

徐 丽,陈 新,魏海蓉,等. 核桃 NBS 类抗病基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):37-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.009

核桃 NBS 类抗病基因的克隆及序列分析

徐 丽,陈 新,魏海蓉,张力思,宗晓娟,王甲威,刘庆忠

(山东省果树研究所/山东省果树生物技术重点实验室,山东泰安 271000)

摘要:NBS-LRR 蛋白在植物抵御各种病原物的侵袭中发挥重要作用。利用 RT-PCR 技术以香玲核桃叶片为材料,克隆核桃核苷酸结合位点(nucleotide binding site,NBS)类抗病基因类似物(resistance gene analog,RGA),并对该基因和编码蛋白序列进行分析。结果表明,该序列长 512 bp,具有 NBS 的典型结构域。利用 DNAMAN 软件进行相似性比对发现该序列与其他植物的 NBS 具有较高的同源性。核桃 NBS 类基因的克隆为其进一步研究应用奠定了基础。

关键词:核桃;NBS-LRR;抗病基因;克隆;序列分析

中图分类号:Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0037-03

利用转座子标签法,Johal 等分离出第 1 个玉米抗圆斑病基因 *Hml*^[1],利用图位克隆法,Martin 等分离出第 2 个抗病基因 *Pto*^[2],现已至少分离出 70 多种抗病 *R* 基因。根据 *R* 基因保守结构域的不同,已克隆的 *R* 基因编码蛋白质可以分为五大类:STK、LRR-TM、NBS-LRR、LRR-TM-STK、毒素还原酶类 *R* 基因^[1,3-4]。其中,NBS-LRR 类 *R* 基因是一类具有核苷酸结合位点和富含亮氨酸重复基序的蛋白,广泛存在于植物的基因组中^[5]。如拟南芥中大约含有 150 个^[6],水稻基因组中含有 600 多个^[7]。这类蛋白常常与真菌或细菌病原的效应子进行结合,抑制病原在植物细胞中定植和扩展。NBS 区被认为是许多蛋白质执行功能的必需元件,与 ATP 和 GTP 的结合有关,而且它还具有激酶活性,可以激活其他功能蛋白。LRR 结构域则可能在蛋白质的相互作用中起重要作用,参与抗病反应的识别及识别后的抗病信号传导^[8]。

核桃(*Juglans regia*)是胡桃科胡桃属的植物,是具有很高经济价值的经济林树种^[9]。我国的核桃产量在世界上一直居于前列^[10],但由于核桃生产过程中的多种病虫害等生物因子影响了我国核桃产业的健康持续发展,使我国核桃出口量不断降低。随着核桃种植面积的不不断扩大,病害的发生也越来越严重,在病原菌发生较重的年份,可以造成核桃园大面积减产或地区性核桃绝收,经济损失惨重。本研究从香玲核桃叶片中克隆得到 NBS 类抗病基因,为进一步研究 NBS 蛋白功能并为核桃抗病品种的选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试核桃品种为香玲,保存在山东省果树研究所国家核

桃板栗资源圃。T₄DNA 连接酶、pMD18-T 载体、TaqDNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品;大肠杆菌 DH5a、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 TIANGEN 产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 核桃总 RNA 提取及 RT-PCR

采用北京天根 TIAN GEN RNA plant plus Reagent 试剂盒提取叶片总 RNA,用 DNase I (TaKaRa)消化去除 RNA 中的 DNA。参照 Fermentas 公司说明书,以 Oligo(dT)¹⁸ 为引物反转录合成 cDNA 第 1 链。根据 GenBank 中注册的核桃 NBS-LRR 类基因序列设计 1 对特异引物:JrNBSF: 5'-GGGGGGGTGGGGAAGACGACT-3' 和 JrNBSR: 5'-GAGGGCGAGGGGAGGCC-3'。以获得的反转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3 NBS 类基因的克隆

RT-PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段,连接 pMD18-T 载体、转化大肠杆菌 DH5a、筛选阳性克隆,菌落 PCR 鉴定后由上海生工生物有限公司测序。

1.4 NBS 类基因序列分析和同源性比较

用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLASTx 和 BLASTn 进行序列相似性分析;利用 DNAMAN 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 NBS 抗病基因序列的克隆及分析

以反转录 cDNA 为模板,JrNBSF 和 JrNBSR 为引物,进行 PCR 扩增。产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,在 500 bp 处出现特异性条带,片段大小与预测值基本一致(图 1),测序结果表明,该序列长 512 bp。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,其氨基酸序列与其他物种的 NBS 类抗病基因具有较高的相似性,其中与核桃(AFU49031.1)相似性最高,达到 98%,其次与碧桃(XP_007221584.1)、香瓜(AEV46158.1)和小扁豆(CAD56845.1)的同源性达到 49% 以上。

收稿日期:2014-07-08

基金项目:科技部科技基础平台项目(编号:2014-048);农业部种质资源保护与利用项目(编号:2014NWB009);中俄国际科技合作专项(编号:2012DFR30700)。

作者简介:徐 丽(1983—),女,山东曲阜人,博士,助理研究员,从事果树种质资源和分子生物技术研究。E-mail:xuli1245@163.com。

通信作者:刘庆忠,博士,研究员,从事果树生物技术与资源育种研究。Tel:(0538)8266631;E-mail:qzliu001@126.cn。

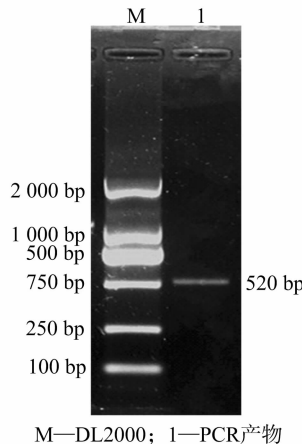
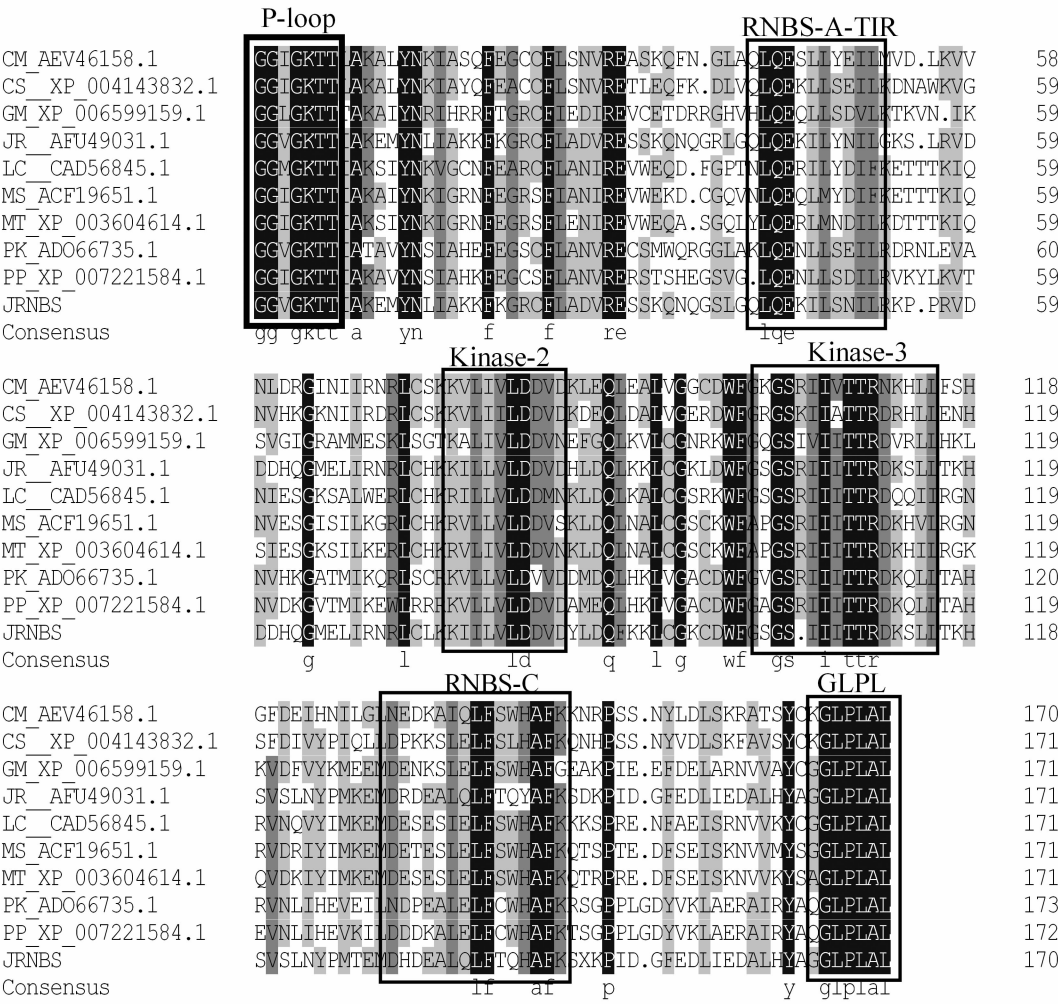


图1 PCR 产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果

2.2 氨基酸序列分析及系统进化树的构建

利用 DNAMAN 软件比较 NBS - LRR 类抗病基因的氨基酸同源性,结果表明,该 NBS 类抗病基因的氨基酸与数据库中不同物种的 NBS 具有较高的同源性,且都具有典型结构域如 P - loop (GG - GKTTL/TK)、kinase - 2 (RI/L - VLDDVD)、RNBS - A - TIR (LQE - ILSEI/VL)、kinase - 3 (WFG - GSR - TTR)、RNBS - C (IE/QLFSW/LHAF)、GLPL (GLPLAL) 等 (图 2)。分析核桃 NBS 类抗病基因的氨基酸系统发育树 (图 3) 发现,葫芦科的黄瓜和香瓜聚为一组;豆科的大豆、苜蓿和小扁豆聚为一组;蔷薇科的扁桃和甘肃桃聚为一组;香玲核桃与已报道核桃优系聚在一起。NBS 类抗病基因的氨基酸在这些物种之间的进化关系与这些物种在植物形态分类学上的地位一致,表明 NBS 类抗病基因的氨基酸在物种进化上的保守性。



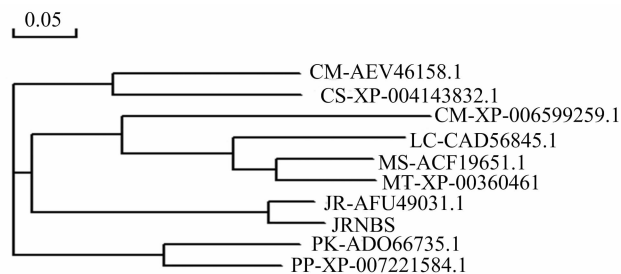
JR—核桃 (*Juglans regia*) ; PP—碧桃 (*Prunus persica*) ; CS—黄瓜 (*Cucumis sativus*) ; CM—香瓜 (*Cucumis melo*) ; GM—大豆 (*Glycine max*) ; MT—蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) ; MS—紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) ; LC—小扁豆 (*Lens culinaris*) ; PK—甘肃桃 (*Prunus kansuensis*)

图2 不同植物NBS-LRR类抗病基因编码氨基酸序列的同源性

3 结论与讨论

NBS - LRR 类抗病蛋白的典型特征是具有 1 个核苷酸结合位点 (NBS)、1 个富亮氨酸重复 (LRR) 和 N 端的一些结构

域。其中 NBS 结构域常被广泛地用于植物抗病基因的识别和分类,该区域包含一些非常保守的基序,如 P - loop、kinase - 2a、kinase - 3 和跨膜结构域 GLPL 等。NBS 结构域能够结合 ATP 或 GTP,可能参与抗病信号的传递,在植物抗病



注同图 2

图 3 不同植物中 NBS-LRR 基因序列的系统进化树

反应中起重要的作用^[11]。近年来,该类基因已在许多果树中克隆获得,如荔枝、龙眼、柚子、香蕉、梨、草莓和苹果等^[12-16]。本研究得到的香玲核桃 NBS 类抗病基因同源序列与多个物种的 *R* 基因具有较高的同源性,氨基酸结构分析表明,该序列含有 NBS 类抗病基因所特有的典型功能域 *P*-loop、kinase-2、kinase-3、GLPL 等结构域,初步推断该基因可能与核桃抗病性相关。该抗病基因的克隆可以为核桃分子育种提供基因资源,同时随着植物遗传转化技术的不断完善,进行抗病基因工程操作。

Meyers 等研究发现,双子叶植物中同时存在 TIR-NBS-LRR 和 non TIR-NBS-LRR 2 类抗病基因,并且 non TIR-NBS-LRR 类抗病基因中 Kinase-2 的共有序列可总结为 (Y/V)(L/V)(L/L/V)V(L/V)DD(L/V)W,最后一个氨基酸为天冬氨酸(D),而在 TIR-NBS-LRR 中 Kinase- 的共有序列可总结为 (V/L/I)(L/L/V)(L/L/V)V(L/L/V)DD(V/I)X,最后 1 个氨基酸为任意氨基酸,通常为色氨酸(W)。因此,在 Kinase-2 末端中,当最后一个氨基酸为色氨酸(W)时,该基因属于 non-TIR-NBS-LRR 类型;而当最后一个氨基酸为天冬氨酸(D)时,则该基因为 TIR-NBS-LRR 类抗病基因^[17]。氨基酸序列分析表明,本研究克隆得到的核桃 NBS 结构中,kinase-2(LLVLDDVW/D)最后一个氨基酸为天冬氨酸(D),推测所属基因为 TIR-NBS-LRR 类抗病基因,本结论符合 Meyers 的研究结果^[17]。

参考文献:

- [1] Johal G S, Briggs S P. Reductase activity encoded by the *Hml* disease resistance gene Inmaize[J]. Science, 1992, 258 (5084): 985-987.
- [2] Martin G B, Bogdanove A J, Sessa G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins[J]. Annual Review of Plant Biolo-

gy, 2003, 54: 23-61.

- [3] Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262 (5138): 1432-1436.
- [4] Yu Y G, Buss G R, Maroof M A. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 (21): 11751-11756.
- [5] Hommand-Kosack K E, Jones J D G. Plant disease resistance gene [J]. Annu Rev Plant Mol Biol, 1997, 48: 575-607.
- [6] Meyers B C, Kozik A, Griego A, et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2003, 15 (4): 809-834.
- [7] Monosi B, Wissner R J, Pennill L, et al. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice[J]. TAG. 2004, 109 (7): 1434-1447.
- [8] Tameling W L, Elzinga S J, Darmin P S, et al. The tomato *R* gene products *I*-2 and *Mi*-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity[J]. The Plant Cell, 2002, 14: 2929-2939.
- [9] 苏为耿, 陆斌, 刘金凤, 等. 短侧枝挂果核桃优良品种选择[J]. 广西林业科学, 2012, 41 (3): 248-251.
- [10] 马庆国. 中国核桃品种的遗传多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- [11] Deyoung B J, Innes R W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense[J]. Nature Immunology, 2006, 7 (12): 1243-1249.
- [12] 黄代青. 果树 *R* 基因同源序列克隆的初步研究[J]. 福建果树, 2002, 21 (增刊 1): 1-4.
- [13] 袁克华, 冯仁军, 程萍, 等. 香蕉 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25 (5): 271-274.
- [14] 张洪磊, 张朝红, 王跃进. 早酥梨抗黑星病相关新基因 *Vnp1* 的克隆及其表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (2): 239-245.
- [15] 刘建成, 段可, 李静, 等. 草莓 NBS-LRR 家族基因 *FaNBS1* 的克隆与表达分析[J]. 果树学报, 2011, 28 (6): 1025-1031.
- [16] 宋霄, 柏素花, 戴洪义. 苹果 *NBS-LRR1* 基因的鉴定与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40 (7): 1233-1243.
- [17] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily[J]. Plant Journal, 1999, 20 (3): 317-332.