

MDgb、MDsa 处理的 G_s 高于 MD 处理; MD、MDgb、MDsa 各处理的 G_s 日平均值为 0.14 、 0.24 、 $0.22 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, MDgb、MDsa 处理的 G_s 分别比 MD 处理的 G_s 平均值高了 71.4% 、 57.1% 。在重度胁迫下, SDgb、SDsa 和 SD 处理的 G_s 在 07:00—09:00 呈现上升趋势, 13:00 以后各处理的 G_s 逐渐减小; SD、SDgb、SDsa 各处理的 G_s 平均值为 0.10 、 0.13 、 $0.11 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, SDgb、SDsa 处理分别比 SD 处理的 G_s 平均值高了 30.0% 、 10.0% 。说明外源 GB、SA 可以提高辣椒的叶片气孔导度, GB 处理的效果好于 SA 处理。

2.3 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片胞间 CO_2 浓度的影响

图 3 表明, 在中度胁迫下, MDgb 和 MD 处理的 C_i 在 09:00—19:00 呈现“降-升-降-升”趋势, 而 MDsa 处理的 C_i 呈现“降-升降”趋势; MD、MDgb、MDsa 各处理的 C_i 平均值为 206.7 、 255.8 、 $241.4 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, MDgb、MDsa 处理分别比 MD 处理的 C_i 平均值高了 23.8% 、 16.8% 。在重度胁迫下, SDgb、SDsa 和 SD 处理的 C_i 在 07:00—19:00 呈现“升-降-升-降-升”的趋势, 并且在 11:00 出现最小值; SD、SDgb、SDsa 各处理的 C_i 平均值为 183.6 、 190.8 、 $179.9 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, SDgb 处理比 SD 处理的 C_i 平均值高了 3.9% 。说明中度胁迫下外源 GB、SA 处理可以维持较高的胞间 CO_2 浓度, 并且 GB 效果优于 SA; 而在重度胁迫下, 外源 GB 处理对胞间 CO_2 浓度有促进

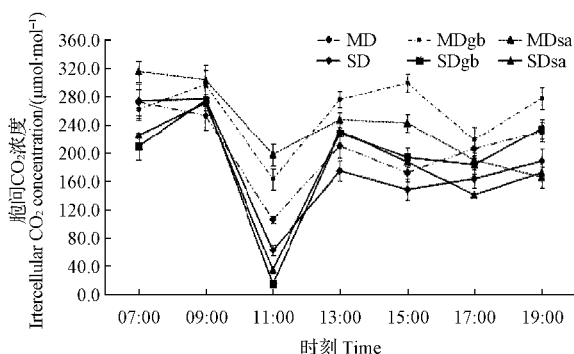


图 3 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片胞间 CO_2 浓度(C_i)的影响

Fig. 3 Effects of GB and SA on intercellular CO_2 concentration of hot pepper leaves under drought stress

作用, 而 SA 处理对胞间 CO_2 浓度改善不明显。

2.4 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片气孔限制值的影响

气孔限制值(L_s)可以反映植物叶片对大气 CO_2 的相对利用效率^[10]。图 4 表明, 在干旱胁迫下, 各处理的 L_s 在 09:00 出现最小值, 11:00 出现 1 个高峰。在中度胁迫下, MD、MDgb、MDsa 各处理的 L_s 平均值为 56.49% 、 37.26% 、 42.92% , MDgb、MDsa 处理分别比 MD 处理的 L_s 平均值低了 19.23% 、 13.57% ; 在重度胁迫下, SD、SDgb、SDsa 各处理的 L_s 平均值为 58.62% 、 48.08% 、 55.12% , SDgb、SDsa 处理分别比 SD 处理的 L_s 平均值低了 10.54% 、 3.50% 。这说明, 外源 GB 处理降低 L_s 的效果好于 SA 处理。

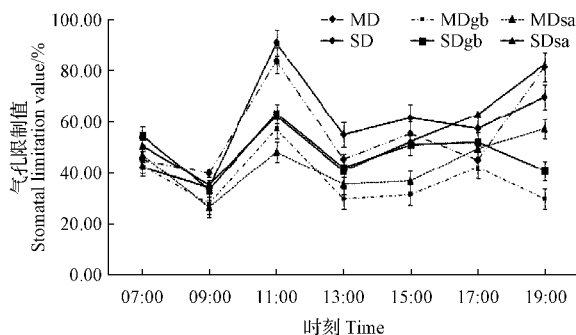


图 4 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片气孔限制值(L_s)的影响

Fig. 4 Effects of GB and SA on stomatal limitation of hot pepper leaves under drought stresses

2.5 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片蒸腾速率的影响

图 5 表明, 在中度胁迫下, 从 07:00—19:00, MDsa、MDgb 处理的 Tr 呈现先升后降的趋势, 在 11:00 达到最大值, 这可能由于此时环境温度、 G_s 较高造成; MD 处理的 Tr 趋势为“锯齿状”, 在 13:00 出现最大值; MD、MDgb、MDsa 各处理的 Tr 平均值为 2.8 、 4.6 、 $4.3 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, MDgb、MDsa 处理分别比 MD 处理的 Tr 平均值高了 64.2% 、 53.6% 。在重度干旱下, SDgb 处理的 Tr 呈现“双峰型”, 2 个峰值依次出现在 09:00、13:00, SDsa 和 SD 处理出现先升后降趋势, 11:00 达到最大值; SD、SDgb、SDsa 各处理的

Tr 平均值为 2.4、2.7、2.5 $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, SDgb、SDsa 处理分别比 SD 处理的 Tr 平均值高了 12.5%、4.2%。说明干旱胁迫下,外源 GB、SA 处理能提高蒸腾速率,并且 GB 处理的提高效果好于 SA 处理。

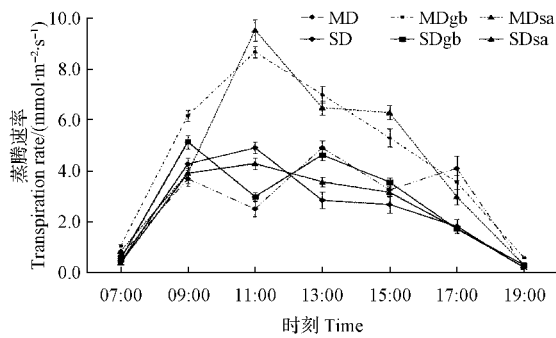


图 5 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片蒸腾速率(Tr)的影响

Fig. 5 Effects of GB and SA on transpiration rate of hot pepper leaves under drought stress

2.6 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片水分利用效率的影响

植物叶片水分利用效率(WUE)可以反映植物光合与蒸腾作用之间的关系^[11],水分利用效率值越大,植物节水能力越强,耐旱生产力越高。图 6 表明,在干旱胁迫下,各处理的 WUE 趋势为“U”型。在中度胁迫下,MD、MDgb、MDsa 各处理的 WUE 平均值为 6.06、5.53、5.78 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, MDgb、MDsa 处理分别比 MD 处理的 WUE 平均值低了 8.7%、4.6%;在重度胁迫下,SD、SDgb、SDsa 各处理 WUE 平均值为 6.68、

5.93、6.11 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, SDgb、SDsa 处理分别比 SD 处理 WUE 平均值低了 11.2%、8.5%。说明在干旱胁迫下,外源 GB、SA 处理降低了 WUE,这可能是由于 GB、SA 处理使叶片Gs(图 2)、Tr(图 5)较高造成的。

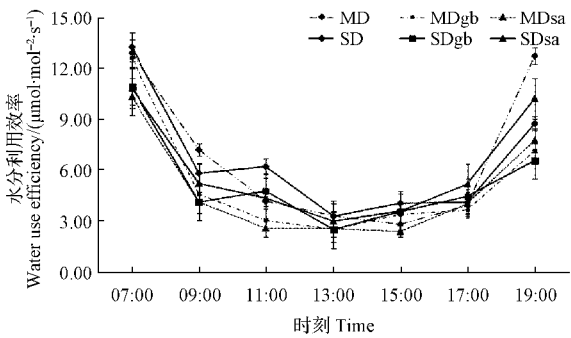


图 6 GB、SA 对干旱胁迫下辣椒叶片水分利用率(WUE)的影响

Fig. 6 Effects of GB and SA on water use efficiency of hot pepper leaves under drought stress

2.7 各指标与光合速率的相关性分析

选取各处理光合相关因子分析与净光合速率之间的相关性(表 1)。相关分析表明,中度干旱胁迫下,各处理的 Pn 与 Gs 呈显著正相关,并且施用外源 GB、SA 处理的 Pn 与 Tr 呈极显著正相关;重度干旱胁迫下,干旱处理的 Pn 与 Gs、Tr 呈极显著正相关,外源 GB、SA 处理的 Pn 与 Gs、Tr 呈显著正相关;净光合速率与其它指标的相关程度不显著。因此,干旱胁迫下,外源 GB、SA 处理通过增大气孔导度,改善蒸腾速率来提高叶片净光合速率。

表 1 不同干旱胁迫下 Pn 与光合相关因子的相关关系

Table 1 Correlation of environment factors with photosynthesis under different drought stresses

处理 Treatment	气孔导度 Stomatal conductance	胞间 CO ₂ 浓度 Intercellular CO ₂ concentration	蒸腾速率 Transpiration rate	水分利用效率 Water use efficiency	气孔限制值 Stomatal limitation value	温度 Temperature
MD	0.848 *	-0.446	0.537	-0.533	-0.054	0.391
MDgb	0.819 *	-0.280	0.921 * *	-0.588	0.280	0.580
MDsa	0.861 *	-0.260	0.798 * *	-0.700	-0.634	0.539
SD	0.896 * *	-0.090	0.940 * *	-0.419	-0.068	0.309
SDgb	0.860 *	-0.199	0.840 *	-0.500	-0.077	0.465
SDsa	0.839 *	-0.190	0.867 *	-0.626	-0.494	0.469

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

植物的净光合速率日动态有午休现象^[12],光合午休可造成 CO₂ 同化量损失达 30%~50%之多^[13],成为制约作物高产稳产的一个重要因素。该研究结果表明(图 1),在不同干旱胁迫下辣椒的 Pn 日变化不同,中度胁迫条件下呈现典型双峰曲线,2 次峰值分别出现在 11:00 和 17:00;而重度胁迫条件下呈现单峰曲线,峰值出现在 09:00,随后 Pn 一直减小。施用外源 GB 和 SA 后,辣椒的 Pn 日变化对不同程度干旱胁迫的响应有明显差异。在中度胁迫条件下,外源 GB 和 SA 处理的净光合速率日变化为双峰曲线,2 次峰值分别出现在 11:00 和 15:00;重度胁迫条件下,外源 GB 和 SA 处理的净光合速率日变化为双峰曲线,2 次峰值分别出现 09:00 和 15:00。这说明在中度胁迫下外源 GB 和 SA 的施用可以提高“光合午休”期间辣椒的净光合速率,而随着干旱胁迫加深,外源 GB 和 SA 的施用能改变净光合速率日变化的趋势,通过“光合午休”来提高辣椒的净光合速率,主要原因在于中午高温强光环境下,通过降低胞间 CO₂ 浓度(图 3)、气孔限制值(图 4)、蒸腾速率(图 5)来应对多重胁迫对光合机构造成的伤害。

FARQUHAR 等^[14]研究表明,植物净光合速率降低的原因包括非气孔因素和气孔因素,如果干旱胁迫下光合速率下降伴随胞间 CO₂ 浓度降低而气孔限制值升高,这是由气孔因素所致;相反,如果胞间 CO₂ 浓度升高伴随气孔限制值下降导致光合作用下降,这是由非气孔因素所致。该研究表明,在中度胁迫下,11:00—13:00 时,叶片 Pn 下降,Ci 升高,Ls 减小,判断这一段时期内主要是由非气孔因素影响叶片净光合速率,外源 GB 和 SA 的施用可以减缓净光合速率下降幅度,进一步提高胞间 CO₂ 浓度,降低气孔限制值;在重度胁迫下,09:00—11:00,叶片 Pn 下降,Ci 下降,Ls 增大,判断这一段时期内主要是由气孔因素影响叶片净光合速率;外源 GB 和 SA 的施用能减缓净光合速率下降幅度,降低胞间 CO₂ 浓度,减缓气孔限制值增加的程度。因此,在不同的干旱胁迫下,开花结果期辣椒光合作用的下降是由气孔限制因素或非气孔因素限制所致;施用外

源 GB 和 SA 可以在一定程度上缓解气孔因素和非气孔因素对净光合速率造成的影响,通过改善光合机构性能^[15-16],减轻中午缺水、高温和强光对辣椒叶片造成的不良影响,减缓辣椒叶片净光合速率的下降程度,进而保证辣椒有较高的光合生产力。

参考文献

- [1] 谢小玉,马仲炼,白鹏,等. 辣椒开花结果期对干旱胁迫的形态与生理响应[J]. 生态学报,2014,34(13):3797-3805.
- [2] 夏方山,毛培胜,闫慧芳,等. 植物花后光合性能与物质转运的研究进展[J]. 草地学报,2013,21(3):420-427.
- [3] 黄义春,李建民,段留生,等. 甜菜碱对玉米幼苗抗旱性的诱导效应[J]. 种子,2015,34(9):28-35.
- [4] 黄婷婷,牛志浩,丁振山,等. 水杨酸对玉米种子萌发早期耐旱性的影响[J]. 种子,2017,36(2):33-37.
- [5] 谭龙涛,喻春明,陈平,等. 外源水杨酸对干旱胁迫及复水下苧麻生理特性和产量的影响[J]. 核农学报,2016,30(2):388-395.
- [6] 贺丽江,陈雷宇,李文略,等. 干旱胁迫下喷施甜菜碱对苧麻生理特性及产量的影响[J]. 中国麻业科学,2015,37(3):130-134.
- [7] 张冬野,赵婷婷,李景富,等. 水杨酸和氯化钙对干旱胁迫下番茄幼苗生理特性的影响[J]. 浙江农业学报,2016,28(10):1687-1694.
- [8] 刘思露,杨鹏,尹淑霞. 外源甜菜碱对葡萄剪股颖的抗旱性调控作用分析[J]. 草业学报,2015,24(3):80-88.
- [9] 曹翠玲,刘林丽,田强兵. 水杨酸对玉米幼苗抗旱性的影响[J]. 玉米科学,2004,12(增刊):103-104.
- [10] MARTIN C A, STABLER L B. Plant gas exchange and water status in urban desert landscapes[J]. Journal of Arid Environments,2002,51:235-254.
- [11] 张建国,李吉跃,沈国舫. 树木耐旱特性及其机理研究[M]. 北京:中国林业出版社,2000.
- [12] 王晓燕,杨淑贞,赵明水,等. 濒危植物天目铁木和羊角槭的光合及蒸腾特性日动态比较[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2015(2):113-119.
- [13] 许大全,张玉忠,张荣铤. 植物光合作用的光抑制[J]. 植物生理学通讯,1992,28(4):237-243.
- [14] FARQUHAR G D, SHARKEY T D. Stomatal conductance and photosynthesis[J]. Annual Review of Plant Physiology,1982,33(3):317-345.
- [15] SAKAMOTO A, MURATA N. The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme to create stress-resistant transgenic plants[J]. Plant Physiology,2001,125:181-188.
- [16] 郝敬虹,易畅,尚庆茂,等. 干旱胁迫下外源水杨酸对黄瓜幼苗膜脂过氧化和光合特性的影响[J]. 应用生态学报,2012,23(3):717-723.

Effect of Betaine (GB) and Salicylic Acid (SA) on Phytosynthetic Characters of Hot Pepper Under Drought Stress During Blossom and Fruit Period

MA Zhonglian^{1,2}, ZHOU Hangfei¹, XIE Xiaoyu¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716; 2. College of Agronomy and Life Sciences, Zhaotong University, Zhaotong, Yunnan 657000)

Abstract: The purpose of this study was to explore the effects of exogenous salicylic acid (SA, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and glycine betaine (GB, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on physiological characters of ‘Yunjiao 2’ of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) under drought stress during blossom and fruit period by the water controlable pot planting. The results showed that under the condition of drought stress, exogenous GB and SA could effectively enhance the net photosynthesis rate (P_n), transpiration rate (T_r), stomatal conductance (G_s) and the intercellular CO_2 concentration (C_i), the daily average net photosynthetic rate were $\text{GB} > \text{SA} > \text{drought}$. Through correlation analysis showed that the relationship of net photosynthesis rate with the environmental factors, net photosynthesis rate was positively correlated with stomatal conductance, while net photosynthesis rate was positively correlated with stomatal conductance and transpiration rate by exogenous GB and SA treatments under drought stress.

Keywords: hot pepper; drought stress; GB; SA; phytosynthetic characteristics

辣椒落叶打什么药效果好

信息广角

辣椒落叶病原因主要有：一是高温、高湿的天气有利于病害的发生发展；二是高温季节遇到暴风雨或连阴雨易导致大发生，造成早期落叶；三是田间积水，栽植密度过大，椒田郁闭，发病率增高；四是植株脱肥早衰，生长势弱，有利于病害发生；五是椒田连作，前茬遗留病株残体多，增加了越冬菌源，发病率高。辣椒落叶病防治措施如下。

平衡施肥平衡营养供给，防止徒长和早衰，提高植株抗病能力。辣椒施肥应以基肥为主，施入足够的优质有机肥。进入开花期，需肥量增加，应及时追肥，一般每 667 m^2 追施磷酸二铵 $15 \sim 20 \text{ kg}$ ，尿素 $10 \sim 15 \text{ kg}$ ，硫酸钾 $8 \sim 10 \text{ kg}$ ，锌肥 $2 \sim 3 \text{ kg}$ 。同时叶面喷施 $0.3\% \sim 0.4\%$ 的磷酸二氢钾溶液。保证营养平衡供给，促进辣椒植株不早衰，不疯长，健康生长，增强抗病能力。

合理排灌通过合理的排灌，调节椒田温、湿度，减少病害发生。高温、高湿是早期落叶病发生的重要条件，合理的调节田间温度、湿度是防治落叶病的重要措施。在辣椒开花结果后，要根据土壤墒情变化情况，遇干旱要及时灌水，灌水时推广小水渗灌，杜绝大水漫灌。在地下水位高的地区要实行高垄栽培，如遇暴雨或连阴雨时要及时排水，防止田间积水，降低田间湿度，减少发病率。

科学管理改善田间生长环境，降低发病。一是辣椒采收后要清理病株残体，摘除枯枝落叶，集中烧毁，减少田间菌源；二是合理密植，改善椒田通风透光条件，减少病害发生；三是控制氮肥的施用量，防止辣椒植株徒长，降低发病率。四是及时中耕除草，改善土壤理化性能，促进根系生长，提高吸收功能，保证植株生长健壮；五是适当剪枝，在椒田密度过大，植株生长旺盛时，可适当的进行剪枝，促进辣椒稳发壮长，提高抗病能力。

轮换用药：在发病前或发病初期，喷施杀菌剂防治。发病前可用 $1:1:200$ 波尔多液进行预防。发病初期可选 70% 甲基托布津可湿性粉剂 $800 \sim 1\,000$ 倍液、 50% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍液等。每隔 $7 \sim 10 \text{ d}$ 喷 1 次，连喷 $2 \sim 3$ 次。

为控制病害，提高辣椒产量，增加经济效益，必须提早防治。应以农业防治为主，以化学防治为辅。

(来源：农业之友)

doi:10.11937/bfyy.20183632

SlGLK2 转录因子在番茄品种 Heirloom 果实中的功能及变异分析

唐亚萍, 杨 涛, 帕提古丽, 王柏柯, 杨生保, 余庆辉

(新疆农业科学院 园艺作物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要: Goldern2-Like (*SlGLK2*) 基因是调控未成熟果实叶绿体发育重要的转录因子。番茄 (*Solanum lycopersicum*) 未成熟果实中叶绿体对成熟果实的糖类、风味物质积累和提高番茄品质具有一定的作用。Heirloom 品系作为优异的种质资源, 在果实颜色、大小、形状和风味等方面有很大差异。以 32 个 Heirloom 品种为研究材料, 通过表型调查研究果实表型性状, 检测果实不同部位和不同发育时期叶绿素含量, 筛选 20 个 Heirloom 品种克隆 *SlGLK2* 基因和启动子序列, 运用荧光定量 PCR 分析调控果实叶绿体发育的相关基因, 从而分析基因间的调控关系, 以期研究 *SlGLK2* 转录因子对 Heirloom 品种叶绿体发育的影响。结果表明: 含有 *SlGLK2* 基因的品种, 未成熟果实拥有深绿色果肩, 其不同发育时期绿色果实果肩的叶绿素含量明显高于果实底部。在 *SlGLK2* 基因上游非编码区和编码区共发现 21 个单核苷酸多态性 (SNPs), 经聚类分析发现, 部分 SNPs 与未成熟果实的表型相关。果实叶绿体发育相关基因的表达分析表明 *TKN2*、*TKN4* 和在番茄果实的果肩部表达量明显高于果实底部, 且 *TKN2*、*TKN4* 位于 *SlGLK2* 上游并调控 *SlGLK2* 基因的表达。

关键词: Heirlooms; *SlGLK2*; 叶绿素; 单核苷酸多态性 (SNPs)

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2019)11-0024-09

Heirloom 番茄品系是美洲流传下来的传统农家品系, 具有独特的风味, 能够成为改良和提高番茄品质的育种材料。Heirloom 番茄主要分为四大类: 商业品系、家庭用品系、新品系和神秘品

系^[1-2]。Heirloom 番茄因果实富含糖、酸及独特的口感和风味, 在美国市场受到消费者的广泛青睐^[3]。同时, 也因其果实品质的独特性, 在美国农贸市场中的售价普遍高于普通番茄品种^[4]。Heirloom 番茄包含的资源类型多样, 是育种家根据市场和消费者需求进行现代栽培番茄品种改良的优异种质资源, 但 Heirloom 品系番茄在国内的研究报道较少。

在过去的 70 年, 番茄果实颜色的均一化成为消费者和育种家不断追求的主要品质特点之一, 均一化是指在番茄果实成熟后靠近果柄端不含有绿色的果肩^[5]。番茄果实颜色的均一化是市场和消费者导向的育种结果, 但是, 这却导致了番茄果实中糖及风味物质含量的下降。*GLK* 转录因子属于 *NAC* 转录因子家族, 在多种植物中已证实 *GLK* 在调控叶绿体发育方面扮演着重要的作

第一作者简介: 唐亚萍 (1986-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为加工番茄遗传育种。E-mail: tangyaping624@sina.com.

责任作者: 余庆辉 (1970-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为加工蔬菜遗传育种。E-mail: yuqinghui98@sina.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31760581); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (CARS-23-G-25); 国家重点研发专项资助项目 (2017YFD0101906); 新疆自治区科技重大专项资助项目 (2016A01001-2); 新疆自治区“天山创新团队”资助项目 (2018D14005);

收稿日期: 2019-01-15

用^[6-9]。*SlGLK2* 主要调控番茄果实肩部叶绿体的合成,使果实含有深绿色果肩。

然而,Heirloom 品系中 *GLKs* 转录因子的研究报道较少。针对此,该研究从形态学入手,调查部分 Heirloom 品系果实的主要表型和品质差异,结合果实不同部位叶绿素含量的差异调查,对 *SlGLK2* 转录因子在 Heirloom 品系间的基因序列和启动子区序列进行差异分析,利用 qRT-PCR 完成 *SlGLK2* 转录因子在果实不同部位的基因表达研究,进一步阐明 *SlGLK2* 转录因子对番茄未成熟果实叶绿体合成及成熟果实品质之间的作用影响,以期利用 *SlGLK2* 转录因子提高番茄品质研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Heirloom 品系的种子购买于美国 Baker Creek Heirloom Seed Company。于 2016 年 5—8 月采取 Heirloom 品系青果期的幼果和中果将果实上部和下部分别装入离心管,在液氮中速冻后放入 -80 °C 冰箱中保存,备用于 RNA 和 DNA 的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 叶绿素的提取和可溶性固形物含量测定

分别称取 50 mg 青果期幼果和中果果实上部和下部果肉组织。在组织研磨机中研磨,加入 1 mL N,N-二甲基甲酰胺,测定上清液在 645 nm 和 663 nm 的吸收光并利用公式计算叶绿素浓度。每个品种至少 5 次重复。可溶性固形物含量利用折光仪进行测定,每个品种至少 10 次重复。

1.2.2 DNA 和 RNA 的提取及反转录

总 DNA 的提取参照 QiagenDNeasy Plant Kit 说明书的步骤进行。总 RNA 的提取参照 Qiagen RNeasy Plant Kit 说明书的步骤进行。cDNA 的合成利用 Thermo 反转录试剂盒。

1.2.3 *SlGLK2* 转录因子在 Heirloom 品系的全长克隆及 SNPs 分析

SlGLK2 基因的编码区和上游序列采用同源克隆的方法设计引物并克隆(表 1)。PCR 反应体系如下:模板 1 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,dNTPs 2 μ L,10 \times Ex Taq buffer 2.5 μ L,Ex Taq

polymerase 0.2 μ L,RNA-free H₂O 18.3 μ L,总体系 25 μ L;反应程序为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,55~62 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经测序及序列拼接后,进行不同品种间 *SlGLK2* 基因的序列比对,利用 R 语言分析 SNPs。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
SIGLK2-1-F	ATGCTTGCTCTATCTTCATCA
SIGLK2-1-R	TGGGACTGCCTTATCAACACC
SIGLK2-2-F	GGACTCCAGAGCTACATAGG
SIGLK2-2-R	TGGCACCCTATACATTTGC
SIGLK2-3-F	AAATATCGAGCTCATCGAA
SIGLK2-3-R	ACCTTTTGATAATGTGGAT
SIGLK2-4-F	CATTTTGGCATCCACATTAT
SIGLK2-4-R	TCAAGTTGGGGTATTTTT
SIGLK2-U1-F	TGAACATGGAAACATTGCACGA
SIGLK2-U1-R	CGCGTGATTCACCCCAATA
SIGLK2-U2-F	TCTAAATCCACACGCACGTCA
SIGLK2-U2-R	AACGGTGTAGGCCAACTTA
SIGLK2-U3-F	GACTATTCATGACATAAT
SIGLK2-U3-R	GCCACGAGTTCGCCTAGAA
SIGLK2-U4-F	GATGGGCCTGCTAGTTTTG
SIGLK2-U4-R	GGCCATGCAAACACTATT
SIGLK2-U5-F	AATAGTGTTCATGAGCC
SIGLK2-U5-R	TGGTTGAAAAAGTTGACAAGG
SIGLK2-U6-F	CTCTTAGGTGGGCGAAC
SIGLK2-U6-R	TCAGACATGGACACACTGCT
SIGLK2-U7-F	AGCAGTGTGTCCATGCTGA
SIGLK2-U7-R	ACCTTTTCATTACCGTTTGGC
SIGLK2-U8-F	CCTATGTGGTGTCTACGTGT
SIGLK2-U8-R	AAAATACCCTTTCATTACCG
SIGLK2-U9-F	GGGTATATGTGAGCCAAAAC
SIGLK2-U9-R	ACAGGCAATGAAATCGCTCA
SIGLK2-U10-F	TTCAATCATCTCGTATCAACC
SIGLK2-U10-R	TGATGAAGATAGAGCAAGCAT

1.2.4 荧光定量 PCR

以番茄 *actin* 为内参基因进行 Heirloom 品系间不同果实部位的 *SlGLK1*、*SlGLK2*、*TKN2*、*TKN4* 和 *APPR2* 的荧光定量 PCR(引物见表 2)。PCR 反应体系为 20 μ L:模板 2 μ L,上下游引物各 0.3 μ L,7.5 μ L Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems),4.9 μ L 的 RNA-free H₂O。反应程序为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 3 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环,溶解曲线用:95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 1 min 和 95 °C 变性 5 s。

表 2 荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Primer sequence for real time PCR

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
qActin-F	TTGCCGCATGCCATTCTTCGTT
qActin-R	GCCCTTCTTTCATAGCCCATCTC
qGLK1-F	GCAACTCTGCTGCTGAGATGAA
qGLK1-R	CGTTGCAGAACGATAGACTATGTAGT
qGLK2-F	GGGGTGCAAATCAGAGGC
qGLK2-R	CCTTACATGTTTGGGGGCATCCAC
qTKN2-F	CCATATCCATCGGAATCTCAG
qTKN2-R	TGGTTTCCAATGGCTCTTTC
qTKN4-F	TATCGATGGCCTTATCCACGGAA
qTKN4-R	TCGATCCAGCACTTACACCTTCCA
qAPPR2-F	GCAACTCTGCTGCTGAGATGAA
qAPPR2-R	CGTTGCAGAACGATAGACTATGTAGT

每个基因重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

1.3 数据分析

试验数据采用 R 软件进行分析并制图。

2 结果与分析

2.1 Heirloom 品种的表型分析

在 32 个 Heirloom 品种中,果实的形状、颜色和大小均有很大差异。果实形状的多样性在果实刚刚形成时就已经产生,并且这种多样性一直延续到果实成熟。根据果实绿熟期的表型将果实分为 4 类(表 3):含有果肩的(U),仅有条纹的(ST),果肩和条纹均有的(SS)和没有果肩的(u)。果实在成熟时的颜色也存在很大的差异,除了常见的红色外还有绿色、黄色、橙色和深红色,甚至有些品种在成熟后仍然保持着绿色,例如 Green Moldovan,Green Doctors 和 Green Sausage。大多数品种在成熟后果肩便消失,但有些品种在成熟后仍然保留绿色果肩。红熟期果实大小也有很大差别,果实直径从小于 1 cm 的樱桃番茄到 4~6 cm 的大果番茄。

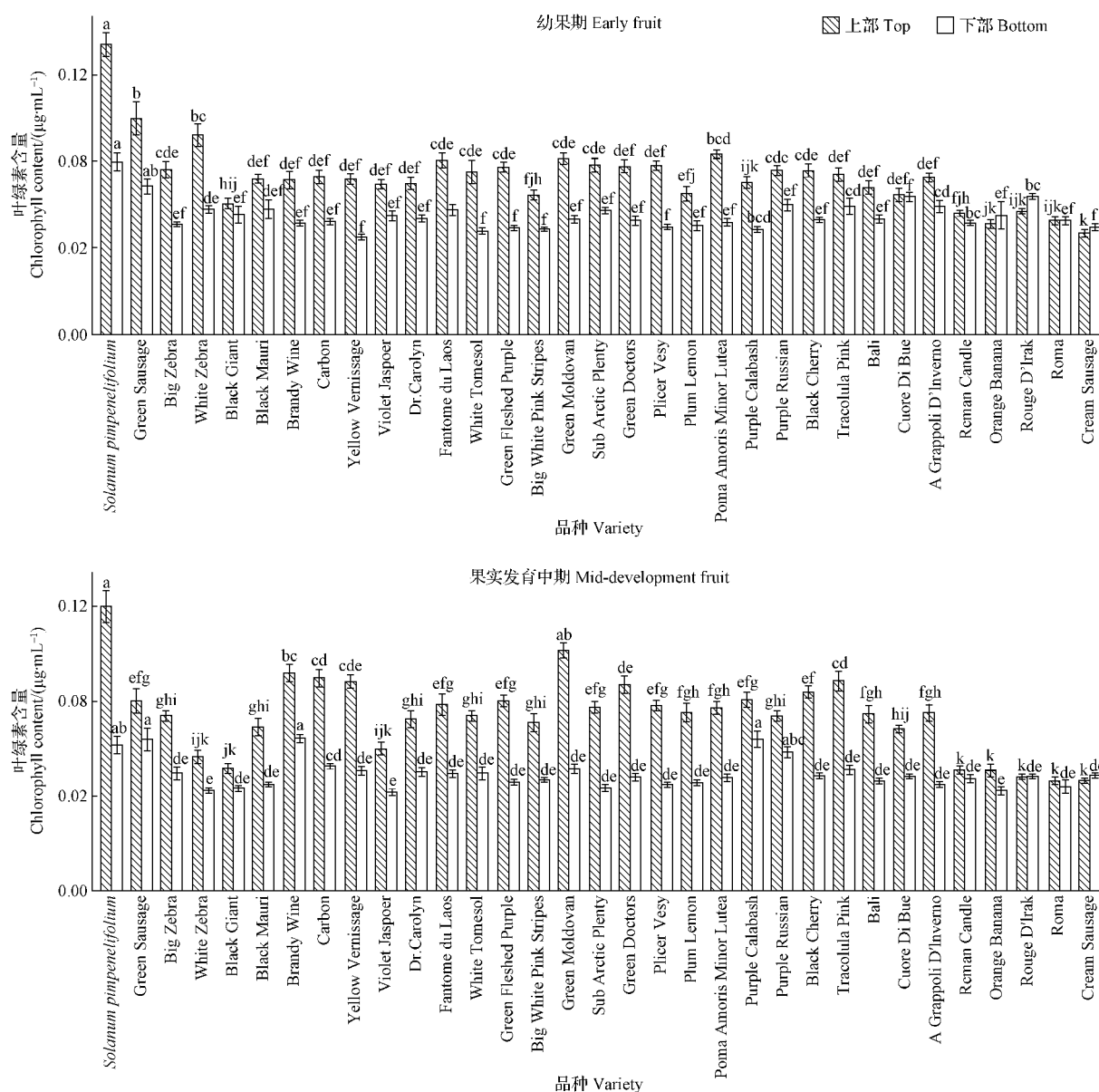
表 3 Heirloom 品种果实主要性状
Table 3 Characteristics of fruit in Heirloom variety

Heirloom 品种 Heirloom variety	果实形状 Fruit shape	绿果表型 Green fruit phenotype	红果颜色 Ripe fruit color
A Grappoli D'Inverno	倒卵球形	SS	红色
Bali	扁平形	U	红色
Big White Pink Stripes	圆形	SS	绿色含有果肩和条纹
Big Zebra	扁平形	SS	绿色含有果肩和条纹
Black Giant	扁平形	SS	深红色含有果肩和条纹
Black Cherry	圆形	U	红色含有果肩
Black Mauri	长椭圆形	SS	红色含有果肩
Brandy Wine	扁圆形	U	红色
Carbon	圆形	SS	红色含有果肩
Cream Sausage	长椭圆形	u	黄色
Cuore Di Bue	桃形	U	红色
Dr. Carolyn	圆形	SS	黄色
Fantome du Laos	圆形	SS	黄色含有条纹
Green Doctors	圆形	U	绿色
Green Fleshed Purple	圆形	SS	橙色含有果肩
Green Moldovan	扁平形	U	绿色含有果肩
Green Sausage	长椭圆形	SS	绿色含有果肩和条纹
Orange Banana	长椭圆形	u	红色
Plicer Vesý	扁平形	U	红色
Plum Lemon	桃形	U	黄色
Poma Amoris Minor Lutea	倒卵球形	SS	黄色
Purple Calabash	圆形	U	红色含有果肩
Purple Russian	长椭圆形	U	红色含有果肩
Roma	长椭圆形	u	红色
Roman Candle	长椭圆形	ST	黄色
Rouge D'Irak	圆形	U	红色
Sub Arctic Plenty	圆形	U	红色
Tracolula Pink	桃形	U	红色
Violet Jaspoer	倒卵球形	SS	红色含有果肩和条纹
White Tomesol	扁平形	U	红色
White Zebra	桃形	SS	黄色
Yellow Vernissage	圆形	U	黄色含有条纹

2.2 绿色果实不同部位的叶绿素含量差异

野生番茄(*Solanum pimpinellifolium*)作为对照,将未成熟的 32 个 Heirloom 品种,按果实上部(靠近果柄)和果实下部(远离果柄),绿色果实发育早期(开花后 5~7 d)和果实发育中期(12~15 d)进行分类。分别测定各品系、各部位不同发育时期的未成熟果实果肉中的叶绿素含量。由图 1 可知,野生番茄在 2 个时期果实上下部的叶绿

素含量最高,随着果实的成熟,果实下部的叶绿素含量有轻微的下降。在不同 Heirloom 品种间,叶绿素的含量差异显著。在果实发育初期,Heirloom 品种的果实上部含有深绿色果肩和果皮条纹的 Green Sausage 叶绿素含量最高。果实发育中期,Green Moldovan 果实上部的叶绿素含量最高。相反,没有果肩的 Cream Sausage 果实上部叶绿素含量在果实发育初期和中期都是最低。



注:小写字母表示在 0.05 差异水平显著。下同。

Note: Lowercase letter represent significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 Heirloom 品种未成熟果实发育早期和发育中期果实上部和下部的叶绿素含量

Fig. 1 Chlorophyll content of top and bottom at early fruit and mid-development fruit of Heirloom

Heirloom 品种果实下部叶绿素含量在果实发育初期和中期均没有显著差异。

2.3 果实可溶性固形物、叶绿素含量和果实大小的关系

通过折光法检测 32 个 Heirloom 成熟番茄果汁的可溶性固形物含量(图 2),野生番茄的含量最高,比最低的高出近 3 倍。果实较小的樱桃番茄(Green Docrots)可溶性固形物含量高于普通番茄。但是,Black Mauri 作为大果番茄其可溶性固形物含量不仅高于普通番茄,而且还高于一

些樱桃番茄。Black Mauri 在果实成熟后仍含有果肩,并且果实表现为红色。含有果肩和条纹的 Green Sausage 可溶性固形物含量与 Black Mauri 相似。不含果肩的 Roma 和 Cream Sausage 可溶性固形物含量最低。综上,Heirloom 果实大小与可溶性固形物含量没有明显的正相关。经果实可溶性固形物与果实叶绿素含量关系的分析得出,Heirloom 品种的可溶性固形物与果实上部及下部叶绿素的含量没有相关性(图 3)。

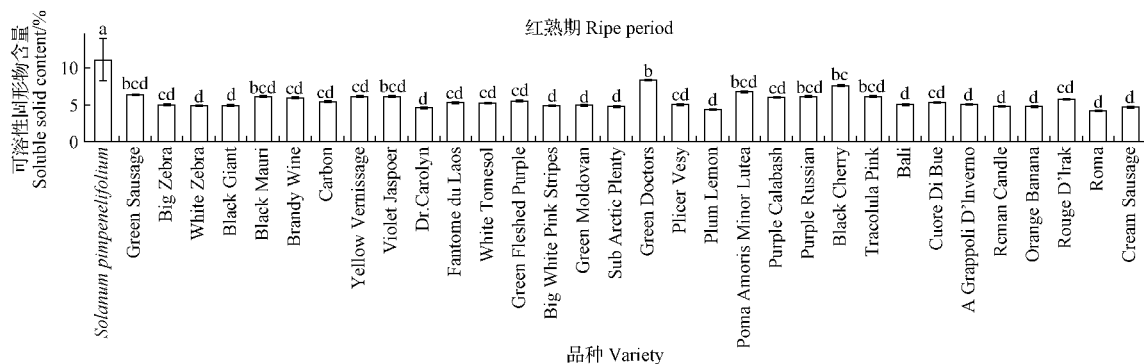


图 2 Heirloom 品系可溶性固形物含量

Fig. 2 Soluble solid content in Heirloom

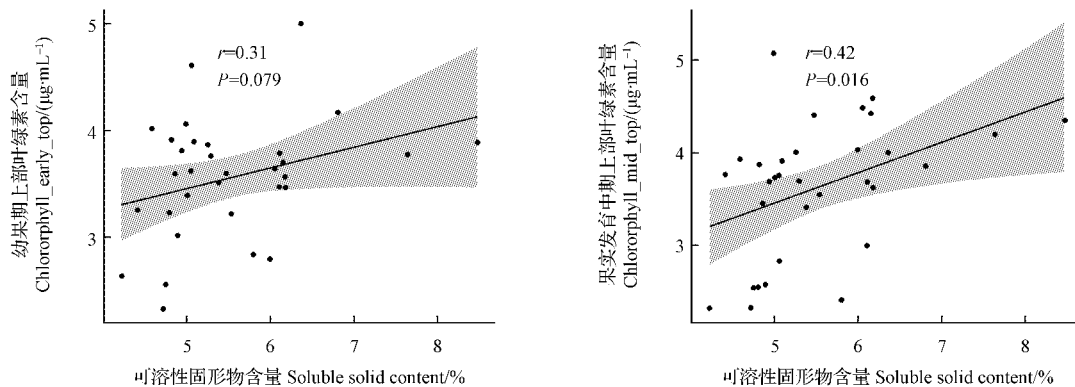


图 3 Heirloom 品系果实可溶性固形物含量与叶绿素含量的相关性

Fig. 3 Correlation between soluble solid content and chlorophyll content in Heirloom

2.4 *SIGLK2* 基因编码区和启动子区 SNPs 分析

通过表型、叶绿素含量和可溶性固形物含量的差异挑选 20 个 Heirloom 品种,采用同源克隆的方法获得不同 Heirloom 品种 *SIGLK2* 基因全长序列及基因上游非编码区序列,分析 *SIGLK2* 基因非编码区和编码区对果实叶绿素合成的影

响。在基因的编码区发现 16 个 SNPs(图 4),在不含果肩的 Cream Sausage 中,*GLK2* 基因外显子区 210 bp 处多了一个 A 碱基。这个 A 碱基是果实无果肩的主要原因,同时不含有果肩的 Cream Sausage 果实叶绿素含量及可溶性固形物含量均为最低。另外一个外显子区域的 SNPs 发