

芝麻 NBS 类抗茎点枯病相关基因的克隆与分析

于 沐¹, 刘红彦^{1,2*}, 苗红梅³, 田保明¹

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002;
3. 河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据前期获得的芝麻抗茎点枯病 NBS-RGAs 序列与河南省芝麻研究中心提供的 EST 序列比对结果, 设计 4 对特异引物, 从 10 个对茎点枯病表现不同抗性的芝麻品种中扩增得到 16 条 RGAs (抗病基因同源序列), GenBank 登录号分别为 KC477692~KC477707, 它们编码的氨基酸序列均具有 NBS(核苷酸结合位点)类型抗病基因的特征结构域。Blastx 分析结果表明, 16 个 RGAs 基因编码的部分氨基酸序列与已知 NBS 类抗病蛋白同源性为 35%~52%。聚类分析发现这些 RGAs 基因聚为 4 类, 且均为 non TIR-NBS 类型, 为进一步筛选芝麻抗茎点枯病基因奠定了基础。

关键词: 芝麻; 茎点枯病; 核苷酸结合位点; 抗病基因同源序列; 序列分析

中图分类号: S435.653 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)10-0074-06

Cloning and Analysis of NBS-type Resistance Genes in Sesame against *Macrophomina phaseolina*

YU Mu¹, LIU Hong-yan^{1,2*}, MIAO Hong-mei³, TIAN Bao-ming¹

(1. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
3. Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this study, four pairs of specific primers were designed based on comparison of NBS-RGAs of stem blight-resistant cultivars with sesame EST sequences, with which sixteen full-length RGA genes (GenBank accession number: KC477692 - KC477707) were cloned from ten different resistance cultivars against *Macrophomina phaseolina*. All of these RGA gene sequences contained the characteristic domains of NBS-type disease resistance genes, and shared the amino acid identities of 35% - 52% with NBS-type disease resistance protein according to Blastx analyses. They were divided into four types by MEGA 4.0, and all belonged to non TIR-NBS type. The result gives the foundation for further screening sesame resistance genes against *Macrophomina phaseolina*.

Key words: *Sesame indicum* L.; *Macrophomina phaseolina*; NBS; resistance gene analog (RGA); sequence analysis

芝麻茎点枯病是由菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*)引起的一种土传病害, 对我国芝麻产量

和品质影响较大。近几十年来, 开展芝麻茎点枯病抗病机制研究, 提高芝麻的抗茎点枯病水平已成为

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-15-1-05); 河南省创新型科技人才队伍建设工程

作者简介: 于 沐(1987-), 女, 河南正阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。E-mail: ym8926123@163.com

* 通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学及植物病害生物防治研究。

E-mail: liuhy1219@163.com

我国乃至世界芝麻遗传育种工作的重要研究任务和目标^[1-2]。但是目前尚未见芝麻抗茎点枯病基因克隆的报道。近年来,抗病基因同源克隆技术已成为植物抗病基因克隆的重要方法之一,该技术是根据植物抗病基因(R 基因)的保守结构域,设计简并引物,扩增植物基因组 DNA 或 cDNA,得到 R 基因同源序列(resistance gene analog, RGA)。R 基因的保守结构域包括核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)、富亮氨酸重复序列(leucine rich repeats, LRR)、类受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(receptor-like serine/threonine kinases, STK)、亮氨酸拉链(leucine zipper, LZ)以及与果蝇 Toll 蛋白及哺乳动物白细胞介素-1 受体(toll and interleukin-1 receptor, TIR)的胞外域相似的区域,其中 NBS-LRR 基因是植物 R 基因家族中最大的一类, NBS 区域存在若干保守区,其同源序列常与一些已知的抗病基因位点紧密连锁^[3-5]。根据 NBS 区域高度保守的特点,已在多种植物如玉米^[6]、甘薯^[7]、高粱^[8]、柚^[9]、甜菜^[10]中,利用同源基因克隆方法成功克隆了 RGAs。易图永等根据 NBS 保守区域从不同抗、感辣椒疫病的 9 种辣椒种质材料中扩增得到 14 条与辣椒疫病抗性相关的 RGAs 基因,发现抗疫病 RGAs 同样存在于高感疫病辣椒品种中,而在感病品种基因组中也存在一些抗疫病微效 QTLs 位点^[11]。关于芝麻 RGA 的克隆,本实验室(河南省农

作物病虫害防治重点实验室)前期研究已取得了一定进展,高树广等^[12]根据已知植物抗病基因 NBS-LRR 保守结构域合成了 1 对简并引物和 2 对特异引物,从 6 个抗茎点枯病的芝麻品种中扩增得到了 11 条 RGAs。本研究根据实验室前期获得的芝麻抗茎点枯病 NBS-RGAs 序列与河南省芝麻研究中心提供的 EST 序列比对结果,设计 4 对特异引物,从 10 个对茎点枯病表现不同抗性的芝麻品种中分离芝麻抗病相关基因全长序列,其对于揭示芝麻抗病机制,加快芝麻抗病育种进程具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

试验选用的 8 个抗茎点枯病芝麻品种 KKU3 (S1)、缅甸黑芝麻(S2)、杨树黄和尚头(S3)、开封一条鞭①(S4)、商水农家种(S5)、项城大籽白(S6)、新蔡选抗(S7)、豫芝 11(S8)和 2 个感病芝麻品种和尚头(S9)、野芝 1 号(S10),均由河南省农业科学院芝麻研究中心提供。取芝麻幼嫩组织,用液氮速冻后,保存于-70 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据本实验室前期克隆得到的芝麻 NBS 类型 RGAs 标记与芝麻研究中心提供的 EST 序列比对结果设计引物(表 1),用于从 10 个不同抗性的芝麻品种中扩增 RGAs。

表 1 芝麻 RGAs 扩增所用的引物

| 引物编号 | 引物序列(5'—3') | 预期扩增长度/bp |
|-------|------------------------------|-----------|
| NBS1 | F: AGTGGTTATAGAAGACGAGGTTTGG | 2 326 |
| | R: AATGAACAAGTGGAGGAAGAAGAAC | |
| NBS2 | F: CCCATTCATTGTCTGAAACTCC | 2 805 |
| | R: GGTGTTGAAAATCCCACCTGTC | |
| NBS8 | F: AGGAAACACTCCACTACCATCTACG | 2 377 |
| | R: CCCTGTAAACGCATTGTCCCT | |
| NBS12 | F: CTCTTTGGCATCATCCATCTC | 1 905 |
| | R: GAAGCAGGAATACAGAGGTCATC | |

1.2.2 芝麻基因组 DNA 和总 RNA 的提取及 PCR 扩增 芝麻材料的基因组 DNA(gDNA)提取采用 CTAB 法^[13];用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa 公司)提取芝麻材料的总 RNA,以 DNA 酶 I 处理后备用。参照反转录试剂盒操作说明书合成第一链 cDNA,反转录引物采用随机六聚体引物。

以 gDNA 或 cDNA 为模板,利用 4 对引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:10 ng/ μ L 的模板 3 μ L、10 \times LA buffer II 2 μ L、2.5 mmol/L dNTP 1 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L、LA Taq 酶

(5 U/ μ L)0.2 μ L,用 ddH₂O 补齐至 20 μ L。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 3 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,在 Bioer PCR 仪上进行。

1.2.3 序列的比较、分析 使用 1.2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分离,切胶回收目的条带,将回收的 PCR 产物克隆至 pMD19-T 载体,送上海生物工程技术有限公司测序。测序结果使用 Blastn 及 Blastx 在 NCBI 数据库中进行同源序列搜索,然后结合 NCBI 的 ORF finder 程序搜索开放阅读

框,使用 DNAMAN 软件进行序列多重比对和保守结构域分析,使用 MEGA 4.0 构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取及 cDNA 合成

部分样品的 RNA 电泳检测结果见图 1,可以看出 RNA 的 3 条带非常清晰,说明无降解现象,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.8~2.0,表明提取的 RNA 质量能够满足反转录要求。采用随机六聚体引物反转录得到的 cDNA,用内参 *UBQ5* 基因(GenBank 登录号:JQ658357.1)^[14]的定量引物(F: 5'-TCTCGC-CGACTACAACATTCA-3'; R: 5'-TGGA-CACTCTTTCCTCAACCTCT-3')进行检测,均能扩增出 202 bp 的目标条带,因此合成的 cDNA 可用作 PCR 扩增模板。

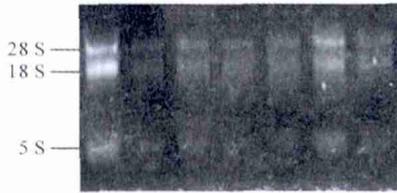
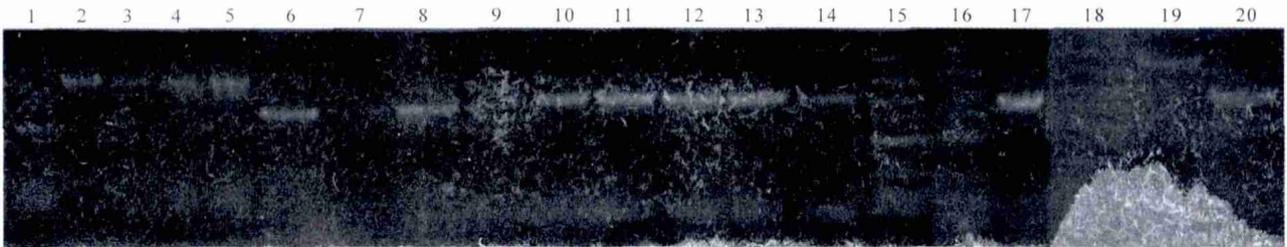


图 1 芝麻 RNA 电泳图谱

2.2 不同芝麻品种 RGAs 的克隆与序列比对

不同芝麻品种中 NBS 家族基因克隆结果及其 GenBank 登录号见图 2 和表 2。从表 2 可以看出,共得到 16 条 RGAs;利用 NBS1 引物,获得 9 条序列,命名为 *SIRGA1*,DNAMAN 比对结果发现感病品种和尚头中此基因序列与 8 个抗病品种中的相似性为 98.7%,而 8 个抗病品种中此基因序列相似性为 99.91%,和尚头中存在 3 个碱基位点缺失,新蔡选抗中存在 1 个碱基位点缺失;利用 NBS2 引物,从商水农家种中获得一条 2 805 bp 的条带,命名为 *SIRGA2*;利用 NBS8 引物,从 3 个抗病品种中扩增得到大小为 2 377 bp 的条带,命名为 *SIRGA8*,DNAMAN 比对 3 个抗病品种中该基因序列相似性为 99.71%,从感病品种野芝 1 号中扩增得到一条 2 371 bp 大小的条带,命名为 *SRRGA8*,其与 3 个抗病品种中 *SIRGA8* 的序列相似性为 97.82%,*SRRGA8* 基因碱基序列中存在 15 个碱基位点缺失,9 个插入突变;利用 NBS12 引物从感病品种和尚头及抗病品种商水农家种的 cDNA 中分别扩增出一条 1 905 bp 的条带,命名为 *SIRGA12*,DNAMAN 比对发现抗感品种中此基因序列相似性为 99.37%,其中有 12 个碱基位点存在差异。



1、15、16、18. DL 5000 Marker; 2—5. 在芝麻品种 S4、S6、S7、S10 中扩增的 *SIRGA8*(*SRRGA8*); 6—14. 在芝麻品种 S1—S9 中扩增的 *SIRGA1*; 17. 在芝麻品种 S9 中扩增的 *SIRGA12*; 19、20. 在芝麻品种 S5 中扩增的 *SIRGA2* 及 *SIRGA12*

图 2 不同芝麻品种中 NBS 家族基因的扩增结果

表 2 不同芝麻品种中 NBS 家族基因克隆结果

| 基因 | 模板 | 引物 | 基因扩增长度/bp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | | | 和尚头 (S9) | 开封一条鞭①(S4) | kku3 (S1) | 缅甸黑芝麻(S2) | 商水农家种(S5) | 项城大籽白(S6) | 新蔡选抗(S7) | 杨树黄和尚头(S3) | 豫芝 11 (S8) | 野芝 1 号 (S10) | | | | | | | | | | |
| <i>SIRGA1</i> | gDNA | NBS1 | 2 323 (KC) | 2 326 (KC) | 2 325 (KC) | 2 326 (KC) | 2 326 (KC) | 477692 | 477693 | 477694 | 477695 | 477696 | 477697 | 477698 | 477699 | 477700 | | |
| <i>SIRGA8</i> (<i>SRRGA8</i>) | gDNA | NBS8 | | 2 377 (KC) | 2 377 (KC) | | | | 2 377 (KC) | 2 377 (KC) | | | | | | | 477703 | 477704 | | 2 371 (KC) | | |
| <i>SIRGA2</i> | cDNA | NBS2 | | | | | | 2 805 (KC) | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>SIRGA12</i> | cDNA | NBS12 | 1 905 (KC) | | | | | | 1 905 (KC) | | | | | | | | | | | | 477706 | 477707 |

注:基因扩增长度后括号中为 GenBank 登录号。

2.3 不同芝麻品种 RGAs 编码的氨基酸序列分析

利用 NCBI 的 Blastx 对获得的芝麻 RGAs 的氨基酸序列进行分析(表 3), 结果发现, *SIRGA1* 编码的部分氨基酸序列与 *Solanum hougasii* 的 RGH1 蛋白(AEW48211.1)、RGH9 蛋白(AEW48189.1)相似性为 38%; *SIRGA2* 编码的部分氨基酸序列与番茄(*Solanum lycopersicum*)的 NRC1 蛋白(ABC26878.1)相似性为 52%, 与甜菜

(*Beta vulgaris*) 的 NBS-LRR 类型抗病蛋白(ABJ99598.1)相似性为 44%; *SIRGA8* 编码的部分氨基酸序列与马铃薯(*Solanum demissum*)的 R1 蛋白(AAY53482.1)相似性为 38%, 与野生马铃薯(*Solanum acaule*)的 NBS-LRR 蛋白(CAB56299.1)相似性为 35%; *SIRGA12* 编码的部分氨基酸序列与 *Solanum × Edinense* 的 RGH9 蛋白(AEW48201.1)相似性为 43%。

表 3 芝麻 4 个亚类 RGAs 基因代表序列与 GenBank 上已有 NBS 类基因编码的氨基酸同源性分析

| 基因 | GenBank 登录号 | 描述 | 物种 | 同源性/% | E 值 |
|----------------|-------------|---------------|-----------------------------|-------|--------------------|
| <i>SIRGA1</i> | AEW48211.1 | RGH1 蛋白 | <i>Solanum hougasii</i> | 38 | 2e ⁻⁹⁶ |
| | AEW48189.1 | RGH9 蛋白 | <i>Solanum hougasii</i> | 38 | 4e ⁻⁹⁰ |
| <i>SIRGA2</i> | ABC26878.1 | NRC1 蛋白 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 52 | 0.0 |
| | ABJ99598.1 | NBS-LRR 类抗病蛋白 | <i>Beta vulgaris</i> | 44 | 0.0 |
| <i>SIRGA8</i> | AAY53482.1 | R1 蛋白 | <i>Solanum demissum</i> | 38 | 6e ⁻⁸⁰ |
| | CAB56299.1 | NBS-LRR 蛋白 | <i>Solanum acaule</i> | 35 | 1e ⁻¹⁰⁸ |
| <i>SIRGA12</i> | AEW48201.1 | RGH9 蛋白 | <i>Solanum × Edinense</i> | 43 | 6e ⁻⁹⁷ |

2.4 不同芝麻品种 RGAs 与已知 R 基因编码氨基酸的比较与聚类分析

根据得到的芝麻品种 RGAs 推测氨基酸序列, 与 GenBank 中登录的亚麻 *L6* 基因(U27081)^[15]、拟南芥 *RPS2* 基因(AAA21874)^[16]、*RPM1* 基因(X87851)、番茄 *IC1* 基因(AF039681)、烟草 *N* 基因(U15606)^[17] 的 NBS 保守区进行氨基酸同源比对, 结果显示, 4 类 RGAs 与 *IC1* 的相似性在 36.52%~41.74%, 与 *RPS2* 的相似性在 21.12%~26.18%, 与 *L6* 的相似性在 22.69%~25.42%, 与 *N* 的相似性在 4.82%~13.36%, 与 *RPM1* 的相似性在 8.19%~34.73%(表 4)。说明 NBS 类家族基因在芝麻基因组中广泛存在。

表 4 芝麻 4 个亚类 RGAs 代表序列与已知植物 R 基因保守区编码的氨基酸一致性比较 %

| 抗病基因产物 | <i>SIRGA1</i> | <i>SIRGA2</i> | <i>SIRGA8</i> | <i>SIRGA12</i> |
|-------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <i>IC1</i> | 38.70 | 41.74 | 36.68 | 36.52 |
| <i>RPS2</i> | 24.79 | 21.12 | 26.18 | 24.68 |
| <i>L6</i> | 24.48 | 24.15 | 22.69 | 25.42 |
| <i>N</i> | 13.36 | 4.82 | 11.30 | 12.12 |
| <i>RPM1</i> | 34.73 | 8.19 | 32.64 | 32.22 |

采用 DNAMAN 进行多序列比对及保守基元分析(图 3), 结果显示, 16 条 RGAs 具有 NBS 类抗病基因编码蛋白的部分结构特征, 如含有 P-Loop、

Kinase-2、RNBS-A、RNBS-B、RNBS-C 等保守氨基酸序列, 且 16 条 RGAs 的 Kinase-2 的共有序列(LLVLDDVW)最后一个氨基酸为天冬氨酸(W), 表明均为 non TIR-NBS 类型^[18]。

进一步聚类分析(图 4)显示, 16 条 RGAs 分为 4 个亚类, 与 non TIR-NBS 类基因聚在一起, 其中 *SIRGA2* 与 non TIR-NBS 类 *IC1* 聚为一类, *SIRGA1*、*SIRGA8*、*SRRGA8*、*SIRGA12* 与 non TIR-NBS 类 *RPM1* 聚为一类, TIR-NBS 类 *N*、*L6* 单独聚为一类。

3 结论与讨论

本研究从 10 个不同抗、感茎点枯病芝麻品种中克隆了 16 个 NBS 类 RGAs 基因, 其推测的氨基酸与 NCBI 中马铃薯、番茄及甜菜的抗病蛋白氨基酸序列相似性在 35%~52%, 且含有 NBS 类抗病基因的保守结构域, 因此, 这些 RGAs 基因中的一部分可能是抗病相关基因。通过对 16 条序列进行比对分析, 发现保守结构域之间存在许多点突变、小片段的插入或缺失, 这是芝麻 RGAs 趋异的现象, 与在甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]^[8] 中的研究结果相似。另外聚类分析发现这些 RGAs 聚为 4 类, 且其保守结构域中 Kinase-2 的共有序列(LLVLDDVW)最后一个氨基酸为天冬氨酸(W), 与 non TIR-NBS 类 *RPM1* 聚为一类。

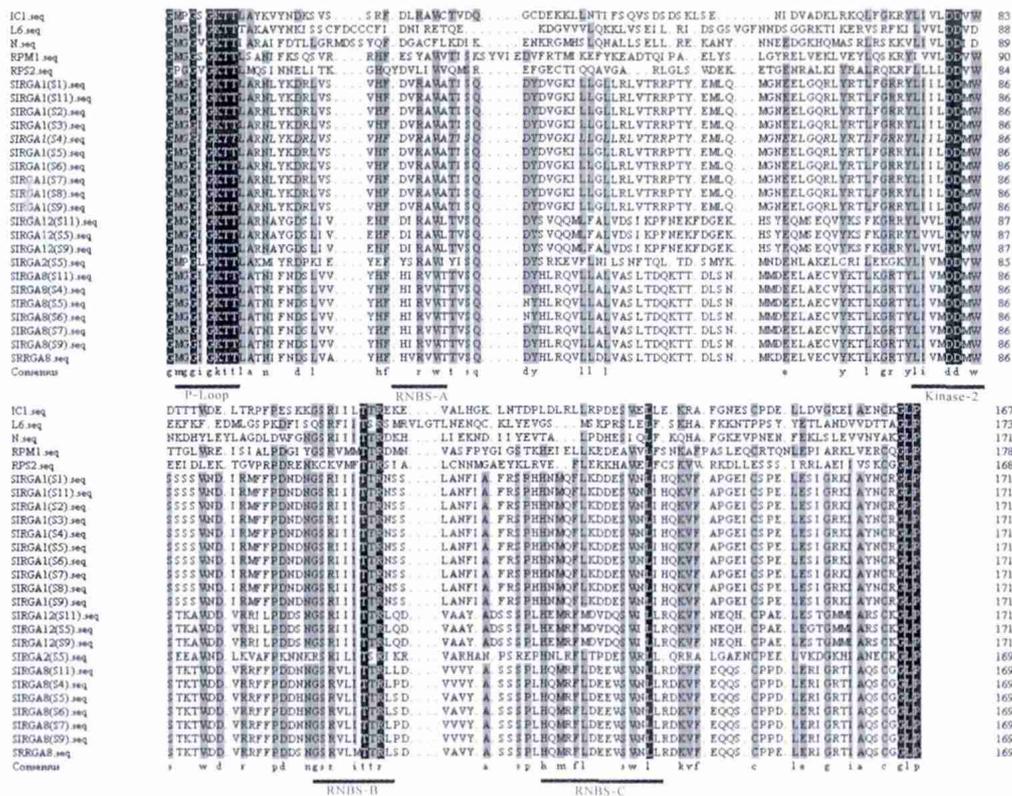


图 3 芝麻 RGAs 预测的氨基酸多序列比对及保守基元分析

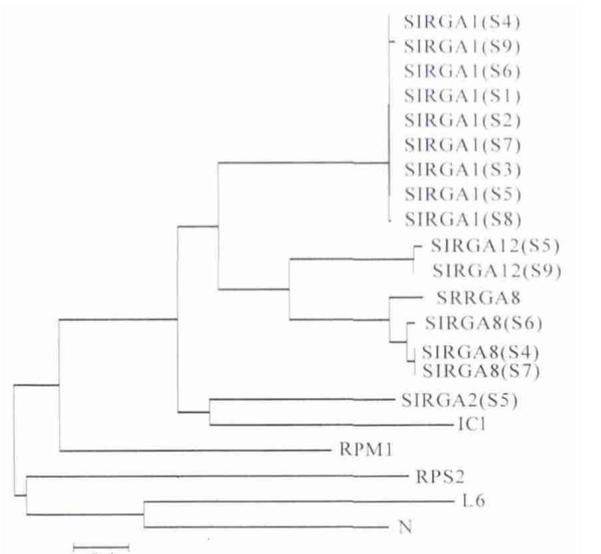


图 4 芝麻 RGAs 与已克隆 R 基因编码的氨基酸序列聚类分析结果

分离克隆 RGAs 基因有两方面的应用前景，一是有可能直接得到抗病基因，二是可以从筛选出与抗病基因连锁的 RGA 标记，构建高密度遗传图谱，两者在利用分子育种技术改良农作物抗病性方面均具有重要的应用价值。本研究初步分析了芝麻抗、感品种中抗病基因类似物的差异，为今后基因功能验证和 SNP 等分子标记开发奠定了基础；另外，进一步分析了这些基因与已知抗病基因的同源关

系，为芝麻抗茎点枯病基因的克隆和鉴定奠定了基础。已克隆的 16 个 RGAs 基因是否为芝麻抗茎点枯病基因或抗病基因的 RGA 标记，需要通过定量表达分析、遗传转化、基因敲除和连锁性分析等方法进行验证。

参考文献：

[1] 张海洋,郑永战,卫双玲.我国芝麻产业现状与发展对策[C].全国芝麻和特油作物产业暨学术研讨会论文集,2007:9-18.

[2] Zhang H, Miao H, Wang L, et al. Genome sequencing of the important oilseed crop *Sesamum indicum* L. [J]. Genome Biology, 2013, 14: 401.

[3] Aarts M G M, Hekkert B T L, Holub E B, et al. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11(4): 251-258.

[4] Collins N C, Webb C A, Seah S, et al. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11(10): 968-978.

[5] Rivkin M I, Vallejos C E, McClean P E. Disease-resistance related sequences in common bean [J]. Genome, 1999, 42: 41-47.

(下转第 98 页)

- 研究初报[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 76-78.
- [7] 阮义理, 蒋文烈, 林瑞芬. 稻病毒病介体昆虫灰飞虱的研究[J]. 昆虫学报, 1981, 24(3): 283-290.
- [8] 孙枫, 徐秋芳, 程兆榜, 等. 中国水稻黑条矮缩病研究进展[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 195-201.
- [9] 陈声祥, 张巧艳. 我国水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病研究进展[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 97-103.
- [10] 秦国正, 王飞. 玉米粗缩病的研究进展[J]. 山东农业科学, 2006(3): 117-120.
- [11] 王飞. 玉米粗缩病抗病位点的分子标记定位[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [12] 张爱红. 玉米自交系植株水稻黑条矮缩病毒的积累[D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- [13] 吴淑华, 王朝辉, 范永坚, 等. 江苏省玉米粗缩病病原病毒的 RT-PCR 检测[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 369-372.
- [14] 陈长军, 程兆榜, 熊如意, 等. 玉米粗缩病灰飞虱传毒模型的建立[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(1): 7-11.
- [15] 陈巽祯, 杨满昌, 刘信义, 等. 玉米粗缩病发病规律及综合防治研究[J]. 华北农学报, 1986, 1(2): 90-97.
- [16] 刘志增, 池书敏, 宋占权, 等. 玉米自交系及杂交种抗粗缩病鉴定与分析[J]. 玉米科学, 1996, 4(4): 68-70.
- [17] 张会孔, 杨振霞, 陈振东, 等. 玉米粗缩病严重度分级标准的研究[J]. 植保技术与推广, 1998, 18(5): 3-4.
- [18] 王安乐, 陈朝辉, 邵新胜, 等. 玉米自交系材料抗粗缩病鉴定筛选初报[J]. 玉米科学, 1998, 6(4): 65-66.
- [19] 田兰芝, 路银贵, 邱垫平, 等. 玉米抗玉米粗缩病田间自然鉴定影响因素的研究[C]//彭友良. 中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 2004: 322-325.
- [20] 苗洪芹, 田兰芝, 路银贵, 等. 简便易行的玉米粗缩病严重度分级标准[J]. 植物保护, 2005, 31(6): 87-89.
- [21] 路银贵, 曹永胜, 田兰芝, 等. 玉米粗缩病病情严重度分级标准及病情指数与产量损失率关系的研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 87-90.
- ~~~~~
- (上接第 78 页)
- [6] Xiao W K, Xu M L, Zhao J R, *et al.* Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 63-72.
- [7] 陈观水, 周以飞, 林生, 等. 甘薯 NBS 类抗病基因类似物的分离与序列分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(5): 359-365.
- [8] Totad A S, Fakrudin B, Kuruvinashetti M S. Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) [J]. Euphytica, 2005, 143: 179-188.
- [9] 黄代青, 王平, 吕柳新. 柚 cDNA 中 NBS-LRR 类 R 基因同源序列的分离[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1580-1584.
- [10] Tian Y Y, Fan L J, Thureau T, *et al.* The absence of TIR-type resistance gene analogues in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genome[J]. Journal of Molecular Evolution, 2004, 58: 40-53.
- [11] 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 等. 几个抗疫病性不同的辣椒材料抗病基因同源序列的分离与比较[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 540-544.
- [12] 高树广, 刘红彦, 王俊美, 等. 芝麻 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与分析[J]. 河南农业科学, 2011, 40(9): 81-85.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [14] 刘莉铭, 刘红彦, 田保明. 茎点枯病菌诱导下芝麻内参基因的筛选[J]. 作物学报, 2012, 38(3): 471-478.
- [15] Lawrence G J, Finnegan E J, Ayliffe M A, *et al.* The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Ara-bidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*[J]. Plant Cell, 1995, 7(8): 1195-1206.
- [16] Mindrinos M, Katagiri F, Yu G L, *et al.* The *A. thaliana* disease-resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats[J]. Cell, 1994, 78(6): 1089-1099.
- [17] Whitham S, Dinesh-kumar S P, Choi D, *et al.* The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor [J]. Cell, 1994, 78(6): 1011-1015.
- [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 with the nucleotide-binding superfamily[J]. Plant J, 1999, 20: 317-332.