

溃疡病菌诱导下毛白杨防御相关基因的应答反应

张秀英^{1,2}, 宋瑞清¹, 理永霞³, 吕全³, 刘振宇⁴, 张星耀^{3*} (1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林长春 130000; 3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 4. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271000)

摘要 [目的] 研究溃疡病菌诱导下毛白杨防御相关基因的应答反应。[方法] 以毛白杨为试验材料, 用溃疡病菌对 7 月龄幼苗进行接种, 提取诱导前后的毛白杨树皮 mRNA, 通过反转录生成 cDNA, 构建 72 h 差异表达的 SSH-cDNA 文库。随机挑选 199 个阳性克隆进行测序, 将测序结果与 NCBI 基因库中序列进行比较, 并对这些 EST 在 dbEST 数据库进行同源检索分析, 利用 RT-qPCR 对文库中 7 个基因进行进一步分析。[结果] 172 个 EST 找到了同源序列, 其中有 32 个序列与防御相关。在毛白杨受到溃疡病菌诱导时, 这些防御基因的表达量明显上升。[结论] 该研究为开展毛白杨抗溃疡病重要功能基因的克隆和鉴定奠定了基础。

关键词 毛白杨; 葡萄座腔菌; 防御相关基因; 抑制性消减 cDNA 文库; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S763.13 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03555-04

Response of Defense-related Genes of *Populus tomentosa* Induced by *Botryosphaeria dothidea*

ZHANG Xiu-ying, ZHANG Xing-yao et al (School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To study the response of defense-related genes of *Populus tomentosa* induced by *Botryosphaeria dothidea*. [Methods] Total RNA was extracted from the bark of *Populus tomentosa* before and after inoculation by *Botryosphaeria dothidea*. Barks mRNA were purified and transcribed into cDNA. Constructed a poplar-pathogen interaction cDNA library from fungus inoculated poplar bark 72 h post-inoculation (hpi), randomly selected 199 positive cloning. Selected unisequences defense-related, and further analysis by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). [Results] 172 EST sequences showed homology to sequences with assigned putative identity in public databases, including 32 sequences associated with defense-related genes. [Conclusion] The expression of these genes was significantly increased in *Populus tomentosa* induced by *Botryosphaeria dothidea*. It is expected that this study will lay certain foundation for cloning of major genes of *Populus tomentosa* having function of resisting *Botryosphaeria dothidea*.

Key words *Populus tomentosa*; *Botryosphaeria dothidea*; Defense-related genes; SSH cDNA library; Real Time PCR (qRT-PCR)

杨树溃疡病是一种慢性病, 主要危害树干, 分布广泛, 严重影响了杨树幼苗及幼树的生长, 已成为影响我国杨树人工林发展的主要因素之一。目前, 对杨树-病原相互作用的分子机制研究主要集中在杨树与锈菌^[1-2]和杨树与杨盘二孢菌^[3]的相互作用研究, 而对杨树-溃疡病菌的相互作用的分子机制研究较少^[4], 从基因组水平上研究病原菌的致病机理和机制更少。由于互作系统本身的复杂性, 要探究植物与病原菌互作的响应机制, 阐明其中的分子机理, 需要进一步深入开展关于基因调控机理方面的研究。

Diatchenko 等^[5]建立以 PCR 为基础的差减杂交技术, 具有高灵敏性、目的序列富集程度高、操作简便、丰度相对一致等优点。该技术因其显著特点受到广泛关注, 已成为差异表达基因的有效分离方法, 迄今为止在林木病害研究中已有许多报道^[6-7]。笔者用溃疡病高抗品种毛白杨作为试验材料, 接种溃疡病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 72 h 后构建 cDNA 文库, 同时利用获得的 EST 测序结果进行实时 PCR 验证, 进一步研究杨树树皮在溃疡病菌诱导后的基因表达情况。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料。毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.), 高抗树

种, 15 年生, 感病指数为 0~6.0^[8], 生长于中国林业科学院内, 采摘 1 年生健康枝条, 扦插 1 个月苗木生根后, 挑选生长状态一致的幼苗进行定植, 幼苗长至 7 月龄时用于试验。

1.1.2 病原菌及接种方法。试验菌株为 *Botryosphaeria dothidea* 菌株, 菌株号为 CXY001, 分离于杨树溃疡病斑, 经单孢培养鉴定, 再回接, 以此确认致病性(致病力中等), 保存于中国林科院菌种保藏中心。试验前, 先将病原菌活化, 参考赵仕光等的接种方法并稍加修改^[9]。接种 72 h 后取样, 截取病健交界处 0.5 cm × 1.0 cm 长条形树苗干部树皮(带形成层), 约每 500 mg 样品用锡铂纸包成 1 包后, 迅速投入液氮中, 于 -80 °C 下贮存备用(图 1)。对照采用接种无菌培养基后 72 h 取样。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 mRNA 的纯化。采用鼎国公司的植物 RNA 提取试剂盒提取毛白杨树皮的总 RNA, 使用 Plant RNAzol 试剂盒提取真菌的总 RNA, 使用微量紫外分光光度计进行 RNA 定量测定, 利用 Promega 公司的 mRNA 分离纯化试剂盒 [PolyA Tract Systems III (Z5300)] 分离纯化 mRNA, 通过电泳检测其完整性。

1.2.2 构建抑制性差减文库及重组子的鉴定。利用 Clontech 公司的抑制性差减杂交文库构建试剂盒 (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) 构建溃疡病菌诱导毛白杨 72 h 的差减文库。在试验过程中以真菌接种处理的杨树树皮作为试验方 (Tester); 参照方 (Driver) 一部分来源于培养基处理的杨树树皮的 mRNA, 一部分来源于培养基培养的真菌 mRNA (图 2)。将消减杂交反应后得到的 cDNA 与 pMD-19T 载体连接, 导入感

基金项目 林业公益性行业科研专项 (201204501); 中国林科院院部基金 (CAFYBB20111005-4); 科技部基础性工作专项 (2009FY210100)。

作者简介 张秀英 (1977-), 女, 山东平原人, 讲师, 在读博士, 从事分子生物学研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事森林病理学研究。

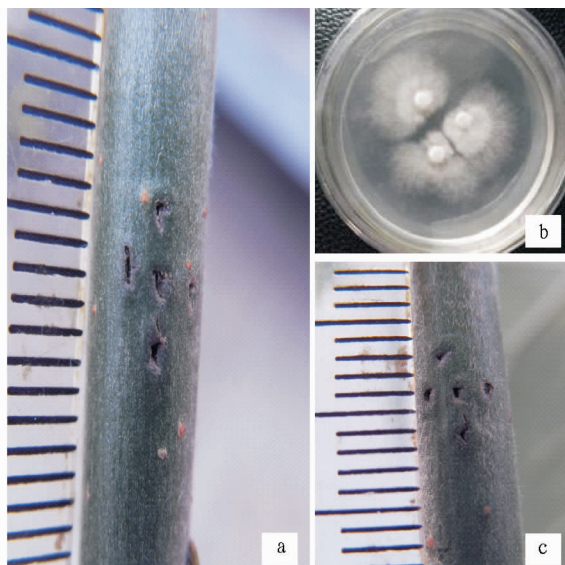
收稿日期 2014-04-03



注:1.对照;2.接种病原菌的毛白杨。

图1 毛白杨对照及接种72 h后的发病症状

受态细胞,振荡培养,将转化菌涂在含有 Amp 抗性的 LB 平板上,37 °C 下培养 16 h,通过蓝白斑筛选挑出阳性克隆,加入 96 孔细胞培养板中(含有 Amp/LB 液体培养基),摇床培养。吸取菌液,PCR 扩增,检测插入片段的大小。



注:a. *B. dothidea* 菌诱导毛白杨 72 h,作为试验方;b. 培养 72 h 的菌丝;c. PDA 培养基诱导毛白杨 72 h。将培养 72 h 的菌丝与 PDA 培养基诱导 72 h 的毛白杨按 1:1(mRNA)的比例混合,作为参照方。

图2 抑制差减文库的试验方和参照方

表1 Real-time PCR 引物序列

样品号	推测功能	5'-寡核苷酸	3'-寡核苷酸
CXY1446	kunitz trypsin inhibitor TI3 (KTI3)	CTCGGTGACCTTTGATCCTTATGTG	CGGTCACAATCAATCTCCTCTGAGT
CXY1804	P450 like protein precursor	TCCCAGGGACAAAGTGAACATTCTAG	ATTGTAGCTTTTGTATGTTGGCAGGA
CXY1421	zinc finger protein(Cys/His-rich)	TAGCAACGATGAGTTTATCTGAGGA	ACCCAAACCCTTGAGCAGTCATAGT
CXY1313	beta-glucosidase (Bgl)	GACTCCGTACCTCAGCAACCAT	TCACAAACGAAAGACGCCTC
CXY1727	Cysteine proteinase inhibitor	GGGCCGTCGTTTACTGGTG	CCTCTACTCCAAGTAAACGTGCAA
CXY0112	actin depolymerizing factor 7 (ADF7)	GACTTCACTCGCTGTTTG	CCTCTACTCGAACTTCA
CXY0504	calmodulin binding	TGCACTCCACTCCACTAAGAAACA	TGACTGTCTGCCATTCTCA
EF-1 α		CAAGCCCATGTTCTGGAGA	CACCGCTGGGATCCTTCTTC

1.2.3 抑制消减杂交文库测序及序列分析。抑制消减杂交文库测序由鼎国公司完成,将获得的 EST 序列进行 EST 前处理,剔除不符合要求的序列,然后递交 NCBI 网站,通过 NCBI 网站上的 BLAST(或者 BLASTN)序列比对工具,在 GenBank 的 dbEST 数据库上对 EST 序列进行同源检索分析。

1.2.4 Real-time PCR 定量检测。使用 7 月龄苗木进行接种试验。以不接种溃疡病菌毛白杨苗木作为对照方,以接种溃疡病菌的毛白杨作为测试方,分别于接种后 12、24、48、72、96 和 144 h 取样,剪取对照和接种材料的树皮置于液氮中,-80 °C 下保存备用。每个接种时间处理 5 株毛白杨,重复 3 次。

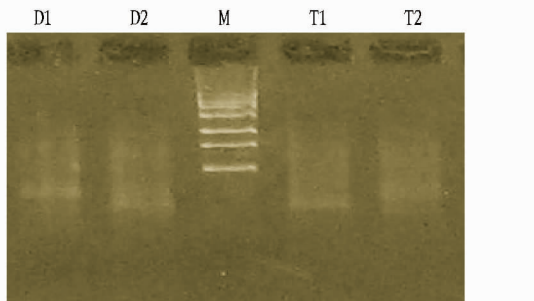
以 EF-1 α 作为内参基因,根据内参基因设计特异性引物,依此来设计 PCR 反应的循环数及目的基因扩增的模板量。使用 SYBR GREEN PCR MasterMix(TOYOBO)试剂盒进行荧光实时定量 RT-PCR,在 7500 循环仪(Biorad)进行实时定量 PCR 反应。Real-time PCR 反应体系包括 2 \times SYBR Green Supermix(Qiagen) 15 μ l、正向和反向引物各 0.5 μ l、cDNA 模板 2 μ l。PCR 反应条件为:95 °C 10 min;94 °C 20 s,60 °C 1 min,72 °C 1 min,45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对实时定量 PCR 结果进行定量分析,引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 酶切效果 分别取 2 μ g 试验方和参照方的 mRNA,经反转录生成双链 cDNA,经限制性内切酶 *Rsa*I 酶切,结果表明 *Rsa*I 酶切后酶切的 cDNA 大小范围明显小于未酶切的 cDNA,说明酶切完全,符合试验要求,可以用于差减文库的构建(图 3)。

2.2 文库筛选及插入片段大小 *Rsa*I 酶切后进行接头连接和 2 轮杂交,接着进行 2 轮抑制 PCR,参照方和试验方的大部分共有序列已被差减消除,不同表达序列得到进一步富集。随机挑取 100 个克隆进行质粒抽提,再进行 PCR 扩增和凝胶电泳,其中有 95 个存在有效产物。克隆的插入片段大小范围为 300 ~ 500 bp,与 SSH 预期插入片段的大小吻合。

2.3 抑制差减文库差减效率分析 经 2 次差减后的内参 *Tub* 基因,在经过 28 个循环后,隐约可见扩增条带,比未差减对照(经 23 个循环出现清晰的目的条带)出现扩增条带的时间晚,说明了经过 2 次抑制 PCR 后只保留了试验方受溃疡病菌侵染后,诱导表达的基因,试验方和参照方中共同转录的基因得到了有效扣除(图 4)。

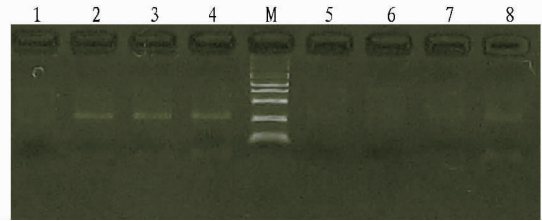


注: D1. 酶切前的对照; D2. 酶切后的对照; T1. 酶切前的处理; T2. 酶切后的处理; M. DL2000。

图3 酶切效率电泳图谱

2.4 溃疡病菌诱导下差异表达 cDNA 片段序列分析 在所获得 597 个阳性克隆中随机挑取 199 个进行 PCR 测序反应, 然后递交 NCBI 网站, 通过 NCBI 网站上的 BLASTX (或者 BLASTN) 序列比对工具, 在 GenBank 的 dbEST 数据库上对 199 个 EST 序列进行同源检索分析, 分析结果表明 172 个

ESTs 与 GenBank 数据库中现有的已知植物基因(蛋白)在结构上具有不同程度的相似性, 有 16.4% 的 EST 序列与抗病相关基因片段有较高的同源性, 如几丁质酶基因、蛋白酶抑制剂、胡豆合酶和细胞色素 P450 等; 此外, 还获得了一些其他基因, 如信号相关基因(锌指蛋白), 当病原菌诱导杨树时, 信号基因会发出信号传递给寄主杨树, 从而诱导基因表达量发生变化(表 3)。



注: M. DL2000; 1~4 为差减前 18、23、28 和 33 个循环; 5~8 为差减后 18、23、28、33 个循环。

图4 差减效率分析

表3 NCBI 数据库中 EST 序列的 BLASTx 和 BLASTn 的比对结果

样品号	频率	相关蛋白	E 值	预测功能
CXY1421	3	zinc finger protein (Cys/His-rich) [<i>Pinus radiata</i>]	2e-29	Contain the EAR transcriptional repressor domain
CXY0504	1	calmodulin binding [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1e-10	Promote the generation of reactive oxygen species
CXY0112	15	actin depolymerizing factor 7 (ADF7) [<i>Populus trichocarpa</i>]	8e-36	Regulate actin dynamics in plant cells
CXY0415	1	class I chitinase [<i>Elaeis guineensis</i>]	3e-10	PR-11 family protein
CXY1313	1	beta-glucosidase (Bgl) [<i>Ricinus communis</i>]	4e-1	PR-2 family protein
CXY1446	1	kunitz trypsin inhibitor TI3 (KTIB) [<i>Populus tremula</i>]	0.0	PR-6 family protein
CXY1727	1	Cysteine proteinase inhibitor [<i>Ricinus communis</i>]	1e-16	Same above
CXY1804	5	P450 like protein precursor [<i>Phillyrea latifolia</i>]	3e-39	P450-Involved in generating lignin
CXY0511	4	strictosidine synthase (STR) family protein [<i>Silene latifolia</i>]	6e-04	PR-10 family protein

2.5 目标基因表达模式的 Real-time PCR 分析 从构建的文库中选取 7 个基因(蛋白), 利用实时定量 PCR 分析其在 6 个时间点(12、24、48、72、96 和 144 h)的表达情况。从图 5 可以看出, CXY1446、CXY0504、CXY1313 和 CXY142 这 4 个基因在溃疡病菌诱导后表达趋势基本一致, 即诱导 12 h 后表达水平升高; 随着诱导时间的增长, 这 4 个基因的表达水平也随之升高; CXY0112、CXY1804 和 CXY1727 这 3 个基因的变化趋势基本相同, 即在溃疡病菌诱导 12 h 后这 3 个基因的表达水平都下降; 诱导 24 h 后随着诱导时间的增加, 基因表达量逐渐升高, 其中 CXY0112 基因的表达水平增加了 90 倍。

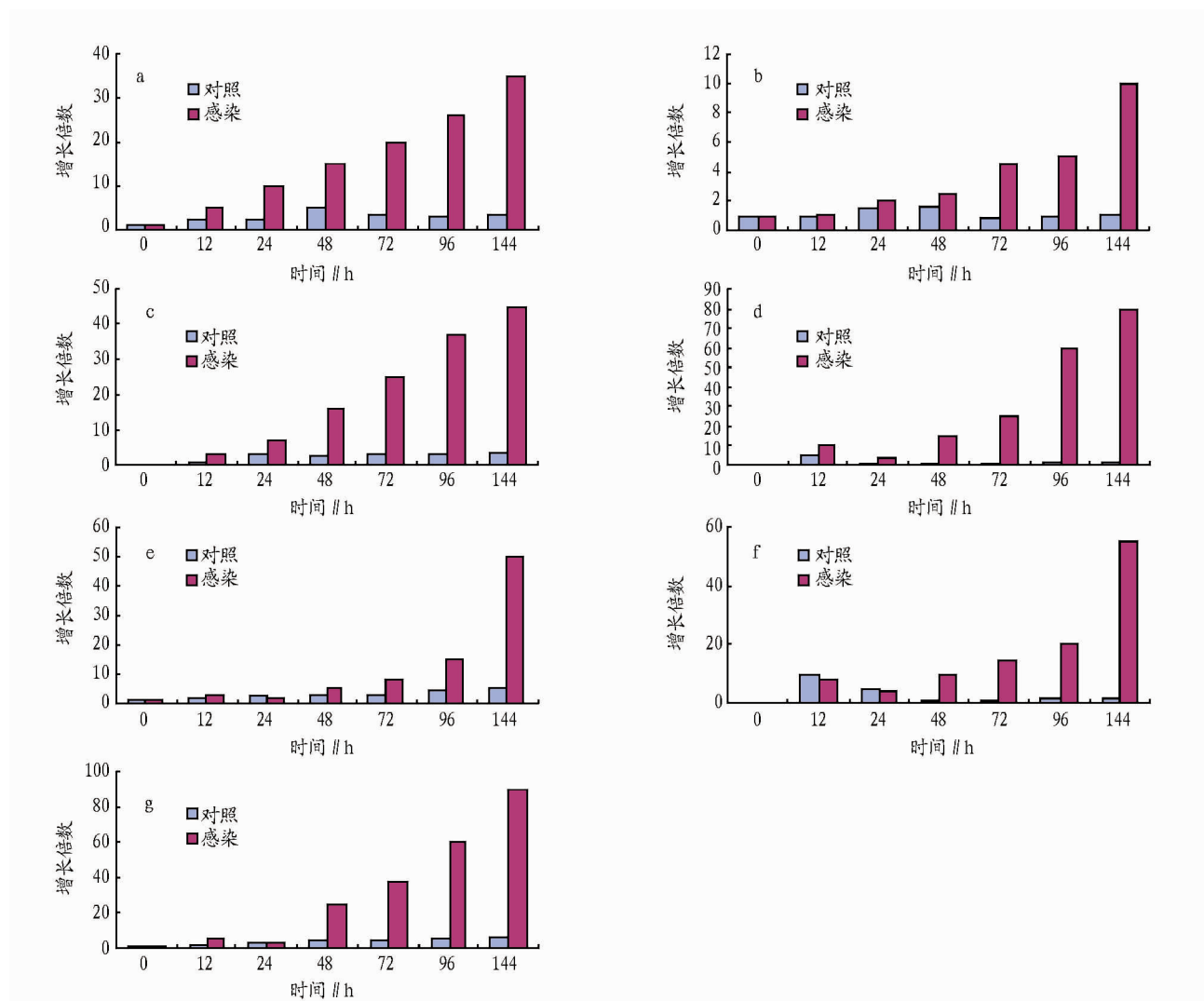
3 讨论

抑制差杂交技术是从基因组水平研究差异表达基因的重要方法之一, 已经成功应用于多种植物中^[10-13]。笔者通过抑制差杂交技术分析了溃疡病菌诱导毛白杨后基因的表达情况, 从中获得了一些可能参与防御的候选基因。

在生物体的多种代谢反应中, 苯丙烷代谢与抗病反应有着紧密关系, 而细胞色素 P450 恰恰是这个途径的关键酶。该研究 P450 (CXY1804) 表达水平先升后降, 诱导 24 h 后表达水平持续稳定增长, 表明在这个诱导过程中毛白杨接收了胁迫信号, 对抗溃疡病基因进行调控。P450 可以通过催化合成与抗病相关的次生代谢物^[14] (如木质素和植保素), 进而产

生与病原菌诱导和抗溃疡病相关的基因或物质。与病程相关的另一个重要的蛋白-几丁质酶与植物抗病原微生物有关^[15]。几丁质酶能够毁坏病原真菌细胞壁新沉积的物质, 以至病原真菌死亡, 并刺激了寄主的抗病反应, 使寄主做出相应的防卫反应。该研究中 CXY0415 属于此类蛋白。几丁质酶还可以与 β -1,3-葡聚糖酶协同作用, 激发植物多种抗病反应, 诱导抗病防卫反应的产生^[16]。该研究中 CXY1313 属于此类, 其表达水平一直处于上升趋势, 说明当溃疡病菌侵染毛白杨树皮时, β -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶这 2 种酶共同作用, 发挥了对病原菌的抵抗, 抑制了病原菌的生长。

肌动蛋白(Actin)是真核生物中一种重要的蛋白质, 大量积累在附着胞形成处, 可以阻止病原菌侵入^[17-18]。该研究中肌动蛋白因子 7 (ADF7) (CXY0112) 在初始阶段表达水平很低, 诱导 48 h 后表达逐渐增加, 144 h 达到最高, 是初始 90 倍, 大量积累, 以更好地抵制病原菌侵入。锌指蛋白 (CXY1421) 属于细胞信号传递基因, 可以将溃疡病菌的诱导信号传递给寄主毛白杨^[19]; 钙信使 (CXY0504) 除了传递信号外, 还参与并调节基因表达, 增强 Active oxygen 的产生, 更加有效抵抗外来病菌的入侵^[20-21]。锌指蛋白和 Ca^{2+} 作为抗病反应信号, 在生物体内是相辅相成、相互作用的, 互相接受和传递信号。胡豆合酶 (CXY0511) 是吲哚生物碱合成途径中



注:a. CXY1313;b. CXY1446;c. CXY0504;d. CXY1804;e. CXY1421;f. CXY1727;g. CXY0112。

图5 实时荧光定量 RT-PCR 结果

重要的中间产物,也参与植物的防御反应^[22]。

植物蛋白酶抑制剂^[23-24]已在西红柿、农作物大豆及栗属植物中被发现,且防御功能广泛存在。在毛白杨被溃疡病菌诱导后,半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CXY1727)的表达持续升高,主要是抑制叶片中衰老基因的表达,间接延长了寄主毛白杨的寿命,抑制了病原菌的生长繁殖,反映了蛋白抑制剂在植物防御反应中的功能;笔者还发现 Kunitz TI3 (CXY1446)抑制剂,在锈菌侵染颤杨和杂交杨中寄主表现出对锈菌的抗性^[25-26]。随着溃疡病菌侵入时间的增长,此抑制剂的表达量也迅速增加。

综上所述,抑制差减杂交技术是一种高通量检测基因差异表达的方法。该研究获得了一些防御的候选基因,为今后研究杨树与溃疡病抗性提供分子依据,为揭示此类病害发生的机理和病菌的侵染机制具有重要的意义。

参考文献

- [1] DAVID L J, HACQUARD S, FEAU N, et al. Chasing effectors in the secretome of *Melampsora larici-populina* [J]. *Biology of Plant-microbe Interactions*, 2010, 7: 1-6.
- [2] HACQUARD S, DUPLESSIS S, DELARUELLE C, et al. *Melampsora larici-populina* Transcript Profiling During Germination and Timecourse Infection

- of Poplar Leaves Reveals Dynamic Expression Patterns Associated with Virulence and Biotrophy [J]. *MPMI*, 2011, 24: 808-818.
- [3] 曾友志. 杨树黑斑病原-杨生褐盘二孢菌分泌蛋白及效应因子研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [4] 理永霞. 杨树与溃疡病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 互作机制 [D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [5] DIATCHENKO L, LAUY F C, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractively bridging: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (12): 6025-6030.
- [6] MIRELLA A, VOLKER J, BRIAN B, et al. Identification and monitoring of *Ulmus americana* transcripts during in vitro interactions with the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2010, 5: 1-13.
- [7] SIMONA M S, LEONARDO S, ANNALISA D G, et al. Characterization of genes associated with induced resistance against *Penicillium expansum* in apple fruit treated with quercetin [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2010, 56(1): 1-11.
- [8] 杨俊秀, 李武汉, 符毓秦, 等. 抗溃疡病杨树种类的调查研究 [J]. *西北林学院学报*, 1990, 5(4): 1-10.
- [9] 赵仕光, 朱玮, 岳红艳. 溃疡病菌在杨树树皮组织中的扩展和对寄主细胞超微结构的影响 [J]. *林业科学研究*, 1999, 12(2): 118-126.
- [10] AGUILAR-HERNÁNDEZ H S, SANTOS L, LEÓN-GALVÁN F, et al. Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168: 2102-2109.

3 讨论

笔者利用实验室近期分离的强毒株分别研制了蜂胶佐剂、黄芪多糖佐剂、铝胶佐剂、生理盐水 4 种灭活疫苗,将 4 种疫苗进行比较,结果表明 4 种疫苗均具有良好的安全性,但免疫效果存在一定的差异,黄芪多糖佐剂灭活疫苗产生抗体最快,在免疫后 7 d 其抗体滴度可以达到 $7.50 \log_2$,在免疫后 14 d 其血清抗体水平显著高于蜂胶苗和铝胶苗,且抗体维持时间较长,在免疫后 180 d 抗体效价仍可以达到 $5.75 \log_2$,保护率达 75%;铝胶佐剂灭活疫苗产生抗体较慢,免疫后 7 d 其抗体滴度达到 $6.25 \log_2$,在免疫后 28 d 其血清抗体水平才达到黄芪多糖苗和蜂胶苗;常规灭活疫苗抗体水平维持时间较短,免疫后 180 d 其抗体效价已降到 $4.75 \log_2$,保护率达 25%;铝胶苗和蜂胶苗抗体维持时间较长,在免疫后 180 d 抗体效价分别为 $5.50 \log_2$ 和 $5.25 \log_2$,攻毒保护率达 50%。由此可见,黄芪多糖和蜂胶作为天然的免疫增强剂,具有一定的药理活性和保健功能,以其作为佐剂的 RHDV 灭活疫苗吸收快,抗体产生效价高且维持时间较长,是值得进一步推广应用的新型疫苗;常规灭活疫苗中的组织抗原成分可在短时间内被动物机体大量吸收,产生较高水平的抗体,但维持时间较短。铝胶佐剂由于抗原成分释放缓慢,产生高水平抗体所需时间较长,但其维持时间可与蜂胶佐剂相当。

该研究表明,当 RHDV 抗体效价为 $6.25 \log_2$ 时,可以抵抗 RHDV 强毒的攻击;当抗体效价达 $5.75 \log_2$ 时,不能完全抵抗 RhDV 强毒的攻击,初步确定了 RHDV 血凝抑制抗体效价和攻毒保护率之间的关系。该研究还表明 RHDV 灭

活疫苗免疫 4 个月后 4 种疫苗的保护率均可达到 100%,而免疫 6 个月后 4 种疫苗的保护率均没有达到 100%,因此,确定 RHDV 的免疫期为 4~6 个月,绝对不能超过 6 个月,否则无法有效控制 RHDV 的发生与流行。

参考文献

- [1] 杨丽梅,马力,王艳萍,等.兔出血症病毒 ZB 株的分离与鉴定[J].家畜生态学报,2013,34(6):62-65.
- [2] OEM J K,LEE K N,ROH I S,et al. Identification and characterization of rabbit hemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea[J]. J Vet Med Sci,2009,71(11):1519-1523.
- [3] 谢金文,王金良,杨慧,等.兔病毒性出血症的诊断[J].畜牧与兽医,2012,44(2):107-108.
- [4] 刘胜江,薛华平,蒲伯清,等.兔的一种新病毒病——兔病毒性出血症[J].畜牧与兽医,1984,16(6):253-255.
- [5] LE GALL-RECULE G,ZWINGELSTEIN F,BOUCHER S,et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. Vet Rec,2011,168(5):137-138.
- [6] 马力,杨丽梅,王艳,等.兔瘟病毒 VP6 蛋白原核表达及其应用[J].家畜生态学报,2013,34(5):67-70.
- [7] BERTO-MORAN A,PACIOS I,SERRANO E,et al. Coccidian and nematode infections influence prevalence of antibody to myxoma and rabbit hemorrhagic disease viruses in European rabbits[J]. J Wildl Dis,2013,49(1):10-17.
- [8] 李荣权,刘明,李东风.两种黄芪多糖药物佐剂对兔瘟免疫效果的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2011(21):133-134.
- [9] GUO L,WANG D,HU Y,et al. Adjuvant activity of compound polysaccharides on chickens against Newcastle disease and avian influenza vaccine[J]. Int J Biol Macromol,2012,50(3):512-517.
- [10] 王宇航,王艳娟,陈昨含,等.禽霍乱蜂胶与氢氧化铝胶灭活疫苗免疫效果比较试验[J].吉林农业科技学院学报,2012,21(2):4-6.
- [11] MA X,GUO Z,SHEN Z,et al. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig[J]. Cell Immunol,2011,270(1):13-18.
- [12] MARTIN R C,GLOVER-CUTTER K,BALDWIN J C,et al. Identification and characterization of a salt stress-inducible zinc finger protein from *Festuca arundinacea*[J]. BMC Research Notes,2012,5:66.
- [13] 韩欢欢,马韬,谢冰.瓜类蔬菜白粉病抗性诱导及其抗病机制研究进展[J].中国农学通报,2012,28(25):124-128.
- [14] 刘高峰.NO 和钙信使系统在草酸诱导黄瓜叶片抗霜霉病中的作用[J].西北植物学报,2012,32(5):969-974.
- [15] SOHANI M M,SCHENK P M,SCHULTZ C J,et al. Phylogenetic and transcriptional analysis of a strictosidine synthase-like gene family in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement in plant defence responses[J]. Plant Biology,2009,11(1):105-117.
- [16] SIMON A C,BEN K S,LYN M,et al. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets[J]. Exp Bot,2003,53(384):1045-1056.
- [17] 窦世娟.水稻蛋白激酶底物的筛选和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的生化与表达分析[D].保定:河北农业大学,2011.
- [18] AZAIEZ A,BOYLE B,LEVÉE V,et al. Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi[J]. Mol Plant-Microbe Interact,2009,22:90-100.
- [19] BOYLE B,LEVÉE V,HAMEL L,et al. Molecular and histochemical characterisation of two distinct poplar *Melampsora* leaf rust pathosystems[J]. Plant Biol,2010,12:364-376.

(上接第 3558 页)

- [11] MIAO H X,QIN Y H,SILVA J A T,et al. Identification of differentially expressed genes in pistils from self-incompatible *Citrus reticulata* by suppression subtractive hybridization[J]. Molecular Biology Reporter,2013,40:159-169.
- [12] AL-SHANFARI A B,ABDULLAH S N A,SAUD H M,et al. Differential gene expression identified by suppression subtractive hybridization during late reopening of fruit in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2012,30:768-779.
- [13] XU H N,HE X Z,WANG K,et al. Identification of early nitrate stress response genes in Spinach roots by suppression subtractive hybridization[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2012,30:633-642.
- [14] 钟巍然,柴友荣,张凯,等.苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究[J].安徽农业科学,2008(13):5285-5289.
- [15] 阎瑞香,李宁.重组几丁质酶对采后葡萄贮藏过程中抗病效果的研究[J].华北农学报,2012,27(6):158-162.
- [16] 王廷璞,马静静,赵菲佚.β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在农作物病虫害防治中的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(26):14417-14419.
- [17] 余玮,邢虎成,揭雨成,等.苎麻茎皮 EST 数据库构建及肌动蛋白解聚因子(ADF)和雷-tubulin 基因时空表达分析[J].农业生物技术学报,2010,18(2):382-388.
- [18] 林江波,王伟英,邹晖,等.中国水仙肌动蛋白基因的克隆与表达分析[J].福建农业学报,2012,27(9):931-935.