

小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的 RGA 分析

高 倩,王海燕,刘大群,李 星,杨文香

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

摘要:根据已知植物抗病基因的 NBS、LRR 等保守结构域设计引物,对小麦全套抗叶锈病近等基因系材料进行 RGA 分析。引物对 Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1 从近等基因系 TcLr35 中扩增获得一条 747 bp 的特异性片段。序列分析表明,该片段与小麦基因片段 *Triticum urartu* clone BAC 210J24, *Triticum monococcum* DV92 的 BAC 克隆 231A16 等具有较高同源性,为 *Lr35* 的克隆奠定了基础。

关键词:小麦叶锈病;抗病基因;*Lr35*;抗病基因类似序列

中图分类号:S435.121.4⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)06-0050-04

RGA Analysis of the Wheat Leaf Rust Resistance Gene *Lr35*

GAO Qian, WANG Hai-yan, LIU Da-qun, LI Xing, YANG Wen-xiang

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Centre of Plant Pest and Pathogen of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: Based on the conserved domains (NBS, LRR etc) of the known resistance genes, primers were designed to amplify resistant homologous sequences in the near isogenic lines (NILs) of wheat leaf rust resistance using RGA method. A 747 bp specific fragment was found in TcLr35 by primer pair Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1. The specific fragment was isolated from the polyacrylamide gels, re-amplified, cloned and sequenced. The result indicated that it has the high homology with the *Triticum urartu* clone BAC 210J24, *Triticum monococcum* DV92 clone BAC 231A16 etc DNA fragments from wheat, which provide the shortcut for the cloning of wheat leaf rust resistance gene *Lr35*.

Key words: Wheat leaf rust disease; Resistance gene; *Lr35*; Resistance gene analogs

由小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 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主要因素。该病害在世界各产麦区均有发生,可造成严重的经济损失^[1,2]。长期以来,小麦叶锈病的控制主要依赖于抗病品种的培育和推广。然而,小麦叶锈菌毒性基因的产生及新的优势小种不断形成,经常导致品种抗锈性的丧失,因此,需要我们持续筛选抗病基因和培育抗病品种以防止或减轻该病害造成的危害。

TcLr35 是以 Thatcher 为感病亲本、经 6 代回交的遗传背景相似、目的基因不同的小麦抗叶锈病近等基因系材料,携带成株抗叶锈病基因 *Lr35*。*Lr35* 基因最初来源于拟斯卑尔脱山羊草 (*Triticum speltoides*)^[3],通过与 *T. monococcum* 的二倍体回交将其

转移到小麦品种马奎斯 (Marquis) 中。该基因位于 2B 染色体上,与 *Sr39* 紧密连锁,其抗性在二叶期开始表达,六叶期后完全表达,是一个十分有效的成株抗性基因。近年来,国内外学者对 *Lr35* 基因进行了大量的研究,在抗病机制、分子标记及辅助育种方面都取得了一定进展,*Lr35* 的 ISSR 标记已被转化为稳定的 SCAR 标记^[4],RFLP 标记已被转化为稳定的 STS 标记^[5]。王海燕等^[6,7]采用同源序列法根据已克隆植物抗病基因的核苷酸结合位点 (Nucleotide binding site, NBS)、亮氨酸富集重复序列区 (Leucine-rich repeat domain, LRR) 等保守结构域和已报道植物病程相关蛋白基因设计引物,以小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr35 为材料,利用 RT-PCR 技术及 RACE 技术获得了 3 个抗病相关基因 cDNA 全长。

收稿日期:2008-05-30

基金项目:河北省教育厅资助课题 (Z2007408);河北省自然科学基金 (C2008000281)

作者简介:高倩 (1983-),女,河北保定人,硕士,主要从事分子植物病理学研究。

通讯作者:刘大群 (1958-),男,河北石家庄人,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。

通过对目前已克隆的植物抗病基因结构分析,大部分抗病基因存在一些保守区域,抗病基因类似序列(Resistance gene analogs,RGAs)技术是利用抗病基因具有保守结构域特征,通过人工合成引物对基因组 DNA 进行定点扩增,在全基因组水平上检测 DNA 变异,是进行抗病基因克隆的一条很好的途径。利用已知抗病基因的保守序列设计引物进行 PCR 扩增已经在大豆^[8]、马铃薯^[9]、水稻^[10-12]、大麦^[10]、小麦^[13]等作物中分离到了许多 RGA 片段。

本试验根据已克隆的抗病基因 NBS 和 LRR 区设计引物,对 TcLr35 及感病亲本 Thatcher 进行 PCR 扩增,以期获得稳定的多态性片段,为克隆 *Lr35* 奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料为携带小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的近等基因系材料 TcLr35 和感病亲本 Thatcher,以及全套小麦抗叶锈病近等基因系材料,均来自河北农大小麦锈病研究室。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照 Gili 等^[14]提供的 CTAB 法稍作修改后提取小麦叶片基因组 DNA。

1.2.2 DNA 的检测与定量 用紫外分光光度计测定提取的 DNA 的浓度和纯度,将样品稀释至所需浓度,充分混匀,分装,-20℃保存。制备 0.8%琼脂糖凝胶,取 2 μL 稀释样品点样,凝胶成像系统检测 DNA。

1.2.3 供试材料的 PCR 分析 根据已克隆 *R* 基因普遍具有的 NBS 结构域的 P-loop, Kinase-2a, Kinase-3a 和 LRR 区设计引物并组合成对,对材料进行筛选。部分引物序列见表 1。

表 1 部分 RGA 引物

Tab.1 In the part of RGA primer

引物 Primer	序列 Primer sequence
Pto-kin1 IN	AAGTGAACAAAGGTTAGG
Pto-kin2 IN	GATGCACCACCAAGGGG
Pto kin1	GCAATTGAACAAAGGTGAA
XLRR- INV1	TCAAGCCA GATACCC
XaINBS- R	CTCTGATACGAGTTGTC
CIN001	GGNGGNATHGGIAARACIAC
CIN004	NARNGCIARIGGIARICC

反应体系 总体系 20 μL,包括 2 μL DNA (50 ng),0.4 μL 10 mmol/L dNTPs,0.3 μL 5 U/L *Tag* DNA polymerase,2.0 μL 10 ×Buffer (含 Mg²⁺),2 μL 2.5 μmol/L Primer-F,2 μL 2.5 μmol/L Primer-R,加 ddH₂O 至 20 μL。

PCR 反应程序 94℃ 预扩增 5 min;94℃ 1 min;50℃ 1 min;72℃ 2 min;40 个循环,72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 扩增结果在 5%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,65 W 恒定功率电泳至第 1 条 Loading buffer 溴酚兰带到达胶板的另一边缘,银染显色检测 DNA 的多态性。

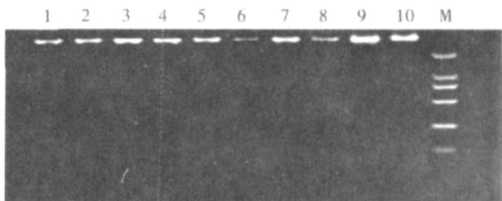
1.2.5 特异性条带的回收和纯化 扩增产物在 PAGE 胶上电泳,经过银染、显色后,用手术刀片切下特异性片段移至干净的 2 mL 离心管中,用 Omega 聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收。以回收产物为模板,再用相应的引物进行再扩增,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,对扩增片段利用上海 Sangon 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收。

1.2.6 特异性片段克隆、测序及同源性分析 将回收片段与 pMD19-T 载体连接,并转化到感受态细胞 JM109 中,筛选阳性克隆交由上海 Sangon 进行序列测定。利用 DNASTar 软件分析序列特征,将测序得到的核苷酸序列在 NCBI 上应用 Blast 软件进行 DNA 序列和蛋白序列的相似性推导分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测供试小麦材料的基因组 DNA,检测结果表明提取的 DNA 可用于本试验研究(图 1)。



1. TcLr35;2. Thatcher;3~10. 小麦抗叶锈近等基因系部分材料;M. DNA Marker DL2000。
1. TcLr35;2. Thatcher;3-10. Part of the near isogenic lines;M. DNA Marker DL2000.

图 1 小麦基因组 DNA 电泳检测

Fig.1 Electrophoresis analysis of the wheat DNA

2.2 TcLr35 和 Thatcher 的扩增结果比较

本研究筛选了 260 对 RGA 引物,对小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr35 和 Thatcher 进行分析。扩增结果发现 4 对引物能扩增出小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr35 特异性条带,即能在 TcLr35 中扩增出特异性条带,而在 Thatcher 中未扩增出相同条带。这 4 对引物分别是 Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1、CIN001/ CIN004、Pto-kin2 IN/ XaINBS- R、Pto-kin1 IN/ Pto kin1。其中引物对 Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1 的扩增结果稳定,能在 TcLr35 中稳定扩增出 1 条 750 bp 左右的特异性片段(图 2)。

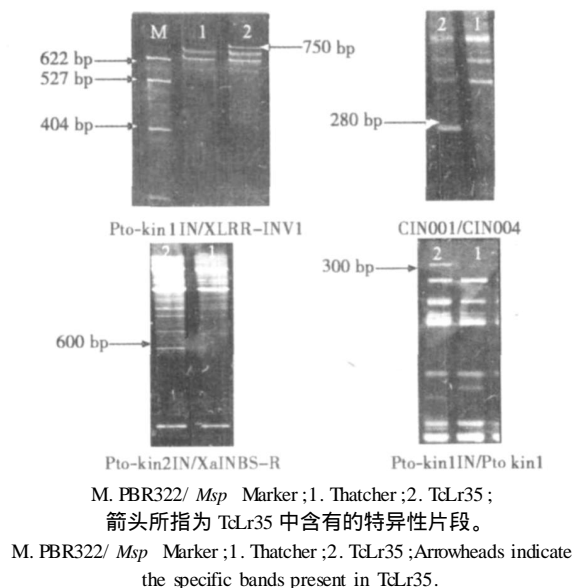
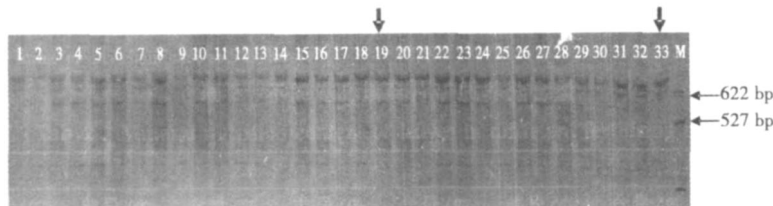


图 2 TcLr35 中扩增出的特异性条带

Fig. 2 The specific band amplified in TcLr35

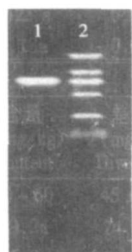
2.3 小麦抗叶锈病全套近等基因系中扩增结果比较



19. TcLr35; 32. Thatcher; 33. TcLr35; M. PBR322/ *Msp* Marker; 其他为部分小麦抗叶锈病近等基因系材料。
19. TcLr35; 32. Thatcher; 33. TcLr35; M. PBR322/ *Msp* Marker; The others were part of the near isogenic lines.

图 3 部分近等基因系中的扩增结果

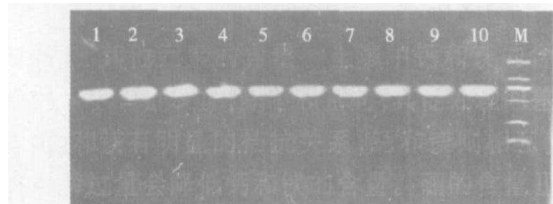
Fig. 3 The result of amplification in the part of the near isogenic lines



1. 回收的特异性条带; M. DNA Marker DL2000。
1. The specific band reclaimed; M. DNA Marker DL2000.

图 4 特异性条带的回收结果

Fig. 4 The pattern of the specific band reclaimed



1 ~ 10. 扩增片段; M. DNA Marker DL2000。

1 - 10. The fragments of the amplification products; M. DNA Marker DL2000.

图 5 扩增产物的检测

Fig. 5 Electrophoresis analysis of the amplification products

2.4.3 克隆片段的序列测定及同源性分析 测序结果表明该特异性片段长度为 747 bp, 通过 Internet

以实验室保存的小麦抗叶锈病全套近等基因系材料, 用引物对 Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1 进行 PCR 扩增, 结果仅在 TcLr35 中出现特异性条带, 而在 Thatcher 和其他近等基因系材料中均无此特异带出现 (图 3)。

2.4 小麦抗叶锈病基因 Lr35 特异性片段序列分析

2.4.1 多态性片段 Lr35-R1 的回收 从 PAGE 上回收约 750 bp 处扩增的多态性条带, 用相应引物 Pto-kin1 IN/ XLRR- INV1 再扩增, 以增加目的片段的 DNA 量。用 1 % 琼脂糖凝胶重新回收纯化, 产物直接用于连接 (图 4)。

2.4.2 多态性片段 Lr35-R1 的克隆 将纯化的 DNA 片段暂命名为 Lr35-R1, 将其连接到 pMD-19T 载体上, 转入大肠杆菌 JM109, 蓝白斑筛选重组子, 从白色菌落培养物中提取质粒, 以质粒为模板, 用原引物、程序进行 PCR 扩增, 结果检测到约 750 bp 处有明显条带 (图 5), 说明挑取的克隆含有目的片段。

NCBI BLAST 对已测序列 Lr35-R1 同源性比较, 经分析发现该序列与许多小麦已克隆出来的基因序列相似。通过 BLAST 比较, Lr35-R1 与 *Triticum monococcum* DV92 的 BAC 克隆 231A16 有 84 % 的同源性, 该克隆来自小麦春化作用基因 *VRN1*, 另外, 该克隆含有 Lr10 叠连群, 推测此片段可能与小麦抗叶锈病基因有关; Lr35-R1 与 *Triticum urartu* clone BAC 210J24 有 96 % 同源性; 与 *Triticum turgidum* subsp. *durum* clone BAC 221H19 有 90 % 同源性; 与 *Triticum urartu* clone BAC 41C8 有 89 % 同源性; 与 *Triticum urartu* clone BAC 292N12 有 88 % 同源性, 以上基因功能目前还尚不明确, 推测此序列也可能是一个新基因片段或是一未知功能基因片段。

3 讨论

自关于用抗病基因产物的保守序列为引物来扩增 RGA 的文章发表以来, 基于抗病基因同源序列来标记、克隆植物抗病基因的方法, 已引起国内外学者的广泛重视。

小麦的基因组在常见植物中几乎是最大的, 包

含将近 16 000 Mb^[15], 比拟南芥的大 128 倍^[16], 其中有 80 % 以上的重复序列, 庞大的基因组和贫乏的分子多样性给多态性片段的筛选带来了困难。因此, 用直接根据抗病基因保守结构域设计引物得到的多态性片段来寻找抗病基因, 可能会提高寻找抗病基因的效率。

虽然利用 RGA 方法来克隆、定位抗病基因已得到广泛的应用, 但也存在着一些问题: 例如有些非抗病基因同样具有保守序列, 因此克隆出的 RGA 未必都与 *R* 基因有关, 克隆到的 RGA 也未必与目的 *R* 基因有关, 因而需要筛选足够数量的 RGA。不同的研究条件产生的带型不一致, 模板量、PCR 体系条件、PCR 扩增程序均可能影响结果分析, 稳定性和重复性差成为 RGA 方法的最大缺点。进行 RGA 分析时由于是在较低严谨条件下进行 PCR 扩增, 如退火温度低, 循环次数多, 所以反应体系的微小变化就可能使某些片段的拷贝数发生改变, 因此对反应条件十分敏感, 处于临界检测状态的 DNA 片段会表现出不稳定的检测情况, 显示出较差的重复性和稳定性。所以, 我们在找特异性片段时应该找较明显的主带, 这样可能很好的提高其稳定性和重复性, 将那些处于临界状态的 DNA 片段有效避免掉; 严格控制扩增模板浓度, 试验证明模板浓度过高或过低都会影响扩增效果, 过高时非特异性扩增会增加, 降低其重复性, 而过低时则大大降低扩增效率, 扩增条带明显减少, 影响其结果可靠性; 优化调整退火温度, 适当的提高退火温度, 使非特异性扩增减少, 也能有效提高其结果的稳定性和重复性; 熟练掌握扩增和银染技术, 注意每一步细节, 严格操作, 尽量减少试验误差。

本研究采用感病亲本 Thatcher 做对照来筛选特异性的 *Lr35* 抗病相关基因片段, 并且此特异性片段在其他近等基因系材料中均不存在, 说明此片段特异性很强。可以推测此差异片段可能与 *Lr35* 有较紧密的联系, 可能是与抗病基因相关的假基因片段与抗病基因相关的调控序列。该片段测序结果长 747 bp, 其 139 ~ 744 核苷酸编码一个长 201 氨基酸的 ORF。经过 NCBI 上的 BLASTx 比较, 未发现其与已知序列有同源性。这表明此序列可能是一个新基因片段或是一未知功能基因片段, 说明此片段可能具有很高的研究价值。因此, 下一步工作是进行引物设计, 做 TAIL-PCR 进行基因延长, 进一步分析其基因功能。另外, 还可以将此特异性片段作为分子标记探针筛选基因组文库。此项研究为 *Lr35* 的克隆奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] Kolmer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust[J]. Annual Review Phytopathology, 1996, 34: 435 - 455.
- [2] Kloppers F J, Pretorius Z A. Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust[J]. Plant Pathology, 1997, 46: 737 - 750.
- [3] Kerber E R, Dyck P L. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* × *Triticum monococcum*[J]. Genome, 1990, 33: 530 - 537.
- [4] Gold J. Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 1999, 2(1): 35 - 40.
- [5] Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G, et al. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 554 - 560.
- [6] 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.
- [7] 王海燕, 刘大群, 杨文香, 等. TdLr35 小麦中病程相关蛋白 1 基因的克隆及分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 16 - 20.
- [8] Kanazin V, Marek L F, Shoemaker R. Resistance gene analogues are conserved and clustered in soybean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 1996, 93: 11746 - 11750.
- [9] Leister D, Ballvora A, Salam 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.
- [10] Leister D, Kurth J, Schulze P, et al. RFLP and physical mapping of resistance gene homologues in rice (*O. sativa*) and Barley (*H. vulgare*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 509 - 520.
- [11] Leister D, Kurth J, Laurie D A, et al. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes[J]. Plant Biology, 1998, 95: 370 - 375.
- [12] 薛勇彪, 唐定中, 张燕生, 等. 水稻基因组中 R 类抗病基因同源序列的分离[J]. 科学通报, 1998, 43(3): 277 - 281.
- [13] Feuillet C, Schachermayr G, Keller B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat[J]. The Plant Journal, 1997, 11(1): 45 - 52.
- [14] Gill KS, Lubbers EL, Gill B S, et al. A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD) [J]. Genome, 1991, 34: 362 - 374.
- [15] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9: 208 - 218.
- [16] Gill B S, Appels R, Bothar-Oberholster A M, et al. A workshop report on wheat genome sequencing [J]. Genetics, 2004, 168: 1087 - 1096.