

# 小麦抗白粉病基因 Pm4b 的 RGA 分析

胡楠<sup>2</sup>, 伊艳杰<sup>3</sup>, 刘红彦<sup>\*</sup>, 柴春月, 刘新涛 (1. 河南省农科院植物保护研究所, 河南郑州 450002; 2. 南阳理工学院, 河南南阳 473004; 3. 兰州大学干旱与草地生态教育部重点实验室, 甘肃兰州 730000)

**摘要** 为克隆抗性基因和发展 Pm4b 的特异分子标记奠定基础。利用 10 对 RGA 引物, 对小麦抗白粉病基因的一些载体品种(系) 进行扩增, 将引物对 R11F/ R11R 从 Pm4b 基因的载体品种 VPM 中扩增出的稳定多态性条带回收、克隆、测序, 获得与小麦 Pm4b 基因的相关抗病基因的同源片段, 并对不同的小麦 Pm 基因载体品系作了检测分析。该稳定多态性条带全长 1 321 bp。序列分析表明这个片段属于 RGA 类序列。用该标记检测小麦不同 Pm 基因载体品种(系), 发现该多态性片段仅出现在 Pm4b 基因载体品种中。该研究可为分离抗性基因和发展 Pm4b 的特异分子标记奠定基础。

**关键词** 小麦; 白粉病; 抗病基因; RGA 标记; 序列分析

中图分类号 S512.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06379-02

## RGA Analysis on the Powdery Mildew Resistance Gene Pm4b in Wheat

HU Nan et al (Plant Protection Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract** The purpose of study was to lay the basis for cloning resistance gene and developing specific molecular markers of Pm4b. Some carrier varieties (lines) with the powdery mildew resistance genes in wheat were amplified with 10 pairs of RGA primers. The stable genetic polymorphism band amplified by primers pairs R11F/ R11R from the carrier variety VPM with Pm4b gene was recycled, cloned and sequenced. The homology fragments of correlated disease resistant gene in wheat Pm4b gene were gotten and the carrier lines of wheat Pm gene were detected. The whole length of the stable genetic polymorphism band was 1 321 bp. The sequence analysis indicated that the fragment belonged to RGA sequence. Through detecting the carrier variety (line) with different wheat Pm genes by the marker, it was found that the genetic polymorphism fragment only appeared in the carrier variety with Pm4b gene. The study could establish the basis for isolating resistance gene and developing specific molecular markers of Pm4b.

**Key words** Wheat; Powdery mildew; Disease resistant gene; RGA marker; Sequence analysis

小麦白粉病是严重威胁小麦生产的主要病害之一, 利用有效的抗病基因是抵御小麦白粉病的有效途径<sup>[1]</sup>。目前已在小麦 34 个抗白粉病基因位点中鉴定出了 50 个主效抗白粉病基因<sup>[2]</sup>, 其中位于 2A 染色体长臂的抗病基因 Pm4b 是一个对许多白粉菌生理小种都具有抗性的基因, 具有较高的应用价值, 然而关于它的研究并不多。PCR 标记 SIS410 与 Pm4b 基因的遗传距离为 3.0 cM<sup>[3]</sup>, 但是不能区分 Pm4b 和 Pm4a。谢皓等<sup>[4]</sup> 将 SIS 特异引物(P<sub>1</sub> + P<sub>2</sub>) 扩出的 1.7 kb PCR 产物进行限制性内切酶酶切分析, 发现 Hnd 酶切的 Pm4b 和 Pm4a 扩增产物有多态性, 由于测定的材料较少, 还需更多的实验结果来验证。

RGA(Resistance gene analogs) 法是根据已克隆植物抗病基因的保守结构域设计引物, 扩增获得 RGAs, 然后分析 RGAs 与抗病基因的关系, 确定候选抗病基因从而获得新的抗病基因<sup>[5]</sup>。分离和克隆植物的 RGA 已成为当前人们比较认同的标记、定位和克隆植物抗病基因的策略之一<sup>[6]</sup>。目前, 在许多作物上都有 RGA 法研究的成功报道。XIE 等<sup>[7]</sup> 用该方法发现了 2 个与小麦抗白粉病基因 Pm31 紧密连锁的 RGA 标记 RGA200 和 RGA390, 表明通过 RGA 方法可以有效地找到与抗病基因连锁的分子标记。

笔者报道了利用 RGA 方法获得的与小麦 Pm4b 基因相关的抗病基因同源片段, 并对不同的小麦 Pm 基因载体品系作了检测分析, 为克隆抗性基因和发展 Pm4b 的特异分子标记奠定基础。

## 1 材料与方

### 1.1 植物材料 参试小麦包括 Khajli/ 8<sup>\*</sup> Cc、Yuma/ 8<sup>\*</sup> Cc、

VPM 及其近等基因系(VPM 7<sup>\*</sup> 百农 3217、国资 24、国资 25、国资 28、Am4/ 3<sup>\*</sup> bai nong 3217) 和其他抗白粉病基因载体品种(系); 感病对照品种为豫麦 49 和 Chancellor。其中部分材料由中国农科院的周益林博士和朱振东博士提供。郑 315 及 91138-16-2-13-12 来自河南省农科院小麦所。

**1.2 引物序列** 根据相关文献<sup>[8-11]</sup> 报道, 由上海生工生物工程公司合成了 10 对 RGA 引物(表 1)。

表 1 用于 RGA 分析的引物对

引物名称	序列	保守区
S3	5 - GGNATGGNGGNTTNGGNAARACNCAN - 3	P-loop
AS3	5 - TCNCGNAINATNTTACNACNCGN - 3	Kinase 3a
F	5 - GGNATGGNGGNNINGGNA(A/G)CANAC - 3	Kinase 1a
R	5 - NCA(T/A)TTNAGNGCNAGNGGNAGNCG - 3	Domain 2
R11F	5 - AACCCAAITCCACCTCTTTTACA - 3	NBS LRR
R11R	5 - TTCCTTTCGAATAGTCACCATAG - 3	
R2F	5 - CTATGGIGACTATTCGAAGGGGAA - 3	NBS LRR
R2R	5 - ATTGIGATTGATGGCATGTCTACG - 3	
CF	5 - CCTCGATGCAATAACTAATTT - 3	NBS
OR	5 - TCTGTTTCCATCAATCAATGT - 3	
NF	5 - TAGGGCTCTTGCTACGT - 3	LRR
NR	5 - TATAAAAAGTGGCGGACT - 3	
3LF	5 - CCTT(G/T)CCTT(G/A)GAGCTTTGAT - 3	NBS LRR
3LR	5 - GCTTCCTTTGCTCCCC(A/G)AG - 3	
R <sub>r</sub> 2F	5 - CAGCAGCCTAAGATTCCTCCTA - 3	LRR
R <sub>r</sub> 2R	5 - TGTCGAGAACCCTCCAATGATAC - 3	
R <sub>r</sub> 3F	5 - AGGCCTTGC AAAATTTAGACCTC - 3	Kinase
R <sub>r</sub> 3R	5 - CTCTAGCAGATGTTTGTTGTGTC - 3	
R <sub>r</sub> 4F	5 - ACCTCTCTGGCACAATGATAAAA - 3	LRR
R <sub>r</sub> 4R	5 - AGACTTGGCCTTGTTCATCATAA - 3	

**1.3 PCR 扩增** PCR 反应总体积为 25 μl, 其中包括 60 ng 左

基金项目 河南省杰出青年科学基金项目(04120001400)。

作者简介 胡楠(1969-), 男, 河南南阳人, 在读博士, 副教授, 从事植物生理生态和分子生物学方面的研究。\* 通讯作者, 博士, 研究员。

收稿日期 2007-03-18

右的基因组 DNA, 0.4  $\mu\text{mol/L}$  引物, 150  $\mu\text{mol/L}$  dNTP(上海生工), 2.5  $\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , 10  $\times$ PCR Buffer, 1 U Taq 酶(TakaRa 公司)。扩增反应程序为: 94 预变性 3 min; 然后 94 变性 30 s, 退火 1 min(温度因不同引物而定), 72 延伸 1.5 min, 35 个循环后, 72 总延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 溴化乙锭染色后利用紫外凝胶成像系统照相观察。

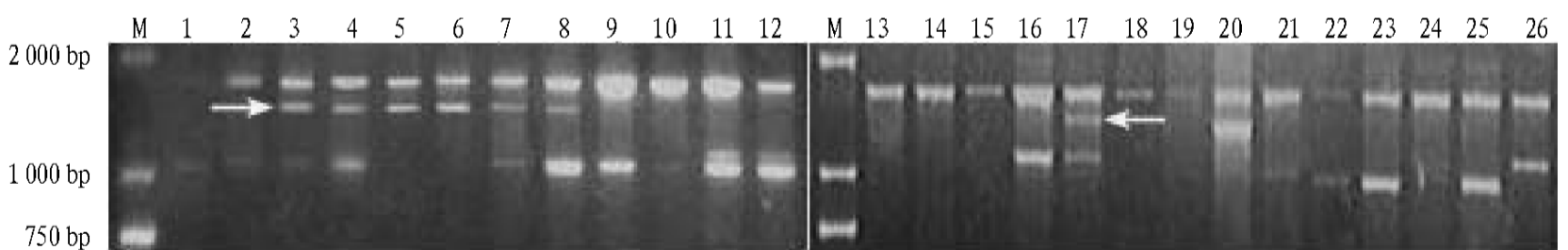
**1.4 克隆测序** 在紫外灯下切出特异性片段, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(TakaRa 公司)回收纯化, 和 PMD18-T Vector(TakaRa 公司)于 16 连接后转化入大肠杆菌 JM109, 涂布平板培养, 挑取阳性克隆经检测后送北京三博远志公司测序。

**1.5 序列分析** 利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 功能对获得的 RAG 序列进行同源性搜索, 运用 DNAMAN, InterProScan 软件进行序列比较分析。

## 2 结果与分析

**2.1 RGA 特异片段的获得及序列分析** 首先用 10 对 RGA 引物对感病品种豫麦 49、Charcellor, 抗白粉病品种 VPM、Yuma/8\* Cc 进行扩增。除引物对 S3/AS3 和 F/R, 其余引物均能在抗病品种中扩增出多态性带; 但只有引物对 R11F/R11R 能在 Pm4b 基因载体品种 VPM 中扩增出约 1 300 bp 的稳定多态性条带。

将引物对 R11F/R11R 从 VPM 中扩增出的多态性片段克隆并测序, 该片段长 1 321 bp, 比从扬麦 5/Sub6V(Pm21) 中扩增出的 1 317 bp 多态性片段长 4 个碱基。利用 NCBI 上的 Blastn 功能对获得的 RAG 序列 RGA1321 进行同源性分析, 发现其第 409~513、520~796、796~846 和 1 281~1 231 这 4 个核苷酸区域与小麦抗叶锈病基因 Lr10(AY270159.1) 的同源性分别达 87%、88%、92% 和 97%。第 1~41、526~802 和 1 034~1 117 这 3 个核苷酸区域与 NBS-LRR 类抗病蛋白的核苷酸序列(AY0840501.1) 的同源性达 95%、88% 和 89%。经 InterProScan 软件预测发现, RGA1321 的氨基酸序列含有信号肽、跨膜区等蛋白质的特征保守域。



注: M 为 DL2000 DNA marker; 箭头所示标记为 1 321 bp 的 RGA 特异带。1. 豫麦 49; 2. Charcellor; 3. VPM(Pm4b); 4. VPM 7\* 百农 3217(Pm4b); 5. 国农 24(Pm4b); 6. 国农 25(Pm4b); 7. 国农 28(Pm4b); 8. An4/3\* bai rong 3217(Pm4b); 9. Khapli/8\* Cc(Pm4a); 10. Yuma/8\* Cc(Pm4a); 11. 郑 315(Pm4a); 12. 91138-16-2-13-12(Pm4a); 13. Axminster/8\* Cc(Pm1a); 14. Uka/8\* Cc(Pm2); 15. CI14121(Pm3b); 16. Tingden(Pm6); 17. VPM(Pm4b); 18. Anigo(Pm17); 19. 96-287(Pm20); 20. 扬麦 5/Sub6V(Pm21); 21. 81-7241(Pm23); 22. 齿牙糙(Pm24); 23. 红袖麦(PmHYM); 24. NC96BGIA3(Pm22); 25. 小白冬麦(PmXBD); 26. Coker 983(Pm5+6)。

图 3 引物 R11F/R11R 对 Pm 基因载体品种(系)的 PCR 扩增结果

## 3 讨论

由于 RGA 本身可能就是潜在的 R 基因, 而且 R 基因常常成簇分布于基因组中, 因此 RGA 标记对于 R 基因的克隆和标记辅助选择可能具有特别的应用价值<sup>[12]</sup>。孔凡晶等<sup>[13]</sup>根据已克隆抗病基因的保守域设计引物, 从簇毛麦 6VS 端体 DNA 中扩增出 10 类抗病基因同源片段 Hrgak1~Hrgak10, 并利用抗病同源序列作为探针, 与小麦抗白粉病基因进行相关

分析。结果表明, Hrgak2、Hrgak4 和 Hrgak5 可能与抗白粉病基因相关, 这些抗病基因同源片段可作为抗病基因克隆的探针。该实验根据不同 RGA 保守区域设计引物, 对含不同抗白粉病基因的材料进行扩增, 最终获得了一个与 Pm4b 基因相关的 RGA 片段。通过序列分析, 发现其部分核苷酸区域与 NBS-LRR 类抗病蛋白的核苷酸序列的同源性很高。据

```

491 ATGGAGAGGCCGTTATACAGGAGTTTTCACAAGTTAGGAGTGATGGGC
1 M E R P L Y R S F H K L G V M G
539 ATCAATGAGAAAAATGATGTAAGTTTTTTTTTCAGCCATTTCGAATCT
17 I N E K N D V K F F F S H F Q S
587 CAGCCGCTGAAGTCATTGTGAGTGCAGTCAGACAAGGGTTGCCTCCA
33 Q P P E V I V S A V R Q G L P P
635 AGACATTTTCTCGCCTCCGAAGAACCTCAAGAGTCTCAAAGTGGAGG
49 R H F L A S E E P Q E S S N W R
683 GACCGCTGGGAGTATTGCCAAAATGGATCAAGAAGCTTTTAGGATGT
65 D R L G V L P K W I K K L L G C
731 TATGAAGTTGAGCTGAGCTTCAACATCCAGCCAGGGTTGAGCAGC
81 Y E V A A E L H N I Q P G L S T
779 ATGTTGCAATGGAAGTCCAAGGGCGGAGAGCTCCATTTTAA820
97 M L Q W K S K G G E L H F *

```

注: \* 代表终止密码子。

图 1 编码区核苷酸序列及推导的氨基酸序列

RGA1321AA. seq	M R P L Y R S F H K L G V M G I N E K N D V K F F F S H F Q S P P E V I V S A V R Q G L P P R H F L A S E E P Q E S S N W R	63
AAQ01786. 1. seq	Q E I G R L S G L R K L C V M G I N E K N D V K F C S A I S N L S R L E S L S V Q S D K G C L D. D I T S P P K N L R S L K L	62
AAW78913. 1. seq	Q E I G R L S G L R K L C V M G I N E K N D V K F C S A I S N L S R L E S L S V Q S D K G C L D. D I T S P P K N L R S L K L	62
AAK84082. 1. seq	Q E I G R L S G L R K L C V M G I N E K N D V K F C S A I S N L S R L E S L S V Q S D K G C L D. D I T S P P K N L R S L K L	62
RGA1321AA. seq	R D R L C V L P K W I K K L L G C Y . . . . . E V A A E L H N I Q P G L S T . . . . . K G G E L H F	109
AAQ01786. 1. seq	E C R L C V L P E W I K K L Q N L V K L S F T T S S Q V E Q D A A M E V L G H L P N L S I L R L P G C S F K G G E L H F	124
AAW78913. 1. seq	E C R L C V L P E W I K K L Q N L V K L S F T T S S Q V E Q D A A M E V L G H L P N L S I L R L P G C S F K G G E L H F	124
AAK84082. 1. seq	E C R L C V L P E W I K K L Q N L V K L S F T T S S Q V E Q D A A M E V L G H L P N L S I L R L P G C S F K G G E L H F	124

图 2 推导的氨基酸序列同已知抗病蛋白的比较

**2.2 RGA 标记检测** 利用 RGA 标记 RGA1321 进一步检测抗白粉病基因 Pm1a、Pm2、Pm3b、Pm4a、Pm4b、Pm6、Pm17、Pm20、Pm21、Pm22、Pm23、Pm24、Pm5+6、PmXBD、PmHYM 的载体品种(系), 发现该多态性片段仅出现在 Pm4b 基因载体品种中(图 3), 在扬麦 5/Sub6V(Pm21) 中扩增的多态性片段稍短, 该 RGA 片段可能与 Pm4b 基因连锁。

(上接第6380页)

现有RGA的研究来看,NBS类保守域基本只出现在抗病基因当中。由其推导的氨基酸序列含信号肽、跨膜区等蛋白质的特征保守域,并且同已知的抗病蛋白也具有很高的同源性,表明该序列属于RGA类序列。这个抗病基因同源片段可被直接用作探针进行分子杂交,或者结合染色体步移技术分离目的基因。

通过RGA克隆R基因或寻找与R基因紧密连锁的标记是一种相对简单的方法,特别是对于复杂基因组。小麦是异源六倍体植物,基因组庞大,所以相对于其他物种在小麦中鉴定多态性是比较困难的。利用RGA标记RGA1321检测不同的Pm基因载体品系,发现该多态性片段仅出现在Pm4b基因载体品系中,在其他抗白粉病材料中均未出现,该RGA片段可能与Pm4b基因连锁,为发展与Pm4b基因紧密连锁的特异分子标记奠定一定的基础。

#### 参考文献

- [1] ZHUZ D,KONG X Y,ZHOUR H,et al Identification and microsatellite markers of a resistance gene to powdery mildew in common wheat introgressed from *Triticum durum*[J]. *Acta Botanica Sinica*,2004,46 :867 - 872.
- [2] MIRANDA L M,MURPHY J P,MARSHALL D,et al. Pm34 :a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*,2006,113 :1497 - 1504.
- [3] 陈松柏,蔡一林,周荣华,等. 小麦抗白粉病基因 Pm4 的STS 标记[J]. *西南农业大学学报*,2002,24(3) :231 - 234.
- [4] 谢皓,陈孝,盛宝钦,等. 小麦新种质 YW243 白粉病抗性鉴定和遗传分析[J]. *作物学报*,2001,27(6) :715 - 721.
- [5] 徐兵强,杜中军,黄俊生. RGA 法克隆候选抗病基因的研究进展[J]. *分子植物育种*,2004,2(3) :421 - 428.
- [6] 丁国华,秦智伟,刘宏宇,等. 黄瓜 NBS 类型抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. *园艺学报*,2005,32(4) :638 - 642.
- [7] XIE C,SUN O,N Z, et al. Identification of resistance gene analogue markers closely linked to wheat powdery mildew resistance gene Pm31[J]. *Hort Breeding*,2004,123(2) :198 - 200.
- [8] LI L A,YING K X,HUA Z R, et al. Isolation and characterization of Mlo and NBS-LRR like gene sequences in wheat [J]. *Acta Botanica Sinica*,2003, 45(4) :472 - 478.
- [9] HE C S,WAN PING,Q Z X. Isolation and characterization of Mlo-like genes of wheat [J]. *Acta Botanica Sinica*,2004,46(6) :744 - 750.
- [10] 姜丽,郑先武,张小红,等. 一个水稻重复序列的分析与定位[J]. *遗传*,2003,25(6) :691 - 694.
- [11] 丁海,宛煜嵩,朱美霞,等. 大豆抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. *分子植物育种*,2003,1(2) :217 - 223.
- [12] WANG XUSHENG, WU WEIREN, JIN GUEI, et al. Genome-wide identification of R genes and exploitation of candidate RGA markers in rice [J]. *Chinese Science Bulletin*,2005,50(11) :1120 - 1125.
- [13] 孔凡昌,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.