

hp-1 和 *hp-2* 基因对番茄营养生长及色素积累的影响

马金竹¹, 金凤媚², 王景安¹, 刘仲齐²

(1. 天津师范大学 化学与生命科学学院, 天津 300384; 2. 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘要:以 9 套含有纯合 *hp-1* 和 *hp-2* 基因的番茄自交系为材料, 通过对苗期营养生长和果实色素积累有关特征比较发现: 在光周期生长条件下, 所有含有 *hp-1* 和 *hp-2* 基因的番茄自交系均表现出相似的特征。即与不含 *hp* 基因对照相比: 幼苗下胚轴和植株节间显著受到抑制, 花期延迟 ($p < 0.01$); 子叶、胚轴、花萼以及果实中叶绿素、花青素和番茄红素显著提高; *hp-1* 和 *hp-2* 基因在不同遗传背景下表现度不同。

关键词: *hp-1*; *hp-2*; 番茄; 营养生长; 色素

中图分类号: S641.201 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0015-05

Effect of *hp-1* and *hp-2* Gene on Nutritional Growth and Pigment Accumulation in Tomato

MA Jin-zhu¹, JIN Feng-mei², WANG Jing-an¹, LIU Zhong-qi²

(1. College of Chemistry and Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300384, China;

2. Tianjin Agricultural Research Center of Biotechnology, Tianjin 300192, China)

Abstract: In order to compare the characteristics of nutritional growth and pigment accumulation in different genetic background, nine tomato inbred lines containing pure *hp-1* and *hp-2* gene were used as experimental materials. The results suggested that NIL (Liger nearly isogenic lines) contained consistent characteristics with *hp* mutant in photoperiod growth condition; such as, they had shorter hypocotyls, elevated levels of anthocyanin in cotyledons, hypocotyls and calyces compared with control. Furthermore, all inbred lines containing *hp* gene had later flowering time (days) and shorter internode; further research on fruit pigment showed that chlorophyll and lycopene content were significantly enhanced. But *hp-1* and *hp-2* gene had inconsistent expressivity in different genetic background.

Key words: *hp-1*; *hp-2*; Tomato; Nutritional growth; Pigment

近年来, 科学家们发现了许多影响植物光代谢的单基因突变体, 其中, 番茄高色素 *hp* 类突变体引起了人们的高度重视。目前发现的 *hp* 类突变体主要包括以下几种: *hp-1*、*hp-1w*、*hp-2*、*hp-2j*、*hp-2dg*^[1-3]。研究结果表明, *hp-1* 和 *hp-2* 为非等位基因, 分别位于第二和第一染色体上, 都具有调节光合色素信号传递的能力, 但光形态建成作用并不完全一致。*hp-1* 能增加叶片细胞中的叶绿体数目和叶绿素含量, 而 *hp-2* 并不能增加细胞中叶绿素的含量; *hp-2* 能增加根细胞中的叶绿体数量并使根变成绿色, 但 *hp-1* 突变体和普通番茄的根细胞中几乎不含叶绿体。从同源性来看, *hp-1* 和拟南芥的 *UV-*

DAMAGE DNA-BINDING PROTEIN1 (DDB1) 属于同源基因; 而 *hp-2* 却和 *DEETIOLATED1 (DET1)* 属于同源基因。这 2 个隐性基因在纯合状态下能显著增加番茄果实番茄红素含量, 对于提高番茄的营养品质具有重要的应用价值^[4, 5]。

目前, 对番茄 *hp-1* 和 *hp-2* 突变体的研究主要集中在果实色素积累, 而对苗期营养体生长影响报道很少, 且由于不同的研究者选用不同遗传背景的材料, 导致对 *hp-1*、*hp-2* 基因生理功能报道存在明显差异, 不能从客观上比较这 2 个基因对番茄营养生长和果实色素积累的影响。本试验以 9 种不同基因型番茄为材料, 在同一近等基因系中比较 *hp-1* 和

收稿日期: 2008-07-20

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2007CB116202); 国家科技支撑计划(2006BAD01A7-3-10)

作者简介: 马金竹(1984-), 男, 安徽合肥人, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学研究。

通讯作者: 刘仲齐(1964-), 男, 甘肃清水人, 研究员, 博士, 主要从事番茄分子育种研究。

王景安(1957-), 男, 河北丰润人, 教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学教学与科研工作。

hp-2 基因的作用机理及不同遗传背景下比较两基因的表现度, 为优质加工番茄新品种选育中利用这 2 个基因提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料

来自美国番茄遗传资源中心(TGRC)的番茄自交系 6 个: 纯合 *hp-1* 自交系 LA3004、LA3290、LA3771、LA3538; 纯合 *hp-2* 自交系 LA4013、LA4014。

自育番茄自交系: Liger 与 LA3004、LA4014 杂交, 然后用 Liger 连续回交 5 代, 再自交 2 代育成近等基因系(NIL) Liger+ *hp-1* 和 Liger+ *hp-2*。对照材料: Liger(不含 *hp-1* 和 *hp-2*)。

1.2 方法

1.2.1 营养发育特征及开花期测定 2008 年 2 月 15 日, 从 9 种不同基因型材料中各取 30 粒种子均匀播种于苗盘中, 组培室中育苗, 23~ 25℃催芽, 在 16 h 光照, 8 h 暗处理的光周期下发芽 15 d 左右, 每种基因型选取 10 株同一天萌发的幼苗, 测定其下胚轴长度, 每隔 1 d 测定 1 次, 连续测定 7 次。待 4 月中旬大部分植株长到 4~ 5 叶时移栽至温室中定植, 每种基因型各取 15 株成为一组, 田间随机分行种植, 株距 30 cm, 行距 50 cm。在第 1 簇花开花时, 每基因型随机挑取 10 株, 测量第 1 簇花下 3 个节间总长度, 取 10 株平均数。

1.2.2 花青素含量的测定 取发芽后 30 d 的 6 种基因型番茄幼苗(另外 3 种基因型苗数少), 准确称取子叶和下胚轴各 0.1 g 于 5 mL 的离心管中, 加入 1 mL(1% HCl) 甲醇溶液, 于暗处放置 48 h, 其间振荡几次, 然后再加入 0.8 mL H₂O 和 2 mL 氯仿, 于 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清于 535 nm 波长下测定其光吸收值, 重复 3 次^[6]。采用同样方法测定花萼和果皮中花青素含量。

1.2.3 显微观察花青素分布 分别取上述发芽后 30 d 幼苗, 采用徒手切片方法, 在光学显微镜下, 观察不同基因型番茄幼苗下胚轴横切面, 显微拍照。待植株开花后, 对处于同一花期(大喇叭期, 花药刚变黄)的花瓣及花萼纵切面进行观察。

1.2.4 *CHS1* 基因 RT-PCR 检测 准确称取发芽后 30 d 的 *hp-1*、*hp-2* 突变体和 Liger 近等基因系幼苗下胚轴各 0.3 g, 利用 RNA 提取试剂盒(AutoLab)提取总 RNA, 检测各 RNA 样品的浓度、纯度和完整性。然后分别从每个样品中取 0.6 μg RNA, 利用 *CHS1*、*18SRNA* 特异性下游引物进行反转录。

CHS1: 5'-TAAGCGCATGTGTGATAAATG-3'

5'-GCACCCTTGTTGTTCTCAGG-3';

18SRNA: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'

5'-CCTCCAATGGATCCTCGTE-3'

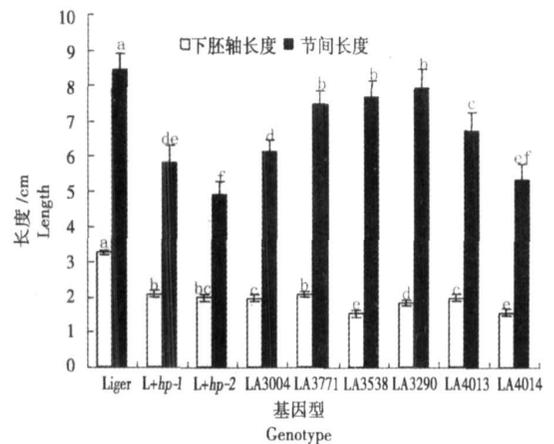
获得 cDNA 第 1 条链(Reverse Transcriptase M-MLV 试剂盒, TAKARA), 取 2 μL cDNA 模板进行 PCR (*CHS1* 反应程序: 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 反应体系为 25 μL 进行 28 个循环; *18SRNA* 反应程序: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 反应体系为 25 μL 进行 28 个循环)。最后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.5 叶绿素和番茄红素测定 试验分别测定了植株叶片和绿熟期果皮中叶绿素含量, 叶片取自同一天开花的第 1 簇花序下第 1 片叶, 果实材料取绿熟期外果皮, 采用无水乙醇法测定^[7]; 待果实完全成熟后, 用甲醇-甲苯抽提法测定果实中番茄红素含量^[8]。

2 结果与分析

2.1 *hp-1*、*hp-2* 基因对番茄营养生长阶段的影响

2.1.1 对下胚轴生长影响 种子萌发后 15 d(图 1), *hp-1* 和 *hp-2* 突变体幼苗下胚轴长度 < 2.0 cm, Liger 近等基因系下胚轴长度约 2.0 cm, 而相应的野生对照 Liger 下胚轴长度超过 3.0 cm。结果表明, 在光周期生长条件下, *hp-1* 和 *hp-2* 基因对番茄幼苗下胚轴生长具有明显抑制效应(图 4A)。该结果与 Anna 等^[4] 在番茄 *hp-2*、*hp-2j* 突变体中结果类似。



相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。Values followed by same letters were not significantly different, values followed by different letters were significantly different ($p < 0.05$).

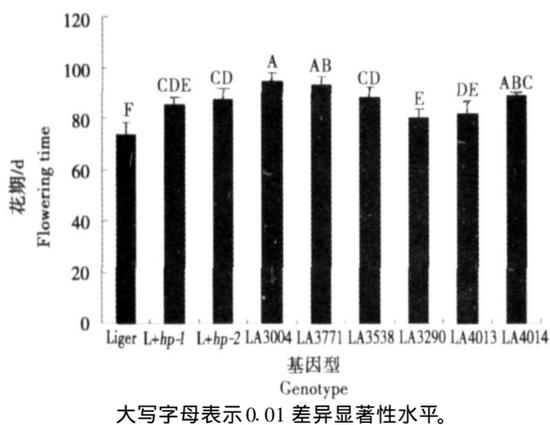
图 1 不同基因型番茄下胚轴和节间长度统计

Fig. 1 Hypocotyl and internode length of different genotypes in tomato

2.1.2 对植株节间生长和花期的影响 Wesam 等^[9] 发现拟南芥 *ddbl*、*det1* 突变体表现出植株矮化、节间缩短、花期提前等特征, 而番茄中同源的

hp-1 和 *hp-2* 突变体是否具有同样特征,目前尚未见报道。试验对不同基因型番茄第1簇花下3个节间总长度测定发现: *Liger+ hp-1* 长度是对照 *Liger* 的67%,而 *Liger+ hp-2* 仅为对照的58%,显然 *hp-1*、*hp-2* 基因的导入致使 *Liger* 植株节间缩短;同样,在其他 *hp-1*、*hp-2* 突变体中获得相似结果,但这种抑制效应在不同遗传背景下表现程度不同,在 *hp-2* 突变体表现略强于 *hp-1* (图1)。

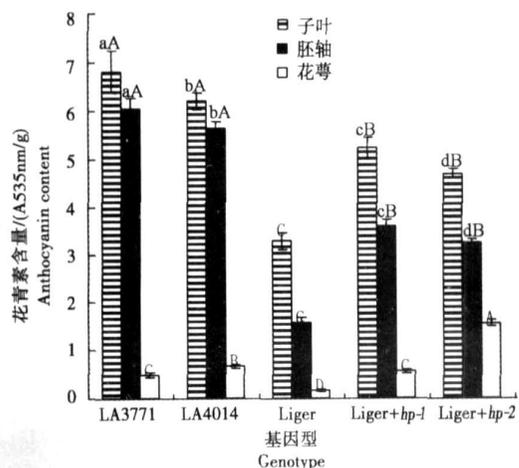
另外,试验详细记录了第1簇花开花时间,结果见图2。在短日照条件下, *Liger+ hp-1* 和 *Liger+ hp-2* 花期比 *Liger* 平均晚12~15 d,其中 LA3004 (*hp-1*) 和 LA3771 (*hp-1*) 甚至晚了20 d。该结果与拟南芥 *ddb1*、*det1* 突变体恰好相反,即 *hp-1*、*hp-2* 基因在番茄中不仅没有促进植株提前开花,反而表现出明显抑制效应 ($p < 0.01$)。



The capital letters indicate the significance at level of 0.01.

图2 不同基因型番茄花期统计

Fig. 2 Flowering time of different genotypes in tomato



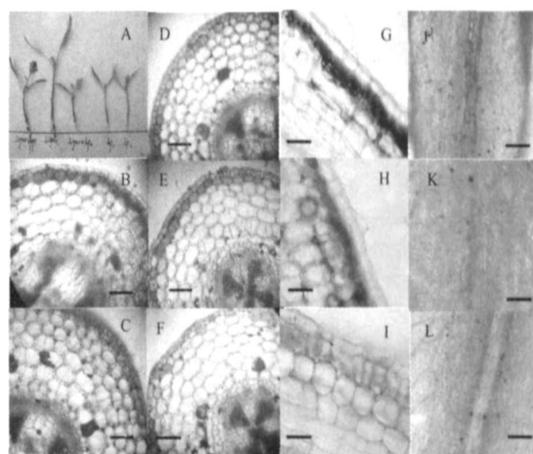
小写字母表示0.05显著性水平,大写字母表示0.01显著性水平。

The capital and small letters indicate the significance at level of 0.01 and 0.05.

图3 不同基因型番茄子叶、胚轴以及花萼中花青素含量
Fig. 3 Anthocyanin content from cotyledons, hypocotyl and calyxes of different genotypes in tomato

2.2 *hp-1*、*hp-2* 基因对苗期花青素积累的影响

2.2.1 花青素含量测定 试验测定了不同基因型番茄子叶、下胚轴和花萼中花青素含量,由图3可知:与对照 *Liger* 相比, *Liger+ hp-1* 子叶和下胚轴花青素含量分别增加了约60%,125%; *Liger+ hp-2* 增加了42%,125%;说明 *hp-1*、*hp-2* 基因的转入导致花青素合成增加。另外,在 LA3771 (*hp-1*) 和 LA4014 (*hp-2*) 中花色素含量显著高于近等基因系 ($p < 0.01$),说明在不同的遗传背景下 *hp-1*、*hp-2* 基因的表现度不同。试验进一步测定了花萼中花青素含量,同样发现 *Liger* 近等基因系含量显著高于 *Liger*。但在 *hp-2* 突变体自交系中表现明显强于 *hp-1* 自交系 ($p < 0.01$),该结果与幼苗期子叶和胚轴中表现恰好相反,说明在番茄不同的发育时期, *hp-1*、*hp-2* 基因的表现度也不同。



A. 番茄幼苗; B. *hp-1*; C. *hp-2*; E, H, K. *Liger+ hp-1*;

D, G, J. *Liger+ hp-2*; F, I, L. *Liger*.

图4 番茄下胚轴长度和不同部位花青素分布
(B- F. 100 μm , G- I. 50 μm , J- K. 150 μm)

Fig. 4 Length in hypocotyl and anthocyanin distribution in different tissues of tomato

2.2.2 显微观察花青素分布 光学显微镜观察番茄幼苗下胚轴横切面发现,在 *hp-1*、*hp-2* 突变体下胚轴的亚表皮细胞中有大量呈现紫红色的花青素分布(图4B, C);同样在 *Liger* 近等基因系中获得类似结果,而在 *Liger* 中分布较弱(图4D, E, F)。另外,试验又分别对花萼纵切面和花瓣进行了观察,发现在 *Liger* 近等基因系花萼亚表皮及花瓣脉管组织中也有大量花青素分布(图4G, J),但在 *Liger+ hp-2* 中分布略强于 *Liger+ hp-1* (图4H, K),而 *Liger* 几乎观察不到(图4I, L)。观察结果进一步验证了上述测定结果,而 *hp-1*、*hp-2* 基因是否会影响其细胞特异性分布,试验未观察到。

2.2.3 *CHS1* 基因 RT-PCR 检测结果 查尔酮合成酶基因 (*CHS1*) 是花青素合成中的一个关键酶基

因^[10, 11]。试验通过 RT-PCR 检测 *CHS1* 基因在突变体和野生材料中定量表达^[12]，发现 *CHS1* 基因在 *hp-1*、*hp-2* 突变体以及 Liger 近等基因系中的表达量均高于野生 Liger 对照(图 5)。说明 *hp-1*、*hp-2* 基因通过某个途径参与 *CHS1* 基因的表达调控，导致查尔酮合成酶产量增加，从而进一步影响花青素合成。

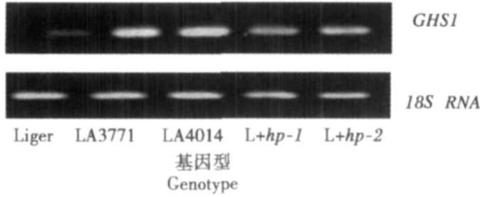


图 5 *CHS1* 基因 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR analysis of *CHS1* gene

2.3 *hp-1*、*hp-2* 基因对果实色素积累的影响

由图 6, 7 结果可知: Liger+ *hp-1* 和 Liger+ *hp-2* 果实中叶绿素含量比 Liger 分别提高了 1.6, 2.9 倍, 番茄红素含量分别提高了约 40%, 64%, 其他突变体中也有不同程度的增加倍数, 果实均表现出更深颜色(图 7)。结果说明, *hp-1*、*hp-2* 基因确实能增加果实中叶绿素和番茄红素合成, 但不同背景下两基

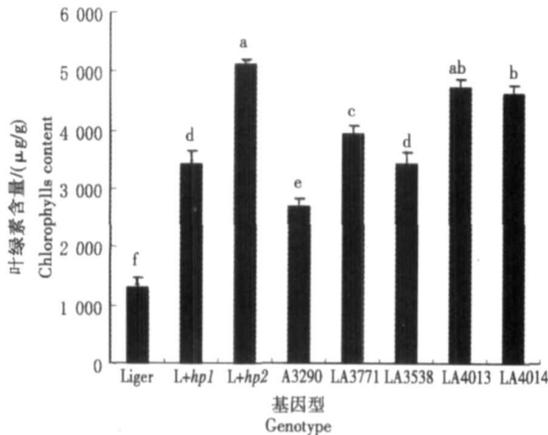


图 6 不同基因型番茄果皮叶绿素含量

Fig. 6 Chlorophylls content from different genotypes in tomato

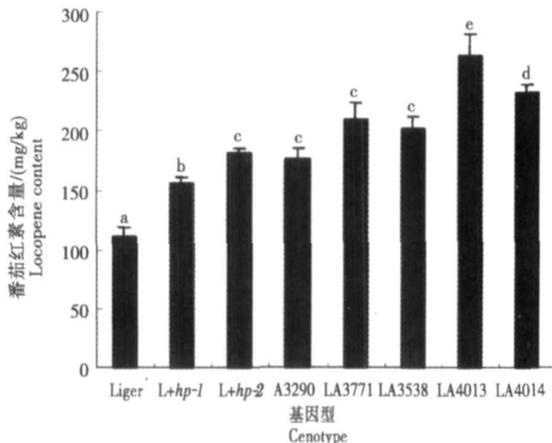


图 7 不同基因型番茄果皮番茄红素含量

Fig. 7 Locopene content from different genotypes in tomato

因作用强度差异较大, 与 *hp-1* 突变体相比, *hp-2* 突变体果实中叶绿素和番茄红素增加更显著, 说明 *hp-2* 基因对于提高番茄果实色素含量具有更大的遗传潜力。

3 讨论

3.1 *hp-1* 和 *hp-2* 基因对营养生长阶段的影响

hp-1 和 *hp-2* 基因影响番茄植株的光形态建成^[13-15]。试验在一定的光周期生长条件下, 所有含有 *hp-1* 和 *hp-2* 基因材料下胚轴生长均受到抑制; 在第一束花开花时, 第一花序下 3 节间总长度明显短于野生对照品种, 且 *hp-2* 突变体表现强于 *hp-1* 突变体, 植株表现矮化; 另外 *hp-1* 和 *hp-2* 基因使植株开花期延迟, 但不同遗传背景下对花期延迟程度差异较大。上述结果表明: *hp-1* 和 *hp-2* 基因在不同遗传背景下均会抑制植株发育, 导致番茄营养生长期延长。

3.2 *hp-1* 和 *hp-2* 基因对花青素积累的影响

试验对番茄植株不同部位花青素含量进行了测定, 与对照相比, 突变体子叶、胚轴、花萼中花青素含量大幅提高; *hp-1* 突变体子叶和胚轴中花青素含量显著高于 *hp-2* 突变体, 但花萼中表现恰好相反 ($p < 0.01$); 显微观察花青素主要分布于亚表皮细胞; 进一步对查尔酮合成酶基因(*CHS1*)表达检测发现, 该基因在 *hp* 突变体和近等基因系中表达量明显高于对照。结果表明, *hp-1* 和 *hp-2* 在不同的发育时期均能够增加花青素合成, 但不同发育期两基因作用程度不同。

3.3 *hp-1* 和 *hp-2* 基因对番茄红素积累的影响

hp-1 和 *hp-2* 基因能大幅提高果实中色素含量, 已成为人们的研究热点^[16-19]。2004 年, Liu 等^[13]通过 RNA 干扰技术获得 *hp-1* 转基因植株番茄红素含量比对照提高 25%~43%, 同年, Ganga 等^[2]获得了 *hp-2* 转基因植株, 其番茄红素含量较对照提高 2 倍以上。本研究中选育的近等基因系 Liger+ *hp-1* 果实中番茄红素比对照提高了约 40%, 与 Liu 等^[13]结果一致; 但在 Liger+ *hp-2* 中增加倍数远低于 Ganga 等结果。说明不同遗传背景对 *hp-2* 基因表现度影响较大, 该现象在上述试验结果中也得到证实。因此, 在番茄红素高含量品种选育中, 应利用不同遗传背景的材料作为自交系受体, 然后从后代中选择番茄红素大幅提高的最佳组合。

参考文献:

[1] Maya S, Michal O S, Rinat O, et al. Molecular aspects of ar-

- thocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1 [J]. Journal of Heredity, 2008, 99(3): 292– 303.
- [2] Ganga R D, Ageeth V T, Anna C M, *et al.* Manipulation of *DET1* expression in tomato results in photomorphogenic phenotypes caused by post-transcriptional gene silencing [J]. The Plant Journal, 2004: 344– 354.
- [3] Raoul J B, Ric de C H V, Michal L, *et al.* The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome [J]. New Phytologist, 2005, 166: 427– 438.
- [4] Anna C M, Francesca F, Rosalia C, *et al.* Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *Deetiolated1* [J]. The Plant Cell, 1999, 11: 145– 157.
- [5] Lieberman M, Segev O, Gilboa N, *et al.* The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (*DDB1*) underlined as the gene that cause the high pigment-1 mutant phenotype [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1574– 1581.
- [6] Kerckhoffs L H J, Kendrick R E. Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato [J]. Plant Research, 1997, 110: 141– 149.
- [7] 郝建军, 康宗利, 于 洋. 植物生理学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 70– 71.
- [8] 刘仲齐, 薛 俊, 金凤媚, 等. 番茄红素快速测定方法的研究 [J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 13– 17.
- [9] Wesam M A K, Dana F S. *DDB2*, *DDB1A* and *DET1* exhibit complex interactions during *Arabidopsis* development [J]. Genetics, 2007, 176: 231– 242.
- [10] Koes R E, Van B R, Quattrocchio F, *et al.* Chalcone synthase promoters in *Petunia* are active in pigmented and unpigmented cell types [J]. The Plant Cell, 1990, 2: 379– 392.
- [11] Shaman D O, Yusen T, Brigitte S, *et al.* Molecular genetic analysis of chalcone synthase in *Lycopersicon esculentum* and an anthocyanin-deficient mutant [J]. Mol Gen Genet, 1990, 224: 279– 288.
- [12] Wang A M, Doyle M V, Mark D F, *et al.* Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [J]. Leukemia, 2000, 14(2): 316– 323.
- [13] Liu Y S, Roof S, Ye Z, *et al.* Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato [J]. PNAs, 2004, 101(26): 9897– 9902.
- [14] Leonardo G, Gaetano P, Patrizia P, *et al.* Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content [J]. Plant Physiology, 2005, 137: 199– 208.
- [15] Chen M, Chory J, Fankhauser C, *et al.* Light signal transduction in higher plants [J]. Annu Rev Genet, 2004, 38: 87– 117.
- [16] Ankanagari S, Rajendra K B, Takatoshi K, *et al.* High pigment1 mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedling [J]. Plant Physiology, 2004, 134: 790– 800.
- [17] Berg H, Faulks R, Granado H F, *et al.* The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 880– 912.
- [18] Janny L P, Marta S, Richard E K, *et al.* The expression of light-regulated genes in the high-pigment1 mutant of tomato [J]. Plant Physiology, 1998, 117: 797– 807.
- [19] Shanna M, Julia V, Paxton P, *et al.* Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyze fruit maturation in tomato [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 377.