

葡萄中 *RPW8.2* 同源基因克隆与表达分析

马 辉<sup>1,4</sup>, 韩永涛<sup>1,2,3</sup>, 高玉荣<sup>1,2,3</sup>, 徐 虹<sup>1,4</sup>, 王跃进<sup>1,2,3</sup>, 文颖强<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨陵 712100; 2. 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨陵 712100; 3. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 4. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**利用同源克隆技术分别从白河 35-2、广西-1、黑比诺、五月紫 4 种葡萄中克隆得到了拟南芥广谱抗病基因 *RPW8.2* 的同源基因, 分别命名为 *VpR8H-BH2*、*VpR8H-GX1*、*VvR8H-PN* 和 *VvR8H-MP*, 氨基酸多序列比对和系统发育分析显示, 该 4 条序列均属于 *RPW8.2* 同源基因。4 种葡萄 *R82H* 基因 cDNA 开放阅读框分别为 2 457 bp、2 445 bp、2 445 bp 和 2 448 bp, 分别编码 819、815、815 和 816 个氨基酸。采用半定量 RT-PCR 技术分析了 *R82H* 基因在 4 种葡萄根、茎、成熟叶、幼嫩叶、卷须不同组织中的表达模式, *R82H* 基因在不同葡萄组织中均有表达, 但是表达丰度不尽相同, 其中, 在白河 35-2 和五月紫葡萄成熟叶中表达量最高, 而在广西-1 和黑比诺中幼嫩叶片中表达量高于其他组织。

**关键词:***RPW8.2*; 葡萄; 同源克隆; 表达分析

中图分类号: S663.1      文献标志码: A      文章编号: 1001-7461(2015)01-0060-09

Molecular Cloning and Expression Analysis of *RPW8.2* Homologous Genes in Grapevine

MA Hui<sup>1,4</sup>, HAN Yong-tao<sup>1,2,3</sup>, GAO Yu-rong<sup>1,2,3</sup>, XU Hong<sup>1,4</sup>, WANG Yue-jin<sup>1,2,3</sup>, WEN Ying-qiang<sup>1,2,3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

4 College of Life Science Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Four genes designated *VpR8H-BH2*, *VpR8H-GX1*, *VvR8H-PN* and *VvR8H-MP* were cloned and sequenced by using homology-based cloning method from Chinese wild grapevine *Vitis pseudoreticulata* accession Baihe-35-2, accession Guangxi-1, and *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, and *Vitis vinifera* cv. May Purple, respectively. Amino acid sequences alignment and phylogenesis results showed that four genes were *Arabidopsis* broad-spectrum disease resistance gene *RPW8.2* homologous genes. The full-length ORF of *VpR8H-BH2*, *VpR8H-GX1*, *VvR8H-PN* and *VvR8H-MP* were 2 457 bp, 2 445 bp, 2 445 bp and 2 448 bp, respectively, and encoded polypeptides of 819, 815, 815 and 816 amino acids, respectively. Semi-quantitative RT-PCR results indicated that four genes were expressed in all of the grapevine tissue types, including root, stem, mature leaves, young leaves and tendrils, but the expressions were different. The *VpR8H-BH2* expression level of accession Baihe35-2 and the *VvR8H-MP* expression level of *Vitis vinifera* cv. May Purple were the most in mature leaves, but the expression level of young leaves of accession Guangxi-1 and *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir were higher than other tissues.

**Key words:** *RPW8.2*; *Vitis*; homology cloning; expression analysis

收稿日期: 2014-03-19    修回日期: 2014-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071772); 高校基本科研业务费专项资金项目(QN2011005)。

作者简介: 马辉, 男, 硕士研究生, 研究方向: 果树育种与生物技术。E-mail: tianma1203@126.com

\* 通信作者: 文颖强, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 葡萄种质资源与生物技术育种。E-mail: wenyq@nwsuaf.edu.cn

拟南芥基因 *RPW8.2* 与植物中其他抗病基因不同,具有广谱抗病性<sup>[1]</sup>。*RPW8.2* 不但对拟南芥白粉菌有抗性作用,而且对烟草白粉菌、烟草花叶病毒和拟南芥霜霉菌也具有一定程度的抗性作用<sup>[2]</sup>。*RPW8.2* 基因另一个显著特点是可以特异地锚定到白粉菌吸器(这是真菌特有的从寄主植物吸取营养的取食器官)外质膜上,诱导产生高浓度的过氧化氢于吸器复合体中,从而杀死吸器<sup>[3]</sup>。这是迄今为止在病原菌和寄主互作过程中,发现的第一个特异锚定到寄主与病原菌表面的蛋白,从而很好地解释了该基因广谱抗病的分子机制<sup>[3-4]</sup>。

葡萄是继拟南芥、水稻、杨树之后的第 4 个得以基因组测序的开花植物<sup>[5]</sup>。这为深入加速研究其抗病基因,提供了很好的平台和资源。通过序列比对,发现葡萄与拟南芥同源性要高于杨树和水稻<sup>[5]</sup>。这暗示着葡萄上的某些古老保守基因和拟南芥亲缘关系更近。更进一步地分析发现,用 *RPW8.2* 的氨基酸序列在 NCBI 上检索,共有 87 个蛋白序列与其有同源性,同源性较高的前 57 个均为 *RPW8.2* 在拟南芥或油菜中的同源基因,紧随其后的 GenBank 登录号为 XM\_003635324.1 的预测基因,是葡萄中与 *RPW8.2* 同源性最高的基因。

为探究葡萄中是否真实存在拟南芥广谱抗病基因 *RPW8.2* 的同源基因,以及这些同源基因在易感病的欧洲葡萄和抗病的中国野生葡萄中的差异及对葡萄抗病性的作用,本研究根据上述葡萄中预测的拟南芥 *RPW8.2* 同源基因(即 GenBank 登录号为 XM\_003635324.1 基因)为模板,设计引物,利用同源克隆技术,分别从抗病的中国华东葡萄广西-1、感病的中国华东葡萄白河 35-2 和欧洲葡萄黑比诺、五月紫 4 种葡萄中克隆 *RPW8.2* 同源基因(为方便描述,葡萄中克隆的 *RPW8.2* 同源基因以下统一简称为 R82H 基因),并对其进行初步的生物信息学分析和表达模式分析,以期为进一步明确基因功能,初步探讨其在葡萄抗病过程中的作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 中国野生华东葡萄抗病株系广西-1 (*Vitis pseudoreticulata* accession Guangxi-1)、感病株系白河 35-2 (*Vitis pseudoreticulata* accession Baihe 35-2),欧洲葡萄品种黑比诺 (*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir)、五月紫 (*Vitis vinifera* cv. May Purple) 叶片均取自西北农林科技大学园艺学院葡萄种质资源圃。

1.1.2 试剂 引物由北京奥科公司合成,反转录试剂盒购自 Fermentas, LA Taq 酶、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶来自 Takara 公司,质粒提取及胶回收试剂盒均购于天根生化有限公司,测序由华大基因完成。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 参照张今今<sup>[6]</sup>等改良的 SDS/酚法提取葡萄叶片总 RNA,总 RNA 的纯化参照王西平<sup>[7]</sup>的方法进行。分别用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总的质量和浓度。按照 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明进行反转录。

1.2.2 目的基因 cDNA 全长的克隆 根据 GenBank 上登录号为 XM\_003635324.1 基因序列,用 Vector NTI 8.0 软件设计引物,分别从上述 4 种葡萄叶片 cDNA 中 PCR 扩增目的基因。

上游引物: R82H-F: 5' AAGCCAATTCAAGTTGATAATTTTC 3', 下游引物: R82H-R: 5' AAGCCAATTCAAGTTGATAATTTTC 3', LA Taq 酶(Takara)进行 PCR 扩增,反应体系为: 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP 5 μL, 模板 1.5 μL, 引物各 2 μL, Taq 酶 0.5 μL, 加水补齐至 50 μL。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环, 72℃ 5 min, 10℃ 保存。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根公司)回收目的条带。将回收的产物连接到克隆载体 pMD19-T, 4℃ 过夜连接,热激法转化将其导入 Top10 细胞中,在 Amp 平板上进行蓝白斑筛选阳性克隆。将鉴定结果为阳性的重组菌摇菌送华大基因测序,测序结果利用 Vector NTI 软件推导氨基酸序列。

1.2.3 目的基因及其编码蛋白质生物信息学分析

利用 NCBI 蛋白数据库进行核苷酸与蛋白质的同源序列比对,通过 MEGA 5.0 软件构建系统进化树;核酸及其编码的蛋白质的组成成分及理化性质利用 ExPASy 工具包中的 ProtParam 程序进行分析;运用 ProtScale 在线工具预测 R82H 蛋白的亲水性及疏水性; R82H 蛋白的跨膜结构域由 TMpred 在线工具进行分析;采用 SignalP 4.1 Server 分析 R82H 蛋白有无信号肽; R82H 基因编码的蛋白二级结构由 SOPMA 在线工具进行预测。

1.2.4 目的基因组织特异性表达分析 采用 SDS/酚法提取 4 种葡萄不同组织部位(根、茎、成熟叶、幼叶、卷须)总 RNA,检测 RNA 完整性后,以 1 μg 总

RNA 量为模板反转录成 cDNA,cDNA 的合成按照 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 的说明书进行操作。根据 VpR82H 基因的 cDNA 序列设计半定量引物:上游 QR8H-F1:5' CAGACTCAATGGGAAGCCTCCAC3' ; 下游 QR82H-R1: 5' GGGCAGTCTCTTCATCGCA 3'。以葡萄 18s rRNA 作为内参基因,其引物为:18srRNA-F: 5' GTAACGGGTGACGGAGAATT-AG3'; 18srRNA-R: 5' CCGTGTCTCAGGATTGGG-TAAT3'。PCR 程序:94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,28 个循环,72℃延伸 5 min,10℃保存。半定量 RT-PCR 均经过 3 次独立重复试验,PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察该基因在 4 种葡萄不同组织部位的表达水平差异。

## 2 结果与分析

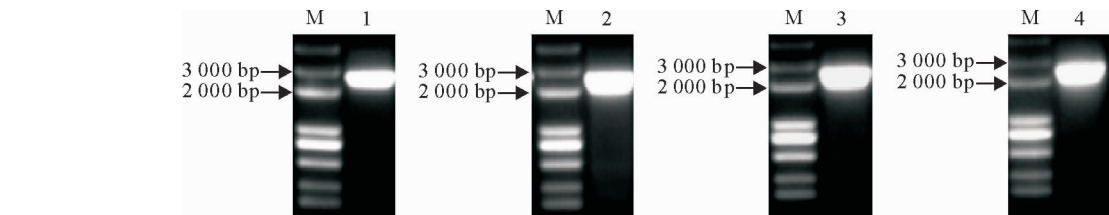
### 2.1 目的基因克隆及序列分析

用 SDS/酚法提取广西-1、白河 35-2、黑比诺和五月紫 4 种葡萄叶片总 RNA,反转录为 cDNA,分别以此 cDNA 为模板,用根据 GenBank 上登录号为 XM\_003635324.1 基因序列设计的特异引物,分别从上述 4 种葡萄叶片 cDNA 中扩增拟南芥广谱抗病基因 *RPW8.2* 的同源基因。

通过 PCR 扩增,分别得到 4 条大小约为 2500bp 的条带,与预测结果一致(图 1)。分别对上述 4 个条带测序并经 NCBI 比对检测,发现上述 4 种 cDNA 片段均具有完整开放阅读框(ORF),且长度相近,其中,白河 35-2、广西-1、黑比诺和五月紫扩增的最长 ORF 长度分别为 2 457、2 445、2 445 bp 和 2 448 bp,分别编码 819、815、815 和 816 个氨基酸。因属首次从葡萄中克隆到拟南芥 *RPW8.2* 基因的同源基因,故将其分别命名为 *VpR8H-BH2*、*VpR8H-GX1*、*VvR8H-PN* 和 *VvR8H-MP*。将这 4 个基因登录 GenBank,登录号分别为 KJ539198、KJ539199、KJ539200 和 KJ539201。

### 2.2 目的基因预测蛋白结构分析

由表 1 可以看出,预测的葡萄 *VpR8H-BH2*、*VpR8H-GX1*、*VvR8H-PN* 和 *VvR8H-MP* 蛋白其分子量分别为 92.86、92.60、92.61 kD 和 92.37 kD,4 种蛋白总疏水性(GRAVY)均在 -0.145 ~ -0.195 之间,说明它们均为亲水性蛋白。4 种预测葡萄蛋白负电氨基酸残基数(天冬氨酸、谷氨酸)总是多于正电氨基酸残基数(精氨酸、赖氨酸),理论等电点分别为 6.08、5.74、5.70 和 5.83,即偏酸性。4 种预测蛋白不稳定指数均超过 40,说明其氨基酸残基可能组合出较多不稳定的二肽结构<sup>[8]</sup>。



M: Trans2K Plus DNA Marker; 1:白河 35-2 葡萄 R82H 基因 PCR 扩增产物;2:广西-1 葡萄 R82H 基因 PCR 扩增产物;3:黑比诺葡萄 R82H 基因 PCR 扩增产物;4:五月紫葡萄 R82H 基因 PCR 扩增产物。

图 1 4 种葡萄 R82H 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplified fragments of R82H in *Vitis*

表 1 R82H 基因编码蛋白理化参数预测				
Table 1 The protein physicochemical parameters of R82H				
蛋白质理化参数	VpR8H-BH2	VpR8H-GX1	VvR8H-PN	VvR8H-MP
氨基酸残基数	819	815	815	816
相对分子量/kD	92.86	92.60	92.61	92.37
理论等电点	6.08	5.74	5.70	5.83
负电氨基酸残基	112	110	111	111
正电氨基酸残基	104	97	98	100
总疏水性	-0.183	-0.174	-0.191	-0.145
不稳定系数	48.78	44.76	45.8	47.82

BI CDD 数据库分析,上述 4 个预测蛋白均含有 RPW8 和 NB-ARC 结构域,位于 N 端(图 2),*VpR8H-BH2* 和 *VvR8H-MP* 还含有 LRR 结构域,位于 C 端。*VpR8H-PN* 的 RPW8 结构域从第 17 到第 192 个氨基酸,编码 175 个氨基酸;NB-ARC 结构域从第 249 到第 466 个氨基酸,编码 217 个氨基酸。其他 3 种葡萄预测蛋白的 RPW8、NB-ARC 结构域与 *VpR8H-PN* 大小类似,这些结果说明我们克隆的片段确实是 *RPW8.2* 的同源基因。

利用软件 SOMPA 分析了葡萄 R82H 蛋白的二级结构,结果表明,*VvR8H-PN* 蛋白包含 50.43%

基于推导的氨基酸序列(图 3~图 6),利用 NC-

的  $\alpha$ -螺旋、15.38%的  $\beta$ -折叠、27.47%的无规则卷曲, VpR8H-BH2、VpR8H-GX1 和 VvR8H-MP 的二级结构与此类似(图 7)。据此推测,  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是葡萄 R82H 蛋白主要的二级结构元件, 无规则卷曲散布于整个蛋白中。

利用 PSORT II Prediction 软件, 分别对 4 种葡萄 R82H 蛋白进行亚细胞定位预测, 结果表明(表

2), 4 种葡萄 R82H 蛋白定位在细胞质和细胞核的可能性较大, 其中 VpR8H-GX1、VvR8H-PN 和 VvR8H-MP 定位在细胞质的可能性最高, 均为 52.2%; 其次为细胞核, 但有所差异, VvR8H-PN 和 VvR8H-MP 定位在细胞核的可能性均为 39.1%, 而 VpR8H-BH2 和 VpR8H-GX1 定位在细胞核的可能性均为 34.8%。

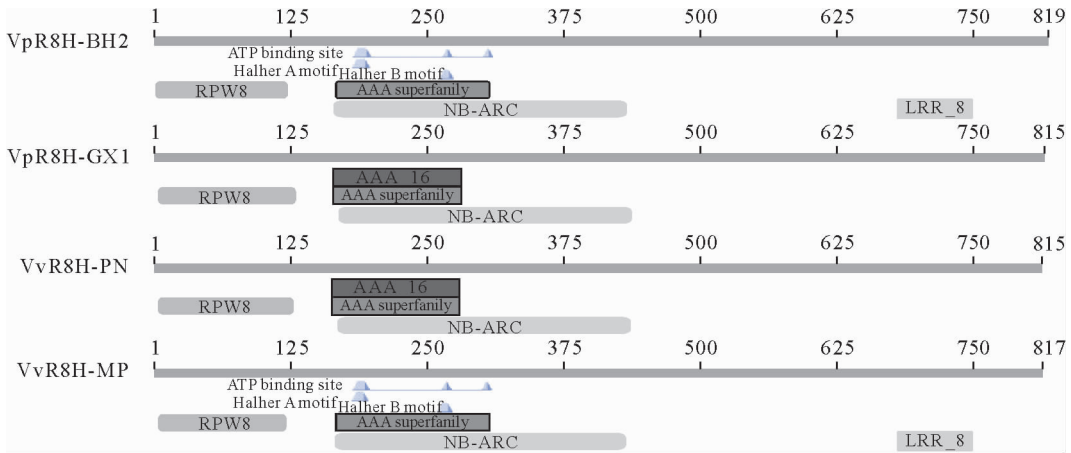


图 2 葡萄 R82H 基因氨基酸序列保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of R82H amino acids sequence in *Vitis*

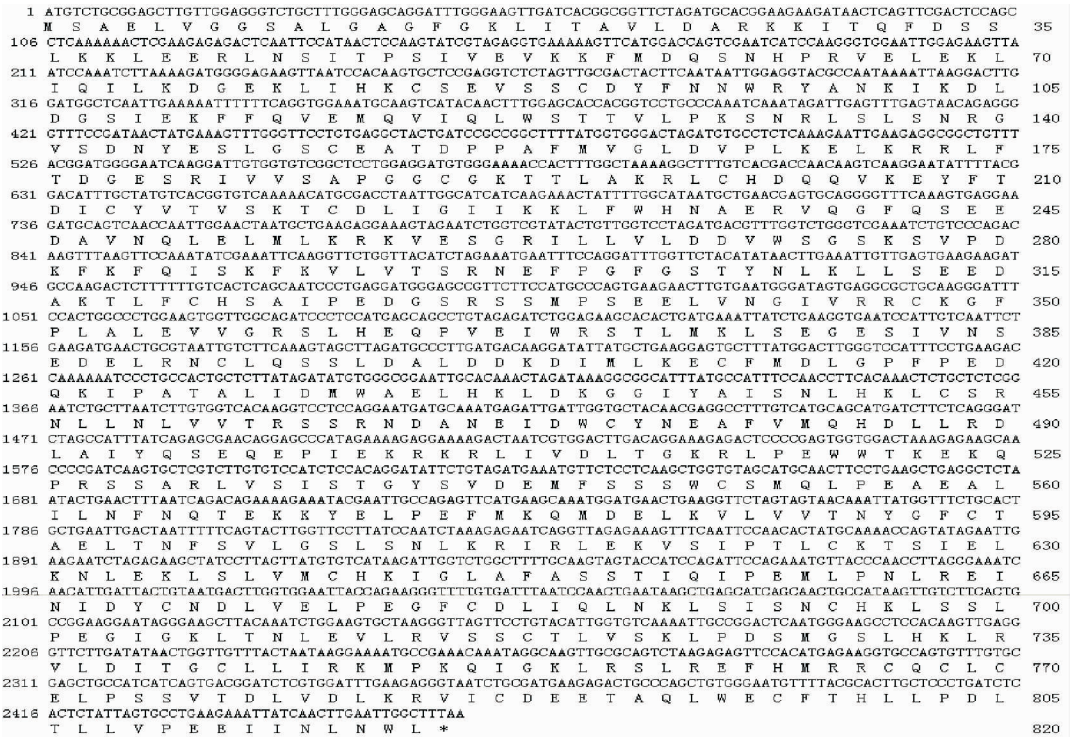


图 3 *VpR8H-BH2* 基因核苷酸及其推导的氨基酸序列(“\*”代表终止子)

Fig. 3 Nucleotide and deduced acids sequence of *VpR8H-BH2*

### 2.3 目的基因进化关系及同源性分析

将 4 种葡萄 R82H 氨基酸序列进行同源比对分析, 结果表明, VvR8H-PN 与预测的欧洲葡萄参考序列的蛋白序列(XP\_003635372.1)同源性最高, 为 99.6%, 表明其亲缘关系最近; VpR8H-GX1、

VpR8H-BH2 和 VvR8H-MP 与预测序列的同源性分别为 98.9%、96.5%和 96.5%(图 8)。进一步分析发现, 其前 180 个氨基酸序列差异性高于剩余氨基酸序列, 也即差异更多的出现在 RPW8 结构域所在位置, 突变位点位于关键氨基酸处。



1 ATCCGCTTGGACGCTTGTGGAGGGGCTCCGCTTCGGACGACGTGTGTTGGAAGTGTTCGCCGGCGGTTGAAGATGCAAGGACTAAGGCAACCAAGTTTCGACTCCAGC  
M A L E L V G G G A A L L G A V F E K L T F A A V E D A R T K A T K F D S S 35  
106 CTCAAAAAAATCGAAGAGACACTCAAAATCCATAAATCCAAGTATCTAGAGATGAAAAGGTGAACGACCAGTTGGATCGTTCAAAAGGAGGAAATGGAGAAGTTG  
L K K L E E L T A G S L I N P S I L E M K R A N D Q L D R S G E M E M K L 70  
211 ATCCAAATCTTAAAGATGGGAGAAAGCTAATCCCAAGTGCTCCAGAGGTCTCTGTGTCGAACACTCTCAAGAAGTGGAGTACGCCAATGAAATCGAGGCGCTG  
I Q I L K D G G B K L I H K C S K V S C N Y F K K W R Y A N E I E A L 105  
316 GAGCAGCTCTCTCTTAAATTTCTTCAGGTGGAAATTCGAAGCCCAACTCAGTAGGACAACAATCGAGATTGGGCTCTGCTCAAAATCAAAATAGATTTCAGTTGGAGT  
E D S L L K I F Q V E L Q A G L S R N N M Q I R V L L K S N R F S W S 140  
421 ACAAAGGGGTTTCGGTTAAATATGAAGTTTGGGTTCTGTAGGCTACTGATCGCGCGGCTTTATAGTGGGACTAGATGTCCTTCAAAAGATTTGAAGAGG  
N K G V S V K Y E S L G S C E A T D P A F M V G L D V P L K E L K R 175  
626 TGGCTGTTACGGATGGGGAATCAAGGATTTGGTGTTCGGCTCTGGAGGATTCGGGAATAACCACTTTGGCTAAAGGGTTTGTACAGACCAAGCAATCAAGGAA  
W L F T D G E S R I V S A P G G G C K T T L A K R L C H D Q Q V V K E 210  
631 TATTTTCAGCAAGTTTCTATGTGACGGTGTCAAAAACATTAACGTAATTTGGCATCATCAAGAAACTATTTGGCATAGTAGTAACAAGTGGGGGGTTTCAA  
Y F Q H I F Y V T V S K T F N L I G I K K L F W H S D E Q V P G F Q 245  
736 AATGAGGAAGATCGACGCAACCAATTTGGAATCTATGCTGAAGGAAAGTAGAATCTGGTTCGTATCTGTTGGTCCTAGATGACGTTTGGTCTGGGTCGGAACTCT  
N E E D A V N Q L E L M L K R K V E S G R I L L D D V W S G S E S 280  
841 TTCTTAACCAAGTTTAACTCCAAATATCGGGATCGAAGGTTCTGATATACATCATGAAGAATGAATTTCCAAATTTGGTCTACATATAAATCTGAATTTGGTAGT  
F L T K F N F Q I S G C K V L I T S R N E F P K F G S T Y N L K L L S 315  
946 GAAGAAGATGCCAAGACTTTTCGGTCAATTCAGCAATCCCTGAGGATGGGAGTGTTCTTCATCGCCGGTGAAGAACCTTGTGAATACGATAGTAGAGGCGCTGC  
E E D A K T L F R H S A I P E D G S S S M P G E D E L V N T I V R K 350  
1051 AAGGGATTTCCACTCGCCCTTGAAGATGGTTCGGACATCGCTCGATGGGCGAGCTGTAGAGATCTGGAGAAGCACACTGATGAAATATCTGAAGGCTGAATCCATT  
K G F P L A L E V G R S L H G Q P V E I W R S T L M K L S E G E S I 385  
1156 GTCAATCTCGAAGTAGAAGTCGCTAATGTTCTTCAGATAGCTTCAGTATGGCCCTTGATGACCAAGGATATTATGTCTGAAGGAGTGTTTATGGAATCTGGGCTCAATT  
V N S E D E L R N C L G S S L D A L D D K D I M L K E C F M D L G S F 420  
261 CCTGAAGACCAAAAATCCCTGCCACTGCTCTTATAGATATGTGGGCGGAATTCGACAACATAGATAAAGACGGCATTATGCAATTTCCAACCTTCAGAAACTC  
P E D Q K I P A T A L I D M W A L E H K L D K D G I Y A I S N L Q K L 455  
1365 TGGCTTCGGAATCTGCTTAACTTTGTGTGTCAAGGAAGATGATCAAAATGAAGATTGATGGTGTACCAATGATGCCCTTGTGATCGAGCATGATCTCTCAGGGAT  
C S R N L N L V T R N D A N E I D W C Y N D A F V M Q H D L L R D 490  
1471 CTAGCCATTTATCAGAGCAACCCAGGAGCCCATAGAAAAGAGGAAAAGACTAATCGTGGACTTGCACAGGAAACAGACTCCCGGAGTGGTGGACTTAAGAAAAATCAG  
L A I Y Q S N N Q E P I E K R K R L I V D L T G N R L P E W W T K E N Q 525  
1576 CCCCATAAGTGCTGCTCTGTGTGTCATCTCCAGCATGAATATGTTCTCTCAAGCTGGTGGCAACATGCAACTCTCGAAGCTGAGGCTCTAATACTGAACCTC  
P Q L S A R A L T S I S T D E M F S S W C N M Q L P E A E L I L N F 560  
1681 AATCAGACAGAAAAATAAATACGAATTCGAGAGTCTAATGAAGCAAAATGGATAAATGAAAGTCTAGTAGTAAACAAATATGTTTCTGTGCTGCTGAATTTGACT  
N Q T E N K Y Y E L P E F M K Q M D K L K V L V T V N Y G F C A A E L T 595  
1786 AATTTTCAGTCTCAGTTCCTTCTTCAATCAATCAAGAGAAATCAGGTTAGAGCAAGTTTCAATTCACCAACTATGCAACACGAGTATGGAATATGAAGAAATCTGGAA  
N F S V L S S L S L N L K R I R L E Q V S I P T L G T T M G E L K N L E 630  
1891 AAGCATCTCCTTAGTCAAGTGTGCATAAGATTTGGTCAGGCTTTTGCAGATAGTACCATCCAGATCCCGAAGATTTACCAAAACCTTSMGGAATCAACATGATTAC  
K L S L V M C H K I G A F A S T S I Q I P E M L N P L N R E I N D Y 665  
1996 TGTAAATGACTTGTGGAATACAGAAAGGGTTTGTGACTTATGTTCAGCTGAATAAGCTAGGACTCAGCAACTGCCATAGCTCTGTGACTGCGGAGGGGATA  
C N D L V E L P E G F C D L V Q L N K L S I S N C H K L S A L P E G I 700  
2101 GGGGAAGCTTCGAAATCTGGAAGTCTAAGGGTTAGTGGCTGTACATTTGGTGTCAAAATTTGCCAGACTCAATGGGAAGCTCCACAAGTTGAGCGTTCTTGATATA  
G K L A N L E V L R V S A C T L V S K L P D S M G S L H K L S V L D I 735  
2206 ACTGTTGTTTTCAGGAATAGGAAAAATGGCAAAACAAATAGGGGAGTTGGCTGGTCTAAGAGAGCTCCAGATGAGAAGGTGGCCAGGTTTGGCGGAGCTGCCACCA  
T G C L R I R K M P K Q I G E L R G L R E L H M R R C P G L R E L P 770  
2311 TCAGTAGCGCTTCGTGGATTGTGAGAGGGTATCTCGATGGAAGAGACTGCCAGCTGCGGAAGATGTTATAGCAGATCTGCTCCCAATCTCAACCATTCAGTG  
S V T L L V D L E R V A I C D E E T A Q L W E C Y T H L P N L T L S V 805  
2416 CCTGAAGAAATTTATCAACTTGAATTTGGCTTTAA  
P E E I I I N L N W L \* 815

图4 *VpR8H-GX1* 基因核苷酸及其推导的氨基酸序列(“\*”代表终止子)

Fig. 4 Nucleotide and deduced acids sequence of VpR8H-GX1

1	ATGGCTTTGGAGCTTGTGGAGGGGGTCTTTGGGAGCAGGATTTGGGAACTTGATCACGGCGGCTTCTAGATGCACGGAAGAAGATAACTCACTGCTGCACCTCAGC	
	CTAALEALVGGGACAAAGTACAGGFGKLLITAVLVLDARKKKIQQGFDDSS	35
106	CTCAAAAACTCGAAGAGACACTAATTCCTAAGCTCGCAAGTATGCTAGAGGTTGAAAAGGTTATCGGACCACTCGCAATCTCCAAGGTTGGAAATGGCAAGTTA	
	LKKLEERLNSITPSSIVEVVKFMQDSSGNHPRVLELKEGL	70
211	ATCCAAATCTTAAAGATGGGGAAGCTAATCCACAGAGTCTCGAGGTTCTACTTTGGCATCTTCAATAAATTTGGAGGTACGCCAATAAAAATTAAGGCCCTTG	
	IQILKLKDGEKLIHKCSSEVSSCDYVSNWRYANKITAKAL	105
316	GATGGCTCAATTTGAAAATTTTTTCAGGTGGAAATTCGAAGCATACAACATTTGGAGCACACAGCTGCTGCCAAAATCAAAATGATTGATTTTGACTAACAGAGG	
	DGSSIEKFFQVEMQVITQLWSTTTTAVLPKSNRLSLSNRR	140
421	GTTCCTCACTAATCAAAATTTGGGTTCTGTGTGAGGCTACTGATCCGCGCGCTTTTATGGTGGCACTAGATAGTGCCCTCTCAAAGAAITTGAAAGAGCGCGCTGTTT	
	VSSDNLNYESLGSCEATATGVPAPFMVGLDVPKLKELKRLRF	175
526	ACGGATGGGGAATCAAGGATTTGGTGTGGCTCTGGAGGATGTGGGAAAACCACTTTGGCTAAAGGCGTTTGTACGCCAACCAAGTCAAGGAATATTTTACG	
	TDTGDESRIVSAPGGCGKTTTLAKRLCTHGDQQVQKEYFT	210
631	GACATTTGCTATGTCCAGGTGTCAAAAACATGGCAACCTAATGGCATCTCAAGAAATCAATTTTGGCATACTGCAAGCACTCGAGGCGTTTCAAAGTGAGGAA	
	DICYVTGVSSTKCTCDLIGIIEKKFLFTHHNNAERVTGQGFQSE	245
736	GATGCACTCAACCAATTCGAACATATGCTGAAGAGCAAGTGAATATGCTGCTATCTGTGCTTCTAGATCAAGCTTTGGCTGTGGGTCAAATCTGTGCCACAG	
	DAVNQLELMLLKRKVESGRILLVLDDVWSSGSKSVPD	280
841	AAGTTTAAAGTCCAAATATCGAAATTCAGGGTTCTGGTTACATCTAGAAAAATTAATTTCCAGGATTTGGTCTTCACTATAACTTGAATTTGTTGAGTGAACAAGAT	
	KFKFKFGISKSKFKVLVTSRNEFFPGFGSTYTNLKLKLSSEED	315
946	GCCAACTGCTTTTTTGTCACTCAGCAATTCCTCAGGATGGGAGCGGCTTCTTCATCGCCAGTGAAGAACTTGTGAATACGATAGTAGGGCGCTGCAAGGCAATTT	
	AKTLLTGTHCHSAIPEDGSGRSSMPSSEELVNVTIATVNRCKGKF	350
1051	CCACTGGCCCTGGAAGTCGTTGGCAAGTCCCTCCATGAGCAGCGCTGTAGACATCTTGGAGAAGCAACTGATGAAATTTATCTGAAGCTGAATCCATTGTCAATCTT	
	PLALELVGTGRSLHLEQVPEIWRSTSLMKLKSSEGESIVNS	385
1156	CAAGCACTCACTGCTTAATTTCTTCAAAGTACGTTACATGCCCTTCATCACAAGCATATTATCTGCAAGCACTTTTATGCACTTCGGCTTCATTTCTTCAACAC	
	EDEELRNLNCLSSSLDALDLDDKIDIMLKECFNLDLGSFPEED	420
1261	CAAAAATCCCTGCCACTGCTCTTATAGATTTGTGGCGGAATTCGCAAACTAGATAAAGCGCGCAATTTATGCCATTTTCAAACTTCAGAAATCTGCTGCTCGG	
	QKIPATATACADLDMWAALEHLHLKLKGGIIVAIASNLKLKLSR	455
1366	AATCTGTTTAATCTTGTGTCACAGAAGTAATGCAAAATGAGATTATGGTGCTACAAGTGCTGCTTGTTCATGACGATCATCTTCTCAGGATCTAGCCATT	
	NLLNLNLVLVTVTRNDANEDIMGCTCYNDAPVMMQHDLLRLDIAI	490
1471	TATCAGAGCGCAAGACGCCATCAAAAAGCAGGAAGAAGCTAATGCTGGACTGCACGAAACAGACTCCCGGACTGTGGGACTAAGAGCAAGCAAGCCGCAATCA	
	YQSEGEQGPATIEKRRKRLIVDLTGNRLPEWWTKEKQPRS	525
1576	ATGCTGCTGCTTGTGCTCCACAGGATATTCTGTAGATCAAAATCTTCTCCTCAAGCTGGTGTAGCATCGCAACTTCTTGAAGCTGAGGCTCTAATACCTGAAC	
	SARLVSTSTGYSVDEDMFSSSWCSMQQLPEAEALILN	560
1681	TTTAACTCAAAATGAAAACAAATACGAATTCGCCAGACTTCATGACGCAAAATCGGATGAACCTCAAGGTTCTTAGTATGAACAAATATTGCTTTTCTGCACCTGCTGAATTG	
	FNQIEIEKKYAYELPEFMKMGMDLEKVLVLTNYGFCCTALEL	595
1786	ACTAATTTTCCAGTACTTGGTTCCTTATCCAATCTAAGAGCAATCAGGTTAGAGAAAGTTTCAATTTCAACCACTATGCAAAAACCGATATGCAATTTGAAGAATCTGT	
	TNFSVLGSLSNLRLRRLREKVSITPLTKTSTIEALKNL	630
1891	GAGAAGCTATCCTTACTGTGTCATAGATTGCTGCGCGCTTTTGCAGAGTACTACCATCCAGATTCCAGAAATGTTACCCAAACCTTACAGAAATCAACATTGAT	
	EKLSLNLNMCHKRIGPAPFASSTIQIPEEMLPNLTEINID	665
1996	TACTGTAAATGACTTGGTGGAATTTACCGAAGGGTTTGTGATTATATCCCAACTGAATAAGCTGAGCATCAGCAACTGCCATTAAGCTGTCTTCACTGCGCGGAAGGA	
	YCNLDLVELPEEGFCDLILQLNLKLSISNCHKLKLSLPE	700
2101	ATAGGCGAAGCTTCAAAATCTGGAAGTGCTAAGGCTTACTGCGCTTACATTTGCTGTCAAAATTCGCAAGCTCAAGTGGGAAGCTCCCAAACTTGAGGCTTCTTGAT	
	IGKLLTNLVELRVLSACTLVSKLPDSMGSLHKLRLVLD	735
2206	ATACTGCTTGTTTACTAATAAGGAAAAATCGCGAAACAAATAGCGGAGTTCGGTAGTCTAAGAGAGTTCCACATGAGAAGTGCCCGGGTTTGTGGCAGCTGCCA	
	ITGCTGLLIRKMPKQIGELRSLREFHMRRCPLGCELP	770
2311	TCATCAGTCAGCGCTTCTGCTGGATTTCGAAGAGGTAATCTGCCATGAACAGACTGCCCACTGCGGAATCTGTTTACCGACTTGTCTCCCGCATCTCACTCTATT	
	SSVTLTLLVDLKRIVLCCGETAQGLWECEFTHTLLPDLTLF	805
2416	GTGCGCTGAAGAAATATCAACTTGAATTGGCTTTAA	
	VPEEIEIINLNLWL*	811

图5 *VvR8H-PN* 基因核苷酸及其推导的氨基酸序列(“\*”代表终止子)

Fig. 5 Nucleotide and deduced acids sequence of *VvR8H-PN*

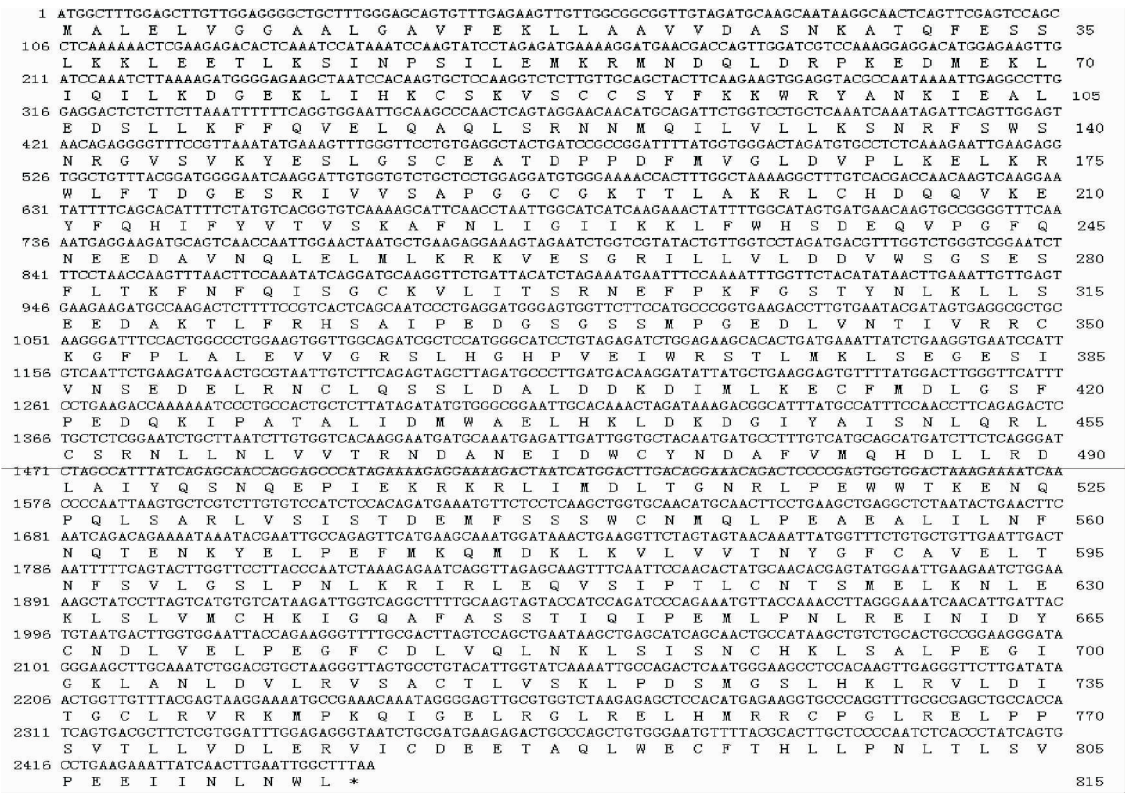
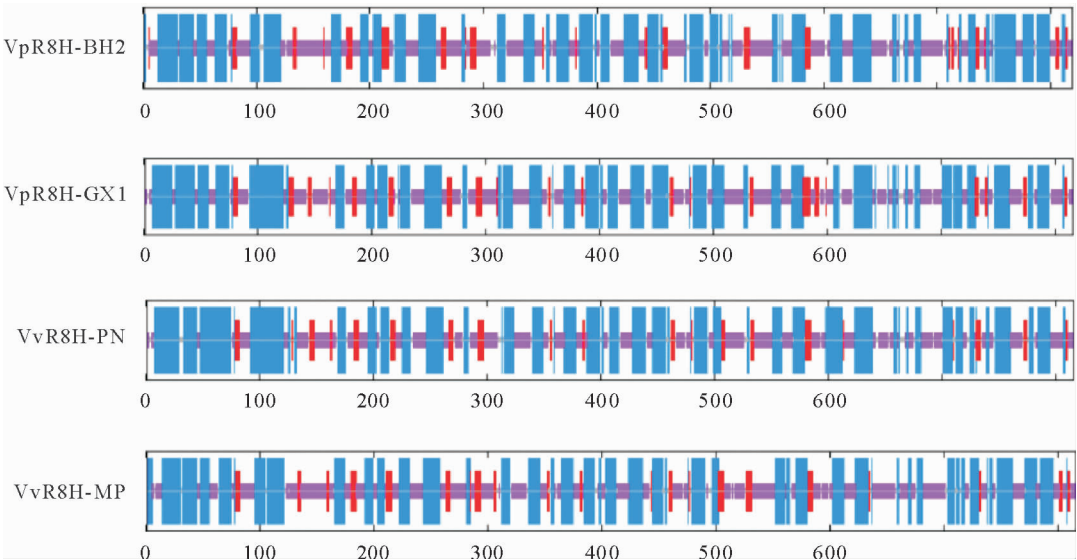


图 6 *VvR8H-MP* 基因核苷酸及其推导的氨基酸序列(“\*”代表终止子)

Fig. 6 Nucleotide and deduced acids sequence of *VvR8H-MP*



蓝色:α-螺旋;紫色:β-折叠;红色:无规则卷曲

图 7 *R82H* 基因编码蛋白二级结构组成分析

Fig. 7 The protein secondary structure composition analysis of *R82H*

表 2 *R82H* 基因编码蛋白亚细胞定位预测

Table 2 The protein subcellular localization prediction of *R82H*

蛋白名称	细胞质	细胞核	线粒体	囊泡	质膜	内质网	高尔基体
VpR8H-GX1	52.2	34.8	4.3				4.3
VpR8H-PN	52.2	39.1	4.3	4.3			
VpR8H-MP	52.2	39.1		4.3		4.3	
VPR8h-BH2	43.5	34.8	4.3	4.3	4.3		



XP_003635372.1	MALELVGGALGAGAEKLFAYEDARTKRTREYSSSLKLEEDLSTINPSITPMRNNQDLDRFREEMERLIQILKDGGERLIHKCSVSSCR	90
VpR8H-BH2	MSAEVLGGALGAGAEKLIITAYEDARKRTTCSSSLKLEEDLSTINPSITPMRNNQDLDRFREEMERLIQILKDGGERLIHKCSVSSCR	90
VpR8H-GX1	MTFTLVGGALGAGAEKLIITAYEDARKRTTCSSSLKLEEDLSTINPSITPMRNNQDLDRFREEMERLIQILKDGGERLIHKCSVSSCR	90
VvR8H-PN	MALELVGGALGAGAEKLFAYEDARTKRTREYSSSLKLEEDLSTINPSITPMRNNQDLDRFREEMERLIQILKDGGERLIHKCSVSSCR	90
VvR8H-MP	MALELVGGALGAGAEKLIITAYEDARKRTTCSSSLKLEEDLSTINPSITPMRNNQDLDRFREEMERLIQILKDGGERLIHKCSVSSCR	90
Consensus	melelvvgaalgaqvfekl aav dar katqtdssllkleeulksinpsilemkrnmddqldpkeemeklqikdgeklhhkcskvssc	
XP_003635372.1	NYEKNWRYANETEDERESLRKEFQVEDCAQLSRNNMQIVLKRNSRSTSNRGVSVFYESLGSCCATDPPFEMVGLDVPLEKELKRLFTD	180
VpR8H-BH2	DYENKNWRYANETEDERESLRKEFQVEDCAQLSRNNMQIVLKRNSRSTSNRGVSDNYESLGSCCATDPPFEMVGLDVPLEKELKRLFTD	177
VpR8H-GX1	SYEKNWRYANETEDERESLRKEFQVEDCAQLSRNNMQIVLKRNSRSTSNRGVSVFYESLGSCCATDPPFEMVGLDVPLEKELKRLFTD	180
VvR8H-PN	NYEKNWRYANETEDERESLRKEFQVEDCAQLSRNNMQIVLKRNSRSTSNRGVSVFYESLGSCCATDPPFEMVGLDVPLEKELKRLFTD	180
VvR8H-MP	DYENKNWRYANETEDERESLRKEFQVEDCAQLSRNNMQIVLKRNSRSTSNRGVSDNYESLGSCCATDPPFEMVGLDVPLEKELKRLFTD	177
Consensus	yfkknwryanklealedsl kffqvlelqaqlsrnnmqi vlkknrfswanrgvsvkyeslgscceatdppafmvglvdpelkelkrllftd	
XP_003635372.1	GESRIVVSAFPGCGKTTILAKRLCHDQVKEYEQHIFVTVSSTFENLIGIIRKLFWHSDCQVFGQNEEDAVNQLELMKKRVESGRILLV	270
VpR8H-BH2	GKSRIVVSAFPGCGKTTILAKRLCHDQVKEYETIICQVTVSVKTCILIGIIRKLFWHSDCQVFGQNEEDAVNQLELMKKRVESGRILLV	267
VpR8H-GX1	GESRIVVSAFPGCGKTTILAKRLCHDQVKEYEQHIFVTVSSTFENLIGIIRKLFWHSDCQVFGQNEEDAVNQLELMKKRVESGRILLV	270
VvR8H-PN	GESRIVVSAFPGCGKTTILAKRLCHDQVKEYEQHIFVTVSSTFENLIGIIRKLFWHSDCQVFGQNEEDAVNQLELMKKRVESGRILLV	270
VvR8H-MP	GESRIVVSAFPGCGKTTILAKRLCHDQVKEYETIICQVTVSVKTCILIGIIRKLFWHSDCQVFGQNEEDAVNQLELMKKRVESGRILLV	267
Consensus	gearivvsapggcgkttlakrlchdqvkqeyfghifvstvstktfnligiikklfwhsdqvgqgqeedavnnqlelmkkrvesgrillv	
XP_003635372.1	LDVWSGSEFLTKNEFCISGGKVLITSRNEFFPFGSTYNLKLSEEDAKTLFCHSAIPEDGSSSMSEPEELVNTVRRCKGFFLALEVV	360
VpR8H-BH2	LDVWSGSESVPRKNEFCISGRKVLITSRNEFFPFGSTYNLKLSEEDAKTLFCHSAIPEDGSSSMSEPEELVNTVRRCKGFFLALEVV	357
VpR8H-GX1	LDVWSGSEFLTKNEFCISGGKVLITSRNEFFPFGSTYNLKLSEEDAKTLFCHSAIPEDGSSSMSEPEELVNTVRRCKGFFLALEVV	360
VvR8H-PN	LDVWSGSEFLTKNEFCISGGKVLITSRNEFFPFGSTYNLKLSEEDAKTLFCHSAIPEDGSSSMSEPEELVNTVRRCKGFFLALEVV	360
VvR8H-MP	LDVWSGSESVPRKNEFCISGRKVLITSRNEFFPFGSTYNLKLSEEDAKTLFCHSAIPEDGSSSMSEPEELVNTVRRCKGFFLALEVV	357
Consensus	lddvwsgeasfltknfqisggkvliitrneffpfgstynlklseeadaktlfchsaipedgsgsswpgedivntivrckgfflalevv	
XP_003635372.1	GRSLHGQFVEIWRSTLMKLSGEGSIVNSEDELNRNCIQSSLDALDKDIMLKECFMDLGSFPEDQKIPATALIDMWAELHKLDRGIGYAI	450
VpR8H-BH2	GRSLHGQFVEIWRSTLMKLSGEGSIVNSEDELNRNCIQSSLDALDKDIMLKECFMDLGSFPEDQKIPATALIDMWAELHKLDRGIGYAI	447
VpR8H-GX1	GRSLHGQFVEIWRSTLMKLSGEGSIVNSEDELNRNCIQSSLDALDKDIMLKECFMDLGSFPEDQKIPATALIDMWAELHKLDRGIGYAI	450
VvR8H-PN	GRSLHGQFVEIWRSTLMKLSGEGSIVNSEDELNRNCIQSSLDALDKDIMLKECFMDLGSFPEDQKIPATALIDMWAELHKLDRGIGYAI	450
VvR8H-MP	GRSLHGQFVEIWRSTLMKLSGEGSIVNSEDELNRNCIQSSLDALDKDIMLKECFMDLGSFPEDQKIPATALIDMWAELHKLDRGIGYAI	447
Consensus	grslhggqvveiwrstlmklsgesivnsedelnrnciqssldaldkdkimlkecfmdlgfepedqkipatalidmwaelhklldrgigyais	
XP_003635372.1	NHQLCSNLLNLVVTIR...NDANEIDWCYNDAFVMQHDLRLDLAIYQSQEPIEKRRKRLVLDITGRLPPEWWTKEQQRCSARLVSIST	537
VpR8H-BH2	NHQLCSNLLNLVVTIRSSNDANEIDWCYNDAFVMQHDLRLDLAIYQSQEPIEKRRKRLVLDITGRLPPEWWTKEQQRCSARLVSIST	537
VpR8H-GX1	NHQLCSNLLNLVVTIR...NDANEIDWCYNDAFVMQHDLRLDLAIYQSQEPIEKRRKRLVLDITGRLPPEWWTKEQQRCSARLVSIST	537
VvR8H-PN	NHQLCSNLLNLVVTIR...NDANEIDWCYNDAFVMQHDLRLDLAIYQSQEPIEKRRKRLVLDITGRLPPEWWTKEQQRCSARLVSIST	537
VvR8H-MP	NHQLCSNLLNLVVTIR...NDANEIDWCYNDAFVMQHDLRLDLAIYQSQEPIEKRRKRLVLDITGRLPPEWWTKEQQRCSARLVSIST	534
Consensus	nhqlkicsrnlalnvlvtr ndaneidwcyndaafvmqhdlldrlaiyqsgnepiekrrklvlditgrrlpewwtkengqqdsarlvsist	
XP_003635372.1	...DEMFSNWCSMQLPEAEALILNFNCDEKRYELPEFMKQMDLKVLVVTVNYGFCATELTNSVLSLSNLKRIRLEQVSTIELCSTS	623
VpR8H-BH2	GYSVDEMFSNWCSMQLPEAEALILNFNCDEKRYELPEFMKQMDLKVLVVTVNYGFCATELTNSVLSLSNLKRIRLEQVSTIELCSTS	623
VpR8H-GX1	...DEMFSNWCSMQLPEAEALILNFNCDEKRYELPEFMKQMDLKVLVVTVNYGFCATELTNSVLSLSNLKRIRLEQVSTIELCSTS	623
VvR8H-PN	...DEMFSNWCSMQLPEAEALILNFNCDEKRYELPEFMKQMDLKVLVVTVNYGFCATELTNSVLSLSNLKRIRLEQVSTIELCSTS	623
VvR8H-MP	GYSVDEMFSNWCSMQLPEAEALILNFNCDEKRYELPEFMKQMDLKVLVVTVNYGFCATELTNSVLSLSNLKRIRLEQVSTIELCSTS	624
Consensus	demfsswnwcnqlpeaealilnfnctenkyelpfmkqmdklvvlvtnygfcaaeltnsvlsglsnlkrirleqvsptlcnts	
XP_003635372.1	MELKNLEKLSLVCHKIGCAFASSTIQIPEMLPNLREINIDYCNLVELPEFGFCDILQNLKLSISNCHKLSLPEFGIGKLANIEVLRVSA	713
VpR8H-BH2	IELKNLEKLSLVCHKIGCAFASSTIQIPEMLPNLREINIDYCNLVELPEFGFCDILQNLKLSISNCHKLSLPEFGIGKLANIEVLRVSA	717
VpR8H-GX1	MELKNLEKLSLVCHKIGCAFASSTIQIPEMLPNLREINIDYCNLVELPEFGFCDILQNLKLSISNCHKLSLPEFGIGKLANIEVLRVSA	713
VvR8H-PN	MELKNLEKLSLVCHKIGCAFASSTIQIPEMLPNLREINIDYCNLVELPEFGFCDILQNLKLSISNCHKLSLPEFGIGKLANIEVLRVSA	713
VvR8H-MP	IELKNLEKLSLVCHKIGCAFASSTIQIPEMLPNLREINIDYCNLVELPEFGFCDILQNLKLSISNCHKLSLPEFGIGKLANIEVLRVSA	714
Consensus	melknleklslvmchkggafasstiqipemlpnlreindycndlvelpefgfcdilqnlklsisnchklsalpegigkrlanlevlrvsa	
XP_003635372.1	CTLVSKLPDSMGSLHKLHFLVDITGCLIRKMPKQIGLRLSREHMRRCEGLRELHFSVTILVLDLVRVICDEETAQLWECSTHLLNLTIL	803
VpR8H-BH2	CTLVSKLPDSMGSLHKLHFLVDITGCLIRKMPKQIGLRLSREHMRRCEGLRELHFSVTILVLDLVRVICDEETAQLWECSTHLLNLTIL	807
VpR8H-GX1	CTLVSKLPDSMGSLHKLHFLVDITGCLIRKMPKQIGLRLSREHMRRCEGLRELHFSVTILVLDLVRVICDEETAQLWECSTHLLNLTIL	803
VvR8H-PN	CTLVSKLPDSMGSLHKLHFLVDITGCLIRKMPKQIGLRLSREHMRRCEGLRELHFSVTILVLDLVRVICDEETAQLWECSTHLLNLTIL	803
VvR8H-MP	CTLVSKLPDSMGSLHKLHFLVDITGCLIRKMPKQIGLRLSREHMRRCEGLRELHFSVTILVLDLVRVICDEETAQLWECSTHLLNLTIL	804
Consensus	ctlvsklpdsmgslhklrvlditgclirkmppkqigrlsrehmrrceglrelhfsvtilvldlvrvicdeetaqlwecsthllpnltl	
XP_003635372.1	SVPEEIIINLNW	814
VpR8H-BH2	LVPEEIIINLNW	818
VpR8H-GX1	SVPEEIIINLNW	814
VvR8H-PN	SVPEEIIINLNW	814
VvR8H-MP	SVPEEIIINLNW	815
Consensus	svpeeiinlnw	

图 8 4 种不同葡萄 R82H 基因氨基酸序列比对

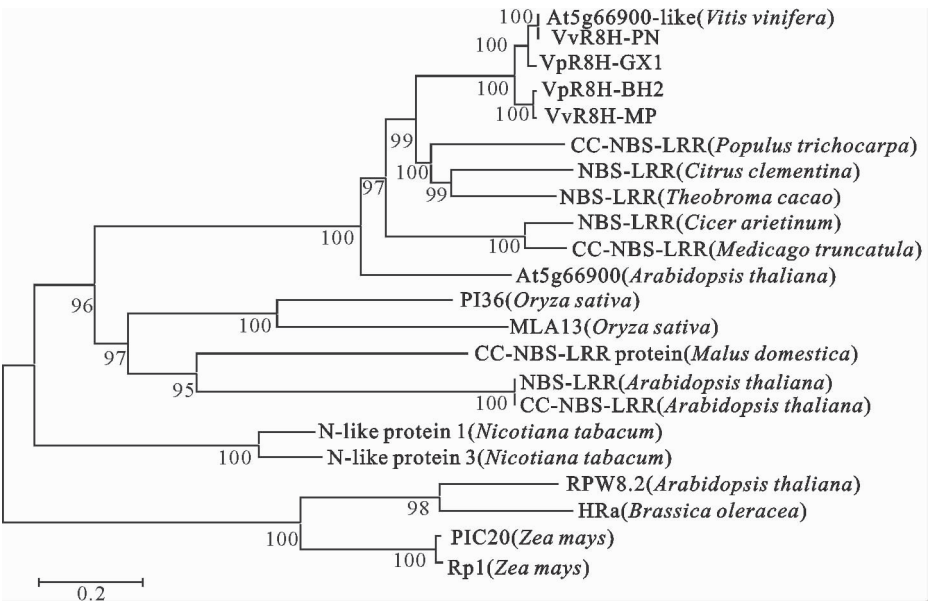
Fig. 8 Alignments of R82H amino acids within four different *Vitis*

利用 VvR8H-PN 氨基酸序列检索 NCBI 蛋白质数据库,加入拟南芥 At5g66900 和 *RPW8.2* 基因和已经报道的其他物种 R 基因蛋白序列一起构建进化发育树(图 9), VpR8H-BH2、VpR8H-GX1、VvR8H-PN 和 VvR8H-MP 位于同一进化枝上,并且能够与其他植物 NBS-LRR 基因聚类在一起。VpR8H-BH2、VvR8H-MP 亲缘关系最近,进化距离也最短;VpR8H-GX1 与 VpR8H-BH2、VvR8H-PN 距离稍远;葡萄 R82H 基因与拟南芥 *RPW8.2* 基因进化距离是比较远的。

2.4 目的基因组织特异性表达分析

为检测目的基因在 4 种葡萄中的表达特性,以温室中 4 种葡萄不同组织为材料,提取不同组织总

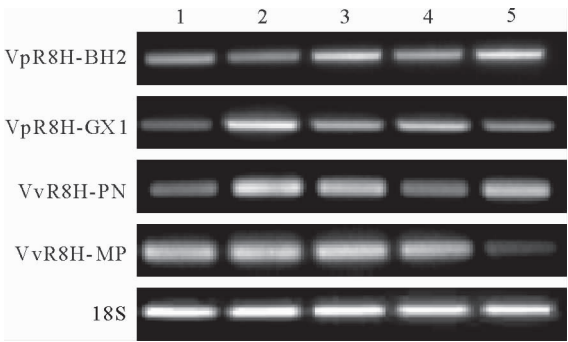
RNA,以反转录后的 cDNA 为模板,进行半定量 RT-PCR 扩增。结果如图 10 所示,R82H 基因在 4 种不同葡萄根、茎、成熟叶、幼嫩叶片和卷须等不同组织中均有表达,但表达量存在一定差异,在白河 35-2 葡萄成熟叶与卷须中表达量较高,茎中较低,根部及幼嫩叶居中;在广西-1 葡萄成熟叶中表达量最高,根部表达最低;在黑比诺葡萄中茎、成熟叶、卷须中表达量均较高,根和幼叶中较低;在五月紫葡萄中除了卷须中较低外,根、茎、成熟叶、幼叶表达量趋于一致,且明显高于卷须部位。这说明 R82H 基因在不同葡萄材料中表达差异较大,在同一葡萄材料中其组织器官表达差异也比较大。



注:葡萄 At5g66900-like(*Vitis vinifera*, XP\_003635372.1)、黑比诺 VvR8H-PN(*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, KJ539200)、白河 35-2 VpR8H-BH2(*Vitis pseudoreticulata* accession Baihe35-2, KJ539198)、五月紫 VvR8H-MP(*Vitis vinifera* cv. May Purple, KJ539201)、广西-1 VpR8H-GX1(*Vitis pseudoreticulata* accession Guangxi-1, KJ539199)、苜蓿 CC-NBS-LRR(*Medicago truncatula*, XP\_003611805.1)、可可 NBS-LRR resistance protein(*Theobroma cacao*, EOX91315.1)、柑橘 CICLE(*Citrus clementina*, ESR55276.1)、鹰嘴豆 NBS-LRR(*Cicer arietinum*, AHG28991.1)、油菜 HRa(*Brassica oleracea*, AAP45320.1)、杨树 CC-NBS-LRR(*Populus trichocarpa*, XP\_002310161.1)、拟南芥 At5g66900(*Arabidopsis thaliana*, Q9FKZ1.1)、苹果 CC-NBS-LRR(*Malus domestica*, AEJ72566.1)、烟草 N-like protein1(*Nicotiana tabacum*, BAF95888.1)、烟草 N-like protein3(*Nicotiana tabacum*, AAT37497.1)、拟南芥 NBS-LRR(*Arabidopsis thaliana*, AAL86316.1)、拟南芥 CC-NBS-LRR(*Arabidopsis thaliana*, BAB08845.1)、水稻 PI36(*Oryza sativa*, ABI64281.1)、水稻 MLA13(*Oryza sativa*, BAD31738.1)、玉米 PIC20(*Zea mays*, AFW55933.1)、玉米 RP1(*Zea mays*, AAD47198.1)

图 9 葡萄 *R82H* 基因进化发育树

Fig. 9 Phylogenetic relationship of *R82H* in *Vitis*



1:根;2:茎;3:成熟叶;4:幼叶;5:卷须

图 10 *R82H* 基因在葡萄不同组织中表达特异性分析

Fig. 10 Semi-quantitative PCR analysis of *R82H* in different tissues of *Vitis*

3 结论与讨论

近年来已从不同植物中克隆出 60 多个 R 基因<sup>[8]</sup>。这些 R 基因编码的蛋白根据其结构域特点可以分为 2 类,一类具有 NBS-LRR 结构域,另一类富含 eLRR 结构域。NBS-LRR 类蛋白根据其 N 端的不同,还可以细分为 2 类,一类为 CC-NBS-LRR,另一类为 TIR-NBS-LRR<sup>[9]</sup>。除此之外,还有一些

非典型的 R 基因,如水稻的 Xa13<sup>[10]</sup> 和 Xa27<sup>[11]</sup>,只含有 TM 结构域;番茄的 Pto 基因<sup>[12]</sup>,只含有 Kin 结构域;而拟南芥广谱抗病基因 *RPW8.2* 只含有 TM 和 CC 结构域<sup>[1]</sup>。

虽然拟南芥基因 *RPW8.2* 是一个非典型的 R 基因,其编码的蛋白仅含有 TM 和 CC 2 个结构域,但是 *RPW8.2* 蛋白却能够特异的锚定在白粉菌吸器外质膜(EHM)上启动广谱抗病性<sup>[13-16]</sup>。大量的突变分析结果表明,2 个精氨酸、赖氨酸富集的氨基酸小 motif(如 R/K-R/K-x-R/K)和 N 端转膜结构域 TM,共同构成了一个 60 个氨基酸残基序列,对 *RPW8.2* 精确锚定到白粉菌吸器外质膜上必不可少<sup>[4]</sup>。这些研究结果一方面对研究防御形成吸器类病原菌如白粉菌等具有重要的参考价值<sup>[4]</sup>,另一方面暗示着 *RPW8.2* 的同源序列有可能成为其他植物包括葡萄抗白粉病的候选基因,也为其他植物如葡萄克隆其同源基因,进而研究其功能提供了理论参考依据。

本研究从 4 种不同葡萄中克隆出拟南芥 *RPW8.2* 的同源基因。进化关系分析结果表明,4 个葡萄 *R82H* 基因推导的氨基酸序列与不同植物



的 NBS-LRR 蛋白序列进化关系更接近(图 9),而与拟南芥 *RPW8.2* 进化关系似乎远些。这可能是因为这些葡萄 *R82H* 基因除了含有 *RPW8.2* 结构域外,还含有 NB-ARC 和 LRR 结构域,导致出现这个进化结果(图 2)。

进一步分析发现,*VvR8H-PN* 与葡萄基因组的参考序列 At5g66900-like 相似性最高,达 99%。五月紫和白河 35-2 同为感病葡萄,广西-1 是抗病中国野生葡萄,来自五月紫的 *VvR8H-MP* 和来自白河 35-2 的 *VpR8H-BH2* 的氨基酸序列同源性也较高,达到了 99%,它们与来自广西-1 的 *VpR8H-GX1* 氨基酸序列同源性分别为 95%、96%。*R82H* 基因在抗病葡萄和感病葡萄中存在的差异,这种关键氨基酸的差异可能会为我们研究不同葡萄材料抗病基因功能提供新的线索。*R82H* 基因在不同葡萄材料中表达差异较大,在同一葡萄材料中其组织器官表达差异也较大,也为今后进一步深入研究其功能提供了参考。本研究中 *R82H* 基因在抗病葡萄和感病葡萄中存在差异,说明该基因可能参与了葡萄抗病过程的基因表达调控,与葡萄抗病性的形成有一定关系,至于究竟是哪个关键结构域或者哪个关键氨基酸在抗病过程中发挥主要作用,有待对其功能进行进一步验证,明确其与葡萄抗病的关系。

参考文献：

[1] XIAO S, ELLWOOD S, CALIS O, *et al.* Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8* [J]. *Science*, 2001, 291: 118-120.

[2] WANG W, DEVOTO A, TURNER J. G, *et al.* Expression of the membrane-associated resistance protein *RPW8* enhances basal defense against biotrophic pathogens[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2007, 20: 966-976.

[3] WANG W, WEN Y, BERKEY R, *et al.* Specific targeting of *RPW8.2* to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21:2898-2913.

[4] WANG W, ZHANG YI, WEN Y, *et al.* A comprehensive mutational analysis of the arabidopsis resistance protein *RPW8.2* reveals key amino acids for defense activation and protein targeting[J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 4242-4261.

[5] The French - Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla [J]. *Nature*, 2007, 449: 463-467.

[6] 张今今,王跃进,王西平,等. 葡萄总 RNA 提取方法的研究 [J]果树学报. 2003,20(3): 178-181.

ZHANG J J, WANG Y J, WANG X P, *et al.* An improved method for rapidly extracting total RNA from *Vitis* [J] *Journal of Fruit Science*, 2003, 20(3): 178-181. (in Chinese)

[7] PRIVALOV P L, GILL S J. Stability of protein-structure and

hydrophobic interaction [J]. *Advances in Protein Chemistry*. 1988, 39: 191-23.

[8] MARTIN G B, BOGDANOVE A J, SESSA G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 23-61.

[9] XIAO S, WANG W, YANG X. Evolution of resistance genes in plants[C]// HEINE H. *Innate Immunity in Plants, Animals, and Humans*. Berlin: Springer Verlag, 2007: 1-25.

[10] GINNY ANTONY, ZHOU J H, HUANG S, *et al.* Rice *Xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*[J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3864-3876.

[11] WU L F, MEI L G, CHELLAMMA S, ZHOU C Y. *XA27* depends on an amino-terminal signal-anchor-like sequence to localize to the apoplast for resistance to *xanthomonas oryzae pv oryzae* [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148 (3): 1497-1509.

[12] ZHOU J M, YING-TSU L, RAY A B, *et al.* The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response [J]. *Cell*, 1995, 83: 925-935.

[13] WANG W, WEN Y, BERKEY R, *et al.* Specific targeting of *RPW8.2* to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 2898-2913.

[14] NANCY A E. The arabidopsis *RPW8* resistance Protein is recruited to the extrahaustorial membrane of biotrophic powdery mildew *Fungi*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 25-43.

[15] XIAO S, ELLWOOD S. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* Mediated by *RPW8*[J]. *Science*, 2001, 291: 118-120.

[16] WANG W, WEN Y, BERKEY R, *et al.* Specific targeting of *RPW8.2* to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 2898-2913.

[17] 杨堃,张朝红,李树秀,等. 葡萄 SVP 类 MADS-box 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北林学院学报, 2012, 24(4): 117-123.

YANG K, ZHANG C H, LI S X, *et al.* Cloning and expression analysis of grape SVP-like MADS-box Gene [J] *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 24(4): 117-123. (in Chinese)

[18] 袁丁,李红,郝文芳,等. 毛果杨全基因组硝酸根转运蛋白家族(NRT2S)序列分析 [J]. 西北林学院学报, 2012, 27(5): 80-86.

YUAN D, LI H, HAO W F, *et al.* Genome-wide sequence analysis of high affinity nitrate transport(NRT2S)gene family in *Populus trichocarpa*. [J] *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 27(5): 112-116. (in Chinese)

[19] 陈欣,祝传书,冯俊涛,等. 雷公藤 RNA 提取方法与优化 [J]. 西北林学院学报, 2014, 29(2): 80-86.

CHEN X, ZHU C S, FENG J T, *et al.* The establishment and optimization of RNA isolation in *Tripterygium wilfordii*. [J] *Journal of Northwest Forestry University*, 2014, 29 (2): 112-116. (in Chinese)