

黄毛草莓编码 NB-ARC 结构域的 *FnCN* 基因和 启动子克隆及 *FnCN* 基因表达分析

胡玉慈¹, 姚立萍², 张童¹, 何淑敏³, 唐鑫彪¹, 陈清西^{1,①}, 文志丰^{1,①}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福州市农业科学研究所, 福建 福州 350018;
3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 利用同源克隆技术得到黄毛草莓 (*Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay) 中编码 NB-ARC 结构域的抗病相关基因 *FnCN* 及启动子序列。序列分析结果表明: *FnCN* 基因开放阅读框的长度为 933 bp (GenBank 登录号 MN240290), 编码 310 个氨基酸残基, 其 N 端有 1 个 Rx-CC 结构域, C 端有 1 个保守的 NB-ARC 结构域。该基因起始密码子上游启动子 *pFnCN* 序列的长度为 910 bp (GenBank 登录号 MN240291), 包含 TATA-box、CAAT-box、激素响应元件、干旱诱导 MYB 结合位点、光响应元件和厌氧诱导顺式作用元件等。氨基酸序列的同源性比对结果表明: 黄毛草莓 *FnCN* 基因与野草莓 (*Fragaria vesca* Linn.) *CN* 基因编码氨基酸序列的相似性最高 (95.16%)。成功构建了黄毛草莓 *FnCN* 基因的植物过表达载体 pCAMBIA1301-HA-*FnCN* 和病毒诱导基因沉默载体 pTRV2-*FnCN*。实时荧光定量 PCR 检测结果表明: 黄毛草莓叶片接种胶孢炭疽菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 后 0~3 h *FnCN* 基因表达下调, 之后逐渐上调; 接种后 48 h 该基因的相对表达量最高, 是接种后 0 h 的 3.3 倍。研究结果显示: 黄毛草莓 *FnCN* 基因响应胶孢炭疽菌的胁迫, 推测其在黄毛草莓抗炭疽病过程中发挥着重要作用。

关键词: 黄毛草莓; 炭疽病; NB-ARC 结构域; *FnCN* 基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q785; S668.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)04-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.04.01

Cloning of *FnCN* gene encoding NB-ARC domain and its promoter from *Fragaria nilgerrensis* and analysis on *FnCN* gene expression HU Yuci¹, YAO Liping², ZHANG Tong¹, HE Shumin³, TANG Xinbiao¹, CHEN Qingxi^{1,①}, WEN Zhifeng^{1,①} (1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Fuzhou Institute of Agricultural Science, Fuzhou 350018, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(4): 1-10

Abstract: Sequences of disease-resistant related gene *FnCN* encoding NB-ARC domain and its promoter were obtained from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay by using homologous cloning technology. The sequence analysis result shows that the length of open reading frame of *FnCN* gene is 933 bp (GenBank accession number MN240290), which encodes 310 amino acid residues, including a Rx-CC domain at N-terminal and a conserved NB-ARC domain at C-terminal. The sequence length of up-stream promoter *pFnCN* of start codon of *FnCN* gene is 910 bp (GenBank accession number MN240291), which includes *cis*-acting elements such as TATA-box, CAAT-box, hormone responsive element, MYB binding site in drought induction, light responsive element, and *cis*-acting element in anaerobic induction, etc. The homologous alignment result of amino acid sequence shows that amino acid sequence encoded by *FnCN* gene from *F. nilgerrensis* has the highest similarity (95.16%) with that encoded by *CN* gene from *Fragaria vesca* Linn. The plant overexpression vector pCAMBIA1301-HA-*FnCN* and virus induced gene

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家自然科学基金(青年项目)(31701907); 福建省自然科学基金项目(2018J01703); 福建农林大学杰出青年科研人才计划项目(xjq201723); 福建省教育厅中青年教育科研项目(JAT170163); 福建省现代农业产业技术体系建设专项(闽财指[2017]625号)

作者简介: 胡玉慈(1998—), 女, 江西萍乡人, 本科, 主要从事果树抗病方面的研究。

①通信作者 E-mail: cqx0246@163.com; zhifengwen@126.com

silencing vector pTRV2-*FnCN* of *FnCN* gene from *F. nilgerrensis* are successfully constructed. The detection result of real-time fluorescence quantitative PCR shows that *FnCN* gene expression in leaf of *F. nilgerrensis* is down-regulated at 0–3 h after inoculation of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., and then gradually up-regulated. The relative expression of *FnCN* gene is the highest at 48 h after inoculation, which is 3.3 times that at 0 h after inoculation. It is suggested that *FnCN* gene of *F. nilgerrensis* can response to *C. gloeosporioides* stress, indicating that it may play an important role in anti-anthracnose process of *F. nilgerrensis*.

Key words: *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay; anthracnose; NB-ARC domain; *FnCN* gene; real-time fluorescence quantitative PCR

植物抗性(resistance, *R*)基因可介导植物对各种病原体的防御反应,如细菌、真菌和病毒,甚至是一些昆虫和线虫等^[1],大多数 *R* 基因可编码 NB-ARC 类抗病蛋白^[2],该类抗病蛋白根据 N 端结构域的不同进一步分为含有 TIR (toll/interleukin-1 receptor) 的 TNL (TIR-NB-ARC-LRR) 蛋白、含有 CC (coiled-coil) 的 CNL (CC-NB-ARC-LRR) 蛋白以及含有 RPW8 (resistance to powdery mildew 8) 的 RNL (RPW8-NB-ARC-LRR) 蛋白^[3-4]。植物基因组内编码 NB-ARC 结构域的抗病基因在其抵御病原菌侵染时起重要作用^[1-2]。Jia 等^[5]研究发现,在植物基因组中,约有 0.2%~1.6% 基因被预测为 NB-ARC 编码基因。迄今为止,已从苹果 (*Malus pumila* Mill.)^[6]、山葡萄 (*Vitis amurensis* Rupr.)^[7]、陆地棉 (*Gossypium hirsutum* Linn.)^[8]、草莓 (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)^[9]、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)^[10] 和花生 (*Arachis hypogaea* Linn.)^[11] 等植物中克隆到 NB-ARC 类抗病基因,大多数 NB-ARC 类抗病基因能响应病原菌的侵染,并通过水杨酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 等信号途径来调控植物对病原菌的防御反应。此外,有研究发现草莓 FaNBS 编码基因可进一步融合 WRKY、Pkinase、MBY 和 RPW8 等结构域发挥其抗病作用^[12]。

草莓隶属于蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属 (*Fragaria* Linn.), 为多年生草本植物,其栽培面积和产量居世界小浆果生产的首位^[13]。由炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 引发的草莓炭疽病是对草莓破坏性极大的病害之一,可造成 80% 以上的草莓幼苗死亡,损失 50% 以上的产量^[14]。目前,对草莓炭疽病的防治仍然采用喷施农药的化学防治,而化学防治易造成果实残毒和环境污染,降低了草莓鲜食及加工产品的品质,因此,培育草莓抗病品种是最经济且有效控制病害的方

法^[15-16]。黄毛草莓 (*Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay) 对叶斑病、炭疽病和蚜虫等病虫害具有较强的抗性,有重要的育种价值^[17]。黄毛草莓主要分布在亚洲东南部,在中国分布于湖南、湖北、云南、贵州、四川、陕西和台湾等地^[18]。马鸿翔等^[19] 研究发现,黄毛草莓叶斑病和炭疽病的田间自然发病率较低,且与部分栽培种杂交后其抗病性能遗传。黄金凤^[20] 通过田间自然发病和接种评价方法,发现黄毛草莓对炭疽病有较强抗性。从黄毛草莓中克隆相关抗病基因并明确其抗病机制,对深入了解黄毛草莓抗病机制及培育抗炭疽病草莓品种具有重要意义。

黄毛草莓对外界不良环境抗性强、适应性好,对草莓品种改良具有重大意义。预实验结果显示:黄毛草莓离体叶片接种胶孢炭疽菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 后,发病率仅 27.78%,病情指数为 16.92,说明黄毛草莓对草莓炭疽病具有较强抗性,但目前国内外对黄毛草莓抗炭疽病方面的研究较少。作者所在课题组前期对黄毛草莓接种胶孢炭疽菌,利用转录组测序技术从黄毛草莓中筛选到 1 个受胶孢炭疽菌诱导表达的序列。本研究利用同源克隆技术从黄毛草莓中获得 *CN* 基因及其启动子序列,对该基因编码的氨基酸序列进行生物信息学分析,同时构建了该基因的植物过表达载体和病毒诱导基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 载体,并利用实时荧光定量 PCR 技术对接种胶孢炭疽菌后的黄毛草莓叶片中 *CN* 基因的转录水平进行了检测,以期明确黄毛草莓 *CN* 基因的抗病功能提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试黄毛草莓由北京市农林科学院张运涛课题

组提供,栽培于福建农林大学园艺学院果树抗病与遗传育种实验室,胶孢炭疽菌菌株 Lch-1911 由湖北省农业科学院韩永超副研究员馈赠。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞、植物过表达载体 pCAMBIA1301-HA 和烟草脆裂病毒载体 pTRV2 由福建农林大学园艺学院果树抗病与遗传育种实验室保存。氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 和卡那霉素 (kanamycin, Kana) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PCR Master Mix、RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、DNA Secure Plant Kit 植物基因组 DNA 提取试剂盒、Universal DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒和 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; *Bam*H I、*Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶, DNA Marker, pMD20-T 载体, Solution I, PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒, PrimeScript® RT reagent Kit 反转录试剂盒以及 RR820A SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒购自日本 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 处理方法 参照韩永超等^[21]的方法制备胶孢炭疽菌分生孢子悬浮液,将胶孢炭疽菌接种至新鲜 PDA 培养基上,于温度 28 °C、避光条件下活化 3~5 d,再从活化后的菌落边缘取菌丝块转接到含体积分数 0.05% 酵母提取液的 PDA 培养基上,于温度 28 °C、避光条件下培养至平板上长出橘红色分生孢子,用灭菌枪头或牙签将菌丝轻轻刮下,无菌水冲洗、重悬,通过 4 层纱布滤去菌丝和培养基杂质,使用血球计数板和 DMi8 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司),用无菌水稀释为孢子浓度 1×10^6 mL⁻¹ 的孢子悬浮液,置于 4 °C 条件下备用。

参照 Zhang 等^[22]的方法,处理组将胶孢炭疽菌分生孢子悬浮液接种到活体黄毛草莓叶片上,对照组接种无菌水,每组分别从 15 株生长健康的黄毛草莓植株上取由上至下第 3 至第 6 位叶片,共接种 50 枚叶片,然后放置在人工气候室培养,培养条件为温度 25 °C、空气相对湿度 70%、光照时间 12 h · d⁻¹ 及光照强度 125 μ mol · m⁻² · s⁻¹。接种后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 每组在同一时间随机采集 2~3 枚叶片置于液氮中速冻,然后置于 -80 °C 冰箱中保存、备用,每组 3 次重复。

1.2.2 黄毛草莓 *CN* 基因和启动子克隆 用无菌剪

刀剪取无病虫害、生长势良好的 5 枚新叶,装入无菌自封袋后迅速放入冰盒中,备用。将叶片置于液氮中研磨成粉末状,以 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第 1 链,再利用 DNA Secure Plant Kit 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。采用 Primer 5.0 软件设计扩增黄毛草莓 *CN* 基因完整开放阅读框 (ORF) 的正向和反向引物,FnCN-F 序列为 5'-ATGGAGTTT GCCGCCATCATTGCT-3',FnCN-R 序列为 5'-AAGT CTGTTATGTGTGGGATAA-3'。设计黄毛草莓 *CN* 基因起始密码子上游启动子序列的正向和反向引物,P-FnCN-F 序列为 5'-ATCCTCCCTGCCAATGAAAAG ACG-3',P-FnCN-R 序列为 5'-GAAGAGAGAAAGA GAGGTTTTATG-3'。分别以 cDNA 第 1 链和叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增体系总体积为 25.0 μ L,包括 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L、正向和反向引物各 1.0 μ L、模板 1.0 μ L 和无菌水 9.5 μ L。扩增程序为:94 °C 预变性 90 s;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,38 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 反应产物经质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 Universal DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段,将回收产物连接到 pMD20-T 载体上,然后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,菌液涂布于含 100 mg · L⁻¹ Amp 的 LB 平板上进行筛选,挑取阳性单菌落进行 PCR 检测,将条带正确的 5 个阳性克隆菌株送至铂尚生物技术 (福州) 有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用 ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) 预测黄毛草莓 *CN* 基因编码的氨基酸序列;利用 NCBI 网站中 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 预测其保守结构域和寻找同源性较高的氨基酸序列;使用 DNAMAN 7.0 软件进行不同种类间同源基因编码氨基酸序列的相似性比较;使用 MEGA 6.0 软件中的邻接 (NJ) 法构建系统进化树;利用 ExPASy-ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测黄毛草莓 *CN* 基因编码氨基酸序列的理化性质;通过在线网站 SignalP 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/?tdsourcetag=s_pctim_aiomsg) 进行信号肽预测;使用 TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜预测;利用在线工具 PSORT Prediction (<http://psort.hgc.jp/form>

2.html)进行亚细胞定位预测;利用SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测黄毛草莓CN蛋白的二级结构;利用PlantCARE数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对启动子序列进行顺式作用元件预测。

1.2.4 植物过表达载体和病毒诱导基因沉默载体构建 根据上述测序结果设计带有 *BamH* I 和 *Kpn* I 酶切位点的植物过表达载体引物,FnCN-over-F 序列为 5'-CGGGATCCCGATGGAGTTTGCCGCCATCATTCCT-3',FnCN-over-R 序列为 5'-GGGGTACCCCTTCTCCCACACATAACAGACTTTT-3',进行PCR扩增,扩增体系和程序同1.2.2。用 *BamH* I 和 *Kpn* I 对 *FnCN-over* 质粒和植物过表达载体 pCAMBIA1301-HA 质粒进行双酶切,回收目的基因小片段和植物过表达载体大片段。根据黄毛草莓 CN 基因的沉默区间设计带 *BamH* I 和 *Xba* I 酶切位点的病毒诱导基因沉默载体引物,TRV2-FnCN-F 序列为 5'-GCTCTAGAGCCCAACAACCATGGGCGTGCAAAG-3',TRV2-FnCN-R 序列为 5'-CGGGATCCCGTTTTCTGAGACACATACCCACAT-3',进行PCR扩增,扩增体系和程序同1.2.2。用 *BamH* I 和 *Xba* I 对 TRV2-FnCN 质粒和病毒载体 pTRV2 进行双酶切,获得目的基因小片段和病毒载体大片段。用 Solution I 连接双酶切基因小片段和载体大片段,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用含 100 mg · L⁻¹ Kana 的 LB 培养基进行筛选,挑取单菌落进行PCR检测,培养阳性菌株提取质粒进行酶切验证,选取5个条带正确的阳性菌株送至铂尚生物技术(福州)有限公司测序。

1.2.5 黄毛草莓 CN 基因实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 采用 RT-qPCR 检测黄毛草莓叶片在接种胶孢炭疽菌后 0、3、6、12、24、48 和 72 h 黄毛草莓 CN 基因的相对表达量,以草莓 *Actin* 基因 (GenBank 登录号 AB116565) 为内参基因。使用 PrimeScript[®] RT reagent Kit 反转录试剂盒反转录合成 cDNA 用于 RT-qPCR 定量分析,RT-qPCR 扩增引物 Real-FnCN-F 序列为 5'-CGCCATCATTGCTGAGAACA-3',Real-FnCN-R 序列为 5'-GCGTACCTGTCCTTGACAC-3'。内参基因扩增引物 Real-FnActin-F 序列为 5'-GCCAGAAAGATGCTTATGTCCGGT-3',Real-FnActin-R 序列为 5'-TGGGGCAACACGAAGCTCAT-3'。扩增体系总体积为 12.50 μ L,包括 SYBR

Premix Ex Taq[™] 6.25 μ L、正向和反向引物各 0.50 μ L、cDNA 模板 1.00 μ L 和无菌水 4.25 μ L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s;60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环。每个样品均设置 3 次生物学重复和技术重复,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法^[23]分析黄毛草莓 CN 基因的相对表达量。

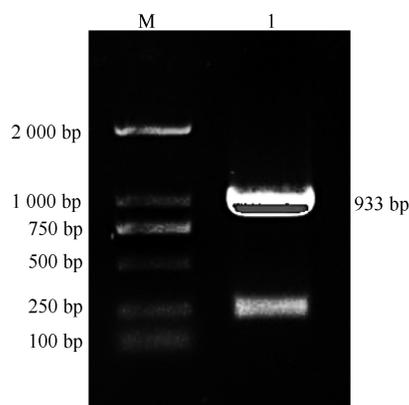
1.3 数据处理

采用 EXCEL 2010 和 SPSS 20.0 软件进行数据分析,采用单因素方差分析和 Duncan's 多重比较方法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 黄毛草莓 *FnCN* 基因和启动子克隆及序列分析结果

2.1.1 黄毛草莓 *FnCN* 基因克隆及序列分析 根据获得的黄毛草莓转录组数据与野草莓 (*Fragaria vesca* Linn.) 相同的 unigene,通过 Primer 5.0 软件设计,利用引物 FnCN-F 和 FnCN-R,以黄毛草莓叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到 1 个长度约 1 000 bp 的条带(图 1)。然后进行连接转化、菌液 PCR 检测阳性克隆及测序,结果显示:黄毛草莓 *FnCN* 基因的开放阅读框长度为 933 bp (GenBank 登录号 MN240290),共编码 310 个氨基酸残基。通过生物信息学分析,*FnCN* 基因编码的氨基酸序列的 N 端包含 1 个 Rx-CC 结构域,C 端包含 1 个保守的 NB-ARC 结构域(图 2)。上述结果表明:*FnCN* 基因属于 NB-



M: DL2000 DNA marker; 1: *FnCN* 基因 *FnCN* gene.

图 1 黄毛草莓 *FnCN* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *FnCN* gene from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay

```

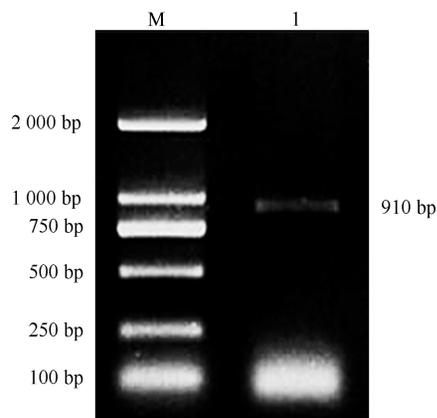
1  ATGGAGTTTGCCGCCATCATTGCTGAGAACATCCTGGGAAGGCTAGCTTCCCATGCTTCTCAAGAGGTCTCTTTGGCATGGGGTGCCCAA
1  M E F A A I I A E N I L G R L A S H A S Q E V S L A W G A Q
91  CTTGAGCTCACAAAGCTCACGAACACTCTATCCACCATCAATCTAGTGCTTCAGGATGCAGAGAAGAAGCAAGTGAAGAATCTCCTAATC
31  L E L T K L T N T L S T I N L V L Q D A E K K Q V K N L L I
181  ACTGATTGGTTGGAAAGCTCAAAGATGTTGTTACGACGTCGATGATGTCCTTGACGAACTGGAGTTCGAAAAGCTGCGGAAGAAAGTG
61  T D W L G K L K D V C Y D V D D V L D E L E F R K L R K K V
271  CTGGCCAACAACCATGGGCGTGTCAAAGGACAGGTACGCCACTTTTTTCGCGTTGGAATCCAACAGTGTTTAACTTCAATATGGGACAT
91  L A N N H G R V K G Q V R H F F S R W N P T V F N F N M G H
361  AAGTGAAAGAGATTAGGGAACGACTTGTGAAATTGATAATGAAAAGAGACAGTTTGCTCTGGTTGAGGTGCCTAAGATAGCTGAAGAT
121  K V K E I R E R L V E I D N E K R Q F A L V E V P K I A E D
451  CATAGTGCTCCCAAGGGATGCAATACAATCAAAGAGAAGCTGATTCTTGGTAGAGGCTTCAGAAGTTATTGGGAGAGATGATGATAAA
151  H S A P Q G M Q Y N Q R E A D S L V E A S E V I G R D D D K
541  GAGCTAATTTTGTAGTCATCTCTTACATAACACTGATATCTCTAATGAGGAGAATGTTTCTGTTATTTCATCCTTGGGTGGGGGGGTG
181  E L I F S H L L H N T D I S N E E N V S V I S I L G L G G L
631  GGTAAGACAACGCTGGCTAAATTGGTGTACAATGATAGCGTGGTAGAGGAGAATTTGAGGTGAAAATGTGGGTATGTGTCTCAGAAAAC
211  G K T T L A K L V Y N D S V V E E N F E V K M W V C V S E N
721  TTTGAAGTCAAATCATAATTCTCAAGATTATCAATGCTGCAACTGATCAAAAATGTGAGGATGAAAGTTGGACCGTATGAAAAGAAGG
241  F E V K S L I L K I I N A A T D Q K C E D E S L D R M K R R
811  TTGCAAGATACTTTGAGAGGTAGAAAGTATTTGTTAGTGTTAGATGATGTTTGGGATACGGAGTCTGTTGGAGTAAACCAGAAAAATGG
271  L Q D T L R G R K Y L L V L D D V W D T E S V G V T P E K W
901  TTGGGTATAAAAAGTCTGTTATGTGTGGGAATAA
301  L G I K S L L C V G *
    
```

首尾方框分别示起始密码子和终止密码子 The boxes in the beginning and end represent start codon and stop codon, respectively; Rx-CC, NB-ARC; 结构域 Domain.

图 2 黄毛草莓 *FnCN* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列
 Fig. 2 Nucleotide sequence of *FnCN* gene from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay and its encoding amino acid sequence

ARC 类基因家族。

2.1.2 启动子克隆及序列分析 利用引物 P-FnCN-F 和 P-FnCN-R 从黄毛草莓基因组 DNA 中扩增得到 1 个长度约 900 bp 的启动子条带(图 3)。测序结果显示,该启动子序列的长度为 910 bp,命名为 *pFnCN* (GenBank 登录号 MN240291)。利用 PlantCARE 数据库对该序列进行顺式作用元件预测,结果(图 4)表明:该启动子不仅含有 TATA-box(核心启动子元件)和 CAAT-box(启动子和增强子区的顺式作用元件)等基本顺式作用元件,还存在 TGACG-motif(茉莉酸甲酯响应元件)、ABRE(脱落酸响应元件)、MBS(干旱诱导 MYB 结合位点)、G-box(光响应元件)、GT1-motif(光响应元件)和 ARE(厌氧诱导顺式作用元件)等。说明黄毛草莓 *FnCN* 基因能响应多种植物激素的诱导,在黄毛草莓受到逆境胁迫时可能发挥重要作用。



M: DL2000 DNA marker; 1: *FnCN* 基因启动子 *FnCN* gene promoter.

图 3 黄毛草莓 *FnCN* 基因启动子的 PCR 扩增结果
 Fig. 3 PCR amplification result of *FnCN* gene promoter from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay

-910 CTTACCTCAGGAGGAATGCGATCTGGTTGCATGCAAATTCACAGCTTCAACCCACTCATCAATTCATCGATTGCGAACCTGTAAGCAAAA
CAAT-box

-820 ACGTGTGCAAAATGTGCACAACGCTCTGCTCCAGCTTCAACACCTTCTTCAGTTAATCGCTTTTCAATGAGAAATTCACGCGCTGTCCC
ABRE CAAT-box

-730 TCAAATATCCTCCCTGCCAATGAAAAGACGCCAAGCGTCTCGGAACCACATTGGCGTACGGTACCTTGGAGTAGTCCAGCGCTTCCATAA

-640 AAGGATTCAACTTGTGTAAGATGAGAGACGAAAAGTAGACCCAAGCAGAGAGAAGAGTGAATGACTGGAGCCGACAATTTGTCTCTCTCTG

-550 TCTATATCAACTGTGTGATTACAACAACCTCTATCTTGCTGAAAATGCAAAACATGAATCAAGTCATTTAGATCTGTTTGAACCTCTCCT
TATA-box MBS

-460 ACCAAACTGAAGCTTCTTCAACACACCAAAACCAGTGTGCCCAATTAATCGAGCAACCCCAATTCATCTGCCTTTGCCTACGAAAAATTT
ARE

-370 AACCGAGGATGTGTACTACACGCTTAACAGGCCTTGACGGAGAAATCAACAGCAAATCAATGACTGCTTGACACGTCTACACAGACAAA
GT1-motif TGACG-motif G-box

-280 CCGAGTACATGCAGAGCTGTACATTCCAAAGCTCTCCCATAAATGTTGAAAGTTGAAACATGCGATGGTGGGACCAGTGGAATAGAGA

-190 ACTATCCTGACGTTTAGTGCAAAATGATTGATACCTGGCTGGCTTATAGCTGTCGACCATTTAATTATCGAGCAGAATAATTGAGGGAAG
TGACG-motif

-100 ACTTGTTGACTGGACTTCATCACTCGTTATTCCAATCTGGGATCGATTTTCATCTATTTCTTCTTCACTCACCTCATAAAACCTCTCT

-10 TTCTCTCTTC

CAAT-box: 启动子和增强子区的顺式作用元件 *Cis-acting element in promoter and enhancer regions*; ABRE: 脱落酸响应元件 *Abscisic acid responsive element*; TATA-box: 核心启动子元件 *Core promoter element*; MBS: 干旱诱导 MYB 结合位点 *MYB binding site in drought induction*; ARE: 厌氧诱导顺式作用元件 *Cis-acting element in anaerobic induction*; GT1-motif, G-box: 光响应元件 *Light responsive element*; TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件 *Methyl jasmonate responsive element*.

图4 黄毛草莓 *FnCN* 基因启动子序列及其顺式作用元件

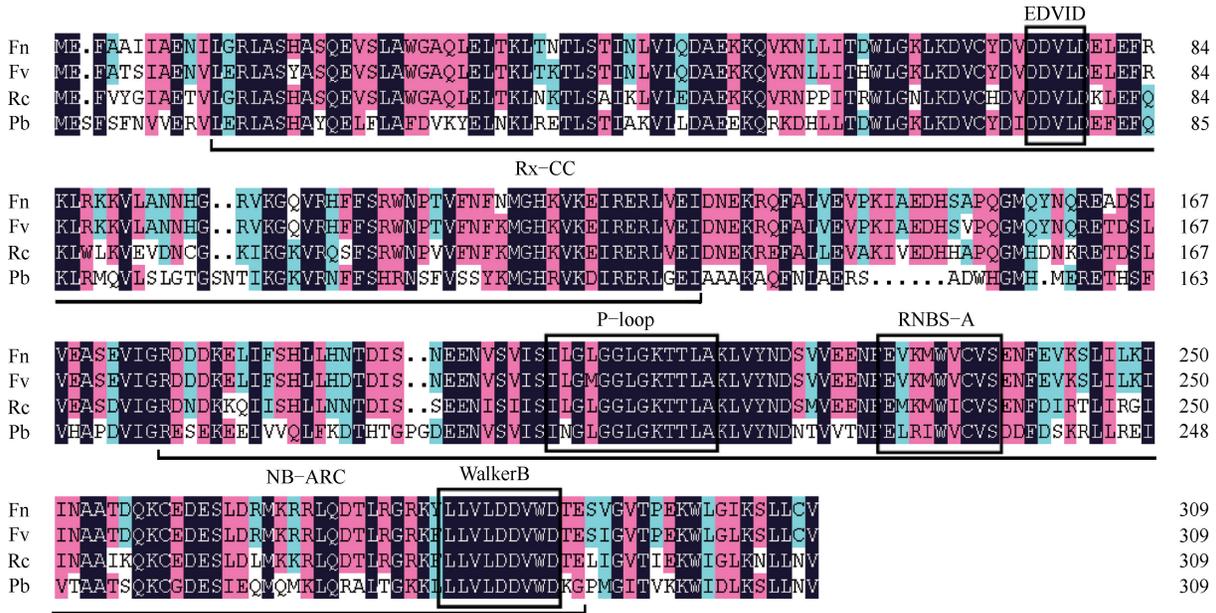
Fig. 4 Sequence of *FnCN* gene promoter and its *cis-acting element* from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay

2.2 黄毛草莓 *FnCN* 基因编码氨基酸序列的理化性质及同源性分析

2.2.1 理化性质分析 ExPasy-ProParam 预测结果表明:黄毛草莓 *FnCN* 基因编码氨基酸序列的分子式为 $C_{1567}H_{2524}N_{432}O_{475}S_9$, 理论相对分子质量为 35 304.43, 理论等电点为 pI 5.43, 不稳定系数为 29.57, 脂肪系数为 104.00, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.279, 推测 *FnCN* 蛋白为稳定的亲脂亲水性蛋白。SignalP 4.1 预测结果表明: *FnCN* 基因编码的氨基酸序列无信号肽, 说明 *FnCN* 蛋白不是分泌蛋白。TMHMM 预测结果表明: *FnCN* 基因编码氨基酸序列中第 1 至第 310 位的氨基酸残基均在膜外, 表明其不存在跨膜区。PSORT Prediction 预测结果表明: *FnCN* 蛋白在细胞质中的可能性较大, 推测 *FnCN* 蛋白位于细胞质中。SOPMA 预测结果表明: *FnCN* 蛋白二级结构中包含 63.55% 的 α -螺旋 (α -helix)、22.26% 的无规则卷曲 (random coil)、11.61% 的延伸链 (extended strand) 以及 2.58% 的 β -转角 (β -turn)。

2.2.2 同源序列比对和进化树分析 BLAST 分析结果显示:黄毛草莓 *FnCN* 基因与 GenBank 上已经公布的野草莓 (GenBank 登录号 XP_004306372.1)、月季花 (*Rosa chinensis* Jacq., GenBank 登录号 XP_024155851.1) 和白梨 (*Pyrus bretschneideri* Rehd., GenBank 登录号 XP_009334476.1) 的 *CN* 基因编码的氨基酸序列的相似性分别为 95.16%、77.42% 和 55.77%。氨基酸序列同源性比较结果 (图 5) 表明:黄毛草莓 *FnCN* 基因与野草莓 *CN* 基因编码氨基酸序列的同源性最高, 其次为月季花和白梨。

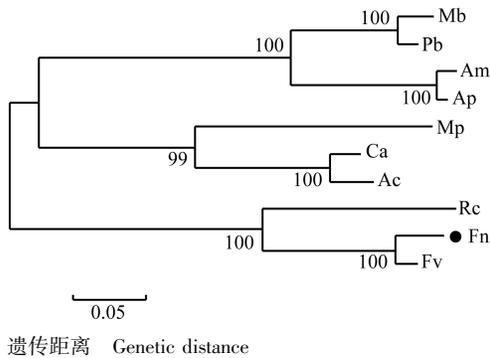
系统进化树 (图 6) 显示:黄毛草莓和野草莓首先聚在一起, 然后再与月季花聚为一个分支, 三者均为蔷薇亚科 (Subfam. Rosoideae Focke) 植物, 说明这 3 个种类的进化关系较近, 加之其同源性也较高, 推测其蛋白质功能也相近。山荆子 [*Malus baccata* (Linn.) Borkh., GenBank 登录号 TQE08476.1]、白梨、梅 (*Armeniaca mume* Sieb., GenBank 登录号 XP_008238997.1)、桃 (*Amygdalus persica* Linn., GenBank 登录号 XP_020420253.1)、苹果 (*Malus pumila* Mill.,



Fn: 黄毛草莓 *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay; Fv: 野草莓 *Fragaria vesca* Linn.; Rc: 月季花 *Rosa chinensis* Jacq.; Pb: 白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd. EDVID, P-loop, RNBS-A, WalkerB: 基序 Motif; Rx-CC, NB-ARC: 结构域 Domain.

图 5 黄毛草莓 *FnCN* 基因与其他种类 *CN* 基因编码氨基酸序列的同源性比较结果

Fig. 5 Homology comparison result of amino acid sequences encoded by *FnCN* gene from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay and by *CN* gene from other species



分支上数据为置信度 Datums in the branches are confidence. Mb: 山荆子 *Malus baccata* (Linn.) Borkh.; Pb: 白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd.; Am: 梅 *Armeniaca mume* Sieb.; Ap: 桃 *Amygdalus persica* Linn.; Mp: 苹果 *Malus pumila* Mill.; Ca: 欧洲甜樱桃 *Cerasus avium* (Linn.) Moench; Ac: 扁桃 *Amygdalus communis* Linn.; Rc: 月季花 *Rosa chinensis* Jacq.; Fn: 黄毛草莓 *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay; Fv: 野草莓 *Fragaria vesca* Linn.

图 6 黄毛草莓 *FnCN* 基因与其他种类 *CN* 基因编码氨基酸序列的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *FnCN* gene from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay and by *CN* gene from other species

GenBank 登录号 XP_008361183.2)、欧洲甜樱桃 [*Cerasus avium* (Linn.) Moench, GenBank 登录号 XP_021802074.1] 和扁桃 (*Amygdalus communis* Linn.,

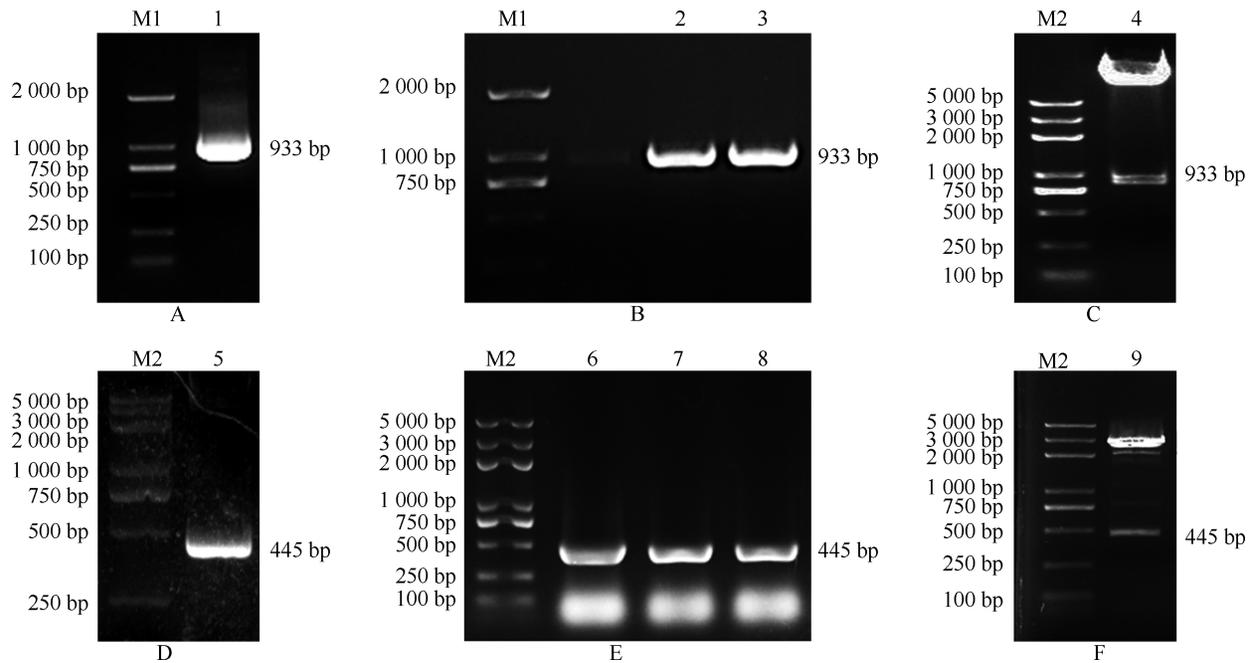
GenBank 登录号 BBH04143.1) 聚为另一个分支, 与黄毛草莓的亲缘关系较远。

2.3 植物过表达载体和病毒诱导基因沉默载体的构建

根据序列信息设计带有酶切位点 *BamH* I 和 *Kpn* I 的植物过表达载体引物 *FnCN-over-F* 和 *FnCN-over-R* 以及 *BamH* I 和 *Xba* I 酶切位点的病毒诱导基因沉默载体引物 *TRV2-FnCN-F* 和 *TRV2-FnCN-R* 分别进行 PCR 扩增, 分别获得长度 933 和 445 bp 的目的基因片段(图 7-A, D)。筛选单菌落进行 PCR 检测(图 7-B, E), 提取阳性菌株质粒进行双酶切验证, 电泳结果显示 2 个条带(图 7-C, F), 对阳性菌株的测序结果与预期构建序列一致, 说明成功构建出植物过表达载体 pCAMBIA1301-HA-*FnCN* 和病毒诱导基因沉默载体 pTRV2-*FnCN*。

2.4 接种胶孢炭疽菌后 *FnCN* 基因的表达分析

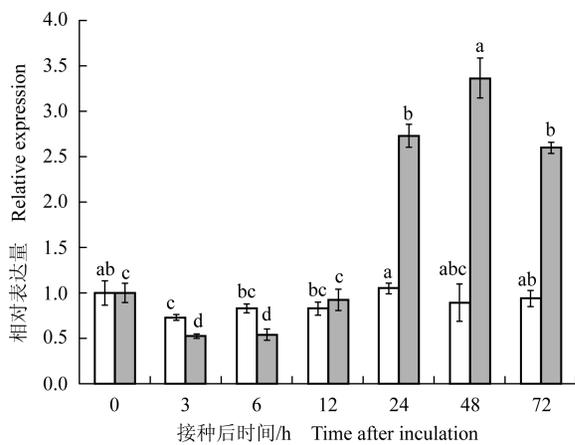
实时荧光定量 PCR 检测结果(图 8)显示: 对照(接种无菌水)组黄毛草莓叶片 *FnCN* 基因的相对表达量变化不大。接种胶孢炭疽菌后, 随着时间的推移, *FnCN* 基因的相对表达量呈“降低—升高—降低”的变化趋势, 其中, 接种后 3 h *FnCN* 基因的相对表达



M1: DL2000 DNA marker; M2: DL5000 DNA marker; 1: *FnCN* 基因过表达区 PCR 扩增结果 PCR amplification result of *FnCN* gene overexpression region; 2,3: *FnCN*-over 阳性菌株鉴定 Positive strain identification of *FnCN*-over; 4: *BamH* I and *Kpn* I 酶切验证 pCAMBIA1301-HA-*FnCN* 重组质粒 *BamH* I and *Kpn* I digested the recombinant plasmid pCAMBIA1301-HA-*FnCN*; 5: *FnCN* 基因沉默区 PCR 扩增结果 PCR amplification result of *FnCN* gene silencing region; 6-8: pTRV2-*FnCN* 阳性菌株鉴定 Positive strain identification of pTRV2-*FnCN*; 9: *BamH* I 和 *Xba* I 酶切验证 pTRV2-*FnCN* 重组质粒 *BamH* I and *Xba* I digested the recombinant plasmid pTRV2-*FnCN*.

图 7 黄毛草莓 *FnCN* 基因植物过表达载体和病毒诱导基因沉默载体的构建

Fig. 7 Construction of plant over-expression vector and virus induced gene silencing vector of *FnCN* gene from *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay



□: 对照 (接种无菌水) The control (inoculated with aseptic water); ■: 接种胶孢炭疽菌 Inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

同一处理不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著 Different lowercases indicate the significant difference at 0.05 level in the same treatment.

图 8 接种胶孢炭疽菌后黄毛草莓叶片 *FnCN* 基因相对表达量的变化
Fig. 8 Change in relative expression of *FnCN* gene from leaf of *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. ex Gay after inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

量最低;接种后 48 h *FnCN* 基因的相对表达量最高,为接种后 0 h 的 3.3 倍;接种后 24 和 72 h *FnCN* 基因的相对表达量也显著高于接种后 0 h,分别为接种后 0 h 的 2.7 和 2.6 倍。

3 讨论和结论

植物在生长过程中为抵抗外界不良环境逐渐进化出 2 个层次的防御机制,一是细胞受体识别病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMP) 触发的免疫反应 (PAMP triggered immunity, PTI),二是抗性 (resistance, R) 蛋白特异性识别病原分泌的效应因子 (毒性因子) 触发的免疫反应 (effectors triggered immunity, ETI)。ETI 能进一步引起植物超敏反应 (hypersensitive response, HR),较 PTI 能更加迅速和有效抑制病原菌的侵入^[24]。而 NB-ARC 类抗病蛋白是目前植物中数量最多的一类 R 蛋白,在不同植物中克隆出的抗病基因中, NB-ARC 类

抗病基因占 80%^[25],已成为植物抗病机制研究和抗病育种的研究热点。NB-ARC 类抗病蛋白中包含 1 个或多个结构域,其中,NB-ARC 结构域在进化过程中具有较高的保守性,其通过转导核苷酸结合状态 ATP/GTP 信号,从而调节 NB-ARC 类抗病蛋白的活性^[26]。Rx-CC 结构域则缺乏保守性,郝炜^[27]发现,Rx-CC 结构域的 EDVID 基序起连接 Rx-CC 结构域和 NB-ARC 结构域的桥梁作用,介导二者间的分子相互作用,有利于传递病原效应蛋白的识别信号。本研究利用同源克隆技术从黄毛草莓中克隆到 1 个 NB-ARC 类抗病基因 *FnCN*,其编码氨基酸序列中包含 1 个 Rx-CC 结构域和 1 个 NB-ARC 结构域,表明 NB-ARC 类抗病基因在进化过程中为了适应多变的环境将具有重要功能的结构域保留下来。

启动子是转录水平上调控基因表达的顺式作用元件,具有转录起始的特异性和表达的高效性^[28],Marone 等^[29]指出,NB-ARC 类抗病基因的表达受顺式和反式作用元件的精细调控,因此,对其启动子的结构进行分析对于了解植物的防御机制有重要意义。已有研究表明:NB-ARC 类抗病基因能响应外源激素胁迫,如‘久香’草莓 (*Fragaria × ananassa* ‘Jiuxiang’) 叶片经外源茉莉酸甲酯和脱落酸处理后,*FaNBS1* 基因的转录水平发生明显变化,其中,茉莉酸甲酯显著抑制 *FaNBS1* 基因的表达^[30]。本研究克隆的黄毛草莓 *FnCN* 基因上游长度为 910 bp 的启动子序列中含有植物激素响应元件,如茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif 和脱落酸响应元件 ABRE 等,由此推测 *FnCN* 基因的表达受多种激素和环境信号的调控,可能参与了黄毛草莓抵御病害的信号调控。

已有研究结果^[31]表明:植物 *R* 基因在没有病原体侵染的状态下表达水平相对较低,当植株受到病原体侵染时,*R* 基因表达水平提高,从而增强植株抗性。Wen 等^[32]研究发现,中国野生华东葡萄 (*Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang) 株系白河-35-1 (Baihe-35-1) 接种白粉菌 [*Erysiphe necator* (Schw.)] 后,*VpCN* 基因的转录水平是接种前的 4.2 倍,将该基因进行异源表达,结果表明转基因拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 对白粉病的抗性增强。本研究中,接种胶孢炭疽菌后,黄毛草莓叶片 *FnCN* 基因的相对表达量先降低,接种后 24~72 h 其相对表达量显著高于接种后 0 h,表明黄毛草莓 *FnCN* 基因在病原菌侵染后先被抑制表达,然后被诱导表达。前人研究发

现,SA 信号途径主要作用于植物遭受细菌和真菌等病原物侵染,而 JA 信号途径主要作用于植物受到机械损伤和虫害等创伤,二者在信号转导过程中存在一定的相互拮抗和协同作用^[33-34]。张庆雨等^[35]研究发现,草莓中 *FaNBS20* 基因在外源 SA 和病原菌的诱导下显著表达,表明 *FaNBS20* 基因可能通过 SA 信号途径参与草莓对炭疽病的防御反应。因此,初步判断 *FnCN* 基因可能属于 JA 信号转导途径上的调控因子,前期黄毛草莓植株通过 SA 信号途径参与胶孢炭疽菌侵染的防御反应,*FnCN* 基因被抑制表达,随后胶孢炭疽菌侵染信号进一步通过 JA 信号途径转导,*FnCN* 基因相对表达量显著提高,与 SA 和 JA 信号途径上的相关基因共同参与病原菌的抵抗反应。此外,*FnCN* 基因在病原菌侵染前期表达下调的原因可能是 *FnCN* 基因在参与识别病原菌侵染信号的过程中,受到上游其他抗病蛋白的调控,所以在侵染前期基因相对表达量呈现降低趋势,在后续研究中将通过酵母单杂交寻找上游调控蛋白。虽然本研究表明 *FnCN* 基因可能在黄毛草莓对炭疽病的防御反应中发挥一定作用,但其在黄毛草莓抗炭疽病过程中的具体作用途径尚未明确,在今后的研究中,将利用遗传转化等生物技术对黄毛草莓 *FnCN* 基因进行深入研究,进一步明确该基因在黄毛草莓抗炭疽病方面的分子防御功能。

参考文献:

- [1] ZHANG S, DING F, PENG H, et al. Molecular cloning of a CC-NBS-LRR gene from *Vitis quinquangularis* and its expression pattern in response to downy mildew pathogen infection [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293(1): 61-68.
- [2] MCHALE L, TAN X, KOEHL P, et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards[J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): 212.
- [3] SHAO Z Q, XUE J Y, WU P, et al. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(4): 2095-2109.
- [4] SHAO Z Q, XUE J Y, WANG Q, et al. Revisiting the origin of plant NBS-LRR genes[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(1): 9-12.
- [5] JIA Y, YUAN Y, ZHANG Y, et al. Extreme expansion of NBS-encoding genes in Rosaceae[J]. *BMC Genetics*, 2015, 16(1): 48.
- [6] 童月霞,胡晓璇,程宗明,等.苹果 NBS-encoding 基因对斑点落叶病菌侵染的表达响应[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(2): 253-260.
- [7] LI X, ZHANG Y, YIN L, et al. Overexpression of pathogen-induced

- grapevine TIR-NB-LRR gene *VaRGA1* enhances disease resistance and drought and salt tolerance in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(2): 957-969.
- [8] LI T G, WANG B L, YIN C M, et al. The *Gossypium hirsutum* TIR-NBS-LRR gene *GhDSCI* mediates resistance against *Verticillium* wilt [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(6): 857-876.
- [9] MARTÍNEZ ZAMORA M G, CASTAGNARO A P, DÍAZ RICCI J C. Isolation and diversity analysis of resistance gene analogues (RGAs) from cultivated and wild strawberries [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(4): 480-487.
- [10] 陆秀红, 张雨, 秦舒婷, 等. 番茄 NBS-LRR 抗根结线虫基因同源序列的克隆与分析[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(1): 67-72.
- [11] 刘宇, 闫彩霞, 张廷婷, 等. 花生 NBS-LRR 类抗病基因的克隆及原核表达[J]. *中国农业科技导报*, 2012, 12(3): 73-78.
- [12] ZOU X, GUO R, ZHANG L, et al. Identification of FaNBS-encoding genes responsive to *Colletotrichum fructicola* infection in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchase) [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2018, 47(5): 499-510.
- [13] 赵密珍, 王静, 袁华招, 等. 草莓育种新动态及发展趋势[J]. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 249-257.
- [14] SREENIVASAPRASAD S, TALHINHAS P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(4): 361-378.
- [15] CASADO-DÍAZ A, ENCINAS-VILLAREJO S, SANTOS B D L, et al. Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 128(4): 633-650.
- [16] OLIVERA J, GLORIA E M, PARISI M C M, et al. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries [J]. *Scientia Horticulture*, 2019, 243: 261-267.
- [17] 李洪雯, DURALIJA B, 何建, 等. 黄毛草莓遗传多样性的荧光 AFLP 分析 [M] // 中国园艺学会草莓分会, 北京市农林科学院. 草莓研究进展 (V). 北京: 中国农业出版社, 2014: 193-201.
- [18] 侯丽媛, 董艳辉, 聂园军, 等. 世界草莓属种质资源种类与分布综述 [J]. *山西农业科学*, 2018, 46(1): 145-149.
- [19] 马鸿翔, 陈佩度. 黄毛草莓与凤梨草莓种间杂种的获得及其细胞遗传学分析 [J]. *中国农业科学*, 2004, 37(12): 1966-1970.
- [20] 黄金凤. 野生草莓种质资源对胶孢炭疽菌的抗性研究 [D]. 南京: 南京农业大学园艺学院, 2012: 44.
- [21] 韩永超, 曾祥国, 向发云, 等. 草莓属植物种质资源对炭疽病抗性的离体评价 [J]. *中国农业科学*, 2019, 52(20): 3585-3594.
- [22] ZHANG Q Y, ZHANG L Q, SONG L L, et al. The different interactions of *Colletotrichum gloeosporioides* with two strawberry varieties and the involvement of salicylic acid [J]. *Horticulture Research*, 2016, 3(1): 16007.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [25] 郑永杰, 伍艳芳, 李江, 等. 樟树 NBS-LRR 类抗病基因家族分析与 *CcRNL* 基因克隆 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(2): 142-149.
- [26] TAMELING W I L, VOSSEN J H, ALBRECHT M, et al. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(4): 1233-1245.
- [27] 郝炜. 马铃薯抗病蛋白 Rx 与其辅因子 RanGAP2 结合机制的结构生物学研究 [D]. 北京: 中国农业大学生物学院, 2014: 71.
- [28] 袁玉辉, 朱守晶, 邹杰, 等. 芥菜型油菜 *BjuA09DFR* 基因及其启动子的克隆与转化和表达 [J]. *西北植物学报*, 2019, 39(1): 24-31.
- [29] MARONE D, RUSSO M A, LAIDÒ G, et al. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(4): 7302-7326.
- [30] 刘建成, 段可, 李静, 等. 草莓 NBS-LRR 家族基因 *FaNBS1* 的克隆与表达分析 [J]. *果树学报*, 2011, 28(6): 1025-1031.
- [31] VEENA M, MELVIN P, PRABHU S A, et al. Molecular cloning of a coiled-coil-nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat gene from pearl millet and its expression pattern in response to the downy mildew pathogen [J]. *Molecular Biology Reports*, 2016, 43(3): 117-128.
- [32] WEN Z, YAO L, WAN R, et al. Ectopic expression in *Arabidopsis thaliana* of an NB-ARC encoding putative disease resistance gene from wild Chinese *Vitis pseudoreticulata* enhances resistance to phytopathogenic fungi and bacteria [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1087.
- [33] 徐刚, 姚银安. 水杨酸、茉莉酸和乙烯介导的防卫信号途径相互作用的研究进展 [J]. *生物杂志*, 2009, 26(1): 48-51.
- [34] 李国婧, 周燮. 植物防御反应中水杨酸与茉莉酸的“对话”机制 [J]. *细胞生物学杂志*, 2002, 24(2): 101-105.
- [35] 张庆雨, 刘芳春, 段可, 等. 水杨酸对草莓炭疽病响应基因 *FaNBS20* 表达的影响 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(1): 53-62.

(责任编辑: 张明霞)