

过量表达 miR319 对番茄果实品质的影响

昌伟¹, 李子龙¹, 胡灿丽¹, 范敬伟¹, 王建立², 杨瑞^{2*}

(1. 北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京农学院农业

应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要 [目的] 探索过量表达 miR319 和过量表达 LA 对番茄果实品质的影响。[方法] 以番茄野生型 M82、过量表达 miR319 和过量表达 LA 番茄为材料, 分析过量表达 miR319 和过量表达 LA 对番茄果实品质的影响。[结果] 过量表达 miR319 植株的可滴定酸、可溶性糖、V_C 和番茄红素的含量下降, 而过量表达 LA 植株的可滴定酸、可溶性糖、番茄红素的含量上升, V_C 含量下降。2 个转基因植株可溶性蛋白的含量与 M82 比较都有所上升。[结论] 过量表达 miR319 和过量表达 LA 对番茄果实品质的影响是相反的, 过量表达 LA 可以提高番茄果实品质。

关键词 番茄 (*Solanum lycopersicum*); miR319; 番茄品质

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)19-06150-02

Effect of Over-Expression miR319 on Fruit Quality of Tomato

CHANG Wei, YANG Rui et al (College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract [Objective] The present study aimed to explore the effects of over-expression miR319 and over-expression LA on fruit quality of tomato. [Method] Effects of over-expression miR319 and over-expression LA on fruit quality of tomato were analyzed by using tomato wild type M82, over-expression miR319 and over-expression LA as material. [Result] The results showed that: The over-expression jaw-D titratable acid, soluble sugar content V_C and Lycopene content were decreased, but over-expression LA, plant titratable, soluble sugar content and Lycopene content were increased, and V_C content was decreased. And two transgenic plants soluble protein content were better than M82. [Conclusion] The effects of over-expression of miR319 and over-expression LA on fruit quality of tomato are opposite and overexpression LA can improve fruit quality.

Key words Tomato; MiR319; Tomato nutritional quality

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是蔬菜中营养价值较高的品种之一, 也是近年来我国设施栽培面积较大的作物。番茄果实的发育是通过一系列生物和非生物因素相互调控的。茉莉酸作为植物调节剂, 可以在番茄的整个生长过程起到非常重要的作用。魏佳等^[1] 发现利用茉莉酸突变体 *spr2* 发现茉莉酸能够促进果实发育时期还原糖的积累。张佳楠等^[2] 利用 Micro-Tom 为试验材料, 外源喷施茉莉酸甲酯, 发现番茄果实中果糖和葡萄糖含量在整个生长发育期都呈递增趋势。Schommer 等^[3] 研究发现, miR319 的靶基因 TCP 转录因子家族成员调控茉莉酸生物合成进程中关键酶基因 LOX2 从而控制着茉莉酸的生物合成。笔者以 M82 为背景的过量表达 miR319 和过量表达 LA 为材料, 比较 3 个品种番茄果实的品质差异, 探索 miR319 对番茄果实的影响, 以期对番茄的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验于 2013 年 10 月~3 月在北京金六环农业园进行。试验材料为番茄野生种 M82, 以 M82 为背景的过量表达 miR319 和过量表达 LA 的转基因番茄。取新鲜果实, 研磨成原浆, 按照不同试验要求精确称量匀浆, 然后进行各项品质指标的测定。

1.2 可溶性蛋白的测定 用考马斯亮蓝 G-250 法测定^[4]。准确称取 4.000 g 番茄果实匀浆, 加入 10 ml 蒸馏水混匀, 于 4℃、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液即为可溶性蛋白溶液。吸取 1.0 ml 上清液, 加入 5.0 ml 考马斯亮

蓝 G-250 溶液, 充分混合, 放置 2 min 后在波长 595 nm 出比色。重复 3 次。

1.3 可溶性糖的测定 采用硫酸蒽酮比色法^[4], 准确称取 0.500 g 番茄果实匀浆, 加入到 15 ml 蒸馏水中, 沸水煮沸 20 min, 冷却后定容至 25 ml。离心 10 min (5 000 r/min), 上清液为待测液, 在 620 nm 下测得吸光度。重复 3 次。

1.4 有机酸总量的测定 采用标准碱滴定定量法。取 10.0 g 匀浆, 约用 50 ml 已煮沸、冷却的蒸馏水定容 250 ml。充分振荡后过滤。吸取 20 ml 滤液, 加入酚酞, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定。重复 3 次。

1.5 维生素 C 的测定 采用 2,6-二氯酚靛酚法测定^[4]。准确称取 5.000 g 番茄果实匀浆, 加入 10 ml 浓度 2% 草酸, 转移到 50 ml 容量瓶中定容。用高岭土和溶液混合, 过滤。取 10 ml 滤液, 用已标定的 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定。重复 3 次。

1.6 番茄红素的测定 用 GB/T 14215-2008 番茄酱罐头标准中测量番茄红素的方法测量^[5]。准确称取 0.200 g 番茄果实匀浆, 置于 10 ml 烧杯中, 加入少量无水甲醇, 过滤, 反复至无色, 保留残渣。分次用少量甲苯浸提番茄红素, 过滤, 至滤液无色, 滤液定容至 50 ml。在 485 nm 下测定提取液的吸光度。重复 3 次。

1.7 统计分析 数据应用 Excel2007、spss19.0 和 origin8 分别进行数据统计、差异显著性分析和作图分析。

2 结果与分析

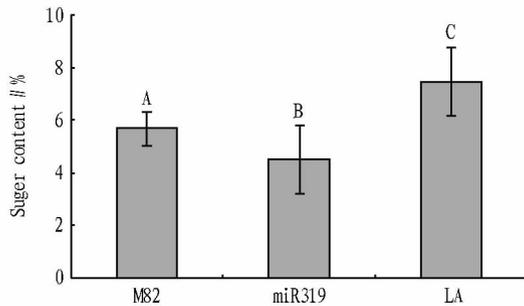
2.1 转基因植株对番茄果实可溶性糖的影响 图 1 表明, M82、过量表达 miR319 植株、过量表达 LA 植株的含糖量分别是 5.69%、4.52% 和 7.49%。过量表达 miR319 之后番茄果实的含糖量下降, 而过量表达 miR319 靶基因 LA 之后, 番茄果实的含糖量上升。这可能是在番茄果实成熟时, 糖含量

基金项目 长城学者 (CIT·&·TCD20130323)。

作者简介 昌伟 (1989-), 男, 安徽滁州人, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜生理与优质安全栽培。* 通讯作者, 实验师, 从事蔬菜生理与优质安全研究。

收稿日期 2014-05-31

受到 miR319 的调控,从而使番茄果实的含糖量下降。结果表明,在番茄果实成熟时,过量表达 miR319 植株的番茄果实含糖量下降,而过量表达 LA 植株的番茄果实含糖量上升。miR319 可能单独或者联合其他机制调控果实糖积累时的过程,是果实内的糖含量发生变化。



注:不同大写字母表示差异极显著,不同小写字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著,下同。

图1 不同番茄果实含糖量

2.2 转基因植株对番茄果实可滴定酸的影响 图2表明, M82 果实的可滴定酸含量为 0.61%, 过量表达 miR319 植株的果实可滴定酸含量为 0.48%, 下降 0.13%, 下降达到极显著 ($P < 0.01$)。过量表达 LA 果实的可滴定酸含量增加 0.1%, 增加达到极显著 ($P < 0.01$)。这可能在番茄果实成熟的过程中, 可滴定酸含量受到 miR319 的负调控, 从而使番茄果实内的可滴定酸含量下降; 而过量表达 miR319 靶基因 LA 时, 抑制了 miR319 的表达, 使番茄果实内的可滴定酸含量上升。

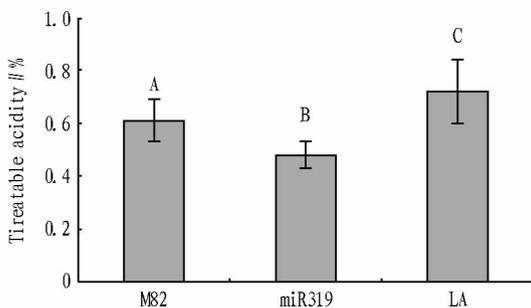


图2 不同番茄果实可滴定酸含量

2.3 转基因植株对番茄果实可溶性蛋白的影响 图3表明, M82、过量表达 miR319 植株、过量表达 LA 植株的蛋白质含量为分别是 122.1、138.5 和 134.4 $\mu\text{g/g}$ 。过量表达 miR319 和过量表达 LA 植株番茄果实的可溶性蛋白相对于 M82 来说分别上升 16.4 和 13.3 $\mu\text{g/g}$, 上升都达到了显著性 ($P < 0.05$)。有可能是在番茄果实成熟的过程中, 过量表达 miR319 和过量表达 LA 植株体内的诱导番茄果实中其他蛋白质的表达, 使果实内的可溶性蛋白含量上升。

2.4 转基因植株对番茄果实维生素 C 的影响 图4表明, M82、过量表达 miR319 和过量表达 LA 的维生素 C 的含量分别是 1762.7、1440.7 和 1593.2 mg/kg。结果表明, 在番茄果实成熟时, 过量表达 miR319 植株的番茄果实和过量表达 LA 植株的番茄果实的维生素 C 含量都有所下降。与野生番茄 M82 相比较都有极显著差异 ($P < 0.01$)。在番茄果实成熟的时候,

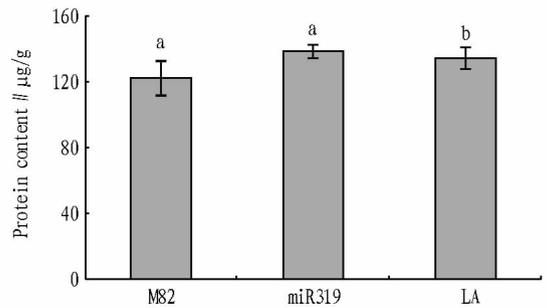


图3 不同番茄可溶性蛋白含量

过量表达 miR319 和过量表达 LA 的维生素 C 含量下降。

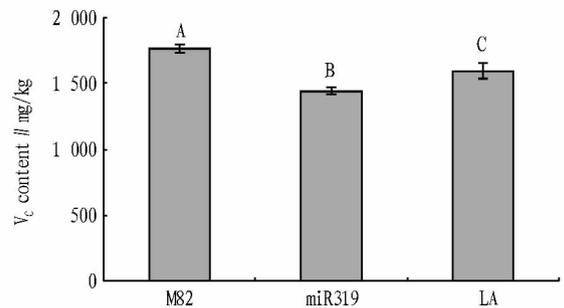


图4 不同番茄维生素 C 含量

2.5 转基因植株对番茄果实番茄红素的影响 图5表明, M82、过量表达 miR319 和过量表达 LA 的番茄红素含量分别为 89.0、84.0 和 98.0 mg/kg FW。与 M82 相比, 过量表达 miR319 植株的番茄果实番茄红素下降 5.0 mg/kg FW, 而过量表达 LA 植株的番茄果实番茄红素上升 9.0 mg/kg FW, 效果显著 ($P < 0.05$)。汪俏梅等^[6]研究发现, 内源茉莉酸能通过邮箱番茄红素合成相关基因而正调控番茄红素的合成, MeJA 处理可以提高番茄红素的合成。试验结果表明, 在过量表达 miR319 植株中, miR319 负调控茉莉酸合成通路中 Lox2 基因, 使番茄内的茉莉酸含量下降, 从而使果实内的番茄红素下降。而在过量表达 LA 植株中, 正向调控茉莉酸表达, 使番茄中茉莉酸含量上升, 使番茄果实内的番茄红素含量上升。

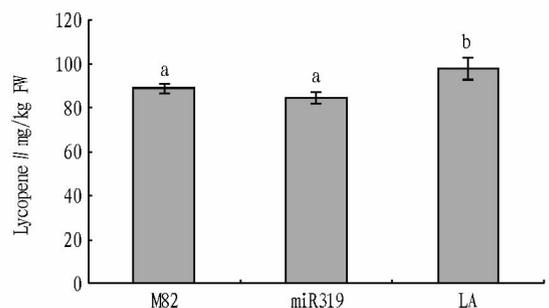


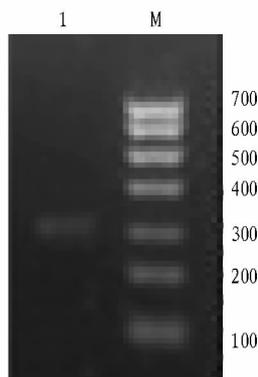
图5 不同番茄红素含量

3 结论与讨论

番茄作为模式植物, 在番茄的转基因上科学家们做了大量的试验, 主要包括一些抗病虫害、提高产量、延迟成熟等品种。1994 年, Calgene 公司第 1 次将多聚半乳糖醛酸酶的反义 cDNA 转入番茄的基因组中, 首先研制出了延迟成熟的转 (下转第 6154 页)

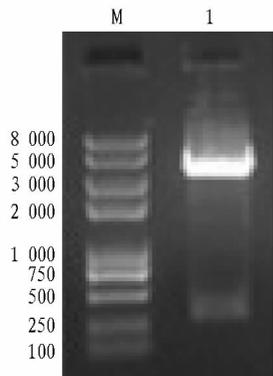
上海生工生物工程有限公司测序。

图 7 为重组克隆质粒 PCR 验证结果,图 7 的第 1 泳道是以重组质粒 pGFP-Pspo0A 为模板的 PCR 反应,得到了一条大小在 300 bp 左右的条带,大小与图 7 中 PCR 产物大小结果相符。图 8 为重组克隆质粒 pGFP-Pspo0A 双酶切验证结果,图中



注:M:Trans Mark I DNA Marker;1:pGFP-Pspo0A PCR。

图 7 重组克隆质粒 pGFP-Pspo0A PCR 验证



注:M:Trans2K™ II Plus DNA Marker;1:pGFP-Pspo0A / EcoR I / Xba I。

图 8 重组克隆质粒 pGFP-Pspo0A 双酶切验证

显示从 pGFP-Pspo0A 上切下一条大小为 300 bp 左右的片段,大小与 PCR 结果相符,另一条 4 800 bp 左右大小的条带与空质粒大小一致,说明克隆载体 pGFP-Pspo0A 构建成功。

2.6 spo0A 基因启动子序列分析将所测序列与 GenBank 数据库中的序列进行 Blast,与 GenBank 已公布的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*168 *spo0A* 基因启动子两者相似性为 98%。

3 结论与讨论

试验以枯草芽孢杆菌 B579 基因组 DNA 为模板,扩增得到芽孢形成基因启动子 Pspo0A,其长度与 NCBI 上报道的 *spo0A* 启动子大小相同,均为 294 bp。将 Pspo0A 连接到 pGFP78 上,构建 pGFP-Pspo0A 重组质粒。通过测序验证质粒构建成功。此重组质粒可以为枯草芽孢杆菌快速检测芽孢形成提供基础。以枯草芽孢杆菌 B579 RNA 为模版,通过反转录,得到 cDNA,RT-PCR 检测芽孢形成关键基因 *spo0A* 的表达量,结果表明在发酵过程前期(6~10 h)中,随发酵过程的进行,*spo0A* 的表达量与芽孢数量呈正相关。该结论为进一步研究提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] 张淑梅,王玉霞,李晶,等. 基因标记枯草芽孢杆菌 BS-68A 在黄瓜上定殖[J]. 生物技术,2006,16(4):73-74.
- [2] LEE K J, SERALATHAN K K, HAN S S, et al. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 1139-1145.
- [3] 穆常青,潘玮,陆庆光,等. 枯草芽孢杆菌对稻瘟病的防治效果评价及机制初探 [J]. 中国生物防治,2006,22(2):158-160.
- [4] KHAN M R, FISCHER S, EGAN D, et al. Biological control of fusarium seedling blight disease of wheat and barley [J]. Phytopathology, 2006, 96: 386-394.
- [5] ZHANG Y C, JIA J H, ZHENG Y, et al. Optimization of sporulation of bio-control bacteria B579 by two-step control strategy [J]. Agricultural Science and Technology, 2011, 12(2): 249-252.
- [6] VIRGINIA CASTILLA-LLORENTE, DANIEL MUÑOZ-ESPÍN, LAURENTINO VILLAR, et al. Spo0A, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication [J]. The EMBO Journal, 2006, 25: 3890-3899.
- [7] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26: 675-684.

(上接第 6151 页)

基因番茄 Flavr-SavrTMP 中,并被批准用于商业化种植,这给研制转基因番茄提供了可行性。但是现在转基因食品在国内没有得到大范围的推广。试验结果发现,在过量表达 miR319 植株番茄果实中可溶性糖和可溶性蛋白都有所下降,说明在番茄果实成熟期,过量表达 miR319 植株体内中 miR319 表达量的提高,导致植株体内茉莉酸含量下降,使可溶性糖和可溶性蛋白的含量下降,而在过量表达 miR319 靶基因 LA 植株中,使茉莉酸含量上升,可溶性糖和可溶性蛋白的含量上升,这与前人的研究一致^[1]。激素对植物体的整个生长发育的调节机制是非常复杂的,通常果实发育并不是由单一激素来调控的,大多是多个激素共同调控的结果。所以下一步的工作可以通过对多个激素共同的作用来研究对番茄果实的影响。

利用转基因植株来研究果实的生长机制和提高番茄产量是农业科学非常重要的手段。从试验结果到生产实践是

需要非常长的时间和机制。试验仅仅是从果实品质来评价转基因番茄,如果后期要大面积推广,应该严格按照国家关于转基因作物的相关标准进行评价,并且在种植过程中为防止转基因番茄破坏生态平衡,应该在相对封闭的环境中种植和管理,要严格与传统的农作物分开,规范转基因番茄的生产和加工过程。

参考文献

- [1] 魏佳,贾承国,李振,等. 利用突变体研究植物激素对番茄果实品质的影响[J]. 核农学报,2009,23(3):521-525.
- [2] 张佳楠,崔娜,王楠,等. 外源茉莉酸甲酯对不同发育时期番茄果实糖含量的影响[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会 2013 年学术年会论文集摘要集. 中国园艺学会,2013:1.
- [3] SCHOMMER C, PALATNIK J F, AGGARWAL P, et al. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets[J]. PLoS Biology, 2008, 6(9): 230.
- [4] 曹建康,姜微波,赵玉梅. 果树采后生理生化实验指导[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007.
- [5] 尚德军,王军. 番茄红素测量方法的改进[J]. 现代科学仪器,2006(1): 117-118.
- [6] 汪俏梅,张敏,陈德龙. 果实中类胡萝卜素的激素调控[J/OL]. <http://www.docin.com/p-561020321.html>.