

基于转录组分析的细叶十大功劳叶去分化过程中药根碱高效积累的分子机制研究

姜天赋¹, 陈瑶¹, 张梦¹, 潘富鹏², 王可豪¹, 杨丙贤¹, 付红伟¹, 张琳^{1*} (1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310008; 2. 浙江农林大学食品与健康学院, 杭州 311300)

摘要:目的 建立细叶十大功劳去分化愈伤组织培养体系;筛选参与药根碱生物合成的关键基因。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定细叶十大功劳不同去分化阶段愈伤组织中苜蓿基喹啉类生物碱含量;采用转录组测序技术分析细叶十大功劳不同去分化阶段愈伤组织基因表达谱,鉴定差异表达基因;通过分析生物碱含量变化差异与差异表达基因的相关性,筛选参与药根碱生物合成的关键基因。结果 细叶十大功劳叶去分化时期非洲防己碱、药根碱、巴马汀和小檗碱含量均有不同程度提升,其中药根碱的含量提升显著;通过对细叶十大功劳叶片和不同去分化期样品的转录本两两比较分析,筛选出了叶片组织对比不同去分化期样品组织间的差异表达基因,进一步通过KEGG富集分析、聚类分析等,注释到了25个参与药根碱生物合成途径中的差异表达基因,其中NCS、7OMT、CNMT、BBE、CAS、STOX等基因可能为参与药根碱生物合成的潜在关键基因。结论 细叶十大功劳去分化时期非洲防己碱、药根碱、巴马汀和小檗碱含量均上升,其中药根碱的含量提升最大;细叶十大功劳愈伤组织培养可以作为生产药根碱等苜蓿基喹啉类生物碱的一种方式。

关键词:细叶十大功劳;药根碱;去分化;积累;转录组

doi:10.11669/cpj.2024.20.007 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)20-1931-08

Molecular Mechanism of Accumulation of Jatrorrhizine in *Mahonia fortunei* (Lindl.) During Dedifferentiation Based on Transcriptome Analysis

JIANG Tianfu¹, CHEN Yao¹, ZHANG Meng¹, PAN Fupeng², WANG Kehao¹, YANG Bingxian¹, FU Hongwei¹, ZHANG Lin^{1*} (1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Resources Protection and Innovation of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a callus culture system for dedifferentiation of *Mahonia fortunei* (Lindl.) in order to screen the key genes involved in the biosynthesis of jatrorrhizine. **METHODS** The contents of benzyloquinoline alkaloids in callus at different dedifferentiation stages were determined by HPLC. Transcriptome was used to analyze the gene expression profiles of callus at different dedifferentiation processes and identify the differentially expressed genes. By analyzing the relationship between the variation of alkaloid content and the differentially expressed genes, the key genes involved in the biosynthesis of jatrorrhizine were screened. **RESULTS** The contents of columbamine, palmatine, jatrorrhizine and berberine increased in varying degrees during the dedifferentiation of *Mahonia fortunei* (Lindl.) leaves, among which jatrorrhizine increased significantly. By comparing and analyzing the transcripts of the leaves of *Mahonia fortunei* (Lindl.) and samples from different dedifferentiated stages, differential expression genes between different dedifferentiated stage samples were screened. Furthermore, through KEGG enrichment analysis, cluster analysis, 25 differentially expressed genes involved in jatrorrhizine biosynthesis pathway were annotated, among which NCS, 7OMT, CNMT, BBE, CAS, STOX may be potential key genes. **CONCLUSION** During the dedifferentiation period, the contents of columbamine, palmatine, jatrorrhizine and berberine all increase, among which the contents of jatrorrhizine increases the most significantly. Callus culture can be used as a method to produce benzyl isoquinoline alkaloids such as jatrorrhizine.

KEY WORDS: *Mahonia fortunei* (Lindl.); jatrorrhizine; dedifferentiation; accumulation; transcriptome

细叶十大功劳 [*Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde] 是中药“功劳木”的药材基源之一,全株均可药用,以干燥的茎入药作功劳木使用,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,临床广泛用于湿热泻痢、黄疸、

基金项目:浙江理工大学科研启动基金资助(22042024-Y);中央财政支持地方高校改革发展专项资金资助(303013-2021-0007)

作者简介:姜天赋,男,硕士研究生 研究方向:中药资源学 *通讯作者:张琳,女,博士,教授,博士生导师 研究方向:中药资源,中药化学和中药新药 Tel:(0571)86843684

目赤肿痛、痈肿等症的治疗^[1]。细叶十大功劳的根、茎、叶均含有苄基异喹啉类生物碱(benzylisoquinoline alkaloids, BIAs)特征活性物质,包括小檗碱、巴马汀、非洲防己碱和药根碱等,其中小檗碱在药材中的含量往往较高、药根碱的含量往往最低。现代药理学证明,药根碱具有显著的抗菌、抗肿瘤等活性,其降血糖作用在相同剂量下甚至强于小檗碱^[2]。但药根碱在细叶十大功劳及其他药用植物中含量极低,很大程度上限制了药根碱的开发利用。

药用植物的愈伤组织培养是快速高效生产活性天然产物的一种生物技术方法,对保护药用植物种质资源也是一种行之有效的技术手段^[3]。愈伤组织培养技术成熟、工业化生产可行性高,同时不受季节和产地等自然条件的影响,因此,采用愈伤组织生产重要的次生代谢产物应用前景广阔^[4]。本研究整合运用细叶十大功劳组织培养技术和转录组测序技术,通过分析细叶十大功劳不同去分化阶段愈伤组织中苄基异喹啉类生物碱含量与差异表达基因的相关性,筛选出了若干参与药根碱生物合成的潜在关键基因。该研究为采用愈伤组织生产药根碱等细叶十大功劳中的活性成分奠定了理论基础。

1 仪器与材料

1.1 植物材料

细叶十大功劳的幼嫩叶片(fresh leaf, FL),经愈伤诱导去分化培养 10、20、30、100 d 的愈伤组织样品分别标记为 DD_10, DD_20, DD_30, DD_100。

1.2 色谱条件

Waters2695 高效液相色谱仪、2998PDA 检测器、Empower 工作站(美国沃特世公司);色谱柱:安捷伦 RPC-18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(美国安捷伦公司);流动相:0.05 mol · L⁻¹ NaH₂PO₄ 缓冲液(pH 值 3.0)和乙腈(色谱纯)梯度洗脱。

2 实验方法

2.1 去分化诱导处理

称量 MS 培养基 4.74 g,蔗糖 30 g,2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid,2,4-D)1.5 mg,吡喃氨基嘌呤(kinetin,KT)0.25 mg,加适量纯水充分溶解后,加入琼脂 10 g,纯水定容至 1 L,调 pH 至 5.8;120 °C 高温灭菌 20 min,待冷却后倾倒入培养基平板,至完全冷却凝固。在无菌室内倒置 3 d 后,无菌落生长即可使用。

剪取细叶十大功劳生长 10 d 左右幼嫩但完全

展开的叶片为外植体,流动自来水冲洗数次并吸干水分后转移至超净工作台,无菌水反复冲洗后再依次用体积分数 75% 乙醇冲洗 20 s、体积分数 1% NaClO 冲洗 3 min、无菌水冲洗 5 次。剪去叶片边缘后剪成 1 cm² 左右块状,接种到 MS 培养基上。

在避光条件下培养 5 d 后,转为每天光照与黑暗交替 12 h 培养,培养计划天数后,取出植物组织液氮冷冻,-80 °C 冰箱保存,备用。

2.2 不同去分化期组织中生物碱含量的测定

细叶十大功劳叶片和不同分化期组织样品 105 °C 烘干、粉碎,过 40 目药筛。精确称量 0.1 g 样品粉末置于 5 mL 离心管中,加入 3 mL 盐酸甲醇溶液(1 mol · L⁻¹ 盐酸-甲醇 = 1:100),称重。超声提取 45 min,补重。8 000 r · min⁻¹ 室温离心 20 min,上清液过 0.45 μm 有机系滤膜,进行 HPLC 分析。

分别精确称取非洲防己碱、药根碱、巴马汀、小檗碱标准品各 1 mg,盐酸甲醇溶液溶解并分别定容至 1 mL 量瓶,配成约 1 mg · mL⁻¹ 的标准品母液。精密移取非洲防己碱母液、药根碱母液、巴马汀母液、小檗碱母液配置成分别含有 50.041、50.332、50.189、1 000.087 μg · mL⁻¹ 对应标准品的混合标准品母液,梯度稀释,制作标准曲线。

HPLC 分析条件:流速:1 mL · min⁻¹;柱温:30 °C;检测波长:265 nm;进样量:20 μL;HPLC 程序见表 1。

表 1 四种生物碱的高效液相色谱(HPLC)法分析程序

Tab. 1 HPLC analysis program of four alkaloids

t/min	A(NaH ₂ PO ₄)/%	B(Acetonitrile)/%
0	80	20
10	73	27
20	71	29
30	5	95
38	5	95
43	80	20
50	80	20

2.3 RNA 提取及测序

使用植物 RNA 提取试剂盒提取叶片或 3 个不同去分化时期的样品中的总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测和 NanoDrop 1000 分光光度计检测其质量和浓度。使用 U-mRNAseq Library Prep 试剂盒对 mRNA 进行片段化处理,用 Smart-RT 酶将 mRNA 片段逆转录成双链 cDNA,通过磁珠法进行纯化。接着通过 PCR 对文库进行扩增,使其达到上机浓度。最后需要通过 Agilent 2100 和荧光定量聚合酶

链式反应(q-PCR)对文库大小和浓度进行检测,质检合格后使用 Illumina Novaseq 6000 上机测序。使用 Trinity-v2.11.0 软件进行从头组装,然后使用 Kallysto 软件估计组装转录本的表达丰度。每个样本重复3次。

2.4 差异基因筛选及分析

基于综合数据库 eggNOG,使用 emapper 2.1.6 软件将组装的单基因数据库与 GO、KEGG 和 PFAM 注释进行比较,获得单基因的功能注释。利用 RSEM 软件对转录本的表达量水平进行估计,采用 FPKM 值作为衡量转录本或基因表达水平的指标。差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选使用 DESeq2 软件,筛选标准为差异倍数 > 1 和 $P < 0.05$ 。通过 BLAST 软件将基因序列比对到京

都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库,鉴定差异基因参与的代谢过程。聚类分析使用 MeV (Multiple experiment viewer)软件中的 K 均值聚类算法。

2.5 实时荧光定量 PCR 分析

筛选出的苄基异喹啉生物碱(benzylisoquinoline alkaloids, BIAs)生物合成途径中的 DEGs,以 *actin* 基因作为内参,使用反转录试剂盒将从 FL、DD_10、DD_20、DD_30 样品提出的总 RNA 反转录为 cDNA。根据得到的转录组数据设计引物(表 2),使用定量试剂盒荧光定量试剂盒 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (武汉艾瑞科生物科技有限公司)制备 qRT-PCR 反应体系,在荧光定量 PCR 仪(ABI 7500)上进行测定,反应程序为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算处理。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 2 Real time fluorescence quantitative PCR primers

Gene ID	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(3'-5')
<i>Actin</i> (AT1G49240)	GGAGCTGAGAGATTCGGTTC	GAATTCCTGCAGCTTCCATC
<i>NCS</i> (DN11300_c0_g1_i11)	GGAAATGATTGAAGGAGG	CAACGGAACTAGTGATAAG
<i>6OMT</i> (DN1303_c0_g1_i5)	AAATGATTGAAGGAGGTT	GAACACTAGTGATAAGAGGGC
<i>7OMT</i> (DN1303_c0_g1_i5)	TGTTTACCTGAAATCGC	CCTTCCACCTTCTACCG
<i>CNMT-A</i> (DN3795_c0_g1_i20)	TGGAGGATGGTTTGCTTC	GTTGATGGCTGGGTTTGT
<i>CNMT-B</i> (DN7887_c0_g1_i14)	TGTTCTTGATCTAGGCTGT	TTATGCTCTGCCAGGAGTA
<i>NMCH</i> (DN10562_c0_g1_i2)	ACGAATCAAGGGCTATGT	GAAACCCAACCAACTCCA
<i>BBE</i> (DN1247_c0_g1_i2)	ATAGTTACGAAGGGTGTTC	ACCTAGACTGCCACCAGA
<i>CAS</i> (DN9772_c0_g2_i4)	AAGTTGGCGACCAGTTAT	AGGCATGTCACGAGCAGA
<i>STOX</i> (DN4908_c1_g1_i5)	TAGTGAACCGCTGATGGAG	GGTAGGTGGAACAGGAAC

3 实验结果

3.1 细叶十大功劳去分化过程中生物碱的含量测定

测定外植体(FL)、不同去分化时期的愈伤组织

中四种主要 BIAs 含量,结果显示细叶十大功劳去分化时期非洲防己碱、药根碱、巴马汀和小檗碱含量均有不同程度提升,其中药根碱的含量提升极其显著。结果见表 3、图 1。

表 3 细叶十大功劳不同去分化期生物碱含量测定结果。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Determination results of alkaloid content at different dedifferentiation stages of *Mahonia fortunei*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

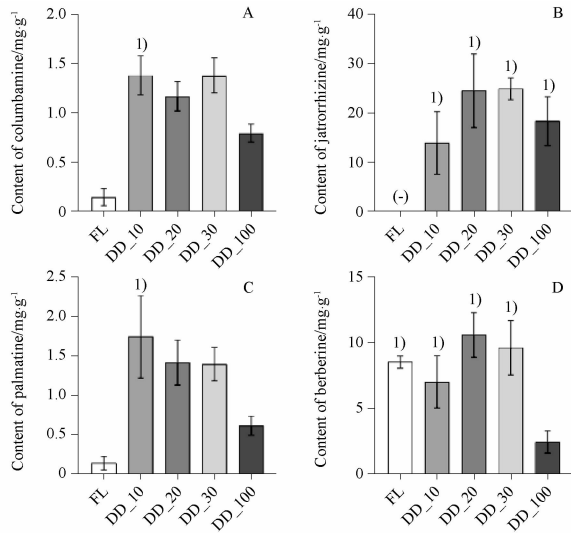
Alkaloid type	Fresh leaf/mg · g ⁻¹	DD_10/mg · g ⁻¹	DD_20/mg · g ⁻¹	DD_30/mg · g ⁻¹	DD_100/mg · g ⁻¹
Columbamine	0.144 ± 0.071	1.382 ± 0.160	1.170 ± 0.122	1.381 ± 0.145	0.795 ± 0.075
Jatrorrhizine	0.041 ± 0.029	13.865 ± 5.191	24.485 ± 6.102	24.890 ± 1.795	18.318 ± 4.049
Palmatine	0.136 ± 0.071	1.743 ± 0.427	1.416 ± 0.234	1.393 ± 0.172	0.614 ± 0.100
Berberine	8.530 ± 0.381	7.017 ± 1.620	10.596 ± 1.388	9.622 ± 1.683	2.450 ± 0.696

3.2 转录组测序及功能注释结果

采集样品 FL、DD_10、DD_20、DD_30 进行转录组测序,每个样品 3 个重复,分别平均产生 70 934、63 976、64 493 和 67 976 个转录本,12 个样品的 GC 含量约为 45%。去除低质量的读序后的 clean data,测定 Q20 百分比(>97.09%)和 Q30 百分比(>92.86%),

这些数据表明测序质量较高,达到了后续数据组装分析的要求(表 4)。经 De novo 拼接后,最终组装获得转录本总共 169 364 个 reads。所有样品的 mapping 率达到 83.66% 以上,BUSCO 评估中,C 率为 87.3%,组装的完整性较好。转录组数据基于 GO、KEGG、PFAM、NR、KOG、Swiss-Prot 和 TrEMBL 等 7 大数据库

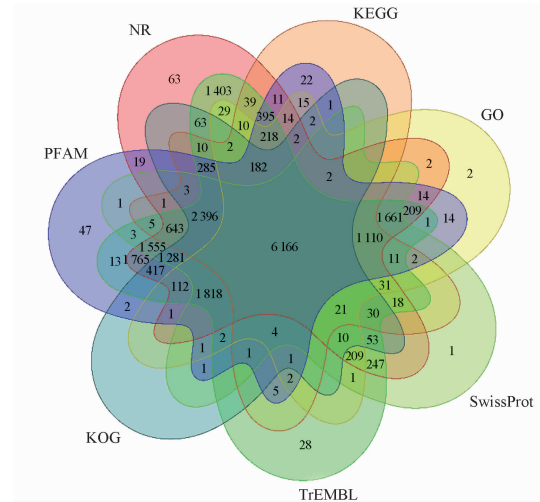
对基因进行功能注释见图2。共有6 166个 unigenes 在7个数据库中都有功能注释。



A - 不同阶段的非洲防己碱含量图; B - 不同阶段的药根碱含量图; C - 不同阶段的巴马汀含量图; D - 不同阶段的小檗碱含量图; 与 FL 组相比, ¹⁾P < 0.05。A - figure of columbamine content at different stages; B - figure of jatrorrhizine content at different stages; C - figure of palmatine content at different stages; D - figure of berberine content at different stages; ¹⁾P < 0.05, vs FL group.

图 1 十大功劳叶片去分化过程中不同阶段的生物碱含量。
n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 1 The alkaloid content in different stages of leaf dedifferentiation of *M. fortunei*. n = 3, $\bar{x} \pm s$



GO - 基因本体论; KEGG - 京都基因与基因组百科全书; PFAM - 蛋白质家族数据库; NR - 非冗余蛋白序列数据库; KOG - 真核生物同源组; Swiss-Prot - 经过注释的蛋白质数据库; TrEMBL - 源于欧洲分子生物学实验室的蛋白质序列数据库。

GO - gene ontology; KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; PFAM - Protein Family Database; NR - non redundant protein sequence database; KOG - eukaryotic homologous group; Swiss Prot - annotated Protein Database; TrEMBL - originates from the protein sequence database of the European Molecular Biology Laboratory.

图 2 细叶十大功劳在不同数据库间基因注释数量的韦恩图

Fig. 2 The Wayne diagram of gene annotation numbers for *M. fortunei* in different databases

表 4 细叶十大功劳转录组测序结果 Clean data 统计

Tab. 4 Clean data statistics of *M. fortunei* transcriptome sequencing results

Sample name	Clean reads	Clean bases/bp	Low quality reads	Duplication reads rate/%	Data use rate/%	Q20/%	Q30/%
A_1	54 146 330	8 020 311 345	929 666	29.74	97.86	97.55	93.16
A_2	56 286 750	8 324 448 686	832 368	27.55	98.19	97.56	93.18
A_3	53 792 550	7 954 410 330	758 662	27.35	98.31	97.52	93.03
B_1	52 280 436	7 729 874 659	841 368	26.94	98.08	97.46	92.89
B_2	49 097 314	7 256 398 575	791 054	26.24	97.91	97.76	93.64
B_3	51 976 032	7 690 237 855	744 330	26.6	98.23	97.7	93.47
C_1	53 454 198	7 924 998 317	1 032 932	29.34	97.72	97.4	92.71
C_2	51 981 132	7 689 171 370	1 273 994	28.86	97.09	97.45	92.86
C_3	49 128 432	7 281 369 051	744 342	27.12	98.18	97.75	93.54
D_1	54 476 462	8 035 413 917	661 002	26.36	98.59	97.63	93.33
D_2	47 585 270	7 048 956 504	679 988	26.73	98.3	97.47	92.9
D_3	49 710 836	7 382 526 120	741 530	27.4	98.25	97.49	92.94

3.3 细叶十大功劳叶片和愈伤组织间差异基因分析

将细叶十大功劳叶片和不同去分化期样品的转录本两两比较分析, 以 $|\log_2 FC| > 1$ 、 $P < 0.05$ 为标准, 筛选出 DEGs。结果显示, FL 对比不同去分化期样品 (DD_10、DD_20、DD_30)

组织间的基因表达差异最为显著, 其中, FL 对比 DD_10 共有 5 873 个 DEGs, 上调基因 1 313 个, 下调基因 4 560 个; FL 对比 DD_20 的 DEGs 共有 7 952 个, 上调基因 2 024 个, 下调基因 5 928 个; FL 对比 DD_30 的 DEGs 共有 127 个, 上调基因 77 个, 下调基因 50 个 (图 3)。

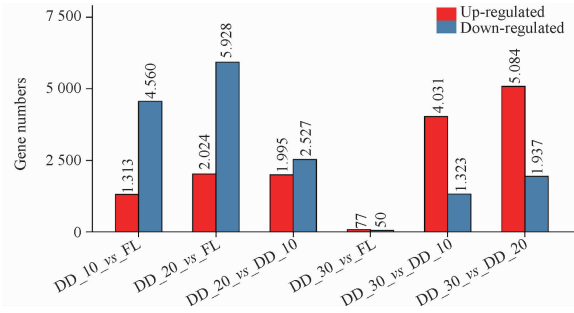
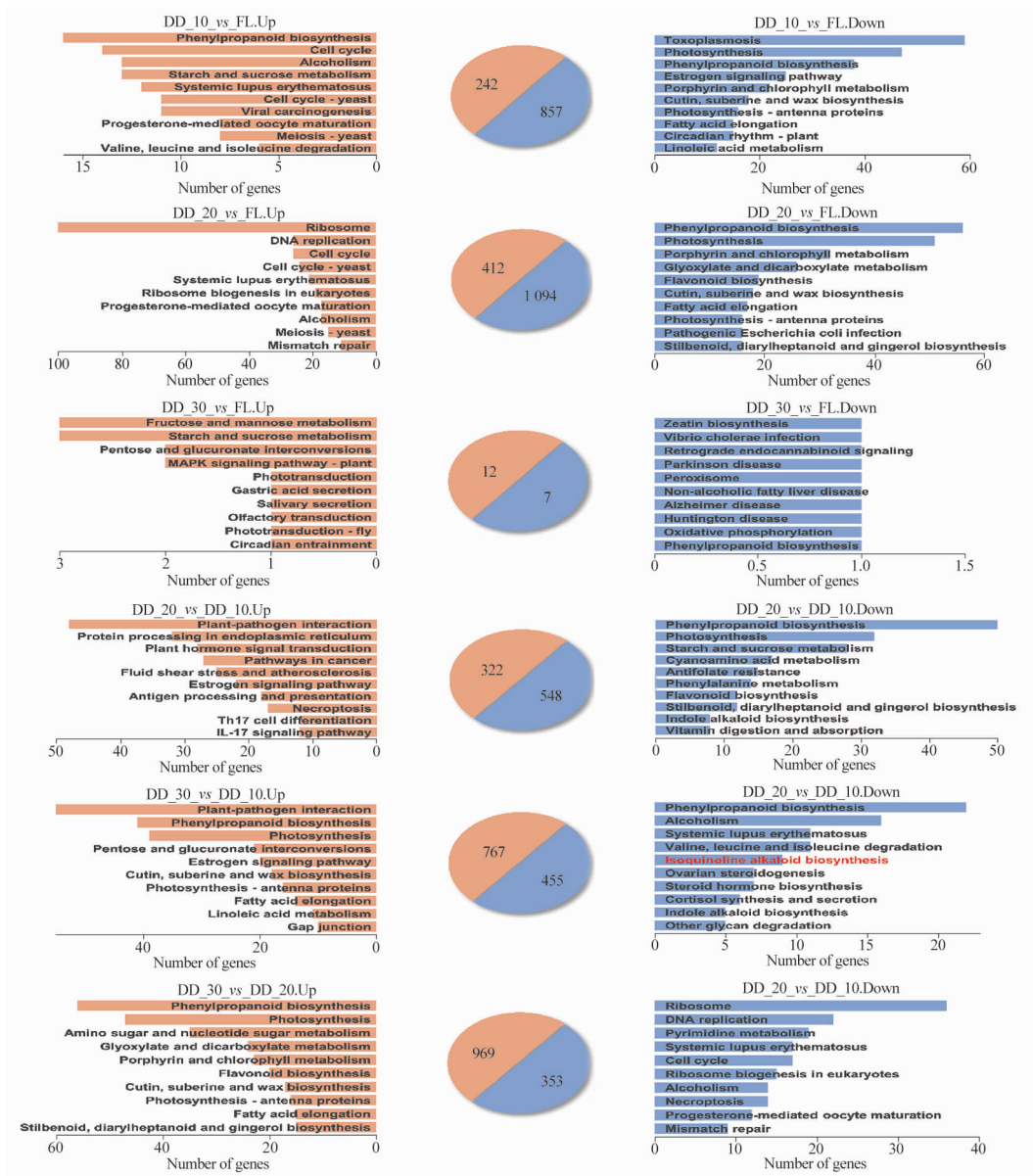


图3 细叶十大功劳幼嫩叶片和不同去分化天数的差异表达基因
Fig. 3 DEGs in fresh leaf and different dedifferentiation days of *M. fortunei*

3.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对得到的 DEGs 进行 KEGG 代谢通路富集分析,从 KEGG 注释基因簇中筛选与药根碱生物合成相关的 DEGs,并将富集程度显著前十名的 KEGG term 进行可视化分析(图4)。其中,DD_10 对比 DD_30 的 DEGs 中显著富集到了 BIAs 生物合成代谢通路,推测可能参与药根碱的生物合成。除此之外,还富集到几类重要的次生代谢通路,包括苯丙素生物合成、黄酮生物合成、吲哚生物碱生物合成、姜辣素生物合成和苯丙氨酸代谢。



富集图展示 5 个实验组差异基因的 KEGG 富集的前 10 个条目,橙色半圆中的数字代表上调的基因数目,蓝色半圆中的数字代表下调的基因数目,红色标记部分是与药根碱生物合成相关的条目。

The enrichment plot displays the top 10 KEGG enriched terms of differentially expressed genes in five experimental groups. Numbers in orange semicircles represent up-regulated genes and numbers in blue semicircles represent down-regulated genes. The red marked area represents the terms related to the biosynthesis of jatrorrhizine.

图4 差异表达基因的 KEGG 富集图

Fig. 4 Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes

3.5 去分化过程中次生代谢相关差异基因的聚类分析

进一步,对富集到次生代谢途径的 DEGs 进行表达模式的聚类分析,通过 K 均值聚类算法生成聚类图见图 5,4 个簇(C1-C4)代表了去分化过程中的不同的基因表达趋势。根据次生代谢通路、聚类分析簇、基因数目绘制了三维图(图 6),清晰地表现出了各个次生代谢途径基因在去分化过程中表达趋势。聚类到 C3 和 C4 簇的基因表达水平分别在 DD_10 和 DD_20 期表现为上调,参与 BIAs 生物合成的 DEGs,76% 分布于 C3 和 C4;此外,聚类到 C3 和 C4 中的 DEGs 表达模式与药根碱含量变化具有相关性,推测可能在去分化过程中参与药根碱的生物合成。

对 DEGs 进行聚类,并使用 Mfuzz R 包可视化。4 个集群被分组, x 轴 - *M. fortune* 样品去分化过程中的时间点,包括 FL、DD_10、DD_20 和 DD_30。y 轴 - DEGs 表达水平的标准化数值。线条的颜色深浅 - 聚类的显著性程度。

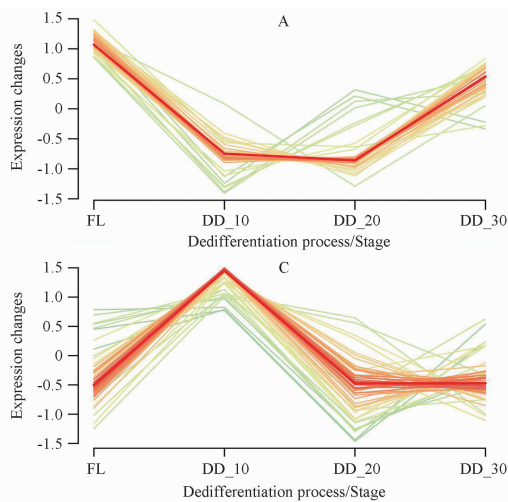


图 6 - 富集于关键次生代谢基因的差异表达基因的聚类分析

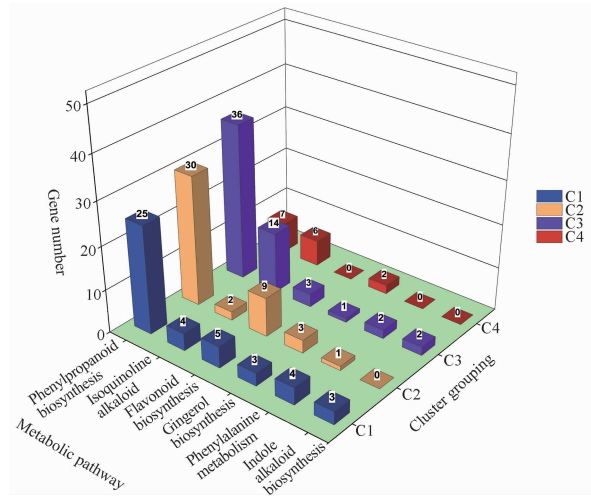
A - cluster 1 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first decreases and then increases, with DD_10 to DD_20 being the plateau period; B - cluster 2 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first decreases and then increases, with DD_10 to DD_20 shows a decreasing trend; C - cluster 3 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first increases and then decreases, reaching its peak at DD_10; D - cluster 4 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first increases and then decreases, reaching its peak at DD_20.

图 6 富集于关键次生代谢基因的差异表达基因的聚类分析

图 6 Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes

3.6 细叶十大功劳中苜基异喹啉生物碱生物合成相关基因分析

在日本黄连的苜基异喹啉生物碱 (BIAs) 合成途径中已经被证实, (S)-去甲基乌药碱合酶 [(S)-norkoclaurine synthase, NCS] 催化 L-酪氨酸 ($C_9H_{11}NO_3$) 转化而来的多巴胺 ($C_8H_{11}NO_2$) 和 4-羟基苯乙醛 (C_8



C1 ~ C4 - 聚类分析中不同基因表达趋势的聚类分组。

C1 - C4 - clustering grouping of different gene expression trends in cluster analysis.

图 5 富集于关键次生代谢基因的差异表达基因的聚类分析

图 5 Cluster analysis of DEGs enriched to key secondary metabolism

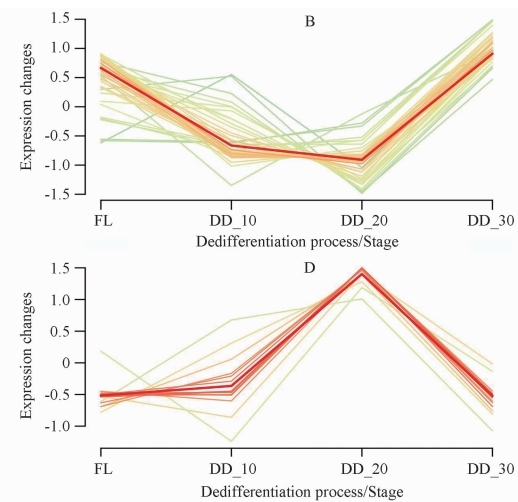


图 6 - 富集于关键次生代谢基因的差异表达基因的聚类分析

A - cluster 1 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first decreases and then increases, with DD_10 to DD_20 being the plateau period; B - cluster 2 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first decreases and then increases, with DD_10 to DD_20 shows a decreasing trend; C - cluster 3 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first increases and then decreases, reaching its peak at DD_10; D - cluster 4 of gene expression trends from FL to DD_30; Gene expression first increases and then decreases, reaching its peak at DD_20.

图 6 富集于关键次生代谢基因的差异表达基因的聚类分析

图 6 Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes

H_8O_2) 缩合成异喹啉类生物碱的前体物质 (S)-去甲基乌药碱 ($C_{16}H_{17}NO_3$), 随后在其他酶的作用下形成 (S)-番荔枝碱 ($C_{19}H_{23}NO_4$) 和 (S)-金黄紫堇碱 ($C_{19}H_{21}NO_4$) 等重要前体物质; (S)-金黄紫堇碱在 (S)-氢化小檗碱合成酶 [(S)-canadine synthase, CAS] 和 (S)-四氢原小檗碱氧化酶 [(S)-tetrahydroprotoberber-

ine oxidase, STOX]的催化下生成小檗碱^[5]。

在细叶十大功劳中,注释到了 25 个参与药根碱($C_{20}H_{20}NO_4$)生物合成途径中的 DEGs,包括 2 个编码 NCS 的 DEGs;7 个编码去甲衡州乌药碱-6-*O*-甲基转移酶(norcochlorine 6-*O*-methyltransferase, 6OMT)的 DEGs;1 个编码去甲衡州乌药碱-7-*O*-甲基转移酶(norcochlorine 7-*O*-methyltransferase, 7OMT)的 DEGs;5 个编码(*S*)-去甲衡州乌药碱-*N*-甲基转移酶[(*S*)-coclaurine *N*-methyltransferase, CNMT]的 DEGs;1 个编码 *N*-甲基衡州乌药碱-3-羟化酶(*N*-methylcoclaurine 3-hydroxylase, NMCH)的 DEGs;1 个编码 3'-羟基-*N*-甲基-(*S*)-乌药碱-4'-*O*-甲基转移酶(3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase, 4OMT)的 DEGs;5 个编码小檗碱桥酶(berberine bridge enzyme, BBE)的 DEGs;1 个编码 CAS 的 DEGs;2 个编码 STOX 的 DEGs,见图 7。根据 DEGs 表达模式与药根碱含量变化的相关性推测出,可能的药根碱合成途径一是通过小檗碱的开环反应,二是通过 C7 位特异性的 *O*-甲基转移酶(7OMT)催化(*S*)-去甲衡州乌药碱生成(*S*)-异乌药碱($C_{17}H_{19}NO_3$),随后通过与小檗碱生物合成相似的合成过程最终生成药根碱。

为了进一步验证转录组数据分析结果的准确性,选取代表性 DEGs 进行 RT-qPCR 分析,见图 8。结果表明,NCS、7OMT、CNMT、BBE、CAS、STOX 基因在 DD_10 期表达量最高,6OMT 基因在 DD_20 期表达量最高,该趋势与聚类分析中的 C3 和 C4 聚类趋势相同。说明这些 DEGs 极有可能为参与药根碱生物合成的潜在关键基因。

4 结论与讨论

药用植物组织培养技术的发展远落后于农业栽培品种,很大程度限制了药用植物遗传转化体系的建立,以及天然产物生物合成的发展。筛选药用植物愈伤组织培养体系是成功建立组培体系的基础,同时,也可以为采用愈伤组织生产具有活性的次生代谢产物提供思路。本研究首次优化建立了细叶十大功劳愈伤组织培养体系,同时发现,在细叶十大功劳去分化过程存在低含量有效成分药根碱高效积累的生物现象。

转录组测序分析技术可以快速获得同物种在不同生理状态下的基因表达情况^[5]。本研究中使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台获得了细叶十大功劳去分化诱导过程中的 clean reads,经过校正后的

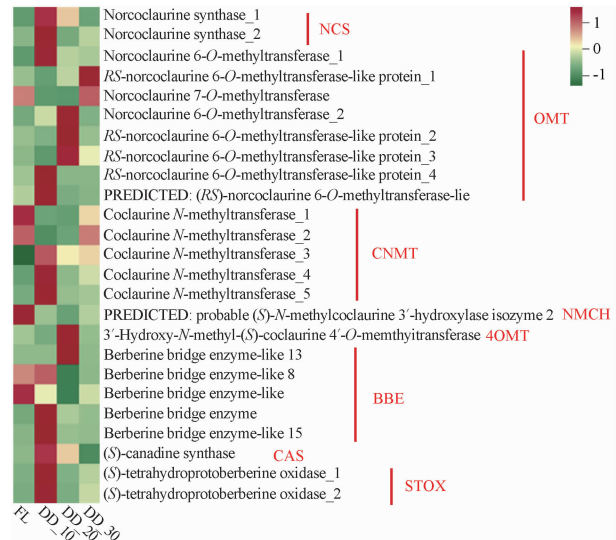
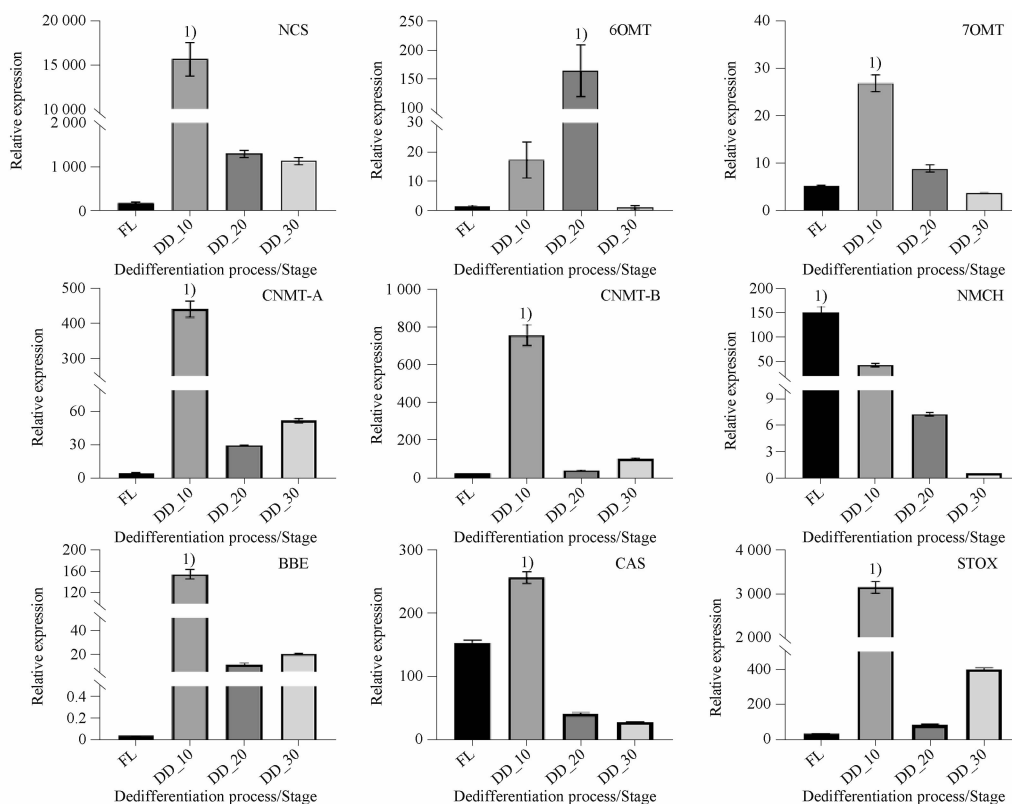


图 7 注释异喹啉生物碱生物合成转录本的基因表达量热图
Fig. 7 Heat map of gene expression level for annotated transcripts of isoquinoline alkaloid biosynthesis

转录组数据质量较高, clean reads 的 Q20 均达到 97.4% 以上。本文为了分析叶片到愈伤组织形成的去分化过程中药根碱高效积累分子机制,选择了 FL、DD_10、DD_20 和 DD_30 的取样时间点,并对测序结果进行了多个数据库的功能注释。本研究中细叶十大功劳去分化过程中的转录组测序和结果分析为后续研究去分化诱导药根碱等次生代谢生物合成研究提供了较完整的转录组数据库。

在本研究中,愈伤组织形成去分化过程中的 DEGs 显著富集到了次生代谢生物合成途径中,相应的,该过程中次生代谢产物的合成量发生了显著的变化^[6]。尤其是,FL 对比 DD_10、DD_20 过程的 DEGs 数目显著高于 FL 对比 DD_30 时的 DEGs,提示去分化初期伴随着活跃的生理变化。对 DEGs 进行了 KEGG 富集分析,注释到了苯丙素生物合成、黄酮生物合成、异喹啉生物碱生物合成等多个次生代谢过程,并且通过 K-means 算法生成了这些参与次生代谢过程基因的表达趋势聚类图,可以清晰地获得次生代谢生物合成在去分化过程中的基因表达趋势。在去分化过程中,参与异喹啉生物碱生物合成的基因的 90% 表达上调,与药根碱的含量积累呈正相关;参与苯丙类生物合成和黄酮生物合成的基因的 78% 表达下调。生物碱和黄酮生物合成都起始于氨基酸类化合物,是否会在生物合成过程中竞争共同的前体物质,从而在同一组织中存在相反的积累趋势有待进一步探讨^[7]。筛选出的 25 个参与药根碱生物合成途径中的 DEGs,在 BIAs 生物合成



注:与 FL 组相比,¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note:¹⁾ $P < 0.05$, vs FL group.

图 8 细叶十大功劳中 9 个异喹啉生物碱生物合成途径中酶基因的相对表达水平。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Relative expression levels of enzyme genes in 9 isoquinoline alkaloid biosynthesis pathways of *M. fortunei*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

途径中催化多种不同反应:NCS 催化多巴胺和 4-羟基苯乙醛的缩合;7OMT 催化(S)-去甲衡州乌药碱的 C7 位的 O-甲基化;CNMT 催化(S)-衡州乌药碱的 N-甲基化;BBE 催化(S)-金黄紫堇碱的成环反应;STOX 催化(S)-四氢原小檗碱的双键形成等^[8-11]。该研究对理解细叶十大功劳中药根碱生物合成机制具有重要意义。

细叶十大功劳中 BIAs 生物合成途径还未被报道,而黄连属和罂粟属中的一些生物碱的生物合成已经有相关报道,如日本黄连中的小檗碱、花菱草中的血根碱、罂粟中的吗啡等^[12-13],这些研究为揭示细叶十大功劳中药根碱生物合成分子机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] WANG J M. Study on the Chinese medicine-Gonglaomu[J]. *Res Tradit Chin Med* (中医药研究), 2002, 18(5):45.
- [2] HE J M, MU Q. The medicinal uses of the genus *Mahonia* in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *Ethnopharmacol*, 2015, 175:668-683. DOI:10.1016/j.jep.2015.09.013.
- [3] FANG H Y, ZHU H, DING H M, et al. Research progress on effect factors of secondary metabolites content in callus[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39(15): 2846-2850.
- [4] CHEN Y Y, LIU X Y, LIU F S, et al. Growth characteristics and secondary metabolite accumulation of *Solanum nigrum* [J].

- [5] CHIN *Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(16): 5170-5178.
- [5] SIMONEAU J, DUMONTIER S, GOSSELIN R, et al. Current RNA-seq methodology reporting limits reproducibility [J]. *Bioinform*, 2021, 22(1):140-145.
- [6] AWADA R, LEPELLEY M, BRETON D, et al. Global transcriptome profiling reveals differential regulatory, metabolic and hormonal networks during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* [J]. *BMC Genom*, 2023, 24(1):41. 10.1186/s12864-022-09098-z.
- [7] WEI G, CHEN Y, GUO X, et al. Biosyntheses characterization of alkaloids and flavonoids in *Sophora flavescens* by combining metabolome and transcriptome [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7388. DOI: 10.1038/s41598-021-86970-0.
- [8] LAINES-HIDALGO J I, MUÑOZ-SÁNCHEZ J A, LOZA-MÜLLER L, et al. An update of the sanguinarine and benzophenanthridine alkaloids' biosynthesis and their applications [J]. *Molecules*, 2022, 27(4):1378. DOI: 10.3390/molecules27041378.
- [9] CORDELL G A. Fifty years of alkaloid biosynthesis in phytochemistry [J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 29-51. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.05.012.
- [10] HAGEL J M, FACCHINI P J. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(5):647-672.
- [11] YAMADA Y, YOSHIMOTO T, YOSHIDA S T, et al. Transcription factors in alkaloid biosynthesis [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 305:339-382. DOI: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00008-1.
- [12] LEYSER O. Auxin Signaling [J]. *Plant Physiol*, 2018, 176(1):465-479.
- [13] SATO F. Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(1):1-9.

(收稿日期:2023-07-07)