

不同 *hp* 基因类型番茄中番茄红素与主要品质性状的差异及相关分析

李文枫, 李景富, 许向阳

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以3种含高色素 *hp* 基因类型的7个突变体番茄为试材,采用随机区组设计,研究了不同 *hp* 番茄果实中番茄红素含量差异及与其它主要品质指标的相关性,以期番茄果实中番茄红素性状的改良提供优良的基因供体和理论依据。结果表明:不同 *hp* 突变体番茄果实中番茄红素含量存在显著和极显著差异,总体趋势表现为 $hp2 > hp1 > hp3 >$ 对照(非 *hp* 基因突变体),其番茄红素含量平均值依次为 153.3、123.8、110.3、103.0 mg/kg;相关分析表明,不同 *hp* 基因突变体番茄果实中番茄红素含量与可溶性蛋白质含量、维生素 C 含量、可溶性总糖含量和糖酸比的相关性均未达到显著水平,但具有一定的正向相关性,即糖酸比 $>$ 维生素 C 含量 $>$ 可溶性蛋白质含量 $=$ 可溶性总糖含量。

关键词:番茄;番茄红素;高色素(*hp*)基因;相关分析

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)13-0097-05

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)是世界上重要的蔬菜作物之一,消费者和商家对番茄的商品性要求越来越高,尤其在大型超市中消费者和商家更青睐色泽红润、口感鲜美且货架期长的番茄。番茄果实为番茄红素提取的主要原材料,番茄红素是一种脂溶性天然色素,可使番茄成熟果实表现为红色果实。番茄红素在防癌

抗癌^[1-3]、预防心血管疾病^[4]、提高免疫功能^[5]和延缓衰老^[6]等方面具有重要的生理功能,目前番茄红素已成为国际上功能性食品成分研究中的热点之一,而我国对其相关研究还处于起步阶段。

在含高色素 *hp* 基因的番茄中含有丰富的番茄红素。高色素(high pigment)基因简称 *hp* 基因,包含 *hp1*、*hp2*、*hp3*、*hp2ⁱ*等。近年来多数研究者已经证实,*hp* 基因具有转红果实中总类胡萝卜素含量提高的作用,幅度在 20%~40%^[7-9],进而促进果实中番茄红素(lycopene)含量增加。其中 *hp1* 和 *hp2* 分别被定位在第 2 和第 1 染色体上^[10-11],并已对 *hp1* 和 *hp2* 基因进行了相关的分子标记辅助选择的育种研究^[12-13]。*hp3* 基因为通过 EMS 法突变玉米黄质环氧化酶基因(*Zep*)而获得^[9],该突变

第一作者简介:李文枫(1982-),女,博士,研究方向为番茄种质资源及分子生物技术。E-mail:lwfangel@163.com.

责任作者:李景富(1943-),男,教授,博士生导师,研究方向为番茄种质资源的研究和利用。E-mail:Lijf_2005@126.com.

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD02B02)。

收稿日期:2014-03-11

Abstract: ISSR reaction conditions of *Quercus variabilis* were optimized systematically via single-factor experiment by using the tender leaves of *Quercus variabilis* as test materials, resulting in establishment of optimal ISSR reaction system and thermal cycling conditions of *Quercus variabilis*. The results showed that the optimal ISSR reaction system included a total volume 25 μ L containing 2.5 μ L 10 \times Buffer, 30 ng template DNA, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.6 μ mol/L primer, 0.3 mmol/L dNTPs. Thermal cycling conditions were as follows: denaturation 1 min at 94 $^{\circ}C$; 35 cycles of 30 s at 94 $^{\circ}C$, 60 s at 51.5~59.0 $^{\circ}C$, 2 min at 72 $^{\circ}C$; and a final extension of 5 min at 72 $^{\circ}C$ at the end of the amplification. Based on the optimized reaction system, 12 primers with superior stability and polymorphism were selected from 100 ISSR primers. 166 bands were amplified in 22 individuals of the natural population in Shaanxi Province, among which 142 were polymorphic loci, the percentage of which was 85.54%, Nei's index 0.2928 and Shannon's information index was 0.4381, indicating the relatively higher genetic diversity within population of *Quercus variabilis*.

Key words: *Quercus variabilis*; ISSR; system optimization; genetic diversity

体产生高水平的番茄红素。现以 3 种 *hp* 类型的 7 个突变体和 2 个对照番茄为试材,研究了不同 *hp* 基因突变型番茄的番茄红素含量差异,同时分析其番茄红素与其它主要品质性状的相关性,以期筛选高番茄红素的 *hp* 基因突变体类型提供理论依据,为改良番茄品系在番茄红素含量和主要品质性状上的不足提供优良基因和供体,为进一步应用高色素 *hp* 基因的分离和克隆研究及应用给予理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:*hp1* 突变体 4 个(LA3368、LA3538、LA3404 和 LA3771);*hp2* 突变体 2 个(LA3006 和 LA4013);*hp3* 突变体 1 个(3-343),均由美国番茄遗传研究所(TGRC)提供;对照番茄为番茄品系 09913 和 09920,由东北农业大学番茄研究所提供。

试验试剂:葡萄糖(进口),0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液,牛血清白,2,6-二氯酚靛酚,抗坏血酸溶液,考马斯亮蓝 G-250,酚酞指示剂,石英砂,氯化钠,草酸,蒽酮,乙醇等,均为分析纯。

1.2 试验方法

供试番茄材料定植在东北农业大学园艺站阳光板温室,试验采用随机区组设计,3 行区,行长 3 m,行距 60 cm,株距 30 cm,3 次重复,取样于中间行,每株留 4 穗果。每个小区随机取 5 个大小均一的红熟期果实,按四分法从果实中部取样,样品保存于-70℃冰箱中。

1.3 项目测定

番茄果实中番茄红素含量测定采用分光光度法^[14];可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法,维生素 C 含量测定采用 2,6-二氯酚靛酚滴定法,可溶性总糖含量测定采用蒽酮比色法,可滴定酸含量测定采用标准滴定法^[15];糖酸比=可溶性总糖含量/可滴定总酸含量;番茄果实红熟期标准参考张要武等^[16]的方法。

1.4 数据分析

利用 DPS 7.05 和 Excel 2007 软件对果实番茄红素含量和 4 个主要品质指标进行数据的整理、方差分析、差异比较分析(SSR)及相关系数(*r*)分析。

2 结果与分析

2.1 不同 *hp* 基因类型番茄突变中番茄红素含量的差异分析

为明确不同 *hp* 基因类型对番茄果实中番茄红素含量的主导性,针对不同的 *hp* 基因类型突变体果实进行番茄红素含量测定和比较分析。由表 1 方差分析可知,9 个番茄品系的果实中番茄红素含量间存在极显著差异($P<0.0001$, $n=8$)。为此,对其进行多重比较分析,结果表明(表 2),不同的 *hp* 基因类型突变体番茄中果实番

表 1 不同番茄突变体番茄红素含量方差分析

Table 1 Analysis of variance of lycopene content of different tomato mutants

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
Source of variation	Square sum	df	Mean square	F value
品种间 Among variety	94.15	8	11.77	44.22**
重复间 Among repeat	0.04	2	0.02	0.08
误差 Error	4.26	16	0.27	
总变异 Total variance	98.45	26		

注:“**”表示处理间在 0.01% 水平差异达极显著。下同。

Note: “**” indicate the significance at level of 0.01 respectively. The same below.

表 2 不同番茄突变体番茄红素含量
新复极差比较分析

Table 2 Comparison analysis of new multiple range of lycopene content of different tomato mutants

<i>hp</i> 基因	序号	品种	番茄红素含量	番茄红素含量平均值	番茄类型
<i>hp</i> gene	No.	Varieties	Lycopene content /mg·kg ⁻¹	The average lycopene content/mg·kg ⁻¹	Tomato type
<i>hp2</i>	1	LA3006	158.7±3.1aA	153.3	高色素番茄
	2	LA4013	148.0±3.0bA		高色素番茄
<i>hp1</i>	1	LA3771	132.3±5.9cB	123.8	高色素番茄
	2	LA3368	128.0±3.6cB		高色素番茄
	3	LA3404	123.7±4.5cB		高色素番茄
	4	LA3538	111.0±6.6dC		高色素番茄
<i>hp3</i>	1	3-343	110.3±7.4dC	110.3	高色素番茄
CK	1	09913	107.3±4.7deC	103.0	普通番茄
	2	09920	98.7±3.1eC		普通番茄

注:小写字母表示差异显著在 5% 水平;大写字母表示差异显著在 1% 水平。

Note: Lowercase letters indicate the significance at level of 0.05; capital letters indicate the significance at level of 0.01 respectively.

茄红素含量存在显著和极显著差异,并具有一定的趋势,具体表现为 $hp2>hp1>hp3>$ 对照,其果实番茄红素含量平均值依次为 153.3、123.8、110.3、103.0 mg/kg,其中 *hp2*、*hp1* 和 *hp3* 类型番茄突变体果实中番茄红素含量分别为对照的 1.49、1.20、1.07 倍;同时发现 LA3006 和 LA4013 果实番茄红素含量较多并排在前 2 位,分别为 158.7 mg/kg 和 148.0 mg/kg,且均为含 *hp2* 基因类型突变体番茄品系。进而说明,不同的 *hp* 基因类型对番茄中的番茄红素含量具有不同的影响作用,尤其 *hp2* 基因类型对番茄中番茄红素含量具有重要的主导作用。

2.2 不同 *hp* 基因类型番茄中主要品质性状的差异分析

对含不同 *hp* 基因类型番茄品系果实中主要品质性状进行方差分析表明(表 3),不同番茄品系间果实可溶性蛋白质含量、维生素 C 含量、可溶性糖含量、糖酸比均存在极显著差异($P<0.01$, $n=8$),重复间仅可溶性糖含量存在极显著差异,其它性状重复间有差异,但不显著。为此,对各品系果实中主要品质性状进行多重比较分析,以其了解不同 *hp* 基因类型番茄的品质性状差异情况。

表 3 不同 *hp* 基因类型番茄突变体品系间
果实主要品质含量方差分析

Table 3 Analysis of variance quality main content of
fruit of different *hp* gene tomato mutants

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	F 值 <i>F</i> value
可溶性蛋白质含量 Soluble protein content/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$	8	23.39 **
重复间 Among repeat	2	0.64
维生素 C 含量 Vitamin C content/ $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}\text{FW}$	8	164.51 **
重复间 Among repeat	2	1.98
可溶性糖含量 Total soluble sugar content/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$	8	747.40 **
重复间 Among repeat	2	7.30 **
糖酸比 Sugar-acid ratio	8	20.60 **
重复间 Among repeat	2	0.68

从图 1 果实的可溶性蛋白质含量的比较分析可以看出,含 *hp3* 基因番茄品系 3-343 的果实中可溶性蛋白质含量最高,对其它品系表现极显著差异,而含 *hp2* 基因的 LA3006 和 LA4013 可溶性蛋白质含量次之,但极显著高于 LA3368、LA3538、LA3404、LA3771,总体表现为可溶性蛋白质含量 $hp3 > hp2 > hp1 >$ 对照。对果实中维生素 C 含量的比较分析表明(图 2),含 *hp1* 基因的 LA3538 维生素 C 含量最高,含 *hp2* 基因的 LA3006 和 LA4013 维生素 C 含量低于 *hp1* 番茄品系,极显著高于其它品系,总体表现为维生素 C 含量 $hp1 > hp2 > hp3 >$ 对照。

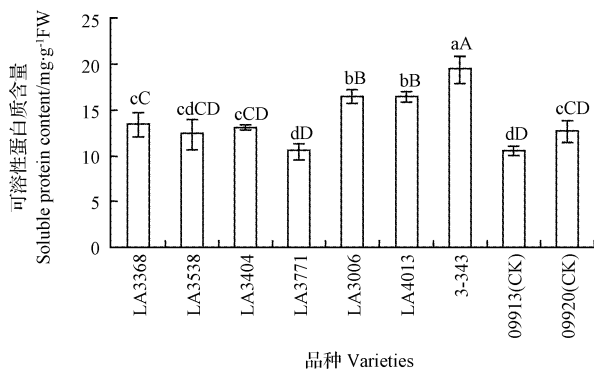


图 1 不同番茄中可溶性蛋白质含量的比较

Fig. 1 Comparison of soluble protein content of
different tomatoes

从图 3 可以看出,含 *hp3* 基因的 3-343 品系的可溶性总糖含量极显著高于其它品系;含 *hp1* 基因的番茄品系其不同的突变体间存在显著差异,具体表现为 LA3538 可溶性总糖含量极显著高于 LA3368,而 LA3404 和 LA3771 之间无显著差异;含 *hp2* 基因的 LA3006 和 LA4013 可溶性总糖含量无显著差异。总体表现为 $hp3 > hp1 > hp2 >$ 对照。图 4 对果实糖酸比的分析表明,在果实的糖酸比中,LA3538、LA3404、LA3771、LA3006、LA4013 和 3-343 无显著差异,并显著

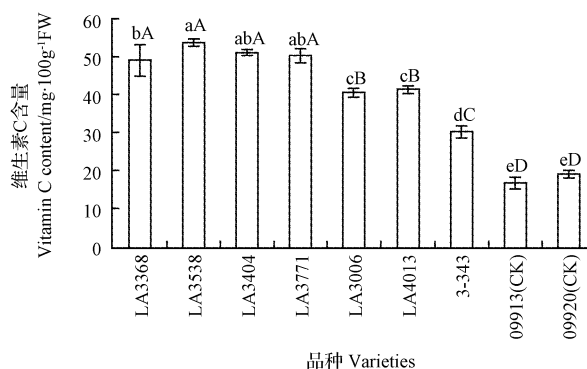


图 2 不同番茄中维生素 C 含量的比较

Fig. 2 Comparison of vitamin C content of different tomatoes

高于 LA3368 及对照,LA3368 和对照 09920 差异不显著,极显著高于对照 09913,总体表现为含 *hp* 基因番茄品系的果实中糖酸比极显著高于对照(LA3368 除外),其中 *hp2* 基因突变体番茄间的果实中糖酸比相对稳定,*hp1* 基因突变体番茄间的果实中糖酸比差异较大。

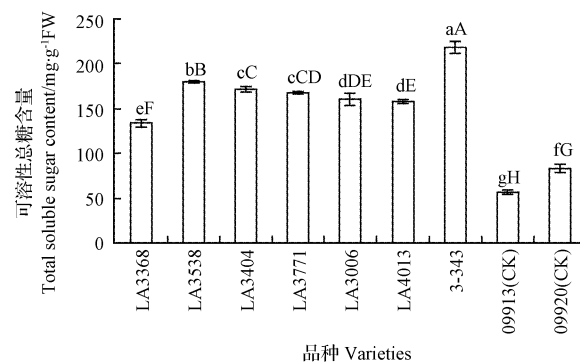


图 3 不同番茄中可溶性总糖含量的比较

Fig. 3 Comparison of total soluble sugar content of
different tomatoes

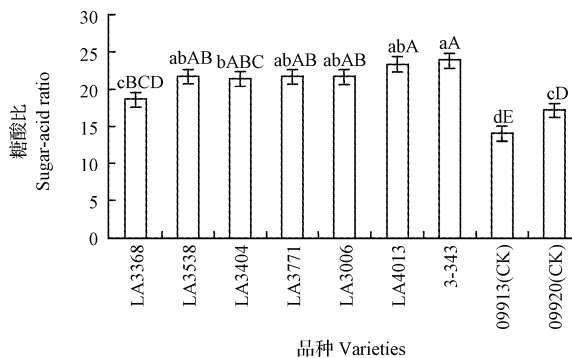


图 4 不同番茄中糖酸比的比较

Fig. 4 Comparison of sugar-acid ratio of different tomatoes

2.3 不同 *hp* 基因番茄中番茄红素与其它主要品质性状的相关分析

由表 4 番茄红素与其它品质性状的相关分析可以看出,不同 *hp* 基因类型番茄果实中番茄红素与可溶性蛋白质含量、维生素 C 含量、可溶性总糖含量和糖酸比均存在正向相关性,其相关的大小趋势表现为糖酸比>维生素 C 含量>可溶性蛋白质含量=可溶性总糖含量,

表 4

不同 *hp* 基因类型番茄突变体果实品质性状的相关分析

Table 4

Correlation analysis of main quality characters of fruit of different *hp* gene tomato mutants

品质性状 Quality characters	番茄红素含量 Lycopene content /mg · kg ⁻¹ FW	可溶性蛋白质含量 Soluble protein content /mg · g ⁻¹ FW	维生素 C 含量 Vitamin C content /mg · (100g) ⁻¹ FW	可溶性总糖含量 Total soluble sugar content /mg · g ⁻¹ FW
可溶性蛋白质含量 Soluble protein content/mg · g ⁻¹ FW	0.32			
维生素 C 含量 Vitamin C content/mg · (100g) ⁻¹ FW	0.47	-0.04		
可溶性总糖含量 Total soluble sugar content/mg · g ⁻¹ FW	0.32	0.59	0.64*	
糖酸比 Sugar-acid ratio	0.48	0.64*	0.60	0.94**

注:“*”表示在 0.05 水平上显著相关,“**”表示在 0.01 水平上显著相关。

Note:“*” means significant at 0.05 level, “**” means significant at 0.01 level.

3 讨论与结论

很多研究表明,*hp1*、*hp2* 两个隐性基因在纯合状态下分别能使番茄果实的类胡萝卜素总量提高 20%~40%^[7-8],*hp3* 突变体转红果实中总类胡萝卜素的含量提高 30%左右^[9],总之 *hp1*、*hp2* 和 *hp3* 基因是通过促进上游底物的类胡萝卜素含量增加而促进番茄果实中番茄红素含量增加(图 5),并且 3 个基因单独对番茄果实中类胡萝卜素含量的作用相近。在该研究中,差异比较分析表明,不同 *hp* 基因单独对番茄果实中番茄红素含量的提高均有较显著的促进作用,并且发现不同 *hp* 基因类型突变体对番茄红素含量的调控存在显著差异,其中 *hp2* 基因对番茄果实中番茄红素含量的调控可能起着主导性作用,其次为 *hp1* 和 *hp3* 基因。具体表现为 *hp2* 基因突变型 LA4013 和 LA3006,自身果实的番茄红素含量平均为 153.3 mg/kg,极显著高于 *hp1* (123.8 mg/kg)、*hp3* (110.1 mg/kg)基因突变体类型及无 *hp* 基因的对照番茄(103.0 mg/kg)类型。进而表明,虽然 *hp1*、*hp2* 和 *hp3* 基因对番茄果实中总类胡萝卜素的含量提高作用相近,但最终对番茄果实中的番茄红素含量的提高作用差异显著,具体表现为 *hp2*>*hp1*>*hp3*,其中 *hp2* 基因具有主导作用。从品质角度分析,*hp2* 基因突变型番茄果实中可溶性蛋白质含量和维生素 C 含量较高,分别略低于 *hp3* 和 *hp1*,而可溶性总糖含量较低,仅高于对照番茄,显著低于 *hp1* 和 *hp3* 突变类型,说明 *hp2* 突变类型具有较好的保健食品指标。所以,*hp2* 基因及其突变类型对番茄果实中番茄红素含量提高的功能解析及其在番茄品质育种研究中的应用都具有重大的意义和研究价值。

品质育种改良,一般目的在于改良单一或两个性状,保持原有其它品质性状指标不发生变化或变化微

但其相关程度均未达到显著水平。而维生素 C 含量与可溶性总糖含量存在显著正相关($R=0.64$, $P<0.05$);糖酸比与可溶性总糖含量存在极显著正相关($R=0.94$, $P<0.01$),与可溶性蛋白质含量存在显著相关($R=0.64$, $P<0.05$)。表明在番茄果实的品质性状中,若单独开展番茄果实中番茄红素含量的改良和育种研究,对番茄果实中其它主要品质性状并不能产生显著的影响。

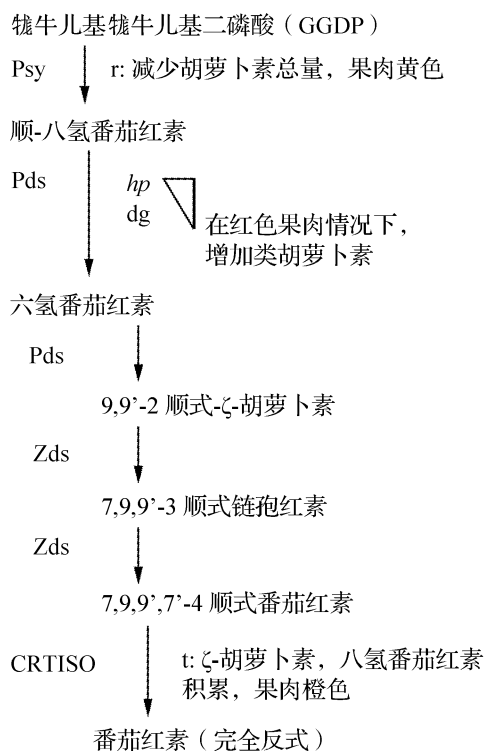


图 5 番茄中番茄红素合成途径

Fig. 5 Synthesis pathway of lycopene in tomato

小,但在实际应用中往往出现改良某单一品质性状后其它品质性状发生了不期望的变化方向,造成改良后的材料不如改良前好。为此,在对某一(A)品质进行改良前,最好明确该品质性状与其它主要品质性状的影响关系(相关性),即在改良 A 品质时,其它主要品质性状随之变化的方向和幅度有多大。在该研究中通过相关分析,发现不同 *hp* 基因类型番茄果实中番茄红素含量与可溶

性蛋白质含量、维生素 C 含量、可溶性总糖含量和糖酸比具有正向相关性,但其相关程度均未达到显著水平,具体表现为糖酸比>维生素 C 含量>可溶性蛋白质含量=可溶性总糖含量,即说明番茄红素性状的改良对其它 4 个主要品质性状并不会造成显著的变化,其性状变化趋势表现为“在提高(或降低)番茄红素含量时,其它 4 个主要品质性状也会随之提高(或降低)”,但在实际育种改良应用中不能忽视可溶性总糖含量和糖酸比指标的增长变化,尤其糖酸比指标与番茄红素含量指标相关性较大($r=0.48$),当其超出一定范围就大大降低了番茄的商品性。综上所述,对于该试验中的含 *hp* 基因突变体番茄果实的品质性状而言,若单独开展番茄果实中番茄红素含量的改良和育种研究,对番茄果实中其它主要品质性状并不能产生显著的影响。

参考文献

- [1] Gann P H. Intermediate biomarkers of lycopene/tomato effects in high-risk prostatic tissue[J]. J Nutr, 2005, 135(8): 2065-2067.
- [2] Giovannucci E, Rimm E B, Liu Y, et al. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk[J]. J Nat Cancer Inst, 2002, 94(5): 391-398.
- [3] Boileau T W, Liao Z, Kim S, et al. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(21): 1578-1586.
- [4] Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2002, 227(10): 900-907.
- [5] Watzl B, Bub A, Briviba K, et al. Supplementation of a low carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men[J]. Ann Nutr Metab, 2003, 47(6): 255-261.
- [6] Kim G Y, Kim J H, Ahn S, et al. Lycopersicon suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B[J]. Immunology, 2004, 113: 203-210.
- [7] Brecht P E, Keng L, Bisogni C A, et al. Effect of fruit portion, stage of ripeness and growth habit on chemical composition of fresh tomatoes[J]. J Food Sci, 1976, 41: 945-958.
- [8] Burton G W, Ingold K U. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant[J]. Science, 1984, 224: 569-573.
- [9] Galpaz N, Wang Q, Menda N, et al. Absciscic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content[J]. The Plant Journal, 2008, 53(5): 717-730.
- [10] Van Tuinen A, Cordonnier-Pratt M M, Pratt L H, et al. The mapping of phytochrome genes and photomorphogenic mutants of tomato[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 115-122.
- [11] Yen H, Shelton A, Howard L, et al. The tomato high pigment (*hp*) locus maps to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1069-1079.
- [12] 刘仲齐, 金凤媚, 薛俊, 等. 番茄高色素基因 *hp1* 和 *hp2* 分子标记的筛选[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 22-26.
- [13] 刘配军, 李景富, 许向阳, 等. 番茄 *hp1* 和 *dg* 基因高效检测体系的建立[J]. 北方园艺, 2013(4): 99-102.
- [14] 李纪锁. 番茄中番茄红素含量影响因素及遗传的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [15] 张宪政. 植物生理学实验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994.
- [16] 张要武, 薛俊, 金凤媚, 等. 番茄果实耐贮性的遗传分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 44-48.

Correlation and Difference Analysis Between Lycopene Content and Main Quality Characters of Tomato with Different *hp* Gene Types

LI Wen-feng, LI Jing-fu, XU Xiang-yang

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Taking 3 *hp* gene types of seven mutants of tomato as material, using randomized block, the correlation and difference between different *hp* gene types and 4 main quality traits of tomato were studied, in order to provide the theory and gene basis for genetic improvement of tomato. The results showed that average lycopene content were 153.3, 123.8, 110.3, 103.0 mg/kg in different varieties ($hp2 > hp1 > hp3 > CK$), which were significant and very significant difference. Correlation analysis between lycopene content and soluble protein content, vitamin C content, soluble sugar content and sugar acid ratio was positive but not significant difference of different varieties (sugar acid ratio>vitamin C content>soluble protein content=soluble sugar content).

Key words: tomato; lycopene; high pigment (*hp*) gene; correlation analysis