

向日葵抗锈病基因同源序列的克隆与分析

林晓红¹, 景 岚^{1*}, 康振生²

(1. 内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特, 010019; 2. 西北农林科技大学/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌, 712100)

摘要: 向日葵锈病严重影响向日葵的产量。为了找到抗锈病相关基因, 根据已知 NBS-LRR 型抗病基因保守结构域 P-loop 和 GLPL 设计简并引物, 以接菌的抗病向日葵品种 CM29 叶片的 cDNA 为模板进行扩增。通过克隆转化得到 10 个具有连续开放阅读框的抗病基因同源序列 (RGA), 经系统进化分析将其分为 TIR-NBS-LRR 和 non-TIR-NBS-LRR 两种类型。对其氨基酸序列进行多重序列比对, 结果显示所获得的 RGA 具有典型的 NBS-LRR 型抗病基因保守结构域, 即 P-loop、kinase-2a、kinase-3a 和 GLPL 结构。运用 BLASTX 分析这些结果, 表明其 RGA 与已知的抗病基因相应保守区域的同源性为 18.1%~51.1%, 说明它们可能与抗病功能基因具有密切联系。

关键词: 向日葵; 锈病; NBS-LRR; 抗病基因同源序列 (RGA); 克隆

中图分类号: S435.655 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2014)04-0508-05

Cloning and analysis of rust resistance gene analogs of sunflower

LIN Xiao-hong¹, JING Lan^{1*}, KANG Zhen-sheng²

(1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China;

2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Sunflower (*Helianthus annuus*) rust restricts growth and production severely. In order to find resistance genes of sunflower to rust disease, degenerated primers were designed based on conserved regions of NBS-LRR genes, P-loop and GLPL, to clone the analogs from infected resistant cultivar CM29. By phylogenetic analysis, 10 cloned resistance gene analogs with continuous open reading frame belonged to TIR-NBS-LRR type and non-TIR-NBS-LRR. Multiple sequence alignment of amino acid showed these RGAs had typical domains of NBS-LRR resistance genes, including P-loop, kinase-2a, kinase-3a and GPLP. These RGAs showed great homology with the known resistance genes by BLASTX analysis, indicating the RGCs were highly related to resistance genes in sunflower.

Key words: *Helianthus annuus*; *Puccinia helianthi* Schw.; NBS-LRR; Resistance gene analogs; Clone

向日葵具有很高的食用和油用价值, 它是世界第二大油料作物, 在中国的栽培面积仅次于大豆和油菜^[1]。向日葵锈病 (*Puccinia helianthi* Schw.) 是向日葵的重要病害之一, 在世界各地普遍发生, 对向日葵的产量和含油量造成严重损失, 在向日葵锈病大爆发的情况下, 产量损失甚至可以高达 70%^[2]。随着我国向日葵种植面积不断扩大, 向日葵锈病的发生逐年加重, 给向日葵生产带来的危害日趋严重^[3]。随着生物技术的不断发展, 运用转基因技术

进行植物品种的改良已被应用到农作物的生产中, 因此植物抗病基因的克隆对于抗病机制及抗病遗传育种的深入研究具有重要的意义。迄今为止, 相继已有 40 多个抗病基因分别从玉米、拟南芥、水稻等植物中克隆出来^[4~7], 通过对已知抗病基因序列研究发现, 这些抗病基因编码的氨基酸序列之间存在高度保守区域, 根据这些保守结构域将抗病基因分为 6 种类型, 其中 NBS-LRR 型抗病基因是最大的一类。这类抗病基因至少包含三部分: 核苷酸结合

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 国家自然科学基金 (31060235, 31360422); 旱区作物逆境生物学国家重点实验室开放课题; 国家向日葵现代产业技术体系 (CARS-16)

作者简介: 林晓红 (1988-), 女, 山西省天镇县人, 硕士, 主要从事向日葵锈病的研究, E-mail: 812074064@qq.com

* 通讯作者: 景 岚 (1971-), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 副教授, 博士, 主要从事向日葵病害研究, E-mail: jinglan71@126.com

位点(nucleotide-binding site, NBS)、富亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)和多变的N-端。其中NBS具有ATP或GTP结合的特性^[8],结构域包括P-loop(又称kinase-1a)、kinase-2a、kinase-3a和GLPL,其中P-loop和GLPL的保守性较强,它们之间约有170个氨基酸残基(510bp核苷酸)。NBS-LRR型抗病蛋白中存在两种N-端^[9],一种是N-端含有一个卷曲螺旋结构,可能在蛋白与蛋白互作过程中发挥作用,这一结构在单子叶植物和双子叶植物中都有报道^[10,11]。另一种NBS-LRR抗病蛋白的N-末端与果蝇发育基因Toll以及哺乳动物白细胞介素-1受体蛋白(TIL)具有很高的同源性,这一类只在双子叶植物中有报道^[10]。第一种non-TIR-NBS-LRR型抗病蛋白有拟南芥的RPM1^[12]和RPS2^[13]和水稻Xa1^[14]。第二种TIR-NBS-LRR抗病蛋白有亚麻的L6抗病基因^[15]和烟草的N抗病基因^[16]和拟南芥的RPP5^[17]。目前已经从多种植物中成功克隆出了抗病基因同源序列,主要以大豆、水稻和麦类为主,Kanazin等^[18]根据已知的抗病基因N、RPS2和L6的NBS保守区域设计简并引物,成功地从大豆中克隆出9类抗病基因同源序列,其中有5类抗病基因类似序列(RGA, resistance gene analogs),已经定位在大豆J连锁群上。Yu等^[4]利用抗病基因同源序列法,从大豆中克隆出11类RGA,已经将其中5类定位在大豆的已知抗病基因附近。而向日葵抗病相关基因的克隆和研究工作还很薄弱,本研究运用同源序列候选基因克隆法即根据已经克隆得到的抗病基因的保守结构域设计简并引物,以接菌后的向日葵抗锈病品种CM29的cDNA为模板进行PCR扩增,对获得的RGA,进行鉴定分析,为获得向日葵抗病基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

向日葵品种为CM29;锈病菌株为300小种,向日葵CM29对锈菌300表现高度抗病,均由内蒙古农业大学植物病理实验室提供。

1.2 培养与接种方法

向日葵种植在人工气候室内,温度20~22℃,相对湿度50%~75%。当幼苗长到第1对真叶充分展开时接种锈菌。采用夏孢子悬浮液接种,用浸湿毛笔蘸取 10^5 个/mL夏孢子悬浮液(加入0.01%

Tween-80并搅拌均匀)涂到充分展开的子叶和第1对真叶背面上。接种后的植株置于相对湿度90%~100%、温度18~20℃的保湿培养箱内黑暗保湿24h,促使夏孢子萌发侵入^[19]。

1.3 向日葵总RNA的提取和cDNA第一链的合成

采用QIAGEN公司的RNeasy® Plant Mini Kit试剂盒提取抗锈病植株CM29接菌24h后植物叶片RNA。用紫外分光光度计(Unic 4802s)检测RNA浓度,并用1.2%琼脂糖电泳检测RNA的完整性。采用Thermo公司的RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒参考说明反转录获得cDNA第一链。

1.4 引物的设计与PCR扩增

根据已经克隆的植物NBS-LRR型抗病基因编码的保守结构域P-loop和GLPL设计3对简并引物(表1),由生工生物工程(上海)有限公司合成。反应体系:模板cDNA 2.0μL,10μmol/L引物各0.5μL,10.0mmol/L dNTPs 1.0μL,10×PCR Buffer 2.5μL,MgCl₂ 2.5μL,5U/μL Taq DNA聚合酶0.3μL,补水至25μL。扩增程序:94℃预变性5min;94℃变性45s,56℃退火50s,72℃延伸1min,35个循环;72℃延伸10min;4℃保存。用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 PCR产物的回收与克隆

PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳后,使用柱式凝胶回收试剂盒(上海生工生物工程(上海)有限公司)回收目的条带,然后将目的片段连接到pMD18-T载体(TaKaRa公司)中,根据产品说明书将其转化到大肠杆菌细胞中。通过M13引物的PCR扩增来检测T载体中是否成功插入目的片段,最后将含有目的DNA片段的菌液送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.6 序列分析、比对和系统发育树的构建

将测得的核酸序列用DNASTAR软件去除载体后,在BLASTX上进行同源性搜索。再用DNASTAR软件对P-loop和GLPL结构域之间的序列进行分析,将DNA序列翻译为氨基酸序列。对进行氨基酸的同源性和多样性分析,并与已知NBS-LRR类抗病基因编码的氨基酸序列一起构建系统发育树。已知基因为亚麻L6(U27081)、M(U73916)、烟草抗病毒基因N(U15605)、马铃薯Gpa2(AFI95939)、Gro1-4(AY196191)、番茄Prf(U65391)、水稻Xa1(AB002266)和拟南RPM1(X87851)、RPS5(AF074916)、小麦Lr1(ABS29034)。

表1 引物序列表
Table 1 List of all primer sequences

引物 Primer	引物序列 Sequence(5'-3')	保守结构域 Conserved domain
F1	GGNGNRTGGNAARACNAC	P-loop(GGV/L/MGKTT)
R1	AANGCHAGNGGYAANCC	GL/FPL/FA/VL
F2	GGDATGVSVGGHDYVGGKAARAC	P-loop(GGV/L/MGKTT)
R2	GCMRCCARAGGMARYCC	GL/FPL/FA/VL
F3	GGNGNRTHGGNAARACHAC	P-loop(GGV/L/MGKTT)
R3	AGNGCHAGNGGYAANCC	GL/FPL/FA/VL

注/Note: M = A/C, S = C/G, Y = C/T, K = G/T, V = A/C/G, H = A/C/G, D = A/G/T, R = A/G, N = A/C/G/T

2 结果与分析

2.1 向日葵 NBS 型 RGA 的克隆结果与分析

根据 NBS 型抗病基因保守结构域设计 3 对简并引物,对 CM29 反转录的 cDNA 进行扩增,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,引物 F1R1 和 F3R3 扩增得到两条 500bp 左右的单一条带,与预期片段大小相符。对其进行回收、连接、转化和克隆,重组克隆经鉴定后,每条选取 8 个阳性克隆进行测序,将测序结果用 DNASTAR 软件对其进行氨基酸推导,发现有 10 条均具有连续的开放阅读框,且包含 NBS 典型的保守结构域: P-loop、Kinase-2 和 GLPL,用 BLASTX 程序进行同源序列搜索发现与已知的抗病基因具有较高的同源性,且都含有 NB-ARC(nucleotide binding and similarity to apaf-1, R genes and the Ced-4)保守结构域。将这些序列命名为向日葵抗病基因同源序列(HaRGA),并将这 10 条 HaRGA 提交到 GenBank,序列登录号为: KJ620870 - KJ620879。上述结果表明,利用已知抗病基因同源序列的保守结构域设计简并引物进行扩增是分离向日葵抗病基因的有效方法。

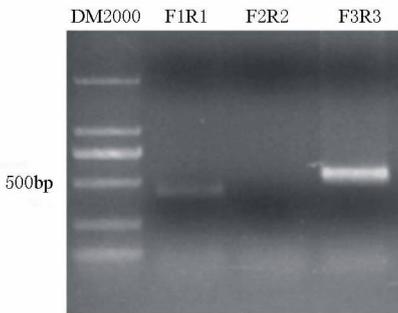


图1 cDNA 扩增结果
Fig. 1 Result of cDNA amplification

2.2 向日葵 HaRGA 系统进化树分析

为了研究向日葵 NBS-LRR 型 RGA 的进化关系,运用 MEGA5 软件对已知的抗病基因包括亚麻 L6(U27081)、M(U73916)、烟草抗病毒基因 N(U15605)、马铃薯 Gpa2(AF195939)和 Gro1-4(AI196191)、番茄 Prf(U65391)、水稻 Xa1

(AB002266)以及拟南芥 RPM1(X87851)和 RPS5(AF074916)、小麦 Lr1(ABS29034)与向日葵 RGA 的氨基酸序列进行系统进化分析(图 2)。如图所示,HaRGA 氨基酸序列被分为两组:具有细胞白介素受体的 TIR-NBS-LRR 和不具有细胞白介素受体的 non-TIR-NBS-LRR。其中 TIR-NBS-LRR 有 4 个序列,HaRGA3、HaRGA5、HaRGA6 和 HaRGA10;Non-TIR-NBS-LRR 包含有 6 个序列,根据分支的一致性可分为两个亚组 HaRGA I 和 HaRGA II,其中 HaRGA I 有 5 个序列:HaRGA1、HaRGA2、HaRGA7、HaRGA8 和 HaRGA9;HaRGA II 仅有一个序列 HaRGA4。

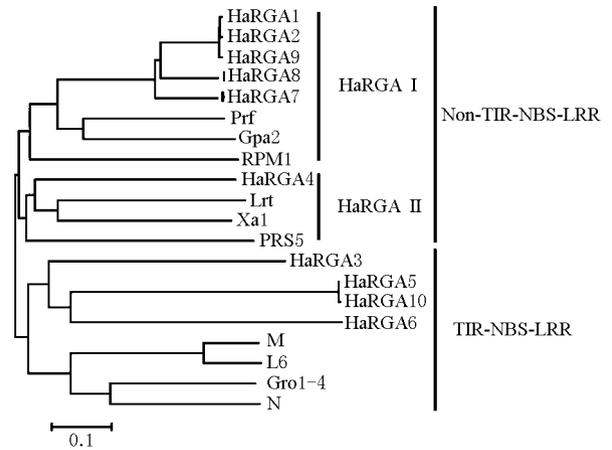


图2 向日葵 RGA 与已知抗病基因氨基酸序列系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of *H. annuus* and other plant R genes

2.3 向日葵 HaRGA 氨基酸序列相似性分析

根据聚类分析结果可以看出,同一亚组的 HaRGA 部分具有较高同源性,因此选出 5 个序列作为代表与已知抗病基因编码的氨基酸序列进行相似性比对(表 2),结果所示 5 条 HaRGA 序列间在氨基酸水平上相似度为 28.9% ~ 80.5%,与已知抗病基因 NBS 区域氨基酸相似度为 18.1% ~ 51.1%。

2.4 向日葵 HaRGA 氨基酸多重序列对比

利用 DNAMAN 软件对所获得的序列与已知的抗病基因相应的 NBS 区序列进行氨基酸多重序列对比,结果显示均具有 NBS 型抗病基因保守结构域 P-loop、kinase-2a、kinase-3a 和 GLPL(图 3)。kinase-2a 结构域的最后氨基酸残基是区别 TIR-NBS-LRR 和 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因的重要特征,TIR-NBS-LRR 型抗病基因 kinase-2a 结构域的最后氨基酸为天冬氨酸(D),而 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因 kinase-2a 结构域的最后氨基酸为色氨酸(W)。结果显示 HaRGA10 的 Kinase-2a 的最后氨基酸残基为

天冬氨酸(D),其他的5条均为色氨酸(W),这与系统进化树分析结果一致。

表2 向日葵 HaRGA 氨基酸序列与已知抗病基因氨基酸序列相似性比较

Table 2 Similarity of amino acid sequences between HaRGA from *H. annuus* and from known plants

名称 Name	HaRGA1	HaRGA4	HaRGA7	HaRGA8	HaRGA10	Xa1	N	Gpa2	RPM1	L6
HaRGA1	100									
HaRGA4	31.1	100								
HaRGA7	77.5	28.4	100							
HaRGA8	80.5	29.7	78.7	100						
HaRGA10	74.6	30.7	73.2	73.9	100					
Xa10	32.9	30.6	32.1	31.2	34.5	100				
N	26.6	20.2	27.2	23.5	30.9	27.9	100			
Gpa2	46.6	24.5	48.4	46.0	51.1	29.6	24.5	100		
RPM1	30.8	28.1	30.0	31.0	33.1	25.1	23.9	33.1	100	
L6	21.1	18.1	21.1	21.6	22.0	21.3	33.9	21.2	20.9	100

P-loop

HaRGA1	CGIGKTIILATKVFNDGYVVKHFFY.VRVVWTVSQT YDKRAVLIQIILASMDV.....KLEFEKTSDS	59
HaRGA2	CGIGKTIILATKVFNDGYVVKHFFY.VRVVWTVSQT YDKRAVLIQIILASMDV.....KLEFEKTSDS	59
HaRGA10	CGIGKTIILATKVFNDAYVVKYHFD.VIAVWTVSQT YDKRAVLTQILG.....	45
HaRGA4	CGVGTKINLANFLYNEKQVQNHFAFNMAWVQVSGEFDIIRISQEIFEAVGG.....KATKAPRN	57
HaRGA7	CGIGKTIILANKVFNDFYVVKHFFY.VRVVWTVSQT YDKRAVLIQIILESIKLDLKEAMEPIHAQERYQLDLEEATDY	74
HaRGA8	CGIGKTIILATKVFNDGYVVKHFFH.VRVVWTVSQT YDKRAVLIQIILESICA.....PLDLEKTSDS	59
Xa1	CGIGKTIILAQVCKDLVKSQFN.VKIIVVYVSEKFDVVKITRQILDHVSN.....QSHGISN	57
N	CGVGTKTIARAIFDILLGRMDSYQFDGACFLDKIKENKRGMSLQALLS.....ELLREKANY	60
Gpa2	CGIGKTIILAAKLYSDPYIMSRFD.IRAKATVSEQEYCVRNVLGLLSLTS.....DEPDY	53
RPM1	CGSGKTIILSANIFKSQSVRRHFE.SYAVWTVSQT YDKRAVLIQIILESICA.....EADTQIPAELYS	61
L6	CGIGKTIILAKAVYNKIISCFDCCCFIDNIRETQEKDGVVVLQKQKLVSEILR.....IDSGVGF	59

Kinase 2a

Kinase 3a

HaRGA1	...KLHEMVHKYLMNKRYLIVVIDIWNIDT.WDNLKLFPP.HDNNGSRILLIS...RLTEVVKHATSN...	119
HaRGA2	...KLHEMVHKYLMNKRYLIVVIDIWNIDT.WDNLKLFPP.HDNNGSRILLIS...RLTEVVKHATSN...	119
HaRGA10SHLIDQRYLIVIEIDIKET...DNLSLFP.RRNNGS.LLIS...RITVAKHARS...	95
HaRGA4	..FNKIQEVLRLDKLIGKRFLIVLDDVWSESHRDWETLVGPFY..TCAFGSKIVITTE...KDKLLKNLGYKP...	122
HaRGA7	...ELLEMVHKRLFRKRYLIVVIDIWHIAT.WDNLKSFPP.HDNTGSRILLTRLQERYTEVAKHANS...	138
HaRGA8	QERYRLRELVYKHLFGKRYLIVMDVWQIET.WDNLKSFPP.HDNNGSRILLIS...RLTEVAKHANLDQER	126
Xa1	..LDTIQDLEEQMKSKKFLIVLDDVWEIRTDWKKLLAPLRNDQVNSQEEATGNMIILTRIQSIASLGL..	128
N	NNEEDGKHQMASRLRSKVKLIVLDDIDNKHLY.LEYLAGLD..WFGNGSRIIIT.....RDKHLIEKND...	123
Gpa2	...QLADQLQKHLKGRYLVVIDIWTTEA..WDDIKLCPF..DCDNGSRILLIT...RNVEVAEYASSG...	113
RPM1	LGYRELVEKLYEVLQSKRYLVVLDVWTTGL..WREISIALF..DGIYGSRVMMIT...RDMNVASFYIGIG..	126
L6	NNDSSGGRKTIKERSRFRKILVVLDDVDERFK..FEDMLGSPK..DFISQSRFIITS...RSMRVLGLTENQ...	124

GLPL

HaRGA1	.GLIHHLGHLSKERSWDLICQKVEH..GNECPEWSIK.PGMQIVANCQGLPIAL	169
HaRGA2	.GLIHHLGHLSKERSWDLICQKVEH..GNECPEWSVK.PGMQIVANCQGLPIA.	168
HaRGA10	..FIHHLRYLSKDES.QLICQKVEQ..GRDCPEWSIK.VGMQIVENCQGLPIA.	142
HaRGA4	..LIKQIGSLPYDDALSIFALHALG.VRNFDSHLSLKPAYADDIVKCKDGFPI..	171
HaRGA7	.GFIHHLIELNKIRSWELLICQKVEH..GIECPEWSIK.PGMQIAESCHGLPIAL	188
HaRGA8	YGLTHHLGYLKNERSWELLICQKVEQ..GNECPEWSIK.PGMQIVEHQGLPIAL	177
Xa1	TVQSIRKLEAKRDDIWSLFFKVAFG.NDKHDSSPGLQVLGKQIASELKGNPIA.	180
N	..IIYEVTALPDHESIQLFKQHAFG...KEVPNENFEKLSLEVNVYAKGLPIAL	172
Gpa2	.KPPHHMLMNFDESWNLLHKKIFEKEGSYSPEFEN..IGKQIALKCGGLPIA.	163
RPM1	.STKHEIELLEKEDEANVLFNSKAFPASLEQCRTQNLEPIARKLVERCQGLPIAI	179
L6	.CKLYEVGSMKPRSLELFSKHAFK...KNTPPSYETLANDVVDTTAGLPIITL	174

图3 向日葵 RGA 氨基酸预测序列与已知 NBS 类抗病基因多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *H. annuus* with known regions of NBS

3 讨论

克隆和研究植物的抗病基因一直是国内外的研究热点,到目前为止,已经分离得到很多植物抗病基因,其中绝大部分是采用图位克隆技术和转座子标签法分离得到。但是对于基因组较大且重复性较多、很难构建高密度的分子标记连锁图谱和很难获得转座子突变体的植物来说,应用这两种经典的克隆抗病基因的方法很难实现,这大大地限制了这些植物在抗病基因分离克隆方面的研究。经过对已知的抗病基因研究发现已克隆的抗病基因编码的氨基酸序列普遍存在高度保守区域,NBS 结构域是目前发现的最重要的抗病基因保守结构域,已经证明根据其设计引物进行抗病基因同源序列的克隆是可行的^[20~24],小麦的抗锈病基因 *Lr10* 的克隆就是利用同源序列扩增法克隆抗病基因的首次报道^[25]。相较前两种方法,RGA 法是一种简捷、有效的克隆抗病基因的方法。

RGA 是个庞大的基因家族,从基因组中分离的 RGA 可能会存在内含子,是不表达的假基因,而从 cDNA 中分离的 RGA 不含内含子,这将更有利于抗病基因的筛选。本研究就是根据 NBS - LRR 型抗病基因保守结构域 P - loop 和 GLPL 区设计简并引物,以接菌向日葵锈病的抗病品种 CM29 叶片的 cDNA 为模板进行扩增,通过克隆转化得到 10 条 HaRGA,经分析这些序列均具有连续的 ORF,编码的氨基酸序列均具有典型的 NBS 结构域即:P - loop、kinase - 2a、kinase - 3a 和 GLPL 结构,且与已知的 NBS 型抗病基因具有很高的相似性,因此推测所获得的 HaRGA 很可能是抗病基因的一部分或与抗病基因紧密连锁。经过系统进化树分析,发现 HaRGA 分为两大类型即 TIR - NBS - LRR 和 non - TIR - NBS - LRR,这与前人报道的双子叶植物中存在两类 NBS - LRR 型抗病基因的结果一致,其中大部分 HaRGA 都为 non - TIR - NBS - LRR。对所得的 HaRGA 进行相似性分析,HaRGA 编码氨基酸水平之间的相似程度为 28.9% ~ 80.5%,可见向日葵 RGA 具有广泛遗传多样性,这些结果将为向日葵抗病基因的克隆奠定基础。目前,我们正通过 RACE 技术对筛选出来的部分 HaRGA 进行 cDNA 全长扩增,对其基因功能进行进一步验证。

参考文献:

- [1] 葛玉彬,陈炳东,卯旭辉,等. 油用向日葵主要经济性性状遗传及其相关分析[J]. 中国油料作物学报,2013,35(5):515 - 523.
- [2] Middleton K J, Obst N R. Sunflower rust reduces yield[J]. Australasian Plant Pathology,1972,1(3):18.
- [3] 刘双平,袁亮,胡俊. 内蒙古向日葵病害种类及研究概况[A]. 中国植物病理学会学术年会论文集[C]. 北京:中国农业科学技术出版社,2006. 319 - 323.
- [4] Yu Y G, Buss G R, Maroof M A. Isolation of a super-family of candidate disease - resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide - binding site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1996,93(21):11 751 - 11 756.
- [5] 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(5 565):92 - 100.
- [6] Mago R, Nair S, Mohan M. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping[J]. Theoretical and Applied Genetics,1999,99(1 - 2):50 - 57.
- [7] Dilbirligi M, Erayman M, Sandhu D, et al. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes[J]. Genetics,2004,166(1):461 - 481.
- [8] Traut T W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide - binding sites[J]. European Journal of Biochemistry,1994,222(1):9 - 19.
- [9] Tamura M, Tachida H. Evolution of the number of LRRs in plant disease resistance genes[J]. Molecular Genetics and Genomics,2011,285(5):393 - 402.
- [10] 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]. The Plant Journal,1999,20(3):317 - 332.
- [11] Pan Q, Liu Y S, Budai - Hadrian O, et al. Comparative genetics of nucleotide binding site - leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis* [J]. Genetics,2000,155(1):309 - 322.
- [12] Grant M R, Godiard L, Straube E, et al. Structure of the *Arabidopsis* *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance[J]. Science,1995,269(5 225):843 - 846.
- [13] Bent A F, Kunkel B N, Dahlbeck D, et al. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine - rich repeat class of plant disease resistance genes [J]. Science,1994,265(5 180):1 856 - 1 860. (下转第 523 页)