

高秆野生稻 PR2 同源序列的分离与序列分析

王德彬, 韦靖鸾, 张 丹, 刘新琼, 刘学群, 王春台, 张向明*

(中南民族大学生命科学学院生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074)

摘 要: 根据已知植物病程相关蛋白基因 β -1,3-葡聚糖酶基因 (PR2) 的保守结构域设计 2 对简并引物, 从高秆野生稻基因组 DNA 中分离出 3 条防卫基因类似物 (defense-genes analogues, DGAs), 其中 2 条具有通读的 ORF, 另一条提前出现终止密码子。对这 3 条序列在 NCBI 上进行同源性搜索发现, 在核苷酸水平这 3 条序列均与水稻的 β -1,3-葡聚糖酶基因具有 90% ~ 93% 的同源性, 与已知大麦、小麦、高粱、黑麦、燕麦、玉米等其它植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因具有 69% ~ 81% 的同源性。在氨基酸水平与水稻、大麦、小麦、黑麦的 β -1,3-葡聚糖酶具有 60% ~ 93% 的同源性。对具有通读 ORF 的 2 条序列 RD1-GG6 和 RD1-GG12 进行表达分析, 发现经水杨酸 (SA) 诱导后表达量明显提高。

关键词: 高秆野生稻; 防卫基因类似物; β -1,3-葡聚糖酶

中图分类号: Q943.2; S511.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0674-05

Molecular Cloning and Sequence Analysis of PR2-Like Sequences in *Oryza alta*

WANG De-Bin, WEI Jing-Luan, ZHANG Dan, LIU Xin-Qiong,
LIU Xue-Qun, WANG Chun-Tai, ZHANG Xiang-Ming*

(Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: Two sets of degenerate primers, which were designed based on the conservative domain of known plant pathogenesis-related protein gene β -1,3-glucanase, were used to isolated defense-genes analogues (DGAs) from genomic DNA of the *Oryza alta*. The desired bands were purified from the gel, and then cloned by T/A cloning. After sequencing and analyzing by alignment, three DGAs with uninterrupted open reading frames (ORFs) were obtained, except for one with immature stop codon. At the nucleic acid level, sequence identity of three DGAs with the β -1,3-glucanase genes of *Oryza sativa* ranged from 90% to 93%, and with the β -1,3-glucanase genes from *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Secale cereale*, *Avena sativa* and *Zea mays* ranged from 69% to 81%. At the amino acid level, the results showed that both two DGAs RD1-GG6 and RD1-GG12 were highly homologous with β -1,3-glucanase amino acid sequences of *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Secale cereale* with 60% - 93%. More importantly, expression level of RD1-GG6 and RD1-GG12 were upregulated at 3, 12, 24 and 48 h after salicylic acid (SA) treatment.

Key words: *Oryza alta*; Defense-gene analogue (DGA); β -1,3-glucanase

在植物与病原菌互作的过程中, 有大量的基因诱导表达, 它们编码的蛋白质参与植物对病原物的防卫反应, 在植物拮抗病原物侵染的防御机制中起着重要作用^[1-4]。而这些防卫反应包括植物细胞对病原菌的识别, 胞内信号的转换与传导, 防卫反应的开启与系统获得抗性的形成等^[3,5,6]。迄今, 已分离的防卫基因有: 参与植保素 (PA) 合成的相关酶基因、病程相关蛋白 (PRP) 基因、木质素合成相关酶基

因、钝化病原菌致病酶或毒素的蛋白质基因、富含羟脯氨酸糖蛋白 (HRGP) 和富含甘氨酸糖蛋白 (PGIP) 的基因、溶菌酶基因、核糖体失活蛋白 (RIP) 基因等^[5,7-9]。PRP 基因是目前的研究热点, 陆续发现的 PRP 蛋白有: 几丁质蛋白酶、蛋白抑制酶、特异的过氧化物酶、葡聚糖酶等, 对烟草、黄瓜、棉花及其它一些双子叶植物的研究发现在抗病性产生前后, 植物细胞会积累大量病程相关蛋白, 并且证实病程相关

收稿日期: 2009-01-14, 修回日期: 2009-07-09。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (30600400); 武汉市青年科技晨光计划资助项目 (200750731302)。

作者简介: 王德彬 (1970 -), 女, 从事植物分子遗传学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zhangxmhb@mail.scuec.edu.cn)。

蛋白与诱导抗病性有关^[5,8,10]。

在这些病程相关蛋白中,葡聚糖酶和几丁质酶可以降解真菌细胞壁结构多糖,使病原物死亡,而且产生的细胞碎片具有诱导寄主产生抗性的作用;几丁质酶和葡聚糖酶在正常情况下只在植物体内有低水平的组成型表达。而过氧化物酶则参与细胞木质化过程,使细胞壁加强,抗病性增加^[11,12]。现有研究发现,在病菌侵染或使用 INA、BTH 和 BABJ 等诱导物后,皆可首先提高几丁质蛋白酶、葡聚糖酶和过氧化物酶的活性,而这些酶皆参与了植物诱导抗病性产生的过程^[11,13]。

野生稻是栽培稻的原始祖先,保留着一些罕见的和重要的基因,由于长期处于野生状态,形成了固有的稳定的遗传特性,蕴含大量丰富优异的基因,因此,克隆与分析野生稻抗病及防卫基因,对阐明水稻抗病性的分子机制及改良作物抗病性具有重要的意义。利用候选基因克隆法克隆具有某些保守结构域的基因是一种简便快捷并且有效的手段,尤其对于基因组比较复杂、难以利用图位克隆和转座子标签法进行基因克隆的作物。本研究利用已知病程相关蛋白基因 β -1,3-葡聚糖酶基因保守结构域设计简并引物,以高杆野生稻的基因组为模板进行 PCR 扩增,旨在获得防卫基因类似物 (defense-genes analogues, DGAS),有助于直接克隆或开发与水稻防卫基因紧密连锁的分子标记及定位、克隆防卫基因,为进一步研究植物防御机制及今后的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

高杆野生稻 (*Oryza alta*), 由华南农业大学卢永根院士惠赠。

1.2 主要试剂

底物 dNTPs、*rTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、pMD18-T vector 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0, 均购自大连宝生物工程 (大连) 有限公司; TRIzol[®] RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司 (USA); 反转录试剂盒 Two-Step M-MLV RT-PCR System 购自 Bipecc Biopharma 公司 (USA); 荧光定量试剂盒 SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司 (Japan); 胰蛋白胨 (trypton) 和酵母粉 (yeast extract) 等购自 Oxoid 公司 (England); 琼脂糖购自 FMC 公司 (USA); 其余试剂均为国产分析纯产品。

1.3 方法

1.3.1 PCR 引物的设计

根据已克隆病程相关蛋白基因 β -1,3-葡聚糖酶基因 (PR2) 的保守结构域设计 2 对简并引物^[1], 预期扩增产物为 700 bp 左右。设计的引物送上海赛百盛生物技术有限公司合成。引物序列信息见表 1。

表 1 研究所用的引物
Table 1 Primer sets used in this study

引物 Primer	序列(5'...3') Sequence(5'...3')
RD1F	RYNGGWGTWTGYTAYGG
RD1R	CADCCRCTYTCNGAYAC
RD2F	TTNTTAWACGYCGCANTGA
RD2R	CAYANAGCAATGRTGGYAAT

注:混合碱基代码:R = A/G; W = A/T; N = A/G/C/T; Y = C/T; D = A/G/T。

1.3.2 DNA 与 RNA 的制备

取高杆野生稻幼嫩叶片,液氮速冻研磨成粉状后采用 CTAB 法提取基因组 DNA,并利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和质量。另外,剪取 2~3 cm 幼嫩叶片浸泡于 2 mmol/L 的水杨酸 (salicylic acid, SA) 溶液,分别于采集处理前和处理后 3、12、24、48 h 的叶片,液氮速冻后,用 TRIzol 提取液抽提总的 RNA。

1.3.3 PCR 扩增及基因克隆

PCR 反应体系为 15 μ L, 反应混合液包含:10 $\times$ PCR buffer 1.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.2 μ L, 正反引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.075 μ L, DNA 模板 (50~100 ng/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补至 15 μ L, 反应在 PTC-200 PCR 仪上进行。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 接下来是 35 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 44~50 $^{\circ}$ C (从 44~50 $^{\circ}$ C 设 4 个温度梯度) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 温度降到 4 $^{\circ}$ C 即完成扩增。扩增产物取出之后于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存、备用。

PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,片段采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,操作步骤按试剂盒说明进行。回收产物与 pMD18-T vector 连接过夜,再通过电激转化导入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,然后将菌液涂于含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 恒温过夜培养。

1.3.4 阳性克隆的鉴定与测序

挑选饱满、白色透明的单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,振荡培养约 12 h,抽提质粒 DNA 后分别用 M13 通用引物进行 PCR 鉴定和限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Pst*I 双酶切鉴定,选择含有插入片段的阳性克隆进

一步用 *Hae*III 酶切鉴定不同的类型,将不同类型的阳性克隆送往上海英骏生物技术有限公司测序,对测序结果正确的克隆测序 2 次。

1.3.5 序列分析 测序获得的核苷酸序列在 NCBI 上进行 Vecscreen 搜索后,利用 DNASTar 软件去除载体序列,将所得序列在 GenBank 中用 BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 搜索蛋白质数据库,并进行核苷酸序列的同源性比较。利用 NCBI 中的 ORF finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对本研究克隆的序列进行开放阅读框查找,并利用 DNASTar 将其翻译成氨基酸序列,利用 ClustalW 软件对 DGAs 所推导的氨基酸序列进行多序列比对,利用 GeneDoc 软件对对比结果进行编辑,在 GenBank 中分析保守基元。

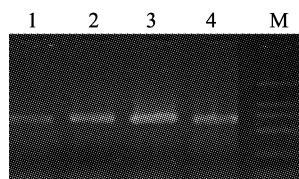
1.3.6 利用荧光定量 PCR 进行表达分析 将所提取的高杆野生稻总 RNA 反转录成 cDNA,利用实时荧光定量 RT-PCR 技术,分析经 SA 处理后具有通读 ORF 的 DGAs 基因的表达量变化。

2 结果与分析

2.1 高杆野生稻 DGAs 的梯度 PCR 扩增及克隆鉴定

利用设计的 2 对简并引物 (RD1 和 RD2) 对高杆野生稻品种的基因组 DNA 进行梯度 PCR 扩增,结果表明,利用梯度 PCR 在退火温度为 44、46、48、50℃ 时,引物对 RD1 得到较清晰的目标带 (图 1)。利用引物对 RD2 扩增时没有目标带。因为在退火温度为 48℃ 时,目标带最亮,所以本研究以退火温度 48℃、引物对 RD1 的 PCR 产物进行回收、纯化和 TA 克隆。

挑取单克隆扩大培养后,提取质粒 DNA 首先进行 PCR 鉴定,结果表明,所挑取的克隆部分扩增出了目标大小的带 700 bp 左右,说明这些克隆为有插入片段的阳性克隆,进一步用 *Eco*RI 和 *Pst*I 双酶切鉴定,结果发现对应的克隆均切出一条约 700 bp 的带。进一步地用 *Hae*III 酶切鉴定,结果表明,所得到的克隆有 4 种不同的类型。



1~4:退火温度为 44、46、48、50℃; M:分子量标记 DL2000

1~4: Annealing temperature 44, 46, 48, 50℃; M: DNA marker DL2000

图 1 引物对 RD1 对高杆野生稻基因组 DNA 的梯度 PCR 扩增产物琼脂糖胶电泳分析

Fig. 1 Primer sets RD1 PCR amplification by different annealing temperature

2.2 高杆野生稻 DGAs 的序列分析

对于利用 RD1 扩增的 PCR 产物克隆得到的 4 种不同类型的阳性克隆,分别进行测序,将测序结果在 NCBI 中利用 BLAST 程序进行同源性搜索,结果表明,3 条序列与病程相关蛋白的 β -1,3-葡聚糖酶 (PR2) 分别具有不同程度的同源性,另外一条为未知的假定蛋白。在核苷酸水平,这 3 条序列与水稻已克隆的 β -1,3-葡聚糖酶基因具有 90% ~ 93% 的同源性,与大麦、小麦、高粱、黑麦、燕麦、玉米等其它植物已克隆的 β -1,3-葡聚糖酶基因具有 69% ~ 81% 的同源性 (见表 2)。

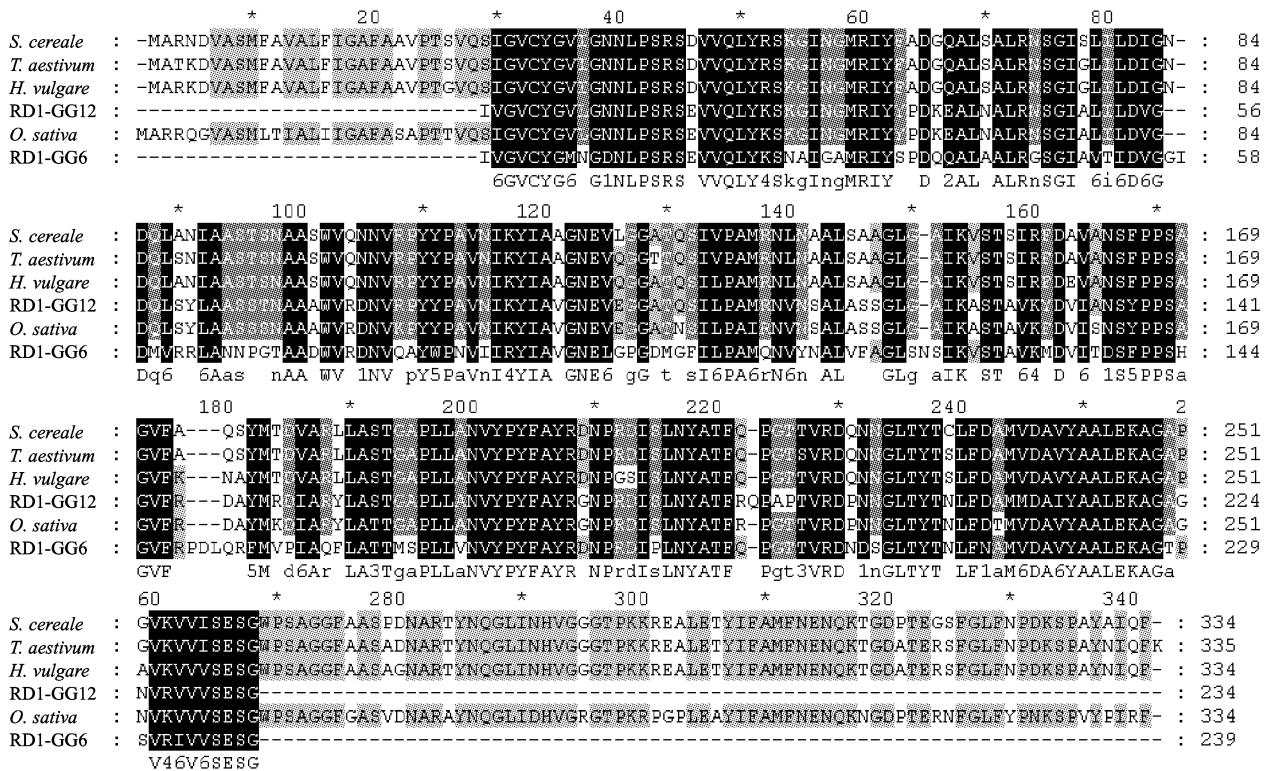
表 2 高杆野生稻中的 PR2 基因类似物与部分 β -1,3-葡聚糖酶基因的核苷酸相似性比较

Table 2 Identity between PR2 genes analogues of *Oryza alta* and some of β -1,3-glucanase

物种 Species	RD1-GG6 (%)	RD1-GG9 (%)	RD1-GG12 (%)
水稻 <i>Oryza sativa</i>	90	90	93
大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	78	78	81
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	72	72	81
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	71	72	72
黑麦 <i>Secale cereale</i>	72	72	80
燕麦 <i>Avena sativa</i>	71	71	77
玉米 <i>Zea mays</i>	69	69	77

进一步进行序列分析,发现这 3 个 DGAs 中 RD1-GG9 序列提前出现终止密码子,从核苷酸水平分析比对,发现 RD1-GG6 与 RD1-GG9 之间的同源性高达 99%,仅有几个碱基的差异,因而可认为 RD1-GG6 与 RD1-GG9 可能为同一个基因,这两条序列间的差异可能是在进行 PCR 克隆或测序时出现错配所致。另一种可能是基因组中基因在进化的过程中复制导致出现的 2 个拷贝。而 RD1-GG6、RD1-GG12 具有连续的 ORF,将这两条序列翻译成氨基酸,并与水稻、大麦、小麦、黑麦的 β -1,3-葡聚糖酶进行氨基酸多序列比对 (见图 2)。结果表明, RD1-GG6 与 RD1-GG12 的氨基酸序列同源性为 65%,与水稻已克隆的 β -1,3-葡聚糖酶氨基酸序列的同源性分别为 89% 和 93%;与大麦、小麦、黑麦、燕麦的 β -1,3-葡聚糖酶的同源性为 60% ~ 77%;而与高粱、烟草、油棕、玉米、葡萄、喙田菁、橡胶树等其它植物的 β -1,3-葡聚糖酶之间的同源性较低,为 50% ~ 57%。

在 NCBI 上对 RD1-GG6 与 RD1-GG12 两条序列间进行核苷酸水平的比对,发现其没有同源性,但进行两条序列间氨基酸水平比对时发现,两者间的同源性高达 65%,推测为在进化的过程中,由于选择



Secale cereale ACCESSION: CAJ58512; *Triticum aestivum* ACCESSION: CAA77085; *Hordeum vulgare* ACCESSION: AAL88447; *Oryza sativa* ACCESSION: AAL35900

图2 高杆野生稻中 PR2 类似基因推定蛋白的氨基酸序列与选定的 β -1,3-葡聚糖酶的氨基酸序列比对
Fig.2 Alignment between amino acid sequence of putative PR2-like protein of *Oryza alta* and that of β -1,3-glucanases from selected plants

压力的影响使得碱基序列发生变化,但未影响部分氨基酸的表达,为遗传密码的简并性。对图2进行分析,发现 RD1-GG12 与水稻、大麦、小麦、黑麦的同源性较高;而 RD1-GG6 与 RD1-GG12、水稻、大麦、小麦、黑麦的同源性较低,氨基酸差异较明显,这种差异是否使其具备另一特别功能还有待进一步研究。

2.3 高杆野生稻 DGAs 的表达分析

用具有通读 ORF 的 2 条 DGAs 序列设计特异性引物,用 SA 处理前后 0、3、12、24、48 h 的高杆野生稻叶片为材料,对这 2 条 DGAs 进行表达分析。经研究发现,这 2 条 DGAs 的表达受 SA 上调。这 2 条序列经 SA 诱导后,表达量在处理 3 h 和 12 h 急剧上升,24 h 和 48 h 后表达量有所下降(见图 3)。

3 讨论

目前,用于植物基因克隆的常见方法有:图位克隆技术,建立在遗传分析和基因定位的基础上;转座子标签法,利用转座子插入突变使某一基因失活,进而用转座子特异基因片段作探针分离出突变的目的基因;差异显示技术,直接鉴定和克隆差异表达基因;候选基因克隆法是根据已知基因的保守结构域

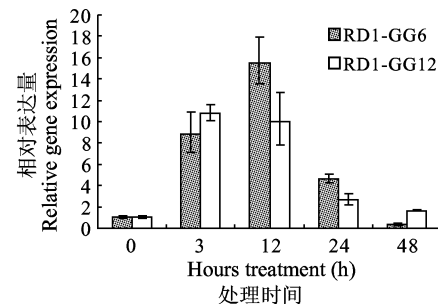


图3 SA 处理后 RD1-GG6 和 RD1-GG12 的表达情况
Fig.3 Expression analysis of RD1-GG6 and RD1-GG12 treated by SA

序列设计并合成简并引物,通过 PCR 扩增克隆已知基因类似物^[14,15]。候选基因克隆法具有比图位克隆和转座子标签法等植物基因克隆方法更为简便、快捷、有效的特点,因而广泛地应用于分子生物学中,包括用于 DNA 作图、DNA 测序、分子系统遗传学等。本研究利用候选基因克隆法,成功地克隆了 3 个防卫基因类似物,通过序列分析发现与水稻、大麦、小麦、黑麦、燕麦等物种已知的 β -1,3-葡聚糖酶之间表现出很高的同源性。

葡聚糖酶在植物中广泛分布,许多植物中都含

有一种以上的葡聚糖酶,不同类型的 β -1,3-葡聚糖酶具有不同的诱导调控机制,不同类型的葡聚糖酶在同一种植物中的丰富程度亦不同。 β -1,3-葡聚糖酶不仅参与植物的防卫反应,还参与了植物的多种生长发育过程^[3,16]。20 世纪 70 年代以前对 β -1,3-葡聚糖酶的研究主要集中于它对植物本身不同发育阶段的作用。至 90 年代,对它的研究已涉及到分类、生理、抗病、分子生物学、基因工程等方面。随着分子生物学技术在植物抗病基因工程中的逐步应用, β -1,3-葡聚糖酶基因的抗病研究取得了快速发展^[12,16,17]。本研究根据 β -1,3-葡聚糖酶基因(PR2)的保守结构域设计简并引物成功分离了 3 条与 PR2 高度同源的水稻 DGAs,通过核苷酸和氨基酸序列的比对分析,序列差异没有发生在保守的结构域,3 条序列可能是同一基因家族的不同成员。本实验所克隆的只是防卫基因的部分序列,可利用 TAIL-PCR、反向 PCR 等技术进一步地扩增其侧翼序列,以获得完整的全长序列,并丰富水稻的 β -1,3-葡聚糖酶基因或防卫基因库,为进一步研究其生物学功能、参与水稻的各种抗性反应的机制及今后的应用奠定基础。另外,更重要的是利用候选基因克隆法分离 RGAs 的一个最直接的用途是对这些序列进行定位。在其他作物中已经有很多将 RGAs 定位到抗性位点附近的例子,如 3 个 RGAs 与小麦条锈病抗性基因共分离^[18],在大麦条锈病抗性位点 *Rph4*, *Rph7* 和 *Rph10* 附近定位了多个 RGAs^[19]。

水杨酸是一种重要的能激活植物抗病防卫反应的信号分子。20 世纪 70 年代就有报道认为外源 SA 可以在植物抗病反应中起作用,90 年代后成为植物抗病机制研究热点之一,其中以烟草中的研究较多。以 TMV 诱导接种烟草,抗性品种植株的基部接种叶中 SA 含量增加 20 ~ 50 倍,上部未接种叶中 SA 含量也增加了 5 ~ 10 倍,且增加后的 SA 量足以诱发 PRs 的积累和抗病性的产生,SA 的增加先于 PR 基因的表达及抗病性的产生^[20-22]。在诱导接种的黄瓜和拟南芥中也观察到类似现象,而感病品种中却没观察到此现象,说明植物体内 SA 水平与抗病性产生密切相关^[12,22]。本实验所分离的 2 条与 β -1,3-葡聚糖酶基因同源且具通读 ORF 的序列,受水杨酸诱导后 3 h 和 12 h 急剧上升,可能与植物的抗病防卫反应有直接的关系。

参考文献:

- [1] 高玉龙,郭旺珍,王磊,张天真. 海岛棉抗病基因类似物与防卫基因类似物的分离及特征分析[J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2006,36(2):97-108.
- [2] 陈观水,周以飞,林生,潘大仁. 甘薯 NBS 类抗病基因类似物的分离与序列分析[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(5):359-365.
- [3] 丁秀英,张军,苏宝林,徐惠风. 水杨酸在植物抗病中的作用[J]. 植物学通报,2001,18(2):163-168.
- [4] 李春娟,单世华,许婷婷,宫清轩. 几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,9,15(5):502-505.
- [5] Xiong L, Lee M, Qi M, Yang Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*,2001,14,685-692.
- [6] 周建明,朱群,白永延. 高等植物防卫反应的信号传导[J]. 植物学通报,1999,16(3):228-237.
- [7] 刘彦峰,刘英,李娜. 植物抗病基因工程的研究进展及前景展望[J]. 生物技术通报,2005,5:8-10.
- [8] 郑秀芳,张勇,缪为. 植物抗真菌病害基因工程的研究策略[J]. 甘肃科学学报,2002,13(1):63-66.
- [9] 蓝海燕,田颖川,王长海,等. 表达 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌的研究[J]. 遗传学报,2000,27(1):70-77.
- [10] 刘爱新,李多川,董汉松,王金生. Harpin_(Xoo) 诱发烟草过敏反应早期 H_2O_2 变化及有关基因表达[J]. 植物病理学报,2006,36(2):163-168.
- [11] 毛碧增,李德葆,李群,何祖华. 转化双价防卫基因获得抗纹枯病水稻[J]. 植物生理与分子生物学报,2003,29(4):322-326.
- [12] Zhen X H, Li Y Z. Ultrastructural changes and location of β -1,3-glucanase in resistant and susceptible cotton callus cells in response to treatment with toxin of *Verticillium dahliae* and salicylic acid[J]. *J Plant Physiol*,2004,161(12):1367-1377.
- [13] 秦跟基,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[J]. 南京农业大学学报,1999,22(3):102-107.
- [14] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,等译. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002.
- [15] Wang S, Zhang E, Li P, Wang X, Li S, Zhu L, Zhai W. Cloning and analysis of a new NBS-LRR resistance gene family in rice[J]. *Acta Genetica Sinica*,2005,327:704-711.
- [16] Wang Y, He S. Molecular biology research of plant-induced disease resistance[J]. *Chin J Appl Environ Biol*,2004,106:811-815.
- [17] Jonathan D, Jones G. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work[J]. *Current Opinion in Plant Biology*,2001,4:281-287.
- [18] Yan G P, Chen X M, Line R F. Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust[J]. *Theor Appl Genet*,2003,106:636-643.
- [19] Collins N, Park R, Spielmeier W, Ellis J, Pryor A J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance gene[J]. *Genome*,2001,44(3):375-381.
- [20] Dilbirli M, Erayman M, Sandhu D, Sidhu D, Gill K S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes[J]. *Genetics*,2004,166:461-481.
- [21] Dong H, Peng J, Yu X, Zhao J, Wang Y, Dong H. Studies on methods in cloning and expression identification of genes that regulate plant disease resistance signal transduction[J]. *J Nanjing Agr Univ*,2003,26:30-35.
- [22] Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Wang S. Os-WRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*,2007,20,492-499.