



番茄红素合成调控基因 *SISGR1* 的分子特征及 sgRNA 分析

刘江娜,张西英,李荣霞,张小伟,白云凤,张爱萍

(新疆生产建设兵团第六师农业科学研究所,新疆五家渠 831300)

摘要 旨在明确番茄 *SISGR1* 基因的分子特征及其 sgRNA 的分布,为利用 CRISPR/Cas9 技术对 *SISGR1* 及其上游启动子序列进行定点突变或片段删除、调控 *SISGR1* 的表达为提高番茄果实的番茄红素含量提供技术支持。利用 Blast 分析番茄红素合成调控基因 *SISGR1* 的分子特征,结果表明 *SISGR1* 基因位于番茄第 8 号染色体,含 4 个外显子和 3 个内含子,编码区长度为 819 nt,编码 272 aa,其中 48~200 aa 为典型的 stay-green superfamily 保守结构域。基于对 RNA-seq 建立的 *SISGR1* 数字表达谱分析表明, *SISGR1* 呈果实特异性表达,在植株的根、茎、叶等部位不表达。利用在线工具 CRISPRdirect 分析表明, *SISGR1* 外显子区域含有 PAM 为 NGG 的 sgRNA 有 64 条,其中 1 条为番茄全基因组上唯一邻近 PAM 12 nt 特异性最高的种子序列,预示该 sgRNA 可用于番茄不同品种 *SISGR1* 基因的靶向编辑并可有效避免脱靶效应。对 *SISGR1* 上游 1 500 bp 启动子序列分析表明,该序列含有 2 条番茄全基因组上特异性较好的唯一 sgRNA 序列,7 条分别含有不同顺式元件的 sgRNA,意味着选用这些 sgRNA 进行基因编辑,可使所含的启动子元件序列发生突变致使功能变化,以提高番茄红素含量。

关键词 番茄; *SISGR1*; 分子特征; 启动子; sgRNA

中图分类号 Q794

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)08-1017-08

番茄红素(Lycopene)含量与番茄果色相关,也是衡量番茄营养品质的重要指标。番茄红素是一种功能性天然色素,在各种类胡萝卜素中抗氧化能力最强,能助于人体细胞免受氧自由基的伤害,保护生物膜,对于提高人体免疫力和延迟机体细胞衰老及预防癌症具有重要作用^[1]。人体不能自主合成番茄红素,只能通过膳食摄取。番茄(*Solanum lycopersicum*)则是人们通过日常饮食补充番茄红素的重要来源。

滞绿蛋白 STAY-GREEN(SGR)最初是在草甸羊茅(*Festuca pratensis*)中发现的^[2],随后也在多种植物中被发现,该蛋白位于叶绿体中,主要参与调控叶绿素的降解代谢^[3]。1999 年有学者发现成熟过程中仍保留叶绿素的 gf 突变体番茄,该突变体叶片完全滞绿,果实在成熟过程中由于仍含有相当数量的叶绿素,导致果实出现褐色或铁锈色的表型^[4]。直至 2008 年番茄中的 *SGR1* 基因首次由康奈尔大学从 gf 突变体中克隆出来,并且将其命名为 *SISGR1*^[5]。目前关于番茄滞绿

基因 *SGR1* 的研究主要集中在叶片及叶绿素降解途径中,有研究表明 *SGR1* 通过影响叶绿素合成途径中关键基因 *PAO* 酶的活性来发挥其作用^[6]。Sakuraba 等^[7]发现 *SGR1* 在叶绿素降解过程中具有招募作用,可能招募叶绿素分解代谢酶,同时与捕光复合体结合形成 SGR-CCEs-LH-CII 复合体,从而调节叶绿素的降解;在非生物胁迫下,过表达 *SGRL* 的呢喃屈出现早期叶片变黄,*SGRL-1* 突变体在盐胁迫下出现滞绿表型^[8];然而针对滞绿突变体在番茄果实色素积累方面的研究较少,有研究发现八氢番茄红素是合成番茄红素的前体,其合成量直接影响番茄红素的形成^[5]。八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)催化两个 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate,牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸)分子聚合生成八氢番茄红素,是番茄红素合成途径中第一个也是最关键的限速酶。番茄中过表达 *SIPSY1* 基因,可显著提高果实中番茄红素含量^[9]。番茄 *SISGR1* 蛋白能与八氢番茄红素合成酶 *SIPSY1*

收稿日期:2021-07-07 修回日期:2022-02-22

基金项目:国家自然科学基金(32160710,31760571);兵团科技人才创新计划(2021CB037);第六师科技计划(1903)。

第一作者:刘江娜,女,硕士,副研究员,从事作物遗传育种相关工作。E-mail:284984737@qq.com

通信作者:张爱萍,女,学士,研究员,从事植物分子育种相关工作。E-mail:592354963@qq.com

互作,抑制 *SIPSY1* 在番茄果实成熟期的活性, RNAi 沉默 *SISGR1* 基因,可提高 *SIPSY1* 的活性,增加番茄果实的番茄红素含量^[10-12]。

近年来以多种新型高效的 DNA 靶向内切酶为基础建立的基因编辑技术^[13],可以对植物靶基因进行定点突变或替换,不必再通过外来转基因调控靶基因功能^[14]。在各种基因编辑技术中, CRISPR/Cas9 技术操作较为简单、效率高,应用更为广泛,它通过特异性 RNA (Guide RNA, gRNA)与靶基因碱基互补配对,将 Cas9 核酸酶引导至靶基因特定位点,将 DNA 双链切断。断裂后的 DNA 修复主要有两种机制,一是非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ),在连接过程中会在断裂位置产生少量核苷酸的插入或删除,造成移码,使基因功能失活;二是同源重组(Homologous recombination, HR),会产生精确的定点替换或者插入突变^[15]。利用 CRISPR / Cas9 技术已对番茄的多个基因,如转录因子 *RIN*、RNA 编辑因子 *SIORRM4*^[16]及生长相关的 *DELLA* 基因^[17]进行了编辑,也为提高番茄红素含量提供了新思路^[18]。

本文分析番茄 *SISGR1* 的特征,设计和筛选该基因编码区及其上游启动子区的 sgRNAs,以期利用 CRISPR/Cas9 技术调控 *SISGR1* 表达及提高番茄果实中的番茄红素含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 *SISGR1* 保守结构域分析

利用 NCBI 搜索番茄 *SISGR1* 蛋白质序列及其保守结构域, BlastP 比较 *SGR1* 家族的多态性。

1.2 染色体定位和基因组结构的确定

利用 NCBI 核酸数据库查询获得 *SISGR1* 的 cDNA,以此作 query,搜索番茄基因组数据库得到相应的 gDNA 序列和所在染色体信息,序列比对确定 *SISGR1* 的基因组结构以及外显子所在染色体位置。

1.3 数字表达谱的建立

以番茄功能基因组数据库网站(<http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/>)中 RNA-seq data 的数据作基础,建立 *SISGR1* 基于 RNA-seq 的数字表达谱。

1.4 sgRNA 的设计和选择

根据 CRISPR-Cas9 靶点设计原则,利用 CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>)^[19] 筛

选 *SISGR1* 及其启动子区域的 sgRNA 序列,即 3'端有 PAM 元件的 20 个连续的碱基序列, PAM 元件设定为 NGG, sgRNA 的结构为 5'-(N) 20NGG-3', N 为任意核苷酸。

1.5 *SISGR1* 启动子顺式作用元件分析

根据 *SISGR1* gDNA 所在染色体信息,获取 *SISGR1* 基因上游 1 500 bp 的启动子序列。利用 PlantCare 服务器 (http://bioinformatics.psb.ugent/webtools/plantcare/html/search_CARE.html)^[20]对 *SISGR1* 启动子序列进行顺式作用元件分析。

2 结果与分析

2.1 番茄 *SISGR1* 的分子特征

从 GenBank 搜索到番茄 *SISGR1* 的蛋白质序列(GenBank Accession: AAY98500.1),该蛋白由 272 个氨基酸组成,平均分子量 30 532.49 u,摩尔消光系数 $40\,540\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,理论等电点 pI 为 8.65, GRAVY (疏水性算术平均值)为 -0.34,属于亲水蛋白,没有跨膜结构域、信号肽和核定位序列。该蛋白的 48~200 aa 具备典型的 stay-green superfamily 保守结构域。序列比对表明,不同物种氨基酸序列多态性主要发生在 stay-green 结构域的下游(图 1)。

2.2 *SISGR1* 的基因组定位和结构

以 *SISGR1* 序列 (GenBank Accession: AAY98500.1)作 query 在番茄的基因组数据库进行 Blast,结果表明 *SISGR1* 位于番茄的第 8 号染色体(CP023764.1),起始密码子至终止密码子的位置在 63 418 923~63 416 720 nt,长 2 204 nt,由 4 个外显子、3 个内含子组成,外显子总长 819 nt,内含子总长 1 385 nt,外显子的长度在 117~360 nt,内含子的长度变化较大,在 100~1 118 nt(图 2)。

2.3 基于 RNA-seq 的 *SISGR1* 数字表达谱

以番茄功能基因组 RNA-seq 数据库为基础,分析 *SISGR1* 基因(ID TC119167)在番茄不同组织以及不同生长时期的表达谱(图 3)。结果显示, *SISGR1* 基因在成熟的红果中大量表达,在破色期的果实和开放的花中有少量表达,而在种子、胚根、顶端分生组织、不同时期的幼苗、根系、叶片、花蕾、绿果中均无表达,验证 *SISGR1* 基因是与果实中番茄红素合成和代谢相关的基因。

Fig. 3 Digital expression profile of *SISGR1* based on RNA-sequence

2.4 sgRNA 的设计和评价

设定 PAM 为 NGG,CRISPRdirect 在线分析表明 *SISGR1* 序列分布 76 条 sgRNA(图 4),其中正链分布 46 条,负链分布 30 条,其中 12 条横跨两个外显子邻接处,不适合进行编辑,另有 16 条含有 TTTTs 序列,使用 pol III 启动子时应尽量

避免选用。在其余的 58 条 sgRNA 中,有 1 条其邻近 PAM 12 nt 的种子序列在番茄全基因组上是唯一序列,特异性最好,位于 681~703 nt,另有 5 条 sgRNA 的邻近 PAM 12 nt 的种子序列除了靶位点外,在基因组的其他位置只有 1 条与其完全匹配的序列,可作为候选序列。



绿色表示这些 sgRNAs 位于外显子绿色示 sgRNA 邻近 PAM 12 nt 的种子序列在番茄全基因组上是唯一序列;蓝色表示该 sgRNA 邻近 PAM 12 nt 的种子序列在基因组的其他位点有 1 条与其匹配的序列;灰色表示这些 sgRNAs 横跨两个外显子邻接处或含有连续 TTTT

These sgRNAs located in exon green showed that the seed sequence of sgRNA adjacent to PAM 12 nt is the only sequence on the whole tomato genome; blue indicates that the seed sequence of the sgRNA is adjacent to PAM 12 nt has one matching sequence at other sites in the genome; grey indicates these sgRNAs across two exons are adjacent or contain continuous TTTT

图 4 sgRNAs 在 *SISGR1* 的分布

Fig. 4 Position of sgRNAs in *SISGR1*

2.5 *SISGR1* 启动子顺式作用元件和 sgRNA 的分布

基因表达主要受其上游的启动子上分布的顺式作用元件调控。利用在线工具 PlantCare 分析 *SISGR1* 上游 1 500 bp 的启动子序列。结果显示,该序列除了含有典型的 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件外,还分布有 ABRE3a、ABRE4、AE-box、AP-1、ARE、AT~TATA-box、CAAT-box、ERE、G-Box、MYC、Myb、STRE、TATA-box、TC-rich repeats 等众多顺式作用元件,其中一些诱导型元件的分布见表 1。

搜寻 *SISGR1* 启动子序列分布的 sgRNA,发

现含有 86 条(图 5),其中正链分布 44 条,负链分布 42 条,剔除 15 条含有 TTTTs 的序列,尚有 71 条可供选择,其中在启动子上游有 2 条特异性较高,分别位于 107~85(负链)和 215~193 nt(负链),其邻近 PAM 12 nt 的种子序列在番茄全基因组上是唯一序列,特异性较好。有 2 条 sgRNA(分别位于 305~327nt 和 306~308)包含了 AE-box 元件,有 5 条 sgRNA(分别位于 625~647 nt,634~656 nt,635~657 nt,1 032~1 054 nt 和 1 033~1 055 nt)包含 ABRE 和 G-box 元件,位于 1 119~1 231 nt 的 sgRNA 则含 TAC-element 元件,意味着选用这些 sgRNA 进行基因编辑,有可能使所含的启动子元件序列发生突变致使功能变化。

表 1 *SISGR1* 启动子顺式作用元件分析

Table 1 Predicted cis-regulatory elements in *SISGR1* promoter

元件 Element	序列及位置 Sequence and position	数量 Number	功能 Function
ABRE	ACGTG,1 044 637 291(—)	3	脱落酸响应顺式作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
AE-box	AGAAACAA,308(—)	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
ARE	AAACCA,869	1	厌氧诱导反应顺式调控元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
G-Box	CACGTT,636(—),1 043(—)	2	光响应顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
G-box	TACGTG,291(—)	1	光响应顺式调控元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC, 142 (—), 1 421	2	防御和胁迫响应顺式调控元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	CCATCTTTTT,1 132(—)	1	水杨酸响应顺式调控元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness

注：(—)表示位于序列的负链上。
Note:(—) means it's on the negative chain of the sequence.

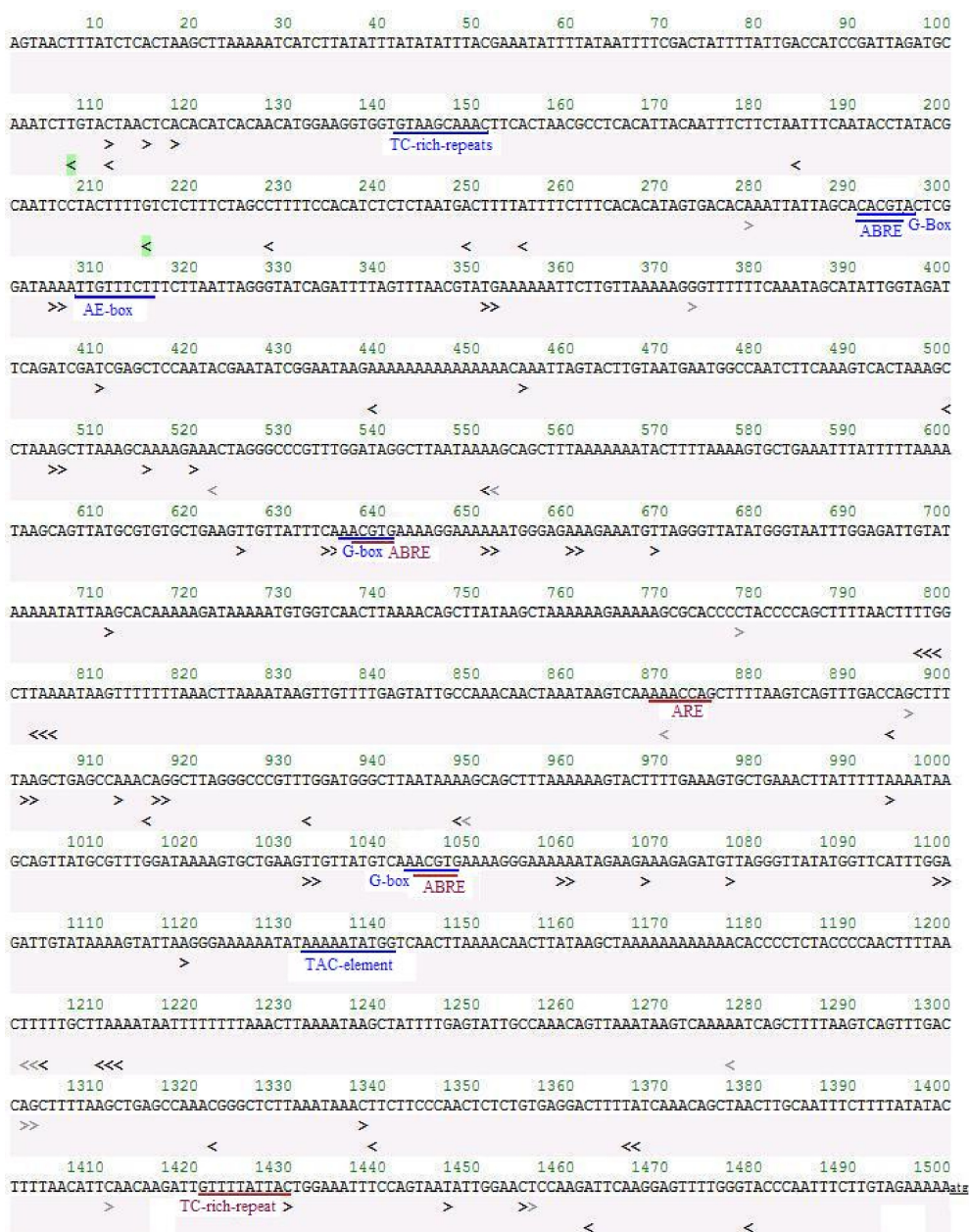
3 讨论

番茄果实成熟时,随着叶绿素逐步降解和有
色体合成,呈现不同果色^[21]。番茄滞绿基因 *SIS-GR1* 突变^[5],使得果实中叶绿素降解不完全而
“滞绿”。番茄滞绿突变多为点突变,有不同的突
变体^[22],表现不同的滞绿程度,使果色深浅不一。
番茄滞绿突变是非功能型突变,叶绿素降解过程
受到抑制,但不影响植株衰老进程中的其他环
节^[23]。*SISGR1* 蛋白可与 PIPSY 互作并影响其
活性,调控果实中番茄红素的含量^[10]。近年来以
多种新型高效的 DNA 靶向内切酶为基础建立的
基因组编辑技术^[13],因具有高效准确、制作简单
的特点,已被广泛应用到植物基因功能研究和定
向改良植物性状方面^[24],该技术可以在不同物种
中对目标基因进行定点敲除、单核苷酸或多核苷
酸片段置换、添加等靶向修饰,不必通过导入反义
基因或 RNAi 基因抑制靶基因功能。本研究中
CRISPRdirect 在线分析表明 *SISGR1* 序列分布
76 条 sgRNA 序列,其中 6 条 sgRNA 可作为后续
种子序列,为利用 CRISPR/Cas9 基因编辑获得
不同位点、不同类型的突变、提高 PIPSY 活性提
供了可能。另外,其中的一些 sgRNA 序列具有
较高的序列特异性,基因编辑时有可能规避脱靶
效应,可作为优先选用序列。

基因表达产物取决于编码序列,表达的时空
量则由启动子调控。利用 CRISPR/Cas9 突变相
关基因的启动子而不是这些基因本身,能够实现

对数量性状的精细调节,微调基因表达而不是剔
除或灭活它们编码的蛋白^[25]。Rodriguez 等^[26]
利用 CRISPR/Cas9 技术对启动子区域进行基因
组编辑,实现对番茄产量性状(果实大小、花序分
枝和株型)的精细调控。对水稻 *Wx* 基因启动子
上的关键顺式作用元件进行基因编辑,创制了多
个可微调直链淀粉含量和蒸煮食味品质的新 *Wx*
等位基因^[27],这些研究表明对启动子进行基因编
辑可以适度调节目的基因的表达。

利用在线工具 PlantCare 分析番茄 *SISGR1*
上游 1 500 bp 的启动子序列,发现 *SISGR1* 启动
子区分布多条顺式作用元件,如脱落酸应答元件
ABRE、水杨酸应答原件 TCA-element,光应答原
件 AE-box、G-Box、逆境胁迫响应元件 TC-rich
repeats 等,可能预示 *SISGR1* 的表达受光照、激
素及逆境胁迫的调控,为通过调节日长、使用激素
或胁迫刺激等途径调节 *SISGR1* 的表达特性提供
了可能。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑可使番茄
SLCLV3 基因的启动子区产生多组突变,诱导番
茄的花序、果实、株型发生广泛变异^[26],实现对基
因表达的微调 and 数量性状的调控。另外,选用 2
条 sgRNA 进行双编辑,将有可能定点删除 2 条
sgRNA 之间的启动子片段及顺式元件序列,对番
茄 *SISGR1* 启动子序列进行分析,发现该序列含
有 86 条 sgRNA,其中 2 条特异性较高且位于序
列上游,其邻近 PAM 12 nt 的种子序列在番茄全
基因组上是唯一序列,可有效降低脱靶效益,二者
的间隔距离为108 nt,可作为后续基因编辑载体



绿色表示 sgRNA 邻近 PAM 12 nt 的种子序列在番茄全基因组上是唯一序列;灰色表示这些 sgRNAs 位于外显子邻接处或含有连续的 TTTT 序列,选用 pol III 启动子尽力避免选用。顺式元件下划线红色示位于正链,蓝色表示位于负链

The green seed sequence of sgRNA near PAM 12 nt is the only sequence on the whole genome of tomato; the grey indicates that these sgRNAs are located adjacency to the exon or contain continuous TTTT sequence, and pol III promoter is selected to avoid selection. The red below underlined cis element is in the positive chain and blue in the negative chain

图 5 *SISGR1* 启动子包含的诱导型顺式作用元件和 sgRNAs

Fig. 5 Position of cis-acting elements and sgRNAs in promoter of *SISGR1*

构建的首选 sgRNA。其中 7 条 sgRNA 还包含顺式作用元件序列,预示如选用这些 sgRNA 进行基因编辑将使所含的顺式元件序列发生突变,为原位探明这些元件的功能,进而调节启动子表达特性、提高番茄果实的番茄红素含量探索一条新途径。

在进行基因编辑时,核酸内切酶切割导致产

生 DNA 双链断裂,然后细胞通过非同源末端连接或同源重组修复断裂。同源重组可产生精确的定点替换或者插入突变,但发生频率较低,也有研究报道,借助双生病毒的复制元件能够提高番茄细胞中的同源重组模板 DNA 的表达量,提高重组效率^[28]。本研究分析表明,番茄 *SISGR1* 基因及其启动子区分布诸多 gRNA,为通过同源重组

修复在 *SISGR1* 基因及其启动子区插入或替换特定序列、创造新的等位基因提供了基础。

参考文献 Reference:

- [1] LI X L, XU J D. Meta-analysis of the association between dietary lycopene intake and ovarian cancer risk in postmenopausal women[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:4885.
- [2] THOMAS H. Mendelian locus controlling thylakoid membrane disassembly in senescing leaves of *Festuca pratensis* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1987, 73:551-555.
- [3] PARK S Y, YU J W, PARK J S, *et al.* The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(5):1649-1664.
- [4] AKHTAR M S, GOLDSCHMIDT E E, JOHN I *et al.* Altered patterns of senescence and ripening in *gl*, a staygreen mutant of tomato [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(336):1115-1122.
- [5] BARRY C S, MCQUINN R P, CHUNG M Y, *et al.* Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(1):179-187.
- [6] HORTENSTEINER S. Chlorophyll degradation during senescence[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57:55-77.
- [7] SAKURABA Y, SCHELBERT S, PARK S Y, *et al.* STAY-GREEN and chlorophyll catabolic enzymes interact at light-harvesting complex II for chlorophyll detoxification during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(2):507-518.
- [8] SAKURABA Y, PARK S, KIM Y, *et al.* Arabidopsis STAY-GREEN 2 is a negative regulator of chlorophyll degradation during leaf senescence[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(8):1288-1302.
- [9] GERRISH, CHRISTOPHER, ENFISSI, EUGENIA M A, BRAMLEY, PETER M, *et al.* Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(10):3194-3211.
- [10] LUO Z D, ZHANG J H, LI J, *et al.* A STAY-GREEN protein *SISGR1* regulates lycopene and β -carotene accumulation by interacting directly with SIPSY1 during ripening processes in tomato[J]. *New Phytol*, 2013, 198:442-452.
- [11] 罗志丹. 番茄果实颜色与质地调控基因 *SISGR1* 和 *nsLTP* 的功能鉴定[D]. 武汉:华中农业大学, 2012.
- LUO ZH D. Function analysis of fruit color and texture regulated genes *SISGR1* and *nsLTP* in tomato[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [12] 邓洁. 番茄滞绿突变体果实后熟及 *SGR1* 突变分析[D]. 广州:华南农业大学, 2018.
- DENG J. Analysis of ripening characteristics and *SGR1* mutation in tomato stay-green mutants[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- [13] VOYTAS D F. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64(1):327-350.
- [14] LI X D, WANG Y N, CHEN S, *et al.* Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:559.
- [15] PUCHTA H, FAUSER F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future[J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(5):727-741.
- [16] ITO Y, NISHIZAWA-YOKOI A, ENDO M, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 467(1):76-82.
- [17] TOMLINSON L, YANG Y, EMENECKER R, *et al.* Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant biotechnology journal*[J]. 2019, 17:132-140.
- [18] LI X, WANG Y, CHEN S, *et al.* Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:559.
- [19] NATIO Y, HINO K, BONO H, *et al.* CRISPRdirect, software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(7):1120-1123.
- [20] LESCOT M, D'HAIS P, MOREAU Y, *et al.* PlantCARE, 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(1):325-327.
- [21] KLEE H J, GIOVANNONI J J. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45(1):41-59.
- [22] BARRY C S, PANDEY P. A survey of cultivated heirloom tomato varieties identifies four new mutant alleles at the green-flesh locus[J]. *Molecular Breeding*, 2009, 24(3):269-276.
- [23] BARRY C S. The stay-green revolution: Recent progress in deciphering the mechanisms of chlorophyll degradation in higher plants[J]. *Plant Science*, 2009, 176:325-333.
- [24] 王艳芳, 苏婉玉, 曹绍玉, 等. 新型基因编辑技术发展及其在植物育种中的应用[J]. 西北农业学报, 2018, 27(5):617-625.
- WANG Y F, SU W Y, CAO SH X, *et al.* Development of novel gene editing technologies and its applications in plant breeding[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2018, 27(5):617-625.
- [25] 张淑娟, 张荣志, 宋国琦, 等. 小麦 *Pinb* 基因启动子区 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建[J]. 山东农业科学, 2020, 52(1):1-9.
- ZHANG SH J, ZHANG R ZH, SONG G Q, *et al.* Construction of promoter region CRISPR/Cas9 genome editing vector of *Pinb* gene in wheat[J]. *Shandong Agricultural University*, 2018.

- tural Sciences*, 2020, 52(1): 1-9.
- [26] RODRIGUEZ L D, LEMMON Z H, MAN J, *et al.* Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 470-489.
- [27] HUANG L, LI Q, ZHANG C *et al.* Creating novel *Wx* alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 2164-2166.
- [28] CERMAK T, BALTES N J, CEGAN R, *et al.* High-frequency, precise modification of the tomato genome[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 16: 232-246.

Molecular Characteristics and sgRNA Analysis of *SISGR1* Gene in Tomato

LIU Jiangna, ZHANG Xiying, LI Rongxia, ZHANG Xiaowei,
BAI Yunfeng and ZHANG Aiping

(Institute of Agriculture Science of Sixth Division, Xinjing Production and Construction Corps, Wujiaqu Xinjiang 831300, China)

Abstract The aim of this study is to clarify the molecular characteristics of *SISGR1* gene and its distribution of sgRNA in tomato, which is expected to use CRISPR/Cas9 technology for site-directed mutation or fragment deletion of *SISGR1* and its upstream promoter sequences, and for improvement of lycopene content in tomato fruits by regulation of *SISGR1* expression. Blast was used to analyze the molecular characteristics of lycopene synthesis regulation gene *SISGR1*. The results showed that *SISGR1* gene was located on chromosome 8 of tomato, which contained 4 exons and 3 introns, with encoding region 819 nt, encoding 272 aa, 48—200 aa was a typical staygreen superfamily conserved domain. Based on RNA-Seq, the digital expression profile of *SISGR1* showed that *SISGR1* was specifically expressed in fruits, and was not expressed in roots, stems and leaves of plants. The results of CRISPRdirect analysis showed that there were 64 SgRNA, with PAM as NGG in the exon region of *SISGR1*, among which one was the only seed sequence adjacent to PAM 12 nt which had the highest specificity in the whole tomato genome. The results indicated that the sgRNA could be used for *SISGR1* gene targeted editing in tomato varieties and could effectively avoid off-target effect. The analysis of 1 500 bp upstream promoter sequence of *SISGR1* showed that the sequence contained 2 unique sgRNA sequences which had good specificity in the whole genome of tomato, and 7 sgRNA sequences with different cis-elements, respectively. It was suggested that the selection of these sgRNA sequences for gene editing could cause mutations in the promoter sequences, and resulted in functional changes.

Key words Tomato; *SISGR1*; Molecular characteristics; Promoter; sgRNA

Received 2021-07-07

Returned 2022-02-22

Foundation item National Natural Science Foundation of China(No. 32160710, No. 31760571); Talent Program of Science and Technology Innovation for Youth, of Xinjiang Production and Construction Corps(No. 2021CB037); Technology Program of Sixth Division(No. 1903).

First author LIU Jiangna, female, master, associate research fellow. Research area: crop genetics and breeding. E-mail: 284984737@qq.com

Corresponding author ZHANG Aiping, female, bachelor, research fellow. Research area: molecular breeding of plant. E-mail: 592354963@qq.com

(责任编辑: 史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)