

番茄 *myb* 基因片段的克隆及在过敏性反应时的表达

蔡新忠¹ 徐幼平² 楼 健²

(¹ 浙江大学植物保护系, 杭州 310029; ² 浙江大学分析测试中心, 杭州 310029)

摘 要: 以烟草 *myb1* 中 MYB 保守区域编码序列的两个相对特异性序列为引物, 以表现过敏性反应 (hypersensitive response, HR) 的番茄苗中提取的 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获取长度为 215 bp 的 *myb* 基因片段 *LeMYB1* 和 *LeMYB2* (GenBank 核酸序列数据库登录号: AY131230 和 AY131231)。两者只有第 63 位碱基不同, 前者序列为 A, 而后者为 G。Northern 杂交分析表明, *LeMYB* 相关基因表达时序与番茄苗 HR 的产生和发展呈密切正相关, 因而可能在 *Gf-9* 决定的 HR 和抗病性产生中起调节作用。

关键词: 番茄; *LeMYB*; 转录因子; 基因表达; *Gf-9*; 过敏性反应

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0589-03

1 目的、材料与方法

植物 MYB 转录因子是动物 c-MYB 原癌基因产物的类似物, 在植物过敏性反应 (hypersensitive response, HR) 和植物抗病性产生中起重要调节作用^[1,2]。为研究转录因子在植物抗病基因 (resistance gene, R) 决定的抗病性中的作用, 通过 RT-PCR 方法克隆了两个番茄 *myb* 片段, 并分析了相关基因在番茄苗中 HR 产生和扩展时的动态表达。

分别以 MM-CF9 植株和转番茄叶霉菌 (*Cladosporium fulvum*) *Avr9* 基因的 MM-CF0 植株为父本和母本进行杂交, 获取含 *Avr9/Gf-9* 基因对的番茄种子^[3]。种子催芽后播于育苗盘, 置于 25 ℃, 光 16 h/暗 8 h 周期的温室中培养。番茄苗分别于露土 1~6 d 逐天取样, 按 Cai 等的方法进行总 RNA 的分离, 凝胶电泳, 杂交膜的印迹, 探针的制备^[4]。用于杂交分析的探针包括本研究中克隆的 *LeMYB1* cDNA 以及萝卜 18S rDNA 1.7 kb *EcoRI* 片段。探针与印迹膜于 65 ℃ 杂交 15 h, 再于 65 ℃, 含 0.1% SDS 的 3 ×SSC, 1 ×SSC 和 0.5 ×SSC 依次洗涤 15 min。然后 -80 ℃ 放射自显影于 Kodak XAR5 胶片。

选择烟草 *myb1* 中 MYB 保守区域的相对特异性序列作为引物。一对为 *myb* 保守的 DNA 结合域序列。上游引物 *mybE* 序列为: 5'-GGCTGGACTATTGAGATCCGG-3'。下游引物 *mybG* 序列为: 5'-TCTCTICAAAGTGGGTGTGCC-3'。另一对引物为 DNA 结合域外侧非保守域序列。上游引物 *mybC* 序列为: 5'-TCCTTGTTGTGAGAAAATGG-3'。下游引物 *mybD* 序列为: AGGAGCTAGCACTGGGCTATC-3'。RT-PCR 采用 SUPERSCRIPT™ ONE-STEP™ RT-PCR 试剂盒 (Life Technologies, Inc.), 先于 50 ℃ 反应 30 min, cDNA 合成后于 94 ℃ 预变性 2 min, 再按 94 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 反应 30 个循环。PCR 产物通过琼脂糖凝胶分离, 回收后与 pGEM-T 载体 (Promega, USA) 连接, 通过 Gene Pulser (Bio-Rad, USA) 电转化感受态大肠杆菌细胞。经氨苄青霉素和蓝白菌落筛选、菌落 PCR 验证等步骤后, 提纯质粒, 通过自动测序系统 (model 373A; Applied Biosystems) 获取序列。通过 BLAST 软件 (NCBI, USA) 进行同源序列的搜索。

2 结果与分析

2.1 番茄 *myb* 基因片段的克隆和序列分析

从露土 4 d 的 *Avr9/Gf-9* 番茄苗中分离总 RNA, 作为 RT-PCR 模板。结果发现, 以 *myb* 保守序列

收稿日期: 2002-09-09; 修回日期: 2003-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070492)

作为引物设计位点的 *mybE*/*mybG* 引物对 RT-PCR 反应形成长约 220 bp 的特异性产物, 而以单引物, 无反转录酶和无 RNA 模板对照的非保守序列作为引物设计位点的 *mybC*/*mybD* 引物, 对 RT-PCR 反应不形成任何产物。

PCR 产物经过多次序列测定, 发现其包含长度均为 215 bp 的两种序列, 称为 *LeMYB1* 和 *LeMYB2*。两者只有第 63 位碱基不同。前者序列为 A, 后者为 G。此为单核苷酸突变导致。前者序列为天冬氨酸 (GAT), 后者则为甘氨酸 (GGT)。*LeMYB1* 和 *LeMYB2* 在 GenBank 核酸序列数据库^[5] 的登录号分别为 AY131230 和 AY131231。*LeMYB1* 序列见图 1, 包含 *myb* 保守重复序列 R2 的最后部分及重复序列 R3。

```

G GCT GGA CTA TTG AGA TGC GGA AAG AGT TGC AGA TTG CGA TGG ACT AAT TAT
  A G L L R C G K S C R I R W T N Y
TTG CGT CCA GAT ATA AAG AGA GGA AAT TTC ACC AAA GAA GAA GAA GAC ACT
L R P D I K R G N F T K E E E D T
ATA ATC AAG CTT CAT GAA AAT CTT GGC AAT AGA TGG TCC GCA ATA GCA GCA AGA
I I K L H E N L G N R W S A I A A R
TTA CCA GGA CGA ACA GAT AAT GAA ATA AAA AAC ATT TGG CAC ACC CAC TTG AAG
L P G R T D N E I K N I W H T H L K
AAGA
K

```

图 1 *LeMYB1* 的 cDNA 和氨基酸序列

LeMYB1 和 *LeMYB2* 的差异序列以加框表示。

Fig. 1 cDNA and predicted amino acid sequence of *LeMYB1*

Framed are the sequence of *LeMYB1* distinct from that of *LeMYB2*.

通过 BLAST 搜索发现, *LeMYB1* 与已报道植物 *myb* 的相应片段有很高的序列一致性。尽管 RT-PCR 引物完全按烟草 *myb1* 序列设计, 但 *LeMYB1* 与一致性最高的不是烟草 *myb1*, 而是番茄 *THM18* 基因, 两者在 DNA 序列上仅于上游引物序列第一个核苷酸及下游引物中 2 个核苷酸不同, 其余 212 个核苷酸完全一致。上游引物核苷酸因不在已知编码框内, 故不知是否导致氨基酸变化。下游引物中一个核苷酸导致相应氨基酸的变化, 另一个则没有。*THM* (tomato hypocotyl Myb) 是 Lin 等^[6] 获得的 *myb* 相关基因 (片段) 克隆, 其功能尚不清楚。报道的 *THM* 克隆有 14 个。*LeMYB1* 与 *THM* 序列 (*THM18* 除外) 一致性明显低, 而与烟草 *myb1* 序列在 DNA 或氨基酸水平均有明显区别。

2.2 *LeMYB1* 相关基因在 *Avr9*/*Cf-9* 番茄苗中的表达

为了观察 *LeMYB1* 相关基因在 *Cf-9* 决定的 HR 和抗病性中的作用, 以克隆的 *LeMYB1* cDNA 为探针进行了 Northern 杂交分析。总 RNA 分离自两类番茄苗。一类只含 *Avr9* 或 *Cf-9* 基因, 它们不会产生 HR。另一类同含 *Avr9* 和 *Cf-9* 基因, 该苗随互补基因对 *Avr9*/*Cf-9* 的表达, 激活抗病反应和 HR^[3]。如图 2 所示, *LeMYB1* 相关基因在只含 *Avr9* 或 *Cf-9* 基因的番茄苗中有较低水平的组成性表达。但在

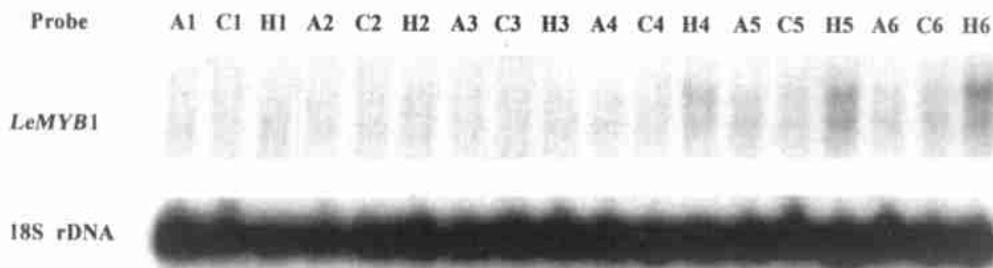


图 2 *LeMYB1* 相关基因在番茄苗中的表达

总 RNA 分别分离自露土 1~6 d 只含 *Avr9* (A) 或 *Cf-9* (C) 以及同含 *Avr9*/*Cf-9* (H) 的番茄苗。

Fig. 2 Expression of *LeMYB1*-related genes in tomato seedlings

Total RNA was isolated from tomato seedlings containing *Avr9* (A), *Cf-9* (C) and both *Avr9* and *Cf-9* (H) at

1 to 6 days after emergence of hypocotyls above soil.

Avr9/ Cf-9 苗中的表达与其 HR 坏死斑产生扩展时序呈密切正相关。*Avr9/ Cf-9* 苗在露土 4 d 时，极少数坏死斑点出现于子叶背面，此时 *LeMYB1* 相关基因的表达明显受到诱导。此后子叶坏死小斑增大，数目增多，*LeMYB1* 相关基因的表达水平也随着增高（图 2）。说明 *LeMYB1* 相关基因可能在 *Cf-9* 决定的 HR 和抗病性产生中起调节作用。*LeMYB1* 相关基因的克隆将为该基因的功能研究奠定必要基础。图 2 显示杂交信号包括两条带，说明 *LeMYB1* 相关基因不止一个，可能为基因家族中的一员。这与该片段编码 *myb* 保守序列，而且本研究克隆到 *LeMYB2* 的事实相符。也与以烟草 *myb1* 为探针的 Northern 分析中发现有两条杂交带的报道相似^[2]。

参考文献：

- 1 Somssich I E, Hahlbrock K. Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.*, 1998, 3: 86 ~ 90
- 2 Yang Y, Klessig D F. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 1996, 93: 14973 ~ 14977
- 3 Cai X, Takken FL W, Joosten M H A J, et al. Specific recognition of AVR4 and AVR9 results in distinct patterns of hypersensitive cell death in tomato, but similar patterns of defence-related gene expression. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2 (2): 77 ~ 86
- 4 Cai X, Xu Y. *Avr/ Cf* interaction induces expression of *Pti*, genes encoding *pti*-interactors. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44 (5): 628 ~ 630
- 5 Benson D A, Karsch-Mizrachi I, Lipman D J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 32 (1): 23 ~ 27
- 6 Lin Q, Hamilton W D O, Merryweather A. Cloning and initial characterization of 14 *myb*-related cDNAs from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Ailsa Craig). *Plant Mol. Biol.*, 1996, 30: 1009 ~ 1020

Cloning of Tomato *myb* Gene Fragments and Expression upon Development of Hypersensitive Response

Cai Xinzong¹, Xu Youping², and Lou Jian²

(¹ Department of Plant Protection, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ² Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract : Two 215 bp *myb* gene fragments, *LeMYB1* and *LeMYB2* with GenBank accession No. AY131230 and AY131231 respectively, were cloned through RT-PCR. The primers were designed in accordance with tobacco *myb1* at the DNA-binding domain conserved in MYB, and the template was the RNA isolated from tomato seedlings showing hypersensitive responses (HR). Only nucleotide 63 was different between the two fragments, of which *LeMYB1* was A and *LeMYB2* was G. Three nucleotides within the primers for cloning of *LeMYB1* were different between *LeMYB1* and counterpart of THM18, whereas 90.7% nucleotide sequence of *LeMYB1* was identical to corresponding parts of tobacco *myb1*. Northern assay revealed that expression of *LeMYB1*-related genes were induced upon occurrence of hypersensitive necrosis in tomato seedlings and enhanced henceforth. Their coincident expression with HR development in tomato indicated that *LeMYB1*-related genes might be involved in regulation of HR and disease resistance conferred by tomato fungal resistance gene *Cf-9*.

Key words : Tomato; *LeMYB*; Transcription factor; Gene expression; *Cf-9*; Hypersensitive response

新书推荐

《基因组》

本书以清晰而简明的写作风格将基因组学的新观点与研究基因表达的传统方法相结合，为基因组作为生命蓝图所起的重要作用提供了最新理解。全书从 3 个方面论述了基因组学的核心主题：基因组的研究方法、基因组的功能、基因组的复制和进化。全书采用大量的图表，形象而简洁，适合各层次的学生使用，是一本必备的现代分子生物学教材。定价：55 元（含邮费）。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。