

盐胁迫对加工番茄叶片番茄红素 β -环化酶基因表达量的影响

张 芬¹, 张 波², 田 丽萍^{1,2}, 薛 琳³, 李 辉 玲¹, 曾 沂 辉³

(1. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学 药学院, 新疆 石河子 832000; 3. 石河子蔬菜研究所, 新疆 石河子 832000)

摘 要:以加工番茄品种“石红 305”、“里格尔 87-5”以及“LA2711”为试材,采用半定量 RT-PCR法初步检测了不同浓度盐胁迫下加工番茄叶片中番茄红素 β -环化酶(*Lyc- β*)基因的表达水平,以期探索盐胁迫对加工番茄类胡萝卜素代谢影响的分子机理。结果表明:一定范围的盐浓度可以上调或下调 *Lyc- β* 基因的表达,且随着盐浓度的增加,不同加工番茄品种叶片中 *Lyc- β* 基因的表达量呈现不均一变化,这可能与品种的基因型以及耐盐性有关;利用 HPLC 方法对相应叶片中 β -胡萝卜素含量进行测定后发现,*Lyc- β* 基因的表达与 β -胡萝卜素含量的变化相符,这也在一定程度上说明盐胁迫可通过调控 *Lyc- β* 基因的表达量来影响 β -胡萝卜素的代谢。

关键词:盐胁迫;加工番茄;番茄红素 β -环化酶(*Lyc- β*);表达量

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0082-04

盐碱环境可以引发植株一系列的生理反应,包括植物养分的运输、代谢系统、生长抑制等^[1]。类胡萝卜素作为植物体内常见的次级代谢产物之一,是广泛存在于自然界的一类重要天然色素的总称,主要由直链番茄红素在 1 端或 2 端环化后形成^[2]。植物中起环化作用的酶主要有番茄红素 β -环化酶(*Lyc- β*)和番茄红素 ϵ -环化酶(*Lyc- ϵ*)2 种,而后者需借助于前者才能完成其相关催化作用,因而认为番茄红素 β -环化酶为类胡萝卜素合成的关键酶^[3]。Dharmapuri 等^[4]把 *Lyc- β* 基因转入番茄,可使番茄果实中的类胡萝卜素增加近 10 倍,表明 *Lyc- β* 基因高表达能够显著提高类胡萝卜素的生物合成。 β -胡萝卜素是植物体内常见的一种类胡萝卜素,其本身具有很强的抗氧化性,在清除植物体内活性氧自由基以及提高植物的抗逆性方面具有重要的作用。为初步探讨盐胁迫对加工番茄色素代谢的影响及其分子机理,该试验在前人研究的基础上,以新疆北疆土地盐胁迫平均含量^[5]为标准,设置高、中、低 3 个盐胁迫区间,探讨了不同盐浓度对加工番茄叶片中关键酶基因 *lyc- β* 表达量及 β -胡萝卜素含量的影响,以期为果实中色素代谢及其相关机理

研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试加工番茄品种“石红 305”、“里格尔 87-5”以及“LA2711”均由石河子蔬菜研究所提供。

1.2 试验方法

采用 1/2 剂量华南农业大学番茄营养液专用配方^[6]进行水培育苗。在 4 叶期,于营养液中加入不同浓度 NaCl 溶液,使其终浓度分别达 50、100、150 mmol/L,其中以 0 mmol/L 的 NaCl 浓度为对照(CK)。在盐胁迫处理 10 d 后取相同叶龄叶片进行相关试验,3 次重复。

1.2.1 半定量 RT-PCR 法测定 *Lyc- β* 酶基因表达量 用无菌水将叶片清洗干净,并用滤纸吸干后用 TIANGEN 公司 RNA prep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒并根据说明书进行总 RNA 提取,cDNA 第一链合成及半定量 RT-PCR 体系均参照天根试剂盒方法进行(TIANGEN, TIAN Script cDNA 第一链合成试剂盒,20 μ L 体系;TIANGEN,2 \times Taq Master Mix PCR 25 μ L 体系)。引物参考李莉等^[7]设计如下:番茄 *Lyc- β* 引物序列(GenBank 登录号为 X86452)上游 5'-GGTATTACTATTCAG-GCAACG-3',下游:5'-CCAATAACGAGGTTCTA-AGTC-3',目的片段为 723 bp。肌动蛋白基因(*Actin*)参考贾峰等^[3](GenBank 登录号为 EU938079)上游引物 5'-TTGACGGAAAGAGGTTAT-3',下游引物 5'-GTTG-GAAGGTGCTGAGAG-3'目的片段为 484 bp。以肌动蛋白基因的相对含量作为内参,在扩增 30~33 个循环

第一作者简介:张芬(1988-),女,硕士研究生,研究方向为植物营养生理生态。E-mail:zhangfen2008_cool@163.com

责任作者:田丽萍(1961-),女,硕士,教授,研究方向为植物营养生理生态和生药学。E-mail:lipingt@163.com

基金项目:科技部“十二五”农村领域国家科技计划资助项目[2011BAD35B07(02)]。

收稿日期:2013-10-23

后, 5 μL 的扩增产物进行 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Gel analysis 软件对基因的相对表达条带进行分析。为方便比较, 设定“石红 305”, 在 0 mmol/L NaCl 胁迫下表达量为 100%。

1.2.2 HPLC 法测定番茄叶片中 β -胡萝卜素含量 标准品的配制: 取一定量的 β -胡萝卜素标品用丙酮(含 0.1% BHT)进行溶解后配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并逐步稀释到 10.0、7.5、5.0、2.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后用 0.45 μm 的针头过滤器过滤备用。色谱柱为 SunFire C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm) (美国 Waters 公司); 流动相: A 为丙酮, B 为甲醇; 洗脱程序: 0~5 min, 35%~25% B; 5~10 min, 25%~10% B, 10.01 min 停止, 间隔 2 min。流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 450 nm; 柱温为室温。

1.3 项目测定

叶片中 β -胡萝卜素提取参考刘国顺等^[8]的方法进行; 色谱条件参考王新超等^[9]方法进行改进。

1.4 数据分析

采用 SPSS 软件进行数据分析, 各处理水平之间用 Duncan's 测验作显著性分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 电泳检测

不同品种及盐胁迫处理加工番茄叶片提取总 RNA 的电泳结果如图 1 所示, 28S、18S、5S 条带清晰说明 RNA 样品基本无降解。经 ddH₂O 溶解的 RNA 溶液 A_{260}/A_{280} 比值在 1.50~1.90 之间, 说明 RNA 可用于 cDNA 的合成。

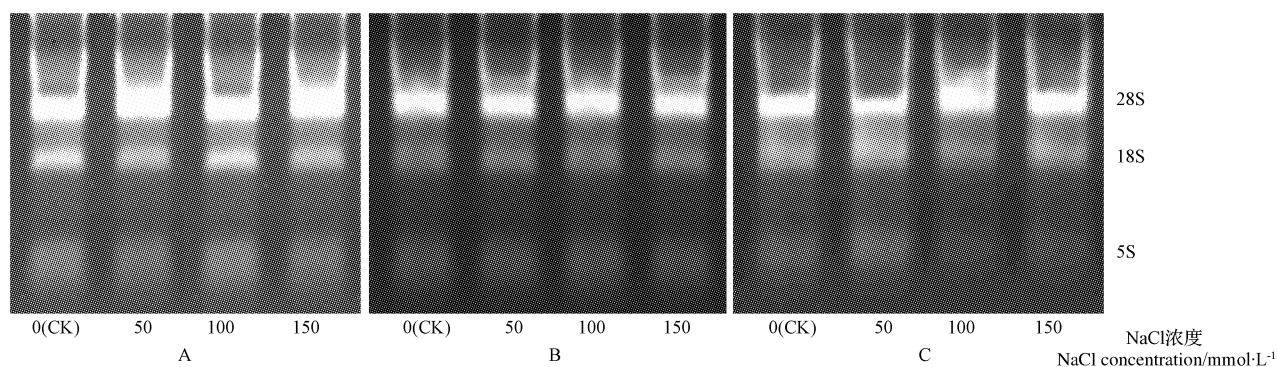


图 1 叶片总 RNA 的电泳检测

注: A. “石红 305”; B. “里格尔 87-5”; C. “LA2711”。下同。

Fig. 1 Results of agarose gel of total RNA extraction

Note: A. ‘Shihong305’; B. ‘Ligeer87-5’; C. ‘LA2711’. The same below.

2.2 $Lyc-\beta$ 基因表达量测定结果

经半定量 RT-PCR 检测, $Lyc-\beta$ 基因的扩增结果如图 2 所示, 各酶基因的扩增产物条带清晰, 基本无拖尾现象。在 3 个品种及不同浓度的盐处理之间, $Lyc-\beta$ 基因的表达量均有一定的差异, 这说明一定范围的 NaCl 胁迫可以上调或下调 $Lyc-\beta$ 基因的表达。由图 3 统计分析结果可知, 随 NaCl 胁迫浓度的升高, 2 个品种的 $Lyc-\beta$ 基因的表达量呈现不均一变化, “石红 305”随着盐胁迫

浓度的增加, 其 $Lyc-\beta$ 基因的表达量逐级下降, 而“里格尔 87-5”和“LA2711”却是先升高, 而后在升高的幅度上又有所降低。0~50 mmol/L 盐胁迫区间下“石红 305” $Lyc-\beta$ 基因表达量变化不明显, 在 NaCl 浓度逐渐升高的时候开始呈现显著性差异; “里格尔 87-5”和“LA2711”2 品种基因表达量随盐胁迫的变化趋势较一致, 且在各胁迫浓度下 $Lyc-\beta$ 基因的表达量变化均较显著, 并于 50 mmol/L 左右变化幅度最大, 呈现增高趋势。

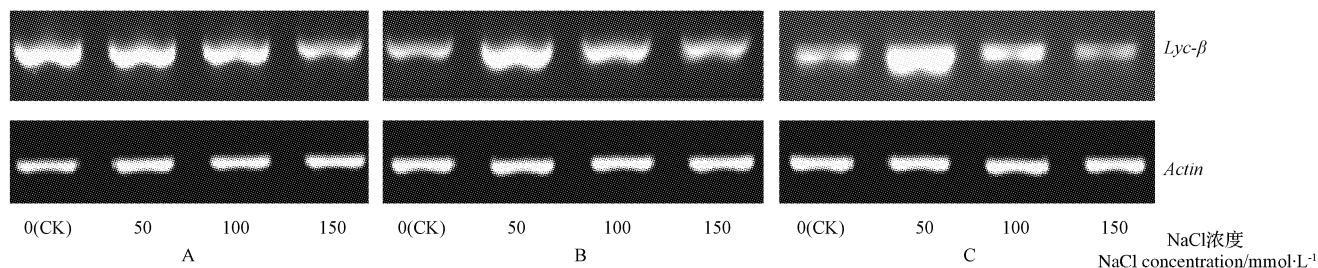


图 2 $Lyc-\beta$ 基因的半定量 RT-PCR 结果

Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of $Lyc-\beta$ gene

2.3 叶片中 β -胡萝卜素含量测定结果

2.3.1 标准曲线的绘制 将配制好的各级 β -胡萝卜素标准品, 10.0、7.5、5.0、2.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 按上述色谱条件进行检测, 以峰面积为纵坐标, 浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 1.6 \times 10^5 x + 70\ 496$, $R^2 = 0.9988$ 。结果表明, β -胡萝卜素的质量浓度在 1~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 其质量浓度与峰面积的线性关系良好。

2.3.2 样品含量的测定结果 由图 4 可以看出, 随着

NaCl 浓度的增加不同番茄品种的叶片中 β -胡萝卜素含量均发生了变化。“石红 305”呈现逐步降低的趋势, 且各处理间差异显著。“里格尔 87-5”和“LA2711”均是先升高在 50 mmol/L 左右处达到峰顶之后开始下降, 但“里格尔 87-5”于 50~100 mmol/L 盐胁迫间差异不显著, 100~150 mmol/L 盐胁迫间的叶片 β -胡萝卜素含量均高于对照组, 而“LA2711”在 150 mmol/L 盐胁迫处理含量与对照相比相对较低, 这也与相应的 $Lyc\beta$ 基因表达量的变化结果相符。

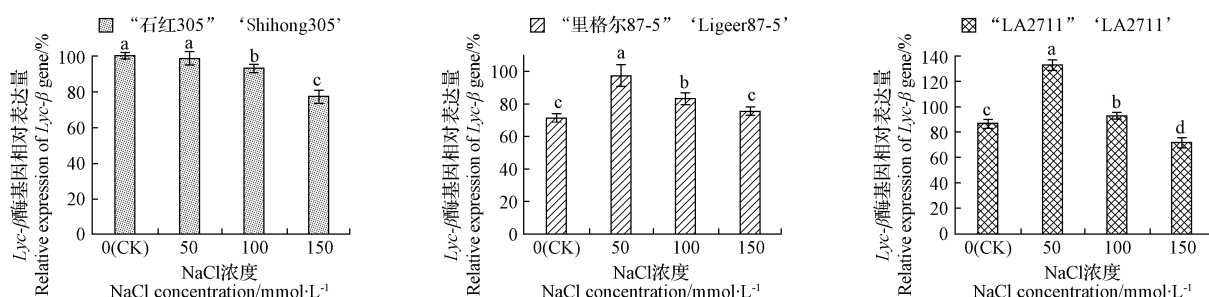


图 3 $Lyc\beta$ 基因的相对表达量统计分析

注: 不同小写字母表示在 0.05 水平下的统计显著性差异 ($P < 0.05$), 相同小写字母, 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同。

Fig. 3 Analysis of relative expression of $Lyc\beta$ gene

Note: Different lower case letters in same column indicate the significant difference under the level of $P < 0.05$. Same lower case letters in same column indicate no significant difference $P > 0.05$. The same as below.

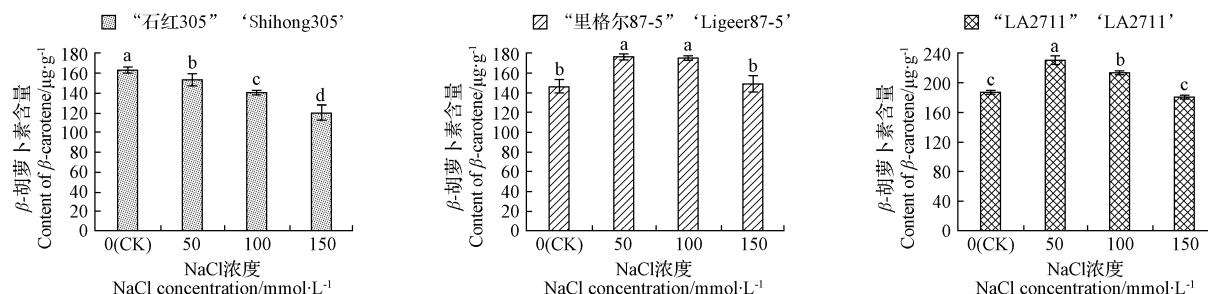


图 4 不同品种 β -胡萝卜素含量

Fig. 4 β -carotene content of different varieties

3 结论与讨论

类胡萝卜素合成过程中关键酶基因的表达量, 可能是造成类胡萝卜素种类及含量在不同物种中存在差异的主要原因。番茄红素 β -环化酶是植物类胡萝卜素代谢中控制番茄红素环化的关键酶, 抑制该基因的表达能导致番茄红素的积累, 而增强该基因的表达能促进番茄红素向 β -胡萝卜素和含 β -环的胡萝卜素转变^[10]。该试验对不同盐浓度条件下番茄红素 β -环化酶表达量的测定结果表明, $Lyc\beta$ 基因表达量的高低与 β -胡萝卜素的合成有着直接的联系。这说明一定程度的盐胁迫可以通过改变代谢过程关键酶基因的表达进而影响 β -胡

胡萝卜素的积累, 这与 Rodrigo 等^[11]对柑橘果实的研究结果相符。

关于类胡萝卜素代谢合成调控, 自 20 世纪 80 年代就有学者进行了广泛研究, 研究因子包括光照、温度、化学物质、养分供应、甚至海拔高度等^[12-14]。一般认为类胡萝卜素的合成与温度、光照和湿度等有关, 这些环境因子对植物体内类胡萝卜素合成基因的表达有明显影响^[15], 而盐作为一种常见的环境影响因子, 它与类胡萝卜素代谢之间应该也存在有一定的联系。该研究对 β -胡萝卜素含量的测定结果表明, 一定范围的盐浓度确实可以影响加工番茄叶片中 β -胡萝卜素的代谢, 导致其含量发生改变。但不同番茄品种对盐胁迫的响应不尽相同。

“石红 305”对不同盐梯度的表现与牛艳等^[16]对宁夏枸杞中 β -胡萝卜素的研究结果相似,但就“里格尔 87-5”和“LA2711”叶片 β -胡萝卜素含量随盐胁迫的变化来看,此趋势并不具有普遍性。

综上所述,在不同浓度盐胁迫条件下,加工番茄品种“石红 305”叶片中番茄红素 β -环化酶基因的表达水平随着 NaCl 胁迫浓度的增加逐渐减小,而“里格尔 87-5”和“LA2711”却表现为先升高后降低,这可能与不同品种的基因型以及耐盐性有关。对叶片 β -胡萝卜素含量的测定也表明,其含量的高低与 *Lyc- β* 基因表达密切相关。但随着 NaCl 胁迫浓度的改变以及处理时间的变化,二者的变化趋势以及 β -胡萝卜素的代谢与加工番茄品种抗盐能力之间的关系还有待进一步研究。该试验从加工番茄叶片中 β -胡萝卜素与盐胁迫浓度的相关性出发,初步探讨了盐胁迫对加工番茄色素代谢的影响,试验结果可为果实中相关色素的研究以及资源与环境的合理开发利用提供理论参考。

参考文献

- [1] Parida A K, Das A B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60: 324-349.
- [2] 杨式华,徐济仓,盛冀萍,等.烟草中质体色素研究进展[J]. *云南化工*, 2007, 34(1): 69-73.
- [3] 贾峰,徐文,刘卫群,等.温度与光照强度对烤烟番茄红素 β -环化酶基因表达的影响[J]. *植物生理学报*, 2011, 47(2): 189-192.
- [4] Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, et al. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits[J]. *FEBS Lett*, 2002, 519(1): 30-34.
- [5] 刘蕾.新疆土壤盐胁迫的组成和分布特征[J]. *干旱环境监测*, 2009, 23(4): 227-229.
- [6] 中国无土栽培技术论坛.常用无土栽培营养液配方[EB/OL]. <http://www.soilles.com>, 2012-11-7.
- [7] 李莉,侯丽霞,施木田,等.番茄红素环化酶基因片段克隆及反义表达载体构建[J]. *山东农业科学*, 2009(1): 1-7.
- [8] 刘国顺,韦凤杰,王芳,等.反相高效液相色谱法测定烤烟叶片发育过程中的类胡萝卜素类物质[J]. *色谱*, 2006, 24(2): 161-163.
- [9] 王新超,陈亮,赵丽萍,等.反相高效液相色谱法测定茶叶中 β -胡萝卜素含量[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(9): 91-93.
- [10] Bramley P M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and Development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 377: 2107-2113.
- [11] Rodrigo M J, Marcos J F, Zacarias L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation[J]. *Agric Food Chem*, 2004, 52(22): 6724-6731.
- [12] 陈义强,刘国顺,凌爱芬.氮、磷、钾肥和土壤水分对烟草烤后叶中类胡萝卜素含量的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(2): 279-282.
- [13] 曹勇,管安伟,谢强,等.土壤质地对烤烟叶片类胡萝卜素及叶绿素的影响[J]. *江西农业学报*, 2012, 24(6): 130-134.
- [14] 白森,韦建玉,邓宾玲,等.海拔高度对烟叶多酚和类胡萝卜素含量的影响[J]. *贵州农业科学*, 2012, 40(7): 66-68.
- [15] 朱长甫,陈星,王英典.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[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(6): 609-618.
- [16] 牛艳,许兴,魏玉清,等.不同产地土壤因子与宁夏枸杞中 β -胡萝卜素关系的研究[J]. *农业科学研究*, 2005, 26(2): 21-39.

Effect of Salt Stress on Expression of Lycopene Cyclase Gene in Processing Tomato Leaves

ZHANG Fen¹, ZHANG Bo², TIAN Li-ping^{1,2}, XUE Lin³, LI Hui-ling¹, ZENG Yi-hui³

(1. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 2. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000; 3. Vegetable Research Institute of Shihezi, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: Taking three tomato cultivars ‘Shihong305’, ‘Ligeer 87-5’ and ‘LA2711’ as material, the expression of lycopene cyclase gene (*Lyc- β*) of processing tomato leaves under the conditions of different salinity level was checked using semi-quantitative RT-PCR, in order to study the molecular mechanism of carotenoids synthesis in processing tomato leaves under salt stress. The results showed that the expression of *Lyc- β* gene could be up or down regulated at the certain range of salinity; it also found that different cultivars changed differently when the salinity level increased, which could be related to the tomato’s genotype and their ability of salt tolerance. HPLC was used for determination of β -carotene content in corresponding leaves, the results illustrated that the change of *Lyc- β* gene expression was correlated with the change of β -carotene content in the leaves. This study further revealed that salt stress could affect the metabolism of β -carotene synthesis by regulating the expression of lycopene cyclase gene.

Key words: salt stress; processing tomato; lycopene cyclase (*Lyc- β*); expression