

# 霜霉病菌侵染的黄瓜叶片 cDNA 文库的构建及抗病相关基因筛选

王丽娟<sup>1</sup>, 牛 德<sup>1</sup>, 孙彩玉<sup>1</sup>, 秦智伟<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 以接种黄瓜霜霉病菌的抗病黄瓜品种‘649’的叶片为材料, 使用改良 SDS 法提取总 RNA, 构建黄瓜叶片全长 cDNA 文库, 得到的原始文库滴度为  $5.5 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>, 扩增后的文库滴度达  $6.5 \times 10^9$  pfu · mL<sup>-1</sup>, 重组率约为 99%, 插入片段在 0.5 ~ 2.0 kb 之间, 大多在 1.0 kb 左右。随机选取 3 360 个克隆进行测序, 共拼接出 2 507 个 unigenes, 其中包括 211 个重叠群 (Contigs) 和 2 296 个单拷贝 EST (Singlets)。生物信息学分析显示: 这些 unigenes 中存在 427 条与植物防御/抗病相关的基因, 其中包括两类抗病基因和细胞程序性死亡相关基因, 这些基因的发现为下一步研究黄瓜抗病机理, 克隆抗霜霉病相关基因提供了重要的参考。

**关键词:** 黄瓜; 霜霉菌; RNA 提取; cDNA 文库; 抗病相关基因

**中图分类号:** S 642.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 11-1775-08

## Construction of cDNA Library from Cucumber Leaves Infection by *Pseudoperonospora cubensis* and Screening of Resistance-related Genes

WANG Li-juan<sup>1</sup>, NIU De<sup>1</sup>, SUN Cai-yu<sup>1</sup>, and QIN Zhi-wei<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; <sup>2</sup>College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted from the leaves of the disease-resistant cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivar ‘649’ challenged by *Pseudoperonospora cubensis* using the modified SDS method. And then, a full-length cDNA library was constructed. The results showed that the primary titer of the constructed cDNA library was  $5.5 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>, and titer of the amplified library was  $6.5 \times 10^9$  pfu · mL<sup>-1</sup>. The recombination rate was about 99%. The size of inserted cDNA fragment ranged from 0.5 kb to 2.0 kb, majority at about 1.0 kb. Sequencing analysis showed that 2 507 unigenes, included 211 contigs and 2 296 singlets were identified in the 3 360 ESTs derived from the cDNA library. The result of the bioinformatics analysis indicated that there were 427 plant defense/resistance-related genes including two type resistance genes and programmed cell death related genes. The discovery of these genes provides an important reference for further studying cucumber disease resistance mechanism and cloning resistance related genes.

**收稿日期:** 2010 - 06 - 22; **修回日期:** 2010 - 10 - 18

**基金项目:** 国家‘863’计划项目 (2002AA207013); 黑龙江省博士后专项科研基金项目 (LBH-Z07213)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zwqin727@163.com)

**Key words:** cucumber; *Pseudoperonospora cubensis*; RNA extraction; cDNA Library; resistance related genes

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 霜霉病是一种流行性很强的黄瓜叶部病害, 也是保护地栽培黄瓜的主要病害 (曹清河 等, 2007), 给黄瓜生产带来很大威胁 (黄仲生和张芝莉, 2002)。目前从病害流行规律、病原菌抗药性和致病机理、植株诱导抗病性以及病害防治等方面对黄瓜与霜霉菌的互作进行了研究 (牛德 等, 2008), 丁国华等 (2005, 2007a, 2007b) 及李金鑫等 (2008) 对克隆到的黄瓜抗霜霉病相关基因进行了研究, 获得了 3 条具有时空特异性表达的抗病相关基因片段; 丁国华等 (2007b) 通过 RAPD 连锁分析已获得了一个与抗霜霉病基因 (*dm*) 连锁距离为 7.85 cM 的扩增片段。但总体来说, 抗霜霉病基因的克隆目前仍未获得成功, 并且一直存在着多基因抗性和单基因抗性的争议, 而且对霜霉菌与黄瓜互作的分子机理仍不清楚。

构建 cDNA 文库已成为当前分子生物学研究和基因工程操作的基础, 也是发现新基因和研究基因功能的重要手段。在黄瓜方面, 目前已构建了黄瓜幼果的 cDNA 文库 (梅茜, 2004)。作者通过构建经霜霉菌侵染的黄瓜叶片 cDNA 文库并进行基因表达分析, 不仅能与梅茜 (2004) 进行黄瓜不同组织, 不同处理方式下黄瓜基因表达的差异比较, 也为研究黄瓜与霜霉菌互作过程中相关基因的表达、克隆特异的抗病相关基因、阐明黄瓜抗病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其处理

抗霜霉病黄瓜品种 ‘649’ 来自东北农业大学园艺学院黄瓜课题组, 种植于东北农业大学园艺站温室。霜霉病病原菌采集自东北农业大学园艺站温室内自然发病的黄瓜叶片上。取材时间为 2009 年 6 月。文库构建试剂盒 Creator<sup>TM</sup> SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 购自 CLOTECH 公司; 96 孔质粒 DNA 提取试剂盒购自 Real Biotech Corporation; *Sfi* I 购自 TaKaRa 公司; 所用耗材均用 DEPC 水处理或 180 °C 高温烘烤 4 h。

霜霉菌菌种的分离纯化参照白智龙和周鸿飞 (2008) 的方法。采用点滴接种法对 2 ~ 3 片真叶期的黄瓜幼苗进行接种, 孢子囊浓度为  $4 \times 10^4$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (董彦琪, 2006)。每片真叶点 3 滴, 每滴 10  $\mu$ L (石延霞 等, 2005)。套袋保湿, 放置于 24 °C 环境中。分别于接种后 4、8、16、24、48 和 72 h 取植株叶片, 经液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存待用。

### 1.2 cDNA 文库构建

#### 1.2.1 黄瓜叶片总 RNA 制备及 cDNA 第一链的合成

采用改良的 SDS 法提取黄瓜叶片总 RNA (刘关君 等, 2009), 并对其浓度和纯度进行测定 (图 1)。反应管中试剂 5  $\mu$ L: 2  $\mu$ L RNA, 1  $\mu$ L SMART IV Oligonucleotide, 1  $\mu$ L CDSIII/3' PCR Primer, 1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。混匀, 瞬时离心, 72 °C 温育 2 min, 冰上冷却 2 min。短暂离心, 向反应管中加入以下组分: 2.0  $\mu$ L 5  $\times$  First-Strand Buffer, 1.0  $\mu$ L DTT (20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 1.0  $\mu$ L dNTP Mix (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 1.0  $\mu$ L MMLV 反转录酶。混匀, 瞬时离心, 42 °C 温育 1 h, 置于冰上终止第一链的合成。

LD-PCR 20  $\mu$ L 反应体系为: 2  $\mu$ L First-Strand cDNA, 10  $\mu$ L 10  $\times$  Advantage 2 PCR Buffer, 2  $\mu$ L 50  $\times$  dNTP Mix, 2  $\mu$ L 5' PCR Primer, 2  $\mu$ L CDSIII/3' PCR Primer, 2  $\mu$ L 50  $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix。反应条件为 95 °C 1 min, 然后在 95 °C 15 s, 68 °C 6 min 条件下进行热循环, 设置了 3 次循环。

反应结束后取 5  $\mu\text{L}$  LD-PCR 产物, 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

### 1.2.2 蛋白酶 K 及 *Sfi* I 内切酶处理

取 50  $\mu\text{L}$  双链 cDNA 和 2  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K ( $20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 混匀, 离心, 温育, 离心。加入 50  $\mu\text{L}$  去离子水, 100  $\mu\text{L}$  苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 振荡 1~2 min, 离心, 取 0.5 mL 上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  氯仿:异戊醇 (24:1), 混匀, 离心, 取 0.5 mL 上清, 加入 10  $\mu\text{L}$  NaAc ( $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1.3  $\mu\text{L}$  糖原 ( $20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 260  $\mu\text{L}$  95%乙醇。离心, 移去上清用 100  $\mu\text{L}$  80%乙醇清洗沉淀, 干燥沉淀, 加入 79  $\mu\text{L}$  去离子水溶解沉淀。在离心管中加入 79  $\mu\text{L}$  cDNA, 10  $\mu\text{L}$  *Sfi* I 酶 ( $20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$   $10 \times$  *Sfi* I Buffer, 1  $\mu\text{L}$  100  $\times$  BSA, 至 100  $\mu\text{L}$ 。50  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h, 使 cDNA 片段产生粘性末端。

### 1.2.3 cDNA 酶切片段分级分离及连接

将酶切产物过 CHROMA SPIN-400 柱, 电泳检测, 将含有 500 bp 以上 cDNA 片段合并, 加入醋酸钠、糖原和酒精, 离心, 溶解沉淀。设置了两个连接反应体系 5  $\mu\text{L}$ : ATP ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $10 \times$  连接缓冲液、T4 DNA 连接酶均为 0.5  $\mu\text{L}$ , pDNR-LIB1.0  $\mu\text{L}$ , 体系 1 和 2 的 cDNA 分别为 1.0  $\mu\text{L}$  和 1.5  $\mu\text{L}$ , 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接, 并检查连接效果。

### 1.2.4 原始文库制备及文库质量检测

每个连接体系中分别加入 25  $\mu\text{L}$  的感受态大肠杆菌, 混合均匀后转入 0.1 cm 的电击杯中进行电击转化, 电压 2 250 V, 时间 5 ms。将转化物移入装有 970  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  下  $225 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 1 h 即为原始文库。从原始文库中取 1  $\mu\text{L}$  混合液加入 1 mL LB 液体培养基中, 并从中取 1  $\mu\text{L}$  加入到 50  $\mu\text{L}$  LB 液体培养基, 涂布在含  $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日随机挑取 20 个单克隆, 进行菌液 PCR, 反应体系 20  $\mu\text{L}$ :  $10 \times$  PCR 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  菌液, 1  $\mu\text{L}$  M13<sup>+</sup>引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  M13<sup>-</sup>引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  dNTP ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  Taq 酶。反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 32 个循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 68  $^{\circ}\text{C}$  5 min。用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测插入片段。

## 1.3 质粒提取及质量检测

取 5  $\mu\text{L}$  原始文库, 经稀释后按照每个平板产生 800 个克隆的标准涂平板。质粒提取试剂盒购自 Real Biotech Corporation。酶切鉴定, 并送交北京华大基因测序。

## 1.4 序列测定及生物信息学分析

使用 SeqClean 软件去除 EST 序列中的载体序列、重复序列和长度小于 100 bp 的序列; 采用 CAP3 软件对高质量的 EST 序列进行聚类 and 拼接; 对于得到的非冗余 EST 序列, 在 NCBI 的 GenBank 和 Swiss-Prot 数据库进行单序列同源性比对, 以确定编码蛋白类别, 通过 UniProt 数据库对其蛋白功能进行确定, 并对所获信息进行综合分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 黄瓜叶片总 RNA 及 LD-PCR 检测

使用改良 SDS 法提取各时间点黄瓜叶片总 RNA, 等量混合后, 经分光光度计测定, 电泳结果显示, 条带清晰, 28S RNA 亮度约是 18S RNA 亮度的一倍 (图 1), 表明 RNA 比较完整, 基本没有降解, 符合建库要求。采用 SMART 技术合成的双链 cDNA 量较少, 需经过一定循环的 LD-PCR 扩增, 其循环次数过多或不足都将会影响到文库的质量 (马金彪, 2006)。本试验对循环次数进行了优化, 发现在 20 个循环时, 扩增产物基本都在 500 bp 以上, 在 23 个循环时, 500 bp 以下的片段已有

所增加, 26 个循环时 500 bp 以下的片段更多 (图 2), 因此决定采用 21 个循环。

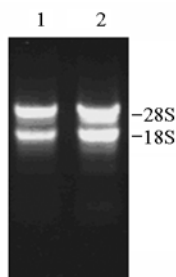


图 1 黄瓜叶片总 RNA 电泳图

1: 2  $\mu$ L 样品用量; 2: 3  $\mu$ L 样品用量。

Fig. 1 Total RNA extracted from leaves of cucumber

1: 2  $\mu$ L total RNA sample; 2: 3  $\mu$ L total RNA sample.

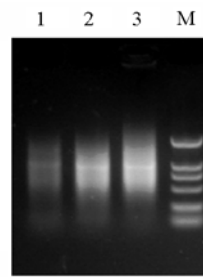


图 2 LD-PCR cDNA 电泳检测

1: 20 个循环; 2: 23 个循环; 3: 26 个循环; M: DL2000。

Fig. 2 LD-PCR cDNA in 1.2% agarose gels

1: The cycles is 20; 2: The cycles is 23; 3: The cycles is 26;

M: DL2000 marker.

## 2.2 cDNA 纯化与回收

SMART 技术构建文库另一关键操作在于通过 CHROMA SPIN-400 柱分离纯化目的片段, 分级分离结束后, 通过电泳检测。电泳时间过长会使 cDNA 片段很难辨认, 电泳 15 min 时 (图 3), 电泳图上各条带就比较清晰, 可满足试验的观察需要。过柱分离的 cDNA 片段主要集中于 8~12 管中, 不过第 11 管已有明显的小于 500 bp 的小片段, 第 7 管中虽然含量较少但片段较大, 因此收集并回收 7~10 管的 cDNA 用于后继试验。

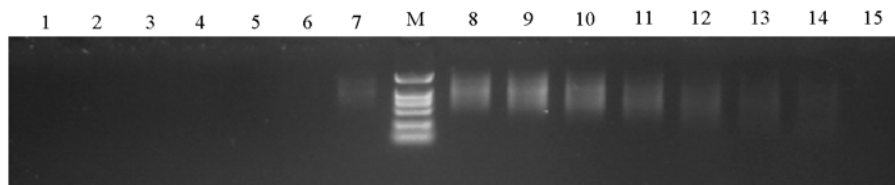


图 3 cDNA 的 CHROMA SPIN-400 柱分离电泳图 (15 min)

1~15: 各收集物编号; M: DL2000。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis for size fractionation of cDNA by passing through CHROMA SPIN-400 (15 min)

1 - 15: The cDNA products tested for size fractionation; M: DL2000.

## 2.3 cDNA 片段与载体的连接效果

以 M13 为引物, 对两个连接体系进行连接效果检测。

结果表明: 两个反应体系里 cDNA 片段与载体均成功连接, 连接目的片段主要集中在 0.5 ~ 2.0 kb 之间。但第 2 个反应体系, 即当 cDNA 与 pDNA-LIB 载体以 1.5 : 1 比例连接时的效果较好, 连接产物较多 (图 4)。

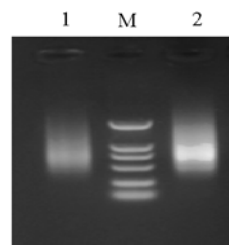


图 4 cDNA 片段与载体连接效果检测

1: 反应体系 1 产物; 2: 反应体系 2 连接产物; M: DL2000。

Fig. 4 PCR detection of the ligation effect of cDNA to pDNA-LIB vector

1: Ligation production of the first reaction system; 2: Ligation production of the second reaction system; M: DL2000.

## 2.4 cDNA 文库的质量评价

菌落检测结果表明, cDNA 片段与 pDNR-LIB 载体以 1.5 : 1 比例连接时, 获得的原始文库滴度为  $5.5 \times 10^6$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 重组率约为 99%。而扩增后的文库滴度达  $6.5 \times 10^9$  pfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。以 M13 为引物进行菌落 PCR, 结果显示, 文库中包含的插入片段大小在 0.5 ~ 2.0 kb 之间, 并多在 1.0 kb 左右, 最大片段约为 2.0 kb (图 5)。

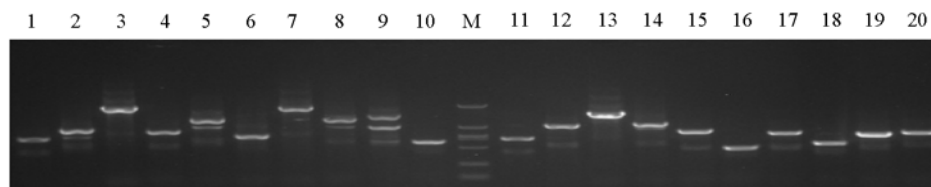


图 5 黄瓜叶片 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测

1 ~ 20: 随机挑取的克隆; M: DL2000。

Fig. 5 PCR of inserted size from cucumber leaves cDNA library

1 - 20: Random selected single clone; M: DL2000.

## 2.5 cDNA 片段序列测定及生物信息学分析

从 cDNA 原始文库中随机挑取阳性克隆, 从提取的质粒中随机挑取若干进行 *Sfi* I 酶切后进行电泳检测, 结果显示质粒提取效果良好, 酶切后的插入片段大小多在 0.5 ~ 2.0 kb 之间, 并多在 1.0 kb 左右, 再次说明了所构建文库的高质量 (图 6)。对所提取的质粒以 M13 为引物进行序列测定, 得到成功序列 3 091 条。当去除载体序列、重复序列和长度小于 100 bp 的序列后, 最终得到的高质量 EST 序列 2 903 条。所得 ESTs 序列长度范围为 101 ~ 604 bp, 平均长度 414.6 bp, CG 含量平均为 42.44%。用 CAP3 软件程序对 2 903 条 ESTs 序列进行聚类拼接, 得到 2 507 条非重复序列 (unigenes), 包括 211 个 Contigs 和 2 296 个 Singlets, unigenes 序列长度从 101 ~ 1 426 bp, 主要集中在 300 ~ 600 bp, 平均为 422.73 bp, CG 含量平均为 38.21%。

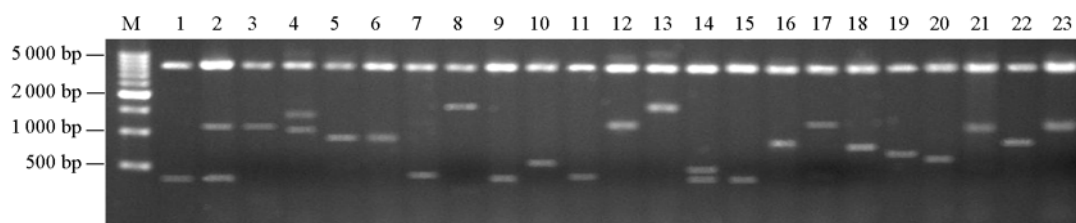


图 6 质粒提取及酶切检测

1 ~ 23: 随机提取的质粒及相应的酶切片段; M: Marker 500。

Fig. 6 Detection of plasmid extraction and enzyme digestion

1 - 23: Random selected plasmid and enzyme incid fragment; M: Marker 500.

对组装后的 2 507 条 unigenes 在 NCBI, Swiss-Prot 数据库中进行同源性质比对, 得到具有已知功能和推测功能的独立基因 1 547 条。在 Uniprot 数据库中确定其蛋白功能, 然后按照 Bevan 等(1998)对拟南芥基因功能的分类标准进行分类, 构建霜霉病菌侵染的黄瓜叶片的基因表达谱。图谱表明: 被赋予功能的基因累计达到 2 231 个 (包括一因多效), 其中有 427 条参与植物防御/抗病过程, 与合成蛋白相关的基因 (包括转录、蛋白合成和蛋白转运和储藏) 表达比较活跃, 涉及种类较多, 有 602 个基因, 约占总数的 26.98%; 其余依次是抗病/防御相关基因 (19.16%)、能量代谢相关基因 (13.1%) 和代谢相关 (包括初级代谢和次级代谢) 基因 (9.7%)。产生这一比例的原因, 可能是病原菌侵袭

植物后, 导致植物产生了一系列系统生理生化反应。

### 3 讨论

#### 3.1 黄瓜叶片 cDNA 文库的构建

植物 cDNA 第 1 链的数量和质量对其 cDNA 文库的质量有重要影响 (Lin et al., 2004)。所以作者采用了 LD-PCR 法对第 2 链 cDNA 进行合成, 可使低丰度的基因表达序列在文库中得到富集, 便于稀有 mRNA 的扩增和克隆。在 cDNA 的合成过程中, 控制 LD-PCR 的循环次数对于 cDNA 的合成大小以及基因在文库中拷贝数分布很重要 (崔红军 等, 2008), 由于试验条件和环境的差异, 不同试验样品获得的最佳数据往往不能运用于其它试验 (岳觐宇 等, 2007), 因此本试验对循环数进行了优化, 并最终采用 21 个循环数。另外, 双链 cDNA 的分级分离也是一个不可忽略的环节, 它是提高低丰度 mRNA 在文库中出现频率、富集 mRNA 的有效方法 (梅茜, 2004), 因为小片段会优先跟载体相连, 使得文库中小片段占有较高的比例, 大大降低文库的质量 (Wellenreuther et al., 2004)。所以作者通过 CHROMA SPIN-400 柱除去绝大部分小于 500 bp 的 cDNA 以提高文库质量。为了获得最佳的 cDNA 与载体的连接效率, 作者设置了两个连接反应体系, 结果证明, 当 cDNA 与载体连接比例为 1.5:1 时效果较好, 这与采用相同构建方法的其它试验结果相同 (王跃平 等, 2008)。在对 cDNA 文库插入片段大小进行检测时, 发现有些泳道出现了多条带, 这很可能是由于菌株分离不纯而包含了其它菌株所致。经测定其原始文库滴度为  $5.5 \times 10^6$  pfu · mL<sup>-1</sup>, 扩增后的文库达  $6.5 \times 10^9$  pfu · mL<sup>-1</sup>, 重组率约为 99%。说明构建的黄瓜幼叶 cDNA 文库完全符合构建基因文库的质量要求 (杨长庚 等, 2006)。为进行大规模的表达序列标签分析、探讨黄瓜与霜霉菌互作过程中的分子机制奠定了基础。

#### 3.2 EST 序列测定及生物信息学分析

通过对得到的非冗余 ESTs 序列在 GenBank 和 Swiss-Port 数据库比对和通过 UniProt 数据库对其蛋白功能进行确定后, 发现在受霜霉菌侵染的黄瓜叶片的基因表达中, 参与蛋白合成、防御/抗病和能量代谢相关的基因所占的比例较大, 分别为 27.02%、19.16%和 13.1%。其中未定义的基因为 1.79%, 未分类基因为 1.19%, 作为未知基因它们将会是以后研究的重点, 也是进一步发现新功能基因的对象。在逆境条件下, 植株在形态结构和生理生化等方面会产生一系列的改变, 包括各种细胞器的膜系统膨胀或破损; 正常代谢过程发生的变化比如呼吸作用加强, 激素发生变化等; 在基因表达上也会启动一些与逆境相适应的基因的表达, 形成各类生物和非生物胁迫蛋白如热激蛋白, 氧化胁迫蛋白, 植物激素诱导蛋白等等, 而提高保护酶系统 (SOD, CAT, POD) 和形成渗透物质 (脯氨酸, 甜菜碱) 也是植物响应抗性反应的一种积极方式 (潘瑞炽, 2001; 王宝山, 2004)。这也许就是文库中存在大量与蛋白合成、防御/抗病和能量代谢相关的基因的原因。

植物组织坏死目前已被越来越多的事实证明是细胞的程序性细胞死亡, 也是植物的一个积极保护性反应 (潘瑞炽, 2001; 王宝山, 2004)。在作者构建的文库中也发现了调控细胞程序性死亡的基因, 在目前的黄瓜抗病研究方面, 人们大多将注意力集中在了植物防御酶系的改变上, 本研究发现将有助于拓展黄瓜的抗病研究领域。构建的受霜霉菌侵染的黄瓜的 cDNA 文库中存在的大量的与抗病/防御的信息, 将为研究黄瓜抗病的分子机理提供依据。

依据“基因对基因假说”和在此基础上发展的“激发子—受体”模型, 植株抗病反应必须是激发子与抗病基因编码的产物 (受体) 相互作用, 进而通过信号传递过程, 从而激活其它防卫基因的

表达(余叔文和汤章城, 1998)。文库中发现的 harpin 诱导家族蛋白等可能就充当着激发子的角色。抗病基因根据它们编码的蛋白质结构可以分为 6 种类型: 蛋白激酶, CC/LZ-NBS/LRR, TIR-NBS-LRR, LRR-TM, LRR-激酶(受体激酶)和其它不属于上述结构的 R 蛋白(陈晓亚和汤章城, 2007)。可以说大多抗病基因编码的蛋白产物一大主要特征就是含有富亮氨酸的重复序列(LRR), 还有一些丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶或丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶受体。在文库中, 作者发现了其中的两类: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类和亮氨酸重复序列蛋白类, 而这些基因的表达是否会影响以及在多大程度上影响植物的抗病性, 或者是否就是黄瓜的抗病基因, 还需要继续深入研究。

由于作者构建的是受霜霉菌侵染后从 4 h 到 72 h 的不同时间点上的黄瓜叶片混合 cDNA 文库。因此, 该文库中包含的抗病相关基因是比较全面的, 但也存在不利的一方面, 比如无法知道这些抗病相关基因在时间和空间上的表达差异以及表达量上的变化, 因此下一步将根据文库中发现的具有抗性特征的基因设计特异引物, 研究其表达差异与黄瓜抗霜霉病的相关性, 这将有助于对黄瓜的抗霜霉病机制的了解和抗霜霉病相关基因的克隆。

## References

- Bai Zhi-long, Zhou Hong-fei. 2008. Correlation analysis on the resistance to downy mildew in cucumber between seedling stage and adult plant stage. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36 (16): 6837 - 6838, 6840. (in Chinese)
- 白智龙, 周鸿飞. 2008. 黄瓜霜霉病苗期与成株期抗性相关分析. *安徽农业科学*, 36 (16): 6837 - 6838, 6840.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson S A, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl T M, Terryn N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian K D, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Vouklatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Dusterhöft A, Moores T, Jones J D G, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes H-W, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N. 1998. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequences from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391 (6666): 485 - 488.
- Cao Qing-he, Wan Hong-jian, Chen Jin-feng. 2007. Progress on downy mildew resistance in cucumber. *China Cucurbits and Vegetable*, 1: 27 - 30. (in Chinese)
- 曹清河, 万红建, 陈劲枫. 2007. 黄瓜霜霉病抗性研究进展. *中国瓜菜*, 1: 27 - 30.
- Chen Xiao-ya, Tang Zhang-cheng. 2007. *Plants physiology and molecular biology*. Beijing: High Education Press. (in Chinese)
- 陈晓亚, 汤章城. 2007. *植物生理与分子生物学*. 北京: 高等教育出版社.
- Cui Hong-jun, Zhang Jun-jie, Huang Yu-bi. 2008. Construction and evaluation of yeast two hybrid cDNA library of maize root. *Molecular Plant Breeding*, 6 (1): 161 - 164. (in Chinese)
- 崔红军, 张军杰, 黄玉碧. 2008. 玉米根部酵母双杂交 cDNA 文库的构建及评价. *分子植物育种*, 6 (1): 161 - 164.
- Ding Guo-hua, Chi Chun-yu, Zhou Xiu-yan, Qin Zhi-wei. 2007a. Southern identification and homology analysis of the resistance gene analog in *Cucumis sativus* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (2): 355 - 360. (in Chinese)
- 丁国华, 池春玉, 周秀艳, 秦智伟. 2007a. 黄瓜抗病基因类似序列(RGA)的同源性分析和 Southern 鉴定. *园艺学报*, 34 (2): 355 - 360.
- Ding Guo-hua, Qin Zhi-wei, Liu Hong-yu, Zhou Xiu-yan, Chi Chun-yu, Wang Zhi-kun. 2005. Analysis and cloning of NBS class disease resistant gene analog in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 638 - 642. (in Chinese)
- 丁国华, 秦智伟, 刘宏宇, 周秀艳, 池春玉, 王志坤. 2005. 黄瓜 NBS 类型抗病基因同源序列的克隆与分析. *园艺学报*, 32 (4): 638 - 642.
- Ding Guo-hua, Qin Zhi-wei, Zhou Xiu-yan, Fan Jin-xia. 2007b. A Novel RAPD and SCAR marker of the resistant gene for downy mildew (dm) in cucumber. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27 (9): 1747 - 1751. (in Chinese)
- 丁国华, 秦智伟, 周秀艳, 范金霞. 2007b. 黄瓜霜霉病抗病基因的 RAPD 及 SCAR 标记. *西北植物学报*, 27 (9): 1747 - 1751.
- Dong Yan-qi. 2006. Analysis on the correlation of disease index of seedling with adult and study on the resistance mechanism to cucumber downy mildew [M.D.Dissertation]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. (in Chinese)

- 董彦琪. 2006. 黄瓜苗期和成株期抗性相关性分析及霜霉病抗性机制的初步研究[硕士论文]. 郑州: 河南农业大学.
- Huang Zhong-sheng, Zhang Zhi-li. 2002. Identification and control in cucumber pests. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 黄仲生, 张芝莉. 2002. 黄瓜病虫害识别与防治. 北京: 中国农业出版社.
- Li Jin-xin, Qin Zhi-wei, Ding Guo-hua, Zhou Xiu-yan. 2008. Cloning and analysis of resistance-related genes for downy mildew in cucumber. Horticulturae Sinica, 35 (3): 371 - 376. (in Chinese)
- 李金鑫, 秦志伟, 丁国华, 周秀艳. 2008. 黄瓜抗霜霉病相关基因 cDNA 片段的分离与分析. 园艺学报, 35 (3): 371 - 376.
- Lin Jun-tang, Jogenananda Pramanik, Wang Cong-rui, Zhang Hui-yong, Feng Hui-gen, Yang Bao-sheng, Li Yu-chang, Xu Cun-shuan. 2004. Study on construction of cDNA library of the treated changliver cell and quality analysis. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 19 (2): 181 - 183.
- Liu Guan-jun, Liu Ming-kun, Xu Zhi-ru, Yan Xiu-feng, Wei Zhi-gang, Yang Chuan-ping. 2009. Construction and analysis of a forward and reverse subtractive cDNA library from leaves and stem of *Polygonum sibiricum* Laxm. under salt stress. Hereditas, 31 (4): 426 - 433. (in Chinese)
- 刘关君, 刘明坤, 许志茹, 阎秀峰, 魏志刚, 杨传平. 2009. 盐胁迫下西伯利亚蓼茎叶正反消减文库的构建及初步分析. 遗传, 31 (4): 426 - 433.
- Liu Xiao-dong, Zhang Zeng-yan, Xin Zhi-yong, Liu Yan. 2005. Cloning and characterization of aphid-induced expressed gene in wheat. Acta Agronomica Sinica, 31 (4): 523 - 525. (in Chinese)
- 刘晓东, 张增艳, 辛志勇, 刘 艳. 2005. 蚜虫诱导的小麦基因 cDNA 的克隆及其表达特性分析. 作物学报, 31 (4): 523 - 525.
- Ma Jin-biao. 2006. Construction of cDNA library from wheat leaves challenged by *Puccinia striiformis* and analysis of expressed sequence tags [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 马金彪. 2006. 条锈菌诱导的小麦叶片 cDNA 文库构建及表达序列标签分析[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Mei Qian. 2004. Construction of cucumber young fruit cDNA library and analysis on ESTs ssequence from partial clones[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest Agricultural University. (in Chinese)
- 梅 茜. 2004. 黄瓜幼果 cDNA 文库构建与部分 ESTs 分析[硕士论文]. 重庆: 西南农业大学.
- Niu De, Fu Jia, Wang Li-juan. 2008. Latest research development of cucumber downy mildew. Journal of Northeast Forestry University, 9: 94 - 98. (in Chinese)
- 牛 德, 付 佳, 王丽娟. 2008. 黄瓜霜霉病研究新进展. 东北林业大学学报, 9: 94 - 98.
- Pan Rui-zhi. 2001. Plants physiology. Beijing: High Education Press. (in Chinese)
- 潘瑞炽. 2001. 植物生理学. 北京: 高等教育出版社.
- Shi Yan-xia, Li Bao-ju, Liu Xue-min. 2005. Several infection factors of *Pseudoperonospora cubensis*. Chinese Journal of Applied Ecology, 16 (2): 257 - 261. (in Chinese)
- 石延霞, 李宝聚, 刘学敏. 2005. 黄瓜霜霉病菌侵染若干因子的研究. 应用生态学报, 16 (2): 257 - 261.
- Wang Bao-shan. 2004. Plants physiology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王宝山. 2004. 植物生理学. 北京: 科学出版社.
- Wang Yue-ping, Li Ying-hui, Chen Xiong-ting, Chang Ru-zhen, Qiu Li-juan. 2008. Construction and characterization of the filling stages seed cDNA library from Suinong 14 (*Glycine max*). Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 30 (1): 40 - 45. (in Chinese)
- 王跃平, 李英慧, 陈雄庭, 常汝镇, 邱丽娟. 2008. 绥农 14 鼓粒期籽粒 cDNA 文库构建及初步分析. 中国油料作物学报, 30 (1): 40 - 45.
- Wellenreuther R, Schupp I, Consortium T, Poustka A, Wiemann S. 2004. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. BMC Genomics, 5: 36 - 43.
- Yang Chang-geng, Zhang Fu-chun, Ma Ji. 2006. Construction and analysis of cDNA library of *Anatolica polita* Borealis. Biotechnology Bulletin, 4: 109 - 114. (in Chinese)
- 杨长庚, 张富春, 马 纪. 2006. 新疆荒漠昆虫光滑鳖甲 cDNA 文库的构建及功能基因筛选. 生物技术通报, 4: 109 - 114.
- Yu Shu-wen, Tang Zhang-cheng. 1998. Plants physiology and molecular biology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 余叔文, 汤章城. 1998. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社.
- Yue Chan-yu, Wu Run-guo, Tian Wen-hong, Xiang Ben-qiong. 2007. Construction a cDNA library of whole plant of horsebean using SMART. Journal of Beijing Normal University: Natural Science, 43 (2): 191 - 193. (in Chinese)
- 岳觐宇, 吴润果, 田文洪, 向本琼. 2007. SMART 法构建蚕豆全植株 cDNA 文库. 北京师范大学学报: 自然科学版, 43 (2): 191 - 193.