

· 研究报告 ·

不同番茄种质叶表次生代谢物质

郭广君^{1†}, 高建昌^{1†}, 王孝宣¹, 国艳梅¹, John C. Snyder², 杜永臣^{1*}

¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²美国肯塔基大学园艺学院, 列克星敦 40546-0091

摘要 多毛番茄(*Solanum habrochaites*)为重要的番茄种质资源, 其叶表存在大量次生代谢物质, 对多种虫害具有趋避或/和毒害作用。利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析栽培番茄(*S. lycopersicum*)9706与3份多毛番茄(LA2329、LA1777和PI134417)材料叶表次生代谢物质。结果表明, 3份多毛番茄叶表可检测到的次生代谢物质种类和总含量均高于普通番茄, 同时多毛番茄亚种间次生代谢物质的种类和含量也存在差异。普通番茄叶表次生代谢物质为3种单萜和3种倍半萜类物质, 其中单萜和倍半萜类物质分别占次生代谢物质总量的60.3%和39.7%。多毛番茄LA2329和LA1777叶表倍半萜类物质的种类和含量较高, 有些萜类物质具有物种特异性。如LA2329中含量最高的 α -姜烯, 其含量为 $2\ 409.1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; LA1777中含量较高的 γ -榄香烯和E- β -法尼烯, 含量分别为 $573.3\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $289.9\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 在其它番茄材料中未检测到这3种倍半萜类物质。PI134417中含量最高的是月桂酸乙酯, 其含量为 $5\ 312.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 在普通番茄中这一物质未见报道。PI134417中甲基酮类物质含量也较高, 其中2-十一烷酮和2-十三烷酮的含量分别为 $689.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1\ 459.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。研究结果可为番茄种质资源利用和次生代谢物质开发提供理论依据。

关键词 次生代谢物质, 多毛番茄, 普通番茄

郭广君, 高建昌, 王孝宣, 国艳梅, John C. Snyder, 杜永臣 (2014). 不同番茄种质叶表次生代谢物质. 植物学报 49, 19–29.

目前作物生产上主要利用化学杀虫剂进行虫害的防治, 但是化学杀虫剂的负面影响给人类带来巨大的经济损失和环境危害, 如危害人类健康、害虫抗药性的产生、化学杀虫剂使用不当造成的农作物减产、害虫天敌的死亡以及水污染等。据统计, 美国由于化学杀虫剂的使用造成的经济损失超过120亿美元(Pimentel, 2009)。相比于化学药剂防治, 利用植物抗性基因培育具有持久抗性的品种是更为经济有效和环保的方法(Jansen, 1993)。利用植物体表次生代谢物质以达到抗虫目的, 是一种新的虫害防治理念(Simmons and Gurr, 2005)。以上两种方法的实施均需要对植物的次生代谢物质具有充分的认识。

长期的人工选择导致栽培番茄部分抗性基因和性状丢失(如抗虫性), 而一些野生番茄材料的抗性很高(Mirnezhad et al., 2010)。野生番茄的抗性由多种因素共同构成, 如叶表腺毛和蜡质产生的物理抗性和叶表次生代谢物质导致的化学抗性(Guo et al., 1993; Snyder et al., 1993), 其中叶表次生代谢物质介导的

化学抗性占主导地位(Simmons and Gurr, 2005)。野生番茄材料中的多毛番茄抗虫种类最多, 抗虫性最强(Farrar et al., 1991), 其叶表次生代谢物质种类最多, 化学结构多样性最高(Schmidt, 2011)。目前, 多数研究仅侧重于对多毛番茄单一或者少数几种次生代谢物质的分析, 缺少对次生代谢物质的总体分析(Son et al., 2009)。

气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)是最为成熟的色谱-质谱联用技术, 具有分辨率高、灵敏度高、重现性好、成本相对较低的优点, 已开发出包含大量标准代谢物的质谱图库, 便于化合物的检索和比对。该技术已成功应用于多种植物代谢物质分析, 是植物代谢组学研究的有力工具(薛震等, 2011; 王鹏飞等, 2012)。近年来, 利用GC-MS技术对番茄果实和叶表代谢物质的研究不断完善, 为利用番茄代谢组学改良番茄品质、提高番茄抗性和研究番茄次生代谢途径构建了良好的理论基础和技术平台(Schauer et al., 2005; Bovy et al.,

收稿日期: 2012-12-18; 接受日期: 2013-05-02

基金项目: 国家自然科学基金(No.30900987)、国家重点基础研究发展规划(No.2009CB119004)和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

[†]共同第一作者

*通讯作者。E-mail: yongchen.du@mail.caas.net.cn

2007; Kovács et al., 2009; Bleeker et al., 2011b; Falara et al., 2011)。

本实验利用GC-MS技术对1份普通番茄和3份多毛番茄材料叶表次生代谢物质进行分析, 探讨不同番茄材料叶表次生代谢物质种类和含量的异同, 以期为进一步利用多毛番茄的种质资源开发次生代谢物质并应用于虫害防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料为普通栽培番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.)9706和多毛番茄(*Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner)LA2329、LA1777和PI13-4417。普通番茄9706由中国农业科学院蔬菜花卉研究所鲜食番茄组提供; 多毛番茄材料由美国肯塔基大学园艺学院John C. Snyder教授提供。

1.2 试剂与仪器

实验所用叶表物质提取液为Sigma HPLC正己烷(n-hexane), 内标为Sigma HPLC正十四烷(n-tetradecane)和正二十四烷(n-tetracosane)。以20 mL带盖玻璃瓶作为提取瓶。分析仪器为岛津GC-MS-QP2010 plus, 色谱柱为VF-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)。运载气体为氦气(He), 柱流量为1 mL \cdot min $^{-1}$ 。称量用METTLER万分之一天平。

1.3 实验方法

1.3.1 番茄材料的培养

2011年7–10月, 将番茄材料种植在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室。温室内温度控制在白天28°C/夜晚20°C。光照为正常日照, 没有外源补光。用营养钵(底部直径为10 cm, 上部直径为15 cm, 高15 cm)育苗, 覆盖防虫网防虫。每隔2天浇水1次, 每周补充NPK复合肥溶液。

1.3.2 番茄叶表次生代谢物质的提取

番茄叶表次生代谢物质的提取参照文献(Besser et al., 2009; Kang et al., 2010)进行, 调整内标浓度。选取6片完全展开叶的番茄植株, 剪下顶端完全展开叶同一侧的2片小叶, 置于提取瓶中, 液氮速冻。在提取

液正己烷中加入内标正十四烷, 终浓度为2.0 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。室温下, 在提取瓶中加入1.5 mL提取液, 振荡提取5分钟。将1 mL叶片提取液转移至上样瓶中, 取1 μL 叶片提取液用于GC-MS分析。提取后的叶片先烘干, 置于万分之一天平上称量叶片干重(dry weight, DW)。每份材料设6次重复。

1.3.3 番茄叶表次生代谢物质的GC-MS分析

GC-MS分析参照前人的方法并进行部分调整(Tikunov et al., 2005)。气相色谱条件: GC进样口温度为280°C。采用升温程序: 初始柱温60°C, 保持4分钟; 以每分钟8°C升至315°C; 在315°C维持7分钟。质谱条件: 离子源为电子轰击EI源, 激发电压为70 eV, 离子源温度为300°C, 四级杆温度为150°C, 扫描范围50–650 m $\cdot\text{z}^{-1}$, 扫描速度为每秒0.5 scans, 扫描时间4.5–41.8分钟。

1.3.4 数据分析

谱图由AMDIS(Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System)软件(版本为2.68)生成。首先进行软件参数设置。仪器设置: GC-MS缺省数据格式为Shimadzu, 仪器类型为四级杆, 扫描方向为无。识别参数: 最低匹配因子60, 每个化合物的多重鉴定, 检出信号阈值选low, 选用扫描设置, 分析类型选RI calibration/performance。解卷积参数: 组分峰宽设为32, Omit/z为0, 相邻峰减除选1, 分辨率和灵敏度为High, 峰型要求为Medium。所用的化合物数据库为NIST05标准质谱图库。QA/QC: 溶剂峰拖尾为84 m $\cdot\text{z}^{-1}$, 柱流失为207 m $\cdot\text{z}^{-1}$ 。扫描设置: 扫描设置1的开始时间为start, 终止时间为6.00分钟, Low m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为15.00, High m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为300.00; 扫描设置2的开始时间为6.00分钟, 终止时间为60分钟, Low m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为29.00, High m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为350.00; 扫描设置3的开始时间为60分钟, 终止时间为9 999.00分钟, Low m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为40, High m $\cdot\text{z}^{-1}$ 为425。

利用MET-IDEA(METabolomics Ion-based Data Extraction Algorithm)软件对番茄叶表次生代谢物质进行定量分析。首先设置参数。色谱参数: 选择气相色谱(GC), 平均峰宽为0.15, 最小峰宽为0.5, 最大峰宽为3, 起始/终止峰斜率为1.5, 保留时间校准精度为0.5, 峰值过载系数为0.75。质谱参数: 仪器类型为

四级杆, 质量精度为0.1, 质量范围为(\pm)0.2。AMDIS特定参数: 最低质量限制为150, 每组分输出离子碎片的数量为1。

利用SIMCA-P11.5软件对次生代谢物质相对定量的结果进行偏最小二乘判别分析(partial least square discriminant analysis, PLS-DA)。

在次生代谢物质靶向分析时, 采用数据库比对的方式进行定性分析。定量分析采用内标法计算各组分的含量。

次生代谢物质含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)=组分积分面积/内标积分面积 \times 内标浓度 \times 提取液体积/叶片干重(g)。

2 结果与讨论

2.1 番茄叶表次生代谢物质的PLS-DA分析

采用GC-MS方法对番茄叶表次生代谢物质进行检测, 在4份番茄材料中鉴定出多种次生代谢物质(表1)。采用内标法计算各化合物相对浓度, 所得化合物相对浓度按保留时间排列成矩阵。采用多元统计学软件进行偏最小二乘判别分析, 分别得到PLS-DA模型的Score图和Loading图(图1)。PLS-DA分析结果表明, 4份番茄材料可以被很好地区分(图1A1, A2), 并且4份番茄材料的次生代谢物质含量具有显著差异(图1B1, B2)。说明叶表次生代谢物质含量不仅具有种间不同, 而且具有种内差异, 是区分番茄种间和种内差异的重要表型特征。

定性分析结果显示, 4份番茄材料叶表次生代谢物质可分为4大类, 即蜡质(主要是C₂₀—C₅₆的长链烷烃)、萜类物质、甲基酮类物质及其它物质。PLS-DA模型中可列出各变量的变量重要性值(variable importance in the projection, VIP), 其中VIP值大于1.0的变量被认为是4份番茄材料中变化明显且对区分贡献较大的因素, 包括大量的萜类和甲基酮类物质及部分蜡质(数据未显示)。蜡质为番茄叶表普遍存在的物质。其它4类物质与番茄多种生物学功能密切相关, 出峰时间一般介于5—25分钟之间。排除蜡质的影响, 我们对其它3类靶向物质进行定性和定量分析。

2.2 番茄叶表靶向物质定性及定量分析

实验结果显示, 4种番茄材料的次生代谢物质总量具有显著差异, 从大到小排序为PI134417>LA2329>

LA1777>9706($F=269.88$, $P<0.000 1$)。不同番茄材料的4类次生代谢物质含量具有显著差异($F=125.45$, $P<0.0001$; $F=146.10$, $P<0.000 1$; $F=72.84$, $P<0.000 1$; $F=954.13$, $P<0.000 1$), 其中倍半萜类物质含量在4份番茄材料中均具有显著差异($F=146.10$, $P<0.000 1$) (表1)。不同番茄材料中控制次生代谢物质合成的基因表达水平和代谢途径具有一定差异, 导致次生代谢物质种类和含量各不相同。因此次生代谢物质是基因与环境作用的最终表型特征(Van Der Hoeven et al., 2000; Besser et al., 2009; McDowell et al., 2011)。

在9706中检测到6种次生代谢物质(图2A), 全部为萜类物质, 总含量为174.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。3种单萜类物质总含量为105.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 占次生代谢物质总量的60.3%。 α -蒈烯(α -carene)、 β -水芹烯(β -phellandrene)和柠檬烯(limonene)含量分别为30.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、40.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和34.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。3种倍半萜类物质总含量为69.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中 α -石竹烯(α -caryophyllene)的含量较低, 为4.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, δ -榄香烯(δ -elemene)和 β -榄香烯(β -elemene)的含量分别为31.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和32.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表1)。据报道, 单萜类物质为栽培番茄的主要次生代谢物质, 检测到的主要是蒎烯(α -pinene和 β -pinene)、2-蒈烯(2-carene)及 β -水芹烯, 其中 β -水芹烯含量最高(Farag and Paré, 2002; Besser et al., 2009; Bleeker et al., 2009; Proffit et al., 2011)。栽培番茄中含有的倍半萜类物质主要为 β -石竹烯(β -caryophyllene)、榄香烯(elemene)及 α -蛇麻烯(α -humulene), 其含量低于单萜类物质(Zhang et al., 2008; Besser et al., 2009)。栽培番茄叶表次生代谢物质种类较少。本实验未检测出蒎烯类物质, 但检测出柠檬烯和柠檬烯氧化物。

LA1777对生物和非生物逆境具有很强的抗性, 在品种改良和抗性研究中应用得比较广泛(Momotaz et al., 2010)。LA1777中检测到22种次生代谢物质(图2B), 总含量为1 993.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。其中包括倍半萜类物质18种, 甲基酮类物质1种, 另3种为其它物质。倍半萜类物质含量为1 739.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 占次生代谢物质总量的87.3%, 其中 γ -榄香烯(γ -elemene)、 β -石竹烯和E- β -法尼烯(E- β -farnesene)含量较高, 分别为573.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、353.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和289.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。此外在LA1777中检测到微量的2-十一烷酮(2-undecanone)和3种其它物质, 含量分别为107.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和147.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表1)。据报道,

表1 不同番茄种叶表靶向次生物质定性及定量分析**Table 1** Quality and quantity analysis of target secondary metabolites on tomato leaf surface

No.	RI ^a	Components identified ^{**}	9706	LA1777	LA2329	PI134417
			Chemical components content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)			
Monoterpoids						
1	976	2-carene	30.5±7.4	—	—	—
2	986	α-phellandrene	40.5±14.7	—	—	—
3	1 017	Limonene	34.2±9.6	—	—	—
28	1 031	<i>Trans</i> -limonene oxide	—	—	3.6±1.4	—
		Monoterpoids contents ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	105.1 a	0 b	3.6 b	0 b
		Monoterpoids percent (%)	60.3	0	0.1	0
Sesquiterpenoids						
4	1 347	δ-elemene	31.6±7.9	89.8±10.0	55.9±11.5	513.5±55.9
5	1 430	β-caryophyllene	32.9±7.9	353.1±52.7	—	53.8±17.1
6	1 462	α-caryophyllene	4.6±1.2	—	—	—
10	1 374	Copaene	—	130.4±27.8	—	36.4±14.0
11	1 426	α-bergamotene	—	42.5±4.0	4.8±1.6	—
12	1 435	γ-santalene	—	104.6±4.7	—	—
13	1 449	γ-elemene	—	573.3±94.3	—	—
14	1 472	β-santalene	—	12.2±1.9	—	—
15	1 476	α-curcumene	—	67.5±5.8	87.5±10.0	—
16	1 484	E-β-farnesene	—	298.9±57.1	—	—
17	1 495	Aromadendrene	—	42.2±3.8	34.5±6.5	—
18	1 507	β-himachalene	—	17.7±2.7	443.2±23.5	—
19	1 519	β-sesquiphellandrene	—	26.4±1.9	22.1±3.8	—
20	1 544	β-bisabolene	—	43.7±2.9	—	—
21	1 561	(+)-δ-cubebene	—	163.3±20.4	—	—
22	1 588	(+)-valencene	—	40.1±11.1	—	—
23	1 617	γ-gurjunene	—	15.3±1.6	—	—
24	1 636	Germacrene D	—	9.7±1.2	—	90.2±25.6
25	1 660	Palustrol	—	7.5±0.3	—	—
32	1 523	α-zingiberene	—	—	2 409.1±448.1	—
33	1 582	<i>Trans</i> -α-bergamotol	—	—	17.9±4.9	—
34	1 657	Cedren-13-ol	—	—	17.2±4.4	—
35	1 684	α-santalol	—	—	23.5±6.8	—
38	1 732	Ar-turmerone	—	—	16.2±4.3	—
39	1 737	β-turmerone	—	—	5.4±1.5	—
40	1 758	α-longipinene	—	—	6.2±1.0	—
43	1 814	α-turmerone	—	—	4.7±1.9	—
46	1 538	Caryophyllene oxid	—	—	—	5.3±1.9
		Sesquiterpenoids content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	69.1 d	1 739.3 b	3 148.2 a	699.2 c
		Sesquiterpenoids percent (%)	39.7	87.3	91.9	8.1
Methyl ketones						
7	1 260	2-undecanone	—	107.2±19.5	—	689.8±151.7
44	1 325	2-dodecanone	—	—	—	4.5±1.8

表1 (续) Table 1 (continued)

No.	RI [*]	Components identified ^{**}	9706	LA1777	LA2329	PI134417
			Chemical components content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)			
45	1 469	2-tridecanone	—	—	—	1 459.7±427.5
48	1 600	2-pentadecanone	—	—	—	41.9±12.1
49	1 650	11-dodecen-2-one	—	—	—	35.0±8.3
		Methyl ketones content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0 b	107.2 b	0 b	2 230.9 a
		Percent (%)	0	5.3	0	25.7
		Others secondary metabolites				
8	1 304	Bi-1-cycloocten-1-yl	—	58.3±16.0	—	—
9	1 317	2-(1-cyclopent-1-enyl-1-methylethyl) cyclopentanone	—	47.8±11.7	—	—
27	847	<i>trans</i> - β -terpinylacetate	—	—	43.7±16.9	—
31	1 461	3,9-dodecadiyne	—	—	7.4±2.2	—
47	1 590	Dodecanoic acid ethenyl ester	—	—	—	5 312.8±388.2
50	1 712	Myristicacid vinyl ester	—	—	—	442.8±71.0
26	1 753	Unknown	—	41.1±7.6	—	—
29	1 278	Unknown	—	—	10.5±2.9	—
30	1 438	Unknown	—	—	35.0±6.9	—
36	1 713	Unknown	—	—	97.9±12.6	—
37	1 727	Unknown	—	—	12.6±1.9	—
41	1 780	Unknown	—	—	55.7±10.1	—
42	1 801	Unknown	—	—	11.3±4.1	—
		Others secondary metabolites content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0 b	147.2 b	274.1 b	5 755.6 a
		Others secondary metabolites percent (%)	0	7.4	8.0	66.2
		Total secondary metabolites content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	174.2 d	1 993.7 c	3 425.9 b	8 685.7 a

*保留指数; **化学成分分类列出。所有数据以6次平行实验的平均值±标准差表示; 同行不同字母表示在0.01水平上差异显著。

^{*}Retention index; ^{**}Compounds listed by class. All data represented the mean value±standard deviation of six independent replications; Values followed the different letter in the same row means differ at the 1% level of significance.

LA1777中可检测出的倍半萜类物质主要有石竹烯(*caryophyllene*)、榄香烯、大根香叶烯B(*germacrene B*)、大根香叶烯D(*germacrene D*)、香柠檬烯(*bergamotene*)、檀香烯(*santalene*)及 β -荜澄茄油烯(β -*cubebene*)等(Van Der Hoeven et al., 2000; Besser et al., 2009; Bleeker et al., 2011a)。另有报道显示, LA1777中含有对烟粉虱具有趋避作用的姜黄烯(*curcumene*)和姜烯(*zingiberene*), 含量分别为12.3 $\mu\text{g}\cdot(24\text{ h}\cdot10\text{ g})^{-1}$ 和9.71 $\mu\text{g}\cdot(24\text{ h}\cdot10\text{ g})^{-1}$ (Bleeker et al., 2009)。实验中检测到LA1777中倍半萜羧酸类物质含量很高, 比例超过次生代谢物质总量的90%, 包

括 α -檀香烯-羧酸(α -*santalenoic-acid*)、 α -香柠檬烯-羧酸(α -*bergamotenoic-acid*)和 β -香柠檬烯-羧酸(β -*bergamotenoic-acid*)等, 这些物质可以降低甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和番茄棉铃虫(*Helicoverpa zea*)的生长速率和成活率(Coates et al., 1988; Van Der Hoeven et al., 2000; Frelichowski and Juvik, 2001; Besser et al., 2009)。大部分已报道的番茄中所含的倍半萜类物质在本实验中都能检测到, 此外还检测出多种微量的未在LA1777中报道的次生代谢物质, 包括部分倍半萜类物质及2-十一烷酮。但是本实验未在LA1777中检测到姜烯及倍半萜

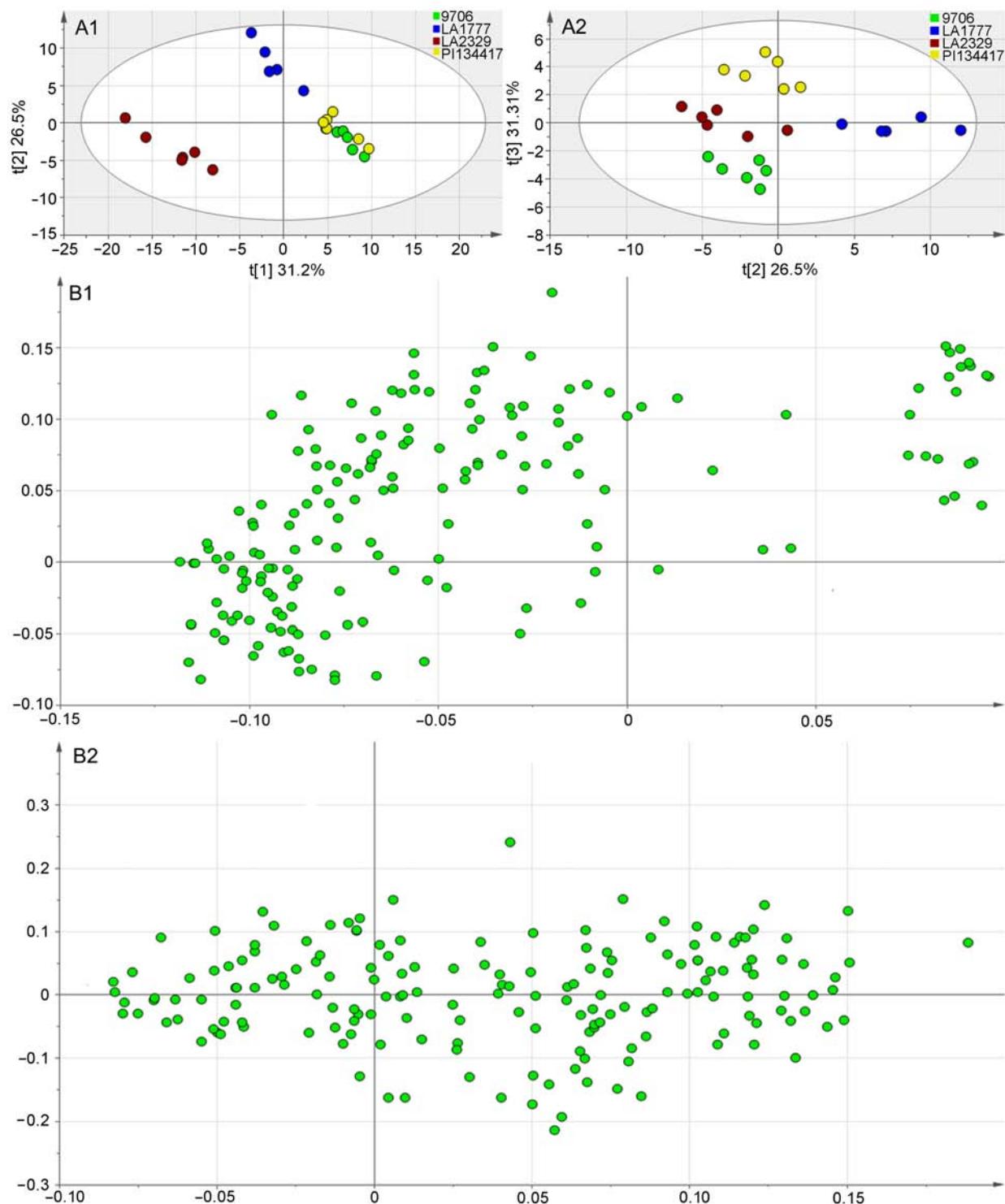


图1 基于4份番茄材料叶表次生代谢物质的PLS-DA模型
(A1), (A2) Score图; (B1), (B2) Loading图

Figure 1 PLS-DA based on the secondary metabolites on leaf surface of four tomato species
(A1), (A2) Score plot; (B1), (B2) Loading plot

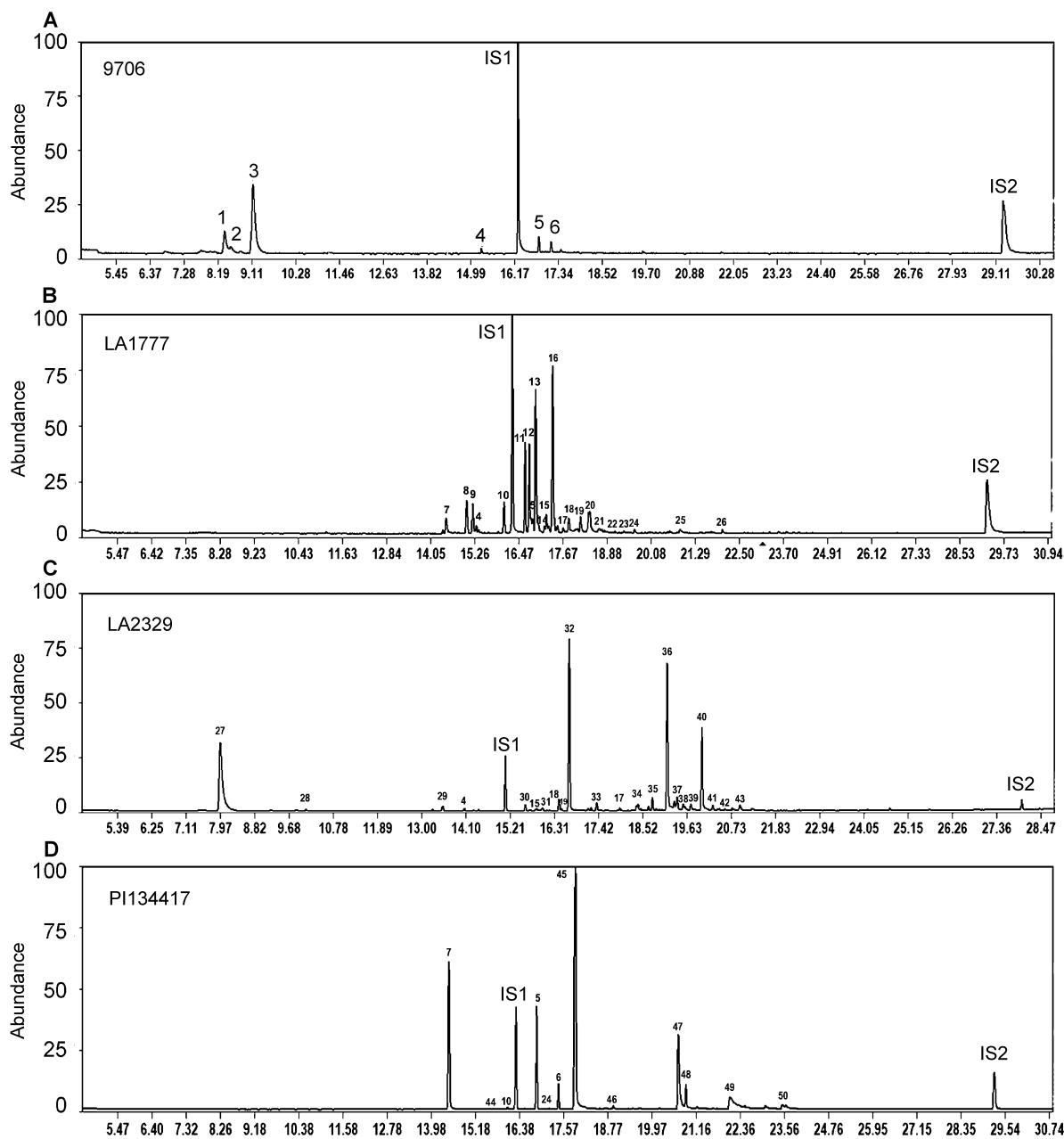


图2 4份番茄材料叶表部分次生代谢物质色谱图
(A) 9706; **(B)** LA1777; **(C)** LA2329; **(D)** PI134417
 图中数字所代表的叶表次生代谢物质编号同表1。IS1为正十四烷。

Figure 2 Chromatogram pattern of some secondary metabolites on leaf surface of four tomato species

(A) 9706; **(B)** LA1777; **(C)** LA2329; **(D)** PI134417

The figures represented the No. of secondary metabolites and corresponded with the No. of Table 1. IS1 was tetradecane.

羧基酸类物质。

与LA1777相比,有关LA2329中次生代谢物质的

研究比较少。本实验在LA2329中检测到的次生代谢物质种类最多,为23种(图2C),其中倍半萜类物质14

种, 单萜类物质1种, 其它物质8种。倍半萜类物质含量为 $3\ 148.2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 占次生代谢物质总量的91.9%, 其中 α -姜烯(α -zingiberene)含量最高, 为 $2\ 409.1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 其次是 β -雪松烯(β -himachalene), 含量为 $443.2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在LA2329中还检测到微量的单萜类物质反式-柠檬烯氧化物(*trans*-limonene oxide)和几种微量物质(表1)。有研究报道, LA2329中挥发性物质总量为 $202.50\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (叶片), 其中倍半萜类物质(3种)为 δ -榄香烯、 γ -榄香烯和 α -姜烯, 含量分别为 $0.06\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 $8.29\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 和 $14.23\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Eigenbrode and Trumble, 1993)。另有研究显示LA2329中挥发性物质的总量为 $96\ \text{ng}\cdot(\text{VI腺毛})^{-1}$, 其中包含2种倍半萜, 为 γ -榄香烯和 α -姜烯, 含量分别为 $3\ \text{ng}\cdot(\text{VI腺毛})^{-1}$ 和 $25\ \text{ng}\cdot(\text{VI腺毛})^{-1}$ (Eigenbrode et al., 1996)。本实验在LA2329中检测到的次生代谢物质种类远多于以上研究所提到的种类, 并且检测到多种倍半萜醇和倍半萜酮类物质, 但未检测到 γ -榄香烯。比较以上结果发现 δ -榄香烯和 α -姜烯在LA2329中比较稳定, 并且 α -姜烯的含量高于其它倍半萜类物质。

PI134417中检测到12种次生代谢物质(图2D), 总含量为 $8\ 685.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。其中甲基酮类物质和倍半萜类物质各5种, 酯类物质2种。甲基酮类物质的含量为 $2\ 230.9\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中2-十一烷酮和2-十三烷酮(2-tridecanone)的含量分别为 $689.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1\ 459.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 此外还有微量的2-十二烷酮(2-dodecanone)、2-十五烷酮(2-pentadecanone)和11-十二烯基-2-酮(11-dodecen-2-one)。5种倍半萜类物质的总量为 $699.2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 其中含量最高的是 δ -榄香烯, 为 $513.5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。次生代谢物质中酯类物质的含量最高, 占次生代谢物质总量的66.2%, 月桂酸乙酯和肉豆蔻酸乙酯的含量分别为 $5\ 312.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $442.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表1)。相对于LA2329和LA1777, PI134417中的次生代谢物质种类较少, 以甲基酮类物质为研究的重点。PI134417中可以检测到的甲基酮类物质包括2-十一烷酮、2-十二烷酮、2-十三烷酮及2-十五烷酮, 其中2-十一烷酮和2-十三烷酮的含量和作用占主导地位(Lin et al., 1987; Antonious, 2001)。PI134417中甲基酮类物质含量受季节影响, 但是物质种类变化不大(George et al., 2005)。以上研究结果表明, PI134417中甲基酮类物质的种类比较稳定, 而本研究结果也验证了这一结论。PI134417中可以检测到少量的倍半萜

类物质, 如 δ -榄香烯, 含量为 $0.9\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Eigenbrode et al., 1996)和石竹烯, 含量为 $13.41\ (24\ \text{h}\cdot10\ \text{g})^{-1}$ (鲜重)(Bleeker et al., 2009)。本实验中可以检测到5种倍半萜类物质, 包括以上2种, 其中 δ -榄香烯的含量最高。本实验中还检测到2种含量极高的酯类物质——月桂酸乙酯(dodecanoic acid ethenyl ester)和肉豆蔻酸乙酯(myristicacid vinyl ester)。目前番茄中没有与之相关的报道。在其它一些植物中可以检测到这2种酯类, 且它们对真菌具有一定的抗性作用(Ledauphin et al., 2003; Ouattara et al., 2007)。

次生代谢物质为代谢组学重要的组成部分, 目前在利用代谢组学研究番茄代谢途径、抗性机理及改善番茄品质等方面取得了一定的进展(Mintz-Oron et al., 2008; Iijima and Aoki, 2009; Mirnezhad et al., 2010; McDowell et al., 2011)。PLS-DA多变量统计方法属于有监督分析方法, 在已有知识的基础上建立信息组(class information), 并利用所建立的组对未知数据进行辨识、归类和预测, 能够从大量多维数据中筛选出贡献于分类的主要差异成分(尹恒等, 2005; 陈天璐, 2011)。本实验证明次生代谢物质的种类和含量在番茄种间和亚种间存在显著差异。相关的研究结果均显示栽培番茄中次生代谢物质种类及含量较少。多毛番茄中次生代谢物质种类较多, 不同的研究侧重点有所不同, 最终检测出的次生代谢物质种类有一定的差异。但是不同番茄材料中具有一些特异、稳定且含量较高的次生代谢物质, 包括栽培番茄中的 β -水芹烯; LA1777中的 γ -榄香烯和 β -石竹烯; LA2329中的 α -姜烯; PI134417中的2-十一烷酮和2-十三烷酮。这些特异且稳定的次生代谢物质是进一步开发和利用野生番茄材料及次生代谢物质的关键所在。

致谢 番茄叶表次生代谢物质的GC-MS测定由农业部蔬菜品质监督检验测试中心(北京)协助完成, 特此感谢!

参考文献

- 陈天璐 (2011). 基于质谱平台的代谢组学数据处理. 见: 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚主编. 植物代谢组学——方法与应用. 北京: 化学工业出版社. pp. 146–147.
- 王鹏飞, 王倩倩, 李先恩, 秦民坚 (2012). GC-MS技术在延胡索块茎代谢产物研究中的应用. 植物学报 47, 149–154.
- 薛震, 段礼新, 漆小泉 (2011). 气相色谱-质谱联用技术. 见:

- 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚主编. 植物代谢组学——方法与应用. 北京: 化学工业出版社. pp. 27–27.
- 尹恒, 李曙光, 白雪芳, 杜昱光 (2005). 植物代谢组学的研究方法及其应用. 植物学通报 **22**, 532–540.
- Antonious GF (2001). Production and quantification of methyl ketones in wild tomato accessions. *J Environ Sci Heal B* **36**, 835–848.
- Besser K, Harper A, Welsby N, Schauvinhold I, Slocombe S, Li Y, Dixon RA, Broun P (2009). Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiol* **149**, 499–514.
- Bleeker PM, Diergaardde PJ, Ament K, Guerra J, Weidner M, Schütz S, de Both MTJ, Haring MA, Schuurink RC (2009). The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiol* **151**, 925–935.
- Bleeker PM, Diergaardde PJ, Ament K, Schütz S, Johne B, Dijkink J, Hiemstra H, de Gelder R, de Both MTJ, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC (2011a). Tomato-produced 7-epizingiberene and R-curcumene act as repellents to whiteflies. *Phytochemistry* **72**, 68–73.
- Bleeker PM, Spyropoulou EA, Diergaardde PJ, Volpin H, De Both MTJ, Zerde P, Bohlmann J, Falara V, Matsuba Y, Pichersky E (2011b). RNA-seq discovery, functional characterization, and comparison of sesquiterpene synthases from *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites* trichomes. *Plant Mol Biol* **77**, 323–336.
- Bovy A, Schijlen E, Hall RD (2007). Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics* **3**, 399–412.
- Coates RM, Denissen JF, Juvik JA, Babka BA (1988). Identification of α-santalenoic and endo-β-bergamotenoic acids as moth oviposition stimulants from wild tomato leaves. *J Org Chem* **53**, 2186–2192.
- Eigenbrode SD, Trumble JT (1993). Antibiosis to beet armyworm (*Spodoptera exigua*) in *Lycopersicon* accessions. *HortScience* **28**, 932–934.
- Eigenbrode SD, Trumble JT, White KK (1996). Trichome exudates and resistance to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Lycopersicon hirsutum* f. *typicum* accessions. *Environ Entomol* **25**, 90–95.
- Falara V, Akhtar TA, Nguyen TTH, Spyropoulou EA, Bleeker PM, Schauvinhold I, Matsuba Y, Bonini ME, Schilmiller AL, Last RL, Schuurink RC, Pichersky E (2011). The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol* **157**, 770–789.
- Farag MA, Paré PW (2002). C₆-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* **61**, 545–554.
- Farrar R, Kennedy G (1991). Insect and mite resistance in tomato. In: Kalloo G, ed. *Genetic Improvement of Tomato*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 121–142.
- Frelichowski JE Jr, Juvik JA (2001). Sesquiterpene carboxylic acids from a wild tomato species affect larval feeding behavior and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* **94**, 1249–1259.
- George FA, Tejinder SK, Alvin MS (2005). Natural products: seasonal variation in trichome counts and contents in *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *J Environ Sci Heal B* **40**, 619–631.
- Guo Z, Weston PA, Snyder JC (1993). Repellency to two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, as related to leaf surface chemistry of *Lycopersicon hirsutum* accessions. *J Chem Ecol* **19**, 2965–2979.
- Iijima Y, Aoki K (2009). Application of metabolomics to improve tomato fruit productivity and quality. *J Jpn Soc Hortic Sci* **78**, 14–22.
- Jansen RC (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**, 205–211.
- Kang JH, Shi F, Jones AD, Marks MD, Howe GA (2010). Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *J Exp Bot* **61**, 1053–1064.
- Kovács K, Fray RG, Tikunov Y, Graham N, Bradley G, Seymour GB, Bovy AG, Grierson D (2009). Effect of tomato pleiotropic ripening mutations on flavour volatile biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 1003–1008.
- Ledauphin J, Guichard H, Saint-Clair JF, Picoche B, Barillier D (2003). Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *J Agr Food Chem* **51**, 433–442.
- Lin SYH, Trumble JT, Kumamoto J (1987). Activity of volatile compounds in glandular trichomes of *Lycopersicon* species against two insect herbivores. *J Chem Ecol* **13**, 837–850.
- McDowell ET, Kapteyn J, Schmidt A, Li C, Kang JH, Descour A, Shi F, Larson M, Schilmiller A, An L, Jones AD, Pichersky E, Soderlund CA, Gang DR (2011). Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome types. *Plant Physiol* **155**, 524–539.
- Mintz-Oron S, Mandel T, Rogachev I, Feldberg L, Lotan O, Yativ M, Wang Z, Jetter R, Venger I, Adato A,

- Aharoni A** (2008). Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiol* **147**, 823–851.
- Mirnezhad M, Romero-González RR, Leiss KA, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL** (2010). Metabolomic analysis of host plant resistance to thrips in wild and cultivated tomatoes. *Phytochem Anal* **21**, 110–117.
- Momotaz A, Scott J, Schuster D** (2010). Identification of quantitative trait loci conferring resistance to *Bemisia tabaci* in an F₂ population of *Solanum lycopersicum* × *Solanum habrochaites* accession LA1777. *J Am Soc Hortic Sci* **135**, 134–142.
- Ouattara L, Koudou J, Obame LCE, Karou DS, Traore A, Bessiere JM** (2007). Chemical composition and antibacterial activity of *Cochlospermum planchoni* Hook. f. ex Planch essential oil from Burkina Faso. *Pak J Biol Sci* **10**, 4177–4179.
- Pimentel D** (2009). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: Peshin R, Dhawan AK, eds. *Integrated Pest Management*. Netherland: Springer. pp. 89–111.
- Proffit M, Birgersson G, Bengtsson M, Reis R, Witzgall P, Lima E** (2011). Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. *J Chem Ecol* **37**, 565–574.
- Schauer N, Zamir D, Fernie AR** (2005). Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J Exp Bot* **56**, 297–307.
- Schmidt AJ** (2011). Specialized Metabolites and Related Biosynthetic Enzymes in Tomato Glandular Trichomes: Defining Biological Functions of Specific Gland Types. Doctoral Thesis. Michigan: University of Michigan. pp. 44–44.
- Simmons AT, Gurr GM** (2005). Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agr Forest Entomol* **7**, 265–276.
- Snyder JC, Guo Z, Thacker R, Goodman JP, Pyrek JS** (1993). 2, 3-dihydrofarnesoic acid, a unique terpene from trichomes of *Lycopersicon hirsutum*, repels spider mites. *J Chem Ecol* **19**, 2981–2997.
- Son HS, Hwang GS, Kim KM, Ahn HJ, Park WM, Van Den Berg F, Hong YS, Lee CH** (2009). Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using ¹H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J Agr Food Chem* **57**, 1481–1490.
- Tikunov Y, Lommen A, De Vos C, Verhoeven HA, Bino RJ, Hall RD, Bovy AG** (2005). A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol* **139**, 1125–1137.
- Van Der Hoeven RS, Monforte AJ, Breeden D, Tanksley SD, Steffens JC** (2000). Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Plant Cell* **12**, 2283–2294.
- Zhang PY, Chen KS, He PQ, Liu SH, Jiang WF** (2008). Effects of crop development on the emission of volatiles in leaves of *Lycopersicon esculentum* and its inhibitory activity to *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *J Integr Plant Biol* **50**, 84–91.

Secondary Metabolites on Leaf Surface of Different Tomato Species

Guangjun Guo^{1†}, Jianchang Gao^{1†}, Xiaoxuan Wang¹, Yanmei Guo¹, John C. Snyder², Yongchen Du^{1*}

¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

²Department of Horticulture, University of Kentucky, Lexington 40546-0091, USA

Abstract *Solanum habrochaites*, an important tomato germplasm resource, is resistant to multiple insect pests and produces an array of secondary metabolites on the leaf surface. We used gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to determine the secondary metabolites on the leaf surface of 4 tomato accessions: one *S. lycopersicum* 9706 and 3 *S. habrochaites* accessions LA1777, LA2329 and PI134417. The 3 *S. habrochaites* accessions produced high amounts of secondary metabolites, whereas *S. lycopersicum* 9706 lacked most of these secondary metabolites. Secondary metabolites on the 9706 leaf surface were 6 terpenoids, which included 3 monoterpenes and 3 sesquiterpenes, of 60.3% and 39.7%, respectively. LA2329 and LA1777 accumulated high amounts of sesquiterpenoids, but the types of sesquiterpenes differed between accessions. α -zingiberene was the most abundant sesquiterpene ($2\ 409.1\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in LA2329. γ -Elemene and E- β -farnesene were the major sesquiterpenes in LA1777: 573.3 and $289.9\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. Dodecanoic acid ethenyl ester, at $5\ 312.8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, was the most abundant secondary metabolite in PI134417. This metabolite has not previously been reported in any tomato species. In addition, methyl ketones, specifically 2-undecanone and 2-tridecanone, at 689.8 and $1\ 459.7\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively, were abundant secondary metabolites in PI134417. Our study provides the theoretical basis for the use of tomato germplasm resources and the development of secondary metabolites.

Key words secondary metabolites, *Solanum habrochaites*, *Solanum lycopersicum*

Guo GJ, Gao JC, Wang XX, Guo YM, Snyder JC, Du YC (2014). Secondary metabolites on leaf surface of different tomato species. *Chin Bull Bot* **49**, 19–29.

† These authors contributed equally in this paper.

* Author for correspondence. E-mail: yongchen.du@mail.caas.net.cn

(责任编辑: 白羽红)