

水稻香叶醇合成酶的筛选与功能鉴定

谭舒畅^{1#}, 孙铭奇¹, 李 彦^{2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: 香稻因其品质优良、香味浓郁、清醇可口, 长期颇受人们喜爱。香叶醇是一种散发玫瑰香味的高价值单萜化合物, 具有广泛的医药生理活性和应用。然而, 香稻中香叶醇含量较低, 且香叶醇合成酶功能未被解析。为筛选和鉴定水稻香叶醇合成酶的候选基因, 本研究以已报道的香叶醇合成酶萜烯合酶(TPS)家族和核苷二磷酸酶 X(NUDIX)水解酶家族基因为靶标, 对水稻进行同源序列比对分析和系统进化树分析, 结合组织特异性表达谱, 筛选到一个在水稻根和穗中高表达的 NUDIX 家族成员 OsNUDX11, 该基因与玫瑰和天竺葵中的香叶醇合成酶亲缘关系较为紧密。通过进一步的蛋白理化性质分析和烟草瞬时表达实验, 证实了 OsNUDX11 与玫瑰和天竺葵中的香叶醇合成酶亚细胞定位一致。故推测 OsNUDX11 参与了香叶醇合成, 为在水稻中大量合成香叶醇提供重要依据。

关键词: 水稻; 香叶醇; NUDIX 水解酶; 亚细胞定位

中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2026)01-0057-09

谭舒畅, 孙铭奇, 李彦. 水稻香叶醇合成酶的筛选与功能鉴定[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(1): 57–65. DOI: [10.15886/j.cnki.rds wxb.20240074](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rds wxb.20240074) CSTR: [32425.14/j.cnki.rds wxb.20240074](https://cstr.cn/32425.14/j.cnki.rds wxb.20240074)



香味是稻米重要的食味品质性状和增值指标之一, 因此, 香味浓郁的香稻品种在市场上深受消费者喜爱, 如日本的‘宫香’、美国的‘Jasmine85’和‘Della’等都是世界颇有名气的香稻品种^[1]。香稻品种除了根以外, 其余各部位均能散发出香味。香稻挥发性代谢物有 300 多种, 包括醛类、酮类、酯类、酸类、醇类、烃类及杂环化合物等, 其中杂环类和醛醇类在香米中积累丰富^[2-3]。研究表明, 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-AP)是香稻的主要香味物质^[4], 然而, 对 2-AP 之外的其他挥发性代谢物研究不足, 且相应的合成基因尚未充分解析。

香叶醇是一种高价值单萜化合物, 具有玫瑰花香, 在植物花器官中含量丰富, 如天竺葵(*Pelargonium hortorum* Bailey)、蜂香薄荷(*Mentha canadensis* Linnaeus)、玫瑰(*Rosa hybrid*)等^[5]。香叶醇具有广泛的生理活性, 如清除过氧化物自由基能力、抗真菌、抗病毒等^[6-7]; 对于多种疾病有治疗作用, 如溃疡、血栓、动脉硬化和免疫缺失等^[8]。此外, 香叶醇还能促进细胞更新和自我修复, 提高细

胞的抗氧化能力, 被广泛用作香化日用产品, 如作为玫瑰系精油的主剂、化妆品、护肤品等^[9]。然而, 香叶醇在植物中含量很低, 通过提取天然香叶醇, 成本高昂^[10]。水稻(*Oryza sativa* L.)是一种重要的经济作物和模式作物, 产量高, 易于栽培管理, 并拥有完整的基因组信息、成熟的代谢组体系及高效率的转化体系。有研究表明, 三叶期的水稻中检测到 8 种单萜倍半萜类化合物, 包括芳樟醇(16.2 ± 7.6 ng·g⁻¹), 香叶醇(797.4 ± 6.9 ng·g⁻¹)和反式橙花叔醇(1042.0 ± 252.4 ng·g⁻¹)等^[11], 然而香叶醇合成酶功能尚未解析。

研究表明, 香叶醇合成酶主要包括 2 个家族, 即定位于质体上的 TPS 家族和 NUDIX 家族。其中, TPS 家族是通过催化由胞质溶胶中的甲羟戊酸(MVA)途径和质体中的 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径生成的香叶基二磷酸(GPP)直接合成香叶醇^[12], 如罗勒(*Ocimum basilicum* L.)*ObGES*^[13]、柑橘(*Citrus reticulata* Blanco)*CitTPS16*^[14]及茶树(*Camellia sinensis*)的*CsTPS1*^[15]; 而 NUDIX 家族通



收稿日期: 2024-04-30

修回日期: 2024-05-28

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(323RC423, 222RC553); 海南大学科研启动项目(RZ2100003223)

第一作者: 谭舒畅(1999—), 男, 海南大学热带作物学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 948306553@qq.com

***通信作者:** 李彦(1992—), 女, 副教授。研究方向: 植物挥发性代谢物合成调控。E-mail: lywithyou@hainanu.edu.cn

过水解 GPP 的一个磷酸基团生成香叶基磷酸(GP),再由植物中的非特异磷酸酶水解产生香叶醇,如玫瑰 *RhNUDX1*^[16]、天竺葵 *PgNdx1*^[17] 等。本研究以已报道的香叶醇合成酶基因为靶标,对水稻基因组进行同源序列比对分析,结合组织特异性表达谱、蛋白质理化性质分析、系统发育树分析和亚细胞定位实验,共同筛选水稻香叶醇合成酶基因。研究结果可为香叶醇合成提供新的基因资源,同时为实现在水稻胚乳中高效合成香叶醇提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析 利用公开数据库 phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), 分别获得 TPS 家族 ObGES 和 CsTPS1, 以及 NUDIX 家族 RhNUDX1 和 PgNdx1 的氨基酸序列, 与水稻和拟南芥基因组进行 Blast 比对分析, 得到其在水稻和拟南芥中的同源序列。使用 MEGA11 软件中的 Clustal W 工具将蛋白序列进行比对分析, 选择 Neighbor-joining Tree 方法构建系统进化树, 筛选出水稻香叶醇合成酶的候选基因。从国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/gene/>)获取 *OsNUDX11* 的 CDS 序列和氨基酸序列; 利用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析蛋白质保守结构域; 在 Espasy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白序列进行理化性质分析; 使用 SWISS-MODEL 网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)对 *OsNUDX11* 蛋白质的三维结构进行预测; 利用 RiceXPro 网站(<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/index.html>)预测 *OsNUDX11* 的组织特异性表达谱; 在公开的水稻转录组数据库 TENOR(<https://tenor.dna.affrc.go.jp/>)上预测 *OsNUDX11* 的非生物胁迫诱导表达谱; 使用 Cell-PLoc 2.0 在线预测工具(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测亚细胞定位。

1.2 水稻 cDNA 的获取 选用野生型中花 11(ZH11) 为研究材料, 在自然环境下培养至分蘖期, 选取健康的倒一叶片, 使用 TRIZOL 试剂(赛默飞世尔科技公司)提取水稻叶片中的 RNA, 并用反转录试剂盒 Supermix(北京全式金生物技术有限公司)将 RNA 反转录为 cDNA。反应条件为 42 °C 15 min, 80 °C 10 s, cDNA 保存于 -20 °C 冰箱。

1.3 基因克隆和载体构建 以水稻叶片的 cDNA 为模板, 利用带有 Gateway 接头的 PCR 特异性引

物(F: 5'-aaaaagcaggcttaATGCTCCTCGTCAGATCCAC-3'; R: 5'-agaaagctgggtaTCACACAGCCAAGTGGTTGTC-3'), 使用高保真酶 KOD FX neo(大连宝日医生物工程有限公司)扩增。利用琼脂糖凝胶电泳分析基因扩增结果。扩增片段通过 Gateway (Thermo Fisher) 技术, 将扩增片段构建至 pDONR207 载体, 转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 并测序得到含正确片段的载体(擎科生物公司)。将比对正确后的质粒通过 Gateway 技术, 使目的片段构建至烟草瞬时表达载体(pEAQ-HT-DEST2), 使用载体正向引物和基因特异性反向引物(F: 5'-cttcgcaagacccttctct-3'; R: 5'-TCACACAGCCAAGTGGTTGTC-3')鉴定。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测基因表达量 使用 Primer 3 Plus 设计实时荧光定量 PCR 引物(F: 5'-TGACATACCATTGATTCTCTAGCA-3'; R: 5'-TGTTTATAGTGCAGTAGTGGAATTTGA-3'), 利用 SYBR 酶(吐露港生物公司), 以水稻 *Ubiquitin5* 基因作为内参基因对水稻样品的 cDNA 的表达量进行检测。反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 循环; 95 °C 30 s; 65 °C 30 s; 95 °C 30 s。每个样品采取 3 个生物学重复, 采用 2^{- ΔC_t} 法计算相对表达量。

1.5 组织特异性表达谱构建 将野生型水稻 ZH11 的种子浸种出芽后, 点种于水培盒中, 置于 30 °C、50% 湿度、光照 16 h + 黑暗 8 h 的光照培养箱中培养至分蘖长出, 分别取样倒一叶、倒二叶、倒三叶、叶鞘、根、第一节点、第二节点、第三节点 8 个样品, 置于液氮速冻后 -80 °C 保存; 将水稻种至土中, 观察水稻生长至开花期, 取倒一叶、倒二叶、倒三叶、叶鞘、花、穗、穗梗、根、第一节点、第二节点、第三节点 11 个样品, 置于液氮速冻后 -80 °C 保存; 以开花后 21 d 为成熟期, 取倒一叶、倒二叶、倒三叶、叶鞘、穗、穗梗、胚乳、根、第一节点、第二节点、第三节点 11 个样品, 置于液氮速冻后 -80 °C 保存。每个样品为 3 株材料的混合样品。

1.6 水稻幼苗冷胁迫处理 使用两周龄的野生型水稻 ZH11 幼苗, 置于 4 °C 环境下 48 h, 处理期间分别在 0、2、4、6、12、24、36 及 48 h 取样幼苗的倒一叶片, 每个实验样品为 3 株材料的混合样品。

1.7 亚细胞定位实验 将携带目的片段的烟草瞬时表达载体转化至 GV3101 农杆菌感受态细胞中(上海维地生物)。挑取阳性单克隆菌落进行菌落

PCR 鉴定,接种至含相应抗性的 LB 培养基中,28 ℃ 恒温摇床振荡过夜培养。以 5 000 r·min⁻¹ 转速离心 5 min 收集全部菌液,加入烟草缓冲液 [10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol·L⁻¹ 4-吗啉乙磺酸 (MES), 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮 (Acetosyringone)] 重悬菌体并调整菌液 OD₆₀₀ 至 1.0,避光复苏 2 h 后。采用无针头注射器将菌液注射至烟草叶片背部,经黑暗条件下培养 24 h,光照条件下培养 24 h 后,使用蔡司 LSM900 共聚焦显微镜观察荧光现象。

2 结果与分析

2.1 水稻香叶醇合成酶 *OsNUDX11* 的筛选 为了筛选水稻香叶醇合成酶,笔者以罗勒和茶叶中已经

报道的萜烯合酶 TPS 家族香叶醇合成酶基因 *ObGES* 和 *CsTPSI* 为靶标。对水稻基因组进行 BLAST 分析(表 1)。结果表明,与 *ObGES* 相似度最高的是 *LOC_Os02g02930* (Identity=34%), *LOC_Os02g02930* 编码 *OsLIS*, 在水稻中发挥芳樟醇合酶的功能;而与 *CsTPSI* 相似度最高的是 *LOC_Os01g23530* (Identity=32%), *LOC_Os01g23530* 编码 *OsTPSI*, 该基因在水稻中具有红没药醇合成酶的功能。以玫瑰香叶醇合成酶基因 *RhNUDX1* 和天竺葵香叶醇合成酶基因 *PgNdx1* 为靶标,对水稻基因组进行 Blast 分析。结果表明,与 *RhNUDX1* 和 *PgNdx1* 相似度最高的是 *LOC_Os09g38040* (Identity=45%)(表 1),且该基因功能并未表征。

表 1 香叶醇合成酶同源序列比对结果

Tab. 1 Homologous sequence alignment of geraniol synthase

候选基因 Candidate genes	Blast 结果 Blast	描述 Description	长度/aa Length	比特得分 Bit score	期望值 E-value	相似度/% Identity
<i>ObGES</i>	Os02g0121700	<i>OsLIS</i>	596	290	1e-78	34
	Os08g0139700	(E)-β-caryophyllene synthase	577	262	5e-70	34
	Os08g0139700	Similar to terpene synthase 6	520	261	1e-69	34
<i>CsTPSI</i>	Os01g0337100	<i>OsTPSI</i>	555	276	3e-74	32
	Os04t0344100	Similar to OSIGBa0106G08.3 protein.	544	258	7e-69	31
	Os08t0168000	Terpene synthase, Resistance to aphids (Rhopalosiphum padi)	547	251	8e-67	33
<i>RhNUDX1</i>	Os09g0553300	NUDIX hydrolase domain containing protein	185	40.4	5e-04	45
	Os06g0634300	Similar to Nudix hydrolase 2	331	32	1.4e-01	29
	Os08g0139700	Similar to terpene synthase 6	520	261	1e-69	31
<i>PgNdx1</i>	Os09g0553300	NUDIX hydrolase domain containing protein	185	37	4e-03	32
	Os08g0375900	Similar to Nudix hydrolase 22	251	36.6	7e-03	35
	Os06g0129700	Nudix hydrolase 14	326	34.3	2.6e-02	40

LOC_Os09g38040 编码 *OsNUDX11*,为进一步确认 *OsNUDX11* 是否与香叶醇合成有关,分别检索已命名的水稻和拟南芥 NUDIX 家族成员,发现 27 个拟南芥和 17 个水稻 NUDIX 水解酶家族成员,将其与玫瑰和天竺葵的香叶醇合成酶蛋白序列构建系统发育树。系统发育树显示,*OsNUDX11* 与 *AtNUDX23*、*PgNdx1* 及 *RhNUDX1* 显示出较为紧密的亲缘关系(图 1),而 *AtNUDX23* 已被鉴定为黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)焦磷酸水解酶^[18],一种参与黄素代谢负反馈调控的水解酶,这表明

OsNUDX11 在水稻中很可能参与香叶醇的生成。

基因结构分析结果表明, *OsNUDX11* 基因含有 7 段外显子和 6 段内含子,编码区共 813 个核苷酸,编码 271 个氨基酸(图 2-a)。利用 NCBI 在线网站的 CDD 功能对 *OsNUDX11* 蛋白质序列的保守结构域进行分析。结果表明,*OsNUDX11* 与 *RhNUDX1* 和 *PgNdx1* 存在一个相同的保守结构域(图 2-b),推测 *OsNUDX11* 可能具有香叶醇合成酶的功能。

2.2 *OsNUDX11* 的蛋白质理化性质分析 采用 Espasy 在线网站对 *OsNUDX11* 蛋白序列进行理

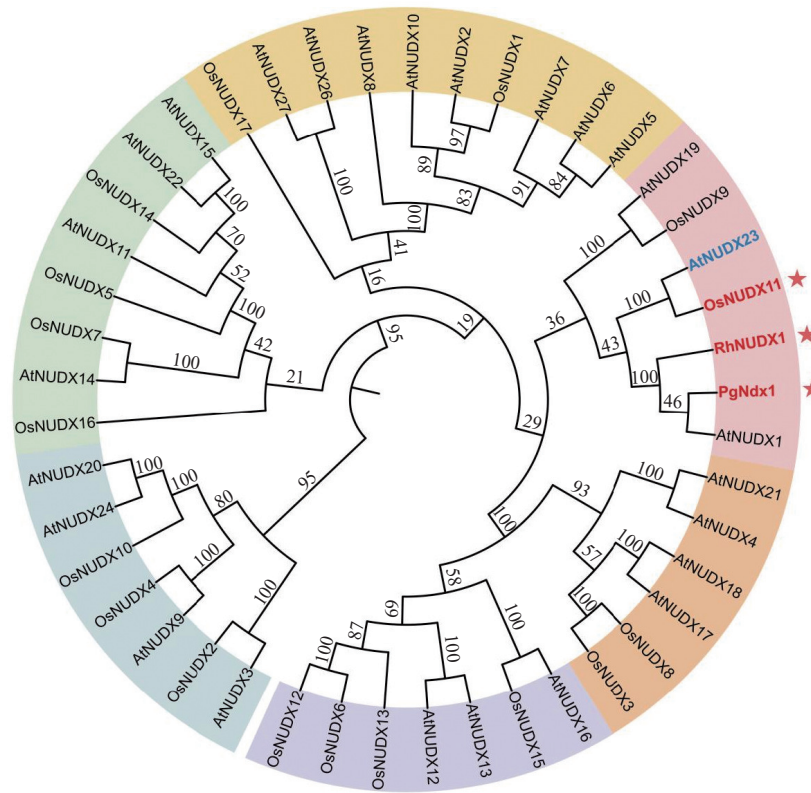
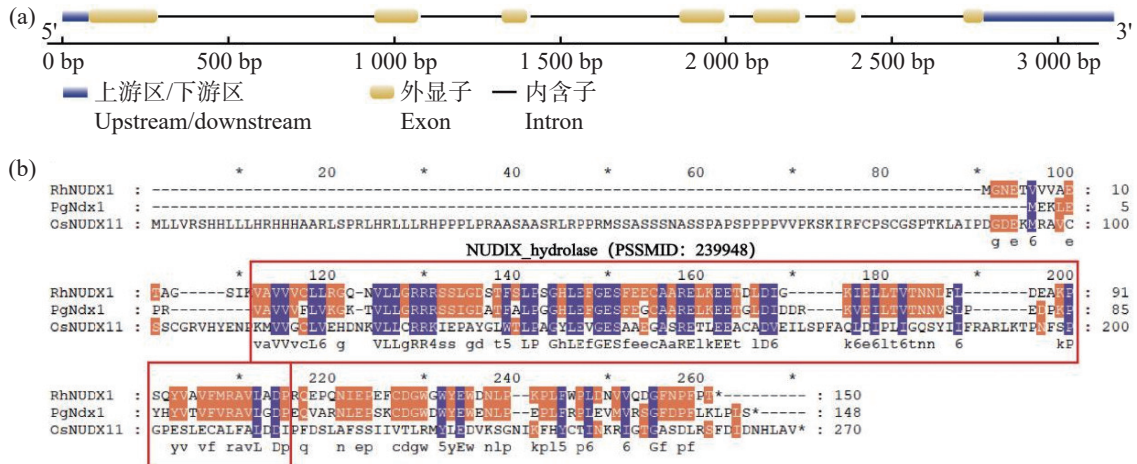


图 1 NUDIX 水解酶家族系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of the NUDIX hydrolase family

注: Os, 水稻; At, 拟南芥; Pg, 天竺葵; Rh, 玫瑰; 包括 17 个水稻 NUDIX 水解酶家族成员, 27 个拟南芥 NUDIX 水解酶家族成员, 一个天竺葵 NUDIX 水解酶家族成员 PgNUDX1 以及一个玫瑰 NUDIX 水解酶家族成员 RhNUDX1。

Note: Os, *Oryza sativa*; At, *Arabidopsis thaliana*; Pg, *Pelargonium hortorum* Bailey; Rh, *Rosa hybrid*; These include 17 members of the rice NUDIX hydrolase family, 27 members of the *Arabidopsis thaliana* NUDIX hydrolase family, a Pg NUDIX hydrolase family member PgNUDX1, and a Rh NUDIX hydrolase family member RhNUDX1.



(a) *OsNUDX11* 的基因结构图; (b) *OsNUDX11*、*RhNUDX1* 和 *PgNUDX1* 蛋白质序列比对结果。红框部分为其三者共有的 NUDIX 水解酶保守结构域, PSSMID 号为 239948。

(a) Gene structure of *OsNUDX11*; (b) *OsNUDX11* *RhNUDX1* and *PgNUDX1* protein sequence alignment results. The red box represents the conserved domains of NUDIX hydrolase shared by the three protein sequences. The PSSMID number is 239948.

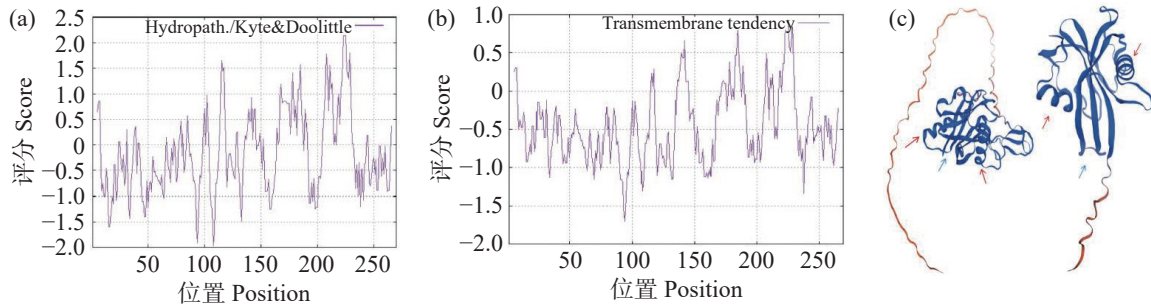
图 2 *OsNUDX11* 基因的结构和蛋白质保守结构域分析Fig. 2 Analysis of the structure and protein conservative domain of *OsNUDX11* gene

化性质预测, 结果表明, *OsNUDX11* 蛋白质相对分子量为 29.66 kDa, 理论等电点为 8.87, 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.118, 疏水性曲线与跨膜趋势分析中氨基酸序列密集均分布在负值以下(图 3-a, 图 3-b),

表明该蛋白为亲水性蛋白且不易发生跨膜; 不稳定系数为 71.95, 表明该蛋白在体外环境中易失活; 脂肪系数为 92.19, 表明其热稳定性较好, 在温度波动范围内不易因热胁迫失活, 但在酶的参与下容易失活。

使用 SWISS-MODEL 在线网站预测 OsNUDX11 蛋白质的三维结构, 结果表明, OsNUDX11 与

RhNUDX1 蛋白的三维结构相似, 均具有两个螺旋结构以及排列整齐的网状结构(图 3-c)。



(a) OsNUDX11 蛋白质疏水性分析, 纵坐标为疏水性评分, 横坐标为氨基酸长度, 评分越高说明蛋白质疏水性越好; (b) OsNUDX11 蛋白质跨膜区预测, 纵坐标为跨膜评分, 横坐标为氨基酸长度, 评分越高说明该蛋白在发挥功能时可能发生跨膜; (c) OsNUDX11 与 RhNUDX1 蛋白质三级结构, 红色箭头标注为螺旋结构, 蓝色箭头标注为网状结构。

(a) Hydrophobicity analysis of OsNUDX11 protein: Hydrophobicity score is on the vertical axis, and amino acid length on the horizontal axis; the higher the score, the better the hydrophobicity of the protein. (b) OsNUDX11 protein transmembrane region prediction: The vertical axis represents transmembrane score and the horizontal axis represents amino acid length; the higher the score, the more likely the protein may undergo transmembrane transition while performing its function. (c) The tertiary structures of OsNUDX11 and RhNUDX1 proteins are indicated by a red arrow indicating a helical structure and a blue arrow indicating a reticular structure.

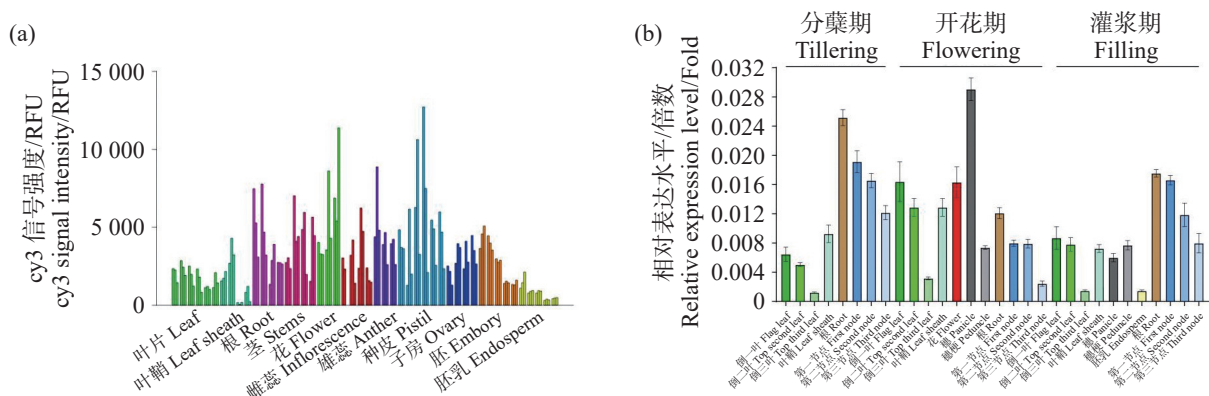
图 3 OsNUDX11 蛋白质的理化性质与 OsNUDX11 和 RhNUDX1 蛋白质的三维结构

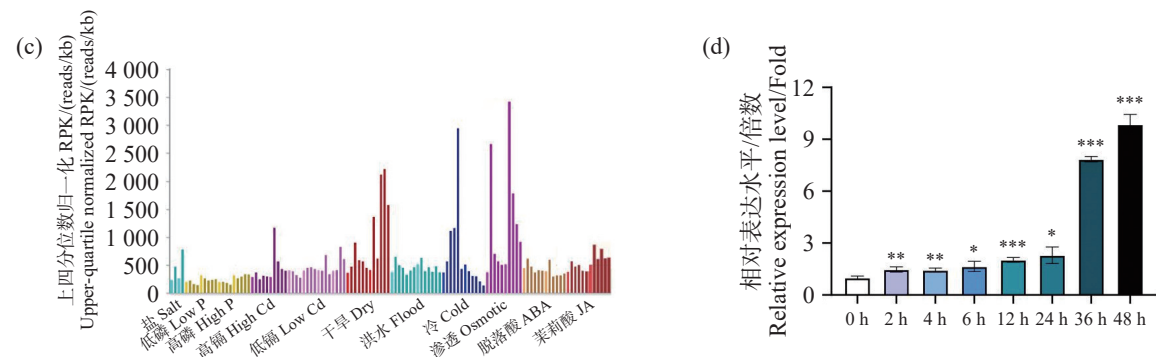
Fig. 3 The physicochemical properties of OsNUDX11 protein the tertiary structure of OsNUDX11 and RhNUDX1 proteins

2.3 OsNUDX11 的表达模式 为探究 *OsNUDX11* 在水稻中的表达模式, 首先使用 RiceXPro 预测 *OsNUDX11* 的组织特异性表达模式, 结果表明, *OsNUDX11* 在根和穗中表达量较高(图 4-a)。为了进一步探究 *OsNUDX11* 的表达模式, 分别对分蘖期、开花期以及灌浆期的野生型水稻 ZH11 的 30 个不同组织的表达量进行测定。结果表明, *OsNUDX11* 在水稻的根和穗中表达量较高, 与网站预测结果一致(图 4-b)。为探究 *OsNUDX11* 受到非生物胁迫的响应, 本研究使用 TENOR 在线网站对不同胁迫下 *OsNUDX11* 表达量进行预测, 结果表明, *OsNUDX11* 对渗透胁迫和冷胁迫的响应较为明显(图 4-c)。为验证该预测结果, 使用野生型水稻 ZH11 的三叶期幼苗在 4 °C 环境下处理 48

h, 并分别测定 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、36 h 以及 48 h 叶片的基因表达量, 结果表明, 在冷处理后 *OsNUDX11* 的表达量随处理的时间增加, 表达量显著提高(图 4-d), 说明 *OsNUDX11* 的表达受冷胁迫调控, 与网站预测结果一致。

2.4 OsNUDX11 亚细胞定位 为明确 *OsNUDX11* 蛋白的亚细胞定位, 利用 Cell-PLoc 2.0 在线预测工具对 *OsNUDX11* 蛋白序列进行分析, 预测结果显示其亚细胞定位与大多数萜烯合酶一致, 均定位于叶绿体(图 5-a)。之后将 35S:*OsNUDX11*-eGFP 融合表达载体(实验组)及 35S:eGFP 空载体(对照组)转入农杆菌感受态细胞 GV3101 中, 分别注射至 1 月龄烟草叶片, 培养 48h 后使用共聚焦显微镜观察荧光现象。结果表明, 与 GFP 空载相比,





(a) RiceXPro 网站由芯片测序测得的 *OsNUDX11* 表达谱图; (b) *OsNUDX11* 表达谱图。其中相同颜色代表不同时期的相同组织; (c) TENOR 网站预测的 *OsNUDX11* 诱导表达谱图; (d) *OsNUDX11* 对冷胁迫的表达谱图。
(a) *OsNUDX11* expression profile obtained from chip sequencing on the RichXPro website; (b) *OsNUDX11* expression profile. The same color represents the same tissue from different periods; (c) *OsNUDX11* induced expression profile predicted by TENOR website; (d) Expression profile of *OsNUDX11* under cold stress.

图 4 *OsNUDX11* 的表达谱和诱导表达
Fig. 4 *OsNUDX11* expression profile and induced expression

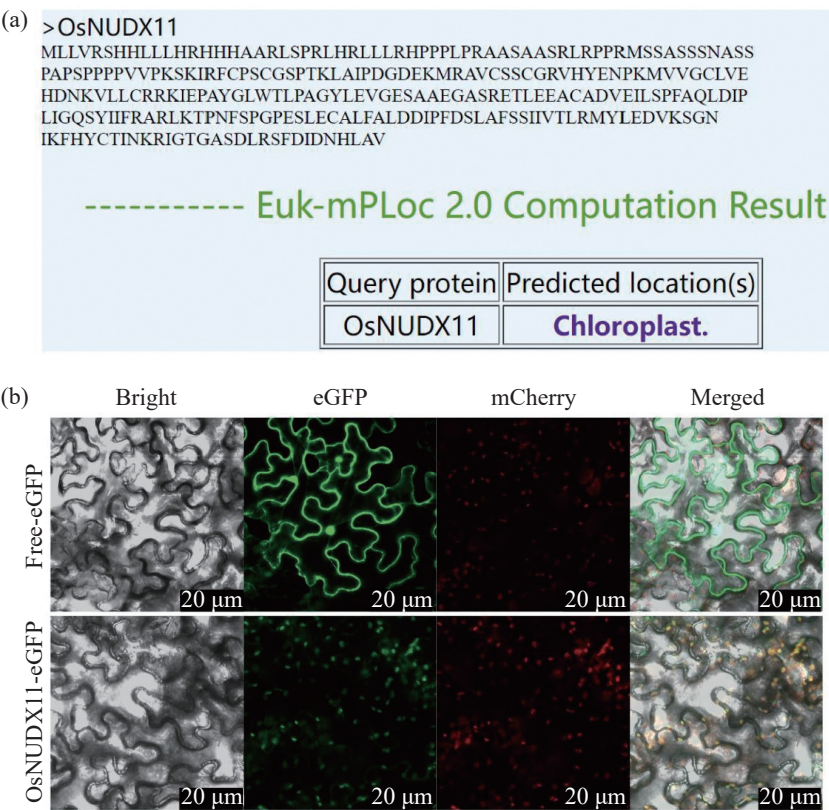


图 5 *OsNUDX11* 亚细胞定位预测结果(a)和 *OsNUDX11* 亚细胞定位结果(b)

Fig. 5 The subcellular localization prediction results of *OsNUDX11* and the subcellular localization results of *OsNUDX11*
注: eGFP-*OsNUDX11* 融合蛋白在 1 月龄本氏烟草叶片中瞬时表达。eGFP 呈绿色荧光, 叶绿体在 488 nm 激发光下呈自发红色荧光, 绿色荧光与红色荧光叠加后呈现黄色荧光。标尺为 20 μm。
Note: The eGFP-*OsNUDX11* fusion protein was transiently expressed in the leaves of 1-month-old *Nicotiana benthamiana*. eGFP shows green fluorescence, chloroplasts show spontaneous red fluorescence under 488 nm excitation light, and yellow fluorescence appears after the superposition of green fluorescence and red fluorescence. The scale bar is 20 μm.

35S:*OsNUDX11*-eGFP 的绿色荧光与叶绿体红色自发荧光完全重叠(图 5-b), 表明 *OsNUDX11* 与玫瑰 *RhNUDX1* 和天竺葵 *PgNdx1* 亚细胞定位一致, 三者均在质体中发挥功能, 进一步说明 *OsNUDX11*

很可能参与香叶醇合成过程。

3 讨论

NUDIX 家族水解酶是一类普遍存在于真核生

物中的水解酶,其功能主要是水解核苷二磷酸化合物^[19]。在植物体中,NUDIX 家族水解酶主要定位在胞质溶胶、线粒体和叶绿体中,控制着多种代谢物的合成,并广泛参与生物和非生物胁迫反应,如干旱、辐射、盐度和病原体攻击^[20]。拟南芥 *AtNUDX9* 主要负责水解 GDP-D-甘露糖生成甘露糖 1-磷酸,通过调节根中的蛋白质 N-糖基化参与 GDP-D-Man 水平的调节,从而影响铵敏感性^[21];大麦 *HvNUDX12* 具有 8-氧代-dGTP、四磷酸二腺苷 (Ap4A) 和鸟苷四磷酸 (ppGpp) 焦磷酸水解酶活性,该独特的结构可耐受非生物胁迫的反应^[22],如受紫外 UV-C 诱导后, *HvNUDX12* 基因表达量显著上调;水稻 *OsNUDX2* 的重组蛋白可在体外水解 8-氧代-dGTP,以及二甲基烯丙基二磷酸 (DMAPP) 和异戊烯基二磷酸 (IPP), *OsNUDX2* 通过不同的底物特异性和同一性有效降低紫外线胁迫^[23];而 *OsNUDX14* 定位在线粒体,参与调控水稻木质素的生物合成,同时调控水稻叶夹角和籽粒垩白度等农艺性状^[24]。

本研究利用已报道的香叶醇合成酶进行 BLAST 比对,鉴定并克隆了一个水稻已被命名的基因 *OsNUDX11*,通过荧光定量实验验证了 *OsNUDX11* 在根和穗中表达量较高且受冷处理诱导,亚细胞定位证实了 *OsNUDX11* 编码的蛋白质在叶绿体中定位,这一定位与玫瑰和天竺葵中报道的 RhNUDX1 与 PgNdx1 一致。但笔者发现 *OsNUDX11* 与玫瑰香叶醇合成酶 RhNUDX1 的蛋白质三维结构仍存在一定差异,因此后续还需要对 *OsNUDX11* 催化香叶基二磷酸生成香叶醇的机制进行进一步探究,为解析 *OsNUDX11* 催化活性提供理论依据。

氨基酸序列比对分析表明, *OsNUDX11* 与拟南芥 *AtNUDX23* 同源关系较近, *AtNUDX23* 在南芥叶片中高度表达,定位在叶绿体中,通过与叶绿体中的八氢番茄红素合酶 (PSY, phytoene synthase) 和牻牛儿苗基焦磷酸合酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 直接相互作用来调节类胡萝卜素的生物合成^[25],同时 *AtNUDX23* 在质体中发挥黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 焦磷酸水解酶活性,通过水解黄素单核苷酸 (FMN) 和 5'-腺苷酸 (AMP),使二者结合产生 FAD,从而调节植物细胞中的黄素稳态^[18]。本研究推测 *OsNUDX11* 可能通过水解香叶基焦磷酸 GPP 来合成香叶醇。因

此,还需继续验证 *OsNUDX11* 可能同时调节水稻类胡萝卜素生物合成与调节水稻生长发育过程中黄素的稳态。

参考文献:

- [1] 余亚莹,邵高能,圣忠华,等. 国内外香稻资源遗传多样性研究 [J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(6), 871–880
- [2] 韩丽欣,任红波,孟利. 大米中风味物质的形成与变化 [J]. 中国农学通报, 2022, 38(30), 126–134
- [3] Hu X Q, Lu L, Guo Z L, et al. Volatile compounds, affecting factors and evaluation methods for rice aroma: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.003>
- [4] Buttery R G, Ling L C, Juliano B O, et al. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31 (4), 823–826. <https://doi.org/10.1021/jf00118a036>
- [5] 周汉琛,杨霁虹,徐玉婕,等. 香叶醇生物合成相关基因 NUDX1 的进化分析 [J]. 茶叶科学, 2022, 42(5), 638–648. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-369X.2022.05.004>
- [6] Edris A E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review [J]. *Phytotherapy Research*, 2007, 21 (4), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- [7] Si W, Ni X, Gong J, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (1), 213–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03994.x>
- [8] 周勇,姚三桃,翁玉春,等. 香叶醇抗真菌作用的研究 [J]. 真菌学报, 1983, 2(4), 262–264. <https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.1983.04.013>
- [9] Bhavaniramya S, Vishnupriya S, Al-Aboody M S, et al. Role of essential oils in food safety: antimicrobial and antioxidant applications [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2019, 2 (2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- [10] 罗彪彪. 应用酵母表面展示技术体外重构甲羟戊酸途径合成香叶醇 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. <https://doi.org/10.27158/d.cnki.ghznu.2020.001106>
- [11] 殷焕然,何玉池,李洋. GC-MS/MS 法分析水稻叶子单萜倍半萜类化合物的组成 [J]. 生物过程, 2017, 7(4), 54–59. <https://doi.org/10.12677/bp.2017.74008>
- [12] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70 (15/16), 1621–1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- [13] Iijima Y, Gang D R, Fridman E, et al. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134 (1), 370–379. <https://doi.org/10.1104/pp.103.4.370>

- [tps://doi.org/10.1104/pp.103.032946](https://doi.org/10.1104/pp.103.032946)
- [14] Li X, Xu Y Y, Shen S L, et al. Transcription factor CitERF71 activates the terpene synthase gene *CitTPS16* involved in the synthesis of *E*-geraniol in sweet orange fruit [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68 (17), 4929–4938. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx316>
- [15] Jiang H, Zhang M T, Yu F, et al. A geraniol synthase regulates plant defense via alternative splicing in tea plants [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10 (10), uhad184. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad184>
- [16] Magnard J L, Rocchia A, Caissard J C, et al. Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses [J]. *Science*, 2015, 349 (6243), 81–83. <https://doi.org/10.1126/science.aab0696>
- [17] Bergman M E, Bhardwaj M, Phillips M A. Cytosolic geraniol and citronellol biosynthesis require a Nudix hydrolase in rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) [J]. *The Plant Journal*, 2021, 107 (2), 493–510. <https://doi.org/10.1111/tpj.15304>
- [18] Maruta T, Yoshimoto T, Ito D, et al. An Arabidopsis FAD pyrophosphohydrolase, AtNUDX23, is involved in flavin homeostasis [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53 (6), 1106–1116. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs054>
- [19] Arczewska K D, Kuśmierk J T. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 2. Role of bacterial mutator gene homologues in human disease. Overview of nucleotide pool sanitization and mismatch repair systems [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54 (3), 435–457. https://doi.org/10.18388/abp.2007_3220
- [20] Ogawa T, Muramoto K, Takada R, et al. Modulation of NADH levels by Arabidopsis Nudix hydrolases, AtNUDX6 and 7, and the respective proteins themselves play distinct roles in the regulation of various cellular responses involved in biotic/abiotic stresses [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57 (6), 1295–1308. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw078>
- [21] Ogawa T, Yoshimura K, Miyake H, et al. Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolases in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148 (3), 1412–1424. <https://doi.org/10.1104/pp.108.128413>
- [22] Tanaka S, Kihara M, Sugimoto M. Structure and molecular characterization of barley Nudix hydrolase genes [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79 (3), 394–401. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.978259>
- [23] Kondo Y, Rikiishi K, Sugimoto M. Rice Nudix hydrolase OsNUDX2 sanitizes oxidized nucleotides [J]. *Antioxidants*, 2022, 11 (9), 1805. <https://doi.org/10.3390/antiox11091805>
- [24] Liu Y R, Zhang W, Wang Y H, et al. *Nudix hydrolase 14* influences plant development and grain chalkiness in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13, 1054917. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1054917>
- [25] Rao S, Cao H B, O'hanna F J, et al. Nudix hydrolase 23 post-translationally regulates carotenoid biosynthesis in plants [J]. *The Plant Cell*, 2024, 36 (5), 1868–1891. <https://doi.org/10.1093/plcell/koae030>

Screening and functional characterization of rice geraniol synthase

Tan Shuchang^{1#}, Sun Mingqi¹, Li Yan^{2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: Fragrant rice has long been cherished for its superior quality, potent aroma, delicate flavor, and pleasant texture. Geraniol, a valuable monoterpene with a rose-like odor, exhibits a broad spectrum of medicinal and physiological activities. Despite its popularity, fragrant rice varieties typically contain low levels of geraniol, and the biochemical function of geraniol synthase in these plants remains undefined. In this context the previously reported geraniol synthase, terpene synthase (TPS), family and the nucleoside diphosphate X (NUDIX) hydrolase family were employed to select candidate genes for geraniol synthase in rice by using homologous sequence alignment analysis and phylogenetic tree analysis of rice, combined with tissue-specific expression profiles, and OsNUDX11, a member of the NUDIX family that is highly expressed in rice roots and panicles was identified. This gene is closely related to geraniol synthases from *Rosa rugosa* (rose) and *Pelargonium graveolens* (geranium). Further analysis of protein physicochemical properties and tobacco transient expression assays confirmed that OsNUDX11 shares consistent subcellular localization with geraniol synthases from rose and geranium. It is, thus, inferred that OsNUDX11 be involved in geraniol biosynthesis, which provides a crucial basis for the large-scale synthesis of geraniol in rice.

Keywords: rice; geraniol; NUDIX hydrolases; subcellular localization

(责任编辑: 钟云芳)