

## 抗感菜豆品种对菜豆普通花叶病毒 侵染后的转录组分析

牛静雅, 唐慕宁, 王新华, 霍思凡, 武文艳, 梁兴瑞, 黄欣琪, 王古悦, 冯 雪

(山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:** 菜豆普通花叶病毒(BCMV)在世界范围内分布广泛并可造成菜豆严重减产。菜豆是 BCMV 的主要寄主,不同遗传背景的菜豆对 BCMV 侵染的响应存在显著差异,目前菜豆抗性基因功能及 BCMV 的致病机制鲜有报道。为了为菜豆抗性基因功能的研究以及分子抗病育种提供相关依据,利用转录组测序(RNA sequencing)技术对 BCMV(C54 株系)侵染感性及不同抗性的菜豆品种材料进行转录组测序,对所得数据筛选差异表达基因并进行 Gene Ontology(GO)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)富集以及进行 Weighted correlation network analysis(WGCNA)分析。结果发现,不同的菜豆品种中病毒的积累量、差异表达基因的定位及一些关键通路对病毒侵染的响应存在共性和差异(如昼夜节律、光合作用、植物-病原体的相互作用和一些代谢途径相关通路等)。在接种叶上, Dubbele witte 品种(DW, 对 BCMV 侵染易感)与 Redland's greenleaf C 品种(RGLC, 对 BCMV 侵染具有抗性)差异表达的基因类型上更为相似,定位于光合体系,在光合作用、光合作用-天线蛋白以及光合生物中的碳固定等通路富集,而 Sanilac(对 BCMV 侵染具有抗性)的差异基因没有在光合作用等通路富集。在系统叶上,2个抗性品种中的差异表达基因类型也有差异。植物被病毒侵染后会干扰植物激素的合成与信号转导通路。通过选取8个关键的植物激素合成或信号转导相关基因进行验证,转录组和 qPCR 数据结果表明,不同的植物激素合成或信号转导相关基因在 BCMV 侵染菜豆后的表达情况存在差异: BCMV 侵染促进了参与水杨酸、茉莉酸和赤霉素合成通路的关键基因的正向调控;乙烯、油菜素内酯以及脱落酸相关的基因在抗感品种中的表达变化趋势不相同。研究结果明确了 BCMV 侵染不同遗传背景的菜豆品种后的转录组差异反应。

**关键词:** 菜豆普通花叶病毒;转录组;WGCNA;菜豆

中图分类号: S436.43

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)02-0065-13

## Transcriptome Analysis of Resistant and Susceptible Common Bean Varieties Infected by Bean Common Mosaic Virus

NIU Jingya, TANG Muning, WANG Xinhua, HUO Sifan, WU Wenyan, LIANG Xingrui,

HUANG Xinqi, WANG Guyue, FENG Xue

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** Bean Common Mosaic Virus(BCMV) is widely distributed worldwide and can cause a serious reduction in common bean yields. Common bean is the primary host of BCMV, and there are significant differences in the response of common beans with different genetic backgrounds to BCMV infection. Currently, there are few reports on the function of resistant genes in common beans and the pathogenic mechanism of BCMV. To provide a data foundation for the study on resistant gene function and molecular disease-resistance breeding for common bean varieties, in this study, RNA-sequencing technology was utilized to conduct transcriptional sequencing of common bean varieties with varying levels of susceptibility to BCMV infection(C54 strain). The obtained data were analyzed to identify differentially expressed genes, and further analyses were conducted using gene ontology(GO), Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) enrichment, and weighted correlation network analysis(WGCNA). It was observed that there were both commonalities and differences in virus accumulation, mapping of differentially expressed genes, and responses of key pathways to virus infection(such as circadian rhythm, photosynthesis, plant-pathogen interaction, and various metabolic pathways) in different common bean varieties. In the infected leaves, the types of differentially expressed genes in Dubbele witte variety(DW, susceptible) and Redland's greenleaf C variety(RGLC, resistant) were more similar to each other, mostly localized in photosynthetic systems and enriched in pathways

收稿日期: 2023-05-07

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目(2020-063); 国家自然科学基金项目(32202247); 山西省自然科学基金项目(20210302123367)

作者简介: 牛静雅(1996-), 女, 山西平顺人, 在读硕士, 研究方向: 菜豆普通花叶病毒。

通信作者: 冯 雪(1984-), 女, 山西晋中人, 教授, 博士, 主要从事植物病毒研究工作。

related to photosynthesis, photosynthesis-antenna protein, and carbon fixation in photosynthetic organisms. Conversely, Sanilac variety(resistant) differential genes did not exhibit enrichment in photosynthesis or other pathways. Additionally, in systemic leaves, the types of differentially expressed genes were distinct in the two resistant varieties. Plant infection by the virus can disrupt plant hormone synthesis and signal transduction pathways. Eight key genes involved in plant hormone synthesis or signal transduction were selected for verification in this study. Transcriptome and qPCR results revealed differential expression of plant hormone synthesis or signal transduction-related genes following BCMV infection. BCMV infection led to the upregulation of key genes involved in the synthesis pathways of salicylic acid, jasmonic acid, and gibberellin. The expression patterns of ethylene, brassinolide, and abscisic acid-related genes differed in susceptible varieties. This study elucidated the transcriptome's differential response to BCMV infection in common bean varieties with different genetic backgrounds.

**Key words:** bean common mosaic virus; transcriptome; WGCNA; common bean(*Phaseolus vulgaris*)

菜豆普通花叶病毒(Bean common mosaic virus, BCMV)在自然条件下可侵染多种豆科植物,菜豆(*Phaseolus vulgaris*)是其主要的寄主。BCMV 侵染菜豆后可引起花叶、畸形、黄化、生长迟缓等症状,严重时会引起局部或者系统性的坏死甚至造成植株死亡,是影响菜豆产量和质量最具危害性的病原之一<sup>[1]</sup>。菜豆普通花叶病毒是马铃薯 Y 病毒属的成员之一,为正单链 RNA 病毒,全长约为 10 kb,包含一个开放阅读框,编码一个多聚蛋白,通过蛋白酶切割产生 10 个具有不同功能的成熟蛋白。从 5' 端到 3' 端依次是:P1(First protein)、HC-Pro(Helper component-proteinase)、P3(Third protein)、6K1、CI(Cylindrical protein)、6K2、NIa(Nuclear inclusion body 'a' protein,包含 NIa-VPg 和 NIa-Pro 等 2 个蛋白)、NIb(Nuclear inclusion body 'b' protein)、CP(Coat protein)。此外,P3 蛋白中核糖体滑移产生一个非结构性蛋白:PIPO(Pretty interesting potyvirus ORF)<sup>[2-5]</sup>。

BCMV 的防治主要依靠抗病育种,菜豆针对 BCMV 的抗性基因有 6 个,包括显性抗病基因 *I* 和隐性基因 *bc-u<sup>d</sup>*、*bc-1*、*bc-2*、*bc-3* 和 *bc-4*<sup>[6-13]</sup>。根据 BCMV 分离株在不同遗传背景的菜豆鉴别寄主品种上的生物学反应,将其分为 8 个致病型(pathogroup, PGs),为 PG-I~PG-VIII<sup>[7,14-15]</sup>。已有研究表明,*bc-1* 和 *bc-2* 基因可能不会影响接种叶中的病毒复制和胞间移动,但它们可能限制病毒在植物中的远距离运输,从而影响病毒的系统性移动。对于大多数分离株,2 个隐性基因(*bc-1* 和 *bc-2*)共同作用的情况下对 BCMV 分离株的抗性比单独作用(*bc-1* 或 *bc-2*)产生的抗性更有效<sup>[16]</sup>。Vps4 AAA+ATPase ESCRT 蛋白(Phvul.011G092700)为 *bc-2* 候选基因。另一个 Vps4 AAA+ATPase ESCRT 蛋白(Phvul.005G125100)被鉴定为新的隐性 *bc-4* 基因的候选基因,*bc-2* 与紧密连锁的 *bc-4* 或 *bc-u<sup>d</sup>* 结合后表现出不同的反应<sup>[13]</sup>。*bc-3* 基因影响病毒的翻译,

本质为 eIF4E(Eukaryotic translation initiation factor 4E)<sup>[10]</sup>。*bc-u<sup>d</sup>* 和 *bc-4* 的基因功能尚不明确。目前市场上的抗性品种多携带 1 个或多个抗性基因,深入了解菜豆对 BCMV 的抗病机制,可为分子抗病育种提供有价值的参考。

植物为了应对病原物的侵染,发展了多种防御机制。防御策略包括对与新陈代谢、信号转导、蛋白质修饰和其他细胞功能相关的各种基因进行差异化调控<sup>[17-19]</sup>。其中,植物激素及其信号转导网络占据着非常重要的地位。对生物胁迫的响应主要是由水杨酸(SA)、茉莉酸(JAs)和乙烯(ET)等植物激素介导的,这些激素诱导植物的防御反应<sup>[20]</sup>。建立植物局部或者系统获得抗性(SAR)主要依赖于水杨酸的积累<sup>[21]</sup>,而诱导性系统抗性(ISR)的发展伴随着茉莉酸的积累<sup>[22]</sup>。有研究通过转录组测序技术(RNA-sequencing)和后期的验证实验揭示了 SA 响应途径参与了菊花对坏死营养真菌链格孢菌防御的响应<sup>[23]</sup>。也有报道证实,SA 或 JA 的施用诱导了丝裂原活化蛋白激酶(MAPK3)防御基因的表达,并增强了番茄对番茄黄卷叶病毒的抗性<sup>[24]</sup>。水稻被水稻矮缩病毒侵染后,其体内的赤霉素 GA1 的含量变低并且赤霉素合成通路中的内根-贝壳杉烯氧化酶(*ent-kaurene oxidase*, KO)的表达水平下调,GAs 积累的减少直接导致了 GA 调节细胞过程的异常功能,从而诱导相关症状的产生<sup>[25]</sup>。利用 ET 信号通路突变体 *ein2*(*ethylene insensitive2*)和 *etr1*(*ethylene response 1*)进行的相关研究表明,去除 ET 信号可以减弱 SA 信号转导的抑制并启动植物的防御反应,从而使拟南芥对花椰菜花叶病毒侵染的抗性增强<sup>[26]</sup>。据报道,ABA 对多种病毒的侵染过程均有响应<sup>[27-29]</sup>。研究发现,经芸苔素内酯(Brassinolide, BL)处理的野生型烟草对烟草花叶病毒的抗性增强,并且 BL 诱导的抗性不同于系统获得抗性(SAR)和伤口诱导的抗病性<sup>[30]</sup>。

我们在菜豆田间样品上分离出了 BCMV 株

系,命名为 C54(GenBank Accession:OP828732)。该株系可以系统侵染 Dubbele witte(简称 DW)菜豆品种并产生皱缩、畸形、黄化等症状,但是不能系统侵染 Redland's greenleaf C 品种(简称 RGLC;抗性基因:*bc-1*)和 Sanilac 品种(抗性基因:*bc-2*,*bc-4*)。以 C54 接种感性和不同抗性的菜豆材料为研究对象,对病毒侵染植株及对照植株样本进行转录组测序分析,明确 BCMV 侵染 DW、RGLC、Sanilac 菜豆品种后的接种叶和系统叶基因在转录水平上表达的共性和差异。本研究进行了感性及不同抗性的菜豆品种被 BCMV 侵染后的转录组分析,旨在为进一步解析不同菜豆品种对 BCMV 的抗病机制提供数据基础和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物栽培和病毒接种

用于接种的毒株分离于山西晋中,经过酶联免疫吸附测定及病毒序列扩增测序确定为菜豆普通花叶病毒,并将其命名为 BCMV-C54,在易感品种 DW 上进行扩繁,并保存于实验室。将菜豆易感品种 DW、抗性品种 Sanilac 和 RGLC 种植于人工智能气候箱(白天 16 h,30 °C/晚上 8 h,24 °C,20 000 lx)中,待菜豆长至第 1 对真叶完全展开时,对其进行病毒接种,接种前在叶片上撒 0.002 5 mm 金刚砂,取 BCMV 染病组织加入磷酸缓冲盐溶液(1.8 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,8.0 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,137.0 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl)进行研磨,取研磨均匀后的汁液对 2 片初生叶进行摩擦接种。对照组使用磷酸缓冲盐溶液进行处理。每组样品进行 3 次独立的生物重复。接种后所有植株安置于 26 °C 的温室(白天 16 h/晚上 8 h,20 000 lx)培养。14 d 后观察植株叶片症状。采用 Trizol 试剂(Biosharp,白鲨生物公司)提取各植株系统叶片的 RNA,然后使用 M-MLV 4 First-Strand cDNA Synthesis Kit(北京博迈德基因技术有限公司)合成第 1 链 cDNA,以 cDNA 为模板,使用 BCMV 特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:95 °C 3 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 70 s,共 40 个循环;72 °C 10 min。

### 1.2 样片采集和测序

接种 14 d 后采集各组接种叶(in)和系统叶(s),在液氮中冷冻 1 h 后立即放入干冰箱中送往公司进行 RNA-sequencing 测序。测序委托北京百迈客生物科技有限公司进行。首先进行总 RNA 提取,检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性,样品检测合格后,进行文库构建,主要流程包括:用带有 Oligo(dT)的

磁珠富集真核生物 mRNA,加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 进行随机打断;以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链,利用 AM-Pure XP beads 纯化 cDNA;纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AM-Pure XP beads 进行片段大小选择;最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。文库构建完成后,使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法对文库的有效浓度(文库有效浓度 $>2$  nmol/L)进行准确定量,以保证文库质量。库检合格后,不同文库按照目标下机数据量进行 pooling,使用 Illumina 平台进行测序。

### 1.3 比对和转录组数据分析

将下机数据进行过滤得到 Clean Data,与菜豆参考基因组(*Phaseolus vulgaris* v2.1)进行比对,得到 Mapped Data,然后进行生物信息分析。同时,将测序结果与 BCMV-C54 基因序列进行比对,得到病毒基因在各样本中的的比对效率以及各基因比对各样本的 raw counts 数目。对样品中的 Mapped Reads 的数目和转录本长度进行归一化,采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)作为衡量转录本或基因表达水平的指标。基于以下数据库(非冗余蛋白质序列数据库(Non-Redundant Protein Sequence Database, NR)、含有详细注释内容的蛋白质序列数据库(Swiss-Prot)、基因本体论(Gene Ontology, GO)、蛋白质家族(Protein family, Pfam)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、直系同源蛋白簇(Cluster of Orthologous Groups of proteins, COG)等)注释基因功能。

### 1.4 差异表达分析及加权基因共表达网络分析

对试验中的生物学重复使用皮尔逊相关性系数作为评估指标。 $r^2$ 越接近 1,说明 2 个重复样品相关性越强。使用 BMKCloud 平台的差异表达基因(DEG)分析工具进行分析。对于有生物学重复的样本,使用 DESeq2 进行样品组间的差异表达分析,获得 2 个生物学条件之间的差异表达基因集。在差异表达基因检测过程中,筛选标准为 FDR(错误发现率) $<0.05$ ,与对照相比,变化倍数大于等于 1.5 倍的基因用于分析<sup>[31]</sup>。筛选后的差异表达基因使用 GO、KEGG 和 Pathway 途径进行富集分析。以基因相对表达量 FPKM 值(每千个碱基的转录每百万映射读取的片段) $>0.1$ 的全部基因为背景,使用北京百迈客生物科技有限公司云平台的 WGCNA

分析工具进行加权基因共表达网络分析。

### 1.5 总 RNA 提取及 qPCR 分析

通过菜豆或者近缘物种序列注释选取了有代表性的 8 个植物激素合成以及信号转导相关的基因。在接种 14 d 时分别对 DW 和 RGLC 病毒处理组和健康对照组植株的系统叶片取样, 每组样品进行 3 次独立的生物重复。将上述采集的样品在液氮中研磨并使用 Trizol 试剂 (Biosharp, 白鲨生物公司) 提取总 RNA。然后使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 合成第 1 链 cDNA。使用 ChamQ Univer-

sal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 在 QuantStudio 平台进行植物激素相关基因的实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR)。PCR 扩增参数如下: 95 °C 3 min, 95 °C 10 s 和 60 °C 15 s, 共 40 个循环。使用 IDT PrimerQuest Tool (<https://sg.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) 进行引物设计, 引物序列见表 1。菜豆基因 *Actin* 作为内参基因用来归一化基因表达。每个反应进行 3 次技术重复。选择基因的相对表达水平以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算并且以平均值表示。误差线表示标准偏差。

表 1 qPCR 所用引物核苷酸序列  
Tab. 1 Nucleotide sequences of primers for qPCR

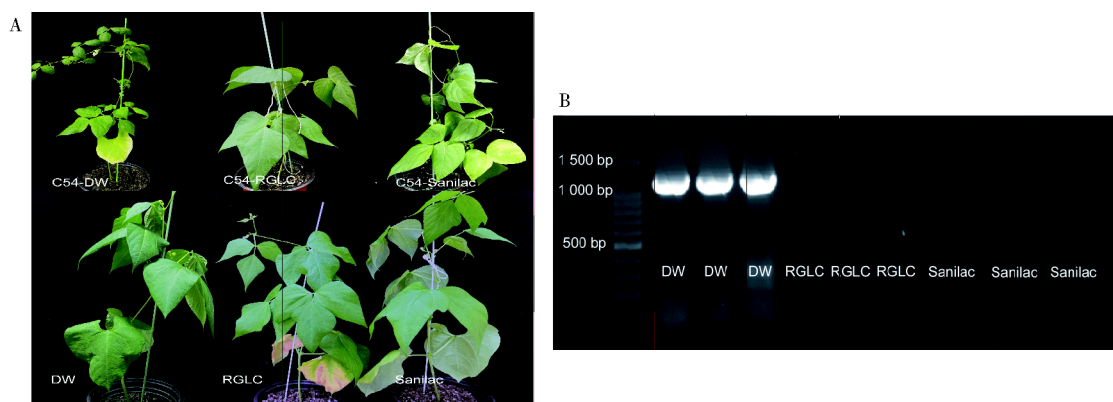
基因 ID	Gene ID	注释	Annotation	引物(5'-3')	Primer(5'-3')
Phvul.004G164800		Peroxisomal fatty acid $\beta$ -oxidation multifunctional protein	AIM1 OS= <i>Arabidopsis thaliana</i> (AIM1)	Forward: CTTTGCTCAGCGGGCTATAA Reverse: CCATTAGACCTCCTCCAACAAC	
Phvul.008G289500		Phenylalanine ammonia-lyase class 3 OS=	<i>Phaseolus vulgaris</i> (PAL)	Forward: CTATCACCAAACTCCTCAACCA Reverse: GCAATGTAGGACAGAGGAATCA	
Phvul.003G109100		Pathogenesis-related protein 1 OS=	<i>Phaseolus vulgaris</i> (PR1)	Forward: CCCAAAGGCTCTTCTGATT Reverse: GTCTCTCCATCCTCAACGAAAG	
Phvul.003G010700		Allene oxide synthase 1, chloroplastic OS=	<i>Solanum lycopersicum</i> (AOS)	Forward: CTCTCTTCAGCCATGTCATCTT Reverse: GTAGTTGTGGCGGTCGATTAT	
Phvul.011G216400		Ethylene receptor OS=	<i>Malus domestica</i> (ETR1)	Forward: CTCTTGTTGAGCTGGGTAGAAC Reverse: TGCTGTCGCAATGTGTAAGA	
Phvul.003G291800		ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 7 OS=	<i>Arabidopsis thaliana</i> (ABF4)	Forward: AACAGTGGATGAGGTTTGGAG Reverse: GTTGTTGCCTTTGAGGAATG	
Phvul.005G183600		Ent-kaurene oxidase OS=	<i>Salvia miltiorrhiza</i> (KO)	Forward: GCAAGGTCTGGGACGTAATATAG Reverse: CAATGGCTCCCTCCATCATATC	
Phvul.004G094100		Steroid 5-alpha-reductase DET2 OS=	<i>Solanum lycopersicum</i> (DET2)	Forward: AACACTGCTTACACACCTAACA Reverse: GCCAGTGACACGAGACTATC	
Phvul.011G064500		Actin OS=	<i>Gossypium hirsutum</i> OX=3635 PE=3 SV=1 (Actin)	Forward: GAAGTTCTTCTC CAACCATCC Reverse: TTCCTTGCTCATTCT GTCCG	

## 2 结果与分析

### 2.1 BCMV 侵染菜豆的鉴定

在菜豆上用机械摩擦接种的方法接种了

BCMV-C54, 14 d 后观察病毒侵染症状, 如图 1-A 所示, BCMV-C54 侵染 DW 后的叶片表现为花叶和黄化。



A. BCMV 侵染感性品种 DW、RGLC 和 Sanilac 的症状图以及健康植株。B. RT-PCR 方法检测 BCMV  
A. Symptoms of BCMV-infected susceptible varieties DW, RGLC, Sanilac and healthy plants. B. BCMV detection by RT-PCR

图 1 BCMV 侵染菜豆的症状图及 RT-PCR 检测  
Fig.1 Symptom and RT-PCR detection of BCMV-infected common bean

在菜豆未摩擦接种的上部叶片中采用 RT-PCR 方法分析验证了病毒的积累量,如图 1-B 可知,在 C54 侵染 DW 的叶片组织中获得了相应的特异性扩增条带,而在 C54 侵染 Sanilac 和 RGLC 的叶片组织中没有获得特异性扩增条带,说明 BCMV 成功侵染感性品种 DW 但不能侵染 Sanilac 和 RGLC,可以进行下一步的转录组测序。

## 2.2 比对信息统计

为了研究感性以及不同抗性的菜豆与 BCMV

之间的互作机制进行了 RNA-sequencing 测序,共完成 36 个样品的转录组分析,各样品 Clean Data 均达到 5.94 Gb, Q30 碱基百分比在 92.68% 及以上,表明数据质量高,可用于后续试验数据分析。将过滤后的 reads 与菜豆的参考基因组 (*Phaseolus vulgaris* v2.1) 进行比对,总体比对的百分比为 76.90%~95.59%,唯一位置比对的百分比为 73.33%~89.75%,有 2.79%~8.66% 的 reads 比对到参考基因组多处位置(表 2)。

表 2 病毒在各样本中的积累量  
Tab.2 Accumulation of virus in each sample

样本 ID Sample ID	比对率/% Mapping rate	样本 ID Sample ID	比对率/% Mapping rate	样本 ID Sample ID	比对率/% Mapping rate	样本 ID Sample ID	比对率/% Mapping rate
CK1	0.01	CK10	0.01	T1	40.64	T10	0.04
CK2	0.02	CK11	0.01	T2	44.64	T11	3.44
CK3	0.01	CK12	0.01	T3	33.01	T12	0.04
CK4	0.01	CK13	0.06	T4	53.52	T13	4.71
CK5	0.02	CK14	0.19	T5	54.87	T14	7.53
CK6	0.00	CK15	0.44	T6	55.68	T15	8.84
CK7	0.03	CK16	0.11	T7	1.35	T16	0.04
CK8	0.04	CK17	0.01	T8	1.49	T17	0.03
CK9	0.01	CK18	0.01	T9	8.28	T18	0.06

注:CK1,CK2,CK3/T1,T2,T3 为 DW 健康/病毒处理植株接种叶的 3 个生物重复;CK4,CK5,CK6/T4,T5,T6 为 DW 健康/病毒处理植株系统叶的 3 个生物重复;CK7,CK8,CK9/T7,T8,T9 为 Sanilac 健康/病毒处理植株接种叶的 3 个生物重复;CK10,CK11,CK12/T10,T11,T12 为 Sanilac 健康/病毒处理植株系统叶的 3 个生物重复;CK13,CK14,CK15/T13,T14,T15 为 RGLC 健康/病毒处理植株接种叶的 3 个生物重复;CK16,CK17,CK18//T16,T17,T18 为 RGLC 健康/病毒处理植株系统叶的 3 个生物重复。

Note: CK1, CK2, CK3/T1, T2, T3 were three biological replicates of the inoculated leaves of DW healthy/virus treated plants. CK4, CK5, CK6/T4, T5, T6 were the three biological repeats of systemic leaves of DW healthy/virus treated plants. CK7, CK8, CK9/T7, T8, T9 were three biological replicates of the inoculated leaves of Sanilac healthy/virus treated plants. CK10, CK11, CK12/T10, T11, T12 were three biological replicates of the systemic leaves of Sanilac healthy/virus treated plants. CK13, CK14, CK15/T13, T14, T15 were three biological replicates of the inoculated leaves of RGLC healthy/virus treated plants. CK16, CK17, CK18//T16, T17, T18 were the three biological repeats of systemic leaves of RGLC healthy/virus treated plants.

## 2.3 病毒比对率分析

通过统计比对到病毒基因组的 reads 数占样品总 reads 数的比例得到 BCMV-C54 在各样本中的积累量(表 2)。其中,感性品种的接种叶样本中的病毒积累量分别为 40.64%、44.64% 和 33.01%,而系统叶中的病毒积累量整体高于接种叶,均为 50% 以上。Sanilac 与 RGLC 处理组接种叶和系统叶上

的病毒积累量有明显下降,为 0.03%~8.84%。RGLC 处理组接种叶的平均病毒比对率高于 Sanilac 处理组接种叶,说明 RGLC 的接种叶病毒积累量高于 Sanilac。在系统叶中,大多数的病毒处理过的 RGLC 和 Sanilac 样本中的病毒积累量很少 (<0.1%),但是 Sanilac 的一个生物学重复样本中的病毒 reads 的比例约为 3.44%(T11)。

表 3 BCMV-C54 基因组各基因在样本里的积累量统计  
Tab.3 Statistics on the accumulation of each gene of BCMV-C54 genome in the samples

Gene	C54-DW-in	C54-DW-s	C54-Sanilac-in	C54-Sanilac-s	C54-RGLC-in	C54-RGLC-s
<i>6k1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>6k2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>CI</i>	+++++	+++++	++++	-	+++++	-
<i>CP</i>	++++	++++	+++++	-	++++	-
<i>HC-Pro</i>	+++	+++	+++	-	+++	-
<i>NIA</i>	++	+	++	-	+	-
<i>VPG</i>	+	+	+	-	+	-
<i>NIB</i>	++++++	++++++	++++++	-	++++++	-
<i>P1</i>	+++	+++	+++	-	+++	-
<i>P3</i>	++	++	++	-	++	-
<i>PIPO</i>	-	-	-	-	-	-

注:“in”为接种叶,“s”为系统叶,“+”表示基因积累量,“-”表示没有积累。

Note: "in" was the inoculated leaves, "s" was the system leaves, "+" was the amount of gene accumulation, "-" was no accumulation.

根据 C54 各基因序列比对各样本的 raw counts 数目可以看出,在接种后的 DW、Sanilac 和 RGLC 的接种叶和系统叶中,NIb 的积累量最多,然后依次是 CI、CP、HC-Pro、P1、P3、NIa、VPg(表 3)。

#### 2.4 差异表达基因筛选和分析

通过对样品间进行相关系数热图及数据分析,将重复性差的样品剔除(CK6、T3、T4),剔除后的生物学重复样品两两之间的  $r^2 \geq 0.8455$ ,表明样品间的相似度较高,生物学重复可靠,可进行下一步分析。

本研究中,各处理组筛选到的上调和下调基因如图 2 所示。为了确定 C54 在 3 个不同菜豆品种上引起的基因表达水平变化,利用维恩图分析了差异

表达基因(图 3)。在接种叶上,C54-DW 与 C54-RGLC 相较于 C54-Sanilac 有更多共同的差异表达基因。其中,C54-DW、C54-Sanilac 存在 656(376+280)个共同的差异表达基因,C54-DW 和 C54-RGLC 存在 1 618(1 242+376)个共同的差异表达基因,C54-Sanilac 与 C54-RGLC 存在 527(376+151)个共同的差异表达基因。3 个品种特有的差异表达基因分别为 3 576、281、1 112 个。而在系统叶上,C54-DW 与 C54-Sanilac、C54-DW 与 C54-RGLC、C54-Sanilac 与 C54-RGLC 分别存在 221、220、66 个共同的差异表达基因。3 个品种特有的差异表达基因分别为 5 794、157、163 个。

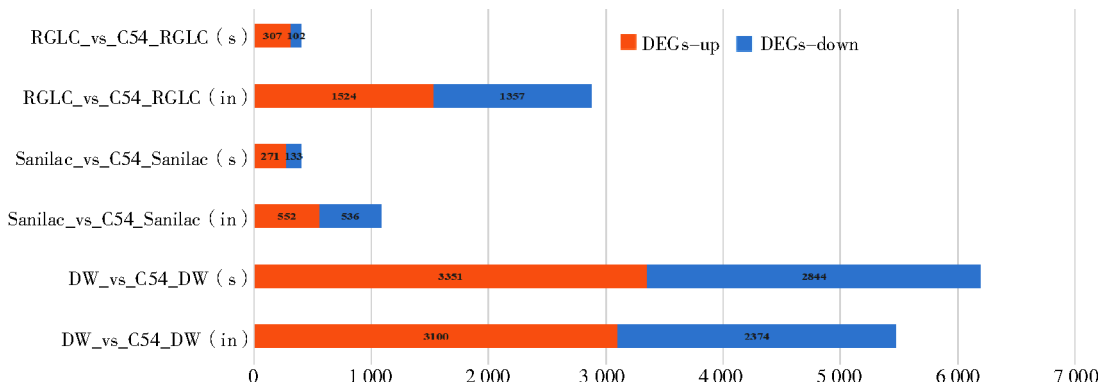
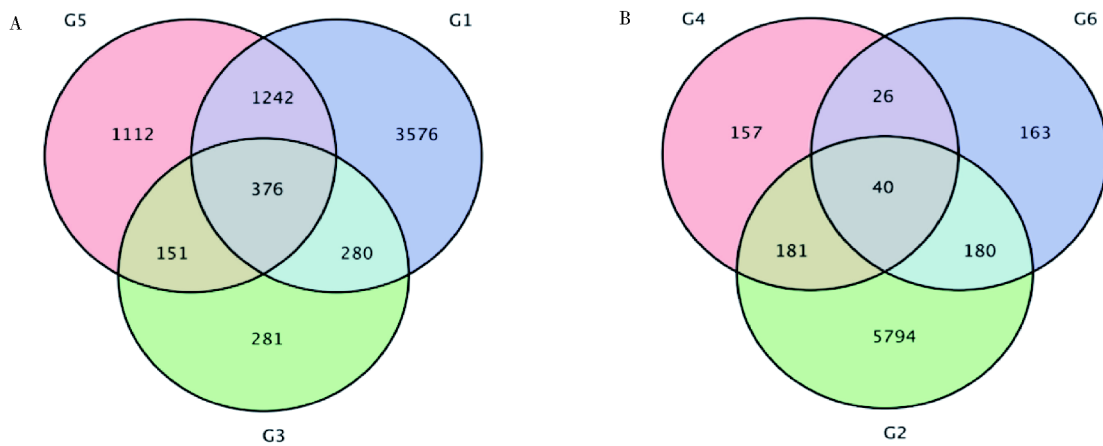


图 2 各处理组与对照相比差异表达基因数量统计

Fig.2 Statistics of the number of differentially expressed genes in each treatment group compared with the control group



A. BCMV 侵染在接种叶引起的差异表达基因。G1. DW; G3. Sanilac; G5. RGLC; B. BCMV 侵染在系统叶引起的差异表达基因。G2. DW; G4. Sanilac; G6. RGLC

A. Differentially expressed genes caused by BCMV infection in inoculated leaves. G1. DW; G3. Sanilac; G5. RGLC. B. Differentially expressed genes caused by BCMV infection in systemic leaves. G2. DW; G4. Sanilac; G6. RGLC

图 3 差异表达基因维恩图  
Fig.3 Venn diagram of differentially expressed genes

结果显示,差异基因表达发生变化数量的多少与症状的严重程度呈正相关性。C54 接种 RGLC 和 Sanilac 后在系统叶上的差异表达基因较接种叶少,并且 Sanilac 上的差异表达基因数量比 RGLC 少。而 C54 接种 DW 在接种叶片上引起的差异表

达基因比系统叶片上的数量少。

#### 2.5 病毒侵染 3 个菜豆品种后的 DEGs 的 GO 富集分析

对 C54 侵染 3 个菜豆品种后引起的差异表达基因进行 GO 富集分析(表 4)。本研究中的数据证实

了被 BCMV 侵染后,菜豆的代谢途径和基因表达水平发生了很大的变化。在细胞组分这个分支中 DW 的接种叶和系统叶的差异表达基因分别显著性富集 33 个和 23 个 GO term, 主要集中于膜的组成部分(GO:0016021)、质体(GO:0009536)、叶绿体(GO:0009507)、叶绿体类囊体(GO:0009534)、叶绿体类囊体膜(GO:0009535)、叶绿体基质(GO:0009570)、光合体系(GO:0009522、GO:0009523)。抗性品种 Sanilac 被病毒侵染后引起的差异表达基因显著性富集在细胞骨架部分(GO:0044430)、肌动蛋白细胞骨架(GO:0015629)、胞间连丝(GO:0009506)、肌凝蛋白复合物(GO:0016459)。抗性品种 RGLC 被病毒侵染后引起的接种叶上的差异表达基因在细胞组分分支中显著性富集 21 个 GO term, 为膜的组成部分、类囊体、叶绿体类囊体、光合体系、细胞外基质(GO:0031012)、质外体(GO:0048046), 系统叶上的差异表达基因在细胞外基质富集。

表 4 GO 富集分析  
Tab.4 GO enrichment analysis

组别 Group	生物学过程 Biological pathways	细胞组分 Cell components	分子功能 Molecular functions
G1	1 364(133)	182(33)	739(99)
G2	1 793(181)	207(23)	795(125)
G3	803(70)	88(4)	326(42)
G4	571(44)	73(6)	233(26)
G5	1 326(101)	100(21)	528(87)
G6	575(48)	56(1)	261(24)

注:各处理组差异表达基因集在 biological pathways、cell components、molecular functions 共 3 个分支富集的 GO term 数量。括号外为差异基因富集(enrich factor>1)到的 GO term 数目,括号内为显著性富集数目( $q$ -value<0.05)。

Note: The number of GO term enriched in biological pathways, cell components and molecular functions of differentially expressed gene set in each treatment group. Outside the parentheses was the number of GO terms from differential gene enrichment(enrich factor >1), and inside the parentheses was the number of significant enrichment( $q$ -value<0.05).

易感品种 DW 被病毒侵染后接种叶和系统叶上引起的差异表达基因在生物学过程方面主要富集在光合作用-光捕获(GO:0009765)、光合作用(GO:0015979)、蛋白质生色团连接(GO:0018298)、翻译(GO:0006412)、脱落酸激活的信号通路(GO:0009738)、叶绿素生物合成过程(GO:0015995)、肉桂酸生物合成过程(GO:0009800)等 GO term。抗性品种 Sanilac 被病毒侵染后在接种叶上的差异表达基因在脱落酸激活的信号通路(GO:0009738)、转录调控-DNA 模板(GO:0006355)、RNA 生物合成过程的调控(GO:2001141)等基因表达的调控方面富集,系统叶上的差异表达基因在对铜离子的响

应(GO:0046688)显著富集。抗性品种 RGLC 被病毒侵染后在接种叶上的差异表达基因的富集结果为光合作用-光捕获、蛋白质生色团连接、光合作用、叶绿素生物合成过程、肉桂酸生物合成过程等,系统叶上的差异表达基因的富集结果为 DNA 整合(GO:0015074)以及基因表达的调控。

在分子功能方面,易感品种 DW 被病毒侵染后接种叶和系统叶上引起的差异表达基因在蛋白激酶活性(GO:0004672)、氧化还原酶活性(GO:0016491)、叶绿素结合(GO:0016168)、多糖结合(GO:0030247)、ATP 结合(GO:0005524)、几丁质结合(GO:0008061)、脱落酸结合(GO:0010427)等 GO term 显著富集。抗性品种 Sanilac 被病毒侵染后在接种叶上引起的差异表达基因在多糖结合、内肽酶抑制剂活性(GO:0004866)、RDDP 活性(GO:0003964)等显著富集,系统叶上的差异表达基因在多糖结合、FAD 结合(GO:0071949)、内肽酶抑制剂活性显著富集,并且二者均有在水杨酸甲酯酯酶活性(GO:0080031)和茉莉酸甲酯酯酶活性(GO:0080032)富集。抗性品种 RGLC 被病毒侵染后在接种叶上的差异表达基因在叶绿素结合、多糖结合、蛋白激酶活性、单加氧酶活性(GO:0004497)、铁离子结合(GO:0005506)、脱落酸结合、ATP 结合显著富集,系统叶上的差异表达基因在多糖结合、内肽酶抑制剂活性显著富集。

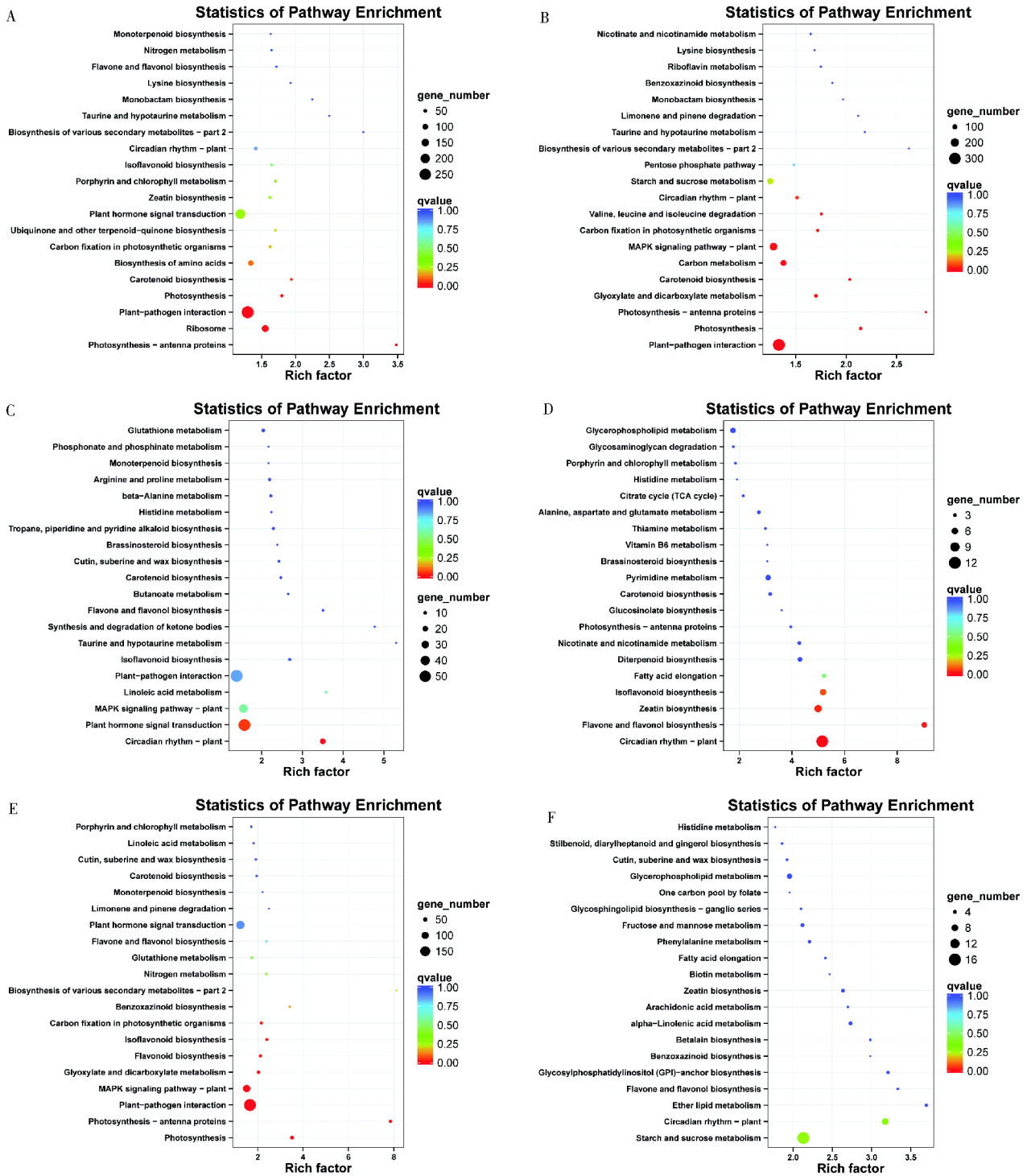
富集结果显示,从细胞组分、生物学过程、分子功能来看,在 BCMV 侵染后 DW 与 RGLC 接种叶中差异表达的基因更为相似,多定位在光合体系,富集于光合作用及光合作用相关,而 Sanilac 中的差异表达基因多定位于细胞骨架和胞间连丝,富集在生物合成过程和基因表达的调控。

## 2.6 病毒侵染 3 个菜豆品种后的 DEGs pathway 富集分析

KEGG 路径可以帮助进一步确定基因的生物功能和相互作用<sup>[32]</sup>。根据与 KEGG 数据库的比较,对  $P<0.01$  的 KEGG pathway 进行分析,选取富集最显著的前 20 个代谢通路,绘制 KEGG 富集气泡图(图 4)。C54 侵染 DW 后在接种叶和系统叶上引起的差异基因共同显著性富集在植物-病原体互作(ko04626)、光合作用(ko00195)、光合作用-天线蛋白(ko00196)、类胡萝卜素生物合成(ko00906)、光合生物中的碳固定(ko00710)、昼夜节律-植物(ko04712)。C54 侵染 RGLC 后在接种叶上引起的差异表达基因同样在光合作用、光合作用-天线蛋

白以及光合生物中的碳固定上富集,但是 Sanilac 的接种叶上引起的差异表达基因没有在这方面富集。2 个抗性品种 Sanilac 和 RGLC 接种叶上的差异表达基因共同富集有植物激素信号转导(ko04075)、MAPK 信号通路-植物(ko04016)、植物-病原物互

作(ko04626)和异黄酮生物合成(ko00943)等代谢途径。昼夜节律-植物在 2 个抗性品种系统叶上的差异表达基因中共同富集。病毒侵染后引起的花叶症状可能主要与光合作用、光合作用-天线蛋白、类胡萝卜素生物合成等代谢途径有关。



A.G1;B.G2;C.G3;D.G4;E.G5;F.G6。圆圈大小表示富集 pathway 途径中差异表达基因的数量,颜色表示校正后的 P 值  
 A. G1; B. G2; C. G3; D. G4; E. G5; F. G6. The size of the circles represented the number of differentially expressed genes in the enriched pathway, and the color represented the corrected  $P$  value

图 4 差异表达基因较多或显著性富集的 KEGG 途径  
 Fig.4 KEGG pathway with more differentially expressed genes or significant enrichment

### 2.7 加权基因共表达网络分析

WGCNA 主要运用在大样本基因表达数据,从中挖掘出具有相似表达谱的基因,将这些基因聚集在一起,归于同一基因模块(module),并探索基因网络与关注的表型之间的关联关系,以及网络中的核心基因。本试验中,WGCNA 将全部基因(FPKM>0.1)分成模块,并将它们与表型相关联。这为不同抗性品种菜豆之间的差异研究提供了分子基础。一般取  $R^2$ (相关系数)>0.8 或达到平台期时最小的  $\beta$  值(邻接函数的参数)用于构建网络。

从图 5 可以看出,确定  $\beta=5$  的软阈值(soft thresholding power)。共得到 12 个模块。12 个模块中大部分呈负相关,但正相关的相关性高。功能分类表明,C54RGLCin 与 MEcyan 的相关性为 0.84(显著性值为  $1e^{-09}$ ),模块中的关键基因主要是关于植物-病原体互作、黄酮和黄酮醇的生物合成、亚油酸代谢。亚油酸代谢包含 JA 生物合成,而黄酮醇作为重要次生代谢物质,其生物合成受 JA 信号转导的调控。

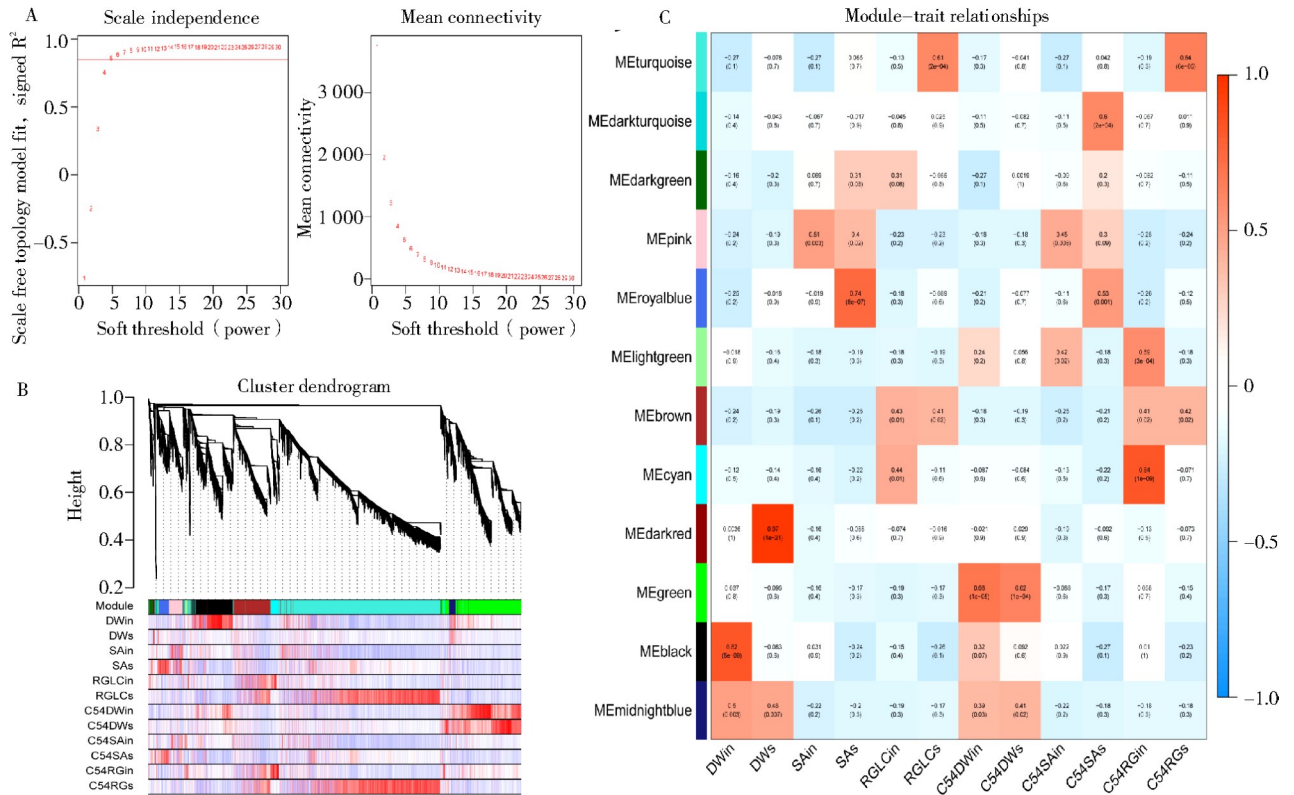


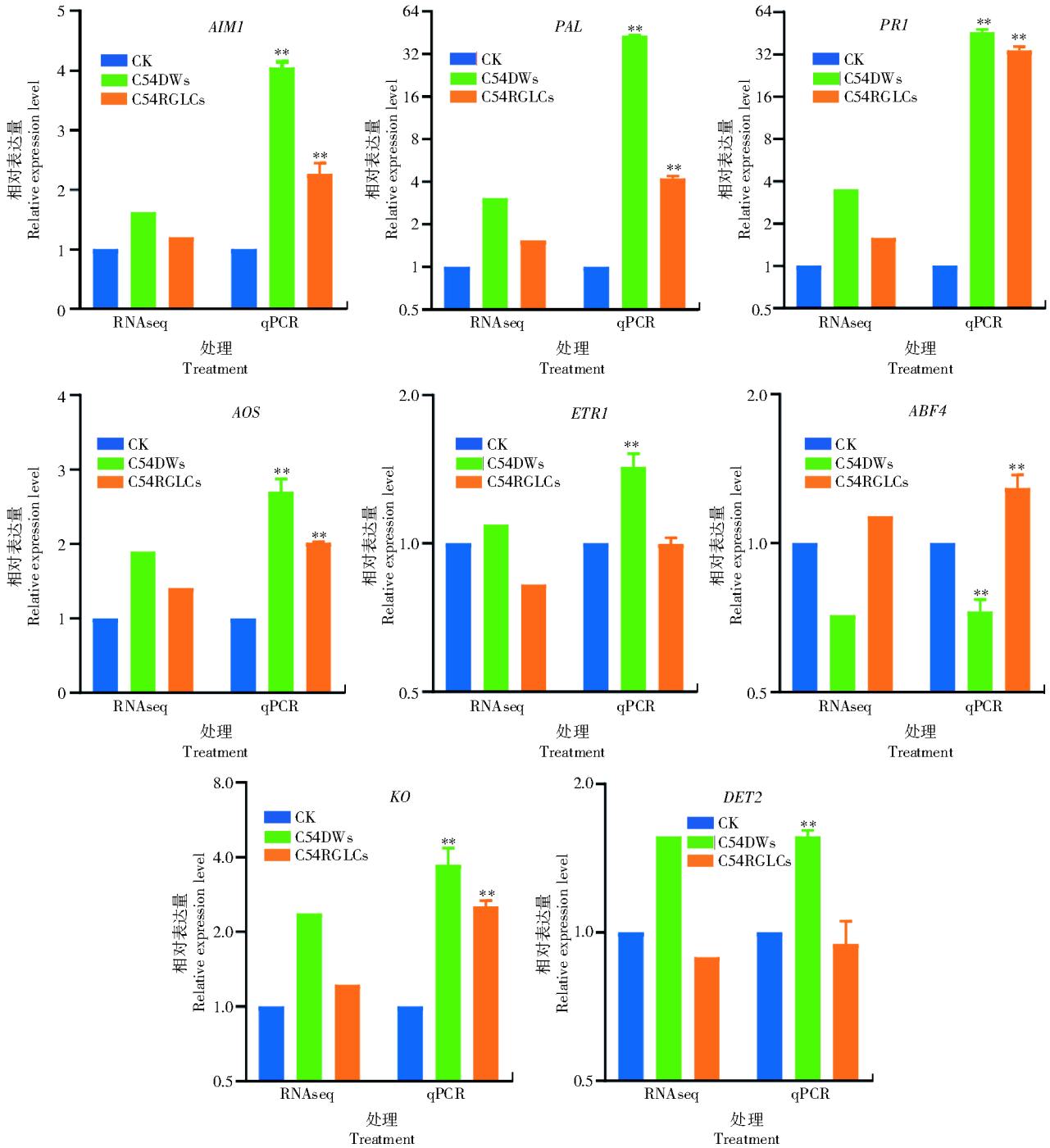
图 5 加权基因共表达网络分析  
**Fig.5 Weighted gene co-expression network analysis**

### 2.8 qPCR 分析

为了明确植物激素相关基因在应对病毒侵染中的潜在功能,从病毒侵染感性品种 DW 和抗性品种 RGLC 的转录组数据集中选取了 8 个植物激素合成及信号转导相关的代表性基因的表达水平进行了 qPCR 验证。由图 6 可知,这 8 个基因 qRT-PCR 的表达水平与转录组测序获得的数据趋势一致,说明该转录组测序结果的可信度较高。其中,在病毒侵染后,抗性品种和感性品种的系统叶中

AIM1、PAL、PR1、AOS、KO 的 mRNA 表达水平相比于对照均上调,而 ETR1 和 DET2 在感性品种中的表达水平略微上调,在抗性品种中的表达水平基本没有变化或者略微下调。ABF4 表达水平的变化则相反,与对照相比,在感性品种中下调,在抗性品种中上调。结果表明,植物激素合成以及信号转导相关基因的表达变化多样。这 8 个基因在面对病毒侵染时感性品种和抗性品种呈现出截然不同的表达模式,这可能与它们在植物中面对病毒侵染

时的生物学功能密切相关。



每个值代表 3 个重复的平均值±SD。\*为与对照组显著差异( $P<0.05$ );\*\*为与对照组极显著差异( $P<0.01$ )

Each value represented the mean ±SD of three replicates. \* was significantly different from the control group( $P<0.05$ ); \*\* was an extremely significant difference from the control group( $P<0.01$ )

图 6 植物激素相关基因在 BCMV 感染的易感和抗性品种中的相对表达水平分析  
Fig.6 Analysis of relative expression levels of plant hormone-related genes in susceptible and resistant varieties infected with BCMV

### 3 结论与讨论

为了明确易感和 2 个抗性品种在 BCMV-C54 感染后的基因表达情况,对病毒接种的 DW、

RGLC、Sanilac 进行了转录组测序。本试验在病毒接种后的第 14 天分别取对照组和病毒处理组的接种叶和系统叶样品进行 RNA-sequencing,并对筛选得到的差异表达基因进行 GO、KEGG Pathway

富集分析和 WGCNA。从病毒比对率以及差异表达基因来看,病毒的复制在 RGLC 接种叶上要比 Sanilac 接种叶稍活跃,并且病毒在系统性侵染 2 个抗性品种时受到阻碍,可能是由于接种叶病毒的积累量较少,不足以进行长距离运输所导致的。抗性基因在病毒侵染菜豆的过程中引发的防御机制可能阻碍了病毒在接种叶上的复制,但具体原因尚有待进一步研究。

病毒基因表达量差异可能与其特异性功能相关。蛋白功能通常是根据其他马铃薯 Y 病毒属成员的研究结果推测:P1 与病毒复制和症状表达有关;HC-Pro 蛋白与蚜虫的传播与病毒积累相关;P3 与寄主症状表达有关;NIb、6K1 和 6K2 参与基因组复制;VPg 和 CI 与病毒在细胞间的移动有关;NIa 可协助病毒在细胞中进行定位。病毒 RNA 的复制和翻译可以通过细胞中 CP 的数量来调节。病毒在 CP 浓度较高的情况下,RNA 复制被抑制,而当 CP 的浓度较低时,RNA 的积累和翻译增强<sup>[33-36]</sup>。相关研究表明,至少有 4 种病毒蛋白,即 P3N-PIPO、CI、P3 和 CP 对于马铃薯 Y 病毒的胞间移动是必不可少的<sup>[37]</sup>。从各基因比对转录组数据库结果来看,NIb、CI 和 CP 的积累量最多,推测它们可能在 BCMV 的复制和胞间移动过程中起关键性作用。

差异基因表达模式的分析清楚地表明了病毒侵染后特异性的宿主反应。本研究对差异表达基因进行 GO 富集分析发现,病毒处理后的易感品种 DW 以及 RGLC 接种叶与健康对照相比表达水平变化明显的基因主要定位于膜、叶绿体和叶绿体相关,这可能与病毒诱导的症状表达相关。Sanilac 中差异表达的基因主要定位于细胞骨架部分、肌动蛋白细胞骨架、胞间连丝,说明植物病毒侵染 Sanilac 后产生差异表达的基因可能与移动运输有关。从 pathway 富集结果来看,病毒侵染 DW 可能抑制寄主的光合作用相关代谢通路,同时类胡萝卜素生物合成也受到明显的影响,说明光合作用途径对植物被病毒侵染响应较为敏感。同时,黄酮和黄酮醇生物合成、异黄酮生物合成等途径多在 2 个抗性品种富集,这是光合作用所产生的次生代谢产物。这些次生代谢产物可能与植物产生的抗性相关。早些时候就有关于病原体侵染后光合作用途径和各种代谢活动相应变化的报道<sup>[38-40]</sup>。植物在病毒应激条件下,细胞广泛地调节代谢活动和能量的产生。光合作用基因活性的降低可能与系统病毒传播后的

黄化或绿色组织表面积减少有关。这种严格的代谢调节对于病毒侵染期间的特定的防御机制至关重要<sup>[41]</sup>。抗性品种 Sanilac 的差异表达基因在昼夜节律-植物通路极显著富集,而该通路参与病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP)诱导的免疫反应<sup>[42-43]</sup>,但与响应细菌和真菌的侵染不同,在植物中至今未识别到植物病毒核酸的模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR),植物应对病毒的第 1 层次免疫反应为完善且高度保守的 RNA 沉默(RNAi)机制,若 RNA 沉默被抑制,则病毒效应子激发的 R 基因功能被激活。有研究表明,与 C54RGLCin 相关性最高的基因主要是关于植物-病原体互作与茉莉酸生物合成及下游调控,RGLC 和 Sanilac 对 BCMV 的抗性分子机制可能并不相同。

植物被病毒侵染后会干扰植物激素的合成与信号转导通路。同时,植物激素可调控病毒的复制、装配、移动以及症状表达等多个方面。不同植物激素之间通过协同或拮抗作用调控病毒胁迫反应<sup>[25,44-48]</sup>。从转录组数据和 qPCR 结果来看,BCMV 侵染促进了参与水杨酸合成通路的关键基因 PAL(Phenylalanineammonialyase, 苯丙氨酸解氨酶)和 AIM1(花序分生组织异常基因)的正向调控。这些基因的上调诱导了病程相关蛋白 PR1 的表达增加。茉莉酸生物合成关键酶 AOS(丙二烯氧化物合酶)和赤霉素合成通路中的 KO(*ent*-kaurene oxidase, 内根-贝壳杉烯氧化酶)同样也在病毒侵染后积极表达。乙烯受体 ETR1、油菜素内酯合成过程的关键限速基因 DET2(DEETIOLATED2)以及 ABA 响应元件结合因子 ABF4(ABA-responsive elements binding factor 4)在抗感品种中的 mRNA 表达变化趋势不相同。不同的植物激素通过拮抗或协同作用以响应 BCMV 对菜豆的影响。

不同抗性的菜豆被 BCMV 侵染后表现出了抗性分子机制上的差异,而这些差异可能与 2 个抗性菜豆品种不同的遗传背景以及菜豆品种特异性有关。在病毒侵染过程中,植物经历了基因表达水平的变化。本研究结果增加了对 BCMV 侵染菜豆后的基因表达水平变化的理解,并为菜豆抗性基因功能的研究以及菜豆对 BCMV 的防御机制提供了理论依据和数据基础。

#### 参考文献:

- [1] SINGH S P, SCHWARTZ H F. Breeding common bean for re-

- sistance to diseases: a review[J]. *Crop Science*, 2010, 50(6): 2199-2223.
- [2] ADAMS M J, ANTONIW J F, BEAUDOIN F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(4): 471-487.
- [3] CHUNG B Y W, MILLER W A, ATKINS J F, et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(15): 5897-5902.
- [4] OLSPERT A, CHUNG B Y, ATKINS J F, et al. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae[J]. *EMBO Reports*, 2015, 16(8): 995-1004.
- [5] RODAMILANS B, VALLI A, MINGOT A, et al. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the Potyviridae family[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(13): 6965-6967.
- [6] CADLE-DAVIDSON M M, JAHN M M. Resistance conferred against bean common mosaic virus by the incompletely dominant I locus of *Phaseolus vulgaris* is active at the single cell level[J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(12): 2601-2608.
- [7] DRIJFHOUT E. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance[J]. *Verslagen Van Landbouwkundige Onderzoekingen*, 1978, 11(1): 1471-1479.
- [8] HART J P, GRIFFITHS P D. A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to Clover yellow vein virus in common bean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(11): 2849-2863.
- [9] KELLY J D, AFANADOR L, HALEY S D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus[J]. *Euphytica*, 1995, 82(3): 207-212.
- [10] NADERPOUR M, LUND O S, LARSEN R, et al. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(2): 255-263.
- [11] COLLMER C W, MARSTON M F, TAYLOR J C, et al. The I gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus bean common mosaic virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(11): 1266-1270.
- [12] SOLER-GARZÓN A, MCCLEAN P E, MIKLAS P N. Genome-wide association mapping of bc-1 and bc-u reveals candidate genes and new adjustments to the host-pathogen interaction for resistance to *Bean common mosaic necrosis virus* in common bean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 699569.
- [13] SOLER-GARZÓN A, MCCLEAN P E, MIKLAS P N. Coding mutations in vacuolar protein-sorting 4 AAA+ATPase endosomal sorting complexes required for transport protein homologs underlie bc-2 and new bc-4 gene conferring resistance to *Bean common mosaic virus* in common bean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 769247.
- [14] LARSEN R C, MIKLAS P N, DRUFFEL K L, et al. NL-3 K strain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from bean common mosaic necrosis virus and bean common mosaic virus[J]. *Phytopathology*, 2005, 95(9): 1037-1042.
- [15] FENG X, MYERS J R, KARASEV A V. Bean common mosaic virus isolate exhibits a novel pathogenicity profile in common bean, overcoming the bc-3 resistance allele coding for the mutated eIF4E translation initiation factor[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(11): 1487-1495.
- [16] FENG X, ORELLANA G E, MYERS J R, et al. Recessive resistance to bean common mosaic virus conferred by the bc-1 and bc-2 Genes in common bean (*Phaseolus vulgaris*) affects long-distance movement of the virus[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(8): 1011-1018.
- [17] WHITHAM S A, YANG C L, GOODIN M M. Global impact: elucidating plant responses to viral infection[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(11): 1207-1215.
- [18] 张贺平. 小麦条锈菌产孢转录组分析[J]. *山西农业科学*, 2020, 48(2): 131-135.
- ZHANG H P. Transcriptome analysis of sporulation of *Puccinia striiformis*[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2020, 48(2): 131-135.
- [19] 刘旭, 张诺, 徐林, 等. 谷子 NPR1 基因特征及响应禾生指梗霉侵染的表达分析[J]. *山西农业科学*, 2022, 50(9): 1233-1239.
- LIU X, ZHANG N, XU L, et al. Characteristics of NPR1 gene in foxtail millet and expression analysis in response to *Sclerospora graminicola* infection[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2022, 50(9): 1233-1239.
- [20] SANTINO A, TAURINO M, DE DOMENICO S, et al. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(7): 1085-1098.
- [21] FU Z Q, DONG X N. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 839-863.
- [22] PIETERSE C M J, VAN LOON L C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 456-464.
- [23] ZHAO X T, SONG L Y, JIANG L W, et al. The integration of transcriptomic and transgenic analyses reveals the involvement of the SA response pathway in the defense of chrysanthemum against the necrotrophic fungus *Alternaria* sp[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 80.
- [24] LI Y Z, QIN L, ZHAO J J, et al. SIMPAK3 enhances tolerance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) by regulating salicylic acid and jasmonic acid signaling in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172466.
- [25] ZHU S F, GAO F, CAO X S, et al. The rice dwarf virus P2 protein interacts with ent-kaurene oxidases *in vivo*, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(4): 1935-1945.
- [26] LOVE A J, LAVAL V, GERI C, et al. Components of *Arabidopsis* defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to Cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(6): 659-670.
- [27] ALAZEM M, LIN K Y, LIN N S. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of Bamboo mosaic

- virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(2): 177-189.
- [28] FRASER R S S, WHENHAM R J. Abscisic acid metabolism in tomato plants infected with tobacco mosaic virus: relationships with growth, symptoms and the Tm-1 gene for TMV resistance[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34(3): 215-226.
- [29] RAJAGOPAL R. Effect of tobacco mosaic virus infection on the endogenous levels of indoleacetic, phenylacetic and abscisic acids of tobacco leaves in various stages of development[J]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1977, 83(5): 403-409.
- [30] NAKASHITA H, YASUDA M, NITTA T, et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2003, 33(5): 887-898.
- [31] 许艺兰, 文露婷, 黄娴, 等. 全州禾花鲤皮肤转录组特征分析[J]. *河南农业科学*, 2023, 52(6): 150-159.
- XU Y L, WEN L T, HUANG Y, et al. Transcriptome characteristics analysis of skin of *Cyprinus carpio* var. Quanzhouensis[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2023, 52(6): 150-159.
- [32] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(suppl\_1): D480-D484.
- [33] IVANOV K I, PUUSTINEN P, GABRENAITE R, et al. Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(9): 2124-2139.
- [34] IVANOV K I, MÄKINEN K. Coat proteins, host factors and plant viral replication[J]. *Current Opinion in Virology*, 2012, 2(6): 712-718.
- [35] YI G H, LETTENNEY E, KIM C H, et al. Brome mosaic virus capsid protein regulates accumulation of viral replication proteins by binding to the replicase assembly RNA element[J]. *RNA*, 2009, 15(4): 615-626.
- [36] YI G H, VAUGHAN R C, YARBROUGH I, et al. RNA binding by the brome mosaic virus capsid protein and the regulation of viral RNA accumulation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 391(2): 314-326.
- [37] REVERS F, GARCÍA J A. Molecular biology of potyviruses[J]. *Advances in Virus Research*, 2015, 92: 101-199.
- [38] SCHARTE J, SCHÖN H, WEIS E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2005, 28(11): 1421-1435.
- [39] BONFIG K B, SCHREIBER U, GABLER A, et al. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves[J]. *Planta*, 2006, 225(1): 1-12.
- [40] BERGER S, SINHA A K, ROITSCH T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15/16): 4019-4026.
- [41] JENS M. Stress Responses to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) infection of resistant and susceptible tomato plants are different[J]. *Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development*, 2012(S1): 38-50.
- PFANNSTIEL JENS M A. Stress responses to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) infection of resistant and susceptible tomato plants are different[J]. *Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development*, 2012, 1(S1): 1152-1160.
- [42] BHARDWAJ V, MEIER S, PETERSEN L N, et al. Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26968.
- [43] ZHANG C, XIE Q G, ANDERSON R G, et al. Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(6): e1003370.
- [44] CASTEEL C L, DE ALWIS M, BAK A, et al. Disruption of ethylene responses by turnip mosaic virus mediates suppression of plant defense against the green peach aphid vector[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 209-218.
- [45] COLLUM T D, PADMANABHAN M S, HSIEH Y C, et al. Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(19): 2740-2749.
- [46] BALIJI S, LACATUS G, SUNTER G. The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes[J]. *Virology*, 2010, 402(2): 238-247.
- [47] TAO T, ZHOU C J, WANG Q, et al. Rice black streaked dwarf virus P7-2 forms a SCF complex through binding to *Oryza sativa* SKP1-like proteins, and interacts with GID2 involved in the gibberellin pathway[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177518.
- [48] ZHAO S S, LI Y. Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1009242.