

高娅北, 孙曙光, 王胜雷, 等. 烤烟成熟期烟叶木质素合成关键酶基因的转录分析 [J]. 中国烟草学报, 2019, 25 (3). GAO Yabei, SUN Shuguang, WANG Shenglei, et al. Transcriptional analysis of key enzyme genes in synthesis of lignin in flue-cured tobacco leaves during maturity stage [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(3). doi: 10.16472/j.chinatobacco.2018.328

烤烟成熟期烟叶木质素合成关键酶基因的转录分析

高娅北¹, 孙曙光², 王胜雷³, 陈二龙⁴, 杨晓亮², 孙占伟⁴, 宋朝鹏^{1*}

1 河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450002;

2 湖北中烟工业有限责任公司, 湖北 武汉 430040;

3 福建省烟草公司, 福建 福州 350003;

4 河南中烟工业有限责任公司, 河南 郑州 450016

摘要: 木质素对烟叶抗性形成具有重要意义, 但含量过高会降低卷烟产品品质。为系统探究木质素在烟叶成熟期合成积累的关键点及调控基因的变化规律, 本研究以 K326 为试验材料, 测定烤烟中部叶成熟期叶片硬度、组织结构、木质素含量及相关合成酶基因的表达模式。结果表明, 成熟期是烤烟木质素合成积累的重要时期, 在整个成熟期后烟叶木质素含量和硬度呈现先增加后降低的变化规律, 在打顶后 30 天, 木质素含量和烟叶硬度达到最大值; 烟叶成熟期木质素合成酶相关基因的 qRT-PCR 表达分析表明: *PAL*、*C4H*、*4CL1*、*CCR1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2*、*PAOI* 和 *F5H1* 基因表达规律与木质素变化规律较为一致, 呈现先增加后降低的变化趋势, 且在打顶后 30 天, 表达量达到峰值。其中 *PAL*、*C4H*、*CCR1*、*CAD2* 和 *PAOI* 基因对烟叶木质素合成积累的贡献较大 ($p < 0.01$, $r = 0.93, 0.90, 0.91, 0.90, 0.89$; $P = 0.24, 0.19, 0.16, 0.17, 0.19$), 是烟叶木质素合成积累过程中的关键调控基因。

关键词: 烤烟; 木质素; 基因表达模式; 成熟期

木质素作为植物细胞壁的主要组成成分, 与植物的抗倒伏能力、抗病性以及抗旱性等多种在生长发育过程中所形成的抗性特征密切相关^[1-3], 但在卷烟原料的生产上, 过高的木质素含量会对卷烟产品燃吸时的感官质量以及安全性方面产生不利影响^[4]。而成熟期是植物生长发育的关键时期, 因此, 探究成熟期烤烟木质素代谢机理可以合理调控烟叶的木质素含量, 对促进优质烟叶的生产以及优质卷烟产品的生产具有重要意义。目前, 国内外学者对于木质素的合成途径进行了大量研究, 主要集中于 2 个方面, 一是苯丙烷类代谢途径, 即木质素与其他酚类物质合成所用的公共路径, 主要包括 *PAL* (苯丙氨酸解氨酶)、*C4H* (肉桂酸 4-羟化酶)、*4CL* (4-香豆酰 CoA 连接酶) 3 种关键酶类, 他们的基因表达量对木质素及其他酚类物质的生物合成及含量高低有重要影响^[5-7]; 二是木质素单体合成的特异路径, 主要包括上游的 *C3H* (香

豆酸 3-羟化酶)、*HCT* (莽草酸羟基肉桂酰转移酶)、*COMT* (咖啡酸 O-甲基转移酶)、*CCoAOMT* (咖啡酰 CoA-O-甲基转移酶) 和 *F5H* (阿魏酸 5-羟化酶) 以及下游的 *CCR* (羟基肉桂酰 CoA 还原酶)、*CAD* (肉桂酸脱氢酶) 和 *PAO* (多胺氧化酶), 这些合成酶基因表达量的高低不仅影响木质素含量的高低, 还对其单体的组成有较大影响^[8-11]。但关于烟草木质素合成路径的研究多集中于木质素与其他酚类物质合成的共用路径以及合成特异途径中的少数几个合成关键酶方面^[12-14], 缺乏对其的合成路径进行全面系统深入的研究, 对于烤烟烟叶成熟过程中木质素合成积累的关键时期及合成关键酶基因尚不清楚。本研究以 K326 为材料, 测定烟株成熟期烟叶生长发育过程的中部叶片硬度、叶片组织结构和木质素含量, 应用 qRT-PCR (荧光定量 PCR) 方法分析木质素合成路径上的 12 个相关合成酶基因 *PAL*、*C4H*、*4CL1*、*4CL2*、*C3H*、

基金项目: 湖北中烟工业有限责任公司资助项目“黄鹤楼原料需求区域拓展技术研究及应用”(2018A011YL05), 河南中烟工业有限责任公司科技创新项目“碳氮专用复合肥工程研发”(ZW2014005)

作者简介: 高娅北 (1995—), 在读硕士研究生, 研究方向为烟草调制加工, Email: gyb1995@126.com

通讯作者: 宋朝鹏 (1978—), 副教授, 主要从事烟草调制的教学科研工作, Email: ycszp@163.com

收稿日期: 2018-10-25; **网络出版日期:** 2019-04-12

F5H1、*HCT1*、*CCR1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2* 和 *PAOI* 的表达量,探究烤烟木质素在成熟期的合成规律、合成积累的关键点及其关键酶基因表达规律,旨在系统探究烟叶木质素合成的分子调控机制,为烤烟品种选育及优质烟叶生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

田间试验于 2018 年在河南省洛阳市洛宁县烟草科技示范基地(地处东经 111°38', 北纬 34°26')进行。试验田植烟土壤为黄棕壤,肥力中等,0~20 cm 土层含有机质 13.54 g/kg、碱解氮 75.16 mg/kg、速效磷 9.16 mg/kg 和速效钾 164.38 mg/kg,土壤 pH 7.26。

选用 K326 为试验品种。按照当地优质烟叶生产技术规范种植管理,行距 110 cm,株距 55 cm,单株留叶数 18~20 片,烟田施氮量为 72 kg/hm²,使用烟草专用复合肥, N:P₂O₅:K₂O = 1:1:2。在打顶后当天、10 d、20 d、30 d、40 d 和 50 d 进行取样(打顶后 30 天中部叶达到适熟状态),采集生长情况正常、叶片完整且朝向一致的烤烟中部叶(10~12 叶位)20 片,其中 10 片在采后立即去除主脉,混合第 6 至第 7 支脉叶肉样品 10 g 左右,用锡纸和纱布包裹后放入液氮中速冻,于 -80 °C 超低温冰箱中进行保存,用于烟叶木质素含量和相关合成酶基因表达量的测定,其余鲜烟叶用于叶片硬度及组织结构测定。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 叶片硬度和组织结构测定。

烟叶硬度测定参照蒋博文等^[15]的方法,采用质构仪进行烟叶硬度测定;烟叶组织结构测定参照宋朝鹏等^[16]的方法,利用 8 mm 打孔器分别在打顶后当天、30 天和 50 天的叶片中部进行取样,采用常规石蜡包

埋染色处理,制片,在 Olympus 光学显微镜下利用测微尺对叶片、上下表皮、海绵组织、栅栏组织厚度进行测量^[17]。

1.2.2 木质素含量测定方法

将新鲜烟叶样品在 80 °C 下烘干至恒重,将干燥后的样品磨碎过 40 目筛,称取 5 mg 于 10 ml 玻璃试管中,采用苏州科铭生物技术有限公司生产的木质素含量微量法试剂盒进行烟叶木质素含量测定。

1.2.3 木质素相关合成酶基因表达量分析

在 NCBI 的 Gene 数据库(NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)检索烟草木质素合成相关酶的编码基因,分别获得普通烟草 PAL、C4H、4CL1、4CL2、C3H、F5H、HCT、CCR、CCoAOMT、COMT、CAD 和 PAO 蛋白的编码区序列(图 1)。将获得的每个基因家族序列进行多序列比对,通过 SMART(<http://coot.embl-heidelberg.de/SMART>)在线软件预测基因的保守区域,利用 Primer 5.0 在基因的 5' 保守区域设计特异 qRT-PCR 引物(表 1)。

采用 Trizol 法提取烟草样品中总 RNA,反转录合成 cDNA^[18]。利用 QuantiFast SYBR Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen, Germany)在 LightCycler 480 II 型荧光定量 PCR 仪(Roche, Swiss)上进行 qRT-PCR。选用烟草核糖体蛋白编码基因 NtL25 作为内参基因,反应程序为: 95 °C 30 s, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 95 °C 30 s, 40 个循环。实验结果采用 2^{-ΔΔCt} 算法进行分析,确定各基因的相对表达量^[19]。试验设置 3 次重复。

1.3 数据分析

运用 Microsoft Excel 2010 进行试验结果统计整理,运用 Origin 2018 进行图片绘制,运用 SPSS 22 进行方差分析及通径分析。

表 1 烟草木质素合成相关酶基因 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 qRT-PCR primer sequence of lignin-related synthetase gene in tobacco leaves

合成路径 Synthetic pathway	基因名称 gene name	基因登录号 Gene ID	引物序列 5' -3' Primer sequence 5' -3'
木质素合成 Lignin synthesis	<i>PAL</i>	107792668, 107786762, 107769293, 107761482, 107831213, 107820497, 107802063, 10780256,	F:CTCACTGGTTTTGGTGCTACT R:AGGCTGCAACTCGAAAAATC
	<i>C4H</i>	107823514, 107812882, 107791262	F:GGCAATCCCTCTTTTAGTCCC R:CTCCTACCAACACCAATGGA
	<i>4CL1</i>	107803673, 107803813, 107785405, 107814113	F:GAACTCAAATCGAACGAATC R:ATGACCCTCCTGAAAATTGTTTAC
	<i>4CL2</i>	107797004, 107766072	F:ATTATCTCCGTCGACTAATTGAGC R:GTCACGAACGGAAGCCTTAACA

续表 1

合成路径 Synthetic pathway	基因名称 gene name	基因登录号 Gene ID	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'
木质素合成 Lignin synthesis	<i>CCR1</i>	107786653, 107804645, 107787492, 107816628, 107770552, 107829067, 107815050,	F:CCTCACTGGCTCTGCTAAAACAT R:TTCTCTTGTAGGCTCTTCACCG
	<i>C3H</i>	107800961	F:CCTCATTATGTGAAAGTAAGGAAGC R:TTCTGAGTTCATAAATCTCTTCCCA
	<i>HCT1</i>	107772942, 107789426, 107826939, 107809545,	F:CTCAACCCACTCCCAACCAT R:GCCTCCTTTAGCACTTTTCCG
	<i>CCoAOMT5</i>	107770611, 107797097, 104226583, 104229202, 104241444	F:AATGGTTCTGTGGTGGCTCC R:CGGCGGCACAAGGTAATG
	<i>COMT1</i>	107795225, 107809583, 107808034, 107793948, 107792974,	F:GATGTTGGAGGTGGTCTTGGA R:CTGGTTTCACTGGTAAAATGGC
	<i>CAD2</i>	107816761, 107790741	F:GAGGGTATGGCACCAGAACAA R:GATGTCCCATTCGCTTTGCTAT
	<i>F5H1</i>	107811350, 107800782, 107799312, 107792945	F:TTCTCTCCAAATCTCGCCGT R:GTTTTCTCATCTGCCGCCA
	<i>PAO1</i>	107832568	F:CTCGTTTTGTACCGGGAC R:AACCTCACAATCAGCATGGA
内参基因 Reference gene	<i>L25</i>	L18902	F:GCTTTCCTTCGTCCCATCA R:CCCCAAGTACCCTCGTAT

注：F 表示上游引物，R 表示下游引物。
Note: F indicates the upstream primer and R indicates the downstream primer.

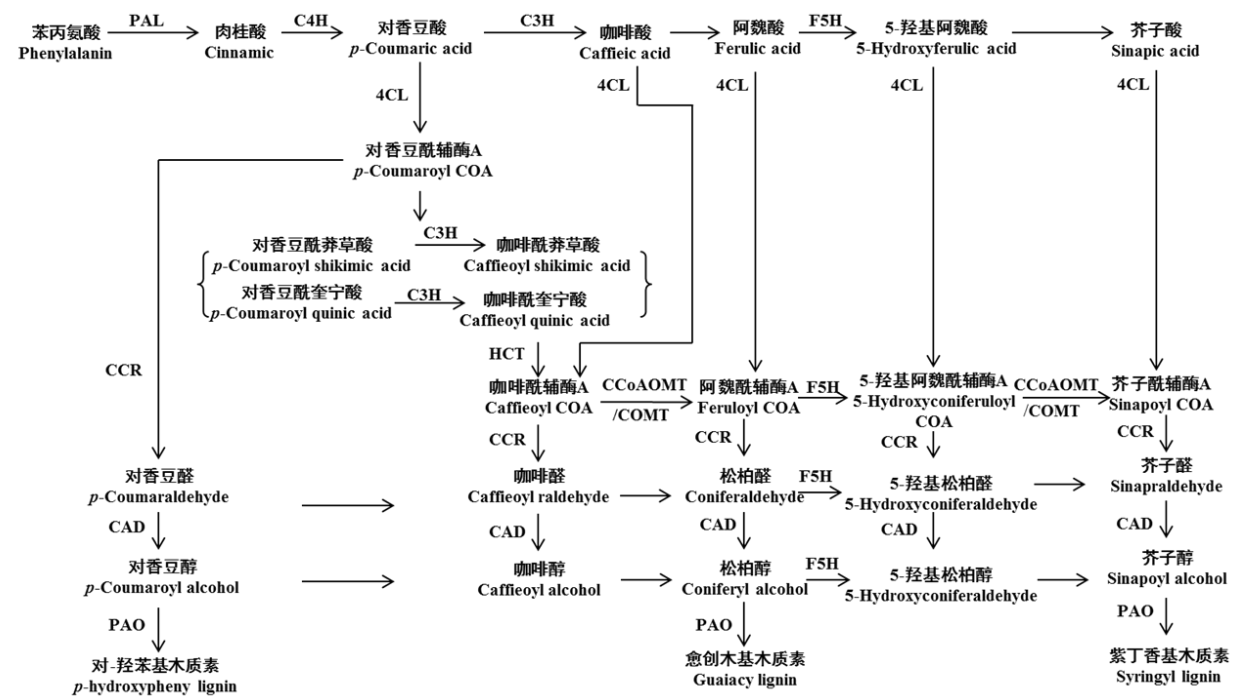


图 1 植物木质素生物合成路径 (由文献 [20-21] 修改而成)
Fig.1 Biosynthesis pathway of lignin in plants (modification based on[20-21])

2 结果

2.1 K326 烟叶硬度和组织结构变化

由表 2 可见, 烟叶硬度在打顶后的不同时期间差异显著, 表现为打顶后先升高而后降低的变化趋势。烟叶在打顶后不同生长发育时期叶片厚度、上下表皮厚度、栅栏组织厚度以及海绵组织厚度之间存在

着不同程度的差异, 其中叶片厚度、栅栏组织厚度和叶片紧密度随烟叶打顶后天数的增加而显著减小, 烟叶上表皮厚度和海绵组织厚度为打顶后 30 d 显著高于其他两时期, 下表皮厚度则表现为打顶后 30 d 显著低于其他两时期; 可见烟叶组织结构会随烟叶打顶后的生长发育发生明显的变化, 各时期间差异明显。

表 2 不同打顶时期烟叶硬度和组织结构的变化

Tab.2 Changes in hardness and tissue structure of tobacco leaves at different topping stages

打顶后天数/d Days after topping /d	硬度 /kg*cm ² hardness /kg*cm ²	叶片厚度 /μm Leaf thickness /μm	上表皮厚度 /μm Upper epidermis thickness /μm	下表皮厚度 /μm lower epidermis thickness /μm	栅栏组织厚度 /μm palisade tissue thickness /μm	海绵组织厚度 /μm Sponge tissue thickness /μm
0	6.54±0.35bB	712.98±7.02aA	39.39±1.73cC	27.56±1.02aA	282.87±3.32aA	341.34±2.75bB
30	7.38±0.49aA	691.23±7.74bB	44.47±1.67aA	25.12±1.15bB	256.42±4.12aA	363.18±2.93aA
50	5.12±0.28cC	576.79±8.75cC	41.82±1.94bB	28.81±1.04aA	213.03±3.89bB	263.41±3.12bB

注: 同一行检测指标不同小写字母和大写字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上存在显著和极显著差异, 下同。

Note: the lowercase letters and uppercase letters in the same row indicate significant and extremely significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.2 烟叶木质素含量变化

由图 2 可见, 不同时期烟叶木质素含量具有显著差异, 在打顶后的成熟阶段, 烟叶木质素含量呈现出先增加后降低的变化趋势, 在成熟时(打顶后 30 天)含量达到最大值, 而后随成熟度进一步增加含量略有降低, 这也与烟叶硬度的变化表现出较为一致的规律。表明成熟期烟叶木质素含量变化较大, 是其合成积累的重要时期。

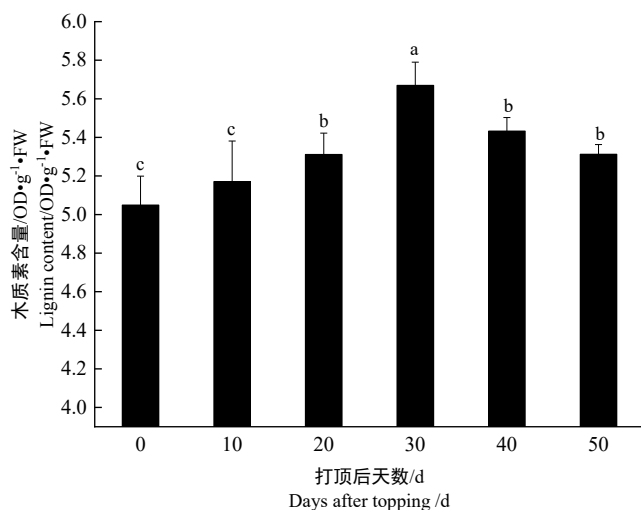


图 2 烟叶成熟期木质素含量变化

Fig.2 Change of lignin content in tobacco leaves at maturity stage

2.3 木质素相关合成酶基因的 qRT-PCR 表达量

由图 3 可见, 利用 qRT-PCR 技术对进入成熟期各发育阶段的烟叶中木质素合成上游、中游和下游各相关酶基因的相对表达量进行分析, 结果表明各基因在烟叶组织中均有表达, 但相对表达量各异。烟叶木质素相关合成酶基因表达量除局部波动外基本都呈现出先上调而后下调的变化趋势, 在打顶后 30 d 其基因表达量最高, 说明打顶后的烟叶成熟阶段是木质素合成积累的关键调控时期。

PAL、*C4H*、*4CL1* 和 *4CL2* 基因为烟叶苯丙氨酸代谢途径中调控木质素和其他物质合成的共用相关酶基因^[22], 属于烟叶木质素合成途径上游的相关酶基因。在本研究中, *PAL*、*C4H*、*4CL1* 基因在成熟过程中基因表达量前后差异较明显, 且均在打顶后 30 d 基因表达量最高, 而后迅速下调; *PAL* 基因相对表达量呈先上调后下调的单峰曲线变化趋势; *C4H* 在打顶后 20 d 略有下调而后迅速上调; *4CL1* 在打顶后表达量呈逐渐下调的趋势, 但前后差异不显著; 而 *4CL2* 基因表达量在成熟过程中前后变化不明显; 说明在木质素合成的苯丙氨酸代谢途径中, 可能是 *PAL*、*C4H*、*4CL1* 基因所发挥的调控作用较大。

C3H、*HCT1*、*COMT1*、*CCoAOMT5* 和 *F5H1* 是调控烟叶中木质素单体合成特异路径上游的相关酶基因。在本研究中 *CCoAOMT5*、*COMT1* 和 *F5H1* 基因

的相对表达量在烟叶成熟过程中前后差异较大,且除个别时期外,其基因表达量均呈先上调后下调的单峰曲线变化趋势,在打顶后 30 d 其基因表达量最高;*C3H* 和 *HCT1* 基因表达量在烟叶成熟过程中变化较小;说明在木质素单体合成的特异途径上游中,可能 *CCoAOMT5*、*COMT1* 和 *F5H1* 基因所发挥的调控作用较大。

CCR1、*CAD2* 和 *PAO1* 基因是调控烟叶木质素单体合成特异路径下游的相关酶基因。在本研究中这些基因的表达量在烟叶成熟期均变化较大,且呈先增加,在打顶后 30 d 达到最大而后迅速下调的单峰变化趋势,说明这些调控木质素单体合成的下游相关酶基因可能对木质素的合成调控作用较大。

结合木质素合成的规律,发现 *PAL*、*C4H*、*4CL1*、*CCR1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2*、*PAO1* 和 *F5H1* 基因表达规律与木质素合成规律较为一致,其中 *PAL*、*C4H*、*CCR1*、*CAD2* 和 *PAO1* 的表达量变化较大,我们推测这些基因可能在烟叶打顶后成熟期生长发育阶段的木质素代谢途径中发挥关键作用。

2.4 木质素含量与其合成相关酶基因表达量的相关性分析

由表3分析表明,木质素含量与 *PAL*、*C4H*、*CCR1*、*CAD2* 和 *PAO1* 基因表达量呈极显著正相关关系,与 *4CL1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*F5H1* 基因表达量呈显著正相关关系,与 *4CL2*、*C3H* 和 *HCT1* 基因表达量相关性不显著;*PAL*、*C4H*、*4CL1*、*F5H1*、*HCT1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2*、*CCR1* 和 *PAO1* 基因的表达有明显的协同作用,相互之间的相关性达到显著或是极显著的关系,其表达量的变化趋势也较为相似。*4CL2* 和 *C3H* 基因的表达量变化趋势与其他基因相差较大,其与木质素含量之间相关系数较小,且基因表达量与木质素含量之间为负相关关系。

2.5 木质素含量与其合成相关酶基因表达量的途径分析

由表4分析表明,烟叶木质素合成相关酶基因表达量对烟叶木质素含量的影响程度相差较大,除 *4CL2* 和 *C3H* 的基因表达量对烟叶木质素含量为负影响外,其他基因均为正影响。其中对木质素含量影响较大的是 *PAL*、*C4H*、*PAO1*、*CAD2* 和 *CCR1*,直接途径系数分别为 0.24、0.19、0.19、0.17 和 0.16,且 *PAL*、*C4H* 和 *PAO1* 的间接途径系数也较大,表明其他基因通过 *PAL*、*C4H* 和 *PAO1* 对木质素

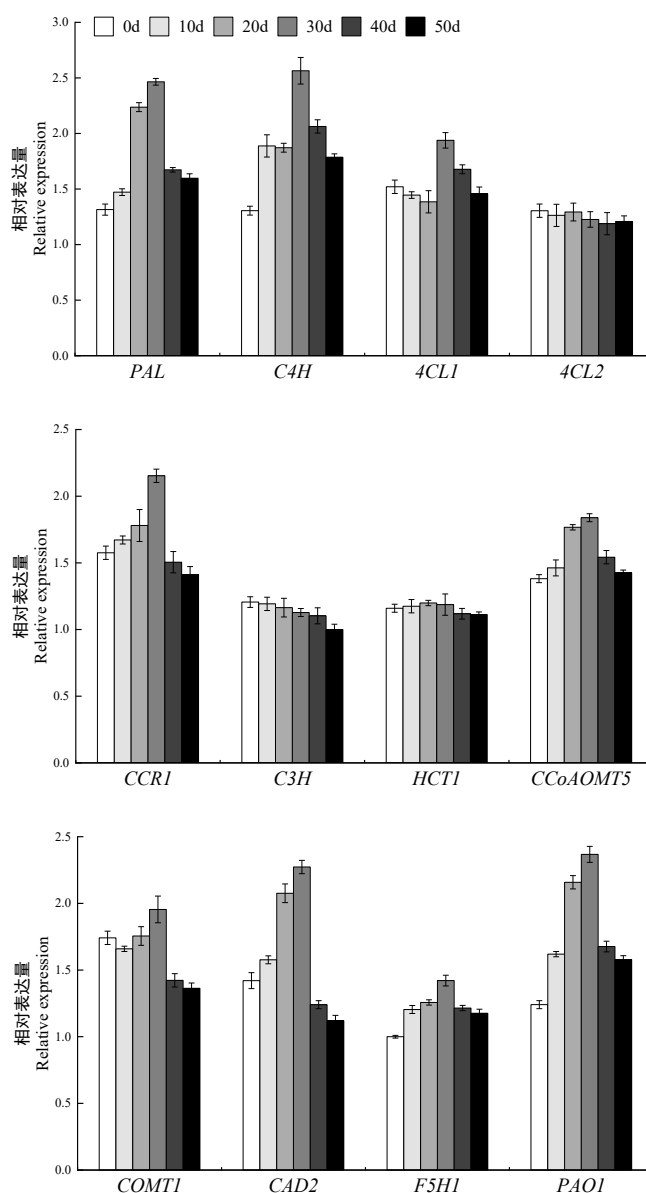


图3 烟叶成熟期木质素合成关键酶基因表达

Fig.3 Gene expression of lignin biosynthesis in tobacco leaves at maturity stage

含量均有较大的间接影响;虽然 *4CL1* 的间接途径系数较小,表明其他基因通过 *4CL1* 对烟叶木质素含量的间接影响略小,但 *4CL1* 基因表达量对木质素含量有相对较大的直接影响,直接途径系数为 0.12; *CCoAOMT5*、*COMT1* 和 *F5H1* 的基因表达量对木质素含量影响差别不大。*HCT1* 和 *4CL2* 对木质素含量的影响较小,其中影响最小的是 *4CL2* 的表达量,直接途径系数为 -0.03。可知,影响木质素含量变化的主要因素为 *PAL*、*C4H*、*PAO1*、*CAD2* 和 *CCR1* 的基因表达量。

表 3 木质素含量与合成相关酶基因表达量的相关性分析
Tab.3 Correlation analysis between lignin content and expression quantity of lignin synthase-related genes

相关系数 Correlation coefficient	木质素 lignin	<i>PAL</i>	<i>C4H</i>	<i>4CL1</i>	<i>4CL2</i>	<i>CCR1</i>	<i>C3H</i>	<i>HCT1</i>	<i>CCoAOMT5</i>	<i>COMT1</i>	<i>CAD2</i>	<i>F5H1</i>	<i>PAOI</i>
<i>PAL</i>	0.93**	1											
<i>C4H</i>	0.90**	0.92**	1										
<i>4CL1</i>	0.76*	0.87*	0.73	1									
<i>4CL2</i>	-0.18	0	0.15	0.18	1								
<i>CCR1</i>	0.91**	0.95**	0.94**	0.89**	0.23	1							
<i>C3H</i>	-0.26	-0.22	-0.16	-0.19	0.32	-0.17	1						
<i>HCT1</i>	0.69	0.87*	0.82*	0.78*	0.29	0.88**	0.6	1					
<i>CCoAOMT5</i>	0.82*	0.94**	0.84*	0.90**	0.04	0.87*	0.54	0.96**	1				
<i>COMT1</i>	0.77*	0.78*	0.90**	0.55	0.41	0.80*	0.2	0.74	0.73	1			
<i>CAD2</i>	0.90**	0.94**	0.87*	0.93**	0.01	0.95**	0.56	0.89**	0.90**	0.63	1		
<i>F5H1</i>	0.79*	0.92**	0.91**	0.89**	0.31	0.93**	0.6	0.87*	0.83*	0.79*	0.93**	1	
<i>PAOI</i>	0.89**	0.89**	0.73	0.99**	0.06	0.89**	0.76*	0.90**	0.90**	0.52	0.96**	0.88**	1

注：*表示相关性差异达显著水平（ $P<0.05$ ）；**表示相关性差异达极显著水平（ $P<0.01$ ）。
Note: * indicates the correlation difference was significant ($P<0.05$), ** indicates the correlation difference was extremely significant ($P<0.01$).

表 4 木质素含量与合成相关酶基因表达量的通径分析
Tab.4 Path analysis of lignin content and expression quantity of lignin synthase-related genes

影响因子	<i>PAL</i>	<i>C4H</i>	<i>4CL1</i>	<i>4CL2</i>	<i>CCR1</i>	<i>C3H</i>	<i>HCT1</i>	<i>CCoAOMT5</i>	<i>COMT1</i>	<i>CAD2</i>	<i>F5H1</i>	<i>PAOI</i>
<i>PAL</i>	<u>0.24</u>	0.15	0.02	-0.03	0.09	-0.07	0.07	0.06	0.07	0.16	0.08	0.11
<i>C4H</i>	0.16	<u>0.19</u>	0.05	-0.03	0.10	-0.06	0.05	0.07	0.10	0.15	0.07	0.13
<i>4CL1</i>	0.12	0.12	<u>0.12</u>	-0.02	0.08	-0.10	0.03	0.06	0.07	0.11	0.08	0.17
<i>4CL2</i>	0.19	0.17	0.02	<u>-0.03</u>	0.08	-0.05	0.06	0.07	0.08	0.16	0.08	0.12
<i>CCR1</i>	0.11	0.02	0.01	-0.01	<u>0.16</u>	-0.04	0.04	0.06	0.05	0.12	0.03	0.06
<i>C3H</i>	0.20	0.18	0.04	-0.03	0.10	<u>-0.10</u>	0.06	0.07	0.09	0.16	0.08	0.14
<i>HCT1</i>	0.16	0.12	0.02	-0.02	0.12	-0.06	<u>0.08</u>	0.07	0.08	0.16	0.02	0.05
<i>CCoAOMT5</i>	0.13	0.10	0.00	-0.02	0.14	-0.09	0.03	<u>0.11</u>	0.06	0.12	0.05	0.12
<i>COMT1</i>	0.18	0.16	0.02	-0.03	0.08	-0.04	0.04	0.06	<u>0.14</u>	0.16	0.07	0.15
<i>CAD2</i>	0.18	0.15	0.02	-0.03	0.16	-0.01	0.06	0.05	0.06	<u>0.17</u>	0.04	0.08
<i>F5H1</i>	0.15	0.14	0.09	-0.03	0.11	-0.02	0.01	0.07	0.10	0.12	<u>0.10</u>	0.14
<i>PAOI</i>	0.12	0.13	0.10	-0.02	0.05	-0.07	0.02	0.07	0.10	0.12	0.09	<u>0.19</u>

注：划横线的数据表示该因素对木质素含量的直接通径系数。
Note: The data with underline indicates the direct path coefficient of factor on lignin content.

3 讨论

木质素作为植物的细胞壁物质，其与纤维素结合后可使植物细胞壁具有一定的硬度和强度，其含量变化可改变植物组织硬度，影响组织结构的发育，从而

使植物具有一定的抗倒伏及抗病能力^[23-24]。成熟期是木质素代谢的关键时期，本研究表明各品种烟叶木质素含量随打顶天数的增加呈先增加后降低的变化趋势，打顶后 30 天达到峰值，随后烟叶衰老程度增加木质素含量降低，这也与玉米等作物叶片成熟过程中

木质素含量的变化规律相一致^[25-26],也可能与随着烟叶的衰老烟叶细胞壁物质逐渐降解有关^[27];从烟叶在打顶后的硬度变化和组织结构发育情况来看,烟叶硬度先增加后降低,这可能与在生长发育过程中的木质素含量变化有关,这也与李玉菲^[28]认为的木质素合成旺盛是造成烟叶偏硬的研究结果相一致;闫克玉等^[29]研究认为烟叶木质素含量随烟叶厚度的增加而减少,本研究呈现相似的研究结果,打顶30d后烟叶厚度减小可能是由于随烟叶衰老,烟叶海绵组织以及栅栏组织逐渐萎缩引起的。

研究表明*PAL*、*C4H*、*4CL1*、*4CL2*、*F5H1*、*HCT1*、*C3H*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2*、*CCR1*和*PAOI*基因在木质素的合成过程中发挥有重要的调控作用^[30],其表达量的大小与植物木质素合成量的多少密切相关^[31-33]。本研究结果发现,*PAL*、*C4H*、*4CL1*、*HCT1*、*CCoAOMT5*、*COMT1*、*CAD2*、*F5H1*、*CCR1*和*PAOI*基因表达量基本呈单峰变化趋势,随成熟度的增加基因表达呈上调趋势,在打顶后30天及适熟时达到最大值,而后随叶片衰老表达量降低,这与黄杰恒等^[34]的研究结果相一致,说明成熟期是烟叶木质素合成的关键时期;*4CL2*基因表达量在成熟期变化规律不明显,前后波动较大,与*4CL1*表达量变化趋势差别较大,这表明*4CL1*基因对木质素合成的调控作用较大,*4CL2*基因对木质素合成的调控作用不大;*C3H*基因表达量在打顶后初期呈下调趋势,可能受打顶后植物体内生理生化反应发生变化所影响,随后变化不明显,说明*C3H*表达量可能对烤烟叶片木质素含量影响不明显,这也与胡丹等^[35]的研究结果一致。

相关分析及途径分析表明,*PAL*、*C4H*、*4CL1*、*HCT1*、*CCoAOMT5*、*F5H1*和*PAOI*基因在与烟叶木质素含量的相关系数及直接途径系数较大,表明他们的相对表达量对烟叶木质素的含量变化影响较大;*C3H*的基因表达量对木质素合成会产生负向影响,但直接途径系数较小,为-0.10,说明它们对烤烟叶片木质素的合成具有负调控作用,如果在一定范围内降低其表达量,对木质素的含量变化可能不会造成影响,但对于抑制其表达对烤烟烟叶木质素合成的影响还需进一步研究。*4CL1*与*4CL2*为植物*4CL*家族基因,在本研究中,*4CL2*对烟叶木质素的合成呈负向影响且直接途径系数较小,这也与HU等^[36]的研究结果一致,是由于二者的差异表达从而调控不同苯丙氨酸代谢途径代谢产物的生物合成,*4CL1*主要参与木质素的生物合成而*4CL2*主要参与类黄酮等物质的生物

合成所引起的。

4 结论

在烤烟中部叶打顶后进入成熟阶段,烟叶木质素含量呈先增加后降低的变化规律,打顶后0-30天是其合成积累的关键时期,在叶片成熟时(打顶后30天)其含量最高;研究其基因表达模式发现,*PAL*、*C4H*、*CCR1*、*CAD2*和*PAOI*基因对烟叶木质素合成积累量的影响较大($p < 0.01$, $r = 0.93, 0.90, 0.91, 0.90, 0.89$; $P = 0.24, 0.19, 0.16, 0.17, 0.19$),是烤烟中部叶木质素合成积累过程中的关键调控基因。本研究从分子生物学角度探究了不同品种烤烟中部叶成熟期叶片木质素合成及关键合成酶基因表达的规律,为烤烟木质素代谢的分子作用机理提供了理论基础。

参考文献

- [1] 汪灿,阮仁武,袁晓辉,等. 荞麦茎秆解剖结构和木质素代谢及其与抗倒性的关系[J]. 作物学报, 2014, 40(10): 1846-1856.
WANG Can, RUAN Renwu, YUAN Xiaohui, et al. Relationship of Anatomical Structure and Lignin Metabolism with Lodging Resistance of Culm in Buckwheat[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(10): 1846-1856.
- [2] 杨辉,沈火林,朱鑫,等. 防御酶活性、木质素和总酚含量与辣椒抗黄瓜花叶病毒的关系[J]. 中国农学通报, 2006(05): 369-373.
YANG Hui, SHEN Huolin, ZHU Xin, et al. A Study on the Relationship between the Resistance to CMV of Hot Pepper and Related Defendant Enzyme Activity, the Content of Lignins, and Total Phenols[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006(05): 369-373.
- [3] 齐曼·尤努斯. 麦类根输导组织坚韧度与抗旱性的关系[J]. 干旱区研究, 1996(03): 46-49.
- [4] 于建军,魏登辉,田斌强,等. 响应面法优化漆酶降解梗丝木质素的工艺[J]. 烟草科技, 2017, 50(03): 57-64.
YU Jianjun, WEI Denghui, TIAN Binqiang, et al. Optimization of lignin degradation by laccase in cut stem with response surface method[J]. Tobacco Science & Technology, 2017, 50(3): 57-64.
- [5] Barros J, Serrani-Yarce J C, Chen F, et al. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis[J]. Nat Plants, 2016, 2(6): 16050.
- [6] Renault H, De Marothy M, Jonasson G, et al. Gene Duplication Leads to Altered Membrane Topology of a Cytochrome P450 Enzyme in Seed Plants[J]. Molecular Biology & Evolution, 2017, 34(8).
- [7] Li Y, Kim J I, Pysh L, et al. Four isoforms of Arabidopsis thaliana 4-coumarate: CoA ligase (4CL) have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism[J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2409.
- [8] Ruben Vanholme, Kris Morreel, Chiarina Darrah, Paula Oyarce, John H. Grabber, John Ralph, Wout Boerjan. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops[J]. New Phytologist, 2012, 196(4).
- [9] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 519-546.

- [10] Sewalt V J H, Ni W, Jung H G, et al. Lignin Impact on Fiber Degradation: Increased Enzymatic Digestibility of Genetically Engineered Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Stems Reduced in Lignin Content[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(5):1977-1983.
- [11] Kitin, Peter, Voelker, Steven L, Meinzer, Frederick C, Beeckman, Hans, Strauss, Steven H, Lachenbruch, Barbara. Tyloses and Phenolic Deposits in Xylem Vessels Impede Water Transport in Low-Lignin Transgenic Poplars: A Study by Cryo-Fluorescence Microscopy[J]. Plant Physiology, 2010, 154(2).
- [12] 孟靖, 王成, 赵曼琳, 等. 反义 4CL 基因调节烟草木质素生物合成[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11):4383-4388.
Jing M, Cheng W, Manlin Z, et al. Lignin Biosynthesis of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Regulated by the Antisense 4CL Gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(11):4383-4388.
- [13] 周培禄, 刘光亮, 王树声, 等. 低温胁迫下烟草多酚代谢及其抗氧化能力分析[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(05):33-39.
Peilu Z, Guangliang L, Shusheng W, et al. Analysis of Polyphenol Metabolism and Antioxidant Capacity of Tobacco Seedlings under Cold Stress[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(05):33-39.
- [14] 李雪平, 彭镇华, 高志民, 等. 抑制 COMT 基因表达对转基因烟草木质素合成的影响[J]. 分子植物育种, 2012, 10(06):689-692.
The Effects of Depressing Expression of COMT on Lignin Synthesis of Transgenic Tobacco[J]. Molecular Plant Breeding, 2012, 10(06):689-692.
- [15] 蒋博文, 魏硕, 王涛, 等. 采后烟叶软化与淀粉、糖代谢及相关基因表达的研究[J]. 中国农业科技导报, 2018(03):30-38.
JIANG Bowen, WEI Suo, WANG Tao, et al. Study on Softening and Metabolism of Starch and Sugar and Related Gene Expression in Postharvest Tobacco Leaves[J]. Journal of Agricultural Science & Technology, 2018(03):30-38.
- [16] 宋朝鹏, 魏硕, 刘相甫, 等. 开片状况对上部烟叶烘烤过程中失水特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(07):8-14.
SONG Zhaopeng, WEI Suo, LIU Xiangpu, et al. Effects of different leaf openness condition on dehydration characteristics of tobacco upper leaves during curing[J]. Journal of Northwest A & F University, 2017, 45(07):8-14.
- [17] 朱金峰, 李广良, 黄海棠. 不同成熟度烟叶烘烤过程中叶片组织结构和形态的变化[J]. 江西农业学报, 2011, 23(07):53-56.
ZHU Jinfeng, LI Guangliang, HUANG Haitang. Changes in Tissue Structure and Morphology of Tobacco Leaves during Curing of Tobacco Leaves with Different Maturities[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(07):53-56.
- [18] 丁福章, 李继新, 袁有波, 等. 烟草不同组织总 RNA 的提取方法初探[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12):98-101.
DING Fuzhang, LI Jixin, YUAN Youbo, et al. Effective Isolation of Total RNA from Tobacco Tissues[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(12):98-101.
- [19] 蒋博文, 王涛, 宋朝鹏, 等. 采后烟叶碳代谢的动态变化分析[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(01):32-41.
JIANG Bowen, WANG Tao, SONG Zhaopeng, et al. Dynamic Analysis of Carbon Metabolism in Tobacco Leaves after Harvest[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(01):32-41.
- [20] John M Humphreys, Clint Chapple. Rewriting the lignin roadmap[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(3).
- [21] Smita Rastogi, Upendra Nath Dwivedi. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase[J]. Plant Science, 2007, 174(3).
- [22] 杨慧芹, 王莎莎, 金云峰, 等. 生长温度对不同生育期烟草多酚物质代谢的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(09):1957-1974.
Yang H, Wang S, Jin Y, et al. Effects of Different Growth Temperature on Polyphenols Metabolism in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaves at Different Growth Stages[J]. Genomics & Applied Biology, 2015, 34(09):1957-1974.
- [23] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1):519-546.
- [24] Ralph J, Lundquist K, Brunow G, et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids[J]. Phytochemistry Reviews, 2004, 3(1-2):29-60.
- [25] 徐宇强, 胡轶, 付凤玲, 等. 干旱胁迫下玉米自交系叶片木质素含量变化及其与耐旱性的关系[J]. 玉米科学, 2007(05):72-75.
XU Yuqiang, HU Yi, FU Fengling, et al. Changes of Lignin Content in Leaf of Maize Inbred Lines Under Drought Stress and Its Relationship with Drought Tolerance[J]. Journal of Maize Sciences, 2007(05):72-75.
- [26] 余朝阁, 黄欣阳, 李天来, 等. 钙对化学诱抗剂诱导番茄叶片木质素合成的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(06):1445-1449.
YU Chao, HUANG Xinyang, LI Tianlai, et al. Effect of calcium on lignin synthesis induced by chemical elicitors[J]. Journal of Plant Nutrition & Fertilizer, 2013, 19(06):1445-1449.
- [27] 宋朝鹏. 烤烟烟叶成熟和烘烤过程中色素变化特征及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
SONG Zhaopeng. Pigment changes and their mechanisms of flue-cured tobacco leaf during maturing and curing phases[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [28] 李玉菲. 不同叶位烟叶生物学特性差异比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
LI Yufei. Comparative study on biological characteristics of tobacco leaves under different stalk positions[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [29] 闫克玉, 闫洪洋, 李兴波, 等. 烤烟烟叶细胞壁物质的对比分析[J]. 烟草科技, 2005(10):6-11.
YAN Keyu, YAN Hongyang, LI Xingbo, et al. Comparative Analysis of Cell Wall Substances in Flue-cured Tobacco Leaf[J]. Tobacco Science & Technology, 2005(10):6-11.
- [30] 章霄云, 郭安平, 贺立卡, 等. 木质素生物合成及其基因调控的研究进展[J]. 分子植物育种, 2006(03):431-437.
ZHANG Xiaoyun, GUO Anping, HE Lika, et al. Advances in Study of Lignin Biosynthesis and its Genetic Manipulation[J]. Molecular Plant Breeding, 2006(03):431-437.
- [31] 黄杰恒. 干旱胁迫下油菜抗倒伏相关性状动态变化及木质素关键基因表达特性分析[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
HUANG Jieheng. Lodging resistant traits and lignin related gene analysis in *B.napus* under drought stress[D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [32] Lu F, Ralph J. Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf[J]. Chemical Communications, 2002, 33(1):90-91.
- [33] 张岩. 白桦 BpCCR 基因的功能研究和应力木转录组分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
ZHANG Yan. Functional Characterization of an BpCCR Gene from

- Betula platyphylla Suks. And Transcriptome Analysis of Reaction wood[D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2012.
- [34] 黄杰恒, 李威, 曲存民, 等. 甘蓝型油菜不同抗倒性材料中木质素代谢途径关键基因表达特点 [J]. 作物学报, 2013, 39(08): 1339-1344.
- HUANG Jieheng, LI Wei, QU Cunmin, et al. Expression Characteristics of Key Genes in Lignin Pathway among Different Lodging Resistance Lines of Brassica napus L[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(08):1339-1344.
- [35] 胡丹, 刘星贝, 汪灿, 等. 不同抗倒性甜芥茎秆木质素合成关键酶基因的表达分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(09):1864-1872.
- HU Dan, LIU Xingbei, WANG Can, et al. Expression Analysis of Key Enzyme Genes in Lignin Synthesis of Culm Among Different Lodging Resistances of Common Buckwheat (Moench) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(09):1864-1872.
- [36] Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (Populus tremuloides)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(9):5407-5412.

Transcriptional analysis of key enzyme genes in synthesis of lignin in flue-cured tobacco leaves during maturity stage

GAO Yabei¹, SUN Shuguang², WANG Shenglei³, CHEN Erlong⁴, YANG Xiaoliang²,
SUN Zhanwei⁴, SONG Zhaopeng^{1*}

1 College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 China Tobacco Hubei Industrial Co. Ltd., Wuhan 430000, China;

3 Fujian Provincial Tobacco Company, Fuzhou 350000, China;

4 China Tobacco Henan Industrial Co. Ltd., Zhengzhou 450016, China

Abstract: Lignin plays an important role in the formation of tobacco leaf resistance, but excessive content of lignin affect quality of cigarette products. In order to systematically explore the key points for lignin synthesis and accumulation in tobacco leaves at maturity stage as well as the change of regulatory genes, this study analyzes leaf hardness, tissue structure, lignin content and expression patterns of lignin synthase-related genes in middle leaves of flue-cured tobacco at maturity stage using K326 as experimental material. Results showed that maturity stage is an important period for the accumulation of lignin in flue-cured tobacco; the lignin content and hardness of tobacco leaves increased first and then decreased after entering maturity period and then reached the maximum 30 days after topping. Results of quantitative RT-PCR analysis of lignin synthase-related genes in mature tobacco leaves indicated that the expression patterns of *PAL*, *C4H*, *4CL1*, *CCR1*, *CCoAOMT5*, *COMT1*, *CAD*, *PAOI* and *F5H1* were consistent with that of lignin changes, i.e. showing a trend of increasing first and then decreasing, and reaching its peak 30 days after topping. Among them, *PAL*, *C4H*, *CCR1*, *CAD2* and *PAOI* genes contributed more to lignin synthesis and accumulation in tobacco leaves ($p < 0.01$, $r = 0.93, 0.90, 0.91, 0.90, 0.89$; $P = 0.24, 0.19, 0.16, 0.17, 0.19$), which can be regarded as key regulatory genes for lignin synthesis and accumulation in middle leaves of flue-cured tobacco.

Keywords: flue-cured tobacco; lignin; gene expression patterns; the maturity stage

*Corresponding author. Email: ycszp@163.com