

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.03.007

番茄热激因子基因 *SlHsfC1* 的表达特性 与耐寒功能分析

覃雅飞, 王华容, 陈世豪, 张燕, 夏雪,
邱见方, 李金华, 潘宇, 张兴国

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 番茄热激因子基因 *SlHsfC1* 受低温诱导表达, 但是否具有耐寒功能尚不清楚。本研究分析了番茄 *SlHsfC1* 基因在低温、高温、水淹和盐胁迫下的表达特性, 以及该基因过表达对转基因植株耐寒性的影响; 初步证实该基因受到低温、高温、水淹和盐胁迫时可诱导表达, 过表达能增强转基因番茄植株的耐寒性。该结果为今后揭示该基因参与番茄冷调控的分子机制奠定了基础。

关键词: 番茄; *SlHsfC1* 基因; 耐寒性; 低温诱导表达

中图分类号: S641.2 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)03-0059-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of Expression Characteristics and Cold-Tolerance Function of the Heat Shock Factor C1 Gene in Tomato

QIN Yafei, WANG Huarong, CHEN Shihao, ZHANG Yan, XIA Xue,
QIU Jianfang, LI Jinhua, PAN Yu, ZHANG Xingguo

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The expression of tomato heat shock factor gene *SlHsfC1* can be induced by low temperature, but it is not clear whether it has the function of cold tolerance. Therefore, this study analyzed the expression characteristics of tomato *SlHsfC1* gene under low temperature, high temperature, water-logging and salt stress, and the effect of overexpression of this gene on cold tolerance of transgenic plants. It was con-

收稿日期: 2021-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872119)。

作者简介: 覃雅飞, 硕士研究生, 主要从事蔬菜生物技术研究。

通信作者: 张兴国, 研究员。

firmed that expression of this gene can be induced by low temperature, high temperature, water-logging and salt stress. Overexpression of *SlHsfC1* gene can enhance the cold tolerance of transgenic tomato plants. The results laid the foundation for revealing the molecular mechanism of this gene involved in regulation of tomato cold tolerance in the future.

Key words: tomato; *SlHsfC1* gene; cold tolerance; low temperature induced expression

番茄(*Solanum lycopersicum*)是世界上最主要的蔬菜作物之一。番茄在生长发育过程中受到了低温、高温、盐碱、水淹、干旱等非生物胁迫的影响,限制其生长、发育甚至最后导致植株的死亡。热激因子(Heat Shock Factor, HSF)是植物响应高温胁迫的主要调控因子,并参与盐、干旱等胁迫反应过程^[1]。热激因子可分为 A、B、C 等 3 类^[2-3];其中, A 类基因具有转录激活功能^[4-5], B 类基因起转录抑制作用, B 类转录激活因子又可以作为 A 类转录激活因子的共激活因子,具有辅助激活功能^[6-7];而 C 类基因因为不具有 AHA 基序,被推测可能不具有转录活性^[8-9],但研究发现, C 类基因在水稻^[10-11]、拟南芥^[12-13]、茶^[14]、番茄^[15-16]等植物中均能受低温显著诱导,是否具有耐寒功能迄今未得到证实。本研究对番茄 *SlHsfC1* 基因在低温、高温、水淹和盐胁迫下的表达特性进行分析,构建该基因的过表达载体,并分析该基因过表达对转基因植株耐寒性的影响,初步证实该基因过表达能增强转基因番茄植株的耐寒性。该研究结果拟对今后揭示该基因如何参与番茄冷调控的分子机制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为野生型番茄 AC⁺⁺ (*Solanum lycopersicum* L. cv. Alisa Craig),由西南大学蔬菜学重点实验室提供。

1.2 菌株

选用的大肠杆菌(*Esherichia coli*)菌株为 DH5 α ,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404。

1.3 生物信息学分析

利用 Cluster W 软件,对番茄、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、短柄草(*Brachypodium distachyon*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小立碗藓(*Physcomitrella patens*)的 Hsf 家族成员的 DNA 结合域(DNA-binding Domain, DBD)进行多重序列比对,并利用 MEGA 软件构建上述 7 种物种 DBD 结构域的系统发育进化树。

1.4 胁迫处理

1.4.1 低温、高温处理

选取长势一致“五叶一心”的番茄苗分别放置于 4 °C, 37 °C 的人工气候培养箱内,按照正常的光暗周期(16 h 光照, 8 h 黑暗)开始处理,以处理 0 h, 4 h, 8 h, 24 h 为时间点收取根、茎、叶作为材料,每一个温度处理的各个时间点需保证至少有 3 株长势一致的番茄苗。

1.4.2 水淹处理

选取长势一致的番茄苗,将番茄苗连带营养钵置于深槽托盘中,向深槽托盘中加入适量的水,保证水深在 10 cm 左右,分别在处理 0 d, 2 d, 4 d, 8 d 时收集根、茎、叶。

1.4.3 盐胁迫处理

选取长势一致的番茄苗, 同时放置在含有 0, 100, 200, 300, 400, 500 mmol/L 盐水的深槽托盘中, 淹没营养钵 5 cm 左右, 处理 24 h 后收集叶组织。

收集叶片材料时, 从下到上选择 3~4 片真叶。选取根部材料时, 将根的泥土清洗干净, 并用滤纸擦干水分, 尽快放入液氮中, 放入 -80 °C 超低温冰箱中保存。

1.5 定量 PCR 分析

采用 RNAiso plus (TaKaRa) 提取总 RNA, CWbio 试剂盒 (康为世纪) 反转录合成 cDNA。 *SlHsfC1* 基因的 qRT-PCR 上游和下游引物分别 P8 和 P9。以番茄中表达稳定的 ELF1- α (elongation factor 1- α) 为内参基因 (表 1)。反应染液为 Sybergreen (康为世纪), 反应体系、表达量计算公式、统计学分析、绘图参照潘阳露^[17]的研究方法。程序为: 94 °C 预变性 3 min、94 °C 变性 30 s、59 °C 退火 15 s、40 个循环、65~95 °C 解链 3 s。

1.6 转基因植株的获得

利用巢式 PCR (引物见表 1), 以番茄 cDNA 为模板, P2/P3 进行第 1 轮 PCR 扩增, 程序为: 98 °C 预变性 2 min、98 °C 变性 15 s、53 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 80 s、30 个循环; 以第 1 轮 PCR 产物为模板, P4/P5 进行第 2 轮 PCR 扩增, 程序为: 98 °C 预变性 2 min、98 °C 变性 15 s、48 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 80 s、3 个循环、98 °C 变性 15 s、57 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 80 s、35 个循环。从番茄 cDNA 中扩增出 *SlHsfC1* 的 CDS 区域, 并装入到双元表达载体中。运用农杆菌介导法转化番茄子叶, 具体方法参见潘阳露^[17]的研究。

将已生根的卡那霉素 (Kan) 抗性番茄植株移栽至营养土。炼苗成活后, 取新叶用 CTAB 法提取 gDNA, 以 nptII 基因的引物 P6/P7 以及目的基因区域定量上游引物 P8 和终止子 Tipt 上的引物 P1 对番茄基因组进行 PCR 扩增, 筛选转基因阳性植株。以 P8/P9 引物对进行 qRT-PCR 分析, 鉴别 *SlHsfC1* 过表达的转基因番茄植株。

1.7 转基因植株的耐寒性鉴定

将 24 °C 培养的过表达转基因阳性植株 (T0 代) 和 AC 野生型植株经 12 °C 冷驯化 2 d 后, 经 4 °C 处理 7 d 后, 再经 2 °C 处理 2 d, 观察低温对植株表型的影响。所有处理的光照条件为 16 h 光照, 8 h 黑暗。

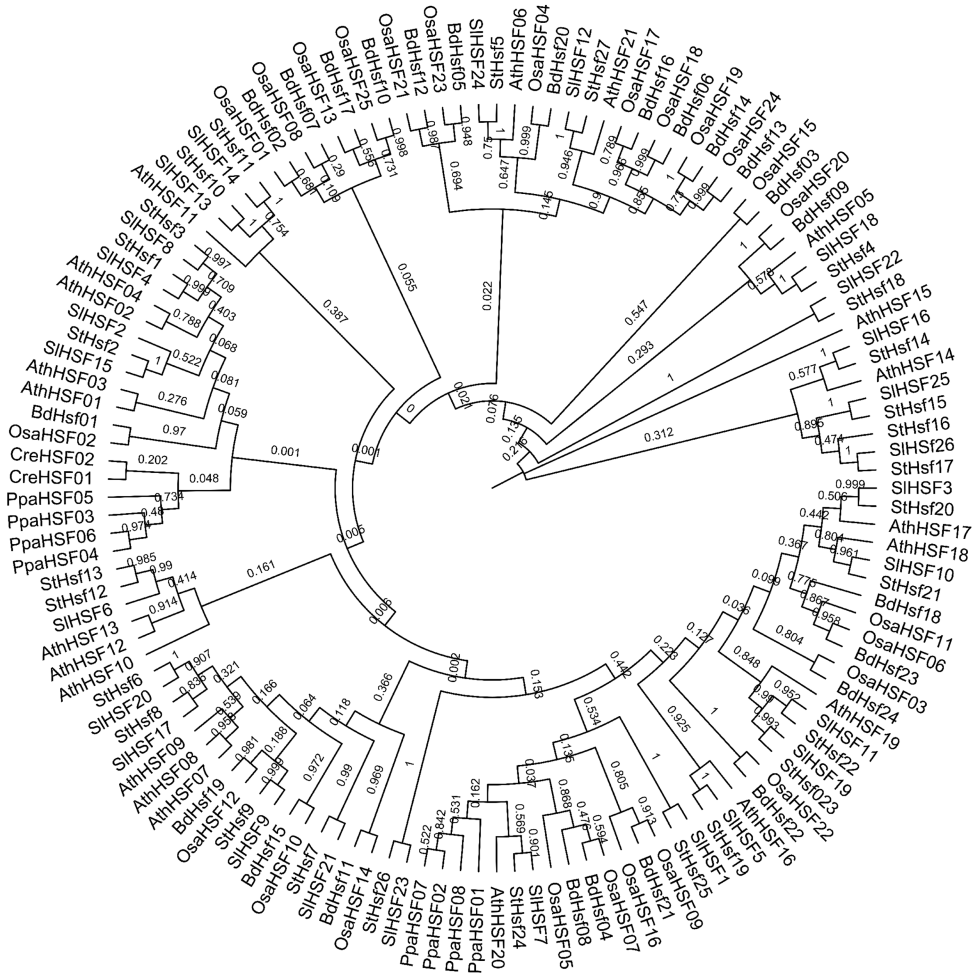
表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	位置
P1	CGTTCGATGACGAAAATGGAAG	Tipt
P2	TCTTCTCTACAACCACCACGAC	<i>SlHsfC1</i>
P3	AAGTGAAACCTCCCAAGTTAAC	<i>SlHsfC1</i>
P4	AAGCTTACCATGGAGGCTAACAATATTA	<i>SlHsfC1</i>
P5	CTCGAGCTCTAAAATCCACCACCGAA	<i>SlHsfC1</i>
P6	CATGAGCGAAACCCTATAGGAACC	nptII 上游
P7	AGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAG	nptII 下游
P8	CGTGAGAAGAAACGGAGACTTGTG	<i>SlHsfC1</i> 上游
P9	CGACGACGGTGAGGACTGACAG	<i>SlHsfC1</i> 下游
P10	ACCTTTGCTGAATACCCTCCATTG	ELF1- α 上游
P11	CACAGTTCACCTCCCTTCTTCTG	ELF1- α 下游

2 结果与分析

2.1 番茄 *SlHsfC1* 与其他 HSF 蛋白的系统发育关系

番茄 *SlHsfC1* 与其他植物 C 类热激因子一样, 是功能尚不明确的一类转录因子. 在系统进化上, *SlHsfC1* (*SlHsf12*) 与同科植物马铃薯 *HsfC1* (*StHsf27*) 的亲缘关系最近, 两者热激元件的 DNA 结合域 (DNA-binding Domain, DBD) 的蛋白序列相似度达到了 100%; 其次是拟南芥的 *HsfC1* (*AthHsf21*), 再其次是单子叶植物水稻 (*OsaHsf17*, *OsaHsf18*, *OsaHsf19*, *OsaHsf24*) 和短柄草 (*BdHsf06*, *BdHsf13*, *BdHsf14*, *BdHsf16*) 的 HsfC 类热激因子; 而与 A 类和 B 类热激因子的序列相似性相差较大, 尤其是在衣藻和苔藓等远古植物种中未发现 *SlHsfC1* 的直系同源基因. 此外, 在番茄的 26 个 HSF 中, *SlHsfC1* 与 *SlHsf24* (*SlHsfA3*) 的序列相似性最大 (图 1).

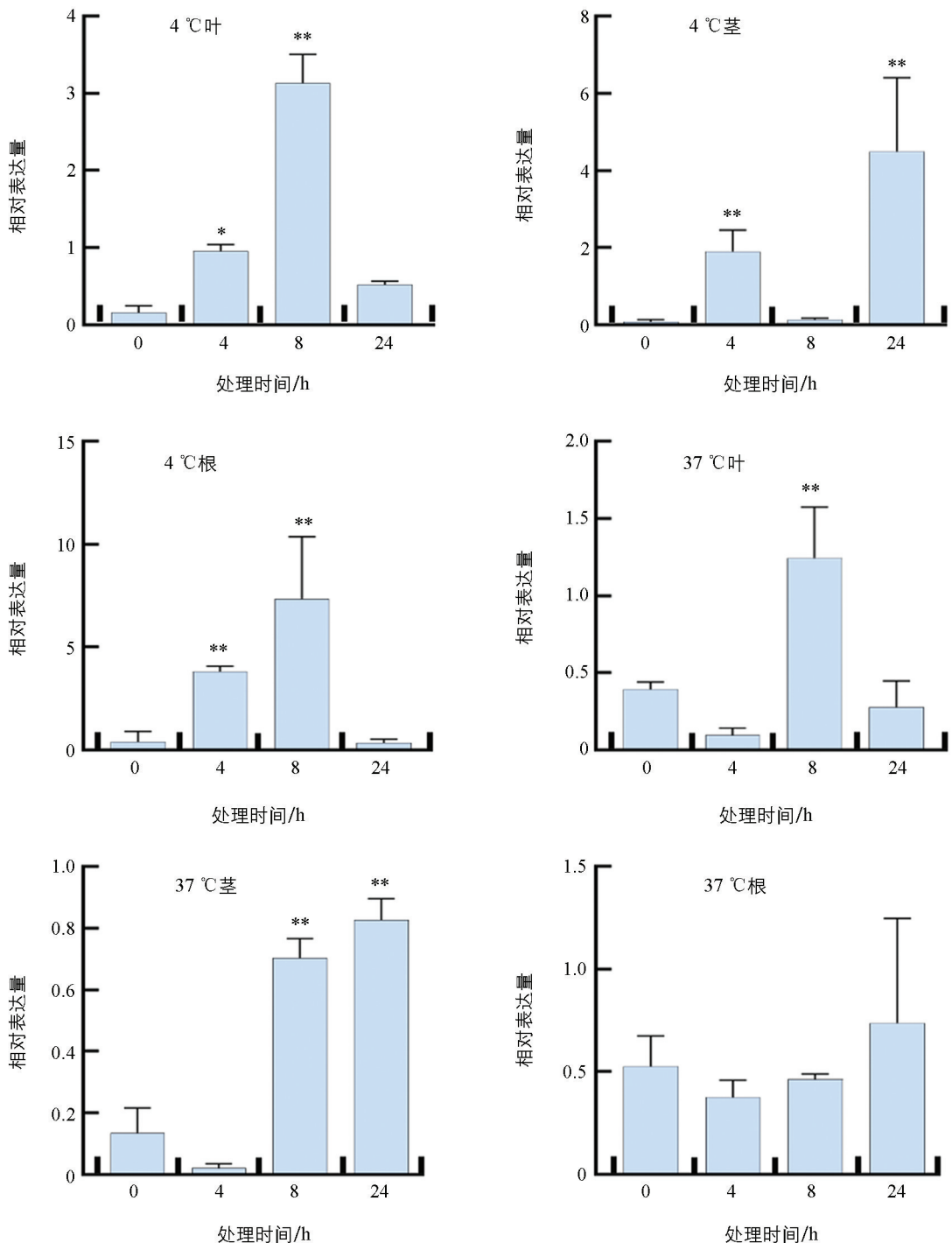


Sl: 番茄 (*Solanum lycopersicum*); Cre: 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*); Bd: 短柄草 (*Brachypodium distachyon*); Osa: 水稻 (*Oryza sativa*); Ath: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*); Ppa: 小立碗藓 (*Physcomitrella patens*); St: 马铃薯 (*Solanum tuberosum*).

图 1 番茄 *SlHsfC1* 基因与其他 HSF 蛋白的系统发育进化树

2.2 *SlHsfC1* 在低温、高温、水涝和高盐逆境下的表达特性

qRT-PCR 检查结果显示, 低温 4 °C 处理 4 h, 番茄根、茎、叶 3 个组织中的 *SlHsfC1* 的表达量均显著增高; 其中, 根和叶片在低温处理 8 h、茎在低温处理 24 h 时, 与 0 h *SlHsfC1* 表达量相比差异有统计学意义 ($p < 0.01$). 经过高温 37 °C 处理 8 h, 叶片 *SlHsfC1* 的表达量明显增高; 高温处理 24 h, 茎组织 *SlHsfC1* 的表达量与 0 h 相比差异有统计学意义 ($p < 0.01$). 表明 *SlHsfC1* 能被高温和低温胁迫诱导表达 (图 2).



采用独立样本 t 检验, “*”表示差异有统计学意义($p < 0.05$), “**”表示差异有统计学意义($p < 0.01$).

图 2 温度胁迫对番茄 *SlHsfC1* 基因表达的影响

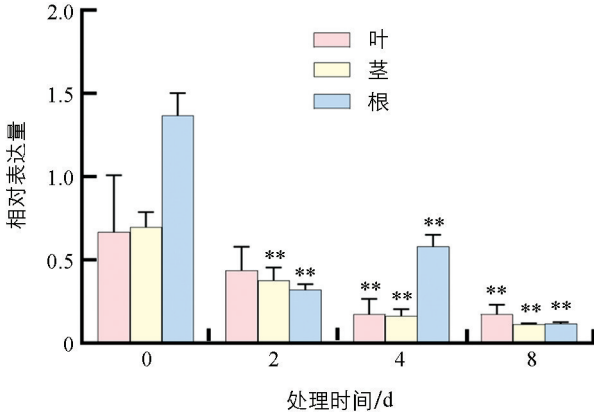
水淹处理后, 番茄叶片中 *SlHsfC1* 基因表达量在未处理时位于最高值, 随着处理时间的延长, *SlHsfC1* 基因表达量逐渐降低, 表明 *SlHsfC1* 的表达可以被水淹所抑制(图 3).

番茄植株经不同浓度的 NaCl 处理 1 d 时, *SlHsfC1* 的表达量均表现为升高; 其中, 500 mmol/L 处理下的表达量与对照的差异有统计学意义($p < 0.01$), 表明 *SlHsfC1* 可以受盐胁迫诱导表达(图 4).

2.3 *SlHsfC1* 过表达转基因植株的获得

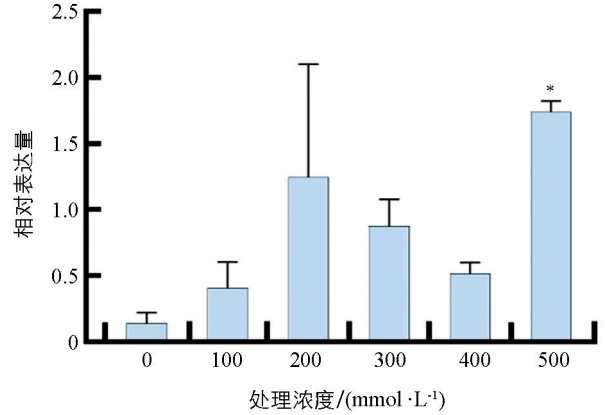
经巢式 PCR 扩增, 得到大小为 1 127 bp 的 *SlHsfC1* 基因 CDS 全长(图 5a). 构建了该基因的过表达

载体(图 5b). 利用农杆菌介导法转化番茄 AC 的子叶外植体, 将 *SlHsfC1* 过表达载体的 T-DNA 整合进番茄 AC 的基因组中. 经引物对 P6/P7、定量上游引物 P1 对 *npt II* 和 *SlHsfC1* 基因进行 PCR 扩增, 分别得到 767 bp 和 894 bp 的目的条带, 筛选出 *SlHsfC1* 转基因阳性株系 10 株(图 5c, d). 经 qRT-PCR 对转基因植株进行检测, 鉴别到 OE2, OE6, OE12 和 OE13 等 *SlHsfC1* 过表达植株. 所有 T₀ 代转基因植株的形态与野生型植株没有差别(图 6).



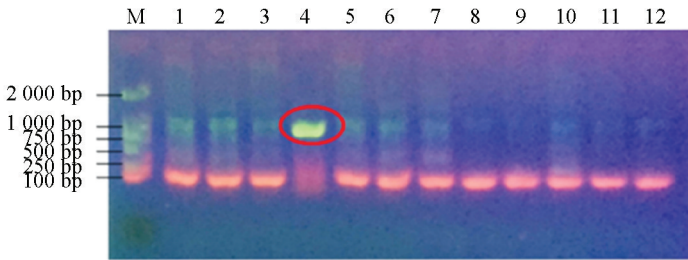
采用独立样本 *t* 检验, “**”表示差异有统计学意义($p < 0.01$).

图 3 水淹对番茄 *SlHsfC1* 基因表达的影响

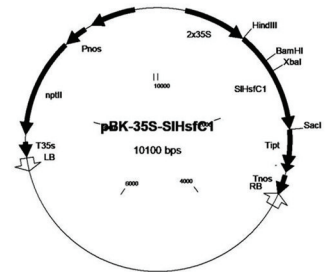


采用独立样本 *t* 检验, “*”表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

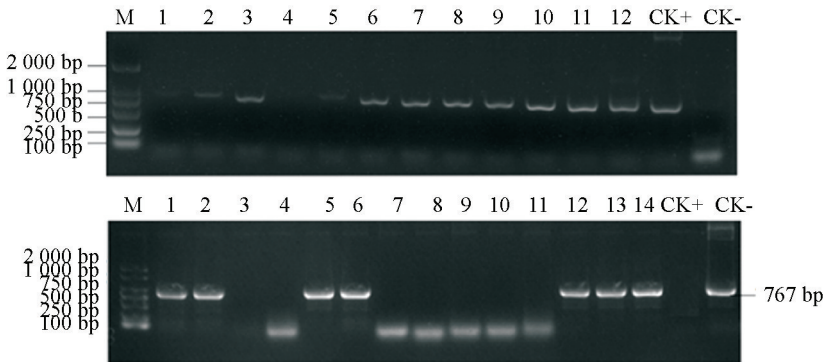
图 4 盐胁迫对番茄 *SlHsfC1* 基因表达的影响



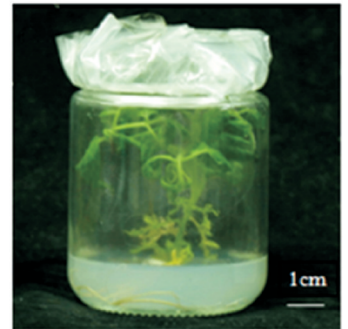
a. *SlHsfC1* 的克隆



b. *SlHsfC1* 的过表达双元载体



c. 转基因植株的 PCR 鉴定



d. Kan 抗性植株

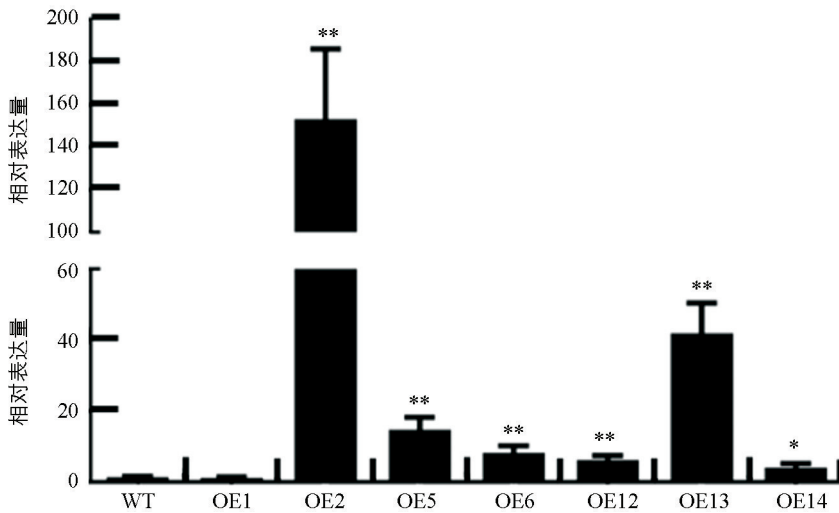
M: DL 2 000 DNA 分子量标准; 1~12: 待检测转基因植株; CK+: 过表达载体; CK-: 水.

图 5 番茄 *SlHsfC1* 基因的克隆与转基因植株的获得

2.4 *SlHsfC1* 过表达能增强转基因植株的耐寒性

为初步鉴别 *SlHsfC1* 是否具有耐寒功能, 将野生型番茄 AC 和 OE2, OE13 过表达植株经过 12 °C, 2 d 的低温驯化, 4 °C, 7 d 和 2 °C, 4 d 的低温处理. 结果发现, 野生型番茄 AC 植株底部叶片完全失水坏死, 顶部叶片出现失绿、失水、坏死, 而过表达转基因植株 OE2, OE13 的顶部叶片未出现坏死、失绿, 表

明 *SlHsfC1* 过表达能增强转基因植株的耐寒性(图 7).



OE1~14: Kan 抗性植株; WT: 野生型番茄 AC 植株; “**”表示差异有统计学意义($p < 0.01$), “*”表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 6 番茄 *SlHsfC1* 基因过表达转基因植株的筛选



a. 常温处理



b. 低温处理

WT: 野生型番茄 AC 植株; OE2 和 OE13: *SlHsfC1* 过表达植株.

图 7 *SlHsfC1* 过表达植株的低温耐受性鉴定

3 结论与讨论

SlHsfC1 在低温、高温、水淹、盐害等非生物胁迫中都有应答,特别是在低温处理后,表达量显著增加. C 类热激因子受低温诱导显著表达的现象在拟南芥^[10-11]、水稻^[10-12]、茶^[14]、多毛番茄^[15]等植物中普遍存在,因此推测 C 类热激因子可能参与了冷胁迫调控. 然而,从蛋白序列上分析认为, C 类热激因子不具有转录活性^[8]. 因此, *SlHsfC1* 等 C 类热激因子在冷适应中的功能尚不清楚.

本研究发现, *SlHsfC1* 过表达的 T0 代植株形态正常,但 T1 代植株明显矮化,与多毛番茄 *HsfC1* 基因在普通番茄中过表达和拟南芥 *HsfC1* 过表达研究中的矮化现象相一致^[15-16]. 由于 T1 代植株非常矮小,难以进行耐寒性分析,故本研究对 T0 代长势正常的转基因植株的耐寒性进行了分析,初步证实过表达 *SlHsfC1* 能增强转基因番茄植株的耐寒性. 低温反应最重要的 CBF(C-REPEAT BINDING FACTORS)过表达后生长受到抑制^[17], CBF 通过激活 GA 分解代谢基因 *GA2ox7* 促进稳定 DELLA 蛋白^[18-19]. 同时,低温会激活 DELLA-GRF 的调控,从而抵抗低温胁迫^[20]. *SlHsfC1* 是如何参与耐寒性调控,尚待 T2 代转基因纯合后进行深入的研究.

参考文献:

- [1] KUMAR S V, WIGGE P A. H2A Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 136-147.
- [2] CHENG Q, ZHOU Y, LIU Z, et al. An Alternatively Spliced Heat Shock Transcription Factor, OsHSFA2dI, Functions in the Heat Stress-Induced Unfolded Protein Response in Rice [J]. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 2015, 17(2): 419-429.
- [3] SINGH A, MITTAL D, LAVANIA D, et al. *OsHsfA2c* and *OsHsfB4b* are Involved in the Transcriptional Regulation of Cytoplasmic OsClpB (Hsp100) Gene in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2012, 17(2): 243-254.
- [4] 万发香, 田婷婷, 杜小兵, 等. 热激因子基因 *AtHSFa1a* 提高烟草的耐热性研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2011, 33(10): 75-80.
- [5] GIESGUTH M, SAHM A, SIMON S, et al. Redox-Dependent Translocation of the Heat Shock Transcription Factor AtHSFA8 from the Cytosol to the Nucleus in Arabidopsis Thaliana [J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(6): 718-725.
- [6] RÖTH S, MIRUS O, BUBLAK D, et al. DNA-Binding and Repressor Function are Prerequisites for the Turnover of the Tomato Heat Stress Transcription Factor *HsfB1* [J]. *The Plant Journal*, 2017, 89(1): 31-44.
- [7] BHARTI K, VON KOSKULL-DÖRING P, BHARTI S, et al. Tomato Heat Stress Transcription Factor *HsfB1* Represents a Novel Type of General Transcription Coactivator with a Histone-Like Motif Interacting with the Plant CREB Binding Protein Ortholog HAC1 [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(6): 1521-1535.
- [8] KOTAK S, PORT M, GANGULI A, et al. Characterization of C-Terminal Domains of Arabidopsis Heat Stress Transcription Factors (HSFS) and Identification of a New Signature Combination of Plant Class a HSFS with AHA and NES Motifs Essential for Activator Function and Intracellular Localization [J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(1): 98-112.
- [9] MA J, XU Z S, WANG F, et al. Genome-Wide Analysis of HSF Family Transcription Factors and Their Responses to Abiotic Stresses in Two Chinese Cabbage Varieties [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36(2): 513-523.
- [10] MILLER G, SUZUKI N, RIZHSKY L, et al. Double Mutants Deficient in Cytosolic and Thylakoid Ascorbate Peroxi-

- dase Reveal a Complex Mode of Interaction between Reactive Oxygen Species, Plant Development, and Response to Abiotic Stresses [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(4): 1777-1785.
- [11] MITTAL D, CHAKRABARTI S, SARKAR A, et al. Heat Shock Factor Gene Family in Rice: Genomic Organization and Transcript Expression Profiling in Response to High Temperature, Low Temperature and Oxidative Stresses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47(9): 785-795.
- [12] MITTAL D, MADHYASTHA D A, GROVER A. Genome-Wide Transcriptional Profiles during Temperature and Oxidative Stress Reveal Coordinated Expression Patterns and Overlapping Regulons in Rice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40899.
- [13] PARK S, LEE C M, DOHERTY C J, et al. Regulation of the Arabidopsis CBF Regulon by a Complex Low-Temperature Regulatory Network [J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(2): 193-207.
- [14] LIU Z W, WU Z J, LI X H, et al. Identification, Classification, and Expression Profiles of Heat Shock Transcription Factors in Tea Plant (*Camellia sinensis*) under Temperature Stress [J]. *Gene*, 2016, 576(1): 52-59.
- [15] 田小琴. 番茄花序间隔节位的 QTL 定位及 *ShHsfC1* 的功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [16] BARRERO-GIL J, HUERTAS R, RAMBLA J L, et al. Tomato Plants Increase Their Tolerance to Low Temperature in a Chilling Acclimation Process Entailing Comprehensive Transcriptional and Metabolic Adjustments [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(10): 2303-2318.
- [17] 潘阳露. 番茄转录因子 *SlbZIP38* 响应干旱和高盐胁迫的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [18] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, et al. The Cold-Inducible CBF₁ Factor-Dependent Signaling Pathway Modulates the Accumulation of the Growth-Repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(8): 2117-2129.
- [19] ZHANG D, SUN W, SINGH R, et al. GRF-Interacting Factor1 Regulates Shoot Architecture and Meristem Determinacy in Maize [J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(2): 360-374.
- [20] LANTZOUNI O, ALKOFER A, FALTER-BRAUN P, et al. GROWTH-REGULATING FACTORS Interact with DELLAs and Regulate Growth in Cold Stress [J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(4): 1018-1034.

责任编辑 王新娟