

MicroRNA 转录后调控欧美杨 *R2R3-MYBs* 抗锈菌表达

李丹蕾, 张瑞芝, 王峰*, 陈俏丽, 牛春阳, 零雅茗, 郝昕

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 强致病锈菌亲和型树种欧美杨适合做寄主感病分子机理研究。研究表明转录因子及其调控 miRNA 在杨树抗/感病过程中起重要的信号传导和调控作用, 决定杨树与锈菌的亲合性。为深入研究杨树感病性, 对欧美杨 *R2R3-MYB* 转录因子及其调控 miRNA 进行研究。[方法] 构建锈菌侵染和未侵染 miRNA 组、降解组文库和基因表达谱文库, 进行高通量测序。对基因表达谱结果进行生物信息学分析鉴定 *R2R3-MYBs*, 根据 miRNA 组和降解组数据确定 *R2R3-MYBs* 调控 miRNA。应用定量 PCR 技术鉴定候选 *R2R3-MYBs* 和其调控 miRNA 的表达量。[结果] 共鉴定到 230 个欧美杨 *R2R3-MYBs*, 其中 55 个 *R2R3-MYBs* 在锈菌侵染和未侵染叶片间表达量差异显著, 其余表达量变化不显著。基于降解组, 共鉴定到由 22 个 miRNA 调控 18 个 *R2R3-MYBs* 的 86 个转录后调控关系。定量 PCR 结果表明 PC-3p-2521022_1 与 *PndMYB173* 存在转录后负调控关系。预测的 *R2R3-MYB* 靶基因涉及水杨酸、茉莉酸、乙烯和脱落酸等多个植物激素抗性路径。[结论] E4 强致病锈菌侵染导致亲和型树种欧美杨 23.9% 的 *R2R3-MYBs* 表达量发生变化, 锈菌侵染不但可以影响 *R2R3-MYBs* 的表达量, 还可以启动或关闭 *R2R3-MYBs* 的表达。欧美杨在 E4 强致病锈菌胁迫条件下, *R2R3-MYBs* 转录后主要受 miR159 和 miR858 家族的 miRNA 调控。

关键词: MicroRNA; *R2R3-MYB*; 欧美杨; 落叶松-杨栅锈菌; 亲和型

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)02-0254-06

MicroRNA-regulated Compatible Poplar *R2R3-MYB* Gene Expression Following the Infection of Virulent *Melampsora larici-populina*

LI Dan-lei, ZHANG Rui-zhi, WANG Feng, CHEN Qiao-li, NIU Chun-yang, LING Ya-ming, HAO Xin

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] The poplar 'Robusta', susceptible to virulent rust E4 *Melampsora larici-populina*, provides suitable host material for the study of the plant host resistance/susceptibility to pathogen. Previously study indicates that the transcription factor (TF) plays an important role in determining the poplar susceptibility. In this study, the authors tried to determine the *R2R3-MYB* TF genes driving basal disease resistance and focus on microRNAs (miRNAs) regulation. [Method] Two small RNA (sRNA) libraries, a degradome cDNA library and 2 digital gene expression libraries were constructed for rust-inoculated (Rust+) and rust-free (Rust-) susceptible poplar 'Robusta' leaves through high-throughput sequencing. The expression of selected miRNA and target *R2R3-MYBs* were identified by RTq-PCR. [Result] Altogether, 230 *R2R3-MYBs* were identified. Among those *R2R3-MYBs*, the expression of 55 genes were suppressed/promoted following the drive straight of the rust, the others were unchanged.

收稿日期: 2016-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500524)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572015EY02, 2572015CA09, 2572016CA04)。

作者简介: 李丹蕾, 博士, 副教授。主要研究方向: 森林保护学和菌物学。电话: 0451-82190232 E-mail: danleili@nefu.edu.cn 地址: 哈尔滨 150040 东北林业大学 林学院。

* 通讯作者: 王峰, 博士, 讲师。主要研究方向: 植物病原线虫学和菌物学。电话: 0451-82190232 E-mail: kingsummit@sina.com 地址: 哈尔滨 150040 东北林业大学 林学院。

Based on the miRNA and degradome sequencing, 86 regulating interactions (22 miRNA to 18 *R2R3-MYB*) were identified. RTq-PCR of selected PC-3p-2521022_1 and *PndMYB173* showed a negative post-transcriptional regulation. The *R2R3-MYBs* target genes predication indicated *R2R3-MYBs* related to many resistance and phytohormone pathways, such as response to salicylic acid stimulus, response to stress, response to jasmonic acid stimulus and response to abscisic acid stimulus. [**Conclusion**] The infection of virulent rust changed the expression of 23.9% *R2R3-MYBs*. The differential expression of *R2R3-MYBs* indicated that the rust fungi infection could not only switch on but also switch off *R2R3-MYB* TF genes. Under the stress of rust infection, the post-transcriptional regulation of *R2R3-MYBs* was regulated by the families of miR159 and miR858.

Keywords: microRNA; *R2R3-MYB*; *Populus × euramericana*; *Melampsora larici-populina*; compatible interaction

MicroRNAs (miRNA) 是一类由 20 ~ 22 个核苷酸构成的非编码小 RNA, 可通过结合靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 使其降解或者阻碍其转录, 从而在转录后水平控制基因表达^[1]。作为基因表达负调控子, miRNA 主要在转录后水平调节植物基因表达^[2], 在植物新陈代谢、组织生长、器官发育分化以及细胞程序性凋亡中起重要作用^[3-4]。此外, miRNA 在植物感受逆境胁迫而做出适应性调整的过程中发挥着重要的作用。特别是在病原侵染过程中, miRNA 能够调控植物抗病途径中的关键靶基因来决定病原与寄主的亲和关系 (compatible/incompatible interaction)。

MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 是一类在其 N 端含有 MYB 结构域的转录因子 (transcription factor, TF)^[5]。MYB 是植物中最大的一类转录因子家族, 涉及水杨酸 (salicylic acid, SA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 及茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 等植物抗病信号传导通路。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) MYB30 编码通过调控超长链 (very-long-chain) 脂肪酸的合成应答病原入侵^[6]。MYB44 经由 WRKY70 激活 SA 介导的防卫反应, 抑制 JA 介导的防卫反应, 通过拮抗调节方式调控拟南芥对生物胁迫应答^[7]。水稻 *OslTR1* 编码 MYB 转录因子调控 JA 防御反应^[8]。根据蛋白含有结构域的数量, MYB 转录因子分为 4 种类型, 其中 R2R3-MYB 转录因子参与植物响应生物和非生物胁迫等过程^[9]。目前发现的植物 MYB 在非生物胁迫表达过程主要受 miR159、miR828、miR172 和 miR319 等家族的 miRNA 调控。例如拟南芥 ABA 刺激促进 miR159 积累, miR159 过表达则抑制 MYB101 和 MYB33 转录^[10]。

对落叶松 - 杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina*) E4 生理小种侵染欧美杨 (*Populus × euramericana*) 研究过程中^[11], 我们发现欧美杨抗病相关基因

的表达并未发生预想的显著上调。以 *NBS-LRR* 基因为例, E4 生理小种侵染后仅 8 个 *TIR-NBS-LRR* 表达上调, 另有 11 个 *TIR-NBS-LRR* 和 3 个 *CC-NBS-LRR* 基因表达下调, 其余 21 个 *NBS-LRR* 基因在 E4 生理小种侵染后表达量未发生显著变化。但, 与抗病相关的 NAC、WRKY 和 MYB 等转录因子基因表达量却发生显著变化。大量研究表明 miRNA 参与植物生长发育和胁迫应答中的各个方面, 可以在不同层面对靶基因进行调控, 是基因表达精细调控必不可少的重要手段, 处于复杂调控网络中的关键位置。关于木本植物 miRNA 在病原菌胁迫中的调控机制的研究相对较少, 特别是“杨树 - 锈菌”体系的 miRNA 调控机制研究仍处于探索阶段^[11, 12]。为揭示欧美杨对 E4 锈菌感病的分子调控机理, 本研究通过 miRNA 组、降解组 (degradome) 和基因表达谱 (digital gene expression profiling, DGE) 等高通量测序技术对锈菌侵染前后欧美杨 *R2R3-MYB* 基因及其调控 miRNA 进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料与锈菌接种

锈菌接种组 (Rust +): E4 强致病性落叶松 - 杨栅锈菌 (东北林业大学森林病理学标本室保存) 孢子悬浮液 (ddH₂O, 含 0.004% Tween 20) 接种欧美杨叶间隔期指数 (leaf plastochrony index, LPI) 为 5 ~ 9 的完全展开的叶片; 对照组 (Rust -): ddH₂O (含 0.004% Tween 20) 处理欧美杨叶片^[13], 分别进行 3 个生物重复。接种量控制在 0.01 mL · cm⁻² 孢子悬浮液。孢子悬浮液对水琼脂培养基喷雾, 显微镜下计数, 计算接种密度 $\rho = 60$ 个孢子 · cm⁻²。Rust + 和 Rust - 叶片同置于 16°C, 相对湿度 60%, 16 h 光照 · 日⁻¹ (80 uEm⁻² s⁻¹) 培养。分别在时间点 2 hpi (hours post inoculation)、6 hpi、12 hpi、24 hpi、48 hpi、96 hpi 及 168 hpi 分别收集 Rust + 和 Rust - 叶片等

量混合 CTAB 法提取各自处理组总 RNA。

1.2 组构建及测序

根据 Illumina Small RNA 制备试剂盒说明书 (Illumina's TruSeq Small RNA Sample Preparation Guide 1) 构建 Rust + 和 Rust - miRNA 组。构建 Rust + 降解组 cDNA 文库。根据 Illumina/Solexa 标准步骤 (directional mRNASeq sample preparation part # 15018460 Rev. A, October 2010. Illumina, San Diego, CA, USA) 构建 Rust + 和 Rust - DGE 文库。构建好的 miRNA 组、降解组 cDNA 文库和 DGE 文库送联川生物 (LC Bio: <http://www.lc-bio.com/>) 进行测序并应用 Illumina's Sequencing Control Studio software version 2.8 (SCS v2.8)、Illumina's Real-Time Analysis version 1.8.70 (RTA v1.8.70)、Illumina's Pipeline version 1.5 和 ACGT101-miR version 4.2 (LC Sciences, Houston, TX, USA) 等完成数据均一化^[14]和基础数据处理。

1.3 生物信息学分析

筛选毛果杨 (*P. trichocarpa*) 和拟南芥基因组中的 *R2R3-MYBs*, 构建本地数据库, 以 DGE 测序结果结合本实验室欧美杨转录组数据进行 BLASTP 比对 (E 值 $< 1e - 10$) 筛选欧美杨 *R2R3 - MYBs*。根据 DGE 测序结果确定锈菌接种前后 *R2R3-MYBs* 表达量变化, $\log_2(\text{rust +}/\text{rust -}) \geq 1$ 定义为表达量上调, $\log_2(\text{rust +}/\text{rust -}) \leq -1$ 定义为表达量下调, $-1 < \log_2(\text{rust +}/\text{rust -}) < 1$ 定义为表达量未发生显著变化。根据伪发现率 (false discovery rate, FDR) 控制差异表达基因^[14]。根据 miRNA 组和降解组鉴定 miRNA 与其靶向 *R2R3-MYBs* 的调控关系。根据 *R2R3-MYBs* 结合域 (binding motifs) 筛选毛果杨基因组潜在的靶基因, 并依据 STRING (<http://string-db.org/>) 收录的拟南芥同源基因预测 *R2R3-MYBs* 与靶基因的互做关系。对靶基因进行 GO (gene ontology) 富集分析 (<http://geneontology.org/>)。

1.4 荧光定量 PCR

分别以 7 个时间点 Rust + 和 Rust - 第一链 cDNA 为模板, 应用 GoTaq 2-Step RT-qPCR System 试剂盒在 Bio-Rad iCycler iQTM5 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。根据测序结果合成 PC-3p-2521022_1 引物 (mi-F: 5'-GTG TCG TGC GGC ACT GAA-3', mi-R: 5'-GAT AAT TGG GCT CCG T-3') 和 PndMYB173 引物 (MYB173-F: 5'-GAA GAC GAG GCG TTA CAG AG-3', MYB173-R: 5'-GGC CCT GAT GAT TGT GTC AT-3')。选用毛果杨 18sRNA 基因 (18S-F: 5'-CGA AGA

CGA TCA GAT ACC GTC CTA-3', 18S-R: 5'-TTT CTC ATA AGG TGC TGG CGG AGT-3') 作为内参基因 (positive internal control)^[15-16]。使用 2 步法 PCR 进行 40 个循环并测定融解曲线。相对定量法计算 3 次重复试验初始模板量 $\log_2(\text{rust +}/\text{rust -})$ 比值, 两配对样本 t 检验差各时间点间异显著性。

2 结果与分析

2.1 锈菌接种及症状观察

欧美杨被 E4 强致病性锈菌侵染至 7 dpi 时叶组织坏死, 无过敏反应 (hypersensitive response, HR) 症状产生, 且已产生大量夏孢子堆 (图 1 Rust +), ddH₂O 对照处理组无明显变化 (图 1 Rust -)。Rust + 组叶片在 2 hpi ~ 1 dpi 未表现明显症状, 2 dpi 叶片局部出现细小褪绿斑点, 4 dpi 叶片可见明显黄色斑点, 7 dpi 病斑面积扩大, 锈菌完成一个生长周期开始形成夏孢子堆。发病过程中未见 HR 和细胞程序化死亡 (programmed cell death, PCD) 等抗性症状出现, 表明欧美杨为高感病树种, 与 E4 强致病性锈菌构成亲和型互做关系。

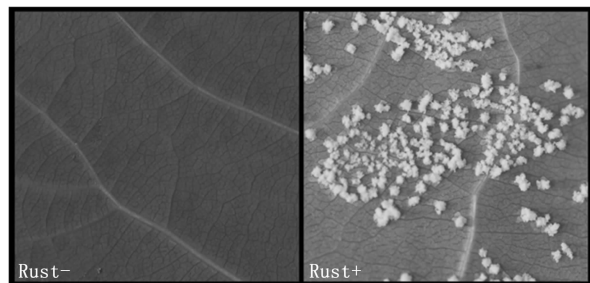


图 1 锈菌侵染后欧美杨症状

Fig. 1 *Populus x euramericana* symptoms post-inoculation of *M. larici-populina*

2.2 欧美杨 *R2R3-MYB* 基因表达量差异

DGE 测序共鉴定到欧美杨 230 个 *R2R3-MYB* 基因, 其中 $\log_2(\text{rust +}/\text{rust -})$ 表达量有差异的基因 55 个 (36 个锈菌接种后表达量上调, 19 个表达量下调), 175 个表达量未发生显著变化。与毛果杨基因组相比较, 有 36 个毛果杨 *R2R3-MYBs* 未在 DGE 测序中找到同源基因。此外, DGE 测序检测到 208 个 MYB 相关基因 (myb-like gene), 其中 21 个表达量下调, 3 个表达量上调, 其余表达量未发生显著变化。进一步分析表达发生变化的 *R2R3-MYB* 基因, 有 10 个锈菌侵染前不表达的 *R2R3-MYBs* 在锈菌侵染后表达, 另有 9 个锈菌侵染前表达的 *R2R3-MYBs* 在锈菌侵染后停止表达 (图 2)。表明, 锈菌侵染不但可以调控 *R2R3-MYBs* 的表达量, 还可以启动或关闭 *R2R3-MYBs* 的表达。

2.3 欧美杨 *R2R3-MYBs* 调控 miRNA 鉴定

综合分析 miRNA 组和降解组数据,鉴定到 18 个 *R2R3-MYBs* 与 22 个 miRNA 共组成 86 对转录后调控关系(图 3)。仅有 7 对转录后调控是单一 miRNA 对单一 *R2R3-MYB*,其余均为 1 个 miRNA 调控多个 *R2R3-MYBs* 且每个 *R2R3-MYB* 受 2 个以上(包括 2 个) miRNA 调控。调控 miRNA 主要集中在 miR159(6 个)和 miR858(5 个)2 个家族,同时检测到 PC-3p-2521022_1 和 PC-5p-301019_3(图 3 黄色标识)2 条新 miRNA。

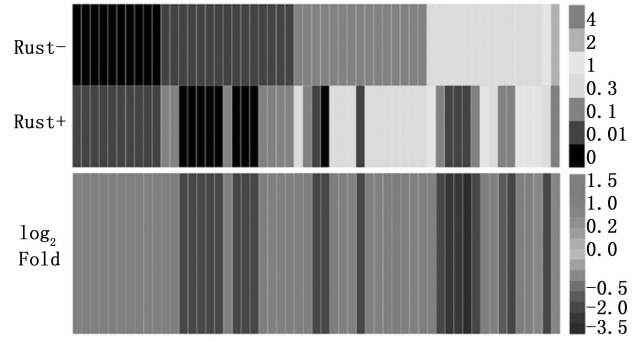


图 2 锈菌侵染前后欧美杨 *R2R3-MYBs* 表达量

Fig. 2 Expression of *Populus x euramericana R2R3 - MYBs* response to *M. larici - populina* infection

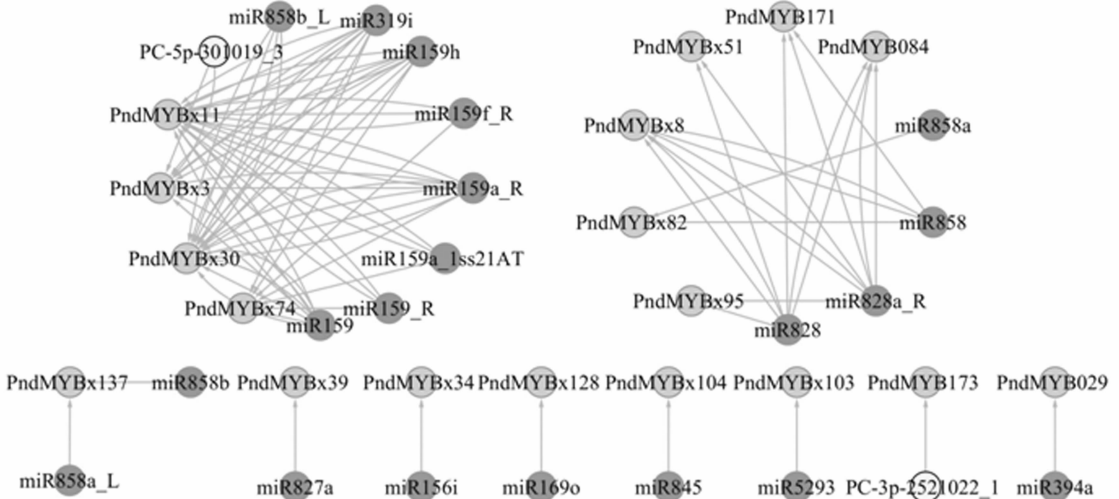


图 3 欧美杨 miRNAs 调控 *R2R3-MYBs* 网络

Fig. 3 *Populus x euramericana* regulatory networks of miRNAs to *R2R3 - MYBs*

2.4 欧美杨 *R2R3-MYB* 及其调控 miRNA 表达量验证

鉴于鉴定到的 miRNA 与 *R2R3-MYB* 转录后调控关系比较复杂,本研究暂选择一对一调控关系的新 miRNA 调控关系进行荧光定量 PCR 验证。PC-3p-2521022_1 在锈菌接种后 7 个时间点(2 hpi、6 hpi、12 hpi、24 hpi、48 hpi、96 hpi 和 168 hpi)表达量变化处于 -0.5 ~ 0.5 之间,变化幅度较小,在 12 ~ 96 hpi 出现往复式波动(图 4 柱状图)。PndMYB173 表达量变化处于 -2 ~ 3 之间,变化幅度较大,在 12 ~ 96 hpi 同样出现往复式波动,且与其调控 miRNA PC-3p-2521022_1 呈负调控关系(图 4 折线图)。两配对样本 *t* 检验结果表明有 PC-3p-2521022_1 表达量有 5 个相邻时间点差异极显著($n = 3$),PndMYB173 表达量有 4 个相邻时间点差异极显著($n = 3$)。

2.5 欧美杨差异表达 *R2R3-MYBs* 靶基因预测

根据结合域,55 个差异表达 *R2R3-MYBs* 中的 48 个成功预测到共计 336 个靶基因。依据 STRING 数据库预测 48 个差异表达 *R2R3-MYBs* 与靶基因构

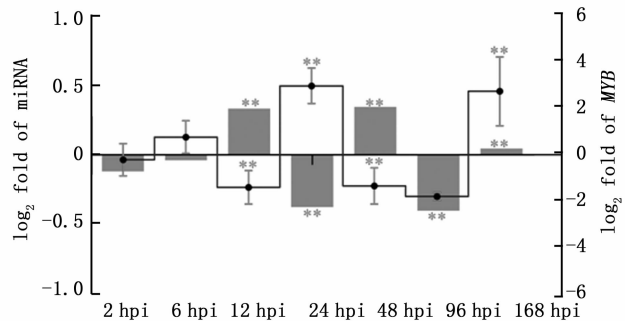


图 4 锈菌侵染欧美杨后 *R2R3-MYB* 及其调控 miRNA 表达量

Fig. 4 Expression of *Populus x euramericana R2R3 - MYBs* and miRNAs response to *M. larici - populina* infection

成 400 个互做关系(图 5)。其中 PndMYBx30 具有最多的 139 个靶基因,构成 139 个互做关系。根据亚细胞定位,这些靶基因主要定位于细胞核(nucleus)、质膜(plasma membrane)、高尔基体(golgi)、液泡(vacuole)和叶绿体(chloroplast)等细胞器。GO 富集分析表明 139 个靶基因涉及多个与免疫、植物激素相应和抗逆相关的生物过程(biological process, 表 1)。

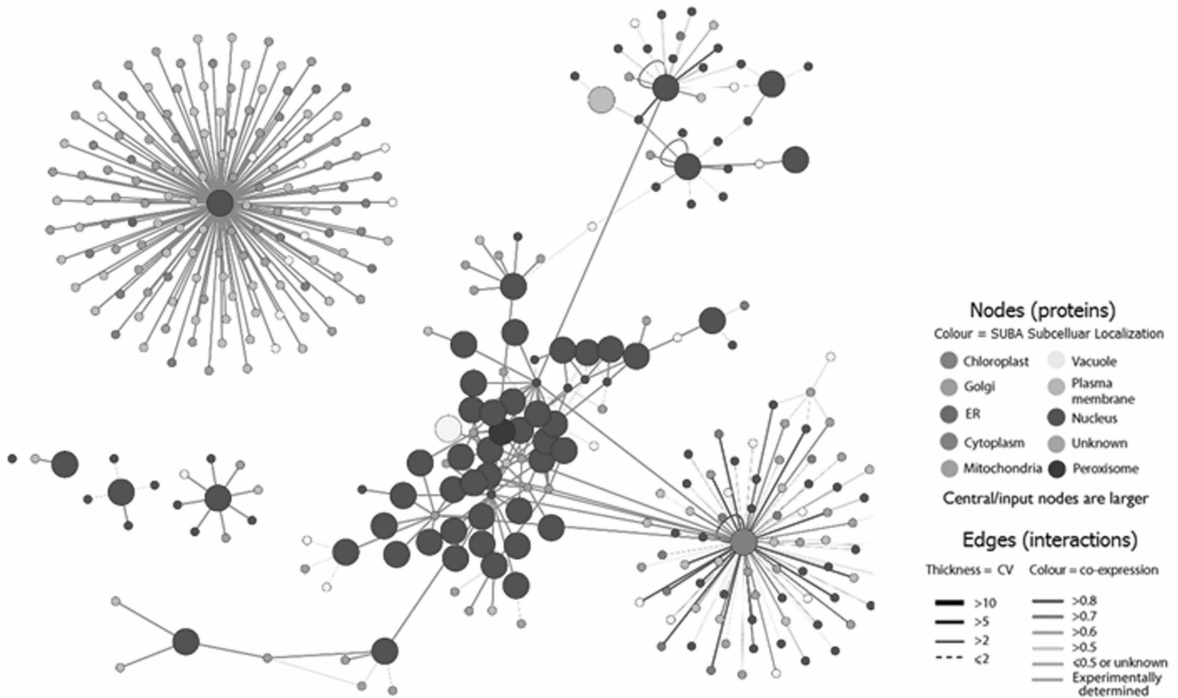
图5 欧美杨 *R2R3-MYBs* 靶基因网络Fig. 5 *Populus* × *euramericana* regulatory networks of *R2R3-MYBs* to target genes

表1 靶基因 GO 富集分析

Table 1 GO enrichment analysis of target genes

序号 No.	GO 术语 GO annotation	功能描述 Description	基因数 Gen number	<i>p</i> 值 <i>p</i> value	伪发现率 FDR
1	GO:0045087	先天免疫应答 innate immune response	5	0.00035	0.0021
2	GO:0002376	免疫系统进程 immune system process	5	0.00046	0.0027
3	GO:0006955	免疫应答 immune response	5	0.00046	0.0027
4	GO:0050896	响应刺激 response to stimulus	34	1.40E-16	1.40E-15
5	GO:0042221	响应化学刺激 response to chemical stimulus	31	6.40E-22	7.90E-21
6	GO:0010033	响应有机物 response to organic substance	29	8.80E-25	1.20E-23
7	GO:0009719	响应内源性刺激 response to endogenous stimulus	28	4.30E-26	6.70E-25
8	GO:0009725	响应激素刺激 response to hormone stimulus	26	3.20E-24	4.30E-23
9	GO:0005634	细胞核 nucleus	21	1.50E-09	3.80E-08
10	GO:0009751	响应水杨酸刺激 response to salicylic acid stimulus	19	1.40E-27	2.20E-26
11	GO:0006950	应激响应 response to stress	19	7.90E-09	6.90E-08
12	GO:0009753	响应茉莉酸刺激 response to jasmonic acid stimulus	18	3.20E-25	4.60E-24
13	GO:0009737	响应脱落酸刺激 response to abscisic acid stimulus	18	4.90E-21	5.90E-20
14	GO:0009628	响应非生物刺激 response to abiotic stimulus	17	3.70E-10	3.30E-09
15	GO:0006970	响应渗透压刺激 response to osmotic stress	15	5.20E-16	4.80E-15
16	GO:0009739	响应赤霉素刺激 response to gibberellin stimulus	14	5.10E-20	5.70E-19
17	GO:0009723	响应乙烯刺激 response to ethylene stimulus	14	9.90E-19	1.10E-17
18	GO:0010035	响应无机物 response to inorganic substance	14	8.80E-17	8.90E-16
19	GO:0009733	响应生长素刺激 response to auxin stimulus	13	7.00E-14	6.30E-13

3 讨论

由 miRNA 介导的植物抗病性已有比较深入的研究^[17-19]。但 miRNA 转录后调控相关的植物感病性研究还处于起步阶段。以往研究表明效应因子诱导的感病性 (effector-triggered susceptibility, ETS) 决

定杨树对锈菌的互作亲和关系 (抗/感病性)。病原侵染后,植物基础抗病性 (basal disease resistance) 由病原诱导的免疫反应 (pathogen-associated molecular patterns triggered immunity, PTI), ETS 和效应因子诱导免疫反应 (effector-triggered immunity, ETI) 的综合反应过程构成^[9]。PTI、ETS 和 ETI 过程涉及到感病

性增强因子 1 (enhanced disease susceptibility 1, EDS1) 和非小种专化抗病因子 1 (non-race-specific disease resistance 1, NDR1) 激活 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 等抗性蛋白 (R) 完成抗病过程。在 EDS1/NDR1 到 R 蛋白的抗病性激活过程中涉及到复杂的信号传导和植物激素调节过程。在 NDR1 将细胞膜外的病原入侵信号传递到膜内后,一系列的 TF 即被激活,主要包括 NAC、WRKY、AP2 和 MYB 等。继而 SA、JA 和 ET 等植物激素相关的抗病路径启动。在这个复杂的寄主病原互作体系中,TF 与其调控 miRNA 是决定寄主与病原亲和性的重要因素,如果抗病信号传导受阻或 miRNA 调控失活寄主即体现为亲和型症状,如果抗病信号顺利传导则寄主将产生 HR 和 PCD 等抗性症状。靶基因预测表明欧美杨差异表达 *R2R3-MYB* 可启动 SA、JA、ET 和脱落酸 (abscisic acid) 等多个植物激素路径。实际接种试验中欧美杨并未发生 HR 或 PCD 等症状,表明欧美杨的抗性信号传导过程可能出现了阻碍。本研究仅对一对 *R2R3-MYB* 转录后调控进行了荧光定量 PCR 验证,这还不足以检验出这种阻碍是否出现在 *R2R3-MYB* 转录后调控的层次上。因此,有必要对 86 对转录后调控关系逐一验证,综合分析欧美杨的感病性机理。

4 结论

E4 强致病锈菌侵染导致亲和型树种欧美杨 23.9% 的 *R2R3-MYBs* 表达量发生变化,锈菌侵染不但可以影响 *R2R3-MYBs* 的表达量,还可以启动或关闭 *R2R3-MYBs* 的表达。欧美杨在 E4 强致病锈菌胁迫条件下,*R2R3-MYBs* 转录后主要受 miR159 和 miR858 家族的 miRNA 调控。已验证的 *R2R3-MYB* 与 miRNA 存在负向转录后调控关系。*R2R3-MYBs* 靶基因涉及多个与免疫、植物激素相应和抗逆相关的生物过程。

参考文献:

[1] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136:215 - 233.

[2] Schwab R, Palatnik JF, Riester M, et al. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome [J]. Developmental Cell, 2005, 8: 517 - 527.

[3] Jover-Gil S, Candela H, Ponce MR. Plant microRNAs and development [J]. The International Journal of Developmental Biology, 2005, 49: 733 - 744.

[4] Willmann M R, Poethig RS. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development [J]. Current Opinion in

Plant Biology, 2007, 10: 503 - 511.

[5] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理 [J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265 - 1271.

[6] Li L. Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression [J]. Plant Journal, 2009, 58:275 - 286.

[7] Shim J S, Jung C, Lee S, et al. AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling [J]. Plant Journal, 2012, 73(3):483 - 495.

[8] Johnson E T, Dowd P F. Differentially enhanced insect resistance, at a cost, in *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing a transcription factor of defensive metabolites [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52:5135 - 5138.

[9] 牛春阳, 王峰, 李丹蕾, 等. C14 族 *R2R3-MYB* 基因调控杨树抗锈菌过敏反应 [J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(7): 16 - 23.

[10] Reyes J L, Chua N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination [J]. Plant Journal, 2007, 49(4): 592 - 606.

[11] Li Danlei, Feng Wang, Chao Wang, et al. MicroRNA-mediated susceptible poplar gene expression regulation associated with the infection of virulent *Melampsora larici-populina* [J]. Bmc Genomics, 2016, 17(1):1 - 16.

[12] Min C, Cao Z. Genome-wide expression profiling of microRNAs in poplar upon infection with the foliar rust fungus *Melampsora larici-populina* [J]. Bmc Genomics, 2015, 16(1):173 - 184.

[13] 陈俏丽, 李丹蕾, 王峰, 等. 欧美杂交杨 *Pnd-LRR3* 基因克隆及其抗锈菌侵染表达 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 3: 95 - 98.

[14] By Yoav B, Daniel Y. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency [J]. Annals Statistics. 2001; 29: 1165 - 88.

[15] Li Q, Lin Y C, Sun Y H, et al. Splice variant of the SND1 transcription factor is a dominant negative of SND1 members and their regulation in *Populus trichocarpa* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(36): 14699 - 14704.

[16] Duan Y, Jiang Y, Ye S, et al. PtrWRKY73, a salicylic acid-inducible poplar WRKY transcription factor, is involved in disease resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 831 - 841.

[17] Nawrath C, Metraux J P. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin. Plant Cell. 1999; 11:1393 - 1404.

[18] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science. 2006; 312:436 - 439.

[19] Liu P T, Wheelwright M, Teles R, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. Nat Med. 2012; 18:267 - 273.