 Mooney S, Leuendorf J E, Hendrickson C, et al. Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. Molecules, 2009, 14:

- 329–351
- 54 Bilski P, Li M, Ehrenshaft M, et al. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol*, 2000, 71: 129–134
- 55 Chen H, Xiong L. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *Plant J*, 2005, 44: 396–408
- 56 Kranner I, Beckett R, Hochman A, et al. Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist*, 2008, 111: 576–593
- 57 Grune T, Reinheckel T, Davies K. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*, 1997, 11: 526–534
- 58 Sassa H, Oguchi S, Inoue T, et al. Primary structural features of the 20S proteasome subunits of rice *Oryza sativa*. *Gene*, 2000, 250: 61–66
- 59 Wu P, Wang X, Qin G X, et al. Microarray analysis of the gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 333–341
- 60 Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol*, 2006, 141: 910–923
- 61 Huang H, Moller I M, Song S Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *J Proteomics*, 2012, 75: 1247–1262
- 62 Chaves M M, Maroco J P, Pereira J S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol*, 2003, 30: 239–264
- 63 Shao H B, Liang Z S, Shao M A. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloid Surface B*, 2006, 47: 132–139
- 64 Ashraf M, Foolad M. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*, 2007, 59: 206–216
- 65 Hounsa C G, Brandt E V, Thevelein J, et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 1998, 144: 671–680
- 66 Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnol Adv*, 2010, 28: 169–183
- 67 Bahn Y S, Xue C, Idnurm A, et al. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 57–69
- 68 Alonso-Monge R, Roman E, Arana D M, et al. Fungi sensing environmental stress. *Clin Microbiol Infec*, 2009, 15: 17–19
- 69 Fernandes L, Araujo M A, Amaral A, et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*—inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res*, 2005, 4: 216–231
- 70 Brown S M, Campbell LT, Lodge J K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10: 320–325
- 71 Li B, Nierras C R, Warner J R. Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 5393–5404
- 72 Warner J R. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1989, 53: 256–271
- 73 Warner J R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 437–440
- 74 Mauro V P, Edelman G M. The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12031–12036
- 75 Adhikari B N, Wall D H, Adams B J. Desiccation survival in an Antarctic nematode: molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC Genomics*, 2009, 10: 69
- 76 Angelovici R, Galili G, Fernie A R, et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 211–218
- 77 Pearson G A, Hoarau G, Lago-Leston A, et al. An expressed sequence tag analysis of the intertidal brown seaweeds *Fucus serratus* (L.) and *F. vesiculosus* (L.) (Heterokontophyta, Phaeophyceae) in response to abiotic stressors. *Mar Biotechnol*, 2010, 12: 195–213
- 78 Piper P W. The heat-shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 134: 121–127
- 79 Tezara W, Mitchell V J, Driscoll S D, et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 1999, 401: 914–917
- 80 Toldi O, Tuba Z, Scott P. Vegetative desiccation tolerance: is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Sci*, 2009, 176: 187–199
- 81 Valliyodan B, Nguyen H T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 189–195

- 82 Abdel Latef A A H. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mycorrhiza*, 2011, 21: 495–503
- 83 Strominger J L. Nucleotide intermediates in the biosynthesis of heteropolymeric polysaccharides. *Biophys J*, 1964, 4: 139–153
- 84 Gibeaut D M. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol Bioch*, 2000, 38: 69–80
- 85 Roberts M R, Warner S A, Darby R, et al. Differential regulation of a glucosyl transferase gene homologue during defence responses in tobacco. *J Exp Bot*, 1999, 50: 407–410
- 86 O'Donnell P J, Truesdale M R, Calvert C M, et al. A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen- related signals. *Plant J*, 1998, 14: 137–142
- 87 Gauslaa Y, Solhaug K A. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia*, 2001, 126: 462–471