

青花菜 CC-NBS-LRR 抗病基因 *BoCNL1* 的克隆与分析

黄笑梅¹ 金建峰² 张雪¹ 朱思眉¹ 朱柯柯¹ 赵罗鹏¹ 蒋明^{1,*}

(1. 台州学院 生命科学学院, 浙江 椒江 318000; 2. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 根据已知序列设计 PCR 引物, 从青花菜中克隆 1 个 NBS-LRR(核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复) 抗病基因 *BoCNL1*; 在生物信息学分析的基础上, 利用 RT-PCR 研究该基因在不同器官中的表达模式。测序结果表明 *BoCNL1* 基因的编码区全长为 2 550 bp, 编码 849 个氨基酸; 编码蛋白具 CC(卷曲螺旋)、NBS 和 LRR 结构域; 进化分析结果表明 *BoCNL1* 与不结球白菜的关系最近, 在进化树上处于同一分支, 与醉蝶花的关系最远; RT-PCR 结果表明 *BoCNL1* 在根、花茎、叶、花蕾、开放的花和嫩角果中均有表达, 但表达量低。

关键词: 青花菜; 抗病基因; CC-NBS-LRR; 基因克隆

中图分类号: S635.3; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2016)02-0259-05

Cloning and characterization of a CC-NBS-LRR disease resistance gene of *BoCNL1* from *Brassica oleracea* var. *italica*

HUANG Xiao-mei¹, JIN Jian-feng², ZHANG Xue¹, ZHU Si-mei¹, ZHU Ke-ke¹, ZHAO Luo-peng¹, JIANG Ming^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Primer pairs were designed according to known sequences, and a nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat (NBS-LRR) disease resistance gene, designated *BoCNL1*, was isolated from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Bioinformatic analysis were performed, and RT-PCR was used to reveal expression patterns of *BoCNL1* in different organs. Results indicated that the complete coding sequence of *BoCNL1* was 2 550 bp in length, encoding 849 amino acids; and the deduced protein sequence contained coiled coil (CC), NBS, and LRR domains. Phylogenetic analysis results showed *BoCNL1* was grouped with the homologous gene in *B. rapa*, indicating their closest relationship, and the longest genetic distance was observed between *B. oleracea* var. *italica* and *Tarenaya hassleriana*. RT-PCR results demonstrated that *BoCNL1* expressed with low levels of transcripts in roots, flower stalks, leaves, flower buds, flowers, as well as young siliques.

Key words: *Brassica oleracea* var. *italica*; disease resistance gene; CC-NBS-LRR; gene cloning

植物在生长过程中通常会遭受真菌、细菌、昆虫和病毒等的侵袭, 通过漫长的进化, 植物已形成复杂的防卫机制以抵御各种生物胁迫^[1]。病害是农业生产蒙受重大损失的主要生

收稿日期: 2015-07-04

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY13C150003); 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2014R428011); 浙江省本科院校中青年学科带头人学术攀登项目(pd2013420)

作者简介: 黄笑梅(1993—), 女, 浙江义乌人, 本科生, 从事植物分子生物学研究。E-mail: 369393248@qq.com

* 通信作者 蒋明, E-mail: jiangming@tzc.edu.cn

物胁迫之一。植物抗病能力取决于病原物无毒基因和寄主抗病基因产物的识别,以及随后相关防卫途径的激活,这一过程通常由抗病基因(resistance gene, R 基因)控制^[2]。R 基因在植物中以基因家族的形式存在,根据编码蛋白的特征,可分为 NBS-LRR(nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat, 核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复)、eLRR-TM(extracellular leucine-rich repeat plus transmembrane receptor, 胞外富含亮氨酸重复跨膜受体)、eLRR-TM-pkinase(extracellular leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, 胞外富含亮氨酸重复跨膜蛋白激酶)和 STK(serine-threonine kinase, 丝氨酸-苏氨酸激酶)等类型^[3]。

NBS-LRR 在 R 基因中所占的比例最大,编码蛋白的 NBS 结构域负责 ATP 的水解及信号的释放,LRR 则充当蛋白质相互作用的平台和蛋白活化的元件^[4]。NBS-LRR 参与多种病原菌的防御,在抗病信号转导和防卫反应激活过程中起着重要作用^[5]。目前已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)、森林草莓(*Fragaria vesca*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)、水稻(*Oryza sativa*)、苹果(*Malus × domestica*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)等植物中克隆或鉴定到大量 NBS-LRR 基因^[6-12]。将八棱海棠(*Malus × robusta*)的 CC-NBS-LRR 基因导入苹果,后者抗火疫病的能力显著增加^[13];水稻 Pi64 基因编码一个新的 CC-NBS-LRR 蛋白,该基因与水稻叶瘟和穗瘟病抗性相关^[14]。青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)是一种深受人们喜爱的保健蔬菜,在生产过程中,受多种病菌的危害,造成产量和品质下降,开展抗病分子育种有着重要的意义,而有关 NBS-LRR 基因的克隆未见报道。本研究从青花菜中克隆一个 NBS-LRR 基因的基础上,进行了序列比对和表达分析,为该基因的功能鉴定和分子育种利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

青花菜材料 Bo0112 由实验室栽植,该材料生育期为 75 d 左右,花球紧实,花蕾深绿色,具有较强的霜霉病和灰霉病抗性。于花期采集根、叶、花茎、花蕾、开放的花和嫩角果,置于 -80 °C 冰箱

备用。从 NCBI 下载 7 条十字花科植物的同源序列用于比对,它们分别来自不结球白菜(*B. rapa*) (登录号: XP_009147850.1)、大白菜(*B. rapa* subsp. *pekinensis*) (ACP30592.1)、甘蓝型油菜(*B. napus*) (CDY22783.1)、高山南芥(*Arabis alpina*) (KFK34203.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (AED95001.1)、亚麻荠(*Camelina sativa*) (XP_010456005.1)和醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*) (XP_010554983.1)

1.2 RNA 的提取和 cDNA 合成

RNA 提取用 TRIzol 法;cDNA 的合成采用 TaKaRa 公司的试剂盒,第一链和第二链的合成根据其提供的说明书进行。

1.3 *BoCNL1* 基因的克隆

根据 NCBI 数据库中的大白菜(登录号: FJ842840.1)和不结球白菜(*B. rapa*) (XM_009149572.1)的 NBS-LRR 基因序列设计 PCR 引物,分别为 CNL1: 5'-ATGGGAGGCTGTGTATCAC-TAGA-3'和 CNL2: 5'-TTACTCCTGTTTCGTGTCTCT-GAAAC-3'。反应体系中含 1 × phusion HF 缓冲液,phusion DNA 聚合酶 0.5 μL (NEB, USA), 0.25 μmol·L⁻¹的 dNTPs(生工生物工程(上海)股份有限公司),各 0.25 μmol·L⁻¹上、下游引物,60 ng 叶片 cDNA 模板,最后加无菌 ddH₂O 至 50 μL。PCR 程序为:98 °C 预变性 30 s;98 °C 变性 10 s,57.5 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 35 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,割取含目的条带的胶块,利用碧云天生物技术研究所的 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化,操作根据其提供的说明书进行。采用生工生物工程(上海)股份有限公司的平端 DNA 片段添 dA 试剂盒,根据其提供的操作手册进行回收产物的平末端加 A 反应。取 3 μL 加 A 产物与 pGEM-T easy 载体(Pro-mega, USA)连接,于 42 °C 通过热激法将连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,取 4 个阳性克隆用于测序。

1.4 生物信息学分析

等电点和分子量利用在线工具 http://web.expasy.org/compute_pi 预测;序列比对用 ClustalX 1.83 软件;MEGA 3.1 用于系统发育树的构建,建树方法为邻接法(neighbor joining method),自

举检测次数为 1 000。

1.5 表达分析

根据测序结果,设计 RT-PCR 引物,分别为 CNL3: 5'-AGTTCGTGCGCATCTATTGATG-3' 和 CNL4: 5'-TCGATAATCCAAAGGTGTTGAACACA-3', 预期 PCR 产物大小约为 700 bp。反应体系中含 1 × PCR buffer, 0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 0.3 μmol·L⁻¹ 的 dNTPs(生工生物工程(上海)股份有限公司), 各 0.2 μmol·L⁻¹ 的 CNL4 和 CNL5 引物, 60 ng 根、叶、花茎、花蕾、开放的花或嫩角果 cDNA, 最后加无菌 ddH₂O 至 20 μL。PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56.5 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、拍照, RT-PCR 实验重复 3 次。以肌动蛋白基因(登录号: AF044573.1) 为内标, 引物分别为 5'-TCTC-GATGGAAGAGCTGTT-3' 和 5'-GATCCTTACCG-AGGGAGGTT-3', PCR 程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55.6 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 33 个循环。

2 结果与分析

2.1 *BoCNL1* 基因及其编码蛋白的特征

以 CNL1/CNL2 为引物对, 从青花菜叶片 cDNA 中扩增到目的条带。测序结果表明, *BoCNL1* 基因的编码区全长为 2 550 bp, 分别以 ATG 与 TAA 为起始和终止密码子, GC 值为 39.73%。*BoCNL1* 编码 849 个氨基酸, 等电点为 7.20, 分子量大小为 96.5 kD。序列分析结果表明, *BoCNL1* 在 +26 ~ +63 位具一个 CC(coiled coil, 螺旋卷曲) 结构域; 在 +158 ~ +438 处具一个 NBS 结构域, 另有一个 LRR 结构域位于 +534 ~ +594 处(图 1)。

2.2 *BoCNL1* 的进化分析

为明确 *BoCNL1* 的进化地位, 从 NCBI 数据库中下载了 7 条十字花科植物的同源序列, 并利用 MEGA 软件构建系统发育树(图 2)。结果表明 8 个 CNL 序列之间的遗传距离为 0.199 ~ 0.731, 甘蓝型油菜与醉蝶花的遗传距离最大, 拟南芥和醉蝶花次之, 为 0.720, 青花菜与不结球白

菜之间遗传距离最小。它们在系统发育树上可分为 3 组, 同为芸薹属的青花菜、大白菜、不结球白菜和甘蓝型油菜聚为一组(I); 拟南芥、高山南芥和亚麻荠聚为一组(II); 而醉蝶花单独处于一个分支(III)。

2.3 *BoCNL1* 基因的表达分析

为研究 *BoCNL1* 在不同器官中的表达模式, 分别以等量的根、叶、花茎、花蕾、开放的花或嫩角果 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。RT-PCR 结果表明, *BoCNL1* 在各个部位均有表达, 但表达量均处于较低的水平(图 3)。

3 讨论

植物抗病基因以超家族的形式存在, 大约有数百甚至数千个分布于基因组中, 其中以 NBS-LRR 类型的 R 基因最为丰富, 它们以基因簇的形式分布在染色体上^[15]。在拟南芥(哥伦比亚生态型) 中有 207 个 R 基因, 其中 149 个为 NBS-LRR 基因^[6]; 从亚麻基因组鉴定得到 147 个 NBS-LRR, 其中 CC-NBS-LRR 类型 49 个, TIR-NBS-LRR 类型 98 个^[9]; 番茄有 252 个 NBS-LRR, 分布于 12 条染色体上^[12]; 苹果和大豆(*Glycine max*) 中的 NBS-LRR 基因数量十分庞大, 分别有 505 和 319 个^[16-17]。最近 Zhang 等^[18] 分别从琴叶拟南芥(*A. lyrata*)、不结球白菜(*B. rapa*)、芥菜(*Capsella rubella*) 和盐芥(*Thellungiella salsuginea*) 基因组中鉴定出 198, 204, 127 和 88 个 NBS-LRR 基因。本研究从青花菜中克隆到一个 NBS-LRR 基因, 该基因的编码区全长为 2 550 bp, 编码 849 个氨基酸。

根据编码蛋白 N 端的结构特征, NBS-LRR 可分为 TIR-NBS-LRR(TNL) 和 CC-NBS-LRR(CNL) 两种类型, TIR 为果蝇 Toll 及哺乳动物白细胞介素 1 受体(*Drosophila* Toll and mammalian interleukin-1 receptors) 的缩写, CC 则为卷曲螺旋(coiled coil) 的简称^[19]。TNL 和 CNL 蛋白在序列和信号传导途径上存在显著差异, 但它们均参与病原菌的识别, 在监控效应子(effector) 诱导蛋白状态方面起着重要作用^[20-21]。本研究中, *BoCNL1* 的 N 端具一个 CC 结构域, 随后为 NBS 和 LRR 结构域, 它是一个典型的 CC-NBS-LRR 蛋白。

```

1  ATGGGAGGCTGTGTATCACTAGATTATCATGTGATCAAGCGCTGAATCAAACCTGCAACTGCCTATTTGGTGATAGAACTACATTCACATGATG
1  M G G C V S L D L S C D Q A L N Q T C N C L F G D R N Y I H M M
97  AAGGCTAATCTTGATGCTCTGGAGACAGCTATGCAAGAACTTAGAGAAAAGCGAGATGATATTGCAAGAAAAGTTTCCATAGAGAAGACAAAGGT
33  K A N L D A L E T A M Q E L R E K R D D I A R K V S I E E D K G
193  TTGGAGCAGCTTGTCTAAGTAAAAGGATGGCGTTCAAGGGTAGAAAATGATTGCTCAGGTGATGATCTGCTTAAAGAGTAGAGAACTGAAACT
65  L E Q L A Q V K G W R S R V E S I D S Q V S D L L K S R E T E T
289  AAAAGATTGTGTCTTTTATAGATATTCTCCAAAATTCATATCAAGCTGTAAGTATGGTAAAGACGTATCGAAGAAGTTAATAGAAGTTAAAGAG
97  K R L C L F R Y F S K N C I S S C K Y G K D V S K K L I E V K E
385  CTTCTATCTAAAGGAATTTTCGAAGAGTTGGCCGAAAAAAGCTTGCAGCAAAGGTTGGAGAAGGAAGATATCCAAAAACAATAGGTTGGATTCC
129  L L S K G I F E E L A E K K L A A K V E K E D I Q K T I G L D S
481  ATGGTTGGAAGGCATGGGACAGCATGAAACCTGAAGGAAGACGTTAGGTATTATGGCATGGGGGGAGTTGGGAAAACAACCTCTTAGCT
161  M V G K A W D S I M K P E G R T L G I Y G M G G V G K T T L L A
577  ACTATCAACAACAATTCGAGGATGAATTTGAAGTTGTGATATGGGTTGTGGTCTTAAAGATTGCAGTACAAGGCATTGAGGATCAGATTCTA
193  T I N N K F E D E F E V V I W V V S K D L Q Y K G I Q D Q I L
673  AGAAGATTATGTCTGACAAGGATTTGGGAAAAGAAAACAGAGAAGGAGAAAAAATAATAGGGAATAACCTAGGAAGAAAATTTGTTCTG
225  R R L C A D K D W E K K T E K E K K K L I G N N L G R K K F V L
769  CTGTTAGATGATCTGTGGAGCGAGGTAGATTTGAACAAGATTGGAGTTCCGCATCCAACCTCAAGAAAATGGATCGAAGATAGTTTCCACTCCT
257  L L D D A D L W S E V D L N K I G V P H P T Q E N G S K I V F T T R
865  TCAAAGGAGTTTTCAGTGCATGGAAGCTGATGAAAGTTGCAAAATTTGATTTGTTGCGCAGCAATGAAGCGTGGGAACGTGTTTCGAAGTATAGTT
289  S K E A V C S D M E A D D K L Q I D C L P A N E A W E L F R S I V
961  GGAGAAGACACATTAAGCTGCATCAGGATATTTCCAGACTGGCAAAACAATTTGTGAAAAATGTTATGGATTGCCACTTGCCTCAATGTGATT
321  G E D T L K L H Q D I P R L A K Q I C E K K C Y G L P L A L N V I
1057  GGCAAAGCCATGTCATGTAAGAGAATGTACACGAATGGCATTATGCATTGATGTTCTCAGTACGCTAGCCACGAGTTTCCAGATATGGAAGAA
353  G K A M S C K E N V H E W H Y A F D V L S T S S H E E F P D M E E
1153  AAGATCTTTTCAGTTTGAAGTTTCAGTATGATGTTTAAAGGAAGAAAAGGTTGAAATCATGCTTCTATATTGTTCTTTGTTCCCGGAAGATTAT
385  K I L S V L K F S Y D G L K E E K V K S C F L Y C F P E D Y
1249  GAAATACTAAGGAGGATTTAGTAGATTTGGATCGGTGAAGGATTTATAAGGAAAAGAGAGATGAAGATGGAAGTAACAACAAAGGTCATGTT
417  E I T K E E L I E Y W I G E G F I K G K R D E D G S N N K G H V
1345  ATTATTGGTTTCATTAGTTTCGTCGCGCATCTATTGATGGAGTGCAGAAACATTTCAAACCTGCGGTGAAAATGCATGATGTTACGTGAAATGGCT
449  I I G S L V R A H L L M E C E E H F K P A V K M H D V L R E M A
1441  CTTTGGATAGGGTCTATTTCGGAAGCGGAAGAAAACAGTGCCTCAAATCCGGTGTGAAGCTAAGCCGTATAACAGATGACATCAACTGGTCA
481  L W I G S I S G K A E E K Q C V K S G V K L S R I P D D I N W S
1537  GTTTCGAGAAGGATCTCGTTGATGAGTAATCAAATTAAGAGATATCTTGTGTCCCAATGCCCAACCTTTGACTCTGTTTCTAAGGGGTAAC
513  V S R R I S L M S N Q I K K I S C C P N C [P N L S T L F L R G N]
1633  CTGTTGAAGGTTGTCGGGGTAAATCTTTTCAGTTTATGCCAGCCTTGTCTATCTTGGATCTTTGCTTAACTCCTTTAGGGAATTTCCGGAA
545  L L K V V P G K F F Q F M P A L V I L D L S L N L L L R E F P E
1729  GAAATTAGCAGCTTGACTTCCTTGGCAATACCTCAATTTATCATTACAGGTATAAGTTTCGTTATCAGTTGTTTGAAGGGGTTGAGGAACTAATA
577  E I S S L T S L Q Y L N L S F T G I S S L S V V L K G L R K L I
1825  AGCCTGGACCTGGGGTGTCTGCGCAGCCTTGAAGCATTTGATGGGATAGGAACAAGCTTACCAAAGCTTCAGGTGTTGAAACTATATCGTTTCTCGT
609  S L D L G C C R S L E S I D G I G T S L P K L Q V L K L Y R S R
1921  GTTTATATTGATGCAAGATCAATTTGAAGAGCTACAACCTTTTAGAGCACTTGAAGATTTTAAACAGTAAACGTGAAAGATGCTTTTATCTTGGAAAGT
641  V Y I D A R S I E E L Q L L E H L K I L T V N V K D A F I L E S
2017  ATCCAAAGAGTTGAGCGATTGGCGAGTTGTGTTCAACACCTTTGGATTATCGAAGTGTCCGAGAGGTTTTAACATTAAACACGGCAGCTCTGGGT
673  I Q R V E R L A S C V Q H L W I I E L S A E V L T L N T A A L G
2113  GGTCTTCGAGAGCTTGAGATGGGATGTCCAAATCTCAGAGATAAGATAGATTGGAAAAGCAAAGAGAAAGATCTTCCTTCCATGCTTCC
705  G L R E L E I G M S K I S E I K I D W K S K E K E D L P S P C F
2209  AAGCACTCTCCAGTGTGCTATAATCAATTTGGAAGGTCCAAAGAATTGAGCTGGTTATTGTTGTCCAAATCTCAAGCATCTAAGGGTGTCA
737  K H L S S V A I I N L E G P K E L S W L L F A P N L K H L R V S
2305  AATTCACGAAGCCTAGAAATAATAAAGGAGAGGGAATGAACATTAGCAATAATGTGCATCCTAATTTGACGGTTCCCTTTGGGAGCTA
769  N S R S L E E I I N K E K G M N I S N N V H P N L T V P F G K L
2401  GAATCCCTCCGTTTAAAGCATTGGCGGAATTAAGAGAATTTTCTCAAATCTCTGCTCTTCCATCCCTGAGAAAATTTGATGTGCAAGACTGC
801  E S L R L R H L A E L K R I F S N P L P L P S L R K F D V E D C
2497  CCAAACCTATCAAAGCTGCCATTAGAGAGTTTTCAGAGACACGAACAGGAGTAA
833  P K L S K A A I R E F Q R H E Q E *

```

下划线部分为螺旋卷曲结构域; 阴影部分为 NBS 结构域; 方框部分为 LRR 结构域。

图 1 *BoCNL1* 基因及其编码蛋白序列

Fig. 1 Gene sequence of *BoCNL1* and its deduced protein sequence

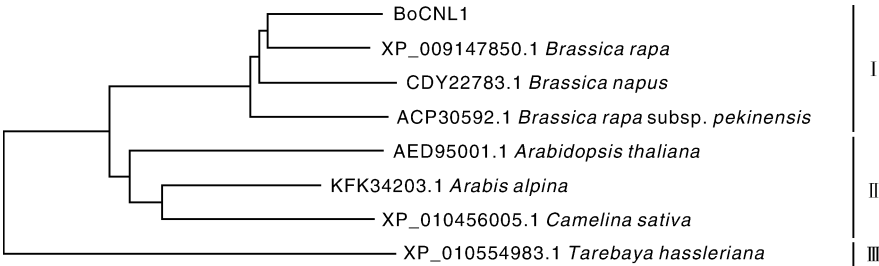


图 2 *BoCNL1* 及其同源序列的系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *BoCNL1* and its homologous sequences

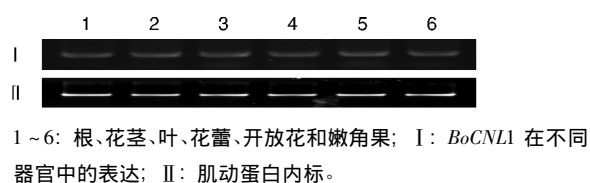


图3 *BoCNL1* 基因的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *BoCNL1*

大部分 NBS-LRR 基因在未感染的健康植株中组成型表达,但表达量较低,仅少部分基因的表达具有组织特异性^[21]。在特定病原菌的侵染下,NBS-LRR 基因的表达上调,并诱导抗病相关基因的表达^[22]。向日葵 (*Helianthus annuus*) 自交系 QIR8 CC-NBS-LRR 基因的表达受霜霉菌 (*Plasmopara halstedii*) 诱导,并激发了一系列信号转导相关基因的表达^[23]。本研究中,*BoCNL1* 在青花菜的根、花茎、叶、花蕾、开放花和嫩角果中均有表达,具有组成性表达的特点,但表达量较低。本课题组将对该基因开展进一步研究,以明确 *BoCNL1* 在不同病原菌侵染下的表达模式,解析其在抗病反应中的生物学功能。

参考文献:

- [1] DANGL J L, JONES J D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 826–833.
- [2] XIAO S, ELLWOOD S, CALIS O, et al. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8 [J]. *Science*, 2001, 291(5501): 118–120.
- [3] 王友红, 张鹏飞, 陈建群. 植物抗病基因及其作用机理 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(1): 92–99.
- [4] 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 (网络版)*, 2011, 9: 1784–1790.
- [5] FAIGÓN-SOVERNA A, HARMON F G, STORANI L, et al. A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in *Arabidopsis* photomorphogenic development [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2919–2928.
- [6] MEYERS B C, KOZIK A, GRIEGO A, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 809–834.
- [7] 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.
- [8] LI J, ZHANG Q Y, GAO Z H, et al. Genome-wide identification and comparative expression analysis of NBS-LRR-encoding genes upon *Colletotrichum gloeosporioides* infection in two ecotypes of *Fragaria vesca* [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 215–227.
- [9] KALE S M, PARDESHI V C, BARVKAR V T, et al. Genome-

wide identification and characterization of nucleotide binding site leucine-rich repeat genes in linseed reveal distinct patterns of gene structure [J]. *Genome*, 2013, 56(2): 91–99.

- [10] 王世全, 张德春, 李平, 等. 水稻中一个 NBS-LRR 抗病同源基因家族的克隆和分析 [J]. *遗传学报*, 2005, 32(7): 704–711.
- [11] 宋霄, 柏素花, 戴洪义. 苹果 NBS-LRR1 基因的鉴定与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(7): 1233–1243.
- [12] 刘云飞, 万红建, 韦艳萍, 等. 番茄 NBS-LRR 抗病基因家族全基因组分析 [J]. *核农学报*, 2014, 28(5): 790–799.
- [13] BROGGINI G A, WÖHNER T, FAHRENTTRAPP J, et al. Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the FB_MR5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5 [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(6): 728–733.
- [14] MA J, LEI C, XU X, et al. Pi64, Encoding a novel CC-NBS-LRR protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(5): 558–568.
- [15] YOUNG N D. The genetic architecture of resistance [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3: 285–290.
- [16] KANG Y J, KIM K H, SHIM S, et al. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 139.
- [17] PERAZZOLLI M, MALACARNE G, BALDO A, et al. Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the Rosaceae family [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e83844.
- [18] ZHANG Y M, SHAO Z Q, WANG Q, et al. Uncovering the dynamic evolution of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in Brassicaceae [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, doi: 10.1111/jipb.12365.
- [19] 李春来, 张怀渝. 植物抗病基因同源序列 (RGA) 研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(6): 853–860.
- [20] PAN Q, WENDEL J, FLUHR R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, 50(3): 203–213.
- [21] MCHALE L, TAN X, KOEHL P, et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards [J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): 212.
- [22] NAVARRO L, ZIPFEL C, ROWLAND O, et al. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense response and bacterial pathogenesis [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 1113–1128.
- [23] RADWAN O, MOUZEYAR S, NICOLAS P, et al. Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 56(412): 567–575.

(责任编辑 张韵)