



赵 芹,谢大森,何晓明,等. 基于 NBS-LRR 类 *R* 基因保守结构域克隆瓠瓜抗病基因同源序列[J]. 华南农业大学学报,2015,36(5):92-98.

基于 NBS-LRR 类 *R* 基因保守结构域克隆 瓠瓜抗病基因同源序列

赵 芹,谢大森,何晓明,罗少波,彭庆务
(广东省农业科学院 蔬菜研究所, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】分离鉴定瓠瓜 *Lagenaria siceraria* 抗病种质的抗病基因同源序列 (Resistance gene analogs, RGAs), 为瓠瓜功能性抗病基因的克隆及分子标记辅助育种奠定基础. 【方法】根据已知核苷酸结合位点和富亮氨酸重复 (Nucleotide binding site and leucine rich repeat, NBS-LRR) 类抗病基因保守区设计简并引物, 从“大籽瓠”抗性材料基因组 DNA 中分离抗病基因同源序列, 并利用生物信息学软件进行长度变异、保守结构域、同源比对与系统进化分析. 【结果和结论】基于同源克隆策略, 获得 23 条瓠瓜 NBS 抗病同源序列, 命名为 HNB1 ~ HNB23, GenBank 登录号为 KJ908192 ~ KJ908214. 序列分析及同源比对结果表明, 这些 RGAs 长度变异在 242 ~ 261 nt 之间, 18 条序列具有连续开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 推导氨基酸序列具有 P-loop、Kinase-2a 典型 NBS 类 *R* 基因保守结构域; 核苷酸序列相似性为 41.5% ~ 98.8%, 氨基酸序列相似性为 21.5% ~ 100.0%; 利用 NCBI Blast 同源搜索发现, 与其他植物尤其是冬瓜、黄瓜、葫芦及丝瓜的已知 *R* 基因具有 40% ~ 100% 相似性; 氨基酸序列聚类分析将其分为 5 个组; 同源进化分析表明, 23 条瓠瓜 RGAs 均为 non-TIR-NBS-LRR 类 *R* 基因, 与推导氨基酸序列多重比较结果一致.

关键词:瓠瓜; NBS-LRR 类; 抗病基因同源序列; 简并引物; 序列分析
中图分类号:S642.9 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2015)05-0092-07

Cloning of resistance gene analogs from *Lagenaria siceraria* based on conserved domains of NBS -LRR type *R* gene

ZHAO Qin, XIE Dasen, HE Xiaoming, LUO Shaobo, PENG Qingwu
(Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract:【Objective】Isolation and identification of resistance gene analogs (RGAs) of *Lagenaria siceraria* would lay the foundation for a further cloning of disease resistance genes and marker-assisted selection (MAS) of resistance breeding. 【Method】According to the conserved domains of nucleotide binding site and leucine rich repeat (NBS-LRR) type of disease-resistance genes in most known plants, degenerate primers were designed and synthesized to isolate resistance gene analogs from genomic DNA of bottle gourd resistant variety “Dazihu”, with length variation, conservative domain, homology alignment and phylogenetics analyzed by various bioinformatics softwares. 【Result and conclusion】Twenty three RGAs were obtained and named as HNB1 – HNB23, and the GenBank accession numbers were KJ908192 – KJ908214. Sequences analyses and alignment results indicated that the full-length of RGAs varied from 242 nt to 261 nt, and the deduced amino acids sequences contained typical conserved domains of NBS *R* genes, such as P-loop and Kinase-2a. Eighteen sequences had continuous open reading frames (ORFs). These RGAs showed a great homologous differences with the similarity ranging from 41.5% to 98.8%, and the amino acid sequence similarity varied from 21.5% to 100.0%. At the nucleo-

tide level, the sequence identity of 23 RGAs ranged from 40% to 100% with the cloned NBS *R* genes from other plants, especially cucumber, wax gourd, luffa and calabash. The result of clustering analyses showed that all RGAs were divided into 5 groups. These RGAs were ranked into non-TIR-NBS-LRR type by homology and evolution analyses, which was consistent with the classification result based on multiple alignment of deduced amino acid sequences.

Key words: *Lagenaria siceraria*; NBS-LRR type; resistance gene analogs; degenerate primer; sequence analysis

瓠瓜 *Lagenaria siceraria*, 别名瓠子、蒲瓜, 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 一年生攀缘草本植物, 原产于印度与热带非洲^[1]. 瓠瓜在我国栽培种植历史悠久, 类型品种十分丰富, 主要分布于长江流域与长江以南地区. 瓠瓜易栽培, 产量高, 嫩瓜柔软多汁, 风味可口, 老瓜供制容器与工艺品^[2], 是华南地区度淡的重要蔬菜, 年种植面积 6 666.7 hm² 以上, 除满足本地市场外, 还销往港澳及冬季北运^[3]. 目前对瓠瓜种质资源研究较少, 仅在种质遗传多样性分析^[3-7] 方面有一些报道.

随着蔬菜产业结构的调整, 瓠瓜的种植面积不断扩大. 白粉病与病毒病是瓠瓜生产上的两大主要病害. 病毒病复合侵染导致产量与品质急剧下降, 商业价值降低^[8], 但目前生产上病毒病难以防治. 白粉病在瓠瓜整个生育期均可侵染发生, 连作田块发病更盛^[9], 几乎所有瓠瓜品种不抗白粉病, 药剂防治与栽培改良效果不佳. 另有一些瓠瓜种质对西瓜枯萎病免疫, 可用作砧木嫁接栽培^[10]. 因此挖掘新的抗性基因资源是研究病原体与寄主植物之间互作的分子机制、实施抗病分子设计育种的基础性工作, 也是病害控制最安全有效的途径^[11-12]. 广东省农业科学院蔬菜研究所瓜类育种一室通过多年种质资源引进、收集和创新, 保存了丰富的瓠瓜资源, 并育成了一些优良品种, 因此利用我们的资源优势, 克隆分析与研究瓠瓜抗病基因, 对提高瓠瓜抗病性及阐明瓠瓜抗病分子机制具有重要意义.

抗病基因克隆是植物分子生物学研究领域的热点之一. 迄今已分离克隆了 70 多个抗病基因^[13], 但主要是通过遗传表型分析如转座子标签技术和以遗传图谱为基础的图位克隆技术获得的^[14]. 这些 *R* 基因编码产物存在许多高度保守区域, 以此为基础将抗病基因分为 8 类^[15], 其中核苷酸结合位点和富亮氨酸重复 (Nucleotide binding site and leucine rich repeat, NBS-LRR) 类抗病基因在基因组中含量最为丰富^[16-17]. 抗病基因同源序列 (Resistance gene analogs, RGAs) 是一类呈簇分布于植物基因组中, 在一定程度上反映抗病基因特点的大基因家族^[18], 它们本身可能为 *R* 基因或假基因一部分或与 *R* 基因紧密连锁, 扩增抗病同源序列已成为标记、定位和克隆植物

R 基因的有效手段^[18-19]. 因此根据这些抗病基因的保守序列设计引物, PCR 扩增同源序列, 成为克隆该类抗病基因的有效途径, 已在大豆、香蕉、白菜和黄瓜等多种作物中广泛应用^[20-23]. 本研究以瓠瓜抗性材料“大籽瓠”为试材, 同源扩增 NBS 类抗病基因序列, 为进一步克隆瓠瓜的功能性抗病基因以及开发分子标记辅助育种提供研究基础, 对阐明瓠瓜抗病分子机制及培育抗病品种具有重要的指导意义.

1 材料与方法

1.1 植物材料

瓠瓜抗性种质“大籽瓠”, 采自山西平遥, 由广东省农业科学院蔬菜研究所保存. 2013 年 8 月播种于温室营养盘内, 待幼苗长至 2 ~ 3 片真叶, 采集叶片保存于 -70 ℃ 冰箱备用.

1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶与 pMD 19-T 载体试剂盒为大连宝生物 (TaKaRa 公司) 有限公司产品; 琼脂糖、DNA 回收试剂盒、Amp 抗生素、dNTPs、DNA marker、大肠埃希菌 DH5 α 感受态均为广州鼎国生物技术有限公司产品; 其余试剂为国产分析纯.

1.3 瓠瓜基因组 DNA 提取与引物设计合成

瓠瓜叶片基因组总 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[24], 质量浓度为 10 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳及纳米紫外分光光度计 (GENEQUANT, Eppendorf, Germany) 检测 DNA 浓度及纯度. 参考斑茅、黄瓜、芒果及辣椒等^[19, 25-27] NBS 类抗病基因保守结构域, 设计合成简并引物. 引物序列为 NBS-F: 5'-GGYATGGGNG-GYMTGCGNAARAC-3', NBS-R: 5'-CCANACATCATC-MAG SACAA-3', 其中 Y = C/T, N = A/G/C/T, R = A/G, M = A/C, S = C/G, H = A/T/C, 引物由广州英骏生物技术有限公司合成.

1.4 PCR 扩增与克隆

以提取的瓠瓜基因组总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应在 ABI Applied 公司 GeneAmp system 9700 型扩增仪上进行. 反应体系总体积为 25 μ L, 包括: 2.5 μ L 10 $\times$ *Ex* buffer (含 MgCl₂), 1 U *Ex Taq* DNA 聚合酶, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.4 μ mol · L⁻¹

引物和 50 ng 模板 DNA. 反应程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s, 反应 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min. PCR 产物用质量浓度为 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶进行电泳,检测结 果在 GeneGeniusBio Imaging System (Bio-Rad) 凝胶 成像系统下观察和拍照.

1.5 PCR 产物的纯化、克隆与测序

PCR 产物回收纯化,克隆至 pMD19-T Vector,转 化至 DH5α 感受态细胞,涂布在固体 LB(含 Amp 100 μg · mL⁻¹)培养基上,37 ℃ 条件下倒置培养过夜,挑 取白斑,利用 M13 通用引物进行菌落 PCR 检测,阳 性克隆菌液送至广州英骏生物技术有限公司测序.

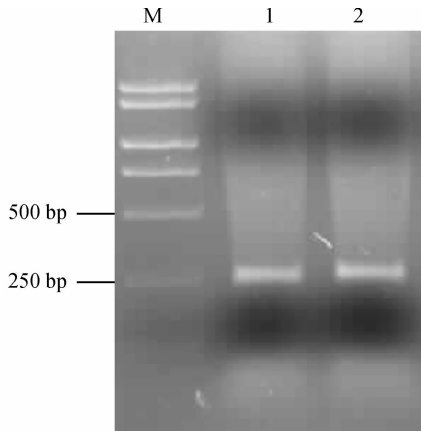
1.6 目的片段序列测定及序列同源性分析

测得序列利用 NCBI Vecscreen 程序搜索并去除 两端载体序列,然后在 GenBank 中用 BLASTX 和 BLASTN 工具进行核苷酸序列和氨基酸序列间的同 源比对搜索,结合 GenBank 公布的其他物种 NBS- LRR 类抗病基因蛋白序列,利用 DNASTar 软件进行 多重序列比对,分析各序列长度、G + C 含量、变异位 点、相似性、遗传分歧及序列比对;利用 NCBI ORF finder 程序进行开放阅读框搜索;最后用 MegAlign 构 建系统发育树研究其进化关系. 用于参比的 R 基因 有:番茄 *Solanum lycopersicum* Mi-1.1 (AF039681)、烟 草 *Nicotiana tabacum* N (BAD12594)、亚麻 *Linum us- itatissimum* M (U73916)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* RPS2 (U14158)、甜瓜 *Cucumis melo* FOM- 2 (AY583855)、番茄 I2C-1 (AF004878)、亚麻 L11 (AF093641),其中 Mi-1.1、RPS2、FOM-2 和 I2C-1 属 于 non-TIR-NBS-LRR 类的抗病基因,而 N、M 与 L11 属于 TIR-NBS-LRR 类抗病基因^[28-29].

2 结果与分析

2.1 瓠瓜 NBS 类 RGAs 的克隆与鉴定

利用 NBS-F1/R1 简并引物扩增瓠瓜基因组 DNA,获得 250 bp 左右的明亮特异条带(图 1),回收 产物克隆至 T 载体,挑取 25 个阳性克隆进行测序, 去除空载体序列与合并相同序列,获得 23 个特异片 段,命名为 HNB1 ~ HNB23, GenBank 登录号为 KJ908192 ~ KJ908214. 测序结果表明,这些片段序列 长度在 242 ~ 261 nt 之间;NCBI blastp 同源比对分析 发现,这 23 条 RGAs 与其他植物 R 基因均具有较高 相似性. 氨基酸序列推导发现,23 条序列均包含 NBS 类 R 基因特有的保守结构域,因此推测均为瓠瓜 RGAs. ORFfinder 分析发现,除 HNB1、HNB7、 HNB20、HNB22 和 HNB23 存在移码突变外,其他 18 个序列均具备连续 ORF. MegAlign 程序同源比对发 现,这 23 条 RGAs 核苷酸序列相似性在 41.5% ~ 98.8% 之间,遗传分歧为 1.2 ~ 109.1,存在 1 020 个



M: DNA marker DL2000; 1~2: 瓠瓜NBS类RGAs PCR产物.

图 1 瓠瓜 NBS 类 RGAs PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoreses analyses of PCR products of NBS RGAs from bottle gourd

变异位点,在 130 ~ 210 nt 区间变异最为丰富;其中 HNB14 与 HNB5、HNB15 与 HNB5、HNB14 与 HNB15、HNB14 与 HNB19 相似性最高,为 98.8%, HNB10 与 HNB11 相似性最低,为 41.5%,由此可见 各序列间相似性变化较大,说明瓠瓜 RGAs 存在丰富 的变异位点,可能分属于瓠瓜中不同抗病基因或具 有 NBS 结构域的不同基因(具体结果未列出).

利用 MegAlign 程序对 23 条 RGAs 推导的氨基 酸序列进行比对,发现氨基酸序列相似性为 21.5% ~ 100.0%,遗传分歧为 0 ~ 223,其中 HNB7 与 HNB9 氨基酸相似性最低,为 21.5%,HNB2 与 HNB4、HNB2 与 HNB5、HNB2 与 HNB14、HNB2 与 HNB15 等 14 对基因片段氨基酸序列相似性为 100.0%. 经氨基酸序列聚类分析,将 23 条 RGAs 分 为 4 组,其中 HNB16、HNB20 与其他片段遗传距离最 远,为第 1 组,分为 2 个亚组,HNB16 与 HNB20 单独 为一亚组;HNB8、HNB9 和 HNB11 组成第 2 组, HNB10、HNB17 和 HNB13 组成第 3 组,剩余 RGAs 形 成第 4 组,包括 3 个亚组(图 2). 由此看出,瓠瓜 NBS 类 RGAs 在进化过程中表现出较大的遗传差异和多 样性.

2.2 瓠瓜 NBS 类 RGAs 保守结构域分析

前人研究报道 NBS 类 R 基因 P-loop 结构域为 GMGGL/LGKTT,Kinase-2 区域为 (L/F) (L/V) VLD (D/N) (V/M) W^[30]. 23 条 RGAs 序列同源比对结果 表明,瓠瓜中 NBS 类 RGAs 结构域相当保守,除 HNB7 不包含 Kinase-2 结构外,其他序列均存在典型 的 P-loop (GMGGL/LGKTT)、Kinase-2 (L/FLVLDD- VW)功能域(图 3),少数序列保守结构域中发生单 个氨基酸突变,HNB9 P-loop 功能域 GMGIGKTT 变 为 GMGGIRRGKTM,HNB23 则变为 GTGGLGKTT,基 本骨架未改变. 上述分析表明,本试验获得的 23 条 序列(HNB1 ~ HNB23)为潜在候选 R 基因片段. 另

外,前人研究报道,TIR-NBS-LRR 类抗病基因 Kinase-2 共有序列可总结为 (V/L/I) (L/I/V) (L/I/V) V (L/V) (L/I/V) DD (V/I) X,最后一个氨基酸为任意氨基酸,通常为色氨酸(D),而 non-TIR-NBS- LRR 的 Ki-

nase-2 共有序列为 (Y/V) (L/V) (L/I/V) V (L/V) DD(I/V) W,最后一个氨基酸为天冬氨酸(W)^[18]。由此可以看出,瓠瓜所有 RGAs 序列 Kinase-2 基序最后一个氨基酸均为 W,所以属于 non-TIR-NBS-LRR 类。

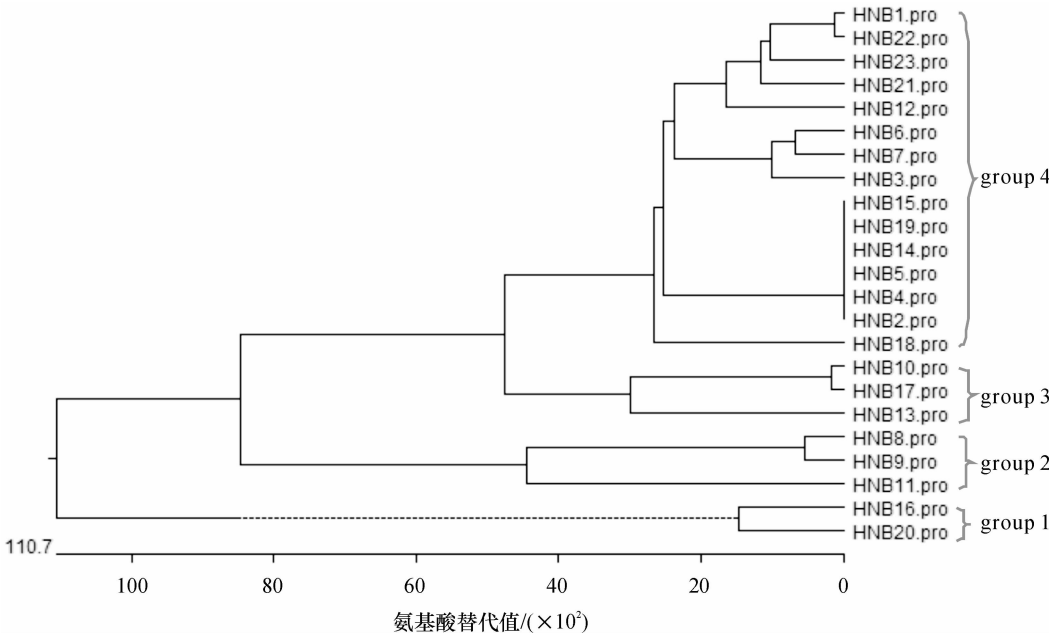


图2 瓠瓜 NBS 类 RGAs 编码氨基酸序列的聚类分析
Fig.2 Clustering analyses of amino acid sequences encoded by NBS type RGAs in bottle gourd

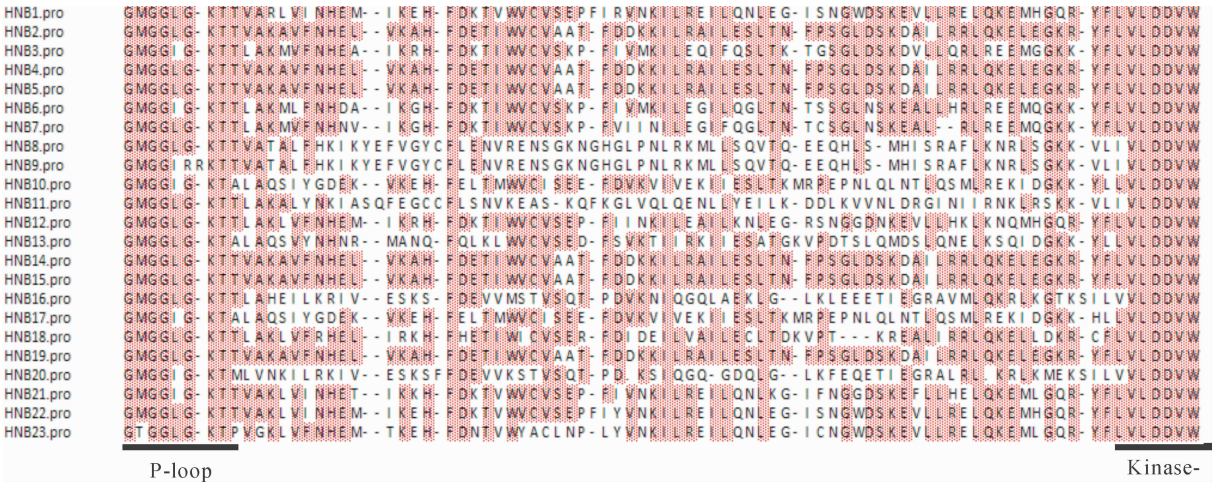


图3 瓠瓜 NBS 类 RGAs 编码氨基酸序列比对
Amino acid sequence alignments of NBS type resistance RGAs in bottle gourd

2.3 瓠瓜 NBS 类 RGAs 氨基酸序列的相似性检索
通过 NCBI Blastp 程序对瓠瓜各 RGAs 进行同源搜索,发现所有 RGAs 氨基酸序列均含有 AAA 超级家族功能域,20 条序列表现 NB-ARC 保守结构域特征,与其他物种相似性在 40% ~ 100% 之间,其中 HNB1、HNB16、HNB22 和 HNB23 与葫芦 *Lagenaria siceraria* RGA (AEV46102) 相似性高达 99% ~ 100%, HNB4、HNB5、HNB14、HNB15 及 HNB19 与丝瓜 *Luffa aegyptiaca* RGA (AFC97124) 相似性高达 96%, HNB18 与黄瓜

Cucumis sativus RGA (XP_0 04161606) 相似性高达 97%, HNB11 与西瓜 *Citrullus lanatus* RGA (AEV46173) 相似性高达 90%, HNB3 与冬瓜 *Benincasa hispida* RGA (AHB60507) 相似性高达 84%, 而 HNB8、HNB9 则与印度芒果 *Mangifera indica* RGA (AEH49854) 相似性最高仅为 48% ~ 49%, 说明克隆的瓠瓜 RGAs 可能是相关抗病基因的一部分或与抗病基因属于同一个基因家族。其他抗病基因的物种名称和 GenBank 登录号以及构建的系统发育进化树见图 4。所有抗病同源

序列分为 5 个组,瓠瓜 RGAs 全部聚集在第 5 组中,包括 23 条瓠瓜 RGAs 和 38 条其他植物 RGAs,又被分为 7 个亚组,瓠瓜 RGAs 主要分布于第 7 亚组中;第 4 组包括 L11、M 和 *Pyrus* × *bretschneideri* (ACN76569), *Nicotiana tabacum* (ACF22039) 和 *Humulus lupulus* (ABS70863) 分别组成第 3 组和第 2 组,第 1 组仅包括 N (BAD12594),与其他 RGAs 遗传距离最远(图 4).



图 4 瓠瓜与其他植物 NBS 类 RGAs 编码氨基酸序列聚类分析

Fig. 4 Clustering analyses of amino acid sequences encoded by NBS type RGAs in known other plants and bottle gourd

对瓠瓜 NBS 类 RGAs 进行同源进化分析,non-TIR-NBS-LRR 类基因 *FOM-2*、*Mi-1.1*、*RPS2*、*I2C-1* 编码氨基酸序列与所有瓠瓜 RGAs 聚集在第 5 组内,而 TIR-NBS-LRR 类基因 *L11*、*M* 与 *N* 编码氨基酸序列和 *Pyrus* × *bretschneideri* (ACN76569)、*Nicotiana tabacum* (ACF22039)、*Humulus lupulus* (ABS70863) 则分布在第 5 组之外的其他组,形成 TIR-NBS-LRR 类(图 4)。同源进化分析结果与前面的推导氨基酸序列多重比较结果是一致的。

3 讨论

植物抗病性一直是国内外研究热点,挖掘和利用抗病基因对提高植物抗病性、阐明抗性机制及培育抗性品种具有重要意义。瓠瓜经济价值巨大,抗性资源丰富,具有许多极有价值的研究 R 基因的材料,但其全基因组较大,且尚未完成全基因组测序,可开发利用的相关分子标记也较少,因而通过经典的图位克隆或转座子标签技术获得 R 基因难度很大。利用已报道的植物 R 基因保守结构域,设计特异简并引物分离 RGAs,成为克隆 R 基因的有效途径之一。利用 RGAs 方法克隆 NBS-LRR 类基因已在辣椒、甜瓜等多种蔬菜中广泛应用^[27, 31]。本研究根据已知 NBS 类 R 基因保守结构设计简并引物,从瓠瓜中分离了 23 条抗病同源序列,其中 18 条序列具有开放阅读框,5 条序列存在移码突变,说明从植物中分离 NBS 类同源基因具有很大的随机性;这些序列与已克隆的黄瓜、冬瓜、丝瓜及葫芦 R 基因蛋白有较高的相似性,表明这些序列属于 RGAs 序列,其中的 18 条序列可能为功能性 R 基因,另外也表明瓠瓜与黄瓜、丝瓜及葫芦等作物的近缘关系。

研究表明,点突变、重组、不等交换和基因转变是 R 基因进化的主要动力^[32]。NBS 类基因以基因簇多拷贝形式与其他 R 基因序列排列在染色体上,使得基因内和基因间错配、重组、重复的频率大大提高,促进无义基因与新 R 基因的产生^[33-34]。瓠瓜 23 条 RGAs 核苷酸序列相似性在 41.5% ~ 98.8% 之间,存在 1 020 个变异位点,在 130 ~ 210 nt 区间变异幅度较高,说明瓠瓜 NBS 类基因存在一个较大的基因家族,这些基因可能是来自同一基因的不同拷贝,且基因变异程度较高。瓠瓜 RGAs 氨基酸序列多重比对与系统进化树分析一致,认为所有序列均属于 non-TIR-NBS-LRR 类,进一步支持了前人的研究结论^[18]。瓠瓜 RGAs 保守结构域也存在突变,但未影响

到整个保守域性质;保守域外的氨基酸序列变异程度较大,序列整体的相似性变化范围较广(21.5% ~ 100.0%),与其他物种相似性在 40% ~ 100% 之间。这些点突变、插入和缺失可能是引起瓠瓜 RGAs 多样性的原因。上述研究结果为进化趋异假说提供了间接证据。

NBS 结构域是最重要的抗病基因保守结构域之一,但具有 NBS 结构域的基因不一定是抗病基因^[19],还需其他可能与抗病更直接相关的重要结构域如 TIR(Toll or interleukin-1 receptor)、LRR(Leucine rich repeats)或 LZ(Leucine zipper)等^[35]。因此,本研究分离得到的 18 条 NBS 类 RGAs,仅作为具有潜在功能的抗病基因片段,分离鉴定真正具有抗病功能的基因还需更深入的研究。

利用基于同源候选基因的克隆策略分离 R 基因是一种简便快捷并且有效的手段,但也具有自身局限性,如分离基因具有很大随机性,获得片段有的不具连续 ORF,有的含有保守结构域,但与植物抗性无关,病原菌诱导不能表达等。因此可通过用不同碱基组合简并引物扩增,或从不同部位、时期 cDNA 分离 RGAs,可提高获得不同 R 序列机会。本研究以“大籽瓠”为试材,同源扩增 NBS 类抗病基因同源序列,为进一步克隆瓠瓜的功能性抗病基因以及分子标记辅助选择育种奠定基础,也为研究瓠瓜 R 基因的起源和遗传进化提供借鉴。

参考文献:

[1] HEISER C B. Variation in the bottle gourd[M]//MEGERS B J, AYENSU E S, DUCKWORTH W D. Tropical forest ecosystems in Africa and South America: A comparative review. Washington D C: Smithsonian Institution Press, 1973: 121-128.

[2] 彭庆务,何晓明,谢大森,等. 瓠瓜的特征特性及育种对策[J]. 广东农业科学, 2003,30(1): 18-19.

[3] 陈孟强,牛玉,林鉴荣,等. 瓠瓜部分种质资源主要性状的初步评价[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 22-24.

[4] 李开银,石伟平,胡宇舟,等. 湖北部分瓠瓜种质资源初步研究及利用[J]. 中国蔬菜, 2003(3): 33-34.

[5] 高山,许端祥,林碧英,等. 38 份瓠瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(4): 396-400.

[6] 高山,许端祥,林碧英,等. 瓠瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(4): 502-506.

- [7] 周先治, 陈阳, 陈最, 等. 基于 5.8S rDNA 和 ITS 序列探讨亚洲瓠瓜的地理分化[J]. 中国蔬菜, 2011(6): 49-53.
- [8] 谷昊, 陈绍宁, 竺锡武, 等. 复合侵染瓠瓜的两种病毒的互作研究[J]. 科技通报, 2009, 25(4): 419-422.
- [9] 王玲平, 吴晓花, 汪宝根, 等. 与瓠瓜品系 J083 白粉病抗性基因连锁的 SCAR 分子标记[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 37(2): 119-124.
- [10] 肖光辉. 瓠瓜 DNA 直接导入西瓜抗枯萎病育种研究进展[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 41-44.
- [11] 阙友雄, 许莉萍, 林剑伟, 等. 斑茅 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(2): 192-197.
- [12] KANAZIN V, MAREK L F, SHOEMAKER R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean[J]. PNAS, 1996, 93(21): 11746-11750.
- [13] 李峰, 张颖, 樊秀彩, 等. 植物 NBS-LRR 类抗病基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2011, 9(108): 1784-1780.
- [14] 贺超英, 张志永, 陈受宜. 大豆中 NBS 类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J]. 科学通报, 2001, 46(12): 1017-1021.
- [15] GURURANI M A, VENKATESH J, UPADHYAYA C P, et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2012, 78: 51-65.
- [16] SHI A, KANTARTZI S K, MMBAGA M, et al. Isolation of resistance gene analogues from flowering dogwood (*Cornus florida* L.)[J]. J Phytopathol, 2008, 156(11/12): 742-746.
- [17] XU Q, WEN X, DENG X. Isolation of TIR and nonTIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt)[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(5): 819-830.
- [18] MEYERS B C, DICKERMAN A W, MICHELMORE R W, et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide binding superfamily[J]. Plant J, 1999, 20(3): 317-332.
- [19] 阙友雄, 许莉萍, 林剑伟, 等. 甘蔗 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J]. 作物学报, 2009, 35(4): 631-639.
- [20] 丁国华, 池春玉, 周秀艳, 等. 黄瓜抗病基因类似序列(RGA)的同源性分析和 Southern 鉴定[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 355-360.
- [21] SUN D Q, HU Y L, ZHANG L B, et al. Cloning and analysis of fusarium wilt resistance gene analogs in "Gold-finger" banana[J]. Mol Plant Breed, 2009, 7(6): 1215-1222.
- [22] 王彦华, 侯喜林, 申书兴, 等. 不结球白菜抗病基因同源序列的克隆及分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2621-2626.
- [23] 丁海, 宛煜嵩, 朱美霞, 等. 大豆抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 217-223.
- [24] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Phytochem Bull, 1987, 19(1): 11-15.
- [25] 丁国华, 秦智伟, 刘宏宇, 等. 黄瓜 NBS 类型抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 638-642.
- [26] 刘洋, 姚全胜, 苏俊波, 等. 芒果 NBS 类抗病基因同源序列克隆与分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 571-576.
- [27] 王铎, 刘长远, 赵奎华, 等. 辣椒 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 2(42): 98-101.
- [28] 高丽华, 周以飞, 郑伟文, 等. 南瓜 NBS 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 长江蔬菜, 2007(8): 40-43.
- [29] 陈玲, 张颖, 邱显钦, 等. 云南悬钩子蔷薇 NBS-LRR 类抗病基因同源克隆与分析[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(1): 56-62.
- [30] QILIN P, JONATHAN W, KOBERT F. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologous in dicot and cereal genomes[J]. J Mol Evol, 2000, 50: 203-213.
- [31] 王贤磊, 高兴旺, 张铁钢, 等. 甜瓜抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2011, 28(2): 136-144.
- [32] ELLIS J, DODDS P, PRYORT. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(4): 278-284.
- [33] BELKHADIR Y R, SUBR A M, DANGL L J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR protein and their partners[J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(4): 391-399.
- [34] GOFF S A, RICKE D, LAN T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*)[J]. Science, 2002, 296(5565): 92-100.
- [35] TRAUL F W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding sites[J]. Eur J Biochem, 1994, 222(1): 9-19.

【责任编辑 李晓卉】