

金魏佳, 何佳, 章燕如, 等. 青花菜病程相关蛋白基因 *BoPR2* 的克隆与表达 [J]. 广东农业科学, 2018, 45 (12) : 76–81.

青花菜病程相关蛋白基因 *BoPR2* 的克隆与表达

金魏佳, 何佳, 章燕如, 范灵希, 唐露静, 叶佳燕, 郑颖, 蒋明

(台州学院生命科学学院, 浙江台州 318000)

摘要: 病程相关蛋白基因以家族形式存在于植物中, 在抗病反应中起着重要作用。以青花菜为试材, 利用 PCR 法克隆到 1 个 *PR2* 基因, 定名为 *BoPR2*。测序结果表明, *BoPR2* 基因组全长 1 188 bp, 具 1 个内含子, 编码区全长 1 092 bp, 编码 351 个氨基酸; 序列比对和系统发育分析结果显示, *BoPR2* 与野甘蓝、甘蓝型油菜和白菜 *PR2* 的相似度最高, 在发育树上聚为一组, 与亚麻荠、荠菜的相似度最低, 亲缘关系最远; 实时定量 PCR 结果表明, *BoPR2* 的表达受芸薹根肿菌诱导, 在 10 d 时的相对表达量最大, 约为对照的 6 倍; 但 *BoPR2* 的表达不受核盘菌的诱导。*BoPR2* 基因的克隆与表达分析, 为青花菜抗病机理研究及开展分子育种奠定了基础。

关键词: 青花菜; 病程相关蛋白; *BoPR2*; 克隆; 表达分析

中图分类号: S436.35

文献标识码: A

文章编号: 1004–874X (2018) 12–0076–06

Cloning and expression analysis of a pathogenesis-related protein gene *BoPR2* from *Brassica oleracea* var. *italica*

JIN Wei-jia, HE Jia, ZHANG Yan-ru, FAN Ling-xi, TANG Lu-jing,

YE Jia-yan, ZHENG Ying, JIANG Ming

(College of Life Sciences, Taizhou University, Taizhou 318000, China)

Abstract: Pathogenesis-related protein genes comprise a gene family in plants, and they play a key role in disease resistance. In this study, a gene designated *BoPR2* was isolated from broccoli material using the PCR method. Sequencing results indicated that the full-length genomic DNA was 1 188 bp with an intron, and its coding sequence was 1 092 bp encoding 351 amino acids. Sequence comparison and phylogenetic analysis results showed that higher similarities were found between *BoPR2* and *PR2* proteins from *Brassica oleracea* var. *oleracea* and *B. rapa* subsp. *chinensis*, and they were clustered into the same clade. The lowest similarities were seen between *BoPR2* and *PR2*s from both *Camelina sativa* and *Capsella rubella*, indicating their distinct relationships. Real-time quantitative PCR results revealed that the expression of *BoPR2* gene was induced by *Plasmodiophora brassicae*, and the highest relative expression level was detected at 10 d after incubation with an approximately 6-fold increase. However, the expression of *BoPR2* was not affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. Isolation and expression analysis of *BoPR2* provide evidence for further studies on disease resistance mechanism and broccoli molecular breeding.

Key words: *Brassica oleracea* var. *italica*; pathogenesis-related protein; *BoPR2*; cloning; expression analysis

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 又名西兰花、绿菜花和绿花椰菜等, 为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属 1 年生或 2 年生草本蔬菜, 是甘蓝的一个变种^[1]。青花菜以花球为

收稿日期: 2018–09–02

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 项目 (2017R430012); 台州市科技计划项目 (162ny14); 浙江省自然科学基金 (LY19C150004)

作者简介: 金魏佳 (1995–), 女, 在读本科生, E-mail: 2829625619@139.com

通讯作者: 蒋明 (1973–), 男, 博士, 副教授, E-mail: jiangming@tzc.edu.cn

主要食用部位, 营养价值高, 富含矿质元素、碳水化合物、蛋白质、维生素及抗癌活性成分萝卜硫素 (Sulforaphane), 是一种深受人们喜爱的保健蔬菜^[2-5]。在我国, 随着青花菜种植面积的不断扩大, 病害的生日趋严重, 根肿病和菌核病已成为青花菜大田生产过程中的两种常见病害, 每年造成的产量损失十分巨大^[5-6]。根肿病由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae*) 引起, 而菌核病由核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 造成, 两种病害在其他芸薹属蔬菜中的发生也十分普遍, 是世界性病害^[7-8]。我国不是青花菜的原产地, 种质资源十分匮乏, 而抗病材料更为稀缺, 通过挖掘抗病相关基因开展分子育种是解决种质短缺的重要途径之一, 也是解析植物-病原菌互作机理的基础和开展抗病分子育种的重要前提^[9-10]。

病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PR) 是植物体内的一类重要蛋白, 在病原菌或物理、化学因子的诱导下表达或积累, 在植物抵御病害及适应不良环境方面发挥着重要作用^[11-12]。根据氨基酸序列的相似性、酶活性或其他生物学特性, PR 可分为 17 个家族, 不同类型的 PR 具有不同的结构特点和功能^[13]。其中 PR2 具有 β -1, 3-葡聚糖酶活性, 其主要作用是水解 β -1, 3-葡聚糖, 这种糖类物质是病原菌细胞壁的主要成分, 因此, PR2 的生成与积累能抑制病原菌的生长和增殖^[14-15]。近年来, 已从烟草 (*Nicotiana tabacum*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和 水稻 (*Oryza sativa*) 等植物中克隆到 PR2 基因, 并明确了它们的序列特征和抗病功能^[16-18], 但是, 有关 PR2 在青花菜中的研究未见报道。本研究以青花菜为材料, 在克隆 BoPR2 基因的基础上, 利用生物信息学手段分析序列特征, 用实时定量 PCR 明确其在芸薹根肿菌和核盘菌侵染下的表达模式, 为开展基因功能鉴定和抗病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试青花菜材料为 Bo0112, 栽植于人工气

候箱, 在 16 h 光照 / 8 h 黑暗的光周期下培养, 两叶一心期时用于病原菌的接种。核盘菌采自浙江临海上盘青花菜基地, 经纯化后保存于台州学院生命科学学院实验室。核盘菌接种采用菌丝块法, 对照用同样大小的马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato Dextrose Agar, PDA) 培养基块, 采集接种 0、6、12、24、36、72 h 的叶片, 用于 RNA 的提取。芸薹根肿菌采自温岭石桥头青花菜基地, 采用张小丽等^[19]的方法接种, 对照用等量的无菌水, 采集接种 0、5、10、15、20、25 d 的根用于 RNA 的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 和 RNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用 SDS 法^[20], RNA 的提取采用 Trizol 法^[21], 经电泳鉴定后置于超低温冰箱保存备用。cDNA 的合成采用 TaKaRa 公司的试剂盒, 按其提供的说明书进行操作。

1.2.2 青花菜 BoPR2 基因的克隆 用于基因克隆的上、下游引物分别为 BoPR2UP: 5'-ATGGTACGATTCAAACATAT-3' 和 BoPR2DN: 5'-TTAGTTGAACTTGACACCATATTT-3', 由北京鼎国生物技术有限公司合成, 用无菌 ddH₂O 配制成 20 μ mol/L 备用。分别以 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 20 μ L 体系中加入以下试剂: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, 20 ng 模板 DNA 或 cDNA, 0.5 μ L 10 mmol/L 的 dNTPs, 0.8 U 的 Taq DNA 聚合酶, 上、下游引物各 0.1 μ L, 加 ddH₂O 至终体积。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、51 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 32 个循环。PCR 扩增结束后, 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.3 PCR 产物的回收、转化和测序 用无菌刀片割取含目的条带的胶块, 采用试剂盒法 (上海碧云天生物技术研究所在) 回收 DNA。取 1.5 μ L 回收产物与 p-GEM-Teasy 载体 (Promega), 置于 4 $^{\circ}$ C 连接, 用热激法导入 Trans5 α 感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司)。经涂布平板, 挑取白色单菌落于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h。用菌液 PCR 鉴定阳性克隆, PCR 程序同基因克隆, 模板改为 0.5 μ L 菌液, 经电泳检测后取 3 个阳性克隆测序。

1.2.4 序列分析 利用 DNAMAN5.2.2、在线工具 SMART (<http://smart.embl.de>) 和 Compute PI/Mw (<http://web.expasy.org/compute>) 对 *BoPR2* 基因序列及其编码蛋白进行理化性质分析^[22]。从 NCBI 数据库中下载甘蓝型油菜 (*B. Napus*, 登录号: XP_013742178.1)、野甘蓝 (*B. oleracea* var. *oleracea*, 登录号: XP_013636025.1)、白菜 (*B. rapa* subsp. *chinensis*, 登录号: BAG68207.1)、萝卜 (*Raphanus. sativus*, 登录号: XP_018458775.1)、拟南芥 (*A. thaliana*, 登录号: ANM63774.1)、玉山筷子芥 (*A. lyrata* subsp. *Lyrata*, 登录号: EFH54399.1)、亚麻荠 (*Camelina sativa*, 登录号: XP_010516340.1) 和芥菜 (*Capsella rubella*, 登录号: EOA24328.1) 等 8 种十字花科植物的 PR2 序列。用 Clustalx 1.81 进行序列比对, 再利用 Mega 3.1 构建进化树, 构建方法为邻接法 (Neighbor-Joining), 经 1 000 次自举检验^[23]。

1.2.5 基因表达分析 根据测序结果, 设计实时定量 PCR 引物, 上、下游引物序列分别为 5'-AAGCAGTACAGCATCCCTCG -3' 和 5'-TGGGAACGTCGAGGATGAAC -3'。表达采用肌动蛋白基因作为内标, 上、下游引物分别为: 5'-ACGTGGACATCAGGAAGGAC-3' 和 5'-GAACCACCGATCCAGACACT-3'。PCR 反应在 Roche Light Cycler 96 PCR 仪上进行, 反应程序: 50°C 5 min, 94°C 30 s; 94°C 5 s、55°C 15 s、

72°C 10 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, 用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *BoPR2* 基因的特征

以 *BoPR2UP* 和 *BoPR2DN* 为引物, 分别以青花菜叶片基因组 DNA 和 cDNA 进行 PCR 扩增, 经测序后得到各自的序列。结果表明, *BoPR2* 基因组全长为 1 188 bp, 包含 1 个内含子 (96 bp), 第 1 与第 2 外显子的长度分别为 130 bp 和 962 bp (图 1)。



方块表示外显子, 线条表示内含子

图 1 *BoPR2* 基因结构

2.2 *BoPR2* 编码蛋白的特征

BoPR2 编码 351 个氨基酸, 经 Compute pI/Mw tool 在线工具预测, *BoPR2* 的理论等电点为 6.85, 分子式为 $C_{1740}H_{2663}N_{467}O_{520}S_{15}$, 分子量为 38 925 u, 不稳定指数为 40.48, 为不稳定蛋白; 其总平均亲水性系数为 -0.304, *BoPR2* 为亲水性蛋白。序列中的天冬酰胺含量最高、达到 8.8%, 丝氨酸次之、为 8.5%, 而半胱氨酸最少、仅 0.3%。通过 NCBI 的 Blast 程序分析发现该蛋白含有 1 个保守的 Glyco hydro 17 结构域, 位于 +34 ~ +350 处 (图 2)。

```

1   ATGGTACGATTCAAACATATAAAAATAAAGTATTTATTTTCATGAAAATGTCTGGGGTTAGGATGTTAGCATCATCACCAATGTGTGCTGTTTCTT
1   M V R F K H I K I K Y Y F M K M S G V R M L A S S P M L L F L
94  CTCAGCCTTCTAATGGCTTCTACTTCGACACCACAGCTGGACAAATCGGAGTATGCTTCGGGCAGATGGGAAATAACATACCAATCCAGCG
32  L S L L M A S Y F D T T A G Q I G V C F G Q M G N N I P N P A
187 GAAGTTGTGGTATGTTCAGCAGTACAGCATCCCTCGAATGCGGATGTACGGTCCCAACCCTAACGCTCTCAAGCTCTCCGTGGCTCCAAC
63  E V V A M F K Q Y S I P R M R M Y G P N P N A L N A L R G S N
280 ATCGAGTTCATCCTCGAGCTTCCCAATGGCGACTTAAAACGCTCTCGCAGACGCCAAGCGGAGGCCAACACATGGGTCCGCGACAAACGTCAG
94  I E F I L D V P N G D L K R L A D S Q A E A N T W V R D N V Q
373 AAGTACAACGATGTCAGATTCAGTACATCTCGTTCGGAACAGAGGTGAAACAGGGGAGCGGGGGCGGCGCTCTCTCCAGGCGATGCGAG
125 K Y N D V R F K Y I S V G N E V K P G E P G A A A L F Q A M Q
466 AACATTTGATAGAGCGCTTCCGCGACGCGCTCAGCGATATCAAGTCTCCAGACTACATTCATGGGAGCCTTCGCGGACACGCTATCCTCCG
156 N I D R A L S A A R L S D I K V S T T T F M G A F A D T Y P P
559 TCGCGCGGACGATCAAGGATGAGTATAGAACTTCTCCAACCGGTATAGGTTTCTTGGTGAACAAGCGATCTCCTCTGCTCGTGAATATC
187 S R G R F K D E Y R N F L Q P V I G F L V N K R S P L L V N I
652 TACACTTACTTCGGCTACATGAACCGGACGCTCTCTCTAGAATTCGCTCTGTTCCCAACCGAATAGTAATAATGAATTCACTGACCCCAACAC
218 Y T Y F G Y M N R D V S L E F A L F Q P N S N N E F T D P N N
745 CAGCTCCGTTACCAAACTTCTTCGACGCCAATCTCGACTCAGTTTACGGCGGCATGGAGAAATCGGGCGGGGGTTCGTTGGATGTCGTGGTG
249 Q L R Y Q N F F D A N L D S V Y A A L E K S G G G S L D V V V
838 TCGGAGAGCGGTTGGCCACGCGAGGACCCGGGCAAGTGTGCCGAATGCGGAGGCTTATGTTAACAAATTTGAGACTACATGTTAATAAG
280 S E S G W P T Q G G P G A S V P N A E A Y V N N L R L H V N K
931 AATGGATCTCCGAAAAGTTCAGGGAACTTATAGAGACTTACATATTCGCCATGTTTCGATGAGAACCGGGAAGCAGACGTCGCGCTAATGATGAG
311 N G S P K R S G K P I E T Y I F A M F D E N G K Q T S P N D E
1024 TATGAGAAGTACTGGGGATGTTTCTCTACTACTAGACAGCTTAAATATGGTGTCAAGTTCACCTAA
342 Y E K Y W G M F S P T T R Q L K Y G V K F N *

```

阴影部分为 Glyco hydro 17 结构域

图 2 *BoPR2* 基因的编码区及推导的氨基酸序列

2.3 BoPR2 与同源序列的比对

为研究 BoPR2 的进化地位, 从 NCBI 数据库下载 8 种十字花科及其近缘植物的 PR 序列, 用 Clustalx 1.81 进行序列的多重比对。由图 3(彩插一)可知, 9 个 PR2 蛋白由 338~365 个氨基酸残基组成, 其中, 野甘蓝的序列最长、氨基酸残基数 365 个, 甘蓝型油菜次之、为 363 个, 玉山筷子芥的最短、338 个。序列比对结果表明, 9 种植物 PR2 的相似性较高, 仅个别氨基酸存在差异, 说明十字花科植物的 PR2 在进化上十分保守。与 BoPR2 相比, 野甘蓝在 +9、+10 位有 2 个氨基酸残基的插入, 甘蓝型油菜则在 +41、+86、+170、+173、+238、+260、+324、+327 位存在差异; 芥菜与其他同源序列之间

的差异较大, 在 +1~+15、+152~+153、+173、+247、+317、+341~+343、+360 位发生氨基酸残基的缺失, 在 +131、+230、+231 位发生氨基酸残基的插入。

2.4 BoPR2 的系统发育分析

利用 Mega 3.1 构建进化树, 构建方法为邻接法。结果(图 4)表明, 8 个不同物种的 PR2 在进化树上可分为 5 组。其中, 青花菜与同为芸薹属的野甘蓝、甘蓝型油菜和白菜的遗传距离最小, 它们之间的亲缘关系最近, 在系统发育树上聚于 I 组; 同为拟南芥属的拟南芥和玉山筷子芥 PR2 之间的遗传距离最近, 它们在进化树上处于同一组(V); 萝卜、芥菜、亚麻芥均单独成组, 分别为 II、III、IV 组。

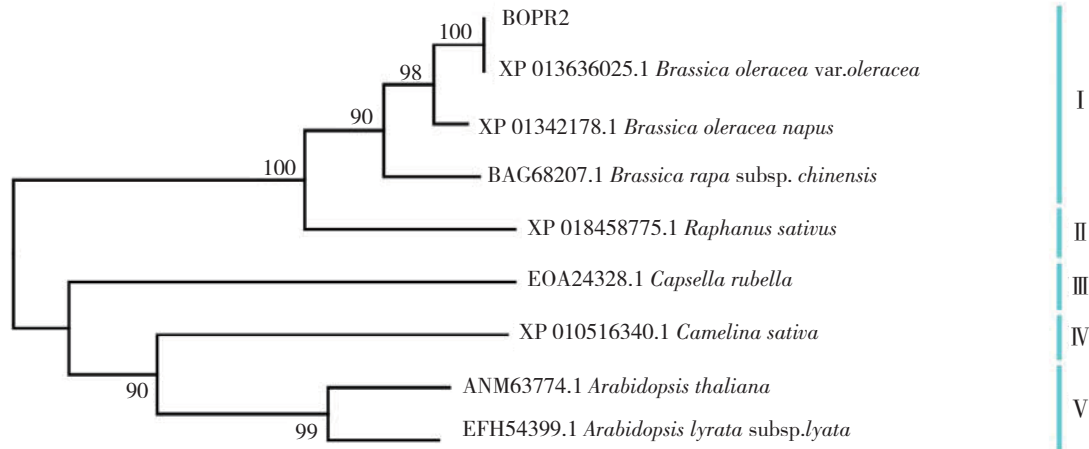


图 4 BoPR2 及其同源序列的进化树

2.5 BoPR2 的表达分析

为研究病原菌胁迫对青花菜 BoPR2 表达的影响, 采用实时定量 PCR 检测表达水平。结果(图 5)表明, 核盘菌不能诱导 BoPR2 的表达, 在侵染 0~72 h 期间, 表达量未见显著变化(图

5A); 在芸薹根肿菌的诱导下, BoPR2 的表达量逐渐增加, 在 10 d 时的相对表达量最大, 约为对照的 6 倍, 随后逐渐降低, 在 15 d 和 20 d 时的相对表达量分别为对照的 3.60、3.22 倍(图 5B)。

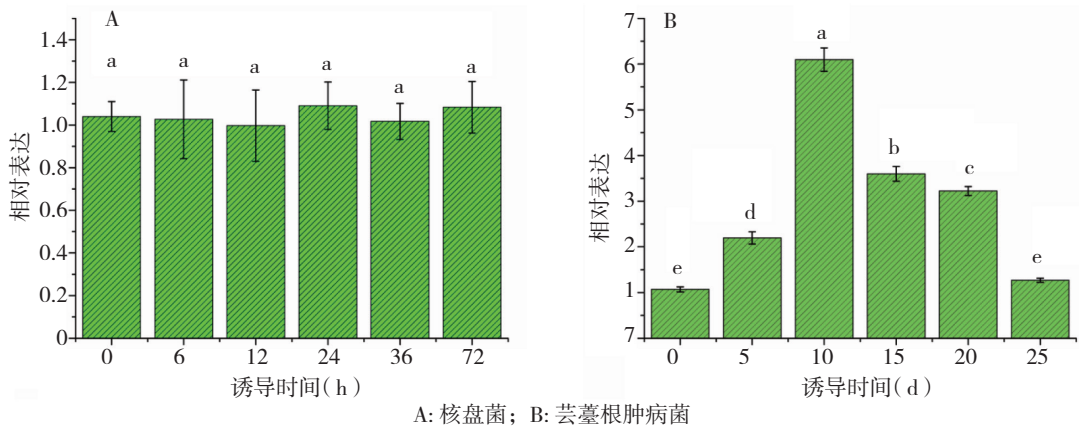


图 5 青花菜 BoPR2 基因的表达

3 结论与讨论

植物 PR2 是一类重要的病程相关蛋白, 在生长发育及抵御病原菌、昆虫和非生物胁迫等方面起着重要作用^[24-25]。PR 蛋白可分为 17 类, 其中 PR1 的功能未知, PR2 编码 β -1,3- 葡聚糖酶, PR3、PR4、PR8 和 PR11 则编码几丁质酶^[26]。已从多种植物中克隆到 PR2 基因, 大豆 (*Glycine max*) GmBG1 基因编码 347 个氨基酸, 等电点为 8.71^[14]; 海岛棉 (*Gossypium barbadense*) GbGLU 基因的全长为 1 086 bp, 编码 361 个氨基酸, 分子量为 39.66 ku^[27]; 小麦 (*Triticum aestivum*) TcLr19PR2 基因的编码区全长为 1 005 bp, 编码 334 个氨基酸^[28]。本研究从青花菜中克隆到 1 个 PR2 基因, 定名为 BoPR2。该基因的编码区全长为 1 092 bp, 编码 351 个氨基酸, BoPR2 与野甘蓝 PR2 的相似度最高, 仅存在 2 个氨基酸残基的差异, 而与同属的甘蓝型油菜、青菜的序列差异稍大, 在进化树上处于相邻的分枝, 这与芸薹属植物的分类结果一致。BoPR2 编码区的大小与芥菜 (*B. juncea*) PR2 相仿, 芥菜 BjPR2 的编码区全长为 1 020 bp, 编码 339 个氨基酸^[29]。

在正常环境条件下, 植物体内的 PR2 含量较少, 活性很低, 但经病原菌侵染后, PR2 的积累量显著增加, 表明 PR2 与植物抵御病害有关^[30]。大豆 GmBG1 基因的表达受腐霉菌 (*Pythium ultimum*) 诱导, 在抗病材料中表达量呈先上升后下降的趋势, 在 24 h 时达到最大值^[14]; 海岛棉 GbGLU 基因受黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 的诱导, 在接种 48 h 时表达量开始升高, 96 h 时达到最大值^[27]; 半定量 RT-PCR 结果表明, 该基因受小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 的诱导, 表达量在 48 h 达到最大值^[28]。芸薹根肿菌是活体寄生菌, 可激活植物的水杨酸信号途径, 而核盘菌为腐生营养菌, 它激活寄主的茉莉酸 / 乙烯信号途径, 而 PR2 是水杨酸信号途径的一个标志基因^[31]。本研究中, 在芸薹根肿菌的诱导下, 青花菜 BoPR2 的表达量逐渐增加, 在 10 d 时的相对表达量达到对照的 6 倍, 但是, BoPR2 基因的表达并不受核盘菌的诱导。

在黑斑病菌 (*Alternaria brassicae*) 侵染下, 芥菜 BjPR2 的表达量也呈先上升后下降的趋势, 在 24 h 时表达量达到最大值^[29]。

本研究以青花菜为材料, 克隆得到 1 个 PR2 基因, 并明确了其序列特征和表达特点, 该基因的表达受芸薹根肿菌的诱导。下一步, 将利用遗传转化方式研究该 BoPR2 在抗病反应中的功能。

参考文献:

- [1] 章燕如, 俞可可, 龚秀, 等. 青花菜 BoBURP1 基因的克隆与表达分析[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(9): 1501-1507.
- [2] 谢祝捷, 李媛, 姚雪琴, 等. 青花菜基因型和环境互作对花球 4- 甲基亚磺酰丁基硫苷含量的影响[J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 625-630.
- [3] 栗延茹, 刘玉新, 李晓程, 等. 不同低温积累强度对青花菜生长发育的影响[J]. 中国蔬菜, 2017(8): 57-61.
- [4] 叶静, 陆宏, 姜丽娜, 等. 青花菜营养吸收特性及专用肥配方筛选研究[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(5): 330-333.
- [5] 孙勃, 许映君, 徐铁锋, 等. 青花菜不同器官生物活性物质和营养成分的研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 59-64.
- [6] 张小丽, 李占省, 方智远, 等. 青花菜与甘蓝近缘野生种 'B2013' 杂交后代对根肿病抗性的遗传分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(11): 2225-2230.
- [7] 曹春霞, 杨妮娜, 程贤亮, 等. 十字花科蔬菜主要病虫害生物防治技术[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(22): 5811-5814.
- [8] 何道根, 檀国印, 朱长志, 等. 8 种杀菌剂对西兰花菌核病的防治效果及对制种产量的影响[J]. 植物保护, 2017(2): 220-223.
- [9] 蒋明, 刘青娥, 管铭, 等. 青花菜锌指蛋白基因 BoCCCH1 的克隆和表达分析[J]. 核农学报, 2016, 30(3): 444-450.
- [10] Park H G. Molecular breeding for plant disease resistance: Prospects and problems[J]. Plant Pathology Journal, 2001, 17(1): 1-8.
- [11] 杨德翠, 张玉喜, 郑国生. 牡丹病程相关蛋白 1

- 基因的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(8):1583-1590.
- [12] 张玉, 杨爱国, 冯全福, 等. 植物病程相关蛋白及其在烟草中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(5): 20-24.
- [13] Sinha M, Singh R P, Kushwaha G S, et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families [J]. Scientific World Journal, 2014: 543195.
- [14] 张丽, 魏崃, 唐晓飞, 等. 大豆 β -1,3-葡聚糖酶(GmBG1)及其同源蛋白的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017(3): 1035-1042.
- [15] 蒋选利, 李振岐, 康振生. β -1,3-葡聚糖酶与植物的抗病性[J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 135-139.
- [16] Shah J, Klessig D F. Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related beta-1,3-glucanase gene, PR-2d [J]. The Plant Journal, 1996, 10(6): 1089-1101.
- [17] Wu C T, Bradford K J. Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves [J]. Plant Physiology, 2003, 133(1): 263-273.
- [18] Hwang D U H, Kim S T, Kim S G, et al. Comprehensive analysis of the expression of twenty-seven beta-1, 3-glucanase genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Cells, 2007, 23(2): 207-214.
- [19] 张小丽, 刘玉梅, 方智远, 等. 青花菜及近缘种属种质资源抗根肿病鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1106-1115.
- [20] Pich U, Schubert I. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(14): 3328-3328.
- [21] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162(1): 156-159.
- [22] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: 597-603.
- [23] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [24] 马骊, 孙万仓, 袁金海, 等. 白菜型冬油菜 β -1, 3-葡聚糖酶基因在低温胁迫下的表达[J]. 植物学报, 2017, 52(5): 10-12.
- [25] Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, et al. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases [J]. Proceedings of The National Academy of Sciences USA, 1987, 84(19): 6750-6754.
- [26] Agarwal P, Agarwal P K. Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(2): 599-611.
- [27] 高玉龙, 郭旺珍, 王磊, 等. 一个棉花 β -1,3-葡聚糖酶基因全长 cDNA 的克隆与特征分析 [J]. 作物学报, 2007, 33(8): 1310-1315.
- [28] 高琳, 栗小英, 张艳俊, 等. 叶锈菌与小麦互作过程中 β -1, 3-葡聚糖酶基因的表达分析 [J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 7-12.
- [29] Ali S, Chandrashekar N, Rawat S, et al. Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from Brassica juncea [J]. Biologia Plantarum, 2017, 61(4): 763-773.
- [30] 左豫虎, 康振生, 杨传平, 等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(6): 600-607.
- [31] Lovelock D A, Donald C E, Conlan X A, et al. Salicylic acid suppression of clubroot in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) caused by the obligate biotroph *Plasmodiophora brassicae* [J]. Australasian Plant Pathology, 2013, 42(2): 141-153.