

谢莹,刘阳,潘素丽,等.加工番茄无离层突变及离区 *JOINTLESS* 基因序列分析[J].江苏农业科学,2014,42(11):30-33.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.008

# 加工番茄无离层突变及离区 *JOINTLESS* 基因序列分析

谢莹<sup>1</sup>,刘阳<sup>2</sup>,潘素丽<sup>1</sup>,陈宏宇<sup>2</sup>,赵婷婷<sup>1</sup>,王傲雪<sup>1,2</sup>

(1.东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150030; 2.东北农业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**以加工番茄有离层品种 09872 和无离层品种 08003 为试验材料,分别提取基因组 DNA 及有离层品种 09872 的花梗离区总 RNA,设计引物扩增并测序,得到 *JOINTLESS* 基因序列(1 286 bp)、*jointless(j)* 突变序列(347 bp)及 *JOINTLESS* 基因表达序列(797 bp)。采用生物学软件对序列进行生物信息学分析,结果表明,加工番茄的 *JOINTLESS* 基因编码序列与普通栽培番茄品种相比,有 2 个碱基发生突变;*jointless(j)* 突变是由 *JOINTLESS* 基因第 1 个外显子的部分序列连同起始密码子上游共 939 bp 的碱基缺失所引起;*JOINTLESS* 基因共编码 265 个氨基酸,预测所得的蛋白质整体表现为亲水性。经系统发育分析得出,加工番茄 *JOINTLESS* 基因序列与矮牵牛中该基因序列相似性最高,与葡萄物种的相似性最低。

**关键词:**加工番茄;离区;*JOINTLESS* 基因;突变;序列分析

**中图分类号:** S641.203 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0030-04

加工番茄是普通番茄的一个栽培种<sup>[1]</sup>。随着番茄加工产业的兴起和快速发展,作为专门用于加工的番茄品种,以其果皮厚、耐储运、番茄红素含量高以及矮化自封顶、免去整枝搭架的麻烦等特点而越来越受到人们的重视。番茄的落花落果特性严重影响番茄的产量。研究发现,无离层番茄品种不仅可以改善番茄生长过程中外界环境引起的落花落果情况,保证番茄产量;而且可以提高机械收获和后续加工效率,同时,可以减少运输过程中果柄对果实造成的机械损伤,对提高果实品质也具有一定的意义。

目前,对番茄花梗离区的研究已成为热点,并取得重要突破。番茄离区发育控制基因 *J* (*JOINTLESS*) 是 MADS-box 基因家族的一员,它的突变会引起番茄果柄或花柄离区的消失。1994 年 Wing 等报道,通过构建遗传和物理图谱,以 TG523 作探针,用 Southern 杂交,将 *J* 定位在番茄细菌人工染色体 TY142 不足 50 kb 的片段内<sup>[2]</sup>,并报道首次分离了与离区发育直接相关的基因 *J*<sup>[3]</sup>。通过重组与反义抑制试验,肯定 *J* 是一个新的 LeMADS-box 基因,转录物表达的时空模式显示,*J* 在花柄离区发育中的特异性是转录后水平上调节的,转基因互补试验证实番茄果实离区正是由这个基因控制的<sup>[4]</sup>。本试验通过对加工番茄无离层突变的原因及加工番茄中 *JOINTLESS* 基因序列进行分析,从分子水平阐述无离层突变发生的原因,以期在无离层加工番茄品种的选育及应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期:2014-01-02

基金项目:新世纪人才培养计划(编号:1251-NCET-004)。

作者简介:谢莹(1988—),女,硕士,从事园艺作物生物技术研究。

E-mail:812489493@qq.com。

通信作者:王傲雪(1973—),男,博士,教授,博士生导师,从事园艺作物生物技术研究。E-mail:wangaoxue@yahoo.com。

1.1.1 植物材料 试验于 2012 年秋季在东北农业大学园艺站进行,有离层加工番茄品种 09872 和无离层加工番茄品种 08003 均由东北农业大学番茄课题组提供,并于日光温室内进行正常栽培管理。选取番茄植株幼嫩叶片,装入 1.5 mL 离心管内,投入液氮中冷冻 5 min,于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.1.2 载体与菌株 pMD18-T 购于宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5 $\alpha$  购于北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *JOINTLESS* 基因片段的克隆 采用 CTAB 法分别提取有离层品种 09872 (J) 和无离层品种 08003 (j) 的基因组 DNA。根据 NCBI 基因序列 AF275345,用 Primer 5.0 软件设计引物 F:5' - ATAGGGTAGAGAGGTTTTTCC - 3', R:5' - CCTAGGCTAAAAGGCGTAG - 3'。PCR 反应体系为 buffer (Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L、引物 R 2  $\mu$ L、引物 F 2  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq* 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L。反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 5 min,40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,经生工生物工程(上海)股份有限公司 DNA 快速纯化/回收试剂盒回收纯化目的片段,并按原体系进行二次扩增;将二次扩增的产物与 pMD18-T Vector 载体重组连接,转化大肠杆菌感受态细胞,并选择阳性克隆送生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 花梗部 *JOINTLESS* 基因 cDNA 克隆 取有离层品种 09872 (J) 植株幼嫩的花梗区,采用 Trizol 法(北京康为世纪生物科技有限公司)提取总 RNA,逆转录合成 cDNA (Promega 公司的 M-MLV),根据 NCBI 基因序列 AF275345,用 Primer 5.0 软件设计引物 F:5' - TCCCTCTTTCTTCAACTCTC - 3', R:5' - ATCTCATGTATTCTGCCCATAG - 3'。PCR 获得 *JOINTLESS* cDNA 片段,PCR 反应体系为 buffer (Mg<sup>2+</sup>) 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L、引物 R 2  $\mu$ L、引物 F 2  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq* 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 35  $\mu$ L。反应条件为:94 ℃

5 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 5 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。cDNA 片段回收扩增, T 载体连接、阳性克隆筛选并测序。

**1.2.3 生物信息学分析** 测序结果利用 NCBI 数据库 Blast 软件进行比对分析, 利用 DNAMAN 5.0 软件进行同源性及蛋白相似性分析, 采用 NCBI 的 Protein Conservation Domain 程序分析蛋白质氨基酸结构。采用 ProtScale 工具对 *JOINTLESS* 编码的蛋白质产物疏水性和亲水性进行分析, 使用 Sopma 分析 *JOINTLESS* 编码蛋白质产物的二级结构, 利用 Phyre 对加工番茄 *JOINTLESS* 基因编码的蛋白质产物进行三级结构预测, 使用 DNAMAN 5.0 软件对 *JOINTLESS* 基因编码产物进行系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 加工番茄无离层突变分析

本试验采用 CTAB 法提取有离层品种 09874 与无离层品种 08003 的基因组 DNA, 用同一对引物对基因片段进行 PCR 扩增。由图 1、图 2 可见, 所得 DNA 片段长度相差 1 000 bp 左右。可见, 无离层品种(j) 在此段内必有一段基因缺失, 其缺失片段的长度为 1 000 bp 左右。

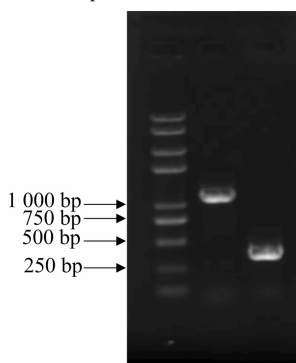
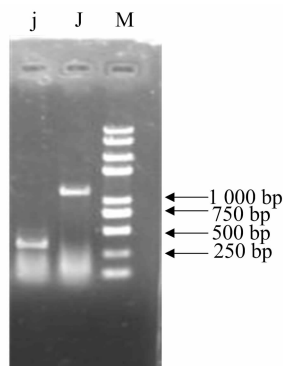


图1 基因片段电泳图示



j—无离层品种08003; J—有离层品种09874

图2 胶回收产物电泳图示

测序获得加工番茄有离层品种的 *JOINTLESS* 基因片段序列长为 1 286 bp, 无离层品种的突变序列只有 347 bp, 这 2 个序列经 Blast 比对发现, 无离层品种的 *JOINTLESS* 基因从第 150 位到第 1 089 位共 939 bp 的碱基发生缺失(图 3)。将 *JOINTLESS* 基因与其 cDNA 序列比对发现, *JOINTLESS* 基因的起始密码子位于 *JOINTLESS* 基因的第 816 位碱基(图 4), 而这一表达起始位置恰好位于无离层品种缺失的部分。因此, 加工番茄无离层品种的突变, 是由 *JOINTLESS* 基因第 1 个外显子的部分序列连同起始密码子上游共 939 bp 的碱基缺失所引起的。

### 2.2 加工番茄 *JOINTLESS* 基因 cDNA 序列的生物信息学分析

**2.2.1 *JOINTLESS* cDNA 序列比对分析** 经 DNAMAN 5.0 软件分析, 测序得出的加工番茄 *JOINTLESS* 基因 cDNA 序列与 GenBank 提交的 cDNA 序列的同源性高达 99.75% (图 5), 蛋白序列(AF275345) 相似性为 97.75%。加工番茄 *JOINTLESS* 基因共编码 265 个氨基酸, 其 cDNA 序列并没有发生插入与缺失, 只是个别碱基发生突变, 这些突变并没有使其保守结构域发生变化。

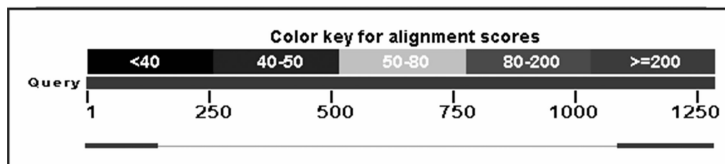


图3 *JOINTLESS* 基因序列与其突变序列的 Blast 比对结果

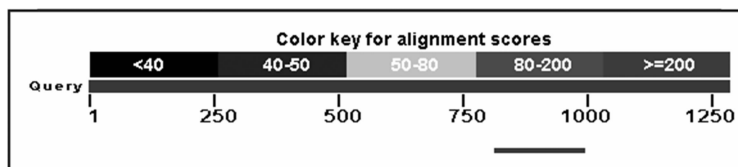


图4 *JOINTLESS* 基因序列与其 cDNA 序列的 Blast 比对结果

**2.2.2 加工番茄 *JOINTLESS* 基因编码蛋白质的结构分析** 通过 NCBI 的 Protein Conservation Domain 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对加工番茄 *JOINTLESS* 全长 cDNA 序列编码的 265 个氨基酸序列进行结构分析, 结果表明, 加工番茄 *JOINTLESS* 基因编码产物属于 MADS 基因家族 type II 类型

中的一员(图 6), 其蛋白分子质量为 30.43 ku, 等电点为 7.387 94。

**2.2.3 *JOINTLESS* 编码蛋白质的疏水性和亲水性分析** 用 ProtScale 工具(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>)对加工番茄 *JOINTLESS* 基因编码的蛋白质产物疏水性和亲水

Cab5'-3'.seq	ATGGCTAGAGAAAAATTCAGATCAAGAAAATAGATAACTCCACAGCAAGCAAGTTACATTTTCATAGAGGAGAAGAGGTTTATTCAAGAAAGCTGAAG	100
CDNA.seq	ATGGCTAGAGAAAAATTCAGATCAAGAAAATAGATAACTCCACAGCAAGCAAGTTACATTTTCATAGAGGAGAAGAGGTTTATTCAAGAAAGCTGAAG	100
Consensus	atggctagagaaaaaattcagatcaagaaaatagataactccacagcaagacaagttacattttca agaggagaagaggtttattcaagaaagctgaag	
Cab5'-3'.seq	AACCTTCTGTTCTCTGTGATGCTGATGTTGCTCTCATCATTTTCTCTTCTACTGGAAAAATATTGACTATTCTAGCTCAAGCATGAAACAAATCTTGA	200
CDNA.seq	AACCTTCTGTTCTCTGTGATGCTGATGTTGCTCTCATCATTTTCTCTTCTACTGGAAAAATATTGACTATTCTAGCTCAAGCATGAAACAAATCTTGA	200
Consensus	aactttctgttctctgtgatgctgatgtgtctctcatcattttcttctactggaaaat atttgactattctagctcaagcatgaacaaatcttga	
Cab5'-3'.seq	GAGGCGTGATTGCATTCOCAAAAATCTGGAATAATGGATCAACCATCACTTGAACCTCAGCTTGTAAGAAATAGCAACTACTCCAGATTAGCAAGGAA	300
CDNA.seq	GAGGCGTGATTGCATTCOCAAAAATCTGGAATAATGGATCAACCATCACTTGAACCTCAGCTTGTAAGAAATAGCAACTACTCCAGATTAGCAAGGAA	300
Consensus	gaggcgtgatttgcatccaataatctggaataatggatcaaccatcacttgaaacttcagcttgtagaaaatagcaactactccagattaagcaaggaa	
Cab5'-3'.seq	ATTTCGAAAAAAGTCATCGATTAAAGGCAATGAGGGGAGAGAAGTTCAGGACTAAATATTGAAGAGTTGCAACAATTGGAGAGATCTCTTGAAGCTG	400
CDNA.seq	ATTTCGAAAAAAGTCATCGATTAAAGGCAATGAGGGGAGAGAAGTTCAGGACTAAATATTGAAGAGTTGCAACAATTGGAGAGATCTCTTGAAGCTG	400
Consensus	atttcgaaaaaagtcatcgattaaggcaaatgaggggagagaacttaaggactaaatattgaagagttgcaacaattggagagatctcttgaactg	
Cab5'-3'.seq	GATTGAGCCGCTCATAGAGAGAAAGGGTGATAAAATAATGAGAGAGATCAACCACTCCACAAAAGGGTATGCATCTAATGGAAAGAAATGAAAAATT	500
CDNA.seq	GATTGAGCCGCTCATAGAGAGAAAGGGTGATAAAATAATGAGAGAGATCAACCACTCCACAAAAGGGTATGCATCTAATGGAAAGAAATGAAAAATT	500
Consensus	gattgagccgctcatagagagaaagggtgataaaataatgagagagatcaaccaactccaacaaaagggatgcactaatggagaataatgaaaaatt	
Cab5'-3'.seq	AAGGCAACAGGTGATGGAGATATCTAATAATAATAATAATAATAATGATATAGAGAGGCAGGAGTAGTAATATTGAACAGAAAAATGGATTAAAT	600
CDNA.seq	AAGGCAACAGGTGATGGAGATATCTAATAATAATAATAATAATAATGATATAGAGAGGCAGGAGTAGTAATATTGAACAGAAAAATGGATTAAAT	600
Consensus	aaggcaacaggtgatggagatatctaataataataataataataatggatatagagaggcaggagtagtaatttgaaccagaaaaatggatttaatt	
Cab5'-3'.seq	AATAATAATAATGAAGATGGCCATCATCTGAATCAGTAACAAATCCATGTAACCAATTGATCCTCCTCTCAAGATGATGATGTTCTGATACTTCTC	700
CDNA.seq	AATAATAATAATGAAGATGGCCATCATCTGAATCAGTAACAAATCCATGTAACCAATTGATCCTCCTCTCAAGATGATGATGTTCTGATACTTCTC	700
Consensus	aataataataatgaagatggccatcatctgaatcagtaacaaatccatgtaactcaattgatcctcctcctcaagatgatgatgttctgactactctc	
Cab5'-3'.seq	TCAAAATGGGGTTAGCTACCTTACTCAGGCTGAAGAGATCAAAAGCAAGGTGTGGCTATTTTGTATGTTATTAGAAGAGGAGAAAAAAGTA	797
CDNA.seq	TCAAAATGGGGTTAGCTACCTTACTCAGGCTGAAGAGATCAAAAGCAAGGTGTGGCTATTTTGTATGTTATTAGAAGAGGAGAAAAAAGTA	797
Consensus	tcaaatggggttagctaccttactcaggctgaagagatcaaaagcaaggtgtggctattttgtatgttattagaagaaggagaaaaaaaagta	

图5 加工番茄 *J* 基因 cDNA 序列与原预测 GenBank 上序列核酸比对示意图

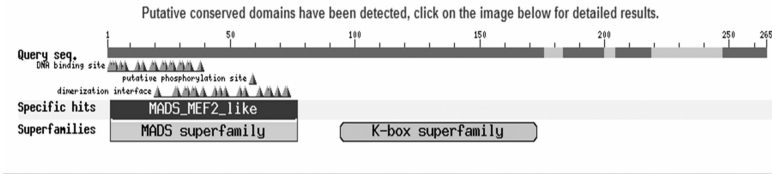


图6 番茄 *JOINTLESS* 基因编码的蛋白质结构图示

性进行分析,依据氨基酸分值越低亲水性越强、分值越高疏水性越强的规律,由图 7 可以看出,整个蛋白质中疏水性最大值为 2.144,最小值为 -3.200,在整个肽链中亲水性氨基酸大量分布其中,整体表现为亲水性。

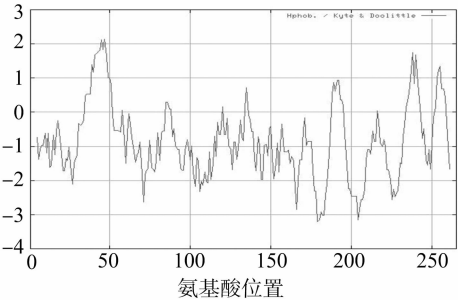


图7 番茄 *JOINTLESS* 基因编码产物的疏水性分布情况

2.2.4 *JOINTLESS* 编码蛋白质的二级结构分析 用 Sopma ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 对 *JOINTLESS* 编码蛋白质产物的二级结构进行分析,结果表明, *JOINTLESS* 的二级结构中 53.21% 为  $\alpha$  螺旋结构,32.83% 为不规则卷曲结构,10.19% 为  $\beta$  折叠结构,3.77% 为  $\beta$  转角结构(图 8)。

2.2.5 *JOINTLESS* 编码蛋白质产物的三级结构分析 利用

Phyre 的三级结构预测功能 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 对加工番茄 *JOINTLESS* 基因编码的蛋白质产物进行三级结构预测,并利用 Rasmol 软件对三级结构图形化分析。由图 9 可见, *JOINTLESS* 的蛋白质产物含有 50 个氢键,3 个  $\alpha$  螺旋结构,2 个  $\beta$  折叠结构和 8 个转角结构。

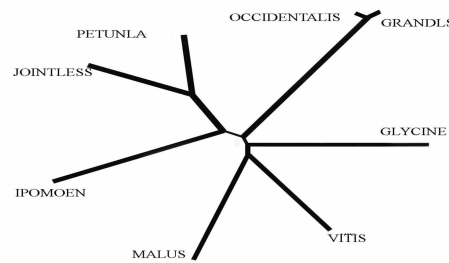
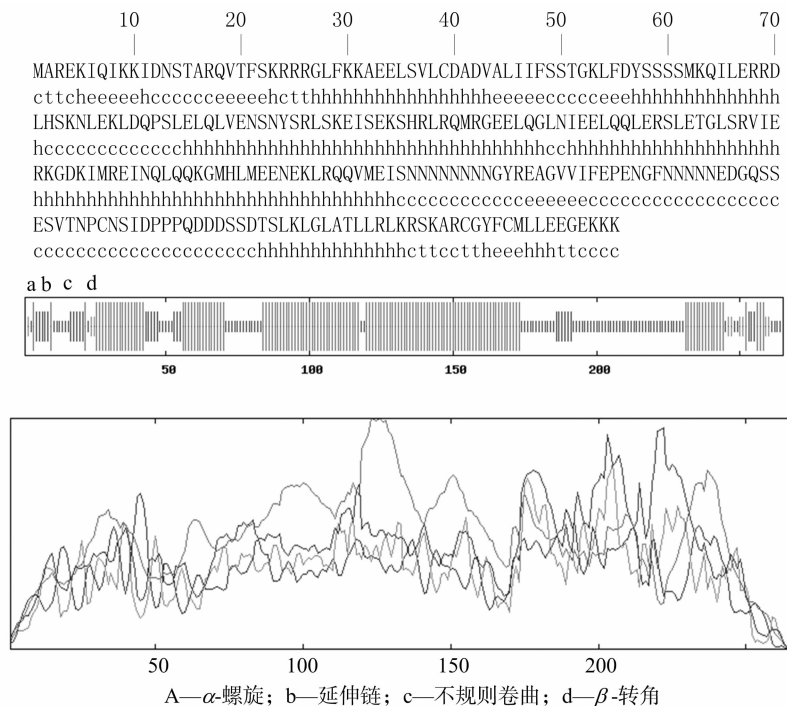
2.3 加工番茄 *JOINTLESS* 编码蛋白质产物的系统发育分析

由图 10 可见,加工番茄 *JOINTLESS* 基因与矮牵牛中该基因序列相似性最高,与葡萄物种的相似性最低。

3 结论与讨论

对加工番茄无离层品种的 *jointless* 突变分析可知,突变是由 *JOINTLESS* 基因第 1 个外显子的部分序列连同起始密码子上游共 939 bp 的碱基缺失所引起的,这个片段的缺失会直接导致其丢失启动子区域的转录因子结合位点,同时丧失转录功能从而不能形成功能蛋白。Mao 等也在番茄自然突变体 j 中发现,由于启动子区段的一段 DNA 缺失引起 J 转录发生变化,导致翻译的蛋白失去功能,最终使番茄的花柄离区发育受到影响,不能形成正常的离区<sup>[4]</sup>。

*JOINTLESS* 基因属于 MADS-box 基因家族,酵母双杂交表明, *JOINTLESS* 蛋白可以与一系列 MADS-box 蛋白形成蛋白复合物<sup>[5]</sup>,这说明 J 作为 MADS-box 家族的一员,在高等



植物 MADS - box 基因对植物基因的调控中,大多数以形成复合体来调控基因的转录与表达,筛选与 *J* 互作的蛋白,同时, *JOINTLESS* 作为调控因子,其功能并不是单一控制离区的发育和形成。在番茄中 *J* 对于花序分生组织特异性和每个花序分生组织花原基的保守性是必需的,这一新功能的发现也许会为进一步研究 *J* 甚至是整个 MADS - box 基因家族调控花的发育机制提供新的思路。

另外,对加工番茄有离层品种 *JOINTLESS* 基因的 cDNA 序列分析可知,与普通栽培品种相比,加工番茄 *JOINTLESS* 基因的保守结构域并没有发生变化,而且基因序列也没有发生插入与缺失,只是 2 个碱基不同,这可能是同物种不同品种间特有的差异所导致,但也不排除在 PCR 扩增时碱基发生错配的可能。

总之,加工番茄的 *JOINTLESS* 基因编码序列与普通栽培番茄品种的相比,发生 2 个碱基的突变,而 *jointless(j)* 突变则是由 *JOINTLESS* 基因第 1 个外显子的部分序列连同起始密码子上游共 939 bp 的碱基缺失所引起;*JONINTLESS* 基因共编码 265 个氨基酸,预测所得的蛋白质整体表现为亲水性;经系统发育分析得出,加工番茄 *JOINTLESS* 基因序列与矮牵牛中该基因序列相似性最高,与葡萄物种的相似性最低。

## 参考文献:

- [1] 蒋先明. 蔬菜栽培学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 17-21.
- [2] Wing R A, Zhang H B, Tanksley S D. Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system; I. Genetic and physical mapping of *jointless*[J]. Mol Gen Genet, 1994, 242(6): 681-688.
- [3] Zhang H B, Martin G B, Tanksley S D, et al. Map-based cloning in crop plants; tomato as a model system II. Isolation and characterization of a set of overlapping yeast artificial chromosomes encompassing the *jointless* locus[J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 613-621.
- [4] Mao L, Begum D, Chuang H W, et al. *Jointless* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development[J]. Nature, 2000, 406(6798): 910-913.
- [5] Leseberg C H, Eissler C L, Wang X, et al. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(8): 2253-2265.