

烟草苯丙烷代谢途径关键酶肉桂酸-4-羟化酶、4-香豆酸-辅酶 A 基因的分离及表达特性分析

于利^{1,2}, 张彦¹, 陈爱国¹, 梁洪波¹, Qamaruddin Jogi^{1,2}, 徐文玲³, 许娜¹

(¹中国农业科学院烟草研究所/农业部烟草生物学与加工重点实验室/中国农业科学院青岛烟草资源与环境野外科学观测试验站/

烟草遗传改良与生物技术重点开放实验室, 青岛 266101; ²中国农业科学院研究生院, 北京 100081;

³青岛农业大学农学与植物保护学院, 青岛 266109)

摘要: 肉桂酸-4-羟化酶 (C4H)、4-香豆酸-辅酶 A (4CL) 是烟草苯丙烷代谢途径的关键酶, 其多酚类产物与烟草品质密切相关。本研究以酚类物质含量合成差异较大的 2 个烤烟品种红花大金元 (HD) 和 K326 为试验材料, 利用同源克隆技术获得这 2 种烟草 *Ntc4h* 和 *Nt4cl* 基因的 cDNA 序列并进行表达特性分析。结果表明, 在 2 个品种中 *Ntc4h* 和 *Nt4cl* 各有 2 个同源基因, *Ntc4h1*、*Ntc4h2*、*Nt4cl1* 和 *Nt4cl2* 的 ORF 长度分别为 1518 bp、1518 bp、1644 bp 和 1629 bp。*Nt4cl1*、*Ntc4h1* 和 *Ntc4h2* 在编码序列上存在品种间差异。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 该 2 种酶的基因在烟草中具有明显的时空表达特异性, 2 种酶基因在根、茎、叶、花和萼片中都有表达, 在茎的木质部和韧皮部中的表达量均显著高于其他组织; 在圆顶期和适熟期表达水平较高, 在适熟期达到最高; 且两品种中的表达模式存在差异。

关键词: 烟草; 肉桂酸-4-羟化酶 (C4H); 4-香豆酸-辅酶 A (4CL); 基因分离; 表达分析

Isolation and Expression Analysis of *Ntc4h* and *Nt4cl* Encoding the Key Enzymes of Phenylalanine Metabolism Pathway in Tobacco

YU Li^{1,2}, ZHANG Yan¹, CHEN Ai-guo¹, LIANG Hong-bo¹, Qamaruddin Jogi^{1,2}, XU Wen-ling³, XU Na¹

(¹Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture/Qingdao Tobacco Resources and Environment Field Station of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tobacco Genetic Improvement and Biotechnology, Qingdao 266101; ²Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract: Cinnamic acid-4-hydroxylase (C4H) and p-coumaric acid-4-ligase (4CL) are the key enzymes in phenylpropanoid metabolic pathway, whose polyphenol products are corresponding to the quality of tobaccos. In the study, cDNAs of these two enzymes were obtained using homology-based cloning from variety honghua dajinyuan (HD) and variety K326, whose quantity of polyphenol products differed significantly and their expression profiles were analyzed by real time qRT-PCR. The results showed that *Ntc4h* and *Nt4cl* both had two homologous genes. The ORF length of *Ntc4h1*, *Ntc4h2*, *Nt4cl1*, and *Nt4cl2* was 1518 bp, 1518 bp, 1644 bp, and 1629 bp, respectively. According to the analysis, *Ntc4h1*, *Nt4cl1*, and *Ntc4h2* showed different coding sequence in these two varieties. Real time qRT-PCR analysis showed that all the genes specifically expressed in a spatial and temporal manner and the expression profiles differed in two varieties. The genes all expressed in root, stem, leaf, flower, and sepal with the expression of xylem and phloem were higher than others. The expression in fast growing stage and technical maturity stage was higher than the others with the highest in technical maturity stage.

Key words: tobacco; phenylpropanoid metabolic pathway; Cinnamic acid-4-hydroxylase (C4H); Coumaric acid-4-ligase (4CL); gene isolation; expression analysis

收稿日期: 2013-11-27 修回日期: 2014-01-23 网络出版日期: 2014-03-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.20140312.003.html>

基金项目: 中国烟草总公司创新平台项目 (201211); 中国烟草总公司重大专项 (TS-06-20110038)

第一作者主要从事烟草生理生化研究。E-mail: yuyuli-2008@163.com

通信作者: 陈爱国, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: chenaiguo@caas.cn

酚类物质与烟叶等级、香吃味、安全性等密切相关,是优质烟重要的品质指标之一。酚类物质主要来源于苯丙烷代谢,关于植物苯丙烷代谢关键酶研究主要集中在园艺植物和药用植物生理生化方面^[1]。烟草中多酚类物质的形成和积累与苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、C4H (Cinnamic acid-4-hydroxylase)、4CL (ρ -coumaric acid-4-ligase)的活性密切相关。烟草中已有关于PAL的基因克隆和遗传多样性^[2]报道,而关于烟草C4H、4CL基因的研究较少。

C4H是第1个被鉴定的植物P450单加氧酶^[1,3],是细胞色素P450超家族CYP73A亚家族中的一员,催化反式肉桂酸转化为对羟基香豆酸。研究表明,至少已有50多种植物的C4H基因被克隆^[4]。该基因在植物体内多以小基因家族的形式存在^[5],棉花中存在2个同源基因^[6],甘蓝型油菜中则至少有13个^[7],但在拟南芥中只有1个^[8]。目前对C4H基因的研究仅限于甘蓝型油菜、亚洲棉、大豆中的基因克隆及生物信息学分析等^[7,9],而烟草中C4H的遗传组成、表达特征及作用模式的研究未见报道。4CL作用于苯丙烷代谢途径最后一步反应,以C4H酶的催化产物羟基香豆酸为底物,催化其生成相应的硫酯,这些硫酯处于苯丙烷代谢途径和各种末端产物特异合成途径的分支点,是烟草酚类物质合成的控制关键点。研究表明,拟南芥4CL由3个基因编码,即*At4cl1*、*At4cl2*、*At4cl3*,*At4cl1*、*At4cl2*可能参与木质素的生物合成以及除类黄酮以外的酚类物质合成,*At4cl3*可能参与类黄酮的生物合成^[8]。从荷兰芹中分离出的4CL基因及启动子,可在植物茎中特异表达^[10]。4CL的编码基因已在慈竹、丹参、大豆、荷兰芹等植物中分离获得^[11-12],对4CL与木质素关系的研究较多,但其在烟草中的遗传组成及表达特异性方面尚无报道。

多酚类物质数量和组分的差异具有定量遗传的特点^[13],本实验室前期研究表明,苯丙烷代谢途径中的主要酶活性与多酚总量均存在品种间差异并呈正相关性,HD的C4H和4CL活性在旺长期和适熟期均显著高于K326,且HD的酚类物质含量显著高于K326^[14]。本试验以筛选出的多酚类物质含量差异明显的2个品种HD和K326为材料,分离克隆苯丙烷代谢调控点的关键酶基因*Ntc4h*和*Nt4cl*,并研究其品种间的表达特性差异,为多酚类产物的定向调控提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

HD和K326种子系中国农业科学院烟草研究所遗传育种中心提供,种植于中国农业科学院烟草所育种楼温室。质粒载体Peasy™-T5、EasyPure™ Plant RNA Kit RNA提取试剂盒、PCR聚合酶、感受态细胞Trans1-T1、Transcript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix等均购自北京全式金生物有限公司。菌液均送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草总RNA的提取及cDNA的合成 利用试剂盒提取试验材料的总RNA,用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,将提取的1 μ g总RNA反转录成cDNA。cDNA合成体系的总体积为20 μ L,反应条件及过程为:总RNA和0.5 μ g/ μ L的Anchored Oligo (dT)₁₈混合,同时加入10 μ L的2 \times TS Reaction Mix、1 μ L的Transcript RT,加RNase-free water至20 μ L;反应条件为42℃孵育30 min;85℃加热5 min失活Transcript RT。

1.2.2 *Ntc4h*、*Nt4cl*基因的克隆 根据NCBI数据库搜索到*Ntc4h1*(序列号:DQ350352)和*Ntc4h2*(序列号:DQ350353),*Nt4cl1*(序列号:U50845)和*Nt4cl2*(序列号:U50846)的序列信息,利用Primer 5软件在5'-UTR和3'-UTR处设计特异性引物(表1),引物由华大基因测序公司合成。RT-PCR为25 μ L反应体系,包括cDNA 1 μ L, *Taq* DNA Polymerase 0.15 μ L, 10 \times TransStart™ Buffer 2.5 μ L, 2.5 mM dNTPs 2 μ L,上下游引物各加0.5 μ L, ddH₂O 18.35 μ L。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s, 58~60℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 35~40个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后,分离PCR产物。切胶回收,将回收产物与Peasy™-T5载体连接,反应条件为25℃水浴20 min。将连接产物转化于大肠杆菌感受态细胞Trans1-T1,菌液过夜培养后挑选具有卡那霉素抗性的单克隆利用通用引物M13(表1)进行阳性重组子鉴定。将鉴定好的菌液送华大测序。

1.2.3 *Ntc4h*、*Nt4cl*基因的生物信息学分析 利用DNAMAN、Primer 5、Lasergene等软件以及烟草基因组网站对测序结果进行生物信息学分析,包括相似性比较、蛋白序列预测及性质分析、功能域预测等。

1.2.4 *Ntc4h*、*Nt4cl*基因在烟草中的表达特性分析 实时荧光定量PCR采用Transgen TOP Green kit

试剂盒(Transgen 公司),反应体系及反应参数均按试剂盒说明书进行。采用 7500 System software 和 ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪进行分析。相对定量数据计算参照基因 ΔCt 法,确定在该荧光阈值下特定的循环数 Ct 值,根据 Ct 值计算各样品的相对表达量 C , $C = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{18S})_{Sx} - (Ct_{Target} - Ct_{18S})_{S1}$, Sx 代表目的样品,

表 1 试验中所采用的引物及序列

Table 1 Primers and sequences used in the study

基因名称 Gene name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	功能 Function	基因名称 Gene name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	功能 Function
C4H1 F3	ACCGTACCAAAACACCAATTTCTC	cDNA 克隆引物	C4H1 - up	CATTGGAAGAAACCCGAAGAG	荧光定量引物
C4H1 R3	TCGCCCTTAATATCCAACACTATCA	cDNA 克隆引物	C4H1 - dn	GCAAGTATAATTCAGGGCAG	荧光定量引物
C4H2 F1	TCATTTCCCTTGTCCTCCAAAAATG	cDNA 克隆引物	C4H2 - up	GCTTGGCGGGTTTGATATTC	荧光定量引物
C4H2 R1	TAGGATCAGAAAGTTCAGCAAGAC	cDNA 克隆引物	C4H2 - dn	AACGTGCTTCTCTCTTCG	荧光定量引物
4CL1UTLF2	CACAATGCCAATGGAGACTACTA	cDNA 克隆引物	4CL1 - up	GCGCTTCATATTTAGGAGCC	荧光定量引物
4CL1UTLR2	GTTACCACCATCAAATACCAAGC	cDNA 克隆引物	4CL1 - dn	CCTTCACTTTGCCACAAG	荧光定量引物
4CL2UTLF2	GCTCTTAGCGTGCCATTTTTC	cDNA 克隆引物	4CL2 - up	GGCCATTGCTAAGAGTCCTAT	荧光定量引物
4CL2UTLR2	TGGCGAACTGGTTATAGTTATTGC	cDNA 克隆引物	4CL2 - dn	GCATTAGGAAATTTGGCTCGA	荧光定量引物
M13F	TGTAACACGACGGCCACT	鉴定所用引物	AQNb18S - 1	GATCAGATACCGTCCTAGTC	荧光定量引物
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	鉴定所用引物	SQNb18S - 2	CCCGGAACCCAAAACCTTTG	荧光定量引物

1.2.5 成熟期烟草不同叶片部位的 C4H、4CL 酶活性测定 肉桂酸-4-羟化酶(C4H)和香豆酸-4-连接酶(4CL)活性测定参照陈爱国等^[14] 苯丙烷关键酶活性的测定方法。C4H 活性的测定波长为 340 nm。OD 值每 1 h 变化 0.01 为一个酶活性单位(U),酶活性表示为 U/mg · prot · h。4CL 活性的测定波长为 333 nm。OD 值每 1 h 变化 0.0001 为一个酶活性单位(U),酶活性表示为 U/mg · prot · h。

2 结果与分析

2.1 Ntc4h、Nt4cl 基因的获得及序列分析

分别以 HD 和 K326 苗期叶片的 cDNA 为模板,采用相应引物利用 RT-PCR 技术获得扩增产物(图 1),片段大小与预期结果相符。根据 5'端 3'端以及中间片段的重叠区,利用 DNAMAN 软件将扩增产物的测序结果进行序列拼接,获得全长序列。测序结果表明,Ntc4h 和 Nt4cl 在烟草中各有 2 个同源基因。运用 Lasergene 软件对测序结果进行 ORF 的提取并进行大小统计,Nt4cl1 的长度为 1644 bp,Nt4cl2 长度为 1629 bp,Ntc4h1 和 Ntc4h2 的长度均为 1518 bp,4 个基因在两品种间长度无差异。运用 Lasergene 软件对各基因进行蛋白序列预测,氨基酸

S1 代表参照样品。

分别对 HD、K326 两烟草品种成熟期的根、叶、花、萼片、韧皮部和木质部进行组织表达特性分析。根据克隆得到的 C4H 和 4CL 序列及持家基因 18S 设计表达引物(表 1)。对同一基因同一组织的表达量进行不同品种的显著性分析。同时,利用 SPSS 数据处理系统软件进行差异显著性分析。

个数及分子量大小见表 2。

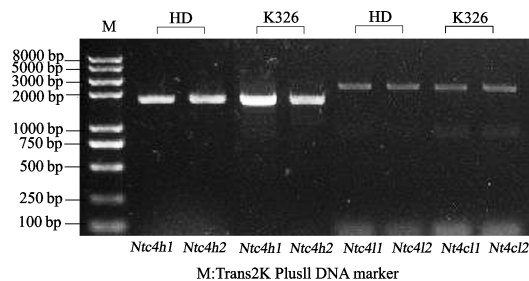


图 1 两品种 Ntc4h 和 Nt4cl 基因的 RT-PCR 扩增结果
Fig. 1 Amplification results of Ntc4h and Nt4cl genes from two varieties by RT-PCR method

表 2 Ntc4h 和 Nt4cl 基因蛋白序列预测及大小比较
Table 2 Comparison and prediction of protein sequence of Ntc4h and Nt4cl

基因 Gene	分子量(D) Molecular weight		氨基酸个数 No. of amino acids	
	HD	K326	HD	K326
Nt4cl1	59842.47	59842.47	547	547
Nt4cl2	59410.89	59410.89	542	542
Ntc4h1	58190.96	58157.75	505	505
Ntc4h2	58181.85	58209.90	505	505

通过 DNAMAN 软件对测序结果进行相似性分析,同一品种同一基因间核酸序列上存在差异。在 HD 中 *Ntc4h* 间相似性为 97.23%,*Nt4cl* 间相似性为 82.26%。在 K326 中 *Ntc4h* 间相似性为 97.30%,*Nt4cl* 间相似性为 82.67%;两品种间也存在差异,*Ntc4h1* 两品种间相似性为 99.87%,*Ntc4h2* 两品种间相似性为 99.93%,*Nt4cl1* 两品种间相似性为 99.52%,*Nt4cl2* 两品种完全相同。

2.2 *Ntc4h*、*Nt4cl* 基因的二级结构预测

利用 NCBI 网站上的 CDD 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对保守域进行预测,*Nt4cl1* 和 *Nt4cl2* 的预测结果一致,都属于 4CL 超家族,具有 4-香豆酸-辅酶 A 连接酶的催化结构域以及关键活性位点。*Ntc4h1* 和 *Ntc4h2* 的预测结果一致,都属于 PLN02394 超家族,为细胞色素 p450 超家族,具有肉桂酸 4-羟基化酶活性。从基因序列分析,所得基因均具有生物学活性。

2.3 *Ntc4h*、*Nt4cl* 基因在不同组织器官中的表达分析

荧光定量 PCR 结果表明:HD 中 *Ntc4h1* 在木质部的表达水平最高,下部叶表达水平最低,整体表达情况为:木质部>韧皮部>根>萼片>中部叶>上部叶>花>下部叶,各组织间表达量相比,萼片和中部叶的表达量无显著差异,其他各组织间表达量差异有统计学意义(图 2A)。K326 中 *Ntc4h1* 在萼片的表达水平最高,上部叶最低,整体表达情况为:萼片>花>木质部>韧皮部>根>下部叶>中部叶>上部叶,各组织中根和下部叶表达量无显著差异,其他组织间表达量差异有统计学意义(图 2A)。在根、木质部、韧皮部、上部叶和中部叶,*Ntc4h1* 表达水平都是 HD 高于 K326,在下部叶、花和萼片中则相反,其中品种间萼片中的表达水平差异有统计学意义,HD 中的表现可能是由于芸香苷等类黄酮化合物相对偏多,作为产物反馈调节了 *Ntc4h1* 的表达水平(图 2A)。可见,*Ntc4h1* 在两品种中的表达模式不同,在两品种同组织中表达量也存在差异。

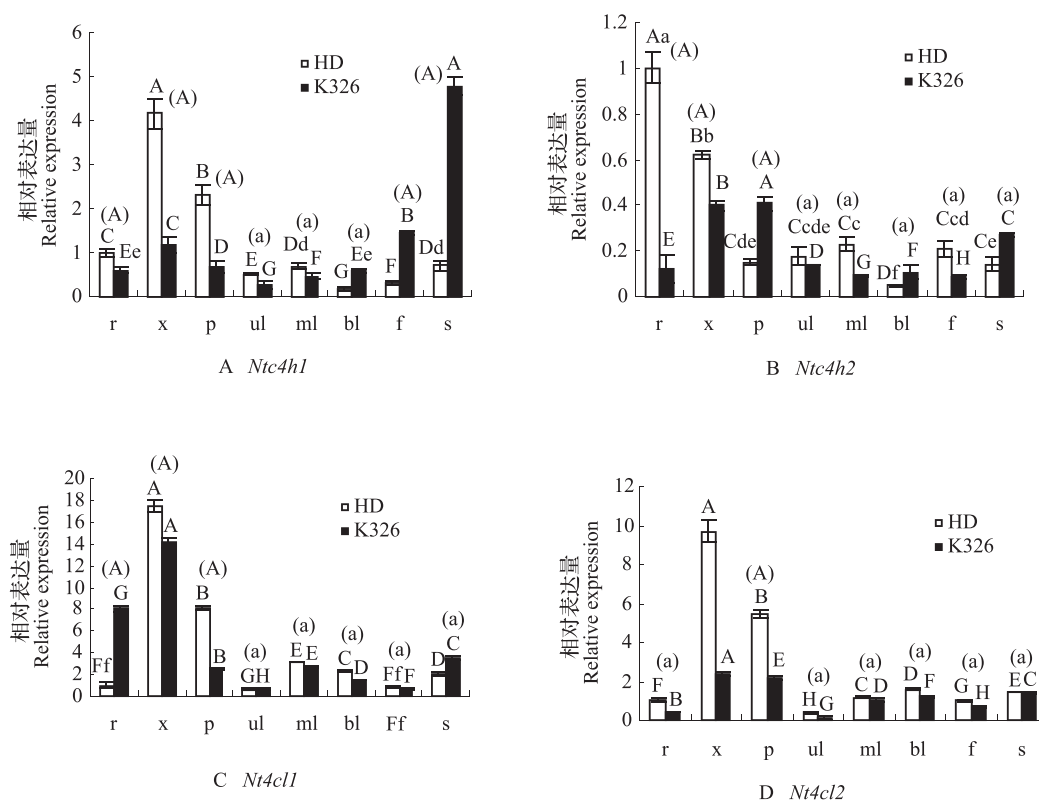
HD 中 *Ntc4h2* 在根部的表达水平最高,下部叶表达水平最低,整体表达情况为:根>木质部>中部叶>花>上部叶>韧皮部>萼片>下部叶,各组织中韧皮部、上部叶、中部叶、花和萼片的表达量相差不大,其他组织间表达量差异有统计学意义(图 2B)。K326 中 *Ntc4h2* 在韧皮部的

表达水平最高,在花中的表达水平最低,整体表达情况为:韧皮部>木质部>萼片>上部叶>根>下部叶>中部叶>花,各组织间表达量差异有统计学意义(图 2B)。在根、木质部、上部叶、中部叶和花中,*Ntc4h2* 表达水平都是 HD 高于 K326,在韧皮部、下部叶和萼片中则相反,并且在 HD 根中表达极显著高于 K326,可能是与 HD 根部的木质化早于 K326 的品种特性有关(图 2B)。可见,*Ntc4h2* 在两品种中的表达模式不同,在两品种同组织中表达量也存在差异。

HD 中 *Nt4cl1* 在木质部的表达水平最高,上部叶表达水平最低,整体表达情况为:木质部>韧皮部>中部叶>下部叶>萼片>根>花>上部叶,各组织中根和花的表达量差异不显著,其他组织表达量差异有统计学意义(图 2C)。K326 中 *Nt4cl1* 在木质部的表达水平最高,在花中的表达水平最低,整体表达情况为:木质部>根>萼片>中部叶>韧皮部>下部叶>上部叶>花,各组织间表达量差异有统计学意义(图 2C)。在木质部、韧皮部、中部叶、下部叶和花中 *Nt4cl1* 表达水平都是 HD 高于 K326,在根、上部叶和萼片中则相反(图 2C)。可见,*Nt4cl1* 在两品种中的表达模式不同,在两品种同组织中表达量也存在差异。

HD 中 *Nt4cl2* 在木质部的表达水平最高,上部叶表达水平最低,整体表达情况为:木质部>韧皮部>下部叶>萼片>中部叶>根>花>上部叶,各组织间表达量差异有统计学意义(图 2D)。K326 中 *Nt4cl2* 在木质部的表达水平最高,上部叶最低,整体表达情况为:木质部>韧皮部>萼片>下部叶>中部叶>花>根>上部叶,各组织间表达量差异有统计学意义(图 2D)。在各组织中 *Nt4cl2* 表达水平都是 HD 高于 K326(图 2D)。可见,*Nt4cl2* 在两品种中的表达模式不同,在两品种同组织中表达量也存在差异。

综上所述,*Ntc4h* 的 2 个同源基因在 HD 的不同组织中表达特征相似,在木质部和韧皮部中的表达量显著高于其他组织,*Nt4cl* 的 2 个同源基因在 HD 的不同组织中表达量的高低与 *Ntc4h* 的 2 个同源基因有同样表现,并且基本上呈现木质部的表达高于韧皮部的趋势。*Ntc4h*、*Nt4cl* 的各 2 个同源基因在 K326 不同组织表达量的趋势均不一致,而 *Ntc4h2*、*Nt4cl2* 在 K326 中都呈现出木质部和韧皮部的表达量要高于其他组织。



r:根;x:木质部;p:韧皮部;ul:上部叶;ml:中部叶;bl:下部叶;f:花;s:萼片。无括号字母表示不同组织器官间表达的差异比较,括号中字母表示两品种间表达的差异比较。大写字母表示在 $P < 0.01$ 水平上不同组织表达量极显著差异,小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上显著差异,下同
r: Root, x: Xylem, p: Phloem, ul: Up leaf, ml: Middle leaf, bl: Below leaf, f: Flower, s: Sepal. Letters without brackets represent difference comparison of expression in different issues. Letters in brackets represent difference comparison of expression in two varieties. Capital letters represent significant differences in different issues at $P < 0.01$. Cases letters represent significant differences in different issues at $P < 0.05$, the same as below

图2 *Nt4h1*、*Nt4h2*、*Nt4cl1* 和 *Nt4cl2* 在两品种不同组织中的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *Nt4h1*, *Nt4h2*, *Nt4cl1*, and *Nt4cl2* in different tissues of the two varieties

2.4 *Nt4h*、*Nt4cl* 基因在不同生育时期中部叶片中的表达分析

荧光定量 PCR 结果表明:*Nt4h1* 在 HD 和 K326 中不同生育期间的表达量差异较大,均达到极显著差异水平(图 3A),在圆顶期和适熟期的表达水平均显著高于旺长期(图 3A),*Nt4h1* 在两品种的表达模式基本相同。在旺长期和适熟期,HD 中 *Nt4h1* 的表达水平高于 K326(图 3A)。*Nt4h2* 在 HD 和 K326 中不同生育期间的表达模式与 *Nt4h1* 的表达特点相同(图 3B)。

Nt4cl1 在 HD 和 K326 不同生育期间的表达量存在较大差异(图 3C)。*Nt4cl1* 在圆顶期和适熟期的中部叶表达水平显著高于旺长期,在 HD 中圆顶期达到最高,在 K326 中适熟期表达水平最高(图 3C)。在圆顶期和适熟期,*Nt4cl1* 在 HD

中的表达水平高于 K326(图 3C)。*Nt4cl2* 在 HD 和 K326 不同生育期间的表达量差异较大(图 3D)。不同生育时期中,*Nt4cl2* 在 HD 的适熟期表达水平最高,旺长期的水平最低,而在 K326 的圆顶期表达水平最高,旺长期和适熟期表达水平较低(图 3D)。在适熟期 HD 中的表达水平高于 K326,其他时期 K326 的表达水平高于 HD(图 3D)。可见,*Nt4cl1* 和 *Nt4cl2* 在两品种不同生育时期的表达模式不同。

综上所述,*Nt4h* 的 2 个同源基因在两品种不同生育时期中部叶中表达特征相似,都是圆顶期和适熟期表达水平明显高于旺长期。*Nt4cl* 的 2 个同源基因在 HD 不同生育时期中都是圆顶期和适熟期表达水平明显高于旺长期,在 K326 中则没有这种显著表现。

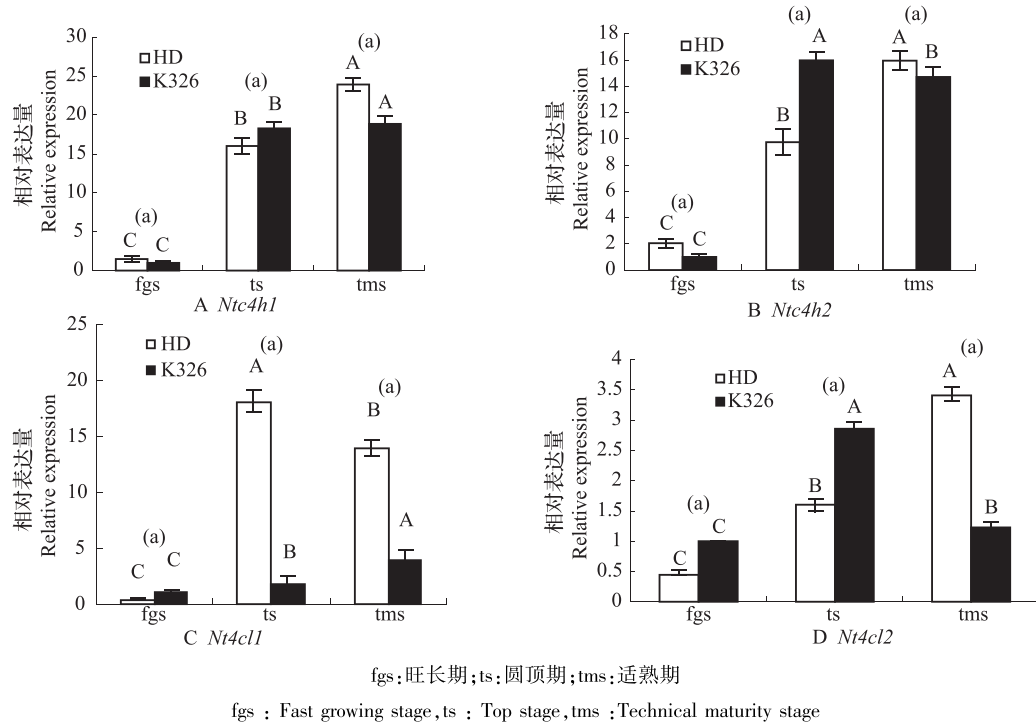


图3 *Ntc4h1*、*Ntc4h2*、*Nt4cl1* 和 *Nt4cl2* 在两品种不同生育时期的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *Ntc4h1*, *Ntc4h2*, *Nt4cl1*, and *Nt4cl2* in leaves of the two varieties at different growing stages

2.5 C4H、4CL 在 2 个烟草品种不同叶片部位的酶活性变化

由图 4A 可见,在适熟期 HD 中,C4H 活性大小表现为:中部叶 > 上部叶 > 下部叶。这与 *Ntc4h1*、*Ntc4h2* 在 HD 不同组织中的表达水平一致。在适熟期 K326 中,C4H 活性表现为:上部叶 > 下部叶 > 中

部叶。这与 *Ntc4h2* 在 K326 不同组织中的表达水平一致。在两品种中 C4H 活性均表现为 HD 高于 K326,这与 *Ntc4h1*、*Ntc4h2* 在不同组织中表达水平基本一致。由图 4B 可见,在适熟期 HD 和 K326 中,4CL 活性大小均表现为:中部叶 > 下部叶 > 上部叶,这与 *Nt4cl1* 在不同组织中表达水平一致。

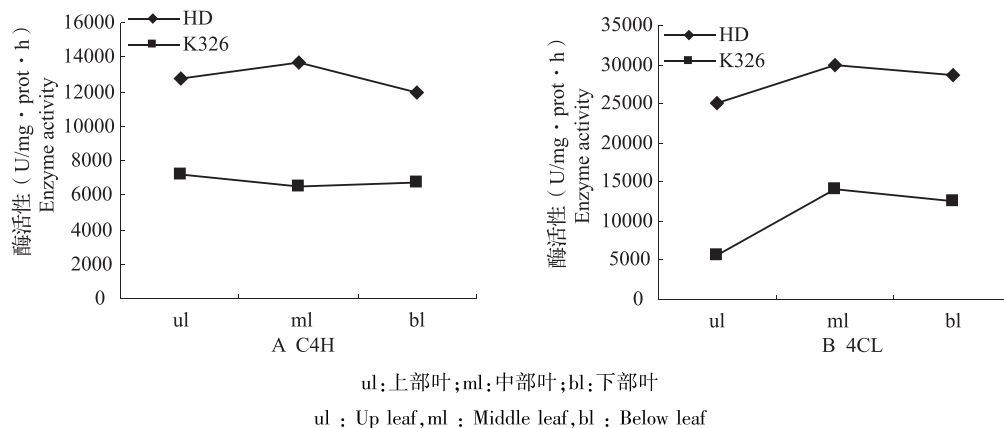


图4 C4H、4CL 在两品种不同叶片部位的酶活变化

Fig. 4 Enzyme activity of C4H and 4CL in different leaves of the two varieties

3 讨论

酚类被认为是产生烟草香气的主要成分之一^[15],与烟叶品质密切相关。酚类物质含量的变化主要表现在 C4H、4CL 这 2 个重要酶的活性变化

上^[15]。本研究以筛选的 2 个酚类物质含量差异较大的烤烟品种为研究材料,克隆 2 个关键酶的基因,拟从分子水平解释 2 个品种酶活性差异的产生机理。拟南芥 *At4cl1*、*At4cl2* 参与木质素的生物合成以及除类黄酮以外的酚类物质合成,*At4cl3* 参与类黄

酮的生物合成^[8]。从大豆中分离出的 4 种 *4cl* 基因在苯丙烷代谢产物的合成中有不同的功能^[9]。*NtC4H* 和 *Nt4CL* 在烟草中均存在 2 个同工酶,HD 中 *Nit4h1* 和 *Nit4h2* 相似性为 97.23%,K326 中 *Nit4h1* 和 *Nit4h2* 相似性为 97.30%。但因为核酸序列的差异,可导致功能不同。因此推测烟草中两基因也存在功能分化。两品种中,HD 中 *Nit4h1* 两品种间相似性 99.87%,*Nit4h2* 两品种间相似性 99.93%,*Nt4cl1* 两品种间相似性 99.52%,*Nt4cl2* 两品种完全相同。4 个基因在两品种间只存在单碱基差异,因此推测序列差异不是导致两品种间的酶活性及酚类物质含量差异的主要原因,可能由于两品种中苯并烷代谢途径的调控机理存在差异。

研究表明 C4H 基因在花瓣、花萼和果皮中均有较高水平的转录表达,导致花瓣含有大量的苯丙烷代谢途径的产物花色苷^[6]。欧芹中 C4H 在维管束发达的花梗中表达丰富,在幼叶和老叶中不表达^[10],认为 C4H 的表达与植物的木质化进程密切相关。本研究结果显示烟草中 C4H 在木质部、韧皮部的表达水平较高,推测 C4H 与烟草的木质化活动有关,但在 HD 和 K326 两种烟草植株中适熟期的上部叶、中部叶和下部叶中均有表达。

本实验室前期研究表明,苯丙烷代谢途径中的主要酶活性与多酚总量均存在品种间差异并呈正相关性,HD 的 C4H 和 4CL 活性在旺长期和适熟期的中部叶中均显著高于 K326^[14]。本研究表明 *Nit4h1* 在两品种根、木质部、韧皮部、上部叶和中部叶的 *Nit4h1* 表达水平都是 HD 高于 K326,在下部叶、花和萼片中则相反。*Nit4h2* 在两品种根、木质部、上部叶、中部叶和花中的表达水平都是 HD 高于 K326,在韧皮部、下部叶和萼片中则相反。*Nt4cl1* 在两品种木质部、韧皮部、中部叶、下部叶和花中的表达水平都是 HD 高于 K326,在根、上部叶和萼片中则相反。*Nt4cl2* 在两品种各组织中的表达水平都是 HD 高于 K326。推测中部叶的酶活性高是由于该酶基因在此部位表达量高。

有研究表明,4CL 基因在大豆从营养生长进入生殖生长的过程中相对表达量增加^[16]。本实验室前期研究表明,HD 的酚类物质含量显著高于 K326^[14]。在 HD 和 K326 中,多酚物质含量有随生育时期持续上升的趋势,多酚总量在旺长期和适熟期最高^[14]。本研究结果表明,在 HD 和 K326 中 *Nt4cl* 在圆顶期和适熟期表达量较高,且在 HD 中的表达量高于 K326,与彭东^[17]研究结果一致。在彭

东^[17]研究中 4CL 酶活在 HD 中随生育时期逐渐升高,K326 中则先降低后升高,而本研究 HD 中的 *Nt4cl1* 表达量则先升高后降低,K326 中的 *Nt4cl2* 先升高后降低,推测可能是 2 个基因在不同品种中 4CL 合成过程中具有不同的分工。*Nit4h1* 和 *Nit4h2* 在 HD 和 K326 中在不同生育时期的相对表达量为适熟期高于圆顶期,旺长期较低。

综合以上结果可以推测酚类物质的分布与分配与 2 种酶在烟草中的分布与分配密切相关,并且 *Nit4h*、*Nt4cl* 在 HD 中同向作用于酚类物质的合成。两基因在 K326 中的表达也呈现茎部表达高于其他组织,但是在不同部位的表达趋势不一致,由此推测 *Nit4h*、*Nt4cl* 在 K326 中作用于酚类物质合成的模式不同于在 HD 中。进一步的研究可以构建 *Nit4h*、*Nt4cl* 的过表达载体和瞬时沉默载体,通过转基因方法研究这 2 个基因在烟草中的生物学功能。

参考文献

- [1] Russell D W, Conn E E. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedling[J]. Arch Biochem Biophys, 1967, 122: 255-258
- [2] 李莉,赵越,马君兰,等. 苯丙氨酸代谢途径关键酶 PAL、C4H、4CL 研究进展[J]. 生物信息学, 2007, 5(4): 187-189
- [3] Ehltng J, Bittner D, Wang Q, et al. Three 4-coumarate: coenzyme A ligase in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms[J]. Plant J, 1999, 19(1): 9-20
- [4] 陈安和,李加纳,柴友容,等. 羽衣甘蓝中一个突变型肉桂酸-4-羟化酶基因的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2007(4): 915-922
- [5] 张涛. 柠条锦鸡儿肉桂酸四羟化酶基因的克隆及表达分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2012
- [6] 骆萍,马国栋,陈晓亚,等. 亚洲棉 C4H 同源 cDNA 的分离和表达特征分析[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 77-81
- [7] 陈安和. 甘蓝型油菜及其亲本物种 C4H 基因家族克隆及比较基因组学研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006
- [8] 林建中. 拟南芥 4CL3 基因在类黄酮合成代谢中的功能分析[D]. 长沙: 湖南大学, 2009
- [9] 王安娜,王婵娟,吴蕾,等. 大豆 C4H 基因克隆及生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 12-15
- [10] Schalk M, Nedelkina S, Schoch G, et al. Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of aplant P450, CYP73A1[J]. Biochemistry, 1999, 38: 6093-6113
- [11] 胡尚连,曹颖,黄剩雄,等. 慈竹 4CL 基因的克隆及其生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(8): 204-210
- [12] 张婷婷. 丹参 C4H 基因原核表达载体的构建及重组蛋白的纯化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011
- [13] 徐晓燕,孙五三,王能如,等. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003(1): 3-5
- [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: 240-246
- [15] 朱小茜. 多酚等物质在烟叶生长中的变化及其与烟叶等级关系的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2006
- [16] 王艳,武林,孙梦阳,等. 不同生育时期大豆异黄酮合成相关酶基因表达的分析[J]. 大豆科学, 2012, 31(6): 887-893
- [17] 彭东. 光质、光强对烤烟苯丙烷代谢的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013