研究论文

小苍兰芳樟醇合酶基因的克隆及表达分析

樊荣辉[1, 2, 3] 黄敏玲[1, 2, 3]* 钟淮钦[1, 2, 3] 罗远华[1, 2, 3]

([1]福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; [2]福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;
[3]福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 芳樟醇是小苍兰花香的主要成分, 为了研究小苍兰芳樟醇合酶的合成与代谢机理, 采用RT-PCR方法从小苍兰‘金童’花瓣中克隆到1个芳樟醇合酶(linalool synthase, *LIS*)基因, 含有完整的cDNA开放阅读框(open reading frame, ORF), 共1 779个碱基(GenBank收录号KX452731)。与其他物种的芳樟醇合酶氨基酸序列有40%~95%的同源性。系统进化树分析显示, ‘金童’*LIS*与小苍兰首先聚为一类, 其次与百合、姜、芭蕉的单贴合酶亲缘关系较近。应用荧光定量PCR分析表明, 在小苍兰品种White Wing-2中*LIS*表达量最高, 在花瓣中高表达, 且在花发育的始花期表达量最高。

关键词 小苍兰; 芳樟醇合成酶; 基因克隆; 表达分析

Cloning and Expression of Linalool Synthase Gene in *Freesia*

Fan Ronghui[1,2,3], Huang Minling[1,2,3]*, Zhong Huaiqin[1,2,3], Luo Yuanhua[1,2,3]

([1]*Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China*;
[2]*Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China*;
[3]*Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China*)

Abstract Linalool is the main components of the floral scent emitted from *Freesia*. In order to explore the synthesis and metabolic mechanism of linalool synthase (LIS), the open reading frame (ORF) sequence of *LIS* gene was cloned from petals of *Freesia* ‘Jintong’ using RT-PCR. The cDNA included a whole ORF of 1 779 bp. The amino acid was highly conserved compared with other LIS homologues and shared up to 40%~95% homology with other LIS. Phylogenetic analysis indicated that LIS in ‘Jintong’ was clustered together with LIS of *Freesia hybrida* firstly and was more related to monoterpene synthases of *Lilium sp*., *Hedychium coronarium* and *Musa acuminata*. The result from fluorescent quantitative PCR analysis indicated that *LIS* was highly expressed in early flowering period, and the transcriptional level was highest in White Wing-2 and petals.

Keywords *Freesia*; linalool synthase; gene cloning; expression analysis

与花色等其他观赏性状相比, 有关花香的研究相对滞后, 主要集中于花香成分研究。直到近年来, 其生物合成途径逐渐明确[1-2], 相关酶基因才相继被研究和应用[3]。1992年, Facchini和Chappell[4]首次在

收稿日期: 2016-06-16 接受日期: 2016-08-26
花卉育种科技创新团队建设(批准号: CXTD-2-17)、福建省省属公益类科研院所专项(批准号: 2014R1026-12)和福建省农科院创新团队PI项目(批准号: 2016PI-40)资助的课题
*通讯作者。Tel: 0591-87586106, E-mail: huangml618@163.com
Received: June 16, 2016 Accepted: August 26, 2016
This work was supported by Team of Technology Innovation by Flower Breeding (Grant No.CXTD2011), the Special Project of Provincial Public Research Institutes in Fujian Province (Grant No.2014R1026-12) and PI Project of Innovative Team in Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-40)
*Corresponding author. Tel: +86-591-87586106, E-mail: huangml618@163.com
网络出版时间: 2016-10-31 16:04:04 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161031.1604.008.html

烟草中克隆到两个倍半萜合酶基因。此后, 多个花香相关基因相继被克隆和研究, 但在观赏植物中克隆到的单萜合酶基因极其有限[5]。1996年, Dudareva等[6]在仙女扇中, 通过筛选cDNA文库而得到完整的芳樟醇合酶(linalool synthase, *LIS*)基因。此后, 在观赏植物中单萜合酶基因相继被克隆, 在金鱼草中获得罗勒烯合酶基因和月桂烯合酶基因[7], 在紫苏中获得香叶醇合酶基因和芳樟醇合酶基因[8], 在薰衣草中获得水芹烯合酶基因[9], 在百合水仙中获得月桂烯合酶基因[10]等。

植物花香是由低分子量挥发性物质的混合物组成的。花香能够吸引传粉昆虫、抵制草食动物并作为免疫信号激起防卫反应[11-12], 从而确保植物的产量和质量[13]。研究表明, 大部分花香物质属于以下三类: 萜烯类化合物(terpenoids)、苯丙酸类化合物/苯环型化合物(benzenoids/phenylpropanoids)和脂肪族衍生物(aliphatic compounds)[14]。萜类化合物的结构单位是异戊二烯(isoprene, C5), 可分为单萜(monoterpene, C10)、倍半萜(sesquiterpene, C15)和二萜(diterpene, C20)等, 是植物中种类最多的次生代谢化合物[15]。芳樟醇是一种重要的单链状萜类化合物, 有α和β两种异构体, 还有左旋、右旋两种旋光异构体[16]。茶叶[17]、仙女扇[18]等香气的主要挥发性物质为芳樟醇。芳樟醇被广泛应用于合成香料、医药、调香及食品和饲料等工业领域。基于其特有的芳香性、抗菌作用以及驱避有害昆虫等方面的功效, 在饲料调味剂、动物生产等方面具有潜在应用价值[19]。芳樟醇合酶(LIS)将犍牛儿焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)一步催化成芳樟醇(linalool)[20]。因此, 可以通过导入单一芳樟醇合酶基因达到增加挥发性物质的目的。该酶及相关基因的研究为培养具有新型香味的转基因观赏植物及合成香料奠定了基础。

小苍兰(*Freesia hybrida klatt*)为鸢尾科香雪兰属多年生球根类花卉, 其品种丰富、花色多样、香气浓郁, 深受人们喜爱, 也是开展花香研究的良好植物材料[21-22]。在小苍兰释放的花香中, 萜类化合物最多, 释放量最大, 单萜类尤其是芳樟醇、γ-萜品烯是其花香的主要成分[11]。本研究基于小苍兰花香成分测定的研究结果, 选取香味浓郁且萜烯类化合物含量丰富的自育品种'金童'作为实验材料, 采用同源克隆的方法, 分离小苍兰芳樟醇合酶基因, 并对不同品种、不同组织及不同花发育阶段进行了表达分析, 以期为进一步研究基因的功能及花香成分代谢机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验在福建省农业科学院作物研究所进行, 以自育的小苍兰新品系'金童'花瓣为供试材料, 进行基因克隆。并对不同品种花瓣(表1)、不同组织(雌蕊、雄蕊、花瓣、叶片)及不同发育时期的花朵(花蕾前期、花蕾中期、花蕾后期、始花期)进行表达分析。

1.2 RNA提取及cDNA合成

取上述存放于–80 ℃冰箱中的样品, 应用多糖多酚植物总RNA快速提取试剂盒(百泰克生物技术有限公司)提取总RNA, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测。使用M-MLV逆转录酶(TaKaRa公司)进行逆转录。

1.3 *LIS*基因序列的克隆

根据GenBank上发表的LIS氨基酸序列和核苷酸序列, 设计引物LIS-F和LIS-R(表2), 以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应条件为: 94 ℃预变性5 min; 94 ℃变性30 s, 50 ℃退火30 s, 72 ℃延伸2 min, 35个循环; 72 ℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的片段并连接到载体pMD18-T(TaKaRa公司), 转化大肠杆菌DH5α(本实验室保

表1 用于表达分析所用小苍兰品种

Table 1 Freesia varieties for expression analysis

品种名称 Varieties	花色 Flower color	瓣型 Petaline type	香味 Floral scent	来源 Source
Jintong	Yellow	Double flower	Fragrant	Self-fertile strain
Ziyu	Purple	Single flower	Fragrant	Self-fertile variety
Xiangmei	Red	Double flower	Fragrant	Self-fertile variety
White Wing-2	White	Double flower	Fragrant	Introduced variety
Shuguang	Yellow	Single flower	Fragrant	Introduced variety

表2 小苍兰*LIS*基因克隆及表达分析所用引物

Table 2 Primers used to clone *LIS* genes in *Fressia* and analyze their expression

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	目的 Purpose
LIS-F	5′-ATG GCT CTC TTG CCG TGT-3′	For the cDNA of ORF
LIS-R	5′-TTA GAG GGG AAT GGG TTC-3′	
P1	5′-ATC CAG ATG TAG TAC GCC AGT C-3′	For the expression of *LIS*
P2	5′-AGT GCT ACC GAT TTC AGT GAT T-3′	
AC-F	5′-GAG CAT GGC ATT GTC AGC AAC T-3′	For the internal control
AC-R	5′-TGG CGT AGA GGG AAA GAA CAG C-3′	

存), 通过蓝白斑筛选及PCR扩增鉴定阳性克隆后进行测序(铂尚生物技术有限公司), 得到*LIS*的开放阅读框(open reading frame, ORF)。

1.4 生物信息学分析

利用NCBI网站的BLAST搜索相似序列, 通过BioXM预测该蛋白质的分子量和等电点, 使用ClustalX 1.81软件进行多重序列比对。

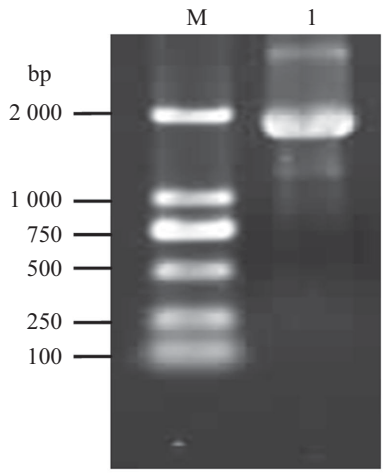
1.5 荧光定量PCR分析

根据已获得的*LIS*全长序列, 设计1对引物P1和P2(表2), 扩增长度为244 bp; 以小苍兰*actin* (AF069229)为内参, 应用引物AC-F和AC-R(表2), 扩增长度为220 bp, 荧光定量PCR进行扩增(7500, 美国ABI公司)。反应体系为: 12.5 μL Power SYBR Green PCR Master Mix, 正、反向引物各1 μL(10 μmol/L), 1 μL cDNA, 补ddH_2O至25 μL。反应程序为: 95℃预变性10 min; 95 ℃变性15 s, 56 ℃退火1 min, 72 ℃延伸1 min, 40个循环。每个样品3次取样, 每个反应3个重复, 采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析试验结果。

2 结果

2.1 *LIS*全长cDNA克隆

根据LIS蛋白质序列设计一对ORF扩增引物LIS-F和LIS-R, 以‘金童’花瓣cDNA为模板, 进行PCR, 获得约1 800 bp条带(图1), 目的片段胶回收测序结果为1 779 bp, 且包含完整的开放阅读框(ORF), 编码593个氨基酸, 预测的理论等电点为4.77, 分子量为146.11 kDa, GenBank登录号为KX452731。序列经BLASTp, 与参考蛋白质序列小苍兰(AFP23421)、姜(JN695016)和六出花(FR822739)有很高同源性, 氨基酸序列同源性分别为95%、56%和45%(图2)。初步认为, 它是小苍兰‘金童’*LIS*基因的ORF, 且含有萜类合酶的典型结构天冬氨酸富集模体(DDxxD)。



M: DNA标准分子量DL2000; 1: 开放阅读框(ORF)。

M: DNA marker DL2000; 1: open reading frame (ORF).

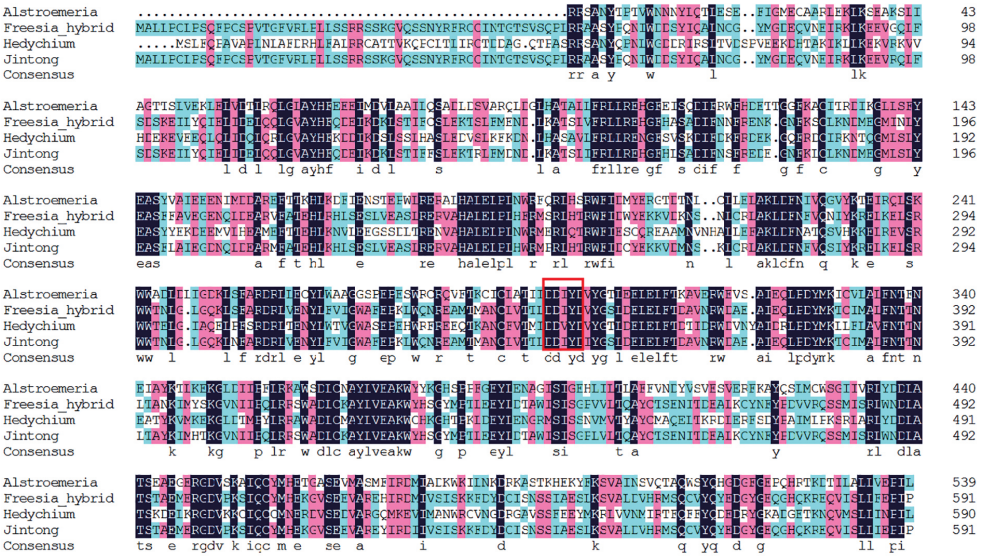
图1 小苍兰*LIS*基因的克隆

Fig.1 Clone of *LIS* gene in *Freesia*

利用MEGA 4.0软件对小苍兰‘金童’LIS编码的蛋白与其他植物的单萜合酶氨基酸序列进行进化关系分析, 对包括‘金童’在内的12个单萜合酶的氨基酸序列构建系统进化树(图3)。结果显示, 小苍兰‘金童’LIS与单子叶植物的单萜合酶亲缘关系较近, 聚为一类, 而与双子叶植物为不同分支, 亲缘关系较远。

2.2 *LIS*基因表达的分析

以小苍兰*actin*为内参, 用荧光定量PCR技术检测*LIS*在小苍兰不同花发育阶段、不同组织及不同品种的表达分析。结果表明, *LIS*从蕾期开始表达量逐渐增加, 到花蕾后期及始花期达到最高(图4)。在不同组织中表达分析结果表明, *LIS*在花瓣中表达量最高, 其次是雄蕊、雌蕊、叶片。对5个品种花瓣中的表达进行分析比较, 结果显示, 在White Wing-2中表达量最高。



方框部分为DDxxD模。

The box parts indicate DDxxD motif.

图2 小苍兰LIS氨基酸同源性分析

Fig.2 Homology analysis of LIS in *Freesia*

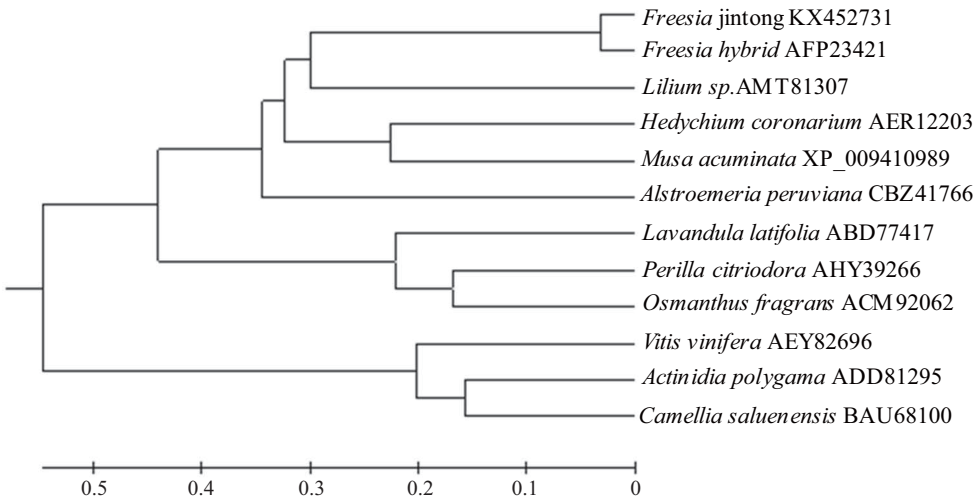


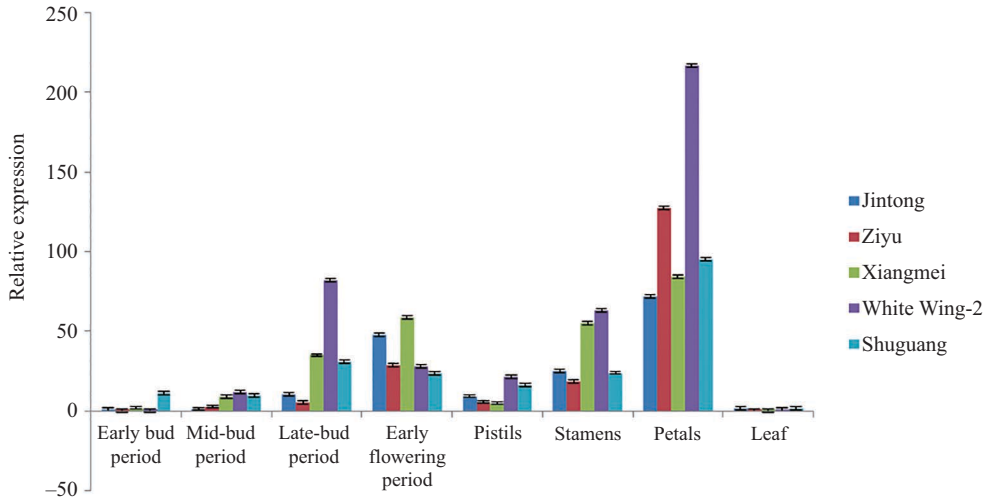
图3 小苍兰LIS与其他植物单贴合酶氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of LIS in *Freesia* with other plant of monoterpene synthases

3 讨论

花香是评价观赏花卉的重要特征, 萜类被认为是花香中重要的挥发物成分[23-24]。植物中的萜类化合物具有多样性特征, 即一种植物中可能存在多种萜类。Aubourg等[25]对拟南芥的基因组序列分析发现, 在40种萜烯类合酶基因中, 有30种在基因结构和序列相关性具有相似性, 可能是在进化过程中发生基因的细微变化, 从而导致结构和功能的改变。近期研究表明, 几乎所有的萜类合酶都含有一个天冬氨酸富集模体(DDxxD), 这个模体被认为具有结合金属离子的作用[26], 是萜类合酶的一个典型结构。本研究通过RT-PCR获得的小苍兰合酶基因含有典型的DDxxD。

LIS是萜类化合物生物合成的重要酶, 一步反应可生成挥发性物质芳樟醇[20]。仙女扇的*LIS*基因在柱头、雄蕊和花瓣中表达, 在叶片和花萼中不表达; 并且在花发育的整个过程都有表达, 在花蕾后期表达量最高[27]。唐丽等[28]对金桂的研究中表明, *LIS*在雌蕊、雄蕊和花瓣中表达, 在叶片和花萼中不表达。本研究通过荧光定量PCR的方法对小苍兰不同组织中*LIS*表达情况进行分析, 发现小苍兰花瓣中*LIS*表达量最高, 其次是雌蕊和雄蕊, 在叶片中表达



柱状图表示5个小苍兰品种(金童、紫玉、香玫、White Wing-2、曙光)在不同花发育时期(花蕾前期、花蕾中期、花蕾后期、始花期)及不同组织部位(雌蕊、雄蕊、花瓣、叶片)的表达水平。*actin*为对照基因。每个样品3次取样, 每个反应3个重复。

The measurements represent the expression level of five varieties of *Freesia* (Jintong, Ziyu, Xiangmei, White Wing-2 and Shuguang) in different growth periods of flowering (early bud period, mid-bud period, late-bud period and early flowering period) and different tissues(pistils, stamens, petals and leaf). The level of each gene is relative to that of *actin*. Three sampling each sample, three technical replicates each reaction.

图4 *LIS*在小苍兰不同品种中的表达

Fig.4 Expression of *LIS* in different varieties of *Freesia*

量最低; 并对其花发育过程中的表达情况进行分析发现, 在始花期*LIS*表达最高, 且5个品种的表达情况表现高度一致。又有研究表明, 芳樟醇是小苍兰花香的主要成分[21-22], 说明*LIS*在小苍兰挥发性物质释放过程中起着重要作用。我们在研究不同品种时发现, 在White Wing-2中*LIS*表达量显著高于其他品种, 这为进一步筛选花香浓郁新品种提供参考。

参考文献 (References)

1 Tholl D, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, Pichersky E, *et al*. Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. Plant Cell 2004; 16(4): 977-92.

2 Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, *et al*. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. Plant Physiol 2004; 135(4): 1993-2011.

3 Dudareva N, Pichersky E. Metabolic engineering of floral scent of ornamentals. J Crop Improv 2006; 18: 325-46.

4 Facchini PJ, Chappell J. Gene family for anelicitor-induced sesquiter pene cyclase in tobacco. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(22): 11088-92.

5 Degenhardt J, Kollner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiter pene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry 2009; 70(15/16): 1621-37.

6 Dudareva N, Cseke I, Blanc VM, Pichersky E. Evolution of floral scent in Clarkia: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. Plant Cell 1996; 8(7): 1137-48.

7 Dudareva N, Martin D, Kish C M, Kolosova N, Gorenstein N, Faldt J, *et al*. (E)-13-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new TPS-subfamlly. Plant Cell 2003; 15(5): 1227-41.

8 Masumoto N, Korin M, Ito M. Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. Phytochemistry 2010; 71(10): 1068-75.

9 Demissie ZA, Sarker LS, Mahmoud SS. Cloning and functional characterization of β-phellandrene synthase from *Lavandula angustifolia*. Planta 2011; 233(4): 685-96.

10 Aros D, Gonzalez V, Allemann RK, *et al*.Volatile emissions of scented *Alstroemeria* genotypes are dominated by terpenes, and a myrcene synthase gene is highly expressed in scented *Alstroemeria* flowers. J Exp Bot 2012; 63(7): 2739-52.

11 Knudsen ET, Tollsten L. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: Floral scent composition in moth-pollinated taxa. Bot J Linn Soc 1993; 113: 263-84.

12 Paré PW, Tumlinson JH. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. Plant Physiol 1997; 114(4): 1161-7.

13 Shulaev V, Silverman P, Raskin I. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 1997; 368(6626): 738.

14 Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products: Secondary metabolites/biochemistry and molecular biology of plants. Biochem Mol Biol Plants 2000: 1250-318.

15 Yonekura-Sakakibara K, Saito K. Functional genomics for plant natural product biosynthesis. Nat Prod Rep 2009; 26(11): 1466-87.

16 Chen X, Yauk YK, Nieuwenhuizen NJ, Matich AJ, Wang MY. Characterisation of an (S)-linalool synthase from kiwifruit (*Actinidia arguta*) that catalyses the first committed step in the production of floral lilac compounds. Func Plant Biol 2010; 37(2): 232-43.

17 刘晶晶, 王富民, 刘国峰, 贺志荣, 杨 华, 韦朝领, 等. 茶树萜类

香气物质代谢谱与相关基因表达谱时空变化的关系. 园艺学报(Liu Jingjing, Wang Fumin, Liu Guofeng, He Zhirong, Yang Hua, Wei Chaoling, *et al*. Correlation between spatiotemporal profiles of volatile terpenoids and relevant terpenoid synthase gene expression in *Camellia sinensis*. Acta Horticulturae Sinica) 2014; 41(10): 2094-106.

18 Pichersky E, Raguso RA, Lewinsohn E, Croteau R. Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae): I. localization and developmental modulation of monoterpene emission and linalool synthase activity. Plant Physiol 1994; 106(4): 1533-40.

19 李天娇, 冷平生, 杨 凯, 郑 健, 胡增辉. 百合单萜合成酶基因的克隆与序列分析. 北京农学院学报(Li Tianjiao, Leng Pingsheng, Yang Kai, Zheng Jian, Hu Zenghui. Molecular cloning and characterization of monoterpene synthase gene in Lilium flowers. Journal of Beijing University of Agriculture) 2014, 29(3): 6-10.

20 樊荣辉, 黄敏玲, 钟淮钦, 吴建设, 叶秀仙. 花香的生物合成、调控及基因工程研究进展. 中国细胞生物学学报(Fan Ronghui, Huang Minling, Zhong Huaiqin, Wu Jianshe, Ye Xiuxian. Adavances in biosynthesis, regulation and genetic engineering of floral scent. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(9): 1028-36.

21 任雪冬, 程光荣, 王永明. 顶空萃取–气相色谱–质谱法分析香雪兰的挥发性成分. 质谱学报(Ren Xuedong,Cheng Guangrong, Wang Yongmin. AnaIysis of volatile flavor components in *Freesia refacta* by headspace extraction GC/MS. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society) 2007; 28(2): 83-6.

22 刘宝峰, 高丰展, 房 强, 王 丽. 间接顶空固相微萃取–气相色谱–质谱法对红花香雪兰天然花香成分的分析. 分析化学(Liu Baofeng, Gao Fengzhan, Fang Qiang, Wang Li. Determination of red Freesia flower volatiles with indirect headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography and mass spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry) 2016; 44(3): 444-50.

23 Yu FN, Utsumi R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono and sesquiterpenoid biosynthesis. Cell Mol Life Sci 2009; 66(18): 3043-52.

24 Fhnrich A, Krause K, Piechulla B. Product variability of the cineole cassette′ monoterpene synthases of related Nicotiana species. Mol Plant 2011; 4(6): 965-84.

25 Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. Mol Genet Genomics 2002; 267(6): 730-45.

26 Sacchettini JC, Pouher CD. Creating isoprenoid diversity. Science 1997; 277(5333): 1788-9.

27 Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E. Evolution of floral scent in Clarkia: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. Plant Cell 1996; 8(7): 1137-48.

28 唐 丽, 唐 芳, 段经华, 刘友全, 钟秋平. 金桂芳樟醇合成酶基因的克隆与序列分析. 林业科学(Tang Li, Tang Fang, Duan Jinghua, Liu Youquan, Zhong Qiuping. Cloning and sequence analysis of a homologous linalool synthase gene involved in floral scents in *Osmanthus fragrans* var. thunbergii. Scientia Silvae Sinicae) 2009; 45(5): 11-9.