

花香代谢与调控研究进展

孔 湿 孙 明 潘会堂 张启翔

(北京林业大学园林学院 国家花卉工程技术研究中心)

摘要:植物的花朵香味是由一系列低分子量的挥发性化合物组成,并形成其特有的特征。花香化合物主要由萜类、苯类/苯丙素类、脂肪酸衍生物和一些含氮或硫化合物等组成。这些花香化合物除了能吸引授粉者前来完成授粉,还是一种防御策略。一般对花朵周围气体进行采样分析,从而得到更真实的花香样本。花香化合物主要由植物花瓣的表皮细胞和特殊分泌组织释放,释放过程受到花发育和授粉状态、内源生物钟及环境条件的影响。大多数花香化合物是通过类异戊二烯途径、苯类/苯丙素类途径和脂肪酸途径合成。可以采用传统生化方法、同源克隆技术或基因组学等方法克隆花香相关基因。通过基因工程可以改良植物的花香性状,除了导入植物中没有的外源基因,还可以调控相关内源基因或转录因子的表达,但是其中还有很多难点有待解决。

关键词:花香;生物合成途径;节律;基因工程

中图分类号: S68 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2012)02-0146-09

KONG Ying; SUN Ming; PAN Hui-tang; ZHANG Qi-xiang. **Advances in metabolism and regulation of floral scent.** *Journal of Beijing Forestry University* (2012) 34(2) 146-154 [Ch, 71 ref.] National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Floral scent is a complex mixture of low molecular weight volatile compounds, which gives the flower its unique fragrance. Plant scent is mainly composed of terpenoids, benzenoids/phenylpropanoids, fatty acid derivatives, and compounds containing nitrogen or sulfur. These volatile compounds act as attractants to pollinators that provide the plant with reproductive benefit. While in plant cells, these compounds could be toxic to those organisms that ingest the plant. Scent substances from the air in the vicinity of the flower are sampled, providing a more realistic image of the volatile profile. Most of the floral scent compounds are emitted from petal epidermal cells or highly specialized secretory structures such as scent glands. The composition of floral scents is changing during the flower lifespan in relation to flower stage and pollination status, endogenous rhythms, environmental conditions. Most floral scent compounds are produced by only a few major biochemical pathways, such as isoprenoid, phenylpropanoid/benzenoid and fatty acid pathways. Traditional biochemical method, homology cloning technology, and genomics approach have been used to clone genes involved in floral scent production. Recent progress in the molecular biology of floral scents offers tools for modification of fragrance in flowering plants, including introducing new genes, regulating the expression of endogenous genes or transcription factors. But many difficulties remain to be overcome.

Key words floral scent; biosynthesis pathway; rhythms; genetic engineering

自然界有很多植物的花朵能释放出芳香气味,并形成自己的显著特征。花香研究在农业、生物学、医药和香水化妆品工业等方面有着重要的价值。花香被誉为“花卉的灵魂”^[1],在观赏植物和切花上有

着重要的审美价值。例如在对香豌豆(*Lathyrus odoratus*)切花的调查中发现,花香比花色和花型更能影响消费者的决定^[2];但是常见的花卉育种目标大多集中在花色、花形、瓶插寿命等方面,却忽略了

收稿日期:2011-04-19

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAD01A18)、中央高校基本科研业务费专项资金(BLJD200910)。

第一作者:孔湿,博士生。主要研究方向:百合花香及育种。电话:010-62337106 Email: lovekywater@163.com 地址:100083北京市清华东路35号北京林业大学园林学院。

责任作者:张启翔,教授,博士生导师。主要研究方向:园林植物种质资源与育种。电话:010-62338005 Email: zqx@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

花香的育种^[3-4]。由于香味的浓郁程度往往与花朵开放的持续时间成负相关(就同一物种而言),观赏植物的传统育种使得很多花朵的香气成分消失或浓度降低^[5]。

同时,由于不少植物花朵的气味令人感到愉快,利用花香来治疗一些心理和生理疾病,以及研究人类闻到这些香味后其机体作出的反应。花香研究已经成为近年来热门的研究领域之一^[6]。

1 植物花香物质的种类及作用

植物花香物质,是植物花朵释放的次生代谢产物,主要是由许多低分子量易挥发的化合物混合而成。花香中的主要成分是萜类和苯类/苯丙素类,脂肪酸衍生物和一些其他(尤其是含氮或硫)化合物等也有出现^[7-8]。最常见的化合物是单萜中的(*E*)- β -罗勒烯、芳樟醇、 α -蒎烯、 β -蒎烯、柠檬烯,倍半萜石竹烯和不规则萜6-甲基-5-庚烯-2-酮,以及苯类/苯丙素类中的苯甲醛、水杨酸甲酯、苯甲醇和2-苯乙醇等。它们在迄今调查的50%以上的科中都有分布^[9]。不同物种间的花香组成在挥发物的成分、释放量和相对含量上差异很大^[10]。

研究表明多数植物的花朵能够释放出气味。普遍认为这些气味有2种基本功能:首先是吸引授粉者前来授粉。许多种类不能自花授粉,需要吸引授粉者进行繁殖,而吸引授粉者前来是给予相应的回报如花蜜等。昆虫能够区分复杂的花香混合物,而且根据花香的特征进行有差别的访问,这对种群结构和生殖隔离有重要的意义^[11],所以现在常在生态学和系统发生学等方面对花香进行研究^[12]。在此基础上,一些食虫植物如猪笼草(*Nepenthes rafflesiana*)的上位笼能够释放出花香中的常见挥发物来诱捕昆虫^[13]。其次,花香是一种防御策略,来抵御昆虫或动物对植物的伤害。许多挥发物在抵抗微生物和食草动物上有活性,一些花香化合物在特殊环境下对某些生物来说是有毒的。例如:丁子香酚是一种抗菌化合物和抗真菌剂,有明显的抗食草昆虫的效果,它能阻止昆虫进食并且对一些昆虫如甲虫来说是有毒的;水杨酸甲酯可以作为一个抗真菌试剂;芳樟醇在植物被吃的时候对食草动物是有毒的^[14-15]。

2 植物花香物质的检测

当植物的花朵从植株上采下来以后,它们的香味组成会发生变化,因为从生物学上来说这部分已经死了^[16],会因为受到损伤而产生额外的挥发物。历史上花朵挥发物的采集和分析同那些不挥发物的

化合物一样,如蒸馏法、萃取法等;但由于这2种方法无法精确复制原始的挥发混合物来进行分析,所以现在的研究多集中对在完整植株的顶空气体样本进行采样分析^[17-18]。这些技术可以归为2大类群,动态或静态顶空采样,两者的区别在于是否采用顶空循环气体将挥发物浓缩在吸附剂中^[18]。

2.1 花香采样技术

2.1.1 静态顶空采样

静态顶空采样的优点是在一个密闭采样空间中达到挥发物的富集,适用于那些低挥发性的花朵;但是如果静态采样时间过长,温度升高和缺乏气体交换等会影响正常生理进程,从而影响挥发物的释放^[19]。固相微萃取技术(solid phase microextraction, SPME)是一种快速、有效、简便的采样方法,现已广泛应用于很多植物的花香采样。SPME能利用纤维头表面的色谱固定相吸附挥发性成分,不需要有机溶剂,所需样品量少,操作简便快速,集采样萃取浓缩为一体,能够与气相色谱和质谱仪器连用;但其缺点是纤维头易断,操作时要十分小心。

2.1.2 动态顶空采样

动态顶空采样技术可以排除静态顶空采样中遇到的一些问题。总体而言,通过一个连续的气流,长时间的吸附可获得大量的挥发物,可以用来进行之后的各种检测分析。连续气流的进入提供了适宜的温度和气体交换,避免了顶空化合物的积累从而影响挥发物的释放;然而,外部空气进入的净化很重要,避免带入杂质,例如采用活性炭过滤^[19]。一种流行的动态顶空采样方法是闭合循环套路,将植物全部或部分置入一个密闭系统,携有挥发物的气体连续通过吸附剂,使得气体样本富集,尤为适合那些低释放率的花朵。

2.2 挥发物的脱附和检测

气相(gas chromatography, GC)是分离、鉴定和量化植物挥发物的最有效的层析技术。可以用有机溶剂洗脱吸附剂中吸附的挥发物后GC进样分析,或用热脱附方法直接对吸附管加热,载气携带着吸附剂中释放出的挥发物预冷凝后进入GC管分析。为了检验GC分离出来的挥发物成分,一种FID(flame ionization detector)检测器只提供保留时间的信息,另一种MS(mass spectrum)能够提供更多的信息来进行结构分析。一般GC/FID联用用作定量分析,GC/MS联用用作定性分析。其中也存在一些问题,例如单萜是一种广泛存在于植物体内的次生代谢产物,存在着大量的同分异构体,质谱图非常相似,用质谱鉴定较为困难^[20]。保留指数例如Kovats

指数常用来定性和区分不同的化合物。花香中大部分常见化合物很容易通过气相保留时间和质谱鉴定出来。由于现在做不到花香释放率的严格定量,所以花香定量检测只是一个大概。

为了检测挥发物中的香气活性物质,产生了通过鼻子闻气相色谱流出物中挥发性化合物来区分样品中真正的致香活性物质,即气相色谱/嗅觉计法(gas chromatography/olfactometry,GC/O)。在香气物质检测的基础上,结合GC/O技术和阈值(threshold value)分析,可以确定花朵挥发物中的主要致香成分^[21]。

近年来,国内在花朵挥发物的检测上已经进行了诸多实验,研究了一些主要经济作物和园林植物的花香成分组成,包括桂花(*Osmanthus fragrans*)^[22]、梅花(*Prunus mume*)^[23]、蜡梅(*Chimonanthus praecox*)^[24]、月季(*Rosa*)^[25]、芍药(*Paeonia lactiflora*)^[26]、姜花(*Hedychium*)^[27]和地被菊(*Chrysanthemum morifolium*)^[28]等。国外相关研究集中在花香与授粉者、进化和系统发生之间的关系,而国内在这方面的研究还不多见。

3 花香物质合成释放的调控

3.1 花香的合成部位

多数实验表明,大多数植物的花香来自花瓣,其他花器官如雌蕊、雄蕊、花萼和蜜腺等也能散发少量的香气,还有一些植物的挥发物是在特异香腺产生^[19]。在金鱼草(*Antirrhinum majus*)中,主要芳香物质在上部和下部的花冠裂片中产生和释放^[29-30];烟草(*Nicotiana suaveolens*)和非洲茉莉(*Stephanotis floribunda*)的花香主要在花冠裂片中产生^[31];但在*Ranunculus acris*中,花瓣和雄蕊对整个花朵的花香贡献率相同^[32]。

通过对相关酶的研究发现,挥发物几乎都在花瓣和其他花器官的表皮细胞中合成,从而能更好地挥发到空气中^[33]。在芳香的释放3,5-二甲氧基甲苯的月季品种中,与花香化合物合成有关的苔黑素氧位甲基转移酶OOMT1和OOMT2特异位于花瓣,并且主要位于花瓣的近轴表皮细胞中。随着花瓣的发育,表皮细胞中的OOMTs与膜的联系增强,说明有这些酶参与的花香物质生化合成途径可能与细胞的分泌机制直接相关^[34]。不过,对花香化合物合成的亚细胞定位仍然很少^[35]。

3.2 花香的释放规律

香气的组成和含量在花发育的过程中都发生着变化。这其中受到很多方面的影响,包括花发育和授粉状态、内源生物钟和环境因素等。

3.2.1 花发育和授粉状态

为了使授粉机会最大化和减少受伤机会,花朵往往在它做好接受花粉的准备、参与授粉的昆虫活性最大的时候才开始产生香味^[11-36]。完成授粉后,香味逐步减弱直至消失。有的在授粉后花朵香味还会发生改变,例如兰科的一种植物*Ophrys shegodes*授粉后花朵的香味发生改变,导致对昆虫的吸引力降低,使得授粉昆虫更可能去造访那些还未被授粉的花朵^[37]。

3.2.2 内源生物钟

某些植物中花香挥发物的释放有一定的节律,而有些植物花香挥发物的释放则维持一个比较恒定的水平。有的植物在白天和晚上释放的挥发物也不同,这与授粉者类型有关。一般来说,白天产生的香味比夜间浓郁的花朵,主要依赖蜜蜂等昆虫在白天完成授粉;而对于那些主要依赖蛾类等在夜间授粉的花朵,情况则正好相反。金鱼草花朵由蜜蜂授粉,主要花香物质苯甲酸甲酯、月桂烯、罗勒烯的释放在白天的释放量很高;相反,在烟草和矮牵牛(*Petunia × hybrida*)花瓣中,苯甲酸甲酯主要在夜间释放,为了吸引授粉蛾类^[36,38]。

在花香释放中,一些挥发物的释放表现出24 h节律,有的则没有。说明存在不同的机制调控着这些化合物的合成和释放。在月季(*Rosa hybrid 'Honesty'*)和金鱼草中发现,在缺乏外界环境的刺激下(全黑和全光条件下),它们的香味释放遵循着一种自由释放的模式。说明这些种类中花香的释放是由生物钟控制的,或参与调控挥发物合成的底物水平,或调控参与挥发物产生最后一步中酶的活性^[19,38]。

即使同一朵花散发出不同挥发物,每种挥发物也可能表现出独立的释放模式。例如在兰科植物*Ophrys shegodes*检测中发现,与白天相比,夜间释放出低水平的多数醛类和甲基庚烯酮,却有着明显高水平的多数烃类,α-蒎烯、柠檬烯、桉树脑和2-壬醇的释放。说明每种挥发物的独立振幅并不一致^[11,37]。

3.2.3 环境因素

环境因素主要包括温度、光照等。例如:5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)只在光照下参于磷酸脱氧木酮糖(DXP)途径,从而影响DXP途径的活性,进而影响单萜产量的积累^[39-41];在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花朵顶空检测到的几乎所有萜类都表现出明显的日间释放模式,而其他非萜类成分则没有这种节律^[42-43]。生长在25℃环境下的罗勒(*Ocimum basilicum*)比15℃时产出更高的挥发

油,其中丁子香酚的相对含量增长尤其明显,不过对桉树脑和芳樟醇产量没有影响^[44]。白三叶(*Trifolium repens*)的花朵在10℃时的挥发物释放量明显低于15和20℃,推测升高温度可以加快挥发物的释放^[45]。

4 植物花香物质的生物合成途径

在过去10年中,在花香挥发物的生化途径和调控其生成的分子机制上的研究有了重要的进步。大多数花香化合物的合成是受到多个基因和酶调控的复杂网络系统^[46]。在目前已鉴定的1 700多种挥发物中^[9],大部分化合物是经由以下几种生化途径合成的。

4.1 菊烯类化合物合成途径

近年来,有关植物菊烯类化合物代谢的研究取得了较大进展,基本明确了植物中菊烯类化合物的主要代谢途径、代谢中间产物、关键酶及其基因。植物中菊烯类物质有着共同的前体物质:异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和3,3-二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)。它们的生物合成主要存在2条不同的代谢途径:一条是甲羟戊酸(MVA)途径,主要存在于胞质和内质网中,参与甾醇、倍半萜和三萜等次生代谢产物的生物合成;另一条是2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径,主要参与单萜、二萜、类胡萝卜素等的生物合成^[47]。

各1分子的IPP和DMAPP头对尾的缩合,在香叶基焦磷酸合酶(GPPS)的作用下形成香叶基焦磷酸(GPP),这是所有单萜化合物的前体;2分子的IPP和1分子的DMAPP在法呢基焦磷酸合酶(FPPS)的作用下浓缩形成法呢基焦磷酸(FPP),这是倍半萜化合物的前体。一般认为FPP和倍半萜的形成在胞质中进行,而GPP、焦磷酸香叶基香叶酯(CGPP)以及单萜及二萜在质体中合成^[48];但是新的研究发现,胞质中也能合成单萜^[48],质体中也能合成倍半萜^[49],随着研究的深入,对萜烯类合成和代谢的途径能有更深入的了解^[50]。前体形成以后,在萜烯合酶(Terpene synthases,TPSs)家族的反应下形成各种单萜、倍半萜和二萜。许多花香化合物中的萜类化合物是萜类合酶的直接产物,其他则是在TPSs催化形成的主要萜类产物的基础上羟基化、脱氢化、酰化和其他反应生成的,其生化途径见图1^[8,51-54]。

4.2 苯类/苯丙素类化合物合成途径

苯类/苯丙素类化合物主要经由肉桂酸(cinnamic acid)途径合成。该途径以莽草酸

(shikimic acid)为前体,经苯丙氨酸(phenylalanine)形成反式肉桂酸(trans-cinnamic acid),然后经过一些甲基转移酶和酰基转移酶的作用而甲基化或酰化,形成一系列挥发性化合物。大部分挥发物的合成需要多个基因的参与。反应途径和相关产物及参与合成的酶见图2^[8,10,55-59]。

4.3 脂肪酸合成途径

脂肪酸衍生物主要通过3个过程形成:α氧化、β氧化和脂氧合酶途径。C18脂肪酸(亚麻酸和亚油酸)在脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)作用下形成氢过氧化物。在丙二烯氧化合酶(allene oxide synthase, AOS)作用下生成茉莉酸,然后在茉莉酸甲基转移酶(jasmonate methyltransferase)作用下生成茉莉酸甲酯。同时氢过氧化物在氢过氧化物裂解酶(hydroperoxide lyase, HPL)作用下形成C6和C9挥发醛类,有的会在烯醛异构酶(alkenal isomerase)的作用下形成异构体,然后C6和C9醛类被乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)的催化下形成相应的醇类。一些参与脂氧合酶途径的基因已经被分离鉴定,但是在花器官中的表达还未被检测^[60]。

5 植物花香基因工程研究进展

1996年,Dudareva等从仙女扇(*Clarkia breweri*)中克隆了LIS基因,这是花香生物学研究的里程碑^[61-62]。随后科学家们又从仙女扇花朵中克隆了IEMT、BEAT、SAMT基因,在金鱼草中克隆了BAMT基因。越来越多的调控花香合成的基因被克隆和鉴定。目前来说,研究花香相关的基因集中在几种模式植物如仙女扇、金鱼草、烟草、矮牵牛和月季中。

5.1 花香相关基因的分离

一是通过传统生化方法途径分离,如编码LIS、BEAT、SAMT、IEMT、BAMT、POMT的基因。该方法用反向遗传法筛选目标cDNA文库,用纯化的酶序列作探针。编码POMT的基因通过RACE方法,用基于纯化酶的氨基酸序列设计简并引物进行克隆。总之,此方法特异性较强,通过这种方法,花香相关基因可以被准确分离,不过酶纯化阶段很困难^[4]。

二是同源克隆。基于保守序列设计简并引物,然后进行PCR特异性扩增。如金桂(*Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*)和薰衣草(*Lavandula officinalis*)中参与芳樟醇合成的LIS基因,是基于已知的花香相关基因的序列信息,通过RT-PCR和RACE方法获得^[63-64]。这种方法可以有效分离目的基因,但由于已知信息量较为有限,设计简并引物较困难。

三是基因组学方法。该方法通过应用EST数

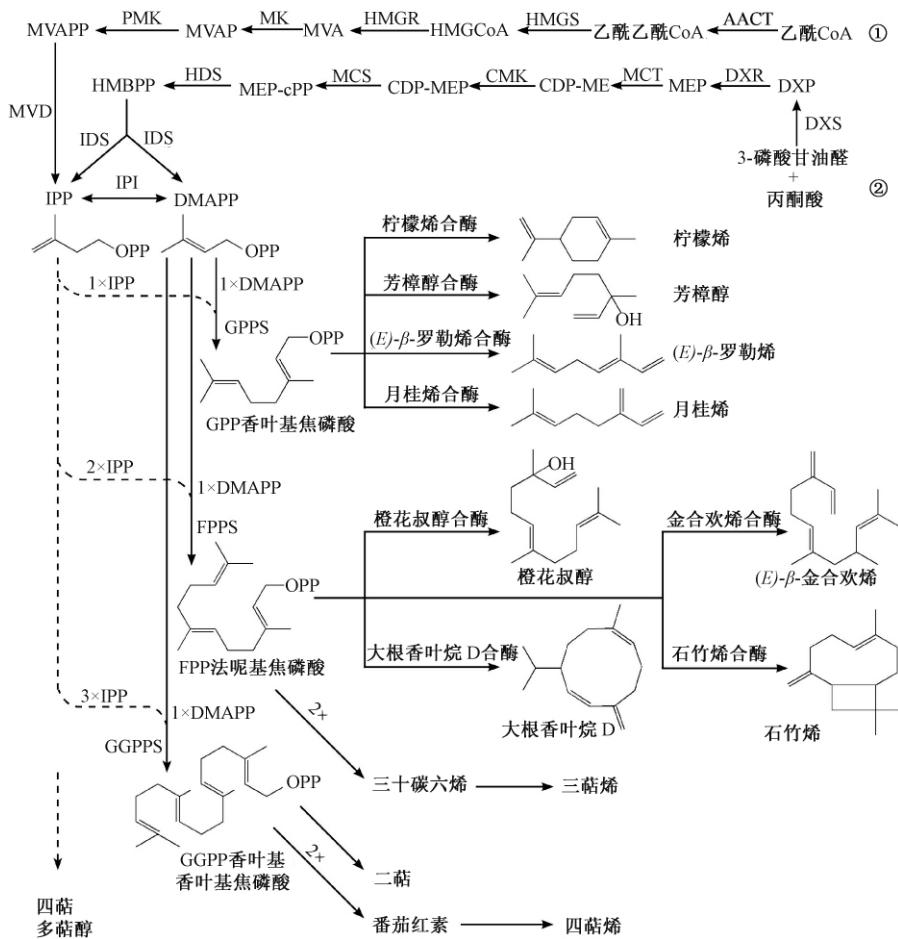


图1 植物中萜烯类化合物合成途径示意图

Fig. 1 Outline of terpenoids biosynthetic pathway

注: ①细胞质 MVA 途径; ②质体 MEP 途径。AACT. 乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶; HMGS. HMGC-CoA 合酶; HMGC-CoA. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A; HMGR. HMGC-CoA 还原酶; MVA. 甲羟戊酸; MK. 甲羟戊酸激酶; MVAP. 甲羟戊酸-5-磷酸; PMK. 甲羟戊酸磷酸激酶; MVAPP. 甲羟戊酸-5-二磷酸; MVD. 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶; IPI. 异戊烯基二磷酸异构酶; DXS. 5-磷酸脱氧木酮糖合酶; DXP. 5-磷酸脱氧木酮糖; DXR. 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶; MEP. 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸; MCT. CDP-ME 转移酶; CDP-ME. 4-磷酸胞苷-2-甲基赤藻糖; CMK. CDP-ME 激酶; CDP-MEP. 二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藻糖醇-2-磷酸; MCS. MEP-cPP 合酶; MEP-cPP. 2-C-甲基-D-赤藻糖醇-2-A-环二磷酸; HDS. HMBPP 合酶; HMBPP. (E)-4-羟基-3-甲丁-2-烯基二磷酸; IDS. IPP/DMAPP 合酶; GPPS. 香叶基焦磷酸合酶; FPPS. 法呢基焦磷酸合酶; GGPPS. 香叶基香叶基焦磷酸合酶。

数据库、代谢轮廓、微阵列表达分析、蛋白质组学和基因表达系列分析等技术来确定新的基因。*OOMT1* 和 *OOMT2* 是在 EST 数据库中经过同源搜索 BLAST 比对其他的 *O*-甲基转移酶来确定。*BPBT* 基因也是用同样的方法分离出来。香叶醇/香茅醇乙酰转移酶也是经过同其他的乙醇乙酰转移酶比较后确定才克隆出来。不过,这种方法需要高级的实验设备和大量的资金投入,并不适合普通的实验室^[57]。

5.2 花香物质代谢途径的调控

多年来,对观赏植物的研究集中在花色、花型、抗病性和采后保鲜等方面,缺乏香味已经成为花卉界中公认的一个问题。花香分子生物学上的研究进展,为植物花香的改良提供了新思路。近些年,主要有2种方法:一是引入花香相关的外源基因;二是调

控内源相关基因的表达。

5.2.1 引入花香相关的外源基因

植物花香基因工程的一个方法是引入受体植物没有的香味物质合成基因。例如将柠檬(*Citrus limon*)中3个不同的单萜基因转到烟草中,转基因烟草的叶和花中都生产出 β -蒎烯、柠檬烯、 γ -萜品烯以及很多副产品,引起了香味的强烈改变^[65]。

5.2.2 调控内源相关基因或转录因子的表达

另一个方法是通过调控上游或下游内源基因的表达来获得更多的目标产物,或者阻碍一个不想要产物的表达,引起代谢的改变,从而改变花香成分。

上游调控是在提高代谢途径中编码上游酶催化前体的量来提高目标产物的产量,其中挥发物的前体物质是个关键因素。例如5-磷酸脱氧木酮糖还

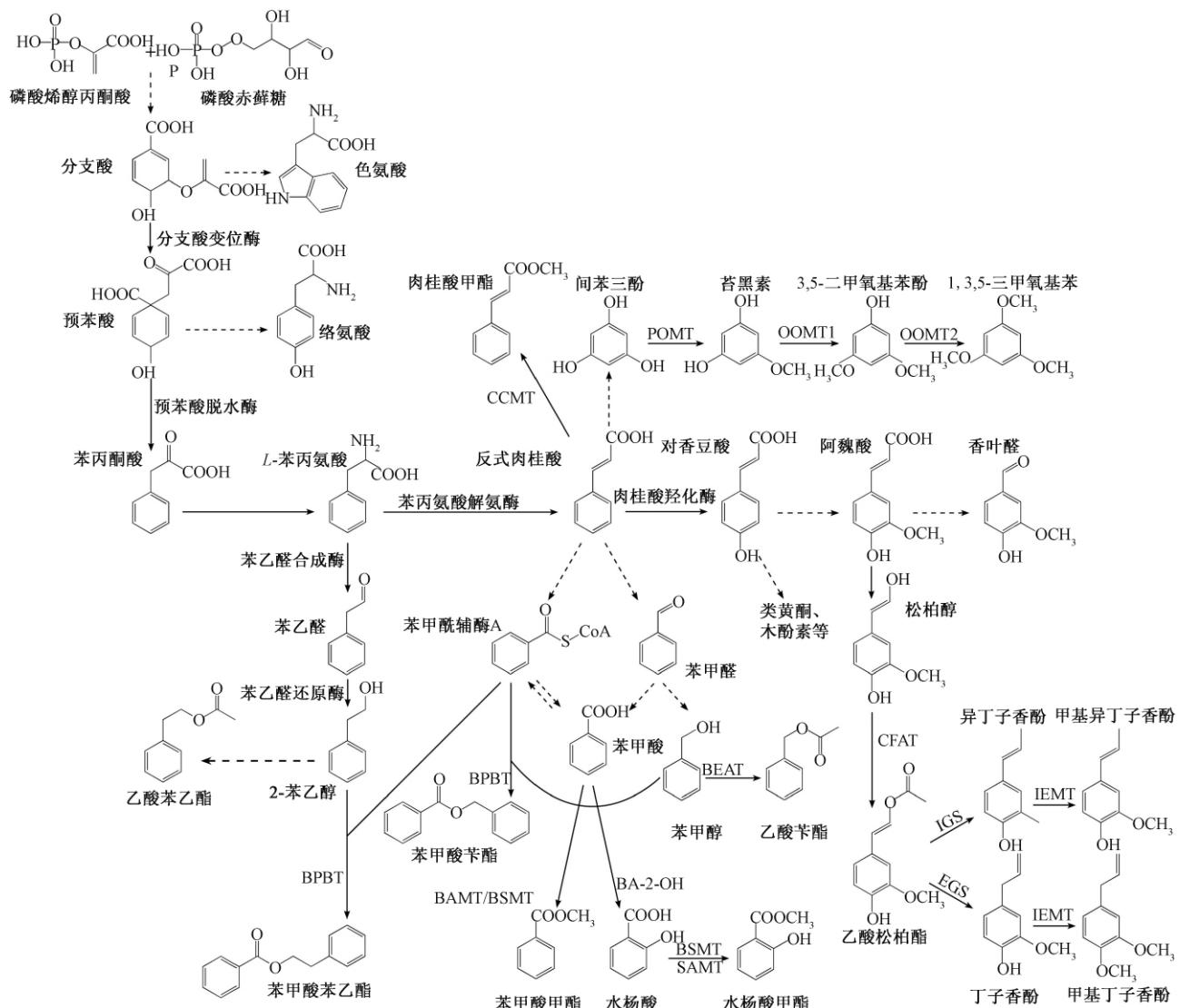


图 2 苯类/苯丙素类化合物合成途径示意图

Fig. 2 Outline of benzenoids/phenylpropanoids biosynthetic pathway

注: 实线为直接反应, 虚线为间接反应。BAMT. 苯甲酸羧基位甲基转移酶; BA-2-OH. 苯甲酸羟化酶; BEAT. 苯甲醇乙酰基转移酶; BPBT. 苯甲醇/苯乙醇苯甲酰基转移酶; BSMT. 苯甲酸/水杨酸羧基位甲基转移酶; CCMT. 对香豆酸/肉桂酸羧基位甲基转移酶; CFAT. 松柏醇酰基转移酶; EGS. 丁子香酚合酶; IEMT. (异) 丁子香酚氧位甲基转移酶; IGS. 异丁子香酚合酶; POMT. 间苯三酚氧位甲基转移酶; OOMT. 苔黑素氧位甲基转移酶; SAMT. 水杨酸羧基位甲基转移酶。

原异构酶(DXR)上游调控酶催化MEP的产量,是一个IPP和DMAPP的一个中间产物。将DXR基因转入到辣薄荷(*Mentha × piperita*)中,转基因植株和野生种比起来精油产量提高了50%^[66]。下游调控转基因矮牵牛植株中转录启动子*ODORANT1*(*ODO1*)的表达,使得经由莽草酸途径合成的前体物质减少,明显的降低了花香主要成分苯类化合物的释放水平^[67]。结构反义表达转基因来下游调控柠檬烯羟化酶导致薄荷精油中柠檬烯水平的提高^[68]。

还有一种策略是阻碍那些与目标化合物有着同样前体但是不想要的化合物的产生,这样能获得更多的目标化合物。例如在香石竹(*Dianthus caryophyllus*)中,花青素和苯甲酸甲酯都是通过苯基

丙酸类途径合成。通过反义抑制催化花青素形成的关键酶——黄烷酮-3-羟化酶基因的编码来阻碍花青素的生物合成,使得代谢转移到苯甲酸的产生,导致了苯甲酸甲酯的产量提升,与对照植株相比转基因植株更为芳香^[69]。

5.3 花香基因工程中存在的问题

花香基因工程中仍然存在着很多难点。一是外源基因的导入或已知基因活性的改变,有时并不足以调节花香,如细胞中没有可供催化的底物,这是影响挥发物产生的一个主要局限。研究表明,从金鱼草中释放的苯甲酸苄酯,受到其前体物质苯甲酸的限制^[29]。

二是转基因植物中的挥发物可能会被修饰成不挥发的形式,例如糖基化和羟基化,或者一些不挥发

的衍生物可能会随着目的产物一同产生。例如将仙女扇中的 *LIS* 的 cDNA 转基因到矮牵牛中。在转基因矮牵牛植株的花瓣和叶片中检测到 *LIS* 活性;但是花瓣中只有痕量的芳樟醇,而不挥发的芳樟醇配糖体却被大量检测到^[70]。

三是转基因植物中释放的化学产物的改变可能不足以被人类感觉到。例如将 *LIS* 基因转入到香石竹中(香石竹正常状态下产生苯甲酸和倍半萜烯,没有单萜),转基因植株的花瓣和叶中都释放出芳樟醇,在花瓣中也被检测到芳樟醇的衍生物正、反式芳樟醇氧化物。芳樟醇和它的衍生物占到花瓣的整个花香挥发物总量的 10%,但是人类的嗅觉并不能分辨出花香气味上的改变^[71]。

四是代谢通量的改变可能会影响植物的生长状态。局部代谢通量的改变可能会引起其他生化反应底物的不足,或是高浓度的花香产物对植物来说是有毒的,例如一些单萜包括芳樟醇已经被证明对植物细胞是有害的。与同样生长在温室的野生型植株比起来,转基因拟南芥植株表达 *FaNES1* 生长迟缓^[42]。转基因矮牵牛植株表现出未预料到的形态变化——大花和大叶,这可能是由于参与合成苯甲酸苄酯合成的酶 BPBT 也参与了营养器官的代谢过程^[59]。

在某种程度上,花香化合物的生化途径已经被阐述。一些花香相关的基因已经被分离和鉴定,并且科学家试图利用基因工程手段去调节花香。不过从整体来说,花香研究仍然处于初级阶段,调控花香产生和释放的机制无论理论上还是技术上都还只是一个粗略的框架。

参 考 文 献

- [1] 陈秀中,王琪. 中华民族传统赏花理论探微[J]. 北京林业大学学报 2001, 23(增刊 1): 16—21.
- [2] SEXTON R, STOPFORD A P, MOODIE W T, et al. Aroma production from cut sweet pea flowers (*Lathyrus odoratus*): the role of ethylene[J]. *Physiologia Plantarum* 2005, 124(3): 381—389.
- [3] 缪曼珉,陈建春,张宗东. 花朵香味的生理、遗传及调控[J]. 分子植物育种 2007, 5(6): 67—74.
- [4] BOHLMANN J, MEYER-GAUNEN G, CROTEAU R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(8): 4126—4133.
- [5] VAINSTEIN A, LEWINSOHN E, PICHERSKY E, et al. Floral fragrance. New inroads into an old commodity [J]. *Plant Physiology* 2001, 127(4): 1383—1389.
- [6] SCHNEPP J, DUDAREVA N. Floral scent: biosynthesis, regulation and genetic modifications [M] // AINSWORTH C. *Annual plant reviews volume 20: Flowering and its manipulation*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd 2007: 240—257.
- [7] KNUDSEN J T, TOLLSTEN L, BERGSTRÖM L G. Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(2): 253—280.
- [8] DUDAREVA N, PICHERSKY E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(3): 627—633.
- [9] KNUDSEN J, ERIKSSON R, GERSHENZON J, et al. Diversity and distribution of floral scent [J]. *The Botanical Review* 2006, 72(1): 1—120.
- [10] NEGRE F. *Biosyntheisi and regulation of floral scent in snapdragon and petunia flowers* [D]. West Lafayette: Purdue University, 2005.
- [11] DUDAREVA N, PIECHULLA B, PICHERSKY E. Biogenesis of floral scent [M] // JANICK J. *Horticultural reviews: Volume 24*. Oxford: John Wiley & Sons, Inc. 2010: 31—54.
- [12] MEEKIJAROENROJ A, BESSIÉRE J, ANSTETT M. Chemistry of floral scents in four *Licuala* species (Arecaceae) [J]. *Flavour and Fragrance Journal* 2007, 22(4): 300—310.
- [13] DI GIUSTO B, BESSIÉRE J, GUÉROULT M, et al. Flower-scent mimicry masks a deadly trap in the carnivorous plant *Nepenthes rafflesiana* [J]. *Journal of Ecology* 2010, 98(4): 845—856.
- [14] GANG D R. Evolution of flavors and scents [J]. *Annual Review of Plant Biology* 2005, 56: 301—325.
- [15] ROSS J R. *S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT): an enzyme involved in floral scent and plant defense in Clarkia breweri* [D]. Ann Arbor: University of Michigan, 2002.
- [16] RAGUSO R A, PELLMYR O. Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods [J]. *OIKOS*, 1998, 81: 238—254.
- [17] STASHENKO E E, MARTINEZ J R. Sampling flower scent for chromatographic analysis [J]. *Journal of Separation Science* 2008, 31(11): 2022—2031.
- [18] QUALLEY A, DUDAREVA N. Plant volatiles [M] // *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd 2010: 1—9.
- [19] DUDAREVA N, PICHERSKY E. *Biology of floral scent* [M]. Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis Group 2006.
- [20] 苏越,刘素红,王呈仲,等. 谱图相似度分析结合保留指数对单萜烯同分异构体的 GC-MS 定性分析 [J]. 分析测试学报, 2009, 28(5): 525—528.
- [21] 宋国新,余应新,王林祥,等. 香气技术与分析实例 [M]. 北京:化学工业出版社 2008.
- [22] 孙宝军. 中国部分桂花品种芳香成分研究 [D]. 开封:河南大学 2011.
- [23] 赵印泉,潘会堂,张启翔,等. 梅花花朵香气成分时空动态变化的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4): 201—206.
- [24] 周明芹,向林,陈龙清. 蜡梅花香及花色色素成分的初步研究 [J]. 北京林业大学学报 2007, 29(增刊 1): 22—25.
- [25] 叶灵军,张立,张启翔,等. 现代月季品种主要香气成分的分析 [J]. 北方园艺 2008(9): 93—95.
- [26] 黄雪,王超,王晓菡,等. 茵药‘杨妃出浴’和‘大富贵’花香成分初探 [J]. 园艺学报 2010, 37(5): 817—822.
- [27] 范燕萍,王旭日,余让才,等. 不同种姜花香气成分分析 [J]. 园艺学报 2007, 34(1): 231—234.

- [28] 孙明, 刘华, 张启翔, 等. 3个地被菊品种香气成分的分析[J]. 沈阳农业大学学报 2008, 39(1): 92-95.
- [29] DUDAREVA N, MURFITT L M, MANN C J, et al. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(6): 949-961.
- [30] DUDAREVA N, MARTIN D, KISH C M, et al. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(5): 1227-1241.
- [31] ROHRBECK D, BUSS D, EMMERT U, et al. Localization of methyl benzoate synthesis and emission in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* flowers [J]. *Plant Biology*, 2006, 8(5): 615-626.
- [32] BERGSTRÖM G, DOBSON H E M, GROTH I. Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1995, 195(3): 221-242.
- [33] DUDAREVA N, PICHERSKY E, GERSHENZON J. Biochemistry of plant volatiles [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 1893-1902.
- [34] SCALLIET G, LIONNET C, LE BECHEC M, et al. Role of petal-specific orcinol O-methyltransferases in the evolution of rose scent [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 18-29.
- [35] KOLOSOVA N, SHERMAN D, KARLSON D, et al. Cellular and subcellular localization of S-adenosyl-L-methionine benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(3): 956-964.
- [36] YAKIR E, HILMAN D, HARIR Y, et al. Regulation of output from the plant circadian clock [J]. *FEBS Journal*, 2007, 274(2): 335-345.
- [37] SCHIESTL F P, AYASSE M. Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximising reproductive success? [J]. *Oecologia*, 2001, 126(4): 531-534.
- [38] KOLOSOVA N, GORENSTEIN N, KISH C M, et al. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(10): 2333-2347.
- [39] LICHTENTHALER H K, ROHMER M, SCHWENDER J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 101(3): 643-652.
- [40] SKINKIS P A. *The effects of shading on monoterpene accumulation in 'Traiminet' grape berries and the identification and quantitative analysis of monoterpene constituents* [D]. West Lafayette: Purdue University 2006.
- [41] 刘玲, 余义勋. 植物香气的合成和代谢的分子生物学研究进展 [J]. 中国生物工程杂志 2008, 28(6): 289-294.
- [42] AHARONI A, GIRI A P, DEUERLEIN S, et al. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 2866-2884.
- [43] CHENG A, LOU Y, MAO Y, et al. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(2): 179-186.
- [44] CHANG X M, ALDERSON P G, HOLLOWOOD T A, et al. Flavour and aroma of fresh basil are affected by temperature [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(7): 1381-1385.
- [45] JAKOBSEN H B, OLSEN C E. Influence of climatic factors on emission of flower volatiles *in situ* [J]. *Planta*, 1994, 192(3): 365-371.
- [46] 赵印泉. 梅花花香成分分析及花香相关基因 *PmOMT* 的克隆与表达 [D]. 北京: 北京林业大学 2010.
- [47] 李莉, 高凌云, 董越, 等. 植物类异戊二烯生物合成相关酶基因研究进展 [J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版 2008, 31(4): 461-466.
- [48] AHARONI A, GIRI A P, VERSTAPPEN F, et al. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3110-3131.
- [49] SALLAUD C, RONTEIN D, ONILLON S, et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 301-317.
- [50] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展 [J]. 园艺学报 2011, 38(2): 379-388.
- [51] 张长波, 孙红霞, 巩中军, 等. 植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶 [J]. 植物生理学通讯 2007, 43(4): 779-786.
- [52] CSEKE L J. *Molecular biology of floral scent evolution: characterization of linalool synthase (LIS) in diverse species* [D]. Ann Arbor: University of Michigan, 1998.
- [53] HSIEH M H, GOODMAN H M. The *arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 641-653.
- [54] AHARONI A, JONGSMA M A, KIM T, et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 5: 49-58.
- [55] COLQUHOUN T A, SCHIMMEL B C J, KIM J Y, et al. A petunia chorismate mutase specialized for the production of floral volatiles [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(1): 145-155.
- [56] KAPTEYN J, QUALLEY A V, XIE Z Z, et al. Evolution of cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3212-3229.
- [57] XIANG L, MILC J A, PECCIONI N, et al. Genetic aspects of floral fragrance in plants [J]. *Biochemistry-Moscow*, 2007, 72(4): 351-358.
- [58] PICHERSKY E, DUDAREVA N. Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell [J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(3): 105-110.
- [59] ORLOVA I, MARSHALL-COLON A, SCHNEPP J, et al. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3458-3475.
- [60] SCHWAB W, DAVIDOVICH-RIKANATI R, LEWINSOHN E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 712-732.
- [61] 孙明, 吕晋慧, 张启翔. 花香基因工程研究进展 [J]. 安徽农业

- 科学 2007, 35(11): 3169-3171.
- [62] DUDAREVA N, CSEKE L, BLANC V M, et al. 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.
- [63] 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.
- [64] 张雪荣. 薰衣草芳樟醇合成酶的基因克隆、功能鉴定及转基因技术的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [65] LUCKER J, SCHWAB W, VAN HAUTUM B, et al. Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 510-519.
- [66] MAHMOUD S S, CROTEAU R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(15): 8915-8920.
- [67] VERDONK J C, HARING M A, VAN TUNEN A J, et al.
- ODORANTI* regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1612-1624.
- [68] MAHMOUD S S, WILLIAMS M, CROTEAU R. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(5): 547-554.
- [69] ZUKER A, TZFIRA T, BEN-MEIR H, et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene [J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9(1): 33-41.
- [70] LUCKER J, BOUWMEESTER H J, SCHWAB W, et al. Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside [J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(4): 315-324.
- [71] LAVY M, ZUKER A, LEWINSOHN E, et al. Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene [J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9(2): 103-111.

(责任编辑 董晓燕)

本刊 2012 年第 3 期要目预告

- 贾秀红等: 亮叶水青冈次生林种间分离特征的研究
- 覃炳醒等: 干旱胁迫对黄檗幼苗生理及叶片中小檗碱含量影响
- 施征等: 干旱、高盐对梭梭叶绿素荧光特性的影响
- 唐辉等: 不同产地地枫皮的红外光谱和化学计量学快速评价
- 赵曦阳等: 楸树无性系叶绿素荧光及生长特性变异研究
- 张娟等: 自然背景下的梅花图像分割算法研究
- 王传贵等: 化学成分对木材细胞壁纵向弹性模量和硬度的影响
- 赵索菲等: 基于时域、频域的层积材强度检测系统
- 胡雄武等: 直流电法 CT 技术检测林木孔洞结构特征
- 魏万殊等: 二种硼基防霉剂对慈竹重组材性能的影响
- 李博等: 森林消防车驾驶员视野在四维结构下的衰减研究