

转录因子 SIBEL1/2/11 在番茄果实成熟中的功能研究

刘诗颖, 张梦卓, 许兴蝶, 陈亚妹, 孟兰环*

海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228

摘要: 番茄成熟过程涉及色泽转变、质地软化及风味物质积累等关键农艺性状的协同调控, 其分子机制解析不仅是采后生物学的核心目标, 更是实现果实品质改良与贮藏期精准调控的重要基础。本研究通过多维度实验解析番茄转录因子 BEL 家族成员 SIBEL1、SIBEL2 和 SIBEL11 的功能, 系统进化分析与氨基酸序列比对结果表明, SIBEL1/2/11 具有高度保守的蛋白结构域, 提示其存在潜在功能相似性。时空表达模式分析结果显示, 三者在果实成熟关键阶段(破色期至完熟期)呈现同步高表达。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术获得 *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 的单基因及三基因共编辑株系, 单基因编辑株系 CR-*SIBEL1*、CR-*SIBEL2*、CR-*SIBEL11* 均出现果实成熟延迟表型, 而三基因同时编辑的株系则导致植株生殖发育异常, 无法完成开花结实。此外, 逆转录实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *SIBEL1/2/11* 基因影响多个番茄成熟相关基因的表达。上述结果共同表明, SIBEL1/2/11 存在功能冗余, 协同调控番茄果实成熟进程。该研究为番茄果实成熟期的遗传改良发掘了新靶点。

关键词: 番茄; SIBEL; 果实成熟; 基因编辑; 基因功能冗余

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

Functions of Transcription Factors SIBEL1/2/11 in Tomato Fruit Ripening

LIU Shiyong, ZHANG Mengzhuo, XU Xingdie, CHEN Yamei, MENG Lanhuan*

School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Tomato ripening involves the coordinated regulation of key agronomic traits such as color transformation, texture softening, and flavor compound accumulation. Elucidating its molecular mechanisms is not only a central goal in postharvest biology but also crucial for improving fruit quality and achieving precise control of storage duration. In this study, the functions of SIBEL1, SIBEL2 and SIBEL11, members of the BEL family of transcription factors in tomato, were systematically investigated through multi-dimensional experiments. Phylogenetic and amino acid sequence alignment analyses revealed that SIBEL1, SIBEL2 and SIBEL11 possessed highly conserved protein domains, suggesting potential functional similarities. Spatiotemporal expression profiling showed that the genes were synchronously highly expressed during critical stages of fruit ripening, from the breaker to the full ripening stage. Using CRISPR-Cas9 technology, single-gene and triple-gene editing lines of *SIBEL1*, *SIBEL2* and *SIBEL11* were generated. The single-gene editing lines CR-*SIBEL1*, CR-*SIBEL2* and CR-*SIBEL11* all exhibited a delayed fruit ripening phenotype, while the triple editing line resulted in impaired reproductive development, failing to proceed to flowering and fruit setting. Furthermore, reverse transcription quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis revealed that *SIBEL1/2/11* modulated the expression of multiple ripening-related genes in tomato. Collectively, the results demonstrate that SIBEL1/2/11 functioned redundantly to coordinately control the fruit ripening process. This study identified novel targets for the genetic improvement of tomato fruit ripening.

Keywords: tomato; SIBEL; fruit ripening; gene editing; gene function redundancy

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.03.005

收稿日期 2025-11-03; 接受日期 2025-12-06

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32260792)。

作者简介 刘诗颖 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬采后分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 孟兰环 (MENG Lanhuan), E-mail: huanhuanaini1012@126.com。

果实是种子发育和传播的植物器官,在人类膳食结构中占有重要地位,是维生素、类胡萝卜素、多酚类、类黄酮等多种营养物质的重要来源^[1]。番茄(*Solanum lycopersicum*)是世界范围内广泛种植的果蔬之一,具有种植周期较短、营养价值丰富等特点,有利于果实成熟和发育研究。番茄果实成熟是一个复杂的生物学过程,该过程涉及淀粉的积累、细胞壁分解与重塑、叶绿体降解、有色质体形成等^[2]。

果实发育调控机制需要广泛的分子参与者,包括转录因子(transcription factor, TF)。作为转录因子的蛋白质负责识别和结合靶基因启动子中的特定 DNA 序列,改变其表达水平,以控制发育过程并对内源性和环境刺激(包括应激刺激)做出反应^[3]。含有保守的 DNA 结合同源结构域(homeodomain, HD)的 TFs 被指定为同源盒蛋白,负责识别并结合 DNA,从而调控基因表达,是生物体发育的核心参与者^[4]。三氨基酸环延伸(three-amino acid loop extension, TALE)同源结构域转录因子是一类高度保守的蛋白超家族^[5],其典型结构特征是在第一和第二个 α -螺旋之间多出 3 个氨基酸残基^[6]。植物中的 TALE 蛋白家族由 KNOX (KNOTTED1-like homeobox) 和 BEL (BEL1-like homeobox) 两个亚家族组成。TALE 蛋白在植物激素调节、叶绿体发育、细胞壁修饰、叶片形成等过程中发挥重要作用^[7-10]。

基因功能冗余是指 2 个或多个基因在功能上存在部分或完全重叠,使得单个基因的缺失或突变可能不会显著影响生物体的表型或生存能力,因为其他基因可以补偿其功能^[11]。这种冗余性通过自然选择得以维持,并可能为生物体提供进化优势。

基因的功能冗余是普遍存在的,同一基因家族的成员之间往往具有高度的同源性,存在功能冗余的可能性也更高。JA-ZIM 结构域(JA-ZIM-domain, JAZ)家族基因参与调节茉莉酸(Jasmonate, JA)信号转导,MA 等^[12]从丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中鉴定出 9 个 *SmJAZ* 基因, *SmJAZ1/2/5/6/9* 在 JA 诱导的丹参酮合成中起激活作用,但对丹酚酸 B (Sal B) 的合成则表现为抑制,体现了其功能的冗余性。转录因子 WIP 家族在调控拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶片和细胞大小方面表现出部分冗余功能, *wip2 wip5* 双突变体在成熟植株

中表现出更强的表型^[13]。基因冗余在维持分生组织稳态中起关键作用,LIU 等^[14]利用 *ZmCLE15* 对 *ZmCLE17* 部分冗余的补偿机制,在不破坏发育稳定性的前提下提高了玉米(*Zea mays*)产量。核糖核苷酸还原酶亚基基因 *SIRNRL2* 和 *SIRNRL1* 在番茄细胞周期进程、叶绿体生物发生和光合作用的调节中起关键作用,突变体 *slrnrl1* 表现出植株矮小、嫩叶绿化和果实较小等表型, *slrnrl2* 突变体未表现出任何可见的表型,但双突变体 *slrnrl1 slrnrl2* 无法发育^[15],由此证实 *SIRNRL1* 和 *SIRNRL2* 功能冗余,番茄的生存、生长和发育至少需要其中一种 RNRL。

本课题组前期已对番茄转录因子 SIBEL11 进行功能表征研究,发现其参与番茄果实叶绿体发育和叶绿素积累过程^[8],并影响番茄果实类胡萝卜素积累^[16]。本研究采用系统发育树构建、基因结构分析、逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应(Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR)、CRISPR-Cas9 介导的基因编辑技术等手段,进一步解析番茄转录因子 BEL 家族中 SIBEL1/2/11 的结构共性。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为番茄(*Solanum lycopersicum*) Ailsa Craig (AC) 品种。*SIBEL11* 基因编辑植株种子由海南大学食品科学与工程学院保存。栽培基质为泥炭土与蛭石按体积比 3:1 混合。野生型(WT)及基因编辑系植株均培养于人工气候室,培养条件:日/夜温度为 25℃,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,相对湿度为 80%。以花朵完全开放且轻摇时可见花粉散落之日标记为开花第 0 天。采集植物组织样品后,立即于液氮中速冻,随后转移至-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 *SIBEL1/2/11* 的生物信息学分析 番茄、拟南芥、马铃薯和辣椒的氨基酸序列从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库下载。使用 MEGA 12 软件进行多序列比对,选择邻接法绘制系统进化树,将结果导入 iTOL (<https://itol.embl.de>) 在线软件进行系统进化树优化。使用 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) 在线软件和 iTOL 软件预测蛋白结构域并绘制蛋白结构域示意图。通过 Swiss-MODEL (<http://swissmodel>。

expasy.org) 在线软件预测目的氨基酸序列的二级结构, 下载生成的“.pdb”文件, 将结果导入 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript>) 在线软件, 绘制氨基酸序列比对示意图。

1.2.2 基因编辑载体构建及植株转化 载体构建参照华南农业大学刘耀光实验室双子叶植物基因编辑载体构建方法^[17]。使用在线软件 CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn>) 设计基因编辑靶点, 其中单基因编辑载体设计 2 个靶点, SIBEL1/2/11 基因共编辑载体设计 6 个靶点。采用重叠 PCR 法在启动子和 sgRNA 主链之间引入靶标, 形成 sgRNA 表达盒。将多个 sgRNA 表达盒插入 pYLCRISPR/Cas9 载体中进行表达。使用 CRISPR-P2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2>) 在线软件和 CRISPR-GE 软件预测脱靶位点。将构建好的

载体转化到根癌农杆菌菌株 GV3101 中进行表达, 并通过潮霉素抗性基因 (Hyg) 鉴定筛选阳性植株。

1.2.3 总 RNA 提取和 qRT-PCR 分析 使用 RNAprep Pure Plant Kit (TIANGEN BIOTECH, Beijing, China) 试剂盒提取总 RNA, 并使用 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix (TIANGEN BIOTECH, Beijing, China) 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN BIOTECH, Beijing, China) 提取总 RNA 进行 qRT-PCR。选择 *Slactin* 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行基因相对表达量的计算^[18]。所有数据均表示为来自 3 个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。使用 GraphPad Prism 10 软件绘制直方图。本试验所用引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物
Tab. 1 Gene primer used for quantitative real time polymerase chain reaction primers

基因 Gene	基因编号 Gene code	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>Slactin</i>	Solyc11g005330	ATCCACGAGACTACCTAC	CTCATACGGTCAGCAATA
<i>SIACS2</i>	Solyc01g095080	GAAAGAGTTGTTATGGCTGGTG	GCTGGGTAGTATGGTGAAGGT
<i>SIACS4</i>	Solyc05g050010	GCTCGGAGGTAGGATGGTTTC	GTTCTCTTCCATTGTGCTTGT
<i>SIACO1</i>	Solyc07g049530	CAAACAGACGGGACACGAAT	ATTGGATCACTTTCCATTGCCT
<i>SIETR1</i>	Solyc12g011330	GCCTTTTATCTTCCATCGTGGA	GATACTTCATTAGCAAGTCGTCA
<i>SIETR3</i>	Solyc09g075440	ACTCTCTTAAACGTGGCGGG	GTGGGCTAATTCCACACCCA
<i>SIEIN2</i>	Solyc09g007870	CCACTAACTTGGGATCTTG GTA	AGAGCTGGGACAATGGAAATAA
<i>SIEIL1</i>	Solyc06g073720	AGGCTCCAACGACA ACTTCC	ATCCAATGCTAGGTAGATTCCG
<i>SIERF2</i>	Solyc09g075420	CGTTTGTCATCCACCGACCT	GTCACGAATTCAGCAGCCC
<i>SIRIN</i>	Solyc05g012020	CAGCTTGAACGTCAATTGGAT	CTTTGCTCACCACAATGCCA
<i>SICNR</i>	Solyc02g077920	ACATCCTTCTTGCCAGGTCG	GCCTTCGGCAACTCTCTTA
<i>SINOR</i>	Solyc10g006880	AGAGAACGATGCATGGAGGTTT	ACTGGCTCAGGAAATTGGCAATG
<i>SITAGL1</i>	Solyc07g063420	ACTTTCTGTTCTTTGTGATGCT	TGGATGCTTCTTGCTGGTAG
<i>SIFUL1</i>	Solyc06g069430	GTTTGGCCACAACA CTGGACT	CTTGCTGCTGTGAAGAACTACC
<i>SIPG2a</i>	Solyc10g080210	AGCTAAGGGTGATGGAAAAAC	TGAAAAGGTGATTGCTTGAGA
<i>SIE8</i>	Solyc09g089580	GAATCCTCCTAGTCCACAAG	GAGACCGAGACCTTCAGA

2 结果与分析

2.1 SIBEL1/2/11 基因系统进化分析

基于 NCBI 数据库, 查询得到 SIBEL11 (Solyc11g068950) 的氨基酸序列, 选择物种番茄、拟南芥、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*) 进行同源序列比对。下载同源性较高的 18 条氨基酸序列, 其中来源于拟南芥、马铃薯、辣椒和番茄的基因数量分别为 5、5、6 和 2。蛋白质结构域预测分析结果表明, 这 18 条

序列均包含 BEL 家族蛋白的典型结构域特征^[19], 即 POX (proliferating cell nuclear antigen OXidoreductase) 结构域和 HOX (homeodomain) 结构域。使用 MEGA 12 软件进行多序列比对, 并采用邻接法 (Neighbor Joining, NJ) 构建系统进化树 (图 1), bootstrap 值为 1000 次。筛选出番茄基因组中与 *SIBEL11* 同源性最高的 2 个基因, 即 *SIBEL1* (Solyc01g007070) 和 *SIBEL2* (Solyc-06g074120)。系统发育树显示, *SIBEL11* 与 *SIBEL2*

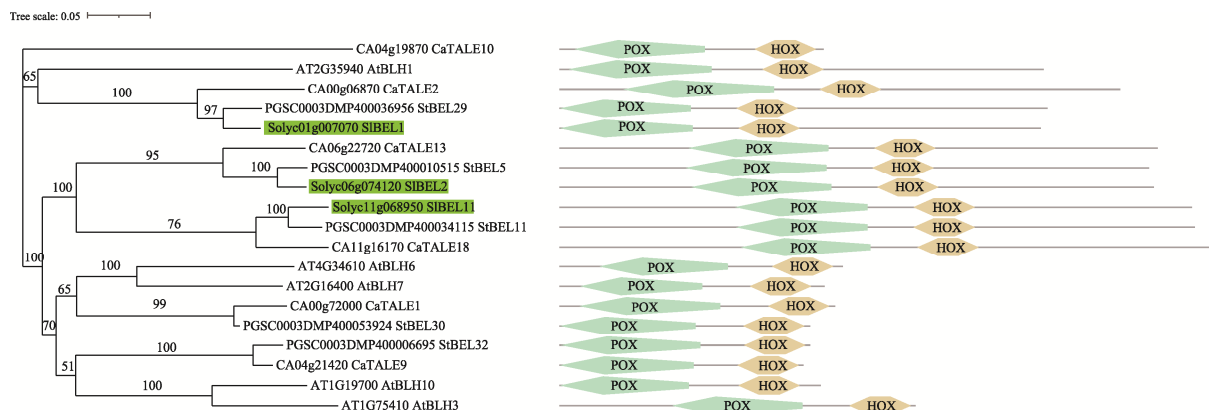


图 1 SIBEL11 与其他物种同源蛋白系统进化树及蛋白结构域

Fig. 1 Phylogenetic tree of SIBEL11 with homologous proteins across species and representative protein domain structures

形成高支持率亚分支，而 SIBEL1 位于其邻近的姊妹分支。尽管存在拓扑分化，三者仍共同构成番茄 BEL 家族中一个近期进化的保守簇^[20]。因此，在发育通路中，三者可能通过冗余机制相互补偿。

2.2 SIBEL1/2/11 保守结构域的多序列比对分析

使用 InterPro 软件分析 SIBEL1/2/11 各保守结构域及位置信息发现，POX 结构域在 SIBEL1 (189~334 aa)、SIBEL2 (211~357 aa)、SIBEL11 (184~322 aa) 内高度保守，HOX 结构域在 SIBEL1 (382~446 aa)、SIBEL2 (405~469 aa)、SIBEL11 (370~434 aa) 内高度保守。将 SIBEL1/2/11 的 POX 和 HOX 结构域进行多序列比对，并

使用 ESPript 3.0 软件绘制氨基酸序列比对示意图 (图 2)。结果显示，POX 结构域在 SIBEL1、SIBEL2 和 SIBEL11 中呈现 45.10% 序列一致性 (identity)、79.96% 序列相似性 (similarity)，其中 SKY 核定位盒完全相同。HOX 结构域呈现 98.46% 序列一致性，100% 序列相似性。HOX 结构域含有 4 个 α -螺旋二级结构，第 3 个 α -螺旋为 DNA 识别螺旋^[21]，其中色氨酸 (Trp⁵⁰) 通过疏水作用嵌入碱基对，苯丙氨酸 (Phe⁵¹) 维持螺旋构象刚性。分化的 POX 域可能拓展互作网络多样性，而高度保守的 HOX 域支持三者结合相同的靶基因，形成补偿性调控网络，这为基因的功

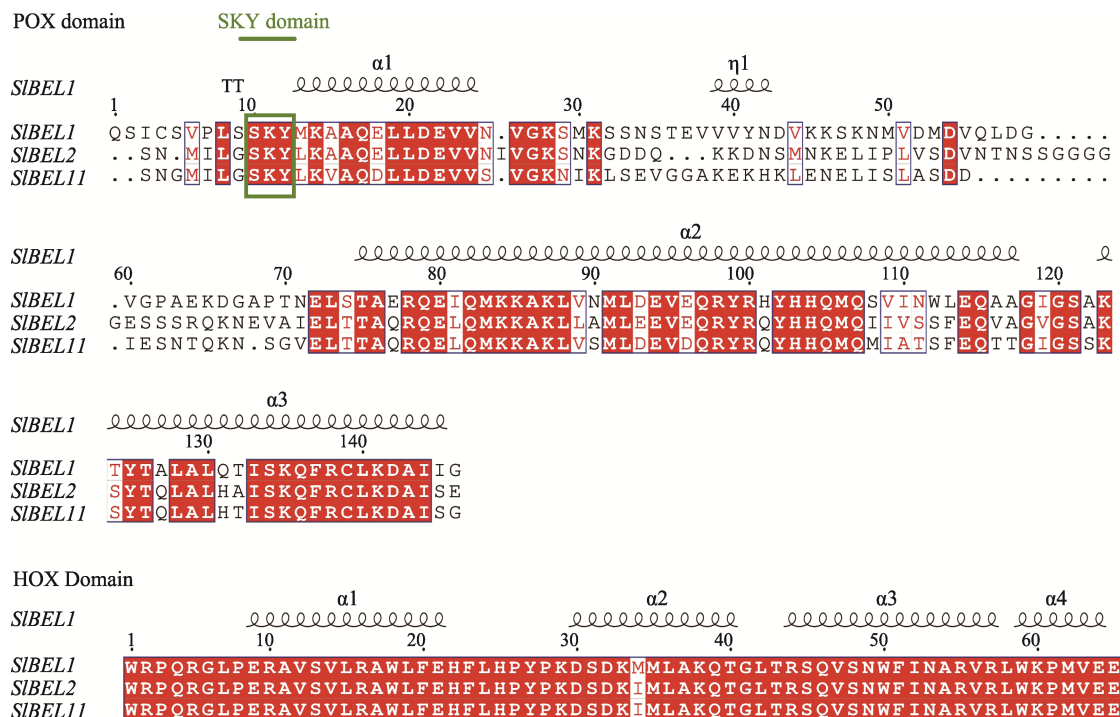


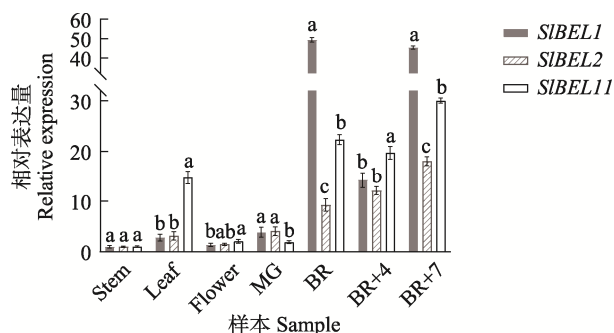
图 2 SIBEL1、SIBEL2 和 SIBEL11 保守域的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of conserved domains in SIBEL1, SIBEL2 and SIBEL11

能冗余提供分子基础。

2.3 *SIBEL1/2/11* 在野生型番茄植株中的表达模式

为了阐明 *SIBEL1/2/11* 在番茄生长发育中的潜在功能,以野生型 Ailsa Craig 番茄品种为材料,采集其茎、叶、花以及不同成熟阶段的果实样本,运用 qRT-PCR 检测 *SIBEL1/2/11* 的相对表达量。结果(图3)表明, *SIBEL1/2/11* 在检测的所有组织中均有表达, *SIBEL1/2/11* 在茎(stem)、花(flower)、绿熟(MG)时期的相对表达量均较低, *SIBEL11* 在叶中的相对表达量显著高于 *SIBEL1* 和 *SIBEL2*。在破色期(BR)、破色 4 d (BR+4)、破色 7 d (BR+7) 的果实中, 3 个基因均呈现较高的表达量。随着果实成熟, *SIBEL2* 的表达量呈持续上升趋势, *SIBEL1* 和 *SIBEL11* 在 BR+4 果实中的表达量略有下降。 *SIBEL1/2/11* 在各组织中的表达谱呈现高度相似性,尤其在果实破色期后,相对表达量显著高于其他组织,推测其在番茄果实发育成熟进程中可能发挥重要作用。结合前期系统进化与序列比对分析的潜在功能相似性,该表达特征进一步支持三者可能存在功能冗余。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

图3 *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 在番茄中的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of *SIBEL1*, *SIBEL2* and *SIBEL11* in tomato

2.4 *SIBEL1/2/11* 基因编辑后影响番茄开花和果实成熟

为进一步探究 *SIBEL1/2/11* 的功能,基于 CRISPR-Cas9 基因编辑靶点选择原则,共确定 6 个最佳靶点(图 4A),使用 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑技术分别对 3 个基因进行单基因编辑和 3 个基因同时编辑。

阳性 T_0 代番茄转化株经自花授粉获得 T_1 代

种子,通过对 *SIBEL1/2/11* 基因组 DNA 靶点附近的 DNA 序列进行测序分析,最终获得单基因编辑纯合植株各 2 株,分别命名 CR-*SIBEL1* #1、CR-*SIBEL1* #3、CR-*SIBEL2* #7、CR-*SIBEL1* #8、CR-*SIBEL11* #14 和 CR-*SIBEL11* #24。在 T_2 代植株中, CR-*SIBEL1* 两个基因编辑植株在不同的靶点位置分别插入 1 bp, CR-*SIBEL2* 两个基因编辑植株在同一靶点位置分别观察到 10 bp 片段缺失与 1 bp 插入, CR-*SIBEL11* 两个基因编辑植株在同一靶点分别缺失 2 bp 和插入 1 bp(图 4B)。以上编辑方式均导致蛋白质翻译提前终止,这些纯合基因编辑株系的稳定将为后续探索 *SIBEL1/2/11* 在植物生理过程中的功能提供基础。将 *SIBEL1/2/11* 同时编辑的 T_0 代植株,命名为 CR-*SIBEL1/2/11* #18,测序分析结果显示,其中 *SIBEL1* 和 *SIBEL2* 均为单等位基因编辑,靶点位置分别缺失 1 bp 和 2 bp,而 *SIBEL11* 为双等位基因编辑,靶点位置的 2 个等位基因分别显示 5 bp 缺失和复杂编辑(图 4C)。

果实成熟期间,在不同的转基因番茄植株中观察到果实转色的表型变化(图 4D)。在果实发育过程中,野生型植株(WT)破色通常发生在 35 d 左右,然而,在 6 种单基因编辑株系中,果实破色时间均有延迟。CR-*SIBEL1*、CR-*SIBEL2* 和 CR-*SIBEL11* 系破色平均延迟 3 d,但最终会达到与野生型相当的红熟水平。正常番茄植株从花序发育到开花结果,可细分为花序分化期、花器官形成期、开花期、授粉受精期、坐果期、果实发育期 6 个阶段, T_0 代三基因编辑植株 CR-*SIBEL1/2/11* #18 在花器官形成期虽然形成了萼片,但存在子房发育畸形的缺陷,致使花朵在未绽放时就因生殖失败而脱落(图 4E),因此,未能得到三基因共编辑植株 CR-*SIBEL1/2/11* #18 的果实及种子。由此推测,单个 *SIBEL1*、*SIBEL2* 或 *SIBEL11* 基因均会影响番茄果实成熟,编辑其中 1 个基因后,基因的冗余性补偿了其功能,而同时编辑 3 个基因将导致植株出现严重的生殖发育缺陷。

2.5 *SIBEL1/2/11* 基因对番茄成熟相关多基因通路的调控作用

为探究 *SIBEL1/2/11* 基因在番茄果实成熟中的分子调控机制,通过 qRT-PCR 检测花后 35 d 果实中乙烯代谢、成熟调控等通路中关键基因的相对表达量。结果(图 5)显示,乙烯信号转导

BEL 家族基因作为同源结构域转录因子, 在植物生殖发育、形态发育和胁迫响应中发挥重要调控作用。例如, 拟南芥中 BELL1 蛋白与 MADS-box 蛋白相互作用, 参与胚珠发育的调节^[21-22]; 转录因子 BLH2 与 BLH4 通过直接激活 *PME58* 冗余地调控拟南芥种子黏液中高半乳糖醛酸的去甲基酯化作用^[23]。目前已经报道过番茄 BEL 家族基因 *SIBEL2*、*SIBEL4* 和 *SIBEL11* 在番茄果实成熟和果实脱落中发挥作用^[8, 24-26]。在 *SIBL4* RNAi 突变体中, 由于脱落区表皮细胞增大, 导致果实花梗形成受到干扰, 果实过早脱落^[24]。转录因子 *SIBEL11* 调节类黄酮生物合成以微调生长素外流, 从而防止番茄过早落果^[27]。但关于番茄 BEL 家族基因功

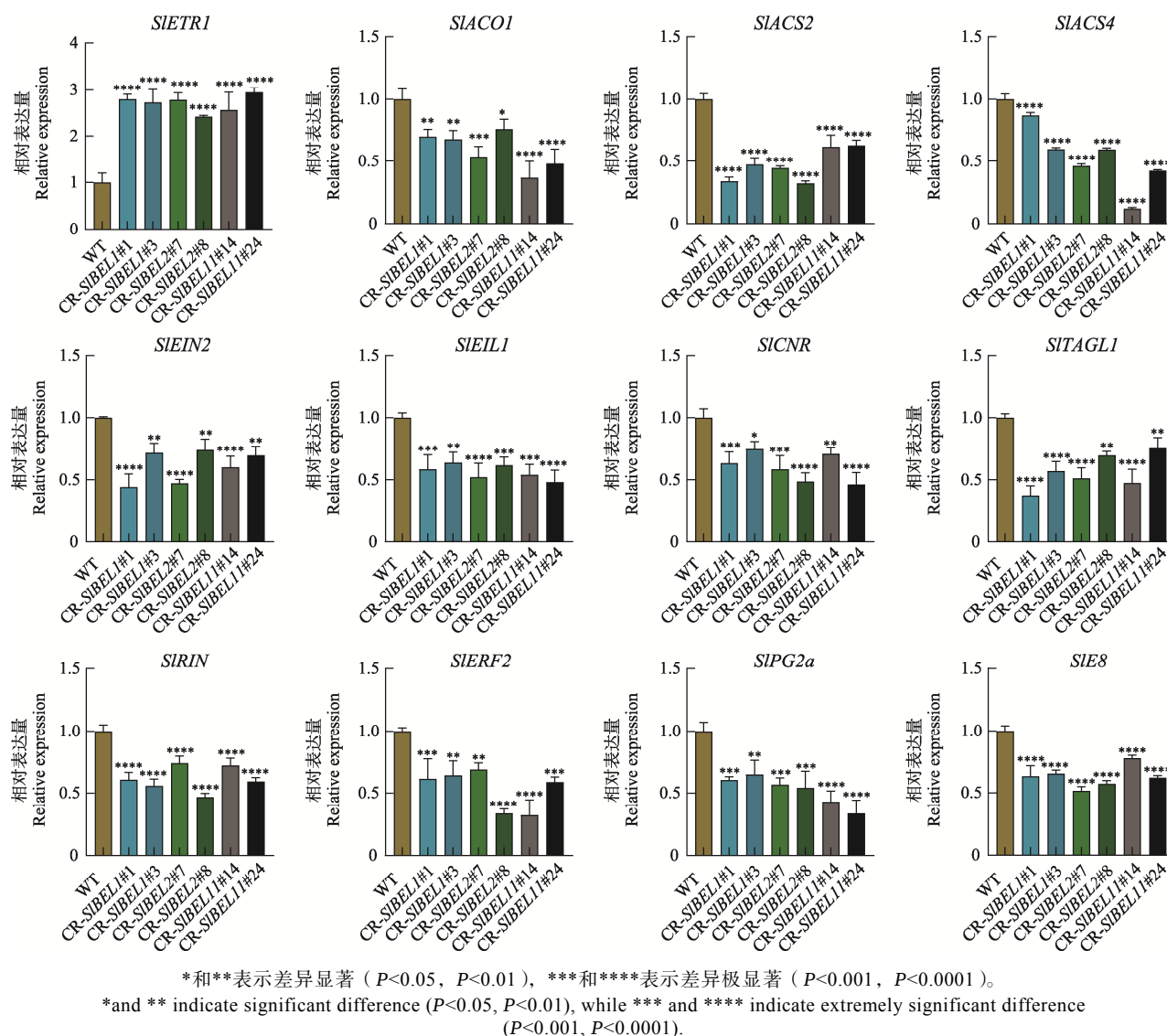


图5 番茄果实成熟相关基因的相对表达量分析

Fig. 5 Analysis of relative expression levels of genes related to tomato fruit ripening

能冗余方面少有研究。本研究发现, *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 同源性较高, 在番茄植株中的表达模式高度一致, 单基因编辑后出现相似表型, 即番茄破色时间延长, 成熟进程延迟, 表明 *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 均不同程度地参与番茄果实的发育成熟。系统进化、序列保守性及单突变体表型的相似性, 推测 *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 在功能上存在冗余, 在单个基因的缺失情况下, 另外 2 个成员可能在一定程度上能够补偿其功能, 维持成熟进程的基本运行。在此基础上, 通过构建 *SIBEL1/2/11* 三基因同时编辑载体, 获得基因编辑株系 CR-*SIBEL1/2/11* #18, 该植株出现无法开花结实的生殖发育异常。可见单基因的缺失可由旁系同源物补偿, 有助于学者理解多基因家

族如何通过协作以确保关键生命过程的稳定性。

不同类型的转录因子在多个调控网络中发挥作用以催化番茄果实成熟。番茄作为呼吸跃变型果实, 其成熟依赖于乙烯的生物合成。1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 (ACS) 和 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 (ACO) 是乙烯生物合成中的关键限速酶^[28-29], ACS 催化乙烯底物 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 转化为乙烯的前体物质 1-氨基环丙-1-羧酸酯 (ACC), ACO 将 ACC 转化为乙烯^[30]。花后 35 d 的 *SIBEL1/2/11* 单基因编辑番茄果实中, *SIACO1*、*SIACS2* 和 *SIACS4* 的表达受到抑制, 影响乙烯生物合成从而抑制番茄果实成熟。*SIEIN2*、*SIEIL1*、*SIE8* 和 *SIETR1* 是乙烯信号转导途径的关键因素。其中沉默 *SIEIN2* 抑制番茄红素生物

合成^[31], *SIEIL1* 可介导植物早期乙烯响应基因的转录^[32], *sle8* 突变体番茄果实成熟加快^[33]。*SIBEL1/2/11* 单突变体果实中的 *SIEIN2*、*SIEIL1* 相对表达量下降, 是果实成熟延迟的原因之一。*SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 均不同程度地调控乙烯受体基因 *SIETR1* 的表达, 在基因编辑果实中, *SIETR1* 基因的表达量显著上升, 而已有研究表明, 过表达 *SIETR1* 转基因株系会出现果实成熟延迟表型^[34]。*SICNR*、*SITAGL1*、*SIRIN* 与 *SIERF2* 在 *SIBEL1/2/11* 基因编辑果实中下调表达, 其中 *SICNR* 属于 SBP-box 转录因子, *SITAGL1* 和 *SIRIN* 属于 MADS-box 转录因子, *SIERF2* 属于乙烯响应因子 ERF 家族, 它们都通过结合靶基因启动子的特定元件, 调控下游一系列果实成熟相关基因的表达, 对番茄果实的转色、软化、风味物质积累等成熟相关表型产生影响^[35-38]。果实软化常伴随着编码细胞壁降解酶的基因的转录和转录后调节, 包括多糖水解酶和转糖基化酶, 聚半乳糖醛酸酶 (PG) 是成熟番茄果实中含量最丰富的多糖水解酶之一^[39], 转基因果实中 *SIPG2a* 下调表达会导致果实软化进程减慢。

然而, 本研究未明确 *SIBEL1/2/11* 在番茄果实成熟调控过程中的下游靶基因, 未来可以通过酵母双杂交技术、蛋白质免疫共沉淀等试验进行完善。为了更系统地揭示其调控网络, 可在 *SIBEL* 单基因编辑及三基因共编辑背景下进行全面的转录组学及代谢组学分析, 探索新的成熟调控网络。

本研究通过生物信息学分析、基因编辑技术、基因的表达分析, 确定了 *SIBEL1*、*SIBEL2* 和 *SIBEL11* 是番茄果实成熟过程中一组功能冗余的正向调控转录因子, 它们构成一个关键的调控模块, 不仅精确调控番茄果实成熟时序, 其功能完整性更是植物生殖发育所必需的。这些发现丰富了果实成熟调控网络, 体现了多基因家族功能冗余的重要性, 并为通过精准育种策略优化果实品质与贮藏性能开辟了新的路径。

参考文献

- [1] SEYMOUR G B, CHAPMAN N H, CHEW B L, ROSE J K. Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(3): 269-278.
- [2] FENN M A, GIOVANNONI J J. Phytohormones in fruit development and maturation[J]. *The Plant Journal*, 2021, 105(2): 446-458.
- [3] LIU Q, ZHANG G, CHEN S. Structure and regulatory function of plant transcription factors[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 271-278.
- [4] HOLLAND P W. Evolution of homeobox genes[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, 2013, 2(1): 31-45.
- [5] BÜRGLIN T R, AFFOLTER M. Homeodomain proteins: an update[J]. *Chromosoma*, 2016, 125(3): 497-521.
- [6] BERTOLINO E, REIMUND B, WILDT-PERINIC D, CLERC R. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(52): 31178-31188.
- [7] DOLGIKH A V, RUDAYA E S, DOLGIKH E A. Identification of BELL transcription factors involved in nodule initiation and development in the legumes *Pisum sativum* and *Medicago truncatula*[J]. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(12): 1808.
- [8] MENG L H, FAN Z Q, ZHANG Q, WANG C C, GAO Y, DENG Y K, ZHU B Z, ZHU H L, CHEN J Y, SHAN W, YIN X R, ZHONG S L, GRIERSON D, JIANG C Z, LUO Y B, FU D Q. BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 11 regulates chloroplast development and chlorophyll synthesis in tomato fruit[J]. *The Plant Journal*, 2018, 94(6): 1126-1140.
- [9] LIU Y Y, YOU S J, TAYLOR-TEEPLES M, LI W H, SCHUETZ M, BRADY S M, DOUGLAS C J. BEL1-LIKE HOMEODOMAIN6 and KNOTTED *Arabidopsis* THALI-ANA7 interact and regulate secondary cell wall formation via repression of REVOLUTA[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(12): 4843-4861.
- [10] BYRNE M E, IMLAY E, RIDZA N N B. Shaping leaves through TALE homeodomain transcription factors[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2024, 75(11): 3220-3232.
- [11] THOMAS J H. Thinking about genetic redundancy[J]. *Trends in Genetics*, 1993, 9(11): 395-399.
- [12] MA P D, PEI T L, LÜ B B, WANG M, DONG J E, LIANG Z S. Functional pleiotropism, diversity, and redundancy of *Salvia miltiorrhiza* Bunge JAZ family proteins in jasmonate-induced tanshinone and phenolic acid biosynthesis[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac166.
- [13] DIAZ-RAMIREZ D, DIAZ-GARCIA U S, MAGDALENO-GARCIA G, HUEP G, APPELHAGEN I, SAGASSER M, MARSCH-MARTINEZ N. Expression and functional analyses of the WIP gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plants*, 2022, 11(15): 2010.
- [14] LIU L, GALLAGHER J, AREVALO E D, CHEN R, SKOPELITIS T, WU Q Y, BARTLETT M, JACKSON D.

- Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize *CLE* genes[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(3): 287-294.
- [15] GU M J, LU Q, LIU Y, CUI M, SI Y Q, WU H L, CHAI T Y, LING H Q. Requirement and functional redundancy of two large ribonucleotide reductase subunit genes for cell cycle, chloroplast biogenesis and photosynthesis in tomato[J]. *Annals of Botany*, 2022, 130(2): 173-187.
- [16] HE Y, WANG Y, ZHANG M Z, LIU G S, TIAN C, XU X B, PAN Y G, SHI X Q, ZHANG Z K, MENG L H. SIBEL11 affects tomato carotenoid accumulation by regulating SILCY-b2[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1062006.
- [17] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, LIU W, CHEN Y, QIU R, WANG B, YANG Z F, LI H Y, LIN Y R, XIE Y Y, SHEN R X, CHEN S F, WANG Z, CHEN Y L, GUO J X, CHEN L T, ZHAO X C, DONG Z C, LIU Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [18] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [19] ZOUNKOVÁ A, KONEČNÝ J, LIPAVSKÁ H, MAŠKOVÁ P. BEL transcription factors in prominent *Solanaceae* crops: the missing pieces of the jigsaw in plant development[J]. *Planta*, 2023, 259(1): 14.
- [20] KISSINGER C R, LIU B S, MARTIN-BLANCO E, KORNBERG T B, PABO C O. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions[J]. *Cell*, 1990, 63(3): 579-590.
- [21] BENCIVENGA S, SIMONINI S, BENKOVÁ E, COLOMBO L. The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(7): 2886-2897.
- [22] PAGNUSSAT G C, YU H J, SUNDARESAN V. Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis thaliana* eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene *BLH1*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(11): 3578-3592.
- [23] XU Y, WANG Y P, WANG X Y, PEI S Q, KONG Y Z, HU R B, ZHOU G K. Transcription factors BLH2 and BLH4 regulate demethylesterification of homogalacturonan in seed mucilage[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(1): 96-111.
- [24] YAN F, GAO Y S, PANG X Q, XU X, ZHU N, CHAN H, HU G J, WU M B, YUAN Y J, LI H H, ZHONG S, HADA W, DENG W, LI Z G. BEL1-LIKE HOMEODOMAIN4 regulates chlorophyll accumulation, chloroplast development, and cell wall metabolism in tomato fruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(18): 5549-5561.
- [25] YAN F, GONG Z H, HU G J, MA X S, BAI R Y, YU R N, ZHANG Q, DENG W, LI Z G, WURIYANGHAN H. Tomato SIBL4 plays an important role in fruit pedicel organogenesis and abscission[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 78.
- [26] NIU X L, LI H L, LI R, LIU G S, PENG Z Z, JIA W, JI X, ZHU H L, ZHU B Z, GRIERSON D, GIULIANO G, LUO Y B, FU D Q. Transcription factor SIBEL2 interferes with GOLDEN2-LIKE and influences green shoulder formation in tomato fruits[J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(4): 982-997.
- [27] DONG X F, LIU X F, CHENG L N, LI R Z, GE S Q, WANG S, CAI Y, LIU Y, MENG S D, JIANG C Z, SHI C L, LI T L, FU D Q, QI M F, XU T. SIBEL11 regulates flavonoid biosynthesis, thus fine-tuning auxin efflux to prevent premature fruit drop in tomato[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(4): 749-770.
- [28] OETIKER J H, OLSON D C, SHIU O Y, YANG S F. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34(2): 275-286.
- [29] PRASANNA V, PRABHA T N, THARANATHAN R N. Fruit ripening phenomena-an overview[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, 47(1): 1-19.
- [30] ADAMS D O, YANG S F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene[J]. *Plant Physiology*, 1997, 60(6): 892-896.
- [31] WANG R H, YUAN X Y, MENG L H, ZHU B Z, ZHU H L, LUO Y B, FU D Q. Transcriptome analysis provides a preliminary regulation route of the ethylene signal transduction component, SIEIN2, during tomato ripening[J]. *Public Library of Science ONE*, 2016, 11(12): e0168287.
- [32] JI L, LI Z F, LING T, YANG Y W, ZOUINE M, BOUZAYEN M. A conserved phosphorylation site regulates the transcriptional function of ETHYLENE-INSENSITIVE3-like1 in tomato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(1): 427-439.
- [33] BRISOU G, PIQUEREZ S J M, MINOIA S, MARCEL F, CORNILLE A, CARRIERO F, BOUALEM A, BENDAHMANE A. Induced mutations in SIE8 and SIACO1 control tomato fruit maturation and shelf-life[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(20): 6920-6932.
- [34] OKABE Y, ASAMIZU E, ARIIZUMI T, SHIRASAWA K, TABATA S, EZURA H. Availability of Micro-Tom mutant library combined with TILLING in molecular breeding of

- tomato fruit shelf-life[J]. *Breeding Science*, 2012, 62(2): 202-208.
- [35] ZHOU L L, SUN Z Y, HU T T, CHEN D, CHEN X, ZHANG Q L, CAO J K, ZHU B Z, FU D Q, ZHU H L, QU G Q. Increasing flavonoid contents of tomato fruits through disruption of SISPL-CNR, a suppressor of SIMYB12 transcription activity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(2): 290-292.
- [36] WU M, ZHOU Y, MA H F, XU X, LIU M C, DENG W. SIMYB72 interacts with SITAGL1 to regulate the cuticle formation in tomato fruit[J]. *The Plant Journal*, 2024, 120(4): 1591-1604.
- [37] SLUGINA M A, EFREMOV G I, SHCHENNIKOVA A V, KOCHIEVA E Z. Characterization of RIN isoforms and their expression in tomato fruit ripening[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1739.
- [38] SUN Y, ZHANG M, GENG M H, GENG Z K, LU Z X, LIU N N, LIU Z M, ZENG D X, YAO G F, HU K G, ZHANG H. Hydrogen sulfide interferes with ethylene biosynthesis and signaling pathway in tomato by the mediation of SIERF.D2 persulfidation[J]. *The Plant Journal*, 2025, 121(4): e70000.
- [39] POWELL A L, KALAMAKI M S, KURIEN P A, GURRIERI S, BENNETT A B. Simultaneous transgenic suppression of LePG and LeExp1 influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(25): 7450-7455.