

烟草尼古丁去甲基化酶基因及其在育种中的应用

宋中邦, 肖炳光, 卢秀萍*

(云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100)

摘要: 尼古丁通过去甲基化反应生成去甲基尼古丁, 后者是潜在的致癌物质亚硝基去甲基尼古丁的合成前体, 可能对人体健康产生危害。尼古丁去甲基化酶基因最近被克隆并进化分析, 这些基因还作为目标基因应用于低去甲基尼古丁烟草品种选育。该文对近年来该领域研究进展进行综述, 并展望该领域未来的研究方向。

关键词: 尼古丁; 去甲基尼古丁; 尼古丁去甲基化酶; 碱谱进化; 烟草育种

中图分类号: S572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)06-0849-05

Nicotine N-demethylase gene and its application in tobacco breeding

SONG Zhong-Bang, XIAO Bing-Guang, LU Xiu-Ping*

(Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi 653100, China)

Abstract: Nicotine, which is produced by N-demethylation of nicotine, can serve as the precursor of potential carcinogen N-nitrosornicotine (NNN) synthesis. Nicotine N-demethylase (NND) genes were cloned and applied to evolutionary analysis. These genes were also employed as target for tobacco breeding to produce tobacco with low level of nornicotine. In this review, the recent works concentrated on NND genes and suggestions for future research were discussed.

Key words: nicotine; nornicotine; nicotine N-demethylase; alkaloid profile evolution; tobacco breeding

尼古丁(nicotine)、去甲基尼古丁(nornicotine)、假木贼碱(anabasine)、和新烟碱(anatabine)是普通烟草(*Nicotiana tabacum*)中主要的生物碱, 其中尼古丁是首要的生物碱, 占生物碱总含量的90%~95%, 去甲基尼古丁含量通常低于总生物碱的3.5%。但某些烤烟和白肋烟品种在其成熟和烘烤过程中可以将大部分尼古丁转化为去甲基尼古丁, 使后者成为含量最高的生物碱(Wernsman等, 1968)。去甲基尼古丁在高温条件下能转化生成麦斯明(myosmine)和取代吡啶化合物, 可能影响烟草的本香(Roberts, 1988)。去甲基尼古丁还可能对人体健康产生危害, 主要表现在它是潜在致癌物质亚

硝基去甲基尼古丁(nitrosornicotine, NNN)的合成前体(Hecht等, 1989), 它本身也能直接诱导吸烟者血浆中蛋白的异常糖基化, 能与常用类固醇类药物发生共价反应, 影响药效和毒性(Dickerson等, 2002)。鉴于去甲基尼古丁的特殊性质, 尼古丁去甲基化及催化该反应的酶编码基因一直是研究热点, 本文对近年来该领域研究进展进行综述。

1 尼古丁去甲基化反应机制

尼古丁向去甲基尼古丁转化机制的研究已经开展了半个多世纪。这种转化最初被认为是转甲基反

收稿日期: 2012-03-08 修回日期: 2012-05-21

基金项目: 国家自然科学基金(31060046); 云南省烟草公司科技项目(2011YN04)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060046); Science and Technology Project of Yunnan Provincial Tobacco Company (2011YN04)]

作者简介: 宋中邦(1982-), 男, 安徽肥东人, 博士, 从事烟草分子育种, (E-mail) zbsoon@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 卢秀萍, 女, 研究员, 从事烟草育种研究, (E-mail) xplu1970@163.com.

应,用 $[^{14}\text{C-methyl}]$ nicotine 饲喂烟草植株显示 ^{14}C 原子可被整合进入胆碱,约 90%的 ^{14}C 活性都存在于胆碱的甲基基团(Leete 等,1959)。还有研究表明只有在甲基基团受体如甘氨酸、乙醇胺存在的条件下烟草植株匀浆才能转化尼古丁生成去甲基尼古丁(Bose 等,1956)。但这些结果未能在烟草细胞悬浮培养液中重复(Hao 等,1998)。最近的研究结果倾向于烟草通过氧化机制进行尼古丁去甲基反应,这与细胞色素 P450 还原酶参与鼠肝脏尼古丁脱毒机制相似(Hitoshi 等,1993)。主要有如下几个证据,耳状烟草和普通烟草的去甲基活性集中于微粒体(Chelvarajan 等,1993;Hao 等,1998);尼古丁去甲基反应是分子氧和 NADPH 依赖型(Chelvarajan 等,1993);细胞色素 P450 型酶的抑制剂能抑制尼古丁去甲基反应(Chelvarajan 等,1993)。

对尼古丁吡咯环上哪个位置碳原子被氧化也采用同位素标记的方法开展了多项研究。吡咯环上连接 N 原子的 C-2' 和 C-5' 碳原子,以及甲基碳原子都可能发生氧化反应。但 C-2' 和 C-5' 位置发生氧化反应先后被排除(Leete 等,1959;Botte 等,1997)。皱叶烟草(*N. plumbaginifolia*)细胞自身不能合成尼古丁,但能使外源尼古丁去甲基化。Mesnard 等通过同位素标记化合物 $[^2\text{H-methyl}]$ Nicotine、 $[^{13}\text{C-methyl}]$ nicotine、 $[^{14}\text{C-methyl}]$ nicotine 饲喂皱叶烟草后分析同位素标记在胞内的重新分配,结果表明尼古丁氧化水解可能生成不稳定的中间产物 N'-hydroxymethylnornicotine,其自发裂解生成去甲基尼古丁和甲醛。甲醛通过氧化先后生成甲酸和 CO_2 ,或者直接进入四氢叶酸介导的一碳代谢途径(Mesnard 等,2002;Bartholomeusz 等,2005)。这是迄今为止对尼古丁氧化去甲基后甲基碳代谢途径最详细的阐述。

2 尼古丁去甲基酶基因克隆及功能分析

植物基因组含有许多细胞色素 P450 基因,其编码的蛋白超家族广泛参与各种初级和次级代谢,如固醇、赤霉素、木质素的生物合成,许多植物-环境互作相关的代谢物如萜类、类苯基丙烷、生物碱、芥子油苷的生物合成也有细胞色素 P450 参与(Xu 等,2007)。细胞色素 P450 参与生物碱合成主要作为羟化酶,如 CYP71D12 是水甘草碱 16-羟化酶(Schroder 等,1999),CYP76B6 作为香叶醇/橙花醇

10-羟化酶(Collu 等,2001)。在部分萜类吲哚生物碱合成过程中细胞色素 P450 可以催化开环反应(Irmeler 等,2000)。尽管许多实验推断催化尼古丁去甲基反应的可能是细胞色素 P450 单加氧酶,对其生化特征也进行了广泛的研究,但一直以来未能从细胞抽提物中纯化获得有活性的尼古丁去甲基酶(Nicotine N-demethylase, NND)(Chelvarajan 等,1993;Hao 等,1996,1996;Hao 等,1998)。

定位和克隆 NND 基因是从分子水平阐述去甲基尼古丁生成机制的前提。早期研究表明烟草高去甲基尼古丁含量表型由单显性基因座控制(Griffith 等,1955),但该基因座代表 NND 基因本身,还是其上游调控因子却不得而知。Siminszky 等(2005)通过 microarray 技术分析了遗传背景高度相似的“转化株”(去甲基尼古丁为主要生物碱成分)和“非转化株”(尼古丁为主要生物碱成分)烟草的基因表达水平,获得了若干在“转化株”上调表达的细胞色素 P450 基因,属于 CYP82E2 亚家族。通过 RNAi 技术抑制 CYP82E2 亚家族基因表达后发现“转化株”中去甲基尼古丁含量降到“非转化株”水平。酵母表达分析表明该亚家族中 CYP82E4 具有 NND 活性,能够催化 $[^{14}\text{C}]$ nicotine 生成 $[^{14}\text{C}]$ nornicotine。Xu 等(2007)先使用简并引物 PCR 扩增获得 32 个 P450 家族基因,再通过芯片杂交方法在乙烯处理叶片中筛选出 3 个表达水平上调的 cDNA,其中一个 cDNA 在酵母中编码蛋白具有 NND 活性,序列比对表明该基因就是 Siminszky 等(2005)克隆的 CYP82E4 基因。对 CYP82E4 基因启动子分析表明,其在根中表达水平极低,在衰老叶片和花器官中高水平表达,且表达受衰老特异诱导(Chakrabarti 等,2008)。对该酶一级结构分析表明其含有细胞色素 P450 蛋白典型的保守底物识别位点和跨膜结构域,但植物中去甲基酶的分子模型暗示它具有更强的底物和反应特异性(Xu 等,2007)。最近 Wang 等(2011)通过分子动力学分析了 CYP82E4 及其同源蛋白 CYP82E3 在活性区域外的单氨基酸突变所导致二者结构的变化及功能分化,揭示了细胞色素 P450 单加氧酶催化尼古丁去甲基反应的机制。

Gavilano 等(2007)从普通烟草绿色叶片 cDNA 文库扩增获得 *NtabCYP82E5V2* 基因,该基因在普通烟草“转化株”和“非转化株”的绿色叶片中表达水平高于 *NtabCYP82E4*,能够产生具有 NND 活性的酶,在绿色叶片中去甲基尼古丁合成中起主要作用。

另一个能够编码活性 NND 的 CYP82E2 亚家族基因是 *NtabCYP82E10*, Blast 搜索结果显示该基因的 EST 主要出现在源于根特异性或包含根组织的 cDNA 文库, 这表明它可能主要在根组织中表达 (Lewis 等, 2010)。酵母转化子微粒体蛋白的酶活性分析表明, *NtabCYP82E4*, *E5V2*, *E10* 的 *K_m* 值分别为 3.9、5.6、3.9, 说明三者催化能力非常接近 (Gavilano 等, 2007; Xu 等, 2007; Lewis 等, 2010)。

3 NND 基因与烟草碱谱进化

烟草属的吡啶生物碱组成具有种特异性, 在不同种间高度变化, 但大部分种都存在某种生物碱含量占主导地位 (Saitoh 等, 1985)。绒毛状烟草 (*N. tomentosiformis*) 在绿色及衰老叶片中均积累去甲基尼古丁; 而林烟草 (*N. sylvestris*) 在绿色叶片中主要积累尼古丁, 但在叶片衰老过程中大部分尼古丁转化为去甲基尼古丁 (Gavilano 等, 2007)。虽然普通烟草是源于绒毛状烟草和林烟草种间杂交形成的异缘四倍体, 但其碱谱与两个祖先迥异。大部分普通烟草的绿色和衰老叶片中, 尼古丁大约占生物碱总量的 95% (Saitoh 等, 1985)。因此普通烟草碱谱

进化史中必然发生两次失活事件, 使得源自两个祖先的转化因子丧失功能。Mann 等 (1964) 推测分别源自绒毛状烟草和林烟草的尼古丁转化基因座 Ct 和 Cs 发生功能丧失性突变造成普通烟草积累尼古丁的表型。

对于普通烟草尼古丁转化基因座的研究最近取得了一系列进展。Siminszky 等 (2005) 在普通烟草基因组中发现了 CYP82E2 亚家族的 3 个基因 *NtabCYP82E2*, *NtabCYP82E3*, *NtabCYP82E4*。进一步研究表明 *NtabCYP82E3*, *NtabCYP82E4* 来源于绒毛状烟草, 在染色体上被定位于 Ct 基因座 (Gavilano 等, 2007)。绒毛状烟草中二者的同源基因 *NtomCYP82E3*, *NtomCYP82E4* 均能表达产生具有 NND 活性的酶, 其中前者在绿色叶片中强烈表达, 后者在成熟叶片中表达被特异上调 (Gavilano 等, 2007)。在普通烟草的进化历程中, *NtabCYP82E3* 发生一个剔除突变而丧失功能, *NtabCYP82E4* 能够编码具有活性的 NND, 但在转录水平被不稳定抑制, 两方面协同造成普通烟草“非转化株”中 Ct 基因座失活, 而“转化株”中 *NtabCYP82E4* 能正常表达 (Siminszky 等, 2005; Gavilano 等, 2007)。

表 1 烟草尼古丁去甲基酶基因的进化
Table 1 Evolution of tobacco nicotine N-demethylase gene

种名 Species		尼古丁去甲基酶基因 Nicotine N-demethylase gene			
绒毛状烟草 <i>N. tomentosiformis</i>		<i>NtomCYP82E3</i> ; 在绿色叶片中强 表达	<i>NtomCYP82E4</i> ; 叶片衰老过程表达上调	<i>NtomCYP82E5V2</i> ; 在绿色叶片中强 表达	
林烟草 <i>N. sylvestris</i>		<i>NsylCYP82E2</i>			<i>NsylCYP82E10</i>
栽培烟草 <i>N. tabacum</i>		<i>NtabCYP82E2</i> (失 活); E375K 和 W422L 氨基酸突 变造成功能丧失	<i>NtabCYP82E3</i> (失 活); W330C 氨基 酸突变造成功能 丧失	<i>NtabCYP82E4</i> (活 性); 在“非转化株”中表达受 到抑制, 在“转化株”的叶 片衰老过程表达	<i>NtabCYP82E5V2</i> (活性); 在绿色和 衰老叶片中低水 平表达
					<i>NtabCYP82E10</i> (活性); 根中特异 表达

在普通烟草中 *NtabCYP82E2* 基因源自林烟草, 定位于染色体上的 Cs 基因座, 与林烟草基因组中的同源基因 *NsylCYP82E2* 相似, 二者都在成熟叶片中被显著诱导表达 (Chakrabarti 等, 2007)。 *NsylCYP82E2* 能表达具有 NND 活性的酶, 但由于两个退化突变造成 *NtabCYP82E2* 功能丧失 (Chakrabarti 等, 2007)。综上所述, 普通烟草中遗传自祖先亲本的尼古丁转化基因座 Ct、Cs 均在其进化过程中发生突变造成功能丧失 (表 1), 这导致其积累尼古丁的表型, 区别于两个亲本积累去甲基尼古丁的表型。

4 低去甲基尼古丁烟草品种的选育

由于去甲基尼古丁及其衍生物 NNN 对人类健康潜在的威胁, 培育去甲基尼古丁含量较低的烟草品种一直是育种研究的目标。近年来国内育种工作者探索了打顶时间、水份供应等栽培技术的改良对烟株去甲基尼古丁含量的影响 (韩锦峰等, 2009; 蔡联合等, 2009), 此外还通过杂交的方法对主栽白肋烟品种鄂烟一号进行遗传改良, 有效降低了烟碱的转化率 (史宏志等, 2007a, b)。随着编码 NND 的

CYP82E2 亚家族基因被克隆及功能分析,该亚家族基因也成为各种分子育种操作的目标。Gavilano 等(2006)通过 RNAi 技术抑制白肋烟强“转化株”CYP82E4 及其同源基因的表达,转基因植株的去甲基尼古丁转化率最低,只有 0.8%,甚至低于白肋烟“非转化株”普遍为 3%~5%的转化率。这些转基因植株大规模田间试验数据也证实了上述结果,与非转基因对照植株相比,转基因植株去甲基尼古丁含量下降大约 6 倍,同时 NNN 和总 TSNA 含量也相应下降(Lewis 等,2008)。由于转基因技术用于商业烟草生产面临法规、专利保护及终端用户接受程度等各方面的挑战,使用化学诱变策略的突变育种技术被尝试用于低去甲基尼古丁品种的选育。

Julio 等(2008)在 1 132 个 EMS 诱变突变株中筛选得到 10 株在 *NtabCYP82E4* 基因座发生点突变的烟草,其中无义突变及错义突变株中去甲基尼古丁含量降至极其微量水平。Lewis 等(2010)用 EMS 诱变的方法分别获得了 *NtabCYP82E4*、*NtabCYP82E5V2*、*NtabCYP82E10* 发生突变的白肋烟材料,将三种材料杂交筛选后获得三基因同时突变的突变株,其去甲基尼古丁含量远远低于对照株,约占总生物碱含量 0.5%(对照株大于 90%),研究者认为将这些突变导入商业品系中将是降低烟草制品中去甲基尼古丁含量可行的策略。为了快速有效的实现这个目标,Li 等(2011)开发了特异的 CAPs 和 dCAPs 标记来鉴定这些突变,结果表明这些标记能够辅助导入上述点突变进入商业品种,成功地降低了去甲基尼古丁和 NNN 水平。

5 研究展望

普通烟草“非转化株”中去甲基尼古丁占总生物碱含量约为 2%~5%,然而在上述通过 RNAi 技术或 EMS 突变获得的烟草植株中,去甲基尼古丁含量虽有明显下降,但仍占总生物碱含量的 0.5%,这表明仍有一定量的去甲基尼古丁合成(Lewis 等,2008,2010)。造成这个结果可能有如下 3 个原因:(1)RNAi 植株中 CYP82E2 亚家族基因表达并未被完全抑制(Lewis 等,2008);(2)EMS 突变株中仅三个具有功能的 NND 被突变失活,由于烟草基因组序列未知,可能还存在其它 CYP82E2 亚家族基因能够编码 NND(Lewis 等,2010);烟草基因组测序完成之后可能获得更多的 CYP82E2 亚家族基因

序列信息,深入研究可能获得新的 NND 基因信息;(3)烟草中还可能存在不以尼古丁为中间产物的去甲基尼古丁合成途径,最近对甲基腐胺氧化酶(MPO)的功能分析为这种推断提供了依据。MPO 催化甲基腐胺氧化脱氨生成 N-甲氨基丁醛,它是尼古丁吡啶环合成的中间产物。但最近发现 MPO 能直接以腐胺为底物生成非甲基化的吡咯啉化合物,该化合物环化产物可能作为尼古丁合成酶底物直接生成去甲基尼古丁(Heim 等,2007;Kato 等,2007)。对该途径开展研究可能全面阐述去甲基尼古丁在烟草中的生物合成机制,为生产不含去甲基尼古丁(Nornicotine-free)烟草提供理论依据。

虽然 CYP82E2 亚家族基因已被克隆及功能分析,对 CYP82E4 基因的启动子也进行了初步分析,但关于调控该家族基因表达的转录因子还无相关研究发表。如果能够鉴定出 CYP82E2 亚家族基因表达所需共同的转录因子,一方面可以对尼古丁去甲基化与信号通路的关系有更深刻理解;而转录因子基因也可以作为 EMS 诱导突变的靶基因,直接生成低去甲基尼古丁含量的烟草,从而避免三突变株育种过程中反复的杂交及筛选过程,加快育种效率。

参考文献:

- Bartholomeusz TA, Bhogal RK, Molinie R, et al. 2005. Nicotine demethylation in *Nicotiana* cell suspension cultures; N'-formyl-nornicotine is not involved[J]. *Phytochemistry*, **66**:2 432-2 440
- Bose BC, De HN, Mohammad S. 1956. Studies on the biogenesis of alkaloids in tobacco plants (II) Investigation on transmethylation of nicotine and nor-nicotine in *N. tabacum* and *N. glauca* [J]. *Indian J Med Res*, **44**:91-97
- Botte M, Mabon F, Le Mouillour M, et al. 1997. Biosynthesis of nornicotine in root cultures of *Nicotiana glauca* does not involve oxidation at C-5' of nicotine[J]. *Phytochemistry*, **46**:117-122
- Cai LH(蔡联合), Yang J(杨军), Yin QS(尹启生), et al. 2009. Effect of drought stress on burley tobacco's nicotine conversion in fast growing period(旺长期干旱胁迫对白肋烟烟碱向降烟碱转化的影响)[J]. *Acta Tobacco Sinica*(中国烟草学报), **15**(3):63-66
- Chakrabarti M, Bowen SW, Coleman NP, et al. 2008. CYP82E4-mediated nicotine to nornicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway[J]. *Plant Mol Biol*, **66**:415-427
- Chakrabarti M, Meekins KM, Gavilano LB, et al. 2007. Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco[J]. *New Phytol*, **175**:565-574
- Chelvarajan RL, Fannin FF, Bush LP. 1993. Study of nicotine demethylation in *Nicotiana glauca* [J]. *J Agric & Food Chem*, **41**:858-862

- Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AM, *et al.* 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis[J]. *FEBS Lett*, **508**:215–220
- Dickerson TJ, Janda KD. 2002. A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:15 084–15 088
- Gavilano LB, Coleman NP, Bowen SW, *et al.* 2007. Functional analysis of nicotine demethylase genes reveals insights into the evolution of modern tobacco[J]. *J Biol Chem*, **282**:249–256
- Gavilano LB, Coleman NP, Burnley LE, *et al.* 2006. Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nornicotine content[J]. *J Agric Food Chem*, **54**:9 071–9 078
- Gavilano LB, Siminszky B. 2007. Isolation and characterization of the cytochrome P450 gene CYP82E5v2 that mediates nicotine to nornicotine conversion in the green leaves of tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, **48**:1 567–1 574
- Griffith RB, Valleau WD, Stokes GW. 1955. Determination and inheritance of nicotine to nornicotine conversion in tobacco[J]. *Science*, **121**:343–344
- Han JF(韩锦峰), Han FG(韩富根), Liu HS(刘华山), *et al.* 2009. Effects of topping time on precursor of tobacco-specific nitrosamines in flue-cured tobacco(打顶时间对烤烟特有亚硝酸胺前体物的影响)[J]. *J Henan Agric Sci*(河南农业科学), **38**(7):58–60
- Hao D, Yeoman MM. 1996. Mechanism of nicotine N-demethylation in tobacco cell suspension cultures[J]. *Phytochemistry*, **41**:477–482
- Hao D, Yeoman MM. 1996. Nicotine N-demethylase in cell-free preparations from tobacco cell cultures[J]. *Phytochemistry*, **42**:325–329
- Hao D, Yeoman MM. 1998. Evidence in favour of an oxidative N-demethylation of nicotine to nornicotine in tobacco cell cultures[J]. *J Plant Physiol*, **152**:420–426
- Hecht SS, Hoffmann D. 1989. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer[J]. *Cancer Surv*, **8**:273–294
- Heim WG, Sykes KA, Hildreth SB, *et al.* 2007. Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript[J]. *Phytochemistry*, **68**:454–463
- Hitoshi N, Hirotsugu O, Toshikatsu N, *et al.* 1993. Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s[J]. *Biochem Pharm*, **45**:2 554–2 556
- Irmmler S, Schroder G, St-Pierre B, *et al.* 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase[J]. *Plant J*, **24**:797–804
- Julio E, Laporte F, Reis S, *et al.* 2008. Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding[J]. *Mol Breed*, **21**:369–381
- Katoh A, Shoji T, Hashimoto T. 2007. Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, **48**:550–554
- Leete E, Bell VM. 1959. The Biogenesis of the Nicotiana Alkaloids. VIII. The Metabolism of Nicotine in *N. tabacum*[J]. *J Am Chem Soc*, **81**:4 358–4 359
- Lewis RS, Bowen SW, Keogh MR, *et al.* 2010. Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in *Nicotiana tabacum* L.; functional characterization of the CYP82E10 gene[J]. *Phytochemistry*, **71**:1 988–1 998
- Lewis RS, Jack AM, Morris JW, *et al.* 2008. RNA interference (RNAi)-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves[J]. *Plant Biotechnol J*, **6**:346–354
- Li D, Lewis R, Jack A, *et al.* 2011. Development of CAPS and dCAPS markers for CYP82E4, CYP82E5v2 and CYP82E10 gene mutants reducing nicotine to nornicotine conversion in tobacco[J]. *Mol Breed*, **1**–11
- Mann TJ, Weybrew JA, Matzinger DF, *et al.* 1964. Inheritance of the conversion of Nicotine to Nornicotine in Varieties of *Nicotiana tabacum* L. and Related Amphiploids[J]. *Crop Sci*, **4**:349–353
- Mesnard F, Roscher A, Garlick AP, *et al.* 2002. Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by *Nicotiana plumbaginifolia* cell-suspension cultures[J]. *Planta*, **214**:911–919
- Roberts DL. 1988. *Natural tobacco flavor*[J]. *Recent Advances in Tobacco Sci*, **14**:49–81
- Saitoh F, Norma M, Kawashima N. 1985. The alkaloid contents of sixty nicotiana species[J]. *Phytochemistry*, **24**:477–480
- Schroder G, Unterbusch E, Kaltenbach M, *et al.* 1999. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase[J]. *FEBS Lett*, **458**:97–102
- Shi HZ(史宏志), Li JP(李进平), Li ZP(李宗平), *et al.* 2007a. Study on decreasing nicotine conversion in Chinese burley hybrid through genetic improvement(遗传改良降低白肋烟杂交种烟碱转化率研究)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), **40**(1):153–160
- Shi HZ(史宏志), Li JP(李进平), Li ZP(李宗平), *et al.* 2007b. Improvement of the trait of nicotine conversion in burley tobacco hybrid(白肋烟杂交种烟碱转化性状的改良)[J]. *J Henan Agric Univ*(河南农业大学学报), **41**(1):21–24
- Siminszky B, Gavilano L, Bowen SW, *et al.* 2005. Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**:14 919–14 924
- Wang S, Yang S, An B, *et al.* 2011. Molecular dynamics analysis reveals structural insights into mechanism of nicotine N-demethylation catalyzed by tobacco cytochrome P450 mono-oxygenase[J]. *PLoS ONE*, **6**:e23342
- Wernsman EA, Matzinger DF. 1968. Time and site of nicotine conversion in tobacco[J]. *Tobacco Sci*, **12**:226–228
- Xu D, Shen Y, Chappell J, *et al.* 2007. Biochemical and molecular characterizations of nicotine demethylase in tobacco[J]. *Physiol Plant*, **129**:307–319

作者: 宋中邦, 肖炳光, 卢秀萍, SONG Zhong-Bang, XIAO Bing-Guang, LU Xiu-Ping
作者单位: 云南省烟草农业科学研究院, 云南玉溪, 653100
刊名: 广西植物 ISTIC PKU
英文刊名: Guihaia
年, 卷(期): 2012, 32(6)

参考文献(38条)

1. Bartholomeusz TA; Bhogal RK; Molinie R Nicotine demethylation in Nicotiana cell suspension cultures: N'-formylornicotine is not involved 2005
2. Bose BC; De HN; Mohammad S Studies on the biogenesis of alkaloids in tobacco plants (II) Investigation on transmethylation of nicotine and nor-nicotine in N. tabacum and N. glauca 1956
3. Botte M; Mabon F; Le Mouillour M Biosynthesis of nornicotine in root cultures of Nicotiana glauca does not involve oxidation at C-5' of nicotine 1997
4. 蔡联合, 杨军, 尹启生, 李玉娥 旺长期干旱胁迫对白肋烟烟碱向降烟碱转化的影响[期刊论文]-中国烟草学报 2009(3)
5. Chakrabarti M; Bowen SW; Coleman NP; Meekins KM; Dewey RE; Siminszky B CYP82E4-mediated nicotine to nornicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway[外文期刊] 2008(4)
6. Chakrabarti M; Meekins KM; Gavilano LB Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco 2007
7. Chelvarajan RL; Fannin FF; Bush LP Study of nicotine demethylation in Nicotiana glauca 1993
8. Collu G; Unver N; Peltenburg-Looman AM Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis 2001
9. Dickerson TJ; Janda KD A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease 2002
10. Gavilano LB; Coleman NP; Bowen SW Functional analysis of nicotine demethylase genes reveals insights into the evolution of modern tobacco 2007
11. Gavilano LB; Coleman NP; Burnley LE Genetic engineering of Nicotiana tabacum for reduced nornicotine content 2006
12. Gavilano LB; Siminszky B Isolation and characterization of the cytochrome P450 gene CYP82E5v2 that mediates nicotine to nornicotine conversion in the green leaves of tobacco 2007
13. Griffith RB; Valleau WD; Stokes GW Determination and inheritance of nicotine to nornicotine conversion in tobacco 1955
14. 韩锦峰, 韩富根, 刘华山, 白海群, 魏跃伟, 樊红, 解莹莹 打顶时间对烤烟特有亚硝胺前体物的影响[期刊论文]-河南农业科学 2009(7)
15. Hao DY; Yeoman MM MECHANISM OF NICOTINE N-DEMETHYLATION IN TOBACCO CELL SUSPENSION CULTURES[外文期刊] 1996(2)
16. Hao D; Yeoman MM Nicotine N-demethylase in cellfree preparations from tobacco cell cultures 1996
17. Hao D; Yeoman MM Evidence in favour of an oxidative N-demethylation of nicotine to nornicotine in tobacco cell cultures 1998
18. Hecht SS; Hoffmann D The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer 1989
19. Heim WG; Sykes KA; Hildreth SB Cloning and characterization of a Nicotiana tabacum methylputrescine oxidase transcript 2007
20. Hitoshi N; Hirotsugu O; Toshikatsu N Nicotine metabolism by rat hepatic cytochrome P450s 1993
21. Irmeler S; Schroder G; St-Pierre B Indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase 2000
22. Julio E; Laporte F; Reis S Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding 2008

23. [Katoh A;Shoji T;Hashimoto T Molecular cloning of Nmethylputrescine oxidase from tobacco 2007](#)
24. [Leete E;Bell VM The Biogenesis of the Nicotiana Alkaloids.VIII.The Metabolism of Nicotine in N.tabacuml 1959](#)
25. [Lewis RS;Bowen SW;Keogh MR Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in Nicotiana tabacum L.:functional characterization of the CYP82E10 gene 2010](#)
26. [Lewis RS;Jack AM;Morris JW;Robert VJ;Gavilano LB;Siminszky B;Bush LP;Hayes AJ;Dewey RE RNA interference \(RNAi\)-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves\[外文期刊\] 2008\(4\)](#)
27. [Li D;Lewis R;Jack A Development of CAPS and dCAPS markers for CYP82E4,CYP82E5v2 and CYP82E10 gene mutants reducing nicotine to nornicotine conversion in tobacco 2011](#)
28. [Mann TJ;Weybrew JA;Matzinger DF Inheritance of the conversion of Nicotine to Nornicotine in Varieties of Nicotiana tabacum L. and Related Amphiploids 1964](#)
29. [Mesnard F;Roscher A;Garlick AP;Girard S;Baguet E;Arroo RRJ Evidence for the involvement of tetrahydrofolate in the demethylation of nicotine by Nicotiana plumbaginifolia cell-suspension cultures\[外文期刊\] 2002\(6\)](#)
30. [Roberts DL Natural tobacco flavor 1988](#)
31. [Saitoh F;Noma M;Kawashima N The alkaloid contents of sixty nicotiana species 1985](#)
32. [Schroder G;Unterbusch E;Kaltenbach M Lightinduced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis:tabersonine 16-hydroxylase 1999](#)
33. [史宏志, 李进平, 李宗平, BUSH Lowell P, 王昌军, 刘国顺 遗传改良降低白肋烟杂交种烟碱转化率研究\[期刊论文\]-中国农业科学 2007\(1\)](#)
34. [史宏志, 李进平, 李宗平, 王昌军, 王俊 白肋烟杂交种烟碱转化性状的改良\[期刊论文\]-河南农业大学学报 2007\(1\)](#)
35. [Siminszky B;Gavilano L;Bowen SW Conversion of nicotine to nornicotine in Nicotiana tabacum is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase 2005](#)
36. [Wang S;Yang S;An B Molecular dynamics analysis reveals structural insights into mechanism of nicotine N-demethylation catalyzed by tobacco cytochrome P450 mono-oxygenase 2011](#)
37. [Wernsman EA;Matzinger DF Time and site of nicotine conversion in tobacco 1968](#)
38. [Xu DM;Shen YX;Chappell J;Cui MW;Nielsen M Biochemical and molecular characterizations of nicotine demethylase in tobacco\[外文期刊\] 2007\(2\)](#)

引用本文格式: [宋中邦, 肖炳光, 卢秀萍, SONG Zhong-Bang, XIAO Bing-Guang, LU Xiu-Ping 烟草尼古丁去甲基化酶基因及其在育种中的应用\[期刊论文\]-广西植物 2012\(6\)](#)