北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究

李娴 陈思思 谢剑波

Transcriptome analysis of poplar leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides*

Li Xian, Chen Sisi, Xie Jianbo

引用本文:
李娴, 陈思思, 谢剑波. 杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(4):91-102. doi: 10.12171/j.1000-1522.20210481
Li Xian, Chen Sisi, Xie Jianbo. Transcriptome analysis of poplar leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(4):91-102. doi: 10.12171/j.1000-1522.20210481

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210481

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

胶孢炭疽菌侵染杨树叶片的组织病理学研究

Histopathology study of poplar leaves infected by *Colletotrichum gloeosporioides*

北京林业大学学报, 2018, 40(3): 101-109. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20170385

果生炭疽菌转录因子CfHac1的BRLZ结构域生物学功能研究

Functional analysis of BRLZ motif of the transcription factor CfHac1 in *Colletotrichum fructicola*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 70-76. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210087

转录组分析氧化胁迫对毛白杨悬浮细胞生长发育的影响

Effects of oxidative stress on growth and development of suspension cells of *Populus tomentosa* by transcriptome analysis

北京林业大学学报, 2019, 41(9): 90-98. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20190157

镉胁迫下美洲黑杨无性系‘中菏1号’转录组分析

Transcriptome analysis of clone *Populus deltoides* ‘Zhonghe 1’ under cadmium stress

北京林业大学学报, 2021, 43(7): 12-21. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20210037

转录组分析组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA对毛白杨悬浮细胞表达谱的影响

Transcriptome analysis of gene expression profiling in the suspension cells of *Populus tomentosa* treated by histone deacetylase inhibitor TSA

北京林业大学学报, 2018, 40(9): 1-14. https://doi.org/10.13332/j.1000-1522.20180158

基于全长转录组序列、核基因与叶绿体基因分析琼岛杨在杨属的亲缘关系

Genetic relationship of *Populus qiongdaoensis* in *Populus* based on full-length transcriptome sequences, nuclear genes and chloroplast genes

北京林业大学学报, 2021, 43(10): 28-37. https://doi.org/10.12171/j.1000-1522.20200286

DOI:10.12171/j.1000−1522.20210481

杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究

李 娴　陈思思　谢剑波
（北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083）

摘要:【目的】通过生理指标和高通量转录组数据解析杨树响应病原菌侵染的分子机制，为探究杨树叶片在胶孢炭疽菌侵染下生理及分子响应模式奠定重要的理论基础。**【方法】**以毛白杨无性系 LM50 为试验材料，对胶孢炭疽菌侵染后 3 种抗氧化酶活性（多酚氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶）变化模式进行分析；基于 RNA 高通量测序技术分析关键基因及其表达模式。**【结果】**病原菌侵染叶片 6 d 后，丙二醛含量和 3 种抗氧化酶的活性显著提高。共检测到 4 547 个杨树差异表达基因，其中 2 262 个基因上调，2 285 个基因下调，差异基因主要富集到糖类、脂类、次生代谢产物、苯丙烷、谷胱甘肽、多种氨基酸、不饱和脂肪酸合成及代谢等生物学通路。WRKY、ERF 等转录因子家族表达量明显改变，可能在杨树响应病原菌胁迫过程中发挥了重要作用，其中 27 个 WRKY 和 23 个 ERF 转录因子表达明显受到激活。MapMan 分析结果表明病原菌侵染导致氧化胁迫的产生，植物激素含量也增加，这些激素作为信号激活防御反应，最终诱导大量抗病通路相关基因表达。**【结论】**27 个 WRKY 和 23 个 ERF 转录因子可能在杨树响应病原菌胁迫的过程中起到重要的调控作用，谷胱甘肽、苯丙烷和类黄酮次生代谢通路可能参与杨树响应胶孢炭疽菌侵染过程。

关键词：杨树；生物胁迫；转录组；胶孢炭疽菌
中图分类号：S792.11；S718.85　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000−1522(2024)04−0091−12
引文格式：李娴，陈思思，谢剑波. 杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究［J］. 北京林业大学学报，2024，46(4)：91−102.
Li Xian, Chen Sisi, Xie Jianbo. Transcriptome analysis of poplar leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(4): 91−102.

Transcriptome analysis of poplar leaves infected with *Colletotrichum gloeosporioides*

Li Xian　Chen Sisi　Xie Jianbo
(School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract:［**Objective**］Our objective was to explore the key genes and the molecular mechanism during the infection of *Colletotrichum gloeosporioides*, which could provide new insights into the genetic basis on poplar defense pathways.［**Method**］The healthy poplar (*Populus tomentosa* LM50) leaves were inoculated with *C. gloeosporioides*. The dynamic changes of antioxidase activities of poplar leaves and key genes in the plant-interaction pathway were investigated by physiological and biochemical assays and high-throughput transcriptome sequencing.［**Result**］Malondialdehyde content, polyphenol oxidase activity, superoxide dismutase activity and catalase activity in poplar leaves were increased at 6 d after inoculation. A total of 4 547 differential genes were screened between healthy and infected leaves, among which 2 262 were up-regulated and 2 285 were down-regulated. Differential expression genes were distributed in many functional categories, including sugar, lipid, secondary metabolite, glutathione, phenylpropanoid, amino acid, unsaturated fatty acids metabolites and so on. A large number of transcription factors were detected to be

收稿日期: 2021−11−19　**修回日期:** 2022−05−09
基金项目: 国家自然科学基金项目（31872671、31972954、32022057），中国科协项目（2018QNRC001），国家林业草原科技创新青年拔尖人才项目（2020132607）。
第一作者: 李娴。主要研究方向：遗传学。Email: lixianwzx@163.com　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 谢剑波，副教授，博士生导师。主要研究方向：林木遗传育种。Email：jbxie@bjfu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

activated during the infection, such as 27 WRKY, 23 ERF, suggesting that transcription factors play important roles in response to pathogen stress. During the infection, the reactive oxygen species may act as signals that modulate the activating of plant stress responses and disease resistance pathways. The results were further confirmed by real-time quantitative PCR of six differential expressed genes detected by RNA-seq, despite differences in magnitude. [**Conclusion**] The above results uncover several essential genes that may play crucial roles in response to biotic stress. Pathways of glutathione, phenylpropanoid and flavonoid biosynthesis may also be activated during the infection.

Key words: *Populus tomentosa*; biotic stress; transcriptome; *Colletotrichum gloeosporioides*

杨树(*Populus* spp.)是一种成材快、适应性强的多年生木本植物，并且是世界上分布最广的树种之一。我国杨树人工林的种植面积已持续多年位居世界第一，其天然种约有 50 种，分布于全国 22 个省区。由于杨树生长快且轮伐期短，在工业和生活中有多种用途，是建立速生丰产林的主要树种。然而，随着人工林面积不断扩大和种植树种单一化，林地生态系统变得脆弱，易发生大规模病害，造成了严重的经济损失。杨树烂皮病在华北、西北等地广泛发生，某些林场发病率超过 50%。杨树溃疡病死亡率可高达 30%，而黑斑病曾对南京地区的响叶杨(*P. adenopoda*)造成毁灭性影响。此外，落叶病曾导致杨树生长量减少约 25%，木材损失约 30%[1]。胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是十大植物真菌病原体之一在全球热带、亚热带和温带地区均有分布。在我国北方，由胶孢炭疽菌引起的炭疽病频繁发生，尤其是在北京、陕西、河北、甘肃等地区，毛白杨(*P. tomentosa*)和北京杨(*P.* × *beijingensis*)受害最为严重[2]。

目前关于炭疽菌生物学特性、相关基因表达调控、侵染机制等方面已有相关研究。炭疽菌的侵染机制可以分为胞内半活体侵染和角质层下层侵染，这两种侵染方式前期都需分生孢子萌发产生芽管和附着胞[3−4]。张晓林等[5]采用光学显微镜、扫描和透射电镜技术系统地揭示了胶孢炭疽菌在杨树叶片上的侵染特征，确认了胶孢炭疽菌侵染杨树的类型为胞内半活体侵染型。炭疽菌的分生孢子产生附着胞，附着胞成熟后形成的侵染钉穿透角质层和表皮细胞壁，最终导致次生菌丝在寄主表皮和叶肉细胞内扩展，而次生菌丝的产生是由活体营养寄生阶段转为死体营养阶段的标志。大量次级菌丝在植物细胞生长，这些菌丝分泌大量细胞壁降解酶破坏植物组织为自身生长发育获取营养，最终导致叶片坏死。已有研究揭示胶孢炭疽菌的分子调控机制，如胶孢炭疽菌 *CgSho*1 与 *CgMsb*2 共同调节病原菌信号识别和致病性[6]; *CgRac*1 是不对称发育的主要调节因子，参与病原菌形态发生和核分裂过程，其活性改变会影响胶孢炭疽菌发育并导致非致病性[7]。在拮抗胶孢炭疽菌侵染方面，研究表明芽孢杆菌可以通过合成水解酶和抗菌化合物抑制胶孢炭疽菌生长，将分离自芽孢杆菌的环四肽作用于胶孢炭疽菌，结果显示环四肽具有对胶孢炭疽菌显著抗性[8]，Zhang 等[9]研究发现施加外源油菜素内酯(BR)显著抑制了胶孢炭疽菌的传播，提高了苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性，表明外源 BR 可能通过激活苯丙烷合成来提高抗病性。

植物响应胶孢炭疽菌侵染的机制也有相关研究，如草莓(*Fragaria* × *ananassa*)[10]、茶树(*Camellia sinensis*)[11]、柱花草(*Stylosanthes* spp.)[12]、鳄梨(*Persea americana*)[13]等。陈哲等[10]研究发现草莓与炭疽菌互作过程中，类黄酮生物合成、谷胱甘肽代谢、植物激素信号转导等植物抵御胁迫相关的途径富集到不少基因。Fang 等[14]利用病毒介导的基因沉默技术构建 *HSP*17.4 沉默株系，发现草莓 *HSP*17.4 能诱导水杨酸和茉莉酸途径协同作用，从而提高对炭疽病的抗性。Jiang 等[12]结合转录组学和代谢组学解析柱花草(*Stylosanthes* spp.)对炭疽菌的防御反应，差异表达基因功能富集分析结果表明黄酮类生物合成途径中酶的基因强烈响应病原菌诱导。Mehmood 等[15]以抗性草莓为试验材料，转录组数据表明胶孢炭疽菌侵染后宿主防御基因与萜类合成基因共表达，代谢组学分析结果表明萜类化合物在叶片中快速积累。然而，杨树响应胶孢炭疽菌胁迫的分子机制的研究相对薄弱，转录调控机制、关键抗病通路目前仍不清晰。基于以上科学问题，本研究以毛白杨无性系 LM50 为研究材料，对胶孢炭疽菌侵染后的杨树叶片进行高通量转录组测序，分析病原菌侵染下转录水平变化，发掘杨树抗病相关通路和关键基因，为杨树抗病新品种的选育提供重要理论依据。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

以毛白杨(*Populus tomentosa*)无性系 LM50 为研究材料，将生长 1 个月的组培苗经过炼苗后移栽

到灭菌过的大田土中，置于温室条件（光照 12 h/d，相对湿度约 60%，温度（25 ± 2）℃）下连续培养 3 个月，选取长势相近的幼苗作为试验材料，3 棵苗子为一组。

试验所用菌株为胶孢炭疽菌 BJ12，分离自北京林业大学校内毛白杨叶片，保存于北京林业大学林木花卉遗传育种实验室。病原菌侵染采用菌饼接种法，胶孢炭疽菌在 PDA 培养基活化后，置于 25 ℃培养箱生长 5 ~ 7 d，用孔径 1 cm 的打孔器打孔，将有菌面贴于叶片表面，侵染 6 d 后剪取叶片，对照接种无菌 PDA 培养基做同样处理[16]。对照和处理选取相同位置的叶片，采集到的样品液氮速冻处理后保存于−80 ℃ 冰箱备用。

1.2　叶片酶活性测定

酶粗提液的制备参照费莉玢[17]所用方法，每个处理重复 3 次，提取液保存于−80℃ 冰箱备用。丙二醛（MDA）含量和 3 种抗氧化酶，包括多酚氧化酶（PPO）、超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）均采用酶联免疫法，绘制标准曲线后计算得到样品浓度，具体试验步骤按照上海沪鼎生物科技有限公司酶联免疫分析试剂盒操作。

1.3　转录组测序和生物信息学分析

叶片 RNA 提取和纯度检测参照宋润先等[18]采用的方法，以检测合格的 RNA 构建文库，利用 Illumina HiSeq^{TM}4000 高通量平台进行双端测序获得原始测序数据，文库构建和测序工作交由诺禾致源有限公司完成。

以毛果杨（*Populus trichocarpa*; version 3.1）基因组序列[19]作为参考，从 phytozome（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/）开放平台下载相关文件，同时对测序得到的原始数据进行过滤质控，得到高质量转录组数据（clean reads）。利用 Hisat2（version 2.0.9）将 clean reads 比对到参考基因组[20]，使用 Cuffdiff 软件进行差异基因分析[21]。为最大程度降低假阳性，筛选差异表达基因的条件设定为：差异倍数（fold change，FC）> 1.5，显著性 $P < 0.05$。使用网页版工具 agriGO（http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php/）进行差异基因 GO 富集分析[22]；利用 TBtools（version 1.068）进行 KEGG 富集分析[23]；使用 MapMan（version 3.5.1）分析差异基因响应模式[24]。

1.4　差异表达基因的 qRT-PCR 验证

基于转录组数据的分析结果，选取 6 个可能与植物抗性相关的上调差异表达基因进行 qRT-PCR 分析，验证转录组测序分析数据的可靠性，以 0 h 样品为对照，试验流程参照 Chen 等[25]使用的方法。数据处理使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因的相对表达量[26]。通过在线网站（https://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/）设计引物，并由生工生物工程（上海）有限公司合成。

2　结果和分析

2.1　表型和生理指标测定

侵染第 6 天对杨树对照及试验组叶片生理指标进行分析，测定 MDA 含量及 PPO、SOD、CAT 活性。MDA 含量和 CAT、SOD 活性与对照相比均有不同程度增加，且差异极显著（图 1）。MDA 含量比对照高出 213.41%，CAT、SOD 和 PPO 活性分别比对照高出 393.16%、151.39% 和 116.56%。

2.2　测序结果统计

如表 1 所示，各样品最终得到 clean data 至少 3 Gbp，过滤条件下，数据总体通过率平均达到 97.4% 以上，各样品 Q20 占比至少 98%，Q30 占比均在 93% 以上。质控过程中，GC 含量保持在 43.7% ~ 45.1% 之间，表明测序技术对样本数据没有较高的偏好性，且样品本身无污染。以上结果说明本次测序的 cDNA 文库质量高，可以进行后续的生物信息学分析研究。

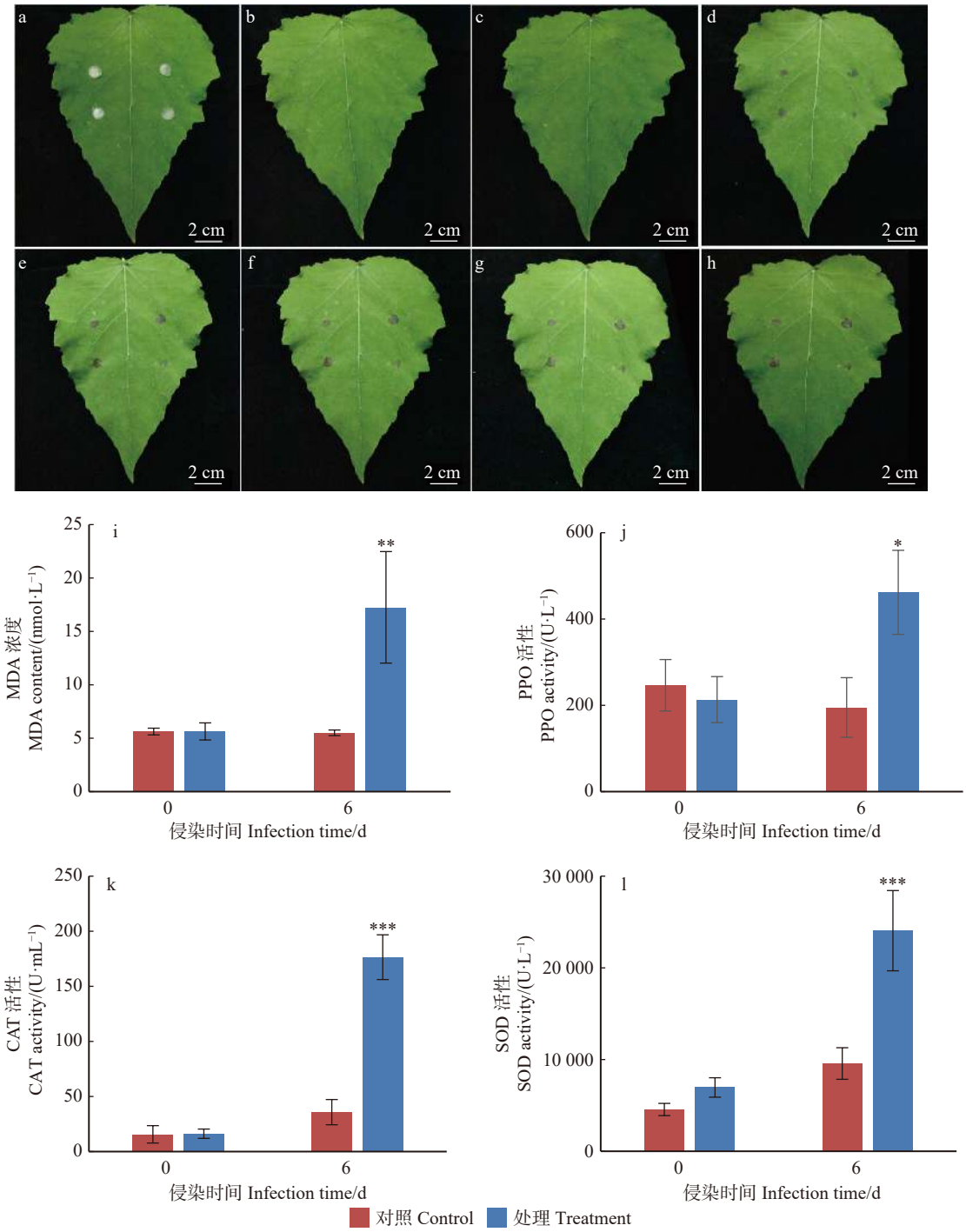
2.3　差异表达分析

为探究病原菌侵染下杨树转录水平的变化，首先对差异基因表达进行严格筛选，条件为差异倍数（fold change，FC）> 1.5 且 $P < 0.05$，结果表明共有 4 547 个基因在转录水平上存在显著性差异，其中上调基因为 2 262 个，下调基因为 2 285 个（表 2）。根据 FC 进行分类，差异基因倍数变化大多集中在 1.5 ~ 5.0 倍之间。大于 5.0 倍的差异基因中，上调基因共 136 个，如 *PR*-1（FC = 9.9）、*WRKY*51（FC = 5.3）、细胞色素 P450（FC = 5.1）等；下调基因共 61 个，包括聚半乳糖醛酸酶（FC = −5.8）、果胶裂解酶（FC = −5.3）等。

2.4　差异表达基因的 GO 富集分析

对筛选到的差异基因进行 GO 富集分析，4 547 个基因分别注释到细胞组分、分子功能和生物学过程 3 大类中。其中，富集到差异基因最多的 3 个分子功能条目是催化活性、转录活性、氧化还原酶活性；生物学过程富集到差异基因最多的是代谢途径、细胞代谢途径和大分子代谢途径 3 个条目；线粒体、细胞壁合成和代谢是细胞组分中富集到差异基因最多的 2 个条目。

进一步分析表明，上调差异表达基因富集到 135 个通路中（$P < 0.05$），细胞组分、分子功能和生物学过程分别占总数的 10%、35% 和 55%（图 2a）。生物学过程显著富集到的 GO 条目包括氧化还原、代谢过程、呼吸气体交换、胁迫响应、多细胞生物进



a 为胶孢炭疽菌接种方式；b ~ h 分别为侵染后 0、1、2、3、4、5、6 d 的叶片；a ~ h 叶片标尺 = 2 cm。*、**、***分别表示对照和处理之间差异显著性水平为 P<0.05、P<0.01、P<0.001。 a, inoculation method of *Colletotrichum gloeosporioides*; b−h, leaf symptoms of 0 to 6 d after inoculation; leaf bar = 2 cm. *, **, and *** denote significant differences between controls and treatments at the $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ levels, respectively.

图 1 胶孢炭疽菌胁迫下杨树叶片表型变化及 MDA 浓度（i）及 PPO（j）、CAT（k）、SOD（l）活性变化

Fig. 1 Leaf symptoms and change of MDA (i), PPO (j), CAT (k), SOD (l) activity after inoculation

程等，分子功能显著富集到氧化还原酶活性、血红素结合、四吡咯结合、铁离子结合、催化活性等条目中；而线粒体组分、线粒体、线粒体膜、细胞器等 GO 条目富集显著到细胞组分（图 2c）。下调差异表达基因富集到 213 个通路中，细胞组分、分子功能和生物学过程分别占总数的 5%、45% 和 50%（图 2b）。碳代谢、微管运动、脂代谢、细胞多糖代谢、葡聚糖代谢等是差异显著的生物学过程条目，分子功能通路中显著富集条目包括催化活性、水解酶活性、微管马达活性、纤维素合酶等，细胞组分显著富集到细胞壁、外部封装结构和质外体等（图 2d）。

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析，共注释到 204 条 KEGG 通路上，其中 50 条通路被显

表 1　过滤质控结果统计表

Tab. 1　Statistics about filter and quality control results

样本名称 Sample name	数据量 Data amount/Gbp	合格片段比率 Percentage of reads passed filter/%	碱基错误率 Base error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC含量 GC content/%
0h_1	3.76	98.76	0.04	98.25	94.69	44.70
0h_2	3.77	98.50	0.04	98.27	94.74	45.10
0h_3	2.93	98.14	0.04	98.25	94.69	44.60
6d_1	3.00	98.12	0.04	98.16	94.58	44.78
6d_2	3.56	98.16	0.04	98.20	94.63	44.54
6d_3	3.60	97.40	0.04	98.12	94.48	43.70

注：Q20为质量值达到20的碱基占总碱基的比例；Q30为质量值达到30的碱基占总碱基的比例。Notes: Q20, proportion of base with a mass value of 20 to the total base; Q30, proportion of base with a mass value of 30 to the total base.

表 2　显著性差异表达基因统计分析

Tab. 2　Statistical analysis of significantly differential expressed genes

FC	上调基因数目 Up-regulated gene number	下调基因数目 Down-regulated gene number
> 1.5	2 262	2 285
1.5 ~ 3	1 584（70.0%）	1 807（79.1%）
3 ~ 5	542（23.96%）	417（18.25%）
> 5	136（6.0%）	61（2.7%）

注：FC.差异倍数。括号内数据为上调基因数量或下调基因数量占差异基因数量的百分比。Notes: FC, fold change. In parentheses, the data is the percentage of the number of up-regulated genes or down-regulated genes in the number of differential genes.

著富集（$P < 0.05$），选取前 30 条作图（图 3）。富集到的通路中，代谢途径包含类目最多，包括糖类、脂类、氨基酸、不饱和脂肪酸等多种物质，这与 GO 富集得到的结果一致。代谢途径上调差异表达基因主要富集到谷胱甘肽、苯丙烷、类黄酮、氨基酸、亚麻酸、萜类化合物等，下调差异表达基因则富集到脂质、碳、叶啉和叶绿素、淀粉和蔗糖、长链脂肪酸、磷酸肌醇、维生素、不饱和脂肪酸等（表 3）。

苯丙烷合成途径共有 57 个基因发生变化，其中 34 个基因上调；谷胱甘肽代谢途径 36 个基因发生变化，其中 25 个上调；类黄酮合成途径 20 个基因发生变化，其中 14 个上调。值得注意的是，苯丙烷代谢是参与植物防御反应的主要次级代谢通路之一，它的分支又是类黄酮的合成途径，因此对类黄酮和苯丙烷生物合成通路中的基因进行了注释分析[27]。

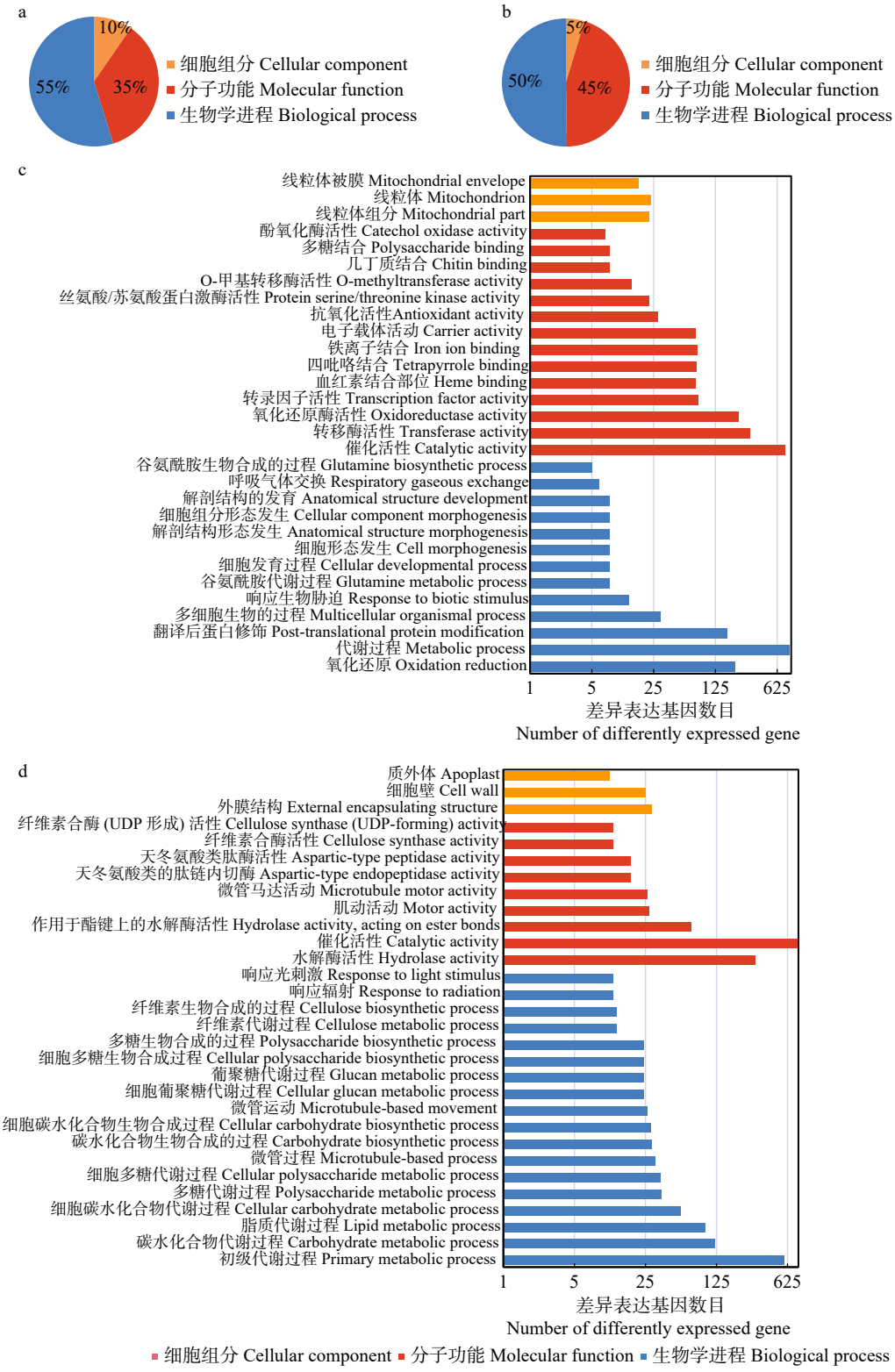
苯丙烷类化合物合成通路中的关键酶，其富集到的基因大多呈上调表达趋势，主要包括 PAL（Potri.010G224100）、4CL（Potri.003G188500、Potri.001G036900）、CHS（Potri.014G145100）、LDOX（Potri.004G030700）、CCoAOMT（Potri.001G304800）、CAD（Potri.009G095800）、POX（Potri.005G135300、Potri.013G156500、Potri.014G143200）等。另有少量基因呈下调表达趋势，如 PAL（Potri.006G126800）、4CL（Potri.018G094200）、FLS（Potri.004G139500、Potri.004G139700）等。

2.6　杨树响应炭疽菌侵染的转录因子及 MapMan 分析

为揭示转录因子响应胶孢炭疽菌侵染的表达模式，将差异基因和毛果杨转录因子数据库进行比对，共有 322 条基因被注释为 38 个家族的转录因子（表 4）。MYB、ERF、bHLH 转录因子数量最多，分别为 36、34、31 个，值得注意的是 WRKY 转录因子富集到 27 个，且全部上调表达（图 4）。

对筛选到的 4 547 个基因进行 MapMan 分析，以差异基因生物学功能划分为不同层级，得到杨树–病原菌互作的调控网络[23]。结果显示在病原菌诱导下，与激素信号（生长素、乙烯、茉莉酸、水杨酸）、细胞壁、抗逆、次级代谢、MAPK、转录因子等关联的基因被激活（图 5）。植物在受到病原菌侵染时启动保护酶系统，保护宿主免受 ROS 造成的氧化损伤，POD 则作为重要抗氧化酶清除体内自由基。显然，在杨树抵御病原菌胁迫的过程中需要大量 POD 的积累，MapMan 结果显示氧化还原相关的差异基因大多呈上调表达趋势，如氧化还原态、过氧化物和谷胱甘肽-S-转移酶，其中，10 个编码 POD 合成的基因受到活性氧信号激发大量表达。ROS 引发植物产生过敏反应（hypersensitive response，HR），宿主体内激素含量随之大量增加，这些激素作为二级信号进而激活防御反应，即 *PR* 基因的大量表达[28]。本研究结果中 19 个 *PR* 基因上调表达，编码抗菌蛋白 CC-NBS-LRR、NBS-LRR、TIR-NBS-LRR 等在抗病过程中的积累。

此外，次级代谢产物在抗病过程中也发挥关键作用，代谢通路差异基因注释到多种酶，包括 CHS、DFR、LDOX、CCR、CLA 等苯丙烷合成关键酶上调



a、c 为上调基因；b、d 为下调基因。a and c are up-regulation genes; b and d are down-regulation genes.

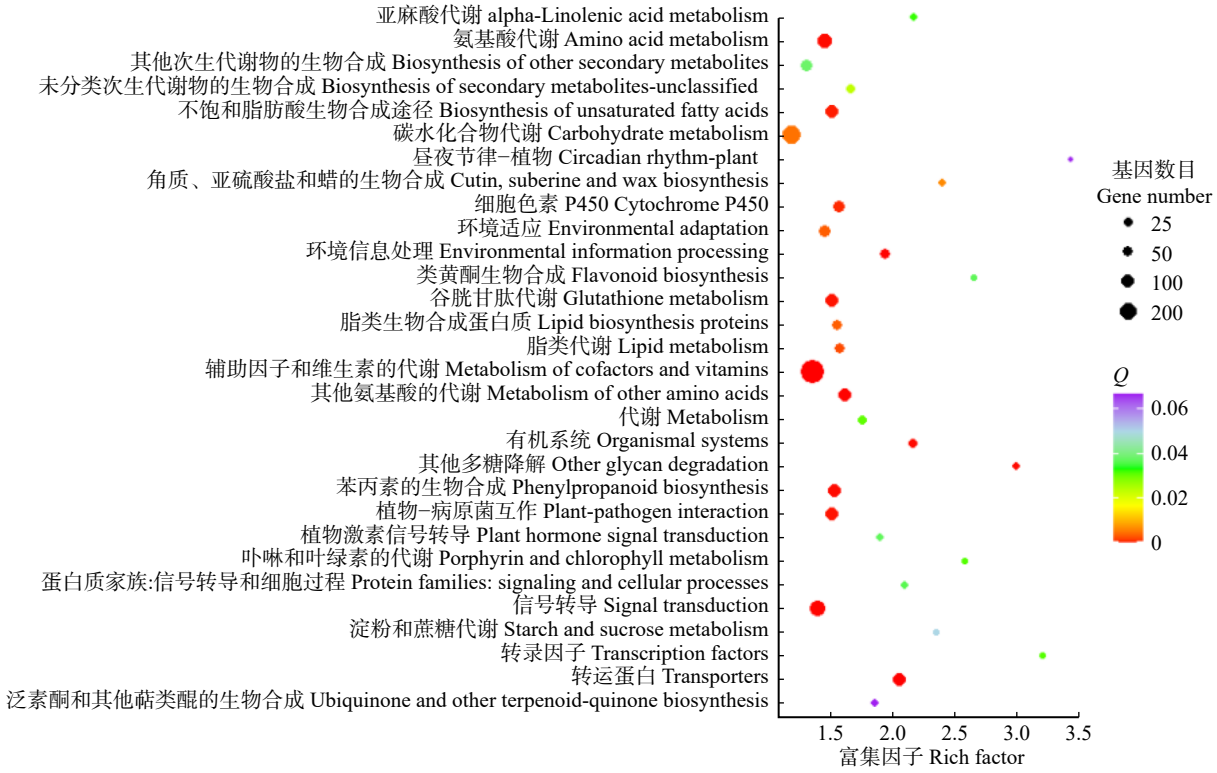
图 2 差异基因 GO 功能富集分析

Fig. 2 GO function enrichment of different experssed genes (DEGs)

表达，这与 KEGG 富集结果相似。MapMan 结果表明大量转录因子也被激活表达，其中，11 个 MYB 转录因子和 WRKY 家族全部 20 个转录因子上调表达，包括 WRKY75（FC = 7.7）、WRKY51（FC = 5.3）、WRKY70（FC = 5.3）、MYB62（FC = 4.5）、MYB3（FC = 3.8）、WRKY18（FC = 3.7）。

2.7 qRT-PCR 验证

为检验转录组数据的真实性和可靠性，根据数据分析结果选取 6 个关键基因，通过 qRT-PCR 检测其表达水平。分析结果表明，选取的基因表达趋势



Q. 富集程度。下同。*Q*, enrichment degree. The same below.

图 3　差异基因 KEGG 富集分析

Fig. 3　KEGG enrichment analysis of DEGs

表 3　差异表达基因 KEGG 富集分析

Tab. 3　KEGG enrichment analysis of DEGs

KO号 KO ID	代谢途径 Metabolic pathway	基因数量 Gene number	*Q*
	上调基因 Up-regulation gene		
Ko09105	氨基酸代谢 Amino acid metabolism		0.026
Ko00940	苯丙烷生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	34	< 0.001
Ko09106	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids	34	0.026
Ko09108	辅酶因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	30	0.136
Ko09109	萜类和多酮类代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	27	0.057
Ko00480	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	25	0.000
Ko00630	乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	14	0.055
Ko00941	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	13	0.001
Ko00592	亚麻酸代谢 alpha-Linolenic acid metabolism	11	0.053
Ko00900	萜类化合物生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	11	0.059
Ko00350	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	10	0.181
Ko00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	9	0.117
Ko00910	氮代谢 Nitrogen metabolism	8	0.056
	下调基因 Down-regulation gene		
Ko09101	碳代谢 Carbohydrate metabolism	92	< 0.001
Ko09103	脂代谢 Lipid metabolism	58	< 0.001
Ko09110	其他次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	36	0.023
Ko09108	辅酶因子和维生素的代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	31	0.022
Ko09106	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids	25	0.188
Ko00500	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	23	0.001
Ko00940	苯丙烷的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	23	0.062
Ko00040	戊糖、葡萄糖醛酸转换 Pentose and glucuronate interconversions	15	0.030
Ko00860	卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	13	< 0.001
Ko00061	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	12	0.008
Ko00562	磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	12	0.018
Ko00564	甘油磷脂 Glycerophospholipid metabolism	12	0.145
Ko00062	长链脂肪酸 Fatty acid elongation	10	0.008
Ko00460	氰基氨基酸代谢 Cyanoamino acid metabolism	9	0.070
Ko00561	甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	8	0.187
Ko00511	其他多糖降解 Other glycan degradation	7	0.012

表 4 转录因子统计表

Tab. 4 Statistics of transcription factors

转录因子家族 Transcription factor family	数量 Number	转录因子家族 Transcription factor family	数量 Number	转录因子家族 Transcription factor family	数量 Number
MYB	36	SBP	7	Nin-like	2
ERF	34	GRF	6	LSD	1
bHLH	31	HSF	6	ARR-B	1
WRKY	27	ZF-HD	5	SRS	1
NAC	23	TALE	5	BES1	1
bZIP	14	CO-like	5	Whirly	1
HD-ZIP	13	Trihelix	5	AP2	1
C2H2	13	TCP	4	C3H	1
MYB_related	11	LBD	4	E2F/DP	1
GRAS	10	DBB	4	NF-YA	1
Dof	10	B3	4	WOX	1
GATA	8	YABBY	3	RAV	1
ARF	8	MIKC_MADS	3		
G2-like	8	STAT	2		

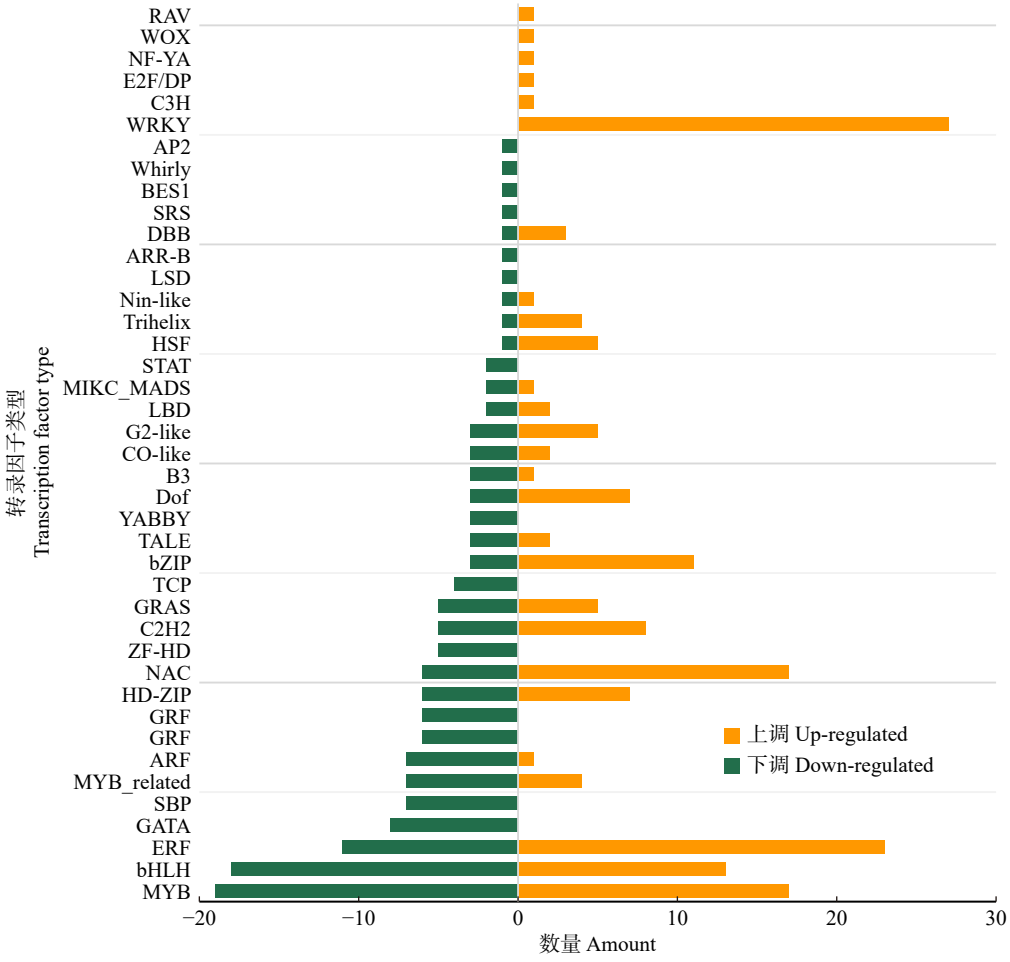


图 4 转录因子数量统计

Fig. 4 Statistics of transcription factors

与转录组测序结果一致，表明 RNA-seq 结果可靠（图 6）。

苯丙烷代谢途径起始于苯丙氨酸，首先在苯丙氨酸解氨酶（PAL）的作用下转化为反式肉桂酸，再经过肉桂酸羟化酶（C4H）催化形成对香豆酸，然后经 4-香豆酸–辅酶 A 连接酶（4CL）将其转化为对香豆酰辅酶 A。随后分为两个分支，经查尔酮合成酶（CHS）、查尔酮异构酶（CHI）、二氢黄酮醇-4-还原酶

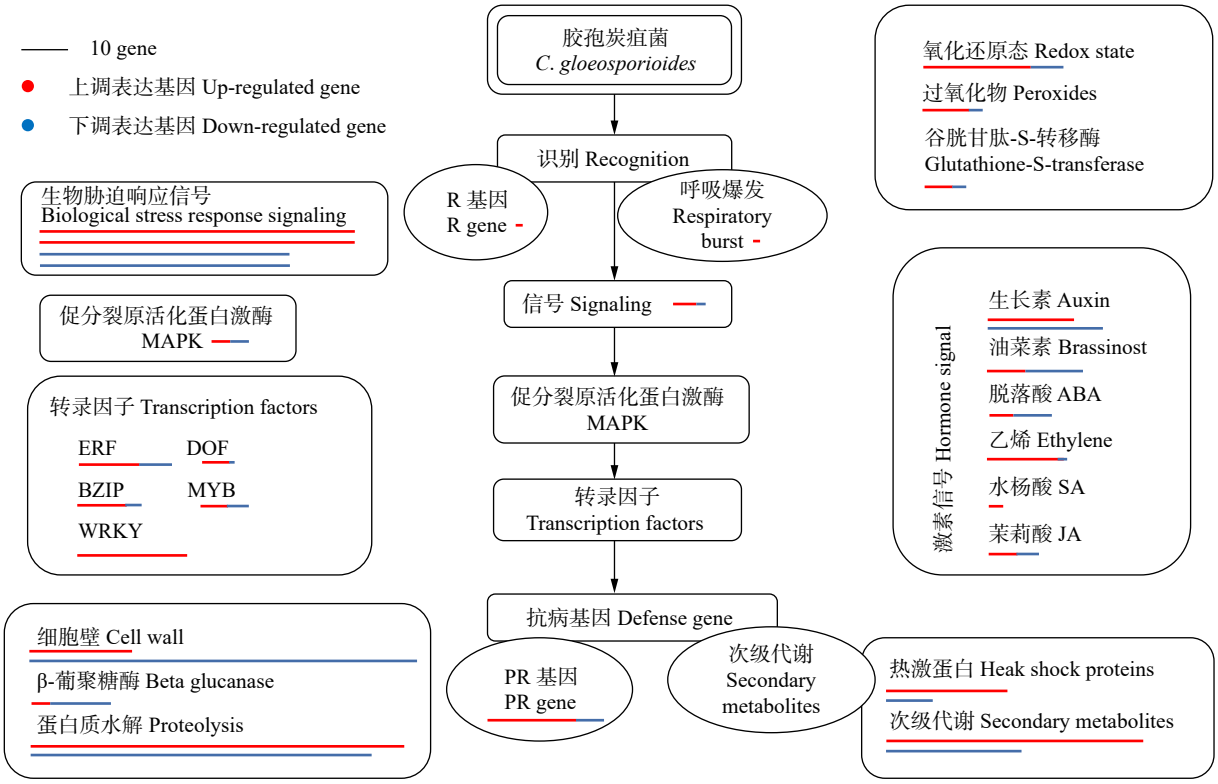


图 5　MapMan 分析杨树–胶孢炭疽菌互作相关的差异表达基因

Fig. 5　DEGs involved in poplar-*C. gloeosporioides* interaction analysis by MapMan

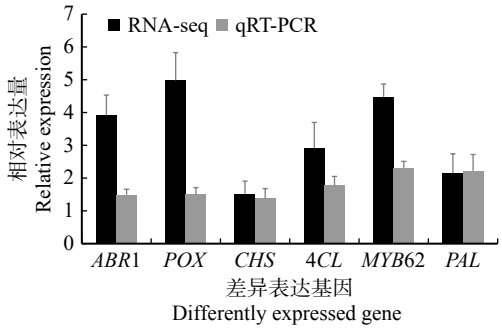


图 6　差异表达基因 qRT-PCR 分析

Fig. 6　qRT-PCR analysis of DEGs

(DFR)、无色花青素还原酶(LDOX)、黄酮醇合酶(FLS)等催化形成类黄酮化合物，另一分支经咖啡酰辅 A-O-甲基转移酶(CCoAOMT)、肉桂醇脱氢酶(CAD)、过氧化物酶(POX)等催化形成木质素[29]。PAL 既是苯丙氨酸代谢途径的关键酶也是限速酶，CHS 是连接苯丙烷生物合成和类黄酮生物合成途径的关键酶，为黄酮、黄酮醇及其他物质的合成提供了基本的碳架结构，4CL 则调控苯丙氨酸代谢途径的最后一步反应，催化形成木质素类和黄酮类化合物。由图可知，苯丙烷合成通路的关键酶基因在接种胶孢炭疽菌后表达上调，包括 *4CL*(Potri.018G094200)、*PAL*(Potri.010G224100)、*POX*(Potri.005G135300)、*CHS*(Potri.014G145100)。此外，转录因子 MYB62(Potri.008G122100)和 ABR1(Potri.005G087200)作为植物抗逆过程中的重要调控因子，在病原菌胁迫条件下表达量显著提高。

3　讨　　论

植物受到病原菌胁迫后，会激活多条抗逆通路来抵御病原菌侵染，KEGG 富集结果表明这些抗逆通路大多与生长、代谢和激素相关。转录因子在宿主生长发育调控及抗逆途径中起到重要作用，广泛存在于植物体内，能够与基因启动子区域特异性结合，激活或抑制下游基因的表达。ERF 转录因子家族作为逆境信号参与到胁迫信号交叉途径中[30]，同时，在水杨酸、茉莉酸、乙烯、脱落酸等植物激素胁迫应答反应中起到重要作用[31]。WRKY 同样是植物的重要转录因子家族，可以作为防御基因的调节因子，且是不同信号途径的靶标[32]。拟南芥 *AtERF2* 转录因子是茉莉酸胁迫响应基因的正调控因子，介导了对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性，小麦植株 ERF 转录因子可以激活 *PR* 基因，将其转入烟草植株中过表达，提高了对链格孢菌(*Alternaria alternate*)的抗病性[33]。ERF 转录因子也可以通过 ABA 信号通路，负调控对真菌病原菌的抗性，如过量 ABA 导致水稻内源 ET 水平降低，从而提高了对稻瘟病的敏感性[34]。MapMan 分析结果表明，杨树与胶孢炭疽菌互作过程中，激素相关基因大多受到病原菌正向调控，如 89% 乙烯相关基因上调表达，表明乙烯水平可能作为信号分子影响下游基因的表

达，进而实现抗病目的。然而，病原菌胁迫下的激素信号分子并不是独立发挥作用的，激素信号分子之间存在相互串扰。本研究中 WRKY 和 ERF 转录因子与激素信号分子之间的调控关系尚不明确，有待进一步研究。

活性氧（ROS）含量提高是植物响应病原菌侵染的重要特征之一，持续累积的 ROS 会对宿主细胞造成损伤[35]。随着 ROS 水平的变化，植物清除系统中的抗氧化酶活性也发生大幅变化[36]。如木薯叶片被病原菌侵染后，CAT 活性随侵染时间延长而增大，PPO 活性在侵染初期变化不显著，随着时间的推移迅速增强，表明相关酶机制启动以应对病原菌侵染[37]。炭疽菌的侵染同样可以导致茶树叶片 CAT、SOD 活性提高[38]。MDA 是参与细胞膜过氧化作用的主要成分之一，含量越高对细胞膜伤害越大。杨树叶片受到炭疽菌侵染 6 d 后 MDA 含量显著提高，说明此时胶孢炭疽菌已经对植物的活性氧清除系统产生破坏，并导致了细胞膜脂化。在此过程中，参与植物体内抗氧化及活性氧清除过程的过氧化物酶、双加氧酶、抗坏血酸过氧化物酶、无色花青素还原酶等基因表达上调，酶活测定结果同样表明抗氧化酶（CAT、PPO、SOD）活性相比对照得到显著提高。说明杨树受到胶孢炭疽菌侵染后，抗氧化酶在清除 ROS、维持宿主体内 ROS 平衡，缓解病原菌胁迫造成的氧化损伤中发挥了重要作用。

苯丙烷代谢途径激活是植物响应病原菌侵染的标志之一，该途径在多种酶催化作用下分别合成黄酮类化合物和木质素，苯丙氨酸作为多种酚类化合物（如黄酮类化合物、异黄酮类化合物、植物激素）的前体，在宿主防御反应中起到重要作用[39−40]。类黄酮通过清除体内自由基来保护植物免受外界侵扰，木质素沉积在细胞壁上可以提高组织机械强度并有效抑制病原菌生长，单宁可以有效抑制真菌的体外生长[41]。黄瓜 *CsMYB*60 促进关键基因 *Cs*4*CL*、*CsCHS* 的表达，调控黄酮醇和单宁合成，诱导单宁在根部积累，进而增强对根腐病的抗性[42−43]。在茶树抗病品种“ZC108”中，CAD 相关基因的表达水平高于感病品种“LJ43”，且在受到炭疽菌侵染后，PAL 调控基因显著上调表达[44]。木质素通过加固细胞壁的形式参与植物防御反应，如番茄被 *V. dahliae* 侵染后，抗病品种木质素含量比感病品种高 4%[45]。本研究中，胶孢炭疽菌侵染杨树叶片后苯丙烷合成通路及类黄酮合成通路受到强烈诱导，PAL、4CL、CHS 等关键酶合成相关基因表达量提高，因此推测，胶孢炭疽菌侵染可能导致了植物体内类黄酮含量提高和木质素积累，这些抗病物质的增加提高了杨树抗病性。

需注意的是，本研究荧光定量 PCR 结果与转录组测序结果虽然呈现相同表达趋势，但表达倍数存在差异。通过比较重复性、准确性、数据统计等多方面因素，RNA-seq 在测定基因表达水平方面整体水平更高[46−47]。研究发现 qRT-PCR 检测结果与 RNA-seq 测序结果大多是一致的，但也有相当一部分基因的表达倍数存在差异，检测结果的相关性最低可低至 0.58，仅中度相关[48]。此外，qRT-PCR 检测结果受到模板、特异性引物、仪器设备、扩增效率等多种因素影响。qRT-PCR 检测到的信号取决于模板的质量，本研究所用模板 cDNA 是在本实验室制备的，而转录组测序所用模板 cDNA 为公司制备，二者之间可能存在差异。引物特异性和扩增效率密切相关，也是影响 qRT-PCR 结果的重要原因[49]。本研究所用引物和模板可能是导致 qRT-PCR 检测结果低于 RNA-seq 结果的重要因素。

病原菌不同菌株之间的致病性强弱不同，菌饼接种方式虽然比较老，但对于部分未建立孢子液接种方法和孢子液侵染效率较低的植物来说，菌饼接种方式更加高效。如利用果生炭疽菌孢子液侵染苹果叶片，发现抗病品种叶片表面没有形成次生菌丝，孢子液侵染不能使抗病品种发病[50]。王杰等[16]对红叶石楠炭疽病病原进行研究时发现，菌饼法的侵染效果更好。此外，后续实验结果也证明，本研究得到的数据是可靠的。我们利用生物信息学分析筛选到多个关键基因，包括 *WRKY*18 和 *bZIP*44。目前已通过农杆菌介导的遗传转化技术成功构建杨树 *bZIP*44 过表达株系，表型观测结果显示过表达株系的平均株高在生长 1 个月、2 个月和 3 个月时，分别高出对照 30%、21% 和 14%。杨树叶片侵染结果表明过表达株系的抗病性得到显著提高（$P < 0.05$），通过酵母双杂交实验及 DAP-seq 试验已经筛选到的 *bZIP*44 互作蛋白及下游靶基因（研究结果未发表）。

为进一步探究关键基因 *bZIP*44 在杨树抗病过程中的具体作用机制，后续我们将继续开展分子实验对其进行功能研究，解析关键基因调控网络，结合代谢组学验证黄酮类化合物和木质素等抑菌物质在杨树响应胶孢炭疽菌侵染过程中的作用。综上所述，本研究获得的杨树响应病原菌胁迫的生理指标及转录组数据，将为今后解析杨树与病原菌互作机制提供重要的数据支撑，同时也为杨树抗逆新品种的培育提供理论基础。

4 结　　论

本研究对受到胶孢炭疽菌侵染的杨树叶片进行转录组测序，筛选得到 4 547 个差异表达的基因，并

对差异表达基因进行生物信息学分析。结果表明: 杨树受到病原菌侵染后，一方面利用抗氧化酶系统清除宿主体内不断累积的 ROS; 另一方面编码黄酮类化合物和木质素等抗病物质的合成，从而提高杨树对胶孢炭疽菌的抗病性。胶孢炭疽菌侵染导致活性氧含量增加，抗氧化物酶基因随之上调表达，激活了植物体内清除氧系统(CAT、PPO、SOD)以维持活性氧代谢平衡。同时，转录组数据及 qRT-PCR 结果均表明类黄酮、木质素等抑菌物质调控基因被诱导，可能促进了抑菌物质的合成和积累，进而达到抑制了病原菌生长的目的。

参　考　文　献

[1] 徐梅卿, 周旭东, 朴春根, 等. 中国不同栽培区杨树品系及其病害种类 [J]. 林业科学研究, 2009, 22(5): 705−714.
Xu M Q, Zhou X D, Pu C G, et al. *Populus* cultivation-clones in different cultivated area and its diseases in china[J]. Forest Research, 2009, 22(5): 705−714.

[2] 贺伟, 杨旺, 沈瑞祥. 北京杨炭疽病的初步研究 [J]. 森林病虫通讯, 1991(4): 7−9.
He W, Yang W, Shen R X. Primary research of *Populus* × *beijingensis*[J]. Forest Pest and Disease, 1991(4): 7−9.

[3] Perfect S E, O'Connell R J, Green E F, et al. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction[J]. Plant Journal, 2010, 15(2): 273−279.

[4] Bailey J A, O'Connell R J, Pring R J. Infection strategies of *Colletotrichum* species[J]. Colletotrichum Biology Pathology & Control, 1992, 7: 88−120.

[5] 张晓林, 张俊娥, 贺璞慧中, 等. 胶孢炭疽菌侵染杨树叶片的组织病理学研究 [J]. 北京林业大学学报, 2018, 40(3): 101−109.
Zhang X L , Zhang J E, He-pu H Z, et al. Histopathology study of poplar leaves infected by *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2018, 40(3): 101−109.

[6] Liu N, Meng F, Tian C. Transcriptional network in *Colletotrichum gloeosporioides* mutants lacking *Msb*2 or *Msb*2 and *Sho*1[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(2): 207.

[7] Nesher I, Minz A, Kokkelink L, et al. Regulation of pathogenic spore germination by *CgRac*1 in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(8): 1122−1130.

[8] Choub V, Maung C E H, Won S J, et al. Antifungal activity of cyclic tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Pathogens, 2021, 10(2): 209.

[9] Zhang L, Ahammed G J, Li X, et al. Exogenous brassinosteroid enhances plant defense against *Colletotrichum gloeosporioides* by activating phenylpropanoid pathway in *Camellia sinensis* L[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2018, 37(4): 1235−1243.

[10] 陈哲, 黄静, 赵佳, 等. 草莓应答炭疽菌侵染的转录组分析 [J]. 植物保护, 2020, 46(3): 138−146.
Chen Z, Huang J, Zhao J, et al. Transcriptomics analysis of strawberry response to *Collectotrichun theobromicola* infection[J]. Plant Protection, 2020, 46(3): 138−146.

[11] Wang Y, Hao X, Lu Q, et al. Transcriptional analysis and histochemistry reveal that hypersensitive cell death and H_2O_2 have crucial roles in the resistance of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) to anthracnose[J]. Horticulture Research, 2018, 5(1): 18.

[12] Jiang L, Wu P, Yang L, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal the induction of flavonoid biosynthesis pathway in the interaction of *Stylosanthes-Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Genomics, 2021, 113(4): 2702−2716.

[13] Luis A X O, Esther A C T, Sandra G M, et al. Transcriptomic analysis of avocado Hass (*Persea americana* Mill.) in the interaction system fruit-chitosan-*Colletotrichum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 956.

[14] Fang X, Chai W, Li S, et al. *HSP*17.4 mediates salicylic acid and jasmonic acid pathways in the regulation of resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* in strawberry[J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22: 817−828.

[15] Mehmood N, Yuan Y, Ali M, et al. Early transcriptional response of terpenoid metabolism to *Colletotrichum gloeosporioides* in a resistant wild strawberry *Fragaria nilgerrensis*[J]. Phytochemistry, 2021, 181: 112590.

[16] 王杰, 沈雪梅, 刘丹, 等. 四川省红叶石楠炭疽病病原菌鉴定及其潜在侵染源测定 [J]. 植物保护学报, 2020, 47(3): 637−646.
Wang J, Shen X M, Liu D, et al. Identification of the pathogens causing anthracnose and determination of the potential infection source of *Photinia* × *fraseri* in Sichuan Province[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(3): 637−646.

[17] 费莉玢. *Botryosphaeria dothidea* 侵染后山核桃酚类物质合成相关酶活及关键基因的表达特性 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2020.
Fei L F. Enzyme activity and expression of key genes related to phenolic synthesis in pecans after *Botryosphaeria dothidea* infection[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2020.

[18] 宋润先, 李翔, 毛秀红, 等. 镉胁迫下美洲黑杨无性系'中菏 1 号'转录组分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(7): 12−21.
Song R X, Li X, Mao X H, et al. Transcriptome analysis of clone *Populus deltoides* 'Zhonghe 1' under cadmium stress[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(7): 12−21.

[19] Tuskan G, Difazio S, Jansson S, et al. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. Science, 2006, 313: 1596−1604.

[20] Trapnell C, Hendrickson D G, Sauvageau M, et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(1): 46−53.

[21] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357−360.

[22] Tian T , Liu Y , Yan H , et al. AgriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W122−W129.

[23] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools, an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194−1202.

[24] Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, et al. Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes[J]. The Plant Journal, 2004, 37(6): 914−939.

[25] Chen S S, Zhang Y, Zhao Y, et al. Key genes and genetic

interactions of plant-pathogen functional modules in poplar infected by *Marssonina brunnea*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2020, 33(8): 1080−1090.

[26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402−408.

[27] 廖天悦, 申铁. 基于转录组的福鼎大白茶叶片两种发育阶段的苯丙烷代谢合成途径分析比较 [J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2021, 39(3): 15−22.
Liao T Y, Shen T. Analysis and comparison of phenylpropane metabolic pathways in two developmental stages of Fuding Dabai tea leaves based on transcriptome[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2021, 39(3): 15−22.

[28] Hwang I S, Choi D S, Kim N H, et al. Pathogenesis-related protein 4b interacts with leucine-rich repeat protein 1 to suppress PR4b-triggered cell death and defense response in pepper[J]. The Plant Journal, 2014, 77(4): 521−533.

[29] 汪丽君. 杨树转录因子 MYB6 调控类黄酮和木质素生物合成的机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
Wang L J. The transcriptional regulatory mechanism of the poplar transcription factor MYB6 involved in flavonoid and lignin biosynthesis[D].Chongqing: Southwest University, 2018.

[30] 赵金玲, 姚文静, 王升级, 等. 杨树 AP2/ERF 转录因子家族生物信息学分析 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(10): 21−29.
Zhao J L, Yao W J, Wang S J, et al. Bioinformatics analysis of poplar *AP2/ERF* gene family function[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015, 43(10): 21−29.

[31] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展 [J]. 遗传, 2012, 34(7): 835−847.
Zhang J Y, Wang Q J, Guo Z R. Progresses on plant AP2/ERF transcription factors[J]. Hereditas (Beijing), 2012, 34(7): 835−847.

[32] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. Plant Physiology, 2009, 150(4): 1648−1655.

[33] Zhu Z, Shi J, Xu W, et al. Three ERF transcription factors from Chinese wild grapevine *Vitis pseudoreticulata* participate in different biotic and abiotic stress-responsive pathways[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(10): 923−933.

[34] Liu D, Chen X, Liu J, et al. The rice ERF transcription factor *OsERF*922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3899−3911.

[35] 王媛, 梁军, 张星耀. 抗、感病杨树与溃疡病菌互作中活性氧及相关酶的动态 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2008, 32(5): 41−46.
Wang Y, Liang J, Zhang X Y. Changes of active oxygenandrelated enzymes during the interaction of poplar and canker disease pathogen[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2008, 32(5): 41−46.

[36] Bowler C, Montagu M V, Inze D, et al. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83−116.

[37] 吴美艳. 木薯抗细菌性枯萎病的生理特性及转录组学研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.
Wu M Y. Study on physiological characteristics and transcriptomics of cassava resistance to bacterial wilt[D]. Nanning: Guangxi University, 2020.

[38] 赖建东. 炭疽菌侵染后茶树 cDNA-AFLP 体系构建和基因差异表达研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
Lai J D. Gene expression analysis of tea leaves in response to *Colletotrichum kahawae* infection revealed by cDNA-AFLP[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture & Forestry University, 2016.

[39] Nicholson R L, Hammerschmidt R E. Phenolic compounds and their role in disease resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 30(1): 369−389.

[40] Macdonald M J, D'Cunha G B. Erratum: A modern view of phenylalanine ammonia lyase[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2007, 85(6): 759−759.

[41] 王斌, 白小东, 张静荣, 等. 乙酰水杨酸采前处理诱导哈密瓜果实的采后抗病性 [J]. 果树学报, 2018, 35(2): 222−230.
Wang B, Bai X D, Zhang J R, et al. The induction of pre-harvest acetylsalicylic acid treatment on postharvest resistance of Hami melon fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(2): 222−230.

[42] 李佳林. *CsMYB*60 调控黄瓜类黄酮生物合成的分子机制 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
Li J L. Molecular mechanism of the flavonoid biosynthesis regulated by *CsMYB*60 in cucumber[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.

[43] Wang L, Ran L, Hou Y, et al. The transcription factor MYB115 contributes to the regulation of proanthocyanidin biosynthesis and enhances fungal resistance in poplar[J]. New Phytologist, 2017, 215: 351−367.

[44] Lu W, Wang Y, Ca O H, et al. Transcriptome analysis of an anthracnose-resistant tea plant cultivar reveals genes associated with resistance to *Colletotrichum camelliae*[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148535.

[45] Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, et al. The *Ve*-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H_2O_2, peroxidase and lignins and drives *PAL*gene expression[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 232.

[46] Hoen P A, Ariyurek Y, Thygesen H H, et al. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(21): e141−e141.

[47] Marioni J C, Mason C E, Mane S M, et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays[J]. Genome Research, 2008, 18(9): 1509−1517.

[48] Kogenaru S, Yan Q, Guo Y, et al. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 629.

[49] De G T B, Aldred N, Clare A S, et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(3): 351−356.

[50] 白静科. 果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 与苹果不同抗性品种互作研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
Bai J K. Interaction between resistant and susceptible apple cultivars and *Collctotrichum fructicola* [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016.

（责任编辑 范 娟
责任编委 张星耀）