

小麦 NBS类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与特征分析

张楠, 王海燕, 刘大群

(河北农业大学植物保护学院 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要: 根据已克隆植物抗病 (R) 基因 NBS 保守结构域设计简并引物, 采用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE), 在小麦抗叶锈病近等基因系材料 TcLr19 中进行抗病同源基因 cDNA 全长的扩增。获得了 1 个通读的 NBS 类抗病同源基因 *Sl1A11* cDNA 序列, 该序列全长 2923bp 编码 878 个氨基酸序列。生物信息学分析结果表明, 该片段含有 NB-ARC 保守结构域和多个 LRR 结构域。聚类分析表明, *Sl1A11* 编码的蛋白与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 编码的蛋白亲缘关系较近, 而与 *Lr10* 亲缘关系较远。半定量 RT-PCR 分析表明, 该基因在小麦叶片中为低丰度组成型表达。本研究在 TcLr19 小麦中成功获得了抗病基因同源序列, 为最终克隆小麦抗叶锈病目的基因奠定了基础。

关键词: 小麦; 核苷酸结合位点 (NBS); 抗病基因同源序列 (RGA s); cDNA 末端快速扩增技术 (RACE); 半定量 RT-PCR

Cloning and Characterization of a NBS Resistance Gene Homology cDNA Sequence from Wheat

ZHANG Nan, WANG Hai-yan, LIU Da-qun

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei / Biological Control Center of Plant Disease and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001)

Abstract Resistance gene homology sequence from wheat was isolated by using homology-based method. A pair of degenerated primer was designed according to the nucleotide binding site conserved domains of the cloned plant disease resistance (R) genes. RT-PCR and RACE were used to obtain the full length sequence of the disease resistance homology gene in the near isogenic lines TcLr19. One open-reading NBS class of resistance gene analogs (RGA s) named *Sl1A11* was obtained which was 2923bp in length and encoded 878 amino acids. Bioinformatics analysis showed the deduced amino acids of *Sl1A11* protein consisted of a NB-ARC conserved domain and many leucine-rich repeats (LRR) domains. The phylogenetic tree analysis indicated a considerable identity of the protein encoded by *Sl1A11* with that of wheat leaf rust resistance gene *Lr1*, but a lower similarity with *Lr10*. The *Sl1A11* gene appeared not to be induced by *Puccinia tritici* and was a constitutive gene with low abundance in wheat leaf tissue by semi-quantitative RT-PCR. The resistance homology sequence was successfully obtained in TcLr19, which provides the shortcut for cloning of wheat leaf rust resistance gene.

Key words Wheat; Nucleotide binding site (NBS); Resistance gene analogs (RGA s); Rapid amplification cDNA end (RACE); Semi-quantitative RT-PCR

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 适应性强, 分布广, 是世界上最重要的粮食作物, 由小麦叶锈菌 (*Puccinia tritici*) 引起的小麦叶锈病是影响世界小麦稳产高

产的重要病害之一, 也是影响我国小麦生产的重要因素, 其分布范围比条锈病和秆锈病更广, 严重时可造成 40% 的损失^[1-2]。国内外的研究和生产实践证明,

收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-04-04

基金项目: 国家自然科学基金 (30700505); 河北省自然科学基金 (C2008000281); 河北省教育厅 (2009130)

作者简介: 张楠, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: zn_1107@163.com

通讯作者: 王海燕, 副教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: haiyangaofe@yahoo.com.cn

刘大群, 教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: lq@mail.hebau.edu.cn

培育抗叶锈病小麦品种是防治该病最经济、有效和安全的途径,而掌握优良的抗病基因资源则是实现抗病育种突破的重要物质基础,因此,加强小麦抗叶锈病基因的研究和利用显得尤为重要。

迄今为止,已有 60 多个抗病基因分别从玉米、拟南芥、番茄、水稻、小麦、大麦等多种植物中获得成功克隆^[3],氨基酸水平比对结果表明,这些 R 基因序列之间具有类似的保守结构域^[4-5],如核苷酸结合位点(Nucleotide binding site, NBS)、富含亮氨酸重复(Leucine-rich repeats LRR)、丝氨酸/苏氨酸激酶(Serine-threonine kinase, STK)、亮氨酸拉链(Leucine zipper, LZ)和 Toll/白细胞介素-1 受体类似结构(Toll/interleukin-receptor similarity, TIR)等。一系列研究表明,存在于植物抗病基因中的保守结构域,为从植物中克隆和研究植物抗病基因提供了一条经济、快捷的途径。依据这些保守序列设计合成简并引物,从植物材料中克隆抗病基因的同源序列,再结合 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)获得完整的抗病候选基因。目前,已在马铃薯^[6]、玉米^[7]、小麦^[8-10]、水稻^[11]、蚕豆^[12]、鹰嘴豆^[12]等植物中分离到了许多与已知 R 基因同源的核苷酸序列。到目前为止,对小麦抗叶锈病基因遗传和抗病性已进行了多方面研究,国际上已发现 90 余个抗叶锈病基因,现已命名到了 *Lr61*^[13],有 58 个被标记在特定的染色体上。其中,抗叶锈病基因 *Lr10*^[14]、*Lr21*^[15]、*Lr1*^[16]和 *Lr34*^[17]已被成功克隆。小麦抗叶锈病基因 *Lr19* 来源于长穗偃麦草(*Aegilops elongatum*),定位在 7DL 染色体上,该基因是在苗期即开始表达的全生育期抗叶锈病基因,且抗性很强,至今在南非、中国等地只有少数几个菌株对之表现毒力,是一个极具应用价值的主效抗病基因。2009 年, Gennaro 等^[18]采用 NBS-profiling 的方法,从一套含有 *Lr19* 的硬粒小麦和长穗偃麦草的重组系中获得了与 *Lr19* 抗病相关基因的全长,但并未对该基因进行定位和功能验证,只是从结构上推断出为 *Lr19* 的候选基因。

本研究拟根据已克隆植物抗病基因的 NBS 保守结构域设计简并引物,利用 RT-PCR 方法从抗叶锈病小麦近等基因系材料 TdLr19 中扩增抗病基因同源片段,通过 RACE 技术获得该基因 cDNA 全长,对其结构、表达情况进行分析,以期小麦抗叶锈病机制的深入研究及最终克隆抗叶锈病基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料为携带有抗叶锈病基因 *Lr19* 的

回交 6 代近等基因系小麦材料 TdLr19,供试小麦叶锈菌菌株为 07-10-421-3 (FHJT),该菌株对 TdLr19 表现低毒力。植物材料和病原菌均由河北农业大学小麦锈病研究室收集保存。

1.2 方法

1.2.1 小麦叶片总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成 小麦在温室生长至一叶一心期接菌鉴定,从抗性植株上剪取叶片提取总 RNA。RNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。参考 M-MLV 酶说明书反转录获得 cDNA 第一链。

1.2.2 RT-PCR 方法分离小麦抗病基因同源片段 根据已克隆植物抗病基因 NBS 的保守结构域设计引物组合 S11: A11 (表 1)。PCR 反应体系为 25 μl 反应体积包含 1 × PCR buffer, 200 μmol/L dNTP, 200 ng 引物, 3 μl cDNA 和 1.5 U TaqDNA 聚合酶。反应程序为: 94℃ 预变性 1 min; 35 个循环为 94℃ 变性 1 min; 50℃ 退火 1 min; 72℃ 延伸 2 min; 最后 72℃ 延伸 10 min; 10℃ 保存。

表 1 试验用引物

Table 1 Sequences of the primers used in the isolation		
保守氨基酸序列 Conserved domains	引物 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence
GGVGKTT (P-loop)	S11	GGIGGCTGGAAACAC
GLPLAL	A11	ARIGCTARIGGARICC

R = A/G; I = A/T/C/G

1.2.3 RACE 以获得的小麦抗病基因同源片段为靶序列,在其 5' 末端设计两条反向基因特异引物 S11A11-R1 和 S11A11-R2,在其 3' 末端设计 2 条正向基因特异引物 S11A11-F1 和 S11A11-F2 (表 2)。全长基因引物根据 5'-RACE 和 3'-RACE 的测序结果,获得拼接的全长序列,分别在其开放阅读框两端设计引物 S11A11Fu1 和 S11A11Fu2 扩增全长基因 (表 2)。

表 2 RACE 引物

Table 2 The primers for RACE		
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	序列长度 (bp) Sequence length
S11A11-R1	GCCACTGATTTTGTTCTGCTTGTGCT	27
S11A11-R2	TCCACTCCTGCTCTCTCTTCCAC	25
S11A11-F1	TGGATGAAATCACA TTGAGTGGTCTGGA	28
S11A11-F2	GGAGTTTGGCTGTTTTCAAGGCAT	26
S11A11Fu1	ACTCTCCTTCTCTGAGACCATC	24
S11A11Fu2	CCAACTCTCTAGTGCATCCAC	23

使用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (clon-
tech, 大连) 提供的 PowerScript 逆转录酶和寡聚
(dT) 引物, 按照说明书进行 cDNA 合成。利用 BD
AdvantageTM 2 PCR Enzyme System, 分别以 5'-RACE
cDNA 合成产物和 3'-RACE cDNA 合成产物为模板
进行 PCR 扩增, 反应体系参照试剂盒说明书。

反应程序: 95℃预变性 1min, 31个循环为 94℃变
性 30s, 66℃退火 1min, 72℃延伸 3min, 最后 72℃延伸
10min。巢式 PCR 以第一轮 PCR 产物 10倍稀释液为
模板, 提高退火温度为 70℃, 其余同第一轮 PCR 扩增。

1.2.4 PCR 产物的回收及克隆 PCR 产物经 1.0%
琼脂糖胶电泳分离, 目的 DNA 片段用 TaKaRa 公司的
凝胶回收试剂盒回收纯化。回收片段连接到 pGEM-
T Easy 载体 (Promega 美国), 热激法转化 DH5α 感
受态细胞进行克隆。

1.2.5 半定量 RT-PCR 提取经不亲和小麦叶锈菌
07-10-421-3 (FHIT) 分别诱导 Q 6, 12, 18, 24,
36, 48, 60, 72 和 96h 的 TcLr19 小麦叶片总 RNA, 以
未接菌的 TcLr19 小麦叶片总 RNA 为对照, 然后对
其进行反转录反应。选择在小麦中组成型表达的
Actin 基因作为内标, 通过调整模板浓度, 使内标基
因的 PCR 扩增产物量一致, 此时的模板用于全长基
因的表达分析。

1.2.6 序列测定与生物信息学分析 序列测定委
托上海生工生物工程技术有限公司完成。将获
得的序列与 GenBank 中的序列进行比较和分析, 利
用 SMART 分析推导蛋白结构域, 用 DNAMAN 中
Sequence Alignment 程序下的 Phylogenetic 对所获得
基因编码的蛋白质产物进行系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 小麦抗病基因同源片段 *S11A11* 的分离

利用简并引物组合 S11E A11, 以小麦近等基因
系材料 TcLr19 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得
一条近 500bp 的单一一条带 (图 1), 与预期片段大小
相符。回收该条带, 并进行连接转化。经克隆测序,
TcLr19 中获得一条 524bp 的通读序列, 推导出氨基
酸的序列长度为 150 个氨基酸, 暂命名为 *S11A11*。

经 BLASTp 分析, 该序列含有保守结构域 NB-
ARC。利用 DNAMAN 软件将 *S11A11* 与 GenBank 中已
登录的番茄 *IXC-1* (gi 75318195) 和 *IXC-2* (gi 75318196),
拟南芥 *RPS2* (gi 30173240)、*RPM1* (gi 29839510)、
RPP13-like protein 4 (*RPP13L4*, gi 29839509) 和
RPP8-like protein 1 (*RPP8L1*, gi 29839442)、亚麻 *L6*

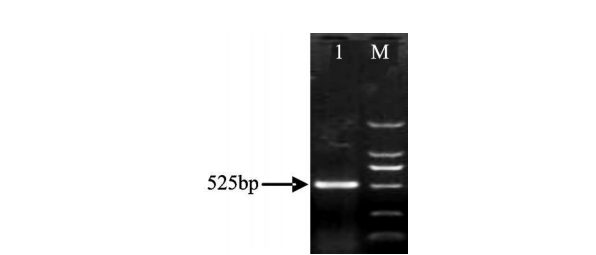


图 1 引物 S11E A11 RT-PCR 扩增产物
Fig 1 RT-PCR product amplified by primer pair S11E A11
L: RT-PCR product; M: DL2000 marker
L: RT-PCR 产物 M: DL2000 标记

(gi 75102252) 等 7 个已知的植物抗病基因相应
的 NB-ARC 区序列进行比较, 结果显示它们的保
守结构域相当一致 (图 2), 都具有抗病基因 NBS
的特征结构域 (激酶 2a 激酶 3a) 和 HD 疏水结
构域。

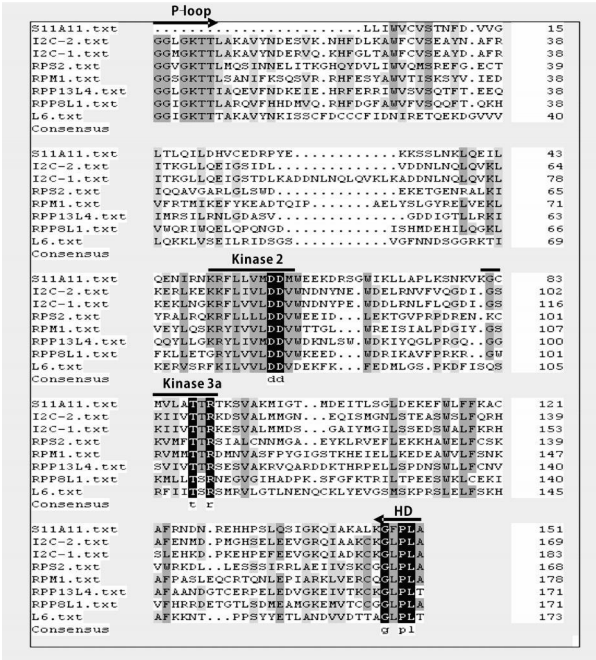


图 2 *S11A11* 同源片段与 7 种已知抗病基因
NB-ARC 保守结构域比较

Fig 2 A alignment of deduced amino acid of NB-ARC
domains sequence between *S11A11* and 7 known genes

2.2 RACE-PCR 产物分析

以 *S11A11* 片段为靶序列, 在靠近 5' 端设计 2
条嵌套式引物 S11A11-R1 和 S11A11-R2。巢式
PCR 扩增获得一条约 1200bp 片段 (图 3)。经测
序, 5' RACE 产物长为 1190bp, 与靶序列能够拼
接, 具有 270bp 重叠区域, 编码通读的蛋白质氨
基酸序列。

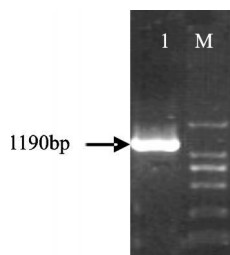


图 3 *S11A11* 片段 5' RACE 的 PCR 产物

Fig 3 The 5' RACE-PCR product of *S11A11* fragment

1 巢式 PCR 产物 The nested PCR product M: DL2000 marker

在靠近 3'端设计 2 条嵌套式引物 *S11A11*-F1 和 *S11A11*-F2 巢式 PCR 扩增获得一条约 1600bp 片段 (图 4)。经测序, 3'-RACE 产物长为 1599bp 含有 25bp 的 poly(A) 尾, 与靶序列能够拼接, 具有 120bp 重叠区域, 编码通读的蛋白质氨基酸序列。

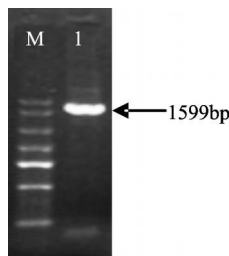


图 4 *S11A11* 片段 3' RACE 的 PCR 产物

Fig 4 The 3' RACE-PCR product of the *S11A11* fragment

1 巢式 PCR 产物 The nested PCR product M: DL2000 marker

2.3 *S11A11* 基因 cDNA 全长的获得

将 5'-RACE、3'-RACE 序列与靶序列 *S11A11* 用 DNAMAN 的 Sequence Assembly 程序进行拼接, 为了验证拼接获得的基因序列, 分别在拼接序列的 5'末端和 3'末端设计特异性引物 *S11A11*-Full1 和 *S11A11*-Full2 以 TdLr19 的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 结果获得了一条 3Kb 左右的扩增片段 (图 5), 将该条带克隆测序, 测序结果和拼接序列基本一致。该序列全长为 2923bp 在 GenBank 注册得到序列号为 GU356592 用 ORF Finder 查找拼接序列的开放阅读框, 结果显示, 162-2798 位核苷酸为开放阅读框, 长 2637bp 编码 878 个通读的蛋白质氨基酸序列。161bp 的 5'非翻译区 (non translated region, UTR), 100bp 的 3'非翻译区和 25bp 的多聚腺苷酸尾。

2.4 *S11A11* 基因编码蛋白氨基酸的结构分析

利用 SMART 进行基因结构分析发现, 小麦 *S11A11* 基因推导的蛋白在其 N 端第 226-512 位氨基酸序列为典型的 NB-ARC 结构域。进一步分析发现, *S11A11* 基因的 LRR 保守结构域含有 11 个重复, 与

“LxxLxLxx” 结构相一致。从图 6 可以看出, *S11A11* 基因编码产物具有 CC、NBS、LRR、HD 等保守结构域, 符合典型单子叶植物所具有的 CC-NBS-LRR 结构模式。

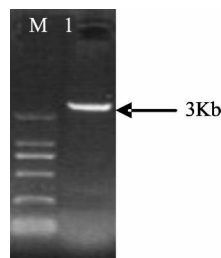


图 5 *S11A11* 全长 PCR 产物

Fig 5 The full length PCR product

1: PCR 产物 The PCR product M: DL2000 marker

2.5 小麦 *S11A11* 基因编码蛋白质产物的系统发育分析

为了分析小麦 *S11A11* 基因与其他小麦抗病基因以及抗病相关基因的关系, 利用 DNAMAN 对其编码的蛋白产物进行了系统发育分析, 从图 7 中可以看出, 首先 *S11A11* 与小麦抗叶锈病基因 *Lr1* 编码的蛋白聚为一类, 说明其与 *Lr1* 亲缘关系最近; 其次与 *Lr21* 的亲缘关系较近, 而与 *Lr34* 和 *Lr10* 的亲缘关系较远。 *S11A11* 与已克隆的小麦抗白粉病基因 *Pm3a* 以及 Gennaro 等^[18] 获得的 *Lr19* 的候选基因 *Lr19-AG15* 亲缘关系最远。

2.6 小麦叶锈菌接种处理对 *S11A11* 基因表达的影响

以生长一叶一心期的 TdLr19 小麦为材料, 采用撒粉法接种叶锈菌 07-10-421-3 分别于接种后 Q 6 12 18 24 36 48 60 72 96h 采集叶片, 提取总 RNA, 并以未接菌的 TdLr19 小麦叶片总 RNA 为对照, 反转录成 cDNA, 用小麦组成型表达基因 *Actin* 作内标调整浓度, 以 *S11A11* 全长进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明: TdLr19 在接菌前以及接菌后 96h 内, *S11A11* 基因均有表达, 而且表达水平基本一致, 说明在取样时间范围内, TdLr19 未受小麦叶锈菌的诱导 (图 8), 其表达方式为低丰度组成型表达。

3 讨论

同源序列法是目前克隆植物抗病基因的主要方法之一, 尤其在小麦抗病基因克隆中应用较为广泛。Feuillet 等^[14, 19] 用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶保守区域的引物, 成功地克隆到小麦抗叶锈病基因 *Lr10* 候选基因序列; Seach 等^[20] 用抗病基因同源序列 (RGA) 分

1
MSGLLGTVVDAAGWLVSILDSFFTERMEAWTREIGLAEDVEKLKFMRYVQMVLAAGKRSIDNMPLAQSLDDLRLGLYDSEDVMDLDDYY
RLEQQIIIEGKGCSAPTGTNLEGSYVSSSTLSSVVKLVCSATSQITDWISHGRKRKREEEGLAHCNMLPLEIKDSISKRINIVNLLCSNGNSVKGVLO
LENLRMTATSSKSQNIARDHYMTTSVPESKVVGRDAERDKIIDLLIKGGSSDLNVLVVVGS[GGVGKTT]LVRYVYHAKRIKDHFDLLIWVCVSTNF
DVVGLTLQILDHVCEDRPYEKKSSLNKLQEILQENIRNKR[LLVMDDMW]EEKDRSGWIKLLAPLKSNNKVK[GCMVLATTR]TKSVAKMIGTMDEIT
LSGLDEKEFWLFFKACAFRNDNREHPSLQSIGKQIAKALK[GFPLAL]QSVGALLSTEVSQHWTTVRDKRSLQGYDDDLILPKLSYDYLPPVYL
QRCFSYCSLYPEDYGFDDGKELVHAWISQNFVQCKDPTIRLEETGHGYLEKLVDLGGFFQKDGSHYV[MHD]LMHVLAGMVSSNECATIDGLKSGAIR
ASVRHSSIIADYDKDEHVSNSSEKFDKILQKGSWHK 607
608
LRTLMLFGRSSIHLSGPLRLTLCNEAKC
LRLLSVTGADI SSIYNSSNLFH
LRYI SAYRVSNPAFRQALTRCYH
LQVLDVGISGNDVPTDMNN
LVNLRHLIAHEKVHHAIDCVSNMTS
LQELKFKVQNVGSFEIGQLQSMNE
LVSLGVSQL E NVKTKEEAWAAMLTHKEY
LETMFLSWE NSSMSLQPEAAEDVLDGLQPHQN
LKTLEITGYGGAISPTWLSSAFSVTS
LRILHLEECREWQILSTHGMHS
LRKLTIRMLNLMELSVLDLST 878

图 6 TcLr19小麦 *S11A11* 基因编码的氨基酸序列

Fig 6 The deduced amino acid sequence of the *S11A11* gene from TcLr19

CG: N 端对应的氨基酸序列为 CC 结构域 (划线区) CC conserved domains corresponding amino acid in N end (underlined);
NBS P-Loop GVGKTT; K inase- 2 LLVMDDMW; K inase- 3a GCMVLATTR;
HD: GFPLAL (加边框区 In boxed); LRR 结构域 (阴影区 In shadowed areas)

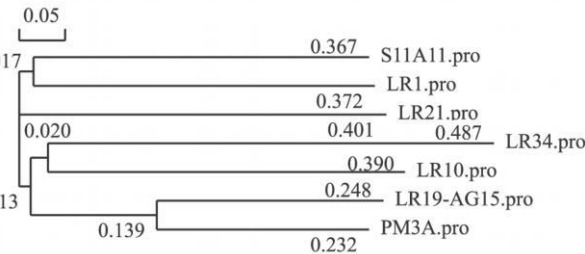


图 7 *S11A11* 基因序列系统发育树

Fig 7 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of *S11A11* gene

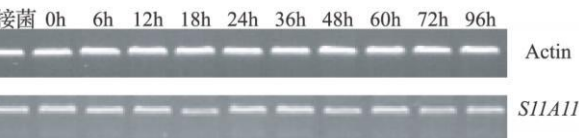


图 8 *S11A11* 全长序列在 TcLr19 中 RT-PCR 扩增结果

Fig 8 The RT-PCR products of the *S11A11* full length sequence in TcLr19

离到含有 *Lr37*、*Yr17*、*Sr38* 的片段; 王海燕等^[21-22]用 RGA 结合 RACE 技术得到了 *Lr35* 抗病相关基因的全长序列。

抗病基因同源序列 (RGA s) 在植物基因组中大量存在, 与 R 基因相关的 RGA s 只是其中的一部分。

就现有的 RGA s 研究来看, NBS 类是目前发现的最重要的抗病基因保守结构域, 且基本只出现在抗病基因中, 主要由 3 个区域组成: 第一区域为磷酸结合环 (P-bop), 又称激酶 la (K inase-la); 第二区域为激酶-2 (K inase-2); 第三区域为激酶-3a (K inase-3a)^[23-24]。为此, 本研究选择了 NBS 类 R 基因保守域为克隆对象, 根据 P-bop 和 GLPL 保守区域设计简并引物, 从经 6 代回交, 仅含有目的基因 *Lr19* 的小麦抗叶锈病近等基因系材料 TcLr19 中克隆得到了 1 个典型 NBS 类结构特征的小麦抗病基因同源序列, 包括: ①功能尚未明确的 K inase-2 区; ②与 DNA 的嘌呤或核糖结合相关的 K inase-3a 区; ③功能尚未清晰化的疏水结构域 GLPL 区, 但是缺少 ATP 或 GTP 的磷酸结合位点 K inase-la 区。由于用 RGA 法得到的序列只是抗病基因同源序列的一部分, 为得到完整的序列, 本研究进一步采用了快速有效的 RACE 技术获得了该片段的全长序列 *S11A11*。同时在回交亲本 Thatcher 中进行了验证, 经琼脂糖凝胶电泳检测发现, 其目的片段大小相近, 不能有效地揭示抗感材料之间的差异, 但序列分析却可以发现多个单碱基的差异, 包括碱基的 SNP 和插入 (缺

失),这种差异是不能用普通的琼脂糖凝胶电泳检测到的,这与前人的研究结果一致^[6, 25-29]。

对 *SlIA11* 编码产物进行结构分析发现,具有 CC、NBS、LRR、HD 等保守结构域,符合典型的单子叶植物所具有的 CC-NBS-LRR 结构。进一步对比发现,本研究所获得的全长序列含有完整的 NBS 结构域和 11 个 LRR 重复序列,其 LRR 的结构与“LxxLx-Lxx”相一致,基本符合胞质 LRR 结构要求,并且与 Gennaro 等^[18]获得的 *Lr19* 的候选基因 *Lr19-AG15* 中 24 个 LRR 重复序列的结构相一致,重复数的不同可能是由于所获得的功能区不同,进而导致最后的延伸结果不同。以 *SlIA11* 全长序列为基础,将其翻译产物与 GenBank 中登录的抗病基因具有较高的相似性,系统发育分析显示 *SlIA11* 与小麦抗叶锈病基因 *Lr1*、*Lr21* 具有较高的同源性,但与 *Lr10* 同源性较低,而且, *SlIA11* 与 *Lr19-AG15* 的同源性仅 15.09%,而与已克隆的小麦抗白粉病基因 *Pm3a* 的同源性也仅 14%。

本研究下一步的工作可以从以下几个方面开展:(1)基因定位。试验所用材料 TcLr19 所携带的抗病基因 *Lr19* 位于小麦 7D 染色体长臂上,为确定克隆的片段是否与 *Lr19* 抗病基因相关,还需对该基因片段进行染色体定位。(2)明确 *SlIA11* 基因在亲本中的分布情况。R 基因及其同源序列在基因组中至少以 3 种方式存在。第一是以基因簇 (gene cluster) 的形式存在于染色体的某一复杂位点;第二是以简单的单基因位点存在,但在不同品种间有多个等位基因;第三是以单基因或基因簇的形式存在于染色体的不同位点。有的 R 基因或其同源序列可同时以其中 1 种或 2 种形式存在于基因组中。(3)基因功能的进一步验证。尽管序列和结构上的分析均已表明, *SlIA11* 基因为小麦抗病同源基因,但还需在转基因体系或通过病毒诱导的基因沉默 (virus induced gene silencing VIGS) 技术进一步验证该基因的功能。

致谢: 取样设计实施和论文撰写过程中得到河北农业大学张汀、闫红飞、张立荣等老师的指导;试验实施过程中得到河北农业大学刘春燕硕士、程飞飞学士和于少雄学士的帮助,在此表示衷心感谢。

参考文献

- [1] Kemer JA. Genetics of resistance to wheat leaf rust [J]. Annual Review Phytopathology, 1996, 34 (1): 435-455
- [2] Singh R P, Huerta-Espino J, Roelfs A P. The wheat rusts [C]. FAO Corporate Document Repository, Rome: FAO, 2002.

- 227-249
- [3] Dhillon M, Erayman M, Sandhu D, et al. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance gene [J]. Genetics, 2004, 166 (1): 461-481
- [4] 王友红, 张鹏飞, 陈建群. 植物抗病基因及其作用机理 [J]. 植物学通报, 2005, 22 (1): 92-99
- [5] 刘继海, 程在全, 杨明攀, 等. 云南 3 种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (3): 273-280
- [6] Lester D, Balkvora A, Salanini F, et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants [J]. Nature Genetics, 1996, 14: 421-429
- [7] Collins N C, Webb C A, Seah S, et al. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11 (10): 968-978
- [8] 刘松青, 何莎, 蒋芳, 等. 小麦抗病基因同源序列 (RGAs) 的克隆与序列分析 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (3): 83-88
- [9] 黄萱, 徐子勤, 陈立余, 等. 小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39 (2): 91-96
- [10] Bozkurt O, Hakkı E E, Akkaya M S. Isolation and sequence analysis of wheat NBS-LRR type disease resistance gene analogs using degenerate PCR primers [J]. Biochemical Genetics, 2007, 45: 469-486
- [11] Monosi R W, Isser R J, Pennill L, et al. Full-genome analysis of resistance gene homologs in rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109: 1437-1447
- [12] Palmirino C, Sabovic Z, Cubero J J, et al. Identification and characterization of NBS-LRR class resistance gene analogs in faba bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Genome, 2006, 49: 1227-1237
- [13] Herrera-Foessel S A, Singh R P, Huerta-Espino J, et al. Molecular mapping of a leaf rust resistance gene on the short arm of chromosome 6B of durum wheat [J]. Plant Disease, 2008, 92 (12): 1650-1654
- [14] Feuillet C, Travella S, Stein N, et al. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100: 15253-15258
- [15] Huang L, Brooks S A, Li W, et al. Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat [J]. Genetics, 2003, 164: 655-664
- [16] Cloutier S M, Calkins B D, Loutre C, et al. Leaf rust resistance *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65 (1-2): 93-106
- [17] Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeier W, et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat [J]. Science, 2009, 323 (5919): 1360-1363
- [18] Gennaro A, Koebner R M D, Ceoloni C. A candidate for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat [J]. Functional & Integrative Genomics, 2009, 9: 325-334
- [19] Stein N, Feuillet C, Wicker T, et al. Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97: 13436-13441
- [20] Seah S, Bariana H, Jahier J, et al. The introgressed segment carrying rust resistance genes *Yr17*, *Lr37* and *Sr38* in wheat can be asayed by a cloned disease resistance gene-like sequence [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 600-605

(下转第 615 页)

续表

品种名称 Name	原产地 Origin	籼粳 Subspecies	水陆 Low land and upland rice	粘糯 Non- Glutinous and glutinous rice	全生育期 (d) Growth duration	株高 (cm) Plant height	柱头外露 Stigma outcrop	穗长 (cm) Panicke length	千粒重 (g) 1000-grain weight	种皮色 Color of brown
老来红	曲靖市	粳	水	粘	108	119	外露	16.78	23.6	红色
半节芒	曲靖市	粳	水	粘	108	110	外露	20.19	23	红色
大白谷	师宗县	粳	水	粘	105	114		22.2	24.3	白色
高酒谷	彝良县	粳	水	糯	108	110		23.5	25.88	白色
短干糯	云龙县	粳	水	糯	103	120		21.97	29.72	白色
金包银	镇康县	籼	水	粘	119	157	中	20.7	26.12	白色
毛香谷	镇雄县	粳	水	糯	93	95		18.78	24	白色

3 讨论

稻种资源抗性遗传多样性不可避免地与气候紧密联系在一起, 存在相互影响和作用, 而稻种资源的遗传多样性正在遭受气候变化的影响和冲击, 进一步探明不同生态环境中稻遗传多样性的差异表现, 十分有利于多样性保护与利用。因此, 不少学者从不同的角度开展研究环境对稻作抗性多样性的影响^[10-12], 但多见通过不减少基因和物种多样性, 不毁坏重要的生境和生态系统等方式, 来保护利用生物资源, 以保证生物多样性持续发展^[13], 朱有勇等^[14-15]利用稻种资源抗性遗传多样性实现稻作生产的可持续发展。少见定量分析稻种资源抗性遗传多样性与生态环境(温度)相互关系的报道。

云南地处低纬度地区, 全年太阳光热较多; 云南位于欧亚大陆东南部, 地理位置特殊, 西北面是“世界屋脊”青藏高原, 南近辽阔的海洋, 季风气候极为明显, 冬季受干燥的大陆季风控制, 夏季盛行湿润的海洋季风, 加上错综复杂的高原地形地貌, 从而形成了特殊的高原季风气候, 呈现出气候类型的多样性。这样的生态地理环境为云南稻种资源抗病性多样性形成提供了得天独厚的条件, 营造了稻抗病性多样性的空间分异基础, 因此, 云南是开展作物抗病多样

性研究条件最好的地区之一。

参考文献

[1] 刘志贤, 肖一龙, 刘二明, 等. 利用水稻品种抗性遗传多样性持续控制稻瘟病研究进展 [J]. 作物研究, 2003, 17(02): 103-105

[2] 杨忠义, 苏艳, 曹永生, 等. 稻种资源多样性的生态地理分布研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 475-479

[3] 杨忠义, 曹永生, 卢义宣, 等. 云南稻种资源生态地理分布研究 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006

[4] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 中国稻作资源目录 [M]. 北京: 农业出版社, 1976-1992

[5] 韩龙植, 魏兴华, 曹桂兰, 等. 水稻种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 农业出版社, 2006

[6] 《云南农业地理》编写组. 云南农业地理 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1981: 31-38

[7] 云南省测绘局. 云南省地图集 [M]. 昆明: 1982

[8] 云南省农牧渔业厅. 云南省种植业区划 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1992

[9] 云南省气象局. 云南省农业气候资料集 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 1983

[10] 汤圣祥, 江云珠, 张本敦, 等. 中国稻区的生物多样性 [J]. 生物多样性, 1999, 7(1): 73-78

[11] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 等. 云南稻种资源表型遗传多样性的研究 [J]. 作物学报, 2001, 27(9): 822-837

[12] 姬广海, 钱君, 张世光, 等. 云南水稻抗白叶枯病品种的遗传多样性初报 [J]. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 118-122

[13] Myers N. Threatened biotas ‘hotspots’ in tropical forests [J]. *Environmentalist* 1988, 8: 1-20

[14] 朱有勇, He Leung 陈海如, 等. 利用抗病基因多样性持续控制水稻病害 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(6): 832-839

[15] 刘二明, 朱有勇, 肖放华, 等. 水稻品种多样性混栽持续控制稻瘟病研究 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 164-168

[25] 李爱丽. 小麦抗白粉病基因同源序列的分离鉴定及分子标记的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2002

[26] 谌谋华. 利用同源序列法克隆柑橘抗病基因类似物及其初步分析 [D]. 重庆: 华中农业大学, 2003

[27] 陈秀珍. 小麦抗白粉病近等基因系 cDNA 文库构建及抗病相关基因的全长 cDNA 克隆 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004

[28] 徐兵强. 香蕉、番木瓜和芒果 NBS-LRR 类和 STR 类抗病基因同源序列的克隆和特征分析 [D]. 广州: 华南热带农业大学, 2005

[29] 王海燕. TcLr35 小麦抗病相关基因的克隆及分析 [D]. 保定: 河北农业大学, 2006

[上接第 610 页]

[21] 王海燕, 杨文香, 刘大群. 小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1558-1564

[22] 王海燕, 刘大群, 杨文香, 等. 1 个小麦 NBS 类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与鉴定 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(5): 507-513

[23] Bent A F. Plant disease resistance genes: function meets structure [J]. *Plant Cell* 1996, 8: 1757-1771

[24] Qin G J, Chen P D, Gu H Y, et al. Isolation of resistance gene analogs from wheat based on conserved domains of resistance genes [J]. *Acta Botanica Sinica* 2003, 45(3): 340-345