

外源生长素对番茄果实蔗糖代谢 关键酶活性及基因表达的影响

崔娜^{1,2}, 李天来¹, 赵聚勇¹, 林凤², 白丽萍²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 辽宁 沈阳 110161;

2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以普通栽培型番茄辽多丽为试验材料,研究了花期施用 PCPA 对发育过程中的番茄果实糖含量变化、蔗糖代谢关键酶活性及可溶性酸性转化酶基因表达的影响。结果表明,随着番茄果实的发育,可溶性酸性转化酶的活性和酶基因的表达式均增强,果糖和葡萄糖的含量也呈递增的趋势,成熟时含量最高。PCPA 处理在果实发育的成熟期提高了酸性转化酶的活性,促进了可溶性酸性转化酶基因的表达,增加了果糖和葡萄糖的含量。

关键词:番茄;外源生长素;蔗糖代谢;酸性转化酶;基因表达

中图分类号:S641.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)03-0099-03

Effects of Exogenous Auxin on Related Enzymes Activities of Sucrose Metabolism and Gene Expression in Tomato Fruits

CUI Na^{1,2}, LI Tian-lai¹, ZHAO Ju-yong¹, LIN Feng², BAI Li-ping²

(1. College of Horticulture, Key Laboratory of Protected Horticulture of Liaoning Province, Shenyang 110161, China; 2. Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Sugar contents, activities of related enzymes and gene expression of soluble acid invertase during tomato fruit development by PCPA treatment were studied. The results exhibited that activity of acid invertase and gene expression of soluble acid invertase enhanced during fruit development, while the contents of fructose and glucose increased. The activity of acid invertase was improved and gene expression of soluble acid invertase was accelerated during mature period of fruit after PCPA treatment so that the contents of fructose and glucose were increased.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill.; Exogenous auxin; Sucrose metabolism; Acid invertase; Gene expression

蔗糖是番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 植株重要的光合产物,也是体内长距离运输的主要形式,但在成熟番茄果实中所占比例极少,主要是果糖和葡萄糖^[1]。蔗糖进入糖代谢需要酸性转化酶等酶类分解为果糖和葡萄糖,因此是植物生长发育中起关键作用的酶。酸性转化酶主要以可溶性和不溶性两种状态存在,这两种形态的转化酶是由两类完全不同的基因家族编码的^[2,3]。不同形式的转化酶在植物不同发育阶段和不同组织中的作用不同,植物细胞的中央大液泡是果实中可溶性糖的主要贮存场所,而细胞中大约 90% 的酸性转化酶为可溶性的^[4],主要位于液泡中,调控已糖水平和将储存于液

泡中的蔗糖进行利用,因此可溶性酸性转化酶的基因表达情况和酶活性直接影响番茄果实中糖的积累,从而影响果实的品质。关于转化酶活性和番茄果实中糖含量的变化及外源激素对蔗糖代谢相关酶的影响已有一些研究报道^[5-8],但外源生长素对番茄果实中酸性转化酶基因表达的影响及对酶活性的调控,从而影响果实中糖的积累还未见报道。本研究以番茄为试验材料,研究了花期施用外源生长素 PCPA 对番茄果实糖的组成与含量、蔗糖代谢相关酶的活性和可溶性酸性转化酶基因表达的影响,以探讨 PCPA 对番茄糖积累的调控,为进一步利用植物生长调节剂调控番茄果实品质奠定基础。

收稿日期:2009-02-21

基金项目:国家支撑项目(2006BAD07B04);沈阳市科学技术计划项目(1071147-3-00-2);沈阳农业大学青年基金项目(20060217)

作者简介:崔娜(1968-),女,辽宁桓仁人,副教授,农学博士,主要从事蔬菜生理及分子生物学的研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试番茄为普通栽培型番茄辽园多丽,2006 年 1 月 19 日播种,穴盘育苗,3 月 4 日定植于沈阳农业大学工厂化高效农业工程技术研究中心基地日光温室内,行距 50 cm,株距 35 cm。单干整枝,留一穗果。其他栽培管理同一般生产。

试验以蘸蒸馏水为对照,在番茄第一花序第二花开花时用 PCPA 蘸花。对照和处理均分别在第一花序第二花开放时挂牌记载日期,然后分别在开花后 25 d 和 40 d 及成熟期(目测全果粉红色为成熟期,集中在开花后 55~60 d,用“m”表示),取第一花序第二果混合样称重,用于糖分组成与含量、酸性转化酶、中性转化酶、蔗糖合成酶、蔗糖磷酸合成酶活性及可溶性酸性转化酶基因表达的测定。重复 3 次。

1.2 糖分组成与含量的测定

将取样后称重的样品在 80%乙醇溶液中提取蔗糖、果糖和葡萄糖,提取 3 次。提取后用高效液相色谱(HPLC)测定。测定方法及色谱条件为:Water 600E 高效液相色谱,氨基柱,柱温为 30℃,2410 示差检测器,流动相比比例为 75%乙腈 25%超纯水,流速为 1.0 mL/min,Water Millennium 软件控制及数据处理。

1.3 蔗糖代谢相关酶活性的测定

酶的提取:参照王永章和张大鹏^[9]的方法。酶活性的测定:蔗糖合成酶(SS)、蔗糖磷酸合成酶

(SPS)、酸性转化酶(AI)和中性转化酶(NI)活性,参照於新建^[9]的方法。试验中的 UDPG 及 6-磷酸果糖均购自美国 Sigma 公司。

1.4 可溶性酸性转化酶基因表达的测定

按 50~100 mg/mL Trizol 试剂提取组织总 RNA,参照姜晶等^[11]的方法 Northern 杂交分析。可溶性酸性转化酶基因(AF465613)5'端引物为 AI2F:5'-AACTCCGCCCTCTC GTTACACA,3'端引物为 AI2R:5'-TAGGATGGTACGCGACCCTG。用地高辛标记方法(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit, Roche)进行探针标记。然后在不同处理后提取总 RNA,经 1.2%的甲醛变性电泳分离后,采取毛细转移法将 RNA 转移到尼龙膜上,用已标记好的酸性转化酶 cDNA 片段作为探针进行 Northern 杂交。

2 结果与分析

2.1 外源生长素 PCPA 对番茄果实糖含量的影响

图 1 显示,番茄果实果糖(以鲜质量计)、葡萄糖含量(以鲜质量计)在整个生长发育期呈递增的趋势,开花后 40 d 增长开始加快,成熟时达到最高,且处理区高于对照区,说明 PCPA 处理可以在果实发育的后期提高果糖和葡萄糖的含量。而蔗糖含量(以鲜质量计)随着果实的发育呈递减的趋势,虽然 PCPA 处理与对照差异不大,但在果实的整个发育期都略高于对照。

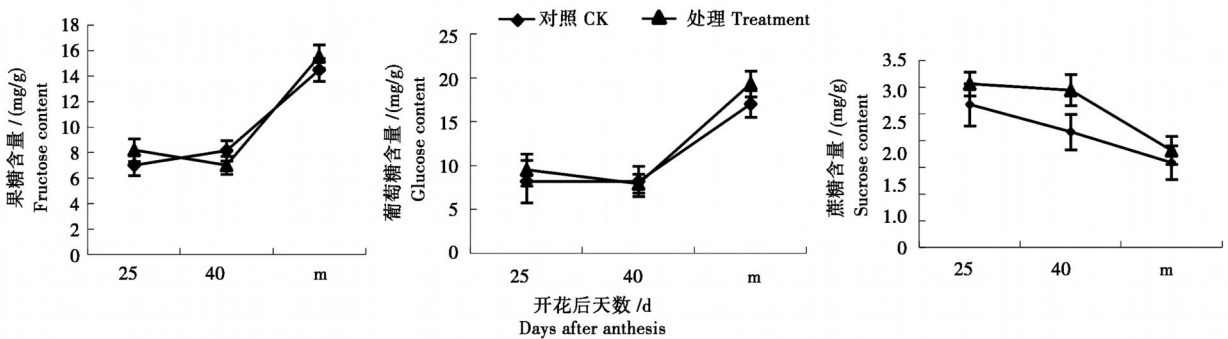


图 1 PCPA 处理对番茄果实糖含量的影响

Fig.1 Effects of PCPA on sugar contents in tomato fruits

2.2 外源生长素 PCPA 对番茄果实蔗糖代谢相关酶活性的影响

从图 2 可以看出,番茄果实中,酸性转化酶的活性(以鲜质量计)随着果实的发育呈上升的趋势,在开花 40 d 之前活性较低,且处理与对照无明显差异,然后开始迅速上升,成熟时活性最强且处理明显高于对照,说明 PCPA 处理后在番茄果实发育的后期能明显提高酸性转化酶的活性。中性转化酶活性(以鲜质量计)与酸性转化酶活性变化趋势相同,都

是开花后 40 d 之前较低,之后迅速上升,成熟时活性达到最高,但处理组与对照组无显著差异。蔗糖合成酶活性随着果实的发育过程呈逐渐下降趋势,果实成熟时降到极低的水平,且 PCPA 处理没有提高其活性。而番茄果实中,无论处理还是对照组蔗糖磷酸合成酶活性(以鲜质量计)都很低,随着果实发育过程变化不大,说明对于普通栽培型番茄来说,蔗糖磷酸合成酶对果实中蔗糖合成起作用不大。

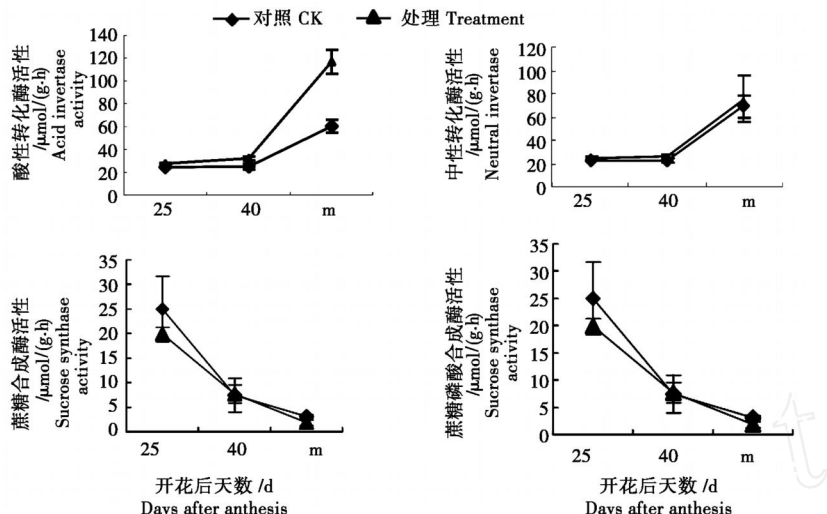


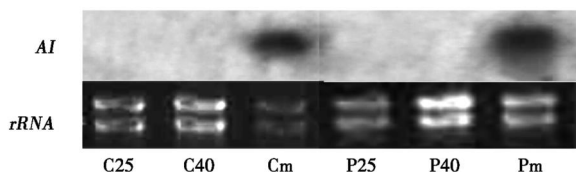
图2 PCPA处理对番茄果实蔗糖代谢相关酶活性的影响

Fig.2 Effects of PCPA on related enzymes activities of sucrose metabolism in tomato fruits

以上结果表明,外源生长素 PCPA 处理后,在番茄果实成熟期明显提高了酸性转化酶的活性,但对中性转化酶、蔗糖合成酶和蔗糖磷酸合成酶活性没有明显的影响。所以本试验进一步在分子水平检测了可溶性酸性转化酶的基因表达的情况。

2.3 外源生长素 PCPA 对番茄果实可溶性酸性转化酶 mRNA 的影响

以番茄液泡转化酶的 cDNA 片段为探针,对不同发育期番茄果实的液泡转化酶基因表达进行了检测,结果如图 3 所示。未成熟的果实中处理和对照均未检测到可溶性酸性转化酶基因的表达,而在成熟的番茄果实中处理和对照组均检测到了可溶性酸性转化酶基因的表达,且外源生长素 PCPA 处理能够增加其表达量。



C25. 开花后 25 d 对照组;C40. 开花后 40 d 对照组;Cm. 成熟时对照组;P25. 开花后 25 d PCPA 处理组;P40. 开花后 40 d PCPA 处理组;Pm. 成熟时 PCPA 处理组;AI. 可溶性酸性转化酶基因。C25. Control of 25 days after anthesis;C40. Control of 40 days after anthesis;Cm. Control of mature stage;P25. PCPA treatment of 25 days after anthesis;P40. PCPA treatment of 40 days after anthesis;Pm. PCPA treatment of mature stage;AI. Gene of soluble acid invertase.

图3 PCPA对番茄果实可溶性酸性转化酶 mRNA 的影响

Fig.3 Effects of PCPA on mRNA of soluble acid invertase in tomato fruits

3 讨论

齐红岩等^[5]的研究显示,光合产物在番茄的维管束系统中主要以蔗糖形式运输,蔗糖此时几乎没有发生降解,从维管束系统卸载到果实中时才分解成为果糖和葡萄糖,而蔗糖分解主要由酸性转化酶

催化。本研究中成熟的番茄果实中果糖和葡萄糖的含量较高,这与已有的研究报道一致,同时,外源 PCPA 处理后明显提高了番茄果实中的果糖和葡萄糖的含量,也提高了酸性转化酶的活性和可溶性酸性转化酶基因的表达,说明 PCPA 既可以在转录水平也可以在翻译水平促进番茄果实可溶性糖的积累。但酸性转化酶还包括细胞壁束缚型的种类,其占总酸性转化酶的 10%,存在于细胞壁中,在蔗糖的分解和卸载过程中也起作用^[12],也会在一定程度上影响番茄果实糖的代谢和积累,因此外源生长素对其基因表达的影响及其通过基因表达调控番茄果实糖代谢与积累还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘以前,沈火林,石正强.番茄果实生长发育过程中糖的代谢[J].华北农学报,2006,21(3):51-56.
- [2] Tang G Q,Luscher M,Sturm A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning[J]. Plant Cell, 1999,11(1):177-189.
- [3] Sturm A,Tang G Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development,growth and carbon partitioning[J]. Trends in Plant Science,1999,4(10):401-407.
- [4] Yelle S,Hewitt J D,Robins N L, et al. Sink metabolism in tomato fruit. Analysis of carbohydrate assimilation in a wild species[J]. Plant Physiol,1988,87:737-740.
- [5] 齐红岩,李天来,刘海涛,等.番茄不同部位中糖含量和相关酶活性的研究[J].园艺学报,2005,32(2):239-243.
- [6] 崔娜,李天来,赵聚勇.外源生长素 PCPA 对番茄果实蔗糖代谢的影响[J].北方园艺,2008,5:8-12.
- [7] 李天来,清野贵将,大川亘,等.トマトにおける维管束の走向と光合成産物の车流経路の関係[J]园艺学会杂志,2000,69(1):69-75.
- [8] 李天来,赵聚勇,崔娜,等.苗期喷施表油菜素内酯对番茄叶中蔗糖代谢的影响[J].植物生理学通讯,2008,3:417-420.
- [9] 王永章,张大鹏.乙烯对成熟期新红星苹果果实碳水化合物代谢的调控[J].园艺学报,2000,27(6):391-395.
- [10] 於新建.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1985:148-149.
- [11] 姜晶,李天来,李伟.番茄酸性转化酶 cDNA 片段的克隆与表达分析[J].园艺学报,2005,32(5):885-888.
- [12] Eschrich W. Free space invertase,its possible role in phloem unloading[J]. Ber Deut Bot Ges,1980,93:363-378.