壳二孢叶枯病病原菌 Ascochyta rabiei 胁迫下 鹰嘴豆防御相关基因的表达分析

蔡军马德英郁帆羌松*

(新疆农业大学农学院,农林有害生物监测与安全防控重点实验室,乌鲁木齐 830052)

摘要:为挖掘获得新的抗性基因,培育鹰嘴豆 Cicer arietinum 抗壳二孢叶枯病(病原菌为 Ascochyta rabiei)新品种,以项目组前期获得的102个差异表达的新基因为基础,随机选取29个基因进行同源性分析,以鹰嘴豆 Actin(EU529707)和 Ef-1a(AJ004960)作为参考基因,利用实时荧光定量 PCR 技术检测这29个基因在宿主植物鹰嘴豆抗性品种系选03中的表达规律。结果显示,基于同源性分析结果可将29个基因大致分成4类,涉及信号传导机制、细胞运输、转录和细胞拯救、防御、毒性;功能分析结果显示,功能未知的基因数目最多,达到了11个,其中多数为鹰嘴豆未定性基因。这29个基因在A. rabiei 胁迫下都发生了不同程度的差异表达,表达差异时间点集中在胁迫后72h,并在96h 恢复至正常表达水平。其中解毒相关基因474在72h时相对表达水平最高,是对照处理0h的19.773倍,抗氧化修复相关基因1137的相对表达水平最低,约为对照处理0h的1/3。筛选获得的差异表达基因中,表达上调的基因有10个,表达下调的基因有16个,其余3个基因的表达差异不明显。上调表达基因可能与鹰嘴豆应对A. rabiei 侵染的应答机制有关,其中与免疫应激相关的蛋白基因如谷胱甘肽S-转移酶、咖啡酰辅酶A、泛素蛋白基因等可能直接参与了鹰嘴豆应对A. rabiei 的免疫识别和防御。

关键词: 鹰嘴豆; 壳二孢叶枯病; Ascochyta rabiei; 基因; 防御机制; 差异表达

Expression analysis of chickpea defense-related genes induced by Ascochyta rabiei

Cai Jun Ma Deying Yu Fan Qiang Song*

(Key Laboratory for Monitoring and Safety Control of Crop and Forest Pests, College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: To excavate new resources for breeding of new chickpea resistant varieties to *Ascochyta rabiei*, the pathogen causing *Ascochyta* blight, 29 genes were randomly selected for homology analysis based on 102 differentially expressed new genes obtained by the research group in the early stage. *Actin* (EU529707) and *Ef-1a* (AJ004960) were used as reference genes to detect these genes in the resistant chickpea variety Xixuan 03 by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the 29 genes were roughly divided into four categories: cell rescue, defense, toxicity, signal transduction mechanism, cell transport and transcription. The results of functional analysis showed that the number of genes with unknown functions was the largest (11), most of which were undetermined genes of chickpea. The 29 genes were differentially expressed under *A. rabiei* stress, and the expression was concentrated at 72 h after treatment, and their normal expression level was restored at 96 h. Among them, the detoxification-related gene 474 showed the highest relative expression level at 72 h, which was 19.773

基金项目:国家自然科学基金(31560492)

^{*} 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: qse26@163.com 收稿日期: 2018-07-30

times of the control at 0 h, and the relative expression level of anti-oxidation repair-related gene 1137 was the lowest, about 1/3 of the control at 0 h. Among the differentially expressed genes obtained by screening, there were 10 up-regulated genes and 16 down-regulated genes, and the expression differences of the other three genes were not significant. In particular, up-regulated genes might be involved in the response mechanism of chickpeas to *A. rabiei* infection, among which protein genes related to immune stress such as glutathione *S*-transferase, caffeyl-CoA, ubiquitin protein gene etc. might directly participate in the immune recognition and defense of chickpeas in response to *A. rabiei*.

Key words: chickpea; Ascochyta blight; Ascochyta rabiei; gene; defense mechanism; differential expression

鹰嘴豆 Cicer arietinum 为自花授粉二倍体一年 生植物,具有16个染色体(Taleei et al., 2009);是继 普通菜豆之后世界第2大栽培豆类,2016年世界总 种植面积为13 106 hm²,总产量达1 300 万t(FAO-STAT,2016)。鹰嘴豆主要种植在南亚、西亚、北非、 东非、南欧、大洋洲、北美洲的棕色和暗褐色土壤地 带(Reddy & Singh, 1984; Reddy & Kabbabeh, 1985)。 目前,限制鹰嘴豆产量的主要因素是由真菌病原体 Ascochyta rabiei(有性型为 Didymella rabiei)引起的 壳二孢叶枯病(Ascochyta blight),主要危害叶片、叶 柄、茎秆和幼嫩荚果,形成典型的圆形环坏死病变 (Coram & Pang, 2006; 曾繁明和杨忠芳, 2011)。低 温(15~25℃)和潮湿(>150 mm 降雨量)环境条件有 利于该病害的发展,可能引起年损失接近100%(Navas-Cortes et al., 1998; Bayaa & Chen, 2011)。由于 杀菌剂的大量使用会造成环境污染,因此抗性鹰嘴 豆品种的培育是目前最经济有效的措施(Gan et al., 2006)。虽然世界上主要鹰嘴豆种植区的育种计划 都集中在生产耐受 A. rabiei 的品种上,但是控制能 有效激活抗性基因的基因和途径仍属未知。而且由 于病原菌的不断演化和新致病型的出现,限制了抗 性品种的有效性,因此需要不断挖掘新的抗性资源。

植物抗性或对病害的易感性取决于病原体和宿 主的遗传背景。尽管植物对病原菌侵染具有被动的 物理和化学屏障,但主动防御反应仅在病原体感知 后才开始。对一般和特定病原体相关分子的感知通 过信号传导级联和许多基因的转录激活触发防御反 应(Leo et al.,2016)。一般诱导子包括蛋白质、脂质 和糖蛋白,触发非品种特异性防御反应(Hahlbrock et al.,2003; Montesano et al.,2003),而特异效应子 由病原体 *Avr* 基因编码,并根据基因-基因假设通过 与植物 *R* 基因的相互作用触发栽培种特异性防御反 应(Dangl & Jones,2001)。病原体感知后的信号传 导和转录激活导致主动防御反应,包括钙和离子通 量、氧化爆发期间活性氧增加(Lamb & Dixon, 1997) 和过敏性细胞死亡(Greenberg, 1997)。转录因子和 蛋白激酶的表达以及细胞溶质钙的增加对于这些防 御信号的传导不可或缺(Grant & Mansfield, 1999)。 各种防御基因的表达也导致防御性化合物的产生, 如病程相关蛋白(van Loon & van Strien, 1999)和苯 丙酸类(Dixon et al., 2002)。在基因组水平上, 植物 的防御反应复杂多样, 从识别到信号传递到直接参 与的每个基因都构成了协调响应网络的一部分。

目前,高通量技术的使用和新基因组数据的可 用性将最终改变作物改良的分子策略,详细了解这 些基础性状的分子机制或许会发现优良的育种新策 略(Millan et al.,2006)。转录组测序技术可以从整 体水平研究生物体或特定组织对生物胁迫反应相关 基因的结构和功能,揭示特定生物过程和病害发生 过程中的分子响应机制(Pickrell et al.,2010)。利用 转录组测序获得的序列信息与公共数据库中的序列 信息进行比对,或许可以挖掘到新的基因并预测其 功能。为了表征分子水平上的应激反应,实时荧光 定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)技术被广泛用于基因表达分析(van Guilder et al.,2008)。

由于A. rabiei 刚传入我国,鹰嘴豆种质对该菌的抗性及抗性基因的研究尚属空白,针对该菌的致病力和遗传学分析也鲜见详细报道(Peng et al., 2009;2010)。新疆维吾尔自治区(简称新疆)拥有大量的鹰嘴豆种质资源,项目组前期收集到了42份鹰嘴豆材料,其中部分是当地的主栽品种,部分是农家品种,且兼含Kabuli和Desi两种生态型,马丽娟等(2013)对这些鹰嘴豆材料的室内鉴定和田间鉴定结果表明,不同鹰嘴豆品种对A. rabiei表现出了显著的抗性差异,并利用 RAPD 技术完成了这些品种的聚类分析。筛选出遗传背景差异较大的高抗和高感A. rabiei 的鹰嘴豆材料,利用转录组测序技术研究

了感病后其转录组结构和功能在不同时间点的差 异,结合鹰嘴豆基因组序列信息,共获得25282个与 参考鹰嘴豆基因组对比结果为阳性的基因,挖掘到 950个新基因,其中发现了102个差异表达的新基因 (未发表数据)。本研究在此基础上利用 qPCR 对随 机筛选的29个差异表达基因进行深入研究,探索其 在宿主植物防御机制中的关键性以及表达规律,以 期获得参与防御机制的关键基因,为鹰嘴豆抗性育 种提供新的抗性资源,丰富我国关于鹰嘴豆对 A. rabiei 免疫响应分子机理研究的理论。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及培养基:鹰嘴豆抗性品种系选03收 集于新疆昌吉回族自治州木垒县。鹰嘴豆煎汁马铃 薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 土豆200g、鹰嘴豆粉20g、葡萄糖20g、琼脂20g、氯 霉素 0.1g,加蒸馏水到1L。

供试菌株:于2017年7月从木垒县鹰嘴豆种植 乡采集田间病株,风干后剪取带有病斑的组织倒入 适量0.1%升汞液进行表面消毒1.5 min,之后用无 菌水冲洗3次。然后接种于鹰嘴豆煎汁PDA培养 基上,根据该真菌特异的菌落及孢子形态进行初步 鉴定,经分离培养并纯化供试(刘薇等,2012)。

试剂:柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒 (B518661)、M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒 (B532435)、2×SGFast qPCR Master Mix(Low Rox) 试剂盒(B639272),生工生物工程(上海)股份有限公 司;2×Taq PCR Master Mix(含染料)、DL2000 DNA Marker,北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

仪器:7500 Fast型荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司;Biometra 070-851 PCR 扩增仪、DYY-6C 电泳 仪,北京六一仪器厂;Quantum ST5 凝胶成像系统, 法国 Vilber 公司;Colibri 超微量分光光度计,德国 Berthold公司。

1.2 方法

1.2.1 供试病原菌总RNA提取与cDNA合成

将分离获得的病原菌A. rabiei 接种到鹰嘴豆煎 汁PDA平板上,于26℃恒暗培养15d,加适量无菌 水洗脱分生孢子,经血球计数板计数,调整分生孢子 悬浮液浓度约为5×10⁵ 个/mL,待用。鹰嘴豆于无菌 土中种植,出苗后2周即苗高约20 cm时采用孢子喷 雾法进行人工接种,设清水为对照。在室内进行人 工接种的第1个12 h内,每隔2~3 h喷雾1次,喷雾 要求分生孢子悬浮液覆满鹰嘴豆幼苗的茎秆和叶片 正反面。室内温度25±2℃,保持相对湿度60%以 上。分别按照接种前0h、接种后12、36、72、96h,以 及清水对照处理后12h和36h,采集鹰嘴豆叶片样 品装入离心管后迅速冷冻于液氮中,液氮或-80℃ 保存备用。

参考柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒说明书 分别提取鹰嘴豆叶片各个时间点样品的RNA,样本 起始量50 mg。以1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质 量,超微量分光光度计检测OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值。并 按照M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒说明书进行 cDNA的合成,所得cDNA于-20℃保存备用。

1.2.2 基因序列的BLAST同源性分析

基于本课题组2015年通过转录组测序技术获得的鹰嘴豆基因序列,共获得25282个与参考鹰嘴 豆基因组对比结果为阳性的基因,挖掘到新基因 950个,其中发现了102个差异表达的新基因(未发 表数据)。现于102个差异表达的新基因中随机筛 选29个基因(表1),将其序列提交NCBI数据库使 用BLASTN或BLASTX进行序列同源性搜索比对。 1.2.3 基因引物专一性检测及其标准曲线的建立

根据转录组测序技术获得的29个基因序列,在 NCBI网站上在线设计并筛选获得 qPCR 扩增所用 的特异性引物(表2),由生工生物工程(上海)股份 有限公司合成。首先应用常规 PCR 检验引物的特 异性,即是否扩增出单一目的片段条带。常规 PCR 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 10 µL、10 µmol/L 上下游引物各1 µL、cDNA模版1 µL,ddH₂O补足至 20 µL;常规 PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃ 变性1 min,58℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循 环;72℃延伸5 min;4℃保存。在 TAE缓冲液(1×) 中的1%琼脂糖电泳凝胶上于100 V 条件下电泳 30 min,用溴化乙锭染色来监测 PCR 产物,在紫外 光下显现并拍照。

本试验选择未进行接菌处理(0 h)的样品为模版,建立目的基因和参考基因的标准曲线,将反转录得到的 cDNA 溶液按 5 的倍数进行稀释,即设定初始 cDNA 浓度为1,分别稀释为1×5⁰、1×5⁻¹、1×5⁻²、1×5⁻³、1×5⁻⁴的 cDNA 浓度。将以上倍数稀释的 cDNA 作为模版进行 qPCR,每个浓度 3 次重复。反应体系: 2×SG Fast qPCR Master Mix (Low Rox) 10 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 0.4 μ L、cDNA 模版 1 μ L、DNF Buffer 2 μ L,以 PCR-Grade Water 补充体积至20 μ L。qPCR反应程序: 50℃保持 2 min; 95℃预变

性3 min;95℃变性5 s,60℃退火30 s,定量重复40个 循环。qPCR反应结束后,对每个基因的扩增曲线 和熔解曲线进行分析,确定引物的特异性,以及 cD-NA浓度是否合适,荧光定量 PCR 仪直接给出基因 标准曲线的相关参数。

1.2.4 qPCR检测基因的相对表达量

以鹰嘴豆 Actin(EU529707)和 Ef-1a(AJ004960) 作为参考基因(Castro et al., 2012),以SYBR Green I 为荧光染料,分别检测防御相关基因在鹰嘴豆接种 A. rabiei前后的相对表达量,分析A. rabiei胁迫后不 同防御相关基因的表达差异。根据不同引物调整退 火温度(表2),每个样品3次重复,反应体系和热程 序与1.2.3相同。以鹰嘴豆抗性品种系选03接种前 0h为对照组,分别检测29个基因在接种后12、36、 72、96 h,以及清水对照处理后 12 h 和 36 h 的表达 量,设定待测基因和参考基因在接种前0h的相对表 达量为1,qPCR检测结果由荧光定量PCR仪自动采 集给出Ct值,每个样品重复3次取平均值,基因表达 量采用 $2^{-\Delta\Delta G}$ 法进行分析,其中 $\Delta \Delta Ct = (Ct_{10})^{-1}$ Ct 参考) 试验 - (Ct 10 - Ct 参考) 对照。分别计算每个参考基 因与目的基因的相对表达量,并将两者的几何平均 数作为双参考基因标准化结果。荧光定量 PCR 仪 根据选择的程序及采集的Ct值自动分析29个基因 在A. rabiei胁迫下不同时间点的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 鹰嘴豆总 RNA 的检测

取接种 A. rabiei 前后不同时间的鹰嘴豆样品提取总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,样品的总 RNA条带清晰,表明质量较好;总 RNA 的 OD_{260 nm}/OD_{280 nm}值在 1.9~2.1 之间,表明纯度较高,可用于后续 qPCR 分析。

2.2 筛选基因的BLAST搜索

为获得29个基因的功能信息,将序列提交NC-BI数据库,首先使用BLASTN进行序列同源性搜 索,其中基因474、1414和623都在鹰嘴豆中搜索出 100% 同源基因,其余基因分别在鹰嘴豆和蒺藜苜蓿 Medicago truncatula 中搜索到同源性为70%~97%的 同源基因;而基因1686和280无法匹配到高分值与 高覆盖率的同源基因,则使用BLAST X 搜索其同源 蛋白,皆为红车轴草 Trifolium pratense 的蛋白,但同 源性较低(表1)。值得注意的是,针对基因1531搜 索到的同源基因为非植物基因,但在未接菌的清水 对照中和接菌前皆有此基因的表达,故推测基因 1531是未知的新基因。根据同源基因的功能信息, 可将29个基因大致分成4类,分别涉及细胞拯救、防 御、毒性,信号传导机制,细胞运输,转录。功能分析 结果发现,功能未知的基因数目最多,达到了11个, 其中多数为鹰嘴豆未定性基因。

表1 鹰嘴豆基因及其 BLAST 搜索结果

Table 1 Chickpea gene and BLAST results

基因			同源性	
代号	比对的同源序列功能注释	E值	Sequence	登录号
Gene	Functional annotation of homologous sequence	E-value	identity	Accession no.
ID			(%)	
细胞拯	救、防御、毒性 Cell rescue, defense and virulence			
474	鹰嘴豆谷胱甘肽S-转移酶3mRNA,完整编码序列	0	100	KT336760.1
	Cicer arietinum glutathione S-transferase 3 mRNA, complete coding sequence			
1137	蒺藜苜蓿克隆MTH2-18f6,完整序列	0	84	AC148242.14
	Medicago truncatula clone MTH2-18f6, complete sequence			
1523	蒺藜苜蓿染色体8克隆MTH2-64g3, 完整序列	4e-97	83	AC174146.17
	M. truncatula chromosome 8 clone mth2-64g3, complete sequence			
270	蒺藜苜蓿类E3泛素蛋白连接酶,假定mRNA	0	88	XM 003617823.2
	M. truncatula E3 ubiquitin protein ligase RIE1-like protein, putative mRNA			
475	预测:鹰嘴豆可能的谷胱甘肽S-转移酶(LOC101488259), mRNA	0	87	XM 004492319.2
	Predicted: C. arietinum probable glutathione S-transferase (LOC101488259),			
	mRNA			
934	蒺藜苜蓿棉子糖合酶或种子抑制蛋白mRNA	$2_{2}, 71$	74	VM 012605520 1
	M. truncatula raffinose synthase or seed inhibition protein mRNA	2e-/1	/4	XM_013003330.1
1686	红车轴草核糖核酸酶H	4e-43	35	PNY07715.1
	Trifolium pratense ribonuclease H			
1492	蒺藜苜蓿克隆MTH2-117n1,完整序列	1e-165	5 77	AC147201.19
	<i>M. truncatula</i> clone MTH2-117n1, complete sequence			

登录号

Accession no.

XM 003620823.2

XM 003628001.2

XM 013614454.1

XM 013589534.1

XM 003603397.2

XM 013605839.1

XM 013585937.1

XM 013589114.1

CT963108.2

同源性

Sequence

(%)

70

E-value identity

E值

2e-38

代号 比对的同源序列功能注释 Gene Functional annotation of homologous sequence ID 667 蒺藜苜蓿染色体5克隆MTH4-37c5,完整序列 M. truncatula chromosome 5 clone MTH4-37c5, complete sequence 1712 蒺藜苜蓿咖啡酰辅酶A 3-O-甲基转移酶mRNA M. truncatula caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase mRNA 信号传导机制 Signal transduction mechanism 1456 蒺藜苜蓿富半胱氨酸类受体激酶部分mRNA M. truncatula cysteine-rich receptor-like kinase partial mRNA 611 蒺藜苜蓿富半胱氨酸类受体激酶蛋白mRNA M. truncatula cysteine-rich receptor-like kinase protein mRNA 1454 蒺藜苜蓿蓬乱/Egl-10/PH结构域蛋白mRNA M. truncatula dishevelled/Egl-10/leckstrin domain protein mRNA 细胞运输 Cellular transport 928 蒺藜苜蓿稀有脂蛋白类A双psiβ-桶蛋白mRNA M. truncatula rare lipoprotein A-like double-psi beta-barrel protein mRNA 868 蒺藜苜蓿跨膜氨基酸转运蛋白家族蛋白部分mRNA M. truncatula transmembrane amino acid transporter family protein partial mRNA 1390 蒺藜苜蓿类 Sec14p磷脂酰肌醇转移家族蛋白部分mRNA M. truncatula Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein partial mRNA 1450 蒺藜苜蓿跨膜蛋白,假定mRNA M. truncatula transmembrane protein, putative mRNA 转录 Transcription 未

86 0 0 86 0 84 0 83 89 5e-77 0 88 0 93 1e-156 76

1531	盘状细胞黏菌AX4溴结构域蛋白(DDB_G0267958)mRNA,完整编码序列	1e-04	85	XM_642353.1
	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 bromodomain-containing protein (DDB_G0267958)			
	mRNA, complete coding sequence			
知功	能蛋白 Unknown			
931	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101509958),ncRNA	0	96	XR 001143972.1
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101509958), ncRNA			—
637	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101490651),转录变异X7,misc RNA	0	87	XR 001145016.1
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101490651), transcript variant			—
	X7, misc_RNA			
2036	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101503279),ncRNA	0	97	XR_190434.2
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101503279), ncRNA			
1155	蒺藜苜蓿假设蛋白mRNA	1e-73	84	XM_003629593.2
	M. truncatula hypothetical protein mRNA			
1414	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101513425),ncRNA	0	100	XR_001144371.1
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101513425), ncRNA			
1801	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101514225),转录变体X1,ncRNA	0	91	XR_190343.2
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101514225), transcript variant			
	X1, ncRNA			
937	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101513707),ncRNA	0	91	XR_001143992.1
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101513707), ncRNA			
280	红车轴草假设蛋白蛋白L195_g006699	3e-17	27	PNY10130.1
	T. pratense hypothetical protein L195_g006699			
13	蒺藜苜蓿假设蛋白	0	86	XM_003593818.2
	M. truncatula hypothetical protein mRNA			
623	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101514029),ncRNA	0	100	XR_189714.1
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101514029), ncRNA			
1213	预测:鹰嘴豆未定性蛋白(LOC101488797),ncRNA	0	92	XR_190096.2
	Predicted: C. arietinum uncharacterized (LOC101488797), ncRNA			

基因

续表1 Continued

2.3 引物的特异性及其标准曲线

在 qPCR 过程中,29个基因扩增的荧光强度均 有不同程度增加。29个基因和2个参考基因的熔解 曲线均呈单峰型,表明 qPCR 无非特异性扩增,即引 物的特异性良好。以 cDNA 浓度为 x,循环阈值即 Ct 值为y,制作每个基因的标准曲线函数,各基因的标准曲线函数及其线性相关系数如表2所示,基因 1213和1492的扩增效率分别为117%与112%,其余 基因的扩增效率都在90%~110%之间,线性相关系 数均大于0.990。

表2 鹰嘴豆基因的特异性引物及其标准曲线

	Table 2 Specific prin	mers for chickpea	a genes and s	tandard curves		
基因代号 Gene ID	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增片段 Size (bp)	标准曲线方程 Standard curve equation	R^2	扩增效率(%) Amplification efficiency
474	F:TCAAGACTTCACCAACCACCC	60	80	<i>y</i> =-3.567 <i>x</i> +25.684	0.996	91
931	F:TCAAATACTGCACCCTCCCC R:ACAAGTACAAGCATCCTCTCCC	59	165	<i>y</i> =-3.344 <i>x</i> +24.874	0.991	99
1450	F:TTGCTTGGATGGTGGCTTCA R:AACTCTTTGGGTGACACGGT	60	217	<i>y</i> =-3.241 <i>x</i> +23.710	0.995	103
1456	F:TGGGGACTCTGGTGTGAAGG R:GGTAGACATGGTTGGGCGAT	60	147	<i>y</i> =-3.194 <i>x</i> +24.420	0.996	106
1137	F: AAAGTCATCTAAGGCAACGC R: GAATGGTCAGTGAAGGAGGG	57	108	<i>y</i> =-3.213 <i>x</i> +22.923	0.995	105
637	F:CTTTGAGGCGAGAACATGGG R:ACCGGTTGAGTCAGAGTTAGAAG	59	118	<i>y</i> =-3.381 <i>x</i> +27.264	0.992	98
1523	F:CGGAGCTATGGAGGTACACG R:TCCAAGTGGAGGCAACAACA	59	102	<i>y</i> =-3.476 <i>x</i> +25.388	0.995	94
2036	F:TGTGCTTTGATCCTTGGCTCT R:TGATGCTATTGCCACTTCGT	59	92	<i>y</i> =-3.532 <i>x</i> +25.787	0.997	92
928	F:TGGCGCCAGCATACCATAGA R:GGAAGCAGTGCCAAGGTCAG	61	213	<i>y</i> =-3.238 <i>x</i> +25.796	0.997	104
270	F:CCTGTTTGGCCTATGAGGGT R:ACTGTAGCGGCCATAAACCA	59	84	<i>y</i> =-3.456 <i>x</i> +27.290	0.991	95
1155	F:TAGCGGCGTCGTTTCTCAAA R:GGAGGCAATGATTTGGTCCG	60	139	<i>y</i> =-3.309 <i>x</i> +24.329	0.993	101
1414	F:ACGCGAGTCGCTTATTGCTA R:CACAGTTTGGCAACACACCC	60	107	<i>y</i> =-3.585 <i>x</i> +24.114	0.997	90
475	F:AGGTGAAGCTTTTTGGAGTGGA R:ATGGGACCAAAAACGAGCCAA	60	287	<i>y</i> =-3.448 <i>x</i> +23.637	0.991	95
1801	F:TCTGTTAGAGGCTGCCTTATTCC R:CTTGCCACTTGCAACCCATT	60	182	<i>y</i> =-3.482 <i>x</i> +19.990	0.998	94
934	F:AGGGGGCAACGTGATTCTGAC R:TGACGGGAGCTTGGAATTGG	60	107	<i>y</i> =-3.381 <i>x</i> +25.094	0.992	98
937	F:CCTCAAAATGTTGCAGGGGA R:ACAAGCATCCAAGACACAGCA	59	96	<i>y</i> =-3.392 <i>x</i> +24.957	0.999	97
611	F:CAACCGTAGACACGAGTCCC R:ACGCTAGCCTCCTTTGTAGC	60	169	<i>y</i> =-3.497 <i>x</i> +24.041	0.99	93
1454	F:TGTCATTAGTGTAGGGTGTCCG R:AACCTCTAACCGCCTGTCTC	59	187	<i>y</i> =-3.117 <i>x</i> +23.750	0.998	109
868	F:GCAACACACCCTCTTTGTGTC R:TTATGTACCCCCACACCCAC	59	138	<i>y</i> =-3.520 <i>x</i> +24.574	0.996	92
280	F:TGTGGCTACGTGAATGCGAT R:AGGTTGCTTGAAAGAGGCCA	60	108	<i>y</i> =-3.213 <i>x</i> +23.478	0.998	105
1390	F:CGAGCCCTTACGGACAACAT R:GGATCCCAGTCCCTTGCTTT	60	90	<i>y</i> =-3.198 <i>x</i> +23.430	0.997	105
13	F:GACCTTTCCTACGCCATGCT R:TTTCAAGCAAAGGCCTGAAGC	60	81	<i>y</i> =-3.436 <i>x</i> +25.007	0.994	95
1686	F:TCTCATCCGCAACAAGGGAG R:TAACTTTGTCAAGCGCCCCA	60	148	<i>y</i> =-3.180 <i>x</i> +22.847	0.997	106

基因代号	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	扩增片段	标准曲线方程	D	扩增效率(%)
Gene ID	Primer sequence $(5' - 3')$	Annealing temperature	Size (bp)	equation	R^2	Amplification efficiency
1492	F:GTGGTGCACTTTCGTAGCTT	59	100	y=-3.063x+24.482	0.995	112
	R:TTGTTCCCACCTTACCCCAC					
667	F:GGTGCCTAGTACGTTACCCC	60	139	y = -3.150x + 25.427	0.995	108
	R:GGGCGGTAAAAAGCCAACAC					
1712	F:AACACTCTATGGGGTGGACG	59	176	<i>y</i> =-3.272 <i>x</i> +22.893	0.991	102
	R:AATTACACAATGCGCCTGCAA					
623	F:ATTGCAACTCTTGGCAACTCT	59	94	<i>y</i> =-3.451 <i>x</i> +23.219	0.992	95
	R:TAGCAGGGACAGAGCTGTTG					
1531	F:TGTAGGCTTTCATGGGTCGG	59	150	<i>y</i> =-3.387 <i>x</i> +23.188	0.992	97
	R:GCCCCTTCGATGATGGTAGA					
1213	F:TTCACAACCTTCCGCCTTCG	60	101	y = -2.963x + 25.912	0.992	117
	R:TTTGCGCTAACAGCGTAGGA					
Actin	F:TTGGAGACGAGCAGCGTTTCAGA	59	71	<i>y</i> =-3.275 <i>x</i> +23.947	0.993	102
	R:GCCTGCTGCTTCCATTCCT					
EF - 1α	F:GAGAGGTCCACCAACCTTGACT	60	80	y = -3.459x + 21.808	0.999	95
	R:GAGAGGTCCACCAACCTTGACT					

续表2 Continued

2.4 鹰嘴豆接种A. rabiei 后防御相关基因的表达差异

2.4.1 鹰嘴豆防御相关基因的表达及其规律

29个基因在 A. rabiei 胁迫下都发生了不同程度 的差异表达,表达差异时间点集中表现在72 h,并在 96 h恢复至正常表达水平。其中谷胱甘肽 S-转移酶 3 mRNA(474)在72 h时的相对表达水平最高,是对 照处理0 h的19.773 倍,蒺藜苜蓿克隆 MTH2-18f6 完整序列(1137)的相对表达水平最低,约为对照处 理0 h的1/3(表3)。相对表达水平是对照5 倍以上 的基因有474、1712、270和937,474参与植物解毒, 1712 与木质化进程密切相关,270 是降解体内蛋白 质的相关酶,而937 未定性;相对表达水平是对照 2 倍以上、5 倍以下的基因有12个,其中功能未知的 基因为931、1414、1155、1213、1801、637(表3)。

在接种 A. rabiei 后,大多数基因的表达在72 h 才发生变化,部分基因的表达水平在12 h开始发生 变化。如475 在接种后12 h被抑制,只是抑制程度 不同,直到36 h有所恢复或恢复至正常水平,72 h又 被强烈诱导或抑制,96 h多数基因又有所恢复或恢 复至正常水平,也有少数基因如667 和928 被诱导上 调表达。值得注意的是基因868 和1213 的表达较其 它基因有些差异,868 在接种后12 h被诱导,直至36 h 仍然处于诱导状态,仅在72 h被抑制,96 h时又被诱 导;1213 在接种12 h被抑制,36 h有所恢复,72~96 h 仍被抑制,即表现为全程被抑制。

2.4.2 鹰嘴豆防御相关基因表达差异的分类

基于基因响应 A. rabiei 胁迫的区别、被诱导或抑制的异同以及表达量的差异,即根据基因在12 h

与72h的表达差异,可以将这些基因划分为5类。 第I类,如474和1712,受到*A. rabiei*侵染后,主要在 72h被诱导表达;第II类包含1454、1456和2036,全 程表达变化幅度较小且不明显;第III类包含475和 937,在12h时表达下调,在72h时表达上调;第IV 类,如611和1801,主要在72h时表达被抑制;第V 类,如637和623,表现为在12h和72h时都被抑制 (表3)。

结合表1中各基因的功能分类结果分析发现,与细胞拯救、防御、毒性相关的10个基因中MTH系列基因(除1686、934外的1137、1523、1492和667)在72h的表达量都相对下调,而其余4个基因的表达量表现为诱导上调。与信号传导机制相关的基因在任何时间点都未被诱导上调,如1456和1454,全程表达量不发生明显变化;又如611、1390和1531,在72h表现为被抑制。与细胞运输相关的4个基因中,仅跨膜运输蛋白基因1450在72h被诱导上调,其余3个基因皆表现为被抑制。可能与转录相关的基因1531在72h的表达被抑制。

3 讨论

qPCR技术普遍运用于mRNA表达差异分析的研究中。Kanakachari et al.(2016)研究发现应用qP-CR进行基因表达分析,试验数据的标准化需要表达稳定的参考基因。但是Li et al.(2015)研究发现目前没有参考基因在所有试验条件下均可以通用,且使用单一参考基因会出现相对误差。van de Sompele et al.(2002)研究结果表明,采用不同单参考基

因,其差异倍数在3.0倍到6.4倍之间,个别样本的表 达差异甚至高达20.0倍,而采用双参考基因所得结 果可能与单参考基因的结果相反或是错误的(de Carvalho et al.,2013; Sara et al.,2015)。因此 qPCR 试验信息最低限度标准(minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiment, MIQE)指南明确指出应筛选在试验条件下相对稳 定表达的参考基因并以多参考基因进行校正(Bustin et al.,2009; 2010)。Garg et al.(2010)已经确定 *EF-1a*是鹰嘴豆样品中最稳定表达的参考基因之一,而*Actin*是荧光定量较为常用的一种参考基因。 本试验通过对mRNA相对定量检测时参考基因的 选择与qPCR数据标准化精确性的考察,发现参考 基因*EF-1a*和*Actin*扩增效果良好,且扩增效率较一 致,表达稳定,相关性高。结果还显示,*EF-1a*和*Actin*作为双参考基因可以消除极值的出现,使结果更 为准确,原因可能是由于几何平均数在多样本计算 后使得结果出现的范围缩小,整体数值比较集中。

表3	應嘴豆在 Ascochyta	urabiei 胁迫下相关基因的相对表达水平
100		

Table 3	Polativa	avaraccion	lavalo	of related	ganas in	chicknee	induced by	Ascoch	ta rabia
Table 5	Relative	expression	levels	of related	genes m	спискреа	induced by	y ASCOCHV	la rabie

基因代号		相对	表达水平 Rela	tive expression	level		分类
Gene ID	CK12 h	CK36 h	12 h	36 h	72 h	96 h	Classification
474	1.136	1.155	1.234	1.048	19.773	1.504	Ι
1712	1.058	1.123	1.111	1.199	5.887	1.174	
931	0.904	0.947	0.910	1.052	3.606	1.043	
1450	0.926	1.038	0.935	1.015	2.340	1.176	
270	0.952	1.107	0.917	1.221	5.006	1.248	
1414	0.797	0.833	0.705	0.884	3.434	1.015	
13	0.935	0.966	0.946	1.117	1.476	1.018	
1155	0.833	0.935	0.860	0.893	3.024	0.806	
1454	0.924	0.913	0.778	0.978	1.191	1.088	II
1456	0.944	1.051	0.886	1.171	1.099	1.194	
2036	0.847	0.976	0.814	0.964	1.203	0.978	
475	1.044	0.965	0.767	1.085	2.747	1.210	III
937	0.988	0.886	0.736	0.967	7.078	1.358	
611	1.048	1.043	0.904	1.170	0.437	0.947	IV
1801	0.915	1.025	0.893	1.197	0.448	1.002	
1686	0.906	1.001	0.829	1.017	0.463	1.079	
1531	0.891	0.977	0.828	1.098	0.552	0.912	
1523	0.864	1.092	0.860	1.142	0.573	1.155	
1390	0.809	0.953	0.855	1.145	0.793	1.077	
868	0.874	1.028	0.999	1.491	0.571	1.422	
934	1.219	1.286	1.149	1.252	0.915	1.316	
637	0.962	0.952	0.848	1.077	0.493	1.101	V
623	1.018	0.959	0.742	1.070	0.514	1.111	
1137	1.333	0.842	0.704	0.875	0.352	1.017	
667	1.079	1.187	0.841	1.221	0.537	1.764	
928	0.876	1.027	0.725	1.059	0.565	1.354	
1492	1.005	0.982	0.843	1.021	0.464	0.923	
280	1.047	1.096	0.861	1.195	0.724	1.289	
1213	0.735	0.807	0.578	0.827	0.355	0.591	

本研究从构建cDNA文库中通过差异筛选、qP-CR验证和生物信息学功能分析,发现29个鹰嘴豆 基因均响应 A. rabiei 胁迫而发生了差异表达,并且 它们的表达量变化规律大致相同。根据与它们同源 的基因推测,这些基因可能参与了病原菌和环境胁 迫防御反应、信号传导及细胞运输等生物学过程。 在前期对A. rabiei 侵染过程的研究中,分别对不同时间点0、12、24、36、48、72、96h采集叶片进行真菌染色观察,仅可在叶片被侵染后72h观察到大量真菌分生孢子及菌丝,在96h并未观察到真菌分生孢子及菌丝(未发表数据)。通过对照排除前期清水对基因表达的影响,发现这些基因表达水平的变化集

中在72h,并在96h恢复正常,这与病原菌的侵染过程一致,说明这些基因表达的变化与接种 A. rabiei 相关,表明所分离到的基因以及这些基因的表达变化是可靠的。

病原菌A. rabiei 接种鹰嘴豆后 12 h,其分生孢 子开始发芽(Pandey et al., 1987), 在 24 h 形成附着丝 分泌黏液渗出物以便与宿主表面紧密接触(Köhler et al., 1995)。此时,已知坏死真菌产生化合物,例如 皂甙解毒酶(Markham & Hille, 2001), 以抑制植物 防御反应并阻止宿主防御途径的信号传导(Staples & Mayer, 2003)。抗氧化修复蛋白基因 MTH 系列 基因1137、1523、1492和667在12~96h之间的表达 反复下调并恢复正常,从另一方面说明了病原菌接 触与侵入期间使植物活性氧代谢失衡,但宿主植物 快速反应缓解并抵抗这种氧化伤害。当活性氧水平 超出宿主植物防御机制所及范围,细胞就处于氧化 胁迫状态,引发脂质过氧化、蛋白质氧化、核酸损伤 和酶失活,并能激活程序性细胞死亡(Klaus & Heribert,2004; Møller et al.,2007)。但在低浓度下,活性 氧能在植物细胞信号传导途径中作为第二信使介导 由植物激素直接或间接引发的多种应答反应,包括 气孔关闭、向地性、种子萌发、细胞程序性死亡以及 获得对生物及非生物胁迫的抗性等(Klaus & Heribert,2004)。活性氧这种"阴阳"双重作用完全取决 于其产生和清除之间的精妙平衡(Olsen et al., 2013)。A. rabiei 在鹰嘴豆组织中的渗透和生长集 中在入侵48~72h之间,期间产生细胞壁降解酶,例 如角质酶、木聚糖酶和外多糖半乳糖醛酸酶,还产生 3种不同类型的毒素——索拉纳吡喃酮(A、B和C)、 细胞松弛素 D 和未知的蛋白质植物毒素 (Jayakumar et al., $2005)_{\circ}$

病原菌侵染宿主后,宿主响应相对应的免疫应 答机制,为抵抗微生物攻击,使用一系列识别与防御 机制,包括固有的结构特征和组成性累积或排泄的 次生代谢产物(Armstrong-Cho & Gossen, 2005)。 如鹰嘴豆接种 A. rabiei 后,在72h表达水平较高的 3个基因为474、270和1712,其中解毒相关基因474 的高表达,即是宿主对病原真菌毒素的解毒作用(张 云欢等, 2018);基因270翻译的泛素蛋白功能是标 记需要分解掉的蛋白质,这可能是宿主对蛋白类毒 素的识别标记作用,然后通过26S蛋白酶进行降解, 同时泛素蛋白也可以标记跨膜蛋白,参与蛋白质的 膜泡运输,在细胞信号传导、内吞以及DNA损伤修 复中起着重要作用(宋素胜和谢道昕, 2006);咖啡酰 辅酶A氧甲基转移酶1712是木质素合成关键酶,木 质素是构成植物细胞壁的成分之一,能够赋予植物 抵抗伤害、病原菌侵染、代谢胁迫及细胞内部紊乱等 生物胁迫的能力,木质化组织和髓实质不受病原体 侵袭(王华美等,2014)。通常情况下,易感植物的反 应过慢或反应过小,无法有效对抗入侵的病原体,菌 丝在表皮下扩张后,植物细胞失去正常形态,细胞结 构迅速解体(Höhl et al., 1990; Yang et al., 1997)。鹰 嘴豆抗性品种系选03对A. rabiei 侵染后的反应迅速 且反应程度大,表明防御机制在感染后很快被激活, 才能有效对抗入侵的病原菌。病原菌在植株内部侵 染期间,抗性品种的细胞壁明显变厚、变褐及形成胶 状填充物等,细胞间丝状通道被木质沉积阻断,阻碍 病原菌的继续侵染,限制其定殖和分生孢子形成的 区域(Pereira et al., 2013)。为了抵抗病原菌侵染, 抗病品种形成了相应的物理防御机制,以阻止附着 胞的发育、侵入钉的穿透和侵染菌丝的定殖,而易感 品种缺乏这种机制。因此,在抗性品种中A. rabiei 的生长停止在非原生质体空间内,而菌丝在易感品 种的非质外体空间中迅速扩散(Höhl et al., 1990; Ilarslan & Dolar, 2002)。然而, 优良鹰嘴豆品种中 存在的抗性是部分或不完全的,到目前为止仍未发 现对A. rabiei的完全抗性。

在宿主接种病原菌后的72~96h,推测此阶段为 宿主攻击与清除病原菌的阶段,本文称之为攻击机 制,此阶段的完成是建立在有效对抗的前提下,即防 御是攻击的前提。假设宿主植物不能够抵抗病原菌 的攻击,则无法继续完成对病原菌的攻击与清除,然 后宿主以过敏性细胞死亡的方式阻隔病原菌在细胞 和组织间的传播。因此,宿主植物的抗病性并不是 某一类编码蛋白基因可完成的,是需要从识别到信 号传递到直接参与的每个基因共同完成。本试验通 过qPCR证实了基于转录组测序技术的一些新基因 的差异表达,但是下一步将涉及通过诸如遗传转化 和抗性相关的多态性定位等方法进行功能表征和验 证。本研究结果证实了鹰嘴豆防御反应的组织病理 学研究,尽管仅包含少数A. rabiei防御相关基因,但 对植物抗性的分子控制提供了新的见解,所产生的 信息增强了对这种植物-病原体关系的理解,并可 能有助于制订针对抗性栽培品种生产的育种计划。

参考文献(References)

Armstrong-Cho C, Gossen BD. 2005. Impact of glandular hair exudates on infection of chickpea by *Ascochyta rabiei*. Canadian Journal of Botany, 83(1): 22-27

- Bayaa B, Chen W. 2011. Ascochyta blight of chickpea.//Chen W, Sharma HC, Muehlbauer FJ. Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. Saint Paul, Minnesota: APS Press, pp. 34–40
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FSB, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S. 2010. MIQE précis: practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. BMC Molecular Biology, 11(1): 74
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett JF, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4): 611–622
- Castro P, Roman B, Rubio J, Die JV. 2012. Selection of reference genes for expression studies in *Cicer arietinum* L.: analysis of *cyp81E3* gene expression against *Ascochyta rabiei*. Molecular Breeding, 29(1): 261–274
- Coram TE, Pang ECK. 2006. Expression profiling of chickpea genes differentially regulated during a resistance response to *Ascochyta rabiei*. Plant Biotechnology Journal, 4(6): 647–666
- Dangl JL, Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature, 411(6839): 826–833
- de Carbalho K, Bespalhok Filho JC, dos Santos TB, de Souza SGH, Vieira LGE, Pereira LFP, Domingues DS. 2013. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization. Molecular Biotechnology, 53(3): 315–325
- Dixon R, Achnine L, Kota P, Lui CJ, Reddy MS, Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. Molecular Plant Pathology, 3(5): 371–390
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database). 2016. FAOSTAT production statistics of crops. http://www.fao.org/faostat/zh/#data/QC/visualize. 2018-06-20
- Gan YT, Siddique KHM, MacLeod WJ, Jayakumar P. 2006. Management options for minimizing the damage by Ascochyta blight (Ascochyta rabiei) in chickpea (Cicer arietinum L.). Field Crops Research, 97(2/3): 121–134
- Garg R, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M. 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications, 396(2): 283–288
- Grant M, Mansfield J. 1999. Early events in host-pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology, 2(4): 312–319
- Greenberg JT. 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 525–545
- Hahlbrock K, Bednarek P, Ciolkowski I, Hamberger B, Heise A, Liedgens H, Logemann E, Nurnberger T, Schmelzer E, Somssich I, et al. 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen

interactions. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 100(S2): 14569–14576

- Höhl B, Pfautsch M, Barz W. 1990. Histology of disease development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. Journal of Phytopathology, 129(1): 31–45
- Ilarslan H, Dolar FS. 2002. Histological and ultrastructural changes in leaves and stems of resistant and susceptible chickpea cultivars to Ascochyta rabiei. Journal of Phytopathology, 150(6): 340–348
- Jayakumar P, Gan YT, Gossen BD, Warkentin TD, Banniza S. 2005. Ascochyta blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. Canadian Journal of Plant Pathology, 27(4): 499–509
- Kanakachari M, Solanke AU, Prabhakaran N, Ahmad I, Dhandapani G, Jayabalan J, Kumar PA. 2016. Evaluation of suitable reference genes for normalization of qPCR gene expression studies in brinjal (*Solanum melongena* L.) during fruit developmental stages. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178(3): 433–450
- Klaus A, Heribert H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, 55: 373–399
- Köhler G, Linkert C, Barz W. 1995. Infection studies of *Cicer arieti-num* (L.) with GUS-(*E. coli β*-glucuronidase) transformed *Asco-chyta rabiei* strains. Journal of Phytopathology, 143(10): 589–595
- Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease response. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 251–275
- Leo AE, Linde CC, Ford R. 2016. Defence gene expression profiling to Ascochyta rabiei aggressiveness in chickpea. Theoretical & Applied Genetics, 129(7): 1333–1345
- Li DD, Hu B, Wang Q, Liu HC, Pan F, Wu W. 2015. Identification and evaluation of reference genes for accurate transcription normalization in saffower under different experimental conditions. PLoS ONE, 10(10): e0140218
- Liu W, Ma DY, Duan XD, Liang MJ, Qiang S. 2012. Effects of different culture media on mycelium growth and sporulation of *Ascochyta* sp. Xinjiang Agricultural Sciences, 49(12): 2249–2253 (in Chinese) [刘薇, 马德英, 段晓东, 梁明杰, 羌松. 2012. 不同 培养基对鹰嘴豆褐斑病菌丝生长及产孢的影响. 新疆农业科 学, 49(12): 2249–2253]
- Ma LJ, Zhang JS, Li LM, Chen XL, Zeng FM, Yang ZF, Qiang S. 2013. Resistance evaluation and genetic diversity analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to *Ascochyta rabiei*. Journal of Plant Genetic Resources, 14(6): 1179–1184 (in Chinese) [马丽 娟,张巨松,李利民,陈晓露,曾繁明,杨忠芳, 羌松. 2013. 鹰嘴 豆种质资源对 *Ascochyta rabiei* 的抗性评价及遗传多态性分 析. 植物遗传资源学报, 14(6): 1179–1184]
- Markham JE, Hille J. 2001. Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. Molecular Plant Pathology, 2 (4): 229–239
- Millan T, Clarke HJ, Siddique KHM, Buhariwalla HK, Gaur PM, Kumar J, Gil J, Kahl G, Winter P. 2006. Chickpea molecular breed-

ing: new tools and concepts. Euphytica, 147(1/2): 81-103

- Møller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology, 58: 459–481
- Montesano M, Brader G, Palva E. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. Molecular Plant Pathology, 4 (1): 73–79
- Navas-Cortes JA, Perez-Artes E, Jimenez-Diaz RM, Llobell A, Bainbridge BW, Heale JB. 1998. Mating type, pathotype, and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of *Ascochyta* blight of chickpea. Phytoparasitica, 26(3): 199–212
- Olsen LF, Issinger OG, Guerra B. 2013. The Yin and Yang of redox regulation. Redox Report, 18(6): 245–252
- Pandey BK, Singh US, Chaube HS. 1987. Mode of infection of Ascochyta blight of chickpea caused by Ascochyta rabiei. Journal of Phytopathology, 119(1): 88–93
- Peng H, Cheng HY, Chen C, Yu XW, Yang JN, Gao WR, Shi QH, Zhang H, Li JG, Ma H. 2009. A NAC transcription factor gene of chickpea (*Cicer arietinum*), *CarNAC3*, is involved in drought stress response and various developmental processes. Journal of Plant Physiology, 166(17): 1934–1945
- Peng H, Yu XW, Cheng HY, Shi QH, Zhang H, Li JG, Ma H. 2010. Cloning and characterization of a novel NAC family gene *Car-NAC1* from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Molecular Biotechnology, 44(1): 30–40
- Pereira AC, Cruz MFA, Paula Junior TJ, Rodrigues FA, Carneiro JES, Vieira RF, Carneiro PCS. 2013. Infection process of *Fusarium* oxysporum f. sp. phaseoli on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. Tropical Plant Pathology, 38(4): 323–328
- Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, Veyrieras JB, Stephens M, Gilad Y, Pritchard JK. 2010. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. Nature, 464(7289): 768–772
- Reddy MV, Kabbabeh S. 1985. Pathogenic variability in Ascochyta rabiei (Pass.) Lab. In Syria and Lebanon. Phytopathology Mediterranean, 24(3): 265–266
- Reddy MV, Singh KB. 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germ plasm accessions for resistance to *Ascochyta* blight. Plant Disease, 68(10): 900–901
- Sara RO, Helena LAV, Carlos BD. 2015. Effect of carbon monoxide on gene expression in cerebrocortical astrocytes: validation of reference genes for quantitative real-time PCR. Nitric Oxide, 49: 80– 89

- Song SS, Xie DJ. 2006. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. Chinese Bulletin of Botany, 23(5): 564-577 (in Chinese) [宋素胜,谢道昕. 2006. 泛素蛋白酶体途径及其对植 物生长发育的调控. 植物学通报, 23(5): 564-577]
- Staples RC, Mayer AM. 2003. Suppression of host resistance by fungal plant pathogens. Israel Journal of Plant Sciences, 51(3): 173– 184
- Taleei A, Kanouni H, Baum M. 2009. QTL analysis of Ascochyta blight resistance in chickpea.//Kim T, Yang LT, Park JH, Chang ACC, Vasilakos T, Yeo SS. Advances in communication and networking FGCN 2008: communications in computer and information science, vol 27. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 25–40
- van de Sompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3(7): 1–12
- van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques, 44(5): 619–626
- van Loon LC, van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological & Molecular Plant Pathology, 55(2): 85–97
- Wang HM, Yu YC, Fu CX, Zhou GK, Gao HH. 2014. Progress of a key enzyme-caffeoyl-CoA, 3-O-methyltransferase in lignin biosynthesis. Genomics and Applied Biology, 33(2): 458-466 (in Chinese) [王华美, 于延冲, 付春祥, 周功克, 高欢欢. 2014. 木质素 合成关键酶咖啡酰辅酶 A 氧甲基转移酶的研究进展. 基因组 学与应用生物学, 33(2): 458-466]
- Yang Y, Shah J, Klessig D. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes and Development, 11(13): 1621– 1639
- Zeng FM, Yang ZF. 2011. Chickpea brown spot control measures. Rural Science & Technology, (3): 45-46 (in Chinese) [曾繁明, 杨 忠芳. 2011. 鹰嘴豆褐斑病防治措施. 农村科技, (3): 45-46]
- Zhang YH, Zheng WB, Zhao M, WangChen JZ, Zhou EX, Shu CW. 2018. Bioinformatics and expression analysis of glutathione Stransferase gene from Rhizoctonia solani AG1-IA. Journal of North China Agricultural University, 33(1): 45–51 (in Chinese) [张云欢,郑文博, 赵美, 王陈骄子, 周而勋, 舒灿伟. 2018. 水稻 纹枯病菌谷胱甘肽S-转移酶基因的生物信息学及表达分析. 华北农学报, 33(1): 45–51]

(责任编辑:李美娟)