

李 芬,王 辉,李文丽,等. 番茄筋腐病抗感材料果实中 *CAD* 基因的表达与分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):81–84.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.23.019

# 番茄筋腐病抗感材料果实中 *CAD* 基因的表达与分析

李 芬,王 辉,李文丽,王 富

(青岛农业大学园艺学院/青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:**以筋腐病易感高代自交系 C285 和抗病高代自交系 P31 的果实为材料,研究了番茄果实不同发育时期木质素含量的差异、果实中 *CAD* 基因的预测及 2 个 *CAD* 基因的相对表达。结果表明,C285 果实中木质素含量在转色期时达到峰值,红熟期略有降低,而 P31 果实中的木质素含量在绿熟期、转色期及红熟期变化较小,绿熟期含量最低、红熟期最高;利用拟南芥 *CAD* 基因作为参考基因,在番茄中共查询到 5 个 *CAD* 旁系同源基因,且在核酸水平与拟南芥中同源基因间的一致性为 66.7%;5 个 *CAD* 基因在 2 份材料中存在 13 个突变位点,其中 Solyc01g107590 (*CAD590*) 和 Solyc03g078440 (*CAD440*) 突变位点较多;*CAD590* 和 *CAD440* 在 P31 的绿熟期和转色期相对表达量较为稳定,在红熟期则大幅升高,而 2 个基因在 C285 中则均呈下降趋势,其中 *CAD440* 降幅更大;绿熟期 *CAD590* 和 *CAD440* 在 C285 中相对表达量与 P31 相比分别高出 2 倍和 5 倍,转色期 P31 中 *CAD590* 和 *CAD440* 则分别高于 C285 同期的表达量,其增幅分别为 44.4%、130%、170%;而红熟期 2 个基因的相对表达量在 P31 材料中差异较小。因此推断 *CAD* 基因的表达与木质素含量之间存在一定的关系。

**关键词:**番茄;筋腐病;木质素;肉桂醇脱氢酶(*CAD*);基因表达与分析

**中图分类号:** S436.412.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)23–0081–04

随着人们对于番茄需求量的增加,番茄的栽培面积在不断扩大,尤其是设施栽培面积逐年增加,但病害也层出不穷,

收稿日期:2017–10–27

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2014CQ034);山东省现代农业产业技术体系建设专项(编号:SDAIT–05–02);青岛农业大学高层次人才科研基金(编号:663–1115041);山东省农业良种工程。

作者简介:李 芬(1993—),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail:15192642252@163.com。  
通信作者:王 富,博士,教授,研究方向为番茄遗传育种及生物技术。E-mail:wangfuabcd@163.com。

近年来,番茄筋腐病成为严重制约番茄生产的一类生理性病害,影响番茄果实的商品价值,成为迫切需要解决的问题。番茄筋腐病,也称条腐病,一般发生在冬、春季的设施保护地与露地,主要危害果实,但叶片和茎在外观上并无明显变化。1921 年,这种病害被首次提及,随后在世界上广为报道。Bewley 等得出番茄筋腐病产生的重要因素是缺钾<sup>[1]</sup>。但同时有研究表明仅多施钾肥不能彻底解决问题。1958 年,日本的农学家首次在该国发现番茄筋腐病,随后发现致病的其中一个关键原因是保护地长期连作。该病在果实上表现出褐变型筋腐果与白变型筋腐果 2 种类型。研究发现引起番茄筋腐病发生的因素包括番茄品种、温度、光照时间、光照度、CO<sub>2</sub> 含

- functions of type I and type III interferons[J]. *Immunity*,2019,50(4):907–923.
- [3] Zinzula L, Tramontano E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG–I–like receptors: hide, mask, hit[J]. *Antiviral Research*,2013,100(3):615–635.
- [4] Uehara J, Ohkuri T, Kosaka A, et al. Intratumoral injection of IFN– $\beta$  induces chemokine production in melanoma and augments the therapeutic efficacy of anti–PD–L1 mAb[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,2017,490(2):521–527.
- [5] Wei J Y, Ma Y M, Wang L, et al. Alpha/beta interferon receptor deficiency in mice significantly enhances susceptibility of the animals to pseudorabies virus infection[J]. *Veterinary Microbiology*,2017,203:234–244.
- [6] Huang B, Zhang L L, Lu M Q, et al. PCV2 infection activates the cGAS/Sting signaling pathway to promote IFN– $\beta$  production and viral replication in PK–15 cells[J]. *Veterinary Microbiology*,2018,227:34–40.
- [7] Luo R, Xiao S, Jiang Y, et al. Porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon– $\beta$  production by interfering with the RIG–I signaling pathway[J]. *Molecular Immunology*,2008,45(10):2839–2846.
- [8] Bentz G L, Liu R, Hahn A M, et al. Epstein–Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon– $\beta$ [J]. *Virology*,2010,402(1):121–128.
- [9] Gupta M, Mahanty S, Ahmed R, et al. Monocyte–Derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with Ebola virus secrete MIP–1 $\alpha$  and TNF– $\alpha$  and inhibit Poly–IC–induced IFN– $\alpha$  *in vitro*[J]. *Virology*,2001,284(1):20–25.
- [10] Abe H, Imamura M, Hiraga N, et al. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Journal of Hepatology*,2011,55(1):11–18.
- [11] Ford E, Thanos D. The transcriptional code of human IFN– $\beta$  gene expression[J]. *Biochimica et Biophysica Acta–Gene Regulatory Mechanisms*,2010,1799(3/4):328–336.
- [12] 王艳艳,金蕊,徐华国,等. 干扰素基因刺激因子启动子的克隆、鉴定及活性分析[J]. *江苏医药*,2015,41(13):1489–1491.

量、土壤理化性质、施肥种类等。

木质素(lignin),是酚类多聚体,植物体内的大分子物质,由肉桂醇单体集聚而成,有运输水分与矿物质、增强机械强度及抵御不良环境的作用。木质素的生物合成途径由 2 步组成:在细胞质中,通过一系列酶催化,苯丙氨酸或酪氨酸逐步转化为木质素单体,然后被转运到细胞壁通过脱氢聚合成木质素<sup>[2]</sup>。肉桂醇脱氢酶(cinamyl alcohol dehydrogenase,简称 CAD)是木质素合成途径中最早研究的酶类之一,主要在木质素单体合成过程中的最后一步起作用<sup>[3-4]</sup>。CAD 基因存在同源基因,拟南芥中 CAD 类似基因有 17 个,9 个基因(*AtCAD1*~*AtCAD9*)与烟草和火炬松存在 70% 相似,为真正 CAD 基因,余下 8 个基因(*AtCAD101*~*AtCAD108*)为相似基因<sup>[5]</sup>。大多数植物中,CAD 底物类似物被抑制活性后,植物抗病能力减弱,易感染病原菌。

目前,CAD 对木质素的合成、调控已取得较好成效,主要在杨树、水稻、小麦中的改良品种、抗病方面的研究,但 CAD 基因的表达与分析对番茄筋腐病所产生的影响以及如何指导番茄育种的报道还非常少。因此本试验以番茄筋腐病易感高代自交系 C285 和抗病高代自交系 P31 为试验材料,通过对木质素代谢关键基因 CAD 的分析,研究番茄筋腐病果实与正常果实在相对基因表达量上的差异分析;研究抗感番茄筋腐病果实在绿熟、转色及红熟期果实中基因 CAD 的表达,探讨番茄筋腐病发生过程中木质素生物合成与哪些基因的异常表达有关,从而揭示筋腐病发生的分子机制,达到从分子角度进行预防的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用的 2 份番茄材料为青岛农业大学大学园艺学院番茄课题组提供的筋腐病易感高代自交系 C285 和抗病高代自交

系 P31。

1.2 试验方法

1.2.1 木质素含量测定方法 本试验中通过木质素(lignin)含量试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定木质素含量。

1.2.2 CAD 基因的预测及突变位点分析 参考拟南芥 CAD 基因家族的 9 个基因,从番茄的基因组中去找同源基因。系统进化树采用 Mega 4.0 的 NJ(neighbor joining)法。直系和旁系同源基因的一致性采用 Needle 程序(<http://emboss.sourceforge.net/>)。突变位点分析主要依据 P31 和 C285 这 2 份材料的重测序数据。

1.2.3 荧光定量分析方法

1.2.3.1 植物总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 本试验中通过 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(TaKaRa 公司)进行。cDNA 的合成采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒。

1.2.3.2 CAD 基因引物设计 针对 CAD 基因在 2 份材料中的突变位点分析,筛选出 2 个突变位点较多的同源基因 *Solyc01g107590*(CAD590)和 *Solyc03g078440*(CAD440),采用 Primer3 软件进行引物设计,扩增片段长度设定在 180~250 bp,引物长度为 20 bp 左右,退火温度为 60℃,所设计的引物如表 1 所示。内参基因选用 *Actin*,引物信息(F:5'-CAACGAGAATTGCCTTGCT-3',R:5'-CTTAACATCCGCACCAACCT-3'),扩增片段长度为 233 bp,退火温度为 60℃。

1.2.3.3 荧光定量 PCR 以番茄果实 cDNA 为模板,荧光定量 PCR 仪选用 Roche(Light Cycler 480)。反应体系(20.0 μL):RNA 的反转录反应液(cDNA 溶液)1.6 μL,10 μL SYBR Premix Ex Taq II,0.8 μ 正向引物,0.8 μ 反向引物,6.8 μL dH<sub>2</sub>O。反应程序:95℃ 30 s;PCR 反应 40 循环(95℃ 5 s,60℃ 30 s);熔解。试验设置 3 次重复,反应结束后分析荧光值变化曲线和熔解曲线。

表 1 引物序列

酶名称	基因名称	片段长度 (bp)	引物序列(5'→3')
SICAD	<i>Solyc01g107590</i>	224	F:TATGGCACCAGAACAGCAG;R:CAGCTCCTAGGTGGTCCAAG
	<i>Solyc03g078440</i>	250	F:TGTTCATCAGCGCTTTGTTC;R:CTTGGTGATGGCCTCATCTT

1.2.3.4 数据处理与分析 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算目的基因的相对表达量;采用 Excel 2010 和 DPS 7.05 进行数据处理分析及作图。

2 结果与分析

2.1 不同番茄果实发育过程中木质素含量的比较

由图 1 可知,番茄感病高代自交系 C285 果实中木质素含量在转色期时达到峰值,红熟期略有降低,而 P31 果实中的木质素含量在绿熟期、转色期及红熟期变化较小,绿熟期含量最低、红熟期最高。

2.2 番茄中 CAD 基因的预测

在番茄基因组(SL 3.0)及注释基因的基础上,针对拟南芥中 CAD 家族基因,采用 BLASTN 和 BLASTP 程序对番茄中木质素生物合成基因进行了鉴定。笔者在番茄中共搜索到 5 个同源基因,分布于番茄染色体 1、3、11、12 等 4 条染色体中,

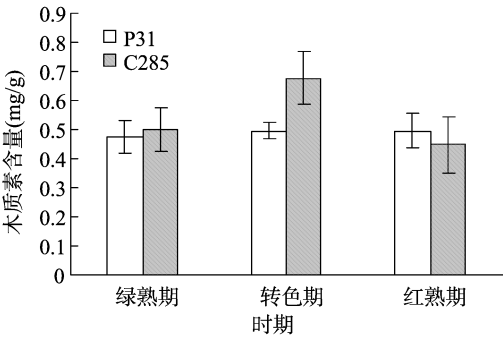


图 1 不同品种不同时期木质素含量比较

番茄 CAD 基因与拟南芥相应基因间在蛋白质水平上保持 61.5%~73.0% 的一致性,平均为 66.7%(表 2)。

拟南芥中 CAD 家族成员有 9 个基因,且功能均已通过验证,该家族基因也有串联重复基因簇出现(*CAD6*、*CAD7*和

表 2 番茄中鉴定出的 CAD 基因

Soly 编号	一致性 (%)
<i>Solyc01g107590</i>	64.5
<i>Solyc11g011340</i>	61.5
<i>Solyc11g011330</i>	62.5
<i>Solyc03g078440</i>	73.0
<i>Solyc12g055820</i>	71.5

*CAD8*)。通过序列比对发现在番茄中存在 5 个同源基因,同时也有串联重复基因簇的出现 (*Solyc11g011330* 和 *Solyc11g011340*)。系统进化分析发现(图 2),2 个串联重复基因簇聚在一个分支,这暗示 *CAD* 在拟南芥和番茄中可能经历了相似的进化途径。*Solyc03g078440* 与 *CAD9*、*CAD2* 及 *CAD3* 聚为一簇且与 2 个串联重复基因簇亲缘关系较近;*Solyc12g055820* 与 *CAD1* 聚在一起,两者可能为直系同源基因;*Solyc01g107590* 则与 *CAD4* 和 *CAD5* 亲缘关系较近。

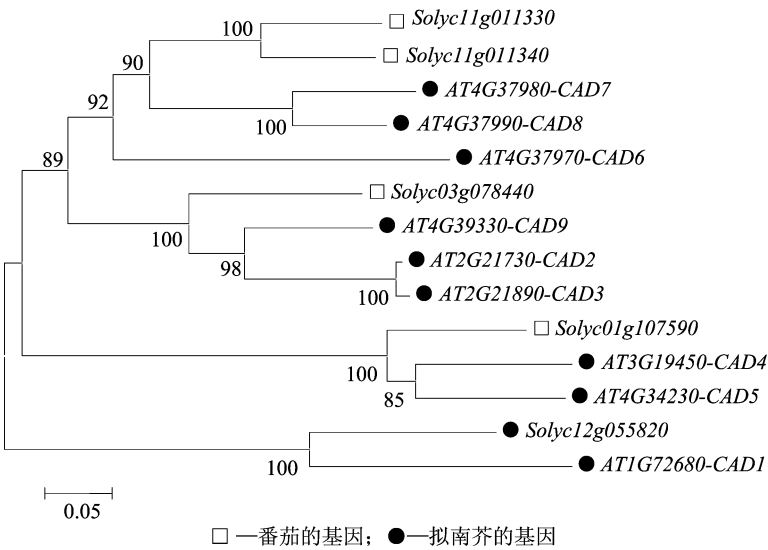


图2 CAD家族基因进化树

2.3 不同番茄材料中 CAD 基因的变异分析

2 份材料重测序数据(表 3)显示,5 个 *CAD* 基因中有 13 个 SNP(单核苷酸多态性)或 InDel(插入缺失标记)位点,且绝大多数突变位点分布在基因间区或内含子区。

*Solyc01g107590* 和 *Solyc03g078440* 在 2 份材料中存在的变异位点较多,分别为 4 个和 5 个,突变位点多有可能在基因表达水平产生影响。

表 3 不同材料中 CAD 基因的变异分析

基因编号	起始碱基位置	终止碱基位置	参照	C285	P31	所在区域
<i>Solyc01g107590</i>	95 089 575	95 089 575	C	C	CA	基因间区
	95 091 302	95 091 302	C	CT	C	5'UTR
	95 094 938	95 094 939	GT	G	GT	基因下游
	95 095 667	95 095 667	C	T	C	3'UTR
<i>Solyc11g011340</i>	4 390 328	4 390 328	C	C	CT	内含子区
	4 367 209	4 367 209	T	TAA	T	内含子区
<i>Solyc11g011330</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Solyc03g078440</i>	50 922 930	50 922 930	G	G	T	基因间区
	50 925 082	50 925 082	C	T	C	基因间区
	50 927 899	50 927 899	C	A	C	基因间区
	50 933 428	50 933 428	G	GAA	G	基因间区
	50 941 367	50 941 367	TA	T	TA	基因间区
<i>Solyc12g055820</i>	61 811 538	61 811 538	T	T	TAAA	基因上游
	61 820 696	61 820 696	A	AT	A	基因间区

注:“—”表示无变异。

2.4 不同番茄果实中 CAD 基因的表达

2.4.1 不同番茄果实发育过程中 CAD 的表达与分析 在果实发育过程中 2 番茄 *CAD* 基因的相对表达量见图 3,*CAD590* 和 *CAD440* 在 P31 的绿熟期、转色期和红熟期相对表达量较为稳定;而 2 个基因的表达在 C285 中则均呈下降趋势,其中 *CAD440* 降幅更大。

2.4.2 不同番茄果实相同发育阶段 CAD 的表达与分析 木质素生物合成关键基因 *CAD* 在 2 份材料中的相对表达结果(图 4)显示,绿熟期 *CAD590* 和 *CAD440* 在 C285 中相对表达量与 P31 相比分别高出约 2 倍和 5 倍;转色期 P31 中 *CAD590* 和 *CAD440* 则分别高于 C285 同期的表达量,其增幅分别为 130% 和 170%;就红熟期而言,2 个基因的相对表达量在 P31

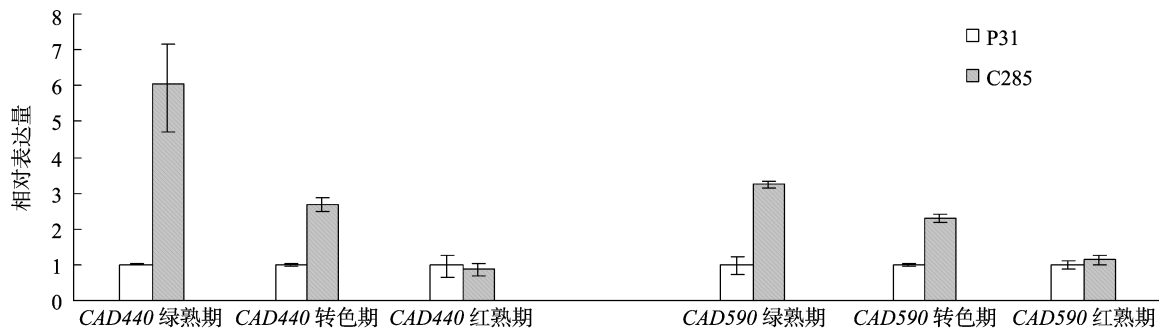


图3 CAD 基因的相对表达量

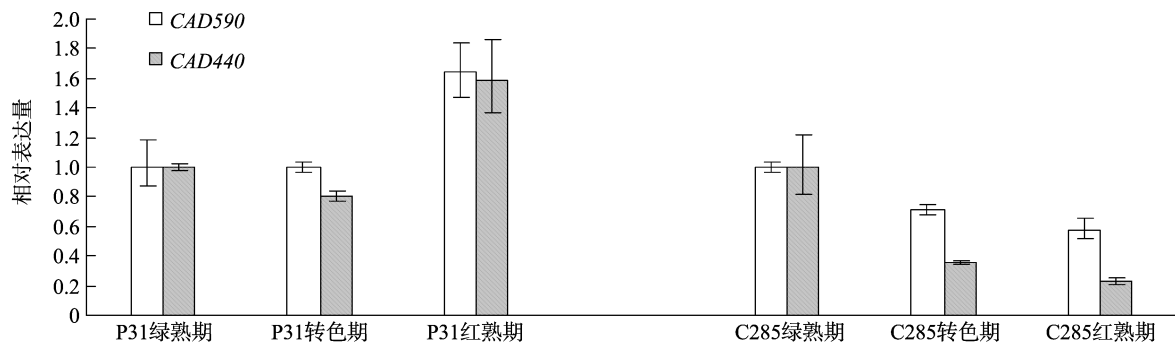


图4 2 份材料中相同时期 CAD 基因的相对表达量

材料中差异较小。

### 3 讨论与结论

本研究以拟南芥中 *CAD* 基因家族的 9 个基因作为参考基因,在番茄中共查询到 5 个 *CAD* 旁系同源基因,且在核酸水平与拟南芥中同源基因间的一致性为 66.7%;5 个 *CAD* 基因在 2 份材料中有 13 个存在突变位点,其中 *Solyc01g107590* 和 *Solyc03g078440* 在 2 份材料中存在的变异位点较多。番茄抗病材料 P31 和感病材料 C285 的果实中木质素含量在不同生育阶段均有差异,感病材料 C285 中木质素含量在转色期时达到峰值,红熟期略有降低;抗病材料 P31 中的木质素含量在 3 个时期变化较小,绿熟期含量最低、红熟期最高。说明抗病材料 P31 在番茄生长过程中,*CAD* 基因表达正常,木质素含量相对稳定,而感病材料 C285 在每个时期其木质素含量不如抗病材料 P31 稳定,*CAD* 基因存在变异所致,这与已有研究结果<sup>[8-9]</sup>一致。

本研究结果表明,*CAD590* 和 *CAD440* 在 P31 的绿熟期和转色期相对表达量较为稳定,在红熟期则大幅升高;而 2 个基因的表达在 C285 中则均呈下降趋势,其中 *CAD440* 降幅更大。绿熟期 *CAD590* 和 *CAD440* 在感病材料 C285 中相对表达量与 P31 相比分别高出 2 倍和 5 倍,转色期也分别提高了 130% 和 170%,而红熟期 2 个基因的相对表达量在 2 份材料中差别较小。同一基因在不同材料中同一时期表达不同,不同基因在同一材料同一时期也不尽相同,这与朱金鑫等的研究结果<sup>[10-11]</sup>一致。

### 参考文献:

[1] 孟令新. 钾、钙、镁肥对保护地番茄生理性病害与产量的影响

[J]. 安徽农学通报,2008,14(10):60-61.

[2] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology,2003,54(1):519-546.

[3] Sun Y, Wu Y, Zhao Y, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of two cinnamyl alcohol dehydrogenases from a liverwort *Plagiochasma appendiculatum* [J]. Plant Physiology and Biochemistry,2013,70:133-141.

[4] Ralph J, Lundquist K, Brunow G, et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids [J]. Phytochemistry Reviews,2004,3(1/2):29-60.

[5] Saballos A, Ejeta G, Sanchez E, et al. A genome-wide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies *SbCAD2* as the *brown midrib6* gene [J]. Genetics,2009,181(2):783-795.

[6] Goffner D, Joffroy I, Grima-Pettenati J, et al. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus xylem* [J]. Planta,1992,188(1):48-53.

[7] Ma Q H. Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat [J]. Journal of Experimental Botany,2010,61(10):2735-2744.

[8] 王汉荣,方丽,任海英. 番茄筋腐病的识别与防治[J]. 中国蔬菜,2011(15):24-25.

[9] 裴玉侠,寇春会. 番茄筋腐病的发病原因与综合防治技术[J]. 黑龙江农业科学,2012(10):163-164.

[10] 朱金鑫,孙金金,原晓龙,等. 巴拉圭瓜多竹 *CAD* 基因的克隆与分析[J]. 西部林业科学,2017(1):6-11,16.

[11] 张明. 茶树中三个与茶尺蠖取食诱导相关的肉桂醇脱氢酶 (*CAD*) 基因克隆与功能分析[D]. 合肥:安徽农业大学,2011.