



基于转录组分析植物调节剂 S3307 对大豆根瘤菌 *Sinorhizobium shofinae* 生长发育的调控机制

陶思羽¹, 彭耀², 高瑞廷¹, 曾传鑫¹, 王松¹, 张永光¹, 王涛¹, 陈文浩¹

(1. 宜宾学院 农林与食品工程学部固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000; 2. 宜宾自然免耕研究所, 四川 宜宾 644300)

摘要: 为研究烯效唑(S3307)对自生状态下大豆根瘤菌生长和共生表型影响的机制, 比较不同浓度 S3307 对大豆根瘤菌 *Sinorhizobium shofinae* 的细胞生长、显微结构的影响, 通过回接试验进行验证, 并通过转录组分析揭示其调控机理, 最后通过 qRT-PCR 检测 S3307 处理对 *S. shofinae* *nod* 基因表达的影响。结果显示: 在培养液中添加 S3307 能够降低 *S. shofinae* 细胞的生长速度、改变细胞大小, 减少细胞内 PHB 数量。盆栽回接试验显示 S3307 处理 *S. shofinae* 虽然减少了根瘤数, 但提高了大豆植株的茎、叶干重。转录组学分析获得了 203 个差异基因表达谱, 功能富集分析显示这些差异表达基因中被显著抑制的基因主要分布在参与生长以及细胞结构等途径。qRT-PCR 分析表明 S3307 处理抑制了 IC52_RS29880 (*nodA*) 和 IC52_RS31765 (*nodD*) 基因的表达, 与转录组测序结果一致。试验结果表明植物生长调节剂对纯培养根瘤菌生育存在调控作用, 转录组学分析揭示了其调控作用主要发生在细胞过程、定位、新陈代谢、应激响应、生长等过程, 这些研究数据有助于我们评价植物调节剂对大豆—根瘤菌共生体系结瘤固氮效率的影响。

关键词: 植物调节剂; 根瘤菌; 生长发育; 转录组学

Transcriptome Analysis of Regulatory Mechanism of Plant Growth Regulator S3307 on Growth and Development of *Sinorhizobium shofinae*

TAO Siyu¹, PENG Yao², GAO Ruiting¹, WANG Song¹, ZHANG Yongguang¹, WANG Tao¹, ZENG Chuanxin¹, CHEN Wenhao¹

(1. Solid-State Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Faculty of Agriculture, Forestry and Food Engineering of Yibin University, Yibin 644000, China; 2. Yibin Natural No-Tillage Research Institute, Yibin 644300, China)

Abstract: Aiming to investigate the molecular mechanism of the effect of S3307, a plant growth regulator, on the growth and development of *Sinorhizobium shofinae* under symbiotic conditions. Various concentrations of S3307 were compared for their effects on cell growth and microstructure of *S. shofinae*. The effect of S3307 treatment on the transcription level of *S. shofinae* *nod* gene was detected by qRT-PCR, which was verified by tieback experiment, and the regulatory mechanism was further clarified by transcriptome analysis. The results indicated that the addition of S3307 to the culture medium slowed down the cell growth rate, induced alterations in the microstructure and reduced the number of PHB of *S. shofinae*. Tieback test revealed that S3307 treatment reduced the number of nodules but increased the stem and leaf dry weight of soybean plants. Transcriptomic analysis identified 203 differentially expressed genes, with functional enrichment analysis showing that the significantly inhibited genes were mainly involved in pathways related to growth and cell structure. qRT-PCR verification showed that S3307 treatment inhibited the expression of IC52_RS29880 (*nodA*) and IC52_RS31765 (*nodD*) genes, which was consistent with the transcriptome sequencing results. Plant growth regulators have a certain regulatory effect on symbiotic rhizobia and soybeans. The transcriptome results showed that S3307 treatment inhibited the expression of *S. shofinae* growth gene, and their regulatory effects mainly occurred in cell process, localization, metabolism, stress response and growth. These research findings contribute to our assessment of the impact of plant growth regulators on soil ecological safety.

Keywords: plant growth regulator; rhizobia; growth and development; transcriptomics

植物调节剂(Plant Growth Regulators, PGRs)是通过人工合成或微生物中提取的化合物, 具有与植物激素相似的生理活性, 并可影响内源激素的合成、运输、代谢及其生理活动。烯效唑(Uniconazole, S3307)属广谱性、高效植物生长抑制剂, 可通过抑制赤霉素的合成发挥控制营养生长、抑制细胞伸

长、矮化植株、增进抗逆性等作用^[1-2]。但作为一种人工合成的化学物质, S3307 施用后仅有 10% ~ 20% 通过蒸腾、扩散等作用进入植物体, 绝大部分将残留在环境中, 尤其是土壤; 且 S3307 在土壤中具有较稳定的稳定性, 虽可通过水解、光解或淋溶等作用被降解, 但在不同类型土壤中其降解半衰期均大

收稿日期: 2024-03-02

基金项目: 四川省科技计划项目(2021YJ0294); 国家级大学生创新创业训练计划支持项目(202410641062X); 宜宾学院科研项目(2017RC03)。

第一作者: 陶思羽(2002—), 女, 本科生, 专业为生物工程。E-mail: 2036382445@qq.com。

通讯作者: 陈文浩(1985—), 男, 博士, 副教授, 主要从事的根瘤菌生理生化研究。E-mail: wenhao_chen1985@126.com。

于3个月^[3]。同时,S3307对土壤中各类微生物活性有显著的影响,如抑制 *Podosphaera leucotricha*、*Penicillium digitatum*、*Gloeosporium musarum*、*Puccinia recondita*、*Piricularia oryzae*、*Erysiphe graminis* 等病原菌生长。最近有研究表明适当浓度的 S3307 还可改善变形菌门微生物在植物根系的定殖率,从而促进菌根合成,但降低了根际土中微生物的多样性^[4]。

许多研究已为 PGRs 调控豆科植物-根瘤菌互作效应提供了证据,例如在根瘤菌中补充 L-色氨酸可能是改善豆类生长、结瘤和产量的有效途径^[5];一些黄酮类化合物可以作为诱导黄酮类化合物引发的 *nod* 基因转录激活的拮抗剂(抗诱导剂)^[6]。同时,很多学者也已通过叶面喷施或浸种的方式将 S3307 作用于豆科植物,并对根瘤的形成和发育进行了跟踪观测^[7-9]。但大多研究都是基于豆科植物-根瘤菌共生体系,未排除宿主植物或土壤环境对根瘤菌调控的干扰且主要针对植物,对 PGRs 调控根瘤菌细胞生长、形态发育、基因表达的机理并不明确。因此本研究以纯培养 *S. shofinae* 为研究对象,利用转录组学分析初步明确 S3307 对其表型产生的调控机理,向培养基中添加 S3307 以模拟其土壤残留。本研究通过表型试验检测 S3307 对 *S. shofinae* 细胞生育的影响并通过回接大豆进行验证;采用转录组测序分析筛选显著差异表达基因;采用 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析显示在生物过程中差异基因表达的主要路径;采用 qRT-PCR 检测 S3307 处理对 *S. shofinae nod* 基因表达的影响。研究旨在为大豆栽培过程合理施用 S3307 进而提高大豆-根瘤菌共生体系结瘤固氮效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆根瘤菌株 *S. shofinae* 由中国农业大学根瘤菌保藏中心(CCBAU)提供,编号为 251167;S3307 来自宜宾学院固态发酵资源利用四川省重点实验室;大豆品种冀豆 17 由河北省农业科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备 酵母麦芽提取物琼脂培养基(YMA):甘露醇 10.0 g,酵母浸粉 3.0 g,MgSO₄·7H₂O 0.2 g,NaCl 0.1 g,K₂HPO₄ 0.25 g,KH₂PO₄ 0.25 g,琼脂 15 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,调节至 pH6.8~7,121℃灭菌 20 min。

S3307 母液:水溶性 S3307 10.0 g,蒸馏水定容至 100 mL,储存于 4℃冰箱中备用。

1.2.2 根瘤菌生物量的测定 于 100 mL 三角瓶中装入 40 mL YMA 液体培养基并封口,121℃灭菌 20 min。S3307 母液分别按照体积比为 1×10⁻¹、1×10⁻²、1×10⁻³、1×10⁻⁴、1×10⁻⁵和 1×10⁻⁶浓度

添加到 YMA 液体培养基中。随后按接种量 5% 加入 *S. shofinae*,28℃、170 r·min⁻¹ 摇床培养。采用 VIS-723G 型分光光度计在 600 nm 测量各处理菌液 OD 值,分析生物量。测量时间为 2,4,8,16,24,36,48,72 和 96 h。每个处理 3 次重复,选择对 *S. shofinae* 生长影响较显著的 S3307 添加量进行后续试验。

1.2.3 根瘤菌显微结构观察 扫描电镜制备:用刀片将长有菌体的 YMA 固体培养基切下并修正成大约 10 mm×10 mm 的正方形。将制作好的样品放入装有 2.5% 戊二醛的安瓿瓶中 2~4 h,取出后用磷酸缓冲液清洗 3 次,再放入 1% 的锇酸中 4~6 h,取出后用磷酸缓冲液清洗 3 次,乙醇梯度脱水,30%、50%、70%、85% 和 95% 各 1 次,100% 乙醇 2 次,每次 15~20 min,随后用乙酸异戊酯置换 2 次,每次 20 min。将样品取出,放置于干燥定性滤纸上,放入临界点干燥器样品室,进行 CO₂ 临界点干燥。待样品干燥后,将样品倒入平皿,碳导电胶带一面粘在 1/4 盖玻片上,另一面倒扣轻压在样品上,翻正后用镊子或牙签将样品铺平。离子溅射金后进行扫描电镜观察(Hitachi, S-3400N);加速电压使用 5.0 kV^[10]。

透射电镜制备:分别取对数生长期的菌体,8 000 r·min⁻¹ 离心收集菌体于 EP 管中,加 2.5% 戊二醛静置 45 min,离心去上清后用 0.1% PBS 冲洗,每次清洗时混匀并静置 5 min,2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min,去上清,重复 3 次,洗去戊二醛。加入 1% 的锇酸避光固定 1 h,然后再用 0.1% PBS 冲洗 3 次。30%、50%、70%、90% 乙醇梯度脱水,每次 10 min,90% 乙醇+90% 丙酮(1:1)每次 10 min,90% 丙酮每次 10 min,100% 丙酮,3 次,每次 10 min,将样品依次在包埋剂:丙酮为 1:2、1:1、2:1 的混合液中各渗透 1 h,加入纯包埋剂,渗透过夜;次日换入干净的纯包埋剂,温箱保存,37℃ 12 h,45℃ 12 h,60℃ 24 h,使包埋剂聚合。样品制备好后用透射电子显微镜(Hitachi, H-600)观察,加速电压为 100 kV。在透射电镜下可测量 *S. shofinae* 细胞长和宽,并用 SPSS 20.0 软件进行显著性分析^[11]。

1.2.4 *S. shofinae* 回接大豆验证 挑选颗粒饱满的大豆种子置于 95% 乙醇中浸泡 30 s,弃废液;然后加入 3% NaClO 溶液中浸泡 5 min,弃废液,最后用无菌水冲洗 10 次。将大豆种子置于 1% 的水平琼脂板上 28℃ 催芽 2 d,发芽后的种子移栽到双层钵的蛭石中。将经 S3307 处理的 *S. shofinae* 培养至对数期,菌液经 8 000 r·min⁻¹ 离心后用无菌蒸馏水冲洗,反复数次以去除 S3307,随后制成生理盐水-根瘤菌悬浮液(OD₆₀₀ = 0.2)。每个种子接种 1 mL 悬浮液到植株根部,覆盖蛭石完成接种,并用 1 mL 无

菌水作对照处理。移栽和接种过程在超净工作台中进行,避免污染。移栽接种完成后,塑料杯封口置于人工光照间内培养(24 ℃,12 h/12 h 昼夜周期),移栽后第4天用“十字法”剪开封口膜,植物生长期间向玻璃瓶中补充无菌去离子水。

植株生长第18天后,用日本美能达公司产手持式 SPAD-502 型叶绿素计测定倒二叶位叶片叶绿素含量,至第40天试验结束。将植株沿根部水平面剪断,自来水冲洗干净,分别测定茎叶干重,统计结瘤数量。

1.2.5 转录组学分析 使用选定浓度 S3307 处理生长至对数期的 *S. shofinae*,使用 TRIzol® Reagent (Invitrogen) 提取总 RNA,使用 DNase I (TaKara) 去除基因组 DNA。将经过品质检测的 RNA 样本 ($OD_{260/280}=1.8\sim2.2$, $OD_{260/230}\geq 2.0$, $RIN\geq 6.5$, $28S:18S\geq 1.0$, $>10\text{ }\mu\text{g}$) 送至武汉迈特维尔生物科技有限公司构建文库,利用 Illumina HiSeq 2000 平台进行检测,得到检测数据。每个转录样本的表达水平使用 RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) 方法计算^[12]。利用 edgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) 进行差异表达分析。然后差异显著基因通过 GO (Gene Ontology, <http://geneontology.org/>) 数据库和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes, <https://www.kegg.jp/>) 数据库进行基因的功能注释,分析差异基因参与的代谢途径。

1.2.6 *nod* 基因 qRT-PCR 验证 为了验证转录组信息的可信度,同时验证 S3307 可抑制结瘤的试验结果,选择调控根瘤菌结瘤的代表基因 *nodA* 和 *nodD*^[13] 进行 qRT-PCR 验证。采用 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取经选定浓度 S3307 处理后生长至对数期的 *S. shofinae* 的总 RNA,以添加等量去离子水处理的 *S. shofinae* 的总 RNA 为对照。使用反转录试剂盒 TransScript II First Strand cDNA Synthesis SuperMix 进行反转录。采用 Primer3-2.4.0 软件设计各处理荧光定量 PCR 引物(表1)。qRT-PCR 扩增体系共 12.5 μL ,其中包括 Eco GreenI 荧光燃料 MIX 6.25 μL ,正向引物 0.25 μL ,反向引物 0.25 μL ,cDNA 第一条反应产物 2 μL ,ddH₂O 3.5 μL 。使用细菌核苷酸通用引物(338F,518R)扩增 16S rDNA V3 区基因并将其作为内参基因。反应条件:95 ℃ 5 min,1 个循环;95 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,40 个循环,采用 ABI PRISM 7000 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。将 PCR 反应结束后的溶解曲线是否存在唯一峰作为判定 PCR 扩增特异性的标准。所有反应进行 3 次重复。采用 SDS 2.3 软件(美国 Applied Biosystems 公司)对结果数据进行分析。

表 1 qRT-PCR 引物
Table 1 qRT-PCR primers

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence | 片段长度 Fragment length/bp |
|---------------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>nodA</i> F | CGCAGCGGAATCTACGAG | 226 |
| <i>nodA</i> R | GCTCGATTACGGCCTTAGGT | 226 |
| <i>nodD</i> F | ATCTGTTGGTGGCGGAAC | 242 |
| <i>nodD</i> R | CGGCAGGTTGAGATAGACATC | 242 |
| 338 F | CCTACGGGAGGCAGCAG | 180 |
| 518 R | ATTACCGCGCTGCTGG | 180 |

2 结果与分析

2.1 不同浓度 S3307 对 *S. shofinae* 生物量的影响

如图 1 所示,添加不同浓度的 S3307 均表现出对 *S. shofinae* 生长的延缓抑制。其中,当 S3307 的添加量为 1×10^{-1} (v/v) 时, *S. shofinae* 的生长曲线未出现明显波动,表明在此浓度下根瘤菌不能生长;而当添加量为 1×10^{-2} (v/v) 时,培养 96 h 后 *S. shofinae* 的 OD₆₀₀ 仅为 1.57,根瘤菌生长进入稳定期并显著低于其他处理。因此,选择 S3307 添加量 1×10^{-2} (v/v) 进行后续研究。

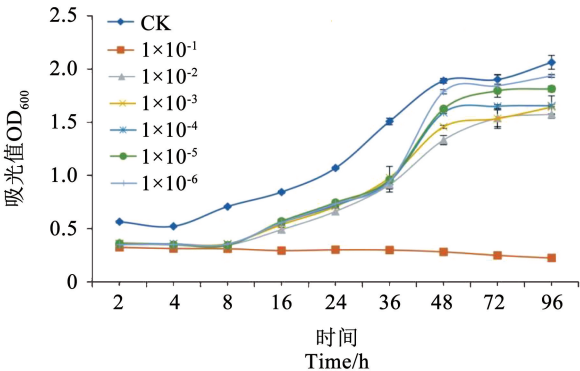
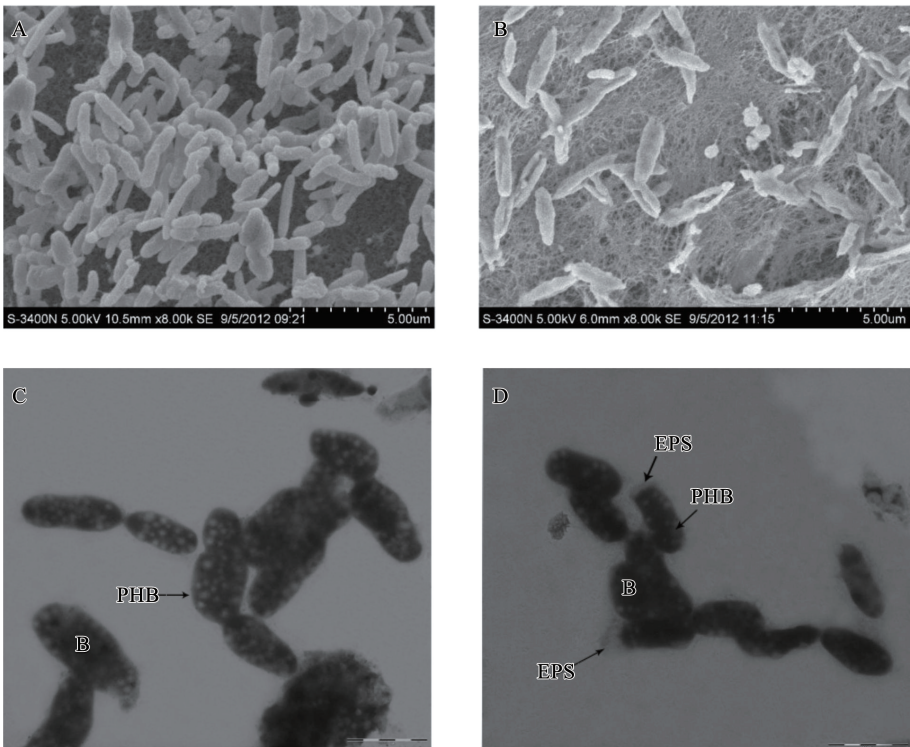


图 1 不同浓度 S3307 对 *S. shofinae* 生长的影响
Fig.1 Effects of different concentrations of S3307 on the growth of *S. shofinae*

2.2 S3307 对 *S. shofinae* 细胞结构的影响

从图 2 可以明显看出,与对照(图 2A)相比 S3307 处理使 *S. shofinae* 的细胞两端更加突出(图 2B),这可能是因为 S3307 诱导了 *S. shofinae* 细胞产

生了大量的胞外多糖(EPS),从而改变了其形状。此外, S3307 使 *S. shofinae* 的 PHB (Polyhydroxybutyrate, 聚羟基丁酸酯) 颗粒数量明显减少(图 2C 和 D)。



注: A. *S. shofinae* 扫描电镜; B. S3307 处理 *S. shofinae* 扫描电镜; C. *S. shofinae* 透射电镜; D. S3307 处理 *S. shofinae* 透射电镜。PHB. 聚羟基丁酸酯; EPS. 胞外多糖。

Note: A. Scanning electron micrograph of *S. shofinae*; B. Scanning electron micrograph of *S. shofinae* following intervention with S3307; C. Transmission electron micrograph of *S. shofinae*; D. Transmission electron micrograph of *S. shofinae* following intervention with S3307. PHB: Polyhydroxybutyrate; EPS: Extracellular polysaccharides.

图 2 S3307 对 *S. shofinae* 细胞结构的影响

Fig. 2 Effects of S3307 on the cell structure of *S. shofinae*

2.3 S3307 处理对接种 *S. shofinae* 大豆结瘤及植株部分发育性状的影响

回接试验结果显示,经 S3307 处理后,接种 *S. shofinae* 大豆的结瘤数被显著抑制,较 CK 结瘤数

下降 25.5%,叶绿素含量略有下降,但统计结果不显著(表 2)。而经 S3307 处理后,接种 *S. shofinae* 大豆的叶干重和茎干重显著高于 CK,分别提高了 19.4% 和 20.0%。

表 2 S3307 处理对 *S. shofinae* 共生大豆结瘤及植株部分发育性质的影响

Table 2 Effects of S3307 on *S. shofinae* symbiosis, and partial developmental characteristics of soybean plants

| 处理 Treatment | 结瘤数 Number of nodule | 叶绿素含量 Content of chlorophyll/(mg·g ⁻¹) | 叶干重 Dry weight of leaf/g | 茎干重 Dry weight of stem/g |
|---------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>S. shofinae</i> | 43.14 ± 4.10 a | 16.51 ± 1.86 a | 0.62 ± 0.11 a | 0.39 ± 0.08 a |
| <i>S. shofinae</i> -S3307 | 32.14 ± 2.41 b | 13.29 ± 1.00 a | 0.86 ± 0.16 b | 0.54 ± 0.12 b |

注:处理间不同小写字母表示存在显著差异($P < 0.05$)。
Note: Different lowercase letters mean there were significant differences between treatments ($P < 0.05$).

2.4 S3307 处理 *S. shofinae* 转录组测序分析

2.4.1 转录组测序数据质量评估 如表 3 所示,每个样品产生了 30 M 左右的原始序列,去除低品质数据后得到 Clean Reads 序列数为 23.70 ~ 34.82 M;

GC 含量为 60% 左右;Q20 和 Q30 的碱基比例分别达到 98% 和 95% 以上,说明样本的测序数据品质良好。同时,质控后的测序数据中 77% 以上可比对到参考基因组中,比对效果较好,可以进行后续分析。

表 3 转录组测序数据质量分析
Table 3 Transcriptome sequencing data quality analysis

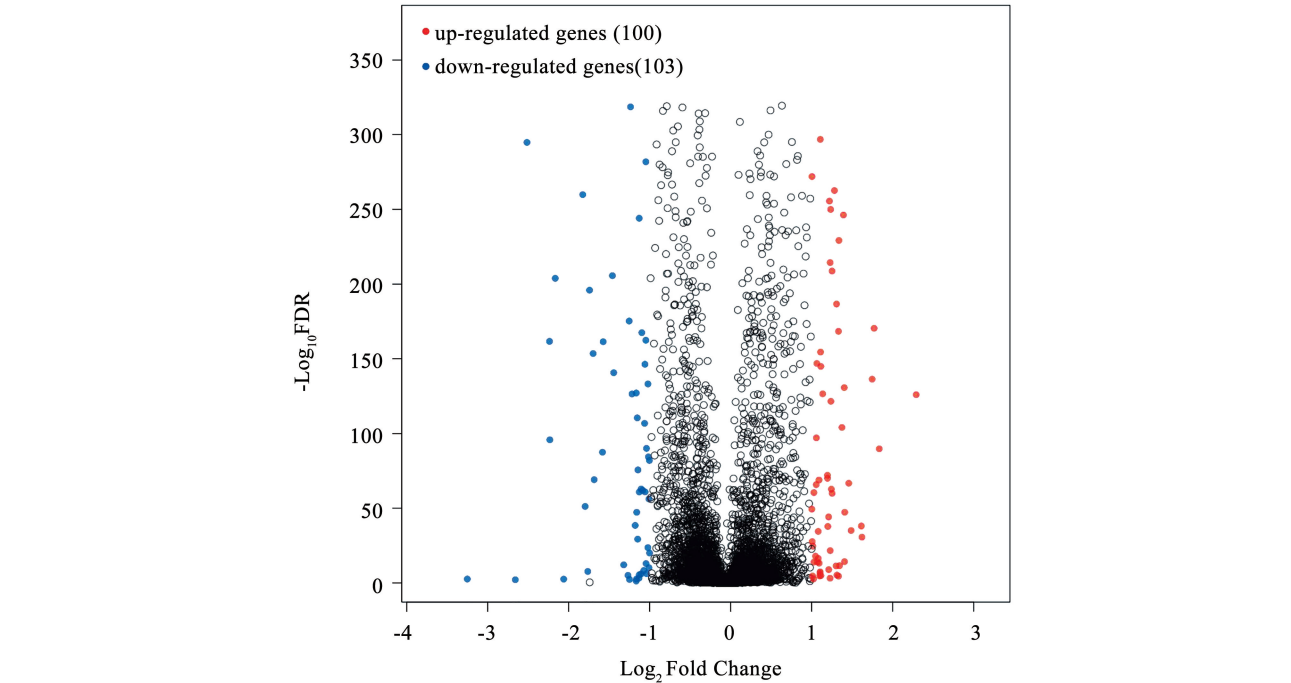
| 处理 Treatment | 全部数据 Total reads | 原始数据 Clean reads | 错误率 Error/% | Q20/% | Q30/% | GC 含量 GC content/% | 比对率 Mapped rate/% |
|-----------------|---------------------|---------------------|----------------|-------|-------|-----------------------|----------------------|
| CK-1 | 26315536 | 26254080 | 0.0219 | 98.98 | 95.98 | 58.40 | 77.60 |
| CK-2 | 34474082 | 34391436 | 0.0224 | 98.92 | 95.74 | 59.14 | 82.46 |
| CK-3 | 30389260 | 30317246 | 0.0222 | 98.95 | 95.85 | 58.82 | 80.35 |
| S3307-1 | 34894912 | 34822908 | 0.0213 | 99.07 | 96.33 | 59.80 | 86.64 |
| S3307-2 | 23753836 | 23699870 | 0.0225 | 98.91 | 95.70 | 60.55 | 91.70 |
| S3307-3 | 29330176 | 29267668 | 0.0218 | 99.00 | 96.08 | 60.10 | 88.69 |

2.4.2 差异表达基因分析 对经 S3307 处理后 *S. shofinae* 中差异表达基因筛选阈值为 $|\log_2 FC| \geq 1$, $FDR \leq 0.05$ 。其中红色圆点表示显著上调的基因,蓝色圆点表示显著下调的基因,黑色圆圈为非显著差异基因。如图 3 所示,S3307 处理与 CK 相比,共获得 203 个显著差异表达基因,其中有 100 个上调,103 个下调。进一步对这些在两组间发生差异表达的基因进行功能和通路分析表:在处理组中,*rpmC*、*rplJ* 和 *odhB* 等显著下调的基因与细胞的生长密切相关;*argF*、*prmC*、IC52_RS01865、IC52_RS28270、IC52_RS28255、IC52_RS20735 和 IC52_RS13735 等显著上调的基因和细胞的形态密切相关;另外,IC52_RS04520、*acs fba*、*adhP* 和 IC52_RS18040 等在处理组中显著下调的基因与 PHB 的合成相关,*cyoD*、*nuoK*、IC52_RS03295、IC52_RS05010 和 IC52_RS03300 等在处理组中显著上调的基因与 PHB 代谢密切相关(表 4)。在此基础上进一步对本次转录组学分析中发现的差异表基因进行了 GO 和 KEGG 分析,从而挖掘其中在 S3307 的干预下潜在的作用途径。

2.4.3 差异基因表达 GO 功能注释和 KEGG 富集分析 在上述研究的基础上,进一步对转录组学分析中筛选到的差异基因进行 GO 功能注释,从宏观角度分析自生状态下的根瘤菌响应 S3307 处理基因

的功能分布特征。主要基于 level2 层级对差异基因的 GO 注释结果进行整理统计,对差异基因的功能注释分为 3 大类:生物过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)(图 4)。在生物过程(BP)中差异基因表达主要被注释到细胞过程、定位、新陈代谢、应激响应、生长等过程,其中参与生长的基因绝大多数被下调,和表 4 的结果保持了一致性,还与试验中 S3307 抑制 *S. shofinae* 细胞生长及结瘤的结果保持了一致性。在细胞组成(CC)中差异基因表达主要被注释到细胞结构体和胞内组成。在分子功能(MF)中差异基因表达主要被注释到催化活性、结构分子活性、转运活性,其中参与结构分子活性的基因绝大多数被下调,这可能是导致 S3307 处理 *S. shofinae* 细胞结构发生变化的原因。

生物体内的不同基因表达产物通过相互作用发挥生物学功能,对差异表达基因的通路注释分析有助于进一步解读基因功能。因此,为深入了解差异基因表达的功能,对 S3307 处理 *S. shofinae* 的 30 条差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,结果如图 5 所示,S3307 处理后差异基因表达主要富集在糖酵解/糖异生、氧化磷酸化、丙酸代谢、氯烷烃及氯烯烃降解和 ABC 转运蛋白等通路。其中,糖酵解/糖异生通路的差异基因表达可能是导致 S3307 处理 *S. shofinae* 细胞内 PHB 合成减少的原因。



注：红色点表示显著上调的基因,蓝色点表示显著下调的基因,黑色点为非显著差异基因。

Note: Red dots represent significantly upregulated genes, blue dots represent significantly downregulated genes, and black dots represent non-significantly differentially expressed genes.

图 3 S3307 处理 *S. shofinae* 差异基因谱火山图

Fig. 3 Volcano plot of differential gene expression in *S. shofinae* treated with S3307

表 4 相关通路关键基因的表达情况

Table 4 Expression profile of key genes in pathways relevant

| 通路 Pathways | 基因号 Gene ID | 基因名 Gene name | 上调/下调 Up/Down | Log ₂ FC | P | 功能 Function |
|--|----------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------------|---|
| 细胞生长相关 Cell growth correlation | IC52_RS10465 | <i>rpmC</i> | 下调 | -1.03 | 0 | LSU ribosomal protein L29p (L35e) |
| | IC52_RS10555 | <i>rplJ</i> | 下调 | -1.14 | 0 | 50S ribosomal protein L10 |
| | IC52_RS28380 | <i>odhB</i> | 下调 | -1.16 | 0 | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component |
| 细胞形态相关 Cell morphology correlation | IC52_RS29595 | <i>argF</i> | 上调 | 1.23 | 2.57×10^{-216} | ornithine carbamoyltransferase |
| | IC52_RS02325 | <i>prmC</i> | 上调 | 1.52 | 0 | hypothetical protein AB395_00002830 |
| | IC52_RS01865 | - | 上调 | 1.00 | 6.15×10^{-274} | inner membrane protein |
| | IC52_RS28270 | - | 上调 | 1.06 | 2.32×10^{-67} | hypothetical protein AB395_00003453 |
| | IC52_RS28255 | - | 上调 | 2.02 | 0 | manganese ABC transporter substrate-binding lipoprotein |
| | IC52_RS20735 | - | 上调 | 1.23 | 5.64×10^{-23} | ATP-binding cassette domain-containing protein |
| | IC52_RS13735 | - | 上调 | 1.21 | 0 | IMP dehydrogenase |
| PHB 合成相关 PHB synthesis correlation | IC52_RS04520 | - | 下调 | -1.14 | 0 | aldehyde dehydrogenase |
| | IC52_RS26690 | <i>acs</i> | 下调 | -1.48 | 0 | acetyl-CoA synthetase |
| | IC52_RS20280 | <i>fba</i> | 下调 | -1.70 | 2.48×10^{-155} | hypothetical protein AB395_00005738 |
| | IC52_RS13720 | <i>adhP</i> | 下调 | -1.34 | 0 | hypothetical protein AB395_0000418 |
| | IC52_RS18040 | - | 下调 | -1.44 | 0 | quinoprotein ethanol dehydrogenase |
| PHB 代谢相关 PHB metabolism correlation | IC52_RS23270 | <i>cyoD</i> | 上调 | 1.24 | 2.46×10^{-64} | hypothetical protein AB395_00005111 |
| | IC52_RS05015 | <i>nuoK</i> | 上调 | 1.62 | 4.41×10^{-32} | NADH:ubiquinone/quinone oxidoreductase |
| | IC52_RS03295 | - | 上调 | 1.07 | 2.82×10^{-15} | cytochrome C oxidase subunit IV |
| | IC52_RS05010 | - | 上调 | 1.08 | 6.36×10^{-36} | NADH-ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase, chain 6 |
| | IC52_RS03300 | - | 上调 | 1.09 | 1.78×10^{-70} | bb3-type cytochrome oxidase subunit IV |

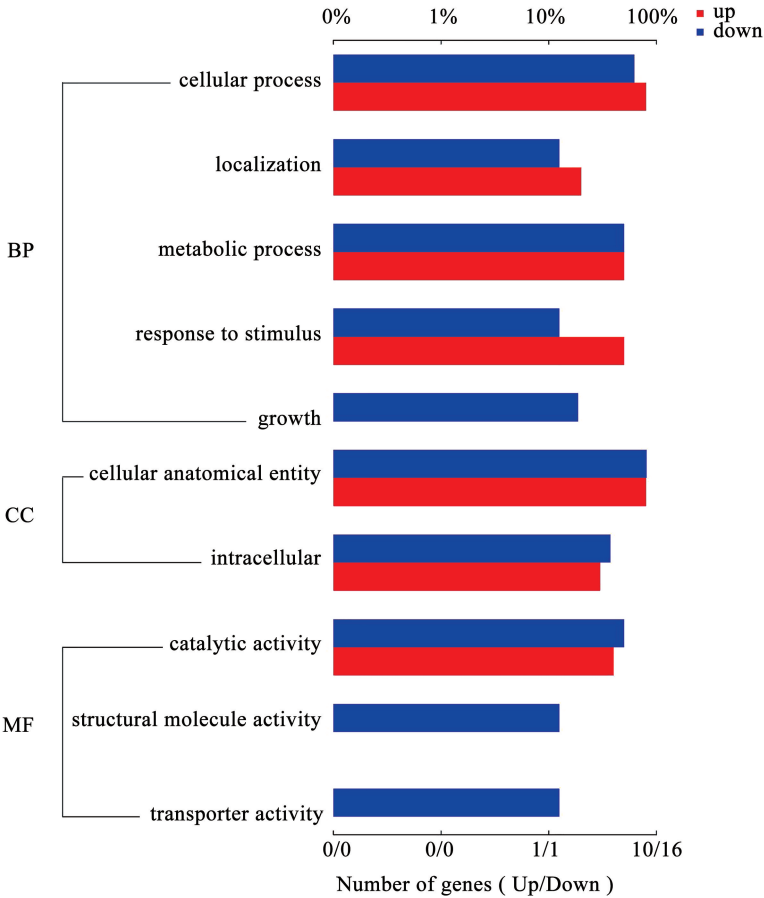
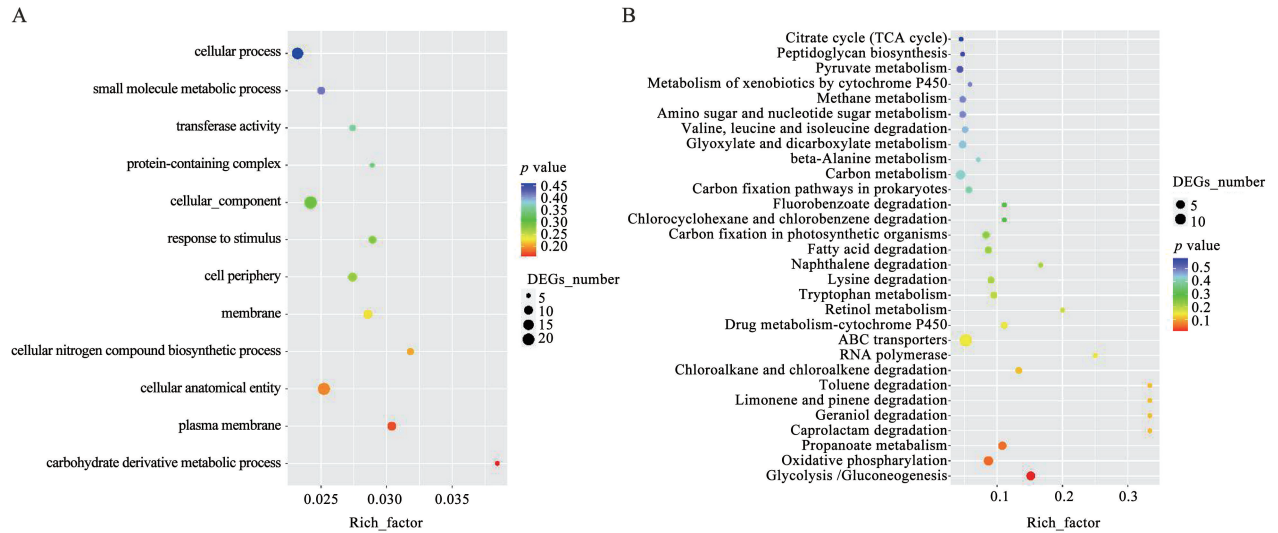


图 4 差异表达基因的 GO 分析
Fig.4 GO analysis of differentially expressed genes



注：A. GO 富集分析；B. KEGG 富集分析。
Note: A. GO enrichment analysis; B. KEGG enrichment analysis.

图 5 S3307 处理 *S. shofinae* 的差异基因谱的 GO 和 KEGG 富集

Fig.5 The enrichment status of GO and KEGG in the differential gene profile of *S. shofinae* treated with S3307

2.5 S3307 对 *S. shofinae* *nod* 基因表达的影响

为了验证转录组信息的可信度,同时验证 S3307 可抑制结瘤的试验结果,选择调控根瘤菌结瘤的差异表达基因 IC52_RS29880 (*nodA*) 和 IC5 2_

RS1765 (*nodD*) 进行 qRT-PCR 验证,结果如图 6 所示,S3307 处理下调了 *S. shofinae* 的 *nodA* 和 *nodD* 表达,表达量分别下调了 23.9% 和 7.9%,与转录组测序结果相符。

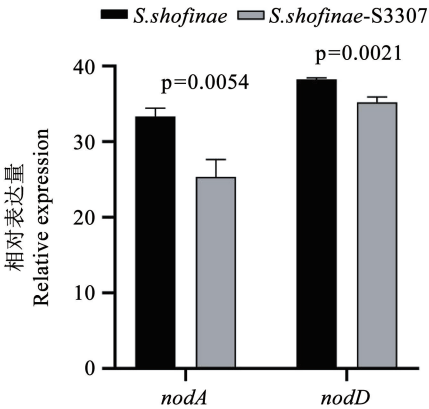


图6 差异基因 *nod* 的 qRT-PCR 验证
Fig.6 qRT-PCR validation of differential gene *nod*

3 讨论

虽然植物调节剂已被广泛用于农业生产,但它对根瘤菌—根系共生体系产生的生物学调控效应报道非常有限。已有报道指出 S3307 可抑制作物的营养生长^[14-16],本研究结果显示 1×10^{-2} S3307 (v/v) 处理显著抑制了 *S. shofinae* 的生长,改变了细胞形态,影响了部分基因表达,特别是下调了 *nod* 基因表达。这可能是关于 S3307 直接对纯培养根瘤菌生长和形态影响的首次报道。

在表型试验中发现,添加 S3307 显著抑制了 *S. shofinae* 细胞生长,且诱导了细胞形态的改变,很多研究也得到了类似的结果^[17-19]。值得注意的是,添加 S3307 显著减少了 *S. shofinae* 细胞内 PHB 的数量。早期研究已经表明,PHB 在细胞内的积累是对如热休克、紫外线辐射、氧化剂和渗透休克等各种应激的反应^[20],如 Gorshkov 在研究三唑类杀菌剂对豌豆结瘤影响时发现,杀菌剂会使豌豆根瘤内的 PHB 大量积累,从而降低固氮能力^[21]。因此可以推测,适当浓度的 S3307 有助于根瘤菌消耗 PHB 发挥固氮作用,这可能是盆栽试验中促进大豆植株发育的一个因素,具体原因有待进一步研究。

豆科植物与根瘤菌形成的共生结构是个复杂的过程。在共生有机体中,宿主与共生体必然发生信号交流。在根瘤发生过程中,植物调节剂很早就被认为是信号传递的介质^[22]。植物调节剂应用在豆科植物上来调控根瘤生长发育的研究较多。如大豆用生长素、乙烯利和激动素浸种,结果表明乙烯利、激动素促进了根瘤的提前发生,而生长素延迟了根瘤的发生^[23]。但是尚不清楚根瘤的发生提前和延迟过程中不同植物调节剂在其中扮演的信号传递角色及其具体的分子机制。本研究基于转

录组学分析探究了植物调节剂 S3307 和 大豆根瘤菌 *S. shofinae* 之间的信号传递和共生机制,初步揭示了 S3307 在根瘤菌自身生长及结瘤固氮表现中的调控机制,筛选出了在此过程中存在差异表达的基因集,对得到的差异基因分别进行了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,从宏观上展示了 *S. shofinae* 及大豆根部响应 S3307 处理的基因的功能分布特征。转录组学分析初步解释了表型试验中 *S. shofinae* 中 PHB 减少的原因,并揭示了 S3307 处理结瘤固氮被抑制的分子调控机制,在本研究中未能进一步对筛选到的差异表达基因谱参与调控结瘤固氮的具体信号传递机制深入研究,这将是后续工作的重点。此外,由于 *nod* 基因参与了植物细胞的生长和根瘤的形成^[24],因此测定了 *nodA* 和 *nodD* 的相对转录丰度。结果表明经 S3307 处理 *S. shofinae* 的 *nodA* 与 *nodD* 基因表达量与对照相比均表现出不同程度的下调,这说明了添加适当浓度的 S3307 导致 *S. shofinae* 的生长及在大豆根系上的结瘤数减少的原因可能是由于其降低了总的活菌数或抑制了其 *nod* 基因表达。

本研究采用蛭石盆栽方式在人工温室进行回接验证,屏蔽了土壤、气候等环境因素对试验的影响。大量研究证实根瘤固氮为植物提供氮源,但与茎叶在植物体内的营养物质分配方面构成了一定程度的竞争关系,一定程度上抑制植株其它部位的生长发育^[25-27]。研究结果显示经 S3307 处理的 *S. shofinae* 接种大豆虽然在一定程度上减少了根瘤数,但增加了大豆植株茎叶干重,说明 S3307 可以通过调控 *S. shofinae* 来改善根瘤菌与宿主植物之间的营养分配关系。

4 结论

本研究以纯培养 *S. shofinae* 为研究对象,向培养基中添加 S3307 以模拟其土壤残留。表型试验结果显示:S3307 可降低 *S. shofinae* 细胞的生长速度、改变细胞大小,减少细胞内 PHB 数量;经 S3307 处理的 *S. shofinae* 接种大豆虽然减少了结瘤数和叶绿素含量,但提高了大豆植株的叶干重和茎干重。功能富集分析显示,在生物过程中差异基因表达主要被注释到细胞过程、定位、新陈代谢、应激响应、生长等过程,S3307 调控差异基因 *nod* 表达结果与表型试验结果一致。因此,施用适当浓度的 S3307 可以通过调控根瘤菌合理分配植物体内的营养物质,从而促进大豆植株的生长发育。

参考文献

[1] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10): 1227-1281. (LI J, LI C Y. Seventy-year major research progress in plant hormones by Chinese scholars[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2019, 49(10): 1227-1281.)

[2] STRYDHORST S, HALL L, PERROTT L. Plant growth regulators: What agronomists need to know[J]. Crops & Soils, 2018, 51(6): 22-26.

[3] 马婧玮, 李通, 周玲, 等. 烯效唑在棉花及土壤中的残留及降解动态[J]. 农药学报, 2017, 19(3): 374-380. (MA J W, LI T, ZHOU L, et al. Residue and dissipation of uniconazole in *Gossypium* spp. and soil [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2017, 19(3): 374-380.)

[4] LI X, YE L, ZHANG X, et al. Root-tip cutting and uniconazole treatment improve the colonization rate of *Tuber indicum* on *Pinus armandii* seedlings in the greenhouse [J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(2): 535-547.

[5] KARTHIK C, OVES M, SATHYA K, et al. Isolation and characterization of multi-potential *Rhizobium* strain ND2 and its plant growth-promoting activities under Cr(VI) stress[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2017, 63(8): 1058-1069.

[6] ALÍAS-VILLEGAS C, FUENTES-ROMERO F, CUÉLLAR V, et al. Surface motility regulation of *Sinorhizobium fredii* HH103 by plant flavonoids and the NodD1, TtsI, NodR, and MucR1 symbiotic bacterial regulators [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7698.

[7] XIANG H, WANG S, LIANG X, et al. Foliar spraying of exogenous uniconazole (S3307) at the flowering stage as an effective method to resist low-temperature stress on mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek][J]. Scientific Reports, 2023, 13: 22331.

[8] WANG S, ZHOU H, FENG N, et al. Physiological response of soybean leaves to uniconazole under waterlogging stress at R1 stage [J]. Journal of Plant Physiology, 2022, 268: 153579.

[9] 黄文婷, 冯乃杰, 郑殿峰, 等. 烯效唑和胺鲜酯对大豆叶片光合特性与碳代谢的调控效应[J]. 大豆科学, 2020, 39(2): 243-251. (HUANG W T, FENG N J, ZHENG D F, et al. Effects of uniconazole and diethyl aminoethyl hexanoate on photosynthetic characteristics and carbon metabolism of soybean leaves[J]. Soybean Science, 2020, 39(2): 243-251.)

[10] CHEN W H, YANG S H, LI Z H, et al. *Ensifer shofinae* sp. nov., a novel rhizobial species isolated from root nodules of soybean (*Glycine max*) [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017, 40(3): 144-149.

[11] TAN Y, XU S, WU R, et al. A gradient Laponite-crosslinked nanocomposite hydrogel with anisotropic stress and thermo-response [J]. Applied Clay Science, 2017, 148: 77-82.

[12] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.

[13] SPAINK H P, WIJFFELMAN C A, PEES E, et al. *Rhizobium* nodulation gene nodD as a determinant of host specificity [J]. Nature, 1987, 328(6128): 337-340.

[14] HASAN M, BANO A, HASSAN S, et al. Enhancement of rice growth and production of growth-promoting phytohormones by inoculation with *Rhizobium* and other rhizobacteria [J]. World Applied Sciences Journal, 31(10): 1734-1743.

[15] WANG L, MU C, DU M, et al. The effect of mepiquat chloride on elongation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) internode is associated with low concentration of gibberellic acid [J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2014, 225: 15-23.

[16] 张瑞浦, 王娜, 王可心, 等. 植物生长调节剂 S3307 对绿豆源库生理代谢的影响 [J/OL]. 作物杂志, 2023: 1-11. (2023-03-28). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1808.S.20230328.1514.003.html>. (ZHANG R P, WANG N, WANG K X, et al. Effects of plant growth regulator S3307 on physiological metabolism of mung bean [J/OL]. Crops, 2023: 1-11. (2023-03-28). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1808.S.20230328.1514.003.html>.)

[17] OLANREWAJU O S, GLICK B R, BABALOLA O O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(11): 197.

[18] RADEMACHER W. Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production [J]. Annual Plant Reviews, 2016, 49: 359-404.

[19] SMALL C C, DEGENHARDT D. Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review [J]. Ecological Engineering, 2018, 118: 43-51.

[20] TRAINER M A, CHARLES T C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(4): 377-386.

[21] GORSHKOV A P, KUSAKIN P G, BORISOV Y G, et al. Effect of triazole fungicides Titul Duo and vintage on the development of pea (*Pisum sativum* L.) symbiotic nodules [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): 8646.

[22] 李梦洁, 李占彪, 周思含, 等. 植物根际微生物调控根系构型研究[J]. 中国农业气象, 2021, 42(11): 895-904. (LI M J, LI Z B, ZHOU S H, et al. Advances in the root system architecture regulated by plant rhizosphere microorganisms [J]. Chinese Journal of Agrometeorology, 2021, 42(11): 895-904.)

[23] 韩冬, 张代平, 王平, 等. 化控技术在大豆种植中的研究与应用[J]. 黑龙江农业科学, 2020(12): 134-138. (HAN D, ZHANG D P, WANG P, et al. Research and application of chemical control technology in soybean planting [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2020(12): 134-138.)

[24] GHANTASALA S, ROY CHOUDHURY S. Nod factor perception: An integrative view of molecular communication during legume symbiosis [J]. Plant Molecular Biology, 2022, 110(6): 485-509.

[25] JEUDY C, RUFFEL S, FREIXES S, et al. Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses [J]. The New Phytologist, 2010, 185(3): 817-828.

[26] 王晓丽, 王敏, 岳爱琴, 等. 氮素营养和根瘤菌接种对大豆结瘤固氮和生长的影响 [J]. 华北农学报, 2022, 37(1): 95-102. (WANG X L, WANG M, YUE A Q, et al. Effects of nitrogen nutrition and *Rhizobium* inoculation on nodulation and nitrogen fixation and growth of soybean [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(1): 95-102.)

[27] 朱佳豪, 焦健, 蒲怡, 等. 固氮根瘤菌与海南主栽菜用大豆的共生匹配性和促生效应 [J]. 大豆科学, 2023, 42(4): 441-450. (ZHU J H, JIAO J, PU Y, et al. Symbiotic compatibility and growth promotion effect of nitrogen fixing rhizobia on Hainan vegetable-type soybean [J]. Soybean Science, 2023, 42(4): 441-450.)