

孙计平, 王亚乐, 李雪君, 等. 基于转录组测序筛选烟草响应疫霉侵染的候选基因[ J ]. 江苏农业学报, 2025, 41( 3 ) : 457-467.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.03.004

## 基于转录组测序筛选烟草响应疫霉侵染的候选基因

孙计平, 王亚乐, 李雪君, 平文丽, 孙 焕

(河南省农业科学院烟草研究所, 河南 许昌 461000)

**摘要:** 疫霉属真菌是主要的植物病原菌, 会对很多作物造成毁灭性伤害, 为挖掘烟草响应疫霉侵染的候选基因, 用烟草疫霉菌侵染河洛 1 号幼苗, 通过转录组测序技术, 对疫霉菌侵染前与侵染后 24 h 和 48 h 的差异表达基因( DEG )进行基因本体( GO )和京都基因与基因组百科全书( KEGG )富集分析, 并利用实时定量聚合酶链反应( qRT-PCR )技术验证。结果表明, 疫霉菌侵染后 24 h 和 48 h 分别筛选出 DEG 4 563 个和 14 053 个, 共同变化的基因 3 623 个, 其中 1 502 个上调差异表达基因被 GO 基因组注释, 主要富集在谷胱甘肽代谢过程和蛋白质磷酸化生物学过程; 787 个下调差异表达基因被 GO 基因组注释, 主要富集在转录调控。KEGG 富集分析结果显示, 差异表达基因主要富集在植物-丝裂原活化蛋白激酶信号通路、植物激素信号转导通路和植物-病原菌互作通路。植物-病原菌互作通路中 *FLS2* 上调促进 *MEKK1* 磷酸化, 诱导蛋白激酶 *MPK4*, 引起 *WRKY12* 持续下调表达, *WRKY9*、*WRKY24*、*WRKY26*、*WRKY31*、*WRKY33*、*WRKY40* 持续上调表达; 诱导蛋白激酶 *MPK3/6* 表达, 引起 *WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY17* 和 *WRKY41* 上调表达, 导致 *PR-1* 基因持续下调表达, 河洛 1 号植株感病。

**关键词:** 转录组; 疫霉; 河洛 1 号; 烟草

**中图分类号:** S572; S435.72

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440( 2025 ) 03-0457-11

## Screening of candidate genes in response of tobacco to *Phytophthora nicotianae* infection based on transcriptome sequencing

SUN Jiping, WANG Yale, LI Xuejun, PING Wenli, SUN Huan

( Tobacco Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Xuchang 461000, China )

**Abstract:** *Phytophthora* fungi are important plant pathogens that cause devastating damage to many crops. To identify candidate genes in tobacco that respond to *Phytophthora nicotianae* infection, seedlings of Heluo No.1 were infected with *Phytophthora nicotianae*. Differential expression genes (DEGs) before infection and 24 h, 48 h after infection were analyzed by Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses, based on transcriptome sequencing. The results were verified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results indicated that 4 563 DEGs and 14 053 DEGs were identified at 24 h and 48 h post-infection, respectively, with 3 623 genes showing common changes. Among them, 1 502 up-regulated DEGs were annotated by GO genome, mainly enriched in glutathione metabolism process and protein phosphorylation biological process. A total of 787 down-regulated DEGs were annotated by GO genome, mainly enriched in transcriptional regulation. KEGG enrichment analysis showed that DEGs were primarily enriched in the plant-mitogen activated protein kinase signaling pathway, plant hormone signal transduction pathway and plant-pathogen interaction pathway. In the plant-

pathogen interaction pathway, the up-regulation of *FLS2* promoted the phosphorylation of *MEKK1*, which induced the expression of protein kinase *MPK4*, caused the continuous down-regulation of *WRKY12* and the continuous up-regulation of *WRKY9*, *WRKY24*, *WRKY26*, *WRKY31*, *WRKY33* and *WRKY40*. Besides, the expression of protein kinases *MPK3/6*

收稿日期: 2024-05-22

基金项目: 河南省烟草公司洛阳市公司科技项目( 202241030020005-

3 ); 河南省农业科学院基础性科研工作项目( 2024JC09 )

作者简介: 孙计平( 1978- ), 女, 河北玉田人, 博士, 副研究员, 研究方向为烟草遗传育种。( E-mail ) sunjiping2002@ 126.com

was induced, leading to the up-regulation of *WRKY11*, *WRKY15*, *WRKY17* and *WRKY41*, and the continuous down-regulation of the *PR-1* gene. As a result, Heluo No.1 plants were more susceptible to *Phytophthora nicotianae* infection.

**Key words:** transcriptome; *Phytophthora nicotianae*; Heluo No.1; tobacco

疫霉菌变异复杂、传播速度快、存活能力强,容易对内吸式杀菌剂产生抗药性<sup>[1]</sup>。疫霉菌侵染给农业和林业造成毁灭性危害,比如大豆疫霉病<sup>[2]</sup>、马铃薯晚疫病<sup>[3]</sup>、橡树疫霉病<sup>[4]</sup>、辣椒疫病<sup>[5]</sup>是全世界范围内严重的真菌病害,已经造成了重大损失。由烟草疫霉菌造成的烟草黑胫病和剑麻斑马纹病<sup>[1]</sup>均位居各种病害之首。烟草疫霉菌属于一种土传双鞭毛卵菌的植物病原体<sup>[6]</sup>,使用普通的真菌杀菌剂防治效果较差,选育出抗病品种成为控制该病害行之有效的方案。烟草抗黑胫病基因资源有限,研究疫霉与烟草互作,筛选疫霉侵染过程中发挥作用的关键基因,对烟草抗病分子育种具有重要的科学意义。转录组测序有助于解析植物对非生物胁迫的应答机理,发掘功能基因<sup>[7]</sup>,张燕梅等<sup>[8]</sup>分析剑麻疫霉菌与烟草疫霉菌互作转录组数据,发现病程相关蛋白(PR)、苯丙素类生物合成等基因表达量上调;竹龙鸣<sup>[9]</sup>通过分析在大豆疫霉侵染抗病品种和感病品种过程中 *RpsJS* 基因表达量的差异,筛选到 3 个抗性(R)基因;卢珍红等<sup>[10]</sup>认为 *GbWRKY51* 可能通过调节植保素或乙烯的生物合成来防御隐地疫霉菌的胁迫。Meng 等<sup>[11]</sup>利用比较转录组分析,挖掘烟草抗/感疫霉关键基因。近年来,挖掘植物感病基因的研究越来越引起人们关注,大豆转乙酰酶 *GmTAP1* 是一种易感因子,它被大豆疫霉菌分泌的诱导致病关键毒性因子 RxLR 的效应物 PsAvh52 劫持,从而增强了大豆的易感性<sup>[12]</sup>。

河洛 1 号是河南省烟草公司洛阳市公司联合河南中烟工业有限责任公司、浙江中烟工业有限责任公司、河南省农业科学院烟草研究所共同培育的烤烟新品种,该品种适应性广、耐旱性强,但易感黑胫病,烟草疫霉菌克服其防御反应的发病机制尚不清楚。本研究拟对河洛 1 号幼苗人工接种烟草疫霉菌,通过转录组测序技术(RNA-seq)和生物信息学分析,筛选疫霉菌侵染后不同时间的差异表达基因,挖掘响应疫霉菌侵染的相关候选基因,为进一步选育抗病烟草品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为烟草品种河洛 1 号(品种代号:

LY1306)。

### 1.2 烟草苗的疫霉菌胁迫处理

烟草品种河洛 1 号采用漂浮育苗,培养至 4 张真叶时,选取 21 株长势一致的烟草苗移栽到花盆(直径 10 cm,高 10 cm)中,预先对培养土进行灭菌处理,每盆 1 株,置于人工气候箱培养(温度:白天 25 ℃,晚上 18 ℃;湿度 60%;光照处理:16 h 光/8 h 暗)。

接种疫霉菌:待烟草苗长至 6~7 张真叶时接种疫霉菌 1 号生理小种,选取 3 株烟草苗作为对照(CK),不接菌,选取 18 株烟草苗接菌(接菌量为每株 2 mL 疫霉菌孢子悬浮液,孢子含量 1 mL  $5 \times 10^7$  个,接菌部位为茎基部);分别取不接菌(CK)、接菌 24 h(H24)、接菌 48 h(H48)接菌部位上下各 1 cm 范围内的茎,液氮速冻后,置于干冰中运输至北京百迈客生物科技有限公司进行 RNA 提取及后续 RNA-seq 测序,设 3 次生物学重复,每个重复 3 株混合取样。

### 1.3 RNA-seq 数据分析

原始数据(Raw data)经过质控,获得高质量的 Clean data。参考烟草数据库 N.tabacumv1.0 Edwards 2017 BLASTA ([http://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_tabacum/genome/](http://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome/))进行序列比对,利用 StringTie 将已匹配的 Reads 进行组装。利用皮尔逊相关系数进行生物学重复检测,并制作相关性热图;利用主成分分析(PCA)评估样品的离散度。采用每千个碱基的转录组每百万映射读取的碎片(FPKM)值对基因表达水平的高低进行评估,利用 DESeq2\_EBSeq 软件进行差异表达基因表达分析,设置筛选条件为  $|\log_2 FC| \geq 1$  且  $P \leq 0.01$  (FC 表示差异表达倍数)。

对疫霉菌处理后 24 h 和 48 h 共同变化的基因进行分析,去除未被基因本体(GO)基因组注释以及冗余的差异表达基因,筛选疫霉菌侵染 24 h 和 48 h 表达量持续增加/降低的基因进行 GO 富集分析及功能描述。

利用百迈客生物云计算平台(<https://www.biocloud.net/>)在线分析,对持续上调或下调的差异表达基因(DEG)进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;对重要代谢通路进行 KEGG 通

路注释分析,挖掘响应疫霉胁迫的基因。

#### 1.4 qRT-PCR 验证

挑选 12 个抗/感病相关的 DEGs 进行实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR), 验证 RNA-seq 结果的准确性。以烟草 *L25* 基因 (GenBank: L1890) 为内参基因, 引物详见表 1。qPCR 扩增反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环 40 次。数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法。

表 1 qPCR 反应所用引物

Table 1 Primers used for qPCR

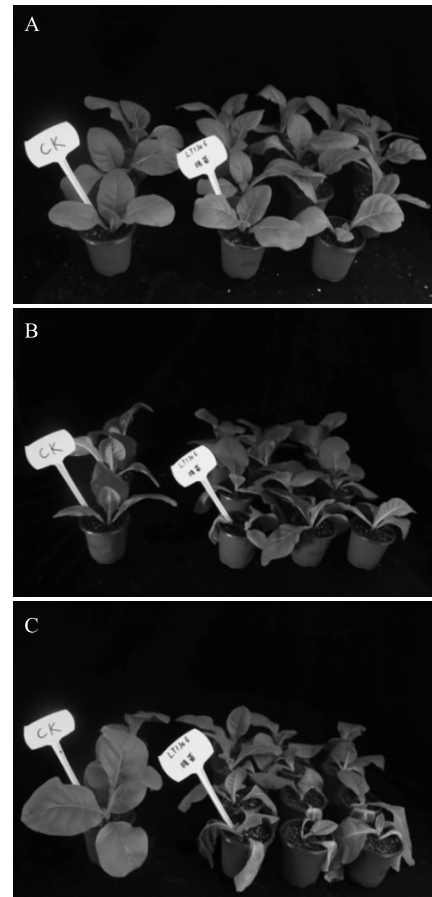
基因登录号	引物名称	序列(5'→3')
LOC10771892	WAKL20-F	TGCTGAGGTCACCCCTGAAT
	WAKL20-R	GAACGTACAGCAAATCGGCG
LOC107830484	bHLH81-F	GTGGAACGCGCATAAGTGAC
	bHLH81-R	GTGGATAGCAAAAGTCAGTGCC
LOC107792230	WRKY15-F	TGTGAGAGGTTGTCCAGCAC
	WRKY15-R	ACTCCACAATGACAAAATACATGAC
LOC107824587	WRKY40-F	TGGAGTATATGAACAACCAGCAGA
	WRKY40-R	TGAGCTGCTTCTGTATGAACG
LOC107815425	WRKY53-F	ACCAAGCTTTTAACCTCTGCACAT
	WRKY53-R	AAGTTGGCGAGCATCTGGTT
LOC107778152	WRKY41-F	TGAGCTCAATGGCTTCTACTACT
	WRKY41-R	TAGCACAGGCTGGGGAGATT
LOC107802364	WRKY11-F	AACTCGCCGACTTCACTGTT
	WRKY11-R	GTCGGCTGTGGTGGAGTTTC
LOC104111089	PR-1-F	TGCAGCTCGTTCAGCACTTA
	PR-1-R	GCCTGGCTCGGCGAC
LOC107799566	MPK3-F	CAGATGTTACAGGGCACCAG
	MPK3-R	GCCGAGAAGCTCAGTTAGCA
LOC107826584	ClpB1-F	TCGTTGCAAAAGTCTCGCAG
	ClpB1-R	CACTCTTGCTGCACCAATCC
LOC107827270	CBL1-F	GAAGGACTCTTGGTGAAGGC
	CBL1-R	GTCCACGATTCGAGCCTTCT
LOC107779554	NSI-F	CCACTTCTCCCGTTACTGCTT
	NSI-R	CCCGGATCTGATGGATTCCC
L25(内参基因)	L25-F	AGTTACATTCCACCGACC
	L25-R	TCCTCAATCTTCTCATTCGACG

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草疫霉菌侵染下植株的表型变化

分别于接种疫霉菌后 24 h 和 48 h 调查河洛 1 号 (LY1306) 表型, 河洛 1 号在接种疫霉菌后 24 h 叶片出现轻度萎蔫, 接种疫霉菌后 48 h 叶片出现重

度萎蔫 (图 1)。



A: 不接种疫霉菌的烟草苗表型; B: 接种疫霉菌 24 h 的烟草苗表型; C: 接种疫霉菌 48 h 的烟草苗表型。

图 1 LY1306 疫霉菌接种前、接种后 24 h 以及接种后 48 h 的烟草苗表型

Fig.1 Phenotype of tobacco seedlings LY1306 before and 24 h, 48 h after *Phytophthora nicotianae* inoculation

### 2.2 转录组测序数据质量评估

对 3 组不同处理 9 个烟草苗茎样本进行转录组测序, 结果见表 2, 经过滤后共有 55.79 Gb Clean data, G+C 含量为 42.77%~44.48%, 碱基识别出错率小于千分之一 ( $Q_{30}$ ) 占比 91.70%~94.13%。各样品 Clean reads 的参考基因组比对率为 84.16%~91.92%, 测序质量合格。

### 2.3 不同样品间基因表达水平相关性分析

不同样品间基因表达水平的相关性分析结果 (表 3) 表明, 重复间相关系数最低为 0.912, 最高为 0.982, 说明试验重复性较好; CK 与 H24 的相关性大于 CK 与 H48 的相关性, 说明随着疫霉菌侵染时间延长基因表达量变化更大。

以基因表达量为水平向量,主成分分析(PCA)结果如图 2 所示,样品组间距离较远,组内距离较近,能较好地把 3 组样品分开。PCA 结果显示第 1

主成分(PC1)占比 45.07%,第 2 主成分(PC2)占比 17.64%,两者对样品差异的贡献值超过 60.00%,可以代表样品间的差异情况。

表 2 转录组数据质量评估

Table 2 Quality assessment of transcriptome sequencing data

样本	总数据(bp)	比对数据(bp)	比对率(%)	G+C 含量(%)	Q30 占比(%)
CK-1	40 281 238	35 978 800	89.32	43.76	93.70
CK-2	44 073 062	39 133 679	88.79	43.25	91.70
CK-3	40 998 000	36 580 759	89.23	44.48	93.77
H24-1	40 591 886	37 095 539	91.39	42.95	92.56
H24-2	40 839 706	37 070 335	90.77	43.10	93.93
H24-3	40 172 206	36 927 540	91.92	42.77	93.70
H48-1	38 437 664	32 349 685	84.16	43.95	94.13
H48-2	46 105 222	41 825 497	90.72	43.13	93.65
H48-3	41 999 254	38 354 682	91.32	43.35	93.30

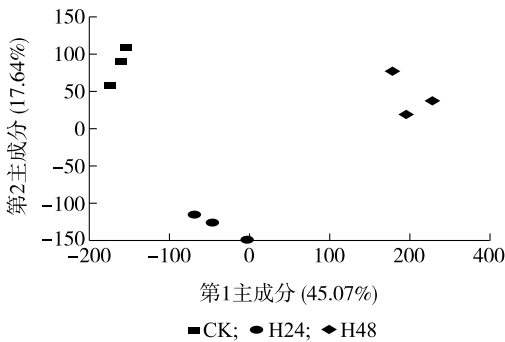
CK:不接种疫霉菌;H24:接种疫霉菌 24 h;H48:接种疫霉菌 48 h。

表 3 样品间基因表达量的相关性分析结果

Table 3 Analysis results of gene expression correlation between samples

样本	基因表达量的相关性								
	H48-3	H48-2	H48-1	H24-3	H24-2	H24-1	CK-3	CK-2	CK-1
H48-3	1.000								
H48-2	0.979	1.000							
H48-1	0.919	0.935	1.000						
H24-3	0.375	0.433	0.491	1.000					
H24-2	0.432	0.490	0.537	0.958	1.000				
H24-1	0.532	0.589	0.637	0.912	0.945	1.000			
CK-3	0.238	0.291	0.368	0.746	0.679	0.630	1.000		
CK-2	0.261	0.316	0.389	0.755	0.703	0.652	0.982	1.000	
CK-1	0.221	0.271	0.346	0.768	0.710	0.646	0.978	0.968	1.000

CK:不接种疫霉菌;H24:接种疫霉菌 24 h;H48:接种疫霉菌 48 h。



CK:不接种疫霉菌;H24:接种疫霉菌 24 h;H48:接种疫霉菌 48 h。

图 2 样品间主成分分析(PCA)

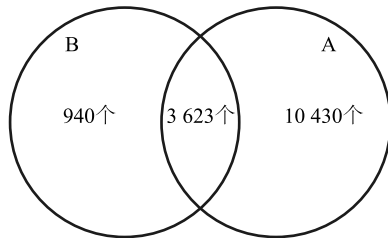
Fig.2 Principal component analysis (PCA) between samples

2.4 差异表达基因( DEG )分析

疫霉菌侵染后 24 h 和 48 h 发生表达变化的 DEG 韦恩图见图 3。各比较组合筛选出的 DEG 数量见表 4。与对照相比较,疫霉菌侵染后 24 h 共筛选出 4 563 个 DEG,其中 2 691 个上调,1 872 个下调;延长疫霉菌侵染时间,差异表达基因的数量随之增加,疫霉菌侵染后 48 h 共筛选出 DEG 14 053 个,其中上调基因 6 848 个,下调基因 7 205 个。疫霉菌侵染后 24 h 和 48 h 有 3 623 个共同变化的基因,其中 2 078 个共同上调,1 486 个共同下调,59 个上调、下调不一致。进一步分别将上调和下调的差异表达基因去除未被 GO 基因组注释以及冗余的差异表达基



因,筛选得到持续上调/下调的差异表达基因,其中,1 502个上调,787个下调。



A:0 h 与 48 h 的比较组;B:0 h 与 24 h 的比较组。

图3 疫霉菌侵染后 24 h 和 48 h 烟草样品差异表达基因的韦恩图

Fig.3 Venn diagram of differential expression genes in tobacco samples 24 h and 48 h after *Phytophthora nicotianae* infection

## 2.5 差异表达基因 GO 分类

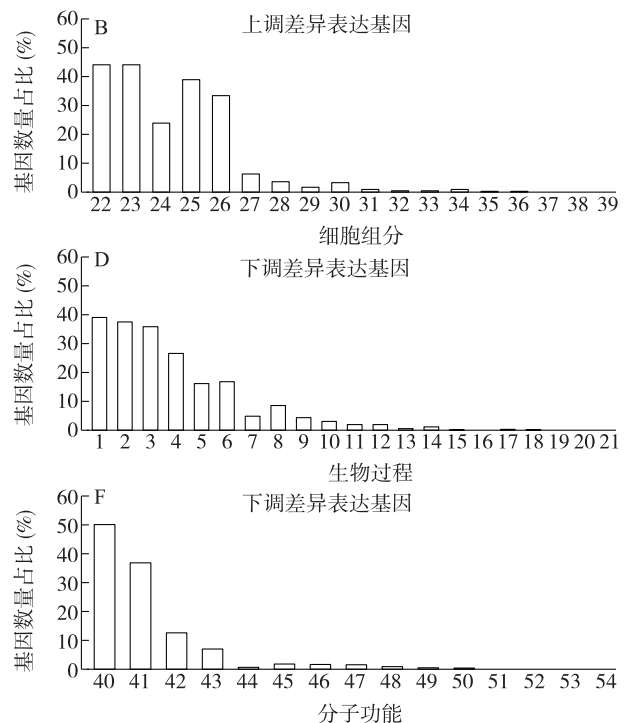
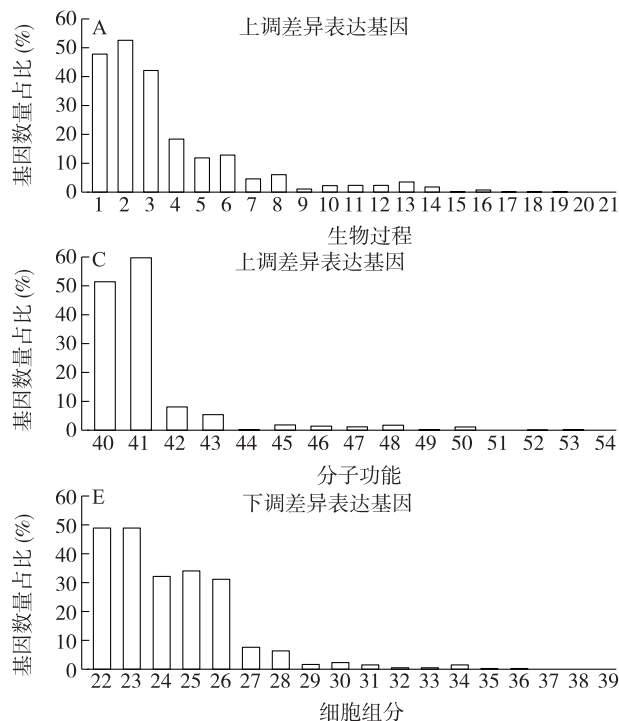
对接种疫霉菌孢子悬浮液后持续变化的 DEG 进行 GO 分类发现,上调的1 502个差异表达基因参

与了 47 个 GO 功能分类项,其中分子功能中的催化活性节点 897 个,结合节点 772 个;生物过程 (Biological process) 中的代谢过程 (Metabolic process) 节点 790 个 (图 4A、图 4B、图 4C)。787 个下调差异表达基因参与了 43 个 GO 功能分类项,主要富集在分子功能大类中的催化活性节点 (290 个) 和结合节点 (394 个),以及生物过程类目中的代谢过程节点 (295 个) 和细胞过程节点 (293 个) (图 4D、图 4E、图 4F)。

表 4 疫霉菌侵染各时间的差异表达基因数量统计

Table 4 Statistics of the number of differential expression genes at different time points after *Phytophthora nicotianae* infection

分组	总基因数量(个)	上调基因数量(个)	下调基因数量(个)
0 h 与 24 h 的比较组	4 563	2 691	1 872
0 h 与 48 h 的比较组	14 053	6 848	7 205
24 h 和 48 h 共表达基因	3 623	2 078	1 486
48 h 和 24 h 持续上调/下调的基因	2 289	1 502	787



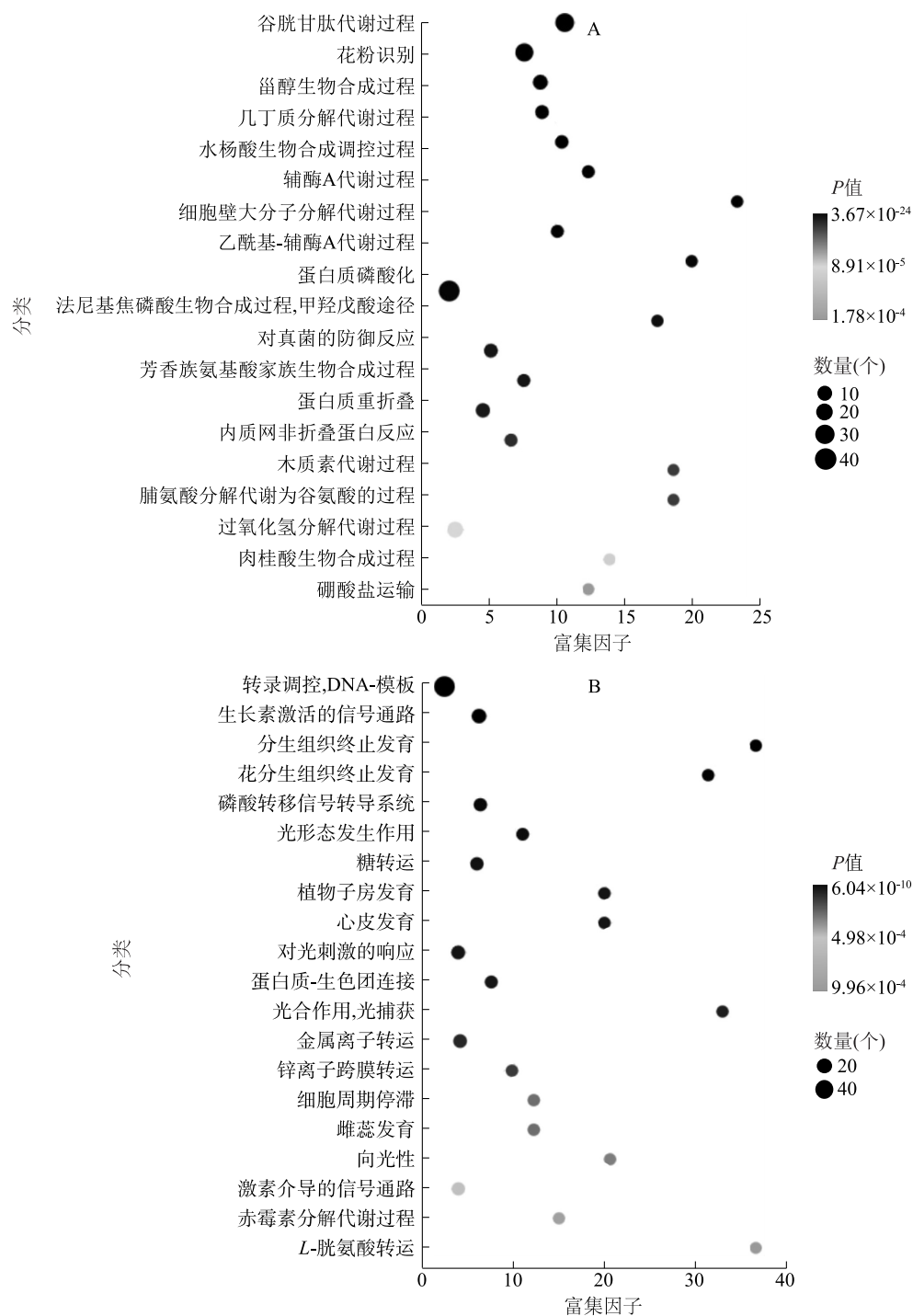
A、B、C 为上调差异表达基因;D、E、F 为下调差异表达基因。1:细胞过程;2:代谢过程;3:单一有机体过程;4:生物调节;5:定位;6:应激响应;7:细胞成分组织或生物发生;8:信号;9:发育过程;10:细胞生物过程;11:繁殖;12:生殖过程;13:多生物过程;14:解毒;15:生长;16:免疫系统过程;17:节律过程;18:运动;19:行为;20:生物黏附;21:细胞集合;22:细胞;23:细胞部分;24:细胞器;25:膜;26:膜部分;27:细胞器部分;28:大分子复合物;29:膜封闭腔;30:胞外区;31:细胞连接;32:其他有机体;33:其他有机体部分;34:共质体;35:超分子复合体;36:胞外区部分;37:拟核;38:突触;39:突触部分;40:结合;41:催化活性;42:转运活性;43:核酸结合转录因子活性;44:结构分子活性;45:分子功能调节剂;46:信号转换器活性;47:分子换能器活性;48:抗氧化活性;49:转录因子活性,蛋白质结合;50:电子载体活性;51:养分库活性;52:蛋白质标签;53:翻译调节因子活性;54:金属伴侣蛋白活性。

图4 差异表达基因的基因本体 (GO) 分类

Fig.4 Gene ontology (GO) classification analysis of differential expression genes

进一步分析生物过程大类,发现1 502个上调差异表达基因主要富集在谷胱甘肽代谢过程(31 个)

和蛋白质磷酸化(41 个)(图 5A)。787 个下调差异表达基因主要富集在转录调控(59 个)(图 5B)。



A:上调差异表达基因;B:下调差异表达基因。

图 5 差异表达基因本体(GO)富集图

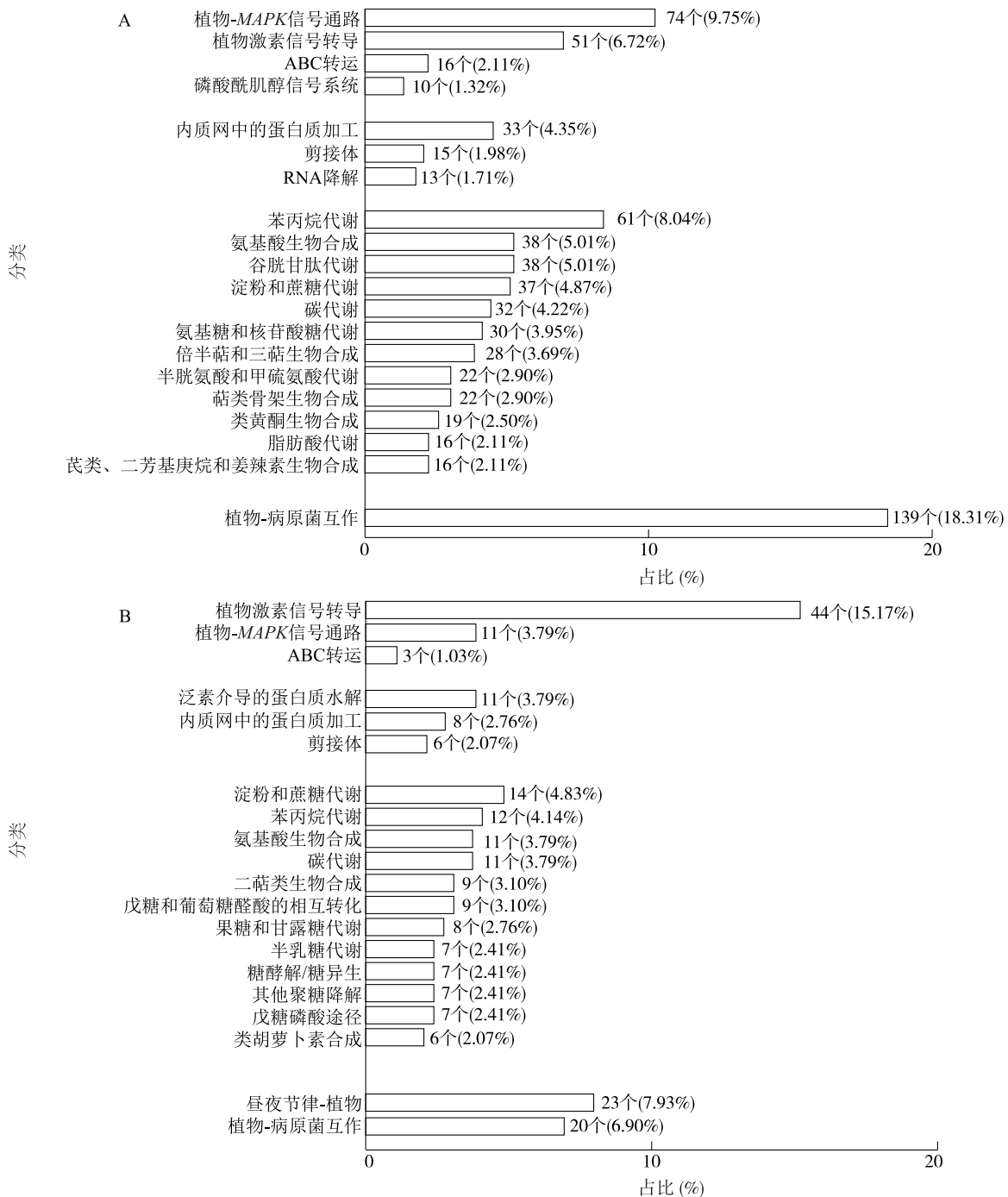
Fig.5 Gene ontology (GO) enrichment plot of differential expression genes

## 2.6 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果表明,接种疫霉孢子悬浮

液不同时间段持续上调或下调的差异表达基因均主要富集到 20 条通路中(图 6)。1 502 个持续上调的

差异表达基因主要富集在植物-病原菌互作(139个)、植物-丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)信号通路(74个)、苯丙烷代谢(61个)和植物激素信号转导(51个)通路(图6A)。另外787个持续下调的差异表达基因主要富集在植物激素信号转导(44个)和植物-病原菌互作(20个)通路(图6B)。



A:上调差异表达基因;B:下调差异表达基因。括号中的百分数表示该基因在 KEGG 数据库注释到这一类基因中的占比。*MAPK*:丝裂原活化蛋白激酶;ABC:ATP 结合盒。

图6 差异表达基因 KEGG 分类分析

Fig.6 KEGG classification analysis of differential expression genes

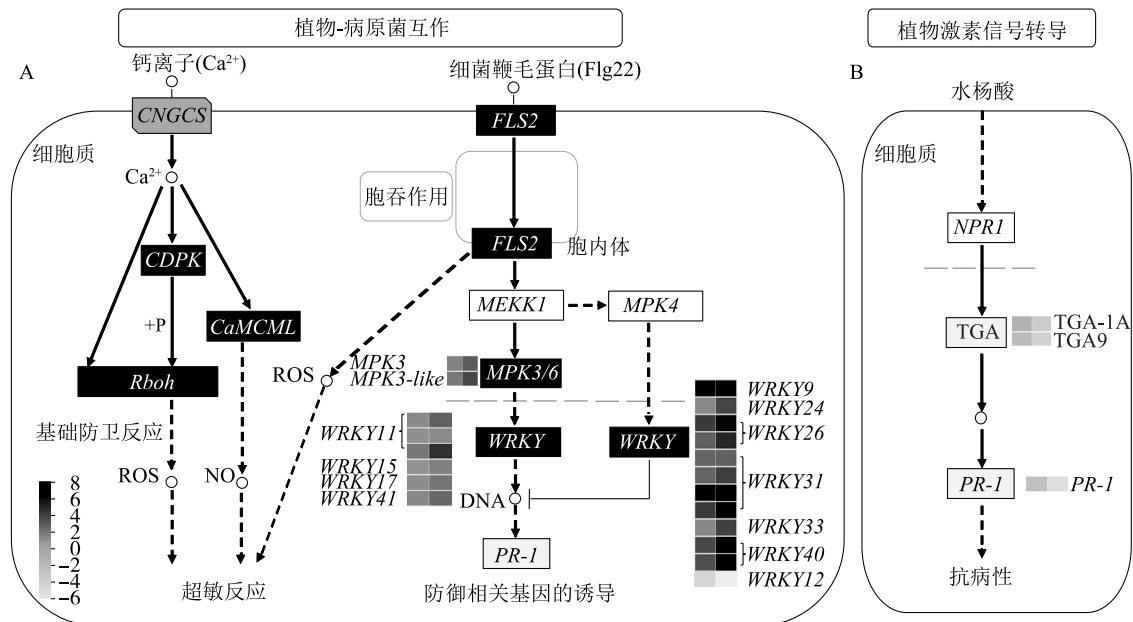
将参与植物-病原菌互作通路的 159 个差异表达基因注释到 KEGG 通路中,主要涉及病原体相关分子

模式(PAMP)、 $\text{Ca}^{2+}$ 第二信使信号转导、植物免疫识别受体 *FLS2* 调节等,重要节点的差异表达基因表达如图 7A 所示。烟草植株受到疫霉菌感染后,一方面, $\text{Ca}^{2+}$ 传感器接收到信号,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,促进钙依赖蛋白激酶(CDPK)磷酸化,激活植物还原性辅酶II(*NADPH*)氧化酶(*Rboh*),引发基础防卫反应,从而促进活性氧(ROS)暴发并增强免疫力;另一方面调动细胞内类钙调素(CaMCML)激活下游相关基因的表达,促进产生一氧化氮(NO)。ROS 暴发和生成的 NO 共同引发植物超敏反应(HR)。

细菌鞭毛蛋白 Flg22 被受体激酶 *FLS2* 感知,引起 *FLS2* 表达上调,一方面间接促进 ROS 暴发,引发植物超

敏反应;另一方面引起丝裂原活化蛋白激酶(*MEKK1*)磷酸化,诱导蛋白激酶 *MPK4*,激活 *WRKY12* 下调表达,*WRKY9*、*WRKY24*、*WRKY26*、*WRKY31*、*WRKY33* 和 *WRKY40* 上调表达,抑制合成特定化合物。诱导蛋白激酶 *MPK3/6* 表达,引起 *WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY17* 和 *WRKY41* 上调表达,促进分泌特定化合物。*PR-1* 在疫霉菌感染后表达量持续下调,主要受到多个基因共同作用。

将 95 个植物激素信号转导通路的差异表达基因注释到 KEGG 通路中,其中水杨酸(SA)信号通路见图 7B,病程相关基因非表达子(*NPR1*)激活 TGACG 基序结合因子(TGA)转录因子下调表达,促进分泌某种化合物,导致 *PR-1* 下调表达。



□□:前面的□表示0 h与24 h的比较组,后面的□表示0 h与48 h的比较组;○:化学分子;+P:磷酸化;ROS:活性氧;NO:一氧化氮;CNGCs:环核苷酸门控离子通道家族基因;CDPK:钙依赖蛋白激酶;CaMCML:类钙调素;*Rboh*:还原型辅酶II(*NADPH*)氧化酶;*FLS2*:受体样激酶;*MEKK1*:丝裂原活化蛋白激酶;*MPK3/6*、*MPK4*:蛋白激酶;*PR-1*:病程相关蛋白1基因;*NPR1*:病程相关基因非表达子1。■:上调和下调;□:激活;□:间接作用;■:上调;□:下调。A:植物-病原菌互作通路;B:水杨酸代谢通路。

图 7 植物-病原菌互作通路和水杨酸代谢通路图

Fig.7 Plant-pathogen interaction pathway and salicylic acid metabolic pathway

## 2.7 利用 qRT-PCR 验证 RNA-seq 结果的准确性

挑选 12 个共同变化的差异表达基因进行实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测,从图 8 可以看出,12 个基因相对表达量在 2 种检测方法中变化趋势一致,说明转录组测序(RNA-seq)结果可靠。

*MPK3*、*WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY41*、*WRKY40*、*PR-1* 均是植物与病原菌互作和 SA 信号通路中的重要基因。疫霉菌感染河洛 1 号后,*MPK3*、*WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY41*、*WRKY40* 作为诱导防御的负调节

因子,相对表达量持续上调,共同作用导致 *PR-1* 基因相对表达量下调,植株感病。

## 3 讨论

烟草疫霉引发的烟草黑胫病是烟草生产中最严重的毁灭性病害之一,热带、温带和亚热带地区烟草黑胫病发病情况尤为严重<sup>[13]</sup>。对易感黑胫病烟草品种河洛 1 号接种高浓度疫霉孢子悬浮液后发现,疫霉感染后 24 h 和 48 h 烟草苗的叶片分别表现轻度萎焉



和重度萎蔫。RNA-seq 结果表明,延长疫霉侵染时间,DEG 数量增加,疫霉菌侵染后 24 h 和 48 h 分别筛选出 DEG 4 563个和14 053个,其中有3 623个表达量共同变化的基因,说明有一部分基因持续参与疫霉诱导反应,去除未被 GO 基因组注释的基因,得到持续上调和下调的差异表达基因,分别为1 502个和 787 个。GO 富集分析发现共同上调的差异表达基因主要富集在谷胱甘肽代谢过程和蛋白质磷酸化。越来越

多的研究表明,谷胱甘肽在植物对干旱、低温和盐胁迫的耐受性中起着重要作用<sup>[14-15]</sup>,此外,谷胱甘肽还与抵抗生物应激的防御反应有关,包括抵御病毒、真菌和细菌感染<sup>[16-18]</sup>。谷胱甘肽能够通过捕捉自由基产生的有害物质,从而防止有害物质对细胞和组织产生氧化损伤,并介导 SA 的信号通路<sup>[19]</sup>。共同下调的差异表达基因主要富集在转录调控,通过调节转录活性来响应逆境胁迫<sup>[20]</sup>。

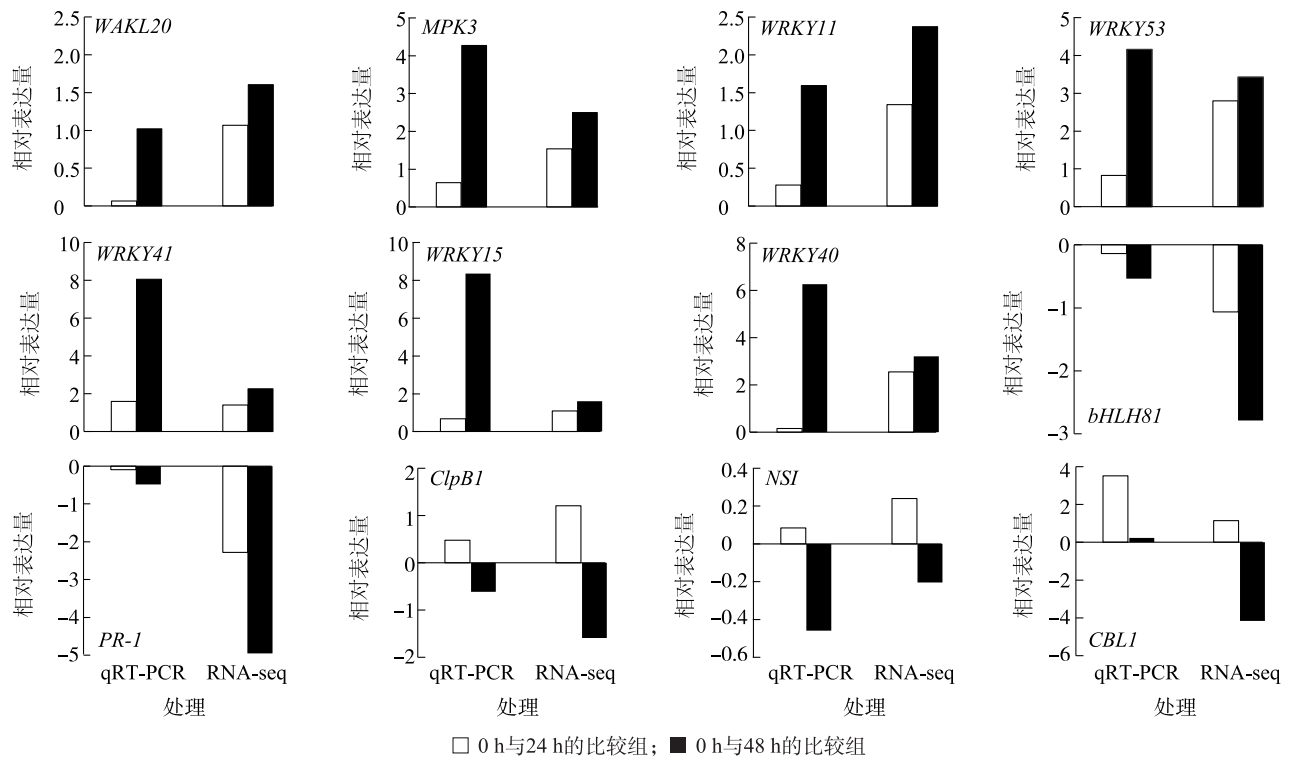


图8 RNA 测序与 qRT-PCR 验证基因表达水平的比较

Fig.8 Comparison of gene expression levels by RNA-sequencing and qRT-PCR

植物对病原菌的反应是通过诱导相关基因转录从而调节信号转导通路及触发植物自身的内在免疫系统<sup>[21]</sup>,在病原菌侵染下植物自身会引发基础防卫反应,从而诱导应激相关基因的表达。在植物与病原菌彼此识别后,以胞间信号方式进行跨膜传递,随后形成第二信使信号分子、级联传递及各信号途径的交叉作用,最终激活防卫基因的表达<sup>[22]</sup>。病程相关蛋白(PR)是植物受到病原物侵扰后产生的一类水溶性蛋白,包括 19 个基因家族,其中,PR-1 是抗病信号通路中标志性基因,具有限制真菌侵害的功能<sup>[23]</sup>。本研究 KEGG 分析结果表明,疫霉菌侵染后持续上调或下调的差异表达基因均涉及了 50 条通路,植物-病原菌互作 KEGG 通路注释结果表明,PR-1 表达量持续

下调,主要是受到 MPK4 和 MPK3/MPK6 共同作用,这和人前得出的 MPK3 和 MPK4 分别是诱导防御和免疫的负调节因子的研究结果<sup>[24-25]</sup>一致。水杨酸(SA)主要激活对生物营养性病原体的防御反应,本研究水杨酸信号通路中 PR-1 下调表达是由于 NPR1 激活 TGA 相关基因下调表达。

疫霉菌侵染植物后,植物细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,从而激活钙依赖性蛋白激酶(CDPK)和钙离子结合蛋白(CALBs),进而导致超敏反应(HR)<sup>[22]</sup>;细菌的鞭毛蛋白(Flg22)被细胞表面的受体蛋白激酶识别后也能把信号向细胞内传递,引起短暂的 ROS 暴发<sup>[26]</sup>,另外也能激发 MAPK 通路<sup>[27]</sup>,激活或抑制抗病相关防御基因,从而通过一系列磷酸化反应向细

胞内发出信号,调控 *WRKYs* 转录,响应逆境胁迫<sup>[28]</sup>。本研究中,*PR-1* 在疫霉菌侵染后表达量持续下调,是 *MPK4* 和 *MPK3/MPK6* 共同作用的结果,*MPK4* 导致 *WRKY12* 下调表达,引起 *WRKY* 家族多个基因上调表达。同时,*FLS2* 表达上调也间接促进 ROS 暴发,引发超敏反应。此外,ROS 暴发和 NO 共同引发植物超敏反应;烟草植株受到疫霉侵染, $\text{Ca}^{2+}$  传感器接收到信号,一方面激活 *Rboh* 促进 ROS 暴发;另一方面调动 *CaMCML* 促进产生 NO。

*WRKY* 家族成员可以识别 *PR1* 基因启动子区域 W-box 序列[(T)(T)TGAC(C/T)],调控脱落酸(ABA)、ROS 等信号通路响应逆境胁迫<sup>[29-30]</sup>。*WRKY* 转录因子响应植物病原菌防御,向小华等<sup>[31]</sup> 研究发现 *NtWRKY26*、*NtWRKY30*、*NtWRKY32* 受黑胫病病原菌诱导,可能与烟草-黑胫病病原菌互作机制相关。*WRKY* 家族基因在植物防御机制中的作用方式可分为负调控、正调控、正或负调控 3 种方式<sup>[32-34]</sup>。(1)负调控,比如:过表达 *AtWRKY25*、*AtWRKY38*、*AtWRKY62* 株系显著抑制抗病基因 *PR1* 的表达,在植物防御机制中起到负调控作用<sup>[35-36]</sup>; *WRKY11* 和 *WRKY17* 是拟南芥基础抗性的负调控因子,以特异性或以部分冗余的方式起作用<sup>[37]</sup>; *WRKY7* 在防御丁香假单胞菌时起负向作用<sup>[38]</sup>; *MPK4* 是水杨酸依赖性防御反应的抑制因子, *WRKY25* 负调节水杨酸介导的病原菌防卫反应<sup>[35]</sup>; *BnWRKY15* 抑制 *BnWRKY33* 的转录激活能力,过表达 *BnWRKY15* 能够增加甘蓝型油菜对菌核病病菌的易感性<sup>[39]</sup>; *MdWRKY40b* 的沉默可以提高苹果植株对白粉病的抗性<sup>[40]</sup>。 *MdDMR6* 编码水杨酸降解基因, *MdWRKY17* 能够直接与 *MdDMR6* 启动子结合引发植株易感性,且感病种质 *MdWRKY17* 表达水平显著高于耐受种质<sup>[41]</sup>。(2)正调控: *WRKY6* 正向激活 *PR1* 启动子,参与植物病原体防卫过程<sup>[31]</sup>; *CpWRKY11* 与拟南芥 *AtERKY20* 的同源性最高,病原菌侵染后显著上调,可能主要通过茉莉酸信号途径参与病原菌应答反应<sup>[42]</sup>。 *WRKY41* 可能是水杨酸和茉莉酸通路串扰的关键调控因子,过表达 *WRKY41* 植株在丁香假单胞菌侵染下抗性增强,促进拟南芥 *PR5* 基因的表达<sup>[43]</sup>。(3)正或负调控: *WRKY12* 对拟南芥次生细胞壁的形成具有负调控作用,大白菜感染软腐病后 *BrWRKY12* 表达量上调,但其同源基因 *AtWRKY12* 表达量下调<sup>[44]</sup>。本研究中河洛 1 号有多个 *WRKY* 家族基因响应疫霉菌侵染,其中, *WRKY9*、*WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY17*、*WRKY24*、*WRKY26*、*WRKY31*、*WRKY33*、*WRKY40* 和 *WRKY41* 表达量持续上调,疫霉菌侵

染后 *WRKY12* 表达量持续下调。多条途径共同作用导致 *PR-1* 在疫霉菌侵染后持续下调表达。

筛选的 12 个差异表达基因(*WRKY12*、*MPK3*、*WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY40*、*WRKY41*、*WRKY53*、*PR1*、*bHLH81*、*ClpB1*、*CBL1*、*NSI*) RNA-Seq 与 qRT-PCR 定量验证结果趋势基本一致,证明转录组测序结果可靠,部分基因表达量存在差异,主要是由于 2 种检测技术本身的差异及表达量计算方法不同,也可能是检测的基因序列特征复杂或者表达水平较低等原因。结合转录组测序结果、差异表达基因分析和前人研究结果,实时荧光定量 PCR 检验结果验证后筛选出 *MPK3*、*WRKY11*、*WRKY15*、*WRKY41*、*WRKY40*, 可以作为河洛 1 号响应疫霉侵染的候选基因。

## 参考文献:

- [1] 汪平. 剑麻受烟草疫霉侵染后转录组测序分析[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- [2] 李逸文, 王林焰, 陈豪琦, 等. 2015–2023 年 1406 份大豆品种(系)对大豆疫霉的抗性评价[J/OL]. 南京农业大学学报, 2024; 1-8 [2024-02-29]. <https://link.cnki.net/urlid/32.1148.S.20240110.1734.002.html>.
- [3] 田峰奇, 王路遥, 董莎萌. 马铃薯与致病疫霉互作研究进展与展望[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 89-110, 126.
- [4] GRÜN WALD N J, GOSS E M, PRESS C M. *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(6): 729-740.
- [5] 刘艳艳, 丁颖, 刘兴华, 等. 辣椒 *CaSYT1* 的鉴定及其在疫霉侵染过程中的功能初探[J]. 园艺学报, 2024, 51(3): 533-544.
- [6] 杜天宇. 烟草抗黑胫病转录与调控机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [7] 张纯, 唐承晨, 王吉永, 等. 转录组学在植物应答逆境胁迫中的研究进展[J]. 生物学杂志, 2017, 34(2): 86-90.
- [8] 张燕梅, 赵艳龙, 李俊峰, 等. 剑麻与烟草疫霉互作过程中的转录组研究[J]. 热带作物学报, 2018, 39(3): 540-546.
- [9] 竹龙鸣. 大豆对大豆疫霉菌侵染响应的转录组学和代谢组学研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [10] 卢珍红, 原晓龙, 李绅崇, 等. 非洲菊对隐地疫霉侵染响应 *WRKY* 转录因子的鉴定及表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2024; 1-10 [2023-10-25]. <http://kns.cnki-net.webvpn.hnagri.org.cn/kcms/detail/46.1068.S.20231025.1320.008.html>.
- [11] MENG H, SUN M M, JIANG Z P, et al. Comparative transcriptome analysis reveals resistant and susceptible genes in tobacco cultivars in response to infection by *Phytophthora nicotianae*[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 809.
- [12] LI H Y, WANG H N, JING M F, et al. A *Phytophthora* effector recruits a host cytoplasmic transacetylase into nuclear speckles to

- enhance plant susceptibility[J]. *eLife*, 2018, 7: 1-23.
- [13] 张豫丹, 马晓寒, 李俊领, 等. 绿原酸对烟草疫霉的抑制作用及对烟草黑胫病的防治效果研究[J]. *作物杂志*, 2022(2): 230-236.
- [14] CENN M C, KO K, CHANG W L, et al. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(5): 926-939.
- [15] GOMEZ L D, VANACKER H, BUCHNER P, et al. Inter-cellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term chilling[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1662-1671.
- [16] SWARNALOK D, GABRIELA C C, WAHLSTEN M, et al. Disruption of the methionine cycle and reduced cellular glutathione levels underlie potex-potyvirus synergism in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(8): 1820-1835.
- [17] MUKAIHARA T, HATANAKA T, NAKANO M, et al. *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY is a glutathione-degrading enzyme that is activated by plant cytosolic thioredoxins and suppresses plant immunity[J]. *Microbiology*, 2016, 7(2): 1-14.
- [18] ZECHMANN B. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress[J]. *Plants*, 2020, 9(9): 1067.
- [19] ZHU F, ZHANG Q P, CHE Y P, et al. Glutathione contributes to resistance responses to TMV through a differential modulation of salicylic acid and reactive oxygen species[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1668-1687.
- [20] 王 斌, 杨盼迪, 王玉昆, 等. 采后黄瓜在冷驯化处理过程中的转录组变化[J]. *西北农业学报*, 2024, 33(2): 256-270.
- [21] 刘 潮, 韩利红, 褚洪龙, 等. 植物与病原菌互作的分子机制研究进展[J]. *生物学通报*, 2018, 45(10): 2271-2279.
- [22] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(8): 539-548.
- [23] 曲 硕, 焦耀磊, 付加禹, 等. 抗病基因 *PRI* 在大豆中的遗传转化与多抗材料的培育[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(1): 174-184.
- [24] 刘婉迪. 中国野生毛茛苣莢合酶基因家族新成员抗白粉病机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [25] FREY N F, GARCIA A V, BIGEARD J, et al. Functional analysis of *Arabidopsis* immune-related MAPKs uncovers a role for *MPK3* as negative regulator of inducible defences[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(6): 87.
- [26] FELIX G, DURAN J D, VOLKO S, et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(3): 265-276.
- [27] ASAI T, TENA G, PLOTNIKOVA J, et al. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity[J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 977-983.
- [28] 王淑叶, 伍国强, 魏 明. WRKY 转录因子调控植物逆境胁迫响应的作用机制[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(1): 35-52.
- [29] 李 爽, 熊 樱, RALF M X, 等. 转录因子 *WRKY6* 和 *PRI* 在拟南芥胁迫记忆中的表达模式[J]. *植物研究*, 2019, 39(5): 752-759.
- [30] 黄 幸, 丁 峰, 彭宏祥, 等. 植物 *WRKY* 转录因子家族研究进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(12): 129-143.
- [31] 向小华, 吴新儒, 晁江涛, 等. 普通烟草 *WRKY* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. *遗传*, 2016, 38(9): 840-862.
- [32] 却 枫, 刘庆楠, 查若飞, 等. 孝顺竹中笋箨衰老相关 *WRKY* 转录因子的鉴定与分析[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2023, 47(6): 113-123.
- [33] 朱飞雪, 程玉江, 郭 丽. 蝴蝶兰 *WRKY57* 基因的克隆、亚细胞定位及响应脱落酸功能分析[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(18): 54-62.
- [34] 陈 娜, 邵 勤, 李晓鹏. 番茄 *WRKY* 转录因子功能的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(13): 6-17.
- [35] ZHENG Z Y, MOSHER S L, FAN B F, et al. Functional analysis of *Arabidopsis* *WRKY25* transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae* [J]. *BMC Plant Biology*, 2007, 7: 2.
- [36] KIM K C, LAI Z B, FAN B F, et al. *Arabidopsis* *WRKY38* and *WRKY62* transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(9): 2357-2371.
- [37] JOURNOT-CATALINO N, SOMSSICH I E, ROBY D, et al. The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of Basal resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 3289-3302.
- [38] KIM K C, FAN B F, CHEN Z X, et al. Pathogen-induced *Arabidopsis* *WRKY7* is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1180-1192.
- [39] LIU F, LI X X, WANG M R, et al. Interactions of *WRKY15* and *WRKY33* transcription factors and their roles in the resistance of oilseed rape to *Sclerotinia* infection[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(4): 911-925.
- [40] 沙仁和, 兰黎明, 王三红, 等. 苹果转录因子 *MdWRKY40b* 抗白粉病的机理[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(24): 5220-5229.
- [41] SHAN D Q, WANG C Y, ZHENG X D, et al. *MKK4-MPK3-WRKY17*-mediated salicylic acid degradation increases susceptibility to *Glomerella* leaf spot in apple[J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(2): 1202-1219.
- [42] 杨 敏, 李庆萌, 周陈平, 等. 番木瓜 *WRKY* 转录因子 *CpWRKY11* 的克隆和表达[J]. *西北农林科技大学学报*, 2023, 51(5): 119-130, 138.
- [43] HIGASHI K, ISHIGA Y, INAGAKI Y, et al. Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced *WRKY41* transcription factor in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Genetics Genomics*, 2008, 279(3): 303-312.
- [44] 董 悦, 王远达, 王志敏, 等. *WRKY12* 调控植物发育的分子机制[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(1): 142-148.

(责任编辑:陈海霞)