

马铃薯基因组中3个番茄 *Cf-9* 的 LRR 区同源片段的克隆及序列分析

汪国平¹, 卢婷¹, 乐素菊², 林明宝¹

(1 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 2 仲恺农业技术学院 生命科学学院, 广东 广州 510225)

摘要:根据番茄 *Cf-9* 与 *Cf-9B* 抗病蛋白富亮氨酸重复区域(LRR)对应的核苷酸序列设计引物,用 PCR 方法从马铃薯基因组扩增出 2 个同源片段;用 *Cf-9* 序列在 SGN 网站中对马铃薯 EST 组序列搜索获得第 3 个同源序列. 分析表明马铃薯的 3 个序列与番茄的序列高度保守,在核苷酸水平上相似度大于 85%,在氨基酸水平上相似度大于 75%,但依来源不同而明显分为 2 组,说明已发生了较大程度的分化.

关键词:马铃薯; 番茄; *Cf-9*; 富亮氨酸重复

中图分类号:S532

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)01-0117-03

Cloning and Sequence Analysis of Homologues to LRR Domain of Tomato *Cf-9* Gene in Potato Genome

WANG Guo-ping¹, LU Ting¹, YUE Su-ju², LIN Ming-bao¹

(1 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Two sequences homologous to leucine rich repeat (LRR) domain of tomato *Cf-9* gene were obtained from potato genome through PCR amplification using a pair of primers specific to the conserved part of *Cf-9* and *Cf-9B*. A third homologue was found by blastn-searching *Cf-9* sequence against potato Uni-Genes in SGN website (www.sgn.cornell.edu). It indicated that a high similarity existed between sequences from potato and tomato with a similarity of more than 85% at nucleotide level and more than 75% at amino acid level. The comparison revealed that a significant variation had taken place between potato and tomato *Cf9*-LRRs.

Key words: potato; tomato; *Cf-9* gene; leucine rich repeats

番茄和叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* 互作系统符合“基因对基因”理论^[1],是研究植物和病原菌互作分子机理的模式系统,近年来,这方面的研究已取得了重要成就^[2]. 马铃薯与番茄亲缘关系很近,这 2 种作物最近在分类学上被合并到茄属 *Solanum* 中. 研究表明马铃薯基因组中含有番茄叶霉病抗病基因 *Cf-9* 的同源基因,并且几种茄科作物(包括马铃薯)基因组中还保守地含有 *Cf-9* 与病原菌无毒基因 *Avr9* 相识别并激发抗病反应的信号传导途径相关基

因^[3],但番茄是目前发现的茄科作物中叶霉病菌的唯一寄主,换言之,马铃薯等其他茄科作物对叶霉病具有非寄主抗性. 番茄抗叶霉病基因编码的 Cf 蛋白的大部分都非常保守,但前端大约 24 个富亮氨酸重复(C1 区域)差异较大,研究表明该区域与抗性特异性有关^[4-5]. 马铃薯 Cf 蛋白在这一区域与番茄有多大差异? 这些差异是否与马铃薯表现为非寄主抗性有关? 研究这些问题的首要基础是从马铃薯中获得这些序列,本文在这方面进行了初步探索,从马铃薯中分

收稿日期:2007-06-07

作者简介:汪国平(1967—),男,副教授,硕士,E-mail: gpwang@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2007A020300009-6)

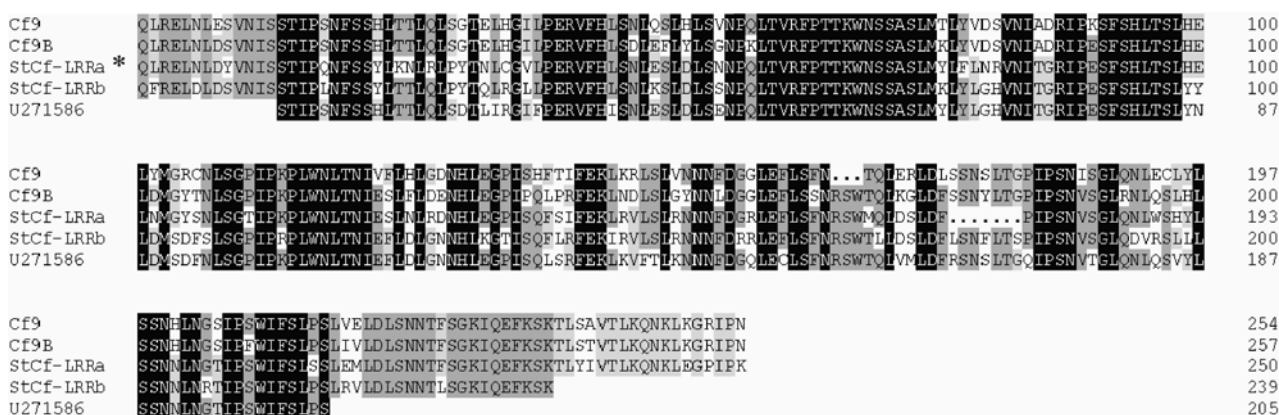
离得到番茄 *Cf-9* 基因 C1 区域的 3 个同源片断。

1 材料与方法

将从市场购买的马铃薯(品种名未知)种于土壤中让其萌发,取植株的叶片用 CTAB 方法提取 DNA。根据 *Cf-9* 与 *Cf-9B* 基因的核苷酸序列相同区域设计 1 对引物^[4,6],经 PCR 扩增出 *Cf-9* 基因的 LRR5 到 LRR16 间的 814 bp 区域,引物序列为 F:5'-TTGAAGT-GCTCCTTAAGAACTTGAC-3'; R:5'-TGTAGGTTCTTCT-GGTTTAGGAGTG-3'。用 TA 克隆法将 PCR 产物连接于 pCR2.1 载体上,蓝白斑筛选,挑选 8 个阳性克隆用 M13 引物进行测序。对序列进行组装,得到与 *Cf-9* 同源的 2 个不同序列片断,分别命名为 StCf-LRRa 及 StCf-LRRb。用 *Cf-9* 序列对 SGN 网站(www.sgn.cornell.edu)中的马铃薯的 EST 组装序列(unigene)进行 blastn 搜索,得到与上 2 个序列不同的 *Cf-9* 同源序列 U271586。用 DNAMAN 软件对所有序列在核苷酸及氨基酸水平进行比对,并进行聚类分析。

2 结果与分析

StCf-LRRa、StCf-LRRb 及 U271586 在核苷酸水平上与 *Cf-9* 的相似度大于 85% (去除缺失部分),在氨基酸水平上与 *Cf-9* 及 *Cf-9B* 蛋白的相似度大于 75% (图 1 及图 2)。StCf-LRRa 长为 797 bp,可能源自 1 个假基因,因为序列中部出现 1 个 17 bp 的缺失,使得阅读框移码而出现 2 个终止密码子; StCf-LRRb 长为 736 bp,比预期的 814 bp 要短,尾部丢失包括引物在内的 78 bp,可能是由于 PCR 产物断裂所致。U271586 仅有 656 bp,由 2 个 EST 组装而成;与 *Cf9* 蛋白比较, U271586 的预测蛋白对应于 *Cf9* 的 LRR6-LRR14,之后突然跳跃到 LRR27,因此, U271586 可能代表一类新的 *Cf* 同源基因。进一步对数据库 EST 分析发现, U271586 的一个成员 EST 来自晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 接种的马铃薯叶片 cDNA 文库,而在其他文库中不表达,预示着其功能可能与抗病性有关。



* StCf-LRRa 中的编码框移位被调整,以便于序列比较

* The frame-shift in StCf-LRRa was adjusted to enable the alignment

图 1 马铃薯及番茄 *Cf 9*-LRR 的序列比较

Fig. 1 Alignment of predicted potato *Cf 9*-LRRs and tomato *Cf-9* and *Cf-9B* LRRs

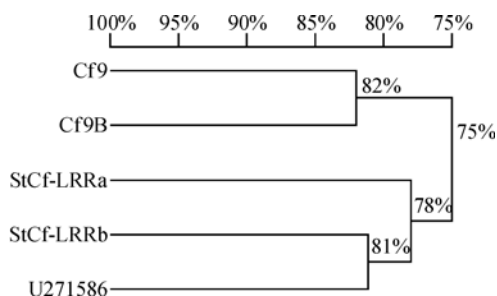


图 2 马铃薯及番茄 *Cf9*-LRR 的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of *Cf9*-LRRs from potato and tomato

对得到的马铃薯序列及已报道的番茄 *Cf-9* 及 *Cf-9B*^[4,6] 的对应蛋白质序列进行聚类分析发现, 2 个来自于番茄的序列聚为一类, 而 3 个来自马铃薯的序列聚为一类(图 2), 说明马铃薯和番茄的 *Cf* 基因

已发生了较大程度的分化。对所预测的氨基酸序列进行分析, 马铃薯序列中出现 LxxLxxLxxLxLxxNx-LxGxIPxx 重复, 具有与 *Cf9* 类似的 LRR 结构域的典型特征。马铃薯与番茄间有些区段氨基酸序列非常保守, 而有些区域则差异较大; 进一步与 NCBI 数据库收录的不同番茄材料来源的 31 个 *Cf* 同源基因编码的蛋白比较, 克隆得到的 257 个氨基酸位点上有 39 个氨基酸是马铃薯所特有的(本文未具体列出)。

本文报道了从马铃薯中克隆得到番茄 *Cf* 基因的同源片断, 所发现的马铃薯特有氨基酸是否与马铃薯对叶霉病表现为非寄主抗性有关值得深入研究, 后续研究将利用这些片段与 *Cf-9* 及 *Cf-9B* 进行结构域交换 (domain swapping) 或定点突变, 再运用

渗入法 (agroinfiltration) 进行瞬时表达, 从而研究马铃薯特有氨基酸残基对抗病反应的影响。

参考文献:

- [1] VAN DER BIEZEN E A, JONES J D G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept [J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23:454-456.
- [2] RIVAS S, THOMAS C M. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum* [J]. Annu Rev Phytopathol, 2005, 43:395-436.
- [3] HAMMOND-KOSACK K E, TANG S J, HARRISON K, et al. The tomato *Cf*-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product Avr9 [J]. Plant Cell, 1998, 10:1251-1266.
- [4] PARNISKE M, HAMMOND-KOSACK K E, GOLSTEIN C, et al. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the *Cf*-4/9 locus of tomato [J]. Cell, 1997, 91:821-832.
- [5] TOMAS C M, JONES D A, PARNISKE M, et al. Characterization of the tomato *Cf*-4 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in *Cf*-4 and *Cf*-9 [J]. Plant Cell, 1997, 9:2209-2224.
- [6] JONES D A, THOMAS C M, HAMMOND-KOSACK K E, et al. Isolation of the tomato *Cf*-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging [J]. Science, 1997, 266:789-793.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 116 页)

参考文献:

- [1] 胡松华. 蝴蝶兰:品种 栽培 鉴赏[M]. 广东:广东科技出版社,2001:1-5.
- [2] 郭凤芝,冯会,姜翠翠,等. 花卉香味基因工程研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2006,2(1):25-28.
- [3] BEEN C G, KIM H Y. Breeding of scent phalaenopsis and fragrance pattern analysis by GC/SAW electronic-nose system [J]. J Kor Flower Res Soc, 2003, 11(2):183-189.
- [4] 范燕萍,余让才,黄蕴,等. 姜花挥发性成分的固相微萃取-气相色谱质谱分析[J]. 园艺学报,2003,30(4):475.
- [5] GLENN P S, MICHAEL O H Jr, STEFAN B, et al. Chemistry and geographic variation of floral scent in *Yucca filamentosa* (Agavaceae) [J]. American Journal of Botany, 2005, 92(10):1624-1631.
- [6] 杨荣华. 白柠檬果皮油特征香气成分的评价[J]. 食品与发酵工业,2000,26(3):31-34.
- [7] HIROTOSHI T, SUMITRA B, TAKUMI Y, et al. The volatile constituents in the peel and pulp of a green thai mango, khieo sawoei cultivar (*Mangifera indica* L.) [J]. Food Sci Technol Res, 2001,7(1):72-77.
- [8] 李瑞红,范燕萍. 白姜花不同开花时期的香味组分及其变化[J]. 植物生理学通讯,2007,43(1):176-180.

【责任编辑 柴 焰】