

引文格式: 曾婉俐, 向海英, 刘德水, 等. 烟草 Orange 蛋白突变体的转录组和代谢组分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(5): 40–47. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202208063](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202208063)

烟草 Orange 蛋白突变体的转录组和代谢组分析*

曾婉俐¹, 向海英¹, 刘德水^{2,3}, 周会娜⁴, 高 茜¹, 潘帮珍⁵, 李雪梅¹, 李 晶^{1**}

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650231; 2. 上海烟草集团技术中心 北京站, 北京 101121;
3. 上海烟草集团 北京卷烟厂有限公司, 北京 100021; 4. 中国烟草总公司 郑州烟草研究院, 河南 郑州 450001;
5. 中国科学院 西双版纳热带植物园/热带植物资源可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650223)

摘要:【目的】分析烟草 Orange 蛋白突变体的转录组和代谢组, 为培育高类胡萝卜素含量的烟草提供理论依据。【方法】通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 获得带有 3 个碱基缺失的 *NtOR* 基因突变株系 208。采用转录组测序、液相色谱—质谱联用的非靶向方法、气相色谱—质谱联用的衍生化方法和顶空进样技术, 对突变株系的差异基因和差异代谢物进行分析。【结果】突变株系 208 叶片中的 β -胡萝卜素和紫黄质含量显著下降。转录组分析显示: 突变株系 208 中有 10 369 个差异表达基因, 其中 4 178 个基因上调, 6 191 个基因下调。代谢组分析显示: 突变株系 208 与对照相比有 160 个差异代谢物。【结论】突变株系 208 中的类胡萝卜素含量下降, 色素代谢途径中玉米黄素环氧化酶基因下调, 有机酸和二萜类代谢物含量显著升高。

关键词: 烟草; 类胡萝卜素; Orange 蛋白; β -胡萝卜素; 紫黄质

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2024) 05-0040-08

Transcriptomic and Metabolomic Analyses of Orange Mutant in Tobacco

ZENG Wanli¹, XIANG Haiying¹, LIU Deshui^{2,3}, ZHOU Huina⁴,
GAO Qian¹, PAN Bangzhen⁵, LI Xuemei¹, LI Jing¹

(1. R & D Center of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China;

2. Technology Center of Shanghai Tobacco Group, Beijing Station, Beijing 101121, China;

3. Shanghai Tobacco Group, Beijing Cigarette Factory Co., Ltd., Beijing 100021, China;

4. Zhengzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001, China;

5. Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: [Purpose] To analyze the transcriptome and metabolome of a tobacco Orange protein mutant, providing a theoretical foundation for cultivating tobacco with high carotenoid content.

[Methods] CRISPR/Cas9 technology was used to obtain a tobacco *NtOR* gene mutant (line 208) with a three-base deletion. The differential genes and metabolites of the mutant lines were analyzed by transcriptome sequencing, non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and gas

收稿日期: 2022-08-30

修回日期: 2024-09-19

网络首发日期: 2024-10-24

*基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项 [110202001028 (JY-11)]; 云南中烟工业有限责任公司科技项目 (2021JC09); 云南省烟草化学重点实验室开放课题 (2021539200340248)。

作者简介: 曾婉俐 (1983—), 女, 四川渠县人, 博士, 副研究员, 主要从事烟草品质特色研究。

E-mail: 165691973@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 李晶 (1982—), 女, 云南大理人, 博士, 副研究员, 主要从事烟草化学研究。E-mail: lijing_1107@163.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20241023.1713.003>



chromatography-mass spectrometry (GC-MS) derivatization and headspace injection techniques.

[**Results**] The contents of β -carotene and violaxanthin were significantly decreased in mutant line 208. Transcriptome analysis showed there were 10 369 differentially expressed genes in mutant line 208, with 4 178 up-regulated and 6 191 down-regulated genes. Metabolome analysis showed that mutant line 208 had 160 different metabolites compared with the control. [**Conclusion**] In mutant line 208, the content of carotenoid decreases, and the zeaxanthin cyclooxygenase genes in pigment metabolism pathway are down-regulated, and the contents of organic acids and diterpenoids are significantly increased.

Keywords: tobacco; carotenoids; Orange protein; β -carotene; violaxanthin

植物类胡萝卜素是存在于叶绿体和有色体膜中的脂溶性色素,具有多种结构和功能^[1],主要包括胡萝卜素(碳氢化合物)和叶黄素(胡萝卜素的氧化衍生物)两大类,其结构由8个类异戊二烯单位浓缩后逐步演变而成^[2]。类胡萝卜素合成代谢途径中的中间代谢产物(如 β -胡萝卜素和黄体素)参与植物的光合作用^[3],而终产物(如脱落酸和独脚金内酯)则与植物的抗氧化能力和生长发育相关^[4]。类胡萝卜素是重要的香气前体物质^[5],通过酶促或非酶促氧化降解,生成紫罗酮、 β -大马酮等香味物质,显著影响烟叶的香气质量^[6]。在烟叶的生长、成熟、调制、醇化和燃烧过程中,类胡萝卜素的积累、转化和降解将直接影响烤烟的香气风格和品质^[7]。因此,烟草中类胡萝卜素及其降解产物含量的变化可能会对烟叶的品质产生重要影响。

Orange (OR) 基因最早在花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 中被发现,其自发突变导致菜头颜色改变,使植物器官呈现橙色^[8]。OR 蛋白是一种质体定位的蛋白质,含有富含半胱氨酸的锌指结构域,在多种植物中高度保守^[9]。八氢番茄红素合酶 (phytoene synthase, PSY) 是类胡萝卜素合成途径中的关键限速酶,其过量积累会导致类胡萝卜素含量增加^[10-11]。研究表明:OR 蛋白可通过转录后调控 PSY 活性,从而影响类胡萝卜素的合成^[12]。在多种植物中,如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、甘薯 [*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill] 和水稻 (*Oryza sativa* L.), 过表达 OR 基因均能提高类胡萝卜素的含量^[12-14]。

CRISPR/Cas9 技术具有操作简单、快速高效等优点,广泛应用于植物的基因编辑中。2015 年,研究人员在普通烟草中建立了 CRISPR/Cas9 技术

体系,并实现了对 *NtPDS* 和 *NtPDR6* 基因的定点突变^[15]。此后,CRISPR/Cas9 技术多次应用于烟草基因功能验证和突变体创制^[16-18]。本研究运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得了烟草 *NtOR* 基因突变的纯合株系 208,并测定和分析了该突变株系成熟期叶片的类胡萝卜素含量以及代谢组和转录组的变化,旨在揭示烟草 *NtOR* 基因在类胡萝卜素合成通路中的作用,为通过基因工程技术培育优良烟草品种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 编辑载体构建和突变烟株的获得

供试烟草品种为红花大金元;基因编辑载体 CRISPR/Cas9 来自西南大学家蚕重点实验室,用于实现 *NtOR* 基因的编辑。

1.1.1 CRISPR/Cas9 基因编辑载体的构建

以拟南芥 *AtOR* 基因 (*Arabidopsis thaliana*, AT5G61670) 蛋白序列为参考,在栽培烟草参考基因组数据库 (<https://solgenomics.net/>) 中进行同源比对,鉴定栽培烟草的 OR 蛋白序列。使用 DNAMAN[®] 6.0 软件进行多物种 OR 蛋白序列的多重比较分析。这些物种序列包括普通烟草的祖先种林烟草 (*Nicotiana sylvestris*, XP_009771548.1)、绒毛状烟草 (*N. tomentosiformis*, XP_009599295.1)、拟南芥 (*A. thaliana*, AT5G61670)、番茄 (*Solanum lycopersicum*, NP_001315338.1)、胡萝卜 (*Daucus carota*, KZM92469.1)、澳洲棉 (*Gossypium australe*, KAA3456878.1)、褐枝猕猴桃 (*Actinidia rufa*, GFY84422.1)、紫苏 (*Perilla frutescens*, KAH6790-465.1)、菠萝 (*Ananas comosus*, XP_020085475.1) 和芝麻 (*Sesamum indicum*, XP_011084764.1)。

根据 *NtOR* 基因的基因组 DNA 序列,利用

在线网站 CRISPR MultiTargeter (<http://www.multipcrispr.net/index.html>) 设计 sgRNA 靶位点, 选取得分最高的核苷酸序列 (GTTCCTTCTATAGAG-ATATC) 合成正向引物 (F: 5'-GATTGTTCTTCTATAGAGATATCTGG-3') 和反向引物 (R: 5'-CAAACAAGGAAGATATCTCTATAGACC-3')。将合成的引物用双蒸水稀释至 100 ng/ μ L, 正、反向引物各取 5 μ L 混合至 PCR 管中。PCR 仪的退火程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 每 8 s 降温 0.1 $^{\circ}$ C, 至 25.0 $^{\circ}$ C。退火后形成中间为特异引导序列的双链结构 (5'-GATTGTTCTTCTATAGAGATATCTGG-3', 3'-CAAACAAGGAAGATATCTCTATAGACC-5'), 作为目的片段。

使用 *Bsa*I 限制性内切酶酶切 CRISPR/Cas9 载体, 将酶切后的载体与目的片段连接, 取连接产物 10 μ L 加入到 *Trans*-T1 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 10 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 迅速将感受态细胞放回冰上 2 min。取转化产物 60 μ L 均匀涂布于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 下培养 12~18 h。随机挑取单菌落并提取质粒, 使用测序引物 U626 (5'-GGATTGCAAGCAGGCATCAA-3') 和 U627 (5'-CGCTTCAAAAATCCCTTCCAC-3') 进行 Sanger 测序, 确认目的片段已正确插入 CRISPR/Cas9 载体。

1.1.2 *NtOR* 基因突变烟株的创制

采用农杆菌介导的叶盘法, 对构建的 CRISPR/Cas9-*NtOR* 编辑载体进行常规遗传转化和组培试验, 并对烟草类胡萝卜素合成相关基因 *NtOR* 进行编辑。待分化芽生根 10 d 后, 取叶片进行 *NtOR* 基因突变检测。突变检测使用华大基因 BGISEQ-500 平台, 采用 PE100 测序类型进行高通量测序, 测序引物为 F: 5'-AAACACCTACCACTGGCCAC-3' 和 R: 5'-CATCGGAGGCCATAGATCGC-3'。挑选发生编辑的 T_0 代植株, 收种后按代数继续扩繁; 于 T_1 代 4 叶期取叶片进行 *NtOR* 基因突变检测, 挑选发生纯合编辑的 T_1 代植株并收种; 再按代数扩繁, 于 T_2 代 4 叶期时再次取叶片进行 *NtOR* 基因突变检测, 最终获得纯合无标签的 T_3 代突变株系 208。

1.2 代谢成分分析

1.2.1 色素分析法检测类胡萝卜素含量

采用靶向色素分析法检测成熟期新鲜烟叶中的类胡萝卜素含量。取成熟期中部烟叶第 9~11 片

中的 2 片作为 1 个生物学重复, 共设 3 个生物学重复。将烟叶沿主脉撕开, 一半用于代谢组测序, 另一半用于转录组测序。称取冻干烟叶粉末 20 mg, 加入 90% 丙酮溶液 1.5 mL, 冰浴超声 30 min, 以 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 500 μ L 至平底色谱瓶。上样至 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent 公司) 进行检测, 标样纯度 $\geq 95\%$, 叶绿素 b 的检测波长为 428 nm, 其他质体色素的检测波长为 448 nm。

1.2.2 基于液相色谱—质谱联用 (LC-MS) 技术的非靶向方法检测代谢成分

称取冻干烟叶粉末 20 mg, 加入提取试剂 (75% 甲醇) 1.5 mL, 涡旋 6~15 s 后, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 下振摇提取 1 h。以 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 800 μ L 至进样瓶进行 LC-MS 分析 (I-Class 超高效液相色谱, 英国 Waters 公司)。采用 Progenesis QI 软件处理数据, 采用峰面积归一化法计算代谢物的相对含量, 最终使用 SIMCA 14.1 软件进行统计分析。

1.2.3 基于气相色谱—质谱联用 (GC-MS) 技术的衍生化方法

称取冻干烟叶粉末 20 mg, 加入萃取溶剂 ($V_{\text{异丙醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=3:3:4$) 1.5 mL (每毫升萃取溶剂中含 1 μ L 内标十三酸, 即 2 μ g/mL), 超声 1 h 后, 涡旋 2 次, 每次 30 s。以 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 500 μ L 至 2 mL 锥形玻璃进样瓶中, 并在真空下浓缩干燥。加入 20 mg/mL 甲氧胺吡啶溶液 100 μ L, 涡旋 2 次, 每次 15 s, 并在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 下孵育 90 min; 加入硅烷化试剂 BSTFA 100 μ L, 涡旋 20 s 后, 在 60 $^{\circ}$ C、200 r/min 下硅烷化 60 min。样品室温静置后进行 GC-MS 分析 (Agilent 6890 系列气相色谱仪, Agilent 公司)。使用全扫描选择离子监测模式 (Scan-SIM) 获取数据, 质量扫描范围设置为 33~600 m/z, 溶剂延迟时间为 5 min, 扫描速度为 2.59 scan $\cdot$ s $^{-1}$, 界面和离子源的温度分别为 280 和 230 $^{\circ}$ C, 检测器电压维持在 1.2 kV, 电子碰撞能量为 70 eV。

1.2.4 基于 GC-MS 技术的顶空进样方法

称取烟叶粉末 1 g 于 20 mL 顶空进样瓶中, 压紧瓶盖, 进行 GC-MS 分析 (Agilent 7890A 气相色谱系统和 7697A 顶空进样器, Agilent 公司; 5977 质量选择检测器, MSD)。色谱柱为 Agilent

DB-5MS。柱温箱初始温度为 40 ℃,以 5 ℃/min 增加到 80 ℃,持续 2 min;然后以 5 ℃/min 增加到 150 ℃,持续 5 min;再以 5 ℃/min 增加到 200 ℃;最后以 10 ℃/min 增加到 280 ℃。上样体积 1 μ L,不分流进样;柱流量为 1 mL/min;传输线和离子源的温度分别为 280 和 230 ℃。仪器分析前,使用全氟三丁胺对质谱仪进行调试,以获得最佳性能。采用全扫描模式采集数据,质谱扫描范围设置为 33~600 m/z。

1.2.5 代谢物统计分析方法

采用正交偏最小二乘判别分析法对检测鉴定出的代谢产物进行多元统计分析,获得变量重要性投影值(variable importance in project, VIP)结合 P 值筛选结果,同时满足 $VIP>1$ 和 $P<0.05$ 的代谢物即为差异代谢物。

1.3 转录组分析

1.3.1 RNA 提取

使用天根生化科技(TIANGEN)的 RNAprep Pure 试剂盒提取烟草叶片总 RNA。所有样品的 RNA 完整性指数均大于 6.4,质量符合建库测序要求。

1.3.2 cDNA 文库构建

使用适用于 Illumina 测序平台的 NEBNext[®] Ultra[™] RNA 文库制备试剂盒(NEB,美国)构建 cDNA 文库。使用 qRT-PCR 对文库有效浓度进行准确定量,文库有效浓度需高于 2 nmol/L,以保证文库质量。

1.3.3 测序质控和转录组数据与参考基因组序列比对

测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。使用 TopHat2 软件将清洁数据(clean reads)与栽培烟草参考基因组(<https://solgenomics.net/>)进行比对,获取在参考基因组或基因上的位置信息,并分析测序样品特有的序列特征。

1.3.4 差异基因表达分析

使用 DESeq2 软件进行差异表达分析,以计算获得差异表达基因。基因表达量的计算采用每百万转录本数(transcripts per million, TPM)法。

1.3.5 差异基因 GO 分析和 KEGG 富集分析

使用 ClusterProfile 软件对差异基因集进行基因本体论(gene ontology, GO)功能分析及 KEGG 通路富集分析。对于 KEGG 通路富集,显著性富集的阈值设定为校正后的 P 值(P_{adj})小于 0.05。

2 结果与分析

2.1 获得的烟草 OR 基因编辑突变体

栽培烟草参考基因组中共获得 2 条高匹配度的蛋白序列,分别为 NtOR (XP_016501308.1)和 NtOR2 (NP_001312150.1)。氨基酸序列多重比对结果显示:普通烟草 OR 基因的 2 个拷贝(NtOR 和 NtOR2)分别来源于林烟草和绒毛状烟草的 OR 基因(图 1a)。烟草的 OR 蛋白序列高度保守, NtOR 编码的氨基酸序列 N 端含有 OR 类蛋白特有的 CxxCxGxG 结构域,与其他物种的 OR 氨基酸序列相似度达 79%;烟草 NtOR 与番茄 SlOR 的蛋白序列同源性最高,达 86.22% (图 1b)。此外,烟草中的该基因由 8 个外显子和 7 个内含子组成(图 1c),表明 OR 蛋白编码基因在烟草属内具有高度保守性。

根据 NtOR 基因的基因组 DNA 序列,设计了靶向 NtOR 基因的特异性靶点(图 2a)。对 T_0 代阳性植株的 NtOR 基因进行高通量测序,经自交纯合种植,获得了 NtOR 基因发生纯合编辑的 T_3 代阳性植株(编号 208)。该植株的 NtOR 基因缺失了 3 个碱基(TCT)(图 2a),导致翻译后产物第 25 位的亮氨酸缺失(图 2b)。

2.2 突变烟株类胡萝卜素含量检测

由图 3 可知:与对照烟株相比,突变株系 208 烟叶中的类胡萝卜素含量显著降低,尤其是 β -胡萝卜素和紫黄质的含量显著降低。这表明 NtOR 基因的突变影响了烟草中 β -胡萝卜素和紫黄质的合成。

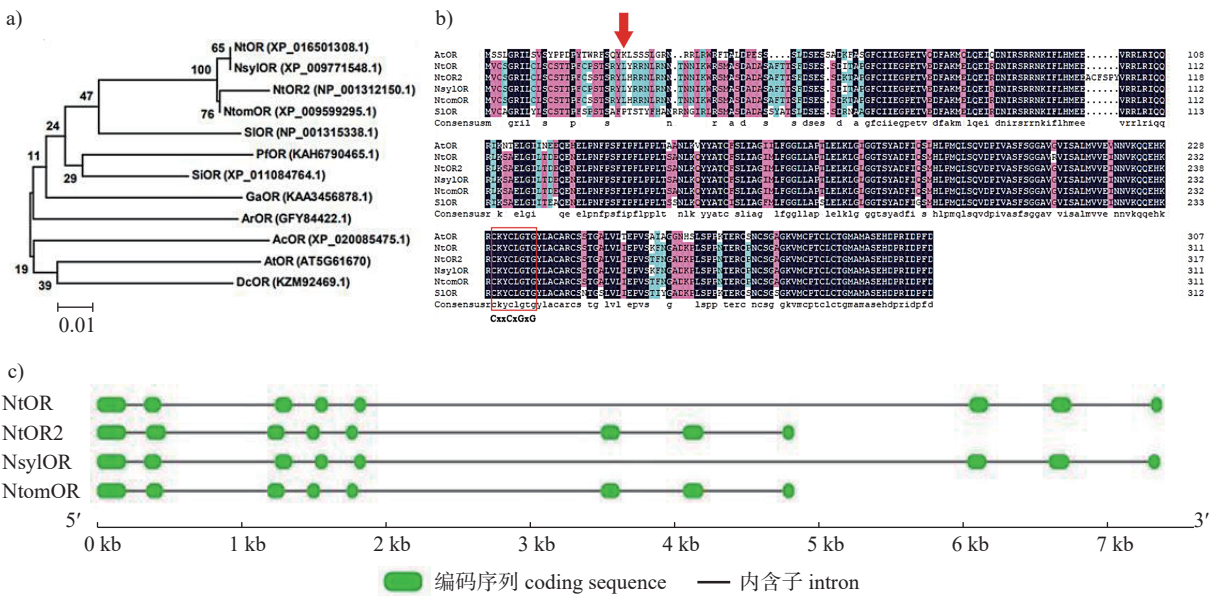
2.3 突变烟株的代谢成分

虽然差异倍数较小,但基于 LC-MS 技术的非靶向方法仍筛选出 136 个差异代谢物。由图 4 可知:采用 GC-MS 技术的衍生化法和顶空进样法分别筛选出 10 和 14 个差异代谢物。与对照烟株相比,突变株系 208 中的有机酸、二萜类、芳香烃、呋喃类等代谢物含量显著升高,而氨基酸、生物碱和甾醇类物质的含量则显著降低。

2.4 突变烟株的转录组

由图 5 可知:与对照烟株相比,突变株系 208 中共检测到 10 369 个差异表达基因,其中上调基因 4 178 个,下调基因 6 191 个。

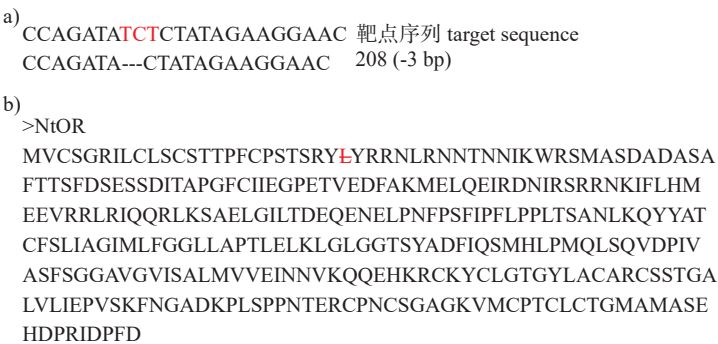
由图 6 可知:差异表达基因主要富集于植物—病原菌互作途径;类黄酮生物合成途径、苯丙烷



注：红框标注为 CxxCxGxG 基序，红色箭头指示第 25 位亮氨酸。
Note: The CxxCxGxG motif is highlighted in the red box, and the 25th leucine is indicated by the red arrow.

图 1 烟草与其他物种 OR 氨基酸序列的比对

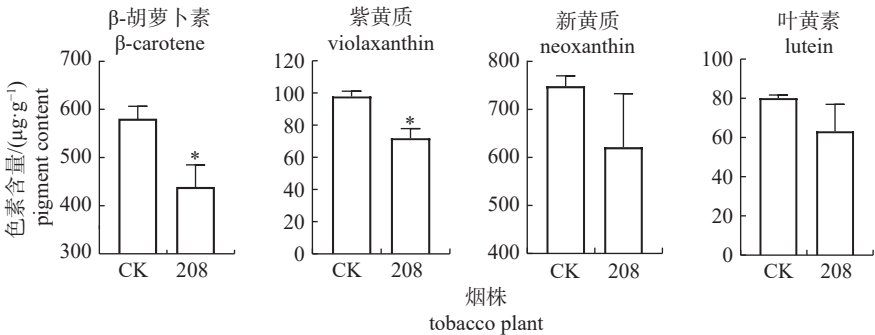
Fig. 1 Alignment of OR amino acid sequences from tobacco and other plant species



注：a) 靶点序列及基因编辑后的缺失位点；b) 编辑后 *NtOR* 基因编码的氨基酸序列中缺失第 25 位亮氨酸 (红色标记)。
Note: a) target sequence and deletion site after gene editing; b) the amino acid sequence of the edited *NtOR* gene, showing the deletion of the 25th leucine (indicated in red).

图 2 突变株系 208 的 *NtOR* 基因靶点序列和缺失位点

Fig. 2 Target sequence and deletion site of the *NtOR* gene in mutant line 208



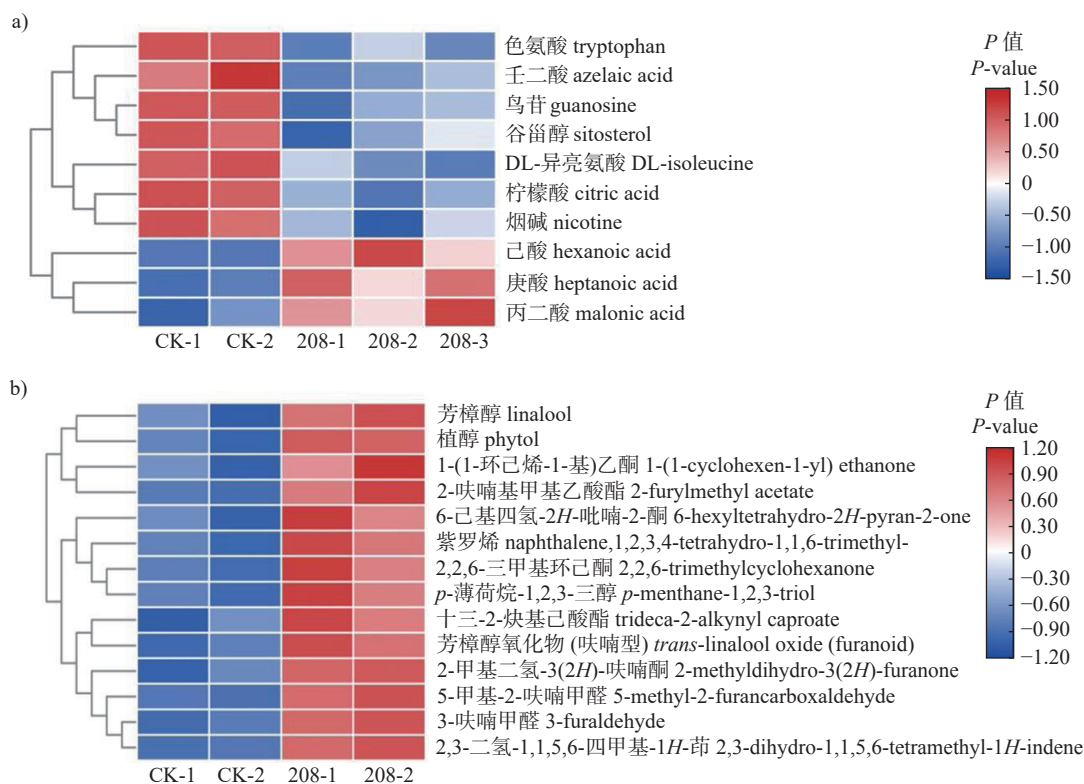
注：“*”表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: “*” indicates significant differences ($P<0.05$).

图 3 突变株系 208 成熟期中部鲜叶的色素含量

Fig. 3 Pigment content of the middle leaves of mutant line 208 at maturity

生物合成途径、二萜生物合成途径和类胡萝卜素生物合成途径也富集了较多的差异表达基因。类黄酮是烟草中重要的致香前体物质, 其合成、代谢在烟草香气物质形成中起着关键作用; 苯丙烷生物合成途径的产物和二萜类化合物也在烟草品

质的形成中发挥重要作用。因此, 推测 *NtOR* 基因的突变可能影响了类黄酮和萜类物质的代谢, 从而可能改善烟叶品质。表明 *NtOR* 基因对调节烟草香气和品质具有重要意义。



注: a) 基于 GC-MS 技术的衍生化方法; b) 基于 GC-MS 技术的顶空进样方法。

Note: a) derivatization method based on GC-MS; b) headspace injection method based on GC-MS.

图 4 基于 GC-MS 检测突变烟株 208 与对照株系的差异代谢物热图

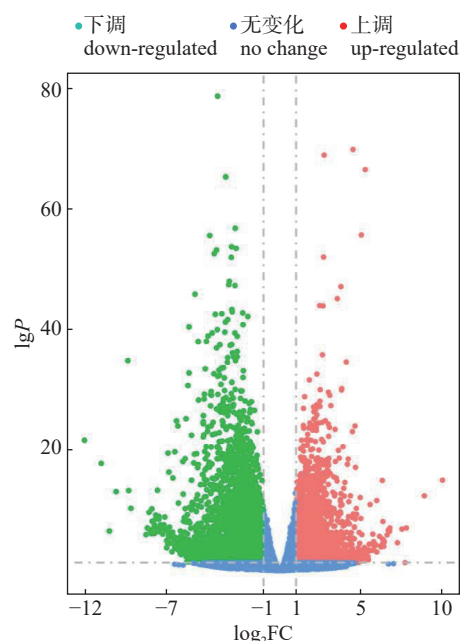
Fig. 4 Heatmap of differential metabolites of mutant line 208 and control plant detected by GC-MS

3 讨论

烟草是中国重要的经济作物, 也是植物生物技术研究中常用的模式植物。烟草主要用于卷烟产品的生产, 稳定的香气风格是确保卷烟产品质量和效益的前提。类胡萝卜素作为主要的香气前体物质, 是当前烟草香气研究的热点。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了针对 *NtOR* 基因的靶标敲除载体, 并转化至烟草中, 获得了 *NtOR* 基因突变的纯合株系 208。该突变株系中, *NtOR* 基因缺失了 3 个碱基, 导致第 25 位亮氨酸缺失。*NtOR* 突变导致香气前体物质 β -胡萝卜素和紫黄质的含量显著降低, 这一结果与前人研究中“OR 基因的过表达可提高 β -胡萝卜素含量”的结论^[14, 19-20]相一致。在拟南芥中, *AtOR* 基因的过表达可促

进类胡萝卜素的积累^[14, 19]; 对积累少量类胡萝卜素的白玉米品种进行 *AtOR* 基因转化, 可将类胡萝卜素含量提高 32 倍^[20]。此外, 花椰菜^[9, 21]、甘薯^[12]和甜瓜^[22]的 *OR* 基因也均可促进类胡萝卜素的积累。

本研究表明: 突变株系 208 中, *NtOR* 基因编码的氨基酸序列缺失了 1 个亮氨酸, 对类胡萝卜素的积累产生了显著影响。在拟南芥中过表达 *AtOR* 基因、在高粱中过表达 *OR* 基因均可使类胡萝卜素含量增加 2 倍, 而改变野生型 *OR* 蛋白的单一氨基酸 (如将 90 位精氨酸替换为组氨酸或丙氨酸) 可显著增强其促进类胡萝卜素积累的能力^[19]。组氨酸是蛋白质活性位点或结合位点中最常见的氨基酸之一^[23], 因此, 在 *OR* 中的突变可能改变



注: FC: 差异倍数。

Note: FC: fold change.

图 5 突变株系 208 和对照烟株的基因表达差异

Fig. 5 Differences of gene expression between mutant line 208 and control tobacco plant

或产生新的活性中心, 或赋予该区域与某些未知蛋白质新的相互作用能力。本研究, 突变株系

NtOR 基因编码的氨基酸序列缺失了第 25 位亮氨酸, 导致类胡萝卜素含量降低, 这可能是由于亮氨酸的缺失导致了活性中心或结合位点丧失, 这一假设有待进一步研究验证。

除 β -胡萝卜素和紫黄质的含量变化外, 本研究还检测到大量差异代谢物和差异表达基因, 其中, 玉米黄素环氧化酶表达下调, 紫黄质含量显著下降。类胡萝卜素不仅是致香前体物质, 还是植物体内合成脱落酸和独脚金内酯的前体^[3], 其含量变化必然会导致这 2 种植物激素的含量发生变化。有研究表明: *AtOR* 基因的过表达通过脱落酸依赖途径增强了拟南芥的耐旱性^[24]; 而甘薯中的 OR 蛋白可提高其耐盐性^[13]; 过表达甘薯 OR 基因的转基因苜蓿植株表现出较强的非生物胁迫耐受性^[25]。这些研究结果可能解释了突变株系 208 中差异表达基因在植物—病原菌互作途径中的富集。此外, 类黄酮生物合成途径、苯丙烷生物合成途径、二萜生物合成途径和类胡萝卜素生物合成途径也富集了较多的差异表达基因, 而类黄酮、苯丙烷的合成产物和二萜在烟草品质形成中发挥着重要作用, 因此, 突变株系 208 的烟叶品质可能会发生显著变化。

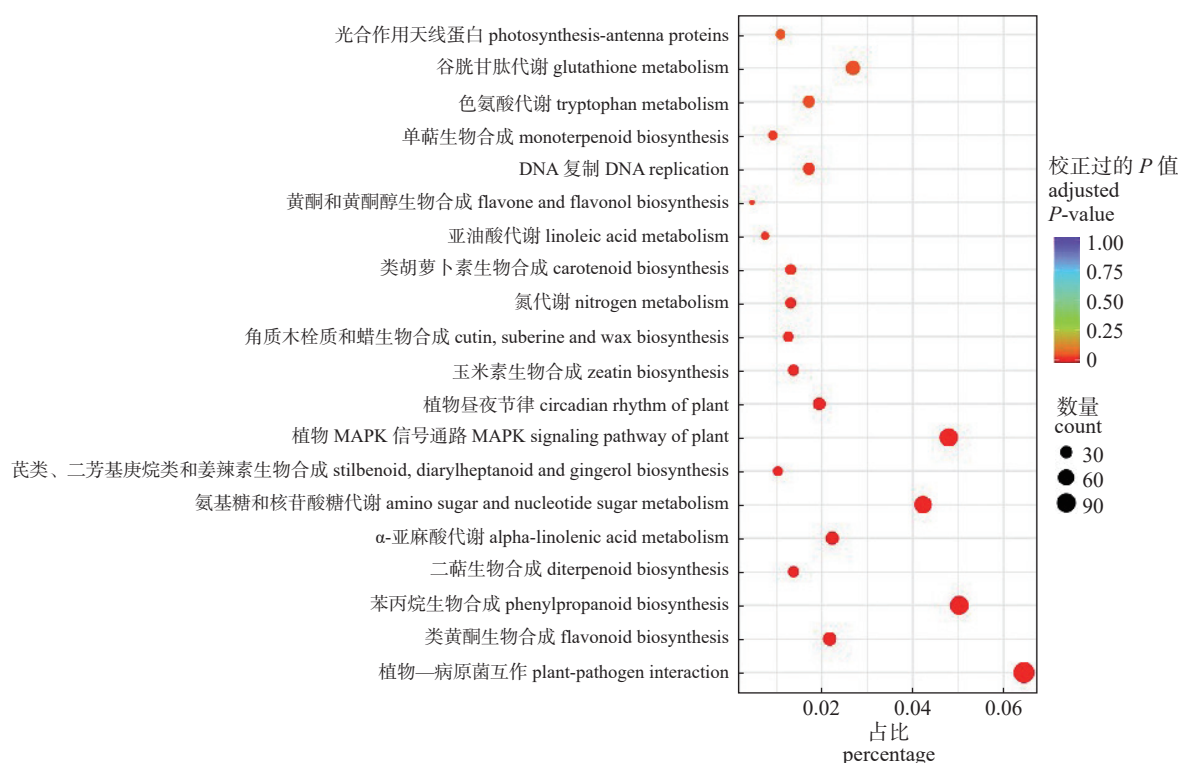


图 6 突变株系 208 中差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in mutant line 208

4 结论

本研究运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得了烟草 *NtOR* 基因突变株系。该株系的 *NtOR* 基因发生了 3 个碱基的缺失突变。与对照烟株相比, 突变株系烟叶中重要的香气前体物质 β -胡萝卜素和紫黄质的含量显著降低; 同时, 向紫黄质转化的玉米黄素环氧化酶的表达下调。差异表达基因主要富集于植物—病原菌互作途径。研究结果为进一步探讨 OR 蛋白的结构及其活性中心的改变提供了基础, 也为培育抗病且类胡萝卜素含量较高的烟草品种提供了理论依据。

[参考文献]

- PAUL D F, PETER M B. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids[J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43(3): 228. DOI: [10.1016/j.plipres.2003.10.002](#).
- BARTLEY G E, SCOLNIK P A. Plant carotenoids, pigments for photo protection, visual attraction, and human health[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1027. DOI: [10.1105/tpc.7.7.1027](#).
- STAHL W, SIES H. β -carotene and other carotenoids in protection from sunlight[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96(5): 1179. DOI: [10.3945/ajcn.112.034819](#).
- CUTLER S R, RODRIGUEZ P L, FINKELSTEIN R R, et al. Absciscic acid: emergence of a core signaling network[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 651. DOI: [10.1146/annurev-arplant-042809-112122](#).
- POPOVA V, IVANOVA T, PROKOPOV T, et al. Carotenoid-related volatile compounds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) essential oils[J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3446. DOI: [10.3390/molecules24193446](#).
- MALDONADO-ROBLEDO G, RODRÍGUEZ-BUSTAMANTE E, SANCHEZ-CONTRERAS A, et al. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 62(5/6): 484. DOI: [10.1007/s00253-003-1315-6](#).
- 陶陶, 来苗, 姬小明, 等. 烤烟类胡萝卜素及其降解产物与香气特性的关系研究[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(2): 294. DOI: [10.16213/j.cnki.scjas.2016.02.015](#).
- CRISP P, WALKEY D G A, BELLMAN E, et al. A mutation affecting curd color in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* DC)[J]. *Euphytica*, 1975, 24: 173. DOI: [10.1007/BF00147182](#).
- LU S, VAN ECK J, ZHOU X J, et al. The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3594. DOI: [10.1105/tpc.106.046417](#).
- CUNNINGHAM F X, GANTT E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1998, 49: 557. DOI: [10.1146/annurev-arplant.49.1.557](#).
- MAASS D, ARANGO J, WUEST F, et al. Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6373. DOI: [10.1371/journal.pone.0006373](#).
- ZHOU X J, WELSCH R, YANG Y, et al. Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3558. DOI: [10.1073/pnas.1420831112](#).
- KIM S H, AHN Y O, AHN M J, et al. Cloning and characterization of an *Orange* gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweet potato cultures[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 70: 445. DOI: [10.1016/j.plaphy.2013.06.011](#).
- BAI C, RIVERA S M, MEDINA V, et al. An *in vitro* system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation[J]. *The Plant Journal*, 2014, 77(3): 464. DOI: [10.1111/tpj.12384](#).
- GAO J P, WANG G H, MA S Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(1/2): 99. DOI: [10.1007/s11103-014-0263-0](#).
- XIE X D, QIN G Y, SI P, et al. Analysis of *Nicotiana tabacum* PIN genes identifies NtPIN4 as a key regulator of axillary bud growth[J]. *Plant Physiology*, 2017, 160: 222. DOI: [10.1111/ppl.12547](#).
- 姚恒, 白戈, 谢贺, 等. 利用CRISPR/Cas9技术创制烟草 *NtMYC2* 基因的定点突变[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(6): 2328. DOI: [10.13271/j.mpb.015.002328](#).
- DONG C, QU G, GUO J G, et al. Rational design of geranylgeranyl diphosphate synthase enhances carotenoid production and improves photosynthetic efficiency in *Nicotiana tabacum*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2022, 67(3): 315. DOI: [10.1016/j.scib.2021.07.003](#).
- YUAN H, OWSIANY K, SHEEJA T, et al. A single amino acid substitution in an ORANGE protein promotes carotenoid overaccumulation in Arabidopsis[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 421. DOI: [10.1104/pp.15.00971](#).
- BERMAN J, ZORRILLA-LOPEZ U, MEDINA, et al. The Arabidopsis *ORANGE* (*AtOR*) gene promotes carotenoid accumulation in transgenic corn hybrids derived from parental lines with limited carotenoid pools[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(6): 933. DOI: [10.1007/s00299-017-2126-z](#).
- LOPEZ A B, VAN ECK J, CONLIN B J, et al. Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(2): 213. DOI: [10.1093/jxb/erm299](#).
- TZURI G, ZHOU X J, CHAYUT N, et al. A 'golden' SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*)[J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(2): 267. DOI: [10.1111/tpj.12814](#).
- BARNES M R, GRAY I C. Bioinformatics for geneticists[M]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2003.
- SHAN Y J, LI D, CAO J J, et al. Over-expression of *Arabidopsis* *ORANGE* gene enhances drought stress tolerance through ABA-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, 96: 91. DOI: [10.1007/s10725-021-00760-2](#).
- WANG Z, KE Q B, KIM M D, et al. Transgenic alfalfa plants expressing the sweet potato *Orange* gene exhibit enhanced abiotic stress tolerance[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126050. DOI: [10.1371/journal.pone.0126050](#).

责任编辑: 何承刚