

小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 基因的差异表达

李 星, 李亚宁, 刘大群, 杨文香

(河北农业大学 植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要: 为了研究与小麦抗叶锈病相关基因的表达情况, 从分子水平阐明小麦的抗病机制。以 Thatcher 和 Thatcher 为遗传背景的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 为材料, 利用 cDNA-AFLP 技术, 开展了与小麦抗叶锈病基因 *Lr41* 相关的差异表达基因研究。共选用 180 对引物组合对 *Lr41* 差异表达的基因进行了分析, 获得了 61 对能够在小麦近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher 之间扩增出差异条带的多态性引物。获得 5 对能够扩增出 5 条对小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 具有特异性条带的引物, 分别是 P-AC/M-CAA、P-AG/M-CAT、P-AG/M-CCC、P-CC/M-CCA、P-GA/M-CAA。将重复性好的 4 条差异片段进行回收、克隆、测序, 经序列同源性检索发现了 1 条与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 编码蛋白同源性较高的序列, 其他的 3 个序列功能未知, 研究结果为探明 TcLr41 的抗病机制和进行该抗病基因的克隆奠定了基础。

关键词: 小麦叶锈病; 抗病基因; cDNA-AFLP; *Lr41*

中图分类号: S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0122-05

Differential Expression of Genes in Wheat Near Isogenic Line TcLr41

LI Xing, LI Ya-ning, LIU Da-qun, YANG Wen-xiang

(Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: The objective of this paper is to study the resistant genes expression profile of wheat leaves and the wheat resistant mechanism to the pathogen at the molecular level. cDNA-AFLP analysis was carried out between Thatcher and its near isogenic line TcLr41 resistant to wheat leaf rust to study the differential expression related to *Lr41*. A total of 180 primer combinations were screened and sixty-one of them showed the ability to produce polymorphic fragments between TcLr41 and Thatcher. Five of the 61 primer combinations that were P-AC/M-CAA, P-AG/M-CAT, P-AG/M-CCC, P-CC/M-CCA and P-GA/M-CAA amplified specific bands with TcLr41 respectively. Four repeatably differential expression fragments were reclaimed from the polyacrylamide gels, re-amplified, cloned and sequenced. After blasting analysis showed that one of the fragments was high homology with the protein encoded by wheat leaf rust resistant gene *Lr1*. No similar sequences were found in GenBank for the other three fragments. The results will facilitate researches on the resistance mechanism and the cloning of TcLr41.

Key words: Wheat leaf rust; Resistance gene; cDNA-AFLP; *Lr41*

小麦叶锈病是影响世界小麦稳产高产的重要病害之一, 培育和利用抗病品种是控制小麦叶锈病流行为害的经济、有效措施。随着分子生物学技术的不断发展, 人们利用限制长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 (Random amplification polymorphism DNA, RAPD)、

简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR)、简单重复序列间 (Inter simple sequence repeats, ISSR) 和扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 等技术成功的获得了 30 多个小麦抗叶锈病基因的分子标记^[1]。Bachem 等^[2]发明的 cDNA-AFLP 技术, 是一种 mRNA 指纹图谱技术。该技术保

收稿日期: 2008-07-22

基金项目: 国家重大基础研究前期专项 (2005CCA01600); 高校博士点基金 (20050086002); 中国博士后科学基金 (20060390770)

作者简介: 李 星 (1980-), 女, 河北唐山人, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者: 刘大群 (1958-), 男, 河北石家庄人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

杨文香 (1966-), 女, 河北沧州人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

留了 AFLP 多态性丰富、稳定性高、无需了解序列信息等优点的同时, 集中显示基因组表达序列的多态性差异; 且重复性好、准确可靠、效率高^[3], 可对生物体转录组进行全面、系统的分析。目前该技术已广泛地应用于玉米^[4]、大豆^[5]、小麦^[6,7]、水稻^[8]、甜菜^[9]、大麦^[10]等作物抗病或抗逆过程中差异表达基因的研究。小麦抗叶锈病基因 *Lr41* 最初来源于粗山羊草小麦 (*Triticum tauschii*)^[11], 该基因是由单基因控制的显性表达基因, 其抗叶锈性从苗期开始表达, 表现出十分有效的抗叶锈病性。目前人们仅找到了与 *Lr41* 共分离的 AFLP, RAPD 分子标记^[12], 但该基因在 RNA 水平上的基因差异表达研究尚未见报道。本研究以小麦抗叶锈近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher 为材料, 利用 cDNA-AFLP 技术从 mRNA 表达方面研究 TcLr41 与小麦叶锈菌互作时的基因表达的差异, 寻找与抗病基因表达相关的目的片段, 为阐明小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 的抗病机制和该基因的克隆奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试小麦材料为小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher, 是加拿大禾谷作物研究中心的 PL. Dyck 和 R. G. Anderson 培育的, 由美国禾谷锈病研究中心提供; 小麦叶锈菌株 05-12-90 致病类型 (TKTJ), 由河北农业大学小麦锈病研究中心提供; 小麦叶锈菌株 05-12-90 与小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 构成非亲和反应, 反应类型为“1”型。

1.2 接种和取样

种植小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和感病亲本 Thatcher, 培养至第一叶片完全展开后, 采用撒粉法接种小麦叶锈菌 05-12-90, 以不接种 05-12-90 的 TcLr41 和感病材料 Thatcher 为对照。接种后 12, 24, 36, 48, 72, 96 h 分别剪取 TcLr41 和 Thatcher 的接菌叶片和未接菌叶片, 用于提取叶片总 RNA。

1.3 总 RNA 提取及检测

利用植物 RNA 提取试剂盒 (Tiagen, 北京), 按照试剂盒所提供的操作规程提取小麦叶片总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 并利用紫外分光光度计法测定 RNA 的浓度和纯度。

1.4 cDNA-AFLP 分析

等量混合不同时间段提取的 RNA, 将接菌 TcLr41、未接菌 TcLr41、接菌 Thatcher 和未接菌 Thatcher 分别组建成总 RNA 池, 利用 M-MLV RTase cDNA Synthesis kit (Takara, 大连) 合成双链 cDNA, 经

纯化后, 使用 *Pst* I, *Mse* I 2 个限制性内切酶进行双酶切。酶切体系如下: 20 μ L cDNA 模板, 0.5 μ L *Pst* I (10 U/ μ L), 0.5 μ L *Mse* I (10 U/ μ L), 8.0 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.8 μ L BSA, 加 ddH₂O 至 40 μ L。酶切反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 65 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。在酶切产物中加入以下成分: 1.5 μ L *Pst* I adapter, 1.5 μ L *Mse* I adapter, 1 μ L 10 \times T₄ ligase Buffer, 1 μ L ATP (10 mmol/ μ L), 1 μ L BSA, 0.2 μ L T₄ DNA ligase (350 U/ μ L), 混匀后, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

预扩增反应体系: 10 μ L 未稀释的连接产物, 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 1.5 μ L P+ 0 (50 ng/ μ L), 1.5 μ L M+ 0 (50 ng/ μ L), 10 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 0.3 μ L *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L), 加 ddH₂O 至 50 μ L。预扩增程序: 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 2 min。预扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20 $^{\circ}$ C 保存。

选择性扩增体系: 5 μ L 稀释 20 倍的预扩增产物, 2 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.7 μ L P+ NN (50 ng/ μ L), 0.7 μ L M+ NNN (50 ng/ μ L), 0.4 μ L 10 mmol/L dNTP, 0.12 μ L *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L), 加 ddH₂O 至 20 μ L。选择性扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 65 $^{\circ}$ C (每个循环降低 0.7 $^{\circ}$ C), 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 12 个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 56 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 23 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 2 min。选择性扩增产物先用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果, 然后用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离条带, 银染显色检测 cDNA 的多态性。

1.5 差异性条带的回收、再扩增和纯化

用聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒 (Omega, 美国) 对差异条带进行回收, 以回收产物为模板, 用相应的引物进行再次扩增, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 对扩增效果好的片段利用 Agarose Gel DNA Purification Kit (Takara, 大连) 从琼脂糖凝胶中进一步回收纯化。

1.6 差异片段克隆、测序及同源性分析

将回收片段与 pMD19-T 载体 (Takara, 大连) 连接, 并转化到感受态细胞 JM109 (Takara, 大连) 中, 筛选阳性克隆交由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。利用 DNASTAR 软件分析特征序列, 将测序得到的核苷酸序列在 NCBI 上应用 Blast 软件进行 DNA 序列和推导的蛋白质序列的相似性分析。

2 结果与分析

2.1 小麦叶片总 RNA 的提取

本研究利用植物 RNA 提取试剂提取小麦叶片

总 RNA 数量大, 质量高, RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶上检测基本无降解, 25 s 与 23 s 亮度的总和与 18 s 的亮度比值在 2.0~ 1.0。测定的 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8~ 2.0, OD_{260}/OD_{230} 的比值大于 2.0, 浓度约为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 提取的 RNA 适合于下一步的试验。小麦叶片总 RNA 的电泳检测结果如图 1。

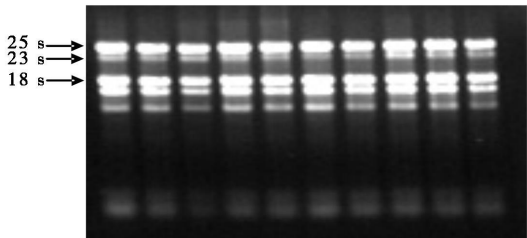
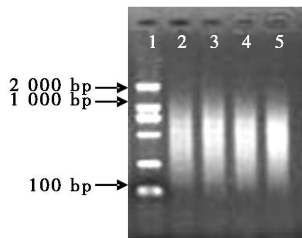


图 1 小麦叶片总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis analysis of total RNA extracted from the wheat materials

2.2 cDNA-AFLP 分析

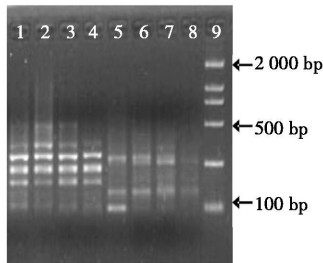
双链 cDNA 经酶切、连接后进行 PCR 扩增, 为了尽可能减少非靶序列的扩增, 使用了嵌套引物策略, 分两轮进行 PCR 扩增, 预扩增引物未增加选择性碱基。扩增后, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其结果, 扩增片段在 100~ 1 000 bp, 预扩增产物浓度较高, 可稀释后作为模板用于选择性扩增。预扩增产物的电泳检测结果如图 2。



1. DNA marker DL2000; 2~ 5. 预扩增片段。
1. DNA marker DL2000; 2~ 5. The fragments of pre-amplification products.

图 2 预扩增产物的检测

Fig. 2 Electrophoresis analysis of the pre-amplification products



1~ 8. 选择性扩增片段; 9. DNA marker DL2000。
1~ 8. The fragments of selected amplification products; 9. DNA marker DL2000.

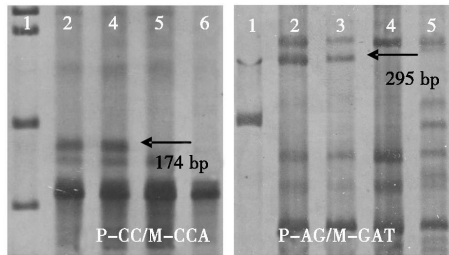
图 3 选择性扩增产物的检测

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the selected amplification products

将预扩增产物稀释 20 倍后进行扩增, 选用

P+ NN、M+ NNN 引物组合进行选择扩增, 选择性扩增产物大小均介于 100~ 500 bp, 条带分布均匀, 无脱尾现象, 适合用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行片段的分离。琼脂糖凝胶电泳检测选择性扩增产物结果如图 3。

本研究采用 180 对 cDNA-AFLP 引物对小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 差异表达的基因进行了分析, 180 对引物组合共观测到 5 367 条左右的条带, 平均每一对选择性引物可以获得约 29.8 条带。61 对引物能够在小麦近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher 之间扩增出差异条带, 多态性引物检出率为 33.89%。扩增结果分析发现, 存在几种不同类型的差异表达片段。如: 在小麦抗叶锈近等基因系 TcLr41 的样品中出现, 而在对照 Thatcher 的样品中缺失的一些条带; 在接菌的 Thatcher 及未接菌的 Thatcher 中存在的条带, 而在其他样品中缺失的一些条带; 在接菌处理的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中出现, 而在未接菌的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中缺失的条带等。其中有 5 对引物能扩增出小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 特异性条带, 即能在接菌的 TcLr41 及未接菌的 TcLr41 中扩增出特异条带, 而在接菌的 Thatcher 和未接菌的 Thatcher 中均未扩增出相同条带的引物组合。所得的 5 对引物分别是 P-AC/M-CAA、P-AG/M-CAT、P-AG/M-CCC、P-CC/M-CCA、P-GA/M-CAA, 部分特异性引物扩增结果如图 4 所示。



1. PBR322/ *Msp* I Marker; 2. 未接菌 TcLr41; 3. 接菌 TcLr41; 4. 未接菌 Thatcher; 5. 接菌 Thatcher; 箭头所指为 TcLr41 中含有的特异性片段。
1. PBR322/ *Msp* I Marker; 2. TcLr41 inoculated without the pathogen; 3. TcLr41 inoculated with the pathogen; 4. Thatcher inoculated without the pathogen; 5. Thatcher inoculated with the pathogen; Arrowhead indicated the specific bands present in TcLr41.

图 4 引物 P-CC/ M-CCA 和 P-AG/ M-CAT 在 TcLr41 中扩增出的特异性条带

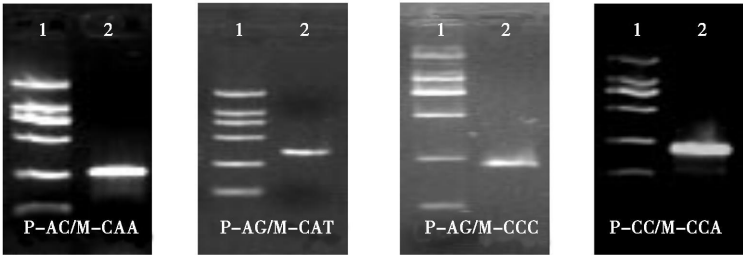
Fig. 4 The specific bands amplified with P-CC/ M-CCA and P-AG/ M-CAT in TcLr41

2.3 特异性条带的回收、再扩增

将特异性条带回收后, 应用相对应的引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳上检测, 发现 5 条特异性条带中有 4 条可以得到再扩

增产物, 回收率是 80%, 应用聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒对特异性条带进行回收的效率较高, 且回收的条带纯度比较高, 再次扩增的结果稳定, 且与回收

的条带大小相等, 再次扩增产物琼脂糖电泳结果结果如图 5 所示。



1. DNA marker DL2000; 2. 回收的特异性条带。
1. DNA marker DL2000; 2. The specific band reclaimed.

图 5 特异性条带的回收结果

Fig. 5 The pattern of the specific band reclaimed

2.4 特异性片段克隆、测序及同源性分析

将回收纯化成功的 4 条特异性片段与 pMD19-T 载体连接, 经过转化后挑取阳性克隆进行测序, 测序结果与 GenBank 的非冗余核苷数据库进行同源性比对分析, 发现这 4 条序列均与小麦的 cDNA 克隆片段序列同源性达到 90% 以上, 但未发现同源性较高的已知功能基因, 因此不能明确这些序列所代表的基因的具体功能, 所以把这些序列又与 GenBank 的

非冗余蛋白数据库进行同源性比对分析, 发现序列 4f-85(P-CC/M-CCA) 推测的翻译蛋白蛋白与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 编码的蛋白同源性较高, 同源性为 84%, 序列 4f-17(P-AC/M-CAA) 推测的翻译蛋白蛋白与一个来源于水稻的假想蛋白同源性为 78%, 另外两个序列 4f-36(P-AG/M-CAT), 4f-38(P-AG/M-CCC) 均未找到其同源序列(表 1)。

表 1 与 GenBank 已知基因同源性比较结果

Tab. 1 The homology of the fragments with the functional identified genes in GenBank					
样品编号 Sample No.	长度/ bp Length	同源基因 Homologous gene	生物种 Organism	配准比 Identity	期望值 E-value
4f-17	225	Hypothetical protein OsJ-000361	<i>Oryza sativa</i>	63/ 80 (78%)	1e- 25
4f-85	174	LrF-like protein	<i>Triticum aestivum</i>	50/ 59 (84%)	2e- 20
4f-36	295	No found			
4f-38	184	No found			

3 讨论

cDNA-AFLP 技术在 cDNA 酶切片段两端加上统一的接头作为 PCR 扩增的模板, 使经典 PCR 反应的可靠性大为提高。Habu 等^[13] 比较了 DD-PCR 和 cDNA-AFLP 技术扩增结果, 重复性都可达 100%。Fukuda 等^[14] 的试验也证实 cDNA-AFLP 分析再现性达 95% 以上。本试验研究中发现由引物 P-AC/ M-CAA、P-AG/M-CAT、P-AG/M-CCC、P-CC/M-CCA、P-GA/M-CAA 扩增出的差异表达片段均可重复出现, 且得到的差异片段经分析与小麦的 EST 序列的同源性较高, 从而也证实该试验方法重复性好及可靠性高的特点。小麦基因组比较复杂, 而其 cDNA 具有较低的复杂度, 所以我们分别在 *Pst* I 和 *Mse* I 引物 3 末端加上 2 个和 3 个选择性核苷酸, 虽然提高加入选择性核苷酸数目会降低扩增片段数, 但却会提高检测的灵敏度。本试验选用了 180 对引物进行了 cDNA-AFLP 分析, 共观测到 5 367 条左右的条带,

平均每一对选择性引物可以获得约 29. 8 条条带, 这与以 DNA 为模板进行扩增能得到平均 34. 5 条带^[15] 相比要少很多, 可能是因为基因组 DNA 中含有内含子, 而 cDNA 中没有内含子, 只有表达基因, 因此 cDNA 中扩增得到的条带较少。不同的 cDNA-AFLP 引物组合的扩增带型、扩增带数量和分布均匀程度差异很大, 多态性和区分能力也不相同。本研究筛选得到了 61 对能够在小麦近等基因系 TcLr41 和感病对照 Thatcher 之间揭示出多态性的引物, 多态性引物检出率为 33. 89%, 此研究结果也表明了 cDNA-AFLP 技术在目的基因研究上的可用性。

本试验采用 cDNA-AFLP 方法, 运用聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法对接种叶锈菌后的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher、未接种的 TdLr41 和 Thatcher 的基因片段进行差异比较、分析。扩增结果分析发现, 存在几种不同类型的差异表达片段。如: 仅在小麦抗叶锈近等基因系 TcLr41 的样品中出现, 而在对照 Thatcher 的样品中缺失的条带; 仅在接菌

的 Thatcher 及未接菌的 Thatcher 中都存在的条带; 仅在接菌处理的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中出现, 而在未接菌的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中缺失的条带等。仅在接菌的 Thatcher 及未接菌的 Thatcher 中都存在的条带可能是与小麦感叶锈病基因相关的基因片段; 仅在接菌处理的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中出现, 而在未接菌的小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr41 和 Thatcher 样品中缺失的条带可能是小麦与小麦叶锈菌之间亲和互作与非亲和互作过程中共同起作用的基因片段; 其中仅在接菌和未接菌的 TcLr41 中存在的差异条带可能是 TcLr41 与小麦叶锈菌非亲和互作中起重要作用的基因片段, 可作为为下一步研究的重点。本研究中得到了一些此种类型的差异条带, 仅对这些差异片段的表达模式有了初步的了解, 还需比较一系列不同时间点差异片段的表达情况, 获得更多信息, 从而进一步阐明其在小麦抗病过程中表达调控机制。

植物在与病原物长期相互影响共同进化的过程中, 逐渐形成一系列复杂而行之有效的防御机制以抵御病原物的侵入、扩展, 这些机制在植物中有些是共同的, 有些却是特有的。人们对已经克隆的抗病基因的结构分析发现, 植物抗病基因所编码的抗病蛋白具有一些保守的结构域, 它们在识别病原菌产物、引发防卫反应过程中起着重要作用。本研究发现一条 TcLr41 中特异表达片段, 其编码的蛋白与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 编码的蛋白同源率为 84%, 由此推测小麦抗叶锈病基因与叶锈菌互作过程中可能存在某些共同的抗病机制。但由于该特异性片段比较短, 仅有部分序列与已知功能基因相匹配, 只能初步推测其功能, 所以下一步我们将利用 RACE 等技术对其进行延长, 得到全长 cDNA 序列, 进一步验证所得基因序列的功能, 为明确小麦抗叶锈病基因 *Lr41* 的抗病机制, 进行目的基因定位和克隆奠定基础。

参考文献:

- [1] 闫红飞, 杨文香, 刘大群. 小麦抗叶锈近等基因系 TcLr38 抗病相关基因片段的分离[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 308–312.
- [2] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, de Bruijn S M, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of

gene expression during potato tuber development[J]. Plant J, 1996, 9: 745–753.

- [3] Money T, Reader S, Qu L J, *et al.* AFLP-based mRNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24: 2616–2617.
- [4] 薛春生, 肖淑芹, 王国英, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术分析玉米自交系黄早四甘蔗花叶病毒侵染后基因差异表达[J]. 植物病理学报, 2005, 35(3): 229–234.
- [5] Umezawa T, Mizuno K, Fujimura T. Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP[J]. Plant Cell Environment, 2002, 25(12): 1617–1625.
- [6] 秘彩莉, 张学勇, 温小杰, 等. 利用 cDNA-AFLP 技术获得小麦耐盐性相关基因 *TaVHA-C* [J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1736–1742.
- [7] 陈云芳, 杨文香, 闫红飞, 等. 小麦抗叶锈病近等基因系 *TcLr35* 基因表达差异研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 109–112.
- [8] Mao C, Yi K, Yang L, *et al.* Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components[J]. J Exp Bot, 2004, 55(394): 137–143.
- [9] Samuelian S, Kleine M, Ruyter-Spira C P, *et al.* Cloning and functional analyses of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection[J]. Plant Mol Biol, 2004, 54(1): 147–156.
- [10] Eckey C, Korrell M, Leib K, *et al.* Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55(1): 1–15.
- [11] Cox T S, Raupp W J, Gill B S. Leaf rust-resistance genes *Lr41*, *Lr42* and *Lr43* transferred from *Triticum tauschii* to common wheat[J]. Crop Sci, 1994, 34: 339–343.
- [12] Lottering J M, Botha A M, Klopfer F J. AFLP and RAPD markers linked to leaf rust resistance gene *Lr41* in wheat[J]. South African Journal of Plant and Soil, 2002, 19: 1–6.
- [13] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, *et al.* Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234: 516–521.
- [14] Fukuda T, Kido A, Kajino K. Cloning of differentially expressed genes in highly and low metastatic rat Osteosarcomas by a modified cDNA-AFLP method[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 35–40.
- [15] 张峰, 宋文芹, 陈瑞阳. AFLP-银染法检测植物基因组多态性[J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21(2): 98–101.