

甜瓜抗霜霉病基因同源序列克隆与分析

李金玉¹ 李冠^{1*} 赵惠新² 王贤磊¹ 颜雪¹

¹新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; ²新疆师范大学生命与环境科学学院, 乌鲁木齐 830054

摘要 采用 RT-PCR 扩增的方法, 从高抗霜霉病甜瓜品种‘日本安农二号’中克隆到约 3 kb 的 cDNA 片段(命名为 *MRGH-J*), 该基因是一个连续的通读编码框, 编码 1 007 个氨基酸。推测的蛋白质分子量为 113.7 kDa, 等电点为 7.88, 蛋白质预测无跨膜区。根据推测的氨基酸序列, 该基因属于 TIR-NBS-LRR 类抗病基因, 具有 TIR-NBS-LRR 类抗病基因所有的保守结构域。核苷酸序列和氨基酸序列同源性分析结果显示, *MRGH-J* 与甜瓜抗病基因的同源序列 *MRGH12* 及抗霜霉病相关基因 *mp-19* 均具有高达 99% 的同源性, 推测该基因可能在甜瓜抗霜霉病中起作用。

关键词 甜瓜; 抗病基因; 霜霉病

Cloning and Sequence Analysis of Resistance to Downy Mildew Gene Analogs from Melon (*Cucumis melon* L.)

LI Jin-Yu¹, LI Guan^{1*}, ZHAO Hui-Xin², WANG Xian-Lei¹, YAN Xue¹

¹College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; ²College of Life and Environment Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

Abstract The cDNA sequence (named *MRHG-j*) which was 3 kb long and encoded 1 007 amino acids was cloned from the melon of high resistance to downy mildew by RT-PCR. Putative protein molecular weight was 113.7 kDa with an isoelectric point of 7.88 and no predicted transmembrane domain. It belonged to the TIR-NBS-LRR resistance gene based on putative amino acid sequence and contained all of conservative domains of TIR-NBS-LRR resistance genes. The deduced nucleic acid and amino acid sequence of *MRGH-J* shared 99% identity with the reported melon resistance gene analog *MRGH12* and resistance to downy mildew gene *mp-19*, which suggested that it might be of great importance in melon disease resistance.

Key words melon; disease resistance gene; downy mildew

近年来,甜瓜(*Cucumis melon* L.)的许多抗病基因以及与抗病基因紧密连锁的分子标记在甜瓜基因图谱中已得到定位,而甜瓜抗霜霉病基因研究相对较晚,现在已知的抗霜霉病基因有 *Pc-1*、*Pc-2*、*Pc-3*、*Pc-4* 和 *Pc-5* (Cohen 等 1985; Thomas 等 1988; Epinat 和 Pitrat 1989; Kenigsbuch 和 Cohen 1992),但这些基因至今还没有克隆到。

Zhao 和 Li (2005) 用同源序列法结合 PCR 技术,并根据已克隆的抗病基因产物的保守结构域设计简并引物,从甜瓜品种‘黄旦子’(Huang danzi)中克隆到一个 510 bp (*mp-19*) 的片段,采用半定量 RT-PCR 方法证实该基因的表达受霜霉病病原菌 [*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov.] 的诱导,确认该基因与霜霉病相关。我们曾将 *mp-19* 在 GenBank 进行了 BLAST 比对分析,结果 *mp-19* 与 van Leeuwen 等 (2005) 报道的甜瓜抗

病基因同源序列 *MRGH12* (AAU04760) 的相应片段有极高同源性 (99%), 由此,我们推测 *MRGH12* 可能与抗霜霉病相关。但 *MRGH12* 的功能尚未确切验证,只是初步预测可能与抗病信号传导相关,其功能尚待进一步验证。

此外,植物在病原激发子的诱导下,基因表达水平常有变化,DNA 水平有基因变异。长期在这种环境下,它可以或多或少地记录到生物上,而使其获得抗逆反应和抗逆性,以适应不同的环境(缪颖和伍炳华 2001)。由于抗病基因存在小种专业化性,所以不同地域和分布不同的病原生理小种可能会影响抗病基因的差异。我们以适合

收稿 2005-11-04 修定 2006-04-28

资助 新疆维吾尔自治区高校重点项目(200521102)。

*通讯作者(E-mail: guanli@xju.edu.cn, Tel: 0991-8585071)。

在新疆栽培的高抗霜霉病甜瓜品种为实验材料, 以此两个基因 *MRGH12* 和 *mp-19* 为参考, 设计引物用 RT-PCR 方法克隆到一个抗霜霉病基因同源序列 (命名为 *MRGH-J*, GenBank 注册号 DQ287966), 可供进一步验证此克隆基因的功能和探讨植物抗病防御反应机制参考。

材料与方法

甜瓜 (*Cucumis melon* L.) ‘日本安农二号’ (Japan annong-2), 是日本农林水产省野菜试验场于 1979 年育成的高抗霜霉病甜瓜品种, 由新疆西域种业集团有限公司提供。RNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和 PCR 引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司。RNA PCR 试剂盒、pMD18-T 载体、DNA 标准分子量和 ExTaq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司 (Takara)。大肠杆菌 DH5 α 菌株是我们实验室保藏的菌种。其余药品为国产分析纯试剂。

甜瓜总 RNA 的提取, 依据操作试剂盒进行。参考 *MRGH12* 基因, 设计了 PCR 特异引物序列: 上游引物 P1, 5' ATGGCTTCCTCCACCACCAC 3'; 下游引物 P2, 5' TCAACCCCATTTCT-CCCAAG 3'。反转录用寡聚脱氧胸腺嘧啶作下游引物, 依照 Takara RNA PCR Kit 操作指南进行。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 反应用设计的特异性引物 P1 和 P2。扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

按 Takara 公司 PCR 产物回收试剂盒说明书进行 PCR 产物的回收。回收的 *MRGH-J* cDNA 片段与 pMD18-T 载体在 T₄ DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 过夜, 使 *MRGH-J* cDNA 连接到 pMD18-T 的载体上。连接产物转化感受态细胞。采用菌落 PCR 筛选阳性克隆, 引物用特异引物 P1 和 P2 和参考 *mp-19* 设计的引物 P3 和 P4。上游引物 P3, 5' GGTGGAGTAG GCAAGACG(A)AC 3'; 下游引物 P4, 5' CAGAGC(T)TAAT GGAAGGC 3'。用两组引物均扩增预期条带的克隆, 委托 Takara 公司进行全自动测序。

实验结果

1 RT-PCR 产物

采用提取的总 RNA, 以寡聚脱氧胸腺嘧啶为引物进行反转录得到单链 cDNA。以设计的 PCR 引物 P1 和 P2 进行扩增, RT-PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳鉴定, 可见一条约 3 kb 的条带 (图 1), 与我们预计的大小一致, 初步推测为 *MRGH-J* 基因片段。

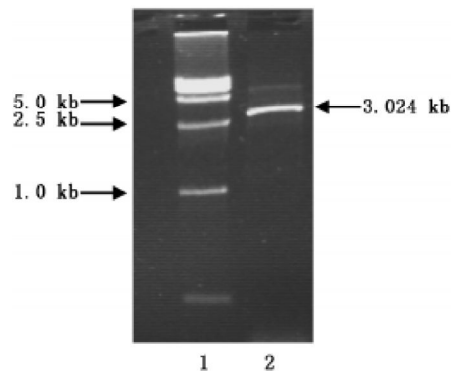


图 1 ‘日本安农二号’ *MRGH-J* cDNA RT-PCR 扩增
Fig.1 Amplification of *MRGH-J* cDNA by RT-PCR from ‘Japan annong-2’
1: DL15000 分子量标记; 2: *MRGH-J* cDNA。

2 *MRGH-J* cDNA 的序列

片段回收并构建到 pMD18-T 载体上, 以上述设计的两组引物对重组子进行菌落 PCR 鉴定。对两组引物都能够扩增得到预期片段的重组质粒 pMD18-T/*MRGH-J* 进行测序的结果如图 2。

3 序列同源性分析

测定核苷酸序列的结果表明, *MRGH-J* cDNA 克隆长 3.024 kb, 含有一个完整的开放阅读框, 共编码 1 007 个氨基酸。经用 Antheptot 5.0 软件分析, 其氨基酸分子量为 113.7 kDa, 等电点为 7.88, 序列预测无跨膜区。用 DNAMAN 软件进行同源比对时发现: 所克隆序列的对应部分与甜瓜抗病基因同源序列 *MRGH12* 和 *mp-19*, 无论在核苷酸水平还是在氨基酸水平均具有高达 99% 的同源性。同 *MRGH12* 推导的氨基酸相比, *MRGH-J* 有 5 个氨基酸发生变化, 其中 1 个氨基酸位点变化 (第 228 个氨基酸, 由 I 变为 V) 位于核昔

```

1   ATGGCTTCCTCCACCACCACCAAGGAATCATCTCCTTTTCTTCTTCTCCTAGATACATA
61  TTTGACGTCTTTCTCAGCTTCAGAGGCGTGGACACTCGCAATAACATCACAAATCTTCTT
121 TACGAAGCTCTGAGGCGACAAGGCATCATTTGTTTTCAGAGATGACGATGAGCTCGAGACA
181 GGGGAAGGCTATTGCTAACACTCTAACCAACTCGATTAGGCAATCCAGGTGTACCAATTTGTT
241 ATTTCTCTCTAAAAGATATGCAGATTCAAATGGTGCCTTGAGGGAGTTGGTTGAGATTGTC
301 AAAATGCAAGAAATTCCTTTCAAAACAAATAGTTCTTTGGTPTTTCTACAAAAATTAAGCCCCTCC
361 GATGTCAACAGCCCTACTGGGATTTTGTAGAAATTCCTTTGTTGATTTCCGAGAATGATGTT
421 AAGGAGAATTTTGAAGAGGTTTCAGGACTGGAGGAACGCCATGGAAGTGGTTGGAGGTCTC
481 ACTCCATGGGTTGTAAACGAACAGACCGAAACAGAGGAAGTCCAAAAGATTTGTTAAGCAT
541 GCTTTTCGATCTTTCTGCGTCCCTGATTTGCTTAGCCATGATGAGAATTTGGTTGGCATTGAAC
601 TTGAGATTAATAAAAATGAATATGCTTATGGGCATAGGGCTGGATGATAAGCGCTTTTATT
661 GGGATATGGGGGATGGGTGGAGTAGGCAAGACAACATTTGCTTAAAGCTGTTTTCAAAAAGC
721 GTCGCTCGTGAAATCCACGGAAAGTTGCATTTCTGGAAAATGTTAAGAAAACTTTTAAAGAA
781 GTTAGAGGCTTGGTGTCTTTGCAGGAGAAAACTTCTTTCCGATACTCTAATGAGAGGAAAA
841 GTTCAAATTAAGATGCTGAGGGAGTTGAAATGATAAAGAAAAACTTAGGAAATCGAAAA
901 GTTTTTGTTGTTCTCGATGATGTTGATCATTTTAGCCAGGTGAAAGATCTGGCAGGAGGA
961 GAAGAGTGGTTTGGTTGTGGAAGTAGAATCATCATTTACAACAAGAGATGAAGTTTTCGTT
1021 CTTTCTCTTGGAAATGATATAAGATACAATGTTGAGACTTTCCGTGATGAAGAGGCTCTTT
1081 CAGCTCTTTTTGCCATGAAGCATTTTGGAGTGAAGTTCCCTAAGAAAAGTTATTTGGATCTT
1141 TGTATGCCATTTTGTAGAATATGCTGAGGGCTTCCATTTGGCAATCAAGGCCCTTGGCAT
1201 TCTTTGCACAATAGATTTGTTTAAAGTCAATGGGAAGGTGCCATTTAGAAAGTTAAATAATCT
1261 TTAACAGGCAAGTATATGAAAACCTTGAAAATTAGTTATGATGCACTTTGGAAGGAAGAG
1321 AGGAGAATTTTTTTGTATATTGCCTGTTTTCTTAAAGGACAGAGCAAAGACCTAGTTCATT
1381 GACACATTCGTGAGTTTTTGAATTTGATGCTGCTGATGGACTTCTTACCAGAAAAAGGCT
1441 GCCGATGTACTTTGTATAAAAAGAAAACCTGCTGCTGATGCACTAAAAAAAATTCAGGAGAAA
1501 TCCCTCATRAACTGTGGTGAATGACAAAATACAGATGCATAATTTACACCAAAAACTAGGC
1561 CAAGAAATCTTTTCGTGAGGAGTCAATCGAGGAAAAAGTACTAGGCTATGGCATCGAGAGGAT
1621 ATGAACCATGCTTTAAGGCATAAACAGGGAGTTTGAAGCTATTTGAAAACCATTTGCCATTTGAC
1681 TCAAAACGAGCATGGAGAGTCAACACTTAAATACCAAGTTCTTTTTACGCAATGACCGGTCTA
1741 AAAGTGTGCGTGTTCATAATGTATTCCTTTCTGGAGATCTTGAATATCTCTCAAGCAAG
1801 TTGAGACTTCTCAGTTGGCATGGATATCCCTTCAGAAATTTGCCATCGGATTTCCAGCCA
1861 AATGAACTATTTGAACTCAATTTACAGAATAGCTGCATGAAAATTTTTTGGAGAGAAACA
1921 GAGAAGTTGGATAAATTTGAAGGTAATAAACCTTAGTAAATTTCCAAGTTTTTATTGAAGACC
1981 CCTGACCTGTCAACGGTGCABAACTTTGAGAGGCTGGTCTTGAATGGTTGTATAAGACTA
2041 CAAGAGCTTCACTATCTGTCCGCATTTCAAAGCATCTAATCTTTTTTGGATCTTAAAGGAC
2101 TGCAAACTCTCTCAAAAGCATTTGTTCTAATATTTCTCTTGAATCACTCAAGATCTCTATT
2161 CTTTTCTGGTTTCAAGACTTTGAAAATTTTCCAGAGATTTGTTGGGAAAACATGAAAACTTTTG
2221 ACAGAGCTTCAATTTAGATGGCACTGCTATTTCGAAAATTCGATGCCTCAATTTGAAAACCTT
2281 ACAAGCCTTGTTTTGTTGGATCTTAGAAAACGCAAAAATCTTCTTACACTTCCAAAACGGC
2341 ATCGGTTGGCTTAAACATCCATTAACATCTCGCATTTGGGTGGCTGCTCAAAGCTTTGACCAA
2401 ATTTCTGACAGCTTTGGGGAACATTTCTTTGTTTAGAGAACTTTGATGTGAGTGGTACTTTCT
2461 ATTAGTCAATATCCCATTTGTTCTTACGACTTTTGAAGCAACCTCAAAGCATTTGAATTCGAAA
2521 GGCTATCCCGAAAAATPATGTCATTCATTTATTTCCCATPATGGAGTACGCCGAGGAGTAA
2581 GATTCACATTCATTTGTTTTGAGGTTGATAACTTTGCTTTTTCGAATTTTCATTCAGTGAAG
2641 GTTTTTGAATTTTAGTACTGCAAGCTGGCAGATGGAGACATACCCGACGACCTCAGCTGT
2701 TTGTCTTCAATTACACTTTCTGGATCTAAGCAGGAACCTCTTCAACCAACCTGCCCTAATAGT
2761 TTGGGTCAACTTATCAATCTCAGATGCCTTGTTTTTGGACAACGTCAGTAGGCTCAGGTCA
2821 TTACCGAAGTTCCCAAGTCACTTACTTTATGTACTGCAAGGGATTTGTGTTCACATGAAA
2881 GAAGACTATAACAAAGAAGATCGCGGGCCTATGAGCGAAAACAGAAGTAAGGGTCTCTTAGT
2941 TACCCCTCATCAGCTGAAGACCAAACTCTAAAATCTCTCAGATGATATCAAGTATGTGC
3001 ACAGCTTGGGAGAAATGGGGTTGA
    
```

图2 ‘日本安农二号’ *MRGH-J* 基因 cDNA 序列

Fig.2 The sequence of *MRGH-J* cDNA in ‘Japan among-2’

酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)区,另外3个位点(第811个氨基酸,由K变为E;第859个氨基酸,由N变为S;第861个氨基酸,由

N变为D)发生在亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)区。另外还发现,该基因的氨基酸序列与甜瓜的其它抗病基因氨基酸序列同源性较

高, 而与烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)、水稻(*Oryza sativa*)以及番茄(*Lycopersicon esculentum*)的抗病基因氨基酸序列同源性较低(图3)。

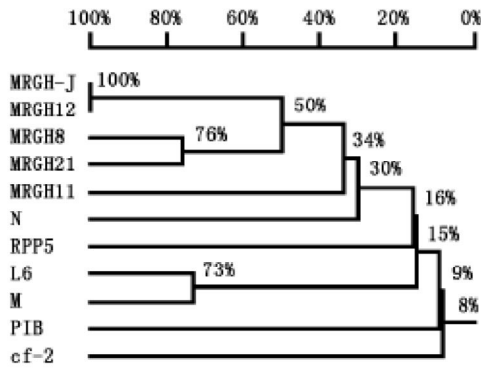


图3 ‘日本安农二号’MRGH-J氨基酸序列与甜瓜MRGH12 (AAU04760)、MRGH8 (AAU04763)、MRGH21 (AAU04761)、MRGH11 (AAU04759)、烟草N (AAA50763)、拟南芥RPP5 (AAF08790)、亚麻L6 (AAA91022)及M (AAB47618)、水稻PIB (BAA76282)以及番茄cf-2 (AAC15780)的氨基酸序列同源性比较
Fig.3 Comparison on analysis of the MRGH-J amino acid sequences of ‘Japan annong-2’ with the MRGH12 (AAU04760), MRGH8 (AAU04763), MRGH21 (AAU04761), MRGH11 (AAU04759) of melon and tobacco N (AAA50763), *Arabidopsis* RPP5 (AAF08790), linum L6 (AAA91022) and M (AAB47618), rice PIB (BAA76282), tomato cf-2 (AAC15780)

4 MRGH-J基因的氨基酸保守性分析

GenBank 搜索比对分析发现, 所克隆的基因具有抗病基因的保守结构域, 分别为TIR区、NBS区和LRR区。研究发现(Meyers等1999)TIR区可分为3个保守区: TIR-1、TIR-2和TIR-3。在NBS-LRR区又有8个典型的保守区, 分别为Pre-P-loop区、P-loop (kin-1)区、RNBS-A区、kin-2区、RNBS-B (kin-3)区、RNBS-C区、GLPL区和RNBS-D区。其中, RNBS-A和RNBS-D区在TIR-NBS-LRR类和非TIR-NBS-LRR类抗病基因中是完全不一样的。将MRGH-J和部分TIR-NBS-LRR类抗病基因用CLUSTAL进行序列分析, 结果(图4)显示MRGH-J具有以上所有的保守结构域。其中RNBS-A和RNBS-D区也符合TIR-NBS-

LRR类所特有的保守特点。

讨 论

本文通过RT-PCR技术从高抗霜霉病甜瓜品种‘日本安农二号’中扩增了一个抗病基因同源序列MRGH-J。该基因编码1007个氨基酸的通读编码框。分析发现, MRGH-J的氨基酸序列属于TIR-NBS-LRR类抗病基因。TIR类结构域一般存在于双子叶植物的抗病基因结构中, 而单子叶植物大都属于非TIR-NBS-LRR类抗病基因(Meyers等1999; Pan等2000)。本文克隆的MRGH-J也是来自于双子叶植物, 与此结论相符合。而且MRGH-J包含了TIR-NBS-LRR类抗病基因所有的保守结构域, 其中NBS区中的RNBS-A和RNBS-D区可用来划分TIR和non-TIR类型抗病基因, 同时也可用来研究抗病基因的进化关系(Michelmore和Meyers 1998)。TIR结构域与果蝇发育基因Toll以及哺乳动物白细胞介素-1受体(IL-1R)基因的胞质信号区域同源, 而后两类基因参与的反应都激活了某些转录因子(Taylor 1998)。因此, 植物中带有此结构的抗病基因可能与激活防卫基因的转录因子有关。

核苷酸序列和氨基酸序列通过DNAMAN软件比对分析发现, 所克隆序列的相应部分与甜瓜抗病基因同源序列MRGH12和mp-19, 无论在核苷酸水平还是在氨基酸水平均具有高达99%的同源性。由MRGH-J同MRGH12和mp-19的高度同源性, 推测MRGH-J可能在甜瓜抗霜霉病中起作用。我们现正在构建该基因的植物表达载体, 通过转基因接种当地霜霉病来进一步验证该基因的功能表达情况, 以其实实现抗病基因资源的有效利用。这对改善和提高新疆甜瓜品质, 发展新疆特色经济可能有意义。

与MRGH12推导的氨基酸相比, MRGH-J共有5个氨基酸发生变化, 不同的氨基酸主要分布在NBS区和LRR区。LRR是长度在24个氨基酸之内的多重重复, 它含有多个亮氨酸或其它亲水残基。目前认为LRR为病原菌的特异识别区域, 单个核苷酸的改变都有可能改变专性识别。例如, 亚麻抗锈基因的同一家族成员L2、L6和L10存在不同小种专化抗性, 分析其基因产物结构上

的区别,发现这些蛋白只在LRR附近的氨基酸存在差异。LRR区域的多样性较高则有利于植物细胞识别不同病原体无毒基因(*AVR* gene)编码的蛋白(Ellis等2000; Jia等2000; Dodds等2001)。这正是植物抗病基因与病原菌无毒基因协同进化和适应性选择的结果(Zhou等2004)。根据MRGH-J同MRGH12在LRR区的序列差异,推测可能是不同品种适应特定的环境造成的,如当地的病原菌发生的变异会引发相应的抗病基因也发生变化。另外,该基因氨基酸序列与甜瓜的其它抗病基因同源序列如MRGH8、MRGH11、MRGH21的氨基酸序列相比,同源性比其它物种克隆的抗病基因氨基酸序列要高,说明不同抗病基因有种属特异性。

参考文献

- 缪颖, 伍炳华(2001). 植物抗逆性的获得与信息传导. 植物生理学通讯, 37 (1): 71~76
- Cohen Y, Cohen S, Eyal H, Thomas CE (1985). Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI124111. *Cucurbit Genet Coop Rep*, 8: 36~38
- Dodds PN, Lawrence GJ, Ellis JG (2001). Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β -strand/ β turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *Plant Cell*, 13: 495~506
- Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000). The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends Plant Sci*, 5: 373~379
- Epinat C, Pitrat M (1989). Inheritance of resistance of three lines of muskmelon (*Cucumis melo*) to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). In: Thomas CE (ed). *Cucurbitaceae' 89. Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm*. Charleston: South Carolina, 133~135
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 19: 4004~4014
- Kenigsbuch D, Cohen Y (1992). Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI 124112 and commonality of resistance genes with PI 124111F. *Plant Dis*, 76: 615~617
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20: 317~332
- Michelmore RW, Meyers BC (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res*, 8: 1113~1130
- Pan Q, Liu YS, Budai-Hadrian O, Sela M, Goren LC, Zamir D, Fluhr R (2000). Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologous in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, 155: 309~322
- Taylor CB (1998). Defence responses in plants and animals—more of the same. *Plant Cell*, 10: 873~876
- Thomas CE, Cohen Y, McCreight JD, Jourdain EL, Cohen S (1988). Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo*. *Plant Dis*, 72: 33~35
- van Leeuwen H, Garcia-Mas J, Coca M, Puigdomènech P, Monfort A (2005). Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. *Mol Genet Genomics* 273 (3): 240~251
- Zhao HX, Li G (2005). Cloning and expression analysis of downy mildew resistance-related cDNA sequences in melon. *Agr Sci China*, 4 (11): 839~844
- Zhou T, Wang Y, Chen JQ, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D (2004). Genome-wide identification of NBS genes in *japonica* rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol Genet Genomics*, 271: 402~415