

野生稻 NBS 类抗病基因同源序列的分离与序列分析

张向明, 韦靖鸾, 张 丹, 王春台, 刘学群, 刘新琼

(中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要:为了挖掘野生稻中的抗病资源, 根据已克隆的植物抗病基因核苷酸结合位点序列中的保守结构域设计 3 对简并引物, 从疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点野生稻基因组 DNA 中分离出 13 条 NBS 类抗病基因类似物, 其中 11 条具有连续的 ORF, 具有 NBS 类 R 基因的保守基元 P-loop, kinas-2, kinas-3a 和 GLPL。在 NCBI 上进行同源性搜索发现, 其中 12 条 RGAs 的核苷酸序列与水稻已知的 NBS 类 R 基因具有 66%~94% 的同源性, 与其他植物已知 R 基因具有 67%~84% 的同源性; 其对应的氨基酸序列与水稻已知的 NBS 类 R 基因具有 43%~93% 的同源性, 与其他植物已知 R 基因具有 37%~79% 的同源性。另外 1 条的核苷酸序列与水稻假定的 NBS 类 R 基因具有 76% 的同源性, 其氨基酸序列与水稻假定的 NBS 类 R 基因具有 74% 的同源性。根据序列分析结果设计 6 对不同基因特异性引物, 并利用 RT-PCR 技术进行表达分析, 结果表明, *RN1BD5*、*RN1BD10*、*RN1GG2* 和 *RN1YY6* 均能表达, 说明这些片段可能是功能性抗病基因的部分序列; 而 *RN1KY9* 和 *RN1GG5* 没有表达, 可能是假基因。

关键词:野生稻; 抗病基因类似物; 基因分离; 序列分析

Isolation and Sequence Analysis of NBS Resistance Gene Analogues in Wild Rice

ZHANG Xiang-ming, WEI Jing-luan, ZHANG Dan, WANG Chun-tai, LIU Xue-qun, LIU Xin-qiong

(Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology/College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract: To explore resistance genes from wild rice, three sets of degenerate primers were designed based on the conservative domain of the nucleotide binding site (NBS) region from the cloned plant disease resistance genes (*R*) to isolate resistance gene analogues (RGAs) from genomic DNA of *Oryza granulata*, *O. officinalis*, *O. alta*, *O. latifolia* and *O. punctata*. After sequencing and analyzing by alignment, 13 NBS RGAs were detected, 11 of which had uninterrupted open reading frames (ORF) and contained the conserved motifs of NBS *R* genes such as P-loop, kinas-2, kinas-3a and GLPL, and the other two sequences were with immature stop codon. At the nucleotide level, the sequence identity of 12 RGAs ranged from 66% to 94% with the cloned NBS *R* genes from *O. sativa*, and between 67% and 84% with the cloned *R* genes from other plants. While the 12 RGAs deduced amino acid sequences showed identity with the cloned NBS type *R* gene from *O. sativa* ranging from 43% to 93%, and with the cloned *R* gene from other plants ranging from 37% to 79%. As for the other RGA, its nucleotide sequence identity with *O. sativa* putative NBS class *R* genes was 76%, and the deduced amino acid sequence identity was 74%. To further analyze the expression of these RGAs, RT-PCR was performed. The results showed that *RN1BD5*, *RN1BD10*, *RN1GG2* and *RN1YY6* could express, which indicated that these fragments might be partial sequence of functional *R* genes; whereas *RN1KY9* and *RN1GG5* didn't express, which indicated they might be residual arti

收稿日期: 2010-03-29 修回日期: 2010-04-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30600400); 湖北省自然科学杰出青年基金项目(2009CDA125); 中南民族大学校级教学改革项目(JYX09031)

作者简介: 张向明, 讲师, 从事生物信息学研究。

通讯作者: 刘新琼, 副教授。E-mail: xinqiongliu@126.com

facts of functional resistance genes or pseudogenes.

Key words: Wild rice; Resistance gene analogues (RGAs); Gene isolation; Sequence analysis

近年来,水稻生产受到了严重的威胁,一方面是由于水稻改良品种的大面积推广使得其遗传基础日益狭窄,另一方面是由于水稻病原菌和害虫的复杂多变。实践证明,挖掘新的抗性基因资源,结合分子育种技术培育和合理利用新抗病品种是控制病害的最经济有效的途径^[1]。而作为栽培稻原始近缘种的野生稻,长期处于野生状态,具有丰富的遗传多样性,保留着一些罕见和重要的基因,是宝贵的种质资源。野生稻对病虫害的抗性、对各种逆境的耐受性以及胞质雄性不育等,已广泛应用于现代栽培稻的育种改良^[2-3]。因此,克隆、分析与研究野生稻抗病基因,对改良水稻抗病性及阐明水稻抗病性的分子机制具有重要意义。

抗病基因(resistance gene, *R*)是指寄主体内能特异性识别病原并激发抗病反应的基因,它与病原菌的无毒基因 *Avr* (avirulence gene) 直接或间接编码产物(配体)互作后,启动并传导信号,激发如过敏反应 HR (hypersensitive response) 和系统获得抗性 SAR (system acquired resistance) 的抗病反应^[4-7]。迄今,已从植物中分离得到近 50 个 *R* 基因,大多数都符合基因对基因的关系,对多种真菌、细菌、病毒等病原体具有抗性^[8],并且这些 *R* 基因编码的产物存在极其相似的结构域。根据它们所编码的保守结构的不同,可把 *R* 基因分为 7 类^[9-12]:毒素还原酶类;核苷酸结合位点和富含亮氨酸重复序列(nucleotide binding site and leucine-rich repeat, NBS-LRR)类;蛋白激酶类(protein kinase, PK);胞外 LRR 类;受体激酶类;编码的蛋白仅含有完整的卷曲螺旋结构域(coiled-coil, CC)和 NBS 结构域;编码的蛋白为一个转录因子(TFIIA γ)的基因。模式植物全基因组测序结果表明,NBS-LRR 类 *R* 基因在植物基因组中广泛存在,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中 1% 的基因为 NBS-LRR 类 *R* 基因,而在水稻基因组中具有约 660 个 NBS-LRR 类 *R* 基因^[11-14]。

大量研究表明,抗病基因类似物(resistance gene analogues, RGAs)与 *R* 基因之间的关系主要有 3 种:第一, RGA 是 *R* 基因或假基因的一部分;第二, RGA 与 *R* 基因紧密连锁;第三, RGA 与目的抗病基因无关^[11, 15]。因此可根据 *R* 基因的保守

区域设计简并引物,直接进行 *R* 基因同源片段的扩增、分离及克隆。本研究利用已克隆的植物 NBS 类 *R* 基因的保守结构域设计简并引物,从 5 种不同野生稻中分离鉴定 RGAs,直接克隆或开发与水稻抗病基因紧密连锁的分子标记及定位、克隆抗病基因,为挖掘新的抗性资源打下基础,对培育新的抗病品种具有重要的指导意义,为进一步研究水稻抗病性的分子机制及改良普通栽培稻的抗病性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点野生稻,栽种于中南民族大学现代化温室。

宿主菌 *E. coli* DH5a,由中南民族大学生物技术综合实验室提供。

PCR 相关试剂及 T/A 克隆试剂盒,均购自大连宝生物工程(大连)有限公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司(USA);反转录试剂盒 Two-Step M-MLV RT-PCR System 购自 Bipece Biopharma 公司(USA);其余试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 取疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点 5 种野生稻幼嫩叶片,采用 CTAB 法提取基因组 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和质量。

1.2.2 引物设计 根据已知的植物 *R* 基因 NBS 序列中的保守结构域设计 3 对简并引物^[12](表 1),预期扩增产物为 500bp 左右。根据测序及序列分析结果,用软件 Primer 5.0 (<http://www.primerbiosoft.com>)设计 6 条基因特异性引物用于表达分析,同时设计 1 对看家基因 *Actin* 特异性引物(表 1)。引物由金思瑞科技(南京)公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及克隆测序 PCR 反应采用标准反应体系在 PTC-200 PCR 仪上进行,扩增条件为:94℃ 预变性 4min;94℃ 变性 30s,44~50℃ (从 44~50℃ 设 4 个温度梯度)退火 30s,72℃ 延伸 1min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 7min,温度降到 4℃ 即完成扩增。扩增产物取出之后于 4℃ 冰箱保存、备用。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences information used in this study

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'...3') Forward primer sequence (5'...3')	反向引物序列 (5'...3') Reverse primer sequence (5'...3')
<i>RN1</i>	5' ATGGGNGGNATYGGNAARAC 3'	5' ATDGCNARDGGSAGNCC 3'
<i>RN2</i>	5' GGNGGNRTNGGNAACAAC 3'	5' CAANGCCAANGGCAANCC 3'
<i>RN3</i>	5' GGTGCGYTTGGGAAGARAACG 3'	5' CAACGCNAGRGGCAADCC 3'
<i>RN1BD5</i>	5' GAACAATCTCAATCCCTACG 3'	5' TGTTCCTCCAGGACTACTCTC 3'
<i>RN1BD10</i>	5' ATGAGCAGAGGATAAGGGAG 3'	5' CTCTTCTTTGCTCGTATGCC 3'
<i>RN1GG2</i>	5' GTCACTGCAAGCTGCCACT 3'	5' GAAGCCCAATGCCTCAGATG 3'
<i>RN1GG5</i>	5' GATGGAAGGATAAGGGAGAG 3'	5' CGTAAGCGGTTCCGAATGAT 3'
<i>RN1YY6</i>	5' TGGGAAGACAACAATGGCTC 3'	5' CATCCTACTGCTGCTGACATC 3'
<i>RN1KY9</i>	5' CAGGCATGGCTATGTGTTTC 3'	5' GACAATCTTGGTCCCTATG 3'
<i>Actin</i>	5' TATGGTCAAGGCTGGGTTCCG 3'	5' CCATGCTCGATGGGTACTT 3'

混合碱基代码: R = A/G; N = A/G/C/T; Y = C/T; D = A/C/T

Mixed base code: R = A/G; N = A/G/C/T; Y = C/T; D = A/C/

PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,目的片段回收后,与 pMD18-T vector 连接,具体方法参照产品说明书进行。对阳性克隆通过菌落 PCR 和酶切鉴定,最后再测序验证。

1.2.4 序列分析 测序获得的核苷酸序列在 NCBI 上进行 Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>) 搜索并去除载体序列;然后在 GenBank 中用 BLASTX 和 BLASTN 分别搜索蛋白质数据库和核酸数据库,并进行核苷酸序列和氨基酸序列间的同源性分析;利用 NCBI 中的 ORF finder 程序进行开放阅读框搜索;用 Multiple 分别进行核苷酸与氨基酸序列的比对,利用 GeneDoc 软件编辑比对结果。然后用 MEGA4 构建系统发育树并用 Bootstrap 法评估系统发育树的可靠性。

1.2.5 RNA 制备、cDNA 的反转录及 RT-PCR 表达分析 取疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点 5 种野生稻幼嫩叶片,液氮速冻研磨成粉状后用 TRIzol 提取液抽提总的 RNA,用 1.2% 甲醛变性的琼脂糖凝胶检测。用 DNase I 处理总 RNA 样品,利用反转录试剂盒 Two-Step M-MLV RT-PCR System 进行反转录,具体方法参照产品说明书。然后利用 RT-PCR 对目的基因进行表达分析,以看家基因 *Actin* 作为内参。

2 结果与分析

2.1 野生稻 RGAs 的分离与鉴定

根据植物已知抗病基因 NBS 结构域设计 3 对简引物,以疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点野生稻的基因组 DNA 为模板,*RN1* 扩增均得到一条约 500bp 的条带(图 1);*RN3* 扩增只有疣粒野生稻得到一条约 500bp 的条带,其他 4 种野生稻未扩增出任何条带;*RN2* 扩增 5 种野生稻未出现任何条带(数据未列出)。

对这些扩增产物进行回收及克隆和鉴定,从高秆野生稻中鉴定出 4 种不同的阳性克隆 *RN1GG1*、*RN1GG2*、*RN1GG5* 和 *RN1GG6*;从斑点野生稻中鉴定出 4 种不同的阳性克隆 *RN1BD2*、*RN1BD5*、*RN1BD6* 和 *RN1BD10*;从药用野生稻中鉴定到 2 种不同的阳性克隆 *RN1YY6* 和 *RN1YY17*;从宽叶野生稻中鉴定到 3 种不同的阳性克隆 *RN1KY1*、*RN1KY9* 和 *RN1KY11*;从疣粒野生稻中鉴定到 3 种不同的克隆 *RN1YL1*、*RN3YL3* 和 *RN3YL9*。对这 16 种不同类型的阳性克隆测序并在 NCBI 中进行核苷酸序列的同源性搜索发现,其中有 13 条序列与已知的植物 NBS 类抗病基因具有不同程度的同源性。另外,从疣粒野生稻中分离出的 3 条序列的氨基酸序列与植物中的 *R* 基因

没有同源性,可能是因为疣粒野生稻属于 GG 基因组,与其他野生稻的差异较大,所以根据已知的 NBS 类抗病基因保守结构域所设计的引物可能不适用于扩增疣粒野生稻的 *R* 基因。

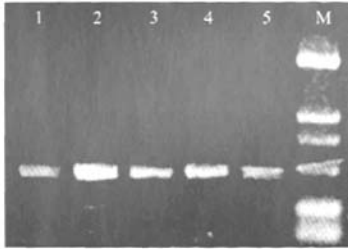


图1 引物对 RN1 的 PCR 扩增电泳图
Fig.1 Electrophoretogram of primer set RN1 PCR amplification

M: 分子量标记 DL2000; 1~5: 分别扩增疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点野生稻基因组 DNA
M: DNA marker DL2000; 1~6: Amplification the genomic DNA of *O. granulata*, *O. officinali*, *O. alta*, *O. latifolia* and *O. punctata*

2.2 野生稻 RGAs 的序列分析

将 13 条 RGAs 在 NCBI 进行同源性搜索,得到 12 条 RGAs 在日本晴中的定位及其同源性的信息,而 *RN1GG1* 没搜索到相关信息(表 2)。*RN1BD5* 和 *RN1BD6* 分别在日本晴第 11 号和第 1 号染色体上存在多拷贝;*RN1BD2*、*RN1BD6* 和 *RN1BD10* (同源性达 99%) 位于同一基因簇;*RN1GG6*、*RN1YY6* 和 *RN1YY17* (同源性达 97%~98%) 分布在日本晴第 8 号染色体的相同位置;*RN1KY1*、*RN1KY9* 和 *RN1KY11* (同源性达 91%~98%) 与 *RN1BD5* 均分布在日本晴第 11 号染色体且相距较近,约 10~20kb (<200kb),故它们可能属于同一基因簇;*RN1BD5* 与 *RN1KY1*、*RN1KY9* 和 *RN1KY11* 的相似性为 64%~70%。其他序列的相似性为:*RN1GG5* 与 *RN1BD2*、*RN1BD6* 和 *RN1BD10* 为 66%~67%;*RN1BD5* 与 *RN1GG6* 和 *RN1YY6*、*RN1YY17* 为 73%~74%;*RN1KY1*、*RN1KY9* 和 *RN1KY11* 与 *RN1GG6*、*RN1YY6* 和 *RN1YY17* 为 67%~72%(表 3)。

表 2 野生稻 RGAs 的定位及其与 NBS 类基因的同源性

Table 2 RGAs of Wild rice orientation and sequence identity with NBS type genes

基因名称 Gene name	水稻染色体 Chromosome	日本晴基因组位置 Location of Nipponbare genomic	同源性(%) Identity
<i>RN1GG1</i>	-	-	-
<i>RN1GG2</i>	Chromosome 4	22393-21861	80
<i>RN1GG5</i>	Chromosome 8	1877-1377	67
<i>RN1GG6</i>	Chromosome 8	62023-61520	85
<i>RN1BD2</i>	Chromosome 1	120609-121111	96
<i>RN1BD5</i>	Chromosome 11	121361-120859;108715-108213	91
<i>RN1BD6</i>	Chromosome 1	100225-99732;121111-120609	96
<i>RN1BD10</i>	Chromosome 1	121111-120609	96
<i>RN1KY1</i>	Chromosome 11	92445-92948	67
<i>RN1KY9</i>	Chromosome 11	92948-92445	72
<i>RN1KY11</i>	Chromosome 11	92948-92454	72
<i>RN1YY6</i>	Chromosome 8	62023-61520	86
<i>RN1YY17</i>	Chromosome 8	61520-62023	85

“-”表示未搜索到相关信息

“-” indicates not searching for the relevant information

利用 NCBI 中的 ORF finder 程序对 12 条 RGAs 的序列进行开放阅读框寻找,并用 DNASTAR 将具有连续 ORF 的序列翻译成氨基酸序列,结果表明,除了 *RN1YY17* 提前出现终止子,其他 11 条 RGAs 均具有连续的 ORF 序列。对 11 条 RGAs 所推测氨基

酸序列进行多序列比对和同源性分析发现,这 11 条 RGAs 在氨基酸水平的序列相似性最高达 100%,最低仅为 25%(表 3)。将 11 条具有连续的 ORF 的 RGAs 与 GenBank 中登录的 *NPL1*、*PIC23*、*Pid3*、*Pit*、*R2*、*R3*、*R5* 和 *R10* 等水稻 *R* 基因进行氨基酸同源性

表 3 野生稻 RGAs 氨基酸序列间的相似性分析

Table 3 The amino acid sequence identity of RGAs in wild rice

(%)

基因名称 Gene name	<i>RN1</i> <i>BD2</i>	<i>RN1</i> <i>BD5</i>	<i>RN1</i> <i>BD6</i>	<i>RN1</i> <i>BD10</i>	<i>RN1</i> <i>GG2</i>	<i>RN1</i> <i>GG5</i>	<i>RN1</i> <i>GG6</i>	<i>RN1</i> <i>KY1</i>	<i>RN1</i> <i>KY9</i>	<i>RN1</i> <i>KY11</i>	<i>RN1</i> <i>YY6</i>
<i>RN1BD2</i>	-	99	99	-	67	-	-	-	-	-	-
<i>RN1BD5</i>	44	-	-	-	-	74	64	69	70	74	-
<i>RN1BD6</i>	99	43	99	-	66	-	-	-	-	-	-
<i>RN1BD10</i>	100	44	99	-	67	-	-	-	-	-	-
<i>RN1GG2</i>	27	27	27	27	-	-	-	-	-	-	-
<i>RN1GG5</i>	55	35	55	55	25	-	-	-	-	-	-
<i>RN1GG6</i>	44	64	44	44	26	39	67	72	72	98	-
<i>RN1KY1</i>	40	57	40	40	25	36	58	-	91	67	-
<i>RN1KY9</i>	44	61	43	44	27	39	63	91	98	72	-
<i>RN1KY11</i>	44	61	44	44	27	40	64	92	99	72	-
<i>RN1YY6</i>	45	64	44	45	26	39	98	58	64	64	-

“-”表示没有同源性,斜对角左下方为氨基酸序列间的相似性,斜对角右上方为其对应的核苷酸序列间的相似性

“-”indicates no homology. The similarity percentage among amino sequence and nucleotide sequence are given below and above the diagonal, respectively

比对及聚类分析(图 2),*RN1BD5*、*RN1GG6*、*RN1YY6*、*RN1KY1*、*RN1KY9* 和 *RN1KY11* 与 *NPLI*、*R2*、*R5* 和 *R10* 聚为一大类,*RN1GG5*、*RN1BD2*、*RN1BD6* 和 *RN1BD10* 与 *R3*、*PIC23* 和 *Pit* 聚为一大类,*RN1GG2* 与 *Pid3* 聚为一大类。

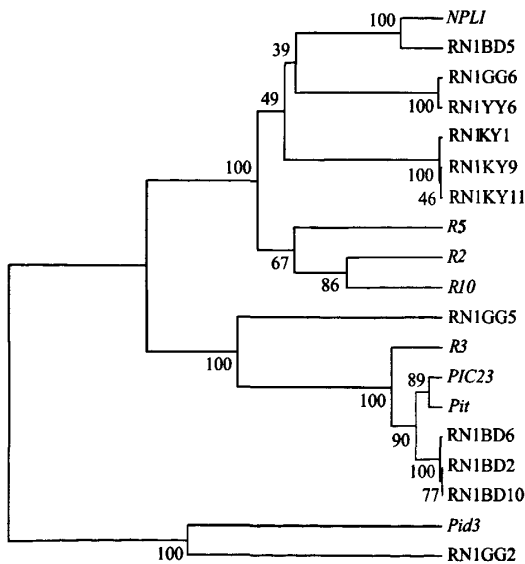


图 2 野生稻 RGAs 的氨基酸序列与水稻已知 R 基因的氨基酸序列聚类分析

Fig. 2 The phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence of putative resistance gene analogs from wild rice and *Oryza sativa* cloned R gene

利用 GeneDoc 对 11 条 RGAs 氨基酸序列与水稻中已克隆的 NBS 类 R 基因进行多序列比对分析发现,其推定的氨基酸序列具有 NBS 类抗病基因所特有的保守基元 P-loop、kinas-2、kinas-3a 和 GLPL 等,另外几个其他氨基酸残基在大多数序列里也是保守的(图 3)。它们所推测的氨基酸序列与水稻已知的 NBS-LRR 类 R 基因具有 43% ~ 93% 的同源性,与其他植物已知的 R 基因具有 37% ~ 79% 的同源性。

通过在日本晴中的定位和序列的相似性分析,发现来源于同一种野生稻的克隆(如 *RN1BD6* 与 *RN1BD10*; *RN1YY6* 与 *RN1YY17*; *RN1KY9* 与 *RN1KY11*)的核苷酸序列同源性高达 98% 以上,仅有几个碱基的差异,而其所推测的氨基酸序列同源性也高达 98% 以上,因而可认为这些基因可能为同一个基因,这些序列间的差异可能是在进行 PCR 克隆或测序时出现错配所致;另一种可能是基因组中基因在进化的过程中复制导致出现的多个拷贝。来源于不同野生稻的克隆(*RN1GG6* 与 *RN1YY6*、*RN1YY17*)的核苷酸序列同源性高达 97% 和 98%,而它们所推测的氨基酸序列同源性也高达 98%,可能是这两个基因是一对等位基因。而有些 RGAs 之间在核苷酸水平没有同源性,但其推测的氨基酸序列具有不同程度的同源性,有些同源性较高,推测为在进化的过程中,由于选择压力的影响使得碱基序列发生变化,但未影响部分氨基酸的表达,为遗传密码的简并性。

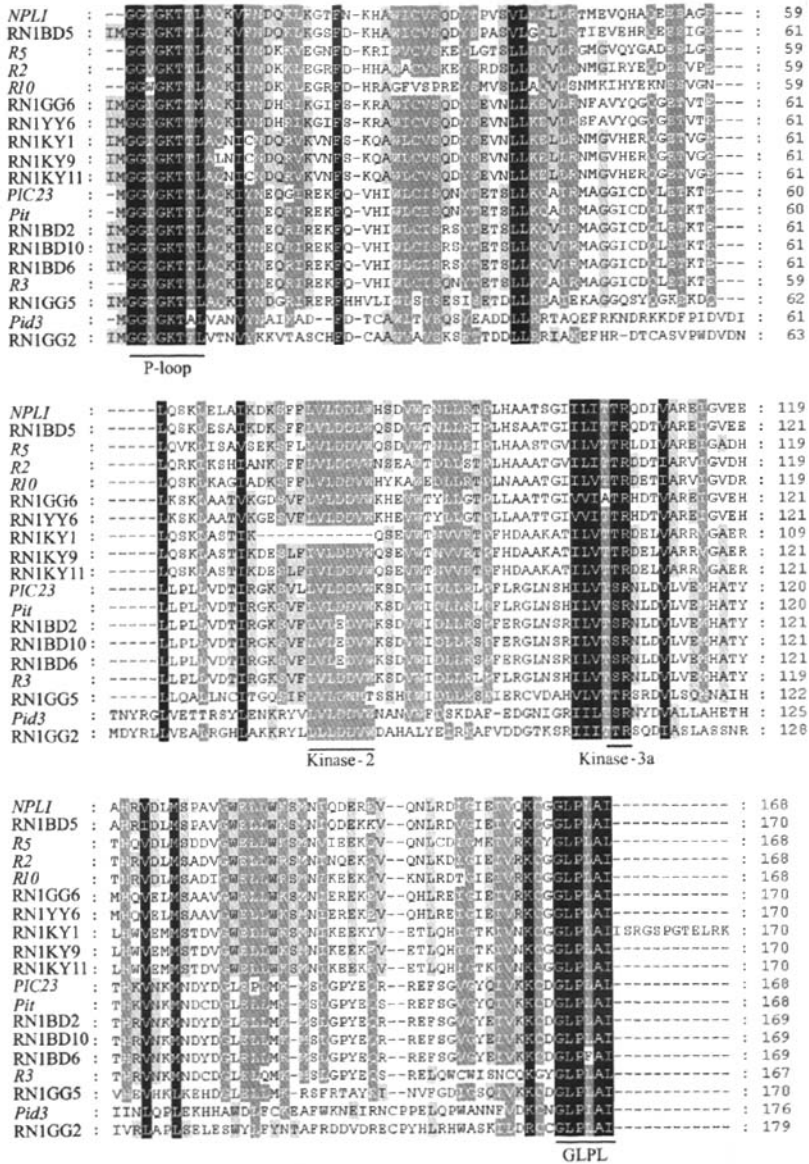


图3 野生稻 RGAs 推定的氨基酸序列与水稻已知 R 基因的氨基酸序列对比

Fig. 3 Alignment between amino acid sequence of putative RGAs of wild rice and that of *Oryza sativa* cloned R gene

2.3 野生稻 RGAs 的表达分析

根据 11 条 NBS 类 RGAs 在日本晴中的定位和序列间的相似性分析,对同源性差异较大的 6 个 RGAs 基因 (*RNIBD5*、*RNIBD10*、*RNIGG2*、*RNIIY6*、*RNIKY9* 和 *RNIGG5*) 设计基因特异引物,以疣粒、药用、高秆、宽叶和斑点 5 种野生稻为材料进行表达分析。用 *Actin* 引物扩增反转录得到的 cDNA 和基因组 DNA 检测 cDNA 的质量,结果表明各野生稻

cDNA 扩增的片段比基因组来源扩增的片段小, DNA 带型清晰,说明 RNA 反转录得到的 cDNA 质量较好。然后用 6 对特异性引物进行 PCR 扩增和电泳检测这些片段的表达情况(图 4),结果表明, *RNIBD5*、*RNIBD10*、*RNIGG2* 和 *RNIIY6* 均能表达,说明这些 RGAs 可能是有功能性的抗病基因;而 *RNIKY9* 和 *RNIGG5* 没有表达,说明这 2 个基因可能是假基因。

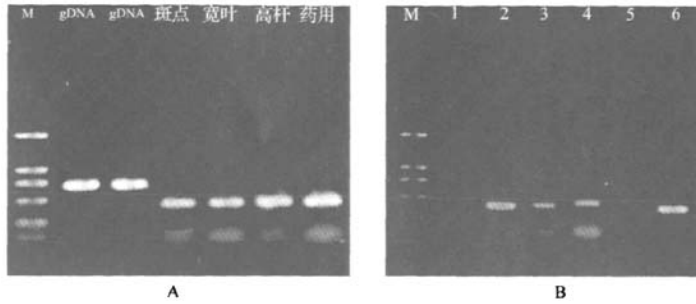


图 4 野生稻 RGAs 的表达分析

Fig. 4 Expression of RGAs in wild rice

M: 分子量标记 DL2000; A: *Actin* 引物对野生稻的基因组 DNA 和 cDNA 的扩增检测; B: 1-6 泳道表示野生稻 RGAs 特异引物 PCR 检测结果, 分别为 *RN1KY9*, *RN1BD5*, *RN1BD10*, *RN1GG2*, *RN1GG5* 和 *RN1YY6*

M: DNA marker DL2000; A: the amplification test of primer *Actin* towards DNA and CDNA of wild rice;

B: the lane 1-6 mean the test result of special primer of PCR of RGAs in wild rice, *RN1KY9*, *RN1BD5*, *RN1BD10*, *RN1GG2*, *RN1GG5*, *RN1YY6*, respectively

3 讨论

植物 NBS 类抗病基因存在着高度的保守性, 本研究根据其保守结构域设计引物进行野生稻 RGAs 的克隆, 成功分离了 11 条具有连续 ORF 的 RGAs。序列分析显示这些 RGAs 与已知的抗病基因具有高度的同源性; 结构分析表明这些 RGAs 含有 NBS 类抗病基因所特有的保守基元 P-loop、kinas-2、kinas-3a 和 GLPL 等 (图 3)。通过表达分析发现 *RN1BD5*、*RN1BD10*、*RN1GG2* 和 *RN1YY6* 均能表达, 可能是功能性的抗病基因。但是具有 NBS 特征的序列也可能不是抗病基因, 如 *RN1KY9* 和 *RN1GG5* 没有表达, 可能是功能抗病基因的残遗物, 也可能是由于抗病基因簇里的重组进一步演化出的假基因。利用基于同源候选基因的克隆策略对分离与已知抗病基因紧密连锁和可能存在的同一候选基因是一种简便快捷并且有效的手段, 尤其对于基因组比较复杂, 难以利用图位克隆和转座子标签法进行基因克隆的作物。

模式植物全基因的测序结果表明, NBS-LRR 类的抗病基因在植物基因组中广泛存在, 在水稻基因组中约有 660 个 NBS-LRR 类的抗病基因^[13-14, 16-17]。并且 NBS-LRR 类基因往往成簇排列在染色体上^[8, 18], 这种成簇排列方式使得基因内和基因间错配、重组和交换的频率增大, 在产生“无义”基因的同时加快了新 *R* 基因的产生^[19]。本研究从同种野生稻中克隆得到了不同类型的 NBS 类 RGAs, 如 *RN1BD5* 和 *RN1BD2*、*RN1BD6*、*RN1BD10*; *RN1GG6*、*RN1GG5*、

RN1GG2 等, 说明了同种植物中存在着多个 *R* 基因。而通过在日本晴染色体上的定位信息, *RN1BD5* 和 *RN1BD6* 分别在日本晴第 11 号和第 1 号染色体上存在多拷贝序列, 说明了 *R* 基因存在着多个拷贝。*RN1KY1*、*RN1KY9*、*RN1KY11* 与 *RN1BD5* 均分布在日本晴第 11 号染色体且相距较近, 约 10 ~ 20kb (< 200kb), 故它们可能属于同一基因簇。*R* 基因在不同物种之间也存在着高度的保守性, 如 *RN1GG6* 和 *RN1YY6* (同源性达 97% ~ 98%) 分布在日本晴第 8 号染色体的相同位置, 它们可能为一对等位基因。同源性分析表明, 11 条 RGAs 间在氨基酸水平的序列相似性最高达 100%, 最低仅为 25% (表 4), 在不同的作物品种及不同作物上克隆的 RGA 片段的高相似性和高度差异性, 在某种程度上说明了生物进化和系统演化规律。另外部分 RGAs 在保守结构之间存在许多点突变、小片段的插入或缺失 (图 3), 它们可能是趋异的原因^[20]。

在疣粒野生稻中, 已经克隆了 6 类 NBS-LRR 抗病基因类似物, 它们与已克隆的抗病基因在氨基酸序列上具有极低的一致性^[21]。本研究通过 NBS 类抗病基因保守结构域设计的 3 对引物扩增疣粒野生稻得到 3 条序列, 序列分析显示与 GenBank 数据库中的抗病基因同源性很低, 仅为 4% ~ 8%。可能的原因是疣粒野生稻为 GG 基因组, 在长期进化过程中, 由于加倍、重排和基因选择性丢失等因素的影响, 形成了具有自己特异性的基因组成分^[22-23]。

参考文献

- [1] 宋从凤, 王金生. 植物抗病基因工程策略及其前景[J]. 世界农业, 2001, 10(10): 39-41

- [2] 申建梅, 孙东磊, 万树青, 等. 野生稻抗病虫基因的研究与利用[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(6):19-22
- [3] 鄂志国, 王磊. 野生稻有利基因的发掘和利用[J]. 遗传, 2008, 30(11):1397-1405
- [4] Wang S Q, Zhang D H, Li P, et al. Cloning and analysis of a new NBS-LRR resistance gene family in rice [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32:704-711
- [5] 尉万聪, 薛照辉, 高武军, 等. 植物抗病反应中的信号物[J]. 世界农业, 2000, 13(3):33-34
- [6] 赵中秋, 郑海雷, 张春光. 植物抗病的分子生物学基础[J]. 生命科学, 2001, 13(3):135-138
- [7] 刘彦峰, 刘英, 李娜. 植物抗病基因工程的研究进展及前景展望[J]. 生物技术通报, 2005(5):7-10
- [8] Ellis J, Dodds P, Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(4):278-284
- [9] Iyer A S, Mc Couch S R. The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2004, 17:1348-1354
- [10] Dixon M S, Jones D A, Keddie J S, et al. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins [J]. Cell, 2001, 84: 451-459
- [11] 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, 6(22):429-433
- [12] 高玉龙, 郭旺珍, 王磊, 等. 海岛棉抗病基因类似物与防卫基因类似物的分离及特征分析[J]. 中国科学(C辑), 2006, 36(2):97-108
- [13] 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
- [14] 杨勤志, 杨佩文, 王群, 等. 水稻抗病基因同源序列的克隆及测序分析[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(4):241-247
- [15] 秦根基, 李万隆, 陈佩度. 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 102-107
- [16] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding super-family [J]. Plant J, 1999, 20:317-332
- [17] Yu J, Hu S N, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. Science, 2002, 296: 79-92
- [18] Belkadir Y R, Subr A M, Dangl L J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR protein and their partners [J]. Curr Opin plant biol, 2004, 7:391-399
- [19] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) [J]. Science, 2002, 296: 92-100
- [20] 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
- [21] 刘继梅, 程在全, 杨明攀, 等. 云南三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
- [22] Wang X S, Wu W R, Jin G L, et al. Genome-wide identification of R genes and exploitation of candidate RGA markers in rice [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 11:1120-1125
- [23] Ge S, Sang T, Lu B R, et al. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:14400-14405

《中国粮油学报》是中国科学技术协会主管、中国粮油学会主办、全国食品工业类中文核心期刊, 主要登载谷物、油脂化学方面的学术论文; 报道优质粮油品质资源选育、贮藏、加工利用以及品质检测方法方面的研究成果。

主要栏目: 稻谷研究、小麦研究、大豆研究、玉米研究、杂粮研究、淀粉研究、油脂研究、饲料研究、储藏研究、信息自动化、加工工艺研究、标准与检测方法、综述等。

邮发代号: 80-720, 单月刊, 大 16 开, 每期 20 元, 全年 240 元(含邮费)。

地址: (100037) 北京市西城区百万庄大街 11 号粮科大厦

银行开户行: 交通银行北京百万庄支行

户名: 中国粮油学会

账号: 110060774018010013416

电话: 010-68357510 010-68357507

网址: <http://www.ccoonline.com>

E-mail: lyxuebao@public.bta.net.cn

lyxuebao@ccoonline.com

lyxuebao@163.com

《仲恺农业工程学院学报》(原《仲恺农业技术学院学报》)是由仲恺农业工程学院主办的自然科学学术期刊, 创刊于 1988 年, 主要刊登农学、园艺、园林、植物保护、生物技术、食品科学、资源环境、动物科学、动物医学、机电工程、农业经济、数学、物理、化学与化工、计算机、电子信息, 以及其他相关学科及其交叉学科的基础理论和应用研究成果、实验新方法、新技术和国内外研究动态等。主要栏目有研究报告、研究简报、文献综述等。读者对象主要是相关学科科技工作者、高校师生和相关学科科技管理人员。

本刊为季刊, 逢季末月底出版, 国内外公开发行。每册定价: 8.00 元, 全年定价 32 元。自办发行, 并参加《全国非邮发报刊联合征订》发行。

订阅办法: 汇款至天津市大寺泉北里别墅 17 号, 天津市河西联合征订服务部(邮编 300385), 亦可直接汇款至《仲恺农业工程学院学报》编辑部订阅(汇款单注明订阅 200x 年《学报》多少份)。

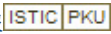
地址: (510225) 广州市纺织路东沙街 24 号《仲恺农业工程学院学报》编辑部

网址: <http://znjx.chinajournal.net.cn>;

E-mail: journal@zhku.edu.cn;

联系人: 夏成锋 电话: 020-89002383

野生稻NBS类抗病基因同源序列的分离与序列分析

作者: 张向明, 韦靖鸾, 张丹, 王春台, 刘学群, 刘新琼, ZHANG Xiang-ming, WEI Jing-luan, ZHANG Dan, WANG Chun-tai, LIU Xue-qun, LIU Xin-qiong
作者单位: 中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 湖北武汉, 430074
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2010, 11(6)

参考文献(23条)

1. 鄂志国;王磊 野生稻有利基因的发掘和利用[期刊论文]-遗传 2008(11)
2. Ge S;Sang T;Lu B R Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species 1999
3. Dixon M S;Jones D A;Keddie J S The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins 2001
4. 申建梅;孙东磊;万树青 野生稻抗病虫基因的研究与利用[期刊论文]-中国野生植物资源 2006(06)
5. 朱从凤;王金生 植物抗病基因工程策略及其前景[期刊论文]-世界农业 2001(10)
6. Iyer A S;Mc Couch S R The rice bacterial blight resistance gene xa5 encodes a novel form of disease resistance[外文期刊] 2004
7. Ellis J;Dodds P;Pryor T Structure, function and evolution of plant disease resistance genes[外文期刊] 2000(04)
8. 刘彦峰;刘英;李娜 植物抗病基因工程的研究进展及前景展望[期刊论文]-生物技术通报 2005(05)
9. 赵中秋;郑海雷;张春光 植物抗病的分子生物学基础[期刊论文]-生命科学 2001(03)
10. 尉万聪;薛照辉;高武军 植物抗病反应中的信号物 2000(03)
11. Wang S O;Zhang D H;Li P Cloning and analysis of a new NBS-LRR resistance gene family in rice 2005
12. Wang X S;Wu W R;Jin G L Genome-wide identification of R genes and exploitation of candidate RGA markers in rice 2005
13. 刘继梅;程在全;杨明攀 云南三种野生稻中抗病基因同源序列的克隆及序列分析[期刊论文]-中国农业科学 2003(03)
14. Xu O;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 2005
15. Goff S A;Ricke D;Lan TH A A draft sequence of the rice genome(Oryza sativa L. ssp. Japonica) [外文期刊] 2002(5565)
16. Belkhadir Y R;Subr A M;Dangl L J Plant disease resistance protein signaling:NBS-LRR protein and their partners[外文期刊] 2004(4)
17. Yu J;Hu S N;Wang J A A draft sequence of the rice genome(Oryza sativa L. ssp. indica) 2002
18. Meyers B C;Dickerman A W;Michelmore R W Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding super-family[外文期刊] 1999(3)
19. 秦根基;李万隆;陈佩度 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展[期刊论文]-南京农业大学学报 1999(03)
20. 杨勤忠;杨佩文;王群 水稻抗病基因同源序列的克隆及测序分析[期刊论文]-中国水稻科学 2001(04)

21. [陈观水;周以飞;林生](#) [甘薯NBS类抗病基因类似物的分离与序列分析](#)[期刊论文]-[热带亚热带植物学报](#) 2006(05)
22. [高玉龙;郭旺珍;王磊](#) [海岛棉抗病基因类似物与防卫基因类似物的分离及特征分析](#)[期刊论文]-[中国科学c辑](#) 2006(02)
23. [罗敏;朱友林;余潮](#) [植物抗病基因的克隆及其结构与功能](#)[期刊论文]-[遗传](#) 2000(22)

本文读者也读过(7条)

1. [张影波. 庞玉新. 莫廷辉. 董美超. 解辉. 蔡秀清](#) [巴西橡胶NBS类抗病基因同源序列的克隆与分析](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#)2009, 37(24)
2. [张娜. 杨文香. 刘大群. ZHANG Na. YANG Wen-xiang. LIU Da-qun](#) [TcLr24小麦STK类抗病基因同源片段的分离和特征分析](#)[期刊论文]-[华北农学报](#)2010, 25(5)
3. [袁克华. 冯仁军. 程萍. 张银东. Yuan Kehua. Feng Renjun. Cheng Ping. Zhang Yindong](#) [香蕉NBS-LRR类抗病基因同源序列的克隆与分析](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#)2009, 25(5)
4. [张丽荣. 陈儒钢. 张俊红. 欧阳波. 肖景华. 李汉霞. 叶志彪. ZHANG Li-ying. CHEN Ru-gang. ZHANG Jun-hong. OU YANG Bo. XIAO Jing-hua. LI Han-xia. YE Zhi-biao](#) [辣椒抗病基因同源序列的克隆与分析](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#) 2008, 41(1)
5. [张楠. 王海燕. 刘大群. ZHANG Nan. WANG Hai-yan. LIU Da-qun](#) [小麦NBS类抗病基因同源cDNA序列的克隆与特征分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#)2010, 11(5)
6. [阙友雄. 许莉萍. 林剑伟. 陈如凯. QUE You-Xiong. XU Li-Ping. LIN Jian-Wei. CHEN Ru-Kai](#) [甘蔗NBS-LRR类抗病基因同源序列的分离与鉴定](#)[期刊论文]-[作物学报](#)2009, 35(4)
7. [张楠. 王海燕. 刘大群. ZHANG Nan. WANG Hai-yan. LIU Da-qun](#) [小麦STK类抗病基因同源序列的克隆与分析](#)[期刊论文]-[华北农学报](#)2010, 25(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201006014.aspx