

疫霉侵染辣椒基因差异表达的cDNA-AFLP分析

贺俐¹, 徐波^{2,3}, 黄子君¹, 何水林^{2,4,*}, 吴杨^{1,*}

¹井冈山大学生命科学学院, 江西吉安343009; 福建农林大学²作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, ³生命科学学院, ⁴作物科学学院, 福州350002

摘要: 采用cDNA-AFLP (complementary DNA-amplified fragment length polymorphism)技术, 以高抗疫霉病辣椒品种‘L11’接种疫霉菌的叶片为材料, 对6叶期辣椒幼苗灌根接种疫霉菌感染后6个时间点的叶片基因表达谱进行了差异分析。利用86对引物组合, 共筛选出了363条差异表达的cDNA片段, 对其中100个表达差异显著的片段进行测序, 最终得到73个差异片段的核苷酸序列。经Blastx比对和功能分类分析, 其中45个序列与已报道的功能基因具较高同源性, 其功能涉及蛋白质代谢、信号转导、防御反应、碳水化合物代谢和光合作用等。在差异片段序列基础上设计特异引物, 采用基于PCR技术的96孔文库筛选方法, 从文库中分离得到2个差异基因的全长cDNA, 荧光定量PCR分析结果显示其表达模式符合cDNA-AFLP表达谱。本研究利用cDNA-AFLP技术筛选到的一批与抗疫霉病相关的基因片段, 可进一步用于功能鉴定和分子育种。

关键词: 辣椒(*Capsicum annuum*); 疫霉; cDNA-AFLP

cDNA-AFLP Analysis of Differentially Expressed Genes in Pepper Infected by *Phytophthora capsici*

HE Li¹, XU Bo^{2,3}, HUANG Zi-Jun¹, HE Shui-Lin^{2,4,*}, WU Yang^{1,*}

¹College of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China; ²Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, ³College of Life Sciences, ⁴College of Crop Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Pepper cultivar ‘L11’ with the high resistance to *Phytophthora capsici* was used as the experimental material, complementary DNA-amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP) was used to analyze gene differential transcription profiling of six-leaf-stage seedlings of pepper infected by root-irrigating *P. capsici*. Eighty-six primer combinations were used to investigate 363 cDNA fragments. After sequencing of 100 ESTs, the nucleic acid sequences of 73 ESTs were obtained. Blastx analyses and functional annotations were then performed and the results revealed that 45 ESTs showed homologous to the known function genes of other species. The function of homologous genes involved in different pathways such as protein metabolism, signal transduction, defense responding, carbohydrate metabolism and photosynthesis. Using specific primers designed from the sequences of TDFs, two differential expression gene full-length cDNA were isolated by the method of PCR-based 96-hole screening, which were chosen for further real-time PCR expression patterns and confirmed the cDNA-AFLP profiles. Gene expression profiling in response to *P. capsici* and differentially expressed genes of pepper were identified via cDNA-AFLP analysis. These novel genes could be used in future for functional analysis and strategies of molecular breeding.

Key words: pepper (*Capsicum annuum*); *Phytophthora capsici*; cDNA-AFLP

辣椒是我国一种重要的蔬菜和工业加工原料作物, 年种植面积在133万hm²左右, 居蔬菜的第二位, 但经济总产值高达700亿元而居蔬菜之首(索桂川2011), 在农村产业结构调整 and 农民增收中具有十分重要的发展前景(刘颖等2010)。然而, 辣椒生产中经常遇到疫霉的危害, 病害一旦发生则难以通过施用化学农药控制, 轻则减产和品质降低, 重则绝收, 全球每年辣椒生产因疫霉危害导致的损

失达1亿美元以上(宗宪春等2006)。培育和推广应用抗病品种是最紧迫、最有效和最环保的出路(耿

收稿 2015-01-20 修定 2015-02-15

资助 国家自然科学基金(31260482和31060263)、江西省科技厅科技支撑计划项目(20122BBF60135)和江西省教育厅科技计划项目(GJJ13543和GJJ13544)。

* 共同通讯作者(E-mail: wuyangfenghao@126.com; shl-he201304@aliyun.com; Tel: 0796-8100493)。

三省等2011), 而了解辣椒抗疫霉病机制, 是培育高抗品种、合理利用抗病资源的重要依据, 这就要求人们从基因表达整体水平上去了解抗病相关基因表达的种类与数量及分析其相互关系。

辣椒种间及种内存在巨大的遗传多样性(方荣等2004), 含有丰富的变异类型, 抗性基因也比较丰富。辣椒与疫霉菌互作反应非常复杂, 如识别、信号转导、抗病基因与防御反应相关基因的表达等(贺俐等2011)。目前, 辣椒抗疫霉病机制研究多集中在抗性遗传规律、QTLs定位、病程相关蛋白(贾庆利等2012)等方面。辣椒疫病抗性的遗传规律比较复杂, 不同抗性品种的抗病遗传模式存在差异, 总的来说可概括为3种: 单基因模型、寡基因模型和多基因模型(曾莉等2010), 同时为了定位和克隆辣椒疫病抗性基因, 国内外研究者对部分材料的疫病抗性基因进行了QTL定位研究(Kim等2008), 开发了一些分子标记并分离了一些抗病相关基因(Oh等2013; Wang等2013; Zhang等2013), 由于辣椒疫病抗性遗传比较复杂, 且主要决定于品种的遗传本质, 所以已经开发的分子标记只是与杂交亲本的抗性基因连锁紧密, 在不同品种间的通用性不高, 加之辣椒基因组比较大(Yoo等2003), 且基因组内重复序列较多, 利用分子标记技术来克隆抗病基因有一定的难度。这些研究对理解辣椒对疫病的抗性分子机制还远远不够, 仍然缺乏系统全面的研究。cDNA-AFLP (complementary DNA-amplified fragment length polymorphism)技术作为一种高通量的全基因组表达分析工具, 是分析基因表达水平及差异表达基因分离有力的手段, 具有效率高、重复性好、无需了解序列信息等优点(Bachem等1998)。为此, 本研究以高抗辣椒疫霉病的辣椒品种‘L11’为材料, 利用cDNA-AFLP技术对辣椒抗疫霉病反应中的mRNA表达进行不同时间点的差异比较分析, 以期获得辣椒抗疫霉病新基因, 为进一步解析辣椒抗疫霉病机制和培育抗病品种提供理论基础及技术依据。

材料与amp;方法

1 试验材料

高抗辣椒疫霉病的辣椒(*Capsicum annuum* L.)品种‘L11’, 由福建农林大学植物抗逆与遗传改良实验室提供; 辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* L.)

由福建省农科院植保所提供。

2 接种与取样

待辣椒植株长到6叶期时进行接种处理。采用灌根接种法(林柏青和张松林1994)接种辣椒疫霉菌, 接种孢子悬浮液浓度为 2×10^5 个·mL⁻¹。接种前将苗钵灌透水, 用玻璃棒在距幼苗根约3 cm处扎孔, 孔深3 cm左右, 并于接种前取幼嫩叶片(立即放入液氮, 送实验室超低温冰箱保存)为对照材料, 诱导材料每株灌根约3 mL孢子悬浮液, 于接种后6、12、18、24、48 h分别取样, -80 °C冻存(混合后作为诱导用于RNA提取)。

3 试验方法

3.1 RNA提取及cDNA合成

采用上海华舜公司小量柱离心式植物总RNA抽提试剂盒提取总RNA, 提取方法按照试剂盒说明书进行, 先用DNA酶I处理去除DNA污染, 后用经DEPC处理的水制备1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA完整性。使用Clontech公司的SMARTTM cDNA Library Construction Kit试剂盒反转录mRNA及双链cDNA的合成, 双链cDNA制备参照试剂盒说明书进行, 用核酸蛋白检测仪检测浓度和纯度, 并利用在辣椒中组成型表达的*Actin*基因设计内参引物进行PCR, 对各个样本的起始量进行均一化处理。限制性内切酶购自NEB公司; pMD18-T载体、DNA连接酶、Taq酶、dNTP购自TaKaRa公司。DNA回收试剂盒购自北京博大泰克生物技术有限公司。低熔点琼脂糖为ABI公司产品。其他常用试剂为国产分析纯。

3.2 cDNA-AFLP实验相关接头及引物

接头和引物均由上海三博远志公司合成, 其相关序列见表1。

表1 cDNA-AFLP接头和引物序列

Table 1 Adaptors and primers used for cDNA-AFLP analysis

名称	序列
<i>Apo</i> I接头引物1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>Apo</i> I接头引物2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Mse</i> I接头引物1	5'-GACGATGAGTCTCTGAG-3'
<i>Mse</i> I接头引物2	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
<i>Apo</i> I预扩增引物	5'-CTCGTAGACTGCGTACCAATT-3'
<i>Apo</i> I选择性扩增引物	5'-GACTGCGTACCAATT(C/T)NN-3'
<i>Mse</i> I预扩增引物	5'-GACGATGAGTCTCTGAGTAA-3'
<i>Mse</i> I选择性扩增引物	5'-GATGAGTCTCTGAGTAA-3'

3.3 cDNA-AFLP过程

参照Bachem等(1996)建立的cDNA-AFLP体系及程序并进行优化。以ApoI和MseI为酶切组合,取20 μ L双链cDNA酶切连接,制备预扩增模板,并利用选择性引物预扩增,将预扩增产物稀释10倍后用于选择性扩增,选择性扩增产物用6.0%的聚丙烯酰胺变性凝胶检测,用银染法显影。室温下自然干燥胶板,用扫描仪进行凝胶上条扫描和数据保存。回收差异片段并进行二次扩增用于后续实验。

3.4 差异片段的回收、二次扩增及序列测序分析

用煮沸法从聚丙烯酰胺凝胶上回收差异条带,用原引物进行二次扩增,PCR程序与选择性扩增反应相同。凝胶回收试剂盒回收后,与pMD18-T载体连接、转化感受态细胞大肠杆菌DH5 α 菌株。筛选重组子并提取质粒,送上海三博远志公司进行测序。序列分析利用GenBank的dbEST数据库和蛋白数据库以及NCBI中的BLAST工具进行差异表达基因同源性比对,推测EST序列所代表的基因功能,对于不能检索到同源基因的EST,确定EST是已公布的序列还是本研究新发现的EST序列。

3.5 差异基因全长cDNA的获得

利用实验室前期构建的疫霉侵染下的辣椒cDNA文库(林明等2009),采用基于PCR技术的96孔板筛选目的基因法,用特异性引物对辣椒cDNA文库进行筛选,获得了阳性噬菌体克隆。

3.6 荧光定量PCR验证

为验证差异基因的cDNA-AFLP表达谱,根据分离获得的全长基因设计引物。总RNA的提取以及cDNA的制备同上述3.1节。应用Eppendorf公司的荧光定量PCR仪,以各时间点cDNA第一链为模板,进行PCR扩增。反应体系和程序参照TaKaRa SYBR Primix Ex TaqTM使用说明书。20 μ L反应体系为: 2 \times SYBR Primix Ex TaqTM 10 μ L, 正向和反向引物各0.4 μ L, 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μ L, cDNA模板1.5 μ L, ddH₂O 7.3 μ L。反应条件设定为: 95 $^{\circ}$ C 预变性12 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 33 s; 72 $^{\circ}$ C 40 s, 42个循环; 每个样品设3管重复,所有设定保存后运行程序。根据仪器自带软件分析计算各基因在不同处理的Ct值,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}算法(Pfaffl 2001),以各时间点内参基因辣椒肌动蛋白基因Actin的量为标准来确定目标基因的量。

实验结果

1 疫霉侵染下辣椒叶片mRNA的cDNA-AFLP分析

为了分析辣椒疫霉侵染下辣椒叶片体内基因表达变化情况,实验中随机选取了3对引物组合对侵染处理期间对照植株的叶片样品进行了cDNA-AFLP分析。结果发现,基因表达谱基本一致,无差异表达基因;即疫霉菌处理期间内的基因表达差异只会来自疫霉侵染,而不会受到植物本身及其他外界因素的干扰。

利用ApoI和MseI为酶切组合的86对引物对接辣椒疫霉处理叶片进行cDNA-AFLP分析。图1统计表明,共扩增出4 000余条带,每对引物平均扩增40~60条带,片段大小基本分布在50~1 000 bp之间;所有扩增反应被重复2次,银染结果表明扩增模式前后一致;86对引物共扩增出大约363条差异

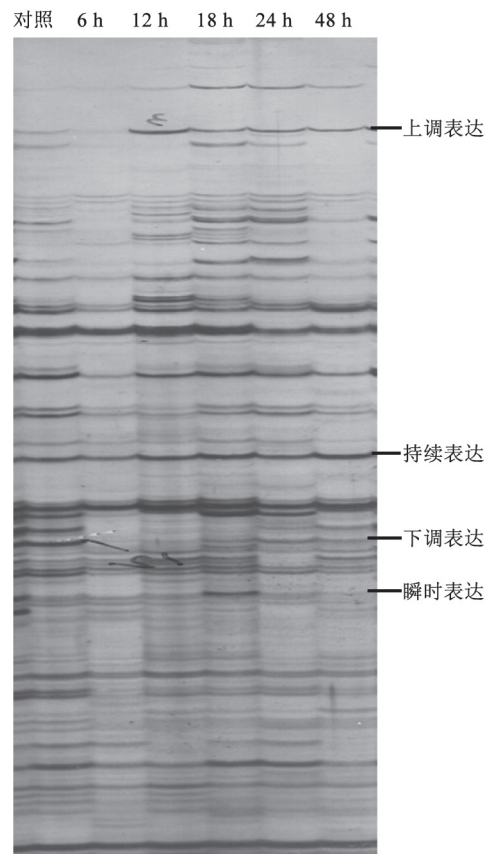


图1 部分cDNA-AFLP扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig.1 PAGE electrophoresis patterns of some cDNA-AFLP amplification products

表达片段(transcript-derived fragment, TDF)。

根据扩增条带的表现, 可将TDF的表达模式分为以下几种(图1): (1)上调表达, 这类基因在疫霉菌的诱导下特异表达或者增强表达; (2)下调表达, 这类基因受疫霉影响表达抑制或者表达强度减弱; (3)持续表达, 这类基因的表达不受外界胁迫的影响, 是一些比较保守、组成型表达的基因; (4)瞬时表达, 这类基因只在外界胁迫处理的特定时间段内才响应, 可能是一些特殊功能的调控因子, 在发挥作用后迅速降解。363条差异表达TDF中, 上调表达203条(56%), 下调表达76条(21%), 持续表达65条(18%), 另外19条(5%)为瞬时表达。

2 序列比对和功能分析

部分差异表达基因的测序和功能预测表明, 从363条差异表达TDF中随机挑取100个回收后进行2次扩增测序, 最终得到73个有效序列。在NCBI上的同源性分析显示: 在73个TDFs中, 其中45个序列与已知功能基因有较高的同源性(表2), 16个序列与未知功能的基因同源, 12个TDFs未找到同源基因, 这些序列可能是一些应答辣椒疫霉的新基因片段。将这73个差异转录本进行功能注释分类, 可分为蛋白质代谢、信号转导、防御反应、碳水化合物代谢、光合作用、未知功能蛋白和无同源性蛋白。由此可见, 辣椒应答疫霉胁迫的分子响应调控机制相当复杂, 有大量的各种类型的功能基因参与其中。

3 获得差异表达基因cDNA全长

根据差异片段自行设计引物, 采用基于PCR技术的96孔板筛选目的基因法, 用特异性引物对辣椒cDNA文库进行了筛选, 成功获得了TDF8和TDF13差异基因片段的全长cDNA序列(表3)。经NCBI比对分析, TDF8编码硫堇蛋白EU367112, 硫堇蛋白(thionins)是一类广泛存在于植物中的小分子(约5 kDa)生物活性肽, 目前已从15种植物中分离出100多种, 该蛋白可通过抑制消化酶的活性并与膜蛋白及脂质分子相互作用, 来抵抗细菌和真菌等病原微生物(Stec 2006; Pelegrini和Franco 2005; Egorov等2005)。TDF13编码抗菌蛋白EU401721, 与其他植物的几丁质酶类抗菌蛋白有不同程度的同源性, 含有几丁质酶相似的结构域, 为几丁质酶类抗菌蛋白, 可识别几丁质酶的亚基,

并能与之结合, 当有真菌危害时或机械损伤时, 抗菌蛋白能提高植物的抗性(Hagen等2007)。

4 荧光定量PCR验证

Real-time PCR分析显示(图2), 在接种疫霉菌侵染早期, 2个基因均诱导表达, 硫堇蛋白*CaThs*基因在接种后6 h诱导表达明显, 之后表达量有所下降, 但总体还是高于接种前。抗菌蛋白*CaAPs*基因在接种后3 h诱导表达明显, 但在这之后表达量明显降低, 并低于接种前的表达量。这2个基因的不同Real-time PCR表达模式符合其cDNA-AFLP表达谱特征。

讨 论

辣椒疫病是由疫霉菌引起的真菌性病害, 辣椒与疫霉菌互作受一系列复杂的信号调节, 疫霉菌的侵染可以导致辣椒的局部抗性, 伴随辣椒发生一系列的反应。辣椒在受到辣椒疫酶侵染后可能诱导多个基因表达来抵抗辣椒疫霉的侵染, 这些基因如何被分离并克隆? cDNA-AFLP是一种成熟的用于植物差异基因表达的方法, 已被广泛用于植物的基因差异表达研究。利用该技术, 黄河等(2012)获得了菊花抗白锈病侵染过程中18个与已报道的抗病基因具较高同源性的EST, 其功能涉及到抗病、信号转导、光合作用和光呼吸、反转录转座子以及植物基础代谢; 陈荣平等(2012)获得了12个烟草花叶病毒诱导烟草抗性的基因表达片段, 它们与核酸代谢、蛋白质合成与修饰、能量代谢、胁迫响应、细胞内运输和糖代谢等相关。本试验利用cDNA-AFLP技术进行差异表达基因筛选, 获得了73个阳性差异表达片段, 其中45个序列与已知功能的胁迫相关基因有较高的同源性, 这些基因与蛋白质代谢、信号转导、防御反应、碳水化合物代谢和光合作用等有关, 而其中参与抗逆或抗病的相关基因比例较大, 涉及植物体内多条代谢途径, 表明高等植物对病害的耐受性在一定程度上具有相似的分子基础, 并可推测辣椒与疫霉菌互作后是通过多种代谢途径协调作用来抵抗疫霉侵染的。

利用cDNA-AFLP技术分析基因表达差异, 其最终目标是为了分离差异表达基因, 研究被分离基因在生物个体中起的作用。本研究将cDNA-AFLP

表2 差异表达片段的比对结果

Table 2 Comparison of the differential expressed fragments

生物学功能	编号	长度/bp	登录号	功能描述	E值	
蛋白质代谢	TDF6	113	FE193288	Arginine decarboxylase	3.00E-13	
	TDF17	118	FE193326	Ubiquitin-conjugating enzyme ubc7	1.00E-25	
	TDF28	113	FE193084	Aspartic proteinase	2.00E-63	
	TDF40	223	FE193348	Elongation factor 1-alpha	5.00E-34	
	TDF47	211	FE193245	Glutamate decarboxylase	6.00E-23	
防御反应	TDF50	176	FE193259	Protein disulfide isomerase	1.00E-37	
	TDF2	111	FE193234	Hydroxycinnamoyl transferase	1.00E-44	
	TDF8	230	FE193301	Thionin protein	1.00E-10	
	TDF13	137	FE193170	Antifungal protein	3.00E-13	
	TDF16	256	FE193379	Heat shock protein 70	1.00E-25	
	TDF23	185	FE193272	Metallothionein-like protein	2.00E-63	
	TDF27	136	FE193110	Non-specific lipid transfer protein	5.00E-34	
	TDF33	119	FE193086	Protease inhibitor-like protein	6.00E-23	
	TDF35	171	FE193319	Catalase	2.00E-40	
	TDF38	196	FE193239	Cytochrome P450	1.00E-26	
	TDF44	361	FE193236	Universal stress protein	2.00E-37	
	TDF52	192	FE193228	Defensin-like protein	2.00E-36	
	TDF56	169	FE193230	Dehydration stress-induced protein	2.00E-24	
	TDF58	285	FE193154	Heat shock protein 90	6.00E-15	
	TDF59	219	FE193355	Peroxidase	9.00E-50	
	TDF61	192	FE193276	Protein kinase c inhibitor	3.00E-41	
	TDF62	123	FE193081	Spermidine synthase	2.00E-65	
	TDF64	175	FE192438	Oleate desaturase	6.00E-23	
	TDF65	136	FE193328	Osmotin protein	2.00E-08	
	TDF68	310	FE193373	Proteinase inhibitor II	2.00E-43	
	TDF73	235	FE193257	Dehydroascorbate reductase	7.00E-90	
	光合作用	TDF1	115	FE193248	Chlorophyll a b binding protein	3.00E-41
		TDF14	224	FE192439	Ribulose biphosphate carboxylase Oxygenase	2.00E-27
TDF20		182	FE192451	Rubisco activase	2.00E-08	
TDF25		169	FE193282	Light harvesting chlorophyll a b-binding protein	2.00E-43	
TDF34		129	FE193200	Chloroplast sedoheptulose—biphosphatase	7.00E-81	
TDF39		236	FE193210	Chloroplast protein cp12	1.00E-19	
TDF42		356	FE193164	Chloroplast ferredoxin I	1.00E-25	
TDF49		241	FE193202	Thioredoxin	6.00E-17	
TDF66		282	FE193156	Plastocyanin-like domain-containing protein	1.00E-19	
信号转导		TDF15	227	FE193251	GTPase activating protein GYP7	3.00E-13
	TDF22	196	FE193290	Small GTP-binding protein	2.00E-25	
	TDF36	250	FE193280	Signal peptidase	2.00E-63	
	TDF37	390	FE193279	Zinc finger (b-box type) family protein	1.00E-34	
	TDF41	160	FE193266	Calcium-dependent protein kinase	5.00E-23	
	TDF54	207	FE192426	Leucine-rich receptor like kinases	1.00E-13	
	TDF63	125	FE193109	Small ras-like GTP-binding nuclear protein	1.00E-25	
	碳水化合物代谢	TDF7	140	FE193305	Polygalacturonase inhibitor protein	2.00E-34
TDF24		214	FE193267	Pyruvate kinase	1.00E-18	
TDF43		282	FE193291	UDP-glucose pyrophosphorylase	6.00E-17	

与RACE技术相结合,快速扩增差异基因全长,成功克隆了硫堇蛋白与抗菌蛋白两个差异cDNA全长基因,并对这两个基因进行了Real-time PCR分

析,Real-time PCR的结果与cDNA-AFLP技术获得的差异片段的结果基本一致,这说明利用cDNA-AFLP技术可以有效地揭示疫霉菌诱导下的差异

表3 辣椒差异表达基因的克隆

Table 3 Cloning of pepper differential expression genes

差异片段	登录号	基因	编码蛋白	长度/bp	功能
TDF8	EU367112	CaThs	硫堇蛋白	608	防御反应
TDF13	EU401721	CaAPs	抗菌蛋白	645	防御反应

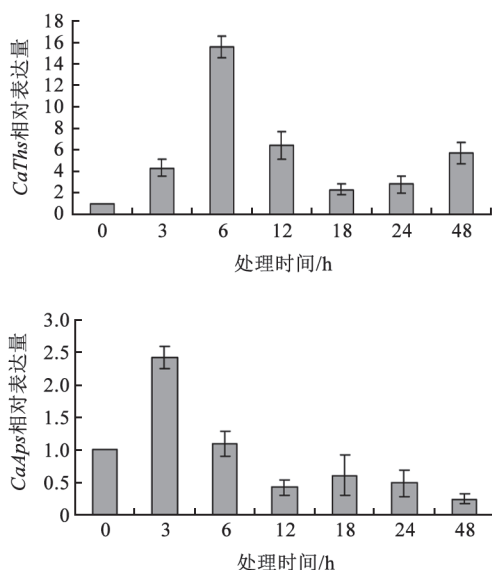


图2 差异表达基因的qRT-PCR分析

Fig.2 qRT-PCR analysis of the differentially expressed genes

基因的表达。在辣椒抵御病害等生物胁迫的进程中, 辣椒硫堇蛋白与抗菌蛋白这两个基因的表达都受到疫霉侵染的影响, 这表明它们可能参与了一些重要的生理过程。硫堇蛋白是植物非特异性防御系统的重要组成部分, 对多数病原微生物的生长具有抑制作用(李海青等2013)。有研究表明, 它具有 α -淀粉酶活性以及抑制离子通道的特点, 通过影响致病菌细胞膜通透性而具有广谱抗真菌或细菌的特性(宗晓娟等2010)。硫堇蛋白不仅受一些外源激素表达, 而且容易受病原菌侵染诱导表达。本研究中克隆得到的硫堇蛋白基因*CaThs*在疫霉菌侵染下, 早期诱导表达十分明显, 后期虽表达量有所下降, 但总体还是高于接种前, 可能该基因在辣椒应答疫霉侵染时起作用。寄主植物-病原微生物互作的后续反应过程, 植物表现出了一定的生理生化抗菌途径, 其中一条主要途径是产生和积累包括几丁质酶、葡聚糖酶和植物抗真菌多肽等, 这些蛋白质对真菌的生长有着直接或者间接的抑菌效果(周晓鸿等2012)。本研究分离得到

的辣椒抗菌蛋白基因为几丁质酶类基因, 有研究显示植物几丁质酶中的结合域可识别并结合真菌等病原菌细胞壁的几丁质, 可显著抑制真菌菌丝和孢子的生长(崔欣和杨庆凯2002)。本研究中辣椒*CaAPs*基因的定量表达分析结果表明, 该基因在疫霉侵染下能被诱导表达, 暗示着其在植物抵御疫霉病等病害防御反应中可能起重要作用。

除了这两个分离得到的全长cDNA基因, 其他获得的差异基因应该与辣椒抵御疫霉侵染存在一定的联系, 但本试验未能加以全面分析。我们将进一步探明这些差异基因与疫霉侵染之间的关系, 以便为辣椒等其他茄科作物的抗病分子机制研究提供借鉴和参考, 为作物分子育种提供关键的基因源。

参考文献

- 陈荣平, 刘磊, 万秀清, 邱恩建, 王春军, 宋宝刚, 颜培强, 杨铁钊 (2012). TMV侵染烟草基因差异表达的cDNA-AFLP分析. 作物学报, 38 (1): 62~70
- 崔欣, 杨庆凯(2002). 植物几丁质酶在抗真菌病害基因工程中的应用. 植物保护, 28 (1): 39~42
- 方荣, 陈学军, 缪南生, 万新建, 胡新龙(2004). 辣椒(*Capsicum* spp.) 遗传资源与分子育种进展. 江西农业学报, 16 (3): 55~61
- 耿三省, 陈斌, 张晓芬, 孙京涛(2011). 我国辣椒育种动态及市场品种分布概况. 辣椒杂志, (3): 1~4
- 贺俐, 吴杨, 许东风(2011). 疫霉侵染下辣椒幼苗消减文库的构建与初步分析. 植物研究, 31 (1): 95~99
- 黄河, 王顺利, 戴思兰(2012). 利用cDNA-AFLP技术鉴定菊花品种“紫荷”的抗白锈病相关基因. 中国农业科学, 45 (5): 926~935
- 贾庆利, 巩振辉, 李大伟(2012). 辣椒定位于叶绿体的13-脂氧合酶基因(*CaLOX2*)的克隆及表达分析. 农业生物技术学报, 20 (10): 1126~1134
- 李海青, 李臻, 王莹莹, 柳絮, 王庆国, 姚方印, 刘炜(2013). 转小萝卜 γ -硫堇蛋白基因*RsAFPI*水稻的获得及其稻瘟病抗性初步鉴定. 中国水稻科学, 27 (4): 335~343
- 林柏青, 张松林(1994). 辣椒品种抗疫病鉴定方法的初步研究. 中国蔬菜, (4): 21~24
- 林明, 贺俐, 徐波, 刘志钦, 王育娜, 官德义, 马洪丽, 何水林(2009). 疫霉侵染的辣椒cDNA文库的构建及非特异性脂转移蛋白cDNA的筛选. 福建农林大学学报(自然科学版), 38 (2): 150~153
- 刘颖, 陈斌, 张晓芬, 耿三省(2010). 我国朝天椒生产的市场前景、存在问题及对策. 蔬菜, (1): 34~35
- 索桂川(2011). 蔬菜主栽品种问卷调查结果——辣椒. 中国蔬菜, (11): 30~32
- 曾莉, 曹必好, 徐小万, 李颖, 王恒明, 罗少波(2010). 辣椒抗疫病遗传与育种的最新研究进展. 中国农学通报, 26 (12): 174~177
- 周晓鸿, 田芳, 杜丽璞, 王轲, 林志珊, 叶兴国(2012). 植物与有益微生物互作的分子基础及其应用的研究进展. 中国农业科学, 45 (14): 2801~2814

- 宗宪春, 谢立波, 郭亚华, 李景富(2006). 植物基因工程在辣椒育种中的应用. 北方园艺, (4): 61~62
- 宗晓娟, 王甲威, 刘庆忠(2010). 硫堇蛋白及细胞防御素在植物抗病性育种中的研究. 生物技术通报, (3): 21~24
- Bachem CWB, Oomen RJFJ, Visser RGF (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol Biol Rep*, 16: 157~173
- 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
- Egorov TA, Odintsova TI, Pukhalsky VA, Grishin EV (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26: 2064~2073
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V (2007). The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol*, 73: 2128~2134
- Kim HJ, Nahm SH, Lee HR, Yoon GB, Kim KT, Choi D, Kweon OY, Cho MC, Kwon JK, Han JH et al (2008). BAC-derived markers converted from RFLP linked to *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet*, 118: 15~27
- Oh SK, Yoon J, Choi GJ, Jang HA, Kwon SY, Choi D (2013). *Capsicum annuum* homeobox 1 (CaHB1) is a nuclear factor that has roles in plant development, salt tolerance, and pathogen defense. *Biochem Biophys Res Commun*, 442: 116~121
- Pelegrini PB, Franco OL (2005). Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multifunctional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11): 2239~2253
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29: e45
- Stec B (2006). Plant thionins—The structural perspective. *Cell Mol Life Sci*, 63 (12): 1370~1385
- Wang XJ, Zhu XP, Tooley P, Zhang XG (2013). Cloning and functional analysis of three genes encoding polygalacturonase-inhibiting proteins from *Capsicum annuum* and transgenic CaPGIP1 in tobacco in relation to increased resistance to two fungal pathogens. *Plant Mol Biol*, 81: 379~400
- Yoo EY, Kim S, Kim YH, Lee CJ, Kim BD (2003). Construction of a deep coverage BAC library from *Capsicum annuum*, 'CM334'. *Theor Appl Genet*, 107: 540~543
- Zhang YL, Jia QL, Li DW, Wan JE, Yi YX, Gong ZH (2013). Characteristic of the pepper *CaRGA2* gene in defense responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *Int J Mol Sci*, 14: 8985~9004