

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01011

条锈菌诱导的小麦抗病与感病近等基因系 SSH 文库构建及分析

舒伟^{1,2}, 陈晓红¹, 牛永春^{1,3}

1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;
2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193;
3. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081

摘要: 为分析条锈菌诱导下的小麦抗病与感病近等基因系之间差异表达的基因, 以接种小麦条锈菌 CY26 小种的抗病近等基因系 Yr4/6×Taichung 29 幼苗叶片 cDNA 作为实验方, 接种 CY26 的感病亲本 Taichung 29 幼苗叶片 cDNA 为驱动方, 利用抑制消减杂交(SSH)技术构建了一个包含 1 300 余克隆的消减文库。对文库中 600 个克隆进行了反向 Northern 点杂交筛选, 对获得的阳性克隆进一步进行了 Northern 杂交验证, 获得显著差异的克隆 12 个。经测序和 BlastX 分析, 其中 6 个差异表达序列的推测产物分别为亮氨酸重复序列蛋白、过氧化氢酶、硫氧还蛋白、RNA 结合蛋白、抗坏血酸过氧化物酶和热激蛋白。除亮氨酸重复序列为信号传导类蛋白外, 其他几个均为抗病防御类蛋白。

关键词: 小麦; 条锈病; 近等基因系; 抑制消减杂交; 差异表达

Construction and analysis of the SSH library with the resistant wheat near-isogenic line and its susceptible parent infected by *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici*

SHU Wei^{1,2}, CHEN Xiao-Hong¹, NIU Yong-Chun^{1,3}

1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
3. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: To analyze the differentially expressed genes between resistant and susceptible wheat near-isogenic lines infected by *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici*, a subtractive library containing about 1300 clones was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) in which the cDNA from resistant Yr4/6 × Taichung 29 seedlings inoculated with race CY26 was used as the tester, and the corresponding cDNA from susceptible Taichung 29 as the driver. Six hundred clones from the library were analyzed with reverse Northern blot. The positive clones were further tested by Northern blotting analysis. Twelve clones were verified and showed significant difference. By means of sequencing and

收稿日期: 2011-01-24; 修回日期: 2011-04-27

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: G2000016202)资助

作者简介: 舒伟, 博士, 讲师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: shuwei7866@126.com

通讯作者: 牛永春, 博士, 研究员, 研究方向: 植物抗病遗传。E-mail: niuyongchun@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2011-7-27 15:48:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110727.1548.002.html>

BlastX analysis, six function-known differentially expressed sequences were detected, and their putative products were leucine-rich repeat protein, catalase, thioredoxin H-type, RNA binding protein, ascorbate peroxidase, and heat shock protein, respectively. Among them, leucine-rich repeat protein belongs to signal transduction protein, and others belong to defense response protein.

Keywords: wheat; stripe rust; near-isogenic line; suppression subtractive hybridization (SSH); differential express

小麦条锈病(*Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici*)是小麦生产上的重要病害,在全世界各小麦种植区均有不同程度的发生,在我国发生尤为严重。由于小麦条锈病菌的高度变异性,以及条锈病的暴发流行性,小麦条锈病的持续、有效控制问题一直困扰着国内外锈病工作者。研究表明,培育和应用抗病品种是防治小麦条锈病经济、安全、有效的方法,但大面积推广种植单一抗源品种又常常哺育病菌新小种的发展和流行,导致品种的抗病性“丧失”。实现生产品种抗病基因多样化和抗病基因合理布局是我国小麦条锈病持续控制的根本策略,丰富的抗病基因是实施这一策略的物质基础^[1~3]。利用生物技术方法获得有效抗病相关基因并将其转移到农艺性状好的育种材料中,有望在较短周期内育出抗病良种。

小麦抗条锈近等基因系 *Yr4/6*×Taichung 29 经过 6 代回交选育而成, *Yr4/6*×Taichung 29 与其感病亲本 Taichung 29 除对条锈病抗性不同外,在其他遗传特性上极其相似^[4]。通过抗病基因识别病原物的入侵,从而诱导植物产生过敏反应或者随后引起系统抗性,是植物抵御病原物入侵的重要方式^[5, 6]。小麦不同品种受到同一病原物侵染后抗、感表型差异是由于病原物激活了不同的分子反应机制造成的。*Yr4* 是主效抗病基因,利用分离差异表达基因的技术比较 *Yr4/6*×Taichung 29 抗病反应与 Taichung 29 感病反应中差异表达的基因,就可能获得包括 *Yr4* 基因、*Yr4* 启动的信号转导相关基因和重要的防卫基因等一系列抗病相关基因的信息。这将有助于我们揭示植物-病原物的互作机理;同时,获得的抗病相关基因也可望用于小麦抗病基因工程育种。

抑制消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)是由 Diatchenko 等^[7]于 1996 年建立的分选差异表达基因的方法,该方法可以快速有效

地富集差异表达基因从而大大提高了研究差异表达基因的效率。近年来,SSH 技术在研究植物的抗逆境、抗病机制等方面得到广泛应用^[8~12]。利用 SSH 方法在近等基因系和其感病亲本之间筛选抗病与感病差异表达基因的研究尚未见报道。本研究试图利用 SSH 技术分离小麦抗条锈近等基因系和其感病亲本接种同一病菌后差异表达的基因。

1 材料和方法

1.1 小麦材料准备

小麦抗条锈近等基因系 *Yr4/6*×Taichung 29 和其感病亲本 Taichung 29,小麦条锈菌 CY26 小种,均由中国农业科学院植物保护研究所提供。于小麦幼苗一叶展开时接种,10 保湿 24 h 后移入控温温室,温度 18/12 (白天/晚上),光照 12~14 h/d^[1]。

1.2 总 RNA 提取和 mRNA 分离

分别于接种 24、48、72 h 后取接种叶片,每个时间点各取叶片 500 mg。将接种后 3 个时间点的 *Yr4/6*×Taichung 29 叶片等量混合作为目标组(Target),接种后 3 个时间点的 Taichung 29 叶片等量混合作为对照组(Control)。用 TRIZOL 试剂(Gibco 公司产)分别提取目标组和对照组叶片总 RNA,用 PolyAtract® mRNA 抽提试剂盒(Promega 公司产)分离总 RNA 中的 mRNA。

1.3 SSH 文库的构建

按照 Clontech 公司的抑制消减杂交试剂盒说明书,用分离获得的目标组 mRNA 和对照组 mRNA 分别合成 cDNA,然后以目标组 cDNA 为实验方(Tester),对照组 cDNA 为驱动方(Driver),进行抑制消减杂交。将杂交后的 cDNA 进行了两轮 PCR 扩增,第一轮 PCR 扩增了 27 个循环,第二轮 PCR 扩增了 15

个循环。回收第二轮 PCR 扩增产物与载体 pGEM-T (Promega 公司产)连接,连接产物用热激法转化到大肠杆菌 DH-5a 中。转化的菌液涂于含有 IPTG、X-gal 和氨苄青霉素的 LB 平板,37℃培养 16 h。挑取生长良好的白色单克隆接种于 96 孔细胞培养板中,于 37℃过夜培养,在培养菌液中加 20%甘油后保存于 -70℃冰箱中。采用试剂盒提供的接头引物进行 PCR 扩增和提取质粒后进行 *EcoR* I 酶切两种方法对质粒中插入片段大小进行检测。

1.4 SSH 文库的反向 Northern 筛选

在采用反向 Northern 点杂交方法进行文库筛选中,共制备了 3 个探针:目标组探针、对照组探针和一个未接种处理探针,分别用目标组总 RNA、对照组总 RNA、未接种处理的 *Yr4/6*×Taichung 29 叶片总 RNA 作模板制备。探针制备方法参照《分子克隆实验指南》(第三版)^[13]第 9 章,用寡聚(dT)作为引物合成 α -³²P 标记的 cDNA 探针。

SSH 文库点阵膜的制备:(1)将 NC 尼龙膜裁成 6.1 cm×2.6 cm 的长方形,用针在膜上按 0.5 cm×0.5 cm 轻印点阵,每张膜上 60 个点,成 5 排 12 列点阵。(2)随机挑取文库克隆,利用抑制消减杂交试剂盒提供的接头引物进行 PCR 扩增,PCR 产物 95℃变性 3 min,立即置于冰上,短暂离心。(3)每克隆分别取 0.5 μ L 变性 PCR 产物按照针印点阵手工点样于尼龙膜上,每张膜点上 59 个克隆和 1 个内参基因 GAPDH 的 PCR 产物作对照,同样克隆点阵排列的杂交膜制备 3 张为一组,在 900 W 微波炉中烤膜 2 min,用保鲜膜包裹置 4℃保存备用。

将预杂交后的 SSH 文库点阵膜分别与 3 个不同的探针进行杂交,然后进行洗膜、压片和显影等,方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)^[13]。未接种处理探针的杂交信号作为一个参考,当目标组探针和对照组探针杂交信号表现差异时,同时比较未接种处理表达量有所变化的基因才可以确定与条锈菌诱导有关。在两次重复杂交实验中都稳定表现差异信号的克隆确定为阳性克隆。

1.5 阳性克隆的 Northern 验证

由于反向 Northern 点杂交筛选常常存在结果重复性较差的情况,对反向 Northern 筛选获得的阳性克隆进行了 Northern 杂交验证。

以差异克隆的质粒 DNA 作模板,用随机引物延伸法合成放射性标记的 DNA 探针。未接种 *Yr4/6*×Taichung 29 叶片总 RNA、目标组总 RNA 和对照组总 RNA 各 15 μ g 分别上样,在含 15%甲醛的变性琼脂糖凝胶上电泳分离。探针制备、尼龙膜印迹、预杂交、杂交、洗膜、压片、显影等方法参考《分子克隆实验指南》(第三版)^[13]。

1.6 EST 的测序和比对分析

Northern 杂交表现差异的克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将校正后的测序数据在 GenBank 的非冗余蛋白(nr)数据库进行 BlastX 比对,期望域值设定为 1e-5。Blastx 比对后没有显著匹配的序列再利用 BlastN 比对 GenBank 中 EST 数据库,了解该 EST 与哪些片段同源及这些片段的来源等信息。参照 Bevans 等^[14]和 Ashburner 等^[15]的方法对功能已知的 ESTs 进行分类。

2 结果与分析

2.1 小麦抗病与感病近等基因系接种后的反应型

小麦抗条锈近等基因系 *Yr4/6*×Taichung 29 和其感病亲本 Taichung 29 幼苗接种小麦条锈菌 CY26 两周后,*Yr4/6*×Taichung 29 呈现抗病反应型,可见叶片上有大量的坏死斑和少量的微小孢子堆。Taichung 29 呈现感病反应型,可见叶片上有大量的孢子堆。

2.2 抑制消减杂交及文库构建

对分别提取的接种处理后 3 个时间段的小麦叶片总 RNA 进行电泳检测, rRNA 条带清晰, OD_{260}/OD_{280} 在 1.9~2.1 之间,总 RNA 质量较好。从总 RNA 中分离目标组和对照组的 mRNA 后,分别合成双链 cDNA, cDNA 用 *Rsa* 酶切。经电泳检测,酶切后的 cDNA 片段长度整体变小、分布于低分子量区。酶切后的目标组 cDNA 片段连接上接头分子后用试剂盒推荐的方法检测连接效率,电泳检测表明,连接后的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)PCR 扩增产物亮度大约为总 GAPDH 扩增产物亮度的 1/4,表明大约有 25%的酶切片段被连接上了接头分子,达到进行抑制消减杂交的要求。抑制消减杂交后通过两轮 PCR 扩增来富集目标组的差异表达序列。第二轮 PCR 产物回收后连接入 pGEM-T 载体,通过蓝白斑

筛选, 挑取了 1 300 余白色重组克隆, 构建了一个条锈菌诱导的小麦抗病、感病近等基因系 SSH 文库。

随机挑选 20 余克隆提取质粒后经过 *EcoR* 酶切, 切下的片段在 100 ~ 500 bp 之间。挑取菌落利用试剂盒提供的接头引物扩增, 扩增片段与酶切结果一致。

2.3 SSH 文库的分析

2.3.1 反向 Northern 点杂交筛选以及 Northern 验证

在反向 Northern 点杂交筛选实验中, 每 3 张同样克隆点阵的杂交膜为一组, 分别与 3 个不同的探针进行杂交, 即目标组探针、对照组探针和未接种处理探针。共筛选了 600 个克隆, 在有杂交信号的克隆中, 部分克隆在与目标组和对照组探针杂交中表现明显差异, 与未接种处理进行比较, 可见目标组和对照组发生下调或上调的程度不同, 这些基因可以初步确定为抗病、感病反应中呈现差异表达的基因。同时, 通过 3 个探针的筛选, 也发现了一些虽然在目标组和对照组中不表现差异, 但在抗病品种和感病品种中受接种诱导表达量同时上调或者下调的基因(图 1)。低丰度表达的基因由于不能在膜上产生信号, 所以不能通过反向 Northern 点杂交筛选的方法确定是否为差异表达基因。总体上, 在有杂交信号的克隆中显示差异信号的克隆较少, 假阳性率约在 85%以上。

为了进一步验证反向 Northern 点杂交筛选的结果, 对筛选中表现差异且重复性好的克隆进行了 Northern 杂交分析。结果表明, 部分克隆如 10B6 为目标组与对照组差异表达的 EST, 与点杂交筛选的信号一致; 而部分克隆如 4C11 在 Northern 杂交中并没有像反向 Northern 点杂交筛选实验中那样显示差异信号, 应该为点杂交筛选过程中的假阳性克隆(图 2)。通过 Northern 杂交验证, 获得在目标组和对照

组中表现显著差异的克隆 12 个。

2.3.2 差异表达 EST 序列的功能分析

对经 Northern 验证表现差异的 12 个克隆进行了测序, 将校正过的序列在 GenBank 的非冗余蛋白(nr)数据库中进行了 BLASTx 比对。有 6 个 EST 其同源

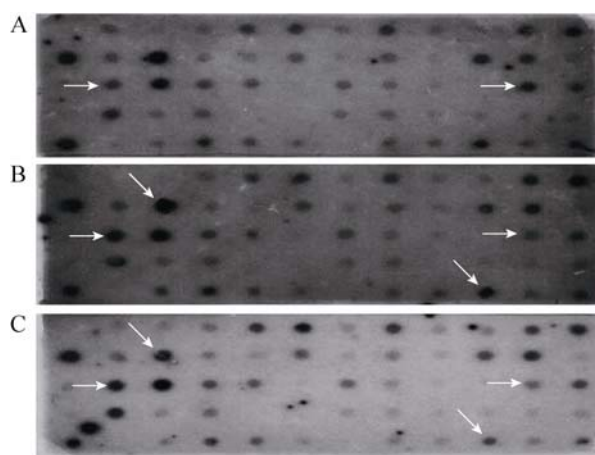


图 1 消减文库中部分克隆的 Northern 点杂交分析
3 张同样方法制备的膜分别与 3 个探针进行杂交后显影。内参 GAPDH 基因 PCR 产物点于右下角。A: 未接种处理探针; B: 目标组探针; C: 对照组探针。斜向箭头所指为目标组探针和对照组探针间显示差异信号的克隆; 水平箭头所指为未接种探针和接种处理探针(B 或 C)间显示差异信号的克隆。

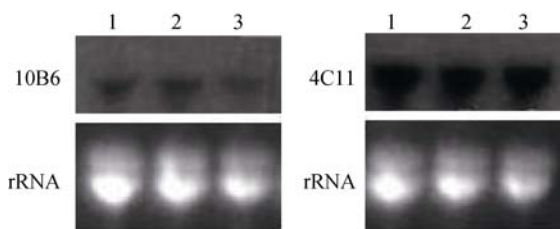


图 2 克隆 10B6 和 4C11 的 Northern 分析
分别以克隆 10B6 和 4C11 质粒 DNA 为模板制备探针进行杂交, 同时以 rRNA 电泳 EB 染色检测上样量的一致性。1: 未接种处理的 Yr4/6×Taichung 29 叶片总 RNA; 2: 目标组总 RNA; 3: 对照组总 RNA。

表 1 差异表达 ESTs 与 GenBank 中功能已知基因的相似性比较

克隆号	碱基长度(bp)	同源基因编码产物	同源基因来源	基因类别	E 值
10B6	304	推测的亮氨酸重复序列	<i>Oryza sativa</i>	信号传导类	6e-45
10B3	576	过氧化氢酶	<i>Oryza sativa</i>	抗病防御类	3e-69
9E4	248	硫氧还蛋白	<i>Ricinus communis</i>	抗病防御类	6e-16
6C6	356	推测的 RNA 结合蛋白	<i>Triticum aestivum</i>	抗病防御类	3e-77
4C2	174	抗坏血酸过氧化物酶	<i>Hordeum vulgare</i>	抗病防御类	3e-73
1G12	220	热激蛋白	<i>Triticum aestivum</i>	抗病防御类	3e-58

序列的功能已知,它们的推测产物分别为亮氨酸重复序列蛋白、过氧化氢酶、硫氧还蛋白、RNA 结合蛋白、抗坏血酸过氧化物酶和热激蛋白。其中亮氨酸重复序列可能是抗病品种在早期启动的抗病信号分子,其它几个均为抗病防御类蛋白(表 1)。另外 6 个 EST 的 BLASTx 比对没有获得 E 值小于 10^{-5} 的同源序列。为了确定这些序列不是来自于条锈菌,将它们 GenBank 的 EST 数据库进行了比对,结果表明这 6 条序列均来自于普通小麦(*Triticum aestivum* L.)。

3 讨论

分离抗病品种中的抗病基因以及抗病相关基因可以帮助我们了解并利用植物的抗病机制,具有重要的理论和实际意义。本研究利用 SSH 技术,以小麦抗条锈病近等基因系为材料,分离病菌诱导下的抗病品种和感病品种之间差异表达的基因,成功构建一个包括 1 300 余克隆的消减文库。经过对文库进行大量的反向 Northern 点杂交筛选和 Northern 验证,获得了 12 个在接种的 Yr4/6×Taichung 29 和 Taichung 29 中差异表达基因的 EST。经测序和 BLASTx 分析,发现其中 6 个 EST 分别与推测的亮氨酸重复序列、过氧化氢酶、硫氧还蛋白、推测的 RNA 结合蛋白、抗坏血酸过氧化物酶和热激蛋白高度同源。它们可能是一些参与小麦抗病反应的信号传导通路基因和防卫基因的表达序列。对它们进行条锈菌诱导下不同时间点表达量变化的分析,将有助于进一步确定这些 EST 的功能及其与抗病的关系。

近年来,国内外在小麦抗病基因的鉴定、分离以及功能研究方面开展了大量的研究工作。骆蒙等^[9]和吴金华等^[16]为了获得小麦抗白粉病的相关基因,分别构建了白粉菌诱导下的 SSH 文库,发现了大量的编码信号传导类蛋白和病程相关蛋白的抗病相关基因序列。于秀梅等^[11]也成功构建了一个条锈菌诱导下的小麦 SSH 文库。Duan 等^[17]从构建的小麦抗条锈病 SSH 文库中发现了一个小麦热激蛋白 TaHSC70 的表达序列并进一步对其功能进行了研究。本研究构建的 SSH 文库富集的差异表达基因不仅与病原物诱导相关,而且在小麦抗病和感病近等基因系中呈现差异表达,这将有助于了解小麦抗病品种中哪些更为关键和重要的抗病相关基因得到了更早、更有

效的启动。

不同实验材料和不同程度的差异样品,利用 SSH 方法分离差异表达基因的效率也会大不相同。样品的复杂度过大,假阳性会较高。同样,样品差异度也不能太小,否则同样会造成假阳性较高^[18]。据报道^[19],SSH 要高效地富集差异表达的基因,就要求目标基因的相对浓度高于 0.01%,在实验方和驱动方中的浓度比大于 5 倍。因此,为了排除文库中的假阳性信息,应该对构建的消减文库进行严格的筛选和验证,才能得到较为可靠的数据。考虑到要排除与条锈菌诱导无关的品种之间原本差异表达的一些基因,我们对文库的筛选方法进行了改进,制备目标组与对照组探针的同时,增加了一个未接种处理的探针用于并行筛选。只有在 3 个探针分别杂交中信号表现差异的基因才可能为抗病相关基因。对点杂交筛选获得的基因还需要通过 Northern 分析验证才能最后确认为差异表达基因。

已克隆的抗病基因主要是通过基于分子标记的图位克隆法获得,这需要有丰富的分子标记和基因组文库^[20~22]。从 EST 获得基因的信息,然后通过 cDNA 的途径克隆抗病基因就不需要花费大量工作寻找分子标记和构建小麦基因组文库。如果筛选到具有抗病基因同源结构域的 EST^[23,24],并且该 EST 在 F₂ 代中与抗病性完全共分离,就能确认该序列为抗病基因的 EST,然后通过 3'RACE 和 5'RACE 就可获得基因的 cDNA 全长。理论上讲,利用 SSH 的方法在抗病近等基因系 Yr4/6×Taichung 29 和其感病亲本 Taichung 29 之间筛选差异表达基因, Yr4 基因的 EST 应该在消减文库中富集。在本研究获得的差异表达的 ESTs 中,一个与亮氨酸重复序列结构域高度同源的序列 10B6 值得关注,很多抗病基因都具有该受体结构域^[25],这提示 10B6 序列有可能是 Yr4 基因表达产物。因此,有必要在 F₂ 代中验证这个 EST 序列是否与抗病性共分离。如果 10B6 表达序列与抗病性共分离,就可以证明 SSH 文库中富集的 10B6 序列是 Yr4 基因的表达产物,通过获得的 EST 序列进而可以克隆该抗病基因。

参考文献(References):

- [1] 李振岐,曾士迈.中国小麦锈病.北京:中国农业出版社,2002.

- [2] 吴立人, 牛永春. 我国小麦条锈病持续控制的策略. 中国农业科学, 2000, 33(5): 46–54.
- [3] Chen XM. Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat. *Can J Plant Pathol*, 2005, 27(3): 314–337.
- [4] 徐世昌, 吴立人, 万安民, 王凤乐, 赵文生, 牛永春. 以 Taichung 29 为背景的小麦抗条锈病近等基因系转育进展. 植物保护, 2004, 30(2): 19–22.
- [5] Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1992, 4(6): 645–656.
- [6] Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 1995, 268(5211): 661–667.
- [7] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025–6030.
- [8] Guo P, Bai G, Carver B, Li R, Bernardo A, Baum M. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. *Mol Genet Genomics*, 2007, 277(1): 1–12.
- [9] 骆蒙, 孔秀英, 刘越, 周荣华, 贾继增. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究. 遗传学报, 2002, 29(9): 814–819.
- [10] 郭新红, 姜孝成, 潘晓玲, 戴玉池, 姜维明, 陈良碧. 用抑制差减杂交法分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的 cDNA 片段. 植物生理学报, 2001, 27(5): 401–406.
- [11] 于秀梅, 喻修道, 屈志鹏, 韩青梅, 郭军, 黄丽丽, 康振生. 条锈菌诱导的小麦抑制差减杂交文库构建及其表达序列标签研究. 植物病理学报, 2007, 37(1): 50–55.
- [12] 朱龙付, 涂礼莉, 张献龙, 聂以春, 郭小平, 夏启中. 黄萎病菌诱导的海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析. 遗传学报, 2005, 32(5): 528–532.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南 (第三版) (黄培堂等译). 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 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 SA, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl TM, 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 KD, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Dusterhöft A, Moores T, Jones JD, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes HW, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 1998, 391(6666): 485–488.
- [15] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25–29.
- [16] 吴金华, 胡银岗, 王新茹, 张宏, 王长有, 王秋英, 吉万全. 小麦抗白粉病 SSH-cDNA 文库中差异基因的表达模式. 作物学报, 2008, 34(12): 2121–2125.
- [17] Duan YH, Guo J, Ding K, Wang SJ, Zhang H, Dai XW, Chen YY, Govers F, Huang LL, Kang ZS. Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 301–307.
- [18] Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(20): E90.
- [19] Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*, 2002, 3: 12.
- [20] Matin GB, Bogdanove AJ, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 23–61.
- [21] Dilbirli M, Erayman M, Sandhu D, Sidhu D, Gill KS. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. *Genetics*, 2004, 166(1): 461–481.
- [22] Catherine F, Silvia T, Nils S, Albar L, Nublat A, Keller B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15253–15258.
- [23] Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 2009, 323(5919): 1360–1363.
- [24] van Ooijen G, van den Burg HA, Cornelissen BJC, Takken FLW. Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. *Annu Rev Phytopathol*, 2007, 45: 43–72.
- [25] Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11746–11750.