

张银霞,张敏,田蕾,等.宁夏水稻品种抗稻瘟病基因  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  和  $Pi9$  的检测分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):35-39.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.010

# 宁夏水稻品种抗稻瘟病基因 $Pi-ta$ 、 $Pi-b$ 和 $Pi9$ 的检测分析

张银霞,张敏,田蕾,杨淑琴,李培富

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**为明确宁夏水稻品种中抗稻瘟病基因  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  和  $Pi9$  的分布情况,为宁夏水稻抗穗颈瘟病的分子标记辅助选择育种奠定基础。利用  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  和  $Pi9$  3 个与抗稻瘟病基因紧密连锁的功能标记,对 94 份宁夏水稻品种进行抗稻瘟病基因的分子检测。结果表明,宁夏水稻品种中含  $Pi-ta$  抗性基因的占 46.8%,含  $Pi-b$  抗性基因的占 93.6%,含  $Pi9$  抗性基因的占 27.7%,同时含有  $Pi-ta$  和  $Pi-b$  抗性基因的占 44.7%,同时含有  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  和  $Pi9$  抗性基因的占 12.8%。根据报道, $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  基因的联合效应与穗颈瘟抗性正相关系数为 0.71,表明从宁夏水稻品种中选育抗穗颈瘟品种是有基因基础的。

**关键词:**水稻品种;稻瘟病;穗颈瘟; $Pi-ta$  基因; $Pi-b$  基因; $Pi9$  基因;抗病基因

**中图分类号:** S435.111.4<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0035-04

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物之一,其产生的稻谷是全球半数以上人口的主食。由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*;无性态:*Pyricularia grisea*)引起的稻瘟病是水稻生产的主要病害之一<sup>[1]</sup>,严重威胁世界的粮食安全<sup>[2-3]</sup>。实践证明,利用抗稻瘟病基因培育抗性品种是防治水稻稻瘟病最经济、最有效、最环保的手段<sup>[4]</sup>。

宁夏是我国北方粳稻主产区之一,有悠久的水稻栽培历史,形成了独特而丰富的水稻遗传资源。近年来,随着全球气候变暖,稻瘟病的发生越来越严重,成为宁夏水稻的常发性病害,也是制约宁夏灌区水稻增产的主要病害,每年都有不同程度的发生,主要以穗颈瘟危害为主,尤其是 2006—2007 年,局部地区甚至有大发生<sup>[5]</sup>。然而,这些种质资源却没能得到充分利用,其原因首先是这些种质资源的抗稻瘟病基因类型和抗性尚不清楚;其次是常规育种法通常是在抗病性由主效基因控制时才是最有效的,并且存在效率低、工作量大、操作困难等缺点。

近年发展起来的分子标记技术可快速、准确地鉴定出材料中所含的抗性基因类型,并利用与稻瘟病抗性基因紧密连锁的分子标记进行分子标记辅助选择育种,这对于培育抗稻瘟病水稻品种有重要意义。目前已定位的抗稻瘟病基因至少有 68 个位点,总共有 83 个主效基因,它们成簇地分布在除第 3 染色体外的所有水稻染色体上<sup>[6]</sup>,已经有叶瘟、颈瘟、苗瘟共 24 个抗稻瘟病基因被克隆(根据中国水稻数据中心提供的资料),与其紧密连锁或共分离的分子标记多数都已被开发出来。本研究利用对穗颈瘟抗性贡献较大且相关性较紧密

的抗稻瘟病基因  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$ 、 $Pi9$  的紧密连锁的分子标记<sup>[7-9]</sup>对宁夏水稻品种的抗病基因进行分子检测与分析,旨在研究这 3 个抗性基因在宁夏水稻品种中的分布情况,为通过分子标记辅助选择育种技术培育抗穗颈瘟的水稻新品种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

选用由宁夏大学、宁夏农业科学院等选育出的 94 份水稻品种作为供试材料:农科 843、宁粳 3 号、宁粳 7 号、宁粳 9 号、宁粳 12、宁粳 15(作)、宁粳 16、宁粳 18(作)、宁粳 19(作)、宁粳 23(作)、宁粳 25(作)、宁粳 26(作)、宁粳 27(作)、宁粳 28、宁粳 29、宁粳 31(作)、宁粳 32(作)、宁粳 33(作)、宁粳 34、宁粳 35、宁粳 36、宁粳 37、宁粳 38、宁粳 39(作)、宁粳 40、宁粳 41、宁粳 42(作)、宁粳 43(李)、宁粳 44、宁粳 45、宁粳 46、宁粳 47(节 7)、宁稻 216、宁香稻 1 号、宁香稻 2 号、宁香稻 3 号、宁香优 2 号、京宁 2 号、京宁 3 号、京宁 6 号、京宁 7 号、宁资 218、宁资 460、节 9、节 12、花 92、花 96、花 98、花 117(作)、中花 17、鉴 17、鉴 1310、鉴 1320、鉴 11、鉴 61、鉴 24、鉴 1342、鉴 1346、鉴 1360、2007-218、2009XE-588、2001QX-62、2011-173、2012-731、2012-151、2012-162、2012-336、2012.784(航)、2013-1、2013-409、2013P2-36、2013-1104、2013-1120、2013-1134、11NX-2417、11NX-2324、318、05P3、SD-3、SD-4、毛毛糯、宁糯 5 号、黑兰稻、小糯稻、养和白皮大稻、大白芒稻、叶盛大皮大稻、小红板稻、小瓠板稻、有芒小瓠板稻、小白板稻、有芒大瓠板稻、大瓠板稻、白皮小稻。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物合成 PCR 特异性引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

1.2.2 基因组总 DNA 的提取 利用 SDS 法提取总 DNA,并

收稿日期:2016-02-23

基金项目:宁夏高校项目(编号:NGY2014058);宁夏水稻育种专项(编号:2013NYYZ0302);国家自然科学基金(编号:31360324)。

作者简介:张银霞(1979—),女,宁夏平罗人,博士,副教授,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:zyinxia2008@126.com。

用琼脂糖电泳检测 DNA 的质量。以总 DNA 为模板,按下列反应体系(20 μL)进行 PCR 扩增:2.0 μL 10 × 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)、0.4 μL dNTP(2.5 mmol/μL)、每种引物各 1.0 μL (2 mmol/L)、0.2 μL *Taq* 酶、2.0 μL 模板 DNA,用 ddH<sub>2</sub>O 补

足至 20 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,退火(温度依据引物说明而定),72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,核酸染料染色,紫外灯下观察拍照。

表 1 用于 PCR 反应的引物名称、序列及预期片段长度

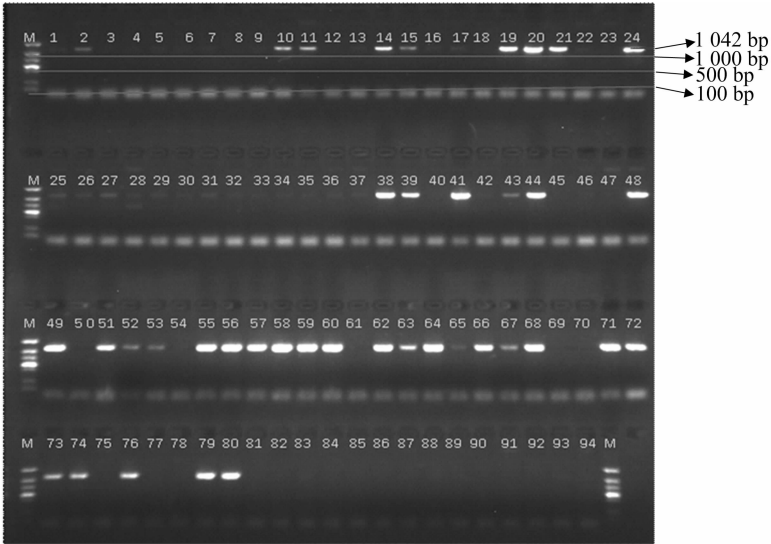
目标基因	标记	引物序列 (5'→3')	片段大小(bp)	参考文献
<i>Pi-ta</i>	YL183/YL87	F:AGCAGGTTATAAGCTAGGCC;R:CTACCAACAAGTTCATCAAA	1 042(抗)	[10]
<i>Pi-b</i>	Lys145	F:TCGGTGCCTCGGTAGTCACT;R:GGGAAGCGGATCCTAGGTCT	803(抗)	[11]
<i>Pi9</i>	M- <i>Pi9</i>	F:GCTGTGCTCCAAATGAGGAT;R:GCGATCTCACATCCTTTGCT	291(抗)/397	[12]

2 结果与分析

2.1 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Pi9* 基因功能标记的检测和验证

利用 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Pi9* 抗性基因的功能标记特异性 PCR 引物对 94 份宁夏水稻品种进行抗病基因检测。图 1 为 *Pi-ta* 基因的检测结果,可以看出,携带 *Pi-ta* 抗性基因的品种利用 *Pi-ta* 引物 YL183/YL87 能扩增出 1 042 bp 的片

段,不含抗性基因 *Pi-ta* 的不能扩出 1 042 bp 的片段。图 2 为 *Pi-b* 基因的检测结果,可以看出,携带 *Pi-b* 抗性基因的品种利用 *Pi-b* 引物 Lys145 能扩增出 803 bp 的片段。图 3 为 *Pi9* 基因的检测结果,可以看出,携带 *Pi9* 抗性基因的品种利用 *Pi9* 引物 M-*Pi9* 能扩增出 291 bp 的片段,不携带 *Pi9* 抗性基因的品种扩增出的片段为 397 bp。



M—marker; 1~94 样品编号与表 2 所列品种名称对应。图2、图3同

图1 宁夏水稻品种抗性基因 *Pi-ta* 的 PCR 扩增结果

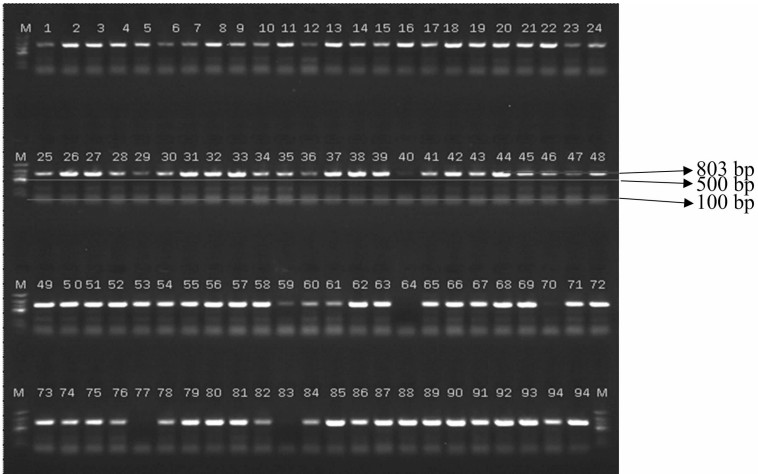


图2 部分水稻品种中抗性基因 *Pi-b* 的 PCR 扩增结果

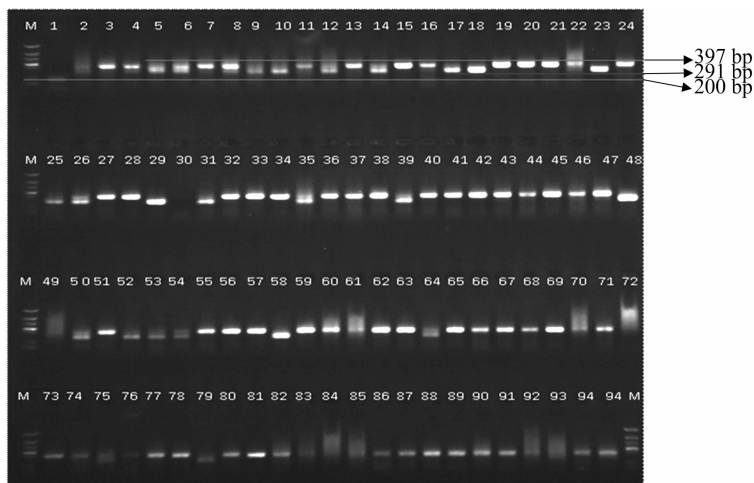


图3 部分水稻品种中抗性基因 *Pi9* 的 PCR 扩增结果

## 2.2 宁夏水稻品种抗稻瘟病基因分子检测结果

通过对宁夏水稻品种抗稻瘟病基因的分子检测,表 2 结果表明:94 份宁夏水稻品种中含有 *Pi-ta* 抗性基因的有 44 份,占 46.8%,根据报道,*Pi-ta* 抗性基因与抗穗颈瘟有正相关关系<sup>[7,13]</sup>,在宁夏水稻品种中含有 *Pi-ta* 抗性基因占 46.8%,说明从宁夏当地品种中培育抗穗颈瘟的品种是有基因基础的;含有 *Pi-b* 抗性基因的有 88 份,占 93.6%,说明宁夏水稻品种中大多数都含有 *Pi-b* 基因;含有 *Pi9* 抗性基因的有 26 份,占 27.7%,*Pi9* 抗性基因为光谱抗性基因,而在宁夏水稻品种中单独含 *Pi9* 抗性基因的材料较少。94 份材料中同时含有 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 抗性基因的有 42 份,占 44.7%,根据报道,*Pi-ta*、*Pi-b* 基因的联合效应与穗颈瘟抗性正相关系数为 0.71<sup>[7,13]</sup>。因此,携带这 2 个抗病基因可以大大提高穗颈瘟抗性,这也说明从宁夏当地品种中培育抗穗颈瘟的品种是有基因基础的。由表 2 还可见,同时含有 *Pi-ta* 和 *Pi9* 抗性基因的有 14 份,占 14.9%;同时含有 *Pi-b* 和 *Pi9* 抗性基因的有 23 份,占 24.5%;同时含有 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Pi9* 抗性基因的有 12 份,占 12.8%。

## 3 讨论与结论

由于稻瘟病的发生逐年增加,尤其是穗颈瘟危害最为严重,严重时可导致颗粒无收<sup>[14]</sup>。而近几年发展的通过分子标记辅助选择育种(MASB)在水稻抗稻瘟病育种上应用回交转移抗性基因并进行多个抗性基因的聚合,从而达到增加品种的抗性和抗谱,培育出多抗品种的事例越来越多,比如董巍等通过 MASB 方法将供体 BL6 的 *Pi1*、*Pi2* 抗性基因聚合到培矮 64S 水稻品种中,筛选出 10 株对稻瘟病的叶瘟和穗颈瘟抗性明显增强的改良株系<sup>[15]</sup>。表明多个抗性基因聚合后,抗性基因之间表现为极显著的基因互作,协同抵抗单个抗病基因不能抵抗的生理小种<sup>[16]</sup>,这是多基因聚合后抗谱拓宽、抗性增强的重要原因,因此基因聚合是培育稻瘟病持久抗性的有效方法。在聚合杂交中,应用目标性状紧密连锁的分子标记进行辅助选择,可以快速准确地将多个目标基因聚合于一个重组体。比如王军等研究表明,*Pi-ta*、*Pi-b* 基因的联合效应与穗颈瘟抗性呈正相关,并且这种相关性比 *Pi-ta* 和 *Pi-b* 单独存在与穗颈瘟抗性的相关性要紧密<sup>[7]</sup>。

本研究应用 3 个抗稻瘟病基因紧密连锁的分子标记对宁夏水稻品种进行检测,结果表明,46% 的宁夏水稻品种中含有抗稻瘟病基因 *Pi-ta*,而 *Pi-ta* 基因与穗颈瘟抗性的相关性为 0.5<sup>[7]</sup>;44% 的宁夏水稻品种中含有抗稻瘟病基因 *Pi-ta* 和 *Pi-b*,而这 2 种基因与穗颈瘟抗性的相关性为 0.7<sup>[13,7]</sup>,所以这 2 种抗性基因的存在,可以为宁夏水稻选育抗穗颈瘟品种奠定基因基础。*Pi9* 为广谱抗性的基因<sup>[17]</sup>,而宁夏水稻品种中缺乏 *Pi9* 基因,若以此为主效基因,可以聚合其他抗性基因以拓宽抗谱、提高持久抗稻瘟病的能力。目前在宁夏地区最严重的稻瘟病危害为穗颈瘟,可以利用品种中含有 *Pi-ta* 基因的品种与其他品种进行 MASB,选育抗穗颈瘟的品种。所以本研究为宁夏水稻抗稻瘟病以及抗穗颈瘟的分子标记辅助育种奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Couch B C, Kohn L M. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea* [J]. *Mycologia*, 2002, 94 (4): 683 - 693.
- [2] Qu S H. Rice diseases [M]. 2nd ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985: 109 - 201.
- [3] Zeigler R S, Tohme J, Nelson J, et al. Linking blast population analysis to resistance breeding: A proposed strategy for durable resistance [C] // Zeigler R S, Leong S A, Teng P S, et al. Rice blast disease. Wallingford, United Kindom: CAB International and IRRI, 1994: 16 - 26.
- [4] Fomba S N, Taylor D R. Rice blast in West Africa: its nature and control [C] // Zeigler R S, Leong S A, Teng P S, et al. Rice blast disease. Wallingford, United Kindom: CAB International and IRRI, 1994: 343 - 355.
- [5] 刘 媛, 杨明进, 杨宁权. 宁夏水稻稻瘟病发生原因分析及防治策略 [J]. *农业科学研究*, 2008, 29(4): 105 - 106.
- [6] 赵家铭, 张丽霞, 郑文静. 稻瘟病抗病基因定位及克隆研究进展 [J]. *辽宁农业科学*, 2014(2): 47 - 49.
- [7] 王 军, 杨 杰, 杨金欢, 等. *Pi-ta*、*Pi-b* 基因在江苏粳稻穗颈瘟抗性育种中的价值分析 [J]. *华北农学报*, 2012, 27(6): 141 - 145.
- [8] 杨小林, 曾凡松. 张 舒, 等. 20 个稻瘟病抗性基因在湖北省的利用价值分析 [J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(16): 3798 - 3801.

表 2 抗稻瘟病基因  $Pi-ta$ 、 $Pi-b$  和  $Pi9$  在宁夏水稻品种中的分布

序号	名称	基因			序号	名称	基因		
		$Pi-ta$ (抗)	$Pi-b$	$Pi9$			$Pi-ta$ (抗)	$Pi-b$	$Pi9$
1	农科 843	+	+	-	48	花 98	+	+	+
2	宁粳 3 号	+	+	-	49	花 117(作)	+	+	+
3	宁粳 7 号	-	+	-	50	中花 17	-	+	+
4	宁粳 9 号	-	+	-	51	鉴 17	+	+	-
5	宁粳 12	-	-	+	52	鉴 1310	+	+	+
6	宁粳 15(作)	-	+	+	53	鉴 1320	+	+	+
7	宁粳 16	-	+	-	54	鉴 11	-	+	+
8	宁粳 18(作)	-	+	-	55	鉴 61	+	+	-
9	宁粳 19(作)	-	+	+	56	鉴 24	+	+	-
10	宁粳 23(作)	+	+	+	57	鉴 1342	+	+	-
11	宁粳 25(作)	+	+	-	58	鉴 1346	+	+	+
12	宁粳 26(作)	-	+	+	59	鉴 1360	+	+	-
13	宁粳 27(作)	-	-	-	60	2007-218	+	+	-
14	宁粳 28	+	-	+	61	2009XE-588	-	+	-
15	宁粳 29	+	+	-	62	2001QX-62	+	+	-
16	宁粳 31(作)	+	+	-	63	2011-173	+	+	-
17	宁粳 32(作)	+	+	+	64	2012-731	+	-	+
18	宁粳 33(作)	-	+	+	65	2012-151	-	+	-
19	宁粳 34	+	+	-	66	2012-162	+	+	-
20	宁粳 35	+	+	-	67	2012-336	+	+	-
21	宁粳 36	+	+	-	68	2012.784(航)	+	+	-
22	宁粳 37	-	+	-	69	2013-1	-	+	-
23	宁粳 38	-	+	+	70	2013-409	-	+	-
24	宁粳 39(作)	+	+	+	71	2013P2-36	+	+	-
25	宁粳 40	+	+	+	72	2013-1104	+	+	-
26	宁粳 41	+	+	+	73	2013-1120	+	+	-
27	宁粳 42(作)	+	+	-	74	2013-1134	+	+	-
28	宁粳 43(李)	-	+	-	75	11NX-2417	-	+	+
29	宁粳 44②	-	+	+	76	11NX-2324	+	+	-
30	宁粳 45	-	+	-	77	318	-	-	-
31	宁粳 46	-	+	+	78	05P3	-	+	-
32	宁粳 47(节 7)	-	+	-	79	SD-3	+	+	+
33	宁稻 216	-	+	-	80	SD-4	+	+	-
34	宁香稻 1 号	-	+	-	81	毛毛糯	-	+	-
35	宁香稻 2 号	-	+	+	82	宁糯 5 号	-	+	-
36	宁香稻 3 号	-	+	-	83	黑兰稻	-	-	-
37	宁香优 2 号	-	+	-	84	小糯稻	-	+	-
38	京宁 2 号	+	+	-	85	养和白皮大稻	-	+	-
39	京宁 3 号	+	+	+	86	大白芒稻	-	+	-
40	京宁 6 号	-	+	-	87	叶盛大皮大稻	-	+	-
41	京宁 7 号	+	+	-	88	小红板稻	-	+	-
42	宁资 218	-	+	-	89	小琥板稻	-	+	-
43	宁资 460	+	+	-	90	有芒小琥板稻	-	+	-
44	节 9	+	+	-	91	小白板稻	-	+	-
45	节 12	-	+	-	92	有芒大琥板稻	-	+	-
46	花 92	-	+	-	93	大琥板稻	-	+	-
47	花 96	-	+	-	94	白皮小稻	-	+	-

注:“+”为携带抗性基因,“-”为不携带抗性基因。

[9] 范方军,王芳权,刘永峰,等.  $Pi-b$ 、 $Pi-ta$ 、 $Pikm$  和  $Pi54$  对水稻穗颈瘟的抗性评价[J]. 华北农学报,2014,29(3):221-226.

[10] Jia Y,Wang Z,Sing P. Development of dominant rice blast  $Pi-ta$  resistance genemarkers[J]. Crop Science,2002,42(6):2145-2149.

[11] 刘 洋,徐培洲,张红宇,等. 水稻抗稻瘟病  $Pi-b$  基因的分子标记辅助选择与应用[J]. 中国农业科学,2008,41(1):9-14.

[12] 张 羽,冯志峰,张 晗,等. 陕西省水稻种质资源中  $Pi9$  基因的分布状况[J]. 四川农业大学学报,2013,31(2):115-121.

付强,邹颖,余婧,等.烟草蛋白酶体 $\alpha 2$ 型亚单位的克隆和序列分析[J].江苏农业科学,2016,44(9):39-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.011

# 烟草蛋白酶体 $\alpha 2$ 型亚单位的克隆和序列分析

付强,邹颖,余婧,赵杰宏,任学良

(贵州省烟草科学研究院/烟草行业烟草分子遗传重点实验室,贵州贵阳 550081)

**摘要:**为研究烟草识别病毒并将其降解为蛋白酶体基因,以拟南芥的蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号:AF043520.1) 为信息探针,用电子克隆的方法从烟草栽培品种中克隆到 1 个蛋白酶体基因 *NtPAB1*, 并对其序列分析。结果表明,*NtPAB1* 包含完整的开放读码框,编码 219 个氨基酸,含有 1 个保守域 proteasome\_alpha\_type\_2;通过同源比对和进化分析发现,*NtPAB1* 氨基酸序列与葡萄 PAB1 的序列一致性达到 98%。以上结果表明,*NtPAB1* 是栽培烟草中未报道的编码蛋白酶体基因。

**关键词:**栽培烟草;蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位;蛋白降解;克隆;序列分析

**中图分类号:** S188;S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0039-03

马铃薯 Y 病毒属的蚜传辅助因子 (HC-Pro) 是释放感染所需病毒蛋白的三大蛋白酶之一<sup>[1]</sup>,HC-Pro 抑制植物体内起抗病毒作用的 RNA 干涉,但其具体分子机制尚无报道<sup>[2-3]</sup>。近期研究发现,莴苣花叶病毒的 HC-Pro 能干涉泛素/26S 蛋白酶体系统中核心元件 20S 蛋白酶体的活性,而泛素/26S 蛋白酶体系统参与抗病毒反应<sup>[4]</sup>。Ballut 等研究发现,烟草花叶病毒、莴苣花叶病毒的 RNA 能够被蛋白酶体识别水解,这暗示 20S 蛋白酶体的核酸内切酶活性可能参与植物体内的抗病毒过程<sup>[5]</sup>。

泛素/26S 蛋白酶体在植物发育的方方面面起着重要作用,影响着一系列生理过程,包括胚胎发育和衰老<sup>[6]</sup>。泛素/26S 蛋白酶体的核心元件是受到紧密调控并高度特异的 26S 蛋白酶体,由二级结构为圆柱形的 20S 核心蛋白酶结合 1 个 19S 调控因子构成<sup>[7]</sup>。筒形的 20S 蛋白酶体由 4 个环形结构构成,包括在 2 个外侧的环形结构中的 7 个  $\alpha$  亚基,而内侧的 2 个环形结构上具有 7 个  $\beta$  亚基,其大体的构型为  $\alpha 1-\alpha 7/\beta 1-\beta 7//\beta 1-\beta 7/\alpha 1-\alpha 7/\alpha 1-\alpha 7$ <sup>[7]</sup>。尽管已经从烟草、土豆、绿豆、豌豆等植物中纯化得到 20S 蛋白酶体<sup>[8-10]</sup>,但是目

前尚无关于栽培烟草中蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因序列的报道。

随着近年来多个物种全基因组测序的完成和表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 计划的发展,电子克隆技术应运而生,其技术核心是利用生物信息学技术组装延伸 ESTs 序列,获得基因的部分乃至全长 cDNA 序列。本研究采用电子克隆的方法获得 1 个蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因 *NtPAB1*, 并对其生物信息学分析,为进一步研究烟草中外源蛋白、异常蛋白的降解奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 烟草 *PAB1* 基因的电子克隆

以拟南芥的蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号:AF043520.1) 为信息探针<sup>[11]</sup>,对 GenBank 中 EST\_others 数据库指定物种烟草 (*Nicotiana tabacum*) 进行 Blast 比对,并利用菲莫公司林烟草和绒毛状烟草的全基因组测序数据<sup>[12]</sup>,将比对到的烟草栽培品种美国普通烟草的全部 EST 序列使用 Codon Code Aligner 软件进行拼接,形成重叠群 (contig)。利用拼接获得的重叠群作为探针,再次进行同源检索、拼接,重复以上过程直至没有更多 EST 被检出,获得普通烟草的 *PAB1* cDNA 序列。最后,再以此片段在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,对比其他物种同源基因的相似性和一致性,判断拼接所得 cDNA 片段的正确性以及读码框 (open reading frame, ORF) 序列的完整性。

### 1.2 烟草 *PAB1* 基因的生物信息学分析

序列比对、ORF 查找和翻译在“http://www.ebi.ac.uk/”提供的相应模块上完成。采用 ExPASy 网站上 Prot-Param、

收稿日期:2015-07-30

基金项目:贵州省科技厅科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2014]2118 号)。

作者简介:付强(1984—),男,贵州赤水人,博士,副研究员,主要从事烟草遗传育种与蛋白质组学研究。E-mail: nestal1984fu@sina.com。

通信作者:任学良,博士,研究员,主要从事烟草基因组学研究。E-mail: renxuel@126.com。

[13]何重. *Pi-ta* 和 *Pi-b* 基因在水稻穗颈瘟抗性育种中的利用[D].南京:南京农业大学,2013.

[14]Zhuang J Y, Ma W B, Wu J L, et al. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice[J]. Euphytica, 2002, 128(3): 363-370.

[15]董巍,李信,晏斌.利用分子标记辅助选择改良矮培 64S 的稻瘟病抗性[J].分子植物育种,2010,8(5):853-860.

[16]徐未末,王兴,黄永相.水稻抗稻瘟病基因的分子标记与标记辅助育种研究进展[J].江苏农业学报,2013,29(4):898-906.

[17]Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901-1914.