

doi: 10.19928/j.cnki.1000-6346.2021.1026

辣椒苗期抗感黄瓜花叶病毒病比较转录组学分析

雷阳 成妍 乔宁 焦彦生 吴越莉

(山西农业大学园艺学院, 山西太原 030031)

摘要: 为了研究辣椒在黄瓜花叶病毒侵染下的分子响应机制、发掘抗病相关基因, 以感病材料茄门和抗病材料 JJ101 为对象, 对接种黄瓜花叶病毒前后的茄门和 JJ101 叶片进行高通量转录组测序, 并利用生物信息学方法对基因表达和功能进行研究。结果显示, 采用 RPKM 法计算基因表达量, 共筛选出 JJ101 和茄门接种黄瓜花叶病毒后的 1 158 个差异表达基因。其中有 643 个差异基因在 GO (gene ontology) 中富集, 功能主要涉及酶活性、代谢过程和防御反应等。有 287 个差异基因归入 KEGG 通路, 在这些通路中, 包括植物-病原互作、植物激素信号传导等过程。研究发现, 辣椒对黄瓜花叶病毒的免疫是一个极其复杂、多个通路共同调节的过程, 蛋白质代谢、防御反应、激素调节等通路均参与其中, 为后续深入研究辣椒抗病分子机理奠定了理论基础。

关键词: 辣椒; 黄瓜花叶病毒; 转录组; 功能

黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 为雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的代表病毒 (Fan et al., 2019)。其寄主范围涵盖 100 个科中的 1 200 种植物, 对辣椒的危害尤为严重 (Wei et al., 2017)。在贵州、四川、湖南、湖北以及江浙等辣椒主产区, 黄瓜花叶病毒的检出率在各种病毒中最高 (陈玉珍等, 2016)。国外抗 CMV 辣椒资源筛选工作开展较早, 已鉴定出多个对 CMV 表现抗病的材料, 如 Perennial (Caranta & Palloix, 1996) 和 Bukang (Kang et al., 2017), 并获得了一系列辣椒品种。国内的辣椒种质资源丰富且栽培历史悠久, 目前已经获得一些耐 CMV 的抗性资源 (张晓敏等, 2015; 李宁等, 2016)。虽然目前国内外在辣椒 CMV 抗源筛

选上已取得一定成效, 但获得的抗病材料仍较少。利用辣椒抗病品种可有效解决化学药剂带来的农药残留、病菌抗药性等问题, 因此挖掘抗病种质资源、探究抗病机理, 在辣椒育种工作中具有很大的现实意义。

目前高通量测序技术已在生物研究领域广泛应用, 该技术可以快速、全面、准确地比较不同样本中存在显著差异的表达基因, 通过生物信息学分析探究差异基因功能分类, 进而筛选出与差异表型相关的基因群。刘永杰等 (2016) 对禾谷镰刀菌侵染后玉米幼根内转录组分析发现, 镰刀烯醇毒素解毒基因、植物激素调节基因和磷脂酶 D 信号通路在玉米免疫禾谷镰刀菌的过程中发挥重要作用。雷阳等 (2019) 对辣椒抗感疫病材料转录组进行测序分析, 在 KEGG 通路中筛选到 117 个抗病基因, 主要包括植物激素调节、氧化磷酸化、植物激素信号传导、苯丙烷类次生代谢途径等过程, 说明这些途径在辣椒免疫疫病的过程中高度活跃。李海录等 (2017) 对山定子接种褐斑菌后的叶片进行转录组测序, 共筛选到 94 个抗病基因, 涉及氨基酸代谢、植物激素信号传导等防御途径。王晓阳等 (2020) 对棉花短绒突变体和野生种的转录组进行测序分

雷阳, 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事蔬菜植物保护方面的研究,

E-mail: leiyanghd@163.com

收稿日期: 2020-06-28; 接受日期: 2020-11-18

基金项目: 山西省青年基金项目 (201901D211563), 山西省科技成果转化引导专项 (201804D131062), 山西省农业科学院农业科技创新研究课题/博士后基金项目 (YCX2020BH4), 山西农业大学学术恢复科研专项 (2020xshf25)

析,发现 Ca^{2+} 信号传导、MAPK 级联反应、氧化还原活性等途径的异常表达,使得突变体不能正常形成短绒纤维。Zhu 等(2018)通过比较辣椒接种 CMV 的转录组,发现 WRKY 转录因子可能参与对病毒的免疫反应。

本试验以 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术为基础,从感病材料茄门和抗病材料 JJ101 中筛选与 CMV 抗性相关的转录本,从而深入了解辣椒抗 CMV 的转录组信息,从中筛选造成抗性差异的重要基因,为进一步揭示辣椒抗病动态过程、拓展抗病种质资源和抗病育种工作提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 86 份辣椒材料(表 1)均由山西省农业科学院蔬菜研究所搜集并提供。试验所用 CMV BJ1 分离物由中国农业科学院植物保护研究所惠赠。病毒接种在烟草叶片扩繁后, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 CMV 接种方法和样品 RNA 提取

每份辣椒材料选择籽粒饱满、颜色和大小一致的种子播于 72 孔穴盘(基质为腐殖质:珍珠岩 = 3 V:1 V),于 2018 年 4 月在山西农业大学园艺学院(太原校区)温室中进行培养。待幼苗长至 3~4 片真叶时开始接种。以茄门为感病对照,以 Perennial 为抗病对照。CMV 接种方法、病情分级标准及病情指数的计算均参照李宁等(2018)的描述。每份材料设置 3 次重复,每个重复种植 10 株。

将筛选出的感病材料茄门和抗病材料 JJ101 的幼苗叶片分别接种 CMV,茄门接种后 0 h 和 72 h 的 2 个处理,分别命名为 QIEMEN-0h 和 QIEMEN-72h;JJ101 接种后 0 h 和 72 h 的 2 个处理,分别命名为 JJ101-0h 和 JJ101-72h。将样品叶片迅速置于液氮中冷冻,然后放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中保存备用。

利用 TRIzol 试剂提取茄门、JJ101 各处理的总 RNA,然后利用 RNase-free DNase I 除去总 RNA 中残余的 DNA。利用 TST-A831-1 分光光度计检测茄门、JJ101 叶片总 RNA 的浓度和纯度。

1.3 转录组文库构建及高通量测序

将提取的 QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h

和 JJ101-72h 4 个样品的叶片总 RNA,参考 Orcheski 和 Brown (2017)的方法构建特异性文库。经 RNA 提取、纯化和文库构建后,将样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司,利用 Illumina HiSeq 测序平台对文库进行双端测序。对 QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h 和 JJ101-72h 4 个样本原始数据进行过滤,剔除质量值低于 20% 的碱基。最后,利用 FastQC 对单基质量、碱基含量分布、GC 含量分布、序列碱基质量等 4 个指标的数据进行质量控制分析。

1.4 转录组测序数据分析

将 QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h 和 JJ101-72h 4 个样本数据与辣椒参考基因组(Capsicum. annum.L Zunla-1 Release 2.0, <http://peppersequence.genomics.cn/>)进行比对。采用 Zatta 等(2017)的方法,根据基因组注释信息,可得到序列的来源基因以及表达产物的结构,然后基于比对到基因的序列数目,用统计学方法计算表达量,并进一步比较基因、转录本和外显子在不同样品和分组之间的表达差异。为了能够在样品内以及样品间比较基因的表达量,采用 RPKM (reads per kilo bases per million reads)对基因的表达量进行标准化,并在此基础上以 $\text{FDR} \leq 0.001$ 和 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ 为条件筛选出 2 组样本间差异表达基因。

$$\text{RPKM} = \frac{\text{总外显子读数}}{\text{定位的读数(百万)} \times \text{外显子长度(kb)}}$$

1.5 qRT-PCR 验证

为了验证 Illumina HiSeq 测序后的差异基因准确性,对植物-病原菌互作通路(KO: 04626)的 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。使用软件 Primer 5.0 设计跨越内含子与外显子边界的引物,可有效剔除假阳性,防止 qRT-PCR 过程中扩增到基因组 DNA 影响试验结果。从 QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h 和 JJ101-72h 4 个样本中各提取 RNA 3.0 μg ,利用 PrimeScript[®] Reverse Transcriptase 试剂盒进行反转录。以辣椒延伸因子 EF-341a 为内参基因,采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, USA) 进行 qRT-PCR 反应,每个反应重复 3 次,最后利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析结果。

2 结果与分析

2.1 86 份辣椒种质资源的 CMV 抗性鉴定

对来源广泛的 86 份辣椒材料进行苗期 CMV 抗性鉴定, 材料间表现出明显的抗性差异 (表

1)。其中, 发病最严重的材料为茄门, 病情指数为 79.47, 植株呈现明显矮化的症状, 个别植株甚至死亡。而发病最轻的材料为 JJ101, 病情指数为 18.67, 接种 CMV 后仅轻微出现明脉和花叶的症状。在 86 份辣椒材料中, 2 份材料对 CMV 表现高

表 1 辣椒种质资源 CMV 抗性鉴定

种质	来源	分类	病情指数	种质	来源	分类	病情指数
茄门	中国北京	<i>C. annuum</i> L.	79.47	PI 201238	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	50.12
J219-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	76.92	淮安青椒	中国江苏	<i>C. annuum</i> L.	49.40
J11-1	中国山西	<i>C. frutescens</i> L.	67.00	J291-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	49.33
J32-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	65.76	I2904	中国台湾	<i>C. frutescens</i> L.	49.22
PBC912	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	65.58	J20-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	48.67
PI 224443	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	65.48	PI 224424	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	48.00
PBC635	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	65.41	PI 201232	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	45.41
J225-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	64.67	PI 281428	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	44.00
J229-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	64.67	PBC1439	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	43.00
J28-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	63.67	LJNF002	南非	<i>C. annuum</i> L.	41.17
J232-2	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	63.59	LJMG005	美国	<i>C. chinense</i> Jacquin	41.17
J17-1	中国山西	<i>C. chinense</i> Jacquin	63.00	JJ103	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	41.00
J211-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	62.69	LINF013	南非	<i>C. annuum</i> L.	40.57
J4-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	62.59	GZZY	中国贵州	<i>C. annuum</i> L.	40.29
J301-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	61.69	LJMG017	美国	<i>C. annuum</i> L.	40.24
朝天椒	中国吉林	<i>C. annuum</i> L.	61.17	GZZY	中国贵州	<i>C. annuum</i> L.	39.87
PI 439360	中国台湾	<i>C. frutescens</i> L.	60.78	文昌灌木椒	中国海南	<i>C. frutescens</i> L.	39.36
PBC904	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	60.29	PI 201234	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	39.35
PBC75	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	59.78	P1096	中国湖南	<i>C. annuum</i> L.	39.22
PI 189550	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	59.75	LJNF003	南非	<i>C. annuum</i> L.	38.40
J23-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	59.69	扫把椒	中国云南	<i>C. frutescens</i> L.	38.36
J37-1	中国山西	<i>C. frutescens</i> L.	59.67	登封线椒	中国河南	<i>C. annuum</i> L.	38.17
J56-2	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	59.36	小米椒	中国云南	<i>C. annuum</i> L.	38.11
PBC1430	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	59.12	LXQ	中国海南	<i>C. frutescens</i> L.	38.07
J45-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	58.36	KOR P24	韩国	<i>C. annuum</i> L.	37.92
PBC1478	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	57.95	湘潭辣椒	中国湖南	<i>C. annuum</i> L.	37.70
J245-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	57.36	shijiemen	中国贵州	<i>C. annuum</i> L.	37.40
PI 281438	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	57.36	六安小辣椒	中国安徽	<i>C. annuum</i> L.	37.37
J215-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	57.00	LXQ 黄灯笼	中国海南	<i>C. chinense</i> Jacquin	37.01
J224-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	56.67	J243-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	37.00
J27-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	56.36	泰国朝天椒	泰国	<i>C. annuum</i> L.	36.76
J27-2	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	56.00	J226-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	36.22
J231-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	55.36	LJMG003	美国	<i>C. annuum</i> L.	35.97
PI 281426	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	54.67	J289-1	中国山西	<i>C. chinense</i> Jacquin	34.67
2014AVRDC-08	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	54.50	PI 441640	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	32.67
PBC932	中国台湾	<i>C. chinense</i> Jacquin	52.81	PI 188478	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	32.12
J220-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	52.33	四川羊角椒	中国四川	<i>C. annuum</i> L.	30.31
J222-1	中国山西	<i>C. chinense</i> Jacquin	52.00	P1023	中国湖北	<i>C. annuum</i> L.	30.21
J12-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	51.67	P0747	中国湖北	<i>C. annuum</i> L.	27.48
益都红	中国山东	<i>C. annuum</i> L.	51.17	LJMG021	美国	<i>C. annuum</i> L.	24.35
KOR P02	韩国	<i>C. annuum</i> L.	50.95	JJ104	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	20.67
J244-1	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	50.33	Perennial	法国	<i>C. annuum</i> L.	19.49
VC214a	中国台湾	<i>C. annuum</i> L.	50.32	JJ101	中国山西	<i>C. annuum</i> L.	18.67

感($DI > 75$), 42 份材料表现感病($50 < DI \leq 75$), 37 份材料表现中抗($30 < DI \leq 50$), 5 份材料表现抗病($10 < DI \leq 30$), 未筛选出对 CMV 表现免疫($DI = 0$)及高抗($0 < DI \leq 10$)的材料。在 5 份抗病材料中, JJ101 的抗性最好, 甚至优于曾用于抗 CMV 遗传定位的法国材料 Perennial, 因此选用 JJ101 作为抗病材料进行后续试验。

2.2 转录组测序数据质量检测

4 份材料叶片转录组测序数据统计和质量检测结果如表 2 所示。本次测序共获得碱基总数为 27.60 Gb, 其中样品 JJ101-72h 获得总碱基数最多, 为 7.43 Gb, 样品 QIEMEN-72h 获得总碱基数最少, 为 6.31 Gb。在 4 个样品中, 质量值 ≥ 30 的碱基(Q30)最少的为样品 QIEMEN-72h, 为 5.78 Gb, 4 个样品 Q30 百分比均在 90% 以上。GC 含

量在 45.15%~46.64% 的范围内。检测结果表明转录组测序具有较高的可信度, 未出现异常数据, 可保证后续分析结果的准确性。经过 FastQC 对原数据进行质量筛控, QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h、JJ101-72h 样本数据量在一定程度上均有所减少, 但高质量序列百分比最低的样品 JJ101-0h 也在 96.49% 以上, 4 个样本的质量分数均未低于 Q20。

利用 Tophat/Tophat2 软件将有效数据与辣椒基因组数据进行比对, QIEMEN-0h、QIEMEN-72h、JJ101-0h、JJ101-72h 样品与参考基因组匹配的序列占比分别为 79.95%、78.81%、85.06% 和 84.73%(表 3)。对文库的基因饱和度进行测试发现, 随着测序数据量的增加, 基因数量未见明显增多, 说明测序数据量接近饱和。这些结果都表明, 这 4 个样本可

表 2 测序数据统计

样品	总碱基数/Gb	Q30/Gb	Q30/%	GC/%	高质量序列碱基数/Gb	高质量序列百分比/%
QIEMEN-0h	7.22	6.50	90.07	45.65	7.06	97.86
QIEMEN-72h	6.31	5.78	93.00	45.71	6.08	97.84
JJ101-0h	6.64	6.09	91.80	45.15	6.40	96.49
JJ101-72h	7.43	6.64	91.86	46.64	7.09	96.64

表 3 Clean reads 与辣椒基因组比对基本信息

样品	有效序列 总数/个	与参考基因组匹配 的序列总数/个	与参考基因组匹 配的序列占比/%	比对多个位置 的序列占比/%	比对一个位置 的序列占比/%	比对到基因区域 的 reads 占比/%
QIEMEN-0h	42 944 268	34 333 942	79.95	5.22	76.41	54.04
QIEMEN-72h	46 219 230	36 425 375	78.81	3.96	74.85	53.56
JJ101-0h	43 769 853	37 230 637	85.06	4.45	82.53	55.21
JJ101-72h	41 250 694	34 951 713	84.73	4.19	80.54	55.79

以进一步用于差异表达基因的分析。

2.3 茄门和 JJ101 接种 CMV 的差异表达基因分析

采用 DESeq (version 2.11.0) 软件对茄门和 JJ101 接种 CMV 0 h 和 72 h 后的基因表达进行差异分析, 将接种 CMV 0 h 设为对照, 可以消除基因型特异性和病毒转录组造成的背景干扰, 从而获得与抗病和感病相关的更多数据。以表达倍数差异 $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$, 显著性 P 值 < 0.05 为条件筛选差异基因。首先对 CMV 侵染茄门前后的两组材料 QIEMEN-72h 和 QIEMEN-0h 进行差异比较, 共得到 1 633 个显著差异表达基因, 其中上调基因为 657 个, 下调基因为 976 个。然后再对 CMV 侵染 JJ101 前后的两组材料 JJ101-72h 和 JJ101-0h 进

行差异分析, 共得到 1 895 个显著差异表达基因, 其中上调基因为 831 个, 下调基因为 1 064 个。

2.4 差异基因功能显著性富集分析

利用基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析 JJ101 和茄门在接种 CMV 后的显著差异基因的功能。结果显示, JJ101 与茄门的 1 158 个差异基因中, 有 643 个差异表达基因被富集。通过前 20 的 GO 子类可以看出 (图 1), 大部分差异基因涉及分子功能和生化过程, 而属于细胞组成的很少。在分子功能类别中, 55 个基因涉及碳氧裂解酶活性, 53 个基因涉及氧化还原酶活性, 46 个基因涉及过氧化物酶活性, 38 个基因涉及肽链内切酶活性, 31 个基因涉及萜烯合成酶活性, 28 个基因涉及催

化活性, 16 个基因富集在了蛋白酶负调节活性, 9 个基因涉及裂解酶活性, 8 个基因涉及单氧酶活性; 而生化功能类别中, 37 个基因富集在了代谢过程逆境反应, 22 个基因涉及氧化还原过程, 20 个基因涉及小分子代谢过程, 17 个基因涉及代谢过程, 12 个基因涉及防御反应。以上结果可以说明, JJ101 和茄门的差异基因在两者体内调节了不同的酶类活性、产生了不同的代谢过程和造成了不同的防御反应, 从而形成了两者对 CMV 的抗性差异。

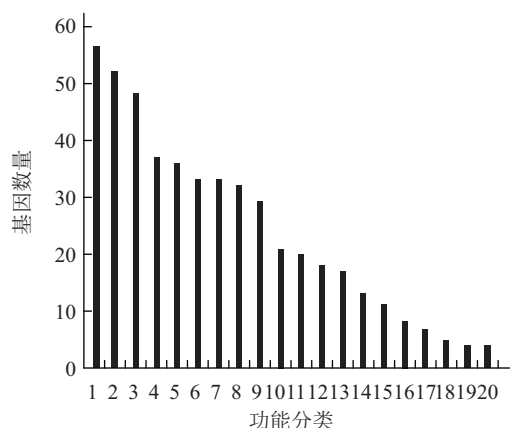


图1 基因中前 20 的 GO 功能类别分析

1, 碳氧裂解酶活性; 2, 氧化还原酶活性; 3, 过氧化物酶活性; 4, 肽链内切酶调节活性; 5, 代谢过程逆境反应; 6, 碳氮裂解酶活性; 7, 单一生物体过程; 8, 萜烯合成酶活性; 9, 催化活性; 10, 氧化还原过程; 11, 小分子代谢过程; 12, 代谢过程; 13, 蛋白酶负调节活性; 14, 防御反应; 15, 胞外区; 16, 裂解酶活性; 17, 单氧酶活性; 18, 氧化磷酸化过程; 19, 水解酶活性; 20, 甲酸脱氢酶活性。

在植物体内, 不同基因相互协调作用共同行使生物学功能, 为了研究 JJ101 在接种 CMV 前后有哪些生物学过程发生改变, 将 JJ101 与茄门的 1158 个差异基因与 KEGG 数据库数据进行对比, 结果表明 (图 2), 共有 287 个差异基因归入 KEGG 通路。在这些通路中, 有 42 个基因富集在了泛素介导的蛋白水解作用通路, 34 个基因涉及植物激素信号传导通路, 32 个基因涉及 RNA 退化通路, 22 个基因富集在了氧化磷酸化通路, 17 个基因涉及 cAMP 信号通路, 14 个基因涉及氨基酸的生物合成通路, 11 个基因富集在了淀粉和蔗糖代谢通路, 10 个基因归类于 mRNA 监测通路, 同时还有基因归类到了糖酵解通路、氨基糖和核苷酸糖代谢通路、VEGF 信号通路、磷脂酶 D 信号通路、磷脂酰肌醇信号系统通路、黏液通路、MAPK 信号通路、泛酸酯和 CoA 生物合成通路、内质网蛋白处理通路、

氯烷烃和氯烯烃降解通路、RNA 转运通路。值得关注的是植物-病原互作的相关基因发生了显著变化, 共有 10 个差异基因归类到了这一途径, 揭示该代谢通道相关基因发生了显著变化。在这 10 个基因中, *Capana02g001851* 和 *Capana06g000269* 两个基因为类病原相关分子模式所触发的免疫反应蛋白基因 5 (pathogenesis-related genes transcriptional activator 5-like, PTI5); *Capana02g002076* 为一氧化氮合酶基因 (nitric-oxide synthase, NOS); *Capana05g001792* 为促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, MAPKKK1); *Capana02g000687* 为类促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1-like); *Capana03g002879* 为促分裂原活化蛋白激酶 4 (mitogen-activated protein kinase 4, MAPK4); *Capana06g002562* 为类促分裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3-like); *Capana07g002392* 和 *Capana06g000196* 两个基因为抗病蛋白基因 (disease resistance protein, RPM1); *Capana03g003522* 为抗性蛋白 RGA1 基因 (表 4)。

对基因本体论和 KEGG 的富集结果综合分析可发现, JJ101 和茄门对 CMV 不同的抗性主要表现为逆境响应过程、酶类活性上的差异, 同时蛋

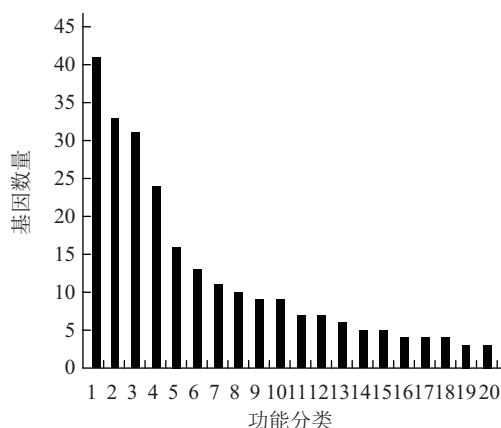


图2 差异基因前 20 的 KEGG 通路功能分析

1, 泛素介导的蛋白水解作用; 2, 植物激素信号传导; 3, RNA 退化; 4, 氧化磷酸化; 5, cAMP 信号通路; 6, 氨基酸的生物合成; 7, 淀粉和蔗糖代谢; 8, mRNA 监测通路; 9, 植物-病原互作; 10, 糖酵解; 11, 氨基糖和核苷酸糖代谢; 12, VEGF 信号通路; 13, 磷脂酶 D 信号通路; 14, 磷脂酰肌醇信号系统; 15, 黏液; 16, MAPK 信号通路; 17, 泛酸酯和 CoA 生物合成; 18, 内质网蛋白处理; 19, 氯烷烃和氯烯烃降解; 20, RNA 转运。

表 4 植物-病原互作通路下差异基因的 KEGG 功能注释

基因序号	KEGG Orthology 编号	基因注释
Capana05g001792	K13414	促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 1
Capana02g000687	K13414	类促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 1
Capana03g002879	K20600	促分裂原活化蛋白激酶 4
Capana06g002562	K20536	类促分裂原活化蛋白激酶 3
Capana02g001851	K13433	类病原相关分子模式所触发的免疫反应蛋白 5
Capana06g000269	K13433	类病原相关分子模式所触发的免疫反应蛋白 5
Capana02g002076	K13427	一氧化氮合酶
Capana07g002392	K13457	抗病蛋白 RPM1
Capana06g000196	K13457	抗病蛋白 RPM1
Capana03g003522	K13470	抗性蛋白 RGA1

白代谢途径、植物激素调节等过程也与抗性差异相关,而在这些通路中植物-病原互作通路起着尤为重要的作用。

2.5 利用 qRT-PCR 荧光定量验证差异表达基因

为了验证转录组测序分析的差异基因的准确性和可靠性,利用实时荧光定量 PCR 对植物-病原互作通路下的 10 个基因(表 4)在 JJ101 接种 CMV 前后表达变化进行分析,发现 qRT-PCR 结果与转录组结果显著相关,相关系数为 0.773 3(图 3),由此证明转录组测序数据结果是准确和可靠的。

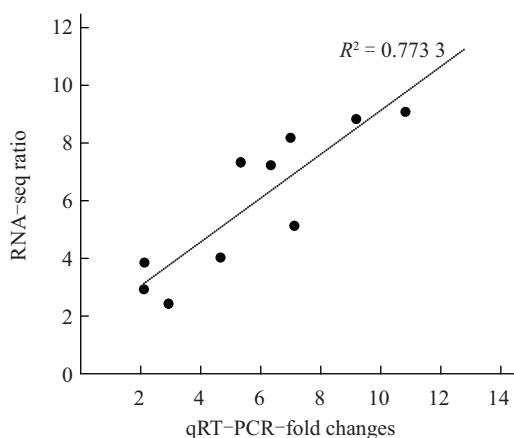


图 3 10 个转录因子基因的 qRT-PCR 及转录组表达量的相关性分析

3 结论与讨论

植物具有独特的免疫系统响应病原物的侵染,其中基础防御通路为病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)触发的免疫反应(PTI)(Zatta et al., 2017),更深层的防御方式为病原效应物触发的免疫效应(effector-triggered

immunity, ETI)。ETI 途径往往通过抗病蛋白(resistance proteins)识别病原物的特异效应因子(effectors),当抗病蛋白识别到效应因子后会进入激活态,进而启动病原微生物感染位点的细胞的程序性死亡,有效隔绝病原物的传播。目前研究较多的编码抗病蛋白的基因,主要有在拟南芥上发现的 *RPM1* 和 *RGA1* 基因,其同源序列在其他植物的基因组中也有报道(Lee et al., 2015; Borgen et al., 2017; Kasmi et al., 2017; 王娇等, 2019; Janda et al., 2019)。促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)可将 ATP 上的磷酸基团转移到底物氨基酸残基上,使其催化磷酸化,而 MAPKKK 是激活这一过程的关键蛋白。MAPKKK 主导的级联反应一方面可以参与激素信号转导以及植物的生长发育进程,同时也是植物抗病反应中的重要组成部分(张振才等, 2014)。

本试验中 KEGG 通路富集结果发现,相比于茄门, JJ101 在接种 CMV 后,有 10 个差异基因表现为植物-病原互作功能。其中 4 个基因为 MAPK 级联途径的基因,包括 2 个促分裂原活化蛋白激酶 MAPK 基因和 2 个促分裂原活化蛋白激酶 MAPKKK; 2 个为类病原相关分子模式所触发的免疫反应蛋白基因 PTI; 3 个基因为抗病蛋白基因,包含 2 个 RPM1 和 1 个 RGA1。表明 JJ101 相比于茄门,在 CMV 侵染过程中 PTI 途径、ETI 途径和 MAPK 级联途径异常活跃,综合调动了植物体内免疫系统响应,从而有效地抵抗了病原菌的入侵。这些差异基因的表达与 JJ101 的抗病性显著相关,这一结果也再次证实了 *RPM1*、*RGA1*、*PTI5*、*PTI6*、*MAPK3*、*MAPK4*、*MAPKKK1* 等基因在植物免疫反应中起着十分重要的作用。

研究发现,过氧化物酶可以通过抑制真菌生长和去除 H_2O_2 来达到抵抗病原侵染,减轻病害发生的作用。Alcázar 等 (2010) 发现辣椒受到辣椒疫霉侵染后,过氧化物酶活性显著增加,且与辣椒品种的抗病性呈正相关。多酚氧化酶是 ETI 途径的重要功能蛋白,可将酚氧化为单宁类物质,造成病原菌侵入点细胞的程序性死亡,从而达到阻碍病原扩展的目的 (Rosalia et al., 2011)。植物激素信号途径是重要的植物免疫信号系统,目前报道最多的有茉莉酸、乙烯和水杨酸等通路 (王妮妍和蒋德安, 2002; Birch et al., 2009; Sorokan et al., 2011; Boevink et al., 2016; Kang et al., 2017)。其中,茉莉酸信号途径在植物抗病反应中发挥着至关重要的作用,茉莉酸可诱导过氧化物酶、多酚氧化酶等防御性酶的合成,与酶活性调节途径串联,从而激活整个植物防御系统 (Balaji et al., 2011)。本试验中 GO 和 KEGG 通路富集结果发现,相比于茄门,CMV 侵染后 JJ101 有 46 个差异基因归类为过氧化物酶基因,22 个差异基因归类为氧化磷酸化过程,34 个差异基因归类为植物激素信号传导通路,说明这些基因在 JJ101 抵抗 CMV 侵染的过程中都有重要的表现,是 JJ101 表现抗病的重要基因。这与前人的研究结果相契合,由此可见 JJ101 对 CMV 的免疫是多途径共同作用的过程。除了起主要作用的植物与病原互作的相关通路,还包括多种酶活性调节通路、植物激素抗病信号传导途径在其中贡献力量。这些通路在调控 JJ101 对 CMV 的抗性过程中一方面可以独立行使其功能,另一方面还可以互相调动,从而参与到其他途径中共同行使功能。说明 JJ101 对 CMV 的抗性并非是由单一基因引起的,而是一个需要大量不同类别、不同途径的基因参与其中的系统性调节过程,这与本试验的转录组分析结果相一致。

本试验通过高通量转录组测序,对茄门和 JJ101 在接种 CMV 前后进行了比较深入的转录组学研究,其结果可为在转录水平上全面了解茄门和 JJ101 对 CMV 抗性的分子基础提供有价值的见解。通过研究发现,JJ101 和茄门抗 CMV 是一个高度复杂、多途径协同的过程:PTI 途径、ETI 途径和 MAPK 级联途径等防御反应在其中起主要作用,酶活性调节、植物激素调节等通路协同作战。研究

结果为后期更深入研究辣椒抗病分子机制奠定了基础,为抗病育种提供了理论依据。

参考文献

- 陈玉珍,谭新球,朱春晖,孙书娥,刘勇,张德咏. 2016. 我国部分地区常见农作物上黄瓜花叶病毒分离物核酸多样性分析. 植物保护学报, 43 (3): 427-433.
- 雷阳,成妍,乔宁,焦彦生,苗如意,杨玉花. 2019. 辣椒苗期抗感疫病比较转录组学分析. 华北农学报, 34 (3): 194-202.
- 李海录,宋艳艳,冯浩,黄丽丽,强晓玉,韩青梅. 2017. 苹果褐斑病菌侵染苹果属山定子的转录组学分析. 农业生物技术学报, 25 (1): 32-42.
- 李宁,王飞,尹延旭,姚明华. 2016. 国外引进辣椒种质的农艺性状及抗性评价. 辣椒杂志, 14 (2): 22-26.
- 李宁,尹延旭,王飞,姚明华,赵荣秋,李雪娇. 2018. 辣椒抗 CMV 种质资源筛选及 SRAP 分析. 北方园艺, 13 (3): 1-6.
- 刘永杰,马传禹,叶建荣. 2016. 玉米幼根接种禾谷镰刀菌后的转录组分析. 中国农业大学学报, 21 (11): 1-9.
- 王娇,高存钢,曹伟琳,丁新华,储昭辉. 2019. 马铃薯晚疫病病原效应子 PITG-16427.2 的基因序列分析及功能验证. 植物病理学报, 12 (6): 1-13.
- 王妮妍,蒋德安. 2002. 茉莉酸及其甲酯与植物诱导抗病性. 植物生理学报, 38 (3): 279-284.
- 王晓阳,王丽媛,潘兆娥,何守朴,王骁,龚文芳,杜雄明. 2020. 亚洲棉短绒突变体纤维发育及其差异基因表达分析. 作物学报, 46 (5): 645-660.
- 张晓敏,张正海,毛胜利,王学瑛,李锡香,王立浩,张宝玺. 2015. 我国辣椒种质资源对黄瓜花叶病毒的抗性及相关分析. 中国蔬菜, (3): 49-54.
- 张振才,梁燕,李翠. 2014. 植物 MAPK 级联途径及其功能研究进展. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 42 (4): 207-214.
- Alcázar M D, Egea C, Espín A, Candela M E. 2010. Peroxidase isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum, 94 (3): 736-742.
- Balaji V, Sessa G, Smart C D. 2011. Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 101 (12): 349-357.
- Birch P R, Armstrong M, Bos J, Boevink P, Gilroy E M, Taylor R M, Wawra S, Pritchard L, Conti L, Ewan R, Whisson S C, West P, Sadanandom A, Kamoun S. 2009. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. Journal of Experimental Botany, 60 (11): 1133.
- Boevink P C, Wang X, McLellan H, He Q, Naqvi S, Armstrong M R, Zhang W, Hein I, Gilroy E M, Tian Z, Birch P R. 2016. A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms

- that promote late blight disease. *Nature Communications*, 7 (3): 10311.
- Borgen M A, Wang D, Grill B. 2017. *RPM-1* regulates axon termination by affecting growth cone collapse and microtubule stability. *Development*, 144 (24): 4658-4672.
- Caranta C, Palloix A. 1996. Both common and specific genetic factors are involved in polygenic resistance of pepper to several potyviruses. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 (1): 15-20.
- Fan X R, Du Y A, Cai Y M, Zhang Y C, Zhao X, Liang J L, Yang D, Zhang Q, Zhang X X, Zhang W J, Xu Y, Zhao K. 2019. Rapid and sensitive detection of cucumber mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51 (2): 223-226.
- Janda M, Lamparová L, Zubíková A, Burketová L, Martinec J, Krčková Z. 2019. Temporary heat stress suppresses pamp-triggered immunity and resistance to bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 20 (7): 1005-1012.
- Kang D S, Min K J, Kwak A M, Lee S Y, Kang H W. 2017. Defense response and suppression of *Phytophthora* blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *lentinula edodes*. *The Plant Pathology Journal*, 33 (3): 264-275.
- Kasmi E F, Chung E H, Anderson R G, Li J, Wan L, Eitas T K, Gao Z, Dangel J L. 2017. Signaling from the plasma-membrane localized plant immune receptor RPM1 requires self-association of the full-length protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10 (1013): 114-119.
- Lee M E, Lo W C, Miller K E, Chou C S, Park H O. 2015. Regulation of *Cdc42* polarization by the *Rsr1* GTPase and *Rga1*, a *Cdc42* GTPase-activating protein, in budding yeast. *Journal of Cell Science*, 128 (11): 2106-2117.
- Orcheski B, Brown S. 2017. High-throughput sequencing reveals that pale green lethal disorder in apple (*malus*) stimulates stress responses and affects senescence. *Tree Genetics & Genomes*, 13 (1): 9-24.
- Rosalía N P, Guadalupe F A, Ramón A S, Carlos A S, Yumi E N, Francisco J G, Adolfo A G, José J Z. 2011. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131 (3): 669-683.
- Sorokan A, Benkovskaya G, Burkhanova G, Blagova D, Maksimov I. 2011. Effects of salicylic and jasmonic acids on the components of pro/antioxidant system in potato plants infected with late blight. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58 (3): 299-306.
- Wei Y, Wang F, Qian Y, Chen D. 2017. Change of catalase activity in interaction of tobacco and cucumber mosaic virus. *Tobacco Science & Technology*, 50 (5): 19-23.
- Zatta S, Rehrauer H, Gram A, Boos A, Kowalewski M P. 2017. Transcriptome analysis reveals differences in mechanisms regulating cessation of luteal function in pregnant and non-pregnant dogs. *BMC Genomics*, 18 (1): 757.
- Zhu C H, Li X F, Zheng J Y. 2018. Transcriptome profiling using Illumina- and SMRT-based RNA-seq of hot pepper for in-depth understanding of genes involved in CMV infection. *Gene*, 666: 123-133.

Comparative Transcriptome Analysis of CMV Resistance of Pepper at Seedling Stage

LEI Yang, CHENG Yan, QIAO Ning, JIAO Yansheng, WU Yueli

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China)

Abstract: In order to explore the molecular response mechanism of pepper under infection of cucumber mosaic virus and resistant genes related to this virus, the paper took susceptible material ‘Qiemen’ and resistant material ‘JJ101’ as objectives, and conducted high-throughput transcriptome sequencing on ‘Qiemen’ and ‘JJ101’ before and after inoculation of CMV, and carried out studies on gene expression and function by bioinformatics method. The results showed that by using RPKM to calculate gene expression level, 1 158 differentially expressed genes (DEGs) were screened out after ‘Qiemen’ and ‘JJ101’ were inoculated with CMV. Among them, 643 DEGs were enriched in Gene Ontology (GO). Their functions were mainly referred to enzyme activity, metabolic process and defense reaction, etc. While 287 DEGs could be included into KEGG pathways, including plant pathogen interaction, plant hormone signal transduction, etc. process. Studies discovered that pepper immunity to CMV was an extreme complicated and multi-pathway coordinated process, jointly participated by protein metabolism, defense response, hormone regulation and the other pathways, laying a theoretical foundation for further research on pepper resistant molecular mechanism.

Keywords: pepper; cucumber mosaic virus (CMV); transcriptome; function