

rolC 基因对颠茄托品烷生物碱合成的影响

路星星¹, 谭艾娟¹, 周浩¹, 敖雯雯¹, 吕世明², 满建民¹, 张明生¹, 强玮^{1*}

(1. 贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院, 山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室, 山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 发根农杆菌浸染植物后产生的发根可合成高水平次生代谢产物, 这种代谢增强作用是由 *rol* 基因诱导激发的, 因此可利用 *rol* 基因提高颠茄中托品烷生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 的合成能力。本研究以颠茄为实验材料, 将发根农杆菌 pRiA4 质粒上的 *rolC* 基因通过 CaMV35S 启动子驱动, 导入颠茄中超表达。分析转基因颠茄的表型、TAs 含量以及 TAs 合成途径关键酶基因转录表达水平变化。结果表明, 转基因颠茄表现出根系发达、雄性不育、雄蕊柱长高于雌蕊、提前开花、节间缩短、花小且多、腋芽和侧芽增多、顶端优势下降和叶片狭长等表型; 转基因颠茄的 TAs 含量均显著高于对照, 莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱含量最高可达对照的 2.58、3.59 和 15.77 倍; TAs 合成途径中的 3 个关键酶基因腐胺 N-甲基转移酶 (*PMT*)、托品酮还原酶 I (*TRI*) 和莨菪碱 6- β -羟化酶 (*H6H*) 的表达量与对照相比表达上调。以上研究表明 *rolC* 基因通过上调颠茄 TAs 合成关键酶基因的表达提高了颠茄中 TAs 的合成能力, 为利用 *rolC* 基因进行高 TAs 含量的颠茄分子育种奠定了基础。

关键词: 颠茄; *rolC* 基因; 莨菪碱; 东莨菪碱; 山莨菪碱

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0533-08

Effect of the *rolC* gene on biosynthesis of tropane alkaloids in *Atropa belladonna*

LU Xing-xing¹, TAN Ai-juan¹, ZHOU Hao¹, AO Wen-wen¹, LÜ Shi-ming², MAN Jian-min¹, ZHANG Ming-sheng¹, QIANG Wei^{1*}

(1. Ministry of Education, Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Hair roots induced by *Agrobacterium rhizogene* produce higher levels of secondary metabolites than non-induced plants, and the enhanced metabolic capacity is driven by the *rol* gene. We hypothesized that *rol* genes can be utilized to improve the biosynthesis of tropane alkaloids (TAs) in *Atropa belladonna*. In this study, the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogene* pRiA4 plasmid, driven by a CaMV35S promoter, was overexpressed in *A. belladonna*. The phenotypes, TAs content and transcriptional expression of key genes in TAs biosynthesis were analyzed in transgenic *A. belladonna* plants. Results show that transgenic *A. belladonna* exhibited a well-developed root system, male sterility, higher stamen column length than pistil, early flowering, internode shortening, smaller but more flowers, increased axillary buds and lateral buds, decreased apical dominance, and long and narrow leaves as compared to wild-type plants. Transgenic *A. belladonna* produced more TAs than wild-type plants, with

收稿日期: 2021-09-30; 修回日期: 2021-10-13.

基金项目: 贵州省科技计划重大专项课题 (黔科合平台人才 [2017] 5411-06); 贵州大学培育项目 (贵大培育 [2019] 51 号); 贵州大学引进人才科研项目 (贵大人基合字 [2017] 58); 贵州省中药材现代产业技术体系建设项目 (GZCYTX-02); 国家喀斯特石漠化防治工程技术研究中心建设 (2012FU125X13); 贵州省生物学一流学科建设项目 (GNYL [2017] 009).

*通讯作者 Tel: 13678505784, E-mail: wayneqiang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1431

the content of hyoscyamine, anisodamine and scopolamine reaching 2.58, 3.59 and 15.77-fold that of the control group, respectively. The gene expression of putrescine N-methyltransferase (*PMT*), tropinone reductase I (*TRI*) and hyoscyamine 6- β -hydroxylase (*H6H*), key enzymes in TAs biosynthesis, were up-regulated compared with the control group. The above results indicate that the *rolC* gene enhances TAs biosynthesis in *A. belladonna* by up-regulating the expression of key enzymes in the TAs biosynthesis pathway, laying a foundation for genetic manipulation of *A. belladonna* to increase TAs content by increasing *rolC* gene expression.

Key words: *Atropa belladonna* L.; *rolC* gene; hyoscyamine; scopolamine; anisodamine

托品烷生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 是一类主要产于少数茄科植物的次生代谢产物, 具有抗胆碱活性, 主要包括莨菪碱 (hyoscyamine)、东莨菪碱 (scopolamine) 和药效较低的山莨菪碱 (anisodamine), 临床上应用最多的是莨菪碱和东莨菪碱。莨菪碱有止痛解痉的功能, 可治疗胆道、胃痉挛, 也可用于治疗周围血管病、突发性耳聋、各种神经疼痛、晕船、癫痫等疾病。东莨菪碱作为颠茄中药理作用最强的一种生物碱, 可用作副交感神经系统抑制剂, 作用较强且短暂。临床上用它的氢溴酸盐治疗咳嗽、平喘、麻醉镇痛等疾病, 也可作为控制由帕金森病引起的震颤、僵硬等症状的药物^[1]。颠茄 (*Atropa belladonna* L.) 虽然是《中国药典》收录的 TAs 的主要商业药源植物, 但野生颠茄中的 TAs 含量较低, 其中莨菪碱含量大约为干重的 0.02%~0.17%, 东莨菪碱含量仅为干重的 0.01%~0.08%, 因此培育高产 TAs 含量的颠茄植株是现代中药产业化的重要目标^[2]。

植物外植体经发根农杆菌浸染后, 农杆菌中 Ri 质粒的 T-DNA 区被整合到宿主植物基因组中, 可在伤口部位诱导产生发根, 发根相比母体植物的根具有更强的次生代谢产物合成能力, 其代谢物含量往往高于自然根数倍。研究发现这主要是由发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 区的 *rol* 基因引起的, *rol* 基因家族现已鉴定有 *rolA*、*B*、*C*、*D* 四个成员^[3]。以植物细胞和器官培养为研究体系, 发现单个的 *rol* 基因在茄科、茜草科、五加科和蔷薇科中能够促进植物细胞产生大量的次生代谢产物^[4]。*rolB* 和 *rolC* 基因是诱导植物生根和激活代谢物质合成的主效基因。*rolB* 基因能够提高茜草愈伤中的蒽醌含量达 15 倍^[5]、青蒿中的青蒿素提高达 9 倍^[6], 使山葡萄中的白藜芦醇含量提高达干重的 3.15%, 是对照的 100 倍^[7]。*rolC* 转化的人参根培养物中人参皂苷含量极高 (干重 6.58%), 提高达 3 倍^[8]; 莴笋经 *rolC* 转化后总酚含量提高 53%~98%, 总黄酮含量增加 45%~58%^[9]。虽然目前 *rol* 基因在植物中的作用机制尚不明晰, 但利用 *rol* 基因提高细胞次生代谢物生产的方法已得到大量关注。

颠茄中 TAs 主要在根中合成, 悬浮细胞和愈伤组

织中基本不能积累 TAs, 且利用植物细胞培养体系进行基因功能研究尚可, 但用于次生代谢物大规模工业生产还不成熟。在很长一段时间内, 植物药用活性成分获得还是以植株提取为主, 所以, 在植株水平研究 *rol* 基因对颠茄植株中 TAs 合成的作用对相关产业有更重要的意义。本研究通过代谢工程技术获得 *rolC* 基因超表达的转基因颠茄植株, 观察超表达 *rolC* 基因颠茄与野生型颠茄的表型差异、检测其生物碱含量以及颠茄生物碱合成途径中的关键酶基因表达量, 探讨 *rol* 基因对颠茄生物碱合成的影响, 为高产 TAs 的颠茄分子育种奠定基础。

材料与方 法

植物材料 颠茄种子 (*Atropa belladonna* L.) 由西南大学生命科学学院廖志华教授提供, 繁育并保存于贵州大学植物生理生化与分子生物学实验室。

仪器和试剂 高效液相色谱仪 (Waters 2695, 美国 Waters 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX Connect); PCR 仪 (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler); 头孢霉素 (cefradine, Cef)、卡那霉素 (kanamycin, Kan)、赤霉素 (gibberellins, GAs)、6-苄氨基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA)、萘乙酸 (1-naphthaleneacetic acid, NAA)、乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS)、玉米素 (zeatin, ZT)、吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA) 和 3-吲哚丁酸 (3-indolebutyric acid, IBA) (索莱宝生物技术有限公司); 胶回收试剂盒 TIANgel Midi Purification Kit、质粒提取试剂盒 TIAprep Mini Plasmid Kit 和总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司); 莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱标品 (美国 Sigma 公司); 重组试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物技术有限公司); Phenomenex Gemini C18 110A 色谱柱 (上海岛津 GL 公司); 高保真 Taq DNA 聚合酶为 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒、TB Green® premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa 生物技术有限公司)。本研究所用引物及测序服务由北京擎科新业生物技术有限公司提供。其他试剂均为分析纯国产试剂。

***rolC* 基因的克隆** 根据已发表的发根农杆菌中 pRiA4 质粒的序列 (其中包含 *rolC* 基因编码序列) GenBank (序列号: X03433), 按重组试剂盒说明分别设计含有 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点的 *rolC* 基因重组引物 F-*rolC*: ACGGGGGACTCTAGAGGATCCGTTAACATGGCTGAAGACGA 和 R-*rolC*: CGATCGGGGAAATTCGAGCTCGACTAACATTAGCCGATTG。用高保真酶扩增 *rolC* 基因, 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 30 个循环 (94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火, 72 °C 延伸 45 s), 最后 72 °C 延伸 2 min。对 PCR 产物进行胶回收纯化, 测定浓度, 用于后续与 pBI121 质粒进行重组。

***rolC* 基因超表达载体的构建** 以 pBI121 为植物表达载体, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 在 37 °C 下进行双酶切 2 h, 胶回收纯化载体大片段。按重组试剂盒说明, 在 37 °C 条件下将线性化的载体片段和 *rolC* 基因重组 PCR 产物 (摩尔比 1:3) 连接 30 min, 反应体系为: 2 μL 5×CEII buffer、1 μL E-nase II、3 μL PBI121 酶切产物、1 μL *rolC* 基因片段、3 μL ddH₂O。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 在含 Kan (50 mg·L⁻¹) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 分别进行 PCR 和测序验证, 将验证正确的质粒命名为 pBI121-*rolC*。图 1 为 *rolC* 基因超表达载体示意图。

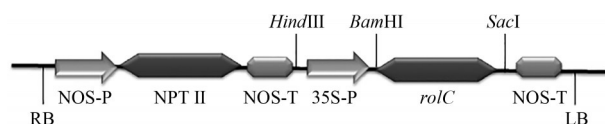


Figure 1 Construction of *rolC* gene expression vector

CaMV35S-*rolC* 转基因颠茄的获得 挑选饱满的颠茄种子用 1 g·L⁻¹ 的赤霉素浸泡 24 h, 流水反复冲洗 0.5 h 后, 转移至超净工作台。用无菌水冲洗 3~4 次, 再用 75% 的酒精消毒 1 min, 无菌水漂洗除尽酒精, 再用 50% 的次氯酸钠溶液消毒 8~10 min, 无菌水反复冲洗, 除尽残留消毒液。用无菌滤纸将种子表面水分吸干, 接种在含有 Cef (200 mg·L⁻¹) 的 MS 固体培养基上, 25 °C 温室培养, 光周期为 16 h/8 h (亮/暗)。待颠茄种子长出两片子叶后, 剪取其下胚轴和子叶作为外植体, 在含有 pBI121-*rolC* 质粒的根癌农杆菌 EHA105 菌液中浸染 8 min, 无菌滤纸吸干外植体上多余的菌液, 将其移至含有 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮、1 mg·L⁻¹ 6-BA 和 1 mg·L⁻¹ NAA 的 MS 基本培养基上 25 °C 暗处共培 4 d, 再转移到含有 1 mg·L⁻¹ 的 ZT、0.5 mg·L⁻¹ IAA、400 mg·L⁻¹ 的 Cef 和 100 mg·L⁻¹ Kan 的 MS 基本培养基除菌筛选抗性芽, 待分化出抗性芽后, 将其转移到含有 0.2 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸和 400 mg·L⁻¹ 的 Cef 的 MS 生根培养基中, 正

常光周期条件下培养, 直至长成完整植株。每 4 周对转基因植物进行传代培养, 除菌彻底后提取 DNA 进行分子检测, 确认是否转入外源 *rolC* 基因, 并根据农杆菌 EHA105 的 VirD 区设计一对引物 F-VirD: GAGTATGAAACCTTTTCCTATCA 和 R-VirD: GGGATACGGACAAAATGGAG, 避免残留农杆菌造成假阳性。

颠茄的表型分析 拍照记录 CaMV35S-*rolC* 颠茄各个时期的表型变化, 将颠茄移至田间栽培, 记录颠茄的叶长、叶宽、节间及叶鲜重, 通过 IBM SPSS Statistics 22 分析转基因颠茄与野生型颠茄在表型上的差异。

生物碱标准曲线的制作 精确称取 1.000 mg 的莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱标准品粉末, 配制成 1.000 mg·L⁻¹ 的标准母液, 再依次稀释为 500、250、100、50、25、10 μg·mL⁻¹ 的标准液。每个梯度样品重复进样 3 次, 进行 HPLC 检测, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 对 3 种生物碱的标准曲线进行线性拟合, 线性回归方程分别为: 莨菪碱 $y = 7.93 \times 10^3 x - 1.87 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9996$), 山莨菪碱 $y = 4.59 \times 10^3 x + 5.37 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9998$), 东莨菪碱 $y = 6.31 \times 10^3 x - 2.60 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9994$)。

颠茄生物碱的提取和测定 颠茄生物碱的提取参照 Ashtiana 等^[10] 的方法, 稍有改动。用 HPLC 测定莨菪碱、山莨菪碱及东莨菪碱的含量, 每个株系取 3 株颠茄叶片混合样作为 1 个处理, 共 3 个重复。根据各线性回归方程计算出莨菪碱、山莨菪碱和东莨菪碱含量。色谱柱为 C18 液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇和乙腈等比例混合液: 乙酸铵缓冲液 (0.1% 甲酸, pH = 4.0) = 17:83, v/v; 检测波长为 215 nm; 柱温 40 °C; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测时间 20 min, 进样量为 20 μL。

RNA 的提取及 cDNA 的合成 取 1 个月大的颠茄幼苗叶片及根部, 液氮速冻, 研磨至粉状。根据总 RNA 提取试剂盒提取颠茄 RNA, 用微量核酸浓度检测仪及琼脂糖凝胶电泳测定核酸的浓度和质量, A_{260}/A_{280} 均大于 1.8 小于 2.1, 表明 RNA 无蛋白和 DNA 污染, -80 °C 冰箱保存备用。按照反转录试剂盒说明书, 每个样品反转录 500 ng RNA 合成 cDNA 第一链, -20 °C 冰箱保存备用。加样体系: 2 μL 5×PrimeScript™ Buffer (for Real Time)、1 μL Oligo dT Primer (50 μmol·L⁻¹)、0.5 μL PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、2 μL Random 6 mers (100 μmol·L⁻¹)、1 μL 总 RNA, 补足 RNase Free H₂O 至 10 μL, 反转录反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

引物设计与 qRT-PCR 检测 根据 NCBI 上公布的序列, 利用 Vector NTI Suite 8.0 软件设计 TAs 合成途径中的关键酶基因引物序列 (表 1)。将反转录得到的

cDNA 稀释 5 倍, 取 2 μL 作为 qRT-PCR 模板, 以 *ACTIN* (序列号: JX154681) 和 *PGK* (序列号: JX154676) 为内参, 采用 Pfaffl Method 进行相对表达量计算。qRT-PCR 的反应体系组成为: 10 μL SYBR Premix EX Taq ($2\times$)、Forward & Reverse Primer 各 0.8 μL 、6.4 μL ddH₂O 和 2 μL cDNA, 每个样品设置 3 个重复, 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 适当温度退火 30 s (在此收集荧光信号), 40 个循环; PCR 结束后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 分析熔解曲线。

Table 1 qRT-PCR Primer and sequences

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
Fq- <i>ACTIN</i>	TTGTGTTGGACTCTGGTGATGG	60
Rq- <i>ACTIN</i>	CCGTTTCAGCAGTGGTGGTG	
Fq- <i>PGK</i>	TCGCTCTGGAGAAGGTTGAC	59.5
Rq- <i>PGK</i>	CTTGTCCGCAATCACTACATCAG	
Fq- <i>rolC</i>	CGACGATGATGCTCTGCTT	58.8
Rq- <i>rolC</i>	GGAAGGTTGGTGAGGAGTG	
Fq- <i>PMT</i>	CCTACTTACCCTACTGGTGTATC	56.4
Rq- <i>PMT</i>	GCGAAAGATGGCAAATAAAAAGC	
Fq- <i>TRI</i>	CCTGCTGCTTCTTATATTACGG	57
Rq- <i>TRI</i>	GCCCAAGGTACAAATCACAA	
Fq- <i>H6H</i>	TTCCACTTGAGCAGAAAGCAAAGC	56.4
Rq- <i>H6H</i>	CCTCATGGTCAACTTCTCACTTCC	

数据整理及软件分析 IBM SPSS Statistics 22 软件对所有实验数据进行统计分析, 转基因样本与对照样本进行 *t* 检验, 显著水平为 $P < 0.05$, 极显著水平为 $P < 0.01$, 采用 Origin 2019b 制图。

结果与分析

1 pBI121-*rolC* 表达载体的构建

设计 *rolC* 基因的同源重组克隆引物, 从发根农杆菌 pRiA4 质粒的农杆菌 C58C1 中扩增得到含有 *Bam*H I 和 *Sac* I 位点的 *rolC* 基因 (图 2A), 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切 pBI121 获得载体骨架, 将其重组后, 转入 DH5 α 大肠杆菌, 通过菌检并测序得到 pBI121-*rolC* 的表达载体 (图 2B)。

2 CaMV35S-*rolC* 转基因颠茄的获得

剪取 15 d 左右的颠茄幼苗子叶及下胚轴 (图 3A), 经 EHA105-pBI121-*rolC* 菌液转化共培后, 将外植体转移

至含有 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan 的筛选培养基上, 未转基因的组织无法在 Kan 筛选培养基上存活, 而 pBI121-*rolC* 中的 *NptII* 基因能够使转基因组织对 Kan 具有抗性, 转基因组织可以诱导出抗性芽 (图 3B)。待抗性芽长至 2 cm 后将其剪下并转入含有 IBA (0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 MS 生根培养基中 (图 3C), 待长成完整植株, 将颠茄移植至育苗钵温室培养 (图 3D), 提取 DNA 进行 *rolC* 基因的 PCR 检测, 用 F-VirD 和 R-VirD 引物排除由于农杆菌污染造成的假阳性现象, 最终选取 3 个株系的 CaMV35S-*rolC* 转基因植株用于分析 (图 4)。

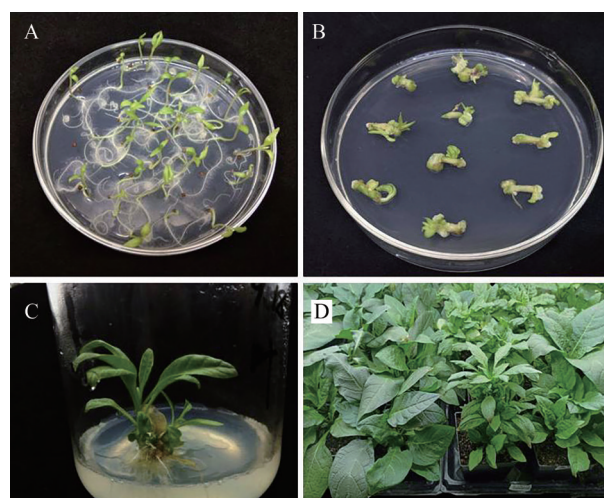


Figure 3 Genetic transformation flow chart of *A. belladonna*. A: Obtaining sterile belladonna seedlings through detoxification; B: Obtainment of kanamycin-resistant plants through selecting on medium with 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin; C: Propagation of transgenic *A. belladonna* plants; D: Transplantation of partial transgenic *A. belladonna* plants

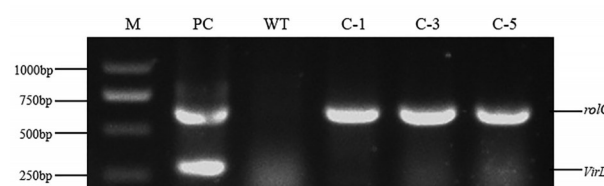


Figure 4 Detection of the *rolC* gene and the *VirD* gene by PCR. M: DNA marker; PC: Positive control; WT: Wild-type (as control); C-1, C-3, C-5: CaMV35S-*rolC* transgenic *A. belladonna* line

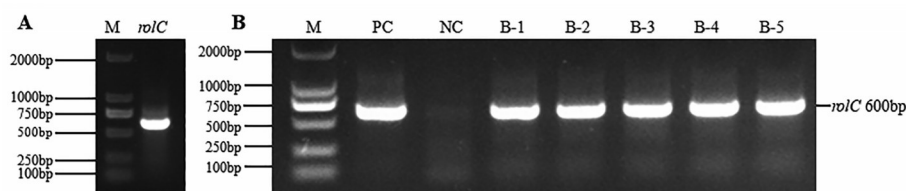


Figure 2 Detection of *rolC* gene by PCR. A: PCR amplification of *rolC* gene; B: PCR detection of *rolC* gene in colonies. M: DNA marker; PC: Positive control; NC: Negative control; B-1 to B-5: Positive bacterial clones

3 CaMV35S-*rolC* 颠茄的表型分析

CaMV35S-*rolC* 颠茄 3 个转基因株系相比于对照, 花期提前、数量增多、侧芽丛生、腋芽分化旺盛 (图 5A~C), 其中 C-1 株系叶片表现为皱叶 (图 5A); CaMV35S-*rolC* 颠茄花朵体型小、花径短、雄蕊柱长高于雌蕊 (图 5D), 而对照表型与之相反; CaMV35S-*rolC* 颠茄生根和根系发育能力明显增强, 根系更为发达茂密 (图 5E)。将 CaMV35S-*rolC* 颠茄与对照移至田间种植 1 个月后, 观测园艺性状, 结果见表 2, CaMV35S-*rolC* 颠茄的叶宽、叶长、节间距及鲜重均显著低于对照, 但叶片长宽比显著高于对照, 表现为狭长叶, 而对照叶片稍钝圆 (图 5D)。

4 托品烷生物碱含量的测定

通过 HPLC 检测田间种植 3 个月的颠茄叶片中的生物碱含量, 结果见图 6。CaMV35S-*rolC* 颠茄的莨菪碱、东莨菪碱和山莨菪碱含量均显著高于对照, 莨菪碱含量由高到低为 C-5 > C-1 > C-3 > WT, C-5 株系的莨菪碱含量 ($6\,547.38\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$) 是对照 ($2\,538.50\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$) 的 2.58 倍 (图 6A); 山莨菪碱含量为 C-1 > C-3 > C-5 > WT, C-1 株系的山莨菪碱含量为 $721.16\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$, 是对照 ($200.81\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$) 的 3.59 倍 (图 6B); 东莨菪碱含

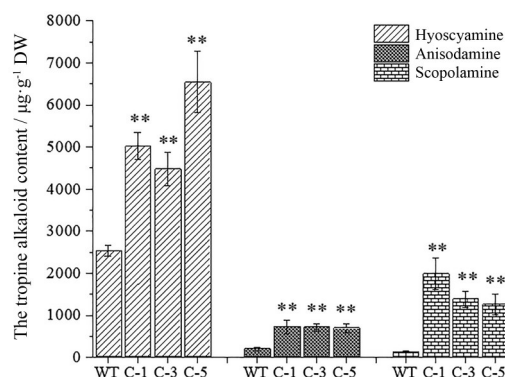


Figure 6 The contents of hyoscyamine, anisodamine and scopolamine in leaves of *A. belladonna*. ** $P < 0.01$ vs WT (wild-type, as control)

量为 C-1 > C-3 > C-5 > WT, 其中 C-1 株系的东莨菪碱含量为 $1\,986.43\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$, 是对照 ($125.99\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{DW}$) 的 15.77 倍 (图 6C)。

5 TAs 合成途径中关键酶基因的相对表达量

在 CaMV35S-*rolC* 颠茄和野生型颠茄叶片中均未检测到 TAs 合成途径关键酶基因 *PMT*、*TRI* 和 *H6H* 基因, 仅在颠茄根中检测到。CaMV35S-*rolC* 颠茄根中 *PMT*、

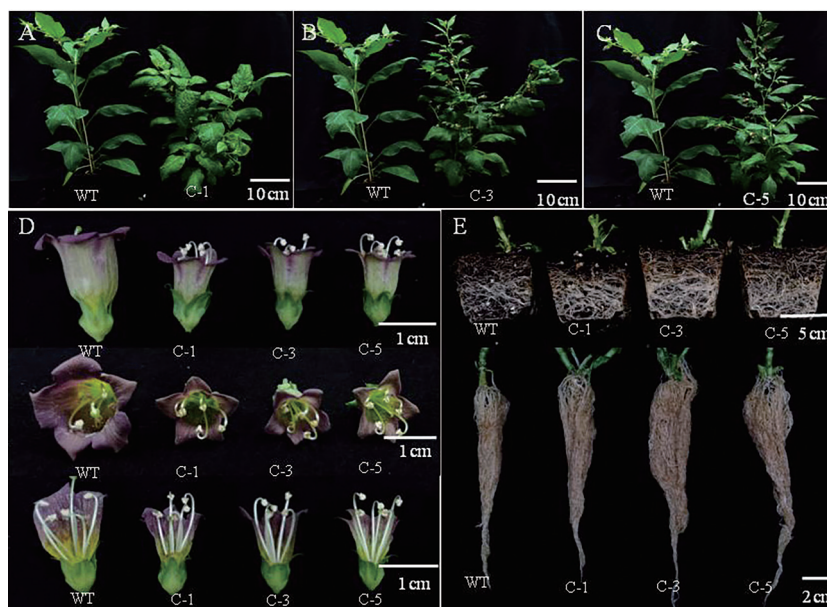


Figure 5 The phenotypes of *A. belladonna* (wild-type and transgenic). A~C: Wild-type and transgenic *A. belladonna* seedlings in the pots; D: Comparison of flowers of wild-type and transgenic *A. belladonna*. E: Comparison of roots of wild-type and transgenic *A. belladonna*. WT: Wild-type (as control); C: CaMV35S-*rolC* transgenic *A. belladonna* line

Table 2 Statistical table of phenotypic of wild-type and transgenic *A. belladonna*. Note: Followed by different low case letter in each column are significantly different ($P < 0.05$); WT: Wild-type (as control)

Name	Leaf length/cm	Leaf width/cm	Aspect ratio	Internode length/cm	Fresh weight/g
WT	16.5 ± 0.7^a	8.4 ± 0.2^a	1.96 ± 0.13^d	3.1 ± 0.4^a	1.775 ± 0.114^a
C-1	13.0 ± 0.5^{bc}	4.2 ± 0.2^c	3.08 ± 0.21^a	0.8 ± 0.3^c	0.737 ± 0.133^{bc}
C-3	14.3 ± 0.3^b	5.3 ± 0.1^c	2.72 ± 0.03^b	1.3 ± 0.2^{bc}	0.855 ± 0.027^b
C-5	12.5 ± 0.9^c	4.7 ± 0.4^{cd}	2.67 ± 0.07^b	0.7 ± 0.3^c	0.608 ± 0.040^c

*TRI*和*H6H*基因表达量均显著高于对照, C-1株系根中*PMT*、*TRI*和*H6H*基因的表达量上调倍数最大, 分别是对照的8.96、3.61和30.43倍(图7)。*H6H*是提高幅度最大的下游途径基因, 相比对照提高了24倍以上。未在野生颠茄中检测到*rolC*基因, 仅在CaMV35S-*rolC*颠茄的根及叶片中检测到(图8)。

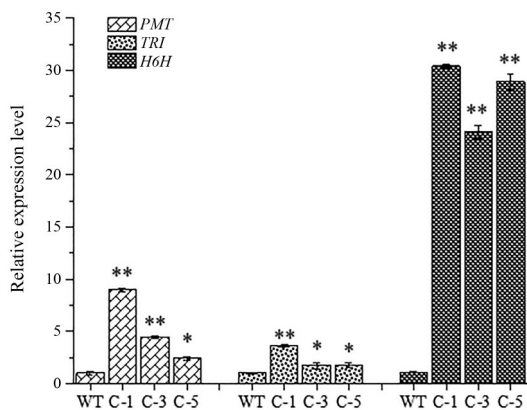


Figure 7 Gene expression levels of key enzymes in the TA synthesis pathway in *A. belladonna* roots. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT (wild-type, as control)

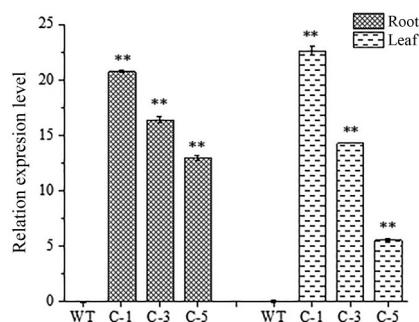


Figure 8 *rolC* gene expression level in *A. belladonna* roots and leaves. ** $P < 0.01$ vs WT (wild-type, as control)

讨论

颠茄中的莨菪碱和东莨菪碱是具有重要医疗价值的抗胆碱药物, 市场需求巨大, 提高药源植物中这两种生物碱含量是植物次生代谢研究的热点之一。对*rol*基因的研究最初在于阐明其对植物发根的诱导能力, 后来发现*rolB*和*rolC*还具有天然的促进植物次生代谢合成的能力。Bonhomme等^[11]用携带*rolC*基因的根癌农杆菌GV3101浸染颠茄子叶诱导产生了发根, 发现*rolC*基因在促进毛状根生长以及生物碱的积累方面发挥了重要作用, 使发根生长速率提高了17倍, 生物碱含量达未转化根的12倍。Grishchenko等^[12]用CaMV35S启动子控制*rolC*基因在朝鲜槐愈伤中表达, 发现转基因朝鲜槐的鲜重及异黄酮类化合物的含量均高于对照。Bulgakov等^[13]和Shkryl等^[5]发现*rolC*基因同样能够提

高莨菪草细胞中莨菪碱的合成, 其含量达到了未转化细胞的1.3~4.3倍。因此*rolC*基因对植物中次生代谢产物合成的促进作用是广谱的, 它可作为植物次生代谢工程潜在的有效靶基因。

本研究同时也观察到CaMV35S-*rolC*颠茄植株地上部分发育变异, 导致园艺性状发生了较大的改变。转*rolC*颠茄顶端优势降低, 相比对照植株矮小、节间缩短、腋芽丛生、节间数及分支数繁多, 同时叶片狭长、提前开花、花多但花形小。在烟草和青蒿中也报道过类似现象, *rolC*基因在提高次生代谢产物的同时也诱导植物表型发生一系列的可遗传变异^[14]。*rolC*基因曾报道在芽的形成过程中表现出重要的作用, 它含有一个大小为540 bp的开放阅读框, 编码的蛋白具有细胞分裂素 β -葡萄糖苷酶活性, 可以促进受体植物内细胞分裂素水平提高^[8], 这可能是导致CaMV35S-*rolC*颠茄植株腋芽茂盛, 侧芽丛生的主要原因。

关于CaMV35S-*rolC*颠茄花朵的表型差异与前人研究一致^[15,16], CaMV35S-*rolC*颠茄相比野生型颠茄提前开花, 但在烟草中*rolC*基因的转入导致了烟草花期推迟^[17]。因此在不同物种中*rolC*基因调控植株的开花时间也存在差异。Schmülling等^[18]研究发现单转*rolC*基因的烟草花朵花粉产量减少、种子蒴果小且雄性不育。本研究已获得转基因T1代植株, T0代转基因植株通过自交法无法获得T1代植株, 已得到的T1代转基因植株是通过用野生型颠茄给T0代CaMV35S-*rolC*颠茄授粉获得。表明CaMV35S-*rolC*颠茄也存在雄性不育这一性状, 雄性不育这个性状能够在一定程度上减少基因漂移造成的基因污染。

*rolC*基因的导入同样诱导颠茄地下部分缺失顶端优势, 所以根系发达, 根生物量显著增多。TAs主要在颠茄的须根中合成, 再运输到地上部位^[19]。颠茄根生物量的增加, 有助于促进TAs生物碱的合成, 提高颠茄中TAs含量。徐洪伟^[20]研究发现经发根农杆菌侵染的玉米毛状根和再生植株根系发达、节根分节较多, 经PCR和PCR-Southern分子杂交检测出在玉米毛状根及再生植株基因组中整合了Ri质粒上的*rolC*基因。由于毛状根再生植株的发达, 在水分胁迫下依旧能提供植物生长代谢过程中所需的水分, 表现出了很好的抗旱性。而本研究中获得的CaMV35S-*rolC*颠茄根系在表型上与经农杆菌侵染的玉米毛状根再生植株一致, 在后续研究中可探究CaMV35S-*rolC*颠茄的抗旱能力。

东莨菪碱在野生颠茄中含量极低但药效更强, 已有很多针对提高东莨菪碱含量的代谢工程研究。*PMT*和*H6H*作为TAs合成途径中的第一个和最后一个关键酶是被研究得最深入的。托品烷还原酶I (TRI) 位于

TAs 合成途径的重要分支处,可控制 TAs 的代谢分流,与托品烷还原酶II (TRII) 存在竞争关系,催化整个反应向莨菪碱方向合成^[19,21]。*PMT*、*TRI* 和 *H6H* 均具有组织特异性,仅在颠茄的根部表达,Wang 等^[22]在颠茄中同时超表达了 *PMT* 和 *H6H*,证实了 *PMT* 和 *H6H* 之间呈协同作用的关系,*H6H* 的表达量与东莨菪碱的含量之间呈正相关关系。本研究未在颠茄叶片中检测到 TAs 合成途径关键酶基因 *PMT*、*TRI* 和 *H6H*,CaMV35S-*rolC* 颠茄根中的 *H6H* 的相对表达量与野生型相比提高了 20.10~49.89 倍,转基因颠茄的东莨菪碱含量也显著高于对照,其中 *H6H* 表达量最高的株系 C-1 的东莨菪碱含量是对照的 15.77 倍。由此也可看出,*rolC* 基因也可用作提高颠茄中东莨菪碱含量的靶基因。Yun 等^[23]和 Wang 等^[22]发现超表达 *H6H* 在促进东莨菪碱生物合成,提高东莨菪碱在转基因植株中积累的同时,也会导致莨菪碱的积累降低,本研究在颠茄中超表达 *rolC* 基因后,在催化代谢流向东莨菪碱合成的同时也促进了莨菪碱的合成与积累。

CaMV35S 启动子会驱动 *rol* 基因在整株颠茄中表达,造成转基因颠茄地上部分呈现出与野生颠茄的表型差异。颠茄须根是 TAs 的合成部位,合成途径中的关键酶基因 *PMT*^[24]、*TRI*、*H6H*^[25] 的启动子均已被分离,且具有根组织特异性,因此下一步利用这些启动子驱动 *rolC* 基因与合成途径基因协调表达,预期能有效地保留和发挥 *rolC* 基因在须根中对颠茄中 TAs 合成的促进作用,同时也能避免转 *rolC* 基因颠茄地上部位表达造成的发育变异,同样地避免了转基因的颠茄雄性不育这一性状,从而获得纯系的转 *rolC* 基因颠茄植株,更好地实现 *rolC* 基因在代谢工程中的合理利用。

综上所述,外源引入 *rolC* 基因可导致颠茄园艺性状改变,但可通过提高 TAs 合成途径中关键酶基因的表达量大幅度提高颠茄中莨菪碱、山莨菪碱及东莨菪碱含量。本研究选育的高产莨菪碱及东莨菪碱的转基因株系可进一步改造培育为更具优势的药源品种,也可为研究 *rolC* 基因调控次生代谢产物的合成机制奠定基础。

作者贡献: 强玮、谭艾娟和张明生设计了本实验;周浩、敖雯雯构建了植物表达载体;满建民和路星星完成了颠茄的遗传转化、种植及相关指标的记录及检测;吕世明和路星星分别完成了数据分析和论文初稿的写作;强玮、谭艾娟、吕世明及张明生共同指导论文的写作与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Kohnen-Johannsen KL, Kayser O. Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production [J]. *Molecules*, 2019, 24: 796-818.
- [2] Xia K, Liu X, Zhang Q, et al. Promoting scopolamine biosynthesis in transgenic *Atropa belladonna* plants with *pmt* and *h6h* overexpression under field conditions [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 106: 46-53.
- [3] Chandra S, Chandra R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 371-395.
- [4] Chandra S. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34: 407-415.
- [5] Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, et al. Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100: 118-125.
- [6] Dilshad E, Cusido RM, Palazon J, et al. Enhanced artemisinin yield by expression of *rol* genes in *Artemisia annua* [J]. *Malaria J*, 2015, 14: 1-10.
- [7] Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, et al. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells [J]. *J Biotechnol*, 2007, 12: 681-692.
- [8] Bulgakov VP. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism [J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26: 318-324.
- [9] Ismail H, Dilshad E, Waheed MT, et al. Transformation of *Lactuca sativa* L. with *rolC* gene results in increased antioxidant potential and enhanced analgesic, anti-inflammatory and antidepressant activities *in vivo* [J]. *3 Biotech*, 2016, 6: 215.
- [10] Ashtiania F, Sefidkonb F. Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5: 6515-6522.
- [11] Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1249-1252.
- [12] Grishchenko OV, Kiselev KV, Tchernoded GK, et al. The influence of the *rolC* gene on isoflavonoid production in callus cultures of *Maackia amurensis* [J]. *Plant Cell Tissue Org*, 2013, 113: 429-435.
- [13] Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes [J]. *J Biotechnol*, 2002, 97: 213-221.
- [14] Khan S, Saema S, Banerjee S, et al. Role of *rol* genes: potential route to manipulate plants for genetic improvement [M] // Ahmad N, Anis M. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore: Springer, 2016: 419-446.
- [15] Sun GF. The effect of *rolC* gene on flowering [J]. *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 1992, (03): 11.
- [16] Kurioka Y, Suzuki Y, Kamada H, et al. Promotion of flowering

- and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV35S-*rolC* chimeric gene of the Ri plasmid [J]. Plant Cell Rep, 1992, 12: 1-6.
- [17] Zhang Z, Sun AJ, Fang JG. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco plant with *rolC* gene [J] J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报), 2001, 24: 25-29.
- [18] Schmülling T, Schell J, Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development [J]. EMBO J, 1988, 7: 2621-2629.
- [19] Qiang W, Wang YX, Zhang QZ, et al. Expression pattern of genes involved in tropane alkaloids biosynthesis and tropane alkaloids accumulation in *Atropa belladonna* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 52-58.
- [20] Xu HW. Research of Regenerative Plants Induced by *Agrobacterium rhizogenes* in Hairy Root Cultures and Drought Resistance in Maize (发根农杆菌诱导玉米毛状根再生植株及抗旱性研究) [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2007.
- [21] Qing W, Xia K, Zhao XP, et al. Cloning and enzymatically functional characterization of a novel tropinone reductase I (*DaTRI 2*) gene in *Datura arborea* [J] Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 574-581.
- [22] Wang X, Chen M, Yang C, et al. Enhancing the scopolamine production in transgenic plants of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes [J]. Physiol Plant, 2011, 143: 309-315.
- [23] Yun DJ, Hashimoto T, Yamada Y. Metabolic engineering of medicinal plants: transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89: 11799-11803.
- [24] Suzuki K, Yamada Y, Hashimoto T. Expression of *Atropa belladonna* putrescine *N*-methyltransferase gene in root pericycle [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40: 289-297.
- [25] Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, et al. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6 β -hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers [J]. Plant Mol Biol, 1999, 40: 141-152.