



红橘响应褐斑病菌侵染的转录组学分析

唐科志, 周常勇

(西南大学柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要:【目的】明确红橘(*Citrus reticulata* Blanco, cv. Hongjv)接种褐斑病致病菌——链格孢菌橘致病型(*Alternaria alternata* tangerine pathotype)后基因种类和表达量在转录水平的变化规律, 确定红橘响应该致病型侵染的关键基因。【方法】采用链格孢菌橘致病型接种红橘离体叶片, 28 h后选取感病叶片和未接种叶片提取RNA, 进行转录组高通量测序, 然后利用生物信息学分析, 以甜橙基因组为参考, 以 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$, $q\text{-value} \leq 0.01$ 为阈值选取感病和健康红橘叶片转录组的差异表达基因, 应用GO数据库对差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)进行功能分类, KEGG分析代谢途径, MapMan软件分析生物胁迫信号通路相关基因的表达变化。采用qRT-PCR方法对测序结果进行验证。【结果】红橘接种链格孢菌橘致病型28 h后产生大量与胁迫相关的差异表达基因, 获得上调差异基因5 173个, 下调差异基因6 555个。GO功能分类显示差异基因主要与蛋白结合、膜、氧化还原过程等相关。通过KEGG富集和MapMan软件分析发现, 红橘在受链格孢菌橘致病型胁迫的过程中基础代谢被严重破坏。乙烯、水杨酸和生长素等寄主防御相关的植物激素信号转导途径多个基因表达出现差异, 其中乙烯起主导作用, 乙烯受体ETR 3个成员被不同程度激活, 下游激酶和乙烯响应因子均上调, 生长素大部分关键信号基因、绝大部分生长素响应因子ARF和水杨酸合成途径的基因均下调表达。同时, 黄酮醇、花青素、萜类化合物和生物碱合成相关基因受该菌诱导显著变化, 萜类合成中大部分基因下调, 而黄酮类合成相关上调基因数量和表达趋势均强于表达下调基因, 有抗虫和抑菌作用的硫代葡萄糖苷基因呈上调趋势。进一步研究发现, 大量参与抗逆过程的转录因子如WRKY、bZIP、ERF、MYB、NAC被诱导激活, 其中大部分WRKY和bZIP转录因子受该菌正向调控, 超过50%的ERF家族基因表达上调; 在转录因子调控下, PTI及ETI响应基因如受体激酶、R蛋白、NBS抗病蛋白等大量表达, 多个PR家族抗菌蛋白基因上调表达, 22个抗氧化保护酶系统POD成员基因受到活性氧信号激发大量表达。以上结果表明链格孢菌橘致病型侵染对寄主内部生理状态产生显著影响。选取了19个与植物抗病相关基因进行qRT-PCR分析, 其基因表达趋势与测序数据一致。【结论】获得了红橘响应链格孢菌橘致病型侵染的差异表达基因及显著上调表达基因, 其主要富集于代谢过程、应激反应及转录调控等条目中, 这些基因的相互协同调控是红橘对该致病型产生防御反应的重要机制。

关键词: 红橘; 链格孢菌橘致病型; 转录组; 差异表达基因

Transcriptome Analysis of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Hongjv Infected with *Alternaria alternata* Tangerine Pathotype

TANG KeZhi, ZHOU ChangYong

(Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to reveal the gene expression pattern at transcriptional level of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco, cv. Hongjv) after inoculated with the brown spot pathogen (*Alternaria alternata* tangerine pathotype), and

收稿日期: 2020-01-19; 接受日期: 2020-03-27

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-27)

联系方式: 唐科志, Tel: 023-68349338; E-mail: tangkezhi@cric.cn. 通信作者周常勇, E-mail: zhoucy@cric.cn

to identify the key genes of tangerine responding to the pathogen infection. 【Method】 Detached leaves of tangerine were inoculated with *A. alternata* tangerine pathotype for 28 h and used for RNA extraction and transcriptome sequencing. Sequencing results were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Differentially expressed genes (DEGs) were screened with $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$, $q\text{-value} \leq 0.01$ as threshold and clean reads were compared with genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). GO database was used to perform functional classification of DEGs, KEGG was used to analyze metabolic pathways, and MapMan software was used to analyze the expression changes of genes related to biological stress signaling pathways. 【Result】 A large number of DEGs related to stress were produced at 28 h post inoculation, 5 173 up-regulated and 6 555 down-regulated genes were obtained. GO functional classification showed that the DEGs were mainly related to protein binding, membrane and oxidation-reduction process. KEGG enrichment and MapMan software analysis revealed that the basic metabolism of tangerine was severely damaged during the stress of *A. alternata* tangerine pathotype. The expression of multiple genes in host defense-related plant hormone signal transduction pathways such as ethylene (ET), salicylic acid (SA) and auxin (AUX) varied to some extent, of which ET plays a key role. The three members of the ET receptor ETR were activated to different degrees, among which downstream kinases and ET response factors were up-regulated, whereas most key signal genes of AUX, most members of AUX response factor ARF and genes in SA synthesis pathway were all down-regulated. Meanwhile, genes related to flavonol, anthocyanins, terpenoids and alkaloid synthesis were drastically changed by the fungus. Most genes of terpenoid synthesis were down-regulated, while the number and expression trend of up-regulated genes related to flavonoid synthesis were stronger than those of the down-regulated genes. Glucosinolate genes with anti-insect and antibacterial effects were up-regulated. Furthermore, a large number of transcription factors involved in stress resistance processes such as WRKY, bZIP, ERF, MYB and NAC were induced and activated. Most members of WRKY and bZIP transcription factors were positively regulated by the fungus, and the expressions of more than 50% of the ERF family genes were up-regulated. Under the regulation of transcription factors, PTI and ETI response genes such as receptor kinases, R proteins and NBS anti-disease proteins were largely expressed, multiple resistance PR genes were up-regulated and the expressions of 22 POD genes of antioxidant protective enzyme systems were largely activated by reactive oxygen species. The above results indicated that *A. alternata* tangerine pathotype infection had a great effect on the physiological state of citrus plants. To validate the findings, 19 DEGs related to anti-disease were selected for further analyses using qRT-PCR. The result was fairly consistent with that of transcriptional sequencing. 【Conclusion】 The DEGs and the significantly up-regulated expression genes obtained in *C. reticulata* Blanco, cv. Hongjv were mainly involved in the metabolic process, the response to stress and the transcriptional regulation. The synergistic regulation of these genes is an important mechanism of defense reaction to *A. alternata* tangerine pathotype.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco, cv. Hongjv; *Alternaria alternata* tangerine pathotype; transcriptome; differentially expressed gene (DEG)

0 引言

【研究意义】由链格孢菌橘致病型 (*Alternaria alternata* tangerine pathotype) 引起的柑橘褐斑病 (*Alternaria brown spot*, ABS) 可危害柑橘的嫩梢、嫩叶及果实, 常对部分宽皮柑橘生产带来严重问题^[1-3]。澳大利亚于 1903 年首次报道该病害^[4], 随后在美国、哥伦比亚、土耳其、以色列等柑橘产地相继发现。2010 年, 在我国云南的栽培品种上首次鉴定到柑橘褐斑病菌^[5], 此后, 在国内其他柑橘产区也陆续暴发该病^[6-8]。近年来, 柑橘褐斑病在敏感品种红橘 (*Citrus reticulata* Blanco, cv. Hongjv) 上的暴发已造成局部地区橘类产业巨大的经济损失。国内外对柑橘褐斑病菌部分功能基因研究已取得一定进展^[9-12], 但其流行规律、致病机理以及寄主应答机制仍不清楚, 有待进一步深入研究。【前人研究进展】WANG 等^[13-14]对链格孢菌橘致

病型菌株 Z7 进行了全基因组测序分析, 证明柑橘褐斑病菌功能基因主要为 ACT 毒素合成基因、信号转导基因、次级代谢相关基因、ROS 解毒相关基因等, 并通过转录组测序研究了主要转录因子对菌株产孢及致病性的调控; WU 等^[15]通过对霜霉病菌 (*Plasmopara viticola*) 侵染葡萄前后的叶片样品进行 RNA-seq 测序, 共获得 15 249 个候选的差异表达基因; XU 等^[16]通过 RNA-seq 研究了棉花受黄萎病菌 (*Verticillium dahlia*) 侵染后的转录组变化, 共鉴定到 3 442 个与防御相关的基因, 其中木质素合成相关基因的表达在抗病品系中表达显著上调, 推测木质素可能在棉花抗病中发挥重要作用; WARD 等^[17]借助 RNA-seq 技术研究了覆盆子根腐病抗病及感病品系受到病原菌 *Phytophthora rubi* 侵染后的基因表达差异, 结果显示 WRKY 转录因子、三羧酸循环、木质素合成及编码病程相关蛋白的基因等均表现为转录表达上调; WANG 等^[18]利用

RNA-seq 技术研究了葡萄柚的抗病及感病品系在黄龙病菌 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) 侵染后的转录表达差异,发现两个品系在转录因子、次级代谢、受体激酶及激素信号转导等多个途径相关基因均存在表达差异,通过后验验证,推测出与黄龙病菌抗性相关的两个基因 DMR6-like 和 NPR1-like;李湘龙等^[19]通过 RNA-seq 技术分析水稻与稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 互作早期的转录表达谱,为研究稻瘟病菌效应蛋白基因及其功能打下了基础。【本研究切入点】RNA-seq 可为植物响应胁迫过程中基因表达调控、蛋白质功能和代谢通路等研究提供大量信息,在植物病原菌的致病机理、植物对病原菌的胁迫应答,以及病原菌与植物寄主相互作用的机制机理等研究中应用十分广泛。但利用 RNA-seq 技术进行链格孢菌橘致病型与柑橘互作的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】利用 RNA-seq 技术对链格孢菌橘致病型侵染红橘前后的基因表达变化进行分析,找到红橘响应链格孢菌橘致病型侵染的关键基因,为柑橘的抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

试验于 2018—2019 年在西南大学柑桔研究所国家柑桔苗木脱毒中心实验室完成。

1.1 供试材料及样品采集

链格孢菌橘致病型菌株 Z7 由浙江大学李红叶教授提供,保存于国家柑桔苗木脱毒中心实验室。寄主材料为红橘,种植于国家柑桔苗木脱毒中心网室。取活化后的链格孢菌橘致病型菌株 Z7 于 PDB 培养基上,30℃、150 r/min 摇菌 48 h。收集单个菌丝球接种大小、叶龄和成熟度均一致的红橘离体叶片,将处理组和未接种菌丝的对照组叶片于 28℃培养箱保湿培养。接种 28 h 后,叶片出现轻微反应,未见明显症状,此时采集样品,利用 RNA-seq 技术分析红橘对链格孢菌橘致病型的早期防御机制。每个样本同时取两份,一份送交公司测序,另一份液氮中速冻后保存于-80℃冰箱用于后期试验验证。对照和处理组分别设置 3 个生物学重复(对照样本名称分别为 C0_1/2/3,接种菌株样本名称分别为 ZC_1/2/3)。

1.2 转录组测序

1.2.1 总 RNA 提取及质量检测 采用 Trizol(Invitrogen)提取寄主叶片总 RNA^[11],并用 RQ1 RNase-Free DNase (Promega)处理去除 DNA。利用 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 条带初步分析。使用分光光度计

NanoDrop™ (ThermoFisher) 进行样本纯度的检测,通过 OD_{260/280} 及 OD_{260/230} 比值进行判断。采用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit) 检测样品总 RNA 的浓度、完整性(RIN 值、28S/18S)及片段大小,主要根据真核生物 rRNA 的完整性来判断,包括 28S rRNA、18S rRNA 及 5.8S rRNA 的峰值及电泳条带完整性。

1.2.2 文库构建与上机测序 样品提取总 RNA 后,用 Dynalbeads oligo(dT)磁珠富集有 polyA 尾巴的 mRNA,加入 fragment buffer 将 RNA 片段化,再以片段化的 mRNA 为模板,采用随机的 N6 primer 进行反转录生成 cDNA 一链,再合成 cDNA 二链,纯化并经 DNA 末端修复,加碱基 A,加测序接头,再经琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,完成文库构建。利用 BGISEQ-500 平台采用双末端法(Pair-End)对文库进行测序。

1.3 转录组数据分析

1.3.1 原始测序数据处理 测序得到的原始序列中含有带接头的、低质量的 reads,为了保证后续信息分析质量,需要对原始测序数据进行过滤,得到 clean reads,以保证后续分析数据的可靠性。

1.3.2 参考基因组比对 针对上述得到的 clean reads,使用 HISAT^[20]将 clean reads 比对到甜橙参考基因组序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10702>),然后统计比对上的基因组的比对率以及 reads 在染色体上的分布,从整体上了解样品差异。

1.3.3 表达量分析及差异表达基因检测 使用 Bowtie 2 将 clean reads 比对到上述较为完整的参考序列,再使用 RSEM 计算基因和转录本的表达水平。使用 PoissonDis 算法进行差异基因检测,参数为 $|\log_2 \text{fold change (FC)}| \geq 1$, $q\text{-value} \leq 0.01$ 。

1.3.4 差异表达基因功能分析 利用 GO 数据库对差异表达基因进行功能分类,利用 KEGG 分析代谢途径,使用 $P\text{-value} < 0.05$ 作为显著富集基因的阈值,使用 MapMan 软件对差异基因进行图形化分析。

1.4 qRT-PCR 验证

采用与转录组测序相同的样品材料,随机选取差异表达基因进行 qRT-PCR 分析,验证转录组测序分析数据的可靠性。

通过 DNAMAN 软件设计引物,然后由英潍捷基(上海)贸易有限公司进行引物的合成,并通过电泳及 qRT-PCR 熔解曲线检测引物特异性。相关验证基因扩增引物序列见表 1。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达并换算成 $\log_2 FC$ 。

表 1 qRT-PCR 验证基因选择及引物设计

Table 1 Genes selection and primers design for qRT-PCR

基因 ID	Gene ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')		产物长度 Length of product (bp)
Cs4g12760	F: TTCGTCTTGCTCTTCGGATAA	R: GCACTCCAACGGAATCTCTAA		202
Cs2g09310	F: GGTGTCATTCTCTCCTACC	R: GCAGTTCCTCGCCTATTCT		198
Cs5g15470	F: CAGCCTTGTCGGTATGAGAA	R: CAACACCCAATCTTCCTTGAG		151
Cs5g21860	F: GCTCTGTGGGCATTCTTGC	R: CTCTCGTGTAGAAGCTCTTGCC		142
Cs7g20700	F: ACGGTTCAAGGCTCATTTAG	R: TGGGATTGGCATCATCAAT		185
Cs3g10430	F: TGGAGACGTAGAGGCTGTCAA	R: CATACCAATATTTTGAGCATTTT		121
Cs6g07410	F: GGAGAGTGGTGGAATGCTGAT	R: CACTTCGAGCGTGTAGGTTTG		150
Cs6g20850	F: CCAGCAGGCATGAGAAATTA	R: TGACCATCGTGGAACAGTA		229
Cs1g01180	F: TGCAGTAGAAGTTGATGGTGATG	R: AATGAGCCGTTAGCGACAAG		165
Cs1g04680	F: AGCTGCAAGGGTTTGGTTAG	R: GAATTTGCGTTTGGTGATGA		150
Cs8g13680	F: GCCTATGCTTGCTGTTGTTTC	R: GAAGGCAGTCCATCCATACTTC		194
orange1.1t03118	F: CAAGCTCTCCAGGCAAGAGT	R: GGTCCACGGCCATAGTAGAA		247
orange1.1t03618	F: CGGGATGAACATTTGGTTTA	R: CTAGCCTTCTGATCTTGACACA		184
orange1.1t05311	F: GCTGGGATATAACTCCTTCTCA	R: TTCCGCTAAACCAATCACTT		172
Cs2g06120	F: GCACAAGGAAATGGGTTTGT	R: GAAACACGCTGGGATCACTT		229
Cs6g07400	F: ACATGGCTGCAAGAGCATAC	R: CCATTGAGGTCCACCCTTA		197
orange1.1t00214	F: ACGCTCTGTCCCTCAACAAG	R: CCGCTACTGCCTCTGTATC		171
orange1.1t02319	F: GGGATCTACTGCCGACACTC	R: CGACGACGACCTTTGATCTT		245
orange1.1t03603	F: GGACAATGCTGATCCGAAAG	R: TCAACCAAGCCTCCTGAAAC		203
CitActin	F: CATCCCTCAGCACCTTCC	R: CCAACCTTAGCACTTCTCC		191

2 结果

2.1 与参考基因组比对结果

测序 reads 经过数据质控后，将各样品过滤后的 clean reads 与甜橙基因组进行比对分析，各样品的比对率及唯一比对率都相对比较均匀，详细的比对结果见表 2。经测序得到的 6 个转录组文库中的数据与甜橙参考基因组进行比对后获得的 mapped reads 占总

reads 的 74%以上，根据样品间分析可知，对照样品中的 mapping 率接近 90%，说明在接菌后随着菌体在叶片内增殖，病原菌的转录本影响总的 mapping。

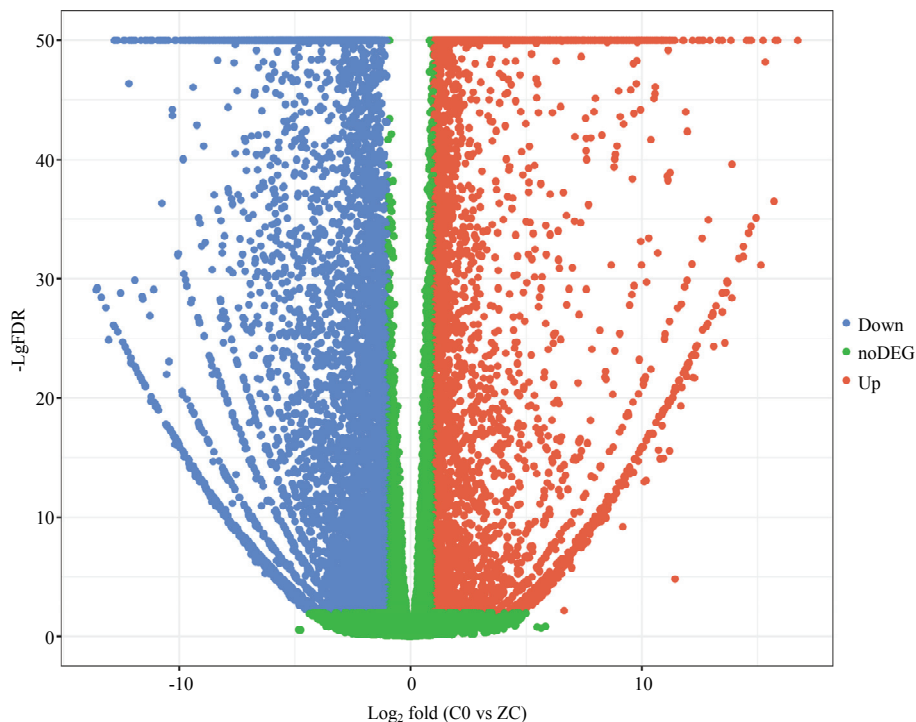
2.2 差异表达基因筛选

根据差异基因筛选条件 $q\text{-value}\leq 0.01$ ，差异倍数 $|\log_2FC|\geq 1$ ，链格孢菌橘致病型接种红橘 28 h 后获得上调差异基因 5 173 个，下调差异基因为 6 555 个（图 1）。

表 2 比对参考基因组结果统计

Table 2 Summary of genome mapping

样本	总序列数	比对上序列比例	比对上唯一位置序列比例	双端比对上序列比例
Sample	Total reads	Total mapped reads (%)	Unique mapped reads (%)	Reads mapped in paired (%)
C0_1	47713764	90.30	86.99	84.18
C0_2	54696950	88.96	85.64	82.20
C0_3	52284118	89.93	86.59	83.36
ZC_1	55857454	75.22	71.84	69.94
ZC_2	53372222	74.18	70.98	68.37
ZC_3	57202046	74.31	70.99	68.87



图中每个点代表一个基因，蓝色和红色的点代表显著差异表达基因，红色的点表示其基因表达量上调，蓝色的点表示其基因表达量下调，绿色的点表示这些基因无显著差异

Each point in the figure represents a gene, and the blue and red dots represent significant differentially expressed genes (DEGs), the red dot indicates that the gene expression level is up-regulated, the blue dot indicates that the gene expression level is down-regulated, the green dot indicates that these genes are not significant difference

图 1 链格孢菌橘致病型侵染引起红橘差异表达基因火山图

Fig. 1 Volcano plot of DEGs of tangerine inoculated with *A. alternata* tangerine pathotype

2.3 差异表达基因 GO 功能富集分析

红橘受链格孢菌橘致病型侵染的差异基因根据 GO 分类的规则分为 3 大类：分子功能、细胞组分和生物学过程（图 2）。在生物学过程中差异基因主要属于蛋白磷酸化、代谢过程、氧化还原过程和跨膜运输。细胞组分中只包括两类与膜相关的条目。分子功能相关的基因富集最多，其中更多基因富集在蛋白结合、ATP 结合、催化活性、蛋白激酶活性和氧化还原活性。

对所有富集的 GO term 进行筛选，筛选条件为多重检验校正 $q\text{-value}<0.05$ ，利用 WEGO 通过比较所有富集的基因和差异基因占基因总数的百分比，可以得出哪些差异的比例高出一般基因富集的水平，如图 3 所示，在代谢过程、膜系统、抗氧化活性、转运及核酸绑定相关基因 GO 富集程度高于平均水平。

将差异基因分成表达上调和表达下调基因，图 4 显示在同病原菌互作过程中，红橘不同代谢途径的基因均呈现上调或下调，值得注意的是碳水化合物代谢过程

中上调基因 91 个而下调基因 146 个，说明病原菌侵染直接破坏红橘的碳水化合物代谢。叶绿体相关的基因和调控光系统的基因也主要呈下调状态，说明光合作用也受到负面影响。微管相关基因也是以下调状态为主，说明细胞骨架也被病原菌攻击受损。DNA 绑定的转录因子活性增强，说明大量转录因子被激活调控下游抗病基因表达，蛋白激酶活性也以上调为主，说明免疫相关的 PTI 和 ETI 中大量受体激酶也被病原菌激活。

2.4 差异表达基因 KEGG 功能富集分析

以 KEGG Pathway 为单位，应用超几何检验，分析鉴别差异表达基因中显著富集的代谢通路或信号转导途径。Pathway 富集到的通路涉及到 6 975 个差异基因，对所有富集的 KEGG Pathway 进行筛选，共获得 20 条显著富集的 Pathway，分别为代谢途径(ko01100)、次生代谢物合成(ko01110)、碳循环(ko01200)、糖酵解/糖异生(ko00010)、丙酮酸代谢(ko00620)、光合作用(ko00195)、柠檬酸循环(ko00020)、光合

作用-天线蛋白质 (ko00196)、脂肪酸降解 (ko00071)、卟啉和叶绿素代谢 (ko00860)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (ko00260)、氨基糖和核苷酸糖代谢 (ko00520)、谷胱甘肽代谢 (ko00480)、 α -亚麻酸代谢 (ko00592)、苯丙烷类生物合成 (ko00940)、植物激素信号转导 (ko04075)、抗坏血酸代谢 (ko00053)、双酚降解 (ko00363)、柠檬烯和蒎烯的降解 (ko00903)、二苯乙烯、二芳庚烯和姜辣素的生物合成 (ko00945) (图 5)。

2.5 红橘响应链格孢菌橘致病型感染差异表达基因

2.5.1 植物激素信号转导途径及相关基因 接种链格孢菌橘致病型 28 h RNA-seq 结果显示, 红橘防御相关的植物激素信号转导途径中多个基因表达具有差异, 乙烯 (ET)、水杨酸 (SA) 和生长素 (AUX) 等

重要防御相关的植物激素信号通路受到影响 (图 6)。

在红橘响应链格孢菌橘致病型的激素信号转导中乙烯起了主导作用。首先, 乙烯受体 ETR 的 3 个成员 *Cs9g08850*、*Cs5g33560* 和 *Cs5g14390* 被该菌不同程度激活, ETR 下游的激酶 CTR1 中 *Cs6g15490*、*Cs3g17090* 表达量也随之升高, 随后受 MPK-MEKK 将信号进一步放大, 到信号下游 *Cs4g17960* 和 *Cs7g05390* (编码 EBF 1/2), *Cs3g06940*、*Cs3g06930*、*orange1.1t04381*、*Cs2g29100* (编码 EIN3) 和最终的转录调控因子乙烯响应因子 ERF 1/2 均表现出表达量升高趋势。

而在生长素信号中大部分的关键基因表达下调, AUX 作为生长素信号的最上游, 大量的红橘同源基因 *Cs8g16440*、*Cs3g05470*、*Cs2g05440*、*Cs3g05500*、*orange1.1t00508* 等均呈现下调表达趋势, 而生长素

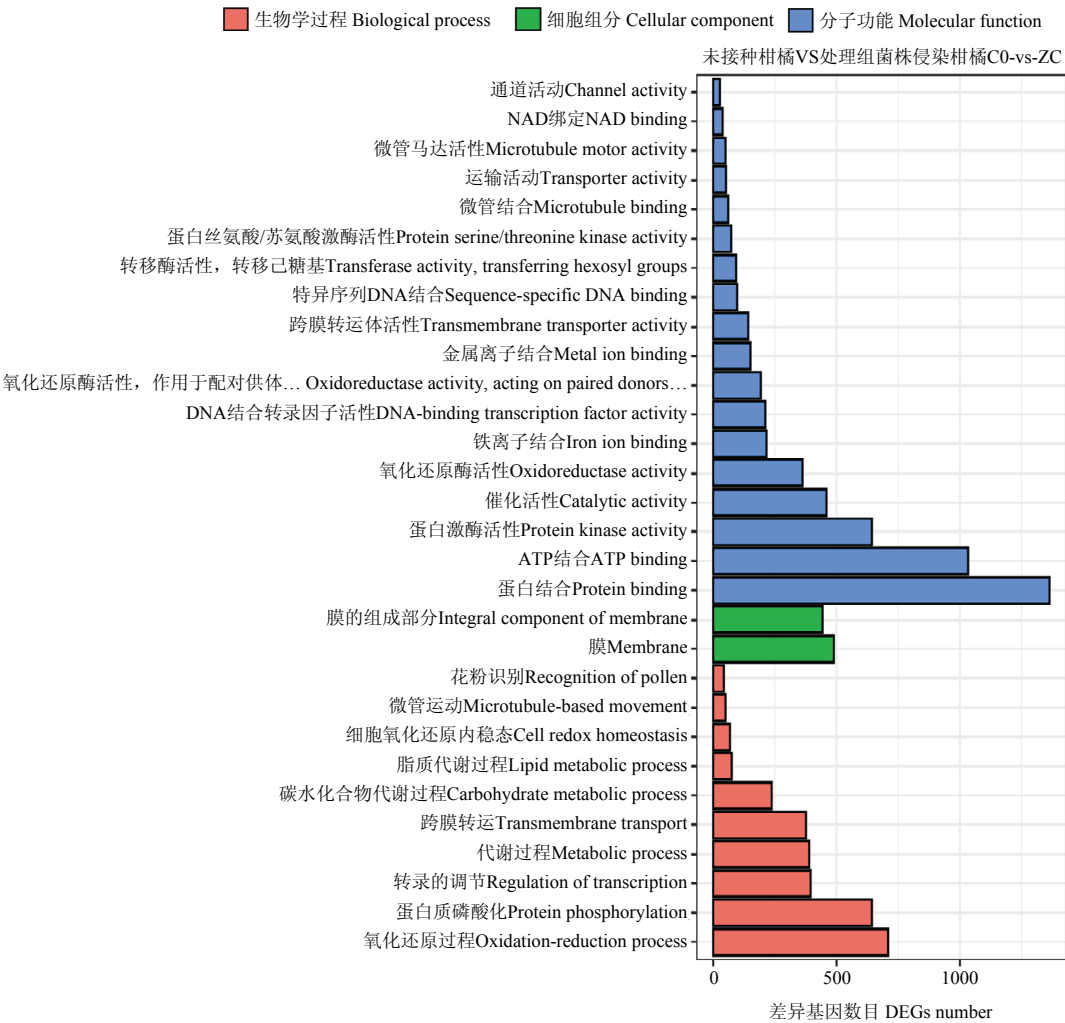
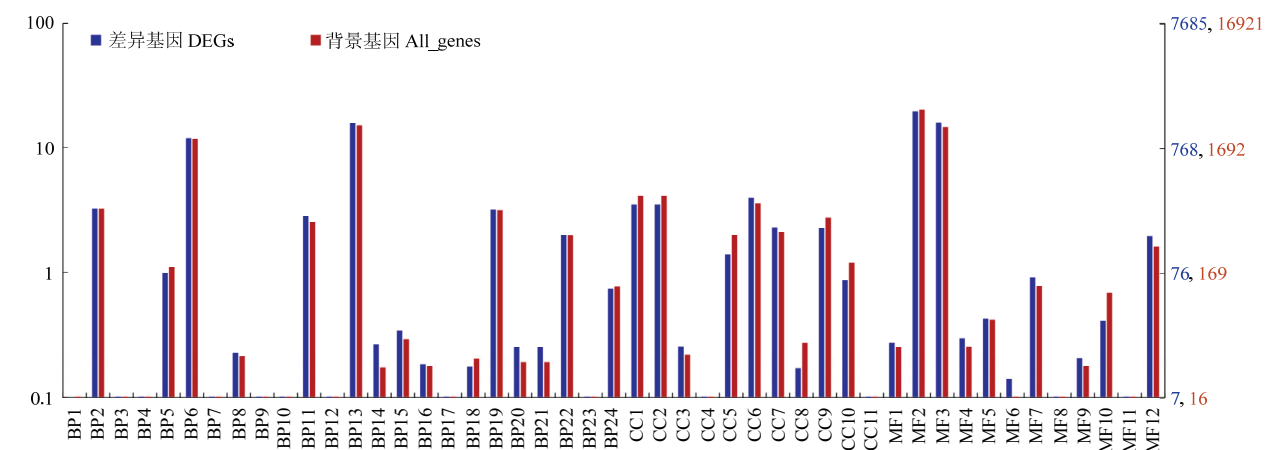


图 2 差异表达基因 GO 富集
Fig. 2 DEGs GO enrichment

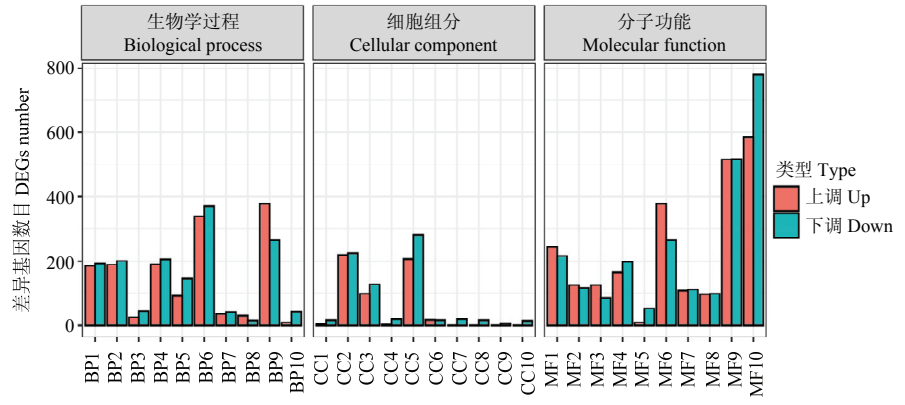


横坐标表示 GO 的 3 个方面; 左侧纵坐标表示基因数目的百分比; 右侧纵坐标表示对应 GO term 的基因数 X axis: Three aspects of GO; The left ordinate: The percentage of the number of genes; The right ordinate: The corresponding GO term gene number

BP1: 生物黏附 Biological adhesion; BP2: 生物调节 Biological regulation; BP3: 碳利用 Carbon utilization; BP4: 细胞增殖 Cell proliferation; BP5: 细胞成分组成或发生 Cellular component organization or biogenesis; BP6: 细胞过程 Cellular process; BP7: 解毒 Detoxification; BP8: 发展过程 Developmental process; BP9: 增长 Growth; BP10: 免疫系统过程 Immune system process; BP11: 定位 Localization; BP12: 运动 Locomotion; BP13: 代谢过程 Metabolic process; BP14: 多生物过程 Multi-organism process; BP15: 多细胞生物过程 Multicellular organismal process; BP16: 生物过程负调控 Negative regulation of biological process; BP17: 氮利用 Nitrogen utilization; BP18: 生物过程正调控 Positive regulation of biological process; BP19: 生物过程调节 Regulation of biological process; BP20: 繁殖 Reproduction; BP21: 生殖过程 Reproductive process; BP22: 刺激反应 Response to stimulus; BP23: 节律过程 Rhythmic process; BP24: 信号 Signaling; CC1: 细胞 Cell; CC2: 细胞部分 Cell part; CC3: 细胞外区域 Extracellular region; CC4: 细胞外区域部分 Extracellular region part; CC5: 大分子复合物 Macromolecular complex; CC6: 膜 Membrane; CC7: 膜部分 Membrane part; CC8: 膜包围腔 Membrane-enclosed lumen; CC9: 细胞器 Organelle; CC10: 细胞器部分 Organelle part; CC11: 超分子复合物 Supramolecular complex; MF1: 抗氧化活性 Antioxidant activity; MF2: 绑定 Binding; MF3: 催化活性 Catalytic activity; MF4: 电子载体活性 Electron carrier activity; MF5: 功能分子调控 Molecular function regulator; MF6: 分子传感器活性 Molecular transducer activity; MF7: 核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity; MF8: 营养库活性 Nutrient reservoir activity; MF9: 信号传感器活性 Signal transducer activity; MF10: 结构分子活性 Structural molecule activity; MF11: 转录因子活性、蛋白质结合 Transcription factor activity, protein binding; MF12: 转运活性 Transporter activity

图 3 差异表达基因 WEGO 分类

Fig. 3 WEGO classification of DEGs



BP1: 跨膜运输 Transmembrane transport; BP2: 细胞氧化还原内稳态 Cell redox homeostasis; BP3: 转录调节、DNA 模板化 Regulation of transcription, DNA-templated; BP4: 碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process; BP5: 氧化还原过程 Oxidation-reduction process; BP6: 脂质代谢过程 Lipid metabolic process; BP7: 花粉识别 Recognition of pollen; BP8: 蛋白质磷酸化 Protein phosphorylation; BP9: 基于微管运动 Microtubule-based movement; BP10: 代谢过程 Metabolic process; CC1: 叶绿体 Chloroplast; CC2: 核 Nucleus; CC3: 微管 Microtubule; CC4: 膜 Membrane; CC5: 细胞外区域 Extracellular region; CC6: 光系统 II Photosystem II; CC7: 光系统 II 氧化复合体 Photosystem II oxygen evolving complex; CC8: 光系统 I 反应中心 Photosystem I reaction center; CC9: 膜的外部成分 Extrinsic component of membrane; CC10: 膜的组成部分 Integral component of membrane; MF1: 催化活性 Catalytic activity; MF2: DNA 结合转录因子活性 DNA-binding transcription factor activity; MF3: 氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity; MF4: 微管结合 Microtubule binding; MF5: 蛋白激酶活性 Protein kinase activity; MF6: 铁离子结合 Iron ion binding; MF7: 氧化还原酶活性, 作用于配对供体, 结合或还原分子 Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular; MF8: ATP 结合 ATP binding; MF9: 蛋白结合 Protein binding; MF10: 血红素结合 Heme binding

图 4 差异表达基因 GO 分类

Fig. 4 GO classification of DEGs

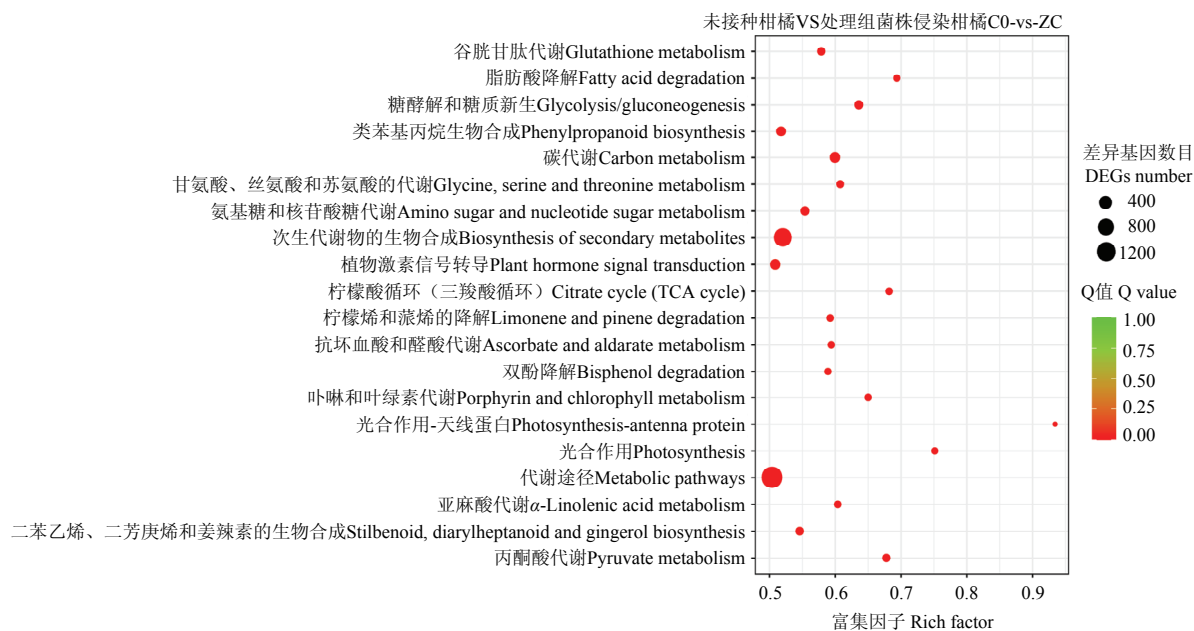


图 5 差异表达基因的 KEGG 通路分析
Fig. 5 KEGG pathway analysis of DEGs

响应蛋白编码基因 *Cs8g16440*、*Cs3g05470*、*Cs2g05440*、*Cs3g05500*、*orange1.1t00508* 等也随 AUX 信号诱导剧烈上升，在生长素信号途径重要转录因子家族中的生长素响应因子 ARF 是具有多个成员的基因家族，而红橘中绝大部分成员如 *Cs8g16440*、*Cs3g05470*、*Cs2g05440*、*Cs3g05500*、*orange1.1t00508*、*Cs5g32400* 都表现出受链格孢菌橘致病型诱导的负调控表达。

在 SA 合成-降解途径中，*Cs2g18260* 编码的 UGT74F1 在体外将 UDP-葡萄糖转移至水杨酸（形成葡萄糖苷）、苯甲酸、槲皮素和草酸盐。*Cs2g18240* 对应 S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖性甲基转移酶超家族蛋白，具有甲基转移酶活性参与水杨酸合成，*Cs5g21260*（编码 UGT74F1）由水杨酸、病毒、真菌和细菌诱导，参与色氨酸合成途径。这些参与水杨酸合成途径的基因受链格孢菌橘致病型诱导后均表达下调，推测在该菌侵染过程中有大量 SA 合成。在 SA 信号转导途径中大量的 TGA 转录因子同样受该菌诱导，而下游的 PR 基因不同成员既有表达上调也有表达下调，这些基因除了受 SA 调控外也受其他信号影响。

2.5.2 红橘响应链格孢菌橘致病型的转录调控 转录因子（TF）是开启基因转录过程的“主要开关”。图 7 显示本研究在差异表达基因中发现来自不同 TF 家族的多个成员。最具代表性的 TF 类是 WRKY 系列，

在红橘中大概有 50 个成员，大部分成员均受链格孢菌橘致病型诱导正调控，其中 *WRKY22*、*WRKY33*、*WRKY72*、*WRKY75*、*WRKY28* 都相较于对照上调 10 倍以上，同时也包括 *WRKY13* 在内的一些成员响应应该菌并表达下调。bZIP 类转录因子能与 WRKY 蛋白发生互作，通常与 WRKY 参与相同的调控模式。转录组数据显示在差异表达基因中 bZIP 家族的大部分成员（*Cs1g26010*、*Cs3g10860*、*Cs5g29820*）也受该菌侵染上调表达，只不过表达显著性稍低于 WRKY 转录因子。由于乙烯信号途径基因的大量表达，在转录因子中有一类称为乙烯响应因子的蛋白与该信号途径联系紧密，而差异表达分析也验证了相关的数据，在该菌侵染 28 h 后的样品中超过 50% 的 ERF 家族成员（*Cs3g23270*、*Cs4g06410*、*Cs5g33540*）表达上调，其他 TF 家族也不同程度的被诱导差异表达，包括 NAC、MYB、ZF-HD、B3、HB、C2H2、TiFy 和 bHLH 家族。

2.5.3 次级代谢产物生物合成相关基因 在响应链格孢菌橘致病型过程中，与黄酮醇、花青素、萜类化合物和生物碱生物合成相关的基因受该菌诱导产生剧烈变化（图 8）。萜类合成中大部分基因表现下调，而黄酮类合成相关的差异表达基因既有表达上调又有表达下调，总体来说表达上调基因的数量和表达趋势

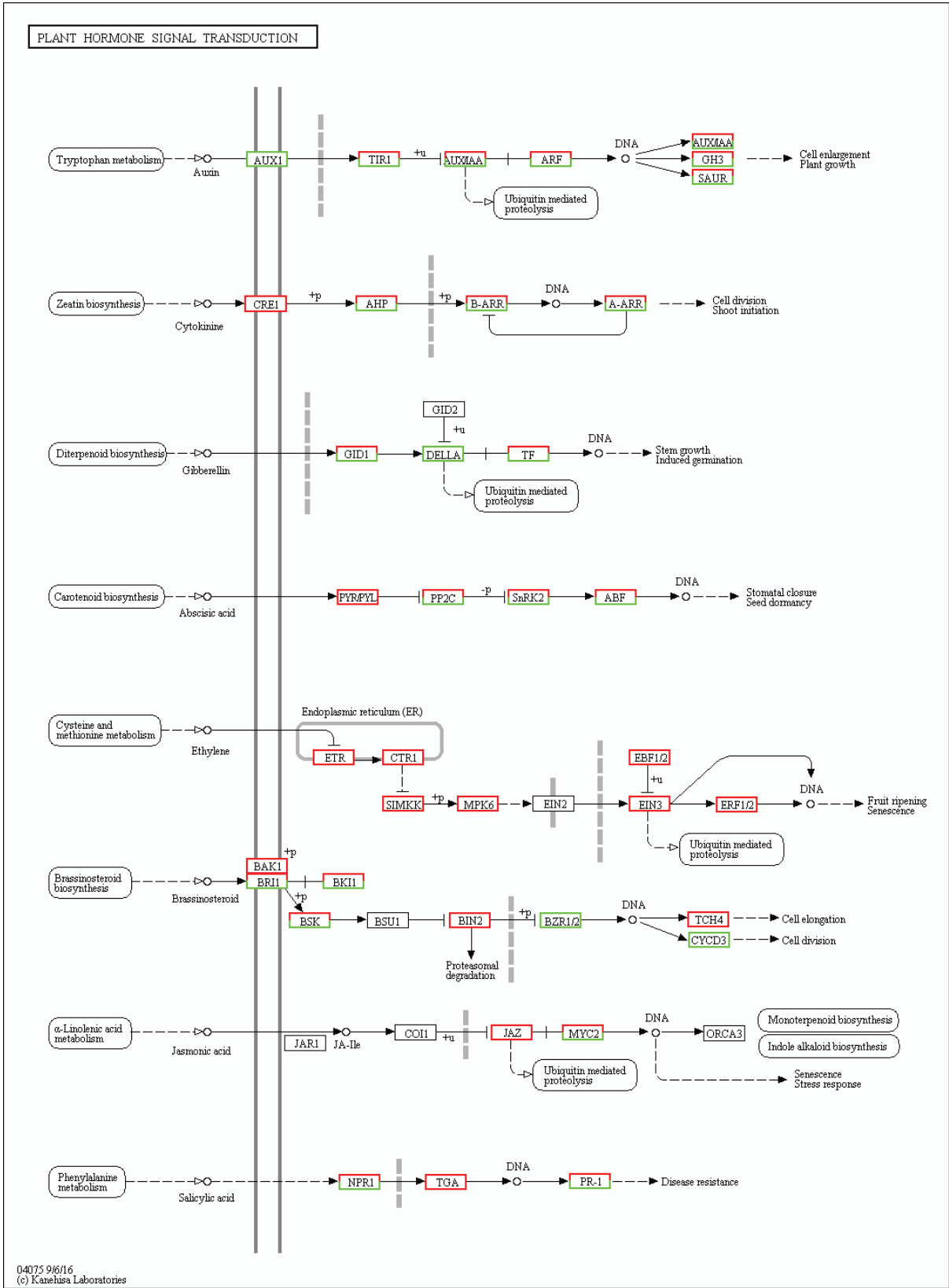


图 6 KEGG map 分析植物激素信号转导相关的差异表达基因
Fig. 6 DEGs involved in plant hormone signal transduction analyzed by KEGG map

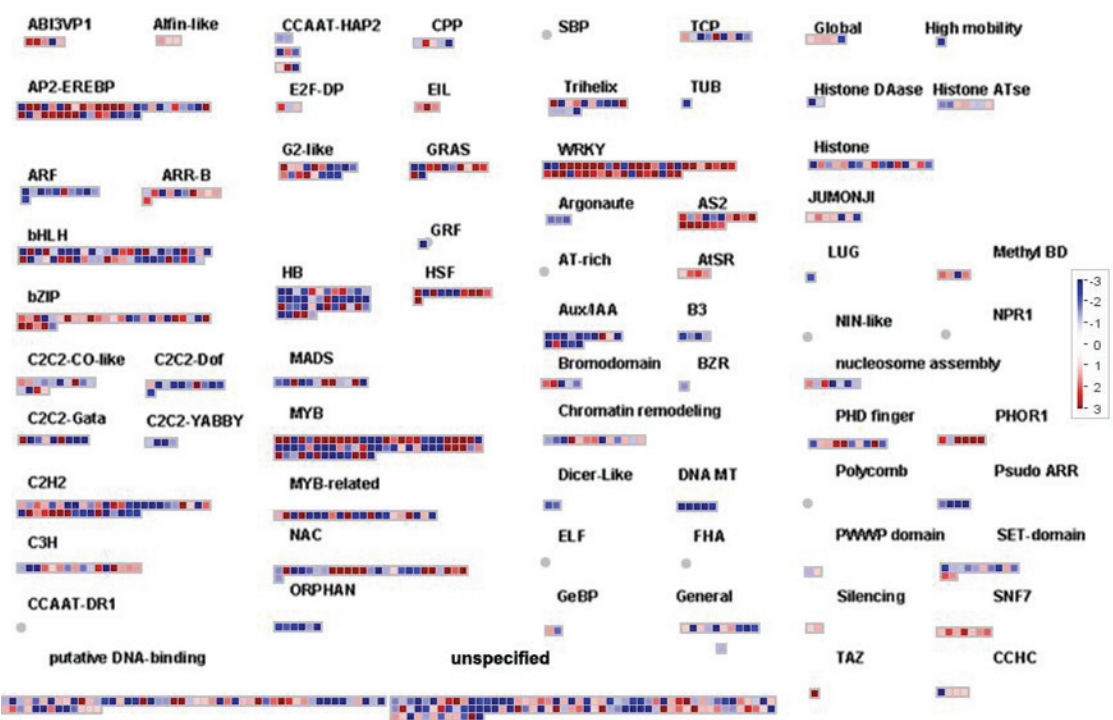


图 7 MapMan 分析转录因子相关的差异表达基因

Fig. 7 DEGs involved in transcription factor analyzed by MapMan

均强于表达下调基因,其中黄烷酮-3-羟化酶(*Cs1g03950*)、2-oxoglutarate (*Cs5g29930*、*Cs9g02930*、*Cs9g14520*、*Cs9g14500*)和 Fe(II)/ascorbate oxidase(*orange1.1t03581*、*orange1.1t03576*、*orange1.1t03582*) 均在侵染过程中积累,UDP-糖基转移酶家族则在黄酮和花青素合成过程中表达下调。硫代葡萄糖苷有抗虫和抑菌的作用,在该菌的影响下总体呈现上调趋势,而生物碱相关基因和类胡萝卜素代谢相关基因表达趋势与此相反。此外,该菌还诱导了涉及木质素生物合成的基因 PAL(*Cs8g16290*、*Cs7g24940*)、4CL(*Cs5g06990*)、HTC(*Cs1g14450*),表明在受侵染的组织中木质素沉积,木质化可作为限制病原菌定殖的有效防御机制,转录组数据呈现出感染组织中细胞壁活动剧烈变化,支持了植物在感染期间感知病原并激活防御机制的观点。

2.5.4 病原与植物互作途径相关基因 MAPK 信号途径中 *CsMPK7*、*CsMKK3*、*CsMAP3Ka* 信号级联均受链格孢菌橘致病型激活表达,同时表达量上调的还有下游主要转录因子成员 *ERF*、*WRKY*、*bZIP*、*MYB*。ETI 中的 R 蛋白基因(*Cs5g21850*、*Cs5g21860*、*orange1.1t03118*),TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白编码

基因(*Cs1g26330*)和 NB-ARC 类抗病蛋白编码基因(*orange1.1t03734*)均响应该菌正向调控表达,NB-LRR 家族也是由该菌侵染诱导引起寄主细胞程序性死亡并产生过敏反应(HR)。

植物跨膜受体能感知细胞外微生物相关分子,跨膜受体对应不同的受体激酶,激酶有不同的胞外结构域对应识别不同的胞外分子。本研究结果显示,受感染的红橘显著富集受体激酶和受体蛋白质,在被链格孢菌橘致病型侵染 28 h 后,红橘多个 LRR 类受体基因(*Cs2g04320*、*Cs2g04330*、*Cs6g10370*)被激活,此外还有 DUF 受体激酶、LRK 受体激酶、LysM 类受体激酶、WAK 受体激酶和凝集素受体激酶这些不同类型的激酶基因都有超过 5 个以上的家族成员被剧烈诱导。此外多种基因编码抗菌蛋白也在该菌激活下引起上调,这些基因属于病程相关(PR)超家族,包括多个家族组成的抗病群体构成植物诱导防御机制,编码 PR 基因的转录本 PR-1、PR-2(β -1-3-葡聚糖酶)、PR-3、PR-4、PR-8、PR-11(几丁质酶)、PR-5(thaumatin)、PR-6(蛋白酶抑制剂)、PR-9(过氧化物酶)和 PR-10(核糖核酸酶)在链格孢菌橘致病型侵染期间累积。高等植物中的保护酶系统

在遭受胁迫过程中保护植物不受细胞内 ROS 造成的氧化损伤，调控抗氧化活性清除 ROS 对植物的伤害依赖于过氧化物酶（POD）家族蛋白。显然，在红橘受到链格孢菌橘致病型侵害的过程中需要积累大量的 POD 基因，因此 *Cs2g09310*、*Cs2g28680*、

Cs7g20700 等 22 个 POD 成员基因均受到活性氧信号激发大量表达。其他上调防御基因包括转录因子、蛋白酶抑制剂和 NADPH 氧化酶负责产生超氧离子，这些结果证实柑橘内部启动了完全的防御反应（图 9）。

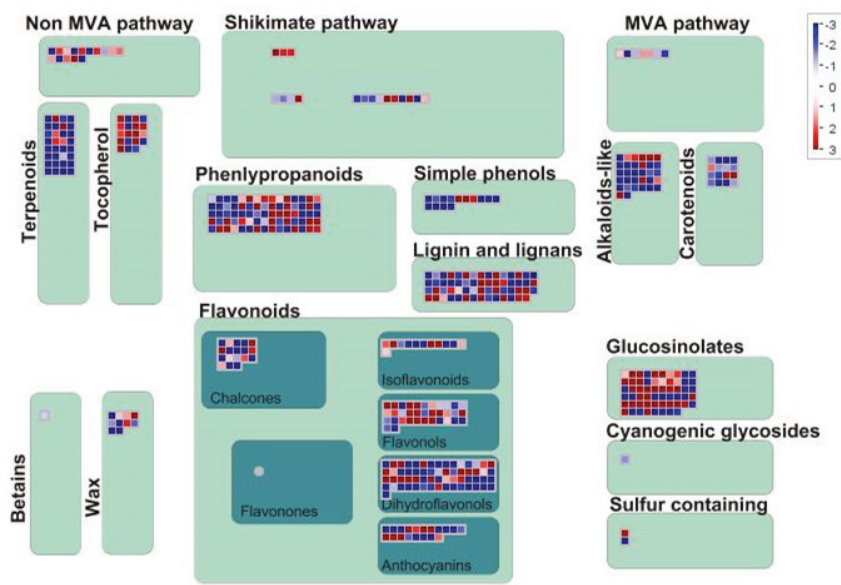


图 8 MapMan 分析次级代谢产物合成相关的差异表达基因
Fig. 8 DEGs involved in secondary metabolite biosynthesis analyzed by MapMan

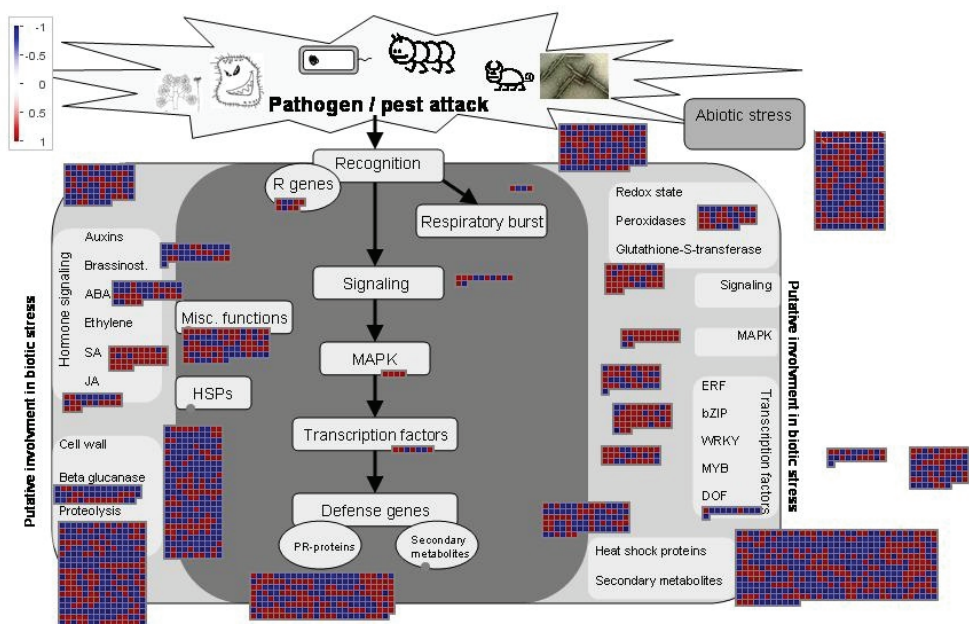


图 9 MapMan 分析寄主-病原互作相关的差异表达基因
Fig. 9 DEGs involved in host-pathogen interaction analyzed by MapMan

2.6 qRT-PCR 验证

为检测转录数据的真实性和可靠性, 根据转录组的差异基因, 选取了一些已报道明确与植物抗病相关的基因且在差异表达分析中 \log_2FC 接近 10 的成员, 通过 qRT-PCR 技术检测其表达水平。由图 10 可以看出调控抗氧化活性的 POD 基因 (*Cs2g09310*、*Cs7g20700*) 和谷胱甘肽转移酶基因 (*orange1.lt03618*) 在接种链格孢菌橘致病型的样品中均显著表达上调, 细胞壁代谢相关的漆酶 (*Cs6g07410*) 和果胶转移酶 (*Cs3g10430*) 受该菌攻击也呈现上调趋

势, PTI 响应的受体激酶 LRR (*orange1.lt05311*) 也受该菌诱导, 同样 ETI 调控的 R 基因 NB-ARC 蛋白 (*Cs1g01180*) 也上调, 几丁质酶 (*Cs5g21860*、*orange1.lt03118*) 作为主要的抗病蛋白上调倍数均超过 10 倍, 转录因子 NAC (*Cs5g15470*)、MYB (*Cs4g12760*) 和 WRKY (*Cs6g20850*) 均为植物抗逆过程中重要的调控因子, qRT-PCR 和转录数据显示所检测的 3 个转录因子均受该菌诱导显著上调, qRT-PCR 结果与转录组显示基因表达变化趋势一致。

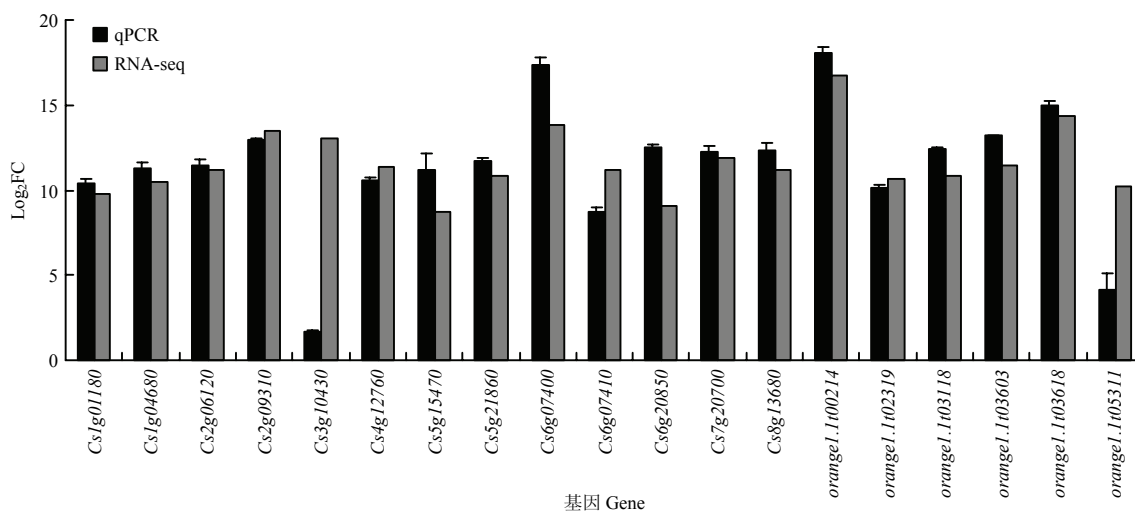


图 10 差异表达基因 qRT-PCR 鉴定

Fig. 10 Identification of DEGs by qRT-PCR

3 讨论

3.1 植物防御反应中的激素平衡

本研究中的 MPK 信号通路和乙烯信号途径均富集大量上调的差异基因, MPK 家族成员接受链格孢菌橘致病型信号从而控制红橘 ET 信号合成, 通过 ET 信号调控下游 ERF 类转录因子起到激活抗病基因的作用。本氏烟的 Ca^{2+} 结合蛋白 Calreticulin 3a 在识别源自致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 的 MAMP 后参与 ET 的诱导产生, 进一步证明 ET 信号传导是产生抗微生物毒素所必需的^[21]。 Ca^{2+} 信号 (CDPK 和 CML) 在本研究中被激活, 因此 Ca^{2+} 也参与响应链格孢菌橘致病型入侵信号并激活 ET 产生来调控抗病反应。

通过 MapMan 和 KEGG 所注释的差异基因显示,

红橘茉莉酸 (JA) 途径中的激素合成及信号转导相关基因均发生剧烈变化, 其中编码 JA 生物合成所需 12-氧代二亚油酸还原酶的 7 个基因全部上调, JA 受链格孢菌橘致病型感染后大量合成作为抗病信号激活下游基因表达。关于 JA 参与防御反应报道很多, 如通过激发子和病原体攻击增加内源性 JA 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 水平, 外源性应用 JA 或 MeJA 诱导防御反应基因表达^[22-23]。本研究中的 JA 下游 PR 基因和相关次生代谢产物合成基因均受到不同程度诱导。芸薹生链格孢 (*A. brassicicola*) 感染上调 JA 生物合成和 JA 诱导的防御基因^[24]。通过直接对拟南芥喷雾接种芸薹生链格孢分生孢子能激活 JA 相关基因表达^[25]。JA 在小麦冠腐病菌 (*Fusarium pseudograminearum*) 攻击期间延迟了小麦症状的产生^[26], 并且增强了对壳多胞 (*Stagonospora nodorum*) 感染的抗性^[27], 因此 JA 信

号通路是植物对抗死体营养型真菌特别是链格孢真菌的主要信号转导途径。

3.2 转录因子调控植物防御反应

链格孢菌橘致病型侵染红橘的过程调控抗病基因表达的主要为 WRKY 和 ERF 转录因子,检测到的 43 个差异表达的 WRKY 转录因子中只有 9 个表达下调,其余成员均显著上调,其中 WRKY22/28/72/75 的 \log_2FC 接近 10。由于受乙烯信号的刺激,乙烯响应因子 ERF (*Cs7g19640*、*Cs7g04300*、*Cs1g04680* 和 *Cs1g04650*) 显著上调并且超过 10 倍以上。

WRKY 转录因子可作为防御基因表达中的正或负调节因子,并且是不同防御信号途径的靶标^[28]。拟南芥 WRKY70 参与防御途径之间的交互作用,对坏死细菌软腐菌 (*Pectobacterium carotovorum*) 的抗性起重要作用,作为 SA 响应转录的激活因子又是 JA 响应转录的抑制剂^[29]。*AtWRKY70* 在灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 感染中被诱导,并且 *wrky70* 突变体表现出对此菌的敏感性增强,但对死体营养型真菌芸蓼生链格孢具有抗性^[30]。本研究中红橘的 WRKY70 作为拟南芥 *AtWRKY* 的同源基因,也受链格孢菌橘致病型激活,说明 WRKY70 对植物抵御死体营养型真菌的机制有一定相似性。拟南芥 *wrky33* 突变体对上述两种菌均非常敏感,表明 WRKY33 是对这些死体营养型真菌防御的关键正调控因子^[31]。WRKY33 整合寄主信号传导以赋予对病原体攻击抗性的作用模式,并且 WRKY33 与 MAP4 及 MPK4 的底物 MKS1 在细胞核相互作用来实现对抗病信号的调控^[32-33]。在菊花中也筛选到一个响应链格孢的转录因子基因 *CmWRKY33.1*,通过在菊花中过表达证实该基因亦能增强菊花对该菌的敏感性^[34]。过表达菊花的另一个 WRKY 转录因子基因 *CmWRKY15* 可激活 ABA 相关下游基因,增加过表达植株对细极链格孢 (*A. tenuissima*) 的敏感性^[35]。在甜橙基因组中预计有超过 50 个 WRKY 转录因子,本试验接种链格孢菌橘致病型 28 h 后通过 MapMan 注释到 WRKY 成员中 80% 以上显著上调,红橘受该菌胁迫后激活转录因子的主要成员为 WRKY,其转录的部分成员可能是红橘对链格孢菌橘致病型的感病基因。

APETALA2/乙烯响应元件结合因子 (AP2/ERF) 家族构成一个大型植物特异性转录因子家族,拟南芥中有 140 多个成员,水稻中有 160 个成员^[36]。转录分析揭示 AP2/ERF 型转录因子家族成员在病原菌攻击后被强烈诱导。ERF 亚家族成员显示出对 GCC

序列 (AGCCGCC) 的最大亲和力,并且参与对生物应激响应基因的调节,特别是与 JA 和 ET 信号传导途径相关的基因^[37-39]。过表达 *ERF1* 的转基因拟南芥系足以赋予植株对灰葡萄孢、棉花枯萎病菌 (*F. oxysporum*) 和小不整球壳菌 (*Plectosphaerella cucumerina*) 的抗性^[40-41]。*ERF59/ORF59* 的过表达增强对灰葡萄孢的抗性,而 RNAi-*ORF59* 沉默的株系更易受影响^[36]。*ERF1* 和 *ERF59/ORF59* 似乎都是 JA 和 ET 信号通路的关键整合子^[25]。*ORF59* 被证明是抵消 SA 介导的 JA/ET 应答基因抑制的关键介质^[42]。在链格孢菌橘致病型侵染过程中红橘的 ERF 家族成员受病原菌剧烈诱导,也说明红橘在响应该菌侵染的过程中 ET 水平改变作为信号刺激下游抗病基因表达来实现抗菌目的。

3.3 植物次级代谢产物介导的防御反应

苯丙烷代谢途径是参与植物防御反应的主要次级代谢产物通路之一,该途径主要通过诱导植物产生具有抗病原微生物活性的次级代谢产物^[43]。ZHU 等^[44]在对苹果响应链格孢菌苹果致病型 (*A. alternata* apple pathotype) 的转录组研究中发现 β -葡萄糖苷酶基因被诱导表达,该基因参加修饰多种植物抗毒素。氧脂素作为一种具有保护作用的分子,其相关的合成基因 *LOX* 也受该菌诱导。本研究中 β -葡萄糖苷酶基因和 *LOX* 同源基因也受链格孢菌橘致病型诱导大量表达。另外,木质素合成相关的漆酶 (*Cs6g07400*、*Cs6g07410*)、HCT (*Cs7g29080*)、COMT (*Cs5g18010*、*orange1.1t05423*、*Cs5g24990*、*orange1.1t00578*、*Cs5g24910*) 表达量均超出对照 6 倍以上。DORIA 等利用双向电泳研究柑橘响应该菌的蛋白质组学也发现木质素合成相关基因 Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (COMT) 和 Caffeoyl-coa O-methyltransferase-like (CCOMT) 显著上调表达^[45]。烟草在抵御链格孢菌烟草致病型 (*A. alternata* tobacco pathotype) 时能响应激发子诱导的 JA 信号苯丙烷途径中 feruloyl-CoA 6'-hydroxylase 1 表达生成东莨菪素^[46]。此外,在红橘响应链格孢菌橘致病型的过程中,咖啡因代谢途径中的差异基因 (*Cs2g30140* 和 *Cs7g23340*) 均显著上调,因此次生代谢产物能直接或间接地参与红橘对该菌的抗病过程。

类异戊二烯或萜类化合物是一组用于生长和发育的化学物质,但也具有抵抗不同压力的特殊功能^[47],烟草中的 ERF 转录因子受 ET 和 JA 信号调控,能激活下游的 *EAS12* 表达合成倍半萜类抗菌物质甜椒醇

抑制链格孢菌烟草致病型^[48]。水稻 *OsTPS19* 超表达帮助植株产生大量柠檬烯从而抵御稻瘟病菌^[49]。正常状态下植物的萜类物质具有参与抑制病原菌生长并且在植物体内传递抗病信号的作用^[50], 然而红橘被链格孢菌橘致病型感染过程中 MapMan 注释的萜类合成 30 个基因中 22 个呈现下调表达, 而在激素信号中 ET 和 JA 信号又呈现出上调表达, 表明该菌对红橘体内萜类骨架的破坏导致抗病的萜烯类物质合成受影响, 造成萜类物质含量不足以抑制该菌导致感病。

3.4 红橘防御链格孢菌橘致病型感染的 ROS 信号及 ROS 清除

ROS 产生与清理之间的平衡会受到许多不利因素的干扰, 植物受到严重胁迫时 ROS 平衡会被打破^[51]。病原菌攻击会造成大量的 ROS 产生来抑制病菌在植物体内繁殖, 病菌和植物体双方都通过清除 ROS 维持自身细胞活性, 链格孢菌通过 NADPH 氧化酶和过氧化物酶耐受植物产生的 ROS 保证其毒力^[10]。NADPH 氧化酶是植物-病原体互作过程中产生 ROS 的主要因子之一, 通过将电子从细胞内 NADPH 转移到质外体中的分子氧来催化超氧化物产生的跨膜蛋白^[52], 可通过自发歧化或细胞壁超氧化物歧化酶 (SOD) 的催化活性将超氧化物进一步转化为 H₂O₂。ROS 产生的主要来源是 NADPH 氧化酶^[53]。本研究显示柑橘能通过识别链格孢菌橘致病型的 PPR 导致 CDPK 活性升高, 促使下游 NADPH 氧化酶同源基因 *rboh-Cs8g12000* 和 *Cs3g14240* 显著升高来调控 ROS 抑制该病原菌生长。

过氧化物酶类如抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 被证实为植物受到病原菌感染时产生的病程相关蛋白, 是有效的活性氧清除剂, 在植物调控细胞的氧化还原动态平衡、防御反应及胁迫响应中具有重要作用^[54]。植物中的酶法 ROS 清除机制还包括 SOD 和过氧化氢酶 (CAT), 在链格孢菌橘致病型接种后的红橘中检测到 *Cs2g09310*、*Cs2g28680* 和 *Cs7g20700* 等 20 多个 POD 成员均受到真菌毒素刺激活性氧信号激发大量表达, 其他抗氧化途径中包括超过 30 个谷胱甘肽转移酶 (GST) 受 ROS 诱导, 抗坏血酸合成酶和 APX 都有不同程度上调, 而在不同品种柑橘响应链格孢菌橘致病型的双向电泳中筛选出的差异蛋白同样发现 GSTAPX^[45], 从转录层面和蛋白层面说明感病柑橘通过保护酶系统调整自身内部的 ROS 平衡来对抗该菌。

4 结论

链格孢菌橘致病型的感染引起红橘大量基因差异表达。利用 qRT-PCR 验证了 19 个差异基因的表达量变化, 均与 RNA-seq 分析结果一致。GO 功能分类显示差异基因主要与分子功能、细胞成分和生物过程相关。KEGG 和 MapMan 分析表明, 受链格孢菌橘致病型诱导上调的差异表达基因可富集到病原菌识别、信号转导、活性氧消除、转录调控、次生代谢反应病程相关蛋白等生物胁迫相关基因类别。转录组数据分析显示, 大量萜类合成酶在受链格孢菌橘致病型感染后呈现下调表达, 推测是红橘对该菌敏感的原因。

References

- [1] KOHMOTO K, SCHEFFER R P, WHITESIDE J O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology*, 1979, 69(6): 667-671.
- [2] NISHIMURA S, KOHMOTO K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology*, 1983, 21: 87-116.
- [3] 李红叶, 梅秀凤, 符雨诗, 黄峰, 陈再廖, 杨小平, 王一光, 黄海华. 柑橘链格孢褐斑病的发生危害风险和治理对策. *果树学报*, 2015, 32(5): 969-976.
LI H Y, MEI X F, FU Y S, HUANG F, CHEN Z L, YANG X P, WANG Y G, HUANG H H. *Alternaria* brown spot of citrus: The risk and management strategy. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(5): 969-976. (in Chinese)
- [4] COBB N. Letters on the diseases of plants-*Alternaria* of the citrus tribe. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 1903, 14: 955-986.
- [5] WANG X F, LI Z A, TANG K Z, ZHOU C Y, YI L. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Yunnan Province, China. *Plant Disease*, 2010, 94(3): 375.
- [6] 陈昌胜, 黄峰, 程兰, 冯春刚, 黄涛江, 李红叶. 红橘褐斑病病原鉴定. *植物病理学报*, 2011, 41(5): 449-455.
CHEN C S, HUANG F, CHENG L, FENG C G, HUANG T J, LI H Y. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot on tangerine (*Citrus reticulata* cv. Hongjv). *Acta Phytopathologica Sinica*, 2011, 41(5): 449-455. (in Chinese)
- [7] 黄峰, 朱丽, 侯欣, 李红叶. 瓠柑褐斑病病原鉴定. *浙江农业科学*, 2012(9): 1281-1282.
HUANG F, ZHU L, HOU X, LI H Y. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot on *Citrus suavisissima* Hort. ex Tanaka. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 2012(9): 1281-1282. (in Chinese)

- [8] 赵圆, 王玲杰, 王雪峰, 唐科志, 周常勇, 李太盛. 杂柑褐斑病的病原鉴定. 果树学报, 2014, 31(2): 292-295.
- ZHAO Y, WANG L J, WANG X F, TANG K Z, ZHOU C Y, LI T S. Identification of the pathogenic fungus causing brown spot in two tangerine hybrid varieties. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(2): 292-295. (in Chinese)
- [9] CHUNG K R. Mitogen-activated protein kinase signaling pathways of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *MAP Kinase*, 2013, 2(4): 16-23.
- [10] YANG S L, YU P L, CHUNG K R. The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 923-935.
- [11] 唐飞艳, 孔向雯, 吕韦玮, 唐科志. 柑橘褐斑病菌 *AaSIP2* 基因生物学功能初步研究. 园艺学报, 2018, 45(12): 2358-2370.
- TANG F Y, KONG X W, LÜ W W, TANG K Z. Preliminary studies on the function of *AaSIP2* gene in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(12): 2358-2370. (in Chinese)
- [12] MA H J, ZHANG B, GAI Y P, SUN X P, CHUNG K R, LI H Y. Cell-wall-degrading enzymes required for virulence in the host selective toxin-producing necrotroph *Alternaria alternata* of citrus. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: Article 2514.
- [13] WANG M S, SUN X P, YU D L, XU J P, CHUNG K R, LI H Y. Genomic and transcriptomic analyses of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* in response to oxidative stress. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32437.
- [14] 王明爽. 柑橘褐斑病菌比较基因组和转录组分析及柑橘绿霉病菌产孢中心调控途径和高渗甘油途径的功能基因研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- WANG M S. Comparative genome and transcriptome analysis of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* and functional analysis of genes involved in the central regulatory pathway of conidiation and the high osmolarity glycerol pathway in *Penicillium digitatum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese)
- [15] WU J, ZHANG Y L, ZHANG H Q, HUANG H, FOLTA K M, LU J. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurens* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 234.
- [16] XU L, ZHU L F, TU L L, LIU L L, YUAN D J, LIN L, LONG L, ZHANG X L. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(15): 5607-5621.
- [17] WARD J A, WEBER C A. Comparative RNA-seq for the investigation of resistance to Phytophthora root rot in the red raspberry 'Latham'. *Acta Horticulturae*, 2012, 946(946): 67-72.
- [18] WANG Y S, ZHOU L J, YU X Y, STOVER E, LUO F, DUAN Y P. Transcriptome profiling of Huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible *Citrus* plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: Article 933.
- [19] 李湘龙, 柏斌, 吴俊, 邓启云, 周波. 第二代测序技术用于水稻和稻瘟菌互作早期转录组分析. 遗传, 2012, 34(1): 102-112.
- LI X L, BAI B, WU J, DENG Q Y, ZHOU B. Transcriptome analysis of early interaction between rice and *Magnaporthe oryzae* using next-generation sequencing technology. *Hereditas*, 2012, 34(1): 102-112. (in Chinese)
- [20] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [21] MATSUKAWA M, SHIBATA Y, OHTSU M, MIZUTANI A, MORI H, WANG P, OJIKI M, KAWAKITA K, TAKEMOTO D. *Nicotiana benthamiana* calreticulin 3a is required for the ethylene-mediated production of phytoalexins and disease resistance against oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(8): 880-892.
- [22] GUNDLACH H, MÜLLER M J, KUTCHAN T M, ZENK M H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(6): 2389-2393.
- [23] NOJIRI H, SUGIMORI M, YAMANE H, NISHIMURA Y, YAMADA A, SHIBUYA N, KODAMA O, MUROFUSHI N, OMORI T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology*, 1996, 110(2): 387-392.
- [24] VAN WEES S C M, CHANG H S, ZHU T, GLAZEBROOK J. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 606-617.
- [25] VAHABI K, REICHELT M, SCHOLZ S S, FURCH A C U, MATSUO M, JOHNSON J M, SHERAMETI I, GERSHENZON J, OELMULLER R. *Alternaria brassicae* induces systemic jasmonate

- responses in *Arabidopsis* which travel to neighboring plants via a *Piriformospora indica* hyphal network and activate abscisic acid responses. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: Article 626.
- [26] DESMOND O J, EDGAR C I, MANNERS J M, MACLEAN D J, SCHENK P M, KAZAN K. Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2006, 67: 171-179.
- [27] JAYARAJ J, MUTHUKRISHNAN S, LIANG G H, VELAZHAHAN R. Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of β -1,3-glucanase and thaumatin-like proteins in wheat and enhance resistance against *Stagonospora nodorum*. *Biologia Plantarum*, 2004, 48(3): 425-430.
- [28] PANDEY S P, SOMSSICH I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [29] LI J, BRADER G, PALVA E T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, 2004, 16(2): 319-331.
- [30] ABUQAMAR S, CHEN X, DHAWAN R, BLUHM B, SALMERON J, LAM S, DIETRICH R A, MENGISTE T. Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 2006, 48(1): 28-44.
- [31] ZHEN Z Y, QAMAR S A, CHEN Z X, MENGISTE T. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 2006, 48(4): 592-605.
- [32] ANDREASSON E, JENKINS T, BRODERSEN P, THORGRIMSEN S, PETERSEN N H, ZHU S, QIU J L, MICHEELSEN P, ROCHER A, PETERSEN M, NEWMAN M A, NIELSEN H B, HIRT H, SOMSSICH I, MATTSSON O, MUNDY J. The map kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal*, 2005, 24(14): 2579-2589.
- [33] QIU J L, FIIL B K, PETERSEN K, NIELSEN H B, BOTANGA C J, THORGRIMSEN S, PALMA K, SUAREZ-RODRIGUEZ M C, SANDBECH-CLAUSEN S, LICHOTA J, BRODERSEN P, GRASSER K D, MATTSSON O, GLAZEBROOK J, MUNDY J, PETERSEN M. *Arabidopsis* map kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal*, 2008, 27(16): 2214-2221.
- [34] LIU Y, XIN J, LIU L, SONG A, GUAN Z, FANG W, CHEN F. A temporal gene expression map of chrysanthemum leaves infected with *Alternaria alternata* reveals different stages of defense mechanisms. *Horticulture Research*, 2020, 7: 23.
- [35] FAN Q, SONG A, XIN J, CHEN S, JIANG J, WANG Y, LI X, CHEN F. *Cmwrky15* facilitates *Alternaria tenuissima* infection of chrysanthemum. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0143349.
- [36] PRE M, ATALLAH M, CHAMPION A, DE VOS M, PIETERSE C M, MEMELINK J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 2008, 147(3): 1347-1357.
- [37] PIETERSE C M, LEON-REYES A, VAN DER ENT S, VAN WEES S C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(5): 308-316.
- [38] GUTTERSON N, REUBER T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 465-471.
- [39] YU W Q, ZHAO R R, SHENG J P, SHEN L. *SLERF2* is associated with methyl jasmonate-mediated defense response against *Botrytis cinerea* in tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(38): 9923-9932.
- [40] BERROCAL-LOBO M, MOLINA A. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(7): 763-770.
- [41] BERROCAL-LOBO M, MOLINA A, SOLANO R. Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 2002, 29(1): 23-32.
- [42] LEON-REYES A, DU Y J, KOORNNEEF A, PROIETTI S, KORBES A P, MEMELINK J, PIETERSE C M, RITSEMA T. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(2): 187-197.
- [43] FERRER J L, AUSTIN M B, STEWART Jr. C, NOEL J P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(3): 356-370.
- [44] ZHU L, NI W, LIU S, CAI B, XING H, WANG S. Transcriptomics analysis of apple leaves in response to *Alternaria alternata* apple pathotype infection. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: Article 22.
- [45] DORIA M S, GUEDES M S, DE ANDRADE SILVA E M, DE

- OLIVEIRA T M, PIROVANI C P, KUPPER K C, BASTIANEL M, MICHELI F. Comparative proteomics of two citrus varieties in response to infection by the fungus *Alternaria alternata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136: 410-423.
- [46] SUN H H, WANG L, ZHANG B Q, MA J H, HETTENHAUSEN C, CAO G Y, SUN G L, WU J Q, WU J S. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(15): 4305-4315.
- [47] THOLL D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 148: 63-106.
- [48] SONG N, MA L, WANG W, SUN H, WANG L, BALDWIN I T, WU J S. An ERF2-like transcription factor regulates production of the defense sesquiterpene capsidiol upon *Alternaria alternata* infection. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(20): 5895-5908.
- [49] CHEN X, CHEN H, YUAN J S, KOLLNER T G, CHEN Y, GUO Y, ZHUANG X, CHEN X, ZHANG Y J, FU J, NEBENFÜHR A, GUO Z, CHEN F. The rice terpene synthase gene *OsTPS19* functions as an (*S*)-limonene synthase *in planta*, and its overexpression leads to enhanced resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Biotechnology Journal* 2018, 16(10): 1778-1787.
- [50] HAMMERBACHER A, COUTINHO T A, GERSHENZON J. Roles of plant volatiles in defense against microbial pathogens and microbial exploitation of volatiles. *Plant, Cell and Environment*, 2019, 42(10): 2827-2843.
- [51] HUANG H, ULLAH F, ZHOU D X, YI M, ZHAO Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: Article 800.
- [52] MARINO D, DUNAND C, PUPPO A, PAULY N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(1): 9-15.
- [53] TORRES M A. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(4): 414-429.
- [54] KUŹNIAK E. The ascorbate-gluthione cycle and related redox signals in plant pathogen interactions//ANJUM N A. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer Science+Business Media B.V, 2010: 115-136.

(责任编辑 岳梅)