

• 农业生物技术 •

大豆 *AGBI* 同源基因在防御反应中起正向调控作用

吴楠¹, 兰胡娇¹, 黄敏君¹, 王文絮¹, 刘建中^{1,2*}

1 浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321004

2 浙江师范大学生命科学学院 浙江省特色经济植物生物技术重点实验室, 浙江 金华 321004

吴楠, 兰胡娇, 黄敏君, 王文絮, 刘建中. 大豆 *AGBI* 同源基因在防御反应中起正向调控作用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1050-1064.

WU Nan, LAN Hujiao, HUANG Minjun, WANG Wenxu, LIU Jianzhong. *GmAGBI* plays a positive regulatory role in soybean defense responses[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1050-1064.

摘要: 由 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 和 $G\gamma$ 这 3 个亚基组成的异源三聚体 GTP 结合蛋白(简称 G 蛋白)在真核生物的信号转导中起着重要作用。拟南芥基因组中仅有 1 个 $G\beta$ 亚基编码基因 *AGBI*, 在免疫反应中起着正调控作用, 然而 *AGBI* 在大豆防御中的作用尚不清楚。鉴于大豆是四倍体植物, 存在基因功能冗余, 本研究利用菜豆豆荚斑驳病毒诱导的基因沉默技术同时沉默大豆基因组中同源性高达 86%–97% 的 4 个 *GmAGBI* 同源基因, 以探究其在大豆免疫中的作用。沉默 *GmAGBI* 导致大豆植株出现矮化表型, 暗示 *GmAGBI* 可能参与大豆的生长发育; 抗病性分析表明沉默 *GmAGBI* 导致大豆对大豆斑疹病菌的抗性降低, 而该抗性的降低与 *GmAGBI* 沉默植株叶片中病原菌侵染诱导的活性氧的积累量的显著下降以及细菌中保守的鞭毛蛋白 N 端 22 个氨基酸小肽 flg22 诱导的 *GmMPK3* 激活程度的显著降低相关联。此外, 酵母双杂交实验证明大豆中的 *GmAGBI* 可能与 *GmAGG1* 存在互作关系。综上所述, *GmAGBI* 是大豆防御反应中的正调控因子, 且大豆中 G 蛋白也可能以进化上保守的异源三聚体的形式发挥作用。

关键词: *GmAGBI*; G 蛋白; 病毒诱导的基因沉默技术; 防御反应; 活性氧

资助项目: 国家自然科学基金(32170761, 31571423)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170761, 31571423).

*Corresponding author. E-mail: jzliu@zjnu.cn

Received: 2023-06-12; Accepted: 2023-08-18; Published online: 2023-08-30

GmAGB1 plays a positive regulatory role in soybean defense responses

WU Nan¹, LAN Hujiao¹, HUANG Minjun¹, WANG Wenxu¹, LIU Jianzhong^{1,2*}

1 College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: Heterotrimeric GTP-binding protein (G-proteins) complex, which consists of $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$ subunits, plays critical roles in defense signaling. *Arabidopsis* genome contains only a single $G\beta$ -encoding gene, *AGB1*. Loss function of *AGB1* in *Arabidopsis* results in enhanced susceptibility to a wide range of pathogens. However, the function of soybean *AGB1* in immunity has not been previously interrogated. Bioinformatic analysis indicated that there are four *GmAGB1* homologous genes in soybean genome, sharing homology of 86%–97%. To overcome the functional redundancy of these *GmAGB1* homologs, virus-induced gene silencing (VIGS) mediated by the bean pod mottle virus (BPMV) was used to silence these four genes simultaneously. As expected, these four *GmAGB1* homologous genes were indeed silenced by a single BPMV-VIGS vector carrying a conserved fragments among these four genes. A dwarfed phenotype was observed in *GmAGB1*s-silenced soybean plants, suggesting that *GmAGB1*s play a crucial role in growth and development. Disease resistance analysis indicated that silencing *GmAGB1*s significantly compromised the resistance of soybean plants against *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* (*Xag*). This reduced resistance was correlated with the decreased accumulation of pathogen-induced reactive oxygen species (ROS) and the reduced activation of *GmMPK3* in response to flg22, a conserved N-terminal peptide of flagellin protein. These results indicate that *GmAGB1* functions as a positive regulator in disease resistance and *GmAGB1* is indispensable for the ROS production and *GmMPK3* activation induced by pathogen infection. Yeast two hybrid assay showed that *GmAGB1* interacted with *GmAGG1*, suggesting that an evolutionary conserved heterotrimeric G protein complex similarly functions in soybean.

Keywords: *GmAGB1*; guanine nucleotide-binding proteins; virus-induced gene silencing; defense responses; reactive oxygen species

异源三聚体 G 蛋白是由 3 个不同的亚基 α 、 β 和 γ 组成的复合体, 其中 $G\beta$ 和 $G\gamma$ 自动形成二聚体, 是不可分离的^[1-4]。该蛋白复合体是真核生物中高度保守的信号转导系统。动植物中的异三聚体 G 蛋白不但在结构上相似, 同时还具有相对保守的作用机制。拟南芥基因组中编码 1 个 $G\alpha$ (GPA1)、1 个 $G\beta$ (AGB1)、3 个 $G\gamma$ (AGG1、

AGG2 和 AGG3)^[1-4]。 $G\alpha$ 亚基中除 GPA1 基因外, 还发现了非典型的 $G\alpha$ (XLG1、XLG2 和 XLG3)^[5-6]。大豆是目前发现含有最多 G 蛋白基因家族的植物, 有 4 个 $G\alpha$ 、4 个 $G\beta$ 和 10 个 $G\gamma$ ^[1,7-8]。植物 G 蛋白在众多信号传导途径中发挥着重要作用^[9-15]。动物基因组中编码大约 800 个具鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide

exchange factor, GEF)活性的 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCR)^[2-3]。但植物基因组中并未发现典型的 GPCRs^[16-18], 表明植物中 G 蛋白信号激活的机制可能与动物有所不同。大量证据表明, 植物基因组中大量存在的受体类激酶(receptor-like kinases, RLKs)发挥着与动物中 GPCRs 同等作用, 其感知并将细胞外刺激信号传递给 G 蛋白, 然后激活下游效应子从而激活免疫反应^[19-23]。

异源三聚体 G 蛋白在抗病方面发挥着重要作用。拟南芥 AGB1 功能丧失突变体对各种病原物的侵染均表现高度敏感^[24-35]。拟南芥 Ga 不参与程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)或病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)引发的活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生而参与植物的防御反应, 但可通过调控气孔关闭参与防御反应^[1,28,36]。拟南芥中 3 个 Gy 亚基的编码基因 *AGG1*、*AGG2* 和 *AGG3* 之间存在功能冗余。*agg1* 或 *agg2* 单突变体对病原体的敏感性相较野生型无显著差异^[28,36], 但 *agg1agg2* 双突变体和 *agg1agg2agg3* 三突变体对病原体的敏感性依次增强^[33,36]。上述结果表明 G 蛋白各亚基均对植物抗病性起着重要作用, 是植物免疫所必需的。异源三聚体 G 蛋白通过调控依赖于 NADPH 氧化酶的 ROS 的生物合成而参与免疫防御反应^[1,20-21,23,29-34,37-39]。诱导活性氧是植物遭病原物侵染后最快的防御反应之一^[39-42]。植物中 ROS 的来源主要是定位于质膜上的 NADPH 氧化酶复合体催化形成^[40-41]。拟南芥 NADPH 氧化酶是由 10 个亚基(RbohA-RbohJ)组成的复合体^[40]。其中, RbohD 和 RbohF 是病原菌侵染诱导合成 ROS 的最重要亚基^[42-43]。拟南芥 *agb1* 突变体、*xlg2* 突变体和 *agg1agg2* 双突变体中由 flg22、elf18 和 chitin 等诱导合成的活性氧显著减少^[1,20-21,27,38], 且对丁香假单胞杆菌的抗病性显著降低^[20-21,27,38]。

这些结果说明 RLKs 和 G 蛋白作用于同一免疫信号通路调控 ROS 的产生^[15]。活性氧 ROS 在防御中具双重效应^[37,42,44]。高浓度 ROS 对植物细胞具直接毒害作用, 使细胞处于氧化胁迫状态, 并可诱导启动程序性细胞死亡^[45]; 而低浓度的 ROS 可调控植物细胞对环境胁迫的应答^[42,44]。突变体分析表明, G 蛋白和 *AtRbohD* 与 *AtRbohF* 作用于同一信号通路中, *AtAGB1* 对 *AtRbohD* 和 *AtRbohF* 具有上位性^[30]。另一方面, 植物通过调控气孔关闭限制病原物进入叶片, 起到防御效果。植物一旦感知到病原物的入侵便会关闭气孔, 限制病原体侵入^[46]。ROS 作为第二信使可激活 Ca²⁺通道, 造成 Ca²⁺的内流, 而 Ca²⁺的内流则可促进气孔关闭, 限制病原物侵入^[31,47-48]。

拟南芥 AGB1 功能丧失不影响 MPK3/MPK6 的激活, 但降低了 MPK4 的激活^[27], 表明 AGB1 参与不依赖于 MPK3/MPK6 但依赖于 MPK4 的防御途径。拟南芥 MPK4 作用于 MEKK1-MKK1/MKK2 的下游, 在防御反应中起负调控作用^[27]。但发现 *mekk1* 与 *mkk1/mkk2* 突变体中 flg22 所诱导产生的 ROS 并未受影响, 说明 AGB1 很可能还参与了不依赖于 MPK4 的防御途径^[38]。

迄今为止对拟南芥 G 蛋白已有广泛而深入的研究, 但对其在大豆中的研究才刚刚开始。本研究利用豆荚斑驳病毒-病毒诱导的基因沉默(bean pod mottle virus-virus-induced gene silencing, BPMV-VIGS)系统同时沉默了大豆基因组中的 4 个 *AGB1* 同源基因, 发现同时沉默这些基因可降低大豆的抗病性; 而其抗性的降低与细菌侵染所诱导的 H₂O₂ 的生成减少及 *GmMPK3* 激活的降低相关联; 酵母双杂实验结果表明 *GmAGB1* 可能与 *GmAGG1* 存在相互作用关系。综上所述, *GmAGB1* 同源基因在大豆免疫中起正调控作用, 且大豆 G 蛋白也可能以进化上保守的异源三聚体的形式发挥作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 大 豆

本研究中使用的 大豆品种为 Williams 82, 种植在 22 °C 的生长箱中, 光周期为 16 h 照明/8 h 黑暗。

1.1.2 菌 种

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α /TOP10、大豆黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Xag*)、大豆假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Psg*) R4 菌株以及酵母 AH109 菌株。

1.1.3 flg22

源自 *Psg* 的 flg22 小肽由杭州华安生物技术 有限公司合成^[49-50]。

1.2 方 法

1.2.1 BPMV 介导的 VIGS 技术-载体构建、基 因枪法侵染及沉默效果验证

BPMV-VIGS 载体的构建以及利用基因枪法 侵染大豆幼苗此前已有描述^[51-52]。通过 BLAST 以及关键词搜索大豆基因组(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/Phytozome>), 发现大豆编码 4 个 *GmAGBI* 同源基因: Glyma.11G118500、Glyma. 12G043900、Glyma.04G013100 和 Glyma.06G013000。首先用 Glyma.11G118500-F 与 Glyma.11G118500-R 这对引物(表 1)从大豆 cDNA 中扩增出 354 bp 的 片段, 接着用 *Bam*H I 与 *Kpn* I 对该扩增片段进 行双酶切, 然后连接至用 *Bam*H I 与 *Kpn* I 双酶 切的 BPMV2 载体中构建可同时沉默上述 4 个 基因的 BPMV 沉默载体 BPMV2-*AGBI*s。

载体构建成功后, 将 BPMV2 空载体和 BPMV2-*AGBI*s 质粒分别与 BPMV1 质粒混合包 被在 1.6 μ m 金粉颗粒上, 接着利用 PDS-1000/He 基因枪将上述金粉颗粒分别轰至生长 7 d 左右 大豆幼苗两片展开的真叶上; 待 3 周左右, 侵

染成功的大豆植株的上部系统叶片便会出现 病毒症状。在有症状的系统叶片打孔取样后提 取 RNA 进行沉默效果的验证。验证成功后, 将所有具病毒症状的系统叶片收集后在磷酸 缓冲液中研磨, 离心后含大量病毒的汁液保存 于-80 °C 超低温冰箱储存, 用于后续大规模摩 擦接种。

1.2.2 反转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

cDNA 的合成: 总 RNA 的提取按生产商提 供的方法进行(Invitrogen); cDNA 的合成按厂 商提供的方法(ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO)进行。

PCR 反应: PCR 反应按 Tian 等^[50]所述方 法进行。用 SYBR green qPCR RT 试剂盒(TOYOBO) 进行 qPCR, qPCR 反应按生产商提供的操作手 册进行。qPCR 扩增所用仪器为 Applied Biosystems Quantstudio 1 (Thermofisher)。

1.2.3 引物信息

本研究所用引物信息见表 1。

1.2.4 沉默效果验证

分别用沉默验证引物(表 1)对从沉默植株中提 取的 RNA 所合成的 cDNA 进行 RT-PCR 分析。

1.2.5 接种大豆斑点病病菌及菌落单位计数分析

Xag 的培养、接菌及菌落计数分析按文献中 所描述方法进行^[50]。

1.2.6 GmMPK3/6 磷酸化激活分析

大豆叶片中蛋白质的提取、SDS-PAGE 胶分 离、转膜以及 Western blotting 均参见已发表的 方法^[49]。蛋白提取液组分为: 50 mmol/L Tris-MES (pH 8.0), 0.5 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 另加 蛋白酶抑制剂混合液(protease inhibitor cocktail S8830, Sigma-Aldrich)。所用抗体为 p44/p42 抗体(Cell Signaling Technology), 稀释倍数为 1:3 000。

表 1 本研究所用的引物^[1]Table 1 Primers used in this study^[1]

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
Primers for BPMV-VIGS vector construction		
Glyma.11G118500-F	AAAGGATCCATAGTGTGGAATGCTCTAACTAG	32
Glyma.11G118500-R	AAAGGTACCCTACATCTGCAGTATGTCCAGA	31
Primers for silencing examination		
BPMV-F	CAAGAGAAAGATTTGTTGGAGGGA	24
BPMV-R	ACAAGGAAATCCGGTACGCTT	21
Glyma.11G118500-V-F	ACCTTCTTTCCATCAATAATAAAG	24
Glyma.11G118500-V-R	TAAAAGTAGAAATTGCCAAAAC	22
Glyma.12G043900-F	TCAGAAAGTCAGAAACAACCTTG	22
Glyma.12G043900-R	ATCTCCATTTGTGTATCCAGC	21
Glyma.04G013100-F	GAATTTATTTAGGAAGCATGGT	22
Glyma.04G013100-R	TTTTGAAGAGATCCTAAATTCAA	23
Glyma.06G013000-F	AGGTTTCTTGCAAAGATTGT	20
Glyma.06G013000-R	TGAGTTTTCTGGCTTGTTAGA	21
GmEIF1b-F	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	21
GmEIF1b-R	CGTTTCATGAATTCAGTAGC	21
Primers for Y2H constructs		
pGBKT7-GmAGB1-F	AAGCATATGATGTCTGTTACGGAGCTCAA	28
pGBKT7-GmAGB1-R	TTGGAATTCTTAAGTTGTCTCCTATGCC	28
pGADT7-GmAGG1-F	TTGGGATCCATGGCGTCTGAAACGGC	26
pGADT7-GmAGG1-R	TTGCTCGAGTCAAAGTATCCAACATCTACATGC	33

The bold sequences are *Bam*H I and *Kpn* I restriction sites, for cloning PCR fragments into BPMV-VIGS.

1.2.7 pGBKT7/*GmAGB1* 和 pGADT7/*GmAGG1* 酵母双杂交载体的构建及酵母双杂交分析

利用表 1 所列引物通过 RT-PCR 扩增出 *GmAGB1* 和 *GmAGG1* 的全长 cDNA 片段; 将所扩增出的全长 *GmAGB1* 与 *GmAGG1* cDNA 分别用 *Nde* I/*Eco*R I 和 *Bam*H I/*Xho* I 进行双酶切; 接着电泳后割胶回收上述片段; 然后将纯化回收的上述两个片段分别克隆至用同一组限制性内切酶切割并纯化回收的 pGBKT7 与 pGADT7 载体中。通过菌落 PCR 及测序分析对构建好的载体进行确证, 最后按生产商(Clontech)提供的方法将上述构建好的载体共同转化至 AH109 酵母菌株进行互作分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmAGB1* 同源基因基之间同源性关系分析

用拟南芥 *AGB1* 序列 BLAST 大豆基因组 (phytozome), 结果发现大豆基因组中有 4 个 *AGB1* 同源基因: Glyma.11G118500、Glyma.12G043900、Glyma.04G013100 和 Glyma.06G013000^[1]。它们与拟南芥 *AGB1* 基因的同源性均高于 75% (表 2)^[1]。序列分析表明 *GmAGB1* 家族中的 4 个基因可分为 2 个亚组, 亚组之内同源性高达 97%, 而亚组之间同源性也高达 86% 以上(表 2)^[1]。从这 4 个 *GmAGB1* 基因序列比结果中发现有一段相对保

守的区域(图 1)。在 Glyma.11G118500 基因中选取一个 354 bp 的片段用于构建 BPMV-*GmAGBI* 沉默载体。该沉默片段与同亚组 Glyma.12G043900 基因之间同源性高达 97% 以上, 与另一亚组 2 个

基因 Glyma.04G013100 和 Glyma.06G013000 之间的同源性高达 89% 以上, 这 4 个基因之间还有 4 个连续超过 20 bp 以上能够产生 siRNA 的 100% 同源区段(图 1, 红色框区域)。由于利用 BPMV-

表 2 大豆 *GmAGBI* 同源基因以及拟南芥 *AGBI* 基因之间的同源性比较

Table 2 Comparison of homology between soybean and *Arabidopsis GmAGBI* homologs

Gene ID	Glyma.11G118500 (%)	Glyma.12G043900 (%)	Glyma.04G013100 (%)	Glyma.06G013000 (%)
Glyma.12G043900	97			
Glyma.04G013100	87	87		
Glyma.06G013000	87	86	97	
AT4G34460	76	76	75	75

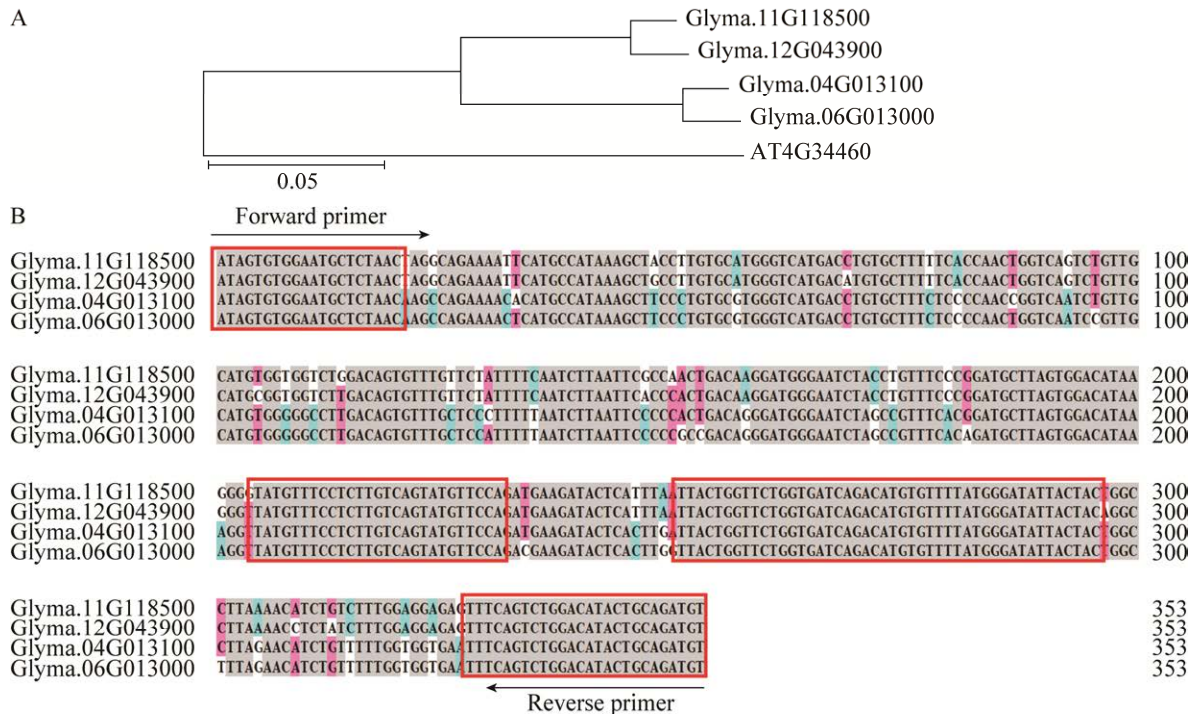


图 1 *GmAGBI* 四个同源基因的基因编码区序列的进化聚类分析以及 *GmAGBI* 沉默片段的序列比对。A: 大豆基因组中 4 个 *GmAGBI* 同源基因的聚类分析。拟南芥 *AGBI* 基因(At4G34460)用作参考基因。进化树用 MEGA5.10 软件绘制。B: 大豆 *GmAGBI* 四个同源基因中对应于构建沉默载体片段的序列比对。Glyma.11G118500 片段序列中选取与 Glyma.12G043900、Glyma.04G013100 及 Glyma.06G013000 同源性最高的片段作为 *GmAGBI* 的沉默片段; 方框内是表示 4 个基因间同源性为 100% 的区段, 箭头部分表示所用引物序列

Figure 1 Phylogenetic analysis of the sequences of the coding regions of four *GmAGBI* genes and the alignment of the sequences corresponding to the silencing fragments of the four *GmAGBI* genes used for VIGS vector construction. A: Phylogenetic analysis of the sequences of the coding regions of four *GmAGBI* genes in soybean. The *Arabidopsis AGBI* gene (At2G38470) was used as a reference gene. MEGA5.10 was used for phylogenetic analysis. B: Sequence alignment of the four *GmAGBI* gene fragments corresponding to the silencing fragment used for construction of VIGS vector. The Glyma.11G118500 fragment was used for making the BPMV-VIGS silencing construct; The boxed-sequences indicated 100% homologous segments among these four genes. The sequence regions of both forward and reverse primers are indicated on top of the alignment.

VIGS 系统可以同时沉默同源性高达 85% 以上的两个或多个基因^[53-54], 因此选取 Glyma.11G118500 中保守的 354 bp 片段, 理论上不但可以沉默同亚组的另一个基因, 还可同时沉默另一亚组的 2 个基因, 即同时沉默 4 个 *GmAGBI* 基因。

将上述构建好的 BPMV-*GmAGBI* 沉默载体与 BPMV-0 空载体按已发表的基因枪方法分别侵染大

豆幼苗^[51-52]。将侵染成功后具明显病毒症状的叶片研磨后用磷酸缓冲液提取病毒汁液用于摩擦法批量接种, 接种 2 周左右便可在上部未接种叶片上看到明显的病毒症状, 说明病毒已从接种叶片移动至上部系统。结果发现 BPMV-*GmAGBI* 沉默植株较 BPMV-0 空载体对照植株显著矮小(图 2A 与 2B), 说明沉默 *GmAGBI* 对大豆的生长发育有一定的影响^[1]。

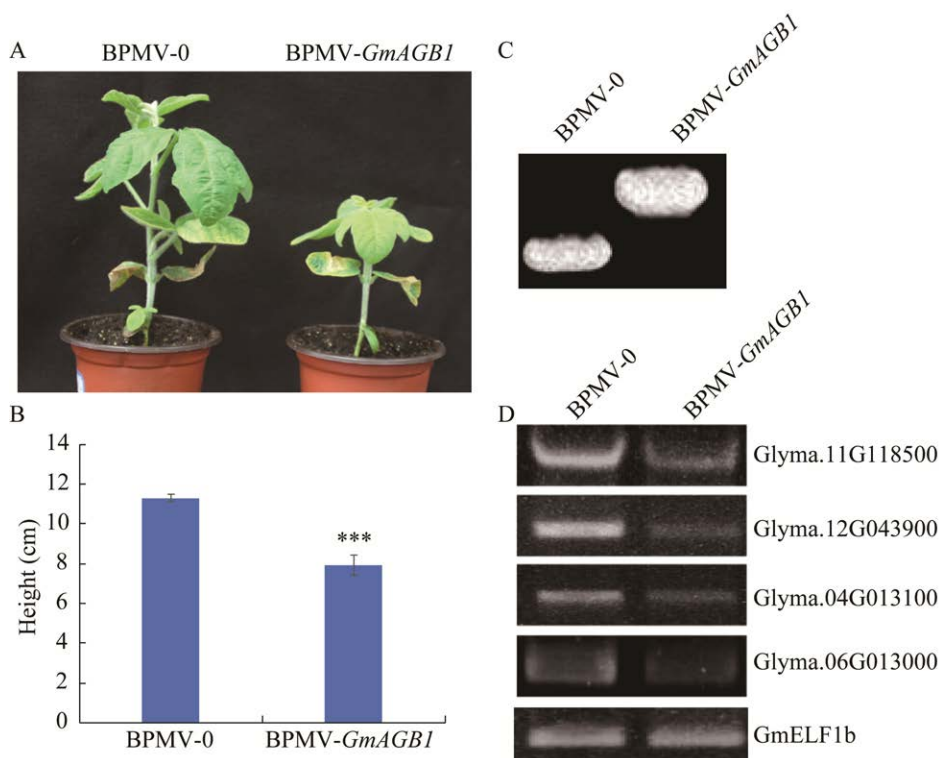


图 2 同时沉默 4 个 *GmAGBI* 同源基因导致大豆植株矮化 A: 与空载体株相比, 沉默 *GmAGBI* 导致大豆植株出现矮化表型. B: BPMV-0 空载体植株与 *GmAGBI* 沉默植株株高比较. ***代表显著性水平 $P < 0.0001$ (Student's *t* test). C: 用 BPMV-RNA2 载体上引物所做的 RT-PCR 结果表明从 *GmAGBI* 沉默植株中扩增出的片段大于从空载体侵染植株中扩增出的长度, 且该长度的增加与插入靶基因片段的大小相符. D: RT-PCR 分析表明 *GmAGBI* 沉默植株中 Glyma.11G118500、Glyma.12G043900、Glyma.04G013100 和 Glyma.06G013000 被同时沉默, *GmELF1b* 用作内参基因

Figure 2 Silencing four *GmAGBI* homologous genes simultaneously in soybean results in a dwarfed stature. A: Silencing *GmAGBI* led to a dwarfed stature compared with the BPMV-0 plants. B: Comparison of the height of the *GmAGBI*-silenced plant with that of vector control plant. *** represents significant difference at $P < 0.0001$ (Student's *t* test). C: The RT-PCR product from the *GmAGBI*-silenced plants is larger than that of the vector control plants using a pair of primers on the BPMV-RNA2 vector. The increased length of the fragment in the BPMV-*GmAGBI* plants is equivalent to the size of the inserted fragment. D: RT-PCR analysis using the gene-specific primers confirmed that the four *GmAGBI* homologous genes: Glyma.11G118500, Glyma.12G043900, Glyma.04G013100, and Glyma.06G013000 were silenced simultaneously in the *GmAGBI*-silenced plants. *GmELF1b* was used as a reference gene.

仅凭病毒症状并不能确定沉默植株中的 *GmAGBI* 基因是否被沉默。为了确证 *GmAGBI* 的确被沉默, 需进行 RT-PCR 分析。用 BPMV 载体上的特异性引物进行 RT-PCR 分析, 发现从 BPMV-*GmAGBI* 植株中扩增出的片段显著大于从 BPMV-0 空载体植株中扩增出的片段, 且扩增产物增加的幅度与插入的靶基因片段大小一致(图 2C); 利用 4 个 *GmAGBI* 同源基因特异性引物进行的 RT-PCR 分析结果表明, *GmAGBI* 沉默植株中不但 Glyma.11G118500 被沉默, Glyma.12G043900、Glyma.04G013100 和 Glyma.06G013000 也均被同时沉默(图 2D), 表明用同一 BPMV-*GmAGBI* 载体同时沉默了 4 个 *GmAGBI* 同源基因^[1]。

2.2 *GmAGBI* 沉默植株对大豆斑疹病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *Xag*) 的抗性降低

为了解 *GmAGBI* 在大豆中抗病性方面的效应, 通过喷施侵染法同时对 *GmAGBI* 沉默植株和 BPMV-0 空载体植株叶片喷施大豆斑疹病菌菌液, 接种细菌 6 d 后细菌菌落计数分析表明 *GmAGBI* 沉默植株叶片中菌落数显著高于 BPMV-0 空载体叶片(图 3), 表明沉默 *GmAGBI* 显著降低了大豆对大豆斑疹病菌的抗性, 即 *GmAGBI* 为大豆防御反应的正调控因子。

2.3 沉默 *GmAGBI* 显著降低大豆叶片中病原菌侵染诱导的 ROS 积累量

拟南芥 G 蛋白作用于类受体激酶(receptor-like kinases, RLKs)下游调控依赖于 RbohD 与 RbohF 的 ROS 的生物合成^[20-23,30]。 *AtRbohD* 和 *AtRbohF* 亚基与 G 蛋白作用于同一信号通路, 负责防御相关的 ROS 的生物合成^[1,30]。拟南芥 *agbl* 突变体叶片中 PAMPs 诱导的 ROS 积累量显著降低且对病原菌的抗性显著下降^[1,30,33,38,45]。用大豆斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Psg*)分别对空载体对照植株与 *GmAGBI* 沉默植株叶片处理不同时间, 然后用 DAB 染色法对

ROS 的积累情况进行检测。结果发现, 与 BPMV-0 植株相比, *GmAGBI* 沉默植株中 *Psg* 侵染诱导产生的 ROS 积累量显著减少(图 4), 说明大豆 *GmAGBI* 参与调控病原菌诱导的 ROS 生物合成。

2.4 *GmAGBI* 沉默植株中 *GmMPK3/6* 激酶对 flg22 的应答分析

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)级联途径是植物防御反应信号转导途径中的重要组分之一^[55]。植物中 MPK3 和 MPK6 为免疫反应的正调控因子, 而 MPK4 则起负调控作用^[55-56]。为了检测沉默 *GmAGBI* 是否影响 MAPK 的激活, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ flg22 对 BPMV-0 对照植株及 BPMV-*GmAGBI* 植株叶片处理 0–6 h, 在不同时间点取样后进行激酶活性分析。flg22 是细菌鞭毛蛋白 N 端含 22 个氨基酸的小肽, 可被类受体激酶 2 (flagellin sensing

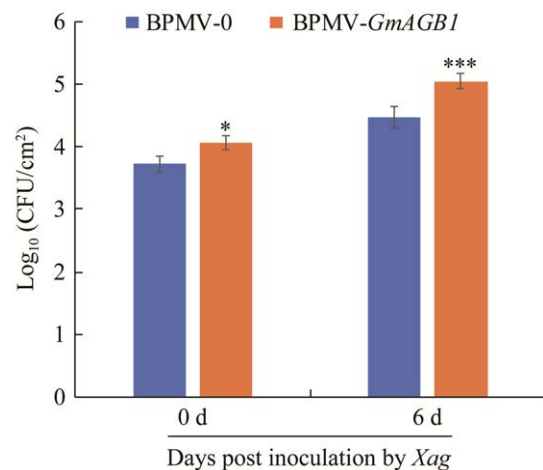


图 3 BPMV-0 空载体植株与 *GmAGBI* 沉默植株叶片接种大豆斑疹病菌后菌落形成单位比较 *Xag* 接种后 6 d 后 BPMV-0 与 BPMV-*GmAGBI* 沉默植株细菌菌落计数统计。*与***分别代表显著性水平 $P<0.05$ 与 $P<0.001$ (Student's *t* test)

Figure 3 Comparison of the colony forming units between the BPMV-0 and the *GmAGBI*-silenced plants infected by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (*Xag*) at 0 and 6 d post inoculation (dpi). * and *** represents significant difference at $P<0.05$ and $P<0.001$, respectively (Student's *t* test).

2, FLS2)识别,从而激活 MAPKs 信号途径。用可识别磷酸化态 MPK3/4/6 的抗体 phospho-p44/42 MAP Erk1/2 经 Western blotting 对所采集叶片中的蛋白样品进行激酶分析。结果表明 flg22 诱导的 *GmMPK6* 的激活程度在空载体植株叶片与 *GmAGB1* 沉默植株叶片之间并无显著差异(图 5);

而在 flg22 诱导 30 min 及 120 min 时, *GmMPK3* 在 *GmAGB1* 沉默植株叶片中的激活程度显著低于空载体对照叶片(图 5),说明 *GmAGB1* 的功能在 flg22 诱导的 *GmMPK3* 的激活中起着重要作用,而 *GmMPK3* 激活程度的降低可能是 *GmAGB1* 沉默植株抗病性降低的原因之一。

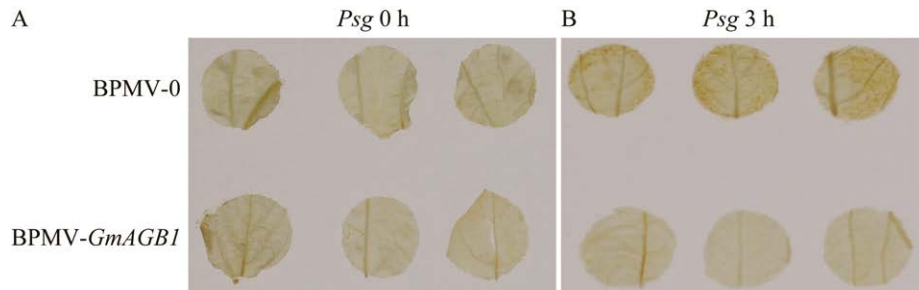


图 4 沉默 *GmAGB1* 导致大豆斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Psg*)侵染诱导的 H₂O₂ 积累水平显著降低 从 BPMV-0 空载体植株与 *GmAGB1* 沉默植株采取的叶片用 *Psg* 分别侵染 0 h (A) 与 3 h (B), 然后用 DAB 进行染色. 棕色显示 H₂O₂ 的积累

Figure 4 Silencing *GmAGB1* results in a reduced accumulation of H₂O₂ induced by *Psg* (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) infection. The leaves collected from BPMV-0 and *GmAGB1*-silenced plants were subjected to *Psg* infection for 0 h (A) or 3 h (B). The accumulation of H₂O₂ was visualized by DAB staining. The presence of brownish color indicated H₂O₂ accumulation.

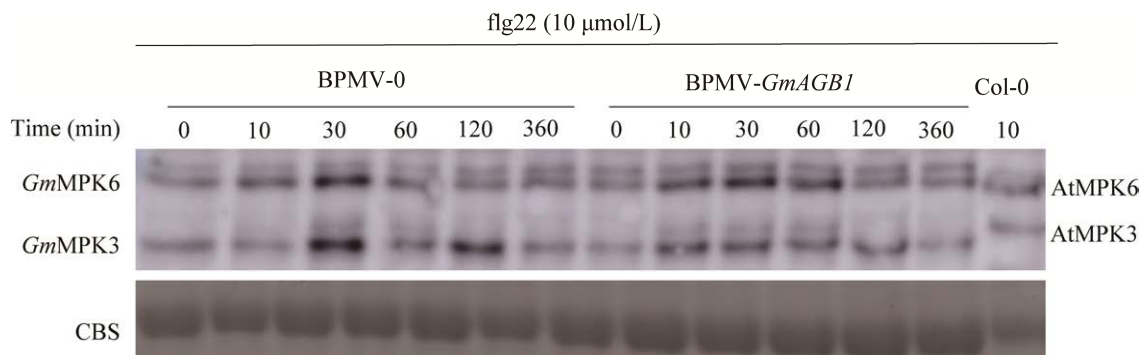


图 5 *GmAGB1* 沉默植株叶片中 flg22 诱导的 *GmMPK3* 激酶激活程度降低 取 BPMV-0 和 BPMV-*GmAGB1* 沉默植株叶片, 在湿润滤纸上孵育 24 h, 以去除伤害效应; 然后用 10 μmol/L 的 flg22 分别处理上述叶片 0-6 h, 并在不同时间段取样; 最后用专一性识别磷酸化态 MPK3 与 MPK6 的抗体 phospho-p44/42 MAP Erk1/2 通过 Western blotting 进行激酶分析. 用考马斯亮蓝染色作为上样量对照

Figure 5 The flg22-induced activation of *GmMPK3* is reduced in the *GmAGB1*-silenced plants relative to vector control BPMV-0 plant. The leaf discs collected from BPMV-0 and BPMV-*GmAGB1* plants were incubated on the moisture filter papers to eliminated wounding effect followed by treatment with 10 μmol/L flg22 for different time as indicated. The kinase activity was examined on the protein samples extracted from these leaf discs by a western blotting analysis using a phospho-p44/42 MAP Erk1/2 antibody that specifically recognizes phosphorylated MPK3 and MPK6. CBS (coomassie blue staining) was used as a loading control.

2.5 *GmAGB1* 与 *GmAGG1* 互作

为了确定大豆中 G 蛋白是否以异源三聚体形式存在^[2-3], 本研究利用酵母双杂交(yeast two hybrid, Y2H)技术对 *GmAGB1* 与 *GmAGG1* 进行了互作分析, 成功构建了 BD-*GmAGB1* 和 AD-*GmAGG1* 载体并将这 2 个载体共转化至 AH109 菌株。另外, 共转化 BD-*GmAGB1*+AD 以及 AD-*GmAGG1*+BD 组合至 AH109 菌株作为阴性对照。将上述共转化的酵母菌株分别在二缺培养基(缺亮氨酸与苏氨酸)和四缺培养基(缺亮氨酸、苏氨酸、组氨酸与丙氨酸)上进行培养。

BD-*GmAGB1*+AD 以及 AD-*GmAGG1*+BD 共转化酵母菌株可在二缺培养基生长, 但不能在四缺培养基上生长, 说明 BD-*GmAGB1* 和 AD-*GmAGG1* 并没有自激活现象。而 BD-*GmAGB1*+AD-*GmAGG1* 共转化酵母菌株既可以在二缺陷培养基上生长, 也可以在四缺培养基上生长, 说明 *GmAGB1* 可能与 *GmAGG1* 互作(图 6)。共转化 AD-T (T 基因编码 SV40 病毒大 T 抗原)与 BD-p53 (p53 基因编码肿瘤抑制蛋白)的 AH109 菌株作为阳性对照, 共转化 AD-T 与 BD-Lam (*Lam* 基因编码人 Lamin C 蛋白)的 AH109 菌株作为阴性对照。

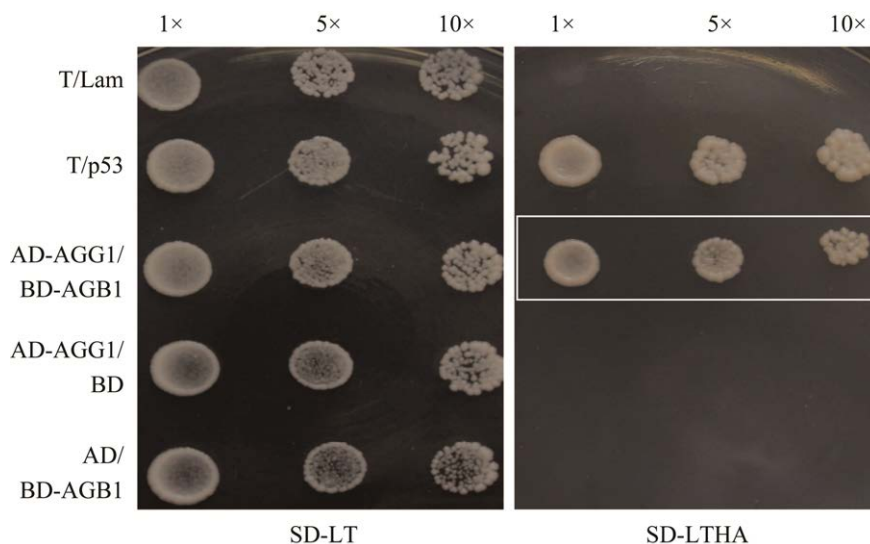


图 6 *GmAGB1* 与 *GmAGG1* 之间可能存在互作 pGBKT7/*GmAGB1* 和 pGADT7/*GmAGG1* 共转化 AH109 后, 共转化菌株既可在不含 Trp 与 Leu 的二缺培养基正常生长, 也可在不含 Trp、Leu、His 和 Ade 的四缺培养基上生长, 表明 *GmAGB1* 可能与 *GmAGG1* 存在直接相互作用。共转化 BD-*GmAGB1* 与 AD 或共转化 BD 与 AD-*GmAGG1* 的 AH109 菌株均不能在四缺培养基上生长, 说明无自激活现象。共转化 pGBKT7/Lam 与 pGADT7-T 的 AH109 菌株作为阴性对照, 共转化 pGBKT7/p53 和 pGADT7-T 的 AH109 菌株作为阳性对照。1×、5×与 10×代表稀释倍数。SD-LT 为缺亮氨酸与苏氨酸的二缺培养基, SD-LTHA 为缺亮氨酸、苏氨酸、组氨酸与腺嘌呤的四缺培养基

Figure 6 *GmAGB1* interacts with *GmAGG1* in a yeast two hybrid assay. The AH109 strain co-transformed with BD-*GmAGB1* and AD-*GmAGG1* not only grew on the medium without containing Trp and Leu but also on the medium without containing Trp, Leu, His and Ade, indicating that *GmAGB1* directly interacted with *GmAGG1*. The AH109 strain co-transformed with BD-*GmAGB1* and AD or with BD and AD-*GmAGG1* did not grow on the quadruple dropout medium, indicating that there was no self-activation. The AH109 strain co-transformed with T and Lam was included as a negative control, and the AH109 strain co-transformed with p53 and T was included as a positive control. 1×, 5× and 10× represent diluting factors. SD-LT is a dropout SD medium without leucine and threonine and SD-LTHA is a dropout medium without leucine, threonine, histidine and adenine.

3 讨论

动、植物中的异源三聚体 G 蛋白均由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成^[2-3]。G β 和 G γ 不可分离, 始终以异源二聚体形式存在^[4,57-58]。动、植物中 G 蛋白被激活后, G α 便与 G $\beta\gamma$ 二聚体分离, 然后通过各自的下流的效应因子以不同方式激活免疫反应^[2-3]。拟南芥基因组中仅有 *AGB1* 一个基因编码 G β 亚基, 其功能丧失可降低拟南芥对各种病原物的抗性^[23-34]。

大量研究表明 BPMV-VIGS 可成功用于研究大豆的基因功能^[59-66], 且利用 BPMV-VIGS 可同时沉默同源性高达 85% 以上的两个或多个基因^[53-54]。本研究拟通过利用 BPMV-VIGS 技术同时沉默多个 *GmAGB1* 基因以检测其在大豆免疫中的作用。通过 RT-PCR 分析, 发现 *GmAGB1* 沉默植株中这 4 个 *GmAGB1* 同源基因被同时沉默(图 2), 再次证明 VIGS 技术在克服基因功能冗余方面的优势。

与拟南芥 *agb1* 突变体矮小的表型相似^[36], 沉默 *GmAGB1* 也导致大豆植株出现矮化表型(图 2), 说明 *AGB1* 在植物生长发育的调控方面起着重要作用。沉默 *GmAGB1* 同时导致大豆对 *Xag* 的抗性降低(图 3), 这也与拟南芥 *agb1* 突变体对多种病原菌的抗病性降低这一结果相似^[15], 说明 *AGB1* 同源蛋白在调控发育与抗病性方面的功能在不同植物间是高度保守的。这可能与异源三聚体 G 蛋白作用于多个 RLKs 下游作为植物发育与防御信号的共同汇聚点这一事实相关^[15]。

活性氧暴发是植物类受体激酶在感知到病原菌感染后的最初反应之一^[41-44]。NADPH 氧化酶是病原菌诱导产生 ROS 的关键酶。拟南芥 NADPH 氧化酶是以复合体形式发挥作用, 其由 10 个亚基(*AtRbohA-J*)组成^[30]。*AtRbohD* 和 *AtRbohF* 是诱导合成 ROS 的关键亚基^[40-43]。拟

南芥异源三聚体 G 蛋白在 RLKs 的下游发挥作用, 参与 ROS 的生物合成^[20-23,28-33,36-38]。遗传学证据证明 *AGB1* 和 *RbohD/RbohF* 在同一信号通路中发挥作用, *AGB1* 作用于 *AtRbohD* 和 *AtRbohF* 的下游^[30]。本研究发现沉默 *GmAGB1* 后, 大豆植株中 *Psg* 侵染所诱导的 ROS 积累量较空载体植株显著降低(图 4), 表明 *GmAGB1* 的功能是 *Psg* 诱导合成 ROS 所必需的。拟南芥 *agb1* 突变体中 *flg22* 诱导产生的 ROS 量较野生型中显著减少^[27,38], 说明拟南芥和大豆 *AGB1* 同源蛋白在病原菌诱导产生 ROS 方面的功能是保守的。气孔是病原菌入侵植物的主要门户之一, 植物通过调控气孔的关闭来限制病原物入侵^[28,41], 作为第二信使, ROS 可激活 Ca^{2+} 通道, 造成 Ca^{2+} 内流, 从而促进气孔关闭^[43,46]。采用喷施法对大豆植株叶片接菌, 发现 *GmAGB1* 沉默植株对 *Xag* 的抗性较空载体对照植株显著降低(图 3)。*GmAGB1* 沉默植株抗病性的降低与其叶片中 *Psg* 诱导所产生的 ROS 积累量的降低(图 4)呈正相关, 说明 *GmAGB1* 沉默植株中 ROS 对气孔的调控的改变可能是造成其对 *Xag* 抗性降低的部分原因。

flg22 诱导 *GmMPK6* 的激活在 *GmAGB1* 沉默植株与对照植株之间并没有显著差异, 但 *GmMPK3* 的激活却显著降低(图 5), 与 *GmAGB1* 沉默植株对 *Xag* 的抗性降低(图 3)呈正相关。而植物中 *MPK3* 的激活与细胞死亡及抗病性均呈正相关^[67], 说明 *GmAGB1* 沉默植株中 *GmMPK3* 激活的减弱(图 5)是其对 *Xag* 抗性降低(图 3)的主要原因之一。与野生型 *Col-0* 相比, 拟南芥 *agb1* 突变体中 *flg22* 诱导的 *MPK3* 和 *MPK6* 的激活都没有显著差异^[27,38], 说明大豆和拟南芥中 *AGB1* 介导的免疫反应在下游信号途径上可能存在差异^[1]。拟南芥 *agb1* 突变体中 *flg22* 诱导的 *MPK4* 激活程度降低^[27,38]。拟南芥 *MPK4* 作用于

MEKK1-MKK1/MKK2 的下游, 在 SA 介导的防御反应中起负调控作用^[1,68-71]。在大豆中, 无论是用不同浓度的 flg22 或 SA 处理, 还是用 *Psg* 侵染均检测不到 *GmMPK4* 的激活^[1,49], 因此目前还不能确定 *GmMPK4* 是否作用于 *GmAGB1* 的下游^[1]。

拟南芥中的 G β 分别与 G α 、G γ 互作^[12-13]。大豆基因组编码 4 个 G α 、4 个 G β 和 10 个 G γ ^[7-8], 不同 *GmG β* 与 *GmG γ* 之间存在互作^[1,7-8]。酵母双杂交实验证明 *GmAGB1* 很可能与 *GmAGG1* 存在互作(图 6), 说明大豆中 G 蛋白很可能也是通过形成异源三聚体发挥作用。

综上所述, 通过对 *GmAGB1* 沉默植株的表型观察及抗病性分析, 揭示在大豆中沉默 *GmAGB1* 同源基因可影响大豆的正常生长发育并造成抗病性降低, 而其抗病性的降低与病原菌侵染所诱导的 ROS 积累量的降低及 flg22 诱导的 *GmMPK3* 激活程度的减弱相关联。*GmAGB1* 沉默植株中 ROS 积累量的降低可导致双重效应, ROS 积累量的降低不但减少了其对细菌的直接毒害作用或阻断了 ROS 介导的下游信号途径, 而且还可能影响对气孔关闭的调控, 从而最终影响抗性。G 蛋白在不同植物免疫反应中的功能是保守的。

致谢

感谢美国爱荷华州立大学(Iowa State University)的 Steve A. Whitham 和 John Hill 教授提供的 BPMV-VIGS 系统。

REFERENCES

- [1] 吴楠. 利用病毒诱导的基因沉默技术解析 *GmAGB1* 在大豆防御反应中的作用[D]. 金华: 浙江师范大学硕士学位论文, 2020.
WU N. Analysis of the role of *GmAGB1* in soybean defense response by virus-induced gene silencing technology[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [2] McCUDDEN CR, HAINS MD, KIMPLE RJ, SIDEROVSKI DP, WILLARD FS. G-protein signaling: back to the future[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62(5): 551-577.
- [3] OLDHAM WM, HAMM HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(1): 60-71.
- [4] SMRCKA AV, FISHER I. G-protein $\beta\gamma$ subunits as multi-functional scaffolds and transducers in G-protein-coupled receptor signaling[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(22): 4447-4459.
- [5] LEE YR J, ASSMANN SM. *Arabidopsis thaliana* 'extra-large GTP-binding protein' (AtXLG1): a new class of G-protein[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(1): 55-64.
- [6] DING L, PANDEY S, ASSMANN SM. *Arabidopsis* extra-large G proteins (XLGs) regulate root morphogenesis[J]. The Plant Journal, 2007, 53(2): 248-263.
- [7] CHOUDHURY SR, BISHT NC, THOMPSON R, TODOROV O, PANDEY S. Conventional and novel G γ protein families constitute the heterotrimeric G-protein signaling network in soybean[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23361.
- [8] BISHT NC, JEZ JM, PANDEY S. An elaborate heterotrimeric G-protein family from soybean expands the diversity of plant G-protein networks[J]. New Phytologist, 2011, 190(1): 35-48.
- [9] TEMPLE BRS, JONES AM. The plant heterotrimeric G-protein complex[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 249-266.
- [10] CHEN JG. Heterotrimeric G-proteins in plant development[J]. Frontiers in Bioscience, 2008, 13: 3321-3333.
- [11] STEFFENS B, SAUTER M. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(4): 375-378.
- [12] BOTELLA JR. Can heterotrimeric G proteins help to feed the world?[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(10): 563-568.
- [13] XU Q, ZHAO MZ, WU K, FU XD, LIU Q. Emerging insights into heterotrimeric G protein signaling in plants[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2016, 43(8): 495-502.
- [14] PANDEY S, VIJAYAKUMAR A. Emerging themes in heterotrimeric G-protein signaling in plants[J]. Plant

- Science, 2018, 270: 292-300.
- [15] ZHONG CL, ZHANG C, LIU JZ. Heterotrimeric G protein signaling in plant immunity[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(4): 1109-1118.
- [16] URANO D, JONES AM. Round up the usual suspects: a comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors[J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1097-1102.
- [17] URANO D, JONES AM. Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65: 365-384.
- [18] TRUSOV Y, BOTELLA JR. Plant G-proteins come of age: breaking the bond with animal models[J]. Frontiers in Chemistry, 2016, 4: 24
- [19] TUNC-OZDEMIR M, URANO D, JAISWAL DK, CLOUSE SD, JONES AM. Direct modulation of heterotrimeric G protein-coupled signaling by a receptor kinase complex[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(27): 13918-13925.
- [20] LIANG XX, DING PT, LIAN KH, WANG JL, MA MM, LI L, LI L, LI M, ZHANG XJ, CHEN S, ZHANG YL, ZHOU JM. *Arabidopsis* heterotrimeric G proteins regulate immunity by directly coupling to the FLS2 receptor[J]. eLife, 2016, 5: e13568.
- [21] LIANG XX, MA MM, ZHOU ZY, WANG JL, YANG XR, RAO SF, BI GZ, LI L, ZHANG XJ, CHAI JJ, CHEN S, ZHOU JM. Ligand-triggered de-repression of *Arabidopsis* heterotrimeric G proteins coupled to immune receptor kinases[J]. Cell Research, 2018, 28(5): 529-543.
- [22] CHOUDHURY SR, PANDEY S. Interaction of heterotrimeric G-protein components with receptor-like kinases in plants: an alternative to the established signaling paradigm?[J]. Molecular Plant, 2016, 9(8): 1093-1095.
- [23] XU L, YAO X, ZHANG N, GONG BQ, LI JF. Dynamic G protein alpha signaling in *Arabidopsis* innate immunity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 516(3): 1039-1045.
- [24] LLORENTE F, ALONSO-BLANCO C, SÁNCHEZ-RODRIGUEZ C, JORDA L, MOLINA A. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*[J]. The Plant Journal, 2005, 43(2): 165-180.
- [25] TRUSOV Y, ROOKES JE, CHAKRAVORTY D, ARMOUR D, SCHENK PM, BOTELLA JR. Heterotrimeric G proteins facilitate *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling[J]. Plant Physiology, 2006, 140(1): 210-220.
- [26] TRUSOV Y, SEWELAM N, ROOKES JE, KUNKEL M, NOWAK E, SCHENK PM, BOTELLA JR. Heterotrimeric G proteins-mediated resistance to necrotrophic pathogens includes mechanisms independent of salicylic acid-, jasmonic acid/ethylene- and abscisic acid-mediated defense signaling[J]. The Plant Journal, 2009, 58(1): 69-81.
- [27] ISHIKAWA A. The *Arabidopsis* G-protein β -subunit is required for defense response against *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(1): 47-52.
- [28] LEE S, ROJAS CM, ISHIGA Y, PANDEY S, MYSORE KS. *Arabidopsis* heterotrimeric G-proteins play a critical role in host and nonhost resistance against *Pseudomonas syringae* pathogens[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82445.
- [29] LOREK J, GRIEBEL T, JONES AM, KUHN H, PANSTRUGA R. The role of *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein subunits in MLO2 function and MAMP-triggered immunity[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2013, 26(9): 991-1003.
- [30] TORRES MA, MORALES J, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ C, MOLINA A, DANGL JL. Functional interplay between *Arabidopsis* NADPH oxidases and heterotrimeric G protein[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2013, 26(6): 686-694.
- [31] MARUTA N, TRUSOV Y, BRENYA E, PAREKH U, BOTELLA JR. Membrane-localized extra-large G proteins and Gbg of the heterotrimeric G proteins form functional complexes engaged in plant immunity in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 1004-1016.
- [32] BRENYA E, TRUSOV Y, DIETZGEN RG, BOTELLA JR. Heterotrimeric G-proteins facilitate resistance to plant pathogenic viruses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh[J]. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11(8): e1212798.
- [33] URANO D, MARUTA N, TRUSOV Y, STOIAN R, WUQY, LIANG Y, JAISWAL DK, THUNG L, JACKSON D, BOTELLA JR, JONES AM. Saltational evolution of the heterotrimeric G protein signaling mechanisms in the plant kingdom[J]. Science Signaling, 2016, 9(446): eaaf9558.
- [34] ESCUDERO V, JORDÁ L, SOPEÑA-TORRES S, MÉLIDA H, MIEDES E, MUÑOZ-BARRIOS A, SWAMI S, ALEXANDER D, McKEE LS, SÁNCHEZ-VALLET A, BULONE V, JONES AM, MOLINA A. Alteration of cell wall xylan acetylation

- triggers defense responses that counterbalance the immune deficiencies of plants impaired in the β -subunit of the heterotrimeric G-protein[J]. *The Plant Journal*, 2017, 92(3): 386-399.
- [35] ZENG WQ, HE SY. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(3): 1188-1198.
- [36] CHAKRAVORTY D, TRUSOV Y, ZHANG W, ACHARYA BR, SHEAHAN MB, McCURDY DW, ASSMANN SM, BOTELLA JR. An atypical heterotrimeric G-protein γ -subunit is involved in guard cell K^+ -channel regulation and morphological development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(5): 840-851.
- [37] ZHANG HJ, WANG MF, WANG W, LI DQ, HUANG Q, WANG YC, ZHENG XB, ZHANG ZG. Silencing of G proteins uncovers diversified plant responses when challenged by three elicitors in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(1): 72-85.
- [38] LIU JM, DING PT, SUN TJ, NITTA Y, DONG O, HUANG XC, YANG W, LI X, BOTELLA JR, ZHANG YL. Heterotrimeric G proteins serve as a converging point in plant defense signaling activated by multiple receptor-like kinases[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(4): 2146-2158.
- [39] CHAKRAVORTY D, GOOKIN TE, MILNER MJ, YU YQ, ASSMANN SM. Extra-large G proteins expand the repertoire of subunits in *Arabidopsis* heterotrimeric G protein signaling[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 512-529.
- [40] TORRES MA, JONESJDG, DANGL JL. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(10): 1130-1134.
- [41] PEI ZM, MURATA Y, BENNING G, THOMINE S, KLÜSENER B, ALLEN GJ, GRILL E, SCHROEDER JI. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 731-734.
- [42] SUZUKI N, MILLER G, MORALES J, SHULAEV V, TORRES MA, MITTLER R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(6): 691-699.
- [43] TORRES MA, JONES JDG, DANGL JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 373-378.
- [44] LAMB C, DIXON RA. The oxidative burst in plant disease resistance[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48: 251-275.
- [45] PENG M, KUC J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(6): 696.
- [46] MELOTTO M, UNDERWOOD W, KOCZAN J, NOMURA K, HE SY. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 969-980.
- [47] MURATA Y, PEI ZM, MORI IC, SCHROEDER J. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(11): 2513-2523.
- [48] ARNAUD D, LEE S, TAKEBAYASHI Y, CHOI D, CHOI J, SAKAKIBARA H, HWANG I. Cytokinin-mediated regulation of reactive oxygen species homeostasis modulates stomatal immunity in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(3): 543-559.
- [49] XU HY, ZHANG C, LI ZC, WANG ZR, JIANG XX, SHI YF, TIAN SN, BRAUN E, MEI Y, QIU WL, LI S, WANG B, XU J, NAVARRE D, REN DT, CHENG NH, NAKATA PA, GRAHAM MA, WHITHAM SA, LIU JZ. The MAPK kinase kinase GmMEKK1 regulates cell death and defense responses[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(2): 907-922.
- [50] TIAN SN, LIU DD, ZHONG CL, XU HY, YANG S, FANG Y, RAN J, LIU JZ. Silencing *GmFLS2* enhances the susceptibility of soybean to bacterial pathogen through attenuating the activation of *GmMAPK* signaling pathway[J]. *Plant Science*, 2020, 292: 110386.
- [51] ZHANG CQ, YANG CL, WHITHAM SA, HILL JH. Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 2009, 22(2): 123-131.
- [52] ZHANG CQ, BRADSHAW JD, WHITHAM SA, HILL JH. The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 52-65.
- [53] LIU JZ, GRAHAM MA, PEDLEY KF, WHITHAM SA. Gaining insight into soybean defense responses

- using functional genomics approaches[J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2015, 14(4): 283-290.
- [54] LIU JZ, FANG Y, PANG HX. The current status of the soybean-soybean mosaic virus (SMV) pathosystem[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1906.
- [55] MENG XZ, ZHANG SQ. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51: 245-266.
- [56] PITZSCHKE A, SCHIKORA A, HIRT H. MAPK cascade signalling networks in plant defence[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(4): 421-426.
- [57] SONDEK J, BOHM A, LAMBRIGHT DG, HAMM HE, SIGLER PB. Crystal structure of a GA protein β dimer at 2.1 Å resolution[J]. *Nature*, 1996, 379(6563): 369-374.
- [58] WALL MA, COLEMAN DE, LEE E, IÑIGUEZ-LLUHI JA, POSNER BA, GILMAN AG, SPRANG SR. The structure of the G protein heterotrimer $G\alpha 1\beta 1\gamma 2$ [J]. *Cell*, 1995, 83(6): 1047-1058.
- [59] LIU JZ, HORSTMAN HD, BRAUN E, GRAHAM MA, ZHANG CQ, NAVARRE D, QIU WL, LEE Y, NETTLETON D, HILL JH, WHITHAM SA. Soybean homologs of MPK4 negatively regulate defense responses and positively regulate growth and development[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3): 1363-1378.
- [60] LIU JZ, WHITHAM SA. Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance[J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(1): 110-121.
- [61] LIU JZ, BRAUN E, QIU WL, SHI YF, MARCELINO-GUIMARÃES FC, NAVARRE D, HILL JH, WHITHAM SA. Positive and negative roles for soybean MPK6 in regulating defense responses[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 2014, 27(8): 824-834.
- [62] HASHIMI S, WU NN, RAN J, LIU JZ. Silencing autophagy-related gene 2 (ATG2) results in accelerated senescence and enhanced immunity in soybean[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11749.
- [63] LIU DD, LANHJ, MASOUD HS, YE MY, DAI XY, ZHONG CL, TIAN SN, LIU JZ. Silencing *GmBIR1* in soybean results in activated defense responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7450.
- [64] 周涛, 叶梅燕, 刘天瑶, 兰胡娇, Hashimi Said Masoud, 郭威, 刘建中. 沉默 *GmATG10* 导致大豆免疫反应的激活[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(2): 586-602.
- ZHOU T, YE MY, LIU TY, LAN HJ, MASOUD HS, GUO W, LIU JZ. Silencing *GmATG10* results in activation of immune responses in soybean[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(2): 586-602 (in Chinese).
- [65] LI JM, YE MY, WANGCF, MA XH, WU NN, ZHONG CL, ZHANG YJ, CHENG NH, NAKATA PA, ZENG LR, LIU JZ. Soybean *GmSAUL1*, a bona fide U-box E3 ligase, negatively regulates immunity likely through repressing the activation of *GmMPK3*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(7): 6240.
- [66] 钟晨丽, 王文絮, 廖莉娜, 刘建中. 沉默大豆 *GmWRKY33B* 基因导致大豆抗病性降低[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(1): 163-176.
- ZHONG Chenli, WANG Wenxu, LIAO Lina, LIU Jianzhong. Silencing *GmWRKY33B* genes leads to reduced disease resistance in soybean[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(1): 163-176.
- [67] GENOT B, LANG J, BERRIRI S, GARMIER M, GILARD F, PATEYRON S, HAUSTRAETE K, van der STRAETEN D, HIRT H, COLCOMBET J. Constitutively active *Arabidopsis* MAP kinase 3 triggers defense responses involving salicylic acid and SUMM2 resistance protein[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1238-1249.
- [68] SUAREZ-RODRIGUEZ MC, ADAMS-PHILLIPS L, LIUYD, WANG HC, SU SH, JESTER PJ, ZHANG SQ, BENT AF, KRYSAN PJ. MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 661-669.
- [69] GAO MH, LIU JM, BI DL, ZHANG ZB, CHENG F, CHEN SF, ZHANG YL. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants[J]. *Cell Research*, 2008, 18(12): 1190-1198.
- [70] QIU JL, ZHOU L, YUN BW, NIELSEN HB, FIIL BK, PETERSEN K, MacKINLAY J, LOAKE GJ, MUNDY J, MORRIS PC. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 212-222.
- [71] PITZSCHKE A, DJAMEI A, BITTON F, HIRT H. A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling[J]. *Molecular Plant*, 2009, 2(1): 120-137.

(本文责编 陈宏宇)