

网络出版时间:2014-10-16 12:51

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.11.105

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.11.105.html

花生栽野杂交后代抗病基因类似物的克隆与分析

李 忠^{1,2}, 江立庚¹, 唐荣华², 韩柱强², 钟瑞春²,
贺梁琼², 蒋 菁², 熊发前², 唐秀梅²

(1 广西大学 农学院, 广西 南宁 530007; 2 广西农业科学院经济作物研究所, 广西 南宁 530004;

3 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西 南宁 530007)

【摘 要】 【目的】在花生野生种、栽培种及栽野杂交后代中, 克隆抗病基因类似物(Resistance gene analog, RGA)相关基因片段, 为抗病基因的进一步分离、鉴定及利用奠定基础。【方法】以 14 个花生栽野杂交种和 2 个抗病花生亲本为材料, 应用 PCR 方法扩增来自基因组 DNA 的抗病基因类似物序列, 并分析其同源性。【结果】扩增出 15 条来自基因组 DNA 的抗病基因类似物序列, 序列长度在 500 bp 左右, 由此推导出的 15 条氨基酸序列含有典型的 NBS 保守区的 N 端糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点。15 条花生 RGA 氨基酸序列间的同源性在 73.2%~100.0%, 与已发表的花生抗病基因类似物的相似性较高, 达 72.1%~100.0%; 与已知的其他作物的抗病基因编码的氨基酸序列有 34.1%~54.6%的同源性。【结论】分离到的 15 个花生抗病基因同源片段为抗病基因的部分序列。

【关键词】花生; 抗病基因类似物; 克隆

【中图分类号】S565.2

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2014)11-0032-07

Cloning and analysis of resistance gene analogs in filial generation of genus *Arachis*

LI Zhong^{1,2}, JIANG Li-geng¹, TANG Rong-hua², HAN Zhu-qiang²,
ZHONG Rui-chun², HE Liang-qiong², JIANG Jing²,
XIONG Fa-qian², TANG Xiu-mei²

(1 Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530007, China;

2 Guangxi Academy of Agricultural Sciences Economic Crops Research Institute, Nanning, Guangxi 530004, China;

3 Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: 【Objective】Resistance gene analogs (RGAs) of wild peanut variety, peanut cultivar and their filial generation were cloned to provide basis for further separation, identification and utilization of peanut resistance genes. 【Method】Resistance gene analogs of filial generation of genus *Arachis* and their parents were isolated using homology-based method. The resistance gene analogs were amplified using primers based on the conserved regions from reported peanut resistance genes. 【Result】15 resistance gene analogs with length of 500 bp were obtained. The RGAs contained typical NBS conserved motifs, such as N-glycosylation site, Protein kinase C phosphorylation site, Casein kinase II phosphorylation site and N-myristoylation site. The sequences of these 15 RGAs shared 73.2%—100.0% identity. They also showed high sequence identity (72.1%—100.0%) with reported peanut resistance genes. Putative amino acid se-

【收稿日期】2013-07-08

【基金项目】国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-14-华南区栽培岗位); 广西青年基金项目(桂科青 0991016); 广西重点实验室建设项目(12-071-09)

【作者简介】李 忠(1979—), 男, 广西百色人, 助理研究员, 主要从事花生栽培与遗传育种研究。E-mail: gxlizhong@126.com

quences deduced from these 15 RGAs shared 34.1%—54.6% identity with the sequences of resistance genes of other plants.【Conclusion】The obtained 15 RGAs from genus *Arachis* belonged to sequences of the resistance genes.

Key words: peanut; resistance gene analog; clone

花生栽培种是异源四倍体作物,遗传基础狭窄,在形态、抗性、品质等性状上有一定变异,但变异程度较其他作物低,而且许多危害花生的病虫害缺乏抗源^[1-2]。花生野生种具有丰富的遗传变异,也存在很多栽培花生所不具备的优良性状。前人的研究表明,花生野生种对一些病虫害的抗性显著高于栽培种,如对花生早斑病、晚斑病、锈病等病害高抗或者免疫^[1,3-7]。通过种间杂交或其他生物技术将花生野生种的抗病基因转移到花生栽培种中,是扩大花生栽培种遗传基础、种质创新和新品种选育的重要途径。*Arachis correntina* 是与花生栽培种杂交亲和的少数野生花生品种之一,在田间表现出耐贫瘠、抗病性好、耐连作等优良特性。

植物抗病基因的分离是近年来植物分子生物学领域的一个研究热点,所采用的技术手段主要有转座子标签法、图位克隆法和同源序列克隆法等。抗病基因类似物(Resistance gene analog, RGA)分子育种技术是一种利用已知抗病基因所编码的蛋白质保守结构域设计简并引物,并分离和克隆抗病基因及其同源片段的技术,它为作物品种的性状改良及抗病机制的研究提供了新的途径,且已在包括花生在内的许多作物研究方面取得了进展^[8-16]。这些研究结果表明,应用 RGA 克隆技术分离植物抗病基因,并据此进行分子标记辅助抗病育种是一种可行且有效的方法。利用 RGA 克隆技术分离花生的 RGA,不仅有助于筛选花生各种抗病基因的分子标记,建立花生抗病育种分子标记辅助体系,而且通过对花生 RGA 的结构、表达和调控的研究,将有助于深入探明花生的抗病机制。本研究根据已知抗病基因的保守结构域设计引物,在花生野生种 *A. correntina*、栽培种“桂花 21”和花生栽野杂交后代中克隆抗病相关基因片段,以期为花生抗病基因的进一步分离、鉴定及利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试花生材料共 16 个,其中 0901~0914 为 2009 年由花生野生种 *A. correntina*(父本)与栽培种“桂花 21”(母本)杂交所得的 14 个子 7 代材料;花

生属花生区组野生种 *A. correntina*,来自国家种质野生花生南宁分圃;抗锈病栽培品种“桂花 21”由广西农业科学院经济作物研究所育成和提供。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计与合成 参照文献[12],依据植物 R(Resistance)基因 NBS 区的保守序列设计合成 1 对引物,引物序列见表 1。引物由上海生物工程有限公司合成。

表 1 依据植物 R 基因 NBS 区的保守序列设计的引物
Table 1 Primers designed based on NBS conserved regions of R genes

引物 Primer	序列(5'→3') Sequences
PLTR-fwd	GGNATGGGNGTNGGNAARACNACN
PLTR-rev	NCANCARAANGGNTGNGGNGGGTANGG

注(Note):N. A+C+G+T;R. A+C.
1.2.2 gDNA 的提取 取花生幼嫩叶片,用液氮于研钵中磨成粉状,用 CTAB 法^[17]提取 gDNA。
1.2.3 花生抗病基因类似物基因的克隆和测序
1) PCR 反应条件。以花生 gDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:2.5 μL 10×PCR buffer,2.0 μL 25 mmol/L MgCl₂,2.5 μL 1.0 mmol/L dNTPs,20 μmol/L 上下游引物各 1 μL,1 U *Taq* DNA 聚合酶,约 100 ng 模板,补足 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃变性 30 s,50℃1 min,72℃1 min,40 个循环;72℃延伸 10 min,4℃终止反应。

2) PCR 产物的克隆及测序。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳(80 V,200 A)40 min,用 OMEGA 公司 GEL EXTRACTION KIT 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒回收差异 DNA 片段。按 TIANGEN 公司 pGM-T 载体试剂盒使用说明,将回收的 PCR 产物与 pGM-T 载体连接。将连接的质粒载体转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含 IPTG(200 mg/L)、氨苄青霉素(100 mg/L)和 X-Gal (20 mg/L)的 LB 固体培养基上,37℃倒置培养 12~16 h。挑取 5~7 个白色单菌落,进行菌落 PCR 检测,检测插入片段的有无和大小。将阳性克隆菌用牙签挑出,置于用 1.5 mL 离心管制作的 LB 固体培养基小平板中,送样至上海 Invitrogen 公司

测序。

1.2.4 序列比对与分析 使用 DNAstar、DNAclub 软件进行序列初步分析,包括 DNA 至氨基酸转换、ORF 分析。应用 PIR 网站 (<http://pir.georgetown.edu/>)进行蛋白质保守区结构分析。使用 NCBI 网站上的 BLAST 搜索同源序列,并对各组 RGA 氨基酸序列与已知 R 氨基酸序列的同源性进行综合性分析,用 DNAMAN 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 花生 RGA 的扩增与鉴定

利用依据 R 基因 NBS 区保守序列设计合成的引物 PLTR,以花生基因组 gDNA 为模板进行 PCR 扩增。对 PCR 扩增谱带的分析结果表明,引物 PL-TR 的 PCR 产物出现 1 条 500 bp 左右的条带,条带

较清晰,有 1 个花生材料 0909 没有条带(图 1)。目的片段经回收、克隆,获得 15 个花生抗病基因类似物基因(13 个来自栽野杂交后代,2 个分别来自父母本),相应序列见图 2。图 2 表明,15 条序列均具有完整开放读码框(ORF),这些序列的大小在 498~500 bp。将本试验所得基因序列提交 NCBI 网站,得到 4 个 GenBank 收录号,分别为:KF885730.1、KF885729.1、KF885731.1 和 KF885732.1。对推导出的 15 个花生 RGA 完整氨基酸序列蛋白质结构的分析表明,15 条序列含有典型的 NBS 保守区的 N 端糖基化位点(NNSG)、蛋白激酶 C 磷酸化位点(TTR、SWK、SCK)、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(TRND、SYDD)、N-豆蔻酰化位点(GLPLAI、GIFPAD)特征序列(图 2)。

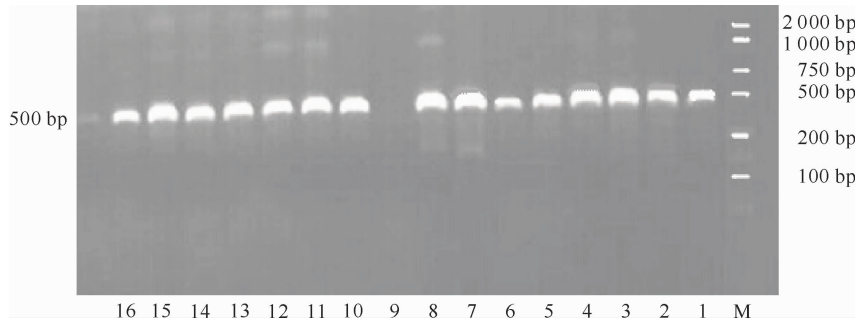


图 1 花生 RGA 的 PCR 扩增结果

M. DL2000 Marker;1. 0901;2. 0902;3. 0903;4. 0904;5. 0905;6. 0906;7. 0907;8. 0908;9. 0909;10. 0910;11. 0911;12. 0912;13. 0913;14. 0914;15. *Arachis correntina*;16. 桂花 21(Guihua 21)

Fig.1 PCR products of peanut RGA

2.2 花生 RGA 序列的同源性比较

2.2.1 花生 RGA 氨基酸序列的相似性 利用 DNAMAN 软件,对 15 条 RGA 氨基酸序列与 GenBank 中收录的有代表性的 8 条来自花生的抗病 R 氨基酸序列进行分析,结果见图 3。由图 3 可知,15 个 RGA 氨基酸有很高的相似性,序列间的同源性在 73.2%~100.0%;2 个亲本序列的同源性为 73.8%,其中母本“桂花 21”与栽野杂交后代材料序列的相似性为 73.9%~100.0%,比父本 *A. correntina*(73.2%~98.2%)略高。15 条 RGA 氨基酸序列与已发表的花生抗病基因氨基酸序列也具有较高的相似性,相似性在 72.1%~100.0%,依据聚类结果可将这些序列分为 2 组:在第 I 组中,只有基因 0903、*A. correntina* 和 0907 聚在一起,序列间的相似性较高,为 95.4%~98.2%;其余 RGA 材料均聚在第 II 组中,序列间的相似性在 81.6%~100.0%。

第 I 组与第 II 组的相似性为 74.0%。

2.2.2 花生与其他作物 RGA R 序列的相似性 将 15 个片段的氨基酸序列输入 NCBI 网站的 GenBank 数据库,利用 BLAST 进行同源性搜索,然后与其他作物的 R 序列氨基酸(表 2)进行比对,结果见图 4。由图 4 可以看出,与 15 条氨基酸序列同源性相对较高的作物主要有:番茄(*Solanum lycopersicum*, 序号:1~3)、葡萄(*Vitis vinifera*, 序号:4~9)、大豆(*Glycine max*, 序号:10~14)、毛果杨(*Populus trichocarpa*, 序号:15~16)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*, 序号:17~18)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*, 序号:19~22)、马铃薯(*Solanum tuberosum*, 序号:23~27)、烟草 NBS 抗性基因类似蛋白(*Nicotiana tabacum*, 序号:28~31)、野生马铃薯(*Solanum albicans*, 序号:32~34)(表 2)。通过氨基酸序列的相应区域 BLAST 比对发现,15 条氨基酸序列

与其他植物之间的同源性均较小,在34.1%~54.6%,其中与大豆序列12的氨基酸序列同源性最高,达51.9%~54.6%;与烟草序列30的氨基酸序列同源性最低,为34.1%~39.1%。聚类结果可分为4大类,本试验所得的15个序列聚在一起,其他作物序号4~22的氨基酸序列聚为一类,这2大类

的同源性为 45%; 序列 1~3, 23~26 及 28~34 归为一类, 与前述 2 大类的同源性为 43%; 序列 27 单独归为一类, 与前述 3 大类的同源性为 41%。这些具有一定程度同源的、来自于其他物种的抗病基因可能与花生具有近亲关系。

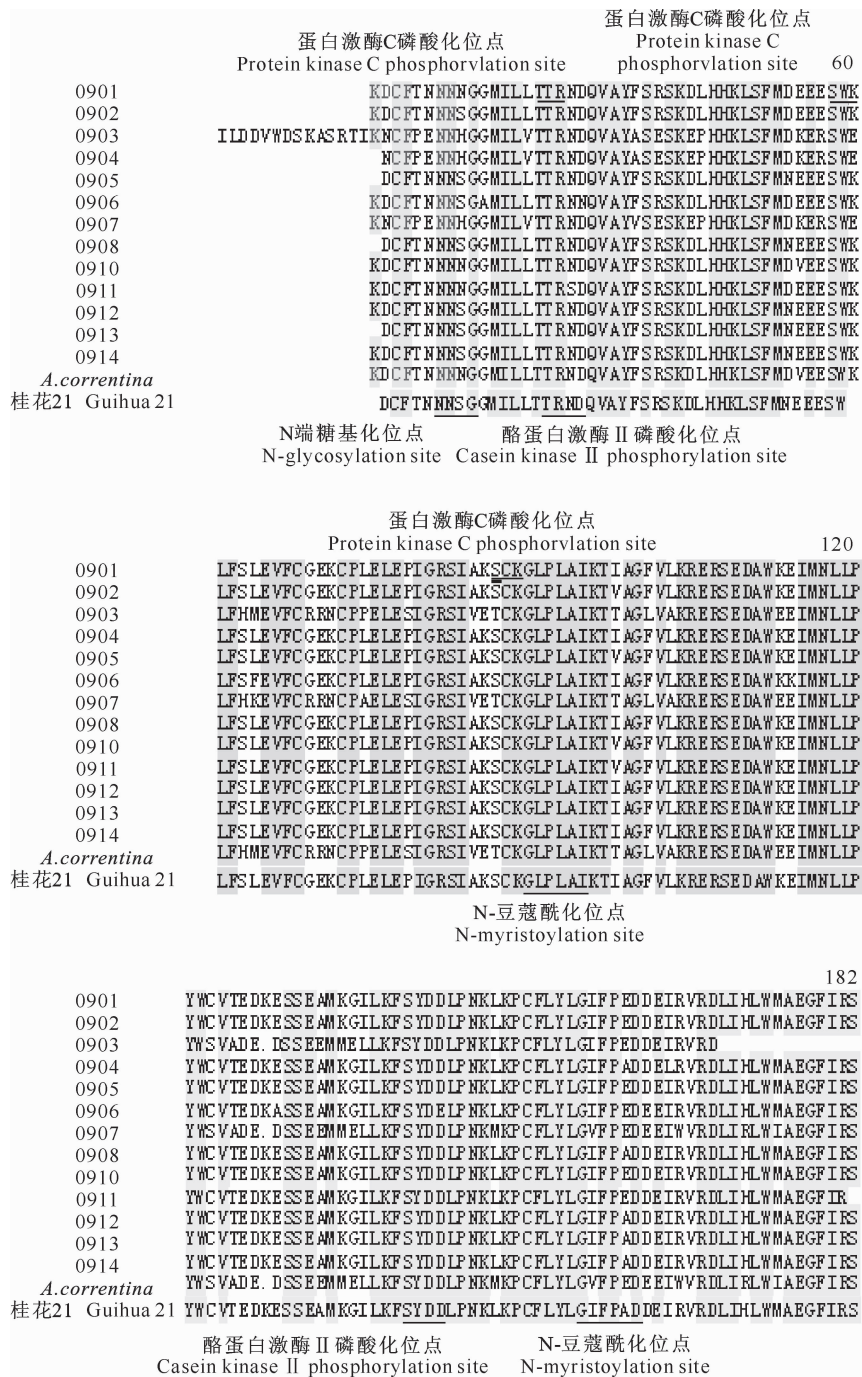


图 2 花生 RGA 氨基酸序列的比对分析

灰色阴影标注一致性序列

Fig. 2 Alignment analysis of peanut RGA amino acid sequences

Shaded are identical residues

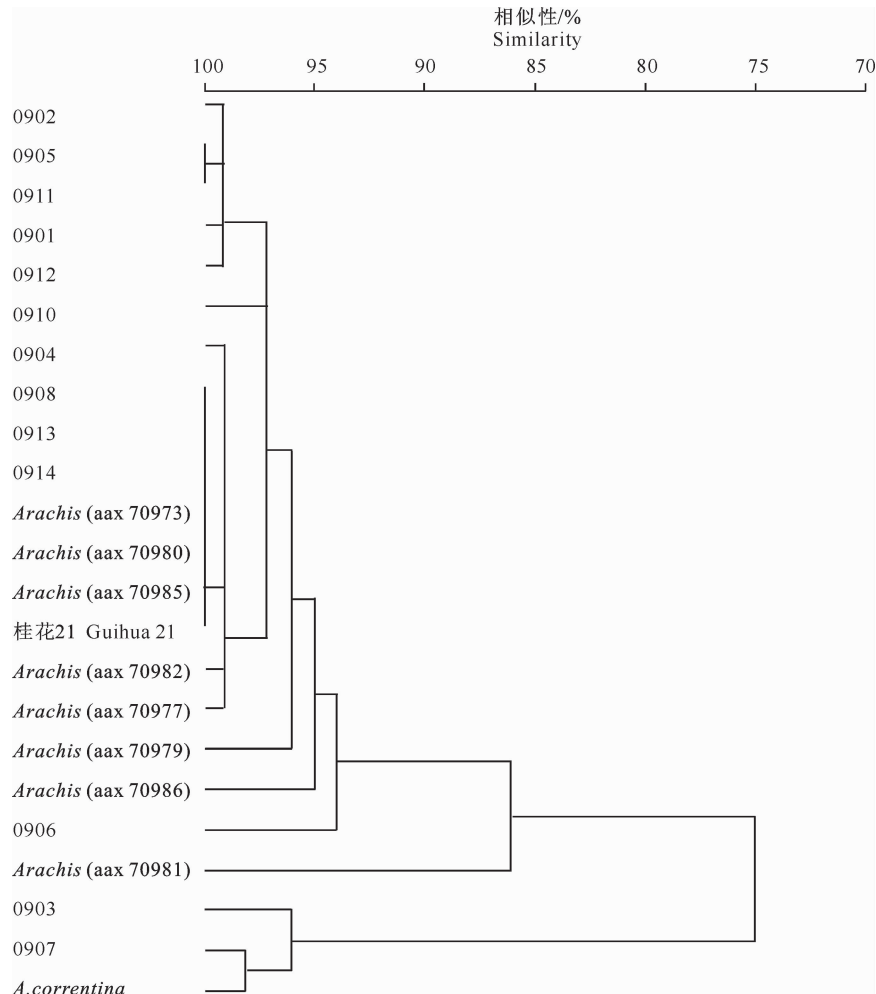


图 3 15 个花生 RGA 氨基酸序列与已知的 8 个花生 R 氨基酸序列的相似性分析

Fig. 3 Similarity between the deduced amino acid sequences of 15 RGAs of peanut and the known 8 R genes of peanut

表 2 用于与花生 RGA 序列相似性分析的其他作物的 R 序列

Table 2 List of known R genes of other crops

作物 Crop	序号 No.	NCBI 上的序列登录号 NCBI reference sequence	作物 Crop	序号 No.	NCBI 上的序列登录号 NCBI reference sequence
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	1	XP_004252073.1	鹰嘴豆 <i>Cicer arietinum</i>	17	XP_004505810.1
	2	AEW48197.1		18	AHB79188.1
	3	XP_004248477.1		19	ESW03445.1
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	4	XP_003633887.1	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	20	ESW03442.1
	5	XP_003633890.1		21	ESW03444.1
	6	CAN70484.1		22	ESW03443.1
	7	CBI38087.3		23	XP_006366307.1
	8	XP_003633889.1	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	24	XP_006345283.1
	9	CAN70484.1		25	XP_006357457.1
大豆 <i>Glycine max</i>	10	XP_003544316.1		26	AAT39962.2
	11	XP_003551806.1		27	XP_006356563.1
	12	XP_003530486.1	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	28	ACE79504.1
	13	XP_003551808.1		29	ACE79503.1
	14	XP_003539930.1		30	ACE79502.1
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	15	EEE79568.1		31	ACE79501.1
	16	XP_002334697.1	野生马铃薯 <i>Solanum albicans</i>	32	CAB56299.1
				33	AEW48190.1
				34	CAB50786.1

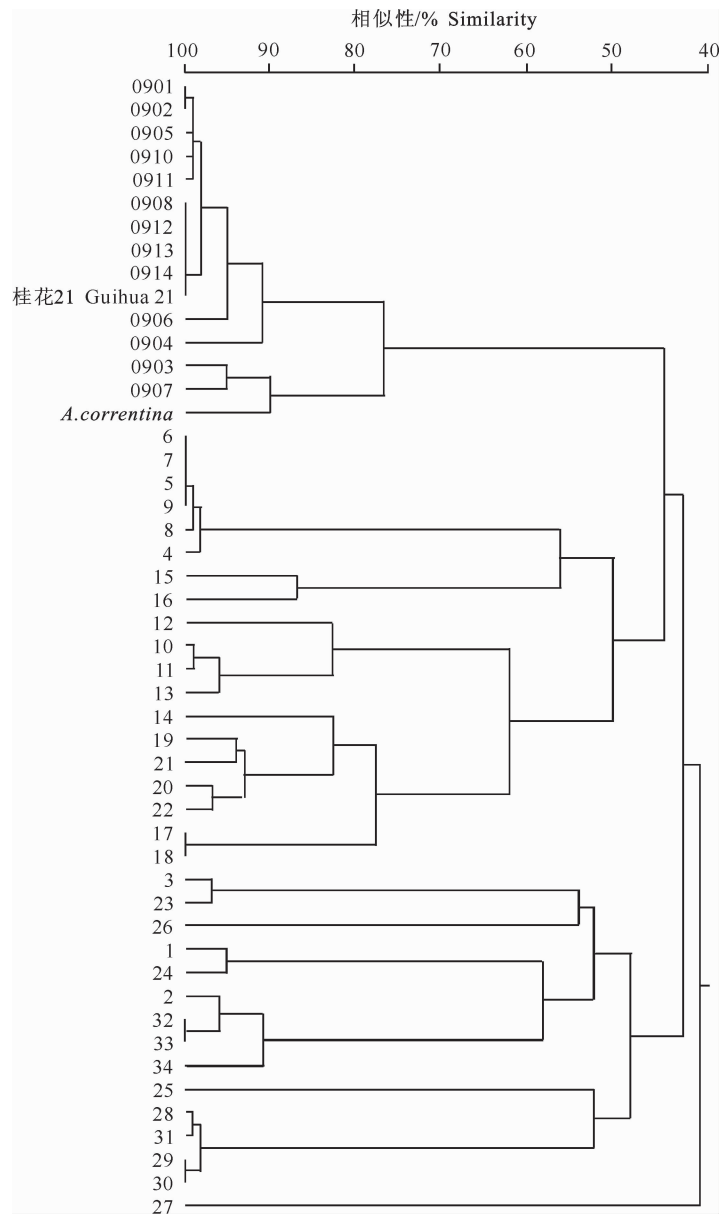


图 4 花生 RGA 序列与其他作物的 R 氨基酸序列的相似性分析
1~34 为用于相似性分析的其他作物的 R 序列,与表 2 同

Fig. 4 Similarity of the deduced amino acid sequences of RGA of peanut with the known R genes of other plants
1—34 are the known R genes of other crops,the same as Table 2

3 讨 论

花生野生种的抗病基因可通过有性杂交转移至栽培品种中^[18],获得高抗病性的花生新品系,这是花生抗病育种的创新途径之一。由于大多数野生种为二倍体,栽培种是四倍体,三倍体栽野种间杂种的育性需要染色体加倍才能恢复,杂种后代存在遗传不稳定性,野生种基因整合到栽培种基因组中的几率较低,因此如何准确地选择出含有野生种优良基因的目标单株显得非常重要。对花生属种间抗病基因同源序列进行克隆和分析,对深入明确抗病基因

结构与功能的关系有重要意义。

本研究中 15 条氨基酸序列间以及与已发表的花生抗病基因类似物的同源性,均在 72.1% 以上,表明花生种间遗传基础窄、多态性水平低,这与其他研究结果^[19-20]相似。15 条氨基酸序列与其他作物的 R 氨基酸序列同源性在 34.1%~54.6%,说明花生的 RGA 与其他植物之间的亲缘关系要远一些,这与经典分类学的结果基本一致。

本研究分离到的 15 个花生抗病基因同源片段,含有抗病基因保守结构域的 N 端糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-

豆蔻酰化位点,推测它们可能为抗病基因的部分序列。而且这些 RGA 的氨基酸序列存在差异,与已知花生的抗病基因相似性较高,与其他作物的 RGA 序列也存在一定的相似性,推断这些 RGA 基因可能同属于一个基因家族。14 个栽野杂交子代材料中有 1 个未扩增出抗病基因类似序列,各杂交子代间氨基酸序列存在单核苷酸差异位点,说明在子代繁育过程中可能发生了基因变异。

花生 RGA 序列的获得,对于花生抗病育种实践具有重要的现实意义。首先,可根据获得的 RGA 克隆设计特异引物继续扩增相关的抗病基因,获得基因全长序列及附近序列;另外,根据测序结果设计栽野种间抗病基因分子标记,有助于在种间杂种后代群体中选择含有野生种抗病基因的优良单株。

[参考文献]

[1] 万书波. 中国花生栽培学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003:245-269.
Wan S B. Chinese peanut cultivation [M]. Shanghai:Shanghai Science and Technology Publishing House, 2003:245-269. (in Chinese)

[2] 姜慧芳,段乃雄,任小平. 花生种质资源的综合评价 [J]. 中国油料作物学报,1998,20(3):31-35.
Jiang H F, Duan N X, Ren X P. Evaluation of groundnut germplasm [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(3): 31-35. (in Chinese)

[3] Mehan V K, Liao B S, Tan Y J, et al. Bacterial wilt of groundnut information bulletin No. 35 [M]. Patancheru, India: International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics, 1994:1-20.

[4] 唐荣华,周汉群,蔡贇业. 花生栽野种间杂交研究 [J]. 广西农业科学,1994(1):5-8.
Tang R H, Zhou H Q, Cai J Y. Study on peanut cultivated variety and wild varieties hybridization [J]. Guangxi Agricultural Science, 1994(1):5-8. (in Chinese)

[5] Sheikh M B, Sunil K P. Variations in methionine-rich protein composition of the genus *Arachis* [J]. Peanut Science, 1984 (1):1-3.

[6] 周 蓉. 花生(野生种)叶部病害抗病性鉴定 [J]. 花生科技, 1990(2):33-34.
Zhou R. Peanut (wild species) foliar disease resistance identification [J]. Journal of Peanut Science, 1990(2):33-34. (in Chinese)

[7] Bertoli D J, Leal-Bertoli S C M, Lion M B, et al. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis* [J]. Mol Gen Genomics, 2003, 270:34-45.

[8] Speulman E, Bouchez D, Holub E B, et al. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant J, 1998, 14(4):467-474.

[9] Xiao W K, Xu M L, Zhao J R, et al. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113:63-72.

[10] Mago R, Nair S, Mohann M. Resistance gene analogues from rice: Cloning, sequencing and mapping [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99:50-57.

[11] Flieger S P, Lefebvre V, Caranta C, et al. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions [J]. Genome, 1999, 42(6):1100-1110.

[12] Yuksel B, Estill J C, Schulze S R, et al. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut [J]. Molecular Genetics Genomics, 2005, 274(3):248-263.

[13] 简桂良,赵 磊,张文蔚,等. 陆地棉抗病基因同源序列的克隆与分析 [J]. 生物技术通报, 2011(10):101-108.
Jian G L, Zhao L, Zhang W W, et al. Cloning and analysis of NBS type resistance gene analogs in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(10): 101-108. (in Chinese)

[14] 魏 芳,马鸿翔. 小麦抗赤霉病品种 NBS 同源序列克隆与分析 [J]. 生物技术通报, 2012(2):128-135.
Wei F, Ma H X. Isolation and analysis of NBS analogs from wheat fusarium head blight resistant cultivars [J]. Biotechnology Bulletin, 2012(2):128-135. (in Chinese)

[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.
Zhang X M, Wei J L, Zhang D, et al. Isolation and sequence analysis of NBS resistance gene analogues in wild rice [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(6):741-748. (in Chinese)

[16] 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.
Wang Y H, Hou X L, Shen S X, et al. Isolation and characterization of resistant gene analogs from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(12): 2621-2626. (in Chinese)

[17] 颜子颖,王海林. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京:科学出版社, 1999:29-38.
Yan Z Y, Wang H L. Choreography molecular biology lab manual [M]. Beijing:Science Press, 1999:29-38. (in Chinese)

[18] 唐荣华,周汉群. 花生属栽野杂种后代抗青枯病研究 [J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(3):61-65.
Tang R H, Zhou H Q. Peanut plant wild bacterial wilt resistance research of hybrid progeny [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2000, 22(3):61-65. (in Chinese)

[19] Raina S N, Rani V, Kojima T, et al. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species [J]. Genome, 2001, 44(5):763-772.

[20] Milla S R, Isleib T G, Stalker H T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers [J]. Genome, 2005, 48(1):1-11.