

배추 무사마귀병 마커 탐색을 위한 배추 뿌리 단백질체 분석

정재윤 · 임용표 · 황철호

Root proteome analysis of Chinese cabbage in response to *Plasmodiphora brassicae* Woron

Jae Yun Jeung · Yong Pyo Lim · Cheol Ho Hwang

Received: 3 November 2015 / Revised: 10 December 2015 / Accepted: 17 December 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Clubroot disease is one of the most wide-spread and devastating diseases in the cultivation of Chinese cabbage. To develop a protein marker for resistance to clubroot disease in Chinese cabbage, a comparative proteome analysis was performed between a sensitive line, 94SK, and a resistant line, CR Shinki DH. Three proteins of two fold or higher accumulation that are specific to each line were found 3 days after inoculation of the *Plasmodiphora brassicae*. They are glutamine synthetase, malate dehydrogenase/oxidoreductase and fructose-bisphosphate aldolase in the 94SK and actin, phosphoglycerate kinase, and Cu/Zn superoxide dismutase in the CR Shinki line. From the comparison of the synthesized proteins in the 94SK and the CR Shinki, CR Shinki was found to produce more ATP-binding protein for the ABC transporter while 94SK showed a higher level of pathogenesis-related protein 1 production. All of these proteomic variations may lead to the development of molecular markers to accelerate the breeding process.

Keywords Clubroot disease, *Plasmodiphora brassicae*, Proteome, Root

J. Y. Jeung · C. H. Hwang (✉)
단국대학교 식량생명공학과
(Department of Crop Science and Biotechnology1, Dankook University Cheonan 31116, Korea)
e-mail: sfeho@dankook.ac.kr

Y. P. Lim
충남대학교 원예학과
(Department of Horticulture2, Chungnam National University, Daejeon 305-764 Korea)

서론

배추 무사마귀병은 배추의 뿌리에 다양한 크기의 혹들을 만들고, 잔뿌리 수를 줄여 수분 흡수기능을 저하시켜 식물체 지상부가 위조하면서 생육이 위축되어 말라 죽게 만든다. 병원균은 토양서식 점균류의 일종으로 인공배지에서 자라지 않으며, 휴면포자는 십여년간 생존이 가능한 것으로 알려졌다(Kim et al. 1977). 1980년에 전라북도 장수, 경기도 이천에서 많이 발생하였고, 이후 1990년대부터 전국적으로 확산되어 태백의 고랭지 채소 재배지역 등에서 피해가 가장 큰 병해 중 하나이다(Jang et al. 2001).

배추무사마귀병에 저항성 유전자 분리를 위한 F1 종자의 약 배양을 통해 만들어진 계통인 CR Shiki DH (Clubroot Shiki Doubled-Haploid)의 저항성분석을 통해 단인자 우성 유전자에 의한 저항성을 확인하였다(Jung et al. 2001). 배추무사마귀병에 저항성을 보이는 CR Shiki DH 계통과 감수성을 보이는 94SK와의 교배로 얻어진 F₂집단을 이용해 저항성 연관 AFLP 표지인자가 개발되었다(Piao et al. 2002). CR Shiki DH 계통은 배추 무사마귀병 race 2, 4, 8번에 저항성관련 단일 우성유전자인 *CRb*를 갖고 있음을 확인하였다(Piao et al., 2004). 또한 RAPD 마커를 이용하여 반복선발 계통 간의 유전적 다양성 분석방법이 연구도 진행되었다(Yu et al. 2005).

저항성과 연관된 DNA 수준에서의 마커를 발굴하려는 노력과 동시에 병발생 또는 저항성과 연관된 단백질을 발굴하여 병 발생 및 병 저항성기작을 밝히려는 연구가 진행되었다. 양배추 뿌리썩음병을 일으키는 *Leptosphaeria maculans* 균에 저항성을 보이는 *Brassica carinata*의 접종균과 비접종균의 비교단백질체 분석을 통해 항산화제 관련 유전자군, CO₂ 고정관련 경로에 필요한 유전자군, 식

물의 영양대사관련 유전자군 등이 저항성과의 관련 가능성을 제시하였다(Subramanian et al. 2005). *Brassica rapa*의 뿌리 단백질체 비교를 통해 배추무사마귀병에 감수성 품종에서는 발현되지 않는 수종의 단백질들을 저항성 품종에서 발견하였다(Kaido et al. 2007). 배추 downy mildew (*Hyaloperonospora parasitica*)에 접종된 *Brassica napus*에서 91개의 단백질의 양이 증가하였고, 이들을 전사체와 비교하였을 때 33종의 단백질이 전사체의 증가와 일치하는 것으로 확인하였다(Sun et al. 2014).

본 연구는 배추무사마귀병 저항성 계통과 감수성 계통간의 비교단백질체 분석을 통해 배추무사마귀병 발생 연관마커 개발 및 새로운 저항성 유전자 탐색을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

공시재료의 재배 및 병원균 접종

배추 무사마귀병에 감수성인 94SK와 배추 무사마귀병의 race 2, 4, 8에 저항성인 CR Shinki DH (Clubroot Shinki Doubled-Haploid) 계통을 본 연구의 공시재료로 이용하였다. 배추 종자를 25×38×12 cm 포트에 파종하여 온실에서 25/20°C(16/8 hr, 주/야) 조건으로 1개월 동안 배양하였다. Williams (1966)의 방법으로 단일 포자로 분리된 *Plasmodiophora brassicae* Woron. 레이스4를 1×10⁷ spores/ml의 농도로 뿌리에 접종하였고, 토양 수분함량은 80%, pH는 6으로 유지하였다.

뿌리 조직으로부터의 단백질 추출 및 정량

접종 후 3, 5일에 94SK와 CR Shinki DH 계통의 개체로부터 수확한 1 g의 뿌리 조직을 분쇄한 후 10 ml의 acetone solution I [10% (w/v) TCA, 0.07% Dithiothreitol (DTT)]을 혼합한 후 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific사)의 15%의 강도로 2분간(pulse on/off 4초/7초) 분쇄하였다. 분쇄 후 조직을 1시간동안 -20°C에서 침전시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 확보한 pellet에 상청액의 동일량의 acetone solution II (0.07% DTT 포함)을 첨가하였다. Pellet과 acetone solution II을 잘 섞는 후 13,000 rpm에 원심분리하여 pellet을 다시 얻고 동일량의 acetone solution II를 넣는 과정을 2회 추가하였다. Pellet에 acetone solution II을 추가한 후 -20°C에서 30분간 침전시켰다. 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 pellet을 동결건조기를 이용하여 건조시킨 후 300~400 µl lysis buffer (7M Urea, 2M Thio-Urea, 40 mM Tris, 4.8% CHAPS, 0.8% Bio-lyte pH3-10, 2 mM TBP, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA)를 추가하고 초음파 분쇄기(Sonic Dismembrator Model 500, Fisher scientific사)의 15% 강도로 2분간(pulse on/off 4

초/7초) 분쇄하여 단백질을 완전히 녹였다. 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 상등액은 Protein Assay Kit I (Bio-Rad사)을 이용하여 정량하였다.

Two-dimensional Electrophoresis

Isoelectric focusing을 위해 단백질 샘플을 rehydration buffer [9.4 M urea, 4%(w/v) CHAPS, 100 mM DTT, 0.5% Bio-lyte]에 섞어서 전체량이 450 µl로 만든 후 tracking dye로 0.001% Bromophenol Blue 1 µl를 첨가하였다. 샘플은 30분-1시간상온에서 rehydration buffer와 반응한 후 rehydration tray의 well에 일정하게 분주하고 그 위에 IPG strip (pH 4-7, 24 cm, Amersham Biosciences사)을 올려놓고 증발을 막기 위해 1.8 ml의 Drystrip Cover Fluid (Pharmacia Biotech)로 덮었다. IPGphor (Amersham Biosciences사)을 이용하여 20°C에서 rehydration (50 V, 24 hr) 한 후 250 V-1 hr (20°C), 500 V-1 hr (20°C), 1000 V-2 hr (20°C), 8000 V-0.5 hr, 8,000V - 9,000 Vhr (20°C)로 총 5단계로 하여 약 96,200 Vhr로 Focusing하였다. Focusing이 끝난 strip들은 equilibration buffer1 [6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 30% (w/v) glycerol, 1% (w/v) DTT]에서 15분간, equilibration buffer2 [6 M urea, 50 mM Tris pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 4% (w/v) iodoacetamide]에서 15분간 침지하여 orbital shake를 통해 천천히 흔들면서 평형화하였다. Strip에 남아있는 equilibration buffer를 증류수로 적신 종이 위에 strip을 올려놓고 흡수시켰다. SDS-PAGE는 평형화가 끝난 strip들은 24×21×0.1 cm의 13% acylamide gel 위에 올려놓고 1% low melting agarose (0.01% Bromophenol blue 포함)로 젤 표면에 고정시켰다. SDS-PAGE는 Ettan DALTsix Large Vertical Electrophoresis System (Amersham Biosciences사)을 이용하여 젤 당 2 W (30 min), 4 W (30 min), 20 W (5 hr) 조건에서 전기영동을 수행하였다.

Silver staining

Rabilloud (1992)의 Silver 염색방법을 변경하여 본 실험에 이용하였다. 이미지 분석을 위해 전기영동이 끝난 젤은 500 ml의 fixing solution (50% ethanol, 12% acetic acid)으로 2시간 이상 흔들면서 고정하였다. 이후 500 ml의 washing solution (50% Ethanol)으로 20분씩 2회 씻은 후 증류수로 20분간 1회 씻었다. 500 ml의 sensitizer용액(0.02% Na₂S₂O₃)으로 2분간 처리 후, 증류수로 3분씩 3회 씻은 후 500 ml의 Staining solution (0.2% AgNO₃, 0.02% Formalin)으로 20분간 염색하였다. 염색 후 45초씩 2회 증류수로 씻어준 후 500 ml의 develop solution (6% Na₂CO₃, 0.05% Formalin, 0.0004% Na₂S₂O₃)으로 교체하여 조심히 흔들면서 적정 수준의

단백질 spot이 보일 때 500 ml의 Stop solution (50% Methanol, 12% acetic acid)으로 10분간 처리하여 반응을 멈추었다.

Coomassie blue staining

단백질 동정을 위한 젤은 Neuhoff et al. (1988)의 Coomassie blue staining 방법으로 염색하였다. SDS-PAGE 실행이 끝난 gel을 3 hr 500 ml의 fixing solution [7% Acetic acid, 40% (v/v) Methanol]으로 고정한 후 500 ml의 staining solution [17% Ammonium sulfate, 34% Methanol, 3% Phosphoric acid, 0.1% Coomassie G250 (Bio-rad사)]으로 24시간 처리하여 염색하였다. 염색 후 500 ml의 destaining solution [1% Acetic acid]으로 배경의 염색을 줄였다.

Image analysis

UMAX Powerlook 1100 Scanner (UMAX사)를 이용하여 500 dpi의 해상도와 전송모드를 선택하여 gel을 scan하여 이미지를 디지털화 하였다. MelanieIII (GeneBio, Geneva, Switzerland, <http://www.genebio.com/Melanie.html>)를 이용하여 Image들 간의 차등발현 단백질들의 양적, 질적으로 분석을 실시하였다. Spot detection은 gel의 일부분을 선정하여 수동으로 parameters (Number of smooths, Laplacian threshold, Partials threshold, Saturation, Peakedness increase, Minimum perimeter)를 선택하여 지역 내의 단백질들을 최대한 많이 탐색할 수 있는 수준을 정하여 모든 gel 내의 단백질들을 탐색하였다. 비교하는 이미지들 간의 동일한 특정 abundant protein들을 landmark로 지정한 후 이를 기초로 두 gel 이상의 matching을 시도하였다. 한 gel의 전체 spot들의 이미지 합에 대하여 특정 spot이 차지하는 상대적 volume을 % volume으로 Mellanie III 프로그램에 의해 계산된 parameter를 비교하여 2배 이상 차이 나는 단백질들에 대하여 차

등 발현 단백질을 선정하고 annotation하였다. 단백질들의 pI는 IEF에 이용된 IPG strips의 pH와 MelanieIII 프로그램을 이용하여 계산하였으며, SDS-PAGE 과정에서 Low molecular weight protein standard (Amersham Biosciences)를 분자량 마커로 동일한 gel에서 전기영동한 후 MelanieIII 프로그램으로 각 단백질의 정확한 분자량을 정하기 위한 지표로 사용하였다.

LC-MS/MS를 통한 단백질 동정

Gel로부터 잘라 회수한 단백질은 trypsin으로 in-gel digestion한 후 LC/MS-MS (Thermo Finnigan LCQ DECA; 프로테옴텍, 서울)을 통해 각 펩타이드들의 아미노산 배열정보를 얻었다. Mascot search program을 이용하여 NCBI, SWISS-PROT, 및 Mass Database와의 peptide sequence 대응을 통한 homology 조사를 통해 단백질들을 동정하였다.

결과 및 고찰

병원균 접종에 따른 뿌리 단백질체 비교

파종 후 한 달간 생육한 94SK와 CR Shinki DH 식물에 배추 무사마귀병 race 4를 접종한 후 3일, 5일에 뿌리를 채취하여 단백질을 추출하였다. 동시에 접종한 다른 식물을 35일간 연장 재배한 후 병 발생을 조사하여 본 접종의 유효성을 검증하였다(Fig. 1). IEF의 pH 3-10 범위에서 예비로 단백질을 분석하였을 때에 주로 pH 4-7 범위에서 많은 단백질이 탐색되었기에, 해상도를 높이기 위해 pH 4-7 범위에서의 단백질체를 분리하여 약 500종의 단백질을 관찰하였다(Fig. 2).

배추 무사마귀병 감수성 계통인 94SK의 접종 후 3일째



94SK root at 35days



94SK root at 35days after inoculation

Fig. 1 Confirmation of Clubroot disease symptoms in the Chinese cabbage roots of 94SK with inoculation of *Plasmodiophora brassicae* at 35 days after inoculation (DAI) compared to the 94SK root without inoculation

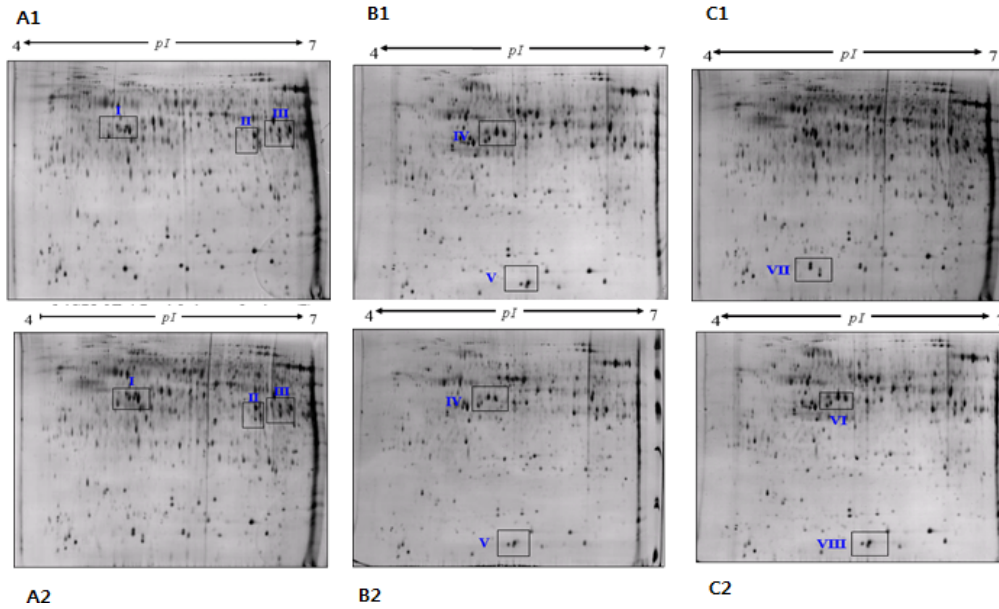


Fig. 2 Comparative proteomic analysis of root proteins of 94SK (clubroot disease susceptible Chinese cabbage) without inoculation (A1) and with inoculation (A2) at 3 DAI. CR Shinki DH line (clubroot disease resistant Chinese cabbage) without inoculation (B1) and with inoculation (B2) at 3 DAI. C1 and C2 are recombined data of A2 and B1 for comparison

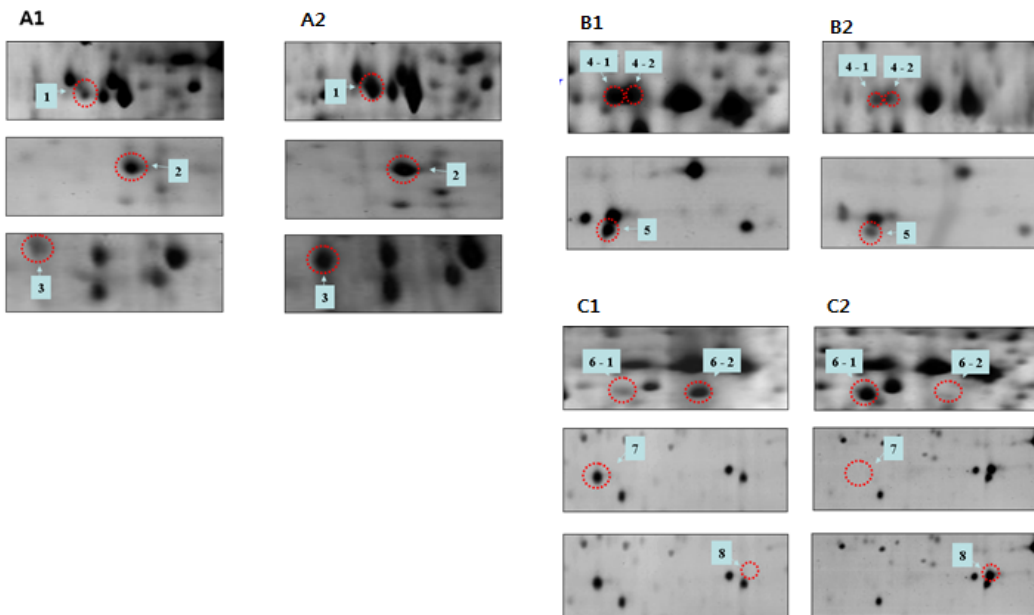


Fig. 3 Parts of 2-D images as shown in Fig 2 showing difference in proteins from roots of 94SK without inoculation (A1) and with inoculation (A2) at 3 DAI as well as from roots of CR Shinki DH line without inoculation (B1) and with inoculation (B2) at 3 DAI. C1 and C2 are parts of 2-D images showing difference in proteins from the roots of 94SK and CR Shinki DH line without inoculation, respectively. The circles indicate the up or down regulated proteins in those comparisons

3종의 단백질의 발현증가를 확인하였다(Fig. 3 A2). 이미지 분석을 통해 2배 이상의 차이를 보이는 단백질로 Spot 1 (pI 5.12, Mw 45 KDa), spot 2(pI 5.92, Mw 36 KDa), spot 3 (pI 6.51, Mw 43 KDa)들이 관찰되었다. 또한 배추무사마귀병 저항성을 보이는 CR Shinki DH 계통 식물의 접종 후 3일의 뿌리에서 비접종 식물과 비교하여 3개 단백질,

Spot 4-1 (pI 5.31, Mw 52 KDa)과 4-2 (pI 5.31, Mw 52 KDa), spot 5 (pI 5.67, Mw 63 KDa)이 차등 발현단백질로 선정되었다(Fig. 2 B2). 이미지 분석프로그램인 MelanieIII로 측정된 % Volume을 통해 2배 이상 발현량의 차이를 보이는 단백질로 확인되었다.

품종간의 뿌리 단백질체 차등발현 비교

감수성인 94SK와 저항성인 CR Shinki DH 계통의 비접종 근 시료간의 프로테옴 비교를 통해 4종의 단백질 spot을 확인하였다(Fig. 3 C2). 저항성계통과 관련된 비유도성 단백질로 추정되는 단백질은 저항성 계통에서 높은 발현을 보이는 Spot 6-1 (pI 5.15, Mw 15 KDa)과 spot 8 (pI 5.30, Mw 47 KDa)과 감수성 계통에서 상대적으로 높은 발현량을 보이는 spot 6-2 (pI 5.68, Mw 15 KDa)와 spot 7 (pI 5.42 Mw 45 KDa)이다.

동정된 단백질의 기능분석

감수성인 94SK에 접종 후 3일에 발현량이 증가된 단백질은 glutamine synthetase, malate dehydrogenase/oxidoreductase, fructose-bisphosphate aldolase로 확인되었다(Table 1). Glutamine synthetase는 암모니아 동화작용의 주요 효소로서 아미노산으로 합성하는 경로의 주요 효소로 세포내 암모니아 농도를 조절한다. 또한 에너지대사를 활발히 하여 병원체에 대응하여 세포활성을 높이거나(endurance), 역으로 세포사멸을 유도하여(evasion) 병 저항성을 유도하는 것으로 보고되었다(Seifi et al. 2013). Fructose-bisphosphate aldolase는 CO₂ 동화 과정을 조절하는 효소로써 calvin cycle에서 광합성으로 된 탄소가 starch와 sucrose로 생합성하는 흐름을 조절하는 중요한 역할을 한다. Malate dehydrogenase/oxidoreductase도 CO₂ 고정과정과 관련하여 C₃ 식물들에서 엽록체와 광합성세포의 세포질 사이에서 에너지를 전달

하는 역할을 한다(Pagano et al. 2000). 직접적으로 병 저항성과 관련되지 않았더라도 이들 단백질들은 배추 무사마귀병의 초기 감염과 관련한 배추 단백질 마커로서 활용성이 보인다.

저항성 품종인 CR Shinki DH 계통에서 접종 후 3일째에 발현이 특이적으로 증가하는 단백질들은 각기 actin, phosphoglycerate kinase, Cu/Zn superoxide dismutase (SOD)로 확인되었다(Table 1). Actin은 병원균의 침입을 물리적으로 차단하여 식물의 비숙주 특이적 저항성에 관여하는 단백질이다(Kobayashi et al. 1997). 식물의 actin microfilament의 형성을 cytochalasin 등으로 억제하였을 때 병저항성이 감소되었다. 식물은 병 발생 시 병원균을 공격하기 위한 자유기산소를 과량으로 생성하고, 과도하게 생산된 자유기산소는 식물에도 해가 되기에 이를 제거하여야 한다. 자유기산소를 제거하는 Cu/Zn SOD가 병 저항성 식물인 *Brassica carinata*의 프로테옴 분석을 통해 특이적으로 증가함을 보고하였다(Subramanian et al. 2005). Phosphoglycerate kinase (PGK)는 세포질과 엽록체에 isoform으로 존재하면서 세포질에서는 해당작용에, 엽록체에서는 광합성의 암반응에 관여한다(Anderson et al. 1970). 최근 Arabidopsis의 watermelon mosaic virus 저항성 유전자인 엽록체 PGK로 보고되었으나 저항성을 일으키는 기작은 알려지지 않았다(Ouibrahim et al. 2014).

비접종의 94SK와 CR Shinki DH 계통에서 특이한 발현차이를 보이는 단백질은 glutamine synthetase (GS), pathogenesis-related protein 1 (PR-1), ATP-binding protein of ABC transporter이다(Table 1). GS는 감수성 94SK에서 접종 3일 후

Table 1 Identification of the proteins showing differential expression in the roots from 94SK and CR Shinki DH lines

Spot NO.	Identity	Peptides matched	NCBI accession No.	Mr(KDa)/pI
1	glutamine synthetase	IIAEYIWWGGSGMDMR	gi 228454 Arabidopsis thaliana	47.225/6.28 94SK w/ up-regulated
2	malate dehydrogenase/oxidoreductase	VLVVANPANTNALILK	gi 15219721 Arabidopsis thaliana	35.548/6.11 94SK w/ up-regulated
3	fructose-bisphosphate aldolase	FADELIANAAYIG TPGKGILAADESTGTIGK	gi 15227981 Arabidopsis thaliana	38.363/7.01 94SK w/ up-regulated
4-1	actin	HTGVMVGMGQKDAYVGD EAQSK	gi 1145693 Arabidopsis thaliana	41.737/5.31 CR Shinki DH line w/ up-regulated
4-2	phosphoglycerate kinase	ELDYLVG AVSNPK	gi 1022803 Arabidopsis thaliana	23.854/5.05 CR Shinki DH line w/ up-regulated
5	Cu/Zn superoxide dismutase	AVVVHADPDDLKGGGH ELSLATGNAGGR	gi 2305111 Raphanus sativus	15.086/5.44 CR Shinki DH line w/ up-regulated
6-1	glutamine synthetase	EHIAAYGEGNER	gi 19518 Lactuca sativa	39.446/5.24 CR Shinki DH line w/o specific
7	pathogenesis-related protein 1	AEVGVGLRWDEKVAAY AR	gi 1228950 Arabidopsis thaliana	19.371/7.62 94SK w/o specific
8	ATP-binding protein of ABC transporter	ACVTFVVAQRISTVK	gi 17133869 Nostoc sp. PCC 7120	66.233/7.68 CR Shinki DH line w/o specific

발현된 단백질로 비접종시 저항성 식물에서 감수성 식물에 비해 높게 발현하였다. PR-1은 *Arabidopsis*에서 병원균 감염으로 유도되는 식물방어기작에서 그리고 salicylic acid 처리로 발생한 전신획득저항성(SAR) 발생과 동시에 발현되었다(Lebel et al. 1998). 다양한 독성물질의 세포질로부터 격리시키는 역할을 하는 ATP-binding protein of ABC transporter는 밀의 역병, powdery mildew 저항성 유전자로 밝혀졌다(Krattinger et al. 2009).

Plasmiodiophora brassicae Worn.는 배추 무사마귀병을 일으키는 토양 절대기생균으로 배추 및 다른 십자화과에 심각한 피해를 준다. 약제방제는 병원균 내성 증진 및 인체 농약 축적 등의 문제로 저항성 품종의 육종이 가장 이상적인 전략이다. 이에 배추 무사마귀병 감수성인 94SK와 저항성인 CR Shinki DH 계통의 병발생 전후의 발현 단백질을 비교하여 병 저항성과 연관될 가능성이 있는 단백질들을 탐색하였다. 동정된 단백질들 중에서 glutamine synthase, actin, phosphoglycerate kinase, Cu/Zn superoxide dismutase, pathogenesis-related protein 1, ATP-binding protein of ABC transporter는 직접적으로 다양한 식물의 내병성과 연관이 보도되었다. 이는 내병성 마커를 찾으려는 본 프로테오믹 분석과 일치하는 것으로 여겨진다. 또한 알려진 병저항성 기작과 연관성이 적은 malate dehydrogenase/oxidoreductase, fructose-bisphosphate aldolase의 경우는 새로운 초기 병 발생을 검정하는 마커로서 가능성을 모색해 볼 수 있겠다.

동정된 단백질을 바탕으로 저항성 관련 기작 단백질들을 품종과 접종에 따라서 통계화를 한다면 배추 무사마귀병 저항성 단백질 marker가 개발되어 품종 육종 및 선발에 이용될 수 있다. 본 연구가 앞으로 진행될 단백질 marker의 기초 자료에 이용되길 기대한다. 또한 배추 단백질 map을 구축하여 시기별, 병원균별로 단백질체 수준 변화를 비교할 수 있는 기본지표를 구축, 이용해야 할 것이다.

References

- Jang CS, Piao Z, Park YJ, Lim YP (2001) Development of anther-derived lines resistant to clubroot disease (*Plasmiodiophora brassicae* Woron.) in Chinese cabbage. *J Kor Hort Sci* 42:689-694
- Kaido M, Ishikawa T, Hori H (2007) Comparative proteomic analysis of the resistant response in root culture to the clubroot disease agent *Plasmiodiophora brassicae*. *Bull Facul Agric Niigata Univ* 60:67-71
- Kim DW, Oh JH (1977) Incidence, pathogenicity of clubroot fungus (*Plasmiodiophora brassicae*) and varietal resistance in Chinese cabbage. *Kor J Plant Pathol* 13:95-99
- Kobayashi Y, Yamada M, Kobayashi I, Kunoh H (1997) Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiol* 38:725-733
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323:1360-1363
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant J* 16:223-233
- Neuhoff VN, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of protein in polyacrylamide gel including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262
- Ouibrahim L, Mazier M, Estevan J, Pagny G, Decroocq V, Desbiez C, Moretti A, Gallois J-L, Caranta C (2014) Cloning of the *Arabidopsis* *rwm1* gene for resistance to *Watermelon mosaic virus* points to a new function for natural virus resistance genes. *The Plant J* 79:705-716
- Pagano EA, Chueca A, Lopez-Gorge J (2000) Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *J. Exp. Bot.* 51:1299-1307
- Piao ZY, Park YJ, Choi SR, Hong CP, Park JY, Choi YS, Lim YP (2002) Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene in chinese cabbage into a SCAR marker. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43(6):653-659
- Piao ZY, Deng YQ, Cho SR, Park YJ, Lim YP (2004) SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *plasmiodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) *Theor Appl Genet* 108:1458-1465
- Rabilloud T (1992) A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 13:429-439
- Seifi HS, Bockhaven JV, Angenon G, Hofte M (2013) Glutamate metabolism in plant disease and defense: Friend or Foe? *MPMI* 26:75-485
- Subramanian B, Bansal VK, Kav NNV (2005) Proteome-level investigation of *Brassica carinata*-derived resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Agr and Food Chem* 53:313-324
- Sun C, Wang L, Hu D, Riquicho AR, Liu T, Hou X, Li Y (2014) Proteomic analysis of non-heading Chinese cabbage infected with *Hyaloperonospora parasitica*. *J Proteomics* 98:15-30
- Williams PH (1996) A system for the determination of race of *Plasmiodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56:624-626
- Yu CY, Hu SW, Zhao HX, Guo AG, Sun GL (2005) Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110:511-518