

甘蓝型油菜*BnaTPSA08-1*基因过表达载体构建与其功能验证

钟微^{1,2}, 刘佳桢^{1,2}, 谢湘^{1,2}, 邓雯晶^{1,2}, 阮颖^{1,2}, 刘春林^{1,2*}

¹湖南农业大学植物代谢调控与代谢工程实验室, 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙

²岳麓山实验室, 湖南 长沙

收稿日期: 2024年10月16日; 录用日期: 2024年11月18日; 发布日期: 2024年11月27日

摘要

萜类化合物是植物中最大的代谢物群组之一, 在植物应对生物和非生物胁迫过程中发挥着重要作用。萜烯合成酶(Terpene synthases, TPSs)是植物萜类化合物合成的关键酶, 然而目前关于油菜萜烯合成酶研究很少报道。为探究TPSs在油菜中的作用, 本文对甘蓝型油菜萜类合酶基因*BnaTPSA08-1* (*BnaA08T0101600Z*)进行了功能研究。在克隆得到甘蓝型油菜*BnaTPSA08-1*基因CDS序列基础上, 成功构建了*BnaTPSA08-1*基因的过表达双元载体pFGC5941-35s::*BnaTPSA08-1*。利用农杆菌介导的甘蓝型油菜下胚轴遗传转化方法成功获得5株稳定遗传的*BnaTPSA08-1*基因过表达转基因植株。通过收集过表达转基因植株释放的有机挥发性气体, 并用GC-MS测定气体组分, 结果显示: 与对照植株的有机挥发性组分比较, 过表达植株产生25种不同类型的挥发性气体, 其中十一烷及其衍生物占比最多, 这说明*BnaTPSA08-1*基因产物的生化功能是促进十一烷及其衍生物的合成, 这为进一步研究*BnaTPSA08-1*基因在甘蓝型油菜中的生物学功能打下了良好基础。

关键词

甘蓝型油菜, 萜烯合成酶基因, 过表达载体, 有机挥发性气体, 生化功能

Construction of Overexpression Vector and Functional Verification of *BnaTPSA08-1* Gene in *Brassica napus* L.

Wei Zhong^{1,2}, Jiazhen Liu^{1,2}, Xiang Xie^{1,2}, Wenjing Deng^{1,2}, Ying Ruan^{1,2}, Chunlin Liu^{1,2*}

¹Laboratory of Plant Metabolic Regulation and Metabolic Engineering, Hunan Agricultural University, College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

²Yuelu Mountain Laboratory, Changsha Hunan

*通讯作者。

文章引用: 钟微, 刘佳桢, 谢湘, 邓雯晶, 阮颖, 刘春林. 甘蓝型油菜 *BnaTPSA08-1* 基因过表达载体构建与其功能验证[J]. 植物学研究, 2024, 13(6): 623-632. DOI: 10.12677/br.2024.136065

Abstract

Terpenoids are one of the largest groups of metabolites in plants and play an important role in plant response to biotic and abiotic stresses. Terpene synthases (TPSs) are key enzymes in the synthesis of terpene compounds in plants. However, there are few reports on terpene synthases in rapeseed. In order to explore the role of TPSs in rapeseed, the function of the terpene synthase gene *BnaTPSA08-1* (*BnaA08T0101600Z*) in *Brassica napus* was studied. Based on the cloned CDS sequence of *BnaTPSA08-1* gene in *Brassica napus*, the over-expression vector pFGC5941-35s::*BnaTPSA08-1* was successfully constructed. Five transgenic plants with stable *BnaTPSA08-1* gene over-expression were successfully obtained by Agrobacteria-mediated hypocotyl genetic transformation of *Brassica napus*. The organic volatile gases released by overexpressed transgenic plants were collected and the gas components were determined by GC-MS. The results showed that: Compared with the organic volatile components of control plants, over-expressed plants produced 25 different types of volatile gases, among them, undecane and undecane derivatives account for the most, indicating that the biochemical function of *BnaTPSA08-1* gene product is to promote the synthesis of undecane and undecane derivatives. This provides a good basis for further study on the biological function of *BnaTPSA08-1* gene in *Brassica napus*.

Keywords

Brassica napus, Terpene Synthase Gene, Overexpression Vector, Organic Volatile Gas, Biochemical Function

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)属于十字花科植物,作为一种重要的经济作物,“一菜多用”优势明显,油菜不仅是人类重要的食用油来源,而且在生物能源、药物、旅游观赏、蜜源、饲料、绿肥、蔬菜等领域发挥重要作用[1]。在油菜生产过程中同样面临着病虫害的严重危害,比如核盘菌侵染引起的菌核病导致油菜大量减产[2]。为了减少因病虫害带来的产量损失,必须使用化学农药加以防治,由此对人与环境的危害也就不可避免。为了减少化学农药危害,增强油菜自身抵抗病虫害的能力是降低化学农药使用量和其副作用的有效途径。萜类化合物是植物次生代谢产物中最大的一类,目前发现的萜类化合物已超过8万种,具有抗氧化、抗炎、抑制肿瘤等生物活性[3],在植物生长发育和植物抗性方面也发挥关键作用。萜烯类化合物如沉香醇和石竹烯在花朵中的挥发可以吸引传粉昆虫,同时也可能具有抗菌作用,帮助植物防御病原体[4]。萜烯合成酶(Terpene synthases, TPSs)是植物萜类化合物合成的关键酶,主要参与单萜、倍半萜和二萜的生物合成[5],TPSs催化是萜类化合物合成过程中的最后一个环节[6]。萜烯合成酶基因(TPSs 基因)的表达受到多种转录调控因子的控制,这些转录调控因子协同工作以控制萜烯的生物合成[7]。*AtTPS03*是萜烯合成酶的*AtTPS*基因家族的成员[8],它主要负责单萜的合成[8]。单萜由碳氢化合物组成,是最大一类植物次生代谢物[9],单萜及其衍生物在生物和医学领域展现出多种重要作用,包括抗炎、抗菌、抗病毒和抗氧化等生物活性[10]。

有关甘蓝型油菜中 TPSs 基因在油菜挥发性气体成分合成中的作用报道极少, 本研究对甘蓝型油菜中的 TPSs 基因 *BnaTPSA08-1* 进行了克隆和过量表达研究, 并对过表达植株挥发性气体组分进行研究, 验证 *BnaTPSA08-1* 可能与油菜什么挥发性有机化合物的合成有关, 为进一步研究 *BnaTPSs* 基因在油菜中的生物学功能奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

甘蓝型油菜材料“XY15”种子来自于湖南农业大学作物表观遗传调控与发育重点实验室。大肠杆菌 DH5 α 感受态由本实验室保存, 植物表达载体 pFGC5941 由本实验室提供。

2.2. 方法

2.2.1. 过量表达载体构建

以甘蓝型油菜 cDNA 为模板, 构建反应体系如下: cDNA (300 ng) 1 μ L、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L、2 \times Phanta Buffer 25 μ L、dNTP Mix 1 μ L、引物 F (10 μ M) 0.5 μ L、引物 R (10 μ M) 0.5 μ L 以及 ddH₂O 21 μ L, 总体积为 50 μ L。PCR 反应条件设置为: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 持续 3 分钟; 变性 95 $^{\circ}$ C, 15 秒; 退火 62 $^{\circ}$ C, 15 秒; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 45 秒; 最终延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟, 共进行 34 个循环。使用引物 *BnaTPSA08-1-F*(5'ATGAAAACACAGTCACAGCCTCT3')和 *BnaTPSA08-1-R*(5'TTATGGAACAGGGTAGACGAGCA3')扩增带有酶切位点的 *BnaTPSA08-1* 的 CDS 片段。

通过胶回收试剂盒回收目标片段, 并将回收的片段连接到 pEASY 载体上, 然后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。涂抹到带有卡那霉素(Kan)的筛选培养基上, 挑单菌落, 根据以下反应体系进行菌落 PCR 验证: 单菌落/菌液/DNA 1 μ L、2 \times Rapid Taq Master Mix 7.5 μ L, 引物 F (10 μ M) 0.2 μ L, 引物 R (10 μ M) 0.2 μ L, 以及 ddH₂O 6.1 μ L, 总体积 15 μ L。PCR 条件与前述相同, 仅改变引物为 pFGC5941-35S-2577F(5'ATGACGCACAATCCCACTATCCTTC3')和 *BnaTPSA08-1-R*, 以确认转化成功样品。测序结果显示正确的, 则进一步扩大培养后, 用质粒提取试剂盒提取带目标片段的 pEASY-*BnaTPSA08-1* CDS 质粒用于下一步。

在提取质粒后, 根据以下酶切反应体系酶切与连接: 质粒(1 ng) 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 酶 1 (*Nco*I) 约 0.5 μ L, 酶 2 (*Xba*I)约 0.5 μ L 及 ddH₂O 至 20 μ L。其中, 对 pEASY-*BnaTPSA08-1* CDS 和 pFGC5941 进行双酶切分别回收需要的片段; 将大小正确片段再通过 T4 连接酶完成连接后, 用 DH5 α 感受态细胞转化大肠杆菌。同样挑选单菌落验证, 如与预期一致, 对检验合格的阳性株送去测序, 对比分析测序结果。如确认无误, 即可扩大培养并从中提取质粒。测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

2.2.2. 根癌农杆菌转化

采用电击转化法, 将过表达载体 pEASY-*BnaTPSA08-1* 质粒转化至根癌农杆菌 GV3101 中。随后, 将转化后的菌株涂布于含有 50 μ g \cdot mL⁻¹卡那霉素、50 μ g \cdot mL⁻¹利福平和 50 μ g \cdot mL⁻¹庆大霉素的培养基上, 以筛选阳性菌株。将平板放置于 28 $^{\circ}$ C 摇床中培养 2~3 天后, 挑取单个菌落进行阳性克隆的鉴定。

2.2.3. 遗传转化油菜

将 XY15 的种子消毒后, 铺在发芽培养基上, 在黑暗条件下避光生长 6~7 天后, 取出切成 0.8 cm 长的下胚轴作为转化受体的外植体; 用含有 pEASY-*BnaTPSA08-1* 质粒的农杆菌 GV3101 菌液浸染下胚轴 15 min, 取出下胚轴放在无菌纸上晾干, 再平铺在共培培养基上, 转入 24 $^{\circ}$ C 培养室里, 暗培养 40~48 h; 将通过共培后的下胚轴转移到诱导培养基上, 在 24 $^{\circ}$ C, 16 h 光照/8 h 黑暗条件的培养室中培养, 待诱导

出愈伤组织, 21 d 后将外植体转移至分化培养基, 使愈伤组织分化出再生苗, 期间每隔两周更换一次新的分化培养基, 直到分化出新的叶芽; 待分化出的叶芽长到一定程度后, 转移到生根培养基中生根 2~3 周; 之后将已经生根的小幼苗转移至蛭石中进行炼苗一周, 再将小幼苗移栽至土壤中。

2.2.4. 转基因油菜的检测

待小花砵中的植株长出 2~3 片新叶, 用 CTAB 法提取油菜叶片 DNA, PCR 检测引物对应: pFGC5941-35S-2577F(5'ATGACGCACAATCCCCTATCCTTC3')和 *BnaTPSA08-1-R*(5'TTATGGAACAGGGTAGACGAGCA3')。预计 PCR 产物的长度为 1647 bp, 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

2.2.5. 荧光定量 PCR

按照荧光定量试剂盒检测体系, 总体系为 20 μ L, 取反转录后的 cDNA 100 ng, 2 \times BioZues® HS Taq Universal SYBR Green qPCR Master Mix 10 μ L, 正向引物(10 μ M), 反向引物(10 μ M), Nuclease-free water 补足至 20 μ L, 程序设置为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 S, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 次循环; 最终 72 $^{\circ}$ C 30 S 进行 RT-qPCR 分析。

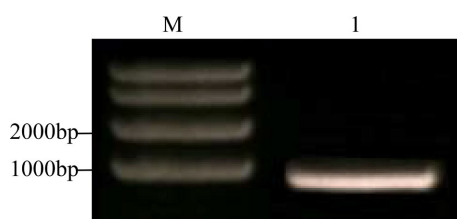
2.2.6. 气体收集色谱条件

GC-MS 分析条件: HB-88 毛细管柱(100.0 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m); 载气为 He(纯度 99.9999%); 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C; 柱温: 初始温度 120 $^{\circ}$ C, 保持 1 min、10 $^{\circ}$ C/min 升温至 175 $^{\circ}$ C, 保持 10 min、5 $^{\circ}$ C/min 升温至 210 $^{\circ}$ C, 保持 5 min、5 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C, 保持 15 min; 柱流速: 1.04 mL/min, 分流比: 20:1; 离子源温度: 200 接口温度: 220 $^{\circ}$ C; 质核比扫描范围: 50~700 m/z; 进样量: 1 μ L。

3. 结果与分析

3.1. 过表达载体 pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 的构建

甘蓝型油菜 *BnaTPSA08-1* 基因克隆的上游引物的 5'端添加限制性内切酶 *Nco*I (CCATGG) 和其保护碱基(CATG), 即 *BnaTPSA08-1-F*, (CATGCCATGG)ATGAAAACACAGTCACAGCCTCT; 下游引物 5'端添加限制性内切酶 *Xba*I (TCTAGA) 和其保护碱基(GC), 即 *BnaTPSA08-1-R*, (GCTCTAGA)TTATGGAACAGGGTAGACGAGCA。以携带目的基因的“XY15”基因组 cDNA 为模板, 用高保真 PCR 扩增和胶回收目标片段。PCR 反应体系: PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μ L、dNTP Mix (10 mM each) 1 μ L、2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μ L、*BnaTPSA08-1-F*/*BnaTPSA08-1-R* 各 1 μ L、ddH₂O 19 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。从而获得一条约 1647 bp 的带(图 1), 随后将 PCR 反应产物在 1.6% 的琼脂糖凝胶中电泳检测, 回收目的片段。



注: M: Trans2K® Plus II DNA Marker; 1: 目标片段 PCR 产物

Figure 1. *BnaTPSA08-1* fragment PCR product
图 1. *BnaTPSA08-1* 片段 PCR 产物

将目的片段连接 pEASY-Blunt 载体进行测序, 与 ZS11 基因组序列进行比对, 结果如图 2 所示, 克隆得到的序列为 *BnaTPSA08-1*。

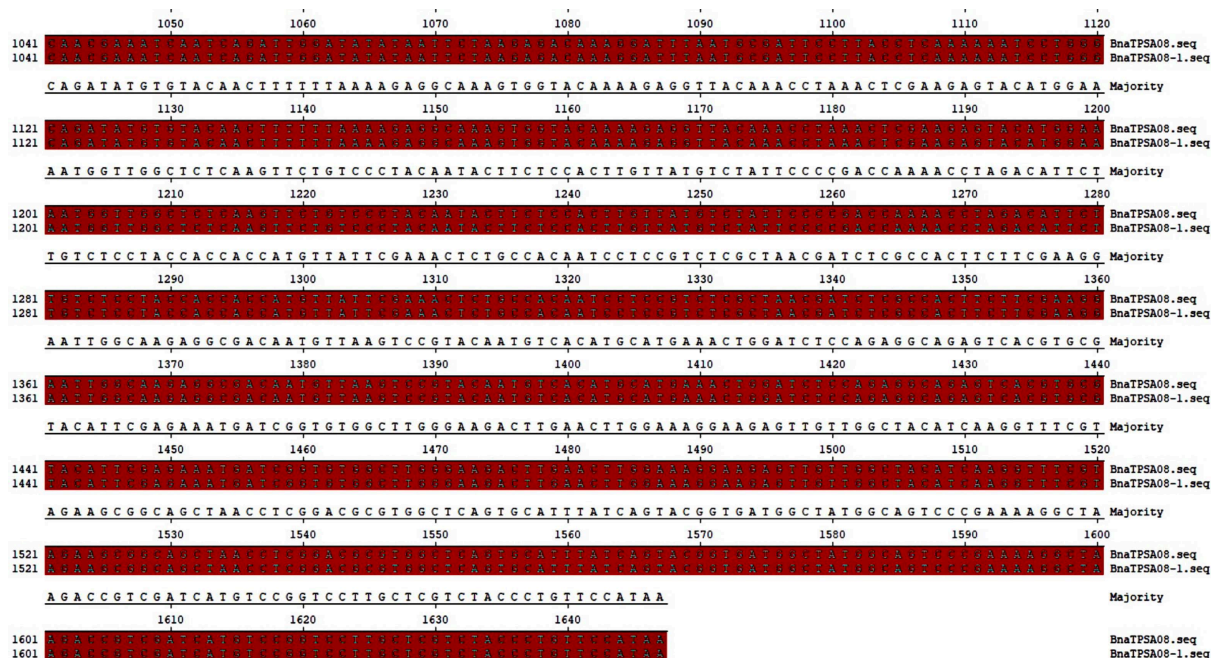
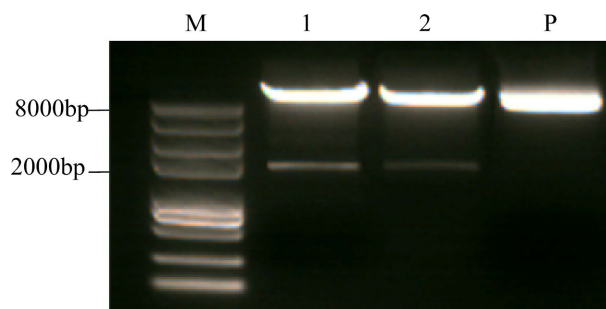


Figure 2. Sequencing results of *BnaTPSA08-1* connected to the pEASY-Blunt vector

图 2. *BnaTPSA08-1* 连接 pEASY-Blunt 载体测序结果

用 *Nco*I 和 *Xba*I 对目的片段和 pFGC5941-35S 载体分别进行双酶切(如图 3), 酶切体系(20 μ L): DNA 100 ng、FD Green buffer 2 μ L、*Nco*I 1 μ L、*Xba*I 1 μ L、ddH₂O 补足。37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。反应结束后进行琼脂糖凝胶检测并胶回收备用。



注: M: Trans2K® Plus II DNA Marker; 1、2: *Nco*I、*Xba*I 双酶切 pFGC5941 载体; P: 阳性对照(未酶切); N: 空白对照

Figure 3. *Nco*I、*Xba*I double enzyme digestion pFGC5941 vector

图 3. *Nco*I、*Xba*I 双酶切 pFGC5941 载体

将胶回收后的目标片段和双元表达载体 pFGC5941-35S 进行连接反应, 构建 pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 过表达载体。连接体系(10 μ L): Linear Vector DNA 50 ng、Insert DNA:1 molar ratio over vecto、T4 DNA ligase 0.5 μ L、10 \times T4 DNA ligase Buffer 1 μ L、Water, nuclease-free 补足、

22℃连接 30 min 并转化大肠 DH5 α 。挑取菌落进行 PCR 鉴定。对鉴定出的阳性菌落进行测序, 以确保载体构建的准确性。成功构建的载体命名为 pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 过表达载体(如图 4)。

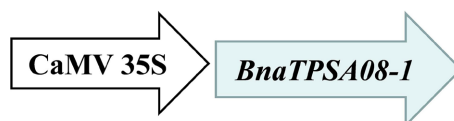
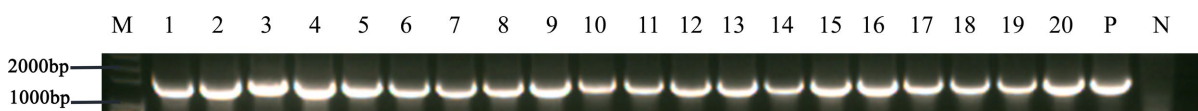


Figure 4. pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* overexpression vector schematic
图 4. pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 过表达载体简图

3.2. 农杆菌介导的甘蓝型油菜下胚轴遗传转化及转基因阳性植株的鉴定

将 pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 转入农杆菌 GV3101, 使用引物 pFGC5941-35S-2577F(ATGACGCACAATCCCCTATCCTTC)和 *BnaTPSA08-1*-R 验证, PCR 结果显示(如图 5), 已成功转入 GV3101 的质粒, 可作为后续油菜遗传转化制备侵染下胚轴的菌液。



注: M: Trans2K® Plus II DNA Marker; 1~20: 单菌落 PCR 产物, P 为阳性对照 pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1*, N: 空白对照

Figure 5. pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* overexpression vector *Agrobacterium* colony PCR

图 5. pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 过表达载体农杆菌菌落 PCR

验证成功的农杆菌菌液, 如 2.2.2 所述方法进行农杆菌介导的甘蓝型油菜下胚轴遗传转化。将成功炼苗的油菜抗性苗提取 DNA, 使用引物 pFGC5941-35S-2577F 和 *BnaTPSA08-1*-R 进行转基因油菜检测。最终通过遗传转化, 得到 28 株抗性油菜, 检测其中 15 株抗性油菜得到 11 株转基因油菜, 阳性率为 73%。转基因及抗性油菜统计表(如表 1)所示, 油菜遗传转化及转基因鉴定示意图(如图 6, 图 7)所示。

Table 1. Statistical table of transgenic rape

表 1. 转基因油菜统计表

载体	抗性	下胚轴	愈伤组织	抗性幼苗	转基因油菜	阳性率(%)
pFGC5941-35S:: <i>BnaTPSA08-1</i>	PPT	1150	756	28	11 (15)	73%

注: M: 250 bp DNA Ladder; 1~15: 抗性苗 1-15 号; N: 空白对照 p: 质粒阳性对照; N: 水空白对照。

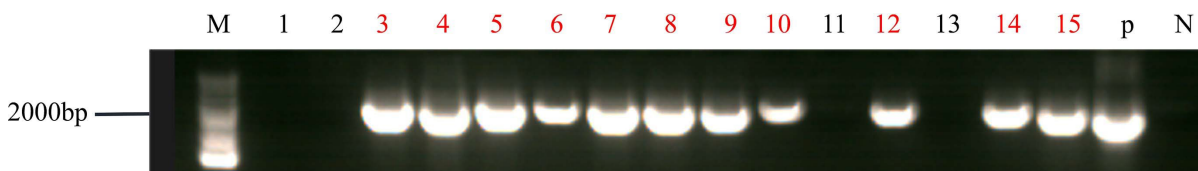
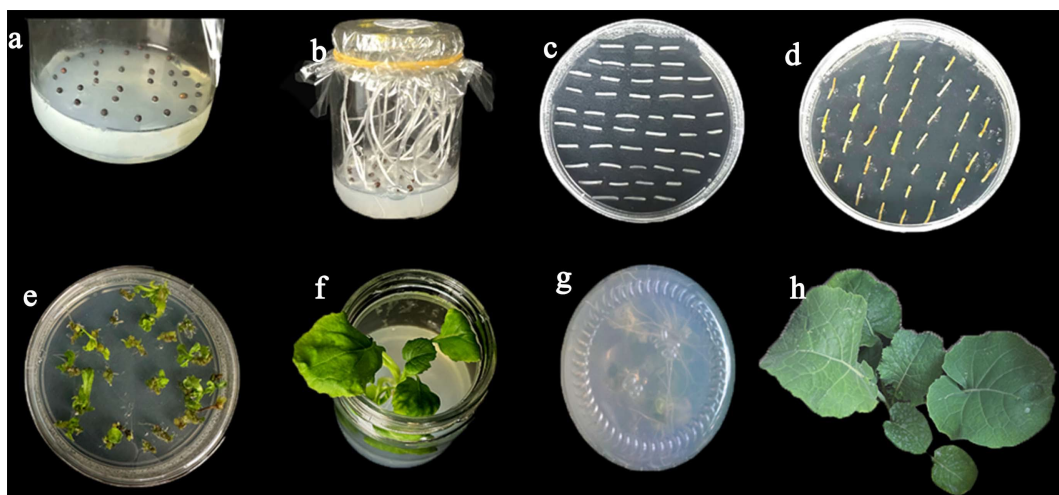


Figure 6. Identification of expression frame of pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* in rape material 1-15

图 6. pFGC5941-35S::*BnaTPSA08-1* 转油菜材料 1-15 表达框鉴定

提取转基因油菜的叶片 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 使用荧光定量 PCR 分析 XY15 与转基因油菜中 *BnaTPSA08-1* 的相对表达水平, 荧光定量 PCR 引物使用网站 NCBI 设计, 其中正向引物为 *BnaA08-dIF*:

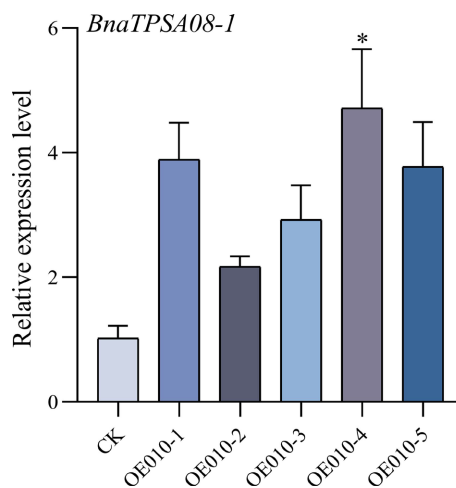


注: a: 铺种; b: 下胚轴生长; c: 共培养; d: 愈伤组织诱导; e: 愈伤组织再分化; f: 生根后的再生苗; g: 抗性苗生根; h: 炼苗后的抗性苗

Figure 7. Schematic diagram of genetic transformation of rape

图 7. 油菜遗传转化示意图

CGGGAACAAATATGCGAAAGAGG, 反向引物为 BnaA08-dlR: TCGGAACATAAGGGCAGTCG, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量并将野生型油菜相对表达量标准化为 1, 结果显示, 在 1 号转基因油菜中, *BnaTPSA08-1* 转录水平上调最高(如图 8)。



注: 符号*表示在 $p < 0.05$ 的概率水平上与 CK 有统计学意义上的显著偏差。

Figure 8. Detection of *BnaTPSA08-1* transcription level in transgenic rape

图 8. 转基因油菜中 *BnaTPSA08-1* 转录水平检测

3.3. 植株挥发性气体收集与组分测定

3.3.1. 定性检测

将四叶期的 XY15 与 4 号转基因油菜分别放入两个相同大小的器皿中, 利用 TA 吸附管分别将两株试验材料进行挥发性气体收集, 并分别使用正己烷将其稀释, 定容至 500 μL , 使用 2.2.3 所述条件进行组分测定, 通过岛津 GCMS-QP2010 毛细管色谱柱分离, 质谱检测, 得出 2 种色谱组物质分离图(图 9、图

10)其中, XY15 中分离出有效成分 3 种, 分别是 1-(2-甲氧基-1-甲基乙氧基)异丙醇、2-(2-甲氧基丙氧基)丙醇和二乙二醇丁醚。而过表达 *BnaTPSA08-1* 油菜(OE10-4)中分离出有效成分 25 种, 主要是烷类物质, 其中多数为十一烷及十一烷的衍生物。

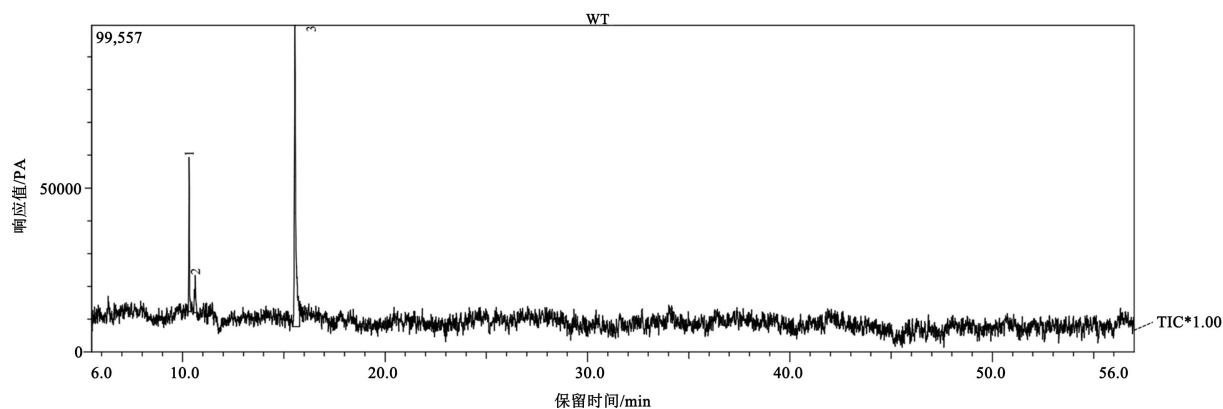


Figure 9. Chromatogram of various substances in wild type (WT) volatile gas collection of *Brassica napus*

图 9. 甘蓝型油菜野生型(WT)挥发性气体收集中各物质色谱图

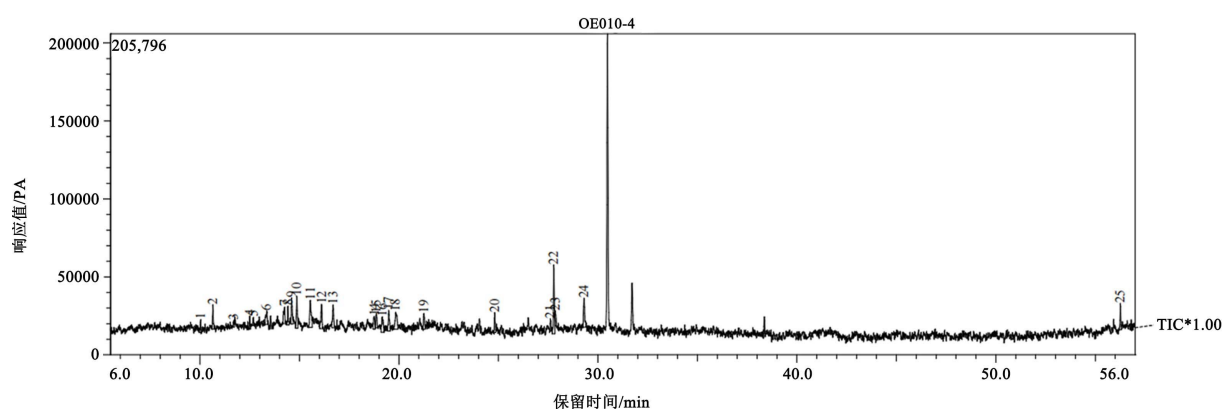


Figure 10. Chromatograms of various substances in volatile gas collection of overexpressed *BnaTPSA08-1* rape (OE10-4)

图 10. 过表达 *BnaTPSA08-1* 油菜(OE10-4)挥发性气体收集中各物质色谱图

3.3.2. 定量分析

通过对两种材料的挥发性成分进行定量分析(表 2、表 3), WT 植株中共鉴定出 3 种挥发物分别占比为 1-(2-甲氧基-1-甲基乙氧基)异丙醇: 15.545%、2-(2-甲氧基丙氧基)丙醇 6.08%、二乙二醇丁醚 77.96%, OE10-4 植株中共鉴定到 25 种挥发物, 其主要成分的相对占比为 2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇双异丁酸酯 35.86%, 烷类物质 37.95%, 其中十一烷及十一烷衍生物 16.09%。

Table 2. Relative contents of volatile components in WT plants

表 2. WT 植株挥发性成分相对含量组成

组分序号	CAS 号	化合物	保留时间	占比
1	20324-32-7	1-(2-甲氧基-1-甲基乙氧基)异丙醇	10.317	15.545
2	13588-28-8	2-(2-甲氧基丙氧基)丙醇	10.624	6.08
3	112-34-5	二乙二醇丁醚	15.545	77.96

Table 3. Relative contents and composition of volatile components in overexpressed plants
表 3. 过表达植株挥发性成分相对含量组成

组分序号	CAS 号	化合物	保留时间	占比
1	124-18-5	癸烷	10.032	1.36
2	104-76-7	2-乙基己醇	10.65	3.45
3	17312-78-6	3,4-Dimethylundecane	11.697	1
4	1120-21-4	十一烷	12.5	1.83
5	124-19-6	壬醛	12.683	1.33
6	3304-28-7	4-Hexenal, 5-methyl-2-(1-methylethylidene)	13.351	3.4
7	1632-70-8	5-甲基十一烷	14.25	4
8	2980-69-0	4-甲基十一烷	14.415	2.77
9	17312-78-6	3,4-Dimethylundecane	14.609	5
10	1002-43-3	2-(氯甲基)-1-甲基-1H-咪唑盐酸盐	14.87	6.14
11	112-34-5	乙二醇丁醚	15.546	7.84
12	112-40-3	十二烷	16.115	5.56
13	17301-23-4	2,6-二甲基十一烷	16.69	4.74
14	17301-22-3	2,5-dimethylundecane	18.755	2.87
15	17312-80-0	2,4-二甲基十一烷	18.866	2.88
16	6117-97-1	4-甲基十二烷	19.173	4.36
17	1560-97-0	2-甲基十二烷	19.491	4.37
18	1560-96-9	2-甲基十三烷	19.831	6.37
19	544-76-3	正十六烷	21.252	3.08
20	629-59-4	十四烷	24.819	2.95
21	31081-18-2	3-Methyl-5-propylnonane	27.617	1.58
22	128-37-0	抗氧化剂 264	27.786	11.28
23	96-76-4	2,4-二叔丁基苯酚	27.853	2.61
24	777-95-7	1,6-二氧杂环十二烷-7,12-二酮	29.304	6.03
25	41556-26-7	光稳定剂 HS-508 (292)	56.26	3.21

从 XY15 与过表达植株之间挥发性成分种类与比例差异进行分析, 两者间主要差异是过表达植株挥发性成分中有十一烷及十一烷衍生物, 而 XY15 中没有。说明 *BnaTPSA08-1* 基因的主要生化功能是催化十一烷及其衍生物的合成。

4. 结论

本研究通过比较过量表达 *BnaTPSA08-1* 植株与受体材料 XY15 的有机挥发组分差异, 结果显示过表达植株出现了 XY15 植株没有的十一烷及其衍生物的产生, 说明 *BnaTPSA08-1* 基因的主要生化功能是催化十一烷及其衍的生物合成。

5. 讨论

萜类化合物是自然界中广泛存在的一类具有重要生理功能和显著生物活性的天然产物[11], 而萜烯

合成酶类(Terpene synthases, TPSs)是植物萜类化合物合成的关键酶[12], *CsTPS21* 可以催化单萜类物质合成[13], 玉米中的 *ZmTPS6* 可以催化倍半萜物质合成[14], 拟南芥中的 *AtTPS03* 与 *AtTPS08* 催化单萜类物质合成[15] [16], 而甘蓝型油菜中的 *BnaTPSA08-1* 能催化十一烷及其衍的生物合成, 这说明萜烯合成酶类不仅催化萜类物质的合成, 还能催化烷类物质的生物合成, 这是萜烯合成酶类作用的新发现, 大大拓宽了人们对萜烯合成酶类生化功能的认知。

项目基金

国家重点研发计划项目(2022YFD1200400-3), 湖南省研究生科研创新项目(CX20230695)。

参考文献

- [1] 张哲, 殷艳, 刘芳, 王积军, 傅廷栋. 我国油菜多功能开发利用现状及发展对策[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 618-623.
- [2] 张卡, 李浩杰, 张锦芳, 崔成, 柴靛, 郑本川, 蒋梁材. 甘蓝型油菜菌核病抗病性研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(6): 1095-1102.
- [3] Christianson, D.W. (2017) Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chemical Reviews*, **117**, 11570-11648. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287>
- [4] 闫浩, 徐雪峰, 杜金凤. 香子含笑叶挥发油 GC-MS 分析及抗菌性研究[J]. 农学学报, 2019, 9(3): 56-60.
- [5] Cui, A., Jin, Y., Li, Y., Nie, T. and Sun, L. (2023) Systematic Identification of TPS Genes in *Gossypium* and Their Characteristics in Response to Flooding Stress. *Frontiers in Plant Science*, **14**, Article 112684. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1126884>
- [6] Cao, Z., Ma, Q., Weng, Y., Shi, J., Chen, J. and Hao, Z. (2023) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of TPS Gene Family in *Liriodendron Chinense*. *Genes*, **14**, Article 770. <https://doi.org/10.3390/genes14030770>
- [7] 胡莉. 茉莉花萜烯合成酶(TPS)特异基因的功能分析[D]: [硕士学位论文]. 福州: 福建农林大学, 2023.
- [8] Fäldt, J., Arimura, G., Gershenzon, J., Takabayashi, J. and Bohlmann, J. (2003) Functional Identification of *AtTPS03* as (e)-B-Ocimene Synthase: A Monoterpene Synthase Catalyzing Jasmonate- and Wound-Induced Volatile Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **216**, 745-751. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0924-0>
- [9] Yang, Z., Li, Y., Gao, F., Jin, W., Li, S., Kimani, S., *et al.* (2020) MYB21 Interacts with MYC2 to Control the Expression of Terpene Synthase Genes in Flowers of *Freesia hybrida* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **71**, 4140-4158. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa184>
- [10] Zielińska-Błajet, M. and Feder-Kubis, J. (2020) Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article 7078. <https://doi.org/10.3390/ijms21197078>
- [11] 程晓雷, 刘天罡, 陶慧. 萜类化合物的非常规生物合成研究进展[J/OL]. 合成生物学: 1-23. <https://link.cnki.net/urlid/10.1687.Q.20240428.1517.008>, 2024-05-05.
- [12] 贾聪玲, 舒娟, 党静洁, 王雪, 吴敏南, 刘潺潺. 荆芥萜类合成酶(TPS)基因家族鉴定与分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(22): 6039-6050.
- [13] 朱汉斌. 广东省农业科学院果树研究所柑橘黄龙病研究获进展[EB/OL]. <https://link.cnki.net/doi/10.28514/n.cnki.nkxsb.2023.002293>, 2023-09-28.
- [14] 万薇. 倍半萜合酶催化 FPP 发生 1, 6 环化反应的控制机理[D]: [硕士学位论文]. 保定: 河北大学, 2023.
- [15] Vaughan, M.M., Wang, Q., Webster, F.X., Kiemle, D., Hong, Y.J., Tantillo, D.J., *et al.* (2013) Formation of the Unusual Semivolatile Diterpene Rhizathalene by the *Arabidopsis* Class I Terpene Synthase *TPS08* in the Root Stele Is Involved in Defense against Belowground Herbivory. *The Plant Cell*, **25**, 1108-1125. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100057>
- [16] Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., *et al.* (2010) Variation of Herbivore-Induced Volatile Terpenes among *Arabidopsis* Ecotypes Depends on Allelic Differences and Subcellular Targeting of Two Terpene Synthases, *TPS02* and *Tps03*. *Plant Physiology*, **153**, 1293-1310. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154864>