

根肿菌侵染油菜抗感病品种早期防御酶活性及转录组分析

郭 珍¹ 葛 波¹ 韩美丽¹ 陶伟林² 胡 燕² 陈国康^{1*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400716; 2. 重庆市农业科学院蔬菜花卉研究所, 重庆 401329)

摘要: 为探究抗病和感病2种油菜品种抗病机理及基因表达差异,通过水培法观测油菜抗病品种6M80和感病品种中双11号接种根肿菌后的根毛侵染,利用紫外分光光度法和RNA-Seq技术分别测定根部防御酶的活性及所有的转录序列。结果表明,接菌后3~15 d油菜品种6M80的根毛侵染率显著低于油菜品种中双11号,其根内过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)活性在接菌后第12天达到峰值,且显著高于油菜品种中双11号,分别为382.50、2 044.44和3 342.22 U·g⁻¹·min⁻¹。与未接菌相比,油菜抗病品种6M80和感病品种中双11号接菌后第3、6、9、12天共分别存在6 607个和2 499个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。功能注释结果表明,大多数DEGs参与信号传导、生物代谢、转录过程及防御机制。油菜品种6M80和中双11号中分别存在82个和53个防御酶相关的DEGs。研究表明,根肿菌侵染油菜抗病品种早期防御酶活性较高,其相关差异表达基因参与木质素生物合成和过氧化氢代谢,并在抗根肿病过程中发挥着重要作用。

关键词: 根肿菌; 油菜; 抗性; 防御酶; 转录组

Analysis of defense enzyme activities and transcriptome of clubroot-resistant and -susceptible in canola to clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* during early infection

Guo Zhen¹ Ge Bo¹ Han Meili¹ Tao Weilin² Hu Yan² Chen Guokang^{1*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Vegetable and Flower Research, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China)

Abstract: For the purpose to analyze resistance mechanism and differentially expressed genes (DEGs) of clubroot-resistant (6M80) and -susceptible (Zhongshuang 11, ZS11) of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*, the incidence of root-hair infected in two varieties was measured after inoculation under solution culture conditions. Furthermore, the activities of defensive enzymes and a global transcriptome profiling of the roots of clubroot-resistant (6M80) and -susceptible (ZS11) of Canola were performed, respectively, by ultraviolet spectrophotometry and RNA-Seq. The results showed the infected rate on root-hair of 6M80 by *P. brassicae* was significantly lower than those of ZS11 at 3–15 d after inoculation. The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in 6M80 reached the peak at 12 d after inoculation and were significantly higher than ZS11, and they were 382.50, 2 044.44, 3 342.22 U·g⁻¹·min⁻¹, respectively. Compared with uninoculated treatment, the total

基金项目: 重庆市“十三五”社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2015shms-ztxx80011, cstc2015shms-ztxx80009), 重庆市农委榨菜产业技术体系创新团队建设项目

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: chenguokang@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-22

of DEGs at three, six, nine and 12 days after inoculated were 6 607 and 2 499 in 6M80 and ZS11. Functional annotation showed that most of the DEGs were involved in signal transduction, metabolism, transportation, and defense. Cultivars 6M80 and ZS11 of canola had 82 and 53 DEGs of defense-related enzymes respectively. The above studies suggested that defensive enzyme activity was higher, and DEGs of defense-related enzymes was involved in lignin biosynthesis and hydrogen peroxide metabolism in clubroot-resistance of canola by *P. brassicae* during early infection. These metabolism pathways played much important role in clubroot resistance.

Key words: *Plasmodiophora brassicae*; canola; resistance; defense enzyme; RNA-Seq

由芸薹根肿菌 *Plasmodiophora brassicae* Woron. 引起的十字花科根肿病是重要的世界性土传病害,最早发现于欧洲(Howard et al., 2010),在我国最早在台湾省发现,目前已扩散至华南、华北、东北、西南及西北地区(Diederichsen, 2006),严重影响十字花科油料、蔬菜及其它作物产量(Arne et al., 2015),目前选育抗病品种成为防治该病的有效方法之一。

芸薹根肿菌是一种土传的专性寄生菌,其生活史主要分3个阶段,即休眠孢子囊、根毛侵染和皮层侵染、无性短循环(杨晓琴等, 2015),关于寄主对根肿菌抗病性的研究,不同的学者采用不同的研究方法,Rahman et al.(2011)采用较传统的方法即温室盆栽及田间调查,朱红丽等(2015)则通过温室盆栽试验结合根毛侵染率和皮层侵染面积及实时荧光定量PCR技术评价植物的抗病性。寄主抗性在生理生化水平上主要与防御酶、水杨酸、茉莉酸和乙烯的代谢活性密切相关(Balamuralikrishnan et al., 2005),其中防御酶主要包括过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)等。朱红丽(2016)研究表明CAT和SOD与白菜抗性密切相关,黄芸(2014)研究表明根内激素与抗病性也有一定的关系。随着分子生物学技术的发展及应用, RNA-Seq技术在生物体基因差异表达研究中也得到广泛应用(Novaes et al., 2008; Alagna et al., 2009),国内外学者利用该技术揭示生物体内特定时间和具体组织所表达的全部基因模式,如Chu et al.(2014)研究表明,相对于感病品种,白菜抗病品种接种根肿菌15 d后,与茉莉酸、乙烯信号途径和新陈代谢活性相关的基因上调,但是参与水杨酸新陈代谢和信号途径的相关基因表达量未增加。Chen et al.(2016)利用RNA-Seq技术对白菜抗病品种进行转录组测序及分析,发现在抗病和感病品种之间存在151个与病菌-寄主互作相关的差异基因。

由于传统方法对抗病性的研究只停留在宏观水

平,且油菜根肿病的抗病机理目前还不明确,本研究通过紫外分光光度法测定油菜抗病品种和感病品种苗期接种根肿菌前后油菜根内防御酶的活性变化,比较防御酶与寄主抗病性的差异,并通过RNA-Seq技术测定分析油菜抗感品种根部防御酶相关差异表达基因,以期进一步探索抗病机理及与抗病相关的基因,为油菜抗病育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和油菜品种:菌株采自重庆市涪陵区根肿病较重的榨菜上,鉴定为4号生理小种,置于-20℃备用。油菜感病品种中双11号(病情指数为46.0)、油菜抗病品种6M80(病情指数为8.5),种子由西南大学油菜工程研究中心提供。

试剂及仪器:愈创木酚,上海谱振生物科技有限公司;氯化硝基氮蓝四唑(NBT),上海源叶生物科技有限公司;核黄素,成都市科龙化工试剂厂;邻苯二酚、过氧化氢,上海国药集团化学试剂有限公司;RNAprep pure植物总RNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。Neubauer血球计数板,上海光学仪器厂;精密pH仪,成都世纪方舟科技有限公司;DK-8D恒温水浴锅,上海齐欣科学仪器有限公司;GT16-2高速冷冻离心机,上海京工实业有限公司;ScanDrop250生化分光光度计,德国耶拿分析仪器股份有限公司;DYY-6C型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;2100生物分析仪,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备及接种

将冷藏于-20℃冰箱的榨菜根肿置于室温中解冻腐烂24 h后去掉木质部,称取40 g加适量的无菌水用组织搅拌机搅成匀浆,纱布过滤2次,制备孢子悬浮液备用,利用水培法(Lou et al., 2014)将孢子悬浮液接种催芽4 d的油菜幼苗。将幼苗夹在有小口

的直径为15 mm、厚度为2 mm的圆泡沫上,置于经过遮光处理的10 mL离心管内,每管加入10 mL孢子悬浮液,对照组加10 mL无菌水,分别于接种3、5、7、9、11、13、15 d后采集油菜根部置于储备液中保存备用,于接种3、6、9、12 d后采集油菜根部置于-80℃冰箱备用,于接种3、6、9、12、15 d后采集油菜根部用于防御酶测定。

1.2.2 根毛侵染率的显微统计

采集接种根肿菌3、5、7、9、11、13、15 d后的适量油菜,取其根部,用蒸馏水冲洗3~4次,用固定液固定后再用蒸馏水反复冲洗,然后用荧光桃红进行染色,30~40 min后置于显微镜下观察并记录根毛侵染数,每棵观察100根根毛,3个生物学重复,并计算根毛侵染率。根毛侵染率=根毛侵染数/100×100%。

1.2.3 酶粗液的提取及活性测定

油菜根内POD、CAT、SOD酶液提取及测定参照高俊凤(2006)方法,并有所改动,即首先采集各个处理的油菜幼苗根部剪碎,称取0.4 g,将缓冲液体积增加0.5倍进行酶粗液的提取及测定。每个样品重复测定3次,取平均值。

1.2.4 RNA抽提、cDNA文库构建、质检及测序

按照RNAprep pure植物总RNA提取试剂盒操作说明提取油菜根总RNA,并用1%琼脂葡萄糖凝胶电泳、分光光度计及生物分析仪质量检测,为消除人为干扰,每个时间(0、3、6、9和12 d)设3个生物学重复。

用带有Oligo(dT)的磁珠富集真核生物mRNA加入Fragmentation Buffer将mRNA进行随机打断,以mRNA为模板合成第一条cDNA链和第二条cDNA链,最后通过纯化、末端修复及PCR富集得到cDNA文库。使用Qubit2.0和Agilent 2100对文库进行检测,用Q-PCR对文库进行准确定量(文库有效浓度>2 nmol)。检测合格后,10个文库用IlluminaHiSeq平台进行测序。

1.2.5 RNA-Seq分析、数据分析及注释

通过RNA-seq技术分析油菜抗病品种6M80和感病品种中双11号接种根肿菌0、3、6、9和12 d后在转录水平上的差异。从10个cDNA文库中总共得到379 841 406条clean reads,共有112.71 Gb。10个文库序列的CG%均在46%以上,且Q30碱基百分比在89.17%以上,大约有71%的reads序列可以比对到参考基因组(<http://www.genoscope.cns.fr/brassiccanapus/data/>),表明所得数据满足进一步分析的需要。

利用TopHat2(Kim et al., 2013)将clean reads与

参考基因组即油菜中双11号基因组进行序列比对(<http://www.genoscope.cns.fr/brassiccanapus/data/>),然后再通过基因功能分类数据库(GO数据库)(Ashburner et al., 2000)、基因产物在细胞中的代谢途径的数据库(KEGG数据库)(Kanehisa et al., 2004)等数据库进行基因注释。

1.3 数据分析

采用Excel 2007和SPSS 19.0软件进行数据分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 接种根肿菌后2个油菜品种的根毛侵染率

接种根肿菌后油菜抗病品种6M80和感病品种中双11号的根毛侵染率均呈先增长后降低的趋势,接菌后3~15 d为根肿菌主要侵染期,仅在接菌后第11天,处于下降期的油菜感病品种中双11号的根毛侵染率与油菜抗病品种6M80的峰值接近,其它接种时间油菜抗病品种6M80的根毛侵染率均显著低于感病品种中双11号($P<0.05$,图1)。

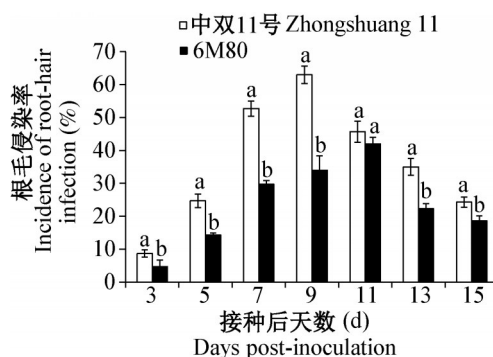


图1 接种根肿菌后不同接种时间2个油菜品种的根毛侵染率
Fig. 1 The root-hair infection rate of two varieties of canola at different time during *Plasmidiophora brassicae* infection

图中数据为平均数±标准误。同色柱不同字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.2 侵染前后油菜根部防御酶活性的变化

接种6 d后,油菜抗病品种6M80根内CAT活性为 $38.77 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,显著低于对照组($P<0.05$),而感病品种中双11号中CAT活性显著高于对照组且达到峰值($P<0.05$),为 $172.50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。接种根肿菌9、12 d后,油菜感病品种中双11号和抗病品种6M80根内CAT活性显著高于对照组($P<0.05$),且接种12 d后油菜抗病品种6M80根内的CAT活性出现峰值,为 $382.50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,且显著高于油菜感病品种中双11号($P<0.05$,表1)。

接种根肿菌后,油菜抗病品种6M80根内SOD活性均高于感病品种中双11号。接种6 d后,油菜抗病品种6M80和感病品种中双11号根内SOD的活性均出现增长趋势,分别为1 350.43U·g⁻¹·min⁻¹和1 360.38 U·g⁻¹·min⁻¹,两者之间差异不显著但均显著高于对照组($P<0.05$)。接种12 d后,抗病品种6M80根内的SOD活性出现峰值,为2 044.44 U·g⁻¹·min⁻¹且显著高于油菜感病品种中双11号($P<0.05$,表1)。

接种根肿菌3、9、12 d后,油菜感病品种中双11号和抗病品种6M80根内POD的活性显著高于对照组($P<0.05$)。接种3 d后油菜感病品种中双11号根内POD的活性最高,为1 933.33 U·g⁻¹·min⁻¹,显著低于油菜抗病品种6M80的POD活性2 933.33 U·g⁻¹·min⁻¹($P<0.05$)。接种根肿菌12 d后,油菜抗病品种6M80根内的POD活性出现峰值(3 342.22 U·g⁻¹·min⁻¹)且与油菜感病品种中双11号差异显著($P<0.05$,表1)。

表1 接种根肿菌后不同时间不同处理的2个油菜品种根部的防御酶活性
Table 1 Defensive enzyme activities at root of two varieties canola of different treatments infected by *Plasmodiophora brassicae* in different time

处理 Treatment	CAT 活性 CAT activity (U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)				
	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
ZS11CK	32.50±0.87 c	48.33±0.48 b	125.00±2.65 b	86.67±0.77 d	91.67±1.64 a
ZS11+RS	48.33±0.87 a	172.50±3.29 a	170.00±5.00 a	125.00±1.73 c	66.70±0.82 c
6M80CK	16.67±0.45 d	50.00±2.65 b	58.33±0.86 d	142.50±1.00 b	79.17±0.57 b
6M80+RS	44.77±0.73 b	38.77±2.00 c	82.50±4.33 c	382.50±3.46 a	66.80±0.31 c

处理 Treatment	SOD 活性 SOD activity (U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)				
	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
ZS11CK	648.65±50.21 d	1 000.00±70.01 c	400.00±100.53 b	776.67±100.58 b	90.57±50.43 d
ZS11+RS	981.81±70.12 c	1 350.43±80.32 a	178.96±50.47 c	685.71±100.34 c	601.48±30.54 c
6M80CK	1 068.75±60.54 b	1 179.49±50.45 b	130.00±60.58 c	640.00±70.53 c	926.98±80.67 b
6M80+RS	1 290.00±80.06 a	1 360.38±80.58 a	1 200.00±140.43 a	2 044.44±80.43 a	1 024.44±70.43 a

处理 Treatment	POD 活性 POD activity (U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)				
	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
ZS11CK	973.33±61.10 c	200.00±46.19 c	675.56±111.02 c	444.44±187.30 b	466.67±83.27 b
ZS11+RS	1 933.33±23.09 b	240.00±40.00 c	1 475.56±125.01 b	960.00±373.33 b	493.33±83.27 b
6M80CK	2 173.33±388.50 b	840.00±80.00 a	1 440.00±187.30 b	853.33±431.09 b	812.33±23.09 a
6M80+RS	2 933.33±61.10 a	520.00±105.83 b	1 991.11±160.00 a	3 342.22±93.38 a	813.33±23.09 a

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。ZS11CK、ZS11+RS、6M80、6M80+RS分别表示油菜品种中双11号对照、油菜品种中双11号被根肿菌休眠孢子侵染、油菜品种6M80对照、油菜品种6M80被根肿菌休眠孢子侵染。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test. ZS11CK, ZS11+RS, 6M80, 6M80+RS indicate control group of Zhongshuang 11 of canola, Zhongshuang 11 of canola infected rest spores of *P. brassicae*, control group of 6M80 of canola, 6M80 of canola infected rest spores of *P. brassicae*.

2.3 防御酶相关的差异表达基因分析

2.3.1 差异表达基因(DEGs)的筛选

抗病品种6M80未接菌和接菌后共存在6 607个差异表达基因,其中接种根肿菌3、6、9和12 d后共

同的差异表达基因是2 099个(图2-A);感病品种中双11号未接菌与接菌之间共存在2 499个差异表达基因,其中接种根肿菌3、6、9和12 d后共同的差异表达基因是126个(图2-B)。

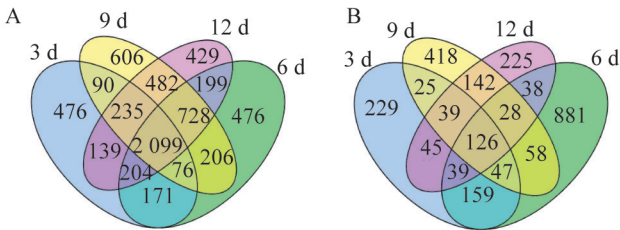


图2 不同接种天数后油菜抗病品种6M80(A)和感病品种中双11号(B)的差异表达基因数
Fig. 2 Number of differentially expressed genes at different time of 6M80 resistant canola (A) and Zhongshuang 11 susceptible canola (B) after inoculation

2.3.2 差异表达基因(DEGs)的注释

在GO数据库中,抗病品种6M80和感病品种中双11号中分别有2 228和6 015个DEGs被富集注释到3个GO分类,分别是细胞组成、分子功能和生物代谢。抗病品种6M80和感病品种中双11号在细胞

组成分类中DEGs富集数目最多的功能是细胞和细胞组分。结合和催化反应是DEGs在分子功能分类中的主要功能。生物代谢分类中DEGs富集数目最多的前3个功能是细胞过程、代谢过程、单有机体过程(图3)。

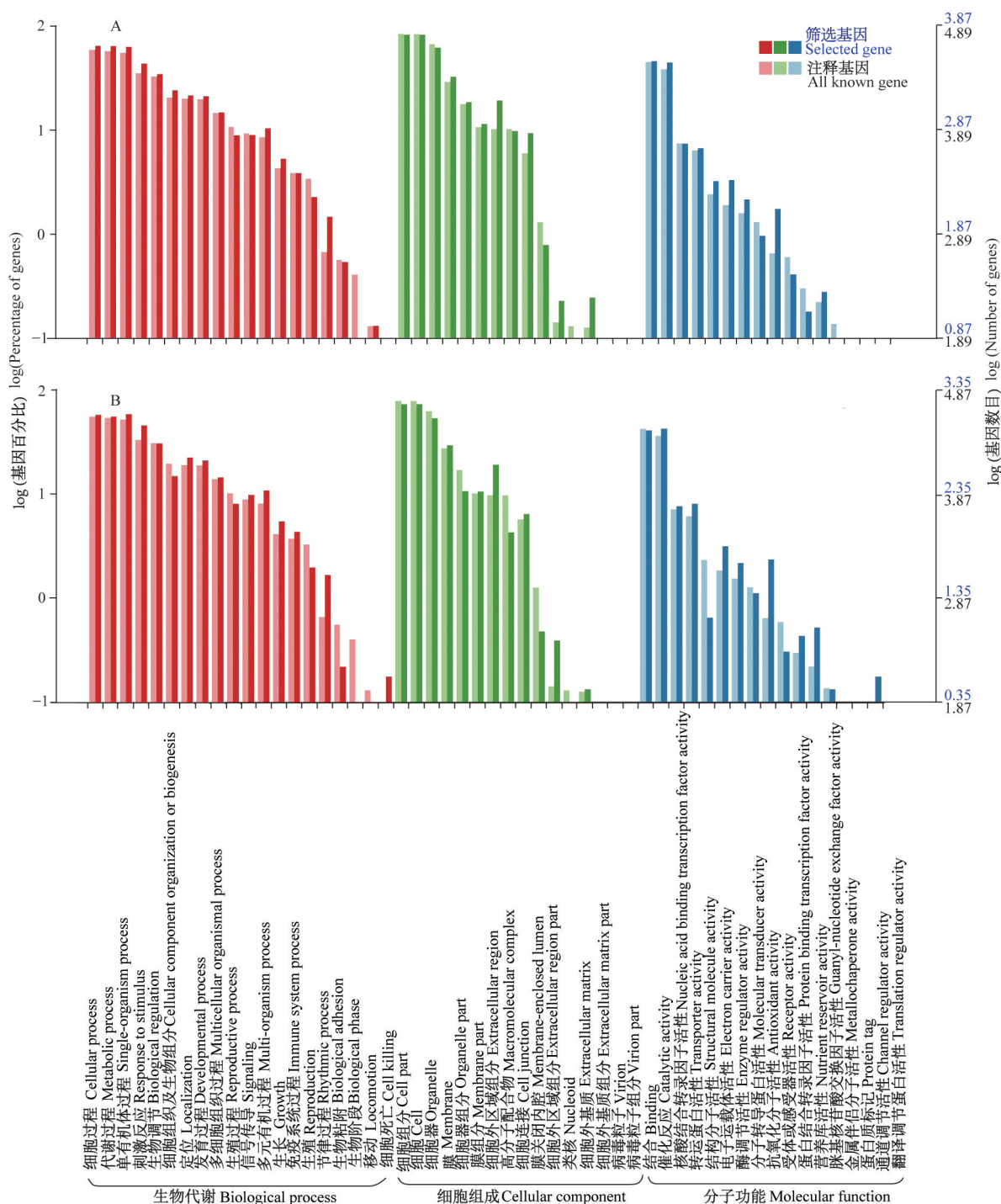


图3 油菜抗病品种6M80(A)和感病品种中双11号(B)DEGs的GO功能注释

Fig. 3 GO assignment of DEGs in 6M80 resistant canola (A) and Zhongshuang 11 susceptible canola (B)

在KEGG数据库中,抗病品种6M80有2 553个EDGs被注释到120条代谢通路中,而感病品种中双

11号中有899个EDGs被注释到100条代谢通路中。抗病品种6M80中代谢途径核糖体富集的DEGs数

目最多,其次是苯丙素的生物合成及甘氨酸的生物代谢(图4)。

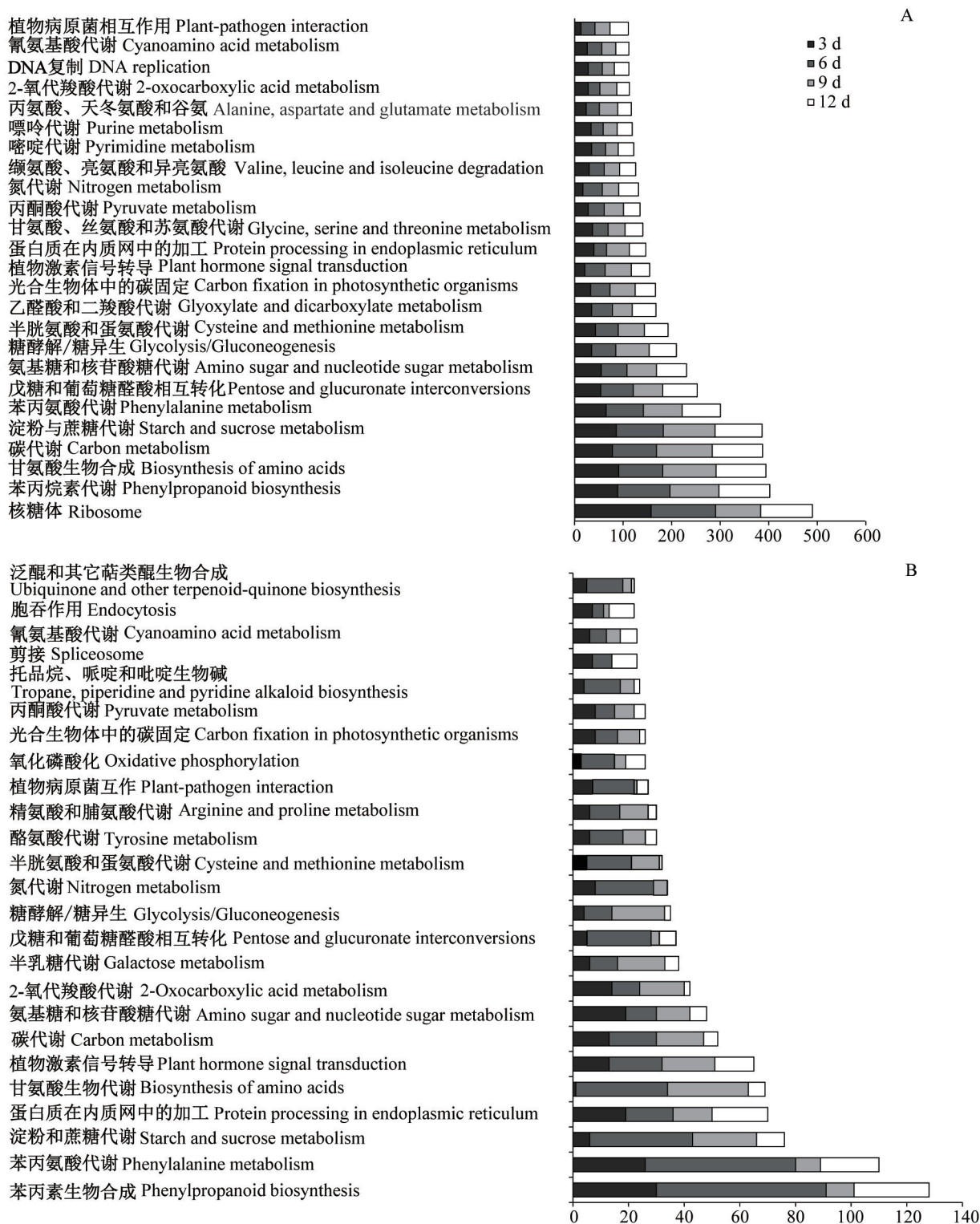


图4 油菜抗病品种6M80 (A)和感病品种中双11号(B)中DEGs富集较多的前25个KEGG途径

Fig. 4 25 top KEGG pathway of 6M80 (A) and Zhongshuang 11 (B) of canola

2.3.3 与过氧化氢代谢及木质素合成相关的基因

KEGG数据库分析表明,CAT和SOD相关基因参与过氧化氢代谢,POD相关基因参与木质素生物

合成。品种6M80中分别与CAT、SOD、POD相关的差异基因有7、3、72个,品种中双11号中分别与CAT、SOD、POD相关的差异基因有2、1、50个(图5)。

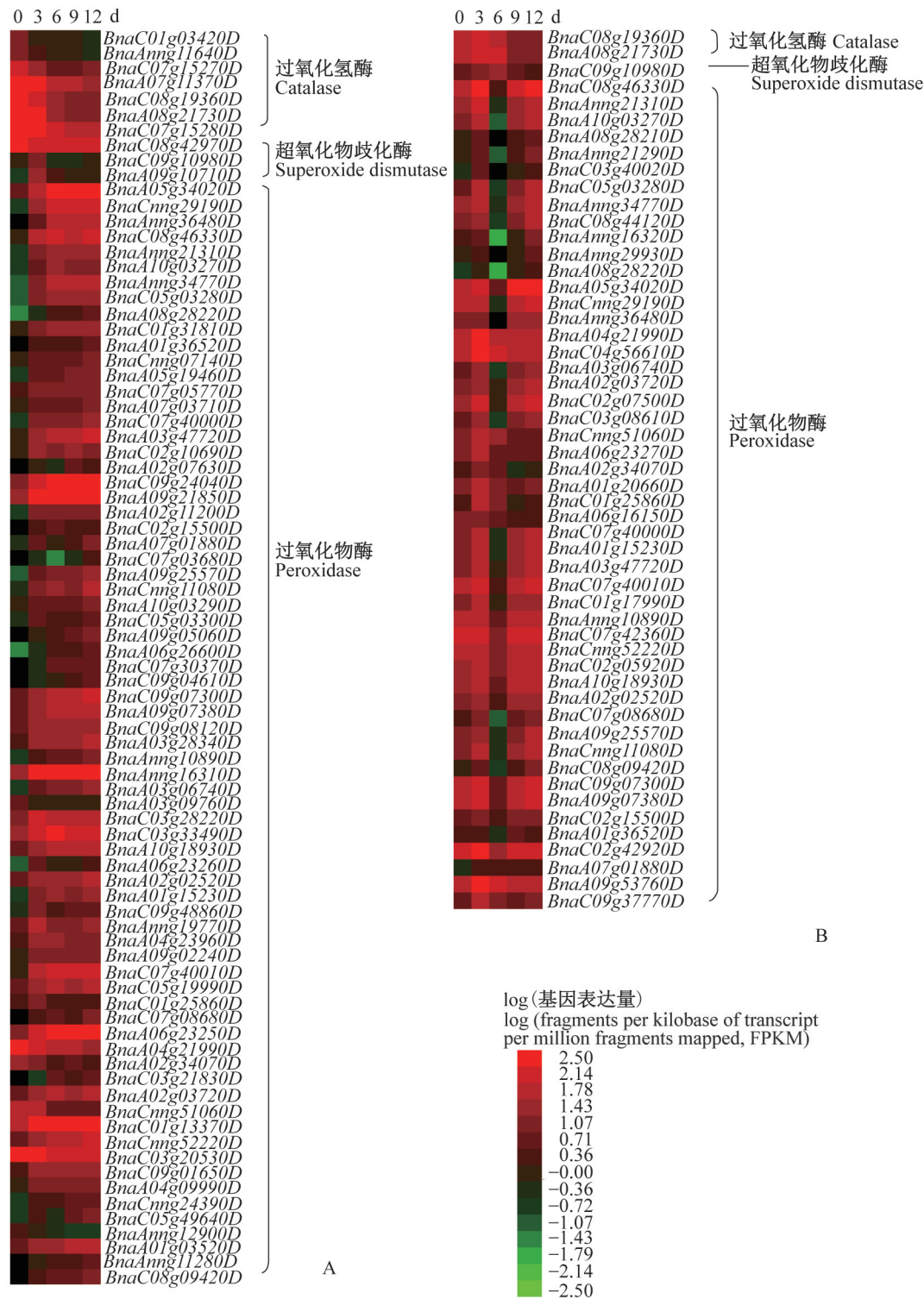


图5 油菜抗病品种6M80 (A)和感病品种中双11号(B)DEGs中与防御酶相关基因热图

Fig. 5 Heat maps of defense enzyme related genes in DEGs of 6M80 resistant canola (A) and Zhongshuang 11 susceptible canola (B)

接种6 d后,油菜抗病接种6M80中与CAT相关的基因(*CAT1*、*CAT2*、*CAT3*)相对于未接种(接种0 d后)下调,而感病品种中双11号中与CAT相关的基因(*CAT2*、*CAT3*)上调。接种3 d后,油菜抗病品种6M80和感病品种中双11中与SOD相关的基因(铜

伴侣*SOD*、*Cu/Zn-SOD*)均上调,但是接种9 d后,2个品种中与SOD和CAT相关的基因均下调。接种后,油菜抗病品种6M80中与POD相关的基因(*POD27*、*POD2*、*POD30*、*POD64*、*POD44*等)在每个时间点均上调,但是感病品种中双11号在接种6 d后与POD

相关的基因(*POD27*、*POD2*、*PODC3*、*POD57*、*POD71*等)下调。表明油菜抗病品种6M80接种根肿菌前期与SOD相关的基因上调而与CAT相关的基因下调,但是油菜感病品种中双11号接种根肿菌前期与CAT和SOD相关的基因均上调。接种根肿菌后油菜抗病品种6M80中与POD相关的基因均上调,但是感病品种中双11号接种根肿菌6 d后与POD相关的基因下调。

3 讨论

本研究观测了2个不同油菜抗性品种对根肿菌的根毛侵染所表现出的差异。试验结果显示,抗病品种6M80的根毛侵染率显著低于感病品种中双11号,且2个品种的根毛侵染动态均呈近正态分布,表明接菌后3~15 d为根肿菌主要侵染期,该结果与朱红丽等(2015)研究结果相一致,这为后续防御酶和转录组分析提供了条件。

本试验测定结果表明,根肿菌侵染后,不同抗性品种间的CAT活性存在显著差异,且侵染前期感病品种SOD活性变化幅度较大,而在侵染后抗病品种SOD活性均较高,抗病品种根内POD活性增加比感病品种迅速,这与已有的相关报道一致(潘哲超等,2008;程洁,2013)。CAT参与植物的抗病反应且发挥重要的作用(Polidoros et al., 2001; Dat et al., 2003)。本研究发现植物防御酶中与CAT和SOD相关的基因主要参与植物体内过氧化氢的代谢,接种根肿菌6 d后,油菜抗病品种6M80中CAT活性下降同时与CAT相关的基因下调,而中双11中CAT的活性增加且与CAT相关的基因上调,但是接种9 d后,6M80中CAT活性增加但是与CAT相关的基因下调,这可能与MAPK信号调控有关(Zhang et al., 2006)。SOD相关基因表达量的改变可以增强植株病害的抵抗力(Viczián et al., 2014)。接种根肿菌3 d后,油菜感病品种中双11号和抗病品种6M80根内SOD活性均增加,同时2个品种中与SOD相关的基因均上调,说明SOD在过氧化氢代谢中具有重要作用。接种12 d后6M80中SOD活性达到峰值但是与SOD相关的基因下调,该结果可能与AP2、NAC、GRAS、MYB和C3H等转录因子调控有关(Jin et al., 2013; Shafi et al., 2015; Xu et al., 2015)。

POD与活性氧的清除、激素生物合成、木质素生物合成和光合作用有关(王铮,2007)。本研究结果显示植物体内与POD相关的基因主要参与植物木质素的合成。接种根肿菌3、9、12 d后,油菜抗病

品种6M80和感病品种中双11号中POD的活性相对于对照组均增加,同时与POD相关的基因也均上调。这可能是病原菌侵染寄主后激发了体内与POD相关的基因转录表达,从而促进合成木质素、植保素等抑菌物质,增强寄主的抗病性(杨玉锋,2006),但是接种6 d后,油菜感病品种中双11号中POD相关的基因下调,这与Siemens et al.(2006)在拟南芥*Arabidopsis thaliana*中的结果相一致。

根肿菌侵染后,不同油菜抗性品种间的POD、CAT和SOD防御酶活性存在明显差异,可以作为抗性筛选的辅助指标(朱红丽等,2015)。防御酶相关的基因与寄主抗病性之间存在一定相关性,其中CAT和SOD在过氧化氢代谢中发挥着重要作用,POD在抑菌物质木质素的合成代谢中发挥着重要作用。本试验只探讨了寄主抗病机制中防御酶活性及防御酶相关的基因的作用,而寄主抗病机制其它途径及相关基因还需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Alagna F, D'Agostino N, Torchia L, Servili M, Rao R, Pietrella M, Giuliano G, Chiusano ML, Baldoni L, Perrotta G. 2009. Comparative 454 pyro sequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics*, 10: 399
- Arne S, Johan F, Andrea K, Sabine J, Tua L, German BR, Magnus K, Andrej S, Vignesh D, Su RC, et al. 2015. The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthase. *Scientific Reports*, (6): 1153
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25: 25–29
- Balamuralikrishnan M, Doraissaamy S, Ganapathy T, Viswanathan R. 2005. Effect of biotic and abiotic agents on *Sugarcane mosaic virus* titre, oxidative enzymes and phenolics in *Sorghum bicolor*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 40(1/2): 9–22
- Chen JJ, Pang WX, Chen B, Zhang CY, Piao ZY. 2016. Transcriptome analysis of *Brassica rapa* near-isogenic lines carrying clubroot resistant and susceptible alleles in response to *Plasmodiophora brassicae* during early infection. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1183
- Cheng J. 2013. Study for the related analysis of physiological and biochemical mechanism in Chinese cabbage and cabbage. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [程洁. 2013. 白菜、甘蓝根肿病相关生理生化指标的分析. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Chu GM, Song T, Falk KC, Zhang XG, Liu XJ, Chang A, Lahlali R, McGregor L, Gossen DB, Yu FQ, et al. 2014. Fine mapping of Rcr1 and analyses of its effect on transcriptome patterns during infection by *Plasmodiophora brassicae*. *BMC Genomics*, 15:

- 1166
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, van de Cotte B, Langebartels C, Kangasjärvi J, Inzé D, van Breusegem F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal*, 33(4): 621–632
- Diederichsen E, Beckmann J, Schondelmeier J, Dreyer F. 2006. Genetics of clubroot resistance in *Brassica napus* 'Mendel'. *Acta Horticulturae*, 706: 307–311
- Gao JF. 2006. Plant physiology experimental guidance. Beijing: Higher Education Press (in Chinese) [高俊凤. 2006. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社]
- Howard RJ, Strelkov SE, Harding MW. 2010. Clubroot of cruciferous crops: new perspectives on an old disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(1): 43–57
- Huang Y. 2014. Changes of IAA and ZT level in mustard induced by *Plasmodiophora brassicae* infection. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [黄芸. 2014. 榨菜受根肿菌感染后 IAA 和 ZT 的时空动态. 重庆: 西南大学]
- Jin HX, Huang F, Cheng H, Song HN, Yu DY. 2013. Overexpression of the *GmNAC2* gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(2): 435–442
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32: D277–D280
- Luo HC, Chen GK, Liu CP, Huang Y, Xiao CG. 2014. An improved culture solution technique for *Plasmodiophora brassicae* infection and the dynamic infection in the root hair. *Australasian Plant Pathology*, 43(1): 53–60
- Novaes E, Drost DR, Farmerie WG, Georgios JP Jr., Grattapaglia D, Sederoff RR, Kirst M. 2008. High-throughput gene and *SNP* discovery in *Eucalyptus grandis* an uncharacterized genome. *BMC Genomics*, 9: 312
- Pan ZC, Chen JB, Fan JH, Zhou HP, Qiu SG, Ye Y, Guo ZH. 2008. Activities of defense related enzymes induced by grade toxin from *Magnaporthe grisea*. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 23(2): 162–166 (in Chinese) [潘哲超, 陈建斌, 范静华, 周惠萍, 邱世刚, 叶漪, 果志华. 2008. 稻瘟菌粗毒素对水稻防御性相关酶系的诱导. 云南农业大学学报, 23(2): 162–166]
- Polidoros AN, Mylona PV, Scandalios JG. 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize *Cat2* gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research*, 10(6): 555–569
- Rahman H, Shakir A, Hasan MJ. 2011. Breeding for clubroot resistant spring canola (*Brassica napus* L.) for the Canadian prairies: can the European winter canola cv. Mendel be used as a source of resistance? *Canadian Journal of Plant Science*, 91(3): 447–458
- Shafi A, Chauhan R, Gill T, Swarnkar MK, Sreenivasulu Y, Kumar S, Kumar N, Shankar R, Ahuja PS, Singh AK. 2015. Expression of *SOD* and *APX* genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in *Arabidopsis* under salt stress. *Plant Molecular Biology*, 87(6): 615–631
- Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmülling T, Parniske M, Ludwig-Müller J. 2006. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(5): 480–494
- Viczián O, Künstler A, Hafez MY, Király L. 2014. Catalases may play different roles in influencing resistance to virus induced hypersensitive necrosis. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 49(2): 189–200
- Wang Z, Che SH, Li XJ, Wang L, Wei XH, Song YJ, Qin L, Wang QH, Wang LS. 2007. Research of biochemical characters relating to peroxidase in *Brassica campestris* L. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 35(1): 167–169 (in Chinese) [王峥, 车淑红, 李小娟, 王丽, 魏小辉, 宋雅娟, 秦丽, 王清华, 王林嵩. 2007. 油菜中过氧化物酶及相关生化指标的研究. 河南师范大学学报(自然科学版), 35(1): 167–169]
- Xu K, Chen SJ, Li TF, Ma XS, Liang XH, Ding XF, Liu HY, Luo LJ. 2015. *OsGRAS23*, a rice *GRAS* transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 15: 141
- Yang XQ, Ma GH, Zhou DN, Chen GK, Xiao CG. 2015. Pathogenic infection of the secondary zoospores of *Plasmodiophora brassicae* Woron. *Journal of Plant Protection*, 42(2): 188–193 (in Chinese) [杨晓琴, 马冠华, 周丹妮, 陈国康, 肖崇刚. 芸薹根肿菌次生游动孢子侵染致病分析. 植物保护学报, 42(2): 188–193]
- Yang YF. 2006. Resistance mechanism of physiological and biochemical of different cotton varieties by *Verticillium dahlia*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34(16): 3924–3925 (in Chinese) [杨玉峰. 2006. 不同棉花品种对黄萎病的生理生化抗性机制研究. 安徽农业科学, 34(16): 3924–3925]
- Zhang AY, Jiang MY, Zhang JH, Tan MP, Hu XL. 2006. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141(2): 475–487
- Zhu HL. 2016. Resistance evaluation methods for clubroot and analysis biochemical indexes. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [朱红丽. 2016. 芸薹根肿病抗性评价方法及相关生化指标分析. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Zhu HL, Xiao CG, Chen GK, Ma GH, Qing L. 2015. Resistance analysis of Chinese cabbages to *Plasmodiophora brassicae* based on early infection in roots. *Journal of Plant Protection*, 42(4): 510–516 (in Chinese) [朱红丽, 肖崇刚, 陈国康, 马冠华, 青玲. 基于根肿菌早期侵染量的白菜抗性分析. 植物保护学报, 42(4): 510–516]

(责任编辑:张俊芳)