

李文静,高鑫博,吴晶慧,等. 番茄根特异性基因 *SIRSP3* 启动子的鉴定及功能解析[J]. 江苏农业学报,2026,42(6):1231-1238.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2026.06.015

番茄根特异性基因 *SIRSP3* 启动子的鉴定及功能解析

李文静^{1,2}, 高鑫博¹, 吴晶慧¹, 霍明杉¹, 赵楠楠¹, 雷佳¹, 王聪艳¹, 张新业¹, 朱 姝¹

(1.廊坊师范学院生命科学学院,河北 廊坊 065000; 2.廊坊市生物样品分析及农残检测重点实验室,河北 廊坊 065000)

摘要: 根是植物重要的营养器官,其生长发育直接影响作物抗逆能力与产量形成,因此了解根特异性表达基因及其启动子对作物改良具有重要意义。本研究基于番茄不同组织部位(根、茎、叶、花、果实)的转录组数据,筛选出根中优势表达基因 *Solyc03g096420*,命名为 *SIRSP3*。利用荧光定量 PCR 分析 *SIRSP3* 基因的表达模式,克隆 *SIRSP3* 基因的启动子,根据顺式作用元件的分布位置采用 5'端缺失法对启动子进行分析,并通过同源重组法构建 *SIRSP3* 基因的全长及截短启动子融合 β -葡萄糖醛酸苷酶报告基因(*GUS*)的表达载体,转化拟南芥进行组织表达模式分析。荧光定量 PCR 分析结果表明,*SIRSP3* 基因在番茄根部特异表达。顺式作用元件分析结果表明,*SIRSP3* 基因启动子内部含有根部特异性表达元件;*GUS* 组织化学染色结果表明,2 000 bp 和1 300 bp *SIRSP3* 基因启动子特异性在拟南芥根部表达,而 700 bp 及 300 bp *SIRSP3* 基因启动子呈组成型表达。综上,本研究中 *SIRSP3* 基因启动子为根特异性基因启动子,1 300 bp *SIRSP3* 基因启动子可以取代2 000 bp 启动子行使功能,在番茄抗逆遗传改良中具有重要意义。

关键词: 番茄; 根特异性基因启动子; 顺式作用元件

中图分类号: Q75;Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)06-1231-08

Identification and functional analysis of the promoter of the tomato root-specific gene *SIRSP3*

LI Wenjing^{1,2}, GAO Xinbo¹, WU Jinghui¹, HUO Mingshan¹, ZHAO Nannan¹, LEI Jia¹, WANG Congyan¹, ZHANG Xinye¹, ZHU Shu¹

(1.College of Life Sciences, Langfang Normal University, Langfang 065000, China; 2.Langfang Key Laboratory of Biological Sample Analysis and Pesticide Residue Detection, Langfang 065000, China)

Abstract: Roots are important vegetative organs, and their growth and development directly affect crop stress resistance and yield formation. Therefore, understanding root-specific expressed genes and their promoters is of great significance for crop improvement. Based on transcriptome data from different tissues (root, stem, leaf, flower and fruit) of tomato, a root-predominant gene, *Solyc03g096420*, was identified and designated as *SIRSP3*. The expression pattern of the *SIRSP3* gene was analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The promoter of the *SIRSP3* gene was cloned, and a 5'-deletion analysis was performed based on the distribution of *cis*-acting elements. Subsequently, expression vectors carrying the full-length and truncated *SIRSP3* promoters fused with the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene were constructed via homologous recombination and

transformed into *Arabidopsis thaliana* for tissue-specific expression pattern analysis. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results showed that the *SIRSP3* gene was specifically expressed in tomato roots. *Cis*-acting element analysis revealed that the promoter of the *SIRSP3* gene contained root-specific expression elements. *GUS* histochemi-

收稿日期:2025-06-30

基金项目:河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目(JYQ202101)

作者简介:李文静(1982-),女,山东德州人,博士,副教授,主要从事分子生物学研究。(E-mail)liwenjing@lfnu.edu.cn

通讯作者:朱 姝,(E-mail)zhushu@lfnu.edu.cn;张新业,(E-mail)zhigancao@126.com

cal staining results revealed that the 2 000 bp and 1 300 bp *SIRSP3* gene promoter fragments drove specific expression in *Arabidopsis* roots, whereas the 700 bp and 300 bp *SIRSP3* gene promoter fragments exhibited constitutive expression. In summary, the *SIRSP3* gene promoter identified in this study is a root-specific promoter, and the 1 300 bp *SIRSP3* promoter can replace the 2 000 bp promoter in function, which is of great significance for the genetic improvement of stress tolerance in tomato.

Key words: tomato; root-specific gene promoter; *cis*-acting elements

高等植物基因表达受转录起始、mRNA 稳定性及翻译效率调控。启动子负责转录起始,在控制基因转录和调控基因表达方面具有重要作用。根特异性启动子在改良根系结构及功能,提高植物抗逆性、抗病性,优化植物代谢途径,促进靶基因定向表达,减轻非靶组织负担方面具有重要作用^[1-4]。传统根特异性启动子筛选依赖同源克隆策略,例如大豆(*Glycine max*) *GmPRP2*^[5]、*GmTIP* 基因启动子^[6]及番茄(*Solanum lycopersicum*) *SlTIP-1*^[7]基因启动子,但其跨物种应用存在显著局限性。冯婵莹等^[8]的研究结果表明,拟南芥、水稻中根特异性表达基因的番茄同源基因,未必能够保持根特异性表达特征,因此通过同源克隆筛选根特异性启动子的风险较高。此外,同源克隆多聚焦已知根特异表达基因,且通常针对单个或少数基因,因此该方法发掘新基因能力有限,且难以适应高通量筛选需求。

目前研究人员已成功克隆烟草(*Nicotiana tabacum*) *NtR12*^[1]、草莓(*Fragaria × ananassa*) *FaRB7*^[9]、大豆 *GmPR1-9*^[2]、*GmPRP2*^[5]、*GmTIP*^[6]、*GmBDP1*、*GmADR1*^[10]及西部白松(*Pinus monticola*) *PsPR10*^[11]等根特异性基因的启动子。然而,针对番茄根特异性启动子的研究,除李文静团队鉴定的 *SlTIP-1*^[7]、*SlMT3*^[12]、*SlNRT2.4* 基因启动子^[13],以及 Jenny 等^[14]报道的 *SIREO* 基因启动子外,其他研究团队鲜有报道。因此,高效挖掘和鉴定新型番茄根特异性基因的启动子迫在眉睫。

随着高通量测序技术的发展,基于转录组等组学数据筛选根特异性表达基因进而挖掘其启动子的策略,已成为根特异性基因启动子研究的主流。Moissejev 等^[15]整合了多物种转录组数据,建立起玉米、大豆和高粱根特异性基因数据库;Gao 等^[16]利用拟南芥、水稻、玉米 3 种植物 13 种不同组织的 35 个 RNA-Seq 数据库,分别鉴定出 489 个、276 个、728 个根特异性表达基因(RTEG)。尽管番茄中已积累了大量的不同组织的转录组数据^[17],但根特异性基因启动子的组学挖掘、鉴定却鲜有报道。

组织特异性基因启动子的功能发挥,依赖其内

部顺式作用元件的种类、数量、排列方式及组合模式,这些元件在调控基因时空特异性表达中发挥关键作用。除包含一般启动子共有的 TATA box、CAAT box 和 GC box 等核心元件外,组织特异性基因的启动子还必须具备控制其组织特异性表达的专属顺式作用元件。以水稻理想株型基因 *IPA1* (Ideal plant architecture 1) 为例,其启动子中一段 54 bp 的片段(该片段是转录因子 An-1 抑制穗和根中 *IPA1* 基因表达的靶位点)发生缺失突变后,会导致关键顺式作用元件功能丧失,进而解除对穗部、茎秆及根系发育的负调控作用,最终实现穗粒数、穗重、株高和茎粗等多性状的协同改良,打破了产量性状间的负相关效应^[18]。这一发现清晰揭示了顺式作用元件的微调作用对基因表达模式及表型精准调控的分子基础。

番茄因其基因组注释完善、遗传转化体系成熟等优势,成为研究基因功能与代谢调控的模式物种。本研究团队前期通过番茄转录组数据分析,鉴定到 1 个根部特异性表达基因 *SIRSP3*。为进一步解析 *SIRSP3* 基因功能及其应用价值,本研究以 Micro-Tom 番茄为材料,首先通过荧光定量 PCR 技术验证 *SIRSP3* 基因的组织表达模式,随后克隆获得 *SIRSP3* 基因的全长启动子与系列截短启动子,并利用同源重组技术分别构建 *SIRSP3* 全长启动子-*GUS* 融合表达载体、*SIRSP3* 截短启动子-*GUS* 融合表达载体,将上述载体异源转化拟南芥,以 *CaMV35S* 组成型启动子驱动的 *GUS* 载体为对照,通过 *GUS* 组织化学染色,分析 *SIRSP3* 基因启动子的组织表达特异性及转录活性强度,进而定位其核心调控元件,以期对番茄及相关作物根特异性基因的功能解析与根特异性启动子的挖掘利用提供参考,同时为通过基因工程技术实现外源基因在作物根部的特异性高效表达、培育抗逆作物新种质提供理论依据与技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

Micro-Tom 番茄和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

栽培容器选用黑色方形育苗盆,基质为德国 KLAS-MANN 公司 K 牌大汉营养土。番茄培养温度为 25 ℃,光照度为 90 μmol/(m² · s),光周期为光照 16 h/黑暗 8 h;拟南芥培养温度为 23 ℃,光照度为 70 μmol/(m² · s),光周期为光照 12 h/黑暗 12 h。二元表达载体 p1300GN-35S TOP10 和 GV3101 菌株由本实验室保存。

1.2 番茄 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

番茄各部位(根、茎、叶、花、绿熟期果实、破色期果实)的总 RNA 提取均参照天根生化科技(北京)有限公司的 RNA simple total RNA Kit 试剂盒(产品编号:DP419)说明书进行。以各部位提取的高质量总 RNA 为模板,进行第一链 cDNA 合成,试验操作严格参照宝生物工程(大连)有限公司的 Prime Script RT reagent Kit with gDNA eraser 试剂盒(产品编号:RR037A)说明书进行。

1.3 番茄 *SIRSP3* 基因的表达分析

基于 *SIRSP3* 基因和内参基因 *actin-7*(GenBank 登录号:NM_001308447.1)的编码序列(CDS),采用 DNAMAN 软件设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。反应体系和反应程序参照北京艾德莱生物科技有限公司 2×Sybr Green qPCR Mix(Low ROX)说明书进行。试

验设置 3 次重复,*SIRSP3* 基因在番茄不同组织的表达量采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算,差异显著性分析使用 SPSS 19.0 软件,表达模式图绘制使用 Origin 8.5 软件。

1.4 番茄叶片总 DNA 提取、全长及截短 *SIRSP3* 基因启动子克隆

从番茄基因组数据库(<http://solgenomics.net/>)获取 *SIRSP3* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的非编码调控序列,作为该基因的全长启动子,基于 p1300GN-35S 载体多克隆位点和同源重组需求,设计包含 *Hind* III 与 *Bam* H I 的正反向引物(表 1)。为进行 5'端缺失分析,进一步设计正向引物 *SIRSP3*-F300、*SIRSP3*-F700 和 *SIRSP3*-F1300,分别与反向引物 *SIRSP3*-R 配对,用于扩增 300 bp、700 bp 和 1 300 bp 的截短片段。番茄叶片基因组 DNA 提取采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法,扩增反应使用北京艾德莱生物科技有限公司 2×A8 Fast HiFi PCR Master Mix 进行。反应体系和反应条件参照李文静等^[13]的方法进行。全长及截短 PCR 片段经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,确认 300 bp、700 bp、1 300 bp 和 2 000 bp 目标条带大小符合预期后,采用天根生化科技(北京)有限公司 DNA 纯化回收试剂盒(DP214)纯化目的片段。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>SIRSP3</i> -qRT F	GCTGCTTACTGTGACGTTAG	荧光定量 PCR
<i>SIRSP3</i> -qRT R	GCGAAGGATATTAAGGAGAGA	荧光定量 PCR
<i>Slactin</i> -qRT F	AACACCCTGTTCTCCTGACTG	荧光定量 PCR
<i>Slactin</i> -qRT R	GAGAAAGCACAGCCTGGATAG	荧光定量 PCR
<i>SIRSP3</i> -F2000	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAGACTTACATATACTTGAATAAG	启动子克隆
<i>SIRSP3</i> -R	GGA CTGACCA CCGGGATCCGTCTCTCTTTCTATGCTCTTTC	启动子克隆
<i>SIRSP3</i> -F300	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAGATATTTTGAGAAAATTTAAAC	缺失启动子克隆
<i>SIRSP3</i> -F700	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTTTCATGTATATAACCACTTATATT	缺失启动子克隆
<i>SIRSP3</i> -F1300	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAACGTGATAATTAAATAAATATTG	缺失启动子克隆
<i>HYG</i> -F	AAGTTCGACAGCGTCTCCGAC	阳性苗检测
<i>HYG</i> -R	TCTACACAGCCATCGGTCAG	阳性苗检测
<i>SIRSP3</i> -F300 检测	CCAAGCTTAGATATTTTGAGAAAATTTAAAC	阳性苗检测
<i>GUSR</i> -287 检测	TTGCCGTAATGAGTGACCGCATCGA	阳性苗检测

1.5 基因启动子顺式作用元件分析

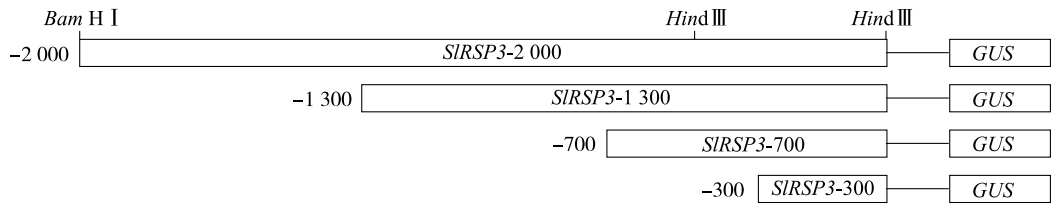
通过 Plant CARE^[19] 和 New PLACE^[20] 网站分析 *SIRSP3* 基因启动子区包含的顺式作用元件。

1.6 *SIRSP3* 基因全长及截短启动子植物表达载体的构建

为解析 *SIRSP3* 基因启动子的功能区域,本研究

通过同源重组技术构建含不同长度启动子片段的植物表达载体。具体操作如下:取 1 μL 经 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切并纯化的 p1300GN 载体骨架(含 *GUS* 报告基因,用于后续启动子活性的可视化分析),分别与 4 μL 纯化的 *SIRSP3* 全长(2 000 bp)及截短片段(1 300 bp、700 bp、300 bp)的 PCR 产物混合,加入天根生化科技(北京)有限公司 2 $\times$ EasyGeno Assembly

Mix 试剂盒进行同源重组反应。最终成功构建植物表达载体 p1300GN-*SIRSP3*-2 000、p1300GN-*SIRSP3*-1 300、p1300GN-*SIRSP3*-700 和 p1300GN-*SIRSP3*-300 (每个载体分别含 1 种长度的 *SIRSP3* 基因启动子片段及 *GUS* 报告基因)(图 1),用于拟南芥遗传转化以分析启动子的组织表达模式。



GUS: β -葡萄糖醛酸苷酶基因。

图 1 用于拟南芥遗传转化的表达载体示意图

Fig.1 Schematic diagram of the expression vectors for *Arabidopsis* genetic transformation

1.7 拟南芥的遗传转化及阳性植株检测

使用冻融法将 p1300GN-*SIRSP3*-2 000、p1300GN-*SIRSP3*-1 300、p1300GN-*SIRSP3*-700 和 p1300GN-*SIRSP3*-300 表达载体及对照载体(p1300GN-35S)导入农杆菌 GV3101,菌落 PCR 获得阳性克隆。挑取农杆菌阳性单菌落,于 28 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 过夜培养,之后使用含有 0.05% (体积比) Silwet L-77 表面活性剂的 1/2 MS (含 5% 蔗糖)重悬菌液,采用蘸花法侵染去顶、剪去已开放花蕾的拟南芥。 T_0 代种子使用 30 mg/L 潮霉素筛选获得 T_1 代幼苗,提取该幼苗 DNA,使用 HYG-F/HYG-R 进行 PCR 检测。

1.8 转基因植株的 *GUS* 组织化学分析

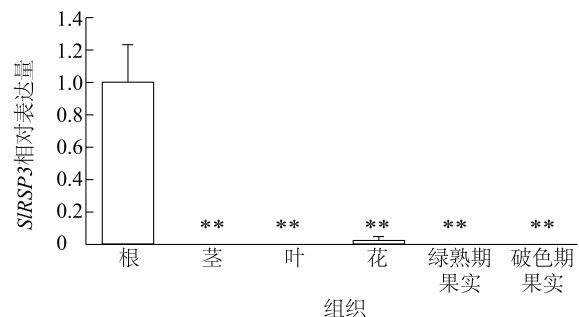
T_1 代转基因及野生型拟南芥幼苗于含有潮霉素的 MS 培养基培养 21 d,取上述幼苗浸没于 500 μL *GUS* 染色液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗处染色过夜。除去染色液,用 70% 乙醇脱色至野生型叶片呈白色,使用 SteREO Discovery.V12 体视显微镜(德国蔡司公司产品)拍照。

2 结果与分析

2.1 *SIRSP3* 基因表达模式

采用荧光定量 PCR 检测 *SIRSP3* 基因在番茄根、茎、叶、花、绿熟期果实、破色期果实组织表达情况,结果显示该基因在根中表达水平极显著高于在其他组织中表达水平($P < 0.01$)(图 2)。初步表明,

SIRSP3 基因呈现根特异性表达。



** 表示 *SIRSP3* 基因在番茄不同组织中相对表达量与在根中相对表达量相比差异达极显著水平($P < 0.01$)。

图 2 *SIRSP3* 基因在不同番茄组织中的表达

Fig.2 Expression levels of the *SIRSP3* gene in different tissues of tomato

2.2 *SIRSP3* 基因的启动子顺式作用元件

为解析 *SIRSP3* 基因启动子的潜在调控机制,本研究利用 New PLACE、Plant CARE 在线工具对 *SIRSP3* 基因启动子序列进行顺式作用元件预测与分析。结果表明,该启动子含有多个基本核心元件(TATA-box、CAAT-box)和根特异性表达元件(ROOTMOTIF、TAP1、REM2、REM6、MYCCONSUSAT、SURECOREATSULTR11、OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE)。此外,其启动子区还包含光响应相关元件,如 Box 4、ATCT-motif、G-box(表 2)。

表 2 *SIRSP3* 基因的启动子顺式作用元件

Table 2 *Cis*-acting elements in the promoter of *SIRSP3* gene

元件名称	序列	序列数量	位置(bp)	功能
CAAT-Box	CAAT,CCAAT、CAAAT	17	-1 767~-1 762,-1 766~-1 763,-1 711~-1 708,-1 651~-1 647,-1 222~-1 218,-1 184~-1 811,-1 149~-1 145,-1 104~-1 101,-1 110~-1 096,-945~-942,-904~-901,-863~-859,-810~-807,-179~-175,-150~-146,-119~-115,-35~-31	启动子和增强子内部通用顺式作用元件
TATA-Box	TATATA,ATATAA、TATTAAAA、TACAAAA、ATATAT,TATA、ATTATA,TATACA、TATAAAA	60	-1 991~-1 988,-1 926~-1 921,-1 924~-1 921,-1 902~-1 899,-1 888~-1 885,-1 877~-1 872,-1 876~-1 873,-1 872~-1 867,-1 871~-1 868,-1 733~-1 720,-1 634~-1 631,-1 426~-1 423,-1 418~-1413,-1 417~-1 414,-1 359~-1 356,-1 208~-1205,-1 208~-1 203,-1 207~-1 202,-1 206~-1 203,-1 204~-1 201,-1 182~-1 177,-1 181~-1 178,-1 132~-1 127,-1 130~-1 127,-1 072~-1 067,-1 071~-1 068,-1 055~-1 052,-1 055~-1 049,-860~-855,-859~-856,-859~-853,-852~-846,-807~-804,-792~-787,-791~-788,-694~-691,-694~-689,-693~-688,-682~-678,-661~-654,-580~-577,-483~-480,-483~-478,-482~-497,-466~-461,-464~-461,-456~-453,-452~-457,-450~-447,-356~-353,-356~-351,-204~-199,-202~-199,-194~-191,-70~-67,-70~-65,-69~-64,-68~-65,-66~-63,-44~-41	核心启动子元件
Box 4	ATTAAT	8	-1 881~-1 876,-1 547~-1 542,-1 313~-1 308,-1 076~-1 071,-607~-601,-406~-400,-386~-380,-322~-217	参与光响应
G-Box	CACGTT	1	-1 162~-1 157	参与光响应
ATCT-motif	AATCTAATCC	1	-318~-310	参与光响应
NTBBF1ARROLB	ACTTTA	1	-101~-96	组织特异性表达和生长素诱导必需元件
REM2	AATTAATC	1	-608~-601	根特异性表达顺式作用元件
REM6	AGCACC	1	-1 860~-1 855	根特异性表达顺式作用元件
MYCONSENSUSAT	CANNTG	4	-1 481~-1 476,-1 222~-1 217,-475~-470,-150~-145	根特异性表达顺式作用元件
SURECOREATSULTR11	GAGAC	2	-747~-743,-5~-1	根特异性表达顺式作用元件
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	4	-1 825~-1 820,-1 335~-1 330,-1 171~-1 166,-837~-832	根瘤特异性表达元件
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	1	-1 966~-1 962	根瘤特异性表达元件
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	19	-1 887~-1883,-1 870~-1 866,-1 844~-1 840,-1 821~-1 817,-1 777~-1 773,-1 672~-1 668,-1 633~-1 629,-1 490~-1 486,-1 425~-1 421,-1 282~-1 278,-1 203~-1 199,-1 007~-1 003,-790~-786,-681~-677,-662~-658,-563~-559,-298~-294,-206~-202,-193~-189	参与根特异性表达元件

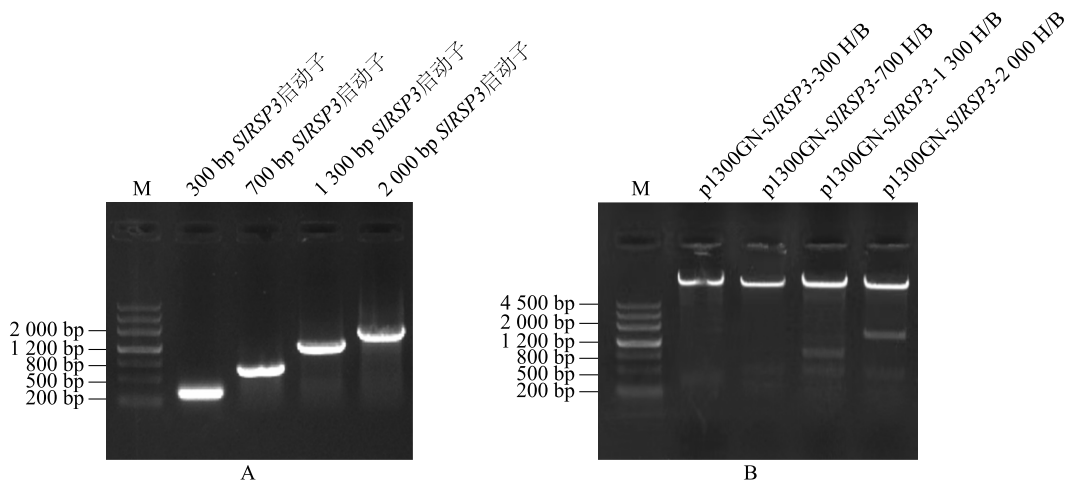
2.3 *SIRSP3* 基因的启动子克隆及植物表达载体构建
提取番茄叶片基因组 DNA,以其为模板,使用 *SIRSP3*-F2000、*SIRSP3*-F1300、*SIRSP3*-F700、*SIRSP3*-F300 4 个正向引物分别与 *SIRSP3*-R 引物配对,PCR 扩增 *SIRSP3* 基因的全长启动子及截短启动子,分别获得长约 300 bp、700 bp、1 300 bp 和 2 000 bp 的条带(图 3A)。

采用 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切 p1300GN-35S 并纯化载体骨架,与纯化后的 *SIRSP3* 基因的启动子全长及截短片段同源重组,并转化 TOP10。将菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆提取质粒,使用 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切。由于 *SIRSP3* 基因的启动子 1 540

bp (-460 bp) 处含有 *Hind* III 位点,除载体框架外,300 bp、700 bp、1 300 bp 和 2 000 bp *SIRSP3* 基因的启动子分别切出 300 bp、460 bp+240 bp、460 bp+840 bp、460 bp+1 540 bp 条带(图 3B)。酶切及测序结果正确的重组子命名为 p1300GN-*SIRSP3*-300、p1300GN-*SIRSP3*-700、p1300GN-*SIRSP3*-1 300 和 p1300GN-*SIRSP3*-2 000。

2.4 拟南芥遗传转化

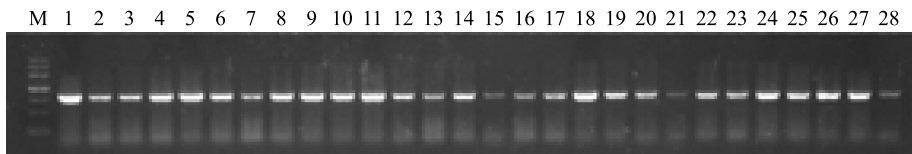
为验证 *SIRSP3* 基因启动子活性,将相关载体经冻融法转化 GV3101 并筛选阳性菌,采用蘸花法侵染拟南芥未开放花蕾,经潮霉素筛选及 PCR 验证,获得转基因阳性拟南芥(图 4)。



A:全长及截短 *SIRSP3* 基因启动子克隆;B:全长及截短 *SIRSP3* 基因启动子表达载体双酶切。M:Marker,DNA 相对分子量标准。H/B 代表 *Hind* III/*Bam* HI。

图 3 全长及截短 *SIRSP3* 基因启动子表达载体构建

Fig.3 Construction of expression vectors with full-length and truncated *SIRSP3* gene promoters



M:Marker III ,DNA 相对分子量标准;1:质粒对照;2~28:转基因拟南芥植株。

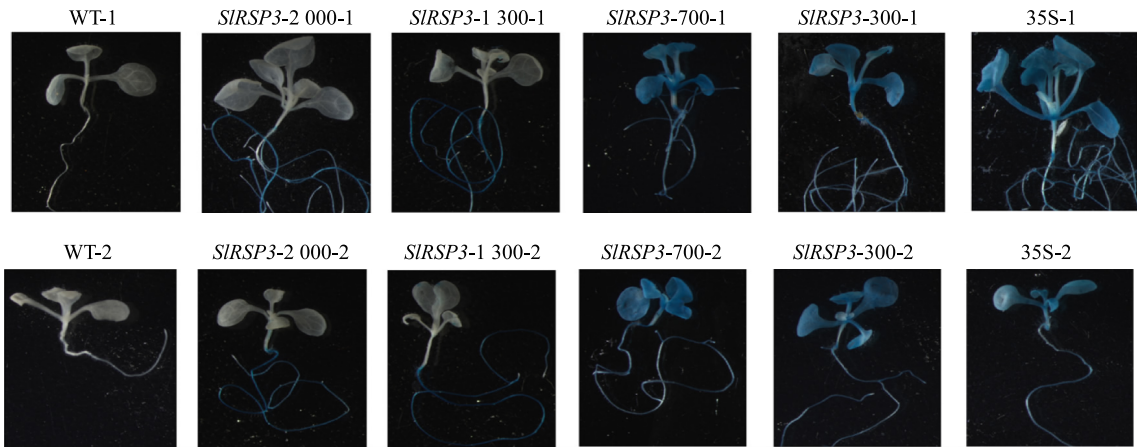
图 4 T₁代转基因拟南芥 PCR 分析结果

Fig.4 PCR analysis of T₁ transgenic *Arabidopsis* plants

2.5 转基因拟南芥 *GUS* 活性

每个载体采用 10 个 21 d 苗龄 T₁代转基因拟南芥株系幼苗开展 *GUS* 组织化学染色。结果(图 5)显示,野生型(WT)植株各器官均未检测到显色反应,转

p1300GN-35S 植株的根、茎、叶均呈蓝色,而转化全长和 1 300 bp *SIRSP3* 基因启动子的植株根中 *GUS* 基因强烈表达,地上部分基本不表达,转化 700 bp 和 300 bp *SIRSP3* 基因启动子的植株呈现组成型表达。



WT-1、WT-2:野生型植株;*SIRSP3*-2 000-1、*SIRSP3*-2 000-2:转化全长 *SIRSP3* 基因启动子植株;*SIRSP3*-1 300-1、*SIRSP3*-1 300-2、*SIRSP3*-700-1、*SIRSP3*-700-2、*SIRSP3*-300-1、*SIRSP3*-300-2:转化截短 *SIRSP3* 基因启动子植株;35S-1、35S-2:转化 p1300GN-35S 植株。

图 5 *SIRSP3* 基因全长及截短启动子 *GUS* 表达模式

Fig.5 Analysis of *GUS* expression patterns driven by the full-length and truncated promoters of the *SIRSP3* gene

3 讨论

根特异性基因启动子的功能解析与应用对作物遗传改良具有关键作用,其通过精准调控抗逆基因在根部的时空表达,可提升植株养分利用效率及对干旱、盐碱等非生物胁迫与土传病害的抵御能力^[21]。尽管水稻 (*Oryza sativa*)^[22-23]、玉米 (*Zea mays*)^[24]、大豆^[25-26]等作物中已成功分离多个根特异性基因启动子,但番茄根特异性基因启动子的研究仍滞后。本研究基于番茄多组织转录组数据成功筛选出1个根高特异性表达候选基因 *SIRSP3*,克隆其全长及截短启动子并替换 p1300GN 载体中的 *CaMV35S* 启动子,通过拟南芥异源转化和 GUS 染色证实其根特异性及表达强度。

基因的组织特异性表达主要由启动子区顺式作用元件调控网络决定^[24]。本研究对启动子顺式作用元件的分析结果表明,*SIRSP3* 基因的启动子不仅包含 TATA-box、Box4、G-Box 等核心启动子元件及光响应元件,还包含 REM2、REM6、MYCCONSENSUSAT、SURECOREATSULTR11、ROOTMOTIFTAPOX1、OSE1ROOTNODULE 和 OSE2ROOTNODULE 等多个根特异性调控基序,提示该基因通过多元件协同作用实现根部特异性表达。Gao 等^[16]通过 BioProspector、Weeder、Homer 和 Xtreme 软件对 489 个水稻、276 个拟南芥和 728 个玉米根特异性基因的启动子进行顺式作用元件分析,发现 REM1-16 在根特异性基因启动子中富集程度显著高于非根特异性基因启动子,该结果与 *SIRSP3* 基因启动子中存在 REM2、REM6 一致,提示 REM 基序在根特异性调控中具有进化保守性;闫强等^[2]发现,大豆中6个根特异性 *GmPR1* 基因启动子区均存在保守的 MYCCONSENSUSAT 元件,番茄 *SIRSP3* 基因启动子也含有该元件,结合其根部特异性表达特征,这一发现为 MYCCONSENSUSAT 元件参与根系发育调控提供了跨物种证据。

为解析根特异性基因启动子顺式作用元件的功能,本研究采用 5'端缺失法,构建了包含不同长度 *SIRSP3* 基因启动子(2 000 bp、1 300 bp、700 bp、300 bp)且嵌合 *GUS* 报告基因的植物表达载体,并通过拟南芥遗传转化进行功能验证。GUS 组织化学染色结果表明,2 000 bp 和 1 300 bp *SIRSP3* 基因启动子均驱动外源基因实现根特异性表达,而 700 bp 和

300 bp 的启动子片段则使基因呈现组成型表达模式。薛冬等^[25]研究发现 11 个根系特异性表达基因启动子均含有多个根特异性表达元件,这类元件正是介导基因根特异性表达的关键,该结论与本研究结果一致。不过,特定顺式作用元件虽是基因组织特异性表达的必要条件,但其单独存在并不足以完全决定基因表达模式。例如,*SINRT2* 基因家族中 *SINRT2.4* 基因启动子依靠根特异性元件的组合实现在根部特异性表达;而 *SINRT2.3* 基因和 *SINRT2.5* 基因虽含有同类根特异性元件,却因元件的空间排布、数量差异,以及与其他调控元件的互作关系,最终表现为根、花、叶等多组织共表达^[13]。本研究中同样观察到类似现象:300 bp 和 700 bp 的 *SIRSP3* 基因启动子区段虽然分别含有 5 个和 10 个已注释的根特异性元件,却呈现组成型表达特征。这与李文静等^[27]的研究发现相呼应——*GluC* 基因的全长启动子具有胚乳特异性表达特性,而当该启动子缺失至-999 bp时,其在茎、叶中也出现了表达。上述结果表明,*SIRSP3* 基因启动子700~1 300 bp 区域可能存在促进根特异性表达的顺式作用元件或抑制非根组织表达的顺式作用元件,这些元件通过复杂的调控方式介导基因在根特异性表达。后续研究可采用 CRISPR-Cas9 介导的基序定点敲除技术,进一步探究该根特异性基因启动子的核心调控元件。

4 结论

综上,本研究首次报道了 *SIRSP3* 基因的启动子为根特异性启动子,1 300 bp *SIRSP3* 基因启动子在保持功能完整性的同时显著缩短序列长度,为多基因共转化系统提供了更高效的启动子资源^[28]。相较于传统组成型启动子,*SIRSP3* 基因启动子的应用可精准定位抗逆/养分吸收相关基因在根部的表达,避免非靶器官代谢负担^[29]。本研究结果丰富了番茄根特异性基因启动子资源,为番茄及其他茄科作物根特异性基因启动子筛选提供了有效策略,为抗逆基因工程及多基因共转化系统提供了良好的材料。

参考文献:

- [1] CAI T C, CHEN H, YAN L M, et al. The root-specific *NtR12* promoter-based expression of RIP increased the resistance against bacterial wilt disease in tobacco[J]. Molecular Biology Reports,

- 2022,49(11):503-514.
- [2] 闫强,薛冬,胡亚群,等.大豆根特异性 GmPR1-9 启动子的鉴定及其在根腐病抗性中的应用[J].中国农业科学,2022,55(20):3885-3896.
 - [3] BOROUJENI N A, KHATOONI S B, MOTAMED M J, et al. Root-preferential expression of newcastle virus glycoproteins driven by *NtRELI* promoter in tobacco hairy roots and evaluation of oral delivery in mice[J]. Transgenic Research,2022,31(2):201-213.
 - [4] ZHANG C, PAN S F, CHEN H, et al. Characterization of *NtRELI*, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts[J]. Plant Cell Reports,2016,35(4):757-769.
 - [5] CHEN L, JIANG B J, WU C X, et al. *GmPRP2* promoter drives root-preferential expression in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots[J]. BMC Plant Biology,2014,14:245.
 - [6] CHEN L, JIANG B J, WU C X, et al. The characterization of *GmTIP*, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),2015,121(2):259-274.
 - [7] 李文静,李甜怡,乔洁,等.番茄 *SlTIP-1* 基因的克隆、表达及启动子活性分析[J].植物生理学报,2020,56(6):1221-1230.
 - [8] 冯婵莹,李涛,黎振兴,等.番茄根特异基因的表达分析[J].植物生理学报,2015,51(6):921-934.
 - [9] VAUGHAN S P, JAMES D J, LINDSEY K, et al. Characterization of FaRB7, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts[J]. Journal of Experimental Botany,2006,57(14):3901-3910.
 - [10] XUN H W, ZHANG X, YU J M, et al. Analysis of expression characteristics of soybean leaf and root tissue-specific promoters in *Arabidopsis* and soybean[J]. Transgenic Research,2021,30(6):799-810.
 - [11] LIU J J, EKRAMODDOULLAH A K. Root-specific expression of a western white pine *PR10* gene is mediated by different promoter region in transgenic tobacco[J]. Plant Molecular Biology,2003,52(1):103-120.
 - [12] 王佳音,张云逸,薛婷婷,等.番茄磷酸盐转运蛋白 *SlPT2* 基因启动子克隆及功能分析[J].河南农业科学,2024,53(6):120-127.
 - [13] 李文静,张新业,张智研,等.番茄 *SlNRT2* 基因家族鉴定、启动子克隆及表达分析[J].植物生理学报,2024,60(1):97-107.
 - [14] JENNY P, SAKURE A A, YADAV A, et al. Molecular cloning and characterisation of root-specific *SIREO* promoter of the Indian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar[J]. Functional Plant Biology,2024,51:24063.
 - [15] MOISSEYEV G, PARK K, CUI A, et al. RGPDB database of root-associated genes and promoters in maize, soybean, and Sorghum[J]. Database,2020,2020:38.
 - [16] GAO S, CHAI Y, ZHOU X Y, et al. Mining of root-specific expression genes and their core *cis*-regulatory elements in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences,2025,26(4):1720.
 - [17] LI Y, CHEN Y, ZHOU L, et al. MicroTom metabolic network:rewiring tomato metabolic regulatory network throughout the growth cycle[J]. Molecular Plant,2020,13(8):1203-1218.
 - [18] SONG X G, MENG X B, GUO H Y, et al. Targeting a gene regulatory element enhances rice grain yield by decoupling panicle number and size[J]. Nature Biotechnology,2022,40:1403-1411.
 - [19] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. A database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research,2002,30(4):325-327.
 - [20] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999[J]. Nucleic Acids Research,1999,27(1):297-300.
 - [21] KHANDAL H, GUPTA S K, DWIVEDI V, et al. Root-specific expression of chickpea cytokinin oxidase/dehydrogenase 6 leads to enhanced root growth, drought tolerance and yield without compromising nodulation[J]. Plant Biotechnology Journal,2020,18(11):2225-2240.
 - [22] HUANG L Y, ZHANG F, QIN Q, et al. Identification and validation of root-specific promoters in rice[J]. Journal of Integrative Agriculture,2015,14(1):1-10.
 - [23] JEONG H J, JUNG K H. Rice tissue-specific promoters and condition-dependent promoters for effective translational application[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2015,57(11):913-924.
 - [24] LI Y, LIU X Q, CHEN R M, et al. Genome-scale mining of root-preferential genes from maize and characterization of their promoter activity[J]. BMC Plant Biology,2019,19(1):584.
 - [25] 薛冬,闫强,胡亚群,等.大豆根系特异表达基因全基因组水平挖掘及其启动子活性鉴定[J].植物生理学报,2023,59(1):55-66.
 - [26] YU L L, ZHANG H, GUAN R X, et al. Genome-wide tissue-specific genes identification for novel tissue-specific promoters discovery in soybean[J]. Genes,2023,14(6):1150.
 - [27] 李文静,孙艳香.水稻谷蛋白基因 *GluC* 启动子的克隆及表达分析[J].植物研究,2018,38(6):921-930.
 - [28] DONG Q, JIANG H Y, XU Q Q, et al. Cloning and characterization of a multifunctional promoter from maize (*Zea mays* L.)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2015,175(3):1344-1357.
 - [29] TAKAIWA F. Influence on accumulation levels and subcellular localization of prolamins by fusion with the functional peptide in transgenic rice seeds[J]. Molecular Biotechnology,2023,65(11):1869-1886.

(责任编辑:黄克玲)