

番茄 *AP2a* 和 *MYB12* 转录因子的克隆 及 *CYRSV* 侵染下的表达分析

李妤, 陈永对, 吴阔, 郑雪, 张仲凯*
(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所
/云南省农业生物技术重点实验室, 昆明 650205)

摘要: 番茄 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 是重要的转录因子, 但其在辣椒黄化环斑病毒 (chilli yellow ringspot orthospovirus, *CYRSV*) 侵染下的表达模式还未见研究报道。为探究 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的功能及其在 *CYRSV* 侵染下的表达响应模式, 该研究以番茄品种 ‘靓思’ 为试验材料, 通过 RNA 提取、逆转录、克隆等试验获得 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 编码序列, 并采用生物信息学方法分析 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白的功能结构域及理化性质, 同时分析蛋白的亚细胞定位, 再运用实时荧光定量 PCR 检测 *CYRSV* 侵染后 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 在叶片中的表达情况。结果表明: (1) *SLAP2a* 全长 1 206 bp, 编码 401 个氨基酸, *SIMYB12* 全长 1 017 bp, 编码 338 个氨基酸。番茄 *AP2a* 与咖啡 *AP2a* 核苷酸序列的亲缘关系最近, 而番茄 *MYB12* 与马铃薯 *MYB12* 核苷酸序列的亲缘关系最近。(2) 亚细胞定位实验发现, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白定位于细胞核和细胞膜。(3) *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达受 *CYRSV* 接种后诱导, 在接种病毒后 4、7、9 d, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达量上调, 而在 14 d 时表达量降低, 但仍高于对照组。该研究成功克隆了转录因子 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因, 并初步阐明了番茄 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子在 *CYRSV* 侵染下的表达模式。

关键词: 番茄, *AP2a*, *MYB12*, 辣椒黄化环斑病毒, 基因克隆, 表达模式
中图分类号 Q954.8 文献标识码 A

Cloning of tomato *SLAP2a* and *SIMYB12* transcription factor genes, and their expression analysis infected by chilli yellow ringspot virus (*CYRSV*)

LI Yu, CHEN Yongdui, WU Kuo, ZHENG Xue, ZHANG Zhongkai*
(Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Province Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Kunming 650205, China)

Abstract: The tomato transcription factors *SLAP2a* and *SIMYB12* are considered to play significant roles in regulatory processes; however, their expression patterns in response to chilli yellow ringspot virus (*CYRSV*) infection have not yet been documented. To investigate the

基金项目: 国家自然科学基金 (32360638); 云南省科技计划项目基础研究专项青年项目 (202301AU070121); 云南省科技计划项目基础研究专项面上项目 (202501AT070087); 云南省科技计划项目基础研究专项重大项目 (202501BC070017); 云南省种子种业联合实验室 (202205AR070001)。

第一作者: 李妤 (1990—), 博士, 助理研究员, 研究方向为植物病毒与寄主互作, (E-mail) liziyu19901211@126.com。

***通信作者:** 张仲凯, 博士, 研究员, 研究方向为植物病毒与生物技术, (E-mail) zhongkai99@sina.com。

functional roles of *SLAP2a* and *SIMYB12* and their expression response patterns during CYRSV infection, this study utilized the ‘Liangsi’ tomato as the experimental material. The coding sequences of *SLAP2a* and *SIMYB12* were obtained through experimental procedures including RNA extraction, reverse transcription, and cloning. The functional domains and physicochemical characteristics of the *SLAP2a* and *SIMYB12* proteins were analyzed using bioinformatics approaches, and their subcellular localization was also examined. Real-time fluorescence quantitative PCR was employed to quantify the expression levels of *SLAP2a* and *SIMYB12* in leaves following CYRSV infection. The results were as follows: (1) The full-length *SLAP2a* sequence was 1 206 bp, encoding 401 amino acids, whereas the full-length *SIMYB12* was 1 017 bp, encoding 338 amino acids. Phylogenetic analysis of tomato *SLAP2a* indicated a close evolutionary relationship with the coffee *AP2a* gene. Similarly, phylogenetic analysis of tomato *SIMYB12* revealed relative close relationship with the potato *MYB12* gene. (2) Subcellular localization analysis revealed that the *SLAP2a* and *SIMYB12* proteins were localized in the nucleus and cell membrane. (3) The expression levels of *SLAP2a* and *SIMYB12* were up-regulated at 4, 7, and 9 days post-inoculation (dpi), and its expression level decreased at 14 dpi, although it remained significantly higher than that in the control (CK) group. In summary, the transcription factor genes *SLAP2a* and *SIMYB12* have been successfully cloned, and this study preliminarily elucidates the expression patterns of the tomato *SLAP2a* and *SIMYB12* transcription factors during CYRSV infection.

Key words: tomato, *AP2a*, *MYB12*, chilli yellow ringspot virus (CYRSV), gene clone, expression pattern

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是茄科一年生或多年生草本植物, 主要从南美洲传入中国, 因其含有丰富的胡萝卜素等对人体有益的营养成分, 而深受广大消费者的青睐。番茄相比于其他蔬菜品种具有较高的经济收益, 因此番茄在中国面积和产量在不断地上升。自 1980 年起, 中国已成为亚洲地区最大的番茄生产国, 云南是西南地区重要的番茄种植区域 (刘玉芯, 2024)。云南元谋地区是许多蔬菜的反季节种植地, 其中番茄是元谋主栽蔬菜品种之一。在番茄的生产过程中会受到各类病害的侵扰, 其中病毒病是影响番茄产业发展的重要因素, 番茄病毒病也严重制约了当地经济的发展。辣椒黄化环斑病毒 (chilli yellow ringspot virus, CYRSV) 是一种负单链 RNA 病毒, 属于布尼亚病毒目 (Bunyavirales) 番茄斑萎病毒科 (Tospoviridae) 正番茄斑萎病毒属 (*Orthotospovirus*) 病毒, 是在 2014 年在云南红河州地区辣椒上首次发现并鉴定命名的新正番茄斑萎病毒属病毒 (Zheng et al., 2020)。番茄斑萎病毒科所属病毒是布尼亚病毒目中唯一能侵染植物的病毒。目前, CYRSV 主要侵染云南的辣椒和番茄, 对云南的蔬菜经济造成严重的损失。正番茄斑萎病毒属中的番茄斑萎病毒 (tomato spot wilt virus, TSWV) 是位居全球十大植物病毒第二名 (Scholthof et al., 2011), 而近几年 CYRSV 开始在云南省内传播蔓延, 经常与 TSWV 和番茄褐色皱纹果病毒等在番茄上复合侵染。因此, 研究 CYRSV 的侵染机制, 并找寻 CYRSV 抗性基因对 CYRSV 防控研究至关重要。

植物中存在许多种类的转录因子, 它们在植物的生长发育与代谢活动中起到至关重要的调节作用。转录因子可以广泛参与到植物生命进程中的各类生物学过程的调控之中。转录因子通过调节特定靶基因亚群的表达, 在真核生物的几乎所有发育过程中起着至关重要的作用。转录因子通常不是单独作用的, 而是与靶基因启动子区域的特定位点相互作用, 进而调控目的基因的表达。AP2 是 AP2/ERF 超家族的重要成员, 它作为植物特有的一种调控因子发挥着重要作用。AP2/ERF 超家族包含 AP2 亚家族、乙烯反应元件结合蛋白亚家族以及 RAV 亚

家族，在植物发育、乙烯反应和病原抗性等多个进程中具有重要意义。AP2/ERF 转录因子可以调节类胡萝卜素积累，APETALA2a (AP2a) 属于 AP2/ERF 家族的 AP2 亚家族。有研究显示，番茄 *SLAP2a* 基因能对果实成熟起到负调控的作用，RNAi 对 *SLAP2a* 的抑制导致果实过度产生乙烯、早熟，并通过改变类胡萝卜素途径通量来改变类胡萝卜素积累，并且 *SLAP2a* 基因可以调控 *PSY1* 基因的表达 (Chung et al., 2010)。利用转录组和代谢谱分析也表明 *SLAP2a* 是番茄果实成熟的主要调控因子 (Karlova et al., 2011)，在 *SLAP2a* 基因沉默的番茄果实中，AP2a 在催熟过程中起到一个负反馈作用。AP2a 通过介导乙烯信号通路，调节下游信号通路，进而调控类胡萝卜素合成 (Sang et al., 2022)。近年来，许多物种中的 AP2 转录因子被鉴定报道 (赵营等, 2023; 张麒功等, 2023; 赵鑫悦等, 2024 魏玲等, 2024)，AP2 转录因子在植物抗病过程中的转录调控、磷酸化翻译后修饰调控、次生代谢物合成以及激素信号传导等方面发挥着重要作用 (裴丹等, 2025)。但是，有关 AP2a 的报道却很少，关于其在植物病毒 CYRSV 侵染植株中的功能作用更是未见报道。

植物中一个较大的转录因子家族为 R2R3-MYB 家族 (Du et al., 2009)，植物 MYB 转录因子大多隶属于此家族，该家族对植物的生长发育和代谢活动有着重要的调节意义，转录因子 MYB 在植物生长发育与代谢活动的正常进行方面起到重要的调节功能，如 R2R3-MYB 转录因子参与调控苯丙烷代谢 (Qi et al., 2015)、响应生物和非生物胁迫 (Fang et al., 2017) 以及激素响应 (Yuan et al., 2013) 等。大多数植物 MYBs 属于 R2R3-MYB 亚家族 (Stracke et al., 2001)，参与了包括苯基丙酸类生物合成 (Liu et al., 2015)，组织和器官的发育 (Lee & Schiefelbein, 1999) 以及激素响应 (Jin & Martin, 1999) 等过程。在拟南芥中，密切相关的 R2R3-MYB 蛋白 MYB11、MYB12 和 MYB111 促进编码关键的黄酮醇生物合成酶基因的表达 (Stracke et al., 2010, 2017)。类黄酮不仅赋予水果和种子颜色，并有助于非生物应激反应 (Wang et al., 2016)。黄酮醇的产生需要经过连续的步骤，由查尔酮合成酶 (CHS)、查尔酮黄酮异构酶 (CHI)、黄酮 3'-羟化酶 (F3'H) 和黄酮醇合成酶 (FLS) 进行催化 (Forkmann & Martens, 2001)，而这些步骤中关键酶编码基因的调控由 MYB 转录因子负责 (Mehrtens et al., 2005)。目前，韭菜 (付桃桃等, 2025)、西番莲 (张炎书等, 2023)、百合 (杨捷等, 2018) 和烟草 (王姗姗等, 2017) 等物种中的 MYB12 被报告鉴定，MYB12 在调控植物应答病害、虫害等生物胁迫和干旱、低温、盐等非生物胁迫中起着重要作用 (关范圆等, 2024)，但关于其在植物病毒 CYRSV 侵染植株中的功能作用未见报道。

综上，AP2a 和 MYB12 是植物重要的转录因子，尤其在调控植物色素代谢调控及非生物胁迫方面发挥着重要作用，但 AP2a 和 MYB12 在病毒侵染中的作用还未可知。前期调查发现，CYRSV 侵染番茄后，番茄叶片会出现黄化，果实会出现黄化环斑、坏死斑等颜色症状，而 AP2a 和 MYB12 是重要的植物色素代谢调控转录因子，因此 AP2a 和 MYB12 转录因子在病毒侵染过程中起着重要作用，AP2a 和 MYB12 是否与病毒侵染引起的颜色症状有关，AP2a 和 MYB12 在 CYRSV 侵染下是怎样的表达模式，这些问题仍不清楚。

为了解 CYRSV 侵染番茄后的 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因的表达变化，阐明 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 在病毒侵染中的作用，本研究以番茄为研究对象，采用基因克隆、亚细胞定位等分子生物学及生物信息学分析方法，对 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因功能结构域和亚细胞定位进行分析，并在 CYRSV 侵染下对番茄中 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因的表达水平进行检测，拟探讨以下问题：(1) *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白的理化性质、功能结构特点及与其他植物的进化关系；(2) *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白的亚细胞定位情况；(3) *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因在 CYRSV 侵染下的表达模式。本研究结果为番茄 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因的功能挖掘提供理论基础，也为进一步阐明 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 在 CYRSV 侵染中的作用及其潜在分子机理奠定前期基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

供试番茄品种‘靓思’材料在人工气候室中种植，培养至 6~8 叶期，用于 CYRSV 接种试验。CYRSV 病毒株由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所植物病毒团队保存。

1.2 基因克隆

根据番茄 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的基因序列信息，引物由上海生工生物工程股份有限公司合成并提供。番茄总 RNA 提取按照湖南艾科瑞生物工程有限公司所提供的 SteadyPure Plant RNA Extraction Kit (AG21019) 试剂盒说明书操作，并利用反转录试剂盒 (AG11711, 湖南艾科瑞生物工程有限公司, 长沙) 合成 cDNA。利用引物对所合成的 cDNA 进行 PCR 操作，反应体系：2×Taq mix 12.5 μL；Forward primer (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL；Reverse primer (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL；cDNA 2 μL；ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应步骤：94 °C 预变性 30 s；98 °C 变性 10 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1.5 min，35 个循环；72 °C 彻底延伸 2 min，4 °C 保存。引物序列如下：*SLAP2a*-F: 5'-ATGTGGAATTTAAATGATTCCTCC-3'，*SLAP2a*-R: TCAAGGTCTCATAAAATAATGATG-3'；*SIMYB12*-F: 5'-ATGGGAAGAACACCTTGTGTG-3'，*SIMYB12*-R: 5'-CTAAGACAAAAGCCAAGATACAATG-3'。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，目的片段被割胶回收用于下一步克隆。克隆用试剂盒为 pMD™18-T Vector Cloning Kit (6011, Takara, 大连)，依照说明书把纯化后的片段与 pMD™18-T 载体相连接，接着用热激法将其转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。在经过菌液 PCR 鉴定后，挑取阳性单克隆送到上海生工生物工程股份有限公司测序，从而得到 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因序列。

1.3 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因的生物信息学分析

借助 ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具对番茄 AP2a 和 MYB12 蛋白的分子量、理论等电点以及亲水性等理化性质展开分析。利用软件 MEGA 5.0 对与 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 同源的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、大豆 (*Glycine max*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、咖啡 (*Coffea arabica*) 等植物的核酸序列进行多序列比对，比对结果采用邻接法 (Neighbor-joining)，选择 Bootstrap method 检验，重复 1 000 次，用于构建系统发育树。

1.4 AP2a 和 MYB12 蛋白的亚细胞定位实验

将 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的 T 克隆载体分别用 *Bam*HI/*Sa*II 和 *Bam*HI/*Hind*III 进行双酶切，同时 pCAMBIA1303-*mGFP* 载体也分别用 *Bam*HI/*Sa*II 和 *Bam*HI/*Hind*III 进行双酶切，在琼脂糖凝胶电泳上检测确定将载体都切开后进行胶回收实验，随后用 T4 连接酶将 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 胶回收产物分别与胶回收后的 pCAMBIA1303-*mGFP* 载体进行连接，最终构建 pCAMBIA1303-*mGFP*: *SLAP2a* 和 pCAMBIA1303-*mGFP*: *SIMYB12* 表达载体。利用液氮速溶法将 pCAMBIA1303-*mGFP*: *SLAP2a*、pCAMBIA1303-*mGFP*: *SIMYB12* 载体和 pCAMBIA1303-*mGFP* 空载体转入农杆菌 GV3101 中，将新鲜培养的含有 pCAMBIA1303-*mGFP*: *SLAP2a*、pCAMBIA1303-*mGFP*: *SIMYB12* 载体和 pCAMBIA1303-*mGFP* 空载体的 GV3101 农杆菌菌液在室温 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，随后除去上清液保留沉淀，在沉淀中加入现配的侵染缓冲液 (100 mL 无菌双蒸水中加入 100 μL 浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的乙酰丁香酮、50 μL 浓度为 500 mmol·L⁻¹ 的 MES、1 mL 浓度为 1 mol·L⁻¹ 的 MgCl₂)，调整其 OD₆₀₀ = 0.6-1.0，28 °C 静置 6~8 h 后接种至 5~6 叶期健康的本氏烟叶片，接种时先用无菌注射器针头轻轻刺叶片下表皮，随后用去除针头的无菌注射器吸取合适的侵染液，将注射器轻轻接触下表皮针孔处，慢慢推进注射器，推入大约 100 μL 侵染液即可。

实验设置 3 次生物学重复, 每次每组注射侵染 5 株本氏烟草, 每株烟注射侵染 3 片叶, 每片叶 1 个浸润点。处理后的本氏烟草正常培养 48~72 h 之后进行制片, 把制好的片子放在激光共聚焦显微镜 488 nm 激发光下, 对本氏烟草注射叶片中目的蛋白于明、暗视野下的定位情况进行观察。

1.5 CYRSV 侵染后 *SLAP2a*, *SIMYB12* 的表达模式分析

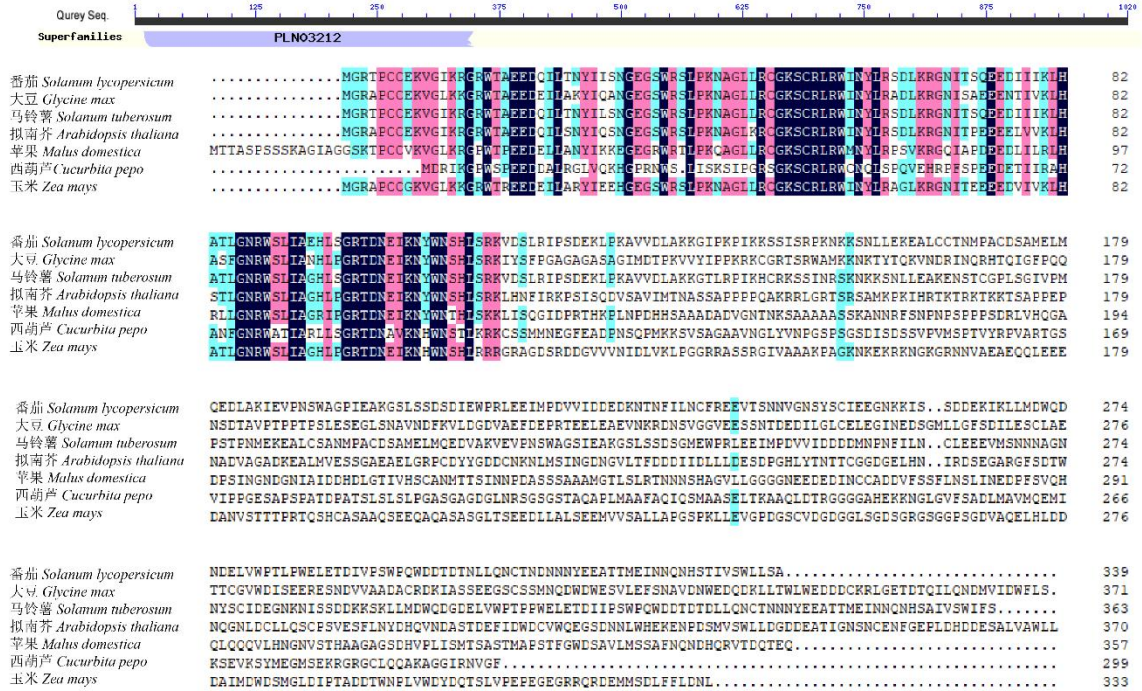
本研究用对 CYRSV 病毒易感的番茄品种 ‘靓思’ 为试验材料。将毒源从冰箱拿出, 在接种缓冲液中研磨均匀后, 接种到 7~8 叶期番茄叶片上, 取接种后 4、7、9、14 d 的植株系统叶片样品, 以对应的接种缓冲液样本为对照 (CK), 每个时期的样本设 3 个生物学重复, 开展 qPCR 检测。依据湖南艾科瑞生物工程股份有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒 (AG21019, 湖南艾科瑞生物工程股份有限公司, 长沙) 说明书对各组系统叶片样本进行总 RNA 提取。以 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子的基因序列设计 qPCR 引物: CYRSV-N-F: 5'-GCGGTACTGCAGATGTTGAA-3', CYRSV-N-R: 5'-GGTCCAATCTTCTGGTCCAA-3'; *SLAP2a*-F: 5'-AGTGGGGAACAAAATTGACG-3', *SLAP2a*-R: 5'-TGCTGCATGTGCTGTATCAA-3'; *SIMYB12*-F: 5'-GCCAGCTTGTGATAGTGCCAT-3', *SIMYB12*-R: 5'-AAGGCTTCCCTTGGCCTCTA-3'; 内参基因选用 β -*ACTIN*, β -*ACTIN*-F: 5'-CCTCAGCACATTCCAGCAG-3', β -*ACTIN*-R: 5'-CCACCAAACCTTCTCCATCCC-3'。荧光定量所用仪器为 ABI QuantStudio 6 型荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国), 试剂使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (AG11718, 湖南艾科瑞生物工程股份有限公司, 长沙), qPCR 反应体系: 2×Taq (SYBR) mix 5 μ L; Forward primer (10 μ M) 0.5 μ L; Reverse primer (10 μ M) 0.5 μ L; cDNA 1 μ L; ddH₂O 3 μ L。qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式对基因相对表达量予以计算, 分析 CYRSV 病毒侵染后 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达变化情况。

2 结果与分析

2.1 番茄 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因克隆

SLAP2a 和 *SIMYB12* 基因的 PCR 产物电泳检测结果分别得到大小为 1 206 bp 和 1 017 bp 的单一特异性条带 (图 1)。*SLAP2a* 包含 1 个 ORF, 编码 401 个氨基酸; *SIMYB12* 包含 1 个 ORF, 编码 338 个氨基酸 (图 2)。根据 ProtParam 在线工具预测结果表明, *SLAP2a* 蛋白的理论等电点为 8.15, 分子量为 44.91 kDa, 不稳定系数为 48.46, 脂肪系数为 56.68, 平均亲水性系数为 -0.873。*SIMYB12* 蛋白的理论等电点为 4.99, 分子量为 38.57 kDa, 不稳定系数为 46.23, 脂肪系数为 82.22, 平均亲水性系数为 -0.692。结果表明, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白均属于不稳定的亲水性蛋白。

SIMYB12



黑色阴影表示保守性为 100%；粉色阴影表示保守性为 75%；蓝色阴影表示保守性为 50%。

The black shading indicates 100% conservation; the pink shadow indicates a conservation of 75%; the blue shadow indicates a conservation of 50%.

图 4 SIMYB12 的保守结构域与多种植物多序列比对分析

Fig. 4 Conservation domain and multiple sequence alignment analysis of SIMYB12 in various plants

2.3 SIAP2a 和 SIMYB12 基因的系统发育和多序列比对分析

选取与番茄 *AP2a*、*MYB12* 基因同源的植物核酸序列构建进化树。结果发现，番茄 *AP2a* 与咖啡 *AP2a* 的核酸同源性最高，属于同一分支，亲缘关系近；与拟南芥、欧洲油菜的 *AP2a* 亲缘关系较近；与苹果、大豆、烟草的 *AP2a* 亲缘关系较远（图 5）。番茄 *MYB12* 与马铃薯 *MYB12* 的核酸同源性最高，属于同一分支，亲缘关系近；与芹菜 *MYB12* 的亲缘关系较近，而与花椒、西葫芦、苹果 *MYB12* 的亲缘关系较远（图 5）。

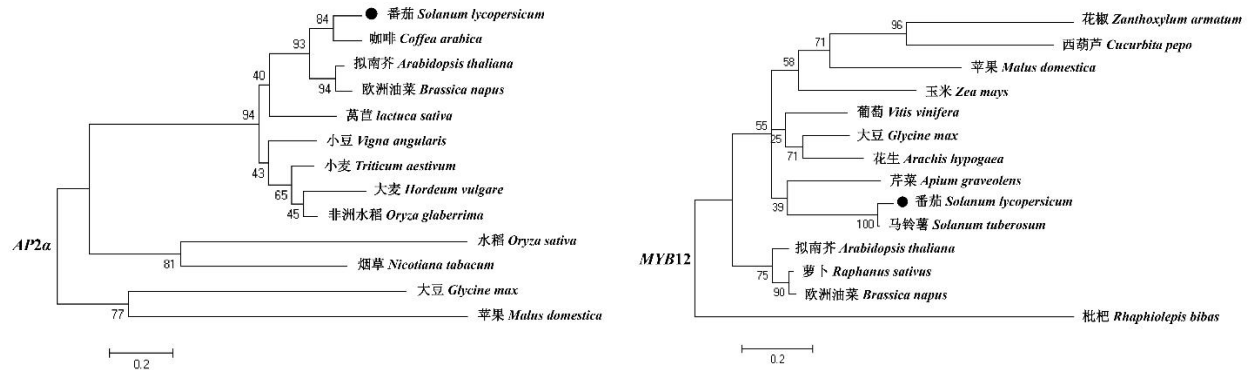


图 5 番茄与其他植物 *AP2a*、*MYB12* 基因的系统进化分析

Fig. 5 The phylogenetic analysis of *AP2a*, *MYB12* gene in tomato and other plants

2.4 SIAP2a 和 SIMYB12 蛋白的亚细胞定位分析

为探究 SIAP2a 和 SIMYB12 蛋白在细胞内的定位情况，采用 GV3101 农杆菌介导的接种法将 pCAMBIA1303-*mGFP: SIAP2a*、pCAMBIA1303-*mGFP: SIMYB12* 载体及 pCAMBIA1303-*mGFP* 空载体分别注入本氏烟叶片。在 48~72 h 后，从叶片下表皮细胞取材，再用激光共聚焦显微镜进行观察。结果图 6 显示，pCAMBIA1303-*mGFP* 对照组中细胞内存在非特异性的绿色荧光信号，而 pCAMBIA1303-*mGFP: SIAP2a*、pCAMBIA1303-*mGFP: SIMYB12* 实验组在细胞膜和细胞核上都展现了明确的绿色荧光信号，在本氏烟草叶片表皮细胞的细胞膜与细胞核中均发现了明显的绿色荧光，说明 SIAP2a、SIMYB12 蛋白属于细胞膜和细胞核定位蛋白。

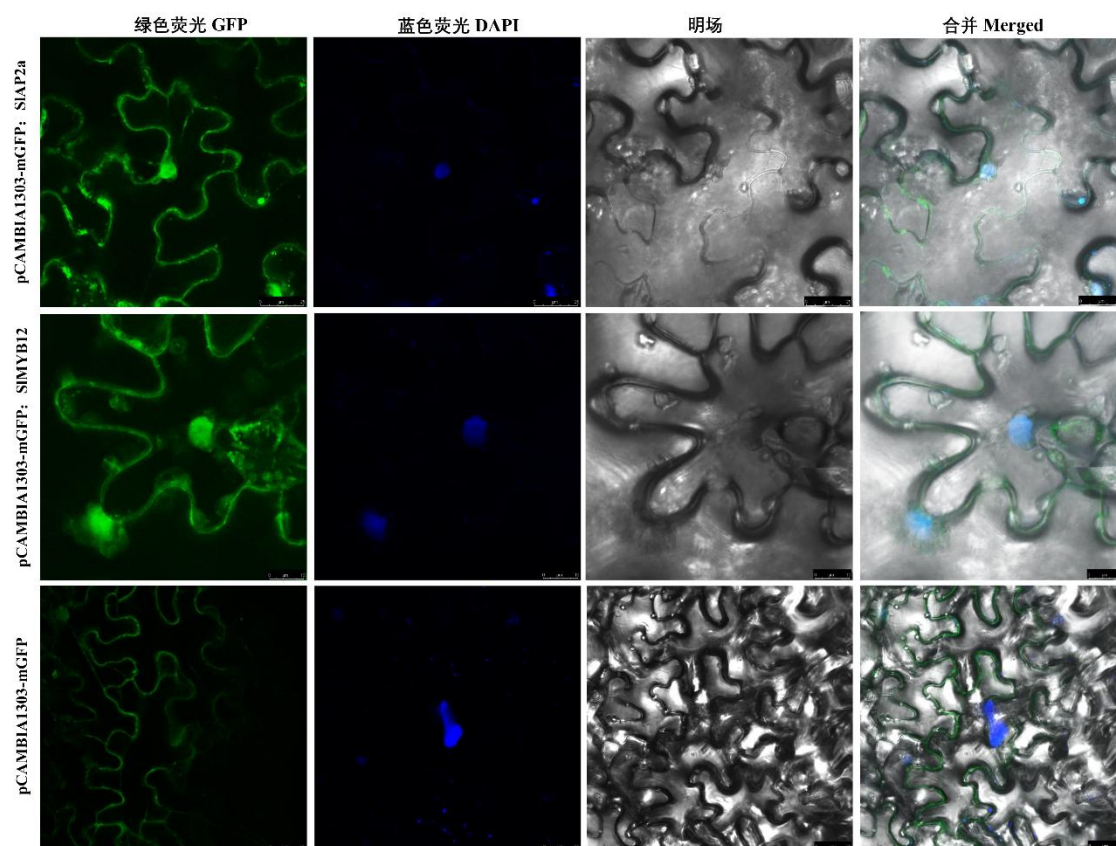
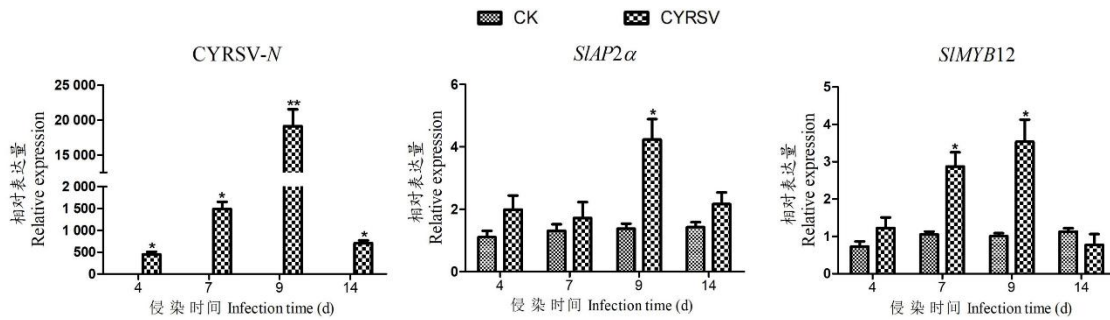


图 6 SIAP2a 和 SIMYB12 在本氏烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of SIAP2a and SIMYB12 in *Nicotiana benthamiana* epidermal leaves

2.5 CYRSV 侵染后 SIAP2a 和 SIMYB12 的表达分析

使用实时荧光定量 PCR 检测 *SIAP2a* 和 *SIMYB12* 基因在 CYRSV 侵染下的相对表达量。如图 7 所示，CYRSV 侵染‘靓思’品种番茄苗后，系统叶片中 CYRSV 的表达量在 9 d 达到最大值，之后在 14 d 降低。同时，系统叶片中 *SIAP2a*、*SIMYB12* 基因的表达量逐渐升高，也在 9 d 达到峰值，在 14 d 表达量降低（图 7）。结果表明，*SIAP2a* 和 *SIMYB12* 基因能随着病毒量的变化而变化，CYRSV 侵染过程中 *SIAP2a* 和 *SIMYB12* 基因可能发挥着重要作用。



使用 Graphpad prism 5.0 软件进行作图，学生 T 检验进行统计学分析。与对应的对照相比，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ 。

Graphpad prism 5.0 software was used for graphing, Student's t-test was used for statistical analysis. Compared with the corresponding control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

图 7 CYRSV 侵染下 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *SLAP2a* and *SIMYB12* under CYRSV infection

3 讨论

AP2/ERF超家族中的重要成员AP2亚家族，是植物特有的转录因子家族，在植物发育、乙烯反应和病原抗性等多个过程中发挥重要作用（张麒等，2018）。番茄*AP2a*基因的表达变化会改变类胡萝卜素积累，进而对果实成熟起着负调控的作用（Chung et al., 2010）。*SLAP2a*作为AP2/ERF超家族成员之一，其相关研究主要集中在过程成熟及调控果实中类胡萝卜素合成代谢途径方面，而关于*AP2a*在番茄抗病中的相关研究也甚少。本研究克隆和分析*AP2a*基因，番茄*AP2a*基因CDS全长1 206 bp，编码401个氨基酸，而草莓APETALA2同源基因CDS有1 820 bp，编码435个氨基酸（宿红艳等，2005）；红花玉兰*AP2*基因CDS有1 638 bp，编码545个氨基酸（马江，2020）；木本油料文冠果*AP2*基因CDS有1 548 bp，编码515个氨基酸（刘晓辉等，2018）；甜芥*AP2*基因CDS有1 374 bp，编码453个氨基酸（张柯彬等，2017）；芍药*AP2*基因CDS有1 578 bp，编码525个氨基酸（吴彦庆等，2017），这些都表明不同物种之间的*AP2a*基因存在差异。*SLAP2a*蛋白属于不稳定的亲水性蛋白，结构域分析发现其包含了AP2结构域，隶属于AP2超家族，不同物种之间的*SLAP2a*蛋白结构域保守，而不同物种间的序列差异大，主要集中于蛋白结构的碳末端附近。

*MYB12*可调控类黄酮合成代谢途径，高温可通过上调*MYB12*阳性调节因子提高亚洲杂交百合花青素色素的合成（Yamagishi, 2022）。因此，对植物*MYB12*转录因子进行克隆和功能研究，有助于探索其在植物生长发育、物质代谢、非生物胁迫，以及生物胁迫等方面的功能作用，而有关*MYB12*在生物胁迫方面，尤其是在病毒侵染上的研究报道很少。番茄*MYB12*基因相关报道甚少，本文克隆的*SIMYB12*全长1 017 bp，编码338个氨基酸，而苹果（周兰等，2017）、烟草（王姗姗等，2017）和草莓（陈静等，2015）中*MYB12*基因的CDS全长分别是1 042 bp、1 248 bp和855 bp，这表明不同物种植物之间*MYB12*基因的差异大。*SIMYB12*蛋白属于不稳定的亲水性蛋白，其结构域分析发现包含了PLN03091结构域，不同物种之间的*SIMYB12*蛋白结构域保守，不同物种间的序列差异大，主要集中于蛋白结构的碳末端附近。

番茄作为重要的蔬果，在农业生产过程中，其生长与产量受病原微生物侵染的影响很大。*AP2a*和*MYB12*是重要的色素代谢调控因子（Allan et al., 2008; 樊宝莲等，2021; Dang et al., 2021），前期田间调查发现CYRSV侵染番茄后，会导致番茄果实出现黄化环斑，白化斑等颜色变化，果实颜色的变化与果实色素合成代谢之间存在重要的联系，而*AP2a*和*MYB12*

基因与果实色素代谢密切相关。因此, *AP2a* 和 *MYB12* 在 CYRSV 侵染过程中可能发挥某些功能作用。研究植物 *AP2a* 和 *MYB12* 转录因子与病原物(病毒)的互作对植物抗病毒分子育种, 以及深入了解转录因子与病毒蛋白互作机制具有重要作用。

CYRSV 侵染番茄后 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子的表达趋势未见研究, 本研究对 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子进行了克隆, 并使用双酶切方法构建 pCAMBIA1303-*mGFP::SLAP2a* 及 pCAMBIA1303-*mGFP::SIMYB12* 融合表达载体。亚细胞定位结果发现, 番茄 *AP2a* 和 *MYB12* 蛋白在细胞核和细胞膜均有定位, 这与马江(2020), 贺威智等(2023)及史建磊等(2025)研究中展现的 *AP2*, *MYB12* 蛋白主要定位在细胞核的结果基本符合。CYRSV 侵染‘靓思’品种番茄后, RT-qPCR 检测不同时间点 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达情况, 发现接种后 9 d *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达量达到高峰, 而在接种后 14 d 表达量下降。结果发现 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 变化趋势与 CYRSV 病毒的表达量变化基本一致, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因能随着病毒量的变化而变化, 因此 CYRSV 侵染过程中 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因发挥着重要作用。王丽平等(2024)研究证实, 玉米 *MYB12* 基因在非生物胁迫下表达被明显诱导, 其结果提示 *MYB12* 调控玉米干旱抗性并响应低磷胁迫, 能帮助玉米抵抗此胁迫。本研究显示, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因在 CYRSV 侵染后 9 d 被显著诱导, 说明 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因可能参与调控番茄 CYRSV 抗性。未来将需要更多的实验来证明 CYRSV 在番茄中的积累水平与 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子的表达量之间的相关性, CYRSV 诱导了 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的表达, *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 转录因子在番茄响应 CYRSV 胁迫过程中发挥的具体功能作用及作用机理也需要进一步实验证明。本研究对番茄 *AP2a* 和 *MYB12* 基因进行了克隆, 并在病毒侵染过程中对它们的表达模式进行了分析, 这进一步拓宽了 *AP2a* 和 *MYB12* 基因在植株中的功能作用。

综上所述, 本研究成功克隆了番茄转录因子 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的编码区, 揭示了 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 蛋白均属于不稳定的亲水性蛋白, 它们的功能结构域序列比较保守, 但蛋白结构的碳末端附近突变较大, 因此不同物种间 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因序列差异较大; 明确了 *AP2a* 和 *MYB12* 蛋白在细胞核和细胞膜均有定位; 并揭示了 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因在 CYRSV 侵染后被显著诱导, 因此推测 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 基因可能参与调控番茄 CYRSV 抗性。本研究结果从与病毒侵染的关系上丰富了转录因子 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 的功能研究, 为进一步研究转录因子 *SLAP2a* 和 *SIMYB12* 在 CYRSV 侵染番茄过程中的功能提供理论依据。

参考文献:

- ALLAB AC, HELLENS RP, LAING WA, 2008. MYB transcription factors that colour our fruit [J]. *Trends in Plant Science*, 13 (3): 99-102.
- CHEN J, HU YH, ZHANG XX, et al., 2015. Cloning and protein property analysis of the transcription factor *MYB12* gene in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 42 (2): 268-271. [陈静, 胡亚会, 张享享, 等, 2015. 森林草莓转录因子 *MYB12* 基因克隆及蛋白特性分析 [J]. *安徽农业大学学报*, 42 (2): 268-271.]
- CHUANG MY, VREBALOV J, ALBA R, et al., 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SLAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening [J]. *The Plant Journal*, 64 (6): 936-947.
- DANG QY, Sha HY, NIE JY, et al., 2021. An apple (*Malus domestica*) *AP2/ERF* transcription factor modulates carotenoid accumulation [J]. *Horticulture Research*, 8 (1): 223.
- DU H, ZHANG L, LIU L, et al., 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family [J]. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74 (1): 1-11.

- FAN BL, WANG XY, 2021. Research progress of transcription factors regulating carotenoid synthesis pathway in plant [J]. *Molecular Plant Breeding*, 19 (13): 4401-4408. [樊宝莲, 王晓云, 2021. 转录因子调控植物类胡萝卜素合成途径的研究进展[J]. 分子植物育种, 19 (13): 4401-4408.]
- FANG Q, JIANG TZ, XU LX, et al., 2017. A salt-stress-regulator from the poplar R2R3 MYB family integrates the regulation of lateral root emergence and ABA signaling to mediate salt stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114 (2017): 100-110.
- FORKMANN G, MARTENS S, 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2): 155-160.
- FU TT, WANG XY, MAA AC, et al., 2025. Cloning, expression and functional analysis of *MYB12* gene in *Allium tuberosum* [J]. *China Vegetables* (4): 80-86. [付桃桃, 王雪莹, 马爱锄, 等, 2025. 韭菜 *MYB12* 基因克隆、表达及功能分析[J]. 中国蔬菜 (4): 80-86.]
- GUAN FY, ZHENG YY, MI XY, et al., 2024. Research advance of the functions of R2R3-MYB transcription factors in plant response to biotic and abiotic stresses [J]. *Plant Medicine*, 3 (3): 1-9. [关范圆, 郑语嫣, 米芯雨, 等, 2024. R2R3 型 MYB 转录因子调控植物胁迫应答的研究进展[J]. 植物医学, 3 (3): 1-9.]
- HE WZ, LEI WQ, GUO XX, et al., 2023. Identification of the MYB gene family and functional analysis of key genes related to blue flower coloration in *Agapanthus praecox* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 50 (6): 1255-1268. [贺威智, 雷伟奇, 郭祥鑫, 等, 2023. 百子莲 MYB 家族鉴定及蓝色形成关键基因功能分析[J]. 园艺学报, 50 (6): 1255-1268.]
- JIN H, MARTIN C, 1999. Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 41 (5): 577-585.
- KARLOVA R, ROSIN FM, BUSSCHER-LANGE J, et al., 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that *APETALA2a* is a major regulator of tomato fruit ripening [J]. *The Plant Cell*, 23 (3): 923-941.
- LEE MM, SCHIEFELBEIN J, 1999. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning [J]. *Cell*, 99 (5): 473-483.
- LIU J, OSBOURN A, MA P, 2015. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Molecular Plant*, 8 (5): 689-708.
- LIU XH, MA JY, LUO Y, et al., 2018. Full-length cDNA sequence and bioinformatics analysis of *APETALA2* gene in *Xanthoceras sorbifolium*, a woody oil crop [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, (2): 145-146. [刘晓辉, 马静怡, 罗媛, 等, 2018. 木本油料文冠果 *APETALA2* 基因全长 cDNA 序列与生物信息学分析[J]. 现代农业科技, (2): 145-146.]
- LIU YX, 2024. Research on the international competitiveness and trade potential of China's tomato products [D]. Changchun: Jilin Agricultural University: 11. [刘玉芯. 2024. 中国番茄类产品出口国际竞争力及贸易潜力的研究[D]. 长春: 吉林农业大学: 11]
- MA J, 2020. Cloning and functional analysis of *MawuAP2* and its protein interaction-related genes in *Magnolia denudate* [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 74. [马江, 2020. 红花玉兰 *MawuAP2* 及其蛋白互作相关基因的克隆与功能分析[D]. 北京: 北京林业大学: 74.]

- MASUMI Y, 2022. High temperature enhances anthocyanin coloration in Asiatic hybrid lily flowers via upregulation of the MYB12 positive regulator [J]. Horticultural Plant Journal, 8 (6) : 769-776.
- MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, et al., 2005. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. Plant Physiology, 138 (2) : 1083-1096.
- PEI D, SHANG QQ, LI JQ, et al., 2025. Progress on AP2/ERF transcription factor in regulating plant disease [J/OL]. Acta Phytopathologica Sinica: 1-16 [2025-09-04]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001671>. [裴丹, 尚俏俏, 李佳琦, 等, 2025. AP2/ERF 转录因子介导植物抗病反应研究进展 [J/OL]. 植物病理学报: 1-16 [2025-09-04]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001671>.]
- QI L J, YANG J, YUAN Y, et al., 2015. Overexpression of two *R2R3-MYB* genes from *Scutellaria baicalensis* induces phenylpropanoid accumulation and enhances oxidative stress resistance in transgenic tobacco [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 94 (2015): 235-243.
- SANG KQ, LI JJ, QIAN XJ, et al., 2011. The APETALA2a/DWARF/BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 module contributes to carotenoid synthesis in tomato fruits [J]. The Plant Journal, 112 (5) : 1238-1251.
- SCHOLTHOF KB, ADKINS S, CZOSNEK H, et al., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 12 (9) : 938-954.
- SHI JL, HUANG SY, CHEN XZ, et al., 2025. Re-identification of AP2/ERF transcription factors in search for disease resistance-related genes in tomato plant [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 40 (2): 113-122. [史建磊, 黄少勇, 陈先知, 等, 2025. 番茄 APETALA2 乙烯响应因子重鉴定及抗逆相关基因筛选 [J]. 福建农业学报, 40 (2) : 113-122.]
- STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B, 2001. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Current Opinion in Plant Biology, 4 (5): 447-456.
- STRACKE R, JAHNS O, KECK M, et al., 2010. Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation [J]. New Phytologist, 188 (4): 985-1000.
- STRACKE R, TURGUT-KARA N, WEISSHAAR B, 2017. The AtMYB12 activation domain maps to a short C-terminal region of the transcription factor [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences, 72 (7/8): 251-257.
- SU HY, ZHOU SM, WANG L, et al., 2005. Cloning and expression analysis of forest strawberry *APETALA2* gene [J]. Acta Botanica Sinica of Northwest China, 25 (10): 1937-1942. [宿红艳, 周盛梅, 王磊, 等, 2005. 草莓 *APETALA2* 同源基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 25 (10) : 1937-1942.]
- WANG F, KONG W, WONG G, et al., 2016. *AtMYB12* regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 291 (4): 1545-1559.
- WANG LP, WANG XY, FU JY, et al., 2024. Functional identification of Maize transcription factor ZmMYB12 in enhancing plant drought resistance and low phosphorus tolerance [J]. Acta Agronomica Sinica, 50 (1): 76-88. [王丽平, 王晓钰, 傅竞也, 等, 2024. 玉米转录

- 因子 ZmMYB12 提高植物抗旱性和低磷耐受性的功能鉴定[J]. 作物学报, 50 (1) : 76-88.]
- WANG SS, ZHAO YY, LI CJ, et al., Cloning and expression analysis of transcription factor MYB12 from *Nicotiana tabacum* [J]. Tobacco Science and Technology, 50 (8): 1-9. [王姗姗, 赵影影, 李超杰, 等, 2017. 烟草转录因子 MYB12 基因克隆及表达模式分析[J]. 烟草科技, 50 (8) : 1-9.]
- WEI L, KOU MR, LI W, 2024. Cloning and expression analysis of *MiERF2*, an AP2/ERF transcription factor in Mango [J]. Journal of Tropical Crops, 45 (1): 1-9. [魏玲, 寇明睿, 李雯. 芒果 AP2/ERF 转录因子 *MiERF2* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带作物学, 45(1): 1-9.]
- WU YQ, CHENG ML, ZHAO DQ, et al., 2017. Cloning and bioinformatics analysis of APETALA2 (AP2) in *Paeonia lactiflora* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 32 (3): 58-64. [吴彦庆, 成梦琳, 赵大球, 等, 2017. 芍药分生组织决定基因 APETALA2(AP2) 的克隆及生物信息学分析[J]. 华北农学报, 32 (3) : 58-64.]
- YANG J, ZHANG X, PENG MD, et al., 2018. Cloning and expression analysis of MYB12 in *Lilium* oriental hybrid 'Sorbonne' [J]. Plant Science Journal, 36(6): 812-816 + 818-823 + 817. [杨捷, 张星, 彭梦笛, 等, 2018. 百合转录因子 MYB12 的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 36 (6) : 812-816+818-823+817.]
- YUAN Y, WU C, LIU YJ, et al., 2013. The *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB transcription factors modulates flavonoid biosynthesis by regulating GA metabolism in transgenic tobacco plants [J]. PLoS One, 8 (10): e77275.
- ZHANG KB, CHEN BQ, LIU ZX, 2017. Cloning and expression analysis of the *FaesAP2* gene from *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) [J]. Plant Science Journal 35 (3): 354-361. [张柯彬, 陈炳全, 刘志雄, 2017. 甜荞 *FaesAP2* 基因的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 35 (3) : 354-361.]
- ZHANG Q, CHEN J, LI L, et al., 2018. Research progress on plant AP2/ERF transcription factor family [J]. Biotechnology Bulletin, 34 (8): 1-7. [张麒, 陈静, 李俐, 等, 2018. 植物 AP2/ERF 转录因子家族的研究进展[J]. 生物技术通报, 34 (8) : 1-7.]
- ZHANG QG, LI XQ, YE ZL, et al., 2023. Identification of AP2 gene family in *Gardenia jasminoides* and its expression analysis under salt stress [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 52 (4): 457-465. [张麒功, 林协全, 叶泽霖, 等, 2023. 栀子 AP2 基因家族成员鉴定及其在盐胁迫下的表达模式[J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 52 (4) : 457-465.]
- ZHANG Y, ZHOU HW, WEI Q, et al., 2023. Cloning and expression analysis of *PeMYB12* gene from Passion fruit (*Passiflora edulis*)[J]. Molecular Plant Breeding, 21 (18) : 5937-5946. [张炎书, 周红武, 魏卿, 等, 2023. 西番莲 *PeMYB12* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 21 (18) : 5937-5946.]
- ZHAO XY, XIE JH, WANG T, et al., 2024. Identification and analysis of AP2 subfamily transcription factors in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. Journal of Fruit Science, 41 (8): 1490-1503. [赵鑫悦, 谢婧衢, 王天, 等, 2024. 甜橙 AP2 亚家族转录因子的鉴定与分析[J]. 果树学报, 41 (8) : 1490-1503.]
- ZHAO Y, LIU WG, LI SG, et al., 2023. Bioinformatics and expression analysis of 15 potato AP2/ERF transcription factors [J]. Molecular Plant Breeding, 21 (9): 2806-2815. [赵营, 刘

- 维刚, 李世贵, 等, 2023. 15 个马铃薯 AP2/ERF 转录因子的生物信息学与表达分析[J]. 分子植物育种, 21 (9) : 2806-2815.]
- ZHENG KY, CHEN TC, WU K, et al., 2020. Characterization of a new *orthospovirus* from chilli pepper in Yunnan province, China [J]. *Plant Disease*, 104 (4): 1175-1182.
- ZHOU L, ZHANG LY, PIAO YZ, et al., 2017. Cloning and bioinformatics analysis of *MYB12* gene in apple [J]. *Agricultural Science Journal of Yanbian University*, 39 (2): 15-22. [周兰, 张利义, 朴永振, 等, 2017. 苹果 *MYB12* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 延边大学农学学报, 39] (2) : 15-22.]