

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201403048

武安泉, 王俊生, 阮先乐, 等. 番茄 RGA4 蛋白与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的同源比较分析[J]. 广西植物, 2015, 35(3): 420—427

Wu AQ, Wang JS, Ruan XL, *et al.* Homology analysis of tomato RGA4 and potato Rpi-blb1 protein[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3): 420—427

番茄 RGA4 蛋白与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的同源比较分析

武安泉, 王俊生*, 阮先乐, 范小芳, 陈 龙

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

摘要: 为获得番茄抗晚疫病广谱性基因信息, 采用同源电子克隆法, 基于番茄蛋白序列数据库, 以马铃薯晚疫病广谱抗性蛋白 Rpi-blb1 为种子序列, 获得番茄疾病抗性蛋白 RGA4, 并进行基因电子定位和基因结构、模体、二级结构、基因进化及基因电子表达等分析, 以证明两者的进化关系。结果表明: 番茄 RGA4 蛋白(XP_004245923.1)序列具有 NB-ARC 和 LRR_s 两个保守结构域, 定位于第 8 条染色体 SL2.40 区间, 相应基因位于 8 号染色体序列的 57228847—57232935 bp 区间, 长度为 4 089 bp, 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 编码 988 个氨基酸序列, 该蛋白为不稳定分泌球形蛋白; 番茄 RGA4 蛋白和马铃薯 Rpi-blb1 蛋白在二级结构分布、基因序列组成、基因定位等方面相似性较高, 可确定两者为垂直同源关系, 但在基因进化和模体组成方面存在差异, 可能导致两者功能上的不同。研究结果可为番茄晚疫病广谱抗性基因克隆及其利用提供理论依据。

关键词: 番茄; 晚疫病; 垂直同源; 生物信息学分析

中图分类号: Q943.2; S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0420-08

Homology analysis of tomato RGA4 and potato Rpi-blb1 protein

WU An-Quan, WANG Jun-Sheng*, RUAN Xian-Le, FAN Xiao-Fang, CHEN Long

(College of Life Sciences and Agriculture, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Using electronic cloning method, the putative disease resistance protein RGA4 and the homologue of the potato Rpi-blb1 protein were obtained from tomato's protein sequences database in NCBI by protein-blast when the sequence of late blight resistant protein Rpi-blb1 from potato was used as query sequence, then, they were compared in gene mapping, gene structure, modify, secondary structure, topological structure and electronic gene expression profile, etc, for proving their evolutionary relationship. The result showed that tomato RGA4 protein (XP_004245923.1) was composed of 988 amino acid residues with NB ARC and LRR_s conserved domain, the corresponding cDNA sequence (XM-004245875.1) was located on SL2.40 region in the chromosome 8, with genomic DNA length 4 089 bp, the alignment region in chromosome 8 between 57228847—57232935 bp, and composed of two exons and one intron. The tomato RGA4 protein was an unstable globular secretory protein without transmembrane structure. Tomato RGA4 protein was regarded as an orthologous of potato Rpi-blb1 protein because they were similar in secondary structure composition, gene sequence composition, gene mapping, etc, but their minor differences in gene evolution and composition could result in different functions. This study would provide theory for cloning late blight resistant gene and its utilization in tomato breeding of disease resistance.

Key words: *Solanum lycopersicum*; late blight; orthologous; bioinformation analysis

收稿日期: 2014-05-28 修回日期: 2014-08-25

基金项目: 河南省教育厅基金(14B210022); 河南省高校博士科研启动经费(ZKSYBSCX201110)。

作者简介: 武安泉(1973-), 男, 河南西峡人, 硕士, 讲师, 主要从事生物化学教学与研究, (E-mail) wuanquan19@163.com。

通讯作者: 王俊生, 博士, 副教授, 主要从事生物信息学与植物分子育种研究, (E-mail) wjs0099@163.com。

番茄晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 是番茄生产中的主要病害。每年在番茄主产区均造成较大的经济损失, 已成为番茄生产的主要障碍。晚疫病是由致病疫霉菌引起的一种真菌性病害, 在世界范围内广泛分布, 主要危害马铃薯、番茄等茄科作物 (Kamoun *et al.*, 2005)。近年来, 在番茄抗晚疫病基因克隆方面取得了一定进展, 分别克隆了抗番茄晚疫病的几个主效基因如 *Ph-1*、*Ph-2*、*Ph-3* 和 *Ph-4* (Chunwongse *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 1998; Brouwer *et al.*, 2004), 但随后发现番茄中出现了对上述主效基因有抗性的晚疫病菌株 (贾芝琪等, 2009); Zhang *et al.* (2013) 把野生醋栗番茄中获得的抗性基因 *Ph-3* 转入番茄栽培种中使其获得了广谱晚疫病抗性, 并且对其进行了染色体精细定位。然而目前已有的番茄野生资源中, 尚没有发现更好的其他抗性基因, 尤其广谱性晚疫病抗性基因。

近年来, 马铃薯晚疫病的研究取得了较快进展, 已从马铃薯野生种中克隆鉴定出了 20 多个抗性基因 (周军会, 2008), 其中 *Rpi-blb1* 和 *Rpi-blb2* 是从马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中分离出的晚疫病广谱抗性基因 (Van der Vossen *et al.*, 2003, 2005), 且 *Rpi-blb2* 基因被转入番茄中获得了抗马铃薯晚疫病菌株的番茄植株 (Van der Vossen *et al.*, 2005), 证明这种抗性可在番茄和马铃薯之间进行转移, 但是否可以抵抗番茄晚疫病生理小种尚未可知。马铃薯和番茄同属茄科植物, 二倍体物种均具有 12 对染色体, 是比较基因组学研究的很好材料。因此, 本研究为证明番茄栽培种中存在番茄晚疫病广谱抗性基因, 以马铃薯抗病基因 *Rpi-blb1* 的蛋白序列为种子序列, 基于番茄蛋白质序列数据库、基因组数据库、EST 数据库等, 利用生物信息学方法获得了番茄中与马铃薯 *Rpi-blb1* 基因同源的 RGA4 蛋白和基因序列, 并对其基因结构信息、定位信息, 以及同源蛋白质的结构与功能信息进行了深入分析, 为番茄抗晚疫病的分子育种奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 种子序列及其来源

以马铃薯抗晚疫病基因 *Rpi-blb1* (Van der Vossen *et al.*, 2003) (蛋白序列 Accession number 为 AAR29069.1; 970AA, 核酸序列 Accession number

为 AY426259.1) 作为种子序列, 利用 NCBI 网站提供的 BLAST-Protein 工具搜索非冗余的番茄蛋白质序列数据库, 获得番茄 RGA4 蛋白序列与其具有最高的序列相似性 (70%), 与其他所有蛋白的氨基酸序列相似性最高为 35%。

1.2 生物信息学分析软件

通过 Conserved Domain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线工具, 搜索蛋白质序列保守域; 在 BLAST-protein 结果页, 选择所有序列后, 利用 Tree View 功能显示比对序列与同源序列的距离进化树 (采用 Neighbor Joining 法, kimura protein 距离, 序列最大差异值设定为 0.7, 有根树显示); 从 NCBI 主页进入 Genomes & Maps, 链接 Map Viewer, 而后利用番茄 RGA4 序列在其基因组序列数据库中同源比对, 从比对结果中获得定位信息, 或从相应 mRNA 序列 (XM004245875.1) 注释信息中获得基因定位识别号 LOC101251707 进行超链接, 从而获得该基因定位信息和基因结构信息; 在序列定位基础上, 利用 NCBI 中提供的番茄遗传图谱对 RGA4 蛋白序列的标记进行搜索。

利用 ExPASy 网站的 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜区预测; 利用 TargetP 1.1 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 Plant-PLoc 软件 (Chou *et al.*, 2008) 进行亚细胞定位分析; 利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽序列; 利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 软件进行二级结构预测; 利用 NPS (Network Protein Sequence analysis, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>) 提供的 Proscan 进行蛋白模体分析。

1.3 表达分析

利用 GeneBank 数据库中 EST 数据, 通过同源比对获得与番茄 RGA4 核酸序列相似的 EST 序列, 从而推测其表达模式或者利用 Unigene 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) 对其进行电子表达谱分析, 在以上分析基础上, 进一步通过 GEO 数据库 (Gene Expression Omnibus (GEO) Database) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profile/>) 分析 RGA4 相关的表达信息。

2 结果与分析

2.1 番茄 RGA4 蛋白与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白是垂直同源物

2.1.1 序列同源比对和结构域分析 以马铃薯抗晚疫病基因 Rpi-blb1 (基因组序列号 AY426259.1; 7 349 bp) 对应的蛋白质序列 (AAR29069.1) 为种子序列, 在番茄非冗余蛋白质数据库进行 BLASTp 搜索, 发现番茄蛋白序列 XP_004245923.1 (编码 988 个氨基酸), 是与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白相似性最高的同源蛋白 (Identities=70%, E-Value=0) 序列, 其相应的 mRNA 序列为 XM_004245875.1, 基因组序列获取号为 NW_004194350.1, 该蛋白被定义为假定的疾病抗性蛋白 RGA4 蛋白。

通过 Conserved Domain 在线工具, 搜索番茄 RGA4-protein 保守域 (图 1:A), 表明该蛋白序列具有 NB-ARC (151~434 位 AA) 和 LRR-8 (522~579 位 AA) 两个保守结构域, 马铃薯 Rpi-blb1 蛋白序列存在 3 个保守结构域 (图 1:B), 分别为 NB-ARC (154~434 位 AA)、COG4886 (460~614 位 AA) 和 LRR8, 其中 COG4886 实际是一个包含较多亮氨酸的 LRR 域, 因此通过序列相似性和结构域相似性比较推测, 番茄 RGA4-protein (XP_004245923.1) 与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白 (AAR29069) 为同源蛋白, 相应的基因为同源基因。

为进一步确定两者同源关系, 利用马铃薯 Rpi-blb1 蛋白与番茄蛋白数据库中所有的疾病抗性蛋白或晚疫病抗性蛋白构建分子进化树, 结果 (图 2) 表明, 马铃薯 Rpi-blb1 蛋白 (图 2 中红色箭头所指) 与番茄 RGA4 蛋白距离最近 (图 2 中蓝色箭头所指), 尤其两者在 NB-ARC 保守区, 序列具有更高的相似性, 因此推测两者属于垂直同源物。因此我们对番茄 RGA4 蛋白进行生物信息学分析, 以进一步挖掘番茄晚疫病广谱抗性基因信息。

2.1.2 番茄 RGA4 蛋白基因结构与定位分析 番茄 RGA4 蛋白的 mRNA 序列 (XM004245875.1) 注释信息表明, 其对应的基因定位序列识别号为 LOC101251707, 通过对基因序列识别号 LOC101251707 进行超链接, 结果 (图 3) 发现该基因定位于 8 号染色体 SL2.40, 其所在的基因组序列 (contig 群) 为 NC-015445.1, 在基因组序列上的匹配位置为 57228847-57232935, 长度 4 089 bp, 该

基因由 2 个外显子 (编码序列分别长 433 nt 和 2 534 nt) 和 1 个内含子 (内含子位置为 57229441-57230341, 长度为 901 nt) 组成 (图 3), 蛋白编码区 (XP004245923.1, 图 3 中红色部分) 与 NC-015445.1 contig 群内的匹配位置为 57229009-57232874, 长度为 3 866 bp, 编码 988 个氨基酸。进一步利用 NCBI 番茄遗传图谱 (Shirasawa *et al.*, 2010) 上的标记, 将该基因定位在两个 SSR 标记之间 (TES1088 和 TES0349), 间距 0.651 cM。Van der Vossen *et al.* (2003) 研究表明, Rpi-Blb1 基因也是由两个外显子 (编码序列分别长 427 nt 和 2 486 nt) 和一个内含子 (长度 678 nt) 组成的, 并且定位在马铃薯 8 号染色体上。

2.1.3 番茄 RGA4 蛋白亚细胞定位、跨膜区和信号肽分析 用 TargetP 1.1 (默认参数) 进行亚细胞定位, 结果显示番茄 RGA4 蛋白为叶绿体蛋白 (cTP)、线粒体蛋白 (mTP)、分泌途径蛋白 (SP) 和其它任何定位的神经网络分值分别为 0.043、0.052、0.768、0.456, 定位结果为分泌蛋白, 可靠性级别 RC 值为 4, 可靠性不高 (最高级别 RC=1, 最低级别 RC=5), 马铃薯 Rpi-Blb1 蛋白被定位于 SP 蛋白, 可靠性级别 RC 为 3; 进一步用 Plant-PLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantPLoc.cgi>) 进行亚细胞定位分析, 表明 RGA4 蛋白和 Rpi-blb1 蛋白均定位于细胞质。用 TMHMM 软件进行跨膜区预测, 结果显示番茄 RGA4 蛋白和马铃薯 Rpi-Blb1 蛋白均不存在跨膜螺旋区域, 这与利用 “DAS”-Transmembrane Prediction server 预测结果一致; 信号肽分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 表明两者均不存在信号肽序列。

2.1.4 番茄 RGA4 蛋白和马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的二级结构和模体比较 利用 SOPMA 软件对番茄 RGA4 蛋白二级结构进行预测, 结果表明该蛋白二级结构中 α 螺旋、无规则卷曲、扩展束和 β 转角占比分别为 60.73%、30.01%、7.02% 和 2.24%; 马铃薯 Rpi-blb1 蛋白二级结构中 α 螺旋、无规则卷曲、扩展束和 β 转角占比依次为 62.27%、30.01%、7.42% 和 1.86%, 两者二级结构占比很接近; 进一步比较两者的二级结构分布 (图 4), 结果表明两者二级结构在序列中的分布顺序也极其相似, 甚至一致。利用 NPS 提供的 Proscan 对两个蛋白进行模体扫描, 表 1 显示, 番茄 RGA4 蛋白和野生马铃薯 Rpi-blb1 蛋白具有 7 类共同的模体 (modify) 结构, 分别是 N-糖

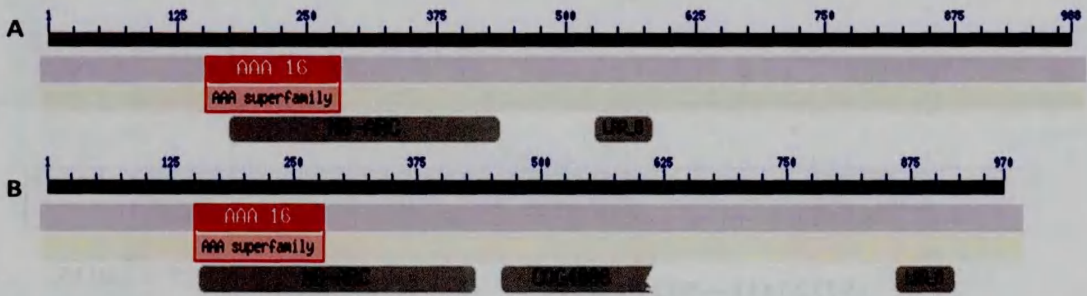


图 1 番茄 Rpi-blb1 蛋白保守结构域

Fig. 1 Conserved domain of tomato Rpi-blb1 protein

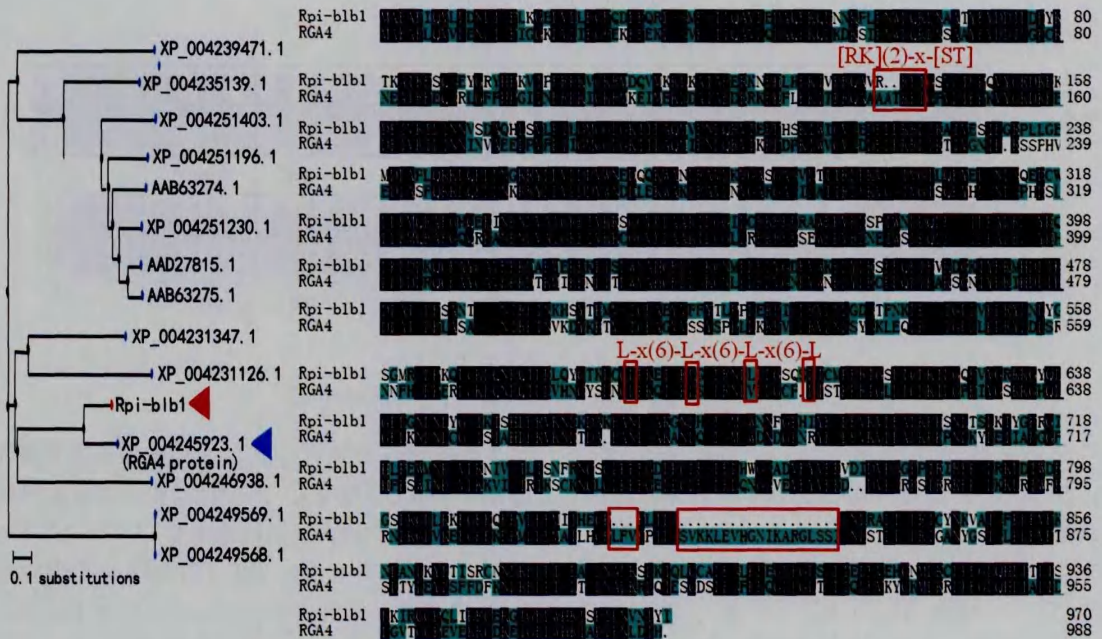


图 2 番茄 RGA4 蛋白是马铃薯 Rpi-blb1 蛋白同源物 Rpi-blb1 表示野生马铃薯来源；RGA4 表示番茄来源。

Fig. 2 Tomato RGA4-protein is the ortholog of potato Rpi-blb1 Rpi-blb1 refers to sources of wild potato; RGA4 refers to the source of tomato in the sequence alignment figure.

基化位点(N-glycosylation site)、蛋白激酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site,) 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site)、N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation site)、酰胺化位点(Amidation site)、ATP/GTP 结合位点(ATP/GTP-binding site motif A (P-loop))、EGF 样结构域,并且每类 modify 在蛋白序列中的数量、相对位置较接近,差异之处在于野生马铃薯 Rpi-blb1 蛋白存在 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site)和 1 个亮氨酸拉链模式(Leucine zipper pattern)。

2.2 番茄 RGA4 蛋白表达分析

2.2.1 番茄 RGA 蛋白的 EST 表达谱 以番茄 RGA4 蛋白相应的 mRNA 序列为种子序列在番茄 EST 数据库中搜索获 13 条相关 EST 序列,相似性在 99% 以上的序列有 8 条(表 2),其中 5 条来自于幼苗发芽 25~40 d 后的愈伤组织,其余 3 条分别来自于叶片,花芽和开放的花朵以及根。进一步利用 Unigene 数据库对其进行电子表达谱分析,表明该基因(蛋白)主要在愈伤组织中表达(表 3),其 TPM 值为 370,而在其他组织中未能检测到该基因的转录本。

2.2.2 番茄 RGA4 蛋白的 GEO profile 进一步在基

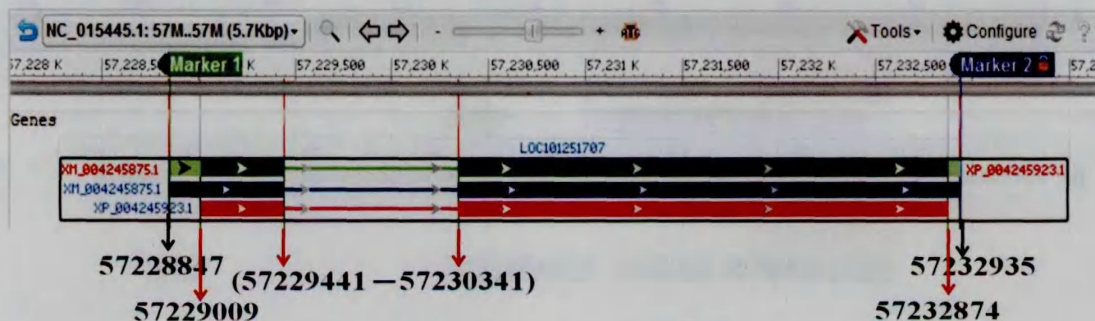


图3 番茄 RGA4 基因序列结构

Fig. 3 Sequence structure of tomato RGA4 gene

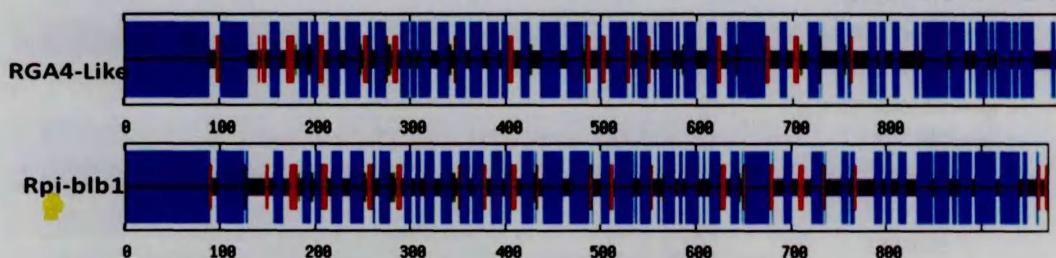


图4 番茄 RGA4 蛋白二级结构预测

Fig. 4 Predicted secondary structure of tomato RGA4 protein

因表达数据库 GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profile/17585487>) 中查询番茄 RGA4 基因表达信息,发现在表达平台 GPL788 内表达模式 GDS1670 (基因克隆号 cLEC32B21, Gb-AC 号为 AW032533,与番茄 RGA4 基因 cDNA 序列完全一致)可以代表番茄 RGA4 基因在平台条件下的表达模式。结果表明,正常番茄植株叶片在未损伤条件下 RGA4 基因表达平均值(GSM13877-13879)高于损伤后的平均表达量,即受机械损伤后该基因表达被抑制;另外,转反义 *Rboh* 基因(呼吸猝发氧化酶)的番茄植株在机械损伤条件下高于不损伤条件下的表达,同时也低于非转基因植株的基因表达量,这表明 *Rboh* 基因能够促进 RGA4 基因的表达。其他数据平台未查询到 RGA4 基因的表达信息。

3 讨论与结论

3.1 番茄 RGA4 蛋白与马铃薯 Rpi-blb1 的垂直同源关系

NB 是指核苷酸结合位点,存在于许多 ATP-或者 GTP-结合蛋白中,例如 Ras 蛋白质,ATP 合成酶

的 β 亚基等(韩德俊等,2005),可能在蛋白质的磷酸化和去磷酸化中改变蛋白的构象,从而调节蛋白质的活性状态。本研究获得的番茄 RGA4 蛋白由 988 个氨基酸组成,具有 NB-ARC 和 LRR8 两个保守结构域,被定位于第 8 号染色体,与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的保守结构域和定位信息相同(Van der Vossen *et al.*, 2005);并且两者在 NB-ARC 保守域内均存在 AAA-ATPase 超级家族的序列特征(图 1),表明两者可能参与这类蛋白质的活化过程。NB-ARC 结构域是植物疾病抗病蛋白中普遍存在的一类保守结构域(王海燕等,2006),LRR8 是一段亮氨酸重复区域,是植物细胞特异性识别病原物无毒基因(Avr)编码蛋白的主要区域(Gerben *et al.*, 2008; Lokossou *et al.*, 2009; 游录鹏等,2012),而且也与植物抗病信号的转导有关(Ade *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2003)。因此,由两者具有共同的保守域和序列特征,推测马铃薯 Rpi-blb1 蛋白和番茄 RGA4 蛋白极可能是垂直同源的。通过对马铃薯 Rpi-blb1 蛋白和番茄蛋白数据库中相似性较高的同源蛋白构建序列进化树(图 2)和二级结构比较分析(图 5),进一步证明两者是垂直同源蛋白,是由共同

表 1 番茄 RGA4 和马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的 modify 比较

Table 1 Comparison of the modify informations between tomato RGA4 protein and potato Rpi-blb1 protein

模体名称 Modify name	模体类型和获取号 Modify type and access number	RGA4 蛋白模体位点信息 Modify information for RGA4 protein	Rpi-blb1 蛋白模体位点信息 Modify information for Rpi-blb1 protein
N-glycosylation site	N-(P)-[ST]-[P] PS00001	12-15;NLTS;533-536;NLSY; 660-663;NDTD;667-670;NLSA;724- 727;NHSV;761-764;NGSV;851- 854;NLST	12-15; NLTS; 168-171; NVSD; 311- 314; NLSQ; 488-491; NTSS; 668-671; NLSA;706-709;NLTS 725-728;NHSV;742-745;NCSC
Protein kinase C phosphorylation site	[ST]-x-[RK] PS00005	133-135; TER; 292-294; TTR; 528- 530; SLR; 593-595; TSK; 598-600; SLR; 632-634; SKK; 669-671; SAK; 733-735; SIR; 738-740; SCK; 779-781; STR; 780-782; TRR; 786-788; SLK; 831-833; SVK; 857-859; SLR	291-293; TTR; 527-529; SLR; 592-594; TSK; 597-599; SLR; 649-651; SIK; 670- 672; SAK; 709-711; SLK; 789-791; SLR; 800-802; SLK; 838-840; SLR; 887-889; SLK; 936-939; SLK
Casein kinase II phos- phorylation site	[ST]-x(2)-[DE] PS00006	84-87; TRFE; 293-296; TRLE; 314-317; SPHD; 369-372; SEWE; 537- 540; SKLE; 545-548; SIGD; 564-567; SLPE; 662-665; TDAE; 868-871; SLPE; 878-871; TYLE; 884-887; SFFD; 917-920; SFPE	87-90; SQSE; 292-295; TRLE; 313- 316; SQED; 544-547; STGD; 653-656; SHLE; 849-852; SFPE; 898-901; SLPE; 909-912; SLTE
N-myristoylation site	G-[EDRKHPFYW]- x(2)-[STAGCN]-[P] PS00008	187-192; GLGKTT; 283-288; GARGAS; 299-304; GSIMGT; 350- 355; GVPLAA; 513-518; GVVSSY; 606-611; GCPLTS; 617-622; GLLTCL; 631-636; GSKKGH; 839- 844; GNIKAR; 861-866; GANYGS	143-148; GSVLTE; 185-190; GLGKTT; 282-287; GASGAS; 298- 303; GSIMGT; 349-354; GVPLAA; 358-363; GGILCF; 596-601; GSLRNL; 617-622; GSLTCL; 673-678; GNLHSL; 799-804; GSKLGL
Amidation site	x-G-[RK]-[RK] PS00009	105-108; IGKR	105-108; VGKR; 253-256; NGKR; 630- 633; VGRK
ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)	[AG]-x(4)-G-K-[ST] PS00017	184-191; GMGGLGKT	182-189; GMGGLGKT
EGF-like domain sig- nature 2 742-753 1 个	C-x-C-x(2)-[GP] -[FYW]-x(4,8)-C PS01186	742-753; CLCLPPFGELPC	743-754; CSLPFPFDLPC
cAMP and cGMP de- pendent protein kinase phosphorylation site	[RK](2)-x-[ST] PS00004	None	139-142; RRET
Leucine zipper pattern	L-x(6)-L-x(6)-L -x(6)-L PS00029	None	588-609; LPKETSILGSLRNL- DGSQSL

祖先种通过物种分化形成的。

3.2 番茄 RGA4 蛋白与马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的进化比较

植物基因组中抗病基因一般具有成簇存在的特点。R 基因簇的出现主要是通过基因座内发生重复和重组、转座子及突变和重新识别循环发生。Van der Vossen *et al.* (2003) 研究表明, 在野生马铃薯 *Rpi-blb1* 基因(RGA2-blb)座位两侧分布有 *RGA3-blb*、*RGA1-blb* 和 *RGA4-blb* 同源基因, 这些基因编码的平行同源蛋白的序列相似性很高(70%~81%), 并且证明 *Rpi-blb1* 基因是祖先基因 *RGA1-blb* 和 *RGA3-blb* 通过重组事件进化而来。而在番茄 RGA4 的下游, 分布着基因 myb family transcription factor APL-like(XP_004245962.1, 282 个 AA), 在其上游区, 依次分布有功能未知的蛋白 XP_004245955.1(具有 DUF1995 结构域, 311AA)、putative disease resistance protein RGA1-like(一个假

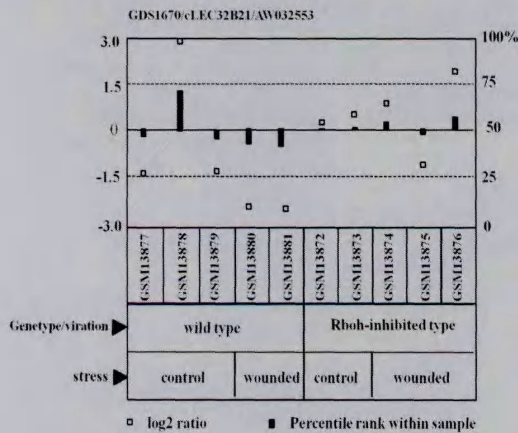
基因, 不编码蛋白质)和疾病抗性蛋白 RGA2-like(XP_004246198.1, 编码 176 个氨基酸, 仅具有一个 NB-ARC 保守结构域, 与 RGA4 具有 66% 的序列相似性, 这些基因编码的蛋白质序列相互间相似性不高, 并不完全成簇分布, 并不存在显著的进化相关。因此番茄 RGA4 基因和马铃薯 *Rpi-blb1* 基因进化事件并不完全一致。

植物受病原菌侵染后, 通过病原识别, 信号转导, 启动下游各种防御机制, 产生 HR(过敏)或抗性反应。因此信号识别是植物 R 蛋白参与病菌互作的重要步骤。在 NBS-LRR 类抗性蛋白中, LRR 域和包含 NBS 域的 N 末端区被认为是 R 类抗性蛋白中识别病原物的重要部位(游录鹏等, 2012), 尤其 LRR 序列作为信号识别序列已经被实验证实(Dodds *et al.*, 2003)。本研究利用 Proscan 软件对两个蛋白进行模体搜寻, 发现马铃薯 *Rpi-blb1* 蛋白存在一个 Leucine zipper patter(L-x(6)-L-x(6)-L-x

表 2 番茄 RGA4 基因的电子表达分析

Table 2 Expression profile of tomato RGA4 gene in different tissues by in silico analysis

Est 序列 获取号 Accession number	同源 EST 表达信息 Homology EST expression information				组织名称 Tissue name	EST 表达谱 EST profile	
	相似性 Identity (%)	来源品种 Cultivar	序列长度 Sequence length (bp)	组织类型 Tissue type		每百万转录本中 的数目 Transcripts per million (TPM)	基因的 EST/总 EST 库 Gene EST/Total EST in pool
AW032184.1	99	TA496	407	幼苗发芽 25~40 d	370	5/13487	
AW032553.1	100	TA496	575	后的愈伤组织	细胞培养 Cell culture	0	0/7343
AW035092.1	99	TA496	152	Callus of seedling	花芽 Floral bud	0	0/2485
AW035099.1	97	TA496	305	after germination	花 Flower	0	0/28266
AW035144.1	99	TA496	631	25-40 d	果实 Fruit	0	0/72062
BP904589.1	100	Micro-Tom	472	叶片 Leaf	叶片 Leaf	0	0/73274
BG630848.1	99	E6203	382	花芽和花	根 Root	0	0/11276
FS203017.1	100	Micro-Tom	121	Floral bud and flower	根 Root	0	0/2952
				根 Root	种子 Seed	0	0/2952



Sample	Title	Value	Rank
GSM13877	Wt Control 1	-0.179515	26
GSM13878	Wt Control 2	1.43029	99
GSM13879	Wt Control 3	-0.289827	28
GSM13880	Wt Systemic Wounded 1	-0.465938	11
GSM13881	Wt Systemic Wounded 2	-0.520769	10
GSM13872	Mut Control 2	0.0621223	53
GSM13873	Mut Control 3	0.0922073	60
GSM13874	Mut Systemic wounded 1	0.183963	68
GSM13875	Mut Systemic wounded 2	-0.15682	32
GSM13876	Mut Systemic wounded 3	0.377401	83

图 5 番茄 RGA4 基因的古O表达模式 GSM13877-13881 为非转基因植株 (GSM13877-13879 为正常对照植株 3 次重复, GSM13780-13781 为受损伤植株 2 次重复) 叶片; GSM13872-13876 为转反义 Rboh 基因(呼吸猝发氧化酶)植株叶片 (GSM13872 和 GSM13873 为未损伤植株 2 次重复, GSM13874-13875 为受伤植株 3 次重复); 红色柱状条表示相应样品中基因表达的相对量(单次基因表达相对于对照平均表达量比值的 Log2 函数值, 值越大表示表达丰度越高, 相反则低); 蓝色方块表示所有样品的基因相对表达量排名。

Fig. 5 GEO expression profile of tomato RGA4 gene GSM13877-13881 is not genetically modified plants blades (GSM13877-13879 is normal controlled plant for 3 repetitions, GSM13780-13781 is the damaged plant for 2 repetitions); GSM13872-13876 for antisense gene Rboh leaves (GSM13872 and GSM13873 are undamaged plant for 2 repetitions; GSM13874-13875 is the injured plant for 3 repetitions); the red columnar samples represent the relative amounts of gene expression in corresponding samples (Log2 function value of the ratio of single gene expression to controlled average expression, the higher value refers to the greater expression amount); Blue squares represent ranking of relative gene expression of the all samples.

(6)-L(表 1, 图 2; B), 而 RGA4 蛋白在该模体序列中第三个亮氨酸(L)被缬氨酸(V)替代(图 2; B), 这可能会导致该 Leucine zipper patter 局部的超二级结构发生变化, 可能会影响局部空间结构和功能改变; 另外番茄 RGA4 蛋白在 823-825 和 831-849 位的两段氨基酸序列(图 2; B)相对于马铃薯 Rpi-blb1 蛋白来说, 属于插入序列, 这也导致了番茄 RGA4 在这一区域形成异常的 LRR-8 结构, 番茄 RGA4 蛋白在这两段序列位置上的异常改变可能会影响其对

病原物的有效识别。另外, 马铃薯 Rpi-blb1 蛋白的 139~142 位氨基酸序列 RRET 是一个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点, 而番茄 RGA4 蛋白相同位置为 AATRET(图 2; B), 不再形成依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点, 这可能会导致番茄栽培种 RGA4 不能识别植物互作过程中产生的信号分子而失去抗晚疫病的能力, 当然, 这一结论尚需要进一步进行试验验证。

根据 RGA4 蛋白同源的 EST 序列信息表明该

基因在叶片、花器官、根以及愈伤组织中均有表达, 这表明该基因表达部位分布较广, 表现组成性表达特点; 利用 Unigene 数据库获得的 EST 表达信息表明该基因仅在愈伤组织中表达, 两者存在较大差异, 这可能与 Unigene 数据库信息量不足有关。利用 GEO 数据库仅获得了与番茄 RGA4 蛋白相关的部分表达信息, 即番茄 RGA4 在植株机械伤害(或胁迫)条件下下调表达, Rboh(呼吸猝发氧化酶)基因能够促进 RGA4 基因的表达。当前结论是利用数据库中现有信息获得的, 因此准确完善地表达信息还需要 EST 数据库和 GEO 表达信息库的不断丰富和完善。更为重要的是, 这些表达信息是我们设计后续实验的基础和参考, 可以避免不必要的重复和浪费, 从而提高实验的目的性和效率。

本研究获得的番茄抗病蛋白 RGA4 蛋白序列(XM00424587.1)是对番茄测序品种 Heinz1706 测序结果翻译获得的, 因此理论上确实是晚疫病抗性蛋白, 所在基因位点是抗性基因位点, 但是否具有抗性基因(或蛋白)的功能与品种本身相关, 因此, 在后续研究中我们将针对该基因位点, 在不同的抗晚疫病番茄栽培品种、野生种之间进行同源基因克隆, 并研究该基因的变异和表达与抗晚疫病的关系, 以其为番茄抗晚疫病分子育种方面提供帮助。

参考文献:

- Ade J, DeYoung B J, Golstein C, *et al.* 2007. Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine rich repeat protein by a bacterial protease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**(7):2 531-2 536
- Brouwer DJ, Jones ES, Clair DAS. 2004. QTL analysis of quantitative resistance to *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato and comparisons with potato[J]. *Genome*, **47**(3):475-492
- Chunwongse J, Chunwongse C, Black L, *et al.* 1998. Mapping of the Ph-3 gene for late blight from *L. pimpinifolium* L3708 [J]. *Rep Tomato Genet Coop*, **48**:963-971
- Dodds PN, Lawrence, GJ, Ellis JG. 2003. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax[J]. *Plant Cell*, **13**:163-178
- Hwang CF, Williamson VM. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi[J]. *Plant J*, **34**(5):585-593
- Gerben V, Ooijen. 2008. Transcomplementation, but not physical association of the CC-NB-ARC and LRR domains of tomato R protein Mi-1.2 is altered by mutations in the ARC2 subdomain [J]. *Mol Plant*, **1**(3):401-410
- Han DJ(韩德俊), Cao L(曹莉), Chen YF(陈耀锋), *et al.* 2005. Molecular basic of interaction between disease resistance gene and avirulence gene(植物抗病基因与病原菌无毒基因互作的分子基础)[J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), **32**(12): 1 319-1 326
- Hwang CF, Williamson VM. 2003. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi[J]. *Plant J*, **34**(5):585-593
- Jia ZQ(贾芝琪), Cui YH(崔艳红), Li Y(李颖), *et al.* 2009. Expression the potato late blight resistant gene R3a, R1 and RB in tomato (马铃薯抗晚疫病基因 R3a, R1 和 RB 在番茄中的表达)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **36**(8):1 153-1 160
- Kamoun S, Smart CD. 2005. Late blight of potato and tomato in the genomics era[J]. *Plant Dis*, **89**(7):692-699
- Chou KC, Shen HB. 2008. Cell-PLoc: a package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms[J]. *Nat Protocols*, **3**:153-162
- Lokossou AA, Park TH, Van Arkel G, *et al.* 2009. Exploiting knowledge of R/Avr genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV[J]. *Mol Plant Micro Inter*, **22**(6):630-641
- Moreau P, Thoquet P, Oliver J, *et al.* 1998. Genetic mapping of Ph-2, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato[J]. *Mol Plant Micro Inter*, **11**(4):259-269
- Shirasawa K, Asamizu E, Fukuoka H, *et al.* 2010. An interspecific linkage map of SSR and intronic polymorphism markers in tomato[J]. *Theor Appl Genet*, **121**(4):731-739
- Van der Vossen EA, Sikkema A, Hekkert B, *et al.* 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato[J]. *Plant J*, **36**(6):867-882
- Van der Vossen EA, Gros J, Sikkema A, *et al.* 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato [J]. *Plant J*, **44**(2):208-222
- Wang HY(王海燕), Yang WX(杨文香), Liu DQ(刘大群), *et al.* 2006. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene homolog sequences from wheat(小麦 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **39**(8):1 558-1 564
- You LP(游录鹏), Miao Q(苗婧), Zhou AL(邹爱兰), *et al.* 2012. Nucleotide polymorphism and molecular evolution of the LRR region in potato late blight resistance gene Rpi-blb2(马铃薯抗晚疫病基因 Rpi-blb2 的 LRR 区域多态性及分子进化分析)[J]. *Hereditas* (遗传), **34**(4):485-494
- Zhang C, Liu L, Zheng Z, *et al.* 2013. Fine mapping of the Ph-3 gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato[J]. *Theor Appl Genet*, **126**(10):2 643-2 653
- Zhou JH(周军会). 2008. Advancement of late blight resistance genes in potato(马铃薯晚疫病抗病基因研究进展)[J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报), **5**:13-17