

甘薯 NBS 类抗病基因类似物的分离与序列分析

陈观水^a, 周以飞^b, 林生^b, 潘大仁^{a*}

(福建农林大学, a. 生命科学学院; b. 作物科学学院, 福州 350002)

摘要: 利用已克隆植物抗病基因 NBS (Nucleotide binding site) 序列中的保守模体(motif) “P-loop” 和 “GLPL” 合成简并引物, 以甘薯(*Ipomoea batatas*)栽培品种青农 2 号基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 通过 T/A 克隆、测序和序列分析, 共得到 15 条具有连续 ORF 的抗病基因类似物(Resistance gene analogues, RGAs)序列, 它们之间核苷酸序列间的相似性系数在 41.2%–99.4% 之间, 而相应推测的氨基酸序列间的相似性系数在 20.6%–100% 之间, 同时对分离的 RGAs 的核苷酸和氨基酸序列进行系统发育树分析, 表明甘薯 RGAs 可分为 TIR (Drosophila Toll or human interleukin receptor-like) 和 nonTIR 两类。对甘薯 RGAs 和 5 个已克隆植物 NBS 的氨基酸序列进行结构分析表明, 它们包括 “P-loop”、“Kinase-2”、“Kinase-3a”、“GLPL” 4 个抗病基因所共有的保守模体。这些表明甘薯与其它物种的 NBS 类 RGAs 可能具有同样的起源和进化机制。

关键词: 甘薯; NBS; 抗病基因类似物; 基因分离; 序列分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)05-0359-07

Isolation and Sequence Analysis of NBS-type Resistance Gene Analogues in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

CHEN Guan-shui^a, ZHOU Yi-fei^b, LIN Sheng^b, PAN Da-ren^{a*}

(Fujian Agriculture and Forestry University; a. College of Life Science; b. College of Crop Science, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Degenerate primers based on conserved motif (P-loop and GLPL) of the nucleotide binding site (NBS) region from the cloned plant disease resistance genes were used to isolate resistance gene analogues (RGAs) from genomic DNA of the sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivar Qingnong No. 2. The desired bands (~500 bp) were purified from the gel, and then cloned by T/A cloning. After sequencing and analyzing by alignment, 15 RGAs with uninterrupted open reading frames (ORFs) were obtained. Sequence identity among the 15 RGA nucleotide sequences ranged from 41.2% to 99.4%, while the 15 RGAs deduced amino acid sequences showed identity ranged from 20.6% to 100%. The phylogenetic analyses for RGA nucleotide sequences and the deduced amino acids showed that RGAs from sweet potato were divided into two groups, TIR (Drosophila Toll or human interleukin receptor-like) type and nonTIR type. The analysis of RGAs amino acid sequence structures suggested that they contained the domains such as P-loop, Kinase-2, Kinase-3a, and GLPL. These results showed that NBS type RGAs isolated from sweet potato might have the same origin and mechanism of evolution as that in other plants.

Key words: Sweet potato; NBS (nucleotide binding site); RGA (resistance gene analogues); Gene isolation; Sequence analysis

收稿日期: 2006-03-29 接受日期: 2006-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(30370900); 福建省科技攻关计划重大项目(2003N001)资助

* 通讯作者 Corresponding author

植物在生长过程中常会受到病原微生物的侵袭,为了抵御外来微生物的危害,植物在长期的进化过程中,形成了一系列复杂的抗病防御机制,如:由于植物先天性结构屏障和固有的毒性化合物的存在而表现的非寄主抗性,以及植物由于抗病基因(Resistance gene, R)的存在而表现出的局部或系统抗性^[1-3]。因此,克隆与分析植物抗病基因,对阐明植物抗病性的分子机制及改良作物抗病性具有重要的意义。

目前已从植物中分离到近 50 个抗病基因,通过对其产物分析发现这些抗病基因编码的产物存在极其相似的结构域,如核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)、富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRR)、丝氨酸/苏氨酸激酶(serine-threonine kinase, STK)、亮氨酸拉链结构(leucine zippers, LZ)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)、Toll 白介素-1 区域(Toll-interleukin-1 region, TIR)等。根据其产物中保守结构域的不同,可将抗病基因分成 5 类,其中 NBS 类是已分离抗病基因中最大的一类,它们广泛存在于植物的基因组中^[3-5]。由于所有 NBS 类抗病基因都含有许多保守模体(conserved motif),如 NBS 区域中的“P-loop”、“GLPL”等,这为基于同源序列的 NBS 类抗病候选基因的克隆提供了理论上的可能性。Kanazin^[6]和 Yu^[7]报道用抗病基因产物的保守序列为引物扩增 R 基因类似序列(resistance gene analogues, RGA)后,目前已在大豆(*Glycine max* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、花生(*Arachis hypogaea* L.)等近 20 种植物中分离到了许多抗病基因类似物(resistance gene analogues, RGAs)序列^[6-9],并对其起源、多样性和进化机制进行了研究。

甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 是双子叶植

物,属于旋花科(Convolvulaceae)甘薯属,是重要的粮食、饲料、工业原料及植物能源作物。我国是世界上栽培面积最大的甘薯生产国,年生产量约 1.0×10^8 t,约占世界甘薯总产量的 85.0%^[20-21]。甘薯病害对甘薯产量与品质造成很大的影响,如甘薯线虫病和病毒病。由于甘薯是同源六倍体,基因组庞大且复杂,迄今对甘薯抗病基因的分子克隆及抗病基因进化研究还未见报道。本研究根据其它植物的抗病基因编码产物的保守序列设计简并引物,通过 PCR 扩增从甘薯基因组中分离抗病基因类似物(RGAs),以分析甘薯 RGAs 序列的多样性及进化关系,为深入研究甘薯抗病基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

植物材料为抗根结线虫病的甘薯品种青农 2 号,由广东省农业科学院作物研究所提供。

1.2 甘薯基因组 DNA 的提取及简并引物的设计

甘薯基因组 DNA 提取,根据郭金平等^[20]的方法稍作修改。简并引物根据 *Grol-4*, *Gpa-2*, *Mi-1.1* 等抗病基因所编码产物的 NBS 区域的保守序列设计,引物由华大基因—上海鼎安生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3 PCR 扩增及产物的克隆与测序

PCR 扩增反应总体积为 20 μ l,其中包含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 100 μ mol/L dNTPs, 0.3 μ mol/L 引物浓度, DNA 模板 50 ng μ l⁻¹, *Taq* 酶 1.5 U。

将样品放入 Eppendorf DNA 扩增仪中进行 PCR 扩增。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环;94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸

表 1 用于扩增的简并引物

Table 1 Degenerate primers used in amplification

引物 Primer	保守氨基酸结构域 Conserved amino acid domain	引物序列 Sequence (5'→3')	简并性 Degeneracy
F3	GGV/I/MGKTT	GGNGGNRTHGGNAARACHAC	2304
F6	GGV/I/MGKTT	GGNGGNRTNGGNAARACNAC	4096
B1	GL/FPL/FA/VL	AKWGCYARRGGDARYCC	576
B2	GL/FPL/FA/VL	GCMRCCARAGGMARYCC	64

F: 正向引物 Forward primer; B: 反向引物 Reverse primer. N=A/T/C/G; M=A/C; W=A/T; S=C/G; Y=C/T; K=G/T; V=A/C/G; H=A/C/T; D=A/G/T; R=A/G.

10 min.

扩增产物在含有 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 溴化乙锭(etidium bromide, EB)的 1.5%琼脂糖凝胶上用 1 \times TAE 电泳缓冲液电泳分离,片段回收采用 PCR Fragment Recovery Kit (TAKARA 公司)试剂盒。回收产物用 pMD-18T Cloning Kit (TAKARA 公司)试剂盒连接,氯化钙法转化 *E. coli* DH 5 α 的感受态细胞,涂于含有 IPTG, X-gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取白色菌落,接种于 LB 液体培养基,并用相应引物进行 PCR 检测。有插入片段的阳性克隆送 TAKARA 公司进行测序。

1.4 序列分析

测序获得的核苷酸序列采用 BLAST 程序在 GenBank 上进行相似性搜索,然后利用 DNAMAN 6.0 查找 ORF 并翻译成氨基酸序列,再用 Clustal W 1.8 分别进行核苷酸序列与氨基酸序列的排列,最后用 Mega 3.1 构建系统发育树并用 Bootstrap 法评估系统发育树的可靠性。用于氨基酸序列比较的抗病基因有:*Mi-1.1*(AF039681)、*N*(U15606)、*M*(U73916)、*Grol-4*(AY196151)、*Gpa-2*(AF195939)。

2 结果和分析

2.1 甘薯 RGAs 的分离与鉴定

对根据抗病基因的氨基酸保守结构域合成的

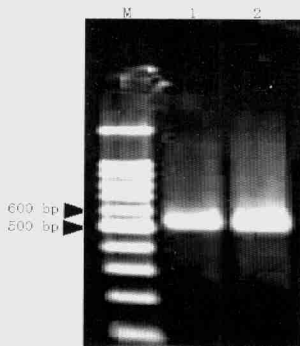


图1 甘薯简并引物的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR amplification of degenerate primers for sweet potato

M: 100 bp DNA Ladder; 1: F3-B2 引物组合 F3-B2 primer combination; 2: F6-B1 引物组合 F6-B1 primer combination

简并引物进行组合,以甘薯抗根结线虫品种青农 2 号基因组 DNA 为模板进行扩增。引物组合 F3-B2 和 F6-B1 都扩增出一条约 500 bp 的条带(图 1),而其它引物组合未扩增出任何条带。对该扩增产物进行回收、克隆,随机测序其中的 20 个克隆,利用 BLASTX 程序鉴定得到 NBS 序列 15 条,并提交给 GenBank,登录号为 DQ341401-DQ341404, DQ341406, DQ341407, DQ377949-DQ377957。另 5 条序列中有的与果胶酯裂解酶、烟草 ABC 转运器(ABC transporter)蛋白具有较高的相似性,或完全找不到相似序列。获得的 15 条 NBS 序列(分别命名为 RGA1-RGA15)中全部具有连续的可阅读框(ORF),且含有引物设计的两个保守结构域,同时没有发现任何可剪接位点(Splicing site)。

2.2 甘薯 RGAs 的分析

将从甘薯中分离获得的 15 个 RGAs 的核苷酸序列用 Clustal W 1.8 和 Mega 3.1 进行序列多样性分析。从所构建的 N-J 树(图 2)中可以看出,这些 RGAs 序列可分为两大类,第 I 类组成的成员最多,有 13 个 RGAs 序列(RGA2, RGA3, RGA5-RGA15),第 II 类仅有 2 个 RGAs 序列(RGA1, RGA4)。其氨基酸的分析结果也与核苷酸的分析结果一致。15 个 RGAs 的核苷酸序列间的相似性系数在 41.2%~99.4%之间,而相应推测的氨基酸序列间的相似性系数在 20.6%~100%之间(表 2)。

2.3 甘薯 RGAs 的比较分析

将甘薯的 15 个 RGA 的氨基酸序列与已克隆的抗病基因 NBS 区域进行了系统发育树分析。已克隆的抗病基因包括马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)的 *Grol-4*、*Gpa-2* 基因,番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)的 *Mi-1.1* 基因,烟草(*Nicotiana* spp.)的 *N* 基因和亚麻(*Linum usitatissimum* L.)的 *M* 基因。其中, *Mi-1.1* 和 *Gpa-2* 属于 nonTIR-NBS 类的抗病基因,而其它基因属于 TIR-NBS 类抗病基因。从系统发育树可以看出,分离的 15 条 RGAs 序列中, RGA1、RGA4 属于 nonTIR-NBS 类的抗病基因,而其余 13 条 RGAs 序列属于 TIR-NBS 类基因(图 3)。甘薯属于双子叶植物,本研究结果与双子叶植物中同时存在 TIR-NBS 和 nonTIR-NBS 两类抗病基因的研究结果相一致。

利用 Clustal W1.8 对甘薯的 15 条 RGAs 的氨

表 2 甘薯 RGAs 的核苷酸序列与氨基酸序列之间的相似性系数 (%)

Table 2 The similarity percentage among nucleotide sequences and amino acid sequences in sweet potato RGAs

	RGA1	RGA2	RGA3	RGA4	RGA5	RGA6	RGA7	RGA8	RGA9	RGA10	RGA11	RGA12	RGA13	RGA14	RGA15
RGA1	-	43.2	43.0	46.1	43.2	43.8	44.2	44.4	41.2	44.0	44.0	42.2	42.8	42.4	41.8
RGA2	21.6	-	99.0	46.9	99.4	74.7	77.5	78.0	72.6	77.2	73.9	76.6	56.2	52.8	68.9
RGA3	21.6	99.4	-	46.7	99.2	74.9	77.3	78.0	72.6	76.8	74.1	76.2	55.6	52.6	68.7
RGA4	22.8	23.6	23.0	-	46.7	49.3	52.9	48.9	47.4	52.4	50.2	47.8	44.7	46.0	47.5
RGA5	21.6	99.4	100.0	23.0	-	75.3	77.7	78.0	72.8	77.2	74.1	76.8	56.0	53.0	68.9
RGA6	21.7	60.5	61.0	23.8	61.0	-	79.7	83.0	76.3	80.3	79.3	82.4	56.9	52.1	68.8
RGA7	23.8	65.2	65.8	23.1	65.8	69.4	-	82.2	74.7	97.9	90.1	82.8	60.8	55.2	69.8
RGA8	21.1	65.1	65.7	23.1	65.7	74.4	74.5	-	75.5	82.2	81.3	82.6	58.7	52.1	71.1
RGA9	20.6	58.8	59.4	22.5	59.4	66.5	64.2	65.2	-	75.1	75.5	77.3	54.1	52.8	70.0
RGA10	21.6	65.3	65.9	22.4	65.9	71.5	97.5	75.0	64.8	-	90.6	82.1	58.5	53.9	69.3
RGA11	21.0	62.4	63.0	24.2	63.0	72.1	82.9	71.5	63.6	84.4	-	80.2	57.9	52.0	70.1
RGA12	23.5	65.3	65.9	23.6	65.9	75.0	72.8	73.8	67.3	72.8	71.1	-	57.1	52.0	70.9
RGA13	21.7	45.3	44.7	24.4	44.7	45.6	49.4	46.7	40.9	47.1	46.5	47.1	-	63.8	58.6
RGA14	22.2	34.9	35.5	23.3	35.5	38.1	43.2	37.5	38.0	40.2	40.2	41.4	48.5	-	52.1
RGA15	21.1	55.6	56.1	25.5	56.1	56.5	59.2	59.4	57.0	57.9	59.1	57.9	43.5	37.1	-

斜对角右上方为甘薯 RGAs 间核苷酸序列间的相似性系数,斜对角左下方为氨基酸序列间相似性系数。The similarity percentage among nucleotide sequences and amino acid sequences are given above and below the diagonal, respectively.

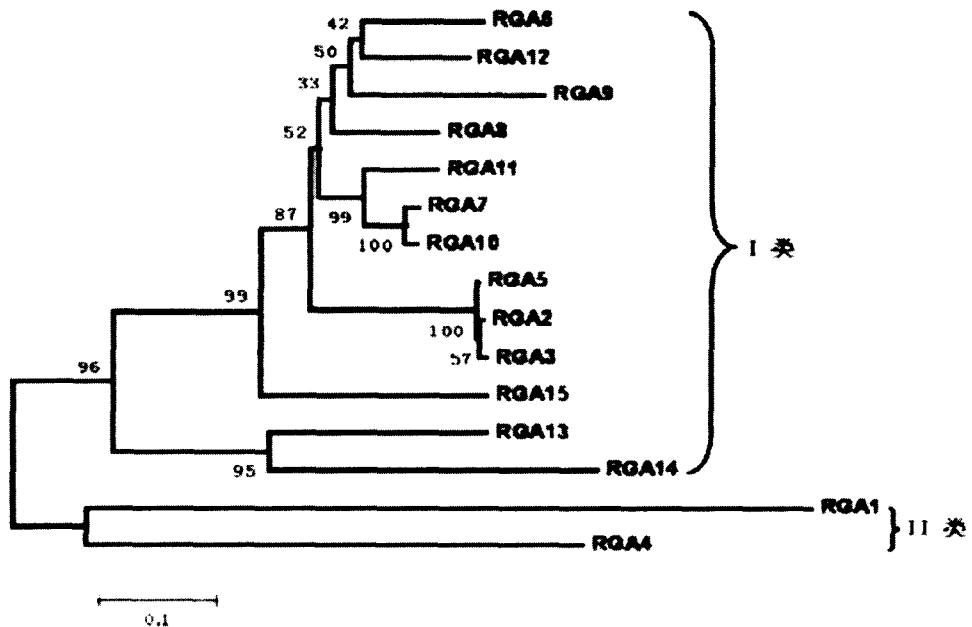


图 2 用邻接法得出的甘薯 RGAs 的核苷酸序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree for nucleotide sequences isolated from sweet potato by neighbor-joining method

氨基酸序列以及 *Gro1-4*、*Gpa-2*、*Mi-1.1*、*N*、*M* 基因的 NBS 区域进行多序列对比分析。结果表明：这些 RGAs 序列具有 NBS 类抗病基因的 4 个保守模体：“P-loop”、“Kinase-2”、“Kinase-3a”和“GLPL”。并且 TIR-NBS 类抗病基因中的 Kinase-2 的共有序

列可总结为(V/L/I)(L/I/V)(L/I/V)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),而在 nonTIR-NBS 中 Kinase-2 的共有序列可总结为(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)(图 4),这与 Meyers 等的研究

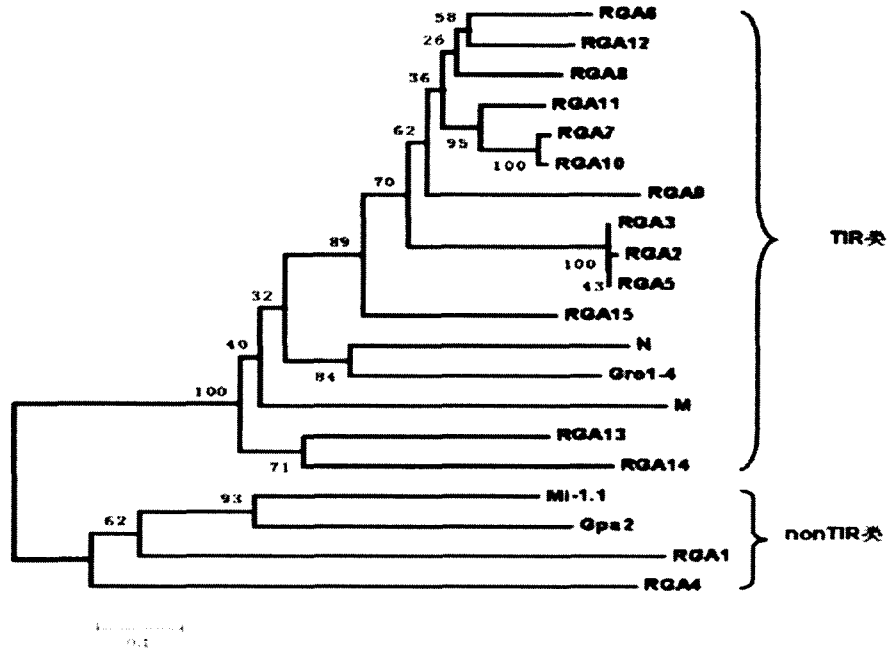


图3 甘薯 RGAs 的氨基酸序列与已克隆抗病基因的 NBS 区域的 N-J 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on alignment of amino acid sequences in sweet potato RGAs and NBS region of isolated disease resistance genes. The numbers on the branches represent bootstrap values (for 1 000 replications).

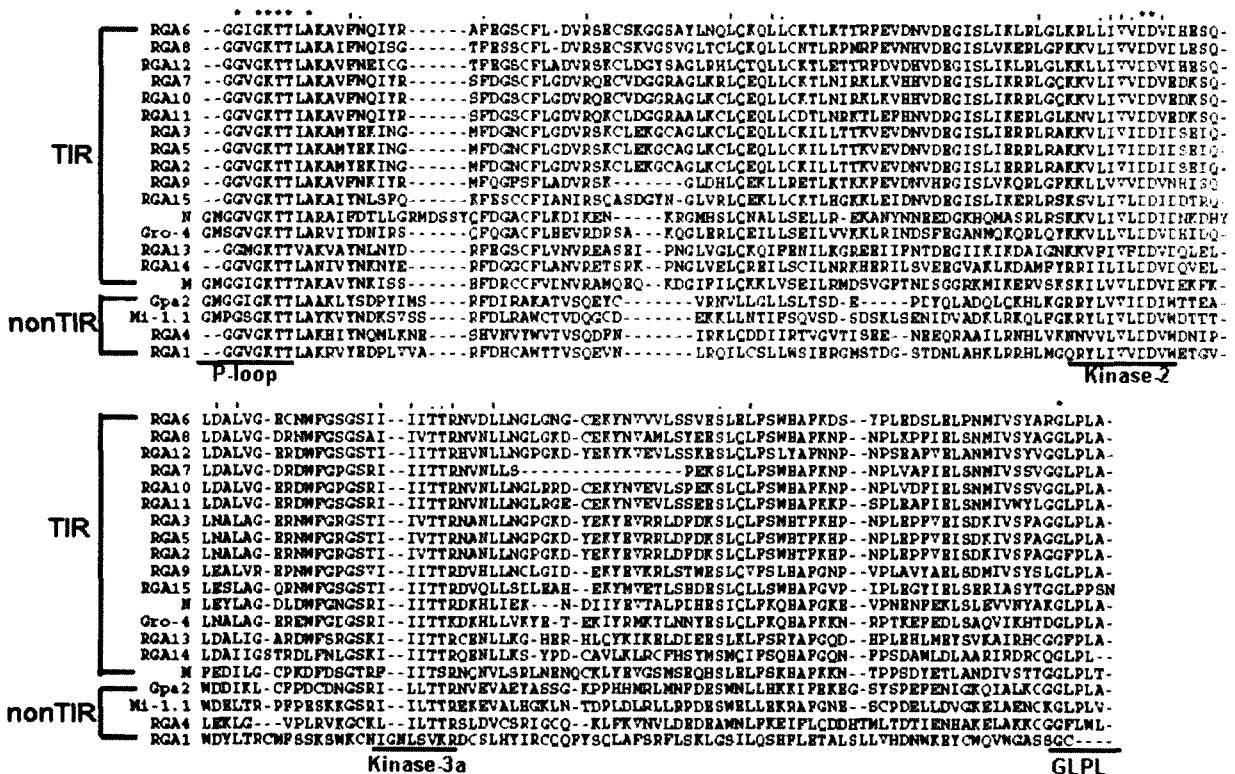


图4 甘薯 RGAs 氨基酸序列与 5 个已知抗病基因 NBS 区域的多重序列比对

Fig. 4 Multiple amino acid sequence alignment in sweet potato RGAs with the NBS region of

five known plant disease resistance genes constructed with Clustal W1.8

最下方的横线表示该区域为两类 RGAs 共同的保守结构域。The mutual domains are denoted by underlines.

结果一致^[22]。

3 讨论

3.1 甘薯 RGAs 的分离与鉴定

利用根据已克隆的植物抗病基因 NBS 区保守结构域设计的简并引物组合 F3-B2 和 F6-B1, 成功地从甘薯中分离到 RGAs。对 15 条 RGAs 的结构分析表明, 这些 RGA 序列中含 NBS 类抗病基因的保守结构域, 如 P-loop、Kinase-2、GLPL 等, 并且这些序列具有连续的可阅读框(ORF)。因此, 这些 RGA 序列中的一部分可能是功能性的抗病基因的部分序列。

获得的其它 5 条序列中, 有的与 ABC 转运器和反转录转座因子有一定的相似性, 这说明 NBS 序列与信号转导因子有一定的进化关系, 同时也说明, 转座子可能在抗病基因进化过程中起了一定的作用。

模式植物全基因的测序结果表明, NBS 类的植物抗病基因在植物基因组中广泛存在。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组中, 1% 的基因为 NBS 类抗病基因, 而在水稻基因组中具有 660 个 NBS 类的抗病基因^[23]。通过相关抗病基因序列的简并引物的设计与 PCR 扩增, 能够有效地研究各种植物的 RGAs。我们的研究表明, 在甘薯基因组中同样含有大量的 NBS 类的序列, 由于甘薯是同源六倍体, 基因组庞大且重复序列多, 有关甘薯分子生物学方面的研究进展缓慢。因此充分利用生物信息学的相关技术研究乃至克隆甘薯抗病基因不失为一条捷径。

3.2 甘薯 RGAs 的多样性及进化关系分析

目前已从近 20 种植物中分离了 NBS 类的植物抗病基因和 RGAs。本研究首次对甘薯中 NBS 类 RGAs 的多样性及复杂度进行研究。分离的 15 个具有连续 ORF 的 RGAs 可分为两个亚类: TIR-NBS 和 nonTIR-NBS。序列之间的相似程度在 41.2%–99.4% 之间, RGA2 与 RGA5 之间具有最高的相似性 (99.4%), RGA1 与 RGA9 之间相似性最低 (41.2%) (表 2), 因此 RGA2 与 RGA5 可能是同来自同一基因的不同拷贝, 而 RGA1 与 RGA9 则可能代表趋异起源 (divergent origins)。研究表明, 在植物基因组中的 RGA 序列的多样性可能是由于不等交

换造成的, 但造成 RGA 序列的多样性和复杂度的遗传机理直接证据还待进一步研究。

遗传学与基因组学的研究为 NBS 类抗病基因的进化及变异产生机理提供了新的见解。目前, 关于植物抗病基因进化的遗传机制主要有两个: 逐步进化趋异 (slowing evolving divergence) 假说和快速进化过程 (rapidly evolving process), 本研究结果为这两个遗传机制提供了一些佐证^[12]。通过对 15 条序列的比对分析表明: 在保守结构之间存在许多点突变, 小片段的插入或缺失事件, 它们是甘薯 RGAs 趋异的源泉, 这与在咖啡 (*Coffea arabica*) 和花生 (*Arachis hypogaea* L.) 中的研究结果相似^[9,10]。这表明, 在甘薯中, NBS 类抗病基因的进化是逐步进化趋异, 而不是快速进化过程, 这与前人关于抗病基因进化的研究结果相符^[22,24]。

本研究首次对甘薯中 RGAs 进行分离研究, 并对甘薯中 NBS 类抗病基因的多样性和进化关系进行了初步的探讨, 还有许多工作还有待于进一步研究, 比如所分离到的 RGAs 与甘薯中抗病基因的关系及甘薯其它类别 RGAs 的分离和进化机制, 甘薯抗病基因的克隆等等。

参考文献

- [1] Han D J (韩德俊), Cao L (曹莉), Chen Y F (陈耀锋), et al. Molecular basic of interaction between disease resistance gene and avirulence gene [J]. Acta Gen Sin(遗传学报), 2005, 32(12):1319–1326. (in Chinese)
- [2] Dong J X(董继新), Dong H T(董海涛), Li D B(李德保). Recent advances on plant disease resistance genes [J]. Acta Phytopathol Sin(植物病理学报), 2001, 31(1):1–9.(in Chinese)
- [3] Yi T Y(易图永), Xie B Y(谢丙炎), Zhang B X(张宝玺), et al. Application of plant resistance gene analogs in cloning and mapping resistance genes [J]. Biotechn Bull(生物技术通报), 2002, (2):16–20.(in Chinese)
- [4] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance gene [J]. Annu Rev Plant Mol Biol, 1997, 48:575–607.
- [5] Luo M(罗敏), Zhu Y L(朱友林), Yu C(余潮), et al. Cloning of the plant resistance genes and their structure and function [J]. Hereditas(遗传), 2000, 22(6):429–433.(in Chinese)
- [6] 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(21):11746–11750.
- [7] Yu Y G, Buss G R, Saghai M M A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21):11751–11756.

- [8] Wang S Q(王世全), Zhang D C(张德春), Li P(李平), et al. Cloning and analysis of a new NBS-LRR resistance gene family in rice [J]. *Acta Gen Sin(遗传学报)*, 2005, 32(7):704-711.(in Chinese)
- [9] Noir S, Combes M C, Anthony F, et al. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees [J]. *Mol Gen Genom*, 2001, 265:654-662.
- [10] Yuksel B, Estill J C, Schulze S R, et al. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut [J]. *Mol Gen Genom*, 2005, 274:248-263.
- [11] Martinez Z M G, Castagnaro A P, Diaz R J C. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries [J]. *Mol Gen Genom*, 2004, 272: 480-487.
- [12] Xu Q, Wen X P, Deng X X. Isolation of TIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular marker linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111:819-830.
- [13] Irigoyen M L, Loarce Y, Fominaya A, et al. Isolation and mapping of resistance gene analogues from *Avena strigosa* genome [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:713-724.
- [14] Hinchliffe D J, Lu Y Z, Potenza C, et al. Resistance gene analogue marker are mapped to homologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110:1074-1085.
- [15] Deng Z, Huang S, Ling P, et al. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequence in *Citrus* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:814-822.
- [16] Tu L L(涂礼莉), Zhang X L(张献龙), Zhu L F(朱龙付), et al. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene analogues in sea-island cotton [J]. *Acta Gen Sin(遗传学报)*, 2003, 30(11):1071-1077.(in Chinese)
- [17] Yaish M W F, Saenz de M L E, Perez de la V M. Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species [J]. *Genome*, 2004, 47: 650-659.
- [18] Leeuwen H V, Garcia-Mas J, Coca M, et al. Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes [J]. *Mol Gen Genom*, 2005, 273:240-251.
- [19] Leister D, Ballvora A, Salamini F. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants [J]. *Nat Genet*, 1996, 13:421-429.
- [20] International Potato Center. International Potato Center Annual Report 2004 [M]. Lima: International Potato Center (CIP), 2004.
- [21] Guo J P(郭金平), Pan D R(潘大仁). PCR detection of nematode resistance in sweet potato [J]. *Acta Agro Sin(作物学报)*, 2002, 28 (2):167-169.(in Chinese)
- [22] 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.
- [23] Yu J, Hu S N, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. *Science*, 2002, 296:79-92.
- [24] Pan Q, Wendel J, Fluhr R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes [J]. *J Mol Evol*, 2000, 50:203-213.