

# 菠菜 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的克隆及分析

折红兵<sup>1</sup> 范桂彦<sup>1</sup> 张合龙<sup>2</sup> 王晓武<sup>1</sup> 武剑<sup>1</sup> 钱伟<sup>2\*</sup> 徐兆生<sup>2\*</sup>

[<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 中蔬种业科技(北京)有限公司, 北京 100081]

**摘要:** 依据已知 NBS-LRR 类抗病基因的 P-loop 和 GLPL 两个保守结构域设计简并引物, 对抗菠菜霜霉病商业杂交种 RZ51-147、自交系 12S3 和 12S4 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增、克隆和序列测定, 共获得 23 条具有完整开放阅读框且含有 NBS 结构的抗病基因同源序列 (resistance gene analogs, RGAs), 编号为 SP1~SP17、SP19~SP24, 其在 NCBI 中的登录号为 KX914865~KX914887。核苷酸比较分析结果表明, 这 23 条 RGAs 大多与甜菜中推测的一些抗病蛋白基因或其他相关蛋白基因具有较高的同源性, 其中 SP1、SP2、SP5、SP6、SP10、SP11、SP12、SP13 等 8 条序列均与甜菜 RF45 类抗病蛋白有着 86% 以上的同源性; SP3、SP4、SP8、SP9、SP24 等 5 条序列与甜菜 RPP13 类抗病蛋白的同源性在 85% 以上, 与向日葵抗霜霉病基因 *PI8* 相应区域的氨基酸序列相似性为 32.20%~33.52%, 且在进化树上聚为一类, 推测其可能与抗霜霉病相关。同源进化分析结果表明, 除 SP7 外, 其余序列均为 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因, 并与推导的氨基酸序列多重比较结果一致。

**关键词:** 菠菜; 抗病基因同源序列; NBS-LRR; 菠菜霜霉病

菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 别名波斯草、赤根菜, 是藜科菠菜属一年生草本植物, 二倍体 ( $2n=12$ ) 雌雄异株, 栽培历史悠久, 抗寒性强, 适应性广, 复种指数高, 经济效益好, 在我国南北各地广泛种植, 是秋、冬、春三季重要的绿叶蔬菜之一 (钱伟等, 2014)。菠菜霜霉病是一种主要为害叶部的真菌性病害, 是菠菜生产上为害严重的常发性病害, 不仅严重影响菠菜产量, 而且直接影响菠菜的商品品质和食用品质 (李金堂等, 2013)。

在自然界中, 植物生长发育的过程中易受到多种病原微生物的侵害, 为抵抗这些病原微生物的侵袭, 植物体内会形成不同的抗病机制, 其中之

一便是抗病基因 (*R* 基因) 介导的防御反应 (刘登全等, 2016), 病原菌中能够引起特定 *R* 蛋白介导响应的分子结构是无毒因子 (*Avr*), 特异的 *R* 蛋白识别无毒因子后便可触发免疫反应 (Soosaar et al., 2005)。据报道, *R* 基因对细菌、病毒、真菌、卵菌甚至线虫和昆虫病原体都有抗性, 目前国内外已经克隆了约 70 个植物 *R* 基因, 氨基酸序列比对发现 *R* 基因的蛋白结构极其保守, 其中最大的一类 *R* 基因为 NBS-LRR 类抗病基因, 它由高度保守的核苷酸结合位点 (Nucleotide-binding site, NBS) 和富含亮氨酸重复域 (Leucine rich repeat, LRR) 两个主要部分组成, 且含有 P-loop、Kinase-2、Kinase-3 和 GLPL 4 个高度保守的结构域 (Dangl et al., 2001; 丁国华, 2004; Harris et al., 2013)。目前菠菜中抗病基因的报道较少, Feng 等 (2015) 构建了 1 个菠菜 BCA 文库并鉴定出 14 个抗病相关基因, 其中有 9 个抗病基因同源序列 (resistance gene analogs, RGAs) 编码 NBS-LRR 结构。与菠菜同科的甜菜中已报道了大量的 NBS-LRR 类抗病基因, Hunger 等 (2003) 利用简并引物从甜菜基因组、甜菜叶和根 cDNA 以及 EST 序列中总共得到

折红兵, 男, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: 13051127571@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding authors): 徐兆生, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: xuzhaosheng@caas.cn; 钱伟, 副研究员, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: qianwei@caas.cn

收稿日期: 2017-01-07; 接受日期: 2017-04-10

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAD02B04, 2014BAD01B08), 国家自然科学基金项目 (31401872), 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS), 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

47个R相关基因,其中有21个RGAs属于NSB-LRR类基因;Tian等(2004)同样根据保守域NBS-LRR设计简并引物从甜菜基因组中克隆出12个NBS-LRR类抗病基因;Dohm等(2014)通过对甜菜转录本数据的分析,共预测出715个RGAs,其中仅含有33个NBS-LRR类抗病基因,占总基因数的12.1%。在其他植物基因组中也存在大量的NBS-LRR类抗病基因,Meyers等(2003)研究发现拟南芥基因组序列中包含149个NBS-LRR类抗病基因和58个缺少LRRs的相关基因;Huang等(2009)通过对黄瓜的基因组测序,大量黄瓜R基因也被鉴定出来,共发现61个含有NBS结构的抗性基因且3/4的基因以11个簇分布在黄瓜染色体基因组上;此外,在水稻中也发现了600个NBS-LRR类抗病基因,占总基因数(40000个)的1.5%(Azhar et al., 2011)。根据NBS-LRR类抗病基因广泛存在于植物基因组中且具有高度保守结构域这一特点,设计简并引物,进行同源序列的扩增,成为克隆该类抗病基因的有效途径,目前这种方法已在辣椒(赵敬等,2012)、小麦(谢欢等,2016)、大豆(丁海等,2003)、水稻(郑先武等,2001)、甜瓜(Zhao & Li, 2004)等多种植物中广泛应用。

菠菜霜霉病是菠菜生产中最主要的病害之一,目前国内外有关菠菜抗霜霉病基因克隆的报道较

少。本试验依据NBS-LRR类抗病基因保守区域设计简并引物,对不同菠菜材料的基因组DNA进行PCR扩增,获得一定数量的RGAs;并对获得的RGAs进行序列分析和鉴定,旨在为进一步研究菠菜抗霜霉病基因、培育抗病品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为菠菜商业杂交种RZ51-147〔抗菠菜霜霉病生理小种1~8,瑞克斯旺(中国)种子有限公司〕,中国农业科学院蔬菜花卉研究所菠菜课题组选育的菠菜自交系12S3和12S4。3份材料均于2016年春在中国农业科学院蔬菜花卉研究所廊坊基地种植。

PCR相关试剂购于北京天根生化科技有限公司,pEASY-T1载体试剂盒和大肠杆菌(*E. coli*)菌株DH5 $\alpha$ 购于北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据已克隆的植物抗霜霉病基因*PI8*、*RPP1*、*RPP4*、*RGC2*、*RPP8*等(<http://prgdb.org.eu/old.php>)的NBS-LRR保守区域P-loop和GLPL的核苷酸序列特征,运用Primer 5软件和Codehop(Rose et al., 1998, 2003)设计2对简并引物,引物序列见表1,并交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 用于扩增菠菜中RGAs的简并引物

引物	引物序列(5'-3')	保守区	保守结构域
Ploop-1	GKATGGGKGGHWTGGNAARAC	P-loop	GG(V/I)GKTT
GLPL-1	GGYACGATWGCYAGHGGMARBC	GLPL	GLPLA(L/I)K(A/V)
Ploop-2	ATGGGTGGCATTGGNAARACHAC	P-loop	GGIGKTT
GLPL-2	GCCACGAGAGCYARHGGHARBC	GLPL	GLPLALVA

注:引物I(Ploop-1/GLPL-1)由Primer 5软件合成,Ploop-1为正向引物,GLPL-1为反向引物,混合碱基代码K=G/T、H=A/C/T、W=A/T、R=A/G、Y=C/T、M=A/C、B=C/G/T;引物II(Ploop-2/GLPL-2)由Codehop合成,Ploop-2为正向引物,GLPL-2为反向引物,混合碱基代码N=A/G/C/T、R=A/G、H=A/C/T、Y=C/T、B=C/G/T。

1.2.2 DNA的提取 5月3日、幼苗5~6叶期,各材料分别取幼嫩叶片2~3片,采用CTAB法(Doyle, 1987)提取基因组DNA,通过2%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.2.3 NBS-LRR序列的PCR扩增 以提取的菠菜基因组DNA为模板,分别采用上述2对简并引物Ploop-1/GLPL-1和Ploop-2/GLPL-2进行常规PCR扩增,反应体系为:10 $\times$ HIFI buffer I 3.2  $\mu$ L,

dNTP(2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 1.6  $\mu$ L, HIFI酶 0.2  $\mu$ L, 引物(10 pmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各1  $\mu$ L, DNA模板(100 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 3  $\mu$ L, 加ddH<sub>2</sub>O补足至20  $\mu$ L。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环;72 $^{\circ}$ C补平10 min。PCR扩增产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像分析系统上进行拍照分析。

1.2.4 PCR产物的回收与克隆 PCR产物经1.5%

琼脂糖凝胶检测,按照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的使用说明书进行操作。将回收的片段连接到 pEASY-T1 载体上,接着转化至大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,而后均匀涂布于含有 Kan/IPTG/X-gal 的 LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取白斑,利用 M13 引物进行 PCR 扩增来检测 T1 载体中是否成功插入目的片段,最后将含有目的片段的菌液送上海美吉生物有限公司进行测序。

1.2.5 序列分析、比对及系统发育树构建 将测序结果用 NCBI 上的 Vecscreen 程序去除 pEASY-T1 载体,获得插入片段的核苷酸序列。然后利用 NCBI 中 BLAST 工具与 GenBank 中登记的序列进行同源性比较,并利用 ORF Finder 搜索开放阅读框;采用 MEGA 软件进行氨基酸同源性分析、序列比对并和已知 NBS-LRR 类抗病基因相应区域的氨基酸序列一起构建系统发育树。用于氨基酸序列参比的 NBS-LRR 类抗病基因有:拟南芥抗霜霉病基因 *RPP1*、*RPP4*、*RPP5*、*RPP8*、*RPP13*, 莴苣抗霜霉病基因 *RGC2B*, 向日葵抗霜霉病基因 *PI8*, 葡萄抗霜霉病基因 *MrRPV1*, 亚麻抗锈病基因 *M*、*L6*, 小麦抗叶锈病基因 *Lr1*、*Lr10*, 其中 *RPP1*、*RPP4*、*RPP5*、*MrRPV1*、*M*、*L6* 基因属于 TIR-NBS-LRR 类抗病基因,而 *RPP8*、*RPP13*、*RGC2B*、*PI8*、*Lr1* 和 *Lr10* 基因属于 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 菠菜 RGAs 的扩增、克隆及序列测定

利用 2 对简并引物 Ploop-1/GLPL-1 和 Ploop-2/GLPL-2 对菠菜材料 RZ51-147、12S3、12S4 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得 6 条 500 bp 左右的片段(图 1),这些片段的大小与已知 NBS-LRR 类抗病基因中 P-loop 与 GLPL 区域之间的距离相一致。目的片段经回收、克隆后得到大量的白斑重组子,从每份材料中随机挑选 60 个重组子进行 PCR 检测,共获得 130 个阳性重组子,每份材料挑取 40 个阳性重组子进行测序。测序结果比对显示参试材料具有较高比例的重复序列,3 份菠菜材料 RZ51-147、12S3、12S4 中雷同重组子的比例分别为 57.5%、54.5%、42.1%。将重复序列合并整理后得到 27 条序列,初步确认为 RGAs;进

一步分析后发现 27 条 RGAs 中只有 23 条具有连续的开放阅读框和 NBS 功能结构域(表 2),编号为 SP1~SP17、SP19~SP24,GenBank 登录号为 KX914865~KX914887;其余 4 条序列中 2 条在阅读框内存在终止密码子,推测可能为无功能基因,编号为 SP18 和 SP25,另外 2 条有开放的阅读框但无 NBS 功能结构域,编号为 SP26 和 SP27。上述结果表明,利用简并引物对菠菜基因组 DNA 进行扩增是一种获得 RGAs 的有效途径。

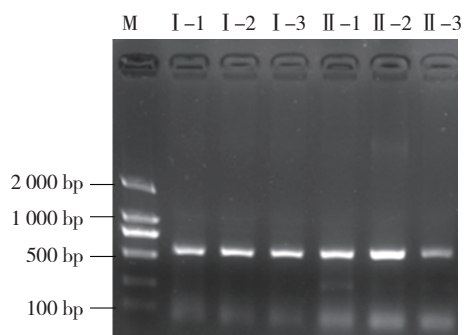


图 1 菠菜 NBS-LRR 类抗病基因 PCR 产物电泳结果

M, DNA marker 2000; I-1、I-2、I-3, 引物 I 扩增的目的片段; II-1、II-2、II-3, 引物 II 扩增的目的片段。

表 2 3 份菠菜材料中扩增出 23 条抗病基因同源序列 (RGAs)

材料	抗病同源序列
RZ51-147	SP2、SP3、SP4、SP6、SP24
12S3	SP1、SP5、SP7、SP8、SP9、SP10、SP13、SP14、SP15、SP20、SP21
12S4	SP1、SP3、SP4、SP6、SP11、SP12、SP16、SP17、SP19、SP22、SP23

### 2.2 菠菜 RGAs 氨基酸保守结构域分析

前人研究报道,NBS-LRR 类抗病基因包括 4 个保守区域,依次为 P-loop (GMGGVGGKTT)、Kinase-2 (VVLDDVW)、Kinase-3 (GSR/KILVTTR) 和 GLPL (GLPLALV) (Williamson, 1999; 丁国华, 2004)。通过 ORF Finder 软件分析,本试验获得的 23 条 RGAs 结构域相当保守,除 SP20 没有 P-loop 保守结构域外,剩余序列均具有 NBS-LRR 保守结构域(图 2);少数序列保守结构域中发生氨基酸突变,如序列 SP12 和 SP13 的 GLPL 结构域由 GLPLALV 分别变为 GPTFSSR 和 GTSTSSR。上述结果表明,本试验获得的 23 条序列均为 NBS-LRR 类 RGAs。

在 SpinachDB 网站中 (<http://222.73.98.124/>

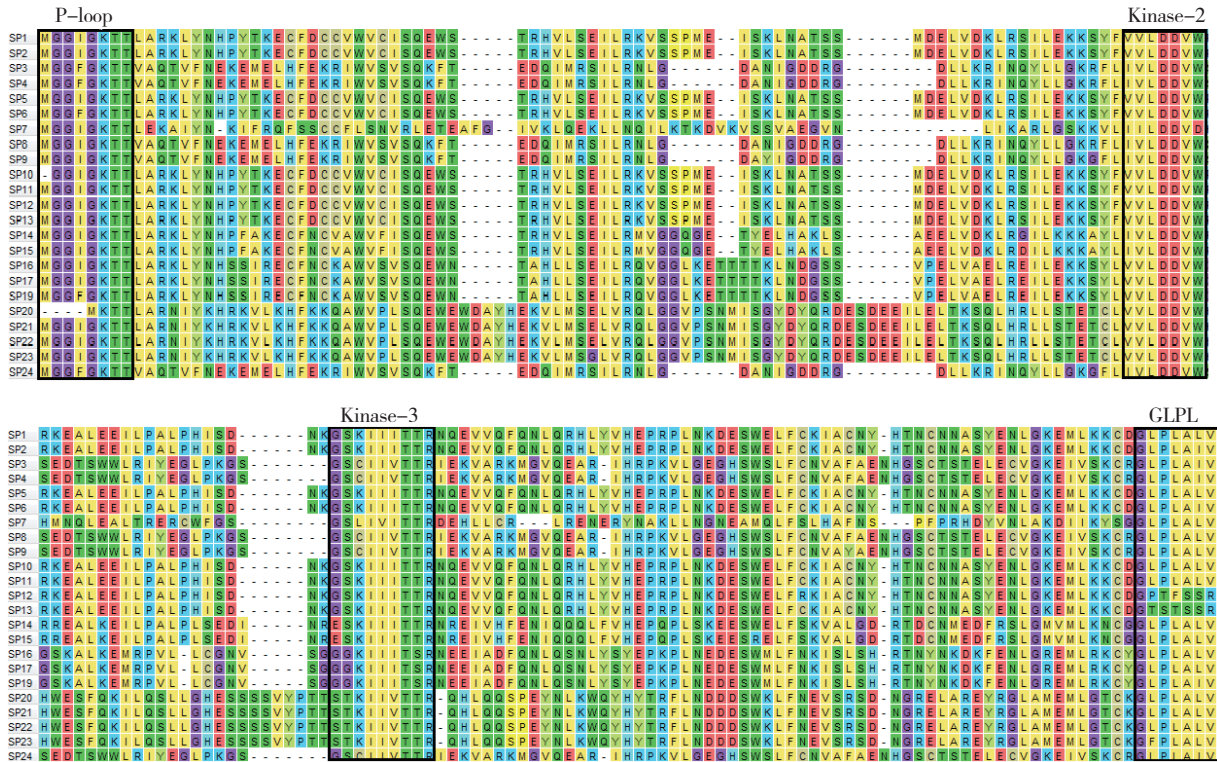


图2 菠菜 RGAs 氨基酸序列 NBS-LRR 区域多重比较结果

spinachdb/) 运用 Blastn 程序对这 23 条 RGAs 进行同源搜索, 结果显示除 SP7、SP14 和 SP15 外, 其余 RGAs 都可以锚定在相应的菠菜 scaffold 上。这些 RGAs 位于 scaffold2266、scaffold8025、scaffold52304 以及 scaffold13200 这 4 条 scaffold 上。其中 SP1、SP2、SP5、SP6、SP10、SP11、SP12、SP13 位于 scaffold2266 上 33 000~33 530 区间内; SP3、SP4、SP8、SP9、SP24 位于 scaffold8025 上 17 937~18 458 区间内; SP16、SP17、SP19 位于 scaffold52304 上 33 536~34 077 区间内; SP20、SP21、SP22、SP23 位于 scaffold13200 上 11 378~11 957 区间内。以上结果表明, 菠菜 NBS-LRR 类抗病基因成簇出现, 可能大量存在于 scaffold2266、scaffold8025、scaffold52304 以及 scaffold13200 这 4 条 scaffold 上。

研究表明, 按 N- 端的结构特点可以把 NBS-LRR 类抗病基因细分为 TIR-NBS-LRR 和 non-TIR-NBS-LRR 两大类。保守结构域 Kinase-2 末端的氨基酸是区分这两类抗病基因的重要特征之一, 若 Kinase-2 区域末端氨基酸为天冬氨酸 (D), 则是 TIR-NBS-LRR 类抗病基因; 若 Kinase-2 区域末端氨基酸为色氨酸 (W), 则是 non-TIR-NBS-

LRR 类抗病基因 (Meyers et al., 1999, 2003)。从图 2 可以看出, 除 SP7 外, 其余 RGAs 氨基酸序列中 Kinase-2 区域域末端的氨基酸均为色氨酸 (W), 表明菠菜 RGAs 主要属于 non-TIR-NBS-LRR 类型。

### 2.3 菠菜 RGAs 核苷酸序列同源性分析

通过 NCBI Blastn 程序对获得的 23 条 RGAs 序列进行同源搜索, 除 SP20、SP21、SP22、SP23 序列在 GenBank 中没有找到同源序列外, 其余 19 条 RGAs 序列均匹配到与之具有高同源性的序列 (表 3)。这些基因序列大多来自与菠菜同科的甜菜, 还有 1 个来自辣椒; 大部分为假定的抗病蛋白, 少部分为功能未知的蛋白。这 19 条 RGAs 序列中, SP1、SP2、SP5、SP6、SP10、SP11、SP12 以及 SP13 之间核苷酸序列相似性高达 95.81%~99.01%, 且这 8 条序列均与甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白有着 86% 以上的同源性; SP3、SP4、SP8、SP9 和 SP24 之间核苷酸序列相似性为 96.39%~99.62%, 这 5 条序列与甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白的同源性在 85% 以上。

### 2.4 菠菜 RGAs 氨基酸序列聚类分析

应用 MEGA 软件将获得的 23 条 RGAs 氨基酸

表 3 GenBank 中与菠菜 RGAs 具有高同源性的基因序列

序列编号	GenBank 中同源基因	登录号	核苷酸序列同源性/%
SP1	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP2	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP5	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP6	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP10	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP11	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP12	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	86
SP13	甜菜 RF45 类 (LOC104888057) 抗病蛋白, X2 转录变体, mRNA	XM_010672 889.1	87
SP14	甜菜未知蛋白 (LOC104888055), mRNA	XM_010672 884.1	78
SP15	甜菜未知蛋白 (LOC104888055), mRNA	XM_010672 884.1	77
SP16	甜菜 3 号染色体区域, 克隆: 33E19	AB646 135.2	77
SP17	甜菜 3 号染色体区域, 克隆: 33E19	AB646 135.2	71
SP19	甜菜 3 号染色体区域, 克隆: 33E19	AB646 135.2	69
SP3	甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白, X5 转录变体, mRNA	XM_010690 478.1	86
SP4	甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白, X5 转录变体, mRNA	XM_010690 478.1	86
SP8	甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白, X5 转录变体, mRNA	XM_010690 478.1	86
SP9	甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白, X5 转录变体, mRNA	XM_010690 478.1	85
SP24	甜菜 RPP13 类 (LOC104902631) 抗病蛋白, X5 转录变体, mRNA	XM_010690 478.1	86
SP7	辣椒 TMV (LOC107864338) 抗病蛋白, mRNA	XM_016710 687.1	87
SP20	无		
SP21	无		
SP22	无		
SP23	无		

序列与亚麻 *M*、*L6*、拟南芥 *RPP1*、*RPP4*、*RPP5*、*RPP8*、*RPP13*、莴苣 *RGC2B*、向日葵 *PI8*、葡萄 *MrRPV1* 以及小麦 *Lr1*、*Lr10* 基因的相应区域氨基酸序列进行相似性比较。结果显示 (图 3), 供试序列共聚成两大类, SP7 与亚麻 *M*、*L6*、葡萄 *MrRPV1* 和拟南芥 *RPP1*、*RPP4*、*RPP5* 基因聚成一大类, 为 TIR-NBS-LRR 类抗病基因, SP7 与葡萄抗霜霉病基因 *MrRPV1* 相应区域的氨基酸序列相似性为 41.44%; 其余 22 条 RGAs 与拟南芥 *RPP8*、*RPP13*、莴苣 *RGC2B*、小麦 *Lr1*、*Lr10* 以及向日葵 *PI8* 基因聚成另一大类, 为 non-TIR-NBS-LRR 类抗病基因, 这与前面推导的氨基酸序列比较结果是一致的。其中 non-TIR-NBS-LRR 类型又可细分为 5 小类, SP1、SP2、SP5、SP6、SP10、SP11、SP12、SP13 聚为一类 (I 类), 它们的氨基酸序列相似性高达 98.83%, 推测它们属于同一基因簇; SP20、SP21、SP22、SP23、*RPP8* 聚为一类 (IV 类), 其中菠菜 RGAs 氨基酸序列的相似性高达 99.12%, 推测它们处于同一基因簇, 并且与拟南芥 *RPP8* 的相似性为 27.27%~29.21%; SP3、SP4、SP8、SP9、SP24 与 *PI8*、*RGC2B* 和 *Lr1* 聚为一类 (V 类), 这

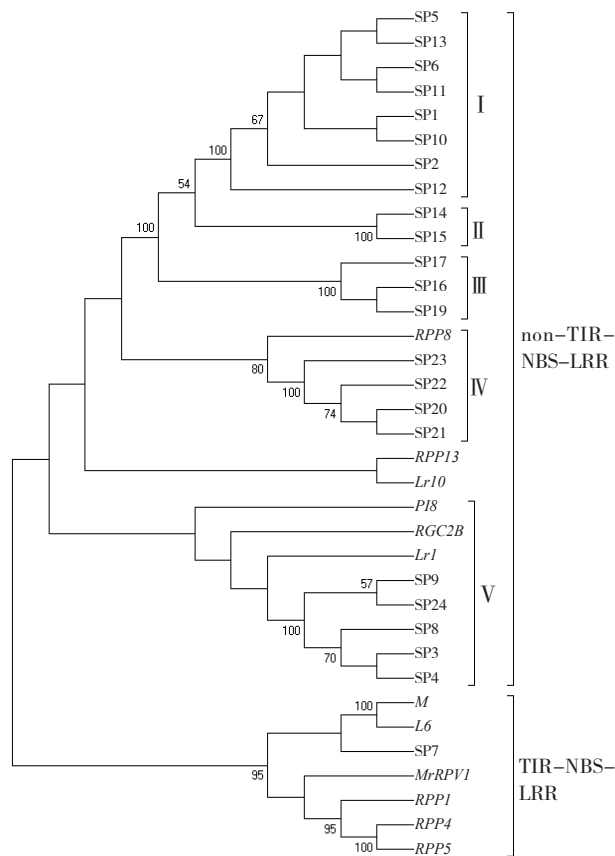


图 3 菠菜 RGAs 氨基酸序列聚类分析结果

5条菠菜RGAs氨基酸序列相似性为99.08%，且与向日葵抗霜霉病基因*PI8*相应区域氨基酸相似性为32.20%~33.52%，故推测这5条RGAs同样属于同一基因簇；菠菜23条RGAs大部分都聚在这3类中。

I、II、III类没有已知的抗病基因与其聚在一起，可能是用于聚类的抗病基因较少，也可能是它们属于新的抗病基因类型。

### 3 结论与讨论

目前关于菠菜抗病基因克隆的报道仅有一例(Feng et al., 2015)，本试验依据NBS-LRR类抗病基因的保守区域设计2对简并引物Ploop-1/GLPL-1和Ploop-2/GLPL-2，经过PCR扩增、克隆和测序等步骤，从菠菜中分离出23条抗病基因同源序列(RGAs)，除SP20没有P-loop保守结构域外，其余RGAs序列均含有NBS-LRR类抗病基因的4个保守结构域(P-loop、Kinase-2、Kinase-3和GLPL)。聚类分析结果表明，除SP7外，其余RGAs可分为5类，每一类中的RGAs彼此之间氨基酸相似性较高，如第I类RGAs间氨基酸相似性高达98%以上，第V类RGAs间氨基酸相似性高达99%。产生这样的原因主要有：①每一类菠菜RGAs在核苷酸水平上虽有差异，但是由于密码子的简并性，不同的核苷酸序列翻译成氨基酸后这种差异变的更小；②可能是测序误差引起的，使得同一序列测序后获得不同的重组子。

应用Blastn工具在GenBank中搜索，发现这23条RGAs序列主要与甜菜中的一些抗病蛋白或其他相关蛋白有较高的同源性。进一步研究发现，SP3、SP4、SP8、SP9、SP24这5条RGAs氨基酸序列之间有着99%以上的相似性，它们与向日葵抗霜霉病基因*PI8*相应区域的氨基酸序列相似性为32.20%~33.52%，且在进化树上聚为一类，推测这5条RGAs序列位于菠菜中类*PI8*抗病基因的基因簇上；SP1、SP2、SP5、SP6、SP10、SP11、SP12和SP13氨基酸序列之间的相似性在98%以上，且这些RGAs的核苷酸序列与甜菜RF45类抗病蛋白基因有着86%以上的同源性，推测它们属于同一基因簇并在菠菜中编码RF45类抗病蛋白；此外，SP20、SP21、SP22和SP23序列在GenBank中没有找到与之相匹配的核苷酸序列，但在进化树上与拟

南芥抗霜霉病基因*RPP8*聚在一起，推测这4条序列成簇的存在于菠菜基因组中且结构类似*RPP8*基因。这些研究结果为菠菜抗病基因的分离和克隆提供了条件，同时也说明利用简并引物对菠菜基因组DNA进行扩增获得RGAs是一种可行的途径。

NBS-LRR类抗病基因是植物R基因中最大的一类，这类基因根据N-端的结构特点可以细分为两类：一类是果蝇Toll蛋白和哺乳动物白细胞介素-1受体同源域(TIR-NBS-LRR或TNL蛋白)，在双子叶植物中发现，如烟草的*N*基因、亚麻的*M*和*L6*基因等；另一类是N端卷曲螺旋域(CC-NBS-LRR或CNL蛋白)，也称non-TIR-NBS-LRR，在单子叶、双子叶植物中均有发现，如单子叶植物小麦的*Lr1*、*Lr10*基因以及双子叶植物拟南芥的*RPP13*、*RPP8*基因等。此外，根据Kinase-2区域末端氨基酸也可以区分这两类抗病基因，当该氨基酸是色氨酸(W)时为CNL类抗病基因；是天冬氨酸(D)时为TNL类抗病基因(Meyers et al., 1999)。菠菜属于藜科菠菜属双子叶植物，通过对菠菜23条RGAs序列进行分析发现，SP7氨基酸序列的Kinase-2区域最后一个氨基酸为天冬氨酸(D)，且在进化树上与TIR类的亚麻*M*、*L6*和葡萄*MrRVP1*基因聚在一起，判断其为TIR-NBS-LRR类抗病基因；其余22条RGAs的Kinase-2区域末端氨基酸为色氨酸(W)，且在进化树上与non-TIR类的抗病基因聚在一起，故判断其为non-TIR-NBS-LRR类抗病基因。两种分析结果是一致的。由于此前菠菜R基因的报道较少，且本试验所获RGAs片段多数没有与已知R基因聚为一类，且含有NBS结构的RGAs并不全部和抗病相关，因此，菠菜RGAs的类型、功能以及与抗病基因的关系等问题仍有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 丁国华. 2004. 黄瓜抗病基因同源序列的克隆及其对霜霉病抗病基因标记的研究〔博士论文〕. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 丁海, 宛煜嵩, 朱美霞, 方宣钧. 2003. 大豆抗病基因同源序列的克隆与分析. 分子植物育种, (2): 217-223.
- 李金堂, 默书霞, 杨子亮, 吴金鹏. 2013. 菠菜霜霉病的识别及防治. 长江蔬菜, (9): 46-47.
- 刘登全, 王园秀, 崔朝宇, 秦双林, 欧阳慧, 蒋军喜. 2016. 晚熟温州蜜柑NBS-LRR类抗病基因同源序列的克隆及分析. 江西

- 农业大学学报, 38 (1): 83–89.
- 钱伟, 张合龙, 刘伟, 徐兆生. 2014. 菠菜遗传育种研究进展. 中国蔬菜, (3): 5–13.
- 谢欢, 周颖, 杨文香, 张娜, 刘大群. 2016. TcLr24 小麦 NBS-LRR 同源基因的克隆与分析. 西北农业学报, 25 (4): 518–522.
- 赵敬, 万红建, 杨悦俭, 侯喜林. 2012. 辣椒 NBS-LRR 类型抗病基因同源序列的克隆及分析. 江苏农业学报, 28 (3): 611–616.
- 郑先武, 翟文学, 李晓兵, 王文君, 徐吉臣, 刘国振, 朱立煌. 2001. 水稻 NBS-LRR 类 R 基因同源序列. 中国科学 (C 辑), 31 (1): 43–51.
- Azhar M T, Amin I, Bashir A, Mansoor S. 2011. Characterization of resistance gene analogs from *Gossypium arboreum* and their evolutionary relationships with homologs from tetraploid cottons. *Euphytica*, 178 (3): 351–362.
- Dangl J L, Jones J D G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411 (6839): 826–833.
- Dohm J C, Minoche A E, Holtgräwe D, Capella-Gutiérrez S, Zakrzewski F, Tafer H, Rupp O, Sörensen T R, Stracke R, Reinhardt R, Goesmann A. 2014. The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*, 505 (7484): 546–549.
- Doyle J J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11–15.
- Feng C, Bluhm B H, Correll J C. 2015. Construction of a spinach bacterial artificial chromosome (BAC) library as a resource for gene identification and marker development. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (6): 1996–2005.
- Harris C J, Sloodweg E J, Govere A, Baulcombe D C. 2013. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (52): 21189–21194.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas W J, Wang X, Xie B, Ni P, Ren Y. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41 (12): 1275–1281.
- Hunger S, Gaspero G D, Mohring S, Bellin D, Schäfer-Pregl R, Borchardt D C, Charles-Eric D, Werber M, Weisshaar B, Salamini F, Schneider K. 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome*, 46 (1): 70–82.
- Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, Sivaramakrishnan S, Sobral B W, Young N D. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal*, 20 (3): 317–332.
- Meyers B C, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore R W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15 (4): 809–834.
- Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, Pietrokovski S, McCallum C M, Henikoff S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26 (7): 1628–1635.
- Rose T M, Henikoff J G, Henikoff S. 2003. CODEHOP (CONsensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 31 (13): 3763–3766.
- Soosaar J L M, Burch-Smith T M, Dinesh-Kumar S P. 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (10): 789–798.
- Tian Y, Fan L, Thurau T, Jung C, Cai D. 2004. The absence of TIR-type resistance gene analogues in the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genome. *Journal of Molecular Evolution*, 58 (1): 40–53.
- Williamson V M. 1999. Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2 (4): 327–331.
- Zhao H, Li G. 2004. Cloning and expression analysis of downy mildew resistance-related cDNA sequences in melon. *Agricultural Sciences in China*, 4 (11): 839–844.

## Cloning and Analysis of NBS-LRR Type Disease-resistant Gene Analogs in *Spinach oleracea* L.

SHE Hong-bing<sup>1</sup>, FAN Gui-yan<sup>1</sup>, ZHANG He-long<sup>2</sup>, WANG Xiao-wu<sup>1</sup>, WU Jian<sup>1</sup>, QIAN Wei<sup>2\*</sup>, XU Zhao-sheng<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>China Vegetable Seed Technology Co., Ltd., Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to understand better the resistant mechanism of spinach (*Spinach oleracea* L.) downy mildew and lay foundation for further clone of spinach downy mildew resistance genes and marker-assisted-selection of resistance breeding, 2 pares of degenerate primers were designed from the conserved motifs of NBS-LRR type plant resistance gene. There are 3 types of spinach material-commercial hybrid ‘RZ51-147’, inbred line ‘12S3’ and ‘12S4’. Two pares of primers were used for amplifying the disease-resistant gene analogs (RGAs) by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA of these 3 material. After cloning and sequencing the PCR products, 23 resistance gene analogs with uninterrupted open reading frames (ORFs) and conserved

# 萝卜水通道蛋白基因 *RsAQP1b* 的表达模式及功能分析

周志国 冯 雪

(廊坊师范学院生命科学学院, 河北廊坊 065000)

**摘 要:** 以萝卜品种白玉春为材料, 利用同源克隆的方法获得萝卜水通道蛋白基因 *RsAQP1b* 的编码序列全长, 在萝卜苗期干旱胁迫下分析 *RsAQP1b* 基因及蛋白的表达模式; 在烟草中表达该基因, 研究干旱胁迫下烟草中 MDA 含量及保护酶的活性变化。结果表明: 萝卜水通道蛋白基因 *RsAQP1b* 的编码序列全长 861 bp, 编码 286 个氨基酸。制备了 *RsAQP1b* 多克隆抗体, 效价在 1 : 512 000 以上。Real time PCR 与 Western blot 检测表明, 干旱胁迫导致 *RsAQP1b* 基因与蛋白的表达水平整体下降。PEG6000 干旱处理下的转基因与野生型烟草 MDA 含量都增加, 但是转基因烟草的增加幅度小; 随着干旱程度加重, 转 *RsAQP1b* 基因烟草中 SOD 含量呈上升趋势, CAT 含量呈先上升后下降趋势, POD 含量呈上升趋势, 酶活性均高于相应野生型对照。

**关键词:** 萝卜; 水通道蛋白; 表达模式; 过表达

萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 是我国重要的根菜类蔬菜作物。水通道蛋白 AQP (aquaporin) 属于跨膜通道蛋白 MIP (major intrinsic proteins) 超家族, 是细胞膜上选择性高效转运分子特异的孔道

蛋白, 广泛分布在植物发育各个时期的各种组织与器官中, 介导细胞的水分跨膜转运, 在水分运输过程中起到非常重要的作用 (Verdoucq et al., 2014)。苗期遭受水分胁迫, 容易造成萝卜生理性病害, 严重影响生长后期肉质根的产量与品质。研究萝卜水通道蛋白, 对选育优质、高产、抗逆性强的萝卜新品种有重要意义。1988 年, Agre 等在人红细胞膜上发现一个 28 kD 的跨膜多肽 (Denker et al., 1998), 直到 1992 年分离出第一个

周志国, 男, 讲师, 专业方向: 蔬菜作物生物技术育种, E-mail: zhiguo\_zhou@163.com

收稿日期: 2016-04-19; 接受日期: 2017-02-21

基金项目: 河北省教育厅青年基金项目 (QN2017351), 廊坊师范学院校级项目 (LSLQ201407), 廊坊师范学院教改项目 (K2015-13)

domains of NBS were obtained from spinach, and deposited in GenBank with the accession number of KX914865-KX914887. Homology research showed that most of these 23 RGAs shared high homology with some putative disease-resistant genes or the other relative protein genes in *Beta vulgaris*. For example, the nucleotides of SP1, SP2, SP5, SP6, SP10, SP11, SP12, SP13 were over 86% identical to disease resistance protein RF45 from sugar beet, and the nucleotides of SP3, SP4, SP8, SP9, SP24 were over 85% identical to sugar beet disease resistance RPP13 protein. In addition, these 5 RGAs shared 32.20%-33.52% amino acid sequence homology with sunflower downy mildew resistance gene *PI8*, and clustered a group with *PI8* gene in phylogenetic tree, suggesting that these 5 RGAs might be related to downy mildew gene. Homologous evolution analysis demonstrated that all of RGAs were ranked into non-TIR-NBS-LRR type *R* gene except SP7, which was consistent with the result based on multiple alignment of deduced amino acid sequences.

**Key words:** *Spinacia oleracea* L.; Resistance gene analogs; Nucleotide binding site-leucine rich repeat (NBS-LRR); Spinach downy mildew