

芝麻 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与分析

高树广^{1,2}, 刘红彦^{2,3*}, 王俊美^{2,3}, 倪云霞^{2,3}, 田保明¹

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 3. 河南省农作物病虫害防治重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 分离和分析芝麻抗、感茎点枯病材料的抗病基因同源序列(resistance gene analogs, RGAs), 可以为芝麻抗茎点枯病相关基因的克隆奠定基础。根据已知植物抗病基因的 NBS-LRR 类保守结构域, 合成了 1 对简并引物和 2 对特异引物, 对 6 个抗茎点枯病芝麻品种中的抗病基因进行扩增, 结果得到 11 条抗病基因同源序列。BLAST X 分析发现, 获得的 11 条 RGAs 与已知的 RGAs 有较高的相似性, 氨基酸相似性为 42%~57%。聚类分析将其分成 5 个亚类, 均属于 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因。其氨基酸序列都不同程度地含有 NBS 保守区的典型特征基序, 其中 P-loop-GLPL 区域氨基酸序列与已知抗病基因对应区域的相似性为 18.2%~49.7%。

关键词: 芝麻; 茎点枯病; NBS-LRR; 抗病基因同源序列

中图分类号: S435.653 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)09-0081-05

Isolation and Analysis of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sesame

GAO Shu-guang^{1,2}, LIU Hong-yan^{2,3*}, WANG Jun-mei^{2,3}, NI Yun-xia^{2,3}, TIAN Bao-ming¹

(1. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. Henan Key Laboratory of Crop Pest Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Cloning and analysis of resistance gene analogs(RGAs)of resistant/susceptible sesame to *Macrophomina phaseoli* could lay the foundation for cloning resistance-related genes. One pair of degenerate primers and two pairs of specific primers were designed based on nucleotide binding site (NBS)-leucine rich repeats (LRR) conserved domain of reported resistance genes from other plants to amplify resistance genes from six sesame varieties resistant to *Macrophomina phaseoli* and eleven RGAs were obtained. BLAST X analysis indicated that eleven RGAs showed high sequence identities with the known RGAs, and the amino acid identities were 42%—57%. Clustering analysis showed that the eleven RGAs were sorted into five subgroups and all belonged to non-TIR-NBS-LRR type of resistance genes. Putative amino acid sequences all had characteristic sequences of NBS conserved domain to some extent, and shared 18.2%—49.7% identities with known resistance genes in P-loop-GLPL region.

Key words: Sesame; Stem blight; NBS-LRR; Resistance gene analogs

自 1992 年从玉米中克隆出第 1 个植物抗病基因(R 基因) *Hm1* 以来, 采用图位克隆法和转座子标签法已从多种作物中克隆到 70 余个抗病基因^[1]。

这 2 种方法对基因组较小、具有高分辨率物理图谱和遗传图谱的植物来说比较适用^[2]。分析发现, 已克隆的抗病基因产物有一些区段高度保守^[3], 这些

收稿日期: 2011-03-04

基金项目: 国家芝麻产业技术体系(nycytx-20-1-05)

作者简介: 高树广(1985-), 男, 河南西华人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物抗病遗传。E-mail: shuguanggao2008@163.com

* 通讯作者: 刘红彦(1964-), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: liuhy1219@163.com

保守区域不仅有助于对抗病基因进行分类,而且也对抗病基因的克隆提供了新的途径,即抗病基因同源序列(resistance gene analogs, RGAs)法。RGAs 法根据已知抗病基因保守区域设计简并引物,以植物的基因组 DNA 或 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到抗病基因的同源序列,进一步筛选抗病基因。小麦抗叶锈病基因 *Lr10*^[4] 和马铃薯抗马铃薯 X 病毒基因 *Rx2*^[5] 就是利用 RGAs 法克隆抗病基因的经典例子,说明利用该法克隆抗病基因是可行的。目前,从拟南芥^[6]、亚麻^[7]、大豆^[8]、水稻^[9]、菜豆^[10] 等多种作物中都分离到了 RGAs,通过研究发现,它们或者是 R 基因或其假基因的一部分,或者与 R 基因紧密连锁,为进一步克隆 R 基因奠定了基础。在已克隆的植物抗病基因中,成员最多的是 NBS-LRR(nucleotide binding site-leucine rich repeats)类,它们编码蛋白的共同特点是 N 端存在着核苷酸结合位点(NBS),近 C 端存在着亮氨酸重复序列(LRR),其保守基序有 P-loop、kinase-2、kinase-3a、GLPL 等。根据 N 端是否有 TIR 结构域出现,又可以将 NBS-LRR 类抗病基因细分为 TIR-NBS-LRR 和 non-TIR-NBS-LRR 2 个亚类。据 kinase-2 基序最后一个残基,可以预测已克隆的抗病基因同源序列属于 TIR-NBS-LRR 类(D)或 non-TIR-NBS-LRR 类(W),可信度为 95%^[11]。植物 NBS 结构与动物细胞凋亡的调节因子(如线虫的 CED-4)结构相似,主要是在蛋白与蛋白之间的相互作用中作为一个功能组件;LRR 结构主要参与配体的结合,也可促进配体与防御反应信号转导途径中其他蛋白的作用。含有 NBS-LRR 类的抗病基因产物主要是在 LRR 感

受信号后,通过 NBS 与核苷三磷酸结合参与基因转录的调控^[12]。

芝麻(*Sesamum indicum* L.)属胡麻科胡麻属,是我国重要的油料作物^[13-14]。在芝麻整个生长发育阶段,病害种类多,发生普遍,其中茎点枯病、枯萎病危害严重,是芝麻高产稳产的主要制约因素。利用抗病品种是控制芝麻病害最有效、经济、环保的措施,但目前芝麻病害防治主要是采用化学防治,对抗病基因的研究和利用薄弱^[15-16]。鉴此,根据已知抗病基因的保守结构域合成引物,从抗茎点枯病芝麻材料中扩增、克隆抗病基因同源序列,以期获得抗茎点枯病相关基因或抗病基因的 RGAs 标记,为利用分子育种技术选育抗病品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

选择 6 个抗茎点枯病芝麻品种:新蔡选抗、野芝 1 号、ZZM1393、ZZM2590、ZZM3330、ZZM3971,2 个感病品种:ZZM1275 和 ZZM3547,用于抗病基因同源序列分析。

1.2 芝麻基因组 DNA 的提取

采集新鲜的芝麻幼叶,−70℃ 保存,备用。采用常规 CTAB 法提取基因组 DNA,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,稀释至每微升 10 ng 作为 PCR 扩增的模板。

1.3 引物合成

参考文献报道设计,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 1 对简并引物 F+R 和 2 对特异引物 S+AS、NF+NR(表 1)。

表 1 用于 PCR 扩增芝麻抗病基因的引物

引物名称	引物序列(5′-3′)	保守区域	退火温度/℃	参考文献
F	GGNATGGGNGGNTNGGNAA(A/G)CANAC	kinase-1a	47.3	[17]
R	NCA(T/A)TTNAGNGCNAGNGGNAGNCC	domain2		
S	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	GGV/IGKTT	44.7	[18]
AS	CAACGCTAGTGGCAATCC	GLPLA/TL		
NF	TAGGGCCTCTTGCTACGT	LRR	41.2	[19]
NR	TATAAAAAGTGGCGGACT	YGLLHR		

注:N=A/T/C/G;M=A/C;W=A/T;S=C/G;Y=C/T;K=G/T;V=A/C/G;H=A/C/T;D=A/G/T;R=A/G

1.4 芝麻抗病基因的 PCR 扩增

PCR 扩增所用试剂购自宝生物工程(大连)有限公司,PCR 扩增体系为:DNA 6 μL,引物(10 μmol/L)各 1 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)0.8 μL,MgCl₂ (15 mmol/L) 2.5 μL,10 × PCR buffer 2.5 μL,*rTaq* 酶(5 U/μL)0.2 μL,ddH₂O 补至 25 μL。扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 终延伸 10 min;10℃ 保存。PCR 扩增在 Life Pro 基因扩增

仪(杭州博日科技)上进行。

1.5 芝麻抗病基因 PCR 产物的克隆

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,利用 Axygen 公司的 DNA Gel Extraction Kit 回收扩增出的全部片段。将获得的片段与 pMD19-T 载体(宝生物工程(大连)有限公司)在 16℃ 条件下连接过夜后,用氯化钙法转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,均匀涂布在 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 固体培养基上。37℃ 培养过夜,随机挑选其中的 8 个白斑,在含 Amp

100 mg/L 的 LB 液体培养基中 37℃、200 r/min 振荡培养 5 h, 利用原始引物进行菌落 PCR, 检测插入片段的有无及长度, 随机挑选 1 个阳性重组子, 送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 芝麻抗病基因序列分析

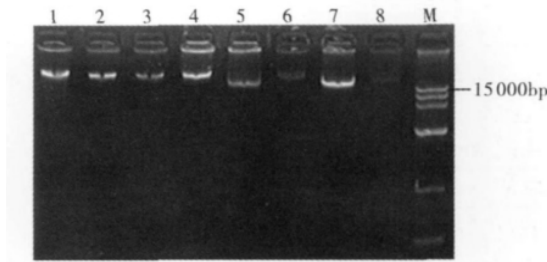
利用 BLAST X 将所得序列与 GenBank 库中的序列进行比较、分析。利用 MEGA 4.0.2 和 DNAMAN 6.0 软件对获得序列和已知抗病基因序列进行比对、聚类并构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 芝麻抗病基因 PCR 扩增结果

芝麻基因组提取结果见图 1, 从中可以看出, 基因组的完整性和纯度均达到 PCR 扩增的要求。利用

2 对特异引物和 1 对简并引物从感病品种中共扩增出 6 个片段, 从抗病品种中共扩增出 30 个片段。每对引物从不同品种中扩增片段的数量和序列长度见表 2。



1—8 为 ZZM1275、新蔡选抗、ZZM3547、ZZM1393、ZZM2590、ZZM3330、ZZM3971、野芝 1 号; M 为 DL15 000 bp DNA ladder marker

图 1 芝麻基因组 DNA 电泳图谱

表 2 芝麻抗病基因 PCR 扩增结果

引物	ZZM1275 (感)	ZZM3547 (感)	新蔡选抗	ZZM1393	ZZM2590	ZZM3330	ZZM3971	野芝 1 号
S+AS	1360/510/352	—	1359/509/382	1359/511/382	1358/511/382	×	1346/510/352	510
NF+NR	524	—	942/880/523	975/611/554	523	×	942/784/524	×
F+R	—	1147/529	1173/522	521	—	1192/525	×	1187/530

注: — 表示没作为模板; × 表示没有扩增出条带

2.2 芝麻 RGAs 的初步分析

将目的条带进行回收, 并克隆测序。36 条序列中, 13 条序列与抗病基因具有较高同源性, 并具有完整开放阅读框, 编号 *SIRGA1*—*SIRGA13*, 其中 *SIRGA1* 由引物对 NF+NR 扩增得到, GenBank 登录号 JF460715; *SIRGA2*—*SIRGA7* 由引物对 S+AS 扩增得到, GenBank 登录号 JF460716—JF460721; *SIRGA8*—*SIRGA13* 由引物对 F+R 扩增得到, GenBank 登录号

HQ874454—HQ874459。其中 *SIRGA2* 和 *SIRGA10* 两条序列分别存在于感茎点枯病品种 ZZM1275 和 ZZM3547 的基因组中, 其他 23 条序列或与逆转录转座子相关, 或与 RGAs 特征不相符, 均不再进行分析。

2.3 芝麻 RGAs 与已知 R 基因的同源性分析

对 11 条 RGAs 进行 BLAST X 分析, 结果表明, 芝麻 RGAs 与其他植物的 R 基因有着较高的同源性, 相似性为 42%~57% (表 3)。

表 3 芝麻 RGAs 序列的 BLAST X 分析结果

RGAs 序列	具最高同源性的基因产物	GenBank 序列号	物种	相似性/%	E 值
<i>SIRGA1</i>	抗性蛋白类似蛋白	AAU89652.1	枳 (<i>Citrus trifoliata</i>)	54	1e ⁻²³
<i>SIRGA3</i>	NBS-LRR 抗性蛋白类似蛋白	AAM47597.1	辣椒 (<i>Capsicum annuum</i>)	56	7e ⁻⁴⁹
<i>SIRGA4</i>	NBS-LRR 抗性蛋白类似蛋白	AAM47597.1	辣椒	57	2e ⁻⁴⁶
<i>SIRGA5</i>	NBS-LRR 抗性蛋白类似蛋白	AAM47597.1	辣椒	55	6e ⁻⁴⁹
<i>SIRGA6</i>	NBS-LRR 抗性蛋白类似蛋白	AAM47597.1	辣椒	56	3e ⁻⁵¹
<i>SIRGA7</i>	RGA	ABA60366.1	欧薄荷 (<i>Mentha longifolia</i>)	51	5e ⁻³⁹
<i>SIRGA8</i>	抗性蛋白 RPP13	XP002521786.1	蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	49	1e ⁻³⁰
<i>SIRGA9</i>	NBS-LRR 抗性蛋白类似蛋白	AAM47597.1	辣椒	49	4e ⁻⁴⁰
<i>SIRGA11</i>	抗性蛋白类似蛋白	CAC82598.1	咖啡 (<i>Coffea Arabica</i>)	52	9e ⁻⁴⁰
<i>SIRGA12</i>	RGA	ABA60367.1	欧薄荷	42	5e ⁻²⁸
<i>SIRGA13</i>	抗性蛋白 PSH-RGH6	ABY61745.1	马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	57	4e ⁻³⁷

2.4 芝麻 RGAs 的聚类分析

利用 MEGA 4.0.2 软件, 对 11 条 RGAs 编码的氨基酸序列与 6 个已知抗病基因 *N* (U15606)、*L6* (U27081)、*M* (U73916)、*Prf* (U65391)、*Gpa2* (AF195939) 和 *RPMI* (X87851) 的相应区域氨基酸序列进行聚类分析 (图 2)。结果表明, 分离出来的 RGAs 都

与 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因聚在一起。根据聚类结果, 将 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因又分为 5 个亚类, 其中 *SIRGA3*、*SIRGA4*、*SIRGA5*、*SIRGA6*、*SIRGA9*、*SIRGA13* 和 *Gpa2* 聚为一类, *SIRGA1* 和 *Prf* 聚为一类, *SIRGA7* 和 *SIRGA11* 聚为一类, *SIRGA8* 和 *SIRGA12* 单独成为一类。

3 讨论

抗病基因保守结构域不仅有助于对抗病基因进行分类,而且有助于研究抗病作用机制,同时也为克隆抗病基因提供了新的途径。通过 RGAs 法克隆抗病基因同源序列的主要目的是分离作物的抗病基因和作为分子标记跟踪抗病基因。通过田间自然诱发鉴定的方法,鉴定了不同芝麻种质对茎点枯病的抗性,筛选出 6 个抗病品种。为了充分利用这些抗病资源,根据报道的植物 NBS-LRR 类抗病基因保守结构域合成 1 对简并引物和 2 对特异引物,从 6 个抗病品种中扩增出 11 条 RGAs。序列分析结果表明,11 个 RGAs 均属于 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因,聚类分析将其分成 5 个亚类, *SIRGA7*、*SIRGA8*、*SIRGA11*、*SIRGA12* 没有与已知的抗病基因聚在一起,可能与用于聚类的抗病基因较少有关,也可能是未知的抗病基因类型。RGAs 氨基酸序列与已知抗病基因产物的相似性在 42%~57%。通过与已知植物抗病基因 P-loop-GLPL 区域氨基酸序列相似性比较发现,11 条序列均不同程度地含有 NBS 保守区的典型特征序列,在保守结构域之间存在许多氨基酸残基的突变,说明抗病基因在芝麻基因组中的进化是逐步趋异,这与前人研究结果相吻合^[20]。本试验也从感病品种中分离出了 2 条含有抗病基因保守结构域的序列,推测这 2 条序列可能与目的 R 基因无关,也可能是具有潜在抗性功能的 R 基因。其余序列中部分与反转录转座子有关,推测 NBS-LRR 类序列与反转录转座子可能存在一定的进化关系。NBS-LRR 类结构在植物基因组中广泛存在,也为抗病基因的克隆和筛选增加了难度。

参考文献:

- [1] Liu J, Liu X, Dai L, *et al.* Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34: 765-776.
- [2] 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.
- [3] Ellis J, Dodds P, Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(4): 278-284.
- [4] Fenillet C, Schaefermayr G, Keller B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat[J]. *The Plant J*, 1997, 11: 45-52.
- [5] Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, *et al.* Agrobac-
- terium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes application to the *Rx2* locus in potato[J]. *Plant J*, 2000, 21: 73-81.
- [6] Aarts M G, Lintel H B, Holub E B, *et al.* Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11(4): 251-258.
- [7] Dodds P N, Lawrence G J. Contrasting modes of evolution acting on the complex N locus for rust resistance in flax[J]. *Plant J*, 2001, 27: 439-453.
- [8] Yu Y G, Buss G R, Maroof M A S. Isolation of a super-family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93(21): 11751-11756.
- [9] Chen X M, Line R F, Leung H. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97(3): 345-355.
- [10] Kalavacharia V, Stavely J R, Myers J R, *et al.* *Crg*, a gene required for Ur-3-mediated rust resistance in common bean, maps to a resistance gene analog cluster[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13(11): 1237-1242.
- [11] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmores R W, *et al.* Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily[J]. *Plant J*, 1999, 20: 317-332.
- [12] Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl J L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 391-399.
- [13] 张鹏, 张海洋, 郭旺珍, 等. 以 SRAP 和 EST-SSR 标记分析芝麻种质资源的遗传多样性[J]. *作物学报*, 2007, 33(10): 1696-1702.
- [14] 张海洋, 卫双玲, 卫文星, 等. 芝麻同源四倍体的诱发与鉴定[J]. *华北农学报*, 2001, 16(2): 12-15.
- [15] 孟祥峰, 高新国, 张春生. 河南省芝麻茎点枯病发病规律及防治措施[J]. *河南农业科学*, 2003(10): 69.
- [16] 韩俊岭. 淮北地区夏芝麻主要病害发生特点及防治技术[J]. *现代农业科技*, 2010(17): 183.
- [17] 刘卫东, 王石平. 水稻中大麦 *Mlo* 和玉米 *Hml* 抗病同源序列的分析与定位[J]. *遗传学报*, 2002, 29(10): 875-879.
- [18] 孔凡晶, 马有志, 陈孝, 等. 簇毛麦端体 6VS 的抗病同源序列的克隆及分析[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(10): 1223-1227.
- [19] 陈夕军, 周益军, 徐敬友, 等. 利用 RGA-PCR 方法进行水稻抗瘟基因分子标记[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2004, 25(3): 55-59.
- [20] Pan Q, Wendel J, Fluhr R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes[J]. *J Mol Evol*, 2000, 50: 203-213.