

紫丁香花香成分鉴定及关键 *TPS* 基因的功能分析

吴静^{1,2,3}, 邹吉睿¹, 汪进莹¹, 马波¹, 孟昕⁴, 胡增辉^{1,2}, 冷平生^{1,2}

(¹北京农学院园林学院, 北京 102206; ²城乡生态环境北京实验室, 北京 102206; ³林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100091; ⁴国家植物园, 北京 100093)

摘要: 萜烯合成酶 (*TPS*, terpene synthase) 基因是萜类化合物生物合成途径中的关键基因, 其在植物萜烯代谢中起到重要的作用。本研究以紫丁香 (*Syringa oblata* Lindl. ex Carr.) 花瓣为材料, 在优化固相微萃取花香化合物条件的基础上, 对4个不同花发育时期 (花蕾期、初开期、盛花期和衰败期) 的花香化合物进行鉴定分析; 结合基因组和转录组数据筛选到了 *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 关键候选基因, 并对其进行了克隆和功能研究。结果表明: (1) 最适的萃取条件为 30 °C 萃取 40 min; 4个花发育时期的花香总释放量呈先升高后下降的趋势, 盛花期达到最高; 4个时期中萜烯类化合物的释放量占花香总释放量的比例均最高, 其中以单萜罗勒烯的释放量最高。(2) *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 基因编码区长度分别为 1731 bp 和 1779 bp, 编码氨基酸分别为 576 个和 592 个, 编码的蛋白具有 Terpene_cyclase_plant_C1 保守结构域, 属于 Isoprenoid_Biosyn_C1 超家族; 实时荧光定量表明 2 个基因均在花瓣中表达量最高, 在不同花发育时期表达量均呈先升高后下降趋势, 在盛花期表达量最高, 与单萜罗勒烯的释放量呈正相关。(3) 在金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 花瓣中异源瞬时过表达 *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 基因, 发现罗勒烯释放量与对照组相比分别显著增加 10.91 倍和 23.67 倍。综上所述, 紫丁香花香主要成分为单萜类化合物, *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 可以影响紫丁香单萜化合物, 尤其是罗勒烯的合成。

关键词: 紫丁香; 花香; 萜烯合成酶; 单萜化合物

Identification of Floral Components and Functional Analysis of Key *TPS* Genes in *Syringa oblata*

WU Jing^{1,2,3}, ZOU Jirui¹, WANG Jinxuan¹, MA Bo¹, MENG Xin⁴, HU Zenghui^{1,2}, LENG Pingsheng^{1,2}

(¹College of Landscape Architecture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206; ²Beijing Laboratory for Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 102206; ³Key Laboratory of Genetics and Breeding of Trees and Flowers, Ministry of Education, Beijing 100093; ⁴National Botanical Garden, Beijing 100093)

Abstract: Terpene synthase (*TPS*) gene is a key regulator gene in the biosynthesis pathway of terpenoids, playing a crucial role in plant terpene metabolism. In this study, the floral fragrance components of lilac petals at different flower development stages (including bud stage, beginning stage, blooming stage and withering stage) were identified and analyzed on the basis of optimizing the floral conditions of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The key candidate genes of *SoTPS2* and *SoTPS3* were identified by combining genome and transcriptome data, and their isolation and preliminary functional investigation were carried out. The results showed that: (1) The optimal extraction condition was 30 °C for 40 min by analyzing the difference of types and release amount of volatile compounds under different extraction temperature and time. The total release of floral fragrance showed a trend of first increasing and then decreasing during the four flower development

收稿日期: 2023-11-17 网络出版日期: 2024-01-16

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231117003>

第一作者研究方向为花卉分子育种, E-mail: wjmxy1988@126.com

通信作者: 胡增辉, 研究方向为植物生理生态, E-mail: buahuzenghui@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31800602); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (BFUKF202211); 北京市教委生态修复工程学高精尖学科建设项目

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31800602); Fundamental Research Funds for the Central Universities (BFUKF202211); Beijing Municipal Education Commission through the Innovative Transdisciplinary Program "Ecological Restoration Engineering"

stages, and the peak (highest level) was observed at full flowering stage. Terpene compounds accounted for the highest proportion in total of floral components in the four periods, and the monoterpene ocimene was the highest. (2) The open reading frames (ORF) of *SoTPS2* and *SoTPS3* genes were 1731 bp and 1779 bp, respectively, encoding 576 and 592 amino acids. The deduced proteins have Terpene_Cyclase_Plant_C1 conservative structural domain, belonging to Isoprenoid_Biosyn_C1 superfamily. The highest transcripts of the two genes were detected in the petals via real-time PCR, and the increased expression was first detected followed by a decrease along with the flower development stages. The gene expressions positively correlated with the release of ocimene. (3) Through the transient overexpression of *SoTPS2* and *SoTPS3* genes in the petals of *Antirrhinum majus*, we observed 10.91 and 23.67-fold increased on the release of ocimene, respectively, compared with the unoverexpressed group. Collectively, the main components of floral fragrance in lilac petals are monoterpenes, and *SoTPS2* and *SoTPS3* as downstream regulating genes can contribute the synthesis of monoterpenes, especially ocimene.

Key words: lilac; floral fragrance; terpene synthase; monoterpenes

释放花香是开花植物的一个重要特征,在植物繁衍、防御以及植物间的相互作用等方面具有重要的生物学意义。此外,花香作为衡量花卉品质的重要指标,对提升花卉的观赏价值和经济价值具有重要意义。近年来,从花香植物中提取精油、香料作为香水和化妆品的原料也成为发展趋势。植物花香化合物主要分为萜烯类化合物、苯丙酸类/苯环型化合物和脂肪酸衍生物 3 大类^[1]。萜烯类化合物是植物挥发物中最大的一类,其中单萜是许多植物花香的主要成分^[2-5]。目前已清楚,萜烯化合物的生物合成途径有两条:一条是质体内的甲基赤藓糖醇磷酸(MEP, methylerythritol phosphate)途径,主要参与单萜的合成;另一条是胞质内的甲羟戊酸(MVA, mevalonic acid)途径,主要介导倍半萜的合成^[6-7]。

萜烯合成酶(TPS, terpene synthase)位于萜烯生物合成途径的终端,直接参与萜烯产物合成,其在植物萜烯代谢中起到至关重要的作用^[6]。迄今,大多数 TPSs 基因是从营养组织和果实中分离出来研究它们的防御作用^[8]。然而,从植物进化和物种形成的角度看,植物花器官释放的香气在吸引传粉者方面发挥着至关重要的作用,与其他花性状结合,决定了植物授粉方式。近年来,在小苍兰(*Freesia hybrida* (Jacq.) Klatt)、百合(*Lilium brownii* var. *viridulum* Linne)等花器官中克隆出了 TPS 基因,并证明其在萜烯合成中的作用^[8-10]。例如,在小苍兰花瓣中鉴定出的 TPS 基因,催化了芳樟醇、橙花叔醇、月桂烯和罗勒烯等多个萜烯挥发物的合成^[8];在百合中,*LiTPS2* 过表达烟草能促进单萜的产生,并能有效地调节百合品种的香气^[9];在耧斗菜(*Aquilegia viridiflora* Pall)中,TPS7、TPS8 和

TPS9 分别主要产生(+)-柠檬烯、 β -倍半水芹烯和蒎烯,与耧斗菜属植物花朵的主要萜类化合物基本一致^[11]。因此,研究 TPS 基因的表达模式和调控机制对揭示萜烯类花香化合物的合成释放机理具有重要意义。

紫丁香(*Syringa oblata* Lindl. ex Carr.)隶属于木犀科(Oleaceae)丁香属(*Syringa*),花香浓郁、花色雅致、姿态优美,抗逆性强,是我国北方常见的庭园观赏植物,也是研究植物花香的优良材料。近些年,对紫丁香花香的研究发现,萜烯类化合物是其主要的花香成分^[12-14],但对萜烯合成中哪些 TPS 基因起关键作用尚不清晰。本课题组前期基于紫丁香 4 个不同花期的花瓣转录组数据和基因组数据^[15],筛选到了表达量高、差异表达倍数 fold ≥ 2 且与单萜成分释放规律一致的 2 个关键候选基因 *SoTPS2* 和 *SoTPS3*。为此,本研究利用顶空固相微萃取(HS-SPME, headspace solid phase microextraction)结合气相色谱-质谱联用(GC-MS, Gaschromatography-Mass spectrometry)的方法,以紫丁香花瓣为材料对不同温度和时间萃取条件进行优化,在此基础上对不同花发育阶段的花香成分进行鉴定分析;克隆候选基因 *SoTPS2* 和 *SoTPS3*,进行生物信息学分析,采用荧光定量 PCR 技术检测基因时空表达模式,并通过异源瞬时过表达方法验证其功能。研究结果将为紫丁香花香化合物合成和遗传调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料紫丁香采集于北京农学院丁香种质

资源圃。在紫丁香开花期间,选择晴朗无风的上午9:00-10:00分别采集4个不同花期(花蕾期、初花期、盛开期和衰败期)的植株前后左右不同方位的花瓣用于花香成分测定,花期分类及采样标准参考Ma等^[15]的分类方法。采集4个花发育阶段的花瓣和盛开期的根、茎、叶、花瓣和花萼共5个组织,每个样本3个生物学重复,迅速在液氮中冷冻,于-80℃冰箱储存。瞬时过表达所用材料为购买于美国泛种子公司(PanAmerican Seed Co., West Chicago, Illinois)的金鱼草马里兰(*Antirrhinum majus* L. 'Maryland')。

1.2 花香的采集与分析

采用顶空固相微萃取(HS-SPME)技术采集花香,主要步骤为:用20 mL样品瓶装好0.5 g花瓣鲜样,加入5 μL内标(10 mL无水乙醇+1 μL 3-辛醇),水浴平衡5 min后将萃取头插入萃取瓶,推出萃取纤维至花朵上方1 cm处,进行萃取。设置25℃、30℃、35℃的萃取温度和35 min、40 min、45 min的萃取时间。采集同一个花序轴上大小相近的花瓣分成3组作为生物学重复,每个样本按照上述程序重复测定花香3次作为技术重复。设置空白顶空进样瓶作对照。

表1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Utilization
<i>SoTPS2</i> -F	ATGGCAGTCTACAAGATCTTCTC	基因克隆
<i>SoTPS2</i> -R	CTATGACCTACGAATTGTGGCA	
<i>SoTPS3</i> -F	ATGGCACATATCATCCAACCTCC	
<i>SoTPS3</i> -R	CTATGGCTGCGTCAATTGAATAGG	
<i>qSoTPS2</i> -F	GGTTTGCTTCAGGGCACTTG	荧光定量表达
<i>qSoTPS2</i> -R	CATCCACCTGAACGGTTCCA	
<i>qSoTPS3</i> -F	AAAGAAGTTGGAGGAGGCGG	
<i>qSoTPS3</i> -R	CTAAACCGGTATCCCAGGCC	
<i>qSoActin</i> -F	TGGAATGTGCTGAGAGATGC	内参引物
<i>qSoActin</i> -R	TGCTGACCGTATGAGCAAAG	

1.4 基因的克隆及生物信息学分析

根据课题组已有基因组和转录组数据^[15],利用Snapgene软件设计*SoTPS2*和*SoTPS3*基因克隆引物(表1),PCR扩增体系(使用ApexHF HS DNA Polymerase FS Master Mix,艾科瑞生物工程有限公司,湖南)和程序参照Li等^[17]方法。PCR产物经

利用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)鉴定花香化合物种类及其释放量。使用NIST08数据库,对各化合物成分进行定性分析,根据内标法进行定量分析,通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)软件计算相对峰面积。

1.3 RNA的提取及实时荧光定量分析

采用液氮研磨法将采集到的不同花发育时期的花瓣磨成粉末,参照RNA提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司,北京)说明书提取RNA,并通过2%琼脂糖凝胶电泳检测质量;使用艾科瑞Evo M-MLV反转录试剂盒(艾科瑞生物工程有限公司,湖南)获得cDNA,于-20℃冰箱备用,方法参照试剂盒说明。

以反转录的cDNA为模板,设计特异性定量引物(表1),使用Bio-Rad公司荧光定量PCR仪Mini Option进行实时荧光定量(qRT-PCR)扩增,扩增体系为25 μL,包含12.5 μL的SYBR Green Pro Taq Mix(全式金生物技术有限公司,北京),1 μL的cDNA,各1 μL的正反向引物和9.5 μL无酶无菌的水。设置反应程序为94℃ 30 s;94℃ 5 s;55℃ 15 s;72℃ 10 s,40个循环。设置3次生物学重复,*SoActin*-F/R作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[16]计算基因的相对表达量。

1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,DNA凝胶回收试剂盒(擎科生物科技股份有限公司,北京)回收目的片段,连接到Pclone007载体(艾科瑞生物工程有限公司,湖南)转化到大肠杆菌DH5α(上海唯地生物技术有限公司,上海)中。菌落PCR筛选阳性克隆送往睿博兴科生物公司测序。

使用在线网站 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 工具比对基因核苷酸序列相似性;用 DNAMAN 软件比对氨基酸序列;用在线网站 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质;用在线网站 NPSA (http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 预测蛋白质二级结构;用在线网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质三级结构;用 NCBI 网站 CD-Search 工具分析蛋白质保守结构域;用 MEGA7 软件构建系统进化树。

1.5 基因瞬时过表达

将拟过表达基因 (*SoTPS2*、*SoTPS3*) 的 CDS 序列构建到 pNC-Cam3304-35S 载体 (中国热带农业科学院热带生物技术研究所言普博士提供) 中,得到 pNC-Cam3304-35S-*SoTPS2* (简称:35S-*SoTPS2*) 和 pNC-Cam3304-35S-*SoTPS3* (简称:35S-*SoTPS3*) 重组载体,以 pNC-Cam3304-35S (简称:35S) 的空载体作为对照,将重组载体和空载体转入农杆菌感受态 GV3101 中培养扩繁,收集菌体后用侵染液重悬,OD₆₀₀ 值调为 0.8~1.2,将含有 pNC-Cam3304-35S-*SoTPS2*、pNC-Cam3304-35S-*SoTPS3* 和 pNC-Cam3304-35S 载体的侵染液避光孵育 3 h。用 1 mL 针孔注射器侵染金鱼草花瓣背面,在黑暗条件下培养 1 d 后正常光照 4~6 d 左右,待花朵盛开状态时进行花香成分测定,同时测定相关基因的表达水平。

1.6 数据统计分析

用于统计分析的数据均进行了 3 次生物学重复,对于紫丁香不同器官和不同开花时期花瓣中 *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 的表达水平,采用 SPSS 27.0.1 软件中的 one-way ANOVA 进行,对于基因的沉默效率和过表达效率检测,采用 *t* 检验方法,同时使用该软件进行可视化 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 顶空固相微萃取条件优化

当萃取温度为 25 °C 时,随萃取时间的增加,花香释放量和挥发物种类均呈上升趋势 (图 1A),因此 25 °C 时最适的萃取时间为 45 min。当萃取温度为 30 °C 和 35 °C 时,萃取时间未达 40 min 前,花香释放量和挥发物种类逐渐增加,40 min 后花香释放量和挥发物种类呈减少的趋势 (图 1B,C),表明萃取 40 min 后,萃取头上已经吸附的花香成分开始分解,出现花香释放量降低的现象,因此 40 min 是 30 °C 和 35 °C 萃取的最适时间。

萃取温度为 30 °C 时花香释放量大于 25 °C 和 35 °C,表明一定温度的升高可以加大挥发物的扩散从而加快吸附速度,当萃取达到平衡时,温度再升高可能导致挥发物在涂层和样品中的分配系数减小,灵敏度降低,导致吸附减少。因此,紫丁香最适的花香固相微萃取条件为 30 °C 萃取 40 min。

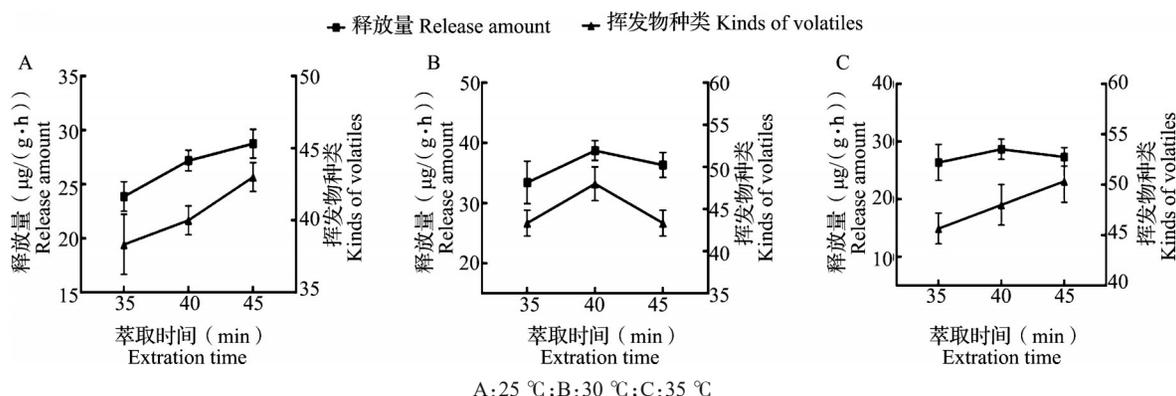


图 1 不同萃取温度和时间花香释放量和种类的变化

Fig. 1 Comparison of volatile species and release amount at different extraction temperatures and times

2.2 不同花发育时期花香成分测定

4 个花发育时期的花香总释放量呈先升高后下降的趋势,盛开期达到最高,其释放量约为初开期和花蕾期的 40 倍。在 4 个花发育时期,萜烯类化合物的释放量占总释放量比例均最高,分别为 78.99%、67.42%、85.61% 和 83.49%,在盛开期萜烯类化合物

释放量达到最大值 (图 2)。萜烯类化合物中含量最高的 5 种成分分别是罗勒烯 (1, 3, 6-Octatriene, 3, 7-Dimethyl-), 反式罗勒烯 (1, 3, 6-Octatriene, 3, 7-Dimethyl-, (E)-), 别罗勒烯 (2, 4, 6-Octatriene, 2, 6-Dimethyl-), 蒎烯 ((1R)-(+)- α -Pinene) 和丁香醇 A, B, C, D (Lilac alcohol, 丁香醇 A 与丁香醇 B/C/D

互为同分异构体),均为单萜化合物。罗勒烯和丁香醇在4个花发育时期呈现出先升高后下降的趋势,在盛开期释放量为最高;反式罗勒烯和别罗勒烯前2个时期释放量极低甚至未检测到,盛开期和

衰败期释放量均呈现上升趋势;蒎烯在花蕾期的释放量最高,随着花的发育释放量也呈现下降趋势,在衰败期的释放量最低(图3)。

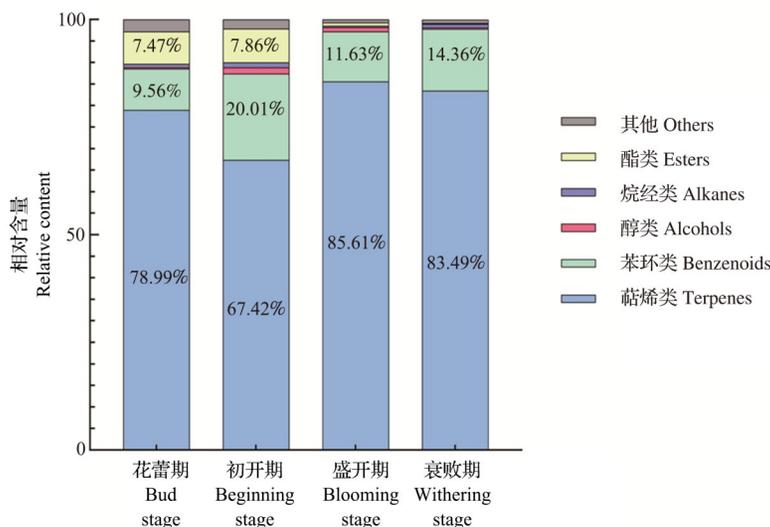


图2 4个花发育时期不同类成分的相对含量

Fig. 2 The relative content of different categories in petals of four development stages

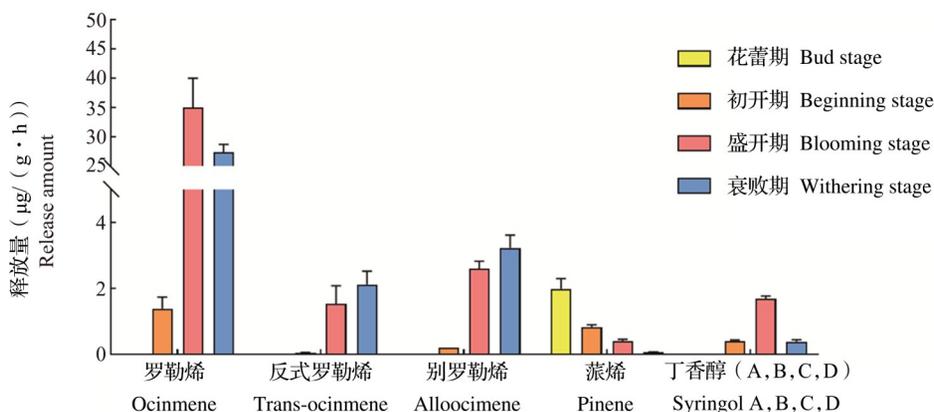


图3 紫丁香4个花发育时期萜烯类化合物释放量

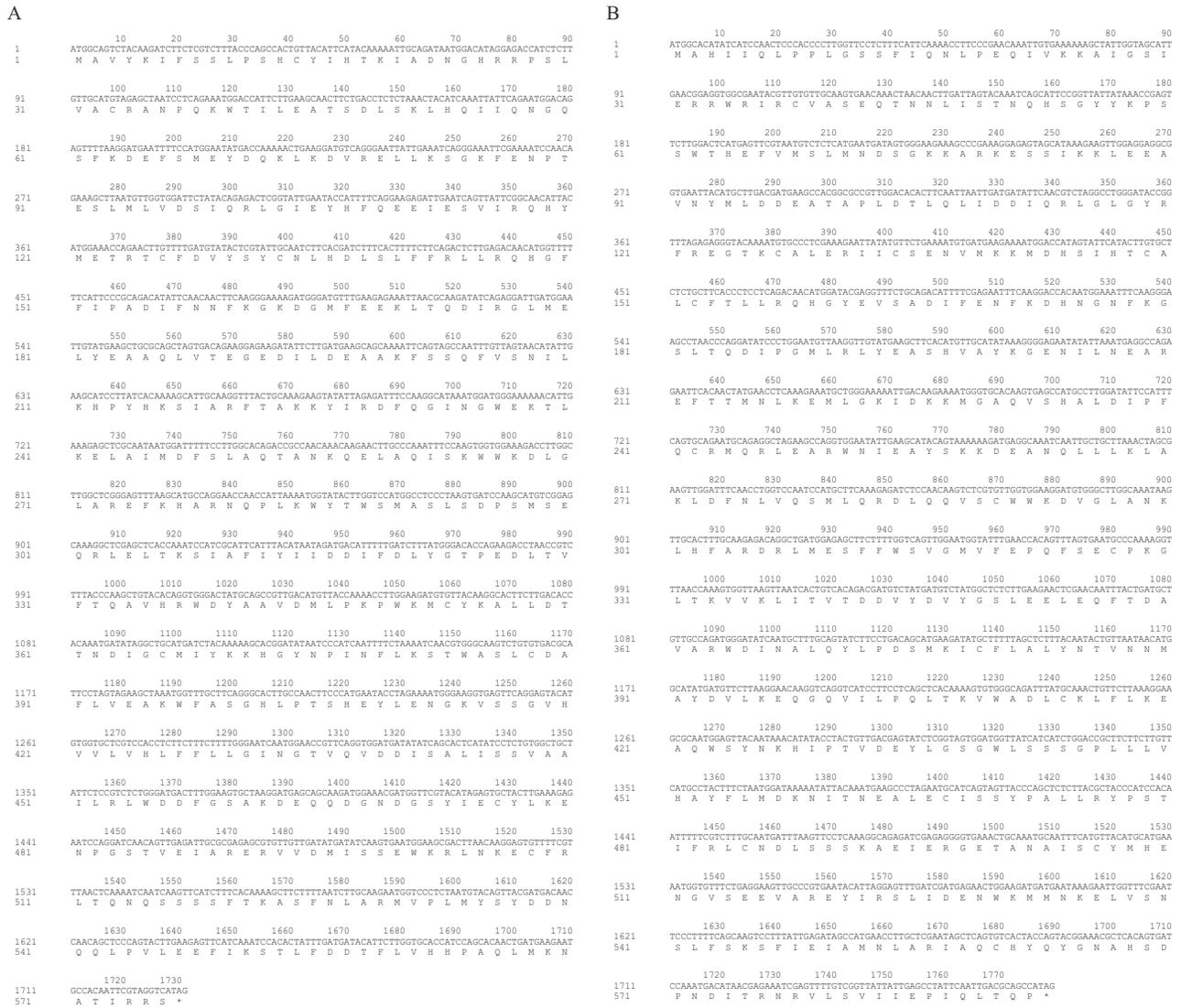
Fig. 3 Terpenoids released in four development periods of *S. oblata*

2.3 SoTPS2和SoTPS3基因克隆和生物信息学分析

以紫丁香的cDNA为模板PCR扩增获得SoTPS2和SoTPS3基因的开放阅读框(ORF)全长,分别为1731 bp和1779 bp;全长序列分别编码576个和592个氨基酸(图4)。SoTPS2和SoTPS3蛋白的相对分子质量分别为66.6 kD和67.97 kD,等电点分别为5.97和5.98,带负电荷的残基(Asp+Glu)数分别为75和74,带正电荷的残基(Arg+Lys)数分别为64和65,不稳定系数分别为36.21和41.76,平均亲水性分别为-0.315和-0.279,表明SoTPS2是稳定亲水蛋白,SoTPS3为不稳定的亲水蛋白。SoTPS2和SoTPS3蛋白均含有Terpene_cyclase_plant_C1保守结构域,属于Isoprenoid_Biosyn_C1超家族。SoTPS2和

SoTPS3蛋白的二级结构预测, α -螺旋占比分别为67.19%和66.05%,无规则卷曲占比分别为24.65%和28.04%,为主要的蛋白二级结构。

SoTPS2和SoTPS3与其他物种的氨基酸进行同源性比对及系统进化树分析,表明SoTPS2与金鱼草的罗勒烯合酶(AmTPS2)和月桂烯合酶(AmTPS1)相似性最高;SoTPS3与桂花(*Osmanthus fragrans* L.)的反式罗勒烯合酶(OfTPS1/2)以及油橄榄(*Olea europaea* L.)的萜烯合酶(OeTPS3)相似性最高(图5,6);SoTPS2和SoTPS3的蛋白序列均含有DDXXD和(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE两个萜烯合酶高度保守的氨基酸基序。系统进化树还显示,SoTPS2属TPS-g亚家族,SoTPS3属TPS-b亚家族(图6)。



A:*SoTPS2*;B:*SoTPS3*
 图4 紫丁香 *SoTPS2*和*SoTPS3*基因序列全长及编码氨基酸序列
 Fig. 4 Full-length sequences and coding amino acids of *SoTPS2* and *SoTPS3* of *S. oblata*

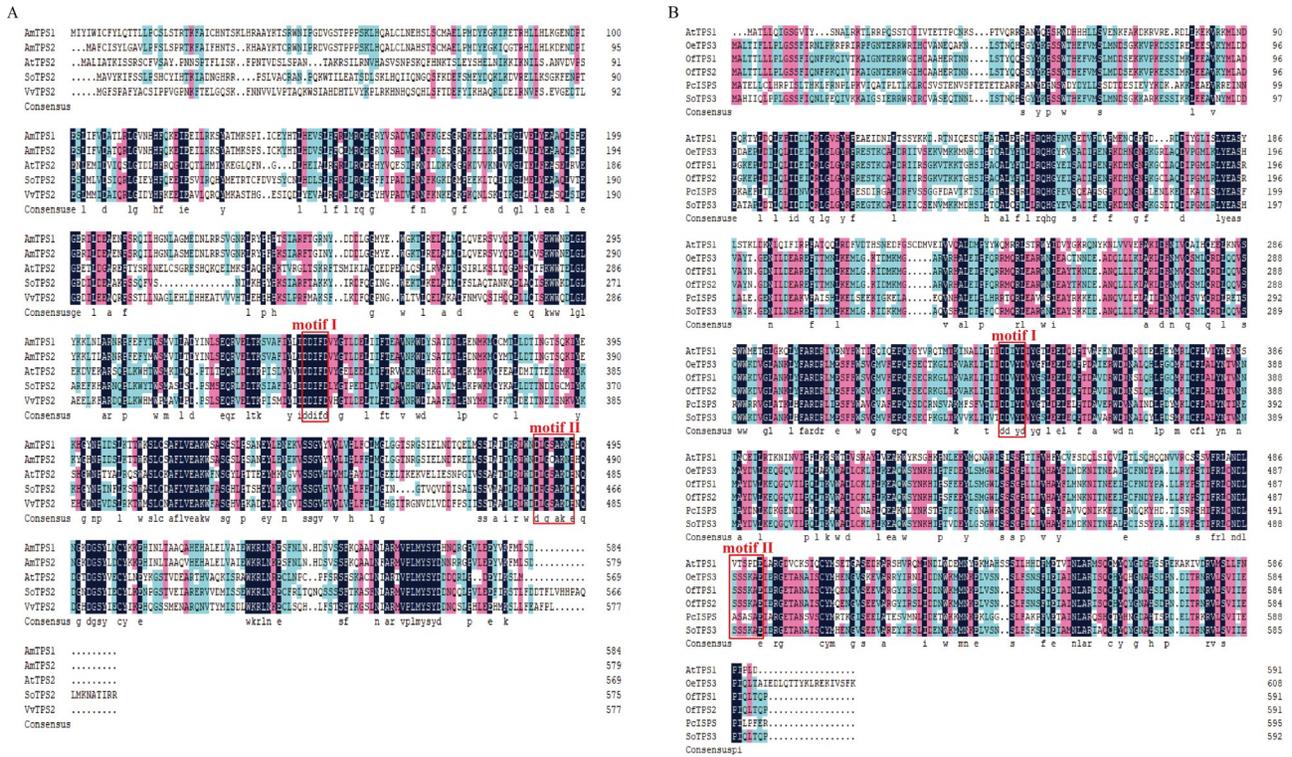
2.4 *SoTPS2*和*SoTPS3*基因的时空表达分析

*SoTPS2*和*SoTPS3*基因具有表达差异性($P < 0.05$)。qRT-PCR结果显示,2个基因在4个不同花发育时期表达量呈先上升后下降的趋势,均在盛花期达到最高,盛花期*SoTPS2*表达量是初开期的5.39倍,衰败期下降回初开期表达水平,盛花期*SoTPS3*表达量是初开期的37倍,衰败期下降至初开期的21.4倍;盛开期的不同组织里,*SoTPS2*和*SoTPS3*基因在花瓣的表达量显著高于其他组织,在茎和叶中几乎无表达(图7)。

2.5 瞬时过表达*SoTPS2*和*SoTPS3*基因对单萜释放的影响

利用金鱼草花瓣瞬时过表达*SoTPS2*和

*SoTPS3*基因,分析基因的表达量和单萜化合物释放量的变化(图8)。结果显示,过表达株系中,2个基因的表达量相较于对照组(35S)分别增加了约6倍和7倍;相较于对照组,过表达组的单萜类化合物释放量也均有所上升,过表达*SoTPS2*后,罗勒烯、别罗勒烯和反式罗勒烯分别增加了10.91倍、2.44倍、3.07倍;过表达*SoTPS3*单萜释放量增加最多,其中罗勒烯、别罗勒烯、反式罗勒烯分别增加了23.67倍、3.39倍、5.18倍。上述结果表明*SoTPS2*和*SoTPS3*基因对紫丁香单萜花香化合物的合成释放有重要作用,尤其是对罗勒烯,与其释放量呈显著正相关。



黑色、红色、蓝色部分分别表示同源性=100%、≥75%、≥50%；红框为基序 DDXXD 和 DXXXXE
 A:SoTPS2;B:SoTPS3;The black, red, and blue parts represent homology = 100%, ≥75%, ≥50%,
 respectively; Red boxes are the DDXXD and DXXXXE motifs

图5 紫丁香 SoTPS2 和 SoTPS3 与其他植物 TPS 蛋白同源性比对

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences encoded by SoTPS2 and SoTPS3 of *S. oblata* with other plant homologs

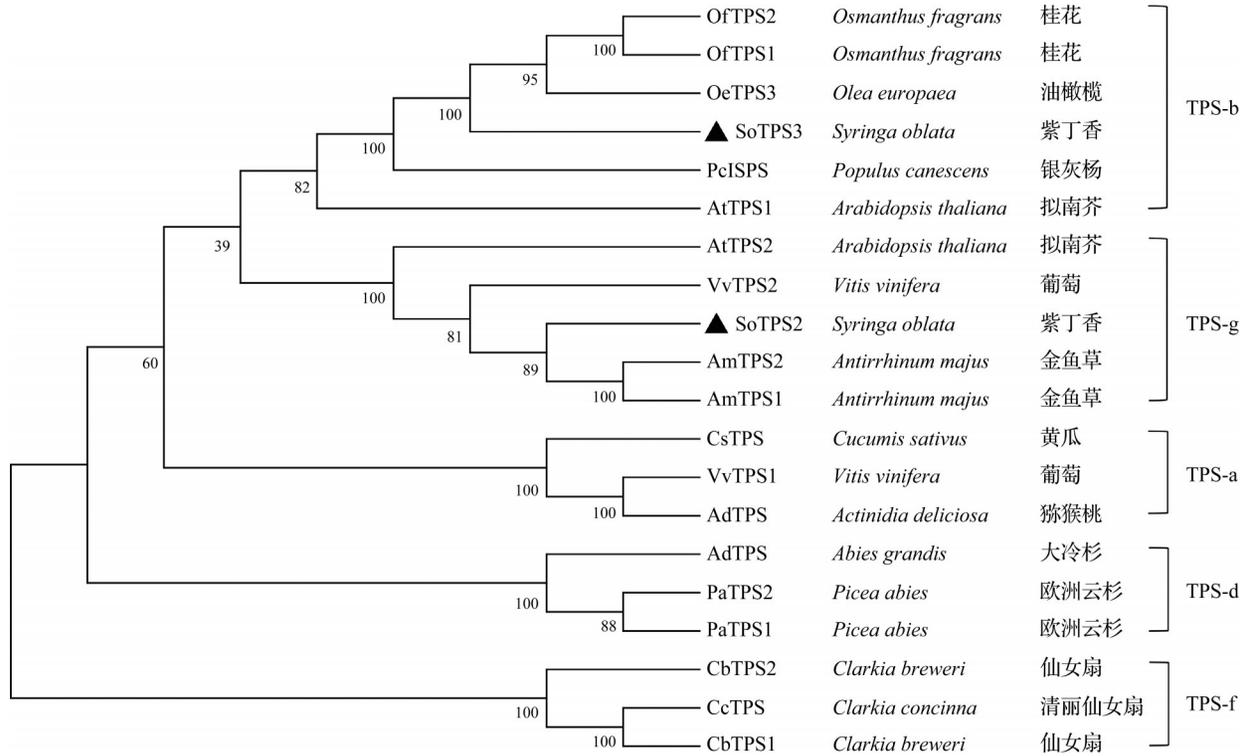
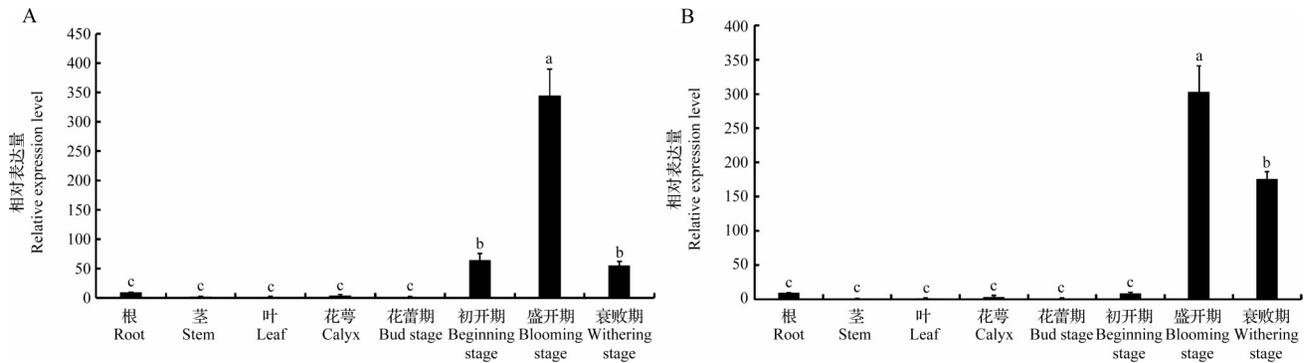


图6 紫丁香 SoTPS2、SoTPS3 与其他物种的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic trees of SoTPS2 and SoTPS3 of *S. oblata*

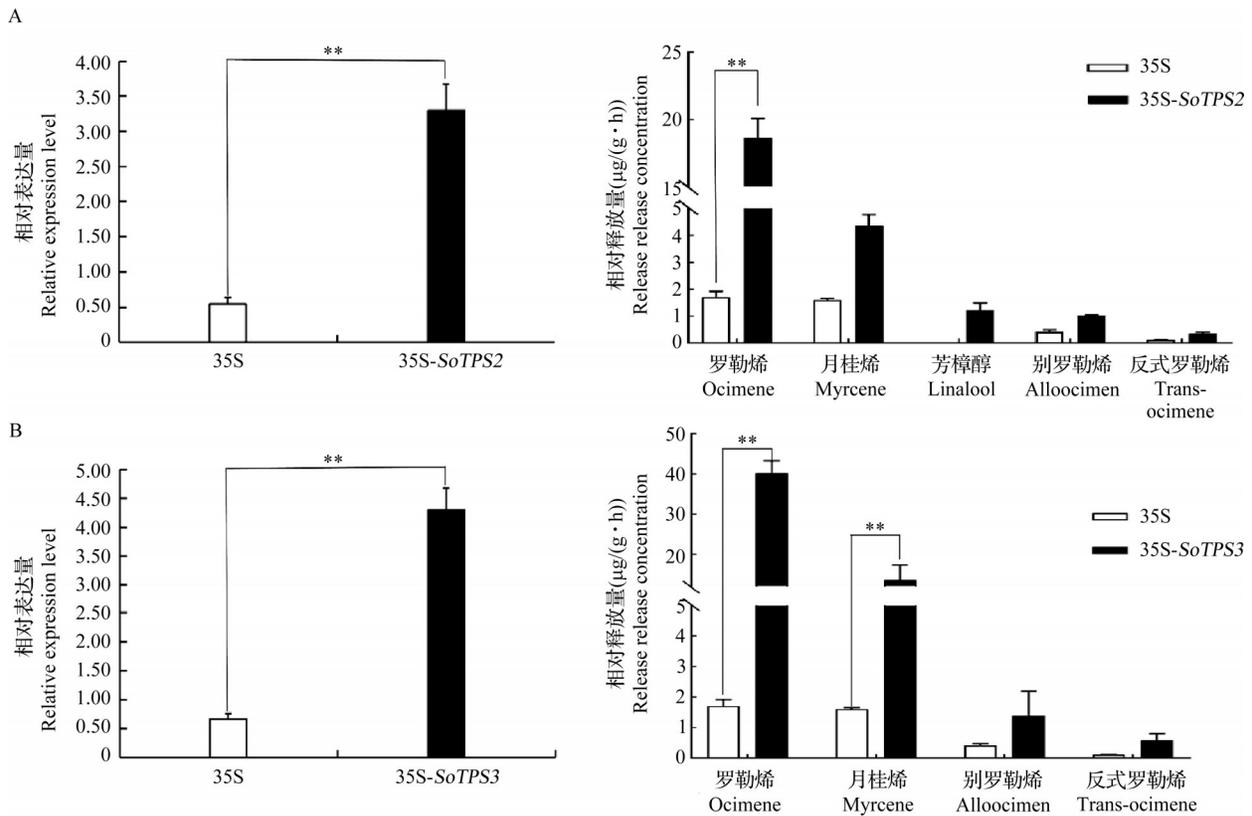


不同的小写字母表示组间在0.05水平上差异显著

A: *SoTPS2*; B: *SoTPS3*; Different normal letters mean significant differences at 0.05 level

图7 紫丁香 *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 在不同花发育时期和不同组织中的相对表达量

Fig. 7 *SoTPS2* and *SoTPS3* genes relative expression level in different development stages and in different tissues of *S. oblata*



A: *SoTPS2*; B: *SoTPS3*; 左: 基因相对表达量; 右: 单萜化合物相对释放量; **表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著

A: *SoTPS2*; B: *SoTPS3*; Left: Gene relative expression; Right: Relative release of monoterpene compound;

**indicate significant difference at the level of $P < 0.01$

图8 金鱼草中瞬时过表达 *SoTPS2* 和 *SoTPS3* 后基因表达量及单萜化合物释放量

Fig. 8 Gene relative expression and monoterpene compound release after transient overexpression of *SoTPS2* and *SoTPS3* in *A. majus* 'Maryland'

3 讨论

因花香比花形、花色等表观植物性状更复杂, 所以快速准确地对植物花香进行采集在研究进程中尤为重要^[18]。目前花香化合物的采集方法主要包括萃取法、蒸馏提取法和顶空法3大类^[19], 其中顶空固相微萃取和动态顶空是最常用的2种方法。近

年来, 固相微萃取作为一种高效、无溶剂的分析方法, 被广泛应用于观赏植物的挥发性成分的分析^[20-21]。萃取温度和时间等因素影响该方法的萃取效果, 优化条件可以明显改善试验效果^[22]。为了更准确地检测紫丁香花香成分并定量分析花香释放

规律,本研究通过前期预实验后,选定10:1的分流比,并选取25~35℃为萃取温度范围,35~45 min为萃取时间范围。运用优化后的萃取条件对紫丁香4个花发育时期的花香成分进行测定,花香释放量呈先升高后降低的趋势,盛开期花香释放量最高;4个时期花香的主要化合物均为萜烯类化合物,与回瑞华等^[14]的研究结果一致。

萜烯合酶作为萜烯合成最后一步的关键酶,虽然其基因序列具有一定的保守性,但TPS蛋白在进化过程中及在不同的植物中具有多样性,其家族成员中包含了100多个基因,对萜烯化合物的合成种类具有直接的决定作用^[23-24, 11]。萜烯合酶基因家族分为7个亚家族(TPS-a~TPS-g),其中TPS-a、TPS-b和TPS-g为被子植物特有的亚家族,分别负责催化产生倍半萜、环形单萜、非环形单萜和倍半萜^[25]。在天竺葵(*Pelargonium hortorum* Bailey)中发现了4个萜烯合酶,其中来自TPS-g亚家族的香叶醇合酶,主要负责玫瑰香型的单萜生物合成^[26];在百合中发现了属于TPS-g亚家族的*LiTPS2*并过表达烟草(*Nicotiana tabacum* L.)发现单萜芳樟醇的释放显著升高^[9]。本研究中紫丁香*SoTPS2*聚类在TPS-g亚家族,与拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的芳樟醇合酶、金鱼草的月桂烯合酶和罗勒烯合酶聚在同一分支,表明其可能催化生成单萜类化合物。TPS-b亚家族包含被子植物的单萜合酶基因,在桂花中*OfTPS3*聚类到TPS-b亚家族,催化生成单萜化合物罗勒烯^[27];小苍兰中的*FhTPS1*和*FhTPS2*也聚类到TPS-b亚家族,分别催化生成单萜化合物芳樟醇和 α -松油醇^[8]。本研究中紫丁香*SoTPS3*蛋白也聚类在TPS-b亚家族,其蛋白氨基酸序列N端不含RRX8W环化结构域,表明*SoTPS3*可能催化生成链状单萜类化合物。

目前紫丁香尚未建立成熟的遗传转化体系,异源植物中转基因功能验证是常用方法。冯楠^[28]在蜡梅(*Chimonanthus praecox* L.)中克隆了单萜合酶基因*CpTPS16*和倍半萜合酶基因*CpTPS5*,在烟草中瞬时过表达可以产生芳樟醇和石竹烯;刘偲等^[29]将桂花萜烯合酶基因*OfTPS5*异源瞬时过表达于烟草叶片,证明其可催化形成芳樟醇;Wang等^[30]将*VvDXS*、*VvDXR*和*VvTPS56*基因分别和共同瞬时过表达烟草叶片,3个基因均可促进多种单萜化合物合成,共同过表达效果比单一基因促进效果更明显,*VvTPS56*比上游2个基因促进效果更明显。为了更清楚地了解*SoTPS2*和*SoTPS3*基因对萜类化合

物的作用,本研究利用异源过表达方法,在花香模式植物金鱼草花瓣中瞬时过表达*SoTPS2*和*SoTPS3*,发现这2个基因对金鱼草花香主成分罗勒烯、月桂烯和反式罗勒烯等单萜化合物的产生有促进作用,其中*SoTPS3*对单萜化合物罗勒烯的释放量影响更大。本研究发现*SoTPS2*和*SoTPS3*基因均可以调控多种单萜化合物,可能由于萜烯合酶的复杂性,在同一物种中不同萜烯合酶可以催化生成相同的产物,且有的萜烯合酶可以催化同一底物生成多种萜类化合物^[8, 29]。

综合所述,*SoTPS2*和*SoTPS3*基因均参与单萜类化合物合成,初步明确了其对紫丁香萜烯类化合物合成的促进作用,为紫丁香在萜烯化合物合成机制的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Dudareva N, Klempien A, Muhlemann J K, Kaplan I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 2013, 198(1): 16-32
- [2] Du F, Wang T, Fan J M, Liu Z Z, Zong J X, Fan W X, Han Y H, Grierson D. Volatile composition and classification of *Lilium* flower aroma types and identification, polymorphisms, and alternative splicing of their monoterpene synthase genes. *Horticulture Research*, 2019, 6: 110
- [3] Han Y, Wang H, Wang X, Li K, Dong M, Li Y, Zhu Q, Shang F. Mechanism of floral scent production in *Osmanthus fragrans* and the production and regulation of its key floral constituents, β -ionone and linalool. *Horticulture Research*, 2019, 6: 106
- [4] Li R C, Li Z Y, Leng P S, Hu Z H, Wu J, Dou D Q. Transcriptome sequencing reveals terpene biosynthesis pathway genes accounting for volatile terpene of Tree Peony. *Planta*, 2021, 254(4): 67
- [5] Han Y, Lu M, Yue S, Li K, Dong M, Liu L, Wang H, Shang F. Comparative methylomics and chromatin accessibility analysis in *Osmanthus fragrans* uncovers regulation of genic transcription and mechanisms of key floral scent production. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac096
- [6] Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M. New insights into plant isoprenoid metabolism. *Molecular Plant*, 2012, 5(5): 964-967
- [7] Vranová E, Coman D, Gruiissem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 665-700
- [8] Gao F, Liu B, Li M, Gao X, Fang Q, Liu C, Ding H, Wang L, Gao X. Identification and characterization of terpene synthase genes accounting for volatile terpene emissions in flowers of *Freesia* \times *hybrida*. *Journal of Experimental Botany*,

- 2018, 69(18): 4249-4265
- [9] Zhang T, Guo Y, Shi X, Yang Y, Chen J, Zhang Q, Sun M. Overexpression of *LiTPS2* from a cultivar of lily (*Lilium* 'Siberia') enhances the monoterpenoids content in tobacco flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 151: 391-399
- [10] Yang Y Y, Ma B, Li Y Y, Han M Z, Wu J, Zhou X F, Tian J, Wang W H, Leng P S, Hu Z H. Transcriptome analysis identifies key gene *LiMYB305* involved in monoterpene biosynthesis in *Lilium* 'Siberia'. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1021576
- [11] Yang S, Wang N, Kimani S, Li Y, Bao T, Ning G, Li L, Liu B, Wang L, Gao X. Characterization of terpene synthase variation in flowers of wild *Aquilegia* species from Northeastern Asia. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhab020
- [12] Yang X, Zhao J, Zheng J. Analysis of floral scent emitted from *Syringa* plants. *Forestry Research*, 2016, 27(2): 273-281
- [13] 员梦梦. 11 种香花植物鲜花香气成分及香型分类研究. 新乡: 河南科技学院, 2016
- Yuan M M. Study on the aroma composition and flavor styles classification from flowers of eleven fragrant-flowered plants. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2016
- [14] 回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 刁全平, 肖海燕. 紫丁香花与花蕾挥发性化学成分的 HS-SPME-GC-MS 分析. 鞍山师范学院学报, 2020, 124(6): 31-33
- Hui R H, Hou D Y, Li T C, Diao Q P, Xiao H Y. Analysis of volatile chemical constituents in flowers and flowers buds of lilacs by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Anshan Normal University*, 2020, 124(6): 31-33
- [15] Ma B, Wu J, Shi T L, Yang Y Y, Wang W B, Zheng Y, Su S C, Yao Y C, Xue W B, Porth I, El-Kassaby Y A, Leng P S, Hu Z H, Mao J F. Lilac (*Syringa oblata*) genome provides insights into its evolution and molecular mechanism of petal color change. *Communications Biology*, 2022, 5: 686
- [16] Wang Y, Dou Y, Wang R, Guan X, Hu Z, Zheng J. Molecular characterization and functional analysis of chalcone synthase from *Syringa oblata* Lindl. in the flavonoid biosynthetic pathway. *Gene*, 2017, 25(11): 16-23
- [17] Li Z Y, Liu B, Hu Z H, Wu J, Leng P S. Cloning, expression analysis and subcellular localization of *PsDXR* and *PsMCS* genes in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(4): 730-740
- [18] Arab A, Bento J M. Plant volatiles: New perspectives for research in Brazil. *Neotrop Entomol*, 2006, 35(2): 151-158
- [19] Stashenko E E, Martínez J R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(11): 2022-2031
- [20] Balasubramanian S, Panigrahi S. Solid-phase Microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products; A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 4(1): 1-26
- [21] 孟昭阳, 寇亚平, 葛红, 刘冉, 牛鹏飞, 贾瑞冬, 赵鑫, 吕英民, 杨树华. 月季满庭芳华及其亲本花香成分的遗传分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(6): 1639-1648
- Meng Z Y, Kou Y P, Ge H, Liu R, Niu P F, Jia R D, Zhao X, Lv Y M, Yang S H. Genetic analysis of the fragrant components in the *Rose* variety Mantingfanghua and its parents. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(6): 1639-1648
- [22] Zhang F, Wei Z S, Wang P, Li K X, Zhan P, Tian H L. Using neural network coupled genetic algorithm to optimize the SPME conditions of volatile compounds in Korla Pear. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(23): 4535-4547
- [23] Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 95: 4126-4133
- [24] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 2011, 66: 212-229
- [25] Huang H, Kuo Y W, Chuang Y C, Yang Y P, Huang L M, Jeng M F, Chen W H, Chen H H. Terpene synthase-*b* and terpene synthase-*elf* genes produce monoterpenes for *Phalaenopsis bellina* floral scent. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 1422
- [26] Blerot B, Martinelli L, Prunier C, Saint-Marcoux D, Legrand S, Bony A, Sarrahere L, Gros F, Boyer N, Caissard J C, Baudino S, Jullien F. Functional analysis of four terpene synthases in rose-scented pelargonium cultivars (*pelargonium* × *hybridum*) and evolution of scent in the *Pelargonium Genus*. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1435
- [27] Zeng X, Liu C, Zheng R, Cai X, Luo J, Zou J, Wang C. Emission and accumulation of monoterpene and the key terpene synthase (TPS) associated with monoterpene biosynthesis in *Osmanthus fragrans* Lour. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 6: 1232
- [28] 冯楠. 蜡梅花香挥发物测定及 2 个萜烯合酶基因功能初步研究. 武汉: 华中农业大学, 2017
- Feng N. Determination of floral volatile components and preliminary study on function of two terpene synthase in Wintersweet. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2017
- [29] 刘偲, 席婉, 袁金梅, 朱琳琳, 陈洪国, 邹晶晶, 郑日如. 桂花 '莲籽丹桂' 芳樟醇合酶基因 *OjTPS5* 的克隆及功能鉴定. *园艺学报*, 2020, 47(2): 310-320
- Liu C, Xi W, Yuan J M, Zhu L L, Chen H G, Zou J J, Zheng R R. Molecular cloning and functional characterization of linalool synthase gene *OjTPS5* in *Osmanthus fragrans* 'Lianzi Dangu' flowers. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(2): 310-320
- [30] Wang W, Khalil-Ur-Rehman M, Wei L L, Nieuwenhuizen N J, Zheng H, Tao J M. Effect of thidiazuron on terpene volatile constituents and terpenoid biosynthesis pathway gene expression of Shine Muscat (*Vitis labrusca* × *V. vinifera*) Grape Berries. *Molecules*, 2020, 25(11): 2578