

李金燃, 张麒功, 陈丝雨, 等. 梔子 *TPS* 基因家族鉴定及与萜类物质代谢的相关性分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(1): 66-78.

LI Jinran, ZHANG Qigong, CHEN Siyu, et al. Identification of *TPS* genes family in *Gardenia jasminoides* and its relationship with terpenoid metabolism[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(1): 66-78.

## 梔子 *TPS* 基因家族鉴定及与萜类物质代谢的相关性分析

李金燃<sup>1,2</sup>, 张麒功<sup>1,3</sup>, 陈丝雨<sup>1,3</sup>, 陈淑颖<sup>1,3</sup>, 陈清海<sup>4</sup>, 邹双全<sup>1,3</sup>

(1. 福建农林大学 林学院, 福州 350002; 2. 南平市延平区东坑林业站, 福建 南平 353000; 3. 自然生物资源保育利用福建省高校工程技术研究中心, 福州 350002; 4. 泉州市城市森林公园发展中心, 福建 泉州 362000)

**摘要:** *TPS* 基因家族是萜类化合物合成的末端关键酶, 在梔子花香的形成中起重要作用。为了明确梔子 *TPS* 基因家族成员的基本特征, 利用生物信息学方法对梔子 *TPS* 基因进行家族成员鉴定; 通过外源激素喷施试验进行转录组测序, 结合顶空固相萃取和气相色谱-质谱联用技术, 分析不同外源激素浓度下梔子花朵 *TPS* 基因家族成员表达水平和代谢物含量变化关系。结果表明: 从梔子基因组中共鉴定获得 *GjTPS* 家族成员 41 个, 编码氨基酸 380-849 个, 含有外显子 5-15 个不等, *GjTPS* 家族成员定位在叶绿体中, 并且不均匀地分布在 10 条染色体上; 共线性分析表明梔子与其同科植物中粒咖啡的 *TPS* 基因有更近的亲缘关系。系统发育分析结果显示 *GjTPS* 基因分为 5 个亚家族, *TPS-a*、*TPS-b* 亚家族包含了大多数 *GjTPS* 家族成员。*GjTPS* 家族成员的大多数启动子顺式作用元件在植物激素响应类别中, 并且包含 MYC 基序的茉莉酸甲酯响应元件是其中大类; 通过转录组数据得到 *GjTPS02*、*GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21*、*GjTPS22* 这 6 个基因在各处理的表达量较高。对基因表达量与萜类物质含量变化进行相关性分析, 发现 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> 的茉莉酸甲酯有助于梔子 *TPS* 基因家族成员的表达及萜类物质的释放; *GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21*、*GjTPS22* 这 5 个基因可能参与梔子花香调控。本研究结果可为后续梔子 *TPS* 基因家族功能特性研究提供借鉴。

**关键词:** 梔子; 萜类合成酶; 基因家族; 生物信息学; 挥发性萜类物质

中图分类号: Q943.2

文章编号: 1000-1700(2024)01-0066-13

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Identification of *TPS* Genes Family in *Gardenia jasminoides* and Its Relationship with Terpenoid Metabolism

LI Jinran<sup>1,2</sup>, ZHANG Qigong<sup>1,3</sup>, CHEN Siyu<sup>1,3</sup>, CHEN Shuying<sup>1,3</sup>,

CHEN Qinghai<sup>4</sup>, ZOU Shuangquan<sup>1,3</sup>

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Nanping City Yanping District Dongkeng Forest Station, Nanping Fujian 353000, China; 3. Engineering Research Center of Natural Biological Resources Conservation and Utilization of Fujian Higher Education, Fuzhou 350002, China; 4. Quanzhou City Forest Park Development Center, Quanzhou Fujian 362000, China)

**Abstract:** Terpene synthase is a key enzyme in the synthesis of terpenoid compounds in *Gardenia jasminoides* and plays a key role in the formation of aromas. In order to clarify the basic characteristics of *TPS* Gene family members of *G. jasminoides*, the *TPS* gene family members of *G. jasminoides* were identified by bioinformatics method. We then used exogenous hormone spray test combined with transcriptomic approach to analyze the differential gene expression patterns of *TPS* gene family members in the flower of *G. jasminoides*. The contents of terpenoid compounds in flower of *G. jasminoides*

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 福建农林大学科技计划项目(闽林科便函[2020] 29号); 福建省林业科技项目(闽林科便函[2022] 9号); 福建省林业科技推广项目(2022TG09)

第一作者: 李金燃(1995-), 女, 硕士, 助理工程师, 从事药用植物栽培与利用研究, E-mail: 749816505@qq.com

通信作者: 邹双全(1963-), 男, 博士, 研究员, 从事药用植物栽培与利用研究, E-mail: 282014224@qq.com

at different developmental exogenous hormone spray were also measured by using head solid-phase micro-extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. The results showed that 41 members of *GjTPS* family were identified from genome database of *G. jasminoides*, encoding 380 to 849 amino acids and containing 5 to 15 exons. The members of *GjTPS* family were localized in chloroplasts and distributed unevenly on 10 chromosomes. Collinearity analysis revealed that *TPS* gene in *G. jasminoides* has a closer relationship with the *TPS* gene of Coffee canephora. Phylogenetic Analysis showed that *GjTPS* genes were divided into 5 subfamilies, and *TPS*-a and *TPS*-b subfamilies contained most of the members of *GjTPS* family. Most of cis-acting regulatory elements *GjTPS* promoters were in the Plant hormone response category, and the Methyl jasmonate Response element containing MYC motif is a large category among them. The transcriptome data showed that *GjTPS02*, *GjTPS12*, *GjTPS14*, *GjTPS20*, *GjTPS21*, *GjTPS22* were highly expressed in all treatments. The correlation between gene expression and terpenoid content was analyzed, and it was found 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> methyl jasmonate contributes to gene expression of *TPS* family members and terpenoid release of *G. jasminoides*. *GjTPS12*, *GjTPS14*, *GjTPS20*, *GjTPS21*, *GjTPS22* might be involved in the regulation of aroma formation in *G. jasminoides*. These result can provide reference for the subsequent function characteristics study of *TPS* gene family of *G. jasminoides*.

**Key words:** *Gardenia jasminoides*; terpene synthase; gene family; bioinformatics; volatile terpenoids

栀子 (*Gardenia jasminoides*) 别名黄栀子、山栀子、红果树、林兰, 是茜草科 (Rubiaceae)、栀子属 (*Gardenia*) 常绿灌木。栀子花香浓郁, 是我国著名的八大香花之一<sup>[1]</sup>, 其挥发油带有强甜味的水果香, 属名贵的花香香料之一, 用于多种香型化妆品、香皂和香精中<sup>[2]</sup>。栀子有着重要的药用及观赏价值, 其植株适应性强, 成活率高, 植株内含有多种经济价值较高的萜类 (主要为环烯醚萜类、三萜类)、黄酮类、栀子苷、绿原酸、藏红花素等药用成分及可食用的色素, 具有解热镇痛、保肝利胆等多种功效<sup>[3]</sup>。其花洁白精致, 具有一定的观赏及食用价值, 以花入药具有清肺凉血之功效, 主治肺热咳嗽鼻衄之症<sup>[4]</sup>。

萜类化合物是一类结构多样的植物次生代谢产物<sup>[5]</sup>, 是植物芳香物质的重要组成成分, 也是植物花器官吸引昆虫传粉、进行自我防御的主要物质<sup>[6]</sup>。萜类化合物是植物体内数目和种类最丰富的一类化合物, 究其原因, 正是由于萜类合成酶 (terpene synthase, *TPS*) 的多样性造成的<sup>[7]</sup>。萜类合成酶 (*TPS*), 是萜类化合物生物合成的末端关键酶, 可催化不同的前体物质最终生成不同的萜类化合物<sup>[8]</sup>, 直接决定萜类产物生成的种类和数量<sup>[9]</sup>, 在植物生长发育中起重要作用<sup>[10]</sup>。萜类合成酶的作用效果极其多样, 不但能够调节花香、促进生长调节等, 同时对于植物的防御机制也有着巨大的意义<sup>[7]</sup>。萜类合成酶分别以牻牛儿基焦磷酸 (GPP)、橙花基焦磷酸 (NPP)、法呢基焦磷酸 (FPP) 和牻牛儿基焦磷酸 (GGPP) 为直接前体底物合成相应的单萜、倍半萜、二萜等物质<sup>[11]</sup>。*TPS* 基因家族含有以  $RRX_nR$  为基序的 PF01397 (N-末端) 及以  $DD_{xx}D$  为基序的 PF03936 (C-末端)<sup>[12]</sup>, 可分为 *TPS*-a、*TPS*-b、*TPS*-c、*TPS*-d、*TPS*-e/f、*TPS*-g、*TPS*-h<sup>[13]</sup> 这 7 个亚家族。其中 *TPS*-a、*TPS*-b、*TPS*-g 为被子植物特有, *TPS*-h 只在卷柏属<sup>[13-14]</sup> 中发现。近年来, 全基因组 *TPS* 基因家族在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[15]</sup>、大花蕙兰 (*Cymbidium faberi*)<sup>[16]</sup>、山茶 (*Camellia sinensis*)<sup>[17]</sup>、月季 (*Rosa chinensis*)<sup>[18]</sup>、竹叶花椒 (*Zanthoxylum armatum*)<sup>[19]</sup>、葡萄 (*Vitis vinifera*)<sup>[20]</sup> 等植物中已鉴定, 其中葡萄具有已知的最大 *TPS* 基因家族, 多达 69 个 *TPS* 基因家族成员<sup>[18]</sup>。

萜类化合物在栀子花及花香挥发物占据主导地位<sup>[21]</sup>, 其萜类合成酶 *TPS* 基因家族鉴定和分析还未见报道。随着基因组测序技术的成熟, 栀子基因组测序已经完成<sup>[22]</sup>。因此, 本研究对栀子 *TPS* 基因家族进行鉴定, 利用生物信息学的手段深入剖析栀子 *TPS* 基因家族的基因结构、进化模式等方面; 通过外源激素喷施试验进行转录组测序, 分析不同激素水平栀子花朵的表达情况, 结合顶空固相微萃取和气相色谱-质谱联用技术, 测定不同激素水平栀子花朵中萜类物质含量; 为今后探索栀子 *TPS* 基因结构和功能奠定基础, 深入研究 *TPS* 基因家族成员在栀子花香代谢调控中的作用提供理论参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 *GjTPS* 基因家族成员鉴定

准备拟南芥的 TPS 蛋白序列 (Tair: Arabidopsis.org) 和 梔子全基因组数据 (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。在 InterPro 网站 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 下载含有 2 个特定的 TPS 结构域 (PF01397、PF03936) 的种子文件, 使用 TBtools 软件筛选梔子 TPS 家族基因, 保留含有 2 个结构域且 E-value  $\leq 1 \times 10^{-5}$  的基因; 通过本地 Blast V3 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+ /LAT-EST/>) 获得梔子同源蛋白序列。将以上两个蛋白序列文件进行合并后去重复, 再进一步用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) 在线网站进行结构域验证, 去除不含 TPS 两个结构域的基因。*GjTPS* 家族成员理化性质由 Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 提供, 亚细胞定位预测分析则采用 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 的数据。

### 1.2 梔子系统发育树、保守基序及基因结构分析

使用 MEGA5 软件以 muscle 将梔子 *GjTPS* 蛋白序列进行多序对比, 用最大似然法以 JTT+G 模型建树, Bootstraps 设置重复次数 1 000 次, 其余参数为默认构建系统发育树。MEME 网站 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测保守基序, TBtools 软件绘制基因结构图。将 *GjTPS* 保守基序、基因结构、保守结构域结果按照系统发育树顺序用 TBtools 软件分别进行可视化。

### 1.3 梔子与不同物种的系统发育分析

从在线网站 EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>) 中下载拟南芥、葡萄的基因序列; 中粒咖啡<sup>[23]</sup> (*Coffea canephora*) 基因序列于中粒咖啡基因组数据库 (<https://coffee-genome-hub.southgreen.fr/>) 下载。将梔子、拟南芥、葡萄、中粒咖啡 TPS 家族蛋白序列集合, 用 MEGA5 软件进行多序对比, 采用最大似然法构建系统发育树。使用 Adobe Illustrator CC 2020 软件进行美化分类。

### 1.4 染色体定位、基因重复类型及物种间共线性分析

根据鉴定的 *GjTPS* 基因 ID 名称, 使用 TBtools 软件进行 *GjTPS* 基因染色体定位可视化及 Blast 得到基因重复文件。于在线网站 EnsemblPlants 下载月季与番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[24]</sup> 基因组, 使用 TBtools 软件对梔子与自身及拟南芥、中粒咖啡、月季、番茄进行一一比对, 得到共线性分析结果, 并在 TBtools 软件中进行可视化, 高亮其产生共线性的基因连线。

### 1.5 启动子顺式作用元件分析

41 个 *GjTPS* 基因上游 (2000 bp) 的序列由 TBtools 软件得到, 用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测启动子元件, 并进行可视化。

### 1.6 外源激素喷施试验

于 2022 年 12 月选取长势基本一致且健康的 2 年生梔子分关 1 号进行盆栽定植, 2023 年 4 月开始参考张云峰<sup>[25]</sup>、刑勇翔<sup>[7]</sup> 的方法进行外源激素喷施试验, 具体用量见表 1 (IAA、MeJA 试剂购自上海麦克林生化科技有限公司)。试验共 7 个处理, 每个处理 20 个重复; 喷施用量每次每盆 50 mL, 每隔 7 d

喷 1 次, 共喷施 2 次。于 6 月 10 日采取每个处理盛花期的梔子花朵, 用液氮速冻后置冰箱 (-80 °C) 中保存, 用于测定不同外源激素浓度下梔子花朵 TPS 基因家族成员的表达量。

### 1.7 不同外源激素浓度下梔子花朵萜类物质含量测定

参考 MARIE 等<sup>[26]</sup> 的方法并作修改, 采用顶空固相微萃取 (HS-SPME) 结合气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS), 测定不同外源激素浓度下梔子花朵 TPS 基因对应产物的含量。气相色谱仪质谱仪品牌为 Agilent, 型号为 6890N-G5795B; 色谱柱为 HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)。称取适量样品至 20 mL 顶空瓶中, 加入内标 2-辛醇, 使其上机浓度为 5 mg·L<sup>-1</sup>, 加入饱和氯化钠, 放入 80 °C 加热 30 min, 30 min 后用将顶空微萃取进样针扎入顶空瓶中继续加热 30 min 后, 250 °C 进样口解析 5 min。

色谱条件: 初始柱温 50 °C 保持 2 min, 以 5 °C·min<sup>-1</sup> 升至 180 °C 保持 5 min, 再以 10 °C·min<sup>-1</sup> 升至 250 °C, 保持 5 min; 进样口温度为 250 °C; 传输线温度为 280 °C; 载气流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样方式为

表 1 试验处理水平

Table 1 Experimental treatment level			
激素处理 Hormone treatment	处理水平 Treatment level		
	1	2	3
吲哚乙酸 IAA / (mg·L <sup>-1</sup> )	25	50	125
茉莉酸甲酯 MeJA / (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.25	0.50	1.25

不分流进样。

质谱条件: 离子源温度为 230 °C, 四级杆温度为 150 °C, 质谱为 EI 源, 全扫 40~600 m/z。

### 1.8 梔子 TPS 基因家族成员表达模式及与萜类物质相关性检测

对外源激素喷施试验中保存的梔子花朵进行转录组测序, 获得不同外源激素浓度下梔子 TPS 基因家族成员的表达量, 利用 TBtools 软件绘制表达量热图, 分析 TPS 基因家族成员在不同外源激素浓度下的表达模式; 采用模糊数学隶属函数法分析外源激素喷施的最适浓度。根据梔子花朵中萜类物质的含量变化和 TPS 成员的相对表达量, 使用 SPSS 27.0 软件进行相关性分析后再用 Origin 2022 软件绘制相关性热图。

## 2 结果与分析

### 2.1 GjTPS 基因家族鉴定与蛋白质特征

使用 TBtools 软件分别筛选出 53 条和 66 条基因序列、本地 Blast V3 程序得到 72 条基因序列; 经过手动筛选, 最终一共鉴定并获得 GjTPS 基因家族成员 41 个, 并依次命名为 GjTPS01~GjTPS41 (表 2)。梔子 41 个 GjTPS 家族成员编码蛋白的理化性质分析结果如表 2。GjTPS 基因编码氨基酸数量为 380~849 个, 预测分子量范围为 43.93~97.05 kDa。理论等电点为 5.09~6.48, 全部成员被认为酸性 ( $pI < 7$ )。不稳定指数为 37.71~55.68, 具有不稳定指数  $< 40$  的稳定蛋白 7 个及不稳定指数  $> 40$  的不稳定蛋白 34 个。脂肪族指数为 82.75~98.06, 平均疏水性为 -0.466~-0.148, 均表现为亲水性。亚细胞定位结果显示梔子 GjTPS 基因均定位在叶绿体上。

### 2.2 梔子 TPS 基因家族保守基序、基因结构、保守结构域分析

TPS 基因家族成员基本含有保守的  $DD_{xx}D$ 、 $RRX_sW$  的结构域。保守基序分析表明 (图 1A), 同一亚家族中 motif 结构大多相似, GjTPS 基因家族蛋白含有基序 9~17 个, 其中 GjTPS07 含有基序 17 个, GjTPS33、GjTPS34 含有基序 9 个; 最保守的基序为 motif1, 除了 GjTPS16、GjTPS17、GjTPS18 不含此基序, 其余 GjTPS 基因亚家族均含有, 其基序含  $DD_{xx}D$  结构域 (图 1B); motif8 同样是 TPS 亚家族蛋白常见保守基序, 其结构域为  $RRX_sW$  (图 1C), 多数 TPS 亚家族含有此基序, 但 TPS-c、TPS-e/f 亚家族大多数基因不含 motif8。

由图 2 可知, GjTPS 家族的外显子数量在 5~15 之间, 内含子仅存在于 GjTPS18、GjTPS36 中。同一亚家族具有相似的外显子数目及结构。其中 TPS-a 亚家族含有外显子 5~8 个, TPS-b 有 6~10 个, TPS-c 有 11~15 个, TPS-e/f 有 12~14 个, TPS-g 有 7 个, 这与中粒咖啡的报道一致。对梔子 TPS 家族的保守结构域进行分析, 发现 TPS-a 与 TPS-b 亚家族为 Terpene\_cyclase\_plant\_C1 结构域, 其余亚家族均有特定的结构域。

### 2.3 系统发育分析

使用梔子 (41 个)、拟南芥 (32 个)、葡萄 (49 个) 与中粒咖啡 (41 个) TPS 家族的蛋白序列构建 ML 树 (图 3)。其中拟南芥为草本植物, 葡萄为藤本植物, 中粒咖啡为小乔木且与梔子同为茜草科植物。依据拟南芥的 TPS 基因家族分类方法, 将梔子、拟南芥、葡萄、中粒咖啡的 163 个蛋白序列划分为 5 个亚家族。在梔子中, TPS-b 亚家族成员最多, 共有 14 个家族成员; TPS-a 亚家族有 12 个成员, TPS-c 亚家族有 6 个家族成员, TPS-e/f 亚家族含有 8 个成员, 而 TPS-g 亚家族仅有 1 个成员。与之相似, 中粒咖啡中 TPS-a、TPS-b 两个亚家族占据 29/41 的 CcTPS 家族成员<sup>[23]</sup>。从上述保守基序分析中可知, 几乎所有梔子 TPS 家族成员具有高度保守的富含天冬氨酸的结构域  $DD_{xx}D$ ; 除了 TPS-c、TPS-e/f 亚家族几乎不存在  $RRX_sW$  结构域, 其余家族具有此结构域。其中,  $DD_{xx}D$  在异戊烯基二磷酸底物的金属依赖电离中是重要的,  $RRX_sW$  在单萜合酶的环化中是必不可少的<sup>[16]</sup>。

### 2.4 染色体定位及进化类型分析

由图 4 可知, 在 10 条染色体上不均匀地分布着梔子的 41 个 GjTPS 基因。梔子 GjTPS 基因在 9 号染色体上分布最多, 共有 13 个。2 号、4 号、5 号、11 号染色体只有 1 个 GjTPS 基因; 1 号和 6 号染色体有 6 个 GjTPS 基因; 最短的 3 号染色体有 4 个 GjTPS 基因。这表明染色体长短和 GjTPS 基因的分布没有明显的相关性。根据 TBtools 软件 Blast 得到的基因重复文件, 串联重复 (36.59%)、近端重复 (26.83%)、分

表 2 梔子 *TPS* 基因家族特征信息Table 2 Characterization of *TPS* family identified in *Gardenia jasminoides*

基因 ID Gene ID	氨基酸数量 Number of amino acids	等电点 Isoelectric point	分子质量/kDa Molecular mass	不稳定系数 Instability index	脂肪族指数 Aliphatic index	平均疏水性 Average hydrophobicity	亚细胞定位 Subcellular Localization
GjTPS01 Gj8A83T44.1	481	5.40	55.70	38.13	89.23	-0.283	叶绿体 Chloroplast
GjTPS02 Gj8A84T55.1	592	5.25	68.97	41.02	91.10	-0.313	叶绿体 Chloroplast
GjTPS03 Gj8P351T10.1	691	5.79	79.09	45.71	93.95	-0.184	叶绿体 Chloroplast
GjTPS04 Gj8A352T75.1	794	5.90	90.61	38.65	92.85	-0.198	叶绿体 Chloroplast
GjTPS05 Gj7A349T47.1	591	5.40	68.37	55.68	89.26	-0.390	叶绿体 Chloroplast
GjTPS06 Gj7P350T5.1	604	5.17	69.47	48.19	83.05	-0.441	叶绿体 Chloroplast
GjTPS07 Gj7P350T7.1	664	6.48	76.65	42.35	95.02	-0.174	叶绿体 Chloroplast
GjTPS08 Gj7A350T74.1	584	5.78	67.31	51.99	93.37	-0.296	叶绿体 Chloroplast
GjTPS09 Gj11P28T2.1	509	5.49	58.83	45.66	85.91	-0.267	叶绿体 Chloroplast
GjTPS10 Gj6A47T47.1	570	5.30	65.90	46.34	88.21	-0.320	叶绿体 Chloroplast
GjTPS11 Gj6A51T68.1	380	5.44	43.93	49.45	93.00	-0.280	叶绿体 Chloroplast
GjTPS12 Gj6A51T69.1	569	5.57	65.67	46.26	93.48	-0.216	叶绿体 Chloroplast
GjTPS13 Gj6A51T70.1	569	5.61	65.53	45.58	94.69	-0.179	叶绿体 Chloroplast
GjTPS14 Gj6A52T52.1	566	5.46	65.87	45.99	86.40	-0.431	叶绿体 Chloroplast
GjTPS15 Gj6A324T103.1	794	5.92	91.55	45.39	93.66	-0.257	叶绿体 Chloroplast
GjTPS16 Gj3P62T5.1	745	5.52	85.05	38.97	90.95	-0.266	叶绿体 Chloroplast
GjTPS17 Gj3P63T3.1	737	5.65	84.18	37.71	88.11	-0.286	叶绿体 Chloroplast
GjTPS18 Gj3A64T32.1	590	5.82	66.95	42.94	85.97	-0.292	叶绿体 Chloroplast
GjTPS19 Gj3P101T5.1	511	5.50	58.55	47.94	89.00	-0.277	叶绿体 Chloroplast
GjTPS20 Gj1A15T71.1	531	5.62	60.76	40.19	92.62	-0.279	叶绿体 Chloroplast
GjTPS21 Gj1A27T43.1	553	5.34	63.56	43.12	91.92	-0.310	叶绿体 Chloroplast
GjTPS22 Gj1A27T44.1	678	6.09	77.57	41.22	88.79	-0.170	叶绿体 Chloroplast
GjTPS23 Gj1P28T5.1	513	5.83	59.59	39.86	82.75	-0.466	叶绿体 Chloroplast
GjTPS24 Gj1P48T12.1	810	5.79	93.13	44.92	95.60	-0.235	叶绿体 Chloroplast
GjTPS25 Gj1A48T101.1	849	5.74	97.05	46.42	87.44	-0.278	叶绿体 Chloroplast
GjTPS26 Gj5A48T34.1	616	5.53	70.30	43.00	87.53	-0.236	叶绿体 Chloroplast
GjTPS27 Gj2A85T27.1	559	5.56	64.47	45.08	84.15	-0.364	叶绿体 Chloroplast
GjTPS28 Gj9A124T90.1	549	5.16	63.03	38.83	90.22	-0.250	叶绿体 Chloroplast
GjTPS29 Gj9A149T114.1	726	6.16	82.89	41.46	95.26	-0.148	叶绿体 Chloroplast
GjTPS30 Gj9P172T11.1	820	5.79	92.99	42.32	90.20	-0.279	叶绿体 Chloroplast
GjTPS31 Gj9A360T34.1	553	5.33	64.28	42.66	90.71	-0.317	叶绿体 Chloroplast
GjTPS32 Gj9A370T22.1	553	5.49	63.91	46.31	83.67	-0.356	叶绿体 Chloroplast
GjTPS33 Gj9P384T5.1	679	5.84	78.11	43.77	98.06	-0.160	叶绿体 Chloroplast
GjTPS34 Gj9P384T6.1	769	5.21	88.35	46.01	87.02	-0.344	叶绿体 Chloroplast
GjTPS35 Gj9P391T1.1	807	6.35	93.09	38.73	84.99	-0.273	叶绿体 Chloroplast
GjTPS36 Gj9A393T36.1	801	5.93	91.87	43.61	88.63	-0.226	叶绿体 Chloroplast
GjTPS37 Gj9A896T83.1	606	5.09	69.75	48.43	90.15	-0.225	叶绿体 Chloroplast
GjTPS38 Gj9A933T124.1	603	5.42	69.39	44.79	86.38	-0.339	叶绿体 Chloroplast
GjTPS39 Gj9A933T125.1	602	5.35	69.36	42.58	89.10	-0.302	叶绿体 Chloroplast
GjTPS40 Gj9P933T10.1	609	5.53	70.38	45.44	85.21	-0.315	叶绿体 Chloroplast
GjTPS41 Gj4A368T22.1	559	5.80	64.55	48.03	83.65	-0.322	叶绿体 Chloroplast

散重复(26.83%)、全基因组重复或片段重复(9.76%)是梔子 *GjTPS* 基因家族扩张的主要驱动因素。其中串联重复在 1 号、6 号、8 号、9 号染色体中形成小型基因簇,除标红的几个基因簇外,还有几个与其距离很近的基因,可能是由比较古老的串联重复形成<sup>[9]</sup>。

为进一步挖掘梔子 *TPS* 基因自身及与其他物种间的进化关系,本研究构建了梔子、拟南芥、中粒咖啡、月季与番茄的共线性分析(图 5),分别产生 2, 4, 17, 6, 5 条共线性基因对。其中,梔子有 5 条染色体与中粒咖啡产生共线性关系,且存在的共线性基因对数目将近为其他树种的 3 倍及以上。同时,在 APG IV 分类系统中,梔子与中粒咖啡都属于茜草科植物,进一步证明了梔子与中粒咖啡拥有更近的亲缘关系。

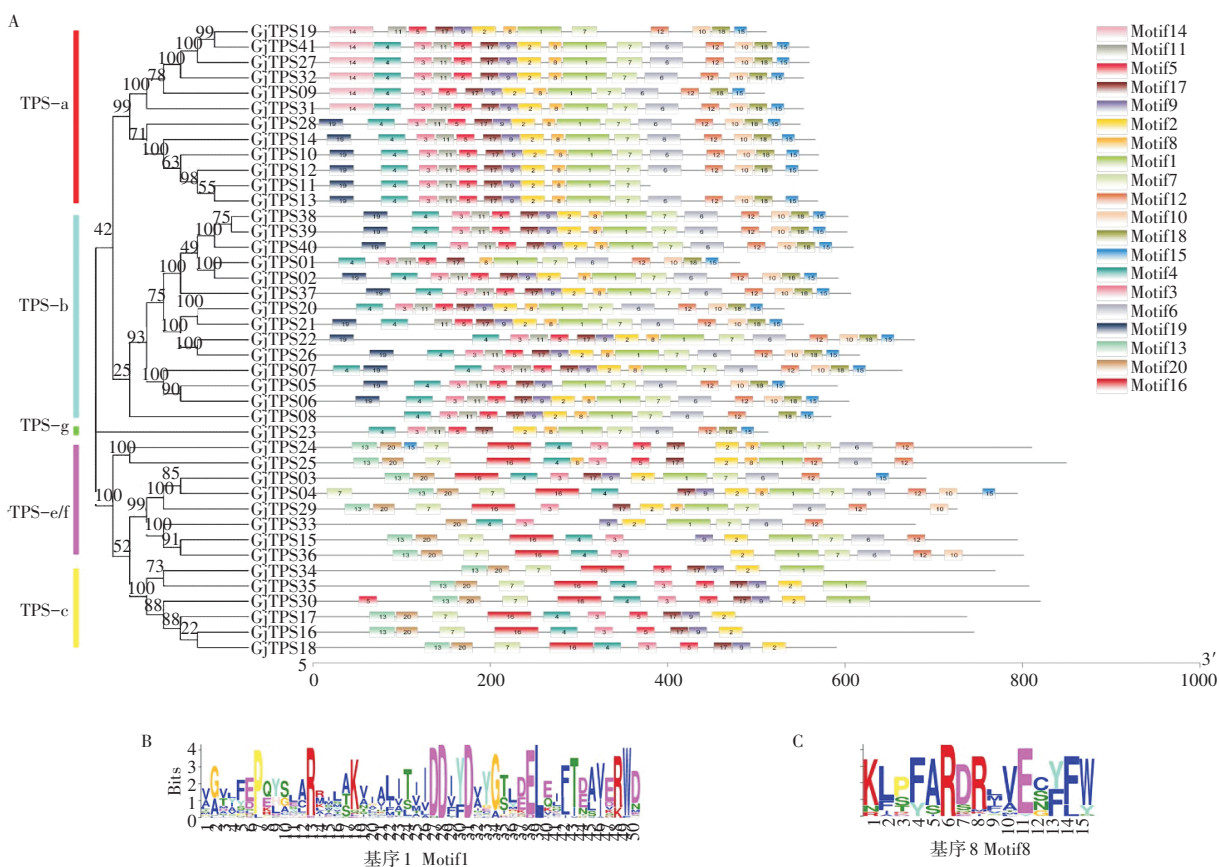


图1 栀子 *GjtPS* 基因家族成员保守基序分布

Figure 1 Conserved motifs of *GjtPS* gene family members in *G. jasminoides*

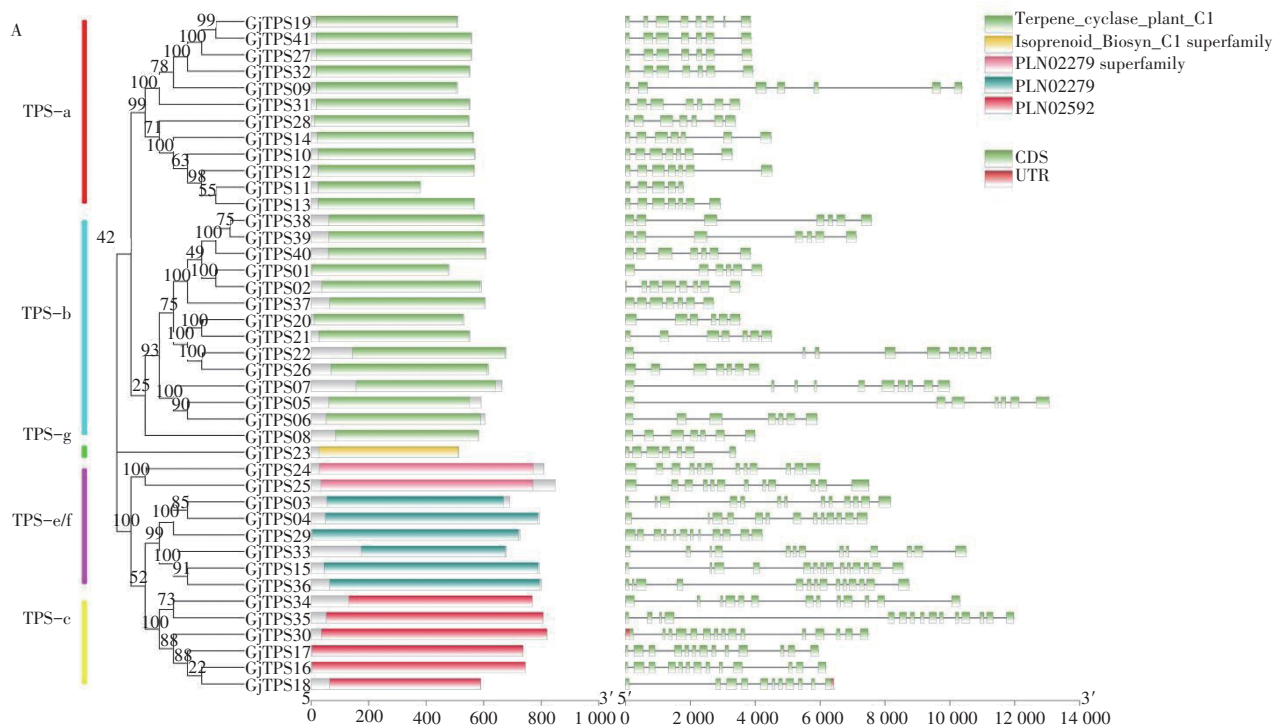


图2 栀子 *GjtPS* 基因结构、保守结构域分析

Figure 2 Structure analysis of *GjtPS* gene in *G. jasminoides*

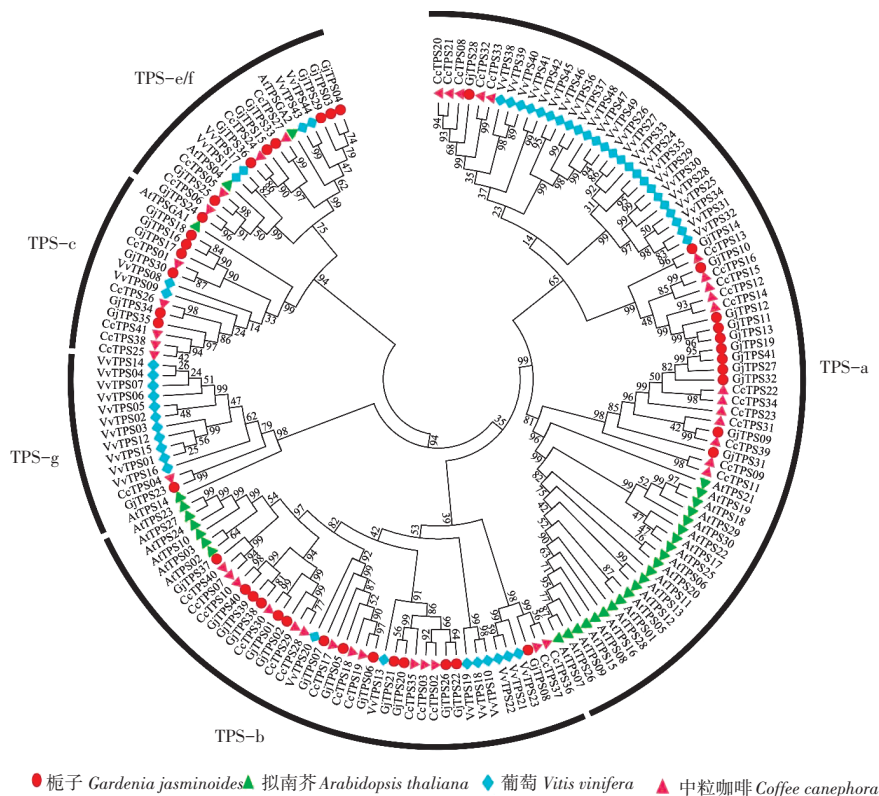
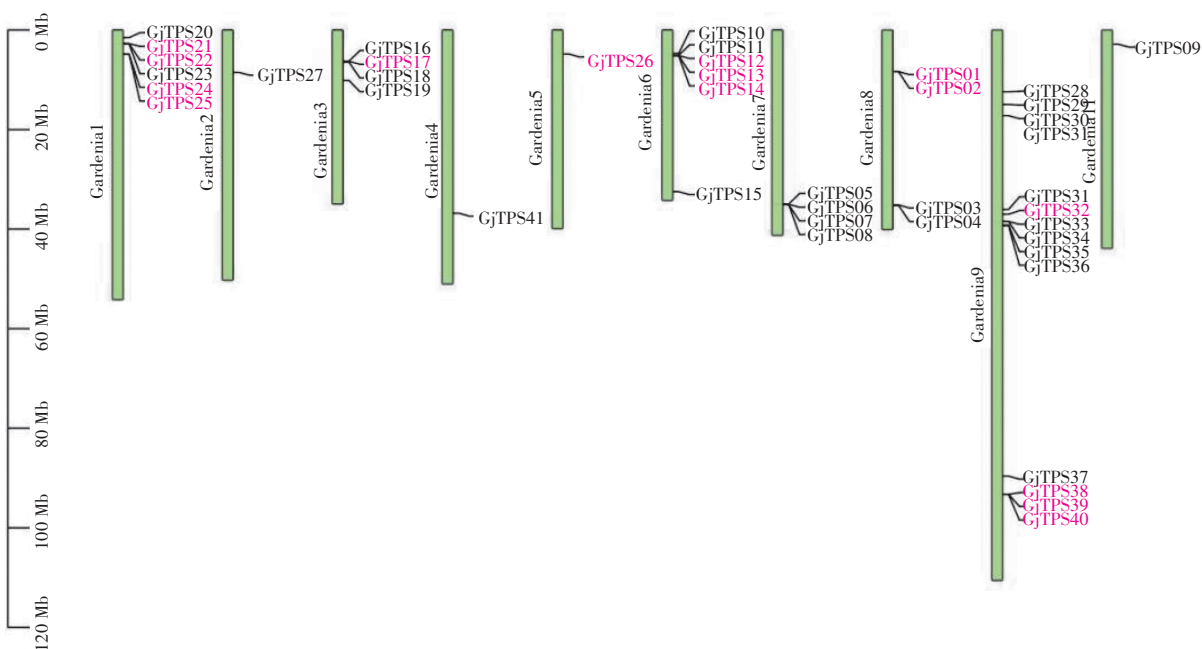


图3 梔子、拟南芥、葡萄、中粒咖啡的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of TPS in *G. jasminoides*, *A. thaliana*, *V. vinifera* and *C. canephora*



红色表示基因有串联重复

Red indicates that there are tandem repeats in genes

图4 梔子 *GjTPS* 基因家族染色体定位分析

Figure 4 Chromosome locations of *GjTPS* gene family members in *G. jasminoides*

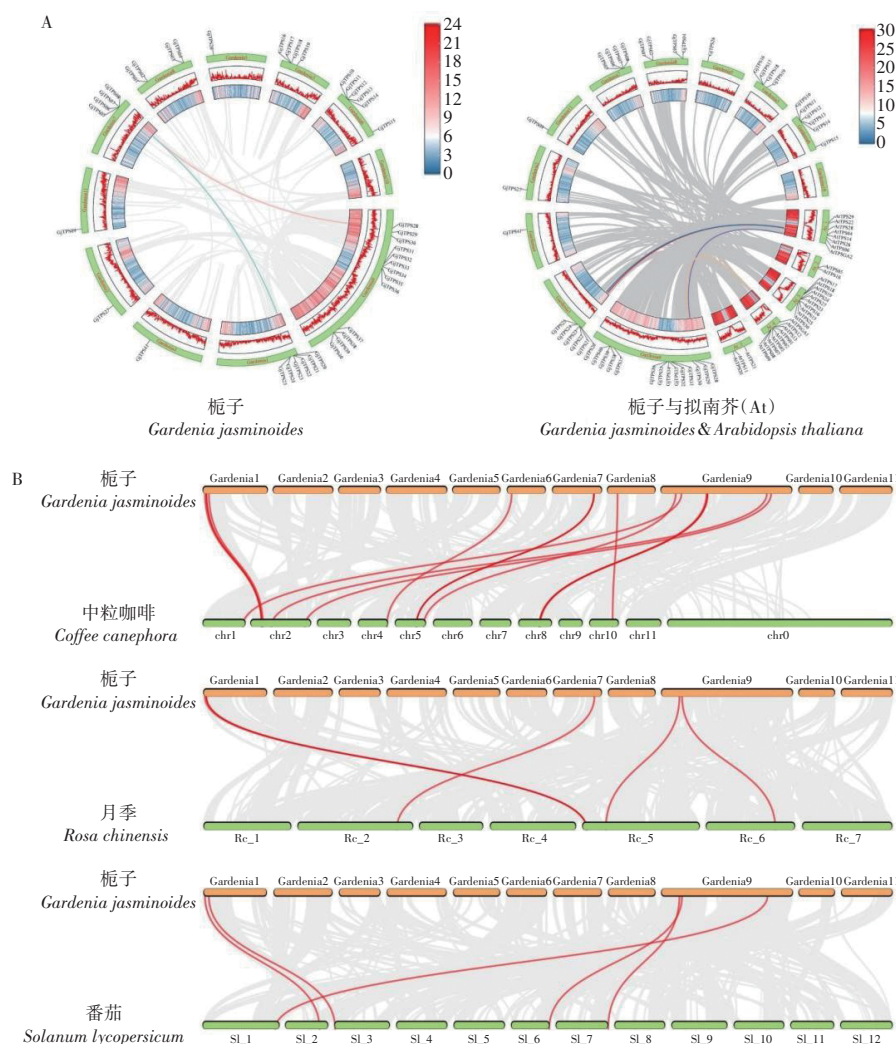


图5 栀子与4种不同物种的共线性分析

Figure 5 Collinearity analysis of *G. jasminoides* and four other species

## 2.5 启动子顺式作用元件分析

使用PlantCARE网站分析栀子 *GjTPS* 基因起始密码子上游 2 000 bp 的核苷酸序列, 鉴定出 1 056 个与先前报道的植物生长发育、植物激素响应和胁迫相关具有相似性的顺式作用调控元件<sup>[18]</sup>(图 6A)。参与植物生长发育的元件(201 个), 主要包括开花调控、种子特异性表达、胚乳特异性表达等元件(图 6B); 植物激素响应元件(493 个), 主要有赤霉素、茉莉酸甲酯、生长素等元件(图 6C); 胁迫响应元件(362 个)包括防御和应激反应、创伤反应、干旱反应等元件(图 6D)。其中, 大多数的顺式元件在植物激素响应(493/1056)类别中, 且 MYC 基序(185/493)的占比最大, 与茉莉酸甲酯响应相关。综上, 栀子 *GjTPS* 基因可能受到多种植物激素和非生物胁迫的调节<sup>[18]</sup>, 栀子 *TPS* 基因家族参与植物生长发育、激素、胁迫响应。

## 2.6 不同外源激素浓度下栀子 *TPS* 基因家族成员的表达模式

由图 7 可知, 大部分的栀子 *TPS* 基因家族成员在不同外源激素浓度下表达量不高, 但有 6 个成员在不同外源激素浓度作用下出现高表达, 这 6 个基因均为 TPS-a 与 TPS-b 亚家族成员。吲哚乙酸低浓度与茉莉酸甲酯高浓度, *TPS* 基因家族成员表达量均出现上调现象; 结合表 3 可见, 吲哚乙酸 25 mg·L<sup>-1</sup> 与茉莉酸甲酯 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> 这两个浓度分别为两种外源激素的最适喷施浓度。 *GjTPS02*、*GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21*、*GjTPS22* 在各个处理中均高度表达, 推测这些 *TPS* 基因可能与栀子花香有关。

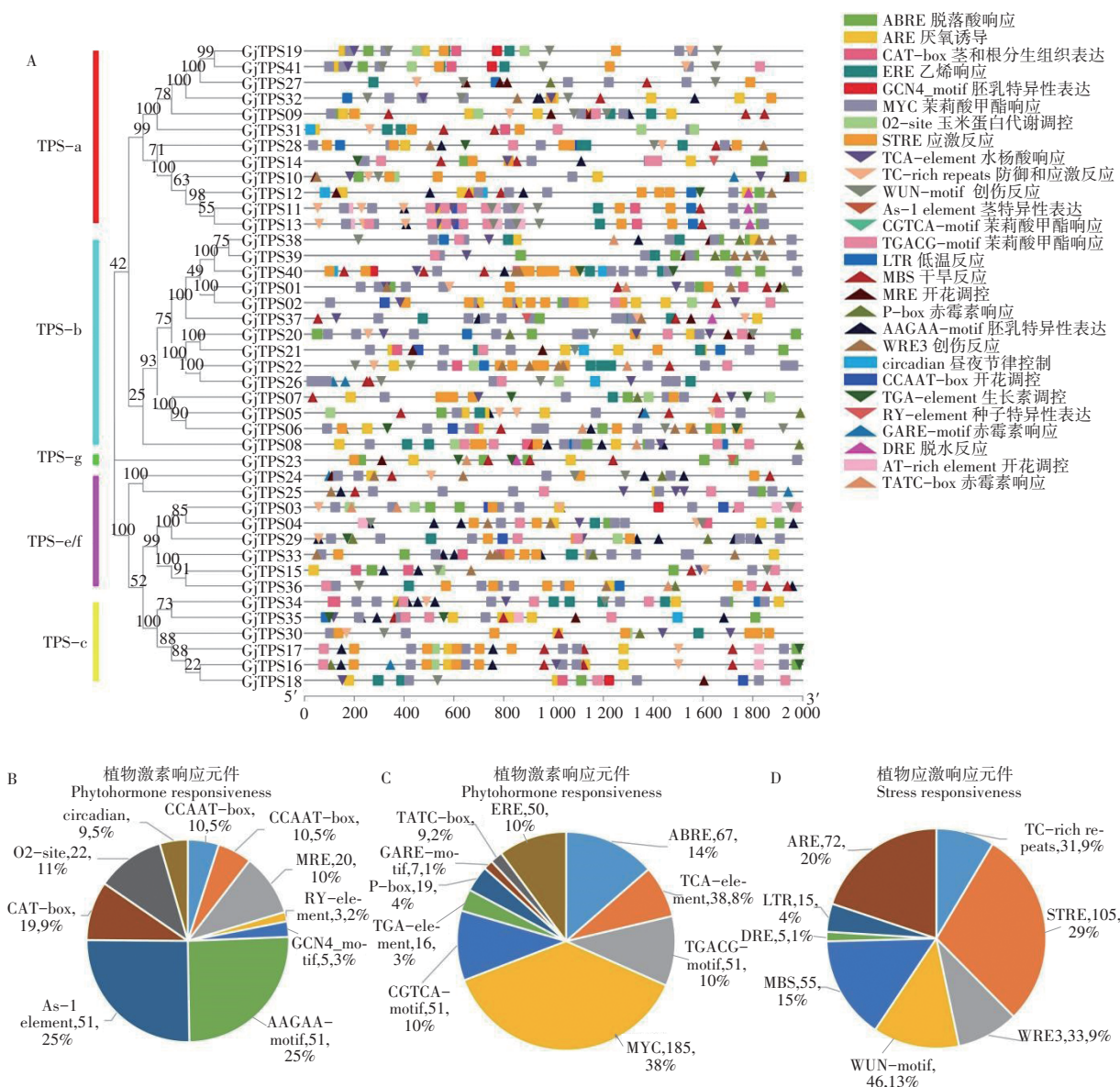


图 6 梔子 *GjtPS* 基因家族启动子顺式元件分析

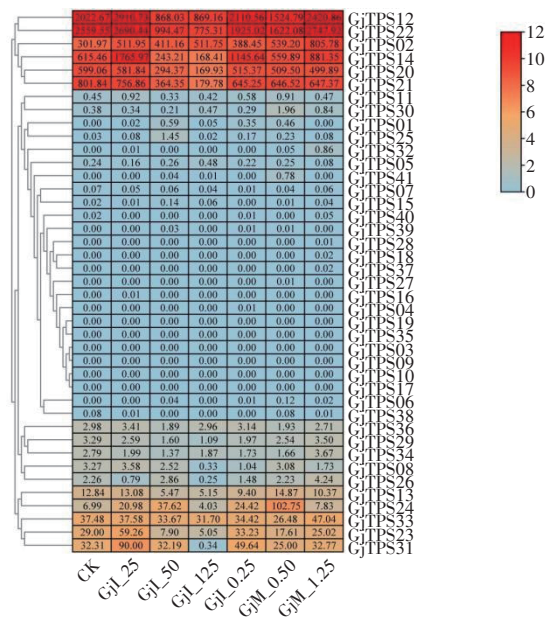
Figure 6 Analysis of cis-acting regulatory element in the promoter region of *GjtPS* gene family in *G. jasminoides*

### 2.7 不同外源激素浓度下梔子花朵萜类物质含量分析

对不同外源激素浓度下梔子花朵挥发性成分进行鉴定分析,分析其中的萜类物质,并绘制热图,使梔子花朵萜类物质的释放结果可视化。根据 GC-MS 检测出的 10 种含量最多的萜类物质分析,不同外源激素浓度下梔子花朵的萜类物质释放量不同。由图 8 可知,在所有浓度下梔子萜类物质释放量中,芳樟醇释放量最高;茉莉酸甲酯  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时芳樟醇、 $\alpha$ -松油醇和香叶醇的含量都较高,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,未检测出橙花醇。在对照组中只检测出 7 种含量较大的萜类物质;吡啶乙酸处理中,浓度从低到高分别检测出 8, 9, 10 种萜类物质,呈逐渐上升趋势;茉莉酸甲酯处理中,浓度从低到高分别检测出 8, 10, 10 种萜类物质。说明茉莉酸甲酯  $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  是本试验萜类物质释放的最适浓度。

### 2.8 TPS 表达量与萜类物质挥发量的相关性分析

梔子花朵 TPS 表达量与萜类物质挥发量的相关性分析结果表明(图 9), *GjtPS12*、*GjtPS14*、*GjtPS23*、*GjtPS31*、*GjtPS36* 与 7 种萜类物质呈正相关; *GjtPS20*、*GjtPS21*、*GjtPS24* 与 6 种萜类物质呈正相关; *GjtPS22* 与 5 种萜类物质呈正相关;其余均与小于 5 种萜类物质呈正相关。其中 *GjtPS08* 仅与橙花醇挥发量呈正相关,与其余萜类物质均为负相关;橙花醇仅与 *GjtPS24* 呈负相关,其余 TPS 基因家族成员均为正相关;芳樟醇与 *GjtPS12*、*GjtPS14*、*GjtPS20*、*GjtPS21*、*GjtPS22* 的相关性较大,其余均较



GjI-为吲哚乙酸喷施;GjM-为茉莉酸甲酯喷施,下同  
GjI- represented IAA; GjM- represented MeJA, the same below

图7 栀子 *TPS* 基因在不同外源激素浓度下的表达情况

Figure 7 The expression of *TPS* family genes of *G. jasminoides* at different concentrations of exogenous hormones

表3 不同外源激素浓度下栀子 *TPS* 基因的隶属函数平均值

Table 3 Subordinate function values of *TPS* family genes of *G. jasminoides* at different concentrations of exogenous hormones

基因 ID Gene ID	CK	GjI_25	GjI_50	GjI_125	GjM_0.25	GjM_0.50	GjM_1.25
GjTPS02	0.53	0.49	0.39	0.36	0.61	0.57	0.35
GjTPS08	0.42	0.43	0.51	0.42	0.57	0.54	0.45
GjTPS12	0.49	0.51	0.40	0.46	0.52	0.52	0.49
GjTPS13	0.45	0.56	0.54	0.58	0.62	0.40	0.60
GjTPS14	0.50	0.55	0.51	0.37	0.34	0.44	0.65
GjTPS20	0.60	0.45	0.36	0.46	0.45	0.34	0.36
GjTPS21	0.45	0.43	0.49	0.48	0.38	0.60	0.53
GjTPS22	0.46	0.52	0.40	0.35	0.34	0.55	0.61
GjTPS23	0.47	0.39	0.61	0.37	0.34	0.62	0.44
GjTPS24	0.43	0.53	0.39	0.41	0.34	0.54	0.62
GjTPS29	0.45	0.57	0.60	0.39	0.45	0.46	0.49
GjTPS31	0.36	0.35	0.42	0.45	0.57	0.35	0.44
GjTPS33	0.59	0.41	0.45	0.56	0.55	0.56	0.65
GjTPS34	0.45	0.60	0.36	0.65	0.38	0.52	0.47
GjTPS36	0.54	0.56	0.58	0.52	0.41	0.61	0.57
PJZ	0.48	0.49	0.47	0.45	0.46	0.51	0.52

注:最后一行 PJZ 为 15 个基因各处理的平均值。

Note: The last line of PJZ was the average value of each treatment of 15 genes.

小或为负相关; *GjTPS23* 与 2-(4-甲基-3-环己烯-1-基)丙醛呈显著性负相关。结合栀子花朵转录组 *TPS* 基因表达情况,最终得到 5 个可能参与栀子花香调控的基因,分别为 *GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21* 和 *GjTPS22*。

### 3 讨论与结论

*TPS* 基因家族是个中等规模的基因家族,其 *TPS* 基因数量范围为 20~150<sup>[15]</sup>。例如,江南卷柏有 14 个 *SmTPS*,山茶有 23 个 *CsTPS*,拟南芥有 32 个 *AtTPS*,葡萄有 69 个 *VvTPS*。根据 *TPS* N 端和 C 端结构域,本研究一共鉴定出 41 个 *GjTPS* 基因,分为 5 个亚家族,不含 *TPS-d* 与 *TPS-h* 亚家族。*TPS-b* 是栀子

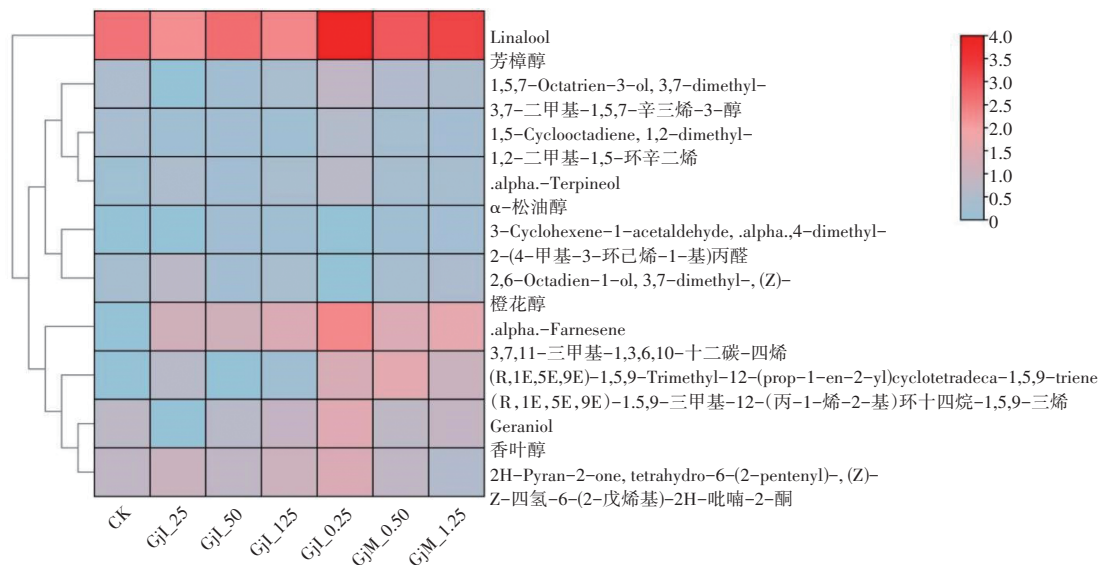


图8 不同外源激素浓度下栀子萜类物质释放

Figure 8 The release of terpenoids in the flowers of *G. jasminoides* at different concentrations of exogenous hormones

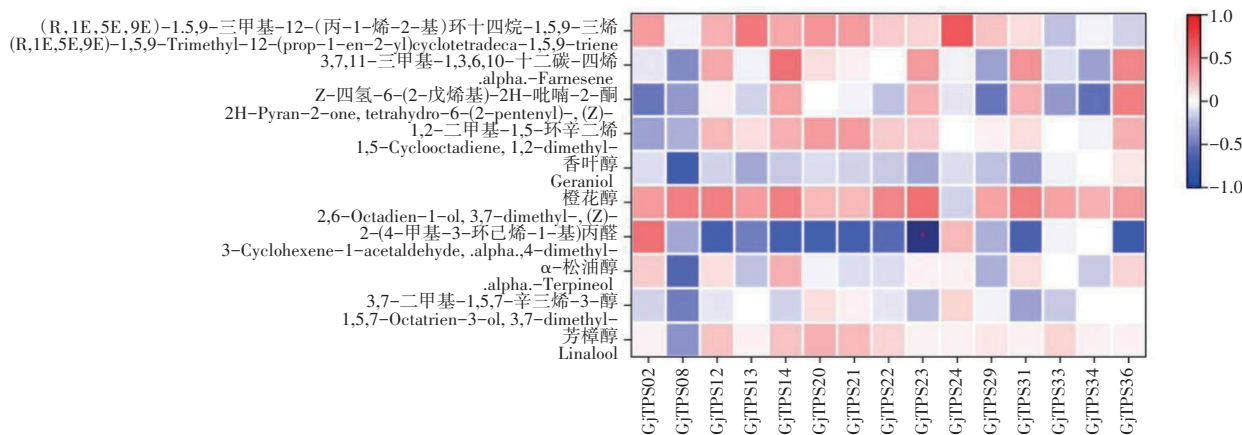


图9 栀子TPS家族成员基因表达与挥发性萜类物质含量相关性

Figure 9 Correlation analysis of gene expression and content of volatile terpenoids in TPS family members of *G. jasminoides*

最大的亚家族,本结果与铁皮石斛、大花蕙兰的结果一致,但与拟南芥、月季、中粒咖啡的结果不一样。在与拟南芥、中粒咖啡、葡萄的比较分析中,栀子TPS-b、TPS-c、TPS-e/f亚家族发生了选择性的扩张,是由近端重复、分散重复与串联重复导致。基因家族的扩张一般与植物的生物学特性相关,如葡萄TPS-a亚家族的扩张带来巨大的旁系同源簇,使其与来自其他物种的TPS基因关系更密切。拟南芥与葡萄中TPS-b亚家族是单萜合酶的主要来源,负责催化多种单萜化合物的形成。拟南芥中的*AtTPS04*被证实是香叶基芳樟醇合酶<sup>[27]</sup>;葡萄TPS-g亚家族被证实与芳樟醇、香叶醇合成相关,TPS-b亚家族则可促进松油醇的合成<sup>[18]</sup>。栀子花朵的挥发性萜类物质鉴定中,单萜化合物芳樟醇、α-松油醇、香叶醇、橙花醇占比较大,其中芳樟醇是栀子花朵的主要挥发性成分之一;栀子含有更多的TPS-b、TPS-e/f亚家族基因,能够合成更多芳香类化合物。

生长素作为一种不可或缺的植物激素,在植物生长发育的诸多进程中都发挥着重要的作用;柯艳果<sup>[28]</sup>发现使用吲哚乙酸处理后,姜花挥发性物质释放量均显著升高。茉莉酸甲酯是由硬脂酸途径产生的脂肪酸衍生物,也是茉莉中特殊香味的重要组成成分;姜一凡<sup>[29]</sup>发现茉莉酸甲酯长期处理(24 h)能显著提高毛果杨叶中萜类物质的释放量。本研究采用吲哚乙酸与茉莉酸甲酯进行喷施试验,发现吲哚乙酸低浓度与茉莉酸甲酯高浓度,TPS基因家族成员表达量均出现上调现象,*GjTPS02*、*GjTPS12*、

*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21*、*GjTPS22* 这 6 个基因在各处理的表达量较高; 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> 的茉莉酸甲酯对梔子花朵萜类物质释放影响较大, 芳樟醇是梔子花朵的主要挥发性萜类物质。结合转录组和 GC-MS 分析结果, 对梔子 *TPS* 基因表达水平和萜类物质含量进行相关性分析, *GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21*、*GjTPS22* 分别与 7, 7, 6, 6, 5 种萜类物质呈正相关, 这 5 个基因可能参与梔子花香代谢的调控。

RRX<sub>g</sub>W 在异戊烯基二磷酸底物的金属依赖电离中和单萜合酶的环化中是必不可少的<sup>[16]</sup>。其中, *TPS-a* 家族的第 2 个 R 是不保守的<sup>[20]</sup>, 在 *TPS-b* 亚家族中是保守的, *TPS-c* 亚家族不含有 RRX<sub>g</sub>W 结构<sup>[13]</sup>, 本研究结果与其保持一致。RRX<sub>g</sub>W 与单萜合酶质粒转运肽相关, 拟南芥的 *TPS-b* 亚家族成员中的 *AtTPS10* 被表征为月桂烯与罗勒烯合酶<sup>[13]</sup>。在 *GjTPS* 基因的启动子区域观察到很多的顺式作用元件, 大多数在植物激素响应类别中, 茉莉酸甲酯响应相关的 MYC 基序占据大部分的位置。结果表明, 梔子 *GjTPS* 基因的表达模式可以通过茉莉酸甲酯来调控, 并且可以响应多种环境胁迫调控。

萜类合成酶基因形成基因簇有助于基因组合的共遗传和共表达, 减少单一通路基因在重组后丢失的可能性<sup>[30]</sup>。染色体定位显示, 1, 3, 5, 6, 8, 9 号染色体都存在串联重复, 且 8 号和 9 号染色体的基因簇都为 *TPS-b* 家族成员, 推测这加强了基因的共表达。共线性可以反映物种间的进化关系, 远缘物种经历更大程度的基因组重排, 使得共线性区域的数量和范围均减少, 而近缘物种的基因组间往往蕴藏着丰富的共线性区域<sup>[31]</sup>。共线性分析表明, 梔子与其同科植物中粒咖啡有更近的亲缘关系, 两者的共线性基因对高达 17 对; 梔子 *GjTPS* 的基因中也存在 2 条基因对, 说明梔子这 2 条 *GjTPS* 基因对有着很强的亲缘关系。

本研究通过对梔子 *TPS* 基因家族成员的鉴定及与功能分析, 结合外源激素喷施试验进行转录组与挥发性萜类物质含量测定, 发现梔子 *TPS* 基因在 *TPS-b* 亚家族发生了选择性扩张, 家族成员达到拟南芥的 2.3 倍; 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> 的茉莉酸甲酯有助于梔子 *TPS* 基因家族成员的表达及萜类物质的释放; *GjTPS12*、*GjTPS14*、*GjTPS20*、*GjTPS21* 和 *GjTPS22* 这 5 个基因可能与梔子萜类化合物的合成、释放相关。本研究结果为后续研究梔子 *TPS* 家族基因调控花香提供了一定的理论依据, 为进一步解析梔子 *GjTPS* 基因功能提供了一定的方向。

## 参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典. 第一部[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 125.
- [2] 刘百战, 高芸. 固相微萃取-气相色谱/质谱分析梔子花的头香成分[J]. 色谱, 2000, 18(5): 452-455.
- [3] 张庆红. 梔子组织培养及原生质体分离的研究[D]. 广州: 中医药大学, 2015.
- [4] 卢路路. 梔子花功效成分及生物活性探索研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2021.
- [5] 胡田. 江南卷柏微生物型萜类合成酶的功能研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021.
- [6] 周妮, 朱莉, 郎志宏, 等. 萜类化合物在植物间接防御中的作用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(7): 101-107.
- [7] 邢勇翔. 外源茉莉酸甲酯处理影响玫瑰抗旱性与花香合成的机理研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [8] 杨国霞, 蒋宝鑫, 何凡, 等. 杜鹃花 *TPS* 基因家族鉴定及与萜类物质代谢的关系分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3740-3756.
- [9] 熊美新. 姜花精油的成分、抗氧化功效及关键萜类成分合成酶基因的功能分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [10] YU Z M, ZHAO C H, ZHANG G H, et al. Genome-Wide identification and expression profile of *TPS* gene family in *Dendrobium officinale* and the role of DoTPS10 in linalool biosynthesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21: 5419.
- [11] 杨仕梅, 张天缘, 丘日光, 等. 番茄 *TPS* 基因家族鉴定与分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(16): 5215-5223.
- [12] EL-GEBALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D427-D432.
- [13] CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. The Plant Journal, 2011, 66: 212-229.
- [14] LI G L, KÖLLNER T G, YIN Y B, et al. Nonseed plant *Selaginella moellendorffii* has both seed plant and microbial types of terpene synthases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109: 14711-

- 14715.
- [15] AUBOURG S, LECHARNY A, BOHLMANN J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2002, 267(6): 730–745.
- [16] WANG Q Q, ZHU M J, YU X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of terpene synthase genes in *Cymbidium faberi*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 751853.
- [17] ZHOU H C, SHAMALA L F, YI X K, et al. Analysis of terpene synthase family genes in *Camellia sinensis* with an emphasis on abiotic stress conditions[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 933.
- [18] YAN Y H, LI M L, ZHANG X N, et al. Tissue-specific expression of the terpene synthase family genes in *Rosa chinensis* and effect of abiotic stress conditions[J]. *Genes*, 2022, 13(3): 547.
- [19] 任妙珍, 董凯麟, 张 剑, 等. 竹叶花椒 TPS 基因家族全基因组分析[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2022, 59(4): 159–169.
- [20] MARTIN D M, AUBOURG S, SCHOUWEY M B et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLeDNA cloning, and enzyme assays[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 226.
- [21] YU R, LI Y, SI D, et al. Identification, quantitative and bioactivity analyses of aroma and alcohol-soluble components in flowers of *Gardenia jasminoides* and its variety during different drying processes[J]. *Food Chemistry*, 2023, 420: 135846.
- [22] XU Z C, PU X D, GAO R R, et al. Tandem gene duplications drive divergent evolution of caffeine and crocin biosynthetic pathways in plants[J]. *BMC Biology*, 2020, 18(1): 63.
- [23] 程 甜, 魏 强, 李广林. 中粒咖啡萜类合成酶基因家族的生物信息学分析[J]. *植物学报*, 2016, 51(2): 235–250.
- [24] FALARA V, AKHTAR T A, NGUYEN T T H, et al. The tomato terpene synthase gene family[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 770–789.
- [25] 张云峰. 外源激素对碗莲开花生理生化指标的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
- [26] GAY M, LEMPEREUR L, FRANCIS F, et al. Control of *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778) and other mites with volatile organic compounds, a review[J]. *Parasitology*, 2020, 147(7): 731–739.
- [27] HERDE M, GÄRTNER K, KÖLLNER T G, et al. Identification and regulation of *TPS04/GES*, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C16-homoterpene TMTT[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(4): 1152–1168.
- [28] 柯艳果. 生长素信号及其应答因子对姜花花香物质代谢的调控研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [29] 姜一凡. 五种园林植物与花香及胁迫防御相关的挥发性萜类物质的调控与合成[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [30] NÜTZMANN H W, HUANG A C, OSBOURN A. Plant metabolic clusters—from genetics to genomics[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(3): 771–789.
- [31] 周显臻, 姚诗幻, 李嘉雯, 等. 落叶松-杨栅锈菌基因复制事件及共线性分析[J]. *菌物学报*, 2021, 40(3): 580–591.

[责任编辑 马迎杰]