

# 桂花花瓣醇酰基转移酶基因的克隆与表达

刘 偲 曾祥玲 郑日如 罗 靖 王彩云

华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为探讨桂花花瓣醇酰基转移酶基因的功能,从桂花品种‘柳叶金桂’花瓣中克隆得到 1 个醇酰基转移酶基因,命名为 *OfAAT1*,该基因全长 1 386 bp,编码 461 个氨基酸;通过 qRT-PCR 分析发现,*OfAAT1* 基因在花器官尤其在花瓣中大量表达,而在幼叶中基本不表达;其表达量随着花朵的开放逐渐增加,至盛花期达到最大,末花期又减少;*OfAAT1* 基因的表达量在盛花期还呈现明显的昼升夜降的节律性变化;进一步的氨基酸序列比对和系统进化树分析表明,该基因编码的氨基酸存在酰基转移酶 BAHD 家族特有的保守结构域,与矮牵牛 PhCFAT 亲缘最近,其次是大豆 GmCHAT 和马铃薯 StCHAT;结合桂花花瓣香气挥发性成分分析,初步推测桂花 *OfAAT1* 的功能可能与矮牵牛 PhCFAT 相似,可催化松柏醇产生松柏二酯,进一步被降解为异丁香酚,或与大豆 GmCHAT 和马铃薯 StCHAT 相似,与以脂肪酸为底物的酯类香气合成相关。

**关键词** 桂花; 醇酰基转移酶; qRT-PCR; 香气挥发性成分; 酯类香气

**中图分类号** S 685 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0036-07

桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 是我国十大传统名花之一,以其浓香闻名。桂花不仅具有良好的观赏品质,广植于庭院绿地,深受大众的喜爱,同时其在食品加工、香精、香料工业等方面彰显出巨大的经济价值<sup>[1]</sup>。前人通过 GC/MS 技术分析认为,桂花香气的挥发性成分主要有萜类、酯类、醇类、酮类和醛类等<sup>[2-3]</sup>,基于 GC/MS 结合 GC-O 技术分析的最新研究表明,以‘柳叶金桂’(‘Liuye Jingui’)、‘厚瓣银桂’(‘Houban Yingui’)和‘橘橙丹桂’(‘Gecheng Dangui’)品种为代表检测出的 54 种挥发性成分中,鉴定出了 17 种对桂花香气形成具有贡献的活性成分。这其中酯类挥发性成分如丁酸叶醇酯、丁酸己酯是桂花香气活性物质中的重要组分,且香气强度在‘柳叶金桂’中均明显高于其他 2 个桂花品种<sup>[3]</sup>。醇酰基转移酶是酯类生物合成途径中最末端的关键酶,在不同植物中具有广泛的底物选择性,可利用多种酰基 CoA 和多种醇作为底物形成不同的酯类化合物<sup>[4]</sup>。近年来,一些来自于植物花和果实的醇酰基转移酶基因相继被报道,如矮牵牛 *PhCFAT*<sup>[5]</sup>、月季 *RhAAT1*<sup>[6]</sup>、草莓 *FaAAT2*<sup>[7]</sup>、猕

猴桃 *AdATs*<sup>[8]</sup> 和番茄 *SlAAT1*<sup>[4]</sup> 等。这些基因均属于酰基转移酶类的 BAHD 家族,具有作为酶活性位点的 H<sub>xxx</sub>D 基序和附加的 DFGWG 及其变异基序的 2 个保守结构域<sup>[9]</sup>。但目前还未见关于桂花醇酰基转移酶基因的研究,更没有从分子水平研究桂花中重要的酯类香气物质与酰基转移酶类 BAHD 家族成员之间关系的相关报道。本试验以酯类物质含量丰富的‘柳叶金桂’(*O. fragrans* ‘Liuye Jingui’)为材料,利用 RACE 技术从其花瓣中克隆到一个醇酰基转移酶基因,利用分子生物学数据库和分析软件对该基因编码的蛋白质序列进行分析比对和系统进化关系预测,并结合基因的时空表达分析及酯类挥发性物质的变化趋势,初步推测该基因可能的功能,旨在揭示桂花花瓣酯类挥发性物质的分子代谢机制,并为桂花香气品质遗传改良与分子育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验以华中农业大学校园生长势良好的桂花

收稿日期: 2015-05-25

基金项目: 教育部博士点基金项目(20130146110022); 华中农业大学自主创新项目(2013PY088); 黄冈师范学院项目“大别山特色花卉资源”研究(2015TD02)

刘 偲, 硕士, 研究方向: 园林植物花香品质生理与分子机理. E-mail: 18202719109@163.com

通信作者: 王彩云, 博士, 教授, 研究方向: 园林花卉品质生理与分子生物学. E-mail: wangcy@mail.hzau.edu.cn

品种‘柳叶金桂’(*O. fragrans* ‘Liuye Jingui’)成年树(树龄约 50 a)为供试材料,于 2011 年 4 月采集其春梢幼嫩叶片(自上而下第 2~4 片叶),按照周媛<sup>[10]</sup>和杨康民<sup>[1]</sup>的花期划分方法,于同年 10 月分别采集其铃梗期、初花期、盛花期和末花期 4 个时期的花瓣以及盛花期不同组织部位。昼夜节律样品采样时间为 06:00—24:00,每隔 6 h 取样 1 次,其他样品均为 07:00—09:00。从不同花序上混合采样 2 g,花香检测用新鲜花瓣,其余样品及时置于液氮速冻,后放置于-80 °C 冰箱进行贮存备用。

## 1.2 RNA 的提取

取 0.2 g 贮存样品用液氮进行磨样,主要步骤参照 Trizol 试剂盒说明书进行。

## 1.3 RACE 操作

取不同开花时期等量混合后的 RNA 2 μg 进行反转录获得 5' RACE 和 3' RACE cDNA,参照 Smart RACE(Clontech, USA)操作说明书进行。

## 1.4 3' RACE 扩增

根据张园<sup>[11]</sup>获得的 CFAT 短片段标签序列设计 2 条正向引物:*OfAAT1-3'-1* 和 *OfAAT1-3'-2*(表 1)。第 1 轮扩增的引物为 *OfAAT1-3'-1* 和 UPM。反应体系为(共 20 μL):Premix *Taq*<sup>®</sup> Mix (2×) 10 μL, *OfAAT1-3'-1*(10 μmol/L) 0.2 μL, UPM(10 μmol/L) 1 μL, 3' RACE cDNA 1 μL 为模板,加水至 20 μL。反应程序:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 25 个循环, 72 °C 延伸 10 min。第 2 轮扩增的引物为 *OfAAT1-3'-2* 和 UPN,以稀释 25 倍后的第 1 轮扩增产物 1 μL 为第 3 轮扩增的模板,按比例扩大反应体系,后续 PCR 条件同第 1 轮扩增。

## 1.5 亚克隆和测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,回收,按照全式金公司(北京)的亚克隆说明书操作连接到 pEASYTM-T1 Simple 载体上,然后转化到大肠杆菌克隆感受态细胞 Trans1-T1,涂布含 100 mg/L Kan 的 LB 平板。以 M13R 和 M13F 为引物进行 PCR 阳性检测,对检测的阳性克隆进行测序。

## 1.6 5' RACE 扩增

根据 3' RACE 的测序信息设计 2 条反向引物:*OfAAT1-5'-1* 和 *OfAAT1-5'-2*(表 1)。第 1 轮扩增引物为 *OfAAT1-5'-1* 和 UPM,以 5' RACE cDNA 为模板;第 2 轮扩增引物为 *OfAAT1-5'-2* 和 UPN,PCR 条件同 3' RACE 扩增。回收目的片段,

进行亚克隆和测序。

## 1.7 生物信息学分析

利用 DNAMAN 进行信息序列拼接和比对,所得序列在 NCBI 进行 Blast 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),开放读码框(ORF)预测在 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)上进行,用 MEGA5.1 软件进行 Bootstrap 检测和分子进化树的构建,在 Expasy 网站(<http://www.expasy.org/tools/>)分析预测蛋白质结构。

## 1.8 OfAAT1 基因的 qRT-PCR 分析

分别提取不同样品的总 RNA, DNase I (RNase-free)(Thermo Fisher Scientific, USA)处理后,用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)进行反转录合成 cDNA 第 1 链。以组成型表达的细胞激动蛋白基因(*β-actin*)作为内参基因,内参引物为 actin-R 和 actin-F, *OfAAT1* 基因引物为 AAT-R 和 AAT-F(表 1)。在 ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应体系及程序参考 Takara 公司的 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>™</sup> II (Perfect Real Time)操作说明书(Takara, Japan),每个样品 3 次重复。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对表达量的分析<sup>[12]</sup>。

表 1 基因克隆与表达分析的特异引物

Table 1 Primers used for gene cloning and expression analysis	
引物 Primers	序列 Sequence
<b>RACE PCR</b>	
AAT1-3'-1	AGCCGAGGGAGGAGATGACCTTTCCAAG
AAT1-3'-2	GATGAAGCCGCCATTGTTGTATCCTCCG
AAT1-5'-1	CCAATCTCCATTCTCTCTCAGCTAGGC
AAT1-5'-2	CCGCATCCGAAGTTCAATTTTCGTCACG
<b>RT-qPCR</b>	
AAT1-f0	TATTATCATCTATACCCCACTCC
AAT1-r0	GCTTCTTTTGCTCTATTTTCACTG
Actin-f0	ATTAGTCTCTTCCAGCCTTCTTTG
Actin-r0	ATTATTTCTTGTCTACATACGGTCAG

## 1.9 HS-SPME-GC-MS 香气检测

参考 Cai 等<sup>[3]</sup>的 HS-SPME-GC-MS 方法萃取挥发态香气物质。将 2 g 花瓣密封于 20 mL 萃取瓶中平衡 15 min,由 2 cm 的萃取头(50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS, Supelco 公司,美国)于室温(25±2) °C 下顶空萃取 30 min。萃取结束后,于 230 °C 解吸附 5 min。GC/MS 分析系统采用的是 Thermo DSQ II 气相色谱-质谱联用仪,配备 HP-5MS 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm I.D, 0.25 μm 膜厚

度, Agilent 公司, 美国)。将 GC-MS 分析所得质谱图与 NIST (2005) 谱库检索比对标准物质的质谱图, 然后根据科瓦茨保留指数 (Kovats' Retention Indices, RI) 和相关参考文献进行进一步定性确认, 并根据总离子流色谱峰的峰面积归一化法进行定量。

## 2 结果与分析

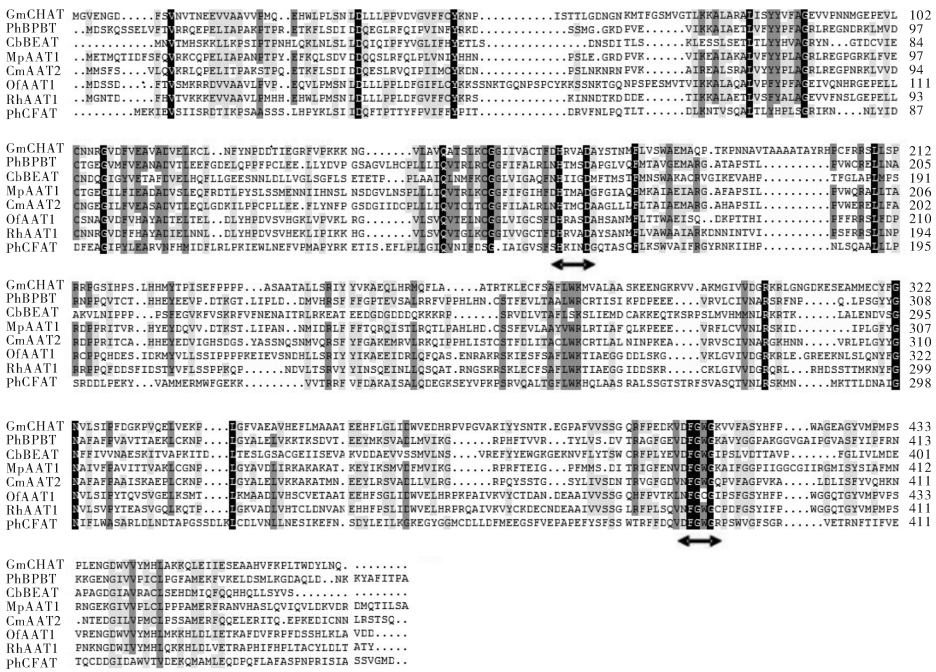
### 2.1 桂花 OfAAT1 基因的克隆及氨基酸序列分析

利用 RT-PCR 和 RACE 方法, 从桂花中克隆到基因的 5' 端 cDNA 为 1 275 bp, 3' 端为 447 bp, 序列组装后得 1 654 bp 的 cDNA, 其中包含 1 个 1 386 bp 的完整开放阅读框, 该基因被命名为 *OfAAT1*, 在 GenBank 中登录号为 KM006496。OfAAT1 包含了 461 个氨基酸, 预测的分子质量和等电点分别为 51.392 8 ku 和 5.79。将桂花 OfAAT1 与其他植物已知功能的醇酰基转移酶进行序列比对分析, 结果 (图 1) 表明, 桂花醇酰基转移酶 OfAAT1 与矮牵牛 *Petunia × hybrida* 松柏醇乙酰基转移酶 PhCFAT 的相似性最高, 达到 61%, 其次是大豆 *Glycine max* 顺-3-己烯-1-醇乙酰基转移 GmCHAT, 相似性为 49%, 与矮牵牛 (*Petunia × hybrida*, PhBPBT)、甜瓜 (*Cucumis melo*, CmAAT2)、仙女扇

(*Clarkia breweri*, CbBEAT)、苹果 (*Malus domestica*, MdAAT1) 和月季 (*Rosa hybrid*, RhAAT1) 相似性均较低, 分别为 24%、21%、18%、21% 和 15%。这些序列共同的特点是在其氨基酸序列中含有 BAHD 酰基转移酶家族特有的 HXXXD 和附加的 DFGWG 保守结构域 (或者有些特殊变异)。因此, 可确定从桂花中克隆的该基因是 BAHD 酰基转移酶家族的一个成员。利用 MEGA5.1 软件的邻接法, 将 OfAAT1 蛋白与 GenBank 上登录的不同物种的酰基转移酶进行分子进化树分析, 结果 (图 2) 表明, 桂花 OfAAT1 蛋白与矮牵牛 PhCFAT 聚为一类, 亲缘关系相对最近。其次, 葡萄 VvHCT、土豆 StCHAT、大豆 GmCHAT 聚为另一类, 与桂花 OfAAT1 较近, 而其他的矮牵牛 PhBPBT、甜瓜 CmAAT2、苹果 MdAAT1 等聚为一簇, 但与桂花 OfAAT1 相对较远。因此, 推测桂花 OfAAT1 与矮牵牛 PhCFAT 的功能类似。

### 2.2 桂花 OfAAT1 基因的时空表达分析

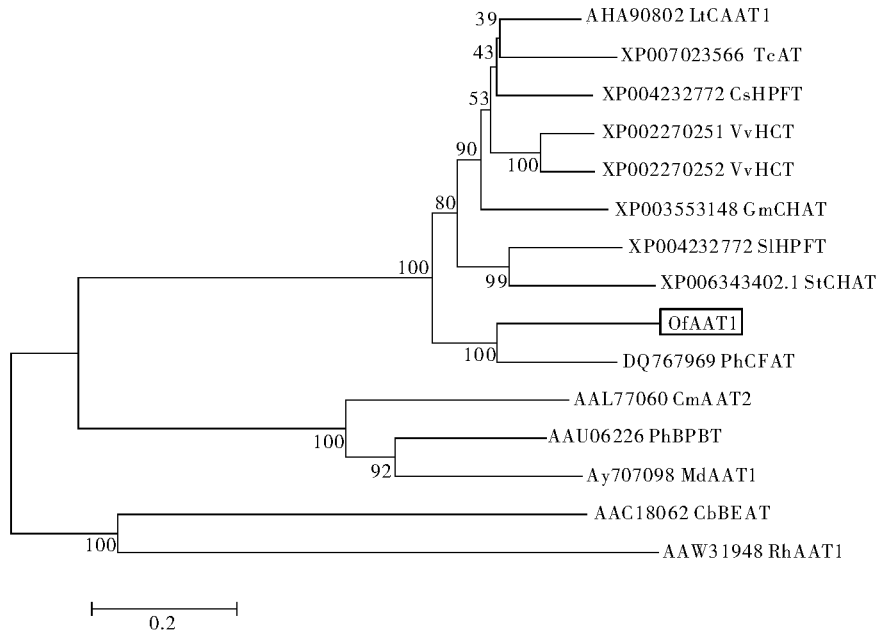
通过设计特异性引物 (表 1) 进行 qRT-PCR, 对桂花 *OfAAT1* 基因在不同组织部位、开花时期以及昼夜变化的表达量进行了分析, 结果 (图 3) 表明: *OfAAT1* 基因在幼叶中基本不表达, 而在花器官中特异表达, 包括花瓣、雄蕊、雌蕊与花梗, 其中花瓣表



黑色箭头标示为 HXXXD 与 DFGWG 2 个保守结构域 The HXXXD and DFGWG conserved motifs are identified by horizontal arrows.

图 1 桂花 *OfAAT1* 和其他几种植物已知醇酰基转移酶功能的氨基酸序列比对

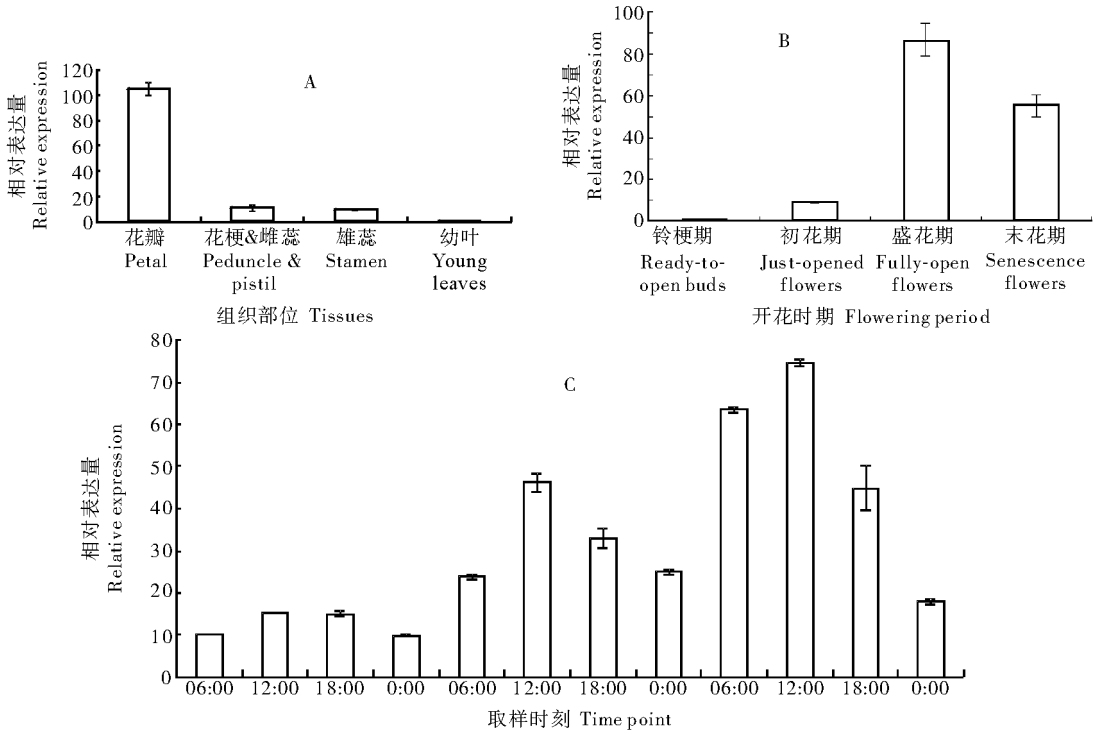
Fig.1 Deduced amino acid sequences alignment of *OfAAT1* with AATs from other species



Cb: 仙女扇; Cm: 甜瓜; Cs: 柑橘; Gm: 大豆; Lt: 拉瑞尔; Md: 苹果; Ph: 矮牵牛; Rh: 月季; Sl: 番茄; St: 马铃薯; Tc: 可可; Vv: 葡萄  
 Cb: *Clarkia breweri*; Cm: *Cucumis melo*; Cs: *Citrus sinensis*; Gm: *Glycine max*; Lt: *Larrea tridentata*; Md: *Malus domestica*; Ph: *Petunia × hybrida*; Rh: *Rosa hybrid*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*; Tc: *Theobroma cacao*; Vv: *Vitis vinifera*.

图 2 桂花 OfAAT1 和同源蛋白的同源性比对分析

Fig.2 Homology alignment of OfAAT1 and other homologous protein



A: *OfAAT1* 在桂花处于盛花期时不同组织部位的表达; B: *OfAAT1* 在桂花不同开花时期的花瓣片中的表达; C: *OfAAT1* 桂花盛花期时昼夜表达。A: Expression pattern of *OfAAT1* gene in different organs of fully-open flowers; B: Expression pattern of *OfAAT1* gene at different flower period; C: Circadian change of *OfAAT1* transcript at different time points.

图 3 桂花 *OfAAT1* 的时空表达分析

Fig.3 Spatial and temporal expression analysis of *OfAAT1*

达量最高;在开花进程中,开花早期表达量呈现较低的水平,当到达盛花期时,表达量显著增加,末花期之后,表达量又有微弱的下降;连续 3 个昼夜观测表明,*O*fAAT1 基因表达量在变化过程中呈现出明显的昼夜节律,均表现为白天升高、夜晚降低的趋势。

### 2.3 桂花不同开花时期的酯类香气物质变化

为探讨 *O*fAAT1 基因表达与桂花酯类香气合成释放之间的关系,对‘柳叶金桂’花瓣不同开花时

期的挥发性成分进行检测,并重点分析了酯类挥发性物质的含量变化(表 2)。结果表明,在桂花的不同开花时期中,正丁酸-2-戊酯、异丁酸叶醇酯、丁酸叶醇酯、 $\gamma$ -癸内酯的含量均呈现先升高后下降的单峰型变化,即从铃梗期到盛花期含量逐渐增加,到盛花期出现峰值,末花期开始下降。这一变化趋势与 *O*fAAT1 基因的表达变化趋势基本一致。而另外一些含量较低的酯类物质如异丁酸叶醇酯、*n*-戊酸-

表 2 ‘柳叶金桂’不同开花时期的酯类挥发性物质

Table 2 Ester volatiles emitted by ‘Liuye Jingui’ at different flower periods

物质名称 Compound name	峰面积( $\times 10^6$ ) Area			
	铃梗期 Ready-to-open buds	初花期 Just-opened flowers	盛花期 Fully-open flowers	末花期 Senescence flowers
正丁酸-2-戊酯 Butanoic acid, 2-pentenyl ester, (Z)-		6.49 $\pm$ 0.34	23.20 $\pm$ 3.60	
异丁酸叶醇酯 Cis-3-Hexenyl iso-butyrate	0.73 $\pm$ 0.29	10.98 $\pm$ 1.60	9.70 $\pm$ 0.92	9.10 $\pm$ 1.58
丁酸叶醇酯 Butanoic acid, 3-hexenyl ester, (Z)-	0.83 $\pm$ 0.44	87.81 $\pm$ 12.03	204.7 $\pm$ 30.16	21.15 $\pm$ 7.60
丁酸己酯 Butanoic acid, hexyl ester		6.14 $\pm$ 2.20	21.53 $\pm$ 8.22	1.10 $\pm$ 0.30
<i>n</i> -戊酸-顺式-3-己烯-1-基酯 n-Valeric acid cis-3-hexenyl ester	0.42 $\pm$ 0.14	3.42 $\pm$ 0.60	3.84 $\pm$ 0.68	3.36 $\pm$ 0.73
顺式-3-己烯基异戊酸酯 cis-3-Hexenyl isovalerate			3.35 $\pm$ 0.36	3.51 $\pm$ 0.36
(Z)-己酸-3-己烯酯 Hexanoic acid, 3-hexenyl ester, (Z)-			1.16 $\pm$ 0.46	0.28 $\pm$ 0.05
$\gamma$ -癸内酯 $\gamma$ -Decalactone	43.44 $\pm$ 12.27	409.70 $\pm$ 76.32	281.06 $\pm$ 40.99	48.92 $\pm$ 5.66
总量 Total	45.42 $\pm$ 13.24	524.54 $\pm$ 93.09	548.62 $\pm$ 85.39	87.42 $\pm$ 16.28

注:表中‘空白’表示不存在或未检测出该物质。Note: ‘The bank’ means not detected or existed.

顺式-3-己烯-1-基酯、顺式-3-己烯基异戊酸酯、(Z)-己酸-3-己烯酯等物质的含量则保持较为平稳的水平。

## 3 讨 论

酯类挥发性成分是桂花特征香气物质中重要的组成成分,醇酰基转移酶是酯类合成途径中最末端的关键酶,在酯类合成中扮演着重要的角色<sup>[9]</sup>。本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术从桂花花瓣中获得了酰基转移酶基因 BAHD 家族中的 *O*fAAT1 基因。张园<sup>[11]</sup>运用 cDNA-AFLP 与 RT-PCR 技术仅获得了 3'端 862 bp 的基因片段,根据 Blastn 比对分析,认为与 *PhCFAT* 相似性为 68%,直接将该基因片段命名为 *CFAT*。本研究在此基础上不仅克隆到了包含一个完整开放阅读框的基因全长(1 386 bp),还通过生物信息学分析认为,该基因属于酰基转移酶 BAHD 家族,具有该家族高度保守结构域 HXXXD 以及附加 DFGWG 的 NFGCG 突变结构

域。前人已有研究表明,这些保守区域在一些酶中会发生一些变化,如 DFGWG 这个保守区在苹果<sup>[13]</sup>、矮牵牛<sup>[5]</sup>中均变为 NFGWG,在杨树中变成 DFGFG、DFGWA、DFGWK、NFGWG、DLGFG、DYGWG 和 NLGWG 这样的一些区域<sup>[14]</sup>。BAHD 酰基转移酶是一个多功能蛋白质大家族,可利用酰基 CoA 作为底物,产生各种挥发性酯类、修饰后的花青素以及与植物抵抗病原微生物侵害的相关化合物<sup>[15]</sup>。将 *O*fAAT1 与其他植物进行 Blastp 比对以及系统进化树分析,与已知功能的矮牵牛 *PhCFAT* 相似性为 61%,亲缘关系最近。前人研究认为,*PhCFAT* 可催化松柏醇产生松柏二酯,进一步被降解为异丁香酚等苯丙烷类物质<sup>[5]</sup>。一些桂花品种花瓣释放的挥发性物质中可检测到异丁香酚的异构体丁香酚,而有些品种,如本试验中的‘柳叶金桂’尚未检测到<sup>[2-3,16-18]</sup>。因此,*O*fAAT1 虽与 *PhCFAT* 相似性最高,推测功能相似,但底物尚不确定,建议命名为 *O*fAAT1。另一方面,我们在‘柳叶金桂’花瓣中

检测到大量以脂肪酸为前体的酯类挥发性物质,如丁酸叶醇酯、丁酸己酯、 $\gamma$ -萘内酯等 8 种,桂花 *O*fAAT1 与合成这一酯类香气有关的大豆 *Gm*-CHAT 以及马铃薯 *St*CHAT 相似性分别为 49% 和 48%,与甜瓜 *Cm*AAT2、苹果 *Md*AAT1 氨基酸相似性仅为 20% 左右。但有研究表明,BAHD 家族的成员在结构上都有一定的相似性,但其相似性在氨基酸水平上只有 10%~30%<sup>[14]</sup>。因此,*O*fAAT1 也有可能参与桂花花瓣中脂肪酸酯类香气物质的合成。

本研究中,*O*fAAT1 在幼叶中基本不表达,而在花器官中特异表达,尤其在花香的主要产生部位花瓣中大量表达。这一结果与前人研究的金桂中芳樟醇 *O*fLIS 基因的表达模式一致<sup>[18]</sup>。同时,与其亲缘关系最近的矮牵牛 *Ph*CFAT 也具有花部特异性表达的特点一致<sup>[5]</sup>。在桂花 *O*fAAT1 不同开花进程的表达式变化研究中发现,铃梗期、初花期保持较低的水平,到盛花期后显著增加,末花期又呈下降趋势,这与桂花酯类香气释放规律基本同步,如正丁酸-2-戊酯、异丁酸叶醇酯、丁酸叶醇酯、 $\gamma$ -萘内酯等主要酯类物质的含量呈现铃梗期到盛花期逐渐增加,盛花期达到最大值,到末花期出现了显著的下降。基于这一结果,我们推测:(1)末花期酯类合成的前体底物不断消耗导致酯类香气合成减弱;(2)酯类香气物质的合成和 *O*fAAT1 表达的变化具有一定相关性;(3)BAHD 家族存在多个成员。猕猴桃、苹果、梨、甜瓜等果实中均分离出多个与酯类香气合成有关的 AAT 基因<sup>[8,19-20]</sup>。因此,可能存在 *O*fAAT1 的其他家族成员,和 *O*fAAT1 共同参与了酯类香气物质的合成。本研究中 *O*fAAT1 基因表达量日变化显示香气合成基因 *O*fAAT1 具有明显的昼夜节律变化。虽然,由于盛花期花瓣开放状态变化迅速导致连续 3 d 的表达量有较为显著的差异,但昼升夜降的节律变化基本一致,并与金鱼草香气合成基因变化规律相似。金鱼草主要依靠蜜蜂授粉,其重要香气活性物质月桂烯和 *E*- $\beta$ -罗勒烯的释放与其相关的单萜合酶和 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合成酶基因 *DXPS* 的变化规律一致,均呈现白天升高夜晚降低的昼夜变化<sup>[21-22]</sup>。而依靠蛾类授粉的矮牵牛则主要在夜晚释放香气,其中异丁香酚的释放量与 *Ph*CFAT 表达量相一致,均表现为夜晚达到最大值,而最低值出现在白天<sup>[5]</sup>。这说明植物花香释放与其传粉昆虫习性相关,并且这种昼夜规律受

基因表达量与底物有效性等因素的直接控制<sup>[23]</sup>。

近几年来,一些植物如桃、苹果、金鱼草等的花香代谢途径通过转录组测序结合香气物质代谢得到了较为全面的解析<sup>[24-26]</sup>,下一步工作将通过转录组测序结合酯类挥发性物质的分析,克隆其他 BAHD 家族成员,并对 *O*fAAT1 及其他成员进行功能分析以解析桂花酯类香气合成代谢的调控机制。

## 参 考 文 献

- [1] 杨康民.中国桂花[M].北京:中国林业出版,2012.
- [2] XIN H P, WU B H, ZHANG H H, et al. Characterization of volatile compounds in flowers from four groups of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2013, 93: 923-931.
- [3] CAI X, MAI R Z, ZOU J J, et al. Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by gas-chromatography-olfactometry and GC-mass spectrometry[J]. Journal of Zhejiang University—Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2014, 15(7): 638-648.
- [4] 曹颖, 胡尚连, 张慧莹, 等. 番茄醇酰基转移酶基因 SIAAT1 克隆序列分析和原核表达[J]. 植物研究, 2012, 32(6): 731-736.
- [5] DEXTER R, QUALLEY A, CHRISTINE M, et al. Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol[J]. The Plant Journal, 2007, 49: 265-275.
- [6] SHALIT M, GUTERMAN I, VOLPIN H, et al. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A: geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals[J]. Plant Physiology, 2003, 131: 1868-1876.
- [7] CUMPLIDO-LASO G, MEDINA-PUCHE L, ENRIQUETA M, et al. The fruit ripening-related gene *Fa*AAT2 encodes an acyltransferase involved in strawberry aroma biogenesis[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 4275-4290.
- [8] GÜNTHE C S, CHRISTIAN C, MARSH K B, et al. Characterisation of two alcohol acyltransferases from kiwifruit (*Actinidia* spp.) reveals distinct substrate preferences[J]. Phytochemistry, 2011, 72: 700-710.
- [9] 王梦姣. 植物 BAHD 酰基转移酶家族研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(12): 124-126.
- [10] 周媛. 桂花花瓣衰老过程中细胞程序性死亡特征与机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2008.
- [11] 张园. cDNA-AFLP 技术分离桂花香气相关基因[D]. 福州: 福建农林大学图书馆, 2009.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [13] SOULEYRE E J F, GREENWOOD D R, FRIEL E N, et al. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), *Mp*AAT1, produces esters involved in apple fruit flavor[J].

- FEBS J, 2005, 272: 3132-3144.
- [14] YU X H, GOU J Y, LIU C J. BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70: 421-442.
- [15] 杨宇婷, 武晓红, 田璞玉, 等. 桂花(晚银桂、贵妃红和窈窕淑女)挥发性成分分析[J]. 河南大学学报(医学版), 2010, 29(1): 14-20.
- [16] 胡春弟, 梁逸曾, 曾茂茂, 等. 不同品种桂花挥发油成分的分析研究[J]. 化学试剂, 2010, 32(3): 231-234.
- [17] 陈虹霞, 王成章, 孙燕, 不同种桂花挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 生物质化学工程, 2012, 46(4): 37-41.
- [18] 唐丽, 唐芳, 段经华, 等. 金桂芳樟醇合成酶基因的克隆与序列分析[J]. 林业科学, 2009, 45(5): 11-19.
- [19] DEFILIPPI B G, MANRÍQUEZ D, LUENGWILAI K, et al. Aroma volatiles: biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening[J]. *Advances in Botanical Research*, 2009, 50: 1-37.
- [20] 乌云塔娜, 康秀, 胡尚力, 等. 中国梨醇-酰基转移酶基因的克隆及遗传多态性[J]. 中南林业科技大学学报, 2010(4): 39-44.
- [21] DUDAREVA N, MARTIN D, KISH C M, et al. (E)- $\beta$ -ocimene and myrcene synthase genes of foral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1227-1241.
- [22] DUDAREVA N, NEGRE F. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 113-118.
- [23] DUDAREVA N, KLEMPIEN A, JOELLE K, et al. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds[J]. *New Phytologist*, 2013, 198: 16-32.
- [24] SÁNCHEZ G, VENEGAS-CALERÓN M, SALAS J J, et al. An integrative “omics” approach identifies new candidate genes to impact aroma volatiles in peach fruit [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 343.
- [25] NIEUWENHUIZEN N J, GREEN S, CHEN X Y, et al. Functional genomics reveals that a compact terpene synthase gene family can account for terpene volatile production in apple [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161: 787-804.
- [26] MUHLEMANN J K, MAEDA H, CHANG C Y, et al. Developmental changes in the metabolic network of snapdragon flowers [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e40381.

## Cloning and expression of the alcohol acyltransferase gene from *Osmanthus fragrans* flowers

LIU Cai ZENG Xiangling ZHENG Riru LUO Jing WANG Caiyun

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The alcohol acyltransferase gene, named as *OfAAT1*, was isolated from *Osmanthus fragrans* ‘Liuye Jingui’ flower. The full length of this gene was 1 386 bp encoding a protein of 461 amino acids. The result of qRT-PCR analyses showed that the expression of *OfAAT1* was weak in young leaves and specific in the flower organs, with the highest level in the petals. The gene expression increased gradually with the opening of flowers and reached the maximum value at the stage of full bloom. During this stage, the expression of *OfAAT1* had a significant circadian rhythm. Amino acids alignment and phylogenetic analysis showed that *OfAAT1* contained conserved domain of the acyltransferase BAHD family, and had higher homology with PhCFAT from petunia, GmCHAT from soybean and StCHAT from potato. Combining with analyzing components of volatile esters, the *OfAAT1* function was predicted to be the similar to that of PhCFAT, which catalyzes the synthesis of coniferyl acetate with coniferyl alcohol and the degradation of it to isoeugenol. Meanwhile, *OfAAT1* might involve in the synthesis of fatty acid esters, the same as GmCHAT and StCHAT. It will be helpful for understanding the mechanisms of metabolism of volatile esters in *O. fragrans* Lour.

**Keywords** *Osmanthus fragrans* Lour.; alcohol acyltransferase; qRT-PCR; aroma volatile components; volatile aroma

(责任编辑: 张志钰)