

小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源 cDNA 序列的分离与鉴定

张立荣, 杨文香, 刘大群

(河北农业大学植物保护学院植物病理系/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要:利用抗病基因的保守结构设计引物,从抗叶锈病近等基因系材料 TcLr24 中扩增出一条 703bp 的条带 RCA1,通过与 GenBank 比对,选取与 RCA1 高度同源的若干条带,在它们共有的保守序列位置设计引物,利用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术扩增抗病同源基因 cDNA 全长。扩增到 3 条全长 cDNA,经 BLASTp 比较,这些序列都含有 NBS 保守结构域和多个 LRR 结构域,与很多已知植物抗病基因的功能相应区域一致。对 *FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 实时定量 PCR 分析,表明这 3 个基因在小麦叶片中都是组成型表达。本研究在小麦材料 TcLr24 中得到 3 条抗病基因同源 cDNA 全长,为研究小麦抗病基因奠定了基础。

关键词:小麦抗叶锈病基因;cDNA 末端快速扩增技术;生物信息学;同源基因

Cloning and Character of Resistance Homologues Contained NBS-LRR in Wheat TcLr24

ZHANG Li-rong, YANG Wen-xiang, LIU Da-qun

(Biological Control Center of Plant Diseases and Pests of Hebei Province/College of Plant Protection,
Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract:Resistance gene cDNA homology sequence from wheat was isolated using homology-based method. The primers were designed according to the conserved sequence of resistance gene analogs and a 703bp fragment was isolated from TcLr24. A few homologous sequences were captured when processing similarity search in GenBank database. We designed primers based on highly conserved region among the above sequences and the rapid amplification cDNA ends(RACE) was used to obtain the full length sequence of disease resistance homology gene in the TcLr24 near isogenetic lines. Three full length cDNA sequences were obtained. BLASTp analysis showed that the deduced amino acids of protein contained a NBS conserved domain and many leucine-rich repeats(LRR) domains, which were identical to the conserved domains of many plant resistance genes. These sequences appeared not to be induced by *Puccinia triticina* and were constitutive genes in the wheat leaf tissue by real-time PCR. In this study, we obtained three resistance homology sequences which provide the short cut for researching of wheat resistance gene.

Key words:Wheat leaf rust resistance gene;Rapid amplification cDNA ends(RACE);Bioinformatics;Homologues

植物抗病基因(resistance gene, R 基因)的克隆是深入了解植物抗病机制和利用基因工程进行植物遗传改良的基础。至今人们已从植物中克隆了 60 余个 R 基因^[1],这些基因抵抗的病原物种类虽然不

同,但它们所编码的蛋白中大多含有如核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)、富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)、亮氨酸拉链结构(leucine zippers, LZ)、跨膜结构域(transmembrane

收稿日期:2010-09-24 修回日期:2011-01-22

基金项目:国家自然科学基金项目(30771391)

作者简介:张立荣,博士研究生,研究方向为分子植物病理学

通讯作者:刘大群,博导,从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。E-mail:ldq@hebau.edu.cn

杨文香,博导,从事分子植物病理学研究。E-mail:wenxiangyang2003@163.com

domain, TM)、Toll 蛋白及白细胞介素-1 受体 (toll-interleukin-1 receptor, TIR)、丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-specific protein kinase, STK) 等保守结构域^[2-4]。利用抗病基因保守结构域设计引物,以植物基因组 DNA 或 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,可以得到该植物的抗病基因类似序列 (resistance gene analog, RGA)。目前已从马铃薯、水稻、拟南芥、小麦、大豆、棉花等 20 多种植物上扩增出一大批抗病基因同源序列^[5-10]。*Lr21*^[11]、*Lr10*^[12]、*Lr1*^[13]和 *Lr34*^[14]是成功克隆到的小麦抗叶锈病基因,其中 *Lr1*、*Lr10* 和 *Lr21* 含有 NBS-LRR 结构。cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 是一种从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 5' 和 3' 末端简单而有效的方法,被广泛用于许多已知功能基因片段的延伸和全长 cDNA 的克隆^[15-20]。TcLr24 是含有抗叶锈病基因 *Lr24* 的单基因系材料,该基因来源于长穗偃麦草 (*Thinopyrum ponticum*, $2n = 70$) (3Ag/3DL) 易位系^[21],对目前我国叶锈菌小种表现高水平的抗性。本研究以非亲和叶锈菌接菌后的抗叶锈病单基因系 TcLr24 小麦为材料,根据抗病基因 NBS-LRR 保守结构域设计特异性引物,利用 RACE 技术,结合生物信息学资源获得 3 条抗病同源基因 cDNA 全长,为研究抗病基因奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

小麦抗叶锈病单基因系 TcLr24 由河北农业大学锈病研究中心提供。供试叶锈菌菌株 88-26-12-4 (BGQQ),对 TcLr24 表现无毒力(表现型“0”)。

1.2 总 RNA 的提取、cDNA 第 1 链的合成、抗病同源片段的扩增

TcLr24 小麦材料盆栽,待幼苗长至第 1 叶完全展开时(7d 左右),采用撒粉法接菌,诱导 0、12、18、24、36、48 和 72 h 分别取样,样品混合后利用 Tiangen 公司 RNA 提取试剂盒,提取叶片总 RNA,并利用 Tiangen 公司的反转录酶进行反转录反应获得第 1 链 cDNA。操作过程依据说明书进行。根据已克隆的植物抗病基因保守结构域设计引物(上游序列:5'-GCGGGTCTGGGAAATCTACC-3',下游序列:5'-CTGCAGTAAGCAAAGCAACG-3'),对反转录所得 cDNA 进行扩增。扩增总体积为 25.0 μ l,包括 cDNA 1.0 μ l, RGA 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, *Taq* DNA 聚合酶

(5U/ μ l) 0.2 μ l, dNTP (40 mmol/L) 0.5 μ l, PCR 补足水 25.0 μ l。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 10 $^{\circ}$ C 保温。

1.3 RACE

1.3.1 RACE 引物的设计 以 RGA1 片段为基础,用 NCBI 提供的 BLASTn 进行比对,选择与 RGA1 片段同源程度较高的 5 条抗病相关基因序列,它们的 GenBank 登陆号分别是 AF158635.1、AF052641.2、AY124651.1、EU327996.1 和 AJ420959.1,用 DNASTar 软件进行序列组装,在它们高度保守序列位置设计 2 条用于 3' RACE 的正向引物:GSP: AGGAGATTGCAGAAAAGCTGAAGGG; NGSP: CAGGCTAGCCGT-TGCTTTGCTTACT。

根据 3' RACE 结果在每条序列非保守区设计序列的 5' RACE 扩增的引物。

GSP1: TGCAATCTCAACCCCAATGTTCTGG

NGSP1: AGAAGGCGGTATCATCAACCTCAGT

GSP2: CTAGAACCCGCAGTTTCGGCAGACT

NGSP2: TAACTCTGAACAAAAAGATGGCGGA

GSP3: TGTCCGAAAGCAAGATATCGTAGA

NGSP3: CTCAACTGCTATCCCTCCAACA

1.3.2 全长基因引物设计 根据 3' RACE 和 5' RACE 的测序结果,获得拼接的全长基因,设计全长引物序列如下。

P1F: CAATTACCATTGCTGCCGTAGGAT

P1R: TCATTCATAAAAATTTCTCGCA

P2F: AGGTATTACAAATACAAAGCTGAT

P2R: GGGCCACATAAACCTTTTCCTG

P3F: GTTGTCATCTACGACTACCGCA

P3R: GAGCCAAAAATACGTAAGAGACTG

1.3.3 RACE-PCR 3' 和 5' RACE 反转录反应使用 SmartTM RACE cDNA Amplification kit (Clontech),按照说明书进行。利用 BD AdvantageTM 2 PCR Enzyme System,分别以 3' RACE cDNA 和 5' RACE cDNA 为模板,进行扩增。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以第 1 轮 PCR 产物稀释液为模板进行巢式 PCR,退火温度为 68 $^{\circ}$ C,程序与第 1 轮 PCR 扩增相同。

1.4 PCR 产物的回收及克隆

PCR 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳,目的 DNA 片段采用 TaKaRa 公司的 PCR 凝胶回收试剂盒回收纯化。PCR 产物连接于 Promega 公司的 pGEM-T 载

体 16℃ 过夜。转化筛选后挑选阳性克隆交上海生物工程公司测序。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

提取非亲和小麦叶锈菌菌株 88-26-12-4 诱导 0、12、24、48、72h 的 TcLr24 小麦叶片总 RNA 分别进行反转录反应。所得各时间点 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应,用于基因的表达分析。每个时间点重复 3 次,以无菌水代替 cDNA 模板作为试验中的阴性对照,为消除各时间点的样品量差异及反转录效率的影响,以小麦中组成型表达的基因 *GAPDH* 作为内参,进行 PCR 扩增比较。

1.6 目的序列的生物信息学分析

将获得的序列与 GenBank 中的序列进行比较和分析,寻找开放阅读框,并推导氨基酸序列。利用 NCBI 和 DNASTar、DNAMAN 等软件进行蛋白结构同源性及功能比较分析。

2 结果与分析

2.1 抗病基因同源片段的获得

以抗病基因保守区域设计的引物 F1 和 R1 在抗病近等基因系 TcLr24 中扩增出 1 条 703bp 的条带(图 1),经克隆和测序,获得 1 条 702bp 的通读序列,

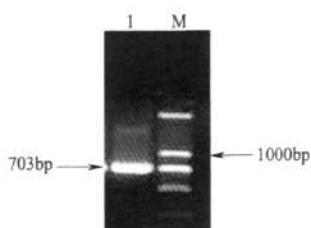


图 1 引物 F1/R1 扩增的结果

Fig. 1 Amplification profile of primers F1/R1

1: TcLr24; M: marker DL2000

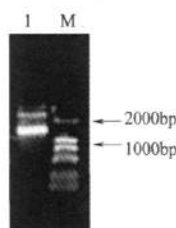


图 2 3' RACE 扩增产物

Fig. 2 The 3' RACE-PCR product

1: TcLr24 的 3' RACE; M: marker DL2000

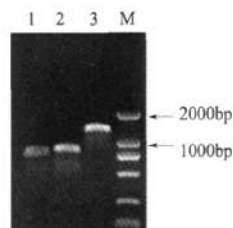


图 3 5' RACE 扩增产物

Fig. 3 The 5' RACE-PCR product

1; 5-1; 2; 5-2; 3; 5-3; M: marker DL2000

2.3 基因 cDNA 全长的获得

将 5' RACE、3' RACE 用 DNAMAN 的 Sequence Assembly 程序进行拼接,为了验证拼接获得的基因序列,分别在拼接序列的 ORF 外侧设计特异性引物,以 TcLr24 的 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,获得了 3 条大于 2 kb 的扩增片段(图 4)。将这 3 条片段克隆测序,测序结果和拼接序列基本一致,分别命名为 *FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3*。*FRGA-1* 序列包含 2772bp 的开放读码框,编码 924 个通读的蛋白质氨基酸序列;*FRGA-2* 序列 2400bp 的开放读码框,编码 799 个通读的蛋白质氨基酸序列;*FRGA-3* 序列包含 2184bp 的开放读码框,编码 728 个通读的蛋白

推导出氨基酸的序列长度为 234 个氨基酸,命名为 RGA1。BLASTn 同源性比较表明,该片段与小麦中 V6 抗性基因(*v6*)同源性为 91%,与粗山羊草胞囊线虫抗性基因(*Cre3*)同源性为 88%,与小麦、大麦及圆锥小麦中一些 NBS-LRR 类型抗病基因有很高的同源性。选取同源性最高的 5 条片段用 DNAMAN 与 RGA1 进行比对,发现 RGA1 与这些基因具有高度保守序列。

2.2 RACE 的扩增结果

以 3' RACE 引物进行巢式 PCR 扩增获得 2 条大于 2000bp 片段和 1 条小于 2000bp 片段(图 2)。经克隆测序得到 3 条不同的 3' RACE 产物,分别命名为 3-1、3-2 和 3-3。其中 3-1 长为 2081bp,包含 26bp 的 pol(A) 尾;3-2 长为 1954bp,包含 26bp 的 pol(A) 尾;3-3 长为 1580bp,包含 25bp 的 pol(A) 尾。其中 3-2 可以与最初获得的 RGA1 完全拼接重叠。这 3 条序列的 5' RACE 经巢式 PCR 扩增获得 3 条片段(图 3),分别命名为 5-1、5-2 和 5-3。经测序分析,5-1 为 1554bp,5-2 为 1023bp,5-3 为 885bp,都有起始密码子。采用 DNA-MAN5.0 的 Sequence Assembly 程序对 3' RACE 与 5' RACE 测序结果分别进行拼接,得到 3 条拼接序列。这 3 条序列均具有完整的开放阅读框。

质氨基酸序列。

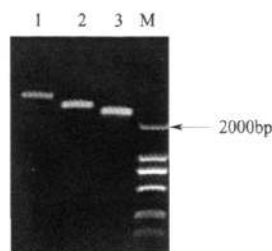


图 4 全长片段的电泳图

Fig. 4 The pattern of the PCR product using the primers based on full length on electrophoretic gel

1: *FRGA-1*; 2: *FRGA-2*; 3: *FRGA-3*; M: marker DL2000

2.4 基因编码蛋白质氨基酸的结构分析

利用 NCBI 的 BLAST 工具对 *FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 基因编码的蛋白质序列进行同源性检索,结果表明,*FRGA-1* 与普通小麦抗胞囊线虫蛋白有高达 96% 同源性。有多个植物抗病相关蛋白与 *FRGA-2* 具有同源性,其中同源性最高的是偏凸山羊草 V6 基因蛋白(84%),其次是圆锥小麦 *Cre3* 候选基因蛋白(76%)和推定的粗山羊草中 NBS-LRR 类型病害抗性蛋白(76%),另外,*FRGA-2* 与普通小

麦、水稻、玉米等很多植物的抗病同源蛋白也有较高的同源性,而且与已经克隆的抗叶锈基因 *Lr21* 的蛋白也有 44% 的同源性。*FRGA-3* 与圆锥小麦 *Cre3* 候选基因蛋白有较高的同源性(95%)。

FRGA-1、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 基因的 LRR 保守结构符合胞内 LRR 重复“LXXLXXLXXXXCXXL”序列模式,而且具有 NBS、LRR 和 HD 等一系列植物抗病基因的保守结构域(图 5)。

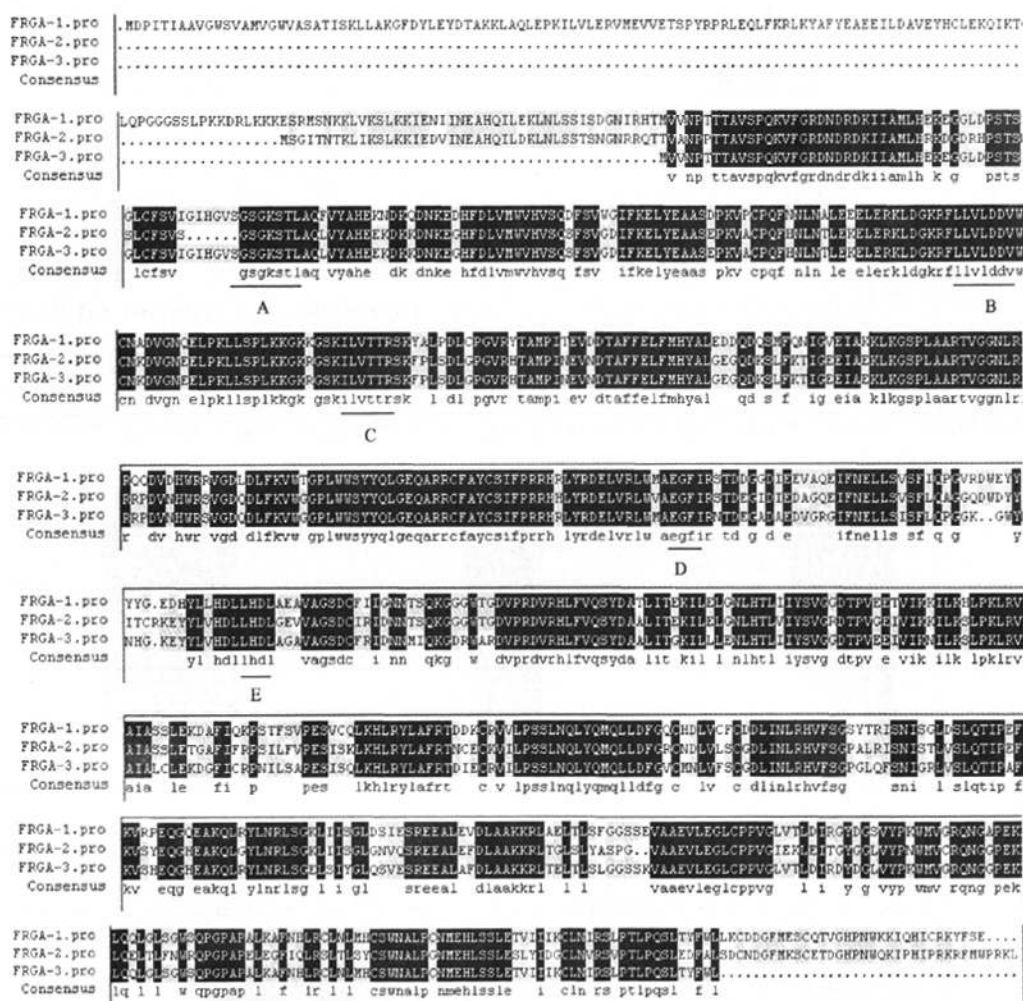


图 5 *FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 编码蛋白的比对结果

Fig. 5 The intercomparison BLAST of *FRGA-1*, *FRGA-2* and *FRGA-3* proteins

A ~ E: 保守结构域; A ~ E underlined: conserved domains

2.5 小麦叶锈菌接种处理对 *FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 基因表达的影响

为了探明在叶锈菌感染小麦的过程中,*FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 基因表达模式,进行了实时定

量 PCR 分析。在叶锈菌感染小麦的过程中,表明 *TcLr24* 在接菌 72h 内,*FRGA-1*、*FRGA-2* 和 *FRGA-3* 基因均有表达,而且各个时间点的表达水平基本一致,差异不显著。说明在取样时间范围内,*TcLr24*

不受小麦叶锈菌的诱导,这3个基因均为组成型表达(图6)。

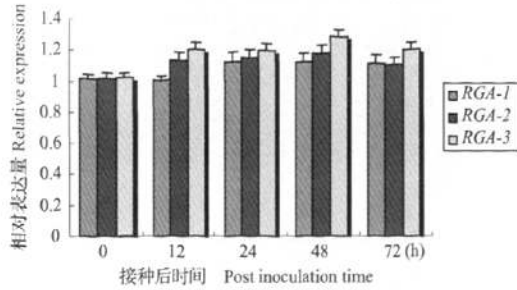


图6 叶锈菌诱导表达结果

Fig. 6 Effect on the expression of gene by inoculating with *Puccinia triticina*

3 讨论

利用同源克隆技术,可获得很多抗病基因同源序列^[22-25],分析已知植物抗病基因编码的蛋白质结构域可分为四大类:(1)NBS-LRR类型的胞内受体蛋白基因;(2)丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STK)基因;(3)含有胞外LRR结构和胞内STK结构的跨膜受体蛋白基因;(4)同时含有胞外LRR和胞内STK结构的跨膜受体蛋白基因。其中以NBS-LRR类型的R基因最多,比如拟南芥的RPS2^[26]、番茄的I2^[27]、亚麻的M^[28]、水稻的Xa1^[29]、小麦的Cre3^[30]、小麦的Lr21和Lr10等。小麦抗叶锈病基因Lr10是第一个利用同源序列克隆的抗病基因。NBS结构域能够结合ATP或GTP,在植物抗病反应中具有重要的作用。LRR结构域参与蛋白与蛋白的相互作用,在抗性蛋白中识别受体。本研究利用NBS-LRR类型抗病基因保守序列设计引物,扩增的同源片段RGA1,在GenBank库中进行相似性检索,结果发现RGA1存在高度同源的若干序列,其中有部分序列完全相同,那么这些序列在功能上可能有协同性或相似性,于是结合这些生物信息学资源,在高度保守的序列设计RACE引物,通过cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)锚定Poly(A)尾可以获得多条全长序列。如果一个基因是多基因家族的成员,用基因特异引物(GSP)可能同时扩增出几个同源的cDNA。

本研究在TcLr24小麦中克隆了FRGA-1、FRGA-2和FRGA-3基因cDNA全长。利用SMART进行基因结构分析发现,小麦FRGA-1、FRGA-2和FRGA-3基因推导的蛋白具有典型的NB-ARC结构域,也是

P-loop NTP酶超基因家族。而这个结构域也是NBS-LRR类植物抗病基因的典型特征,如抗叶锈基因Lr21编码的蛋白中就存在2个NB-ARC的保守结构和ATP酶超基因家族结构。NBS在许多蛋白质中具有ATP或GTP结合活性,R基因中NBS结构域的高度保守性说明核苷酸结合对R基因发挥功能是必不可少的。LRR结构域在蛋白质的相互作用中起重要作用,它不仅参与抗病反应的识别,还与识别以后的抗病信号的传导有关,已克隆的绝大多数R基因均具有LRR结构域。对FRGA-1、FRGA-2和FRGA-3基因编码产物的结构分析表明为单子叶植物所特有的CC-NBS-LRR类抗病相关类似蛋白。

在植物中,含LRR的蛋白在细胞生长发育、抗病反应过程中起着重要作用,主要有类受体蛋白激酶、R基因编码蛋白和多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白。这表明在不同类别的抗病基因中,LRR的作用方式有可能不同^[31-32]。FRGA-1、FRGA-2、FRGA-3基因编码产物含有12个完整的LRR重复序列,符合胞内LRR的结构特征,属于nonTIR-NBS-LRR抗病基因,编码胞外受体相关蛋白。比较FRGA-1、FRGA-2和FRGA-3编码的蛋白在NBS结构上差异很小,具有高度同源性,而在LRR区编码的蛋白差异很大,LRR区域更能准确地代表基因,很可能这3个基因属于功能不同的基因类型。

Seah等^[33]研究发现小麦中抗线虫基因CreX的位点与抗锈基因群(Sr38、Yr17和Lr37)紧密连锁,来源于大麦中的一个RGA在小麦中与小麦D基因组上Cre3的抗病候选同源序列紧密连锁,且具有很高的同源性,这个RGA很可能属于抗病超基因家族成员,命名为偏凸山羊草V6^[34]。有趣的是本试验利用RACE技术克隆出来的这3个基因,除FRGA-1与已经克隆出来的普通小麦抗胞囊线虫蛋白^[35]有高达96%同源性以外,FRGA-2与偏凸山羊草V6基因蛋白有84%的同源性,与推定的粗山羊草中NBS-LRR类型病害抗性蛋白也有76%的同源性。FRGA-3与V6基因也具有60%的同源性,很可能FRGA-2和FRGA-3就是D染色体上抗病基因本身或者是超基因家族中抗病基因的成员。

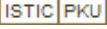
荧光定量PCR的结果表明小麦叶锈菌接种处理对FRGA-1、FRGA-2和FRGA-3基因的表达并没有产生明显的影响,这与王海燕等^[36]对小麦中一个NBS类型的抗病同源基因的研究结果是一致的。另外张楠等^[37]也证实了在TcLr19中的一类抗病同源基因是属于组成型表达模式。这些基因如何与抗

病基因相互作用,以及基因的精确定位,还有待进一步明确。

参考文献

- [1] Dilbirigi M, Erayman M, Sandhu D, et al. Identification of wheat chromosomal regions containing ex-expressed resistance gene [J]. *Genetics*, 2004, 166: 461-481
- [2] 刘继梅,程在全,杨明擎,等.云南3种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(3): 273-280
- [3] Michal R, Doris B, Jonathan D. The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2009, 22(2): 157-165
- [4] Andris K, Robert B, Jayaveeramuthu N. Barley stem rust resistance genes: structure and function [J]. *Plant Genom*, 2009, 2(2): 109-120
- [5] Lee S Y, Seo J S, Rodriguez-lanetty M, et al. Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species [J]. *Mol Genet Genom*, 2003, 269: 101-108
- [6] 张增艳,许泉升,刘耀光,等.利用中间偃麦抗病基因同源序列分离黄矮病抗性候选基因克隆[J]. *作物学报*, 2004, 30(3): 189-195
- [7] Martinez Zamora M G, Castagnaro J C, Diaz Ricci J C. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RCA) from cultivated and wild strawberries [J]. *Mol Genet Genom*, 2004, 272: 480-487
- [8] Irigoyen M L, Loarca Y, Fominaya A, et al. Isolation and mapping of resistance gene analogs from the *Avena strigosa* genome [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 7139-7240
- [9] Bayram Y, James C. Orgaization and evolution of resistance gene analogs in peanut [J]. *Mol Genet Genom*, 2005, 274: 248-263
- [10] Xu Q, Wen X P, Deng X. Isolation of TIR and non TIR 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: 819-830
- [11] Huang L, Steven A, Wanlong L. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat [J]. *Genetics*, 2003, 164: 655-664
- [12] Catherine F, Silvia T, Nils S. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15253-15258
- [13] Cloutier S, Brent D, Caroline L, et al. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the largepsr567 gene family [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 93-106
- [14] Simon G K, Evans S L, Wolfgang S, et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat [J]. *Science*, 2009, 323: 1360-1363
- [15] 田振东,柳俊,谢从华. cDNA 文库与 RACE 方法结合克隆一个马铃薯病程相关蛋白基因 cDNA [J]. *遗传学报*, 2003, 30(11): 996-1002
- [16] 王邦俊,王强,张志刚. 利用 RACE 技术扩增大豆抗病基因同源 cDNAs' 末端序列 [J]. *遗传*, 2003, 25(4): 425-427
- [17] 李红,孟薇,邵勇. 利用 RACE 技术和生物信息学资源快速约取多个候选同源基因 [J]. *生物技术通讯*, 2001, 12(4): 257-259
- [18] 李广存,金黎平,王晓武. cDNA 文库与 RACE 方法结合克隆马铃薯 *DnaJ-like* 基因全长 cDNA [J]. *园艺学报*, 2007, 34(3): 649-654
- [19] Chen H, Vierlenn R. A molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families [J]. *Plant Sci*, 2000, 150(2): 129-137
- [20] 陈渝萍,薛社普. 应用改进的 SSP 抑制 PCR 技术扩增 cDNA 片段旁侧序列 [J]. *基础医学与临床*, 1999, 19(4): 1-5
- [21] Sears E R. Agropyron-wheat transfers induced by homoeologous pairing [C] // Proceeding of the 4th International Wheat Genetics Symposium. Columbia, USA: University of Missouri, 1973: 191-199
- [22] Mago R, Nari S, Mohan M. Resistance gene analogue from rice: cloning, sequencing and mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 50-57
- [23] Kanazin V, Marek L F, Shoemaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11746-11750
- [24] Shen K A, Meyers B C, Islam-Faridi M N, et al. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to cluster of resistance genes in lettuce [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, 11: 815-823
- [25] Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Characterization of disease resistance gene-like sequence in near-isogenic lines of tomato [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 331-338
- [26] 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: 1089-1099
- [27] Ori N, Eshed Y, Paran I, et al. The *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat super-family of plant resistance genes [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(4): 521-532
- [28] Anderson P A, Lawrence G J, Morrishi B C, et al. Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region [J]. *Plant cell*, 1997, 9: 641-651
- [29] Yoshimura S, Yamamouchi U, Katayose Y, et al. Expression of *Xal*, a bacterial inoculation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 40: 659-665
- [30] Laudah E S, Moullet O, Appels R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat [J]. *Genome*, 1997, 40: 659-665
- [31] 秦跟基,李万隆,陈佩德. 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展 [J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(3): 102-107
- [32] 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
- [33] Seah S, Spelmeyer W, Jahier J, et al. Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13(3): 334-341
- [34] Seah S, Sivasithamparan K, Karakousis A, et al. Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 937-945
- [35] Zhai X G, Liu Y, Liu Y H, et al. Characterization and expression profiling of a novel cereal cyst nematode resistance gene analog in wheat [J]. *Mol Biol*, 2008, 42(6): 960-965
- [36] 王海燕,刘大群,杨文香. 1 个小麦 NBS 类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与鉴定 [J]. *植物病理学报*, 2009, 39(5): 507-513
- [37] 张楠,王海燕,刘大群. 小麦 NBS 类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与特征分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(5): 605-610

小麦NBS-LRR类抗病基因同源cDNA序列的分离与鉴定

作者: 张立荣, 杨文香, 刘大群, ZHANG Li-rong, YANG Wen-xiang, LIU Da-qun
作者单位: 河北农业大学植物保护学院植物病理系/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定, 071001
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2011, 12(3)

参考文献(37条)

1. 张楠;王海燕;刘大群 [小麦NBS类抗病基因同源cDNA序列的克隆与特征分析](#) 2010(05)
2. 王海燕;刘大群;杨文香 [1个小麦NBS类抗病基因同源cDNA序列的克隆与鉴定](#) 2009(05)
3. Zhai X G;Liu Y;Liu Y H [Characterization and expression profiling of a novel cereal cyst nematode resistance gene analog in wheat](#) 2008(06)
4. Seah S;Sivasithamparam K;Karakousis A [Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley](#)[外文期刊] 1998(5/6)
5. Seah S;Spelmeyer W;Jahier J [Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat](#) 2000(03)
6. 王友红;张鹏飞;陈建群 [植物抗病基因及其作用机理](#) 2005(01)
7. 秦根基;李万隆;陈佩度 [植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展](#) 1999(03)
8. Laudah E S;Moulet O;Appels R [Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the Cre3 nematode resistance locus of wheat](#) 1997
9. Yoshimura S;Yamamouchi V;Katayose Y [Expression of Xal, a bacterial inoculation](#) 1997
10. Anderson P A;Lawrence G J;Morrishi B C [Inactivation of the flax rust resistance gene M associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region](#) 1997
11. Ori N;Eshed Y;Paran I [The 12 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat super-family of plant resistance genes](#) 1997(04)
12. Mindrinos M;Katagiri F;Yu G L [The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats](#) 1994
13. Ohmori T;Murata M;Motoyoshi F [Characterization of disease resistance gene-like sequence in near-isogenic lines of tomato](#) 1998
14. Shen K A;Meyers B C;Islam-Faridi M N [Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to cluster of resistance genes in lettuce](#) 1998
15. Kanazin V;Marek L F;Shoemaker R C [Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean](#) [外文期刊] 1996(21)
16. Mago R;Nari S;Mohan M [Resistance gene analogue from rice: cloning, sequencing and mapping](#)[外文期刊] 1999
17. Sears E R [Agropyron-wheat transfers induced by homoeologous pairing](#) 1973
18. 陈渝萍;薛社普 [应用改进的SSP抑制PCR技术扩增eDNA片段旁侧序列](#) 1999(04)
19. Chen H;Vierlinn R [A molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families](#)

2000(02)

20. [李广存;金黎平;王晓武 eDNA文库与RACE方法结合克隆马铃薯DnaJ-like基因全长eDNA](#) 2007(03)
21. [李红;孟薇;邵勇 利用RACE技术和生物信息学资源快速钓取多个候选同源基因](#) 2001(04)
22. [王邦俊;手强;张志刚 利用RACE技术扩增大豆抗病基因同源eDNA5'末端序列](#) 2003(04)
23. [田振东;柳俊;谢从华 cDNA文库与RACE方法结合克隆一个马铃薯病程相关蛋白基因eDNA](#) 2003(11)
24. [Simon G K;Evans S L;Wolfgang S A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat](#) 2009
25. [Cloutier S;Brent D;Caroline L Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat \(Triticum aestivum L.\) is a member of the largepsr 567 gene family](#) 2007
26. [Catherine F;Silvia T;Nils S Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat \(Triticum aestivum L.\) genome](#) 2003(25)
27. [Huang L;Steven A;Wanlong L Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat](#) 2003
28. [Xu Q;Wen X P;Deng X Isolation of TIR and non TIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose\(Rosa roxburghii Tratt\)](#) 2005
29. [Bayram Y;James C Orgaization and evolution of resistance gene analogs in peanut](#) 2005
30. [Irigoyen M L;Loarce Y;Fominaya A Isolation and mapping of resistance gene analogs from the Avena strigosa genome](#) 2004
31. [Martinez Zamora M G;Castagnaro J C;Diaz Ricci J C Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues \(RGA\) from cultivated and wild strawberries](#) 2004
32. [张增艳;许景升;刘耀光 利用中间偃麦抗病基因同源序列分离黄矮病抗性候选基因克隆](#) 2004(03)
33. [Lee S Y;Seo J S;Rodriquez-lanetty M Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species](#) 2003
34. [Andris K;Robert B;Jayaveeramuthu N Barley stem rust resistance genes:structure and function](#) 2009(02)
35. [Michal R;Doris B;Jonathan D The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death in-duction](#) 2009(02)
36. [刘继梅;程在全;杨明攀 云南3种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析](#) 2003(03)
37. [Dilbirligi M;Erayman M;Sandhu D Identification of wheat chromosomal regions containing ex-pressed resistance gene](#)[外文期刊] 2004(1)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201103016.aspx