

番茄果实成熟过程中番茄红素含量及合成相关基因表达的分析

刘英明, 姜晶*, 王晶, 杨艳丽, 孟昭娟

沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁省设施园艺重点实验室, 沈阳110866

摘要: 以2个高代自交系粉果番茄MLK₁和红果番茄FL₁为材料, 利用实时荧光定量PCR技术及色差仪法, 对果实成熟过程中4个时期的番茄红素含量分析及八氢番茄红素合成酶(*Psy1*和*Psy2*)和番茄红素环化酶(*Lcy*)基因的表达进行研究。结果表明, 在番茄果实成熟的过程中, 番茄红素的含量也逐渐增高, 在完熟期达到最高, 且红果中的含量高于粉果中的。在2个番茄品种果实不同部位中, *Psy1*、*Psy2*和*Lcy*基因在果实逐渐成熟的过程中转录水平均逐渐增加, 在完熟期表达量最高, 且红果FL₁中的表达量高于粉果MLK₁表达量, 果实中*Psy*基因的表达量高于*Lcy*基因的表达量。

关键词: 番茄; 番茄红素; 实时荧光定量PCR; 基因表达

Analysis of Lycopene Content and Biosynthetic Related Gene Expression during Maturation of Tomato Fruit

LIU Ying-Ming, JIANG Jing*, WANG Jing, YANG Yan-Li, MENG Zhao-Juan

Key Laboratory of Protected Horticulture, Ministry of Education, Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: Two tomato cultivars red fruit FL₁ and pink fruit MLK₁ with significant difference in lycopene content were used for the study of the lycopene content and the gene expression of phytoene synthase (*Psy1* and *Psy2*) and lycopene cyclase (*Lcy*) in different organs and at four development stages of fruits. The results showed that the content of lycopene gradually increased in tomato fruit ripening process and was the highest in the ripe stage, the content of lycopene in red fruit FL₁ was higher than that in pink fruit MLK₁ tomato. Three genes were expressed in different parts of the two varieties tomato fruits in the transcription level and the expression levels were the highest at the ripe stage. The genes expression of red fruit FL₁ was higher than those in pink fruit MLK₁. *Psy* gene expression level was higher than the expression levels of *Lcy* gene in the same varieties of fruit.

Key words: tomato; lycopene; real-time quantitative PCR; gene expression

番茄红素(lycopene)是植物合成的一种天然类胡萝卜素。它广泛存在于番茄、西瓜、柚、胡萝卜、南瓜、番木瓜和番石榴等蔬菜水果中, 而番茄中的含量最高, 每100 g鲜重含量为0.2~20 mg。番茄红素是胡萝卜素的异构体, 通过类异戊二烯代谢途径合成, 可以在环化酶的作用下转变成 δ -胡萝卜素、 γ -胡萝卜素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄素、紫黄质、新黄素等类胡萝卜素。八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, *Psy*)是植物类胡萝卜素生物合成中促进番茄红素合成的上游关键酶, 催化两分子的牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)缩合形成八氢番茄红素, 由*Psy*基因编码, 在番茄中已获得2个编码基因(Fraser等1999; Kato等2004)。番茄红素 β -环化酶(lycopene β -cyclase, *Lcy*)基因从

拟南芥(GBAN L40176)中分离得到, 随后陆续从辣椒(GBAN X86221)、番茄(GBAN X86452)、烟草(GBAN X81787)和黄水仙(GBAN X98796)中分离到, 该酶催化番茄红素分子的2个末端形成 β 环, 即为 β -胡萝卜素(许昌杰和张上隆2000; 朱长甫等2004)。

目前, 国内外对番茄红素的生理功能、保健功能及其提取工艺方法研究较多, 针对高番茄红素品种选育的研究也主要以加工番茄为材料(Shewmaker等1999; Hirschberg 2001; Kabelka等2004; Bramley 2002; Gallagher等2004; 吕鑫等

收稿 2012-10-11 修订 2012-12-26
资助 国家自然科学基金项目(30971999)和辽宁省教育厅重点实验室项目课题(2009S052)。

* 通讯作者(E-mail: jiangjingcau@163.com; Tel: 024-88487143)。

2009), 但就番茄果实不同部位、不同时期的番茄红素含量变化与番茄红素合成基因表达分析的相关性研究在国内外鲜有报道。本文以2种果色不同的鲜食番茄品种为试材, 采用色差法估测了番茄果实成熟过程中不同部位的番茄红素含量, 同时利用实时荧光定量方法检测了番茄红素代谢过程的3个酶基因的表达, 根据相关性分析确定番茄果实发育过程中番茄红素积累的关键酶, 了解掌握它们在各个时期的表达量, 为类胡萝卜素在各个时期的调控提供研究信息, 为进一步了解番茄果肉类胡萝卜素积累特点奠定基础。

材料与方法

1 材料与试剂

供试材料为沈阳农业大学蔬菜分子育种实验室经过多年培育获得的性状表现稳定的高代自交系粉果类番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.) MLK₁ 和红果类番茄FL₁。

RNA提取试剂盒RNAPrep pure购自宝生物工程(大连)有限公司, RNase I、2.5×RealMasterMix/20×SYBR solution和PCR系列试剂均购自大连TaKaRa公司。

2 试验方法

分别于植株绿熟期(果实充分长大, 果实顶部由绿色转为白色, 但还没有着色)、转色期(果实顶部着色程度达到1/4左右)、成熟期(果实颜色进一步发展, 红色由顶部扩展到果腹部, 进而颜色扩展到整个果实, 果实肩部只留少许绿色)、完熟期(果实完全成熟, 且果肉开始软化) 4个时期取果实的果柄、胶质胎座、心室隔壁和中果肉, 取样后样品立即置于液氮内, 用于总RNA的提取, 而果实中剩下的部分用CR-400全自动色差仪(圣光仪器有限公司)分别测量果柄、胶质胎座、心室隔壁和中果肉的L、a和b值, 每样品取3个果实, 并分别求出

a/b值。番茄红素含量测定采用孟昭娟等(2006)的丙酮甲苯分析方法。

2.1 总RNA的提取及反转录cDNA

取50 ng~2 μg的总RNA, 加入5 μL 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs、1 μL 10 μmol·μL⁻¹ Oligo d(T)₁₅彻底混匀后于65 °C下变性5 min后, 迅速置于-20 °C冷却2 min。再加入5 μL 5×M-MLV Reaction Buffer、1 μL M-MLV Reverse Transcriptase和1 μL Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, 用RNase-free ddH₂O补充到25 μL, 混合液于37 °C下保温62 min, 70 °C下保温15 min, 将反转录得到的cDNA于-20 °C保存, 以备用于实时荧光定量分析。

2.2 实时定量RT-PCR

将上述得到的cDNA稀释4倍后取2 μL, 并分别与2 μL引物(2 μmol·L⁻¹, 表1)及9 μL 2.5×RealMaster-Mix/20×SYBR solution、7 μL ddH₂O混匀后, 采用AB (Applied Biosystems) 7500 Real Time PCR System和软件7500 software v2.0.1对样品cDNA进行相对定量分析, 用2^{-ΔΔCT}法, 3次重复, 其中Actin作为内参基因。

2.3 数据处理

试验数据用Excel、DPS软件进行标准误差分析及相关性分析。试验重复3次。

实验结果

1 番茄果实成熟过程中番茄红素含量的变化

本研究首先将色差值与利用分光光度计方法测定的番茄红素含量进行相关性分析, 根据表2数据得出, 在红果中色差值a/b与番茄红素含量的相关系数为0.9725, 在粉果中为0.9471, 均达到了极显著正相关。这与已有研究根据色差计的读数估测果实中番茄红素的含量相一致(Arias等2000; 王辉等2010)。因此本实验后续番茄红素含量均以色差值a/b表示。根据色差计的读数估测果实中番茄

表1 实时荧光定量RT-PCR所用引物

Table 1 Primers of real-time fluorescence quantitative RT-PCR

基因名称	正向引物	反向引物
<i>Actin</i>	5' TGTCCCTATTTACGAGGGTTATGC 3'	5' AGTTAAATCACGACCAGCAAGAT 3'
<i>Psy1</i>	5' TGGCCCAAACGCATCATATA 3'	5' CACCATCGAGCATGTCAAATG 3'
<i>Psy2</i>	5' GTTGATGGCCCTAATGCATCA 3'	5' TCAAGCATATCAAATGGCCG 3'
<i>Lcy</i>	5' TCGTTGGAATCGGTGGTACAG 3'	5' AGCTAGTGTCTTGGCCACCAT 3'

红素的含量, 这对于以提高番茄红素含量为主要目标的优质育种具有重要意义, 育种者可以通过色差计来快速方便的初选高番茄红素的优良基因型。

由表3可知, 在果实发育成熟过程中, a/b值逐渐增大, 在完熟期达最高, 且在完熟期同一部位红果FL₁的a/b值比粉果MLK₁的大。在绿熟期时两果

实中胶质胎座的a/b值较大, 而且在进入转色期时, 其a/b值增加得也快, 说明番茄果实中红色最先积累于胶质胎座, 番茄红素在胶质胎座中合成最早。进入转色期后, 中果肉的a/b值增长加快, 到完熟期时为最高, 同时也高于果实的其他部位, 这说明番茄红素含量决定着番茄果实(生理成熟期到完熟期)颜色的深浅。

表2 不同成熟时期番茄果实色差值与番茄红素含量的关系

Table 2 The relationship between the color readings and lycopene content in different maturation periods of tomato fruit

果实发育时期	MLK ₁				FL ₁			
	a值	b值	a/b值	番茄红素含量/ mg·100 g ⁻¹ (FW)	a值	b值	a/b值	番茄红素含量/ mg·100 g ⁻¹ (FW)
绿熟期	-12.68±1.04	14.30±0.83	-0.89±0.03	0.04	-7.46±0.92	23.85±2.34	-0.31±0.07	0.01
转色期	-2.61±0.09	16.51±0.84	-0.16±0.02	0.05	0.02	22.90±1.38	0.01	0.21±0.02
成熟期	5.52±0.24	17.59±0.90	0.31±0.05	0.55±0.04	12.18±0.82	19.98±1.45	0.61±0.03	1.50±0.08
完熟期	13.97±0.48*	9.91±0.94	1.41±0.09*	1.61±0.09	26.19±2.40*	16.52±1.34	1.59±0.12*	5.68±0.36*

*表示在0.05水平上差异显著。下表同此。

表3 不同成熟时期两种番茄果实各部分色差a/b值

Table 3 The a/b value of different parts in different maturation periods of two tomato fruit

果实部位	MLK ₁ a/b值				FL ₁ a/b值			
	绿熟期	转色期	成熟期	完熟期	绿熟期	转色期	成熟期	完熟期
果柄	-0.41±0.01	-0.03±0.01	0.32±0.04	0.76±0.05	-0.32±0.03	-0.04	0.49±0.04	0.96±0.08
胶质胎座	-0.04	0.17±0.01*	0.94±0.14*	1.18±0.09	-0.01	0.26±0.02*	0.85±0.07*	1.34±0.09
心室隔壁	-0.54±0.05	0.09±0.01	0.71±0.09	1.09±0.07	-0.55±0.04	0.05	0.51±0.03	1.31±0.04*
中果肉	-0.45±0.04	-0.34±0.02*	1.19±0.10*	1.31±0.09	-0.59±0.05	0.09±0.01	1.38±0.10*	1.64±0.10

2 番茄果实成熟过程中*Psy1*、*Psy2*和*Lcy*基因的表达变化

由图1-A可知, 在绿熟期2个番茄品种果柄、胶质胎座、心室隔壁和中果肉中均能检测到*Psy1*和*Psy2*基因转录水平的表达, 但其表达量均较小, 且在不同品种、不同部位没有明显的差异。说明果实尚未着色或着色不明显, 与表3中a/b值均为负数一致, 果实中*Psy*基因的表达量很少, 番茄红素合成很少或还未合成, 导致果实偏青。*Lcy*在两果实各部分中也均有表达。

番茄果实进入转色期(图1-B)以后, *Psy1*和*Psy2*基因的表达量稍有增加, 但增加量不是很多, 增加水平几乎一致, 这就为番茄果实着色做了合成酶的积累, 以促使番茄红素的合成。*Lcy*基因的表达量在两果实不同部位中表达量趋势不一致,

但整体上均呈现上升趋势。

从图1-C中可知, *Psy1*和*Psy2*基因的表达量在两果中均有明显的增加, 尤其在中果肉中增加量较多, 但是红果FL₁的表达量始终多于粉果MLK₁, 同时在表3中a/b值也快速增大, 果实红色加深, 番茄红素合成加快。*Lcy*的表达量大体上继续也呈现上升趋势, 但整体上其上升的趋势要低于番茄红素合成酶上升的趋势。因此可以看出, 在果实成熟过程中番茄红素的合成量远高于番茄红素的降解量, 从而导致番茄果实不断的加深。

由图1-D可知, *Psy1*和*Psy2*基因在两果实中均有不同程度的表达, 且不同部位之间表达量有明显不同, 整体上均呈现上升趋势, 但上升的趋势较成熟期稍缓慢。红果FL₁中*Psy1*和*Psy2*基因的表达量均明显高于粉果MLK₁, 因此*Psy*基因可能在调

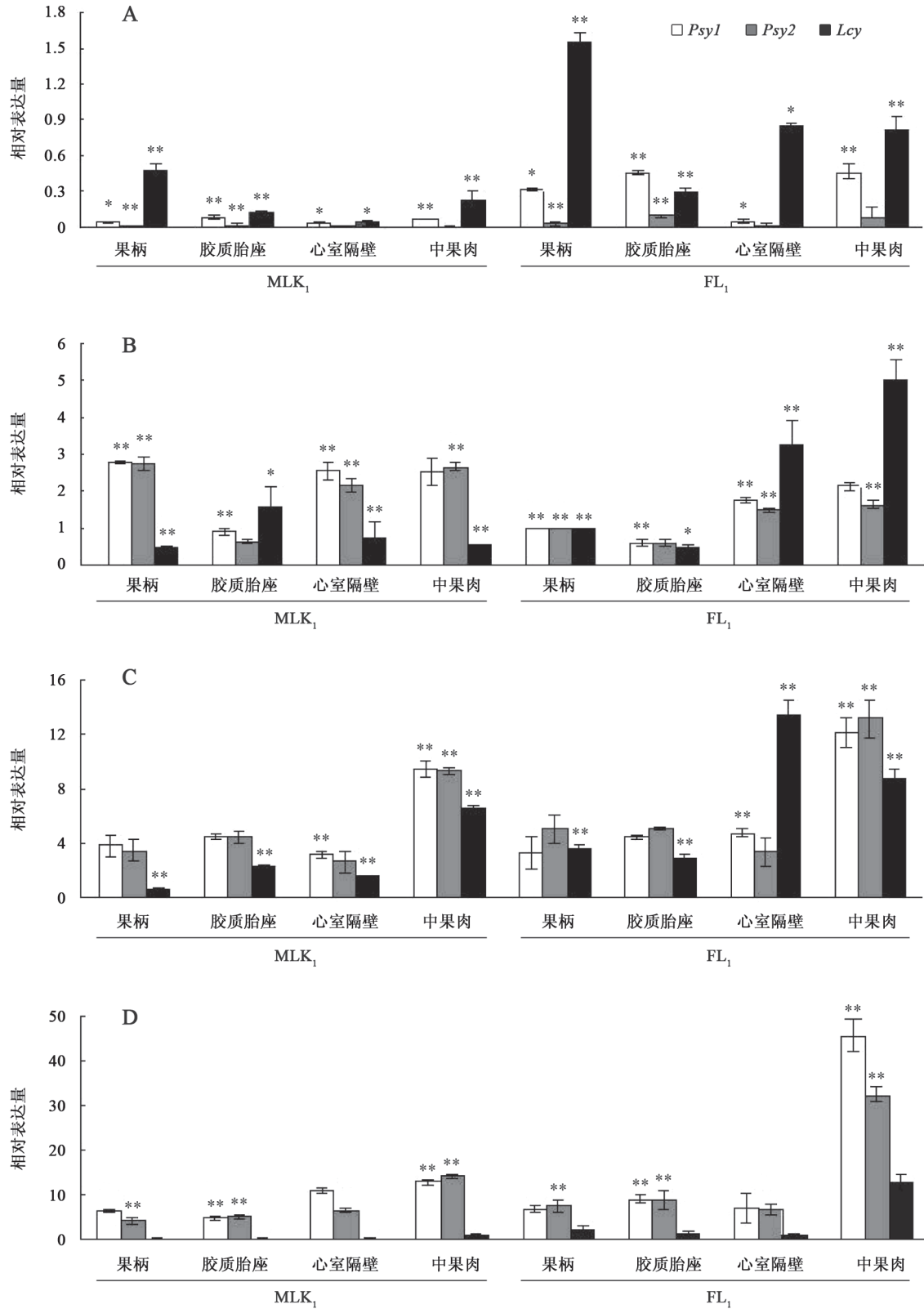


图1 成熟时期番茄不同部位*Psy1*、*Psy2*和*Lcy*基因相对表达含量

Fig.1 The relative expression levels of *Psy1*, *Psy2* and *Lcy* gene during maturation periods in different parts of tomato fruit
A为绿熟期; B为转色期; C为成熟期; D为完熟期。 **表示在0.01水平上差异显著; *表示在0.05水平上差异显著。

控番茄果肉颜色形成中起重要作用。*Psy*基因的表达量在中果肉中持续增加,且明显高于果实其他部分的表达量,这与色差计的测量结果相吻合。

3 番茄红素含量与基因表达的相关性分析

由表4可知,两种番茄果实成熟过程中,不同部位番茄红素积累与番茄红素合成代谢的相关基因表达相关性有差别,其中*Psy1*和*Psy2*基因表达对两果实中果肉番茄红素含量的积累是呈显著的

正相关性,即该基因在两种果实中果肉部位表达愈强,番茄红素的积累量愈多。*Lcy*基因在两个果实中不同部位与番茄红素含量存在不同程度的相关性,但差异不显著。这一结果表明*Psy1*和*Psy2*基因是两种番茄果实中果肉部位积累番茄红素的关键基因。另外*Psy1*在红果FL₁的胶质胎座中的表达也与该部位的番茄红素积累呈显著的正相关。

表4 果实发育时期番茄各部位番茄红素含量与基因表达相关性的分析

Table 4 Correlation among lycopene content and gene expression during different maturation periods in various parts of tomato fruit

果实部位	<i>Psy1</i>		<i>Psy2</i>		<i>Lcy</i>	
	MLK ₁	FL ₁	MLK ₁	FL ₁	MLK ₁	FL ₁
果柄	0.8161	0.8297	0.4978	0.8121	-0.1347	0.2507
胶质胎座	0.758	0.9422*	0.7920	0.8716	-0.4286	0.2269
心室隔壁	0.6973	0.7500	0.7176	0.8010	0.0501	-0.0845
中果肉	0.9119*	0.9422*	0.9255*	0.9537*	0.3220	0.6891

讨 论

已有研究表明,番茄果实成熟过程中,叶绿体转化为有色体,类胡萝卜素含量上升,这主要是由于番茄红素含量增加的结果(Fraser等1994)。本文结果也表明番茄果实中的番茄红素积累是由于转色期后合成番茄红素上游的*Psy*基因表达增强以及转化番茄红素生成胡萝卜素的*Lcy*基因表达减弱的结果。不同果实部位的类胡萝卜素组成含量不同,成熟期番茄红素主要存在中果肉(表3),而在果实内部如胶质胎座和心室隔壁等部位则较少,这表明光照条件影响了果实成熟期番茄红素的积累。这也可能是由于不同酶活性在果实发育不同阶段和果实不同部位存在差异,因此,酶基因的表达可能与时间和空间有关。*Psy*是类胡萝卜素合成途径中的限速酶之一,该酶充分表达就会导致八氢番茄红素的累积,最终影响类胡萝卜素的合成,所以*Psy*在植物的花和果实显色中起着重要作用。大多数植物都表达单一的*Psy*基因,而番茄、烟草、玉米和水稻等少数植物中有2个表达有差异的*Psy*基因,即*Psy1*和*Psy2*,其表达具有器官或质体特异性(Bramley等1992; Rosati等2000)。番茄红素生物合成主要受到植物个体发育阶段的调节,如在番茄的叶、花、果中,*Psy*和*Lcy*的表达量不同,在果实

成熟过程中、尤其是进入转色期以后*Psy*和*Lcy*基因的表达量迅速增加。3个基因在果实发育的不同时期都有表达,说明了它们在高等植物类胡萝卜素代谢中的重要作用。

Corona和Fermie (2006)研究发现,在番茄进入转色期以后,*Psy1*的mRNA表达水平显著提高,而参与下游合成的*Lcy*等基因表达水平下降。在本文中,对2种果色的鲜食番茄品种果实发育成熟过程中不同时期的*Psy*基因表达进行分析,发现*Psy*基因在番茄不同组织器官中的表达具有明显差异;在2个品种的成熟果实中,*Psy*基因表达量存在差异,红果中的表达量高于粉果,表明*Psy*基因可能在调控番茄果肉颜色形成中起重要作用。对2种番茄品种的果实发育成熟过程中的*Lcy*基因表达进行分析,结果发现其表达量不及*Psy*基因,表明*Lcy*基因不是2个番茄品种果实颜色产生差异的关键原因。

目前虽已分离和鉴定了多种植物类胡萝卜素生物合成途径的酶基因,并且植物类胡萝卜素基因工程也取得了可喜的进展。但仍缺乏对植物体内类胡萝卜素生物合成的调控机制以及类胡萝卜素生物合成基因的表达调控机制的认识,因此阐明植物体内类胡萝卜素合成相关基因表达调控的机制是非常重要的和迫切的。本文已利用高代自交系为材料,利用分子标记技术对番茄红素性状进

行QTL分析,期望获得新的类胡萝卜素合成调控的位点。

参考文献

- 吕鑫,侯丽霞,张晓明,李莉,何启伟(2009). 番茄果实成熟过程中番茄红素含量的变化. 中国蔬菜, (6): 21~24
- 孟昭娟,刘姝红,姜晶(2011). 鲜食番茄果肉中番茄红素含量性状的遗传分析. 中国农学通报, 27 (5): 452~456
- 王辉,李文丽,王富(2010). 由番茄果实表面色差估计的番茄红素含量遗传分析. 中国农学通报, 26 (4): 215~218
- 徐昌杰,张上隆(2000). 植物类胡萝卜素的生物合成及其调控. 植物生理学通讯, 36 (1): 64~70
- 朱长甫,陈星,王英典(2004). 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因在基因工程中的应用. 植物生理与分子生物学学报, 30 (6): 609~618
- Arias R, Lee TC, Logendra L, Janes H (2000). Correlation of lycopene measured by HPLC with the L^* , a^* , b^* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. J Agric Food Chem, 48: 1697~1702
- Bramley P, Teulieres C, Blain I, Bird C, Schuch W (1992). Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. Plant J, 2 (3): 343~349
- Bramley PM (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. J Exp Bot, 53: 2107~2113
- Carrari F, Fernie AR (2006). Metabolic regulation underlying tomato fruit development. J Exp Bot, 57 (9): 1883~1897
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM (1999). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: evidence for tissue-specific gene expression. Plant Physiol, 105: 405~413
- Gallagher CE, Matthews PD, Li F, Wurtzel ET (2004). Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. Plant Physiol, 135: 1776~1783
- Hirschberg J (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Curr Opin Plant Biol, 4: 210~218
- Kabelka E, Yang W, Francis DM (2004). Improved tomato fruit color within an inbred backcross line derived from *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* involves the interaction of loci. J Ame Soc Hortic Sci, 129 (2): 250~257
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. Plant Physiol, 134 (2): 824~837
- Rosati C, Aquilani R, Dharmapuri S, Pallara P, Marusic C, Tavazza R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G (2000). Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. Plant J, 24 (3): 413~420
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999). Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J, 20 (4): 401~412