

沉默大豆 *GmATG5* 加速叶片衰老并增强大豆抗病性

Said M. Hashimi¹, 黄敏君¹, 陈宇¹, 刘建中^{1,2,3*}

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 遗传与发育生物学研究所, 浙江 金华 321004

3 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

Said M. Hashimi, 黄敏君, 陈宇, 刘建中. 沉默大豆 *GmATG5* 加速叶片衰老并增强大豆抗病性[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1065-1075.

HASHIMI Said M., HUANG Minjun, CHEN Yu, LIU Jianzhong. Silencing *GmATG5* genes accelerated senescence and enhanced disease resistance in soybean[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1065-1075.

摘要: 自噬在生物体细胞内物质循环利用及适应各种胁迫方面起着重要作用。然而, 对大豆自噬途径的研究鲜有报道。本研究利用大豆豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus, BPMV)介导的基因沉默技术, 对大豆自噬相关基因 5 (*autophagy-related gene 5*, *ATG5*)同源基因进行沉默。结果发现, 经暗处理的 *GmATG5* 沉默植株叶片上积累过量的 ATG8 蛋白, 说明自噬降解途径受损; 与自噬途径受损相一致, 暗处理的 *GmATG5* 沉默植株叶片出现明显的衰老加速的表型; 另外, *GmATG5* 沉默植株叶片中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累量以及水杨酸含量显著增加, 说明沉默 *GmATG5* 激活了免疫反应; 抗病性分析表明, *GmATG5* 沉默植株对大豆斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Psg*)的抗性较空载体对照植株显著增强, 但该抗病性的增强并不依赖于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径的激活。

关键词: 自噬; 病毒诱导的基因沉默; 免疫反应; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)

资助项目: 国家自然科学基金(32170761)

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

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

Received: 2023-06-23; Accepted: 2023-09-15; Published online: 2023-09-21

Silencing *GmATG5* genes accelerated senescence and enhanced disease resistance in soybean

HASHIMI Said M.¹, HUANG Minjun¹, CHEN Yu¹, LIU Jianzhong^{1,2,3*}

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

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

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

Abstract: Autophagy plays an essential role in recycling/re-utilizing nutrients and in adaptations to numerous stresses. However, the roles of autophagy in soybean have not been investigated extensively. In this study, a virus-induced gene silencing approach mediated by bean pod mottle virus (BPMV) was used to silence *autophagy-related gene 5 (ATG5)* genes in soybean (referred to as *GmATG5*). Our results showed that ATG8 proteins were massively accumulated in the dark-treated leaves of the *GmATG5*-silenced plants relative to the vector control plants (BPMV-0), indicating that autophagy pathway is impaired in the *GmATG5*-silenced plants. Consistent with the impaired autophagy, an accelerated senescence phenotype was observed on the leaves of the dark-treated *GmATG5*-silenced plants, which was not shown on the leaves of the dark-treated BPMV-0 plants. In addition, the accumulation levels of both reactive oxygen species (ROS) and salicylic acid (SA) were significantly induced in the *GmATG5*-silenced plants compared with that of the vector control plants (BPMV-0), indicating an activated immunity. Accordingly, the *GmATG5*-silenced plants exhibited significantly enhanced resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (*Psg*) in comparison with the BPMV-0 plants. Nevertheless, the activated immunity observed in the *GmATG5*-silenced plant was independent of the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK).

Keywords: autophagy; virus-induced gene silencing; immunity; mitogen-activated protein kinase (MAPK)

在真核生物中,自噬是在营养缺乏条件下降解与重复利用细胞内营养元素的重要的保守机制^[1-2]。在正常生长条件下,自噬帮助细胞维持新陈代谢产物的稳态平衡,而在胁迫条件下,其可将损坏的细胞器、不能被26S蛋白酶体降解的变性蛋白的聚集物以及不需要的代谢物运送至液泡或溶酶体进行降解成基本单元后重新用于营养循环^[2-4]。植物自噬途径需要40多种自噬相关基因(*autophagy-related gene, ATG*)编码的蛋白协同参与完成^[2,5]。自噬的发生需要形成双层膜的自噬体(*autophagosomes*)。自噬体的形成起始

于吞噬泡组装点,新的膜在该组装点不断形成、扩展、内陷并逐渐封闭,将附近需要降解的货物包裹其中,最终形成自噬体^[1-2]。自噬体形成后随即被运至液泡附近,自噬体的外膜与液泡膜融合、然后向内凹陷,将只有内膜的自噬体(又称自噬小体, *autophagic bodies*)运进液泡,最后其内膜及包裹其中的内容物被液泡中所含大量嗜酸性的各种水解酶降解成基本单元,这些基本单元又被重新运回细胞质为细胞提供新的合成原料^[2]。据报道,自噬在植物中涉及参与众多生物学过程,其中包括生长与发育、激素反应、胁迫

适应、衰老、细胞死亡以及抗病性^[6-15]。

先前自噬被认为是非选择性的,但现已知由受体蛋白介导的选择性自噬途径可通过与嵌在自噬体膜上的 ATG8 互作而招募并清除泛素化的蛋白或蛋白聚集体、受损的细胞器、入侵病原物的某种蛋白乃至整个病原物^[15]。通过修饰将磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanoamine, PE)加在 ATG8 的 C 末端的甘氨酸残基(ATG8-PE)是将 ATG8 嵌入自噬体膜的前提条件^[2]。ATG8 的 PE 化不但对自噬体的形成至关重要,同时在选择性自噬中发挥着关键作用^[2,15]。ATG8 首先被翻译为一个较长的前体,经蛋白酶 ATG4 切割后暴露出 C 末端的甘氨酸残基^[2,16]。ATG8-PE 的形成需要通过类似于泛素化(ubiquitylation)的催化过程。ATG8-PE 连接酶由 Ub-折叠蛋白 ATG12、ATG12 的靶蛋白 ATG5 及其支架蛋白 ATG16 组成。经 ATG7 与 ATG12 专一性 E2 结合酶的顺次作用,催化 ATG12 碳端的甘氨酸与 ATG5 中保守的赖氨酸之间形成一个异肽键(isopeptide bond),从而使 ATG12 与 ATG5 结合。两分子 ATG12-ATG5 通过 ATG5 与 ATG16 二聚体互作形成异源六聚体,该六聚体催化 ATG8 的酯化,最终形成 ATG8-PE^[2,17-18]。

拟南芥 *atg5* 突变体在自然条件下具早衰的表型,并对缺碳与缺氮高度敏感,同时伴随细胞器与细胞质中蛋白质迅速丧失以及在营养缺乏诱导条件下液泡中缺乏自噬小体的积累^[19-21];这些结果表明 ATG5 在自噬途径中发挥着不可或缺的作用,其功能丧失可导致自噬缺陷。*atg5* 突变体对干旱胁迫、热胁迫及氧化胁迫高度敏感^[22-23];拟南芥中 ATG5 功能丧失可导致对死体营养型真菌芸苔链格孢(*Alternaria brassicicola*)的抗病性降低^[24],但对生体营养型的白粉病真菌(*Golovinomyces cichoracearum*)的抗性显著增强^[21]; *atg5* 突变体中积累过量 FREE1 蛋白,并对缺铁高度敏感^[25]。

对自噬途径的研究是近期的热点,在模式植物拟南芥中已有大量报道,然而在农作物如大豆中的研究则才刚刚开始。本研究利用大豆豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus, BPMV)介导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术成功沉默了大豆中的 2 个 *GmATG5* 的编码基因。证明沉默 *GmATG5* 导致大豆植株出现自噬缺陷相关表型,如对暗处理高度敏感以及细胞内积累过量 ATG8,同时伴随激活依赖于过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)与水杨酸(salicylic acid, SA)但不依赖于 *GmMPK3/6* 的免疫反应。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆材料: William 82 品种。大豆在培养箱生长,设置为 22 °C,光/暗周期为 16 h/8 h。

菌种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5a/TOP10 及大豆斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, Psg) R4 菌株。*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* R4 菌株由美国爱荷华州立大学(Iowa State University)的 Steve A. Whitham 和 John Hill 教授提供。

1.2 方法

1.2.1 BPMV 介导的 VIGS 技术

大豆 BPMV-VIGS 系统的使用包括载体构建、PDS-1000/He 基因枪(Bio-Rad)法侵染大豆幼苗均参照此前已发表的方法^[26-27]。

在 Phytozome 基因组数据库网站用拟南芥 ATG5 的 cDNA 序列进行 BLAST,发现大豆基因组中有 2 个 ATG5 同源基因: *Glyma.14G210200* 和 *Glyma.02G240700*。用 *Glyma.14G210200* 的扩增引物通过逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增出 321 bp 的 *GmATG5* 片段用于构建沉默载体。用 *GmATG5* 克隆片段上下游 200 bp 左右的特异性验证引物,通过 RT-PCR 进行沉默效果验证。*GmELF1b* 为内参基因。本研究所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
Construction of primers for BPMV-VIGS vector		
<i>Glyma.14G210200-F</i>	GGATCC AGCTTTATTA ACTCACTGAAAGAGG	31
<i>Glyma.14G210200-R</i>	GGTACC CAGCATCTTCAA AAATCATCAA ACT	31
Primers for silencing examination and for RT-PCR		
BPMV-F	CAAGAGAAAGATTGTTGGAGGGGA	24
BPMV-R	ACAAGGAAATCCGGTACGCTT	21
<i>Glyma.14G210200-V-F</i>	GGAGTCGACACCATTTGGT	19
<i>Glyma.14G210200-V-R</i>	CCTGGATCAGATGAACTTTCTC	22
<i>GmELF1b-F</i>	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	21
<i>GmELF1b-R</i>	CGTTTCATGAATCCAGTAGC	21

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

1.2.2 RT-PCR

RNA 的提取及逆转录反应按试剂盒提供的方法进行(ReverTra Ace Qpcr RT, TOYOBO)。对所提取的 RNA 进行。将 cDNA 稀释 1 倍,按生产商提供的手册中的比例加入 PCR 反应所需的各组分(Nonoprotein)。PCR 扩增程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。

1.2.3 接种大豆斑点病病菌

Psg 的培养及菌落计数分析参见本实验室已发表的文章^[28-31]。

1.2.4 3,3-diaminobenzidine (DAB)染色法检测 H₂O₂

用 DAB 染液染色 H₂O₂ 的方法参考已发表的方法^[32]。

1.2.5 蛋白质印迹分析

对在黑暗中处理不同时间的叶片中提取蛋白,然后按已发表的方法^[33]用拟南芥 ATG8 (Agrisera, AS142769)和 UBQ (Agrisera, AS08307)的抗体进行 Western blotting 分析。

1.2.6 GmMPK3/6 磷酸化检测

按已发表的方法提取大豆叶片中的蛋白^[33-35]。将 flg22 处理不同时间的叶片中所提取的蛋白通过 SDS-PAGE 进行分离,然后通过半干电转移装置(Bio-Rad)将蛋白转至聚偏氟乙烯(poly-

vinylidene fluoride, PVDF)膜上(Millipore);然后用 Phospho-p44/42 MAP Erk1/2 抗体 (Cell Signaling Technology)进行孵育;用三乙醇胺-吐温缓冲液(Tris buffered saline-Tween-20, TBST)将膜清洗 3 次将膜清洗 3 次,然后在二抗中进行孵育,最后用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)底物(Millipore)通过曝光检测条带。

2 结果与分析

2.1 沉默 *GmATG5* 不影响大豆的生长发育

为了研究自噬在大豆中的作用,利用菜豆豆荚斑驳病毒 BPMV 介导的基因沉默技术(BPMV-VIGS)沉默若干自噬相关的 *ATG* 基因,其中之一便是 *ATG5* 同源基因。发现大豆基因组中有 2 个 *ATG5* 编码基因(*Glyma.14G210200* 与 *Glyma.02G240700*),二者之间同源性高达 96%,而与拟南芥 *ATG5* 的同源性均大于 75%,将其分别命名为 *GmATG5a* 与 *GmATG5b*^[36]。将 *GmATG5a* 序列中一段 321 bp 片段克隆至 BPMV2 载体^[26-27],构建 BPMV2-*GmATG5*。该插入片段与 *GmATG5b* 相对应片段的同源性也高达 96% (图 1),理论上用该单一载体可同时沉默 *GmATG5a* 与 *GmATG5b* 两个基因。通过基因枪

法将包被 BPMV1 与 BPMV2-*GmATG5* 质粒的金粉共同轰入 7 d 大小大豆幼苗的两片真叶进行侵染。与此同时,用 BPMV1+BPMV2 侵染的大豆作为对照,并称之为空载体对照株,简称为 BPMV-0。打基因枪 15 d 后上部系统叶片便会出现 BPMV 病毒症状,表明侵染成功。将有病毒症状的系统叶片在磷酸缓冲液中充分研磨,离心后收集汁液,便可用于后续大批量接种。通过摩擦接种法将 BPMV-0 与 BPMV-*GmATG5* 分别批量接种于 7 d 大小大豆幼苗的两片真叶上,待系统叶片出现病毒症状时便可对这些植株进行沉默效果验证。

结果发现 BPMV-*GmATG5* 与 BPMV-0 植株在表型上并无很大区别(图 2A),说明 *GmATG5* 可能并不参与大豆的生长发育。RT-PCR 分析结果表明,BPMV-*GmATG5* 植株中 *GmATG5* 的转录水平较 BPMV-0 植株显著下降(图 2B),说明 *GmATG5* 成功被沉默。

2.2 沉默 *GmATG5* 可加速黑暗处理条件下大豆叶片黄化与衰老

在自然生长条件下,拟南芥自噬突变体表现出叶片黄化等衰老加剧的表型^[20-21,37-39]。但在自然生长条件下,大豆 *GmATG5* 沉默植株并未表

现出加速衰老的黄化表型(图 2A)。估计这可能与基因沉默并不能完全根除 *GmATG5* 有关。为了检测这一可能性,从 BPMV-0 与 BPMV-*GmATG5* 植株上摘取叶片,置于铺有湿润滤纸的培养皿中,连续于黑暗条件下培养。连续黑暗处理可使植物由于缺乏光合作用而导致缺碳,从而诱导自噬,加速植株衰老。正如所期,连续暗处理 7 d 后,BPMV-*GmATG5* 植株的黄化水平显著高于 BPMV-0 对照植株(图 3),再次证明沉默 *GmATG5* 后导致大豆自噬途径缺陷。

2.3 沉默 *GmATG5* 导致大豆叶片中积累过量 *GmATG8*

作为 E3 连接酶(E3-ligase)复合体中的一员,ATG5 在 ATG8 的 PE 化修饰及 ATG8-PE 嵌入自噬体的内、外膜这一过程中起着至关重要的作用^[2]。为了检测沉默 *GmATG5* 后沉默植株的细胞内是否积累过量的 ATG8,用源于拟南芥 ATG8 的抗体对分别从经暗处理的 BPMV-0 与 BPMV-*GmATG5* 植株叶片中提取的蛋白样品进行 Western blotting 分析。正如预期,*GmATG8* 在 BPMV-*GmATG5* 植株叶片中积累量显著高于在 BPMV-0 植株叶片中积累量(图 4),说明沉默 *GmATG5* 造成大豆自噬途径缺陷。

```
Glyma.14G210200: AGCTTTATTAACCTCACTGAAAGAGGCTGCATATTAATAAATGGGAATAGCAAAAATGTGATGAACATGTCTCAAACCTGATCAGGTGGAGCTCTGGGGCT
Glyma.02G240700: AGCTTTATTAACCTCACTGAAAGAGGCTGCATATTAATAAATGGGAATAGCAAAAATGTGATGAACATGTCTCAAACCTGATCAGGTGGAGCTCTGGGGCT

Glyma.14G210200: CTGTTTTAAATGGTAAATTGAAACTTATCGACGGGTGGCATCCAAAGCTTAAGCTTGGAACTTTTGAAGATGAATATATGGAAAATGTAGTTCAGTCTT
Glyma.02G240700: CTGTTTTAAATGGTAAATTGAAACTTATCGACGGGTGGCATCCAAAGCTTAAGCTTGGAACTTTTGAAGATGAATATATGGAAAATGTAGTTCAGTCTT

Glyma.14G210200: GATTAAATCTCCACAAAGTCCAGGGGATACTGATGTTACGGACAACTGAACTACTGCTAGGATTCCCTGTTGTTTATATCTGTGGACTGTCAATGAGGAG
Glyma.02G240700: GATTAAATCTCCACAAAGTCCAGGGGATACTGATGTTACGGACAACTGAACTACTGCTAGGATTCCCTGTTGTTTATATCTGTGGACTGTCAATGAGGAG

Glyma.14G210200: TTTGATGATTTTGAAGATGCT
Glyma.02G240700: TTTGATGATTTTGAAGATGCT
```

图 1 *GmATG5* 沉默片段的序列比对 Glyma.14G210200 片段用于构建 BPMV-VIGS 沉默载体

Figure 1 The alignment of the sequences corresponding to the silencing fragments of the two *GmATG5* genes used for VIGS vector construction. The Glyma.14G210200 fragment was used for making the BPMV-VIGS silencing construct.

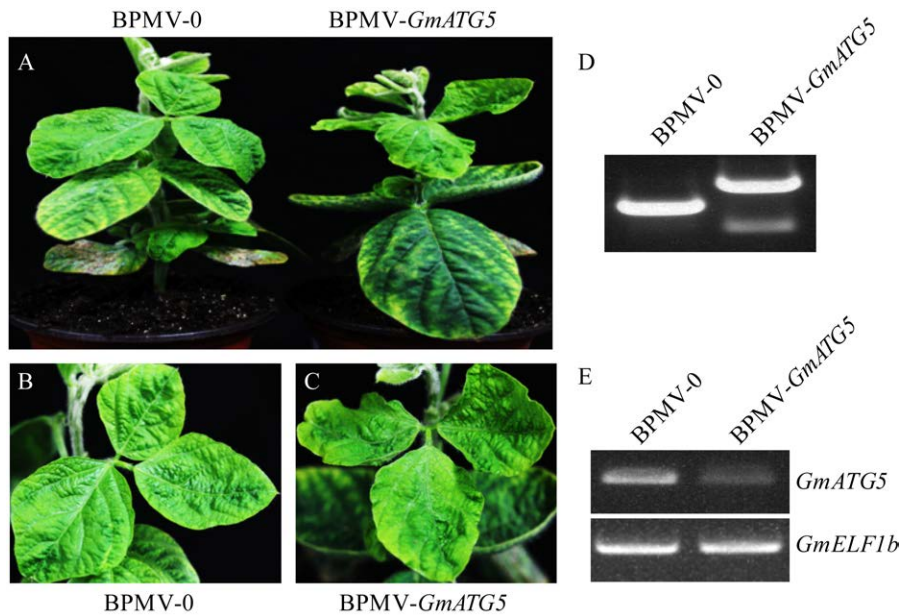


图 2 沉默 *GmATG5* 对大豆的生长发育并无显著影响 A: 在正常生长条件下空载体对照株(BPMV-0)与 *GmATG5* 沉默株的表型比较. B: BPMV-0 空载体植株的叶片表型. C: *GmATG5* 沉默植株的叶片表型. D: 用 BPMV-RNA2 载体上引物进行的 RT-PCR 分析. 结果显示从 *GmATG5* 沉默植株中扩增出的片段大于从 BPMV-0 侵染植株中扩增出的长度, 且增幅与插入靶沉默片段的大小相一致. E: 用位于 *Glyma.14G210200* 沉默片段上、下游引物进行的 RT-PCR 分析证明 *GmATG5* 沉默植株中的 *GmATG5* 的确被沉默. *GmELF1b* 作为内源参考基因

Figure 2 Silencing *GmATG5* does not significantly affect the growth and development of soybean plants. A: Phenotype of the vector control plants (BPMV-0) and the *GmATG5*-silenced plants (BPMV-*GmATG5*) under normal growth conditions. B: Leaf phenotype of the BPMV-0 plant. C: Leaf phenotype of the BPMV-*GmATG5* plant. D: The RT-PCR fragment amplified from the *GmATG5*-silenced plants is larger in size than that of amplified from the BPMV-0 plants using primers flanking the insertion site of the BPMV-RNA2 vector. E: Verification of *GmATG5* silencing by RT-PCR analysis using a pair of primers designed from *Glyma.14G210200* that located upstream and downstream of the inserted fragment, respectively. *GmELF1b* was used as an internal reference gene.

2.4 沉默 *GmATG5* 导致过量积累水杨酸与 H_2O_2

拟南芥自噬突变体具有免疫持续激活的特性, 如水杨酸(salicylic acid, SA)与 H_2O_2 积累水平升高等^[20-21,40-41]。为了探究大豆 *GmATG5* 沉默植株是否也具有相似的表型, 对在黑暗处理条件下的 BPMV-0 与 BPMV-*GmATG5* 植株叶片上 H_2O_2 的积累水平进行染色并测定 SA 含量。结果表明, 暗处理后 *GmATG5* 沉默植株叶片上的 H_2O_2 的积累水平以及 SA 含量均显著高于空载

体对照植株(图 5A-5B), 说明沉默 *GmATG5* 可能通过导致自噬缺陷而造成免疫自激活。

2.5 沉默 *GmATG5* 导致大豆对大豆斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, Psg)的抗性增强

上述结果表明沉默 *GmATG5* 导致大豆免疫反应激活(图 5A、5B), 而免疫激活一般与抗病性呈正相关。为了检测 *GmATG5* 植株中的免疫激活是否与抗病性相关联, 对 BPMV-0 空载体对照植株与 BPMV-*GmATG5* 沉默植株叶片通过喷洒

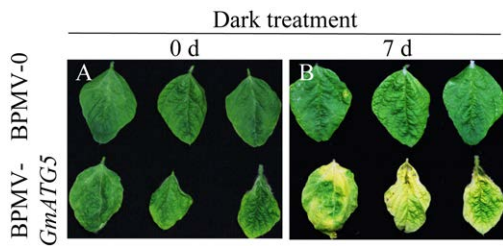


图 3 沉默 *GmATG5* 导致黑暗处理的叶片加速衰老 A: 暗处理前 BPMV-0 空载体植株叶片与 *GmATG5* 沉默植株叶片的表型比较. B: 暗处理 7 d 后 BPMV-0 空载体植株叶片与 *GmATG5* 沉默植株叶片的表型比较

Figure 3 Silencing *GmATG5* results in an accelerated senescence phenotype. A: Comparison of leaf phenotype between BPMV-0 plants and the *GmATG5*-silenced plants before dark treatment. B: Comparison of leaf phenotype between BPMV-0 plants and the *GmATG5*-silenced plants after 7 d of dark treatment.

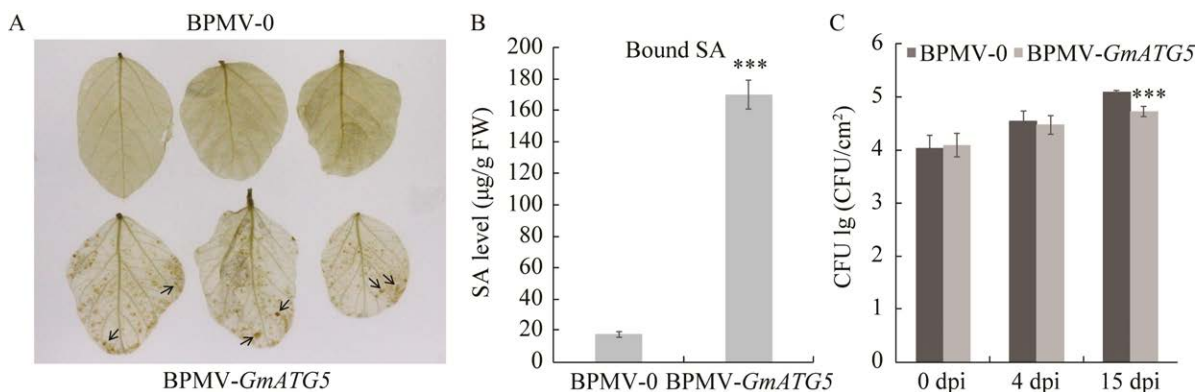


图 5 *GmATG5* 沉默植株中免疫反应被激活 A: DAB 染色表明 H₂O₂ 的积累水平在 *GmATG5* 沉默株中显著升高. 箭头指向 H₂O₂ 积累处; B: *GmATG5* 沉默株中结合态水杨酸含量显著高于空载体对照植株. C: *Psg* 侵染的菌落计数分析. CFU: 菌落形成单位. ***代表显著性水平 $P < 0.001$ (Student's *t* test)

Figure 5 Silencing *GmATG5* leads to the activation of immune responses. A: An elevated accumulation level of H₂O₂ was observed in the *GmATG5*-silenced plants by DAB staining. The arrows pointed to the areas of H₂O₂ accumulation; B: The conjugated SA level was significantly higher in the *GmATG5*-silenced plants than that of the vector control plants. C: Growth assay for *Psg* infection. CFU: colony forming unit. dpi=days post inoculation. *** represents $P < 0.001$, Student's *t*-test.

法进行大豆斑点病菌 *Psg* 接菌。将 *Psg* 菌液均匀喷洒于大豆叶片的上面、下面，然后将大豆整株用塑料袋罩住保持湿润，以有利于 *Psg* 侵染。在接菌后不同天时，从被侵染叶片上打孔取样，进行菌落形成单位计数统计分析。结果表明，

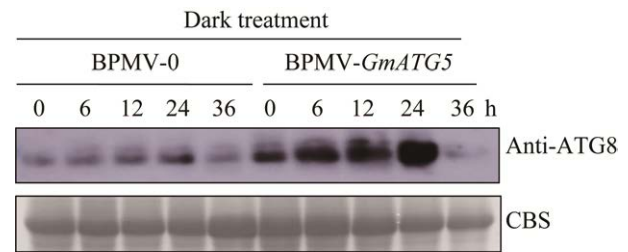


图 4 沉默 *GmATG5* 造成 *GmATG8* 在叶片中的积累水平升高 在暗处理不同时间后 BPMV-0 空载体植株与 *GmATG5* 沉默植株中 *GmATG8* 蛋白积累水平的比较

Figure 4 Silencing of *GmATG5* results in an elevated accumulation level of *GmATG8*. Comparison of *GmATG8* protein accumulation level between BPMV-0 control plants and the BPMV-*GmATG5* silenced plants treated in the dark for different periods of time.

BPMV-0 对照植株叶片上的菌落数显著高于 *GmATG5* 沉默植株叶片上的菌落数(图 5C), 说明沉默 *GmATG5* 可导致大豆植株对 *Psg* 的抗性增强。上述结果表明 *GmATG5* 在大豆免疫反应中起着负调控作用。

2.6 沉默 *GmATG5* 造成 flg22 诱导的 *GmMPK6* 的激活水平的下降

前期的研究表明, MAPK 信号途径不受拟南芥中 *ATG* 基因功能丧失的影响^[24]。为了研究沉默 *GmATG5* 对大豆中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)激活的效应, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ flg22 处理 BPMV-0 和 BPMV-*GmATG5* 沉默植株叶片 0–360 min, 然后用可专一性检测 MPK3/6 磷酸化的人源抗体 p44/42 MAP Erk1/2 对从上述叶片中提取的蛋白质进行 Western blotting 分析。如图 6 所示, 相对于 BPMV-0, flg22 诱导的 *GmMPK3/6* 激活程度在 *GmATG5* 沉默植株叶片中显著减弱, 表明 *GmATG5* 沉默植株中激活的防御反应(图 6)不依赖于 *GmMPK3/6* 的激活, 即 *GmATG5* 为大豆 *GmMPK3/6* 激活的负调控因子。

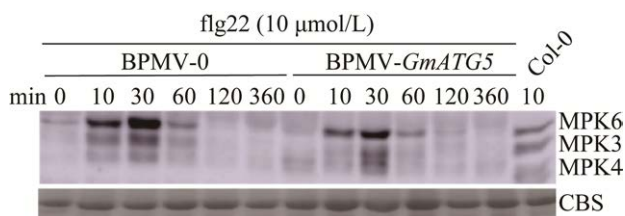


图 6 沉默 *GmATG5* 降低了 flg22 诱导的 *GmMPK3/6* 激酶的激活 将 BPMV-0 和 BPMV-*GmATG5* 沉默植株叶片分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 flg22 处理 0–360 min 后提取蛋白, 然后用专一性识别磷酸化态 MPK3 与 MPK6 的抗体 phospho-p44/42 MAP Erk1/2 通过 Western blotting 对上述蛋白样品进行激酶分析. 用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 flg22 处理 10 min 的拟南芥样品作为阳性对照. 用考马斯亮蓝染色作为上样量对照

Figure 6 The activation of flg22-induced *GmMPK3* and *GmMPK6* is significantly reduced in the *GmATG5*-silenced plants. The BPMV-0 and *GmATG5*-silenced plants were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ flg22 for the indicated times. The kinase activation was detected by immunoblotting analysis using phospho-p44/42 MAP Erk1/2 antibody, which specifically recognizes phosphorylated MPK3/6. The *Arabidopsis* leaf samples treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ flg22 for 10 min was used as a positive control. CBS: Coomassie blue staining was used as a loading control.

3 讨论与结论

本研究小组曾经研究发表的大豆基因均有两个拷贝^[28-31,33-35,42-44]。与此相符, 本研究在大豆基因组中也发现 2 个 *GmATG5* 基因。大豆 *GmATG5* 的功能是维持自噬途径正常运转所必需的。*ATG5* 参与 *ATG8* 的 PE 化。PE 化的 *ATG8* 一方面在自噬体的形成过程中扮演重要角色, 另一方面嵌入自噬体膜的 *ATG8-PE* 可通过与含 *ATG8* 互作基序(*ATG8-interacting motif*, AIM)的受体蛋白的互动而介导众多蛋白的选择性自噬降解, 因而可影响众多生物学过程, 如抗病性、抗旱性、激素信号途径等^[2,15]。

自噬是真核生物中特有的分解代谢与营养循环途径。在植物中, 自噬在植物的营养循环、生长发育、衰老、细胞死亡、生物胁迫与非生物胁迫反应中均起着重要作用^[2,4,11-12,45]。在模式植物拟南芥中对自噬已经有了比较深入透彻的研究, 但在作物种中的研究则十分有限。利用 BPMV-VIGS 系统, 在大豆中成功沉默了 *GmATG5* (图 1)。拟南芥自噬相关基因的突变体通常在正常生长条件下表现出加速衰老与免疫激活的表型^[20-21,37-39], 但在大豆 *GmATG5* 沉默植株中并未观察到此表型(图 2A), 这可能与 BPMV-VIGS 介导的沉默并非 100% 有关, BPMV-VIGS 介导的沉默效率一般介于 80%–90%。由于在正常生长条件下自噬只维持在基准水平, 而未被沉默的 10%–20% *GmATG5* 足以维持正常生长条件下的需求。然而在自噬诱导条件下, *GmATG5* 沉默植株中残留的 10%–20% *GmATG5* 不足以组装充足的自噬体以满足自噬的需求, 因而表现出与自噬缺陷相关的加速衰老表型(图 3)。

ATG8 蛋白在自噬体的形成与通过选择性自噬介导某些特殊蛋白的降解中起着重要作用, 且

始终存在于自噬体中,并最终随自噬体进入液泡中降解^[2]。如果 ATG5 缺失,便不能使 ATG8 被 PE 化,就会致使 ATG8 不能嵌入自噬体膜,导致自噬体形成的缺陷及选择性自噬降解途径的缺陷。由于嵌入自噬体内膜的 ATG8-PE 最终也会被运输至液泡内随自噬小体一同被降解,理论上讲 ATG5 缺失导致的结果之一便是 ATG8 在细胞内大量积累^[2]。与此相符,大豆 *GmATG5* 沉默植株叶片中也积累过量 *GmATG8* (图 4),说明 *GmATG5* 沉默植株中的自噬途径受损。

植物的衰老与过量积累 ROS 相关。线粒体、叶绿体与过氧化物酶体等细胞器是细胞内 ROS 的主要来源,而自噬的功能之一便是通过降解氧化受损的细胞器从而清除由此产生的 ROS,进而避免 ROS 诱导的细胞衰老^[11,15,46-48]。*GmATG5* 沉默植株中过量积累 ROS (图 5A)支持上述说法。众所周知,植物中 ROS 还在诱导细胞死亡与激活免疫反应方面发挥重要作用^[49-50]。*GmATG5* 沉默植株中所表现出的免疫激活如 SA 含量的增加(图 5B)也与 ROS 的过量积累(图 5A)有关,ROS 与 SA 之间可形成正向的调控环路以放大免疫信号^[50]。与免疫激活相一致,*GmATG5* 沉默植株对 *Psg* 的抗性显著增强(图 5C),这也与拟南芥突变体自噬突变体对生体营养型病原菌抗性增强相一致,再次说明自噬途径的功能在大豆与拟南芥中是保守的。

拟南芥中丧失 ATG2 的功能并不影响 MAK3/6 的激活^[24],在大豆中沉默 *GmATG2a/2b* 导致 flg22 诱导的 *GmMPK3/6* 激活程度的降低^[29],而沉默 *GmATG10a/10b* 则导致 flg22 诱导的 *GmMPK3/6* 激活程度的增强^[30]。说明拟南芥与大豆 ATG2 对 MAK3/6 的激活具不同效应,而大豆中不同 ATG 蛋白对 MAK3/6 的激活具截然相反的效应。与沉默 *GmATG2a/2b* 相似^[29],沉默 *GmATG5* 导致 flg22 诱导的 *GmMPK3/6* 激活程度

的减弱(图 6),说明 *GmATG5* 正调控 *GmMPK3/6* 的激活;该结果同时还说明 *GmATG5* 沉默植株中观察到的免疫激活(图 5A, 5B)与抗病性增强(图 5C)不依赖于 *GmMPK3/6* 的激活(图 6)。

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 BPMV-VIGS 系统。

REFERENCES

- [1] MIZUSHIMA N. Autophagy[J]. FEBS Letters, 2010, 584(7): 1279.
- [2] LI F, VIERSTRA RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(9): 526-537.
- [3] LIU YM, BASSHAM DC. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 215-237.
- [4] AVIN-WITTENBERG T. Autophagy and its role in plant abiotic stress management[J]. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(3): 1045-1053.
- [5] MICHAELI S, GALILI G, GENSHIK P, FERNIE AR, AVIN-WITTENBERG T. Autophagy in plants-what's new on the menu?[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(2): 134-144.
- [6] LIU YL, SCHIFF M, CZYMMEK K, TALLÓCZY Z, LEVINE B, DINESH-KUMAR SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response[J]. Cell, 2005, 121(4): 567-577.
- [7] HOFIUS D, SCHULTZ-LARSEN T, JOENSEN J, TSITSIGIANNIS DI, PETERSEN NHT, MATTSSON O, JØRGENSEN LB, JONES JDG, MUNDY J, PETERSEN M. Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2009, 137(4): 773-783.
- [8] ÜSTÜN S, HAFRÉN A, HOFIUS D. Autophagy as a mediator of life and death in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 40: 122-130.
- [9] XU GY, WANG SS, HAN SJ, XIE K, WANG Y, LI JL, LIU YL. Plant Bax inhibitor-1 interacts with ATG6 to regulate autophagy and programmed cell death[J]. Autophagy, 2017, 13(7): 1161-1175.
- [10] DING X, ZHANG X, OTEGUI MS. Plant autophagy: new flavors on the menu[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 46: 113-121.

- [11] MARSHALL RS, VIERSTRA RD. Autophagy: the master of bulk and selective recycling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 173-208.
- [12] LEARY AY, SAVAGE Z, TUMTAS Y, BOZKURT TO. Contrasting and emerging roles of autophagy in plant immunity[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 52: 46-53.
- [13] QI H, XIA FN, XIAO S. Autophagy in plants: physiological roles and post-translational regulation[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(1): 161-179.
- [14] YANG M, ISMAYIL A, LIU YL. Autophagy in plant-virus interactions[J]. Annual Review of Virology, 2020, 7(1): 403-419.
- [15] RAN J, HASHIMI SM, LIU JZ. Emerging roles of the selective autophagy in plant immunity and stress tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(17): 6321.
- [16] OHSUMI Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems[J]. Nature Review of Molecular Cell Biology, 2011, 2: 211-216.
- [17] HANADA T, NODA NN, SATOMI Y, ICHIMURA Y, FUJIOKA Y, TAKAO T, INAGAKI F, OHSUMI Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(52): 37298-37302.
- [18] CHUNG T, PHILLIPS AR, VIERSTRA RD. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12a and ATG12b loci[J]. Plant Journal, 2010, 62(3): 483-493.
- [19] THOMPSON AR, DOELLING JH, SUTTANGKAKUL A, VIERSTRA RD. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways[J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2097-2110.
- [20] YOSHIMOTO K, JIKUMARU Y, KAMIYA Y, KUSANO M, CONSONNI C, PANSTRUGA R, OHSUMI Y, SHIRASU K. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(9): 2914-2927.
- [21] WANG Y, NISHIMURA MT, ZHAO T, TANG D. ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2011, 68(1): 74-87.
- [22] ZHOU J, WANG J, YU JQ, CHEN ZX. Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 174.
- [23] ZHOU J, WANG J, CHENG Y, CHI YJ, FAN BF, YU JQ, CHEN ZX. NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(1): e1003196.
- [24] LENZ HD, HALLER E, MELZER E, KOBER K, WURSTER K, STAHL M, BASSHAM DC, VIERSTRA RD, PARKER JE, BAUTOR J, MOLINA A, ESCUDERO V, SHINDO T, van der HOORN RAL, GUST AA, NÜRNBERGER T. Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. The Plant Journal, 2011, 66(5): 818-830.
- [25] ZHANG T, XIAO Z, LIU C, YANG C, LI J, LI H, GAO C, SHEN W. Autophagy mediates the degradation of plant ESCRT component FREE1 in response to iron deficiency[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8779.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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(2019): 110386.
- [29] HASHIMI SM, 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.
- [30] 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).
- [31] 钟晨丽, 王文絮, 廖丽娜, 刘建中. 沉默大豆 *GmWRKY33B* 基因导致大豆抗病性降低. 生物工程学报, 2024, 40(1): 163-176.
- ZHONG CL, WANG WX, LIAO LN, LIU JZ.

- Silencing *GmWRKY33B* genes leads to reduced disease resistance in soybean[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 163-176 (in Chinese).
- [32] REN D, YANG H, ZHANG S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(1): 559-565.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] HASHIMI SM. 沉默大豆自噬相关基因导致加速衰老及增强免疫反应[D]. 金华: 浙江师范大学硕士论文, 2021.
HASHIMI SM. Silencing autophagy-related genes (ATGs) results in the accelerated senescence and enhanced immunity in soybean[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2021 (in Chinese).
- [37] DOELLING JH, WALKER JM, FRIEDMAN EM, THOMPSON AR, VIERSTRA RD. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(36): 33105-33114.
- [38] HANAOKA H, NODA T, SHIRANO Y, KATO T, HAYASHI H, SHIBATA D, TABATA S, OHSUMI Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene[J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1181-1193.
- [39] XIONG Y, CONTENTO AL, BASSHAM DC. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2005, 42(4): 535-546.
- [40] HAYWARD AP, TSAO J, DINESH-KUMAR SP. Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009, 20: 1041-1047.
- [41] MUNCH D, RODRIGUEZ E, BRESSENDORFF S, PARK OK, HOFIUS D, PETERSEN M. Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in *Arabidopsis*[J]. Autophagy, 2014, 10(9): 1579-1587.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] HOFIUS D, LI L, HAFREN A, COLL NS. Autophagy as an emerging arena for plant-pathogen interactions[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 8: 117-123.
- [46] LI FQ, CHUNG T, VIERSTRA RD. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2014, 26(2): 788-807.
- [47] XIE QJ, MICHAELI S, PELED-ZEHAVI H, GALILI G. Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(5): 264-265.
- [48] YOUNG PG, BARTEL B. Pexophagy and peroxisomal protein turnover in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2016, 1863(5): 999-1005.
- [49] TORRES MA, JONES JDG, DANGL JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 373-378.
- [50] 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.

(本文责编 郝丽芳)