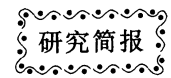


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00940



利用斑茅 cDNA 芯片研究甘蔗受黑穗病菌侵染后基因差异表达

阙友雄 许莉萍* 林剑伟 徐景升 张积森 张木清 陈如凯

福建农林大学 / 农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 福建福州 350002

摘要: 为了解甘蔗抗黑穗病的分子机制, 利用斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片检测了甘蔗受黑穗病菌胁迫后的基因差异表达。经杂交, 在 cDNA 芯片的 3 860 个模板中, 有效差异表达(Ratio 值 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5)的基因为 101 个, 其中上调 55 个, 下调 46 个。部分基因的定量 PCR 验证表明, 芯片杂交结果可靠。上调表达基因经测序、冗余序列剔除, 一共获得 36 个 unique ESTs。已知功能的 22 个上调表达基因, 涉及多条生理代谢途径, 如光合作用、离子转运和核酸代谢途径; 以及多种分子水平的进程, 如基因转录、蛋白质合成与修饰以及细胞信号转导等。另外, 还检测到 14 个未知功能基因。结果表明, 甘蔗对黑穗病的抗性具有复杂的机制。本研究为解释甘蔗受黑穗病菌胁迫后的基因差异表达及其网络构建奠定了基础, 还为今后系统研究甘蔗对生物与非生物胁迫的响应机制提供技术支持。

关键词: 甘蔗; 黑穗病菌; 斑茅; cDNA 芯片; 差异表达基因

Application of *E. arundinaceus* cDNA Microarray in the Study of Differentially Expressed Genes Induced by *U. scitaminea*

QUE You-Xiong, XU Li-Ping*, LIN Jian-Wei, XU Jing-Sheng, ZHANG Ji-Sen, ZHANG Mu-Qing, and CHEN Ru-Kai

Key Laboratory of Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: RNAs of sugarcane leaves with (treatment) or without (control) the infection of *U. scitaminea* were extracted, subjected to hybridization of cDNA microarray based on *E. arundinaceus* cDNA sequence and further validated by Real-time qPCR. There were about 101 differentially expressed ESTs (with ratio value ≥ 2.0 or ≤ 0.5) among 3 860 genes sets in a microarray plate, with 55 up-regulated, and 46 down-regulated by *U. scitaminea*. After sequencing and redundant sequences elimination, we totally obtained 36 unique ESTs up-regulated after the infection of *U. scitaminea*. Among them, 22 were involved in several metabolism pathways, such as photosynthesis, ion transport and nucleotide metabolism, as well as some genes related to transcription factors, proteins synthesis and modulation, and cellular signal transduction. And the function of the 14 remaining ESTs was unknown. In conclusion, the molecular mechanism of sugarcane smut resistance is complex. This investigation would provide an understanding for differentially expressed genes induced by *U. scitaminea* and set a mode for the systematic research on molecular mechanism of sugarcane responses to biotic and abiotic stress.

Keywords: Sugarcane; *Ustilago scitaminea*; *E. arundinaceus*; cDNA microarray; Differentially expressed gene

甘蔗黑穗病是一种真菌病害。迄今, 许多研究者在黑穗病菌的小种分化以及甘蔗对黑穗病的形态、细胞学和生理生化抗性等方面开展了不少的研究, 但甘蔗对黑穗病抗性的分子机制涉及众多基因的协同作用, 相关研究还比较少。Orlando 等^[1]利用 cDNA-AFLP 技术研究了甘蔗与黑穗病菌互作后的分子响应; Que 等^[2]克隆了甘蔗 NBS-LRR 类抗病相关基因, 并利用定量 PCR 技术研究了

该基因在甘蔗对黑穗病抗性中的作用; 阙友雄等^[3]利用 DDRT-PCR 技术研究了甘蔗受黑穗病菌侵染后基因的差异表达。

cDNA 芯片, 又称 cDNA 微阵列, 是一种反向 Northern 杂交技术(Reverse Northern)^[4]。利用结构基因组提供的信息, cDNA 芯片技术能够有效地对基因功能进行系统分析, 在植物功能基因组研究, 尤其是在植物和病

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA100701), 农业部引进国际先进农业科学技术计划(948 计划)项目(2006-G37), 国家自然科学基金项目(30170639), 福建省科技厅国家科技项目备案(F2007AA100701), 现代农业产业技术体系建设专项资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 许莉萍, E-mail: xlpmail@yahoo.com.cn

第一作者联系方式: E-mail: queyouxiong@yahoo.com.cn

Received(收稿日期): 2008-09-01; Accepted(接受日期): 2008-12-13.

原互作用中相关基因的鉴定和分离中, 有着广泛的应用前景^[4]。近几年来, cDNA 芯片技术已经被广泛应用到植物与病原互作机制的研究当中, 在阐释病菌胁迫下植物体内信号传导网络和基因差异表达模式等方面, 发挥了重要的作用^[5]。已有研究认为对于尚无可直接利用芯片的特定植物, 在尚未开发出芯片之前, 可借用已开发的模式植物或近缘植物芯片研究其基因表达^[6]。类似地, 应用该技术有望为甘蔗抗黑穗病相关基因的克隆和功能鉴定提供更多的信息。

本实验运用农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室开发的斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片, 筛选黑穗病菌胁迫下甘蔗中诱导表达的 EST。对克隆的 EST 进行序列比对和功能分析, 目的是深入了解甘蔗受黑穗病菌胁迫后的基因差异表达情况, 探讨甘蔗抗黑穗病的分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料为甘蔗高抗黑穗病品种 NCo376, 由福建农林大学农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室提供。因主要目的为研究甘蔗抗黑穗病品种的抗性机制, 仅使用抗病品种为材料。接种所用病原菌为甘蔗黑穗病菌 (*U. scitaminea* Syd.) 小种 2, 采集自感小种 2, 抗小种 1 的甘蔗品种 F134。为保证实验数据可靠, 采用相同方法同时处理 2 份实验材料, 分别进行芯片杂交, 仅将 2 次杂交中表达趋势一致的芯片位点进行下一步分析。芯片相关信息见刘文龙等文章^[7]。

1.2 试验设计

选取 30 条生长健壮、长势一致蔗茎, 双芽茎段, 平均分为 2 份, 50℃ 热水脱毒处理 2 h 后, 采用人工针刺接种法, 其中一份接种黑穗病菌孢子悬浮液(实验组), 接种浓度为 5×10^5 个 mL^{-1} , 另一份接种灭菌双蒸水(对照组)。接种后置 25℃ 下保湿 24 h, 再种植于田间^[8]。待甘蔗生长到出现黑穗病症状后, 分别采集实验组和对照组的甘蔗

+1 叶(可见肥厚带下第 1 个叶片), 用于 RNA 提取。

1.3 总 RNA 的提取和纯化

提取甘蔗叶片总 RNA^[9], 采用 QIAGEN RNeasy Kit 纯化 RNA。RNA 线性放大和荧光探针制备与定量参照 Message Amp aRNA Kit (Ambion) 说明书。

1.4 芯片杂交与洗涤

芯片杂交与洗涤具体步骤见网友雄博士学位论文^[10]。

1.5 cDNA 芯片杂交的数据分析

图像获取和数据分析具体步骤见网友雄博士学位论文^[10]。设定 Ratio 值在 0.5~2.0 范围内的基因表达差异不显著, Ratio 值 2.0 和 0.5 分别为表达上调(up-regulated)和下调(down-regulated)基因。

散点图显示基因表达丰度差异。片内相关系数反映芯片杂交重复性。检出率反应探针和模板匹配性。

1.6 cDNA 克隆测序及序列分析

挑选芯片杂交中表达上调(Cy3/Cy5 2)的克隆送到上海生工生物工程技术有限公司测序。剔除冗余序列后, 得到 unique EST。在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)将 unique EST 进行比对, 根据蛋白相似性, 参考拟南芥测序计划(Arabidopsis Sequencing Project)的功能分类方法对 EST 进行分类, 并分析各个 EST 在甘蔗抗黑穗病分子机制中的潜在功能。部分 EST 序列同数据库中已知功能基因的同源性较低, 但考虑到本实验所获得的 EST 序列较短, 仍然认为这些序列之间具有相同的功能。

1.7 以实时荧光定量 PCR 验证芯片杂交数据

根据笔者已克隆甘蔗的 RGA 片段(Ea-0564)和 NBS-LRR 基因序列(Ea-0632), 25S rRNA 基因为内参基因, 设计定量 PCR 引物(表 1)。25 μL PCR 体系含 12.5 μL 2 \times SYBR Primix Ex Taq, 0.5 μL Primer F (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 0.5 μL Primer R (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 2.5 μL cDNA 模板, 和 9 μL dd H₂O。PCR 程序为 95℃ 10 s, 94℃ 5 s, 60℃ 25 s, 40 个循环。设置 60℃ 至 90℃ 每隔 0.2℃ 读取荧光值 1 次, 生成融解曲线。每个样品设 3 次重复。采用 DPS 软件处理数据。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers for Real-time qPCR

引物编号 Primer name	克隆号 Clone ID	引物序列 Sequence (5'-3')
Ea0564-F	Ea-0564	GTCTTGATGATGATGGGAGAAAG
Ea0564-R		CGATTGTGAAGTCCAAAGAAG
Ea0632-F	Ea-0632	GAAAACAACACAGCGGAGGAG
Ea0632-R		GCAACAGCAAGGGCAAGA
25S rRNA2F	Internal control	GCAGCCAAGCGTTCATAGC
25S rRNA2R		CCTATTGGTGGGTGAACAATCC

2 结果与分析

2.1 cDNA 芯片杂交效果

从 cDNA 芯片杂交散点图(图 1-A)可以看出, 部分基

因分布于散点图的左上侧, 在甘蔗受黑穗病菌胁迫后上调表达; 部分基因分布于散点图右下侧, 下调表达。片内相关系数为 0.705, 散点集中在斜率为 1 的轴线两侧, 杂交数据重复性良好, 结果可靠(图 1-B)。

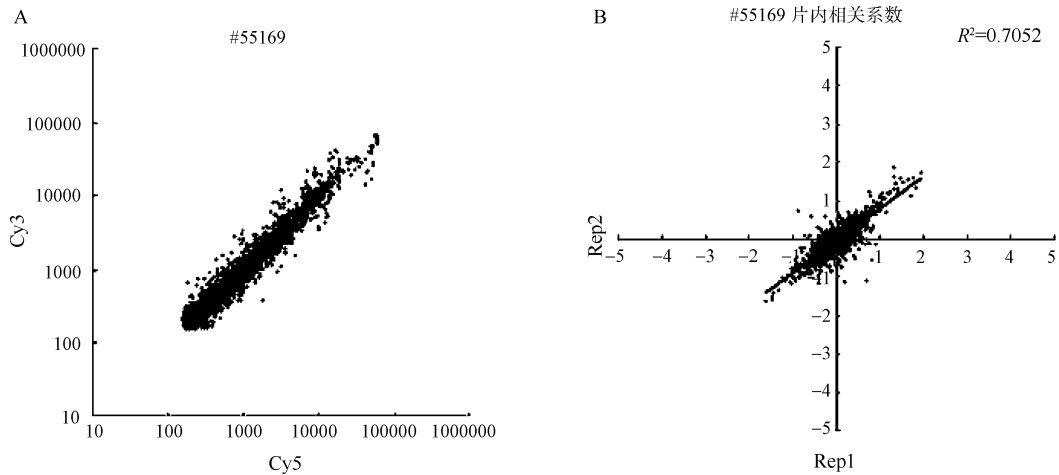


图 1 芯片杂交的散点图和片内相关系数
Fig. 1 Dot plot of hybridization signals and intra-slip relativity

A: 散点图; B: 片内相关系数图。
A: dot plot of hybridization signals; B: intra-slip relativity.

2.2 甘蔗受黑穗病菌胁迫后上调表达 EST 的筛选与功能分类

从 1 844 个检测位点(即 3 860 个芯片点阵中杂交信号良好位点)中,共筛选出 101 个差异表达 ESTs,其中 55 个为上调表达 ESTs,46 个为下调表达 ESTs。

对上调表达的 55 个 ESTs 进行单向测序,经序列分析,剔除冗余序列,得到 36 个 unique ESTs(表 2)。同源性检索发现其中 14 个为功能未知的新基因,其余 22 个均在 GenBank 上检索出同源基因,占有所有 36 个上调表达 unique EST 的 61.1%。这些 EST 大体被分为 8 大类(表 2):

(1) 蛋白质合成与蛋白修饰相关基因,包括 2 个核糖体蛋白基因。Wool 等^[11]研究表明,核糖体蛋白参与蛋白质生物合成、复制、转录、翻译调控、细胞凋亡、DNA 修复等,在生物体的生长、发育过程中起重要的作用。本研究中,核糖体蛋白上调表达,以适应黑穗病菌的胁迫。

(2) 碳水化合物代谢相关基因,包括如 UDP-葡萄糖-4-差向异构酶基因、二磷酸核酮糖羧化酶基因、C2 结构域蛋白和 Rubisco 活化酶等 4 个基因。其中,二磷酸核酮糖羧化酶是卡尔文循环的关键酶,还对许多外界因子如水杨酸、盐胁迫和干旱处理等具有明显的应答反应^[12]。本研究中,4 个碳水化合物代谢相关基因上调表达,表明黑穗病菌胁迫影响了碳水化合物合成和甘蔗的光合作用。

(3) 细胞信号转导相关基因,包括 8 个基因,如受体蛋白激酶基因和锌指蛋白基因等。蛋白激酶对植物-病原菌相互作用具有调节作用,在对病毒、细菌等的抗性中发挥重要作用^[13]。锌指蛋白是最大的一类 DNA 结合蛋白,在植物耐盐和耐高盐中具有重要作用,并受低温和 ABA 的特异诱导^[14]。而 ATP 合酶(登录号为 EU071808)是生物体内进行氧化磷酸化和光磷酸化的关键酶^[15]。这表明细胞信号途径可能与甘蔗对黑穗病的抗性密切相关。

(4) 转录相关基因,如 RNA 聚合酶基因。RNA 聚合

酶(RNA polymerase)能识别启动子,形成转录复合物,启动特定基因转录和表达^[16]。黑穗病菌胁迫后,可能正是 RNA 聚合酶转录了在黑穗病抗性反应中起作用的基因的转录和表达。

(5) 核酸代谢相关基因,如核酸结合蛋白基因。

(6) 起离子转运作用的基因,如泛肽蛋白连接酶基因。泛肽基因与离子转运有关,不仅在热胁迫、干旱胁迫和烟草花叶病毒抗性中起作用^[17],还能直接参与病原体防御,提高植物对病害的综合抗性^[16]。离子转运途径可能参与了甘蔗对黑穗病菌胁迫的响应。

(7) 其他在甘蔗受黑穗病菌胁迫过程中发挥作用的相关基因,如 NADH 脱氢酶基因和细胞壁蛋白基因。植物可以通过调节 NADH 介导的循环电子传递或叶绿体呼吸电子传递来平衡植物细胞氧化还原系统,影响 Rubisco 酶活性,减轻逆境胁迫的伤害。细胞壁蛋白是细胞壁的结构成分,细胞壁的功能主要体现在 3 个方面,即维持细胞形状与控制细胞生长、物质运输与信息传递以及参与植物的抗逆反应。

(8) 未知功能基因。共 14 个,占 38.9%。另外,36 条差异表达基因,在 cDNA 芯片杂交中的 Ratio 值是不一样的,分布在 2.045~9.572 之间,具有不同的表达水平(表 2)。

2.3 cDNA 芯片杂交结果的定量 PCR 验证

所选择的两个 ESTs 序列在用定量 PCR 技术进行表达分析时,虽然在具体的 Ratio 值上并未与芯片杂交分析结果完全吻合,但是,这两个 ESTs 序列表达却同它们各自在 cDNA 芯片杂交中的结果基本一致,其中 Ea-0564 在芯片杂交和定量 PCR 验证中的 Ratio 值分别为 2.113 和 2.524, Ea-0632 的 Ratio 值则分别为 2.468 和 1.972,皆为上调表达(图 2)。结合芯片阳性参照 GAPDH 和 APRT 的杂交结果和定量 PCR 验证结果一致^[18]。因此,cDNA 芯片

表 2 甘蔗受黑穗病菌胁迫后 cDNA 芯片中表达上调的 ESTs 序列分析
Table 2 Sequence alignment of up-regulated ESTs after infection by *U. scitaminea*

基因类型(个数) Gene type (number)	克隆编号 Clone ID	NCBI 登录号 Accession number	Ratio 值 Ratio value	Blast 检索 Blast hit	功能描述 Description	物种 Species	同源性(氨基酸) Homology (Amino acid)
蛋白质合成与修饰相关基因(2) Protein modulation and protein synthesis(2)	Ea04-042	EU071783	2.682	CAA68422.1	Ribosomal protein L22	<i>Zea mays</i>	84/85 (98%)
	Ea10-053	EU071788	3.018	CAA68422.1	Ribosomal protein L22	<i>Zea mays</i>	86/86 (100%)
碳水化合物代谢相关基因(4) C-compound, carbohydrate metabolism(4)	Ea09-052	EU071785	2.338	AAP68981.1	UDP-glucose-4-epimerase	<i>Zea mays</i>	25/27 (92%)
	Ea04-043	EU071784	2.110	XP_465295.1	C2 domain-containing protein-like	<i>Oryza sativa</i>	18/18 (100%)
	Ea27-063	EU071793	2.277	CAA78027.1	Ribulose biphosphate carboxylase	<i>Zea mays</i>	128/129 (99%)
	Ea13-074	EU071798	2.089	AAA18392.1	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Zea mays</i>	85/87 (97%)
细胞信号转导相关基因(8) Cellular communication and signal transduction Mechanism(8)	Ea04-106	EU071787	3.207	BAD46526.1	Putative receptor-like protein kinase	<i>O. sativa</i>	34/35 (97%)
	Ea07-074	EU071803	3.135	XP_470885.1	Putative ring-H2 zinc finger protein	<i>O. sativa</i>	14/31 (45%)
	Ea08-092	EU071807	6.385	ABA98616.1	Protein kinase domain	<i>O. sativa</i>	14/34 (41%)
	Ea12-075	EU071813	2.080	BAB97372.1	S-locus-related I	<i>M. arvensis</i>	13/27 (48%)
	Ea08-104	EU071808	2.352	NP_188532.2	Protein binding	<i>A. thaliana</i>	19/67 (28%)
	Ea09-104	EU071786	2.674	BAD27289.1	ATP synthase I subunit	<i>S. officinarum</i>	107/109 (98%)
	Ea05-064	EU071800	2.113	XP_550392.1	Putative leucine-rich repeat/extensin 1	<i>O. sativa</i>	11/14 (78%)
	Ea06-032	EU071801	2.468	NP_172668.1	Leucine-rich repeat/extension	<i>A. thaliana</i>	24/81 (29%)
转录相关基因(1) Transcription(one)	Ea16-090	EU071789	2.045	CAA36511.1	RNA polymerase beta" subunit	<i>Zea mays</i>	84/115 (73%)
核酸代谢相关基因(1) Nucleotide metabolism(1)	Ea50-033	EU071795	2.125	AAA33486.1	Nucleic acid-binding protein	<i>O. sativa</i>	42/48 (87%)
离子转运相关基因(2) Ion transporter(2)	Ea07-018	EU071802	2.455	NP_850430.1	Ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>A. thaliana</i>	15/46 (32%)
	Ea05-029	-----	2.939	NP_187459.1	Ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>A. thaliana</i>	14/44 (31%)
甘蔗受黑穗病菌胁迫过程中起其他作用的基因 (4) Others(4)	Ea08-037	EU071806	4.479	AAT02521.1	Cell wall protein	<i>Chlamydomonas</i>	10/13 (76%)
	Ea13-052	EU071797	2.802	CAA59104.1	D-hordein	<i>H. vulgare</i>	8/21 (38%)
	Ea14-019	EU071790	3.207	CAA09812.1	NADH dehydrogenase	<i>H. vulgare</i>	98/101 (97%)
	Ea17-060	EU071810	2.904	AAD38291.1	Putative polyprotein	<i>O. sativa</i>	15/42 (35%)
未知功能基因(14) Unknown(14)	Ea13-068	EU071782	2.833	AAT44674.1	Hypothetical protein 137	<i>S. officinarum</i>	118/118 (100%)
	Ea21-261	EU071791	2.779	ABD32447.1	Hypothetical protein	<i>M. truncatula</i>	20/74 (27%)
	Ea21-059	EU071792	2.172	CAA33959.1	Unnamed protein produc	<i>O. sativa</i>	37/58 (63%)
	Ea50-052	EU071796	5.957	AAT94024.1	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	12/26 (46%)
	Ea08-123	EU071809	2.463	BAD35205.1	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	25/71 (35%)
	Ea22-133	EU071811	9.572	AAM64462.1	unknown	<i>A. thaliana</i>	15/37 (40%)
	Ea04-118	EU071812	3.573	AAR91063.1	Hypothetical protein	<i>Zea mays</i>	37/82 (45%)
	Ea30-097	EU071794	2.081	BAD44787.1	Unknown protein	<i>O. sativa</i>	14/33 (42%)
	Ea05-039	EU071799	2.119	AAU43987.1	Unknown protein	<i>O. sativa</i>	12/27 (44%)
	Ea13-053		2.321	XP_474151.1	OSJNBa0060D06.10	<i>O. sativa</i>	19/55 (34%)
	Ea08-021	EU071805	2.064	XP_450232.1	Hypothetical protein	<i>O. sativa</i>	16/42 (38%)
	Ea08-015	EU071804	2.882	NP_918590.1	B1080D07.24	<i>O. sativa</i>	20/71 (28%)
	Ea12-091	EU071814	2.303	AAT44674.1	Hypothetical protein 137	<i>S. officinarum</i>	124/125 (99%)
	Ea02-038	EU071815	3.066	AAT44674.1	Hypothetical protein 137	<i>S. officinarum</i>	100/101 (99%)

能较真实反映基因表达变化, 差异的产生可能仅仅是实验误差或者两种实验技术之间本身的灵敏度差异导致。

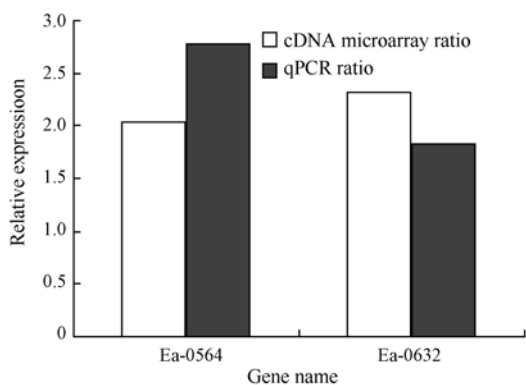


图 2 cDNA 芯片的定量 PCR 验证

Fig. 2 Real-time qPCR assay of cDNA microarray hybridization data

3 讨论

cDNA 芯片技术具有高通量和高敏感性特点, 在植物与真菌互作以及植物与细菌互作的分子机制研究方面的应用较为广泛^[5-6,19-20]。然而, 由于研究对象(如基因组不清楚等)及经费问题, 大多植物目标 cDNA 芯片尚未开发, 限制了 cDNA 芯片技术的应用。Girke 等^[6]的研究证实, 拟南芥 cDNA 芯片可应用于近缘植物基因表达研究。此后, 近缘和远缘植物芯片的应用已经有不少成功的报道^[21-22]。

斑茅是甘蔗的近缘植物。本实验利用斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片, 对黑穗病菌胁迫后甘蔗基因表达的差异情况进行了初步研究, 共检测到 1 844 个表达位点, 占芯片总位点的 47.78%, 获得了 36 个上调表达的差异基因, 表明甘蔗 cDNA 与斑茅 cDNA 之间的近缘杂交是有效的, 说明利用斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片可以获得甘蔗受黑穗病菌胁迫后基因差异表达的大量信息。定量 PCR 验证结果也表明, 斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片能较真实地反映甘蔗受黑穗病菌胁迫后部分基因的表达量变化。因此, 甘蔗逆境相关基因芯片诞生之前, 斑茅干旱胁迫 cDNA 芯片可用于甘蔗基因差异表达的研究。

植物在长期进化过程中形成了一套复杂的机制来抵御病原菌的侵染, 它们通过感知病原物并迅速启动防卫反应, 以达到抗病目的^[5,21-22]。前人研究表明, 在植物与病原互作过程中, 有各种不同功能的大量基因差异表达^[19-20]。本实验中, cDNA 芯片杂交结果表明, 在甘蔗受黑穗病菌胁迫后, 上调表达的基因, 除部分直接参与病原物的杀伤和阻遏(如细胞壁蛋白基因)外, 更多的是在抗黑穗病机制中参与不同生理代谢或分子途径。这些基因的功能涉及光合作用、离子转运以及核酸代谢等, 同时基因转录和细胞信号转导相关基因也上调表达。推测甘蔗对黑穗病菌的抗性是多种代谢途径和不同水平分子进程协调

作用的结果。这与 Orlando 等^[1]的研究结果一致; 笔者^[3]前期利用 DDRT-PCR 技术研究甘蔗受黑穗病菌侵染后基因的差异表达, 也获得类似的结果。因此, 甘蔗对黑穗病的抗性是众多基因共同参与的一个分子适应过程。本实验结果对利用近缘植物基因芯片, 研究甘蔗基因表达差异无疑具有积极的借鉴作用。

References

- [1] Orlando B H, Thomma B P, Carmona E, Borroto C J, Pujol M, Arencibia A, Lopez J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 1115-1121
- [2] Que Y X, Lin J W, Zhang J S, Ruan M H, Xu L P, Zhang M Q. Molecular cloning and characterization of a non-TIR-NBS-LRR type disease resistance gene analogue from sugarcane. *Sugar Tech*, 2008, 10: 71-73
- [3] Que Y-X(阙友雄), Xu L-P(许莉萍), Lin J-W(林剑伟), Chen R-K(陈如凯). Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene analogs from sugarcane. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(4): 631-639 (in Chinese with English abstract)
- [4] Fan J-J(樊金娟), Zhao K-J(赵开军), Xu Z-J(徐正进). Application of cDNA microarrays in the study of plant functional genomics. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2004, (3): 26-29(in Chinese with English abstract)
- [5] Reymond P. DNA microarray and plant defense. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 313-321
- [6] Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, Ohlrogge J. Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1570-1581
- [7] Liu W-L(刘文龙), Zhang J-S(张积森), Rao J(饶进), Cai Q-H(蔡秋华), Weng X-Y(翁笑艳), Ruan M-H(阮妙鸿), Que Y-X(阙友雄), Chen R-K(陈如凯). Construction and analysis of suppression subtractive hybridization library for *Saccharum arundinaceum* Retz. leaves exposed to drought stress. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(6): 961-967(in Chinese with English abstract)
- [8] Que Y-X(阙友雄), Xu L-P(许莉萍), Lin J-W(林剑伟), Chen T-S(陈天生), Chen R-K(陈如凯), Li Y-L(李依龙). Establishment of evaluation system of smut resistance for sugarcane varieties. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2006, 7(1): 18-23(in Chinese with English abstract)
- [9] Que Y X, Li W, Xu J S, Xu L P, Zhang M Q, Chen R K. A simple and versatile protocol for isolation of RNA from plant, fungi and animal. *J Agric Sci Technol*, 2008, 2: 63-65
- [10] Que Y-X(阙友雄). Molecular Response to the Interaction between Sugarcane and *Ustilago scitaminea*. PhD dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2008(in Chinese with English abstract)
- [11] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 164-165

- [12] Dong X-L(董晓丽), Zhou J-T(周集体), Du C-H(杜翠红), Yan B(严滨). The progresses of studies in molecular biology of RubisCO. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2001, 12: 95-97(in Chinese with English abstract)
- [13] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science*, 1995, 270: 1804-1806
- [14] Kim H S, Delaney T P. *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense independent of both salicylic acquired resistance. *Plant Cell*, 2002, 14: 1469-148
- [15] Ni Z-L(倪张林), Wei J-M(魏家绵). The structure and catalytic mechanism of ATP synthase. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2003, 29(5): 367-374(in Chinese with English abstract)
- [16] Ming Z-H(明镇寰). Information processing by RNA polymerase during RNA chain elongation. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(1): 47-50(in Chinese with English abstract)
- [17] Becker F, Buachfeld E, Schell J, Bachmair A. Altered response to viral infection by tobacco plant perturbed in ubiquitin system. *Plant J*, 1993, 3: 875-881
- [18] Zhang J-S(张积森), Li W(李伟), Que Y-X(阙友雄), Ruan M-H(阮妙鸿), Zhang M-Q(张木清), Chen R-K(陈如凯). Cloning of two house-keeping genes from *Erianthus arundinaceus* and the application in cDNA microarray. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2007, 15(4): 277-283(in Chinese with English abstract)
- [19] Yoshijiro N, Mari N, Motoaki S, Junko I, Maiko N, Asako K, Akiko E, Tetsuya S, Masakazu S, Masatomo K, Yukio T, Pyoyun P, Kazuo S. The cDNA microarray analysis using an *Arabidopsis pad3* mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 377-387
- [20] Tao Y, Xie Z Y, Chen W Q, Jane G, Chang H S, Han B, Zhu T, Zou G Z, Fumiaki K. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 2003, 15: 317-330
- [21] Chen W Q, Nicholas J P, Jane G, Fumiaki K, Chang H S, Thomas E, Felix M, Luan S, Zou G Z, Steve A W, Paul R B, Tao Y, Xie Z Y, Chen X, Steve L, Joel A K, Jeffery F H, Azzedine S A, Brigitte M M, Manfred H, Kappeli K, Thomas H, Jeffery L D, Wang X, Zhu T. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 2002, 14: 559-574
- [22] Horvath D P, Schaffer R, West M, Wisman E. *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species. *Plant J*, 2003, 34: 125-134