

烤烟烟碱转运蛋白基因与烟碱积累的相关性研究

尹鹏嘉^{1,2}, 任 民¹, 陈爱国¹, 孙 鑫³, 周世奇^{1,2}, 张 玉¹,
罗成刚¹, 杨爱国¹, 徐宗昌¹, 文柳璿^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 农业农村部科技发展中心, 北京 100081)

摘 要: 解析烟碱转运相关基因对烟碱积累的影响, 可为定向改良烟碱性状提供理论指导。本研究对 7 份烟碱含量不同的烤烟进行水培, 检测打顶前后烟碱含量、烟碱合成基因 (*NtPMT*、*NtQPT*)、烟碱转运基因 (*NtNUP1*、*NtJAT1/2*、*NtMATE1/2*) 以及囊泡运输调节基因 (*NtGEF*) 的表达量变化。经相关分析、主成分分析和相关网络分析表明: (1) 烟碱合成基因 *NtPMT*、*NtQPT* 与烟碱转运基因 *NtNUP1*、*NtMATE1/2* 相互促进表达; (2) 根部和叶部的主效烟碱转运基因中, *NtJAT1* 是腰叶的主要烟碱转运基因, *NtNUP1*、*NtJAT1*、*NtMATE1/2* 在根部对烟碱转运都有贡献, 且转运效率依次递减; (3) 囊泡运输调节因子 *NtGEF* 也能间接影响叶部烟碱积累。因此, 在对烟碱性状进行定向改良时, 可考虑烟碱合成、转运以及囊泡运输调节因子对烟碱积累的贡献大小。

关键词: 烤烟; 转运基因; 烟碱积累; 相关性

中图分类号: S572.03

文章编号: 1007-5119 (2018) 05-0025-08

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2018.05.004

Study on the Correlation between Nicotine Accumulation and Nicotine Transporter Genes in Flue-cured Tobacco

YIN Pengjia^{1,2}, REN Min¹, CHEN Aiguo¹, SUN Xin³, ZHOU Shiqi^{1,2}, ZHANG Yu¹,
LUO Chenggang¹, YANG Aiguo¹, XU Zongchang¹, WEN Liuying^{1*}

(1. Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tobacco Gene Resources, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School, CAAS, Beijing 100081, China; 3. Development Center for Science and Technology Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R., Beijing 100081, China)

Abstract: In order to provide theoretical guidance for high quality tobacco breeding, analysis of contribution from nicotine transport related factors to nicotine accumulation was conducted. Seven flue-cured tobacco germplasms with different nicotine contents were planted in hydroponics devices and were treated by topping. The nicotine content, and expression levels of 2 key nicotine biosynthetic genes (*NtPMT*, *NtQPT*) and 3 transporters genes (*NtNUP1*, *NtMATE1/2*, *NtJAT1/2*) and a vesicular traffic regulator gene (*NtGEF*) were detected and analyzed. Correlation analysis, principal component analysis and related network analysis were conducted. The results showed that: (1) expression of nicotinic biosynthetic genes (*NtPMT* and *NtQPT*) and nicotine transporter genes (*NtNUP1* and *NtMATE1/2*) was promoted by each other; (2) nicotine transporter genes that play dominant roles in leaves and roots were different. *NtJAT1* was the dominant transporter in middle leaves; *NtNUP1*, *NtJAT1* and *NtMATE1/2* genes were the main genes of nicotine transportation in the root, with their transporting efficiency decreased in the above listed order; (3) the vesicular traffic regulator gene (*NtGEF*) also indirectly affected the accumulation of nicotine in middle leaves. Therefore, when seeking directional improvement for nicotine content, breeders should consider the influence of nicotine synthesis genes, transporter genes and vesicle transport regulatory factors on nicotine accumulation.

Keywords: flue-cured tobacco; transport efficiency; nicotine accumulation; expression analysis

烟碱是烟草的重要品质性状之一, 解析烟碱合成转运基因对烟碱转运积累的影响, 可为烟草品质定向改良提供理论指导。烟碱在烟草根部合成, 通过木质部运输到地上部分, 多数储存在叶肉细胞的

基金项目: 山东省自然科学基金“胞内运输调节因子 *NtGEF* 调控烟碱转运蛋白的机制研究”(ZR2016CB39); 中国农业科学院烟草研究所青年科学基金“胞内运输调节因子 *GEF* 的功能研究”(2015A01); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-TRIC01)

作者简介: 尹鹏嘉(1990-), 男, 硕士, 研究方向为烟草遗传育种。E-mail: strength2011@sina.cn。*通信作者, E-mail: wenliuying@caas.cn

收稿日期: 2018-02-13

修回日期: 2018-07-30

液泡中^[1-2]。烟碱的合成积累受到多种因素影响,其中遗传是主要因素。目前,已报道5种转运蛋白具有转运烟碱的功能。研究表明,烟碱转运蛋白 NtNUP1 定位于质膜上,在根尖中较强表达,对烟碱转运有很高的特异性;NtNUP1 主要负责将胞质外体的烟碱转运至胞质内,从而维持根部烟碱平衡^[3-4]。其余4个转运蛋白属于多药与毒素外排家族 (Multidrug and Toxic Compound Extrusion, MATE),除转运烟碱外还转运其他底物。SHOJI 等^[5]研究发现,位于烟草根部液泡膜上的烟碱转运蛋白 NtMATE1/2 调控根部液泡内烟碱的平衡。MORITA 等^[6]发现位于液泡膜上的烟碱转运蛋白 NtJAT1 在根、茎、叶中都有表达,特别在绿叶中表达显著, NtJAT1 主要负责烟碱与质子转运。另一种 MATE 家族的烟碱转运蛋白 NtJAT2 在叶片中特异性表达,定位于叶部液泡膜上^[7]。烟碱在根部合成的过程主要受 *NtPMT*、*NtQPT* 两个关键基因调控^[8-11]。此外,多数蛋白质通过囊泡运输实现在细胞内的分选和定位,而鸟苷酸交换因子 GEF 具有激活 Rab5 蛋白的功能,可以调节蛋白质从高尔基到液泡的运输^[12],因此推测 *NtGEF* 基因可能参与转运蛋白的亚细胞定位,进而影响烟碱的转运积累。

虽然已知烟草中 *NtGEF*、*NtNUP1*、*NtMATE1/2*、*NtJAT1/2* 等多个因子直接或者间接地参与了烟碱的转运,但是这些基因对烟碱积累的贡献大小以及其烟碱转运效率的关系如何还未见报道。本研究采用分子生物技术及多种统计分析方法对7个烤烟品种的烟碱含量与烟碱转运、合成相关基因进行检测并分析,旨在为定向培育高烟碱品质烟草的育种工作提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

7份不同烟碱含量的烤烟品系种质资源(长葛柳叶,09-53,NCTG-61,9201,大柳条,OX2028,K326)由国家烟草种质资源中期库提供。其中高烟碱烤烟品种3份,低烟碱烤烟品种3份,对照采用全国主栽培品种 K326。

1.2 试验时间、地点

本试验于2016—2017年在中国农业科学院烟草研究所进行,试验材料苗期在人工气候培养室培养[平均气温(25±2)℃,相对湿度(60±5)% ,光照12h、黑暗12h],移栽期至成熟期在温室培养[平均气温(28±2)℃,相对湿度(50±5)% ,光照12h、黑暗12h]。

1.3 试验方法

1.3.1 水培装置与营养液的制备 试验材料苗期与成熟期的培养均采用水培,水培营养液采用 Hoagland 全营养液,培养方式采用泡沫板漂浮培养,水培设备及布局参照专利标准^[13]。

1.3.2 样品采集及烟碱含量的测定 分别在打顶前和打顶后20d,选择生长状态一致的烟株,并对烟株的腰叶、根部进行取样,每3株混合为一个样本,取3次生物学重复,用锡箔纸包裹后放入液氮,分别用于RNA提取和冷冻干燥。同时把采收的鲜烟叶用105℃杀青30min并烘干^[14],制成烟叶样品。杀青后烟叶样品烟碱含量测定在农业部烟草产业产品质量监督检验测试中心进行,检测方法参照行业标准YC/T217—2007,计算打顶后烟碱含量的增加量(Y)。

1.3.3 RNA的提取及qRT-PCR检测 用RNAiso Plus (Takara, Code No.: 9108)提取烟叶和烟根的总RNA,并用凝胶电泳和超微量分光光度计检测RNA的浓度和质量,采用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Code No.: RR047)将总RNA反转录成cDNA,稀释5倍后利用SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara, Code No.: RR820)在荧光定量PCR仪ABI 7500上进行qRT-PCR分析,其扩增程序参考文章标准^[15],每个样品做3次技术重复。实验中各个基因的特异引物见表2,其中*NtMATE1/2*、*NtJAT2*、*NtGEF*基因引物用Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计,*NtPMT*、*NtQPT*、*NtJAT1*、*NtNUP1*基因引物参考文献^[4,6,16]。内参基因*NtActin*引物参照ZHANG等^[16]文章。

表 1 用于荧光定量 PCR 验证的基因及引物

Table 1 Genes and primers used in qRT-PCR

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	前后引物 Forward (F) or reverse (R) primer	引物序列 Sequence from 5' to 3'
<i>NtActin</i>	AB026056	F R	CCACACAGGTGTGATGGTTG GTGGCTAACACCATCACCAG
<i>NtNUP1</i>	GU174267	F R	TTGGTTACAAACGGGTGGAT AAAATTCGGGGTGTTCATCAA
<i>NtQPT</i>	AB038494	F R	GACGCATTCCGTGAAAGCAC AAGTAATGGCGCTCATGCTC
<i>NtPMT</i>	AF126812	F R	CCAGGCTTAATAGAGTTGGA AAAATGGCACTTCTGAACAC
<i>NtJAT1</i>	AM991692	F R	AGGGCTGGTGGTGGTATGG CCACAACACACAGATTGGTATGC
<i>NtJAT2</i>	AB922128	F R	GCGAACTTCGGAGTTATGGGA GGGGACTAGCAGTTTTCTCCG
<i>NtGEF</i>	XM_016659283	F R	TACAGGGCACCAAGGGACA TTGCCGCCTAAACCTTTGTA
<i>NtMATE1/2</i>	AB286962/AB286961	F R	GTTATTCTGCTTTGGGTTACATTCCG ATTCTTGTTTAGAGGTCCTTTTAGG

1.4 数据分析

采用 Excel 2013 进行主成分分析数据标准化^[17]处理, 计算平均值、标准差及变异系数, 实时荧光定量 PCR 数据计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算^[18], 用 Graph Prism 软件中的 Tukey 法进行单因素方差分析, 采用 SAS 9.2^[19-21]数据处理系统进行相关分析、主成分分析等统计分析, 用 UCINET6.0 软件^[22]作烟碱与基因及基因之间的相关网络图。

2 结果

2.1 打顶前后腰叶烟碱含量差异分析

由表 2 可以看出, 在打顶后, 腰叶烟碱含量均有不同程度的升高, 说明打顶这一农艺措施对烟草烟碱的产生与积累具有积极的诱导作用。打顶后供试品种腰叶烟碱含量变异系数达 54.55%, 高于打顶

前的烟碱含量变异系数 47.05%, 而打顶后的烟碱含量增加量的变异系数更是达到了 80.96%, 说明打顶后烤烟品种的烟碱含量开始急剧增加, 不同烟碱种质烤烟的烟碱含量也是在打顶后才开始出现明显的变化。在打顶后, 大柳条的烟碱含量增幅最大, OX2028、09-53 次之, 说明烤烟烟碱含量受品种因素的影响较大。以上结果说明, 打顶前后各个烤烟品种之间烟碱含量变异丰富, 反映出不同品种的真实变化, 可代表田间烤烟品种用于烟碱增量与烟碱基因表达的相关性分析。

2.2 打顶前后腰叶及根部烟碱基因表达量分析

分别对腰叶与根部 2 个组织的烟碱合成、转运相关基因表达量检测, 并计算打顶后相对于打顶前的相对表达量, 用单因素方差分析法对差异显著的

表 2 供试品种的烟碱含量表现值

Table 2 Nicotine content analysis of tested germplasm

烟碱类型 Nicotine type	品种 Variety	种质类型 Germplasm type	腰叶烟碱含量 Nicotine content of middle leaf/ (mg·g ⁻¹)			增幅 Increase/%
			打顶前	打顶后	Y (打顶后-打顶前)	
			Before topping	After topping	Y (After-Before)	
高烟碱 High nicotine	长葛柳叶	地方	2.70	5.53	2.83	104.81
	09-53	选育	2.27	5.41	3.14	138.33
	NCTG-61	引进	1.84	2.60	0.76	41.30
低烟碱 Low nicotine	9201	选育	2.09	2.14	0.05	2.39
	大柳条	地方	0.51	1.45	0.94	184.31
	OX2028	引进	0.59	1.49	0.90	152.54
对照 Control	K326	引进	1.48	2.20	0.72	48.65
平均数 Average/(mg·g ⁻¹)			1.64	2.97	1.34	
标准差 SD			0.77	1.62	1.08	
变异系数 CV/%			47.05	54.55	80.96	

基因进行标识(表3)。结果表明,在成熟期叶部,打顶后的各个与烟碱代谢相关的基因相对打顶前表达量大部分上调,可以根据叶部5个基因的表达情况,把5个基因分成2类,第1类基因(*NiGEF*、*NiJAT2*、*NiNUP1*)在各供试品种中表达量均上调显著;第2类基因(*NiQPT*、*NiJAT1*)在各试验材料中既有上调也有下调表达,但多为上调表达。在

成熟期根部,打顶后的各个与烟碱代谢相关的基因相对打顶前表达量既有上调也有下调,可以根据叶部7个基因的表达情况,把7个基因分成2类,第1类基因(*NiJAT2*、*NiPMT*、*NiNUP1*、*NiGEF*)在除NCTG-61外的供试品种中均为上调表达,第2类基因(*NiJAT1*、*NiMATE1/2*、*NiQPT*)供试品种中既有上调表达也有下调表达。

表3 打顶前后腰叶与根部烟碱相关基因相对表达量

Table 3 The relative expression of nicotine related gene after and before topping in middle leaf and root

品种 Variety	腰叶 middle leaf					根部 Root						
	<i>NiQPT</i>	<i>NiNUP1</i>	<i>NiJAT1</i>	<i>NiJAT2</i>	<i>NiGEF</i>	<i>NiPMT</i>	<i>NiQPT</i>	<i>NiMATE1/2</i>	<i>NiGEF</i>	<i>NiNUP1</i>	<i>NiJAT1</i>	<i>NiJAT2</i>
K326	0.90	1.95**	2.63**	1.08	1.36*	1.27**	0.10**	0.07**	8.33**	12.88**	0.44**	29.04**
长葛柳叶	0.01**	4.68**	2.95**	79.17**	2.33**	1.19	31.10**	5.92**	23.97**	21.44**	0.63**	2.24**
09-53	2.48**	1.16	1.56**	63.92**	3.57**	0.20**	6.68**	0.64**	0.05**	0.02**	0.34**	0.09**
NCTG-61	9.63**	4.75**	4.75**	4.07**	27.61**	18.04**	0.00**	0.44**	5.50**	47.88**	0.64**	4.18**
9201	1.84**	2.30**	1.41**	66.83**	2.24**	1.74*	0.01**	0.02**	1.56**	0.59**	0.32**	12.03**
大柳条	9.65**	26.49**	0.94	39.66**	17.72**	1.34*	0.00**	0.19**	1.38**	1.34**	0.09**	1.19
OX2028	0.10**	1.82**	1.05	1.19	2.77**	1.21*	22.98**	5.40**	1.55**	0.28**	0.85	2.37**

注:表中数字>1表示打顶后上调表达,表中数字<1表示打顶后下调表达;*和**分别代表p=0.05和p=0.01显著水平。

Note: After topping expression value >1 Indicates up expressed, expression value <1 Indicates down expressed; * and ** Indicate significant difference between before and after topping at 0.05 and 0.01 level respectively.

2.3 腰叶烟碱增量与叶部烟碱相关基因相关分析

对供试烤烟品种腰叶烟碱增量及5个烟碱转运、合成基因的简单相关分析(表4)表明,烟碱增加量(Y)只与*NiJAT1*呈显著正相关。意味着腰叶中,烟碱转运蛋白基因中可能只有*NiJAT1*的表达起主要作用,且*NiJAT1*转运烟碱的贡献多于*NiJAT2*。此外,*NiGEF*与*NiQPT*呈极显著正相关,说明在腰叶中,囊泡运输调节因子*NiGEF*与烟碱合成基因*NiQPT*的表达相互促进。由此可见,叶部烟碱相关基因之间也存在显著的相关关系,所以仅根据简单相关分析不能完全揭示其内部真实性关系。

表4 腰叶烟碱增量与烟碱相关基因简单相关系数

Table 4 Simple correlation coefficient between nicotine content and its related genes in middle leaves

Factors	Y	<i>NiQPT</i>	<i>NiNUP1</i>	<i>NiJAT1</i>	<i>NiJAT2</i>
<i>NiQPT</i>	0.0725				
<i>NiNUP1</i>	-0.3470	0.6820			
<i>NiJAT1</i>	0.8602*	0.2861	-0.2810		
<i>NiJAT2</i>	0.0342	-0.2210	0.0509	-0.2520	
<i>NiGEF</i>	0.3545	0.9429**	0.4881	0.5228	-0.3418

注:*和**分别代表p=0.05和p=0.01差异显著,下同。

Note: * and ** Indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level respectively. The same below.

2.4 腰叶烟碱增量与叶部烟碱相关基因的主成分分析

为对腰叶烟碱增量与基因表达量原始数据进行降维及防范基因之间多重共线性,采用主成分分析法对烟碱含量及烟碱合成、转运基因进行分析(表5)。结果表明,影响烟碱增量的前2个主成分共同解释了所有综合信息的79.21%,且特征值均大于1,因此,可初步用于筛选影响烟碱增量的基因。

由表5可知,主成分1特征向量中载荷较高的主成分为*NiQPT*与*NiGEF*且符号与烟碱增量(Y)相同,说明腰叶中,*NiQPT*和*NiGEF*表达量变化越大烟碱增量也越大。*NiQPT*的原始变量对主成分1的影响程度为0.9684,大于*NiGEF*,表明*NiQPT*

表5 叶部主分量基因的特征值、贡献率、累计贡献率

Table 5 Characteristic values, contribution rate and cumulative proportion of the principal gene components in leaves

Factors	Prin1	Prin2
Y	0.055 5	0.973 8
<i>NiQPT</i>	0.968 4	0.062 6
<i>NiNUP1</i>	0.570 5	-0.316 0
<i>NiJAT1</i>	0.234 9	0.911 2
<i>NiJAT2</i>	-0.145 4	-0.033 4
<i>NiGEF</i>	0.909 5	0.332 9
特征值 Characteristic values (E)	2.719 8	2.012 3
贡献率 Contribution rate CR/%	45.52	33.68
累计贡献率 Cumulative proportion CP/%	45.52	79.21

对烟碱增量的贡献大于 *NtGEF*。主成分 2 的特征向量中载荷较高的主成分为 *NtJAT1*，说明腰叶中，烟碱转运蛋白 *NtJAT1* 的基因表达量变化对烟碱增量影响也较大。此外，主成分 1 的贡献率大于主成分 2 的，说明腰叶中 *NtGEF*、*NtQPT* 的表达变化对烟碱增量的影响大于 *NtJAT1*。

2.5 腰叶烟碱增量与根部烟碱相关基因分析

对供试烤烟品种腰叶烟碱增量与根部 7 个烟碱转运、合成基因进行简单相关分析(表 6)，烟碱合成基因 *NtNUP1* 与烟碱增量 (*Y*) 呈显著正相关 (0.8493)，说明 *NtNUP1* 对烟碱积累的直接影响显著。另外，*NtMATE1/2* 与 *NtQPT* 呈极显著正相关，*NtNUP1* 与 *NtPMT* 也呈显著正相关，相关系数达 0.8887，说明在烤烟根部的烟碱转运基因(*NtNUP1*、*NtMATE1/2*) 与烟碱合成基因 (*NtPMT*、*NtQPT*) 的表达相互促进。可见根部烟碱相关基因之间也存在显著的相关关系，所以仅根据简单相关分析不能完全揭示其内部真实性关系。

表 6 腰叶烟碱增量与根部烟碱相关基因的简单相关系数
Table 6 Simple correlation coefficient of nicotine content in middle leaves and nicotine related gene expression in roots

Factor	<i>Y</i>	<i>NtPMT</i>	<i>NtQPT</i>	<i>NtMATE1/2</i>	<i>NtNUP1</i>	<i>NtJAT1</i>
<i>NtPMT</i>	0.6003					
<i>NtQPT</i>	0.3075	-0.3031				
<i>NtMATE1/2</i>	0.2704	-0.2292	0.9830**			
<i>NtGEF</i>	0.5267	0.1162	0.4634	0.4973		
<i>NtNUP1</i>	0.8493*	0.8887**	-0.0429	-0.0078	0.4486	
<i>NtJAT1</i>	0.3234	0.2891	0.6433	0.7176	0.3523	0.3873
<i>NtJAT2</i>	-0.2676	-0.1062	-0.3928	-0.3783	0.2143	0.0133 -0.0820

2.6 腰叶烟碱增量及根部烟碱相关基因的主成分分析

为了排除不同基因之间的相关关系对烟碱增量的间接影响，采用主成分分析方法对其进行分析(表 7)。结果表明，影响腰叶烟碱含量变化的前 3 个主成分共同解释了所有综合信息的 90.61%，且特征值均大于 1。因此，可初步用于筛选影响烟碱增量的在根部表达的烟碱相关基因。

由表 7 可知，主成分 1 的特征向量中载荷量较高的主成分为 *NtPMT*、*NtNUP1*，且符号与打顶前后腰叶烟碱增加量 (*Y*) 相同，说明在打顶后根部

NtPMT、*NtNUP1* 表达量上调倍数越高则腰叶烟碱增量也越大；主成分 2 的特征向量中载荷较高的主成分为 *NtJAT1*、*NtMATE1/2*，且符号与打顶前后腰叶烟碱增量 (*Y*) 相同，说明打顶后根部 *NtJAT1*、*NtMATE1/2* 的表达量变化越大，则腰叶烟碱增量也越大；主成分 3 的特征向量中载荷较高的主成分为 *NtGEF* (0.937 9)，且符号与打顶前后腰叶烟碱增量 (*Y*) 相同，说明在根部 *NtGEF* 的表达量倍数变化越大，腰叶烟碱积累量也越大。此外，主成分 1 的贡献率为 46.21%>主成分 2 (30.68%)>主成分 3 (13.72%)，说明主成分 1 至主成分 3 对原始变量的解释力度依次减弱，意味着这些基因对腰叶烟碱增量的贡献降低，从大到小依次为根部 *NtPMT*、*NtNUP1* 的表达量变化效应大于 *NtMATE1/2*、*NtJAT1* 的，继而大于 *NtGEF* 的。而主成分 1 的原始变量中 *NtPMT* 对主成分 1 的影响系数为 0.975 7，大于 *NtNUP1* (0.965 9)，在主成分 2 的原始变量中，*NtJAT1* 对主成分 2 的影响系数为 0.924 2，大于 *NtMATE1/2* (0.855 3)。说明根部烟碱合成基因 *NtPMT* 对腰叶烟碱增量的贡献大于 *NtNUP1*，烟碱转运基因 *NtJAT1* 对腰叶烟碱增量的贡献大于 *NtMATE1/2*。

2.7 腰叶烟碱增量及烟碱相关基因的网络关系

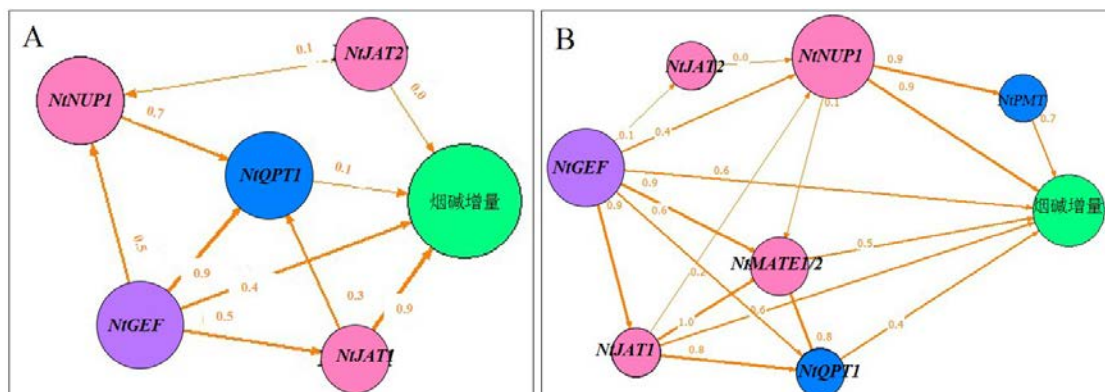
为了更加清晰准确地展现腰叶烟碱增量与烟碱转运、合成基因的关系以及各个因子之间的关系，基于简单相关系数，用 UCINET 6.0 分析软件制作

表 7 根部主成分基因的特征值、贡献率、累计贡献率
Table 7 Characteristic values, contribution rate and cumulative proportion of the principal gene components in roots

Factors	Prin1	Prin2	Prin3
<i>Y</i>	0.802 1	0.312 2	0.433 3
<i>NtPMT</i>	0.975 7	-0.063 7	-0.194 5
<i>NtQPT</i>	-0.174 4	0.788 0	0.502 6
<i>NtMATE1/2</i>	-0.118 1	0.855 3	0.410 2
<i>NtGEF</i>	0.189 8	0.278 1	0.937 9
<i>NtNUP1</i>	0.965 9	0.033 4	0.236 3
<i>NtJAT1</i>	0.364 9	0.924 2	-0.002 3
<i>NtJAT2</i>	-0.056 3	-0.147 9	0.035 7
特征值 Characteristic values (E)	3.696 7	2.454 7	1.097 6
贡献率 Contribution rate (CR)/%	46.21	30.68	13.72
累计贡献率	46.21	76.89	90.61
Cumulative proportion(CP)/%			

腰叶烟碱增量及烟碱转运蛋白基因、烟碱合成基因之间的相关网络图(图 1A, B)。从分析结果来看,不同的节点有着不同的属性,节点间有着丰富的关系属性。在腰叶的相关网络图中,入度较高的节点即在整个腰叶烟碱积累中,有较高影响力的节点。图中烟碱增量(indegree=4)、*NtQPT*(indegree=3),说明 *NtQPT* 在腰叶的烟碱积累过程中有较大贡献。接近中心度最小的点为 *NtQPT*(closeness=20)、*NtGEF*(closeness=20),说明 2 个基因在网络中独立性最强,其表达不易受到其他基因的影响。而出度最高的是 *NtGEF*(outdegree=4),说明 *NtGEF* 是此网络中与其他基因表达有交互作用最多的点。在与烟碱有交互的基因中,*NtJAT1* 的交互强度最高,达到 0.9,说明 *NtJAT1* 是腰叶中最主要的烟碱转运基因,而 *NtJAT2* 对烟碱的转运效率最低。

从图 1B 中可以看出,在根部的烟碱合成及转运的网络中,入度较高的节点即在整个腰叶烟碱积累过程中有较高影响力的节点有烟碱增量(indegree=6)、*NtMATE1/2*(indegree=4)、*NtNUP1*(indegree=3),说明 *NtMATE1/2*、*NtNUP1* 在烟碱转运积累过程中有较大作用。接近中心度最小的点为 *NtNUP1*(closeness=26)、*NtGEF*(closeness=26),说明 2 个基因在网络中独立性最强,其表达不易受到其他点的影响。而出度最高的点是 *NtGEF*(outdegree=6),说明 *NtGEF* 是此网络中与其他基因表达有交互作用最多的点,*NtGEF* 与 *NtMATE1/2*、*NtJAT1* 的交互强度为 0.9,说明 *NtGEF* 对 2 个基因的表达影响最大。此外,与烟碱增量有交互作用的烟碱转运基因中,*NtNUP1* 交互强度最高达 0.9,说明根部 *NtNUP1* 转运烟碱的效率最高,*NtJAT1*、*NtMATE1/2* 次之。



注: A, 腰叶中的相关网络图; B, 根部的相关网络图。Note: A, related network map in middle leaf; B, related network map in root.

图 1 腰叶烟碱增量及烟碱转运、合成基因的相关网络图

Fig. 1 Related network map of nicotine increment and biosynthetic genes, transporter genes

3 讨论

3.1 创伤影响烟碱相关基因表达

创伤可诱导烟碱转运,合成基因上调表达^[6]。为避免根部损伤导致烟碱相关基因表达变化,本研究采用新型水培循环系统,对高低烟碱烤烟品种进行种植。在该试验条件下,7个烤烟品种打顶后的叶部烟碱含量相比于打顶前均增高,说明用温室水培体系培养的烟草也表现出田间烟草植株积累烟碱的规律^[23-26],这为分析烟碱相关基因的表达提供稳定的检测环境。

3.2 在叶部表达且对烟碱积累有影响的基因

对烟草腰叶中烟碱积累与打顶前后相关基因表达差异分析显示,腰叶中 *NtJAT1*、*NtQPT*、*NtGEF* 3 个基因是影响腰叶中烟碱增量的主要因子,*NtJAT1* 是腰叶中最主要转运烟碱的基因。张震彪等^[27]报道腰叶在落黄过程中,转运蛋白 *NtJAT1* 表达上调,本研究中 *NtJAT1* 基因在 7 个品种的腰叶中均为上调表达,进一步说明在不同烟草品种中,*NtJAT1* 基因对腰叶中烟碱积累均起到首要作用。

3.3 在根部表达且对烟碱积累有影响的基因

烤烟根部是烟碱合成和起始转运的主要器官,共筛选出 5 个影响烟碱增量的主要因子,分别为

NtPMT、*NtNUP1*、*NtJAT1*、*NtMATE1/2*、*NtGEF*。烟碱合成基因 *NtPMT* 的表达对烟碱增量的贡献大于 3 个烟碱转运基因(*NtNUP1*、*NtMATE1/2*、*NtJAT1*) 和囊泡运输调节因子(*NtGEF*)。而 KATO 等^[4]的研究表明 *NtNUP1* 是根部最主要的转运基因。本研究中,在根部 3 个烟碱转运基因中,*NtNUP1* 对烟碱的增加贡献最高,且表达量与腰叶烟碱增量呈极显著正相关。这进一步证明不同烟草品种间,根部 *NtNUP1* 基因对烟碱积累均起到首要作用。

本研究中烟草中囊泡运输调节因子(*NtGEF*)的基因表达对腰叶烟碱增量也有影响。已报道水稻 OsGEF 蛋白对去向液泡的蛋白运输具有显著的调控作用^[28],而本研究中根部 *NtGEF* 与几个烟碱转运基因有交互作用,并且 *NtGEF* 对 *NtMATE1/2*、*NtJAT1* 2 个基因的表达影响最大,推测 *NtGEF* 可能通过介导烟碱转运蛋白(*MATE1/2*、*NtJAT1*)的定位来影响烟碱的积累。由此可推测,除已报道的烟碱合成、代谢途径基因之外,还有其他未知因子参与烟碱积累。

3.4 遗传对烟碱积累和相关基因的影响

品种遗传背景是影响烟碱含量的主要因素^[30-31],不同烟碱含量的 7 个烟草品种,打顶前、后的烟碱含量在品种间增加差异较大。同时烟碱相关基因的表达量变化幅度在不同品种间表现不一致,这可能与各品种遗传背景有很大关系。揭示影响烟碱积累遗传因子还需要持续深入研究。

目前我国烟叶生产普遍存在上部叶烟碱含量偏高的问题,影响烟叶的利用。并且,随着电子烟市场的逐渐开发,对高烟碱含量烟叶的需求不断加大。本研究对烟碱合成及转运基因对烟碱积累贡献的差异进行分析,研究结果可为早期高烟碱品种的分子选育提供可用的基因资源,也为烟草叶片的烟碱积累调控提供理论指导。

4 结 论

不同烟碱相关基因对烟碱增量的贡献程度不同。叶部 *NtJAT1*、*NtQPT*、*NtGEF* 是影响烟碱积累 3 个主要基因,且 *NtJAT1* 是叶部影响烟碱转运

的主要基因。根部 *NtPMT*、*NtNUP1*、*NtJAT1*、*NtMATE1/2*、*NtGEF* 5 个基因影响烟碱积累,其中烟碱合成基因 *NtPMT* 对烟碱增量影响最大,且 *NtNUP1* 是根部最主要的烟碱转运基因。囊泡运输调节因子 *NtGEF* 在叶部和根部对烟碱积累都有影响。

参考文献

- [1] DAWSON R F. Nicotine synthesis in excised tobacco roots [J]. American Journal of Botany, 1942, 29(10): 813-815.
- [2] THURSTON R, SMITH W T, COOPER B P. Alkaloid secretion by trichomes of nicotiana species and resistance to aphids[J]. Entomologia Experimentalis Et Applicata, 2011, 9(4): 428-432.
- [3] HILDRETH S B, GEHMAN E A, YANG H, et al. Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(44): 18179-18184.
- [4] KATO K, SHOJI T, HASHIMOTO T. Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway[J]. Plant Physiology, 2014, 166(4): 2195-2204.
- [5] SHOJI T, INAI K, YAZAKI Y, et al. Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots[J]. Plant Physiology, 2009,149(2): 708-718.
- [6] MORITA M, SHITAN N, SAWADA K, et al. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *nicotiana tabacum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(7): 2447-2452.
- [7] SHITAN N, MINAMI S, MORITA M, et al. Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*[J]. PloS One, 2014, 9(9): e108789.
- [8] CHATTOPADHYAY M K, GHOSH B. Molecular analysis of polyamine biosynthesis in higher plants[J]. Current Science, 1998, 74(6): 517-522.
- [9] CHOU W M, KUTCHAN T M. Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 1998, 15(3): 289-300.
- [10] KUTCHAN T M. Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants[J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1059-1070.
- [11] WAGNER R, FETH F, WAGNER K G. The pyridine-nucleotide cycle in tobacco: Enzyme activities for the recycling of NAD [J]. Planta, 1986, 167(2): 226-232.
- [12] 文柳瓊. 烟草 Rab5 鸟苷酸交换因子 GEF 的鉴定与分析 [C]//中国作物学会. 第六届全国小麦基因组学及分子

- 育种大会论文集. 北京: 中国作物学会, 2015.
- WEN L Y. Identification and analysis of tobacco Rab5 guanylic acid exchange factor GEF[C]//The Crop Science Society of China. Proceedings of the Sixth National Wheat Genomics and Molecular Breeding Conference. Beijing: The Crop Science Society of China, 2015.
- [13] 文柳瓔, 任民, 罗成刚, 等. 大规模开展烟草次生代谢物表型鉴定的水培设备及方法: 中国, 106973773A [P]. 2017-07-25.
- WEN L Y, REN M, LUO C G, et al. Hydroponic equipment and method for large-scale phenotypic identification of tobacco secondary metabolites: China, 106973773A [P]. 2017-07-25.
- [14] 陶晓秋, 黄玫. 青育方法对烟叶化学成分影响的研究[J]. 现代农业科技, 2008(16): 180-183.
- TAO X Q, HUANG M. Study on the influence of greening methods on the chemical components of tobacco leaves[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(16): 180-183.
- [15] 盖小雷, 刘艳华, 姚志敏, 等. 烟草茄尼醇积累与萜类关键酶基因表达的相关性[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(1): 8-14.
- GAI X L, LIU Y H, YAO Z M, et al. Study on the Correlation between solanesol accumulation and expression of gene encoding terpenoid synthetic enzymes in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(1): 8-14.
- [16] ZHANG H B, BOKOWIEC M T, RUSHTON P J, et al. Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NuJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis[J]. Molecular Plant, 2012, 5(1): 73-84.
- [17] 向长萍, 谢军, 聂启军, 等. 23个苦瓜品种(系)农艺性状的主成分分析[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 378-381.
- XIANG C P, XIE J, NIE Q J, et al. Principal component analysis on characters of balsam pear[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2001, 20(4): 378-381.
- [18] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [19] 杜强, 贾丽艳. SAS 统计分析标准教程[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2010.
- DU Q, JIA L Y. SAS Statistical Analysis Standard Guide[M]. Beijing: People Post Press, 2010.
- [20] 夏坤庄. 深入解析 SAS [M]. 北京: 机械工业出版社, 2015.
- XIA K Z. In-depth analysis of SAS[M]. Beijing: Machinery Industry Press, 2015.
- [21] 焦健, 高庆荣, 王大伟, 等. 不同小麦雄性不育类型光合速率的影响因子分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1622-1629.
- JIAO J, GAO Q R, WANG D W, et al. Analysis on factors affecting photosynthetic rate in different male sterility lines of wheat[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(6): 1622-1629.
- [22] Borgatti S P, Everett M G, Freeman L C. Ucinet[M]. New York: Springer, 2014.
- [23] 张丹, 刘国顺, 章建新, 等. 打顶时期对烤烟根系活力及烟碱积累规律的影响[J]. 中国烟草科学, 2006, 27(1): 38-41.
- ZHANG D, LIU G S, ZHANG J X, et al. Effect of different topping time on activity of root system and accumulation of nicotine in tobacco plants[J]. Chinese Tobacco Science, 2006, 27(1): 38-41.
- [24] 范江, 杨继洪, 王守旗, 等. 打顶对烤烟生长和各器官烟碱积累分配的影响[J]. 作物研究, 2016, 30(1): 36-40.
- FAN J, YANG J H, WANG S Q, et al. Effect of topping on growth of flue-cured tobacco and nicotine accumulation and distribution in different organs[J]. Crop Research, 2016, 30(1): 36-40.
- [25] 刘华山, 田效园, 韩锦峰, 等. 烟草对机械伤害的响应[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(3): 58-62.
- LIU H S, TIAN X Y, HAN J F, et al. Tobacco response to the mechanical wounding[J]. Chinese Tobacco Science, 2009, 30(3): 58-62.
- [26] 招启柏, 汤一卒, 王广志. 烤烟烟碱合成及农艺调节效应研究进展[J]. 中国烟草科学, 2005, 26(4): 19-22.
- ZHAO Q B, TANG Y Z, WANG G Z. The review on studies of nicotine synthesis and roles of agronomic regulation in flue-cured tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2005, 26(4): 19-22.
- [27] 张震彪, 李伟, 杜咏梅, 等. 烟叶落黄过程中烟碱代谢规律及相关基因表达分析[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(6): 91-97.
- ZHANG Z B, LI W DU Y M, et al. Analysis of nicotine metabolism and related gene expression during senescence of tobacco leaves[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(6): 91-97.
- [28] WEN L, FUKUDA M, SUNADA M, et al. Guanine nucleotide exchange factor 2 for Rab5 proteins coordinated with GLUP6/GEF regulates the intracellular transport of the proglutelin from the Golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(20): 6137-6147.
- [29] 尹鹏嘉, 任民, 孙鑫, 等. 烤烟主要农艺性状变异特征以及与烟碱含量的相关分析[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(1): 10-16.
- YIN P J, REN M, SUN X, et al. Variation of main agronomic traits and correlation analysis of nicotine content in flue-cured tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(1): 10-16.
- [30] 周齐志. 烟草烟碱含量研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(6): 2359-2361.
- ZHOU Q Z. Research progress in the nicotine content in tobacco leaf[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(6): 2359-2361.