

番茄根特异基因的表达分析

冯婵莹^{1,2,3}, 李涛^{2,3,*}, 黎振兴², 李植良², 徐小万^{2,3}, 丁丽雪^{1,2,3}, 王永飞^{1,*}

¹暨南大学生命科学技术学院, 广州510532; ²广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州510640; ³广东省蔬菜新技术研究重点实验室, 广州510640

摘要: 根特异表达基因与根的生长发育及功能密切相关。本研究以根特异表达基因 *Solyc02g084780* 的表达模式为模板, 在番茄表达谱中筛选获得95个根特异表达基因; 在拟南芥和水稻中通过同源比对分别得到93和95个直系同源基因。对3个物种的根特异表达基因的表达模式开展研究, 结果表明直系同源基因的表达变异与进化关系相关。根特异表达基因的启动子分析结果表明, 基因的表达模式与启动子中调控元件的特性有关; 并对番茄8个根特异表达基因进行RT-PCR验证。

关键词: 番茄; 根; 特异表达基因; 启动子分析

Expression Analysis of Root-Specific Genes in Tomato

FENG Chan-Ying^{1,2,3}, LI Tao^{2,3,*}, LI Zhen-Xing², LI Zhi-Liang², XU Xiao-Wan^{2,3}, DING Li-Xue^{1,2,3}, WANG Yong-Fei^{1,*}

¹Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ³Guangdong Key Laboratory for New Technology Research of Vegetables, Guangzhou 510640, China

Abstract: There is a close relation between root-specific gene expression and root development and functions. Using the expression pattern of *Solyc02g084780* as a model, 95 root-specific genes had been found in tomato expression profile data. By homologous comparison, 93 and 95 orthologous homologous genes were found in *Arabidopsis thaliana* and rice, respectively. After comparing the expression pattern of orthologous homologous genes among these plants, the results showed that the expression pattern was different, and the expression pattern variation was similar in closer species while it's greater in further species. The promoter analysis indicated that the difference of genes expression pattern was due to the characters of cis-elements in promoters, which was further proved by RT-PCR results of 8 randomly selected genes.

Key words: tomato (*Solanum lycopersicum*); root; specifically-expressed genes; promoter analysis

植物根系具有固定植株、吸收水分与营养、合成植物激素和必需物质、参与生物与非生物胁迫应答等功能(Kapulnik和Koltai 2014)。根系发育起始于初生根的形成, 进而产生一级和高级侧根; 不同类型的根系结构基本相同(Wysocka-diller等2000)。虽然根的结构比较简单, 但根系的形成与发育具有非常复杂的调控机制, 从而决定植物在不同环境条件下的适应和生存能力。前人在模式植物拟南芥根发育调控基因研究中发现, 初生根、侧根和不定根的形成受到不同遗传途径的调控(Benkova和Hejatko 2009)。拟南芥的初生根是由根尖分生组织(包括静止中心及其周围的干细胞)经过不断的分裂、生长和分化形成的(Stahl和Simon 2009)。植物根尖分生组织发育的调控主要受PLT途径和SHR/SCR途径调节。PLT编码AP2型的转录因子促使根尖形成干细胞微环境, 过量表达PLT基因促进根系分生组织的起始, 且PLT1和

PLT2存在功能冗余, 若二者突变则失去静止中心特性, 从而导致根尖分生组织瓦解(Aida等2004; Galinha等2007)。同时, *SCR*、*SHR*、*MGP*和*JKD*等基因也参与调控根分生组织纵向模式和辐射模式建成(Benkova和Hejatko 2009)。遗传学研究表明, *SHR*位于*SCR*的上游, *SHR*在中柱内表达, 其表达产物转移到了相邻细胞层, 与*SCR*相互作用一起调控根细胞的不对称分裂和辐射模式的形成; 而转录因子*JKD*和*MGP*通过限制*SHR*和*SCR*作用的

收稿 2015-01-18 修定 2015-05-04

资助 国家自然科学基金(31301776)、农业部现代产业体系项目(CARS-25-G-36)、农业科技成果转化资金项目(2013-GB2-E000361)、广东省对外科技合作项目(2013B050800012)、广东省省级科技计划项目(2014A020208044)、广东省科技厅条件建设项目(粤财教[2013]112号)和广东省农科院院长基金项目(201303)。

* 通讯作者(E-mail: tianxing84@163.com, Tel: 020-38469456; E-mail: msmwdw@163.com, Tel: 020-32742408)。

区域,形成一种精细的反馈调节机制(Nakajima等2001; Cui等2007)。SHR/SCR途径和PLT途径也是通过与各种激素信号通路紧密联系共同调控根的分生组织,如生长素、细胞分裂素、乙烯和赤霉素都参与调节根的增殖、膨大和分化,其中生长素和细胞分裂素信号的互作在维持根分生组织中具有重要作用(Stahl和Simon 2009)。

根据主根与侧根的关系,可将植物根系划分为直根系和须根系两大类。大部分单子叶植物如水稻和小麦为须根系;大部分双子叶植物为直根系如拟南芥(刘大同等2013)。番茄是世界上重要的经济作物和模式植物之一(李艳军等2014),其为直根系,且由主根和侧根组成。由于拟南芥的根系解剖结构简单,且容易获得大量突变体(刘大同等2013),早期对双子叶植物根系发生机理的认识大多是从拟南芥上获得的,而对番茄根的研究较少。Lin等(2005)首次对番茄根特异表达的基因开展研究,发现番茄富含甘氨酸的蛋白(glycine-rich protein, GRP)基因家族,并将其命名为LeGRPs (*Lycopersicon esculentum* GRPs); Northern杂交分析发现该家族的基因主要在番茄的根中特异表达;通过比较LeGRP在番茄不同发育阶段不同组织中的表达量,发现LeGRPs基因家族在番茄幼根早期发育的过程中起重要作用。随后有学者对番茄组织特异表达基因进行筛选,并得到了3个根特异表达基因,但其并未对3个根特异表达基因与根发育的关系进行阐释(Lin等2012)。后续少见关于更多的番茄根中特异表达基因及其与番茄根系发育关系的研究。随着番茄全基因组测序的完成(The Tomato Genome Consortium 2012)及分子生物学研究体系的建立,以及基因芯片等高通量转录组技术在番茄中的应用,使得这一研究成为可能。

因此,本研究以番茄为材料,筛选出了95个根特异表达基因,并随机抽取了8个基因进行RT-PCR检测。通过同源比对,检索拟南芥和水稻中的直系同源基因,并进一步对其在3个物种中的表达模式进行比较,发现其表达模式存在差异,且与进化关系的远近有关。进一步对筛选出的番茄根特异表达基因进行启动子分析,发现基因的表达模式与启动子中调控元件的特性有关。结果将为揭示番茄根的发生、分化、发育和功能机制及茄科植物的遗传改良提供理论参考。

材料与方法

1 相关数据库

番茄(*Solanum lycopersicum* L.)根特异表达基因的表达量、名称、氨基酸序列和染色体定位图信息来源于番茄基因组网站(<http://solgenomics.net/>)。拟南芥基因名称和表达量来源于数据库TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)。水稻的基因名称和表达量来源于数据库Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)。启动子分析在PLACE网站(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)进行。

2 方法

2.1 番茄根特异基因的筛选

Lim等(2012)已经证实基因*Solyc02g084780* (在番茄基因组网站上EST编号为E210745)为番茄根中的特异表达基因。本研究以*Solyc02g084780*基因的表达模式为模板,在番茄表达谱网站上找出在根中大量表达或特异表达的基因,并下载所有这些基因在各器官中的表达量,然后通过下列方程对所有基因的表达量进行分析(Wei等2010; Li等2007):

$$\text{Ratio} = X / \text{Max}(X_i)$$

$$Z = (X - \mu) / SD$$

式中, X 表示基因在根组织中的表达量, X_i 表示基因在其它组织中表达量; μ 表示基因在除根组织以外各组织中表达量的平均值, SD 表示基因在所有组织中表达量的标准差。然后筛选出Ratio值大于10且Z值大于3的基因。

2.2 拟南芥和水稻中直系同源基因的筛选和表达分析

以番茄中筛选出的根特异表达基因编码的氨基酸序列为检索序列,分别在TAIR和Rice Genome Annotation Project网站上进行BlastP搜索,得到这类基因在拟南芥和水稻中的直系同源基因,然后进一步确定这些基因在各组织中的表达量,再绘制出热能图。

2.3 番茄中根特异表达基因的直系同源基因的表达分析

从番茄中筛选到的根特异表达基因中随机抽取6个基因进行具体的表达量分析。随机抽取到的6个基因为*Solyc05g007110*、*Solyc08g077010*、*Solyc02g071070*、*Solyc06g065430*、*Solyc10g055230*

和*Solyc04g007760*。然后将其表达量与其在拟南芥和水稻中的直系同源基因的表达量进行比较。因为不同植物表达谱的测定方法不同, 故将绝对表达量换算为相对表达量。定义基因在根组织中的相对表达量为1, 其它组织中绝对表达量与根组织中绝对表达量之比为该组织的相对表达量。

2.4 番茄根特异基因表达分析

从筛选出的根特异表达基因中选取8个基因进行RT-PCR分析。以番茄‘Heinz 1706’为材料, 分别提取其根、茎、叶、花以及果实中的总RNA, 并按照Takara反转录试剂盒合成cDNA, 然后以按照各基因序列合成的特异引物(表1)进行RT-PCR反应。

表1 RT-PCR的引物序列

Table 1 Primers sequences for RT-PCR

基因名称	基因描述	引物序列	产物大小/bp
<i>Solyc03g113570</i>	类胡萝卜素蛋白(GLPs)	5' CTATTCGCGTGACGTTCTT 3' 5' GTTATGGACCAAGTTTGTG 3'	653
<i>Solyc07g055350</i>	细胞色素P450	5' GGTTGAGAGATCACACGAGA 3' 5' TAAGACCGCTGGTAATGAGA 3'	700
<i>Solyc04g078270</i>	细胞色素P450	5' TACAAAATCTTCCCCCTAGC 3' 5' TGCTCGTCTATTTCTTTTGTG 3'	700
<i>Solyc03g113580</i>	类胡萝卜素蛋白(GLPs)	5' GTGTGACGTTCTTGTGGTT 3' 5' TCAACTTGGAAGGCCTTAGT 3'	601
<i>Solyc02g032030</i>	抗病响应蛋白	5' GGAGAAATTTTGTGTTTGC 3' 5' TGCAAAATCACAACATGGTA 3'	564
<i>Solyc06g060500</i>	AT-hook 蛋白	5' TGGATGATGAAGGAGAGATG 3' 5' CTTTCATGAGGTAATTGCATTG 3'	630
<i>Solyc06g005470</i>	金属硫蛋白	5' GTGGAGGAAGCTGTAATTGG 3' 5' AGTGGGAAGCACTCAACAGT 3'	239
<i>Solyc04g008150</i>	NBS-LRR类抗病蛋白	5' GAAAGAAAATGCATTCATGG 3' 5' GAATTTGCCACTTTCTGGAT 3'	307

2.5 番茄根特异表达基因的启动子分析

用PLACE网站对番茄的根特异表达基因起始密码子上游2 000 bp的序列进行分析, 得到其所具有的启动子元件, 并分析这些元件的特性。同时应用此方法对方法2.3节中抽取到的6个番茄根特异表达基因的直系同源基因进行启动子分析。

2.6 番茄根特异表达基因的染色体定位

根据番茄基因组数据库上基因的染色体定位信息, 应用AutoCAD软件作出基因的染色体定位图, 并用Photoshop对图片进行处理。

实验结果

1 不同器官*Solyc02g084780*基因的表达分析

Lim等(2012)报道*Solyc02g084780*、*Solyc05g007110*以及*Solyc02g082090* (在番茄基因组网站上EST编号分别为E210745、E543254和E542814)为番茄根中的特异表达基因, 对番茄这三个根特异表达基因进行表达量分析(基因表达量来源于番

茄基因组网站<http://solgenomics.net/>)。由表2分析得出, 在Lim等(2012)报道的3个基因中, *Solyc02g084780*基因在根中的相对表达量最高, 为66.295, 因此选取*Solyc02g084780*基因的表达模式为模板。基因*Solyc02g084780*在花器官中的表达量仅次于根中的, 为0.385, 其根中的表达量约为花器官中表达量的172倍。这表明*Solyc02g084780*在根中是大量且特异表达的。

表2 *Solyc02g084780*、*Solyc05g007110*和*Solyc02g082090*在番茄不同器官中的表达量

Table 2 Expression of *Solyc02g084780*, *Solyc05g007110* and *Solyc02g082090* gene in different tomato organs

基因	相对表达量				
	根	芽	花器官	叶	果实
<i>Solyc05g007110</i>	7.540	0	0	0.020	0
<i>Solyc02g082090</i>	23.720	0	0	0.080	0
<i>Solyc02g084780</i>	66.295	0	0.385	0	0.055

2 番茄根特异表达基因的筛选

本研究最终筛选出95个根特异表达基因,其在根中的表达量分布于0.69~2 067.57之间,说明尽管同属根特异表达基因,不同基因间的表达量还是存在很大差异(表3)。其中,Ratio值最大的为

17 042,最小的为12(图1),表明这些基因在根中的表达量高于其它组织的表达量至少11倍,基本上在根中都是特异表达的。

3 拟南芥和水稻中直系同源基因的筛选和表达分析

以番茄的95个根特异表达基因的氨基酸序列

表3 番茄根特异基因各器官中表达量、Ratio和Z值

Table 3 Expression of tomato root-specific genes in different organs and their Ratio values and Z values

基因	相对表达量					Ratio值	Z值
	根	芽	花器官	叶	果实		
<i>Solyc00g072400</i>	766.880	0	0	0.040	0	17 041.778	3.162
<i>Solyc05g046010</i>	460.525	0.035	0	0.040	0	9 210.500	3.162
<i>Solyc03g096420</i>	2 067.570	0	0.230	0.230	0.280	7 384.179	3.162
<i>Solyc08g065670</i>	186.705	0	0	0	0	5 334.429	3.162
<i>Solyc04g007050</i>	74.270	0	0	0.015	0	4 951.333	3.162
<i>Solyc02g071070</i>	75.130	0.015	0.020	0	0	3 756.500	3.162
<i>Solyc03g096410</i>	1 192.125	0	0.335	0.320	0	3 358.099	3.162
<i>Solyc11g006090</i>	300.930	0.110	0	0	0.075	2 735.727	3.162
<i>Solyc04g025750</i>	92.490	0.035	0	0	0	2 642.571	3.162
<i>Solyc06g074990</i>	468.295	0.055	0.155	0.185	0.040	2 401.513	3.162
<i>Solyc04g007750</i>	116.705	0.050	0	0	0	2 334.100	3.162
<i>Solyc05g005850</i>	63.505	0.030	0	0	0	2 116.833	3.162
<i>Solyc01g102380</i>	114.475	0.050	0	0.055	0	2 081.364	3.162
<i>Solyc01g090610</i>	648.165	0.320	0	0	0	2 025.516	3.162
<i>Solyc07g052530</i>	79.400	0.035	0	0	0	1 985.000	3.162
<i>Solyc08g075830</i>	87.295	0.040	0.045	0	0	1 939.889	3.162
<i>Solyc11g072200</i>	138.685	0.080	0.050	0	0.055	1 733.563	3.162
<i>Solyc01g108860</i>	1 344.595	0.465	0.070	0.035	0.125	1 610.293	3.162
<i>Solyc04g015220</i>	46.375	0.015	0	0	0	1 545.833	3.162
<i>Solyc02g082960</i>	123.780	0.090	0	0.050	0	1 375.333	3.162
<i>Solyc05g005840</i>	46.150	0.035	0	0	0	1 318.571	3.162
<i>Solyc04g071080</i>	44.935	0	0.035	0.035	0	1 283.857	3.162
<i>Solyc10g076220</i>	216.445	0	0	0.150	0.185	1 169.973	3.162
<i>Solyc03g005640</i>	40.545	0	0	0.035	0	1 158.429	3.162
<i>Solyc03g091000</i>	168.610	0	0.150	0	0	1 124.067	3.162
<i>Solyc05g055320</i>	36.410	0.035	0	0	0	1 040.286	3.162
<i>Solyc10g076210</i>	184.025	0	0	0.050	0.185	994.730	3.162
<i>Solyc08g065500</i>	57.370	0	0	0	0.060	956.167	3.162
<i>Solyc07g052540</i>	66.745	0.070	0.040	0	0	953.500	3.162
<i>Solyc12g098780</i>	156.930	0.130	0	0	0	951.091	3.162
<i>Solyc03g007570</i>	66.170	0	0.070	0	0	945.286	3.162
<i>Solyc07g009040</i>	91.360	0	0	0	0	913.600	3.162
<i>Solyc02g091590</i>	35.500	0	0.030	0	0.040	887.500	3.162
<i>Solyc06g051550</i>	56.620	0.070	0	0	0	808.858	3.162
<i>Solyc03g096430</i>	617.375	0	0.765	0	0.300	807.026	3.162
<i>Solyc11g007210</i>	39.970	0	0	0.050	0	799.400	3.162
<i>Solyc05g015300</i>	129.140	0	0.165	0.040	0	782.667	3.162
<i>Solyc06g067860</i>	152.430	0.035	0	0.195	0	781.692	3.162
<i>Solyc07g009230</i>	868.765	0.420	1.180	0.855	0.235	736.242	3.162
<i>Solyc04g007760</i>	151.525	0	0	0.050	0.065	704.767	3.162
<i>Solyc05g011940</i>	78.745	0.050	0	0	0	656.208	3.162
<i>Solyc01g102900</i>	84.420	0.085	0.050	0.140	0	603.000	3.162
<i>Solyc07g055350</i>	33.725	0	0	0.060	0	562.083	3.162

表3 (续)

基因	相对表达量					Ratio值	Z值
	根	芽	花器官	叶	果实		
<i>Solyc06g060500</i>	38.525	0	0	0.075	0	513.667	3.162
<i>Solyc03g113580</i>	179.485	0.395	0.230	0.295	0	454.392	3.162
<i>Solyc09g092410</i>	11.150	0.025	0	0	0	446.000	3.162
<i>Solyc08g077010</i>	19.780	0	0	0	0	439.556	3.162
<i>Solyc02g032030</i>	67.900	0.075	0	0	0	424.375	3.162
<i>Solyc09g005500</i>	38.525	0.055	0	0	0.075	405.526	3.162
<i>Solyc10g008900</i>	22.640	0.060	0	0	0	377.333	3.162
<i>Solyc05g007110</i>	7.540	0	0	0.020	0	377.000	3.162
<i>Solyc05g054780</i>	82.440	0	0.225	0	0	366.400	3.162
<i>Solyc06g075630</i>	61.295	0.100	0.080	0.075	0.180	340.528	3.162
<i>Solyc02g082090</i>	23.720	0	0	0.080	0	296.500	3.162
<i>Solyc08g080660</i>	1 818.280	0.230	0	0.520	0.555	244.557	3.162
<i>Solyc08g079720</i>	21.225	0	0.105	0	0	202.143	3.162
<i>Solyc03g079880</i>	849.150	1.930	2.325	1.050	4.825	175.990	3.162
<i>Solyc02g084780</i>	66.295	0	0.385	0	0	172.195	3.162
<i>Solyc05g051210</i>	6.940	0	0	0	0	154.222	3.162
<i>Solyc01g091470</i>	88.305	0.060	0.615	0.100	0.080	143.585	3.162
<i>Solyc04g008150</i>	55.690	0	0	0.445	0	125.146	3.162
<i>Solyc01g102910</i>	82.295	0.660	0.050	0.050	0.060	124.689	3.162
<i>Solyc01g080960</i>	42.800	0.375	0.245	0	0	114.133	3.162
<i>Solyc06g007960</i>	36.870	0.330	0.115	0.300	0.180	111.727	3.162
<i>Solyc05g007640</i>	35.800	0.055	0.065	0.020	0.345	95.467	3.162
<i>Solyc10g055230</i>	99.250	1.085	0.365	0.265	0.325	91.475	3.162
<i>Solyc05g050790</i>	6.285	0.075	0	0	0	83.800	3.162
<i>Solyc04g077260</i>	10.395	0.040	0.050	0.100	0	83.160	3.162
<i>Solyc10g007960</i>	51.815	0	0.205	0.035	0.645	80.333	3.162
<i>Solyc06g005470</i>	1 377.88	0.495	0.580	0.565	3.820	76.741	3.162
<i>Solyc08g065380</i>	6.845	0.090	0.050	0	0.060	76.056	3.162
<i>Solyc09g074890</i>	417.985	3.375	5.635	1.370	1.340	74.177	3.162
<i>Solyc01g008650</i>	15.685	0.050	0.230	0	0	68.196	3.162
<i>Solyc10g084120</i>	411.050	0.460	0.835	0.170	0.280	65.091	3.162
<i>Solyc04g078270</i>	25.540	0.090	0.505	0.230	0.030	50.574	3.162
<i>Solyc06g065430</i>	47.355	1.030	0	0	0	45.976	3.162
<i>Solyc08g067500</i>	379.115	8.810	0.545	3.155	6.080	43.032	3.161
<i>Solyc10g018150</i>	9.525	0	0.225	0.030	0.040	42.333	3.161
<i>Solyc04g005170</i>	10.400	0.225	0.265	0	0	39.245	3.161
<i>Solyc03g111880</i>	19.645	0.510	0	0	0	38.520	3.161
<i>Solyc01g073800</i>	21.995	0	0	0	0	36.057	3.161
<i>Solyc03g033730</i>	91.795	0	0	0	0.685	35.374	3.161
<i>Solyc06g074320</i>	90.450	2.755	0	0.080	0.030	32.831	3.161
<i>Solyc10g007890</i>	2.430	0.075	0	0	0	32.400	3.161
<i>Solyc09g014530</i>	163.900	7.565	0.315	2.220	3.755	21.666	3.159
<i>Solyc05g021390</i>	71.025	3.380	0.310	0	0.035	21.013	3.159
<i>Solyc06g082730</i>	7.150	0.345	0	0	0.035	20.725	3.159
<i>Solyc12g005720</i>	54.305	0.180	0.630	1.960	2.225	18.662	3.155
<i>Solyc04g056310</i>	1.380	0	0.045	0.080	0	17.250	3.156
<i>Solyc05g011970</i>	408.670	7.845	7.115	2.305	2.480	15.874	3.157
<i>Solyc08g074300</i>	0.690	0.040	0	0.045	0	15.333	3.150
<i>Solyc01g107790</i>	10.825	0.105	0.040	0.120	0.240	12.514	3.153
<i>Solyc01g079370</i>	4.060	0.100	0.060	0.225	0.070	18.044	3.158
<i>Solyc03g123400</i>	21.745	0	0.090	0.630	0.150	34.516	3.161
<i>Solyc06g061200</i>	2 085.705	118.310	99.220	13.220	163.465	12.760	3.140

为检索序列,进行BlastP搜索,最终在拟南芥和水稻中分别得到了93(有2个基因由于同源性极低而未显示出来,用NA表示)和95个直系同源基因(表4)。在拟南芥和水稻中的直系同源基因与番茄中

的相似性并非预期中的高(E值较大),这可能是进化距离以及这三种植物根系生长环境差异较大而导致直系同源基因变异较多造成的。但仍存在有相似性极高的基因,甚至在蛋白质水平上无差异(E

表4 番茄95个根特异表达基因在拟南芥和水稻中的直系同源基因
Table 4 Orthologs of 95 root-specific tomato genes in *Arabidopsis* and rice

番茄	拟南芥	E-value	水稻	E-value	基因家族
<i>Solyc08g077010</i>	<i>AT4G17800.1</i>	2.00e-56	<i>Os04g50030.1</i>	1.10e-80	AT-hook蛋白
<i>Solyc01g080960</i>	<i>AT2G35270.1</i>	4.00e-59	<i>Os04g50030.1</i>	1.60e-79	
<i>Solyc11g006090</i>	<i>AT3G04570</i>	9.00e-67	<i>Os02g57520.1</i>	2.00e-79	
<i>Solyc08g079720</i>	<i>AT2G45430.1</i>	1.00e-56	<i>Os02g25020.1</i>	4.10e-88	
<i>Solyc01g091470</i>	NA	NA	<i>Os02g25020.1</i>	7.90e-85	
<i>Solyc06g060500</i>	<i>AT2G45430.1</i>	5.00e-56	<i>Os02g25020.1</i>	3.60e-73	
<i>Solyc05g015300</i>	<i>AT5G25610.1</i>	2.00e-46	<i>Os01g53240.1</i>	2.20e-50	BURP蛋白
<i>Solyc03g033730</i>	<i>AT4G34590.1</i>	4.00e-28	<i>Os02g03960.1</i>	9.60e-25	bZIP转录因子
<i>Solyc06g074320</i>	<i>AT1G08320.3</i>	e-137	<i>Os01g64020.1</i>	1.50e-120	
<i>Solyc04g005170</i>	<i>AT3G30530.1</i>	8.00e-37	<i>Os02g49560.1</i>	1.40e-23	
<i>Solyc02g071070</i>	<i>AT5G41610.1</i>	0	<i>Os05g19500.1</i>	1.40e-254	阳离子转运蛋白
<i>Solyc04g007050</i>	<i>AT3G46530.1</i>	2.00e-45	<i>Os12g29290.1</i>	6.30e-46	CC-NBS-LRR抗病蛋白
<i>Solyc05g007640</i>	<i>AT1G50180.1</i>	2.00e-49	<i>Os07g08890.1</i>	3.60e-56	
<i>Solyc01g073800</i>	<i>AT2G44380.1</i>	2.00e-31	<i>Os07g42030.1</i>	6.50e-19	CHP-rich 锌指蛋白
<i>Solyc03g091000</i>	<i>AT4G12510.1</i>	2.00e-26	<i>Os10g40614.1</i>	1.70e-29	皮质细胞轮廓蛋白(CCD)
<i>Solyc12g005720</i>	<i>AT3G22060.1</i>	1.00e-65	<i>Os05g41370.1</i>	1.70e-36	富半胱氨酸类受体激酶(CRK)
<i>Solyc07g055350</i>	<i>AT3G14690.1</i>	e-176	<i>Os01g43710.1</i>	5.80e-153	细胞色素P450
<i>Solyc05g011940</i>	<i>AT2G46960.2</i>	e-100	<i>Os01g43740.1</i>	9.30e-98	
<i>Solyc04g078270</i>	<i>AT4G37320.1</i>	e-133	<i>Os03g55240.1</i>	3.20e-113	
<i>Solyc01g008650</i>	<i>AT5G25120.1</i>	e-101	<i>Os09g10340.1</i>	1.70e-123	
<i>Solyc06g065430</i>	<i>AT5G36110.1</i>	e-119	<i>Os07g33580.1</i>	1.60e-77	
<i>Solyc10g018150</i>	<i>AT2G42250.1</i>	e-117	<i>Os12g16720.1</i>	3.90e-67	
<i>Solyc03g111880</i>	<i>AT3G48310.1</i>	e-141	<i>Os01g12760.1</i>	7.30e-114	
<i>Solyc05g011970</i>	<i>AT2G26710.1</i>	1.00e-99	<i>Os01g43750.1</i>	1.90e-97	
<i>Solyc05g021390</i>	<i>AT5G36110.1</i>	e-170	<i>Os07g33580.1</i>	5.40e-86	
<i>Solyc06g082730</i>	<i>AT5G24910.1</i>	e-140	<i>Os12g02640.1</i>	1.90e-145	
<i>Solyc10g007890</i>	<i>AT3G14690.1</i>	e-160	<i>Os01g43710.1</i>	2.00e-143	
<i>Solyc06g075630</i>	<i>AT1G07730.2</i>	7.00e-72	<i>Os03g17220.1</i>	9.50e-73	dirigent-like protein (DIR)
<i>Solyc10g008900</i>	<i>AT1G58170.1</i>	3.00e-39	<i>Os11g07690.1</i>	8.50e-33	抗病响应蛋白
<i>Solyc02g032030</i>	<i>AT2G21100.1</i>	1.00e-42	<i>Os11g07770.1</i>	2.40e-35	
<i>Solyc10g055230</i>	<i>AT1G55210.2</i>	2.00e-42	<i>Os11g07830.1</i>	2.70e-36	
<i>Solyc05g054780</i>	<i>AT2G39430.1</i>	8.00e-61	<i>Os03g17220.1</i>	7.30e-66	
<i>Solyc02g082960</i>	<i>AT3G12500.1</i>	5.00e-92	<i>Os05g33130.1</i>	3.90e-92	内切几丁质酶(ech)
<i>Solyc05g050790</i>	<i>AT2G44840.1</i>	3.00e-30	<i>Os04g46240.1</i>	2.00e-24	ERF转录因子
<i>Solyc01g102380</i>	<i>AT1G09560.1</i>	3.00e-74	<i>Os05g19670.1</i>	2.90e-71	类萌发素蛋白(GLPs)
<i>Solyc03g113580</i>	<i>AT1G18980.1</i>	1.00e-67	<i>Os01g18170.1</i>	2.50e-56	
<i>Solyc01g102910</i>	<i>AT5G39110.1</i>	2.00e-80	<i>Os02g29000.1</i>	2.80e-73	
<i>Solyc01g102900</i>	<i>AT5G39190.1</i>	4.00e-81	<i>Os02g29000.1</i>	1.20e-74	
<i>Solyc01g079370</i>	NA	NA	<i>Os11g14470.1</i>	1.5	GRAs蛋白
<i>Solyc03g123400</i>	<i>AT3G13840.1</i>	e-116	<i>Os03g29480.1</i>	1e-100	
<i>Solyc06g061200</i>	<i>AT5G46730.1</i>	1.60	<i>Os10g31440.1</i>	1.0	富甘氨酸蛋白(GRP)
<i>Solyc01g107790</i>	<i>AT4G06744.1</i>	e-106	<i>Os04g57430.1</i>	3.90e-92	类受体激酶(LRR)
<i>Solyc04g007750</i>	<i>AT1G70840</i>	1.00e-23	<i>Os04g39150.1</i>	2.80e-09	乳胶类蛋白
<i>Solyc04g007760</i>	<i>AT1G70890.1</i>	3.00e-24	<i>Os04g39150.1</i>	7.30e-11	

表4 (续)

番茄	拟南芥	E-value	水稻	E-value	基因家族
<i>Solyc09g005500</i>	<i>AT1G70830.3</i>	3.00e-31	<i>Os04g39150.1</i>	1.20e-12	
<i>Solyc09g014530</i>	<i>AT5G28010.1</i>	3.00e-28	<i>Os04g39150.1</i>	5.70e-11	
<i>Solyc06g005470</i>	<i>AT5G02380.1</i>	0.95	<i>Os01g05650.1</i>	8.10e-12	金属硫蛋白
<i>Solyc04g056310</i>	<i>AT1G34670.1</i>	1.00e-77	<i>Os08g37970.1</i>	8.40e-75	MYB转录因子
<i>Solyc04g077260</i>	<i>AT3G49690.1</i>	1.00e-63	<i>Os03g56090.1</i>	7.40e-71	
<i>Solyc08g065380</i>	<i>AT5G56840.1</i>	1.00e-37	<i>Os01g41900.1</i>	4.10e-45	
<i>Solyc08g074300</i>	<i>AT2G24430.2</i>	1.00e-74	<i>Os09g32260.1</i>	4.70e-71	NAC转录因子
<i>Solyc04g008150</i>	<i>AT5G35450.1</i>	2.00e-05	<i>Os01g70080.1</i>	0.002	类抗病基因(NBS-LRR)
<i>Solyc04g015220</i>	<i>AT1G59218.2</i>	3.00e-48	<i>Os10g10360.4</i>	1.20e-52	
<i>Solyc06g074990</i>	<i>AT5G60770.1</i>	0	<i>Os02g02170.1</i>	3.50e-185	硝酸盐转运蛋白(NRT)
<i>Solyc04g025750</i>	<i>AT1G70260.1</i>	7.00e-81	<i>Os01g02870.1</i>	2.10e-43	Nodulin MtN21蛋白
<i>Solyc05g005840</i>	<i>AT3G28050.1</i>	2.00e-61	<i>Os07g34070.1</i>	1.80e-48	
<i>Solyc05g005850</i>	<i>AT3G28050.1</i>	6.00e-44	<i>Os01g02870.1</i>	1.60e-47	Nodulin-like蛋白
<i>Solyc08g067500</i>	<i>AT3G08770.1</i>	3.00e-19	<i>Os11g02369.1</i>	2.00e-24	非特异性脂质转运蛋白(LTP)
<i>Solyc06g007960</i>	<i>AT5G54160.1</i>	8.00e-89	<i>Os08g06100.1</i>	1.40e-69	氧甲基转移酶
<i>Solyc08g080660</i>	<i>AT4G11650.1</i>	7.00e-83	<i>Os03g46070.1</i>	4.90e-69	渗透相似蛋白(OSM)
<i>Solyc02g084780</i>	<i>AT5G66390</i>	e-130	<i>Os01g15830.1</i>	1.40e-119	过氧化物氧化蛋白(PRX)
<i>Solyc07g052530</i>	<i>AT1G05260.1</i>	e-135	<i>Os06g46799.1</i>	8.10e-99	
<i>Solyc07g052540</i>	<i>AT1G05260.1</i>	e-135	<i>Os06g46799.1</i>	5.00e-99	
<i>Solyc05g046010</i>	<i>AT1G05260.1</i>	e-118	<i>Os06g46799.1</i>	8.80e-102	
<i>Solyc02g082090</i>	<i>AT1G30870</i>	2.0e-94	<i>Os07g31610.1</i>	3.90e-76	
<i>Solyc00g072400</i>	<i>AT5G05340.1</i>	2.00e-96	<i>Os03g22020.1</i>	4.50e-98	
<i>Solyc10g076220</i>	<i>AT5G05340.1</i>	4.00e-88	<i>Os04g55740.1</i>	2.90e-94	
<i>Solyc10g076210</i>	<i>AT5G05340.1</i>	3.00e-90	<i>Os04g55740.1</i>	2.10e-93	
<i>Solyc11g007210</i>	<i>AT4G11290.1</i>	5.00e-68	<i>Os01g22370.1</i>	1.60e-77	
<i>Solyc05g055320</i>	<i>AT1G44970.1</i>	4.00e-71	<i>Os05g04490.1</i>	1.90e-76	
<i>Solyc08g075830</i>	<i>AT3G01190.1</i>	e-113	<i>Os11g43980.1</i>	2.60e-93	
<i>Solyc12g098780</i>	<i>AT3G09925.1</i>	4.00e-04	<i>Os11g43640.1</i>	1.40e-74	
<i>Solyc08g065670</i>	<i>AT5G26010.1</i>	3.00e-74	<i>Os02g13100.1</i>	9.50e-74	雌蕊伸展相关蛋白(PELP)
<i>Solyc09g074890</i>	<i>AT4G15800.1</i>	5.00e-30	<i>Os12g35670.1</i>	4.30e-22	Protein phosphatase-2C蛋白
<i>Solyc02g091590</i>	<i>AT2G29000.1</i>	7.00e-89	<i>Os07g38070.1</i>	5.50e-148	快速碱化因子(RALF)
<i>Solyc09g092410</i>	<i>AT5G36930.2</i>	e-155	<i>Os08g43000.1</i>	6.40e-29	受体激酶
<i>Solyc06g051550</i>	<i>AT2G28160.1</i>	1.00e-59	<i>Os04g31290.1</i>	4.70e-31	类抗病蛋白(Tir-NBS-LRR)
<i>Solyc05g007110</i>	<i>AT5G15130</i>	8.0e-48	<i>Os01g09080.1</i>	1.80e-60	转录因子(TF)
<i>Solyc03g096420</i>	<i>AT4G11400.1</i>	4.10	<i>Os12g27025.1</i>	0.035	WRKY转录因子
<i>Solyc03g096410</i>	<i>AT4G11400.1</i>	3.50	<i>Os12g27025.1</i>	0.035	未知
<i>Solyc07g009230</i>	<i>AT5G44430.1</i>	2.00e-04	<i>Os04g44130.1</i>	4.80e-07	
<i>Solyc03g096430</i>	NA	NA	<i>Os02g18830.1</i>	0.096	
<i>Solyc03g005640</i>	<i>AT3G50150.1</i>	3.00e-11	<i>Os11g34090.1</i>	1.90e-09	
<i>Solyc04g071080</i>	<i>AT4G33650.2</i>	2.60	<i>Os03g14615.1</i>	3.30e-57	
<i>Solyc07g009040</i>	<i>AT1G19610.1</i>	0.019	<i>Os01g61360.1</i>	2.40e-05	
<i>Solyc01g108860</i>	<i>AT3G19000.1</i>	e-101	<i>Os03g42130.1</i>	1.10e-89	
<i>Solyc11g072200</i>	<i>AT5G24530.1</i>	1.00e-47	<i>Os07g07410.2</i>	3.70e-54	
<i>Solyc01g090610</i>	<i>AT1G52800.1</i>	3.00e-79	<i>Os05g50090.1</i>	4.40e-38	
<i>Solyc06g067860</i>	<i>AT1G52800.1</i>	5.00e-86	<i>Os05g50090.1</i>	1.40e-48	
<i>Solyc10g007960</i>	<i>AT5G42650.1</i>	e-130	<i>Os03g12500.1</i>	7.20e-123	
<i>Solyc10g084120</i>	<i>AT3G53420.2</i>	e-130	<i>Os02g41860.2</i>	3.20e-120	
<i>Solyc08g065500</i>	<i>AT4G32950.1</i>	1.00e-77	<i>Os02g13100.1</i>	2.80e-76	
<i>Solyc03g007570</i>	<i>AT5G52790.1</i>	e-114	<i>Os03g03430.1</i>	2.60e-113	
<i>Solyc05g051210</i>	<i>AT3G05390.1</i>	3.00e-78	<i>Os04g36710.1</i>	3.90e-99	
<i>Solyc03g079880</i>	<i>AT3G53980.2</i>	3.00e-36	<i>Os05g06780.1</i>	1.50e-33	

NA表示相似性极低。

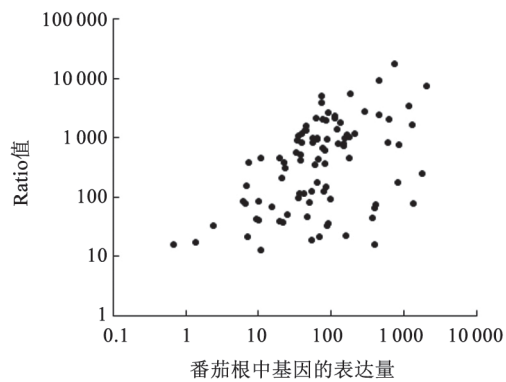


图1 番茄根特异表达基因的Ratio值分布
Fig.1 Distribution of Ratio values of root-specific genes in tomato

值为0), 但这类在蛋白质水平上差异极小或甚至无异(E值很低甚至为0)的直系同源基因只存在于同属双子叶植物的拟南芥中。分析结果表明, 这类基因在进化过程中大多发生了较大的变异, 且在不同植物中的变异程度不同, 进化关系近的植物比进化关系远的植物变异程度更低。

本文按照番茄中95个根特异表达基因的功能对其进行了基因家族的分类。这类基因并不只是从属于一个或两个基因家族, 而是分属于多个不同的基因家族(表4), 其中主要分属于P450、PRX、AT-hook、BZIP以及MYB等多个基因家族, 表明这

类基因编码的蛋白质具有多种不同的功能。进一步对拟南芥的直系同源基因进行GO分析, 也得到了相同的结果(表5)。这类基因存在于多个细胞元件中, 具有多种不同的功能, 参与多个不同的生化过程, 并不具备明显的偏好性。

4 番茄根特异表达基因直系同源基因的表达分析

为了从基因个体上阐明这类基因在不同植物中的表达模式, 本研究随机选取了番茄*Solyc05g-007110*、*Solyc08g077010*、*Solyc02g071070*、*Solyc06g065430*、*Solyc10g055230*和*Solyc04g007760*六个根特异表达基因, 然后将其表达量与拟南芥和水稻中的直系同源基因进行比较。图2显示, 在拟南芥中, 只有*Solyc05g007110*和*Solyc08g077010*两个基因的直系同源基因在根中是特异表达的(所有组织中的相对表达量均<0.1)。与其它组织相比较, 这六个基因在水稻中的直系同源基因在根中的表达量基本上都是最多的(*Solyc04g007760*的除外), 但其它组织的相对表达量仍高达0.6甚至是0.8, 故都不是特异表达。说明就这六个基因而言, 在进化过程中拟南芥的直系同源基因的表达模式已发生了变异, 在水稻中则发生了更明显的变异。

5 番茄、拟南芥以及水稻相关基因的表达分析

本研究通过对拟南芥及水稻中的直系同源基

表5 拟南芥中相关基因功能的GO分析

Table 5 GO analysis of homologous genes in *Arabidopsis*

细胞元件	根特异基因占相关基因的百分数/%	分子功能	根特异基因占相关基因的百分数/%	生化过程	根特异基因占相关基因的百分数/%
细胞外基质	22	其它结合	31	其它生物过程	23
其它细胞质成分	16	其它酶活力	16	其它代谢过程	19
细胞核	12	其它分子功能	9	对压力的响应	16
其它细胞内成分	12	DNA或RNA结合	9	生物或非生物胁迫的响应	10
叶绿体	8	未知的分子功能	8	运输	9
细胞质膜	6	蛋白质结合	6	其它生物过程	8
其它细胞膜	6	转录因子活力	5	发育过程	4
其它细胞成分	4	转移酶活性	5	信号传导	3
质体	3	核苷结合	4	转录过程	2
细胞壁	3	转运蛋白活力	3	未知的生物过程	2
细胞液	3	水解酶活力	2	蛋白质新陈代谢	1
高尔基体	2	激酶活力	2	细胞组织和生物合成	1
未知的细胞成分	1	核酸结合	1	电子传递或能量转移途径	0
线粒体	1	结构分子活力	0	DNA或RNA代谢	0
内质网	1	受体结合活力	0		
核糖体	0				

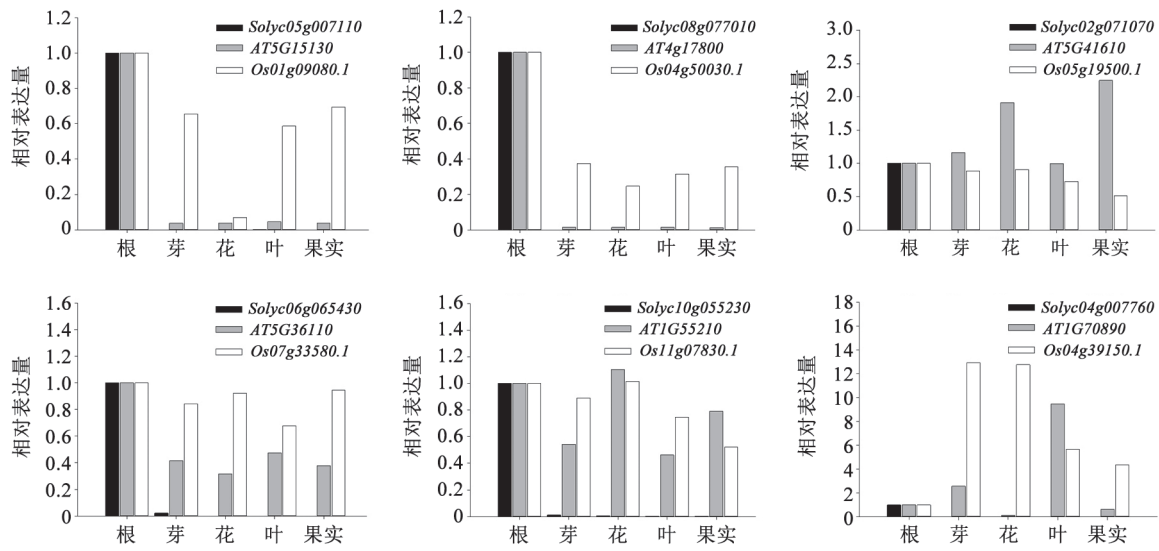


图2 番茄部分根特异表达基因和其直系同源基因在不同器官中的相对表达量

Fig.2 Relative expression of some tomato root-specific genes organs and their orthologous homologous genes in different organs

因的表达量开展Ratio值的计算。Ratio值表示基因在根中特异表达的程度,数值越大,表示基因越偏好于在根中表达。从图3可知,在拟南芥中,这类基因在根中的表达量分布于3~9 000之间,Ratio值分布于0.006~135.7,且Ratio值小于10的基因占多数,Ratio值大于10的基因只有15个。水稻中直系同源基因的表达量分布于1~15之间,Ratio值分布于0.07~1.68之间,不存在Ratio值大于10的基因,表明这类基因在水稻中已发生了极大程度的变异。

为了进一步阐明相关基因在不同植物中的表达差异,本研究还进行了Z值分析。Z值的范围表示某类基因个体间表达模式的差异,范围越小,表

示这类基因个体间的表达模式越接近。分析结果显示,番茄的Z值为 3.15 ± 0.01 ,拟南芥的为 1.33 ± 1.32 ,水稻则为 1.80 ± 1.78 。结果显示与拟南芥相比,水稻中基因Z值的变化范围更广,这类基因在水稻中发生了更大的差异。

为了更直观的对这类基因进行表达分析,本研究对这类基因在不同组织中的表达量进行了热图分析。结果(图4)显示,从番茄中筛选出来的95个基因,存在有少量在根中表达量较低的基因(接近0),但极大部分在根中表达量都很高,且明显高于其它组织。拟南芥中的同源基因在根中的表达量全都较高,不存在表达量接近0的基因,但在根中特

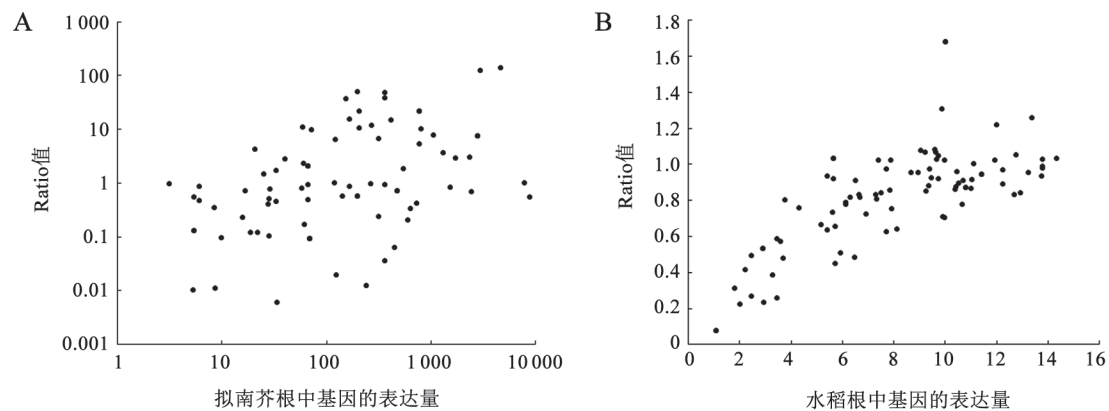


图3 拟南芥和水稻中直系同源基因的Ratio值分布

Fig.3 Distribution of Ratio values of orthologous homologous genes in *Arabidopsis* and rice

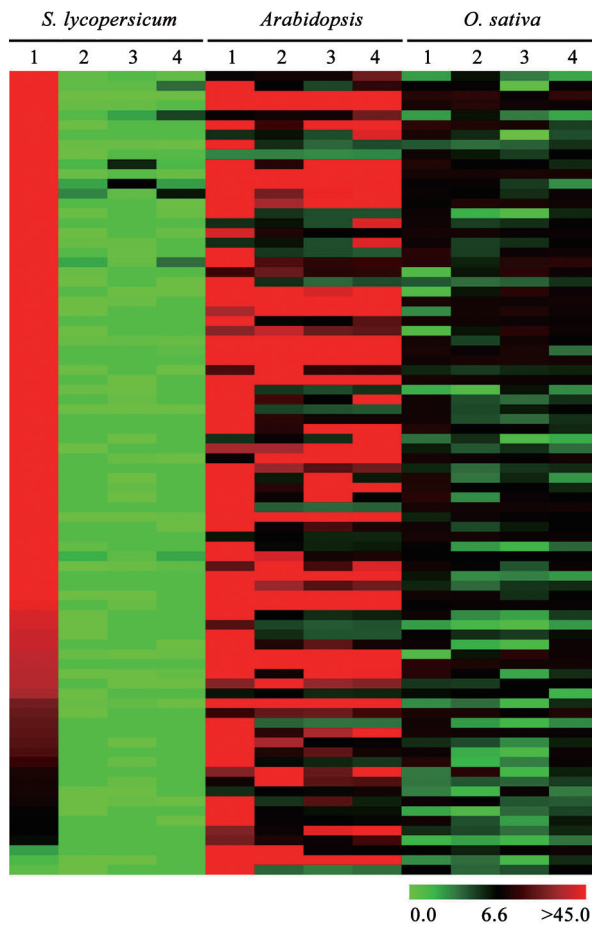


图4 番茄、拟南芥和水稻中相关基因在不同器官中的表达量

Fig.4 Homologous genes expression in different organs in tomato, *Arabidopsis* and rice

1、2、3和4表示基因在根、花、叶和果实中的表达量;红色表示基因表达上调,绿色表示基因表达下调。

异表达的基因占的比例则少于50%。水稻中则不存在在根中大量或特异表达的直系同源基因。

表达分析结果表明,这类基因的表达模式在不同植物中发生了不同程度的变化。拟南芥与番茄同属双子叶植物,但这类基因在这两个物种中的表达模式还是发生了较大程度的变异。这类基因在水稻中发生了更大程度的变异,原因是水稻属于单子叶植物,与番茄的进化关系更远。

6 根特异基因的表达分析

本研究选取番茄8个根特异基因开展表达分析。结果(图5)表明,8个基因中只有5个基因是在根中特异表达的,其余3个基因除在根中表达外,还在花和果实中有一定量的表达,但从条带明暗分析可得,其在根中的表达量仍高于生殖器官中的表达



图5 番茄的根特异基因的表达分析

Fig.5 Expression analysis of root-specific gene of tomato

量,故这8个基因在根中是偏好性表达的。由此可推测筛选出的95个基因均在根中偏好性表达。

7 番茄根特异表达基因的启动子分析

利用PLACE网站对番茄的95个根特异基因进行启动子元件分析(表6)。95个基因中均含有根特异表达必须元件ROOTMOTIFTAPOX1 (Elmayan和Tepfer 1995),还含有与光诱导及组织特异表达有关的GATABOX (Gilmartin等1990),与DOF蛋白结合从而提高转录活性的DOFCOREZM元件(Yanagisawa和Schmidt 1999)以及通过其它方式增强转录效率的CACTFTPPCA1和CAATBOX1元件(Shirsat等1989)。进一步对*Solyc02g084780*的各个启动子元件数目进行统计,发现其含有19个ROOTMOTIFTAPOX1、13个GATABOX、34个DOFCOREZM、29个CACT-FTPPCA1和26个CAATBOX1。这些组织特异表达相关元件在数量上各有不同,共同调控了根系的发育。

番茄根特异表达基因在拟南芥和水稻中的直系同源基因并非都具有根特异表达的特性,为了进一步了解启动子元件与表达模式之间的关系,本研究对不同植物中相应基因的启动子元件进行了比较分析。在分析的基因范围内,所有基因都具有上述5个与组织特异表达相关的启动子元件,

表6 95个番茄根特异表达基因的启动子分析

Table 6 Promoter analysis of 95 tomato root-specific genes

启动子元件	元件序列	含此元件基因数	不含此元件基因数	元件功能
GATABOX	GATA	95	0	组织特异表达调控元件
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	95	0	根系特异表达必须元件
CACTFTPPCA1	YACT	95	0	组织特异表达调控元件
CAATBOX1	CAAT	95	0	组织特异表达调控元件
DOFCOREZM	AAAG	95	0	Dof蛋白结合位点

包括根特异表达必须元件ROOTMOTIFTAPOX1 (表7), 由此推断, 含有根特异表达必须元件并非是根特异表达特性的充分条件。比较分析得, 番茄根特异表达基因的ROOTMOTIFTAPOX1元件数目均高于拟南芥和水稻中直系同源基因的相应元件数目, 由此推断基因根特异表达的特性与基因根特异表达相关元件的数目有关。此外, 第一组中基因AT5G15130为根特异表达基因, *Os01g09080.1*则不具有根特异表达的特性, 但*Os01g09080.1*的

ROOTMOTIFTAPOX1元件数目高于AT5G15130的, 推测基因根特异表达的特性差异并非全由相关元件数目差异造成, 还可能与其它元件种类数目或不同元件之间的相互作用有关。

8 番茄根特异基因的染色体物理定位

根据来自番茄基因组网站上的基因定位信息, 对番茄的95个基因进行了染色体物理定位。结果(图6)显示, 95个根特异表达基因在番茄的12条染色体上均有分布, 分布并不具有偏好性。

表7 番茄根特异表达基因及其拟南芥和水稻中直系同源基因的启动子比较分析

Table 7 Promoter comparative analysis of tomato root-specific genes and their orthologs in *Arabidopsis* and rice

直系同源基因	启动子元件数目					
	GATABOX	ROOTMOTIFTAPOX1	CACTFTPPCA1	CAATBOX1	DOFCOREZM	
第1组	<i>Solyc05g007110</i>	23	41	22	18	28
	<i>AT5G15130</i>	18	20	27	21	26
	<i>Os01g09080.1</i>	9	37	21	17	24
第2组	<i>Solyc02g071070</i>	137	195	206	160	228
	<i>AT5G41610</i>	27	28	32	19	36
	<i>Os05g19500.1</i>	20	11	19	32	18
第3组	<i>Solyc06g065430</i>	17	30	27	24	41
	<i>AT5G36110</i>	24	15	27	18	26
	<i>Os07g33580.1</i>	14	20	15	15	28
第4组	<i>Solyc10g055230</i>	13	25	23	23	29
	<i>AT1G55210</i>	14	14	35	18	45
	<i>Os11g07830.1</i>	16	8	39	14	19
第5组	<i>Solyc04g007760</i>	33	27	26	22	14
	<i>AT1G70890</i>	15	9	51	18	34
	<i>Os04g39150.1</i>	9	3	24	12	12
第6组	<i>Solyc08g077010</i>	21	37	30	13	43
	<i>AT4g17800</i>	16	17	37	22	36
	<i>Os04g50030.1</i>	24	10	42	18	14

讨 论

本研究以根特异表达基因*Solyc02g084780*为模板, 筛选出了95个番茄根特异表达基因。筛选

结果与Lim等(2012)的研究结果基本一致。本研究结果显示Lim等(2012)报道的3个根特异表达基因*Solyc02g084780*、*Solyc05g007110*和*Solyc02g082090*

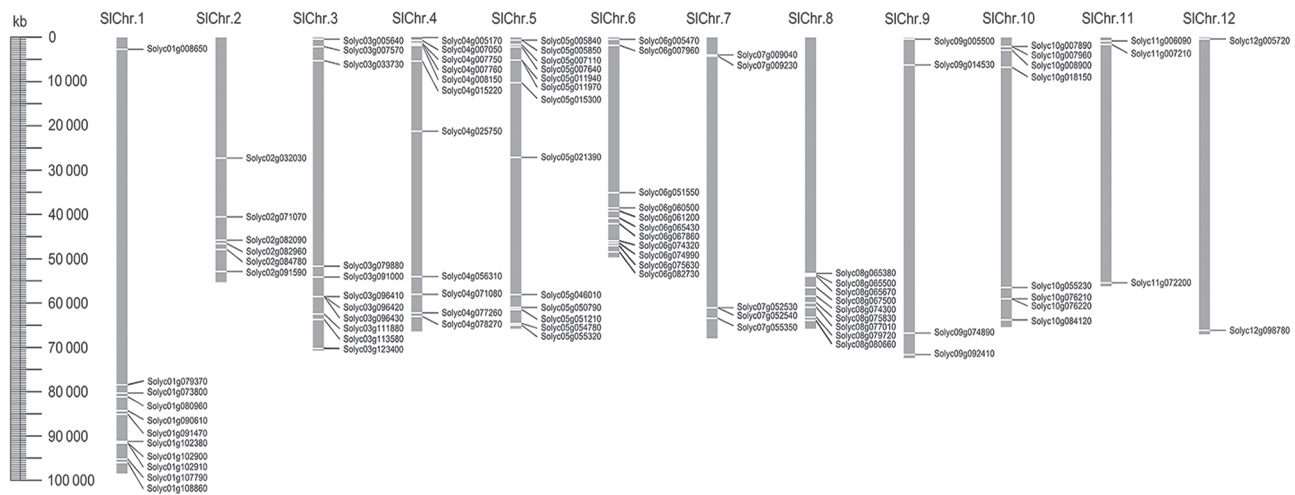


图6 番茄根特异表达基因的染色体物理定位

Fig.6 Chromosome mapping of root-specific genes in tomato

SIChr.1~12表示番茄中1~12号染色体。

(在番茄基因组网站上EST编号分别为E210745、E543254和E542814)的Ratio值分别为172、377和297, 均具有根特异表达的特性。经BlastP搜索, Lin等(2005)报道的根特异表达基因家族LeGRP中的成员*LeGRP2*为番茄基因*Solyc06g061200*, 其在根中的表达量高达2 085.7, Ratio值约为17.6, 也具有根特异表达的特性。然而, 番茄中总共有20个GRP基因家族成员, 研究结果显示Ratio值大于10的*LeGRP*基因只有*Solyc06g061200*, 其余19个成员的Ratio值分布于0.001~3.5之间, 且LeGRP家族中存在根中表达量为0的基因, 表明并不是所有的LeGRP基因家族成员都在根中特异表达。而Lin等(2005)通过Northern杂交分析显示LeGRP基因家族在根中表达量最高, 原因是其使用可用于检测LeGRP基因家族所有成员的通用探针, 检测出的表达量是整个基因家族所有成员在某个器官中的表达量总和, 而根据番茄表达谱网站的信息得, LeGRP家族中除*LeGRP2*外的其余19个成员在不同器官中的表达均处于较低水平, 因此Lin等(2005)检测出的总表达量中根特异表达基因*LeGRP2*的表达量所占的权重远远高于其它成员所占的总权重, 即在此研究中, *LeGRP2*基因的表达模式对整个LeGRP基因家族的表达模式具有导向作用。分析表明, 并不是所有的LeGRP基因家族成员都在根中特异表达, 但其成员*LeGRP2*基因确实具有根特异表达的特性。此外, 筛选出的基因分属于多个

不同的基因家族, 包括细胞色素P450、过氧化氢氧化蛋白(PRX)、AT-hook蛋白、bZIP转录因子等, 表明这类基因编码的蛋白质具有多种不同的功能, 如电子传递载体、转录因子和酶类等, 从而参与植物根系生长发育、抗逆以及营养吸收等过程; 其中还包含已经报道的与根特异表达或根发育有关的GRAs蛋白、MYB转录因子和GRPs蛋白家族(Pysh等2009; Battaglia等2014; Tominaga-wada和Wada 2014; Lin等2005), 筛选出的这些家族成员在番茄中是否具有调控根发育的功能及其分子机制仍有待进一步的研究。

最近有研究报道从番茄基因组中找到了拟南芥MYB家族成员*TRY*的同源基因, 并将其命名为*SITRY*。通过转化得到含有*SITRY*基因的拟南芥突变株并对其表型进行分析, 发现*SITRY*基因在拟南芥中的表达产物可促进根毛细胞的分化, 与拟南芥中*TRY*的功能相同, 均可调控根的发育(Tominaga-wada等2013)。本研究筛选出的基因中并不包含*SITRY*基因(*Solyc01g095640*), 表明该基因并不是在根中特异表达的。进一步对其表达谱进行分析, 发现其在根中的表达量低于植株地上部分的表达量, 与Tominaga-wada等(2013)的研究结果一致。结果显示, 调控根发育的基因不一定具有根特异表达的特性。

本研究还对筛选出的基因以及其在拟南芥和水稻中的直系同源基因进行表达分析, 发现这类

基因在不同物种中均发生了变异,且在水稻中的直系同源基因比拟南芥中直系同源基因的变异程度要大。这是因为番茄与拟南芥同属双子叶植物,而水稻则属于单子叶植物。进化关系越远,变异程度越高。虽然拟南芥和番茄同属双子叶植物,但是拟南芥中的直系同源基因与目的基因的同源性并没有预期中的高(E值普遍较高)。番茄属于茄科,而拟南芥则属于十字花科,其次,线粒体基因组序列比对显示,在112~156百万年前,番茄和拟南芥就开始进化了(Yang等1999)。因此, Lim等(2012)认为分类地位上的差异以及遥远的进化距离导致了这类基因在拟南芥和番茄中的变异较大。

基因的表达需要转录因子与基因转录起始位点上游序列中的特定区域进行结合,包含这些结合位点的DNA序列则为启动子。启动子的作用至关重要,它通过在适当的时期和部位促进或抑制基因的转录起始从而控制基因的表达(Potenza等2004)。在植物基因工程初期,组成型启动子被广泛应用于多种植物中表达不同的基因,如花椰菜花叶病毒35S启动子(Odell等1985)。然而后续研究发现组成型启动子在促进外源基因在受体植物中表达时可能会干扰到受体植物本身正常的生理过程。如某个基因的组成型表达在提高植物对某些病原菌抗性的同时,会导致植株生长的减少,或者使植株对其它病原菌的敏感性增强(Bowling等1997)。可见,使用组成型启动子有可能使外源基因在不恰当的时期、在受体植株的非目标组织中进行大量表达,从而引起预料之外的副作用。组织特异表达启动子则通过控制外源基因在受体植物中适当的时空表达弥补了这一缺陷(Potenza等2004)。目前,已有很多成功应用组织特异表达启动子诱导外源基因在受体植物中表达的成功例子,如在根特异表达启动子LjNRT2或者AtNRT2.1的调控下, *WD*基因在烟草和番茄的根中大量表达,提高了其对尖孢镰刀菌的抗性(Kong等2014)。本实验从番茄中筛选出了95个根特异表达基因,并对其启动子进行了分析,发现这类基因的表达模式与启动子中调控元件的特性有关;在筛选出的启动子元件中,含有与根特异表达有关并已成功用于调控基因在根中特异表达的元件ROOTMOTIFTAPOX1 (Elmayan和Tepfer 1995;李志邈等

2010),还含有其它与组织特异表达有关的元件如GATABOX、CACTFTPPCA1等,这些元件共同作用,调控基因在根部特异表达。通过不同植物中直系同源基因的启动子比较分析,发现直系同源基因表达模式的差异还可能与相关元件的数目差异或其它元件间的相互作用有关,为后续对根特异表达元件ROOTMOTIFTAPOX1及其它相关元件的研究分析提供了理论支持。

本研究从番茄中筛选出了根特异表达基因,对其启动子进行分析,发现这类基因的表达模式与启动子中调控元件的特性有关;对这类基因在拟南芥和水稻中的直系同源基因进行表达分析与比较,发现这类基因在进化过程中发生了变异,且进化距离越远,变异程度越高。本文研究结果为后续筛选鉴定在番茄根中特异表达的新的基因家族以及研究番茄根系发育、根功能的分子机制和根特异启动子提供了新的理论支持。

参考文献

- 李艳军,陈健,陈浩,石志琦,甘立军(2014). 番茄*SI_OASTL/LCD*基因的克隆与表达及其对侧根生长的作用. 植物生理学报, 50(7): 937~945
- 李志邈,杨悦俭,杨飞,叶青静,王荣青,阮美颖,周国治,姚祝平, Ruan YL (2010). 番茄根特异表达基因LeGRP2启动子的克隆及其在拟南芥的表达分析. 中国农业科学, 43(9): 1877~1882
- 刘大同,荆彦平,李栋梁,余徐润,王忠(2013). 植物侧根发育的研究进展. 植物生理学报, 49(11): 1127~1137
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119: 109~120
- Battaglia M, Ripodas C, Clúa J, Baudin M, Aguilar OM, Niebel A, Zanetti ME, Blanco FA (2014). A nuclear factor Y interacting protein of the GRAS family is required for nodule organogenesis, infection thread progression, and lateral root growth. *Plant Physiol*, 164(3): 1430~1442
- Benkova E, Hejatkó J (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol Biol*, 69: 383~396
- Bowling SA, Clarke JD, Liu YD, Klessig DF, Dong XN (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9(9): 1573~1584
- Cui HC, Levesque MP, Vernoux T, Jung JW, Paquette AJ, Gallagher KL, Wang JY, Blilou I, Scheres B, Benfey PN (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*, 316: 421~425
- Elmayan T, Tepfer M (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. *Transgenic Res*, 4: 388~396

- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449 (7165): 1053~1057
- Gilmartin PM, Sarokin L, Memelink J, Chua NH (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, 2 (5): 369~378
- Kapulnik Y, Koltai H (2014). Strigolactone involvement in root development, response to abiotic stress, and interactions with the biotic soil environment. *Plant Physiol*, 166 (2): 560~569
- Kong K, Ntui VO, Makabe S, Khan RS, Mii M, Nakamura I (2014). Transgenic tobacco and tomato plants expressing *Wasabi defensin* genes driven by root-specific *LjNRT2* and *AtNRT2.1* promoters confer resistance against *Fusarium oxysporum*. *Plant Biotechnol*, 31 (2): 89~96
- Li MN, Xu WL, Yang WQ, Kong ZS, Xue YB (2007). Genome-wide gene expression profiling reveals conserved and novel molecular functions of the stigma in rice. *Plant Physiol*, 144 (4): 1797~1812
- Lim CJ, Lee HY, Kim WB, Lee BS, Kim J, Ahmad R, Kim HA, Yi SY, Hur CG, Kwon SY (2012). Screening of tissue-specific genes and promoters in tomato by comparing genome wide expression profiles of *Arabidopsis* orthologues. *Mol Cell*, 34 (1): 53~59
- Lin WC, Cheng ML, Wu JW, Yang NS, Cheng CP (2005). A glycine-rich protein gene family predominantly expressed in tomato roots, but not in leaves and ripe fruit. *Plant Sci*, 168 (2): 283~295
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413: 307~311.
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313 (6005): 810~812
- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 40 (1): 1~22
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J*, 18 (1): 111~119
- Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet*, 215 (2): 326~331
- Stahl Y, Simon R (2010). Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Curr Opin Plant Biol*, 13 (1): 53~58
- The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485 (7400): 635~641
- Tominaga-wada R, Nukumizu Y, Sato S, Wada T (2013). Control of plant trichome and root-hair development by a tomato (*Solanum lycopersicum*) R3 MYB transcription factor. *PLoS ONE*, 8 (1): e54019
- Tominaga-wada R, Wada T (2014). Regulation of root hair cell differentiation by R3 MYB transcription factors in tomato and *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, (5): 91
- Wei LQ, Xu WY, Deng ZY, Su Z, Xue YB, Wang T (2010). Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in *Oryza sativa*. *BMC genomics*, 11 (1): 338
- Wysocka-diller JW, Helaritta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 127: 595~603
- Yanagisawa S, Schmidt RJ (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J*, 17 (2): 209~214
- Yang YW, Lai KN, Tai PY, Li WH (1999). Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages. *J Mol Evol*, 48 (5): 597~604