

番茄 *SIMYB48* 基因生物信息学及表达分析

刘佳凤¹, 郭晓青², 王桂强³, 王虹云⁴, 朱桐¹,
曹守军⁴, 姚建刚⁴, 张丽莉⁴, 张瑞清⁴, 赵婧¹, 李涛^{1,4}

(1. 烟台大学生命与科学学院 山东烟台 264000 2. 烟台市农业技术推广中心 山东烟台 265499
3. 招远市张星镇农业综合服务中心 山东招远 265403 4. 山东省烟台市农业科学研究院 山东烟台 264500)

摘要: MYB 转录因子是植物转录因子家族中数量最多、用途最广的成员之一, 为挖掘更多番茄 (*Solanum lycopersicum*) MYB 转录因子家族成员信息, 初步探究其表达模式及功能, 以番茄 Ailsa Craig 为试材, 采用 RT-PCR 的方法克隆 *SIMYB48* 基因, 并对其进行生物信息学及表达、定位分析。结果表明, 番茄 *SIMYB48* 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 708 bp, 编码 235 个氨基酸, 在番茄的根中表达量最高, 叶中次之。SIMYB48 蛋白含有保守的 MYB 结构域, 定位于细胞核中, 属于不稳定、亲水性蛋白。对 *SIMYB48* 启动子分析, 发现其含有大量的逆境响应元件, qRT-PCR 及 RNA-seq 数据库分析结果表明, 高盐、生物逆境胁迫条件下, *SIMYB48* 基因表达量均随处理时间延长而升高, 干旱胁迫条件下表达量下降, 推测其可能参与番茄生物及非生物逆境胁迫反应。研究结果为进一步深入探究番茄 *SIMYB48* 基因的功能及作用机制提供了参考。

关键词: 番茄; *SIMYB48*; 表达分析; 定位

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)04-027-09

Bioinformatics and expression analysis of tomato *SIMYB48* gene

LIU Jiafeng¹, GUO Xiaoqing², WANG Guiqiang³, WANG Hongyun⁴, ZHU Tong¹, CAO Shoujun⁴, YAO Jian'gang⁴, ZHANG Lili⁴, ZHANG Ruiqing⁴, ZHAO Jing¹, LI Tao^{1,4}

(1. College of Life and Science, Yantai University, Yantai 264000, Shandong, China; 2. Yantai Agricultural Technology Extension Center, Yantai 265499, Shandong, China; 3. Agricultural Comprehensive Service Center, Zhangxing Town, Zhaoyuan 265403, Shandong, China; 4. Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 264500, Shandong, China)

Abstract: MYB transcription factor is one of the most abundant and widely used members of the plant transcription factor family. In order to mine more information about MYB transcription factor family members of tomato (*Solanum lycopersicum*) and preliminarily explore its expression pattern and function, this study took tomato Ailsa Craig as the test material. *SIMYB48* gene was cloned by RT-PCR, and its bioinformatics, expression and localization were analyzed. The results showed that the open reading frame (ORF) length of tomato *SIMYB48* gene was 708 bp, encoding 235 amino acids, and the expression level was the highest in tomato roots, followed by in leaves. The SIMYB48 protein contains a conserved MYB domain, which is an unstable, hydrophilic protein located in the nucleus. *SIMYB48* promoter analysis found that it contained a large number of stress response elements. The results of qRT-PCR and RNA-seq database analysis showed that the expression of *SIMYB48* gene increased with the extension of treatment time under high salt and biological stress, and decreased under drought stress, suggesting that *SIMYB48* gene might be involved in biological and abiotic stress response of tomato. The results of this study provide a reference for further investigation of the function and mechanism of tomato *SIMYB48* gene.

Key words: *Solanum lycopersicum*; *SIMYB48*; Expression analysis; Location

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 具有良好的口感、丰富的营养、繁多的品种以及较高的研究价值和经济价值, 成为我国乃至世界上栽培最为广泛的蔬菜

作物之一。在生物学水平上, 番茄也是应用于多种学科领域、进行遗传转化研究的非常重要的模式植物。自然环境中的高盐、干旱、低温等逆境因素严

收稿日期: 2023-10-10; 修回日期: 2023-12-20

基金项目: 烟台市科技计划项目 (2022XCZX091); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-23-G11); 重庆市巫山县科技项目 (wskjdx-bxm2023004); 国家自然科学基金面上项目 (32372737); 西南作物基因资源发掘与利用国家重点实验室开放课题 (SKL-KF202224)

作者简介: 刘佳凤, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为番茄抗逆基因的验证。E-mail: 19558916823@163.com

通信作者: 李涛, 男, 正高级农艺师, 研究方向为蔬菜育种及分子生物学。E-mail: ytnkyscs@163.com

重影响番茄的生长发育和产量,因此了解番茄在抗逆反应过程中的作用机制,进而探寻抗逆基因资源、选育番茄抗逆品种在理论和生产上具有重大意义。

MYB 转录因子是植物转录因子家族中数量最多、用途最广的成员之一^[1]。MYB 转录因子是基于编码蛋白含有一个或多个高度保守的 DNA 结构域-MYB 结构域,含有大约 50 个氨基酸残基组成的不完全重复的 R 结构(R1,R2 和 R3)^[2]。根据每个基因中 R 结构的数量,可分为 4 个亚类^[3]。其中,R1/R2-MYB 亚类只包含 1 个 MYB 结构域,R2R3-MYB 亚类包含 2 个 MYB 结构域,R1R2R3-MYB 亚类包含 3 个连续结构域,4R-MYB 亚类包含 4 个 MYB 结构域^[4-6]。

在植物中第一个被发现的 MYB 类基因是从单子叶植物玉米中克隆出来的 *ZmMYB1* 基因,该基因为色素合成有关基因^[7]。随着基因组学和分子生物学的发展,越来越多的 MYB 家族成员被鉴定。MYB 转录因子不仅能对激素以及干旱、高温、高盐等逆境胁迫作出应答^[8],而且广泛参与植物初生和次生代谢反应^[9],并对植物的生长发育和形态建成^[10],具有重要的调控作用。MYB 转录因子参与植物的生长发育调控,*AtMYB23* 基因参与拟南芥根表皮发育过程中的正调控途径^[11]。植物 MYB 类转录因子在植物的代谢生理活动中也发挥作用,玉米 *ZmMYB028* 和 *ZmMYB073* 成员与苯丙烷生物合成负调控相关^[12]。已有研究表明,番茄 MYB 类转录因子在响应干旱胁迫方面发挥着重要作用。在干旱胁迫处理下,*SIMYB10* 和 *SIMYB14* 两个基因相对表达量呈升高趋势,将 *SIMYB14* 基因沉默后,通过对生理生化指标以及活性氧的测定,表明 *SIMYB14* 基因对番茄耐盐性和抗旱性有重要作用^[13]。沉默 *SIMYB71* 基因后,促进了番茄植株在干旱胁迫下的生长,降低了活性氧含量、相对电导率和丙二醛含量,影响叶绿素积累和胁迫基因的表达,表明 *SIMYB71* 基因在非生物胁迫方面起着负调控作用^[14]。

笔者前期通过海水栽培番茄的转录组分析,发现随海水浓度增加,*SIMYB48* 表达量升高^[15]。为了进一步研究 *SIMYB48* 转录因子在番茄生长发育以及抗逆过程中的功能和机制,利用 RT-PCR 方法克隆了 *SIMYB48* 基因,并对其进行生物信息学、启动子响应元件、表达、定位等分析,以期后续研究番茄 *SIMYB48* 基因的功能及作用机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验用番茄品种为 Ailsa Craig,种子由山东省

烟台市农业科学研究院蔬菜花卉研究所保存。试验于 2022 年 10 月至 2023 年 7 月在山东省烟台市农业科学研究院蔬菜花卉研究所实验室进行。取新鲜的番茄叶片,锡箔纸包裹置于液氮中冷冻,并在 -80 °C 保存,用于 RNA 提取。用于组织表达分析取样的部位及时期:叶为完全展开的功能叶;茎为生长点下端第 2 节位茎段;根为清洗后的白色根段;花朵为开放当天的花;成熟果为红色的正常健康果实。将番茄种子播种于 20 cm×20 cm 塑料盆中,栽培基质按草炭、蛭石、珍珠岩体积比 2:1:1 进行配置,在植株 5 叶 1 心期时,进行干旱胁迫和高盐胁迫处理,将 200 mL 10% 的聚乙二醇 6000 (PEG-6000) 溶液、200 mL 的 NaCl 溶液(200 mmol·L⁻¹) 分别灌溉番茄植株,在 1、6、12、24、48、72 h 分别取番茄叶片,液氮冷冻,-80 °C 保存,用于逆境胁迫表达分析。亚细胞定位所用植物材料为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* L.),将烟草种子播种于 7 cm×7 cm 穴盘中,光周期设置为光照 12 h/黑暗 12 h,在温度为 (25±2) °C 光照培养箱中培养 1 个月,用于烟草瞬时转化。

RNA 提取试剂盒购于北京华越洋生物科技有限公司;反转录试剂盒购于天根生化科技有限公司;高保真 DNA 聚合酶购于北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购于艾科瑞生物科技有限公司。其他化学药品购于北京聚合美生物科技有限公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 将番茄嫩叶用液氮研磨,按照华越洋 RNA 提取试剂盒操作说明提取植物组织总 RNA,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用天根 cDNA 第一链合成试剂盒将其反转录获得 cDNA,然后置于 -20 °C 保存,用于后续试验。

1.2.2 番茄 *SIMYB48* 基因的克隆 从 NCBI 中获得番茄 MYB 家族基因成员 *SIMYB48* 的序列,利用 Primer 5 工具设计全长引物,引物序列为 F: ATG-GCACAAAGAAGAAATGAGAAGAG; R: TTAGC-CAGCAAAGAATGTGTTATCCT,以 cDNA 为模板,扩增 *SIMB48* 全长序列。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 20 s, 51 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 22 s, 共 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,切胶后使用华越洋 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,将扩增

产物连接至 pMD18-T 克隆载体,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取经 PCR 鉴定的阳性克隆,送样测序。

1.2.3 *SIMYB48* 基因生物信息学分析 在 NCBI 中利用 Conservation Domain 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/?term=>) 进行基因保守结构域分析。在 ProtParam 网站 (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 计算蛋白的等电点、分子质量和分子式。运用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白的跨膜域预测;通过 SignalP- 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 预测信号肽。利用 ExPasy- ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测蛋白质亲水疏水性。利用 SOPMA 网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20sopma.html) 预测蛋白质二级结构。利用 Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 网站进行同源建模预测三级结构。在 NCBI 网站中利用 blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 将 *SIMYB48* 基因与蛋白 nr 数据库比对。利用 DNAMAN 对各物种中的 MYB 的氨基酸序列进行比对。使用 MEGA7 软件的邻接法构建系统进化树。

1.2.4 *SIMYB48* 表达模式分析 采用 CTAB 方法提取番茄不同组织部位 RNA,并反转录为 cDNA。通过 Primer Premier 5 软件设计荧光定量 PCR 引物 (F: ACGATACGGGTGGACTTGAC; R: ATCCTG-GTTGTCCAAGCAAT, 扩增片段为 227 bp), 选取 *actin* 为内参基因,引物序列为 F: GGAATGGGACAGAAGGAT; R: CAGTCAGGAGAACAGGGT, 扩增产物为 183 bp,以获得的 cDNA 为模板,参照 iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit 试剂盒(伯乐生命医学产品上海有限公司)说明书,进行实时荧光定量 PCR 扩增。采用 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(ABI, USA)进行分析,PCR 反应体系为:2× qPCR Mix 10 μ L, 正反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.5 μ L, cDNA 单链模板 1 μ L, ddH₂O 8 μ L, 共 20 μ L。PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环, 60 °C 延伸 1 min。设置 3 次生物学重复,使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因的相对表达量。数据通过 Excel 计算并绘制柱状图。

利用番茄基因组数据库 (<https://solgenomics.net>) 查询番茄 *SIMYB48* 基因相关表达量。在番茄

基因组数据库工具栏内进入番茄表达数据库 (TED),在表达量一栏下的 RNA-seq 数据库中输入基因 ID: Solyc06g005310 进行表达量查询。选取试验编号为 D007,该基因在生物胁迫下,受细菌菌株(荧光假单胞菌、恶臭单胞菌和农杆菌)处理的多个表达量作为参考,分析 *SIMYB48* 基因在生物胁迫下的表达模式,并将 *SIMYB48* 基因数据通过 Excel 整理、绘制柱状图。

1.2.5 亚细胞定位 使用 Primer Premier 5 软件设计引物,并且在特异性引物上添加 BsaI 和 Eco31I 酶切位点及保护碱基 (F: cagtCGTCTCacaacatggca-caagaagaaatgag; R: cagtCGTCTCatacagccagcaagaat-gtgttat),按照 1.2.2 PCR 扩增体系对番茄叶片 cDNA 进行扩增,反应程序为:95 °C 3 min; 95 °C 20 s, 51 °C 20 s, 72 °C 22 s, 共 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,切胶回收目的片段。使用 BsaI 和 Eco31I 限制性内切酶,对载体和胶回收片段进行双酶切,载体双酶切体系如下:Nuclease-free Water 13 μ L, 10× Buffer 2 μ L, BsaI/Eco31I 1 μ L, pBWA (V) HS-ccdb-GLosgfp 4 μ L, 共 20 μ L, 37 °C 反应 1 h。目的基因胶回收片段酶切体系同上。按照 PCR 反应液纯化试剂盒说明书纯化酶切产物。得到纯化产物后进行连接。连接体系为:Nuclease-free Water 5.5 μ L, 10× Buffer 1 μ L, T4DNA ligase 1 μ L, 纯化产物 2.5 μ L, 共 10 μ L。将重组产物转化到大肠杆菌 DH5 α 细胞,菌液 PCR 筛选阳性克隆子进行测序,将测序正确的阳性菌落摇菌培养提取质粒。将表达载体转入农杆菌 GV3101 后,将菌液涂布于卡那霉素抗性 YEB 固体培养基上,挑取单克隆放入 YEB 液体培养基中,在 28 °C 下培养 2 d,离心去上清液后,用 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ (含 120 μ mmol·L⁻¹ AS) 重悬菌体,调节 OD₆₀₀ 至 0.6 左右。从烟草叶片下表皮(背面)压迫注射菌液,弱光培养 2 d。制作玻片,在激光共聚焦显微镜下观察并拍照,同时以空载体转化的农杆菌作为对照,重复上述操作。

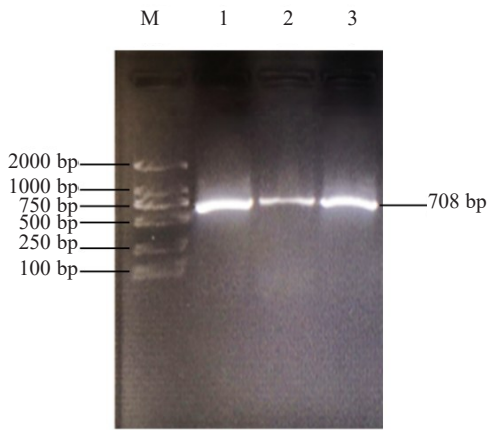
2 结果与分析

2.1 *SIMYB48* 基因的克隆

以番茄嫩叶 cDNA 为模板,以全长引物进行 PCR 扩增,获得基因全长 708 bp (图 1), 编码 235 个氨基酸。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 *SIMYB48* 转录因子的保守结构域分析 为



注: M. DL2000 DNA Marker; 1、2、3 为 *SIMYB48* 扩增条带。

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1, 2 and 3 are *SIMYB48* amplified bands.

图1 *SIMYB48* 基因的 PCR 扩增电泳图
Fig. 1 PCR amplification electrophoresis of *SIMYB48* gene

为了分析 *SIMYB48* 蛋白保守结构域, 将得到的核苷酸序列翻译成蛋白序列后, 在 NCBI 的功能结构域选项中进行预测。结果表明, *SIMYB48* 基因含有典型的 MYB 转录因子家族的 DNA 结构域, 还含有 PLN03091、REB1 和 SANT 结构域(图 2)。

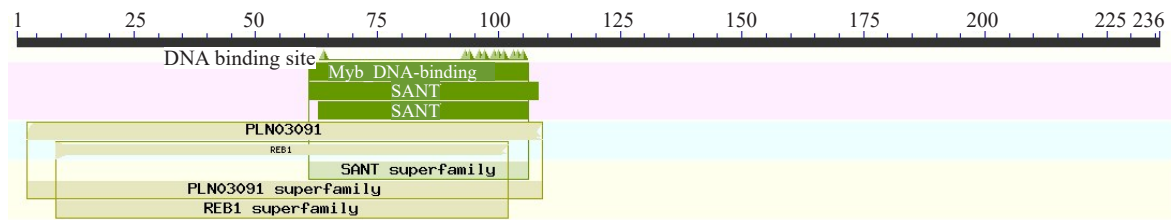


图2 *SIMYB48* 基因保守结构域分析

Fig. 2 Analysis of *SIMYB48* gene conserved domain

表1 *SIMYB48* 编码蛋白质的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of *SIMYB48* encoded proteins

基因名称 Genes name	分子质量 Molecular weight	理论等电点 Isoelectric points	不稳定指数 Instability index	染色体位置 Chromosome location
<i>SIMYB48</i>	27.8 kD	8.86	71.71	6

β -折叠, 仅占 6.81%(图 5-A)。

为了验证笔者对 *SIMYB48* 蛋白二级结构预测的结果, 利用 SWISS-MODEL 网站对 *SIMYB48* 的蛋白三级结构进行建模(图 5-B), 从图中可以看出, *SIMYB48* 蛋白结构主要由无规则卷曲和螺旋结构构成, 与上述的蛋白二级结构预测结果相符。

2.2.2 *SIMYB48* 编码蛋白质的理化性质和信号肽以及编码蛋白质产物的亲水性疏水性分析 利用在线软件 ProtParam 分析 *SIMYB48* 蛋白质的理化性质, 其分子式为 $C_{1226}H_{1874}N_{348}O_{365}S_{15}$, 分子质量为 27.8 kD, 理论等电点 pI 为 8.86。其编码蛋白质的氨基酸组成中丝氨酸(Ser)占比最高, 为 9.4%, 其次是赖氨酸(Lys), 为 8.1%, 天冬酰胺(Asn)为 8.1%。蛋白不稳定性指数为 71.71, 属于不稳定蛋白(表 1)。TMHMM 在线预测该蛋白的跨膜结构, *SIMYB48* 转录因子所编码的 235 个氨基酸均不在跨膜区, 说明 *SIMYB48* 蛋白不含跨膜结构, 不属于跨膜蛋白(图 3-A)。通过 Signal IP4.0 软件分析该蛋白信号肽, 结果表明 *SIMYB48* 蛋白序列无信号肽(图 3-B)。

利用 ExPasy-ProtScale 对 *SIMYB48* 蛋白进行亲水性疏水性分析, 结果如图 4 所示, -3.233 为最小的负值, 1.556 为最大的正值, 负值的绝对值大于正值的绝对值, 表明该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.3 *SIMYB48* 蛋白结构分析 运用在线软件 SOPMA 预测 *SIMYB48* 的二级结构, 结果显示 *SIMYB48* 蛋白中不规则卷曲含量高达 49.79%, 其次是 α -螺旋, 占 36.17%, 延伸链占 7.23%, 最少的是

2.2.4 蛋白的同源比较及进化分析 通过 NCBI 中 Blast 检索, 将 *SIMYB48* 与蛋白 nr 数据库比对, 分析得知 *SIMYB48* 与其他植物的 MYB 蛋白有高度的同源性(图 6), 说明其蛋白的结构和功能都高度保守。结果表明, 同源性最高的是潘那利番茄 MYB48 (XM_015222064.2), 同源性达到 98.07%; 其次是马铃薯 MYB48 (XM_006366855.2), 同源性为 96.92%; 野生马铃薯 MYB48 (XM_049519716.1)、窄刀薯 MYB48 (XM_049556356.1)、辣椒 MYB48 (XM_016721740.2) 这 3 个 MYB 基因编码的氨基酸序列同源性也具有较高的同源性, 分别为 96.72%、96.34%、89.39%。

为了进一步分析 *SIMYB48* 与其他植物 MYB

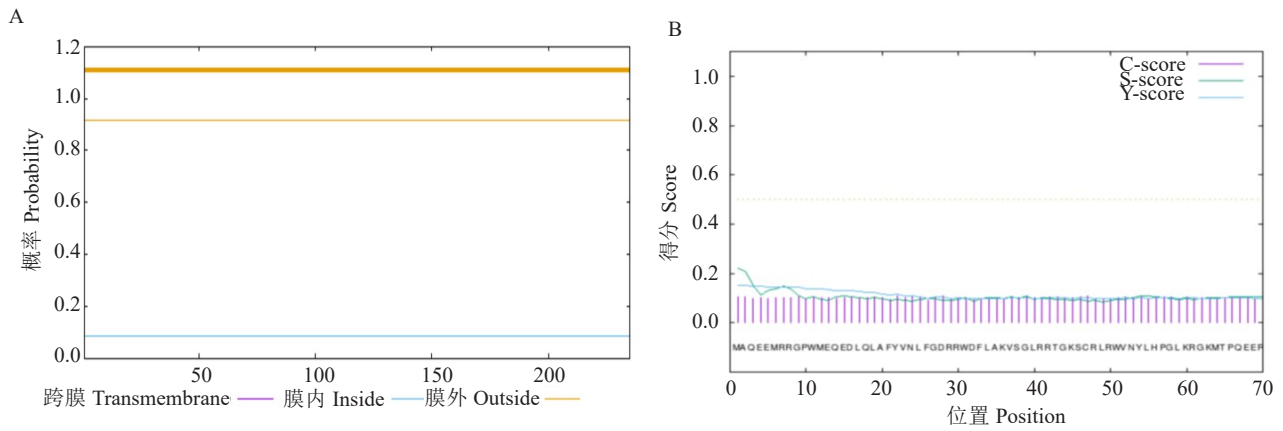


图3 SIMYB48 蛋白跨膜区域(A)及信号肽(B)预测。

Fig. 3 Prediction of SIMYB48 protein transmembrane region(A) and signal peptide(B)

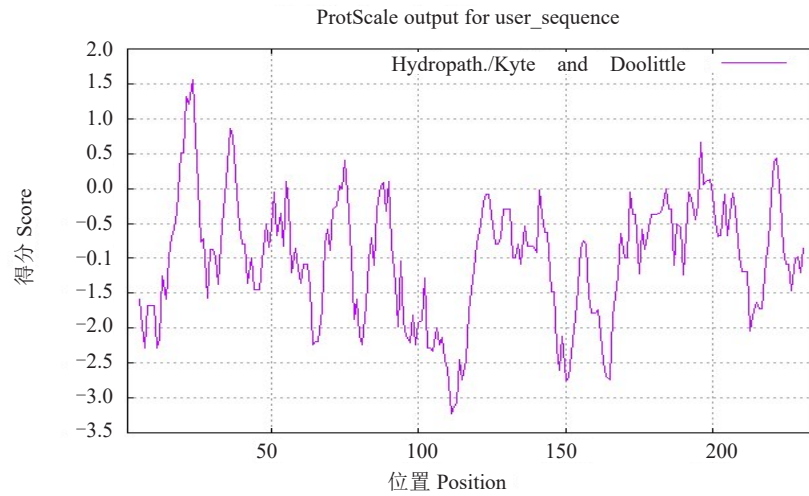
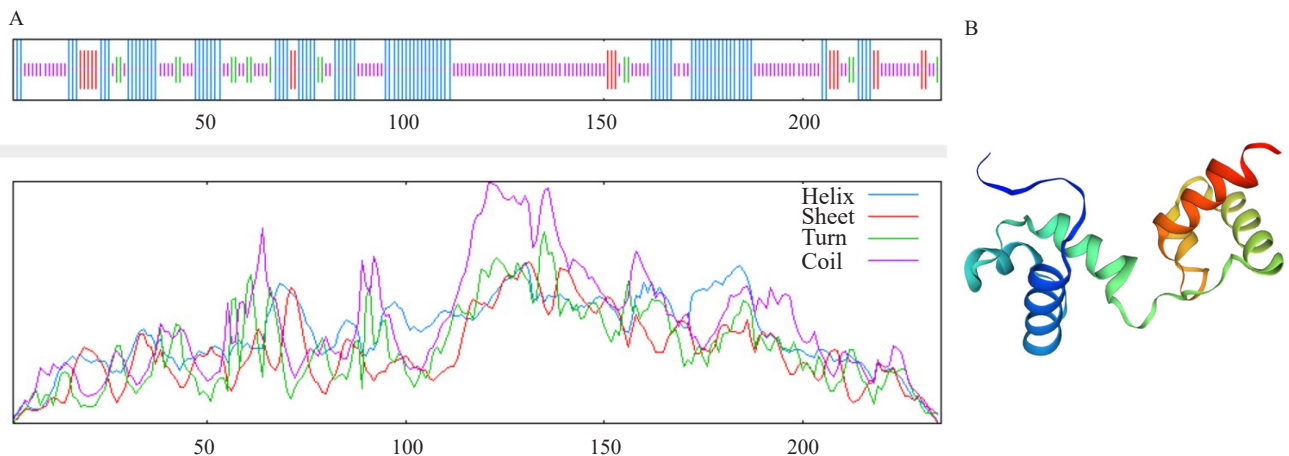


图4 SIMYB48 蛋白的亲水性分析

Fig. 4 Hydrophilic analysis of SIMYB48 protein



注:A. SIMYB48 蛋白二级结构预测;B. SIMYB48 蛋白三级结构预测。蓝色为 α -螺旋;绿色为 β -折叠;紫色为无规则卷曲;红色为延伸链。

Note: A. SIMYB48 protein secondary structure prediction; B. Prediction of tertiary structure of SIMYB48 protein. Blue is alpha helix; Green is β -fold; Purple is random curling; Red is the extension chain.

图5 SIMYB48 蛋白结构预测

Fig. 5 SIMYB48 protein structure prediction

SIMYB48	MTPOEERLILELHASKWGNRWSR	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKAH	DERKN	NAS	SPSSSFNSSSSF	70								
SpMYB48-like	MTPOEERLILELHASKWGNRWSK	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKAH	DERKN	NAS	SPSSSFNSSSSF	70								
StMYB48-like	MTPOEERLILELHASKWGNRWSR	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKAH	DERKN	NAS	SPSSSFNSSSSF	70								
SvMYB48-like	MTPOEERLILELHASKWGNRWSR	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKAH	DERKN	N	SPSSSFNSSSSF	70								
SsMYB48-like	MTPOEERLILELHASKWGNRWSR	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKAH	DERKN	NAS	SPSSSFNSSSSF	70								
CaMYB48	MTPOEERLILELHASKWGNRWSK	IAMKLPGRDTDNEIKNYWRTHMRKKA	DERKN	KAS	SPSSSFNSSSSF	70								
Consensus	mtpqeerlilelhaskwgnrws	iamklpgrtdneiknywrthmrkka	derkn	s	spsssfnsssf									
SIMYB48	SSNSPDVDFFTP	IKKNNERNFYDTGG	LKK	NDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	O	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	139
SpMYB48-like	SSNSPDVDFFTP	IKKNNERNFYDTGG	LKK	NDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	O	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	139
StMYB48-like	SSNSPDVDFFTP	IKKNNERNFYDTGG	LKK	NDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	O	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	139
SvMYB48-like	SSNSPDVDFFTP	IKKNNERNFYDTGG	LKK	NDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	O	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	139
SsMYB48-like	SSNSPDVDFFTP	IKKNNERNFYDTGG	LKK	NDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	O	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	138
CaMYB48	YNSPDVDFFTP	IMENNERNFYDTGG	VKK	INDG	DKM	VYSMDEIWKDIELS	E	SETM	NIKPI	M	SE	I	WN	140
Consensus	snspdv ftpi	nnernfydgg	kk	ndg	km	vysmdeiwkdiels		setm	nikpim	sp	n			
SIMYB48	YCPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	171									
SpMYB48-like	YCPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	171									
StMYB48-like	YCPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	171									
SvMYB48-like	YCPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	171									
SsMYB48-like	YYPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	170									
CaMYB48	YCPN	TLWMS	EEETKMFPOFY	CLDNQDNTFFA	174									
Consensus	y pn	tlwms	eeetkmfpqfy	cldnqdnrtffa										

图6 氨基酸序列同源关系比对

Fig. 6 Homologous relationship comparison of amino acid sequence

之间的进化层面关系,在上述氨基酸多重比对的基础上,利用MEGA 7软件对栽培番茄(*Solanum lycopersicum*)、潘那利番茄(*Solanum pennellii*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、野生马铃薯(*Solanum verrucosum*)、窄刀薯(*Solanum stenotomum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、绒毛状烟草(*Nicotiana tomentosiformis*)、渐狭叶烟草(*Nicotiana attenuata*)和林烟草(*Nicotiana glauca*)这9种植物的MYB氨基酸序列进行系统进化树分析。通过进化树分析(图7)可以看出,与番茄SIMYB48蛋白亲缘关系最近的是潘那利番茄,被聚为一组,其次是马铃薯,这与氨基酸多重比较的结果一致,不同植物中的MYB蛋白进化关系分析结果基本符合植物分类学地位,其种属特性比较明显,即种属关系越近的亲缘关系越近。

2.2.5 SIMYB48 启动子顺式作用元件分析 利用软件 Plant CARE 对 SIMYB48 基因启动子序列上的顺式作用元件进行预测分析,如表 2 所示, SIMYB48 启动子中含有大量与逆境胁迫、激素响应和光响应相关的顺式作用元件,包括光响应元件 GA-motif、GATA-motif、TCCC-motif、G-Box 等,逆境响应元件 ABRE、ARE、TCA-element 等,表明 SIMYB48 可能参与相应生长发育与逆境胁迫响应过程。

2.3 SIMYB48 基因的表达分析

2.3.1 SIMYB48 基因在番茄不同组织中的表达 以番茄肌动蛋白基因 *actin* 为内参,qRT-PCR 分析结果表明, SIMYB48 基因在番茄苗的根、茎、叶和花中均有不同程度的表达,其中在根和叶中的表达量较高,在花和茎中表达量极低,在果实中几乎不表达(图 8)。

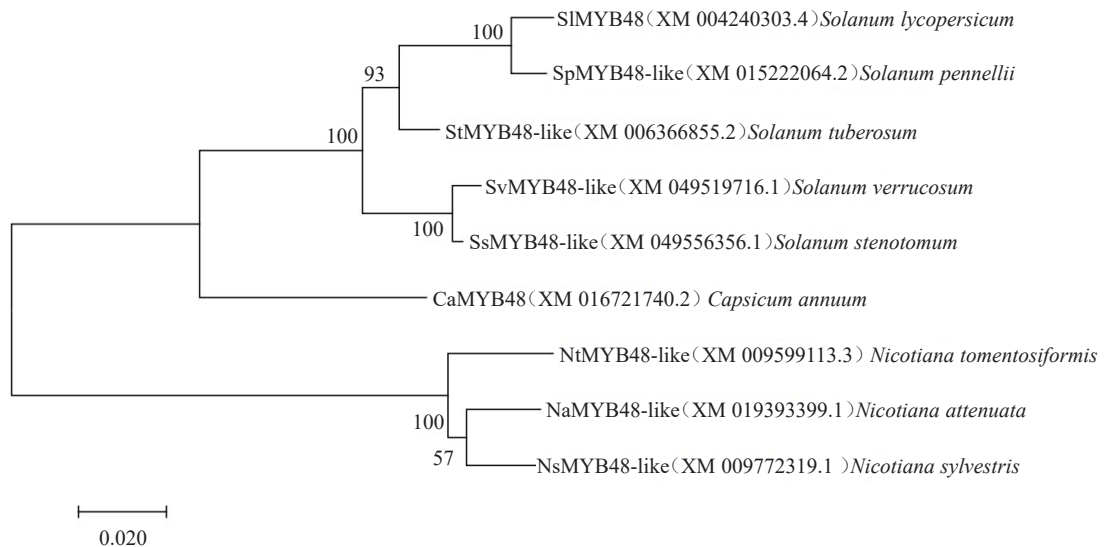


图7 不同物种 MYB 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of MYB amino acid sequences in different species

表 2 *SIMYB48* 基因启动子顺式作用元件分析
Table 2 Analysis of cis-acting elements of *SIMYB48* gene promoter

名称 Name	序列 Sequence	功能 Function	数目 Amount
Box 4	ATTAAT	参与光反应的保守 DNA 模块的一部分	5
ATCT-motif	AATCTAATCC	Part of a conserved DNA module involved in light reactions	1
CAAT-box	CCAAT	启动子和增强子区常见的顺式作用元件	16
	CAAT	Common cis-acting elements in promoter and enhancer regions	20
GA-motif	ATAGATAA	光响应元件的一部分	1
GATA-motif	AAGGATAAGG	Part of a photoresponsive element	2
TCCC-motif	TCTCCCT		1
G-Box	CACGTT	参与光响应的顺式调节元件	1
	CACGTC	Cis-regulating element involved in light response	2
ABRE	ACGTG	参与脱落酸反应的顺式作用元件	3
		Cis-acting elements involved in abscisic acid reactions	
ARE	AAACCA	厌氧诱导所必需的顺式调节元件	1
		Cis-regulatory elements necessary for anaerobic induction	
TATA-box	TATA	转录起始-30 左右的核心启动子元件	29
	TATAA	The core promoter element of transcription initiation -30 or so	11
	ATATAT		8
MRE	AACCTAA	MYB 结合位点参与光响应	1
		MYB binding sites are involved in light response	
Myc	TCTCTTA	MYC 蛋白相关元件	1
MYC	CATGTG	MYC protein-related elements	1
MYB	TAACCA	MYB 蛋白相关元件	1
MYB-like sequence	TAACCA	MYB protein-related elements	1
O2-site	GATGATGTGG	顺式调控元件参与玉米醇溶蛋白代谢调控	1
	GTTGACGTGA	Cis-regulatory elements are involved in the regulation of zein metabolism	1
TCA-element	CCATCTTTTT	水杨酸响应性顺式作用元件	2
	TCAGAAGAGG	Salicylic acid responsive cis-acting element	1
AuxRR-core	GGTCCAT	参与生长素应答的顺式调控元件	1
		Cis-regulatory elements involved in auxin response	
CAT-box	GCCACT	与分生组织表达相关的顺式调控元件	1
		Cis-regulatory elements associated with meristem expression	

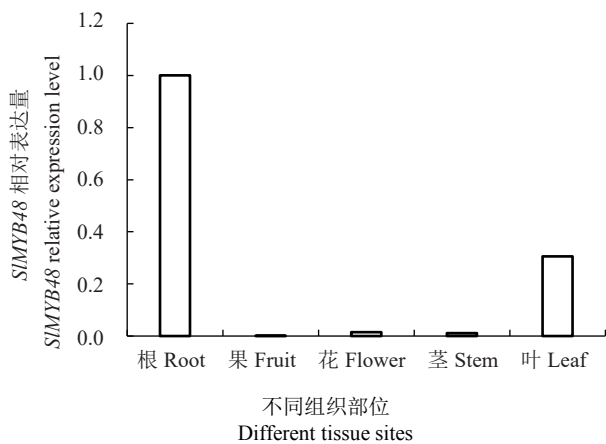


图 8 *SIMYB48* 在番茄不同组织中的表达情况
Fig. 8 Expression of *SIMYB48* in different tissues of tomato

2.3.2 非生物胁迫对 *SIMYB48* 基因表达量的影响 对盐胁迫和干旱胁迫下 *SIMYB48* 的表达量进行分析,如图 9 所示。与对照相比,高盐胁迫处理下,6 h 后 *SIMYB48* 在番茄叶片中表达量迅速上升,并在 48 h 达到最大值,之后略有下降,但表达量均高于对照。模拟干旱条件下,随处理时间延长,*SIMYB48* 表达量呈先降低后升高的变化趋势,处理 1 h,表达量约为对照的一半,12 h 后明显低于对照植株。以上结果表明 *SIMYB48* 对高盐及干旱均产生胁迫响应。

2.3.3 生物胁迫对番茄 *SIMYB48* 基因表达量的影响 番茄叶片在经过细菌菌株(荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌和根癌农杆菌)处理后,*SIMYB48* 基因表达量均随处理时间延长上调,其中根癌农杆菌受诱导更明显,*SIMYB48* 表达量在 6 h 后达到 17.23。受荧光

假单胞菌诱导较弱,说明 *SIMYB48* 可能参与番茄生物胁迫(图 10)。

2.4 *SIMYB48* 基因的亚细胞定位

为了明确 *SIMYB48* 蛋白在细胞中的作用部位,利用农杆菌介导的瞬时转化法,将培养好的带有

SIMYB48 与 GFP 融合蛋白载体的农杆菌注射到烟草叶片,培养 2 d 后在显微镜下观察融合蛋白在烟草叶片细胞中的分布情况。以空载体注射烟草的结果作为对照。结果表明,*SIMYB48* 蛋白定位在细胞核中,说明该蛋白主要在细胞核中表达(图 11)。

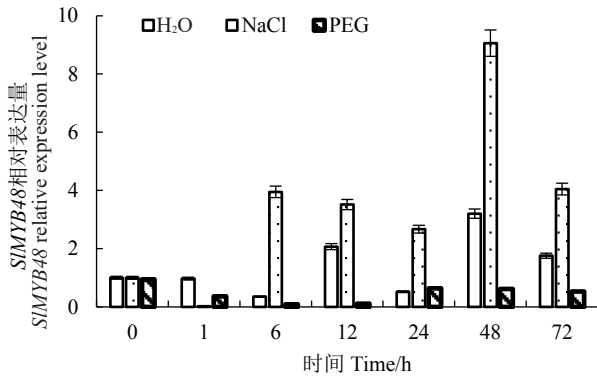


图 9 *SIMYB48* 在高盐及 PEG 模拟干旱逆境胁迫条件下的表达情况

Fig. 9 Expression of *SIMYB48* under high salt and PEG simulated drought stress

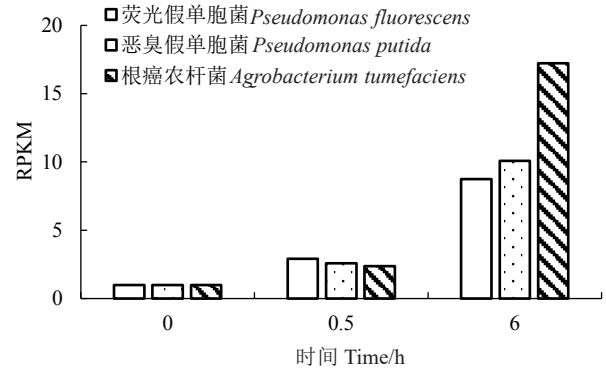
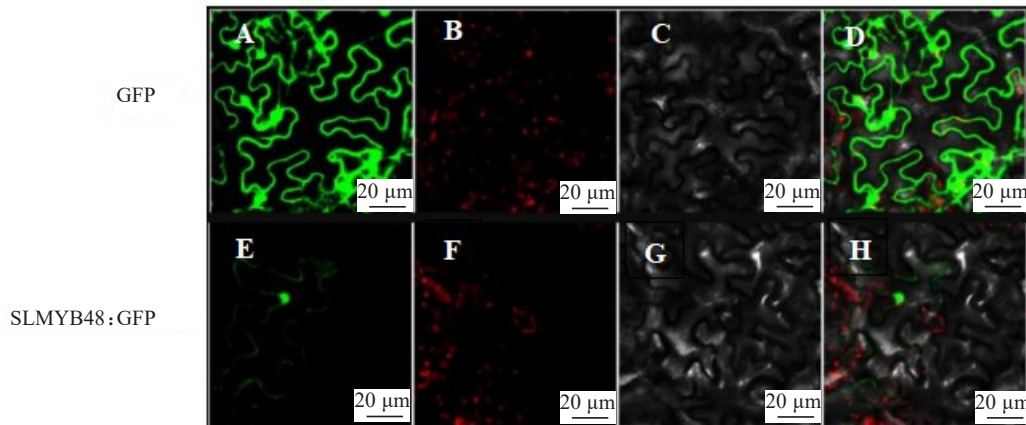


图 10 *SIMYB48* 在细菌菌株胁迫条件下的表达情况
Fig. 10 Expression of *SIMYB48* under bacterial strain stress



注:A-D 表示对照 GFP 蛋白定位;E-H 表示带有 *SIMYB48* 的 GFP 融合蛋白定位。A 和 E 为 GFP 绿色荧光;B 和 F 为叶绿体自发荧光;C 和 G 为明场观察;D 和 H 为三者的叠加图片。

Note: A-D represent control GFP protein localization; E-H represent GFP with *SIMYB48* fusion protein localization. A and E represent GFP green fluorescence; B and F represent Chloroplast autofluorescence; C and G represent bright field observation; D and H represent superimposed picture of the three.

图 11 *SIMYB48* 基因的亚细胞定位
Fig. 11 Subcellular localization of *SIMYB48* gene

3 讨论与结论

R2R3-MYB 蛋白是植物特有的丰富蛋白,在植物的基因组中大约有 100 多个 R2R3-MYB 成员,参与植物生长发育、次生代谢调控、生物和非生物胁迫应答^[16]。笔者通过 RT-PCR 技术克隆得到了全长为 708 bp 的番茄 *SIMYB48* 基因的片段,位于番茄 6 号染色体上。通过生物信息学分析得知,*SIMYB48* 是

一种不稳定的亲水性蛋白,不含跨膜结构域和信号肽。*SIMYB48* 蛋白编码了 235 个氨基酸,对其保守结构域分析表明,*SIMYB48* 蛋白含有 2 个植物 MYB 转录因子家族的特异性结构域-SANT-myb DNA 结合结构域,表明 *SIMYB48* 为 R2R3 型 MYB 转录因子。

通过与其他植物 MYB 氨基酸比对分析,发现番茄 *SIMYB48* 与其他植物的 MYB48 氨基酸表现出了较高的同源性,其中与马铃薯和潘那利番茄的同源性

较高,表现出最近的进化关系。已有研究表明,*St-MYB48-like* 主要参与调控花青素的合成,在植物根的生长中起重要调节作用,同时参与干旱和高盐等非生物胁迫耐受性^[17]。有研究表明,在水稻中过表达 *OsMYB48-1* 能显著提高水稻的耐旱性和耐盐性^[18]。在拟南芥中过表达水稻 *ZmMYB48*,发现 *ZmMYB48* 可能是通过 ABA 信号参与干旱胁迫响应的积极调控因子,表明不同物种的同种基因可能有相似的功能^[19],据此推测番茄 *SIMYB48* 基因可能与调控番茄植株抗逆特性有关。

笔者对番茄 *SIMYB48* 基因启动子序列上的顺式作用元件进行预测分析发现,番茄 *SIMYB48* 启动子中含有大量与逆境胁迫、激素响应和光响应相关的顺式作用元件。*AtMYB48* 在拟南芥根中表达量最高,且与野生型相比,在 H₂O₂ 介导的氧化作用下,*AtMYB48* 敲除后植株的根长显著减少,表明 *AtMYB48* 在根发育中具有正调控作用^[20]。在笔者的研究中,不同部位表达模式分析表明,番茄 *SIMYB48* 基因在番茄根中表达量最高,这与在拟南芥中的研究结果一致,推测 *SIMYB48* 基因在番茄中也存在相似的功能,表明 *SIMYB48* 基因可能在抵抗逆境胁迫和根的生长发育中发挥重要作用。

在盐胁迫和干旱胁迫处理下,通过 qRT-PCR 检测发现,番茄 *SIMYB48* 基因对高盐、干旱均产生响应,其中,在进行盐胁迫处理 48 h 内,*SIMYB48* 基因的表达量迅速上升,并在 48 h 时达到峰值,是对照的 2.8 倍,随后略有下降。在模拟干旱胁迫下,*SIMYB48* 基因的表达量随着干旱处理时间的变化而被抑制表达。这表明该基因参与番茄对高盐和干旱胁迫的响应,受高盐胁迫正调控,受干旱胁迫负调控。在经过荧光假单胞菌等细菌菌株处理后,*SIMYB48* 基因表达量均呈现上升趋势,表明该基因可能在生物胁迫中起调节作用。Rosli 等^[21] 分别用 Pst DC3000(毒力型)和 Pst DC3000(avrB 型)接种病原体,研究转录因子在基础防御和 ETI 中的作用,其中 *AtMYB48* 显示基础防御和 ETI 受损,与 WT 相比,病原体生长势明显更强,表明 *AtMYB48* 基因在基础防御和 ETI 中起着积极的调节作用。

综上所述,番茄 *SIMYB48* 基因的开放阅读框长度为 708 bp,编码 235 个氨基酸,主要在番茄的根及叶中大量表达,定位于细胞核中,属于不稳定、亲水性蛋白,受高盐、干旱、生物等逆境胁迫诱导,推测其可能直接参与番茄根系发育及生物、非生物逆境胁迫响应。

参考文献

- [1] 冯盼盼,陈鹏,洪文杰,等.拟南芥 MYB 转录因子家族研究进展[J].生命科学研究,2016,20(6):555-560.
- [2] SHI M Z, XIE D Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2014, 8(1):47-60.
- [3] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10):573-581.
- [4] HAGA N, KATO K, MURASE M, et al. R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*[J]. Development, 2007, 134(6):1101-1110.
- [5] HOU X J, LI S B, LIU S R, et al. Genome-wide classification and evolutionary and expression analyses of citrus MYB transcription factor families in sweet orange[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112375.
- [6] QIAO M, YU Y C, XIANG F N. The roles of the *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factors in the stress responses[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2009, 21(1):145-150.
- [7] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, et al. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to MYB-related proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. EMBO Journal, 1987, 6(12):3553-3558.
- [8] 郭凯,侯留迪,张莹莹,等.植物 MYB 基因家族研究进展[J].长江大学学报(自然科学版),2020,17(6):93-98.
- [9] 关淑艳,焦鹏,蒋振忠,等. MYB 转录因子在植物非生物胁迫中的研究进展[J].吉林农业大学学报,2019,41(3):253-260.
- [10] 刁鹏飞. *SIMYB41* 基因的克隆及其在番茄低温胁迫响应中的功能分析[D].山东泰安:山东农业大学,2020.
- [11] KANG Y H, KIRIK V, HULSKAMP M, et al. The *MYB23* gene provides a positive feedback loop for cell fate specification in the *Arabidopsis* root epidermis[J]. Plant Cell, 2009, 21(4):1080-1094.
- [12] DU H, FENG B R, YANG S S, et al. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e37463.
- [13] 沈峰屹.番茄 *SLMYB14* 基因响应非生物胁迫的功能分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [14] 冯盼盼.番茄 *SIMYB71* 基因在干旱和盐胁迫响应中的功能研究[D].重庆:重庆大学,2021.
- [15] MU X L, ZHANG L L, WANG H Y, et al. Growth and transcriptome analysis of tomato under seawater stress[J]. South African Journal of Botany, 2021, 137:463-474.
- [16] ALBERT N W, GRIFFITHS A G, COUSINS G R, et al. Anthocyanin leaf markings are regulated by a family of R2R3-MYB genes in the genus *Trifolium*[J]. New Phytologist, 2015, 205(2):882-893.
- [17] 刘婷婷.彩色马铃薯 miR858 对花青素生物合成调控关系研究及其 MYB 基因的克隆[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2019.
- [18] XIONG H Y, LI J J, LIU P L, et al. Overexpression of *OsMYB48-1*, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92913.
- [19] WANG Y, WANG Q Q, LIU M L, et al. Overexpression of a maize *MYB48* gene confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Journal of Plant Biology, 2017, 60(6):612-621.
- [20] IMRAN Q M, HUSSAIN A, LEE S U, et al. Transcriptome profile of NO₂-induced *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):771-785.
- [21] ROSLI H G, ZHENG Y, POMBO M A, et al. Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity[J]. Genome Biology, 2013, 14(12):R139.