

三个苹果NBS基因的鉴定及其对外源生长物质的响应

柏素花^{1,2}, 宋霄¹, 张玉刚¹, 戴洪义^{1,*}

青岛农业大学¹园艺学院,²生命科学学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 为了探讨苹果NBS基因的生理作用, 从苹果中鉴定了NBS家族的3个基因, 分别命名为*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*。这3个基因编码的蛋白质均含有NB-ARC结构域, *MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*蛋白N端还有TIR结构域, *MdTIR-NBS-LRR1*蛋白在C端含有LRR结构。荧光定量PCR分析表明, 这3个不同类型的NBS基因的表达具有明显不同的组织特异性, 此外, *MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*在‘嘎啦’苹果幼苗叶片中均受SA和MeJA诱导。ACC处理不能提高*MdNBS*和*MdTIR-NBS1*基因的表达, 但能诱导*MdTIR-NBS-LRR1*基因表达。结果表明, *MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因可能参与了苹果抗逆或抗病防御反应。

关键词: 苹果; NBS基因; 基因表达; SA; MeJA; ACC

Identification of Three Apple NBS Genes and Their Expression Responding to Exogenous Phytohormones

BAI Su-Hua^{1,2}, SONG Xiao¹, ZHANG Yu-Gang¹, DAI Hong-Yi^{1,*}

¹College of Horticulture, ²Key Lab of Plant Biotechnology of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: To explore the physiological roles of apple NBS genes, three typical NBS genes were identified from *Malus domestica* and designated as *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1*. All the proteins encoded by the three genes contain a NB-ARC domain. In addition, both *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* proteins include a TIR motif in N terminus and *MdTIR-NBS-LRR1* protein has a LRR motif in C terminus. The quantitative real-time PCR revealed that the expressions of these three NBS genes varied with different organs. *MdNBS* was highly expressed in functional leaves, *MdTIR-NBS1* in buds and *MdTIR-NBS-LRR1* in young leaves, respectively. Expression course analysis demonstrated that the expression of *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* in the young leaves of ‘Gala’ apple could be up-regulated by SA and MeJA. ACC treatment could not enhance the expression of *MdNBS* and *MdTIR-NBS1*, but could promote the expression of *MdTIR-NBS-LRR1*. Taken together, the results implied that the three genes might be involved in defense responses against biostress or abiostress in apple.

Key words: *Malus domestica*; NBS genes; gene expression; SA; MeJA; ACC

近年来, 苹果腐烂病、白粉病、轮纹病、早期落叶病等多种真菌病害频繁发生, 造成苹果减产、果品质量下降, 严重地限制了苹果产业的发展。探讨苹果植物的抗病机制、培育苹果抗性品种尤为迫切, 抗病基因的分离和鉴定对于培育抗病品种并深入了解苹果抗病机制具有重要意义。

在长期进化过程中, 植物已逐渐形成一套抵御病原侵染的防御机制, 包括物理防御(如厚的角质层)和化学防御(如酚类物质、丹宁、凝集素、酶类等)两类不同的方式(Chisholm等2006)。其中参与化学防御的物质有些是组成型合成的, 具有基本的、广谱性的防御功能。还有一些则是诱导

合成的, 是针对特定病原的特异性防御反应。介导这些防御物质诱导合成的蛋白有两类(Jones和Dangl 2006), 一类是模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), PRR能够识别病原表面的保守分子, 也即PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), 从而激活一系列的信号元件最终导致抗菌物质的合成(Zhang等2010)。另一类

收稿 2013-09-18 修定 2013-12-17

资助 国家苹果产业技术体系项目(CARS-28-01-07)、青岛市科技计划基础研究项目[12-1-4-5-(1)-jch]和“十二五”农村领域国家科技计划项目(2013BAD02B01)。

* 通讯作者(E-mail: hydai@qau.edu.cn; Tel: 0532-86080008)。

是NBS-LRR, 这是一类能与核苷酸进行结合的蛋白质并具有亮氨酸重复序列(Dangl和Jones 2001)。NBS-LRR蛋白能与病原菌的效应子进行结合而诱发一系列信号转导事件, 最终导致抗菌蛋白的合成。目前发现的植物抗性基因(*R gene*)大都是NBS-LRR家族的基因(Dangl和Jones 2001)。例如, 从玉米(汪结明等2009)、水稻(王世全等2005)、小麦(王海燕等2009)、马铃薯(陈观水等2006)等植物中都已经分离鉴定了具有抗性功能的NBS-LRR蛋白。NBS-LRR蛋白在结构上保守, 又存在着多样性, 是宿主抵抗多种不同病原的潜在分子基础。其保守的结构域包括: NBS (nucleotide-binding-site)、LRR (leucine-rich repeat)、TIR (toll and interleukin-1 receptor)、PK (protein kinase)、CC (coiled-coil)等(孙文丽等2008), 这些结构域分别执行不同的功能(McHale等2006)。NBS结构域是NBS-LRR类亚家族中最保守的部分, 与ATP和GTP的结合有关, 通常被认为是许多蛋白质执行功能的必需元件, 并且含有一些高度保守的基序, 如P-loop (即Kinase-1a)、Kinase-2、Kinase-3a和疏水区GLPL等(Traut 1994)。根据N端结构的不同, NBS-LRR蛋白能够进一步分为两个亚类: 一类是TIR-NBS-LRR蛋白, 其N末端有一个白细胞介素受体(TIR)的同源结构域(Vidal等2002); 另一类是CC-NBS-LRR蛋白, 其N末端有一个螺旋卷曲结构域(CC)。NBS-LRR需要通过两条主要的信号转导途径诱发宿主的免疫反应, 一条是水杨酸依赖的信号转导途径, 另外一条途径是茉莉酸/乙烯信号转导途径。前者参与活体营养病原的防御反应, 后者调控死体营养病原的防御反应。水杨酸信号途径和茉莉酸/乙烯信号途径在一定程度上存在着拮抗, 这二者的平衡是维持植物防御体系完整的重要因素。

在苹果抗病基因鉴定工作中, 早在2004年Baldi等就鉴定了苹果基因组中NBS-LRR类基因的同源序列, 并将其作为分子标记整合到12个连锁群上, 随后NBS-LRR基因与苹果抗病性之间的研究也逐渐展开。Lee等(2003)比较了苹果植物野生种和栽培种中NBS家族基因的结构, 发现野生种和栽培种的NBS基因之间没有明显的序列分化, 表明病原作为选择压力在NBS基因家族的进化过程中发挥重要作用。Calenge等(2005)利用NBS基因家

族序列为基础发展了分子标记用以鉴定和定位苹果抗性基因。另外, 一些与苹果抗病性连锁的NBS基因也被鉴定出来。目前已经发现黑星病的抗性位点Rvi15 (Vr2)包含有3个TIR-NBS-LRR基因(Galli等2010), 火疫病抗性位点包含一个NBS-LRR基因(Parravicini等2011), Dunemann等(2007)还发现苹果白粉病抗性基因与已鉴定的其他NBS类苹果抗病基因连锁。Lee和Lee (2005)还在野生苹果种中鉴定了一个TIR-NBS基因, 转化拟南芥后能使拟南芥具有细菌斑点病抗性。但苹果NBS家族基因的表达与主要抗病信号转导途径之间的关系未见报道, 本研究在对苹果基因组NBS-LRR基因进行分析的基础上, 选取具有代表性的3个具有不同结构域的NBS家族的基因, 分析它们对水杨酸(SA)和茉莉酸甲酯(MeJA)及1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)处理的反应, 为进一步深入研究苹果NBS-LRR基因家族在苹果抗病过程中的功能提供参考信息。

材料与amp;方法

1 植物材料及其处理

试验所用苹果各组织器官取自苹果(*Malus × domestica* Borkh.)品种‘嘎啦’, 外源生长物质处理用‘嘎啦’组培苗进行。组培苗按以前报道的方法(Bai等2013)准备。

植物生长物质诱导处理试验选用由茎尖培养获得的‘嘎啦’组培苗。分别用1 mmol·L⁻¹ SA、100 μmol·L⁻¹ MeJA及10 μmol·L⁻¹ ACC喷洒于‘嘎啦’组培苗的叶片表面, 以喷施蒸馏水的组培苗作为对照, 分别于0、2、4、10、24、30 h后取其叶片液氮速冻, 于-70 °C保存备用。

2 苹果NBS家族基因的鉴定及克隆

苹果幼叶总RNA提取使用原平皓生物技术有限公司的EASYspin植物RNA快速提取试剂盒, cDNA第一链合成用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Cat# K1622)进行, 合成cDNA所用RNA用DNase I处理消除基因组DNA污染。

以拟南芥NBS-LRR蛋白的氨基酸序列为探针用tBLASTn算法搜索苹果基因组数据库GDR (http://www.rosaceae.org/gb/gbrowse/malus_x_

domestica/), 获得苹果NBS家族蛋白的编码基因组序列, 并通过在线软件FGENESH预测编码区。根据预测的编码区设计基因特异性引物, 以合成的幼叶cDNA为模板, 用TaKaRa公司的LA *Taq*酶通过PCR扩增基因的编码区并按常规方法克隆测序, 测序结果用于序列分析及系统进化树构建。

3 序列分析

蛋白同源性分析用BLAST算法(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行, 多重序列比对用软件Clustalx.1.83进行, 蛋白质结构和性质预测用在线软件ExPASy (<http://www.expasy.org/>), 结构域用SMART程序分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz等1998), 系统进化树用MEGA 5.0软件 (Tamura等2011)按邻接算法构建, bootstrap值为1 000。

4 实时定量PCR

基因的实时定量PCR在Light Cycler 480 System (Roche)上进行, 反应体系用SYBR[®] *Rremix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)试剂盒, 按说明书配制。所用引物及扩增产物长度如表1所示, 用 β -actin基因(GQ339778.1)作为内参基因。组织表达分析中, 使用表达量最低的组织作为校正子, 生长物质诱导试验中用未处理的样品作为校正子。数据分析根据Livak和Schmittgen (2001)报道的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行。所有数据都以相对mRNA表达量表示, 并经过单因素方差分析和Duncan检验。

实验结果

1 苹果NBS基因的克隆及分析

以拟南芥NBS-LRR蛋白的氨基酸序列为电子探针搜索苹果基因组数据库, 从搜索结果中选取3个具有代表性的不同结构的NBS家族的基因进行克隆和序列分析, 分别命名为*MdNBS* (GDR ID: MDP0000137959)、*MdTIR-NBS1* (GDR ID: MDP-0000386726)和*MdTIR-NBS-LRR1* (GDR ID: MDP-0000465174)。*MdNBS*基因的开放阅读框(ORF)长为2 859 bp, 编码952个氨基酸; *MdTIR-NBS1*的ORF长为2 832 bp, 编码943个氨基酸; *MdTIR-NBS-LRR1*的ORF长为4 323 bp, 编码1 440个氨基酸。

将得到的3个苹果NBS蛋白与已知其他植物的NBS抗性蛋白的NBS结构域进行多重序列比对, 发现不同植物间氨基酸序列一致性很低, 但都具有NB-ARC结构域, 而且该结构域在不同植物间高度保守, 包含了该基因家族特有的功能基序: 磷酸结合环(P-loop)、Kinase2a和Kinase3a, 其保守序列分别为GMGG(I/L/V)GKTT、VLDD(V/I)(W/D)和GSRXXXTTR (X为任意氨基酸)。除*MdTIR-NBS-LRR1*只包含P-loop和Kinase2a两个基序而不含Kinase3a基序外, 另外两个基因编码的蛋白都包含有上述3个结构基序。另外, 在NB-ARC结构域中还包含疏水结构基序GLPL(A/T)。*MdTIR-NBS*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因所编码的蛋白在N端均含有TIR结构域, *MdTIR-NBS-LRR1*在C端还包含LRR结

表1 用于苹果NBS基因克隆及实时荧光定量PCR的引物

Table 1 Primers for cloning and real-time fluorescence quantitative PCR of NBS genes of apple

基因	引物	引物序列(5'→3')	扩增片段大小/bp
<i>MdNBS</i>	MdNBS-F	ATGGCTGAGGCGATCGTTTC	2 859
	MdNBS-R	TCACACAGCATCCGCTGTAG	
	MdNBS-realttimepcr-F	TCGGTAAGGATTCTACTAAG	103
	MdNBS-realttimepcr-R	TGGTCAGGTTTGGATAGT	
<i>MdTIR-NBS1</i>	MdTIR-NBS1-F	ATGAATACCGGCAGCCTCGC	2 832
	MdTIR-NBS1-R	TCAGATAACCTCAAATCTTTTG	
	MdTIR-NBS1-realttimepcr-F	GTTGGGGACATCAWYGGACT	187
	MdTIR-NBS1-realttimepcr-R	TAAATGGCTCTWGCAAGYGT	
<i>MdTIR-NBS-LRR1</i>	MdTIR-NBS-LRR1-F	ATGGCCGATTCTTCTTCTGA	4 323
	MdTIR-NBS-LRR1-R	TTACAACAACACGAAGGA	
	MdTIR-NBS-LRR1-realttimepcr-F	TTGTATGTCCAGGGAGTGAA	117
	MdTIR-NBS-LRR1-realttimepcr-R	ATAGAGCGAAACCAAGAAA	
β -actin	β -actin-realttimepcr-F	CTGAACCCAAAGGCTAATCG	108
	β -actin-realttimepcr-R	ACTGGCGTAGAGGGAAAAGAA	

构, 其结构特征为LXXLXXLXLXXX (X为不确定的氨基酸)。MdNBS除了含有NB-ARC结构域外不含其他已知的结构域。

根据苹果NBS基因编码蛋白的氨基酸序列和其他不同植物中NBS类蛋白的序列构建系统进化树。如图1所示, MdTIR-NBS-LRR1和草莓FaTIR-NBS-

LRR聚在一个分枝上, 它们和MdTIR-NBS1、烟草N蛋白、亚麻M蛋白、拟南芥RPP5等组成一个亚群, 该亚群的蛋白均含有TIR结构基序。MdNBS则与大豆GmNBS-LRR、拟南芥RPM1、毛果杨PtNBS-LRR、番茄I2C-1、玉米Rp1及水稻Xa1等抗性蛋白聚成另一个亚群, 该亚群不含有TIR结构基序(图1)。

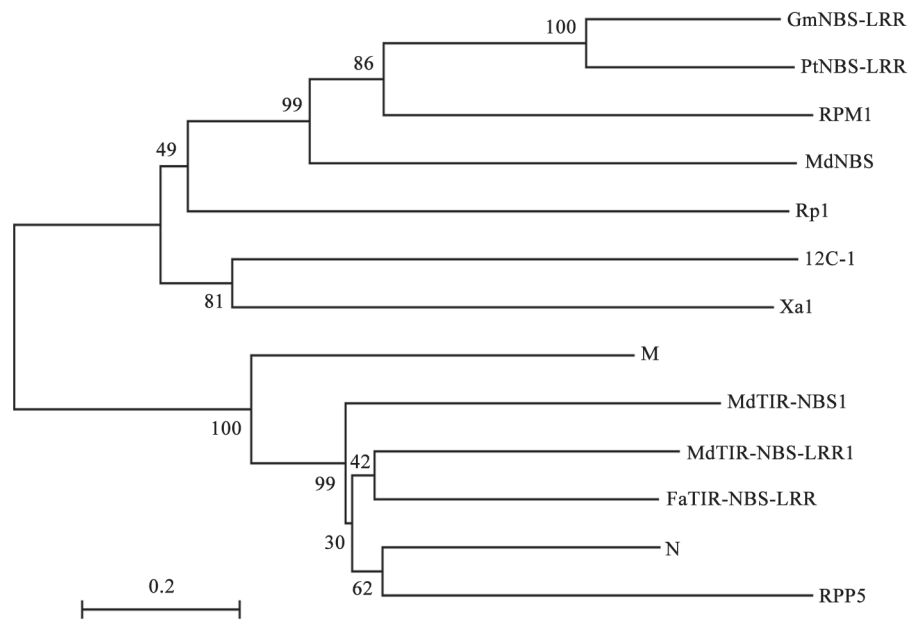


图1 三个苹果NBS蛋白与其他植物抗性蛋白系统进化分析

Fig.1 Phylogenetic tree constructed using the deduced amino acid sequences of three apple NBS proteins and some R proteins from other plant species

GmNBS-LRR: *Glycine max* ACM89637; PtNBS-LRR: *Populus trichocarpa* XP_002297751; RPM1: *Arabidopsis thaliana* CAA61131; MdNBS: *Malus domestica* MDP0000137959; Rp1: *Zea mays* AAP81261; I2C-1: *Solanum lycopersicum* AAB63274; Xa1: *Oryza sativa* AB002266; M: *Linum usitatissimum* AAB47618; MdTIR-NBS1: *Malus domestica* MDP0000386726; MdTIR-NBS-LRR1: *Malus domestica* MDP0000465174; FaTIR-NBS-LRR: *Fragaria ananassa* HQ845018; N: *Nicotiana glutinosa* AAA50763; RPP5: *Arabidopsis thaliana* AAF08790。数字代表1 000重复时的bootstrap值(%)。

2 苹果NBS基因在组织器官中的表达分析

利用荧光实时定量PCR技术分析苹果NBS基因的组织表达特异性, 结果显示苹果3个NBS基因在所分析的6种组织中均有不同程度的表达, 它们有不同的组织表达特异性: 其中MdNBS在功能叶中表达量最高, 在芽中的表达量最低; MdTIR-NBS1基因则在芽中的表达量最高, 在花中表达量最低; MdTIR-NBS-LRR1在幼叶中的表达量最高, 而在枝皮中的表达量最低(图2)。

3 外源SA对MdNBS、MdTIR-NBS1及MdTIR-NBS-LRR1表达的影响

SA、JA和乙烯是参与植物防御反应的主要

信号分子, 为了探讨苹果NBS基因的表达是否受这几种信号分子介导的信号转导途径的调控, 分别用这些外源信号分子处理‘嘎啦’苹果幼苗, 并用荧光定量PCR技术检测这些NBS基因在转录水平的表达。经1 mmol·L⁻¹ SA处理后MdNBS、MdTIR-NBS1及MdTIR-NBS-LRR1基因的表达均有显著提高($P < 0.05$) (图3), 其表达峰值分别为对照的7.38、11.00和13.82倍, 但其表达峰值出现的时间不同。其中, MdTIR-NBS-LRR1基因的表达峰值出现最早, SA处理后4 h表达显著升高, 10 h达到最高点, 而MdNBS和MdTIR-NBS1两个基因的表达峰值分别为处理后的30 h和24 h。

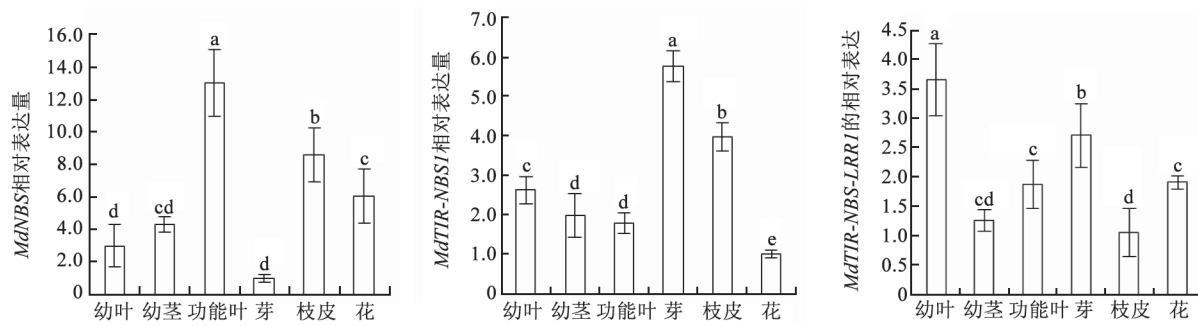


图2 *MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因在苹果各组织和器官中的表达

Fig.2 The expression of *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* in different tissues or organs of apple

柱形上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图同此。

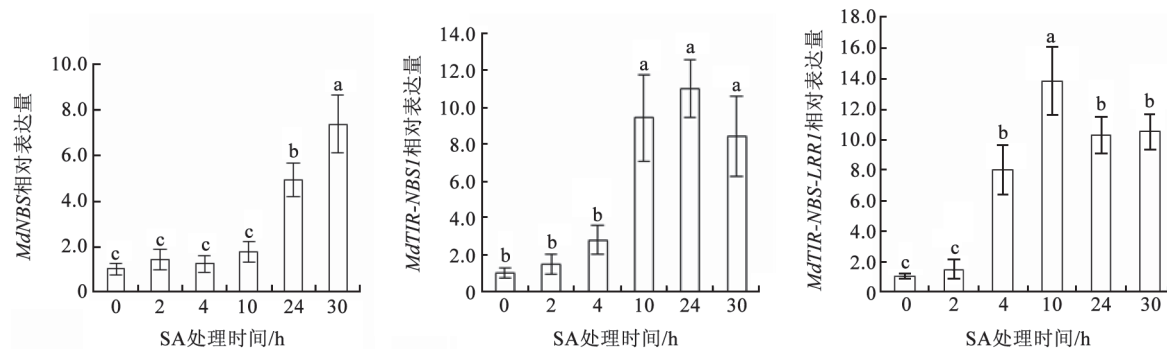


图3 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA处理后*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因的时序表达

Fig.3 The expression course of *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* after treatment with $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA

4 外源MeJA对*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*及*MdTIR-NBS-LRR1*表达的影响

3个NBS基因经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MeJA处理后基因表达均有显著提高(图4)。*MdNBS*和*MdTIR-NBS1*基因的表达均在处理后4 h有显著的提高, 分别在10 h和24 h达峰值。*MdTIR-NBS-LRR1*基因的表达在MeJA处理后10 h表现出显著提高, 此后, 在所检测的时间范围内表达一直呈上升趋势。

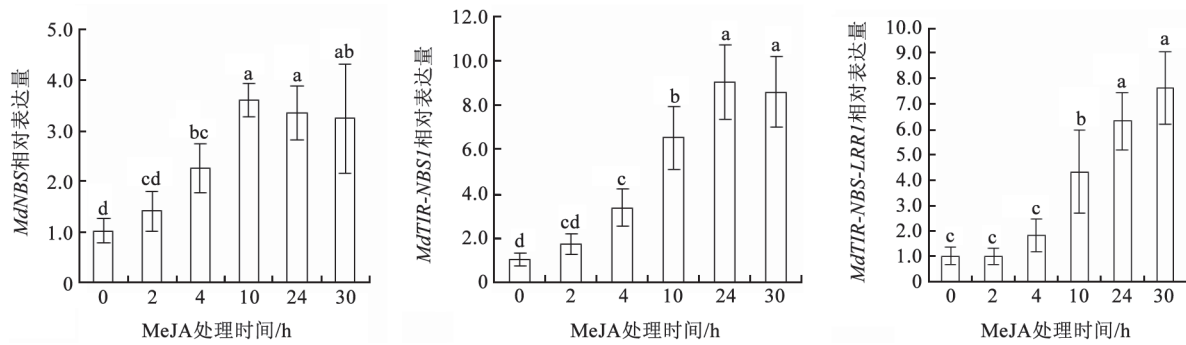
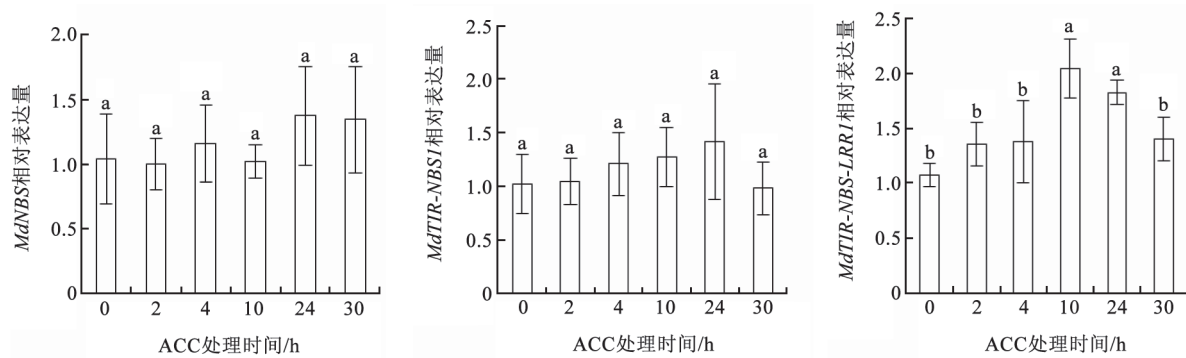
5 外源ACC对*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*及*MdTIR-NBS-LRR1*表达的影响

ACC作为乙烯合成的前体物质, 用于处理‘嘎啦’苹果幼苗, 以检测乙烯分子对NBS基因表达的影响。经 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ACC处理后, *MdNBS*和*MdTIR-NBS1*基因在整个检测时间范围内未发生明显变化($P > 0.05$), *MdTIR-NBS-LRR1*基因在处理4 h出现较小幅度的表达提高(图5), 处理后10 h和24 h的表达显著高于对照, 分别为对照的2.04和1.83倍($P < 0.05$)。

讨论

苹果病害是限制苹果产业发展的瓶颈之一, 挖掘抗病基因用于遗传改良是培育抗病品种的主要途径。NBS基因家族是目前已知的大部分植物抗病基因的来源, 分析苹果基因组上NBS基因家族的组成及结构并分析其表达, 对于快速筛选苹果抗病基因具有重要意义。本文通过对3个苹果NBS基因的结构和表达分析, 为进一步深入研究整个基因家族在植物抗病中的作用提供了基本信息。这3个NBS基因分别代表了苹果NBS蛋白的典型结构。分析具有不同结构的基因表达对不同处理的响应, 可以了解不同结构基序和基序组合对外界刺激的响应模式。

系统进化分析表明, *MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*分属于含有TIR和不含有TIR两个不同的亚群, 这体现了其结构上的差异性。除了结构上的差异以外, 这3个基因主要表达组织亦

图4 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA处理后*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因的时序表达Fig.4 The expression course of *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* after treatment with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA图5 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC处理后*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因的时序表达Fig.5 The expression course of *MdNBS*, *MdTIR-NBS1* and *MdTIR-NBS-LRR1* after treatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ACC

不相同。*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*基因分别在功能叶、芽和幼叶中表达量最高。这暗示NBS家族的成员具有不同的功能,可能分别在组织特异侵染的病原中发挥特异性的防御作用。

SA、MeJA和乙烯是植物体内重要的抗病信号分子,它们在抵御生物类胁迫中具有重要作用(Tsuda等2009)。本研究试图通过检测*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*的表达对3种外源生长物质处理的响应,了解苹果NBS家族的基因在植物抗逆防御反应中可能的功能。结果显示,经外源生长物质SA、MeJA诱导处理后,*MdNBS*、*MdTIR-NBS1*和*MdTIR-NBS-LRR1*在‘嘎啦’苹果叶片的表达均有显著增加,表明NBS基因的表达受到SA和JA信号途径直接或间接的调控,同时也暗示它们可能参与苹果植物的抗病防御反应。尽管均能受到SA和JA处理诱导,但这3个基因的表达模式并不相同,其表达峰值出现的早晚不同,这种差异

可能显示了不同NBS基因在功能上的一种互补。与SA和MeJA不同,ACC处理对*MdNBS*和*MdTIR-NBS1*基因的表达没有显著影响,能小幅度提高*MdTIR-NBS-LRR1*基因的表达,这种差异背后的机理还需要进一步研究,但外源生长物质处理的结果表明,这3个NBS家族的成员可能在苹果植物对生物或非生物胁迫的防御反应中发挥功能。

这3个基因所编码的NBS蛋白具有不同的结构域组成,表达的组织特异性和对外源生长物质处理的反应模式均呈现多样化的趋势,暗示NBS家族的成员通过多样化的机制参与宿主对病原的抵抗。目前,在已经报道的与苹果抗病性相关的基因中,包含了几个NBS家族的基因,例如与火疫病抗性相关CC-NBS-LRR基因(Parravicini等2011),与黑星病抗性相关的3个TIR-NBS-LRR基因(Galli等2010),以及能抗细菌性斑点病的TIR-NBS基因(Lee和Lee 2005)。这些基因所编码的蛋白质中,除了均含有NB-ARC结构域外,其他结构域的组成也

不相同,可见不同的结构域组成可能是宿主抵抗不同病原的需要。我们在以前鉴定的一个NBS-LRR1基因(宋霄等2013)与本研究中的3个NBS家族的基因均不相同,其所编码的蛋白质结构域的组成由NB-ARC和LRR结构域组成,其表达的组织特异性及对外源生长物质处理的反应均与本研究中报道的基因不同,也表明NBS家族的基因可能通过多样化的机制参与宿主植物对不同病原侵染的防御反应。

参考文献

- 陈观水,周以飞,林生,潘大仁(2006).甘薯NBS类抗病基因类似物的分离与序列分析.热带亚热带植物学报,14(5):359~365
- 宋霄,柏素花,戴洪义(2013).苹果NBS-LRR1基因的鉴定与表达分析.园艺学报,40(7):1233~1243
- 孙文丽,刘昱辉,吴元华,傅俊范(2008).植物抗病基因研究进展.湖北农业科学,47(5):598~601
- 王海燕,刘大群,杨文香,李在峰,张立荣,张娜(2009).1个小麦NBS类抗病基因同源cDNA序列的克隆与鉴定.植物病理学报,39(5):507~513
- 汪结明,江海洋,赵阳,项艳,朱苏文,程备久(2009).玉米自交系B73全基因组NBS类型抗病基因分析.作物学报,35(3):566~570
- 王世全,张德春,李平,汪旭东,李世贵,朱立煌,翟文学(2005).水稻中一个NBS-LRR抗病同源基因家族的克隆和分析.遗传学报,32(7):704~711
- Bai SH, Dong CH, Li BH, Dai HY (2013). A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea*. Plant Physiol Biochem, 62: 23~32
- Baldi P, Patocchi A, Zini E, Toller C, Velasco R, Komjanc M (2004). Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. Theor Appl Genet, 109: 231~239
- Calenge F, Van der Linden CG, Van de Weg E, Schouten HJ, Van Arkel G, Denancé C, Durel CE (2005). Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. Theor Appl Genet, 110(4): 660~668
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803~814
- Dangl JL, Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature, 411: 826~833
- Dunemann F, Peil A, Urbanietz A, Garcia-Libreros T (2007). Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pl1* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. Plant Breeding, 126(5): 476~481
- Galli P, Patocchi A, Brogini GA, Gessler C (2010). The *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. Mol Plant-Microbe Interact, 23(5): 608~617
- Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. Nature, 444: 323~329
- Lee SY, Lee DH (2005). Expression of *Mbr4*, a TIR-NBS type of apple *R* gene, confers resistance to bacterial spot disease in *Arabidopsis*. J Plant Biol, 48(2): 220~228
- Lee SY, Seo JS, Rodriguez-Lanetty M, Lee DH (2003). Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. Mol Genet Genomics, 269(1): 101~108
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 25: 402~408
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biol, 7(4): 212~222
- Parravicini G, Gessler C, Denancé C, Lasserre-Zuber P, Vergne E, Brisset MN, Patocchi A, Durel CE, Brogini GA (2011). Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. Mol Plant Pathol, 12(5): 493~505
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci USA, 95(11): 5857~5864
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 28(10): 2731~2739
- Traut TW (1994). The function and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. Eur J Biochem, 222: 9~19
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F (2009). Network properties of robust immunity in plants. PLoS Genet, 5: e1000772
- Vidal S, Cabrera H, Andersson RA, Fredriksson A, Valkonen JPT (2002). Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with *potato virus Y*. Mol Plant-Microbe Interact, 15(7): 717~727
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S et al (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. Cell Host Microbe, 7(4): 290~301