

参赛队员： 章惟博

中学： 上海市交大附中

省份： 上海市

国家/地区： 中国/南方

指导教师姓名： 朱炎

指导教师单位： 复旦大学生命科学学院

拟南芥叶片感染坏死性病原菌灰霉菌后的空间转录组分析
*Spatial transcriptome analysis of Arabidopsis leaves infected by
necrotrophic pathogen Botrytis cinerea*

章惟博

上海市交大附中

摘要

灰霉菌(*Botrytis cinerea*)是一类坏死性病原菌，通过杀死植物宿主细胞并以残骸为食的方式定殖在植物上，并引发导致农业重大经济损失的灰色霉菌病。过去多年来，围绕灰霉菌侵染植物的分子和遗传工作已经揭示了大量与灰霉菌致病相关的植物基因，然而它们在病原菌侵染过程中只有转录水平的改变以及遗传分析，这一点导致我们无法系统性地推测诸多基因在植物应答病原菌侵染时精确的网络结构以及功能关联。空间转录组技术是近年来兴起的前沿技术，能对组织内不同细胞同时采集转录组从而提供更全面的转录组信息。我们通过空间转录组技术，获得了灰霉菌侵染拟南芥叶片后植物启动防御反应的详尽的转录组空间表达谱，突出了激素通路和代谢过程变化的顺序。这些数据提供了防御反应过程中转录变化的前所未有的详细水平。我们同时也发现了染色质重塑因子 INO80 参与植物对灰霉菌的应答，其功能缺失突变体对灰霉菌侵染的敏感性下降，而空间转录组分析显示，INO80 调控了大量病原菌侵染相关通路中的关键基因的分布。

关键词：拟南芥，灰霉菌，防御反应，空间转录组

目录

摘要.....	2
1. 前言.....	4
2. 材料和方法.....	7
2.1. 病原菌培养与植物侵染.....	7
2.1.1. 病原菌培养.....	7
2.1.2. 病原菌侵染植物.....	7
2.2. 病原菌侵染程度的分析.....	8
2.2.1. 病斑直径统计.....	8
2.2.2. 灰霉菌的生长量统计.....	8
2.3. 包埋制片.....	8
2.3.1. 取材与包埋.....	8
2.3.2. 切片.....	9
2.4. 植物表型检测.....	10
3. 结果.....	12
3.1. 灰霉菌侵染模式植物拟南芥叶片的表型观察.....	12
3.2. 灰霉菌侵染植物的早期过程的空间转录组分析.....	13
3.2.1. 取材与包埋.....	13
3.2.2. 空间转录组测序分析结果.....	15
3.3. 染色质重塑因子 INO80 参与植物对灰霉菌侵染的应答.....	18
3.3.1. <i>ino80</i> 突变体植物对灰霉菌的敏感性下降.....	18
3.3.2. <i>ino80</i> 突变体植物影响大量植物应答灰霉菌病原体的基因的空间分布.....	19
3.3.3. <i>ino80</i> 突变体植物的若干表型.....	23
4. 讨论.....	25
5. 参考文献.....	26
6. 致谢.....	28

1. 前言

灰霉菌(*Botrytis cinerea*)是一种分布广泛的植物真菌病原体,具有坏死性营养模式(necrotrophic nutritional mode)。除了一些单子叶作物外,该真菌还会感染超过 200 个双子叶作物宿主并引发灰色霉菌病(gray mold disease)。作为多食性病原体,灰霉菌还感染重要的经济作物,如浆果、番茄和观赏花卉,约有 15-40% 的水果和观赏花卉因采收后腐烂而损失 (AbuQamar et al., 2017),被认为是导致农作物收获前和收获后腐烂以及品质恶化的第二大类的植物病原体。由于灰霉菌具有产生杀菌剂抗性的趋势,因此被认为在农业和科研上受到了越来越多的重视 (Cheung et al., 2020)。

灰霉菌是一类坏死型病原体(necrotrophic pathogen)。与以活体寄主组织为食的生物营养性病原体(biotrophic pathogen)相反,灰霉菌分泌能够降解和杀死宿主细胞的裂解酶和毒素(如毒性代谢物葡双醛霉素),通过杀死植物细胞并以濒临死亡或已经死亡的宿主组织为食来获取营养 (Macioszek et al., 2023)。与此同时,灰霉菌也会利用植物自身的防御机制来实现这一目标 (AbuQamar et al., 2017)。

灰霉菌感染后的最早的标志之一是几分钟后就可以快速而强烈地产生活性氧(ROS, reactive oxygen species),包括不稳定的超氧化物和稳定形式的主要成分过氧化氢(H₂O₂)。H₂O₂通过自由扩散或水通道蛋白促进扩散穿过质膜进入细胞,在感染后数小时持续且高幅度扩增,称为氧化爆发(oxidative burst),是植物在病原体攻击后的一种快速防御反应,是植物免疫的重要有效组成部分。ROS 导致超敏反应(HR, hypersensitive response)和局部细胞死亡以阻止病原体生长所需的营养物质的吸收以及病原体定殖(colonization),而且还作为信号分子激活防御相关基因的表达(Camejo et al, 2016; Lukan and Coll, 2022)。

植物多种激素信号通路以及它们之间的交互在植物生长发育、应答外界各种胁迫等方面发挥着极为关键的作用。植物进化出复杂的机制来感知和应对病原体的攻击。对坏死性病原体的抗性通常需要激活茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号通路,而水杨酸(salicylic acid, SA)信号通路主要是激活对生物营养性病原体的抗性。SA 可以拮抗 JA 信号,反之亦然。SA 的生物合成在生物营养性病原体感染后增加

数倍，SA 通过增加 ROS 引发氧化爆发(oxidative burst)，这是触发植物超敏反应和局部细胞死亡的关键(Saleem et al., 2021)。而当植物宿主细胞受体感知到坏死性病原菌后，通过第二信使(如 ROS)的信号转导触发植物抗性反应，导致 JA 生物合成和依赖 JA 的信号级联的激活，其中包括一系列转录因子以及防御相关的 JA 标记基因的过度表达，例如植物防御素(defensin, 如 *PDFI.2*) (Spoel et al., 2007; Macioszek et al., 2023)。值得注意的是，灰霉菌作为坏死性致病菌会产生一种胞外多糖，作为 SA 通路的激发因子促发了宿主植物自身 SA 通路的激活导致局部细胞死亡，并通过 SA-JA 的拮抗机制，抑制 JA 信号通路以及后续的抵御真菌的分子机制，从而使真菌在番茄(*Solanum lycopersicum*)中发病 (El Oirdi et al., 2011)。

更为复杂的是，植物激素 JA 防御网络被分离成由特定转录因子活性控制的共调节基因的 JA 和 ET 两个“分支”。植物激素 JA 和脱落酸(abscisic acid, ABA)共同调节由 MYC 转录因子的活性控制的 JA 分支，以调节对昆虫和哺乳动物食草引起的大规模组织损伤的反应；而 JA 和植物激素乙烯(ethylene, ET)共同调节由 ERF 转录因子的活性控制的 ET 分支，直接防御坏死性病原体。JA 防御网络的两个分支也是相互拮抗的(Stroud et al., 2022)。SA 早期反应的结构有助于单向诱导防御，而 JA 途径是分支的，可能提供更多样化的防御手段，以允许对更广泛的生物应激源做出反应。

Trp 衍生的吲哚代谢物植保素(camalexin) 是拟南芥中主要的植物抗毒素，是先天免疫系统的关键成分之一，对于防御坏死性病原菌也很重要(Spoel et al., 2007)。植物防御往往依赖于病原体接触部位 camalexin 的合成和靶向递送。相应的代谢或者转运功能的缺失都会导致植物对坏死性病原菌的易感性增加(He et al., 2019)。

染色质重塑因子是一类细胞核蛋白，利用 ATP 水解的能量，介导核小体的滑动、移除以及核小体组分的改变，调控染色质中 DNA 的可及性，在功能上重塑局部或整体染色质结构。INO80 属于染色质重塑因子中的一个家族，该家族中另两个成员 SWR1 和 CHR19 在过去的报道中被发现参与了植物抵御不同病原菌的过程(Marchi-Diaz et al., 2008; Kang et al., 2022)。前期的工作发现，拟南芥 *ino80* 功能缺失突变体对灰霉菌侵染的敏感性下降，相对于野生型植物更加抵抗灰霉菌

的侵染。INO80 被证实参与大量基因的转录水平调控，但 INO80 参与植物应答病原菌侵染的分子机制目前尚未展开。

植物免疫应答涉及由多种转录因子和植物激素调控的动态转录重编程(Tsuda and Somssich, 2015)。大量转录组分析研究积累的数据集为我们提供了机会去捕捉植物免疫系统的信息，例如(信号级联的)网络结构和时间动态。时至今日与日俱增的全局转录组分析强调了时间序列分析的价值 (Birkenbihl et al., 2012)。然而，任何病原菌侵染过程除了时间因素，还有空间因素。空间因素的考虑是关键策略，可以在机制上对免疫中明显复杂的信号交叉互作获得见解(Betsuyaku et al., 2018)。这在以往的转录组分析中是无法得到诠释的。

细胞的转录组、空间位置、形态学、生理学紧密相关，单细胞转录组与空间转录组结合有助于全面解析机体的生物学特征和临床表现。近几年，空间转录组技术逐渐成熟，开始在科研各个领域发挥着关键的作用，在植物器官发育方面描述了多个器官不同细胞转录组的变化过程，全面描述了细胞表型和基因型的关联。本次工作就是利用新兴的空间转录组技术，对坏死性病原菌灰霉菌侵染拟南芥叶片早期过程做了详尽的表型、分子和组学分析，为理解这一重要的致病菌侵染植物的分子过程提供了组学数据。

2. 材料和方法

2.1. 病原菌培养与植物侵染

2.1.1. 病原菌培养

灰霉菌(*Botrytis cinerea*) strain B05.10 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基中(potato dextrose agar, PDA)于 28 度生长 7-10 天, 再转到马铃薯葡萄糖液体培养液(potato dextrose broth, PDB)于 28 度生长 2-3 天。无菌水稀释孢子, 最终制备成浓度为每毫升 1×10^5 个孢子(即血球计数板中间 25 个中方格孢子总数为 10)的孢子悬浮液。

2.1.2. 病原菌侵染植物



选取生长 5-6 周的拟南芥植物接种病原菌孢子。孢子悬浮液接种到标记叶片非主脉区, 每个叶片接种 1 个点, 每个点 $5 \mu\text{L}$ 。接种 3 小时后连续观察发病情况。

2.2. 病原菌侵染程度的分析

2.2.1. 病斑直径统计

在指定的时间，剪取被侵染的植物叶片至解剖镜下量取病斑直径(lesion diameter)，每个时间点需要统计 25-30 片叶子。

2.2.2. 灰霉菌的生长量统计

收集不同时间点的植物叶片，通过试剂盒抽提 DNA，进行定量 PCR 检测。使用植物内参引物 *At ACT 2*(AT3G18780)作为内参(代表拟南芥自身生物量 biomass)，通过三组生物学重复实验计算侵染后植物体内灰霉菌 DNA(*Bo Cut-A*)生物量的相对含量(Kang et al., 2021)。qPCR 引物如下：

Bc Cut-A-F: 5'-GATGTGACGGTCATCTTTGCCC-3'

Bc Cut-A-R: 5'-AGATTTGAGAGCGGCGAGG-3'

At ACT2-F: 5'-CTTGCACCAAGCAGCATGAA-3'

At ACT2-R: 5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT-3'

2.3. 包埋制片

2.3.1. 取材与包埋

选取侵染后不同时间点的植物叶片，以侵染点为中心用手术刀截取 7 mm*5 mm 大小的长方形植物叶片。

2.3.1.1. 固定

截取后的植物叶片浸泡在 1ml EAA(Ethanol : Acetic acid = 3:1)固定液，真空处理 5 分钟。转移叶片至 1 mL 5% sucrose solution with 10x PBS buffer (80g NaCl, 14.7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2g KCl, 2g KH_2PO_4 , to 1L with RNase free water, pH to 7.4), 室温 1 分钟。

2.3.1.2. 溶液置换

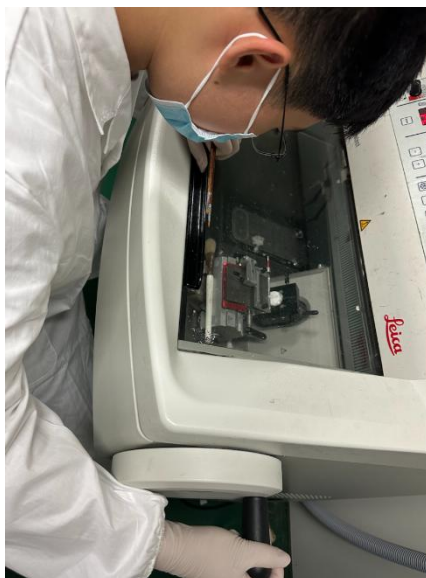
擦干水分后，用 Optimal Cutting Temperature (OCT) compound 浸泡植物叶片 5-10 分钟，直到 OCT 替换叶片表面的 EAA。

2.3.1.3. 包埋

调整植物叶片的位置和方向，确保多个重叠叶片之间填满 OCT 没有空隙且方向统一。将包埋模具泡在液氮冷却过的异戊烷溶液中，待 OCT 模具完全冷冻后取出，放置-80 冰箱中储存。

2.3.2. 切片

2.3.2.1. 低温切片



将 OCT 包埋块贴合在冷冻切片机中，样品在零下 20 度低温下切片，本研究采用 20 μm 的切片厚度。

2.3.2.2. 染色

使用台盼蓝染液(Trypan staining)浸染叶片切片 5-10 分钟,显微镜下检测植物叶片组织结构的完整性。

2.3.2.2. cDNA 合成与成像

合格的植物叶片包埋块寄往百迈客生物科技公司做正式切片,后续的荧光 cDNA 合成和成像在 10x Visium 平台上,分辨率为 55 μm ,实验步骤按照制造商的方案。公司负责采集与数据初步分析。

2.4. 植物表型检测

2.4.1. ROS 检测

取侵染后不同时间点的植物全叶片,加入用 DAB(3,3-二氨基联苯胺)显色试剂盒(20x, Solarbio, DA1010)配置好的 1x DAB 染液,室温黑暗染色 12 小时。染色后用蒸馏水冲洗 3 次。加入 95%乙醇漂洗植物叶片,直到叶片变成无色,吸干表面水分,显微镜下观察。

2.4.2. 死细胞检测

按照 Trypan Blue 染液(台盼蓝法)试剂盒(Solarbio, G4808)比例配置好 1x 染

液，放在 65 度水浴锅中预热。取侵染后不同时间点的植物全叶片，加入配置好的 1x 染液，室温黑暗染色 10 小时。染色后用 95%乙醇冲洗 3 次，浸于 95%乙醇中脱色至少 12 小时。蒸馏水平衡 30 分钟，吸干表面水分，显微镜下观察。

2.4.3. 植保素(camalexin)敏感性检测

植保素(camalexin)母液：公司：MedChemExpress(MCE)，目录号：HY-119502，CAS No. : 135531-86-1，浓度：20 mM in DMSO。

实验方法：将母液加入到 MS 培养基中至 0、10、20 μ g/mL，竖直培养拟南芥幼苗，培养 12 天后观察表型。

3. 结果

3.1. 灰霉菌侵染模式植物拟南芥叶片的表型观察

我们使用浓度为 $5\mu\text{L}$ 的 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 孢子的孢子悬浮液接种到健康生长 5-6 周的拟南芥的莲座叶上，接种 3 小时后连续观察病斑表型(图 3-1)。

在我们接种的坏死性病原菌的侵染下，3 小时后就可以看到坏死病斑的出现(图 3-1A 和 B)，病斑大小在 12 小时内只是缓慢增加，但 12 小时之后，病斑的扩散速度加快，表明灰霉菌的增殖在 12 小时以内处于缓慢的植物-病原菌交互阶段，12 小时之后进入快速阶段(图 3-1A 和 B)。

我们利用商品化的试剂盒抽提了相应植物叶片的基因组 DNA，这其中势必含有正在侵染的灰霉菌的 DNA。我们通过检测灰霉菌单拷贝基因 *Cutinase (Bc cut-A)* 相对于拟南芥自身持家基因 *ACTIN (At ACT)* 的相对含量，来判断灰霉菌在植物体内定殖的程度。定量 PCR 显示，与观察到的病斑大小的变化趋势一致，*Bc cut-A/At ACT* 的数值也是在 12 小时之前处于缓慢增加的状态，但在 12 小时以后，急剧增加(图 3-1C)。这些结果表明，在我们的实验条件下，灰霉菌对于植物的侵染在最早期的 12 小时以内可能受到植物建立各个层面的抵抗，或者病原菌和植物之间还处于一个相互平衡的状态。深入理解这一平衡状态的网络调控以及隐藏的分子层面的变化，对于理解植物抵御病原菌的分子机制具有重要的意义。

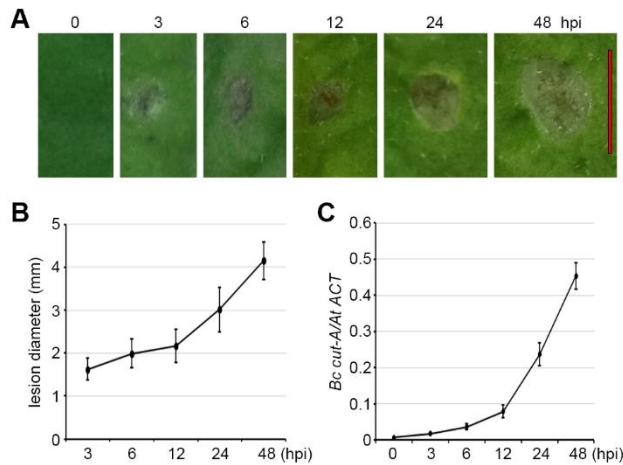


图 3-1. 灰霉菌侵染植物的早期表型

(A)坏死性病原菌灰霉菌侵染点在不同时间时的特写。Bar=5 mm。

(B)不同侵染时间的灰霉菌病斑大小统计。20 个生物学重复的平均值和方差被呈现出来。

(C)通过定量 PCR 展现出灰霉菌单拷贝基因 *Cutinase (Bc cut-A)* 相对于拟南芥自身持家基因 *ACTIN (At ACT)* 的相对含量。3 个生物学重复的平均值和方差被呈现出来。

3.2. 灰霉菌侵染植物的早期过程的空间转录组分析

3.2.1. 取材与包埋

我们按照百迈客生物科技公司提供的流程(见图 3-2)对被侵染的叶片包埋制片。为节省测序成本，我们将不同侵染时期的叶片都切成长方形，按照时期顺序上下叠加后统一包埋制片，其中侵染点的位置尽量靠近中心，从而可以在一个平面看到多个侵染时期的叶片细节。

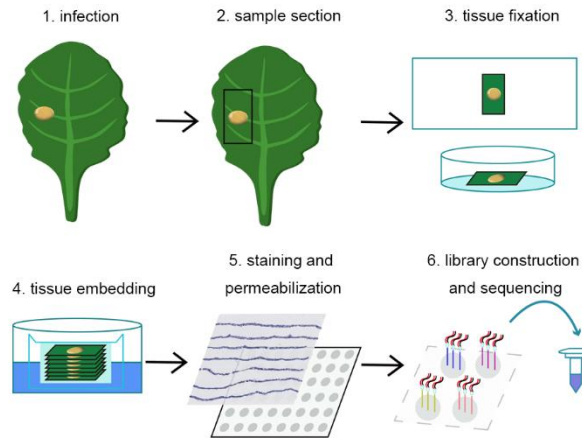


图 3-2. 用于空间转录组分析的制片流程。

注：步骤 1-4 均在实验室完成。步骤四后的包埋块先期由我们自行取部分切片质检(请见图 3-3)，后期样本按流程寄至公司处由公司技术人员正式操作后续步骤。

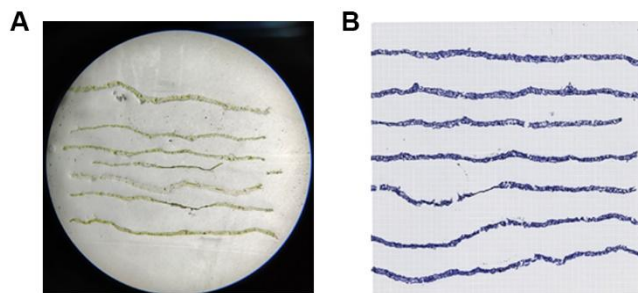


图 3-3. 步骤 4 包埋块先期的切片质检。

(A)显微镜下观察叶片组织完整性（本地完成，质检用）

(B)台盼蓝染色叶片切片（本地完成，质检用）

3.2.2. 空间转录组测序分析结果

3.2.2.1. 测序质检

百迈客生物科技公司对我们的样品做了测序和初步分析。在最终的样本中检测到数千个基因的转录本信息(见图 3-4)，表明我们的制片过程没有发生 RNA 降解或者污染。

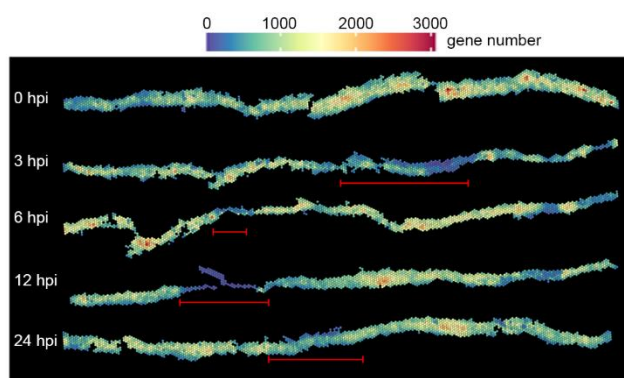


图 3-4. 不同侵染时期的野生型(WT, wild type)拟南芥叶片的测序结果。

注：hpi (hours post infection)指的是灰霉菌侵染后的时间。红色标尺代表的是不同叶片对应的病原菌侵染点，该位点由测序前叶片染色结果标记得到的。

3.2.2.2. 测序结果分析

本课题关注的主旨是拟南芥应答病原菌侵染在分子层面上的应答，因此我们更关注在侵染后基因分布发生富集基因，这些基因视为空间分布的应答基因。在初步分析中，公司技术人员重点筛查在侵染点周边有不同富集特征的基因，而放弃广谱性或者组成型均衡分布的基因，后者在空间转录水平上被视为非应答基因。

由于植物在 12 hpi 开始发生病原菌快速增殖的过程(请见图 3-1)，我们推测植

物在 3 hpi 和 6 hpi 两个时间节点才是植物对病原菌侵染能组织应答的有效时间。因此，我们后续工作重点关注这两个时间节点的应答基因。

根据上述筛选规则，公司技术人员筛选出 3 hpi 时间点的 164 个基因和 6 hpi 时间点的 942 个基因。从数量上，也可以看出随着灰霉菌侵染的加重，植物细胞有更多的基因在空间上发生有特征的富集。通过对基因富集峰与侵染点的相对位置和特征，公司技术人员对 3 hpi 时间点的 164 个基因分为 3 个区域(zones)，即 zone 1 ~ zone 3，而对 6 hpi 时间点的 942 个基因分为 5 个区域(zones)，即 zone 1 ~ zone 5。Zone 数值越小，越靠近侵染点，而 zone 数值越大，越远离侵染点。我们利用公用的数据库网站 AgriGO v2 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2>) 对这些有空间分布特征的基因做了 GO(Gene Ontology)生物过程(biological process)富集分析(图 3-5)。

从 GO 分析结果来看，野生型植物在 3 hpi 还没有 ROS 应答，说明这个节点并没有大量产生病原菌侵染所需的 ROS。总体而言，3 hpi 的野生型除了 response to fungus, response to SA, response to ET 以及 JA 相关途径以外，并没有太多的 GO 富集。这进一步说明，植物激素 SA, ET，尤其是 JA，它们的产生以及相关途径，是植物感知到病原菌侵染的最早出现的转录本空间变化。这一改变代表着植物应答灰霉菌最初的分子调控机制(图 3-5，左)。

野生型植物在 6 hpi 有了明显的 ROS 应答。与此相应的，是植物在侵染点附近更为强烈的 ET、JA 和 ABA 途径基因的大量激活。与之伴随的是，大量与 cell communication 相关的基因在侵染点附近被激活，这可能与大量激素通路被激活，需要更为复杂的交互过程有关。在侵染点附近(Zone 1 和 2)，植物抵御真菌的毒素基因在 6 hpi 时才被激活，表明植物需要 6 个小时，才能开始从转录水平开始表达杀死真菌的代谢物的基因。此外，在远离侵染点(Zone 4 和 5)的区域，植物开始表达免疫相关基因，这可能与植物建立远端的防御地带有关(图 3-5，右)。无论在 3 hpi 还是 6 hpi，光合作用相关的基因都只在最远离侵染点的区域高度富集。这意味着植物叶片在感知到坏死性病原菌侵染后，在相当大的范围内开始抑制光合作用，主动停止植物正常生长，这与植物转变为防御状态是一致的。

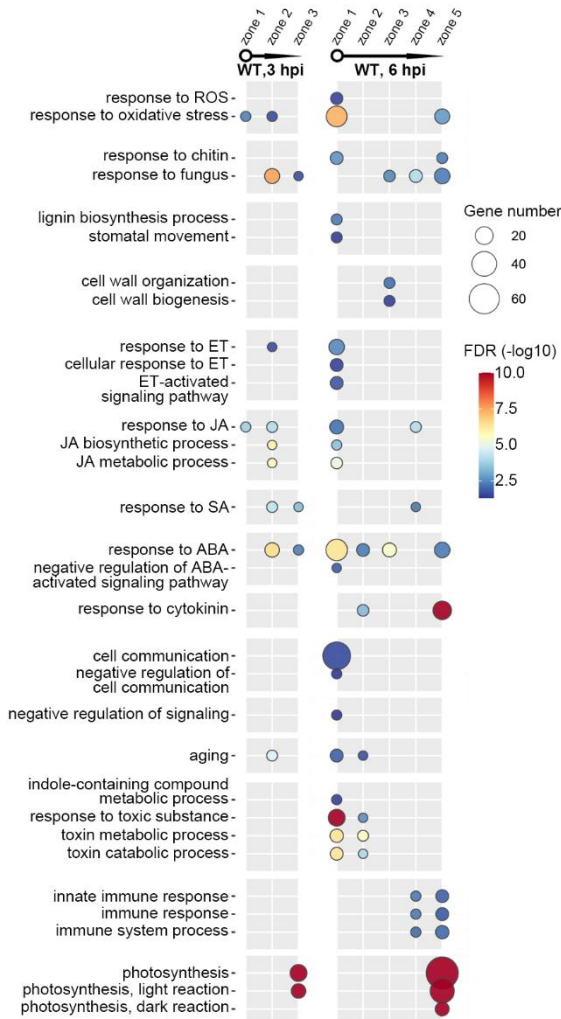


图 3-5. WT 的 3 hpi 和 6 hpi 的基因 GO 富集分析的比较。

注：所有数据均来自于 AgriGO v2 在线网站分析。植物 3 hpi 时间点的 164 个基因分为 3 个区域(zones)，即 zone 1 ~ zone 3，植物 6 hpi 时间点的 942 个基因分为 5 个区域(zones)，即 zone 1 ~ zone 5。Zones 数值的排列意味着从侵染点附近逐渐远离的程度。分析结果的圆圈大小代表相应 GO 对应的基因数量(gene number)，颜色则代表 GO 富集的 FDR(false discovery rate)。

3.3 染色质重塑因子 INO80 参与植物对灰霉菌侵染的应答

3.3.1. *ino80* 突变体植物对灰霉菌的敏感性下降

我们比较了染色质重塑因子 *ino80* 突变体与野生型(WT)对灰霉菌侵染的敏感性,发现 *ino80* 突变体敏感性下降(图 3-6A)。无论从菌斑大小的增长速度(图 3-6B),还是灰霉菌单拷贝基因 *Cutinase* (*Bc cut-A*)相对含量的上升(图 3-6C), 都说明 *ino80* 突变体相对于野生型(WT)对灰霉菌更抵抗。

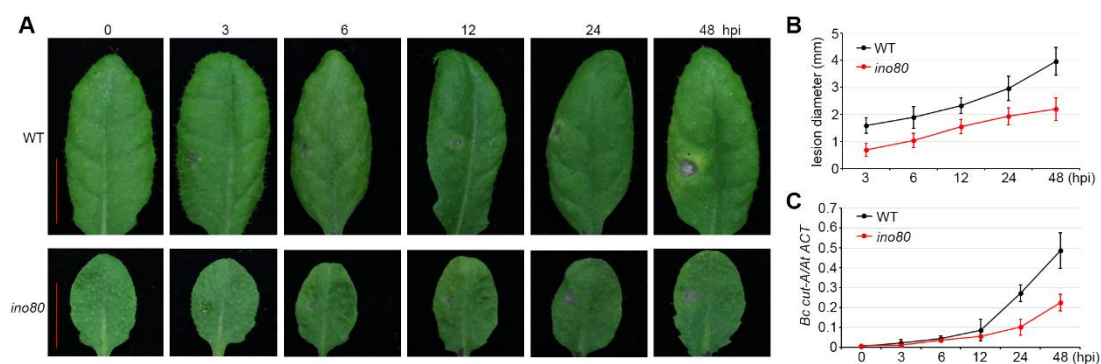


图 3-6. 灰霉菌侵染野生型(WT)和 *ino80* 突变体植物的比较

(A)坏死性病原菌灰霉菌侵染点在不同时间时的特写。Bar=10 mm。

(B)不同侵染时间的灰霉菌病斑大小统计。20 个生物学重复的平均值和方差被呈现出来。

(C)通过定量PCR展现出灰霉菌单拷贝基因 *Cutinase* (*Bc cut-A*)相对于拟南芥自身持家基因 *ACTIN* (*At ACT*)的相对含量。3 个生物学重复的平均值和方差被呈现出来。

3.3.2. *ino80* 突变体植物影响大量植物应答灰霉菌病原体的基因的空间分布

我们将经历相同病原菌处理的 *ino80* 突变体叶片也做了包埋切片并送公司测序。测序质检结果同样达标(图 3-7)。

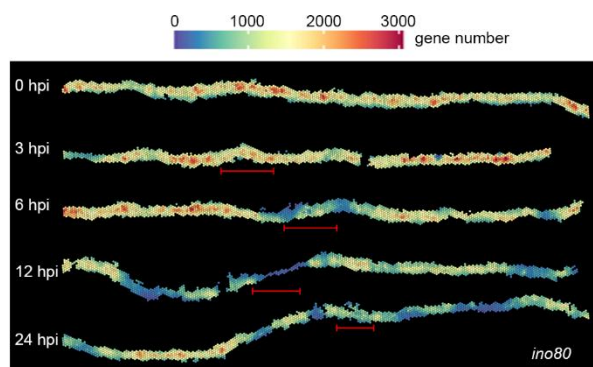


图 3-7. 不同侵染时期的野生型(WT, wild type)拟南芥叶片的测序结果。

注：hpi (hours post-infection)指的是灰霉菌侵染后的时间。红色标尺代表的是不同叶片对应的病原菌侵染点，该位点由测序前叶片染色结果标记得到的。

我们选取了 *ino80* 突变体 6 hpi 的样品，与 WT 植物 6 hpi 的样品进行比较。根据类似的筛选规则，公司技术人员筛选出 *ino80* 突变体 6 hpi 的样品 460 个基因。同样地，这些基因分为 5 个区域(zones)，即 zone 1 ~ zone 5。Zone 数值越小，越靠近侵染点，而 zone 数值越大，越远离侵染点。我们利用 AgriGO v2 对这些有空间分布特征的基因做了 GO(Gene Ontology)生物过程(biological process)富集分析(图 3-8)。

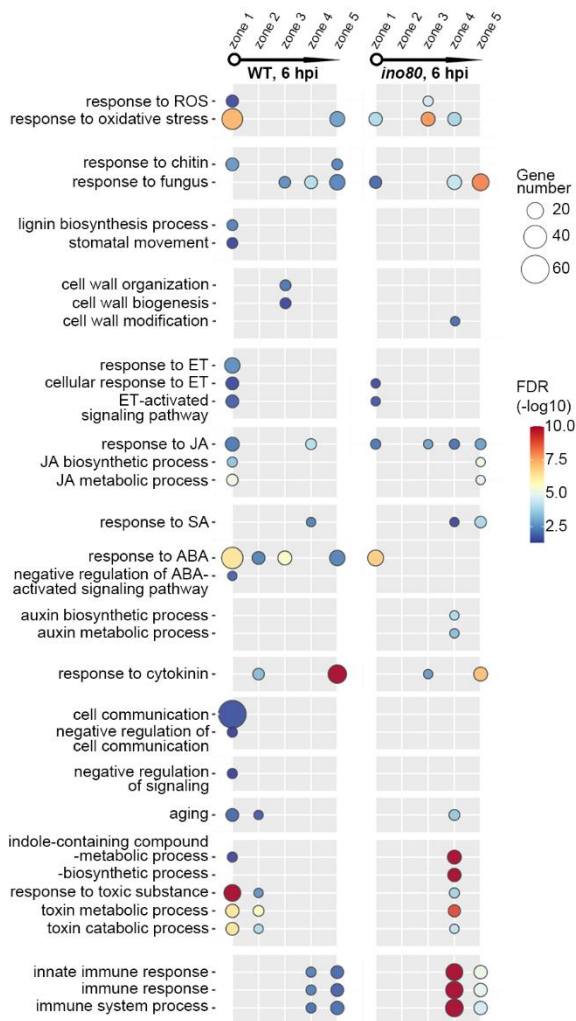


图 3-8. WT 的 6 hpi 和 *ino80* 突变体的 6 hpi 的基因 GO 富集分析比较。

注：所有数据均来自于 AgriGO v2 在线网站分析。野生型植物 6 hpi 时间点的 942 个基因分为 5 个区域(zones), 即 zone 1 ~ zone 5。 *ino80* 突变体 6 hpi 时间点的 460 个基因也分为 5 个区域(zones), 即 zone 1 ~ zone 5。 Zones 数值的排列意味着从侵染点附近逐渐远离的程度。分析结果的圆圈大小代表相应 GO 对应的基因数量 (gene number), 颜色则代表 GO 富集的 FDR(false discovery rate)。

从上述 GO 分析结果来看, *ino80* 突变体尽管在 6 hpi 有了 ROS 应答, 但在空间上处于相对较远的 zone 3 位置, 这表明突变体背景下, ROS 并没有出现在侵染点附近, 而是在远端出现。为了验证这点, 我们调取了 ROS sensing 的标记

基因 *UGT74E2* (AT1G05680)的分布图，该基因可以被 ROS 主要成分 H_2O_2 快速有效地诱导，因为该基因的空间分布可以指示 ROS 的产生(Tognetti et al., 2010)。我们发现 *ino80* 突变体背景下，*UGT74E2* 的转录水平急剧下降，这表明 ROS 无法在 *ino80* 突变体内有效生成(图 3-9)。

由于 ROS 可以扩散，植物细胞同样也会通过清除 ROS(ROS scavenging)的途径，如过氧化氢酶分解过氧化氢，从而在一定空间上(防护带，隔离病原菌侵染位置)缓解扩散的 ROS 对旁侧植物细胞的误杀。这一功能在 GO 富集中体现为 response to oxidative stress。我们看到 *ino80* 突变体在更多的范围内启动了类似的基因。我们调取了 *CAT3* (AT1G20620)的分布图。该基因编码植物主要用于消除 H_2O_2 的代谢酶之一 (Su et al., 2018)。我们发现野生型背景下，*CAT3* 表达分布在 *UGT74E2* 两侧，意味着防护带的建立；而在 *ino80* 背景下，*CAT3* 表达量反而上调，并更为广泛地分布在多个 zones。这可能导致 *ino80* 叶片中 ROS 含量进一步的降低(图 3-9)。

有意思的是，*ino80* 突变体内大量与 SA 和 JA 途径相关的基因的分布发生错乱。我们调取了 SA 途径的标记基因 *PRI* (AT2G14610), JA 途径的标记基因 *LOX4* (AT1G72520), *MYC2* (AT1G32640), *VSP2* (AT5G24770) 以及 *WRKY75* (AT5G13080), 无论是表达量，还是分布的规律，都发生了很明显的改变。*PDF1.2* (AT5G44420)是研究得非常透彻的植物抵御灰霉菌的防御蛋白，我们发现 *PDF1.2* 在 *ino80* 突变体内高度激活，这与突变体对灰霉菌敏感性下降是一致的(图 3-9)。

我们意外地发现，植物大量的用于抵御真菌的抵御蛋白的基因，虽然没有在 *ino80* 突变体的侵染点附近被激活，但在旁侧 zones 内被高度激活。我们推测没有在侵染点附近被激活，这与病原菌灰霉菌没有快速增殖的表型有关，但旁侧高度被激活，这可能与 *INO80* 功能缺失有关。换言之，*INO80* 本身抑制了病原菌侵染点远侧的毒性蛋白的表达和分泌，防止这些毒性蛋白对于植物自身生长的影响。

为了验证这一点，我们调取了 *PAD3* (AT3G26830)的分布图。*PAD3* 是植物合成植物性毒素 camalexin 的关键酶，而 camalexin 可以对灰霉菌有着杀菌效果，同时也对植物本身有抑制作用。我们发现 *PAD3* 在 *ino80* 突变体更广泛的区域被

高表达(图 3-9)，这与 *ino80* 突变体对灰霉菌更抵抗也是一致的。Camalexin 需要通过细胞膜上的转运蛋白 PDR8 和 PDR12 排出体外，从而杀死病原菌(He et al., 2019)。我们发现这两个基因与 *PAD3* 类似，在 *ino80* 突变体内的表达量异常偏高，并且异位分布，这意味着 *ino80* 突变体更容易将毒物排出体外从而保护自己并且杀死病原菌。

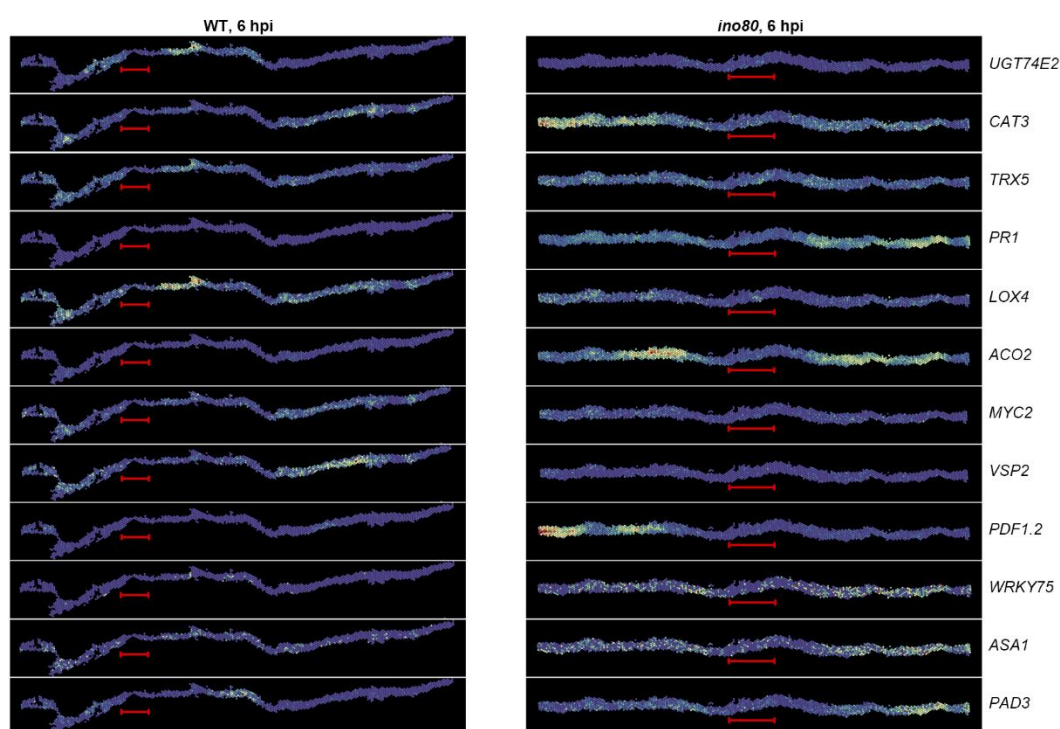


图 3-9. 若干个基因在 WT 的 6 hpi 和 *ino80* 突变体的 6 hpi 的表达量和分布的比较。

注:所有图片均从公司的数据库中调取,表达量已经做了均一化处理,WT 和 *ino80* 之间可以直接比较。

3.3.3. *ino80* 突变体植物的若干表型

由于 ROS 可以杀死植物细胞，而死亡的植物细胞有利于坏死性病原菌灰霉菌的增殖，因此 ROS 并没有快速集中爆发，这与灰霉菌在 *ino80* 突变体里不能快速增殖是一致的。我们利用 DAB 显色试剂盒和台盼蓝法分别验证植物叶片中的 ROS 含量(图 3-10A)和细胞死亡(图 3-10B)。与我们在空间转录组中 ROS 的发现一致，ROS 在野生型植物叶片的侵染点附近快速出现，并且快速扩散，在 48 hpi 时期几乎占据整个视野，但 ROS 的生成在 *ino80* 突变体背景下受到了极大的抑制。与此相应的是，细胞死亡也在 *ino80* 突变体背景下受到了极大的抑制，这与 *ino80* 突变体对灰霉菌的进一步增殖受阻是一致的，因为细胞死亡有利于灰霉菌增殖，而受抑制的细胞死亡是不利于灰霉菌侵染的。

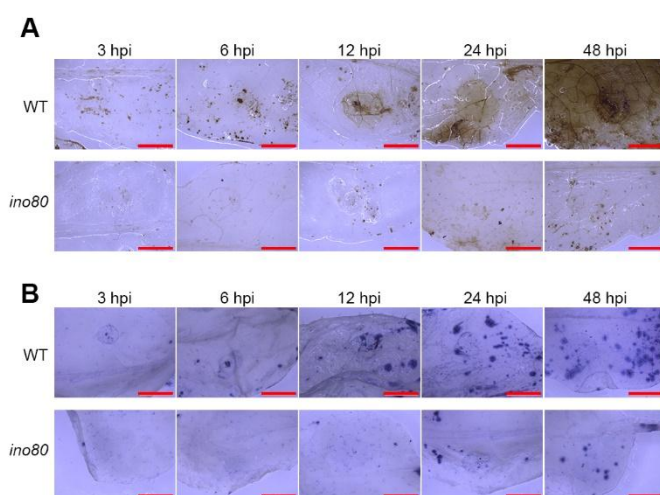


图 3-10. ROS 生成和细胞死亡在 *ino80* 突变体内受到明显抑制。

(A)DAB 显色试剂盒显示 ROS 的生成(褐色物质的生成)

(B)台盼蓝法显示细胞死亡(蓝色斑点的形成)

我们将外源的 camalexin 加入植物培养基，观察植物对外源 camalexin 的敏感性。Camalexin 对植物生长本身也有明显的抑制作用，野生型植物的湿重在不同浓度的 camalexin 处理下急剧下降。相比较之下，*ino80* 突变体对外源 camalexin

不敏感，湿重下降也不明显，这与 *ino80* 突变体表达更多的转运蛋白，从而更有效地排出 camalexin 从而降低毒性带来的伤害是一致的(图 3-11)。

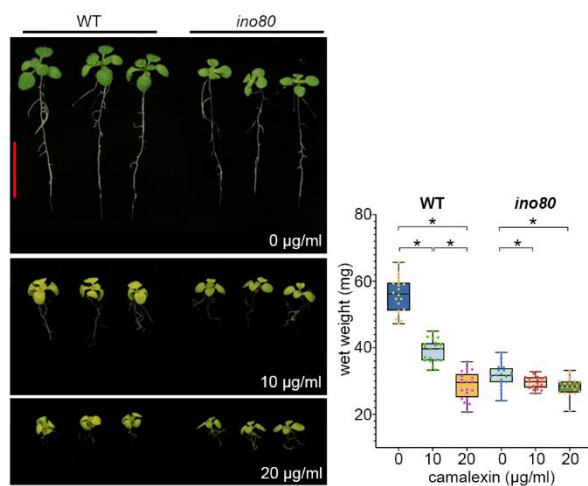


图 3-11. 相对于野生型植物，*ino80* 突变体对外源性 camalexin 不敏感。

注：植物在含有不同浓度 camalexin 的培养基中生长 12 天，然后称取湿重数据并且拍照。

4. 讨论

植物病害对粮食安全造成巨大影响，是全球关注的问题。植物已经进化出复杂而敏感的保护系统来对抗病原体(Yang et al., 2022)。植物病原体的毒力(virulence)和致病性(pathogenicity)往往取决于宿主植物细胞的应答，因此系统性地描述植物细胞在时空维度上基因转录组变化，有助于更好地了解植物对生物胁迫反应的遗传和分子机制，并改善植物病症诊断，并为未来高效的基因编辑和技术开发提供理论和技术平台的支持(AbuQamar et al., 2017)。

我们本次的研究是利用前沿的空间转录组探索坏死性病原菌灰霉菌感染植物叶片过程中植物基因的时空变化。我们发现，尽管病原菌在叶片上造成的菌斑在 3 hpi 时期已经比较明显，但植物并未大规模地产生具有空间分布的基因排列。少量出现的基因仅仅在 SA-JA-ET 途径中有比较小的富集。这暗示植物最早对灰霉菌的应答源自于这些通路的改变，也可能不排除灰霉菌利用这些通路从而实现后续的定殖过程。野生型不同时期基因的对比表明，其它通路，尤其是植保素 camalexin 为代表的植物代谢，以及最重要的 cell communication，是植物后续应答的主要部分。

我们深入探索了染色质重塑因子 *ino80* 对于灰霉菌感染的表型以及相应的空间转录组。大量通路的关键基因的空间转录谱在突变体内发生改变，表明染色质重塑的活性参与了植物从全基因组层面对灰霉菌的应答。后续的研究将深入探索关键靶基因的局部染色质结构特征，从而寻找到 INO80 作为染色质重塑因子在染色质水平调控植物应答灰霉菌对的分子机制。

5. 参考文献

- AbuQamar, S., Moustafa, K., and Tran, L.S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Crit Rev Biotechnol* 37, 262-274.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., and Fukuda, H. (2018). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 59, 8-16.
- Birkenbihl, R.P., Diezel, C., and Somssich, I.E. (2012). *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* 159, 266-285.
- Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., and Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 103, 10-23.
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., and Li, X. (2020). The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*-Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* 9.
- El Oirdi, M., El Rahman, T.A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F., Vojnov, A., and Bouarab, K. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* 23, 2405-2421.
- He, Y., Xu, J., Wang, X., He, X., Wang, Y., Zhou, J., Zhang, S., and Meng, X. (2019). The *Arabidopsis* Pleiotropic Drug Resistance Transporters PEN3 and PDR12 Mediate Camalexin Secretion for Resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Cell* 31, 2206-2222.
- Kang, H., Liu, Y., Fan, T., Ma, J., Wu, D., Heitz, T., Shen, W.H., and Zhu, Y. (2022). *Arabidopsis* CHROMATIN REMODELING 19 acts as a transcriptional repressor and contributes to plant pathogen resistance. *Plant Cell* 34, 1100-1116.
- Lukan, T., and Coll, A. (2022). Intertwined Roles of Reactive Oxygen Species and Salicylic Acid Signaling Are Crucial for the Plant Response to Biotic Stress. *Int J Mol Sci* 23.
- Macioszek, V.K., Jecz, T., Ciereszko, I., and Kononowicz, A.K. (2023). Jasmonic Acid as a Mediator in Plant Response to Necrotrophic Fungi. *Cells* 12.
- March-Diaz, R., Garcia-Dominguez, M., Lozano-Juste, J., Leon, J., Florencio, F.J., and Reyes, J.C. (2008). Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *Plant J* 53, 475-487.
- Saleem, M., Fariduddin, Q., and Castroverde, C.D.M. (2021). Salicylic acid: A key

- regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol Biochem* 168, 381-397.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18842-18847.
- Stroud, E.A., Jayaraman, J., Templeton, M.D., and Rikkerink, E.H.A. (2022). Comparison of the pathway structures influencing the temporal response of salicylate and jasmonate defence hormones in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 13, 952301.
- Su, T., Wang, P., Li, H., Zhao, Y., Lu, Y., Dai, P., Ren, T., Wang, X., Li, X., Shao, Q., et al. (2018). The *Arabidopsis* catalase triple mutant reveals important roles of catalases and peroxisome-derived signaling in plant development. *J Integr Plant Biol* 60, 591-607.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., et al. (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* 22, 2660-2679.
- Tsuda, K., and Somssich, I.E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol* 206, 932-947.
- Yang, Q., Yang, J., Wang, Y., Du, J., Zhang, J., Luisi, B.F., and Liang, W. (2022). Broad-spectrum chemicals block ROS detoxification to prevent plant fungal invasion. *Curr Biol* 32, 3886-3897 e3886.

6. 致谢

首先我要感谢我的指导老师朱炎老师和康惠嘉博士后，他们指引我找到了感兴趣的研究课题，真实第感受到了微生物与植物之间复杂而又神秘的交互过程，他们在实验过程中对我进行了详尽的指导，也对我在论文撰写过程中给予了耐心而又专业的意见。感谢上海市交大附中的程亮老师平时的倾囊相授，让我燃起对生物学的兴趣。最后还要感谢我的爸爸妈妈对我的养育和给了我最大的信任，支持我在学科竞赛中探索课本上没有的知识。