

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.05.016

SlERFD3 在番茄果实成熟过程中的功能研究

马琳, 胡康棣

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为了探究 *SlERFD3* 在番茄果实成熟过程中发挥的作用,文章分析了 *SlERFD3* 在番茄果实成熟不同时期表达量的变化情况,利用病毒诱导基因沉默技术(virus-induced gene silencing, VIGS)构建 *SlERFD3* 沉默番茄植株,发现 *SlERFD3* 沉默加快了番茄成熟进程;检测了 *SlERFD3* 沉默番茄果实中叶绿素、类胡萝卜素的质量比,结果发现,与对照组相比,*SlERFD3* 沉默使番茄叶绿素质量比减少、类胡萝卜素质量比增多;利用实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测 *SlERFD3* 沉默番茄中叶绿素降解基因 *NYC1*、*PAO* 的表达量和类胡萝卜素合成基因 *PSY1* 的表达量,结果发现,与对照组相比,基因 *NYC1*、*PAO*、*PSY1* 表达量均升高,表明 *SlERFD3* 在番茄成熟过程中作为负调控因子发挥作用。

关键词: *SlERFD3* 基因; 番茄; 成熟; 色素

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)05-0682-06

Functional study of *SlERFD3* in tomato fruit ripening

MA Lin, HU Kangdi

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: To investigate the role played by *SlERFD3* in tomato fruit ripening, this paper first analyzed the changes in *SlERFD3* expression at different periods of tomato fruit ripening. *SlERFD3*-silenced tomato plants were constructed using virus-induced gene silencing (VIGS), and it was found that *SlERFD3* silencing accelerated the tomato ripening process. Thereafter, the chlorophyll and carotenoid mass ratios of *SlERFD3*-silenced tomato fruits were examined, and it was found that *SlERFD3* silencing reduced the chlorophyll mass ratios and increased the carotenoid mass ratios of tomatoes compared to the control group. Further detection of chlorophyll degradation genes *NYC1* and *PAO* and carotenoid synthesis gene *PSY1* in *SlERFD3*-silenced tomatoes using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) technique revealed that the expressions of genes *NYC1*, *PAO* and *PSY1* were higher than those in the control group, indicating that *SlERFD3* acts as a negative regulator in the ripening process of tomato.

Key words: *SlERFD3* gene; tomato; ripening; pigment

0 引言

番茄是一种重要的经济作物,其种植面积在蔬菜类中居世界第一,极大地推动了各地经济发展^[1]。番茄具有丰富的营养价值,主要通过类胡

萝卜素、可溶性糖、有机酸、多酚、矿物质和维生素等来发挥作用,还具有一定的保健功效等,因此深受消费者喜爱^[2-4]。文献[5]研究表明番茄具有广泛的生理特性,如抗炎、抗过敏、抗氧化和保护心脏的作用;文献[6]表明食用番茄可以降低患前列

收稿日期:2023-03-20;修回日期:2023-04-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31970200)

作者简介:马琳(1997—),女,河南新乡人,合肥工业大学硕士生;

胡康棣(1984—),女,安徽宿州人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: kangdihu@hfut.edu.cn.

腺癌和其他慢性病的风险。番茄采后货架期短以及易发生腐烂变质等问题一直被广泛关注,且未得到有效解决。

乙烯响应因子(ethylene responsive factor, ERF)在调节植物的生长发育、生物胁迫反应以及非生物胁迫反应等方面发挥重要作用。文献[7]研究表明,ERF通过参与多种植物的生长发育进程,*PpERF4*促进桃子果实的成熟;文献[8]发现多数 *VcERF* 基因在蓝莓花芽休眠解除过程中表达,从而促进蓝莓花芽休眠解除过程;文献[9]研究发现 *MaERF9* 和 *MaERF11* 通过转录调控或与乙烯生物合成基因相互作用参与香蕉果实成熟进程;文献[10]研究表明转录因子 *SlERF4* 参与了番茄成熟进程。

ERF家族在植物生长发育中发挥重要作用,研究表明 *AtERF109* 响应茉莉酸(JA)信号并整合到生长素通路中以调节拟南芥根的结构^[11]。番茄 *SlERFD3* 作为拟南芥 *AtERF109* 的同源基因,在番茄果实成熟过程中发挥的作用并不清楚,为此,本文分析了 *SlERFD3* 在番茄果实成熟不同时期中表达量的变化,通过病毒诱导基因沉默技术(virus-induced gene silencing, VIGS)构建 *SlERFD3* 沉默株系,观察 *SlERFD3* 沉默番茄果实表型变化,检测 *SlERFD3* 沉默果实中色素及色素相关基因表达量的变化,进而明确 *SlERFD3* 在番茄成熟过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 *SlERFD3* 家族系统进化树分析

本文通过 Phytozome 在线网站查找 *SlERFD3* 蛋白序列,蛋白序列下载后通过 BLAST 工具下载番茄和拟南芥中同源序列,利用 MEGA 7.0 软件使用 Neighbor-Joining 法构建 *SlERFD3* 基因进化树。

1.2 TRV-*SlERFD3* 载体的构建

本文利用网站 <http://solgenomics.net> 中的 VIGS Tool 工具选择 375 bp 碱基作为引物序列,以番茄 cDNA 为模板,按照 PhantaTM Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书进行 TRV-*SlERFD3* 载体扩增,通过琼脂糖凝胶电泳检验片段扩增情况,片段利用 DNA 纯化试剂盒将片段纯化,再通过琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

本文利用一步克隆试剂盒将 TRV-*SlERFD3* 片段与载体 TRV 连接,于 37 °C 连接 40 min 后转化大肠杆菌感受态,随后将涂有菌液的培养

基倒置于 37 °C 培养箱中过夜培养。

挑取培养基上的单菌落于少量无菌水中吹吸混匀,利用 2×Rapid Taq Master Mix 酶菌落鉴定,经琼脂糖凝胶电泳鉴定正确的菌液扩大培养后提取质粒,将质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 TRV-*SlERFD3* 重组质粒转化农杆菌

本实验将鉴定正确的质粒取 1 μL 至农杆菌感受态 GV3101 中,于 28 °C 培养箱中培养 2~3 d 后挑选菌落进行鉴定,将鉴定正确的菌液保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.4 病毒诱导基因沉默技术

将农杆菌 TRV1、TRV、TRV-*SlERFD3* 分别在相应抗生素的培养基上划线,将长出的单菌落加入到含有相应抗生素的液体培养基中进行活化,当 A_{600} 为 0.7 时,取 5 mL 菌液于室温下 5 000 r/min 离心 5 min,弃去上清收集菌体沉淀,利用侵染缓冲液使其 A_{600} 为 0.9~1.0 后,避光孵育 3~4 h,再以 TRV1 与 TRV 组合作为对照组,TRV1 与 TRV-*SlERFD3* 组合作为实验组(注射番茄果柄),将侵染后的番茄植株置于 16 °C 黑暗条件下处理 24 h 后,放于土培间继续正常生长,并不断观察拍照记录果实颜色变化。

1.5 番茄中色素的检测

0.5 g 番茄果实于研钵中利用液氮研磨成粉末,加入 5 mL 无水乙醇震荡混匀,将匀浆收集到 10 mL 离心管中,室温下 4 000 r/min 离心 5 min 收集上清,用酶标仪于 470、649、665 nm 波长处分别测定上清液吸光度,计算色素质量比,计算公式如下:

$$w_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649},$$

$$w_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665},$$

$$w = w_a + w_b,$$

$$w_c = (1\,000 A_{470} - 2.06w_a - 114.8w_b)/245.$$

其中: w_a 、 w_b 、 w 、 w_c 分别为叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素的质量比; A_{470} 、 A_{649} 、 A_{665} 分别为 470、649、665 nm 波长处的吸光度。

1.6 番茄 cDNA 的获取

番茄种子去除后,将果肉置于液氮中研磨成粉末,取 0.1 g 粉末按照 RNA 提取说明书提取番茄 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测条带后按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,备用。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

本文以番茄 *Tubulin* 基因作为内参,利用

SYBR Green 进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测, 反应体系为 10 μ L, 按照说明书进行程序设置。检测基因的引物序列见表 1 所列。

表 1 引物序列

基因名称	方向	引物序列
NYC1	F	GATCAGGGAAGAGCACTGTATG
	R	GAGAACACAGACACCCAAGTAT
PAO	F	CCTCATCGTCTTGCTCCTTTAT
	R	GCAGCTTGAGGTATCCTTGT
PSY1	F	GGAATTGTTGGCTTGTGAG
	R	CTCGGGAGTCATTAGCATAGTT

1.8 数据处理

本文数据均以(平均值 \pm 标准差)表示, 作图软件采用 Excel 2010; 利用 SPSS 软件进行显著性分析, 其中, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 *SlERFD3* 组织表达分析及进化树分析

为探究 *SlERFD3* 在番茄果实成熟过程中发挥的作用, 本文分析了 *SlERFD3* 基因在果实成熟过程中表达量的变化, 如图 1 所示。从图 1 可以看出, 随着果实的不断成熟, *SlERFD3* 基因表达量不断升高, 尤其是 *SlERFD3* 基因在番茄红熟期果实的表达量约为小果(直径约 1 cm)的 5 倍。结果表明 *SlERFD3* 参与了番茄果实的成熟过程。

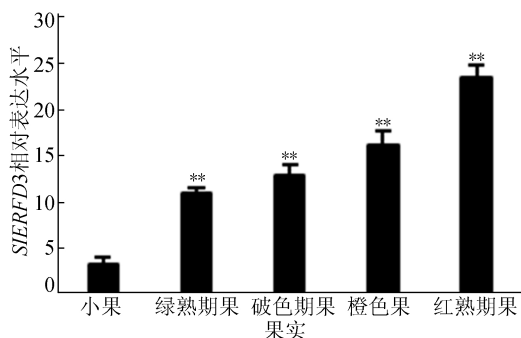


图 1 *SlERFD3* 在不同时期番茄果实中的表达水平

本文通过同源比对, 在拟南芥和番茄中得到了与 *SlERFD3* 源性较高的基因, 主要有番茄中的 *Solyc06g068830*、*Solyc09g075420*、*Solyc04g071770*、*Solyc12g056590*、*Solyc12g042210*、*Solyc10g050970*、*Solyc02g090770*、*Solyc02g090790* 和拟南芥中的

At2G47520、*At2G33710*、*At4G34410*、*At1G43160*、*At3G16770*、*At5G61890*、*At5G07310*、*At5G50080*、*At5G13330*, 这些基因构建的进化树如图 2 所示。

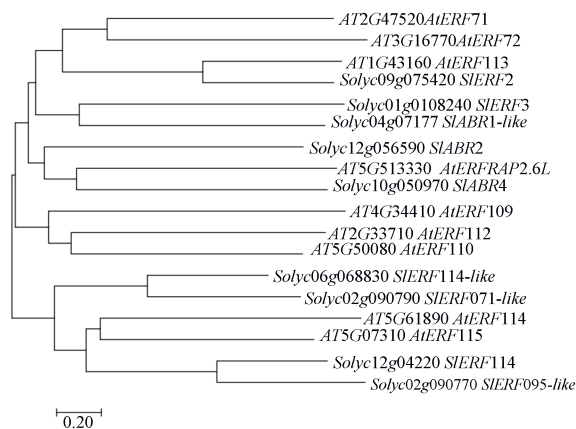


图 2 *SlERFD3* 在拟南芥和番茄中进化树分析

由图 2 可知, 番茄中 *SlERFD3* 与 *SlABR1-like* 源性较高且处在同一分支上, 番茄中的 *SlERFD3* 与拟南芥中的 *AtERF71*、*AtERF72*、*AtERF113* 处于同一分支上, 表明其亲缘关系与番茄中 *SlERFD3* 较近。

2.2 TRV-*SlERFD3* 载体构建及农杆菌转化

本研究以野生型番茄 cDNA 为模板, 利用设计的引物扩增目的基因。TRV-*SlERFD3* 片段克隆和纯化的结果如图 3 所示, 其中 M 表示 DNA Marker。

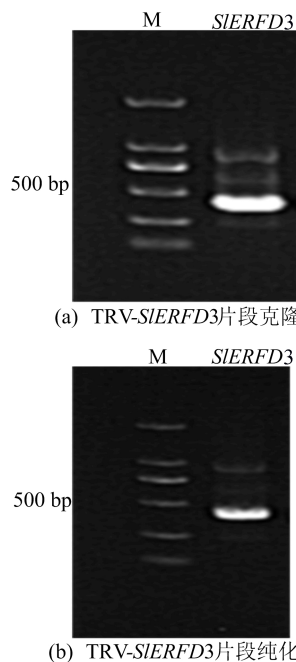


图 3 TRV-*SlERFD3* 片段克隆和纯化结果

由图 3a 可知,预期 TRV-*SlERFD3* 片段长度为 375 bp,最亮的条带位置在 500 bp 稍下方位置,表明片段扩增正确。

由图 3b 可知,将 TRV-*SlERFD3* 片段进行 DNA 纯化去除杂质及其他杂条带后发现,在目的条带位置处有较明亮的条带,表明纯化效果较好。

TRV-*SlERFD3* 大肠杆菌菌落鉴定结果如图 4a 所示,发现泳道 1、3、5 对应的位置符合目的条带位置,泳道 2、4 可能为阴性点,随后将正确的菌液扩大培养。

将鉴定正确的质粒取 10 μ L 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序比对结果如图 4b 所示。从图 4b 可以看出,序列起始位置有 2 处碱基不匹配,这是由于测序机器问题,为正常现象,后续碱基与 *SlERFD3* 的编码序列(coding sequence, CDS)完全匹配,表明 TRV-*SlERFD3* 重组质粒构建成功。

将构建正确的质粒取 1 μ L 至农杆菌感受态 GV3101 中,农杆菌菌落鉴定结果如图 4c 所示,可以看出,条带位置均在 500 bp 以下,符合预期。

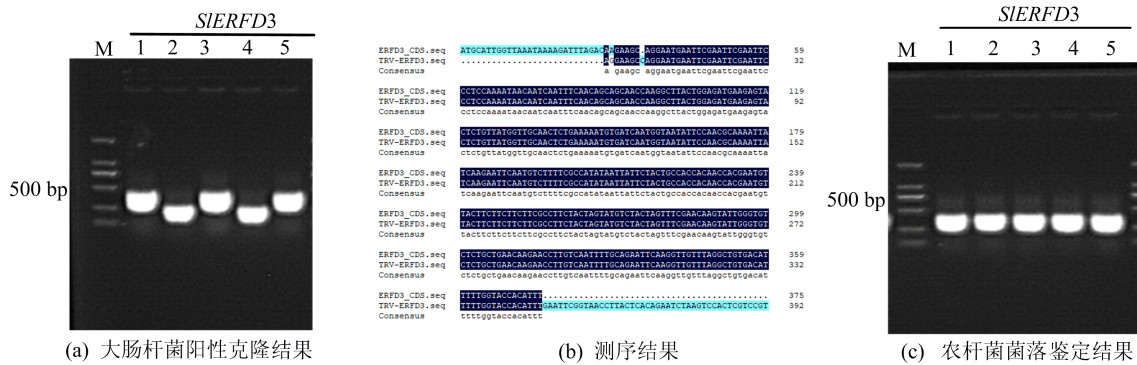


图 4 TRV-*SlERFD3* 大肠杆菌和农杆菌菌落鉴定和测序结果

2.3 TRV-*SlERFD3* 基因沉默番茄果实的获取

本文利用 VIGS 技术构建 TRV-*SlERFD3* 基因沉默番茄,其果实表型如图 5 所示。

2.4 TRV-*SlERFD3* 番茄果实中色素质量比

本文摘取注射菌液后 17、22 d 的番茄,以检测对照组和实验组番茄果实中色素质量比的变化,如图 6 所示。

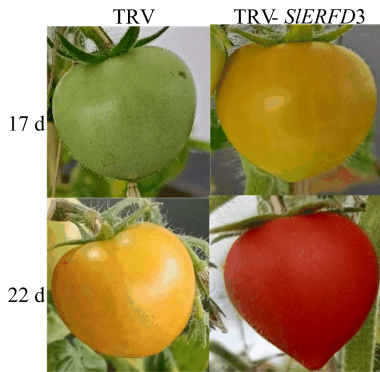


图 5 *SlERFD3* 沉默番茄果实表型

图 5 中:TRV 为对照组;TRV-*SlERFD3* 为 *SlERFD3* 沉默的实验组。

从图 5 可以看出:番茄在注射菌液后 17 d,对照组番茄依旧处于绿熟期,而实验组番茄已经处于破色期;注射后 22 d,对照组番茄处于破色期,而实验组番茄已经处于红熟期。结果表明 *SlERFD3* 沉默加快了番茄的成熟进程,由此可推断 *SlERFD3* 在番茄中作为负调控因子发挥作用。

叶绿素 a 质量比变化如图 6a 所示。从图 6a 可以看出,发现对照组叶绿素 a 质量比均高于实验组的,尤其注射菌液 22 d 后,对照组的约为实验组的 3 倍。

叶绿素 b 质量比变化如图 6b 所示,可以看出,注射菌液 17 d 后,对照组叶绿素 b 质量比略高于实验组,但注射菌液 22 d 后,对照组的约为实验组的 2 倍。

番茄中总叶绿素质量比变化如图 6c 所示,可以看出,注射菌液 22 d 后对照组和实验组相差较大,对照组总叶绿素质量比约为实验组的 3 倍,这表明 TRV-*SlERFD3* 番茄相比对照组番茄含有较少的叶绿素。

番茄中类胡萝卜素质量比变化如图 6d 所示。从图 6d 可以看出:注射菌液 17 d 后,*SlERFD3* 沉默番茄中类胡萝卜素的质量比较高,约为对照组番茄的 4 倍;注射菌液 22 d 后,实验组类胡萝卜素的质量比约为对照组的 1.5 倍。结果表明 *SlERFD3* 沉默加快了番茄类胡萝卜素的合成。

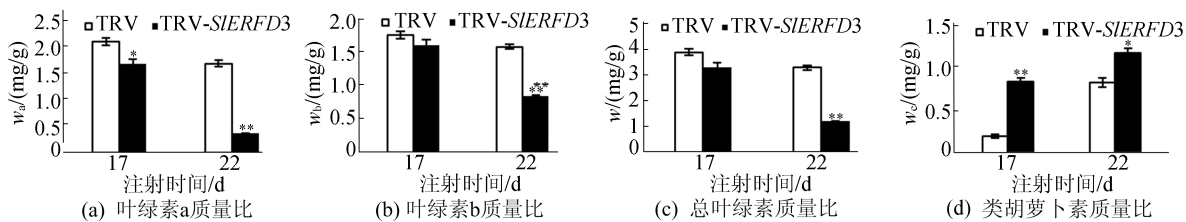


图 6 TRV-SIERFD3 番茄果实中色素质量比变化

2.5 番茄果实色素相关基因表达量分析

为研究色素相关基因在 *SIERFD3* 沉默番茄中的表达量变化,本文通过实时荧光定量 PCR 技术检测瞬时沉默番茄果实中与叶绿素降解相关基因 *NYC1*、*PAO* 以及类胡萝卜素合成相关基因 *PSY1* 表达量的变化。

叶绿素降解基因 *NYC1* 表达量变化如图 7a 所示。从图 7a 可以看出,注射菌液 17 d 后,基因 *NYC1* 在实验组番茄中表达量显著高于对照组,约为对照组的 2 倍;注射菌液 22 d 后,两者基因表达量上升至相近水平。

叶绿素降解基因 *PAO* 表达量变化如图 7b 所示。从图 7b 可以看出,对照组与实验组基因表达量均呈上升趋势,尤其是注射菌液 17 d 后,基

因 *PAO* 在实验组番茄中的表达量约为对照组的 2 倍,注射菌液 22 d 后,实验组的基因 *PAO* 表达量约为对照组的 1.5 倍。

类胡萝卜素合成基因 *PSY1* 表达量变化如图 7c 所示,发现注射菌液 17 d 后,实验组类胡萝卜素质量比远远高于对照组的,此时约为对照组的 18 倍,注射菌液 22 d 后发现实验组的基因 *PSY1* 表达量反而略低于对照组。

综上,叶绿素降解基因和类胡萝卜素合成基因在实验组番茄中表达量均高于对照组,这也与图 6 中叶绿素和类胡萝卜素质量比一致,而叶绿素质量比和类胡萝卜素质量比与图 5 中番茄表型保持一致。结果表明,*SIERFD3* 在番茄果实成熟中作为负调控因子发挥作用。

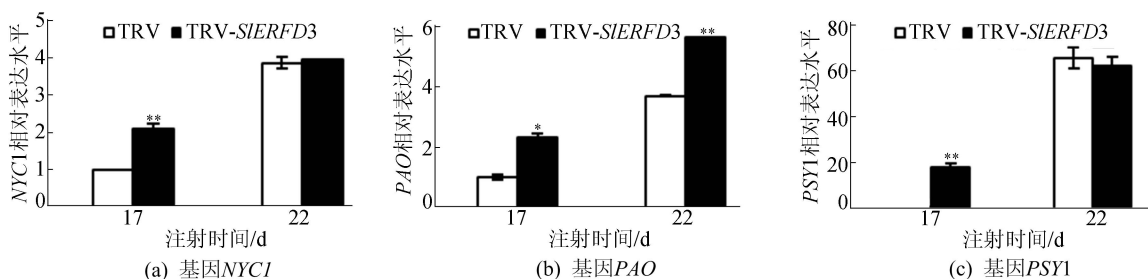


图 7 TRV-SIERFD3 中色素相关基因表达量变化

3 结 论

本文通过分析 *SIERFD3* 在番茄不同成熟时期的表达量,发现 *SIERFD3* 随着番茄果实的成熟进程表达量逐渐升高,表明 *SIERFD3* 可能参与番茄的成熟过程;随后在番茄和拟南芥中找出与 *SIERFD3* 同源性较高的序列制作进化树,发现番茄中 *SIERFD3* 与 *SIABR1-like* 同源性较高且处在同一分支上,番茄中 *SIERFD3* 与拟南芥中的 *AtERF71*、*AtERF72*、*AtERF113* 处于同一分支上,表明它们亲缘关系较近。

为了探究 *SIERFD3* 在番茄成熟中发挥的作用,本文利用 VIGS 技术构建 *SIERFD3* 沉默番茄果实,发现与对照组相比,*SIERFD3* 沉默加快

了番茄的成熟进程,表现在注射菌液 17 d 后,*SIERFD3* 沉默的番茄处于破色期,而对照组番茄处于绿熟期,注射菌液 22 d 后,*SIERFD3* 沉默的番茄处于红熟期,而对照组番茄处于破色期。本研究对沉默番茄中色素质量比进行检测,发现 *SIERFD3* 沉默番茄叶绿素质量比低于对照组的,而类胡萝卜素质量比高于对照组的,这与果实的表型一致。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术对番茄中叶绿素降解基因 *NYC1*、*PAO* 和类胡萝卜素合成基因 *PSY1* 进行检测,发现 *SIERFD3* 沉默的番茄果实中叶绿素降解基因和类胡萝卜素合成基因的表达量均高于对照组。综上,*SIERFD3* 沉默加速番茄果实的成熟进程,表明 *SIERFD3* 在

番茄果实成熟过程中作为负调控因子发挥作用,这将为延长果实的货架期、减少农业损失提供新的依据。

[参 考 文 献]

- [1] KURINA A B, SOLOVIEVA A E, KHRAPALOVA I A, et al. Biochemical composition of tomato fruits of various colors[J]. Vavilov Journal of Genetics and Breeding, 2021, 25(5):514.
- [2] CLINTON S K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease[J]. Nutrition Reviews, 1998, 56(2):35-51.
- [3] LEIVA-BRONDO M, VALCARCEL M, CORTES-OLMOS C, et al. Exploring alternative germplasm for the development of stable high vitamin C content in tomato varieties[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 133(40):84-88.
- [4] RAIOLA A, TENORE G C, BARONE A, et al. Vitamin E content and composition in tomato fruits: beneficial roles and bio-fortification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(12):29250-29264.
- [5] BOHM V. Lycopene and heart health[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(2):296-303.
- [6] FRIEDMAN M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(40):9534-9550.
- [7] WANG X, PAN L, WANG Y, et al. *PpIAA1* and *PpERF4* form a positive feedback loop to regulate peach fruit ripening by integrating auxin and ethylene signals[J]. Plant Science, 2021, 313(37):111084.
- [8] 马芮, 李瑞雪, 郑煜聆, 等. 蓝莓 AP2/ERF 基因家族鉴定及其在休眠解除过程中的表达分析研究[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(12):2854-2864.
- [9] XIAO Y, CHEN J, KUANG J, et al. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(8):2499-2510.
- [10] 李鹤鹏. 番茄 *SIERF. F4* 转录因子在果实成熟及响应干旱胁迫中的功能分析[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [11] CAI X T, XU P, ZHAO P X, et al. Arabidopsis *ERF109* mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation[J]. Nature Communications, 2014, 5(1):5833.
- (责任编辑 闫杏丽)
-
- (上接第 681 页)
- [13] 李师莹, 魏晓锋, 尹会方, 等. 沙门菌多重 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国家禽, 2022, 44(1):102.
- [14] BRANDO D, LIEBANA S, PIVIDORI M I. Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles[J]. New Biotechnology, 2015, 32(5):511-520.
- [15] HYEON J Y, MANN D A, WANG J, et al. Rapid detection of *Salmonella* in poultry environmental samples using real-time PCR coupled with immunomagnetic separation and whole genome amplification[J]. Poultry Science, 2019, 98(12):6973-6979.
- [16] XI H, JUHAS M, ZHANG Y. G-quadruplex based biosensor: a potential tool for SARS-CoV-2 detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 167:112494.
- [17] 刘健慧, 孙炜, 封龙宽, 等. G-四链体特性及其基于核酸辅助检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2):415-422.
- [18] YANG H, ZHOU Y, LIU J. G-quadruplex DNA for construction of biosensors[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 132:116060.
- [19] 刘双娜. 硫黄素 T 与包含 GA 平行双链之间作用及分析应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- [20] ZHAN X, LIU J, YAN L, et al. Sensitive fluorescent detection of *Listeria monocytogenes* by combining a universal asymmetric polymerase chain reaction with rolling circle amplification[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 169:181-187.
- [21] EVELYN, SILVA F V M. Ultrasound assisted thermal inactivation of spores in foods: pathogenic and spoilage bacteria, molds and yeasts[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105:402-415.
- (责任编辑 闫杏丽)