

芒果 NBS 类抗病基因同源序列克隆与分析

刘 洋^{1,3}, 姚全胜², 苏俊波², 洪亚楠^{1,3}, 雷新涛²

(¹中国热带农业科学院湛江实验站, 广东湛江 524000; ²中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524000;

³中国热带农业科学院热带旱作农业研究中心, 广东湛江 524000)

摘要:根据已知物种 NBS 抗病类基因 (RGAs) 保守序列设计引物, 从芒果品种金煌基因组 DNA 中分离得到了 10 条同源序列 (pp-1 ~ 10, GenBank 登录号为 HM446507 ~ 16)。DNA 序列分析表明, 这些 RGAs 在 200 ~ 300 bp 区间存在较大变异, Pi 值都在 0.4 以上。同源性分析表明这些序列的同源性差异范围从 11.0% ~ 98.4%, 离散值范围为 1.6 ~ 100.7, 10 条 RGAs 可以分为 2 大类。蛋白序列分析表明, pp-01 ~ 10 都具有开放读码框, 编码的蛋白含有典型的 NBS 抗病类基因所拥有的 P-loop 和 Kinase-2a 结构域, 通过同源进化分析可将其分为 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 2 类, 与已知物种同源性范围为 20% ~ 60.2%。

关键词:芒果; NBS; 抗病类基因; 同源克隆; 聚类分析

Isolation and Characterization of NBS Type Resistance Gene Analogues from Mango (*Mangifera indica* Linn.)

LIU Yang^{1,3}, YAO Quan-sheng², SU Jun-bo², HONG Ya-nan^{1,3}, LEI Xin-tao²

(¹Zhanjiang Experiment Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS), Zhanjiang, Guangdong 524000;

²South Subtropical Crops Research Institute, CATAS, Zhanjiang, Guangdong 524000;

³Tropical Dry Farming Research Center, CATAS, Zhanjiang, Guangdong 524000)

Abstract: According to the conservative sequences of the NBS-LRR disease-resistant genes (RGAs), we isolated 10 homologous sequences (pp-01-10 and GenBank accession number is HM446507-16) from the mango variety Jin Huang genomic DNA. Analysis of DNA sequences showed that the RGAs had more variation in the 200-300 bp region and Pi value was above 0.4. The clones of pp-01-10 showed great homologous differences with the similarity from 11.0% to 98.4%, divergence value from 1.6 to 100.7, and 10 RGAs could be divided into two groups. pp-01-10 sequences had open reading frames and the encoded protein contained P-loop and Kinase-2a domains that were typical character of NBS gene families. pp-01-10 could be divided into TIR-NBS-LRR and CC-NBS-LRR families and the homology was 20% ~ 60.2% compared with NBS genes of other known species.

Key words: Mango (*Mangifera indica* Linn.); NBS; RGAs; homologous clone; cluster analysis

植物抗病防御体系是植物在生长过程中为了抵御外来微生物的危害, 逐渐形成的抗病防御机制。在这一过程中涉及多种调控基因, 统称为植物抗病基因 (R gene, resistance gene)^[1-3]。克隆抗病基因对于培育作物抗病新品种和研究病原菌与寄主之间的分子互作机制都具有重要的意义^[4]。目前已从

植物中分离到 70 多个抗病基因, 这些基因通常都含有一些相似的结构域, 如核苷酸结合位点 (NBS, nucleotide binding site)、丝氨酸/苏氨酸激酶 (STK, serine/threonine kinase)、富含亮氨酸重复序列 (LRR, leucine rich repeats)、亮氨酸拉链结构 (LZ, leucine zippers)、跨膜结构域 (TM, transmembrane domain)

收稿日期: 2012-07-13 修回日期: 2012-10-25 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1737.018.html>

基金项目:国家自然科学基金项目 (30760147); 海南省自然科学基金项目 (311092); 中央公益性科研基本业务费项目 (ITBB120504)

作者简介:刘洋, 博士, 助理研究员, 研究方向为热带作物品种改良。E-mail: lyfull@163.com

通信作者: 雷新涛, 博士, 副研究员, 研究方向为芒果品种改良。E-mail: xtlei@263.com

等^[5]。根据这些保守结构域,可将抗病基因分成 5 类,其中 NBS 类广泛存在于植物的基因组中^[6-7]。几乎所有 NBS 类抗病基因都含有 NBS 区域中的 P-loop、GLPL 等结构域,自 V. Kanazin 等^[8]和 Y. G. Yu 等^[9]成功分离 R 基因类似序列 (RGA, resistance gene analogues) 以来,目前已从水稻、小麦、甘薯、甘蔗、花生等近 20 种植物中分离到了许多 RGAs 序列^[10-16],并对其起源、多样性和进化机制进行了研究。

芒果 (*Mangifera indica* Linn.) 是重要的热带、亚热带水果,属世界 5 大名果之一。近年来,我国华南几省芒果种植业发展很快,成为许多地区农业经济发展的重要产业。芒果炭疽病是一种严重的芒果病害,在生产和贮运过程中常引起落花、落果、落叶、枝枯、果腐,减产 30% ~ 50%。由于缺乏抗病品种,每年要花费大量的农药、资金、劳力进行化学防治^[17]。我国具有丰富的芒果资源,开展芒果抗病基因挖掘,分离与芒果抗病相关的基因序列,将为芒果抗病品种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为芒果品种金煌。2008 年种植于中国热带农业科学院南亚热带作物研究所芒果种质资源圃,大田常规管理,2009 年 6 月采集芒果的幼嫩叶片于 -20 °C 保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

琼脂糖购自 Gene tech 公司; *Taq* DNA 聚合酶、克隆试剂盒、DNA 回收试剂盒、dNTP 和 DNA Marker 均购自天根生化科技公司; PCR 反应在 TaKaRa 公司 TP-600 型扩增仪上进行。

1.3 芒果植株叶片基因组 DNA 的提取

利用改良 CTAB 法提取芒果基因组 DNA^[18]。运用核酸蛋白测定仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度, -20 °C 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

参考王彦华等^[19]的研究结果以及 NBS 类抗病基因的保守结构域,合成 1 对引物, pp-F1 (GGYATGGGNGGYMTHGGNAARAC (P-loop, GMGGI/LGK-TT)) 和 pp-R1 (CCANACATCATCMAGSACAA (Kinase2, VLDDVW/D)), 由上海生工合成。

1.5 PCR 扩增与克隆

用所设计的引物,以金煌基因组 DNA 为模板扩

增特异片段。PCR 反应体积为 20 μ L, 其中含有 30 ~ 50 ng 模板 DNA, 1 μ mol/L 引物, 200 μ mol/L dNTPs, 1 \times PCR Buffer, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 1 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 程序为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 90 s。共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。取 5 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统进行分析。PCR 产物回收与克隆参照天根生化 DNA 回收试剂盒说明书和 pGEM-T Easy Vector System 说明书, 阳性克隆送上海生工测序。

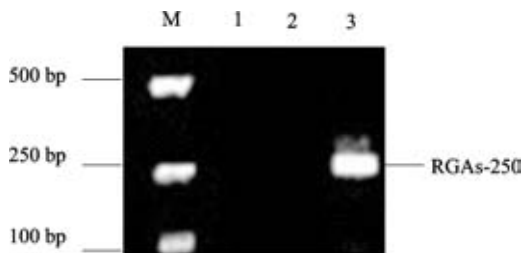
1.6 序列比对与同源性分析

在 NCBI 网站上下载其他物种的 NBS-LRR 类抗病基因蛋白序列^[5], 利用 DNASP 4.0 软件进行 DNA 多态性分析, 利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 进行序列比对和同源进化分析。同源进化分析采用 Cluster W 程序。

2 结果与分析

2.1 芒果 NBS 类抗病基因同源序列的 PCR 扩增、克隆与测序

利用设计的引物组合 pp-F1/pp-R1, 以金煌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得了 250 bp 左右的特异条带, 命名为 RGAs-250 (图 1)。将上述 PCR 产物回收纯化, 连接至 T-easy 载体, 后经过抗生素筛选, 获得 23 个阳性克隆。将这 23 个阳性克隆进行测序, 除掉非特异序列, 并合并一致的序列, 最后共获得 10 个特异片段, 编号为 pp-1 ~ 10。测序结果表明, 获得的序列长度为 246 ~ 261 bp 之间, pp-1 ~ 10 均能推导出氨基酸序列, 将这 10 条序列提交至 GenBank, 登录号为 HM446507 ~ HM446516。



M: DNA Marker V; 1: 空白对照; 2: 模板为水对照;
3: 以 pp-F1 和 pp-R1 为引物, 获得的芒果 NBS 类基因扩增产物
M: DNA Marker V, 1: blank control, 2: control using water as template,
3: PCR products of NBS genes amplified with pp-F1 and pp-R1
as primers in Mango

图 1 芒果 NBS 类基因 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 PCR amplification production of NBS genes in Mango

2.2 芒果 NBS 类抗病基因同源序列的多态性与同源进化分析

利用 MegAlign 对获得的序列进行比对,结果发现 10 个序列之间差异明显(图 2)。利用 DNASP 4.0 软件进行等位变异分析。结果表明,序列间存在 243 个变异位点,其中插入/缺失位点 24 个,单态

性位点 52 个,多态性位点 191 个。此类基因在整个区段变异幅度均较大,大致呈抛物线。在 20 bp 左右时 Pi 最小,约为 0.25,随着基因长度不断增高变异幅度也不短增加,在 200 bp 左右时 Pi 值最高为 0.45,之后开始逐渐降低,在 350 bp 左右时 Pi 下降到接近 0.32(图 3)。

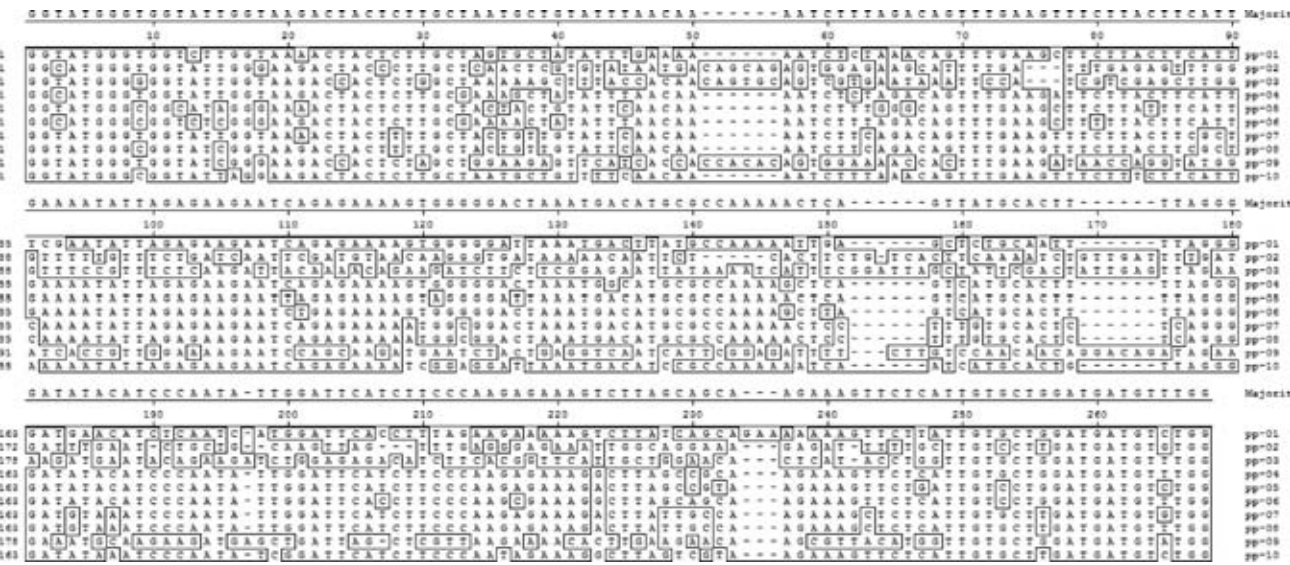


图2 芒果 NBS 类基因序列比对

Fig. 2 Alignment of NBS type gene sequences in Mango

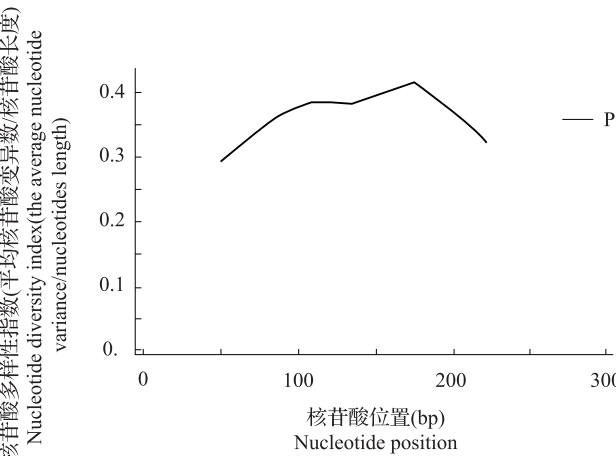


图3 芒果 NBS 基因类似物 DNA 序列多态性

Fig. 3 DNA polymorphism of NBS type resistance RGAs in Mango

利用 DNASTar 软件对这 10 个 RGAs DNA 序列进行同源分析。结果表明,这些序列的相似性存在很大的变异,相似性值范围在 11.0% ~ 98.4%。

其中,pp-07 与 pp-08 的相似性最高,为 98.4%;pp-09 和 pp-04、05、06 和 07 的相似性最低,只有 11.0%。离散值范围为 1.6 ~ 100.7,pp-01 和 pp-03 之间最高为 100.7,pp-07 和 pp-08 之间只有 1.6(表 1)。

利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 程序,采用 Cluster W 算法对 10 条序列进行聚类分析,构建系统发育树(图 4)。以 0.619 为阈值,可将 10 条芒果 NBS 类基因序列分为 2 类。第 I 类包括 pp-07、pp-08、pp-10、pp-05、pp-04、pp-06 和 pp-01,第 II 类包括 pp-03、pp-09 和 pp-02。可以看出,这 2 类基因在进化时表现出了较大的遗传歧化度。

2.3 芒果 NBS 类抗病基因同源序列编码蛋白差异与系统发育分析

获得的 10 个 RGAs 序列中均可以推导出氨基酸序列,氨基酸序列在 47 ~ 62 之间,最长的为 pp-03,最短的为 pp-10。这 10 个序列都含有 NBS 类抗

表 1 芒果 NBS 基因类似物 DNA 序列相似性

Table 1 DNA identity of NBS type resistance RGAs in Mango

		相似性百分比(%) Percent identity									
		pp-01	pp-02	pp-03	pp-04	pp-05	pp-06	pp-07	pp-08	pp-09	pp-10
离散值 Divergence	pp-01		11.2	11.6	83.3	81.3	81.7	79.3	78.0	11.2	79.3
	pp-02	83.2		26.9	13.0	14.2	12.2	14.6	14.2	21.3	12.2
	pp-03	100.7	62.0		16.3	14.6	15.0	11.8	11.8	61.3	15.9
	pp-04	19.0	80.0	89.3		89.0	93.9	85.8	85.8	11.0	87.4
	pp-05	22.3	80.2	98.2	12.0		89.0	84.6	84.6	11.0	87.4
	pp-06	21.2	79.0	90.5	6.4	12.0		82.1	83.7	11.0	85.0
	pp-07	24.6	81.7	96.6	15.9	17.5	20.7		98.4	11.0	85.4
	pp-08	26.6	84.5	95.1	16.0	17.6	18.6	1.6		11.4	85.8
	pp-09	80.0	68.6	59.5	78.3	81.9	78.1	87.2	85.5		11.4
	pp-10	25.0	82.9	92.0	13.9	13.9	16.9	16.4	15.9	79.4	

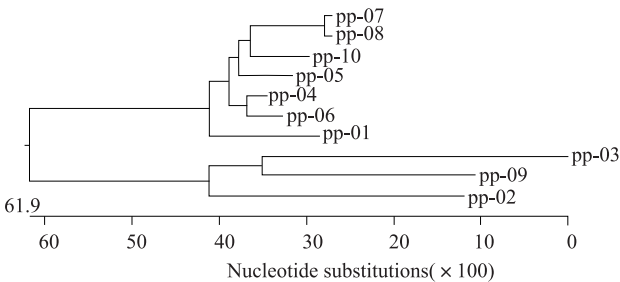


图 4 芒果 NBS 基因类似物 DNA 序列系统发育树
Fig. 4 DNA phylogenetic tree of NBS type resistance RGAs in Mango

病基因保守序列 P-loop(GMGGI/LGKTT) 和 Kinase2 (VLDDVW/D) 结构域。其中, kinase2 (VLDDVW/D)位点非常保守,所有的 10 个序列均完全一致,而 P-Loop(GMGGI/LGKTT)结构域也相当保守,只有 pp-01 和 pp-06 第 5 位点为亮氨酸,其余为异亮氨酸,而 pp-10 第 6 位点的甘氨酸突变为精氨酸(图 5)。

将这 10 个序列与已知物种的 NBS-LRR 类抗病基因序列进行同源性比较(物种名称及 GenBank 登录号见图 6)。结果表明,pp-03 与拟南芥 RPP13

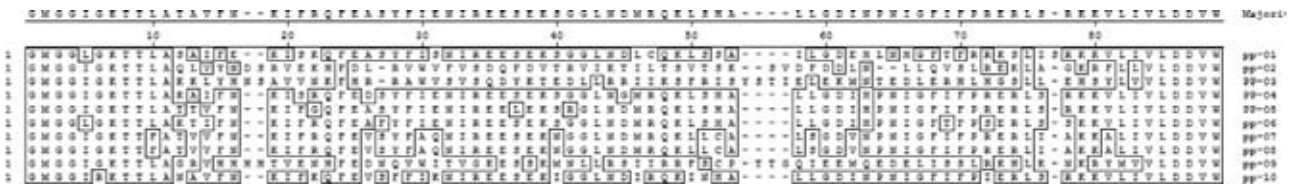


图 5 芒果 NBS 基因类似物编码蛋白序列差异
Fig. 5 Differences of NBS type resistance RGAs protein in Mango

同源性较高为 54.7% ;pp-02 和番茄抗镰刀菌基因蛋白 I2C-1 序列同源性较高为 60.2% , pp-01、pp-04、pp-05 及 pp-06 和亚麻 L6 同源性都在 40% 以上,其余片段与其他物种同源性都较低,在 20% ~ 40% 之间。将获得的片段进行分类,可分为 2 大类,即 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 类,其中 pp-04、pp-05、pp-06 和 pp-01 在 TIR-NBS-LRR 类中, pp-10、pp-07、pp-08、pp-02 和 pp-03 在 CC-NBS-LRR 类中,而 pp-09 和马铃薯 R1 既不属于 TIR-NBS-LRR 类也不属于 CC-NBS-LRR 类(图 6)。

3 讨论

3.1 芒果 NBS 类 RGAs 分离与多样性

NBS 类基因是已知的 R 基因家族中最大的一类基因。对已知的几种模式植物的研究发现,NBS 类在植物中往往存在着多种类型,而且每种类型都含有多个拷贝。这些家族基因往往成簇存在,并且和其他 R 基因序列成簇状排列在染色体上,有些基因簇含有十几个甚至几十个 R 基因序列^[20-21]。正是这种成簇排列的方式使得基因内和基因间错配、

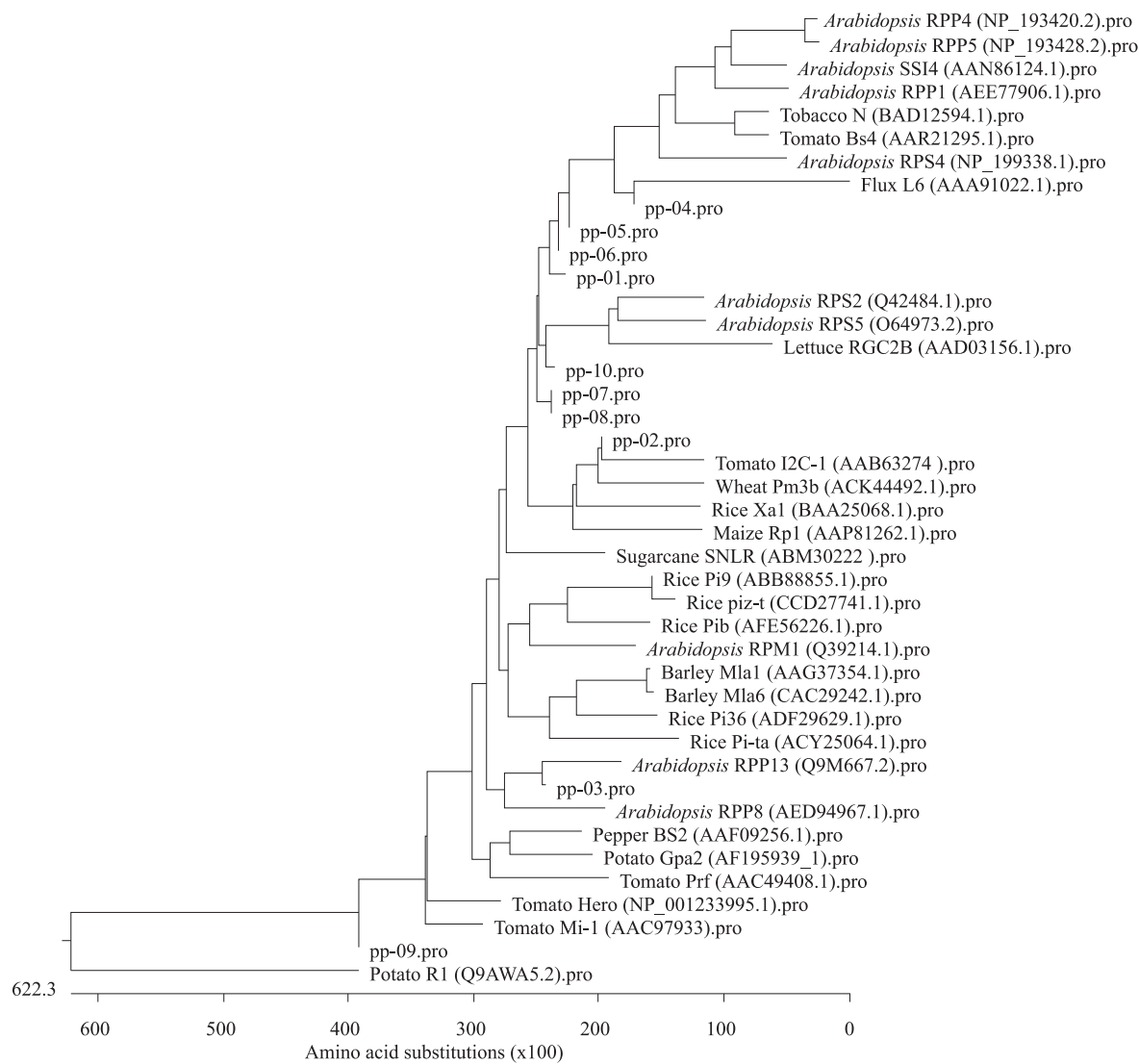


图 6 不同物种 NBS 基因类似物编码蛋白序列聚类分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of NBS type resistance RGAs protein sequences in different plants

重组、重复的频率大大提高,在产生无义基因的同时加快了新的 R 基因的产生。目前从水稻、小麦、甘薯、甘蔗、花生等近 20 种植物中分离到了许多 RGAs 序列都表现出了很高的变异性^[10-16]。本试验扩增获得的 10 条芒果 NBS 类基因片段也存在类似的情况,虽然只有 250 bp 左右,但是这些序列的同源性变异范围很大,从 11.0% ~ 98.4%,离散值范围为 1.6 ~ 100.7。而且,从基因多态性分析来看,10 条序列中有 243 个变异位点,200 bp 附近变异幅度较高。这说明芒果 NBS 类基因存在一个较大的基因家族,且基因变异程度较高。

3.2 芒果 NBS 类蛋白多样性与进化关系

本研究获得的 10 条 RGAs 均能编码氨基酸序列,通过同源比对分析,发现虽然这 10 条序列编码

的蛋白都属于 NBS 类基因,具有典型的 P-loop (GMGGI/LGKTT) 和 Kinase-2 (VLDDVW/D) 保守结构域,而且所有的序列在 Kinase-2 结构域最后一个氨基酸位点都是 W,这与 P. Qilin 等^[22]的研究一致。在保守域中,虽然也有个别序列发生了突变,但是没有影响到整个保守域的性质,如 pp-01 和 pp-06 第 5 位点由异亮氨酸变为亮氨酸。与其他作物 NBS-LRR 类蛋白序列比较分析发现,其他作物如拟南芥保守区变异较大,例如在拟南芥 RPP2 和 RPP5 中,保守域 GMGGIGKTT 的结构中,第 2 位的 M 分别突变为 P 和 Q,在第 5 位的 I 和第 7 位的 T 也分别突变成 V 和 S。在拟南芥 RPP5 中,保守结构域中 VLDDVW 最后一位也突变成了 D,由此可见芒果的 RGAs 保守区更加保守。在保守域外,氨基酸序列

变异程度较大,序列整体的相似性并不高,相似性在 31% ~ 100% 之间,而与其他物种相比,相似性更低,与水稻 Xa1、拟南芥 RPS2、拟南芥 RPS5 和拟南芥 RPP5 等的相似性只有 22% 左右,聚类分析结果也说明了这种情况(图 6)。利用 DNASTar 软件分类的结果与 J. L. Liu 等^[5]的研究是一致的,获得的 10 条序列在 TIR-NBS-LRR 和 CC-NBS-LRR 2 类中都有分布,表明芒果 NBS 类基因比较丰富。但从图上可以看出,马铃薯 R1 距离较远,可能为 CC-NBS-LRR 类中一个新的亚类。

本研究分离的 10 个具有连续 ORF 的 RGAs 表现出较大的变异(图 5),也说明这些基因可能是来自同一基因的不同拷贝,也为进化趋异(slowing evolving divergence)假说提供了一些间接证据^[23]。这也表明,在芒果基因组中的 RGAs 序列的多样性可能是由于不等交换造成的,但造成 RGAs 序列的多样性和复杂度的遗传机理直接证据还待进一步研究。

3.3 芒果 NBS 类 RGAs 与抗病育种

NBS 结构域是最重要的抗病基因保守结构域之一,在植物的抗病反应中起着重要的作用^[24]。但是,许多证据表明,并非只有抗病基因才具有 NBS 结构域,具有 NBS 结构域的基因也不一定就是抗病基因^[25]。其中可以肯定的原因是,NBS 结构域是一类核苷酸结合位点,存在于许多 ATP 或 GTP 结合蛋白中,如 RAS(rat sarcoma)族蛋白、G 蛋白、ATPase 延伸因子等^[26],这些蛋白参与生命活动的各个环节,抗逆响应只是其中的一部分作用。除了 NBS 结构域,NBS-LRR 类抗病基因还应具有其他一些重要的结构域,如 TIR(toll or interleukin-1 receptor)、LRR(1eucine rich repeats)或 LZ(1eucine zipper)等,可能比 NBS 位点具有更直接的抗病作用^[27]。因此,本研究分离得到的 10 条 NBS 类抗病基因同源序列,仅为具有潜在功能的抗病基因片段,想要真正分离具有抗病功能的基因还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] 韩德俊,陈耀锋,曹莉,等.植物抗病基因与病原菌无毒基因互作的分子基础[J].遗传学报,2005,32(12):1319-1326
- [2] 董继新,董海涛,李德葆.植物抗病基因研究进展[J].植物病理学报,2001,31(1):1-9
- [3] 罗敏,朱友林,余潮,等.植物抗病基因的克隆及其结构与功能[J].遗传,2000,22(6):429-433
- [4] 阙友雄,许莉萍,林剑伟,等.斑茅 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J].热带作物学报,2009,30(2):192-197

- [5] Liu J L, Liu X L, Dai L Y, et al. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants[J]. J Genet Genomics, 2007, 34(9): 765-776
- [6] 易图永,谢丙炎,张宝玺,等.植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用[J].生物技术通报,2002(2):16-20
- [7] Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance gene[J]. Annu Rev Plant Mol Biol, 1997, 48: 575-607
- [8] Kanazin V, Marek L F, Shoemaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11746-11750
- [9] Yu Y G, Buss G R, Saghai M M A. Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11751-11756
- [10] 王世全,张德春,李平,等.水稻中一个 NBS-LRR 抗病同源基因家族的克隆和分析[J].遗传学报,2005,32(7):704-711
- [11] 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
- [12] 陈观水,周以飞,林生,等.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
- [13] 阙友雄,许莉萍,林剑伟,等.甘蔗 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J].作物学报,2009,35(4):631-639
- [14] Yuksel B, Estill J C, Schulze S R, et al. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut[J]. Mol Gen Genom, 2005, 274: 248-263
- [15] 张向明,韦靖鸾,张丹,等.野生稻 NBS 类抗病基因同源序列的分离与序列分析[J].植物遗传资源学报,2010,11(6):741-748
- [16] 张楠,王海燕,刘大群.小麦 NBS 类抗病基因同源 cDNA 序列的克隆与特征分析[J].植物遗传资源学报,2010,11(5):605-610
- [17] 肖厚贞,辛吉武,刘志威,等.芒果炭疽病生境生态位[J].热带农业科学,2009,29(6):23-25
- [18] 王家保,王令霞,刘志媛,等.芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J].生物技术,2005,15(5):37-41
- [19] 王彦华,侯喜林,申书兴,等.不结球白菜抗病基因同源序列的克隆及分析[J].中国农业科学,2006,39(12):2621-2626
- [20] Ellis J, Dodds P, Pryor T. Structure function and evolution of plant disease resistance genes[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 278-284
- [21] Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl J L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR protein and their partners[J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7: 391-399
- [22] Qilin P, Jonathan W, Robert F. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologous in dicot and cereal genomes[J]. J Mol Evol, 2000, 50: 203-213
- [23] Xu Q, Wen X P, Deng X X. Isolation of TIR NBS-LRR resistance gene analogues and identification of molecular marker linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 819-830
- [24] Brody J D, Roger W I. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense[J]. Nature Immunol, 2006, 7: 1243-1249
- [25] He C Y, Zhang Z Y, Chen S Y. Cloning and analysis of a disease resistance gene homolog from soybean[J]. Chin Sci Bull, 2001, 46(12): 1017-1021
- [26] Baker B, Zambryski E, Staskawicz B, et al. Signaling in plant microbe interaction[J]. Science, 1997, 276: 726-733
- [27] Traut T W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites[J]. Eur J Biochem, 1994, 222: 9-19