小麦诱导抗性基因 *TaWIR1b* 的克隆及表达分析

王俊美， 徐 飞， 宋玉立*， 李亚红， 刘露露， 韩自行

（河南省农业科学院植物保护研究所，农业部华北南部作物有害生物综合治理重点实验室，郑州 450002）

摘要 全蚀病是小麦上一种重要的土传病害。选育和种植抗病品种是防治小麦全蚀病的根本途径，抗病基因研究是抗病育种的基础性工作。根据基因 *TaWIR1b*（Accession no. M94959.1）的全长序列设计引物扩增‘新农 19’的 cDNA，获得了完整 ORF，编码 85 个氨基酸残基，比对后发现与 *TaWIR1b* 序列同源性达 100%。根据获得的 *TaWIR1b* 基因全长序列设计定量引物，分析 *TaWIR1b* 在全蚀菌胁迫条件下不同互作模式的表达特征。结果表明接种全蚀病菌后抗病小麦品种‘新农 19’中 *TaWIR1b* 基因被诱导表达，接菌后 3 d 达到峰值 143.97，感病品种‘新麦 19’中峰值出现在接菌后 8 d，表达量仅为对照的 4.22 倍，提示该基因可能参与小麦对全蚀病的抗病过程。

关键词 小麦全蚀病； *TaWIR1b*； 基因克隆； 基因表达分析

中图分类号： S 512.1 **文献标识码**： A **DOI**： 10.3969/j.issn.0529 - 1542.2017.05.025

Cloning of the wheat induced resistance gene *TaWIR 1b* and expression analysis

Wang Junmei， Xu Fei， Song Yuli， Li Yahong， Liu Lulu， Han Zihang

（*Institute of Plant Protection*, *Henan Academy of Agricultural Sciences*, *Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Southern Part of North China*, *Ministry of Agriculture*, *Zhengzhou* 450002, *China*）

Abstract Take-all disease, caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*), is one of the important soil-borne diseases of wheat. It is the fundamental way to breed and plant resistant varieties for preventing the disease, and research on resistance genes is the foundation for resistance breeding. In this study, a complete ORF (open reading frame), with 100% homology with *TaWIR1b* from GenBank, was obtained by amplifying cDNA of ‘Xinnong19’ using primers designed based on *TaWIR1b* sequence (Accession no. M94959.1). Primers were synthesized for analyzing the transcription patterns of the gene by quantitative PCR in different wheat-pathogen interaction patterns induced by *Ggt*. The results indicated that *TaWIR1b* was induced by *Ggt* up-regulation expression in resistant cultivar ‘Xinnong19’, with a peak value of 143.97 three days post inoculation, but the peak value was 4.22 at 8 d post inoculation in susceptible cultivar ‘Xinmai19’. It indicates that the gene *TaWIR1b* might be involved in the course of resistant response to take-all disease.

Key words wheat take-all disease； *TaWIR1b* gene； gene cloning； gene expression analysis

小麦全蚀病是由禾顶囊壳小麦变种 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 引起的小麦上一种重要根部病害，在世界各小麦种植区广泛分布。其发生危害重、传播速度快，一旦发生难以根除，一般引起小麦减产 10%～20%，重病田减产近半甚至绝收。选育和种植抗病品种是解决小麦全蚀病危害的根本途径，而抗病基因研究是抗病育种的基础性工作。

*WIR*1（wheat induced resistance 1）基因首次报道是在小麦与大麦白粉菌的非亲和互作中被诱导表达，引起抗性反应[1]。目前小麦中已有 3 个 *WIR*1 基因被克隆鉴定，分别是 *TaWIR1a*、*TaWIR1b* 和 *TaWIR1c*，其中 *TaWIR1a* 和 *TaWIR1b* 聚在同一分支，与 *TaWIR1c* 的同源性较低。对 *WIR*1 基因编码氨基酸的结构分析表明 WIR1 蛋白 N 末端具有疏水残基，这种结构特征降低了剪接的可能性，增加了膜结合的可能性。TaWIR1a 蛋白具有亲水的 C 末端，其可能功能是在病原物攻击的过程中增强

收稿日期： 2016 - 10 - 31 **修订日期**： 2016 - 12 - 19
基金项目： 河南省小麦产业技术体系（S2010 - 01 - 05）；河南省基础与前沿技术研究计划项目（142300413221）；河南省农业科学院自主创新基金
* 通信作者 E-mail：songyuli2000@126.com

细胞膜与细胞壁的黏附从而增强细胞的稳定性[2]。而 TaWIR1b 和 TaWIR1c 蛋白包含有信号肽,与分泌有关,可能涉及细胞壁加固和增强物理屏障从而限制病原菌定殖。

实验室前期抗性鉴定结果中小麦品种'新农 19'对小麦全蚀病菌 GaNS-90 菌株表现中抗[3],可用于研究小麦对全蚀菌的抗性机制。本研究根据已有 *TaWIR1b* 基因的序列合成引物扩增'新农 19'的 cDNA 获得了基因的全长序列。同时根据获得基因的序列合成定量引物,分析了接种小麦全蚀病菌 GaNS-90 后 *TaWIR1b* 在'新农 19'和感病品种'新麦 19'中的表达情况,为进一步研究基因的功能奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

试验所用河南省区试小麦品种'新农 19'(Xinnong19)、'新麦 19'(Xinmai19)及小麦全蚀病菌菌株 GaNS-90 均由河南省农业科学研究院植物保护研究所小麦病害课题组收集、保存。

1.2　试验方法

1.2.1　试验材料的准备与取样

挑取均匀饱满的小麦种子,用 75%乙醇表面消毒 30 s,清水洗净后转移至培养皿中浸种 24 h,然后种植于营养钵中温室(20℃)培养,每天光照 16 h。至长出 4 叶后将整株苗连根拔出冲洗干净,置于放有湿润卫生纸的托盘内,用打孔器打取全蚀菌菌饼并放置于根部,保鲜膜封住托盘。将托盘置于培养箱中,采集接菌后 0、2、3 和 8 d 以及同期不接菌对照的小麦根,用锡箔纸包好液氮速冻,存放于-80℃冰箱备用。

1.2.2　总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

采用 TRIzol 法(参考 TaKaRa 说明书)提取小麦根的 RNA,加入 DNase 纯化 RNA。用 Eppendorf Biospectrometer 分光光度计检测样品的浓度和纯度。用 TaKaRa 的反转录试剂盒获得 cDNA 第一链。-20℃保存备用。

1.2.3　目的基因获得及序列分析

根据目的基因 *TaWIR1b*(Accession no. M94959.1)的 ORF 框两端序列设计引物对:WIR1F:CTCGAAACACACCAGCAT;WIR1R:GGTGCGTGACAGTAGATTAAC。以'新农 19'的 cDNA 为模板进行扩增,扩增体系如下:10×*Taq* buffer 2 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.4 μL,上游引物(10 μmol/L)0.2 μL,下游引物(10 μmol/L)0.2 μL,cDNA 1 μL,*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL,ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶成像系统照相。电泳后回收目标片段,连接入 pMD19-T simple 载体,转化 TJ1 感受态细胞,提取质粒,送上海生物工程有限公司进行测序。

利用 NCBI(http://ncbi.nlm.nih.gov/)中的 ORF Finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)工具查找目的片段的开放阅读框。通过 BLAST 对克隆的目的片段进行同源性分析。

1.2.4　内参及目的基因定量引物设计及检测

以组成型表达基因,小麦的 26S rRNA(Accession no. Z11889.1)作为内参对照,引物序列[4]:26S-F:GAAGAAGGTCCCAAGGGTTC;26S-R:TCTCCCTTTAACACCAACGG。根据克隆得到的基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计定量 PCR 引物,序列如下:WIR1M-F:TGCCGCACAGTTTATGGATG;WIR1M-R:TAAGGTGGTGCGTGACAGTAGA。

先通过普通 PCR 扩增判断引物的特异性,产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。选择最佳退火温度,确保没有引物二聚体产生后按该退火温度进行实时荧光定量 PCR。通过梯度稀释模板的方法绘制标准曲线,检测引物的扩增效率,根据熔解曲线判断引物的特异性。

1.2.5　荧光定量 PCR 检测与分析

应用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪,以各个取样点的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为:2×SYBR Premix *Ex Taq* 10 μL,50×ROX Ⅱ 0.4 μL,WIRIM-F(10 μmol/L)0.8 μL,WIRIM-R(10 μmol/L)0.8 μL,cDNA 第一链 2 μL(10×稀释的 RNA 反转录产物),ddH_2O 补足至 20 μL。反应程序为:95℃ 1 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 40 s,40 个循环。于 72℃收集荧光信号,反应结束后进行荧光值变化曲线和熔解曲线分析。每个反应重复 3 次,*Ct* 值取平均值。以各取样时间点小麦 26S rRNA 的量为内参对照来确定目标基因的相对量,利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法[5]来确定目的基因的相对表达量。

2　结果与分析

2.1　目的基因获得

提取所有试验材料的总 RNA。用 Eppendorf Biospectrometer 检测,所提取的总 RNA OD_{260}/OD_{280}

值为 2.0 左右，表明 RNA 质量较好，OD_{260}/OD_{230} 值大于 2.0，表明 RNA 纯度较高，无小分子盐类污染。用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA，没有降解现象，可用于下一步试验。根据试剂盒说明，利用 TaKaRa First Strand cDNA synthesis 进行 cDNA 第一链合成。

利用扩增基因全长的引物扩增'新农 19'的 cDNA，获得了 370 bp 左右的特异片段，将该片段回收、克隆转化后送公司测序。测序结果表明片段长度为 373 bp，其序列与已报道的 *TaWIR1b* 基因序列完全相同。利用 NCBI 中 ORF finder 工具在克隆片段中找到长 258 bp 完整开放阅读框，该 ORF 编码 86 个氨基酸残基(图 1)。与已知基因 *TaWIR1b* 编码的氨基酸序列 100%一致。获得的 ORF 框 N 末端具有丰富的甘氨酸(glycine G)和脯氨酸(proline P)重复，是 TaWIR1b 的功能区域。

ctcgaaacacaccagc

atggcgtcccacagtgctgccggccgtcgtcccacggcgctcgtgcatatcgctctcttcgtcgccatcgccgcggtcatc

M A S H S A A G R R P T A L V H I A L F V A I A A V I

atcaacagctccgtctgtcttggagccgccgtccacgacgccgccacctcaggcaccggtgctctcgaccctaacgtccct

I N S S V C L G A A V H D A A T S G T G A L D P N V P

gctgttccgacgccgggcggtgccggtcaaccctacaccggccgtgggtgccgcacagtttatggatgtaaaccaccggcg

A V P T P G G A G Q P Y T G R G C R T V Y G C K P P A

ggtagccagccc**taa**ttacatccgcgcgcagaccccatctcccagacacaatgcttgcgaggatccatcgatatatgtaat

G S Q P *

tggttagcacaagttaatctactgtcacgcacc

划线序列是扩增用引物；加粗部分：atg为起始密码子，taa为终止密码子；加框部分为glycine残基；阴影部分为proline残基
Underlined sequences represent amplification primers; atg in bold represent start codon; taa in bold represent stop codon; framed amino acids represent glycine; amino acids written in grey areas represent proline

图 1 基因 *TaWIR1b* 的序列

Fig. 1 The sequence of *TaWIR1b*

2.2 定量表达分析

以小麦核糖体 26S rRNA 基因作为内参对照，采用相对定量的方法分析全蚀菌侵染胁迫条件下基因 *TaWIR1b* 在不同互作条件下的表达模式。结果表明：小麦品种'新农 19'中基因 *TaWIR1b* 受到病原菌侵染后诱导上调表达，且在接种后第 3 天达到高峰值，比对照高出 143.97 倍；而感病品种'新麦 19'中基因的表达高峰出现在接菌后第 8 天，且仅为对照的 4.22 倍，各时期基因的表达量均显著低于'新农 19'(图 2)。

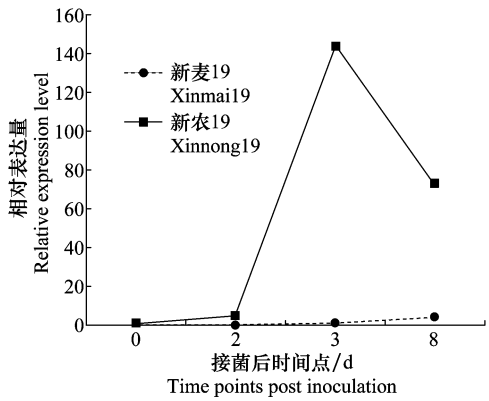


图 2 接种全蚀病菌后 *TaWIR1b* 基因的表达模式

Fig. 2 Expression pattern of the gene *TaWIR1b* after inoculation with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

3 讨论

小麦 *WIR* 基因早在 1989 年被克隆，目前有 *TaWIR1a*、*TaWIR1b* 和 *TaWIR1c* 3 个基因被克隆。已有结果表明，该类基因受到多种病原物的诱导上调表达。其中 *TaWIR1a* 同源基因在大麦与大麦叶锈菌和小麦叶锈菌互作及大麦对大麦白粉菌的基础防御和小种专化型抗性中均可以被诱导表达[6-7]；*WIR1* 在小麦中参与对小麦叶锈菌的非小种专化型抗性和基础防御过程[8]。Coram 等的研究结果表明 *TaWIR1a* 基因参与小麦对条锈菌的小种专化型抗性过程[9]。Diethelm 等比较了小麦抗、感品种中 *TaWIR1b* 基因的表达情况，认为该基因在小麦对赤霉病的抗性中发挥作用，将该基因定位在小麦 5DS 染色体上，并将其列为抗病基因的候选基因[10]。

本研究结果表明，该类基因受到全蚀病菌的诱导而上调表达，在抗病品种'新农 19'中的表达量显著高于感病品种'新麦 19'，峰值出现得也较早，提示该基因可能参与'新农 19'对全蚀病菌的抗病过程。目前对于 *TaWIR1* 的功能没有定论。利用大

麦条纹花叶病毒(BSMV)介导的基因沉默(virus inducing gene silencing, VIGS)系统分析 *TaWIR1* 基因的功能时发现,虽然在病菌诱导后该基因出现上调表达,但并未发现对小麦白粉菌的定殖有影响[1-2]。同时在小麦中过表达 *TaWIR1a* 对于白粉菌吸器的形成不产生影响[11]。沉默试验小麦材料'Renan'中全部 *TaWIR1* 基因对于小麦白粉菌的发育没有显著影响[12]。Diethelm 等则认为该基因对活体营养型病原物和死体营养型病原物的作用是截然相反的,其在植物与死体营养型的病原菌互作时参与抗病过程[10]。小麦全蚀菌属于死体营养型病原物,其启动的小麦抗性和防御反应很可能与同是死体营养型的小麦赤霉菌模式相同,下一步需要深入开展 *TaWIR1b* 基因在'新农 19'与全蚀菌互作中的功能研究,为阐明基因的作用机理及进一步利用奠定基础。

参考文献

[1] Schweizer P, Hunziker W, Mösinger E. cDNA cloning, *in vitro* transcription and partial sequence analysis of messenger RNA from winter wheat(*Triticum aestivum* L.)with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* [J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12(6): 643 - 654.

[2] Bull J, Mauch F, Hertig C, et al. Sequence of a wheat gene encoding a novel protein associated with pathogen defense[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1992, 5(6): 516 - 519.

[3] 徐飞,杨共强,何文兰,等. 不同小麦品种(系)对全蚀病的抗性鉴定与评价[J]. 植物保护,2013,39(2):143 - 146.

[4] Spencer D F, Schnare M N, Coulthart M B, et al. Sequence and organization of a 7.2 kb region of wheat mitochondrial DNA containing the large subunit (26S) rRNA gene [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 20(2): 347 - 352.

[5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[6] Neu C, Keller B, Feuillet C. Cytological and molecular analysis of the *Hordeum vulgare-Puccinia triticina* nonhost interaction[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(7): 626 - 633.

[7] Jansen C, Korell M, Eckey C, et al. Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes[J]. Plant Sciences, 2005, 168: 373 - 380.

[8] Hulbert S H, Bai J, Fellers J P, et al. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene *Lr34/Yr18* [J]. Phytopathology, 2007, 97(9): 1083 - 1093.

[9] Coram T E, Huang X L, Zhan G M, et al. Meta-analysis of transcripts associated with race-specific resistance to stripe rust in wheat demonstrates common induction of blue copper-binding protein, heat-stress transcription factor, pathogen-induced WIR1A protein, and ent-kaurene synthase transcripts [J]. Functional & Integrative Genomics, 2010, 10(3): 383 - 392.

[10] Diethelm M, Rhiel M, Wagner C, et al. Gene expression analysis of four WIR1 - like genes in floret tissues of European winter wheat after challenge with *G. zeae* [J]. Euphytica, 2012, 186(1): 103 - 114.

[11] Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, et al. A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1999, 12(8): 647 - 654.

[12] Tufan H A, Mcgrann G R D, Maccormack R, et al. TaWIR1 contributes to post-penetration resistance to *Magnaporthe oryzae*, but not *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, in wheat [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(7): 653 - 665.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 146 页)

[15] Urayama S, Moriyama H, Aoki N, et al. Knock-down of OsDCL2 in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa endornavirus* [J]. Plant Cell Physiology, 2010, 51(1): 58 - 67.

[16] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et a1. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

[17] 洪健,周雪平. ICTV 第八次报告的最新植物病毒分类系统[J]. 植物病理学报,2005,35(6):1 - 9.

[18] 张忠信. ICTV 第九次报告对病毒分类系统的一些修改[J]. 病毒学报,2012,28(5):595 - 599.

[19] Song D, Cho W K, Park S H, et al. Evolution of and horizontal gene transfer in the *Endornavirus* genus [J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): 8750.

[20] Horiuchi H, Fukuhara T. Putative replication intermediates in *Endornavirus*, a novel genus of plant dsRNA viruses [J]. Virus Genes, 2004, 29(3): 365 - 375.

[21] Valverde R A, Gutierrez D L. Transmission of a dsRNA in bell pepper and evidence that it consists of the genome of an *Endornavirus* [J]. Virus Genes, 2007, 35(2): 399 - 403.

[22] Ikeda K I, Nakamura H, Matsumoto N. Hypovirulent strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2004, 69(2): 385 - 390.

[23] Osaki H, Nakamura H, Sasaki A, et al. An *endornavirus* from a hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa* [J]. Virus Research, 2006, 118(1/2): 143 - 149.

[24] Jo Y, Choi H, Yoon J Y, et al. In silico identification of *Bell pepper endornavirus* from pepper transcriptomes and their phylogenetic and recombination analyses [J]. Gene, 2015, 575(3): 712 - 717.

(责任编辑:杨明丽)