园 艺 学 报 2011，38（3）：471－478 http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica E-mail: yuanyixuebao@126.com

黄瓜霜霉病抗性相关基因的初步研究

李建吾*，司胜伟，胡建斌，刘丽君

（河南省高等学校园艺植物生理与遗传改良重点学科开放实验室，河南省果树瓜类生物学重点实验室，河南农业大学园艺学院，郑州 450002）

摘 要：以黄瓜高抗霜霉病自交系为材料，构建了两个抑制差减文库，经反向 Northern 杂交筛选、测序和序列比对，筛选到 3 个未知功能抗病相关基因。荧光实时定量 RT-PCR 分析结果表明，未知功能抗病相关基因 *2I15*（GD254229）、*3C19*（GD254243）和 *1O08*（GD254207）在抗病自交系接种霜霉病病原菌后，可早期高丰度特异上调表达，而在感病自交系中特异上调表达丰度较低或被特异抑制表达。水杨酸（SA）可诱导 *1O08* 特异上调表达，抑制 *2I15* 和 *3C19* 的表达；茉莉酸（JA）处理可诱导 *1O08* 特异上调表达，而抑制 *2I15* 的表达。ABA 处理可显著诱导 *3C19* 和 *1O08* 特异上调表达，而抑制 *2I15* 的表达。机械伤害、高盐、冷害和热激等其它非生物胁迫可显著抑制或诱导这些基因的表达，因此推测，所筛选到的功能未知基因可能具有参与生物和非生物胁迫反应的作用。

关键词：黄瓜；霜霉病；抑制差减杂交；抗性相关基因

中图分类号：S 642.2 **文献标识码：**A **文章编号：**0513-353X（2011）03-0471-08

Preliminary Study on Resistance-related Genes in Cucumber Inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*

LI Jian-wu*，SI Sheng-wei，HU Jian-bin，and LIU Li-jun

（*Open Key Laboratory of Horticultural Plant Physiology and Genetic Improvement*，*High School of Henan Province*；*Key Laboratory of Fruit Plant and Cucurbit*，*Henan Province*；*Horticulture College of Henan Agricultural University*，*Zhengzhou* 450002，*China*）

Abstract：In order to identify the genes associated with cucumber（*Cucumis sativus* L.）resistance against *Pseudoperonospora cubensis*（Berk. and Curk.）Rostov.，two cDNA libraries were constructed by suppression subtractive hybridization（SSH）. After differential screening by reverse northern dot blot hybridization，sequencing and BLAST，*2I15*（GD254229），*3C19*（GD254243）and *1O08*（GD254207）differential expressed genes with unknown function were isolated，furthermore，expression patterns of the genes were monitored by real-time quantitative RT-PCR. The results indicated that these genes were differentially up-regulated earlier and more quantitative in the resistant inbred line than the susceptible inbred line. Moreover，*1O08* and *2I15* could be differentially up- or down- regulated，respectively，by

收稿日期：2010－11－29；**修回日期：**2011－01－27

基金项目：‘十一五’国家科技支撑计划项目（2009BADB8B02）；河南省科技攻关重点项目（102102110037）；国家高技术研究发展计划（863 计划）项目（2007AA10Z177）

* E-mail：lijw555@sohu.com

致谢：本研究所采用的抑制差减杂交文库是在“园艺植物生物学教育部重点实验室”、“国家蔬菜改良中心华中分中心”、“湖北省马铃薯工程技术研究中心”、华中农业大学园林学院构建完成，并得到谢从华教授研究小组的全额资助，在此表示感谢。

salicylic acid（SA），jasmonic acid（JA）and abscissic acid（ABA），and *3C19* could be induced or suppressed significantly by ABA and SA，respectively. Mechanical wounding，NaCl stresses，cold and heat shock could induce or suppress these genes differential expression，suggesting that these genes may have some functions involved in biotic and abiotic stresses.

Key words：cucumber；downy mildew；suppression subtractive hybridization；resistance-related genes

植物与病原菌互作是一个复杂过程，植物能够采用多种抗病机制抵御病原菌的浸染。这一复杂互作过程涉及植物与病原菌的相互识别、信息交换，植物体由此产生一系列信号传导过程，各种信号途径之间相互交叉、重叠、拮抗或协同等，形成了复杂的防御机制（Kunkel & Brooks，2002）。显然，植物防御机制需要众多基因的参与（Li et al.，2007）。

筛选和确定主要抗病相关基因是研究植物抗病防御反应行之有效的方法，目前已有多种方法可分离和筛选差异表达基因，而抑制差减杂交（suppression subtractive hybridization，SSH）被认为是较为理想的方法之一（Diatchenko et al.，1996）。大量研究发现，已有多种功能的基因参与了植物抗病反应，如细胞防御、信号传导、转录因子、初级代谢、次级代谢、蛋白质合成、蛋白质降解、能量代谢、细胞运输、结合功能蛋白以及未知功能基因等（Klessig et al.，2000；Degenhardt et al.，2005；Kottapalli et al.，2007；Halim et al.，2009；Pandey & Somssich，2009）。其中未知功能基因的发掘对新抗病基因的发现、防御机制的深入细致研究有着重要意义。

作者在利用抑制差减杂交筛选黄瓜霜霉病抗性相关基因时，发现了 3 个差异表达、未知功能基因。本研究试图利用荧光实时定量 RT-PCR，分析这些基因在不同抗性材料以及非生物胁迫中的差异表达，为这些基因功能的进一步验证提供帮助。

1 材料与方法

1.1 植物材料处理和病原菌收集

选用由河南农业大学园艺学院黄瓜研究小组改良并经多次抗病性验证的高抗（IL57）和高感（IL112）霜霉病的黄瓜自交系为试料。在霜霉病发病前 2 个月，种植感病自交系 IL112，病害中期收集病原菌并纯化后，重新接种到病原菌圃健康黄瓜叶片上，待接种叶片发病时收集霜霉病病原菌。

培育健康二叶一心黄瓜幼苗，分别将清水和病原菌（孢子囊 $1 \times 10^5 \cdot mL^{-1}$）喷雾（接种）于第一、二片叶背面，以充分喷湿叶面为度。塑料薄膜覆盖接种幼苗并移至培养室，培养于 20～22 ℃、100%空气相对湿度条件下。24 h 黑暗处理后，光周期调整至光照 $16\ h \cdot d^{-1}$（$500\ \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$）。分别于接种后 0、4、12、24、32、48、56 和 72 h 收集材料，每个处理 5 株，3 次重复。液氮速冻并保存于－80 ℃深冷冰箱。

选用水杨酸（SA）$2\ mmol \cdot L^{-1}$、茉莉酸（JA）$50\ \mu mol \cdot L^{-1}$ 和脱落酸（ABA）$50\ \mu mol \cdot L^{-1}$ 溶液分别喷洒二叶一心幼苗叶片，以喷相同浓度的乙醇为对照，处理后 0、4、8、12 和 24 h 取样，每处理 10 株，3 次重复；分别以 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、5.0%浓度的 NaCl 溶液喷洒叶片背面，以喷清水为对照，处理 12 h 后取样，每处理 10 株，3 次重复；在每片叶上打 3 个孔（保留圆片不致脱离）作为伤害处理，未打孔为对照，放置培养皿中，分别在 0、4、8、12 和 24 h 后取样，每处理 10 株，3 次重复。以 42 ℃热激和 4 ℃低温处理幼苗，室温处理作对照，处理后 0、4、6、8 和 24 h 取样，每处理 10 株，3 次重复。材料收集后液氮速冻，存放－80 ℃保存备用。

1.2　差减文库的构建和筛选

分别收集 IL57 接种病原菌和清水 24、48 和 56 h 后的叶片，采用异硫氰酸胍法提取 RNA（Chomczynski & Sacchi，1987），分别充分混匀 3 个时间段等量的 RNA。参照 Oligotex® mRNA Midi Kit（12）（QIAGEN）说明书分离得到 mRNA，并分别反转录成 cDNA。以接种处理为测验方（Tester），清水处理为驱动方（Driver）连接接头（以构建正向差减文库）；同时，以清水处理为测验方（Tester），接种处理为驱动方（Driver）亦连接接头（以构建反向差减文库）。按照 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtractive Kit（Clontech）分别进行两轮抑制差减杂交。两次 PCR 选择性扩增后，使用 *T*4 DNA 连接酶连接 BlueScript M13（+）SK（*Sma* I 和 *Not* I 双酶切）和酶切（*Not* I）纯化后第 2 次 PCR 扩增产物，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞（大连宝生物）。经蓝白斑挑选，将光亮饱满的菌落装载于 384 孔板中，37 ℃过夜，加入甘油后液氮速冻，－80 ℃保存，正、反向抑制差减文库构建完成。利用反向 Northern 杂交筛选差异表达片段。

1.3　序列同源性检索

差异表达片段用 T7 引物单向测序（上海基康公司），Blastn（EST 库）和 Blastx 检索去除载体与接头的序列，分析所筛选差异片段与 EST 片段及氨基酸序列同源性。根据 Yamamoto 和 Sasaki（1997）判定 EST 功能的标准，确定基因的功能和分类。

1.4　引物设计和实时荧光定量 RT-PCR

采用 OLIGO 6.0 软件，根据 *2I15*，*3C19* 和 *1O08* 的 ESTs 序列设计引物。根据 18S ribosomal cDNA（gi|7595414）设计引物，其 PCR 扩增产物为内标。引物详情见表 1。

荧光实时定量 RT-PCR 采用 SYBR GREEN PCR MasterMix（TOYOBO）试剂盒，在 eppendorf realplex4 mastercycler epgradient *S* 进行。每个反应体系加入 SYBR GREEN PCR MasterMix（TOYOBO）7.5 nL，模板 10 ng，每个引物 0.3 μmol · L^{-1}，终体积为 15 μL SYBR GREEN PCR MasterMix。

95 ℃ 1.5 min；　95 ℃变性 30 s，退火温度分别为 57、58 和 60 ℃ 30 s，72 ℃延伸 30 s，扩增 30 循环；72 ℃延伸 10 min。温度从 65 ℃升至 95 ℃，每 0.2 ℃持续 1 s 捕捉数据。每处理 3 次生物学重复，每个样品 3 次技术重复。

在每个 96 孔 PCR 板设置浓度梯度，建立标准曲线。realplex software 处理数据，相对标准曲线法得到基因的相对表达量，Sigmaplot 作图。

为了增加可信度，参考相关报道（Yang et al.，2002；王冰林，2005），规定接种与对照 Ct 值之比为 Ratio，基因的 Ratio > 2.2 为显著上调表达，Ratio < 0.45 为显著下调表达。

表 1　未知功能 ESTs 和内标的引物序列

Table 1　Sequences of primer pair in the negative control and ESTs associated with unknown function with their annealing temperature and length of PCR products

EST 编号 EST ID	登录号 GenBank accession No.	正向引物 Forward primer （5' to 3'）	反向引物 Reverse primer （5' to 3'）	退火温度/℃ T_m	片段长度/bp Product size
2I15	GD254229	AGAACTTGAAACAGTCGGTGGT	GAACTTGCCTTGTCCCTC	57	147
3C19	GD254243	TAATCCTCTTTCGGTATGTT	GTAGTGATGAATGTCGGTAA	58	136
1O08	GD254207	CGTAAGTCGGTTTATCAGG	GAGAAGGCGTGAAGAAGC	58	149
18S	gi|7595414	GTTGCTTAAGGACTCCGCCA	AGGGGTACCTCCGCATAGCTAG	60	200

2 结果与分析

2.1 未知功能基因的确定

利用反向 Northern 杂交，在 2 个 SSH 文库中筛选差异表达片段。经测序和 Blastn 检索后发现，与差异表达片段 2I15（GD254229）、3C19（GD254243）和 1O08（GD254207）匹配的皆为未知功能的蛋白质，详细比对结果见表 2。

表 2 未知功能 ESTs

Table 2 Identified ESTs involved in unknown function

EST 编号 EST ID	登录号 GenBank accession No.	片段长度/bp Length	预测功能 Putative predicated function of genes	匹配序列来源 Source of matching sequence	匹配序列登录号 Accession No.	E-值 E-value
2I15	GD254229	175	Unknown protein（AT4G18570）	*Arabidopsis thaliana*	NM_117970.3	1.00E-26
3C19	GD254243	359	Unknown protein	*Arabidopsis thaliana*	NP_196670.1	4.00E-16
1O08	GD254207	233	Unknown protein	*Arabidopsis thaliana*	NP_565723.1	3.00E-14

2.2 未知功能基因在抗病和感病自交系中的表达分析

为了验证未知功能基因是否参与黄瓜霜霉病抗病反应，采用实时荧光定量 RT-PCR 研究了这些基因在不同抗病和感病自交系抗病反应中的表达。结果（图 1）表明，在接种霜霉病后 4 h，*2I15* 在抗病自交系 IL57 中的相对表达量达到 5，呈特异上调表达，随后表达丰度逐渐减低，到 48 h 该基因的相对表达量仅为 0.23，呈特异下调表达；同样，在感病自交系 IL112 接种后 48 h，该基因的相对表达量为 0.41，亦呈显著下调表达，而在其它接种时间段，*2I15* 的相对表达量介于 0.56～2.1 之间，呈微弱上调或下调表达。

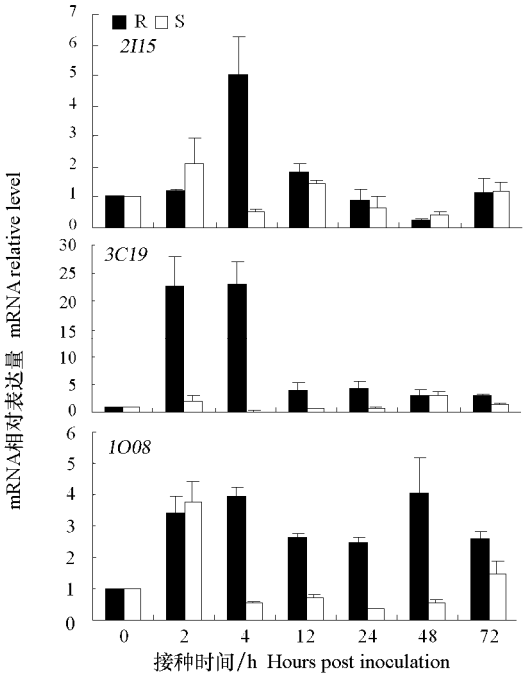

图 1 未知功能基因在黄瓜抗病（R）和感病（S）自交系中的霜霉病菌诱导表达谱

Fig. 1 Expression profiling of the genes with unknown function in resistant（R）and susceptible（S）inbred lines inoculated by *Pseudoperonospora cubensi*

3C19 在抗病自交系 IL57 接种 2、4 h 后高丰度特异上调表达，随后表达丰度下降且特异表达至 72 h；然而，在感病自交系 IL112 接种 4 h 后，该基因的相对表达量为 0.15，呈特异下调表达，接种 48 h 时，相对表达量为 2.8，呈显著上调表达，其它时间段的表达丰度介于 0.55 ~ 2.1 之间。

1O08 在抗病自交系 IL57 接种后 2 ~ 72 h 呈特异上调表达，感病自交系接种 2 h 也可诱导该基因特异上调表达，24 h 诱导其特异下调表达（图 1）。

总之，抗病自交系 IL57 接种霜霉病后，均可诱导这 3 个抗病相关未知功能基因早期高丰度特异上调表达。

2.3　未知功能基因对信号分子的应答

应用实时荧光定量 RT-PCR，验证了信号分子对这些基因的诱导，结果见图 2。经 JA 诱导 8 h 后，*2I15* 呈特异下调表达，处理 12 h 时，SA、JA 和 ABA 均可诱导该基因显著下调表达。*3C19* 在 SA 诱导 8 和 24 h，呈显著下调表达，ABA 处理 24 h,诱导 *3C19* 特异上调表达。*1O08* 经 SA、JA 和 ABA 处理 12 h，均可诱导该基因特异上调表达。

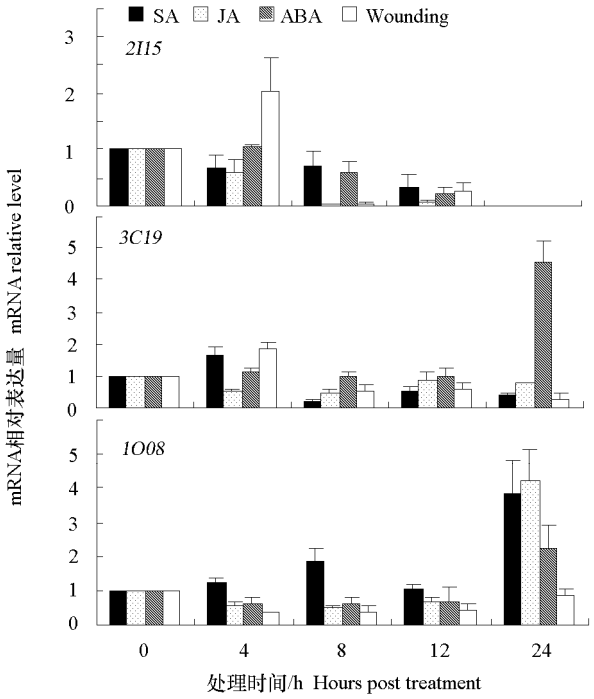

图 2　未知功能基因在黄瓜抗病自交系 IL57 经茉莉酸（JA）、脱落酸（ABA）、水杨酸（SA）和伤害（Wounding）处理后的诱导表达谱

Fig. 2　Expression profiling of the genes with unknown function induced by salicylic acid（SA），jasmonic acid（JA），abscissic acid（ABA），and wounding stresses in the resistant inbred line IL57

2.4　未知功能基因对非生物胁迫应答

其它非生物胁迫对这些基因的诱导效果见图 2、图 3 和图 4。机械伤害处理可显著抑制 *2I15*（8 和 12 h）、*3C19*（8 和 24 h）和 *1O08*（4、8 和 12 h）的表达（图 2）；冷害处理显著抑制了 *2I15*、*3C19* 和 *1O08* 的表达（图 3）；热激处理显著抑制了 *2I15* 和 *3C19* 的表达，特异诱导 *1O08* 的上调表达（图 3）；高盐胁迫可诱导这 3 个基因高丰度特异上调表达（图 4）。

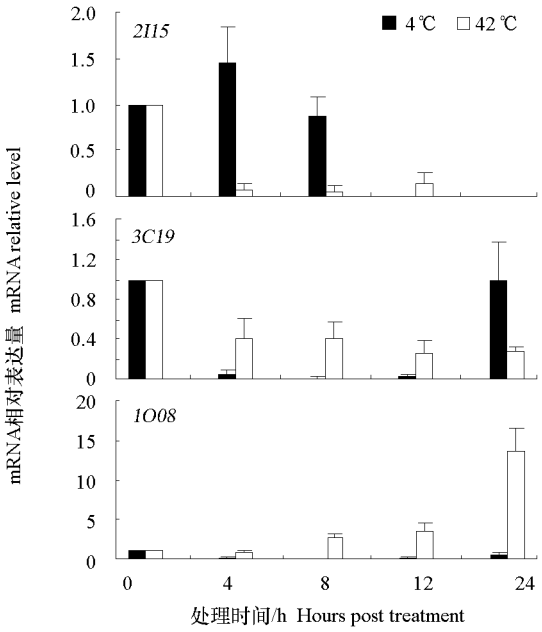

图 3 未知功能基因在黄瓜抗病自交系 IL57 经冷害（4 ℃）和热激（42 ℃）处理后的诱导表达谱

Fig. 3 Expression profiling of the genes with unknown function induced by cold（4 ℃）and heat（42 ℃）shock in the resistant inbred line IL57

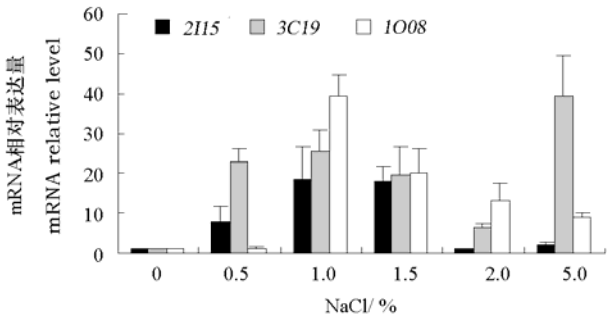

图 4 未知功能基因在黄瓜抗病自交系 IL57 经 NaCl 处理后的诱导表达谱

Fig. 4 Expression profiling of the genes with unknown function induced by NaCl tress in the resistant inbred line IL57

3 讨论

3.1 未知功能基因可能参与了黄瓜霜霉病抗病反应

本研究利用抑制差减杂交筛选到了 3 个抗病相关未知功能基因，为了验证这些基因是否参与了黄瓜霜霉病抗病反应，又分析了这些基因在黄瓜抗、感自交系中的表达模式。结果显示，这 3 个基因在不同的接种时间点具体、详尽的表达模式有所差别，但其共同的特征是在抗病自交系接种的早期可显著、高丰度特异表达，而在感病材料中，虽然 *1O08* 和 *3C19* 分别在 2、48 h 亦可呈特异上调表达，但其表达丰度较低，而且这 3 个基因的表达至少在一个时间点受到了显著抑制（图 2）。大量文献报道，抑制差减杂交是筛选特异表达基因的有效方法（Yang et al.，1999；Schenk et al.，2000；Gao et al.，2008；Salmona et al.，2008），结合特异表达基因在抗、感材料中的表达模式分析，已成

功筛选和验证到抗病相关基因（Tian et al.，2003；Degenhardt et al.，2005；Kottapalli et al.，2007）。深入研究还发现，在不同抗性材料中，差异表达基因的编码产物被归为两大类：一类为调节蛋白，主要包括蛋白激酶、蛋白磷酸酶和转录因子等；另一类为功能蛋白，主要包括病程相关蛋白、防卫相关代谢的关键酶、解毒酶及细胞运转蛋白等（王冰林，2005），大多数调节蛋白在抗病反应早期即可参与其中（Zeidler et al.，2004；van den Burg et al.，2008；Pandey & Somssich，2009），而且，编码抗性相关蛋白的基因在抗性材料中的表达丰度要高于感病材料中的表达（Degenhardt et al.，2005）。虽然目前还缺乏这些基因特异参与黄瓜霜霉病抗病反应的直接证据，但其在抗性材料中早期、显著高丰度的特异表达暗示，这些基因可能参与了黄瓜霜霉病抗病反应。这些基因是否特异性参与黄瓜霜霉病抗病反应、是否具有明确的功能等尚需进一步验证。总之，未知功能基因在抗病反应中功能的深入发掘对抗病基因的发现、乃至抗病分子机制的完善具有重要意义。

3.2　未知功能基因可能涉及 SA 和 JA/ET 介导的抗病途径

植物受到病原菌浸染后，植物会作出各种防卫反应，在复杂的抗病反应中有一系列的信号分子参与其中，已研究证明，SA 和 JA/ET 是植物防卫反应信号传导链的重要信号分子（Klessig et al.，2000；Eulgem et al.，2004；Steffens & Sauter，2009）。本研究发现，*2I15* 可被 SA 和 JA 显著抑制表达（图 2），暗示其可能涉及抗病信号分子诱导的胁迫反应。在病原菌侵染 2 ~ 72 h，*1O08* 持续呈显著上调表达（图 1），而且，有趣地是，外源 SA 和 JA 处理可同时显著诱导 *1O08* 上调表达（图 2），根据最近的研究结果‘植物的抗病反应需要信号分子 SA 和 JA 的协同作用’（Halim et al.，2009）推测，在黄瓜防御霜霉病侵染过程中，*1O08* 可能作为 SA 和 JA 信号传导分子的共同作用体或连接器（connector）而参与抗病反应。

3.3　非生物胁迫

大量研究表明，植物防卫反应与胁迫反应之间存在交互作用，在植物对病原菌应答的基因中，包含一些伤害、干旱、热激、冷害、高盐以及其它非生物胁迫的基因（Seki et al.，2002；Dombrowski，2003；Yuan et al.，2005）。在正常情况下，‘胁迫基因’保持沉默状态，但遭受到胁迫时则迅速表达、参与胁迫反应（Shinozake & Yamaguchi-shinozakik，2000），病原菌能诱导‘胁迫基因’的表达说明植物防卫反应和非生物胁迫反应相统一的一面。本研究发现，机械伤害、冷害、热激和高盐等胁迫可显著抑制或诱导 *2I15*、*3C19* 和 *1O08* 的特异表达（图 2，图 3 和图 4）。上述结果表明，这些基因参与了多种非生物胁迫反应，由于生物胁迫和非生物胁迫存在许多相同的机制。由此推测，这些未知功能基因可能具有参与生物和非生物胁迫反应的作用。

References

Chomczynski P，Sacchi N. 1987. Single step methods of RNA isolation by acid guainidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem，162：156－159.

Degenhardt J，Al-Masri A N，Kürkcüoglu S，Szankowski I，Gau A E. 2005. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. Mol Genet Genomics，273：326－335.

Diatchenko L，Lau Y F C，Campbell A P，Chenchik A，Moqadam F，Huang B，Lukyanov S，Lukyanov K，Gurskaya N，Sverdlov E D，Siebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization：A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA，93：6025－6030.

Dombrowski J M. 2003. Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. Plant Physiol，132：2098－2107.

Eulgem T，Weigman V J，Chang H S，McDowell J M，Holub E B，Glazebrook J，Zhu T，Dangl J L. 2004. Gene expression signatures from three

genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. Plant Physiol，135：1129－1144.

Gao C，Wang Y，Liu G，Yang C，Jiang J，Li H. 2008. Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispid*. Plant Mol Biol，66：245－258.

Halim V A，Altmann S，Ellinger D，Eschen-Lippold L，Miersch O，Scheel D，Rosahl S. 2009. PAMP-induced defense responses in potapo require both salicylic acid and jasmonic acid. Plant J，57：230－242.

Klessig D F，Durner J，Noad R，Navarre D A，Wendehenne D，Kumar D，Zhou J M，Shah J，Zhang S，Kachroo P，Trifa Y，Pontier D，Lam E，Silva H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defence. Proc Natl Acad Sci USA，97：8849－8855.

Kottapalli K R，Rakwal R，Satoh K，Shibato J，Kottalli P，Iwahashi H，Kikuchi S. 2007. Transcriptional profiling of Indica rice cultivar IET8585（Ajaya）infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas*. Plant Physiol Bioch，45：834－850.

Kunkel B N，Brooks D M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol，5：325－331.

Li C，Bonnema G，Che D，Dong L，Lindhout P，Visser R，Bai Y. 2007. Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. Mol Plant-Microbe Interact，20：1161－1172.

Pandey S P，Somssich I E. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiol，150：1648－1655.

Salmona J，Dussert S，Descroix F，de Kochko A，Bertrand B，Joët T. 2008. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. Plant Mol Biol，66：105－124.

Schenk P M，Kazan K，Wilson I，Anderson J P，Richmond T，Somerville S C，Manners J M. 2000. Coordinated plant defense response in *Arabidosis* revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci USA，97：11655－11660.

Seki M，Narusaka M，Ishida J，Nanjo T，Fujita M，Oono Y，Kamiya A，Nakajima M，Enju A，Sakurai T，Satou M，Akiyama K，Taji T，Yamaguchi-Shino-zaki K，Carninc P，Kawai J，Hayashizaki Y，Shinozaki K. 2002. Monitoring the expression profiles of ca. 7000 *Arabidosis* genes under drought，cold，and high-salinity stress using a full-length cDNA microarray. Plant J，31：279－292.

Shinozake Y，Yamaguchi-shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature：Differences and cross-talk between two stress signalling pathways. Curr Opin Plant Biol，3：217－223.

Steffens B，Sauter M. 2009. Heterotrimeric G protein signaling is required for epidermal cell death in rice. Plant Physiol，151：732－740.

Tian Z D，Liu J，Xie C H. 2003. Isolation of resistance related-genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the *R*-gene free potato. Acta Genet Sin，30：597－605.

van den Burg H A，Tsitsigiannis D I，Rowland O，Lo J，Rallapalli G，MacLean D，Takken F L W，Jones J D G. 2008. The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defence responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. Plant Cell，20：697－719.

Wang Bing-lin. 2005. Induced expression profiling of potato genes associated with quantitative resistance to late blight and preliminary exploring of quantitative resistance mechanism［Ph. D. Dissertation］. Wuhan：Huazhong Agricultural University. (in Chinese)

王冰林. 2005. 马铃薯晚疫病水平抗性相关基因诱导表达谱及水平抗性机制初探［博士论文］. 武汉：华中农业大学.

Yamamoto K，Sasaki T. 1997. Large-scale EST sequencing in rice. Plant Mol Biol，35：135－144.

Yang G P，Ross D T，Kang W W，Brown P O，Weigel R J. 1999. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. Nucleic Acids Res，27：1517－1523.

Yang I V，Chen E，Hasseman J P，Liang W，Frank B C，Wang S，Sharov V，Saeed A I，White J，Li J，Lee N H，Yeatman T J，Quackenbush J. 2002. Within the fold：Assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. Genome Biol，3：research0062.1-research0062.12.

Yuan H，Chen X，Zhu L，He G. 2005. Identification of genes responsive to brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål（Homoptera：Delphacidae）feeding in rice. Planta，221：105－112.

Zeidler D，Zahringer U，Gerber I，Hartung T，Bors W，Hutzler P，Durner J. 2004. Innate immunity in *Arabidosis thaliana*：Lipopolysaccharides active nitric oxide synthase（NOS）and induce defence genes. Proc Natl Acad Sci USA，101：15811－15816.