

森林草莓醇酰基转移酶基因 *FvAATW2* 功能研究

董 静, 王桂霞, 钟传飞, 常琳琳, 孙 健, 张宏力, 孙 瑞, 石 琨,
隗永青, 张运涛*

(北京市林业果树科学研究所, 北京市草莓工程技术研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100093)

摘 要: 在从森林草莓 (*Fragaria vesca* L.) 成熟果实中克隆到醇酰基转移酶基因 (*FvAATW2*) 的基础上, 构建由 CaMV35S 启动子驱动的植物正义表达载体 pBI121-*FvAATW2*, 在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) ‘Camarosa’ 品种中过量表达 *FvAATW2*, 以研究其功能。采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草和草莓; 利用 PCR 和 Southern blot 筛选出转基因株系; 通过实时定量 PCR 和测定 AAT 酶活性来检测转基因植株中外源基因的表达; 利用 SPME/GC-MS 方法检测烟草叶片和草莓果实中的挥发性成分。对转基因烟草外源基因表达和早期叶片挥发性成分的检测结果表明, 构建的 *FvAATW2* 表达载体功能正常, 转基因株系能够在生长早期合成酯类物质; 通过检测转基因草莓成熟果实的酯类成分发现, 与野生型对照相比, 转基因草莓果实中酯类占挥发物的总比例以及乙酸辛酯、己酸乙酯、己酸辛酯、辛酸乙酯等挥发酯的比例显著提高, 而丁酸甲酯的含量显著降低, 辛酸乙酯的含量显著增加, 说明外源 *FvAATW2* 在草莓中能够正常表达并影响果实酯类合成, 从而通过改变挥发性酯类构成使果实香气变浓。

关键词: 森林草莓; 醇酰基转移酶; 遗传转化; 挥发性成分检测; 实时定量 PCR

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 01-0041-10

Studying Function of Alcohol Acyltransferase Gene *FvAATW2* of *Fragaria vesca* by Over-expressing in Tobacco and Cultivated Strawberry

DONG Jing, WANG Guixia, ZHONG Chuanfei, CHANG Linlin, SUN Jian, ZHANG Hongli, SUN Rui, SHI Kun, WEI Yongqing, and ZHANG Yuntao*

(Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences; Beijing Engineering Research Center for Strawberry; Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, P. R. China, Beijing 100093, China)

Abstract: *FvAATW2* was an alcohol acyltransferase gene, cloned from *Fragaria vesca* L. fruits by RT-PCR. In this study, the sense plant expression vector pBI121-*FvAATW2* driven by cauliflower mosaic virus 35S promoter was constructed through replacing *GUS* with *FvAATW2*, and then was used to genetically transform tobacco and a cultivated strawberry cultivar ‘Camarosa’, to study the function of *FvAATW2*. *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 carrying pBI121-*FvAATW2* was employed to

收稿日期: 2017-06-04; 修回日期: 2017-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601714); 北京市粮经作物产业创新团队项目 (BAIC09-2018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhytao1963@126.com)

infect leaf-discs in the genetic transformation. Transgenic lines were identified by both PCR and Southern blot. The expression of exogenous *FvAATW2* in transgenic *in vitro* plants was studied using relative enzyme activity and real-time quantitative PCR. It was found that *FvAATW2* expressed in all 6 tested tobacco lines and AAT activity values of 5 lines were higher than wild-type plants. Volatiles in leaves of the transgenic tobacco with the highest AAT activity were also detected by SPME/GC-MS at 10 ~ 12 leaves phase. Octyl propanoate was found in transgenic leaves, while not any ester captured in wild-type plants at the same phase. The results showed that pBI121-*FvAATW2* functioned correctly and esters could be synthesized much earlier in transgenic tobacco than in wild-type one. Four strawberry transgenic lines were obtained after PCR and Southern blot operation. A transgenic line bearing more aromatic fruits was screened out and used for the volatiles detection. Through analyzing the ester composition of mature transgenic fruits, it was found that the proportion of esters in total volatiles and respective proportions of octyl acetate, ethyl hexanoate, octyl hexanoate, and ethyl octanoate were higher significantly than those of wild-type fruits, while mass fraction of methyl butanoate decreased significantly and that of ethyl octanoate increased significantly. It was indicated that exogenous *FvAATW2* expressed normally in cultivated strawberry and effected ester synthesis, and it could make fruit aroma intense by changing ester composition.

Keywords: *Fragaria vesca*; alcohol acyltransferase; genetic transformation; volatile detection; real-time qPCR

酯类物质在草莓香气中起重要作用 (Larsen & Poll, 1992; Schieberle & Hofmann, 1997), 赋予其果香气和花香气 (Dong et al., 2013)。醇酰基转移酶 AAT (Alcohol Acyltransferase) 是酯类合成的关键酶, 催化醇和酰基 CoA 之间的反应 (Forney et al., 2000; 张上隆和陈昆松, 2007; 刘静轩等, 2017)。酯的种类和含量是进行草莓香气类型分类的主要依据 (Ulrich et al., 1997), 在不同种和不同香气类型品种间均存在显著差异 (Pyysalo et al., 1979; Hirvi & Honkanen, 1982; Ulrich et al., 2007)。Dong 等 (2013) 系统比较了凤梨草莓与森林草莓的果实酯类构成, 发现挥发酯的种类、含量、比例的差异导致二者具有不同的香气类型, 因此深入研究酯类合成代谢将有助于了解草莓香气形成及其调控。在酯类物质的生物合成过程中, AAT 对底物的选择特性和底物来源共同影响了合成酯的种类 (Wyllie & Fellman, 2000)。但目前已知的参与酯类合成的代谢途径并不能充分解释草莓果实中酯类物质的多样性 (Perez et al., 1992; Zabctakis & Holden, 1997; Dong et al., 2013; Bianchi et al., 2014; Negri et al., 2015)。有研究表明, 调控苹果 AAT 基因表达, 能够使酯类物质含量和果实香气发生显著变化 (Souleyre et al., 2014), 这为全面理解和调控草莓酯类合成代谢提供了新思路。

采用 RT-PCR 方法已经从森林草莓 (*Fragaria vesca* L.) 成熟果实中克隆到 AAT 基因全长序列, 命名为 *FvAATW2*, 并对其在不同组织和果实发育期间的时空表达特性进行了研究 (董静 等, 2014)。本研究构建由 CaMV35S 启动子驱动的 *FvAATW2* 植物正义表达载体, 分别以模式植物烟草和栽培草莓为试材, 利用农杆菌介导的叶盘法进行遗传转化, 通过检测外源基因的表达以及转基因烟草叶片和转基因草莓果实挥发性物质成分的组成变化, 对 *FvAATW2* 的功能进行研究, 为进一步调控 AAT 基因表达, 研究酯类差异形成的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 农杆菌介导的烟草、草莓的遗传转化

试验于 2011 年在北京市林业果树科学研究院进行。植物材料为烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 和栽培草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch) ‘Camarosa’ 的无菌苗。

利用 *Bam*H I、*Sac* I 酶切位点, 将 pBI121 载体中的 *GUS* 替换为 *FvAATW2*, 构建植物表达载体 pBI121-*FvAATW2*, 并转化农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404。

采用农杆菌介导的叶盘法进行遗传转化。选取继代 20 d 的无菌苗, 将叶片剪成大小约 3 ~ 5 mm² 的叶盘作为外植体。

烟草外植体在农杆菌菌液中浸染 8 min 后取出, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 在 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IAA 的分化培养基上共培养 2 d, 再转至 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IAA + 50 mg · L⁻¹ Km + 400 mg · L⁻¹ Cef 的筛选培养基上培养。当抗性芽长至 1 cm 时切下, 转至 MS + 50 mg · L⁻¹ Km + 400 mg · L⁻¹ Cef 的生根培养基上培养。

草莓外植体在农杆菌菌液中浸染 3 ~ 4 min 后取出, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 在 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ 2,4-D 的分化培养基上暗培养 1 d, 再转至 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ 2,4-D + 50 mg · L⁻¹ Km + 500 mg · L⁻¹ Cef 的筛选培养基上培养。当抗性芽长至 1 cm 时切下, 转至 1/2MS + 0.2 mg · L⁻¹ IBA + 50 mg · L⁻¹ Km + 500 mg · L⁻¹ Cef 的生根培养基上培养。

将已生根的抗性芽进行扩繁, 烟草的继代培养基为 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IAA; 草莓继代培养基为 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA。在此期间, 每 3 周继代 1 次, 每次将 Cef 浓度降低 100 mg · L⁻¹, 直至降为 0 mg · L⁻¹。

1.2 转基因植株的 PCR 和 Southern blot 鉴定

采用 CTAB 法提取抗性芽基因组 DNA, 进行 PCR 扩增鉴定。烟草采用的引物为 F3、R1; 草莓采用的引物为 G1、G2, 为避免内源 AAT 基因干扰, G1 覆盖了一部分载体序列 (表 1)。PCR 反应体系为 20 μL: 含模板 50 ~ 100 ng, 2 μL buffer (不含 Mg²⁺), 2.5 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 0.5 mmol · L⁻¹ dNTP, 0.5 μmol · L⁻¹ 引物和 0.5 U *Taq* 酶。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表 1 本研究所采用的引物序列
Table 1 Sequence of the primers used in this study

来源 Resource	引物名称 (正向/反向) Primer name (Forward/ Reverse)	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
<i>FvAATW2</i>	F3/ R1	ATGGAGAAAATTGAGGTCAGTATA/GCACGAGCCACATAATCTTTC
<i>FvAATW2</i> & 载体/ 载体 <i>FvAATW2</i> & vector/ Vector	G1/ G2	GATCCAGATCTCCAGTCTTATG/ ATATGATCGATGATATCCCATGG
<i>FvAATW2</i>	F8/ R9	CCAAACACACCATCAAACCATCAACTTC/ CAAATCTCCTTGTAGCAACTTTTTTCCG
载体/ <i>FvAATW2</i> & 载体 Vector/ <i>FvAATW2</i> & vector	SF3/ SR1	CATCGTGGAAGAAAGAAGACG/ CATAAGACTGGAGATCTGGATC
<i>FvAATW2</i>	F3/ fR2	ATGGAGAAAATTGAGGTCAGTATA/ AGATTGAAGACTGCAGGGC
烟草 <i>Actin</i> Tobacco <i>Actin</i>	faF2/ faR2	CTGCTGGAATTCACGAAACA/GCCACACCTTGATCTTCAT
草莓 <i>Actin</i> Strawberry <i>Actin</i>	faF1/ faR1	CCACGAGCTGTTTTCCTAG/GATGCCAAATCTTCTCCATGC

参考 Jin 等 (2009) 的方法进行转基因植株的 Southern blot 鉴定, 按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit I (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) 说明书操作。制备烟草探针所用引物对为 F8、R9; 草莓所用引物为 SF3、SR1 (表 1)。利用限制性内切酶 *EcoR* I 进行基因组 DNA 酶切。

1.3 转基因植株外源 *FvAATW2* 实时定量 PCR 检测和 AAT 活性测定

分别以 PCR、Southern blot 鉴定阳性的烟草、草莓转基因株系无菌苗为试材, CTAB 法提取总 RNA, 合成 cDNA 后, 采用 SYBR Green 荧光染料法对外源 *FvAATW2* 的表达情况进行实时定量 PCR 检测。引物为 F3、fR2; 内参采用持家基因 *Actin*, 烟草 *Actin* 引物为 faF2、faR2, 草莓 *Actin* 引物为 faF1、faR1 (表 1)。采用 10 μ L 反应体系: 1.5 μ L cDNA, 引物各 0.5 μ L, 2.5 μ L 无菌水, 5 μ L Mix (SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)。3 次重复。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。

参考隋静等 (2007) 的方法, 提取转基因烟草和草莓无菌苗 AAT 酶, 测定其活性。3 次重复。

1.4 转基因烟草叶片和转基因草莓成熟果实的挥发性成分检测

将 AAT 酶活性最高的烟草转基因株系与野生型对照一起驯化、移植到日光温室, 待植株长出 10~12 片叶时, 取下部 3~4 片完全展开叶片清洗, 液氮速冻后, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

将 PCR、Southern blot 鉴定阳性的草莓转基因株系和野生型对照驯化、移栽到日光温室, 在开花结果后, 选香味变浓的株系, 取成熟果实, 洗净, 吸干表面水分, 用液氮速冻, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

样品预处理及挥发性成分的 SPME/GC-MS 检测参考 Dong 等 (2013) 的方法。3 次重复。未知化合物质谱图经计算机检索, 同时于 NIST library 和 Wiley library 两个质谱库相匹配, 并结合人工图谱解析及资料分析对各材料的总离子流图进行处理, 采用峰面积归一化法计算各成分在总挥发物中所占比例。混标法制备标准曲线进行定量分析, 计算乙酸己酯、乙酸辛酯、丁酸乙酯、丁酸己酯、丁酸辛酯、己酸甲酯、己酸乙酯、辛酸乙酯等酯类成分的含量; 没有标样的, 根据化学结构相似、碳原子数相近的原则进行近似定量。所用标样均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。利用 SAS 软件对数据进行统计分析 (*t* 检验)。

2 结果与分析

2.1 *FvAATW2* 植物表达载体构建

已知 *FvAATW2* 全长 1 394 bp, 与 GenBank 中的 *VAAT* 具有 99 % 同源性 (董静 等, 2014)。将 *FvAATW2* 插入到植物表达载体 pBI121 上, 置于 CaMV 35S 启动子下游, 构建了 *FvAATW2* 正义表达载体 pBI121-*FvAATW2* (图 1)。

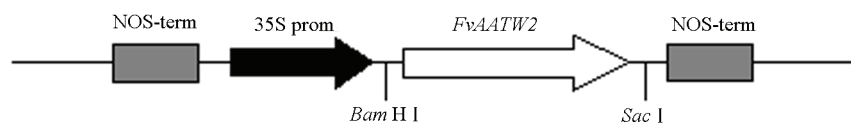


图 1 构建好的植物表达载体 pBI121-*FvAATW2* 质粒图谱

Fig. 1 Diagram of plant expression vector pBI121-*FvAATW2*

经 *Bam*H I、*Sac* I 双酶切鉴定 (图 2)、测序验证, 表达载体构建成功。

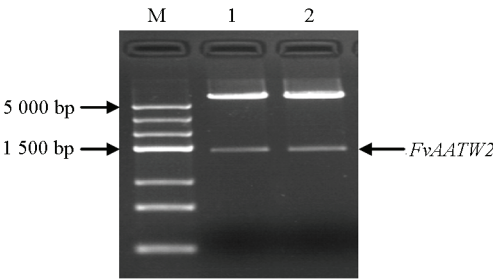


图 2 pBI121-*FvAATW2* 的 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切产物电泳图

M: Marker 70503S; 1、2: pBI121-*FvAATW2* 酶切产物。

Fig. 2 Electrophoresis of pBI121-*FvAATW2* digested by restriction enzymes *Bam*H I and *Sac* I

M: Marker 70503S; 1, 2: Digested pBI121-*FvAATW2*.

2.2 转 *FvAATW2* 烟草的 PCR 和 Southern blot 鉴定

将构建成功的植物表达载体转入农杆菌 LBA4404 中, 采用叶盘法转化烟草, 获得了抗性芽。

通过 PCR 和 Southern blot 鉴定, 在供试的抗性芽中都检测到了外源基因 *FvAATW2* 的存在 (图 3, 图 4), 将其鉴定为阳性的抗性芽, 扩繁为株系。

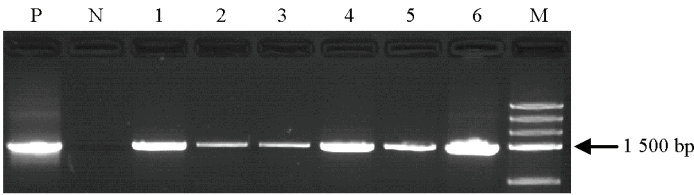


图 3 转基因烟草的 PCR 鉴定

P: 质粒阳性对照; N: 野生型阴性对照; 1~6: 抗性芽; M: Marker 70503S。

Fig. 3 PCR analysis of tobacco transgenic plants

P: Plasmid as positive control; N: Wild type plants as negative control; 1 - 6: Resistant buds; M: Marker 70503S.

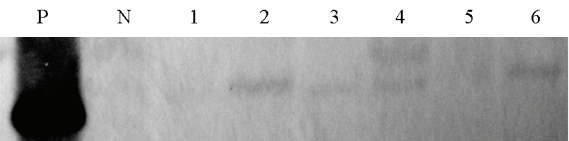


图 4 转基因烟草的 Southern blot 鉴定

P: 质粒阳性对照; N: 野生型阴性对照; 1~6: 抗性芽。

Fig. 4 Southern blot analysis of tobacco transgenic plants

P: Plasmid as positive control; N: Wild type plants as negative control; 1-6: Resistant buds.

2.3 转基因烟草中的外源基因 *FvAATW2* 表达检测

利用实时定量 PCR 检测了外源基因 *FvAATW2* 在烟草转基因株系中的表达 (图 5, A), 结果表明, 供试转基因株系中的 *FvAATW2* 在转录水平上均有表达, 但表达水平存在差异。同时, 通过测定叶片中的 AAT 酶活性发现, 除株系 1 外, 其余转基因株系均高于野生型株系 (图 5, B), 说明外源 AAT 基因可以在转基因株系中表达, 并最终生成具有活性的 AAT 酶。

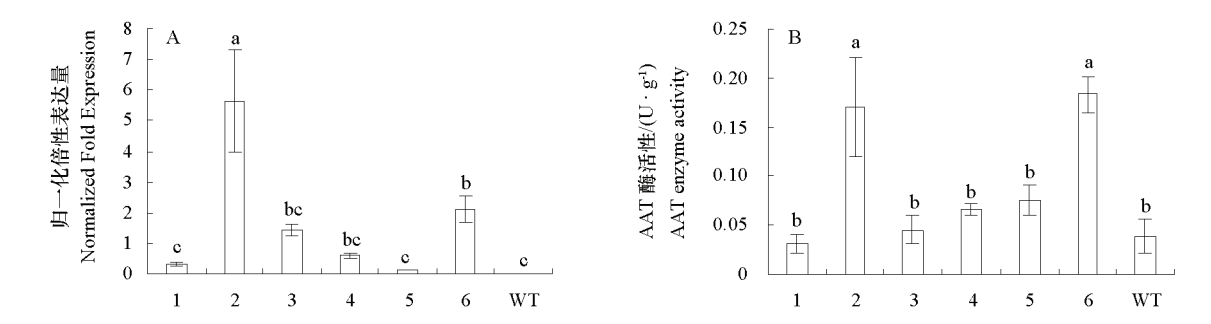


图 5 转基因烟草株系中外源 AAT 基因的表达 (A) 和 AAT 酶活性 (B)
1~6: 转基因株系; WT: 野生型植株。
Fig. 5 Expression of exogenous AAT gene (A) and AAT enzyme activity (B) in tobacco transgenic plants
1 - 6: Transgenic lines; WT: Wild type plants.

2.4 转基因烟草叶片挥发性成分检测

由于外源基因为组成型表达,故选择了 AAT 酶活性最高的转基因烟草株系,在生长早期进行叶片挥发性成分检测。SPME/GC - MS 分析结果(表 2)表明,野生型植株叶片的挥发性成分以醇和醛为主,没有检测到酯类物质;而在转基因株系中,叶片挥发性成分以醛类为主,除了醇类和醛类物质,还检测到丙酸辛酯,在总挥发物中占 3.47%,说明外源基因改变了烟草叶片挥发性成分组成,证明构建的植物表达载体能正常表达。

表 2 野生型与转基因烟草叶片各挥发性成分在总挥发性成分中的比例
Table 2 Proportion of individual volatiles in leaf of wild type tobacco and transgenic plants

挥发物 Volatiles	名称 Name	野生型 Wild type	转 <i>FvAATW2</i> 株系 Trans- <i>FvAATW2</i> line
酯类 Esters	丙酸辛酯 Octyl propanoate	—	3.47
	合计 Total	—	3.47
醛类 Aldehydes	己醛 Hexanal	—	18.52
	2 - 己醛 2-Hexenal	19.37	42.86
	3 - 己醛 3-Hexenal	36.87	—
	壬醛 Nonanal	16.07	3.09
	癸醛 Decanal	—	7.82
	十六醛 Hexadecanal	—	14.34
	2,6 - 壬二醛 2,6-Nonadienal	—	3.59
	合计 Total	72.31	90.22
醇类 Alcohols	3 - 甲基 - 1 - 戊醇 1-Pentanol, 3-methyl-	—	3.62
	2 - 乙基 - 1 - 己醇 1-Hexanol, 2-ethyl-	10.48	—
	4 - 甲基 - 1 - 己醇 1-Hexanol, 4-methyl-	—	2.67
	2 - 己基 - 1 - 癸醇 1-Decanol, 2-hexyl-	17.21	—
	合计 Total	27.69	6.29

注: “—” 未检出。
Note: “—” Not detected.

2.5 转基因草莓的 PCR 和 Southern blot 鉴定

通过叶盘法将 *FvAATW2* 转入草莓栽培品种 ‘Camarosa’ 过量表达,在初步获得的抗性芽中,利用 PCR 和 Southern blot 鉴定出 4 个抗性植株(图 6, 图 7)。

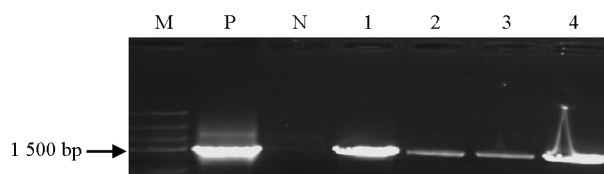


图 6 转基因草莓的 PCR 鉴定

M: Marker 70503S; P: 质粒阳性对照; N: 野生型阴性对照; 1~4: 抗性植株。

Fig. 6 PCR analysis of transgenic strawberry plants

M: Marker 70503 S; P: Plasmid as positive control; N: Wild type plants as negative control; 1 - 4: Resistant plants.

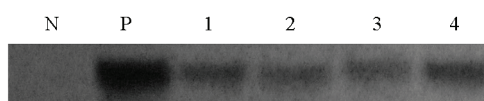


图 7 转基因草莓的 Southern blot 鉴定

N: 野生型阴性对照; P: 质粒阳性对照; 1~4: 抗性植株。

Fig. 7 Southern blot analysis of transgenic strawberry plants

N: Wild type plants as negative control; P: Plasmid as positive control; 1 - 4: Resistant plants.

2.6 草莓转基因植株中的外源基因 *FvAATW2* 的表达检测

如图 8 所示, 实时定量 PCR 检测和 AAT 酶活性测定结果表明, *FvAATW2* 在 4 个草莓转基因株系中均能表达; 与野生型对照相比, 转基因植株的 AAT 酶活性有所提高。

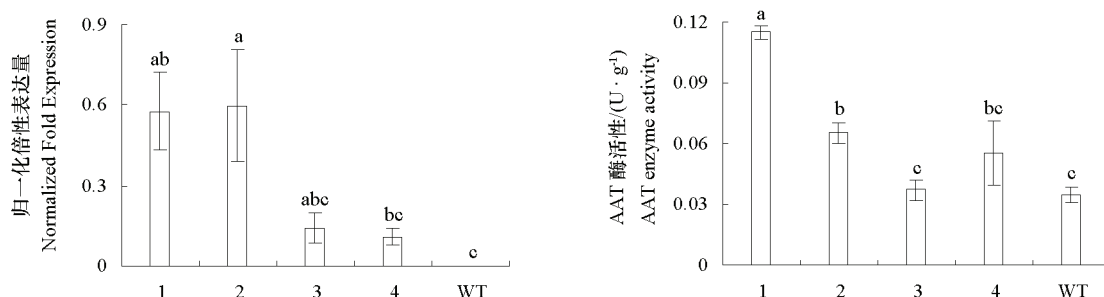


图 8 转基因草莓株系中外源 AAT 基因的表达和 AAT 酶活性

1~4: 转基因株系; WT: 野生型植株。

Fig. 8 Expression of exogenous AAT gene and AAT enzyme activity in strawberry transgenic plants

1 - 4: Transgenic lines; WT: Wild type plants.

2.7 转基因草莓果实挥发性成分检测

将 4 个草莓抗性植株扩繁、驯化, 定植到日光温室中, 果实成熟后从中选出香气变浓的 1 个株系, 并对其成熟果实的挥发性成分进行了检测。结果发现, 转基因株系成熟果实的平均酯类成分种类 (17.0) 与野生型对照 (16.5) 基本一致, 但其在总挥发物中的比例 (65.73%) 极显著提高 (表 3)。

转基因果实的基本酯类构成如表 3 所示, 主要酯类成分的比例和含量都发生了明显变化。与野生型对照相比, 在检测到的酯类成分中, 转基因株系的乙酸辛酯、己酸乙酯、己酸辛酯、辛酸乙酯等 4 个酯类成分在总挥发物中的比例有所提高, 其中乙酸辛酯、己酸辛酯比例显著提高, 己酸乙酯和辛酸乙酯比例极显著提高。在含量方面, 辛酸乙酯也极显著高于对照, 丁酸甲酯则极显著低于对照。

总的来说,转基因草莓果实酯类成分的比例出现了升高的趋势,说明转入的外源基因 *FvAATW2* 能够改变酯类构成并影响果实香气。

表 3 转基因草莓 (TL) 与野生型 (WT) 果实主要酯类成分的平均比例、含量和气味描述
Table 3 Proportion, mass fraction and odor description of fruit esters in strawberry transgenic line (TL) and wild type control (WT)

挥发性成分 Volatiles	比例/% Proportion		含量/(mg·kg ⁻¹ FW) Content		气味描述 (参考文献) Odor description (Reference)
	WT	TL	WT	TL	
乙酸己酯 Hexyl acetate	2.66 ± 0.87	3.03 ± 1.54	2.38 ± 0.51	2.83 ± 0.45	果味, 花香, 甜味 Fruity, floral, sweetish (Noguerol-Pato et al., 2009; Olbricht et al., 2008)
乙酸辛酯 Octyl acetate	2.58 ± 0.24	5.92 ± 1.71*	3.07 ± 1.32	5.06 ± 0.64	橙花, 茉莉, 果香味 Neroli, jasmine, fruity (谢剑平, 2009)
乙酸-2-己烯-1-酯 2-Hexen-1-ol, acetate	2.47 ± 0.85	1.61 ± 0.66	2.22 ± 0.35	1.96 ± 0.12	令人愉快的, 果香味, 菠萝味 Pleasant, fruity, pineapple (Olbricht et al., 2008; Antalick et al., 2010)
丁酸甲酯 Methyl butanoate	2.67 ± 1.07	0.35 ± 0.35	1.26 ± 0.14**	0.14 ± 0.14	果味, 甜味, 菠萝味, 青味 Fruity, sweetish, pineapple, green (Ulrich et al., 2007; Olbricht et al., 2008)
丁酸乙酯 Ethyl butanoate	0.64 ± 0.38	1.08 ± 0.26	0.57 ± 0.52	0.57 ± 0.28	成熟猕猴桃味, 甜味, 菠萝味 Ripe kiwi, sweet, pineapple (Olbricht et al., 2008; Antalick, 2010)
丁酸己酯 Hexyl butanoate	0.77 ± 0.18	1.15 ± 0.44	0.55 ± 0.21	0.69 ± 0.10	果味, 杏子味 Fruity, apricot (Dong et al., 2013)
丁酸辛酯 Octyl butanoate	0.27 ± 0.27	2.58 ± 1.16	0.05 ± 0.05	0.15 ± 0.05	青草味, 橙子, 欧芹, 甜瓜味 Herbaceous, orange, parsley, melon (谢剑平, 2009)
2-甲基丁酸辛酯 Octyl-2methylbutanoate	0.70 ± 0.35	2.00 ± 0.79	0.09 ± 0.06	0.12 ± 0.03	
3-甲基丁酸辛酯 Octyl 3-methylbutanoate	1.05 ± 0.34	2.45 ± 1.05	0.09 ± 0.04	0.14 ± 0.05	
己酸甲酯 Methyl hexanoate	4.09 ± 1.29	4.79 ± 1.53	3.10 ± 1.05	4.47 ± 0.67	果味, 甜味, 菠萝味 Fruity, sweetish, pineapple (Ulrich et al., 2007; Olbricht et al., 2008)
己酸乙酯 Ethyl hexanoate	2.62 ± 0.23	9.48 ± 3.61**	2.92 ± 1.74	7.46 ± 0.90	果味, 菠萝味, 葡萄酒香气 Fruity, pineapple, winy (Sarrazin et al., 2007; Olbricht et al., 2008)
己酸辛酯 Octyl hexanoate	0.08 ± 0.08	0.78 ± 0.78*	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.05	
辛酸甲酯 Methyl octanoate	0.35 ± 0.23	0.77 ± 0.31	0.40 ± 0.23	0.64 ± 0.15	葡萄酒香气, 果味, 橙子 Winy, fruity, orange (谢剑平, 2009; Antalick, 2010)
辛酸乙酯 Ethyl octanoate	0.00 ± 0.00	1.35 ± 0.75**	—	0.67 ± 0.33**	果味, 花香, 葡萄酒—杏子味 Fruity, floral, wine - apricot (Noguerol-Pato et al., 2009; 谢剑平, 2009)
总计 Total	14.48 ± 0.43	65.73 ± 4.9**	28.49 ± 10.49	39.00 ± 2.75	

注: * 表示与野生型对照在 5% 水平上差异显著; ** 在 1% 水平上差异显著。“—” 未检出。
Note: * Means the difference was significant at 5% level compared with wild type control; ** The difference was significant at 1%。“—”Not detected.

3 讨论

采用遗传转化方法进行挥发性成分代谢相关基因的功能研究时,常常需要考虑供转化植株体内是否含有可供利用的底物、底物与基因表达生成的酶在细胞内的分布区域是否一致、生成的产物是否具有挥发性等因素。已报道过的用于香气基因转化的试材主要包括矮牵牛、烟草和番茄等,结果也不尽相同。Luckner 等 (2001) 将 *Clarkia breweri* 的 *S*-柠檬烯合成基因 *lis* 在矮牵牛中过量表达,虽然转基因植株显著增加了非挥发性芳樟醇的积累,但并没有将其转变为挥发性芳樟醇。Guterman 等 (2006) 在矮牵牛中过量表达玫瑰醇乙酰基转移酶基因 *RhAAT*, 使转基因植株产生了 2 种新酯:乙酸苯乙酯和乙酸苯甲酯,并改变了其香气。Beekwilder 等 (2004) 也尝试利用草莓 *SAAT* 转化矮牵牛,却没有成功,不仅转基因植株中没有检测到新酯类物质,而原有的苯甲酸苯甲酯含量也没有得到提高,通过叶片饲喂外源醇发现,这可能是由于矮牵牛体内不存在 *SAAT* 可利用的醇类底物或底物含量少造成的。而李大鹏 (2005) 利用苹果 *MdAAT2* 转化烟草,进行过量表达,引起转基因植株叶片中的挥发性酯类构成发生变化,既增加了已有酯的含量水平,又生成了新的酯类,但在番茄中进行 *MdAAT2* 果实特异性表达时却没有检测到酯类的变化,经推测这可能是由于生成的 *MdAAT2*

酶与底物在细胞内分布于不同的区域造成的。

本研究中借鉴以上研究结果, 采用过量表达的方式, 利用烟草和草莓栽培品种开展野生森林草莓 *FvAATW2* 的功能研究, 结果证明, 这两种供试材料用于 *AAT* 功能研究各有优势。烟草叶片中存在可供草莓 *AAT* 酶催化合成酯类所需的底物, 和草莓遗传转化相比, 转化烟草周期较短, 也更容易进行转基因操作, 即使在植株生长早期 (10 ~ 12 叶), 也能在转基因叶片中检测到新生成的酯, 这有利于加快基因功能研究的进程; 而利用近缘种来研究基因功能, 能提供与原生种更接近的体内代谢环境, 由于用于检测的也是成熟果实, 这使得研究结果更具有说服力, 另外, 还有助于筛选合适的研究对象用于后续研究。

草莓的香气与酯类构成有关 (Dong et al., 2013)。有研究者利用 RNAi 技术下调了 ‘Royal Gala’ 苹果 *AAT1* 表达, 使转基因株系成熟果实的酯类总含量显著下降, 香气明显减弱 (Souleyre et al., 2014)。本研究中, 在相同的栽培条件下, 转入 *FvAATW2* 使草莓栽培品种 ‘Camarosa’ 果实的酯类构成发生了改变, 新生成辛酸乙酯, 已有的 4 种酯比例或/和含量提高, 而另外 1 种酯则下降; 转基因果实中比例和含量提高幅度较大的有乙酸辛酯、己酸乙酯、己酸辛酯、辛酸乙酯等, 这些酯类成分多数都具有令人愉快的花香味和果香味, 它们在总挥发物中所占比例的提高, 可能是转基因果实香气变浓的一个重要原因。

References

- Antalick G, Perello M, Revel G. 2010. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121: 1236 - 1245.
- Beekwilder J, Alvarez-huerta M, Neef E, Verstappen F W A, Bouwmeester H J, Aharoni A. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135: 1865 - 1878.
- Bianchi G, Lovazzano A, Lanubile A, Marocco A. 2014. Aroma quality of fruits of wild and cultivated strawberry (*Fragaria* spp.) in relation to the flavor-related gene expression. *Journal of Horticultural Research*, 22 (1): 77 - 84.
- Dong J, Zhang Y T, Tang X W, Jin W M, Han Z H. 2013. Differences in volatile ester composition between *Fragaria* × *ananassa* and *F. vesca* and implications for strawberry aroma patterns. *Scientia Horticulturae*, 150: 47 - 53.
- Dong Jing, Zhang Yun-tao, Wang Gui-xia, Zhong Chuan-fei, Wang Li-na, Chang Lin-lin. 2014. Expression pattern analysis of strawberry *SAATB2* and *VAATW2* genes. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 23 (12): 149 - 153. (in Chinese)
- 董 静, 张运涛, 王桂霞, 钟传飞, 王丽娜, 常琳琳. 2014. 草莓果实酯类合成关键酶基因 *SAATB2* 和 *VAATW2* 表达特性分析. *西北农业学报*, 23 (12): 149 - 153.
- Forney C F, Kalt W, Jordan M A. 2000. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity, and storage. *HortScience*, 35: 1022 - 1026.
- Guterman I, Masci T, Chen X L, Negre F, Pichersky E, Dudareva N, Weiss D, Vainstein A. 2006. Generation of phenylpropanoids pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers. *Plant Molecular Biology*, 60: 555 - 563.
- Hirvi T, Honkanen E. 1982. The volatiles of two new strawberry cultivars. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 175: 113 - 116.
- Jin W M, Dong J, Hu Y L, Lin H P, Xu X F, Han Z H. 2009. Improved cold-resistant performance in transgenic grape (*Vitis vinifera* L.) overexpressing cold-inducible transcription factors *AtDREB1b*. *HortScience*, 44 (1): 35 - 39.
- Larsen M, Poll L. 1992. Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 195: 120 - 123.
- Li Da-peng. 2005. Expression characterization of the MdAAT2 gene and its regulation mechanism of volatile ester biosynthesis in apple (cv. Golden Delicious). [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University: 87 - 95. (in Chinese)

- 李大鹏. 2005. 苹果醇酰基转移酶基因 *MdAAT2* 参与酯类香气合成调控机理的研究[博士论文]. 泰安: 山东农业大学: 87 – 95.
- Liu Jingxuan, Xu Haifeng, Wang Deyun, Zhang Zongying, Wang Yicheng, Zuo Weifang, Wang Nan, Jiang Shenghui, Mao Zhiqian, Chen Xuesen. 2017. Changes of firmness, aroma, cell wall-modifying enzyme activities and analysis of related-gene expression in 2 red flesh apple strains during fruit storage. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (2): 330 – 342. (in Chinese)
- 刘静轩, 许海峰, 王得云, 张宗营, 王意程, 左卫芳, 王楠, 姜生辉, 毛志泉, 陈学森. 2017. 两个耐贮性不同的红肉苹果株系果实硬度与香气成分及相关酶活性与基因表达差异分析. *园艺学报*, 44 (2): 330 – 342.
- Lucker J, Bouwmeester H J, Schwab W, Blaas J, Plas L H W, Verhoeven H A. 2001. Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside. *Plant Journal*, 27: 315 – 324.
- Negri A S, Allegra D, Simoni L, Rusconi F, Tonelli C, Espen L, Galbiati M. 2015. Comparative analysis of fruit aroma patterns in the domesticated wild strawberries “Produmata di Tortona” (*F. moschata*) and “Regina delle Valli” (*F. vesca*). *Frontiers in Plant Science*, 6: 56, <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00056>.
- Noguerol-Pato R, Gonzalez-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J. 2009. Quantitative determination and characterization of the main odourants of Mencia monovarietal red wines. *Food Chemistry*, 117: 473 – 484.
- Olbricht K, Grafe C, Weiss K, Ulrich D. 2008. Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria* \times *ananassa* Duch. *Plant Breeding*, 127: 87 – 93.
- Perez A G, Olias R, Sanz C, Olias J M. 1992. Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2232 – 2235.
- Pyysalo T, Honkanen E, Hirvi T. 1979. Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated berries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27 (1): 19 – 22.
- Sarrazin E, Dubourdieu D, Darriet P. 2007. Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103: 536 – 545.
- Schieberle P, Hofmann T. 1997. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements after sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 227 – 232.
- Souleyre E J F, Chagne D, Chen X Y, Tomes S, Turner R M, Wang M Y, Maddumage R, Hunt M B, Winz R A, Wiedow C, Hamiaux C, Gardiner S E, Rowan D D, Atkinson R G. 2014. The AAT1 locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to ‘ripe apple’ flavor in ‘Royal Gala’ and ‘Granny Smith’ apples. *The Plant Journal*, 78: 903 – 915.
- Sui Jing, Jiang Yuan-mao, Peng Fu-tian, Guo Ying, Liu Bing-hua, Zhao Feng-xia, Wang Hai-yun. 2007. Development of aroma components and alcohol acyltransferase activity in strawberry fruit during ripening. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1411 – 1417. (in Chinese)
- 隋静, 姜远茂, 彭福田, 国颖, 刘丙花, 赵凤霞, 王海云. 2007. 草莓果实发育过程中芳香物质含量和醇酰基转移酶活性的变化. *园艺学报*, 34 (6): 1411 – 1417.
- Ulrich D, Hoberg E, Rapp A, Kecke S. 1997. Analysis of strawberry flavor-discrimination of aroma types by analysis of volatile compounds. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 205: 218 – 223.
- Ulrich D, Komes D, Olbricht K, Hoberg E. 2007. Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1185 – 1196.
- Wyllie S G, Fellman J K. 2000. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3493 – 3496.
- Xie Jianping. 2009. Tobacco fragrant materials. Beijing: Chemical Industry Press: 261 – 355. (in Chinese)
- 谢剑平. 2009. 烟草香原料. 北京: 化学工业出版社: 261 – 355.
- Zabtakias I, Holden M A. 1997. Strawberry flavor: analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74: 421 – 434.
- Zhang Shang-long, Chen Kun-song. 2007. Molecular physiology of fruit quality development and regulation. Beijing: China Agriculture Press: 184 – 192. (in Chinese)
- 张上隆, 陈昆松. 2007. 果实品质形成与调控的分子生理. 北京: 中国农业出版社: 184 – 192.