

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.06.012

转录因子 SISPL3 在病原菌胁迫中的作用

卢若兮, 苗敏, 范叶珍, 宋武, 祝红艳, 吴子睿

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: SPL 家族成员在植物生长发育和非生物响应中发挥重要的作用, 但在植物抗病原微生物侵害方面的作用尚不清楚。文章构建了 pBI121-35S::SISPL3 基因过表达载体, 并利用番茄遗传转化方法获得 SISPL3 过表达转基因植株, 发现过量表达 SISPL3 基因能够显著增强番茄对丁香假单胞菌番茄致病变种 *Pst* DC3000 的抗性, SISPL3 与泛素分子互作并受到泛素化降解, 表明其可能与抗病蛋白 SINBRP1 协同发挥作用。该研究为作物抗病遗传改良提供了理论基础和基因资源。

关键词: 番茄; SISPL3 基因; *Pst* DC3000; 泛素化

中图分类号: S641.2; Q945.78

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)06-0791-07

Role of transcription factor SISPL3 in pathogen stress

LU Ruoxi, MIAO Min, FAN Yezhen, SONG Wu, ZHU Hongyan, WU Zirui

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: SPL family genes play important roles in plant growth and development and abiotic responses, but their roles in plant resistance to pathogenic microbial attack are unknown. In this study, a pBI121-35S::SISPL3 gene overexpression vector was constructed and SISPL3 overexpression transgenic plants were obtained using a tomato genetic transformation method. It was found that overexpression of the SISPL3 gene significantly enhanced the resistance to *Pst* DC3000 in tomato. The SISPL3 interacted with ubiquitin molecules and was subject to ubiquitinated degradation, suggesting that it may act in concert with the resistance protein SINBRP1. This study provides a theoretical basis and genetic resources for the genetic improvement of crop disease resistance.

Key words: tomato; SISPL3 gene; *Pst* DC3000; ubiquitination

0 引言

植物在生长发育过程中, 不可避免地会受到包括细菌、病毒和真菌病原体在内的多种病原微生物的侵害^[1-3]。病原物入侵植物时, 会触发由位于细胞表面的跨膜受体介导的第 1 层防御, 这种防御被称为病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)引发的免疫反应(triggered immunity, TI), 简称 PTI, 通过模式识别受体(pattern recognition receptors,

PRRs)检测 PAMPs, 激活防御反应^[4]。致病微生物通过干扰质膜上的识别系统或通过向植物细胞胞浆中分泌效应蛋白以抑制 PTI, 当病原体获得抑制初级防御的能力, 则植物进化出由 R 基因编码的抗性蛋白, 以诱导第 2 层防御反应, 即效应子引发的免疫反应(effector-triggered immunity, ETI)^[5]。PTI 适应范围较广, 可识别和响应多种非致病菌的微生物; 而 ETI 目的性更强, 反应更剧烈^[6]。两者彼此独立却又密不可分, 抗性 R 蛋白不仅可以直接识别效应子, 还能与 PTI 的受体

收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31970345)

作者简介: 卢若兮(1999—), 女, 安徽六安人, 合肥工业大学硕士生;

苗敏(1982—), 女, 山西曲沃人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师。

蛋白之间形成复合物,在受到病原物威胁的早期阶段介导信号间的传递与互作,对病原识别复合物起到保护作用^[7]。

大部分编码抗性蛋白的 R 基因的保守基序具有高度同源性,主要编码卷曲螺旋(coiled-coil, CC)、Toll/白细胞介素-1 受体类似结构(TIR)、核苷酸结合位点(nucleotide-binding site, NBS)、富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)结构域, R 基因根据 N 端的不同可分为 CNL(CC-NBS-LRR)和 TNL(TIR-NBS-LRR)两大类^[8]。抗性 R 蛋白可以直接或间接识别病原菌释放的效应因子,介导抗性信号的传递与放大,或通过 N 端结构域多聚化与核质分布激活抗菌反应,还能招募转录因子以调控免疫途径^[9]。然而, R 蛋白传递免疫信号的机制尚不清晰。SINBRP1 是 CNL 类 R 蛋白的一种,正向调控番茄对丁香假单胞菌蕃茄致病变种 DC3000(*Pst* DC3000)的免疫响应,并且其蛋白丰度受泛素蛋白酶体的调控^[10]。

在前期研究中,为了进一步探究 SINBRP1 在免疫信号传递中的功能,以其为诱饵蛋白进行酵母双杂交筛选得到了多个互作蛋白,其中包括转录因子 SiSPL3。SPL 是一类植物特有的转录因子, SPL 家族成员均包含 1 个 SBP 结构域负责与 DNA 序列的特异性结合。该结构域高度保守,有 2 个典型的锌指结构域,主要与下游互作基因启动子上的 GTAC 基序元件识别结合^[11-15]。此外,多种 miRNA 能够与转录后的 SPL 特定位点靶向结合并将其降解,调节其表达水平,进而调控各项功能,属于转录后加工修饰^[16-17]。

SPL 家族成员在促进植物生长发育的多个方面发挥着重要的作用。番茄 *SiSPL13* 通过结合 *SiSFT* 的启动子诱导该基因的表达,从而调控花序的有序分化,抑制 *SiSPL13* 的表达导致营养枝和侧枝上的花序数量增加,造成花与果实的减少,从而影响果实的大小和数量^[18];小麦中的多个 *SBP-box* 基因在茎间分生组织和幼穗中表达,从而调控穗的发育^[19];拟南芥 *AtSPL9* 能够与 *AtABI5* 的中间区域相互作用调节其转录,以 *AtABI5* 依赖的方式激活植物对 ABA 信号的响应,从而抵抗不利环境的胁迫^[20];苹果 *MdSPL13* 通过结合 *MdWRKY100* 启动子上的两段 GTAC 基序激活其转录,增强苹果的抗盐胁迫^[21];番茄 miR157-*SiSPL-CNR* 模块作用于 *SibHLH101* 上游,负调节番茄根中的缺铁应答^[22];过表达 *Os-*

SPL4 的水稻对稻瘟病的抗性增强阻碍了稻瘟病原菌的入侵与扩散,基因敲除株则表现出易感性^[23]。

目前 SPL 家族在植物生长发育和非生物耐受中的作用研究较广泛和深入,而在对抗病原微生物侵害方面的机理研究并不多,特别是在番茄为代表的园艺作物中的研究鲜有报道。为探究与抗性 R 蛋白互作的转录因子 SiSPL3 在免疫应答的作用,本研究构建了 pBI121-35S::*SiSPL3* 基因过表达载体,并利用番茄遗传转化的方法将重组载体导入野生型番茄中,得到 *SiSPL3* 过表达和共抑制转基因植株,发现过量表达 *SiSPL3* 基因能够显著增强番茄对丁香假单胞菌 *Pst* DC3000 的抗性。*SiSPL3* 与泛素分子互作并受到泛素化降解,结果表明其与抗病蛋白 SINBRP1 协同发挥作用。同时发现高温也可以诱导 *SiSPL3* 的表达,说明该转录因子在番茄抵抗高温胁迫中也发挥作用。*SiSPL3* 在响应病原菌应答中的作用机制为番茄作物的抗病品质改良提供了分子靶标和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的野生型(wild-type, WT)番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill. cv. Ailsa Craig) 品种 AC 由美国康奈尔大学 THOMPSON 植物研究所提供,烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 由美国爱德华大学肖郁明教授提供,两者均由本实验室繁育保存;植物种植于合肥工业大学人工气候培养室,培养条件为 16 h 光照(26 °C)和 8 h 黑暗(22 °C),湿度为 65%。

所用菌株有 *Pst* DC3000、酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*) EGY48、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV2260、EHA105, 以上菌株均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交实验

以番茄 *SINBRP1* (Solyc05g008070. 2. 1) 的编码序列(coding sequence, CDS)设计特异性引物 *NBRP1-CCFcoR I*、*NBRP1-NBRXho I*。以 *pEG202::SiNBRP1* 为模板^[10],聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增得到目的基因片段,用限制性内切酶 *EcoR I* 和 *Xho I* 酶切并纯化后,通过 T4 连接酶将其与酶切线性

化后的载体质粒 pEG202 连接,将重组产物转入大肠杆菌 DH5 α 并进行 PCR、测序验证,提取得到重组诱饵质粒 pEG202:: *SiNBRP1-N*。同理设计特异性引物 *NBRP1-LRRF_{EcoR}I*、*NBRP1-LRRRX_{ho}I*,用相同的模板和方法获得重组诱饵质粒 pEG202:: *SiNBRP1-C*。本文所

用的引物及其序列见表 1 所列。

将 2 个诱饵质粒分别与猎物质粒 pJG4-5:: *SiSPL3*^[24] 共转入 EGY48 酵母感受态中,于营养缺陷型三缺 CM 培养基(-Ura,-His,-Trp)中筛选培养;挑单克隆于三缺显色 CM 培养基(X-gal,-Ura,-His,-Trp)中验证相互作用。

表 1 本研究所用的引物及其序列

引物	序列(5'—3')
<i>SPL3RTF</i>	CAAGTTCATGCCAAGGCACC
<i>SPL3RTR</i>	TGTGTCCGTCTAAACGCAGG
<i>NBRP1-CCF_{EcoR}I</i>	CGGAATTCATGGCCTATGCTGTATT
<i>NBRP1-NBRX_{ho}I</i>	CCCTCGAGTTAAGATCTACCACCTCCCATAA
<i>NBRP1-LRRF_{EcoR}I</i>	AACGGCGACTGGCTGGAATTCATGTATCTAGTACCTGAAATGAACCACTG
<i>NBRP1-LRRRX_{ho}I</i>	TTGGCTGCAGTTCGACTCGAGTCAAAGATCGTATTGTAACGAAGGA
<i>SPL3FK_{pn}I</i>	CGGGGTACCATGGCAAACAATGATGCTGG
<i>SPL3RSal I</i>	CCGGTCTGACTCCAGAGATGTCAGCAGTG
<i>SPL3FXba I</i>	TGCTCTAGAATGGCAAACAATGATGCTGG
pEG202F	CGTTGTTCGACGTATTGATG
pEG202R	ATAAGAAATTCGCCCGGAAT
<i>NPT II F</i>	AGACAATCGGCTGCTCTGAT
<i>NPT II R</i>	TCATTTGAAACCCAGAGTC
<i>UBI3RTF</i>	AGGTTGATGACTGGAAGGT
<i>UBI3RTR</i>	AATCGCCTCCAGCCTTGTGTGA

1.2.2 番茄 *SiSPL3* 基因的表达谱测定

收集野生型番茄 AC 的叶(L)、根(R)、茎(St)、花(F)、未熟绿果(immature green, IMG)、成熟绿果(mature green, MG)、破红果实(break red, BR)、成熟红果(ripe red, RR)、种子(Se);取 0.15 g 样品,用 Trizol 法提取总 RNA,利用 HiScript III 反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 分析。根据番茄 *SiSPL3* (Solyc07g062980.2.1) 的基因组序列设计引物 *SPL3RTF*、*SPL3RTR*,以番茄 *SiUBI3* 作为内参基因,引物信息见表 1 所列。

1.2.3 番茄的胁迫处理

将病原菌 *Pst* DC3000 在利福平抗性 LB 固体培养基上活化,28 °C 恒温培养箱倒置培养 2 d。挑取单克隆于 2 mL 利福平抗性 LB 液体培养基中,28 °C 过夜震荡培养;3 000 r/min 离心 6 min,收集菌体并重悬于 1 mL 的 10 mmol/L MgCl₂ 缓冲液中,重复 1 次;用缓冲液稀释至 OD₆₀₀ 为 2 × 10⁻⁵,加入 0.005% Silwet L-77。选取培养条件一致、长势良好的 5 周龄番茄植株,每种基因型设置 3 个重复,将植株倒置于真空装置中进行菌液侵染,处理 0、2、4、8 h 时取样。

高温胁迫处理是将野生型番茄置于 40 °C 植

物培养箱,正常浇水,处理 0、2、6、10 h 时取样;高盐和干旱胁迫处理分别用 300 mmol/L 的 NaCl 和 400 mmol/L 的 Mannitol 浇灌野生型番茄,处理 0、12、24、48 h 时取样。提取 RNA,反转录后用于实时荧光定量 PCR 检测,引物为 *SPL3RTF*、*SPL3RTR*,*SiUBI3* 作为内参基因。

1.2.4 过表达载体构建与转基因植株获取

以番茄 *SiSPL3* (Solyc07g062980.2.1) 的 CDS 设计特异性引物 *SPL3FXba I*、*SPL3RSal I* (引物信息见表 1),以 pJG4-5:: *SiSPL3* 为模板,将目的基因构建到 pBI121-35S 载体上,载体带有 *NPT II* 筛选标记。将构建完成的过表达载体质粒 pBI121-35S:: *SiSPL3* 转入农杆菌 EHA105,利用农杆菌转化法侵染番茄外植体,让外植体形成愈伤组织并在有卡那霉素的 MS 培养基上生长分化筛选,成苗后移栽入土壤。提取植株叶片 DNA,用引物 *NPT II F/R* 进行 PCR 鉴定,得到 DNA 水平为阳性的植株;提取 RNA,反转录后进行实时荧光定量 PCR,引物为 *SPL3RTF*、*SPL3RTR*,*SiUBI3* 为内参基因。

1.2.5 平板菌落计数

接种 *Pst* DC3000 后 2、4 d 进行平板菌落计数,于植株的同一分支、同一位置打孔取相同大小

和数量(2 或 3 孔)的叶片;加 1 mL 10 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲溶液进行研磨,研磨充分后吸入 EP 管,得到原液;用 10 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲液将原液稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍,取 5 μ L 稀释后的样品匀液,接种到利福平抗性 LB 固体培养基上,于 28 $^{\circ}C$ 培养箱中倒置培养,2 d 后记录菌落数并拍照。

1.2.6 原生质体的制备与转化

引物 *SPL3FKpn I*、*SPL3RSal I* (引物信息见表 1)以质粒 pJG4-5::*SISPL3* 为模板,将目的基因构建到 pTEX::5 \times Flag 上,最终得到 pTEX::*SISPL3*-5 \times Flag 质粒。

取 2 片 5 周龄烟草的厚实深绿叶片,石英砂均匀地摩擦叶片背面,用水冲洗干净后,使叶背面朝下平铺于培养皿中,加入 6 mL 原生质体酶解液,于 28 $^{\circ}C$ 培养箱中避光放置 6~8 h 至叶片半透明。收集原生质体酶解液于试管中,在管壁上缓慢加入 1 mL W5 缓冲液,300g 离心 3 min;吸取中层原生质体于新试管中,加入 10 mL W5 缓冲液重悬,100g 离心 2 min;弃上清,将原生质体重悬于 2 mL W5 缓冲液中,冰上避光 1.5~2.0 h;100g 离心 1 min,将沉淀重悬于 1~2 mL MMG 缓冲液中,置于冰上。取 10 μ g pTEX::*SISPL3*-5 \times Flag 质粒与 200 μ L 原生质体混匀,加入 220 μ L PEG4000 摇匀反应 5 min;加入 1 mL W5 缓冲液终止反应,冰上静置 3 min;100g 离心 1 min,弃上清得到片状沉淀;加 1 mL W5 缓冲液重悬,100g 离心 1 min,弃上清;加 1 mL LWI 缓冲液重悬,平分至 2 个 EP 管中,室温避光 1 h;分别加 10 μ mol/L MG132 和等量 DMSO 于管盖上,颠倒混匀,室温避光 6 h;12 000g 离心 1 min,弃上清;加入 60 μ L PLB 裂解液振荡混匀,加入 15 μ L 5 \times 蛋白 loading buffer,95 $^{\circ}C$ 金属浴加热 5 min,蛋白样品用于 Western blotting 检测。

1.2.7 数据处理与分析

实时荧光定量 PCR 实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行标准化处理,所有实验数据使用 Microsoft Excel 2013、GraphPad Prism 8 进行统计学分析并作图,图中数据均以(平均值 \pm 标准差)($n=3$)表示,通过 t 检验分析显著性差异,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 *SISPL3* 与 *SINBRP1* 的相互作用

SINBRP1 蛋白包含 N 端卷曲螺旋 CC 结构

域、核苷酸结合位点 NBS 结构域、胞外/胞内富含亮氨酸重复序列 LRR 结构域,其中 LRR 结构域负责与靶向蛋白质的互作^[10]。通过 PCR 扩增得到 *SINBRP1* 的 CC-NBS 结构域和 LRR 结构域并构建到 pEG202 载体上,获得诱饵质粒 pEG202::*SINBRP1*-N 和 pEG202::*SINBRP1*-C,如图 1 所示。将其分别与猎物质粒 pJG4-5::*SISPL3* 共同转化酵母菌株 EGY48,并在营养缺陷型三缺 CM 培养基(-Ura,-His,-Trp)中筛选培养,获得的转化克隆于三缺显色 CM 培养基(X-gal,-Ura,-His,-Trp)中显色,结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出,在含有显色底物的培养基中,包含 *SISPL3* 和 *SINBRP1* 的 N 端结构域以及 *SISPL3* 和 *SINBRP1* 的 C 端结构域的转化克隆均显示蓝色,表明酵母克隆中包含的 2 个蛋白有相互作用。

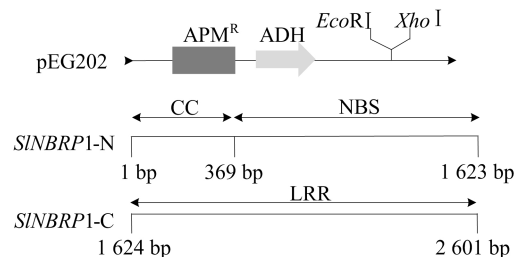


图 1 pEG202::*SINBRP1*-N/C 载体图

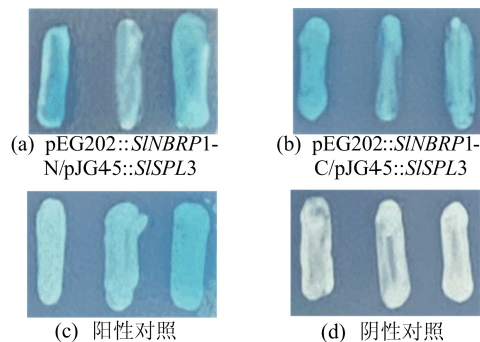


图 2 *SISPL3* 与 *SINBRP1* 在酵母中的相互作用

2.2 番茄 *SISPL3* 基因的表达模式分析

为明确 *SISPL3* 基因在各组织和果实发育过程中的表达情况,通过实时荧光定量 PCR 对野生型番茄的种子、根、茎、叶、花、不同时期果实中的 *SISPL3* 表达水平进行分析,发现 *SISPL3* 基因在所有的组织中均有表达,表现出组成型表达特性,如图 3 所示。

由图 3 可知:种子中的表达量最高,其次是茎;在果实发育阶段,随着果实成熟的进程,*SISPL3* 的表达水平逐渐升高。

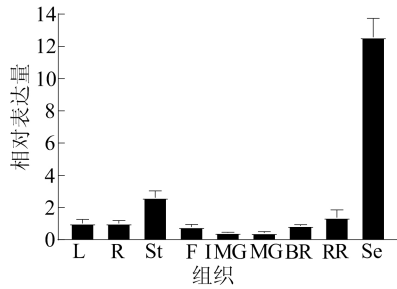


图 3 番茄不同组织 *SiSPL3* 基因的相对表达量

2.3 *SiSPL3* 基因响应病原菌和高温胁迫

为了进一步探究 *SiSPL3* 在各种胁迫中的作用功能,对 5 周龄的野生型番茄施加病原菌 *Pst* DC3000、高温、高盐、干旱胁迫处理,以探究该基因在各种胁迫条件中的响应差异。收集不同胁迫条件、不同胁迫时间的样品,采用实时荧光定量 PCR 分析 *SiSPL3* 的表达情况,如图 4 所示。由图 4 可知:*Pst* DC3000 和高温胁迫处理可以显著诱导 *SiSPL3* 基因表达量,表明 *SiSPL3* 可能参与植物耐受 *Pst* DC3000 和高温胁迫的调控;当受到高盐和干旱胁迫时,*SiSPL3* 表达量没有明显变化,基因未响应胁迫。

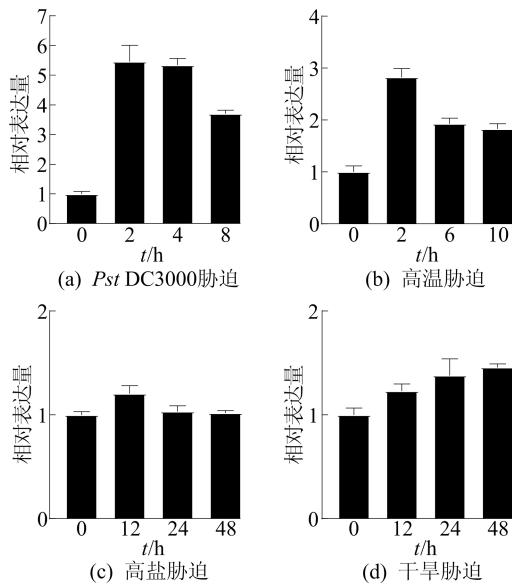


图 4 番茄 *SiSPL3* 在不同胁迫下的表达量

2.4 过表达 *SiSPL3* 对 *Pst* DC3000 的免疫应答

为了探究 *SiSPL3* 在植物响应病原菌胁迫中的作用,本文构建了 *SiSPL3* 过表达载体并利用农杆菌介导法进行番茄遗传转化,通过实时荧光定量 PCR 鉴定其 RNA 水平表达量,获得了过表达 *SiSPL3*-OE(*SiSPL3*-over-expression)和共抑制 *SiSPL3*-CS (*SiSPL3*-co-suppression)转基因

株系,结果如图 5 所示。

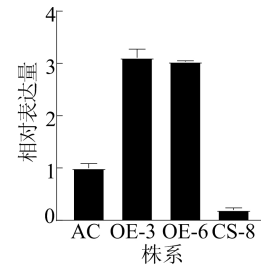


图 5 *SiSPL3* 转基因株系 RNA 水平鉴定结果

各选 3 株 5 周龄番茄株系进行 *Pst* DC3000 胁迫处理,分析不同株系对病原菌的耐受程度以及叶片菌落数,结果如图 6 所示。

由图 6a 可知,*Pst* DC3000 胁迫 6 d 时,相较于野生型和共抑制株系,过表达株系获得了很好的抗病性,没有或有极少量黄褐色病斑,而共抑制株病斑数量显著增多,抗病性大幅减弱。从图 6b 可以看出,共抑制株系叶片菌落数相较于野生型显著增多,而过表达株系叶片菌落相较于野生型明显得到抑制。表明 *SiSPL3* 协助番茄正向调控对病原菌 *Pst* DC3000 的免疫应答。

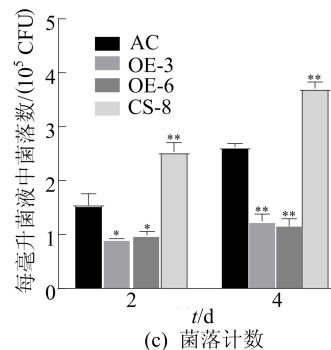
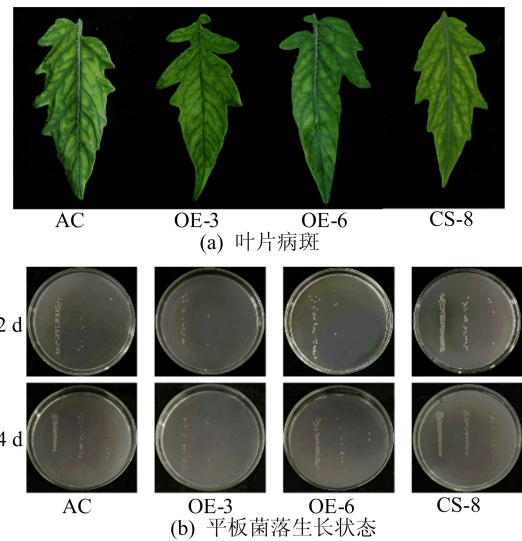


图 6 *SiSPL3* 过表达对 *Pst* DC3000 的耐受性

2.5 SISPL3 的泛素化降解实验

前期研究发现, SINBRP1 受泛素蛋白酶体调控而降解,本研究证实了 SISPL3 与 SINBRP1 存在相互作用,推测 SISPL3 也可能受到泛素化降解的调控,以实现抗病蛋白 SINBRP1 通过调控转录因子的蛋白丰度参与对抗病基因的转录重编程。构建 SISPL3-Flag 表达载体并将质粒转入烟草原生质体,表达 1 h 后将样品分成 2 等份,分别加入等量的蛋白酶体抑制剂 MG132 和溶剂 DMSO,继续避光表达 6 h 后收取样品,同时表达 GFP-Flag,作为对照蛋白。免疫印迹检测结果如图 7 所示。由图 7 可知,在加入 MG132 后,明显抑制了 SISPL3 的降解,SISPL3 蛋白丰度相比于对照 DMSO 处理显著提高,由于 MG132 是 26S 蛋白酶体抑制剂,抑制了蛋白酶体对泛素化修饰分子的降解作用,结果表明 SISPL3 是泛素化降解的底物。

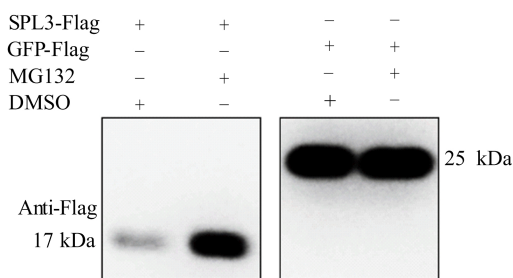


图 7 SISPL3 的泛素化降解实验结果

3 讨 论

本课题组研究发现, *SISPL3* 在番茄的各个部位普遍表达,说明它能够以多种路径调控番茄植株的生长与发育。*Pst* DC3000 和高温胁迫的施加可以诱导番茄 *SISPL3* 表达量在短时间内上升,表明 *SISPL3* 可以正向调控番茄的免疫应答能力和耐热性。研究 SINBRP1 与 SISPL3 的相互作用时发现, SINBRP1 全长蛋白并不能与 SISPL3 互作,将其分段后才能检测到,推测 SINBRP1 蛋白中负责互作的结构域由于空间结构的折叠而无法充分暴露,在两者互作过程中需要效应因子的激活,从而改变蛋白空间结构特性,以识别 SISPL3 并互作。酵母双杂交显示 SISPL3 分别与 SINBRP1 的两端结构域发生较强的相互作用,表明 SISPL3 在抗病应答过程中发挥一定的作用。

外源基因的过量表达被宿主细胞的 RNA 干

扰(RNA interfering, RNAi)机制识别后,会发生同源共抑制(homologous co-suppression)现象,即转基因自身不表达,同时还会造成与其同源的内源基因沉默^[25]。在利用农杆菌介导的 *SISPL3* 过表达转基因植株构建过程中,获得了 *SISPL3* 的过表达 *SISPL3*-OE 和共抑制 *SISPL3*-CS 转基因株系,两者对丁香假单胞菌胁迫表现出截然相反的表型, *SISPL3*-OE 的病斑数量相较于野生型显著减少,病原菌的危害得到了极大的控制,而 *SISPL3*-CS 的叶片病斑数则非常多,抗病性极差。实验结果表明, *SISPL3* 正向调控番茄的免疫应答。

SIWDR204 是 CRL4(CUL4-RING E3 ubiquitin ligase) E3 泛素连接酶复合体中的底物连接蛋白(DDB1-CUL4 associated factor, DCAF)的一种,且与 SISPL3 在细胞核内发生相互作用^[26],并且 SINBRP1 蛋白受泛素化修饰并降解^[10]。基于以上发现,本研究探索 SISPL3 的泛素化修饰调控情况,发现 SISPL3 是 E3 泛素连接酶的底物,且受到泛素化降解,表明两者通过泛素化修饰参与免疫应答调控。前期研究可知 SISPL3 属于转录因子,并定位在细胞核内^[24],而 SINBRP1 定位于细胞质中^[10],由此可推测细胞质中 SINBRP1 识别病原菌释放的效应因子后构象改变,通过核质穿梭进入细胞核内,构象变化后的 SINBRP1 暴露出与 SISPL3 结合的结构域,阻碍了 SISPL3 的泛素化降解,从而激活调控抗病相关基因的表达。酵母双杂交中 SINBRP1 全长蛋白与 SISPL3 没有相互作用,而不同结构域可与 SISPL3 互作,也从另一个角度验证了这种调控机制。

从 *SISPL3* 表达谱的结果看出, *SISPL3* 在果实发育期表达量逐渐上升,推测出 *SISPL3* 可能参与调控番茄果实的成熟机制。在不同胁迫处理后, *SISPL3* 响应病原菌和高温胁迫,而高盐和干旱胁迫对 *SISPL3* 的表达无诱导作用,表明 *SISPL3* 通过识别特定基因的调控元件来调控对不同胁迫的响应和生长发育。基于 SISPL3 的转录因子特性,能够结合到其他基因的启动子上调控基因的转录表达,也可以通过与其他转录因子或功能蛋白互作发挥作用,本研究构建了相关载体,以 SISPL3 为诱饵蛋白,探索互作蛋白和靶向调控基因,深入拓展 SISPL3 的互作网络及在胁迫应答和生长发育中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 陈苗苗,陈列忠. 植物细菌性病害及其防治措施[J]. 浙江农业科学,2022,63(8):1798-1804.
- [2] 何海芳,李静静,张泽龙,等. 我国植物病毒病及其昆虫介体研究概况[M]//魏洪义,曾菊平,夏斌. 华中昆虫研究(第16卷). 咸阳:西北农林科技大学出版社,2020:3-21.
- [3] 李雅娜. 园林植物真菌病害研究进展[J]. 北方园艺,2010(8):218-221.
- [4] SCHREIBER K J, BAUDIN M, HASSAN J A, et al. Die another day; molecular mechanisms of effector-triggered immunity elicited by type III secreted effector proteins[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2016,56:124-133.
- [5] CHISHOLM S T, COAKER G, DAY B, et al. Host-microbe interactions; shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*,2006,124(4):803-814.
- [6] 陈英,谭碧玥,黄敏仁. 植物天然免疫系统研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2012,36(1):129-136.
- [7] QI Y, TSUDA K, GLAZEBROOK J, et al. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant Pathol*,2011,12(7):702-708.
- [8] 刘云飞,万红建,韦艳萍,等. 番茄 NBS-LRR 抗病基因家族全基因组分析[J]. 核农学报,2014,28(5):790-799.
- [9] 陶小荣,朱敏. NLR 免疫受体介导的作物抗病机制:发展现状、机遇与挑战[J]. 中国科学基金,2020,34(4):423-432.
- [10] 黄曼. 番茄 *SINBRP1* 基因的克隆及抗病性研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2019.
- [11] KROPAT J, TOTTEY S, BIRKENBIHL R P, et al. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(51):18730-18735.
- [12] HE Y L, FU X Q, LI L, et al. AaSPL9 affects glandular trichomes initiation by positively regulating expression of AaHD1 in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Science*,2022,317:111172.
- [13] XIE Y, ZHOU Q, ZHAO Y, et al. FHY3 and FAR1 integrate light signals with the miR156-SPL module-mediated aging pathway to regulate *Arabidopsis* flowering[J]. *Mol Plant*,2020,13(3):483-498.
- [14] CHEN X, ZHANG Z, LIU D, et al. SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors; star players for plant growth and development[J]. *J Integr Plant Biol*,2010,52(11):946-951.
- [15] YAMASAKI K, KIGAWA T, INOUE M, et al. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors[J]. *J Mol Biol*,2004,337(1):49-63.
- [16] XU M, HU T, ZHAO J, et al. Developmental functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genet*,2016,12(8):e1006263.
- [17] GANDIKOTA M, BIRKENBIHL R P, HOHMANN S, et al. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings [J]. *Plant J*,2007,49(4):683-693.
- [18] CUI L, ZHENG F, WANG J, et al. miR156a-targeted SBP-Box transcription factor SISPL13 regulates inflorescence morphogenesis by directly activating *SFT* in tomato [J]. *Plant Biotechnol J*,2020,18(8):1670-1682.
- [19] ZHANG B, LIU X, ZHAO G, et al. Molecular characterization and expression analysis of *Triticum aestivum* squamosa-promoter binding protein-box genes involved in ear development [J]. *J Integr Plant Biol*,2014,56(6):571-581.
- [20] DONG H, YAN S, JING Y, et al. MIR156-Targeted SPL9 is phosphorylated by SnRK2s and interacts with ABI5 to enhance ABA responses in *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*,2021,12:e708573.
- [21] MA Y, XUE H, ZHANG F, et al. The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression [J]. *Plant Biotechnol J*,2021,19(2):311-323.
- [22] ZHU H, WANG J, JIANG D, et al. The miR157-SPL-CNR module acts upstream of bHLH101 to negatively regulate iron deficiency responses in tomato [J]. *J Integr Plant Biol*,2022,64(5):1059-1075.
- [23] ZHANG L L, HUANG Y Y, ZHENG Y P, et al. OsamiR535 targets SQUAMOSA promoter binding protein-like 4 to regulate blast disease resistance in rice [J]. *Plant J*,2022,110(1):166-178.
- [24] 张琳. 番茄 *SlWDR204* 基因正调控植物干旱胁迫及植株株高[D]. 合肥:合肥工业大学,2020.
- [25] 孔莹莹,蒋丽,韩凝,等. 植物转基因中同源共抑制的机制及其解决措施[J]. 生命科学,2012,24(5):399-403.
- [26] 张琳,宗宁,刘奎,等. 番茄 WD40 家族 *SlWDR204* 调控植株形态建成的功能分析[J]. 安徽农业大学学报,2021,48(1):40-45.

(责任编辑 闫杏丽)