

基于 PCR 的水稻候选 RGA 标记检验和评估

肖天霞, 赵向前, 汪旭升, 吴为人, 朱军

(浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: 在生物信息学方法开发的基于 e-PCR、共显性的 402 个水稻候选 RGA 标记的基础上, 随机挑选 40 对引物, 分别以水稻品种 Nipponbare 和 93-11 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增验证. 得到清晰条带占所用标记总数的 87.5% (35 个标记), 其中 31 对引物为共显性标记, 4 对引物为显性标记. 用这 31 对 RGA 引物在 24 个水稻品种中进行 PCR 扩增, 结果表明标记具有很好的通用性和特异性. RGA 引物平均标记多态性指标 (PIC) 值为 0.46, 标记具有较好的多态性.

关键词: 水稻; RGA 标记; PCR

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A

XIAO Tian-xia, ZHAO Xiang-qian, WANG Xu-sheng, WU Wei-ren, ZHU Jun (College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Examination and evaluation of PCR based candidate RGA markers in rice. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2007, 33(1): 51-55

Abstract: Based on 402 co-dominant rice candidate RGA markers developed by bioinformatics methods, 40 pairs of primers were randomly selected to test the polymorphisms in rice two subspecies, *japonica* and *indica*. The results showed that 87.5% (35 markers) of the total number of markers obtained the clear bands, which 31 markers were co-dominant and 4 markers were dominant. In addition, 31 primer pairs were used to analyze 24 different *japonica* and *indica* varieties, and the result showed the markers have good commonality and subspecies-specificity. The averaged Polymorphism Information Content (PIC) of RGA markers was 0.46, indicated that the RGA markers have good polymorphism.

Key words: rice; RGA markers; PCR

根据基因对基因假说,植物的抗病(R)基因与病原菌无毒基因相对应^[1-2].迄今已克隆了40多个R基因^[3].R基因是一个庞大的基因家族,根据其蛋白质功能保守域设计简并引物,通过PCR扩增可以分离出大量的抗病基因同源序列或类似物(RGA)^[4].用这种方法已经在

豆、马铃薯、小麦、大麦、水稻和番茄等许多植物中得到RGA^[5-9].由于R基因家族成员在基因组中具有成簇存在的特点,因此RGA标记对R基因的定位和克隆特别有用.RGA是潜在的R基因,同时又可以作为分子标记.传统的RGA标记是一种RFLP标记,应用上不方便,

收稿日期: 2006-06-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470916).

作者简介: 肖天霞(1981—),女,湖北襄樊人,硕士研究生,从事分子生物学和数量遗传学研究. E-mail: sherwinxiao@163.com.

通讯作者: 朱军,男,教授,博士生导师,主要从事生物信息学及数量遗传学研究. Tel: 0571-86971731; E-mail: jzhu@zju.

edu.cn.

开发成本较高,数量上十分有限.以往研究中 RGA-PCR 标记是根据保守区域设计引物,一般选取 LRR 和 NBS 结构域来设计引物^[10-11],且退火温度低,RGA 扩增得到的产物达几百条^[12],特异性差,因此在 R 基因定位和标记辅助育种中用处不大.从基因定位和标记辅助育种的实际需要看,特异 PCR 标记具有更大的应用价值.为了开发基于特异 PCR 引物的 RGA 标记,本文采用生物信息学方法,利用已公布的籼稻(93-11)和粳稻(Nipponbare)的全基因组序列,开发出 402 个候选的 RGA 标记^[13].这些候选 RGA 标记在 e-PCR 中产生单一条带,且表现为共显性.为了检验这些候选 RGA 标记的适用性,用随机挑选的样本进行实验验证,并对 RGA 标记的多态性、通用性及其在籼粳亚种间的特异性进行分析,以期水稻抗病分子标记辅助育种提供便利工具.

1 材料和方法

选用 10 个籼稻品种 93-11 (I1)、Diwani (I2)、Basmati (I3)、南京 11 (I4)、Tetep (I5)、中 413 (I6)、BG 90-2 (I7)、协青早 (I8)、广陆矮 4 号 (I9)、IR64 (I10) 和 14 个粳稻品种 Nipponbare (J1)、Cripto (J2)、Kyeema (J3)、Lemont (J4)、M-204 (J5)、Dawn (J6)、台北 309 (J7)、Starbonnet (J8)、Bluebonnet (J9)、M-103 (J10)、Daegwanbyeon (J11)、Newboonet (J12)、L-202 (J13)、Katy (J14) 作为实验材料.水稻种子由中国水稻研究所提供,其中品种 Nipponbare 和 93-11 与已经完成的测序品种相一致.每份材料发芽后剪取幼嫩叶片,采用 SDS 方法提取总 DNA.

从 402 个候选 RGA 标记中随机挑选 40 对引物,由上海英俊生物技术公司合成. PCR 采取 20 μL 的反应体系: 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上游和下游引物, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1% Triton X-100, 1 U Taq 酶, 1 \times PCR 反应缓冲液和 50 ng 水稻基因组 DNA. 采用降温 PCR (TD-PCR) 扩增,程序为: 94 预变性 5 min, 5 个循环(94 变性 30 s, 61 退火 30 s, 72 延伸 30 s), 10 个循环(94 变性

30 s, 60 退火 30 s, 每循环降低 0.5、72 延伸 30 s), 20 个循环(94 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 30 s), 最后 72 延伸 5 min. 少量引物则采用常规 PCR 方法,程序为: 94 预变性 5 min, 35 个循环(94 变性 30 s, 52 或者 50 退火 30 s, 72 延伸 30 s), 最后 72 延伸 5 min, 详见表 1. 产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,上样量为 3 μL , 银染步骤参照简单快速的 DNA 银染和胶保存方法^[14]. 电泳条带记录方法为: 有带记为 1, 无带记为 0. 用 PIC (Polymorphism Information Content) 作为标记多态性指标, 计算公式为:
$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$
, 式中 P_{ij} 是第 i 个标记第 j 个等位基因(条带)出现的频率^[15].

2 结果与分析

2.1 RGA 标记在 93-11 和 Nipponbare 中的实验验证

将合成的 40 对 RGA 引物在 Nipponbare 和 93-11 的基因组 DNA 中进行扩增, 31 对引物(77.5%) 能获得稳定清晰的目标条带并在两亲本间表现出多态性, 片段大小与 e-PCR 结果一致, 这些引物可作为共显性标记(图 1). 有 2 对引物(RGA29、RGA35)在 93-11 中扩增不到产物, 而在 Nipponbare 中条带清晰(图 1); 1 对引物(RGA28)在 Nipponbare 中同时扩增到 2 个清晰条带, 其中有一个片段大小与 93-11 产物相同; 1 对引物(RGA33)在 93-11 中同时扩增到 2 个条带, 其中一个片段与 Nipponbare 产物大小相同. 因此, 这 4 对引物(10%) 可以作为显性标记. 有 3 对引物(RGA8、RGA17 和 RGA18)虽然在 93-11 和 Nipponbare 中扩增到清晰的条带, 但没有多态性; 有 2 对引物(RGA19 和 RGA25)扩增不到产物. 总之, 在测试的 40 对引物中, 有 35 对引物扩增出多态性条带, 可以作为分子标记, 成功率达到 87.5%. 在这 35 对引物中, 有 6 对引物可以采用常规 PCR, 而其它引物皆用 TD-PCR 进行扩增, 详细结果见表 1.

根据 R 基因的结构和功能域, 水稻基因主

要由 5 大类功能域组成,而 NBS,LRR 和 PK 是主要类型的结构功能域^[13]. 35 个多态性的 RGA 标记也主要由 3 类组成,其中 PK 类 10 个,占 28.57%;NBS-LRR 类 9 个,占 25.71%;

NBS 类 6 个,占 17.14%(表 1). 另外还有 RVT,LRR、PK-LRR、ABC(各有 2 个)以及 MLO 和 PK-NBS(各有 1 个)几种类型,基本上与全基因的 R 基因的构成相一致.

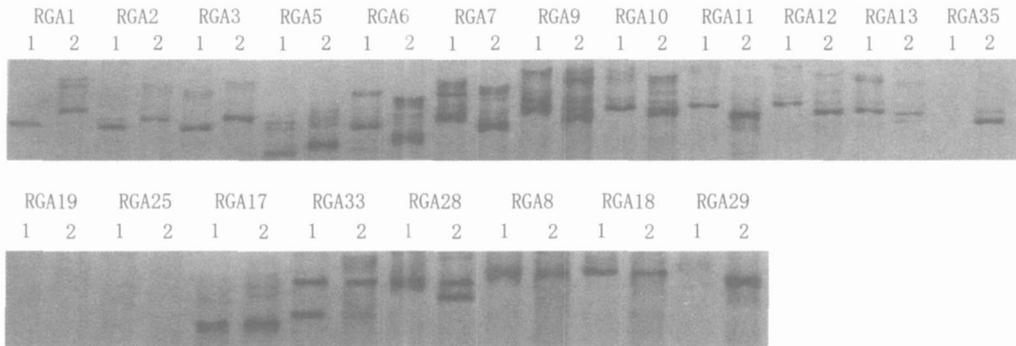


图 1 部分 RGA 标记在 93-11(泳道 1)和 Nipponbare(泳道 2)间的多态性

Fig. 1 Polymorphisms of RGA markers between 93-11 (lane 1) and Nipponbare (lane 2)

表 1 RGA 标记的染色体分布、引物序列、保守结构域分类、退火温度和标记类型

Table 1 Chromosomal distribution, primer sequences, types of conserved domain, Tm and type of RGA markers

引物编号	染色体号	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'	保守结构域	退火温度/°C	标记类型	PIC 值
RGA1	8	ATGCATGCCAGGGTATGTG	GTGAACGATCGTAGGACAC	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.36
RGA2	1	TCCTAGGGGCGACTAAATGA	TTTGTGCTCGTTCACCTGT	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.42
RGA3	4	GCCGCAGAATATCCTTCTTG	CACAATGCCACTGTCACAAA	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.40
RGA4	1	CTGAA GCGGTGCTTCACC	TGGTGA GCGCTCCTATACCT	LRR	50	Co-dominant	0.47
RGA5	7	GTCTGACCCACACGTCATTG	CCGGTGTGTAGCTGTACG	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.50
RGA6	2	GAAC TTGTGGAGTGGTTGG	TCAAA GACCAAA GCACCTCTG	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.56
RGA7	2	TCTATGCTGCTTGTGCCATC	TGCTTTCACATCCTTTGACG	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.52
RGA9	4	CGAA GAGGCTCTCAAACACTG	CGGTACGGTTGGTTCGIAAA	RVT	TD-PCR	Co-dominant	0.49
RGA10	2	TGTTGGCAA GGTTCATGTGAT	GCA GAGGGAAAAA GATTGTTG	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.39
RGA11	7	GCTCTACGACTTCGACCA GA	GATGA GCATCTTCTCGTCA GC	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.57
RGA12	1	AA GGACCCGAAA GCAAAA GT	GAACCTGCAAA TACCAAA GCA	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.54
RGA13	11	TGATGCAACTAA GAA GTGTGTGG	GTGTCTTCA GGTGGGAAAA	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.49
RGA14	5	GAGTTCCGCATCGA GGTAAG	CGGTTGGTATACGAATTGAA GA	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.58
RGA15	11	ACCGGA GGACCTGATA GAT	GGGCTAATGACAA GGTGCAT	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.35
RGA16	11	TTCCCTCGTTATTTGCATGTT	TTTGGTGA GCCCTACATCATCA	LRR	50	Co-dominant	0.37
RGA20	10	CCGCAACGCTAA GTTAATCA	GCAAAAA GAACACACACATATCC	ABC	TD-PCR	Co-dominant	0.50
RGA21	10	GTGCAA GCACACCTGGAATA	CAAAACCATTGACAA GCCAAC	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.51
RGA22	8	ACCA GCGCATGTATTGTTCA	TTCGTTGATGTCTCCTCT	ABC	TD-PCR	Co-dominant	0.39
RGA23	2	GGTGGTGTGGT GATTGGAT	CGTCAATGCTAATGCTTGGGA	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.48
RGA24	10	CCGCAACGCTAA GTTAATCA	GCAAAAA GAACACACACATATCC	MLO	50	Co-dominant	0.46
RGA26	7	CCAAGTCGTA CACTGGGTA CT	GCATCCGTTTGTGTATTGA	NBS-LRR	50	Co-dominant	0.50
RGA27	8	CAAA GCTCACACGCTCAT	GTATCTCACGCGACGCTCAT	NBS	TD-PCR	Co-dominant	0.44
RGA28	2	TACTCCATAATCGCGAA GCA	TCTCCGAAACTATCA GACG	RVT	TD-PCR	Dominant	-
RGA29	8	TCCATCACTGTGAACGGA A	CCCATTGAAAACAA GTCGT	NBS	TD-PCR	Dominant	-
RGA30	3	AGGATGCTTGAA GGTGATGG	TACCA GTGCGCAACAATCAT	PK-NBS	50	Co-dominant	0.51
RGA31	7	GGCCTTATGGCCAACTAT	GCAAA GCAACTGTCAACACC	PK	52	Co-dominant	0.48

续表 1 RGA 标记的染色体分布、引物序列、保守结构域分类、退火温度和标记类型

Continuation of Table 1 Chromosomal distribution, primer sequences, types of conserved domain, T_m and type of RGA markers

引物编号	染色体号	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'	保守结构域	退火温度/	标记类型	PIC 值
RGA32	2	ACGGGATCATGCTTCTTGAG	CCTTCTAGCATCCGAACCAC	PK-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.44
RGA33	2	GGAA GGCTTTGTCATGGAGA	ATATTCCTTGA GCCCAAA	NBS	TD-PCR	Dominant	-
RGA34	3	CAACGCTCCAGGCTAACTCT	AA GATCA GAACGCGGTAA GC	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.48
RGA35	6	CAGCTGCTGCA GAGATAAGC	GCTTTCAACA GCCTGGGTTT	NBS	TD-PCR	Dominant	-
RGA36	12	AA GCCCTA GATCCTGCACCT	TTTGTCAA GCA GATGA GAGCA	NBS-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.43
RGA37	12	GAGACTTTTAA GGCACATGCAA	AAAACAAATACTCCGTTTTTCCA	NBS	TD-PCR	Co-dominant	0.47
RGA38	12	CTCTTTGGACTTCTCGAAGCA	GTGATCACCTCCA GCA GCA	PK-LRR	TD-PCR	Co-dominant	0.48
RGA39	12	TGGA GATACATTCTGCCATT	TTGAGTGGCTCAA GATGCA G	NBS	TD-PCR	Co-dominant	0.48
RGA40	4	CTACGTGAGCTCGCTGGAAT	CACACCAATTCTCACTTGCTA	PK	TD-PCR	Co-dominant	0.15

2.2 RGA 标记的通用性和多态性

用获得的 31 对共显性 RGA 引物,在 24 个水稻品种(包括 Nipponbare 和 93-11)的基因组 DNA 中进行扩增,共检测出 65 个清晰稳定条带,平均每对引物检测到 2.10 个条带。其中 25 对引物只检测到 2 种带型,且片段大小与 93-11 或 Nipponbare 相同,说明 RGA 的片段长度在水稻进化中比较保守。另外有 6 对引物在 1~4 个籼稻或粳稻品种中出现新带型,这可能是由 R 基因的演变造成的。在品种 Diwani

和 Lemont 中,分别检测到 5 个和 3 个杂合位点,这可能和品种的纯度有关。

这 31 对引物在 24 个水稻品种中扩增成功的比例在 75%~100%之间,平均为 94.79%。其中有 19 对引物在全部品种中都能扩增到目标片段,其它 12 对引物在 18~23 个品种中扩增到目标片段,说明这些引物有很好的保守性和通用性(图 2)。这些 RGA 标记最大的 PIC 值为 0.58 (RGA14),最小为 0.15 (RGA40),平均为 0.46 (表 1),表明 RGA 标记具有较高的多态性。

11 J1 I2 I3 I4 I5 I6 I7 J2 I8 I9 I10 J3 J4 J5 J6 J7 J8 J9 J10 J11 J12 J13 J14



图 2 RGA2 在 24 个水稻品种中的多态性

Fig. 2 Polymorphisms of RGA2 among 24 rice accessions

检查 31 个 RGA 标记在 10 个籼稻品种中的扩增情况,发现每个标记平均在 70.65% 的籼稻品种中检测到与 93-11 一致的带型,其中最高为 RGA9,在所有籼稻品种中检测到的带型都与 93-11 一致;最低为 RGA40,只在 2 个籼稻品种中检测到与 93-11 一致的带型。在 14 个粳稻品种中,每个 RGA 标记检测到 Nipponbare 带型的频率平均为 85.45%,比籼稻中与 93-11 带型一致的频率高,表明 RGA 标记在粳稻中较为保守,而在籼粳亚种间和籼稻品种中有较高的变异率。这个结果与孙雁等(2002)的研究结果相似^[16]。

3 讨论

为了对基于生物信息学开发出的 RGA 标记进行适用性评估,随机挑选 40 对 RGA 标记进行实验分析,结果显示 35 对(87.5%)引物可以在 93-11 和 Nipponbare 之间扩增出多态性产物,因此,在已开发的 402 个候选 RGA 标记中,大约有 350 个可以成功开发为基于特异 PCR 的 RGA 标记。另外,有 31 对(77.5%)表现为共显性,表明约有 310 个为共显性标记。通过本研究对 RGA 标记验证,表明经生物信息学方法改进的 RGA 长度多态性将成为一种实

用的分子标记.另外,本研究中有 2 对标记未能在 Nipponbare 和 93-11 中获得目标产物,可能由于本研究所用的材料与测序所用的材料有差异.2 个标记在 Nipponbare 中获得产物,而未能在 93-11 品种中获得目标产物,可能由于 93-11 基因组测序未完成或基因组拼接有误造成.在实验中发现,大多数 RGA 引物除了能够扩增出预期的目标条带之外,也会产生一些非特异扩增条带.为了提高特异扩增条带,在本实验中,29 对引物采用 TD-PCR,退火温度从 60 降到 55.最终使每对 RGA 引物的 PCR 产物片段数目在 1~2 条,大大提高了 PCR 产物的特异性,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳甚至琼脂糖凝胶电泳就可以检测.

本实验结果表明 RGA 在籼稻和粳稻亚种之间具有丰富的多态性,为进一步研究水稻品种之间的亲缘关系和遗传多样性提供了一种新型工具.不同的环境和病原菌的差异都会造成 R 基因序列的不同.随着基因组演化及植物和病原物的共进,将会产生新的多态位点.同时,RGA 标记能够较好的区分籼粳亚种,该特性使 RGA 标记在水稻亚种间杂交育种和亚种间杂种优势利用方面具有重要的应用价值.

植物基因组中抗病基因一般是复合的,而且具有成簇存在的特点.利用生物信息学分析表明,共有 483 个 R 基因由 2 个到 10 个组成 182 个簇,约占总基因组 R 基因的 22.8%.因此,RGA 标记对于 R 基因的定位,克隆和分子标记辅助育种具有特别的应用价值.R 基因簇的出现主要是通过基因座内发生重复和重组、转座子及突变和重新识别循环发生,因此 RGA 标记研究对 R 基因的起源和进化具有一定指导作用.

致 谢:感谢中国水稻研究所为本研究提供种质资源.

References:

[1] Flor H H. The complementary genic systems in flax and flax rust [J]. *Adv Genet*, 1956, 8:29-54.
 [2] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1971, 9:275-296.
 [3] Dangl J L, Jones J D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection [J]. *Nature*, 2001, 411: 826-833.

[4] Kanazin V, Marek L F, Shoemaker R C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21):11746-11750.
 [5] Leister D, Ballvora A, Salamin F, et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance gene from potato with potential for wide application in plants [J]. *Nature Genet*, 1996, 13:421-429.
 [6] Catherine F, Gabriele S, Bent K. Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded the Lr10 disease resistance locus wheat [J]. *J The Plant*, 1997, 11(1): 45-52.
 [7] Seah S, Sivasithamparam S, Karakousis A, et al. Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97:937-945.
 [8] Leister D, Kurth J, Schulze P, et al. RFLP and physical mapping of resistance homologues in rice (*O. sativa*) and Barley (*H. vulgare*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 509-520.
 [9] Kolmer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, 34:435-455.
 [10] Chelkowski J, Koczyk G. Resistance gene analogues of *Arabidopsis thaliana*: Recognition by structure [J]. *J Appl Gen*, 2003, 44:311-321.
 [11] Koczyk G, Chelkowski J. An assessment of the resistance gene analogues of *Oryza sativa* ssp. *japonica*: Their presence and structure [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2003, 8: 963-972.
 [12] LIU Er-ming, XIAO Yr-long, YI You-jin, et al. (刘二明, 肖一龙, 易有金, 等). Relationship between phenotype of blast resistance and similarity of resistance gene analog in rice varieties [J]. *Chinese J Rice Sci (中国水稻科学)*, 2005, 19(3):209-216. (in Chinese)
 [13] WANG Xu-sheng, WU Wei-ren, JIN Gu-lei, et al. (汪旭升, 吴为人, 金谷雷, 等). Genome-wide identification of R genes and exploitation of candidate RGA markers in rice [J]. *Chinese Sci Bull (科学通报)*, 2005, 50(11):1085-1089. (in Chinese)
 [14] XU Shao-bin, TAO Yu-fen, YANG Zhao-qing, et al. (许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等). A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas (遗传)*, 2002, 24(3):335-336. (in Chinese)
 [15] Sanjay S, Hemant T, Robert C E. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value [J]. *Theor Popul Biol*, 2000, 57:265-271.
 [16] SUN Yan, WANG Yur-yue, HE Yue-qiu, et al. (孙雁, 王云月, 何月秋, 等). Analysis of resistance gene analogue for rice cultivars in Yunnan Province [J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2002, 35:502-507. (in Chinese)