

基于绿色荧光蛋白培育线粒体形态可视的番茄

汤慧, 路瑶, 李金焱, 成柯, 朱鸿亮*

中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

汤慧, 路瑶, 李金焱, 成柯, 朱鸿亮. 基于绿色荧光蛋白培育线粒体形态可视的番茄[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1029-1039.

TANG Hui, LU Yao, LI Jinyan, CHENG Ke, ZHU Hongliang. Visualization of mitochondrial dynamics in tomato based on green fluorescent protein[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1029-1039.

摘要: 本研究旨在实现番茄线粒体形态特征和动态变化的可视化, 以便于研究番茄线粒体功能。通过农杆菌(*Agrobacterium*)介导的遗传转化技术, 获得具有线粒体定位功能的绿色荧光蛋白(mitochondria-green fluorescent protein, Mt-GFP)的转基因番茄, 测定转基因 Mt-GFP 番茄果实在绿熟期、破色期和破色后 3 d、6 d、9 d 时的色差、硬度、可溶性固形物、酸度、呼吸速率和乙烯释放量, 并以野生型番茄果实为对照。结果显示, Mt-GFP 蛋白不影响番茄果实正常成熟, 但使番茄果实酸度升高。用蛋白免疫印迹成功验证了番茄叶片和果实中 Mt-GFP 蛋白的表达, 并在激光共聚焦显微镜下清晰地观察到花、叶片和果实细胞中线粒体的形态特征以及花细胞中线粒体的动态变化。转基因 Mt-GFP 番茄植株的培育实现了番茄线粒体可视化, 为研究番茄发育及果实成熟过程中的线粒体功能提供了良好的研究材料。

关键词: 绿色荧光蛋白; 番茄果实; 线粒体定位蛋白; 线粒体可视化; 线粒体功能

Visualization of mitochondrial dynamics in tomato based on green fluorescent protein

TANG Hui, LU Yao, LI Jinyan, CHENG Ke, ZHU Hongliang*

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: This study aimed to visualize the morphological features and dynamic changes of tomato mitochondria to provide a basis for the study of its mitochondrial functions. In this study, transgenic tomatoes expressing mitochondria-localized green fluorescent protein (mitochondria-GFP, Mt-GFP) were obtained by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2100101); 国家自然科学基金(32061143022, 32172639)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2100101) and the National Natural Science Foundation of China (32061143022, 32172639).

*Corresponding author. E-mail: hlzhu@cau.edu.cn

Received: 2023-07-04; Accepted: 2023-09-15

The color, hardness, soluble solids, acidity content, respiration rate, and ethylene production of the transgenic Mt-GFP tomato fruits were determined at the stage of mature green, breaker, and 3, 6, 9 days after breaker, while the wild-type tomato fruits were used as a control. As expected, Mt-GFP recombinant protein did not affect the ripening process, but induced the increased acidity of tomato fruits. The accumulations of Mt-GFP protein in tomato leaves and fruits were successfully verified by Western blotting. The morphological characteristics of mitochondria in flower, leaf and fruit cells as well as the dynamic changes of mitochondria in flower cells were clearly observed and studied under confocal laser microscope. The development of transgenic Mt-GFP tomato plants helps the visualization of tomato mitochondria and provides good research materials for the study of mitochondrial function during tomato development and fruit ripening.

Keywords: green fluorescent protein; tomato fruit; mitochondria localization protein; mitochondrial visualization; mitochondrial function

番茄(*Solanum lycopersicum*)作为一种模型作物, 因具有独特的风味和丰富的营养而深受人们的喜爱, 是全球最具经济价值的蔬菜作物之一^[1]。我国是番茄生产大国, 可食番茄品种多且产能高^[2], 除满足国内市场需要外, 还出口海外, 目前已成为国际番茄贸易的重要力量之一。在这种全球农产品大流通的格局下, 高硬、耐贮的品种是决定番茄贸易市场的关键。成熟是果实发育过程中初级和次级代谢物发生多种理化变化的主要阶段, 是直接影响果实品质形成和贮藏能力的关键时期^[3]。因此, 了解番茄果实成熟调控机制有利于提高果实品质、减少损失, 对推进我国番茄生产布局不断优化起到重要作用。

线粒体(mitochondria)作为细胞中的能量工厂, 参与碳水化合物和氨基酸的氧化代谢, 并通过三羧酸循环和氧化磷酸化过程释放能量, 对植物生长发育和成熟衰老过程十分重要^[4]。在有机体内, 线粒体是具有连续分裂和融合能力的高动态细胞器, 其形态、数量和位置变化具有时空特异性, 响应生物体的各个生长发育阶段^[5-6]。同样, 在番茄中, 线粒体形态与其自身功能密切相关, 并影响番茄果实的成熟过程。例如, 敲除定位于番茄线粒体中的 RNA 编辑因子 SIORRM4 后, 广泛影响了细胞器内的 RNA 编辑水平, 从

而影响线粒体的形态, 造成了细胞内线粒体空泡化和嵴破裂^[7], 在植株形态上表现为叶片黄化, 最终导致果实成熟延迟^[8]。因此, 关注番茄线粒体的形态和动态变化是非常必要的。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞色素 c 氧化酶IV定位于线粒体内膜。Köhler 等^[9]发现将 COX IV 融合增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)会特异性定位于线粒体, 而不会扩散到核内。自此, COX IV 定位序列融合不同荧光蛋白被认为是线粒体定位标记(marker)而被广泛使用^[10-11]。本研究将 COX IV 前端序列融合 GFP 构成的线粒体定位蛋白转入番茄植株中, 通过共聚焦显微镜观察番茄植株线粒体在不同时期和不同部位的形态特征和动态变化, 同时测定转基因番茄外观着色、果实品质、呼吸强度和乙烯释放速率, 为番茄线粒体的功能研究培育良好的材料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种

线粒体定位质粒为 pBIN20 (mt-gk CD3-987)^[10], 感受态农杆菌(*Agrobacterium*) GV3101 购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和激素

乙酰丁香酮、2-(N-吗啡啉)乙磺酸[2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES]、卡那霉素(kanamycin, Kan)、庆大霉素(gentamicin, Gen)、利福平(rifampicin, Rif)、蔗糖、琼脂、特美汀(timentin, Ti)、玉米素(zeatin, ZT)、赤霉素(gibberellin, GA)、吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、吲哚丁酸(indolebutyric acid, IBA)和苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminoadenine, 6-BA)购于北京索莱宝科技有限公司; MS (murashige and skoog) 盐购于北京西美杰科技有限公司。EasyPure Plasmid mini Prep Kit 质粒提取试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; GFP 一抗和鼠源二抗购于艾比玛特生物医药(上海)有限公司; SDS-PAGE 制胶液购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 增强型化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL)购于爱必信(上海)生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器和设备

T100 Thermal Cycler PCR 仪和 Power Pac Universal 蛋白电泳仪购于 BIO-RAD; 硬度计购于衢州艾普计量仪器有限公司; PAL-1 便携式数显折射计购于 ATAGO 公司; GC-2014 气相色谱仪购于岛津企业管理(中国)有限公司; 超分辨 A1RsiDH25 激光共聚焦显微镜使用于清华大学大学生物医学测试中心。

1.2 方法

1.2.1 质粒转化和筛选鉴定

pBIN20 (mt-gk CD3-987)载体的 T-DNA 结

构如图 1 所示。其中, COX IV 序列来源于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)线粒体细胞色素 c 氧化酶IV编码序列的前 22 个氨基酸, 序列为: MLSLRQSI RFFK PATRTL CSSR。线粒体定位功能的 COX IV 序列和 GFP 序列共同作为目的片段, 命名为 Mt-GFP。质粒转化农杆菌(*Agrobacterium*) GV3101 感受态细胞, 把菌液涂布在含有 3 种抗性(Kan 为 100 mg/L, Gen 为 100 mg/L, Rif 为 50 mg/L)的平板上, 28 °C 倒置培养 48 h, 用于后续农杆菌介导的番茄子叶遗传转化试验。

1.2.2 Mt-GFP 的瞬时表达

将农杆菌接种至含有 3 种抗性(Kan 为 100 mg/L, Gen 为 100 mg/L, Rif 为 50 mg/L)的 2 mL 液体 LB 培养液中, 在 28 °C 摇床中培养 24 h, 然后吸取 200 μ L 菌液接种至含有 3 种抗性(Kan 为 100 mg/L, Gen 为 100 mg/L, Rif 为 50 mg/L)的 10 mL 液体 LB 培养液中, 在 28 °C 摇床中培养 12 h。次日 5 000 r/min 离心 6 min 收集菌体, 并弃上清。最后用含有 200 μ mol/L 乙酰丁香酮、10 mmol/L MES 和 10 mmol/L MgCl₂ 的无菌水重新悬浮菌液, 使最终 OD₆₀₀=1.0。将配好的菌液在 28 °C 培养箱中避光静置 3 h, 用于侵染。

选择生长周期为 2-3 周、长势良好并且平整的烟草叶片进行侵染。用 1.0 mL 注射器将菌液从叶片下表皮打入烟草叶片内。注射后, 烟草避光培养 12 h, 光下培养 24-48 h, 即可用于共聚焦观察。



图 1 载体的 T-DNA 结构示意图 RB 和 LB: 左右边界; NOS-p: NOS 启动子; NOS-t: NOS 终止子; 35S: CaMV 35S 启动子

Figure 1 T-DNA region of vector. RB and LB: Left and right borders; NOS-p: Promoter of NOS; NOS-t: Terminator of NOS; 35S: Promoter of CaMV 35S.

1.2.3 农杆菌介导的遗传转化

植物材料：番茄(*Alisa Craig*)。

培养条件：播种期使用 MS 盐培养基(g/L) (MS 盐 2.25, 蔗糖 15.0, 琼脂 7.0), 其余阶段使用双倍 MS 盐培养基(g/L) (MS 盐 4.50, 蔗糖 30.0, 琼脂 7.0)。用 1 mol/L NaOH 调培养基 pH=5.80–5.85, 121 °C 高温灭菌 20 min。根据外植体的不同生长阶段添加相应激素和抗生素(表 1)。

播种期(T0)：在超净工作台中，用 4%次氯酸对番茄种子表面进行消毒杀菌 10 min，然后用无菌水洗涤 8–10 次，每次把水沥干，最后播种于发芽培养基中避光培养 3–4 d 直至种子萌发，然后置于光下继续培养 4–5 d。

预培养期(T1)：待培养瓶中的番茄子叶完全展开且真叶还未生长出来时，在超净工作台中将子叶剪成大小 5 mm×5 mm 的正方形，此过程注意不要在幼嫩的叶片上留下多余的伤口。将剪下的叶片背面朝上置于预培养期的培养基上，暗处培养 48 h。用 $OD_{600}=0.15-0.20$ 的农杆菌菌液浸泡叶片 1 min，然后弃去菌液，将外植体叶片背面朝上继续避光培养 48 h。

芽诱导期(T21)：在超净工作台中，将外植体叶片正面朝上、均匀摆放于芽诱导期的培养基中，在光下培养 7 d，后续每隔 14 d 换一次新

的平板，直至外植体长出芽。

茎伸长期(T22)：将出芽后的外植体转移至芽伸长期的培养瓶中，光下继续培养，直到外植体的茎伸长至 5–6 cm。

根生长期(T3)：用剪刀将茎与愈伤组织分离，把茎插在生根阶段的培养瓶中培养 3–4 周。

炼苗期：外植体的根部足够强壮时，把植株移植在培养土中，用保鲜袋罩住幼嫩的植株，在光下继续培养。

土培期：幼苗逐渐茁壮成长，可将保鲜袋撕开小口透气 2–3 d，然后根据幼苗生长情况移至温室大棚。

1.2.4 T₀代转基因植株鉴定

按照 Ma 等^[12]所述方法提取 T₀代植株叶片样品和果实样品的蛋白，用蛋白免疫印记鉴定阳性转基因植株。

1.2.5 番茄着色测定和农艺性状测定

采收绿熟、破色和破色后 3 d、6 d、9 d 这 5 个时期的番茄果实用于拍照，并随机选取 12 个果实用手持式色差仪测定 L*值、a*值和 b*值。

番茄果实酸度测定采用 NaOH 酸碱滴定法^[13]。

1.2.6 番茄呼吸和乙烯测定

番茄果实从大棚采收后，静置在 28 °C 以散去田间热。将果实称重后置于保鲜盒中闷气 2 h。然后用 1 mL 注射器从盒中抽气，由气相色谱测定。

表 1 组培各阶段培养基的激素和抗生素浓度

Table 1 The concentration of hormone and antibiotics in the media at various stages of tissue culture

Stage	Kan (mg/L)	Ti (mg/L)	Concentration of hormone (mg/L)	
T0	/	/	/	/
T1	/	/	6-BA	1.0
			IAA	0.1
T21	75.0	200	ZT	1.0
			IAA	0.1
T22	75.0	200	ZT	0.5
			GA	1.0
T3	37.5	150	IBA	2.0

/ means no hormone and antibiotic were added.

1.2.7 共聚焦观察 Mt-GFP 番茄不同部位的线粒体形态

GFP 激发波长为 488 nm, 叶绿体自发荧光的激发波长为 640 nm。观察烟草叶片表皮细胞使用 20 倍镜; 观察番茄花、叶片和中果皮细胞使用 60 倍镜。

1.2.8 数据统计和分析

使用 Excel 2019 进行绘图; 使用 SPSS 26 进行数据方差分析和显著性差异分析, 用*表示差异显著($P < 0.05$), NS 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 Mt-GFP 蛋白在烟草叶片细胞中成功表达

以烟草叶片为材料, 将 Mt-GFP 蛋白在烟草细胞中瞬时表达, 于激光共聚焦显微镜下观察发光情况。结果如图 2 所示, 绿色荧光表示 GFP, 红色和粉红色荧光表示叶绿体。为了排除实验中绿色荧光可能是叶绿体的自发荧光,

以注射菌液的烟草为实验组(Mt-GFP), 以未注射菌液的烟草为对照组。结果显示, 在 Mt-GFP 组中, 线粒体被明显的绿色荧光标记, 在细胞中呈现零星点状分布, 证明线粒体定位标记蛋白在植物中表达是可行的。并且线粒体的绿色荧光不与叶绿体自发荧光重叠, 这可以排除所观察到的绿色荧光是高背景下叶绿体自发荧光的串色影响。

2.2 Mt-GFP 转基因番茄的培育和鉴定

Mt-GFP 转基因植株依赖于农杆菌介导的番茄子叶遗传转化技术。通过植物组织培养, 经历播种 T0、预培养 T1、芽诱导 T21、茎伸长 T22、生根 T3、炼苗和土培时期, 最终获得 Mt-GFP 转基因番茄, 结果如图 3 所示。获得成株后, 提取 T0 代番茄叶片和果实蛋白, 结果显示(图 4), 有 3 棵植株的叶片和果实中均检测到 Mt-GFP 蛋白的表达, 即说明转基因植株培育成功。

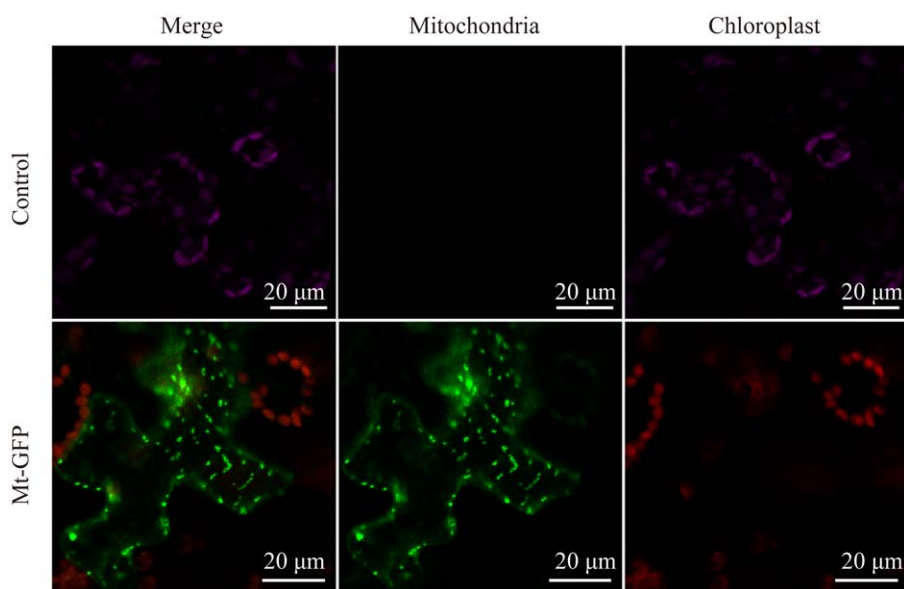


图 2 烟草 MT-GFP 蛋白的激光共聚焦成像

Figure 2 Laser confocal imaging of Mt-GFP protein in tobacco.

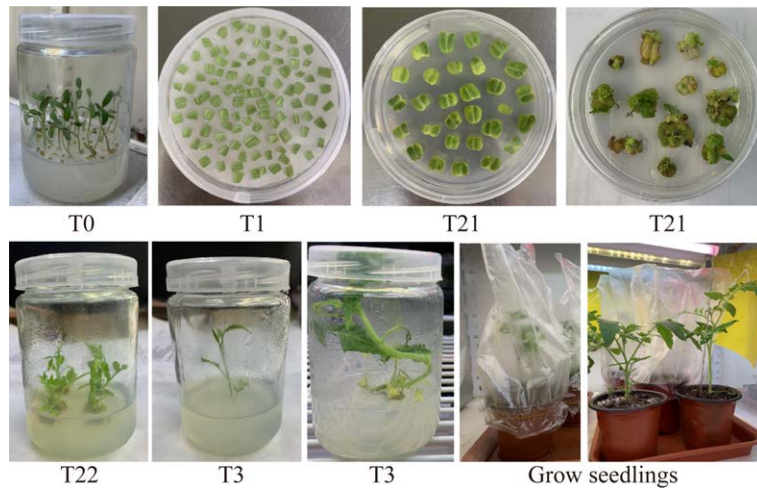


图3 Mt-GFP 番茄的培育过程 T0: 播种期; T1: 预培养期; T21: 芽诱导期; T22: 茎伸长期; T3: 根生长期

Figure 3 The cultivation process of Mt-GFP tomato. T0: Sowing; T1: Pre-culture; T21: Bud induction; T22: Stem elongation; T3: Root growth.

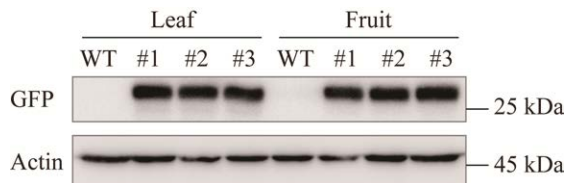


图4 Mt-GFP 蛋白的表达 WT: 野生型番茄; #1-3: 分别是 Mt-GFP 番茄的 3 棵株系

Figure 4 The expression of Mt-GFP protein. WT: Wild type tomato; #1-3: Different strains.

2.3 Mt-GFP 转基因番茄果实表型和成熟品质

2.3.1 Mt-GFP 果实的表型

收获 T0 代 Mt-GFP 番茄种子, 播种在含有卡那霉素的培养基上筛选阳性株系, 获得 T1 代 Mt-GFP 番茄。如图 5A 所示, 在绿熟(mature green, MG)、破色(breaking, Br)和破色后 3 d、6 d、9 d 这 5 个时期内, Mt-GFP 和野生型(wild type, WT) 番茄外观着色无显著性差异。CIE Lab 色差结果显示(图 5B-5D), 随着番茄成熟, 果实由绿色转红, 果实的亮度(L*值)和绿色度(b*值)降低, 红色度(a*值)在果实破色后急剧上升。Mt-GFP 果实在 MG 时期的 L*、a*和 b*值与 WT 相比存在显著性差异($P < 0.05$), 但随着果实成熟, 二者色

差的差异逐渐缩小, 直到 L*、a*和 b*值的差异不再显著。

2.3.2 Mt-GFP 果实的成熟品质

为了检测 Mt-GFP 是否影响番茄果实品质, 测定绿熟、破色和破色后 3 d、6 d、9 d 这 5 个时期的果实的硬度、可溶性固形物、可滴定酸和固酸比, 结果如图 6 所示。随着番茄果实的成熟, 果实硬度下降, 可溶性固形物含量升高, 可滴定酸含量在破色时期出现一个高峰, 随后下降。在成熟过程中, Mt-GFP 番茄果实的硬度和可溶性固形物含量和 WT 无显著性差异(图 6A 和 6B), 但 Mt-GFP 果实的可滴定酸含量显著低于 WT ($P < 0.05$) (图 6C)。对两种番茄的固酸比进行统计, 结果显示在成熟的 5 个时期内, Mt-GFP 果实的固酸比也显著低于野生型番茄($P < 0.05$) (图 6D)。

2.3.3 Mt-GFP 果实的呼吸速率和乙烯释放量

番茄是典型的呼吸跃变型果实, 在果实生长发育的中期会出现呼吸和乙烯的高峰, 这代表番茄果实成熟的启动^[14]。检测了野生型和 Mt-GFP 番茄果实在绿熟、破色和破色后 3 d、6 d、9 d 采摘后的呼吸速率和乙烯释放情况。结果如图 7A、B 所示, 随着果实成熟, 二者均在破色后 3 d

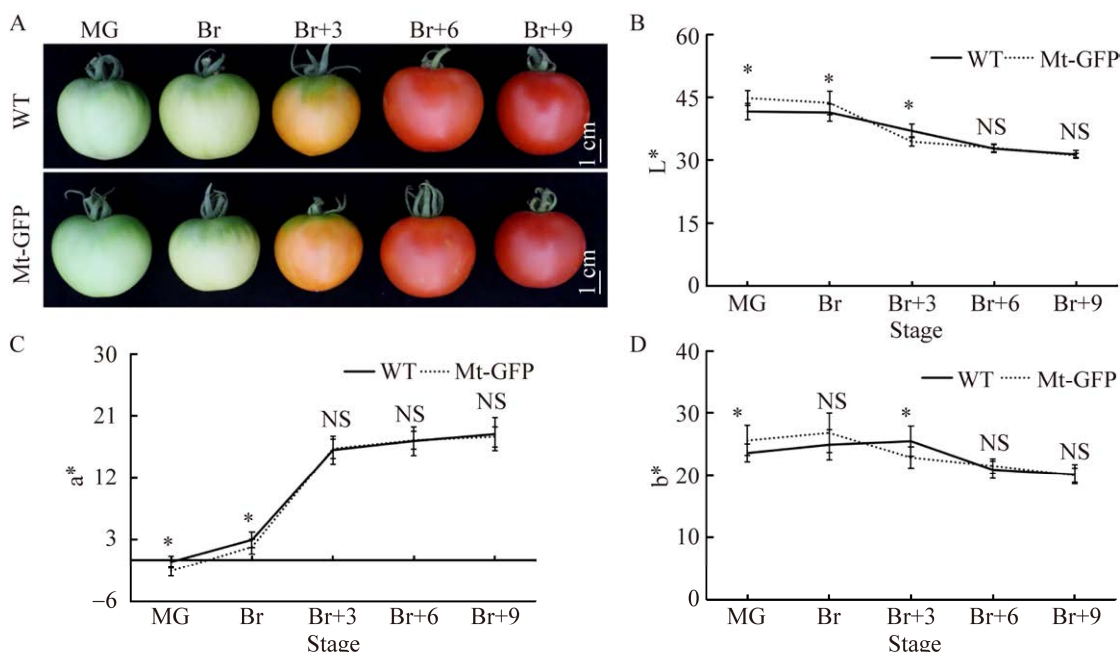


图 5 Mt-GFP 番茄果实表观性状和色差 A: 番茄果实外观; B-D: 番茄果实色差 L*值、a*值和 b*值; MG: 绿熟期; Br: 破色期; NS: 无显著差异

Figure 5 Apparent characters and color difference of Mt-GFP fruits. A: Appearance of tomato; B-D: Chromatic aberration L*, a* and b* of tomato, respectively; MG: Mature green; Br: Breaking; NS: Not significant.

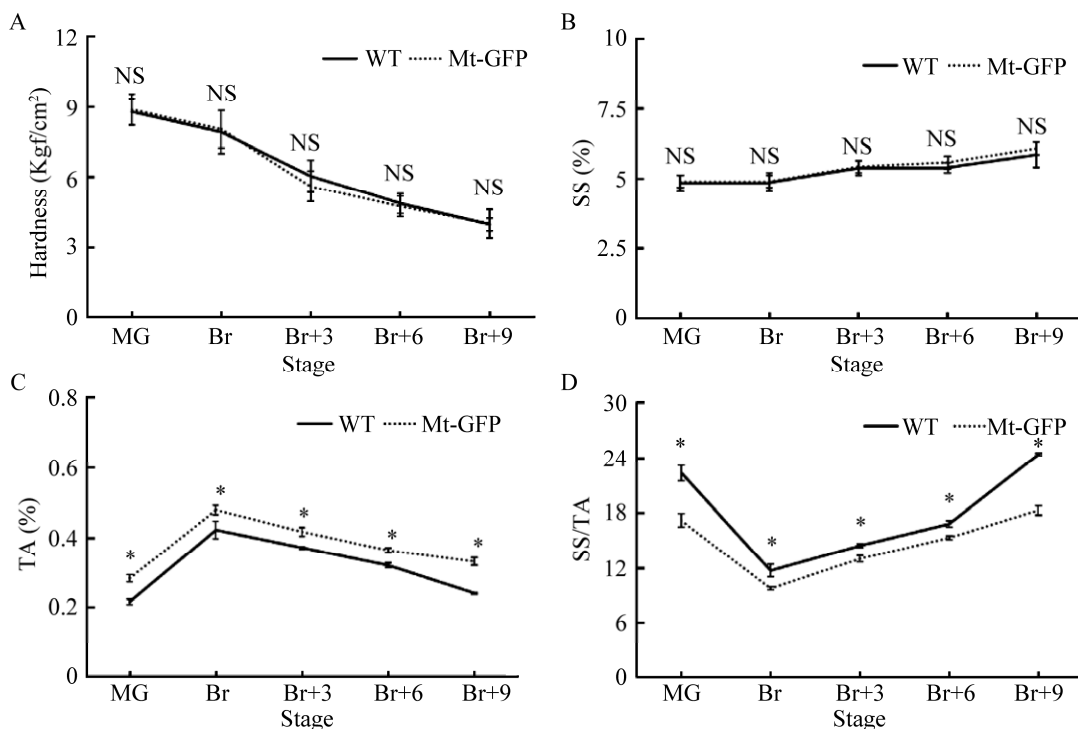


图 6 Mt-GFP 番茄果实品质 A: 硬度; B: 可溶性固形物(SS); C: 可滴定酸(TA); D: 固酸比(SS/TA); MG: 绿熟期; Br: 破色期; NS: 无显著差异

Figure 6 Physiological quality of Mt-GFP fruits. A: Hardness; B: Soluble solid (SS); C: Titratable acid (TA); D: Solid acid ratio (SS/TA); MG: Mature green; Br: Breaking; NS: Not significant.

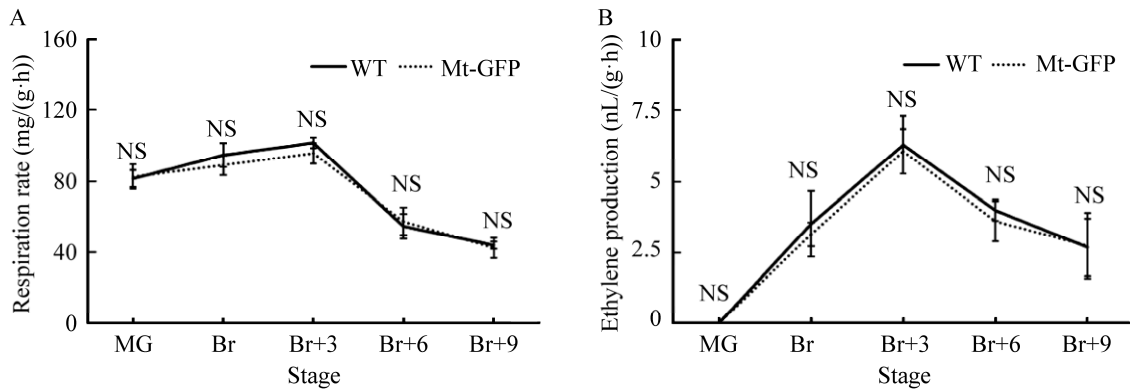


图7 Mt-GFP 番茄果实呼吸强度和乙烯释放量变化趋势 A: 呼吸速率; B: 乙烯释放量; MG: 绿熟期; Br: 破色期; NS: 无显著差异

Figure 7 Trends of respiration intensity and ethylene release of Mt-GFP fruits. A: Respiration rate; B: Ethylene release; MG: Mature green; Br: Breaking; NS: Not significant.

出现呼吸峰和乙烯峰,且果实的呼吸速率和乙烯释放量无显著性差异($P>0.05$),表明 Mt-GFP 蛋白的表达未影响番茄果实的呼吸作用和乙烯合成。

2.4 Mt-GFP 番茄不同部位线粒体形态和动态变化

在激光共聚焦显微镜下观察 Mt-GFP 植株线粒体形态,如图 8 所示,绿色为 GFP 荧光,粉红色和蓝色均为叶绿体在 640 nm 下的自发荧光。花细胞和叶细胞的线粒体呈点状分布在细胞中。在叶片细胞中,叶绿体大多存在于保卫细胞内。在绿熟期番茄果实的中果皮细胞内,可以明显地观察到细胞内中央大液泡和叶绿体的存在,随着果实成熟,在红熟期番茄中果皮细胞内,线粒体数量减少,出现了许多直径约 10 μm 的绿色块状物(如图中箭头所示),这可能是由于叶绿体转变为有色体后,有色体内的类胡萝卜素在激发波长 488 nm 下所显示的荧光^[15]。

用延时方法拍摄番茄花细胞,观察线粒体在 25 s 内的动态变化。如图 9 所示,花细胞中线粒体有点状、杆状和网络状 3 种形态。如白色箭头指示,可以清楚地观察到细胞中点状线粒体向棒状线粒体靠近,最终二者融合;还观察到线粒体网络逐渐分裂,最终形成两个独立的杆状线粒体。

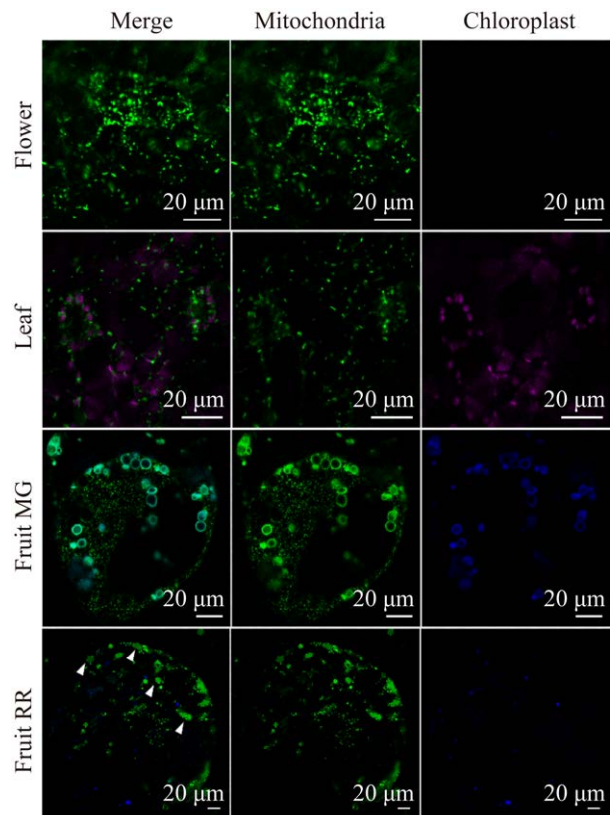


图8 Mt-GFP 番茄花、叶和果实中线粒体形态 MG: 绿熟期; RR: 红熟期

Figure 8 Mitochondrial morphology in flowers, leaves and fruits of Mt-GFP. MG: Mature green; RR: Red ripening.

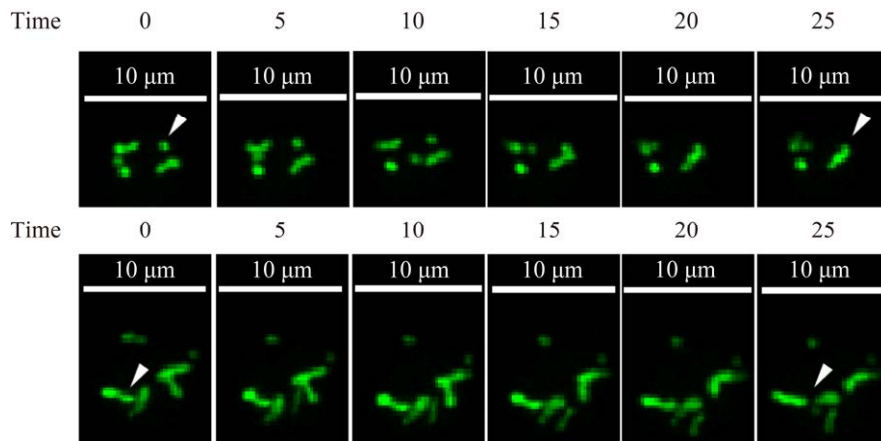


图9 Mt-GFP 番茄花细胞线粒体动态变化过程

Figure 9 Mitochondrial dynamic changes in Mt-GFP tomato flower cells.

3 讨论与结论

本研究在烟草中瞬时表达可以定位在线粒体的绿色荧光蛋白,在激光共聚焦显微镜下可以观察到烟草表皮细胞中被绿色荧光标记的线粒体,其形态清晰可辨,表明 Mt-GFP 可以在植物中指示线粒体。然后借助农杆菌介导的遗传转化技术将 Mt-GFP 转入番茄内,最终在植株的花、叶片和果实细胞中实现了番茄线粒体的可视化。

Mt-GFP 作为线粒体的标记蛋白,其表达应该不影响番茄果实的品质,否则无法应用于线粒体功能研究。文中测定了 Mt-GFP 果实在不同成熟时期的品质变化。随着番茄的成熟,果实细胞中叶绿体的类囊体膜分解,质体变成有色体,类胡萝卜素大量积累^[15],最终导致果实由绿转红,这种变化被称为番茄的“破色”。果实破色后,番茄逐渐软化,还原糖逐渐在液泡中积累^[16],导致糖度升高。Mt-GFP 转基因番茄的外观着色、硬度、可溶性固形物含量与 WT 之间没有统计学差异。但 Mt-GFP 番茄的酸度显著高于 WT,导致 Mt-GFP 的固酸较低。一般来说,酸度是衡量果实风味品质的指标之一^[17]。果实的糖、酸含量受许多因素影响,例如遗传特性、生态环境、

栽培条件等^[18]。在很多研究中显示,在番茄中超表达或抑制某些基因的表达会影响果实品质^[19-21],Mt-GFP 果实的酸度升高也可能是由此导致。虽然线粒体定位荧光蛋白的表达轻度影响了番茄果实品质,但不会影响番茄果实正常成熟。乙烯是番茄果实成熟的核心调节因子,野生型番茄在破色后释放大量乙烯激素,用于调控番茄转色后的果实生长,促进果实成熟^[22-23]。在研究中,Mt-GFP 番茄和野生型番茄均在破色后第 3 天出现乙烯释放高峰,且二者的乙烯释放量无显著性差异($P>0.05$)(图 7),说明 Mt-GFP 的表达不会影响乙烯激素对番茄果实的成熟调控。

线粒体可以根据其形态和动态特性,根据植物细胞的发育需要调整其形状、数量和运动方向。以 Mt-GFP 转基因番茄为材料,观察了线粒体在不同组织和果实成熟过程中的动态变化。在激光共聚焦显微镜下,线粒体零星地分布在番茄细胞质中,呈点状和杆状(图 8),据报道,线粒体在高等植物中通常有多种形态,如:球形、香肠形、线形或网络形^[24],形态变化很大,直径范围为 0.2–1.5 μm ^[25]。这与本研究观察结果一致。

在细胞中,线粒体的动态过程可分为聚变和裂变。它们可以相互融合和连接形成网络状结

构,或通过分裂形成分散的个体。线粒体的运动依赖由肌动蛋白丝、中间丝和微管组成的细胞骨架^[26]。在蛋白激酶的调节下,线粒体可以沿着细胞微管蛋白和肌动蛋白丝快速移动^[27-28]。本研究以番茄花细胞作为研究线粒体动态变化的观察对象。借助共聚焦显微镜,成功地在番茄花细胞中观察到了线粒体的动态变化:随着线粒体在细胞内运动,2个线粒体不断相互靠近并发生融合,或线粒体网逐渐分裂瓦解(图9),这意味着依靠Mt-GFP实现线粒体可视化是可行的。但利用这种方法观察线粒体运动过程存在一定的局限性,例如在番茄果实细胞中,中央大液泡的存在会使线粒体等细胞器被挤到细胞边缘,其次,由于线粒体通常聚集在叶绿体周围^[29-31],较多的叶绿体也可能不利于观察线粒体的运动过程。因此在以后的研究中,可以采用更精密的激光共聚焦显微镜对肉质果实细胞进行观察,或优化改进样品的前处理方式,尽可能规避细胞中叶绿体和中央大液泡或其他细胞器对结果造成的影响。

综上所述,本研究首次将Mt-GFP转入番茄,实现了番茄植株线粒体形态的可视化。未来可将本材料与其他基因编辑番茄杂交,有助于探究不同基因在番茄线粒体中的具体功能,可为细胞器发育与番茄果实成熟和品质之间的分子调控网络提供新的理论依据和基因资源。

REFERENCES

- [1] KLEE HJ, TIEMAN DM. Genetic challenges of flavor improvement in tomato[J]. *Trends in Genetics*, 2013, 29(4): 257-262.
- [2] 孙永珍, 贺靖, 魏芳, 杨伟健. “十三五”我国番茄产业发展及其国际竞争力评价[J]. *中国瓜菜*, 2023, 36(1): 112-116.
SUN YZ, HE J, WEI F, YANG WJ. Evaluation on the development and international competitiveness of China's tomato industry during the 13th Five-year Plan period[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2023, 36(1): 112-116 (in Chinese).
- [3] KLEE HJ, GIOVANNONI JJ. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 41-59.
- [4] ROBLES P, QUESADA V. Emerging roles of mitochondrial ribosomal proteins in plant development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(12): 2595.
- [5] PALIKARAS K, TAVERNARAKIS N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis[J]. *Experimental Gerontology*, 2014, 56: 182-188.
- [6] HOPPINS S, NUNNARI J. The molecular mechanism of mitochondrial fusion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2009, 1793(1): 20-26.
- [7] YANG YF, ZHU GN, LI R, YAN SJ, FU DQ, ZHU BZ, TIAN HQ, LUO YB, ZHU HL. The RNA editing factor SIORRM4 is required for normal fruit ripening in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(4): 1690-1702.
- [8] YANG YF, LIU XY, WANG KR, LI JY, ZHU GN, REN S, DENG ZP, ZHU BZ, FU DQ, QU GQ, LUO YB, ZHU HL. Molecular and functional diversity of organelle RNA editing mediated by RNA recognition motif-containing protein ORRM4 in tomato[J]. *New Phytologist*, 2020, 228(2): 570-585.
- [9] KÖHLER RH, ZIPFEL WR, WEBB WW, HANSON MR. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*[J]. *The Plant Journal*, 1997, 11(3): 613-621.
- [10] NELSON BK, CAI X, NEBENFÜHR A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants[J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(6): 1126-1136.
- [11] STELLMACH H, HOSE R, RÄDE A, MARILLONNET S, HAUSE B. A new set of golden-gate-based organelle marker plasmids for colocalization studies in plants[J]. *Plants*, 2022, 11(19): 2620.
- [12] MA LQ, YANG YF, WANG YQ, CHENG K, ZHOU XW, LI JY, ZHANG JY, LI R, ZHANG LL, WANG KR, ZENG N, GONG YY, ZHU DM, DENG ZP, QU GQ, ZHU BZ, FU DQ, LUO YB, ZHU HL. SIRBP1 promotes translational efficiency *via* SleIF4A2 to maintain chloroplast function in tomato[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(7): 2747-2764.
- [13] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
CAO JK, JIANG WB, ZHAO YM. Guidance on

- Postharvest Physiological and Biochemical Experiments of Fruits and Vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007 (in Chinese).
- [14] BIALE JB. Growth, maturation, and senescence in fruits[J]. *Science*, 1964, 146(3646): 880-888.
- [15] EGEA I, BIAN WP, BARSAN C, JAUNEAU A, PECH JC, LATCHÉ A, LI ZG, CHERVIN C. Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue[J]. *Annals of Botany*, 2011, 108(2): 291-297.
- [16] CARRARI F, FERNIE AR. Metabolic regulation underlying tomato fruit development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(9): 1883-1897.
- [17] MA BQ, CHEN J, ZHENG HY, FANG T, OGUTU C, LI SH, HAN YP, WU BH. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 86-91.
- [18] MATTHEIS JP, FELLMAN JK. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 1999, 15(3): 227-232.
- [19] SHAH K, SINGH M, RAI AC. Bioactive compounds of tomato fruits from transgenic plants tolerant to drought[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 61(2): 609-614.
- [20] KARLOVA R, CHAPMAN N, DAVID K, ANGENENT GC, SEYMOUR GB, de MAAGD RA. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(16): 4527-4541.
- [21] BRUMMELL DA, HOWIE WJ, MA C, DUNSMUIR P. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 25(2): 209-220.
- [22] HUANG W, HU N, XIAOZN, QIU YP, YANG Y, YANG J, MAO X, WANG YC, LI ZG, GUO HW. A molecular framework of ethylene-mediated fruit growth and ripening processes in tomato[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(9): 3280-3300.
- [23] BARRY CS, GIOVANNONI JJ. Ethylene and fruit ripening[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2007, 26(2): 143-159.
- [24] LOGAN DC. Mitochondrial dynamics[J]. *New Phytologist*, 2003, 160(3): 463-478.
- [25] JAIPARGAS EA, BARTON KA, MATHUR N, MATHUR J. Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 783.
- [26] LOGAN DC, LEAVER CJ. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(346): 865-871.
- [27] NEKRASOVA O, KULIK AV, MININ A. Protein kinase C regulates motility of mitochondria[J]. *Biologicheskie Membrany*, 2007, 24: 126-131.
- [28] DONIWA Y, ARIMURA SI, TSUTSUMI N. Mitochondria use actin filaments as rails for fast translocation in *Arabidopsis* and tobacco cells[J]. *Plant Biotechnology*, 2007, 24(5): 441-447.
- [29] STICKENS D, VERBELEN JP. Spatial structure of mitochondria and ER denotes changes in cell physiology of cultured tobacco protoplasts[J]. *The Plant Journal*, 1996, 9(1): 85-92.
- [30] van GESTEL K, KÖHLER RH, VERBELEN JP. Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(369): 659-667.
- [31] XU Z, ZHANG RS, YANG MJ, LAW YS, SUN F, HON NL, NGAI SM, LEONG LIM B. A balance between the activities of chloroplasts and mitochondria is crucial for optimal plant growth[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(6): 935.

(本文责编 郝丽芳)