

甜瓜 STK 类 R 基因同源序列的克隆与分析

张志忠, 孙志浩, 蓝茂锋

(福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002)

摘要: 以植物丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类 (serine-threonine kinase, STK) 抗病基因产物催化结构域 I 和 IX 的保守氨基酸序列 (FGK/V/L/SVYK/RG, DY/IYSF/YGV/L/M) 设计简并引物, 对甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 得到大约 500 bp 的目的条带, 通过重组质粒克隆并经 PCR 检测后得到 12 条不同的 DNA 序列, 命名为 tg1 ~ tg12, 其中 tg2、tg5、tg9 和 tg12 (Genbank 登录号为 JN646853 ~ JN646856) 可以编码完整的氨基酸序列。Blast 分析结果显示: 4 条序列均具有 ATP 结合部位、底物结合部位和激酶结构域的活化环 (A-loop) 等, 属于典型的蛋白激酶基因家族, 可能是 STK 类 R 基因的同源序列片段; 4 条序列与蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 的 STK 同源性均较高。氨基酸序列比对结果显示 tg2、tg5、tg9 和 tg12 均具有 R 基因的 9 个保守结构域, 为 STK 类候选抗病基因类序列。分子系统树显示 tg2、tg5、tg9 和 tg12 与已知的 R 基因 (*Pto*、*Lr10* 和 *Lectin*) 在氨基酸水平上的相似性仅为 33.5% ~ 53.4%, 且 4 个甜瓜同源序列的氨基酸相似性也较低, 表明甜瓜 RGAs 标记可能具有较高的特异性。

关键词: 甜瓜; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 抗病基因同源序列; 氨基酸序列; 克隆; 同源性

中图分类号: S652; Q943.2; Q785 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)03-0008-05

Cloning and analysis on homologous sequences of STK-like R-gene from *Cucumis melo* ZHANG Zhi-zhong, SUN Zhi-hao, LAN Mao-feng (Department of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(3): 8-12

Abstract: Using the conserved amino acid sequence of catalytic domain I (FGK/V/L/SVYK/RG) and IX (DY/IYSF/YGV/L/M) of disease resistance genes belonging to plant serine-threonine kinase (STK) for designing degenerate primers, PCR of genomic DNA of *Cucumis melo* L. was performed and a target fragment about 500 bp was obtained. Twelve DNA fractions with different sequences named tg1-tg12 were obtained by cloning of recombinant plasmids and PCR detection, in which, tg2, tg5, tg9 and tg12 with the GenBank accession No. of JN646853-JN646856 can encode complete amino acid sequences. The blast analysis result shows that four sequences all possess ATP binding site, substrate binding site and A-loop of kinase domain, showing that they belong to a typical kinase gene family and may be homologous sequences of STK-like R-gene. And four sequences have higher homology with STK from *Ricinus communis* L. The alignment result of amino acid sequences reveals that tg2, tg5, tg9 and tg12 all contain nine conserved domains of R-gene, which are candidate analog sequences of STK-like disease resistance genes. The molecular phylogenetic tree shows that tg2, tg5, tg9 and tg12 only have 33.5% - 53.4% similarity in amino acid level with known R-genes (*Pto*, *Lr10* and *Lectin*), and also there is low amino acid similarity among four homologous sequences of *C. melo*, meaning that RGAs markers of *C. melo* may have high specificity.

Key words: *Cucumis melo* L.; serine-threonine kinase (STK); resistance gene analogs (RGAs); amino acid sequence; cloning; homology

收稿日期: 2011-09-26

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目子课题(2007BAD07B03); 福建省重大专项项目(2008NZ0002-1); 福建省自然科学基金资助项目(2011J01083)

作者简介: 张志忠(1976—), 男, 山西大同人, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物生物技术研究。

植物基因组中含有众多针对特定病原体防御的抗病基因 (resistance gene) R 基因。1992 年 Johal 等^[1]从玉米 (*Zea mays* L.) 中分离出第 1 个抗病基因 *Hm1*, 此后逐步开展了对植物 R 基因的克隆及其作用机制研究^[2-4], 由 R 基因控制的防御机制已经成为近年广泛研究的热点。目前报道的大多数 R 基因属于 1 个超基因家族 (150 ~ 600 个成员), 它们的氨基酸序列之间存在很多相同的保守区域, 如: 富含亮氨酸重复序列 (LRR)、核苷酸结合位点 (NBS)、丝氨酸-苏氨酸激酶区 (STK) 和亮氨酸拉链 (LZ) 等结构域^[5]。利用这一特性设计 PCR 特异简并引物, 可以获得许多 R 基因同源序列 (disease resistance gene analogs, RGAs)。目前, 已从阔叶稻 (*Oryza latifolia* Desv.)^[6]、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Miller)^[7]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[8]、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.]^[9]、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)^[10] 和拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]^[11] 等植物中扩增出 RGAs, 并已鉴定出一些抗病候选基因, 这种方法已成为研究植物抗性基因的重要手段。

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 属葫芦科 (Cucurbitaceae) 黄瓜属 (*Cucumis* L.) 植物, 为世界十大水果之一。目前中国甜瓜生产的基地化和设施化比例不断提高, 连作面积越来越大, 连作障碍已成为制约甜瓜生产可持续发展的重大问题。栽培制度及栽培生态环境的改变导致甜瓜病害逐年加重, 目前控制病害的主要措施是化学防治。由于化学防治易引起抗药性和环境污染等问题, 加之在高温高湿地区发生较为严重的病害时使用化学药剂无法有效控制病害, 因而, 利用抗病基因对甜瓜品种进行遗传改良无疑是必要的。

对甜瓜 R 基因的分离是深入了解其抗病机制及通过基因工程进行甜瓜遗传改良的前提, 但甜瓜 R 基因克隆工作起步较晚且进展缓慢, 迄今为止仅克隆获得 1 个与枯萎病抗性相关的基因 (即 *Fom-2*), 该基因在植物 R 基因的结构分类中属于 NBS-LRR 类, 不含 TIR 结构域, 对枯萎病菌的 0 和 1 型生理小种有专化抗性^[12-13]。而有关甜瓜其他抗病功能基因的克隆尚未见报道。利用 RGAs 克隆法获得甜瓜 RGAs, 继而克隆相关基因无疑是一条简捷而有效的途径。作者根据已报道的其他植物 R 基因的 STK 类保守结构域设计简并引物克隆甜瓜 RGAs, 有望从中筛选出与甜瓜抗病性紧密相关的基因, 以期利用抗病基因工程改良甜瓜品种提供理论依据和基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

以甜瓜品种‘甜宝’ (*Cucumis melo* ‘TianBao’) 叶片为实验材料, 该品种具有高抗枯萎病和白粉病、较抗霜霉病等特性。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 甜瓜基因组 DNA 的提取参照文献^[14]的 CTAB 法进行。

1.2.2 目的片段克隆 分别根据 STK 类 R 基因产物的催化结构域 I 的保守氨基酸序列 (FGK/V/L/SVYK/RG) 和 IX 的保守氨基酸序列 (DY/IYSE/YGV/L/M) 设计简并引物, 引物 1 的氨基酸序列为 5'-TTC/TGGIA/G/THGTITAC/TA/CA/GIGG-3'; 引物 2 的氨基酸序列为 5'-AC/TICCA/GA/TAAIC/GA/TA/GTA IAC/TA/GTC-3'。

PCR 扩增模板为甜瓜基因组 DNA, 反应体系总体积 25 μ L, 内含 2.5 μ L 10 \times Ex Taq DNA 聚合酶缓冲液、2 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs、0.5 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ 引物 1、0.5 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ 引物 2、1 μ L 甜瓜基因组 DNA、0.5 μ L 5 U \cdot μ L⁻¹ Ex Taq DNA 聚合酶, 用无菌双蒸水补足至 25 μ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测回收目的片段, 并连接到 pMD18-T 载体上, 送上海博尚生物技术有限公司测序。

1.2.3 RGAs 分析 利用 DNAMAN 6.0 软件对测序后的片段进行分析, 查找可以编码完整氨基酸序列的片段并筛选甜瓜 RGAs, 然后利用 Blast 程序进行相关分析, 并利用 DNAMAN 6.0 软件构建系统树。

2 结果和分析

2.1 甜瓜 RGAs 的获得和初步分析

以甜瓜基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 1 条长度大约 500 bp 的条带 (图 1)。重组质粒经 PCR 检测后, 随机选择 30 个质粒进行测序, 共获得了 12 个不同的 DNA 序列, 分别命名为 tg1 ~ tg12; 经 DNAMAN 6.0 软件分析, 其中的 tg2、tg5、tg9 和 tg12 序列可以编码完整的氨基酸序列, 已提交 GenBank 登录 (登录号: JN646853 ~ JN646856)。

氨酸序列 (XP_002527232.1、XP_002304348.1 和 ACN87635.1) 的相似度较高,最大序列相似度分别为 81%、77% 和 86%;序列 tg9 编码的氨基酸序列与来自蓖麻的 STK 氨基酸序列 (XP_002510333.1) 的相似度较高,最大序列相似度为 61%;序列 tg12 编码的氨基酸序列与来自蓖麻的 STK 氨基酸序列 (XP_002527962.1) 以及来自大豆和苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 的蛋白激酶氨基酸序列 (ACM89609.1 和 ABN05838.1) 的相似度较高,最大序列相似度分别为 76%、68% 和 65%。

将获得的 4 个甜瓜 RGAs 序列 (tg2、tg5、tg9 和 tg12) 与目前具有代表性的 STK 类 R 基因番茄抗假单胞菌基因 *Pto* (U59316)、小麦抗叶锈病基因 *Lr10* (U51330) 和拟南芥外源凝集素蛋白激酶类基因 *Lectin* (AB017067) 的氨基酸序列进行同源性分析,4 条甜瓜 RGAs 序列均含有 STK 类 R 基因的 9 个保守结构域 (图 2),为 STK 类候选抗病基因类序列。

将 4 个甜瓜 RGAs 序列 tg2、tg5、tg9 和 tg12 编码的氨基酸序列与来源于番茄的 *Pto* 基因、来源于小麦的 *Lr10* 基因和来源于拟南芥的 *Lectin* 基因编码的氨基酸序列进行相似性分析,获得的分子系统树见图 3。结果表明:4 个甜瓜 RGAs 序列编码的氨基酸序列与 *Pto* 基因编码的氨基酸序列的相似性为 39.0% ~ 42.8%,与 *Lr10* 基因编码的氨基酸序列的相似性为

36.0% ~ 53.4%,与 *Lectin* 基因编码的氨基酸序列的相似性为 35.5% ~ 51.1%。在甜瓜 tg2、tg5、tg9 和 tg12 序列中,tg2 和 tg5 编码的氨基酸序列相似性最大,达到 95%;tg12 和 *Lr10* 编码的氨基酸序列相似性可达到 55%;而 tg9 与 tg2、tg5、tg12、*Pto*、*Lr10* 和 *Lectin* 编码的氨基酸序列的相似性均最小。据此可将 4 个甜瓜 RGAs 序列分成 3 类:tg2 和 tg5 归为一类,tg12 和小麦抗叶锈病基因 *Lr10* 归为一类,tg9 自成一类。

3 讨 论

利用 R 基因保守区设计简并引物扩增 RGAs 是目前克隆 R 基因的一条简捷有效途径^[15]。作者以 STK 类 R 基因产物的催化结构域 I 和 IX 的保守氨基酸序列为依据设计简并引物,从甜瓜基因组中扩增出 12 个相关序列,序列分析结果显示其中的 4 个 DNA 序列编码的氨基酸序列具有 STK 类 R 基因的结构域,如 ATP 结合部位、底物结合部位等,表明利用 RGAs 进行甜瓜 R 基因的克隆是可行的。但 12 个序列中只有 4 个可以编码完整的氨基酸序列,有效序列的比例较低。因而,如要对所有序列进行分析并筛选 RGAs,则需要大量的测序工作。

甜瓜 RGAs 与目前已知的 STK 类 R 基因 (如番茄抗假单胞菌基因 *Pto*、小麦抗叶锈病基因 *Lr10* 和拟南芥外源凝集素蛋白激酶类基因 *Lectin* 等) 的序列相似度为 30% ~ 50%,同源性不高;而 4 个甜瓜 RGAs 序列的相似性也不高,其相似度最低值仅约 40%。表明甜瓜 RGAs 标记可能具有较高的特异性,是一种较好的分子标记。对于甜瓜的起源和进化至今仍无明确的研究结论,其种质资源的分类也比较复杂,RGAs 标记的这一特点使其在甜瓜种质资源研究和杂种优势利用方面具有较高的应用价值。

Blast 分析结果显示:4 个甜瓜 RGAs 与来自蓖麻的 R 基因片段均有较高的同源性。一般认为蓖麻起源于非洲东北部^[16],而对于甜瓜的起源则存在较大的争议,有“非洲南亚起源说”、“近东起源说”和“非洲起源说”等^[17]。尽管 R 基因的进化速率非常快,但有研究表明某些寄主和病原物的特异性识别已经存在了数百万年^[18];相同起源地的不同植物可能对近似的病原保留了相应的抗性基因。本研究中甜瓜 RGAs 和蓖麻 R 基因表现出较高的同源性,这一结果是否可以作为甜瓜“非洲起源说”的 1 个佐证? 有待

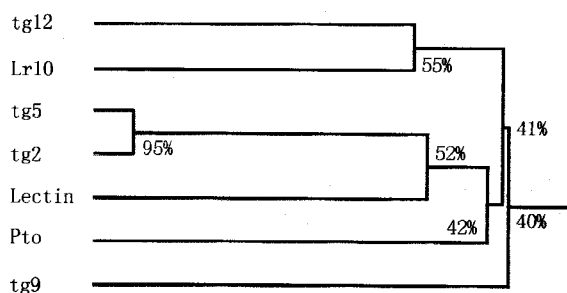


图 3 tg2、tg5、tg9、tg12: 甜瓜 R 基因片段 tg2、tg5、tg9、tg12 编码的氨基酸序列 Amino acid sequences encoded by fragment tg2, tg5, tg9 and tg12 of R-gene from *Cucumis melo* L.; Pto: 番茄 R 基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by R-gene from *Lycopersicon esculentum* Miller; Lr10: 小麦 R 基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by R-gene from *Triticum aestivum* L.; Lectin: 拟南芥 R 基因编码的氨基酸序列 Amino acid sequence encoded by R-gene from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 百分数表示不同序列间相同氨基酸所占比率 The percentages indicate the rate of the same amino acids among different sequences.

图 3 甜瓜 STK 类 R 基因片段编码的氨基酸序列与部分植物已知 R 基因编码的氨基酸序列的分子进化树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by STK-like R-gene fractions from *Cucumis melo* L. with those of known R-genes from several plants

研究证实。而通过克隆大量甜瓜 RGAs, 并进行深入的比较分析可能会有助于这一问题的逐步明晰。

由于 RGAs 克隆法存在一定缺陷, 如由于 *R* 基因常以基因簇的形式存在, 需要进行大量的工作以找到目的抗病基因^[19], 目前尚未完成甜瓜全基因组的测序, 同时可利用的相关分子标记也较少, 因而通过图位克隆法获得 *R* 基因难度很大。关于甜瓜 *R* 基因克隆的报道仅限于 NBS-LRR 类, 尚未见关于 STK 类 *R* 基因克隆的研究报道, 本研究获得的甜瓜 STK 类 RGAs 将有助于对其抗病机制的深入研究, 同时也可利用基因工程技术进行甜瓜抗病性改良提供实验基础。

参考文献:

- [1] JOHAL G S, BRIGGS S P. Reductase activity encoded by the *Hml* disease resistance gene in maize[J]. *Science*, 1992, 258: 985-987.
- [2] YU Y G, BUSS G R, MAROOF M A. Isolation of a super family of candidate disease resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(21): 11751-11756.
- [3] 薛勇彪, 唐定中, 张燕生, 等. 水稻基因组中 *R* 类抗病基因同源序列的分离[J]. *科学通报*, 1998, 43(2): 277-281.
- [4] 李子银, 陈受宜. 水稻抗病基因同源序列的克隆、定位及其表达[J]. *科学通报*, 1999, 44(7): 727-733.
- [5] LEEUWEN H V, GARCIA M J, COCA M, et al. Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 273(3): 240-251.
- [6] SONG W Y, 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.
- [7] MARTIN 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.
- [8] FEUILLET C, SCHACHERMAYR G, KELLER B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat[J]. *Plant*, 2001, 11(1): 45-52.
- [9] ASHFIELD T, BOCIAN A, HELD D, et al. Genetic and physical localization of the soybean *Rpg1-b* disease resistance gene reveals a complex locus containing several tightly linked families of NBS-LRR genes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16: 817-826.
- [10] LEISTER D, BALLVORE A, SALAMINI F. PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants[J]. *Nature Genetics*, 1996, 14(4): 421-429.
- [11] BENT A F, KUMKEL B N, DAHLBECK D, et al. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. *Science*, 1994, 265: 1856-1860.
- [12] LUO M, WANG Y H, FRISCH D, et al. Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using improved methods and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon fusarium wilt (*Fom-2*) [J]. *Genome*, 2001, 44: 154-162.
- [13] JOOBEUR T, KING J J, NOLIN S J, et al. The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(3): 283-297.
- [14] LEVI A, THOMAS C E. An improved procedure for isolation of high quality DNA from watermelon and melon leaves[J]. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 1999, 22: 40-43.
- [15] 阮小蕾, 李华平. 香蕉中抗病基因相似序列的克隆与分析[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(3): 273-276.
- [16] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第四十四卷第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 88-89.
- [17] 林德佩. 中国栽培甜瓜植物的起源、分类及进化[J]. *中国瓜菜*, 2010(4): 34-36.
- [18] 孔 巍, 刘学义. 植物抗病基因特异性分子进化[J]. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 89-96.
- [19] 汪旭升, 吴为人, 金谷雷, 等. 水稻全基因组 *R* 基因鉴定及候选 RGA 标记开发[J]. *科学通报*, 2005, 50(11): 1085-1089.

(责任编辑: 惠 红)