

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.00998

小麦抗病基因类似序列 *BRG1* 的分离与功能分析

李 宁¹ 黄 茜^{1,2} 刘 燕¹ 赵 丹^{1,2} 刘 艳³ 黄占景² 张增艳^{1,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程 / 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081; ² 河北师范大学生命科学院, 河北石家庄 050016; ³ 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

摘 要: 利用 cDNA-AFLP 技术筛选到 1 个在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中特异表达的小麦抗病基因类似序列(BYDV resistance-related gene1, *BRG1*)的基因片段。利用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)和 RT-PCR 技术, 从 YW642 中分离出 *BRG1* 基因全长 cDNA 序列, 获得了一个通读的抗病同源基因 cDNA 序列, 编码由 645 个氨基酸组成的蛋白质, 包含 1 个 NB-ARC 保守结构域和 3 个 LRR 结构域, 该蛋白属于 nucleotide-site binding, leucine-rich repeats (NBS-LRR)家族。荧光定量或半定量 RT-PCR 表达分析表明, *BRG1* 在抗病小麦易位系 YW642 叶片中优势表达, 受 BYDV 的诱导, BYDV 接种后 48 h 表达量最高, *BRG1* 在感病小麦亲本中 8601 中表达量始终较低, 随 BYDV 接种时间延长呈轻微的下调趋势; 而且外源激素水杨酸(SA)与茉莉酸(JA)处理可上调该基因在 YW642 中的表达。利用病毒介导的基因沉默技术分析了 *BRG1* 基因的功能, 结果表明该基因沉默的抗病小麦易位系 YW642 中 BYDV 相对含量增加, 但未造成抗病性表型显著改变, 说明该基因参与抗黄矮病反应, 但不是小麦抗黄矮病重要基因。

关键词: 小麦-中间偃麦草易位系; 小麦黄矮病抗性; cDNA-AFLP; 抗病基因类似序列; 病毒介导的基因沉默

Identification and Functional Analysis of a Wheat Resistance Analogous Gene *BRG1*

LI Ning¹, HUANG Xi^{1,2}, LIU Yan¹, ZHAO Dan^{1,2}, LIU Yan³, HUANG Zhan-Jing², and ZHANG Zeng-Yan^{1,*}

¹ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Sciences / Key Laboratory of Crop Genetic and Breeding, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; ³ Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Barley yellow dwarf virus (BYDV) can cause wheat yellow dwarf. In this study, we isolated a fragment of a wheat resistance analogous gene, tentatively named BYDV response gene 1 (*BRG1*), which was expressed in the BYDV resistant wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line YW642 but was not expressed in the BYDV susceptible wheat Zhong 8601 using cDNA-AFLP technique. The full-length cDNA sequence of the gene *BRG1* was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and RT-PCR methods. The gene *BRG1* encodes a NBS-LRR protein consisting of 645 amino acid residues, which possesses one typical NB-ARC domain and three leucine-rich domains. The result of expression analysis by Q-RT-PCR method indicated that the expression of *BRG1* gene was predominant in the BYDV resistant translocation line YW642 and induced by BYDV infection, reached the peak at 48 h post inoculation with BYDV. However the express level of the gene in the susceptible wheat parent Zhong 8601 was lower than that in the resistant wheat YW642, and showed a decline tendency with BYDV infection time. The mRNA expression of *BRG1* gene in YW642 was up-regulated by salicylic acid (SA) and jasmonate (JA). Virus induced gene silencing technique was used to conduct functional analysis of the gene *BRG1*. The results showed that after BYDV infection, BYDV relative content in *BRG1* knocked-down YW642 was higher than that in YW642 expressing *BRG1* gene, whereas the silenced *BRG1* gene did not obviously alter the plant phenotype to BYDV infection. This result suggested that the gene *BRG1* may be involved in the host response to BYDV infection but not be an important gene.

Keywords: Wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line; Resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV); cDNA-AFLP; Resistance gene analog; Virus-induced gene silencing

本研究由国家高技术研究发展计划(863计划)重点项目(2006AA10A104)和国家重大科技专项-转基因生物新品种培育项目(2008ZX08002-001)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张增艳, E-mail: zhangzy@mail.caas.net.cn, Tel: 010-82108781

Received(收稿日期): 2010-10-25; Accepted(接受日期): 2011-03-28.

小麦黄矮病由蚜虫介导的大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)引起, 是小麦主要病毒病之一。该病的流行难以预测, 发病后难以治愈, 被称为“小麦癌症”, 一般年份减产 5%~10%, 流行年份减产可达 30%^[1]。选育抗黄矮病小麦新品种, 是防治该病害的最经济有效的途径。迄今, 小麦种属中尚未发现真正有效的抗性基因^[2]。小麦近缘植物——中间偃麦草高抗或免疫 BYDV 的多个株系, 至少含有 3 个抗黄矮病基因 *Bdv2*、*Bdv3* 和 *Bdv4*^[3-5]。以小麦-中间偃麦草附加系 L1^[6]为抗源, 通过远缘杂交、中国春 *ph* 突变体诱导部分同源染色体配对和组织培养等途径, 将携带抗黄矮病基因 *Bdv2* 的中间偃麦草染色体 7Ai#1 长臂片段引渗到小麦中, 育成一批抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系, 包括 YW642、YW443、YW243^[7-9]以及 TC5-TC10、TC14 等^[10]。并证明 YW642 中抗黄矮病基因 *Bdv2* 通过抑制 BYDV 的复制与运动产生黄矮病抗性^[11]。然而, 中间偃麦草染色体 7Ai#1L 片段, 除携带抗黄矮病基因 *Bdv2* 外, 还存在不利的连锁累赘^[12], 影响了这些易位系在育种上的广泛利用。因此, 迫切需要分离克隆出 *Bdv2* 及其抗黄矮病相关的重要基因, 研究其作用的分子机制, 并应用于基因工程育种, 以高效地培育抗黄矮病、高产、优质的小麦新品种。

对模式植物抗病反应机制的研究表明, 抗病反应是一个精细的、复杂的防御级联反应, 植物免疫受体、抗病基因编码产物能够直接、间接地识别病原的效应因子, 从而激发一系列防御基因的表达, 最终产生对病原的抗性^[13]。由此可知, 抗病基因是抗病反应信号传导链的起始部分。因此, 克隆抗病基因对培育抗病作物品种和研究病原物与寄主作用机制具有重要的意义。目前, 已从烟草、马铃薯、番茄、拟南芥、大豆、扁豆等植物中克隆出 10 个显性的植物抗病毒基因^[14], 其编码蛋白均为 NBS-LRR 蛋白, 即它们具有类似的保守结构域, 一个中心的核苷酸结合位点(nucleotide binding site, NBS)和 C-端的富含亮氨酸重复(leucine-rich repeats, LRR)区。

cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism)技术是近年发展起来的将 RT-PCR 和 AFLP 技术结合的新技术, 具有多态性丰富、稳定性高、效率高等特点, 已成功用于基因差异表达谱研究^[15]和基因分离^[16]。病毒介导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是指携带目标基因片段的重组病毒侵染植物后, 可诱导植物内同源基因

沉默、引起表型变化, 进而根据表型变异研究目标基因功能的技术^[17]。VIGS 能够使目标基因沉默、进行功能缺失性的互补实验、完成目标基因功能的快速分析, 已作为研究植物基因功能的强有力工具, 用于烟草、番茄、大麦、小麦等植物的抗病反应、生长发育以及代谢调控等过程中功能基因研究^[17]。因此, 将 cDNA-AFLP 和 VIGS 技术相结合, 可以快速分离出重要的植物-病原互作基因。Gabriëls 等^[18]利用 cDNA-AFLP 分析了具 *Cf4* 抗病基因的番茄响应叶霉病菌 *Avr-4* 的表达谱, 获得番茄应答 *Avr-4* 的基因表达片段 400 余个, 用 VIGS 技术对其中 15 个基因表达片段进行功能分析, 结果发现 1 个 NBS-LRR 蛋白(NRC1)是 *Cf* 抗病蛋白功能和 INF1 介导超敏反应(HR)所必需的, 进一步证明 NB-LRR 蛋白在植物抗病信号级联反应中起着重要作用^[18]。

本研究利用 cDNA-AFLP 技术鉴定出 1 个在抗黄矮病小麦中表达的 NBS-LRR 基因片段(*BRG1*), 通过 RACE 技术获得该基因的全长 cDNA 序列, 对其结构、表达情况进行分析, 并用 VIGS 技术初步分析了该基因的功能, 以期小麦抗黄矮病机制的深入研究奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 植物材料及其处理

抗黄矮病的中间偃麦草 Z1146 由中国农业科学院作物科学研究所小麦资源组李立会、李秀全提供, 抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 (4*中 8601/4/中 7902/3/ L1/2*CSph/2/CSN5BT5D)、感黄矮病的小麦亲本中 8601, 由中国农业科学院作物科学研究所小麦分子育种组选育、保存。当上述材料长至二叶一心时取叶片, 然后每株小麦接种 10 头携带 BYDV 的毒蚜(BYDV-毒蚜)和 10 头无 BYDV 的蚜虫, 接种 0、12、24、48 和 72 h 后取小麦叶片, 液氮速冻, 用于提取 RNA。

按照 Zhang 等^[19]方法, 用防卫相关的激素: 水杨酸(SA) 1 mmol L⁻¹、茉莉酸(JA) 0.2 mmol L⁻¹, 处理抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 的叶片, 于处理后 0、1.5、3、6、12 和 24 h 取小麦叶片, 液氮速冻, 用于提取 RNA。

1.2 RNA 提取和双链 cDNA 的合成

利用 Trizol 试剂盒(Invitrogen)提取总 RNA, 按照 cDNA Synthesis kit (TaKaRa)的操作说明进行合成双链 cDNA。

1.3 cDNA-AFLP 差异显示、差异片段的回收与扩增

AFLP 的步骤参照 Vos 等^[20]报道 cDNA-AFLP 体系及程序。Pst I、Mse I 双酶切 200 ng 双链 cDNA, 与相应的接头连接, 将含有 Pst I、Mse I 的预扩引物扩增, 产物稀释 20 倍作为模板, 再用含有 Pst I、Mse I 的选扩引物进行选择扩增, 6%PAGE 电泳分析, 分析差异表达片段。

参照赵继荣等^[21]报道的方法, 回收只在抗黄矮病小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中特异表达、而感病小麦中不表达的基因片段。参照赵继荣等^[21]报道的方法, 利用该选扩引物对再次扩增目的差异条带, 将此扩增产物与原选扩产物在 6% PAGE 分析, 若与原选扩特异带一致且无杂带的, 可将此扩增的差异条带用 1%的琼脂糖分离、回收、克隆、测序分析。

1.4 RGC1B 全长 cDNA 序列的获得与分析

从 cDNA-AFLP 选扩引物对 P38/M16 (表 1) 对抗黄矮病小麦-中间偃麦草易位系 YW642、感黄矮病小麦亲本中 8601 的扩增产物中, 分离到 1 个抗黄矮病小麦中优势表达的 NBS-LRR 同源基因片段 (BRG1)(图 1), 以该特异表达片段为靶序列设计嵌套式引物(表 1), 参照 Invitrogen 公司的 RACE 试剂盒操作说明, 采用巢式 PCR 扩增策略以 YW642 的 cDNA 为模板进行 3'RACE 和 5'RACE, 扩增产物经克隆, 测序, 通过 1 次 3'RACE 和 3 次 5'RACE 获得 3'端和 5'端序列, 利用 NCBI-BLAST-Align 2 sequences using blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)进行拼接, 获得 BRG1 基因的全长 cDNA 序列(3 218 bp), 然后再设计 1 对引物(BR1-OU/BR1-OL)从 YW642 的 cDNA 中 PCR 扩增出包含完整 ORF 的 BRG1 基因全长 cDNA 序列, 克隆、测序。

用 DNAMAN 和 DNASTar 软件分析测序结果, 将核苷酸序列和推测的氨基酸序列在 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 分析。利用 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析推导蛋白结构域, 用 MEGA 4 软件进行系统发育分析, 比较小麦 BRG1 蛋白与小麦其他抗病蛋白 Lr21、Lr1、Lr10、Lr19、Pm3a 与 Lr34 的关系。

1.5 BRG1 表达特性的分析

用小麦 Actin [NCBI accession number: BE398871 (引物 WACT-F/ACT-R)]作为内标基因调整试材 cDNA 模板使起始浓度一致(即均一化), 然后利用 BRG1 特异性引物、Quantative RT-PCR (Q-RT-PCR)、RT-PCR 技术分析该基因表达特性。

1.6 VIGS 法分析基因的功能

参照刘晓东等^[22]方法, 利用 BRG1 基因特异引物: BR1-VIIF: 5'-GCTTAATTAAGACCAAGCTAGC GCATCATC-3', 该基因引物对应 BRG1 基因特异的 3'端、cDNA 序列第 1 659~1 678 核苷酸, 带下画线的序列为 PacI 酶切位点; BR1-VIIR:5'-AAGCG GCCGCATGACAGCGGGAATCAGT-3'该基因引物对应 BRG1 基因特异的 3'端、cDNA 序列第 2 125 至 2 142 位核苷酸, 带下画线的序列为 Not I 酶切位点; PCR 扩增 BRG1 基因 3'端第 1 659 到 2 142 位核苷酸的一段序列。该序列与小麦 NBS-LRR 假定蛋白(登录号为 ABA54554.2)基因的同源性 64%, 与小麦其他抗病基因如 Lr10、Pm3a、Lr19 的同源性低于 50%。亚克隆反向插入到 BSMV 的 γ 载体的多克隆位点形成重组载体。参照刘晓东等^[22]方法, 用转录的重组 BSMV 病毒(BSMV-BRG1)RNA 侵染二叶期的抗黄矮病小麦易位系 YW642 的第 2 片和第 1 片叶片, 以使 YW642 中 BRG1 基因表达沉默, 在 BSMV-BRG1 侵染 7 d 后接种 10 头 BYDV-毒蚜, 4 d 后杀死毒蚜, 于 BYDV-毒蚜接种 15 d, 以 18SrRNA 作为内标基因来调整试材 cDNA 使浓度一致, 用 BYDV- RdRp (登录号为 AY220739)引物(RdRp-F: 5'-TGACCGAGG CTTGGAACGAC-3', RdRp-R: 5'-CGATGGTGGCG AGAGACAGT-3')进行 RT-PCR 以分析 BYDV 的相对浓度, 观察抗性表型的变化。

2 结果与分析

2.1 BRG1 全长 cDNA 序列的获得

通过 cDNA-AFLP 筛选, 获得一个在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中表达的基因片段, 在感黄矮病小麦亲本中 8601 中不表达(图 1), 而且该基因表达片段在携带 BYDV 的毒蚜侵染 0、48 和 72 h 的 YW642 中表达, 在不携带 BYDV 的蚜虫接种 48 h 和 72 h 的抗病 YW642 中不表达(图 1), 说明该基因表达与蚜虫刺吸无关, 只与 YW642 对 BYDV 防御反应有关, 暂命名为 BRG1 (BYDV response gene 1)。图 1 中, 在抗病的 YW642 中 BRG1 本底表达量似乎高于 BYDV 诱导后表达量, 可能与 cDNA-AFLP 选择扩增的起始浓度或该基因参与上游反应有关, 具体原因有待通过 Q-RT-PCR 分析该基因表达来解析。

对该特异性表达的 BRG1 片段进行分离、测序分析, 发现该基因片段长为 146 bp, 第 43~144 位核苷酸编码氨基酸序列与小麦 NBS-LRR 假定蛋白

表 1 *BRG1* 基因克隆与分析所用引物
Table 1 Sequences of primers in isolation and analyses in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	用途 Application
P38	GACTGCGTACATGCAGACC	cDNA-AFLP 选扩引物 Selective primer of cDNA-AFLP
M16	GATGAGTCTGAGTAACGC	cDNA-AFLP 选扩引物 Selective primer of cDNA-AFLP
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT17	3'RACE 第 1 轮扩增通用引物 The first primer for 3'RACE
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'、5'RACE 第 2 轮扩增通用引物 The second primer for 3' and 5'RACE
3P1	TAGCACGCAGTTACAAAG	3'RACE 第 1 轮扩增的基因引物 The first round primer of gene for 3'RACE
3P2	ATGACTGGTGCATGGAAGA	3'RACE 第 2 轮扩增的基因引物 The second round primer of gene for 3'RACE
5P1-1	TGATTCACTGGCACAA	第 1 次 5'RACE 第 1 轮扩增引物 The first gene-specific primer for the first 5'RACE
5P1-2	AAGAAGGGAGCGTCATAC	第 1 次 5'RACE 第 2 轮扩增引物 The second gene-specific primer for the first 5'RACE
5P1-3	GCCAAGCAGACTTCGGACA	第 1 次 5'RACE 第 3 轮扩增引物 The third gene-specific primer for the first 5'RACE
5P2-1	AAGCAGACTTCGGACA	第 2 次 5'RACE 第 1 轮扩增引物 The first gene-specific primer for the second 5'RACE
5P2-2	TCCGTGCTGTTTCTCTA	第 2 次 5'RACE 第 2 轮扩增引物 The second gene-specific primer for the second 5'RACE
5P2-3	AGGAAAAGCAGCAAAATA	第 2 次 5'RACE 第 3 轮扩增引物 The third gene-specific primer for the second 5'RACE
5P3-1	ATCAATACCCTGGAA	第 3 次 5'RACE 第 1 轮扩增引物 The first gene-specific primer for the third 5'RACE
5P3-2	TTTCTGGCAAGTGTGTTTT	第 3 次 5'RACE 第 2 轮扩增引物 The second gene-specific primer for the third 5'RACE
5P3-3	CGGTACATAAGCCGTAATC	第 3 次 5'RACE 第 3 轮扩增引物 The third gene-specific primer for the third 5'RACE
BR1-OU	TGCCGAACCTGATAAAGCATC	扩增 <i>BRG1</i> 全长 cDNA 序列 Forward primer for the full-length cDNA sequence of <i>BRG1</i>
BR1-OL	ACACTCCTTGACAGGTGGTGGT'	扩增 <i>BRG1</i> 全长序列 Reward primer for the full-length cDNA sequence of <i>BRG1</i>
2819U	GTCGCCGCCTCTCGTCCT	RT-PCR 分析 <i>BRG1</i> 表达 Forward primer for RT-PCR analysis of <i>BRG1</i>
3000L	CTCG CTGCCGCCACCCTC	RT-PCR 分析 <i>BRG1</i> 表达 Reward primer for RT-PCR analysis of <i>BRG1</i>
WACT-F	CACTGGAATGGTCAAGGCTG	小麦 <i>actin</i> 基因的 RT-PCR 分析 Forward primer for RT-PCR analysis of <i>actin</i>
WACT-R	CTCCATGTCATCCAGTTG	小麦 <i>actin</i> 基因的 RT-PCR 分析 Reward primer for RT-PCR analysis of <i>actin</i>
18S rRNA-F	GTGACGGGTGACGGAGAATT	小麦 <i>18SrRNA</i> 基因的 RT-PCR 分析 Forward primer for RT-PCR analysis of <i>18SrRNA</i>
18S rRNA-R	GACACTAATGCGCCCGGTAT	小麦 <i>18SrRNA</i> 基因的 RT-PCR 分析 Reward primer for RT-PCR analysis of <i>18SrRNA</i>

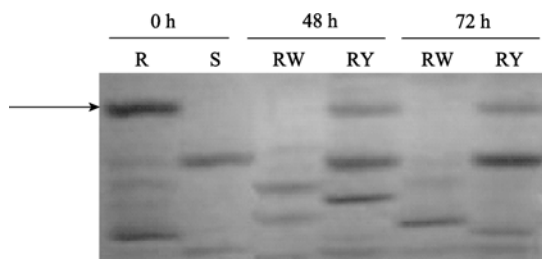


图 1 接种 BYDV-毒蚜 0~72 h 后引物 P38M16 的 cDNA-AFLP 电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic analysis of cDNA-AFLP amplified with P38M16 primers in wheat 0-72 h after inoculation with BYDV-aphids

R: 未接种的小麦-中间偃麦草系 YW642; S: 未接种的小麦品种“中 8601”; RW: 接种不携带 BYDV 蚜虫的 YW642, RY: 接种携带 BYDV 蚜虫的 YW642。

R: wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line; S: common wheat variety “Zhong 8601”; RW: YW642 inoculated with aphids without BYDV; RY: YW642 inoculated with aphids with BYDV.

ABA54554.2 的第 530 至 563 位氨基酸序列有 67% 一致性。

采用 RACE 技术、巢式 PCR 策略, 以 YW642 cDNA 为模板, 通过 1 次 3'RACE 和 3 次 5'RACE 反

应, 对 RACE 产物进行克隆、测序分析与序列的拼接, 最终获得 *BRG1* 基因的全长 cDNA 序列, 长度为 3 218 bp, 包含一个长为 1 938 bp 的完整开放阅读框 (ORF)。为验证该拼接序列的正确性, 又根据拼接的全长序列设计 1 对引物(BR1-OU/BR1-OL), 以 YW642 的 cDNA 为模板, 扩增、克隆包含完整 ORF 的基因 cDNA 序列, 测序分析的结果表明, 扩增的 cDNA 序列与拼接序列完全一致, 证明了该拼接序列的正确性。*BRG1* 基因的全长 cDNA 序列已提交到 GenBank 数据库, 登录号为 HM036360。

2.2 *BRG1* 基因编码蛋白的序列特点

BRG1 基因编码由 645 个氨基酸组成的蛋白 BRG1。经 BLASTp 和 DNAMAN 软件分析, BRG1 蛋白序列含有 NB-ARC 保守结构域, 其全长序列与小麦的一个 NBS-LRR 假定蛋白(登录号为 ABA54554.2)、拟南芥抗病蛋白 RPP13 (登录号为 AF209732)、RPP8 (登录号 AAL32593), Ler3 (登录号为 AAP80285.1)、Ei2-2 (登录号为 AAP80278.1)、Sorb2 (登录号为 AAP80289.1)、ATP binding 蛋白(登录号为 NP_175742.1)、

玉米 RXO1 (登录号为 AAX31149.1)、番茄 NRC1 (登录号为 ABC26878.1) 等具有不同程度的同源性(30%~80%的同源性), 与上述抗病蛋白的 NB-ARC 保守结构域同源性较高(大于 80%)。利用 SMART 分析发现, BRG1 具有 NBS-LRR 抗病蛋白的特征结构域(图 2), 其 N 端第 168~457 位氨基酸序列为 1 个典型的 NB-ARC 结构域, 由 P-loop (核心氨基酸为 GGAGKTTL)、激酶 2a (核心氨基酸为 KRYLVVLDVW)、激酶 3a (核心氨基酸为 GSRVLLTTR)和 HD 疏水结构域(核心氨基酸为 GLPLAL)组成, BRG1 蛋白的 C 端含有 3 个 LRR (“LxxLxLxx”)保守结构域。

BRG1 首先与小麦抗病蛋白 Lr10 聚为一类, 说明其与 Lr10 亲缘关系最近, 其次与 Pm3a、Lr19 亲缘关系较近, 与已克隆的小麦抗病蛋白 Lr34 亲缘关系最远(图 3), 这可能与 Lr34 为 STK-STAR 蛋白, 其他分离的小麦抗病基因编码 NBS 类蛋白有关。

```

1 MAESAVRT VI GSVGNLAVQETTFLCAVNLVGLLKDLMRLKAYLKDVDSKWRSGNARVT
61 VLVSQI RTAAEYEAQNV I EAADYMEKRNRI KKGFI EAI SRYARLPNDLVTLRKI GVDI GHV
121 RRKLN E I FSSADHLKI DLNNTVVEDEFQDYGMYRNSDDVVMVGFEDKKEI VDKLV
181 DNDCLMSVYSI VAMGGAGKTTIARKVYRSPRVKEHFDI LVVVTYSGNFQGITDLLKDI MKQ
241 IMSGRKSI AKMNEYEVGKEI HDFLKARKYLVLDDVME TDTWEQLNRM I KVFLDAENGS
301 RVLTTTRKEDVANHVMPT YVHPLKLDDEKSNELFSSNALPSYRMSVI HDVDEFELGR
361 KLANKCDGLPLALAVLGGYLSKNLNAQTRCDI LSDMPATKDGGMQDI LARSYKDLPDHI
421 LRSCLLYFAAFPEDYKI YVPHLI ELWIAESFI PRTRNHTLEETARSYYTELAQRSLVQVV
481 DRKTAHGWI ESI RI HDI LHDWCMEEARQDGFDTI DKTADQASASSSSNLSMYSYCYGT
541 VSGQI SPATPNVRSLLQFKLSSVSLPKLRFRLRVLCI EDSTLKDFSSVI GGCILHRLLRMR
601 RCRRMTLPSSIGKFLYLQTI DLRTDFEVSTTVPLGHPYAKACLPP
  
```

图 2 *BGCI* 基因编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of *BGCI* gene from YW642

黑体序列表示 NB-ARC 区; 带下画线的斜体序列依次表示 P-Loop、Kinase-2、Kinase-3a 和 HD 区; 带下画线的正体序列表示 LRR 结构域。

NB-ABC domain is shown as bold letters; P-Loop, kinase-2, kinase-3a and HD regions are orderly shown as underline italic sequences; LRR regions are shown as underline sequences.

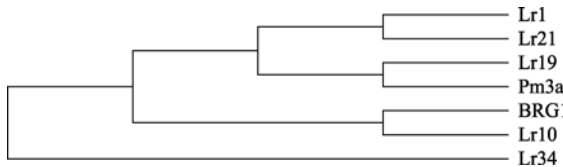


图 3 *BRG1* 与小麦其他抗病编码蛋白序列系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of deduced amino acid sequences of *BRG1* and other resistance proteins in wheat

2.3 *BRG1* 基因的表达特性分析

在 BYDV 接种 0~72 h 的抗黄矮病小麦易位系 YW642 中均观察到 *BRG1* 基因有表达, 表达水平呈上调趋势, 接种 48 h 出现诱导表达高峰, 较接种前提高约 2 倍(图 4-A), 但 *BRG1* 在感黄矮病的小麦中 8601 中表达水平始终较弱, 低于在 YW642 中的表

达水平, 而且 *BRG1* 在感黄矮病的小麦中 8601 中随 BYDV 接种时间延长呈轻微的下调趋势(图 4-A), 说明该基因可能参与抗黄矮病小麦易位系 YW642 对 BYDV 的防御反应。RT-PCR 分析结果表明, 外源 SA 和 JA 处理对 *BRG1* 基因转录表达起促进作用(图 4-B), SA 处理 3 h 对 *BRG1* 诱导表达量最高, JA 处理 12 h 对 *BRG1* 表达的诱导最显著。

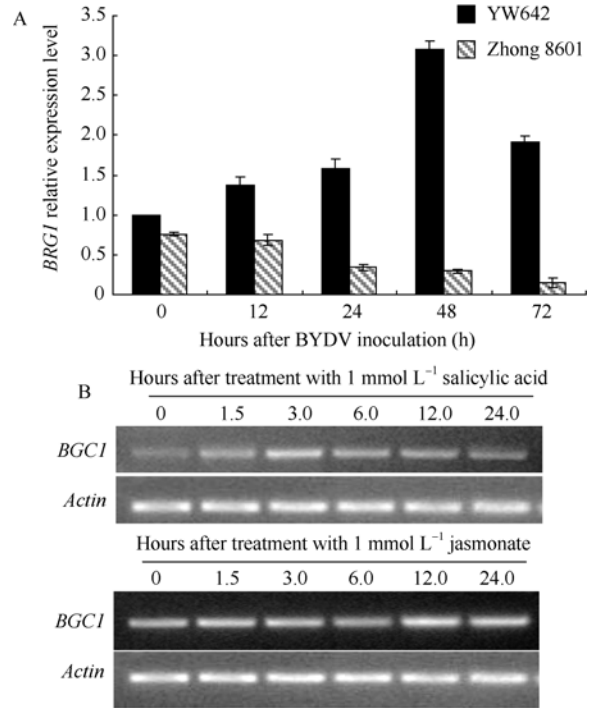


图 4 Q-RT-PCR/RT-PCR 分析 *BRG1* 基因的表达特性
Fig. 4 Analysis of the expression of the gene *BRG1* using Q-RT-PCR and RT-PCR

2.4 *BRG1* 基因的功能分析

采用 VIGS 技术, 在抗黄矮病的小麦易位系 YW642 上接种 BSMV-*BRG1* 来实施 *BRG1* 基因的沉默, 然后接种 BYDV-毒蚜。结果接种 BSMV-*BRG1* 7 d 后, YW642 中 *BRG1* 基因表达量明显下调, 说明 *BRG1* 基因发生了沉默, 沉默效率达 66.7%, 随着接种时间的延长 *BRG1* 基因沉默继续发生。图 5-A 显示了在 BSMV-*BRG1* 接种 22 d 的 YW642 中 *BRG1* 基因表达情况。接种 BYDV 15 d 后(BSMV-*BRG1* 接种 22 d), 与正常的 YW642 抗病对照相比, *BRG1* 基因沉默的 YW642 植株中 BYDV-RdRp 有少量表达(图 5-B), 但未达到感病对照中 8601 中 BYDV-RdRp 的表达水平(图 5-B)。接种 BYDV 35 d 进一步观察发现, 感病对照中 8601 显示感病表型, 正常的 YW642 抗病对照显示抗病表型, *BRG1* 基因沉默的 YW642

植株没有显示出典型的感病表型, 说明 *BRG1* 基因虽然参与了抗病小麦系对 BYDV 防御反应, 但不是抗黄矮病的重要基因。

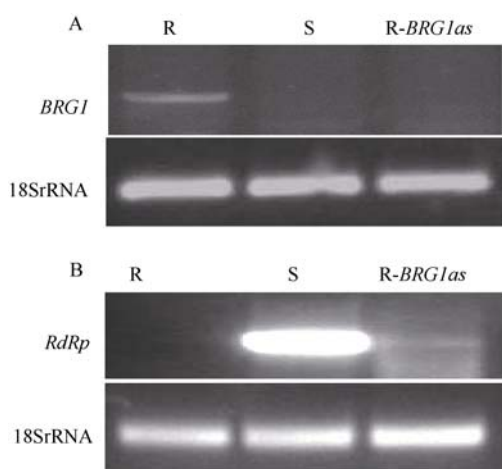


图 5 实施 BSMV-*BRG1* 22 d 后 W642 中 *BRG1* 与 BYDV-RdRp 相对表达量的 RT-PCR 分析

Fig. 5 RT-PCR analysis of expressions of *BRG1* and BYDV-RdRp in YW642 at 22 d after BSMV-*BRG1as* treatment

R: 正常的 YW642; S: 中 8601; R-*BRG1*: 实施 BSMV-*BRG1as* 基因沉默的 YW642。

R: resistant control YW642 expressing-*BRG1*; S: susceptible control Zhong 8601; R-*BRG1*: YYW642 with silenced *BRG1* after treated by BSMV-*BRG1as*.

3 讨论

迄今, 已从玉米、拟南芥、番茄、水稻、小麦、大麦等多种植物中成功分离克隆出 60 余个抗病 (resistance gene, *R*) 基因。它们赋予不同寄主植物对真菌、细菌、病毒等类型病原微生物的抗病性, 上述基因大部分是通过图位克隆法分离出来的 NBS-LRR 编码蛋白。但是, 图位法克隆基因的技术要求高, 工作量大, 周期长。

随着更多植物抗病基因被克隆以及功能基因组学的发展和基因功能分析新技术的完善, 人们试图利用已克隆 *R* 基因保守结构和抗病基因 NBS-LRR 同源序列 (RGA) 共线性分离抗病基因^[23-24]。某些情况下, 这些 *R* 基因保守结构扩增产物有利于分离克隆其他抗病基因, 如玉米抗锈基因 *Rp1-D*^[25]。但是, 抗病基因 NBS-LRR 同源序列在植物基因组中大量存在, 在禾谷类中迅速重组、重排和进化, 大麦、水稻和小麦中同源的 NBS-LRR 基因常常缺失或者定位到非同源染色体位置^[24], 另外与 *R* 基因相关的 RGA 只是其中的一部分, 新的抗病基因也许是新的类型, 因此, 利用已克隆 *R* 基因保守结构分离禾谷类其他抗病基因不一定可行。例如, 国外科学家曾

试图利用大麦与水稻的微共线性、以及水稻 *R* 基因 NBS-LRR 保守序列来克隆 *Rpg1*, 结果只获得 *Rpg1* 附近的分子标记^[23], 最终利用图位克隆法分离出 *Rpg1* 基因^[26], 证明 *Rpg1* 编码 1 个蛋白激酶, 并在 *Rpg1* 位点附近鉴定出 4 个不同的 NBS-LRR 基因家族。然而, 在水稻基因组中没有鉴定到大麦 *Rpg1* 的同源序列。在分离克隆小麦抗叶锈基因 *Lr21*、*Lr10* 和抗白粉病基因 *Pm3b* 期间, 发现小麦和水稻第一群染色体的相应区域之间不存在基因共线性^[24,27]。这些研究结果进一步表明, 利用禾谷类基因组的共线性分离抗病基因并非通用。

本课题组获得了 1 个在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中优势表达的 *BRG1* 基因的全长 cDNA 序列。cDNA-AFLP 分析结果表明 *BRG1* 基因似乎只在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中特异表达, 不受 BYDV 诱导; 然而 Q-RT-PCR 分析结果显示 *BRG1* 基因在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中优势表达, 受 BYDV 诱导而上调表达, 这些差异可能与使用的引物对、所用的分析技术有关。通过 VIGS 技术进行该基因功能互补分析, 结果发现 *BRG1* 基因虽然可能参与抗病小麦 YW642 对 BYDV 的防御反应, 但并不是抗黄矮病的重要基因。本课题研究结果表明, 我们发现, 从转录水平筛选到的差异表达基因未必是所要寻找的目标基因, 因此, 及早应用 VIGS 或其他技术对候选基因进行功能快速分析非常必要。

4 结论

分离克隆出 1 个在抗黄矮病的小麦-中间偃麦草易位系 YW642 中优势表达的小麦抗病基因类似序列 *BRG1*, 它编码由 645 个氨基酸组成的 NBS-LRR 类蛋白质, 并 *BRG1* 参与小麦抗黄矮病反应, 但不是抗黄矮病重要基因。

References

- [1] Larkin P, Kleven S, Banks P. Utilizing *Bdv2*, the *Thinopyrum intermedium* source of BYDV resistance, to develop wheat cultivars. In: Henry M, McNab A, eds. Recent Advances and Future Strategies. Texcoco, Mexico: CIMMYT, 2002. pp 60-63
- [2] Friebe B, Mukai Y, Gill B S, Canderon Y. C-banding and in situ hybridization analyses of *Agropyron intermedium*, a partial wheat × *Ag. intermedium* amphloid, and six derived chromosome addition lines. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 899-905
- [3] Sharma H, Ohm H, Goulart L, Lister R, Appels R, Benlhabib O. Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus

- resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Genome*, 1995, 38: 406–413
- [4] Larkin P, Baeva K, Banks P, Lagudah E, Appels R, Chen X, Xin Z, Ohm H, McIntosh R. Disomic *Thinopyrum intermedium* addition lines in wheat with barley yellow dwarf virus resistance and with rust resistances. *Genome*, 1995, 38: 385–394
- [5] Zhang Z Y, Lin Z S, Xin Z Y. Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 567–573
- [6] Cauderon Y, Saigne B, Dauge M. The resistance to wheat rusts of *Agropyron intermedium* and its use in wheat improvement. In: Sears E R, Sears L M S, eds. Proc Intl Wheat Genet Symp: Wheat Improvement, Vol. 4. University of Missouri, Columbia, MD, USA, 1973. pp 401–407
- [7] Xin Z, Zhang Z, Chen X, Lin Z, Ma Y, Xu H, Banks P, Larkin P. Development and characterization of common wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation lines with resistance to barley yellow dwarf virus. *Euphytica*, 2001, 119: 161–165
- [8] Zhang Z-Y(张增艳), Xin Z-Y(辛志勇), Chen X(陈孝), Qian Y-T(钱幼亭), Lin Z-S(林志珊). Molecular cytogenetic characterization of a new wheat line YW443 with resistance to barley yellow dwarf virus. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2000, 27(7): 614–620 (in Chinese with English abstract)
- [9] Xie H(谢皓), Chen X(陈孝), Zhang Z-Y(张增艳), Xin Z-Y(辛志勇), Lin Z-S(林志珊), Du L-P(杜丽璞), Ma Y-Z(马有志), Xu H-J(徐惠君). Development and molecular cytogenetic characterization of a wheat line YW243 resistant to BYDV. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, 26(6): 687–691 (in Chinese with English abstract)
- [10] Banks P, Larkin P, Bariana H, Lagudah E, Appels R, Waterhouse P, Brettell R, Chen X, Xu H, Xin Z, Qian Y, Zhou M, Cheng Z, Zhou G. The use of cell culture for sub-chromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome*, 1995, 38: 395–405
- [11] Liu X D, Zhang Z Y, Xin Z Y. Molecular evidence of barley yellow dwarf virus replication/movement suppressed by the resistance gene *Bdv2* derived from *Th. intermedium*. *J Genet Genomics*, 2005, 32: 942–947
- [12] Ayala L, Bariana H, Singh R, Gibson J, Gibson A, Mechanicos P. Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. *Theor Appl Genet*, 2007, 116: 63–75
- [13] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444: 323–329
- [14] Maule A, Caranta C, Boulton M. Sources of natural resistance to plant viruses: Status and prospects. *Mol Plant Pathol*, 2007, 8: 223–231
- [15] Wang X, Liu W, Chen X, Tang C, Dong Y, Ma J, Huang X, Wei G, Han Q, Huang L, Kang Z. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 9
- [16] Chen G P, Ma W S, Huang Z J, Xu T, Xue Y B, Shen Y Z. Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance. *Plant Sci*, 2003, 165: 1369–1375
- [17] Zhang Z-Y(张增艳), Yao W-L(姚乌兰), Xin Z-Y(辛志勇). Advance in virus-induced gene silencing, a novel powerfully tools for functional analysis of plant genes. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2006, 7(1): 100–105 (in Chinese with English abstract)
- [18] Gabriëls S, Takken F, Jong C, Liu Q, Turk S, Wachowski L, Peters J, Witsenboer H, Pierre J, Wit D, Joosten I M. cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19: 567–576
- [19] Zhang Z Y, Yao W L, Dong N, Liang H X, Liu H X, Huang R F. A novel ERF transcription activator in wheat and its induction kinetics after pathogen and hormone treatments. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2993–3003
- [20] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407–4414
- [21] Zhao J-R(赵继荣), Li N(李宁), Liu H-X(刘红霞), Bi Y(毕阳), Zhang Z-Y(张增艳). Confirmation of cDNA-AFLP differential expressed fragments of related defense genes against BYDV in wheat. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2009, 10(1): 16–20 (in Chinese with English abstract)
- [22] Liu X-D(刘晓东), Zhang Z-Y(张增艳), Yao W-L(姚乌兰), Xin Z-Y(辛志勇). Implement of barley stripe mosaic virus-based induced gene silencing in wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(11): 1518–1520 (in Chinese with English abstract)
- [23] Zhang Z-Y(张增艳), Yao W-L(姚乌兰), Li H-T(李宏涛), Xin Z-Y(辛志勇). Progress in molecular genetics of barley and wheat. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2005, 25(6): 139–143 (in Chinese with English abstract)
- [24] Ayliffe M A, Lagudah E S. Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Ann Bot*, 2004, 94: 765–773
- [25] Collins N, Drake J, Ayliffe M, Sun Q, Ellis J, Hulbert S, Pryor T. Molecular characterization of the maize *Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell*, 1999, 11: 1365–1376
- [26] Bruggeman R, Rosoks N, Kudrna N, Kilian A, Han F, Chen J, Druka A, Steffenson B, Kleinhofs A. The barley stem rust resistance gene *Rpg1* is a novel disease resistance gene with homology to receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9328–9333
- [27] Han F, Kilian A, Chen J P, Kudrna D, Steffenson B, Yamamoto K, Matsumoto T, Sasaki T, Kleinhofs A. Sequence analysis of a rice BAC covering the syntenous barley *Rpg1* region. *Genome*, 1999, 42: 1071–1076