

# 烟草重要基因篇：5. 烟草香气物质合成代谢相关基因

吕 婧

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

烟草中的香气物质是烟草植株体内形成的一类次生代谢产物, 目前按照致香功能团可分为酸类、醇类、酮类、醛类、酯类、酚类等<sup>[1]</sup>, 其中对烟草香气贡献最大的3类物质分别为多酚类化合物、萜类化合物以及生物碱。近年来, 随着分子生物学、生物化学、生物信息学等学科的发展, 有关这3类物质合成途径中的关键酶基因研究也渐渐深入。

## 1 多酚类化合物相关合成基因

目前在烟草中已发现的酚类包括单宁类、香豆素类、黄酮类、花色素类、简单酚衍生物等, 这些酚类物质通过苯丙烷类代谢途径生成, 广泛地参与调节生长发育、授粉识别和生物防御等各种生理活动<sup>[2]</sup>。其代谢途径关键酶主要有苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮异构酶(CHI)、香豆酸-3-羟化酶(C3H)、咖啡酸-O-甲基转移酶(COMT)、咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(CCoAOMT)、阿魏酸-5-羟化酶(F5H)和肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)等<sup>[3]</sup>。PAL 是苯丙烷类代谢途径中的限速酶和关键酶, 目前已从普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中得到6条基因序列, 平均长度为3747 bp<sup>[4]</sup>; Nagai 等发现, 在普通烟草(Bright Yellow T-13)细胞培养物中加入激动素可以增强 PAL 的活性, 该试验之前在菜豆中已得到证实<sup>[5]</sup>, Nagai 等<sup>[6]</sup>因此从普通烟草中克隆出 PAL 全长 cDNA; Reichert 等<sup>[7]</sup>从普通烟草中克隆到的4个 PAL 基因可以在多个器官中共表达, 并且可同时被酵母诱导子和茉莉酮酸甲酯所诱导。C4H 是苯丙烷途径的第2个关键酶, 属于细胞色素单加氧酶 P450 超家族成员, 其表达活性受不同因素(光照、病害、机械损伤等)影响, 并与木质素合成密切相关<sup>[8]</sup>, Szatmari 等<sup>[9]</sup>对普通烟草做逆境处理, 挑选文库做随机测序, 得到 C4H 基因相关的 EST 序列, 其功能有待进一步深入研究。4CL 属于木质素生物合成关键酶之一, 它作用于苯丙酸途径中最后一步反应, 是苯丙酸途径与木质素特异合成途径的转折点<sup>[10]</sup>; Lee 等<sup>[11]</sup>从普通烟草 cDNA 文库中得到编码 4CL 的 cDNA 克隆, 通过 Northern 杂交显示其 mRNA 在茎中表达量最大。Nishihara 等<sup>[12]</sup>在普通烟草花瓣中克隆得到 CHI 基因, 通过 RNA 干扰发现植株花色素减少、花瓣中黄酮类物质含量发生改变并且花粉中查尔酮大量累积, 该结果首次证明高等植物中采用转基因手段抑制 CHI 表达的可行性, 证实 CHI 基因在查尔酮环化生成黄烷酮的合成代谢途径中起着重要作用。

参与苯丙烷代谢途径的酶多种多样, 这些酶系活性的变化、中间产物及其进一步转化的产物同植物发育、对病原菌侵染的抗性以及色素的形成等生理活动有着密切的关系<sup>[13]</sup>, 陈爱国等<sup>[14]</sup>发现 PAL、C4H、4CL 活性和多酚总量在普通烟草适熟采收时最高, 多酚生物合成积累的主要影响酶是 C4H。目前在烟草中许多参与苯丙烷代谢途径的关键酶基因还未得到, 已克隆基因所在代谢网络的上下游调控机制还需更深入的探讨。

## 2 萜类化合物合成相关基因

烟草中的萜类化合物主要包括单萜、二萜和四萜, 单萜化合物有柠檬醛、薄荷醇、香叶醇等, 是烟草叶面挥发物的主要组成成分<sup>[10]</sup>; 二萜化合物包括新植二烯、类西柏烷类和赖百当类; 四萜化合物中类胡萝

卜素不仅决定调制后烟叶的颜色,其降解产物中的许多物质(大马酮、紫罗兰酮、巨豆三烯酮、二烯猕猴桃内酯等)是烟叶中重要的致香物质<sup>[15]</sup>。这些萜类物质可分别由甲基赤藓醇 4-磷酸途径(MEP)和甲羟戊酸途径(MVA)途径 2 条独立途径生成<sup>[16]</sup>。现已确定,MEP 途径的酶由核基因组编码并进入质体,而 MVA 途径的酶分布于不同的亚细胞间隔中。当野生型植株的 MVA 途径或者 MEP 途径上某种代谢酶的表达受到特异性抑制剂处理而产生无效突变体时,都会导致植株发育阻碍和苗期致死,说明单独一条代谢途径的失效无法被其余途径所弥补<sup>[17]</sup>。MEP 和 MVA 代谢途径关键酶主要有羟甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)、甲羟戊酸激酶(MK)、5-磷酸脱氧木酮糖合成酶(DXS)、5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)、4-磷酸-2C-甲基赤藓糖醇-4-胞苷焦磷酸合成酶(CMS)等。HMGR 催化羟甲基戊二酰 CoA 生成甲羟戊酸,属于 MVA 代谢途径的关键调节步骤,是萜类合成途径中第 1 个限速酶<sup>[18]</sup>,Crevenat 等从普通烟草愈伤组织中克隆了 3 条 *HMGR* 的 cDNA 序列(GenBank 登录号 AF004232.1、AF004233.1 和 U60452.1),平均长度为 2419 bp。MK 是控制整个甲羟戊酸途径的限速酶之一,目前中国农业科学院烟草研究所已经从林烟草(*Nicotiana sylvestris*)中克隆了一条 MK cDNA 全长序列(GenBank 登录号 KC871597)。在普通烟草中已发现 3 条 DXS 相关序列(GenBank 登录号 AJ291721.1、FN429979.1 和 EU650419.1),全长 2386 bp。在普通烟草中已克隆一条全长 1804 bp 的 DXR 序列(GenBank 登录号 DQ839130.1)。中国农业科学院烟草研究所已经从林烟草中克隆了一条 CMS 的 cDNA 全长序列(GenBank 登录号 KC961733.1),表达分析证实,该基因在叶片中表达量最大。类异戊二烯是自然界广泛存在、具有重要经济价值的一类天然化合物。相关过表达试验发现,MEP 途径由数个酶共同控制着代谢流,而 MVA 途径则有着单一的调控步骤。目前通过分子生物学、生物信息学等手段研究有关类异戊二烯合成途径已经取得了较大进展,针对植物细胞进行改良的代谢工程在增加萜类产量与改变萜类分布方面影响显著,可有效地提升植物风味、改变颜色<sup>[19]</sup>。

### 3 生物碱合成相关基因

普通烟草栽培品种中主要有烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱 4 种生物碱,其中烟碱的含量最高,这些生物碱分别由不同代谢途径生成。目前有关莨菪碱、烟碱和黄连素生物合成途径的相关基因已有克隆,同时两条分支代谢途径的关键酶已用于代谢工程,它们分别为:颠茄与林烟草转基因植株中的腐胺-N-甲基转移酶(PMT)、黄连与加州罂粟花悬浮细胞中的(S)-斯氏紫堇碱-9-O-甲基转移酶(SMT)的表达已用于代谢工程<sup>[20]</sup>。PMT 被认为是烟碱合成的限速酶,催化二胺腐胺甲基化生成 N-甲基腐胺。Winz 和 Baldwin<sup>[21]</sup>对渐窄叶烟草(*Nicotiana attenuata*)茎和根做甲基茉莉酮酸酯处理 10 h 后,根部 PMT 的转录本与烟碱含量急剧增加,同时根部施用乙烯利会抑制该反应,从而推断耐烟碱的昆虫攻击会引起渐窄叶烟草产生乙烯,直接抑制烟碱的氮合成。SMT 属于腺苷蛋氨酸(SAM)依赖的 O-甲基转移酶家族,烟碱含量的高低对烟草产品的质量起着重要的作用,有关代谢途径中限速关键酶仍是未知,目前已有调控烟碱以及亚硝酸胺表达水平的相关专利<sup>[22]</sup>。

### 4 问题与展望

目前利用基因工程手段对香气代谢途径的调控还存在着以下问题:研究涉及的非模式植物已分离基因数目较少、一些关键酶的作用机制仍存在争议、三种生物合成途径中的相关酶含量少难以检测等。在已经克隆得到的关键酶基因序列中,利用转基因手段分析香气物质变化的研究少见报道。任民<sup>[23]</sup>利用 SSR 和 TRAP 标记对高香气普通烟草进行了遗传定位研究,发现烟草高香气特征性状属于孟德尔显性质量遗传,筛选到一个距离高香气性状 8.37cM 的 SSR 标记。由于酶和底物具有多样性,烟草香气品质的改良未来可

以通过同时转入多条关键酶基因,以期获得高香气表达的烟草品种。未来的研究重点可以从进一步补充、完善香气物质代谢合成途径及其网络,明确各网络之间的联系和媒介,开展关键酶基因的克隆、表达分析和调控机制以及在不同时空表达的调控因子等方面开展。同时分离相关启动子,实现各种香气成分在特定时间和部位中的高效表达,为改良烟草香气品质、开发和利用香气化合物提供诱人的前景。

### 参考文献

- [1] Wu L, He Z, Wu Y, et al. Evaluation of aroma components in Chinese southwest tobacco by headspace gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25(16): 8853-8858.
- [2] 尹珍,周冀衡,左敏,等.不同成熟度对上部烟叶中性香气物质的影响[J].*南方农业学报*,2013,44(5):760-764.
- [3] Durbin M L, McCaig B, Clegg M T. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome [M]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 79-92.
- [4] Goro T, Manisha S, Keiichi G, et al. Effect of methyl jasmonate and elicitor on PAL gene expression in tobacco cultured cells [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 1998, 7: 79-84.
- [5] Edwards K, Cramer C L, Bolwell G P, et al. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 6731-6735.
- [6] Nagai N, Kitauchi F, Shimosaka M, et al. Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from tobacco cell culture [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1091-1092.
- [7] Reichert A I, He X Z, Dixon R A. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes [J]. *Biochem J*, 2009, 424: 233-242.
- [8] Sewalt V, Ni W, Bloubt J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 41-50.
- [9] Szatmari A, Ott P G, Varga G J, et al. Characterisation of basal resistance (BR) by expression patterns of newly isolated representative genes in tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 728-740.
- [10] Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5407-5412.
- [11] Lee D, Douglas C J. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) gene family (cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins) [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 193-205.
- [12] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 6074-6078.
- [13] 闻刚,赵铭钦,李小勇,等.烤烟生长过程中多酚及相关酶活性的动态变化[J].*江西农业学报*,2013,25(2):98-100.
- [14] 陈爱国,彭东,陈向东,等.烤烟苯丙烷代谢中相关酶活性和多酚产物的关系研究[C]//山东植物生理学会第七次代表大会暨植物生物学与现代农业研讨会论文集,2012.
- [15] Matsuba Y, Nguyen T T, Wiegert K, et al. Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 2022-2036.
- [16] Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 1401-1426.
- [17] Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M. New insights into plant isoprenoid metabolism [J]. *Mol Plant*, 2012, 5: 964-967.
- [18] Choi D, Ward B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1333-1344.
- [19] Roberts S C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 387-395.
- [20] Lisko J G, Stanfill S B, Duncan B W, et al. Application of GC-MS/MS for the analysis of tobacco alkaloids in cigarette filler and various tobacco species [J]. *Anal Chem*, 2013, 85: 3380-3384.
- [21] Winz R A, Baldwin I T. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransferase transcripts [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 2189-2202.
- [22] Conkling M A. Modifying nicotine and nitrosamine levels in tobacco [M]. Google Patents, 2005.
- [23] 任民.烟草 (*N. tabacum* L.) 高香气特征性状的鉴定及其分子标记研究 [D]. 北京:中国农业科学院,2008.