

# 番茄抗叶霉病基因 *Cf-7* 分子标记及片段克隆

张晓烜, 许向阳, 王傲雪, 李景富

(东北农业大学 成栋学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 用 RAPD 方法对番茄抗叶霉病基因 *Cf-7* 进行了分子标记, 得到了 2 个标记, 其中 S429/650 与 *Cf-7* 的遗传距离为 5.3 cM, 并对此片段进行克隆、测序, 此片段长 618 bp。

**关键词:** 叶霉病; *Cf-7*; RAPD

**中图分类号:** Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0130-03

番茄叶霉病(*Fulvia fulva* (Cook))是番茄生产中普遍发生的病害。番茄叶霉病发病率很高, 且传播迅速, 番茄叶霉病菌具有明显的生理分化现象, 能分化出许多生理小种, 是目前蔬菜病害中病菌分化最明显的病害之一。随着抗病品种的推广应用, 选择压力给病原菌生理小种的适应提供了条件, 从而使优势小种发生变化, 病原菌小种逐渐向高层次分化, 使得生产中应用的抗病品种很快被新的生理小种攻克, 成为感病品种。李桂英等<sup>[1]</sup>对发生于我国东北三省的番茄叶霉病菌的生理小种分化情况进行调查分析, 鉴定结果表明东北三省主流生理小种是 1.2.3。孟凡娟等<sup>[2]</sup>重新调查了东北三省番茄叶霉病菌生理小种的分化情况, 鉴定结果表明东北三省目前主流生理小种为 1.2.3.4。

目前有效防止叶霉病的方法是培育抗病品种。自 1930 年以来, 世界各地不断有抗叶霉病的品种应用于生产。但用传统育种方法培育抗病品种通常需要较长的时间, 并且在此期间生理小种不断分化, 给抗病育种带来巨大的压力。而分子标记辅助选择体系的建立为解决以上问题提供了可能性。这是因为分子标记选择方法可以在苗期就进行大量的鉴定, 不受时间、地域的限制, 加速了育种工作的进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**番茄材料:** 只含有 *Cf-7* 基因的抗病亲本 03037、感病亲本 03473 以及由 03037 和 03473 杂交的 F<sub>2</sub> 代单株。上述材料均由东北农业大学园艺系番茄课题组提供。

**病原材料:** 叶霉病菌是由番茄课题组搜集的东北三省的优势生理小种 1.2.3.4。

**试剂:** 10 个碱基的随机引物为上海生工生物工程公司的产品, dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶购自广州宝泰克生物工程公司, PGEM-T Easy 试剂盒购自 Promega 公司, 胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒均购自上海华舜生物工程有限公司, 其它试剂为国产分析纯试剂和 Sigma 公司产品。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 抗病性鉴定** 取保存的番茄叶霉病菌 1.2.3.4 生理小种, 用蒸馏水洗成孢子悬浮液, 孢子浓度为  $1 \times 10^7$  /mL 孢子, 接种于抗病亲本和感病亲本及 F<sub>2</sub> 代群体。15 d 后调查发病情况。将 F<sub>2</sub> 分抗病和感病两级。

**1.2.2 叶片总 DNA 的提取** 将供试材料播种于温室待幼苗长出 3~4 片真叶时, 称取新鲜的番茄叶片 100~200 mg, 总 DNA 的提取参照《植物基因工程》(王关林) SDS 法, 并加以修改进行。

**1.2.3 RAPD 分析和电泳检测** 随机引物筛选采用 Michermore 的混合分组分析法(BSA)进行, 首先筛选在亲本间存在多态性的引物。然后对入选引物再通过抗感池进行筛选。扩增体系为 20  $\mu$ L。反应液组成为: 2.0  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 0.25 mM/L dNTPs, 2.0 mM/L MgCl<sub>2</sub>, 1 U *Taq* DNA 聚合酶(宝泰克公司), 15 ng/ $\mu$ L 随机引物(上海生工生物工程公司), 40 ng 模板 DNA。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应在美国 PE 公司生产的 PE-480 型扩增仪上进行, 扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 溴化乙锭染色后, 在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。

**1.2.4 RAPD 特异片段的克隆和测序** PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外灯下小心切下目的条带, 用上海华舜生物工程有限公司胶回收试剂盒进行回收 RAPD 特异片段, 回收后取 3  $\mu$ L 检测回收 DNA 的质量。纯化后用 PGEM-T Easy 载体连接, 转化于大肠杆菌 *E. coli* JM109 菌株上。测序由鼎国生物公司在 ABI Prism 377 DNA Sequence 上进行, 用 T7 Primer 和 SP6 Reverse Primer 进行双向测序, 根据序列间的重叠

**第一作者简介:** 张晓烜(1978-), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向生物技术。

**通讯作者:** 李景富(1943-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为蔬菜遗传育种及生物技术。

**基金项目:** 国家“863”计划资助项目(2001AA241122)。

**收稿日期:** 2011-01-11

部分读完全序列。

2 结果与分析

2.1 番茄叶霉病抗性的遗传规律

在感病亲本 03473 充分发病的情况下, 参照抗病亲本 03037(只含有 *Cf-7* 基因)的抗病表现对 F<sub>2</sub> 群体 179 个单株进行了抗叶霉病鉴定, 其中 133 株表现为抗病, 46 株感病。进行  $\chi^2$  检测, 基本符合 3 : 1 的比例。以上的分析结果表明, 父本 03037 对番茄叶霉病菌 1. 2. 3. 4 生理小种的抗性是由显性单基因控制的。

2.2 供试材料的 RAPD 分析

筛选了上海生工生物工程公司的 9 组共 180 条随机引物, 对抗感亲本进行 RAPD 分析, 3 次重复, 有 12 条引物能在抗感亲本间扩增出多态性条带, 占全部引物的 7.5%。然后将亲本间筛选出的 12 条多态性引物到抗感池进行复选, 经 3 次重复结果一致, 得到了 2 个特异引物 S429 和 S96。其中引物 S429 扩增的特异带清晰且重复性好, 此特异片断的分子量约为 650 bp 左右, 将其命名 S429/650, 初步断定 S429/650 与 *Cf-7* 基因存在连锁。

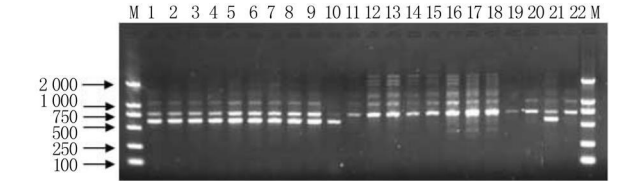


图1 引物 S429 的扩增结果

注 M. 分子量标准; 1~10 抗病单株 11~20 感病单株 21 抗池 22 感池。

用引物 S429 对 179 个 F<sub>2</sub> 单株分别进行 RAPD 扩增, 结果表明 133 个抗病单株中, 127 株有特异带 (S429/650), 6 株无特异带; 46 株感病单株中, 43 株无特异带, 3 株有特异带, 即 179 株中有 9 株重组株, 重组率为 5.03%。利用 MAPMAKER 3.0 软件 (Lander 等, 1987), 临界 LOD 值取 3.0, 并用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位厘摩 (cM)。并用 Mapchart 2.1 进行作图。结果表明, S429/650 与抗病基因 (*Cf-7*) 的遗传距离分别为 5.3 cM, 说明该 RAPD 标记与抗病基因之间存在紧密连锁。

表 1 *Cf-7* 基因与 S429/650 的遗传距离测定结果

<i>Cf<sub>7</sub></i>	S429/650	F <sub>2</sub> 植株数	重组株数	重组率 %	遗传距离 cM
+	+	127			
+	-	6	9	5.03	5.3
-	+	3			
-	-	43			

注 “+”, 代表有“-”, 代表无。

2.3 番茄抗叶霉病 RAPD 特异片段的克隆与序列分析

2.3.1 S429/650 片断的克隆 PCR 产物用上海华舜生物工程有限公司的胶回收试剂盒进行回收, 回收的目的条带用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测 (图 2), 由图 2 可知回收的目的片段完好, 特异性很高。回收产物与 pGEM-T Easy 载体连接, 4℃ 连接过夜; 取 5 μL 转化大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 平

板培养基上 37℃ 倒置培养过夜, 并结合 X-gal 和 IPTG 进行显色反应, 用蓝白斑初步筛选出含有目的基因片段的阳性克隆。经电泳检测, 回收产物中含有约 650 bp 的目的片段。

2.3.2 重组子的 PCR 鉴定 为了快速鉴定筛选阳性克隆, 在 PCR 管中快速加好扩增反应的各种试剂, 然后用无菌枪头挑取小部分菌落, 在小管中吹吸几次, 以 ddH<sub>2</sub>O 为对照, 以正常 PCR 程序进行 PCR 扩增, 扩增出目的基因片段的菌落振荡培养提取质粒进行酶切鉴定, 结果如图 3 所示 (图 3)。

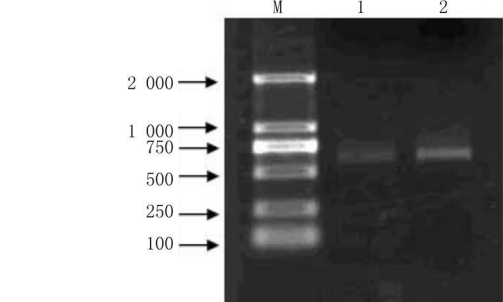


图2 胶回收结果 1~2 片段 S429/650

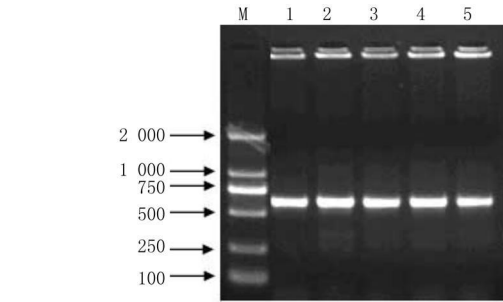


图3 重组子 PCR 扩增结果 1~5 道为特异片段

2.3.3 质粒的酶切鉴定 取通过菌落 PCR 筛选出阳性克隆菌落, 接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃ 170 r/min 振荡培养过夜, 分别提取质粒; 用 *Eco*RI 进行单酶切鉴定, 单酶切得到了 2 条片段, 大的片段是载体片段, 大小为 3 kb 左右, 小的片段是目的基因片段, 大小为 0.65 kb 左右, 说明目的基因片段插入到克隆载体中 (图 4)。

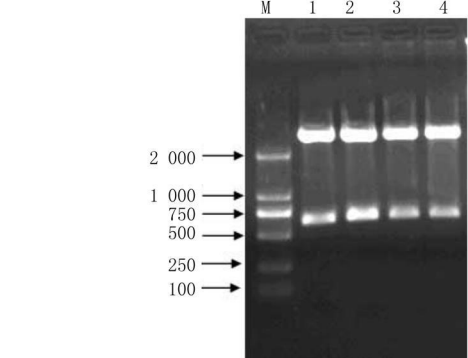


图4 重组克隆的酶切鉴定

2.3.4 RAPD 特异片段测序的结果与分析 克隆片段用 T7 Primer 和 SP6 Reverse Primer 进行双向测序,其中始端 10 个碱基 S429 (TGCC GGCTTG),末端 10 个碱基

是该引物反向结合位点(CAAGCCGGCA)。证实克隆的片段来自引物 S429 的扩增产物,克隆片段的实际长度为 618 bp,碱基序列如下所示(图 5):

1	<u>TGCCGGCTTG</u>	TCACAACAA	ATGCCAAATG	GTCAAATATA	TCCTATATAA	CTAAGTATGC
61	CTCACCATT	CTGCACACTC	ACTGTAAAT	TAACTGAACT	ATTTGAGTCA	TCAGTATTGG
121	CCACACCGGT	CACTCAAATT	TGTGCAAGAA	TATCTACCAT	CACACAAAAA	ATAGGTGGA
181	AATATTCTAA	AAC TTGGTTC	AAAACAATT	TTATATCAAA	ACAAATGGTC	TACAATTAT
241	CAGCAACTAT	AATTCAACTA	CCAATATATA	TATATATACT	ACAATAAGTT	CAATTTTTC
301	CAAAAAACA	ATCAAATCAA	CCAATATTA	AAAATAAACT	TAAAGTAGT	GGGTATGGA
361	ATTCCTCACC	CATTCAAAA	ATATGCAGTT	GTCTTGAAAT	GAAATTGAAA	AAAAAAATAG
421	TTTAGAATGA	ACATAAAGA	AGGC AAGGAA	AATGATCCTA	CTAGGCTATG	TCATGGTGA
481	AGTCTTCATA	TTGTAGCTC	CCTCTGTTTG	TGCATCAGTA	CTTGGTGCT	CAACATCTT
541	AGGTCCACTA	GAGACTACCA	TGGTGCTCA	GAGTGATTCT	ATCTAGCAAT	CTTAAACATA
601	GCCACCTTCA	AGCCGGCA				

图 5 S429/650 片断核苷酸序列 S429/650 由 618 bp 碱基组成

3 讨论

分子标记技术的迅速发展 为抗病育种工作提供了重要的辅助工具。进行分子标记辅助育种的先决条件是找到与抗病基因紧密连锁的分子标记,同时应为育种工作者易于接受,检测程序需要简单快速、经济可靠。目前,不但筛选到一些重要病害抗病基因的分子标记(Martin 等,1991;Paran 等,1993),并且在此基础上已经克隆出一些基因。该试验应用 RAPD 方法进行番茄抗叶霉病基因分子标记的研究 具有简单、可行、成本低的优点。虽然 RAPD 标记的重复性不高,但可以通过严格的操作以减少试验的错误。而更进一步减少 RAPD 标记的不准确性的方法,可以应对所得到的 RAPD 标记转化为稳定的 SCAR 标记。

该研究中得到 2 个 RAPD 标记,其中 S429/650 与抗病基因 Cf-7 间的遗传距离为 5.3 cM,可以认为标记与抗病基因间的遗传距离较近,也就是说标记与抗病基因紧密连锁。但是,该试验中用于研究的后代株数较少(179 株),这有可能影响遗传距离的准确性。要得到紧密连锁的标记还要增加群体的单株数量。该研究中得

到的 RAPD 标记与抗病基因间的遗传距离较近,这充分证明了利用 RAPD 的方法进行基因标记的可行性,其前提是要严格控制反应条件,在得到紧密连锁的标记后,可进一步将其转化为稳定的 SCAR 标记。以提高标记的准确性和可靠性。

参考文献

[1] 李桂英,李景富,李永镐,等.东北三省番茄叶霉病生理小种分化的初步研究[J].东北农业大学学报,1994,25(2):122-125.  
[2] 孟凡娟,许向阳,李景富,等.东北三省新的番茄叶霉病菌生理小种分化初报[J].中国蔬菜,2006(1):121-23.  
[3] 赵福宽,杨瑞,林成,等.番茄耐冷性 RAPD 分子标记的筛选及特异片段的克隆[J].中央民族大学学报(自然科学版),2004,13(1):70-74.  
[4] 田苗英,冯兰香,杨翠荣.应用 RAPD 方法获得与番茄 ToMV 抗性基因 Tm 2n<sub>v</sub> 连锁的分子标记[J].植物病理学报,2000,30(2):124-127.  
[5] 吕晓梅,许向阳,李景富.番茄叶霉病及其抗病育种的研究进展[J].东北农业大学学报,2002,33(4):396-406.  
[6] Jones D A, Dickinson M J, Balint-Kurti P J, et al. Two complex Resistance Loci Revealed in Tomato by Classical and RFLP Mapping of the Cf-2, Cf-4, Cf-5 and Cf-9 Genes for Resistance to *Cladosporium fulvum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions 1993,6(3):348-359.

Molecular Markers Linked to *Fulvia fulva* Resistance Gene and Clone to Specific Fragment

ZHANG Xiao-xuan, XU Xiang-yang, WANG Ao-xue, LI Jing-fu

(College of Adult Education, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** The RAPD marking method was used for analysis to resistance gene Cf-7 for *Fulvia fulva*. Two RAPD markers linked to the Cf-7 were identified. One was sequenced. The genetic distance between resistant gene and RAPD markes was 5.3cM. The mark S429/650 was 618 bp after being sequenced.

**Key words:** *Cladosporium fulvum*; Cf-7; RAPD