

番茄 *AMR1* 基因在抗坏血酸合成代谢中的功能鉴定

李 艳¹, 孙雪雨¹, 张余洋², 王梦扬¹, 赵红星¹, 杨 凡³, 吴立恒⁴

(1. 驻马店市农业科学院 河南驻马店 463000; 2. 华中农业大学·园艺植物生物学教育部重点实验室 武汉 430070; 3. 河南省农业科学院蔬菜研究所 郑州 450002; 4. 泌阳县现代农业技术综合服务中心 河南泌阳 463700)

摘要: 为了深入研究番茄中抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)合成调控因子 *SIAMR1* 的具体调控机制, 以拟南芥 *AMR1* 基因为探针, 筛选番茄同源基因 *SIAMR1*。通过构建 *SIAMR1* 基因超量及干扰(RNAi)表达载体, 利用农杆菌介导的遗传转化法将其转入番茄品系 Ailsa Craig(AC)中, 并测定转基因材料中 *AMR1* 基因、AsA 合成途径关键基因的表达量及相应 AsA 含量。结果表明, 超量表达株系 OE6-8 和 OE12-6 株系幼嫩叶片中 AsA 含量与对照相比分别降低了 92.66% 和 95.41%, 干扰表达株系 RNAi2-4 和 RNAi13-11 幼嫩叶片中 AsA 含量分别提高了 26.86% 和 56.49%。不同物种进化分析表明, *SIAMR1* 与 *AtAMR1* 蛋白同源性相对较高, *SIAMR1* 结构域分析也显示, *SIAMR1* 与 *AtAMR1* 蛋白在 N 端和 C 端具有相同的结构域。本研究结果初步揭示了 *SIAMR1* 基因在番茄 AsA 合成代谢调控中的作用。

关键词: 番茄; 抗坏血酸; 调控因子; 遗传转化

中图分类号: S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)12-036-09

Function identification of tomato *AMR1* gene in ascorbic acid synthesis and metabolism

LI Yan¹, SUN Xueyu¹, ZHANG Yuyang², WANG Mengyang¹, ZHAO Hongxing¹, YANG Fan³, WU Liheng⁴

(1. Zhumadian Agricultural Academy of Science, Zhumadian 463000, Henan, China; 2. Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, Hubei, China; 3. Vegetable Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China; 4. Modern Agricultural Technology Comprehensive Service Center of Biyang, Biyang 463700, Henan, China)

Abstract: In order to deeply investigate the specific regulatory mechanism of *SIAMR1*, an ascorbic acid(AsA) synthesis regulatory factor in tomato, the homologous gene *SIAMR1* in tomato was screened using the *Arabidopsis thaliana* *AMR1* gene as a probe. Overexpression and RNA interference(RNAi) expression vectors for the *SIAMR1* gene were constructed and introduced into the tomato line Ailsa Craig(AC) via *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. The expression levels of the *AMR1* gene, key genes of AsA synthesis pathway, and the corresponding AsA content in the transgenic materials were determined. The results showed that the content of AsA in the young leaves of OE6-8 and OE12-6 lines decreased by 92.66% and 95.41% compared with the control, respectively. In contrast, the AsA content in the young leaves of RNAi2-4 and RNAi13-11 increased by 26.86% and 56.49%, respectively. Evolutionary analysis in different species showed that *SIAMR1* and *AtAMR1* protein had relatively high homology, and *SIAMR1* domain analysis also showed that *SIAMR1* and *AtAMR1* protein had the same domain at the N-terminal and C-terminal regions. This study preliminarily revealed the role of *SIAMR1* gene in the regulation of AsA biosynthesis and metabolism in tomato.

Key words: Tomato; Ascorbic acid; Regulatory factor; Genetic transformation

番茄(*Solanum lycopersicum*)作为重要的蔬菜作物, 富含多种维生素和矿物质, 在人类饮食营养结构中占据重要地位^[1]。抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)又称维生素 C, 是一种广泛存在于植物各组织

和细胞中的水溶性小分子抗氧化物质。AsA 对植物和人体都具有重要作用。对于植物而言, AsA 能有效清除其体内产生的过量活性氧(ROS), 避免植物组织和细胞受到伤害, 从而显著增强植物抵御逆

收稿日期: 2025-05-26; 修回日期: 2025-09-02

基金项目: 驻马店市重大科技专项(ZMDSZDZX2022005)

作者简介: 李 艳, 女, 副研究员, 研究方向为园艺作物遗传育种与栽培。E-mail: ease1988@163.com

通信作者: 吴立恒, 女, 高级农艺师, 研究方向为蔬菜种质资源与农业技术推广。E-mail: 755275800@qq.com

境胁迫的能力;同时,它可以促进植物细胞的膨大和分裂,为植物生长发育提供助力。对于人类及其他灵长类动物来说,AsA 是维持人体健康不可或缺的营养物质,由于自身缺乏 AsA 合成中的最后一步酶,无法自主合成,只能从新鲜水果和蔬菜中摄取^[2-4]。因此,深入探究植物体内 AsA 合成代谢调控机制,对提高植物抗逆性、优化农产品营养结构具有深远意义。

近年来,植物 AsA 合成与代谢相关研究取得了重要突破。甘露糖/半乳糖(*D-Man/L-Gal*)途径是 AsA 合成最先被发现的途径^[5]。此外,随着研究的不断深入,又提出了另外 3 条途径,即古洛糖途径、肌醇途径和 *D*-半乳糖醛酸途径共同参与番茄果实中 AsA 的生物合成^[6]。在番茄 AsA 合成的调控机制研究中,多条途径及相关基因的作用已得到明确。在 *D-man/L-Gal* 途径中,GMP 作为关键限速酶,其家族成员 *SIGMP3* 表达上调或下调均可使番茄果实中 AsA 含量发生显著变化^[7]。进一步研究表明,转录因子 *SIHZ24* 可通过识别并结合 *SIGMP3* 的启动子区域,上调其表达水平,进而提高番茄叶片和果实中的 AsA 含量^[8]。另一转录因子 *SibHLH59* 则通过直接调控 *SIGMP2* 与 *SIGMP3* 的表达,影响果实中 AsA 的积累^[9]。此外,该途径中的 *SIGME1* 和 *SIGME2* 同样发挥重要作用:超量表达 *SIGME1* 和 *SIGME2* 可分别使成熟红色果实中 AsA 含量提升至原来的 1.60 倍和 1.24 倍,且二者存在功能冗余^[10-11]。而转录因子 *SIN-FYA10* 通过负调控 *SIGME1* 的表达,对果实中 AsA 的积累水平产生影响^[12]。*GGP* 表达上调后在同一植物的不同组织和不同植物的同一组织中均具有不同的调控作用,对番茄叶片和果实中 AsA 含量的影响也不相同^[13-17]。转录因子 *SIMYB11* 通过直接影响 *SIGGP*、*SIGLDH* 和 *SIDHAR* 的表达,实现对番茄果实 AsA 含量的调控^[18]。在肌醇途径中,研究发现 *MIOX* 参与 *D*-葡萄糖醛酸的合成,*SIMIOX4* 的过表达可以显著增加番茄叶片和果实中的 AsA 含量^[19]。Zheng 等^[20]发现,*SIIMP3* 表达上调同样能显著提高番茄叶片、果实等不同组织的 AsA 含量。

长期以来,调控植物 AsA 合成的调控因子鲜见报道。直至 2009 年,人们发现了第一个调控 AsA 生物合成的调控因子 *AMR1* (ascorbic acid man-nose pathway regulator 1)。研究表明,*AMR1* 蛋白在 N 端存在一个 F-box 模体,与人类及拟南芥中诸多已知 F-box 蛋白的相应模体呈现出一定相似性;

其 C 端则具有由 48 个氨基酸残基构成的 DUF295 结构域,但该结构域的功能尚不明确。进一步研究发现,拟南芥抗坏血酸 *D-Man/L-Gal* 途径的关键酶基因,在拟南芥 T-DNA 插入突变体 *amr1* 中表达上调。这表明在拟南芥中,*AMR1* 通过负向调控抗坏血酸 *D-Man/L-Gal* 合成途径上下游的多数酶基因,实现对 AsA 代谢的精准调控^[21]。随着研究的不断深入,*AMR1* 的调控作用已在更多植物中得到验证,其表达量与 AsA 含量及合成途径关键酶基因存在紧密关联。苹果中 *MdAMR1* 和甜樱桃中 *PacAMR1* 的表达水平会伴随果实发育成熟逐步上升,而 AsA 含量却呈下降态势,且苹果中 *AMRL1.1* 通过泛素化机制调控 AsA 合成途径中 GMP1 蛋白水平,进而负向调控 AsA 的生物合成^[22-24]。然而,目前关于 *AMR1* 基因的研究在茄果类蔬菜中相对匮乏,其在这类作物中的功能及调控机制仍有待深入探索。

在上述研究背景下,笔者以拟南芥 *AMR1* 基因为探针,通过 Blastn 在番茄数据库中筛选出高同源性的 *SGN-U562778* 基因,将其命名为 *SIAMR1*。围绕番茄 *SIAMR1* 基因,从基因克隆、组织表达分析入手,进而构建超量表达和干涉表达载体,并进行遗传转化,探究其在番茄 AsA 合成代谢中的作用,旨在揭示该基因的调控机制,为番茄品质改良及植物抗逆性研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于基因克隆及遗传转化的材料为番茄常规品系 AC,由华中农业大学园艺林学学院番茄课题组提供。AC 坐果成熟后,收集成株的根、茎、叶、花及不同发育时期的果实样品,重复采样,取样完毕后将其转移至 -70 °C 超低温冰箱保存。试验于 2019 年 4 月至 2022 年 11 月在华中农业大学实验室及试验田进行。

克隆中间载体为 pEASY-B(北京全式金生物有限公司);植物超量表达载体为 PMV2(由 pHellsgate 8 改造),干涉表达载体为 pHellsgate2(本课题组保存)。载体构建过程中用到大肠杆菌感受态 DH5 α (北京全式金生物有限公司),农杆菌菌株为 C58。

1.2 方法

1.2.1 目标基因获得及生物信息学分析 以拟南芥 *AMR1* 基因(AT1G65770)为信息探针,通过 Blast

在 SGN(<http://solgenomics.net/>) 番茄 Unigene 数据库中搜索同源性较高的基因, 获得序列 Unigene SGN- U562778。使用 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对 AMR1 蛋白理化性质进行分析。应用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件对 AMR1 蛋白的结构域进行预测。从 NCBI 数据库下载白梨和苹果等的同源 AMR1 序列, 采用 ClustalW 和 MEGA 11 软件分别进行多序列比对和进化树构建。

1.2.2 *SLAMR1* 组织表达谱及各组织 AsA 含量分析 采用实时荧光定量 PCR(qPCR) 技术对番茄不同组织进行组织表达谱分析。RNA 提取具体操作参考张鸿远^[25]。使用 Primer 5.0 设计 qPCR 特异性引物序列(表 1)。以 *EF1a* 为内参基因, 以 10 μ L 反应体系在罗氏荧光定量 PCR 仪 LC480 (Roche LightCycler 480) 中进行^[26]。每个样品 3 次重复, PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 45 个循环后进行熔解曲线分析, 以便确定引物的特异性。利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量^[27]。

采用高效液相色谱法(HPLC)测定番茄各组织中 AsA 含量和标准溶液, 先经预冷提取液匀浆、离心处理样品, 上清液经滤膜过滤后, 采用 C18 反相

柱, 以酸性流动相洗脱, 于 245~265 nm 波长下检测, 通过标准曲线定量。方法参考 Rizzolo 等^[28], 具体试验步骤参考张晓燕等^[29]。

1.2.3 *SLAMR1* 超量表达载体构建 首先, 利用 Primer 5.0 设计扩增引物, 以番茄 AC 的 cDNA 为模板扩增获得目的片段, 连接至 pEASY-B 载体并转化大肠杆菌, 测序验证后抽提质粒; 双酶切重组质粒, 回收目的片段并连接至 pMV2 载体, 测序验证后转化农杆菌, 超量表达载体的具体操作步骤参考李艳^[30]。载体构建成功后, 将菌液和甘油按照体积比 1:1 的比例混匀, 保存至 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱, 用于下一步番茄遗传转化^[31]。检测所用引物序列见表 1。

1.2.4 *SLAMR1* 干涉表达载体的构建 利用软件分析避开目的基因保守结构域, 选择 300~500 bp 的片段进行 RNAi 抑制表达。用 Primer 5.0 设计带 attb1 和 attb2 位点的引物, 以番茄 AC 的 cDNA 为模板 PCR 扩增干涉片段; 将干涉片段连接至 pHellsgate2 载体, 产物经热激转化大肠杆菌 DH5 α , 测序验证后转入农杆菌感受态, 干涉载体构建的具体步骤参照李艳^[30]。载体构建成功后, 将菌液和甘油按照体积比 1:1 的比例混匀保存至 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱, 用于下一步的番茄遗传转化^[31]。构建载体所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 List of primer sequences

名称 Name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>Q-actin</i>	GTCCTCTTCCAGCCATCCAT	ACCACTGAGCACAATGTTACCG
实时定量 Real-time quantification <i>AMR1</i>	CACGGCATTGGTGTGTTTAG	CCCGTCAAGTTCCAAGAGAA
超量 Excess <i>AMR1</i>	TGCACTGCACTCAAATTATATATG	TCCCCGTCAAGTTCCAAGAG
干涉 Intervene <i>AMR1</i>	AACCTTACCCGTCTTCCC	ATACGCACAGCGACTTTTTC
β - <i>actin</i>	ATGGCAGACGGAGAGGATATTCA	GCCTTTGCAATCCACATCTGCTG
35S	ACGCACAATCCCACTATCCTTC	

1.2.5 *SLAMR1* 转基因植株的阳性检测 转化植株移栽成活后, 采用 CTAB 法提取植株嫩叶 DNA。DNA 先经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 再用表达载体上 35S 启动子正向引物结合基因反向特异性引物进行 PCR 检测, PCR 反应体系参照李艳^[30], 并设阳性对照(质粒 DNA)和阴性对照(未转化的植株)。检测所用引物序列见表 1。

1.2.6 *SLAMR1* 转基因植株的基因表达分析 为了筛选出相对表达量差异大的转基因植株, 采用 Trizol 法抽提转基因植株总 RNA, 具体操作步骤同上; 反转录后测定其浓度, 稀释至 65 ng \cdot μ L⁻¹ 左右待用。采用罗氏荧光定量 PCR 仪 LC480 进行 qPCR

测定分析。

1.2.7 *SLAMR1* 超量及干涉转基因植株叶片 AsA 含量的测定 以转基因植株 T₁ 代叶片为材料, 利用酶标仪测定 AsA 含量(同时以抗坏血酸标准溶液绘制标准曲线); 取新鲜叶片, 经预冷提取液匀浆处理, 离心取上清液; 室温避光反应 30 min; 取上清液加 NaH₂PO₄(pH 5.6), 测定 265 nm 吸光度, 再加 AO 酶反应后再次测定; 根据标准曲线计算含量, 具体方法参照翁莉^[32]。

1.2.8 *SLAMR1* 超量及干涉转基因植株破色期果实 AsA 含量的测定 以转基因植株 T₁ 代破色期果实为材料, 利用 HPLC 测定抗坏血酸含量(同时以抗

坏血酸标准溶液绘制标准曲线)。测定具体方法参照张晓燕等^[29],取液氮研磨的果实粉末,加预冷 0.1% HPO_3 抽提 30 min,离心取上清液;加入等量 DTT,常温暗反应 15 min;采用 C18 柱,以酸性流动相洗脱,254 nm 波长下检测(AsA 出峰约 2.1 min),通过标准曲线定量。

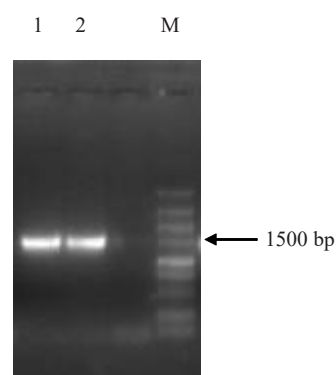
1.3 数据处理

试验数据利用 Excel 和 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 *SIAMR1* 基因的克隆

以 *AtAMR1* 基因(AT1G65770)为信息探针,通过 Blastn 在 SGN 番茄 Unigene 数据库中搜索同源性较高的基因。通过比对,获得同源性较高且具有完整开放阅读框(ORF)的 Unigene SGN-U562778,该基因的 ORF 全长 1283 bp,将其命名为 *SIAMR1*。为了进一步验证 *SIAMR1* 基因的功能,以番茄品系 AC 的 cDNA 为模板,利用 Primer 5.0 根据 *SIAMR1* 基因的 CDS 序列设计扩增引物。电泳结果显示,条带大小与预期目的片段大小一致(图 1)。随后,将 PCR 产物通过胶回收试剂盒回收,送测序公司测序,进一步确认了扩增片段的准确性。



注:M. 分子质量标记;1、2. 目的基因片段。

Note: M. Molecular marker; 1, 2. Target gene fragment.

图 1 *SIAMR1* 全长基因扩增

Fig. 1 Amplification of the full-length *SIAMR1* gene

2.2 *SIAMR1* 蛋白质生物信息学分析

为解析 *SIAMR1* 基因编码蛋白的特性,利用 Expasy 网站 ProtParam 功能分析发现,该基因开放阅读框长 1283 bp,编码 427 个氨基酸;蛋白理论等电点为 5.47,平均疏水性-0.238;氨基酸组成中,带负电荷残基(Asp+Glu)共 55 个,带正电荷残基(Arg+Lys)共 44 个。

为探究 *SIAMR1* 蛋白的结构域特征,通过 SMART 数据库进行 Domain 分析(图 2-A、B),结果

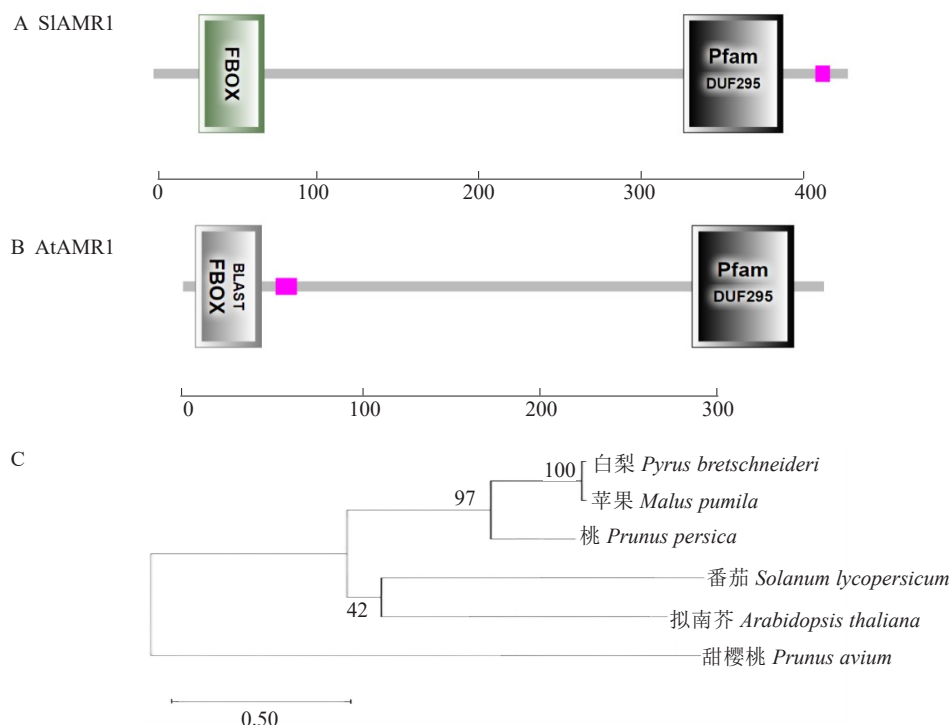
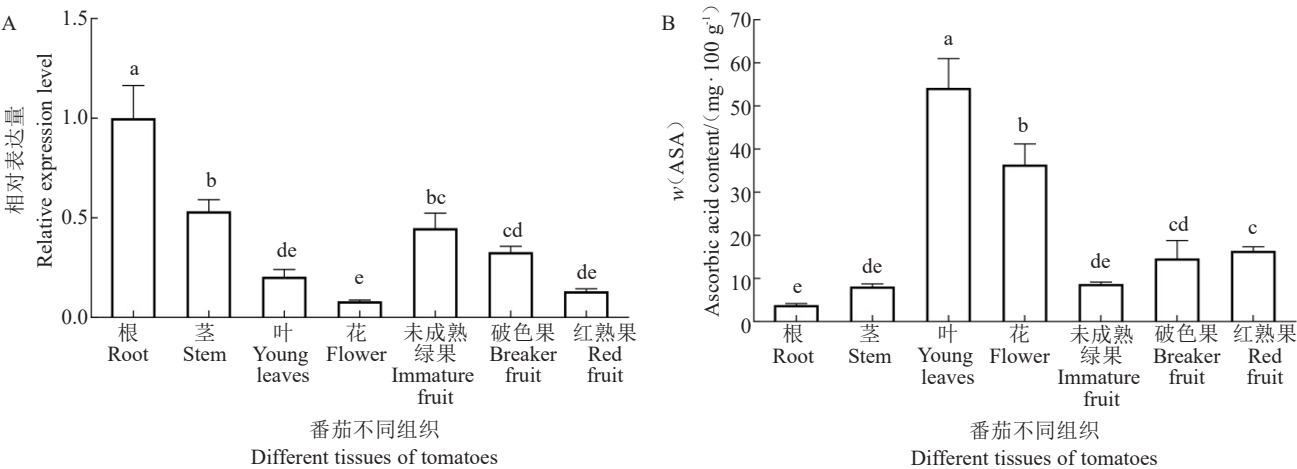


图 2 *AMR1* 蛋白的保守结构域(A 和 B)和进化树(C)

Fig. 2 Conserved domain(A 和 B)and evolutionary tree(C)of *AMR1* protein

显示其在拟南芥和番茄中 N 端与 C 端结构域一致。其中,SIAMR1 在 N 端 28~68 位氨基酸存在 F-box 保守结构域,C 端 326~387 位氨基酸含 61 个残基组成的 DUF295 结构域。为明确其功能分化情况,从 NCBI 数据库中下载亲缘关系较近且研究较多的其他植物 AMR1 蛋白氨基酸序列,经 MEGA 11 构建系统进化树(图 2-C),显示 SIAMR1 与 AtAMR1 蛋白同源性较高。

2.3 SIAMR1 组织表达及各组织 AsA 含量分析
利用 qPCR 分析 SIAMR1 在番茄不同组织中的表达情况。试验结果表明,SIAMR1 在番茄各组织中呈组成型表达,在根中的表达量最高且显著高于其他组织,而在花和红熟果实中的表达量较低(图 3-A)。同时,通过高效液相色谱(HPLC)测定了 AC 各组织中 AsA 含量,根中含量最低,叶片中含量最高且显著高于其他组织;在果实发育过程中,AsA



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level. The same below.

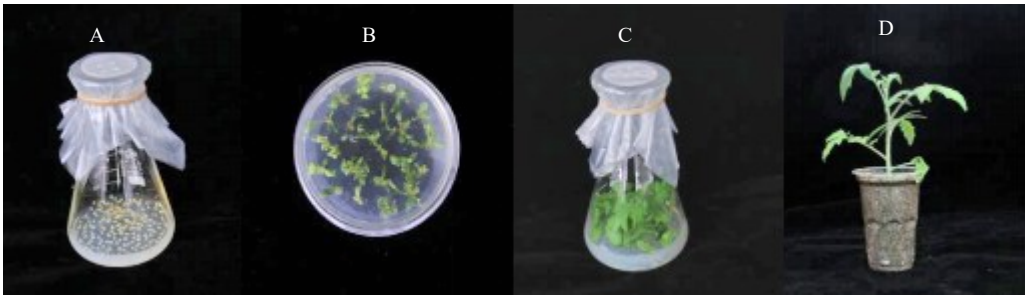
图 3 番茄不同组织中 SIAMR1 表达谱分析(A)和总抗坏血酸含量(B)
Fig. 3 Analysis of SIAMR1 expression profile (A) and total ascorbic acid content (B) in different tissues of tomato

含量呈逐渐增加趋势,红熟期果实的 AsA 含量达到最高(图 3-B)。综合比对分析图 3 数据,发现 SIAMR1 在各组织中的表达量与对应组织中 AsA 含量之间存在一定的负相关性。

2.4 SIAMR1 转基因植株的获得及鉴定

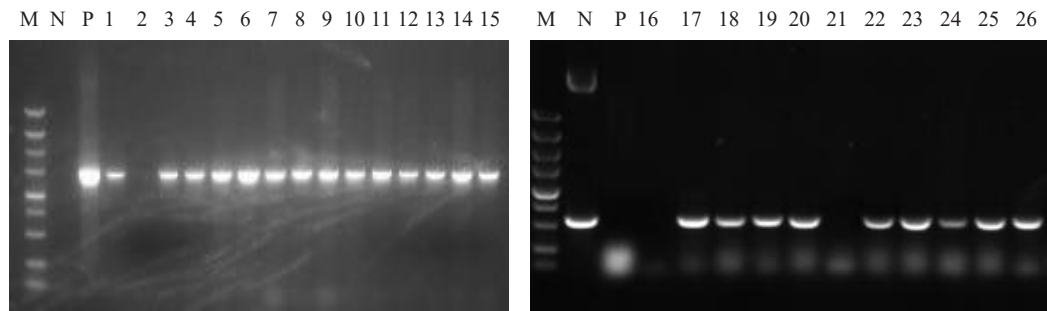
为了进一步验证 SIAMR1 的基因功能,将 SIAMR1 超量和干涉表达载体质粒通过电转化导入农杆菌 C58。通过农杆菌介导的遗传转化法,将表

达载体导入番茄品系 AC 并获得 SIAMR1 转基因材料(图 4),共获得 SIAMR1 超量表达材料 33 株及 RNAi 沉默材料 27 株。利用 PCR 对 SIAMR1 转基因材料进行鉴定,共获得 SIAMR1 超量表达材料 28 株及 RNAi 沉默材料 25 株(图 5)。利用 qPCR 检测 SIAMR1 在 SIAMR1 转基因材料中的表达水平,结果发现 SIAMR1 的表达水平在超量表达株系 OE6-8 和 OE12-6 中分别达到对照材料野生型



注:A. 播种;B. 抗性筛选;C. 生根培养;D. 炼苗。
Note: A. Sowing; B. Resistance screening; C. Rooting culture; D. Hardening-seedling.

图 4 番茄遗传转化过程
Fig. 4 Processes of tomato genetic transformation

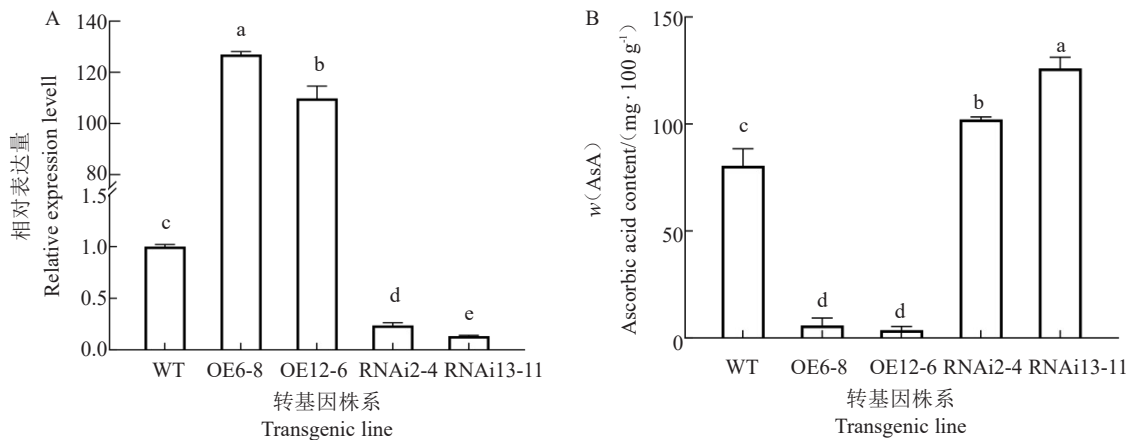


注:M. 分子质量标记;N. 阴性对照;P. 阳性对照(重组质粒);泳道 1~15 为 T_0 代超表达转基因植株;泳道 6~26 为 T_0 代干扰转基因植株;PCR 检测所用引物为启动子 35S 结合基因反向引物。

Note: M. molecular weight marker; N. negative control; P. positive control (recombinant plasmid); Lanes 1 to 15 were T_0 generation overexpressing transgenic plants; Lane 6 to 26 were T_0 interference transgenic plants; The primers used for PCR detection were promoter 35S binding gene reverse primers.

图 5 部分转基因 T_0 代植株阳性检测

Fig. 5 Positive detection of some transgenic T_0 generation plants



注:OE6-8、OE12-6. 超表达株系;WT. 野生型;RNAi2-4、RNAi13-11. 干扰植株。下同。

Note: OE6-8, OE12-6. Overexpression lines; WT. Wild type; RNAi2-4, RNAi13-11. Interference plants. The same below.

图 6 番茄转基因株系叶片的 *SLAMR1* 表达量检测(A)及 AsA 含量测定(B)

Fig. 6 Detection of *SLAMR1* expression level (A) and AsA content (B) in leaves tomatot ransgenic lines

WT 的 126.94 倍和 109.77 倍(图 6-A);而 RNAi 沉默转基因系 RNAi2-4 和 RNAi13-11 中 *SLAMR1* 相对表达量分别比对照显著降低了 76.44%和 86.57% (图 6-A)。综合上述结果,选择 OE6-8、OE12-6、RNAi2-4 和 RNAi13-11 进行后续试验。

2.5 *SLAMR1* 在转基因番茄株系叶片中的相对表达量及 AsA 含量分析

为探究 *SLAMR1* 在转基因植株中的表达及对叶片中 AsA 含量的影响,采用 qPCR 检测超量及沉默转基因植株幼嫩叶片中 *SLAMR1* 的相对表达量。同时,采用盐酸抽提法结合酶标仪测定叶片总 AsA 含量,结果表明,OE6-8 和 OE12-6 的 AsA 含量较对照分别显著降低 92.66%和 95.41%,RNAi2-4 和 RNAi13-11 的 AsA 含量较对照分别显著升高

26.86%和 56.49%(图 6-B)。以上结果表明,超量表达 *SLAMR1* 可显著降低番茄幼嫩叶片中 AsA 含量,而抑制其表达则可显著提高 AsA 含量。

2.6 转基因番茄株系果实中相对表达量及 AsA 含量分析

为进一步验证 *SLAMR1* 的功能,通过 qPCR 检测 *SLAMR1* 在番茄破色期果实中的表达。结果显示,在超量转基因株系 OE6-8 和 OE12-6 植株中 *SLAMR1* 的相对表达量分别达到对照材料的 24.23 倍和 45.31 倍(图 7-A)。与之相反,在干扰转基因株系 RNAi2-4 和 RNAi13-11 破色期果实中 *SLAMR1* 基因的相对表达量仅为对照的 17.50%和 23.48%(图 7-A)。此外,利用 HPLC 对 *SLAMR1* 超量及干扰转基因植株破色期果实中的 AsA 含量进

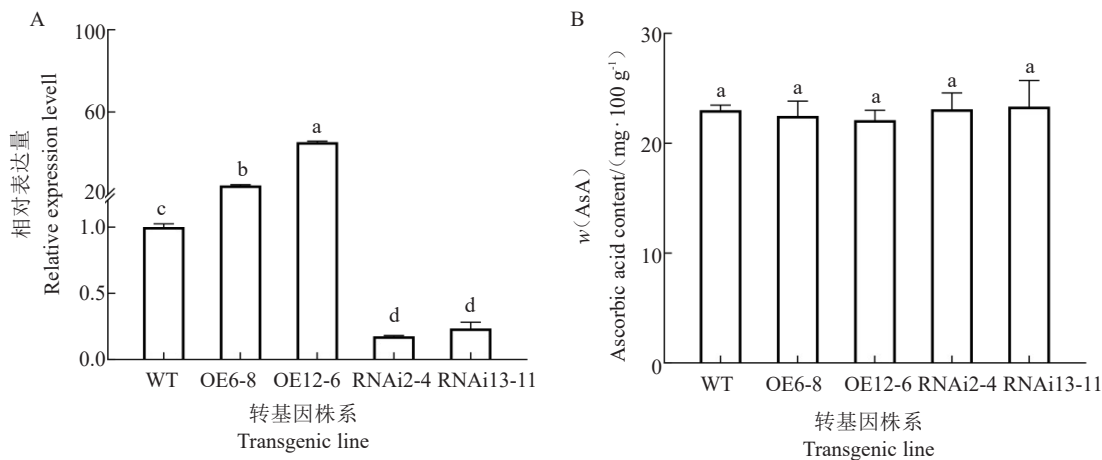


图 7 番茄转基因株系破色期果实的 *SIAMR1* 表达量检测(A)及 AsA 含量测定(B)
Fig. 7 Detection of *SIAMR1* expression levels (A) and AsA content determination (B) of tomato transgenic lines at the breaking color stage of fruit

行测定。结果显示,各转基因株系破色期果实的 AsA 含量与对照相比均未呈现显著差异(图 7-B)。
2.7 转基因株系中 *D-Man/L-Gal* 途径相关酶基因的表达分析

利用 qPCR 分析 AsA 合成 *D-Man/L-Gal* 途径中相关酶基因的表达。结果显示,在叶片中 *SIAMR1* 表达水平上升时, *GMP*、*GME1*、*GME2*、*GGP*、*GPPI*、*GPP2* 和 *GalUR* 基因的表达水平均下

降; *SIAMR1* 表达水平下降时, *GMP*、*GME1* 和 *GME2* 表达无明显变化, *GGP*、*GPPI* 和 *GalUR* 表达量均明显下降,但 *GPP2* 的表达水平却明显上升(图 8-A)。在果实中,无论 *SIAMR1* 表达水平上升或下降, *D-Man/L-Gal* 途径中 7 个基因的表达量均呈现不同程度的下降,除 *GPPI* 外,其他基因的表达量在超量表达株系中比干扰株系中抑制明显(图 8-B)。

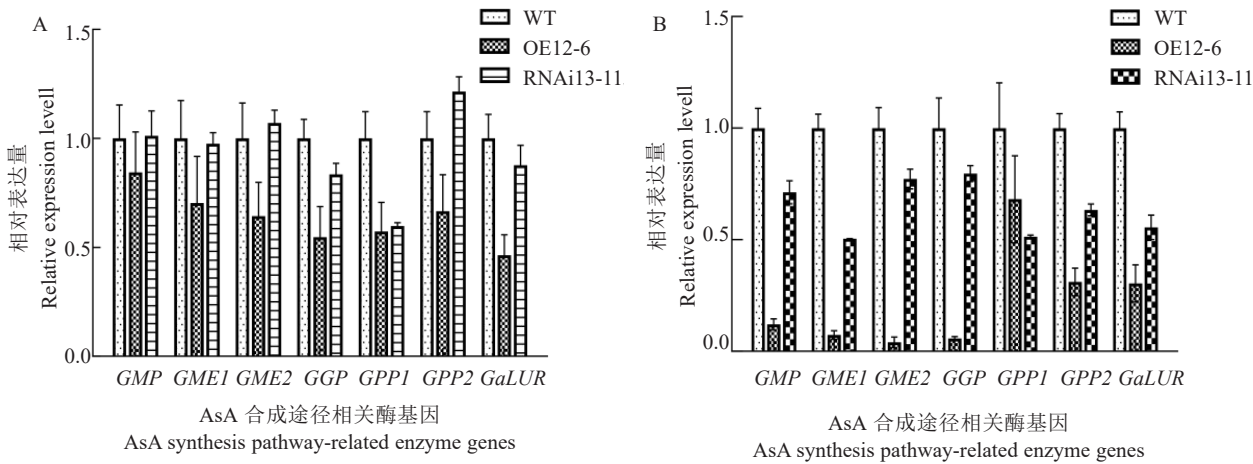


图 8 *SIAMR1* 转基因株系叶片(A)和果实(B)中 AsA 合成相关基因表达分析
Fig. 8 Expression analysis of AsA synthesization-related genes in leaves (A) and fruits (B) of *SIAMR1* transgenic lines

3 讨论与结论

AsA 是一类小分子水溶性抗氧化物质,在植物各个组织和细胞中广泛存在。AsA 还在植物生长发育过程中发挥着重要的功能。首先,它可以清除体内过量的活性氧(ROS),维持细胞内氧化还原水平;其次,可以促进细胞的分裂和膨大,还可以作为

某些金属酶的辅酶,维持金属离子的氧化还原状态。再次,AsA 能提高植物抵御逆境胁迫的能力,同时也是一种重要的营养物质,其含量高低直接影响番茄等园艺产品的品质。
AsA 在植物中生物合成机制已基本清晰,所涉及的基因基本被鉴定和克隆,但其调控机制的研究仍是当下研究的热点。AMR1 是在拟南芥臭氧敏

感型突变体中发现的第一个调控 AsA 生物合成的调控因子。研究表明,拟南芥的 *AMR1* 蛋白在 N 端含有 F-box 结构域,C 端含有 DUF295 结构域。研究发现,甜樱桃的 *PacAMR1* 蛋白结构与拟南芥 *AMR1* 结构类似,同样含有 N 端 F-box 和 C 端 DUF295 结构域。本研究结果表明,*SIAMR1* 与拟南芥 *AMR1* 同源性最高。结构域分析显示,*SIAMR1* 蛋白在 N 端含有 F-box 结构域,C 端含有 DUF295 结构域,属于 F-box 类蛋白家族成员,与前人研究结果一致,同时也说明 F-box 和 DUF295 结构域在 *AMR1* 蛋白中较为保守,可能是其关键功能域。已知 F-box 蛋白可识别激活泛素 E2 蛋白及待泛素化的靶底物,并通过泛素蛋白酶体途径选择性地降解蛋白质^[33],由此推测 *SIAMR1* 蛋白可能通过参与植物泛素化途径调控生长发育。

前人研究表明,拟南芥 *AMR1* 基因通过负调控 *GMP*、*GME*、*GGP* 和 *GPP* 基因的表达,负调控拟南芥叶片中 AsA 含量。在苹果中,*MdAMR1L1* 通过与 *MdGMP1* 互作,泛素化降解 *MdGMP1*,进而负调控苹果中 AsA 的积累。在甜樱桃中,发现 *PacAMR1* 的表达与 AsA 含量呈负相关,说明 *PacAMR1* 也可能负调控甜樱桃中 AsA 的积累。在本研究中发现,*SIAMR1* 表达与 AsA 含量呈负相关。在番茄中超量表达 *SIAMR1* 后,番茄叶片中 AsA 含量下降;反之,沉默该基因后,番茄叶片中 AsA 含量上升,说明 *SIAMR1* 同样可以负调控番茄叶片中 AsA 的积累。进一步研究表明,*SIAMR1* 同样可以负调控 *SIGMP*、*SIGME* 及 *SIGGP* 等基因的表达。然而,番茄果实中,*SIAMR1* 虽然可以负调控 *SIGMP*、*SIGME* 及 *SIGGP* 等基因的表达,但其 AsA 含量无显著变化,推测在番茄果实中可能存在其他 AsA 合成路径。本研究结果初步表明,*SIAMR1* 负调控番茄 AsA 含量,为进一步利用该基因提高番茄 AsA 含量的分子育种提供了理论基础。

参考文献

- [1] 张莉,马彦霞,陶兴林,等.番茄中功能物质的特性及不同加工方式对其品质的影响[J].寒旱农业科学,2024,3(10):883-893.
- [2] 石永春,杨永银,薛瑞丽,等.植物中抗坏血酸的生物学功能研究进展[J].植物生理学报,2015,51(1):1-8.
- [3] CONKLIN P L, FOYER C H, HANCOCK R D, et al. Ascorbic acid metabolism and functions[J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(9):2599-2603.
- [4] 安焯森,王雁伟,田文超,等.基于 CRISPR/Cas9 技术创制高维生素 C 番茄材料[J].中国生物化学与分子生物学报,2025, 41(3):460-469.
- [5] WHEELER G L, JONES M A, SMIRNOFF N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. Nature, 1998, 393 (6683):365-369.
- [6] ZHENG X Z, GONG M, ZHANG Q D, et al. Metabolism and regulation of ascorbic acid in fruits[J]. Plants, 2022, 11 (12): 1602.
- [7] ZHENG C J, OUYANG B, YANG C X, et al. Reducing AsA leads to leaf lesion and defence response in knock-down of the AsA biosynthetic enzyme GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene in tomato plant[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e61987.
- [8] HU T X, YE J, TAO P W, et al. The tomato HD-Zip I transcription factor SIHZ24 modulates ascorbate accumulation through positive regulation of the D-mannose/L-galactose pathway[J]. Plant Journal, 2016, 85(1):16-29.
- [9] YE J, LI W F, AI G, et al. Genome-wide association analysis identifies a natural variation in basic helix-loop-helix transcription factor regulating ascorbate biosynthesis via D-mannose/L-galactose pathway in tomato[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(5): e1008149.
- [10] ZHANG C J, LIU J X, ZHANG Y Y, et al. Overexpression of *SIGMEs* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(3):389-398.
- [11] GILBERT L, ALHAGDOW M, NUNES- NESI A, et al. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato[J]. Plant Journal, 2009, 60(3):499-508.
- [12] CHEN W F, HU T X, YE J, et al. A CCAAT-binding factor, SIN-FYA10, negatively regulates ascorbate accumulation by modulating the D-mannose/L-galactose pathway in tomato[J]. Horticulture Research, 2020, 7(1):200.
- [13] LI X J, YE J, MUNIR S, et al. Biosynthetic gene pyramiding leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress tolerance in tomato[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(7):1558.
- [14] ALEGRE M L, STEELHEART C, BALDET P, et al. Deficiency of GDP- L- galactose phosphorylase, an enzyme required for ascorbic acid synthesis, reduces tomato fruit yield[J]. Planta, 2020, 251(2):54.
- [15] LI T D, YANG X P, YU Y Y, et al. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(12):1160-1163.
- [16] LIU X Y, XIE X D, ZHONG C H, et al. Comparative transcriptome analysis revealed the key genes regulating ascorbic acid synthesis in actinidia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23):12894.
- [17] LIU X Y, WU R M, BULLEY S M, et al. Kiwifruit MYBS1-like and GBF3 transcription factors influence l-ascorbic acid biosynthesis by activating transcription of GDP-L-galactose phosphorylase 3[J]. New Phytologist, 2022, 234 (5): 1782-1800.
- [18] XU X, ZHANG Q, GAO X L, et al. Auxin and abscisic acid an-

- tagonistically regulate ascorbic acid production via the SI-MAPK8-SIARF4-SIMYB11 module in tomato[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(11):4409-4427.
- [19] MUNIR S, MUMTAZ M A, AHIKPA J K, et al. Genome-wide analysis of Myo-inositol oxygenase gene family in tomato reveals their involvement in ascorbic acid accumulation[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1):284.
- [20] ZHENG X Z, YUAN Y J, HUANG B W, et al. Control of fruit softening and ascorbic acid accumulation by manipulation of *SIIMP3* in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(6):1213-1225.
- [21] ZHANG W Y, LORENCE A, GRUSZEWSKI H A, et al. *AMR1*, an *Arabidopsis* gene that coordinately and negatively regulates the mannose/L-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(2):942-950.
- [22] 李京霞, 夏惠, 吕秀兰, 等. 甜樱桃 *PacAMR1* 基因的克隆及表达分析[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(4):607-613.
- [23] 李会霞. *MdAMR1-LIKE* 在苹果抗坏血酸合成调控中的功能研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [24] 马松亚. F-box 蛋白 *MdAMR1L1* 调控苹果抗坏血酸含量的分子机制研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [25] 张鸿远. 甘蓝型油菜 *BnaCCD4* 基因突变体的创制及功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [26] LOVDAL T, LILLO C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 387(2):238-242.
- [27] 王祎祎, 范冰丽, 李营, 等. 番茄 *SIDOG4* 转录因子基因的克隆和表达分析[J]. *中国瓜菜*, 2024, 37(8):24-33.
- [28] RIZZOLO A, FORNI E, POLESELLO A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables[J]. *Food Chemistry*, 1984, 14(3):189-199.
- [29] 张晓燕, 张立秋, 曲平, 等. HPLC 法测定橙子中 L-抗坏血酸含量的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(4):148-151.
- [30] 李艳. 番茄抗坏血酸合成途径基因 *AMR1*、*GGP* 和 *GPP* 功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [31] 欧阳波. 几种病程相关蛋白基因转化番茄的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [32] 翁莉. 番茄 *SIPHT4* 基因的克隆与功能分析[D]. 上海: 上海师范大学, 2024.
- [33] LECHNER E, ACHARD P, VANSIRI A, et al. F-box proteins everywhere[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(6):631-638.

(上接第 35 页)

- One-step, codominant detection of imidazolinone resistance mutations in weedy rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014, 17(2):95-101.
- [19] 杨青青, 唐家琪, 张昌泉, 等. KASP 标记技术在主要农作物中的应用及展望[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(4):58-71.
- [20] 肖玉珍, 张瑞青, 张跃星, 等. 甜瓜 KASP 标记开发及指纹图谱构建[J]. *中国瓜菜*, 2024, 37(9):9-17.
- [21] 陈灵芝, 王兰兰, 高彦萍, 等. 辣椒抗烟草花叶病毒 *L3* 基因的 KASP 标记转化及应用[J]. *中国蔬菜*, 2025(4):66-71.
- [22] DAI D Q, HUANG L, ZHANG X Y, et al. Detection of candidate genes and development of KASP markers for pod length and pod width by combining genome-wide association and transcriptome sequencing in vegetable soybean[J]. *Agronomy*, 2024, 14(11):2654.
- [23] 孙利萍, 贾芝琪, 胡建斌, 等. 碱裂解法快速提取番茄 DNA 的研究[J]. *河南农业大学学报*, 2012, 46(2):136-138.
- [24] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. *棉花学报*, 1998, 10(5):50-52.
- [25] 颜学慧, 梁缘, 沈梦茹, 等. 高粱 DNA 提取方法筛选及其在叶色性状基因定位中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(12):50-56.
- [26] 周悦, 程溪柳, 高英, 等. 高通量半自动基因组 DNA 提取仪的开发与应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4):1224-1232.
- [27] 李岩, 于海琳, 马晓彤, 等. 对 CTAB 法提取菠菜基因组 DNA 实验的优化设计[J]. *化工管理*, 2023(14):15-17.
- [28] 李柯, 赵昆昆, 宁龙龙, 等. 花生 DNA 快速提取方法及应用[J]. *山东农业科学*, 2019, 51(9):68-72.
- [29] 闫玖英, 马长青, 常博, 等. 改良 CTAB 法用于苹果果实基因组 DNA 的提取[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(9):3610-3615.