

番茄抗病基因 $Tm-2^2$ 及其等位基因氨基酸序列的比较

姜国勇^{1*}, 王林华¹, 黄婷婷²

(¹莱阳农学院植物基因工程研究所, 山东青岛 266109; ²青岛农业科学院蔬菜研究所, 山东青岛 266101)

摘要: 从 4 个番茄栽培品种 (*Lycopersicon esculentum* Miller) 中获得了 $Tm-2^2$ 等位基因的同源克隆, 进行序列分析, 结果表明: ‘沙龙’、‘渝抗 2 号’和 ‘97-4’ 分别与 ‘GCR-267’ ($Tm-2^2$)、‘GCR-236’ ($Tm-2$)、以及 ‘GCR-26’ ($m-2$) 有 100% 的同源性, 而樱桃番茄 (*Lycopersicon peruvianum* var *cerasiforme*) 品种 ‘樱红 1 号’ 与 ‘GCR-26’ ($m-2$) 仅有 98% 的同源性; 在 C-端的 LRR 结构域中, 抗病基因 $Tm-2^2$ 和 $Tm-2$ 编码蛋白的氨基酸序列与感病基因 $m-2$ 存在 624 和 704 两个位点的氨基酸差异, 即 624 位点的脯氨酸 (P) 对应亮氨酸 (L)、704 位点的甲硫氨酸 (M) 对应异亮氨酸 (I); 在 601~790 个氨基酸的 LRR 结构域中, 抗病基因 $Tm-2^2$ 、 $Tm-2$ 及其秘鲁种 (*Lycopersicon peruvianum* var *dentatum*) $lpm-2$ 三者均与感病基因 $m-2$ 的编码蛋白存在 23 个氨基酸的差异; 樱桃番茄品种 ‘樱红 1 号’ 与含有 $m-2$ 基因的栽培种之间具有同源性关系。

关键词: 番茄; 抗病基因; $Tm-2^2$ 等位基因; 氨基酸序列

中图分类号: S 641.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 02-0493-04

Comparison of Amino Acid Sequences on Resistant Gene $Tm-2^2$ and Its Alleles

JIANG Guo-yong^{1*}, WANG Lin-hua¹, and HUANG Ting-ting²

(¹Institute of Plant Gene Engineering, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Vegetables Institute, Qingdao Academy of Agricultural Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: Alleles of $Tm-2^2$ from 4 different cultivars were cloned. Sequence analysis of them showed that: Salong, Yukang-2 and 97-4 had 100% identity to reported sequences from GCR267 ($Tm-2^2$), GCR236 ($Tm-2$) and GCR26 ($m-2$), respectively; Cultivar Yinghong 1 had 98% identity to GCR26 ($m-2$); in LRR domain of the encoded proteins, the resistant alleles $Tm-2^2$ and $Tm-2$ have two amino acid at sites of 624 and 704 different from that of the susceptible alleles $m-2$, $lpm-2$, in which proline (P) changed to leucine (L) and methionine (M) to isoleucine (I); in LRR domain of the encoded proteins between the sites of 601 and 790, 23 amino acid differences were found among $Tm-2^2$, $Tm-2$, $lpm-2$ and $m-2$; $m-2$ of Yinghong 1 (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) might be an orthologous gene evolved from *Lycopersicon esculentum* cultivars.

Key words: Tomato; Resistant gene; $Tm-2^2$ alleles; Amino acid sequence

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Miller) 的 $Tm-2^2$ 基因是一个属于 NBS-LRR 家族, 对 *Tobamovirus* 属的病毒专化性的抗病基因, 它位于第九号染色体长臂上、与基因 *nv* 紧密连锁。 $Tm-2^2$ 与 $Tm-2$ 及其感病基因 $m-2$ 互为等位基因, 具有 $Tm-2^2$ 基因的番茄感染病毒株系 *TaMV-2a*, 对其它 5 个番茄花叶病毒 (*TaMV*) 却具有抗性 (Weber & fitzner, 1998)。通过烟草 $Tm-2^2$ 转化体的试验发现 (姜国勇和杨仁崔, 2003), 转化体的 $Tm-2^2$ 基因与病毒无毒基因 *MP* 相互作用时, 病毒移动蛋白激发的受体抗病反应与 $Tm-2^2$ 基因的自主启动子有关; 通过比较 *TMV* 和 *TaMV* 病毒不同分离物移动蛋白氨基酸序列的同

收稿日期: 2006-12-28; 修回日期: 2007-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170633); 教育部出国留学人员基金项目

* E-mail: jiangguoyong@hotmail.com

源性可以清楚地看到, C - 端的氨基酸差异决定了病毒的致病性 (Weber & Pfitzner, 1998; 姜国勇和杨仁崔, 2005)。同样, $Tm-2^2$ 及其等位基因 $Tm-2$ 和 $m-2$ 的编码蛋白分别在 NBS 结构域和 LRR 结构域内存在着氨基酸序列的差异 (Lanfemeijer et al, 2003, 2005), 这种差异决定了 $Tm-2^2$ 及其等位基因的抗病或者感病的性状特征。因此, 研究 $Tm-2^2$ 基因及其编码蛋白的氨基酸序列能够在分子水平上了解番茄品种的抗病特性、抗病基因杂交和重组的遗传规律, 加深理解抗病基因编码蛋白对病毒的识别和应答机制, 为抗病基因的应用奠定基础。

1 材料与方 法

试验材料为栽培番茄 (*L. esculentum* Miller) 品种 ‘沙龙’、‘97-4’、‘渝抗 2 号’; 樱桃番茄 (*L. esculentum* var *cerasiforme*) 品种 ‘樱红 1 号’。

采用 CTAB 法提取植株的总 DNA (姜国勇和杨仁崔, 2003)。以提取的 DNA 为模板, 设计引物进行 PCR 扩增。扩增反应体系 50 μ L。扩增的引物序列为: Primer 1: 5'-ATGCTGAAATCTCTCTTA-CATCA GTAA TC-3'; Primer 2: 5'-TCA TTTACTCA GCTTTTAA GCCGT-3';

反应条件与姜国勇和杨仁崔 (2003) 的文献相同。扩增产物用 DNA Gel Extraction Kit (Sangon, 上海) 回收, T4 连接酶 (Takara, Co.Ltd; 大连) 与 pUm-T 或 pUC57 载体 (Sangon, 上海) 连接; 上海生工生物工程服务有限公司测序。测序分别挑取了 4 个克隆, 其中来源于 ‘渝抗 2 号’ 的克隆为 pUC57-Yukang 2, 来源于 ‘沙龙’ 的克隆为 pUC57-Salong, 来源于 ‘97-4’ 的克隆为 pUm-T-974, 来源于 ‘樱红 1 号’ 的克隆为 pUm-T-Yinghong1。

3 个番茄株系 ‘GCR267’ ($Tm-2^2$, AF536201)、‘GCR236’ ($Tm-2$, AF536200)、‘GCR26’ ($m-2$, AF536199) 和秘鲁野生种 (*L. peruvianum* var *dentatum*) ($lpm-2$, AY765395) 的核苷酸序列来源于 NCBI (www.ncbi.nlm.gov) 的数据库, 应用 DNAMAN 软件分析氨基酸序列。

2 结果与分析

2.1 $Tm-2^2$ 等位基因的克隆及其酶切验证

经过 PCR 特异扩增, 栽培番茄 ‘渝抗 2 号’、‘沙龙’ 和 ‘97-4’ 以及樱桃番茄 ‘樱红 1 号’ 均获得高纯度、单一的 2 586 bp 扩增产物 (图 1)。分别用 *Pst*I (CTGCA/G) 和 *Sph*I (GCATG/C) 来酶切 2 586 bp 的 PCR 回收产物, 分别获得 1 500 bp 和 1 086 bp 的两段 *Pst*I 酶切片段 (图 2), 以及 558 bp 和 2 028 bp 的 *Sph*I 酶切片段 (图 3)。

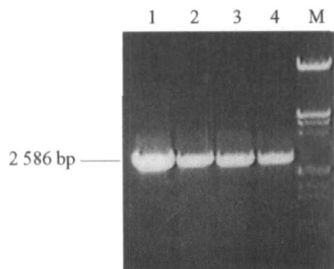


图 2 $Tm-2^2$ 等位基因扩增产物的 *Pst*I 酶切图谱

Fig 2 *Pst*I digestion for PCR products of $Tm-2^2$ alleles

1. Salong; 2. Yukang 2; 3. 974; 4. Yinghong 1.

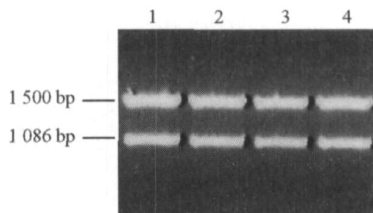


图 1 $Tm-2^2$ 等位基因的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of $Tm-2^2$ alleles

M: DNA Marker *Eco*R I/*Hind*III

1. Salong; 2. Yukang 2; 3. 974; 4. Yinghong 1.

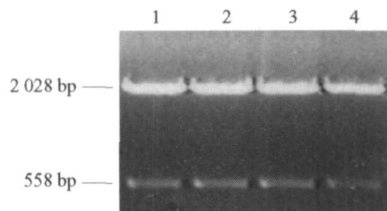


图 3 $Tm-2^2$ 等位基因扩增产物的 *Sph*I 酶切图谱

Fig 3 *Sph*I digestion for PCR products of $Tm-2^2$ alleles

1. Salong; 2. Yukang 2; 3. 974; 4. Yinghong 1.

2.2 *Tm-2* 等位基因的序列比较

对上述 4 个克隆和 Genbank 公布的 ‘GCR267’ (*Tm-2*)、‘GCR236’ (*Tm-2*)、‘GCR26’ (*m-2*) 以及 ‘秘鲁野生种’ (*L. peruvianum* var *dentatum*) (*lpm-2*) 进行氨基酸序列的同源性分析和比较, 结果表明: 来源于品种 ‘沙龙’ 的克隆 pUC57-Sabong 的插入基因序列与 ‘GCR267’ 具有 100% 的同源性; 来源于品种 ‘渝抗 2 号’ 的克隆 pUC57-Yukang 2 的插入基因序列与 ‘GCR236’ 具有 100% 的同源性; 来源于品种 ‘97-4’ 的克隆 pUm-T-974 基因序列与 ‘GCR26’ 具有 100% 的同源性; 而来源于品种 ‘樱红 1 号’ 的克隆 pUm-T-Yinghong 1 基因序列与 ‘GCR26’ 具有 98% 的同源性; 来源于番茄野生种的 *lpm-2* 与 ‘GCR267’ 有 98% 的同源性 (图 4)。

2.3 *Tm-2* 等位基因的 LRR 结构域分析

Tm-2 及其等位基因是一个 NBS-LRR 家族的抗病基因, 富含亮氨酸重复序列 LRR 结构域。对其氨基酸序列进行分析 (图 4, 图 5) 表明, pUC57-Sabong、pUC57-Yukang 2 的插入序列与 ‘GCR267’ 和 ‘GCR236’ 分别具有 *Tm-2* 和 *Tm-2* 基因序列的特征, 与感病基因 *m-2* (‘GCR26’、*lpm-2*) 以及所克隆的栽培品种 ‘97-4’ 和 ‘樱红 1 号’ 的插入序列存在 624 和 704 两个位点的氨基酸差异, 即 *Tm-2* 和 *Tm-2* 基因序列的 624 位点是脯氨酸 (P)、704 位点的甲硫氨酸 (M); 而感病基因 *m-2* 是亮氨酸 (L)

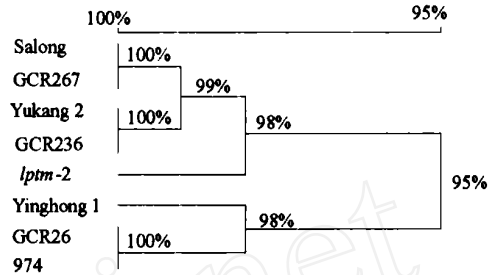


图 4 *Tm-2* 及其等位基因编码蛋白的氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree on completely amino acid sequences encoded by *Tm-2* and its alleles

Salong	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
GCR267	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
Yukang 2	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
GCR236	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
<i>lpm-2</i>	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
Yinghong 1	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
GCR26	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
974	LPNSIVKLTRLETIDIDRRSLIQPPSGVWESKHLRHLCYR	640
Consensus	lpnsivkltrletididrrslq psgvweskhlrhlcyr	
Salong	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
GCR267	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
Yukang 2	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
GCR236	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
<i>lpm-2</i>	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
Yinghong 1	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
GCR26	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
974	RLLRRLINLRKLGILGVSNSTVKMLSIIFSPVLKALEVLKL	720
Consensus	rlrlhrlinlrklgilgvsnsvkmlsifspvlpalkvkl	
Salong	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
GCR267	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
Yukang 2	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
GCR236	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
<i>lpm-2</i>	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
Yinghong 1	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
GCR26	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
974	SESSDPSEQIKLSSYPHIAKLHLNVNRTMALNSQSFPNPL	760
Consensus	f sdpseqi lssyp i klhl nv rt alns fppn	
Salong	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
GCR267	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
Yukang 2	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
GCR236	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
<i>lpm-2</i>	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
Yinghong 1	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
GCR26	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
974	IKLTLAYFSVDRYILAVLKTFFPKLRKLMFICKYNEEKMD	800
Consensus	ikltl f v d lavlkt f pklrklm ickyneekm	

图 5 *Tm-2* 及其等位基因编码蛋白中部分 LRR 结构域的氨基酸序列比较

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences with partial LRR domain encoded by *Tm-2* and its alleles

和异亮氨酸 (I)。秘鲁野生种的 *lpm-2* 基因与栽培品种 ‘GCR267’、‘GCR236’、‘沙龙’以及‘渝抗2号’含有的抗病基因 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 有 98% 的基因序列同源性, 它从第 601 个氨基酸开始到第 790 个氨基酸中至少有 23 个氨基酸与栽培种的等位基因不同。

3 讨论

番茄栽培品种抗病基因 *Tm-2²* 及其等位基因具有 95% 以上的氨基酸同源序列, 表明抗病基因 *Tm-2²* 及其等位基因在进化上是同源的, 抗病基因 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 的形成是由于感病基因 *m-2* 突变的结果, 而这种突变的发生主要是 LRR 结构域中的氨基酸的改变。从同源关系树 (图 4) 可以看出, 栽培品种 ‘GCR267’、‘GCR236’、‘沙龙’以及‘渝抗2号’中含有的抗病基因 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 相互之间具有很高的同源性, 上述 4 个品种的 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 依然与番茄秘鲁野生种的变种 (*L. peruvianum* var. *dentatum*) 的 *lpm-2* 有 98% 的基因序列同源性, 也就是说, 除了第 601 个氨基酸到第 790 个氨基酸之间的 LRR 结构域存在 23 个氨基酸差异外, *Tm-2²* 和 *Tm-2* 基因编码蛋白中的 861 个氨基酸与 *lpm-2* 有相当高的同源性, 所以这一结果同一些学者的观点 (Hall, 1980; Lanfemeijer et al, 2004) 一致, 即 *Tm-2* 基因的抗病性特征来源于番茄秘鲁野生种 (*L. peruvianum*) 的基因突变, 而不是来源于番茄的智利野生种 (*L. chilense*) 的变异株 I.P. 128650 (余诞年等, 1999)。

测序结果还表明, ‘沙龙’和‘渝抗2号’与 GenBank 公布的抗病基因 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 的氨基酸序列 100% 一致, 因此, 可以认为 ‘沙龙’和‘渝抗2号’是分别含有 *Tm-2²* 和 *Tm-2* 的抗病品种。品种 ‘沙龙’含有 *Tm-2²* 基因, 是一个对 TaMV-2 病毒分离物感染, 而对 TaMV-0、TaMV-1、TaMV-2a 病毒分离物具有抗性的品种。从第 601 个氨基酸到第 790 个氨基酸中, *Tm-2²* 和 *Tm-2* 以及 *lpm-2* 至少有 23 个氨基酸与 *m-2* 不同, 在 10% (23 个氨基酸) LRR 结构域发生核苷酸变异, 这一结果表明栽培种 (*L. esculentum* Miller)、樱桃番茄 (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) 与秘鲁野生种 (*L. peruvianum*) 在该结构域内具有显著性的差异。

番茄栽培种 (97-4 和 GCR26) 及其变种樱桃番茄品种 ‘樱红1号’的 *m-2* 的氨基酸序列分析表明, 樱桃番茄作为野生栽培种的变种, 二者的基因序列高度同源 (98%), 也显示它们之间进化的同源关系以及杂交后代的基因稳定性。

References

- Hall T J. 1980. Resistance at *Tm-2* locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica*, 189 - 197.
- Jiang Guo-yong, Yang Ren-cui. 2003. Transgenic tobacco plants expressing tomato *Tm-2²* display resistance specificity to tobamoviruses. *Chinese Journal of Virology*, 19 (4): 365 - 370. (in Chinese)
- 姜国勇, 杨仁崔. 2003. 番茄 *Tm-2²* 基因在烟草中的表达及其对番茄花叶病毒 (TaMV) 的特异性抗性. *病毒学报*, 19 (4): 365 - 370.
- Jiang Guo-yong, Yang Ren-cui. 2005. Tomato R protein *Tm-2²* gene interacting with TaMV movement protein triggered programmed cell death in tobacco transformation. *Acta Microbiologica Sinica*, 45 (2): 301 - 304. (in Chinese)
- 姜国勇, 杨仁崔. 2005. 番茄花叶病毒 TaMV 的移动蛋白诱导 *Tm-2²* 植株程序性细胞死亡. *微生物学报*, 45 (2): 301 - 304.
- Lanfemeijer F C, Dijkhuis J, Sturre M J G, de Haan P, Hille J. 2003. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-2* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*, 52: 1037 - 1049.
- Lanfemeijer F C, Jiang G, Fewerda M A, Dijkhuis J, de Haan P, Yang R, Hille J. 2004. The durable resistance gene *Tm-2* from tomato confers resistance against TaMV in tobacco and preserves its virus specificity. *Plant Science*, 167, 687 - 692.
- Lanfemeijer F C, Wamink J, Hille J. 2005. The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-2²* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 56: 421, 2925 - 2933.
- Weber H, Pfitzner A J. 1998. *Tm-2²* resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact*, 11 (6): 498 - 503.
- Yu Dan-nian, Wu Ding-hua, Chen Zhu-jun. 1999. *Tomato genetics*. Changsha: Hunan Science and Technology Press: 5. (in Chinese)
- 余诞年, 吴定华, 陈竹君. 1999. 番茄遗传学. 长沙: 湖南科学技术出版社: 5.