

番茄 *SIDOGL4* 转录因子基因的克隆和表达分析

王祎祎¹, 范冰丽¹, 李 莹¹, 王改雪¹, 薛东齐¹, 李 艳², 高艳娜¹

(1. 河南农业大学园艺学院 郑州 450046; 2. 驻马店市农业科学院 河南驻马店 463000)

摘要:为了明确 *SIDOGL4* 基因在番茄中的耐盐作用,以栽培番茄 Ailsa Craig 为试验材料,克隆该基因并通过生物信息学方法分析其理化性质和表达特性。结果表明,*SIDOGL4* 基因 CDS 全长 660 bp,编码 219 个氨基酸;保守结构域分析结果表明,该基因仅含有 1 个 DOG1 结构域,属于 bzip 转录因子中的 DOG1 家族成员;系统进化关系表明,*SIDOGL4* 与马铃薯的 StDOGL4 蛋白亲缘关系较近。组织表达谱结果表明,*SIDOGL4* 基因主要在根和破色期果实中表达。亚细胞定位结果表明,*SIDOGL4* 蛋白定位于细胞核。*SIDOGL4* 基因启动子上有多种与非生物胁迫和激素响应相关的顺式元件。构建 *Pro_{SIDOGL4}::GUS* 融合表达载体,遗传转化番茄检测启动子活性,GUS 组织化学染色结果表明,*SIDOGL4* 在根、茎、生长点、种子等组织中都有表达,表明该基因在番茄整个生长发育过程中发挥重要作用。通过公共数据库中转录组数据分析表明,*SIDOGL4* 基因的表达受到盐、干旱、冷和热胁迫不同程度的诱导。为了进一步验证 *SIDOGL4* 基因的功能,在盐处理后,*SIDOGL4* 基因的转录水平呈先升高后降低的趋势,且在盐处理 2 h 后达到最高转录水平。研究结果为探索 *SIDOGL4* 基因在番茄耐盐中的功能奠定了基础。

关键词: 番茄; *SIDOGL4*; 非生物胁迫; 亚细胞定位; 转录水平

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2024)08-024-10

Cloning and expression analysis of tomato *SIDOGL4* transcription factor gene

WANG Yiyi¹, FAN Bingli¹, LI Ying¹, WANG Gaixue¹, XUE Dongqi¹, LI Yan², GAO Yanna¹

(1. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China; 2. Zhumadian Academy of Agricultural Sciences, Zhumadian 463000, Henan, China)

Abstract: In order to clarify the salt-tolerance effect of *SIDOGL4* gene in tomato, the cultivated tomato Ailsa Craig was used as the experimental material to clone this gene and analyze its physicochemical properties and expression characteristics through bioinformatics methods. The results showed that the full length of CDS of *SIDOGL4* gene was 660 bp, encoding 219 amino acids. Conserved domain analysis showed that the gene contained only one DOG1 domain, which belonged to the DOG1 family of bzip transcription factor. Phylogenetic relationship showed that *SIDOGL4* was closely related to StDOGL4 protein in potato. The results of tissue expression profile showed that *SIDOGL4* gene was mainly expressed in root and fruit at the broken color stage. Subcellular localization results showed that *SIDOGL4* protein was located in the nucleus. *SIDOGL4* gene promoter has a variety of cis-elements related to abiotic stress and hormone response. The *Pro_{SIDOGL4}::GUS* fusion expression vector was constructed to genetically transform tomato to detect promoter activity. GUS histochemical staining showed that *SIDOGL4* was expressed in roots, stems, growing points and seeds, indicating that *SIDOGL4* played an important role in the whole growth and development process of tomato. Analysis of transcriptome data from public databases showed that the expression of *SIDOGL4* gene was induced by salt, drought, cold and heat stress to varying degrees. In order to further verify the function of *SIDOGL4* gene, the transcription level of *SIDOGL4* gene showed a trend of first increasing and then decreasing, and reached the highest transcription level after 2 hours of salt treatment. These results laid a foundation for exploring the function of *SIDOGL4* gene in tomato salt tolerance.

Key words: Tomato; *SIDOGL4*; Abiotic stress; Subcellular localization; Transcription level

番茄(*Solanum lycopersicum*)起源于南美洲,在世界上普遍栽培,是最重要的蔬菜作物之一^[1]。在

番茄种植过程中,经常会受到各种胁迫的影响,造成番茄品质和产量下降,严重时会导致整株死亡,

收稿日期:2024-01-09;修回日期:2024-02-28

基金项目:国家自然科学基金(NSFC31801880);河南省重点研发与推广专项(222102110407)

作者简介:王祎祎,女,在读硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:wangyiyi1702@163.com

通信作者:高艳娜,女,讲师,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:gaoyanna@henau.edu.cn

带来巨大的经济损失。野生番茄能够在较高盐胁迫环境下完成生长周期,但是在长期的人工种植过程中,人们更注重果实产量,而非耐盐性状,从而导致番茄栽培品种对盐胁迫的耐受性降低^[2]。鉴定耐盐基因和信号通路,解析生化功能和调控机制,对培育番茄新品种、保障番茄稳产和增产具有重要意义和应用价值,还能为更好地开发利用盐碱地提供物质保障。

土壤盐渍化是指高浓度 Na^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 等可溶性盐分在土壤中积累,使土壤性质恶化和生产质量下降的过程^[3]。据联合国教科文组织和世界粮农组织统计,截至 2015 年,全球有超过 $1 \times 10^9 \text{ hm}^2$ 的盐渍化土地,约占世界总耕地面积的 24%;中国盐碱地总面积约 $9.913 \times 10^4 \text{ hm}^2$,世界排名第三^[4]。这些盐碱地尚未有效利用,是农业发展的巨大潜力资源。除了天然盐碱土,我国还有 $3.6 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 的次生盐渍化土地,严重影响作物生长和产量^[5]。次生盐渍化土地主要是在农业生产过程中,不合理地施用化肥和不正确的灌溉方式导致的^[6]。因此通过提高作物的耐盐性来保证现代农业的高产、高效生产,可以解决人口增加带来的粮食匮乏问题。植物的耐盐性是一个复杂的由多基因控制的数量性状,目前研究者已经发现了多个在盐胁迫信号转导中起作用的关键基因及调控通路,利用现代分子育种手段培育耐盐作物品种是未来育种工作的重点^[7]。

植物耐盐调控主要有离子平衡、渗透调节、活性氧清除和激素调节。离子平衡途径—盐胁迫会破坏植物细胞内的离子平衡,必须通过维持高的 K^+/Na^+ 比率来调节 Na^+/K^+ 稳态,因为过量的 Na^+ 会导致 K^+ 的缺乏^[8]。渗透调节途径—盐胁迫会导致植物细胞渗透压发生改变,需要通过代谢增加细胞内溶质浓度来保持吸水能力,多数植物会通过积累氨基酸中水溶性最高的脯氨酸来应对盐胁迫环境^[9-10]。活性氧清除途径—盐胁迫会导致植物积累过多的活性氧,进而影响细胞膜的选择性,植物会通过积累超氧化物歧化酶和过氧化物酶等保护酶来清除过多的活性氧,玉米 *ZmGRAS13* 基因通过提高过氧化物酶和过氧化氢酶活性来应对高盐胁迫^[11]。激素调节途径—植物在盐胁迫条件下会诱导赤霉素(GA)和脱落酸(ABA)等多种激素的表达来影响植物的生长发育和代谢过程,进而起到耐盐调控的作用。黄洁等^[12]、纪超等^[13]的研究表明,植物受到盐胁迫的早期,根系的 ABA 含量会迅速升高,在到达峰值后,趋于平稳,并且 ABA 可以通过调节植

物气孔的作用来抵抗盐胁迫。

DOG1 家族属于 bZIP 转录因子家族^[14]。在植物中,bZIP 转录因子组成了最大的 ABA 诱导 DNA 结合蛋白家族,对植物生命周期的所有阶段基本都有影响,可以调节植物生长发育进程,如种子发育、光信号传递、花发育、生物和非生物胁迫、ABA 信号和激素反应^[15]。研究表明,bZIP 转录因子在胁迫条件下,可与 ABA 诱导基因的启动子区域结合,调节下游靶基因表达,在生物和非生物胁迫的抗逆反应中起重要作用^[16]。

拟南芥中 DOG1 家族成员主要与种子休眠有关,Zhu 等^[17]、Sall 等^[18]的研究表明,*AtDOGL4* 基因负调控种子休眠和 ABA 响应,并且 DNA 去甲基化酶基因 *ROS1* 通过正调控 *DOGL4* 基因的表达来影响这些进程。*ROS1* 基因可以通过介导的碱基切除修复来实现甲基化和去甲基化,协同调控 DNA 甲基化,并直接影响逆境胁迫相关基因的表达。杜驰等^[19]的研究表明,盐胁迫能够提高盐穗木中 *ROS1* 基因的表达,降低基因组 DNA 的甲基化程度,进而增强植物的耐盐性。

为了研究 *SIDOGL4* 基因是否可以提高番茄的耐盐性,笔者在番茄中克隆 *SIDOGL4* 基因,分析其蛋白的保守结构域、启动子顺式作用元件、系统进化关系及理化性质;利用实时荧光定量 PCR 技术分析其组织表达特异性;构建 GFP 融合表达载体,进行蛋白亚细胞定位分析;构建 *ProSIDOGL4::GUS* 融合表达载体,遗传转化番茄并利用 GUS 组织化学分析检测启动子活性,以期为后期深入研究 *SIDOGL4* 基因的功能和耐盐调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2022 年 4—12 月在河南农业大学园艺学院进行。供试材料为番茄品种 Ailsa Craig(AC)以及本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*),载体为 pMV2-GUS 和 pCAMBIA1302,均由河南农业大学园艺学院茄科课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 以 AC 叶片为材料,利用全式金公司的 Trizol 试剂盒提取 RNA,反转录获得 cDNA。在 SGN 数据库(<https://solgenomics.net/>)中下载 *SIDOGL4* (基因 ID: Solyc02g073580) 的序列信息,利用 Primer 5.0 设计特异性引物 *SIDOGL4*-F/R (表 1),利用 K5 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩

增,获得番茄 *SIDOGL4* 基因全长。

1.2.2 生物信息学分析 利用网站 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 获得基因的物理性质,利用网站 NCBI-CDD 获得基因的保守结构域。利用 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测 *SIDOGL4* 蛋白在细胞中的表达位置。在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 *SIDOGL4* 在不同物种中的同源蛋白的氨基酸序列,先使用 DNAMAN 进行氨基酸多序列对比,然后使用 MEGA-X 软件构建系统进化树。

1.2.3 盐处理 试验于 2022 年 7—9 月在河南农业大学园艺学院温室进行。将番茄 AC 种子用自来水浸泡至吸胀,于 28 °C 恒温培养箱中催芽,待大多数种子露白时播种于 540 mm×280 mm 的 50 孔育苗盘中,共播种两盘约 100 株幼苗。将其放于温室 [16 h 光照/8 h 黑暗,温度(24±2)°C,相对湿度(70±10)%] 中培养。待幼苗长至 4 周,采取随机区组设计,进行盐处理,使用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液均匀喷施幼苗,以清水为对照。处理后 0、1、2、4、8、12、24、36、48 和 72 h 分别采样,每 3 株生长点部位为 1 个重复,取样后立即用锡箔纸包裹并投入液氮中速冻,每个时间点取 3 个生物学重复。样品存于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2.4 qRT-PCR 利用全式金公司的 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA,反转录获得 cDNA。检测 cDNA 的质量,用核酸浓度测定仪 Nanodrop_2000 测定浓度并调为一致。利用 Primer 3.0 在线软件设计引物 Q-*SIDOGL4*-F/R(表 1)。采用 SYBR Green II 荧光染料法,使用 Bio-Rad Laboratories CFX96 实时定量 PCR 仪对基因的相对表达量进行分析。反应体系及程序按照试剂盒 SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, CA, USA) 进行。以 *ACTIN* 为内参基因,用比较阈值法 2^{-ΔΔCt} 分析

数据。

1.2.5 转录组数据分析 从 NCBI-SRA 数据库中下载番茄非生物胁迫相关的转录组数据 (PRJNA624032、PRJNA635375、PRJEB14805) 用于重新分析,过滤掉低质量、包含接头和 ployN 的读长,获得 Clean data,利用 Hisat2 将 Clean data 匹配到番茄参考基因组中 (https://solgenomics.net/ftp/genomes/Solanum_lycopersicum/annotation/ITAG2.4_release/), 用 FeatureCounts 定量分析计算 FPKM^[20]。

1.2.6 启动子序列分析及 GUS 载体构建 选取 *SIDOGL4* 基因 ATG 上游 2 kb 为启动子区,利用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站预测顺式作用元件。利用 Primer 5.0 设计特异引物,引物前面加上同源重组接头序列合成引物 *SIDOGL4*-GUS-F/R(表 1),利用 K5 高保真 DNA 聚合酶通过 PCR 扩增,获得番茄 *SIDOGL4* 基因启动子序列。将其连接到 pMV2-GUS 载体上,转化大肠杆菌。挑取单克隆扩繁,进行菌落 PCR 检测后,将条带大小正确的阳性单克隆菌液送上海生工生物公司测序,测序无误则载体构建成功,命名为 *Pro_{SIDOGL4}::GUS*。将质粒转入农杆菌中,用于番茄遗传转化^[21]。

1.2.7 GUS 组织化学染色 参考高艳娜^[22]的方法配制 GUS 染液。将转基因植株的不同组织浸于 GUS 染液后,放置于 37 °C 恒温培养箱 12~18 h 后,将染色液倒掉,然后先用 95% 酒精进行脱色一次,再用 75% 酒精进行多次脱色,直至脱色完成后进行拍照并放于 75% 酒精中长期保存。

1.2.8 亚细胞定位 利用 Primer 5.0 软件设计特异性扩增引物,引物前面加上同源重组接头序列,合成引物 *SIDOGL4*-1302-F/R(表 1),使用 Phanta Max 高保真 DNA 聚合酶扩增 *SIDOGL4* 基因 CDS 序列(去掉终止密码子),使用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Spe* I 对 pCAMBIA1302 载体双酶切,使用

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'-3')
<i>SIDOGL4</i> -OE-F	ATGACGAGCCAAGTAGCG
<i>SIDOGL4</i> -OE-R	GCTAATCAACATTIATTCTTTTTC
Q- <i>SIDOGL4</i> -F	ATTAGTGAGTGGCGGTGGAG
Q- <i>SIDOGL4</i> -R	CAACCTGTTGCCTCTCCATT
<i>SIDOGL4</i> -GUS-F	TGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCATTTCGGAAGAAGCAGACC
<i>SIDOGL4</i> -GUS-R	GCCTTCGCCATTCTAGACTCGAGTTCTGCTCCACGGTTAT
<i>SIDOGL4</i> -1302-F	ACGGGGGACTCTTGACCATGGATGACGAGCCAAGTAGCGGAAA
<i>SIDOGL4</i> -1302-R	AAGTTCTTCTCCTTACTAGTATCAACATTTATTCTTTTCTT

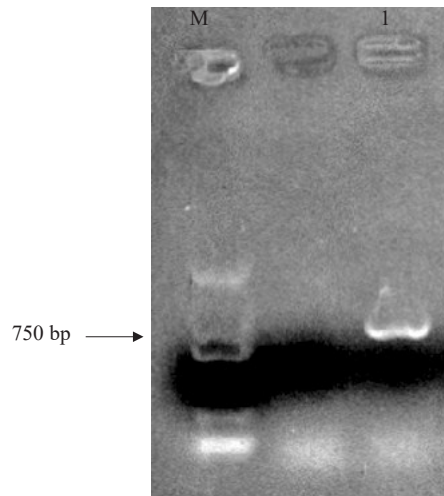
Exnase II 酶将纯化的目的片段和线性载体进行连接,将连接产物以热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,PCR 检测阳性,将阳性克隆送上海生工生物公司测序。载体构建成功后命名为 *SIDOGL4::GFP*,保存菌液备用。将 *SIDOGL4::GFP* 载体质粒转化农杆菌 GV3101 并注射培养 4 周左右的本氏烟草表皮细胞,以 pCAMBIA1302-GFP 做对照,融合了红色荧光蛋白的 H2B-mCherry 为细胞核 Marker。烟草注射后于 21 $^{\circ}\text{C}$ 的培养室暗培养 12 h,光照培养 2~3 d 后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 *SIDOGL4* 基因的序列分析

从 SGN 数据库中下载 *SIDOGL4* 基因的全长序列,以 AC 番茄的 cDNA 为模板,用高保真酶和特异性引物进行 PCR 扩增,获得一个长度 500~750 bp 的片段(图 1),与在数据库中检索到的序列大小一致。CDS 序列长度为 660 bp,无内含子,编码 219 个氨基酸(图 2)。通过 Protparam 软件分析 *SIDOGL4* 蛋白的理化性质,结果表明,蛋白分子质量为 25.40 kD,等电点 7.82,为弱碱性。脂溶系数为 97.03,平均疏水系数为-0.266,不稳定系数为 39.36,为稳定蛋白。利用 NCBI-CDD 网站预测保守结构域,结果表明,该蛋白具有一个 DOG1 保守结构域,位于 23~97 位(图 3)。利用 DNAMAN 软

件对 *SIDOGL4* 和其他植物 DOG1 家族的氨基酸序列进行比对,发现这些蛋白都有一个保守的 DOG1 结构域(图 4)。利用 NCBI 中的 BLASTp 功能对 *SIDOGL4* 氨基酸序列进行蛋白相似性比对,并使用 MEGA-X 分析系统进化关系,构建系统发育树。结果如图 5 所示,*SIDOGL4* 蛋白与马铃薯、烟草、曼陀罗、辣椒为一类,同源性较高,分别为 94.09%、67.23%、80.00%和 74.55%;与枸杞、三叶裂薯和葡萄等的蛋白也有较高的同源性,在 57%以上。



注:M. DL 2000 分子标记;1. PCR 产物。

Note: M. DL 2000 molecular marker; 1. PCR product.

图 1 *SIDOGL4* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification product of *SIDOGL4* gene

1	ATGACGAGCCAAGTAGCGGAAAACTTCACAAAATACTTTGAAAATTGGATGATCCAAC
1	M T S Q V A E N F T K Y F E N W M I Q L
61	GAAGAGTTGCTGAAAACAACCTCGTTATTGTACCTAGGGAGACGTCATACGTAATGATCAC
21	E E L L K Q L V I V P R E T S Y V N D H
121	GAGTTATTGGTGAGTAAAAATGACGACACATCACAAGAACTACTACACAGCCAAATGGGCC
41	E L L V S K M T T H H K N Y Y T A K W A
181	GCAGCTCATGAAGACATCTTAGCATTTCACCTCAATGTGGCTTAGTCCTTTAGA AATC
61	A A H E D I L A F F T P M W L S P L E I
241	GTCTACTCGTGGATCACAGGGTGAAGCCTTCCATGGCGTTTCGATTAGTGAAGTGGCGGT
81	V Y S W I T G W K P S M A F R L V S G G
301	GGAGGAGCGTTTTCGGATGAGGAATGAAGAATATTGATGGTTTGAGGGTGAAAATTCGC
101	G G A F S D E E L K N I D G L R V K I R
361	GGAGAGGAAGAGAAAGTGGAGAGGGAATGGAGAGGCAACAGGTTGCAATTGGGGATAGA
121	G E E E K V E R E M E R Q Q V A I G D R
421	AAAATGGTGAATTAGCAAGGATTAGAAATGATAATGATGAGTTGGTAGAATGGCGTTG
141	K M V E L A R I R N D N D E L V E L A L
481	AAAGGGTTAAGGATGAGTTTAGAAAGGGTTATGAAAATGGCAGATTGTGTTAGGCTTAA
161	K G L R M S L E R V M K M A D C V R L K
541	ACGTTGAAAGGTTTGTGGAGATATTGAGTCCITTACAGAGTGTGATTCTTGCGTGCT
181	T L K G L L E I L S P L Q S V D F L A A
601	ATTCTACTATTCAAATTCAGATGAGGAAAAGGGGAAAGAAAAGAATAAATGTTGATTAG
201	I S T I Q I Q M R K R G R K R I N V D *

图 2 *SIDOGL4* 基因的全长 CDS 序列与推导的氨基酸序列

Fig. 2 The full-length CDS sequence and deduced amino acids sequence of *SIDOGL4* gene

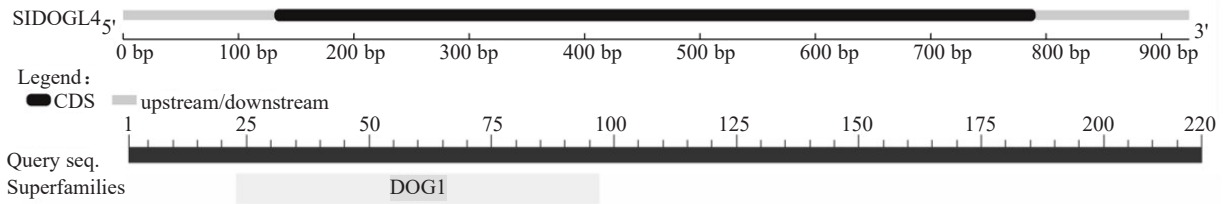
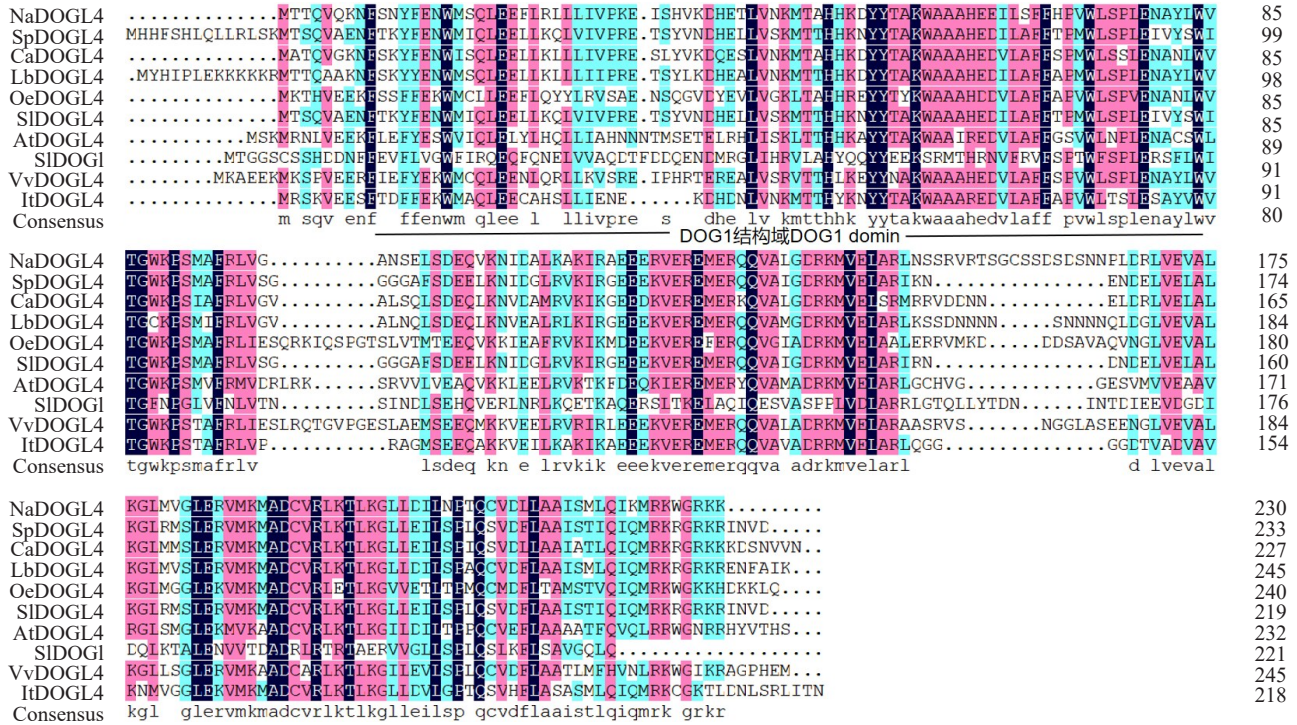


图3 SIDOGL4蛋白的保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of SIDOGL4 protein



注:Na. 烟草;Sp. 潘那利番茄;Ca. 辣椒;Lb. 枸杞;Oe. 木犀榄;Sl. 番茄;At. 拟南芥;Vv. 葡萄;It. 三裂叶薯。

Note: Na. *Nicotiana attenuata*; Sp. *Solanum pennellii*; Ca. *Capsicum annum*; Lb. *Lycium barbarum*; Oe. *Olea europaea*; Sl. *Solanum lycopersicum*; At. *Arabidopsis thaliana*; Vv. *Vitis vinifera*; It. *Ipomoea triloba*.

图4 DOGL4蛋白氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple alignment of amino acid sequences of DOGL4 proteins

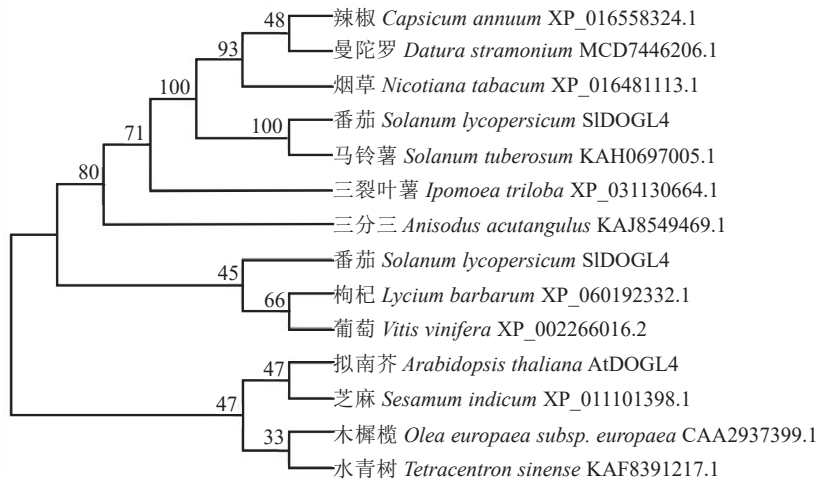


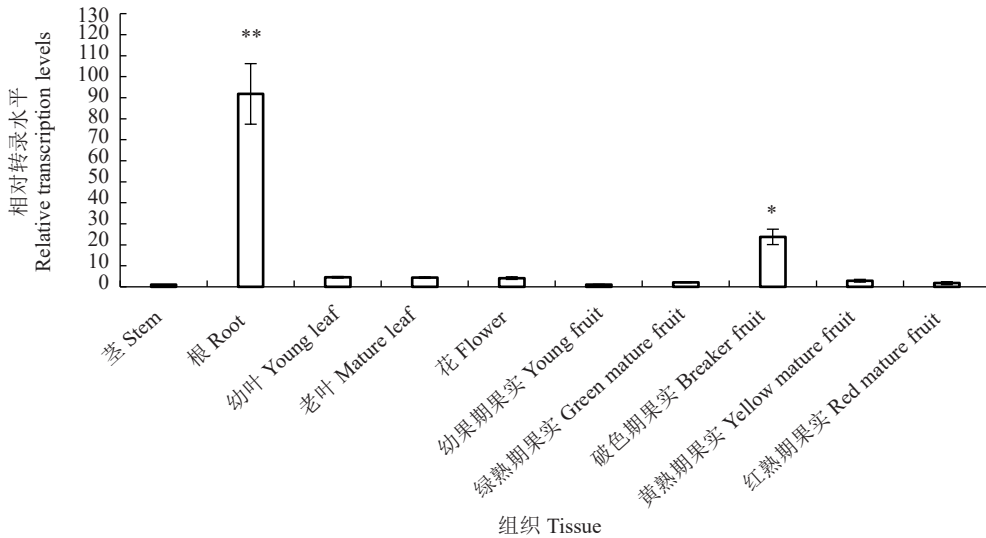
图5 不同物种 DOGL4蛋白的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of DOGL4 proteins of different plants

2.2 *SIDOGL4* 基因的表达特性

为探索 *SIDOGL4* 基因在番茄各组织中的表达情况,以番茄栽培种 AC 各组织(包括根、茎、幼叶、成熟叶、花、幼果、绿熟果、破色果、黄熟果和红熟果)cDNA 为模板,通过 qRT-PCR 检测 *SIDOGL4* 基因的组织表达谱。结果如图 6 所示,*SIDOGL4* 基因在根系中表达量最高,其次是破色期果实,在幼果期果实中表达量最低。

利用公共数据库中的转录组数据进行重新分析,结果如图 7 所示,*SIDOGL4* 基因受到 4 种非生物胁迫不同程度的诱导表达。为了进一步明确 *SIDOGL4* 基因的功能,笔者对 AC 番茄进行了盐处理试验,通过 qRT-PCR 检测了 *SIDOGL4* 基因在番茄盐胁迫处理后的表达情况,结果如图 8 所示,*SIDOGL4* 基因表达受到盐胁迫的诱导,且在盐处理 2 h 时相对表达量达到最高水平。



注: *表示差异显著 ($p < 0.05$); **表示差异极显著 ($p < 0.01$)。下同。

Note: *represent significant difference at 0.05 level; **represent extremely significant difference at 0.01 level. The same below.

图 6 *SIDOGL4* 基因的组织表达谱分析

Fig. 6 Tissue-specific expression profiles of *SIDOGL4* gene

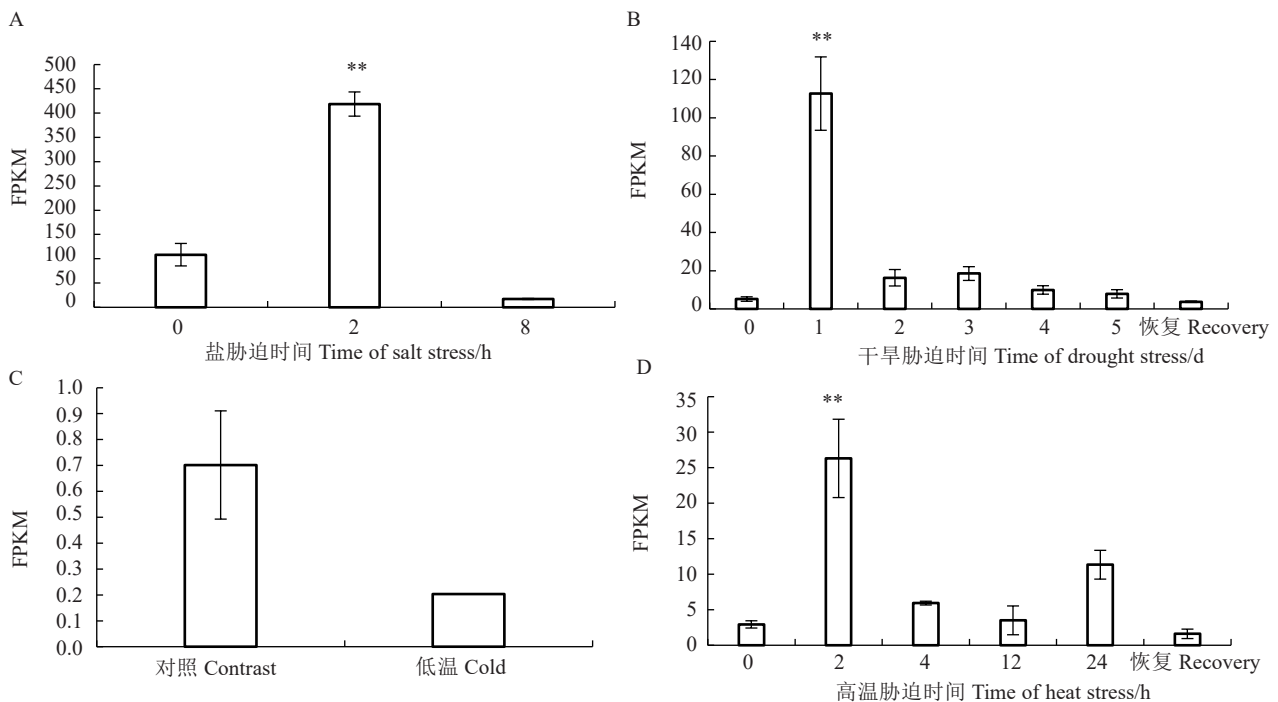


图 7 4 种非生物胁迫处理后 *SIDOGL4* 基因的表达量变化

Fig. 7 Changes of *SIDOGL4* gene expression level after four abiotic stress treatments

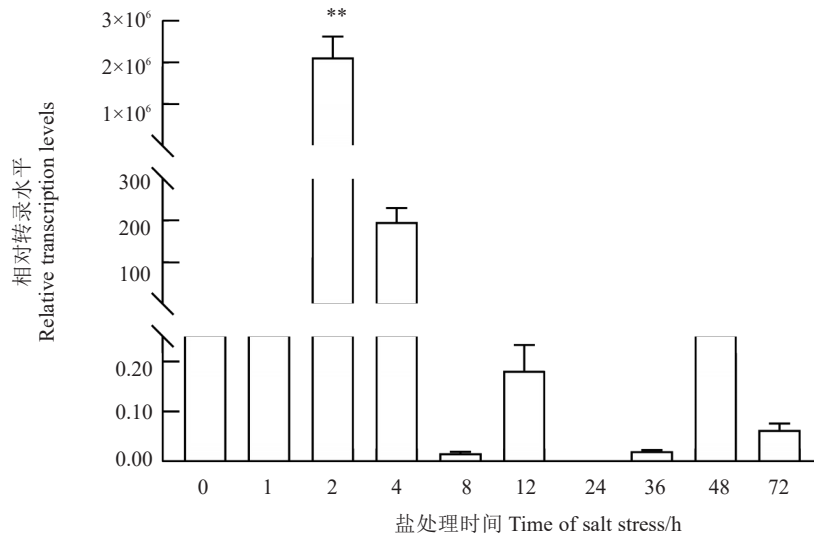


图8 *SIDOGL4* 基因在盐处理后的表达水平

Fig. 8 *SIDOGL4* gene expression level after salt treatment

利用 Cell-PLoc2.0 网站进行亚细胞定位预测, 显示 *SIDOGL4* 蛋白定位于细胞核。为了验证该蛋白的定位情况, 构建基因 *SIDOGL4* 与 GFP 蛋白融合表达载体, 利用农杆菌介导法注射烟草表皮细胞, 对 *SIDOGL4* 蛋白亚细胞定位进行分析, 结果与网站预测结果一致, *SIDOGL4* 蛋白定位于细胞核 (图9)。

利用 PlantCARE 网站对 *SIDOGL4* 基因 ATG 上游 2 kb 的启动子序列进行顺式元件分析, 结果如表 2 所示, 按照其功能主要分为 5 类: 转录与调控、防御和胁迫响应、激素响应、光响应、生长与代谢调

控顺式元件, 推测 *SIDOGL4* 基因及其编码蛋白可能参与植物胁迫响应的调控。

组织表达的部位与基因的功能相互关联, 为了探索 *SIDOGL4* 基因的表达模式, 笔者将 *SIDOGL4* 基因的启动子融合到 GUS 表达载体上, 利用农杆菌介导的遗传转化法转化栽培番茄 AC。对阳性转基因植株各部位用 GUS 染液染色, 并在显微镜下观察, 拍照。染色结果表明, 该基因的表达部位包括顶芽、腋芽、叶片、叶柄、茎、根, 内果皮和种子, 表明 *SIDOGL4* 基因可能参与了番茄植株整个发育过程并发挥了重要作用 (图 10)。

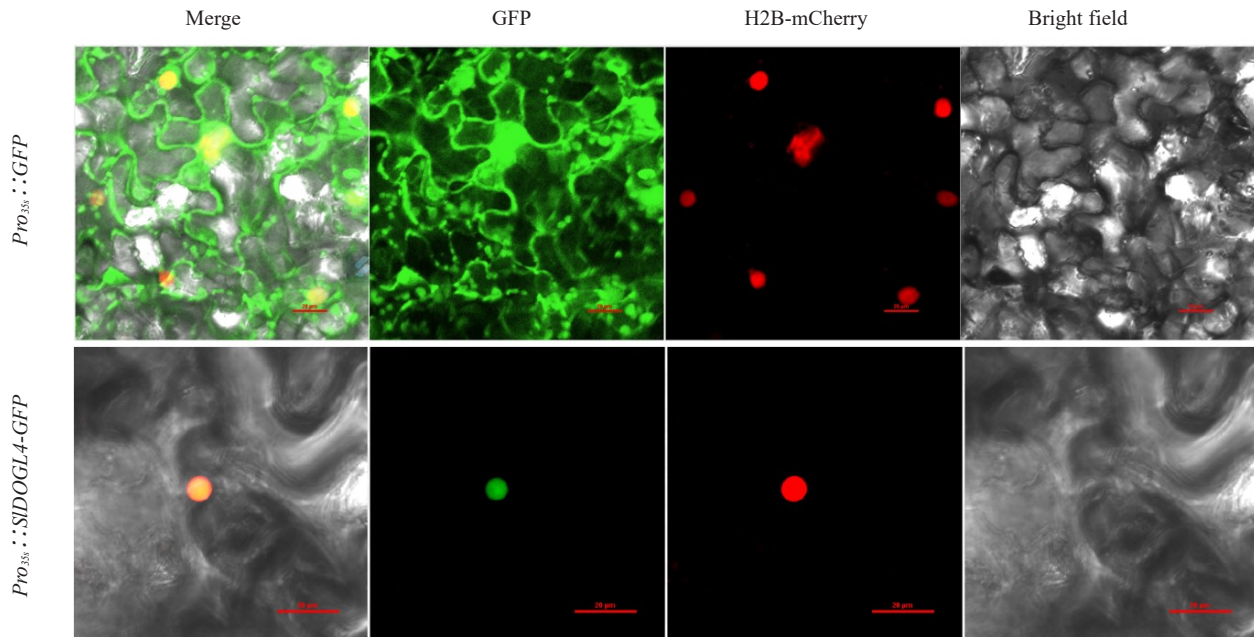
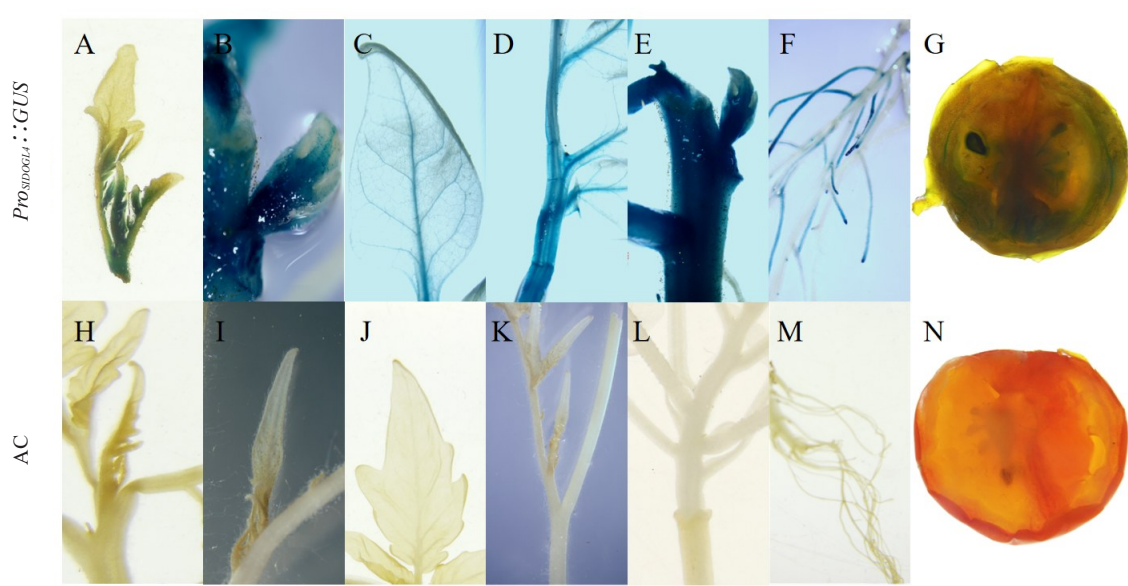


图9 *SIDOGL4* 蛋白亚细胞定位
Fig. 9 *SIDOGL4* protein subcellular localization

表 2 *SIDOGL4* 基因启动子顺式元件分析
Table 2 Analysis of cis-element elements of the promoter of *SIDOGL4* gene

分类 Classification	生物学功能 Biological function	顺式元件 Cis-element	出现频率 Occurrence frequency	
转录与调控 Transcription and regulation	与 RNA 聚合酶结合 Binds to RNA polymerase	TATA-box	69	
	调控转录效率 Regulatory transcriptional efficiency	CAAT-box	43	
防御和胁迫响应 Defense and stress response	防御和胁迫响应 Defense and stress response	TC-rich repeats	1	
激素响应 Hormonal response	水杨酸 Salicylic acid	TCA-element	1	
	脱落酸 Abscisic acid	ABRE	5	
	乙烯 Ethylene	ERE	2	
	赤霉素 Gibberellin	P-box	1	
光响应 Photoresponse	光响应 Photoresponse	BoxII, AT1- motif, GATA- motif, I- Box, MRE, TCT-motif	1	
		Box 4	7	
		G-Box	3	
		G-box	2	
	生长与代谢调控 Growth and metabolic regulation	胚乳表达 Endosperm expression	GCN4_motif	1
		分生组织表达 Meristem expression	CAT-box	1
类黄酮合成调节 Regulation of flavonoid synthesis		MBSI	1	
玉米醇溶蛋白代谢 Zein metabolism		O2-site	1	



注: A~G 为番茄转基因系, H~N 为 AC; A 和 H. 顶芽; B 和 I. 腋芽; C 和 J. 叶片; D 和 K. 叶柄; E 和 L. 茎; F 和 M. 根; G 和 N. 果实。

Note: A-G is the transgenic plant, H-N is the AC plant. A and H represent terminal bud; B and I represent axillary bud; C and J represent leaf; D and K represent petiole; E and L represent stem; F and M represent root; G and N represent fruit.

图 10 *SIDOGL4* 基因启动子 GUS 活性分析

Fig. 10 Analysis of GUS activity of *SIDOGL4* gene promoter

3 讨论与结论

植物通过 SOS、ROS 和 ABA 等信号转导途径来响应并适应盐胁迫^[23]。ABA 信号转导通路参与调控包括盐胁迫在内的多种植物抗逆过程。在受到非生物胁迫时,植物通过快速提高体内 ABA 含量,增强植物抗逆性^[24]。研究表明,ABA 响应盐胁迫是通过 Ca^{2+} 信号和 ROS 信号来促进植物细胞中 ABA 的合成,进而激活 ABA 信号通路相关基因的表达,从而调控气孔的开闭,在生理方面响应盐胁迫^[25]。

拟南芥中的 DOG1 家族包括 *AtDOG1*、*AtDOGL1*、*AtDOGL2*、*AtDOGL3* 和 *AtDOGL4* 等 5 个家族成员,主要通过 ABA 途径来调控种子休眠^[26]。笔者在本研究中从 AC 番茄中克隆到了 1 个 DOG1 家族成员 *SIDOGL4*,系统进化分析表明,与拟南芥等其他物种中的 DOGL4 蛋白具有较高的同源性。*AtDOGL4* 基因表达受 *ROS1* 基因正向调控,来负调控种子休眠和 ABA 响应,并且 DNA 去甲基化可以调控 ABA 诱导基因^[17, 27]。Bharti 等^[28]的研究表明,过表达 *ROS1* 基因通过去甲基化作用提高烟草的耐盐性。因此,*DOGL4* 基因可能通过 *ROS1* 介导的 ABA 途径来响应盐胁迫。笔者通过分析公共数据库中的转录组数据,发现 *SIDOGL4* 可以响应盐和干旱等逆境胁迫,又通过对 AC 番茄进行盐处理试验,qRT-PCR 检测的结果证明了 *SIDOGL4* 确实可以响应盐胁迫。

番茄中 DOG1 家族属于 bZIP 转录因子家族成员,由于其不含有 bZIP 结构域只含有一个 DOG1 结构域,因此有研究指出,DOG1 家族由 bZIP 家族中的 TGA 亚家族进化而来^[18]。bZIP 转录因子组成了植物中最大的 ABA 诱导 DNA 结合蛋白家族,可以影响植物生命周期的所有阶段,如种子发育、生物和非生物胁迫及激素反应等,其中有 40 多个转录因子在胁迫条件下有不同程度的诱导表达^[29-30]。Li 等^[31]对番茄 bZIP 转录因子蛋白进行亚细胞定位,结果表明,大部分番茄 bZIP 转录因子蛋白集中定位于细胞核上。*SIDOG1* 蛋白也定位于细胞核上^[19],因此,笔者推测 *SIDOGL4* 基因可能也是一个转录因子并且可能也定位在细胞核中。为了验证这一推测,笔者首先通过网站预测 *SIDOGL4* 基因定位在细胞核中,再通过亚细胞定位试验进一步证明 *SIDOGL4* 蛋白在细胞核中表达。但是,要确定 *SIDOGL4* 基因是否是一个转录因子,还需要进一步

的转录激活试验来证明。

启动子含有调控基因时空表达的特定顺式元件,是位于 DNA 编码区上游的非编码调控 DNA 基因序列,可以影响基因表达的时间、空间和表达水平^[32]。研究表明,基因的启动子区含有诸多具有不同调控功能的顺式元件,对不同元件进行编辑,将获得基因表达时空量各不相同的突变体,实现基因表达的精细调控,可以满足多层次的育种目标^[33]。笔者克隆了 *SIDOGL4* 基因 ATG 上游 2000 bp 启动子序列,分析结果表明,*SIDOGL4* 基因启动子上除含有 ABA 响应元件外,还有其他防御和胁迫响应元件,表明 *SIDOGL4* 基因可能是逆境胁迫中 ABA 途径中重要的响应调节因子。*DOG1* 基因响应逆境胁迫的功能在其他物种中也有报道,Ruslan 等^[34]发现 *AtDOG1* 基因在拟南芥干旱响应中也发挥重要作用。忽钰哲^[35]的研究表明,*AtDOG1* 基因位于 *AtEIN3* 的下游,参与盐胁迫下种子萌发的负调控。*SIDOGL4* 基因的启动子上除了有脱落酸响应元件以外,还有乙烯、水杨酸和赤霉素多个激素响应元件,这表明 *SIDOGL4* 基因可能响应多种激素信号,从而参与多种信号转导通路。

当植物处于盐胁迫等各种逆境时,根系首先感应环境胁迫信号并调整根系形态特征属性,使植物实现对逆境环境的自适应^[36]。从组织表达谱中可以看出,*SIDOGL4* 基因在根系中的表达量最高,另外,GUS 染色的结果也进一步说明了 *SIDOGL4* 基因在根系中有较高的表达量。这说明 *SIDOGL4* 基因的功能很可能与逆境胁迫响应相关。有趣的是,*SIDOGL4* 基因不仅在根系中有表达,还在茎、生长点、腋芽、叶片、叶柄,内果皮和种子中表达,这不仅和拟南芥中 *AtDOGL4* 基因主要在种子中表达的研究结果一致^[18],还说明了 *SIDOGL4* 基因还可能参与植物生长发育的各个过程。

综上所述,笔者通过对番茄 *SIDOGL4* 基因的克隆、亚细胞定位和 GUS 载体的构建,发现该基因不仅与盐、干旱等胁迫响应相关,还在番茄植株多个组织中均有不同程度的表达,可能参与植株生长发育的整个过程,研究结果为该基因的功能验证奠定了重要基础。

参考文献

- [1] 唐榕梓,张浩,张晓东,等.不同番茄风味相关基因表达模式分析[J/OL].分子植物育种,2023,1-16[2023-11-21].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231120.1049.006.html>.
- [2] 王娟,王柏柯,李宁,等.基因编辑技术在番茄育种中的应用进展[J].植物生理学报,2020,56(12):2606-2616.

- [3] ZHANG Y T, HOU K, QIAN H, et al. Characterization of soil salinization and its driving factors in a typical irrigation area of northwest China[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 837: 155808.
- [4] 李雪,赵泰然,郑毅,等.利用隶属函数法对不同基因型秋葵耐盐碱性的分析与评价[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(20): 6860-6865.
- [5] 刘明慧. ACOH4 蛋白 S-亚硝基化修饰增强番茄耐盐性的机理研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2023.
- [6] PARK H J, KIM W Y, YUN D J. A new insight of salt stress signaling in plant[J]. *Molecular Cells*, 2016, 39(6): 447-459.
- [7] 周扬,王鹏,李雨欣.植物耐盐分子机制研究进展[J]. *广东农业科学*, 2023, 50(10): 97-109.
- [8] AHMAD P, ABDALLAH E F, ALYEMENI M N, et al. Exogenous application of calcium to 24-epibrassinosteroid pre-treated tomato seedlings mitigates NaCl toxicity by modifying ascorbate-glutathione cycle and secondary metabolites[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13515.
- [9] 王忠宇.番茄耐盐的遗传学基础与分子机制研究[D].北京: 中国农业科学院, 2022.
- [10] 许祥明,叶和春,李国凤.植物抗盐机理的研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(4): 379-387.
- [11] 折萌,郑登俞,柯照,等.玉米 *ZmGRAS13* 基因的克隆及功能研究[J]. *作物学报*, 2024, 50(6): 1420-1434.
- [12] 黄洁,白志刚,钟楚,等.水稻耐盐生理及分子调节机制[J]. *核农学报*, 2020, 34(6): 1359-1367.
- [13] 纪超,王晓辉,刘训理.盐胁迫环境下植物促生菌的作用机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(4): 131-143.
- [14] ZHAO X C, ZHANG Y R, LAI J, et al. The *SIDOG1* affect biosynthesis of steroidal glycoalkaloids by regulating game expression in tomato[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 3360.
- [15] 王金英,丁峰,潘介春,等.植物 bZIP 转录因子家族的研究进展[J]. *热带农业科学*, 2019, 39(6): 39-45.
- [16] 马璇,胡小倩,张颖翌,等.植物非生物胁迫中的 bZIP 转录因子[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(8): 2534-2541.
- [17] ZHU H F, XIE W X, XU D C, et al. DNA demethylase ROS1 negatively regulates the imprinting of *DOGL4* and seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2018, 115(42): 9962-9970.
- [18] SALL K, DEKKERS B J W, NONOGAKI M, et al. Delay of germination 1-like 4 acts as an inducer of seed reserve accumulation[J]. *Plant Journal*, 2019, 100(1): 7-19.
- [19] 杜驰,张冀,张丽丽,等.盐胁迫下盐穗木 DNA 甲基化程度与去甲基化酶基因(*Ros1*)表达的相关性研究[J]. *新疆农业科学*, 2017, 54(5): 878-885.
- [20] SUN Y G, JIA X Y, CHEN D X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of cysteine-rich polycomb-like protein (CPP) gene family in tomato[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5762.
- [21] 欧阳波.几种病程相关蛋白基因转化番茄的研究[D].武汉: 华中农业大学, 2003.
- [22] 高艳娜.番茄表皮毛发生转录因子 HD-Zip IV 的克隆和功能鉴定[D].武汉: 华中农业大学, 2016.
- [23] 赵怀玉,林鸿宣.植物响应盐碱胁迫的分子机制[J]. *土壤与作物*, 2020, 9(2): 103-113.
- [24] 林婵. *OsTCL1* 和 *OsTCL2* 基因在 ABA 调控水稻种子萌发中的作用[D].南宁: 广西大学, 2022.
- [25] ZHANG J Y, HUANG S N, CHEN Y H, et al. Identification and characterization of two waterlogging responsive alcohol dehydrogenase genes (*AdADH1* and *AdADH2*) in *Actinidia deliciosa*[J]. *Molecular Breeding*, 2017, 37(4): 52.
- [26] 宋松泉,唐翠芳,雷华平,等.种子休眠与萌发调控的研究进展[J]. *作物学报*, 2024, 50(1): 1-15.
- [27] KIM J S, LIM J Y, SHIN H, et al. ROS1-dependent DNA demethylation is required for ABA-inducible NIC3 expression[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(4): 1810-1821.
- [28] BHARTI P, MAHAJAN M, VISHWAKARMA A K, et al. *AtROS1* overexpression provides evidence for epigenetic regulation of genes encoding enzymes of flavonoid biosynthesis and antioxidant pathways during salt stress in transgenic tobacco[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(19): 5959-5969.
- [29] 李健,李曦,农艳丰.芒果 bZIP 转录因子基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(21): 29-36.
- [30] 朱芸晖,薛冰,王安全,等.番茄 bZIP 转录因子家族的生物学信息学分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(5): 767-774.
- [31] LI D Y, FU F Y, ZHANG H J, et al. Genome-wide systematic characterization of the bZIP transcriptional factor family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(771): 1471-2164.
- [32] 陈建琦,赵明珠,王义,等.植物中组织特异性启动子的研究进展[J]. *北方园艺*, 2023(19): 128-134.
- [33] 张小伟,刘江娜,刘伟,等.玉米 CRISPR/Cas 基因编辑研究进展和前景[J/OL]. *分子植物育种*, 2023, 1-32[2023-11-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231116.1137.012.html>.
- [34] YATUSEVICH R, FEDAK H, CIESIELSKI A, et al. Antisense transcription represses *Arabidopsis* seed dormancy QTL DOG1 to regulate drought tolerance[J]. *EMBO Reports*, 2017, 18(12): 2186-2196.
- [35] 忽钰哲. *EIN3* 通过 *DOG1* 调控拟南芥种子休眠的分子机制研究[D].武汉: 华中农业大学, 2023.
- [36] 王智芳,任胜寒,周凯.菊花水浸液对萝卜种子萌发及幼苗根系形态特征的化感作用研究[J]. *河南科技学院学报(自然科学版)*, 2023, 51(6): 7-13.