



丁香假单胞菌变种 *Pto*(*AvrB*)胁迫下大豆叶片转录组分析

张 雄, 徐鲁荣, 刘思岑, 张镇川, 刘志诚, 耿雪青

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘 要: *AvrB* 是丁香假单胞杆菌大豆致病变种分泌的 III 型效应蛋白因子之一, 为研究携带异源效应蛋白 *AvrB* 的丁香假单胞菌番茄致病变种 *Pto*(*AvrB*) 侵染大豆后的基因转录变化情况, 以大豆 Williams 82 为试验材料, 采用 RNA-seq 技术对不同菌株处理的大豆叶片进行基因表达谱差异分析, 探索大豆非寄主病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 携带的异源效应蛋白 *AvrB* 是否可以增加非寄主病原菌的致病性。结果显示: 共得到 43 422 个序列信息, 不同处理间共有序列为 37 611 个, 其中 *Pto*(*AvrB*) 处理组的序列信息最多。根据 GO 功能分析可以将基因根据功能分为分子功能、细胞成分和生物学过程 3 类, 其差异表达基因涉及信息传递、免疫、次生代谢等过程。KEGG 通路富集分析表明, 差异表达基因主要富集在植物激素信号转导、异黄酮生物合成、苯丙氨酸代谢、植物-病原体相互作用等通路中。在 RT-PCR 检测中发现 4 个随机挑选的差异表达基因的表达量与 RNA-Seq 的变化趋势一致, 说明 RNA-Seq 的结果可靠。研究结果有助于阐明 III 型效应蛋白因子促进病原菌致病效应的机理, 从而为分析 *AvrB* 在病原菌与大豆互作过程中的毒性功能研究和培育抗病大豆品种提供依据。

关键词: 大豆; 丁香假单胞杆菌; *Pto*(*AvrB*); RNA-seq; 差异表达基因

Transcriptome Analysis of Soybean Leaves Under the Stress of *Pseudomonas syringae*

ZHANG Xiong, XU Lu-rong, LIU Si-cen, ZHANG Zhen-chuan, LIU Zhi-cheng, GENG Xue-qing

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *AvrB* is one of the type III effector proteins secreted by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*, in order to study the changes of gene expression profile of soybean under biotic stress, we analyzed the difference of gene expression profiles of soybean leaves treated by different strains of *Pto* and *Pto*(*AvrB*) with RNA-seq technology in soybean Williams 82. And we explored whether the heterologous effector protein *AvrB* carried by the non-host pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* can increase the pathogenicity of non-host pathogens. A total of 43 422 unigenes were screened out, 37 611 common sequences between different treatments were coincident, and the *AvrB* treat group has the most sequence information. According to GO function analysis, genes can be divided into three major categories: Molecular function, cellular composition and biological process. The differentially expressed genes (DEGs) are widely involved in processes such as information transmission, immunity, and secondary metabolism. The KEGG pathway enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes were mainly enriched in pathways such as plant hormone signal transduction, isoflavone biosynthesis, phenylalanine metabolism, and plant-pathogen interaction. The expression levels of four randomly selected DEGs in the RT-PCR were in conformity with the RNA-Seq data, confirming the reliability of the RNA-Seq results. The research promotes us to understand the pathogenic mechanism of type III effector protein factor promoting pathogenic bacteria, and provides a basis for cultivating disease-resistant soybean varieties.

Keywords: Soybean; *Pseudomonas syringae*; *Pto*(*AvrB*); RNA-seq; Differentially expressed genes

大豆是我国最重要的经济作物之一, 但大豆在生长过程中容易受各种病虫害威胁, 严重影响大豆的产量和品质。大豆细菌性斑点病是由丁香假单胞菌大豆致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) 侵染引起的一种重要的大豆细菌病害, 大豆细菌性斑点病是威胁大豆产量的常见世界性病

害。而丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pto*) 可引起番茄细菌性斑点病, *Pto* 在与非寄主植物大豆互作时, 能引起大豆的非寄主抗性, 从而诱发非寄主抗性反应, 而非寄主抗性产生的原因之一就是对应的非病原物缺少特定的致病因子。基因组测序表明丁香假单胞菌基因

收稿日期: 2019-06-14

基金项目: 上海市国际科技合作基金 (17310742000); 上海交通大学“Agri-X”基金 (Agri-X 2016007)。

第一作者简介: 张雄 (1995-), 男, 硕士, 主要从事植物生物胁迫下抗性机制研究。E-mail: ZHANGXIONG233333@sjtu.edu.cn。

通讯作者: 耿雪青 (1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事植物生物胁迫下抗性机制研究。E-mail: xqgeng@sjtu.edu.cn。

组可能包含约 50 个或更多的效应蛋白基因编码各种宿主上的潜在无毒因子,且已证明几种无毒效应因子与病原体适应性功能相关,并且当未被宿主防御系统有效识别时可以增强病原菌毒力^[1]。

AvrB 是 *Pgy* 通过细菌三型分泌系统 (type three secretion system) 分泌的效应蛋白之一,在不含对应 R 基因的寄主植物中,AvrB 可以抑制植物的先天免疫反应,促进病原菌的毒性,效应蛋白对于许多植物和动物致病细菌的致病性是必需的^[2-3]。AvrB 在大豆和拟南芥中分别被 Rpg1-b 和 RPM1 所识别^[4-5]。在不含相应抗性基因的拟南芥和大豆中,AvrB 可以抑制植物的先天免疫反应,促进病原菌生长,引起宿主植物叶片萎黄^[4-6]。进一步研究表明,在没有对应的 RPM1 (resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1) 的拟南芥中,AvrB 在胞质中通过识别 RAR1 (required for Mla-resistance 1) 抑制 PAMP (pathogen-associated molecular patterns) 分子诱导胼质沉积,从而抑制植物的 PTI (PAMP-triggered immunity) 反应^[7]。AvrB 可以通过诱导拟南芥 MPK4 的磷酸化,激活 MPK4 的激酶活性,进而激活茉莉酸信号途径基因的表达,从而促进植物对病原菌的感病性^[8]。这一发现揭示 AvrB 是通过干扰植物激素信号转导来促进病原菌毒性的。

AvrB 是细菌Ⅲ型效应蛋白,其导致拟南芥宿主蛋白 RIN4 的修饰,随后激活 NB-LRR 蛋白 RPM1 (resistance to *preudomonas maculicola* 1)^[6,9]。大豆的抗性蛋白蛋白 RPG1-B (for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) 介导对表达无毒蛋白 AvrB 的特异性抗性,类似于拟南芥中 RPM1。感病大豆品种的 *Pgy* 感染导致褪绿和扩散病变,抗病品种产生 HR 反应^[10]。AvrB 诱导 RIN4 的磷酸化,是 RPM1 诱导的对表达丁香假单胞菌的 AvrB 的抗性所必需的^[6]。与拟南芥不同,大豆含有至少 4 种 RIN4 样蛋白 (GmRIN4a ~ GmRIN4d),沉默 GmRIN4a 或 GmRIN4b 消除了 RPG1-B 对表达 AvrB 的丁香假单胞菌的抗性,大豆 (RPG1-B) 对 GmRIN4a 或 GmRIN4b 的沉默没有表现出组成型的防御反应诱导^[11]。与 RPM1 类似,RPG1-B 不直接与 AvrB 相互作用,但与来自大豆的 RIN4 蛋白结合^[12-13]。AvrB 在拟南芥中具有多个靶标,表明不同的 NB-LRR (nucleotide binding-leucine-rich repeat) 受体可能已经进化以监测Ⅲ型效应蛋白的独立靶标的完整性^[14]。然而,尽管 AvrB 的毒性功能研究已经取得了一些进展,但是 AvrB 如何抑制非病原菌诱

导的抗性反应的报道却较少。

近些年,随着高通量测序的不断发展,转录组学的应用也越来越广。转录组即是 1 个活细胞在某种条件下所转录出来的所有 RNA 的总和,是研究细胞表型和功能的重要手段^[15]。对转录组数据进行分析可以获得基因的功能、表达水平、及相关代谢途径等信息,是对不同条件下生物的生物过程及其分子机理研究的有效手段。成舒飞等^[16]在大豆的全基因组水平上筛选鉴定出了 304 个 MYB 类转录因子,并对其进行了分类和保守结构域分析。张峰等^[17]对大豆矮化和赤霉素调控基因的关系进行了研究,杨楠等^[18]发现了蜡梅花花色同苯丙烷代谢途径相关。由此可见,转录组学有效的应用于生物学的各个方面。

本研究以大豆为材料,通过在转录水平上分析 *Pto* 携带异源效应蛋白 AvrB 侵染大豆的基因表达变化,进一步从功能注释、功能分类及代谢通路富集揭示 AvrB 诱导的差异表达基因情况,以期揭示 AvrB 是如何通过调控宿主植物基因表达来抑制非病原菌诱导的抗性、促进非病原菌的毒性,从而为大豆的抗病育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆 Williams 82 品种幼苗置于 12 h 光照/12 h 黑暗的光照培养箱中生长,光照温度和黑暗温度分别为 25℃ 和 20℃。

三氯甲烷、无水乙醇、DEPC 水和异丙醇购于上海生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 侵染和取样 将 pVSP61 载体和 pVSP61-AvrB 载体 (来源于美国俄亥俄州立大学 Dr. David Mackey 实验室) 分别转化到 *Pto*, 获得 *Pto* (EV) 和 *Pto* (AvrB) 菌株。分别在含有利福平 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和卡那霉素 (75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 KingB (KB) 固体平板培养基上,于 28℃ 培养 *Pto* (EV) 和 *Pto* (AvrB)。将菌液溶解在含 0.04% Silwet L-77 的 10 mM MgCl_2 中,浓度为 $\text{OD}_{600} = 1 (2 \times 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1})$ 。用高压小喷壶将菌株溶液接种到大豆幼苗的叶片上,设置只接种 H_2O 的对照处理,共设 H_2O 对照、*Pto* (EV) 和 *Pto* (AvrB) 3 种处理。待接种的叶片干燥后,于培养箱继续培养大豆植株 10 h,而后从 3 种处理大豆植株上分别选取部位基本相同的叶片,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存。3 次生物学重复。

1.2.2 测序文库的构建 将各处理 3 次生物学重复的样品混在一起,采用 Trizol 法^[19] (TRIZol Reagent, Life Technologies) 提取大豆叶片总 RNA,使用 NanoDrop-2000 核酸分光光度计检测浓度并定量,并且使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。用 DNaseI 去除质量合格的 RNA 中的 DNA,用 Oligo (dT) 磁珠 [Anchored oligo (dT)₂₃ primers, Sigma] 富集 mRNA,然后用打断 buffer 将 mRNA 裂解成 200 bp 的小片段。以此 mRNA 小片段为模板,加入随机引物逆转录合成 cDNA,纯化 cDNA,进行末端修复,加碱基 A 和测序连接头。利用琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,进行 PCR 扩增并完成文库构建。用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI Step One PlusReal-Time PCR System 对构建好的文库进行质检,检测合格后委托深圳华大基因科技有限公司完成测序。

1.2.3 大豆叶片转录组生物信息学分析流程 测序得到的原始图像数据经 base calling 操作转化为原始序列数据 (raw data 或 raw reads),过滤后的数据 (clean reads) 进行碱基的组成和质量值分布绘制。用软件 Bowtie2 将 clean reads 比对到参考序列与基因组序列,计算基因和转录本的表达水平。

1.2.4 差异表达基因的筛选 利用 DESeq 对样品进行组间的差异表达分析^[20],从而获得不同组间的显著差异表达基因。Fold Change 表示所对比的两个处理间各基因表达量的比值。当 log₂Fold Change < 0 时,差异基因是下调的,当 log₂Fold Change > 0 时,差异基因是上调的。筛选阈值为 |log₂Fold Change| ≥ 1 且 FDR < 0.01。分析 *Pto*(EV) 处理与水处理 (*Pto*-vs-H₂O)、*Pto*(*AvrB*) 处理与 *Pto*(EV) 处理 (*AvrB*-vs-EV) 的差异表达基因,绘制维恩图。

1.2.5 GO 基因功能注释和 KEGG 代谢通路分析 通过 BLAST 软件比对到 NR、GO、KEGG 数据库,从而获得差异基因的注释信息,进而对差异基因进行分类,同时进行显著富集分析。将 Q value ≤ 0.05 的通路定义为在差异表达基因中显著富集的通路,并对各组出现的 DEGs 富集的可信度较高的通路进行了比较分析。

1.2.6 qRT-PCR 验证 为了验证转录组数据的可靠性,采用定量 PCR 验证差异表达基因,随机选定 4 个基因进行验证。使用 Trizol 试剂从研磨的不同处理的冷冻叶片组织中提取 RNA,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染。而后采用 Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒进行反转录,将稀释 10 倍后的反转录混合液作为模板,使用 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (TaKaRa) 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应,3 次生物学重复。扩增条件为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 延伸 30 s,循环 40 次。

基因引物序列如表 1 所示,其中 GLYMA_20G141600 基因为内参基因, GLYMA_09G164500 是编码大豆转运蛋白 metal-nicotianamine transporter 的基因 *YSL7*, GLYMA_18G029300 是编码大豆抗性蛋白 nematode resistance protein-like 的基因 *HSPRO2*, GLYMA_01G037200 是编码大豆金属蛋白酶的基因 *metalloendoproteinase 5-MMP*, GLYMA_20G068300 是编码大豆转运蛋白 metal-nicotianamine transporter 的基因 *YSL1*。

1.3 数据分析

使用 Excel 2013 软件分析数据,采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行基因的相对定量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因编号 Gene number	引物序列 Primer sequence
GLYMA_20G141600	正向:5'-GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC-3'
	反向:5'-ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG-3'
GLYMA_09G164500	正向:5'-GTTCTACACAGCTACTGACCA-3'
	反向:5'-CCTTATCATACCAATCACCTC-3'
GLYMA_18G029300	正向:5'-GTGCTCTCCAGAACCTTCC-3'
	反向:5'-TCTTTAGCCTCAAGAAATCGTC-3'
GLYMA_01G037200	正向:5'-ACTTCAACCTCAACATCACAG-3'
	反向:5'-GCCAAACACGGTCTTAATCAC-3'
GLYMA_20G068300	正向:5'-CCTTCTTGCTTTCTGTTTGTG-3'
	反向:5'-GATTGTTACCCTCAGTCCCA-3'

2 结果与分析

2.1 测序质量分析

对不同处理的大豆叶片取样进行转录组测序,从而获得转录组数据。大豆叶片测序得到的 raw reads 在过滤后得到的 clean reads 的比例较高,均在 96% 以上,说明测序质量较好。使用 HISAT 将过滤所得的数据比对到参考基因组序列,比对结果统计如表 2 所示:各个样品的基因序列与参考基因组序

列的比对率较高, *Pto* 处理吻合程度最低,为 96.84%, H_2O 和 *Pto* (*AvrB*) 处理吻合程度均为 96.85%,说明大豆基因组比对较为完全。在各个样品的基因序列中,大于 30 bp 序列的碱基数占 90% 左右,且大多数 reads 在基因组的唯一位置。对不同病菌处理组和对照组的大豆叶片进行了转录组测序分析,基因组比对结果表明,此次转录组测序数据质量较好,可以满足转录组后续分析的基本要求。

表 2 转录组数据质量分析
Table 2 Analysis of data mapped quality in transcriptome

处理 Treatment	H ₂ O	<i>Pto</i> (EV)	<i>Pto</i> (<i>AvrB</i>)
全部序列 Total reads	21858621	21858270	21181965
数据过滤后序列 Total clean reads	21169212 (96.85%)	21167787 (96.84%)	21181965 (96.85%)
可定位序列 Total mapped reads	20453692.63 (96.62%)	20568738.63 (97.17%)	20593106.37 (97.22%)
数据过滤后序列中大于 30 bp 序列的碱基数占总碱基数的比例 Clean Reads Q30/%	90.33%	90.93%	89.95%
多定位序列 Multiple mapped	4974765 (23.50%)	5065451 (23.93%)	5164163 (24.38%)
唯一定位序列 Uniquely mapped	15478928 (73.12%)	15503287 (73.24%)	15428943 (72.84%)

2.2 基因表达水平分析

通过大豆转录组测序产生的基因表达量分析, H_2O 对照、*Pto* (EV) 和 *Pto* (*AvrB*) 处理分别获得 41 051, 39 723 和 40 895 条转录水平上参考基因的序列信息,其中共有的序列信息为 36 711 条(图 1)。

表 3 不同表达水平间的基因数量统计表
Table 3 The number of genes in different expression levels

FPKM	H ₂ O	<i>Pto</i> (EV)	<i>Pto</i> (<i>AvrB</i>)
≤1	13048 (31.79%)	13137 (33.08%)	12378 (30.27%)
1~10	15576 (37.94%)	14472 (36.43%)	15999 (39.12%)
≥10	12427 (30.27%)	12114 (30.49%)	12518 (30.61%)

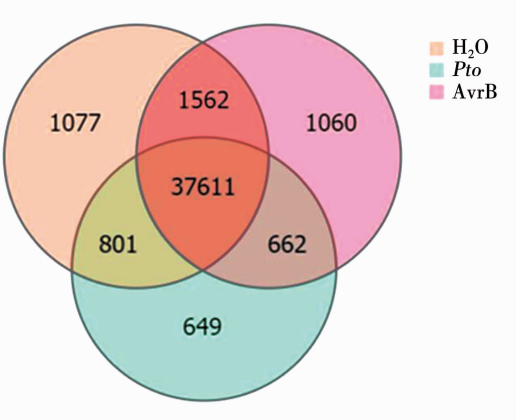


图 1 不同处理组的基因表达量维恩图
Fig. 1 Venn diagram of gene expression in different treatment groups

以 FPKM >1 为标准筛选表达显著的基因,结果发现有 68.21% 的基因在 H_2O 对照处理的大豆叶片中显著表达,66.92% 的基因在 *Pto* (EV) 处理的大豆叶片中显著表达,69.73% 的基因在 *Pto* (*AvrB*) 处理的大豆叶片中显著表达(表 3)。

2.3 差异表达基因分析

筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 维恩图结果显示: *Pto*-vs- H_2O 、*AvrB*-vs-EV 特有的差异表达基因分别为 2 265 和 3 370 个,在 2 个处理组均出现的差异表达基因为 3 041 个。所有基因表达量的火山图可以清晰、直观的看出不同处理的大豆差异基因的表达情况,其中, *Pto*-vs- H_2O 组中获得差异表达基因 5 306 个,其中表达上调基因 1 754 个,表达下调基因 3 552 个, *AvrB*-vs-*Pto* 组中获得的差异表达基因 6 411 个,其中上调基因 4 672 个,下调基因 1 739 个(图 3)。

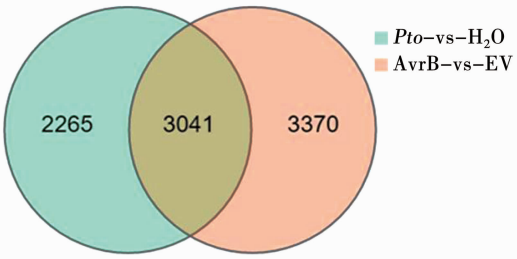


图 2 差异基因维恩图
Fig. 2 Venn diagram of DEGs

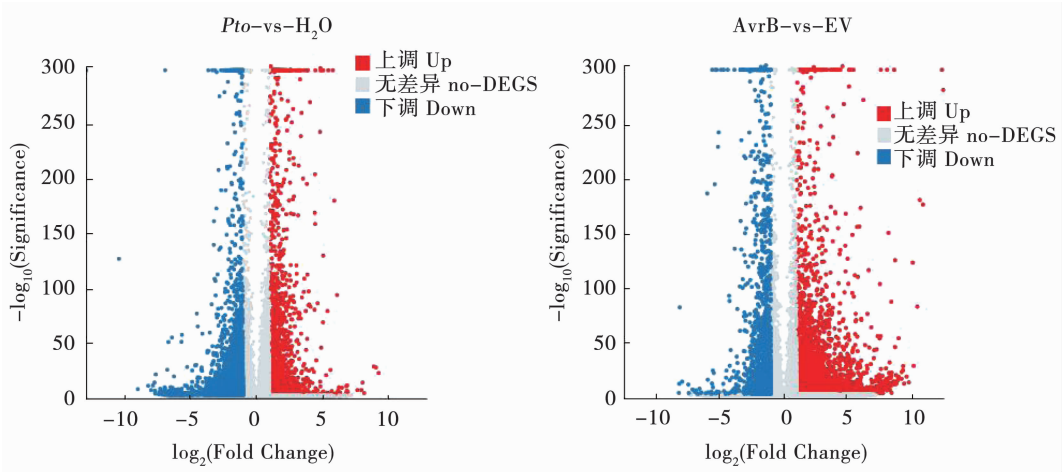
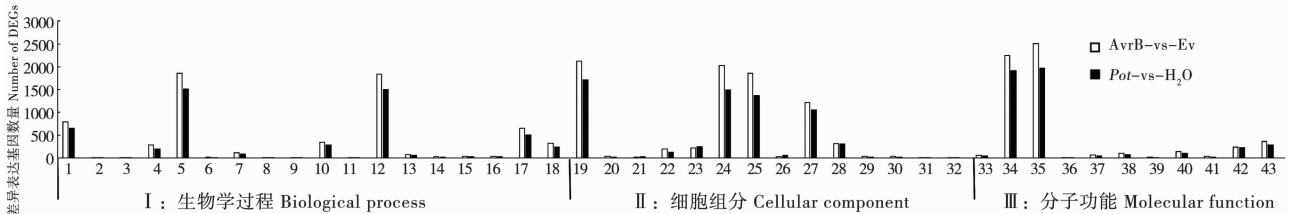


图 3 差异表达基因火山图
Fig. 3 Volcano plot of DEGs

2.4 差异基因功能分析

将差异表达基因比对到 Gene Ontology 数据库,对获得的 DEGs 进行功能分类,从而了解其功能分布特征。本研究共对 18 类生物过程基因、14 类细胞成分基因和 11 类分子功能基因进行功能分析。图 4 所示为不同处理组间显著差异表达的 GO 分类情况,在不同处理组间 DEGs 的功能分布相似度高。且二者在细胞过程、代谢过程和生物调节 3 个生物学过程中亚类中均占比较高;细胞组分中细

胞、膜和膜组分 3 个亚类中均占比较高;分子功能中结合和催化活性 2 个亚类中均占比较高。对研究中获得差异表达基因进行 GO 分类,各组获得的差异表达基因功能分类情况相似度比较高,说明不同处理的各组获得的差异表达基因在功能分类上较为相近。GO 功能分析表明,差异表达基因主要涉及细胞,细胞膜等,其中包含了涉及到一些相关酶类,参与了植物体内次生物质代谢、生物调节等生物过程。



1:生物调节;2:碳利用率;3:细胞增殖;4:细胞成分组织或生物发生;5:细胞过程;6:排毒;7:生长过程;8:生长;9:免疫系统过程;10:定位;11:运动;12:代谢过程;13:多细胞生物过程;14:多生物过程;15:再生产;16:生殖过程;17:对刺激的反应;18:信号传导;19:细胞;20:细胞连接;21:细胞部分;22:细胞外区域;23:大分子复合物;24:膜;25:膜部分;26:膜封闭的管腔;27:细胞器;28:细胞器部分;29:超分子复合物;30:共质体;31:病毒;32:病毒部分;33:抗氧化活性;34:结合;35:催化活性;36:分子载体活性;37:分子功能调节剂;38:分子换能器活动;39:营养水库活动;40:信号传感器活动;41:结构分子活动;42:转录调节活性;43:转运活动。

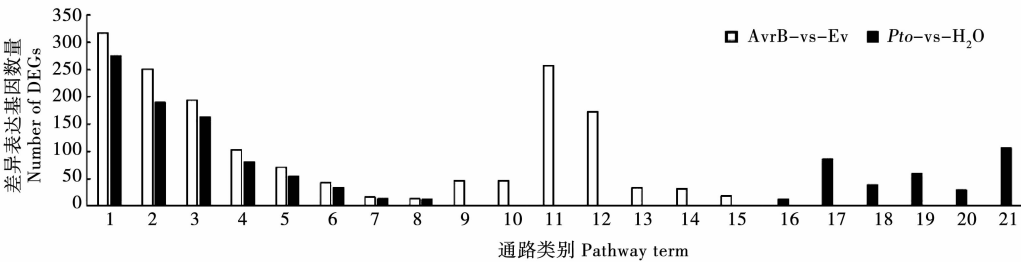
1: Biological regulation; 2: Carbon utilization; 3: Cell proliferation; 4: Cellular component organization or biogenesis; 5: Cellular process; 6: Detoxification; 7: Developmental process; 8: Growth; 9: Immune system process; 10: Localization; 11: Locomotion; 12: Metabolic process; 13: Multicellular organismal process; 14: Multi-organism process; 15: Reproduction; 16: Reproductive process; 17: Response to stimulus; 18: Signaling; 19: Cell; 20: Cell junction; 21: Cell part; 22: Extracellular region; 23: Macromolecular complex; 24: Membrane; 25: Membrane part; 26: Membrane-enclosed lumen; 27: Organelle; 28: Organelle part; 29: Supramolecular complex; 30: Symplast; 31: Virion; 32: Virion part; 33: Antioxidant activity; 34: Binding; 35: Catalytic activity; 36: Molecular carrier activity; 37: Molecular function regulator; 38: Molecular transducer activity; 39: Nutrient reservoir activity; 40: Signal transducer activity; 41: Structural molecule activity; 42: Transcription regulator activity; 43: Transporter activity.

图 4 差异表达基因 GO 分类情况
Fig. 4 GO functional categories of DEGs in different groups

2.5 差异表达基因 KEGG 通路富集

KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的数据库,有助于把基因及表达信息作为一个整体的网络进行研究。通过将差异表达基因同 KEGG 数据库比对,数据库中有21 680个基因具有通路注释,而 *Pto*-vs-*H₂O* 与 *AvrB*-vs-*EV* 具有通路注释的差异基因分别有2 460与2 870个,参与了 132 个生物途径,没有特有的生物途径。它们主要涉及的是植物激素信号转导、

MAPK 信号转导、苯丙烷代谢产物合成等生物途径。对各组出现的 DEGs 富集的可信度较高的通路的比较分析结果如图 5 所示。其中 *Pto*-vs-*H₂O* 组中有 15 条显著富集通路, *AvrB*-vs-*EV* 组中共有 14 条显著富集通路,其中有 8 条通路是两组共有的。它们主要涉及的是植物激素信号转导、植物细菌互动、MAPK 信号转导、苯丙烷合成等生物途径。在 *Pto*-vs-*H₂O* 中显著富集的是糖酵解和谷胱甘肽代谢途径,在 *AvrB*-vs-*EV* 中显著富集的是植物和病原体相互作用、淀粉和蔗糖代谢途径。



1:植物激素信号转导; 2:植物的 MAPK 信号通路; 3:苯丙烷类生物合成; 4:植物昼夜节律; 5:类黄酮生物合成; 6:异黄酮生物合成; 7:天线蛋白质光合作用; 8:花青素生物合成; 9:淀粉和蔗糖代谢; 10:其它聚糖降解; 11:植物—病原体相互作用; 12:果糖和甘露糖代谢; 13:糖胺聚糖降解; 14:脂肪酸伸长率; 15:黄酮和黄酮醇的生物合成; 16:油菜素类固醇生物合成; 17:谷胱甘肽代谢; 18:甘氨酸,丝氨酸和苏氨酸代谢; 19:乙醛酸和二羧酸代谢; 20: β -丙氨酸代谢; 21:糖酵解/糖异生。

1: Plant hormone signal transduction; 2: MAPK signaling pathway of plant; 3: Phenylpropanoid biosynthesis; 4: Circadian rhythm of plant; 5: Flavonoid biosynthesis; 6: Isoflavonoid biosynthesis; 7: Photosynthesis-antenna proteins; 8: Anthocyanin biosynthesis; 9: Fructose and mannose metabolism; 10: Other glycan degradation; 11: Plant-pathogen interaction; 12: Starch and sucrose metabolism; 13: Glycosaminoglycan degradation; 14: Fatty acid elongation; 15: Flavone and flavonol biosynthesis; 16: Brassinosteroid biosynthesis; 17: Glutathione metabolism; 18: Glycine, serine and threonine metabolism; 19: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 20: beta-Alanine metabolism; 21: Glycolysis / Gluconeogenesis.

图5 KEGG 显著富集分析结果

Fig. 5 Over-presentation of DEGs for KEGG pathway in different groups

植物激素相关基因的表达量变化存在一定规律性,绝大部分 IAA、ET 相关基因在 *AvrB*-vs-*EV* 组中是上调的,而谷胱甘肽相关基因却是下调的(表 4)。可能是由于Ⅲ型效应蛋白进入细胞,刺激植物产生 IAA,从而增强植物的感病性。生长素和水杨酸信号途径在植物防御过程中以相互拮抗的方式起作用,水杨酸和生长素信号途径是相互拮抗的,可能是由于生长素抑制水杨酸依赖的防御反应,且缺乏水杨酸的植物 IAA 水平升高^[21]。总之,结果表明 *AvrB* 可能通过影响宿主生长素信号传导,从而抑制 *Pto* 诱导的依赖于水杨酸的抗性反应,如依赖水杨酸的抗性蛋白 PR1 (pathogenesis-related protein-1)

下调,从而促进病原菌的毒力。

2.6 差异表达基因表达量分析验证

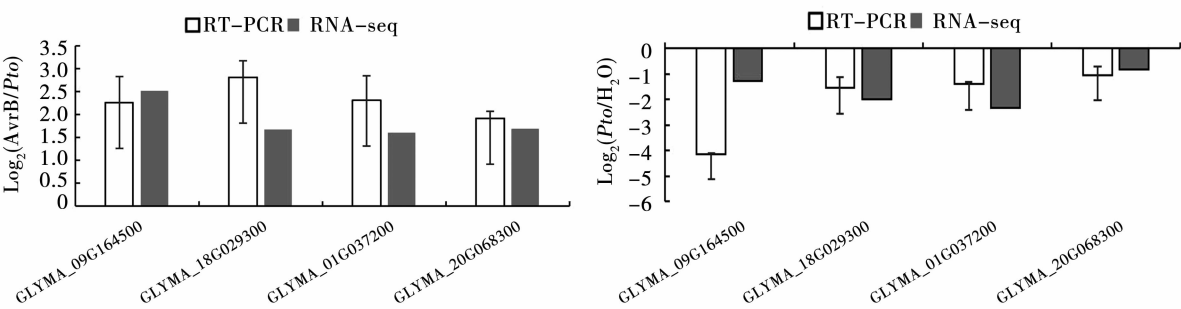
随机挑选 RNA-seq 结果中 *Pto*(*EV*)和 *Pto*(*AvrB*)处理差异表达的 4 个基因 GLYMA_09G164500、GLYMA_18G029300、GLYMA_01G037200、GLYMA_20G068300 进行 RT-PCR 验证,对比分析 RNA-seq 和 RT-PCR 结果的基因相对表达量,2 种检测结果均能说明大豆在效应因子 *AvrB* 的协助下将 *Pto* 下调的基因变为上调表达。尽管 RT-PCR 同 RNA-seq 的灵敏度不同,但二者均可检测出差异基因的表达趋势(图 6),说明 RNA-seq 的结果是可靠的。

表 4 植物激素相关基因
Table 4 Genes related with plant hormones

代谢途径 Metabolic pathway	基因编号 Gene ID	注释 Annotation	变化倍数 (<i>AvrB</i> -vs- <i>EV</i>) Fold Change(<i>AvrB</i> -vs- <i>EV</i>)	FDR (<i>AvrB</i> -vs- <i>EV</i>)
PR1	GLYMA_15G062400	pathogenesis-related protein 1-like	-1.77	2.5375E-303
	GLYMA_15G062500	pathogenesis-related protein 1-like	-1.81	0
IAA	GLYMA_20G225000	AUX/IAA family protein	2.45	1.7136E-108
	GLYMA_20G225000	AUX/IAA family protein	1.30	3.12994E-13
	GLYMA_20G210500	AUX/IAA family protein	2.91	7.25345E-75
	GLYMA_02G142400	auxin-induced protein AUX28-like	4.06	2.1723E-169
	GLYMA_10G180000	auxin-induced protein 22B	1.79	7.43318E-52
	GLYMA_02G142600	auxin-induced protein 22D-like	1.46	3.17833E-14
	GLYMA_10G162400	auxin-responsive protein IAA16-like	3.26	6.30856E-77
	GLYMA_04G089900	auxin-responsive protein IAA8-like	1.33	3.89983E-75
	GLYMA_09G203300	auxin-responsive protein IAA8	1.29	1.84493E-87
	GLYMA_08G197100	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like	1.45	3.88297E-08
	GLYMA_08G036400	auxin-responsive protein IAA27-like	1.67	1.93979E-23
	GLYMA_03G247400	auxin-responsive protein IAA16	1.20	9.2071E-121
	GLYMA_13G354100	auxin-responsive protein IAA26	2.39	1.35529E-38
	GLYMA_10G031800	auxin-induced protein 22D-like	1.81	3.46434E-35
	GLYMA_02G000500	auxin-induced protein 22B	3.06	3.8185E-34
	GLYMA_10G031900	auxin-induced protein AUX28-like	3.35	6.239E-165
	GLYMA_19G245200	auxin-responsive protein IAA16	1.07	2.36728E-14
	GLYMA_15G017500	auxin-responsive protein IAA27-like	1.74	1.2865E-163
	GLYMA_15G020300	auxin-responsive protein IAA26	1.68	7.56415E-15
	GLYMA_13G356600	auxin-responsive protein IAA27	3.82	4.4962E-204
	GLYMA_20G210400	auxin-responsive protein IAA14	1.91	1.5048E-192
	GLYMA_14G185400	auxin-responsive protein IAA9	1.73	1.25571E-17
	GLYMA_02G218100	auxin-responsive protein IAA9	2.34	1.80513E-40
	GLYMA_01G019400	AUX/IAA family protein	1.34	6.73085E-53
	GLYMA_10G180100	auxin-induced protein ali50	1.79	4.7193E-214
ET	GLYMA_15G082800	mitogen-activated protein kinase kinase 4/5	2.64	1.28791E-14
	GLYMA_18G058600	protein G1-like7	1.58	6.51029E-07
	GLYMA_10G008500	protein EIN4	1.55	3.60483E-06
GST	GLYMA_01G106100	tau class glutathione S-transferase	2.16	4.93187E-10
	GLYMA_07G140200	tau class glutathione S-transferase	1.10	3.34232E-30
	GLYMA_13G129000	tau class glutathione S-transferase	-1.22	4.01521E-15
	GLYMA_11G198500	tau class glutathione S-transferase	-1.15	1.01143E-09
	GLYMA_01G106000	tau class glutathione S-transferase	-1.44	9.2749E-182
	GLYMA_07G139700	tau class glutathione S-transferase	-1.44	1.8488E-248
	GLYMA_13G135600	tau class glutathione S-transferase	1.00	2.10966E-10
	GLYMA_08G118700	probable glutathione S-transferase	-1.34	7.31933E-24
	GLYMA_07G075600	glutathione transferase GST 23	-1.27	1.2235E-15
	GLYMA_07G139600	probable glutathione S-transferase	-1.71	8.0088E-14
	GLYMA_07G139800		-1.32	9.45853E-92

续表 4

代谢途径	基因编号	注释	变化倍数(AvrB-vs-EV)	FDR
Metabolic pathway	Gene ID	Annotation	Fold Change(AvrB-vs-EV)	(AvrB-vs-EV)
	GLYMA_03G176300	glutathione S-transferase	-1.46	5.59122E-37
	GLYMA_10G047700	glutathione S-transferase L2	-1.61	0
	GLYMA_02G283900	glutathione S-transferase F9-like	-1.55	1.57658E-07
	GLYMA_01G040200	glutathione S-transferase GST 5	1.14	7.29184E-53
	GLYMA_07G140100	glutathione S-transferase GST 6	-1.27	1.84102E-28
	GLYMA_07G140000	glutathione S-transferase GST 7	-1.73	6.05824E-47
	GLYMA_04G107500	glutathione S - transferase GST 13	-1.43	3.363E-133
	LOC547583(provisional)	probable glutathione S-transferase	-1.33	4.43934E-44
	LOC547584(provisional)	probable glutathione S-transferase	-2.60	0
	GLYMA_20G101100	glutathione S-transferase GST 18	-1.74	1.28813E-57
	GLYMA_13G135500	glutathione S-transferase L3	-1.39	0
	LOC548031(provisional)	glutathione S-transferase GST 20	-1.19	5.07472E-05



A: *Pto*(EV) 处理; B: *Pto*(AvrB) 处理。
A: *Pto*(EV) treatment; B: *Pto*(AvrB) treatment.

图 6 RNA-seq 测序结果的 RT-PCR 验证
Fig. 6 RT-PCR verification of the result of RNA-seq

3 讨论

本研究中,在 *Pto*-vs-*H₂O* 组中 1 754 (33.06%) 个基因表达上调,3 552 (66.94%) 个基因表达下调, *Pto*(AvrB)-vs- *Pto* 组中 4 672 (72.87%) 个基因表达上调,1 739 (27.13%) 个基因表达下调。同 *Pto*(EV) 处理相比, *Pto*(AvrB) 处理的大豆更多基因上调表达。这说明大豆在受到 *Pto* 胁迫的过程中,基因表达的模式以下调为主。与 *Pto*(EV) 相比,大豆面对 *Pto*(AvrB) 的胁迫时,基因表达的模式以上调为主。表明效应蛋白因子 AvrB 在促进非病原菌 *Pto* 侵染大豆的过程中,主要通过调控宿主植物的基因表达水平来调节不同代谢途径和信号转导途径,从而促进非病原菌增强致病性。

植物体内有许多与生物胁迫相关的代谢通路,为了确定其中具有研究价值的代谢通路。在病原

菌胁迫下,大豆会通过改变相关基因的表达水平来调节不同代谢途径和信号转导途径,从而更好的应对胁迫。植物通过抗病信号途径调控相关防卫基因表达,激活免疫反应,从而诱导植物产生抗病性。植物的抗性水平也受植物激素介导的系统信号的影响,包括 SA(水杨酸)、JA(茉莉酸)、ABA(脱落酸)、IAA(生长素)和 ET(乙烯)是主要的抗病信号^[22-24]。除植物可以产生激素外,许多微生物可以产生植物激素,病原菌还可以诱导宿主产生激素,从而使植物体内的激素失衡^[25]。生长素和细胞分裂素参与植物生长和发育的许多重要方面,Ⅲ型效应蛋白和植物毒素冠菌素(COR)均可以调节生长素和细胞分裂素相关的基因^[26]。在接种丁香假单胞菌的过程中,用生长素处理野生型拟南芥植物导致疾病症状发展的显著增加,而生长素信号突变体 *axr 2* (auxin resistant 2) 显示对丁香假单胞菌的抗性

增加,表明完整的生长素信号通路促进对该病原体的易感性^[27-28]。生长素已被证明可调节植物防御反应,生长素信号传导是抗坏死菌的必需品,但对生物营养型细菌增加感病性^[29]。SA 和生长素信号似乎是相互拮抗的,因为生长素抑制 SA 依赖的 PR1 表达,在缺乏 SA 的植物显示 IAA 水平升高^[30-32]。在 *AvrB* 激活了 IAA 信号的传导,从而抑制了相关抗性基因的表达,从而增加丁香假单胞菌的致病性。本研究对差异基因进行了 KEGG 富集分析。其中涉及到植物激素信号转导、植物 MAPK 信号通路、苯丙烷类生物合成、植物昼夜节律、类黄酮生物合成、异黄酮生物合成、光合作用-天线蛋白、花青素生物合成 8 条代谢通路差异表达基因在不同处理组中可靠性都较高。其中包括来自苯丙烷途径的多个分支的许多次级代谢产物,包括木质素、异黄酮其它酚类化合物等。其中部分代谢产物与植物的抗性相关,有助于提高植物成功防御入侵病原体的能力。上述 8 条代谢通路可能与植物抗病有密切的关系,是以后研究所应重点关注的。

不同处理中独特的代谢通路也值得关注,在 *Pto*-vs- H_2O 中显著富集的是糖酵解和谷胱甘肽代谢途径。谷胱甘肽是细胞内最主要的还原型物质,可以调节细胞内的氧化还原状态,通过 Asada-Halliwell 途径清除活性氧,维持体内的活性氧代谢平衡,从而使植物抵抗病原微生物^[33]。表明大豆在非寄主病菌入侵时,谷胱甘肽代谢途径参与了广谱性的抗病反应。

4 结 论

本研究对丁香假单胞菌变种 *Pto*(*AvrB*) 和对照组处理的大豆叶片进行转录组测序,获得了大量的可靠数据,并对差异表达基因进行了 GO 注释、KEGG 富集分析等,通过大豆叶片在细菌斑点病菌的胁迫下进行转录组分析,共得到 43 422 个序列信息,不同处理间共有序列为 37 611 个,其中 *Pto*(*AvrB*) 处理的序列信息最多。差异表达基因主要涉及植物激素信号转导、植物的 MAPK 信号通路、次生代谢、植物-病原体互作,谷胱甘肽代谢等生物学过程。而且 *AvrB* 可以扰乱植物原本的激素传导,抑制谷胱甘肽相关基因的表达,破坏植物体内的活性氧代谢平衡,达到抑制植物的相关抗病反应,从而增强丁香假单胞杆菌的致病性。研究有助于阐明 III 型效应蛋白因子促进病原菌致病效应的机理,所获得的大量与大豆抗病相关的遗传信息能够为大豆抗病育种提供相关的基因资源和理论基础。

参考文献

- [1] Zou J, Rodriguez-Zas S, Aldea M, et al. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(11): 1161-1174.
- [2] Collmer A, Charkowski A O, Deng W L, et al. Bacterial Avr proteins: Secreted agents of parasitism and elicitors of plant defense [J]. Delivery and Perception of Pathogen Signals in Plants, 2001: 36-45.
- [3] White F F, Yang B, Johnson L B. Prospects for understanding avirulence gene function[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(4): 291-298.
- [4] Ashfield T, Ong L E, Nobuta K, et al. Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families [J]. Plant Cell, 2004, 16(2): 309-318.
- [5] Grant M R, Godiard L, Straube E, et al. Structure of the *Arabidopsis* *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance[J]. Science, 1995, 269(5225): 843-846.
- [6] Mackey D, Iii B F H, Wiig A, et al. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2002, 108(6): 743-754.
- [7] Shang Y L, Li X Y, Cui H T, et al. RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector *AvrB* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(50): 19200-19205.
- [8] Cui H, Wang Y, Xue L, et al. *Pseudomonas syringae* effector protein *AvrB* perturbs *Arabidopsis* hormone signaling by activating MAP kinase 4[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 2010, 7(2): 164-175.
- [9] Eitas T K, Nimchuk Z L, Dangl J L. *Arabidopsis* TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector *AvrB* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(17): 6475-6480.
- [10] Selote D, Robin G P, Kachroo A. GmRIN4 protein family members function nonredundantly in soybean race-specific resistance against *Pseudomonas syringae* [J]. New Phytologist, 2013, 197(4): 1225-1235.
- [11] Selote D, Kachroo A. RPG1-B-derived resistance to *AvrB*-expressing *Pseudomonas syringae* requires RIN4-like proteins in soybean [J]. Plant Physiology, 2010, 153(11): 1199-211.
- [12] Leister R T, Katagiri F. A resistance gene product of the nucleotide binding site-Leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo* [J]. The Plant Journal, 2000, 22(4): 345-354.
- [13] Selote D, Kachroo A. RIN4-like proteins mediate resistance protein-derived soybean defense against *Pseudomonas syringae* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(11): 1453-1456.
- [14] Belkhadir Y. *Arabidopsis* RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors *AvrRpt2* or *AvrRpm1* [J]. The Plant Cell Online, 2004, 16(10): 2822-2835.

[15] Berretta J, Morillon A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation[J]. *Embo Reports*, 2009, 10(9): 973-982.

[16] 成舒飞,端木慧子,陈超,等. 大豆 MYB 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. *大豆科学*, 2016, 35(1): 52-57. (Cheng S F, Duanmu H Z, Cheng C, et al. Whole genome identification of soybean MYB transcription factors and bioinformatics analysis[J]. *Soybean Science*, 2016, 35(1): 52-57.)

[17] 张峰, 赵云霞, 黄先忠. 利用转录组测序分析大豆矮小突变体中差异表达基因[D]. 新疆:石河子大学, 2014. (Zhang F, Zhao Y X, Huang X Z. Analysis of differentially expressed genes in soybean dwarf mutants by transcriptome sequencing[D]. Xinjiang: Shihezi University, 2014.)

[18] 杨楠, 赵凯歌, 陈龙清. 蜡梅花转录组数据分析及次生代谢产物合成途径研究[J]. *北京林业大学学报*, 2012, 34(S1): 104-107. (Yang N, Zhao K G, Chen L Q. Analysis of transcriptome data and synthesis pathways of secondary metabolites[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2012, 34(S1): 104-107.)

[19] 吴凯朝, 黄诚梅, 李杨瑞, 等. Trizol 试剂法快速高效提取 3 种作物不同组织总 RNA[J]. *南方农业学报*, 2012, 43(12): 1934-1939. (Wu K C, Huang C M, Li Y R, et al. Rapid and efficient extraction of total RNA from different tissues of three crops by Trizol reagent[J]. *Southern Agricultural Journal*, 2012, 43(12): 1934-1939.)

[20] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(10): R106.

[21] Kazan K, Manners J M. Linking development to defense: Auxin in plant-pathogen interactions[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(7): 373-382.

[22] Alazem M, Lin N S. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(5): 529-540.

[23] Miguel A L, Bannenberg G, Castresana C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(4): 420-427.

[24] Miya A, Albert P, Shinya T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19613-19618.

[25] Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones J D G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49(1): 317-343.

[26] Thilmony R, Underwood W, He S Y. Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46: 34-53.

[27] Chen Z. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(50): 20131-20136.

[28] Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler A H, et al. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway [J]. *Current Biology*, 2007, 17(20): 1784-1790.

[29] Kazan K, Manners J M. Linking development to defense: Auxin in plant-pathogen interactions[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(7): 373-382.

[30] Ding X, Cao Y, Huang L, et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase gh3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice[J]. *The Plant Cell Online*, 2008, 20(1): 228-240.

[31] Park J E, Park J Y, Kim Y S, et al. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(13): 10036-10046.

[32] Abreu M E, Munne-Bosch S. Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(4): 1261-1271.

[33] Wojtaszek P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 322(3): 681-692.