#### PHÂN TÍCH PHIÊN MÃ ĐỘ DÀI ĐẦY ĐỦ CỦA CÙNG BỘ GEN ĐẬU TƯƠNG VỚI CÁC PHẢN ỨNG TƯƠNG THÍCH VÀ KHÔNG TƯƠNG THÍCH VỚI HETERODERA GLYCINES CHO THÂY LÂY NHIỄM TUYẾN TRÙNG KÍCH HOẠT PHẢN ỨNG BẢO VỆ CỦA THỰC VẬT

Minghui Huang<sup>1</sup>, Ye Jiang<sup>1,2</sup>, Ruifeng Qin<sup>1,2</sup>, Dan Jiang<sup>1,2</sup>, Doudou Chang<sup>1,2</sup>, Zhongyan Tian<sup>2</sup>, Chunjie Li<sup>1</sup> và Congli Wang<sup>1</sup> Võ Như Cầm biên dịch

<sup>1</sup>Phòng thí nghiệm Key về chọn giống thiết kế phân tử đậu tương, Viện Địa lý và Nông học Đông Bắc, Học viện Khoa học Trung Quốc, Cáp Nhĩ Tân, Trung Quốc <sup>2</sup>Học viện Khoa học Nông nghiệp Hắc Long Giang, Đại Khánh, Trung Quốc

#### TÓM TẮT

Giải trình tư phiên mã có đô dài đầy đủ với các bài đọc dài là một công cu manh mẽ để phân tích các sự kiện phiên mã và sau phiên mã; tuy nhiên, nó đã không được áp dụng trên đậu tương (Glycine max). Ở đây, một phân tích phiên mã tương đối có chiều dài đầy đủ được thực hiện trên kiểu gen đậu tương 09-138 bị nhiễm tuyến trùng nang đậu tương (SCN, Heterodera glycines) chủng 4 (SCN4, phản ứng không tương thích) và chủng 5 (SCN5, phản ứng tương thích) bằng cách sử dụng Công nghệ Oxford Nanopore. Mỗi mẫu trong số 9 mẫu có chiều dài đầy đủ được thu thập 8 ngày sau khi cấy có/không có tuyến trùng tao ra trung bình 6,1Gb dữ liêu sach và tổng số 65.038 trình tư phiên mã. Sau khi loai bỏ các bản sao thừa, 1.117 gen mới và 41.096 bản sao mới đã được xác đinh. Bằng cách phân tích cấu trúc trình tư của các bản sao mới la, có tổng công 28.759 trình tư khung đoc mở (ORF) hoàn chỉnh, 5.337 yếu tố phiên mã, 288 RNA dài không mã hóa và 40.090 phiên mã mới với chú thích chức năng đã được dư đoán. Gene Ontology (GO) và Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) phân tích làm giàu các gen biểu hiện khác biệt (DEG) cho thấy rằng hormone tăng trưởng, con đường tín hiệu được kích hoạt bởi auxin và tăng trưởng tế bào đa chiều, và con đường sinh tổng hợp phenylpropanoid được làm giàu bằng cách nhiễm cả hai chủng tuyến trùng. Nhiều DEG liên quan đến các yếu tố phản ứng với căng thẳng, con đường dẫn truyền tín hiệu hormone-thực vật và con đường tương tác giữa thực vật - mầm bệnh với nhiều điều chỉnh hơn được phát hiện trong phản ứng không tương thích với lây nhiễm SCN4 và phát hiện nhiều DEG có điều chỉnh liên quan đến quá trình biến đổi thành tế bào và xử lý sinh học carbohydrate trong phản ứng tương thích với lây nhiễm SCN5 khi so sánh với nhau. Trong số đó, các DEG chồng chéo với sự khác biệt về số lượng đã được kích hoạt. Sự kết hợp tương tác giữa protein-protein với DEGs lần đầu tiên chỉ ra rằng nhiễm tuyến trùng đã kích hoạt tương tác giữa yếu tố phiên mã WRKY và VQ (valine-glutamine motif) để góp phần bảo vệ đậu tương. Kiến thức về cơ chế tương tác SCN-đậu tương làm mô hình sẽ giúp hiểu rõ hơn về các tương tác khác giữa thực vật và tuyến trùng.

**Từ khóa:** giải trình tự phiên mã chiều dài đầy đủ, glycine max, Heterodera glycines, phản ứng tương thích và không tương thích, tương tác VQ – WRKY

#### GIỚI THIỆU

Tuyến trùng nang đậu tương (SCN, *Heterodera glycines* Ichinohe) là một trong những bệnh kinh tế quan trọng nhất trên cây đậu tương (*Glycine max* L. Merrill) trên toàn thế

giới. Phân tích thống kê mới nhất ước tính thiệt hại kinh tế lũy kế do dịch bệnh ở 28 bang của Hoa Kỳ từ năm 1996 đến năm 2016 chỉ ra rằng SCN chiếm 23,2% tổng thiệt hại (73.535 USD/ha), được xếp hạng cao nhất, lớn hơn nhiều so với bệnh thứ hai là thối nhũn (10%) (Bandara và cs, 2020). Tại Trung Quốc, thiệt hại kinh tế hàng năm đối với đậu tương có thể lên tới 120 triệu đô la Mỹ (Li Y. và cs, 2011). SCN là tuyến trùng sống ít vận động trong đất ký sinh trên rễ cây đậu tương. Trong giai đoạn di chuyển tự do duy nhất của SCN, con non giai đoạn hai (J2) nở ra từ trứng (con non giai đoạn đầu bên trong trứng) để tìm kiếm rễ vật chủ thông qua các tín hiệu phát ra từ rễ cây, di chuyển đến ngọn rễ và xâm nhập rễ bằng cách sử dụng một mũi nhọn. J2 di chuyển bên trong rễ, thiết lập vị trí cho ăn và lập trình lại các tế bào rễ vật chủ bằng cách hướng các chất tiết của tuyến tiết vào thực vật có thể làm tan thành tế bào và dung hợp nguyên sinh chất của các tế bào lân cận, và cuối cùng hình thành một cấu trúc nuôi dưỡng độc đáo gọi là hợp bào làm nguồn dinh dưỡng cho sự phát triển của tuyến trùng, do đó ngăn cản sự phát triển của cây và ảnh hưởng đến năng suất (Niblack và cs, 2006; Mitchum và Baum, 2008).

Sự kháng thuốc của cây ký chủ kết hợp với luân canh cây trồng là cách hiệu quả nhất để kiểm soát SCN. Hơn 300 locus tính trạng số lượng (QTLs) liên quan đến tính kháng SCN được lập bản đồ tới 20 nhiễm sắc thể (chr) (soybase.org), nhưng chỉ có hai gen kháng chính, rhg1 trên nhiễm sắc thể (chr) 18 và Rhg4 trên chr 8, được nhân bản và đặc trưng (Cook và cs, 2012, 2014; Liu và cs, 2012, 2017). Sự hiện diện của nhiều QTL nhỏ góp phần vào tính kháng ở cây đậu tương kháng hoặc mẫn cảm làm cho việc nhân giống kháng khó khăn hơn dư kiến (Huang và cs, 2021). Hơn nữa, sư thay đổi về độc lực đã làm giảm hoặc mất khả năng đề kháng do việc trồng lâu dài một nguồn giống kháng đơn lẻ, ví du, 90% các nguồn kháng thuốc có nguồn gốc từ PI88788 ở Hoa Kỳ và chủ yếu là các nguồn kháng thuốc Bắc Kinh ở Trung Quốc (Mitchum và cs, 2007; Niblack và cs, 2008; Acharya và cs, 2016; Hua và cs, 2018; Huang và cs, 2022). Hon nữa, Peking và PI88788 chỉ hiển thi khả năng chống một số chủng SCN hoặc loại HG. Việc thiếu các nguồn kháng thuốc rộng rãi và sự hiện diện của nhiều chủng SCN hoặc các loại HG trên đồng ruộng dẫn đến việc SCN lây lan rộng rãi và nhanh chóng. Do đó, hiểu được cơ chế phân tử của sự lây nhiễm SCN và tính kháng của cây trồng sẽ có thêm hiểu biết để phát triển các chiến lược kiểm soát mới, bao gồm cả việc thiết kế các gen ứng viên quan trọng để tăng sức đề kháng.

Thực vật đã tiến hóa để phát triển hai lớp của hệ thống miễn dịch phòng thủ mầm bệnh: lớp đầu tiên là mô hình phân tử liên quan đến mầm bênh hoặc vi khuẩn (PAMP/MAMP) được kích hoạt miễn dịch (PTI); lớp thứ hai là miễn dịch kích hoạt tác dụng (ETI), phù hợp với khả năng kháng bệnh cụ thể theo loài (Dangl và Jones, 2001; Eitas và Dangl, 2010; Monaghan và Zipfel, 2012). Bề mặt thành tế bào thực vật có chứa các thu thể nhận dang mẫu (PRR) có thể phát hiện mầm bệnh hoặc cấu trúc vi khuẩn để kích hoạt PTI và phytohormone là các phân tử tín hiệu liên quan đến phòng thủ, chẳng han như axit salicylic (SA), axit jasmonate (JA), ethylene (ET), khiến thực vật sản sinh ra các protein liên quan đến sinh bệnh học (PR), ví dụ,  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase, chất ức chế giống oxidase, thionin, và proteinase, v.v. (Sels và cs, 2008). ETI được bắt đầu bởi các protein lặp lại vùng protein liên kết nucleotide nôi bào (NLRs) để tao ra phản ứng quá nhay cảm (HR) với sự chết của tế bào cục bô (Eitas và Dangl, 2010). PTI và ETI được kích hoạt bởi hai lớp thụ thể khác nhau trong tín hiệu sớm, nhưng bằng chứng gần đây cho thấy rằng PTI và ETI có thể xuyên âm trong phản ứng xuôi dòng, mặc dù cách chúng góp phần vào khả năng miễn dịch với đầu ra định lượng và/hoặc định tính vẫn chưa được xác định (Naveed và cs, 2020; Yuan và cs, 2021). Phân tích phiên mã của các hệ thống bệnh khác nhau biểu thị rằng cả tương tác tương thích và không tương thích đều có thể gây ra sự thay đổi chồng chéo của biểu hiện gen nhưng có sự khác biệt về số lượng (Mine và cs, 2018; Yuan và cs, 2021).

Các nghiên cứu đã được thực hiện trên các tương tác tương thích và không tương thích giữa SCN và rễ đậu tương dựa trên phân tích microarray và hệ phiên mã RNA-seq (Ithal và cs, 2007; Klink và cs, 2007; Puthoff và cs, 2007; Klink và Matthews, 2009 ; Kandoth và cs, 2011; Li X. và cs, 2011; Li và cs, 2012, 2018; Mazarei và cs, 2011; Wan và cs, 2015; Zhang và cs, 2017; Kang và cs, 2018; Neupane và cs, 2019; Song và cs, 2019; Jiang và cs, 2020; Miraeiz và cs, 2020). Tất cả các chú thích về trình tự đều cho thấy rằng sự lây nhiễm SCN có thể gây ra hoặc ngăn chặn sự biểu hiện gen ở các giống cây trồng mẫn cảm hoặc kháng thuốc và một loạt các gen bảo vệ (*PPRs* và *NLR*s), dòng tín hiệu MAPK (mitogen-hoạt hóa protein kinase), các yếu tố phiên mã *WRKY* và *MYB* (TFs), gen protein sốc nhiệt (*HSP*), gen *PR*, và gen chuyển hóa phenylpropanoid đã được xác định nhưng với phương sai tùy thuộc vào chủng SCN/loại HG và loại thực vật.

Giải trình tự RNA (RNA-seq) dựa trên giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) thông lượng cao (ví dụ: Illumina) đã được sử dụng rộng rãi để đo lường sự biểu hiện gen khác biệt vì nó là một công nghệ tiên tiến và hiệu quả về chi phí (Finotello và Di Camillo, 2015). Tuy nhiên, RNA-seq yêu cầu phân mảnh RNA hoặc cDNA để tạo ra các lần đọc ngắn khi chuẩn bị mẫu, điều này làm giảm thông tin từ các bản sao có đô dài đầy đủ ban đầu; do đó, khó có được các sự kiện xử lý sau phiên mã/đồng phiên mã chịu trách nhiệm tạo ra một phân tử RNA trưởng thành có thể rời khỏi nhân để hoạt động trong tế bào bằng cách thay đổi cấu trúc hóa học của phiên mã sơ cấp RNA (Kiss, 2001). Giải trình tư nâng cao chê phiên mã có đô dài đầy đủ với các lần đọc dài hơn sẽ tránh được những thách thức này. Hiên tai, PacBio và Oxford Nanopore (ONT) là công nghê giải trình tư có đô dài đầy đủ thế hệ thứ 3 phổ biến nhất có thể cung cấp phiên mã phức tạp hơn và tiết lô cấu trúc thực của các trình tự trong quá trình phiên mã, chẳng hạn như nối thay thế (AS), polyadenyl hóa thay thể (APA) và RNA dài không mã hóa (lncRNA) và dung hợp gen, có thể làm tăng độ phức tạp của transcriptome và proteome. So với giải trình tự PacBio, ONT sử dụng phương pháp phong tỏa dòng ion để trình tự trực tiếp các phân tử DNA bản địa dài hơn hoặc các phân tử RNA có chiều dài đầy đủ hơn (Cui và cs. 2020; Xie và cs. 2021). AS, một trong những bước quan trọng trong quá trình sửa đổi sau phiên mã, có thể nhận biết và loại bỏ các vùng bên trong của RNA thông tin tiền thân (pre-mRNA) để tạo ra nhiều mRNA nhằm điều chỉnh sư biểu hiên gen, do đó thúc đẩy sư đa dang của proteome. AS đóng những vai trò quan trọng không chỉ trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật mà còn để đáp ứng với các kích thích hoặc sự thích nghi sinh học hoăc phi sinh hoc (Matsukura và cs. 2010; Seving và cs. 2012; Syed và cs. 2012; Mandadi và Scholthof, 2015; Wang và cs, 2018; Bedre và cs, 2019; Martín và cs, 2021). APA có thể tao ra nhiều đồng dang polyadenyl hóa mRNA thông qua sư phân cắt endonucleolytic trước mRNA và bổ sung đuôi poly (A) ở đầu vi trí phân cắt 3' của một bản sao mới để thay đổi đô dài của các vùng chưa được dịch (UTR) hoặc các vùng mã hóa có thể ảnh hưởng đến sư ổn đinh của mRNA, hiệu quả dịch mã, bản địa hóa dưới tế bào, hoặc tăng hoặc giảm chức năng gen. Do đó, tất cả những thay đổi này sẽ dẫn đến các quá trình sinh lý và sinh hóa thực vật khác nhau (Yeh và Yong, 2016; Sadek và cs, 2019; Zhang và cs, 2020; Tu và cs, 2021); ví dụ, APA tham gia vào quá trình sửa đổi thành tế bào, phát triển lông rễ, sửa chữa DNA và điều chỉnh gen để phản ứng với các căng thẳng phi sinh học và sinh học (Cao và cs, 2019; Ye và cs, 2019; Yan và cs, 2021). Các LncRNA dài hơn 200 nucleotide là các chất điều hòa biểu sinh điều chỉnh sư biểu hiện gen bằng cách tương tác với mRNA, DNA, protein và miRNA để tham gia vào các quá trình sinh học như tăng trưởng và phát triển thực vật cũng như các phản ứng căng thẳng sinh học và phi sinh học (Budak và cs, 2020; Yu et cs, 2020; Tu và cs, 2021; Urquiaga và cs, 2021).

Việc áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen phiên mã có chiều dài đầy đủ ở thực vật bị hạn chế so với giải trình tự thế hệ thứ hai vì chi phí cao hơn. Hiện tại, giải trình tự gen phiên mã có chiều dài đầy đủ để suy ra và cải thiện mô hình gen và xác định các gen mới đã được báo cáo trên lúa, lúa mì, ngô, bông, hồ đào, cây dương và những loại khác nhưng không phải trên đậu tương (Clavijo và cs, 2017; Wang và cs, 2018; Zhang và cs, 2019; Zhao và cs, 2019; Li C. và cs, 2020; Yang và cs, 2021).

Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã chứng minh rằng dòng đậu tương 09-138, phát triển ở đông bắc Trung Quốc, mang các locus rhg1-a và Rhg4-b và có khả năng kháng chủng SCN4 (SCN4, HG type 1.2.3.5.6.7) nhưng có tính nhạy cảm đến chủng SCN5 (SCN5, loại HG 2.5.7), khác với nền kháng cự của Bắc Kinh (rhg1-a + Rhg4-a) và PI88788 (rhg1-b + Rhg4-b) (Hua và cs, 2018; Huang và cs, 2022). Chúng tôi công nhận rằng sự khác biệt về phản ứng đối với hai chủng SCN nên liên quan đến các phản ứng phiên mã riêng biệt trong giai đoạn đầu của nhiễm trùng tuyến trùng như đã mô tả ở trên. Để kiểm tra điều này, dòng 09-138 đã được cấy vào hai chủng SCN, và sự phát triển của tuyến trùng được quan sát bên trong rễ. Phân tích hệ phiên mã chiều dài đầy đủ tượng đối của các dòng đậu tương 09-138 bị nhiễm SCN4 (phản ứng kháng) và SCN5 (phản ứng mẫn cảm) được thực hiện bằng công nghệ ONT. Chúng tội đã điều tra các sự kiện AS và APA và xác đinh lncRNA và các yếu tố phiên mã trong các bản sao mới được phát hiện. Sau đó, các gen biểu hiện khác biệt (DEG) và bản sao (DET) được phân tích, và DEG liên quan đến các yếu tố phản ứng với căng thẳng được khám phá. Các thuật ngữ DEG-GO (Bản thể học) phong phú và các lô trình DEG-KEGG (Bách khoa toàn thư về gen và hệ gen của Kyoto) được so sánh giữa các phản ứng kháng và nhạy cảm. Các tương tác giữa protein và protein đã được dự đoán và một chế độ bảo vệ đã được thiết lập. Cuối cùng, sự biểu hiện của DEG đã được xác nhận bằng RT-PCR định lượng. So sánh giữa các phản ứng tương thích và không tương thích sẽ cung cấp cái nhìn sâu sắc về cơ chế kháng thuốc và xác đinh các gen đề kháng hoặc bảo vê ứng cử viên cho nghiên cứu sâu hơn.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu thực vật và nuôi cấy tuyến trùng

Dòng đậu tương 09-138 được phát triển bởi Học viện Khoa học Nông nghiệp Hắc Long Giang (Hua và cs, 2018). SCN chủng 4 (SCN4, HG loại 1.2.3.5.6.7) và SCN chủng 5 (SCN5, HG loại 2.5.7) ban đầu được thu thập từ đồng ruộng và được nuôi cấy từ các nang đơn trong hơn 5 thế hệ trên giống đậu tương mẫn cảm Dongsheng1 trong một nhà kính với 16 giờ ánh sáng và 8 giờ bóng tối ở 23–28°C, và sau đó được xác định bằng thử nghiệm chủng và đường chỉ thị loại HG (Hua và cs, 2018). Hàng năm, các loại/chủng tuyến trùng HG được xác nhận lại mà không thay đổi độc lực theo thời gian.

Một chất cấy tuyến trùng được chuẩn bị theo phương pháp được mô tả bởi Huang và cs. (2022). Mô rễ cây và đất được thu thập 35-40 ngày sau khi cấy và cho vào cốc 2 chữ L. Hỗn hợp được khuấy mạnh bằng đũa thủy tinh trong khoảng 1 phút và sau đó kết tủa trong 10 giây. Dịch của phần nổi phía trên được rót nhẹ nhàng vào các sàng lồng nhau 75/25µm. Hỗn hợp nang và mảnh vụn rễ trên đầu sàng được dùng nút cao su cọ xát để

nhả trứng. Trứng trên sàng 25µm được rửa bằng vòi nước áp suất cao trong 1 phút và sau đó bằng nước vô trùng trước khi thu. Sau đó, những quả trứng đã thu thập được chuyển lên sáu đến tám lớp giấy lụa được đỡ bởi màn kim loại trên đĩa nở có chứa 3mM ZnSO4 trong nước vô trùng để nở ở 28°C. J2s sau đó được thu thập để cấy sau 3-4 ngày.

#### Cấy tuyến trùng, nhuộm rễ và chuẩn bị rễ để tách chiết RNA

Hạt giống 09-138 được khử trùng bằng cách ngâm trong 0,5% natri hypoclorit trong 20 phút và rửa lại bằng nước vô trùng ba lần. Hai hạt được gieo trong một chậu nhựa đen (đường kính 8 cm x sâu 12 cm) chứa đầy đất và cát đã được khử trùng theo tỷ lệ 1:1. Sau 4 ngày, hai cây con được tỉa thưa thành một cây trong mỗi chậu. Cây con tám ngày được cấy vào hỗn dịch 1 ml chứa 2.000 J2 của SCN4 hoặc SCN5. Cây con được cấy với 1 ml nước làm đối chứng. Các cây được duy trì trong buồng sinh trưởng ở chế độ 16/8 giờ ngày/đêm, 28°C ngày/22°C đêm và độ ẩm tương đối 50%.

Rễ thu hái được nhuộm 3, 6, 8, 10 và 12 ngày sau khi được cấy bằng axit fuchsin (Byrd và cs, 1983). Sự phát triển của tuyến trùng bên trong rễ đã được quan sát, rễ và tuyến trùng được chụp ảnh dưới kính hiển vi soi phân tích Olympus SZX16 bằng phần mềm hình ảnh Tiêu chuẩn Cellsens (Olympus Corporation, Nhật Bản).

Để thu thập rễ để tách chiết RNA, rễ cây 8 ngày sau khi cấy đã được rửa sạch và tráng kỹ bằng nước. Ba rễ từ mỗi lần xử lý được quấn với nhau bằng lá nhôm như một bản sao (một mẫu). Ba lần lặp lại được thực hiện cho mỗi nghiệm thức. Tổng số 9 mẫu có kiểm soát và lây nhiễm SCN4- và SCN5 đã được thu thập. Ngay lập tức, mỗi mẫu đã chuẩn bị được đưa vào nitơ lỏng để làm đông và được giữ ở -80<sup>o</sup>C để tách chiết và giải trình tự RNA.

#### Tách chiết RNA, xây dựng thư viện cDNA và giải trình tự nanopore

RNA tổng số được chiết xuất bằng cách sử dụng RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hoa Kỳ) và DNase không chứa RNase (Qiagen) được sử dụng để loại bỏ sự ô nhiễm DNA trong RNA tổng số. Nồng độ, độ tinh khiết và tính toàn vẹn của RNA chiết xuất được đo bằng gel agar 1% (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) và Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Hoa Kỳ). Quá trình xây dựng thư viện cDNA bắt đầu với 1 µg RNA sử dụng bộ giải trình tự cDNA-PCR (SQK-PCS109) do Oxford Nanopore Technologies (ONT, Inc., Vương quốc Anh) cung cấp theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các thư viện cDNA cuối cùng đã được thêm vào các ô dòng FLO-MIN109 và chạy trên nền tảng PromethION tại Công ty Công nghệ Biomarker (Bắc Kinh, Trung Quốc) để giải trình tự. Các quy trình thử nghiệm bao gồm kiểm tra chất lượng mẫu, xây dựng thư viện, kiểm tra chất lượng thư viện theo các quy trình tiêu chuẩn do ONT cung cấp.

#### Xử lý dữ liệu thô để có được phiên mã có độ dài đầy đủ

Các lần đọc thô phải qua lọc với điểm chất lượng đọc trung bình  $\leq 7$  và độ dài đọc  $\leq 500$  bp, và RNA ribosome được lập bản đồ tới cơ sở dữ liệu rRNA cũng bị loại bỏ. Các trình tự mồi ở cả hai đầu của các lần đọc rõ được tìm kiếm để xác định các trình tự có độ dài đầy đủ, không phải là số (FLNC). Các bản sao FLNC được phát hiện sau đó được lập bản đồ tới bộ gen tham chiếu đậu tương Williams 82.a2.v11 với minimap2 (Li, 2018) để thu được các cụm FLNC và pinfish2 được áp dụng để đánh bóng từng cụm để đạt được đồng thuận đồng nhất. Tất cả các lần đọc được lập bản đồ tiếp tục được thu gọn bằng cách sử

dụng gói cDNA\_Cupcake với độ nhận dạng nhỏ là 90% và độ phủ nhỏ là 85%. Khi phiên mã thừa đã được thu gọn, sự khác biệt 5' không được xem xét. Các bảng phiên mã được so sánh với các phiên mã đã biết của bộ gen tham chiếu Williams 82.a2.v1 sử dụng gffcompare, và các phiên mã mới được xác định để tạo chú thích bộ gen bổ sung. Ranh giới gen đã được sửa đổi và các bản sao có mức biểu hiện  $\leq 1$  đã được lọc.

### Phân tích cấu trúc: Xác định Polyadenyl hóa thay thế, Bản sao dung hợp, Sự kiện nối thay thế và Marker tế bào vi mô

Polyadenyl hóa thay thế đã được xác định thông qua phân tích thêm FLNC bằng Đường ống phân tích phiên mã từ Giải trình tự đồng dạng (TAPIS) (Foissac và Sammeth, 2007). Tối đa hóa nhiều kỳ vọng để kích thích động lực (MEME) (Bailey và cs, 2006) được sử dụng để phân tích trình tự 50bp ngược dòng của vị trí poly A để phát hiện các mô típ FL. Trình tự đồng thuận trước khi phân tích loại bỏ dư thừa được sử dụng để phân tích phiên mã dung hợp. Phiên mã dung hợp được xác định theo các điều kiện sau: được căn chỉnh cho 2 hoặc nhiều vị trí; mỗi địa điểm bao gồm ít nhất 5% phiên mã với độ dài căn chỉnh tối thiểu 1bp; tổng độ dài chiếm hơn 95% tổng độ dài của phiên mã với khoảng cách ít nhất 10k bp giữa hai địa điểm.

Nối thay thế chỉ ra quá trình xử lý tiền mRNA. Phiên mã gen tạo ra tiền mRNA bằng nhiều phương pháp nối. Năm loại sự kiện nối thay thế (vị trí nối 3', vị trí nối 5', bỏ qua exon, lưu giữ intron và exon loại trừ lẫn nhau) của các bản sao được kiểm tra bằng cách sử dụng phần mềm Astalavista dựa trên kết quả căn chỉnh của từng mẫu riêng lẻ với bộ gen tham chiếu (Foissac và Sammeth, 2007). Phần mềm MIcroSAtellite (MISA, một công cụ nhận dạng) được sử dụng để phân tích SSR và các phiên mã dưới 500bp đã bị loại bỏ.

### Dự đoán trình tự mã hóa, Nhận dạng RNA dài không mã hóa và phát hiện yếu tố phiên mã từ bản sao mới lạ

Trình tự mã hóa (CDS) được dự đoán với TransDecoder (v3.0.0; Haas và cs, 2013) dựa trên ORF. LncRNA không mã hóa cho protein. Do đó, LncRNA trong các bản sao mới đã được dự đoán liệu nó có tiềm năng mã hóa hay không bằng phân tích miền protein bao gồm cả bốn phương pháp, Máy tính tiềm năng mã hóa (CPC) (Kong và cs, 2007), Chỉ số mã hóa không mã hóa (CNCI) (Sun và cs, 2013), Công cụ đánh giá tiềm năng mã hóa (CPAT) (Wang và cs, 2013) và họ Protein (Pfam) (Finn và cs, 2014). Các gen mục tiêu LncRNA được dự đoán bằng hai phương pháp: thứ nhất, tùy thuộc vào mối quan hệ vị trí giữa lncRNA biểu hiện khác biệt và mRNA liền kề (trong khoảng cách 100k bp) được biểu hiện khác biệt; thứ hai, theo sự bắt cặp cơ sở bổ sung giữa lncRNA và mRNA bằng cách sử dụng công cụ lncTAR (Li và cs, 2015). TF được phát hiện với iTAK (Zheng và cs, 2016).

#### Định lượng các mức độ phiên mã/biểu hiện gen và phân tích biểu hiện khác biệt

Các lần đọc chiều dài đầy đủ được lập bản đồ có chất lượng khớp > 5 đã được chọn để định lượng. Mức độ biểu hiện gen hoặc phiên mã được đo bằng số đếm trên một triệu (CPM) (Zhou và cs, 2014) và được tính toán như sau:

CPM = (số lần đọc khớp với phiên mã)/(tổng số lần đọc khớp với phiên mã được tham chiếu)  $\times$  106

Biểu hiện khác biệt giữa các nghiệm thức được phân tích với DESeq2 (Anders và Huber, 2010) tùy thuộc vào mô hình phân phối nhị phân âm, do đó thu được DEG hoặc DET. Tỷ lệ phát hiện sai (FDR) được điều chỉnh và kiểm soát bằng phương pháp của Benjamini và Hochberg (1995), và các DEG hoặc DETs với thay đổi log2fold (FC)  $\geq$  2 và FDR <0,01 đã được chọn. Bản đồ nhiệt cho các DEG trong mỗi nhóm được phát triển bằng cách sử dụng gói pheatmap trong R (Phiên bản 1.0.123).

# Chú thích chức năng và phân tích phong phú của các gen/phiên mã được biểu hiện khác nhau

Chú thích chức năng của các gen/phiên mã được tiến hành bằng cách cho nổ với cơ sở dữ liệu bao gồm NR (trình tự protein không dư thừa NCBI) (Deng và cs, 2006), Swissprot (Apweiler và cs, 2004), GO (Ashburner và cs, 2000), Nhóm các nhóm Orthologous (COG) (Tatusov và cs, 2000), Nhóm Ortholog euKaryotic (KOG) (Koonin và cs, 2004), Pfam (Kanehisa và cs, 2004), và KEGG (Mckenna và cs. , 2010).

Phân tích làm giàu bản thể học gen của DEG hoặc DET được thực hiện bằng cách sử dụng phân phối siêu đại đo không trung tâm Wallenius dựa trên gói GOseq R (Young và cs, 2010). Phân tích làm giàu lộ trình KEGG của DEG hoặc DET là đối tượng của phần mềm KEGG Orthology Based Annotation System (KOBAS) (Mao và cs, 2005). Tương tác protein-protein (PPI) cho tất cả các DEG được phát hiện đã được dự đoán bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu STRING4 và được hiển thị trong Cytoscape (Shannon và cs, 2003).

# Xác thực các gen biểu hiện khác biệt bằng phiên mã ngược định lượng theo thời gian thực-PCR

Các mẫu còn sót lai từ quá trình giải trình tư một bộ phân phiên mã có độ dài đầy đủ phải tuân theo qRT-PCR để xác minh DEG. Mồi được thiết kế bằng cách sử dụng phần mềm Primer Premier 5 (Lalitha, 2000) và được tổng hợp bởi Comate Bioscience Company Limited (Changchun, Trung Quốc). Tổng cộng 1 µg RNA đã qua xử lý đã được sử dụng để tổng hợp cDNA sợi đầu tiên bằng cách sử dụng FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix (TIANGEN, Trung Quốc). Phản ứng PCR được thực hiện trong Hệ thống LightCycler® 480 (Roche Life Science, Hoa Kỳ) với ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme Biotech Co., Ltd., Nam Kinh, Trung Quốc) theo quy trình của nhà sản xuất. PCR được thực hiện trong một thể tích 20 µl chứa 100 ng cDNA (2µl). PCR được thực hiện như sau: biến tính ban đầu trong 10 phút ở 95°C, tiếp theo là 40 chu kỳ hai bước ở 95°C trong 10 giây và sau đó ở 60°C trong 1 phút. Sư biểu hiên tương đối của các gen được thử nghiệm được tính toán bằng phương pháp  $-\Delta\Delta$ Ct sử dụng ACTIN làm đối chứng. Ba lần lặp lại sinh học độc lập và ba lần lặp lại kỹ thuật đã được thực hiện cho tất cả các thí nghiêm. Các đoan mồi được sử dung được liệt kệ trong Bảng bổ sung 1. Mối tương quan giữa giải trình tư phiên mã và qRT-PCR đã được hoàn thành trong Excel 2016 và thử nghiêm t-mẫu độc lập được thực hiện bằng SPSS 17.0.

#### KÊT QUẢ

# Sự phát triển khác biệt của *Heterodera glycines* chủng 4 và chủng 5 bên trong rễ của dòng 09-138 ở giai đoạn đầu

Các giai đoạn phát triển khác nhau của hai chủng, SCN4 (Hình 1A) và SCN5 (Hình 1B), đã được quan sát thấy ở rễ. Rễ đậu tương bị cả hai chủng tuyến trùng xâm nhập và không

có sự khác biệt rõ ràng về kích thước tuyến trùng vào ngày thứ 3 (Hình 1). Vào ngày thứ 6, hầu hết SCN5 đã phát triển đến giai đoạn J3 nhưng SCN4 vẫn ở giai đoạn J2. Tuyến trùng đã phát triển từ giai đoạn J3 đến giai đoạn cuối J4 ở rễ bị nhiễm SCN5 ở 8, 10 và 12 ngày (Hình 1B) khi so sánh với J2, J3, hoặc một vài giai đoạn đầu J4 ở rễ bị nhiễm SCN4 (Hình 1A), khẳng định 09-138 kháng SCN4 (số nang/cây,  $13 \pm$  SE 2,7; chỉ số cái, FI = 10) và mẫn cảm với SCN5 (số nang/cây,  $119 \pm$  SE 8.16; FI = 40) (Huang và cs, 2022). Quan sát thấy nhiều đốm nâu (phản ứng quá mẫn cảm) xung quanh một số vị trí ăn của tuyến trùng ở rễ kháng SCN4 hơn ở rễ có SCN5 (Hình 1A).



**Hình 1.** Sự phát triển của tuyến trùng nang đậu tương (A) chủng 4 (HG loại 1.2.3.5.6.7) và (B) chủng 5 (HG loại 2.5.7) bên trong rễ của kiểu gen đậu tương 09-138 tại 3, 6, 8, 10 và 12 ngày như được chỉ ra ở trên cùng của hình ảnh sau khi cấy 2.000 J2. Rễ bị nhuộm bằng axit fuchsin. Thanh chia độ =  $200\mu m$ .

# Thống kê trình tự một số phiên mã có độ dài đầy đủ Nanopore và Xóa dự phòng khỏi phiên mã

Vì sự khác biệt rõ ràng trong sự phát triển của tuyến trùng vào ngày thứ 8 được quan sát thấy ở 09-138, nên các mẫu rễ từ ngày thứ 8 đã được sử dụng để giải trình tự theo chiều dài đầy đủ. Trung bình 6,1Gbp dữ liệu sạch cho 9 thư viện cDNA thu được với phạm vi từ 5,73 đến 6,82Gbp (Bảng bổ sung 2). Chiều dài N50 trung bình là 1.287bp với chiều dài trung bình là 1.142 bp, chiều dài tối đa trung bình là 11.276 bp (9.575-13.426bp) và giá trị chất lượng trung bình là 11 (Q11) (Bảng bổ sung 2). Sau khi rRNA được lọc ra, trung bình 5.296.377 lần đọc rõ (4.681.541-5.888.283) và trung bình 4.258.467 số đọc FLNC (3.767.343-4.641.061) với tỷ lệ FLNC trung bình là 80,4% (Bảng 1).

Treatment <sup>a</sup>	Number of clean reads (except rRNA) <sup>b</sup>	Number of full-length reads <sup>c</sup>	Full-length percentage(%) <sup>d</sup>	
CK-1	5,592,903	4,437,097	79.33	
CK-2	5,683,524	4,641,061	81.66	
CK-3	5,399,629	4,311,944	79.86	
SCN4-1	5,459,017	4,409,582	80.78	
SCN4-2	5,888,283	4,631,268	78.65	
SCN4-3	5,184,003	4,146,135	79.98	
SCN5-1	4,727,932	3,785,053	80.06	
SCN5-2	5,050,558	4,196,724	83.09	
SCN5-3	4,681,541	3,767,343	80.47	
Mean	5,296,377	4,258,467	80.43	

Bảng 1. Số lần đọc rõ và đọc chiều dài đầy đủ, và tỷ lệ phần trăm chiều dài đầy đủ.

<sup>a</sup>CK-1, CK-2, and CK-3 represent control with water for three biological replications on soybean breeding line 09-138; Similarly, SCN4-1, SCN4-2, and SCN4-3 represent root samples infected with soybean cyst nematode race 4 (HG type 1.2.3.5.6.7) for three replications; and SCN5-1, SCN5-2 and SCN5-3 represent SCN race 5 for three replications. <sup>b</sup>Number of clean reads (except rRNA): number of clean read sequences after filtering rRNA. <sup>c</sup>Number of full-length reads: number of full-length reads compared with clean reads.

Cuối cùng, 65.038 trình tự bản sao thừa được loại bỏ chứa 92.079.818 bp với độ dài N50 là 1.665 bp, độ dài trung bình là 1.415 bp và độ dài tối đa là 7.285 bp đã được thu được thông qua việc hợp nhất các trình tự nhất quán (Hình bổ sung 1). Sau khi căn chỉnh với bộ gen tham chiếu và lọc với các chú thích đã biết về bộ gen tham chiếu, 1.117 gen mới và 41.096 bản sao chép mới đã được xác định. Trình tự nhất quán của mỗi mẫu được sử dụng để phân tích AS.

# Phân tích cấu trúc của sự kiện polyadenyl hóa thay thế, sự kết họp bản sao, sự kiện nối thay thế và dự đoán SSR đã tiết lộ sự thay đổi cấu trúc hạt đậu tương trong phản ứng với nhiễm trùng *Heterodera glycines* chủng 4 và chủng 5

Giải trình tự có độ dài đầy đủ có thể xác định chính xác cấu trúc của phiên mã. Phân tích APA dựa trên FLNC đã hiển thị tổng cộng 214.760 phiên mã với nhiều số lượng địa điểm đa A khác nhau. Trong số ba nghiêm thức, phần lớn nhất trong số 23,8% bản sao có > 5vị trí đa A, tiếp theo là 1 vị trí đa A (21,5%) và ít nhất có 5 vị trí đa A (9,6%) (Hình 2A). Số lương bản sao trong mỗi phân bố địa điểm poly A không có sư khác biệt có ý nghĩa (P> 0,05) giữa ba nghiệm thức (Hình 2B). Theo cách mổ xẻ kỹ hơn, chúng tôi thấy rằng nhiễm SCN4 khiến đậu tương tạo ra số trung bình (840  $\pm$  SE 26) lớn hơn đáng kể (840  $\pm$ SE 26) trong số > 10 vị trí đa A so với nhiễm SCN5 (734 ± SE 12) và đối chứng (698 ± SE 26), chỉ ra APA có nhiều vị trí poly A hơn có thể tham gia vào phản ứng không tương thích. Mức độ giàu ở T và A lần lượt được phát hiện ở phía trên và phía dưới của vị trí 50 bp (Hình 2C). Ba mô típ APA giàu GC (CAGGGG, GGCTGC và GGCCGC) được xác đinh trong trình tư 50 bp ngược dòng của các vi trí đa A (Hình 2D). Kiểm tra phiên mã dung hợp trước khi phân tích loại bỏ dư thừa cho thấy 2-12 phiên mã dung hợp cho mỗi mẫu. Tương tự, nhiễm SCN4 tao ra tổng công 21 bản sao dung hợp, trong khi chỉ có 14 bản sao dung hợp được tìm thấy cho SCN5 và đối chứng (Bảng bổ sung 3), cho thấy rằng bản sao dung hợp có thể tham gia vào phản ứng phòng vê.



**Hình 2.** Phân tích sự kiện polyadenylation thay thế (APA) và thay thế (AS) trên kiểu gen đậu tương 09-138 bị nhiễm tuyến trùng nang đậu tương chủng 4 (SCN4) và chủng 5 (SCN5), và nước

là đối chứng (CK). (A) Sự phân bố tổng số vị trí đa A của các gen. (B) So sánh sự phân bố vị trí đa A giữa các nghiệm thức CK, SCN4 và SCN5. (C) Phân bố cơ sở (tính bằng%) ở 50 bp phía trên và phía dưới của vị trí poly A của tất cả các bản sao. (D) Các mô-típ APA đã xác định. (E) Tổng số AS cho CK, SCN4 và SCN5. (F) So sánh các sự kiện AS giữa các phương pháp điều trị CK, SCN4 và SCN5.

Phân tích Astalavista về các phiên mã mới lạ đã chứng minh rằng cả ba nghiệm thức không có sự khác biệt đáng kể về số lượng sự kiện AS trung bình, 1,925 ± SE 54,6, 2,265 ± SE 145,8; và 2,287 ± SE 130.1 cho các nghiệm thức đối chứng, tương ứng SCN4 và SCN5 (Hình 2E), nhưng các sự kiện AS khác nhau giữa các nghiệm thức. Dựa trên tỷ lệ phần trăm trung bình của các sự kiện AS trong số 9 thư viện, có 40,11% lần truy cập intron, 26,28% vị trí nối 3' thay thế, 18,81% bỏ qua exon, 14,34% vị trí nối 5' thay thế và 0,46% exon loại trừ lẫn nhau (Hình 2F). Số lượng các sự kiện AS tại các vị trí mối nối 3' thay thế ở cả hai nghiệm thức bị nhiễm tuyến trùng thấp hơn đáng kể (P <0,05) so với ở đối chứng, trong khi số lượng ở các vị trí ghép nối 5' lớn hơn đáng kể (P <0,05) so với ở sự kiểm soát.

Tổng cộng có 22.486 SSR được xác định từ 61.900 phiên mã mới lạ chứa tổng cộng 90.765.603bp (Bảng bổ sung 4). Ba loại SSR với mono-, di- và tri-nucleotide chiếm 98% tổng số SSR. Có 1.718 SSR hiện diện trong quá trình hình thành hợp chất (tế bào vi sinh tái tổ hợp, khoảng cách hai SSR <100bp) (Hình bổ sung 2 và Bảng bổ sung 4).

Do đó, tất cả các biến thể cấu trúc được thử nghiệm giữa các nghiệm thức đối chứng, SCN4 và SCN5 đã chứng minh rằng sự biến đổi sau phiên mã có thể liên quan đến tính kháng hoặc tính mẫn cảm của tuyến trùng ở đậu tương.

#### Dự đoán trình tự mã hóa của phiên mã mới lạ

Tổng số 37.469 ORF đã thu được, bao gồm 28.759 ORF hoàn chỉnh. Khoảng 38 và 43% tất cả các độ dài protein mã hóa CDS được dự đoán lần lượt nằm trong khoảng 0-100 và 100-200 aa (Hình 3A). Chiều dài protein CDS hoàn chỉnh tương ứng được thể hiện trong Hình 3A.

#### RNA dài không mã hóa liên quan đến các yếu tố phiên mã đáp ứng phòng vệ

Các RNA dài không mã hóa liên quan đến các phản ứng tăng trưởng, phát triển và căng thẳng của thực vật đã thu hút được sự chú ý rộng rãi (Szcześniak và cs, 2015; Urquiaga và cs, 2021). Tổng cộng, 288 lncRNA đã được dự đoán bởi các phân tích miền protein CPC, CNC, CPAT và Pfam; 24 và 90 trong số đó là duy nhất đối với phương pháp CPAT và CPC, tương ứng (Hình 3B); 47,6 (137) và 42,4% (122) trong số đó được phân loại lần lượt là sense\_lncRNA và lincRNA (RNA không mã hóa liên gen dài) (Hình 3C). Antisense-IncRNA và intnic-IncRNA lần lượt chiếm 7,3 (21) và 2,8% (8) (Hình 3C). Số lượng gen mục tiêu cis (275) được điều chỉnh bởi các lncRNA này lớn hơn gần 4 lần so với (85) gen nhắm mục tiêu chuyển đổi. Phân tích miền protein lncRNA-Pfam cho thấy 164 bản sao khớp với cơ sở dữ liệu Pfam, bao gồm các yếu tố phiên mã đáp ứng phòng vệ WRKY, TIR, EF-hand, AUX/IAA, zf-RVT (nhánh kẽm trong phiên mã ngược), zf-CCHC, BolA (protein morphogen do vi khuẩn gây ra căng thẳng) và những chất khác, cho thấy rằng lncRNA có thể tham gia vào phản ứng căng thắng của tuyển trùng ở đậu tương. Điều thú vi là 69 trong số 164 (42%) miền Pfam là protein giống như Extensin được lặp lại từ hai bản sao mới, ONT.12398 (chr 9) và ONT.12400 (chr 9) và 3 miền là các vùng giống như Extensin trong ONT.14325 (chr 10). Các chất mở rộng là một họ glycoprotein giàu hydroxyproline (HRGPs) trong thành tế bào thực vật có thể làm trung gian đề kháng với vi rút, vi khuẩn, nấm và tuyến trùng (Deepak và cs, 2010; Hirao và cs, 2012). Đặc biệt, các chất mở rộng được xác định trong sự hình thành hợp bào SCN (Ithal và cs, 2007; Matsye và cs, 2011) và sự đồng biểu hiện của lncRNA liên quan đến tuyến trùng với HRGP có khả năng làm trung gian lây nhiễm SCN (Khoei và cs, 2021) đã liên tục xác nhận rằng tế bào bị thay đổi thành phần vách với các chất mở rộng có thể đóng vai trò trong việc phòng chống bệnh tật.



**Hình 3.** Chiều dài trình tự mã hóa đồng dạng, lncRNA và các yếu tố phiên mã từ các bản sao mới được xác định từ 9 mẫu đậu tương, và các gen biểu hiện khác biệt (DEG) hoặc các bản sao (DET) trong phản ứng của đậu tương đối với tuyến trùng nang đậu tương chủng 4 (SCN4) và chủng 5 (SCN5) khi so sánh với đối chứng (CK). (A) Sự phân bổ chiều dài của tất cả/hoàn chỉnh trình tự protein mã hóa được dự đoán (đơn vị, aa, axit amin). (B) Số lncRNA được xác định bằng các phương pháp CPC, CNCI, CPAT và Pfam. (C) Tỷ lệ phần trăm phân loại các vị trí lncRNA được chú thích với các bộ gen tham chiếu. (D) Sự phân bố của 20 loại nhân tố phiên mã làm giàu hàng đầu. (E) Số lượng tất cả phiên mã đồng dạng mới lạ được chú thích bởi cơ sở dữ liệu COG, GO, KEGG, KOG, Pfam, Swiss-Prot, eggNOG và NR. (F, G) Số lượng DEG và DET được điều chỉnh và điều chỉnh tăng lên giữa các phương pháp điều trị CK-SCN4 và CK-SCN5.

#### Dự đoán yếu tố phiên mã và phân tích chức năng của phiên mã mới lạ

Dự đoán có 5.337 TFs, bao gồm 176 họ TFs (yếu tố phiên mã, điều hòa phiên mã và protein kinase) với số lượng từ 1 đến 296 (Bảng bổ sung 5). Ba nghiệm thức, đối chứng, SCN4 và SCN5, lần lượt chứa 1.804, 1.787 và 1.746 TF. Các TF phong phú nhất là WRKY (296), AP2/ERF-ERF (APETALA2/Ethylene Responsive Factors, 276), NAC (NAM, ATAF và CUC, 230) và GRAS (GAI, RGA và SCA, 217) (Hình 3D).

Chú thích chức năng của các bản sao thu được từ phân tích nối thay thế cho thấy 128.648 đồng dạng phiên mã đã biết và 40.090 đồng dạng phiên mã mới (Bảng bổ sung 6) và 56.865 gen đã biết và 859 gen mới (Bảng bổ sung 7). Số lượng các phiên mã được chú thích trong tất cả và các đồng dạng mới được hiển thị trong Hình 3E. Trong số đó, chú thích của NR về sự phân bố các loài chỉ ra rằng 86,8; 8,9; 0,95 và 0,4% các bản sao tương ứng với *G. max*, *G. soja, Phaseolus vulgaris* và *Medicago truncatula*. Phân tích làm giàu GO cho thấy 13.483 trên 100.994 (13,5%) đồng dạng *G. max* và 4.350 trên 31.102 (14,0%) đồng dạng mới có liên quan đến phản ứng với kích thích (Hình bổ sung 3A, B).

#### Biểu hiện phiên mã, các gen biểu hiện khác biệt và các phiên mã biểu hiện khác biệt

Phân bố mật độ CPM của các biểu hiện phiên mã của các mẫu được hiển thị trong Hình 4A Bổ sung và mức độ phân tán của phân bố biểu hiện mới lạ trong một mẫu được hiển thị bằng một ô vuông trong Hình 4B Bổ sung. Việc đánh giá hệ số tương quan Pearson giữa các lần lặp lại sinh học chỉ ra rằng phạm vi r là từ 0,682 đến 0,963 (Hình 4C bổ sung). Sự tách biệt rõ ràng giữa nghiệm thức đối chứng với nghiệm thức nhiễm SCN4 và SCN5 được thể hiện trong phân tích thành phần chính (PCA) (Hình 4D bổ sung).

Tổng công, 2.255 DEG và 4.167 DET đã được xác định cho cả ba lần so sánh; DEG hoặc DET được điều chỉnh và điều chỉnh thấp hơn được liệt kê trong Bảng 2, và các biểu đồ núi lửa cho DEG và DET được thể hiện trong Hình bổ sung 5. Không có DEG chồng chéo (Hình 3F) hoặc DET (Hình 3G) được tìm thấy giữa CK-SCN4-up và CK-SCN5down và ngược lại. Số lượng chú thích của DEG và DET với cơ sở dữ liệu chú thích chức năng được liệt kê trong Bảng bổ sung 8. Chỉ có 7 DEG được tìm thấy giữa các nghiệm thức SCN4- và SCN5-, bao gồm 3 DEG được xác định trong CK-SCN5, protein serine/threonine, *Glyma.04G061500* (hoạt động của GO:0004674), Glyma.20G205700 (hoạt động của chất ức chế endopeptidase loại serine, GO:0004867), và Glyma. U029900 (chức năng không xác đinh, màng sinh chất, GO:0005886), và 4 DEG được xác định trong CK-SCN4, Glyma.03G120700 (liên kết calmodulin, GO:0005516), Glvma.10G093900, Glvma.11G099300 (môt thành phần cấu trúc của ribosome, GO:0003735) và Glyma. 19G125300 (liên kết calmodulin, GO:0005516).

**Bảng 2.** Số lượng gen (DEG) và phiên mã (DET) biểu hiện khác biệt giữa các nghiệm thức không bị nhiễm (CK) và *Heterodera glycines* (SCN4 và SCN5), và giữa SCN5 và SCN4

	DEG			DET		
	Total number	Up-regulated	Down-regulated	Total number	Up-regulated	Down-regulated
CKvsSCN4	1,533	726	807	2,694	1,121	1,573
CKvsSCN5	1,383	715	668	2,750	1,064	1,686
SCN5vsSCN4	7	6	1	8	7	1

SCN, soybean cyst nematode; vs.: versus.

#### Phân tích sự phong phú và chú thích bản thể gen được biểu hiện khác biệt

Bằng phân tích chú thích GO, mặc dù chỉ tìm thấy 7 DEG giữa các rễ đậu tương bị nhiễm SCN4 và SCN5, các rễ được xử lý SCN4 hiển thị 986 DEG, trong khi các rễ được xử lý SCN5 cho thấy 913 DEG khi mỗi rễ được so sánh với đối chứng. Các phân loại GO hàng đầu cho cả phương pháp điều tri CK-SCN4 và CK-SCN5 trong BP, MF và CC được hiển thị trong các Hình bổ sung 6A, B, tương ứng. Ba BP được làm giàu hàng đầu cho cả hai phương pháp điều tri là phản ứng với hormone tăng trưởng, con đường tín hiệu được kích hoat bởi auxin và sự phát triển đa chiều của tế bào. Ba CC hàng đầu là thành tế bào kiểu thực vật và bào quan liên kết màng nôi bào đối với CK-SCN4, phần tế bào, phần nôi bào và bào quan liên kết màng nội bào đối với CK-SCN5. Hai MF được làm giàu hàng đầu cho cả CK-SCN4 và CK-SCN5 là hoạt động quercetin 3-O-glucosyltransferase (GTF, EC:2.4) và coniferyl-alcohol GTF, và loại MF thứ ba là pectinesterase (PE, EC:3.1.1.11) hoạt động đối với hoạt động CK-SCN4 và quercetin 4'-O-GTF đối với CK-SCN5. Số lượng khác nhau của DEG được làm giàu cho BP, MF và CC đã được quan sát giữa CK-SCN4 và CK-SCN5 (Hình 4A). Đặc biệt, số lượng SRE (đầu mũi tên chỉ trong Hình 4A) trong CK-SCN4 nhiều hơn so với CK-SCN5, ví dụ: phản ứng với kích thích (SCN4/SCN5, 613/565), tín hiệu (225/181), hệ thống miễn dịch quá trình (121/84), giải độc (41/32), và ràng buộc (582/493) (Hình 4A).



**Hình 4.** Chú thích làm giàu GO hàng đầu của các gen biểu hiện khác biệt (DEG) (A) và so sánh các DEG với điều hòa tăng/giảm liên quan đến các yếu tố phản ứng căng thẳng (B) và kích thích tố (C) ở đậu tương 09-138 bị nhiễm tuyến trùng nang đậu tương chủng 4 (SCN4) và chủng 5 (SCN5) khi so sánh với đối chứng (CK). Các đầu mũi tên màu đỏ ở A chỉ ra các yếu tố ứng suất.

# *Heterodera glycines* nhiễm chủng 4 gây ra các yếu tố phản ứng căng thẳng hơn với sự điều chỉnh nhiều tăng so với *H. glycines* nhiễm chủng 5

Trong phân tích sâu hơn với chú thích BP của SREs, một số lượng lớn hơn các DEG điều chỉnh so với các DEG điều chỉnh thấp hơn được tìm thấy trong cả CK-SCN4 và CK-SCN5 (Hình 4B và Bảng bổ sung 9). Ví dụ: tổng số DEG được điều chỉnh tăng/giảm được cộng lại với nhau cho mỗi SRE được phát hiện là 8.780/6.662 đối với CK-SCN4 và 7.113/5.932 đối với CK-SCN5, cho thấy rằng nhiều gen SRE được tạo ra trong phản ứng

không tương thích hơn trong phản ứng tương thích (Hình 4 và Bảng bổ sung 9). Phản ứng của BP đối với kích thích bao gồm tất cả các loại căng thẳng hoặc kích thích sinh học và phi sinh học (Bảng bổ sung 9), ví dụ, mầm bệnh hoặc sâu bệnh, hóa chất hữu cơ hoặc vô cơ, kích thích tố, nhiệt độ, kích thích nội sinh hoặc bên ngoài, phản ứng phòng vệ, chết tế bào, phản ứng quá mẫn cảm, đáp ứng miễn dịch, làm im lặng gen và MAP kinase (Hình 4B).

Vì phản ứng với hormone tăng trưởng là GO-BP được làm giàu hàng đầu đầu tiên cho cả hai phương pháp điều tri được đề cập ở trên, nên phản ứng với từng hormone đã được kiểm tra và so sánh. Các phản ứng khác nhau với tám loại hormone đã được xác đinh ở cả phản ứng kháng và mẫn cảm so với đối chứng (Hình 4C và Bảng bổ sung 9). Mặc dù các hormone phản ứng với sự lây nhiễm của cả hai chủng tuyến trùng, một số lượng lớn các DEG điều chỉnh cao hơn so với các kích thích tố điều chỉnh thấp đã được tìm thấy trong phản ứng kháng với SCN4 trong SA- (lên/xuống, 31/17), JA- (28/12), axit abscisic- (ABA, 23/17), ET (13/12), axit gibberellic- (GA, 12/9), brassinosteroid- (BR, 7/6) và cytokinin- (CTK, 4/2) các con đường tín hiệu qua trung gian và SA- (16/9) và JA-(6/1) gây ra sư đề kháng toàn thân ngoại trừ con đường tín hiệu được kích hoạt bởi auxin (IAA, 8/10) (Hình 4C). Ngược lại, trong phản ứng CK-SCN5 nhạy cảm, một số lượng thấp hơn các DEG điều chỉnh cao hơn so với các đường dẫn truyền tín hiệu thiền đinh được tìm thấy trong SA- (16/22), ABA- (13/22) và ET- (5/7), và điện trở toàn thân gây ra SA- (8/14) hoặc JA- (0/1). Những kết quả này cho thấy rằng nhiều SREs với nhiều điều chỉnh tăng đã được kích hoạt bởi phản ứng không tượng thích với nhiễm SCN4 khi so sánh với nhiễm SCN5.

#### *Heterodera glycines* nhiễm chủng 5 gây ra nhiều gen biểu hiện khác biệt hơn với nhiều gen được điều chỉnh hơn liên quan đến quá trình biến đổi thành tế bào và quá trình sinh học Carbohydrate so với *H. glycines* nhiễm chủng 4 mỗi khi được so sánh với đối chứng

Không ngạc nhiên, 23 DEG (17 tăng/6 giảm) và 2 (2 tăng/0 giảm) phản ứng với tuyến trùng và sự hình thành hợp bào được xác định trong phản ứng của đậu tương kháng với SCN4, trong khi 34 DEG (24 tăng/10 giảm) và 9 (9 lên/0 xuống) phản ứng với tuyến trùng và sự hình thành hợp bào tương ứng được tìm thấy trong phản ứng mẫn cảm với SCN5. Sự hình thành hợp bào SCN đòi hỏi phải sửa đổi thành tế bào thực vật, trong khi việc sửa đổi thành tế bào liên quan đến sự phát triển đa chiều của tế bào (SCN4/SCN5 DEGs: 38/48) là yếu tố thứ ba được làm giàu BP trong cả hai phương pháp điều trị. Do đó, tất cả các chú thích liên quan đến thành tế bào được thu thập cùng nhau và tổng cộng 28/26 GO đã được chú thích cho CK-SCN4/CK-SCN5 (Hình 5A). Một số lượng lớn DEG trong CK-SCN5 hơn trong CK-SCN4 đã được phát hiện trong tổ chức thành tế bào hoặc cơ chế sinh học (SCN5/SCN4:172/159), sửa đổi thành tế bào (51/27), biến đổi thành tế bào kiểu thực vật (27/15), biến đổi thành tế bào liên quan đến sự phát triển đa chiều của tế bào (12/1), nới lỏng thành tế bào kiểu thực vật (11/2), dày thành tế bào (11/9) và lắng đọng callose trong thành tế bào (8/5).



**Hình 5.** Các gen quy định lên/xuống (DEG) được làm giàu GO trên cùng được biểu hiện khác biệt liên quan đến biến đổi thành tế bào (CW) (A) và quá trình sinh học carbohydrate (B) trên dòng đậu tương 09-138 bị nhiễm SCN4 (tuyến trùng nang đậu tương chủng 4) và SCN5 khi so sánh với đối chứng. Trục x hiển thị số DEG và trục y biểu thị đường đi GO.

Sư hình thành hợp bào đòi hỏi carbohydrate như một chất dinh dưỡng cho tuyến trùng ăn, và các chất vân chuyển đường hoat đông trong hợp bào thông qua các quá trình vân chuyển giữa và nội bào (Hofmann và cs, 2007, 2009; Hofmann và Grundler, 2008). Số lương DEG liên quan đến sư hình thành hợp bào ở CK-SCN5 nhiều hơn so với CK-SCN4 biểu thị sự khác biệt trong quá trình chuyển hóa carbohydrate. Do đó, các quá trình sinh học của cacbohydrat và ba nhóm chính tương ứng (đường, oligosaccharid và polysaccharid), bao gồm các quá trình trao đổi chất, sinh tổng hợp, di hóa và vân chuyển, đã được kiểm tra và so sánh giữa CK-SCN4 và CK-SCN5 (Hình 5B). Tổng cộng, 178, 94, 57 và 13 DEG trong CK-SCN4 lần lượt tham gia vào các quá trình chuyển hóa, sinh tổng hợp, di hóa và vân chuyển carbohydrate; 203, 114, 60 và 22 DEG trong CK-SCN5 tương ứng được liên kết với bốn quy trình. Đối với tất cả các quá trình sinh học liên quan đến carbohydrate, người ta đã tìm thấy 739 DEG với 317 điều chỉnh tăng/giảm 422 trong CK-SCN4 và 870 DEG với 467 điều chỉnh tăng/403 giảm trong CK-SCN5 (Hình 5B). Polysaccharid là thành phần chính của quá trình trao đổi chất, sinh tổng hợp và dị hóa carbohydrate. Số lương DEG điều chỉnh thấp hơn (130) so với DEG điều chỉnh thấp (195) đối với CK-SCN4 đã được phát hiện trong tất cả các nhóm của quá trình chuyển hóa và sinh tổng hợp carbohydrate; đối với CK-SCN5, số lượng gen điều hòa nhiều hơn gen điều hòa chỉ được tìm thấy trong quá trình trao đổi chất polysaccharide (tăng/giảm: 80/51) và sinh tổng hợp (tăng/giảm: 55/30) và sinh tổng hợp monosaccharide (7/5) quy trình (Hình 5B). Polysaccharid và monosaccharid là môt quá trình di hóa carbohydrate chính, nhưng polysaccharid thể hiên quá trình điều chỉnh tăng nhiều hơn là điều chỉnh giảm, và monosaccharid cho thấy quá trình điều chỉnh giảm nhiều hơn ở cả CK-SCN4 và CK-SCN5 (Hình 5B). Quá trình vận chuyển cacbohydrat đã chứng minh rằng oligosaccharid và monosaccharid là những dạng vận chuyển chính; chỉ có 1 DEG điều chỉnh để vận chuyển polysaccharide được phát hiện trong CK-SCN5 nhưng không có trong CK-SCN4. Những kết quả này gọi ý rằng phản ứng tương thích gây ra biểu hiện điều chỉnh hơn trong quá trình sinh học carbohydrate hơn là phản ứng không tương thích.

#### Phân tích làm giàu lộ trình gen và bộ gen trong bách khoa toàn thư Kyoto

Chú thích KEGG cho thấy 273 và 292 đơn vị gene liên quan đến 96 con đường trong con đường CK-SCN4 và 91 con đường CK-SCN5, tương ứng (Bảng bổ sung 10). Hai phương pháp điều trị chia sẻ 83 lộ trình; 13 và 8 con đường duy nhất được phát hiện trong CK-SCN4 và CK-SCN5, ví dụ: tương tác SNARE trong vận chuyển dạng hạt (3 DEG) và phosphoryl oxy hóa (4 DEG) chỉ trong sinh tổng hợp CK-SCN4 và N-Glycan (4 DEG) và sự phân hủy axit béo (1 DEG) chỉ trong CK-SCN5.

Sinh tổng hợp phenylpropanoid là con đường KEGG được làm giàu hàng đầu cho cả CK-SCN4 (Hình 6A) và CK-SCN5 (Hình 6B). 5 con đường KEGG làm giàu hàng đầu sau đây là protein ăng-ten quang hợp, chuyển hóa caffeine, sinh tổng hợp cutin, suberin và sáp, và con đường tín hiệu AGE-RAGE trong các biến chứng tiểu đường đối với CK-SCN4 (Hình 6A), và chuyển hóa tinh bột và sucrose, quang hợp-ăng-ten protein, chuyển hóa nito, và con đường tín hiệu AGE-RAGE trong các biến chứng tiểu đường đối với CK-SCN5 (Hình 6B). Trong số 20 con đường KEGG phong phú hàng đầu, chuyển hóa glycine, serine và threonine, sinh tổng hợp monoterpenoid, thoái hóa glycan khác, phagosome, truyền tín hiệu hormone thực vật, chuyển hóa pyrimidine và phân giải protein qua trung gian là duy nhất đối với CK-SCN4; năm chất chuyển hóa (nito, galactose, cysteine và methionine, ether lipid và inositol phosphate), và sự phân giải valine, leucine, và isoleucine là duy nhất đối với CK-SCN5 (Hình 6B). Điều thú vị là nhà máy tạo nhịp sinh học theo con đường KEGG đã được làm giàu ở vị trí thứ 8 đối với CK-SCN4 và ở vị trí thứ 14 đối với CK-SCN5 (Hình 6A, B).



Hình 6. (A, B) Con đường KEGG làm giàu DEG (các gen biểu hiện khác biệt) trong đậu tương được xử lý với tuyến trùng nang đậu tương chủng 4 (SCN4) và chủng 5 (SCN5) khi so sánh với đối chứng. Mỗi vòng tròn đại diện cho một đường dẫn KEGG, trục tọa độ đại diện cho tên đường dẫn và trục hoành là hệ số làm giàu. Kích thước vòng tròn gợi ý số lượng DEG được bổ sung trong đường dẫn, vòng tròn càng lớn, càng nhiều DEG.

### Con đường sinh tổng hợp Phenylpropanoid được làm giàu nhờ cả hai lây nhiễm tuyến trùng

Cả hai lây nhiễm tuyến trùng SCN4 và SCN5 đều gây ra sinh tổng hợp phenylpropanoid, con đường KEGG được làm giàu hàng đầu. Các hợp chất phenylpropanoid là nguồn trao đổi chất phong phú trong thực vật, cung cấp tiền chất của quá trình tổng hợp lignin (Yao và cs, 2021), trong khi lignin có nhiều trong thành tế bào và nó đóng vai trò quan trong trong việc bảo vệ thực vật trong việc đề kháng cần thiết tại chỗ hoặc có hệ thống (Dixon và al., 2002). Phản ứng enzym được coi là bước quan trong trong quá trình sinh tổng hợp các lớp chính của hợp chất phenylpropanoid. Ba mươi lăm chỉnh thể KEGG của peroxidase (K00430, EC:1.11.1.7), enzym giàu nhất được chú thích trong con đường này. được phát hiện trong điều hòa tăng hoặc giảm đối với cả CK-SCN4 (tăng/giảm:24/4) và CK-SCN5 (tăng/giảm:23/6); 10 trong số 35 gen peroxidase là duy nhất cho CK-SCN5 và 7 gen là duy nhất cho CK-SCN4 (Hình 7A, B). Enzyme peroxidase đóng một vai trò trong bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp lignin để tạo ra p-hydroxyphenyl lignin, guaiacyl lignin, 5-hydroxyguaiacyl lignin, và syringyl lignin (Hình 7B). Mức đô biểu hiện gen của peroxidase 3 (Glyma.03G208200, Glyma.10G022500) đã tăng lên tới 5,2 đến 7,3 lần sau khi nhiễm tuyến trùng so với đối chứng. Sự lây nhiễm SCN4 gây ra hai DEG điều chỉnh giảm: một gen, Glyma.15G002600, enzyme shikimate được mã hóa O-hydroxycinnamoyltransferase (HST, EC: 2.3.1.133), xúc tác phản ứng của hai chất nền, 4-coumaroyl-CoA (4-CCoA) và shikimate, để sản xuất hai sản phẩm, CoA và 4coumaroylshikimate (CSH); DEG khác, Glyma.03G070300, được mã hóa giống serine carboxypeptidase 11 (SCPL11, EC: 2.3.1.91), có thể tao thành sinapoylcholine (sinapine) và đóng những vai trò quan trong trong phản ứng với stress phi sinh vât và sinh học, cũng như tăng trưởng và phát triển (Xu và cs, 2021). Nhiễm trùng SCN5 gây ra sư điều chỉnh giảm của DEG Glyma.04G227700 mã hóa axit caffeic 3-O-methyltransferase (COMT) giống như (EC:2.1.1.68), một loại enzyme quan trong điều hòa tổng hợp lignin (Trabucco và cs, 2013) nhưng không phải cho Nhiễm trùng SCN4. Một gen (Glyma.15G031300) mã hóa enzym cyanogenic beta-glucosidase 13-like (EC:3.2.1.21) tham gia vào quá trình bốc hơi thành tế bào đã làm tăng mức độ biểu hiện tăng 5,87 lần do nhiễm SCN5 (Hình 7A). Cả hai trường hợp nhiễm tuyến trùng đều kích hoạt sự điều hòa của enzym mã hóa DEG Glyma.09G201200 cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD, EC:1.1.1.195) để xúc tác bước cuối cùng của quá trình sinh tổng hợp monolignol, bao gồm p-coumaryl alcohol (H), coniferyl alcohol (G), và sinapyl alcohol (S), thành phần chính của lignin (Hình 7A, B). Những kết quả này chỉ ra sư biến đổi biểu hiện của enzym peroxidase, HST, SCPL và các enzym khác liên quan đến tổng hợp lignin sau khi nhiễm tuyến trùng dẫn đến các phản ứng tương thích và không tương thích bằng cách điều chỉnh sự biến đổi thành tế bào thực vật.

### Truyền tín hiệu hormone thực vật, tương tác thực vật - mầm bệnh và các yếu tố phiên mã MYB góp phần vào phản ứng phòng vệ

Một số lượng DEG tương tự đã được xác định trong cả con đường dẫn truyền tín hiệu hormone thực vật (SCN4/SCN5:26/25) (Hình 7C, D) và con đường tương tác giữa cây trồng với mầm bệnh (SCN4/SCN5:12/14) (Hình 7E, F) nhưng với nhiều biểu hiện khác nhau về mức độ hoặc kiểu gen. Như minh họa trong Hình 7C, D, cả hai lây nhiễm tuyến trùng đều điều hòa tích cực hoặc tiêu cực sự biểu hiện của các hormone (SA, JA, ET, GA, ABA, IAA và CTK) nhưng có sự khác biệt về chất và lượng ở đậu tương (Hình 7D). Ví dụ, mức độ biểu hiện của PR1 (protein liên quan đến cơ chế bệnh sinh 1,

Glyma.15G062400), liên quan đến nhiều con đường không chỉ truyền tín hiệu hormone thực vật (SA) mà còn cả tín hiệu MAPK và tương tác giữa cây trồng với mầm bệnh, đã tăng hơn nhiễm SCN4 (6.5 lần) và SCN5 (5.2 lần) ở đâu tương khi so sánh với đối chứng. Trong con đường auxin, có liên quan đến việc mở rông tế bào và tăng trưởng thực vật, AUX1 và AUX/IAA được điều chỉnh, ví dụ: protein giống chất vận chuyển auxin 4 (Glyma.03G063900) được điều hòa tích cực bởi cả nhiễm SCN4 (4,1 lần) và SCN5 (gấp 4,5 lần), và gen SAUR đáp ứng với auxin (RNA điều hòa nhỏ với auxin) đều được điều chỉnh tăng và giảm (Hình 7C, D). Hai yếu tố phiên mã PIF3 (yếu tố tương tác phytochrome 3) được mã hóa bởi Glyma.19G224700 và Glyma.20G091200, được xác đinh trong con đường GA nhánh cũng như trong con đường nhịp sinh học thực vật, với yếu tố trước đây được điều chỉnh giảm bởi cả nhiễm tuyến trùng và sau này được điều chỉnh giảm bởi nhiễm SCN5. Ba gen (Glyma.09G066500, Glyma.19G069200 và Glyma.11G018000) mã hóa PP2C (protein phosphatase 2C) trong con đường ABA được điều hòa; nhiễm SCN4 gây ra mức độ biểu hiện của ba gen tăng lên khoảng 3 lần và nhiễm SCN5 làm tăng mức độ biểu hiện của hai gen đầu tiên từ 2,2 đến 2,8 lần. JAZ (miền zim jasmonate) được mã hóa bởi *Glyma.17G043700* trong JA liên quan đến phản ứng ứng suất chỉ được phát hiện trong CK-SCN5 với điều chỉnh giảm chứ không phải trong CK-SCN4. Ngược lại, các DEG mã hóa ETR (cảm biến phản ứng ethylene 2), EBF1 (protein hộp F liên kết với EIN3 1) và ERF1 (yếu tố phiên mã đáp ứng với ethylene 1) trong con đường ET liên kết với quá trình chín và già của trái cây chỉ được tìm thấy trong phản ứng kháng với SCN4 nhưng không đối với SCN5 khi so sánh với đối chứng (Hình 7C, D), chỉ ra rằng con đường ET đóng một vai trò trong phản ứng phòng vê và biểu hiên JA bi ức chế trong phản ứng nhay cảm.

Trong con đường tương tác giữa thực vật và mầm bệnh, CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1, *Glyma.02G270800*) được phân loại là PRR trong PTI, CDPK (kinase protein phụ thuộc canxi), Rboh (hô hấp bùng nổ oxy hóa) kích hoạt các loại oxy phản ứng (ROS) tương quan đối với bệnh HR, CaM/CML (protein giống calmodulin/calmodulin) liên quan đến HR, củng cố thành tế bào và đóng khí khổng, và PR1 (*Glyma.15G062400*) liên kết với sự tích tụ phytoalexin và sản xuất miRNA, được xác định trong cả CK-SCN4 và CK -SCN5 nhưng với nhiều mức độ biểu hiện khác nhau; yếu tố phiên mã WRKY xuôi dòng *AtWRKY33* (*GmWRKY15, Glyma.02G232600*) và Pti6 (chất hoạt hóa phiên mã gen PR 6, *Glyma.02G236800*) được kết nối với cảm ứng gen liên quan đến phòng thủ chỉ được phát hiện đáng kể trong CK-SCN4 (Hình 7E, F). Một gen, *Glyma.01G068000*, mã hóa HSP90 đã được phát hiện với điều chỉnh giảm ở CK-SCN4, nhưng hai gen khác, *Glyma.09G131500* (*hsp83*) và *Glyma.16G178800* (*hsp83*), được quy định tiêu cực có ý nghĩa trong CK-SCN5, cho thấy rằng PTI ban đầu được kích hoạt bởi nhiễm cả hai chủng tuyến trùng và sau đó, ETI được kích hoạt bởi nhiễm trùng SCN4.

Trong phân tích KEGG, 20 yếu tố phiên mã giống MYB hoặc MYB đã được phát hiện; trong số này, 12 chỉ được tìm thấy ở nghiệm thức CK-SCN4 và 3 chỉ ở CK-SCN5, biểu thị rằng các yếu tố phiên mã MYB có thể điều chỉnh phản ứng phòng vệ. Ba DEG (*Glyma.03G261800, Glyma.16G017400 và Glyma.19G260900*) kết hợp với yếu tố phiên mã LHY liên quan đến MYB cũng tham gia vào nhịp sinh học của thực vật, được điều chỉnh tiêu cực sau khi nhiễm cả SCN4 và SCN5.



**Hình 7.** Biểu hiện gen và lộ trình KEGG trong sinh tổng hợp phenylpropanoid (<u>https://www.genome.jp/pathway/map00940</u>) (A, B), truyền tín hiệu hormone thực vật (<u>https://www.genome.jp/entry/map04075</u>) (C, D) và tương tác giữa cây trồng - mầm bệnh (<u>https://www.genome.jp/entry/map04626</u>) (E, F) ở đậu tương bị nhiễm SCN4 và SCN5. (A, C, E) đại diện cho mức độ biểu hiện của các gen biểu hiện khác biệt (DEG) liên quan đến con đường tương ứng cho CK (kiểm soát) -SCN4 và/hoặc CK-SCN5; khối trống màu trắng (0) có nghĩa là không có biểu hiện biến thiên nào được phát hiện với Fold Change  $\geq 2$  và False Discovery Rate (FDR) <0,05; bên trái của trục y là mã gen và bên phải là chú thích KEGG tương ứng. (B, D, F) là các con đường KEGG; các khối có màu đỏ, xanh lục và xanh lam biểu thị DEG trong điều chỉnh tăng, điều chỉnh giảm hoặc cả hai cách tương ứng cho cả CK-SCN5 hoặc điều chỉnh tăng, điều chỉnh cho DEG chỉ được tìm thấy trong SCN4/SCN5 hoặc điều chỉnh tăng/giảm; trong bảng (B), ngôi sao màu xanh lam đại diện cho enzym DEG chỉ có trong CK-SCN4 và ngôi sao màu đỏ biểu thị DEG enzym chỉ có trong CK-SCN5.

# Con đường trao đổi chất tinh bột và Sucrose quy định phản ứng nhạy cảm với *Heterodera glycines chủng* 5 và Chitinase I được kiểm soát trong phản ứng phòng vệ với *H. glycines* chủng 4

Con đường chuyển hóa tinh bột và sucrose được làm giàu KEGG thứ hai hàng đầu trong nghiệm thức CK-SCN5 có 40 DEG bao gồm 5 sucrose synthase, 11 chất ức chế giống pectinesterase hoặc pectinesterase/pectinesterase, 5 beta-glucosidase và 4 alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP – hình thành] và các chất khác, có liên quan đến sự

phát triển của thực vật và biến đổi thành tế bào hoặc sự bốc hơi của thành tế bào; những gen này cần thiết cho sự hình thành hợp bào. Trong số này, 8/9 và 16/19 gen điều chỉnh tăng/giảm tương ứng được xác định cho CK-SCN4 và CK-SCN5 (Hình 7A bổ sung), ví dụ: *Glyma.15G223500* (chất ức chế pectinesterase/pectinesterase 47) với mức tăng gấp 5 lần mức độ biểu hiện sau khi nhiễm SCN5, trong khi điều chỉnh tăng *Glyma.03G216000* (chất ức chế pectinesterase 20) có mức độ biểu hiện tăng gấp 3,3 lần ở các rễ bị nhiễm SCN4, cho thấy rằng các DEG này đóng vai trò trong phản ứng tương thích hoặc không tương thích. Trong đường amin và con đường nucleotide, 17/3 DEG điều chỉnh tăng/giảm, hai trong số đó có mức độ biểu hiện tăng hơn 4 lần đáng kể, *Glyma.02G042500* mã hóa tiền chất chitinase lớp I và *Glyma.18G120700* mã hóa hevamine-A -như protein trong rễ bị nhiễm SCN4 (Hình 7B bổ sung), cho thấy rằng hai gen này có thể góp phần vào phản ứng phòng vệ khi bị nhiễm SCN4.

#### Phân tích tương tác Protein-Protein cho thấy tương tác Valine-Glutamine-WRKY và Bộ điều chỉnh Cytokinin phản ứng hai thành phần tương tác ARR-Glutaredoxins-BolA có thể tham gia vào phản ứng phòng vệ

Phân tích PPI trong số tất cả 2.255 DEG chỉ ra tỷ lệ mạng lưới protein-protein là 7.063/2.632 (2,7 ×) cho CK-SCN4/CK-SCN5, bao gồm 866/194 (4,5 ×) kích hoạt, 2715/1381 (2 ×) liên kết, 781/280 (2,8 ×) xúc tác, 401/104 (3,9 ×) biểu hiện, 462/96 (4,8 ×) ức chế, 874/166 (5,3 ×) ptmod (post translational modification - sau sửa đổi dịch mã) và 964/411 (2,3 × ) phản ứng, cho thấy phản ứng kháng của đậu tương đối với nhiễm trùng SCN4 đã kích hoạt nhiều tương tác protein-protein hơn là phản ứng mẫn cảm với nhiễm trùng SCN5, đặc biệt là trong quá trình sửa đổi, ức chế và hoạt hóa sau dịch mã.

Hai gen, Glyma.03G120700 (GmVQ5) và Glyma.19G125300 (GmVQ70), được xác đinh là DEG đáng kể với mức tăng gấp 2,7-3,2 lần ở CK-SCN4 so với CK-SCN5, mã hóa protein liên kết calmodulin (CaMBP) (GO:0005516) mang motif VQ (Valine-Glutamine) được bảo tồn (FxxhVQxhTG), có khả năng tương tác với yếu tố phiên mã vùng liên kết DNA WRKY để đóng vai trò quan trọng trong phản ứng với căng thẳng (Wang và cs, 2014). Do đó, các tương tác giữa các protein VQ và WRKY được mã hóa bởi DEG đã được khám phá dựa trên miền Pfam; 6 trong số 26 VO (GmVO5, GmVO8, GmVO24, GmVQ43, GmVQ44 và GmVQ70) và 19 trong số 74 chú thích WRKY được phát hiện trong CK-SCN4, CK-SCN5 hoặc SCN5-SCN4 (Hình 8A). Điều thú vị là GmWRKY15, được mã hóa bởi Glyma.02G232600 được điều chỉnh, tượng đồng với Arabidopsis AtWRKY33 (WRKYGQK/WRKYGQK) trong con đường tương tác giữa cây trồng với mầm bệnh, được xác định trong CK-SCN4, có thể tương tác với GmVQ24 (AtVQ21, Glyma.06G124400 và cả hai đều được liên kết với GmVO44 (AtVO25, protein liên kết canxi, Glyma.09G111800) với điều chỉnh giảm, có thể liên kết với hai protein liên kết CaM tương đồng là GmVQ5 và GmVQ70 (Hình 8B). Số VQ và WRKY được thiết kế theo Yu và cs (2016), Wang và cs (2019), tương ứng.



**Hình 8.** Biểu hiện gen của VQ (valine-glutamine motif) và yếu tố phiên mã WRKY ở đậu tương bị nhiễm SCN4 và SCN5 khi so sánh với đối chứng (CK), và tương tác protein-protein. (A) Tất cả các gen VQ và WRKY biểu hiện khác biệt đều được hiển thị; khối trống màu trắng (0) có nghĩa là không có biểu hiện biến thiên nào được phát hiện với Fold Change  $\geq 2$  và False Discovery Rate (FDR) <0,05; bên trái của trục y là ID gen và bên phải là tên gen tương ứng (Yu và cs, 2016; Wang và cs, 2019). (B) Tương tác VQ-WRKY-MPK-MKK-MKKK (MPK, kinase protein hoạt hóa mitogen). (C) Mô hình giản đồ cho các vai trò tương tác VQ-WRKY trong phản ứng phòng vệ; Nhiễm SCN4 có thể điều chỉnh các hoạt động của enzym MKKK, MKK và MPK. Một mô hình là kích hoạt MPK có thể giải phóng WRKY khỏi chất nền MSK1 (GmVQ24) và có chức năng bảo vệ thực vật; mô hình khác là liên kết MSK1 được giải phóng với GmVQ5/70 đóng vai trò bảo vệ thực vật. (D) Tương tác ARR-BolA2-GRXS15; ARR-A, bộ điều chỉnh phản ứng Arabidopsis loại A; BolA2, (chất tạo hình dạng do vi khuẩn gây ra căng thẳng); GRXS15, monothiol glutaredoxin-S15. Các đường có màu sắc đa dạng thể hiện loại bằng chứng tương tác (<u>https://string-db.org</u>).

AtWRKY33 có thể tương tác với protein VQ được gọi là protein kích hoạt mitogen (mitogen-activated protein - MAP) co chất kinase 1 (MSK1, AtVQ21), co chất của MPK4 (MAP kinase 4), có thể được kích hoạt khi có sự tấn công của mầm bênh hoặc trùng roi, và sau đó AtWRKY33 là được giải phóng để gây ra sự biểu hiện của phytoalexin deficient 3 (PAD3) trong nhân, và do đó để tăng phản ứng phòng vê (Andreasson và cs, 2005; Cheng và cs, 2012). Ngoài ra, MPK3 và MPK6 cũng có thể tương tác với AtWRKY33 cùng nhau, dẫn đến sự gia tăng biểu hiện gen liên quan đến phytoalexin (Alves và cs, 2014). Sự biểu hiện quá mức của AtWRKY33 dẫn đến giảm tính nhạy cảm với tuyến trùng nang củ cải đường (Heterodera schachtii) (Ali và cs, 2013) giúp AtWRKY33 có thể tham gia vào việc kháng tuyến trùng nang đậu tương. Để tìm kinase của chất nền GmVQ24 (MSK1) trong dữ liệu chú thích, tất cả các kinase MAP được thể hiện đã được tìm kiếm và không tìm thấy AtMPK4 tương đồng; Điều thú vị là chỉ có hai MPK3 tương đồng được mã hóa bởi Glyma. U021800 và Glyma. 12G073000, mỗi loại có mức độ biểu hiện tăng gấp 1 lần trong CK-SCN4, được xác định để tương tác với GmWRKY15 và GmVQ24. Tìm kiểm thêm các DEG khác mã hóa MAPK cho thấy rằng hai gen mã hóa MAP kinase kinase 2 (MPKK2) có mức đô biểu hiên giảm 1,5 đến 1,8 lần chỉ có trong CK-SCN4 (Hình 8B). Hai MPKKK khác được mã hóa bởi Glma.17G173000 và Glyma.17G177900, có thể liên kết với MPK3 và MPKK2, đã được tìm thấy với sư gia tăng 1,2 lần biểu hiện gen trong CK-SCN4 (dữ liệu không được hiển

thị). Tất cả những kết quả này đã chứng minh rằng MPKKK/MPKK/MPK/WRKY-VQ-CaMBPVQ có thể hoạt động cùng nhau trong đậu tương để bảo vệ chống lại sự lây nhiễm SCN4. Dựa trên những dữ liệu này, một mô hình có tương tác VQ – WRKY để đáp ứng với sự lây nhiễm SCN4 đã được thiết lập với hai khả năng, một là giải phóng GmWRKY33 bằng cách kích hoạt MPK3 hoặc bất kỳ kinase nào khác để tạo ra phytoalexin, kích hoạt khả năng bảo vệ thực vật như được mô tả trong *Arabidopsis* (Alves và cs, 2014); còn lại là GmVQ44 liên kết với GmVQ24 (MSK1) để ngăn chặn biểu hiện *GmVQ44*, dẫn đến biểu hiện cao CaMBP GmVQ5/70 để tạo ra kháng SCN (Hình 8C).

Môt tương tác protein-protein thú vi khác đã được phát hiện trong con đường cytokinin nhánh tín hiệu hormone thực vật với hai gen CK-SCN4 DEG được điều chỉnh (Hình 8D), *Glyma.06G187000* (*ARR6*, Log2FC = 2.2) và *Glyma.17G093900* (*ARR5*, Log2FC = 1.5), được phân loại như quy định phản ứng hai thành phần ARR-A (quy định phản ứng Arabidopsis loại A) bao gồm histidine kinase kéo dài màng bên trong và một cơ quan điều hòa phản ứng tế bào chất để cho phép sinh vật cảm nhân và phản ứng với những thay đổi về kích thích môi trường (Stock và cs, 2000). Trong CK-SCN4, các protein giống ARR5 và ARR6 có khả năng tương tác với chaperone ty thể, monothiol glutaredoxin-S15 (GRXS15) và BolA2. GRXS15 được mã hóa bởi DEG Glyma.08G209900 điều chỉnh giảm (Log2FC = -1.8) và BolA2 được mã hóa bởi DEG Glyma.05G188300 điều chỉnh giảm (Log2FC = -1.6) có thể kết nối với yếu tố phiên mã GATA nhánh kẽm (Glyma.06G086400, Log2FC = 1.7) (Hình 8C). Ti thể GRAX15 được báo cáo là đóng những vai trò quan trong trong quá trình trưởng thành protein sắt-lưu huỳnh trong thực vật (Moseler và cs, 2015) và bộ điều chỉnh phiên mã BolA2 có chứa mô-típ chuỗi xoắn (helix-turn-helix – HTH) để liên kết axit nucleic (Kasai và cs., 2004). Tương tác AtBolA3 – GRXS17 đóng một vai trò quan trong trong việc ngăn chăn sư dung nap phi sinh hoc (Cheng và cs, 2011; Qin và cs, 2015). Theo cách tương tư, sư ức chế biểu hiện gen của cả BolA2 và GRAX15 với sự lây nhiễm SCN4 dẫn đến sự đề kháng được biểu thị rằng tương tác BolA2 – GRAX15 có thể điều chỉnh tiêu cực tính kháng SCN4 của đậu tương. Chức năng của tương tác BolA2 – GRAX15 vẫn chưa được báo cáo, nhưng người ta biết rằng BolA2 là nucleon-tế bào chất và tương tác với GRAX15 (Couturier và cs, 2014). Hon nữa, BolA2 được liên kết với lncRNA được phát hiên ở trên. Do đó, các tương tác của ARR5/6-GRAX15-BolA2-GATA có thể chỉ ra một tương tác phức hợp mới tham gia vào quá trình bảo vệ thực vật để đối phó với sự lây nhiễm SCN4.

#### Xác thực các gen biểu hiện khác biệt bằng xét nghiệm QRT-PCR

Các mức độ biểu hiện của 23 DEG thu được từ giải trình tự bộ gen phiên mã có độ dài đầy đủ được so sánh với mức độ biểu hiện thu được từ qRT-PCR. Tương quan biểu hiện (R<sup>2</sup>) giữa chuỗi độ dài đầy đủ và qRT-PCR lên đến 0,6958 (Hình 9A), và so sánh mức độ biểu hiện tương đối giữa SCN4 và SCN5 đã chứng minh rằng dữ liệu qRT-PCR gần như khớp với dữ liệu chuỗi độ dài đầy đủ (Hình 9B). Mức độ biểu hiện tương đối của bốn gen WRKY và ba gen VQ cũng được hiển thị trong Hình 9C.



**Hình 9.** Xác thực các gen biểu hiện khác biệt (DEG) bằng qRT-PCR. (A) Mối tương quan của mức độ biểu hiện DEG giữa RNA-seq và qRT-PCR. (B) Sự biểu hiện tương đối của gen VQ và gen WRKY. (C) Biểu hiện tương đối của 16 DEG khác. Đối với bảng (B, C), trục x hiển thị các gen và chú thích gen khác nhau và trục y là mức biểu hiện tương đối (thay đổi gấp  $log_2FC$ ). Mức độ biểu hiện tương đối được tính theo phương pháp  $-\Delta\Delta Ct$  bằng cách sử dụng gen actin làm kiểm soát nội sinh. Thanh lỗi là viết tắt của SE. Các dấu hoa thị thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa theo phép thử t (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.005; và \*\*\*\*\* p < 0.005).

#### THẢO LUẬN

### Phân tích phiên mã có độ dài đầy đủ: Một công cụ mạnh mẽ để phân tích quy định về phiên mã và sau phiên mã

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên tiến hành phân tích phiên mã có chiều dài đầy đủ trên đậu tương để so sánh các phản ứng của cùng một kiểu gen đậu tương không tương thích và tương thích với các chủng *H. glycines* khác nhau. Rõ ràng, những ưu điểm của giải trình tự gen phiên mã có độ dài đầy đủ bao gồm hiệu suất chi phí cao, thông lượng cao, không có tính đặc hiệu GC và sai lệch cơ sở, đọc trình tự dài, định lượng chính xác ở cấp độ phiên mã, xác định chính xác các đặc điểm cấu trúc (ví dụ: AS, gen dung hợp, APA) mà không phá vỡ trình tự hoặc cấu trúc gen và phân tích DEG/DET cùng một lúc. So với NGS, ONT cần ít số đọc hơn để bao phủ cùng một lượng phiên mã. Ví dụ: NGS thu được trung bình nhiều hơn 3-5 lần số lần đọc rõ (Zhang và cs, 2017; Neupane và cs, 2019; Miraeiz và cs, 2020) khi so sánh với số lần đọc rõ ràng trung bình trong nghiên cứu này. Ngoài ra, các gen mới đã được xác định có thể tạo ra các sự kiện AS mới.

Sự thay đổi về số lượng các sự kiện AS tại vị trí nối 5' hoặc 3' sau cả hai lần nhiễm tuyến trùng và các phiên mã khác nhau giữa ba phương pháp điều trị chỉ ra rằng nhiễm trùng tuyến trùng đã kích hoạt các sự kiện AS khác biệt để tạo ra nhiều phiên mã có thể dẫn

đến bảo vệ thực vật hoặc tính mẫn cảm. Một số trường hợp đã được báo cáo rằng AS điều chỉnh phản ứng và/hoặc thích ứng với stress của cây trồng (Bedre và cs, 2019; John và cs, 2021; Martín và cs, 2021). Ví dụ, gen N của thuốc lá kháng vi rút khảm thuốc lá (TMV) có thể được ghép theo cách khác để tạo ra hai phiên mã cần thiết để góp phần kháng hoàn toàn với TMV (Dinesh-Kumar và Baker, 2000). AS điều chỉnh ABA và các con đường tín hiệu ánh sáng để điều phối sự phát triển của thực vật và phản ứng với căng thẳng (Thiruppathi, 2020).

Thật thú vi, chúng tôi nhân thấy rằng các sư kiên APA phong phú hơn trên mỗi gen được xác đinh với > 5 vi trí đa A (23,8%) so với các vi trí ở 1-5 đa A ở đâu tương, trong khi 2 vi trí đa A được tìm thấy là nơi phân bố sự kiên APA phong phú nhất ở cây cao lượng (Chakrabarti và cs, 2020), và 1 điểm poly A cho loài cây Liriodendron chinense trong họ mộc lan (Tu và cs, 2021). Sự phân bố vị trí đa A trong thực vật có thể bị thay đổi bởi các căng thẳng phi sinh học (Yan và cs, 2021), và các yếu tố cis đặc trưng cho căng thẳng mới ở các vị trí đa A bên trong có thể góp phần gây ra căng thẳng phi sinh học (Chakrabarti và cs. 2020). Trong nghiên cứu này, việc nhiễm tuyến trùng làm tăng sư phân bố > 5 đa A so với đối chứng, đặc biệt, các vị trí > 10 đa A trong phản ứng không tương thích càng khẳng định rằng APA có thể tham gia vào phản ứng căng thẳng của tuyến trùng. Nói chung, APA phản ứng với căng thẳng đóng một vai trò quan trong trong việc điều chỉnh căng thẳng phi sinh học và căng thẳng sinh học thông qua các gen và con đường phản ứng với căng thẳng quan trọng (Ye và cs, 2019; Chakrabarti và cs, 2020; Yan và cs, 2021). Ví du, Ye và cs (2019) phát hiên ra rằng APA trong lúa phản ứng với khả năng chiu stress nhiệt như một chất điều chỉnh tiêu cực, đối với stress Cd bằng cách điều chỉnh quá trình sửa chữa DNA và hình thành thành tế bào, và đối với stress bênh (bênh bac lá do vi khuẩn, vi rút soc lúa và đao ôn) bằng cách điều chỉnh sư trao đổi diệp luc. So sánh các vi trí APA được liên kết với các gen được chú thích hoặc con đường giữa phương pháp kiểm soát và phương pháp điều tri nhiễm tuyến trùng sẽ phát hiện ra chức năng APA ở đậu tương liên quan đến tính kháng hoặc tính mẫn cảm của tuyến trùng. Hơn nữa, sự khác biệt về phiên mã dung hợp và lncRNA giữa các nghiệm thức chứng tỏ rằng giải trình tư gen phiên mã có chiều dài đầy đủ là một công cu manh mẽ để phân tích sự sửa đổi sau phiên mã.

### Truyền tín hiệu hormone thực vật và tương tác giữa thực vật với mầm bệnh liên quan đến phản ứng bảo vệ của thực vật

Cả hai phân tích làm giàu GO và KEGG đều khẳng định một cách nhất quán rằng các yếu tố phản ứng với căng thẳng và các con đường liên quan (truyền tín hiệu hormone thực vật và tương tác giữa thực vật với mầm bệnh) góp phần vào phản ứng miễn dịch bẩm sinh của thực vật đối với SCN. Đáng ngạc nhiên là khi tất cả các DEG trong các nhóm/con đường được xác định trong nghiên cứu này được so sánh với những gì được liệt kê bởi Zhang và cs. (2017), Miraeiz và cs. (2020), chỉ có 1-3 gen chồng chéo được tìm thấy; DEG duy nhất, *Glyma.11G207000*, mã hóa protein lặp lại giàu leucine được tìm thấy trong cả ba nghiên cứu. Sự khác biệt có thể được tạo ra do các hệ thống tương tác SCN-đậu tương và bị ảnh hưởng bởi thời gian cấy, kiểu gen, loại tuyến trùng và mật độ tuyến trùng. Ví dụ, một phân tích phiên mã được tiến hành sớm nhất là 8 giờ sau khi cấy vi khuẩn HG loại 0 trên đậu tương Bắc Kinh, *G. soja* PI 468916, Fayette, và Williams 82 của Miraeiz và cs (2020), và giai đoạn ít vận động sau đó ở 3, 5 và 8 ngày (các mẫu gộp chung) với HG loại 2.5.7 trên hai kiểu gen *G. soja* của Zhang và cs (2017), và 8 ngày với HG loại 2.5.7 và HG loại 1.2.3.5.6.7 trên cùng một kiểu gen 09-138 trong nghiên cứu này. Hầu hết các nghiên cứu hồ sơ phiên mã được kiểm tra trong vòng 2-10 ngày kể từ

khi thiết lập địa điểm cho ăn SCN thường cần 48 giờ sau khi tiêm chủng, và sự hình thành hợp bào và xẹp hợp bào xảy ra trong vòng 2-10 ngày sau khi tiêm chủng có phản ứng kháng thuốc (Klink và cs, 2007; Kandoth và cs, 2011).

Mặc dù các gen biểu hiện khác biệt duy nhất đối với nhiễm SCN4 hoặc SCN5 đã được xác đinh ở 09-138, hầu hết các DEG được biểu hiện trong cả phản ứng kháng và nhay cảm với chỉ một sự khác biệt nhỏ (Hình 7), cho thấy các tính trang định tính và định lượng. Ví du, trong con đường tượng tác giữa thực vật - mầm bênh, các thành phần tín hiệu phụ thuộc PPR-CERK1 ngược dòng và Ca<sup>2+</sup> xuối dòng CDPK, Rboh (kích hoạt phản ứng bùng nổ oxy, ROS), CaM/CML, HSP và PR1 đều được xác đinh cả tượng thích và không tương thích rễ, và các WRKY hạ nguồn và Pti6 với điều chỉnh tăng chỉ được phát hiện trong phản ứng không tương thích (Hình 7E, F), trong khi các thành phần này tham gia vào hoạt động PTI và/hoặc ETI. Trong con đường hormone thực vật, tất cả phytohormone ngoai trừ Brassinosteroid đều được kích hoat với 1-4 DEG chính, trong khi mạng phytohormone của các con đường tín hiệu JA, ET và SA cũng cần thiết cho PTI và ETI (Cui và cs, 2015). Naveed và cs (2020) phát hiên ra rằng cả cây kháng bênh và cây mẫn cảm đều có phản ứng phiên mã gần như giống nhau, nhưng cây kháng bệnh đạt được chương trình tái bản phiên mã biên độ cao sớm hơn vài giờ so với cây mẫn cảm thông qua mang lưới tín hiệu phytohormone phòng vê. Ở đây, chúng tôi chỉ phát hiện môt thời điểm trong giai đoan lây nhiễm sau đó và việc kiểm tra theo chuỗi thời gian sẽ tiết lộ thêm về cách các con đường hoạt động cùng nhau để bảo vệ chống lại sự tấn công của tuyến trùng. Khái niêm PTI-ETI tiếp tục với nhiễu xuyên âm giữa các thành phần tín hiệu PTI-ETI kích hoạt hiệu quả các phản ứng miễn dịch của thực vật ngày càng được các nhà sinh hoc chú ý (Mine và cs, 2018; Naveed và cs, 2020; Yuan và cs, 2021), và khái niêm này cũng có thể áp dung cho tương tác SCN-đâu tương dưa trên các thành phần tín hiệu được xác định trong các con đường này. Ngoài ra, đáng ngạc nhiện là mặc dù 09-138 chứa locus Peking-*rhg1a*, không có bất kỳ DEG nào được tìm thấy trong khu vực đó, điều này cho thấy một cơ chế kháng thay thế trong 09-138.

# Yếu tố phiên mã chức năng tương tác protein-protein trong phản ứng phòng vệ của đậu tương

Các yếu tố phiên mã với vai trò là cơ quan điều hòa phiên mã hoạt động bằng cách liên kết với vùng khởi đông của gen mục tiêu và điều chỉnh phản ứng của thực vật đối với áp lực môi trường, ví dụ, thay đổi sự biểu hiện của các tầng gen phòng vệ (Chen và cs, 2002; Alves và cs, 2014). Các phiên mã mới lạ được xác định trưng bày hơn 5.000 TF, với 5 bảng xếp hang hàng đầu là WRKY, AP2/ERF-ERF, NAC, GRAS và bHLH. Các TF WRKY, với tư cách là họ lớn nhất của các cơ quan điều hòa phiên mã, được xác định nhất quán trong hầu hết các phân tích phiên mã về nhiễm SCN (Ithal và cs, 2007; Kandoth và cs, 2011; Mazarei và cs, 2011; Wan và cs, 2015; Zhang và cs, 2017; Song và cs, 2019; Jiang và cs, 2020; Miraeiz và cs, 2020). Họ WRKY, liên quan đến phản ứng với căng thẳng ở đậu tương, đã được kiểm tra, ví dụ, phản ứng với bệnh gỉ sắt ở đậu tương (Phakopsora pachyrhizi) (Bencke-Malato và cs, 2014), stress do muối (Yu và cs, 2016), mất nước và stress do muối (Song và cs, 2016), và tuyến trùng nang đậu tương (Yang và cs, 2017). Tuy nhiên, 19 WRKY-DEG đến SCN4 hoặc SCN5 được xác đinh trong nghiên cứu này không được tìm thấy trong các nghiên cứu trước đây về nhiễm SCN (Yang và cs, 2017; Zhang và cs, 2017; Miraeiz và cs, 2020), chỉ ra rằng các yếu tố WRKY được xác định này có thể đặc trưng cho dòng 09-138 hoặc các chủng tuyến trùng được sử dụng trong nghiên cứu này.

Các yếu tố WRKY trong thực vật được chia thành năm nhóm (I, IIa + IIb, IIc, IId + IIe và III) và sự tương tác giữa miền WRKY và miền đối tác của nó (ví dụ, VQ) liên quan đến tín hiệu, phiên mã và các quá trình sinh học quan trong khác (Chi và cs. 2013; Alves và cs, 2014). Tương tác WRKY-VQ đã được nghiên cứu kỹ trong cây Arabidopsis. Như đã đề cập ở trên, tương tác AtWRKY33 (nhóm I)/MSK1 kích hoạt biểu hiện gen bảo vệ thực vât (Andreasson và cs, 2005; Qiu và cs, 2008; Alves và cs, 2014). AtWRKY25, môt chất tương đồng của AtWRKY33, cũng có thể tương tác với MSK1 và MPK4 trong trường hợp không có mầm bệnh (Cheng và cs, 2012). Ngoài ra, AtWRKY33 có thể tương tác với hai protein VQ khác, AtSIB1 (protein liên kết yếu tố sigma 1, AtVQ23) và AtSIB2 (AtVQ16), trong nhân để kích hoat khả năng chống lai mầm bênh hoai tử, Botrytis cinerea (Lai và cs, 2011). Trong nghiên cứu này, việc thiếu MPK4 tương đồng chỉ ra một cơ chế tương tác thay thế có thể tham gia vào phản ứng bảo vệ tuyến trùng. Trong hệ thống tương tác giữa đậu tương và sâu bệnh, chỉ có một GmVQ58 được xác định là chất điều hòa tiêu cực đối với tính kháng của đậu tương đối với loại giun thông thường (Spodoptera litura Fabricius), và GmVQ58 có thể tương tác với GmWRK (Li X. và cs, 2020).

Họ CaM bao gồm các protein liên kết Ca<sup>2+</sup> phổ biến hoặc protein cảm biến canxi, có thể đóng vai trò quan trọng trong các dòng tín hiệu tế bào kết hợp với các kích thích môi trường khác nhau (Zeng và cs, 2015). Ví dụ, AtCaMBP25/AtVQ15 được tìm thấy như một tác nhân tiêu cực điều chỉnh khả năng chống chịu căng thẳng thẩm thấu trong quá trình nảy mầm của hạt và sự phát triển của cây con (Perruc và cs, 2004). Truyền tín hiệu qua trung gian CaM có thể điều chỉnh cân bằng nội môi ROS một cách trực tiếp và gián tiếp (Zeng và cs, 2015). Ở đây, chúng tôi tìm thấy DEGs *CaM/CML* trong con đường mầm bệnh thực vật và hai *CaMBPGmVQ5/VQ70*, tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với các VQ và WRKY khác để tạo thành phức hợp GmVQ5/70-GmVQ44-GmWRKY15-GmVQ24 (MSK1) (Hình 8B). Chỉ phản ứng không tương thích mới có thể kích hoạt GmVQ5/70, GmWRKY15 và GmVQ24, đồng thời ngăn chặn đầu nối GmVQ44, cho thấy rằng các tương tác VQ-WRKY tham gia vào phản ứng bảo vệ của thực vật đối với SCN4. Ngoài ra, mức độ biểu hiện cao của GmWRKY15 làm tăng tính kháng SCN đồng nhất với việc biểu hiện quá mức của AtWRKY33 tương đồng làm giảm tính nhạy cảm với *H. schachtii* (Ali và cs, 2013).

### Con đường sinh tổng hợp Phenylpropanoid phong phú hàng đầu tham gia vào cả phản ứng kháng và mẫn cảm

Con đường phenylpropanoid đã được coi là một phản ứng bảo vệ phổ biến chống lại các mầm bệnh bao gồm cả tuyến trùng, và con đường này luôn được bổ sung trong tương tác SCN-đậu tương (Edens và cs, 1995; Dixon và cs, 2002; Zhang và cs, 2017; Li và cs, 2018; Singh và cs, 2019; Miraeiz và cs, 2020). Khoảng 75% DEG trong con đường này là peroxidase, và hơn 80% các gen peroxidase đã được làm giàu có thể được tạo ra sau khi nhiễm tuyến trùng trong phản ứng mẫn cảm hoặc kháng thuốc, phù hợp với các báo cáo trước đây (Miraeiz và cs, 2020), gợi ý rằng peroxidase đóng vai trò trung tâm trong phản ứng với sự tấn công của tuyến trùng. Peroxidase góp phần bảo vệ thực vật bằng cách sửa đổi thành tế bào bao gồm lignin, suberin, polysaccharide feruloyl hóa và HPRG (chất kéo dài), tăng cường sản xuất ROS và sản xuất phytoalexin (Pandey và cs, 2017). Các enzym quan trọng được liên kết với quá trình sinh tổng hợp lignin và được biểu hiện duy nhất trong phản ứng không tương thích (ví dụ: HST, *Glyma.15G002600*) hoặc tương thích (ví dụ, beta-glucosidase, *Glyma.15G031300*) sẽ là các gen được nhắm mục tiêu

tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ khả năng bảo vệ hoặc cơ chế gây bệnh của thực vật.

# Quá trình sinh học Carbohydrate và vai trò biến đổi thành tế bào trong khả năng nhạy cảm của tuyến trùng nang đậu tương

Nhiễm trùng SCN5 gây ra nhiều DEG với nhiều gen được điều chỉnh hơn trong quá trình biến đổi thành tế bào và chuyển hóa carbohydrate so với nhiễm SCN4 nhưng với một số DEG chồng chéo về số lượng, cho thấy các DEG tích lũy và duy nhất trong quá trình sinh học carbohydrate bao gồm chuyển hóa, sinh tổng hợp, chất xúc tác và vân chuyển làm viêc cùng nhau để tao ra SCN mẫn cảm hoặc kháng thuốc. Miraeiz và cs (2020) cũng báo cáo rằng W82 nhạy cảm cho thấy các gen ít đáp ứng hơn, các gen điều chỉnh thấp hơn trong chuyển hóa carbohydrate và protein vận chuyển, và một số gen chồng chéo với kiểu gen kháng thuốc 8 giờ sau khi cấy. Tuy nhiên, một lần nữa, có ít DEG phổ biến hơn được tìm thấy trong khoảng thời gian từ 8 giờ sau khi cấy (Miraeiz và cs, 2020) đến 8 ngày (nghiên cứu này), một beta-glucosidase được điều chỉnh giảm ở 8 giờ nhưng được điều chỉnh tăng lên ở 8 ngày trong nghiên cứu này, gợi ý biểu hiện khác biệt về mặt không gian và thời gian. Trong con đường chuyển hóa tinh bột và sucrose, sucrose synthase, hexokinase, beta-amylase và polygalacturonase bị ức chế nhiều hơn, beta-glucosidase, beta-fructofuranosidase và galacturonosyltransferase được tạo ra trong tương tác tương thích nhiều hơn là trong tương tác không tương thích, chứng tỏ sư phức tạp đối với khả năng gây bệnh của tuyến trùng. Hofmann và cs (2007) đã chứng minh rằng việc cung cấp sucrose cho hop bào do H. schachtii gây ra phu thuộc vào con đường apoplasmic ở giai đoan đầu trong quá trình hình thành syncyti và trên con đường giao hưởng trong giai đoạn sau khi syncytia được liên kết với phloem. Sự thay đổi của một loạt các enzym trong quá trình trao đổi chất có thể giải thích các kiểu biểu hiện enzym khác nhau trong các hệ thống tương tác SCN-đâu tương khác nhau cả về mặt không gian và thời gian.

#### KÉT LUÂN

Kết luận, nghiên cứu này lần đầu tiên đại diện cho sự so sánh trình tự phiên mã có chiều dài đầy đủ giữa các phản ứng tương thích và không tương thích trên cùng một bộ gen đậu tương với *H. glycine*. Các yếu tố phản ứng căng thẳng, con đường tương tác với mầm bệnh thực vật, con đường dẫn truyền tín hiệu hormone thực vật và các yếu tố phiên mã góp phần vào phản ứng miễn dịch của thực vật. Các gen liên quan đến biến đổi thành tế bào và chuyển hóa carbohydrate đóng vai trò quan trọng trong tính nhạy cảm của tuyến trùng. Con đường sinh tổng hợp phenylpropanoid được làm giàu nhờ hai loại nhiễm tuyến trùng. Lần đầu tiên, một mô hình tương tác WRKY-VQ dẫn đến phản ứng bảo vệ thực vật đối với sự lây nhiễm tuyến trùng trong một phản ứng không tương thích được thiết lập. Các sự kiện AS, APA và lncRNA đã được xác định sẽ cung cấp thông tin chi tiết về chức năng của quá trình sửa đổi phiên mã trong quá trình tương tác giữa cây và tuyến trùng. Kiến thức về sự tương tác giữa SCN-đậu tương sẽ giúp chúng ta hiểu được sự phát triển của tính kháng và tính mẫn cảm, và các nghiên cứu chức năng sâu hơn sẽ giúp khám phá các chiến lược kiểm soát mới chống lại tuyến trùng.

#### TÀI LIỆU BỔ SUNG

Tài liệu bổ sung cho bài viết này có thể được tìm thấy trực tuyến tại:

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.866322/full#supplementarymaterial

Bảng bổ trợ S1 | Trình tự mồi cho qRT-PCR.

Bảng bổ trợ S2 | Thống kê dữ liệu sạch.

Bảng bổ trợ S3 | Tất cả danh sách gen dung hợp cho các mẫu khác nhau.

Bảng bổ trợ S4 | Tóm tắt phân tích SSR.

Bảng bổ trợ S5 | Tất cả các yếu tố phiên mã nhận dạng.

Bảng bổ trợ S6 | Chú thích chức năng isoform tiểu thuyết.

Bảng bổ trợ S7 | Chú thích chức năng gen mới.

Bảng bổ trợ S8 | Số lượng DEG và DET được chú thích.

Bảng Phụ S9 | Chú thích DEG-GO hàng đầu của phần tử phản ứng căng thẳng so sánh giữa CK vs SCN4 và CK vs SCN5.

Bảng bổ trợ S10 | So sánh đường dẫn DEG-KEGG hàng đầu giữa CK so với SCN4 và CK so với SCN5.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Acharya, K., Tande, C., and Byamukama, E. (2016). Determination of Heterodera glycines virulence phenotypes occurring in South Dakota. Plant Dis. 100, 2281–2286. doi: 10.1094/PDIS-04-16-0572-RE

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Ali, M. A., Abbas, A., Kreil, D. P., and Bohlmann, H. (2013). Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode Heterodera schachtii in Arabidopsis roots. BMC Plant Biol. 13:47. doi: 10.1186/1471-2229-13-47

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., de Souza, G. B., Barros, V. A., and Fietto, L. G. (2014). Transcription factor functional protein-protein interactions. Proteomes 2, 85–106. doi: 10.3390/proteomes2010085

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11:R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N. H., Zhu, S., et al. (2005). The MAP kinase substrate MSK1 is a regulator of plant defense responses. EMBO J. 24, 2579–2589. doi: 10.1038/sj.emboj.7600737

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., et al. (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. Nucleic Acids Res. 32, D115–D119. doi: 10.1093/nar/gkh131

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. Nat. Genet. 25, 25–29. doi: 10.1038/75556

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C., and Li, W. W. (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic Acids Res. 34, 369–373. doi: 10.1093/nar/gkl198

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Bandara, A. Y., Weerasooriya, D. K., Bradley, C. A., Allen, T. W., and Esker, P. D. (2020). Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. PLoS One 15:e0231141. doi: 10.1371/journal.pone.0231141

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Bedre, R., Irigoyen, S., Schaker, P. D. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Da Silva, J. A., and Mandadi, K. K. (2019). Genome-wide alternative splicing landscapes modulated by biotrophic sugarcane smut pathogen. Sci. Rep. 9:8876. doi: 10.1038/s41598-019-45184-1

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Bencke-Malato, M., Cabreira, C., Wiebke-Strohm, B., Bücker-Neto, L., Mancini, E., Osorio, M. B., et al. (2014). Genome-wide annotation of the soybean WRKY family and functional characterization of genes involved in response to Phakopsora pachyrhizi infection. BMC Plant Biol. 14:236. doi: 10.1186/s12870-014-0236-0

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. Series B. Stat. Methodol. 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

CrossRef Full Text | Google Scholar

Budak, H., Kaya, S. B., and Cagirici, H. B. (2020). Long non-coding RNA in plants in the era of reference sequences. Front. Plant Sci. 11:276. doi: 10.3389/fpls.2020.00276

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Byrd, D. W., Kirkpatrick, T., and Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. J. Nematol. 15, 142–143. doi: 10.1007/11527503\_12

CrossRef Full Text | Google Scholar

Cao, J., Ye, C., Hao, G., Dabney-Smith, C., Hunt, A. G., and Li, Q. Q. (2019). Root hair single cell type specific profiles of gene expression and alternative polyadenylation under cadmium stress. Front. Plant Sci. 10:589. doi: 10.3389/fpls.2019.00589

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Chakrabarti, M., de Lorenzo, L., Abdel-Ghany, S. E., Reddy, A., and Hunt, A. G. (2020). Wide-ranging transcriptome remodelling mediated by alternative polyadenylation in response to abiotic stresses in Sorghum. Plant J. 102, 916–930. doi: 10.1111/tpj.14671

Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., et al. (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell 14, 559–574. doi: 10.1105/tpc.010410

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Cheng, N. H., Liu, J. Z., Liu, X., Wu, Q., Thompson, S. M., Lin, J., et al. (2011). Arabidopsis monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperaturedependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. J. Biol. Chem. 286, 20398–20406. doi: 10.1074/jbc.M110.201707

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Cheng, Y., Zhou, Y., Yang, Y., Chi, Y. J., Zhou, J., Chen, J. Y., et al. (2012). Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in Arabidopsis as interacting proteins of WRKY transcription factors. Plant Physiol. 159, 810–825. doi: 10.1104/pp.112.196816

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J. Q., et al. (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. Mol. Plant 6, 287–300. doi: 10.1093/mp/sst026

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Clavijo, B. J., Venturini, L., Schudoma, C., Accinelli, G. G., Kaithakottil, G., Wright, J., et al. (2017). An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic evidence for chromosomal translocations. Genome Res. 27, 885–896. doi: 10.1101/gr.217117.116

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Cook, D. E., Bayless, A. M., Wang, K., Guo, X., Song, Q., Jiang, J., et al. (2014). Distinct copy number, coding sequence, and locus methylation patterns underlie Rhg1-mediated soybean resistance to soybean cyst nematode. Plant Physiol. 165, 630–647. doi: 10.1104/pp.114.235952

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Cook, D. E., Lee, T. G., Guo, X., Melito, S., Wang, K., Bayless, A. M., et al. (2012). Copy number variation of multiple genes at Rhg1 mediates nematode resistance in soybean. Science 338, 1206–1209. doi: 10.1126/science.1228746

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Couturier, J., Wu, H. C., Dhalleine, T., Pégeot, H., Sudre, D., Gualberto, J. M., et al. (2014). Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1. Mol. Plant 7, 187–205. doi: 10.1093/mp/sst156

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. Annu. Rev. Plant Biol. 66, 487–511. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040012

Cui, J., Shen, N., Lu, Z., Xu, G., Wang, Y., and Jin, B. (2020). Analysis and comprehensive comparison of PacBio and nanopore-based RNA sequencing of the Arabidopsis transcriptome. Plant Methods 16:85. doi: 10.1186/s13007-020-00629-x

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826–833. doi: 10.1038/35081161

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Muck, A., Mithöfer, A., and Shetty, S. H. (2010). Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defense. J. Phytopathol. 158, 585–593. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01669.x

CrossRef Full Text | Google Scholar

Deng, Y. Y., Li, J. Q., Wu, S. F., Zhu, Y. P., Chen, Y. W., and He, F. C. (2006). Integrated NR database in protein annotation system and its localization. Comput. Eng. 32, 71–74. doi: 10.1109/INFOCOM.2006.241

CrossRef Full Text | Google Scholar

Dinesh-Kumar, S. P., and Baker, B. J. (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 1908–1913. doi: 10.1073/pnas.020367497

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., and Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. Mol. Plant Pathol. 3, 371–390. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Edens, R. M., Anand, S. C., and Bolla, R. I. (1995). Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with Meloidogyne incognita or Heterodera glycines. J. Nematol. 27, 292–303. doi: 10.1006/jipa.1995.1090

CrossRef Full Text | Google Scholar

Eitas, T. K., and Dangl, J. L. (2010). NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. Curr. Opin. Plant Biol. 13, 472–477. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.007

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., et al. (2014). Pfam: the protein families database. Nucleic Acids Res. 42, D222–D230. doi: 10.1093/nar/gkt1223

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Finotello, F., and Di Camillo, B. (2015). Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. Brief. Funct. Genomics 14, 130–142. doi: 10.1093/bfgp/elu035

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Foissac, S., and Sammeth, M. (2007). ASTALAVISTA: dynamic and flexible analysis of alternative splicing events in custom gene datasets. Nucleic Acids Res. 35, W297–W299. doi: 10.1093/nar/gkm311

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., et al. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-sequesing the trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. 8, 1494–1512. doi: 10.1038/nprot.2013.084

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Hirao, T., Fukatsu, E., and Watanabe, A. (2012). Characterization of resistance to pine wood nematode infection in Pinus thunbergiiusing suppression subtractive hybridization. BMC Plant Biol. 12:13. doi: 10.1186/1471-2229-12-13

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Hofmann, J., and Grundler, F. M. W. (2008). Starch as a sugar reservoir for nematodeinduced syncytia. Plant Signal. Behav. 3, 961–962. doi: 10.4161/psb.6075

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Hofmann, J., Hess, P. H., Szakasits, D., Blöchl, A., Wieczorek, K., Daxböck-Horvath, S., et al. (2009). Diversity and activity of sugar transporters in nematode-induced root syncytia. J. Exp. Bot. 60, 3085–3095. doi: 10.1093/jxb/erp138

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Hofmann, J., Wieczorek, K., Blöchl, A., and Grundler, F. M. W. (2007). Sucrose supply to nematode-induced syncytia depends on the apoplasmic and symplasmic pathways. J. Exp. Bot. 58, 1591–1601. doi: 10.1093/jxb/erl285

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Hua, C., Li, C. J., Hu, Y. F., Mao, Y. Z., You, J., Wang, M. Z., et al. (2018). Identification of HG types of soybean cyst nematode Heterodera glycines and resistance screening on soybean genotypes in Northeast China. J. Nematol. 50, 41–50. doi: 10.21307/jofnem-2018-007

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Huang, M., Qin, R., Li, C., Liu, C., Jiang, Y., Yu, J., et al. (2021). Transgressive resistance to Heterodera glycines in chromosome segment substitution lines derived from susceptible soybean parents. Plant Genome 14:e20091. doi: 10.1002/tpg2.20091

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Huang, M., Qin, R., Li, C., Wang, M., Jiang, Y., Yu, J., et al. (2022). Response of soybean genotypes from Northeast China to Heterodera glycines races 4 and 5, and characterisation of rhg1 and Rhg4 genes for soybean resistance. Nematology 24, 333–345. doi: 10.1163/15685411-bja10134

CrossRef Full Text | Google Scholar

Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Hearne, L., Maier, T., Baum, T. J., et al. (2007). Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst

nematode infection of soybean. Mol. Plant Microbe Interact. 20, 293–305. doi: 10.1094/MPMI-20-3-0293

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Jiang, H. P., Bu, F. S., Tian, L. Z., Sun, Q. X., Bao, D. F., Zhao, X., et al. (2020). RNAseq-based identification of potential resistance mechanism against the soybean cyst nematode (Heterodera glycines) HG Type 0 in soybean (Glycine max) cv. Dongnong L-204. Crop Pasture Sci. 71, 539–551. doi: 10.1071/CP20060

CrossRef Full Text | Google Scholar

John, S., Olas, J. J., and Mueller-Roeber, B. (2021). Regulation of alternative splicing in response to temperature variation in plants. J. Exp. Bot. 72, 6150–6163. doi: 10.1093/jxb/erab232

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kandoth, P. K., Ithal, N., Recknor, J., Maier, T., Nettleton, D., Baum, T. J., et al. (2011). The Soybean Rhg1 locus for resistance to the soybean cyst nematode Heterodera glycines regulates the expression of a large number of stress- and defense-related genes in degenerating feeding cells. Plant Physiol. 155, 1960–1975. doi: 10.1104/pp.110.167536

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., and Hattori, M. (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. Nucleic Acids Res. 32, D277–D280. doi: 10.1093/nar/gkh063

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kang, W., Zhu, X., Wang, Y., Chen, L., and Duan, Y. (2018). Transcriptomic and metabolomic analyses reveal that bacteria promote plant defense during infection of soybean cyst nematode in soybean. BMC Plant Biol. 18:86. doi: 10.1186/s12870-018-1302-9

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kasai, T., Inoue, M., Koshiba, S., Yabuki, T., Aoki, M., Nunokawa, E., et al. (2004). Solution structure of a BolA-like protein from Mus musculus. Protein Sci. 13, 545–548. doi: 10.1110/ps.03401004

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Khoei, M. A., Karimi, M., Karamian, R., Amini, S., and Soorni, A. (2021). Identification of the complex interplay between nematode-related lncRNAs and their target genes in Glycine max L. Front. Plant Sci. 12:779597. doi: 10.3389/fpls.2021.779597

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. EMBO J. 20, 3617–3622. doi: 10.1093/emboj/20.14.3617

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Klink, V. P., and Matthews, B. F. (2009). Emerging approaches to broaden resistance of soybean to soybean cyst nematode as supported by gene expression studies. Plant Physiol. 151, 1017–1022. doi: 10.1104/pp.109.144006

Klink, V. P., Overall, C. C., Alkharouf, N. W., MacDonald, M. H., and Matthews, B. F. (2007). A time-course comparative microarray analysis of an incompatible and compatible response by Glycine max (soybean) to Heterodera glycines (soybean cyst nematode) infection. Planta 226, 1423–1447. doi: 10.1007/s00425-007-0581-4

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z., Liu, X., Zhao, S., Wei, L., et al. (2007). CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. Nucleic Acids Res. 36, W345–W349. doi: 10.1093/nar/gkm391

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Koonin, E. V., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Krylov, D. M., Makarova, K. S., et al. (2004). A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. Genome Biol. 5:R7. doi: 10.1186/gb-2004-5-2-r7

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Lai, Z., Li, Y., Wang, F., Cheng, Y., Fan, B., Yu, J. Q., et al. (2011). Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. Plant Cell 23, 3824–3841. doi: 10.1105/tpc.111.090571

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Lalitha, S. (2000). Primer premier 5. Biotech. Softw. Internet Rep. 1, 270–272. doi: 10.1089/152791600459894

CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, C., Xiang, X., Huang, Y., Zhou, Y., An, D., Dong, J., et al. (2020). Long-read sequencing reveals genomic structural variations that underlie creation of quality protein maize. Nat. Commun. 11:17. doi: 10.1038/s41467-019-14023-2

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, X., Qin, R., Du, Q., Cai, L., Hu, D., Du, H., et al. (2020). Knockdown of GmVQ58 encoding a VQ motif-containing protein enhances soybean resistance to the common cutworm (Spodoptera litura Fabricius). J. Exp. Bot. 71, 3198–3210. doi: 10.1093/jxb/eraa095

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics 34, 3094–3100. doi: 10.1093/bioinformatics/bty191

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, J. W., Ma, W., Zeng, P., Wang, Z. Y., Geng, B., Yang, J. C., et al. (2015). LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. Brief. Bioinform. 16:806. doi: 10.1093/bib/bbu048

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, S., Chen, Y., Zhu, X., Wang, Y., Jung, K. H., Chen, L., et al. (2018). The transcriptomic changes of Huipizhi Heidou (Glycine max), a nematode-resistant black

soybean during Heterodera glycines race 3 infection. J. Plant Physiol. 220, 96–104. doi: 10.1016/j.jplph.2017.11.001

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, X., Wang, X., Zhang, S., Liu, D., Duan, Y., and Dong, W. (2012). Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. PLoS One 7:e39650. doi: 10.1371/journal.pone.0039650

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, Y., Qi, X., Chang, R., and Qiu, L. (2011). "Evaluation and utilization of soybean germplasm for resistance to cyst nematode in China," in Soybean-Molecular Aspects of Breeding, ed. A. Sudaric (London: InTech Open), 373–396. doi: 10.5772/14379

CrossRef Full Text | Google Scholar

Li, X., Wang, X., Zhang, S., Liu, D., Duan, Y., and Dong, W. (2011). Comparative profiling of the transcriptional response to soybean cyst nematode infection of soybean roots by deep sequencing. Chin. Sci. Bull. 56:1904. doi: 10.1007/s11434-011-4510-3

CrossRef Full Text | Google Scholar

Liu, S., Kandoth, P. K., Lakhssassi, N., Kang, J., Colantonio, V., and Heinz, R. (2017). The soybean GmSNAP18 gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. Nat. Commun. 8:14822. doi: 10.1038/ncomms14822

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Liu, S., Kandoth, P. K., Warren, S. D., Yeckel, G., Heinz, R., and Alden, J. (2012). A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. Nature 492, 256–260. doi: 10.1038/nature11651

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mandadi, K. K., and Scholthof, K. B. (2015). Genome-wide analysis of alternative splicing landscapes modulated during plant-virus interactions in Brachypodium distachyon. Plant Cell 27, 71–85. doi: 10.1105/tpc.114.133991

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mao, X. Z., Cai, T., Olyarchuk, J. G., and Wei, L. P. (2005). Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. Bioinformatics 21, 3787–3793. doi: 10.1093/bioinformatics/bti430

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Martín, G., Márquez, Y., Mantica, F., Duque, P., and Irimia, M. (2021). Alternative splicing landscapes in Arabidopsis thaliana across tissues and stress conditions highlight major functional differences with animals. Genome Biol. 22:35. doi: 10.1186/s13059-020-02258-y

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K., et al. (2010). Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. Mol. Genet. Genom. 283, 185–196. doi: 10.1007/s00438-009-0506-y

Matsye, P. D., Kumar, R., Hosseini, P., Jones, C. M., Tremblay, A., Alkharouf, N. W., et al. (2011). Mapping cell fate decisions that occur during soybean defense responses. Plant Mol. Biol. 77, 513–528. doi: 10.1007/s11103-011-9828-3

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mazarei, M., Liu, W., Al-Ahmad, H., Arelli, P. R., Pantalone, V. R., and Stewart, C. N. Jr. (2011). Gene expression profiling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode. Theor. Appl. Genet. 123, 1193–1206. doi: 10.1007/s00122-011-1659-8

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mckenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., et al. (2010). The Genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res. 20, 1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mine, A., Seyfferth, C., Kracher, B., Berens, M. L., Becker, D., and Tsuda, K. (2018). The defense phytohormone signaling network enables rapid, high-amplitude transcriptional reprogramming during effector-triggered immunity. Plant Cell 30, 1199–1219. doi: 10.1105/tpc.17.00970

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Miraeiz, E., Chaiprom, U., Afsharifar, A., Karegar, A., Drnevich, J. M., and Hudson, M. E. (2020). Early transcriptional responses to soybean cyst nematode HG Type 0 show genetic differences among resistant and susceptible soybeans. Theor. Appl. Genet. 133, 87–102. doi: 10.1007/s00122-019-03442-w

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Mitchum, M. G., and Baum, T. J. (2008). "Genomics of the soybean cyst nematodesoybean interaction," in Genetics and Genomics of Soybean, ed. G. Stacey (New York, NY: Springer), 321–341. doi: 10.1007/978-0-387-72299-3\_17

CrossRef Full Text | Google Scholar

Mitchum, M. G., Wrather, J. A., Heinz, R. D., Shannon, J. G., and Danekas, G. (2007). Variability in distribution and virulence phenotypes of Heterodera glycines in Missouri during 2005. Plant Dis. 91, 1473–1476. doi: 10.1094/PDIS-91-11-1473

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Monaghan, J., and Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. Curr. Opin. Plant Biol. 15, 349–357. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.006

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Moseler, A., Aller, I., Wagner, S., Nietzel, T., Przybyla-Toscano, J., Mühlenhoff, U., et al. (2015). The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 13735–13740. doi: 10.1073/pnas.1510835112

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., and Ali, G. S. (2020). The PTI to ETI continuum in phytophthora-plant interactions. Front. Plant Sci. 11:593905. doi: 10.3389/fpls.2020.593905

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Neupane, S., Mathew, F. M., Varenhorst, A. J., and Nepal, M. P. (2019). Transcriptome profiling of interaction effects of soybean cyst nematodes and soybean aphids on soybean. Sci. Data 6:133. doi: 10.1038/s41597-019-0140-4

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Niblack, T. L., Colgrove, A. L., Colgrove, K., and Bond, J. P. (2008). Shift in virulence of soybean cyst nematode is associated with use of resistance from PI 88788. Plant Health Prog. 9:29. doi: 10.1094/PHP-2008-0118-01-RS

CrossRef Full Text | Google Scholar

Niblack, T. L., Lambert, K. N., and Tylka, G. L. (2006). A model plant pathogen from the kingdom animalia: Heterodera glycines, the soybean cyst nematode. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 283–303. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140218

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., and Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. Anal. Biochem. 6:308. doi: 10.4172/2161-1009.100030

CrossRef Full Text | Google Scholar

Perruc, E., Charpenteau, M., Ramirez, B. C., Jauneau, A., Galaud, J. P., Ranjeva, R., et al. (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings. Plant J. 38, 410–420. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02062.x

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Puthoff, D. P., Ehrenfried, M. L., Vinyard, B. T., and Tucker, M. L. (2007). GeneChip profiling of transcriptional responses to soybean cyst nematode, Heterodera glycines, colonization of soybean roots. J. Exp. Bot. 58, 3407–3418. doi: 10.1093/jxb/erm211

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Qin, L., Wang, M., Zuo, J., Feng, X., Liang, X., Wu, Z., et al. (2015). Cytosolic BolA plays a repressive role in the tolerance against excess iron and MV-induced oxidative stress in plants. PLoS One 10:e0124887. doi: 10.1371/journal.pone.0124887

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Qiu, J. L., Fiil, B. K., Petersen, K., Nielsen, H. B., Botanga, C. J., Thorgrimsen, S., et al. (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. EMBO J. 27, 2214–2221. doi: 10.1038/emboj.2008.147

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Sadek, J., Omer, A., Hall, D., Ashour, K., and Gallouzi, I. E. (2019). Alternative polyadenylation and the stress response. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 10:e1540. doi: 10.1002/wrna.1540

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., and De Bolle, M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiol. Biochem. 46, 941–950. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Severing, E. I., Van Dijk, A. D., Morabito, G., Busscher-Lange, J., Immink, R. G., and Van Ham, R. C. (2012). Predicting the impact of alternative splicing on plant MADS domain protein function. PLoS One 7:e30524. doi: 10.1371/journal.pone.0030524

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Singh, R. R., Chinnasri, B., De Smet, L., Haeck, A., Demeestere, K., Van Cutsem, P., et al. (2019). Systemic defense activation by COS-OGA in rice against root-knot nematodes depends on stimulation of the phenylpropanoid pathway. Plant Physiol. Biochem. 142, 202–210. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.07.003

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Song, H., Wang, P., Hou, L., Zhao, S., Zhao, C., Xia, H., et al. (2016). Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean. Front. Plant Sci. 7:9. doi: 10.3389/fpls.2016.00009

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Song, W., Qi, N., Liang, C., Duan, F., and Zhao, H. (2019). Soybean root transcriptome profiling reveals a nonhost resistant response during Heterodera glycines infection. PLoS One 14:e0217130. doi: 10.1371/journal.pone.0217130

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69, 183–215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Sun, L., Luo, H., Bu, D., Zhao, G., Yu, K., Zhang, C., et al. (2013). Utilizing sequence intrinsic composition to classify protein-coding and long non-coding transcripts. Nucleic Acids Res. 41:e166. doi: 10.1093/nar/gkt646

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., and Brown, J. W. (2012). Alternative splicing in plants-coming of age. Trends Plant Sci. 17, 616–623. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.001

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Szcześniak, M. W., Rosikiewicz, W., and Makalowska, I. (2015). CANTATAdb: a collection of plant long non-coding RNAs. Plant Cell Physiol. 57:e8. doi: 10.1093/pcp/pcv201

Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., and Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res. 28, 33–36. doi: 10.1093/nar/28.1.33

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Thiruppathi, D. (2020). SPLICEd in the seeds: integration of abscisic acid and light signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. 183, 445–446. doi: 10.1104/pp.20.00361

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Trabucco, G. M., Matos, D. A., Lee, S. J., Saathoff, A. J., and Hazen, S. P. (2013). Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid Omethyltransferase in Brachypodium distachyon. BMC Biotechnol. 13:61. doi: 10.1186/1472-6750-13-61

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Tu, Z., Shen, Y., Wen, S., Liu, H., Wei, L., and Li, H. (2021). A Tissue-Specific landscape of alternative polyadenylation, lncRNAs, TFs, and gene co-expression networks in Liriodendron chinense. Front. Plant Sci. 12:705321. doi: 10.3389/fpls.2021.705321

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Urquiaga, M. C. O., Thiebaut, F., Hemerly, A. S., and Ferreira, P. C. G. (2021). From trash to luxury: the potential role of plant lncRNA in DNA methylation during abiotic stress. Front. Plant Sci. 11:603246. doi: 10.3389/fpls.2020.603246

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Wan, J., Vuong, T., Jiao, Y., Joshi, T., Zhang, H., Xu, D., et al. (2015). Whole-genome gene expression profiling revealed genes and pathways potentially involved in regulating interactions of soybean with cyst nematode (Heterodera glycines Ichinohe). BMC Genomics 16:148. doi: 10.1186/s12864-015-1316-8

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Wang, L., Park, H. J., Dasari, S., Wang, S., Kocher, J. P., and Li, W. (2013). CPAT: coding-potential assessment tool using an alignment-free logistic regression model. Nucleic Acids Res. 41:e74. doi: 10.1093/nar/gkt006

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Wang, M., Wang, P., Liang, F., Ye, Z., Li, J., Shen, C., et al. (2018). A global survey of alternative splicing in allopolyploid cotton: landscape, complexity and regulation. New Phytol. 217, 163–178. doi: 10.1111/nph.14762

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Wang, X., Zhang, H., Sun, G., Jin, Y., and Qiu, L. (2014). Identification of active VQ motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean. Gene 543, 237–243. doi: 10.1016/j.gene.2014.04.012

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Wang, Y., Jiang, Z., Li, Z., Zhao, Y., Tan, W., Liu, Z., et al. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of the VQ gene family in soybean (Glycine max). PeerJ 7:e7509. doi: 10.7717/peerj.7509

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Xie, S., Leung, A. W., Zheng, Z., Zhang, D., Xiao, C., Luo, R., et al. (2021). Applications and potentials of nanopore sequencing in the (epi)genome and (epi)transcriptome era. Innovation 2:100153. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100153

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Xu, X., Zhang, L., Zhao, W., Fu, L., Han, Y., Wang, K., et al. (2021). Genome-wide carboxypeptidase-like analysis of the serine protein family in Triticum aestivum reveals TaSCPL184-6D is involved abiotic in stress response. BMC Genomics 22:350. doi: 10.1186/s12864-021-07647-6

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yan, C., Wang, Y., Lyu, T., Hu, Z., Ye, N., Liu, W., et al. (2021). Alternative polyadenylation in response to temperature stress contributes to gene regulation in Populus trichocarpa. BMC Genomics 22:53. doi: 10.1186/s12864-020-07353-9

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yang, J., Lv, W., Shao, L., Fu, Y., Liu, H., Yang, C., et al. (2021). PacBio and Illumina RNA sequencing identify alternative splicing events in response to cold stress in two poplar species. Front. Plant Sci. 12:737004. doi: 10.3389/fpls.2021.737004

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yang, Y., Zhou, Y., Chi, Y., Fan, B., and Chen, Z. (2017). Characterization of soybean WRKY gene family and identification of soybean WRKY genes that promote resistance to soybean cyst nematode. Sci. Rep. 7:17804. doi: 10.1038/s41598-017-18235-8

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yao, T., Feng, K., Xie, M., Barros, J., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., et al. (2021). Phylogenetic occurrence of the phenylpropanoid pathway and lignin biosynthesis in plants. Front. Plant Sci. 12:704697. doi: 10.3389/fpls.2021.704697

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Ye, C., Zhou, Q., Wu, X., Ji, G., and Li, Q. Q. (2019). Genome-wide alternative polyadenylation dynamics in response to biotic and abiotic stresses in rice. Ecotoxicol. Environ. Saf. 183:109485. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109485

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yeh, H. S., and Yong, J. (2016). Alternative polyadenylation of mRNAs: 3'-untranslated region matters in gene expression. Mol. Cells 39, 281–285. doi: 10.14348/molcells.2016.0035

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Young, M. D., Wakefield, M. J., and Smyth, G. K. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. Genome Biol. 11:R14. doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r14

Yu, Y., Wang, N., Hu, R., and Xiang, F. (2016). Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress. Springerplus 5:920. doi: 10.1186/s40064-016-2647-x

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yu, Y., Zhou, Y. F., Feng, Y. Z., He, H., Lian, J. P., Yang, Y. W., et al. (2020). Transcriptional landscape of pathogen-responsive lncRNAs in rice unveils the role of ALEX1 in jasmonate pathway and disease resistance. Plant Biotechnol. J. 18, 679–690. doi: 10.1111/pbi.13234

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Yuan, M., Ngou, B., Ding, P., and Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 62:102030. doi: 10.1016/j.pbi.2021.102030

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zeng, H., Xu, L., Singh, A., Wang, H., Du, L., and Poovaiah, B. W. (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. Front. Plant Sci. 6:600. doi: 10.3389/fpls.2015.00600

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zhang, G., Sun, M., Wang, J., Lei, M., Li, C., and Zhao, D. (2019). PacBio full-length cDNA sequencing integrated with RNA-seq reads drastically improves the discovery of splicing transcripts in rice. Plant J. 97, 296–305. doi: 10.1111/tpj.14120

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zhang, H. Y., Kjemtrup-Lovelace, S., Li, C. B., Luo, Y., Chen, L. P., and Song, B. H. (2017). Comparative RNA-seq analysis uncovers a complex regulatory network for soybean cyst nematode resistance in wild soybean (Glycine soja). Sci. Rep. 7:9699. doi: 10.1038/s41598-017-09945-0

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zhang, J., Gu, H., Dai, H., Zhang, Z., and Miao, M. (2020). Alternative polyadenylation of the stacyose synthase gene mediates source-sink regulation in cucumber. J. Plant Physiol. 245:153111. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153111

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zhao, L., Zhang, H., Kohnen, M. V., Prasad, K., Gu, L., and Reddy, A. (2019). Analysis of transcriptome and epitranscriptome in plants using PacBio iso-Seq and Nanopore-based direct RNA sequencing. Front. Genet. 10:253. doi: 10.3389/fgene.2019.00253

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H., Rosli, H. G., Pombo, M. A., Zhang, P., et al. (2016). iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. Mol. Plant 9, 1667–1670. doi: 10.1016/j.molp.2016.09.014

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar

Zhou, X., Lindsay, H., and Robinson, M. D. (2014). Robustly detecting differential expression in RNA sequencing data using observation weights. Nucleic Acids Res. 42:e91. doi: 10.1093/nar/gku310

PubMed Abstract | CrossRef Full Text | Google Scholar