

# 小麦 NBS 类抗病基因类似序列的多样性和进化关系研究

张立荣 杨文香 刘大群

(河北农业大学 植物保护学院植物病理系 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:** 利用已克隆植物抗病基因 NBS(Nucleotide binding site) 序列中的保守结构 P-loop 和 GLPL 合成简并引物,以小麦近等基因系 TcLr24 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。得到 13 条具有连续 ORF 的抗病基因类似物(Resistance gene analogues, RGAs) 序列,它们之间相应推测的氨基酸序列间的相似性系数在 36.9% ~ 98.3% 之间。对甘薯 RGAs 和 4 个已克隆植物 NBS 的氨基酸序列进行结构分析表明,它们包括 P-loop、Kinase-2、Kinase-3a、GLPL 抗病基因所共有的保守结构。同时对分离的 RGAs 的氨基酸序列进行系统发育树分析,这些 RGAs 与 Xa1、RPS2 聚在一起,并且符合 nonTIR RGAs 类型。这些结果表明小麦与其他物种的 NBS 类 RGAs 可能具有同样的起源和进化机制。

**关键词:** 小麦;NBS;抗病基因类似物

中图分类号: Q78;S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0023-04

## Diversity and Evolutionary Relationship of NBS-type Resistance Gene Analogues in Wheat

ZHANG Li-rong, YANG Wen-xiang, LIU Da-qun

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

**Abstract:** Degenerate primers based on conserved motif (P-loop and GLPL) of the nucleotide binding site (NBS) region from the cloned plant disease resistance genes were used to isolate resistance gene analogues (RGAs) from genomic DNA of wheat. 13 RGAs with uninterrupted open reading frames (ORFs) were obtained. Sequence identity among the 13 RGAs deduced amino acid sequences showed identity ranged from 36.9 % to 98.3%. The analysis of RGAs amino acid sequence structures suggested that they contained the domains such as P-loop, Kinase-2, Kinase-3a, and GLPL. The phylogenetic analyses for the deduced amino acids showed that RGAs from wheat were nonTIR type. These results showed that NBS type RGAs isolated from wheat might have the same origin and mechanism of evolution as that in other plants.

**Key words:** Wheat; NBS (Nucleotide binding site); RGA (Resistance gene analogues)

小麦叶锈病是影响小麦稳产高产的一个重要病害,严重时会造成 40% 的产量损失<sup>[1]</sup>。有效的方法是运用抗叶锈品种,然而,品种抗叶锈性很容易丧失,因此,持续筛选抗病基因和培育抗病品种是当务之急。小麦抗叶锈病新基因的挖掘以及抗叶锈性的研究具有十分重要的意义。现在已在植物中克隆的 60 余个抗病基因<sup>[2-6]</sup>大部分是通过图位克隆法和转座子标签技术。而小麦却不适宜采用这样的方法<sup>[7]</sup>。已经克隆的抗病基因保守结构域往往存在

NBS、LRR 区域,根据已克隆的 R 基因的保守序列结构设计引物扩增基因组 DNA 可获得(Resistance gene analogs, RGAs)。因此抗病基因类似序列很可能与抗病基因密切连锁,或者是抗病基因的一部分。第一个利用同源序列克隆的 R 基因是小麦抗叶锈基因 *Lr10*<sup>[8]</sup>。随后,许多与已知 R 基因同源的核苷酸序列根据 R 基因的保守序列设计合成寡核苷酸引物从马铃薯<sup>[9]</sup>、玉米<sup>[10]</sup>、小麦<sup>[11,12]</sup>、水稻<sup>[13]</sup>、蚕豆、鹰嘴豆<sup>[14]</sup>等作物中分离到。RGA 既可作为一

收稿日期: 2010-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771391);河北省青年基金项目(2010140)

作者简介: 张立荣(1973-),女,天津人,博士,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,教授,博士,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。

杨文香(1966-),女,河北青县人,博士生导师,主要从事分子植物病理学研究。

种基于特异引物 PCR 的 DNA 标记,其本身又可能是潜在的抗病基因,可以在未知的植物基因组 DNA 或 cDNA 中扩增和分离抗病基因同源序列,为筛选抗病基因或抗病相关基因提供了一种有效手段。

小麦抗叶锈基因 *Lr24* 是一个在苗期就开始表达的抗叶锈基因,有很强的抗病性,最早来源于长穗偃麦草 (*Thinopyrum ponticum*,  $2n=70$ ) (3 Ag/3 DL) 易位系<sup>[15]</sup>,具有很好的应用前景的主效基因控制的抗病基因。本研究以小麦抗叶锈近等基因系 TcLr24 为材料,根据已知植物抗病基因的 NBS 类保守区域设计简并引物,应用 RGA 技术进行 PCR 扩增,探索抗病基因同源序列片段的多态性,并为克隆抗叶锈病基因奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

试验所用到的材料为小麦抗叶锈病近等基因系 TcLr24,由河北农业大学锈病研究中心培育。

### 1.2 小麦基因组 DNA 的提取及简并引物的设计

提取小麦近等基因系 TcLr24 基因组 DNA,参照 Gill 等<sup>[16]</sup>提供的 CTAB 法,稍作修改后提取叶片基因组 DNA。简并引物的设计根据抗病基因所编码产物的 NBS 区域 P-Loop 序列和 GLPLAL 序列设计上游引物 WF1 (5'-GGIGGIGTIGGIAAIAICIA-3'),下游引物为 WR1 (5'-AGIGCIAGIGGIAAICCC-3'),引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.3 PCR 扩增及产物的克隆与测序

PCR 扩增反应总体积为 25  $\mu$ L,其中包含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3),50 mmol/L KCl,2.0 mmol/L  $MgCl_2$ ,100  $\mu$ mol/L dNTPs,0.3  $\mu$ mol/L 引物浓度,DNA 模板 50 ng,*Taq* 酶 1 U。样品在 DNA 扩增仪(Eppendorf)中进行扩增。反应程序为:1 个循环 94 $^{\circ}$ C 2 min;35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳,将目的 DNA 片段采用 PCR 凝胶回收试剂盒回收纯化 (TaKaRa)。产物连接于载体 PMD19-T (TaKaRa),16 $^{\circ}$ C 过夜。转化筛选后挑选阳性克隆交上海生工生物工程公司测序。

### 1.4 序列分析

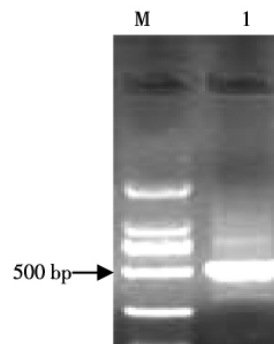
核苷酸序列测序以后采用 BLAST 程序在 GenBank 上进行相似性搜索,再利用 DNAMAN6.0 软件查找 ORF 并翻译成氨基酸序列,然后用 Mega 3.1 构建系统发育树。参比基因有:*RPS2* (ATU14158)、

*N* (U15606)、*Xa1* (U73916)、*L6* (AB002266)。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦 RGAs 的分离与鉴定

以抗病基因的氨基酸保守结构域合成简并引物对小麦近等基因系 TcLr24 基因组 DNA 进行扩增。结果扩增出一条约 500 bp 的条带(图 1),与预期大小相当。对该扩增产物进行回收、克隆,随机测序其中的 20 个克隆(分别命名为 P1-P20),利用 BLASTX 程序鉴定得到 NBS 序列 13 条。获得的 13 条 NBS 序列中都具有连续的可阅读框(ORF),且含有引物设计的两个保守结构序列,同时内部没有终止密码子。另 7 条序列中有终止密码子存在或找不到相似序列。



1. TcLr24; M. Marker DL2000.

图 1 引物 WF1/WR1 扩增的结果

Fig. 1 Amplification result of primer WF1/WR1

### 2.2 同源序列多态性比较

将从小麦分离获得的 13 个 RGAs 的氨基酸序列与 4 个已经克隆的 NBS-LRR 类抗病基因 (*Xa1*、*RPS2*、*L6*、*N*) 利用 DNAMAN 进行比对,结果表明,在 NBS 区段对应保守结构域具有很高的同源性,均含有 P-loop、Kinase-2、Kinase-3a 和 GLPL 保守结构。并且由于 Kinase-2 的共有序列 (LLVLDDVW) 最后一个氨基酸为天冬氨酸 (W) 而属于 non-TIR-NBS 类抗病基因类型,与前人研究结果一致<sup>[15]</sup>。另外对 13 条 RGAs 进行氨基酸序列比对发现序列间多态性明显,同源性最低的只有 36.9%,同源性最高的序列达到 98.3% (图 2)。

### 2.3 小麦 RGAs 的分子系统发育树分析

将小麦的 13 条 RGA 翻译的氨基酸序列结合已克隆的抗病基因 (*L6*、*N*、*Xa1*、*RPS2*) 对 NBS 区域进行了系统发育树分析。已知的 4 个基因 *Xa1*、*RPS2* 属于 nonTIR-NBS 类的抗病基因,而其他两个基因属于 TIR-NBS 类抗病基因。从系统发育树的结果分析,分离的 13 条 RGAs 序列与 *Xa1*、*RPS2* 一样都属于 nonTIR-NBS 类的抗病基因并且聚到一类,而

L6、N 序列属于 TIR-NBS 类基因,单独聚在一起(图 3)。本研究结果与前人研究单叶植物中只有 non-TIR-NBS 抗病基因的研究结果是一致的。而 13 条 RGA 序列又分为了 3 类, P1、P5、P12、P18 是一类,

P6、P17、P10、P13 是一类, P4、P9、P8、P2、P3 是一类。P4、P9、P8、P2、P3 与 *Xal* 亲缘关系最近,很可能具有和 *Xal* 一致的抗病机制。

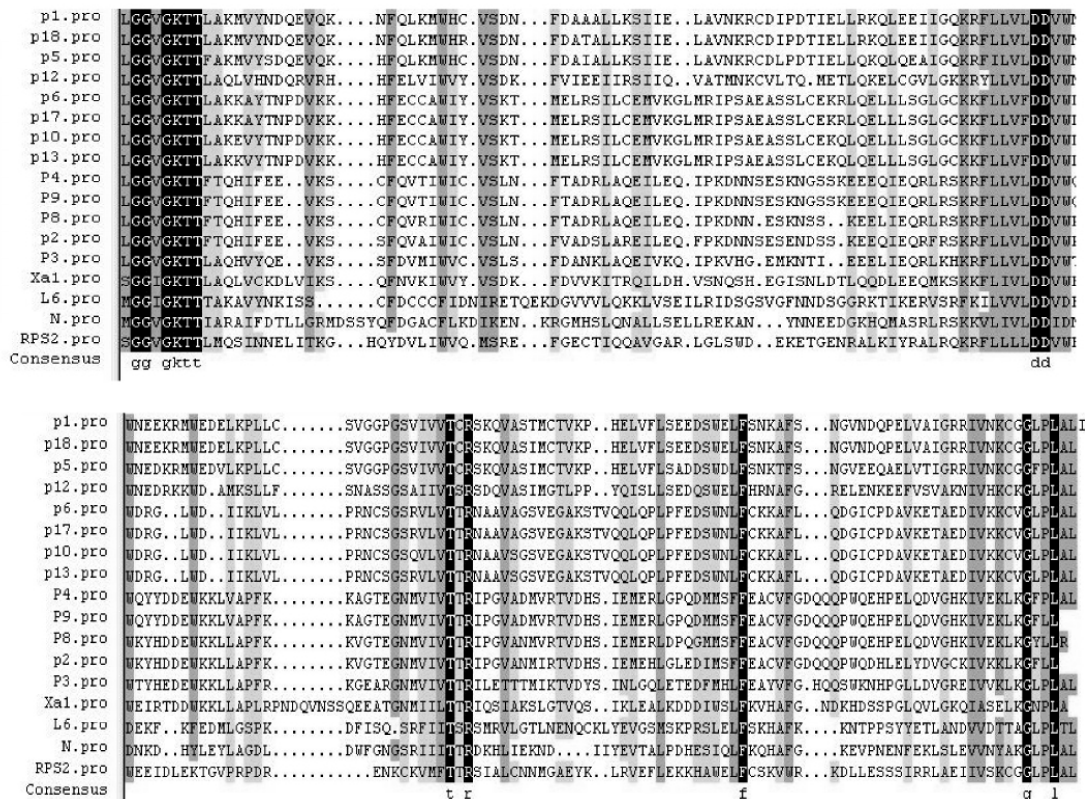


图 2 小麦 RGA 序列的氨基酸比对分析

Fig. 2 Amino acid sequences alignment of 13 NBS sequences in wheat and four R genes cloned

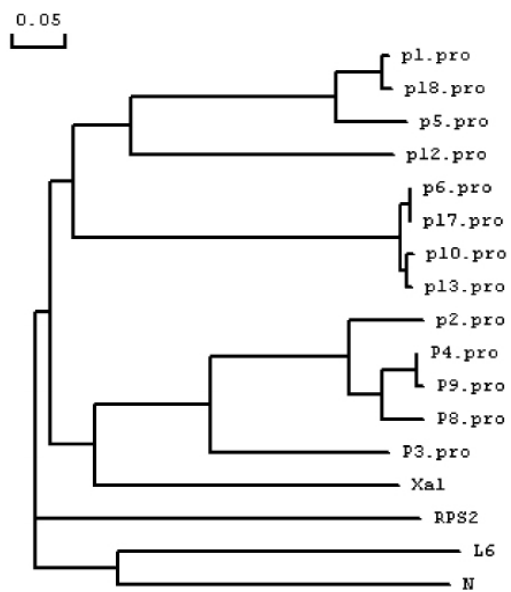


图 3 小麦 NBS 类候选抗病基因与 4 个已知 R 基因相应保守结构域分子系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based of alignment of the amino acid sequences of 13 NBS-like resistance gene and the NBS domains of other plant's gene

### 3 讨论

根据已克隆的植物抗病基因 NBS 区保守结构域设计的简并引物从小麦中成功地分离到 RGAs。对 13 条 RGAs 在结构上分析后表明, 这些 RGA 序列中全部含 NBS 类抗病基因的保守结构域, 如 P-loop、Kinase-2、Kinase-3a、GLPL 等, 并且这些序列具有连续的可阅读框(ORF)。因此, 这些 RGA 序列中的某些可能是功能性的抗病基因的部分序列。

NBS 类的植物抗病基因在植物基因组中存在很广泛<sup>[17]</sup>。通过相关抗病基因序列的简并引物的设计与 PCR 扩增, 能够有效地研究各种植物的 RGAs。本研究首次对小麦中 NBS 类 RGAs 的多样性及复杂度进行研究。分离的 13 个具有连续开放阅读框的 RGAs 都属于 nonTIR-NBS 类型。氨基酸序列之间的相似程度为 36.2% ~ 98.2%。因此 RGA2 与 RGA5 可能有不同的起源(Divergent origins)。通过对 13 条序列的比对分析表明: 在保守结构之间存在许多点突变, 小片段的插入或缺失事件, 它们是小麦 RGAs 趋异的来源, 这与在其它植物中的研究结果是

相似的<sup>[18]</sup>。这表明,在小麦中,NBS类抗病基因的进化也是逐步进化的,而不是快速进化过程,这与前人关于抗病基因进化的研究结果相符<sup>[19]</sup>。本研究首次对小麦中大量RGAs进行分离研究,并对小麦中NBS类抗病基因的多样性和进化关系进行了初步的探讨,还有很多工作还有待于进一步研究,比如所分离到的RGAs与小麦中抗病基因的关系、小麦抗病基因的克隆等等。

## 参考文献

- [1] Knott D R. The wheat rust breeding for resistance [J]. Theor Appl Genet, 1989:191-198.
- [2] 谭明谱. 水稻白叶枯抗性基因 *Xa22* (t) 的克隆 [D]. 武汉:华中农业大学, 2004:10-13.
- [3] 高倩,王海燕,刘大群,等. 小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的 RGA 分析 [J]. 华北农学报, 2008, 23(6):50-53.
- [4] 霍建飞,宋水山,李星,等. CaM 及各亚型基因参与小麦抗叶锈病反应的研究 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4):175-179.
- [5] 杨静静,李星,李亚宁. 小 G 蛋白 *Rob2* 基因参与小麦抗叶锈病反应的研究 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4):1-5.
- [6] 李星,李亚宁,刘大群,等. 小麦抗叶锈病近等基因系 *TcLr41* 基因的差异表达 [J]. 华北农学报, 2008, 23(5):122-126.
- [7] 刘松青,何莎,蒋芳,等. 小麦抗病基因同源序列 (RGAs) 的克隆与分析 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(3):83-88.
- [8] Feuillet C S, Travella N, Stein L, et al. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100:15253-15258.
- [9] Leister D, Ballbora A, Salamin 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] Collins N C, Webb C A, Seah S, et al. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize [J]. Mol Plant MicrobInteract, 1998, 11(10):968-978.
- [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] Bozkurt O, Hakki 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.
- [13] Monosi B, Wisser R J, Pennill L, et al. Full-genome analysis of NBS-LRR-Encoding genes homologues in rice [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109:1437-1447.
- [14] Palomino C, Satovic Z, Cubero J, et al. Identification and characterization of NBS-LRR class resistance gene analogs in fababean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. The NRC Research Press Web, 2006, 49:1227-1237.
- [16] Gill K S, Lubbers E L, 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] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family with the nucleotide-binding superfamily [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] Mago R, Nari S, Mohan M. Resistance gene analogue from rice: cloning, sequencing and mapping [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98:50-57.
- [19] Seah S, Sivasithamparam K, Karakousis A, et al. Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97:937-945.