链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗感品种的转录组差异表达分析

钟胤珊　张懿丹　唐科志*　周常勇*

（西南大学柑桔研究所，重庆 400712）

摘要：为探究柑橘褐斑病致病菌链格孢菌橘致病型（the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*）在侵染柑橘抗感品种过程中的基因表达差异，利用其菌丝球分别侵染感病品种红橘和抗病品种纽荷尔脐橙后，采用高通量测序技术对病原菌菌丝阶段（0 h）及3个侵染时期（接种后12、24和48 h）的样品进行转录组测序与组装，并进行功能注释与分类、差异基因筛选与分析。结果显示：链格孢菌橘致病型侵染感病品种红橘后其特异性差异表达基因的功能主要富集于细胞能量代谢、氨基酸和辅酶的合成与分解以及果胶的降解过程，该菌侵染抗病品种纽荷尔脐橙后其特异性差异表达基因的功能主要富集于细胞结构构建、细胞通信以及环境应激和响应，说明链格孢菌橘致病型侵染红橘和纽荷尔脐橙时所激活的生物反应和代谢途径不同。将该菌接种于红橘离体叶片后，其通过协同调控毒力、代谢及生长发育等过程主动侵染寄主，抑制寄主防御反应，实现在寄主体内的高效寄生适应；而将其接种于纽荷尔脐橙离体叶片后，病原菌与寄主的防御系统一直呈现博弈的状态，该菌也因寄主持续的防御干扰导致其一直未能完全瓦解寄主抗性，致使无法成功侵染定殖。实时荧光定量PCR验证结果与转录组测序结果一致，表明转录组测序数据可靠。

关键词：链格孢菌橘致病型；抗感品种；转录组；差异表达基因

Transcriptome differential expression analysis of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* after infecting citrus resistant/susceptible varieties

Zhong Yinshan　Zhang Yidan　Tang Kezhi*　Zhou Changyong*

（Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China）

Abstract: To explore the differences in gene expression of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* during the infection of citrus resistant/susceptible varieties, the susceptible variety Hongju and the resistant variety Newhall navel orange were inoculated with mycelial pellets of the tangerine pathotype of *A. alternata*, respectively. The high-throughput sequencing technology was used to sequence and assemble the transcriptomes of samples at the mycelial stage of the pathogen (0 h) and during three infection time points (12, 24, and 48 hours post-inoculation). Additionally, functional annotation and classification were performed, along with differential gene screening and analysis. The results showed that the functions of the specifically differentially expressed genes (DEGs) of the tangerine pathotype of *A. alternata* after infecting Hongju were mainly enriched in cellular energy metabolism, the synthesis and decomposition of amino acids and coenzymes, and the pectin degradation process. The functions of the DEGs of this pathogen after infecting Newhall navel orange were mainly enriched in cell structure construction, cell communication, and environmental stress response. These results indicated the differ-

基金项目：国家现代农业产业技术体系专项（CARS-26），中央高校基本科研业务费专项资金（SWU224007）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：kztang@swu.edu.cn，zhoucy@cric.cn

收稿日期：2025-03-20

ences in the biological responses and metabolic pathways activated by the tangerine pathotype of *A. alternata* when infecting Hongju and Newhall navel orange. When the tangerine pathotype of *A. alternata* was inoculated onto detached leaves of Hongju tangerine, it actively infects the host by coordinating the regulation of virulence, metabolism, growth and development processes, thereby suppressing the defense response and achieving efficient parasitism adaptation within the host. When the tangerine pathotype of *A. alternata* was inoculated onto detached leaves of Newhall navel orange, the pathogen and the host's defense systems remained in a state of constant interaction. Due to the continuous defense interference from the host, the pathogen was unable to completely break down the host's resistance, this results in the inability of the mycelium to successfully infect and colonize. The real-time quantitatire PCR verification results were consistent with the transcriptional sequencing results, indicating that the transcriptome sequencing data was reliable.

Key words: the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*; resistant/susceptible varieties; transcriptome; differentially expressed gene

链格孢菌橘致病型(the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*)是引起柑橘褐斑病的病原菌,从分类学角度来看,其属于半知菌亚门丝孢纲丝孢目暗色菌科链格孢属 *Alternaria*(Peever et al.,2002),但关于其种的分类却一直未统一(李亚等,2019)。链格孢菌橘致病型主要侵染橘类及其杂交种和部分宽皮柑橘(Vicent et al.,2000),引起嫩枝、幼芽枯死,幼叶、幼果脱落,使成熟果实的果皮上出现褐色凹陷斑点甚至大面积坏死,导致柑橘鲜果产量和品质严重下降(Canihos et al.,1999)。由于柑橘褐斑病的病程横跨整个柑橘生育期,所以该病对柑橘产业经济效益的影响十分严重。因此,明确链格孢菌橘致病型在侵染柑橘抗感品种过程中的基因表达差异,对该菌分子致病机理研究及其所致病害防控策略制订具有重要意义。

近年来,国内外关于柑橘褐斑病及链格孢菌橘致病型的研究逐年增多,对链格孢菌橘致病型基因组的研究也有一些进展。目前,链格孢菌橘致病型Z7菌株的全基因组测序已完成,通过Illumina和PacBio双平台测序技术组装共获得161个重叠群(>1 000 bp),其总基因组大小为34.41 Mb;比较分析显示,该菌株基因组较芸薹链格孢菌 *A. brassicicola* 的基因组大11%,但较损毁链格孢菌 *A. destruens* 的基因组小25%,与其他已测序链格孢菌属物种的基因组大小相近;其基因组密度为每Mb约351个基因,与其他链格孢菌属物种一致;此外,除芸薹链格孢菌外,Z7菌株与其他链格孢菌属物种间均表现出较高的基因组同源性(Wang et al.,2016)。盖云鹏(2018)比较分析了不同致病力的链格孢菌基因组,发现致病菌株的基因组大小和编码基因数量均显著高于非致病菌株,且通过全基因组比较分析发现引发柑橘褐斑病的链格孢菌属于3个不同的进化支,即交链格孢菌 *A. alternata*、梨黑斑链格孢菌 *A. gaisen* 和 *A. tangelonis*。杨胜男等(2023)通过全基因组关联分析和群体遗传分化指数分析,在宽皮柑橘中鉴定出多个与褐斑病抗性显著相关的候选基因,这为阐明柑橘品种抗褐斑病分子机制及抗病育种提供了重要分子靶点;马慧等(2023)通过转录组测序分析发现链格孢菌橘致病型能抑制柑橘抗感品种的部分生长发育及代谢活动,但是感病品种无法有效抵御该菌毒素的破坏,而抗病品种则能通过特异性激活 *MATE* 基因来抵抗病原菌毒素侵害。然而从链格孢菌橘致病型角度解析其侵染柑橘抗感品种的转录组差异研究仍较匮乏。

为了探究链格孢菌橘致病型在侵染柑橘抗感品种过程中的基因表达差异,本研究利用该菌菌丝球分别侵染柑橘感病品种红橘和抗病品种纽荷尔脐橙,采用高通量测序技术对病原菌菌丝阶段(0 h)及3个侵染时期(接种后12、24和48 h)的样品进行转录组测序与组装,利用功能注释与分类、差异表达基因筛选及实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)验证,解析链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗感品种后的基因表达差异,以期为后续该菌的致病机理研究和所致病害防控提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物和病原菌:红橘和纽荷尔脐橙苗木种植于西南大学柑橘研究所国家柑橘苗木脱毒中心防

虫网室内，于网室自然条件下培养，取春梢展平健康叶片供试。链格孢菌橘致病型菌株Z7由本实验室保存并提供。

供试培养基：马铃薯葡萄糖肉汤（potato dextrose broth，PDB）培养基配制时将去皮马铃薯100 g沸煮30 min，过滤后加入葡萄糖10 g，定容至500 mL；向PDB中加入1.5%琼脂粉即可获得马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基。

试剂和仪器：5×All-In-One RT Master Mix试剂盒、Blas*Taq*™ 2×qPCR Master Mix试剂盒，加拿大Applied Biological Materials Inc.公司；其余试剂均为国产分析纯。Quantagene q325荧光定量PCR仪，北京酷搏科技有限公司；DNBSEQ-T7基因测序仪，深圳华大基因股份有限公司。

1.2　方法

1.2.1　菌株Z7菌丝球的制备、接种观察及取样

在PDA培养基上活化链格孢菌橘致病型Z7菌株，于28 ℃避光培养3~4 d，取菌丝至盛有1 mL无菌水的EP管内，用高通量组织研磨器研磨3次，取200 μL菌丝液加入75 mL PDB培养基中，28 ℃、150 r/min摇培36 h获得符合试验要求的菌丝球。将大小均一的菌丝球分别接种至纽荷尔脐橙和红橘离体叶片右侧，在叶片左侧点接20 μL无菌水作为对照，将接种后的叶片置于保湿培养皿中，在28 ℃培养12、24和48 h后分别观察不同侵染时期叶片的发病情况，并采集菌丝球和叶片混合物1 g，以1 g病原菌菌丝球作为对照，于−80 ℃保存备份。每个时间点取3个生物学重复。

1.2.2　接种菌株Z7柑橘样品的测序

采用CTAB法提取1.2.1各时间点采集样品的总RNA，用带有OligodT的磁珠分别富集总RNA中有polyA尾巴的mRNA，同时用DNA探针杂交rRNA；利用RNaseH选择性消化DNA/RNA杂交链，最后用DNaseI消化掉DNA探针，纯化获得测序所需RNA。通过打断Buffer使获得的RNA片段化，用随机N6引物进行反转录，再合成cDNA二链形成双链DNA。把双链DNA末端补平并使5′端磷酸化，同时使3′端形成一个“A”末端，再连接一个3′端有“T”的鼓泡状接头，通过特异引物进行PCR扩增，产物热变性成单链，再用一段桥式引物将单链DNA环化得到单链环状DNA文库。质检合格后使用DNBSEQ基因测序仪对24个样品进行测序。以上均委托深圳华大基因股份有限公司完成。

1.2.3　测序数据分析及差异表达基因的注释

基于1.2.2测序数据比较链格孢菌橘致病型在侵染柑橘抗病品种纽荷尔脐橙和感病品种红橘后，其基因在0、12、24和48 h的转录表达差异。测序得到的原始数据用SOAPnukee 1.5.2软件进行过滤，去除接头污染、未知碱基N含量大于10%的read以及低质量的read后，得到符合数据分析要求的clean read。

利用HISAT 2.1.0软件将得到的clean read与参考基因组即链格孢菌橘致病型Z7菌株基因组（https://ftp. ncbi. nlm. nih. gov/genomes/all/GCA/001/572/055/GCA_001572055.1_ASM157205v1/）进行序列比对，得到各处理组的比对率；利用Bowtie2 2.2.5软件将得到的clean read与参考基因组序列进行比对，然后使用RESM 1.2.8软件包计算各个样品的基因表达水平；利用PossionDis方法进行样品间基因表达的差异分析，设置条件为Q≤0.01且差异倍数（fold change，FC）的对数绝对值$|\log_2 FC|\geq 2$，并使用pheatmap函数对差异表达基因进行聚类分析。将差异表达基因在GO数据库进行注释，根据注释结果以及官方分类将差异基因进行功能分类，使用TermFinder包进行GO富集分析，以Q≤0.05为阈值，满足此条件的定义为在候选基因中显著富集。

1.2.4　差异表达基因的RT-qPCR验证

为验证链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗感品种转录组测序数据的可靠性，从不同比较组的差异表达基因中挑选了6个致病相关基因进行RT-qPCR验证，以*actin*作为内参基因（唐科志，2020），利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物（表1），委托北京擎科生物科技股份有限公司合成。采用CTAB法提取1.2.1各样品的总RNA，使用5×All-In-One RT Master Mix试剂盒参照说明书反转录合成cDNA，将其作为模板按照Blas*Taq*™ 2×qPCR Master Mix试剂盒说明书进行RT-qPCR检测，各样品重复3次。并通过公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算各基因的相对表达量，以链格孢菌橘致病型的菌丝球为对照。

2　结果与分析

2.1　链格孢菌橘致病型不同侵染时期的观察

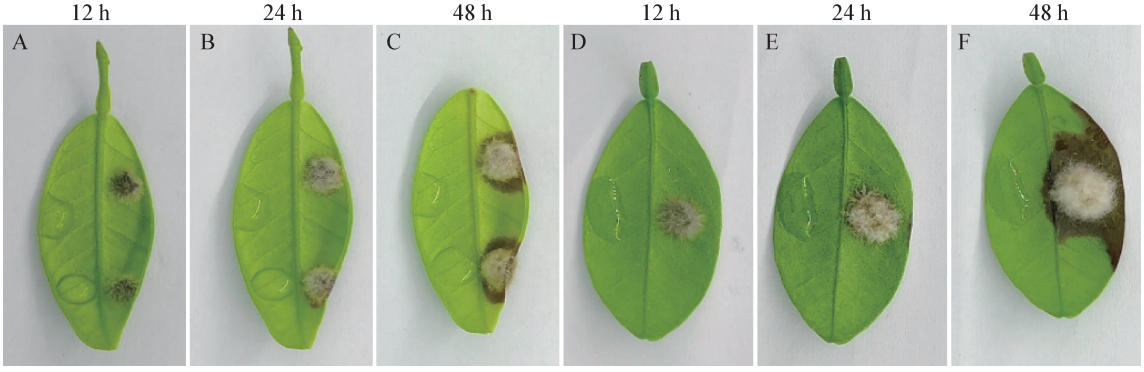
接种链格孢菌橘致病型菌丝球后12 h，菌丝球在红橘和纽荷尔脐橙离体叶片上生长良好，叶片上未出现褐色病斑（图1-A、D）；接种后24 h，菌丝球在两种柑橘离体叶片上继续生长，纽荷尔脐橙叶片上未见褐色病斑，而红橘叶片上出现轻微褐色病斑，但

未沿叶脉扩散(图1-B、E);接种后48 h,纽荷尔脐橙离体叶片上菌丝球大小较24 h时未见明显变化,叶片上出现明显浅褐色圆形病斑,病斑未呈现沿叶脉扩散的趋势(图1-C),而红橘离体叶片上出现明显褐色不规则病斑,病斑呈现沿叶脉扩散的趋势(图1-F)。

表1 本研究所用实时荧光定量PCR引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative PCR primer in this study

基因 Gene	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)	
actin	F: GCCTTCCGTCTTGGGTCT	R: AGGGCGGTGATTTCCTT
AALT_g125	F: CACATCGGCGGTCTTTACG	R: GCAGGAGGTCTGTATTAGGGT
AALT_g2462	F: TCTCCGCTCTTCTTATCTCCG	R: CTTGATGGGCACTATGACAGC
AALT_g8240	F: AGGTGGCGGAGTCTTGGT	R: AAGCCCTCGTTTGGTTCG
AALT_g9301	F: GACACCTCAATCACCCACCA	R: GCGAGCCAGTGCTTCCTAG
AALT_g9488	F: AACCTCCATTTCCATCACCA	R: CATCGCAGTCTCATCAGTCG
AALT_g9548	F: CCACCAACAACGGTTACTCAG	R: TGGATGGAAGGCTGGTTGA



叶片左侧:水对照;叶片右侧:菌丝球。Left side of leaf: Water control; right side of leaf: hyphal pellet.

图1 接种链格孢菌橘致病型后不同时间点抗病品种纽荷尔脐橙(A~C)和感病品种红橘(D~F)离体叶片上的症状

Fig. 1 Symptoms of detached leaves of resistant variety Newhall navel orange (A−C) and susceptible variety Hongju (D−F) at different time post inoculation with the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*

2.2 转录组测序结果评估及与参考基因组比对结果

对链格孢菌橘致病型菌株Z7侵染红橘和纽荷尔脐橙离体叶片0、12、24、48 h的样品进行转录组测序,共测序24个样本,每个样品平均产出6.41 Gb数据,且每个样本文库内获得的read数均大于47.19×10^{6}条,经过测序质量控制后,各样品过滤后的clean read数介于42.38×10^6~43.24×10^{6}条,且各样品Q30碱基百分比均大于91.72%,表明测序质量较高。将各样品clean read与该菌株参考基因组进行比对分析,菌丝中约98.17%的read可比对到参考基因组上,其中有97.38%是唯一比对(表2)。在接种链格孢菌橘致病型菌株Z7后12 h的红橘和纽荷尔脐橙叶片中分别有48.06%和43.94%的转录组数据来源于病原菌;在接种后24 h的红橘和纽荷尔脐橙叶片中分别有45.98%和26.38%的转录组数据来源于病原菌;在接种后48 h的红橘和纽荷尔脐橙叶片中,分别有45.63%和29.26%的转录组数据来源于病原菌(表2),推测可能是取样方法所致。

2.3 链格孢菌橘致病型侵染过程差异表达基因分析

以链格孢菌橘致病型菌丝球为对照组,在该菌侵染红橘叶片12 h后,检测到病原菌中有2 121个差异表达基因,其中1 529个上调表达,592个下调表达;侵染24 h后检测到2 654个差异表达基因,其中1 736个上调表达,918个下调表达;侵染48 h后检测到2 767个差异表达基因,其中1 886个上调表达,881个下调表达(图2)。在该菌侵染纽荷尔脐橙叶片12 h后,检测到病原菌中有1 980个差异表达基因,其中1 358个上调表达,622个下调表达;侵染24 h后检测到2 627个差异表达基因,其中1 729个上调表达,898个下调表达;侵染48 h后检测到3 183个差异表达基因,其中1 920个上调表达,1 263个下调表达(图2)。综上表明,无论是侵染柑橘抗病品种还是侵染感病品种,随着病原菌侵染时间的延长其差异表达基因数量不断增加,而且上调基因数量明

显多于下调基因数量。

表2 链格孢菌橘致病型侵染柑橘叶片的转录组测序质量统计

Table 2 Transcriptome sequencing quality statistics of citrus leaves infected by the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*

样品 Sample	原始read数 Total raw reads/M	过滤后read数 Total clean reads/M	过滤后read中质量值大于30的碱基数占总碱基数的比例 Clean read Q30/%	比对上参考基因组的clean read比例 Total mapping/%	比对上参考基因组唯一位置的clean read比例 Uniquely mapping/%
A0h	48.35	42.77	91.72	98.17	97.38
AG12h	50.68	43.24	92.46	48.06	47.87
AG24h	49.51	42.77	92.46	45.98	45.82
AG48h	47.19	43.20	91.81	45.63	45.47
AK12h	48.93	42.74	92.25	43.94	43.75
AK24h	48.35	42.38	92.57	26.38	26.28
AK48h	47.77	42.51	91.98	29.26	29.16

A0h：链格孢菌橘致病型菌丝；AG12h、AG24h、AG48h：接种后12、24和48 h的红橘叶片；AK12h、AK24h AK48h：接种后12、24和48 h的纽荷尔脐橙叶片。A0h: The hyphae of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*; AG12h, AG24h, AG48h: Hongju leaves at12, 24, 48 h post inoculation (hpi); AK12h, AK24h, AK48h: Newhall navel orange leaves at 12, 24 ,48 hpi.

与侵染12 h的样品相比较，菌丝球侵染红橘叶片24 h后，检测到病原菌中有528个差异表达基因，其中258个上调表达，270个下调表达；侵染纽荷尔脐橙叶片24 h后检测到633个差异表达基因，其中382个上调表达，251个下调表达（图2）。与侵染24 h的样品相比较，菌丝球侵染红橘叶片48 h后检测到病原菌中有279个差异表达基因，其中202个上调表达，77个下调表达；侵染纽荷尔脐橙叶片48 h后检测到143个差异表达基因，其中74个上调表达，69个下调表达（图2）。综合分析表明，无论是侵染柑橘抗病品种还是侵染感病品种，相较于链格孢菌橘致病型相邻侵染时期样品，所获得的病原菌差异表达基因数量呈下降趋势，且上调基因数量仍多于下调基因数量。

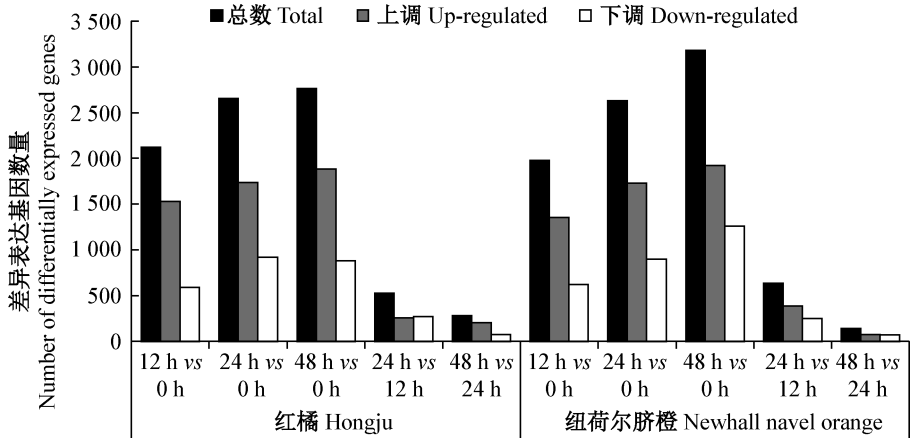


图2 链格孢菌橘致病型不同侵染时期柑橘抗感品种样品间差异表达基因分析

Fig. 2 Analysis of differentially expressed genes of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* between samples of resistant and susceptible varieties at different infection stages

为探究链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗感品种过程中差异表达基因的动态变化特征，对相邻时期获得的差异表达基因集合进行系统性的交集分析，结果显示，链格孢菌橘致病型侵染红橘叶片12、24和48 h的样品分别与其前一个侵染时期样品相比，分别获得1 765、237和116个特异性差异表达基因，其中有42个差异表达基因在3组相邻侵染时期获得的差异表达基因集合中均有出现（图3-A）；链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙叶片12、24和48 h的样品分别与其前一个侵染时期样品相比，分别获得1 690、357和64个特异性差异表达基因，其中有17个差异表达基因在3组相邻侵染时期获得的差

异表达基因集合中均有出现(图3-B)。

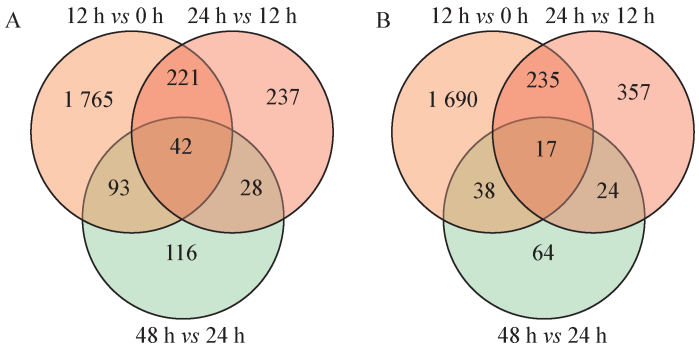


图3 链格孢菌橘致病型侵染红橘(A)和纽荷尔脐橙(B)叶片后不同时间的差异表达基因Venn图

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* after infecting the leaves of Hongju (A) and Newhall navel orange (B)

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗感品种12 h后所获得的特异性差异表达基因中,有1 137个在病原菌侵染抗感品种后均有表达,628个仅在侵染感病品种后表达,553个仅在侵染抗病品种后表达;比较该菌侵染柑橘抗感品种24 h和12 h获得的特异性差异表达基因,有93个在病原菌侵染抗感品种后均有表达,144个仅在侵染感病品种后表达,264个仅在侵染抗病品种后表达;比较该菌侵染柑橘抗感品种48 h和24 h获得的特异性差异表达基因,有7个在病原菌侵染抗感品种后均有表达,有109个仅在侵染感病品种后表达,57个仅在侵染抗病品种后表达。在相同侵染时期柑橘抗感品种的样品中,每个比较组依然存在大量特异性差异表达基因,表明链格孢菌橘致病型在侵染柑橘抗感品种时启动不同的响应基因,故推测其防御机制也可能不同。

2.4 链格孢菌橘致病型特异性差异表达基因功能分析

特异性差异表达基因的GO功能富集结果显示,比较侵染0 h和12 h的样品,链格孢菌橘致病型侵染红橘后得到的特异性差异表达基因的功能主要富集于嘌呤核苷三磷酸代谢过程、精氨酸生物合成过程、ATP生物合成过程以及与质子运输耦合的能量相关过程(图4-A);链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙后得到的特异性差异表达基因的功能主要富集于1,3-β-D葡聚糖合酶介导的葡聚糖合成过程、肽聚糖代谢过程、对活性氧的反应以及1-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶活性通路(图4-B)。

比较侵染12 h和24 h的样品,链格孢菌橘致病型侵染红橘后得到的特异性差异表达基因的功能主要富集于四氢叶酸多聚谷氨酸合成酶活性、富马酰乙酰乙酸酶活性以及谷氨酸脱羧酶活性通路(图5-A);链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙后得到的特异性差异表达基因的功能富集程度较低,在Q值最小的前20个条目中未出现富集比例大于0.4的条目(图5-B)。

比较侵染24 h和48 h的样品,链格孢菌橘致病型侵染红橘后得到的特异性差异表达基因的功能主要富集于果胶裂解酶活性通路(图6-A);其侵染纽荷尔脐橙后得到的特异性差异表达基因的功能主要富集于G蛋白偶联肽受体活性、信息素受体活性、肽受体活性、1-酰基甘油-3-磷酸O-酰基转移酶活性通路以及硝酸盐还原酶活性通路(图6-B)。

2.5 链格孢菌橘致病型特异性差异表达基因聚类分析

链格孢菌橘致病型侵染红橘后,比较侵染0 h和12 h样品,共获得11个表达量显著上调的基因,分别是转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)基因*AALT_g2605*、葡萄糖-6-磷酸酶基因*AALT_g10422*、CenpB-DNA结合蛋白基因*AALT_g3278*、AAA家族ATP酶基因*AALT_g9980*、磷酸盐转运蛋白基因*AALT_g2566*、U4/U6小核核糖核蛋白基因*AALT_g5460*、类枯草杆菌蛋白酶基因*AALT_g320*、Cupin样蛋白基因*AALT_g8201*以及3个假定蛋白基因*AALT_g7983*、*AALT_g5681*和*AALT_g6825*;获得1个表达量显著下调的基因,即可正向调节自噬的基因*AALT_g7771*。比较侵染12 h和24 h的样品,未获得表达量显著上调的基因;但获得3个表达量显著下调的基因,分别是MO25蛋白基因*AALT_g10918*、泛素羧基末端水解酶14(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14,USP14)同源基因*AALT_g10968*和*AAR2*(AAR2-like protein)基因同源基因*AALT_g5059*。比较侵染24 h和48 h的样品,共获得14个

表达量显著上调的基因，分别是糖苷水解酶基因*AALT_g6081*、*AALT_g10661*、*AALT_g1736*、C6锌指蛋白基因*AALT_g5016*、RNA12基因*AALT_g4483*、组氨酸激酶基因*AALT_g8617*、Na^+/H^+逆向转运蛋白基因*AALT_g2592*、辅酶A转移酶家族基因*AALT_g5350*、Rxt3蛋白基因*AALT_g3906*、肌动蛋白ATP酶基因*AALT_g1815*、热休克蛋白基因*AALT_g173*、ABC转运蛋白基因*AALT_g1073*、醇脱氢酶转录效应子基因*AALT_g6269*和1个假定蛋白基因*AALT_g3804*；获得1个表达量显著下调的基因，为甘氨酸裂解系统T蛋白基因*AALT_g7035*。

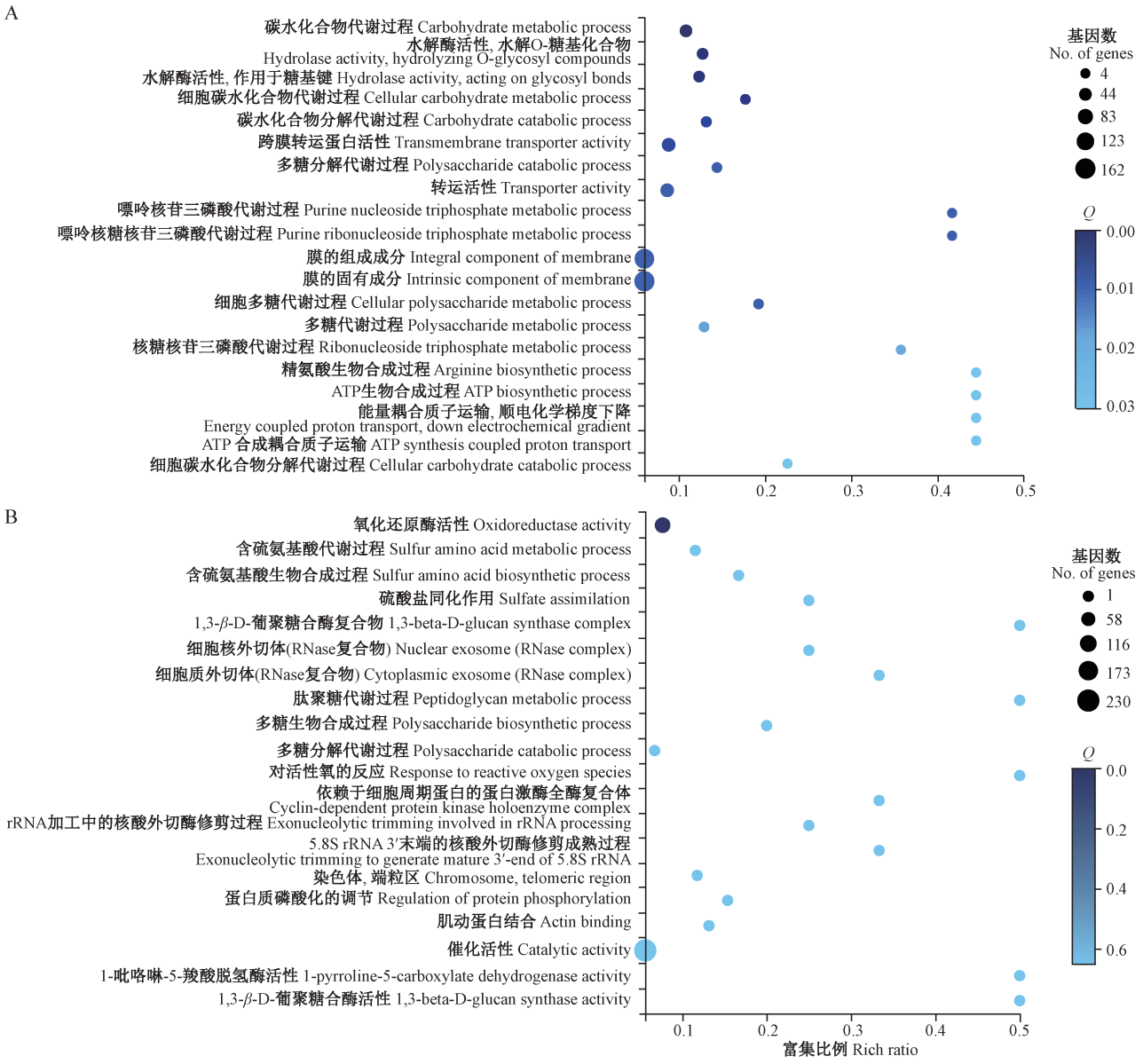


图4　链格孢菌橘致病型侵染红橘（A）和纽荷尔脐橙（B）0 h和12 h样品间的特异性差异表达基因GO功能富集分析

Fig. 4　GO functional enrichment analysis of specific differentially expressed genes between Hongju (A) and Newhall navel orange (B) samples infected by different races of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* at 0 h and 12 h of infection

以*Q*值最小的前20个GO分类作图。The bubble map was plotted with the top 20 GO terms with the smallest *Q* value.

该菌侵染纽荷尔脐橙后，比较侵染0 h和12 h样品，获得5个表达量显著上调的基因，分别是ATP结合蛋白基因*AALT_g5095*、WD40重复蛋白基因*AALT_g6762*、乙酰辅酶A类合成酶基因*AALT_g5927*、膜蛋白基因*AALT_g4769*和YjeF结构域基因*AALT_g5452*；获得2个表达量显著下调的基因，分别是胆碱硫酸酶基因*AALT_g2654*和AhpC/TSA抗氧化酶基因*AALT_g11199*。比较侵染12 h和24 h的

样品，获得5个表达量显著上调的基因，分别是糖苷水解酶基因*AALT_g6081*、麦芽糖透性酶基因*AALT_g4425*、二氢硫辛酰脱氢酶基因*AALT_g9011*、转酮醇酶基因*AALT_g3130*和1个假定蛋白基因*AALT_g7078*；但未获得表达量显著下调的基因。比较侵染24 h和48 h的样品，获得5个表达量显著上调的基因，分别是鸟氨酸脱羧酶基因*AALT_g10619*、NAD(P)结合蛋白基因*AALT_g6002*、MFS通用底物转运蛋白基因*AALT_g3010*、Rho GAP样蛋白基因*AALT_g7463*和线粒体伸长因子基因*AALT_g1615*；同样未获得表达量显著下调的基因。

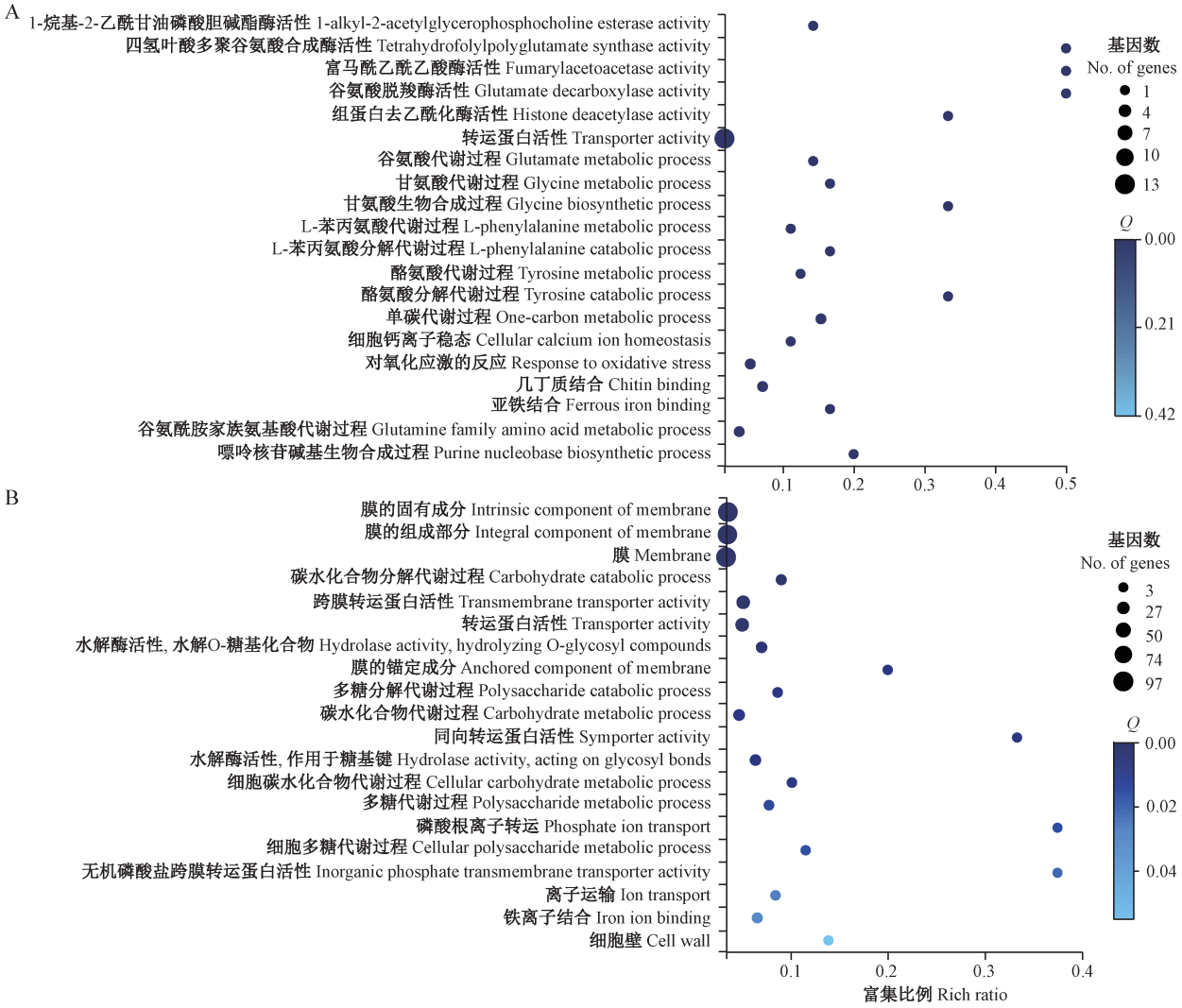


图5 链格孢菌橘致病型侵染红橘(A)和纽荷尔脐橙(B)12 h和24 h样品间的特异性差异表达基因GO功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis of specific differentially expressed genes between Hongju (A) and Newhall navel orange (B) samples infected by different races of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* at 12 h and 24 h of infection

以*Q*值最小的前20个GO分类作图。The bubble map was plotted with the top 20 GO terms with the smallest *Q* value.

2.6 链格孢菌橘致病型特异性差异表达基因的验证

从不同比较组的差异表达基因中挑选了6个致病相关基因进行RT-qPCR验证，分别是磷酸酶基因*AALT_g125*、假定蛋白基因*AALT_g2462*、双特异性磷酸酶基因*AALT_g8240*、醛酮还原酶基因*AALT_g9301*、NAD(P)结合蛋白基因*AALT_g9488*和编码内切-1,4-β-木聚糖酶B前体的基因*AALT_g9548*。RT-qPCR验证结果显示，在链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙过程中，上述致病相关基因的RT-qPCR验证结果与RNA-seq数据在其表达变化趋势上高度一致；在链格孢菌橘致病型侵染红橘过程中，该菌*AALT_g2462*、*AALT_g8240*、*AALT_g9301*和*AALT_g9548*基因的RT-qPCR验证结果与RNA-seq数据在基因其表达变化趋势上高度一致，而*AALT_g125*和*AALT_g9488*的RT-qPCR验证结果在侵染初期与RNA-seq数据有细微偏差，但二者在侵

染中后期的表达变化趋势与RNA-seq数据保持一致，总体上看该转录组测序结果准确性较高，表明转录组测序数据可靠（图7）。

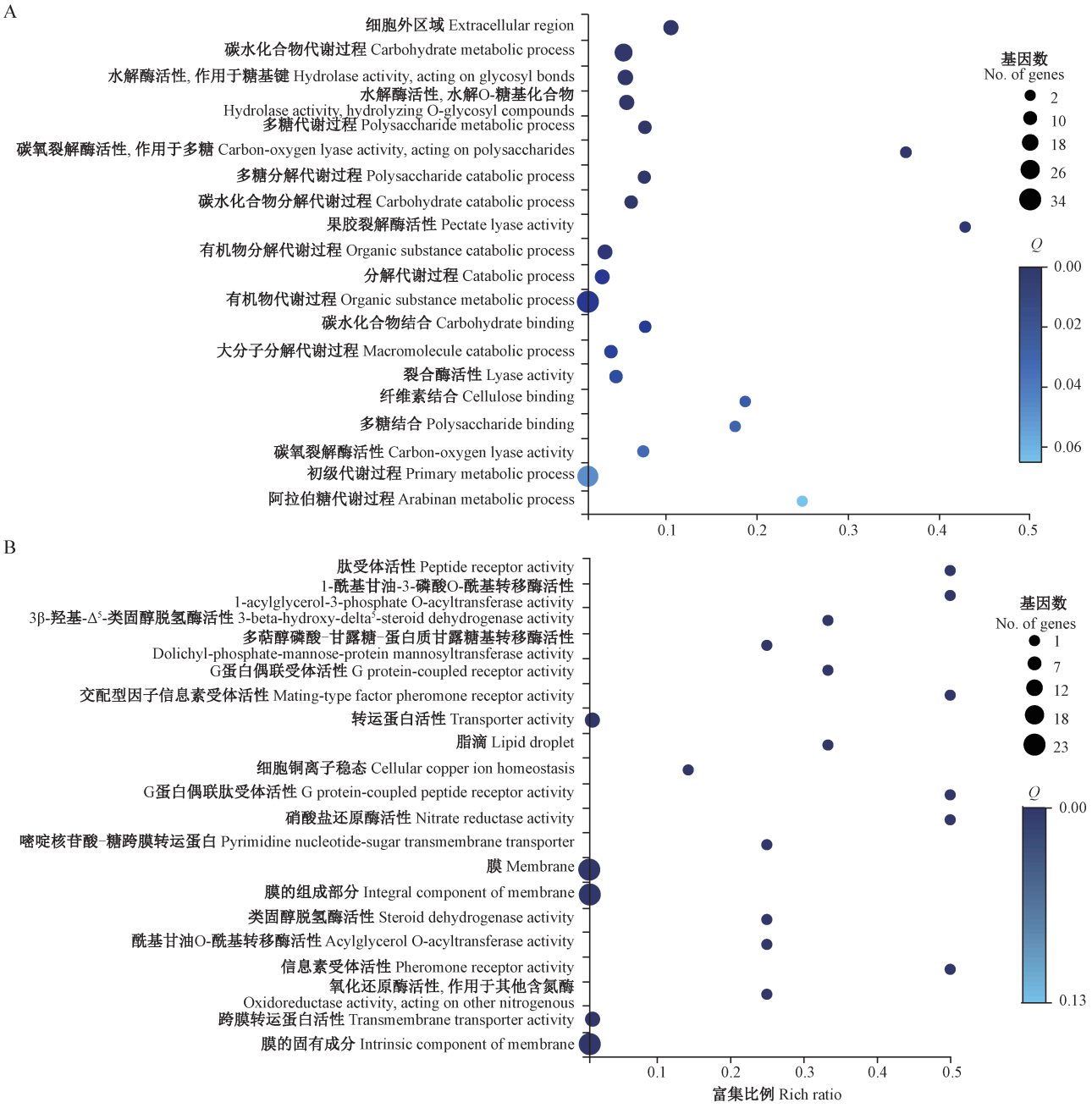


图6　链格孢菌橘致病型侵染红橘（A）和纽荷尔脐橙（B）24 h和48 h样品间的特异性差异表达基因GO功能富集分析

Fig. 6　GO functional enrichment analysis of specific differentially expressed genes between Hongju (A) and Newhall navel orange (B) samples infected by different races of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* at 24 h and 48 h of infection

以*Q*值最小的前20个GO分类作图。The bubble map was plotted with the top 20 GO terms with the smallest *Q* value.

3　讨论

本研究结果显示，在链格孢菌橘致病型侵染柑橘感病品种红橘0~12 h阶段，其特异性差异表达基因富集主要涉及能量代谢、氨基酸合成和质子运输方面，结合聚类分析获得的显著上调差异表达基因和前人的研究结果发现，一些基因在致病真菌中参与糖代谢（Van Schaftingen & Gerin，2002）、染色体分离（Chardon et al.，2022）、能量代谢与蛋白降解（Yedidi et al.，2017）以及磷吸收等过程。在禾谷镰

刀菌 *Fusarium graminearum* 中，Ptr2 肽转运蛋白影响该菌次生代谢物的产生和性发育，而且该蛋白通过调控氮循环参与信号传导过程（Droce et al.，2017）；白色念珠菌 *Candida albicans* 的 Ptr2 肽转运蛋白也具有类似功能（Dunkel et al.，2013）；在裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中，*Prp4* 基因参与 pre-mRNA 剪接和细胞周期过程（Gross et al.，1997）；还有研究发现类枯草杆菌蛋白酶参与蛋白质加工和激活，而且在多种致病性真菌中还参与病原菌黏附和入侵过程，帮助病原菌破坏寄主组织（Hutton，1990；党晓群，2012）；在少孢节丛孢菌 *Arthrobotrys oligospora* 中，Cupin 样蛋白家族基因 *277* 在真菌分生孢子、捕食性陷阱形成和捕获线虫过程中发挥着重要作用（Chen et al.，2020）。本研究结果表明，在链格孢菌橘致病型侵染红橘初期，上述蛋白或酶的编码基因表达量显著上调表达，推测该菌在侵染感病品种后，通过分泌效应蛋白促进侵染菌丝的生长和分化，分泌毒素使被侵染部位细胞的电解质流失，同时增强营养摄取以达到主动侵染寄主的目的。在此过程中，正向调控自噬过程的相关基因的表达量显著下调，也可以进一步验证上述推测。

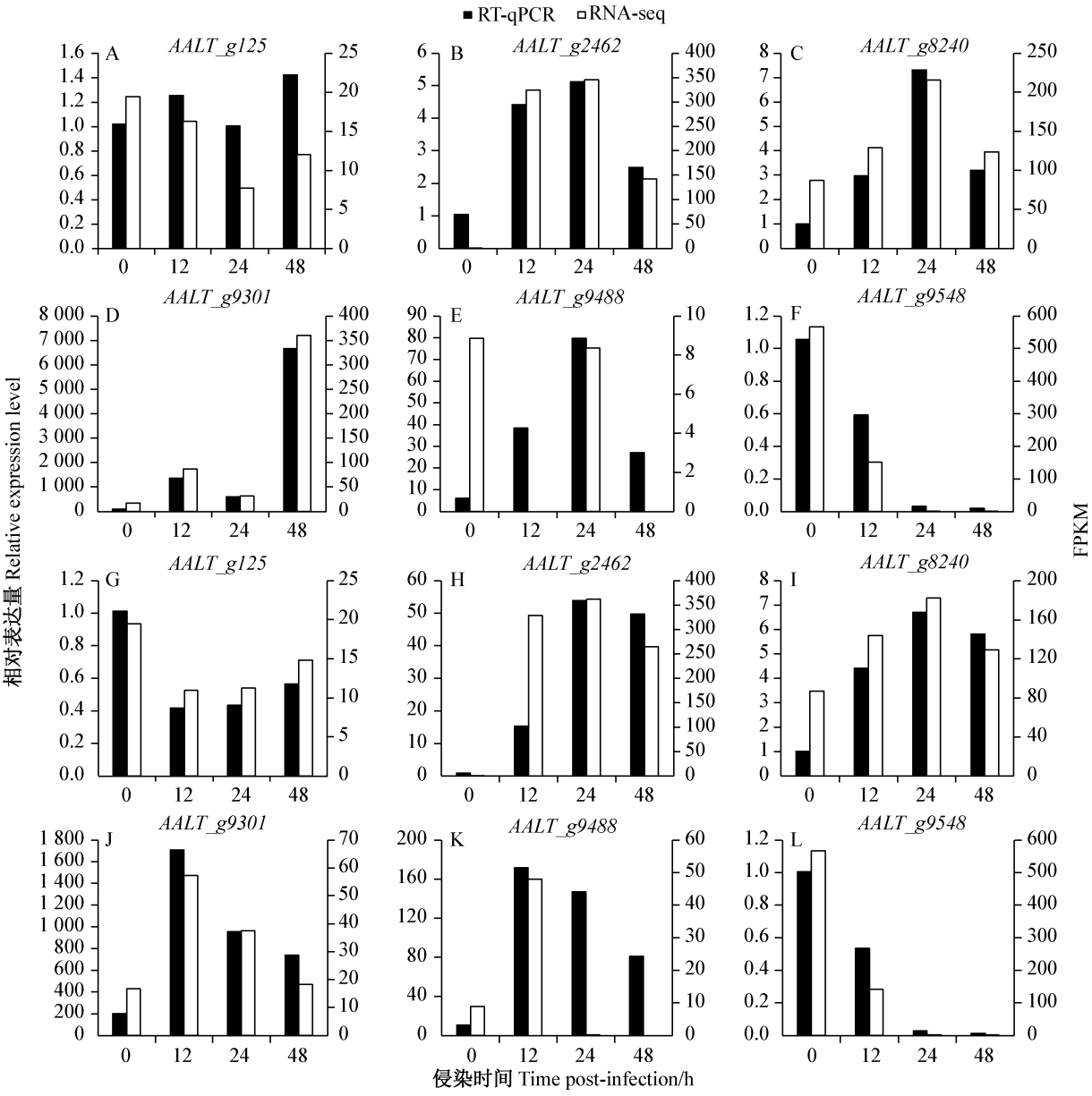


图7 红橘（A~F）和纽荷尔脐橙（G~L）叶片中差异表达基因的转录组测序结果与 RT-qPCR 检测结果比较

Fig. 7 Transcriptome sequencing results of differentially expressed genes in Hongju (A−F) and Newhall navel orange (G−L) leaves were compared with RT-qPCR results

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘感病品种红橘12~24 h阶段，其特异性差异表达基因富集主要涉及氨基酸代谢、能量供应以及辅因子合成方面，结合聚类分析获得的显著下调差异表达基因和前人的研究结果发现，MO25作为一种激酶支架蛋白，在动物、酵母和丝状真菌MST（mammalian sterile 20-like kinase）途径、细胞增殖以及极性信号通路中具有重要作用（Maerz & Seiler，2010；Ta et al.，2023）；在酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*中，*AAR2*参与*ACT*基因和对细胞生长至关重要的基因的pre-mRNA剪接过程（Nakazawa et al.，1991）；USP14作为一种自噬底物，通过去泛素化调控蛋白酶体降解途径，影响细胞周期进程（Sharma et al.，2019）。在链格孢菌橘致病型侵染红橘中期，上述基因表达量显著下降，推测在侵染中期该菌削弱了自身蛋白酶体的修复功能，继续减少自身自噬消耗、维持营养摄取以及效应蛋白和毒素的分泌，从而使自身获得更高的侵染效率，并增强其在寄主体内的适应性。所以在链格孢菌橘致病型侵染红橘24 h后，该菌成功入侵寄主并定殖。

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘感病品种红橘24~48 h阶段，其特异性差异表达基因富集主要涉及微生物的果胶降解通路，结合聚类分析获得的差异表达基因和前人的研究结果发现，组氨酸激酶参与白色念珠菌毒力因子和细胞壁的生物合成，并调控其菌丝发育和应激响应过程（Klippel et al.，2010）；在曲霉*Aspergillus oryzae*中，*Rxt3*能促进该菌菌丝生长、分生孢子形成和淀粉酶合成，并减少曲酸的产生（Chang et al.，2024）；*Hsp70*基因通过调控分子伴侣蛋白的表达，在维持蛋白质稳态中发挥着重要作用（Fernández-Fernández & Valpuesta，2018）；上述基因与参与寄主组织降解与入侵的糖苷水解酶基因和肌动蛋白ATP酶基因、参与真菌性发育的C6锌指蛋白基因（Masloff et al.，2002）、参与降解寄主防御性醇类化合物积累的醇脱氢酶转录子基因、维持自身pH稳态的Na^+/H^+逆向转运蛋白基因、参与pre-rRNA早期成熟的*RNA12*基因（Liang et al.，1992）、参与碳链延伸和中链脂肪酸生物合成的CoA转移酶基因（Yang et al.，2021）以及参与物质转运的ABC转运蛋白基因的表达量显著上调，而促进甘氨酸降解的GCS T蛋白基因（Ren et al.，2022）的表达量下调，推测在链格孢菌橘致病型侵染红橘后期，该菌继续维持营养转运、菌丝发育和毒素分泌，同时通过果胶降解通路强化自身侵染能力，并通过下调甘氨酸降解与曲酸合成基因，减少非必需代谢消耗，以实现高效寄生。所以在链格孢菌橘致病型侵染红橘48 h后，该菌已适应寄主环境，菌丝生长和产孢均未受到抑制，而寄主植物对病原菌入侵的防御也在逐渐瓦解，至此链格孢菌橘致病型完成对红橘离体叶片的侵染定殖。

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗病品种纽荷尔脐橙0~12 h阶段，其特异性差异表达基因富集主要涉及细胞壁合成与修饰、酶活调控和应激响应方面，结合聚类分析获得的显著上/下调差异表达基因和前人的研究结果发现，在低等真核生物中，含WD40重复序列的蛋白质主要参与生长、细胞周期、发育和毒力等过程，而在高等生物中参与多种细胞功能，如信号转导、细胞周期调控、细胞内运输、染色质重塑、细胞骨架组织、细胞凋亡、发育、转录调控和免疫应答等（Jain & Pandey，2018）；在白色念珠菌中，*Edc3*基因中YjeF结构域的缺失会导致该菌菌丝生长受到抑制，但也能增强其对氧化应激的抵抗能力（Kim & Kim，2015）；在微生物中，胆碱硫酸酶具有C、N和S储存库和渗透保护剂双重作用（Cregut et al.，2014）。所以在链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙初期，参与能量代谢与物质转运、生长发育与毒素分泌、信号转导与跨膜运输等过程的基因表达量显著上调，参与硫代谢和抗氧化应激过程的基因表达量显著下调，推测该菌在主动入侵过程中，寄主的防御成功干扰了该菌的防御系统，导致其保护、氧化胁迫响应以及酶活调控等功能受到抑制，从而限制了该菌的侵染能力，致使其侵染效率降低。

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗病品种纽荷尔脐橙12~24 h阶段，其特异性差异表达基因富集程度较低，相关功能条目未达到显著富集水平（富集比例>0.4），但结合聚类分析获得的差异表达基因和前人的研究结果发现，参与寄主组织降解与入侵的糖苷水解酶基因、参与麦芽糖代谢的麦芽渗透酶基因*MAL61*（Zhang et al.，2015）、参与能量代谢和氧化还原平衡的二氢硫辛酰脱氢酶基因（Vaubel et al.，2011）、以及糖转化磷酸戊糖途径非氧化分支中的关键限速酶基因转酮醇酶基因（Kochetov & Solovjeva，2014）的表达量显著上调，且该过程中无表达量显著下调的差异表达基因，表明在链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙中期，该菌呼吸作用增强，能量代谢增加，促进病原菌致病侵染相关基因的表达量显著上调，推测此时病原菌处于维持自身生存并全力破解寄主防御的阶段，二者的部分生长发育

及代谢活动均受到影响，病原菌仍未能成功入侵宿主。

在链格孢菌橘致病型侵染柑橘抗病品种纽荷尔脐橙24~48 h阶段，其特异性差异表达基因富集主要涉及毒素合成、氮源代谢和环境信号感知方面，结合聚类分析获得的显著差异表达基因和前人的研究结果发现，参与多胺亚精胺和精胺合成的鸟氨酸脱羧酶基因（Pegg，2006）、参与催化氧化还原或非氧化还原反应的NAD（P）结合蛋白基因（Hua et al.，2014）、维持生物膜结构和多胺稳态以及参与毒力调控的MFS通用底物转运蛋白基因（Redhu et al.，2016）、参与活性氧生成等免疫调节过程的Rho家族基因（Mosaddeghzadeh & Ahmadian，2021）、参与催化氨酰基tRNA与核糖体结合的线粒体伸长因子基因（Rosenthal & Bodley，1987）的表达量显著上调，且该过程中无表达量显著下调的差异表达基因，表明在链格孢菌橘致病型侵染纽荷尔脐橙后期，该菌通过上调多胺合成、氧化还原调控和毒力调控相关基因的表达量进一步激活致病网络，但纽荷尔脐橙离体叶片接种后48 h时病斑并未沿叶脉扩散且颜色较浅，推测此时病原菌和寄主仍处于对峙状态，离体叶片上出现病斑可能是试验过程中叶片太潮湿导致病原菌周围组织局部腐烂，而且田间也不会出现大量菌丝堆积这样的侵染压力。

综上，相较于相邻侵染时期，该菌侵染红橘和纽荷尔脐橙所得到的特异性差异表达基因的数量均呈现下降趋势，且相同侵染时期，侵染不同品种所得到的特异性差异表达基因的重合率也越来越低，结合特异性差异表达基因功能分析和聚类分析发现，该菌侵染红橘和纽荷尔脐橙时所激活的生物学反应和代谢途径不同。将链格孢菌橘致病型接种于红橘离体叶片后，其通过协同调控毒力、代谢及生长发育等过程主动侵染寄主，抑制寄主防御反应，实现在寄主体内的定殖；将链格孢菌橘致病型接种于纽荷尔脐橙离体叶片后，病原菌与寄主的防御系统一直呈现博弈状态，该菌也因寄主持续的防御干扰导致其一直未能完全瓦解寄主抗性，未能成功定殖。

参 考 文 献（References）

Canihos Y, Peever TL, Timmer LW. 1999. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. Plant Disease, 83(5): 429−433

Chang CF, Wang HR, Liu YL, Xie YT, Xue DX, Zhang F. 2024. A key component Rxt3 in the Rpd3L histone deacetylase complex regulates development, stress tolerance, amylase production and kojic acid synthesis in *Aspergillus oryzae*. Biotechnology Letters, 46(6): 1121−1131

Chardon F, Japaridze A, Witt H, Velikovsky L, Chakraborty C, Wilhelm T, Dumont M, Yang W, Kikuti C, Gangnard S, et al. 2022. CENP-B-mediated DNA loops regulate activity and stability of human centromeres. Molecular Cell, 82(9): 1751−1767

Chen YH, Liu X, Dai R, Ou X, Xu ZF, Zhang KQ, Niu XM. 2020. Novel polyketide-terpenoid hybrid metabolites and increased fungal nematocidal ability by disruption of genes *277* and *279* in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(30): 7870−7879

Cregut M, Durand MJ, Thouand G. 2014. The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms. Microbial Ecology, 67(2): 350−357

Dang XQ. 2012. Studies on functional genome of *Nosema bombycis*: functional analysis of the subtilisin-like protease 1 from *Nosema bombycis*. PhD thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [党晓群. 2012. 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)功能基因组研究: 家蚕微孢子虫类枯草杆菌蛋白酶NbSLP1的功能分析. 博士学位论文. 重庆: 西南大学]

Droce A, Sørensen JL, Sondergaard TE, Rasmussen JJ, Lysøe E, Giese H. 2017. PTR2 peptide transporters in *Fusarium graminearum* influence secondary metabolite production and sexual development. Fungal Biology, 121(5): 515−527

Dunkel N, Hertlein T, Franz R, Reuß O, Sasse C, Schäfer T, Ohlsen K, Morschhäuser J. 2013. Roles of different peptide transporters in nutrient acquisition in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 12(4): 520−528

Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. 2018. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. F1000Research, 7: F1000 Faculty Rev−1497

Gai YP. 2018. Two tales of *Alternaria alternata*: comparative genomics and function of bZIP transcription factor. PhD thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [盖云鹏. 2018. 链格孢菌比较基因组及bZIP转录因子功能研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]

Gross T, Lützelberger M, Weigmann H, Klingenhoff A, Shenoy S, Käufer NF. 1997. Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. Nucleic Acids Research, 25(5): 1028−1035

Hua YH, Wu CY, Sargsyan K, Lim C. 2014. Sequence-motif detection of NAD (P)-binding proteins: discovery of a unique antibacterial drug target. Scientific Reports, 4: 6471

Hutton JC. 1990. Subtilisin-like proteinases involved in the activation of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. Current Opinion in Cell Biology, 2(6): 1131−1142

Jain BP, Pandey S. 2018. WD40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions. Protein Journal, 37(5): 391−406

Kim EC, Kim J. 2015. Deletion analysis of LSm, FDF, and YjeF domains of *Candida albicans* Edc3 in hyphal growth and

oxidative-stress response. Journal of Microbiology, 53(2): 111−115

Klippel N, Cui SN, Groebe L, Bilitewski U. 2010. Deletion of the *Candida albicans* histidine kinase gene *CHK1* improves recognition by phagocytes through an increased exposure of cell wall β-1, 3-glucans. Microbiology, 156(11): 3432−3444

Kochetov GA, Solovjeva ON. 2014. Structure and functioning mechanism of transketolase. Biochimica et Biophysica Acta, 1844(9): 1608−1618

Liang S, Alksne L, Warner JR, Lacroute F. 1992. *rna12*$^{+}$, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in pre-rRNA maturation: characterization of a temperature-sensitive mutant, cloning and sequencing of the gene. Molecular and General Genetics, 232(2): 304−312

Li Y, Lü JR, Zhu L, Lu GD, Wang ZH, Liu GK. 2019. Isolation, identification and phylogenetic analysis of citrus brown spot pathogens in Fujian Province. Journal of Plant Protection, 46(6): 1243−1251 (in Chinese) [李亚, 吕佳芮, 朱玲, 鲁国东, 王宗华, 刘国坤. 2019. 福建省柑橘褐斑病菌的分离、鉴定和系统进化分析. 植物保护学报, 46(6): 1243−1251]

Ma H, Ma HJ, Jiao C, Li HY. 2023. Differential transcriptome analysis of different resistant citrus varieties infected with wild-type and toxin synthesis-impaired strains causing *Alternaria* brown spot. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 49(6): 787−801, 812 (in Chinese) [马慧, 马海杰, 焦晨, 李红叶. 2023. 不同抗性柑橘对野生型和柑橘链格孢毒素合成受阻褐斑病菌侵染的转录响应差异. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 49(6): 787−801, 812]

Maerz S, Seiler S. 2010. Tales of RAM and MOR: NDR kinase signaling in fungal morphogenesis. Current Opinion in Microbiology, 13(6): 663−671

Masloff S, Jacobsen S, Pöggeler S, Kück U. 2002. Functional analysis of the C_6 zinc finger gene *pro1* involved in fungal sexual development. Fungal Genetics and Biology, 36(2): 107−116

Mosaddeghzadeh N, Ahmadian MR. 2021. The RHO family GTPases: mechanisms of regulation and signaling. Cells, 10(7): 1831

Nakazawa N, Harashima S, Oshima Y. 1991. *AAR2* a gene for splicing pre-mRNA of the MATa1 cistron in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 11(11): 5693−5700

Peever TL, Ibañez A, Akimitsu K, Timmer LW. 2002. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathology, 92(7): 794−802

Pegg AE. 2006. Regulation of ornithine decarboxylase. Journal of Biological Chemistry, 281(21): 14529−14532

Redhu AK, Shah AH, Prasad R. 2016. MFS transporters of *Candida* species and their role in clinical drug resistance. FEMS Yeast Research, 16(4): fow043

Ren J, Wang W, Nie JL, Yuan WQ, Zeng AP. 2022. Understanding and engineering glycine cleavage system and related metabolic pathways for C1-based biosynthesis. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 180: 273−298

Rosenthal LP, Bodley JW. 1987. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial elongation factor Tu. Journal of Biological Chemistry, 262(23): 10955−10959

Sharma A, Alswillah T, Kapoor I, Debjani P, Willard B, Summers MK, Gong ZH, Almasan A. 2020. USP14 is a deubiquitinase for Ku70 and critical determinant of non-homologous end joining repair in autophagy and PTEN-deficient cells. Nucleic Acids Research, 48(2): 736−747

Ta KN, Yoshida MW, Tezuka T, Shimizu-Sato S, Nosaka-Takahashi M, Toyoda A, Suzuki T, Goshima G, Sato Y. 2023. Control of plant cell growth and proliferation by MO25A, a conserved major component of the mammalian sterile 20-like kinase pathway. Plant & Cell Physiology, 64(3): 336−351

Tang KZ. 2020. Studies on the function of *AaMR1* and *AaSNF1* genes of *Alternaria alternata* tangerine pathotype. PhD thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [唐科志. 2020. 柑橘褐斑病菌*AaMR1*和*AaSNF1*基因功能研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学]

Van Schaftingen E, Gerin I. 2002. The glucose-6-phosphatase system. Biochemical Journal, 362(3): 513−532

Vaubel RA, Rustin P, Isaya G. 2011. Mutations in the dimer interface of dihydrolipoamide dehydrogenase promote site-specific oxidative damages in yeast and human cells. Journal of Biological Chemistry, 286(46): 40232−40245

Vicent A, Armengol J, Sales R, García-Jiménez J, Alfaro-Lassala F. 2000. First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. Plant Disease, 84(9): 1044

Wang MS, Sun XP, Yu DL, Xu JP, Chung K, Li HY. 2016. Genomic and transcriptomic analyses of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* in response to oxidative stress. Scientific Reports, 6: 32437

Yang QZM, Guo ST, Lu Q, Tao Y, Zheng DC, Zhou QM, Liu J. 2021. Butyryl/caproyl-CoA:acetate CoA-transferase: cloning, expression and characterization of the key enzyme involved in medium-chain fatty acid biosynthesis. Bioscience Reports, 41(8): BSR20211135

Yang SN, Cheng L, Tan YX, Zhu YS, Jiang D. 2023. Genome wide association study for resistance to citrus brown spot disease. Scientia Agricultura Sinica, 56(18): 3642−3654 (in Chinese) [杨胜男, 程莉, 谈月霞, 朱延松, 江东. 2023. 宽皮柑橘褐斑病抗性的全基因组关联分析. 中国农业科学, 56(18): 3642−3654]

Yedidi RS, Wendler P, Enenkel C. 2017. AAA-ATPases in protein degradation. Frontiers in Molecular Biosciences, 4: 42

Zhang CY, Lin X, Song HY, Xiao DG. 2015. Effects of MAL61 and MAL62 overexpression on maltose fermentation of baker's yeast in lean dough. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(8): 1241−1249

（责任编辑：李美娟）