

百合单萜类物质释放与 *LhTPS* 表达关联性研究

王 婷¹,樊俊苗¹,张浩宇¹,樊玮鑫²,杜 方^{1*}

(1. 山西农业大学 园艺学院,山西 太谷 030801; 2. 山西农业大学 实验教学中心,山西 太谷 030801)

摘要: 为研究百合单萜类物质释放与单萜合酶基因表达的关联性,采用顶空固相微萃取(HSSPME)收集了13种不同香型百合4个发育时期的香气;应用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术测定了单萜类挥发物的成分和含量;通过实时荧光定量PCR研究6个百合品种4个发育时期单萜合酶基因 *LhTPS* 的表达规律。结果表明:随着百合花朵的开放,其香气成分中的单萜类物质含量表现出先增加后减少的趋势,有香百合的主要单萜类成分为罗勒烯和芳樟醇,但喇叭百合和东喇叭百合中的单萜类成分主要是1,8-桉叶素和罗勒烯;整体上喇叭百合、东喇叭百合和东方百合的 *LhTPS* 基因表达水平高于麝香百合和亚洲百合;在盛花期时, *LhTPS* 基因的表达水平与罗勒烯和芳樟醇2种化合物的合成具有显著关联性,说明 *LhTPS* 基因对罗勒烯和芳樟醇的合成具有重要的作用,是百合花香合成的关键基因之一。

关键词: 百合; 花香; 气相色谱-质谱法(GC-MS); 单萜物质; *LhTPS* 基因

中图分类号: S859.84 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2018)04-0088-06

Correlation of Monoterpenes Release and *LhTPS*
Expression in *Lilium* Plants

WANG Ting¹, FAN Junmiao¹, ZHANG Haoyu¹, FAN Weixin², DU Fang^{1*}

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Experimental Teaching Center, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The aim of this experiment was to analyze the correlation of the monoterpenes release and monoterpene synthase gene expression in *Lilium plants*. Floral scents emitted from 13 lilies at 4 developmental stages were collected by Head Space Solid Phase Microextraction method and monoterpenes were analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. The expression levels of *LhTPS* from 6 lilies at 4 developmental stages were accordingly studied by real-time quantitative PCR. Results indicated that the content of monoterpenes in the aroma components was increased first and then decreased with lily flower's opening. The main monoterpene components were ocimene and linalool for scent lilies, however, 1,8-cineole and ocimene appeared more in Trumpet and Orienpet lilies. The expression levels of *LhTPS* in Trumpet, Orienpet and Oriental lilies were higher than that in Longiflorum and Asiatic lilies overall. The expression level of *LhTPS* gene was significantly correlated with the synthesis of ocimene and linalool in the blooming stage, implying that *LhTPS* gene played an important role in the synthesis of ocimene and linalool, and was a key gene for synthesis of floral fragrance in lilies.

Key words: *Lilium*; Floral fragrance; Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); Monoterpenes; *LhTPS* gene

收稿日期:2017-10-20
基金项目:山西省应用基础研究项目(201601D011077);山西农业大学引进人才科研启动项目(2014ZZ02);山西省研究生教育改革研究(2017JG37)
作者简介:王 婷(1995-),女,山西吕梁人,在读硕士研究生,研究方向:花卉种质资源创新及生物技术应用研究。
E-mail:1152245453@qq.com
* 通讯作者:杜 方(1973-),女,山西原平人,教授,博士,主要从事花卉种质资源创新及生物技术应用研究。
E-mail:df730227@yeah.net

自古以来,花香就吸引了人们的注意并且渗入了生活的很多方面,被广泛应用于食品、化妆品、医疗等众多领域。近年来,有关学者分别对玫瑰^[1]、桂花^[2]、菊花^[3]、兰花^[4-5]、梅花^[6]和百合^[7]等植物的花香进行了研究。百合是世界上知名的切花花卉,品种丰富、香型多样,有墨香、浓香、淡香和无香4种香型^[8],是开展花香研究的优良材料。

国内外已经初步开展了百合花香的研究工作。现已探明百合花瓣是主要的释香部位^[9-10],其香气成分随着百合花的开放程度以及昼夜节律发生规律性的变化^[10-12],单萜类化合物是有香百合花香挥发物的主要成分,其中月桂烯、罗勒烯和芳樟醇含量较高^[11,13]。与有香百合相比,无香百合中单萜类化合物的释放量很低或检测不到^[10,13]。

单萜类化合物主要通过4-磷酸-2-甲基赤藓糖途径合成,单萜合酶是该生物合成途径最后一步的关键酶^[14-16],单萜合酶基因的表达水平是影响单萜化合物含量的主要因素^[17-18]。现今,已从仙女扇^[19]、拟南芥^[20]、姜花^[21]、六出花^[22]等中克隆得到罗勒烯、芳樟醇、香叶醇等多个单萜类合酶基因,发现这些单萜合酶基因表达与萜烯产物合成有直接关系。目前,已从岷江百合、西伯利亚、罗马广场和 *Belladonna* 花瓣中克隆到 *LreTPS*、*Li-mTPS2*、*LiLiS*、*LiMyS* 和 *LhTPS* 等单萜合酶基因^[9,23-25]。同时,对单萜合酶基因的表达规律研究表明,百合单萜合酶基因在花被片中表达量最高,在叶片中也有一定表达,在雄蕊和柱头中微量表达^[24]。东方百合西伯利亚芳樟醇合酶基因和月桂烯合酶基因的表达量高于亚洲百合罗马广场,且这2种单萜合成酶基因的表达规律随花朵的开放程度表现出先增加后减少的规律^[23]。

虽然百合花香研究已取得了一些进展,但对百合单萜合酶基因的研究仅局限于少数种和品种中,且对于花香挥发性成分的分析 and 基因的研究是独立进行的,尚不清楚主要致香成分与相关基因的关联性。为此,选取了4种香型百合共13个品种的花瓣作为试验材料,检测每个品种在花朵发育的4个时期单萜挥发物的种类和含量;并从中选取不同杂种系的6种材料,研究 *LhTPS* 基因在品种间和花朵发育时期中的表达水平,以确定单萜合酶基因与单萜类挥发物释放的关联性,为进一步开展百合花香育种研究提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

材料选自山西农业大学园艺站露地种植的百合

共计13种,包括2种东喇百合(*Orienpet hybrids*):罗宾娜(墨香)、木门(墨香);2种喇叭百合(*Trumpet hybrids*):完美(墨香)、橙星(浓香);4种东方百合(*Oriental hybrids*):新娘(浓香)、蒙娜丽莎(浓香)、索邦(浓香)、西伯利亚(浓香);2种麝亚百合(*Longiflorum × Asiatic hybrids*):亮钻(淡香)、金石(淡香);1种新铁炮百合(*Lilium formolongi* ‘Julius’):朱丽叶(淡香);2种亚洲百合(*Asiatic hybrids*):塞西尔(淡香)、小重瓣(无香)。根据花被片张开程度将百合花发育阶段分为4个时期:显色期(花被片已充分显色但未张开)、初开期(花被片略张开,花药未散粉)、盛开期(花被片完全张开,花药已散粉)、衰败期(花被片开始萎蔫,花药停止散粉)。在17:00—19:00时间段采集13个品种、4个时期健康植株的花被片,每朵花取一半用于挥发性成分测定,另一半用液氮速冻后置于-80℃冰箱以备RNA提取。

1.2 顶空固相微萃取

称取百合花瓣约1.5 g,置于15 mL 固相微萃取专用顶空瓶中,用已老化好的萃取头(Supelco 公司,50/30 μm PDMS/DVB/CAR)50℃顶空萃取15 min。自动进样,在进样口解析5 min。

1.3 GC-MS 分析

利用山西农业大学实验教学中心共享平台的GC-MS 分析仪进行分析。

GC(Trace ISQ 型号,Thermo公司)工作条件:色谱柱规格为30 m×0.25 mm×0.25 μm(柱长×柱内径×柱膜厚),公司为Thermo,型号为DB-5MS。载气为He,流速为1 mL/min。程序升温过程:起始温度40℃,保持2 min,然后以5℃/min的速度升至270℃,保持6 min。

MS(Trace ISQ 型号,Thermo 公司)工作条件:电离方式为EI;电离电压为70 eV;质谱扫描范围:45~600 amu;离子源温度为280℃;接口温度为280℃。

采用Xcalibur 软件系统,使用NIST 谱库检索定性。各化合物成分绝对含量用峰面积表示。

1.4 总RNA 提取与反转录

选择木门、橙星、索邦、亮钻、朱丽叶、小重瓣6个品种提取花瓣总RNA。RNA的提取根据GenStar 公司的TRIGene 总RNA 提取试剂盒说明书进行,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用NanoDrop 2000C 光度计检测RNA 浓度和纯度,质量合格的RNA 保存于-80℃超低温冰箱。

按照GenStar 公司的StarScript II cDNA 第一链

合成试剂盒说明书反转录 cDNA,将得到的 cDNA 溶液稀释至 100 ng/ μ L,保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.5 引物的设计

以 GenBank 中 *LhTPS* 基因 (KR998333) 序列为模板,采用 primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) 在线设计引物 (正向引物: 5' - AGACTCGCAAGGTTCAAGG - 3'; 反向引物: 5' - CGTACAAGCTCAGCAGTCCT - 3'), 交由生工生物工程有限公司合成。

1.6 实时荧光定量 PCR

以 GAPDH 为内参基因 (正向引物: 5' - TGATAAGTTTGGGATTGTCGAGGG - 3'; 反向引物: 5' - TTTCTGAGTAGCAGTGATGGCGTG - 3'), 利用 TaKaRa 公司 qRT - PCR 试剂盒配置 20 μ L 反应体系,包括 SYBR II 10 μ L、双蒸水 7 μ L、cDNA 1 μ L、Primer 1.6 μ L、ROX 0.4 μ L; 在 7500 Real Time PCR System 运行 qRT - PCR 试验,每个样本重复 3 次。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min (荧光), 共 40 个循环; 溶解曲线条件为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 从 54 $^{\circ}$ C 每 30 s 上升 0.4 直到 95 $^{\circ}$ C, 95 $^{\circ}$ C 30 s (荧光), 54 $^{\circ}$ C 15 s。

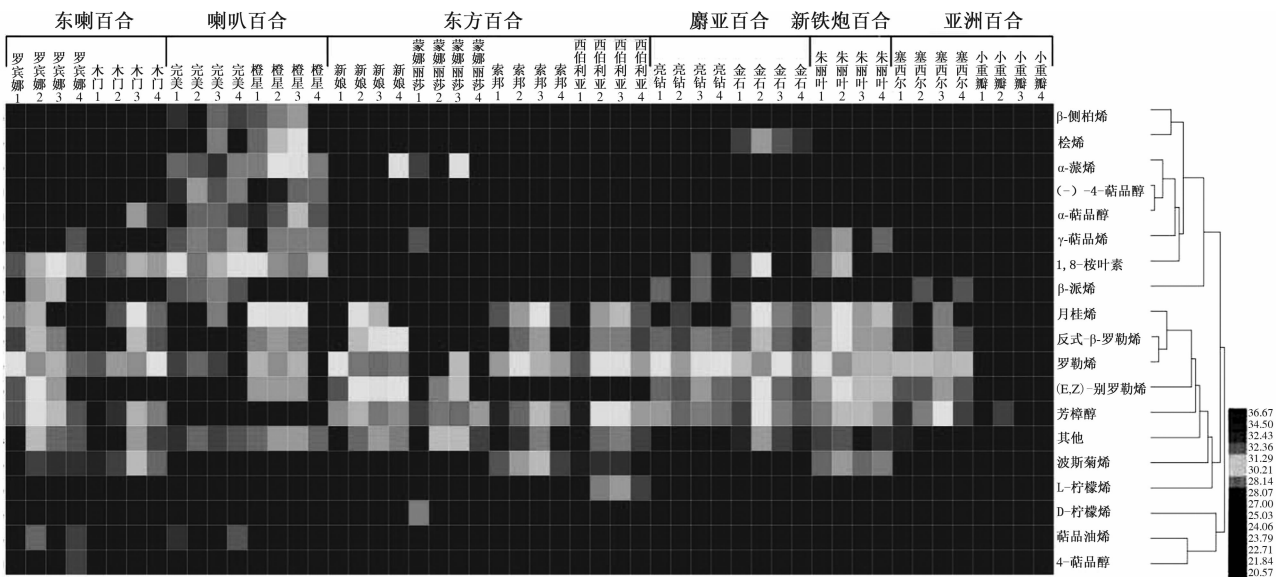
1.7 数据处理与统计分析

利用 Heml 1.0 软件以单萜化合物检测得到的峰面积绘制百合单萜类化合物含量热图,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量,采用 SAS 和 LSD 法进行统计分析及多重比较,利用 Origin 6.0 软件绘制断层图并进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 百合单萜类物质的释放规律

13 种百合 4 个时期单萜类物质的组成和释放



1 表示显色期,2 表示初开期,3 表示盛花期,4 表示衰败期;蓝色表示低水平含量,绿色表示中等水平含量,红色表示高水平含量。其他表示相对含量小于 1% 的单萜类化合物

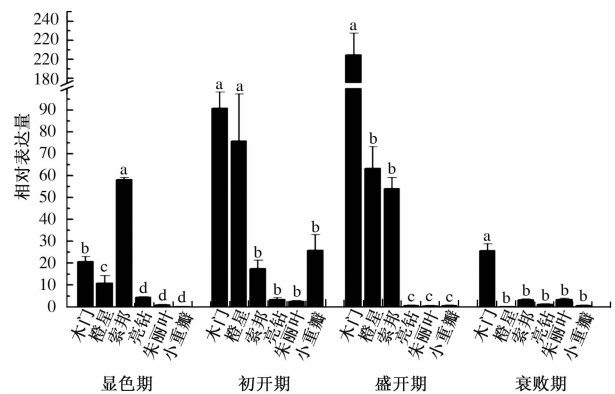
图 1 13 种百合 4 个发育时期单萜类物质释放热图

规律如图 1 所示。每种百合检测到的单萜化合物种类各不相同,在这 13 种百合 4 个时期中,共鉴定出 34 种单萜化合物,含量大于 1% 的如图 1 所示,共 18 种。萜烯化合物中含量较高的是罗勒烯、芳樟醇和 1,8 - 桉叶素。除无香型小重瓣无罗勒烯释放外,其他百合花香挥发物中均含有较多罗勒烯,平均含量为 56.2%,芳樟醇次之,含量为 18.7%。值得关注的是,东喇叭百合和喇叭百合的释放物中,1,8 - 桉叶素的含量最高,占单萜总释放量的 93.93%,超过了罗勒烯的含量,推测这是形成这些百合特殊麝香气味的重要化合物。无香百合小重瓣仅在初开期检测到芳樟醇一种单萜类化合物。由此推测,可以根据单萜化合物的成分对百合的香型进行分类。

在有香百合中,单萜类物质的释放与花的发育时期之间均表现出一定的相关性。同一个品种 4 个时期的百合所检测到的单萜化合物种类相近,含量不同。罗宾娜、完美、金石、朱丽叶 4 个品种在初开期单萜化合物种类和含量达到最高,随着发育进程,在盛开期和衰败期依次减少;其余的 8 个有香百合品种随发育进程释放的单萜化合物种类和含量依次增加,在盛开期达到最高值,随后释放量减少。可以看出,即便是同一个杂种系,不同品种的百合在发育过程中单萜类物质的成分及含量的变化规律也可能不同,但整体上单萜类化合物的成分和含量保持着先增加后减少的变化规律。

2.2 *LhTPS* 基因在花瓣 4 个发育时期不同品种中的表达特征

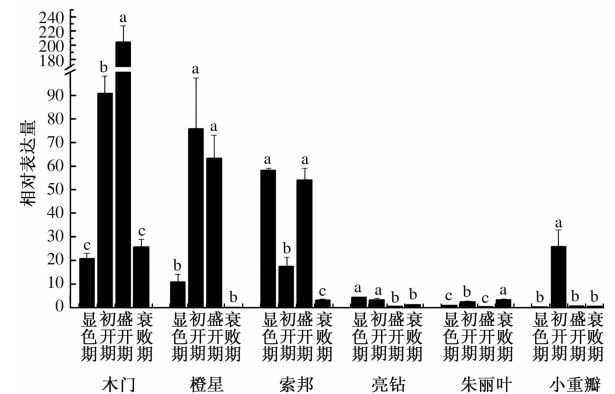
在显色期和盛花期, *LhTPS* 基因在墨香型百合木门和浓香型百合橙星、索邦中的表达量皆显著高于清香型百合亮钻、朱丽叶和无香型百合小重瓣中 *LhTPS* 基因的表达量(图 2)。在初花期, *LhTPS* 基因在墨香型百合木门和浓香型百合橙星中的表达量显著高于其他 4 种百合中 *LhTPS* 基因的表达量。在衰败期, 墨香型百合木门中 *LhTPS* 基因的表达量显著高于在其他 5 种百合中的表达量。



同一时期不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 *LhTPS* 基因在品种间的表达特征

LhTPS 基因在木门和橙星中, 初花期和盛花期的表达量都显著高于显色期和衰败期, 其中, 在木门的盛花期比初花期显著高表达, 在橙星初花期和盛花期的表达差异不显著; 在小重瓣的初开期中比其他 3 个时期显著高表达; 在索邦、亮钻和朱丽叶中没有明显的表达规律(图 3)。



同一品种不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 *LhTPS* 基因在花瓣 4 个发育时期的表达特征

2.3 *LhTPS* 基因的表达水平与单萜化合物含量的相关性分析

使用 Origin 6.0 对 5 种有香百合中对 *LhTPS* 基因的相对表达量与各单萜类物质依次进行相关性分

析发现, 在盛花期时, *LhTPS* 基因表达水平与罗勒烯和芳樟醇 2 种化合物的含量显著相关, 相关系数分别为 0.968 和 0.934, 其中 *LhTPS* 基因表达水平与罗勒烯的含量极显著相关(图 4)。由此可见, *LhTPS* 基因的表达对于罗勒烯和芳樟醇 2 种化合物的合成具有重要的作用。

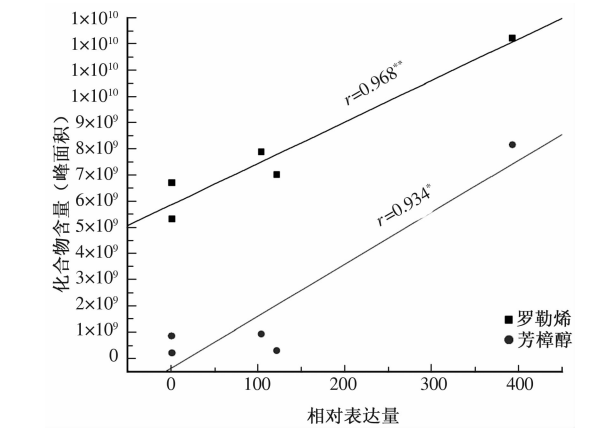


图 4 *LhTPS* 基因的表达水平与罗勒烯和芳樟醇含量的相关性

3 结论与讨论

通过研究 13 种百合 4 个时期单萜类物质的组成和含量发现, 有香百合释放的单萜类化合物种类和含量都较无香百合释放的多, 此结果与 Kong 等^[7,10]、张辉秀等^[13]、Hu 等^[26] 从不同香型百合挥发物的成分所检测出的结果相一致。此外, 各个品种随其发育进程也表现出了一定的规律: 单萜化合物的种类和含量随发育进程先增大后减小, 在初花期或盛花期达到了最高值, 这不仅与白天堂百合^[11] 和西伯利亚百合^[12] 随发育时期表现出的规律相一致, 在其他植物如水仙^[27] 和紫藤^[28] 的不同开花期也发现了同样的规律。同时, 与张辉秀等^[13]、Kong 等^[10] 报道结果一致的是, 本研究发现在东方百合、麝香百合、新铁炮百合和有香的亚洲百合中, 罗勒烯是百合的关键致香成分, 个别东方百合除罗勒烯外也含有大量的芳樟醇, 而东喇叭百合和喇叭百合则释放出较多的 1,8-桉叶素。不同的挥发性化合物的含量和种类使得百合成为香味富有变化的芳香植物, 提供了百合作为模式花香植物研究的可能性。

不同百合品种其 *LhTPS* 基因表达量不同。从整体上来说, 墨香型和浓香型百合的 *LhTPS* 基因表达水平高于淡香型和无香型百合。唐彪等^[23] 从浓香型的西伯利亚和淡香型的罗马广场百合花瓣中克隆得到芳樟醇合酶基因 *Li-LiS* 和月桂烯合酶基因 *Li-MyS*, 发现在花蕾、半开、盛开、衰败 4 个花期中,

在处理 3 h 表现出下降趋势,随后逐渐升高,菊花叶片中 MDA 含量也相对较低;而当菊花经过 -4、-8 ℃低温处理后,SOD、POD 活性均先上升而后迅速下降,在处理 3 h 时达到峰值,而 CAT 活性随着处理时间的延长呈现下降的趋势。轻度低温胁迫时,菊花植株产生应激反应,抗氧化酶活性上升,活性氧清除能力提高;而随着温度的降低,植株抗氧化酶活性大幅度下降,植株缓解活性氧伤害的能力丧失。低温胁迫下菊花通过提高可溶性糖含量和抗氧化酶活性、增加热耗散等生理响应机制来保护光合系统免受破坏,缓解低温伤害。随着温度的降低,超出了菊花自身耐受能力,自身调节能力受到限制,菊花已受到严重低温伤害。

参考文献:

- [1] Liu Y,Zhao Z,Si J,*et al.* Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* [J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 59 (3): 207-214.
- [2] 张子山,杨程,高辉远,等. 低温光抑制恢复过程中黄芩叶片 PS II 活性及其电子传递对 PS I 的影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(4): 1049-1054.
- [3] 史世京,胡尚连,曹颖,等. 冷冻胁迫下方竹抗氧化酶活性和叶绿素荧光特性[J]. *福建林学院学报*, 2013, 33(1): 38-42.
- [4] 常静,郭磊,巩在武. 低温弱光胁迫对辣椒叶片生理特性和光合特性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(10): 113-116.
- [5] 刘鹏,孟庆伟,赵世杰,等. 冷敏感植物的低温光抑制及其生化保护机制[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(1): 36-82.
- [6] 郑路,傅玉兰,陈树桃,等. 菊花抗寒性与营养特性的研究[J]. *园艺学报*, 1994, 21(2): 185-188.
- [7] 许瑛,陈发棣. 菊花 8 个品种的低温半致死温度及其抗寒适应性[J]. *园艺学报*, 2008, 35(4): 559-564.
- [8] 王翠丽,李永,崔洋,等. 9 个秋菊品种叶片脂肪酸组成及其抗寒性评价[J]. *西北农林科技大学学报*, 2014, 42(11): 61-68.
- [9] 李合生,孙群,赵世杰,等. *植物生理生化实验原理和技术* [M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [10] Strogonov B P. Structure and function of plant cells in saline habitats [M]. New Yoke: Halsted Press, 1973: 78-83.
- [11] 王毅,杨宏福. 园艺植物冷害和抗冷性的研究——文献综述[J]. *园艺学报*, 1994, 21(3): 239-244.
- [12] 王秀田,卢秋巍,苍晶,等. 低温驯化对冬小麦叶绿素荧光特性及抗氧化酶活性的影响[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(12): 1959-1969.
- [13] 王以柔,刘鸿先,李平,等. 在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响[J]. *植物生理学报*, 1986, 12(3): 244-251.
- [14] 杨伟,龚荣高,廖明安,等. 低温胁迫对枇杷幼果抗氧化酶系统和组织结构的影响[J]. *西北农林科技大学学报*, 2016, 44(4): 195-202.
- [15] 王以柔,刘鸿先,李平,等. 在光照和黑暗条件下低温对水稻幼苗光合器官膜脂过氧化作用的影响[J]. *植物生理学报*, 1986, 12(3): 244-251.
- [16] 杨伟,龚荣高,廖明安,等. 低温胁迫对枇杷幼果抗氧化酶系统和组织结构的影响[J]. *西北农林科技大学学报*, 2016, 44(4): 195-202.
- [17] 唐彪,胡增辉,冷平生,等. 浓香型和淡香型百合单萜合酶基因差异表达[J]. *北京农学院学报*, 2016, 31(2): 88-94.
- [18] Zeng X L,Cai L,Zheng R R,*et al.* Emission and accumulation of monoterpene and the key terpene synthase (TPS) associated with monoterpene biosynthesis in *Osmanthus fragrans* Lour [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(13): 1232.
- [19] Dudareva N,Cseke L,Pichersky E. Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(7): 1137-1148.
- [20] Chen F,Tholl D,D'Auria J C,*et al.* Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 481-494.
- [21] Li R,Fan Y. Molecular cloning and expression analysis of a terpene synthase gene, *HcTPS2*, in *Hedychium coronarium* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29(1): 35-42.
- [22] Aros D,Gonzalez V,Alleman R K,*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]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2739-2752.
- [23] 唐彪,胡增辉,冷平生,等. 浓香型和淡香型百合单萜合酶基因差异表达[J]. *北京农学院学报*, 2016, 31(2): 88-94.
- [24] 李路路,王欢,孙明,等. 岷江百合单萜合酶基因克隆与表达分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2014, 43(4): 397-402.
- [25] 李天娇,冷平生,杨凯,等. 百合单萜合成酶基因的克隆与序列分析[J]. *北京农学院学报*, 2014, 29(3): 6-10.
- [26] Hu Z H,Tang B,Wu Q,*et al.* Transcriptome sequencing analysis reveals a difference in monoterpene biosynthesis between scented *Lilium* 'Siberia' and unscented *Lilium* 'Novano' [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1351.
- [27] 黄巧巧,冯建跃. 水仙花开放期间香气组分变化的研究[J]. *分析测试学报*, 2004, 23(5): 110-113.
- [28] 李祖光,李建亮,曹慧,等. 紫藤鲜花在不同开花期的头香成分[J]. *浙江农林大学学报*, 2009, 26(3): 308-313.

(上接第 92 页)