

番茄 CCCH 型锌指蛋白基因 *SlC3H64* 和 *SlC3H65* 的特征与表达分析

许瑞瑞, 曹翠宇

(潍坊学院 生物与农业工程学院, 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东 潍坊 261061)

摘要:以番茄品种“中蔬 6 号”为试材,采用生物信息学方法和实时荧光定量 PCR 技术,分析研究了番茄 *SlC3H64* 和 *SlC3H65* 锌指蛋白结构特点,启动子序列内所含胁迫响应元件类别,以及 2 个基因组织表达模式和非生物胁迫条件下表达量变化差异。结果表明:番茄 *SlC3H64* 和 *SlC3H65* 的蛋白预测结构差异较大;启动子序列分析发现,2 个基因中分别含有 11 个和 7 个不同的胁迫响应元件,且二者除了 TC-rich repeat 元件相同外,其余元件均不同;*SlC3H64* 和 *SlC3H65* 在“中蔬 6 号”根、茎和叶中都有表达,且都在叶中表达量最高,5 种不同胁迫处理条件下,*SlC3H64* 响应水杨酸(SA)和高温处理,而 *SlC3H65* 则仅响应甘露醇处理。

关键词:番茄;CCCH 型锌指蛋白;基因;组织;胁迫处理;表达分析

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)19-0110-05

1985 年, MILLER 等在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞的转录因子 TFⅢA 中发现锌指蛋白,该类蛋白是具有锌指结构域的转录因子,现已发现其广泛存在于动植物、酵母和病毒中,是植物中最大的转录因子家族之一^[1-2]。研究表明,根据锌指结构序列和功能的不同,可将锌指蛋白分为八大类: C_2H_2 、 C_8 、 C_6 、 C_3HC 、 C_2HC_5 、 C_4 、 C_4HC_3 、 $C_3H(C$ 代表半胱氨酸, H 代表组氨酸),其中 C_2H_2 型的锌指蛋白数量最多,研究也较为深入,对 CCCH 型锌指蛋白的研究则较少^[3],且主要集中在动物中,有关植物 CCCH 型锌指蛋白的研究报道非常有限。

近些年来,对植物 CCCH 型锌指蛋白的研究主要集中在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)等作物中。WANG 等^[4]通过生物信息学方法鉴定得出,模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组含有 68 个 CCCH 型锌指蛋白基因,其中 AtSZF1 和 AtSZF2 蛋白参与拟南芥对盐胁迫耐性的调控过程^[5]; SOMNUS 通过调控下游基因 mRNA 的稳定性负调控拟南芥光依赖的种子萌发过程^[6]; AtTZF1 蛋白可以在细胞核与细胞质中穿梭,而且与 DNA、RNA 都能结合^[7]。水稻 CCCH 锌指蛋白基因 *OsDOS* 过量表

达后可以延缓叶片衰老^[8]; *OsLIC* 基因编码的蛋白是油菜素内酯应答的负调控因子,可以影响油菜素内酯的合成或/和信号传导,进而调控植株的形态建成^[9]; *OsC3H12* 作为一种核酸结合蛋白,能够正调控水稻对水稻白叶枯病菌的抗性^[10]。研究者还从棉花中分离得到 1 个 CCCH 锌指转录因子 GhZFP1,它可以通过与 GZIRD21A、GZIPR5 相互作用提高植物的耐盐性和抗病性^[11]。综上所述,CCCH 型锌指蛋白基因在植物的抗逆过程中行使着重要的功能。

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一类重要的茄果类蔬菜,科学家们对番茄的研究也越来越深入。番茄 C_2H_2 型锌指蛋白基因 *SICZFP1* 的表达受到低温、干旱和高盐的明显诱导,将 *SICZFP1* 转入拟南芥或水稻中都可增强转基因植株对低温的耐受能力,表明 *SICZFP1* 在植物低温逆境中发挥重要作用^[12]。目前,番茄已经完成全基因组测序,并且已在番茄中鉴定到 80 个 CCCH 型锌指蛋白基因,根据 CCCH 型锌指蛋白的结构特点可以将番茄 CCCH 锌指蛋白基因分为 12 个组,分布在 1~12 号染色体上,系统进化树分析可以将 CCCH 基因家族分为 8 个亚家族,分别是亚家族 I~VIII,其中亚家族 VII 包括 12 个成员^[13]。番茄 CCCH 锌指蛋白家族成员较多,但是目前对其成员的研究仅限于个别基因的鉴定与功能分析。该研究旨在预测番茄 CCCH 型锌指蛋白 *SlC3H64* 和 *SlC3H65* 蛋白的三维结构,分析其启动子序列中含有的胁迫响应元件,分析非生物胁迫条件下 *SlC3H64* 和 *SlC3H65* 的诱导表达模式,并对其在不同

第一作者简介:许瑞瑞(1982-),女,博士,副教授,研究方向为基因表达调控。E-mail:xuruirui2006@163.com。

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(BS2014SW014);潍坊学院自然科学青年资助项目(2014Z12)。

收稿日期:2016-04-26

组织器官中的表达水平进行检测,以期为今后研究番茄 CCCH 型锌指蛋白基因的功能提供一定的理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄品种“中蔬 6 号”,购于山东农业大学种子部;RNA 提取所用试剂盒为 Trizol 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),反转录试剂盒为 Qiagen one step RT-PCR kit;所用仪器为 Bio-rad CFX 96 实时荧光定量 RCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 的生物信息学分析 利用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org>)在线预测了 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 锌指蛋白的蛋白质三维结构;利用 PlantCARE 对 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因前的 1 500 bp 启动子区域进行了胁迫响应元件分析。

1.2.2 番茄种植及胁迫处理 番茄“中蔬 6 号”种子用 50 ℃热水首先进行表面消毒 10 min,然后浸种 10 h,将大小基本一致的种子放于铺有滤纸的培养皿中,于培养箱中 28 ℃暗培养催芽 3~5 d。待番茄幼苗长至 2 cm 左右移入花盆中栽培,生长 4 周后取其根、茎和叶,用液氮冷冻后保存于 -80 ℃超低温冰箱中备用。将生长 4 周的番茄幼苗分别进行干旱(200 mmol · L⁻¹ 甘露醇)、水杨酸(1 mmol · L⁻¹)、乙烯利(200 mmol · L⁻¹)、茉莉酸甲酯(100 mmol · L⁻¹)和高温(37 ℃)处理 6 h,前 4 种处理用水喷施处理 6 h 作为对照,分别取处理后的番茄幼苗,取样后液氮速冻后于 -80 ℃保存备用。

1.2.3 *SIC3H64*、*SIC3H65* 的组织表达分析 番茄幼苗根、茎、叶和不同胁迫处理后的番茄幼苗,采用 Trizol 试剂盒分别提取不同组织的总 RNA,用 RNase-free DNase I 除去基因组 DNA 后,取 4 μg 总 RNA 反转录得到 cDNA,用于 qRT-PCR 表达分析。根据在 plantGDB database (<http://www.plantgdb.org/>) 下载的番茄 CCCH 型锌指蛋白基因序列设计实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)特异引物(表 1),反应体系参照 SYBR® Green Realtime RCR Master Mix 说明书。调整各模板浓度,每个基因扩增时均有内参同时扩增,每个样品 3 次重复。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

Table 1 The primers used in the qRT-PCR

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer
<i>SIC3H64</i>	TCATAGTAGAAGCCGAAGTCC	CACCTCCCTCACCTCCCTC
<i>SIC3H65</i>	AGCGTTTATTGGGTTCATCATC	CGGCATCTTCTCGTTCTG
<i>Slactin</i>	CTTCGTCTTCACTTCAG	ATCATACCAGTCTCAACAC

1.3 数据分析

数据分析采用双标准曲线法,计算平均表达量和相

对偏差,用 Excel 作图。同时利用 $2^{\Delta\Delta CT}$ 大致计算与内参的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 番茄 CCCH 型锌指蛋白 *SIC3H64*、*SIC3H65* 的三维结构预测

利用 SWISS-MODEL 生物学软件在线预测了 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 锌指蛋白的蛋白质三维结构。图 1 左图为 *SIC3H64* 的预测三维结构,包含 α 螺旋、β 折叠和无规则卷曲,而右图中 *SIC3H65* 的预测三维结构则仅含有 β 折叠和无规则卷曲,且多为后者。二者的蛋白三维结构相差较大。蛋白质高级结构由其一级结构决定,又决定该蛋白的功能,预测结果说明二者可能在功能发挥中有着不同的作用。

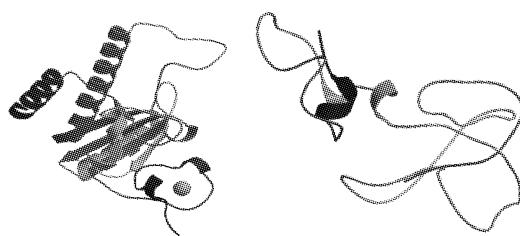


图 1 番茄 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 锌指蛋白的三维预测结构

Fig. 1 The predicted three-dimensional structure of *SIC3H64* and *SIC3H65* zinc finger proteins in tomato

2.2 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因的胁迫响应元件分析

研究发现,功能基因的上游启动子区决定着该基因的表达模式,该区域包含不同的顺式或反式作用元件。在植物体内,不同的转录因子与这些元件结合从而调控基因表达量的升高或降低。课题组分离了 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因上游 1 500 bp 的序列,利用 PlantCARE 软件对它们所包含的元件进行了预测和分析。如表 2 所示,2 个基因的启动子区域均存在多个胁迫响应元件,如 ABRE、HSE、LTR、MBS、TATC-box、TC-rich repeats、ERE、GARE-motif、TCA-element,以上元件分别是响应激素 ABA、高温、低温、干旱、赤霉素、防卫胁迫、乙烯利、赤霉素和水杨酸的元件。*SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因分别含有 11 个和 7 个不同的胁迫响应元件,其中只有 TC-rich repeat 元件相同。

2.3 番茄 CCCH 型锌指蛋白基因 *SIC3H64*、*SIC3H65* 的组织表达分析

为分析 2 个番茄 CCCH 型锌指蛋白基因 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 在不同器官中的表达情况,以番茄不同组织的 cDNA 为模板,利用实时荧光定量 PCR 技术检测其在根、茎、叶中的表达水平。由图 2 可知,*SIC3H64* 和 *SIC3H65* 在根、茎、叶中均有表达,但表达水平不同,表达模式相似。*SIC3H64* 和 *SIC3H65* 在番茄幼苗的叶中

均有较高水平的表达,表达量相近且高于其它组织器官;2个基因在根中的表达量较叶中的低,且*SIC3H64*

基因的表达量略高于*SIC3H65*;2个基因在茎中的表达量都最低,且表达量相近。

表 2 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因上游启动子序列中的胁迫响应元件

Table 2

Stress-related elements in the upstream regions of *SIC3H64* and *SIC3H65* genes

元件及功能 Element and function	元件序列 Element sequence	位置 Location	DNA 链 Strand	基因启动子 Gene-promoter
ABRE (Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness)	TACGTG	746	—	<i>SIC3H64</i>
	AAAAAAATTC	344	+	<i>SIC3H64</i>
	AAAAAAATTC	793	+	<i>SIC3H64</i>
HSE (Cis-acting element involved in heat stress responsiveness)	AAAAAAATTC	536	+	<i>SIC3H64</i>
	AAAAAAATTC	346	—	<i>SIC3H64</i>
	AAAAAAATTC	545	—	<i>SIC3H64</i>
LTR (Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness)	CCGAAA	903	+	<i>SIC3H64</i>
MBS (MYB binding site involved in drought-inducibility)	CAACTG	597	—	<i>SIC3H64</i>
TATC-box (Cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness)	TATCCC	719	+	<i>SIC3H64</i>
TC-rich repeats (Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness)	ATTTTCTCCA	109	+	<i>SIC3H64</i>
	ATTTTCTCCA	1 146	+	<i>SIC3H64</i>
	ATTTTCTCCA	1 150	+	<i>SIC3H65</i>
ERE (Ethylene-responsive element)	ATTTCAAA	249	—	<i>SIC3H65</i>
GARE-motif (Gibberellin-responsive element)	AAACAGA	1 300	—	<i>SIC3H65</i>
TCA-element (Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness)	GAGAAGAATA	1 098	—	<i>SIC3H65</i>
	CCATCTTTT	1 390	—	<i>SIC3H65</i>
	GAGAAGAATA	1 151	—	<i>SIC3H65</i>
	GAGAAGAATA	1 460	+	<i>SIC3H65</i>

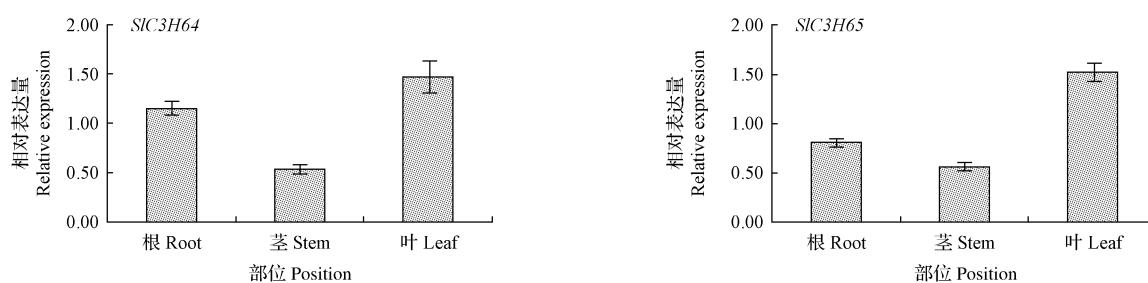


图 2 番茄 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of the *SIC3H64* and *SIC3H65* genes in different tissues in tomato

2.4 番茄 CCCH 型锌指蛋白基因 *SIC3H64*、*SIC3H65* 在不同胁迫条件下的表达分析

为了检测 CCCH 型锌指蛋白基因 *SIC3H64*、*SIC3H65* 对多种非生物逆境胁迫是否有应答反应,利用实时荧光定量 PCR 技术,检测 CCCH 型锌指蛋白基因 *SIC3H64*、*SIC3H65* 在甘露醇、水杨酸、乙烯利、茉莉酸甲酯、高温等各种逆境信号因子存在情况下的表达水平,结果表明,2 个 CCCH 型锌指蛋白基因都不同程度地受

到非生物胁迫的诱导。*SIC3H64* 基因的表达在水杨酸和高温处理后呈上升趋势,且上调明显,表达量较未处理(对照)提高 2.5 倍以上;在甘露醇和茉莉酸甲酯处理后,表达量也有一定程度的上升,但不明显;乙烯利处理后没有变化。*SIC3H65* 基因的表达量受甘露醇的诱导较为明显,表达量与对照相比提高约 2.5 倍;在用水杨酸、茉莉酸甲酯和高温处理后也有一定程度的上升,且上调水平相近;乙烯利处理后表达量无变化(图 3)。结

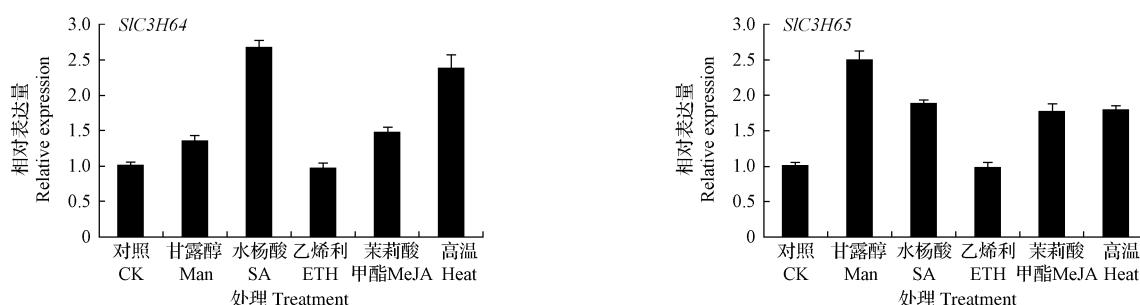


图 3 番茄 *SIC3H64* 和 *SIC3H65* 基因在不同胁迫条件下的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of the *SIC3H64* and *SIC3H65* genes under different stresses in tomato

果表明,2个番茄CCCH型锌指蛋白基因对多种非生物逆境胁迫具有应答反应。

3 讨论

CCCH型锌指蛋白构成了一个大的锌指蛋白转录因子家族,广泛存在于真核生物中,并参与重要的生化反应过程,但是到目前为止,仅有少数蔬菜中个别基因得到鉴定与功能分析。番茄常受温度、光照、营养元素、病虫害等逆境胁迫,严重的影响了番茄的品质与产量,因此,对番茄的抗逆性研究也愈来愈重要。该研究利用实时荧光定量PCR技术首次对番茄CCCH型锌指蛋白基因 $SIC3H64$ 和 $SIC3H65$ 进行表达模式的分析和生物学功能研究,特别是逆境胁迫处理后表达水平的变化。结果表明,2个番茄CCCH型锌指蛋白基因在番茄幼苗的根、茎、叶中都有不同程度的表达,并且 $SIC3H64$ 、 $SIC3H65$ 基因都在叶中表达量最高,在根中次之,茎中最少。而且2个基因的表达量在受到甘露醇、水杨酸、茉莉酸甲酯和高温不同逆境胁迫处理时表现出不同程度的升高,意味着这2个基因可能在番茄响应除乙烯以外的非生物胁迫信号转导途径中发挥着正调控作用。2个基因在受到乙烯利处理后表达量无变化,意味着这2个基因在响应乙烯利非生物胁迫信号转导途径中可能不发挥调控作用。其中2个基因在不同的组织的表达模式和逆境胁迫诱导条件下表达水平的相似性暗示着它们的功能具有相似性,在番茄的生长发育过程中发挥着相同的作用。该试验初步阐明了番茄CCCH型锌指蛋白基因 $SIC3H64$ 、 $SIC3H65$ 的组织表达,并证实了CCCH锌指蛋白可能也参与非生物胁迫时的诱导表达,初步明确了其可能参与的非生物胁迫逆境信号途径。课题组将进一步研究其抗逆机理,以期为提高番茄抗逆性提供一定的理论依据和技术指导。

参考文献

[1] KHANNA R, KRONMILLER B, MASZLE D R, et al. The *Arabidopsis*

- B-box zinc finger family[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21:3416-3420.
- [2] MAZAURIC M H, DIRICK L, PURUSHOTHAMAN S K, et al. Trm112pis a 15kDa zinc finger protein essential for the activity of two tRNA and one protein methyltransferases in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285:18505-18515.
- [3] 秦智慧, 杨青川, 晁跃辉, 等. CCCH型锌指蛋白研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(8):1-6.
- [4] WANG D, GUO Y, WU C, et al. Genome-wide analysis of CCCH zinc-finger family in *Arabidopsis* and rice[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:44.
- [5] SUN J, JIANG H, XU Y, et al. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48:1148-1158.
- [6] KIM D H, YAMAGUCHI S, LIM S, et al. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20:1260-1277.
- [7] POMERANZ M C, HAH C, LIN P C, et al. The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152:151-165.
- [8] KONG Z, LI M, YANG W, et al. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in dela-ying leaf senescence in rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141:1376-1388.
- [9] WANG L, XU Y, ZHANG C, et al. OsLIC, a novel CCCH-type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids signaling[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3:e3521.
- [10] DENG H Q, LIU H B, LI X H, et al. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158:876-889.
- [11] GUO Y H, YU Y P, WANG D, et al. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIPR5[J]. *New Phytologist*, 2009, 183:62-75.
- [12] ZHANG X, GUO X, LEI C, et al. Overexpression of SICZFP1, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(1):185-196.
- [13] XU R R. Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the CCCH zinc finger family in *Solanum lycopersicum*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289:965-979.

Characteristics and Expression Analysis of Two CCCH Zinc Finger Genes $SIC3H64$ and $SIC3H65$ in Tomato

XU Ruirui, CAO Cuiyu

(College of Biological and Agricultural Engineering, Weifang University/Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang, Shandong 261061)

Abstract: Taking ‘Zhongshu No. 6’ as test material, using the methods of bioinformatics and quantitative RT-PCR, protein structure of $SIC3H64$ and $SIC3H65$ CCCH zinc finger proteins were analyzed, several known stress responsive elements in the promoter of these two CCCH zinc finger genes were identified, the expression of these two CCCH zinc finger genes was analyzed in different vegetative organs and under five different stress treatments. The results showed that two CCCH zinc finger proteins had the almost completely different protein tertiary structures. Two CCCH zinc finger genes contained eleven and seven different stress response element, respectively. These elements were different between $SIC3H64$ and

DOI:10.11937/bfyy.201619029

西藏设施番茄晚疫病病原菌 鉴定及生物学特性研究

相 栋¹, 代 万 安¹, 巩 文 峰², 杨 杰¹, 尼 玛 玉 珍¹

(1. 西藏自治区农牧科学院 蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850032; 2. 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000)

摘要:以具典型晚疫病症状的番茄病叶为试材,采用薯片夹叶分离法对病原菌进行分离,测定了不同培养基、pH、温度、碳源、氮源对菌丝生长、产孢的影响,通过病原菌鉴定和生物学特性研究,以期为西藏设施番茄晚疫病发生及防治提供理论依据。结果表明:引起设施番茄晚疫病的病原菌为致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary。病菌菌丝在大多数培养基上均能良好生长,其中 RSA 培养基最适宜菌丝生长及产孢;菌丝生长和产孢的最适温度范围为 18 ℃,最适生长 pH 6~7;菌丝对碳源的利用,以可溶性淀粉最好,麦芽糖最差;在氮源利用方面,菌丝在以脯氨酸为氮源的查氏培养基上生长最快,在精氨酸、胱氨酸和氯化铵上不生长。孢子囊的致死温度为 55 ℃,15 min。

关键词:番茄;晚疫病菌;分离;鉴定;生物学特性

中图分类号:S 436.412.1⁺² **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)19-0114-05

番茄晚疫病是由致病疫霉菌(*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary)引起的一种重要病害,是西藏拉萨、林芝、山南、日喀则等地区设施番茄生产上的常发病害^[1-2]。美国、加拿大、墨西哥等国家均有该病严重发生的报道^[3]。我国北京、云南、贵州、山东、陕西、四川、河北、湖北等省市晚疫病普遍发生^[4]。西藏复杂多样的独特气候环境,加上近年来设施蔬菜在西藏发展迅猛,管理粗放,防治意识不强,番茄晚疫病在西藏已呈逐年加重的趋势,给生产上造成了一定的经济损失。目前,国内很多地区对番茄晚疫病病菌的分离、纯化、生物学特性和生理小种分化等报道较多,但西藏地区对该病害的研究较少,该试验通过对西藏设施番茄晚疫病菌进行

第一作者简介:相栋(1986-),男,硕士,助理研究员,现主要从事园艺植物保护等研究工作。E-mail:xiangd666@126.com.

责任作者:代万安(1968-),男,本科,研究员,现主要从事园艺作物病虫害综合治理等研究工作。E-mail:daiwa1968l@126.com.

基金项目:西藏自治区自然科学基金资助项目(13-43)。

收稿日期:2016-07-20

分离、鉴定和病原菌生物学特性进行初步研究,旨在为西藏设施蔬菜晚疫病综合防治提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015 年 3—9 月,在拉萨、林芝、山南、日喀则等西藏蔬菜主产地,对高效日光温室、大棚等设施条件下番茄晚疫病的发生情况进行了调查,采集具有典型晚疫病的番茄病样,并将采集的病样带至西藏大学农牧科学院植物病理学与微生物学实验室进行保存和病原菌的进一步分离、鉴定、纯化。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离和培养 参照田苗英等^[5]、吴涛等^[6]的分离纯化方法,采用薯片夹叶分离法,选择田间病症典型的刚发病叶片,在超净工作台上消毒,在病健交界处剪取 5~10 mm² 的小块。取无病、无机械损伤的中等马铃薯去皮,用次氯酸表面消毒,在超净工作台上切成 1 cm 厚的马铃薯片。之后将上述的 5~10 mm² 小

SlC3H65 CCCH zinc finger genes, except the TC-rich repeat element. The existence of stress-related elements in CCCH zinc finger gene promoter regions provided further evidence in future research. Expression analysis showed that two CCCH zinc finger genes expressed in root, stem and leaf in ‘Zhongshu No. 6’, with the highest expression level in leaf, similarly. Under five different stress conditions, *SlC3H64* was up-regulated under SA and high temperature stress treatment, while *SlC3H65* only responded to mannitol treatment.

Keywords: tomato;CCCH zinc finger proteins;gene;tissues;stress treatment;expression analysis