

矮牵牛花香生物合成及其调控研究进展

刘璐, 肖志娜, 刘菲, 刘娟旭, 余义勋

(华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

摘要:植物花香成分主要包括萜类、苯基/苯丙烷类和脂肪酸衍生物三大类。对观赏植物而言,花香是其重要品质,花香研究已成为热门研究领域之一。近年来,由于矮牵牛‘Mitchell’等品种香气浓郁,成为研究花香合成与调节的模式材料。矮牵牛花香的主要成分为苯基/苯丙烷类,其合成的上游为莽草酸路径,主要合成部位为花瓣,花香合成和释放具有典型昼夜节律性,并受衰老激素乙烯调节。另外,人们还发现了一些转录因子参与调节花香合成酶基因的表达,其中主要为 R2R3 类 MYB 基因家族成员。现综述了矮牵牛花香生物合成的特点、关键酶以及调节花香的转录因子,以期为植物花香性状的改良提供参考。

关键词:矮牵牛;花香生物合成;转录因子;MYB 基因家族;莽草酸路径

中图分类号:S 681.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0181-05

花香是观赏植物的重要品质,多年来植物花香方面的研究主要集中在对花香成分的鉴定上,已有超过 700 种花香物质从 60 个科的植物中被鉴定出来^[1]。与花色、花型等其它花朵性状相比,花香的研究相对滞后。直到近几年,花香的研究才逐渐深入,花香的物质成分及其生物合成途径逐渐明确^[2-3],生物合成途径中一些关键酶基因相继被研究和应用^[4]。近 20 年来,矮牵牛已经成为花发育、植物自交不亲和、花青素合成以及衰老过程中的乙烯信号转导等方面研究的模式花卉材料^[5-8]。由于矮牵牛品种‘Mitchell’和‘B720’株系香气浓郁,近年来又成为研究花香合成与调节的模式材料^[7]。

1 矮牵牛花香生物合成特点

植物花香成分主要包括萜类、苯基/苯丙烷类和脂肪酸类三大类。花的香气包括多种挥发性的分子,最后的香味由不同挥发物的组成及含量决定^[9]。这些化合物又被氧化、酯化和甲基化所修饰。虽然植物产生挥发物的数目非常多,但是这些化合物的生物合成途径是由少量相互交叉的代谢途径交织形成^[10-14]。萜类是芳香化合物中最的一类,单萜或倍半萜属于萜类,这些萜烯由异戊烯基二磷酸经过甲羟戊酸(MVA)途径和脱氧

木酮糖-5-磷酸途径(DXP)或甲基赤藓醇-4-磷酸途径(MEP)通过不同的单萜和倍半萜合酶合成^[15-16]。苯基/苯丙烷类花香化合物,主要来自 L-苯丙氨酸。完整的生物合成苯丙烷途径尚未完全清楚,但可以肯定的是,该途径涉及羟基化、乙酰化和甲基化反应^[17]。另外该途径的前体苯丙氨酸的合成还涉及到莽草酸路径^[18]。

1.1 矮牵牛花香的主要成分为苯基/苯丙烷类

VERDONK 等^[19]首次以矮牵牛‘Mitchell’为材料,鉴定了矮牵牛花香的主要成分为苯基/苯丙烷类,主要包括苯甲醛、苯乙醛、甲基苯甲酸甲酯、苯乙醇、异丁子香酚和苯甲酸苄酯,以及少量的半萜类。苯基/苯丙烷类合成的上游还涉及到莽草酸路径,苯基/苯丙烷类合成的直接前体为苯丙氨酸,主要调控酶为苯丙氨酸裂解酶(PAL),通过一系列的羟基化、酰基化和甲基化等反应,催化主要底物 L-苯丙氨酸转变成该类挥发性物质(图 1)^[20],而其中的甲基化反应又涉及到甲硫氨酸循环(SAM cycle)^[7]。

1.2 矮牵牛花香在花开放之后合成,且受昼夜节律调节

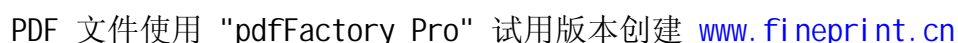
VERDONK 等^[19]采用离体和活体的矮牵牛‘Mitchell’花为材料,发现在蕾期花香合成非常微量,而进入盛花期后花香释放达到峰值,进入衰老阶段又开始下降;用 DNA 芯片技术分析表明,部分苯基/苯丙烷类合成酶基因在一天中不同时间段的表达受昼夜节律调控,多个挥发物成分早上释放量最少,晚上释放量最多。另外,多个花香合成酶及转录因子的表达在花发育的不同阶段以及昼夜节律上也表现出相对应的变化^[19,21-23]。

第一作者简介:刘璐(1991-),女,山西忻州人,硕士研究生,研究方向为观赏植物遗传育种与生物技术。E-mail:405519082@qq.com.

责任作者:余义勋(1973-),男,河南新县人,博士,教授,研究方向为观赏植物遗传育种与生物技术。E-mail:yuyixun@scau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31170653,31270736,31470700)。

收稿日期:2015-09-22



的表达相似,而 *PhCM2* 在花瓣中组成性表达。*PhCM1* 被沉默后,苯丙烷类挥发物减少 60%~70%,分支酸变位酶的活性减少 80%~85%,说明 *PhCM1* 负责分支酸变位酶的作用,参与莽草酸代谢途径的苯基/苯丙烷类的合成。

2.2 矮牵牛花香合成下游路径相关的酶

矮牵牛花香合成下游路径相关的酶为直接合成花香挥发物的酶。迄今为止,人们已经鉴定了至少 10 个矮牵牛苯基/苯丙烷类合成酶基因。NEGRE 等^[24]首次鉴定了矮牵牛 *BAMT*(*benzoic acid carboxyl methyltransferase*),授粉后 *BAMT* 的表达以及 *BAMT* 蛋白的活性均下降,该蛋白活性显示出节律性的变化^[28]。*BOATR1* 等^[29]分离了 *BPBT* (*benzoyl-CoA:benzyl alcohol/phenylethanol benzoyltransferase*) 的 cDNA,矮牵牛花瓣中 *BPBT* 基因转录在一天中也表现出有节律的变化,在下午达到峰值。*KOEDUKA* 等^[30]在矮牵牛中发现 *PhIGS*,*PhIGS* 以松柏酯(*coniferyl acetate*)和 NADPH 为底物合成异丁香酚,*PhIGS* 的表达与异丁香酚的合成方式一致。*DEXTER* 等^[31]鉴定了矮牵牛 *BAHD* 酰基转移酶基因,该基因表达方式与丁香酚生物合成的方式一致,RNAi 技术抑制该基因表达后,丁香酚生物合成也受抑制。2012 年又分离了矮牵牛 *acyl-activating enzyme* (*PhAAE*) 基因,其表达方式与其它苯基/苯丙烷类合成相关基因非常相似。*PhAAE* 定位在过氧化物酶体。RNAi 技术沉默 *PhAAE* 后,苯丙烷类挥发物减少,说明 *PhAAE* 可能负责激活苯基/苯丙烷类合成所必需的 t-肉桂酸^[32]。

3 矮牵牛花香合成调节的转录因子

除了花香合成酶基因之外,人们还发现了一些 R2R3 类 MYB 转录因子参与调节花香合成酶基因的表达,其中 *PhODO1*、*PhPAP1*、*PhEOBII*、*PhEOBI* 和 *PhMYB4* 可以与花香合成酶基因的启动子结合,直接参与花香合成调控。

VERDONK 等^[23]通过针对性的转录组分析(*targeted transcriptome analyses*)鉴定了第 1 个矮牵牛花香调节基因 *PhODO1* (R2R3-MYB 家族成员),能够调节苯基/苯丙烷类的合成,*PhODO1* 的转录在花香释放之前开始增加,在花香释放下降时减少。在 *PhODO1* 表达下降的转基因植株中,苯基/苯丙烷类挥发物的水平显著减少,并且 *PhODO1* 能激活 *EPSPS* (5-烯醇丙酮酰莽草酸磷酸合酶-3-磷酸合成酶) 基因的启动子。

ZVI 等^[33]将能够调节非挥发性物质苯丙烷类产生的拟南芥 MYB 转录因子 *PhPAP1* (production of anthocyanin pigment1) 转化到矮牵牛获得了稳定表达的转基因植株,除了使花色加深外,还使挥发性的苯型烃类与苯丙烷类

复合物的含量增加了 10 倍。表明 *PhPAP1* 转录因子促使花香和花色基因的转录增强,从而导致矮牵牛花香和花色增强。

SPITZER-RIMON 等^[34]用 VIGS 技术筛选出新的矮牵牛花香调节转录因子 *PhEOBII*,该基因也为 R2R3-MYB 类转录因子,其表达也受昼夜节律调节,并与花香合成相关。抑制 *PhEOBII* 的表达导致花香成分如苯甲醛、苯乙基、苯甲酸苄酯和异丁子香酚的减少。*PhEOBII* 表达的变化影响多个挥发物合成酶基因的改变,*PhEOBII* 主要调节苯基/苯丙烷类挥发物的生物合成。*PhEOBII* 还能与 *PhODO1* 和另一个花香转录因子 *PhEOBI* 的启动子结合,并调节它们的表达。

COLQUHOUN 等^[35]鉴定了另一个 R2R3-MYB 类转录因子 *PhMYB4*,该基因与 FVBP 合成和释放的方式一致,该基因沉默后 *PhC4H1* 和 *PhC4H2* 转录显著增加 p-香豆酸释放增加,说明 *PhMYB4* 参与了苯基/苯丙烷类挥发物平衡的调控。

SPITZER-RIMON 等^[36]报道另一个 R2R3-MYB 类转录因子 *PhEOBI* 在矮牵牛花香合成中起重要作用,*PhEOBI* 表达受 *PhEOBII* 调节,且二者共同调节 *PhODO1* 表达。*van MOERKERCKE* 等^[37]研究表明 *PhODO1*、*PhEOBII* 和 *PhIGS1* 在叶肉细胞和表皮细胞中都可以激活,说明苯基/苯丙烷类的合成不仅在表皮细胞中,可能还在叶肉细胞中。另外,*PhODO1* 还可以结合一个 ABC transporter 的基因 *PhABCG1* 的启动子,该基因与 *PhODO1* 共表达(*co-expressed*),并且 *PhODO1* 超表达可以上调 *PhABCG1* 的表达,但 *PhABCG1* 的确切功能还不清楚。

4 展望

矮牵牛作为研究花香合成与调节的模式材料,*VERDONK* 等^[23]、*ZVI* 等^[33]和 *SPITZER-RIMON* 等^[36]的试验证实了转录因子的应用价值。通过调控植物内源基因的表达,可以比较有效地调节植物花香挥发物的散发。一方面,这些转录因子在其它非模式材料的同源基因是否有相类似的作用,还需要进一步证明后才能更广泛地进行应用。另一方面,花香调节是一个非常复杂的过程,很多环境因子都影响花香的生物合成,可能还存在更多的转录因子调节花香,因此,以矮牵牛为模式材料的花香调节研究还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] KNUDSEN J T, TOLLSTEN L, BERGSTRÖM L G. Floral scents-a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques[J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(2): 253-280.
- [2] THOLL D, KISH C M, ORLOVA I, et al. Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric

- geranyl diphosphate synthases[J]. The Plant Cell, 2004, 16(4): 977-992.
- [3] BOATRRIGHT J, NEGRE F, CHEN X, et al. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue[J]. Plant Physiology, 2004, 135(4): 1993-2011.
- [4] DUDAREVA N, PICHERSKY E. Metabolic engineering of floral scent of ornamentals[J]. Journal of Crop Improvement, 2006, 18(1-2): 325-346.
- [5] CHANDLER S F, SANCHEZ C. Genetic modification, the development of transgenic ornamental plant varieties[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(8): 891-903.
- [6] GERATS T, VANDENBUSSCHE M. A model system for comparative research; *Petunia*[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 251-256.
- [7] SCHUURINK R C, HARING M A, CLARK D G. Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(1): 20-25.
- [8] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments; anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 733-749.
- [9] DUDAREVA N, PICHERSKY E. Biology of floral scent[M]. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- [10] JONES R L, BUCHANAN B B, GRUISSEM W. Biochemistry and molecular biology of plants[M]. Wiley Press, 2002.
- [11] DUDAREVA N, CSEKE L, BLANC V M, et al. Evolution of floral scent in *Clarkia*; novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower[J]. The Plant Cell, 1996, 8(7): 1137-1148.
- [12] PICHERSKY E, GANG D R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants; an evolutionary perspective[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(10): 439-445.
- [13] PICHERSKY E, NOEL J P, DUDAREVA N. Biosynthesis of plant volatiles; nature's diversity and ingenuity[J]. Science, 2006, 311(5762): 808-811.
- [14] SCHWAB W. Metabolome diversity; too few genes, too many metabolites? [J]. Phytochemistry, 2003, 62(6): 837-849.
- [15] WU S, CHAPPELL J. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2): 145-152.
- [16] THOLL D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(3): 297-304.
- [17] FERRER J, AUSTIN M B, STEWART C, et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(3): 356-370.
- [18] TZIN V, GALILI G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants[J]. Molecular Plant, 2010, 3(6): 956-972.
- [19] VERDONK J C, de VOS C R, VERHOEVEN H A, et al. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics[J]. Phytochemistry, 2003, 62(6): 997-1008.
- [20] DIXON R A, CHEN F, GUO D, et al. The biosynthesis of monolignols; a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? [J]. Phytochemistry, 2001, 57(7): 1069-1084.
- [21] COLQUHOUN T A, KIM J Y, WEDDE A E, et al. PhMYB4 fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia* × *hybrida* through PhC4H[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, q342.
- [22] UNDERWOOD B A, TIEMAN D M, SHIBUYA K, et al. Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas[J]. Plant Physiology, 2005, 138(1): 255-266.
- [23] VERDONK J C, HARING M A, van TUNEN A J, et al. ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers[J]. The Plant Cell, 2005, 17(5): 1612-1624.
- [24] NEGRE F, KISH C M, BOATRRIGHT J, et al. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers[J]. The Plant Cell, 2003, 15(12): 2992-3006.
- [25] MAEDA H, SHASANY A K, SCHNEPP J, et al. RNAi suppression of Arogonate Dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogonate pathway in petunia petals[J]. The Plant Cell, 2010, 22(3): 832-849.
- [26] COLQUHOUN T A, VERDONK J C, SCHIMMEL B C, et al. Petunia floral volatile benzenoid/phenylpropanoid genes are regulated in a similar manner[J]. Phytochemistry, 2010, 71(2): 158-167.
- [27] COLQUHOUN T A, SCHIMMEL B C, KIM J Y, et al. A petunia chorismate mutase specialized for the production of floral volatiles[J]. The Plant Journal, 2010, 61(1): 145-155.
- [28] KOLOSOVA N, SHERMAN D, KARLSON D, et al. Cellular and subcellular localization of S-Adenosyl-L-Methionine: Benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers[J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 956-964.
- [29] BOATRRIGHT J, NEGRE F, CHEN X, et al. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue[J]. Plant Physiology, 2004, 135(4): 1993-2011.
- [30] KOEDUKA T, FRIDMAN E, GANG D R, et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(26): 10128-10133.
- [31] DEXTER R, QUALLEY A, KISH C M, et al. Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol[J]. The Plant Journal, 2007, 49(2): 265-275.
- [32] COLQUHOUN T A, MARCINIAK D M, WEDDE A E, et al. A peroxisomally localized acyl-activating enzyme is required for volatile benzenoid formation in a *Petunia* × *hybrida* cv. 'Mitchell Diploid' flower[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(13): 4821-4833.
- [33] ZVI M M B, NEGRE Z F, MASCI T, et al. Interlinking showy traits; co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(4): 403-415.
- [34] SPITZER-RIMON B, MARHEVKA E, BARKAI O, et al. EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia[J]. The Plant Cell, 2010, 22(6): 1961-1976.
- [35] COLQUHOUN T A, CLARK D G. Unraveling the regulation of floral fragrance biosynthesis[J]. Plant Signaling and Behavior, 2011, 6(3): 378-381.
- [36] SPITZER-RIMON B, FARHI M, ALBO B, et al. The R2R3-MYB-like regulatory factor EOB1, acting downstream of EOBII, regulates scent production by activating ODO1 and structural scent-related genes in petunia[J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 5089-5105.
- [37] van MOERKERCKE A, GALVAN-AMPUDIA C S, VERDONK J C, et al. Regulators of floral fragrance production and their target genes in petunia are not exclusively active in the epidermal cells of petals[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8): 3157-3171.

阿拉伯半乳糖蛋白在高等植物中的分布及功能

包 晗, 郑 国 琦

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:阿拉伯半乳糖蛋白(arabinogalactan-proteins, AGPs)是一类含有丰富羟脯氨酸或脯氨酸的结构复杂的糖蛋白,其广泛分布在细胞壁、原生质体和质膜上。在植物的根部、花粉管、花粉以及柱头、花柱等组织中均有表达,AGPs 在被子植物营养生长和生殖发育均起着非常重要的作用,可能参与了根形态建成与发育,根系与土壤微生物互相作用,并影响花粉管的生长、花粉粒的成熟和柱头上萌发等。现就其分子结构、分类以及主要研究方法,对植物根组织以及花粉、花粉管、柱头部位 AGPs 的分布和可能功能进行了综述。

关键词:阿拉伯半乳糖蛋白;分布;功能

中图分类号:Q 946.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0185-07

阿拉伯半乳糖蛋白(arabinogalactan-proteins, AGPs)是一种广泛存在于植物组织和细胞的糖蛋白,是富含羟脯氨酸的糖蛋白(Hyp-rich glycoproteins, HRGPs)家族的成员之一。阿拉伯半乳糖蛋白是由 90%以上分支糖链以-O-糖苷键与核心蛋白组成的复杂大分子,它的糖基骨架是由阿拉伯糖和半乳糖等寡聚糖以 β -1,3-连接的主链和 1,6-连接的支链组成^[1-2]。AGPs 的蛋白骨架上一

般具有 1 个或多个阿拉伯半乳糖侧链以及 Ala-Hyp 重复序列,且富含羟脯氨酸或脯氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸^[3-5]。根据 AGPs 构成形式的不同,可分为典型 AGPs 和非典型 AGPs。典型 AGPs 一般有 3 个区域:N 端的信号肽,这段信号序列对于蛋白分泌到胞外是必需的,在成熟后被切除;一段含有丰富脯氨酸或羟脯氨酸,赖氨酸,丝氨酸和苏氨酸且长度可变的中间区域;C 端的疏水跨膜区,通常存在于 AGPs 前体中,之后被 GPI 锚所取代。除了典型 AGPs,在拟南芥中还发现一些不属于以上结构的 AGPs,如富含赖氨酸的 AGPs^[6],包含 1 个或 2 个泛素结构域的 FLAs(fasciclin-like AGPs)^[7]、AG 多肽^[8],含有 GPI 锚但缺乏 Cu^{2+} 结合位点的 PCNL

第一作者简介:包晗(1986-),女,硕士,实验师,现主要从事植物发育学等研究工作。E-mail:18795209024@163.com.

基金项目:宁夏大学自然科学研究基金资助项目(ZR1448)。

收稿日期:2015-09-24

Floral Scent Biosynthesis and Its Regulation in *Petunia*

LIU Lu, XIAO Zhina, LIU Fei, LIU Juanxu, YU Yixun

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: Plant fragrances consist of terpenoids, benzenoids, and fatty acid derivatives. Floral scent is the important character for ornamental plant and has become one of hot points of research field. *Petunia* is the model plant in many research fields, including flower scent. *Petunia* 'Mitchell' predominantly emits volatile phenylpropanoid/benzenoids. The shikimate pathway links carbohydrate metabolism to the synthesis of aromatic amino acids, which could in turn act as precursors for various primary and secondary metabolites, such as benzenoids. In *Petunia*, some enzymes of the volatile phenylpropanoid/benzenoid pathway have been shown to mainly be present in the epidermal cells of petals. Synthesis of floral scent in *petunia* is typical circadian rhythm and is regulated by ethylene. In addition, recent reports show that some R2R3 MYB transcription factor play important roles in regulation synthesis of floral scent in *petunia*. In this paper, the characters and the key enzymes of flower scent biosynthesis, and the trans-factors of its regulation were reviewed in order to contribute to improving the traits of the floral scent in ornamental plants.

Keywords: *Petunia hybrida*; floral scent biosynthesis; transcription factor; MYB gene family; shikimate pathway