

水稻稻瘟病抗病基因的克隆

却志群 (宜春学院, 江西宜春 336000)

摘要 水稻是重要的粮食作物, 稻瘟病严重影响水稻的产量和品质。实践证明, 培育和合理利用抗病品种是控制该病害最经济有效和对环境最安全的途径。然而, 往往具有单一抗病基因的水稻品种在广泛种植一段时间以后就丧失了抗病性。因此, 对稻瘟病的防治一般从两方面着手, 一方面需不断地发掘和创造新抗原; 另一方面, 抗病基因是植物-病原物互作中的一个关键因子, 克隆抗病基因是研究植物抗病机制、揭示植物-病原物互作机理和了解寄主与病原菌共进化规律的基础, 为控制和防治该病害提供全新的理论与途径。

关键词 稻瘟病; 抗病基因; 克隆

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)25-07792-02

Cloning of Rice Blast Resistance Gene

QUE Zhi-qun (Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

Abstract Rice blast could decrease rice yield and quality. Ultimately, the utilization of resistance genes in rice breeding, which was friendly to the environment, was the most effective and economical way against blast. However, many cultivars with one or few resistance genes were short-lived in environments and favorable to the disease. Therefore, it was necessary to control the disease from two sides. On the one hand, maintaining the durability of the blast resistance was to pyramid several resistance genes into an elite cultivar (cv.) to provide multigenic resistance against a wide spectrum of blast races. On the other hand, the system between rice and the rice blast was a good model system to study plant-microbe interactions. What's more, resistance genes were crucial in plant-pathogen system. So, isolating resistance genes would provide the basis for revealing mechanisms of plant resistance, plant-pathogen interaction, and host-pathogen co-evolution.

Key words Magnaporthe grisea; Resistance gene; Clone

稻瘟病是由子囊菌 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (无性态: *Pyricularia grisea* Sacc.) 引起的广泛发生在世界各稻区的最重要水稻病害之一^[1], 也是限制水稻高产稳产的主要因素。据估计, 在1975~1990年的16年间由稻瘟病引起的全球粮食损失高达1.57亿t, 年平均超过1千万t^[2]。20世纪90年代以来, 我国稻瘟病的年发生面积均在380万hm²以上, 造成稻谷年损失量达数亿kg^[3]。

对稻瘟病的控制, 一般采用季节调整、化学防治和种植抗性品种。季节调整常受不同作物茬口的影响而不易操作; 化学防治既昂贵又没有长期有效的杀菌剂, 而且污染环境; 种植抗病品种是最经济、有效的防治措施。但是由于稻瘟病的病原菌小种致病性与遗传的易变性, 新的抗病品种常常推广几年后就很快地丧失抗性^[4]。

因此, 要培育持久的抗病品种, 就必须加深对水稻与稻瘟病菌之间互作调控机制的了解。稻瘟病菌无毒基因与水稻抗病基因之间的特异互作, 符合经典的“基因对基因”学说^[5-6]。而抗病基因是植物与病原菌互作中的一个关键因子, 是抗病机制研究的基础。抗病基因的克隆将有助于揭示寄主与病原菌相互作用的机理, 了解寄主与病原菌共进化的规律。抗病基因的克隆有望为控制和防治该病害提供新的理论与途径^[7-8]。笔者就水稻稻瘟病抗病基因克隆的一些方法作简要的阐述。

1 传统图位克隆技术及应用

1.1 传统图位克隆技术的应用 基因克隆的主要目标是确定特异基因的染色体的位置, 识别、分离该基因并获得其完整序列, 阐明其生化功能并明确其对特定性状遗传的控制关系。来自水稻的抗病基因, 由于植物基因组与原核生物及动物相比, 其蛋白表达量更低, 更难分离和纯化。因此, 植物抗病基因的分离从原先传统的正向遗传学途径逐渐转向反向

遗传学方法, 即先从表型出发, 借助于特定的策略获得目的基因, 然后再去研究其功能^[9]。沿着这一思路产生了一些分离基因的方法, 其中, 以遗传和物理作图为基础的图位克隆法是应用最多的一种。Graudat等和Arondel等最早用该方法成功地克隆了拟南芥的AB3基因和FAD8基因^[10-11]。此后, 图位克隆技术在水稻、大麦、番茄等作物中得到了成功的应用。Martin等用该技术克隆了番茄Pto基因^[12]。Song等用这一技术克隆了水稻Xa21基因^[13]。Yoshimura等用同样的方法克隆了另一个抗白叶枯基因Xa1基因^[14]。Sun等用该方法克隆了水稻白叶枯基因Xa26^[15]。

在水稻稻瘟病抗病基因的分离方面, 到目前为止, 仅有4个稻瘟病抗病基因Pib、Pta、Pi9、Pi-d2被分离^[8, 16-18]。其中Pib、Pta、Pi9和Pi-d2基因是应用传统图位克隆技术分离的。

Pib: 位于第2染色体长臂上, 控制对大多数日本稻瘟病菌小种的抗性。Wang等首先利用RFLP标记构建了Pib位点的高密度遗传图, 并构建了大片段的基因组粘粒文库, 然后以与Pib紧密连锁的RFLP标记作为探针, 筛选基因组文库并进行了染色体步移, 对得到的候选克隆进行了亚克隆, 最后通过遗传互补实验确定了目的基因Pib^[16]。

Pta: 位于水稻第12染色体的着丝粒附近。Bryan等将共分离的RAPD标记转化为RFLP标记, 并以此为探针启动染色体步移, 筛选BAC文库, 构建了包含目标基因的850kb的重叠群, 然后通过测序分析鉴定了候选基因, 最后通过转化含有候选基因的亚克隆和全长cDNA克隆, 对Pita进行了功能验证^[8]。

Pi9: 位于水稻第6染色体上。Liu等用共分离的RAPD标记为探针, 筛选BAC文库, 构建了包含目的基因的100kb的重叠群^[19]; Qu等通过对这100kb进行测序分析, 表明该区域存在一个基因家族, 共有6个候选基因, 最后通过分别转化含有候选基因的亚克隆确定了目的基因Pi9^[17]。

Pi-d2: Chen等首先利用RFLP标记为探针, 筛选BAC文

作者简介 却志群(1980-), 女, 湖北仙桃人, 硕士, 助教, 从事组织培养与遗传工程方面的研究。

收稿日期 2007-04-23

库,然后结合微卫星标记RMB和RM527,启动染色体步移,在水稻第6染色体上定位了Pi-d2基因。随后,Chen等又利用CAPS标记将该基因界定到180 kb的区域内,然后利用生物信息学软件对该区域进行预测,发现仅有一个具有抗病基因保守结构的基因,最后通过遗传转化和功能互补实验证实了该基因为目的基因^[18]。

1.2 传统图位克隆的技术路线 据报道,到目前为止,至少有80多个稻瘟病主效抗性基因被鉴定,其中,60个已被分子定位^[20-22]。为什么目前只有上述4个基因是通过传统的图位克隆技术克隆的呢?这不得不使人们思考该技术在应用时存在的问题。传统的图位克隆法又被称为定位克隆法(positional cloning)。用该方法分离基因是根据功能基因在基因组中都有相对稳定的基因座,利用分离群体的遗传连锁分析将基因定位到染色体上的一个具体位置上,然后通过构建高密度的分子连锁图,找到与目的基因紧密连锁的分子标记,不断地缩小候选区域进而克隆该基因。它一般包括如下步骤:根据功能基因在基因组中都有相对稳定的基因座,利用分子标记对目的基因进行精细定位;构建目的基因所持品种的人工染色体文库;用与目的基因紧密连锁的分子标记筛选其DNA文库,从而构建目的基因区域重叠群(contig)的物理图谱;利用此物理图谱,通过染色体步移(chromosome walking)逐步地逼近目的基因或通过染色体登陆(chromosome landing)的方法最终找到包含目的基因的克隆;通过遗传转化试验证实目的基因的功能。

很明显,从其技术路线中可以看出该技术存在许多问题,如构建目的基因的基因组文库,筛选文库以及亚克隆等,都是非常费时费力的过程。

2 电子图位克隆技术的开发与运用

水稻全基因组工作框架图或工作完整图的完成为科研工作者开辟了一条简捷的图位克隆途径,即充分利用准确而完整的物理图谱和序列等公共信息,进行染色体电子步移,发现与目的基因紧密连锁的标记,构建覆盖目的基因的电子物理图谱(electronic physical map),从而达到克隆基因的目的。这种方法被称为“电子图位克隆”技术。

2.1 电子图位克隆 随着分子生物学的迅速发展,水稻基因组研究以及生物信息学研究的发展,弥补了传统图位克隆方法中存在的不足,为水稻稻瘟病抗病基因的快速定位与克隆开辟了新的途径。一种新的图位克隆方法应运而生:电子图位克隆。

电子图位克隆技术主要包括如下步骤:目的基因的连锁分析;利用连锁的分子标记直接从基因组工作框架序列或工作完整图中构建目的基因位点的电子重叠群;利用长片段PCR(long-range PCR, LR-PCR)等技术扩增目的基因的候选基因;候选基因遗传转化及功能分析等。目前,在水稻稻瘟病抗病基因克隆方面,仅有Pi36是利用该方法获得的。

Pi36:Liu等利用RAPD和SSR标记在水稻第8染色体上定位了一个新的稻瘟病抗性基因Pi36,接着又用共分离的CRG标记在水稻基因组序列图中进行染色体登陆,构建了包含目的基因17 kb的区域,然后通过测序分析鉴定了候选基因,最后通过转化含有候选基因的克隆,对Pi36进行了功能

验证^[23]。

由此可见,电子图位克隆技术充分地利用了水稻基因组学和生物信息学研究提供的信息,省略了在传统的图位克隆法中需构建大片段基因组文库等一系列烦琐的实验步骤,为快速克隆植物抗病基因创造了条件。

3 其他基因克隆方法的运用

3.1 转座子标签克隆法 转座子标签法(transposon tagging)是利用转座子插入到目的基因的内部或附近,引起基因失活,产生出易识别的突变表型,然后利用插入DNA片段作探针,筛选突变体基因组文库,克隆目的基因。目前,已通过转座子克隆法克隆出25种植物的抗病基因。Johal等首先利用此法从玉米中分离出抗灰色长蠕孢(Helminthosporium carbonum)1号小种的Hml特异抗真菌基因^[24]。Johns等和Thomas等利用同样的方法分别从番茄中克隆了抗叶霉病基因G-9和G-4^[25-26]。但是,该方法中筛选转座子插入突变体是一项十分耗力的工作,而且容易出错,所获得的突变体还需要进一步鉴定是自然突变还是插入突变,需要花很多时间。

3.2 基于同源保守序列的克隆方法 基于同源保守序列的克隆方法是一种参考已知基因的保守序列克隆其他基因的方法。该方法以其他种属的同源基因被克隆为前提,根据保守序列设计并合成特异性的简并引物,对植物基因组DNA进行扩增,得到抗病基因类似序列,检测这些序列与抗病性的共分离情况。若它们与抗病基因紧密连锁或带有抗病基因的同源序列,则可用其作为探针筛选cDNA文库或基因组文库,得到目的克隆。该方法需要构建文库和筛库,需要花很多时间和精力,同时,不只是抗病基因才有保守结构,许多AIP和GIP结合蛋白都有此序列,而且基因组中有大量的假基因存在,所获得的候选基因并不都具有能鉴定出的功能。因此,目前该方法在抗病基因的克隆中只用作辅助方法。

总之,随着结构基因组学研究的完成,功能基因组学研究手段的发展,克隆功能基因的方法越来越多。如表达差异筛选克隆法(Differential Screening)、mRNA差异显示(mRNA differential display)法以及抑制性消减杂交法(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)等^[27-30],但是每一种克隆方法都不是万能的,在实验过程中,要综合运用这些技术以及其他的基因克隆方法,相互补充,才能最终快速、准确地达到预期的目标。

参考文献

- [1] OUS H. Rice diseases[M]. 2nd. London: Commonwealth Mycological Institute, 1985:109-201.
- [2] BAKER B, ZAMBRYSKI P, STASKAWCZ B, et al. Signaling in plant-microbe interactions[J]. Science, 1997, 276:726-733.
- [3] 董继新, 董海涛, 李德葆. 水稻抗瘟性研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2000(8):99-102.
- [4] BONMANJ M, MACKILL D J. Durable resistance to rice blast disease[J]. Oryza, 1988, 25:103-111.
- [5] FLOR H H. Current status of the gene for gene concept[J]. Annu Rev Phytopath, 1971, 9:275-296.
- [6] VALENT B, CHUMLEY F G. Molecular genetics of the rice blast fungus, Magnaporthe grisea[J]. Annu Rev Phytopathol, 1991, 29:443-467.
- [7] VALENT B, CHUMLEY F G. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus[C]// ZHGLER R S, LEONG S A, TENG P S. Rice blast disease. Wallingford: CAB International, 1994:111-134.
- [8] BRYANG T, WUKS, FARRALL, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta[J]. Nat Cell, 2000, 12:2033-2045.

(上接第7793 页)

- [9] 张增艳, 孔凡晶, 辛志勇. 植物抗病基因克隆的进展[J]. 生物技术通报, 2000(2) :8 - 11 .
- [10] GRAUDAT J, HAUGE B M, VALON C, et al . Isolation of the Arabidopsis AB3 gene by positional cloning[J] . Plant Cell , 1992 , 4 :1251 - 1261 .
- [11] ARONDEL V, LEMEUX B, HWANG I, et al . Map based cloning of a gene controlling omega 3 fatty acid desaturation in Arabidopsis [J] . Science , 1992 , 258 :1353 - 1355 .
- [12] MARIIN 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 :1432 - 1436 .
- [13] SONG WY, WANG G L, CHEN L L, et al . A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene , Xa21 [J] . Science , 1995 , 270 :1804 - 1806 .
- [14] YOSHIMURA S, YAMANOUCHI U, KATAYOSE Y, et al . Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 :1663 - 1668 .
- [15] SUN X L, CAO Y L, YANG Z F, et al . Xa26, a gene conferring resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein [J] . Plant J, 2004 , 37 :517 - 527 .
- [16] WANG Z X, YANO M, YAMANOUCHI U, et al . The Hb gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes [J] . Plant J, 1999 , 19 :55 - 64 .
- [17] QUS H, LIU G F, ZHOU B, et al . The broad-spectrum blast resistance gene H9 encodes an NBS-LRR protein and is a member of a multigene family in rice [J] . Genetics , 2006 , 172 :1901 - 1914 .
- [18] CHEN X, SHANG J, CHEN D, et al . A Blectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance [J] . Plant J, 2006 , 46(5) :794 - 804 .
- [19] LIU G, LU G, ZENG L, WANG G L. Two broad spectrum blast resistance genes , H9(t) and H2(t) are physically linked on rice chromosome 6 [J] . Mol Genet Gen, 2002 , 267 :472 - 480 .
- [20] KINOSHITA T. Linkage map using mutant genes in rice [J] . Rice Genet Newsl , 1998 , 15 :13 - 74 .
- [21] PAN Q H, HUZ, TANSAKA T, et al . Fine mapping of the blast resistance gene H15 linked to H1, on rice chromosome 9 [J] . Acta Botanica Sinica , 2003 , 45 :871 - 877 .
- [22] ZHU M L, WANG L, PAN Q H. Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses [J] . Phytopathology , 2004 , 94 :515 - 519 .
- [23] LIU X Q, WANG L, CHEN S, et al . Genetic and physical mapping of H36(t) , a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8 [J] . Mol Genet Genomics , 2005 , 274(4) :394 - 401 .
- [24] JOHAL G S, BRIGGS S P. Reductase activity encoded by the Hm1 disease resistance gene in maize [J] . Science , 1992 , 258 :985 - 987 .
- [25] JONES D A, THOMAS C M, HAMMOND KOSACK K E, et al . Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to Cladosporium fulvum by transposon tagging [J] . Science , 1994 , 266 :789 - 793 .
- [26] THOMAS C M, JONES D A, PARNISKE M, et al . Characterization of the tomato Cf-4 gene for resistance to Cladosporium fulvum identifies sequences that determine recognition specificity in Cf-4 and Cf-9 [J] . Plant Cell , 1997 , 9 :2209 - 2224 .
- [27] BEDBROCK J R, SMITH S M, ELIIS R J, et al . Molecular cloning sequencing of cDNA encoding the precursor to the small subunit of chloroplast ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase [J] . Nature , 1980 , 287 :692 - 696 .
- [28] HERSHEY H P, BARKER R F. Molecular cloning of cDNA for Avena phytochrome [J] . PNAS, 1984 , 81 :2332 - 2336 .
- [29] LIANG P, AVERBOUKH L, PARDEE A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization [J] . Nucleic Acids Res , 1993 , 21 :3269 - 3275 .
- [30] DIATCHENKO L, LAU CHRIS Y F, CAMPBEN A P, et al . Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries [J] . PNAS, 1996 , 93 :6025 - 6030 .