

# 转新疆野生樱桃李 *psorPM1* 基因烟草抵抗南方根结线虫

李芳, 朱翔, 乔峰, 陈雪峰, 李虎, 胡建芳\*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

**摘要:** 从新疆野生樱桃李 (*Prunus sogdiana*) 抗南方根结线虫单株中分离克隆得到一个能响应南方根结线虫侵染的抗病基因 *psorPM1*, 利用农杆菌介导方法将其导入烟草中, 并对其抗性进行了鉴定。结果显示, 构建的 pCAMBA1305.1 表达载体能成功地将 *psorPM1* 基因导入高度感病的烟草 ‘W38’ 中, 并获得了 9 株转基因单株。对转基因单株进行抗性鉴定, 结果显示转入 *psorPM1* 基因后使烟草 ‘W38’ 对南方根结线虫的抗性由高度感病变为中度抗病。这一结果预示着 *psorPM1* 基因可能是一个新的与抗根结线虫相关的基因。

**关键词:** 新疆野生樱桃李; 根结线虫; *psorPM1* 基因; 转基因

**中图分类号:** S 662.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 12-2497-08

## *psorPM1* Gene from *Prunus sogdiana* Indicated Resistance to Root-knot Nematode in Tobacco

LI Fang, ZHU Xiang, QIAO Feng, CHEN Xue-feng, LI Hu, and HU Jian-fang\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The root-knot nematode, especially *Meloidogyne incognita* is one of the most harmful pests could induce many crop diseases. Xinjiang wild cherry plum (*Prunus sogdiana*) is a kind of wild and endemic specie in China with significant resistant effect against *M. incognita*. Here we isolated a gene from Xinjiang wild cherry plum, which named *psorPM1*, having responses to the infection of *M. incognita* in the resistant plant. Using *Agrobacterium*-mediated transgenic technology, *psorPM1* gene was introduced into tobacco varieties ‘W38’, which is highly susceptible to *M. incognita*. Then the transgenic tobaccos and plants of control group were inoculated with *M. incognita*. After growing for 60 d, the *psorPM1*-W38 showed varying degrees of resistance to *M. incognita*, even some of the plants nearly had no root-knots. Comparing to the tobaccos of the control group, it is suggested that *psorPM1* gene is capable of helping the tobacco ‘W38’ set up resistance mechanism against the infection of *M. incognita* and finally predict the *psorPM1* is a new root-knot nematode resistance gene candidate.

**Key words:** *Prunus sogdiana*; root-knot nematode; *psorPM1* gene; transgenic

收稿日期: 2013-07-16; 修回日期: 2013-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971981)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hujf@cau.edu.cn)

在中国影响植物生产的主要有 4 种根结线虫, 即南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*)、北方根结线虫 (*M. hapla*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 和花生根结线虫 (*M. arenaria*), 其中又以南方根结线虫危害最为严重。选育出对线虫有抗性的农作物品种是一种最为安全和高效的方法。

1998 年科研人员首次克隆出番茄的抗根结线虫基因 *Mi-1*, 该基因对北方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫等有抗性 (Milligan et al., 1998)。随后在其它农作物中发现和克隆出十几个新的抗线虫基因。这些具有线虫抗性基因的植物大都是一、二年生植物, 其中只有携带 *Mi-1* 基因的抗线虫番茄进行了广泛的商业化生产。目前在木本植物中也找到了抗线虫基因 *Ma* (Claverie et al., 2011), 但对于它的功能和作用机制还有待于进一步研究。

新疆野生樱桃李 (*Prunus sogdiana*) 是中国珍贵的野生果树资源, 具有生长旺盛、易扦插、抗寒、抗病等特点 (Esmenjaud et al., 1996; 廖康 等, 2008)。通过对新疆野生樱桃李接种南方根结线虫, 已鉴定出了一批对南方根结线虫表现不同抗性的单株, 利用其中表现为高度抗病的单株, 筛选到抗病基因 *psorPM1*, 该基因能响应根结线虫侵染而提高其表达 (肖芳权 等, 2010); 并通过 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 得到了 *psorPM1* 基因全长, 其序列与桃抗病基因 *RPM1* 同源性高达 98%, 与 *Mi-1* 等抗线虫基因相同都属于 NBS-LRR 类; 接种根结线虫后在抗性材料中 *psorPM1* 表达量显著增高, 而感病材料在接种前后表达量一直很低 (Li et al., 2011)。进一步研究发现, 在根部形成根结的部位存在大量巨型细胞 (刘青 等, 2013), 并且 *psorPM1* 基因主要在根部韧皮部及皮层薄壁组织中表达并定位于细胞膜上 (Li et al., 2011), 但对 *psorPM1* 的确切功能和作用机制并不清楚。

本研究中以野生型烟草 ‘W38’ 作为转基因材料, 构建 pCAMBIA1305.1 表达载体, 将 *psorPM1* 基因经农杆菌导入植株, 研究转基因效果并对转基因植株进行抗性鉴定, 为深入研究 *psorPM1* 基因功能和抗根结线虫分子机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

新疆野生樱桃李扦插苗 2010 年取自中国农业大学上庄试验站; 对南方根结线虫高度感病的野生型烟草 (*Nicotiana tabacum* L. ‘W38’) 由中国农业大学农学与生物技术学院提供; 抗南方根结线虫的烟草品种 ‘K326’ 由中国农业科学院烟草研究所提供。供试南方根结线虫 (*M. incognita*) 由中国农业大学农学与生物技术学院杨文才实验室提供, pCAMBIA 1305.1 载体由中国农业大学农学与生物技术学院李天忠实验室提供。

### 1.2 *psorPM1* 基因表达载体的构建

利用 CTAB 法从抗南方根结线虫野生樱桃李单株的嫩根中提取总 RNA, 经 M-MLV 反转录作 PCR 模板, 参照 Li 等 (2011) 设计引物扩增出 *psorPM1* 基因 CDS 全长, 经限制性内切酶 (表 1) 将所得产物通过 TA 克隆连接至 T-simple 质粒, 并经大肠杆菌 DH5 $\alpha$  扩增后提取质粒备用。限制性内切酶和 T4 连接酶均由 TaKaRa 公司提供。

用 *Spe* I 和 *Bst*E II 限制性内切酶分别处理含 *psorPM1* 基因的 T-simple 质粒和 pCAMBIA 1305.1, 将切下的 *psorPM1* 片段和切开的 pCAMBIA1305.1 通过 T4 连接酶连接起来, 构建成为 pCAMBIA1305.1-*psorPM1* 表达载体。

### 1.3 转化农杆菌感受态细胞

冻融法转化农杆菌 EHA105 菌株的感受态细胞。取 1  $\mu\text{g}$  左右 pCAMBA1305.1-*psorPMI* 表达载体加入感受态细胞, 冰浴 30 min, 置于液氮中 1 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min 后冰浴 2 min, 加入 YEB 液体培养基 (无抗生素) 700  $\mu\text{L}$ , 经涂板、培养、取阳性克隆、振荡培养, 待菌液  $\text{OD}_{600}$  达 0.4 ~ 0.6 时于 4  $^{\circ}\text{C}$  储存备用。

### 1.4 农杆菌介导的烟草遗传转化

利用叶盘法进行烟草的遗传转化 (王飞 等, 2009)。将组培瓶中的野生型烟草 ‘W38’ 叶片切成 1  $\text{cm}^2$  左右的小方块, 并将其平铺在预培养基 (MS + 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA + 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA) 上, 于 (24  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$ , 光照 1 800 lx, 16 h 光/8 h 暗的条件下培养 48 h, 然后放入 OD 值为 0.6 ~ 0.8 的含 *psorPMI* 基因的农杆菌菌液中缓慢晃动侵染 1 ~ 2 min, 用滤纸吸干多余的菌液, 再次放回预培养基中, 在黑暗条件下继续培养 48 h。将黑暗中培养的烟草叶片转入脱菌培养基 (MS + 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA + 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA + 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cb) 中。待叶片长出愈伤组织后置于筛选培养基 (MS + 2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA + 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA + 1 000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cb + 0.2  $\text{mg}$  潮霉素 B) 中, 待愈伤组织分化为 5 cm 高的幼苗移入生根培养基 (MS + 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA + 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cb) 中。植株 10 ~ 15 cm 高时转出培养瓶, 移栽至花盆中。

### 1.5 阳性转基因烟草的 PCR 鉴定

利用 PCR 法鉴定抗性转化植株中的阳性转基因烟草。获得抗性转化植株后, 用 CTAB 法提取叶片 DNA 及 RNA, 设计 *psorPMI* 基因 CDS 区全长引物 (表 1) 进行检测鉴定。

表 1 *psorPMI* 基因 CDS 区扩增引物及酶切位点引物  
Table 1 Prime sequences used for PCR and restriction enzyme digestion in *psorPMI* CDS

引物名称 Names of primers	引物序列 Sequences (5' - 3')	用途 Applications	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
psorPM1-F	ATGGACTCAGCTCCAACAGCTCTCT	扩增 <i>psorPMI</i> 基因 CDS 区全长	50
psorPM1-R	TCATGTGGGTGAACTATGATGAGCT	Amplification full length of CDS of <i>psorPMI</i>	
全长 <i>Spe</i> I -F Full length <i>Spe</i> I -F	<u>GGACTAGT</u> CCATGGACTCAGCTCCAAC	用于双酶切和连接植物表达载体	53
全长 <i>Bst</i> E II -R Full length <i>Bst</i> E II -R	GGGTCACCTCATGTGGGTGAACTATGAT	Double digestion and link to the plant expression vector	

注: 下划线为酶切位点。

Note: Underlined sequences are restriction sites.

### 1.6 转基因烟草接种南方根结线虫后的抗性评价

利用定量接种法接种转基因烟草 (Lambert et al., 1992): 将 200 条  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的南方根结线虫二龄幼虫悬浮液采用打孔法注入移栽至花盆 (直径 20 cm、高 10 cm) 中的烟草根部土壤, 每盆滴注 10 mL; 对照组滴注 10 mL 蒸馏水。接种后正常管理, 于 60 d 后观察植株根部根结发育状况。

发病级数分为 5 级: 0 级, 有根结根系百分比为 0; 1 级为 1% ~ 5%; 2 级为 6% ~ 25%; 3 级为 26% ~ 50%; 4 级为 51% ~ 75%; 5 级为 75% 以上。病情指数 =  $\sum$  各病级数  $\times$  该级发病株数 / (最高病级数  $\times$  调查总株数)  $\times$  100。抗性评价标准: 病情指数 = 0 为免疫品种 (I), 0 < 病情指数  $\leq$  15 为高抗品种 (HR), 15 < 病情指数  $\leq$  30 为中抗品种 (MR), 30 < 病情指数  $\leq$  50 为抗性品种 (R), 50 < 病情指数  $\leq$  80 为感病品种 (S), 病情指数 > 80 为高感品种 (HS) (韩利芳 等, 2006)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因烟草的获得

将携带新疆野生樱桃李 *psoRPM1* 基因的农杆菌浸染后的 ‘W38’ 烟草叶片置于预培养基中于黑暗条件下培养 48 h 后, 转入脱菌培养基中正常光照条件下进行培养, 1 周后可见叶片周围长出愈伤组织, 3 周后愈伤组织已很发达 (图 1, a), 此时将叶片置于含有潮霉素的筛选培养基中进行抗性筛选, 阳性植株继续生长而假阳性植株不能生长 (图 1, b)。待愈伤组织分化出的芽 5 cm 左右高时将其取下移入生根培养基中 (图 1, c)。当植株长至 10~15 cm 高 (图 1, d) 时将其取出培养瓶, 转入营养土 (蛭石: 腐殖土 = 1:2) 花盆中在温室中生长。

提取转基因烟草叶片的 DNA, 利用 *psoRPM1* 特异性引物进行 PCR 鉴定, 结果显示, 筛选得到 9 株呈阳性的转基因植株 (图 2)。

### 2.2 转基因烟草对南方根结线虫抗性的鉴定

如图 3 所示, 在接种根结线虫后, 野生型 ‘W38’ 植株根部根结很多, 且大都成串分布, 侧根数量较少 (图 3, A); 转 pCAMBA1305.1 空载体的植株根部与野生型植株根部表现相似 (图 3, B); 9 株转基因烟草其根部表型显示出一定差异, 1 号植株地上部生长正常, 但地下部根系分布了较多根结, 与野生型烟草和转空载烟草相比根结数量还是减少 (图 3, C1); 2 号植株的根系部分明显比野生型和空载烟草的根系发达, 根结分布较为分散, 根结数量明显少于 1 号植株 (图 3, C2); 3 号植株转基因烟草地上部的生长情况与 2 号植株类似, 但根系生长不如 2 号植株旺盛, 而根结的数量和分布与 2 号植株相类似 (图 3, C3); 4 号植株转基因烟草生长状况良好, 须根较多, 根结数量少根结也较小 (图 3, C4); 5 号植株和 6 号植株无论从植物的生长状况到根结情况都十分类似, 地上部植株生长良好, 根系发达, 几乎没有根结分布 (图 3, C5、C6), 表现出对线虫较强的抗性; 7 号植株和 9 号植株与 2 号植株的表现相同, 生长根结的根系与未长根结的根系数量基本相同, 且根结的形状大都为米粒状 (图 3, C7、C9); 8 号植株未长根结的根系明显少于长根结的根系, 根结形状为米粒状, 且没有造成根系畸形 (图 3, C8)。对于高度抗根结线虫的烟草品种 ‘K326’ 而言, 地上部生长正常, 叶形比野生型偏圆, 根系十分发达, 且其根部几乎没有根结的分布 (图 3, D)。

如表 2 所示, 在 9 株转基因植株中, 1 级发病的为 2 株, 2 级发病的为 1 株, 3 级发病的为 5 株, 4 级发病的为 1 株。而转空载烟草 (CK) 和未转基因的野生型烟草 ‘W38’ 的发病级数均为 5 级。

根据发病指数计算得到所有转基因烟草的病情指数为 48.9, 根据抗性评价标准  $30 < \text{病情指数} \leq 50$  为抗性品种来判断, 转入 *psoRPM1* 基因后对南方根结线虫的抗性由高度感病变成了中度抗病。

表 2 转基因烟草对南方根结线虫抗性鉴定结果  
Table 2 Identification of tobacco transformed resistant to *M. incognita*

材料代号 Tobacco code	根结占总根的百分数/% Ratio of root-knots in roots	发病级数 Disease progression
1	70	4
2	45	3
3	45	3
4	20	3
5	5	1
6	5	1
7	45	3
8	15	2
9	45	3
CK	90	5
W38	98	5

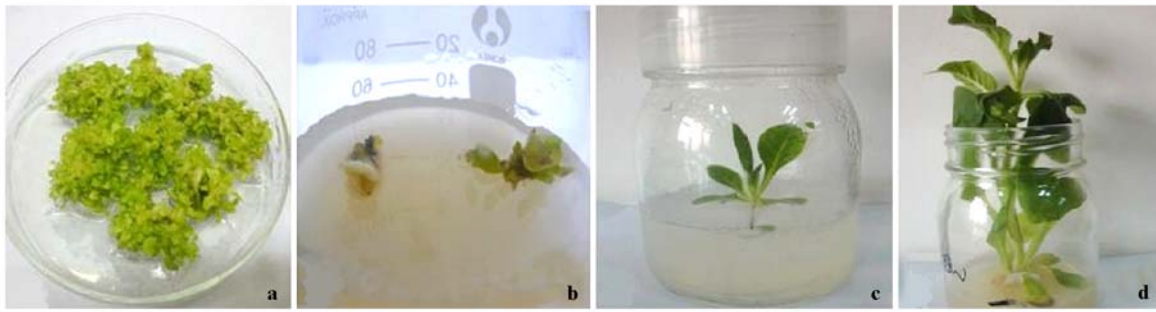


图 1 农杆菌转化的烟草叶片再生及离体培养 (潮霉素筛选压  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

a、c、d: 生长 3、4 和 10 周的转基因烟草; b: 在筛选培养基中正常生长的阳性植株 (右) 和无法生长的假阳性植株 (左)。

Fig. 1 The leaf regeneration of tobacco after transformation via *Agrobacterium tumefaciens* and culture in vitro under selecting pressure of  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  hygromycin

a, c and d: Transgenic tobacco in 3, 4, 10 weeks; b: Transgenic tobacco with hygromycin resistant (right) and untransgenic tobacco (left).

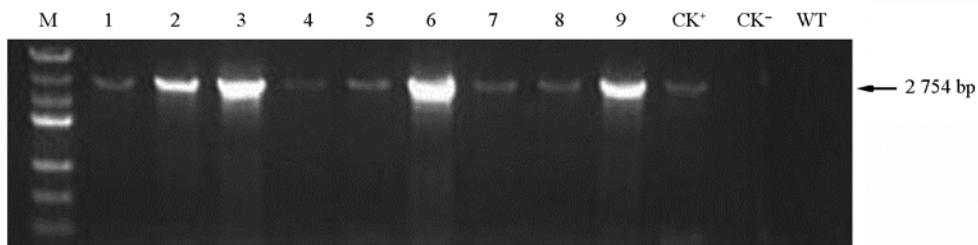


图 2 转基因烟草的 PCR 鉴定

M: 5 000 bp DNA marker; 1~9: 转基因植株;  $\text{CK}^+$ : 抗性野生櫻桃李为正对照;  $\text{CK}^-$ : 转空载的负对照; WT: 野生型 W38 烟草。

Fig. 2 PCR identification of transformed tobacco

M: 5 000 bp DNA marker; 1-9: Transgenic tobaccos with *psorPM1*;  $\text{CK}^+$ : Resistant Xinjiang wild cherry plum;  $\text{CK}^-$ : Transgenic tobaccos with empty plasmid; WT: W38 wild type.



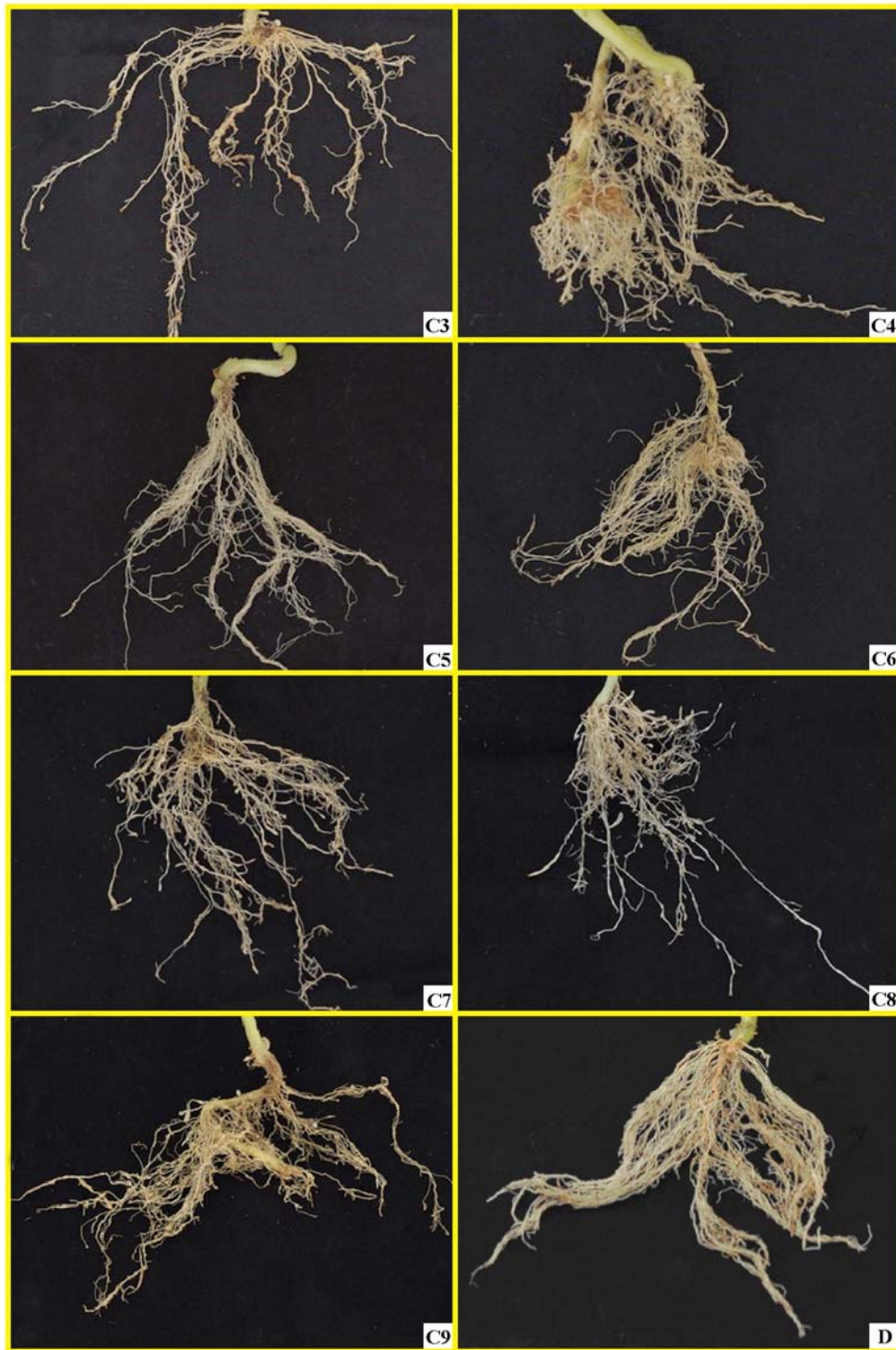


图 3 转基因烟草的根结线虫抗性表现

A: 野生型烟草 'W38'; B: 转空载体烟草; C1~C9: 转 *psoRPM1* 基因烟草; D: 抗性品种 'K326'。

Fig. 3 Result of the nematode resistance in transgenic W38

A: W38 wild type; B: Transgenic tobaccos with empty plasmid;

C1 - C9: Transgenic tobaccos with *psoRPM1*;

D: Root-knot nematode resistant tobacco 'K326' .

### 3 讨论

在植物抗线虫研究中已发现了数十个抗线虫基因, 其中成功克隆并通过转基因验证获得了其中的 7 个基因, 包括 *Hs1<sup>pro-1</sup>* (Cai et al., 1997), *Mi* (Milligan et al., 1998; Vos et al., 1998), *Hero A* (Ernst et al., 2002; Sobczak et al., 2005), *Gpa2* (van der Vossen et al., 2001), *Gro1-4* (Paal et al., 2004), *Rhg1* (Hauge et al., 2001), *Rhg4* (Lightfoot & Meksem, 2001) 以及 *Ma* (Claverie et al., 2004) 基因。在这 7 个抗线虫基因中, 只有 *Mi* 基因(从番茄中克隆得到)和 *Ma* 基因(从櫻桃李中克隆得到)是抗根结线虫的, 其余基因则表现抗其它如包囊线虫等特点。随着研究的深入, 发现利用这些抗线虫基因在相同植物种内进行转基因育种的效果较明显, 而异种植物间的转基因有时会出现意外情况。例如 *Mi-1* 基因在转入烟草和拟南芥后并不表现对根结线虫的抗性 (Williamson & Kumar, 2006); 而将 *Mi-1* 基因转入茄子中, 虽然表现出对线虫的抗性, 但却不像 *Mi-1* 基因在番茄中那样表现对蚜虫的抗性 (Goggin et al., 2006)。将 *Hero A* 基因(抗马铃薯包囊线虫)转到番茄后也并没有对马铃薯包囊线虫的抗性 (Sobczak et al., 2005)。这些例子说明不同植物对外源抗虫基因的表现并不相同。

*posRPM1* 基因属于植物抗病基因 (R 基因) 家族中的 NBS-LRR 类抗病基因 (Li et al., 2011), 在蛋白结构上与 *Mi-1* 等抗线虫基相似。NBS-LRR 类抗病基因编码的蛋白绝大部分都与植物抗病过程有关, 目前普遍认为它们在植物响应病原体入侵时起着信号识别和传递的作用 (Belkhadir et al., 2004; Jones & Dangl, 2006)。异种植物接受外源的抗虫基因必须面对的困难在于新的信号识别体系与原有信号传导路径的有机连接 (Eitas & Dangl, 2010)。在本试验中, *posRPM1* 基因转入烟草后虽然平均对南方根结线虫的抗性反应由高度感病变成了中度抗病, 但部分植株抗性并不强, 这可能与转入基因整合到染色体的位置、转入基因沉默和跨种间转基因有关。同时这一基因被定位于细胞膜上 (Li et al., 2011), 推测该基因功能可能与抗病信号传递过程有关, 并不能起到完全抗病的作用。对 *posRPM1* 基因在抗病分子机制中的具体作用还需要进一步的证据, 目前本实验室正在进行这方面的深入研究。

### References

- Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl J L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (4): 391 - 399.
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff H J, Sandal N N, Marcker K A, Klein-Lankhorst R M, Salentijn E M J, Lange W, Stiekema W J. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 275 (5301): 832 - 834.
- Claverie M, Dirlewanger E, Bosselut N, Van Ghelder C, Voisin R, Kleinhentz M, Lafargue B, Abad P, Rosso M N, Chalhoub B, Esmenjaud D. 2011. The *Ma* gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiology*, 156 (2): 779 - 792.
- Claverie M, Dirlewanger E, Cosson P, Bosselut N, Lecouls A, Voisin R, Kleinhentz M, Lafargue B, Caboche M, Chalhoub B. 2004. High-resolution mapping and chromosome landing at the root-knot nematode resistance locus *Ma* from Myrobalan plum using a large-insert BAC DNA library TAG. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (6): 1318 - 1327.
- Eitas T K, Dangl J L. 2010. NB-LRR proteins: Pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (4): 472 - 477.
- Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos D U, Phillips M S, Ganai M W. 2002. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *The Plant Journal*, 31 (2): 127 - 136.
- Esmenjaud D, Minot J, Voisin R, Bonnet A, Salesses G. 1996. Inheritance of resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* in

- Myrobalan plum TAG. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 (7): 873 - 879.
- Goggin F L, Jia L, Shah G, Hebert S, Williamson V M, Ullman D E. 2006. Heterologous expression of the *Mi-12* gene from tomato confers resistance against nematodes but not aphids in eggplant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (4): 383 - 388.
- Han Li-fang, Cao Zhi-ping, Dong Dao-feng, Wang Xiu-hui. 2006. Resistance evaluation of tomato rootstocks and cultivars (*Lycopersicon esculentum*) to southern root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (5): 1099 - 1102. (in Chinese)
- 韩利芳, 曹志平, 董道峰, 王秀徽. 2006. 番茄砧木及品种对南方根结线虫的抗性鉴定. *园艺学报*, 33 (5): 1099 - 1102.
- Hauge B M, Wang M, Parsons J D, Parnell L D. 2001. Nucleic acid molecules and other molecules associated with soybean cyst nematode resistance. US Patent Application No. 2030005491.
- Jones J D G, Dangl J L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444 (7117): 323 - 329.
- Lambert K, Tedford E, Caswell E, Williamson V. 1992. A system for continuous production of root-knot nematode juveniles in hydroponic culture. *Phytopathology*, 82 (5): 512 - 515.
- Li F, Zhou L, Xiao F Q, Liao K, Hu J F. 2011. Characterization of the *psoRPM1* gene for resistance to root-knot nematodes in wild Myrobalan plum (*Prunus sogdiana*). *African Journal of Biotechnology*, 10 (60): 12859 - 12867.
- Liao Kang, Li Hui-fang, Geng Wen-juan, Liu Ting. 2008. Primary research on cutting propagation of wild cherry plum. *Chinese Wild Plant Resources*, 27 (3): 58 - 60. (in Chinese)
- 廖 康, 李会芳, 耿文娟, 刘 婷. 2008. 野生櫻桃李扦插繁殖研究初报. *中国野生植物资源*, 27 (3): 58 - 60.
- Lightfoot D A, Meksem K. 2001. Isolated polynucleotides and polypeptides relating to loci underlying resistance to soybean cyst nematode and soybean sudden death syndrome and methods employing same. Google Patents, <http://www.google.com/patents/US20080072352>.
- Liu Qing, Qiao Feng, Lu Chong-lie, Zhu Xiang, Li Tian-zhong, Hu Jian-fang. 2013. Morphology and development of root knot in Xinjiang wild Myrobalan plum infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of China Agricultural University*, 18 (1): 101 - 107. (in Chinese)
- 刘 青, 乔 峰, 卢崇烈, 朱 翔, 李天忠, 胡建芳. 2013. 南方根结线虫诱发新疆野生櫻桃李形成的根结形态和发育. *中国农业大学学报*, 18 (1): 101 - 107.
- Milligan S B, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson V M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell Online*, 10 (8): 1307 - 1319.
- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menéndez C M, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C. 2004. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The Plant Journal*, 38 (2): 285 - 297.
- Sobczak M, Avrova A, Jupowicz J, Phillips M S, Ernst K, Kumar A. 2005. 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (2): 158 - 168.
- van der Vossen E A G, Der Voort V, Rouppe J N A M, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe D C, Bakker J, Stiekema W J, Klein-Lankhorst R M. 2001. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: A virus and a nematode. *The Plant Journal*, 23 (5): 567 - 576.
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology*, 16 (13): 1365 - 1369.
- Wang Fei, Xing Xin-sheng, Ma You-zhi, Chen Yao-feng, Cao Xin-you. 2009. Study on the conditions of transferring *D32* gene into tobacco mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 29 (6): 1104 - 1110. (in Chinese)
- 王 飞, 邢新生, 马有志, 陈耀锋, 曹新有. 2009. 根癌农杆菌介导 *D32* 基因转化烟草的条件研究. *西北植物学报*, 29 (6): 1104 - 1110.
- Williamson V M, Kumar A. 2006. Nematode resistance in plants: The battle underground. *Trends in Genetics*, 22 (7): 396 - 403.
- Xiao Fang-quan, Hu Jian-fang, Xu Zheng, Liao Kang, Li Tian-zhong. 2010. Cloning and expression analysis of fragments related to root-knot nematode resistance from wild Myrobalan plum (*Prunus sogdiana*). *Journal of China Agricultural University*, 15 (5): 77 - 83. (in Chinese)
- 肖芳权, 胡建芳, 许 正, 廖 康, 李天忠. 2010. 新疆野生櫻桃李抗根结线虫相关基因片段的克隆与表达分析. *中国农业大学学报*, 15 (5): 77 - 83.