

# 番茄生长素响应因子基因 *SLARF12* 在果实发育过程中的功能分析

刘松瑜, 闫艳秋, 冯秋硕, 卢 钢\*

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310058)

**摘 要:** 以番茄 ‘Micro-Tom’ 为材料, 研究了生长素响应因子基因 *SLARF12* (序列号: HM565127.1) 在果实发育过程的生物学功能。实时定量 PCR 检测表明, *SLARF12* 在花蕾中表达量逐渐降低, 而在授粉后的子房中显著高于去雄后未授粉的子房。利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术抑制 *SLARF12* 表达, 对番茄植株营养生长与花的发育没有显著影响, 但 *SLARF12* RNAi 果实显著大于野生型与空载转化植株的果实, 且开花前去雄未授粉不能形成单性结实的果实。利用半薄切片观察转基因番茄果实早期发育细胞学特性发现, 转化植株的果实果皮细胞显著大于对照果实细胞, 但是两者果皮细胞层数没有显著差异。基因表达分析发现在 *SLARF12* RNAi 的子房与幼果中细胞分化相关基因 *CycB1.1* 和 *CDKB2.1* 等的表达水平同对照相比下降, 而 *SIPEC* 等细胞膨大基因表达量显著高于对照。所以抑制 *SLARF12* 可增强果实中细胞膨大相关基因的表达, 从而促进果实膨大。以上结果表明, *SLARF12* 可负调控番茄果实膨大但不参与坐果启动调控过程, 显示了生长素通过 ARF 信号精细调控果实发育的各个阶段。

**关键词:** 番茄; 番茄生长素响应因子 12; RNA 干扰; 果实形态; 细胞膨大; 基因表达

**中图分类号:** S 641.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 04-0678-13

## Function Analysis of *SLARF12* Gene During Fruit Development in Tomato

LIU Songyu, YAN Yanqiu, FENG Qiushuo, and LU Gang\*

(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** In order to explore the molecular mechanism by which auxin signal transduction mediates fruit set and development, we used tomato variety ‘Micro-Tom’ to evaluate the biological function of an auxin responsive factor, *SLARF12* (HM565127.1), in fruit development. Real-time PCR analysis showed that the *SLARF12* mRNA levels gradually decreased before the flower was fully open, however, it became significantly higher in self-pollinated ovaries than that in emasculated and unpollinated ones. Inhibition of *SLARF12* by RNA interference (RNAi) method had no significant influence on tomato vegetative growth and flower development, but the RNAi fruits in transgenic plants were significantly larger and heavier than those in wild-type plants and empty vector transgenic lines. In addition, no parthenocarpic fruit was developed after artificial emasculation before anthesis. The semi-thin section was performed to compare cytological characteristics in early fruits between RNAi and wild-type plants. The fruit pericarp cells of

收稿日期: 2018-02-14; 修回日期: 2018-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471878); 浙江省重点创新团队项目 (2013TD05); 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ17C150002)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: glg@zju.edu.cn)

transgenic lines were significantly larger than those of wild-type fruits, but the number of pericarp cell layers of transgenic fruit was similar to that of the control fruit. Gene expression analysis showed that the mRNA levels of cell differentiation genes including *CycB1.1* and *CDKB2.1* in the ovary and young fruit of *SLARF12* RNAi transgenic plants decreased when compared with the wild-type fruits, but the expression level of cell expansion gene such as *SIPEC* was significantly higher than that of the control fruit. Therefore, the inhibition of the *SLARF12* expression level would up-regulate the expression levels of cell expansion genes, which might enhance the ability of fruit expansion and result in larger fruits of transgenic plants. The data suggest that *SLARF12* can negatively regulate the fruit expansion process in tomato but is not required for fruit initiation, revealing the auxin can finely regulate fruit development at various stages through ARF signal conduction pathway.

**Keywords:** tomato; *SLARF12*; RNA interference; fruit morphology; cell expansion; gene expression

番茄生产中, 尤其是设施栽培中的低温、高温和弱光等环境条件很容易造成授粉受精不良, 导致落花落果, 严重影响到产量和品质 (Adams et al., 2001; Ploeg & Heuvelink, 2005)。外源施用生长素与生长素类似物 (Abad & Monteiro, 1989), 过量表达生长素合成过程中的基因 (Pandolfini et al., 2002), 都能诱导番茄单性结实。尽管人们对植物生长素信号途径研究取得了长足进步, 同时也鉴定了生长素信号受体、生长素合成运输以及生长素信号传导的一系列基因 (Gray et al., 2001; Hagen & Guilfoyle, 2002), 但生长素调控果实发育的分子机理尚未阐明, 尤其是对于果实发育启动和早期生长过程的调控机制还知之甚少。

生长素响应因子 (ARF) 是在生长素信号途径中与生长素早期反应基因启动子中的应答元件 (AuxRE) TGTCTC 基序结合来调控生长素响应的一类转录因子。ARF 对下游的响应基因起关键调控作用, 在植物体内生长素浓度低的时候, ARF 通过异源二聚化与 AUX/IAA 蛋白结合从而抑制下游生长素反应基因的转录; 当植物体内生长素浓度升高时 (或植物生长调节剂处理后), Aux/IAA 蛋白能被 SCF<sup>TIR1</sup> 共同体所降解, 释放出 ARF 从而激活下游生长素反应基因的转录 (Guilfoyle & Hagen, 2001)。目前已在拟南芥、番茄、水稻、玉米等物种中鉴定了 ARF 家族基因并对部分基因的功能进行了深入研究 (Li et al., 2016)。众多研究表明 ARF 基因可以调控植物多种发育过程, 如顶端组织的形成、微管束的形成、雌雄配子体的发育、开花和果实发育、侧根形成和花器官的衰老以及植物体内花青苷的代谢等 (Inukai et al., 2005; Cheng et al., 2007; Hao et al., 2015; Zhang et al., 2015; Liu et al., 2017; Ren et al., 2017; 王意程 等, 2017)。近年来先后证实一批生长素信号途径基因, 包括 *AtARF8/fwf* (Goetz et al., 2006)、*SLARF8* (Goetz et al., 2007)、*SLARF7/fwf* (de Jong et al., 2009, 2011)、*Aucsia* (Molesini et al., 2009) 等是果实坐果与发育的负调控因子, 这些基因的下调均可以导致果实单性结实; 在木本植物麻风树中过表达 *JcARF19* 会引起果实与种子增大 (Sun et al., 2017); 桃 ARF 可能参与调控硬核期果实与种子的发育 (史梦雅 等, 2014)。这些结果表明 ARF 对番茄果实发育调控的复杂性。目前对于番茄 ARF 基因的研究大多集中在 ARF6 与 ARF8 基因亚家族及相邻的 ARF7 与 ARF19 亚家族基因, 对其他 ARF 基因在果实发育过程的功能还较少涉及 (Goetz et al., 2007; de Jong et al., 2009, 2015)。*SLARF2* 在调控番茄成熟果实发育中有重要作用 (冯媛媛 等, 2012; Hao et al., 2015; Breitel et al., 2016)。*SLARF4* 通过调控糖的代谢从而影响番茄果实早期发育 (Sagar et al., 2013); 而 *SLARF9* 调控早期发育果实的细胞分裂 (de Jong et al., 2015)。在前期研究中, 通过生物信息学以及分子生物学的方法, 鉴定了番茄 15 个新的 ARF 家族基因 (Wu et

al., 2011)。初步表达分析发现位于另一亚家族的一个 ARF 基因 *SLARF12* (序列号: HM565127.1, 先前命名为 *SLARF9B*), 在果实早期发育过程表现出与上述 ARF 基因不同的表达模式 (Wu et al., 2011), 其生物学功能值得深入探究。

本研究中以番茄品种 ‘Micro-Tom’ 为材料, 利用 RNA 干扰技术 (RNAi) 研究了 *SLARF12* 在番茄果实发育过程中的生物学功能, 并通过显微观察及表达分析初步探索了其调控果实发育的作用模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料以及取材

试验材料为番茄矮化品种 ‘Micro-Tom’, 由美国 UC-Davis 大学番茄种质资源库提供, 经本实验室留种保存。

番茄植株在人工气候室内在 16 h / 8 h (光照/黑暗) 的光周期, ( $26 \pm 1$ ) / ( $20 \pm 1$ ) °C (昼/夜) 温度条件下进行培养, 生长至开花后, 对根、茎、叶、花、子房、花芽、萼片、花瓣、花药、花梗等不同组织与器官进行取样。

在番茄花与果实发育的不同时期对子房或幼果进行取样, 包括授粉前花蕾长度为 3.5 ~ 4.5、4.6 ~ 6.0 和 6.1 ~ 7.5 mm 的子房; 同时在番茄花蕾开花前 2 d 人工去雄, 去雄后分别对开花后 3、6 和 9 d 的幼果进行取样; 另外对去雄后花进行人工自交授粉, 在开花后 3 d 取幼果。所有样品液氮冷冻后保存, 备用于提取 RNA 以及基因表达分析。

### 1.2 植物表达载体构建

根据 pCAMBIA1301 载体多克隆位点和 *SLARF12* 的 cDNA 序列, 使用 primer 5.0 设计 RNAi 载体的 152 bp 的干扰片段扩增引物。上游引物序列: 5'-ACGCGTCGACACCTTCATCCTCAAA-3', 5'端加 *Sal* I 酶切位点; 下游引物序列: 5'-CGCGGATCCGCATACCTGAAGTATTTA-3', 5'端加 *Bam*H I 酶切位点。

以番茄 ‘Micro-Tom’ cDNA 为模板, 将 PCR 扩增得到的 152 bp 目的片段与 PUCC 载体分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 并连接得到重组质粒; 对重组质粒用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切, 再与双酶切 (*Bam*H I 和 *Sal* I) 后的目的片段利用同尾酶连接, 得到插入了含有正向、反向目的片段的 pUCCRNAi + *SLARF12* 载体。利用载体上正、反目的片段两端含 *Pst* I 和 *Sal* I 酶切位点, 将正、反目的片段从 pUCCRNAi + *SLARF12* 载体上通过 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切下来, 与经过 *Pst* I 和 *Sal* I 双酶切后的 pCAMBIA1301 载体进行连接, 得到 pCAMBIA1301-*SLARF12* 载体。利用冻融法将 pCAMBIA1301-*SLARF12* 质粒载体转入农杆菌 LBA4404 中。同时构建 pCAMBIA1301 空载质粒载体为对照。

### 1.3 番茄的遗传转化

利用“叶盘法”对 ‘Micro-Tom’ 番茄子叶进行遗传转化 (Sun et al., 2006; 佟少明 等, 2016)。将在 MS 培养基上生长 7 ~ 9 d 的无菌苗叶片接种在 1/2MS 预培养基上培养 1 d 后, 通过农杆菌菌液进行侵染后, 转到诱导培养基 ( $MS + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZT} + 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Hyg} + 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Timentin}$ ) 上培养得到抗性芽。将抗性芽转到 MS 生根培养基 ( $MS + 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Hyg} + 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Timentin}$ ) 上生根后

移栽到装有混合基质（草炭:蛭石 = 3:2）塑料盆中。

#### 1.4 *SLARF12* RNAi 植株的分子鉴定

采用 CTAB 法提取番茄 Hyg<sup>+</sup>抗性植株 DNA, 根据 *SLARF12* RNAi 干扰片段的序列设计上游引物, 以表达载体 pCambia1301 上序列设计下游引物 PCR 扩增检测转基因阳性株系。引物 ARF12-F: 5'-ATGAGACGGATTTCGTGTTT-3'; ARF12-R: 5'-CGACAGTGGTCCCAAAGAT-3'。

GUS 检测参考 Jefferson (1987) 的文献进行。将转基因和野生型番茄材料的根分别置于 X-Gluc 溶液中, 于 37 °C 放置过夜, 经过 FAA 固定 15 min 后用 70%乙醇脱色, 至阴性对照为白色, 体式显微镜 (Leica MZ16 FA, Germany) 下观察并拍照。

#### 1.5 *SLARF12* RNAi 植株生长与果实形态学观察

在人工气候室内栽培转基因和对照番茄植株, 待到开花期时观察营养生长状况、花和果实的形态, 取第 2 批开放的花与果实, 测量花器官各个组织, 包括萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊等的长度与直径, 分析成熟果实的纵径、横径, 单果质量, 果形指数, 单果种子数, 种子千粒质量以及种子发芽率等。每个株系设置 3 个生物学重复, 每个重复包含分别从 10 个不同植株中随机选取同一批的 30 朵开放花和 30 个果实进行分析。利用 SPSS 15.0 Tukey 检验分析数据的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

#### 1.6 半薄切片观察

将野生型与转基因番茄材料种植至开花, 对第 2 批及以后的花与果实分批取样, 包括开花前两天去雄与开放当天的子房, 以及直径为 3~4、5~6、7~8 和 9~10 mm 的不同发育时期的子房或果实。上述每个阶段取 5 个以上子房或果实进行观察。

将样品置于 2.5%戊二醛溶液里面 4 °C 固定过夜。倒掉固定液, 使用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗样品 3 次, 每次 15 min; 再用 1%锇酸溶液将样品固定 1~2 h; 重复漂洗 1 遍; 依次用 50%、70%、80%、90%、95%乙醇脱水处理, 每个浓度 15 min, 再用 100%乙醇脱水 20 min, 纯丙酮 20 min; 丙酮和 EPON812 环氧树脂包埋剂 1:1 混合液处理 1 h, 1:3 混合液处理 3 h, 在纯包埋剂中过夜 (70 °C), 获得包埋好的样品。样品使用 LKB 11800 半薄切片机切片, 厚度 1 μm, 在载玻片上滴 1 滴蒸馏水, 将切片置入水滴中, 再置于展片机 (REICHERT-JUNG HK120) 上 85 °C 下展片。最后用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液配制的 1%亚甲基蓝染色后于 Leica 荧光显微镜 (DFC420C, 德国) 下观察并拍照。

果皮的显微结构可从外到内分为外果皮（外部的 4~5 层细胞）、中果皮（外果皮与内果皮之间的细胞）、内果皮（内部的 1~2 层细胞），每个时期的外果皮与中果皮分别选 30~100 个细胞, 重复 5 个果实, 进行生物学统计 ( $P < 0.05$ )。

#### 1.7 番茄野生型与转基因植株的 *ARF12* 及细胞分化相关基因表达特性分析

在不同发育时期对转基因 *SLARF12-5* RNAi T1 代株系以及野生型植株取样, 采用 TriZol 法 (Invitrogen, USA) 提取 RNA, 按照 Promega 公司提供的 ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System 说明书步骤将 RNA 反转录成 cDNA。

*SLARF12* 及细胞分化相关基因 qRT-PCR 分析引物见表 1。qRT-PCR 反应在 BIO-RAD 公司实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96<sup>TM</sup> Real Time System) 上进行。反应体系: 1 μL cDNA 模板 (10 ng·μL<sup>-1</sup>), 10 μL SYBR Green premix Ex Taq, 引物各 1 μL (10 ng·μL<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 反应程序

为：95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s，50~60 ℃ 30 s，循环 40 次。每个反应荧光信号达到设定阈值时所进行的循环数即是 Ct 值，根据初始模板量对数值与 Ct 值间线性关系的原理，使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法以 *Slubi3*（GenBank 登录号：X58253.1）为内参基因，计算基因的相对表达量（Schmittgen & Livak, 2008）。所有试验样品设 3 个生物学重复。

表 1 qRT-PCR 分析所用引物  
Table 1 The primers for qRT-PCR analysis

基因名称 Gene name	正向序列 (5' - 3') Forward	反向序列 (5' - 3') Reverse
<i>Slubi3</i>	AGAAGAAGACCTACACCAAGCC	TCCCAAGGGTTGTACATACATC
<i>SLARF12</i>	GGAGGCATCAACAAATCAGG	CTTCGGGCAACAAAGCAATC
<i>SICDKB2.1</i>	ATGCTGGTAAGAGTGTATCGG	CGGAGAGTAGTTGGAGGAAC
<i>SlCycb1.1</i>	CGTTACTAGGAGGTCTGCTG	CCTTAGTTACAAGAGGCTTCG
<i>SlPec</i>	ATGGGAAGGATCATGGAGACAGTGG	AAGGAAGAGGACTTCGCAGCTAAGC
<i>SIXTH1</i>	CTGCCACGCCACAAGAAGTCC	TTTGACGAACCCAACGAAGTCTCC
<i>SlEXPA5</i>	AAGGGTTCAAGAACTCAATGGCAAC	ACCATCGCCTGTAGTGACCTTAAAG

2 结果与分析

2.1 *SLARF12* 的表达特性

qRT-PCR 分析结果表明，*SLARF12* 在番茄不同器官与组织中均有表达（图 1，a），在根中表达量最高，其次是芽和茎，花器官中相对较低。而在所有花器官组织中，子房中表达量最高，花药和花梗中最低。

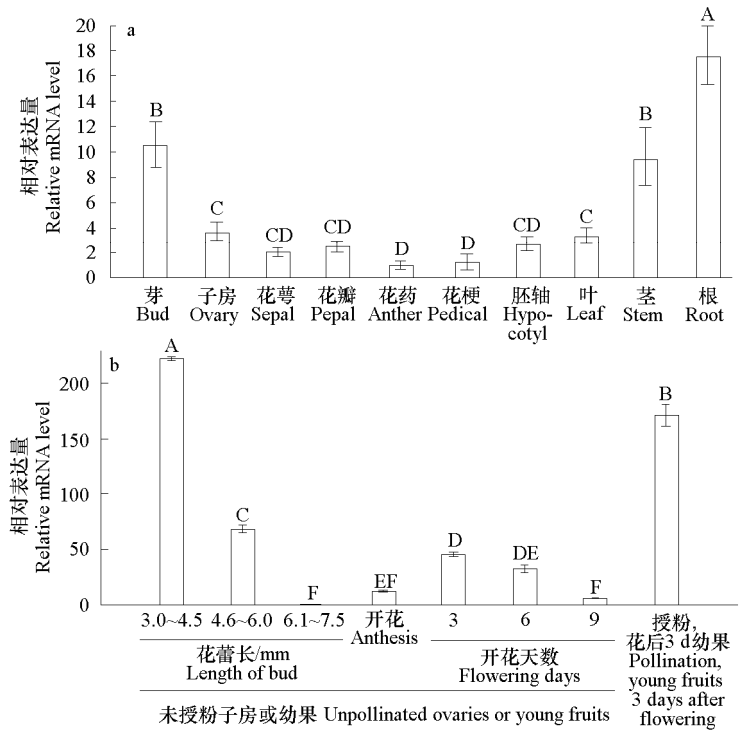


图 1 qRT-PCR 检测番茄 *SLARF12* 的时空表达  
Fig. 1 The expression profiles of *SLARF12* in tomato using qRT-PCR analysis  
 $P < 0.01$ .

对不同发育时期的子房或幼果的分析（图 1，b）发现，在授粉受精之前，随着花的发育，花蕾长度的增加，*SLARF12* 表达量显著下降，直至开花期（anthesis）表达量也很低，在开花后 3 d 时表达量显著升高，9 d 后显著降低；与之相对应的，若去雄后进行人工授粉后，花后 3 d 幼果中 *SLARF12* 表达量急剧增加，明显高于在花期去雄后未授粉各个时期的表达水平。

2.2 转基因植株的获得

通过 PCR 检测获得 7 个转基因株系（图 2）。再经过 GUS 检测（图 3），7 个株系全显阳性，同时获得了 3 个 pCAMBIA1301 空载阳性对照株系。

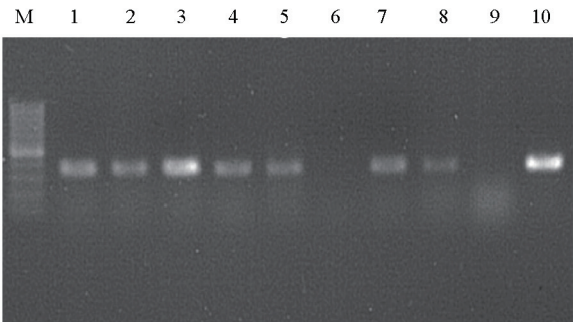


图 2 番茄 ‘Micro-Tom’ *SLARF12* RNAi 植株的 PCR 检测

M: Marker; 1 ~ 8: *SLARF12* RNAi 转基因芽系检测; 9: 阴性对照; 10: 阳性对照。

Fig. 2 PCR amplification detection of *SLARF12* in *SLARF12* RNAi plants of tomato ‘Micro-Tom’

M indicates DNA marker; 1 – 8 indicate the transgenic plants; 9, 10 indicate negative and positive control, respectively.

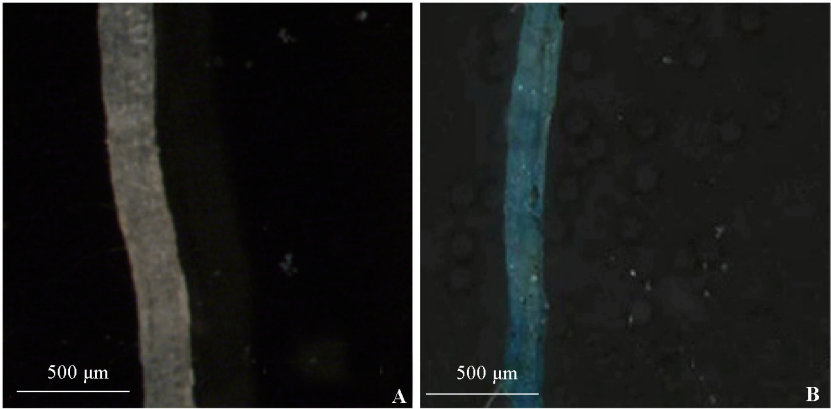


图 3 番茄 ‘Micro-Tom’ *SLARF12* RNAi 植株根的 X-Gluc 组织化学染色检测

A: 野生型番茄根尖; B: 转基因番茄根尖。

Fig. 3 GUS expression in *SLARF12* RNAi plant’s roots of tomato ‘Micro-Tom’ by the staining method of histochemistry

A: Wild type root tip; B: Transgenic root tip.

通过对 *SLARF12* 表达量进行检测，筛选出 3 个有效抑制 *SLARF12* 表达的芽系 *SLARF12*-1、*SLARF12*-2、*SLARF12*-5。*SLARF12* 在叶片中表达量分别为对照的 38.2%、55.3%和 39.6%（图 4）。

对 *SLARF12*-5 株系果实发育过程中 *SLARF12* 基因的表达检测也表明在不同花期的子房与幼果中表达均受到抑制（图 5）。

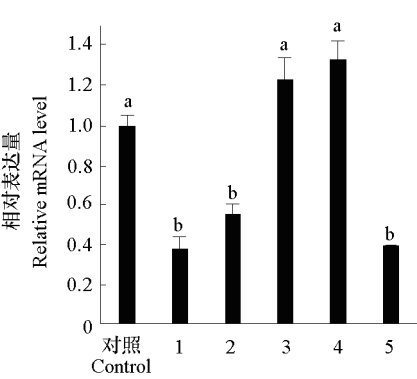


图 4 *SLARF12* 在 *SLARF12* RNAi 各转基因株系中的表达变化  
对照为载体 pCAMBIA1301 转化的对照植株;  
1~5 为 RNAi 不同株系 *SLARF12*-1、*SLARF12*-2、*SLARF12*-3、*SLARF12*-4、*SLARF12*-5。  $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Relative *SLARF12* mRNA levels collected from empty vector line and *SLARF12* RNAi plant  
Control indicates pCAMBIA1301 empty control. 1 - 5: Line of *SLARF12*-1, *SLARF12*-2, *SLARF12*-3, *SLARF12*-4, and *SLARF12*-5.  $P < 0.05$ .

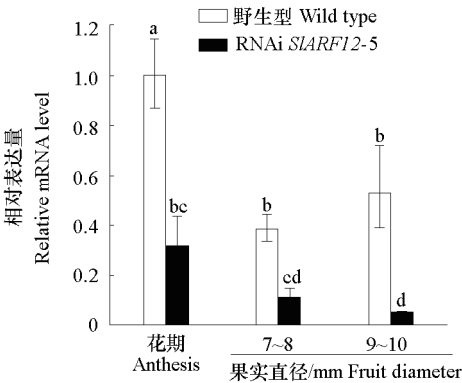


图 5 野生型和转基因 *SLARF12*-5 株系番茄植株不同发育时期 *SLARF12* 基因的表达分析

Fig. 5 Expression of *SLARF12* gene in ovaries and fruits of wild-type and *SLARF12*-5 RNAi plants  
 $P < 0.05$ .

2.3 转基因植株生长特性与果实性状的观察

对抑制程度达到 60%以上的 *SLARF12*-5 与 *SLARF12*-1 株系营养生长与生殖生长特性观察发现，转化植株营养生长以及在花器官形态上与野生型植株相比，均没有显著差异（表 2）。

表 2 *SLARF12* RNAi 植株花器官形态观察

Table 2 The observation of flower morphology of *SLARF12* RNAi transgenic plant

mm

株系 Line	萼片 Sepal		花瓣 Petal		雄蕊 Stamen	
	长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width
WT	6.50 ± 0.50 a	1.30 ± 0.42 a	8.03 ± 0.85 a	3.00 ± 0.10 a	5.83 ± 0.29 a	2.40 ± 0.36 a
<i>SLARF12</i> -5	6.33 ± 0.58 a	1.20 ± 0.26 a	8.50 ± 0.50 a	3.03 ± 0.06 a	5.67 ± 0.29 a	2.53 ± 0.31 a
<i>SLARF12</i> -1	6.67 ± 0.55 a	1.34 ± 0.06 a	8.37 ± 0.64 a	3.33 ± 0.58 a	5.50 ± 0.50 a	2.27 ± 0.46 a
株系 Line	花柱 Style		子房 Ovary			
	长 Length	直径 Diameter	长 Length	宽 Width		
WT	4.73 ± 0.64 a	0.30 ± 0.10 a	1.23 ± 0.06 a	1.03 ± 0.06 a		
<i>SLARF12</i> -5	4.88 ± 0.78 a	0.33 ± 0.06 a	1.37 ± 0.38 a	1.20 ± 0.35 a		
<i>SLARF12</i> -1	4.90 ± 0.36 a	0.32 ± 0.08 a	1.23 ± 0.06 a	1.07 ± 0.12 a		

注：所有统计数据通过 SPSS 15.0 软件进行显著性差异分析（ $P < 0.05$ ）。  
Note: All statistical analyses were performed with SPSS 15.0 ( $P < 0.05$ ).

比较转化植株和野生型番茄果实发育特性发现，*SLARF12*-5 与 *SLARF12*-1 转化株系与野生型植株相比，坐果率没有显著差异，同时单个果实内的种子数量没有明显改变，说明 ARF12 被抑制后对番茄坐果和种子发育影响不大（表 3，图 6）。但是在自交授粉果实中，RNAi 转化株系 *SLARF12*-5 与 *SLARF12*-1 果实质量显著高于野生型与空载 pCAMBIA1301 转化的对照植株的果实。进一步研究发现，果实纵径增加不显著，但横径显著高于野生型与空载转基因植株（表 3）。在去雄未授粉的番茄植株中，野生型与空载转基因植株，*SLARF12*-5 与 *SLARF12*-1 RNAi 转基因株系均无果实形成。

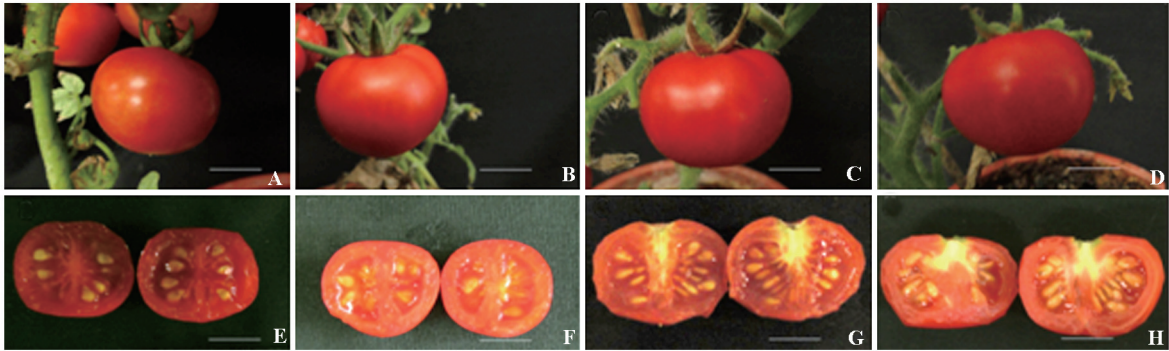


图 6 各组番茄植株的果实性状观察  
A、E: 野生型; B、F: 空载转化株系; C、G: 转基因株系 *SLARF12-5*; D、H: 转基因株系 *SLARF12-1*。  
Fig. 6 Observation of fruit phenotypic characteristics  
A, E: Wild type fruits; B, F: Empty vector line; C, G: RNAi *SLARF12-5* line; D, H: RNAi *SLARF12-1* line.

表 3 番茄野生型和 *SLARF12* RNAi 转基因植株果实发育与种子数比较  
Table 3 Fruit characteristic and seeds number of wild-type and *SLARF12* RNAi transgenic plants

株系 Line	质量/g Weight	纵径/ cm Polar diameter	横径/ cm Equatorial diameter	单果种子数 Seeds per fruit	坐果率/% Fruit set rate
WT	3.45 ± 0.63 b	1.95 ± 0.07 a	1.96 ± 0.12 b	20.33 ± 3.51 a	73.30 a
1301-empty	3.39 ± 0.27 b	1.85 ± 0.07 a	1.92 ± 0.06 b	19.00 ± 1.70 a	69.10 a
<i>SLARF12-5</i>	4.24 ± 0.17 a	2.03 ± 0.15 a	2.43 ± 0.06 a	22.33 ± 8.74 a	64.00 a
<i>SLARF12-1</i>	4.11 ± 0.18 a	1.92 ± 0.19 a	2.30 ± 0.10 a	24.00 ± 6.93 a	71.00 a

注: 所有统计数据通过 SPSS 15.0 软件进行显著性差异分析 ( $P < 0.05$ )。  
Note: All statistical analyses were performed with SPSS 15.0 ( $P < 0.05$ ) .

2.4 *SLARF12* 转化植株果实发育细胞学统计

通过对 *SLARF12* RNAi 株系 *SLARF12-5* 从未受精的子房到授粉后直径 10 mm 的果实显微观察发现, 在开花时野生型和 *SLARF12* RNAi 植株的果皮没有明显的差别 (图 7, A、F)。从果实直径 3 ~ 4 mm 开始, 野生型和 *SLARF12* RNAi 植株果实的外果皮与中果皮细胞大小开始显示出差异, 表现为转基因的株系果实细胞大于野生型果皮细胞。这种差异在果实直径达到 5 ~ 6 mm 以上时更加明显 (图 7, C ~ E, H ~ J)。

对不同时期果实果皮细胞平均面积大小进行统计分析, 同为 5 ~ 6 mm 果实, 转化株系 *SLARF12-5* 外果皮细胞平均面积比野生型增加 76.0%, 中果皮细胞平均面积增加 137% (图 8, A), 说明转化植株的果皮平均细胞显著大于野生型。

对不同发育时期果实果皮 (外、中、内果皮) 的统计发现, 转化植株 3 ~ 4 mm 和 5 ~ 6 mm 果实的细胞层数与野生型果实无显著差异 (图 8, B)。说明转基因番茄成熟的果实显著大于野生型番茄果实并不是由于分化细胞层数增加引起的, 而应主要归因于果皮细胞面积的增加。

2.5 *SLARF12* 转化植株果实发育相关基因的表达

利用转基因与野生型植株分析与果实细胞膨大和细胞分化相关基因的表达变化。qRT-PCR 分析显示, 野生型番茄细胞周期基因 *SICycB1.1* 和 *SICDKB2.1* 表达水平在果实发育的花期和果实直径 7 ~ 8 mm 时期显著下调 (图 9)。野生型番茄果实中影响细胞膨大的果胶裂解酶基因 (*SIPEC*) 和木葡聚



糖内转糖苷酶/水解酶基因 (*SIXTH1*, Vriezen et al., 2008) 在开花后的早期幼果 (直径 7 ~ 8 mm) 表达量增加, 而膨大素基因 *SIEXPA5* (Chen & Chen, 2003) 表达量减少。

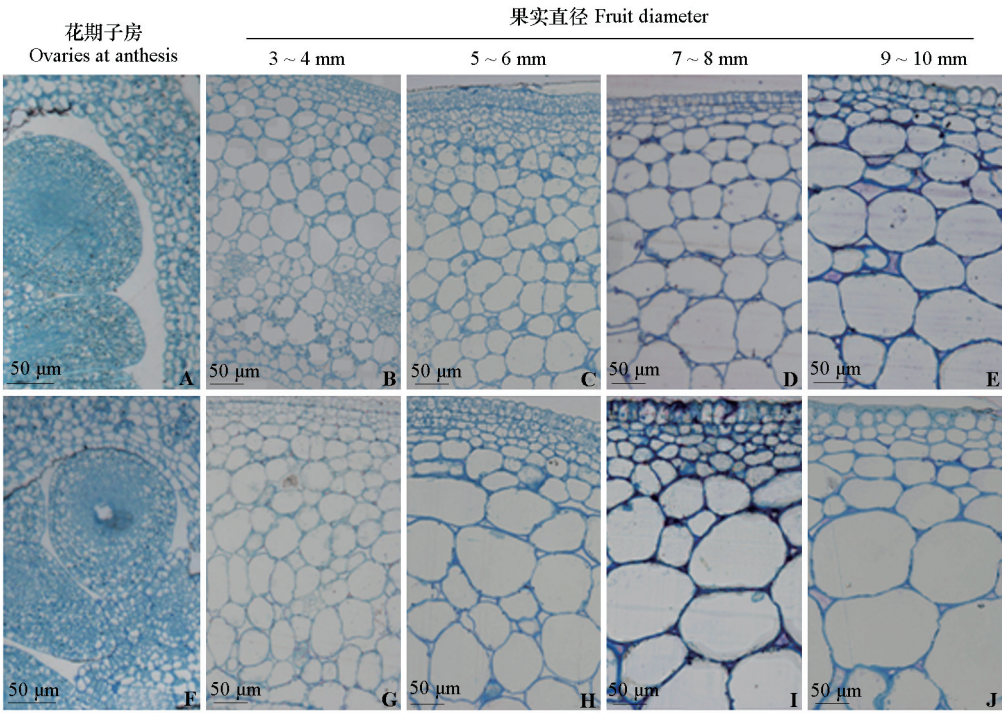


图 7 番茄 ‘Micro-Tom’ 野生型 (A ~ E) 与 *SLRF12* 的 RNAi 转化株系 (F ~ J) 不同发育时期果实果皮的显微观察  
Fig. 7 Microscopic analysis of the pericarp during early fruit development to wild-type (A - E)  
and transgenic line of RNAi *SLRF12-5* (F - J) fruits

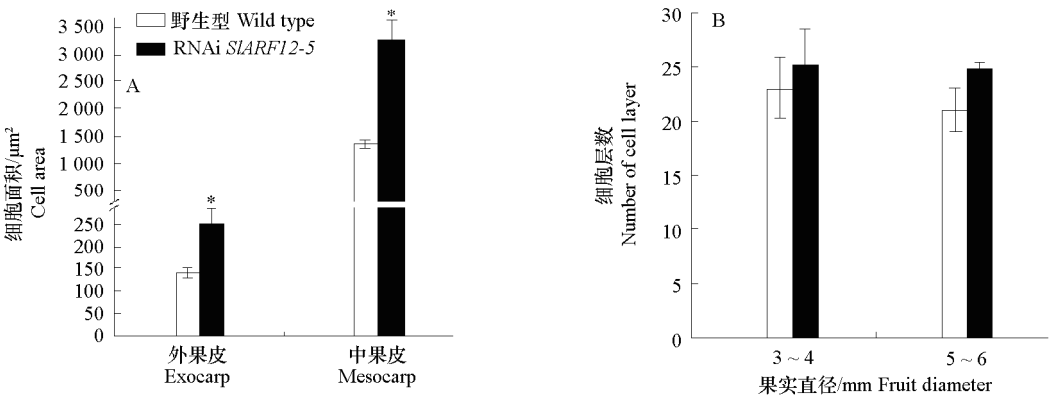


图 8 野生型番茄和 *SLRF12-5* RNAi 植株果实果皮细胞面积与细胞层数的比较  
用来测量果皮细胞面积 (μm<sup>2</sup>) 的果实直径为 5 ~ 6 mm。  
所有统计数据通过 SPSS 15.0 软件对野生型和 *SLRF12-5* RNAi 植株进行显著性差异分析 ( $P < 0.05$ )。  
Fig. 8 The differences of cell area and number of cell layers in the pericarp of wild-type and *SLRF12-5* RNAi tomato fruits  
Fruits of 5 - 6 mm diameter were used for the measurement of cell area.  
The differences between wild-type and transgenic fruits were statistically significant ( $P < 0.05$ ) .

与野生型相比, 转化植株中在花刚开放时 *SIPEC* 表达量与野生型无显著差异, 而 *SIXTH1* 和 *SIEXPA5* 显著下降(分别下降 82%与 80%);在直径 7~8 mm 果实中 *SIPEC* 表达量比野生型增加 2.07 倍, *SIXTH1* 和 *SIEXPA5* 与野生型无明显差异(图 9)。*SIPEC* 表达量的提高, 表明 *SLARF12* 被抑制后增强了开花后果实发育阶段部分细胞膨大基因的表达。

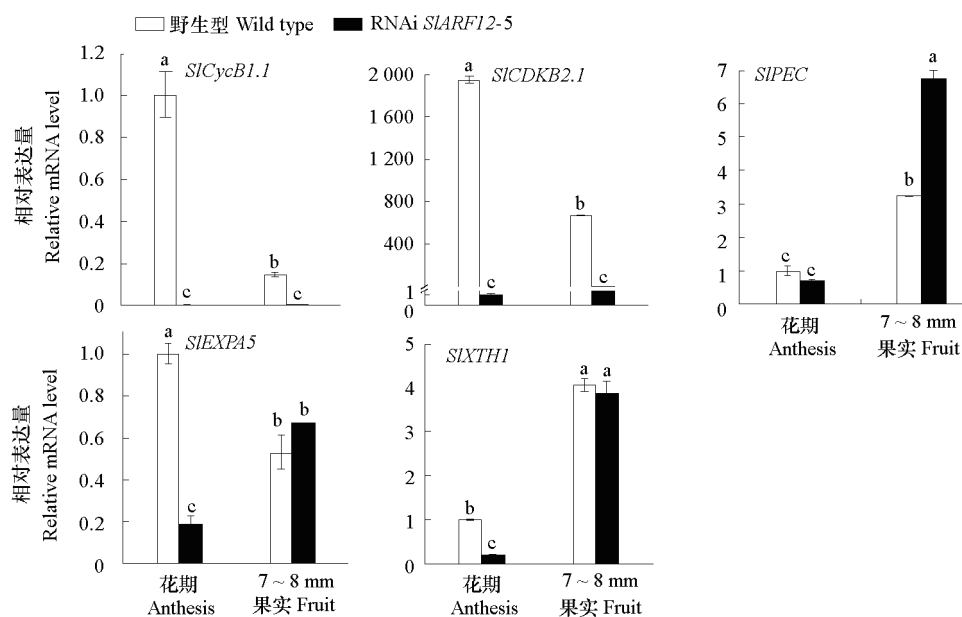


图 9 野生型和转基因番茄植株不同发育时期果实细胞分化和膨大相关基因的表达分析

Fig. 9 Expression of cell division- and cell expansion-related genes in developing fruits of wild-type and transgenic tomato plants  
Tukey's test,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

植物果实发育分为 4 个时期: 坐果期、细胞分裂期、细胞膨大期、果实成熟期 (Crane, 1964; Srivastava & Handa, 2005)。在番茄中, 细胞分化期持续 10~14 d, 而细胞膨大期可持续 6~7 周 (Mapelli et al., 1978; Büniger-Kibler & Bangerth, 1983; Gillaspay et al., 1993)。这一阶段细胞个体增大, 不再分裂, 导致果实膨大。细胞膨大完成后, 进入到果实成熟阶段 (Gillaspay et al., 1993)。果实发育过程受到生长素、赤霉素、细胞分裂素等激素的调控。生长素转录因子 ARF 在植物生长素信号传导过程起着关键的调控作用。现有研究表明植物各 ARF 家族成员在果实发育过程有着不同的功能 (Jones et al., 2002; Goetz et al., 2006, 2007; de Jone et al., 2011; Sagar et al., 2013)。

前期研究表明, 番茄花期去雄后 *SLARF6*、*SLARF7* 与 *SLARF8* 表达量升高 (Wu et al., 2011), 而 *SLARF7* 与 *SLARF8* 在授粉后表达水平下降 (Czerednik et al., 2012; Hao et al., 2015), 并且抑制 *SLARF7* 或 *SLARF8* 表达在去雄后均能诱导单性结实的发生 (Czerednik et al., 2012; Hao et al., 2015)。而本研究表明, *SLARF12* 表达模式完全不同于先前已经鉴定的与果实发育相关的 *ARF6*、*ARF7*、*ARF8* 等 ARF 家族基因。在番茄授粉受精之前, *SLARF12* 表达持续下降, 尤其是在开花前表达量急剧下降, 但在花期 (anthesis) 去雄之后, 表达逐渐升高; 若去雄后在开花期授粉, 表达量急剧增加, 说明其可被授粉强烈诱导。进一步利用 RNAi 技术抑制 *SLARF12* 表达获得的株系去雄后并不能诱导单性结

实的果实。以上结果都证实了,在果实发育中 *SLARF12* 与 *SLARF6*、*SLARF7*、*SLARF8* 等大多数 ARF 基因行使不同的生物学功能。

在先前的分子进化图中 *SLARF12* 与 *SLARF9* 同源性最高,氨基酸序列相似性为 64% (Wu et al., 2011)。表达特性分析发现尽管授粉可以诱导野生型番茄子房中 *SLARF12* 的表达,但在坐果后直径为 7~8 mm 的膨大果实中 *SLARF12* 表达量显著下降。尽管 *SLARF9* 也受到授粉的强烈诱导,但其在开花期后表达量急剧上升 (Serrani et al., 2008; Vriezen et al., 2008),且在坐果后持续增加 (de Jong et al., 2011, 2015),预示着 *SLARF12* 与 *SLARF9* 可能对番茄坐果后的果实发育有不同影响。

番茄 *SLARF12* 基因抑制表达植株营养生长以及花器官发育与野生型相比都没有影响,而果实显著增大。对转化株系 *SLARF12-5* 果实的显微观察发现,在开花期之后, *SLARF12-5* 番茄果实果皮细胞尤其是中果皮细胞面积显著大于野生型,单果质量也显著增加,但是细胞层数未见显著变化,最终导致 *SLARF12* RNAi 转化植株的成熟果实显著大于野生型果实,表明 *SLARF12* 在调控果实果皮细胞膨大过程发挥重要作用。de Jone 等 (2015) 研究表明, *SLARF9* 的 RNAi 番茄植株的果实也大于非转基因果实,但是转基因果实果皮细胞相比野生型细胞更小,其果实增大主要归因于果实中果皮细胞层数的显著增加,由此推断 *SLARF9* 可直接调控果皮细胞的分裂过程。所以 *SLARF12* 与 *SLARF9* 在调控番茄果实发育上有着不同的功能。

番茄成熟果实的大小由开花前后果皮细胞分裂和果实发育后期细胞膨大共同决定,该过程涉及一系列细胞分化、细胞膨大等相关基因的表达以及调控 (Apri et al., 2014; Okello et al., 2015; Musseau et al., 2017)。例如:授粉后与细胞膨大过程有关的 *SIPEC*、*SIXTH1*、*SIEXP5* 会被诱导 (Vriezen et al., 2008),细胞周期基因 *CDK41* 被下调时会减少细胞层数,导致果实变小 (Czerednik et al., 2012)。对 *SLARF12* RNAi 转化植株果实发育时期细胞分化相关的基因表达分析发现, *SlCycB1.1* 和 *SlCDKB2.1* 基因的表达量相比野生型降低,表明部分细胞分化基因下降,然而对应的果皮细胞层层数没有显著变化,其原因尚有待探索。进一步研究发现,在 *SLARF12* RNAi 转化植株中细胞膨大相关基因 *SIEXP5* 与 *SIXTH1* 在花期下降,在坐果后 7~8 mm 果实中与对照相比,没有显著差异。另一个重要的细胞膨大相关基因 *SIPEC* 在坐果后 7~8 mm 果实与表达量显著上升,表明抑制 *SLARF12* 可显著提高部分细胞膨大基因在开花期之后的表达水平,增强了早期果实发育细胞膨大能力。所以抑制 *SLARF12* 表达可引起细胞膨大相关基因表达增强,使得转化植株最终成熟的果实大于野生型植株,其具体调控机制尚待进一步探索。

## References

- Abad M, Monteiro A A. 1989. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: a review. *Scientia Horticulturae*, 38 (3): 167 – 192.
- Adams S R, Cockshull K E, Cave C R J. 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany*, 88 (5): 869 – 877.
- Apri M, Kromdijk J, de Visser P H, de Gee M, Molenaar J. 2014. Modelling cell division and endoreduplication in tomato fruit pericarp. *Journal of Theoretical Biology*, 349: 32 – 43.
- Breitel D A, Chappell-Maor L, Meir S, Panizel I, Puig C P, Hao Y, Yifhar T, Yasuor H, Zouine M, Bouzayen M, Granell Richart A, Rogachev I, Aharoni A. 2016. Auxin response factor 2 intersects hormonal signals in the regulation of tomato fruit ripening. *PLoS Genetics*, 12 (3): e1005903.
- Bünger-Kibler S, Bangerth F. 1983. Relationship between cell number, cell-size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), and those induced parthenocarpically by the application of plant-growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 1 (3): 143 – 154.

- Chen A G, Chen J H. 2003. Advances in the study of expansin. Chinese Bulletin of Botany, 20 (6): 752 – 758.
- Cheng Y, Qin G, Dai X, Zhao Y. 2007. NPY1, a BTB-NPH3-like protein, plays a critical role in auxin-regulated organogenesis in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (47): 18825 – 18829.
- Crane J. 1964. Growth substances in fruit setting and development. Annual Review of Plant Physiology, 15: 303 – 326.
- Czerednik A, Busscher M, Bielen B A, Wolters-Arts M, de Maagd R A, Angenent G C. 2012. Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between *CDKB* and *CDKAI* cell cycle genes. Journal of Experimental Botany, 63 (7): 2605 – 2617.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen W H. 2009. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SLARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. The Plant Journal, 57 (1): 160 – 170.
- de Jong M, Wolters-Arts M, García-Martínez J L, Mariani C, Vriezen W H. 2011. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SLARF7*) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. Journal of Experimental Botany, 62 (2): 617 – 626.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Schimmel B C, Stultiens C L, de Groot P F, Powers S J, Tikunov Y M, Bovy A G, Mariani C, Vriezen W H, Rieu I. 2015. *Solanum lycopersicum* auxin response factor 9 regulates cell division activity during early tomato fruit development. Journal of Experimental Botany, 66 (11): 3405 – 3416.
- Feng Yuan-yuan, Hou Pei, Li Ying-nan, Liu Yong-sheng. 2012. Bioinformatic analysis and subcellular localization of *Solanum lycopersicum* ARF2. Progress in Biochemistry and Biophysics, 39 (1): 51 – 58. (in Chinese)
- 冯媛媛, 侯 佩, 李颖楠, 刘永胜. 2012. 番茄 ARF2 蛋白的生物信息学分析与亚细胞定位. 生物化学与生物物理进展, 39 (1): 51 – 58.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: a developmental perspective. Plant Cell, 5 (10): 1439 – 1451.
- Goetz M, Hooper L C, Johnson S D, Rodrigues J C, Vivian-Smith A, Koltunow A M. 2007. Expression of aberrant forms of auxin response factor 8 stimulates parthenocarp in *Arabidopsis* and tomato. Plant Physiology, 145 (2): 351 – 366.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson S D, Koltunow A M. 2006. Auxin response factor 8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18 (8): 1873 – 1886.
- Gray W M, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. 2001. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of Aux/IAA proteins. Nature, 414 (6861): 271 – 276.
- Guilfoyle T J, Hagen G. 2001. Auxin response factors. Journal of Plant Growth Regulation, 10: 281 – 291.
- Hagen G, Guilfoyle T. 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology, 49 (3 – 4): 373 – 385.
- Hao Y W, Hu G J, Breitel D, Liu M C, Mila I, Frasse P, Fu Y Y, Aharoni A, Bouzayen M, Zouine M. 2015. Auxin response factor *SLARF2* is an essential component of the regulatory mechanism controlling fruit ripening in tomato. PLoS Genetics, 11 (12): e1005649.
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. 2005. Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an auxin response factor in auxin signaling. Plant Cell, 17 (5): 1387 – 1396.
- Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal, 6 (13): 3901 – 3907.
- Jones B, Frasse P, Olmos E, Zegzouti H, Li Z G, Latché A, Pech J C, Bouzayen M. 2002. Down-regulation of *DR12*, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. Plant Journal, 32 (4): 603 – 613.
- Li S B, Xie Z Z, Hu C G, Zhang J Z. 2016. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. Frontiers in Plant Science, 7 (742): 47.
- Liu Z, Miao L, Huo R, Song X, Johnson C, Kong L, Sundaresan V, Yu X. 2017. *ARF2* – *ARF4* and *ARF5* are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology, 59 (1): 179 – 189.
- Mapelli S, Fropa C, Tort G, Soressi G. 1978. Relationship between set development and activities of growth regulators in tomato fruit. Plant and Cell Physiology, 19 (7): 1281 – 1288.
- Molesini B, Pandolfini T, Rotino G L, Dani V, Spena A. 2009. *Aucsia* gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. Plant Physiology, 149 (1): 534 – 548.

- Musseau C, Just D, Jorly J, Gévaudant F, Moing A, Chevalier C, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Fernandez L. 2017. Identification of two new mechanisms that regulate fruit growth by cell expansion in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 8: 988.
- Okello R C, Heuvelink E, de Visser P H, Lammers M, de Maagd R A, Marcelis L F, Struik P C. 2015. Fruit illumination stimulates cell division but has no detectable effect on fruit size in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Physiology*, 154 (1): 114 – 127.
- Pandolfini T, Rotino G L, Camerini S, Defez R, Spena A. 2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*, 2 (1): 1.
- Ploeg D V, Heuvelink E. 2005. Influence of sub-optimal temperature on tomato growth and yield: a review. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80 (6): 652 – 659.
- Ren Z, Liu R, Gu W, Dong X. 2017. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor SLARF2 participates in regulating lateral root formation and flower organ senescence. *Plant Science*, 256: 103 – 111.
- Sagar M, Chervin C, Mila I, Hao Y W, Roustan J P, Benichou M, Gibon Y, Biais B, Maury P, Latché A, Pech J C, Bouzayen M, Zouine M. 2013. *SLARF4*, an auxin response factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiology*, 161 (3): 1362 – 1374.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101 – 1108.
- Serrani J C, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez J L. 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*, 56 (6): 922 – 934.
- Shi Meng-ya, Zhang Wei, Yu Jia, Wang Wen-ping, Liu Yue-ping. 2014. Cloning and expression analysis of ARF and Aux/IAA gene family members in peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (3): 536 – 544. (in Chinese)
- 史梦雅, 张巍, 余佳, 王文平, 刘悦萍. 2014. 桃生长素反应因子和生长素/吲哚乙酸蛋白家族基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 41 (3): 536 – 544.
- Srivastava A, Handa A K. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 67 – 82.
- Sun H J, Uchii S, Watanabe S, Ezura H. 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, 47 (3): 426 – 431.
- Sun Y, Wang C, Wang N, Jiang X, Mao H, Zhu C, Wen F, Wang X, Lu Z, Yue G, Xu Z, Ye J. 2017. Manipulation of auxin response factor 19 affects seed size in the woody perennial *Jatropha curcas*. *Scientific Reports*, 7: 40844.
- Tong Shao-ming, Xi Hai-xiu, Ai Ke-jun, Hou He-sheng. 2016. Expression of *VvACO1* gene in grape and genetic transformation in *Arabidopsis* and tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (12): 2315 – 2324. (in Chinese)
- 佟少明, 席海秀, 艾可筠, 侯和胜. 2016. 葡萄 *VvACO1* 的表达及在拟南芥和番茄中的遗传转化. *园艺学报*, 2016, 43 (12): 2315 – 2324.
- Vriezen W H, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, 177 (1): 60 – 76.
- Wang Yicheng, Xu Haifeng, Wang Nan, Jiang Shenghui, Liu Jingxuan, Wang Deyun, Zuo Weifang, Chen Xuesen. 2017. Molecular cloning and expression analysis of an auxin signaling related gene *MdARF3* in red flesh apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (4): 633 – 643. (in Chinese)
- 王意程, 许海峰, 王楠, 姜生辉, 刘静轩, 王得云, 左卫芳, 陈学森. 2017. 红肉苹果愈伤组织生长素信号相关基因 *MdARF3* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 44 (4): 633 – 643.
- Wu J, Wang F, Cheng L, Kong F, Peng Z, Liu S, Yu X, Lu G. 2011. Identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) genes in *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Reports*, 30 (11): 2059 – 2073.
- Zhang X L, Yan F, Tang Y W, Yuan Y J, Deng W, Li Z G. 2015. Auxin response gene *SLARF3* plays multiple roles in tomato development and is involved in the formation of epidermal cells and trichomes. *Plant and Cell Physiology*, 56 (11): 2110 – 2124.