基于丹参基因组的*COII*基因抗虫与次生代谢调控功能研究

陈尘^{1,2}, 曹晓燕¹, 化文平^{1,3}, 黄英¹, 吕婷婷¹, 张媛^{1*}, 王喆之^{1*}

1. 陕西师范大学生命科学学院, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西安 710119;

2. 陕西省植物研究所, 陕西省西安植物园, 西安 710061;

3. 陕西学前师范学院, 生命科学与食品工程学院, 西安 710100

* 联系人, E-mail: yuanzhang@snnu.edu.cn; zzwang@snnu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-26; 接受日期: 2017-11-07; 网络版发表日期: 2018-02-10

国家自然科学基金(批准号: 31670299, 31300256, 31270338)资助

摘要 本草基因组学极大地推动了药用植物分子育种、次生代谢网络调控和品质成因等研究的进程. 本研究基于本草基因组学, 从模式药用植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)基因组中克隆丹参*COII* (*SmCOII*)基因并初步分析其蛋白特征及表达模式. 利用RNAi技术获得丹参*COII*沉默株系(*iCOII*). 抗虫性检测结果显示, 与对照相比*iCOII*株系叶片损伤指数上升, 对昆虫咬噬耐受性减弱; 同时, 抗性相关基因*WKRY70*和*NPR1*的表达量在*iCOII*株系中显著降低. 进一步检测*iCOII*株系中主要次生代谢产物合成与积累情况, 结果表明*iCOII*株系中迷迭香酸、丹酚酸B、隐丹参酮及丹参酮IIA的含量较野生型显著降低, 其生源合成途径中的关键酶基因*C4H*, *RAS*, *HCT*, *HMGR*, *GGPPS*, *CPS*, *KSL*, *CYP76AH1*的表达量较野生型显著下调, 且与丹参*COII*的沉默显著正相关. 上述结果表明, 丹参*COII*基因参与调控丹参抗虫性及主要次生代谢产物合成和积累过程. 本研究为丹参抗性研究和次生代谢过程调控提供理论依据, 也为优质高产药用植物品种选育奠定了基础.

关键词 本草基因组学, 丹参, *SmCOII*, 抗虫性, 次生代谢

本草基因组学(Herbgenomics)^[1]是利用组学技术研究中药基原物种的生物遗传信息及其调控网络, 阐明中药防治人类疾病分子机制的前沿学科, 包括从基因组水平研究本草的9大内容、9大技术和7大应用方向. 本草基因组学推动了功能基因组学、蛋白组学和代谢组学等现代生命科学技术在药用植物研究领域中的应用, 为次生代谢产物的生物合成、代谢工程和优质高产药用植物品种的选育研究奠定了坚实的基础,

对中药现代化进程具有重大战略性科学意义.

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为唇形科鼠尾草属植物, 以其干燥根及根茎入药, 多用于心脑血管疾病的治疗. 由于丹参次生代谢物质丰富、且其生源合成途径相对清晰, 加之丹参具有稳定的遗传转化体系及利用基因组学和转录组学手段逐步解析的遗传背景, 使得丹参成为研究次生代谢途径的“模式药用植物”^[2].

研究者利用丹参这一模式药用植物开展了一系列

引用格式: 陈尘, 曹晓燕, 化文平, 等. 基于丹参基因组的*COII*基因抗虫与次生代谢调控功能研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 399–411
Chen C, Cao X Y, Hua W P, et al. Roles of *SmCOII* in pest resistance and secondary metabolism regulation based on *Salvia miltiorrhiza* Bunge genome (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 399–411, doi: [10.1360/N052017-00189](https://doi.org/10.1360/N052017-00189)

针对诱导次生代谢途径并提高丹参活性成分含量调控策略的研究。过表达丹参酮合成途径关键酶基因*HMGR1*, *SmGGPPI*, *SmDXS*能够使丹参毛状根中丹参酮含量提高, 共表达*HMGR1*, *SmGGPPI*基因能使丹参酮含量提高为对照的4.74倍^[3]。过表达丹酚酸合成途径关键酶基因*C4H*, *TAT*和*HPPR*能提高丹参中迷迭香酸和紫草酸的含量, 共表达*TAT*和*HPPR*能将迷迭香酸和紫草酸的含量分别提高为对照的4.3和3.2倍^[4]。Zhang等人^[5]还利用组合表达协同调控的方式, 在增加苯丙烷类代谢通路基因流的同时干涉了木质素支路关键酶基因*CCR*的表达, 增加了丹酚酸B等次生代谢产物含量, 为丹参次生代谢途径调控提供新的思路。

*COII*属于F-box蛋白家族成员, 在泛素介导的蛋白酶体降解系统中, 起泛素蛋白连接酶E3的作用。*COII*蛋白具有LRR、锌指结构等与其他蛋白结合的基序, 决定了其识别降解蛋白的精确性, 从而在体内发挥重要的生物学功能。许多研究表明, *COII*同时具有调节植物抗性和育性的作用。Feys等人^[6]报道, *coil-1*表现出雄性不育且对昆虫和病原菌的抗性下降^[7,8]。与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *COII*同源的番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)基因调控种子成熟、介导茉莉素信号参与防御反应, 以及毛状体发育^[9]。烟草(*Nicotiana tabacum* L.) *COII*沉默株*ir-coil*的育性和抗性降低且丧失受茉莉素介导的防御应答^[10]。水稻(*Oryza sativa*) *OsCOII*基因沉默的突变株对昆虫咬噬更加敏感, 并且咬噬后激活的水稻防御过程在*OsCOII*沉默株不能正常激活, 表明水稻*OsCOII*基因在水稻防御反应中发挥关键作用^[11]。多数对*COII*的研究集中在报道*COII*调节植物的育性和抗性上。而Wang等人^[12]干扰烟草*NtCOII*基因表达后, 沉默株的花粉败育且淀粉酶活性降低, 推测*NtCOII*参与烟草育性及淀粉代谢调控过程。这一研究表明, *COII*基因参与了植物代谢过程, 并且根据植物防御过程与代谢过程的密切关系, 推测*COII*基因具有参与调控植物次生代谢过程的潜在可能。

本研究以丹参为材料, 从丹参基因组数据库中克隆得到丹参*COII*基因, 并利用RNAi技术和农杆菌介导的遗传转化法构建丹参*COII*基因沉默株系, 观察丹参*COII*沉默株对棉铃虫咬噬的耐受性, 进一步检测其中迷迭香酸、丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮IIA的含量及合成关键酶基因表达量, 以期阐释丹参*COII*基因

在调节丹参抗性及次生代谢合成方面的功能。以期为进一步改良丹参抗性品种, 提高丹参有效成分含量及对丹参次生代谢调控策略的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

唇形科鼠尾草属植物丹参(*S. miltiorrhiza* Bunge)为实验室温室培育, 种子为实验室保存、收集。棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)由西北农林科技大学宋瑜龙老师惠赠。初孵棉铃虫在人工培养基培养至4龄期后用于丹参抗虫实验。对两年生丹参的茎、叶、韧皮、周皮和木质部取样, 对不同时间点赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯、低温、伤害处理的丹参(30天苗龄)取样, 液氮速冻并于-80℃保存备用。转基因受体材料为野生型丹参组培苗。所用pMD-19T Simple载体购自大连TaKaRa生物公司, pKannibal, pART27载体为本实验室保存; 所用农杆菌*EHA105*, *DH5α*菌株均为本实验室保存。

1.2 试剂与试剂盒

植物Total RNA提取试剂RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue、反转录试剂盒PrimeScript™ II Reverse Transcriptase、高保真DNA聚合酶PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase, Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye), dNTP, dATP, T₄ DNA连接酶、DNA marker DL2000, DL 5000, DNA 1 kb ladder, *Bam*H I, *Xba* I, *Kpn* I, *Xho* I, *Not* I等限制性内切酶, 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); FastStart Universal SYBR Green Master购自上海罗氏制药有限公司; 质粒提取试剂盒、植物基因组DNA提取试剂盒E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit购自OMEGA Engineering, Inc. (美国); 氯仿、异戊醇、无水乙醇、冰乙酸, 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚等常规试剂采用进口分装或国产分析纯。标准品迷迭香酸(Must-14020115 A0004)、丹酚酸B (Must-14052113 A0056)、隐丹参酮(Must-14090711 A0061)、丹参酮II A (Must-14060802 A0057), 均购自Chengdu Must Bio-Technology co. LTD. (色谱纯, 成都); 甲醇、乙腈购自Thorne Fisher公司(色谱纯, 美国)。

1.3 基因克隆

在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索拟南芥、烟草、芝麻(*Sesamum indicum*)等物种*COII*基因的DNA序列作为信息探针, 运用Blastn2.0程序搜索丹参基因组数据库^[13], 获得与之同源性高的contig. 运用DNAStar软件对所得contig进行分析, 用Primer Premier 5.0软件根据预测的*COII*基因开放读码框设计引物序列*SmCOII*-F (5'-CGAATGATGGAGAATGGCTGAATG-3')和*SmCOII*-R (5'-CCAAGGCAAAATTTATTAGTTAAAAGTCTC-3'), 同时设计扩增*COII*基因5'上游2 kb的启动子区引物*pCOII*-F (5'-TTCCACGTTCAAGTAATAATCTCG-3')和*pCOII*-R (5'-ATGGTAGTCGGCTATCGGTACC-3'), 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

按照植物Total RNA提取试剂RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue试剂盒说明书提取30天苗龄丹参全株的总RNA, 并按照反转录试剂盒PrimeScript™ II Reverse Transcriptase合成cDNA, 以其为模板, 用引物*SmCOII*-F/R扩增丹参*COII*基因. 反应条件为: 95℃变性5 min; 95℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸120 s, 35个循环; 72℃延伸10 min. PCR扩增产物电泳、切胶回收、测序(华大基因有限公司(深圳)).

按照植物基因组DNA提取试剂盒E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit说明书提取30天苗龄丹参全株的总DNA, 以其为模板, 用引物*pCOII*-F/R扩增丹参*COII*基因启动子区. 反应条件为: 95℃变性5 min; 95℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸125 s, 35个循环; 72℃延伸10 min. PCR扩增产物电泳、切胶回收、由华大基因有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

将测序得到的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别用Blastn和Blastp进行序列相似度比对. 利用DNAS-tar软件、ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)等完成可读框的查找和翻译、编码蛋白质理化性质分析; 利用Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)完成氨基酸序列的同源性比对和多序列比对; 利用SOPMA和SWISS-MODEL分别完成对蛋白质的二级、三级结构的预测. 用MEGA 6.0中相邻连接法(Neighbour-Joining)对丹参*COII*及其他来源

的*COII*蛋白序列进行聚类分析. 用PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测分析*COII*基因启动子区中所含的顺式作用元件。

1.5 基因表达量检测

利用实时荧光定量PCR检测基因表达量. 反应体系20 μL, 包含10 μL FastStart Universal SYBR Green Master Mix, 5 μL 稀释后cDNA模板, 3 μL H₂O, 以及待扩增基因上下游引物各1 μL (10 mmol/L); 反应条件为95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃ 1 min, 循环40次. 以丹参β-actin基因 (DQ243702)作内参基因检测丹参*COII*基因在不同样本中的表达量, 每个反应组设置3个平行. 数据根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析处理, 用SPSS 12.0软件进行统计分析。

1.6 丹参*COII*基因表达模式分析

提取1.1项所述丹参组织器官以及赤霉素、水杨酸、脱落酸、茉莉酸甲酯、伤害处理后的RNA反转录成cDNA作模板, 用实时荧光定量PCR上游引物*qCOII*-F (5'-AACAGGAAATGGAAGATGTGGAA-3')和下游引物*qCOII*-R (5'-CCAGTAAGACCAACC-GAAAGTCA-3')扩增丹参*COII*基因105 bp特异序列, 按2.3项所述方法检测丹参*COII*基因在不同组织和处理时的表达情况。

1.7 RNAi干扰载体构建及农杆菌转化

根据丹参*COII*基因和pKannibal载体的核苷酸序列, 选取位于丹参*COII*编码区3'端的967~1192 bp一段长为226 bp功能区域但非F-box家族的保守区序列作为干扰靶片段, 用PCR在干扰序列两端分别引入Hind III和Xba I, Kpn I和Xho I两对限制性内切酶酶切位点, 电泳、切胶回收后将其按照正反两向的顺序分别连接在中间载体pKannibal上, 形成含有interference box的重组载体. 经过转化大肠杆菌、挑取阳性克隆进行PCR及酶切验证, 提取验证正确的重组中间载体质粒. 用Not I切下interference box, 将之连接到植物表达载体pART27上, 即构建成功丹参*COII*基因干扰载体p*SmCOII*-RNAi。

按照Zhang课题组^[4]所述方法将丹参*COII*基因干扰载体转化至农杆菌EHA105内, 并用叶盘法转化丹

参, 经过诱导愈伤组织、抗性芽和不定根生成, 形成丹参*COII*沉默株。继代3次后, 提取丹参*COII*沉默株的DNA, 以其作为模板扩增pART27载体中Intron序列, 筛选阳性株系。按照2.2项中所述实时荧光定量PCR反应体系和程序进行检测不同*COII*沉默株中*COII*基因的表达量, 并以野生型丹参作为阴性对照。

1.8 抗虫性检测

摘取移栽至花盆30天的丹参*COII*沉默株与野生型对照顶端真叶各5片, 分别置于铺设浸润纱布保湿的培养皿中, 每片叶接种4龄棉铃虫5头, 封好培养皿口, 将其放在25℃恒温光照培养箱中培养^[14], 接种5天后观察并按照孟凤霞等人^[15]所建立的分级标准统计丹参叶片损伤情况, 所得统计数据利用SPSS软件进行统计学分析。

用2.3项所述方法检测丹参*COII*沉默株和野生型中抗性相关基因*TGA2.1* (*TGA2.1*-F/R: 5'-AGGAAC-CACCGATCCAGACA/GGTGCCCTGAGGTCCTGTT-3'), *WRKY70* (*WRKY70*-F/R: 5'-TCGTGCAAAGAGACACTAAGG/CACATTCCTCACATTTACCG-3')和*NPRI* (*NPRI*-F/R: 5'-CCGTTTTGTCTGAGACTCGAATG/TGTGTCTGGATAGGCGTTTG-3')基因的表达量。

1.9 主要次生代谢产物含量以及相关酶基因表达量检测

标准品溶液制备: 精确称取迷迭香酸、丹酚酸B、隐丹参酮和丹参酮IIA 4种标准品各10.0 mg, 用甲醇(色谱纯)溶解并定容至10 mL, 配制成浓度为1 mg/mL的标准品溶液, 通过改变标准品溶液的进样量获得浓度梯度与相对应的不同峰面积的关系绘制标准曲线。

样品提取: 采集移栽至温室30, 60及100天后的丹参*COII*沉默株和野生型植株根, 洗净、烘干, 研磨成粉并过60目筛后, 精确称取50 mg, 置于1.5 mL离心管中, 加入500 μ L 75%甲醇(含1 mg/mL 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚), 在30℃, 40 kHz下超声提取20 min后于16000 $\times$ g离心6 min, 转移上清液至新的离心管; 沉淀用相同方法再提取2次, 合并3次上清液, 经0.22 μ m微孔滤膜过滤后, 置于棕色进样瓶中, 于4℃冰箱中避光保存。

色谱条件: 色谱柱: Kromasil C18 5 μ 100A色谱柱

(250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相: A相为甲醇, B相为0.4%冰乙酸溶液, C相为乙腈, 采用梯度洗脱^[5], 进样前以流动相梯度初始条件平衡40 min; 柱压上限为400 bar. 检测波长为280 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温30℃; 样品进样量为5 μ L。

以丹参*COII*沉默株和野生型的cDNA作为模板, 按照2.3项所述方法, 检测参与丹酚酸和丹参酮合成通路关键酶基因的表达量^[5,14]。

所得数据用SPSS 13.0软件做组间单因素方差分析及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 丹参*COII*基因及生物信息学分析

利用特异引物*SmCOII*-F/R对丹参cDNA进行扩增, 得到1条约为1800 bp条带。经过条带回收、连接至pMD-19T Simple载体转化大肠杆菌*DH5 α* , 挑取阳性克隆进行PCR验证, 测序并提交至NCBI数据库(GenBank Accession Number: KY744817), 丹参*COII*基因长为1797 bp, 与芝麻、红薯(*Ipomoea batatas*)、烟草的*COII*序列相似度高, 分别为83%, 75%, 72%。

丹参*COII*基因编码599个氨基酸, 预测其分子量为67.60 kD, 等电点为7.14, 不具有信号肽结构和跨膜结构域。二级结构和三级结构分析显示, 该编码蛋白主要由 α 螺旋、无规卷曲和延伸链构成, 并且由 α 螺旋和无规卷曲围绕一圈形成中空口袋状, 且该三级结构与拟南芥*COII*蛋白结构高度相似^[16]。

进一步利用Clustal W2对多种植物*COII*蛋白氨基酸序列进行多重比对结果表明, 丹参*COII*蛋白具有*COII*蛋白保守的结构特征, 含有一个典型的F-box结构域(Accession: smart00256)和9个LRR重复基序(Accession: sd00034) (图1A); 系统进化树分析表明, 丹参*COII*与芝麻*COII*蛋白的亲缘关系最近(图1B)。

2.2 丹参*COII*基因启动子克隆及序列分析

利用特异引物*pCOII*-F/R对丹参基因组DNA进行扩增, 得到1条约为2000 bp条带。经过条带回收、连接至pMD-19T Simple载体转化大肠杆菌*DH5 α* , 挑取阳性克隆进行PCR验证, 测序, 得到*COII*基因起始密码子上游1934 bp的启动子序列。丹参*COII*启动子区含有CAAT-box, TATA-box等典型核心启动元件之外, 还

表 1 丹参*COII*基因启动子顺式调控元件预测

元件名称	位置	功能
ABRE	209(-), 432(+)	脱落酸响应元件
ATCT-motif	839(+)	光响应元件
Box 4	1043(-)	光响应元件
Box-W1	514(-)	真菌诱导子响应元件
CAAT-box	123(+), 125(-), 268(+), 269(-), 323(-), 664(-), 795(-), 845(-), 860(-), 868(-), 944(+), 1068(-), 1128(+), 1187(-), 1237(-), 1276(-)	一般启动子增强子元件
CGTCA-motif	499(+)	茉莉酸甲酯响应元件
G-Box	86(+), 432(-), 209(+), 1317(+)	光响应元件
GARE-motif	1405(-)	赤霉素响应元件
LTR	925(+)	低温响应元件
MBS	58(-), 818(+), 441(-), 1302(+), 260(+), 1460(+)	干旱相关MYB结合位点
P-box	311(-), 314(-)	赤霉素响应元件
TC-rich repeats	614(+), 618(+)	逆境与防御响应元件
TATA-box	680(+), 774(-), 828(-), 898(-), 916(+), 998(-), 1096(-), 1680(+), 1993(+), 1999(+)	核心启动子元件
TGACG-motif	449(-)	茉莉酸甲酯响应元件
W box	514(-)	未知
box E	1076(-)	未知

包含水杨酸响应位点ABRE、真菌诱导子响应位点Box-W、茉莉酸甲酯响应位点CGTCA-motif和TGACG-motif、赤霉素响应位点GARE-motif和P-box、低温响应位点LTR以及响应干旱的MYB类转录因子结合位点(表1)。

2.3 丹参*COII*基因表达模式分析

由图2A可见, 丹参*COII*基因在根中表达最丰, 且在韧皮部中表达较高; 其次是茎、花, 在叶中表达量最低, 然并无显著差异, 表现为组成型表达。并且, 丹参*COII*能迅速响应伤害、低温、茉莉酸甲酯以及水杨酸的诱导(图2B), 表明丹参*COII*基因的表达受到环境及植物激素的诱导。

2.4 干涉载体和沉默株的获得

按照2.5中所述方法扩增丹参*COII*干涉片段, 电泳显示获得条带符合干涉靶区片段大小, 分别回收, 连接至pKannibal载体转化大肠杆菌*DH5 α* , 提取质粒进行PCR验证和酶切验证, 无误后将Sm*COII*-pKannibal和植物表达载体pART27分别用*Not* I 酶切、连接, 转化大肠杆菌*DH5 α* , 挑取阳性克隆进行菌液PCR和酶切验

证。结果显示, 丹参*COII*基因干涉植物表达载体pSm*COII*-RNAi构建成功。

将植物表达载体pSm*COII*-RNAi转化至根癌农杆菌*EHA105*中, 并挑取转化后平板上克隆进行菌液PCR验证。电泳结果显示, 所挑克隆均为阳性, 随机挑取阳性克隆扩大培养, 保存菌种, 标记为AB-pSm*COII*i。

用上述农杆菌浸染丹参叶片, 经过诱导愈伤组织、抗生素筛选、形成抗性芽及生根培养后形成转化后植株(*iCOII*-1~16), 按照2.5中所述方法筛选阳性株系, 检测结果显示株系1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 14和16呈阳性, 转化率为91.67%。此外, 实时荧光性定量PCR结果显示, 丹参*COII*基因在阳性转化株系中的表达量平均为野生型表达量的29.56%, 均呈现极显著差异(图3A)。选取表达量最低的*iCOII*-9, -1, -2 3个株系为实验材料进行后续实验。

2.5 抗虫性检测及相关抗虫基因表达检测

按照2.6项中所描述方法对丹参*COII*沉默株及野生型丹参叶片的抗虫性进行检测, 结果如图3B所示, 丹参*COII*沉默株的叶片受损严重, 表现为叶片损伤面积大且多为连续片状, 而野生型的损伤多为针状散布

图 2 丹参*COII*基因在丹参不同器官、组织(A)及在不同处理下(B)表达模式

于整个叶片. 叶片受损指数显示, 丹参野生型叶片的受损指数平均为1.50, 而丹参*COII*沉默株的叶片损伤指数平均为3.16, 丹参*COII*沉默株表现出对虫噬的超敏性(图3C).

为进一步解释丹参*COII*沉默导致丹参抗性降低的分子机制, 检测了抗性相关基因*NPR1*, *WRKY70*, *TGA2.1*在丹参*COII*沉默株中的表达量. 如图3D所示, *WRKY70*和*NPR1*的表达量在*COII*沉默株中较野生型显著降低, 而*TGA2.1*基因的表达在沉默株和野生型中无显著差异.

2.6 主要次生代谢产物含量检测

按照2.7项中描述的样品制备方法和色谱条件, 检测丹参*COII*沉默株中酚酸类和丹参酮类成分含量. 结果显示(表2), 迷迭香酸和丹酚酸B以及隐丹参酮和丹

参酮IIA这4种产物的含量中均随时间累积, 在移栽后100天样品中积累最高. 在丹参*COII*沉默株中4种主要次生代谢产物含量的均显著低于野生型, 且*iCOII-9*中含量最低, 其余两者次之, 表明*SmCOII*基因在影响丹参次生代谢物质积累过程中具有剂量效应. 在移栽100天的样品中, *iCOII-9*根中迷迭香酸、丹酚酸B、隐丹参酮及丹参酮IIA含量分别为同时期对照丹参根的78.70%, 82.27%, 72.07%和75.67%, 且这些产物含量在移栽60天后即与野生型丹参呈现差异性.

2.7 丹参酮及丹酚酸合成途径酶基因表达量检测

为进一步分析丹参*COII*沉默导致丹参主要次生代谢产物积累减少的分子机制, 检测了丹酚酸及丹参酮合成途径中关键酶基因的表达量. 结果表明, 在*COII*沉默株的酚酸合成途径中, 酶基因*HPPR*, *C4H*,

图3 丹参*COII*沉默株阳性株筛选及抗虫性检测(网络版彩图)

A: 丹参*COII*沉默株中*COII*基因表达量检测, iC代表不同的干涉株系1~16, WT control为未转化丹参对照, **: $P < 0.01$; B: 饲喂棉铃虫5天后丹参叶片照片; C: 饲喂棉铃虫5天后丹参叶片受损指数; D: 丹参*COII*沉默株中抗性基因*NPR1*, *WRKY70*和*TGA2.1*基因表达量. **: $P < 0.01$

RAS, *HCT*的表达量较野生型低, 其中*C4H*和*HCT*的表达量较野生型显著降低, *RAS*的表达量较野生型降低极显著(图4A)。如图4B所示, 相比野生型, 丹参*COII*沉默株中丹参酮合成关键酶*HMGR*, *GGPPS*, *CPS*, *KSL*及*CYP76AH1*的表达量均显著下调。

相关性分析数据显示, *COII*的表达量与酚酸合成途径中的酶基因*HPPR*, *RAS*, *CYP98A14*的表达呈高度正相关($0.80 \leq |r| \leq 1.00$), 与丹参酮合成途径中的酶基因*HMGR*, *GGPPS*, *CPS*, *KSL*及*CYP76AH1*的表达呈显著正相关(相关系数均 > 0.9) (图5)。由此推测丹参*COII*基因的沉默影响了丹参酮合成通路关键酶基因的表达从而导致沉默株中丹参酮类化合物含量显著降低。

3 讨论

随着高通量测序技术的迅速发展, 拟南芥、水稻等模式植物基因组测序工作已经完成, 其他多种经济植物基因组计划随之兴起, 中药学的研究尤其是药用植物的研究, 也逐渐深入到基因组水平, 2016年, 陈士林和宋经元^[1]正式提出了本草基因组学的概念。本草基因组学是用生命科学领域前沿技术, 如高通量测序技术、遗传图谱构建技术、遗传转化及波谱技术联用等, 对药用植物结构基因组、功能基因组、转录组和蛋白质组、中药代谢组等方面进行研究, 推进对药用植物基因组解析和基因资源了解、促进了对药用植物

表 2 不同生长时期丹参*COI1*沉默株中迷迭香酸、丹酚酸B、隐丹参酮和丹参酮IIA含量^{a)}

化合物种类	采集时期	株系			
		<i>iCOI1-1</i>	<i>iCOI1-2</i>	<i>iCOI1-9</i>	WT
迷迭香酸(mg/g)	30天	7.80±0.91**	7.95±0.59**	7.52±0.46**	8.58±0.15
	60天	8.46±0.96*	8.07±1.06**	8.21±0.59**	9.46±0.39
	100天	8.82±0.22*	8.21±0.21**	8.57±0.87**	10.89±0.15
丹酚酸B (mg/g)	30天	5.68±0.16	5.36±0.21*	5.91±0.12**	6.36±0.35
	60天	7.64±0.07*	7.83±0.69	7.53±0.33*	8.80±0.18
	100天	8.30±0.11**	8.21±0.36**	8.03±0.43**	9.76±0.68
隐丹参酮(mg/g)	30天	0.68±0.10	0.61±0.03	0.54±0.04*	0.65±0.05
	60天	1.13±0.08*	1.19±0.04**	0.97±0.04**	1.31±0.03
	100天	1.32±0.02**	1.44±0.06*	1.29±0.09**	1.79±0.08
丹参酮IIA (mg/g)	30天	1.20±0.19*	1.22±0.03**	1.48±0.07*	1.89±0.07
	60天	2.04±0.14	2.03±0.07	1.94±0.06*	2.18±0.06
	100天	2.35±0.02	2.15±0.15	1.99±0.20*	2.63±0.09

a) $\bar{x}\pm SD$; *: $P<0.05$, 与野生型相比差异显著; **: $P<0.01$, 差异极显著, 每份样品5个平行

图 4 基因相对表达量(网络版彩图)

A: 丹参丹酚酸合成途径中关键酶基因; B: 丹参酮合成途径中关键酶基因. 与野生型对照相比, *: $P<0.05$, 差异显著; **: $P<0.01$, 差异极显著, 每份样品5个平行

图5 丹参*COII*基因与丹参次生代谢合成途径中关键酶基因及4种主要次生代谢产物相关性分析
(图中数值为相关系数 r)

有效成分的合成及调控研究,推动药用植物抗病抗逆等优良性状机制的阐释,形成了药用模式生物研究、阐明道地药材形成机制、基因组辅助育种、基因资源保护和利用等七大应用方向,促进了我国中医药资源的研究和开发以及中药产业化的迅速发展。

基于本草基因组学,进一步深入研究基因功能从而揭示药用植物抗逆性状机制及调控药效成分合成过程是本草基因组学的研究重点。RNAi (RNA interference)作为常用基因沉默技术,以其效率高、特异性强、结果可靠的特征,目前依然是研究基因功能不可替代的技术手段。本研究从丹参基因组中克隆了丹参*COII*基因,为了验证丹参*COII*基因的功能,构建了丹参*COII*基因RNAi株系,并由于转化空载对照具有插入片段随机性,设置同时期未转化野生型丹参为对照株系,保证了对照株系基因表达背景的一致。本课题组发现,丹参*COII*基因沉默株的抗虫性明显减弱,并且沉默株中主要次生代谢产物含量也显著降低,表明

丹参*COII*基因参与调节丹参的抗虫性和次生代谢产物积累,为进一步利用基因工程改良丹参品种、提高丹参有效成分含量奠定了理论基础。

经过多序列比对和蛋白结构分析显示,丹参*COII*基因在基因大小、结构域分布、三维结构等方面均与已报道的*COII*基因相似度较高^[9,10,16],说明丹参*COII*基因在蛋白序列上非常保守,预示着该基因功能十分重要。其启动子区包含响应植物激素、参与防御、抗逆反应的作用元件,推测丹参*COII*基因在调控植物应答激素、参与防御、抗逆等生理过程中发挥作用,实时荧光定量PCR结果显示,丹参*COII*基因应答低温、伤害等环境因子及植物激素,具有参与植物防御过程和应答植物激素的潜能。

在漫长的进化过程中,植物为了保护自己不受天敌、昆虫以及病原菌等侵扰或在种内竞争中胜出,会产生一些次生代谢产物,有不饱和烯烃、不饱和醇、生物碱等^[17],它们多与植物防御过程相关^[18,19]。抗虫性

检测结果显示, 丹参*COI1*基因沉默使丹参对昆虫咬噬的抗性降低, 从而推测丹参*COI1*参与调控丹参对昆虫的防御过程. 这一结果与拟南芥、烟草、番茄中*COI1*基因沉默的结果相似^[6,9], 说明*COI1*基因可以调控植物对昆虫咬噬的耐受性, 并且这一功能在植物中非常保守. 同时转录因子TGA家族和WRKY家族成员参与调控植物防御过程, 丹参中*TGA2.1*, *NPR1*和*WRKY70*可能参与了丹参的防御应答^[20-22]. 在丹参*COI1*沉默株中, *NPR1*和*WRKY70*的表达量较野生型显著降低, 推测丹参中*COI1*可能通过调节*NPR1*和*WRKY70*的表达参与调控抗性^[23,24].

关于*COI1*基因功能的报道多为*COI1*调控植物育性、抗逆及防御反应^[11,25-28], 仅在烟草中报道*NtCOI1*与淀粉代谢相关^[12]. 根据植物防御过程和次生代谢合成途径的密切关系, 推测丹参*COI1*基因可能在丹参次生代谢产物合成过程中也发挥调节作用, 结果显示丹参*COI1*基因的沉默使丹酚酸类、丹参酮类化合物合成途径上关键酶基因*RAS*, *CYP98A14*, *GGPPS*等的表达量显著降低, 且与其表达高度正相关, 推测丹参*COI1*基因通过调控丹酚酸类、丹参酮类化合物合成途径上关键酶基因的表达参与调控丹酚酸类及丹参酮类化合物的合成与积累. 此外, 进一步分析丹参酚酸和丹参酮合成关键酶基因启动子区作用元件, *PAL*, *C4H*,

图6 丹参*COI1*参与植物防御和次生代谢过程调控网络机制(推测)(网络版彩图)

丹参*COI1*通过作用于抗性相关基因*NPR1*和*WRKY70*参与丹参防御过程, 同时, *WRKY70*可能进一步激活丹参酮及丹酚酸合成关键酶基因合成相应的次生代谢产物, 丹酚酸类和丹参酮类化合物也可以参与植物防御应答

HMGR, *GGPPS*基因5'侧翼区都含有能与WRKY结合的W-box元件, 从而推测, 丹参*COI1*基因的沉默导致了*WRKY70*表达下调, 该基因的下调有可能影响能与之潜在结合的关键酶基因正常表达, 故而导致丹参酮类及酚酸类产物合成积累降低(图6). 而这一推论仍需进一步实验证明. 本研究证实了丹参*COI1*基因在丹参中发挥调节抗性和次生代谢产物合成的功能, 为进一步为丹参次生代谢产物的生物合成和代谢工程提供理论依据, 为丹参基因组辅助育种奠定基础.

参考文献

- 1 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. 中国中药杂志, 2016, 41: 3881-3889
- 2 宋经元, 罗红梅, 李春芳, 等. 丹参药用模式植物研究探讨. 药学学报, 2013, 48: 1099-1106
- 3 Kai G, Xu H, Zhou C, et al. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metab Eng*, 2011, 13: 319-327
- 4 Xiao Y, Gao S, Di P, et al. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiol Plantarum*, 2009, 137: 1-9
- 5 Zhang Y, Yan Y P, Wu Y C, et al. Pathway engineering for phenolic acid accumulations in *Salvia miltiorrhiza* by combinational genetic manipulation. *Metab Eng*, 2014, 21: 71-80
- 6 Feys B, Benedetti C E, Penfold C N, et al. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 1994, 6: 751-759
- 7 Benedetti C E, Xie D, Turner J G. *COI1*-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 1995, 109: 567-572
- 8 Benedetti C E, Costa C L, Turcinelli S R, et al. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the *Coil* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1037-1042
- 9 Li L, Zhao Y, McCaig B C, et al. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, 2004, 16: 126-143
- 10 Paschold A, Halitschke R, Baldwin I T. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and

- reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *Plant J*, 2007, 51: 79–91
- 11 Ye M, Luo S M, Xie J F, et al. Silencing COI1 in rice increases susceptibility to chewing insects and impairs inducible defense. *PLoS ONE*, 2012, 7: e36214
- 12 Wang W, Liu G, Niu H, et al. The F-box protein COI1 functions upstream of MYB305 to regulate primary carbohydrate metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. TN90). *J Exp Bot*, 2014, 65: 2147–2160
- 13 Xu H, Song J, Luo H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Plant*, 2016, 9: 949–952
- 14 Chen C, Zhang Y, Kulima Q, et al. Overexpression of tomato *Prosystemin* (*LePS*) enhances pest resistance and the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *J Agr Food Chem*, 2016, 64: 7760–7769
- 15 孟凤霞, 沈晋良, 周威君, 等. 转*Bt*基因棉对棉铃虫抗虫性测定方法的研究. 南京农业大学学报, 2000, 23: 109–113
- 16 Yan J, Zhang C, Gu M, et al. The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell*, 2009, 21: 2220–2236
- 17 Degenhardt D C, Reff-Hind S, Stratmann J W, et al. Systemin and jasmonic acid regulate constitutive and herbivore-induced systemic volatile emissions in tomato, *Solanum lycopersicum*. *Phytochemistry*, 2010, 71: 2024–2037
- 18 Lee S, Yang D S, Uppalapati S R, et al. Suppression of plant defense responses by extracellular metabolites from *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 65–77
- 19 Iven T, König S, Singh S, et al. Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Mol Plant*, 2012, 5: 1389–1402
- 20 Zhang X R, Dong J N, Liu H L, et al. Transcriptome sequencing in response to salicylic acid in *Salvia miltiorrhiza*. *PLoS ONE*, 2016, 11: 0147849
- 21 Ekengren S K, Liu Y, Schiff M, et al. Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J*, 2003, 36: 905–917
- 22 Nakayama A, Fukushima S, Goto S, et al. Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 150
- 23 Onkokesung N, Reichelt M, van Doorn A, et al. Differential costs of two distinct resistance mechanisms induced by different herbivore species in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2016, 170: 891–906
- 24 Mukhtar M S, Nishimura M T, Dangl J. NPR1 in plant defense: it's not over 'til it's turned over. *Cell*, 2009, 137: 804–806
- 25 Capella A, Menossi M, Arruda P, et al. COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. *Planta*, 2001, 213: 691–699
- 26 Stotz H U, Jikumaru Y, Shimada Y, et al. Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 1941–1956
- 27 Lee S H, Sakuraba Y, Lee T, et al. Mutation of *Oryza sativa* CORONATINE INSENSITIVE 1b (*OsCOI1b*) delays leaf senescence. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 562–576
- 28 Zhai Q, Zhang X, Wu F, et al. Transcriptional mechanism of jasmonate receptor COI1-mediated delay of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 2814–2828

Roles of *SmCOII* in pest resistance and secondary metabolism regulation based on *Salvia miltiorrhiza* Bunge genome

CHEN Chen^{1,2}, CAO XiaoYan¹, HUA WenPing^{1,3}, HUANG Ying¹, LÜ TingTing¹, ZHANG Yuan¹ & WANG ZheZhi¹

¹ Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China;

² Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province, Institute of Botany of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China;

³ Department of Life Science and Food Engineering, Shaanxi Xue Qian Normal University, Xi'an 710100, China

Herb genomics is of great significance to studies of molecular breeding, secondary metabolite regulation, and quality control of medicinal plants. We isolated *SmCOII* gene from the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* Bunge by screening genome databases and analyzed the structure and expression pattern of this gene. For functional analysis, we down-regulated *SmCOII* expression in *S. miltiorrhiza* (*iCOII*s) via RNA interference. Tests conducted to examine pest resistance revealed that leaf damage scores of *iCOII*s were much higher than those of wild-type plants, whereas the expression of defense genes (*NPR1* and *WRKY70*) was significantly reduced in *iCOII*s. Major secondary metabolite contents of *S. miltiorrhiza* (rosmarinic acid, salvianolic acid B, cryptotanshinone, and tanshinones IIA) were significantly reduced compared with those of wild-type plants. Furthermore, the expression of key genes involved in tanshinones and salvianolic acid biosynthesis pathways (*HMGR*, *GGPPS*, *CPS*, *KSL*, *CYP76AH1*, *C4H*, *RAS*, and *HCT*) was also down-regulated in *iCOII* plants. Our results indicated that *SmCOII* plays a critical role in pest resistance and secondary metabolism regulation in *S. miltiorrhiza*, paving the way for the breeding of high-quality medical plants.

herb genomics, *Salvia miltiorrhiza*, *SmCOII*, insect resistance, secondary metabolism

doi: [10.1360/N052017-00189](https://doi.org/10.1360/N052017-00189)