

濒危南药白木香萜类合成酶的逆境表达模式分析

高志晖¹, 赵文婷^{1,3}, 金 钺¹, 熊换英^{1,4}, 杨 云², 黄俊卿^{1,4}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193
2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南 万宁 571533
3. 东北林业大学园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040
4. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 通过分析各萜类合成酶的表达, 预测各种环境因素和逆境处理对白木香萜类合成的影响。方法 对二年生白木香植株和愈伤组织分别进行多种逆境处理, 采用荧光定量 PCR 分析组织中萜类合成酶基因的表达模式。结果 伤害和火焰均可诱导茎干萜类合成酶转录水平的表达, 火焰法诱导效果更明显; 低温抑制各类萜类合成酶的转录; 愈伤组织的处理中, 茉莉酸甲酯 (MeJA) 对萜类合成酶转录的诱导效果最显著。结论 伤害和火焰均可诱导茎干中萜类的合成, 但火焰效果更好, 低温不利于白木香结香, 多种处理均可诱导愈伤组织萜类合成, 其中 MeJA 诱导效果最佳。

关键词: 白木香; 萜类; 萜类合成酶; 逆境处理; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0749-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.022

Expression pattern analysis of terpene synthases of endangered *Aquilaria sinensis* under different stresses

GAO Zhi-hui¹, ZHAO Wen-ting^{1,3}, JIN Yue¹, XIONG Huan-ying^{1,4}, YANG Yun², HUANG Jun-qing^{1,4}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100193, China
2. Hainan Branch, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Wanning 571533, China
3. College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
4. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To analyze the expression of terpene synthases of *Aquilaria sinensis*, an endangered south medicine, and to predict the influences of the environmental factors and stresses on the synthesis of terpene in *A. sinensis*. **Methods** Two-year old seedlings and calli were treated by different stresses. The gene expression patterns of terpene synthases were analyzed by real-time qPCR. **Results** Wounding and cauterizing could induce the transcriptional expression of terpene synthases in the stems, and the effect of cauterizing was more significant. Low temperature inhibited the transcription of terpene synthases. In calli, methyl jasmonate (MeJA) treatment had the most effective induction. **Conclusion** Both wounding and cauterizing could induce the synthesis of terpenes in stems, while the cauterizing treatment might have better effect. Low temperature has negative influence on agarwood formation. For calli, different treatments could induce the terpene synthesis, while MeJA has the best efficacy.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng.; terpene; terpene synthase; stress treatment; real-time qPCR

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng., 又称土沉香, 属瑞香科沉香属植物, 为我国特有的热带及亚热带常绿乔木, 是我国生产名贵芳香类药材沉香的唯一植物来源。由于沉香的高价值且国际市场需求极大, 长期以来白木香遭到过度砍伐, 其原始林已经基本破坏殆尽。2000年白木香被世界自然保护联盟 (IUCN) 列入《世界自然保护联盟受威胁植

物红色名录》。2004年白木香列入了《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录。沉香主要形成于白木香树干心材部位。然而, 健康的白木香不能形成沉香, 只有在受到伤害、病菌侵染等胁迫时才会合成沉香类化学成分, 经过长时间积累后形成沉香^[1-4]。鉴于沉香形成缓慢, 在成年白木香植株上通过成分比较来分析各种处理对沉香形成的作用耗时较长,

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001607)

作者简介: 高志晖 (1981—), 助理研究员, 博士, 研究方向为药用植物次生代谢调控及分子机制。

Tel/Fax: (010)57833363 E-mail: zhgao@implad.ac.cn

往往需要半年甚至更长的时间；且由于大田栽培的植株在长时间的处理中容易受到多种环境因素的影响，造成条件不可控、难以实现单因素处理、重复性不高、筛选精确度较差。本课题组在前期研究中建立了白木香愈伤和茎组织的 RNA 提取方法^[5-6]，通过高通量测序技术筛选了一批萜类合成酶^[7]，并筛选确定了基因表达分析最适内参基因^[8]，在此基础上，为迅速筛选促进沉香形成的有效处理方法，以二年生白木香植株和白木香愈伤组织为材料，通过多种胁迫处理，并采用荧光定量 PCR 分析组织中萜类合成关键酶基因的表达，以分析预测多种环境因素和逆境相关因子对白木香萜类形成的影响。

1 材料与仪器

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Spreng. 植株为中国医学科学院药用植物研究所温室种植，2 年生，由中国医学科学院药用植物研究所海南分所陈伟平研究员鉴定。Norgen RNA 提取试剂盒购自联川生物公司，反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂和反转录所用 dNTP 购自 Promega 公司，无 RNA 酶的 DNA 酶 I 和 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂购自宝生物公司。反转录引物 Oligo dT18 和扩增引物由北京三博生物公司合成。Sigma 1—14 高速离心机（德国 Sigma 公司），Thermo CR3i 高速冷冻离心机（美国赛默飞世尔公司），BioRad 凝胶成像系统（美国伯乐公司），NanoDrop ND2000 核酸蛋白检测仪（美国赛默飞世尔公司），BioRad PowerPac 电泳仪（美国伯乐公司），Biometra PCR 仪（德国 Biometra 公司），BioRad IQ5 荧光定量 PCR 仪（美国伯乐公司）。

2 方法

2.1 白木香愈伤组织的诱导

取白木香茎段，经氯化汞与 75%乙醇灭菌后置于含 1 μg/mL 萘乙酸（NAA）和 0.8 μg/mL 6-苄氨基嘌呤（6-BA）的 1/2 MS 培养基上，暗培养诱导愈伤组织。所得的愈伤组织于该培养基上培养，每隔 4 周转至新的培养基上继续培养。

2.2 愈伤组织处理方法

将直径 1 cm 大小的愈伤组织转入加入各种激素或试剂的培养基 [脱落酸（ABA）100 μmol/L、H₂O₂ 50 mmol/L、甘露醇 400 mmol/L、茉莉酸甲酯（MeJA）100 μmol/L、NaCl 300 mmol/L、水杨酸（SA）100 μmol/L、乙烯利 50 μmol/L]。处理 6 h 后取样，于液氮中速冻后，保存于 -70 °C 冰箱中待用。

2.3 白木香植株处理

伤害处理：用刀片在白木香枝条和茎上每隔 1 cm 切割伤口，2 h 后取样；火焰处理：将水泥钉用火烧红后在白木香枝条和茎上每隔 1 cm 钻孔，2 h 后取样；低温和高温处理：将白木香植株分别放于 16 °C 和 42 °C 培养箱中培养 6 h 后取枝条组织。样品于液氮中速冻后，保存于 -70 °C 冰箱中待用。

2.4 引物设计

萜类合成的酶的序列来源于高通量测序所得的 EST 序列^[8]。包括辅酶 A 硫解酶（acetoacetyl-CoA thiolase, AACT）、法尼基焦磷酸合酶（farnesyl diphosphate synthase, FPS）、倍半萜合酶（sesquiterpene synthase, SS）、鲨烯合酶（squalene synthase, SQS）以及 DXP 合成酶（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS）各转录本，通过 Oligo 6 软件设计引物，使扩增产物的长度在 100~300 bp，退火温度在 53~57 °C，GC 量在 40%~60%，ASS1 引物参考文献^[9]（表 1）。所有引物经 PCR 扩增后，产物由北京三博生物公司进行测序验证。

2.5 荧光定量 PCR

将不同处理所得的白木香样品磨碎并选用 Norgen 试剂盒提取总 RNA，使用 DNA 酶 15 U 于 37 °C 消化基因组 DNA 30 min，然后加入 0.5 mol/L 的 EDTA 热处理 2 min，再用冷乙醇沉淀 RNA 并清洗一遍，溶于无 RNase 水后使用 Nanodrop ND2000 测定 RNA 浓度，各样品取 0.5 μg RNA 用于反转录，25 μL 反转录体系：Oligo dT（18）0.1 μmol/L，200 U M-MLV，dNTP 0.2 mmol/L，RNA 酶抑制剂 20 U。反转录反应于 37 °C 进行 1 h。取 1 μL 反转录所得 cDNA 进行荧光定量 PCR 扩增。20 μL PCR 体系包含 10 μL 预混液，各 0.2 μmol/L 引物，和 1 μL 反转录所得 cDNA。扩增程序：95 °C 预变性 10 min，95 °C 变性 30 s，63 °C 1 min，共 40 个循环。实验共设 3 个重复。根据前期对白木香内参基因的筛选研究，采用在经各种处理的白木香茎和愈伤组织中稳定表达的基因 TUA 作为内参，引物的选用参考前期研究^[8]。

3 结果与分析

3.1 扩增产物的验证

根据转录组测序组装和注释，白木香中的 AACT、FPS、DXS、ASS、SQS 等重要萜类合成途径的关键酶同源序列被鉴定出来。据此，本实验

表 1 萜类合成酶的引物和扩增片段

Table 1 Primers and amplification fragments of terpene synthases

基因名称	功能	氨基酸相似性 /%	引物序列	引物长度 / bp	扩增片段长度 / bp	退火温度 / °C
AACT1	乙酰辅酶 A C-酰基转移酶	95	正向: CGCGTCAGGGATGAAAGCAACTA 反向: GAATCATGGCCAAGGCGAGAT	23/21	150	55.8
AACT2	乙酰辅酶 A C-酰基转移酶	85	正向: CTGCTCCTGCCCTTGTATTCC 反向: GCTCCGCCATTACATTGACT	22/21	160	53.9
FPS1	法尼基焦磷酸合酶	75	正向: CACCATCCCCTCGCTTTACTT 反向: TACGGGAAGGATAACGCAGAA	21/21	210	54.7
FPS2	法尼基焦磷酸合酶	78	正向: CCGCAGCTTCTCTCTCGTT 反向: GGCGACGGTTGATCTGTTAC	20/21	112	55.8
DXS1	5-磷酸脱氧木酮糖合成酶	96	正向: TTGTAGGGAACCGACGAAGGA 反向: TCAAAGCTAGTGCCAAGACGC	21/21	150	55.3
DXS2	5-磷酸脱氧木酮糖合成酶	80	正向: TGCTCTGGTTCGGAAACT 反向: GCCAAGAATGTTGAATACTGTT	18/22	247	54.1
SQS	鲨烯合酶	88	正向: TTCTGCGAGCTCTTGATACTGTT 反向: ATCCTCTATTGCCTCTGATAAC	23/23	212	52.0
ASS2	倍半萜合酶	44	正向: GCTGGGTTGATGATCTTCGTA 反向: TTCTGCCTCTGAGTTTGTGTAC	21/23	276	54.0
ASS1	倍半萜合酶	96	正向: GTACCGCTACCGAGGGAAGTTGAAGA 反向: TTGGGCGACTTGGTAGCCTTGGT	27/27	586	56.4

设计了荧光定量 PCR 检测引物，以鉴定其表达。

为验证这些引物为各合成酶转录本的扩增引物，首先进行了普通 PCR 扩增。扩增产物琼脂糖凝胶电泳显示，各条带大小与根据高通量测序得到的序列设计引物时得到的扩增片段大小基本一致（图 1）。进而将 PCR 产物测序，所得的测序结果进行 BLAST 比对，所有序列的比对结果均符合转录组的注释结果，即所有扩增产物为萜类合成酶的 DNA 序列。

3.2 白木香植株不同处理下各种萜类关键酶基因的转录水平表达

自然界中沉香的形成需要树木受到伤害、虫蛀、

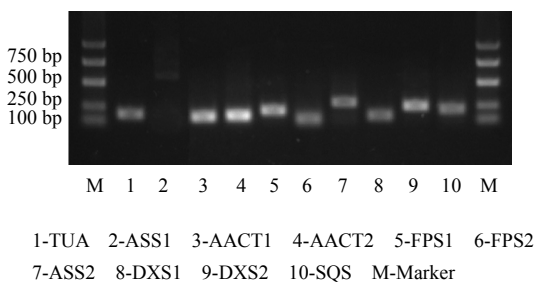


图 1 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of amplification products

雷劈等胁迫，现有的结香技术也主要依赖砍伤、火烙等对白木香树干和枝条的伤害。为检测几种处理和温度等环境因素对结香可能的影响，对二年生白木香树进行伤害、火烙、低温处理和高温处理，以检测各种萜类合酶的转录水平表达。结果显示，各种萜类合酶表达水平对各种胁迫呈现出多样的响应模式，AACT 的两个转录本在伤害处理后表达水平最高，ASS1、ASS2 和 SQS 则在火烙后表达水平最高，而 FPS1 和 FPS2 则分别响应伤害和火烙，特别是 ASS1 和 FPS2 在火烙后表达量出现了剧烈的增加。这个结果表明伤害和火烙均可诱导萜类合酶转录水平的表达，但其机制可能略有不同，即可能通过对不同萜类合酶的诱导合成沉香主要成分。相比较而言，火烙处理的结香效果可能会强于伤害处理。在伤害和火烙处理下，DXS 两种转录本的量均有所减少，特别是火烙处理后，DXS 量剧烈减少，由于 DXS 是 MEP 途径的关键酶^[10]，这个结果表明胞质甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径为白木香萜类合成的关键途径（图 2）。

16 °C 时所有萜类合酶的转录水平都降低了，这可能是由于低温对白木香这种热带树种的整个生长状态造成的影响。在低温胁迫下，白木香

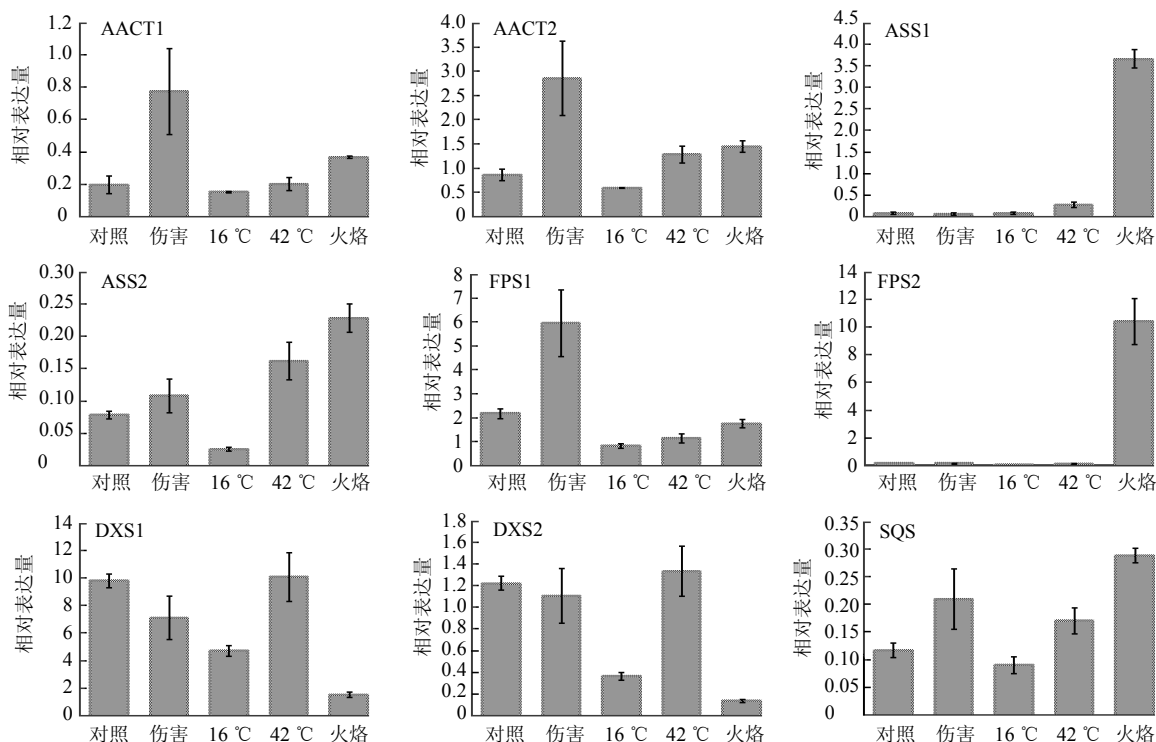


图 2 不同处理对白木香茎中各种萜类合成酶基因表达的影响

Fig. 2 Influences of different treatments on gene expression of terpene synthases in stems of *A. sinensis*

树的生命活力受到抑制以减少能量的消耗，保证树体在低温下存活，所以各种酶的表达也受到抑制。这个结果表明低温对于结香具有不利的影响。在 42 °C 下，ASS2 和 SQS 的表达量有所增加，表明高温可能在一定程度上可以促进结香（图 2）。

3.3 白木香愈伤组织不同处理下各种萜类关键酶的转录水平表达

根据文献报道^[9,11]和本课题组前期的研究，白木香愈伤组织经 MeJA 和 SA 处理均可诱导倍半萜的合成，倍半萜是一种潜在的沉香成分生产材料，因此，考察了 7 种胁迫处理对白木香愈伤组织中萜类合酶的转录水平的影响，结果见图 3。

AACT、ASS、FPS 和 SQS 各转录本在受到胁迫后均有不同程度的增加，而 DXS 两种转录本的量均受到了抑制，这个结果表明逆境胁迫条件下愈伤组织中 MEP 途径受到了抑制。ASS 受胁迫处理后表达量增加幅度最大，FPS 和 SQS 表达量也有明显的增加，而 AACT 的表达量增加较弱。

对不同胁迫处理的分析显示，MeJA 对萜类合酶的诱导效果较明显。ASS1、FPS1 和 SQS 在 MeJA 处理后显示出最高的表达量，此外，MeJA 对其他基因的转录效果也都比较明显。ABA 和乙

烯利对 ASS、FPS1 的诱导也很强烈，表明这两种处理对白木香愈伤组织沉香形成可能会有影响，而且这两种逆境激素涉及的胁迫如衰老、干旱等均可能诱导沉香的形成。而甘露醇和 NaCl 处理也可诱导 ASS 的表达，表明渗透胁迫和盐胁迫也有可能诱导沉香形成。

4 讨论

萜类化合物的生物合成过程从属于异戊二烯代谢途径，前体物质异戊烯焦磷酸（isopentenyl diphosphate, IPP）或二甲丙烯焦磷酸（dimethylallyldiphosphate, DMAPP, IPP 的异构化产物）为萜类合成的基本前体。合成途径有两条，即 MVA 途径和赤藻糖醇（2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP）途径^[10,12]，本实验研究结果显示，在伤害和火焰处理下，DXS 两种转录本的量均有所减少，特别是火焰处理后，DXS 量剧烈减少，由于 DXS 是 MEP 途径的关键酶，这个结果表明 MEP 途径可能不是白木香萜类合成的主要途径。倍半萜是沉香的主要成分^[13]，三萜也被认为是沉香的重要组分^[14-15]。由于沉香的形成只有在树体受到多种伤害后才启动，且其成分被认为具有抑菌活性^[16]，故沉香树脂的形成被认为是一种防御机制，是沉香属植物应对多种

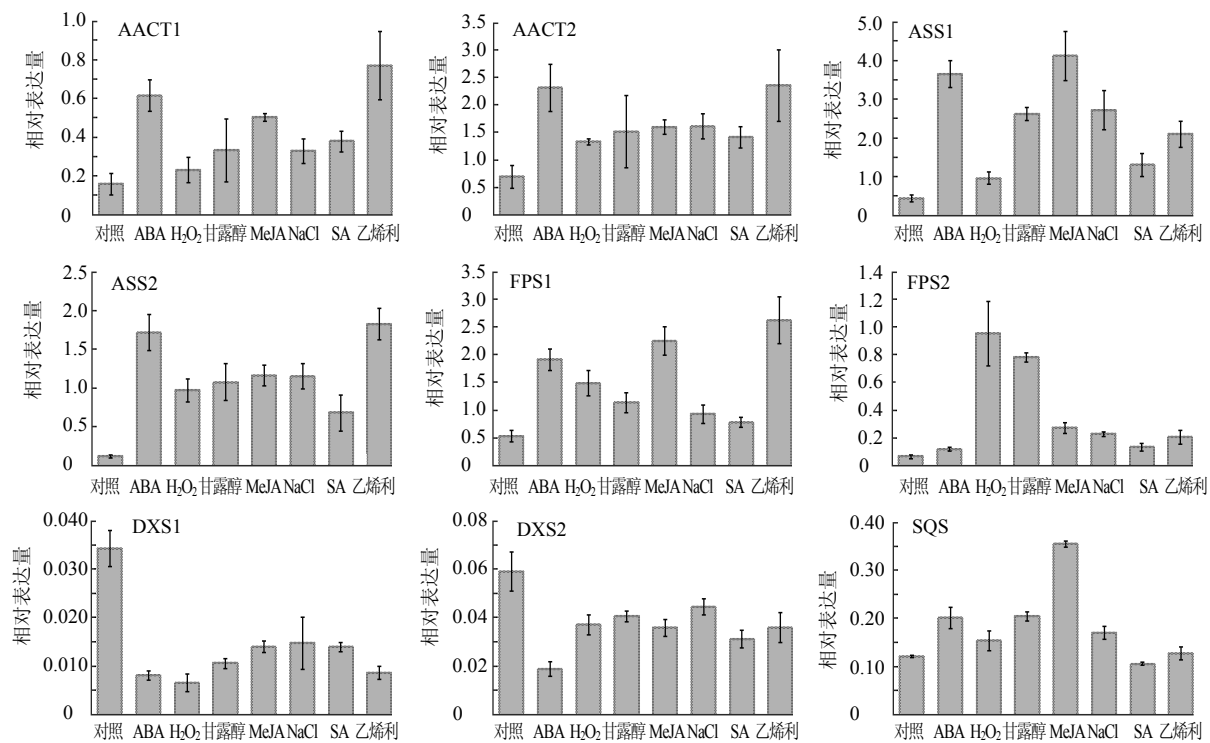


图3 不同处理对白木香愈伤组织中各种萜类合成酶基因表达的影响

Fig. 3 Influences of different treatments on gene expression of terpene synthases in calli of *A. sinensis*

逆境的反应，这与多种萜类在其他植物中的作用一致^[17]。前人研究表明两种逆境激素 MeJA 和 SA 可以诱导沉香属植物愈伤组织或悬浮细胞形成倍半萜类物质^[9,11]，而其他逆境处理、逆境激素或者环境因子的影响尚未可知。由于萜类的生物合成被认为主要受到转录调控^[18]，本研究着眼于各种处理对萜类合酶的转录水平的表达调控。结果表明各种环境因子和逆境处理均可能会对沉香形成造成影响，如 MeJA 的处理，可以显著提高多种萜类合酶的转录水平，这除了与沉香前期研究一致，与其他植物中萜类的多项研究也一致，如对紫杉醇的诱导^[19-21]和松树萜类合酶的诱导^[22]。乙烯利处理也可以提高愈伤组织中萜类合酶的表达，这与玉米中最新报道的乙烯对倍半萜类物质及萜类合成酶的诱导作用一致^[23]，说明乙烯很可能是一种沉香的诱导因子。本研究还表明了盐胁迫、渗透胁迫、温度等处理均可能对沉香形成造成影响，虽然这些因子在萜类合成中的作用尚未见报道，其有效性有待进一步证明，但本研究表明沉香中萜类的形成可能比其他植物对环境的敏感度更高。

参考文献

[1] Yagura T, Shibayama N, Ito M, et al. Three novel diepoxy

tetrahydrochromones from agarwood artificially produced by intentional wounding [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46: 4395-4398.

[2] 广东省植物研究所. 初步揭开沉香结香的秘密 [J]. *植物学报*, 1976, 18(4): 287-291.

[3] 戚树源, 林立东, 胡厚才. 白木香中色酮类化合物的形成 [J]. *中草药*, 2000, 31(9): 658-659.

[4] 戚树源, 林立东, 叶勤法. 沉香中苯基丙酮及其在黄绿墨耳真菌中的生物转化[J]. *生物工程学报*, 1998, 14(4): 464-466.

[5] 杨云, 张争, 孟慧, 等. 濒危南药白木香愈伤组织总 RNA 提取方法研究 [J]. *广东农业科学*, 2010(3): 193-195.

[6] 高志晖, 魏建和, 熊换英, 等. 几种提取白木香茎干总 RNA 方法的比较 [J]. *生物技术通讯*, 2012, 23(5): 718-721.

[7] 张争, 高志晖, 魏建和, 等. 三年生白木香机械伤害转录组学研究 [J]. *药学学报*, 2012, 47(8): 1106-1110.

[8] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, et al. Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9): 1759-1768.

[9] Kumeta Y, Ito M. Characterization of delta-guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant*

- Physiol*, 2010, 154(4): 1998-2007.
- [10] Vranová E, Coman D, Gruişsem W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 318-333.
- [11] Okudera Y, Ito M. Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and cell suspension cultures [J]. *Plant Biotechnol*, 2009, 26(3): 307-315.
- [12] Burlat V, Oudin A, Courtois M, *et al.* Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites [J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 131-141.
- [13] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodivers*, 2012, 9(2): 236-250.
- [14] 林立东, 戚树源. 国产沉香中的三萜成分 [J]. *中草药*, 2000, 31(2): 89-90.
- [15] 刘军民, 高幼衡, 徐鸿华, 等. 沉香化学成分研究 (II) [J]. *中草药*, 2007, 38(8): 1138-1140.
- [16] Chen H, Yang Y, Xue J, *et al.* Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884-4896.
- [17] Dudareva N, Negre F, Nagegowda D A, *et al.* Plant volatiles: Recent advances and future perspectives [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2006, 25: 417-440.
- [18] Nagegowda D A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and sub-cellular compartmentation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(14): 2965-2973.
- [19] Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 7: 1-23.
- [20] Zhang C H, Mei X G, Liu L, *et al.* Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 1561-1564.
- [21] Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, *et al.* Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1129-1132.
- [22] Byun-McKay A, Godard K A, Toudefallah M, *et al.* Wound-induced terpene synthase gene expression in sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(3): 1009-1021.
- [23] Huffaker A, Kaplan F, Vaughan M M, *et al.* Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4): 2082-2097.