

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2021.09.010

番茄的酵母双杂交 cDNA 文库构建与评价^①

阙 怡¹, 张基林², 王梦榕³, 张世才⁴, 孙现超³, 樊光进³

1. 重庆大学 城市科技学院, 重庆 永川 402167; 2. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331;
3. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715; 4. 重庆市农业科学学院 蔬菜花卉研究所, 重庆 401329

摘要: 生物胁迫和非生物胁迫是番茄栽培种植过程中的主要不利因素, 严重影响番茄生长发育、产量和品质. 为研究番茄在生物胁迫和非生物胁迫下的蛋白互作机制, 以测序番茄品种“HeinZ1706”为试验材料, 采用重组方式连接, 构建了在干旱胁迫、TMV 病毒和辣椒疫霉菌侵染的番茄酵母双杂交 cDNA 文库. 结果显示构建的酵母 cDNA 文库的滴度为 1.15×10^7 CFU/mL, 插入的 cDNA 片段平均长度约为 1 kb, 重组率为 100%. 进一步地, 以在细胞核质定位的辣椒疫霉菌 RxLR 效应蛋白 PcAvr3a11 为诱饵, 利用此酵母双杂交 cDNA 文库成功筛选得到 25 个来自番茄的不同候选互作蛋白.

关键词: 番茄; 酵母双杂交; cDNA 文库; 互作蛋白

中图分类号: S432.44

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)09-0075-06

Construction and Evaluation of Yeast Two Hybrid cDNA Library for Tomato

QUE Yi¹, ZHANG Jilin², WANG Mengrong³,
ZHANG Shicai⁴, SUN Xianchao³, FAN Guangjin³

1. City College of Science and Technology, Chongqing University, Yongchuan Chongqing 402167, China;
2. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;
3. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;
4. Institute of Vegetable and Flower Research, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

Abstract: Biological and abiotic stress are the main adverse factors in tomato cultivation and production, which seriously damage the growing development, yield and quality. To study the protein interaction in tomato during biological or abiotic stress, we took “HeinZ1706” tomato variety as the material and constructed a yeast two hybrid cDNA library under drought stress, TMV infection or *Phytophthora capsici* infection with recombinational ligation technology. The results show that the titer of our yeast cDNA library was 1.15×10^7 CFU/mL, the average length of inserted cDNA fragment was about 1 kb and the recombination rate was 100%. Furthermore, we successfully found 25 potential interacted proteins by this yeast two-hybrid cDNA library of PcAvr3a11, a nucleus and cytoplasm localization RxLR effector from *Phyto-*

① 收稿日期: 2020-12-07

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jsyj-smxmX0366); 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jsxc-gksbX0149).

作者简介: 阙 怡, 硕士, 讲师, 主要从事园艺园林植物研究.

通信作者: 樊光进, 讲师, 博士.

phthora capsici, which was used as a bait in yeast two hybrid screening. All these results indicated that this tomato cDNA library, which was constructed in this study with high quality and good integrity, can be used to screen the interaction protein in future.

Key words: tomato; yeast two hybrid; cDNA library; interacting protein

番茄是世界范围内广泛种植的蔬菜作物之一. 同时, 我国是种植面积最大和产量最高的番茄种植国家 (FAO 数据). 然而, 在番茄种植和生长发育过程中, 各种生物和非生物胁迫常常严重制约了其生长发育, 从而影响了番茄的产量和品质. 随着遗传转化技术和分子生物学技术的发展, 番茄也逐渐发展成为一种模式研究作物^[1], 这极大促进了人们对茄科作物的信号转导通路的认识. 已有的研究表明, 植物通过一系列的信号转导过程来准确应答和抵御外界的不利因素^[2-3]. 例如, 在病原菌入侵过程中, 植物就存在病原模式相关分子诱导的免疫 (PTI) 和效应蛋白诱导的免疫 (ETI) 两种不同形式的应答机制^[4]. 有趣的是, 植物的各个信号通路之间存在着复杂的交互关系 (拮抗或者协同促进), 比如, 在番茄的研究中已证实响应病菌侵染和盐胁迫的信号转导通路也存在着交联^[5]. 在信号转导过程中, 蛋白之间的相互作用十分关键^[6]. 因此, 互作蛋白的鉴定成为研究番茄细胞内响应外界胁迫的信号通路的关键.

酵母双杂交系统是广泛使用的筛选和检测蛋白质相互作用的方法之一^[6]. 该技术首次由 Fields 等^[7]提出, 利用酵母菌中 GAL4 转录因子的 DNA 结合结构域 (binding domain, BD) 和转录激活结构域 (active domain, AD) 在空间上稳定接近时能起到重现完整 GAL4 转录因子的特点, 来检测分别融合表达 BD 和 AD 的两个蛋白是否互作. 酵母双杂交技术已经成功应用于多种蔬菜作物的蛋白互作研究, 例如: 抗番茄叶霉病免疫应答的番茄酵母双杂交 cDNA 文库^[8], 响应干旱胁迫的 Micro-TOM 番茄酵母双杂交 cDNA 文库^[9].

为了深入研究番茄响应生物胁迫和非生物胁迫时的分子机制, 本研究以“HeinZ1706”番茄为材料, 分别收集其在 TMV 和辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 侵染下和干旱胁迫下的叶片和根部组织, 采用重组连接的方法, 构建了番茄酵母双杂交 cDNA 文库, 并通过文库滴度测定、重组率和插入片段大小进行了文库质量评估. 最后, 以在细胞核质定位的辣椒疫霉菌 RxLR 效应蛋白 PcAvr3a11 为诱饵蛋白, 利用本次构建的番茄酵母双杂交 cDNA 文库进行文库筛选, 获得了 25 个 PcAvr3a11 的候选互作蛋白. 这些结果为进一步研究 PcAvr3a11 影响寄主植物免疫的机制奠定了一定基础, 也进一步表明该文库的建立对开展病原菌与番茄互作机制和番茄响应干旱胁迫的机制研究可以起到积极的促进作用.

1 材料与方法

1.1 实验材料 and 处理方法

“HeinZ1706”番茄在 22~25 °C, 16 h 光照与 8 h 黑暗交替的光照培养室培养. TMV 毒株由西南大学植物保护学院孙现超课题组保存, 采集被 TMV 完全侵染的本氏烟叶片进行摩擦接种. 辣椒疫霉菌菌株 BS11 在 25 °C 黑暗、10% V8 固体培养基上进行培养, 利用获得的游动孢子进行接种.

将苗龄为 5 周的“HeinZ1706”分为 3 组 (每组 2 棵), 分别进行摩擦接种^[10]野生型 TMV 病毒^[11], 离体叶片接种辣椒疫霉菌游动孢子和干旱胁迫处理. TMV 病毒侵染组出现卷叶、斑点等病毒症状时收集番茄叶片组织; 接种辣椒疫霉菌游动孢子后, 分别在 6, 12, 24 h 收集番茄离体叶片组织. 干旱胁迫是进行缺水 3 d, 叶片出现萎焉时收集番茄叶片和根部组织.

1.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

采用 Trizol 法, 将 3 种不同处理的番茄组织等量混合提取番茄总 RNA, 利用 Oligotex mRNA Kits (Qiagen) 分离纯化样本的 mRNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶和 NanoDrop2000 分光光度计检测其质量和浓度. 获得的 mRNA 条带清晰, 呈弥散状分布, 条带分布均匀, 总量大于 4.5 μg 为合格.

1.3 双链 cDNA 合成

RT-preimer (5'-TCATCTGCAGCTCGAGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTT VN-3') 为引物, 取 4.5 μg mRNA 为模板, 利用 SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) 合成第 1 链 cDNA. 以第 1 链 cDNA 为模板, 利用 Second Strand cDNA Synthesis Kit

(Thermo Scientific)合成 cDNA 第 2 条链. 以获得的双链 cDNA 为模板, 利用 T4 DNA ligase (NEB)加入接头. 3 个读码框, 每个读码框 1 份. 接头序列为(5'-CAGATTACGCTCATATGACAACTTTGTA-CAAAAAAGTTGG(AA)-3'). 最后加入 2 μ L 10 mmol/L dNTP, 2 μ L T4 DNA 聚合酶, 16 $^{\circ}$ C 放置 20 min, 补平末端.

1.4 DNA 的均一化处理

将得到的 cDNA 分别进行乙醇沉淀, 最终溶解在 14 μ L DEPC 水中, 取 12 μ L 进行后续反应, 加入 4 μ L 4X 杂交 buffer, 98 $^{\circ}$ C 2 min, 68 $^{\circ}$ C 5 h. 将反应管保持在 68 $^{\circ}$ C, 加入 4 μ L 5X DSN buffer, 然后加入 0.2 μ L 的 DSN 酶(1 U/ μ L), 置于 68 $^{\circ}$ C 反应 3 min. 加入 10 μ L EDTA, 混匀, 加入等体积的酚氯仿抽提一次. 将抽提产物进行乙醇沉淀, 溶于 80 μ L DEPC 水中. 取 1 μ L 保存. 以剩余 79 μ L cDNA 为模板, 以 5'-CAGATTACGCTCATATGACA-3'和 5'-TCATCTGCAGCTCGAGCACA-3'为引物, 利用 DNA 聚合酶反应扩增 5 个循环. 用 1%质量浓度的低熔点琼脂糖胶电泳检测 cDNA 产物, 切胶回收 500 bp 以上的片段, 获得均一化处理的 cDNA.

1.5 cDNA 与核蛋白酵母双杂交载体 pGADT7 的重组和文库滴度鉴定

将 7 μ L 的 cDNA 与 3 μ L 的经酶切(*Nde* I / *Xho* I)处理线性化的 pGADT7 载体混合, 加入 5 μ L 的 Infusion 重组酶^[12], 以及 5 μ L 的 DEPC 水, 混匀, 置于 50 $^{\circ}$ C 反应 1 h. 通过电击转化高效率的大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 将所有重组反应的产物转化到大肠杆菌中. 将转化后的大肠杆菌 DH5 α 置于 37 $^{\circ}$ C, 225~250 r/min 培养 1 h. 培养结束后, 吸取 10 μ L 培养物稀释 10,100,1 000,10 000 倍, 分别取 10 μ L 稀释液涂布 LB 平板(含 50 mg/L 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 第 2 d 计数菌落数, 获得文库初始滴度. 随机挑取 24 个克隆, 以 pGADT7-F 和 pGADT7-R 为引物, PCR 扩增, 电泳检测重组率和插入片段平均大小. 剩余培养物, 每 10 μ L 涂布一个 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 第 2 d 用涂布器刮取所有菌落混合. 取 1 mL 菌加入甘油(甘油最终浓度为 20%)后液氮速冻保存到-80 $^{\circ}$ C 冰箱; 其他菌用于质粒提取, 获得酵母双杂交 cDNA 文库筛选的质粒.

1.6 诱饵载体构建、亚细胞定位和酵母自激活鉴定

以辣椒疫霉菌 LT1534 cDNA 为模板, 设计特异性引物 PcAvr3a11-F 和 PcAvr3a11-R 扩增编码 PcAvr3a11 成熟区段的基因序列(去掉了分泌信号肽). 通过限制性内切酶的酶切、胶回收、T4 DNA ligase 连接和测序验证得到 pGBKT7: : *PcAvr3a11* 和 pART27: : *GFP-PcAvr3a11* 载体. 将 pART27: : *GFP-PcAvr3a11* 载体转入农杆菌 GV3101 中, 利用根癌农杆菌介导的本氏烟瞬时表达技术^[13]和激光共聚焦观察, 明确 PcAvr3a11 在植物细胞内的定位情况. 利用 PEG/LiAc 介导的酵母转化方法, 将诱饵载体 pGBKT7: : *PcAvr3a11* 和 pGADT7 空载体共转入酵母菌株 AH109, 在缺陷型培养基上检测 PcAvr3a11 是否具有自激活.

1.7 酵母双杂交文库筛选

大规模的酵母双杂交文库筛选参照 YeastmakerTM Yeast Transformation System 2 试剂盒(Clontech)说明书进行. 将转子涂布在 SD/-Leu-Trp-His-Ade 培养基上, 4~5 d 后再将四缺培养基上生长出来的酵母菌落挑取到加有 X- α -Gal 的 SD/-Leu-Trp-His-Ade 培养基上, 挑取生长并变蓝的酵母单菌落, 利用玻璃珠破壁法提取酵母质粒. 将酵母质粒转化大肠杆菌后送测序, 获得候选互作蛋白的基因序列. 将基因序列比对到番茄基因组数据库, 获得候选互作蛋白的注释情况.

2 结果与分析

2.1 番茄总 RNA 和 mRNA 的质量检测

按照 1.1 的方法, 将 3 种处理收集的番茄组织等质量混合, 利用 Trizol 试剂提取番茄总 RNA. 在 1% 琼脂糖胶中检测总 RNA 的提取质量. 如图 1a 所示, 28 S 和 18 S 两条带清晰明亮, 无明显弥散性条带. 由此判断番茄 cDNA 文库的总 RNA 质量较好, 无明显降解. 利用 Oligotex mRNA Kits(Qiagen)分离纯化获得番茄样本的 mRNA. 如图 1b 所示, mRNA 条带在 500~3 000 bp 范围内呈均匀弥散分布, 说明 cDNA 文库

mRNA 质量较好, 满足文库构建要求.

2.2 酵母双杂交 cDNA 文库构建和质量评估

以获得的 mRNA 为模板, 经均一化处理最终获得 ds cDNA, ds cDNA 重组连接到 pGADT7 载体后, 通过电击转化高效率的大肠杆菌获得酵母双杂交 cDNA 文库. 吸取 10 μ L 初始培养物, 稀释 10, 100, 1 000, 10 000 倍, 分别取 10 μ L 稀释液涂布 LB 平板将其涂布到平板上, 计算得到初始文库滴度约 1.15×10^7 CFU. 在 cDNA 文库中随机挑取 24 个单菌落, 进行 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测. 如图 2 所示, 24 个克隆全部扩增出条带, 重组率为 100%, 条带主要分布在 500~2 000 bp, 平均长度约为 1 kb, 条带具有较好多态性. 这表明本次番茄酵母双杂交文库构建满足未来实验需求.

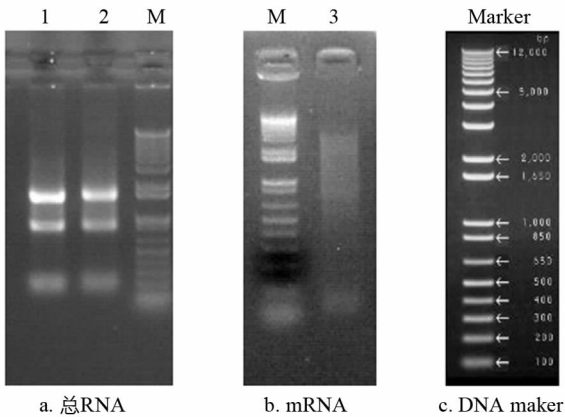
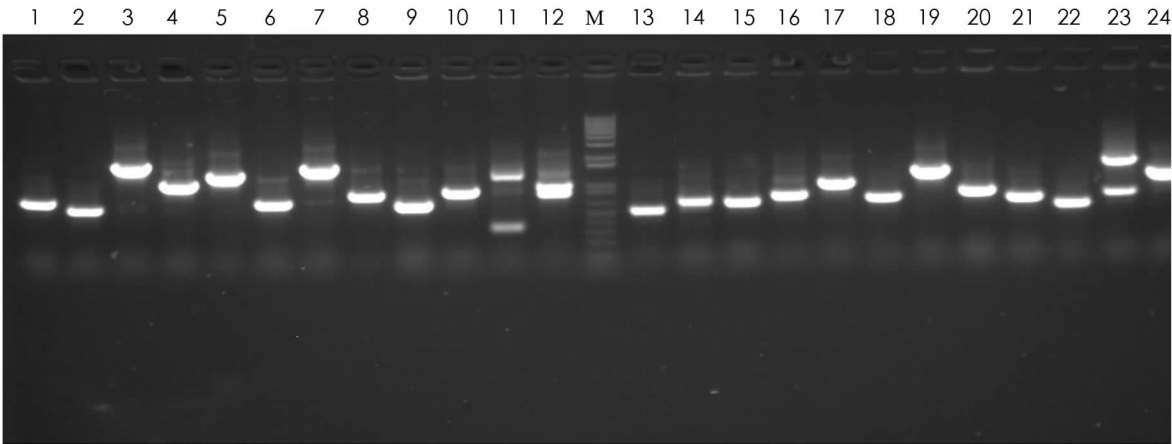


图 1 番茄总 RNA 和 mRNA 电泳结果



注: 1—24. 重组质粒; M: DNA maker
图 2 酵母双杂交 cDNA 文库检测

2.3 诱饵蛋白酵母双杂交载体的构建及其自激活检测

以辣椒疫霉菌 cDNA 为模板, PCR 扩增获得编码辣椒疫霉菌 RxLR 效应蛋白 PcAvr3a11 成熟区段的基因序列(图 3a). 通过酶切、连接和测序验证得到 pGBKT7: : *PcAvr3a11* 和 pART27: : *GFP-PcAvr3a11* 载体. 将 pART27: : *GFP-PcAvr3a11* 载体转入农杆菌 GV3101 中, 利用根癌农杆菌介导的本氏烟瞬时表达技术^[11]和激光共聚焦观察明确 PcAvr3a11 在植物细胞内的亚细胞定位. 如图 3b 所示, GFP-PcAvr3a11 在细胞核和细胞质内都有. 这符合 pGADT7 系统酵母双杂交检测细胞核和细胞质蛋白之间互作的要求. 利用 PEG/LiAc 介导的酵母转化方法, 将诱饵载体 pGBKT7: : *PcAvr3a11* 和 pGADT7 空载体共转入酵母菌株 AH109. 共转化菌株在缺陷型培养基 SD/-Trp-Leu-Ade-His 上的生长情况表明, pGBKT7: : *PcAvr3a11* 不具有自激活(图 3c). 结果均表明, PcAvr3a11 适用于酵母双杂交文库筛选的诱饵蛋白.

2.4 PcAvr3a11 互作蛋白的初步筛选及其序列分析

将番茄酵母 cDNA 文库质粒和 pGBKT7: : *PcAvr3a11* 共转化入酵母感受态细胞 Y2H Gold. 取 10 μ L 转化酵母菌液稀释 1 000 倍后涂布 1 00 μ L 至 SD/-Trp-Leu 平板培养基上, 计算该次筛库的总转化子数目约为 5×10^5 , 理论上已完全覆盖番茄全基因组, 满足酵母双杂交文库筛选的要求. 将剩余未稀释菌液涂布于 50 个 SD/-Leu-Trp-Ade-His 培养皿上进行筛选, 再将生长的阳性克隆挑到 SD/-Leu-Trp-Ade-His + X- α -Gal 培养皿上(图 3d), 共获得 33 个转变为蓝色的阳性生长菌落. 测序结果经过序列相似性对比和重复序列分析后得到 25 个可能与 PcAvr3a11 互作的候选基因(表 1).

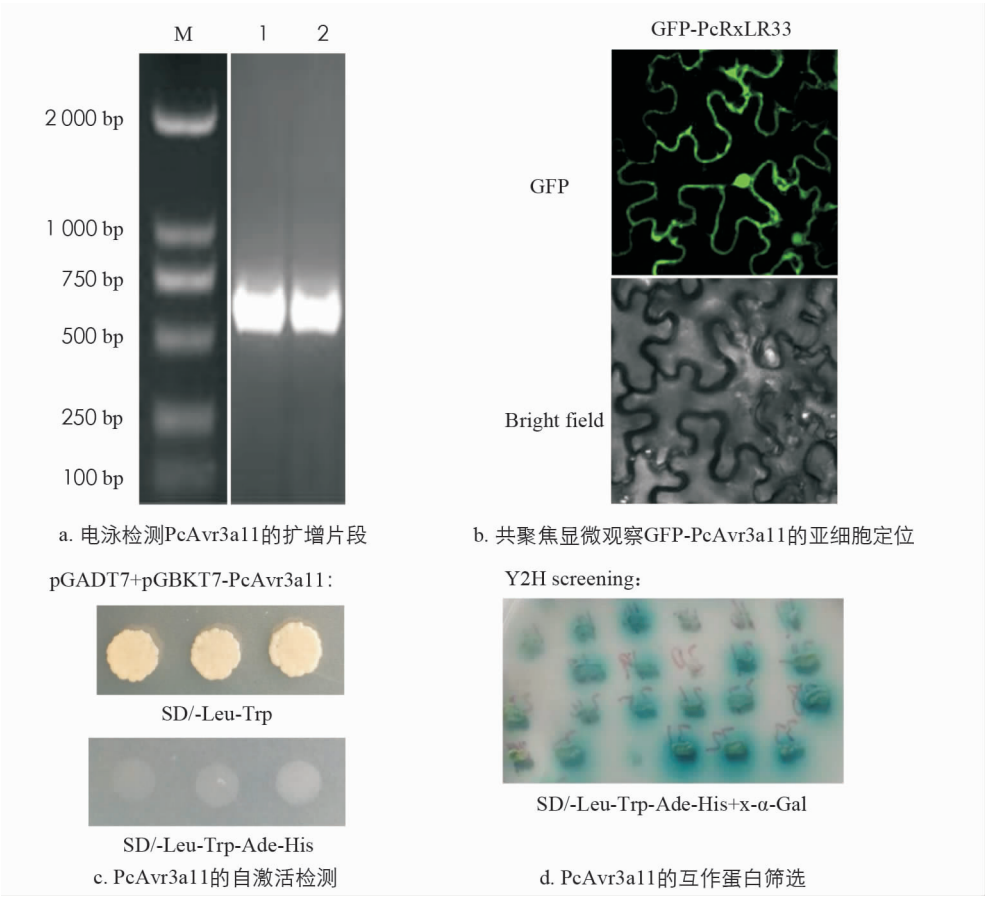


图 3 PcAvr3a11 的亚细胞定位和互作蛋白筛选

表 1 PcAvr3a11 的候选互作蛋白

克隆编号	候选蛋白	登录号
1	LOW QUALITY: Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Solyc01g073800. 2. 1
2	Protein YIPF (AHRD V3. 3 * * * K4D4W9_SOLLC)	Solyc11g007080. 1. 1
3	plastid lipid associated protein CHRC	Solyc02g081170. 3. 1
4	LOW QUALITY: Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Solyc01g073820. 3. 1
5	ADP-ribosylation factor (AHRD V3. 3 * * * ARF_VIGUN)	Solyc05g005190. 3. 1
6	AT hook, DNA-binding motif-containing protein	Solyc07g064560. 3. 1
7	Zinc finger CCCH domain-containing protein	Solyc08g065940. 3. 1
8	LOW QUALITY: Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Solyc03g097960. 1. 1
9	14 kDa proline-rich protein DC2. 15	Solyc01g090970. 3. 1
10	Fructose-bisphosphate aldolase	Solyc01g110360. 3. 1
11	Chromo domain protein LHP1	Solyc10g024470. 2. 1
12	TOMATO WOUND-INDUCED 1	Solyc01g107820. 2. 1
13	triosephosphate isomerase	Solyc01g111120. 3. 1
14	ABC transporter B family protein	Solyc09g008240. 3. 1
15	LOW QUALITY: Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Solyc01g073820. 3. 1
16	Translation initiation factor iso4E	Solyc09g090580. 3. 1
17	LOW QUALITY: Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Solyc01g073820. 3. 1
18	Zinc finger protein, putative	Solyc01g107430. 2. 1
19	zinc finger (Ran-binding) family protein	Solyc05g013330. 3. 1
20	Pathogenesis-related protein 1	Solyc00g174340. 2. 1
21	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Solyc09g057660. 3. 1
22	Tomato RuBP carboxylase small subunit	Solyc03g034220. 3. 1
23	Calcium-binding EF-hand	Solyc01g108190. 3. 1
24	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex assembly factor 3-like protein	Solyc01g088350. 3. 1
25	Protein Red	Solyc07g017490. 3. 1

3 讨论与结论

酵母双杂交技术是筛选互作蛋白的常用手段之一^[6], 对研究植物响应外界胁迫过程中的蛋白作用机理、信号转导过程与代谢途径具有重要帮助. 酵母双杂交 cDNA 文库构建方法主要有 Takara 公司推出的 SMART 法和 Invitrogen 公司推出的 Gateway 法. 本研究利用重组酶一步连接到线性化目的载体 pGADT7 的方法, 既避免了 SMART 方法中 SfiI 酶切 cDNA 片段时可能导致基因断裂的问题, 也避免了 Gateway 方法中两步重组反应会放大基因复制偏好性的问题. 本研究在 cDNA 的 5' 端做了 3 份不同读码框的接头, 尽量保证了插入基因的正确表达. 最后, 为了降低高丰度基因的相对含量, 使用 DSN 法对其进行均一化处理, 降低高丰度基因. 该文库的初始库容量达到了 1.15×10^7 CFU, 重组阳性率为 100%, 平均插入片段大小约为 1 kb, 理论上达到了酵母双杂交 cDNA 文库构建的要求.

PcAvr3a11 是来自辣椒疫霉菌的典型 RxLR 效应蛋白之一^[14]. 本研究实验表明 PcAvr3a11 在酵母系统中不具有自激活且定位于植物细胞核和细胞质中. 因此, 酵母双杂交文库筛选适用于寻找 PcAvr3a11 在寄主植物中的互作蛋白. 利用已构建的酵母双杂交文库, 以 PcAvr3a11 为诱饵蛋白进行了酵母双杂交文库筛选, 最终获得了 25 个候选互作蛋白. 这进一步表明利用重组酶一步连接的方法构建酵母 cDNA 文库具有可行性. 通过农杆菌侵染法^[15], 能较为高效地构建转基因番茄. 未来通过在植物上的进一步验证, 可以确认哪些蛋白是被 PcAvr3a11 靶向并具有生物学意义的植物蛋白. 这些候选互作蛋白为研究 PcAvr3a11 如何干扰寄主植物细胞奠定了一定的研究基础.

参考文献:

- [1] ARIE T, TAKAHASHI H, KODAMA M, et al. Tomato as a Model Plant for Plant-Pathogen Interactions [J]. Plant Biotechnology, 2007, 24(1): 135-147.
- [2] DANQUAH A, DE ZELICOURT A, COLCOMBET J, et al. The Role of ABA and MAPK Signaling Pathways in Plant Abiotic Stress Responses [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(1): 40-52.
- [3] PLANAS-RIVEROLA A, GUPTA A, BETEGÓN-PUTZE I, et al. Brassinosteroid Signaling in Plant Development and Adaptation to Stress [J]. Development, 2019, 146(5): 151894-1-151894-11.
- [4] JONES J D G, DANGL J L. The Plant Immune System [J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.
- [5] KISSOUDIS C, SUNARTI S, VAN DE WIEL C, et al. Responses to Combined Abiotic and Biotic Stress in Tomato are Governed by Stress Intensity and Resistance Mechanism [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(17): 5119-5132.
- [6] SHATNAWI M. Review of Recent Protein-Protein Interaction Techniques [A]//Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology. Amsterdam: Elsevier, 2015: 99-121.
- [7] FIELDS S, SONG O. A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions [J]. Nature, 1989, 340(6230): 245-246.
- [8] 许向阳, 裴童, 吴泰茹, 等. Cf-19 介导的抗番茄叶霉病(*Cladosporium fulvum*)免疫应答酵母双杂交 cDNA 文库构建和鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(5): 10-16.
- [9] 许向阳, 裴童, 吴泰茹, 等. 干旱胁迫下“Micro-Tom”番茄酵母双杂交 cDNA 文库构建和鉴定 [J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(7): 20-26.
- [10] 任芳, 青玲, 熊艳, 等. 伴随中国番茄黄化曲叶病毒的卫星 DNA β 在本氏烟中的种群变异 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2010, 35(5): 110-115.
- [11] 代园凤, 朱虹, 张永至, 等. 毕节市烟草 3 种主要病毒检测及株系分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(9): 63-70.
- [12] 肖熙鸥, 林文秋, 李威, 等. 感染青枯病病原菌 *R. solanacearum* 的茄子酵母双杂交文库构建及评价 [J]. 北方园艺, 2016(21): 102-105.
- [13] 张美祥, 刘廷利, 茹艳艳, 等. 效应因子 PsCRN77 基因在本氏烟中的表达降低其对寄生疫霉的抗性 [J]. 植物病理学报, 2015, 45(6): 619-625.
- [14] BOUTEMY L S, KING S R F, WIN J, et al. Structures of Phytophthora RXLR Effector Proteins: A Conserved But Adaptable Fold Underpins Functional Diversity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(41): 35834-35842.
- [15] 葛歌, 金新开, 沈辉, 等. 拟南芥 AtCBF1~3 基因提高番茄耐寒性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(9): 34-41.