

# 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<sup>\*</sup>

高玉龙 郭旺珍 王 磊 张天真<sup>\*\*</sup>

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要** 利用已克隆的抗病基因(resistance-gene, R 基因)与病程相关蛋白基因β-1,3-葡聚糖酶基因(PR2)的保守序列设计简并引物, 从海岛棉品种海 7124 基因组中成功分离了 79 条核苷酸结合位点(NBS, nucleotide binding site)类 R 基因类似物(RGAs, resistance gene analogs), 21 条丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STK, Serine/Threonine kinase)类 RGAs 和 11 条防卫基因类似物(DGAs, defense gene analogs)。将 NBS 类 RGAs 与棉花中已经克隆的该类 RGAs 进行序列分析, 鉴定了 1 个新的亚族。具有连续 ORF 的 48 条 NBS 类 RGAs 和 20 条 STK 类 RGAs 分别可以划分为 TIR-NBS 与 non-TIR-NBS 两个亚类和 A 与 B 两个亚类。DGA 中有 4 条具有连续的 ORF。对这些具有连续 ORF 的序列进行表达分析发现, 6 条 NBS 类与 1 条 STK 类 RGA 受黄萎病菌诱导表达, 1 条 DGA 经黄萎病菌诱导后表达量明显提高。随机选取的 4 条 TIR 类与 4 条 non-TIR 类 NBS 类 RGAs 中有 3 条呈现 2~3 条杂交带, 其余的都有 5~10 条或以上的杂交带。可见, NBS 类 RGAs 大多数以多基因家族的形式存在。另外, 有 3 条 non-TIR 类 NBS 类 RGAs 出现了一样的杂交带型, 可能这 3 条 RGAs 在基因组中成簇分布。

**关键词** 棉花 抗病基因类似物 防卫基因类似物

植物在自然环境中承受各种病原物的威胁, 如病毒、细菌、真菌、线虫、原生动物和寄生虫等。在长期的进化中, 植物与病原物协同进化, 表现为亲和与不亲和两种关系。植物与病原物的不亲和表现为抗病, 这涉及到一系列复杂的信号传导途径。该途径主要由两类基因控制, 即抗病基因(resistance-gene, R

基因)和防卫基因(defense gene, D 基因)。

截至 2004 年, 利用转座子标签法和图位克隆等方法已从不同作物中克隆了将近 50 个 R 基因<sup>[1]</sup>。对这些 R 基因序列分析发现, 来源于不同作物、抗不同病原物的 R 基因在预测的氨基酸水平上存在几个保守的结构域, 根据这些保守结构域可以将 R 基因分为以下

收稿日期: 2005-09-30; 接受日期: 2005-11-21

\* 国家自然科学基金(批准号: 30270806 和 30370899)、长江学者和创新团队发展计划资助项目

\*\* 联系人, E-mail: [cotton@njau.edu.cn](mailto:cotton@njau.edu.cn)

几类<sup>[2~4]</sup>: 编码含核苷酸结合位点和富含亮氨酸重复位点(NBS-LRR, nucleotide binding site and leucine-rich); 编码含丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STK, Serine/Threonine kinase); 编码含胞质外亮氨酸重复(eLRR, extracytoplasmic leucine-rich repeats)和一个C端膜定位信号等。其中, NBS类R基因根据N端有无果蝇Toll蛋白及哺乳动物白介素-1受体蛋白(TIR, Toll/Interleukin-1 receptor)功能域又可分为: TIR-NBS-LRR与non-TIR-NBS-LRR两类。在已克隆R基因中含有NBS结构域的占71%<sup>[1]</sup>。NBS与STK等结构域对R基因与无毒基因的识别及随后的防卫反应起着关键作用<sup>[5]</sup>。

R基因产物与无毒基因产物识别后激发一系列的信号传导反应, 在这个信号途径中D基因起着关键作用, 它们可阻碍病原物在植物体内生长、运输和繁殖。根据生物学特征, 病程相关蛋白(PR蛋白, pathogenesis-related proteins)可分为以下几类<sup>[6,7]</sup>: 葡聚糖酶、几丁质酶、过氧化物酶等。葡聚糖酶和几丁质酶可以降解真菌细胞壁结构多糖, 使病原物死亡, 而且产生的细胞碎片具有诱导寄主产生抗性的作用<sup>[8~10]</sup>。葡聚糖酶和几丁质酶不仅参与植物的局部诱导抗性, 还参与植物的系统诱导抗性, 这种抗性在植物再次被感染时, 不仅对与初次感染相同的病原物表现抗性, 而且往往对其他类型的病原物也起作用。过氧化物酶可能通过对被病原物感染组织细胞壁酚类残基的氧化阻止病原物的扩散。

利用PCR方法克隆具有某些保守结构域的基因是一种简便、快捷且有效的手段。尤其对于基因组比较复杂, 难以利用转座子标签法与图位克隆进行基因克隆的作物, 这种方法就显得更为重要。R基因与D基因具有保守结构域, 利用这些结构域中的保守序列设计简并引物可能扩增得到R基因类似物(RGAs, resistance gene analogs)与防卫基因类似物(DGAs, defense gene analogs)。这些片段可能是R基因与D基因的部分序列或者可能与R基因与D基因连锁<sup>[11~15]</sup>。

棉花是重要的经济作物, 棉纤维是主要的纺织原料。而棉花的病害比较多, 在我国枯萎病、黄萎病尤其严重, 给棉花生产造成很大的损失。实践证明, 种植抗病品种是防治病害的最经济有效的方法。陆

地棉是我国棉花的主栽品种, 陆地棉抗枯萎病育种非常成功, 但黄萎病抗病品种的培育一直是育种家的一大难题, 主要原因在陆地棉中找不到免疫或高抗的黄萎病抗源。根据其他作物中克隆的R基因与D基因的信息, 分离鉴定棉花RGAs与DGAs, 有助于直接克隆或开发与棉花R基因紧密连锁的标记, 定位、克隆R基因, 为培育抗病品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 DNA与RNA的提取

本试验选用我国遗传研究和育种广泛利用的抗黄萎病品种海岛棉海7124(*G. barbadense* L. cv. Hai7124)为材料克隆RGAs和DGAs。采用CTAB法<sup>[16]</sup>从新鲜幼嫩的叶片提取DNA。将生长至2叶1心的幼苗用塑料营养钵底部定量注菌液法<sup>[17]</sup>接菌黄萎病菌VD8, 以接菌后0, 24, 48, 96, 144 h的根为材料, 用改进的热硼酸法<sup>[18]</sup>提取总RNA。

### 1.2 引物设计与PCR扩增

根据已克隆R基因与病程相关蛋白基因β-1,3-葡聚糖酶基因(PR2)的保守域设计引物(表1), 其中Y782F与Y782R为本实验用Primer 5软件设计, 其余引自文献[11,19~25]。无扩增产物、单引物扩增产物以及扩增产物测序结果与RGAs无关的引物没有列出。扩增NBS类RGAs所用的正反向引物分别根据已克隆NBS类R基因的P-loop与Hydrophobic domain两个结构域设计, 其产物大小为500 bp左右; 扩增STK类RGAs引物根据保守基元I, II, VII和IX设计, 产物为500 bp左右; 扩增DGAs的Glu-S, Glu-AS引物组合预期扩增产物为700 bp左右。PCR反应总体系为30 μL, 包括1×反应缓冲液, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 ng模板DNA, 正反引物各1 μmol/L, 2 U Taq DNA聚合酶。反应在PTC-200(MJ Research, USA)上进行。扩增条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 50~55℃复性1 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 最后72℃延伸7 min。

### 1.3 扩增产物的电泳、回收、克隆及测序

PCR扩增产物经1.5%的琼脂糖电泳分离, 片段回收采用DNA Gel Extraction Kit(V-gene)试剂盒。回

表1 扩增棉花RGAs或DGAs所用引物<sup>a)</sup>

类别	引物	序列(5'-3')	保守氨基酸模体	参考文献
<b>抗病基因类似物(RGAs)</b>				
NBS类				
Y782(F)	ATGGGNGGNATYGGNAARAC	P-loop		本研究
Y782(R)	ATDGCNARDGGSAGNNCC	Hydrophobic domain		
P-loop2(F)	GGNGGNRTNGGNAAAACAAC	GGV/I/MGKTT(P-loop)		[19]
P-loop3(F)	GGNGGNRTNGGAAGACGAC	GGV/I/MGKTT(P-loop)		
P-loop5(F)	GGNGGNRTNGGAARACCAC	GGV/I/MGKTT(P-loop)		
GLPL3(R)	CAANGCCAANGCAANCC	GL/PFL/FAL/V( Hydrophobic domain )		
S1(F)	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG	GGV/IGKTT (P-loop)		[20]
AS1(R)	CAACGCTAGTGGCAATCC	GPLA/TL( Hydrophobic domain )		
Gkt1(F)	GGNGTNGGNAARACCNAC	GGVGKTT(P-loop)		[21]
Pal2(R)	ARIGCTARIIGGIARICC	GLPL(S/A)L		
Gkt2(F)	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	GGV/IGKTT (P-loop)		
Dmg1(R)	AAGATCTCGTCCCATATC	DMGRDL		
F5	GGNGTNGGAAGACAAC	GVGKTT		[22]
F12	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC	GMGGVGKT		
F13	GGTGGGGTWGGKAARACNAC	GGVGKTT		
F14	GGNATGGGNGNNNTNGGNAARACNAC	GMGGVGKTT		
R6	GAANGCCAANGCAAACC	GPLAL		
R9	NACYTTNAGNGCNAGNGGNCC	GLPLALKV		
STK类				
P3(F)	TNGGNSANGNGKNTTYGG	STK subdomain II		[23]
P2(R)	ACNCCRAANGARTANACRTC	STK subdomain IX		
D(F)	GGIGGITYGGIATHGTITWYAARGG	STK subdomain I		[24]
D(R)	ARIARYTTIGCIARICCRAARTC	STK subdomain VII		
<b>防卫基因类似物(DGA)</b>				
Glu-S(F)	RYNGGWGTWTGYTAYGG	LGVCYG		[11]
Glu-AS(R)	CADCCRCTYTCNGAYAC	VSESGW		
Y91(F)	TTTTAACGCCGCAATGA			[25]
Y91(R)	CAGAAAGCAATGGTGGGAAT			

a) F为正向引物; R为反向引物. N=A/G/C/T; Y=C/T; R=A/G; D=A/G/T; S=C/G; W=A/T; K=G/T; I为次黄嘌呤; 实线间的正反引物可以随机组合

收产物用 pGEM-T easy Vector System(Promega)连接过夜, 42 热击法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 与 X-gal 和 IPTG一同涂于含氨苄青霉素的 LB 平板. 37 培养 12~16 h 左右, 挑取白色克隆, 接菌于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基振荡培养 12 h 左右. T7 和 SP6 通用引物 PCR 检测是否有插入片段, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序.

#### 1.4 序列分析与进化树的构建

测序结果用 DNAstar 软件手工去除载体序列, 将所得序列在 GenBank 中用 BLASTx 搜索蛋白质数据库; 搜索不到同源的抗性基因或其类似物时, 再用 BLASTn 搜索核酸数据库. 用 Clustal X 软件对获得的棉花 RGAs 进行多序列比对, 采用默认设置, 并绘制

Bootstrap N-J 树(1000 次重复). 利用 NCBI 中的 ORF finder 程序对本试验克隆的序列进行开放阅读框寻找, 如果是通读的 ORF, 用 DNAstar 将其翻译成氨基酸序列. 用 Clustal X 软件对通读 RGAs 预测的氨基酸序列进行多序列比对. 利用 GeneDoc 软件对比对结果进行编辑, 分析保守基元. 利用 MEGE3 对构建的 N-J 树进行编辑.

#### 1.5 Southern 杂交分析

参考文献[26]与地高辛标记与检测试剂盒说明(Roche, 德国)进行 Sourthern 杂交.

#### 1.6 引物合成及主要试剂

引物由上海英俊生物技术有限公司合成. *Taq*

DNA聚合酶与RNA反转录试剂盒购于大连宝生物工程(大连)有限公司。DNA胶回收试剂盒购于杭州维特洁生化技术有限公司。限制性内切酶购于美国New England Biolabs。地高辛标记与检测试剂盒购于德国Roche。其他用到的一般试剂均购于上海生工生物工程技术有限公司。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花RGAs与DGAs的克隆鉴定

利用表1的引物组合,以海岛棉抗病品种海7124基因组DNA为模板扩增棉花RGAs与DGAs。虽然有些引物出现一些弥散,大多有一条明显的目标带(图1(a))。此外,当用简并引物进行PCR扩增时,有时会有与预期带大小一致的单引物扩增产物(图1(b))。故分别设正反单引物两个对照,只有两条单引物均无扩增产物或与预期产物大小不一致,而正反引物组合扩增出的预期大小的产物才回收测序。

对于每条回收片段最少选取5个阳性克隆进行测序,共测序277个阳性克隆。将测序结果提交到NCBI,用BLAST程序进行同源性搜索发现,79条序列与NBS类R基因有较高的同源性,21条与激酶类R基因或相关蛋白具有同源性,11条与病程相关蛋白有关。

### 2.2 棉花RGAs与DGAs的序列分析

(1) 棉花NBS类RGAs的序列分析:利用PCR方法克隆的棉花NBS类RGAs已有143条<sup>[22,27~29]</sup>。本研究鉴定了79条新的NBS类RGAs,其中13条与棉花中已报道的NBS类RGAs不存在同源性,其余的

与已知的棉花RGAs有85%~99%的同源性。将所有这些棉花RGAs进行聚类分析发现,根据进化距离可分为10个大的亚类,最小的亚类只有1条序列,最多的有67个成员,有1个亚类的成员全部由本研究克隆的5条序列(L500, L501, L502, L518和L519)组成(Bootstrap值为1000),其他还有5个亚类含有本研究获得的序列(结果未列出)。

79条NBS类RGAs中48条具有通读的ORF,BLASTx显示与木薯、大豆、可可和咖啡等的抗性蛋白的同源性为61%~79%;与烟草*N*、番茄*I2*、拟南芥*RPS2*和*RPP5*以及亚麻*M*等R基因的同源性从53%到66%,这48条序列氨基酸序列相似性为15%~100%。对这些序列进行聚类分析(图2),20条与TIR-NBS类R基因烟草*N*、亚麻*L6*与*M*、拟南芥*RPPI*与*RPP5*聚为一类,其余28条与non-TIR-NBS类R基因水稻*XAI*、番茄*MI-1*以及拟南芥*RPS2*与*RPMI*聚为一类。这与Meyers等人<sup>[30]</sup>和涂礼莉等人<sup>[22]</sup>的结果“双子叶植物中存在TIR与non-TIR两类NBS类RGAs”相符。

Traut<sup>[31]</sup>1994年鉴定了核苷酸结合位点的两个保守基元P-loop与Kinase-2; Meyers等人<sup>[30]</sup>1999年通过对拟南芥、水稻、小麦、玉米和大豆等26个不同作物已克隆的R基因及与R基因同源的BAC序列、EST和PCR方法克隆的RGAs等481条序列的分析,鉴定了RNBS-A、RNBS-B和RNBS-C等NBS区保守基元,同时,发现TIR类与non-TIR类R基因或RGAs的RNBS-A在序列上明显不同。TIR类中RNBS-A保守序列为FLENIRExSKKHGLEHLQKLLSKLL,而在non-TIR类中RNBS-A的保守序列为FDLxAWV-

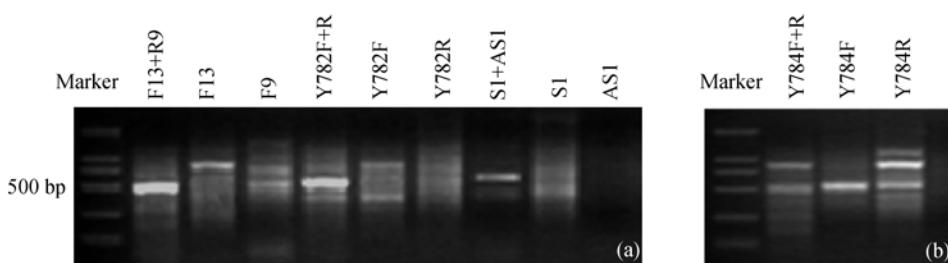


图1 棉花RGAs的PCR扩增

每3个泳道依次为:正反引物组合,正向单引物,反向单引物。(a)正反引物扩增呈阳性且与单引物扩增产物大小不同或者单引物扩增无产物的组合;(b)正反引物扩增呈阳性但产物大小与正向或反向单引物产物一致的组合

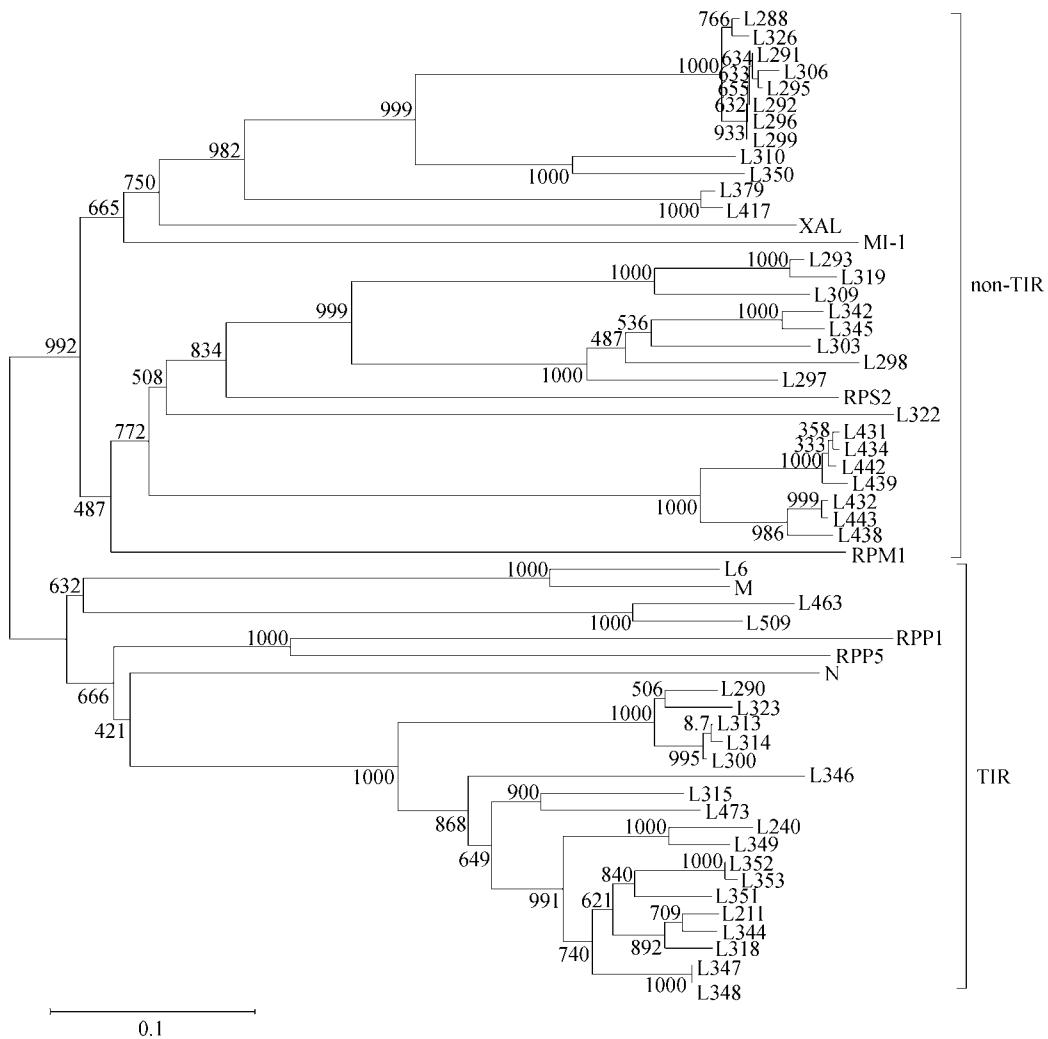


图2 NBS类RGAs氨基酸序列与已克隆R基因的进化树分析

已克隆的R基因有拟南芥的RPS2, PRM1, RPP1和RPP5, 番茄的MI-1, 水稻的XAL, 亚麻的L6与M, 以及烟草的N. 枝条上的数值示Bootstrap值

CVSQxF。根据这两个保守基元可以很清楚地区分这两类NBS类RGAs。分别对棉花TIR与non-TIR两类RGAs进行多序列比对, 各鉴定出6个保守基元(图3)。棉花TIR类RGAs的一致序列是: FL/IADI/VxxKC/HGLVS/CLQKQLLSQIF/L; non-TIR类RGAs的一致序列是: FDS/IV/KxW/IA/VC/TVS/TE/QxF/I, 这两类RGAs特有序列的鉴定可为棉花R基因及其类似物的分类提供依据。除了这6个保守基元外, 棉花NBS类RGAs其他区域也表现了较高序列相似性。

## (2) 棉花STK类RGAs的序列分析: 利用P3与

P2和DF与DR两对引物组合分离到21条棉花STK类RGAs。BLASTx同源性搜索匹配最好的是L444和L455, 它们与大豆受体类似蛋白激酶3均有95%的序列一致性, 同源性达到98%与97%; 同源性最低的是L457与L466, 与这两条序列匹配最好的序列为水稻受体丝氨酸苏氨酸激酶与蛋白激酶Xa21, 序列一致性均为57%, 序列相似性分别为80%和78%。可见, 双子叶作物间的STK类RGAs存在较高的同源性。21条STK类RGAs中20条具有通读的ORF, 与GenBank中激酶类蛋白的同源性为74%~98%。棉花STK类RGAs的氨基酸之间的相似性为35.7%~99.3%。



将 20 条具有连续 ORF 的序列翻译成氨基酸，并与番茄、水稻丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和大豆、水稻的受体类似蛋白激酶构建进化树(图 4)。STK 类 RGAs 可分为两个亚类，A 亚类包括 10 条棉花 STK 类 RGAs，水稻的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和番茄的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶；B 亚类包括 10 条棉花 STK 类 RGAs 和大豆的受体类似蛋白激酶 3。B 亚类中 L444 和 L455 与大豆蛋白激酶 3 序列遗传距离最近，这与 BLAST 搜索结果相符。

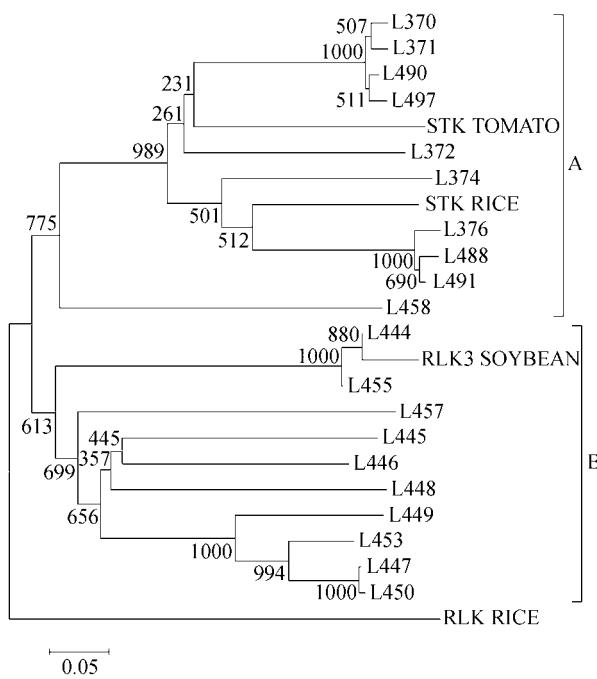


图 4 棉花 STK 类 RGAs 的聚类分析

STK TOMATO 与 STK RICE 分别示番茄与水稻丝氨酸苏氨酸蛋白激酶；RLK3 SOYBEAN 与 RLK RICE 分别示大豆与水稻的受体类似蛋白激酶；枝条上的数值示 Bootstrap 值

将 20 条具有连续 ORF 棉花 STK 类 RGAs 的氨基酸序列与番茄的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶与水稻的受体类似蛋白激酶进行多序列比对，鉴定了 I~VIII 共 9 个 STK 类 R 基因的保守基元(图 5)。

(3) 棉花DGAs的序列分析：11 条DGAs 中 L20, L268 和 L269 的前 265 个碱基与棉花黄萎病诱导表达的病程相关基因序列<sup>[32]</sup>具有 98%~100% 的同源性，但数据库中的序列只是这 3 条序列的一部分。BLASTx

分析表明 L279 与豇豆蛋白酶抑制剂 60 个氨基酸序列有 100% 的同源性，BLASTn 结果发现其与棉花叶卷病基因有 276 个碱基 100% 一致。L354, L359 和 L361 与柑橘 β-1,3-葡聚糖酶具有 85% 的同源性，L362 与柑橘 β-1,3-葡聚糖酶具有 86% 的同源性，L355 与三叶胶的 β-1,3-葡聚糖酶具有 81% 的同源性，L356 和 L363 与 β-葡聚糖酶前体有较高的同源性。这 11 条 DGAs 中 L354, L355, L361 和 L362 具有通读的 ORF。

将具有通读 ORF 的四条序列翻译成氨基酸与柑橘和三叶胶的 β-1,3-葡聚糖酶进行多序列比对(图 6)。L354, L355, L361 与 L362 间的同源性为 56.4%~98.7%，而且它们和柑橘、三叶胶的 β-1,3-葡聚糖酶之间表现出很高的同源性。

### 2.3 棉花 NBS 类 RGAs 的基因组杂交

植物中的 NBS 类基因常以多基因家族的形式存在，多成簇分布在染色体上。为了研究 NBS 类 RGAs 基因家族的大小，我们从 TIR 类与 non-TIR 类中分别选取 4 个克隆做探针与不同酶切的海 7124 基因组进行杂交(图 7)。TIR 类中 L326 与 L379 分别有 3 个拷贝，non-TIR 类中 L314 中有 2 个拷贝，其余的 NBS 类 RGAs 都有 5~10 个拷贝，由此可见棉花 NBS 类 RGAs 大都以多基因家族的形式存在。non-TIR 类中 L344, L346 和 L473 有相同的杂交带型，因此可以推测它们在染色体上呈串联排列。

### 2.4 棉花 RGAs 与 DGAs 的表达分析

棉花黄萎病是目前还难以防治的一种病害。海 7124 是公认的抗黄萎病的品种。为了鉴定与抗黄萎病相关的 RGAs，用具有连续 ORF 的 48 条 NBS 类与 20 条 STK 类 RGAs 以及 4 条 DGAs 设计特异引物(未列出)，以接菌黄萎病菌后 0, 24, 48, 96, 144 h 棉花根为材料对这些 RGAs 与 DGAs 进行表达分析。研究发现，有 6 条 NBS 类与 1 条 STK 类棉花 RGA 的表达受黄萎病菌的诱导，1 条 DGA 的表达受黄萎病菌的上调(8 条基因的 RT 引物见表 2)。它们的表达模式如图 8 所示：7 个 RGAs 在未接菌时都不表达；L290 在接菌后 24 和 48 h 表达；L296 随着接种时间的推移表达量增加；L297 和 L298 表达模式一致，在接菌后

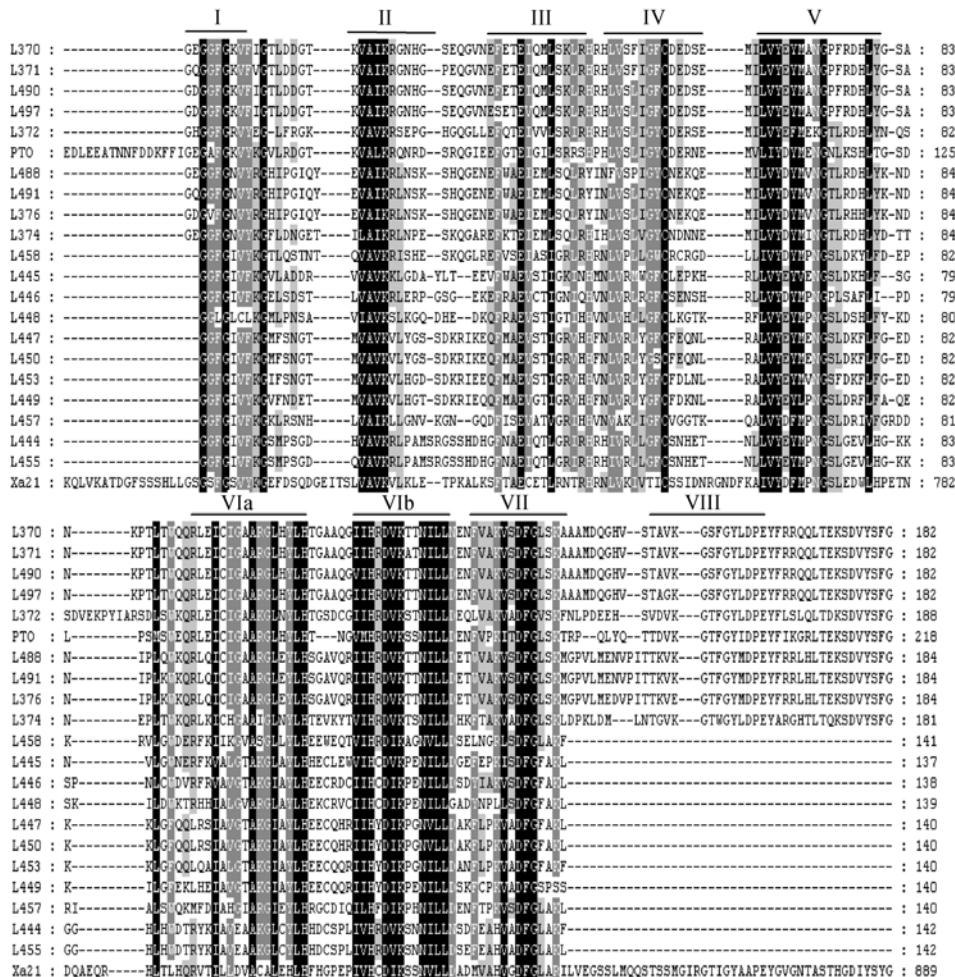


图 5 棉花 STK 类 RGAs 预测的氨基酸多序列比对与保守基元分析

图 6 棉花 DGAs 翻译的氨基酸与柑橘、三叶胶  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的多序列比对

表 2 受黄萎病诱导表达的 8 个棉花 RGAs 或 DGAs RT 引物

序列编号	F (5'-3')	R (5'-3')
L290	GGTGGGGTAGGTAAGACAAC	CCATTGGCATATTCCACTAC
L296	GGTGGGGTTGGTAAGACA	TAAGAGCAAGTGGGAGGC
L297	CAAGCTCAGCACACACCG	AACCTTCAGAGCAGGGGG
L298	TCAGCGCAGAGAGAAC	GTTGTATCTGGCGGTG
L309	AACGACCCCTCTAGCCA	GGGAAACGGAGTTCAA
L347	ATGGGGGAATTGGAAAAA	AGCCCACAGCATAATT
L447	GAAGAGCAGTTCATGGCGGA	ACAAAGCTGGCTAATCCGA
L355	TGAAGTCCCTCCATCATCT	CCGAGTATAACGAATCCAAC

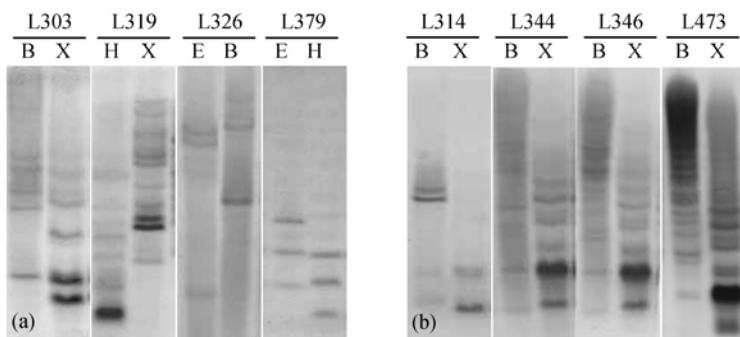


图 7 部分 NBS 类 RGA 的基因组杂交

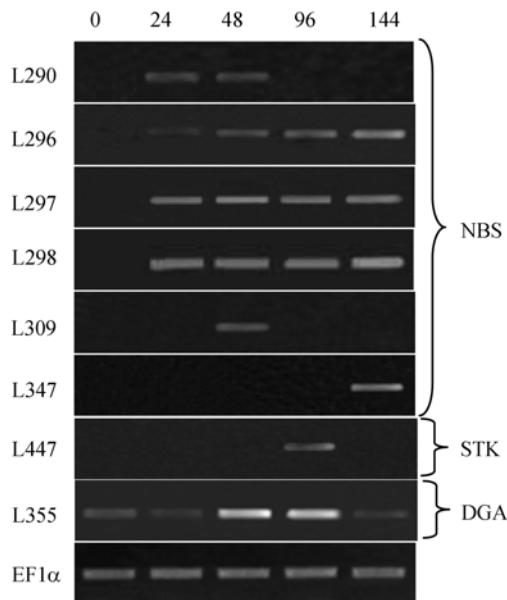
(a) TIR 类 RGA; (b) non-TIR 类 RGA. B 示 *Bam*H I; H 示 *Hind* III; E 示 *Eco*R I; X 示 *Xba* I

图 8 棉花 RGAs 与 DGAs 的 RT-PCR

EF1 $\alpha$  为棉花组成性表达基因, 0~144 示接菌后 0~144 h

24~144 h 表达量无变化; L309, L347 和 L447 分别在接菌后 48, 96 和 144 h 表达; 1 条 DGA(L355) 在接菌后 48 和 96 h 表达量急剧上调。由于所研究的 RGAs 有无内含子还不确定, 没有检测到表达的序列也不能肯定其表达就不受黄萎病的诱导, 有些 RGAs 可能是由于所设引物处于内含子的位置而无扩增产物。

### 3 讨论

#### 3.1 棉花 RGAs 与 DGAs 的分离及相关分析

利用 PCR 方法克隆植物 RGAs 与 DGAs 比转座

子标签和图位克隆法更简便, 从而引起广大研究者的重视。然而, 本试验表明由于利用该方法时所用引物多为简并引物, 有时会有单引物扩增产物干扰, 尤其对于像棉花这类具有不同基因组的多倍体植物。因此, 我们分别设正反两个单引物对照, 从而有效地排除了这种干扰。

NBS 类基因在基因组中占有很大比例, 如拟南芥基因组中有大约 150 个编码 NBS 的基因, 占所有预测 ORF 的 0.5%<sup>[3,33]</sup>; 在水稻中大约有 600 个 NBS 类基因, 占所有预测基因的 1.5%<sup>[30,34]</sup>。棉花中已经克隆的 NBS 类 RGAs 有 143 条, 而本研究克隆了 79 条新的 NBS 类 RGAs。对所有棉花 NBS 类 RGAs 核苷酸聚类发现, 其中有 1 个亚类全是由本研究所分离的序列组成, 另外还有 5 个亚类含有本研究分离的序列, 这不仅丰富了棉花 NBS 类 RGAs 的数量, 同时也丰富了其类型。本实验鉴定的新亚类, 全部是由引物组合 P-loop3(F) 与 GPL3(R) 分离到的。P-loop3(F) 比 P-loop5(F) 简并性有所降低, 与 P-loop2(F) 的区别是 3' 端第 3 和第 5 个碱基由 A 变为 G。可见, 利用多条简并性低的引物比用一条简并性高的引物更容易获得多样化的产物。

植物受体类似蛋白激酶参与了广泛的信号途径, 包括分生组织的生长、叶片的生长、调节脱落及自交不亲和与油菜素类固醇信号, 另外还参与了防卫反应。在已克隆的 R 基因中有 5 个属于蛋白激酶类, 而棉花中还没有有关这类序列的报道。我们分离了 21 条预测的 STK 类 RGAs, 这些序列都与受体蛋白激酶有 74% 以上的同源性, 其中与大豆蛋白激酶 3 同源性

高达 98%。对其中具有连续ORF的 20 个序列进行氨基酸分析，鉴定了 2 个亚族，其中有 1 个亚族包含了大豆受体类似蛋白，而番茄丝氨酸苏氨酸蛋白激酶聚到另外的亚族中。可见，双子叶植物间的STK类基因既有其保守性，也存在多样性。所有这些棉花STK类RGAs含有I~VIII 9 个保守特征序列。我们还发现了 1 条受黄萎病诱导的STK类RGA。小麦<sup>[35]</sup>、大豆<sup>[36]</sup>、葡萄<sup>[37]</sup>和可可<sup>[38]</sup>等植物中已成功分离与定位了 *Pto*类似RGAs与受体类似蛋白激酶RGAs。本研究表明利用PCR方法分离棉花STK类RGAs也是一条有效的途径。

D基因在病原物侵染后寄主的信号传导途径中起着重要的作用。一些防卫反应如超敏反应过程中会产生一些寄主编码的阻碍病原物运输、繁殖等的物质，如葡聚糖酶、几丁质酶和过氧化物酶等病程相关蛋白。根据PR2保守基元设计简并引物并成功分离了 11 条与PR高度同源的棉花DGAs，其中L279 有一部分序列与棉花叶卷病毒基因的部分序列 100%一致。同样的结果在本实验室已经出现过(未发表)，这种现象是否是由于植物在长期与病毒进化的过程中协同进化的结果还有待实验证明。在 4 条与β-1,3-葡聚糖酶同源且具有连续ORF的序列中，L355 受黄萎病诱导表达量在接菌后 48 和 96 h两个时期急剧上升。Zhen等人<sup>[39]</sup>用水杨酸与黄萎病菌同时处理抗黄萎病和感黄萎病的棉花品种，发现水杨酸诱导的抗性品种中β-1,3-葡聚糖酶的含量要高于感性品种。可见，β-1,3-葡聚糖酶与棉花黄萎病抗性可能有直接的关系。

### 3.2 棉花NBS类RGAs在基因组中的分布

植物功能相关但序列高度歧化的抗性基因或其类似物常成簇排列在植物基因组上<sup>[40]</sup>。我们对部分NBS类RGAs基因家族成员进行分析发现，3 条non-TIR-NBS类RGAs与基因组杂交出现了相同的带型，可能这些序列在基因组上成簇分布，并具有相似的功能。在被分析的 8 条序列中，5 条有 5 个以上的家族成员。这可能是由于在长期的协同进化过程中，抗性位点必须保持多样化以适应病原物的多变性。此外，我们还鉴定了 6 条受棉花黄萎病菌诱导的NBS类

RGAs，这些RGAs很有可能与黄萎病抗性有直接的关系(有待进一步的实验证明)。

### 3.3 植物RGAs和DGAs与抗性位点的关系

利用PCR法分离RGAs的一个最直接的用途是对这些序列进行定位。在其他作物中已经有很多将RGAs定位到抗性位点附近的例子，如 3 个RGAs与小麦条锈病抗性基因共分离<sup>[41]</sup>，在大麦条锈病抗性位点 *Rph4*, *Rph7* 和 *Rph10* 附近定位了多个RGAs<sup>[42]</sup>，向日葵的non-TIR-NBS类RGAs与抗霜霉病位点 *P15/P18* 连锁<sup>[43]</sup>。He等人<sup>[29]</sup>将克隆到的 15 个棉花NBS类RGAs定位到棉花 7 个染色体或连锁群上；Hinchliffe等人<sup>[27]</sup>将 9 个RGAs亚群定位到棉花的两个部分同源染色体 12 和 26 上，其中 6 个位于 12 染色体的 25.6 cM 内，3 个位于 26 染色体的 40.5 cM 内。棉花中还没有R基因被定位，所以无法判断这些片段是否与抗病位点连锁，但增加RGAs的数量可以增加找到与某个抗性有关的标记或QTL的可能性。

培育抗黄萎病材料是育种工作者梦寐以求的事情，随着分离 RGAs 与 DGAs 数量的巨增，一定能够找到抗性的标记，以利用分子标记辅助育种或基因工程手段来快速培育抗性材料。

## 参 考 文 献

- 1 Dilbiligi M, Eryman M, Sandhu D, Sidhu D, Gill K S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes. *Genetics*, 2004, 166: 461~481 [[DOI](#)]
- 2 McDowell J M, Woffenden B J. Plant disease resistance genes: Recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(4): 178~183 [[DOI](#)]
- 3 Dangl J L, Jones J D G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 2001, 411: 826~833 [[DOI](#)]
- 4 Jones J D G. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 281~287 [[DOI](#)]
- 5 Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe D C. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J*, 2002, 32: 195~204 [[DOI](#)]
- 6 Lamb C J, Lawton M A, Dron M, Dixon R A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell*, 1989, 56(2): 215~224 [[DOI](#)]
- 7 Hammond-Kosack K E, Jones J D G. Resistant gene-dependent plant defense response. *Plant Cell*, 1996, 8: 1773~1791 [[DOI](#)]

- 8 Collinge D B, Slusarenko A J. Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Mol Biol*, 1987, 4: 389~410[\[DOI\]](#)
- 9 Cramer C L, Bell J N, Ryder T B, Bailey J A, Schuch W, Bolwell G P, Robbins M P, Dixon R A, Lamb C J. Co-ordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *EMBO J*, 1985, 4: 285~289
- 10 Ham K-S, Kauffmann S, Albersheim P, Darvill A G. Host-pathogen interaction. XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with  $\beta$ -1,3-glucanase activity release phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. *Mol Plant Microbe Interact*, 1991, 4: 545~552
- 11 Pflieger S, Palloix A, Caranta C, Blattes A, Lefebvre V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 920~929[\[DOI\]](#)
- 12 Chen X, Soria M A, Yan G, Sun J, Dubcovsky J. Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene *Yr5*. *Crop Sci*, 2003, 43(6): 2058~2064
- 13 Shi Z X, Chen X M, Line R F, Leung H, Wellings C R. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust. *Genome*, 2001, 44(4): 509~516[\[DOI\]](#)
- 14 Radwan O, Bouzidi M F, Nicolas P, Mouzeyar S. Development of PCR markers for the *Pl5/Pl8* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 176~185[\[DOI\]](#)
- 15 Zhang Z Z, Xu J S, Xu Q J, Larkin P, Xin Z Y. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 433~439
- 16 Paterson A H, Lander E S, Hewitt J D. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium spp.*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122~127
- 17 马峙英, 王省芬, 张桂寅, 刘叔倩, 孙济中, 刘金兰. 不同来源海岛棉品种黄萎病抗性遗传研究. *作物学报*, 2000, 26(3): 315~321
- 18 Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem*, 1994, 223: 7~12[\[DOI\]](#)
- 19 Noir S, Combes M C, Anthony F, Lashermes P. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol Gen Genomics*, 2001, 265: 654~662[\[DOI\]](#)
- 20 Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet*, 1996, 14: 421~429[\[DOI\]](#)
- 21 Liu J J, Ekramoddoullah A K M. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.). *Mol Gen Genomics*, 2003, 270: 432~441[\[DOI\]](#)
- 22 涂礼莉, 张献龙, 朱龙付, 聂以春, 郭小平. 海岛棉NBS类型抗病基因类似物的起源、多样性及进化. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1071~1077
- 23 Vallad G, Rivkin M, Vallejos C, McClean P. Cloning and homology modelling of a *Pto*-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 1046~1058[\[DOI\]](#)
- 24 Pflieger S, Lefebvre V, Caranta C, Blattes A, Goffinet B, Palloix A. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome*, 1999, 42(6): 1100~1110[\[DOI\]](#)
- 25 Pfaff T, Kahl G. Mapping of gene-specific markers on the genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol Gen Genomics*, 2003, 269: 243~251
- 26 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis F. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 27 Hincliffe D J, Lu Y Z, Potenza C, Segupta-Gopalan C, Roy G C, Zhang J F. Resistance gene analogue markers are mapped to homeologous chromosomes in cultivated tetraploid cotton. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 1074~1085[\[DOI\]](#)
- 28 Tan H, Callahan F E, Zhang X D, Karaca M, Saha S, Jenkins J N, Creech R G, Ma D P. Identification of resistance gene analogs in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 2003, 134: 1~7[\[DOI\]](#)
- 29 He L M, Du C G, Covaleda L, Xu Z, Robinson A F, Yu J Z, Kohel R J, Zhang H B. Cloning, characterization, and evolution of the NBS-LRR-Encoding resistance gene analogue family in polyploid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17(11): 1234~1241
- 30 Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, Sivaramakrishnan S, Sobral B W, Young N D. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide binding superfamily. *Plant J*, 1999, 20: 317~332
- 31 Traut T W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding-sites. *Eur J Biochem*, 1994, 222(1): 9~19[\[DOI\]](#)
- 32 Mcfadden H G, Chapple R, Feyter R, Dennis E. Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiol Mol Plant P*, 2001, 58: 119~131[\[DOI\]](#)
- 33 Meyers B C, Kozik A, Griego A, Kuang H H, Michelmore R W. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 809~834[\[DOI\]](#)
- 34 Goff S A, Ricke D, Lan T H, Presting G, Wang R L, Dunn M, Glazebrook Jane, Sessions A, Paul O, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange M B, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J P, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S P, Colbert M, Sun W L, Chen L L, Cooper B, Park S, Wood T C,

- Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Saha Budhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, School T, Miller R M, Bhattacharjee S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinsom R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79~92[\[DOI\]](#)
- 35 Feuillet C, Reuzeau C, Kjellbom P, Keller B. Molecular characterization of a new type of receptor-like kinase (*wlrk*) gene family in wheat. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(6): 943~953[\[DOI\]](#)
- 36 Yamamoto E, Knap H T. Soybean receptor-like protein kinase genes: Paralogous divergence of a gene family. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(8): 1522~1531
- 37 Gaspero G D, Cipriani G. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, *Pto*-like and receptor-like kinase related to disease resistance in grapevine. *Mol Gen Genomics*, 2003, 269: 612~623[\[DOI\]](#)
- 38 Lanaud C, Risterucci A M, Pieretti I, N'Goran A K, Fargeas D. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Mol Breeding*, 2004, 13: 211~227[\[DOI\]](#)
- 39 Zhen X H, Li Y Z. Ultrastructural changes and location of  $\beta$ -1,3-glucanase in resistant and susceptible cotton callus cells in response to treatment with toxin of *Verticillium dahliae* and salicylic acid. *J Plant Physiol*, 2004, 161(12): 1367~1377[\[DOI\]](#)
- 40 Hulbert S H, Webb C A, Smith S M, Sun Q. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39: 285~312[\[DOI\]](#)
- 41 Yan G P, Chen X M, Line R F. Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 636~643
- 42 Collins N, Park R, Spielmeyer W, Ellis J, Pryor A J. Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance gene. *Genome*, 2001, 44(3): 375~381[\[DOI\]](#)
- 43 Radwan O, Bouzidi M F, Vear F, Philippon J, De Labrouhe D T, Nicolas P, Mouzeyar S. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the *Pl5/Pl8* locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1438~1446