

大白菜霜霉菌诱导抑制性消减杂交 cDNA 文库的构建和分析

唐永洽^{1,2}, 于拴仓², 朱月林¹, 张凤兰^{2,*}, 余阳俊², 赵岫云², 张德双²

¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

摘要: 以抗霜霉病大白菜双单倍体系(DH) ‘T12-19’ 为材料, 构建了霜霉病诱导表达的正向抑制性消减文库, 并利用反向 Northern 斑点杂交技术对 768 个阳性克隆进行了筛选, 共获得 57 个病原菌诱导上调表达的克隆。测序后得到 55 条通读表达序列标签(ESTs), 对这些 ESTs 序列进行聚类 and 拼接分析, 共获得 50 个 unigenes。Blast 分析表明, 37 个 unigenes 与已知基因高度同源, 占全部非重复序列的 67.3%。对已知功能基因按 MIPS 的分类方法进行功能分类, 发现这些基因的功能主要涉及物质与能量代谢、转录调控、蛋白质合成与代谢、膜及转运、信号转导、抗病防御等。为了验证文库筛选结果的可靠性, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析了其中 2 个克隆 BFCH10 和 BFIA7 的表达谱。结果表明, 这 2 个克隆在接种病菌 6 h 后明显上调表达, 与反向 Northern 斑点杂交结果基本一致。

关键词: 大白菜; 霜霉病; 抑制性消减文库; 实时荧光定量 PCR

Construction and Analysis of Suppression Subtractive Hybridization cDNA Library in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) Leaves Induced by *Peronospora parasitica*

TANG Yong-Qia^{1,2}, YU Shuan-Cang², ZHU Yue-Lin¹, ZHANG Feng-Lan^{2,*}, YU Yang-Jun², ZHAO Xiu-Yun², ZHANG De-Shuang²

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: A forward suppression subtractive hybridization (SSH) library was constructed from leaves of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) double haploid (DH) line ‘T12-19’ resistant to downy mildew which was induced by *Peronospora parasitica*. By reverse Northern blot analysis, 57 up-regulated expressed sequence tags (ESTs) were identified from 768 clones of the SSH library and were sequenced to generate 55 high-quality ESTs. These sequences clustered into 50 unigenes. Blast analyses showed that 37 unigenes shared high identity with genes of known functions involved in energy metabolism, transcription regulation, protein synthesis and fating, membrane transportation, signal transduction, defense, etc. To verify the screening efficiency, the expression profiling of two clones, BFCH10 and BFIA7, was analyzed by real-time PCR. The significant up-regulation was observed in leaves of 6 h post-inoculation for these two clones. These results matched the study by reverse Northern blot analysis.

Key words: *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*; downy mildew; suppression subtractive hybridization (SSH); real-time PCR

大白菜原产于我国, 是我国栽培面积最大的蔬菜作物, 目前已逐渐成为世界性的蔬菜作物。霜霉病是大白菜三大病害(病毒病、霜霉病和软腐病)之一, 其病原菌为寄生霜霉菌。该病从苗期到包心期及其生殖生长阶段均易发生, 严重影响了大白菜的产量及品质。

关于芸薹属植物霜霉病的遗传规律研究主要集中在青花菜、甘蓝和花椰菜上, 在这些作物中都

发现了由主效基因控制的抗病基因(Mahajan 等 1995; Farnham 等 2002; Coelho 和 Monteiro 2003; Monteiro 等 2005)。Farinho 等(2004)鉴定出了与青

收稿 2010-01-27 修定 2010-04-28

资助 国家科技支撑项目(2009BADB8B00-03)、大宗蔬菜产业技术体系建设专项资金、北京市自然科学基金(6102011)和北京市科技计划项目(Z09090501040902)。

* 通讯作者(E-mail: zhangfenglan@nercv.org; Tel: 010-51503038)。

花菜抗霜霉病基因 *Pp523* 紧密连锁的分子标记 OPK17-980和AT.CTA-133/134, 进而将其转化为稳定的SCAR (sequence-characterized amplified region) 和CAPS (cleaved amplified polymorphism sequences) 标记(Farinho 等 2007)。冷月强等(2007)在不结球白菜中, 获得了与抗霜霉病基因紧密连锁的RAPD (random amplified polymorphic DNA) 标记 AY12₁₂₃₈。Yu 等(2009)利用双单倍体系(double haploid, DH)群体定位了控制大白菜苗期霜霉病抗性的主效QTL (quantitative trait loci), 并获得了与之紧密连锁的SSR (simple sequence repeat)和RAPD 标记。然而, 关于大白菜与霜霉菌互作的分子机制的研究尚未见报道。

目前, 植物与病原菌互作分子机制的研究方法有很多, 最常用的有cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Bachem 等 1996)、DDRT-PCR (differential display reverse transcription PCR) (Liang和Pardee 1992)和RDA (representational difference analysis) (Lisitsyn 等 1993)等。与之相比, 抑制差减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)具有快速、高效、假阳性率低的特点(von Stein 等 1997)。该技术已经在植物上得到广泛的应用(Degenhardt等2005; Lin等2006; Li 等 2006; Liu 等 2008)。鉴于SSH技术的诸多优点, 本文利用SSH方法, 构建了大白菜霜霉病诱导的正向差异表达文库, 以期研究大白菜在霜霉病诱导下的差异表达基因, 为进一步揭示大白菜霜霉病抗性的分子机制及分子辅助育种打下基础。

材料与方 法

抗霜霉病大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) DH系材料‘T12-19’由北京市农林科学院蔬菜研究中心通过小孢子培养技术得到。幼苗在空调温室中培养, 温度控制在20~25℃。当幼苗长至三周龄、两片真叶完全展开时接种霜霉菌。病菌的采集和保存、病菌孢子悬浮液的制备以及喷施参照Yu 等(2009)的方法。

在霜霉菌接种后0、6、12、24、48和72 h 分别采集第二片真叶, 用灭过菌的棉球擦净叶片后立即用液氮速冻, -80℃保存。总RNA提取采用TRIZOL试剂盒(TIANGEN)。使用TaKaRa公司

的DNase I去除痕量基因组DNA。

SSH按Diatchenko等(1996)报道的方法, 采用PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech)构建抑制性消减文库, 文库以抗病材料‘T12-19’接种大白菜霜霉菌后6个时期的双链cDNA混合池作为消减杂交的实验方(tester), 以喷清水材料6个时期的双链cDNA混合池作为驱动方(driver)。SSH第二轮PCR产物经纯化后与pGM-T载体连接, 连接产物的热激转化大肠杆菌Top 10, 参照pGM-T克隆试剂盒(TIANGEN)说明书进行。

使用反向Northern斑点杂交进一步筛选差异表达克隆。以24 h接种霜霉菌和24 h喷水对照cDNA作为探针。探针的标记及免疫检测按照地高辛标记试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche)说明书进行。取10 μL PCR扩增产物沸水浴变性10 min, 立即冰浴; 然后取1 μL样品分别点于两张96点阵Hybond-N⁺尼龙膜(Amersham)上, 进行反向Northern斑点杂交。120℃烘膜固定30 min, 杂交温度为42℃。

为了验证文库筛选结果的可靠性, 采用实时荧光定量PCR技术分析其中2个克隆的表达谱。荧光定量PCR仪器为LightCycler480 (Roche), 所用荧光染料为SYBR Green I, 以大白菜甘油醛三磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照基因, 0 h样品作为标准品进行均一化处理。选取BFCH10和BFIA7两个克隆进行相对定量分析, 这两个基因在核苷酸水平上分别与编码拟南芥钙调蛋白结合蛋白和拟南芥钙调蛋白结合/转录调节因子有很高的同源性。荧光定量PCR引物参照表1。PCR反应体系为10 μL, 循环参数为: 95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 57℃ 20 s, 68℃ 20 s, 40个循环。溶解曲线分析在65℃以0.11℃·s⁻¹上升到95℃进行, 重复3次。为了检测PCR扩增效率, 将cDNA样品模板按5倍梯度稀释(1:1、1:5、1:25、1:125和1:625)。利用LightCycler Version 1.5 (Roche Diagnostics)软件分析相关的数据。

采用Pfaffl法(2001)进行相对定量分析。表达水平=(E_{目标})^{ΔCt_{目标(对照-试验)}}/(E_{参照})^{ΔCt_{参照(对照-试验)}}。E指实际扩增效率, Ct值指每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

表1 荧光定量PCR的引物
Table 1 Primers for real-time PCR

基因名称	登录号	引物序列(5' → 3')	产物大小 /bp
<i>GAPDH</i>	AF536826	CAGGTTTGGAAATGTCGAGG; GAGCTGTGAAGCACCTTTC	175
<i>BFCH10</i>	GT053404	ACTCTCCACGATGGTCCTTG; GGGACGTTAGGGGAGCTTAT	157
<i>BFIA7</i>	GT087893	TTGGATTTCCGTGATAAGCA; GTCGGTCTGTCACCAAGTT	122

实验结果

1 差减与未差减杂交产物的二次 PCR

如图1所示, 两轮PCR产物均呈现弥散状。第二次PCR后, 差减后样品片段分布在200~800 bp之间, 要明显小于未差减的对照样品分布, 这说明差减较为成功。

2 文库插入片段大小的检测

经菌落PCR检测, 得到阳性克隆共768个。经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果(图2)表明, 文库的插入片段分布在200~1000 bp, 主要集中在200~500 bp。

3 反向 Northern 斑点杂交和序列比对

将反向 Northern 斑点杂交得到的57个差异克隆测序, 共获得55条高质量的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs), 测序成功率为96.5%。

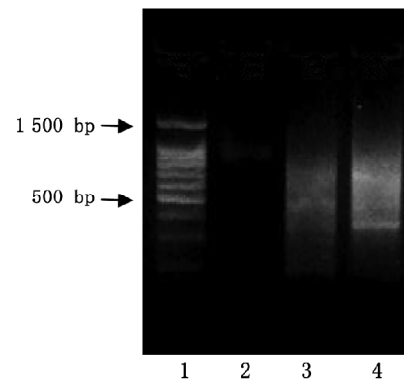


图1 差减及未差减杂交样品的巢式PCR产物
Fig.1 The nested PCR products of unsubtracted and subtracted samples

1: 100 bp DNA Ladder 分子量标准; 2: 差减杂交样品第一次PCR扩增结果; 3和4分别为差减杂交样品和未差减杂交样品第二次PCR扩增结果。

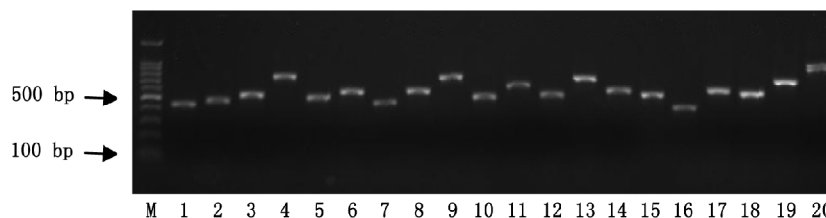


图2 差减 cDNA 文库插入片段的 PCR 检测
Fig.2 PCR analysis of inserted fragments from the subtracted cDNA library
M: 100 bp DNA Ladder 分子量标准; 1~20: 随机挑取的克隆。

55条ESTs序列提交GenBank数据库(登录号: GT053377~GT053406, GT087878~GT087902)。对55条ESTs序列进行聚类 and 拼接后, 共获得4个contigs, 46个 singlets。将所得序列与GenBank中nr数据库进行Blastx与Blastn同源比较, 同时在国际白菜基因组网站(<http://www.brassica-rapa.org/BRGP/index.jsp>)上进行Blastn/unigene比对, 共得到50个 unigenes, 其中有37个为功能已知序列, 占74%; 有7个 unigenes 为假定或未知蛋白; 有4条

ESTs为白菜克隆序列, 功能未知。

根据MIPS (http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html)基因功能分类方法, 50条 unigenes 非重复序列可以细分为10类(表2), 主要包括物质与能量代谢、转录调控、信号转导、蛋白质合成与代谢、膜及转运、抗病防御等。在已知功能序列中, 物质和能量代谢以及信号通路各占37.8%, 其中信号通路主要包括转录、蛋白质合成与代谢等。逆境应答类为第三大

表2 序列同源性比较结果

Table 2 Comparison result of sequence homology

功能分类	克隆号	登录号	同源序列	E 值	
代谢	BFGH3	GT053377	木质葡聚糖内转糖基化酶 ^{Nu}	1E-26	
	BFGH10	GT053378	丙酮酸磷酸二激酶 ^{Nu}	1E-179	
	BFGH12	GT053379	拟南芥核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基 ^{Nu}	2E-30	
	BFAG12	GT053381	甘蓝性油菜 BURP 结构域蛋白 ^X	3E-51	
	BFAG9	GT053385	拟南芥类硫氧还蛋白 2 ^X	4E-6	
	BFAB6	GT053387	甘蓝性油菜硝酸还原酶 ^{Nu}	1E-152	
	BFBA11	GT053390	拟南芥类胡萝卜素裂解双加氧酶 1 ^{Nu}	7E-43	
	BFBG4	GT053393	拟南芥 E1 α 丙酮酸脱氢酶 ^{Nu}	2E-45	
	BFCA6	GT053397	拟南芥蛋白酶体亚基 PAB1 ^{Nu}	1E-164	
	BFAA7	GT087883	拟南芥短链脱氢/还原酶家族蛋白 ^{Nu}	6E-63	
	BFIB10	GT087890	拟南芥蛋白激酶家族蛋白 ^{Nu}	1E-34	
	BFIC4	GT087895	拟南芥尿黑酸 1,2-双加氧酶 ^N	4E-38	
	BFID7	GT087897	拟南芥 M50 肽酶家族蛋白 ^N	1E-07	
	BFHC4	GT087902	拟南芥 PRL1 相互作用因子 K ^N	2E-110	
	信号通路	BFAF10	GT053384	拟南芥结合 mRNA ^N	8E-70
		BFCA3	GT053396	拟南芥 60S 核糖体蛋白 L9 ^{Nu}	1E-53
BFGD11		GT053399	拟南芥富含精氨酸/丝氨酸剪接因子 ^{Nu}	4E-79	
BFCB3		GT053405	拟南芥胚珠败育蛋白 5 ^X	6E-63	
BFCB6		GT053406	拟南芥谷氨酰胺合成酶 ^{Nu}	0	
BFHF4		GT087878	拟南芥放氧加强蛋白 2 ^{Nu}	1E-106	
BFHE3		GT087879	拟南芥含 CP12 结构域蛋白 1 ^{Nu}	1E-53	
BFEG3		GT087880	拟南芥 Argonaute 1 ^{Nu}	1E-148	
BFIB3		GT087886	拟南芥脱水早期应答蛋白 1 ^N	2E-86	
BFIB4		GT087887	拟南芥 60S 核糖体蛋白 L6 ^{Nu}	1E-23	
BFIB6		GT087888	拟南芥转录因子 ^N	3E-89	
BFIA7		GT087893	拟南芥钙调蛋白结合/转录调节因子 ^N	5E-50	
BFIC6		GT087899	拟南芥泛素连接酶 ^N	2E-34	
转运		BFAB12	GT053383	拟南芥液泡膜 H(+)-PPase ^{Nu}	5E-72
	BFIB9	GT087889	拟南芥光系统 II 亚基 Q-2 ^{Nu}	5E-46	
胁迫应答	BFAG8	GT053386	拟南芥信号识别颗粒 54 蛋白 ^{Nu}	1E-135	
	BFBA10	GT053391	拟南芥假定丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 ^{Nu}	1E-102	
	BFDE7	GT053395	拟南芥含有 DNAJ 热休克 N 末端结构域的蛋白 ^{Nu}	1E-14	
	BFCE4	GT053401	拟南芥环核苷酸通道 4 蛋白 ^X	3E-16	
	BFCH10	GT053404	拟南芥钙调蛋白结合蛋白 ^{Nu}	1E-82	
	BFHF9	GT087882	拟南芥 AN1 型锌指蛋白 ^{Nu}	4E-24	
功能未知蛋白	BFIE5	GT087892	大白菜几丁质酶 ^N	0	
	BFAD9	GT053382	拟南芥未知蛋白 ^{Nu}	1E-114	
	BFEE1	GT053388	拟南芥假定蛋白 ^{Nu}	0	
	BFBB10	GT053389	拟南芥假定蛋白 ^{Nu}	0	
	BFGD9	GT053398	拟南芥未知蛋白 ^N	2E-34	
	BFCE5	GT053402	拟南芥假定蛋白 ^N	1E-32	
	BFEG4	GT087881	拟南芥未知蛋白 ^N	4E-133	
其它 ESTs	BFIC9	GT087891	拟南芥未知蛋白 ^{Nu}	1E-112	
	BFBB4	GT053392	拟南芥 rRNA ^N	1E-51	
	BFCE10	GT053403	大白菜克隆 KBrS003O10 ^N	1E-65	
	BFIB2	GT087885	大白菜克隆 KBrB037F09 ^N	0	
	BFIB8	GT087894	大白菜克隆 KBrB007O13 ^N	1E-134	
	BFID6	GT087896	大白菜克隆 KBrB037F09 ^N	4E-51	

X: Blastx 分析; N: Blastn 分析; Nu: Blastn/unigene 分析。

类, 涉及信号转导及抗病防御等, 占 19.4%。

4 荧光定量 PCR 相对定量分析

为了进一步验证反向 Northern 斑点杂交筛选结果的可靠性, 本研究采用荧光定量PCR的方法验证了文库中可能与抗病性相关的两个克隆BFCH10和BFIA7。结果显示: GAPDH、BFCH10和BFIA7熔解曲线均为锐利的单一峰, 扩增曲线的斜率分别为: -3.416、-3.276和-3.484, 符合实验的要求。利用软件分析分别求出每个基因不同时期相对于0 h的表达水平。BFCH10和BFIA7荧光定量检测结果见图3, 接种霜霉菌后, 二者均表现为先升高后降低的表达趋势, 在接种霜霉菌后6 h相对表达量达到最高, 相对于未处理(0 h)上升了10倍左右, 随后又逐渐回落至初始水平。BFCH10和BFIA7喷

水对照处理在各时期的表达也呈相同的变化趋势, 但相对表达量均低于同时期接种霜霉菌的相对表达量。

讨 论

植物抗病机理的研究一直是植物学领域研究的热点问题。植物与病原体(病毒、细菌以及真菌等)的互作关系是两个有机体之间的竞争关系。高等植物已经在长期的进化过程中形成了复杂的防御系统进而保护自身不受侵害(McDowell和Dangl 2000)。目前, 关于大白菜与霜霉菌互作的分子机制的研究尚未见报道。鉴于SSH技术的诸多优点, 本文采用该方法构建了大白菜霜霉病诱导的正向差异表达文库, 以期研究大白菜在霜霉病诱导下的差异表达基因, 为进一步揭示大白菜霜霉病抗性的分子机制奠定基础。在文库构建的过程中, 本研究对其中的关键环节, 包括总RNA质量、接头连接效率、差减效率等进行了严格的控制, 保证了文库的质量。菌液PCR扩增结果表明cDNA插入片段大小主要分布在200~500 bp之间, 符合实验预期要求, 为高效筛选差异表达基因奠定了基础。

本研究采用反向Northern杂交的方法, 从文库中筛选获得了37个与已知功能基因同源的ESTs, 其中包含了与几丁质酶基因序列相似性达99%的克隆BFIE5。几丁质酶是一种重要的病程相关蛋白, 能催化水解真菌细胞壁中的几丁质, 从而抑制真菌的生长和繁殖, 能够提高植物的抗真菌能力(Melchers和Stuiver 2000)。李新玲等(2008)研究表明, 转几丁质酶基因的小麦后代对白粉病田间混合菌种的抵抗能力增强。在文库中还筛选出了与信号转导有关的克隆, 这些克隆包括BFBA10、BFCE4、BFCH10和BFIA7, 它们分别与拟南芥假定丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine protein kinase, putative)、核苷酸通道4蛋白(cyclic nucleotide-gated cation channel 4, CNGC4)、钙调结合蛋白(calmodulin-binding protein, CaMBP)和钙调蛋白结合/转录调节因子(calmodulin binding/transcription regulator)等的同源性都在90%以上。由CaM调控的CNGCs在信号转导、代谢和生长过程中具有重要作用。在病原菌侵染时参与过敏反应抗病信号应答(Balague等2003)。CaMBP能够提高CaM

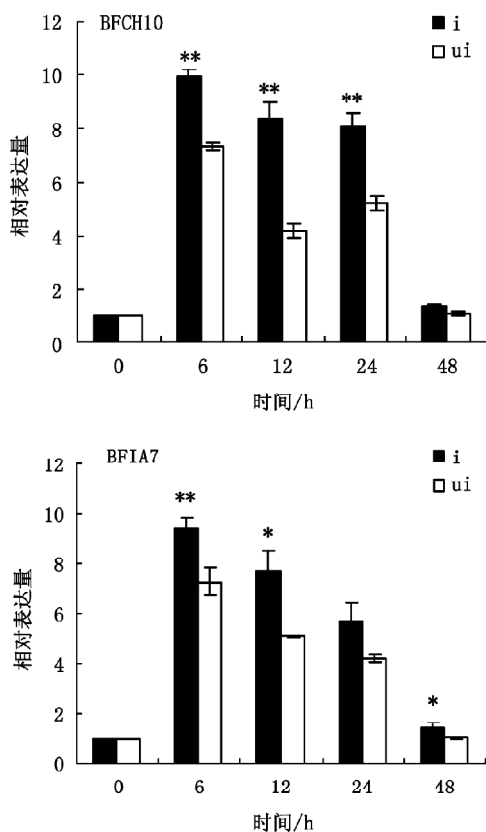


图3 荧光定量PCR法分析BFCH10和BFIA7受病菌侵染后的表达

Fig.3 Expression analysis of BFCH10 and BFIA7 in response to infection by real-time PCR

i: 接种霜霉菌处理样品; ui: 未接种霜霉菌的喷水对照样品。
**: 同时期处理与对照差异极显著; *: 同时期处理与对照差异显著; 没有标注的时期处理与对照差异不显著。

结合 Ca^{2+} 的能力, 并激活其它的酶类活性(Liao 等 1996)。而 CaM 是 Ca^{2+} 信号受体中最重要的一种 (Bouche 等 2005)。钙调蛋白结合 / 转录调节因子是一种乙烯诱导型钙调结合蛋白(Reddy 等 2002)。由此可以推断, 在霜霉病菌的诱导下, 大白菜产生了应激信号, 并将信号向体内传导, 进而引起一系列的防御反应。为了进一步验证反向 Northern 斑点杂交筛选结果的可靠性, 本研究采用荧光定量 PCR 的方法分析了 BFCH10 和 BFIA7 在霜霉病诱导后的表达谱。结果表明, BFCH10 和 BFIA7 受霜霉菌诱导后 6 h 都明显上调表达, 且接病处理与喷水处理差异极显著, 这与反向 Northern 斑点杂交所得结果一致。

综上所述, 该文库的构建具有一定的科学性, 从文库中通过筛选测序得到的克隆具有一定的代表性, 是受霜霉菌侵染后差异性表达的克隆。不过少量的验证难免有一些片面性, 不足以说明复杂的抗病机理, 因此还需要对文库中筛选出的其它差异表达的克隆作进一步的定量分析和功能验证。

参考文献

- 李新玲, 徐香玲, 张楠楠(2008). 转几丁质酶基因的小麦后代遗传分析和抗病性鉴定. 植物生理学通讯, 44 (1): 65~68
- 冷月强, 侯喜林, 史公军(2007). 白菜抗霜霉病基因的 RAPD 标记. 园艺学报, 34 (3): 763~766
- Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant J, 9 (5): 745~753
- Balague C, Lin BQ, Alcon C, Flottes G, Malmstrom S, Kohler C, Neuhaus G, Pelletier G, Gaymard F, Roby D (2003). HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family. Plant Cell, 15: 365~379
- Bouche N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. Annu Rev Plant Biol, 56: 435~466
- Coelho PS, Monteiro AA (2003). Inheritance of downy mildew resistance in mature broccoli plants. Euphytica, 131: 65~69
- Degenhardt J, Al-Masri AN, Kurkcuoglu S, Szankowski I, Gau AE (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 Gen Genomics, 273: 326~335
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED et al (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 93 (12): 6025~6030
- Farinho M, Coelho P, Carlier J, Svetleva D, Monteiro A, Leitao J (2004). Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*). Theor Appl Genet, 109: 1392~1398
- Farinho M, Coelho P, Monteiro A, Leitao J (2007). SCAR and CAPS markers flanking the *Brassica oleracea* L. Pp523 downy mildew resistance locus demarcate a genomic region syntenic to the top arm end of *Arabidopsis thaliana* L. chromosome 1. Euphytica, 157: 215~221
- Farnham MW, Wang M, Thomas CE (2002). A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. Euphytica, 128: 405~407
- Li RJ, Wang HZ, Mao H, Lu YT, Wei H (2006). Identification of differentially expressed genes in seeds of two near-isogenic *Brassica napus* lines with different oil content. Planta, 224: 952~962
- Liang P, Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 257: 967~971
- Liao B, Gawienowski MC, Zielinski RE (1996). Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms. Arch Biochem Biophys, 327: 53~60
- Lin CS, Lai YH, Sun CW, Liu NT, Tsay HS, Chang WC, Chen JW (2006). Identification of ESTs differentially expressed in green and albino mutant bamboo (*Bambusa edulis*) by suppressive subtractive hybridization (SSH) and microarray analysis. Plant Cell Tiss Organ Cult, 86: 169~175
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993). Cloning the differences between two complex genomes. Science, 259: 946~951
- Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye RJ, Zhao LN, Li XH, Lin YJ (2008). Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. Plant Mol Biol, 67: 37~55
- Mahajan V, Gill HS, More TA (1995). Inheritance of downy mildew resistance in Indian cauliflower (group III). Euphytica, 86: 1~3
- McDowell JM, Dangl JL (2000). Signal transduction in the plant immune response. Trends Biochem Sci, 25: 79~82
- Melchers LS, Stuiver MH (2000). Novel genes for disease-resistance breeding. Curr Opin Plant Biol, 3: 147~152
- Monteiro AA, Coelho PS, Bahcevandziev K, Valerio L (2005). Inheritance of downy mildew resistance at cotyledon and adult-plant stages in 'Couve Algarvia' (*Brassica oleracea* var. *tranchuda*). Euphytica, 141: 85~92
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, 29: 2002~2007
- Reddy VS, Ali GS, Reddy ASN (2002). Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. J Biol Chem, 277 (12): 9840~9852
- von Stein OD, Thies WG, Hofmann M (1997). A high throughput screening of rarely transcribed differentially expressed genes. Nucleic Acids Res, 25 (13): 2598~2602
- Yu SC, Zhang FL, Yu RB, Zou YM, Qi JN, Zhao XY, Yu YJ, Zhang DS, Li L (2009). Genetic mapping and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Mol Breeding, 23: 573~590