

云南元江普通野生稻中 *Pi-ta* 和 *Pib* 同源基因的克隆和分析

杨明攀¹, 程在全², 陈善娜¹, 钱君², 尹梅¹, 吴成军², 黄兴奇^{2,*}

¹ 云南大学生命科学学院, 昆明 650091; ² 云南省农业科学院生物技术研究所, 昆明 650223

摘要: 用高保真PCR技术从云南元江普通野生稻中克隆了抗稻瘟病 *Pi-ta* 同源基因的编码区及 *Pib* 基因的部分同源序列。*Pi-ta* 同源基因的编码区序列与报道的栽培稻有99.7%的同源性。根据前人的结果, 从元江普通野生稻的 *Pi-ta* 基因推导的氨基酸序列中918位点为丝氨酸, 属于 *Pi-ta⁻* 等位基因, 不能对含有 *AVRPita* 基因的稻瘟病菌产生抗性。与 *Pi-ta* 基因相比, 元江普通野生稻中的 *Pib* 同源基因第一外显子与栽培稻的相应序列间存在较大差异, 其中有一段87 bp的DNA序列缺失, 而且不能按正常的 *Pib* 基因序列的阅读框进行翻译。因此认为, 元江普通野生稻不具有基于 *Pi-ta* 和 *Pib* 基因的抗稻瘟病遗传基础。

关键词: 元江普通野生稻; *Pi-ta* 基因; *Pib* 基因; 同源序列

Cloning and Analysis of *Pi-ta* and *Pib* Gene Homologues from Yunnan Yuanjiang Type of Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff)

YANG Ming-Zhi¹, CHENG Zai-Quan², CHEN Shan-Na¹, QIAN Jun², YIN Mei¹, WU Cheng-Jun², HUANG Xing-Qi^{2,*}

¹ School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China; ² Biotechnology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650223, China

Abstract: The coding region of *Pi-ta* gene and *Pib* gene homologues from Yunnan Yuanjiang type of common wild rice (*Oryza rufipogon*) had cloned and sequenced by high fidelity PCR. The cloned DNA sequence of *Pi-ta* gene from Yuanjiang type of common wild rice has 99.7% identity with that of cultivated rice (*Oryza sativa*). There was serine at the position 918 within the deduced PITA amino acid sequence. So, according to the previous study, Yuanjiang type of common wild rice may contain a *Pi-ta⁻* allele that can not cause disease resistance response with rice blast pathogens in which contain *AVRPita* gene. Contrary to the *Pi-ta* gene, the cloned *Pib* gene exon I DNA sequence from Yuanjiang type of common wild rice has only 93.9% identity with that of the reported *O. sativa*. There was 87 bp DNA sequence deletion within the cloned *Pib* gene exon I from Yuanjiang type of common wild rice, compared to that of the cultivated rice. And the cloned *Pib* gene sequence cannot be translated into the corresponding PIB amino acid sequence. So, Yuanjiang type of common wild rice may lack the *Pi-ta* and *Pib* gene based rice blast resistance abilities.

Key words: Yuanjiang type of common wild rice (*Oryza rufipogon*); *Pi-ta* gene; *Pib* gene; gene homologues

云南元江普通野生稻是我国迄今发现分布海拔最高(750 m)的普通野生稻, 因气候及生态环境独特, 其生境周围不种植栽培稻, 因此认为是原始性最好而且较纯的普通野生稻类群, 也因而在我国栽培稻演化研究中占有重要地位(袁平荣等 1995)。云南元江普通野生稻, 与江西东乡普通野生稻以及广西桂林普通野生稻被认为是普通野生稻原始祖先型的代表(高立志和洪德元 1999; 王象坤等 1998)。野生稻由于生长环境相对恶劣, 在长期进化过程中形成了许多栽培稻所没有的优异性状(庞汉华 1998; 徐玲玲等 2006; 杨善益等 2006), 因而成为栽培稻育种的重要遗传资源库。

研究野生稻的生理、生化、遗传和分子生物学是发掘和利用野生稻有用遗传资源的前提。此外, 作为水稻最严重的病害之一的稻瘟病, 目前定位的抗稻瘟病 *R* (resistance) 基因至少有 30 个(Iwata 1996), 而克隆的只有 2 个, 即 *Pi-ta* 基因(Bryan 等 2000)和 *Pib* 基因(Wang 等 1999)。前者以基因对基因的方式介导对产生无毒基因 *AVRPita* 的稻

收稿 2007-01-16 修定 2007-04-16

资助 国家自然科学基金(30069003)和云南省自然科学基金(2006C00007Q 和 2004C0010Z)。

* 通讯作者(E-mail: huangxq02@163.com; Tel: 0871-5130681)。

瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的抗性。单拷贝的 *Pi-ta* 基因有 2 个外显子组成, 抗性和敏感性的水稻品种中均有少量的组成型表达。敏感性水稻品种中的 *Pi-ta⁻* 等位基因与抗性水稻品种中的 *Pi-ta⁺* 等位基因仅有 1 个氨基酸残基的差别, 即在第 918 位点处, 抗性品种是丙氨酸而敏感性品种则是丝氨酸。Bryan 等(2000)的转基因实验也证实 *Pi-ta⁺* 与 *AVRPita* 能引起抗病性反应, 而 *Pi-ta⁻* 与 *AVRPita* 之间则不能发生抗性反应。*Pib* 基因有 3 个外显子组成, 其中第一外显子约 1 kb。此种基因对日本的一些稻瘟病菌生理小种有专一抗性并受多种因素诱导表达(如病菌、受伤和环境条件的改变等)(Wang 等 1999)。*Pi-ta* 和 *Pib* 基因在栽培稻中的结构和功能已有较多报道, 而这些基因在野生稻中的表现尚未见报道。梁斌等(1999)鉴定云南野生稻对稻瘟病抗性的结果表明, 元江普通野生稻对自然发生的稻瘟病菌高度敏感。这种对稻瘟病高感特性是否与上述基因的功能差异有关? 为此, 本文采用高保真 PCR 技术从云南元江普通野生稻中克隆了 *Pi-ta* 基因的完整开放阅读框以及 *Pib* 基因第一外显子的同源序列, 并对所克隆的序列及其相应基因进行了分析。

材料与方法

云南元江普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff) 采自云南省元江县野生稻保护基地。实验中所用的 PCR 扩增试剂 Pfu Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司, PCR 产物回收试剂盒及质粒抽提试剂盒购自上海华瞬生物工程公司。克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。

DNA 的提取采用 SDS 法, 按文献的方法进行(Murray 和 Thompson 1980)。提取的 DNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测后, 稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 于 -20°C 冰箱中保存备用。

根据报道的 *Pi-ta* 基因(基因登录号为 AF207842)和 *Pib* 基因(基因登录号为 AB026839)序列, 委托上海生物工程公司合成 3 对引物: Pta1, 5' TCTGATCTTCAGCTAGCGC 3', Pta2, 5' GATTTCATGGCTCGATCGA 3', 克隆 *Pi-ta* 基因含外显子 I 的片段; Pta3, 5' ACGAAGTACTAAATG-TTC 3', Pta4, 5' CCTCTACTCTGAAGACG 3',

克隆 *Pi-ta* 基因含外显子 II 的片段; Pb1, 5' ATGGAGGCGACGGCGCTGAG 3', Pb2, 5' CTTGTCGTAGAAATGCGTA 3', 扩增 *Pib* 基因第一外显子片段。从元江普通野生稻基因组 DNA 中 PCR 扩增 *Pi-ta* 和 *Pib* 同源基因的反应液组成为: 在 $25 \mu\text{L}$ 的体系中加入 $2.5 \mu\text{L}$ $10\times$ 缓冲液、各 5 pmol 引物、约 25 ng 的基因组 DNA、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP、 2.5 U Pfu Taq DNA 聚合酶。扩增条件为: 95°C 预变性 2 min ; 94°C 变性 30 s , 55°C 复性 30 s (*Pib* 基因扩增的复性温度为 60°C), 72°C 延伸 1.5 min , 35 循环; 72°C 延伸 7 min 。

PCR 产物的克隆和测序时, 切下含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶块, 用胶回收试剂盒, 按操作说明回收纯化目的 DNA 片段。纯化的 DNA 片段连接到 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌(DH5 α), 在含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异丙基硫代-B-D-半乳糖苷(IPTG)、 0.01% 5-溴-4-氯-3-吡啶-B-D-半乳糖苷(X-gal)的 LB 平板上进行重组子筛选, 含重组质粒的 DNA 由上海生物工程公司测序。为确保序列测定结果的准确性以及可能扩增到基因的其他家族成员, 每次连接产物分别挑选 3 个独立的重组子进行测序。序列比较、翻译等分析以 DNASIS 等软件完成。

实验结果

1 云南元江普通野生稻中 *Pi-ta* 同源基因的克隆和分析

以引物 Pta1 和 Pta2 从元江普通野生稻扩增获得约 1100 bp 的特异性 DNA 片段(图 1-a), 而以引物 Pta3 和 Pta4 可以从元江普通野生稻中扩增获得约 2000 bp 的特异性 DNA 片段(图 1-b), 扩增的 2 个 DNA 片段包含了 *Pi-ta* 基因完整的编码区。元江普通野生稻 *Pi-ta* 同源基因 DNA 和推导的氨基酸序列与报道的栽培稻中 *Pi-ta⁺* 等位基因相应序列之间有极高的同源性(核苷酸序列间的同源性为 99.7% ; 氨基酸序列间的同源性为 99.3%)。其中有 6 个核苷酸的差异并导致 5 个氨基酸残基的改变(3 次独立测序结果)。元江普通野生稻 *Pi-ta* 基因与水稻 *Pi-ta⁺* 等位基因推导的氨基酸序列中氨基酸残基及其理化性质有差异(表 1)。

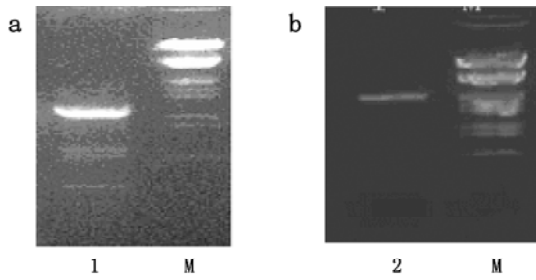


图1 元江普通野生稻基因组 DNA PCR 扩增 *Pi-ta* 基因的琼脂糖电泳图谱

Fig.1 PCR results of *Pi-ta* homolog gene exon I and exon II from Yunnan Yuanjiang type of *O. rufipogon* genomic DNA
1: *Pi-ta* 基因外显子 I 扩增结果; 2: *Pi-ta* 基因外显子 II 扩增结果; M: λ DNA *EcoRI/HindIII* 标准分子量。

表1 元江普通野生稻与栽培稻 *Pi-ta* 基因推导的氨基酸序列中差异的氨基酸残基及其理化性质差异
Table 1 Comparison on the different amino acids between Yuanjiang type of *O. rufipogon* and *O. sativa* within *Pi-ta* gene deduced amino acid sequences

差异位点	氨基酸		差异氨基酸残基所在结构域	差异氨基酸残基间的理化性质
	栽培稻	元江普通野生稻		
106	甘氨酸	丝氨酸	未知	相似
549	赖氨酸	精氨酸	未知	相似
629	苯丙氨酸	丝氨酸	未知	差异
796	谷氨酰胺	谷氨酸	未知	相似
918	丙氨酸	丝氨酸	LRD*	差异

*LRD: 富亮氨酸结构域, 属于非典型的富亮氨酸重复(LRR)结构域。

2 元江普通野生稻中 *Pi-ta* 同源基因与栽培稻 *Pi-ta*⁺ 等位基因推导的氨基酸序列二级结构的差异分析

元江普通野生稻和栽培稻(AF207842) *Pi-ta* 氨基酸序列以 DNASIS 软件预测的二级结构的结果表明, 由于序列高度同源性, 元江普通野生稻与栽培稻该蛋白质的大部分区域均有相同的二级结构, 而在末端富亮氨酸结构域(leucine-rich domain, LRD)内, 由于1个氨基酸残基的差异(表1, 918位点)导致了二者二级结构的较大差异。元江普通野生稻比栽培稻多一个转折(TURN)结构(图未列出)。

3 元江普通野生稻中 *Pib* 同源基因的克隆与分析

用引物Pb1和Pb2从元江普通野生稻中可扩增到约1000 bp 较特异的 DNA 片段, 扩增产物经克隆后分别挑取3个独立的重组克隆进行测序。结果表明3个克隆都为同一序列(在 GenBank 中的登录号为 DQ298750)。所克隆的 *Pib* 同源 DNA 序列与报道的栽培稻相应序列(基因登录号 AB026839)之间有较大差异, 有93.9% 的同源性。元江普通野生稻 *Pib* 基因第一外显子的同源序列中有一段87 bp 的 DNA 序列缺失。部分 DNA 序列比较结果如图2。用 DNASIS 软件对来源于元江普通野生稻的 *Pib* 同源基因序列进行翻译预测结果表明, 虽然缺失序列的碱基数为3的倍数, 但由于差异位点较多(有6.1% 的差异), 此序列不能按栽培稻中此种基因序列的阅读框翻译成相应的氨基酸序列。

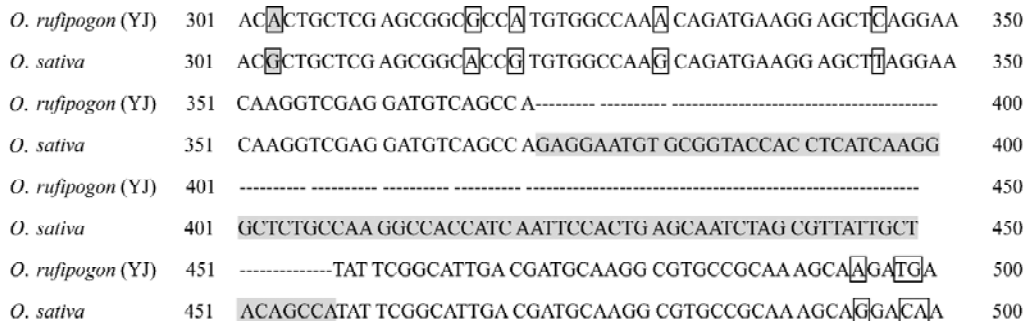


图2 元江普通野生稻中 *Pib* 同源基因的部分 DNA 序列与栽培稻中此种基因相应序列的比较

Fig.2 Comparison of the partial cloned *Pib* gene homologue from Yuanjiang type of common wild rice and the corresponding cultivated rice

O. rufipogon (YJ)为克隆的 *Pib* 同源基因序列, 在 GenBank 中的登录号为 DQ298750; *O. sativa* 为来源于栽培稻的 *Pib* 基因相应序列, 基因登录号为 AB026839。框内为差异核苷酸。

讨 论

元江普通野生稻对稻瘟病的敏感性(梁斌等 1999)极有可能与其含有 *Pi-ta⁻* 等位基因有关。PITA 蛋白质二级结构预测结果也表明,在此蛋白的LRD内,元江普通野生稻与栽培稻 *Pi-ta⁺* 基因推导的氨基酸序列虽然仅仅只有1个氨基酸的差别,但由于2个氨基酸间的理化特性差异较大,以致二者的二级结构有差异。根据基因对基因理论(Flor 1971),病原菌的无毒基因(*AVRPita*)与植物的抗病基因(*Pi-ta*)之间的相互识别是以基因产物的空间结构为基础的(Jones 和 Jones 1996; Hammond-Kosack 和 Jones 1997)。LRD 为非典型的富亮氨酸重复结构域(leucine-rich repeat, LRR), LRR 结构域在抗病基因产物与病原菌无毒基因产物之间相互识别特异性中起主要作用。LRD 空间结构的改变将影响无毒基因与抗病基因产物间的相互识别。虽然 *Pi-ta⁻* 基因与 *AVRPita* 之间不能发生抗病性反应,但该等位基因的组成型表达特性,暗示该基因可能还行使其他尚不知道的生理功能。由于在栽培稻品系中同时存在有 *Pi-ta⁺* 和 *Pi-ta⁻* 等位基因(Bryan 等 2000),在其他类型的野生稻中是否也存在 *Pi-ta⁺* 等位基因,这从研究该基因进化以及发掘野生稻中的抗稻瘟病资源来说是有意义的。

栽培稻中, *Pi-ta* 基因为单拷贝基因(Bryan 等 2000),而 *Pib* 基因属于一个成员数未知的家族成员(Wang 等 1999)。元江普通野生稻中的 *Pib* 部分同源序列与报道的栽培稻中相应序列之间有较大的差异,并有序列缺失(图 2)。如果本文中获得的 *Pib* 基因序列并非其他的家族成员[3次独立测序结果均未发现其他类型的 *Pib* 同源序列,而与栽培稻中克隆的 *Pib* 家族基因 *PibH8* (Wang 等 1999, 2001)只有 52.2% 的同源性],这在一定程度上暗示了在进化中 *Pi-ta* 基因比 *Pib* 基因承受了更大的选择压力。对克隆的 *Pib* DNA 序列翻译分析的结果表明,所克隆的元江普通野生稻中的 *Pib* 基因可能不具有栽培稻中 *Pib* 基因的抗稻瘟病功能。云南元江普通野生稻中既不含有抗病的 *Pi-ta⁺* 等位基因,可能也不具有抗稻瘟病功能的 *Pib* 基因,

因此可以认为,该类型普通野生稻不具备基于 *Pi-ta* 和 *Pib* 基因的抗稻瘟病遗传基础。但作为普通野生稻原始祖先类型的元江普通野生稻来说, *Pi-ta* 和 *Pib* 同源序列给我们提供了一条研究这些基因进化的分子线索。

参考文献

- 高立志,洪德元(1999). 中国稻属研究的主要进展. 中国农业科学, 32 (6): 40~46
- 梁斌,肖放华,黄费元,彭绍裘,陈勇(1999). 云南野生稻对稻瘟病的抗性评价. 中国水稻科学, 13 (3): 183~185
- 庞汉华(1998). 普通野生稻优异种质资源主要特点与利用展望. 种子, 95 (3): 31~32
- 王象坤,孙传清,才宏伟,张局中(1998). 中国稻作起源与演化. 科学通报, 22 (11): 2354~2363
- 徐玲玲,陈善娜,程在全,杨明挚(2006). 云南野生稻离子吸收效率及其动力学特征研究. 植物生理学通讯, 42 (3): 426~430
- 杨益善,邓启云,陈立云,邓化冰,庄文,熊跃东(2006). 野生稻高产 QTL 高效表达的光合生理基础. 植物生理学通讯, 42 (2): 133~137
- 袁平荣,卢义宣,黄西威(1995). 云南元江普通野生稻分化的研究. 北京农业大学学报, 21 (3): 133~137
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia YL, Hershey HP, NcAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell, 12: 2033~2046
- Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol, 9: 275~296
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997). Plant disease resistance genes. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 48: 575~607
- Iwata N (1996). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. Rice Genet Newsl, 13: 12~18
- Jones DA, Jones JDG (1996). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. Adv Bot Plant Pathol, 24: 89~167
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res, 8: 4321~4325
- Wang ZX, Yamanouchi U, Katayose Y, Sasaki T, Yano M (2001). Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. Plant Mol Biol, 47 (5): 653~661
- Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant J, 19 (1): 55~64