MPK4甲基化调控水杨酸信号介导的拟南芥 对齐整小核菌菌株 SC64 的抗性机制

史佳琪 强 胜 张 裕*

(南京农业大学杂草研究室,南京 210095)

摘要:为提升齐整小核菌 Sclerotium rolfsii 菌株 SC64 作为生物除草剂的应用潜力,解析植物对其的 防御机制,通过比较6种生态型拟南芥 Arabidopsis thaliana (Col-0、Ms-0、Gr-1、Se-0、Tu-0和Wa-1) 被菌株 SC64 侵染后病理特征、茎秆木质素水平以及抗病相关基因表达的差异,筛选出抗性最高和 抗性最弱的典型生态型拟南芥,通过施加0.1 mmol/L 外源水杨酸来验证其在拟南芥防御菌株 SC64 侵染过程中对木质素代谢及病理的调节作用,并比较分析6种生态型拟南芥水杨酸上游调控通路 基因 MPK4 启动子区域的甲基化差异。结果显示,6种生态拟南芥中Col-0的木质素化程度最高, 被菌株 SC64 侵染时木质素代谢通路基因 CAD4和 PAL3 表达上调最显著,与其抗病能力最强相吻 合,而Ms-0的病理表型和抗病能力最弱。外源水杨酸预处理使具典型抗性的生态型拟南芥 Col-0 受菌株 SC64 侵染后发病程度加重,木质素化程度减弱,同时木质素代谢通路基因 MYB46、LAC17、 PAL3和 CAD4 被菌株 SC64 侵染后的表达上调程度均显著减弱。另外,6种生态型拟南芥 MPK4基 因启动子区域 CHH 甲基化位点数与该基因相对表达量和茎秆木质素水平均呈极显著正相关,而与 EDSI 基因相对表达量和病斑面积均呈显著负相关。表明拟南芥通过 MPK4 基因启动子区域 CHH 甲基化位点数正调控 MPK4基因的表达量,从而负调控水杨酸代谢,使得木质素代谢水平提高,最 终增强植株对齐整小核菌菌株 SC64 的抗性。

关键词:齐整小核菌菌株 SC64;木质素;水杨酸; MPK4; DNA 甲基化

MPK4 methylation of *Arabidopsis thaliana* regulates salicylic acid signaling mediated resistance to *Sclerotium rolfsii* strain SC64

Shi Jiaqi Qiang Sheng Zhang Yu*

(Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to improve the application potential of *Sclerotium rolfsii* strain SC64 as a bioherbicide, it was necessary to dissect its defense mechanism in plants, and the pathological phenotype, lignification levels and disease response related gene expression differences of six ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (Col-0, Ms-0, Gr-1, Se-0, Tu-0 and Wa-1) infected with strain SC64 were compared. Two A. *thaliana* typical ecotypes (Col-0 and Ms-0) were selected through pathological phenotype, the lignin metabolism and pathology response during the infection of strain SC64 was then verified with the application of 0.1 mmol/L exogenous salicylic acid, the methylation differences of *MPK4* promoters of the upstream regulatory pathway gene of six ecotypes of *A. thaliana* salicylic acid were also compared ultimately. The results showed that Col-0 had the highest degree of lignification among the six ecotypes of *A. thaliana* species, and the expression of *CAD4* and *PAL3* genes was significantly upregulated when in-

基金项目: 江苏省青年基金(BK20180544)

^{*} 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhangyu2013@njau.edu.cn 收稿日期: 2022-06-23

fected by the strain SC64. This was consistent with its strongest disease resistance, while the pathological phenotype and disease resistance of Ms-0 were the weakest among the six ecotypes. The pretreatment of exogenous salicylic acid aggravated the incidence and lignification of the bio-resistant *A. thaliana* after infection by strain SC64, and the upregulation in expression of the lignin metabolism pathway genes *MYB46*, *LAC17*, *PAL3* and *CAD4* was significantly reduced. In addition, the number of CHH methylation sites of the *MPK4* promoter of the six ecotypes of *A. thaliana* were positively correlated with their relative expression and lignin levels, respectively, and were negatively correlated with the relative expression of the *EDS1* gene and leaf disease area. The results showed that *A. thaliana* positively regulated the expression of the *MPK4* through the number of CHH methylation sites of promoter, thereby negatively regulating the metabolism of salicylic acid, which further increased the level of lignin metabolism and ultimately enhanced the resistance to the strain SC64.

Key words: Sclerotium rolfsii strain SC64; lignin; salicylic acid; MPK4; DNA methylation

在杂草防控中,化学除草剂因其使用方便、作用 及时等特点得到了广泛应用(Dayan, 2019)。但化 学除草剂的大量使用带来了土壤板结、水质下降以 及杂草抗性演化风险增加等问题(Duke & Powles, 2008; Gaines et al., 2010)。目前, 随着全球环保意识 的提高和农业可持续发展理念的普及,微生物除草 剂的应用潜力被广泛认可(Dayan, 2019)。生物除 草剂的开发已成为研究热点,本实验室从加拿大一 枝黄花 Solidagao candensis 病株上分离得到致病菌 齐整小核菌 Sclerotium rolfsii 菌株 SC64(唐伟, 2011); 并利用该菌株研发出了致病力强、寄主专化性高和 环境适应性广的生物除草剂——菌克阔(Tang et al., 2011)。核盘菌 Sclerotinia sclerotiorum 与齐整小核 菌的生物学特性相似,其部分菌株已被成功开发为 生物除草剂,如蒙大拿州立大学改良并获得了营养缺 陷型核盘菌,使其只能在杂草内或人为提供的条件 下获得所需营养,从而提升了其除草效果与寄主专 化性(Bourdot et al., 2006);麦吉尔大学从莴苣Lactuca sativa 中分离得到小核盘菌 Sclerotinia minor IMI 344141 菌株,已在草坪养护中成功用于防控西洋蒲 公英 Taraxacum officinale 等阔叶杂草(Abu-Dieyeh & Watson, 2007)。这些研究均给菌株 SC64 作为生物 除草剂的开发应用提供了理论参考。针对菌株SC64 和植物互作机制的研究将为充分开发该菌株作为生 物除草剂提供必要的基础理论。

植物在与病原菌相互作用的长期进化中形成了 多样的抗病防御系统,包括有毒次生代谢产物等定 性防御系统和由抗降解结构物质构成的定量防御系 统(Muller-Scharer et al., 2004; Huang et al., 2013)。 木质素作为细胞壁的重要成分,在植物防御反应中 发挥着重要作用。有研究表明木质素代谢在植物抵 御生物和非生物胁迫中发挥了重要作用(Tronchet et al., 2010; Sattler & Funnell-Harris, 2013) Jung & Casler(2006)研究结果表明, 玉米 Zea mays 茎秆表 皮附近的厚壁组织及维管束木质化程度越高,对细 胞壁降解酶的抵抗能力越强。同时,木质素在感染 细胞中沉积可以防止病原体毒素和降解酶进一步向 宿主细胞扩散,并防止水和养分从宿主细胞向病原 体转移(Smith et al., 2007)。Mandal et al. (2013)研 究发现在抗青枯病菌 Ralstonia solanacearum 番茄 Lycopersicon esculentum 品种中可溶性酚类和木质素 含量显著高于敏感品种,正是由于木质素在细菌侵 染时于抗性品种根系中大量积累增强了其抗性。这 些结果均表明植物细胞壁的木质素化能限制病原菌 的侵染。同时植物在受到生物胁迫后会释放出抗病 相关活性物质,如水杨酸和茉莉酸等,进一步激活植 物的防御反应以应对胁迫(Pichersky & Gersherzon, 2002),如在拟南芥 Arabidopsis thaliana 与丁香假单 胞菌番茄变种 Pseudomonas syringae pv. tomato DC 3000的相互作用中,依赖水杨酸代谢的防御反应增 强了拟南芥的抗病能力(Pieterse et al., 2012)。水杨 酸对植物生长发育过程中及不同部位组织中的木质 素水平也能起到调控作用。例如,用水杨酸处理后 的中国梨 Pyrus bretschneideri 果实在发育过程中, 30个木质素生物合成关键基因的表达大多发生了上 调(Manzoor et al., 2020)。而在拟南芥和紫花苜蓿 Medicago sativa 中观察到水杨酸含量的升高伴随着 羟基肉桂酰辅酶A:莽草酸羟基肉桂酰基转移酶 (hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase, HCT)表达量的下调,从而导致木质素 水平显著降低,同时植株严重矮化。在HCT下调表 达的拟南芥中,通过降低内源性水杨酸含量可以恢

复拟南芥生长,但木质素水平仍较低(Gallego-Giraldo et al.,2011)。同样,在野生型拟南芥中外源施加 水杨酸可以显著抑制其生长(Lee et al.,2020)。

植物在受到致病因子攻击时会激活丝裂原活化 蛋白激酶(mitogen-activated protein kinas, MAPK) 级联信号通路(Zhang et al., 2010; Couto et al., 2016)。该通路能传递各种外部信号,导致基因表达 发生变化,广泛影响细胞活动过程,如生长、分化和 凋亡等(Bressendorff et al., 2016; Poon et al., 2020)。 MAPK进一步作用于激素合成通路基因来调控抗 病激素响应,影响激素信号转导传递,从而可防御病 原菌侵染(Meng & Zhang, 2013)。如拟南芥 MPK4 基因敲除突变体表现出组成性的激活依赖水杨酸途 径的防御反应(Brodersen et al., 2006);在甘蓝型油 菜Brassica napus 中过表达MPK4可增强其对核盘 菌和灰霉病菌 Botrytis cinerea 的抗性(Wang et al., 2009)。MPK3/MPK6可以使乙烯生物合成的限速 酶活性提高,从而激活乙烯诱导的防御反应(Liu & Zhang, 2004; Joo et al., 2008); MPK3/MPK6还可以 诱导植保素蛋白生物合成基因的表达,从而增强拟 南芥对病原菌的抗性(Mao et al., 2011)。综上所述, MAPK在植物响应病原菌侵染时防御相关信号传递 转导及调节植物抗病性中发挥了重要作用。

表观遗传在植物抗生物胁迫中也起着至关重要 的作用,主要有DNA甲基化和组蛋白乙酰化等多种 形式(Xu et al., 2020; Li et al., 2021)。许多研究表明 DNA甲基化水平可以调节基因表达使植物可以快 速响应外界的胁迫刺激。拟南芥受尖孢镰刀菌Fusarium oxvsporum 侵染后抗病相关基因 CAP-PR 和 CRK40的个别CHH位点甲基化略有增加,从而提高 了抗病能力(Le et al., 2014);葡萄 Vitis vinifera 浆果 中的褪黑素通过广泛降低基因启动子的甲基化水平 来提高抗病能力(Gao et al., 2020);水稻 Oryza sativa中抗白叶枯病菌 Xanthomonas oryzae pv. oryzae 基因Xa21G的启动子区域甲基化水平在野生型植 株中更高,增强了水稻对病原菌的抗性(Akimoto et al.,2007)。在这些研究中关键基因不同的DNA甲 基化水平导致植物对胁迫表现出不同的适应性,因 此表观遗传修饰在调控植物与病原菌互作方面的作 用已经成为了该领域的研究热点。本研究为探究齐 整小核菌菌株SC64和植物的互作机制,选取6个生 态型拟南芥,通过比较其病理表型差异、水杨酸和木 质素代谢关键基因表达差异来筛选出抗病表现差异 较大的典型种群;进一步对典型种群施加外源水杨 酸,检测通路上游基因 MPK4 启动子甲基化位点数 差异,以期从 DNA 甲基化调节基因表达层面阐述 MPK4基因启动子甲基化在水杨酸信号介导拟南芥 抗病性方面的表观遗传机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物、菌源和培养基:6种生态型拟南芥 Col-0、Ms-0、Gr-1、Se-0、Tu-0和Wa-1均购于拟南芥生 物资源中心(https://abrc.osu.edu/researchers),在光照 16 h/黑暗8h、光强100 µmol·m⁻²·s⁻¹、温度22℃条件 下培养至4周龄供试。齐整小核菌菌株SC64于南 京农业大学杂草研究室保藏并提供。马铃薯葡萄糖 琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基成分为马铃 薯 200g、葡萄糖20g、琼脂20g、蒸馏水1L,自然pH。

试剂:植物RNA小量提取试剂盒,美国Biomiga 公司;植物DNA提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶DNA 回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;RNA 反转录试剂盒、PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser、TB GreenTM Premix Ex *Taq*TM(Tli RnaseH Plus)、大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5a和克隆载体 pMDTM 19-T,日本 TaKaRa公司; MethyDetectorTM Bisulfite Modification Kit,美国赛默 飞世尔科技公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:E-36HO光照培养箱,上海技舟化工科技 有限公司;Imaging-PAM叶绿素荧光仪,德国Heinz Walz GmbH公司;Bio Photometer plus核酸蛋白测定 仪、Mastercycler ep Realplex2荧光定量PCR仪,德国 Eppendorf公司;AXIO Imager.M2全自动显微镜,德 国Zeiss公司;CM1860冷冻切片机,德国Leica公司; DYY-8B稳流稳压电泳仪,南京大学仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥经菌株SC64侵染后病理表型的观察

选取生长发育一致且无病害胁迫的4周龄不同 生态型拟南芥,以4株为1组装入6孔苗盒中并置于 光照培养箱中,在28℃、全日照条件下适应24h,每 个生态型重复3组。取菌株SC64在PDA平板上于 28℃、黑暗条件下培养2~3d,待菌落生长至PDA平 板2/3面积时,使用直径3mm打孔器在菌落边缘打 取生长旺盛且没有杂菌的菌饼。将菌饼带有菌丝的 一面接种到上述各处理的拟南芥活体叶片上,1片 叶片接种1个菌饼,1株接种2个菌饼。向装有每组 拟南芥的苗盒中加入200mL无菌水,保证苗盒中湿 度维持在90%以上,防止菌饼干枯。待菌株SC64 侵染拟南芥叶片 24 h,利用游标卡尺测量叶片病斑的最长直径和最短直径,并用数码相机拍照记录病斑。同时,用Imaging-PAM叶绿素荧光仪参照成静(2019)的方法检测拟南芥在受到侵染后 3、6、12、18、24、30、36 h的病害发展情况,检测前需要在 25 ℃、黑暗条件下适应 30 min,测定时将测量光、作用光和最大饱和光的强度分别设定为 0.25、110 和 6 000 μ mol·m⁻²·s⁻¹。

分别在菌株 SC64 侵染拟南芥活体叶片 0、3、6、 12、18、24、30和36h,去除菌饼让拟南芥恢复生长 3d,将抽薹的茎秆基部 1.5 cm部分取下,放入FAA 固定液中固定 3d。取出晾干后于 15% 甘油中抽真 空,再使用冷冻切片机将拟南芥茎秆切成 70 nm厚的 薄片,然后置于适量 Wiesner 染色液(无水间本三酚 0.3g、无水乙醇 10 mL 和浓盐酸 5 mL)中染色 20~ 30 s后装片,并在显微镜 10 倍及 20 倍物镜下观察染 色情况,拍照并通过 ImageJ 软件的插件 LigninJ 对其 木质素水平进行分析。

1.2.2 菌株SC64侵染拟南芥后通路基因表达量检测 取1.2.1各处理侵染后3、6、12、18、24、30和36 h 的不同生态型拟南芥莲台座部位叶片放入液氮中冻 存,1株取1片叶片,每个生态型共取12片叶。利用 植物RNA小量提取试剂盒参照说明提取叶片的总 RNA,利用核酸蛋白测定仪测定总RNA的浓度及纯 度,取检测合格的RNA利用RNA反转录试剂盒合 成cDNA,作为模板用于依赖水杨酸的抗病通路相 关基因(MPK4和EDS1)及木质素代谢通路相关基 因(PAL3和LAC17)表达量的实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测。从https:// www.arabidopsis.org/网站下载依赖水杨酸的抗病通 路及木质素代谢通路中关键基因的序列,根据编码 序列 (coding sequence, CDS) 在 Integrated DNA Technologies(idtdna.com)网站利用引物设计工具设 计相应基因的qPCR引物(表1),以ACTIN2为内参基 因,引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。 10 µL qPCR 反应体系: TB Premix Ex Taq(2×)5 µL、 上下游引物各0.2 µL、DNA模板0.8 µL、ddH,O 3.8 µL。 qPCR 反应程序:95 ℃变性30 s,95 ℃退火5 s,56 ℃ 延伸30s,共40个循环。通过扩增曲线和熔解曲线 分析目的基因的表达量。

表1	本研究所用引物信息	
----	-----------	--

基因 Gene	正向引物(5'-3') Sequence forward (5'-3')	逆向引物 (5'-3') Sequence reverse (5'-3')
ACTIN2	GGCTCCTCTTAACCCAAAGG	CAGTAAGGTCACGTCCAGCA
MYB46	CCTTCCTTGACCCACATACAA	CCCTGCGTTTACTCCATAGATAC
PAL3	TGATCCGCTTCAGAAACCTAAA	GCTGCTCTTATCACCTCAATCT
CAD4	GCGGGAGTAACGGTTTATAGTC	CCTACTCCACCTAACCCTAGAA
LAC17	CAGAAAGCCATCCTCTTCATCT	CCGACTGTGTTCCTCTCTATTG
MPK4	TGTTCCTCCTCTTCGTCCTATC	CTCCTCTCCAGTCTCTGAGTTT
EDS1	CCATACGAGGAAGTTGAGGTAAG	AACGTTGAACCCTCCAGAAATA
MPK4-1	YATGTAATTATGGTATYGTTGATGTTAAGT	CCAAATTRTTTTTRACCATAAAACT
MPK4-2	YAGTTTTATGGTYAAAAAYAATTTGG	TCTTCTTCTTTRRTTTTTRTTCTTTTTTTTT
MPK4-3	ATAAAYAAAATTGAAAATTGAYATTAYAAAG	ACATTATACTRAACATARCTACCACCAT

1.2.3 水杨酸预处理对菌株SC64侵染的作用测定

基于1.2.1和1.2.2结果,选择对菌株SC64表现 出抗性最高和最弱的典型生态型拟南芥,并参照 1.2.1方法对2种生态型拟南芥进行培养。将水杨酸 配制成0.1 mmol/L处理液,使用雾化效果好的小喷 瓶对每组拟南芥叶片喷施10 mL处理液,在28 °C、 全日照条件下静置24h后接种菌株SC64,然后观察 拟南芥的病理特征并测定茎秆木质素水平,方法同 1.2.1。同时,基于1.2.2结果进一步对木质素代谢通 路基因MYB46、PAL3、LAC17和CAD4的相对表达量 进行测定,方法同1.2.2。 1.2.4 拟南芥MPK4基因启动子区域甲基化位点测定

参照1.2.1方法对6种生态型拟南芥接种菌株 SC64菌饼,以未接种菌株SC64的相应生态型拟南 芥为对照,处理3h采集莲台座部位叶片放入液氮中 冻存,1株取1片叶片,每个生态型共取12片叶片。按 照植物DNA提取试剂盒说明书提取采集的各处理 叶片的DNA。利用MethyDetector[™]Bisulfite Modification Kit按照说明书用亚硫酸氢盐处理上述DNA 样品,DNA样品用量为500 ng。利用处理后的DNA 为模板对拟南芥*MPK4*基因启动子区域1000 kb序 列进行PCR扩增,共分成*MPK4-1*(441 kb)、*MPK4-2*

(410 kb)和 MPK4-3(325 kb)3 段进行扩增, 对应引 物序列如表1所示。25 µL PCR 扩增体系: Ex Tag Buffer $(10 \times)$ 2.5 μ L MgCl, 2 μ L dNTP Mix 2 μ L \pm 下游引物各1 µL、Ex Taq 0.2 µL、cDNA 1 µL、ddH,O 15.3 μL。反应程序:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸1 min,共35个循环; 72 ℃终延伸10 min(解洪杰, 2014)。利用普通琼脂 糖凝胶DNA回收试剂盒参照说明书对扩增的MPK4 基因启动子区域片段进行回收。使用连接载体 pMD[™] 19-T连接回收扩增片段,于16 ℃过夜培养。将 连接好的载体转化至大肠杆菌感受态细胞DH5a中, 于28 ℃、黑暗条件下培养12 h,通过蓝白斑筛选,挑 选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司南 京分公司测序,通过序列组装比对软件 Sequencher 5.4统计甲基化位点数。同时,应用Pearson相关系数 算法对6种生态型拟南芥MPK4基因启动子区域CHH 甲基化位点数与受侵染后的病斑面积、木质素水平 及抗病相关基因的相对表达量进行相关性分析。

1.3 数据分析

使用 SPSS 22.0 软件对试验数据进行单因素方 差分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性 检验。

2 结果与分析

2.1 拟南芥受到菌株 SC64 侵染后的病理表型变化

随着齐整小核菌菌株 SC64 侵染时间的延长, 6种生态型拟南芥的发病程度逐渐加重,其中生态 型 Col-0上的病程发展速度缓慢,被侵染 18 h时出 现病斑,较其余 5 种生态型都慢;而生态型 Ms-0在 被侵染 12 h时就出现病斑,病程发展速度最快(图 1-A),表明 6 种生态型中 Col-0 对菌株 SC64 的抗性最 强,Ms-0 的抗性最弱,其他 4 种生态型的抗性介于两 者之间。

通过对拟南芥茎秆木质素进行Wiesner染色后,发现未受到菌株SC64侵染时,拟南芥Col-0的茎秆横切面染色程度最深,而Ms-0的茎秆横切面染色程度最浅,其他4种生态型的茎秆横切面染色程度则介于两者之间;受到菌株SC64侵染24h后6种生态型拟南芥的茎秆横切面染色程度均有一定程度的加深,其中Col-0和Ms-0的茎秆横切面染色程度仍分别是最深的和最浅的(图1-B),表明6种生态型拟南芥中Col-0的木质素化程度最高,而Ms-0的木质素化程度最低,其他4种拟南芥的木质化程度介于两者之间。

2.2 菌株 SC64 侵染后水杨酸信号通路基因的表达

对调控水杨酸信号通路基因 MPK4、水杨酸代 谢通路基因 EDSI 及木质素代谢通路基因 CAD4 和 PAL3 的相对表达量测定结果显示,这4个基因的相 对表达量均在拟南芥受到菌株 SC64 侵染后不同时 间上调响应,并分别在受侵染3、12、18 和24 h时达 到峰值;其中 MPK4、CAD4 和 PAL3 的相对表达量上 调程度在 Col-0 中最高,而在 Ms-0 中最低;相反, EDSI 的相对表达量上调程度则在 Col-0 中最低,在 Ms-0 中最高;其他4种生态型中上述4个基因的相 对表达量基本介于 Col-0 和 Ms-0之间(图1-C~F)。

2.3 外源水杨酸对拟南芥防御菌株SC64侵染的影响

对菌株 SC64 表现出抗性最强和最弱的拟南芥 Col-0和 Ms-0 经外源 0.1 mmol/L 水杨酸预处理后, 被菌株 SC64 侵染所引发的发病程度较未经水杨酸 预处理组均有所加重;其中,拟南芥 Ms-0 经外源水 杨酸预处理后在受菌株 SC64 侵染 18 h时病斑明显 扩大,即病害发展加重;拟南芥 Col-0 经外源水杨酸 预处理后在受菌株 SC64 侵染 36 h时病斑明显扩大, 即病害加重(图 2-A)。此外,经外源水杨酸预处理 后,受侵染相同时间下在拟南芥 Col-0 上产生的病 斑小于在 Ms-0上产生的病斑。

木质素 Wiesner 染色结果显示,相较于未经水 杨酸预处理组,拟南芥 Col-0和 Ms-0经外源水杨酸 预处理后,在受到菌株 SC64 侵染后茎秆木质素染色 程度更浅,着色区域更少,说明木质素积累降低; Col-0经外源水杨酸预处理后,茎秆木质素染色程度 仍随着菌株 SC64 侵染时间的延长有所加深,而 Ms-0 经外源水杨酸预处理后茎秆木质素染色程度则随着 菌株 SC64 侵染时间的延长基本不再加深(图 2-B), 表明拟南芥 Col-0和 Ms-0经外源水杨酸预处理后再 接种菌株 SC64 后的木质素积累减少,但 Col-0的木 质素化程度仍高于 Ms-0。

进一步对木质素代谢通路基因 MYB46、PAL3、 LAC17和 CAD4 相对表达量进行测定,相较于未经 水杨酸预处理组,拟南芥 Col-0和 Ms-0经水杨酸预 处理后,在受菌株 SC64 侵染18 h时 MYB46和 CAD4 基因的相对表达量上调达到峰值,在受侵染24 h时 PAL3和 LAC17基因的相对表达量上调达到峰值,且 在拟南芥 Col-0中上述木质素代谢基因的相对表达 量均较 Ms-0中的更高;另外,外源水杨酸预处理组 中 Col-0和 Ms-0受到菌株 SC64 侵染时上述木质素 代谢基因的上调程度均较未经水杨酸预处理组有所 减弱(图 2-C~F)。



A: 拟南芥叶片病斑图, 左图为相机照片, 右图为 Imaging-PAM 检测图片; B: 拟南芥茎秆木质素的 Wiesner 染色图, 上部组图 为10 倍物镜, 下部组图为20 倍物镜; C~F: 分别为 MPK4、EDS1、CAD4和 PAL3 基因的相对表达量; CK: 未受菌株 SC64 侵染 的拟南芥。A: Six ecotypes of Arabidopsis thaliana leaves infected by strain SC64, the left picture is the camera photo, the right picture is the Imaging-PAM detection picture; B: six ecotypes of A. thaliana were infected by strains SC64 with lignin Wiesner staining, with 10× objectives on the top and 20× objectives on the bottom; C-F: MPK4, EDS1, CAD4 and PAL3 genes relative expression levels respectively; CK: not infected with strain SC64.

图1 6种生态型拟南芥受到齐整小核菌菌株 SC64 侵染后的病理表型及抗性基因相对表达量 Fig. 1 Pathology phenotypes and resistant gene relative expression levels of six ecotypes of *Arabidopsis thaliana* after infected with *Sclerotium rolfsii* strain SC64



A: 拟南芥叶片病斑图, 左图为相机照片, 右图为 Imaging-PAM 检测图片; B: 拟南芥茎秆木质素的 Wiesner染色图, 每组图中的上 图为10倍物镜, 下图为20倍物镜; C~F: 分别为 MYB46、PAL3、CAD4和 LAC17基因的相对表达量; CK: 未受菌株 SC64 侵染的 拟南芥。A: Six ecotypes of Arabidopsis thaliana leaves infected by strain SC64, the left picture is the camera photo, the right picture is the Imaging-PAM detection picture; B: six ecotypes of A. thaliana were infected by strains SC64 with lignin Wiesner staining, with 10× objectives on the top and 20× objectives on the bottom; C-F: MYB46, PAL3, CAD4 and LAC17 genes relative expression levels respectively; CK: not infected with strain SC64.

图2 外源0.1 mmol/L水杨酸(SA)预处理对拟南芥受齐整小核菌菌株SC64侵染的影响 Fig. 2 Effect of exogenous 0.1 mmol/L salicylic acid (SA) pretreatment on *Arabidopsis thaliana* infestation by *Sclerotium rolfsii* SC64 strain

5期

为进一步探究表观遗传在调控6种生态型拟南 芥间抗病过程中的差异,克隆调控水杨酸信号通路 基因 MPK4 并测定其启动子区域甲基化位点数,结 果显示,6种生态型拟南芥未受到菌株 SC64 侵染时 MPK4 基因启动子区域 CHH 位点数在所有甲基化 位点数中所占比例在22.2%~100.0% 之间,而6种生 态型拟南芥受到菌株 SC64 侵染3 h时 MPK4 基因启 动子区域CHH甲基化位点数均有所增加,并且在所 有甲基化位点数中所占比例在65.0%~84.8%之间, 表明CHH是MPK4基因启动子区域的主要甲基化 位点类型。6种生态型拟南芥中MPK4基因启动子 区域CHH甲基化位点数在Col-0中最多,在未受侵 染和受菌株SC64侵染3h时分别是7个和56个;而 在Ms-0中最少,在未受侵染和受菌株SC64侵染3h 时分别是2个和13个(表2)。

表2 齐整小核菌菌株 SC64 侵染后6 种生态型拟南芥 MPK4 基因启动子区域甲基化位	点数
Table 2 No. of methylation sites in the MPK4 promoters of six ecotypes of Arabidopsis thalian	a after

止太刑		侵募	e前(CK)			侵到	杂3h后	
生心室	Before inoculation (CK)			3 h post inoculation				
Ecotype	С	CG	CHG	CHH	С	CG	CHG	CHH
Col-0	11	4	0	7	66	8	2	56
Gr-1	9	7	0	2	20	6	1	13
Ms-0	2	0	0	2	17	1	1	13
Se-0	2	0	0	2	24	6	1	17
Tu-0	14	6	1	7	33	4	2	27
Wa-1	11	6	0	5	25	6	1	18

```
infected with Sclerotium rolfsii SC64 strain
```

C、CG、CHG和CHH是不同的甲基化类型。C, CG, CHG, and CHH are different types of methylation.

将6种生态型拟南芥 MPK4 基因启动子区域 CHH甲基化位点数与受侵染24h病斑面积、受侵染 24h木质素水平及受侵染3h时 MPK4 相对表达量 进行相关性分析,结果显示,6种生态型拟南芥在未 受侵染时 MPK4 基因启动子区域 CHH 位点数与受 侵染24h木质素水平呈极显著正相关,与受侵染24h 病斑面积呈显著负相关,与受侵染3h自身相对表达 量呈显著正相关(表3)。6种生态型拟南芥受菌株 SC64 侵染3h时 MPK4 基因启动子区域CHH位点 数与受侵染24h木质素水平呈极显著正相关,与受 侵染24h病斑面积呈显著负相关,与受侵染3h自身 相对表达量呈极显著正相关(表3)。

表3 不同生态型拟南芥*MPK4*启动子CHH甲基化位点数与受齐整小核菌菌株 SC64 侵染24 h的木质素水平和病斑的相关性 Table 3 Correlation between the number of CHH methylation sites in the *MPK4* promoters of six ecotypes *Arabidopsis thaliana* and lignin levels and disease spots infected with *Sclerotium rolfsii* strain SC64 for 24 h

6		0	
	未受侵染时CHH位点数	受侵染24h时病斑面积	受侵染24h时木质素水平
	No. of CHH sites when	Lesion area at 24 h of	Lignin level at 24 h of
	not infected	infection	infection
受侵染3h时CHH位点数	-	-0.878^{*}	0.771**
No. of CHH sites at 3 h of infection			
受侵染24h时病斑面积	-0.915^{*}	1.000	
Lesion area at 24 h of infection			
受侵染24h时木质素水平	0.503**	-0.781**	1.000
Lignin level at 24 h of infection			

*和**表示在0.05和0.01水平显著相关(双尾)。* or ** indicates significant correlation at the 0.05 or 0.01 level (2-tailed).

6种生态型拟南芥未受侵染时 MPK4 基因启动 子区域 CHH 甲基化位点数与受侵染后 12 h的 EDSI 基因相对表达量和受侵染后 18 h的 CAD4 基因相对 表达量分别呈显著负相关和显著正相关; 而受侵染 3 h时 MPK4 基因启动子区域 CHH 甲基化位点数与 受侵染后 12 h的 EDSI 基因相对表达量和受侵染后 18 h的 CAD4 基因相对表达量分别呈极显著负相关和显著正相关(表4),表明6种生态型拟南芥 MPK4 基因启动子区域 CHH 甲基化位点数正调控自身表达,负调控 EDSI 基因的表达,正调控 CAD4 基因的表达。

表4 6种生态型拟南芥 MPK4 基因启动子区域 CHH 甲基化位点数与基因表达量的相关系数

 Table 4 The coefficient of correlation between CHH methylation sites in MPK4 promoter region and gene relative expression level in six ecotypes of Arabidopsis thaliana

	相对表	达量Relative expression	甲基化位点数N	o. of methylation sites	
	<i>MPK4</i> (3 hpi)	EDS1 (12 hpi)	<i>CAD4</i> (18 hpi)	CHH (CK)	CHH (3 hpi)
<i>MPK4</i> (3 hpi)	1.000				
EDS1 (12 hpi)	-0.981**	1.000			
<i>CAD4</i> (18 hpi)	0.954**	-0.959^{**}	1.000		
CHH (CK)	0.838^{*}	-0.877^{*}	0.912*	1.000	
CHH (3 hpi)	0.947**	-0.953**	0.891*	0.770	1.000

hpi: 受侵染后小时数。*和**表示在 0.05 和 0.01 水平显著相关(双尾)。hpi: Hours post inoculation. * or ** indicates significant correlation at the 0.05 or 0.01 level (2-tailed).

3 讨论

木质素在植物防御病原菌侵染过程中发挥着关 键作用,其发育程序性的生物合成和沉积位于次生 细胞壁中,发挥组成性防御作用以阻止病原体定殖 (Bonello & Blodgett, 2003)。本研究中6种生态型 拟南芥未受齐整小核菌菌株 SC64 侵染时 Col-0 的 木质素化程度最强,与其抗病能力最强的特性相吻 合,而Ms-0的木质素化程度最弱,对应的抗病能力 最弱,其他4种生态型的木质素化程度和抗病能力 介于两者之间,该结果表明了木质素对菌株SC64具 有组成性防御作用。木质素合成时首先经苯丙氨酸 解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)和肉桂醇 脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)等参 与木质素单体合成(Vanholme et al., 2010),然后经 漆酶或过氧化物酶氧化后组装形成木质素聚合物 (Vanholme et al., 2012; Rojas-Murcia et al., 2020) 。 病原体与植物的相互作用能诱导苯丙烷途径相关基 因在植物中表达,从而促进相应酶的积累,提高酶活 性和细胞壁木质化水平(Zhao et al., 2009)。在不同 真菌处理的亚麻Linum usitatissimum 细胞悬浮培养 物中,编码PAL和CAD的基因显著上调表达,PAL 活性增强(Hano et al., 2006)。本研究中6种生态型 拟南芥受菌株 SC64 侵染后,木质素代谢通路基因 PAL3和CAD4的相对表达量均发生了不同程度的 上调,相应地木质素化程度均比未受侵染时增强,这 与上述病原体能诱导植物木质素积累的研究结果一 致;且这2个基因在Col-0中的上调表达幅度较其余 5种生物型更大,与其木质素化程度最强的结果相吻 合,推测木质素与拟南芥对菌株SC64的抗性相关。

水杨酸作为植物抗病响应中的经典激素在抵御生物营养型病原菌侵染过程中发挥着关键作用(Glazebrook,2005)。但也有研究表明水杨酸在植

物受到病原菌侵染时起到相反作用,如在表达水杨 酸羟化酶(salicylate hydroxylase, Nahg)的转基因和 野生型番茄品系中,受到野油菜黄单胞菌泡囊变种 Xanthomonas campestris pv. vesicatoria 侵染后,野生 型积聚了大量水杨酸并伴随广泛的黄化和坏死病 症,而转nahg基因株系发病程度显著低于野生型 (O'Donnell et al., 2001)。本研究中拟南芥Col-0和 Ms-0经外源水杨酸预处理后受菌株 SC64 侵染时发 病程度均较未经水杨酸预处理时有所加重,这与 O'Donnell et al. (2001)发现过量水杨酸会加重植物 受到病原菌侵染时的发病程度的研究结果一致。水 杨酸也能对植物生长发育及木质素水平起到负调控 作用,如外源喷施0.2 mmol/L水杨酸会抑制拟南芥 生长(Lee et al., 2020);在HCT表达下调的拟南芥和 紫花苜蓿中观察到水杨酸含量与木质素水平成反比 (Gallego-Giraldo et al., 2011)。本研究发现相较于未 经水杨酸预处理组,拟南芥Col-0和Ms-0经外源水 杨酸预处理后受菌株 SC64 侵染时的木质素积累均 有不同程度降低,Col-0中木质素的积累随侵染时间 延长只有小幅升高,对应其仅在受侵染36h时病斑发 生扩大即病害加重;Ms-0中木质素的积累随侵染时 间延长并未升高,对应其在受侵染18h时病斑就发 生扩大即病害发展提前且加重,推测水杨酸抑制了 木质素在拟南芥防御菌株SC64侵染过程中的积累。

MAPK级联信号通路能调控激素合成通路基因,调节抗病激素响应,从而对病原菌的侵染进行防御(Meng & Zhang, 2013)。MPK4是通过结合特异性底物MKS1负调控EDSI/PAD4的表达,最终实现对水杨酸的抑制作用(Brodersen et al., 2006)。本研究中6种生态型拟南芥受到菌株SC64侵染时MPK4的相对表达量均显著上调,且在Col-0中的上调程度高于其余5种生态型拟南芥;而EDSI基因在Ms-0中的相对表达量上调程度则高于其余5种生态型拟

1356

DNA甲基化在植物生长和防御中也起到了至 关重要的作用(Xu et al., 2020; Li et al., 2021), 如湖 北海棠 Malus hupehensis 的表观遗传研究结果表明 幼叶和老叶转变相关基因表达量与其对应启动子区 域的CHH甲基化呈正相关(Xing et al., 2020); 拟南 芥生物型 Col-0 受尖孢镰刀菌侵染后 CAP-PR 和 CRK40的相对表达量均发生上调且个别CHH位点 的甲基化增加(Le et al., 2014)。本研究中6种生态 型拟南芥在未受侵染和受菌株 SC64 侵染 3 h 的 MPK4基因启动子区域CHH甲基化位点数分别与 其自身表达量呈显著和极显著正相关,这表明该基 因启动子CHH甲基化位点数正调控了其自身表达 量,与Le et al. (2014)研究结果一致。综上所述,6种 生态型拟南芥 MPK4 基因启动子区域 CHH 甲基化 位点数在防御菌株SC64侵染过程中正调控自身表 达量,从而负调控水杨酸通路基因EDSI的表达,使 拟南芥水杨酸含量下降,进而使木质素代谢通路基 因CAD4的表达量上调并促进木质素积累,最终使 得其对菌株SC64的抗性起到了正调控作用。

齐整小核菌菌株 SC64具有成为微生物除草剂 的应用潜力,前期研究表明其菌丝体能入侵到植物 组织中,并分泌细胞壁降解酶和草酸侵染植物体 (Tang et al., 2011)。而植物防御菌株 SC64 侵染的 分子机制尚不完全明确。因此,本研究从木质素和 水杨酸代谢通路以及水杨酸代谢上游调控基因甲基 化3方面探究了拟南芥防御菌株 SC64 侵染的分子 机制,为提高菌株 SC64 作为生物除草剂应用潜力提 供了理论基础。

参考文献(References)

- Abu-Dieyeh MH, Watson AK. 2007. Efficacy of *Sclerotinia minor* for dandelion control: effect of dandelion accession, age and grass competition. Weed Research, 47(1): 63–72
- Akimoto K, Katakami H, Kim HJ, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H. 2007. Epigenetic inheritance in rice plants. Annals of Botany, 100(2): 205–217
- Bonello P, Blodgett JT. 2003. Pinus nigra-Sphaeropsis sapinea as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. Physiological and Molecular Plant Pathology, 63(5): 249–261
- Bourdot GW, Hurrell GA, Saville DJ, Leathwick DM. 2006. Impacts of applied *Sclerotinia sclerotiorum* on the dynamics of a *Cirsium*

arvense population. Weed Research, 46(1): 61-72

- Bressendorff S, Azevedo R, Kenchappa CS, de León IP, Olsen JV, Rasmussen MW, Erbs G, Newman MA, Petersen M, Mundy J. 2016. An innate immunity pathway in the moss *Physcomitrella patens*. The Plant Cell, 28(6): 1328–1342
- Brodersen P, Petersen M, Nielsen HB, Zhu SJ, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J. 2006. *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. The Plant Journal, 47(4): 532–546
- Cheng J. 2019. Cloning of ¹O₂ marker genes of crofton weed and cotton, and preliminary functional study of ¹O₂ marker gene *SIB1* in *Arabidopsis*. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [成静. 2019. 紫茎泽兰和棉花¹O₂标记基因 的克隆及拟南芥¹O₂标记基因 *SIB1* 功能的初步研究. 硕士学 位论文.南京:南京农业大学]
- Couto D, Niebergall R, Liang XX, Bücherl CA, Sklenar J, Macho AP, Ntoukakis V, Derbyshire P, Altenbach D, MacLean D, et al. 2016. The *Arabidopsis* protein phosphatase PP2C38 negatively regulates the central immune kinase BIK1. PLoS Pathogens, 12 (8): e1005811
- Dayan FE. 2019. Current status and future prospects in herbicide discovery. Plants, 8(9): 341
- Duke SO, Powles SB. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science, 64(4): 319-325
- Gaines TA, Zhang WL, Wang DF, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ, Culpepper AS, et al. 2010.
 Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(3): 1029–1034
- Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson LA, Dixon RA. 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin downregulated plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(51): 20814–20819
- Gao SW, Ma WY, Lyu XN, Cao XL, Yao YX. 2020. Melatonin may increase disease resistance and flavonoid biosynthesis through effects on DNA methylation and gene expression in grape berries. BMC Plant Biology, 20(1): 231
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43: 205–227
- Hano C, Martin I, Fliniaux O, Legrand B, Gutierrez L, Arroo RRJ, Mesnard F, Lamblin F, Lainé E. 2006. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. Planta, 224(6): 1291–1301
- Huang TY, Desclos-Theveniau M, Chien CT, Zimmerli L. 2013. Arabidopsis thaliana transgenics overexpressing IBR3 show enhanced susceptibility to the bacterium *Pseudomonas syringae*. Plant Biology, 15(5): 832–840
- Joo S, Liu YD, Lueth A, Zhang SQ. 2008. MAPK phosphorylationinduced stabilization of ACS6 protein is mediated by the noncatalytic C-terminal domain, which also contains the *cis*determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. The Plant Journal, 54(1): 129–140

- Jung HG, Casler MD. 2006. Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. Crop Science, 46(4): 1801–1809
- Le TN, Schumann U, Smith NA, Tiwari S, Au PCK, Zhu QH, Taylor JM, Kazan K, Llewellyn DJ, Zhang R, et al. 2014. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. Genome Biology, 15 (9): 1–18
- Lee KP, Liu KW, Kim EY, Medina-Puche L, Dong HH, Duan JL, Li MP, Dogra V, Li YR, Lv RQ, et al. 2020. Plant natriuretic peptide A and its putative receptor PNP-R2 antagonize salicylic acidmediated signaling and cell death. The Plant Cell, 32(7): 2237– 2250
- Li H, Yang XY, Wang QF, Chen JM, Shi T. 2021. Distinct methylome patterns contribute to ecotypic differentiation in the growth of the storage organ of a flowering plant (sacred lotus). Molecular Ecology, 30(12): 2831–2845
- Liu YD, Zhang SQ. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogenactivated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 16(12): 3386–3399
- Mandal S, Kar I, Mukherjee AK, Acharya P. 2013. Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. The Scientific World Journal, 2013: 1–9
- Manzoor MA, Cheng X, Li GH, Su XQ, Abdullah M, Cai YP. 2020. Gene structure, evolution and expression analysis of the P-ATPase gene family in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*). Computational Biology and Chemistry, 88: 107346
- Mao GH, Meng XZ, Liu YD, Zheng ZY, Chen ZX, Zhang SQ. 2011. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 23(4): 1639–1653
- Meng XZ, Zhang SQ. 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. Annual Review of Phytopathology, 51: 245–266
- Muller-Scharer H, Schaffner U, Steinger T. 2004. Evolution in invasive plants: implications for biological control. Trends in Ecology & Evolution, 19(8): 417–422
- O' Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ. 2001. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. The Plant Journal, 25(3): 315–323
- Pichersky E, Gersherzon J. 2002. Plant odyssey: volatile substances. Biofutur, (224): 22-26
- Pieterse CMJ, van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28: 489–521
- Poon JSY, Le Fevre RE, Carr JP, Hanke DE, Murphy AM. 2020. Inositol hexakisphosphate biosynthesis underpins PAMP-triggered immunity to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis thaliana* but is dispensable for establishment of systemic acquired resistance. Molecular Plant Pathology, 21(3): 376–387
- Rojas-Murcia N, Hématy K, Lee Y, Emonet A, Ursache R, Fujita S, De Bellis D, Geldner N. 2020. High-order mutants reveal an essential requirement for peroxidases but not laccases in Casparian strip lignification. Proceedings of the National Academy of Sci-

ences of the United States of America, 117(46): 29166-29177

- Sattler SE, Funnell-Harris DL. 2013. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? Frontiers in Plant Science, 4: 70
- Smith AH, Gill WM, Pinkard EA, Mohammed CL. 2007. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. Forest Pathology, 37(6): 361–373
- Tang W. 2011. On the potential of *Sclerotium rolfsii* strain SC64 as a bioherbicide. PhD thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [唐伟. 2011. 齐整小核菌(*Sclerotium* rolfsii)菌 株 SC64开发作为生物除草剂的潜力研究. 博士学位论文. 南 京: 南京农业大学]
- Tang W, Zhu YZ, He HQ, Qiang S, Auld BA. 2011. Field evaluation of Sclerotium rolfsii, a biological control agent for broadleaf weeds in dry, direct-seeded rice. Crop Protection, 30(10): 1315–1320
- Tronchet M, Balagué C, Kroj T, Jouanin L, Roby D. 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant Pathology, 11(1): 83–92
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiology, 153(3): 895–905
- Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W. 2012. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. New Phytologist, 196(4): 978–1000
- Wang Z, Mao H, Dong CH, Ji RQ, Cai L, Fu H, Liu SY. 2009. Overexpression of *Brassica napus MPK4* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(3): 235–244
- Xie HJ. 2014 Molecular mechanism of freezing-tolerance differentiation of alien invasive crofton weed (*Ageratina adenophora*) through evolution of *ICE-CBFs* transcription pathway during its invasion northward. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [解洪杰. 2014. 外来植物紫茎泽兰 通过 *ICE-CBFs* 转录途径的耐寒性分化向北入侵的分子机制 研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Xing LB, Qi SY, Zhou H, Zhang W, Zhang CG, Ma WC, Zhang QW, Shah K, Han MY, Zhao J. 2020. Epigenomic regulatory mechanism in vegetative phase transition of *Malus hupehensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(17): 4812–4829
- Xu L, Yuan K, Yuan M, Meng XB, Chen M, Wu JG, Li JY, Qi YJ. 2020. Regulation of rice tillering by RNA-directed DNA methylation at miniature inverted-repeat transposable elements. Molecular Plant, 13(6): 851–863
- Zhang J, Lu HB, Li XY, Li Y, Cui HT, Wen CK, Tang XY, Su Z, Zhou JM. 2010. Effector-triggered and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity differentially contribute to basal resistance to *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23(7): 940–948
- Zhao JW, Buchwaldt L, Rimmer SR, Sharpe A, McGregor L, Bekkaoui
 D, Hegedus D. 2009. Patterns of differential gene expression in Brassica napus cultivars infected with Sclerotinia sclerotiorum.
 Molecular Plant Pathology, 10(5): 635–649