

2 种根结线虫 Cg-1 及其同源基因的克隆和序列分析

吴 平¹ 卓 侃¹ 罗 梅^{1,2} 廖金铃¹

1. 华南农业大学植物线虫研究室, 广州 510642;

2. 仲恺农业工程学院植物保护系/外来有害生物预警与控制研究所, 广州 510225

摘要 采用同源克隆的方法,首次从能克服 *Mi-1* 抗性的象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)中克隆了 *Cg-1* 同源基因,同时克隆了一个爪哇根结线虫无毒种群的 *Cg-1* 及其同源基因。基因序列比较结果显示,象耳豆根结线虫中不存在 *Cg-1* 基因,即象耳豆根结线虫中只具有不包含 CAATGA 片段的 *Cg-1* 同源序列,进一步表明 *Cg-1* 可能是一个无毒基因。对 *Cg-1* 基因序列分析的结果表明,*Cg-1* 基因可能是通过其第三个开放阅读框(ORF)编码的多肽或结构性 mRNA 或两者共同行使生物学功能。

关键词 象耳豆根结线虫; 爪哇根结线虫; 无毒基因; *Cg-1*; 序列分析

中图分类号 S 432.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0036-08

病原微生物与植物的互作是植物病理学研究的热点问题,而病原物无毒基因与寄主抗病基因的互作机制是其中的重要内容。与细菌、真菌和卵菌等病原物一样,植物寄生线虫也会分泌效应蛋白到寄主植物中引发寄主的效应子触发免疫反应^[1],但目前植物寄生线虫中鉴定的无毒基因(效应子)还较少,仅在马铃薯白线虫中确定了 1 个对应于马铃薯抗胞囊线虫基因 *Gpa2* 的无毒基因 *Gp-Rbp-1*^[2] 以及存在于根结线虫中对应番茄抗性基因 *Mi-1* 的 2 个候选无毒基因,即南方根结线虫 *map-1* 基因^[3] 和爪哇根结线虫 *Cg-1* 基因^[4]。其中 *Cg-1* 基因是 Gleason 等^[4] 通过 cDNA-AFLP 方法比较爪哇根结线虫无毒种群 VW4 及其在温室中分化的毒性种群 VW5 的 cDNA 序列克隆到的,分化的毒性种群 VW5 丢失了这个基因位点;体外浸泡 *Cg-1* 基因 dsRNA 的无毒种群 VW4 可获得对 *Mi-1* 抗性番茄的毒性^[4]。随后的研究发现,*Cg-1* 基因存在于根结线虫转座子家族 *Tm1* 成员序列之中,而根结线虫在 *Mi-1* 基因的选择压力下或在自然条件下获得毒性可能与该转座子的活动有关^[5-9]。目前对该基因的生物学功能研究还未见相关报道。

象耳豆根结线虫 *Meloidogyne enterolobii* 和爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica* 是我国热带和

亚热带地区 2 种重要的根结线虫,象耳豆根结线虫通常能克服 *Mi-1* 抗性基因^[6],而爪哇根结线虫则不能克服 *Mi-1*,因此,笔者克隆了这 2 种根结线虫的 *Cg-1* 基因或同家族基因,并分析 *Cg-1* 基因的核酸和编码多肽的序列特征,旨在更深入地探讨其基因的特性并为实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试线虫和主要试剂

象耳豆根结线虫种群 MePYL 和爪哇根结线虫无毒种群 MjGNK 为笔者所在实验室分离鉴定并保存。将 2 种根结线虫分别在温室 25 ℃ 条件下接种于番茄品种夏红 1 号 45 d 后,置于解剖镜下挑取根上的卵块,然后用纯水清洗卵块 2 次,再收集从卵块中孵化出的侵染前 2 龄幼虫用于 RNA 提取。

RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司;反转录系统和 pMD18-T 克隆载体购于 TaKaRa 公司;高保真 DNA 聚合酶 KOD-plus 购于 Toyobo 公司;核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Tiangen 公司。

1.2 线虫 RNA 的提取和反转录

按照 RNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司)使用说明书分别提 2 种根结线虫的总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,按照反转录系统说

收稿日期: 2012-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171824,31071666,30871628)、国家公益性行业(农业)科研专项(201103018)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-045B)

吴 平,博士/博士后,研究方向: 分子植物线虫学, E-mail: wuping1981@yahoo.cn

通讯作者: 廖金铃,博士,教授,研究方向: 植物线虫学, E-mail: jlliao@scau.edu.cn

说明书以 Oligo-dT 为引物进行反转录获得 cDNA，以此作为 PCR 扩增的模板。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 登录的 *Cg*-1 基因序列 (EU214531.2) 设计上游引物 a3-1 (5'-CATTTTCA TTGTTCTTAGGTG-3') 和下游引物 a7 (5'-GTC ATTGTCTCGTTTCACTTAT-3')，用于 2 种根结线虫 *Cg*-1 及其同源基因的扩增，并交由上海英骏生物技术有限公司进行合成。

1.4 PCR 扩增

以合成的 cDNA (1 μL) 为模板，加入 KOD-plus DNA 聚合酶反应缓冲液 (10×) 5 μL，Mg²⁺ 2 μL，10 mol/L 正向和反向引物各 1 μL，2 mmol/L dNTPs 5 μL，5 U/μL KOD-plus DNA 聚合酶 1 μL，加水至 50 μL，混匀离心后放入 PCR 仪扩增。PCR 反应循环：94 ℃ 变性 3 min，接着进行 35 个循环。循环条件：94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，68 ℃ 45 s。循环完毕后，68 ℃ 保温 5 min。

1.5 PCR 产物克隆及序列测定

从凝胶上将 PCR 产物扩增条带切取，利用 Tiangen 公司琼脂糖凝胶回收试剂盒 (DP209) 回收纯化后连接到 pMD18-T 载体，进一步转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中，经蓝白斑和氨苄筛选，重组质粒经扩大培养，提取质粒 DNA 用于检测。测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成。

1.6 序列比对和 Blast 分析

采用 DNAMAN 软件 Multiple sequences Alignment 程序和 DNASTar 软件 MegAlign 程序 (Clustal W 方法) 进行多重核酸和氨基酸序列比对，在 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列 Blast 分析。

1.7 mRNA 二级结构预测

利用 RNA 二级结构在线分析软件 CONTRAfold (<http://contra.stanford.edu/contrafold/server.html>) 对 mRNA 进行二级结构预测。

1.8 肽链结构域和功能位点搜索

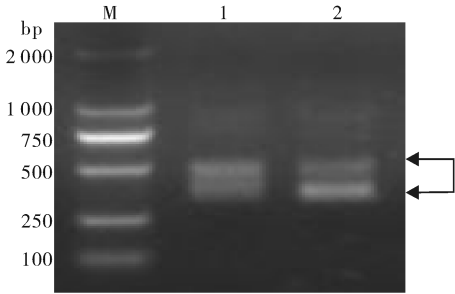
利用在线分析软件 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 对肽链进行结构域和功能位点搜索。

2 结果与分析

2.1 *Cg*-1 及其同源基因克隆与序列比对

分别以爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群和象耳豆根结线虫 MePYL 种群的 cDNA 为模板，利用引

物 a3-1 和 a7 进行 PCR 扩增，扩增产物为 300~500 bp 的混合带 (图 1)。通过凝胶回收后连接到 pMD18-T 载体中，各挑取 20 个克隆进行测序，分别有 15 个和 19 个克隆被成功测序。



箭头所示区域为 PCR 扩增混合产物 Mixed PCR products are shown between arrows; M: DNA 分子质量标准 DNA molecular weight marker; 1: 爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群 cDNA 产物 PCR products of *M. javanica* avirulent strain MjGNK cDNA; 2: 象耳豆根结线虫 MePYL 种群 cDNA 产物 PCR products of *M. enterolobii* strain MePYL cDNA.

图 1 爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群和象耳豆根结线虫 MePYL 种群 *Cg*-1 同源基因的扩增

Fig.1 Amplification of *Cg*-1 homologs in *M. javanica* avirulent strain MjGNK and *M. enterolobii* strain MePYL

爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群的 15 个阳性克隆的片段大小为 350~451 bp，去除完全一致的序列，有 3 个含 CAATGA 片段的 *Cg*-1 序列 (图 2 实线框内) 以及 4 个不含 CAATGA 片段的 *Cg*-1 同源序列被克隆到，分别命名为 *MjGN-Cg*-1、*MjGN-Cg*-1*a*、*MjGN-Cg*-1*b* 和 *MjGN-Cg*1*h*-1~4 (图 2)。将含 CAATGA 片段的序列称为 *Cg*-1 样序列/基因，将不含 CAATGA 片段的序列称为 *Cg*-1 同源序列/基因。3 个 *Cg*-1 样序列中，*MjGN-Cg*-1 与 *Cg*-1 基因序列完全一致；*MjGN-Cg*-1*a* 与 *Cg*-1 基因序列相差 1 个碱基，即 126 bp 处 (图 2 黑色箭头) 为“C”而非 *Cg*-1 基因的“T”；*MjGN-Cg*-1*b* 除 232 bp 处 (图 2 灰色箭头) 有 1 个 81 bp 的未知插入序列外与 *Cg*-1 基因序列完全一致。4 个 *Cg*-1 同源序列 *MjGN-Cg*1*h*-1~4 与 *Cg*-1 基因的相似性为 94%~98%，其中 *MjGN-Cg*1*h*-4 的 3' 端缺失了组蛋白发夹结构保守序列^[4] (图 2 虚线框)。象耳豆根结线虫 MePYL 种群的 19 个阳性克隆的片段大小为 366~430 bp，去除完全一致的序列，最后共获得 8 个同源序列，分别命名为 *MePY-Cg*1*h*-1~8 (图 2)，与 *Cg*-1 基因的相似性为 83%~95%。这 8 个序列均不包含 CAATGA 片段 (图 2 实线框)。

2.2 Cg-1 及其同源基因 ORF 编码多肽序列分析

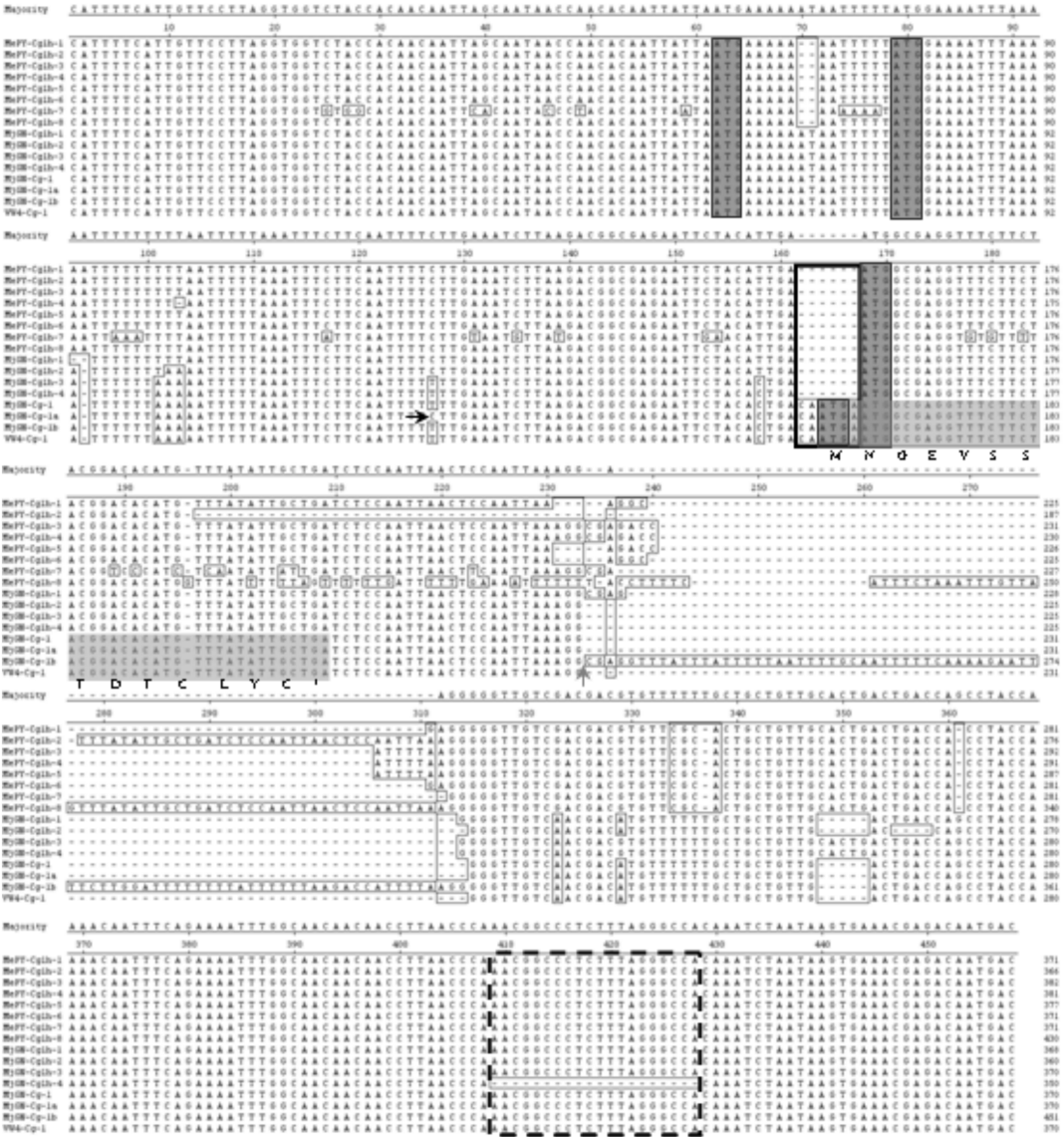
比较 Cg-1 样基因与其同源基因序列,可以发

现其 ORF(图 2 灰色“ATG”起始)及其编码多肽序

列基本一致,象耳豆根结线虫第一个 ORF 因缺失

2 nt 编码 1 个 13 aa 的多肽,爪哇根结线虫第一个

ORF 编码 1 个 3 aa 的寡肽(图 2)。而两者最大的差



MePY-Cg1h-1~8 为象耳豆根结线虫种群 MePYL Cg-1 同源克隆 MePY-Cg1h-1 to 8 are *M. enterolobii* strain MePYL Cg-1 homologous clones; MjGN-Cg1h-1~4、MjGN-Cg-1、MjGN-Cg-1a 和 MjGN-Cg-1b 为爪哇根结线虫无毒种群 MjGNK Cg-1 同源克隆 MjGN-Cg1h-1 to 4, MjGN-Cg-1, MjGN-Cg-1a 和 MjGN-Cg-1b are *M. javanica* avirulent strain MjGNK Cg-1 homologous clones; VW4-Cg-1 为爪哇根结线虫无毒种群 VW4 的 Cg-1 基因序列 VW4-Cg-1 is the Cg-1 gene sequence of *M. javanica* avirulent strain VW4. 黑色实线框内为 CAATGA 片段 CAATGA fragments are within the black line box; 灰色虚线框内为 3' 端蛋白包夹保守序列,黑色箭头位置为 MjGN-Cg-1a 序列 126 bp 处“C”碱基,灰色箭头位置为 MjGN-Cg-1b 序列 81 bp 插入片段位置,深灰色方框内为各序列前 3(或 4)个 ORF 的起始密码子“ATG”,淡灰色标示的为 Cg-1 样序列第 3 个 ORF 片段,下面字母为其氨基酸序列。Semp-loop sequences are within the black dotted line box; The black arrow indicates the nucleotide C of MjGN-Cg-1a at 126 bp, the gray arrow indicates the position of 81 bp insertion of MjGN-Cg-1b, the ATG that initiate the first 3 or 4 ORFs are highlighted in dark gray boxes, the third ORF fragments are highlighted in light gray, under with the amino acids sequence.

图 2 爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群和象耳豆根结线虫 MePYL 种群 Cg-1 同源克隆与 Cg-1 基因的核酸序列比对

Fig.2 Nucleotide sequences alignment of Cg-1 homologous clones of *M. enterolobii* strain MePYL and *M. javanica* avirulent strain MjGNK and Cg-1

别在于, *Cg-1* 样基因转录本由于“CAATGA”片段的插入, 因该片段中包含 1 个起始密码子 ATG, 导致其较之同源基因而增加 1 个 ORF(图 2 淡灰色序列部分), 编码 1 个含 14 aa 的多肽。因此, 笔者对 *Cg-1* 样基因中所增加的这个 ORF 所编码的多肽, 即 14 aa 多肽, 命名为 *Cg1-Polyp3*, 进行进一步序列分析。将 *Cg1-Polyp3* 序列 (MNGEVSSTDTCLYC) 在 PROSITE 网站进行结构域和功能位点搜索, 发现其存在 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化功能位点“SstD”(图 3)。

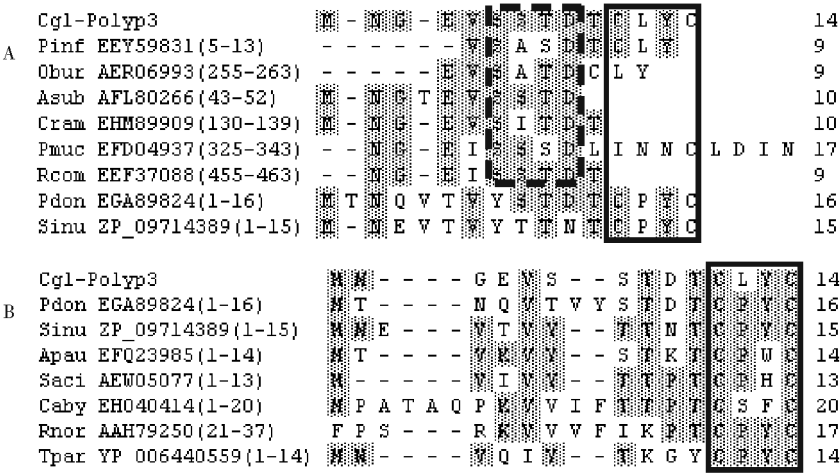
将 *Cg1-Polyp3* 序列在 NCBI 蛋白数据库进行 Blast 分析, 发现该多肽序列与多种细菌、真菌和植物的一些功能蛋白有序列相似性(图 4-A)。将这些同源氨基酸片段于 PROSITE 网站进行功能位点搜索, 发现其中许多序列同样存在酪蛋白激酶 II 磷酸化位点“SX_YD”(X 和 Y 代表任意氨基酸)(图 4-A 虚线框)。

此外, *Cg1-Polyp3* 全长序列还与 2 个谷氧还蛋白(Grx)(序列登录号分别为 EGA89824 和 ZP_09714389)的 N 端序列有较高相似性, 并且其 11 到 14 位氨基酸“CLYC”可能为巯基/二硫键氧化还原活性位点 (thiol/disulfide redox active site) 序列^[10-11](图 4-A 实线框)。在 NCBI 蛋白数据库搜索谷氧还蛋白序列, 发现其中多个物种的谷氧还蛋白的 N 端含有这一保守活性中心序列“CX_YC”(X 和 Y 代表任意氨基酸)(图 4-B 实线框)。



图 3 *Cg-1* 基因第三个 ORF 编码多肽 *Cg1-Polyp3* 的功能位点

Fig. 3 Functional site of the third ORF of *Cg-1* gene encoding peptide *Cg1-Polyp3*



A: *Cg-1* 基因第 3 个 ORF 编码多肽 *Cg1-Polyp3* 与 NCBI 上比对到的蛋白同源序列的同源比对 Alignment of the third ORF of *Cg-1* encoding peptide *Cg1-Polyp3* with the homologous amino acid sequences of the proteins Blasted by *Cg1-Polyp3* in NCBI; B: *Cg1-Polyp3* 与谷氧还家族蛋白 N 端氨基酸序列的同源比对 Alignment of *Cg1-Polyp3* with the N terminal amino acid sequences of glutaredoxin family members; 虚线框为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点“SX_YD”, 实线框为巯基/二硫键氧化还原活性位点“CX_YC”, 括号中的数字表示氨基酸在蛋白中的起止位置 Casein kinase II phosphorylation site SX_YD was highlighted with dotted box, Thiol/disulfide redox active sites CX_YC were highlighted with solid boxes, the numbers in brackets are amino acids positions within the corresponding proteins; Pinf: 晚疫病菌 *Phytophthora infestans*; Obur: 矢车菊 *Otoptera burchellii*; Asub: 海冰黄杆菌 *Aequorivita sublithicola*; Cram: 多枝梭状芽胞杆菌 *Clostridium ramosum*; Pmuc: 厌氧消化链球菌 *Paenibacillus mucilaginosus*; Rcom: 蓖麻 *Ricinus communis*; Pdon: 东海动性球菌 *Planococcus donghaensis*; Sinu: 菊糖芽孢乳杆菌 *Sporolactobacillus inulinus*; Apau: *Aminomonas paucivorans*; Saci: 嗜酸硫化杆菌 *Sulfobacillus acidophilus*; Caby: *Caldithrix abyssi*; Rnor: 褐家鼠 *Rattus norvegicus*; Tpar: *Turneriella parva*.

图 4 *Cg-1* 基因第三个 ORF 编码多肽 *Cg1-Polyp3* 与其同源蛋白的氨基酸序列比对

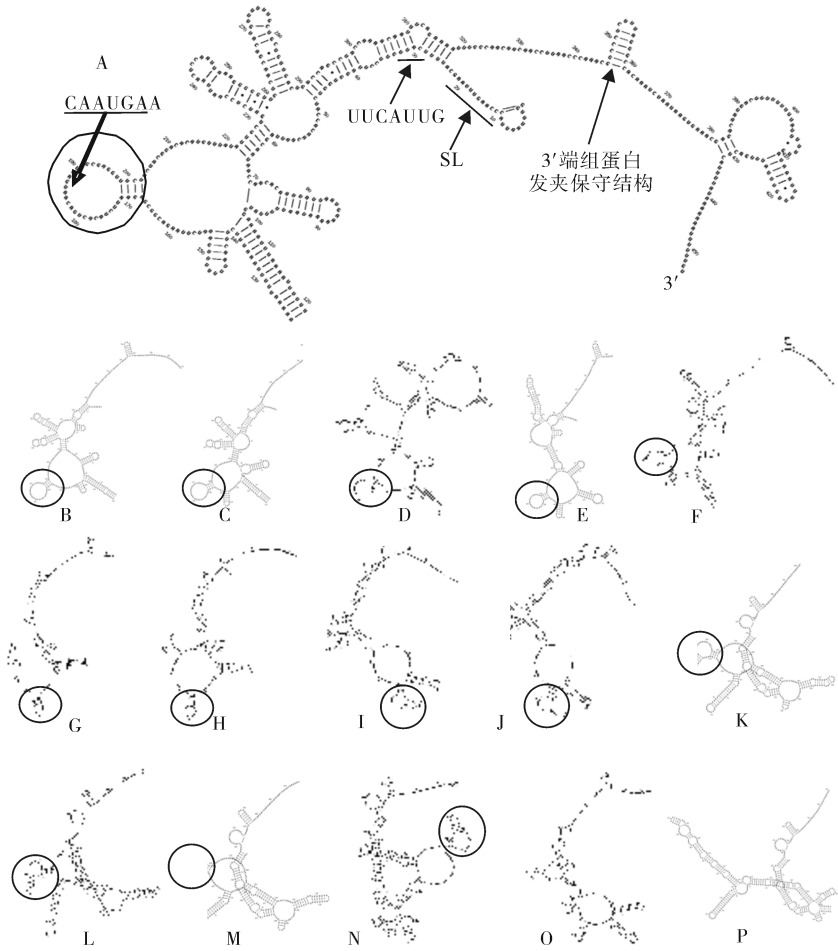
Fig. 4 Amino acid sequence alignment of the third ORF of *Cg-1* encoding peptide *Cg1-Polyp3* with homologous proteins

2.3 Cg-1 及其同源基因 mRNA 二级结构预测

Cg-1 基因 mRNA 全长 456 nt,在其 5'端含有 1 个约20 nt 的剪接前导(spliced leader,SL)序列,在其 3'端组蛋白发夹结构序列之后含有 1 个约 60 nt 的富含“AT”核苷酸的序列^[4]。本试验中以 a3-1 和 a7 引物扩增的克隆不包含上述 2 个序列。

将 Cg-1 基因 mRNA 全长序列及本研究克隆的爪哇根结线虫和象耳豆根结线虫种群的Cg-1样

基因和 Cg-1 同源基因 mRNA 序列,输入到在线分析软件 CONTRAfold 进行 mRNA 二级结构预测。预测的结果显示,Cg-1 基因 3'端存在一个明显的组蛋白发夹结构(图 5-A);“CAAUGA”片段位于 168~202 nt(在 MjGN-Cg-1 中为 146~180 nt 处,图 5-B)发夹结构的环区(图 5-A~B 圆圈),其并未与 5'端的反向互补序列“UUCAUUG”形成双链互补结构(图 5-A~B)。



A,B~H 和 I~P 分别为 Cg-1 基因 mRNA 全长,爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群克隆 MjGN-Cg-1、MjGN-Cg-1a、MjGN-Cg-1b、MjGN-Cg-1h-1~4 和象耳豆根结线虫 MePYL 种群克隆 MePY-Cg-1h-1~8 序列的 RNA 二级结构预测图。A,B-H and I-P respectively are mRNA secondary structures of Cg-1 whole mRNA, sequences of *M. javanica* avirulent strain MjGNK clones MjGN-Cg-1, MjGN-Cg-1a, MjGN-Cg-1b, MjGN-Cg-1h-1 to 4, and *M. enterolobii* strain MePYL clones MePY-Cg-1h-1 to 8; 圆圈内为 Cg-1 及其同源克隆 140~190 nt 区域的发夹结构,“CAAUGAA”片段及 5'端与之反向互补的序列“UUCAUUG”、剪接前导序列(SL)和 3'端组蛋白发夹保守结构^[4]如图箭头标示。140-190 nt hairpins of Cg-1 and its homologs are shown in the dotted line circles,CAAUGAA, and its reverse complement sequence UUCAUUG in the 5' end, spliced leader (SL) and 3' end of histone stem-loop conserved structure^[4] are shown by arrows.

图 5 Cg-1 基因与爪哇根结线虫 MjGNK 无毒种群和象耳豆根结线虫 MePYL 种群 Cg-1 同源克隆的 mRNA 二级结构预测

Fig. 5 RNA secondary structure prediction of Cg-1 and its homologous clones of *M. javanica* avirulent strain MjGNK and *M. enterolobii* strain MePYL

从整体结构看, *Cg-1* 基因(图 5-A)与克隆的 *Cg-1* 样基因(图 5-B~D)和 *Cg-1* 同源基因(图 5-E~P)的 mRNA 二级结构存在一些相似的结构, 如包含 5' 端组蛋白发夹结构(*MjGN-Cg1h-4* 除外, 图 5-H), 有若干双链互补及发夹结构等。

从局部结构看, 在约 140~190 nt 处, *Cg-1* 样基因与其同源基因包含一个发夹结构(图 5-B~N 圆圈)。在爪哇根结线虫中, 含“CAAUGA”片段的 *Cg-1* 和 *MjGN-Cg-1* (图 5-A~B)、*MjGN-Cg-1a* (图 5-C)和 *MjGN-Cg-1b* (图 5-D)在该处发夹结构的环区, 与之同源基因(图 5-E~H)相比, 因“CAAUGA”片段的插入, 而显得更大一些(图 5-A~H 圆圈)。在象耳豆根结线虫中, 该序列区域形成的结构(图 5-I~N 圆圈)与爪哇根结线虫 *Cg-1* 同源基因不同, 并非为一个典型的“双链-环区”发夹结构, 而是一个“双链-环区-双链”结构。

3 讨论

相对于细菌和真菌等病原物无毒基因与寄主抗病基因的互作研究, 更高等生物如植物寄生线虫在这方面的研究还较少。*Cg-1* 基因作为克隆于爪哇根结线虫对应于番茄 *Mi-1* 抗性基因的一个候选无毒基因^[4], 明确其无毒基因身份并揭示其在 *Mi-1* 抗性途径中的作用必将丰富病原微生物与寄主植物互作研究的内容。

在前人的研究基础上, 笔者克隆了象耳豆根结线虫这类能克服 *Mi-1* 抗性的根结线虫的 *Cg-1* 同源基因, 发现所克隆到的 8 个同源基因均不包含 *Cg-1* 基因特征片段“CAATGA”, 这与已报道的爪哇根结线虫毒性种群 VW5^[4] 的 *Cg-1* 同源基因序列特征相一致。该结果进一步证实了 *Cg-1* 基因可能是一个无毒基因。但是, 对于 *Cg-1* 基因的生物学功能以及其行使功能的方式目前尚未见相关的报道。Gleason 等^[4] 认为, *Cg-1* 基因可能是通过其编码的小分子量多肽或其 mRNA 本身来行使功能。

Cg-1 基因转录本是一个具有小开放阅读框的 mRNA (small ORF mRNA, sORF-mRNA), 也可能是一个非编码 RNA^[4]。sORF-mRNA 和非编码 RNA 在细菌、植物和动物中广泛存在, 并且发挥重要的功能, 已越来越受到研究者的重视^[12-15], 如在豆科植物中一类保守的与根瘤菌固氮作用相关的早期结瘤基因 *enod40*, 其转录本即是一个 sORF-mRNA^[16]。近年的研究发现, 该基因不仅可编码 2 个

小分子质量的多肽与蔗糖合成酶结合影响结瘤细胞糖代谢^[17], 而且其结构化的 mRNA 可与 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein)结合参与调节结瘤的形成^[18]。存在于 4 种主要根结线虫中的 16D10 基因, 也是 1 个 sORF-mRNA, 其编码 1 个 43aa 的小分子量多肽, 被分泌到寄主细胞中作为寄主转录因子的配体行使功能^[19]。

笔者通过对 *Cg-1* 样及其同源基因的序列分析发现, 其转录本 ORF (及其编码多肽) 基本一致, 但 *Cg-1* 样基因转录本因“CAAUGA”片段的插入而产生 1 个特异的 ORF (即第 3 个 ORF), 编码 1 个 14 aa 的多肽 Cg1-polyp3, 并且功能位点搜索发现该多肽存在 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化功能位点“SstD”和 1 个巯基/二硫键氧化还原活性位点“CLYC”^[10-11], 预示该多肽可能是具有功能的, 即可能具有磷酸化或氧化还原活性。Cg1-polyp3 尽管不含明显的分泌信号肽^[4], 但其是 1 个仅含 14 aa 的小分子量多肽, 可自由穿梭于细胞间, 因此, 其可能在爪哇根结线虫侵染过程中通过口针或者其他诸如化感器、尾感器或体表等组织器官分泌或扩散到 *Mi-1* 抗性番茄根细胞中, 通过其磷酸化或氧化还原活性与 *Mi-1* 蛋白直接或间接互作, 从而诱发抗病反应。

比较 *Cg-1* 与其爪哇根结线虫同源基因的 mRNA 二级结构发现, *Cg-1* 转录本 140~190 nt 区域所形成的茎环环区因“CAAUGA”片段的插入而更大(图 5-A~D 圆圈), 该差异结构——更大的茎环环区——可能是 *Cg-1* 基因作为无毒基因以结构性 mRNA 形式与 *Mi-1* 抗性途径相关蛋白(或 *Mi-1* 蛋白本身)结合并被识别的关键结构。但在象耳豆根结线虫 *Cg-1* 同源基因中, 相同序列区域形成的发夹结构却不相同(图 5-I~J, M~P 圆圈), 这可能是由于种间序列的差异造成, 但也可能说明该局部区域结构并非一个关键结构, 或者 *Cg-1* 基因 mRNA 可能并不是以其局部而是其整体本身与 *Mi-1* 蛋白直接或间接互作。

另外, Gleason 等^[4] 认为, *Cg-1* 基因 mRNA 含“CAAUGA”片段的“CAAUGAA”序列可能会与其 5' 端反向互补序列“UUCAUUG”形成互补双链结构而影响其二级结构或影响其蛋白翻译, 但本研究的预测结果显示这 2 个序列却并未形成互补结构, 可能是因为这 2 个序列不会形成互补结构, 或者这仅是预测的结果, 并不具有完全的可靠性。此外, 笔者所克隆的爪哇根结线虫和象耳豆根结线虫种群

的 *Cg-1* 样基因以及 *Cg-1* 同源基因,除 *MjGN-Cg1h-4* 外,其 3' 端均包含 1 个组蛋白发夹结构序列,因此属于 Tm1 转座子家族的 Tm1-HH 类 (Tm1 histon-hairpin class) 基因^[9],但组蛋白发夹结构序列的存在及其作用还有待研究。

综上所述,本研究克隆的象耳豆根结线虫 *Cg-1* 同源基因的序列特征可能进一步说明 *Cg-1* 基因是一个缺失于毒性根结线虫(或种群)中的无毒基因,但 *Cg-1* 基因是否确实为 *Mi-1* 基因的无毒基因,并且是否如笔者所推测的,是通过其第三个特异 ORF 编码的小分子量多肽 Cg1-polyp3 或其 mRNA 本身或者两者共同行使无毒基因功能而诱发 *Mi-1* 抗病途径还需要试验证实。

目前,从细菌、真菌、卵菌以及线虫中克隆的无毒基因,绝大多数是以其编码的(分泌)蛋白作为被寄主抗性蛋白直接或间接识别的靶标^[2,20],但尚未有以如此小分子量多肽(14 aa)以及结构性 mRNA 作为无毒基因行使功能的报道。鉴于 *Cg-1* 基因序列的特殊性,确定其无毒基因身份以及其行使功能的分子机制,将增加人们对无毒基因研究的认识。

参 考 文 献

- [1] SMANT G, JONES J T. Suppression of plant defences by nematodes[M]//JONES J T, GHEYSEN G, FENOLL C. Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Springer; Heidelberg, 2011: 273-286.
- [2] SACCO M A, KOROPACKA K, GRENIER E, et al. The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and Ran-GAP2-dependent plant cell death [J]. PLoS Pathog, 2009, 5 (8): e1000564.
- [3] SEMBLAT J P, ROSSO M N, HUSSEY R S, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2001, 14(1): 72-79.
- [4] GLEASON C A, LIU Q L, WILLIAMSON V M. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2008, 21(5): 576-585.
- [5] NETSCHER C. Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato [J]. Cah ORSTOM Ser Biol, 1976(11): 173-178.
- [6] YANG B, EISENBACK J D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China [J]. J Nematol, 1983, 15(3): 381-391.
- [7] PROT J C. A naturally occurring resistance breaking biotype of *Meloidogyne arenaria* on tomato. Reproduction and pathogenicity on tomato cultivars Roma and Rossol [J]. Rev Nematol, 1984(7): 23-28.
- [8] ORNAT C, VERDEJO-LUCAS S. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato [J]. Plant Dis, 2001, 85(3): 271-276.
- [9] GROSS S M, WILLIAMSON V M. Tm1: a mutator/foldback transposable element family in root-knot nematodes [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24534.
- [10] FOLOPPE N, NILSSON L. The glutaredoxin-C-P-Y-C-motif: influence of peripheral residues [J]. Structure, 2004, 12(2): 289-300.
- [11] 王志强, 周智敏, 郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能[J]. 生命科学研究, 2009, 13(6): 548-553.
- [12] CARNINCI P, KASUKAWA T, HAYASHIZAKI Y, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome [J]. Science, 2005, 309: 1559-1563.
- [13] KOUSUKE H, ZHANG X, JUSTIN O B, et al. A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the *Arabidopsis thaliana* genome are transcribed and/or under purifying selection [J]. Genome Res, 2007, 17(5): 632-640.
- [14] CHENG H Y, CHAN W S, LI Z X, et al. Small open reading frames: current prediction techniques and future prospect [J]. Curr Protein Pept Sci, 2011, 12(6): 503-507.
- [15] 陆秀红, 黄金玲, 刘志明, 等. 番茄抗南方根结线虫种质材料 NBS-LRR 类抗病基因的检测[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31 (2): 208-211.
- [16] CRESPI M, JURKEVITCH E, POIRET M, et al. *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth [J]. EMBO J, 1994, 13: 5099-5112.
- [17] ROHRIG H, SCHMIDT J, MIKLASHEVICH S E, et al. Soybean *enod40* encodes two peptides that bind to sucrose synthase [J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 2002, 99: 1915-1920.
- [18] LAPORTE P, SATIAT-JEUNEMAITRE B, VELASCO I, et al. A novel RNA-binding peptide regulates the establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* nitrogen-fixing symbiosis [J]. Plant J, 2010, 62(1): 24-38.
- [19] HUANG G, DONG R, ALLEN R, et al. A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2006, 19: 463-470.
- [20] 耿甜, 彭德良, 李建洪, 等. 腐烂茎线虫热激蛋白新基因的克隆与序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(6): 693-700.

Root-knot nematode Cg-1 and its homologous genes cloning
and sequences analysis

WU Ping¹ ZHUO Kan¹ LUO Mei^{1,2} LIAO Jin-ling¹

1. Laboratory of Plant Nematology, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China;

2. Department of Plant Protection, Zhongkai University of Agriculture and Engineering/
Institute for Management of Invasive Alien Species, Guangzhou 510225, China

Abstract Cg-1, with 8 homologous genes, from *Meloidogyne javanica* is a candidate avirulence gene corresponding to tomato resistance gene *Mi-1*. Comparing with its homologs, Cg-1 contains a CAATGA fragment insertion. In this study, Cg-1 homologous clones from *Meloidogyne enterolobii*, a root-knot nematode that is able to overcome tomato *Mi-1* resistance, were firstly cloned. Meanwhile, Cg-1 and its homologous clones of an *M. javanica* avirulent strain in our laboratory were cloned. Comparison of Cg-1 and these homologous clones from *M. enterolobii* and *M. javanica* strains showed that Cg-1 gene was inexistent in *M. enterolobii* that is there were only Cg-1 homologous genes which did not contain CAATGA existing in *M. enterolobii*. This result further indicated that Cg-1 may be an avirulence gene. Sequence analysis of Cg-1 gene predicts that the third open reading frame (ORF) encoding peptide and its structural mRNA, or both exercise biological function of Cg-1.

Key words *Meloidogyne enterolobii*; *Meloidogyne javanica*; avirulence gene; Cg-1; sequence analysis

(责任编辑:陈红叶)

声 明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本刊声明。如不同意,请作者在来稿时声明,本刊将另作处理。特此声明!

《华中农业大学学报》编辑部