

番茄 NBS-LRR 抗根结线虫基因同源序列的克隆与分析

陆秀红¹ 张雨² 秦舒婷² 黄金玲¹ 张禹¹ 刘志明¹

1. 广西农业科学院植物保护研究所/广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007;

2. 广西大学行健文理学院, 南宁 530005

摘要 根据已知抗病基因的 NBS-LRR 保守结构域设计简并引物, 从抗南方根结线虫病的番茄材料 cDNA 中克隆抗病基因同源序列 (resistance gene analogs, RGAs), 并通过 qRT-PCR 技术检测 RGAs 与南方根结线虫侵染的相关性。序列分析发现, 2 条序列具有 NBS-LRR 保守结构域, 分别命名为 F5-8 和 F5-20; 保守区域氨基酸比对结果显示, F5-8 (GenBank 登录号为 MG860907) 和 F5-20 (GenBank 登录号为 MG860908) 与已知抗病基因保守区域具有很高的相似性, 其中 F5-8 与 Mi-1 相应区域氨基酸相似性为 94%, F5-20 与 Hero 基因相应区域氨基酸相似性为 96%。qRT-PCR 结果发现, F5-8 和 F5-20 在接种南方根结线虫 2 龄幼虫 24 h 后其表达量均发生了变化。初步推测 F5-8 和 F5-20 为南方根结线虫侵染相关基因同源序列。

关键词 番茄; 南方根结线虫; 抗病基因同源序列; NBS-LRR

中图分类号 S 432.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0067-06

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 引起的番茄根结线虫病是番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 的重要病害之一, 该病害一般使番茄减产 10%~20%, 严重地块可达 75% 以上^[1]。生产上采用轮作、杀线剂等方法进行防治, 虽取得一定的防治效果, 但种植抗病品种是防治该病最经济、有效、安全的方法^[2-3]。目前生产上使用的栽培品种多为感病品种, 少数抗病品种存在遗传基础狭窄、抗性单一等问题。采用基因工程技术挖掘新的抗病基因, 获得具有抗根结线虫特性的转基因植株是一条有效的育种途径^[4]。

植物天然抗病基因以多基因或单个显性基因形式存在。越来越多的天然抗线虫基因被发现和利用, 如番茄抗根结线虫基因 Mi-1.2^[5]、番茄抗胞囊线虫基因 Hero A^[6]、抗甜菜胞囊线虫 (*Heterodera schachtii*) 基因 Hs1^{pro-1}^[7]、抗马铃薯胞囊线虫 (*Globodera pallida*) 基因 Gpa-2^[8]。通过对已知抗病基因序列分析发现, 大多抗病基因具有几个明显的保守结构域: 核苷酸结合位点 (nucleotide binding site, NBS)、富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich re-

peat, LRR)、亮氨酸拉链结构 (leucine zipper, LZ)、丝氨酸/苏氨酸蛋白酶 (serine/threonine kinase, STK) 等^[9]。根据抗病基因所编码蛋白结构和功能, 抗病基因可以分为 4 大类: NBS-LRR、LRR、STK、LRR-kinase, 其中 NBS-LRR 类抗病基因根据 N 端结构域不同分为 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 两大类, 是数量最多、分布最广的一个植物抗病基因家族^[10]。Mandeep 等^[11]在鹰嘴豆基因组中发现了 121 个具有 NBS-LRR 保守区域的基因, 对这 121 个基因进行系统研究发现 27 个基因与褐斑病抗病相关。Roberto 等^[12]对马铃薯基因组研究发现 435 个 NBS 类抗病相关基因。Giuseppe 等^[13]在番茄基因组中发现 105 个具有 NBS-LRR 保守区域的基因。根据已知抗病基因的保守结构域设计简并引物从植物基因组或 cDNA 中扩增抗病基因同源序列 (resistance gene analogs, RGAs), 是筛选抗病基因及抗病相关基因的一种有效手段。到目前为止, 所有已发现的植物抗病基因均归属于不同种类的 RGAs^[14]。本研究根据已知抗病基因保守结构域设

收稿日期: 2018-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460465, 31860492); 广西科技重大专项 (桂 AA17204041); 广西农业科学院科技发展基金项目 (2015JZ20)

陆秀红, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物线虫学, E-mail: lu8348@126.com

通信作者: 刘志明, 研究员, 研究方向: 植物线虫学, E-mail: liu0172@126.com

计筒并引物从抗南方根结线虫野生番茄材料中克隆抗病基因同源序列,并通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测抗病基因同源序列与南方根结线虫侵染的相关性。研究发现的抗南方根结线虫基因同源序列可用于分子标记育种并为功能性抗病基因的克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试线虫及番茄材料

供试南方根结线虫采自广西南宁市武鸣区蔬菜大棚,经鉴定为南方根结线虫,接种在广西农业科学院温室内番茄上繁殖备用。试验时在解剖镜下挑取卵囊,将卵囊置于 25 °C 温箱内孵化获得大量二龄幼虫。供试番茄材料 F5 为笔者在广西柳州市郊区采集的野生番茄,仙客 1 号和仙客 5 号为含 *Mi* 基因的抗南方根结线虫番茄品种,由国家蔬菜工程技术研究中心育成,特级大明星由广东省湛江市大地蔬菜种子有限公司生产,红吉星由广西农业科学院蔬菜研究中心育成。

1.2 抗性鉴定

采用接种二龄幼虫鉴定法,将各番茄材料播种在无根结线虫的育苗盘中,待苗长到 4 片真叶时移栽至装有无根结线虫土壤的花盆中(直径 20 cm,高 12 cm),每盆种 4 株,每个材料 4 盆重复。移栽后 15 d,每盆接种 2 000 头南方根结线虫 2 龄幼虫。接种后 45 d 调查根系发病情况,根结分级标准参照赵洪海等^[15]:0 级,根系上无根结;1 级,根系上有 1~5 个根结;2 级,根系上有 6~15 个根结;3 级,根系上有 16~30 个根结;4 级,根系上有 31~50 个根结;5 级,根系上有 50 个以上根结。根结指数按以下公式计算:

$$\text{根结指数} = \frac{\sum(\text{各病级植株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times \text{最重病组数值}} \times 100$$

番茄材料对南方根结线虫的抗性评价参照王新荣等^[16]方法划分:免疫,根结指数 0;高抗:根结指数 1.0~10.0;抗病:根结指数:10.1~25.0;感病:根结指数 25.1~40.0;高感:根结指数 40.0 以上。

1.3 RGA 的扩增及序列分析

番茄总 RNA 用 Trizol 法提取,采用 Fermentas 生产的 cDNA 第一链合成试剂盒 (#K1622) 将总 RNA 反转录成 cDNA,步骤和体系按照说明书进行。根据已知抗病基因所编码的 NBS-LRR 设计 2

条筒并引物:F:5'GGNGGNRTHGGNAARACHAC 3',R:5'AKWGCYARRGGDARYCC 3',均由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒进行纯化,将目的带克隆到 pEGM-T 载体中,筛选阳性克隆进行测序。测序获得的核苷酸序列采用 Vector NTI 进行相似性比对,使用 NCBI 的 ORF (open reading frame)finder 搜索开放阅读框并进行功能域分析,最后用 Mega5 进行系统发育树的构建。

1.4 荧光定量 PCR 检测

番茄材料的准备及线虫接种同本文“1.2”,以不接种线虫的番茄苗为空白对照。接种后 24 h 取样,每个处理取番茄根部充分洗净混合后置于液氮中速冻,约 10 min 后将样品放置 -80 °C 冰箱保存备用。

根据测序结果,设计特异性定量引物(表 1),分别以接种南方根结线虫 2 龄幼虫及空白对照的番茄 cDNA 为模板,*GAPDH* 为内参基因,进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系为 50 μ L,其中包括 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(2 \times)25 μ L、PCR Forward Primer(10 μ mol/L)2 μ L、PCR Reverse Primer(10 μ mol/L)2 μ L、ROX Reference Dye (50 \times)1 μ L、CDNA 模板 4 μ L、ddH₂O(灭菌蒸馏水),每个样品 3 次重复。最后结果以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1 The primer of QPCR

| 基因 Gene | 引物 Primer | 引物序列(5'-3') Sequence |
|------------|--------------|----------------------------|
| F5-8 | F5-8 F | ATTGTCTTAGATGATGTGTGGGATAC |
| | F5-8 R | AGGTCAAGAGGATCAGTGTTTCAG |
| F5-20 | F5-20 F | TACTGCCTCGGAGACAAACGG |
| | F5-20 R | TTTCAAACCTACCTCACCACCTTCG |
| GAPDH | GAPDH-F | CCATCACAGCCACTCAGAAGAC |
| | GAPDH-R | TCAACCACGGACACATCAACAG |

2 结果与分析

2.1 番茄材料对南方根结线虫的抗性鉴定

从表 2 可见,供试的 5 份番茄材料对南方根结线虫抗感差异明显,根结指数在 3.75~73.33 之间。其中大明星根结指数为 73.33,高感;红吉星根结指数为 38.67,感病;仙客 1 号、仙客 5 号和 F5 根结指数分别为 5.00、3.75 和 6.25,差异不显著,抗病。

表 2 番茄材料对南方根结线虫的抗病性评价

Table 2 Evaluation of resistance of tomato to *Meloidogyne incognita*

| 番茄材料 Tomato | 根结指数 Root-knot index | 抗病性 Disease resistance |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 特级大明星 Tejidamingxing | 73.33a | 高感 Highly susceptible |
| 红吉星 Hongjixing | 38.67b | 感病 Susceptible |
| 仙客 1 号 Xianke1 | 5.00c | 高抗 Highly resistant |
| 仙客 5 号 Xianke5 | 3.75c | 高抗 Highly resistant |
| F5 | 6.25c | 高抗 Highly resistant |

注: 同列数据后不同字母表示经 Tukey HSD 法检验在 $\alpha=0.05$ 水平差异显著。Note: Different letters in the same indicate significant difference at $\alpha=0.05$ level by Tukey HSD test.

2.2 RGA 的扩增及序列分析

RGA 扩增获得 2 条具有 NBS-LRR 类抗病基因所特有保守结构域 (p-loop、Kinase-2 a、Kinase-3a、GLPL 区) 的抗病基因同源序列, 分别命名为 F5-8 和 F5-20。对这 2 条 RGAs 序列与已知抗病基因番茄抗根结线虫基因 *Mi-1* (AF091048)、番茄抗根结线虫基因 *Mi-1.1* (NM_001247693.1)、番茄抗根结线虫基因 *Mi-copy2* (U81378.1)、辣椒抗根结线虫基因 *caMi* (DQ465824.1)、番茄抗胞囊线虫基因 *Hero* (AJ457051)、烟草抗 TMV 基因 *N* (AAA50763)、番茄抗叶霉菌病基因 *Cf-2* (2207203A)、番茄抗细菌性斑点病基因 *Pto* (A49332) 进行氨基酸序列比对。比对结果显示, F5-8 与 8 个已知抗病基因相应区域氨基酸相似性为 28%~94%, 其中 F5-8 与番茄抗根结线虫基因 *Mi-1* 相应区域氨基酸相似性为 94%, F5-8 与 2 个番茄抗根结线虫基因 *Mi-1.1*、*Mi-copy2* 和辣椒抗根结线虫基因 *caMi* 相应区域氨基酸相似性均为 92%。F5-20 与 8 个已知抗病基因相应区域氨基酸相似性为 28%~96%, 其中 F5-20 与番茄抗胞囊线虫基因 *hero* 基因相应区域氨基酸相似性为 96%, F5-20 与 4 个抗根结线虫基因相应区域氨基酸相似性均为 72% (图 1)。

用 Clustalx 软件构建系统发育树 (图 2)。从图 2 可以看出, 2 条 RGAs 与已知抗病基因分为 4 个分支, 2 条 RGAs 与 5 个 CC-NBS-LRR (*Mi-1*、*Mi-1.1*、*Mi-copy2*、*CaMi*、*Hero*) 聚为一类; 烟草抗

TMV 基因 *N* (TIR-NBS-LRR)、番茄抗叶霉菌病基因 *Cf-2* (LRR-TM)、番茄抗细菌性斑点病基因 *Pto* (STK) 分别各聚为一类; F5-8 和 F5-20 分别与 *Mi-1*、*Mi-1.1*、*Mi-copy2*、*CaMi* 和 *Hero* 聚在一起, 遗传距离非常小, 表明 F5-8 和 F5-20 可能为 CC-NBS-LRR 类抗病相关基因同源序列。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测分析

为确定研究发现的 F5-8 和 F5-20 与番茄抗南方根结线虫侵染的相关性, 采用实时荧光定量 PCR 检测 F5-8 和 F5-20 接种南方根结线虫 2 龄幼虫 24 h 的表达。结果显示 (图 3), 与对照相比 F5-8 在接种南方根结线虫 2 龄幼虫后 24 h 表达量显著上升, 而 F5-20 表达量下降, 初步推测 F5-8 和 F5-20 为南方根结线虫侵染相关基因同源序列, F5-8 较有可能为南方根结线虫抗性相关基因同源序列。

3 讨论

植物 RGAs 是一类在植物与病原物相互作用中担当重要角色、具有保守结构域和功能的基因, 可作为克隆功能性抗病基因的候选基因^[14]。迄今为止, 已在小麦、水稻、拟南芥等众多植物中发现了大量的 RGAs^[17-20]。但是并不是所有的 RGAs 都是抗病基因, 许多的 RGAs 被证实为假基因, 马铃薯中发现 179 个 RGAs 为假基因, 拟南芥中发现 10 个 RGAs 为假基因, 杨树中发现 161 个 RGAs 为假基因, 在已发现的番茄 RGAs 中 10% 被证实为假基因^[12, 21-24]。许多假基因与 NBS-LRR 具有很高的同源性, 但因移码或提早形成终止密码子等突变导致其序列较短, 序列比对发现 RGAs 假基因可能源于核苷酸的插入或缺失引起的点突变^[25]。假基因被认为是一类没有功能的基因, 但有些假基因可以转录成 mRNA^[26]。因此, 本研究发现的 2 条 RGAs 仅作为抗性候选基因, 需要进一步的试验明确其表达及功能。

在过去的十几年间, 超过 50 个植物基因组测序成功, 数以千计的 RGAs 被发现, 但仅有少数抗病基因得到克隆^[27-29]。因此, 研究 RGAs 与植物抗病进程的关系, 明确其功能对加快抗病基因的克隆具有重要作用。为了确定本研究发现的 F5-8 和 F5-20 两条 RGAs 是否为抗南方根结线虫病相关基因, 采用实时荧光定量 PCR 检测 F5-8 和 F5-20 接种南方根结线虫 2 龄幼虫后 24 h 的表达。本研究发

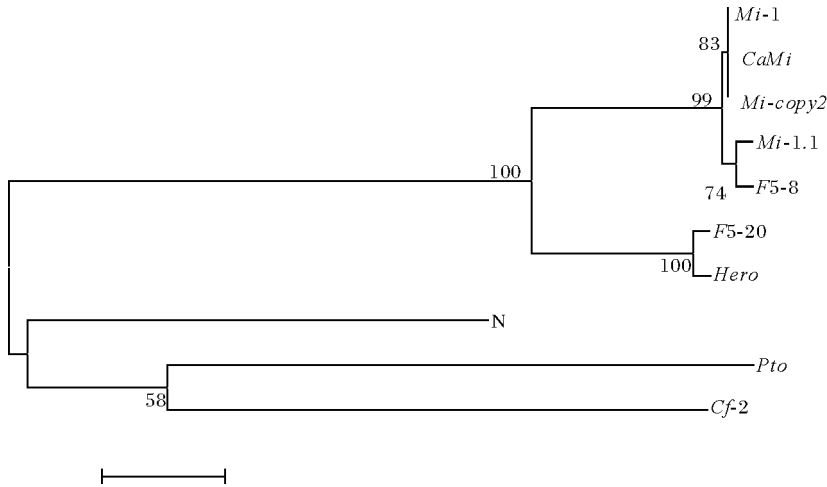
现, *F5-8* 和 *F5-20* 在接种南方根结线虫 2 龄幼虫 24 h 后其表达量均发生了变化, 可以初步推测 *F5-8* 和 *F5-20* 为南方根结线虫侵染相关基因同源序列, *F5-8* 较有可能为南方根结线虫抗性相关基因同源序列。进一步的试验需要获得其全长序列, 通过基因缺失及过表达验证其功能。

| | |
|-----------------|---|
| <i>Cf-2</i> | NLSMLYLYNNQLSGSIPASLGNLNNLSRLYLYNNQLSGSIPPEIGYLSSLTYLDSLNNNSIN |
| <i>Pto</i> | HKFLIGHGVFGKVVYKGVLRDGAQVAKLRRTPESSQGIIEBFETEIETLSFCRHPHLVSL -- |
| <i>N</i> | HNLRLTEWKSAIEHMKNNSSYSGIHDKLIKISYDGLPEKQQEMFLDIACFLRGEEDKYILQ |
| <i>F5-20</i> | R[GSGKTT]LANKVYNNLTVASHFNVRAKCTVSNFNKSKVLREILQQVTASETNGSE -- |
| <i>Hero</i> | PGVGGKTTLANKVYNNLTVASHFK IRAKCTVSNFNKSKVLREILQQVTASETNRSE-- |
| <i>F5-8</i> | RGLGKTTLAYKVVYNDKSVSSQFDLRAWCTVDQGYDDKLLDTIFSQVSDSDSKLSEN |
| <i>Mi-1.1</i> | P[GSGKTT]LAYKVVYNDKSVSSRFDLRAWCTVDQGCDEKLLNTIFSQVSDSDSKLSEN |
| <i>CaMi</i> | P[GSGKTT]LAYKVVYNDKSVSRHFDLRAWCTVDQGYDDKLLDTIFSQVSGSDSNLSEN |
| <i>Mi-1</i> | P[GSGKTT]LAYKVVYNDKSVSRHFDLRAWCTVDQGYDDKLLDTIFSQVSGSDSNL SEN |
| <i>Mi-copy2</i> | P[GSGKTT]LAYKVVYNDKSVSRHFDLRAWCTVDQGYDDKLLDTIFSQVSGSDSNLSEN |
| | p-loop |
| <i>Cf-2</i> | LYENQLASSVPEEIGYLRSLNVLDLSENALNGSIPASFGNLNNLSRLNLVNNQLSGS |
| <i>Pto</i> | IGFCDERNEMILYKYMENGNLKRHLYGSDLPMTSMMSWEQRLEICIGAARGLHYLH |
| <i>N</i> | LRILDKSLVFISEYNQVQMHDLIQDMGKYIVNFQKDPGE---R--SRLWLAKEVEE---- |
| <i>F5-20</i> | DDLAEKLRVALLDKRYL[VLDLDDVW]DIATGEMSIACFPKVERGNRVILTSRSGEVGLK |
| <i>Hero</i> | DDLAEKLRVALLDKRYL[VLDLDDVW]DIATGEMLIACFPKVERGNRVILTSRSGEVGLK |
| <i>F5-8</i> | IDVADKLRKQLFGKRYL[VLDLDDVW]DTTWTDELTRPFPEAKKGSRL[ILTTR]EKEVALH |
| <i>Mi-1.1</i> | IDVADKLRKQLFGKRYL[VLDLDDVW]DTTWTDELTRPFPEAKKGSRL[ILTTR]EKEVALH |
| <i>CaMi</i> | IDVADKLRKQLFGKRYL[VLDLDDVW]DTTTLDELTRPFPEAKKGSRL[ILTTR]EKEVALH |
| <i>Mi-1</i> | IDVADKLRKQLFGKRYL[VLDLDDVW]DTTTLDELTRPFPEAKKGSRL[ILTTR]EKEVALH |
| <i>Mi-copy2</i> | IDVADKLRKQLFGKRYL[VLDLDDVW]DTTTLDELTRPFPEAKKGSRL[ILTTR]EKEVALH |
| | Kinase-2 a Kinase-3a |
| <i>Cf-2</i> | IPEEIGYLRSLNVLDLSENALNGSIPASFGNLNNLSRLNLCIGAARGLHYLHTRAI |
| <i>Pto</i> | TRAIHRDVKSSINILLDENFVPKITDFGSKKGTELDQTHLSTVVKGTGTYIDPEYF |
| <i>N</i> | VMSNNTGTMMAMEAIWVSSYSSTLRFNSQAVKNMKRLRVFNMLWTETKHLPS L |
| <i>F5-20</i> | VKCRSDPVDLQVLTDEKSWELFEKRVFGDEGSCPAELLDIGHQIVEKCK[GGLPL]X |
| <i>Hero</i> | VKCRSDPVDLQVLTDEK--WELFEKRVFRDEGSCPAELLDIGHQIVEKCK[GGLPL]A |
| <i>F5-8</i> | GKLNTPDLRLRRPDESWELLEKRAFGNEICPDELLEDVKGKIAKIV----KGCL-X |
| <i>Mi-1.1</i> | GKLNTPDLRLRRPDESWELLEKRAFGNESCPEDELLDVGKIEAENC---[KGLPL]V |
| <i>CaMi</i> | GKLNTPDLRLRRPDESWELLEKRTFGNESCPEDELLDVGKIEAENC---[KGLPL]V |
| <i>Mi-1</i> | GKLNTPDLRLRRPDESWELLDKRTFGNESCPEDELLDVGKIEAENC---[KGLPL]V |
| <i>Mi-copy2</i> | GKLNTPDLRLRRPDESWELLEKRTFGNESCPEDELLDVGKIEAENC---[KGLPL]V |

用于序列比对的已知抗病基因序列来源于 GenBank。Vector NTI 软件进行序列比定时, NBS-LRR 结构域用黑框表示。The sequences of the *R* (*Mi-1* AF091048, *Mi-1.1* NM_001247693.1, *Mi-copy2* U81378.1, *CaMi* DQ465824.1, *Hero* AJ457051, *N* AAA50763, *Cf-2* 2207203A, *Pto* A49332) used for analysis were derived from GenBank. The NBS-LRR domains are indicated with boxes.

图 1 RGAs 推定的氨基酸序列与已知抗病基因保守结构域的对

Fig.1 Multiple alignment of amino acid sequences of RGAs with the NBS domains of other *R*



用 Mega5 软件中的邻近法(NJ)建立 RGAs 与已知抗病基因的系统进化树。它们的序列来源于 GenBank。系统树中结点处数值代表 1 000 次评估的自举检验置信度。Phylogenetic tree of RGAs and known R were performed using neighbor-joining algorithms in Mega 5 software, The sequences of the R (*Mi-1* AF091048, *Mi-1.1* NM_001247693.1, *Mi-copy2* U81378.1, *CaMi* DQ465824.1, *Hero* AJ457051, *N* AAA50763, *Cf-2* 2207203A, *Pto* A49332) used for analysis were derived from GenBank. The bootstrap confidence values shown at the nodes of the tree are based on 1 000 bootstrap replications.

图 2 RGAs 与已知抗病基因的系统进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of RGAs and known R

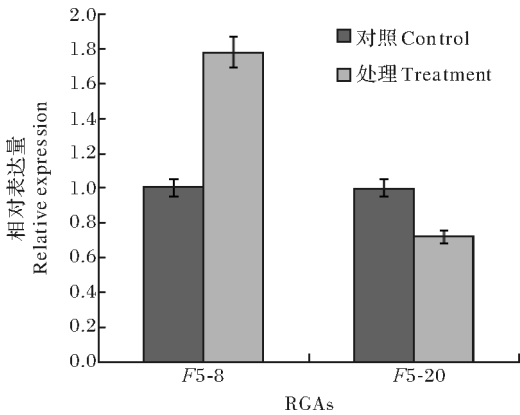


图 3 接种南方根结线虫 24 h 后 RGAs 的表达分析

Fig.3 Comparative analysis of the expression of RGAs 24 h after treated with *M. incognita*

参 考 文 献

[1] 赵鸿, 彭德良, 朱建兰. 根结线虫的研究现状[J]. 植物保护, 2003, 29(6): 6-9.
 [2] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 157-160.
 [3] 赵统敏, 王银磊, 杨玛丽, 等. 番茄根结线虫病抗性基因的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1492-1497.
 [4] MUHAMMAD A, FARRUKH A, AMJAD A, et al. Transgenic strategies for enhancement of nematode resistance in plants[J]. Frontiers in plant science, 2017, 5: e00750.
 [5] WILLIAMSON V M. Root-knot nematode resistance genes in

tomato and their potential for future use[J]. Phytopathol, 1998, 36: 277-293.
 [6] SOBCZAK M, AVROVA A, JUPOWICZ J, et al. Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene[J]. Plant Microbe Interact, 2005, 18: 158-168.
 [7] CAI D G, KLEINE M, KIFLE S, et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet[J]. Science, 1997, 275: 832-834.
 [8] VANDER V, VANDER V, KANYUKA K, et al. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens; a virus and a nematode[J]. Plant J, 2000, 23: 567-576.
 [9] HAMMOND K K E, JONES J D. Plant disease resistance genes[J]. Plant Mol Biol, 1997, 48: 575-607.
 [10] LEAH M, XIAOPING T, PATRICE K, et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards[J]. Genome biology, 2006, 7(4): 212-222.
 [11] MANDEEP S, AMIT A, BUNYAMIN T. Genetic analysis of NBS-LRR gene family in chickpea and their expression profiles in response to ascochyta blight infection[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 838.
 [12] ROBERTO L, OLGA P, MANUEL R, et al. Genome-wide identification and mapping of NBS encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group *Phureja* [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34775.
 [13] GIUSEPPE A, FLORIAN J, KAMIL W, et al. Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14: 120.

- [14] MANOJ K, SEKHWALI, PINGCHUAN L, et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 19248-19290.
- [15] 赵洪海, 武侠, 迟晓红. 不同番茄品种对根结线虫的感染性测定简报[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(2): 180-181.
- [16] 王新荣, 郑静君, 汪国平, 等. 华南地区主要番茄品种对南方根结线虫的抗性评价[J]. 植物保护, 2009, 35(1): 124-126.
- [17] WANG S S, WANG F, TAN S J, et al. Transcript profiles of maize embryo sacs and preliminary identification of genes involved in the embryo sac-pollen tube interaction[J]. *Plant Sci*, 2014, 5: 702-716.
- [18] ZHOU T, WANG Y, CHEN J Q, et al. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes [J]. *Mol Genet Genom*, 2004, 271: 402-415.
- [19] FRITZ-LAYLIN L K, KRISHNAMURTHY N, TOR M, et al. Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 611-623.
- [20] YU J, TEHRIM S, ZHANG F, et al. Genome-wide comparative analysis of NBS-encoding genes between *Brassica* species and *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Genom*, 2014, 15: 3-21.
- [21] MEYERS B C. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant cell*, 2003, 15: 809-834.
- [22] KOHLER A, RINALDI C, DUPLESSIS S, et al. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 619-636.
- [23] PAN Q, LIU Y S, BUDAI H, et al. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis* [J]. *Genetics*, 2000, 155: 309-322.
- [24] ANDOLFO G, SANSEVERINO W, AVERSANO R, et al. Genome-wide identification and analysis of candidate genes for disease resistance in tomato[J]. *Mol Breed*, 2013, 33: 227-233.
- [25] LIU J J, EKRAMODDOULLAH A K. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don) [J]. *Mol Genet Genom*, 2003, 270: 432-441.
- [26] MARONE D, RUSSO M A, LAIDO G, et al. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses [J]. *Mol Sci*, 2013, 14: 7302-7326.
- [27] NORDBERG H, CANTOR M, DUSHEYKO S, et al. The genome portal of the department of energy joint genome institute: 2014 updates[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D26-D31.
- [28] GOODSTEIN D M, SHU S, HOWSON R, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D1178-D1186.
- [29] MONACO M K, STEIN J, NAITHANI S, et al. Gramene 2013: comparative plant genomics resources[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D1193-D1199.

Cloning and analysis of root knot nematode resistance gene of NBS-LRR analogs from tomato

LU Xiuhong¹ ZHANG Yu² QIN Shuting² HUANG Jinling¹ ZHANG Yu¹ LIU Zhiming¹

1. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences / Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning 530007, China;
2. College of Arts and Sciences, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract Degenerated primers were designed according to the conserved regions of NBS-LRR domain from known plant resistance genes. Then these primers were used for amplification of the NBS-LRR analogs from *Lycopersicon esculentum*. Sequence analysis showed that 5 fragments contained the resistance gene analogs, two of which have the ORF region and conserved NBS-LRR domain. *F5-8* (MG860907) shared 94% identity with the resistance genes of *Mi-1*, and *F5-20* (MG860908) shared 96% identity with the resistance genes of *Hero*. The quantitative real-time PCR results showed that expression of *F5-8* and *F5-20* was changed after *Meloidogyne incognita* infection, suggesting that *F5-8* and *F5-20* might be related with nematode infection.

Keywords *Lycopersicon esculentum*; *Meloidogyne incognita*; resistance gene analogs (RGAs); NBS-LRR