



番茄类胡萝卜素降解关键基因筛选

程国亭¹, 李同政¹, 闫珑文², 常海飞¹, 王延峰¹, 梁 燕^{3*}

(1 延安大学 陕西省红枣重点实验室, 延安大学 生命科学学院, 陕西延安 716000; 2 延安科育农业科技有限公司, 陕西延安 716000; 3 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 类胡萝卜素衍生挥发物是番茄重要的芳香物质, 对番茄风味非常重要。类胡萝卜素衍生挥发物代谢复杂, 为筛选调控其合成的关键基因, 研究以 90 个番茄自交系中香气寡淡的 TI4001 和香气浓郁的 CI1005 为材料, 通过实时定量 PCR 分析了番茄类胡萝卜素裂解双加氧酶(*SlCCDs*) 基因在不同组织及不同发育期果实中的表达量, 高效液相色谱测定番茄果实不同成熟期类胡萝卜素含量, 顶空固相微萃取—气相色谱—质谱联用测定番茄果实不同成熟期挥发物的含量。发现在 7 个 *SlCCDs* 基因中, *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因在番茄果实中表达量最高, 且随着果实发育成熟表达量显著升高。果实中类胡萝卜素及其衍生挥发物含量也显著升高。*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因表达量与类胡萝卜素及其衍生挥发物含量之间极显著正相关。推测 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因是裂解类胡萝卜素合成挥发物的关键基因。

关键词: 番茄; 类胡萝卜素; 类胡萝卜素裂解双加氧酶; 降异戊二烯; 挥发物

中图分类号: Q781; S641.2 **文献标志码:** A

Identification of the Key Genes for the Carotenoids Degradation in Tomatoes

CHENG Guoting¹, LI Tongzheng¹, YAN Longwen²,
CHANG Haifei¹, WANG Yanfeng¹, LIANG Yan^{3*}

(1 Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube, College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 2 Yan'an Keyu Agricultural Technology Co., Ltd, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 3 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Carotenoids derived volatiles are important aromatic substances of tomato fruits, which are very important for tomato flavor. The metabolism of carotenoids derived volatiles are complex. In order to select the key genes regulating the synthesis of carotenoids derived volatiles, we used tomato inbred line TI4001 with the weakest aroma and CI1005 with the strongest aroma as materials from 90 inbred lines in this study. The expression of the carotenoids cleavage dioxygenase genes (*SlCCDs*) were analyzed in different tissues and fruits at different development stages by real-time quantitative PCR technique. The contents of carotenoids were tested in fruits by high performance liquid chromatography at different ripening stages. The volatiles contents of tomato fruits were tested by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry technology at different ripening stages. It was found that the *SlCCD1A* and *SlCCD1B* genes had the highest expression levels in tomato fruits, and the expression levels

收稿日期: 2023-04-06; 修改稿收到日期: 2023-08-08

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究一般项目(青年)(2022JQ-177); 陕西省科技厅乡村振兴科技专项(2023-XCZX-23); 陕西省教育厅服务地方专项(22JC061-177); 陕西省红枣重点实验室项目(sxhzdsys-zj21-02); 延安市科技局揭榜制计划项目(2022SLJBZ-009); 延安大学博士科学研究启动项目(YDBK2021-05)

作者简介: 程国亭(1986—), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 主要从事番茄抗逆调控与品质改良研究。E-mail: chengguoting0417@yau.edu.cn

* 通信作者: 梁 燕, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事番茄遗传育种与蔬菜种质资源挖掘研究。E-mail: liangyan@nwsuaf.edu.cn

increased significantly with the fruit ripening. The contents of carotenoids and their derived volatiles also increased significantly. There was a significantly positively correlation among the expression levels of *Sl-CCD1A* and *SlCCD1B* genes with the contents of carotenoids and their derived volatiles. It was speculated that *SlCCD1A* and *SlCCD1B* genes would be the key genes to cleavage carotenoids to synthesis volatiles.

Key words: tomato; carotenoids; carotenoid cleavage dioxygenase; nonisoprene; volatiles

番茄是世界第一大蔬菜作物,在国民经济中占据重要地位。番茄作为研究浆果发育和果实品质形成的模式植物,在科学研究中被广泛应用,特别是2012年番茄全基因组测序完成后,番茄各方面研究迅速推进^[1]。番茄作为蔬菜和水果兼用的作物,其风味品质受到大家的极大关切。研究发现番茄果实风味主要由葡萄糖、果糖、柠檬酸、苹果酸和29种挥发物组成^[2]。番茄果实的挥发物主要是醛类、醇类、酮类、酯类等C₄~C₁₆的小分子有机化合物,其前体物质主要是必需营养物质脂肪酸、类胡萝卜素和氨基酸。脂肪酸衍生的C₆醇和C₆醛含量较高,具有生青气味,与番茄新鲜程度有关。类胡萝卜素衍生的C₁₃和C₁₄酮类、醛类和醇类挥发物,虽然含量较低,但其嗅觉阈值浓度更低,气味特征多为花香、果香、甜味,深受消费者喜爱。苯丙氨酸衍生的挥发物主要是具有刺激性气味的芳香醛和醇,亮氨酸/异亮氨酸衍生的挥发物主要是具有焦糖味的C₄化合物以及少量的短链酯。现代栽培番茄风味下降与至少13种主要挥发物浓度降低密切相关^[2]。因此,增加类胡萝卜素衍生挥发物的含量可成为番茄风味提升的关键^[3]。

番茄类胡萝卜素衍生挥发物主要由类胡萝卜素裂解双加氧酶(CCDs)裂解类胡萝卜素产生^[4-7],只有启动子区含有稀有等位基因的*TomLoxC*基因才具有裂解类胡萝卜素的功能^[8],*SlCCDs*是裂解类胡萝卜素的关键基因^[9-10]。与拟南芥同源性分析发现,番茄*SlCCDs*基因家族包括7个成员,分别是*SlCCD1A*、*SlCCD1B*、*SlCCD4A*、*SlCCD4B*、*Sl-CCD7*、*SlCCD8*和*SlCCD-like*^[11-14],*SlCCDs*基因之间分工和作用机理并不是很清楚。本研究以香气寡淡的TI4001和香气浓郁的CI1005番茄育种自交系为材料,通过分析*SlCCDs*基因表达与类胡萝卜素及其衍生挥发物含量的相关性,初步筛选出*Sl-CCD1A*和*SlCCD1B*基因是裂解类胡萝卜素产生挥发物的关键基因,可为提升现代栽培番茄果实风味品质奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

研究以风味差异显著的番茄育种自交系 TI4001

和 CI1005 为材料,均来自西北农林科技大学番茄生物技术遗传改良团队。TI4001 为绿色普通大果番茄,总挥发物含量最低,不含异戊二烯衍生挥发物,香气寡淡。CI1005 为红色樱桃番茄,总挥发物含量最高,尤其是异戊二烯衍生挥发物含量最高,香气浓郁^[15]。2022 年 1 月 25 日在延安市安塞生态农业示范园的育苗工厂播种,3 月 20 日定植在安塞生态农业示范园日光温室,进行田间常规管理。取番茄第三穗花瓣、花萼、根、茎、叶、侧芽、幼果和绿熟期、转色期、粉熟期和成熟期果实^[16-17],用于 *Sl-CCDs* 基因表达量测定。同时,绿熟期、转色期、粉熟期和成熟期果实用于类胡萝卜素及其衍生挥发物含量测定。

1.2 试验方法

1.2.1 *SlCCDs* 基因特异性表达

在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 *SlCCDs* 基因核苷酸序列。根据实时定量引物设计原则,采用 Primer primer 5.0 软件设计 *SlCCDs* 基因定量检测引物^[18](表 1),*SlActin* 作为内参基因,采用 Trizol 法提取番茄总 RNA^[19]。用 Evo M-MLV 反转录试剂盒 II (Accurate Biotechnology Co., Ltd, 武汉) 先将基因组 DNA 去除,再反转成 cDNA,用 NanoDrop 核酸浓度测定仪 (ThermoFisher Scientific Co., Ltd, 美国) 检测 cDNA 浓度,稀释成 100 ng/mL。以上述反转录的 cDNA 为模板,用 SYBR[®] Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒在 QuantStudio 5 (Life Technologies Co., Ltd, 美国) 上进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 20 μ L,其中 2 $\times$ SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix 10 μ L, cDNA 200 ng,正向和反向引物各 0.2 μ mol/L, ROX Reference Dye 0.4 μ mol/L,用 RAase free water 补齐至 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 60 s, 变性和复性 40 个循环^[20]。每个样品均设置 3 个生物学重复,然后根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 *SlCCDs* 基因的相对表达量。

表 1 试验所用引物
Table 1 The primers used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	片段长度 Length/bp	T _m 值 T _m value/℃
<i>SlActin</i> -F	GTGCGAGTGTCTGTCTGTT	224	55.00
<i>SlActin</i> -R	CCAAGGGATGGTGTAGCCAG		60.00
<i>SlCCD1A</i> -F	TGGTTCGGAGGCTGTATTTG		57.89
<i>SlCCD1A</i> -R	CTCACAGTTTGGCTTGTTCTTG	239	58.30
<i>SlCCD1B</i> -F	GGATCAACGAGAACTACACTGG	234	58.49
<i>SlCCD1B</i> -R	CCTCTTCACATTCAGTCCCAG		58.02
<i>SlCCD4A</i> -F	GTATCGATCGCGGAAGTTGAT	130	58.34
<i>SlCCD4A</i> -R	CGTAGCCATCGTCTTCGTTAG		58.63
<i>SlCCD4B</i> -F	GCCCCATACCTCCGTTTATAAC	226	58.68
<i>SlCCD4B</i> -R	CCACCTCATTTCCGACTCATC		58.44
<i>SlCCD7</i> -F	GATCCATACCATCCGATTTCCC	220	58.39
<i>SlCCD7</i> -R	AACCTCCACTTTCCACTCAC		57.36
<i>SlCCD8</i> -F	CCCAACACCCTACCAAGATT	287	60.20
<i>SlCCD8</i> -R	GTCTTGGATGTGGGGTGATACTA		59.29
<i>SlCCD-like</i> -F	GAGTATCATATGTTGGCAGAGGG	183	58.43
<i>SlCCD-like</i> -R	TGTGATTGTGGTAATAGGGTGTG		58.42
<i>SlCCD1A</i> -F	ATGGGGAGAAAAGAAGATGATGGA	1 638	57.25
<i>SlCCD1A</i> -R	TCACAGTTTGGCTTGTTCTTGAAT		58.63
<i>SlCCD1B</i> -F	ATGGGGATGAATGAAGAAGATGGA	1 638	59.02
<i>SlCCD1B</i> -R	TCACATTTTGGCTTGCTCCTGAA		58.04

1.2.2 果实类胡萝卜素和挥发物含量测定

番茄果实 4 个不同成熟期类胡萝卜素含量用 LC-2010A HT 高效液相色谱(日本岛津株式会社)检测^[21]。用 YMC Carotenoid(C₃₀) 色谱柱(YMC 美国公司,长度×内径为 250 mm× 4.6 mm I. D., 填料颗粒径 5 μm)对类胡萝卜素进行分离,用番茄红素、β-胡萝卜素、叶黄素和玉米黄素标准品确定出峰时间,并做线性回归校准曲线^[22]。

类胡萝卜素(色谱级)标准品均购买自上海源叶生物科技有限公司。番茄果实 4 个不同成熟期挥发物定性和定量方法参照^[23]。

1.2.3 果实 *SICCD1A* 和 *SICCD1B* 基因克隆

根据 Primer primer 5.0 软件设计 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因 CDS 全长引物(表 1)^[24]。采用 Trizol 法提取果实总 RNA,用反转录试剂盒(Takara)生成 cDNA^[25-26]。PCR 扩增 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因 CDS 全长均为 1 638 bp。反应体系为 50 μL,其中 2×高保真酶 25 μL,cDNA 400 ng,正向和反向引物各 0.5 μmol/L,用 RAase free water 补齐至 50 μL。PCR 反应条件:98 ℃预变性 58 s,

98 ℃变性 10 s,58 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环,72 ℃终延伸 300 s,4 ℃保存^[27-31]。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,将含有目的条带的凝胶用胶回收试剂盒(天根公司)进行回收,然后送生工有限公司(上海)进行测序^[32]。

1.3 数据分析

用 Office 2019 软件处理数据,用 SPSS 22.0 软件单因素方差分析中的 Duncan(D)检验分析数据之间差异性,用 Origin 2019 软件作图。

2 结果与分析

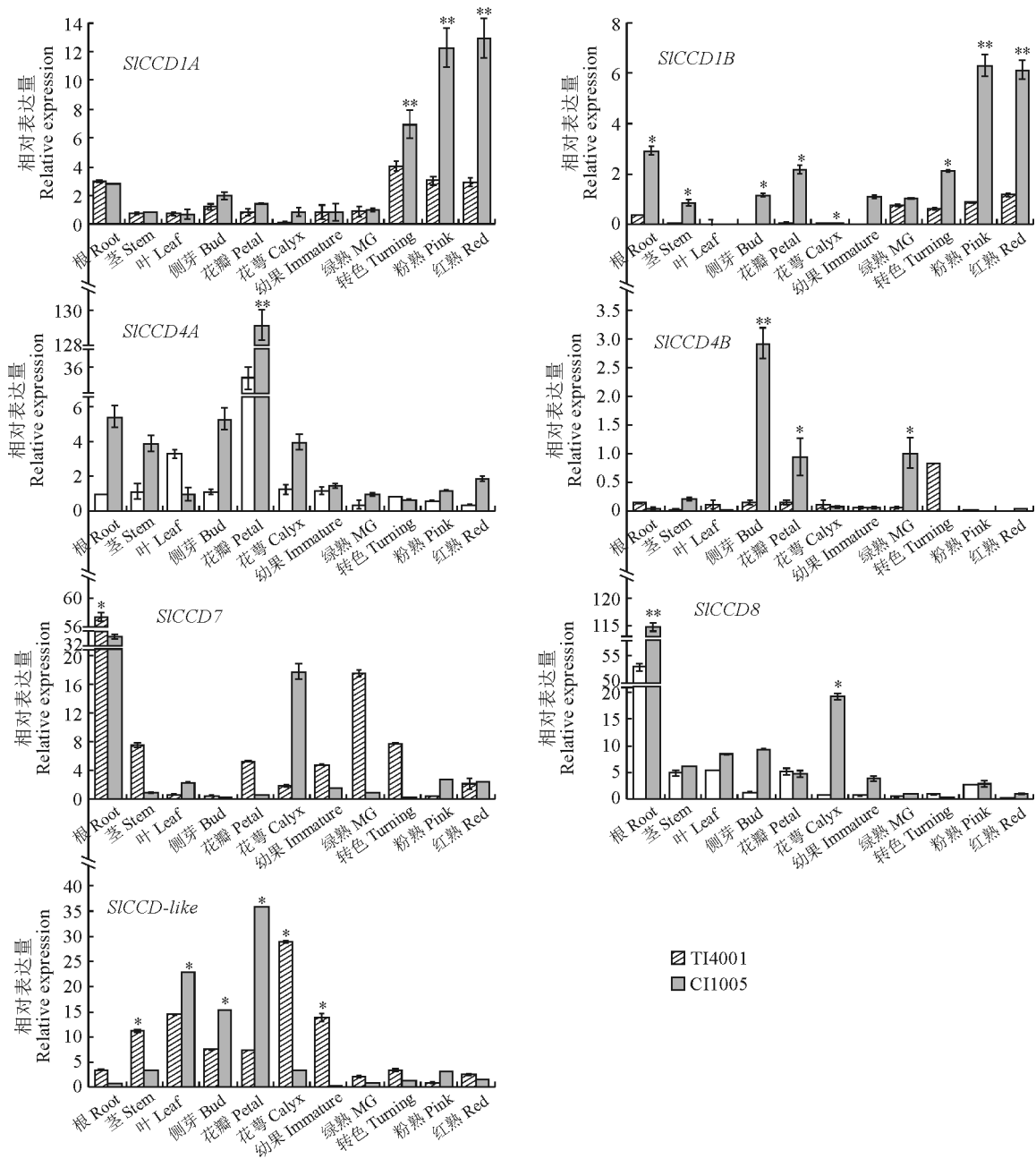
2.1 *SICCDs* 基因表达特性

2.1.1 组织表达特性

番茄 7 个 *SlCCDs* 基因的组织相对表达量如图 1 所示。*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 在 CI1005 和 TI4001 番茄果实中基因表达量显著高于其他组织,*SlCCD4A* 在 2 个番茄花瓣中表达量显著高于其他组织,*SlCCD7* 和 *SlCCD8* 在根中表达量显著高于其他组织。CI1005 中,*SlCCD4B* 在侧芽中表达量极显著高于其他组织,在花瓣和绿熟期果实中表达量

也较高。*SlCCD-like* 在花瓣中表达量显著高于其他组织。TI4001 中,*SlCCD4B* 在转色期果实中表达量显著高于其他组织,*SlCCD-like* 在花萼中表达量高

于其他组织。共同点表现为 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 在果实中表达量最高,*SlCCD4A* 在花瓣中表达量最高,*SlCCD7* 和 *SlCCD8* 在根中表达量最高。



* 表示显著差异($P < 0.05$); ** 表示极显著差异($P < 0.01$). 下同。

图1 *SlCCDs* 基因在番茄组织和成熟期特异性表达

* indicates significant difference ($P < 0.05$); ** indicates very significant difference ($P < 0.01$). The same below.

Fig.1 Expression of *SlCCDs* gene among different tissues and ripening stages of tomato

2 个番茄材料 *SlCCDs* 基因组织相对表达量不同。CI1005 中, *SlCCD1A*、*SlCCD1B*、*SlCCD4A*、*SlCCD4B* 和 *SlCCD8* 在各组织表达量均高于 TI4001, *SlCCD-like* 表达量在叶、芽和花瓣中显著高于 TI4001。TI400 中, *SlCCD7* 在根中, *SlCCD-*

like 在花萼、幼果和茎中表达量显著高于 CI1005。

2.1.2 果实发育时期表达特性

SlCCDs 基因表达量在番茄果实发育不同时期有差异(图 1)。CI1005 中, *SlCCD4B* 在绿熟期果实中最高, *SlCCD1B* 和 *SlCCD-like* 在粉熟期最

高,*SlCCD1A* 在红熟期最高。TI4001 中,*SlCCD-like* 在幼果期最高,*SlCCD1A* 和 *SlCCD4B* 在转色期果实中最高,*SlCCD1B* 在红熟期最高。2 个番茄材料果实成熟过程中 *SlCCD4A*、*SlCCD7* 和 *SlCCD8* 表达量均很低。说明 *SlCCD4B* 主要在成熟早期表达,*SlCCD1B* 主要在成熟后期表达,其他 *SlCCDs* 表达量几乎不受果实成熟进程的影响。

2 个番茄材料 *SlCCDs* 基因果实发育期表达不同。CI1005 中,*SlCCD4B* 表达量在绿熟期果实中显著高于 TI4001 番茄,*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 表达量在转色期、粉熟期和红熟期显著高于 TI4001。TI4001 中,*SlCCD4B* 表达量在转色期果实中显著高于 CI1005。其他 *SlCCDs* 表达量在 2 个材料间没有显著性差异。

2.2 果实不同时期类胡萝卜素及其衍生挥发物含量

2.2.1 类胡萝卜素含量

2 个材料果实番茄红素、 β -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄素含量如图 2 所示。CI1005 中,番茄红素含量远高于其他 3 种类胡萝卜素。番茄红素含量随着果实成熟显著升高,红熟期高达 75.84 mg/(100 g)。

β -胡萝卜素含量绿熟期至粉熟期显著升高,粉熟期到红熟期显著降低,粉熟期最高,为 8.53 mg/(100 g)。叶黄素在绿熟期未检测到,转色期到红熟期显著降低,转色期最高,为 3.89 mg/(100 g)。玉米黄素只在转色期和粉熟期检测到,含量分别只有 0.08, 0.07 mg/(100 g)。TI4001 中,未检测到番茄红素, β -胡萝卜素含量随着果实成熟持续升高,粉熟期最高,为 1.18 mg/(100 g)。叶黄素在绿熟期未检测到,转色期、粉熟期和红熟期含量分别为 0.76, 0.58,0.67 mg/(100 g)。玉米黄素含量绿熟期和转色期高于粉熟期和红熟期,转色期最高,为 0.20 mg/(100 g)。说明红色 CI1005 番茄中类胡萝卜素主要由番茄红素和 β -胡萝卜素组成,绿色 TI4001 番茄中各种类胡萝卜素含量均较低。2 个番茄材料类胡萝卜素含量差异显著。CI1005 中,番茄红素和 β -胡萝卜素含量 4 个发育时期均显著高于 TI4001,叶黄素在转色期和粉熟期显著高于 TI4001。TI4001 中,只有在转色期玉米黄素显著高于 CI1005。2 个材料在其他时期类胡萝卜素含量差异均不显著。说明 CI1005 中类胡萝卜素含量显著高于 TI4001。

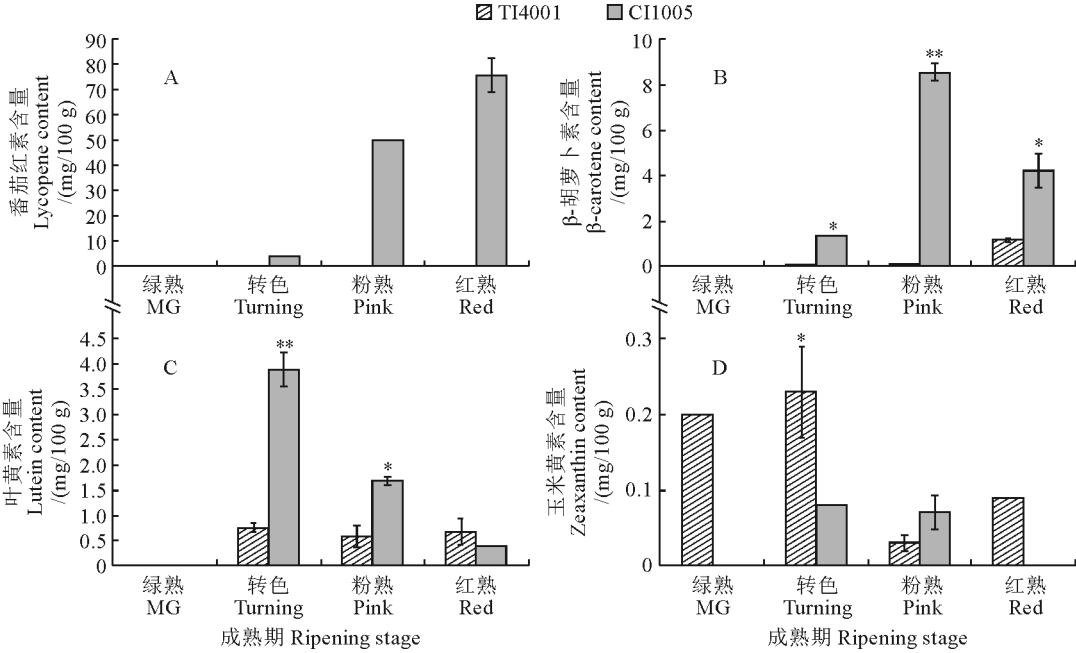


图 2 番茄果实不同成熟期类胡萝卜素含量

Fig. 2 The contents of carotenoids in tomato fruits at different ripening stages

2.2.2 类胡萝卜素衍生挥发物含量

番茄果实不同发育期类胡萝卜素衍生挥发物如图 3 所示。CI1005 中,类胡萝卜素衍生挥发物含量由高到低依次为 6-甲基-5-庚烯-2-酮、香叶基丙酮、柠檬醛和 6-甲基-5-庚烯-2-醇,均随着果实成熟持续

升高,红熟期最高,分别为 179.15,77.54,33.09, 6.35 μ g/kg。TI4001 中,只检测到 6-甲基-5-庚烯-2-酮和香叶基丙酮,最高含量只有 7.70,3.64 μ g/kg,且在果实不同成熟期差异均不显著。说明类胡萝卜素衍生挥发物主要在成熟后期积累。

2 个材料 6-甲基-5-庚烯-2-酮和香叶基丙酮含量在绿熟期差异不显著,在转色期、粉熟期和红熟期,CI1005 中 6-甲基-5-庚烯-2-酮和香叶基丙酮含量在极显著高于 TI4001。说明 CI1005 中类胡萝卜素衍生挥发物含量显著高于 TI4001,且随着果实成熟,差异急剧增大。

2.3 *SlCCDs* 基因与类胡萝卜素及其衍生挥发物之间的相关性

SlCCDs 基因表达量与类胡萝卜素(番茄红素、 β -胡萝卜素和玉米黄素)、类胡萝卜素衍生挥发物(柠檬醛、6-甲基-5-庚烯-2-醇、6-甲基-5-庚烯-2-酮和香叶基丙酮)含量之间的相关性如表 2 所示。

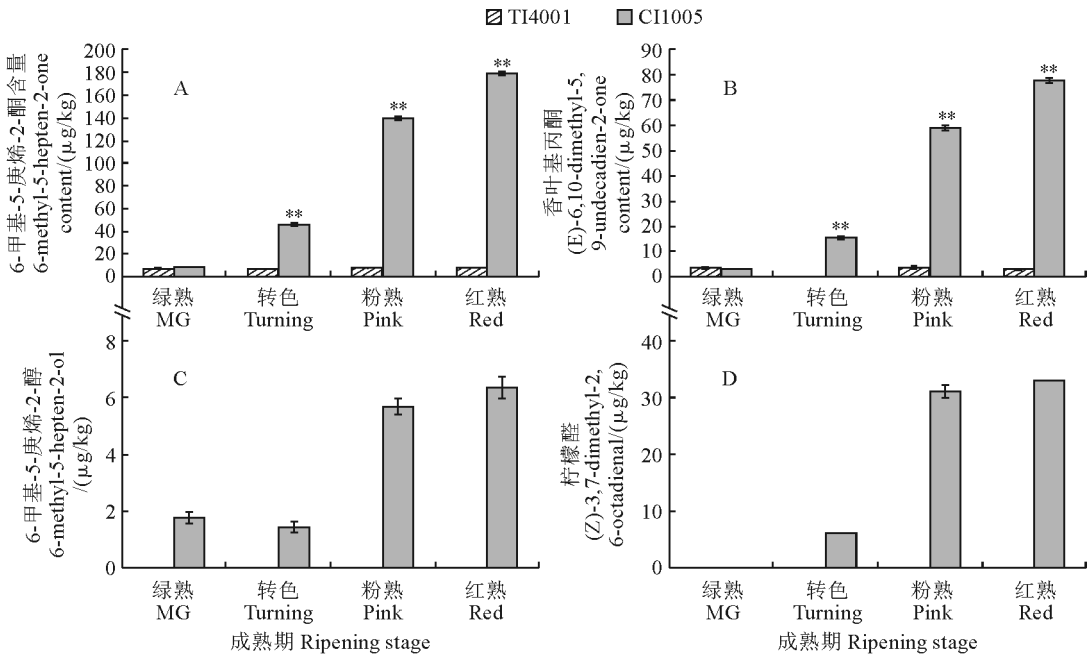


图 3 番茄果实不同成熟期类胡萝卜素衍生挥发物含量

Fig. 3 The contents of carotenoids derived volatiles in tomato fruits at different ripening stages

表 2 *SlCCDs* 基因与类胡萝卜素及其衍生挥发物之间的相关性

Table 2 The correlation between the carotenoids, their derived volatiles and *SlCCDs* genes

指标 Metric	番茄红素 Lycopene	β -胡萝卜素 β -carotene	玉米黄素 Zeaxanthin	柠檬醛(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal	6-甲基-5-庚烯-2-醇 6-methyl-5-hepten-2-ol	6-甲基-5-庚烯-2-酮 6-methyl-5-hepten-2-one	香叶基丙酮 (E)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one
柠檬醛(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal	0.975 **	0.901 **	-0.218	1.000	0.973 **	0.992 **	0.991 **
6-甲基-5-庚烯-2-醇 6-methyl-5-hepten-2-ol	0.956 **	0.854 **	-0.307	0.973 **	1.000	0.971 **	0.970 **
6-甲基-5-庚烯-2-酮 6-methyl-5-hepten-2-one	0.986 **	0.844 **	-0.247	0.992 **	0.971 **	1.000	0.998 **
香叶基丙酮 (E)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one	0.992 **	0.840 **	-0.280	0.991 **	0.970 **	0.998 **	1.000
<i>SlCCD1A</i>	0.915 **	0.866 **	-0.021	0.957 **	0.904 **	0.957 **	0.944 **
<i>SlCCD1B</i>	0.957 **	0.926 **	-0.228	0.996 **	0.972 **	0.983 **	0.981 **
<i>SlCCD4A</i>	0.895 **	0.589	-0.178	0.835 **	0.892 **	0.863 **	0.864 **
<i>SlCCD4B</i>	-0.323	-0.395	0.314	-0.367	-0.214	-0.369	-0.378
<i>SlCCD7</i>	-0.193	-0.234	0.019	-0.226	-0.299	-0.242	-0.227
<i>SlCCD8</i>	0.291	0.509	-0.089	0.371	0.332	0.294	0.308
<i>SlCCD-like</i>	0.052	0.332	0.737 *	0.122	0.005	0.050	0.036

注：* 表示显著相关($P<0.05$)；** 表示极显著相关($P<0.01$)。
Note: * indicates significant correlation ($P < 0.05$); ** indicates very significant correlation ($P<0.01$).

SlCCD1A、*SlCCD1B* 和 *SlCCD4A* 与番茄红素、 β -胡萝卜素、6-甲基-5-庚烯-2-酮、香叶基丙酮、柠檬醛和 6-甲基-5-庚烯-2-醇之间均呈极显著正相关。*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 还与 β -胡萝卜素呈极显著

正相关, *SlCCD-like* 仅与呈玉米黄素显著正相关, 其他 *SlCCDs* 基因表达量与类胡萝卜素及其衍生挥发物之间相关性不显著, 说明 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 是裂解番茄果实中类胡萝卜素产生挥发物

的关键基因。番茄红素和 β -胡萝卜素含量与柠檬醛、6-甲基-5-庚烯-2-醇、6-甲基-5-庚烯-2-酮和香叶基丙酮含量之间均呈极显著正相关,4 种类胡萝卜素衍生挥发物含量之间呈极显著正相关,说明番茄红素和 β -胡萝卜素是这些挥发物的前体。

3 讨 论

前人研究发现,CCDs 基因通过多步骤多场所的协同作用裂解类胡萝卜素^[33]。在质体中,C₄₀ 类胡萝卜素先被 CCD7 和 CCD4 酶裂解成 C₂₇ 阿朴类胡萝卜素,再被 CCD4 酶裂解为 C₁₃ 酮和 C₁₄ 二醛挥发物,或者 C₂₇ 阿朴类胡萝卜素进入细胞基质,被 CCD1 酶裂解为无色 C₁₃ 环己烯酮和黄色 C₁₄ 多烯衍生物^[34-36]。本研究表明,*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因在番茄果实中表达量显著高于其他组织,随着番茄果实成熟表达量显著升高;类胡萝卜素及其衍生的挥发物积累也表现出同样的趋势,随着番茄果实含量显著增加;*SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因表达与类胡萝卜素及其衍生挥发物显著正相关,推测 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 基因是番茄果实中裂解类胡萝卜素的关键基因,需要进一步通过过量表达和基因编辑技术进行验证。Simkin 等^[37]发现,在果实成熟过程中,*SlCCD1A* 表达量绿熟期至橙熟期逐渐降低,橙熟期至红熟期迅速升高,在红熟期达到最高。而 *SlCCD1B* 表达量变化趋势与 *SlCCD1A* 恰好相反,在橙熟期 *SlCCD1B* 表达量最高。Ilg 等^[38]表明 *SlCCD1B* 基因在番茄成熟果实中表达量较高,裂解产物对果实香味贡献最大。Wei 等^[14]认为 *SlCCD1A* 基因在绿熟期表达量最高,破色期迅速降低,粉熟期略有升高,红熟期又开始下降。*SlCCD1B* 与 *SlCCD1A* 基因表达变化趋势恰好相反,粉熟期表达量最低,红熟期表达量最高,可能不同番茄材料之间 *SlCCD1* 基因表达量变化趋势存在差异,有待进一步验证。

CCD1 酶沿着碳主干,在不同位置切割各种立

体化学结构的线性、单环和双环类胡萝卜素,产生众多阿朴类胡萝卜素^[39-40],如 5,6-环氧-3-羟基- β -紫罗酮、香叶基丙酮、 β -紫罗酮、C₁₄ 二醛、3-羟基- β -紫罗酮、9-顺式-新黄质在 C₉-C₁₀ 双键裂解产物、9-顺式-新黄质在 C₉'-C₁₀' 双键裂解产物、4,9-二甲基十二烷-4,6,8-三烯二醛、 α -紫罗酮、假紫罗酮、3-羟基- α -紫罗酮^[38,41-42]。在 C₉-C₁₀ 和 C₉'-C₁₀' 双键位置对称降解而生成 C₁₃ 衍生物,如 β -紫罗兰酮、环柠檬醛、二氢猕猴桃内酯等降异戊二烯香气物质和 C₁₄ 二醛^[43-44]。CCD1 也可作用于 C₅-C₆、C₇-C₈ 和 C₁₁-C₁₂ 双键^[45]。番茄 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 对底物和切割位点没有强的选择性,可多个双键位置氧化裂解顺式类胡萝卜素和全反式类胡萝卜素,以及不同的阿朴类胡萝卜素,产生大量的挥发物、单阿朴类胡萝卜素和二醛产品,包括顺式假紫罗兰酮、橙花醛、香叶醛和法尼基丙酮^[37-38]。番茄 *SlCCD1* 可在 9 和 10 (9' 和 10') C-C 双键位置对称地切割多个类胡萝卜素,产生的 C₁₄ 二醛和 C₁₃ 环己酮^[37]。CCD1 还可根据碳 C₇-C₈ (7'-8') 和 C₁₁-C₁₂ (11'-12') 之间的饱和状态以及 C₅、C₉ 和 C₁₃ (5'、9' 和 13') 上的甲基识别其裂解位点^[41]。双环类胡萝卜素主要在 9,10 (9', 10') 双键处被裂解,非环类胡萝卜素在末端断裂形成香叶醛^[46]。

反义表达番茄 *SlCCD1* 基因,转基因番茄的叶片和果实中的 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 的 mRNA 水平降低了 87%~93%, β -胡萝卜素衍生的 C₁₃ 环己酮—— β -紫罗兰酮和番茄红素衍生的 C₁₃ 无环产物——香叶基丙酮含量分别只下降了 50% 和 60%,转基因植株形态和类胡萝卜素含量并无明显变化^[47]。对 *SlCCD1A* 和 *SlCCD1B* 进行敲除的株系显著降低了所有阿朴类胡萝卜素挥发物的浓度,但他们并没有被彻底消除^[37],说明阿朴类胡萝卜素挥发物的产生存在转录后调控,或者还与其他酶有关,需要进行进一步研究。

参考文献:

[1] ZHU G T, GOU J B, KLEE H, *et al.* Next-gen approaches to flavor-related metabolism[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, **70**: 187-212.

[2] TIEMAN D, ZHU G T, RESENDE M F R, Jr, *et al.* A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor [J]. *Plant Science*, 2017, **355**(6 323): 391-394.

[3] VOGEL J T, TIEMAN D M, SIMS C A, *et al.* Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, **90**(13): 2 233-2 240.

[4] SCHWARTZ S H, TAN B C, GAGE D A, *et al.* VP14 of maize catalyzes the carotenoid cleavage reaction of abscisic acid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 1997, **114**(3): 798.

[5] AULDRIDGE M E, BLOCK A, VOGEL J T, *et al.* Characterization of three members of the arabidopsis carotenoid cleav-

- age dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family[J]. *The Plant Journal*, 2006, **45**(6): 982-993.
- [6] BERTONI G. Maize viviparous14: Structure meets function[J]. *The Plant Cell*, 2010, **22**(9): 2 925.
- [7] MESSING S A, GABELLI S B, ECHEVERRIA I, *et al.* Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid[J]. *Plant Cell*, 2010, **22**(9): 2 970-2 980.
- [8] GAO L, GONDA I, SUN H, *et al.* The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor[J]. *Nature Genetics*, 2019, **51**(6): 1 044-1 051.
- [9] SCHERZINGER D, SCHEFFER E, BAR C, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* ORF Rv0654 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids[J]. *FEBS Journal*, 2010, **277**(22): 4 662-4 673.
- [10] CHENG G T, LI Y S, QI S M, *et al.* *SlCCD1A* enhances the aroma quality of tomato fruits by promoting the synthesis of carotenoid-derived volatiles[J]. *Foods*, 2021, **10**: 2 678.
- [11] TAN B C, JOSEPH L M, DENG W T, *et al.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase gene family[J]. *The Plant Journal*, 2003, **35**(1): 44-56.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1 596-1 599.
- [13] PRIYA R, SNEHA P, DASS J F P, *et al.* Exploring the codon patterns between *CCD* and *NCED* genes among different plant species [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2019, **114**: 103 449.
- [14] WEI Y P, WAN H J, WU Z M, *et al.* A comprehensive analysis of carotenoid cleavage dioxygenases genes in *Solanum lycopersicum*[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, **34**(2): 512-523.
- [15] 常培培. 番茄果实芳香物质和品质性状的鉴定与分析[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [16] CHENG G T, CHANG P P, SHEN Y B, *et al.* Comparing the flavor characteristics of 71 tomato (*Solanum lycopersicum*) accessions in central Shaanxi[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 586 834.
- [17] 王真珍, 陈国梁, 张亦弛, 等. 狗头枣果皮 *GH9* 基因家族鉴定及不同发育期的表达与纤维素含量分析[J]. 西北植物学报, 2023, **43**(4): 539-549.
WANG Z Z, CHEN G L, ZHANG Y C, *et al.* Identification of the *GH9* gene family and expression in different development stages and cellulose content analysis in peel of *Ziziphus jujuba* 'Goutouzao'[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(4): 539-549.
- [18] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, *et al.* MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, **34**: 369-373.
- [19] 樊 胜, 张岚清, 刘 柯, 等. 苹果'长富2号'开花调控转录因子基因 *MdSPL6* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2016, **43**(11): 2 089-2 098.
FAN S, ZHANG L Q, LIU K, *et al.* Cloning and expression of the flowering regulation transcription factor gene *MdSPL6* in *Malus × domestica* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(11): 2 089-2 098.
- [20] 祁世明, 梁 燕. 番茄 *SELF-PRUNING* 基因家族及株形调控功能研究进展[J]. 园艺学报, 2020, **47**(9): 1 705-1 714.
QI S M, LIANG Y. Advances in research of the *SELF-PRUNING* gene family and plant architecture regulatory functions in tomato[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, **47**(9): 1 705-1 714.
- [21] 王曼曼, 薛舒丹, 吴廷全, 等. 光照和温度调控对番茄果实中类胡萝卜素合成的影响[J]. 分子植物育种, 2020, **18**(18): 6 158-6 164.
WANG M M, XUE S D, WU T Q, *et al.* Illumination and temperature control in carotenogenesis of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(18): 6 158-6 164.
- [22] 戴云花, 刘周斌, 杨 莎, 等. 不同光质对辣椒叶色黄化突变体光合生理特性的影响研究[J]. 西北植物学报, 2023, **43**(4): 601-610.
DAI Y H, LIU Z B, YANG S, *et al.* Photosynthetic characteristics and physicochemical properties of pepper leaf yellowing mutants under different light quality[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(4): 601-610.
- [23] CHENG G T, CHANG P P, AHMED H E S, *et al.* Effect of fruit color and ripeness on volatiles profiles in cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) fruit[J]. *Food Science*, 2021, **42**(12): 14-24.
- [24] 任 媛, 赵玉洁, 张心慧, 等. 石榴 *WRKY* 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. 西北植物学报, 2020, **40**(2): 218-231.
REN Y, ZHAO Y J, ZHANG X H, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *WRKY* gene family in *Punica granatum* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(2): 218-231.
- [25] 王世祥, 左希亚, 邢利博, 等. 苹果成花抑制蛋白 *SVP* 基因的克隆、表达及启动子活性分析[J]. 园艺学报, 2019, **46**(8): 1 445-1 457.
WANG S X, ZUO X Y, XING L B, *et al.* Cloning, expression pattern and promoter activity analysis of flowering regulatory gene *SVP* in apple (*Malus × domestica*) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, **46**(8): 1 445-1 457.
- [26] 杨 杰, 陈 蓉, 胡文娟, 等. 甜橙 *SPL* 基因家族的鉴定及其在成花诱导中的表达分析[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(1): 48-56.
YANG J, CHEN R, HU W J, *et al.* Genome-wide identification of *SPL* gene family and expression analysis during flowering induction in *Citrus sinensis* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(1): 48-56.
- [27] 董 凤, 樊 胜, 马小龙, 等. 苹果赤霉素氧化酶基因

GA2ox,GA3ox 和 GA20ox 家族全基因组鉴定及表达分析[J]. 园艺学报, 2018, **45**(4): 613-626.

DONG F, FAN S, MA X L, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of GA2ox, GA3ox and GA20ox in apple[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, **45**(4): 613-626.

[28] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(1): 325-327.

[29] 郑立伟, 赵才德, 宋春晖, 等. 苹果 BR 信号转录因子基因 *Md-BZR1* 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2018, **45**(2): 205-216.

ZHENG L W, ZHAO C D, SONG C H, *et al.* Cloning and expression of transcription factor gene *BZR1* in *Malus × domestica* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, **45**(2): 205-216.

[30] 马雅琳, 梁 燕. 番茄长花柱性状遗传规律与 QTL 分析[J]. 园艺学报, 2020, **47**(2): 264-274.

MA Y L, LIANG Y. Inheritance and QTL analysis of long-style trait in tomato[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, **47**(2): 267-274.

[31] 刘建汀, 叶新如, 张前荣, 等. 西葫芦 *NCED* 基因家族鉴定及其响应干旱胁迫分析[J]. 西北植物学报, 2023, **43**(4): 569-581.

LIU J T, YE X R, ZHANG Q R, *et al.* Genome-wide identification and response to drought stress of *NCED* genes family in Zucchini (*Cucurbita pepo* L.)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(4): 569-581.

[32] 张丽之, 樊 胜, 安 娜, 等. 苹果全基因组 *PAL* 基因家族成员的鉴定及表达分析[J]. 浙江农业学报, 2018, **30**(12): 2 031-2 043.

ZHANG L Z, FAN S, AN N, *et al.* Identification and expression analysis of *PAL* gene family in apple[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, **30**(12): 2 031-2 043.

[33] BRANDI F, BAR E, MOURGUES F, *et al.* Study of ‘Red-haven’ peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, **11**(1): 24.

[34] FLOSS D S, SCHLIEMANN W, SCHMIDT J, *et al.* RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of medicago truncatula causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(3): 1 267-1 282.

[35] FLOSS D S, WALTER M H. Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, **4**(3): 172-175.

[35] PRIYA R, DASS J F P, SIVA R. Gene expression prediction and hierarchical clustering analysis of plant CCD genes[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, **34**(3): 618-627.

[37] SIMKIN A J, SCHWARTZ S H, AULDRIDGE M, *et al.* The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudionone, and geranylacetone[J]. *The Plant Journal*, 2004, **40**(6): 882-892.

[38] ILG A, BRUNO M, BEYER P, *et al.* Tomato carotenoid cleavage dioxygenases 1A and 1B: Relaxed double bond specificity leads to a plenitude of dialdehydes, mono-apocarotenoids and isoprenoid volatiles[J]. *FEBS Open Bio*, 2014, **4**: 584-593.

[39] WASS M N, KELLEY L A, STERNBERG M J. 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**: 469-473.

[40] WANG L, BALDWIN E A, PLOTTO A, *et al.* Effect of methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment on the volatile profile in tomato fruit subjected to chilling temperature[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, **108**: 28-38.

[41] VOGEL J T, TAN B, MCCARTY D R, *et al.* The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(17): 11 364-11 373.

[42] ELHADI M A, ZHANG F J, WU F F, *et al.* Advances in fruit aroma volatile research[J]. *Molecules*, 2013, **18**(7): 8 200-8 229.

[43] SCHWEIGGERT R M, STEINGASS C B, HELLER A, *et al.* Characterization of chromoplasts and carotenoids of red and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.)[J]. *Planta*, 2011, **234**(5): 1 031-1 044.

[44] BABINO D, PALCZEWSKI G, WIDJAJA-ADHI M A K, *et al.* Characterization of the role of β -carotene 9, 10-dioxygenase in macular pigment metabolism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(41): 24 844-24 857.

[45] ADAMI M, DE FRANCESCHI P, BRANDI F, *et al.* Identifying a carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD4*) gene controlling yellow/white fruit flesh color of peach[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, **31**(5): 1 166-1 175.

[46] ILG A, BEYER P, AL-BABILI S. Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis[J]. *FEBS Journal*, 2009, **276**(3): 736-747.

[47] WU Q, TAO X, AI X, *et al.* Effect of exogenous auxin on aroma volatiles of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during postharvest ripening[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, **146**: 108-116.

(编辑:韦青侠)