

张琴林, 张佳蕊, 郭仰东, 等. 低温胁迫下番茄 *SLMYB44-like* 基因的功能分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(19): 24–29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.19.004

低温胁迫下番茄 *SLMYB44-like* 基因的功能分析

张琴林¹, 张佳蕊¹, 郭仰东², 张喜春¹

(1. 北京农学院植物科学技术学院/北京市蔬菜遗传育种与生物技术实验室, 北京 102206; 2. 中国农业大学园艺学院, 北京 100094)

摘要:为探究 *SLMYB44-like* 基因在低温胁迫下的功能, 为番茄抗寒育种提供理论基础。利用病毒诱导的基因沉默技术(VIGS), 以烟草脆裂病毒(TRV2) 为载体, 构建 pTRV2-*SLMYB44-like* 沉默载体并侵染番茄幼苗, 对野生型(WT)、空载组(CK)以及基因沉默组(TRV-*SLMYB44-like*) 3 组番茄植株进行低温处理, 并对植株的表型、脯氨酸含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、丙二醛含量及抗氧化酶活性等生理指标进行测定。植株表型结果显示, 低温胁迫下, 基因沉默植株表现受冷害程度更明显; 抗寒生理指标结果显示, 低温胁迫下, 基因沉默组的脯氨酸含量、可溶性蛋白含量、过氧化氢酶活性和过氧化物酶活性比野生型的低, 而可溶性糖含量、丙二醛含量以及超氧化物歧化酶活性明显比野生型的高, 说明低温胁迫后基因沉默组植株的细胞受损更严重。通过对沉默植株的抗寒性分析, 结果显示 *SLMYB44-like* 基因沉默降低了番茄植株的抗寒性。表明 *SLMYB44-like* 基因响应低温胁迫, 参与了调控过程, 将 *SLMYB44-like* 基因瞬时沉默后, 番茄植株的抗寒性下降。

关键词:番茄; MYB 转录因子; *SLMYB44-like* 基因; 低温胁迫; VIGS; 基因功能

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)19-0024-06

番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill.) 为茄科番茄属植物。低温冷害可能发生在番茄生长的各个阶段, 对番茄种子发芽率、幼苗叶片生长、植株根系生长、花芽分化以及开花坐果等都有影响^[1]。因此, 挖掘番茄抗寒相关基因及转录因子, 探究低温胁迫下的基因功能及分子作用机制, 对番茄抗寒育种具有重要意义。近年来, 主要围绕番茄生物合成、抗病虫害和非生物胁迫响应方面展开番茄 MYB 家族转录因子的功能研究。刘壮斌的研究结果表明, *SLMYB113* 基因受赤霉素(GA)、低温和干旱等多种胁迫诱导表达, 过表达 *SLMYB113* 的转基因番茄株系叶背呈明显紫色, 表明该基因通过促进花青素的积累来提高番茄植株的耐寒性^[2]。番茄 *SLMYB75* 能促进番茄果实挥发性香气的产生, 提高花色苷、酚类和黄酮类物质的含量并加快果实成熟, 提高果实营养品质^[3]。番茄 *SLMYB41* 过表达株系对低温更加敏感, 而 *SLMYB41* 沉默株系使抗氧化酶的活性

提高, 增强了番茄低温抗性, *SLMYB41* 在低温应答过程中起负调控作用, 其表达受低温、高温和 NaCl 诱导^[4]。木瓜果肉中克隆出的基因 *CpMYB44-like* (命名为 *CpMYB1*) 可以与细胞壁降解基因(*CpPME1*、*CpPME2* 和 *CpPG5*) 以及类胡萝卜素生物合成基因(*CpPDS2*、*CpPDS4* 和 *CpCHY-b*) 的启动子结合, 进一步研究发现, *CpMYB44-like* (*CpMYB1*) 是转录抑制因子, 它可以抑制上述启动子的活性^[5]。沉默病毒诱导的番茄 *SISWEET1a* 基因使幼叶中的己糖积累减少约 50%, 而成熟叶中的己糖积累增加了 2 倍, 表明该基因参与糖的转运^[6]。瞬时沉默番茄 *SLAR* 基因影响了番茄果实中类胡萝卜素的积累, 番茄红素和总类胡萝卜素含量低, 说明该基因调控类胡萝卜素合成过程^[7]。病毒诱导的基因沉默(VIGS)介导的番茄 *MYB80* 基因沉默使番茄植株耐寒性降低, 说明 *MYB80* 基因表达受低温诱导^[8]。用病毒诱导的基因沉默方法对番茄 *SULL1*、*SULL5*、*SULL6* 的表达进行沉默, 结果表明, 3 个基因在番茄花梗脱落中起着十分重要的作用^[9]。用 VIGS 沉默处理谷胱甘肽转移酶(GSTU43)后, 抗氧化酶活性降低, 膜损伤程度高, 表明该基因通过降低膜脂过氧化程度, 进而提高番茄低温耐受性^[10]。本研究中番茄基因 *SLMYB44-like* (LOC101262913) 是从实验室前期番茄低温转录组测序结果中筛选

收稿日期: 2022-12-17

基金项目: 北京农学院科技发展基金(纵向)(编号: KYZX-2022010)。

作者简介: 张琴林(1998—), 女, 贵州德江人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: 1994734509@qq.com。

通信作者: 张喜春, 博士, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: xichunzhang@sina.com。

出的基因,但在番茄中尚未见关于该基因响应低温胁迫功能的研究。通过对基因沉默植株的抗寒性分析检测该基因是否影响番茄植株的抗寒性。运用 VIGS 技术瞬时沉默 *SLMYB44-like* 基因,获得基因沉默植株,测定低温处理后相关生理指标,进一步探究 *SLMYB44-like* 基因的功能,为番茄抗寒育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为番茄品种 O-33-1(北京农学院实验室,品种编号 63)。

菌株及试剂:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞、GV3101 农杆菌感受态细胞购于北京博迈德基因技术有限公司;限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;抗氧化酶活性[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物(POD)和过氧化氢酶(CAT)活

性]测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所,其他试剂为实验室保存分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄 *SLMYB44-like* 基因的 VIGS 载体构建

利用番茄基因组数据库(<https://solgenomics.net/>)中 VIGS Tool 选定番茄 *SLMYB44-like* 基因片段,根据插入片段序列设计特异性引物,引物两端分别加上有酶切位点 *Xba* I 和 *Sma* I 的同源臂(表 1)。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切 pTRV2 载体质粒,载体与目的片段分别纯化回收后用同源重组酶进行连接,构建 TRV2-*SLMYB44-like* 载体质粒。将连接后的质粒转入大肠杆菌 DH5 α 感受态,涂板 37 $^{\circ}$ C 倒置培养,挑取单菌落并摇菌,随后进行 PCR 验证并对有目的条带的菌液进行测序。从测序结果完全正确、无点突变的菌液中提取质粒,利用冻融法转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中,验证正确后用于下一步试验。

表 1 引物名称及序列

引物名称	引物序列(5'→3')
VIGS 44-like F	CTTCATCAGAATCTTCGCTTTCGGG
VIGS 44-like R	GAAGTAATCGGGCAATGCTGGC
pTRV2-F	GCTTTATTATTACGGACGACTGG
pTRV2-R	GAACCTAAAACTTCAGACACGGAT
++ V44-like F	AAGGTTACCGAATTCTCTAGACTTCATCAGAATCTTCGCTTTCG
++ V44-like R	TGCTCTTCGGGACATGCCCGGGGAAGTAATCGGGCAATGCTTGG

注:++ V44-like F 和 ++ V44-like R 表示加了同源臂的引物。

1.2.2 番茄 *SLMYB44-like* 基因的 VIGS 侵染体系构建 分别将转入 pTRV1、pTRV2 空载和 pTRV2-*MYB44-like* 质粒的农杆菌菌液放入摇床振荡培养 16 h,温度 28 $^{\circ}$ C,200 r/min, LB 培养基中加卡那霉素。待到 3 种菌液的 $D_{600\text{ nm}}$ =0.6~1.0 时离心收集菌体,调节侵染液 pH 值为 5.6,侵染 Buffer 重新悬浮菌体(200 μ mol/L AS,10 mmol/L MES,10 mmol/L MgCl_2),使菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 调整到 1.0。将 pTRV1 分别与 pTRV2 和 pTRV2-*MYB44-like* 菌液以 1:1 比例混合,在室温条件下静置 3~4 h,注意避光,活化农杆菌菌液。用 1 mL 的无针注射器吸取活化后的菌液,侵染 3~4 周苗龄番茄叶片和子叶背部,至叶背面有明显水渍状,之后将番茄幼苗放在人工气候培养箱(16 $^{\circ}$ C,60% 湿度)黑暗培养 24 h,然后将番茄植株转移至 25 $^{\circ}$ C/20 $^{\circ}$ C(日/夜),16 h/8 h 条件下培养。3 组供试番茄植株数:野生型(WT)30 株;携带 pTRV2 空载组(CK)及基因沉默组(TRV-

SLMYB44-like)各 50 株。

1.2.3 阳性植株鉴定 侵染番茄植株 10 d 后,利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒分别取野生型(WT)、空载组(CK)和基因沉默组(TRV-*SLMYB44-like*)植株的新鲜叶片提取 RNA。利用反转录试剂盒将提取好的 RNA 反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板,用 pTRV2-F 和 VIGS 44-like R 特异引物进行 PCR 扩增,筛选出沉默组阳性植株,而空载组的引物为 pTRV2-F 和 pTRV2-R。

1.2.4 基因沉默后植株的抗寒性分析 将 WT、CK、基因瞬时沉默组 3 组番茄植株置于 4 $^{\circ}$ C、湿度 60%、昼一夜 16 h—8 h 的培养条件下低温处理。取样方法:在低温处理 0、5 d 采集新鲜的番茄叶片,用于测定叶片生理生化指标进行抗寒性分析,吸光度值用紫外分光光度计测定。3 组番茄植株置于 4 $^{\circ}$ C 培养箱中低温处理 5 d 后进行表型观察;游离脯氨酸、丙二醛(MDA)、可溶性蛋白和可溶性糖含量按

《植物生理学实验教程》^[11] 和 Kong 等的方法^[12] 测定;抗氧化酶 (CAT、POD、SOD) 活性用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定;番茄叶片的可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定。所有测定保证至少 3 个生物学重复,最终结果是 3 次试验数据的平均值。用 SPSS 分析数据,当 $P < 0.05$ 时,认为具有显著性差异。

2 结果与分析

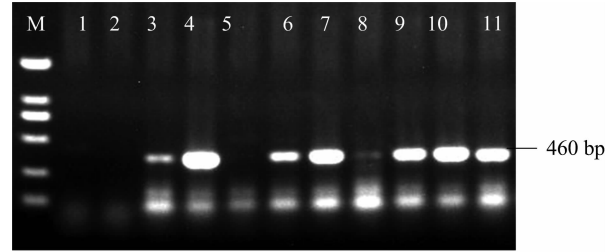
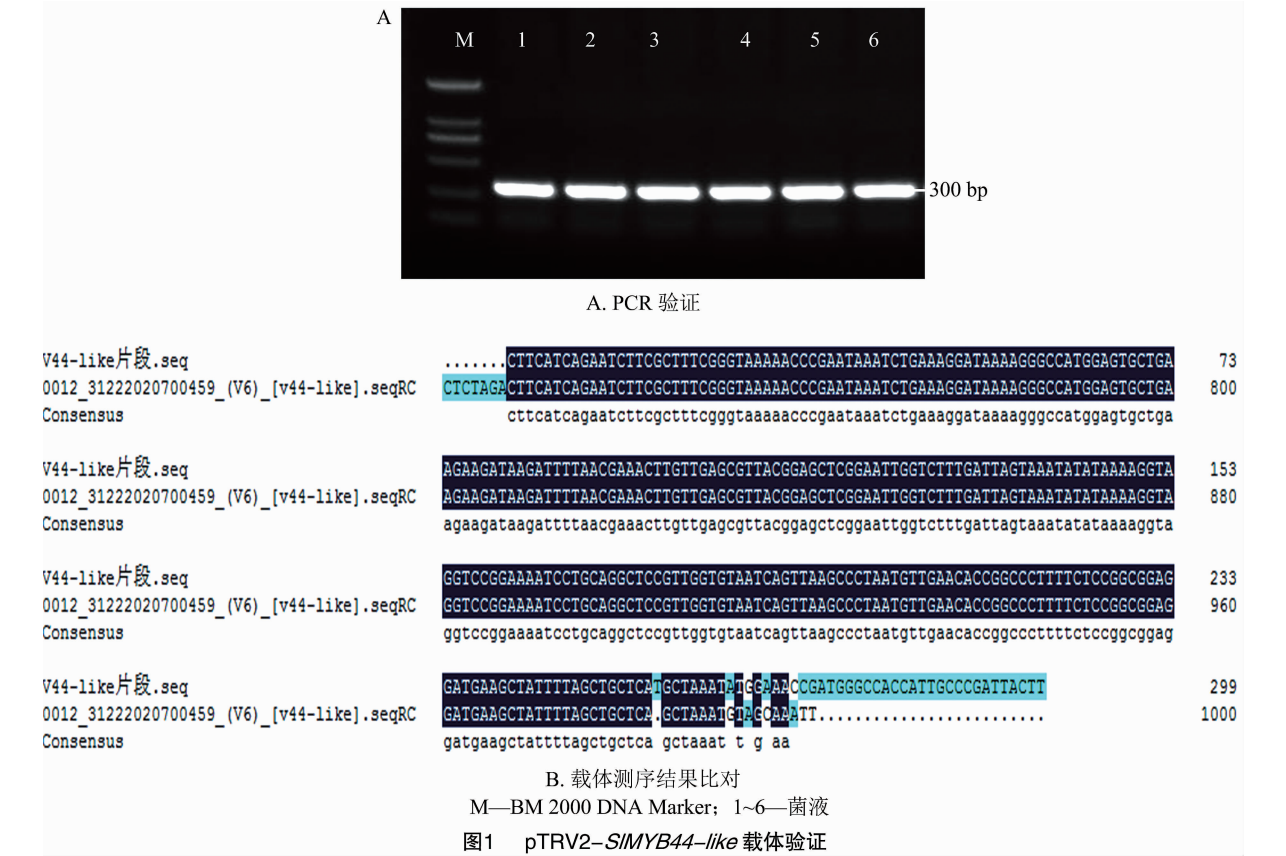
2.1 *SlMYB44-like* 基因的 VIGS 载体构建

在番茄基因组数据库网站中用 VIGS Tool 工具选定 300 bp 左右的 *SlMYB44-like* 基因插入目的片段。经酶切连接,构建 pTRV2-*SlMYB44-like* 载体

质粒。用插入片段特异性引物 V44-like F 和 V44-like R 进行 PCR 验证并测序,载体验证结果见图 1。300 bp 左右出现目的条带,测序结果比对正确,证明载体构建成功,可进行下一步试验。

2.2 阳性植株验证

侵染植株 10 d 后,取番茄植株新鲜叶片提取 RNA,反转录合成 cDNA 用于特异性引物 PCR 扩增,进行阳性植株验证。凝胶电泳结果如图 2 所示,460 bp 处有明亮条带,证明载体已经转入植物体,得到了阳性植株。经过阳性植株鉴定,共得到 pTRV2 空载组 22 株,*SlMYB44-like* 基因沉默组植株 24 株。



M—BM 2000 DNA Marker; 1~2—WT; 3~11—沉默组植株

图2 *SlMYB44-like* 基因瞬时沉默阳性植株验证

2.3 *SlMYB44-like* 基因沉默植株在低温胁迫处理后的表型变化

将野生型、空载组和基因沉默组放入 4 ℃ 光照培养箱低温处理 5 d。通过表型观察和测定抗寒相关生理指标,对基因沉默植株进行抗寒性分析。如图 3 所示,在常温条件下,沉默株系与野生型番茄植株生长状况良好,3 组无明显差别,植株挺立,叶片舒展,而经过 5 d 低温处理后,基因沉默植株表现受

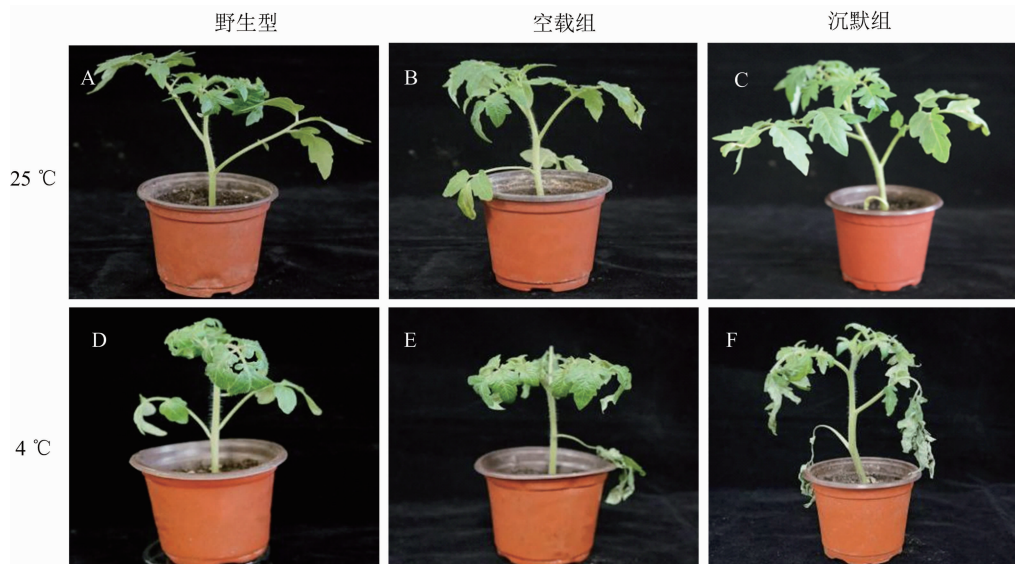


图3 4 °C 低温处理前后番茄植株表型观察

冷害程度更明显,叶片卷曲,萎蔫下垂,下部叶片严重失水,而野生型番茄冷害症状相对较轻。说明 *SLMYB44-like* 基因沉默后植株抗寒性降低。

2.4 低温胁迫下 *SLMYB44-like* 基因沉默植株抗寒生理指标的测定

脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白这 3 种物质都是植物体内重要的渗透调节物质,在细胞渗透调节过程中起着十分重要的作用。从图 4 - A 可以得出,低温胁迫后野生型、空载组和基因沉默组植物体内的游离脯氨酸含量都增加。在常温条件下,3 组植株间的脯氨酸含量无显著差异。低温处理后,野生型和空载组的脯氨酸含量显著增加,而基因沉默组脯氨酸含量略有增加。可能是 *SLMYB44-like* 基因沉默影响了脯氨酸代谢途径,从而降低了植株低温耐受性。由图 4 - B 可以看出,基因沉默组植株和空载组的可溶性蛋白含量均低于野生型,低温处理后,3 组植株的可溶性蛋白含量均下降,这可能是低温胁迫影响了蛋白质的合成,野生型可溶性蛋白含量高,也提高了抗寒性。低温处理后,沉默组可溶性糖含量高于野生型与空载组,可能是沉默组植株对低温胁迫更敏感,受到的伤害更大,需要合成大量的可溶性糖来抵御低温(图 4 - C)。丙二醛是衡量植物氧化胁迫程度的常用指标,具有细胞毒性。MDA 的产生会加重细胞膜的损伤,反映了植物体内膜的过氧化程度。从图 4 - D 可以看出,基因沉默组的丙二醛含量高于另外 2 组,说明基因沉默组植株体内能积累更多的活性氧含量,细胞受损更严重。低温前后丙二醛含量只有少量增长,而低温处

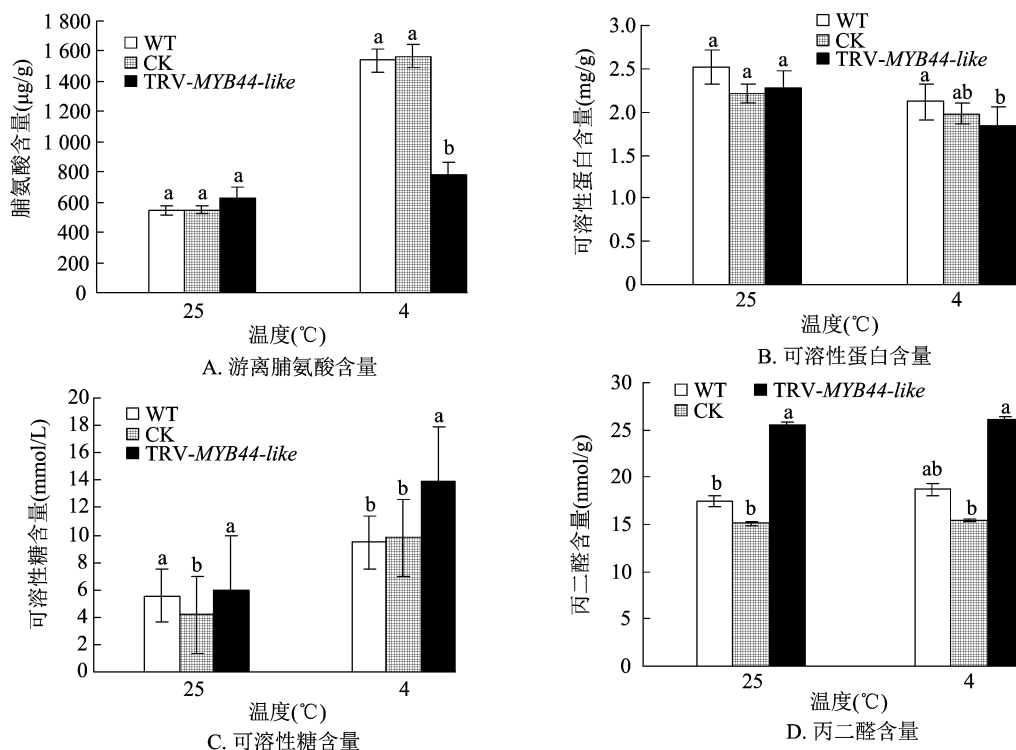
理 5 d 后的丙二醛含量刚好达到处理前近似水平。

由图 5 - A 可知,超氧化物歧化酶活性经低温处理后出现下降,野生型明显低于沉默组,可能低温处理 5 d 后,沉默组植株启动自我保护机制,清除体内过量的活性氧。由图 5 - B 可以看出,低温处理后野生型植株过氧化物酶活性升高,而沉默组过氧化物酶活性低于常温条件,可能是因为植株受到低温胁迫,POD 活性降低。低温处理后 3 组植株过氧化氢酶活性都有升高,野生型高于沉默组,基因沉默组植株 CAT 活性的上升明显低于野生型,说明基因沉默组植株具有较强的抗氧化能力,为基因沉默组植株与野生型的抗氧化比较提供了依据。能清除更多的活性氧,减小低温对植株的伤害(图 5 - C)。这些结果进一步说明了 *SLMYB44-like* 基因沉默后,植株对低温的敏感性上升。

综上所述,由抗寒生理指标测定结果可得, *SLMYB44-like* 基因沉默后,沉默组植株低温耐受性低于野生型植株,与表型观察结果一致。说明 *SLMYB44-like* 基因响应低温胁迫,参与植物体低温胁迫应答调控过程。

3 讨论

VIGS 技术因试验周期短、成本低的特点被广泛应用于基因功能的探究。病毒诱导的基因沉默效率受环境温度因素制约^[13],Burch 等的研究表明,相对较低的温度可以促使植株尽早开启病毒防御机制,使植株出现更为明显的沉默表型,同时,病毒感染过程也与温度相关,较低温度利于病毒感染植



柱上不同小写字母表示同一温度不同处理差异显著($P<0.05$)。图5 同

图4 生理指标的测定

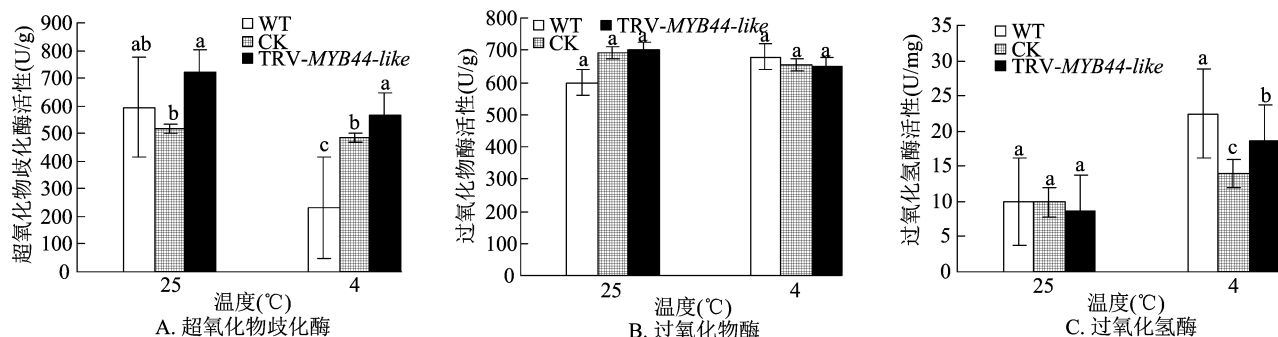


图5 抗氧化酶活性的测定

株,利于提高沉默效率^[14]。在番茄中,21℃是病毒诱导基因沉默的最适温度^[15]。另一个影响因素是植株侵染时期,研究发现,相较于成熟期植株,幼嫩的组织或植株更容易被侵染,且有更高的沉默效率^[16]。本试验中侵染3周苗龄的番茄叶片,侵染后置于培养箱黑暗环境24 h,温度控制在20~25℃,以提高沉默效率,侵染10 d后鉴定沉默阳性植株,进行抗寒性分析。经PCR验证共得到24株阳性植株。

利用TRV诱导*SiMYB44-like*基因沉默时,基因沉默组番茄植株受冷害的程度比较严重,说明*SiMYB44-like*基因参与番茄冷胁迫响应,影响番茄御冷机制。林多等的试验结果表明处理时间越长,番茄叶片POD活性越高,且苗期POD活性比坐果

期高,而2个时期冷敏感程度相近,说明苗期番茄比坐果期更耐低温^[17]。SOD是抗氧化酶清除自由基的第1个参与者,延缓了自由基对细胞的进一步伤害,有研究表明根际低氧胁迫下初期SOD活性提高,而后酶活性随胁迫时间延长逐渐降低^[18]。本试验中超氧化物歧化酶低温处理后出现下降,野生型明显低于沉默组,可能低温处理5 d后,沉默组植株启动自我保护机制,清除体内过量的活性氧。低温后野生型植株过氧化物酶活性升高,而沉默组过氧化物酶活性低于常温条件,可能是因为植株受到胁迫,POD活性降低。

丙二醛是植物体内膜脂过氧化产生的有毒物质。因此,MDA含量是膜脂氧化的一个重要指

标,代表植物膜的伤害程度。^[19]。张静等试验探究了不同耐寒性的番茄品种在低温胁迫下丙二醛和叶绿素含量的变化和差异,结果显示,MDA 含量随胁迫时间增加累积,耐寒性强的品种中 MDA 含量变化较缓慢^[20]。而游离脯氨酸是植物体内一种维持细胞渗透压平衡的渗透调节物质。罗丹等探究了低温胁迫下脯氨酸代谢相关关键酶的活性及脯氨酸含量的变化,结果表明脯氨酸含量在低温初期先升高,之后逐渐降低,相关酶活性趋势相同,与脯氨酸积累呈正相关^[21]。本试验中未低温处理时基因沉默组、空载组及野生型指标差异不大,低温处理后,基因沉默组可溶性蛋白含量低于对照组和空载组,丙二醛含量明显高于野生型和对照组,说明基因沉默后植株受冷害损伤程度更重。低温处理 5 d 时野生型和空载组植株脯氨酸含量大幅上升,而基因瞬时沉默组脯氨酸含量较 0 d 仅有小幅度上升,可能 *MYB44-like* 基因沉默后影响了脯氨酸的代谢,植株抗寒性降低,细胞受损,不能及时调节渗透平衡。阳性植株生理指标测定结果表明,在低温胁迫下,基因沉默组植株的脯氨酸含量和可溶性蛋白含量均低于野生型,而丙二醛含量高于野生型,说明低温胁迫后基因沉默组植株细胞受损程度更严重,因此 *SLMYB44-like* 基因沉默降低了番茄植株的抗寒性。初步认为番茄 *SLMYB44-like* 转录因子响应低温胁迫,参与植株低温胁迫应答与调控。

4 结论

本研究构建了 pTRV2 - *SLMYB44-like* 沉默载体并侵染番茄幼苗,获得基因沉默植株,通过测定基因沉默植株低温处理后的生理指标进行抗寒性分析,结果显示 *SLMYB44-like* 基因沉默降低了番茄植株的抗寒性。表明 *SLMYB44-like* 基因响应了低温胁迫,参与植物体低温胁迫应答调控过程。本结果进一步探究了 *SLMYB44-like* 基因的功能,为番茄抗寒育种提供理论基础。

参考文献:

- [1] 郑东虎,黄俊轩,王丽娟. 番茄低温生态学的研究进展[J]. 北方园艺,2002(3):36-37.
- [2] 刘壮斌. 低温胁迫下番茄 *MYB113* 基因的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学,2019.
- [3] Jian W, Cao H H, Yuan S, et al. *Slmyb75*, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits[J]. Horticulture Research, 2019,6(1):22.
- [4] 刁鹏飞. *SLMYB41* 基因的克隆及其在番茄低温胁迫响应中的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学,2020.
- [5] Kuhn N, Maldonado J, Ponce C, et al. RNAseq reveals different transcriptomic responses to GA₃ in early and midseason varieties before ripening initiation in sweet cherry fruits[J]. Scientific Reports,2021,11(1):13075-13075.
- [6] Ho L, Klemens P A W, Neuhaus H E, et al. SlSweet1a is involved in glucose import to young leaves in tomato plants[J]. J Exp Bot, 2019,70(12):3241-3254.
- [7] D'Amelia V, Raiola A, Carputo D, et al. A basic helix-loop-helix slarancio, identified from a solanum pennellii introgression line, affects carotenoid accumulation in tomato fruits[J]. Scientific Reports,2019,9(1):1-10.
- [8] Chen X H, Duan X F, Wang S, et al. Virus-induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of *myb80* gene involved in solanum lycopersicum cold tolerance[J]. Protoplasma,2018,256(2):409-418.
- [9] Fu X, Shi Z H, Jiang Y, et al. A family of auxin conjugate hydrolases from *Solanum lycopersicum* and analysis of their roles in flower pedicel abscission[J]. BMC Plant Biol,2019,19(1):1-17.
- [10] Liu T, Du Q J, Li S Z, et al. *Gstu43* gene involved in ala-regulated redox homeostasis, to maintain coordinated chlorophyll synthesis of tomato at low temperature[J]. BMC Plant Biol,2019,19(1):1-13.
- [11] 苍晶,赵会杰. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社,2013.
- [12] Kong F Y, Deng Y S, Zhou B, et al. A chloroplast-targeted dnaJ protein contributes to maintenance of photosystem ii under chilling stress[J]. J Exp Bot,2014,65(1):143-158.
- [13] Tuttle J R, Idris Am, Brown J K, et al. Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton[J]. Plant Physiol,2008,148(1):41-50.
- [14] Burch-Smith T M, Anderson J C, Martin G B, et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants[J]. Plant J,2004,39(5):734-746.
- [15] Ekengren S K, Yule L, Schiff M, et al. Two mapk cascades, npr1, and tga transcription factors play a role in pto-mediated disease resistance in tomato[J]. Plant J,2003,36(6):905-917.
- [16] Wang C C, Cai X Z, Wang X M, et al. Optimisation of tobacco rattle virus-induced gene silencing in arabidopsis[J]. Funct Plant Biol, 2006,33(4):347-355.
- [17] 林多,魏毓棠. 低温对番茄叶片 POD 活性及其同工酶的影响[J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(1):47-49.
- [18] 樊严,孙英,安娜,等. 根际低氧胁迫对水培番茄超氧化物歧化酶的影响[J]. 北方园艺,2015(24):9-11.
- [19] 陆新华,孙光明,叶春海. 低温胁迫对菠萝幼苗膜透性·丙二醛和叶绿素含量的影响[J]. 安徽农业科学,2010,38(16):8374-8375,8411.
- [20] 张静,朱为民. 低温胁迫对番茄幼苗叶绿素和丙二醛的影响[J]. 上海农业学报,2012,28(3):74-77.
- [21] 罗丹,张喜春,田硕. 低温胁迫对番茄幼苗脯氨酸积累及其代谢关键酶活性的影响[J]. 中国农学通报,2013,29(16):90-95.