

• 药材与资源 •

诱导子对颠茄毛状根有效成分及代谢关键酶基因表达的影响

郭 双, 刘 佳, 卢克欢, 张翠平, 韦 悦, 吴能表*

西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 目的 提高药用植物颠茄 *Atropa belladonna* 有效成分的产量, 为颠茄在实际生产中提供经济高效的处理方法, 为相关药用植物次生代谢的机制研究提供基础性参考。方法 通过向培养基中添加4种不同诱导子, 包括茉莉酸甲酯(MJ)、硝酸银(AgNO_3)、水杨酸(SA)、酵母提取物(YE), 研究诱导子对颠茄毛状根有效成分的积累及代谢途径中的关键酶基因1,4-丁二氨-氮-甲基转移酶(putrescine *N*-methyl transferase, pmt)基因、托品酮还原酶-I(tropinone reductase-I, trl)基因和莨菪碱6- β -羟化酶(hyoscyamine-6- β -hydroxylase, h6h)基因表达的影响。实验将0.5 g新鲜颠茄毛状根接种于盛有B5液体培养基的三角瓶中, 暗培养12 d后, 将培养基更换为含有诱导子的4种新培养基, 相同条件下再培养2 d后采集毛状根样品, 测定每瓶毛状根的鲜质量、干质量、部分生理指标、托品烷类生物碱的量及3种关键酶基因的表达量。结果 MJ抑制了颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱的产生, pmt、trl基因的表达式与对照组相比也有所下降; AgNO_3 虽然抑制了毛状根的生长, 但却显著提高了托品烷类生物碱的含量, 同时pmt、trl、h6h基因的表达量均升高; SA对颠茄毛状根的生长影响不显著, 但使东莨菪碱的含量提高; YE对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱的含量均有促进作用, pmt、trl、h6h基因的表达量也相应升高。结论 AgNO_3 是提高颠茄毛状根中托品烷类生物碱含量的最佳诱导子, YE在促进颠茄毛状根生长的同时也可促进其次生代谢。推断诱导子通过调控某种或某几种关键酶基因的表达来影响生物碱的代谢合成, 为生产中提高颠茄毛状根药用成分含量提供了可参考的方法。

关键词: 颠茄; 诱导子; 托品烷类生物碱; 毛状根; 茉莉酸甲酯; 硝酸银; 水杨酸; 酵母提取物

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)04-0897-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.024

Influence of elicitors on effective constituents and expression of key metabolic enzyme genes in hairy roots of *Atropa belladonna*

GUO Shuang, LIU Jia, LU Ke-huan, ZHANG Cui-ping, WEI Yue, WU Neng-biao

Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective To improve the yield of the effective medicinal ingredients of *Atropa belladonna*, to provide economic and efficient method for the actual production of *A. belladonna*, therefore to provide a basic reference for the related research on the mechanism of secondary metabolism of medicinal plants. **Methods** In this study, the influences of four kinds of elicitors, including methyl jasmonate (MJ), AgNO_3 , salicylic acid (SA), yeast extract (YE), on the accumulation of active components and the expression level of key metabolic enzyme genes, including putrescine *N*-methyl transferase (pmt), tropinone reductase-I (trl), and hyoscyamine-6- β -hydroxylase (h6h), were studied in hairy roots of *A. belladonna*. 0.5 g fresh hairy roots of *A. belladonna* were cultivated in B5 liquid medium. 12 d later, these mediums were replaced with the new medium containing one kind of four elicitors. Hairy roots were taken samples after 2 d to mensurate the fresh weight, dry weight, the content of tropane alkaloids, some physiological indexes, and three key genes expression level. **Results** MJ inhibited the growth and tropane alkaloids accumulation of hairy roots. The gene expression level of pmt and trl also decreased compared with control group (CK). The contents of tropane alkaloids and the expression level of pmt, trl and h6h were all increased compared with CK by the treatment of AgNO_3 , while the growth of hairy roots was inhibited; SA contributed to the increased content of hyoscyamine, but with no obvious influence on growth of hairy roots. As to YE, the content of tropane alkaloids and the expression level of pmt, trl, h6h were all increased correspondingly. Further more, YE was benefit for the growth of hairy roots. **Conclusion** Elicitors had selective influence on growth and tropane alkaloids accumulation

收稿日期: 2017-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30500041); 重庆市科技攻关项目(cstc2012gg-yyjs80013)

作者简介: 郭 双, 硕士研究生。E-mail: gshuang0102@163.com

*通信作者 吴能表(1969—), 博士, 教授, 四川平昌人。E-mail: wunb@swu.edu.cn

in hairy roots of *A. belladonna*. The best elicitor on accumulation of tropane alkaloids was AgNO_3 . YE could effectively improve of the growth of hairy and contents of tropane alkaloids. This study concluded that these elicitors influence the secondary metabolism of *A. belladonna* by regulating and controlling the expression level of some genes of key metabolic Enzyme, which could provide an effective method to enhance the medicinal composition in the culture of hairy roots of *A. belladonna*.

Key words: *Atropa belladonna* L.; elicitor; tropane alkaloids; hairy roots; methyl jasmonate; AgNO_3 ; salicylic acid; yeast extract

颠茄 *Atropa belladonna* L. 是民间传统的药用植物, 全株富含莨菪碱与东莨菪碱。在临床上主要用于麻醉、镇痛、抗晕动症等^[1]。已有研究表明, 在植物生长期间添加诱导子是提高多种植物次生代谢产物含量的有效途径, 而一般来说, 植物次生代谢产物的积累都会与代谢过程中关键酶的活性有直接或间接的关系。在托品烷类生物碱代谢途径中, 1,4-丁二氨-氮-甲基转移酶 (putrescine *N*-methyl transferase, pmt) 基因、托品酮还原酶-I (tropinone reductase-I, trI) 基因和莨菪碱 6- β -羟化酶 (hyoscyamine-6- β -hydroxylase, h6h) 基因是非常关键的基因, pmt 基因为上游重要基因, 能为下游莨菪碱及东莨菪碱的合成提供充足的前体物质; trI 基因为中间分支点基因, 能使代谢向东莨菪碱合成的方向进行; h6h 基因为下游重要基因, 可转化来自上游代谢途径的代谢流, 合成东莨菪碱。故这 3 种基因的表达对颠茄中托品烷类生物碱的合成有重要作用。目前, 对颠茄的研究主要集中在代谢途径中关键酶基因的克隆, 而未见通过添加诱导子来研究其对颠茄毛状根有效成分含量以及代谢过程中关键酶基因表达的影响的报道。本实验以颠茄毛状根为材料, 通过添加茉莉酸甲酯 (MJ)、 AgNO_3 、水杨酸 (SA)、酵母提取物 (YE) 4 种诱导子研究它们对颠茄毛状根的生长及次生代谢过程的影响, 旨在为提高颠茄有效成分的生产应用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

西南大学生命科学学院天然产物与代谢工程实验室保存在 B5 固体培养基的颠茄毛状根, 利用带有 pCAMBIA1304+载体的发根农杆菌 C58C1 感染颠茄无菌苗真叶诱导获得, 经西南大学生命科学学院吴能表教授鉴定为颠茄 *Atropa belladonna* L. 毛状根。对照品莨菪碱 (批号 S1138919)、东莨菪碱 (批号 S113892) 均购于 Sigma 公司, 质量分数 $\geq 98\%$ 。

1.2 仪器

日本岛津 (Shimadzu) LC-60A 高效液相色谱仪 (泵: LC-20AD、柱温箱: CTO-10AS vp、控制器: SPD-20A); Ultimate XB-C₁₈ 液相色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6

mm, 5 μm); 有机元素分析仪 vario EL cube (德国); Heidolph 旋转蒸发仪 (德祥科技有限公司); 循环水式真空泵; KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SIGMR 3K15 冰冻离心机 (北京五洲当方科技发展有限公司); TG16-W 微量高速离心机、TGL-16M 高速台式冰冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); HH-8 型数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司); Mettler-Toledo 十万分之一电子天平 (深圳深博瑞仪器仪表有限公司); Mettler-Toledo 电子分析天平 (深圳深博瑞仪器仪表有限公司); MDF-382E (N) -80°C 超低温冰冻冰箱 (北京跃达生物科技有限公司); 雪花制冰机 FM40 (北京长流科学仪器有限公司); Mettler-Toledo 酸度计 (深圳深博瑞仪器仪表有限公司); HIRAYAMAHVE-50 全自动高压灭菌锅 (广州深华公司); PXZ-310A 智能人工气候培养箱 (广州深华公司); HRSP-H 海尔生化培养箱 (广州深华公司); 电热恒温鼓风干燥箱 (上海七欣科学仪器设备有限公司); Minipore 纯水系统; UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津公司); Eppendorf 微量移液器 (北京百晶生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 诱导子的制备

将 MJ、SA 分别用无水乙醇助溶溶解后, 再用蒸馏水定容, 配制成 20 $\mu\text{mol/L}$ 的母液, 过 0.22 μm 滤膜除菌备用; 将 AgNO_3 用蒸馏水溶解定容, 配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的母液, 过 0.22 μm 滤膜除菌备用; 将 YE 用蒸馏水溶解定容后, 配制成 200 mg/mL 母液, 高压灭菌锅灭菌备用。

2.2 毛状根培养及诱导子的添加

将 0.5 g 长势一致的新鲜颠茄毛状根接种于盛有 150 mL 无激素的 B5 液体培养基的三角瓶 (250 mL) 中, 置于恒温振荡培养箱 110 r/min, (25 ± 1) $^\circ\text{C}$ 避光培养 12 d 后, 弃原有培养基, 换成添加了 1 种诱导子的 B5 液体培养基, 对照组 (CK) 则换成无诱导子的 B5 液体培养基。使 MJ、 AgNO_3 、SA 终浓度均分别为 150、100、100 $\mu\text{mol/L}$, YE 为 500 mg/L。相同条件下培养 2 d 后采样, 测定颠茄毛状

根的干鲜质量,可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛(MDA)、东莨菪碱、莨菪碱的含量及 pmt、trI、h6h 基因的表达量。每个实验组均设置 3 个重复。

2.3 颠茄毛状根中生物碱的提取与含量测定

参照 Zárate 等^[2]的提取方法,略有改动:将颠茄毛状根于烘箱中 60 ℃烘干至恒定质量,充分研磨后过 50 目筛;称取 100.0 mg 干粉加入 10 mL 提取液(CHCl₃-MeOH-NH₄OH 15:5:1),超声提取 30 min 后室温放置过夜,将提取液抽滤,用 2 mL CHCl₃冲洗残渣,合并所有滤过的滤液;将滤液 40 ℃旋转蒸干,残留物用 2 mL 1 mol/L H₂SO₄和 5 mL CHCl₃溶解,静置分层后收集硫酸相,冰浴中用浓氨水调 pH 至 10.0,再加入 4 mL CHCl₃提取,静置分层后取下层溶液于 40 ℃旋转蒸干,残留物用 1 mL 甲醇溶解为待测样品。样品液 0.22 μm 滤膜滤过,-4 ℃保存备用。采用 HPLC 法^[3]检测莨菪碱和东莨菪碱含量。HPLC 检测使用岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,色谱条件:Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-醋酸铵(58:42, pH 4.6),2.5 mmol/L SDS 混合液;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 215 nm;柱温 40 ℃;进样量 10 μL。

2.4 生理指标测定

可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 等^[4]的方法;可溶性糖含量测定参照刘海英等^[5]的方法;MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸比色法^[6]。

2.5 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 Biospin Plant Total RNA Extraction Kit

试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度计测定其在 260、280 nm 处的吸光度(A)值,A₂₆₀/A₂₈₀均在 1.8~2.1,表明 RNA 无蛋白和 DNA 污染。按照 Promega GoScript 试剂盒使用说明对 RNA 进行反转录,合成用于荧光定量所需的 cDNA,反应体系为 Nuclease-Free Water 5.6 μL,Go Script™ 5× Reaction Buffer 4 μL,MgCl₂(25 mmol/L) 4 μL,Oligo(dT)15 primer(500 μg/mL)Random 0.5 μL,Primers(500 μg/mL) 0.5 μL,PCR Nucleotide Mix 1 μL,Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.4 μL,Go Script™ Reverse Transcriptase 1 μL,总 RNA 3 μL。反应条件:15 min,42 ℃→15 min,70 ℃。

2.6 引物设计与 qRT-PCR

引物设计根据 NCBI 上公布的序列及参照强玮等^[7]的引物序列,见表 1。以反转录得来的 cDNA 为模板,以 pgk 为内参基因,每个样品内参基因与测定基因分别设 3 个重复及 1 个阴性对照,使用 Promega GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR。反应体系为 Nuclease-Free Water 7.2 μL,基因上游引物(10 μmol/L) 0.4 μL,基因下游引物(10 μmol/L) 0.5 μL,Go Taq® qPCR Master Mix,2×10 μL,cDNA 模板 2 μL,反应条件 95 ℃、10 min,95 ℃、10 s,60 ℃、1 min,95 ℃、15 s,80 ℃、5 s,95 ℃、15 s,共 40 循环。融解曲线分析无杂峰,采用 Pfaffl Method 计算基因的相对表达量。

表 1 各基因 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers of qPCR of key genes

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	扩增效率/%	片段长度/bp
pmt	CCTACTTACCCTACTGGTGTATC	GCGAAAGATGGCAAATAAAAGC	93.0	178
trI	TTCTTTGCTTCCCTGCTGCTTC	CAGGCCAACCTTAGTATCACACAG	95.8	191
h6h	TTCCACTTGAGCAGAAAGCAAAGC	CCTCATGGTCAACTTCCTCACTTCC	96.6	199
pgk	TCGCTCTTGAGAAGGTTGAC	CTTGTCCGCAATCACTACATCAG	97.4	195

2.7 数据分析

采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 22.0 对数据进行统计整理和方差分析,Origin 8 绘图。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 不同诱导子对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱含量的影响

实验表明,与对照组相比 MJ、AgNO₃ 均显著抑制了颠茄毛状根的生长,但 AgNO₃ 却显著

促进了东莨菪碱与莨菪碱在颠茄毛状根中的合成,较对照分别提高了 2.54、1.74 倍,而 MJ 使 2 种生物碱的含量都显著降低。SA 作诱导子时,毛状根的生长情况变化并不大,东莨菪碱的含量显著提高,但却降低了莨菪碱的含量。在促进颠茄毛状根的生长方面,YE 有良好效果,2 种生物碱的含量也有显著升高。就东莨菪碱和莨菪碱的产量而言,效果最佳的诱导子分别是 AgNO₃ 和 YE(表 2)。

表 2 不同诱导子对毛状根生长及托品烷类生物碱含量的影响

Table 2 Effects of different elicitors on growth and contents of TAs of hairy roots

诱导子	鲜质量/(g·瓶 ⁻¹)	干质量/(g·瓶 ⁻¹)	东莨菪碱/(mg·g ⁻¹)	莨菪碱/(mg·g ⁻¹)	东莨菪碱产量/(mg·瓶 ⁻¹)	莨菪碱产量/(mg·瓶 ⁻¹)
CK	11.724±0.734 c	0.886±0.023 b	0.754±0.006 d	0.592±0.005 c	6.689±0.024 d	5.243±0.106 c
MJ	9.764±0.235 d	0.768±0.024 d	0.206±0.005 e	0.223±0.004 e	1.589±0.095 e	1.712±0.071 e
AgNO ₃	8.765±0.680 e	0.684±0.012 e	1.912±0.052 a	1.033±0.013 a	13.095±0.579 a	6.696±0.541 b
SA	12.001±0.412 b	0.855±0.010 c	0.983±0.004 b	0.561±0.009 d	8.412±0.101 c	4.806±0.137 d
YE	15.246±0.269 a	1.480±0.040 a	0.796±0.007 c	0.781±0.034 b	11.802±0.406 b	11.567±0.294 a

不同小写字母表示各处理间差异显著, $P < 0.05$, 下同

Different lowercase letters indicate that significant differences among all the processes, $P < 0.05$, same as below

3.2 不同诱导子对颠茄毛状根生长过程中部分生理指标的影响

可溶性糖和可溶性蛋白都是植物体内代谢的重要物质, 是植物生长必需的能源物质和营养物质, 同时也是植物的重要组成部分。从图 1-A 中可以看出, 可溶性蛋白的含量经过诱导子处理后较对照都有显著升高, 其中 YE 对可溶性蛋白含量的提高最为明显, 达到了 10.53 mg/g, 较对照组增加了 22.31%, 另外 3 种诱导子处理组可溶性蛋白的含量虽然也高于对照组, 但组间差异并不

显著。另一方面, 在颠茄培养基中添加不同种类的诱导子后, 各处理组与对照相比, 可溶性糖的含量均显著提高, 其中 AgNO₃ 与 SA 对其含量的影响最大, 分别是对照的 1.58、1.60 倍, 而 YE 组为 4 个实验组中的最低 (图 1-B)。综合来看, MJ、AgNO₃ 和 SA 主要促进了颠茄毛状根的碳代谢, 而 YE 则是促进其氮代谢。

MDA 是膜脂过氧化产物, 会造成细胞中酶和细胞膜的损伤, 破坏膜结构的完整性和功能的稳定性, 其含量是反映膜脂过氧化程度和膜受损伤程度

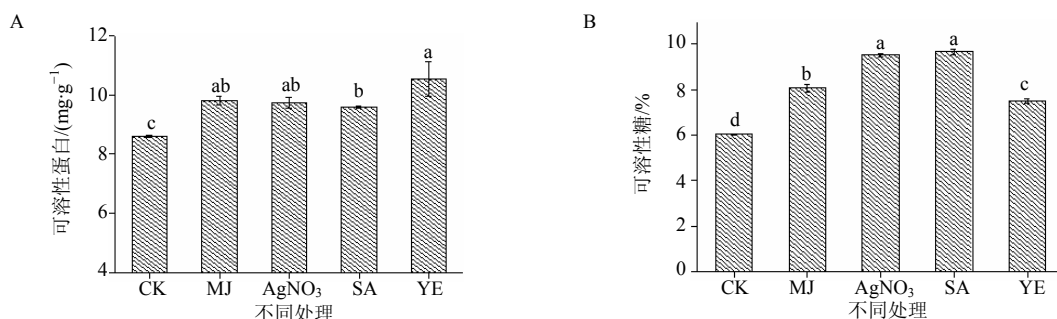


图 1 不同诱导子对可溶性蛋白 (A) 和可溶性糖 (B) 含量的影响

Fig. 1 Effects of different elicitors on contents of soluble protein (A) and soluble sugar (B) of hairy roots

的重要指标^[8]。由图 2 可以看出, MJ、AgNO₃ 和 SA 均使颠茄毛状根中 MDA 含量显著升高, 其中, SA 组升高幅度最大。而 YE 对 MDA 含量并无显著影响, 说明 YE 的添加并未对毛状根细胞膜产生伤害。

3.3 不同诱导子对毛状根托品烷类生物碱关键酶基因表达量的影响

根据诱导子的作用机制可以看出, 诱导子的加入会导致与植物次生代谢产物合成的相关基因表达量发生变化。本实验以 pgk 基因为内参基因, 采用荧光定量 PCR 检测添加不同诱导子处理后颠茄毛状根中托品烷类生物碱合成途径中的 3 个关键酶基因 pmt、tr1、h6h 基因的相对表达量。如图 3 所示, 与

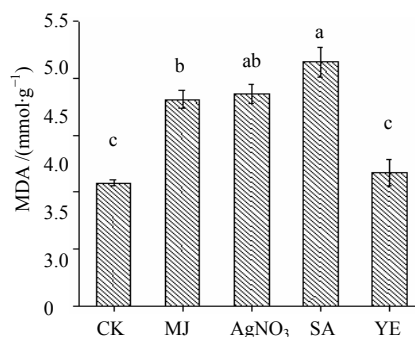


图 2 不同诱导子对毛状根 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of different elicitors on content of MDA of hairy roots

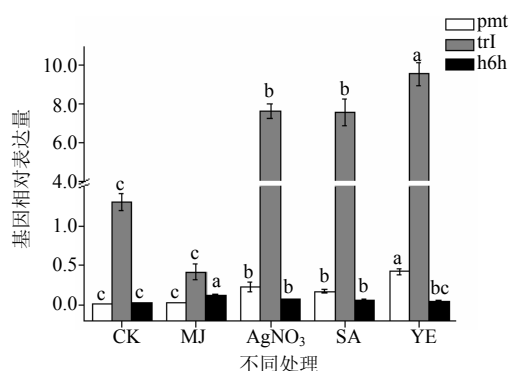


图 3 不同诱导子对颠茄毛状根 pmt、trl、h6h 基因表达量的影响

Fig. 3 Effects of different elicitors on expression of pmt, trl, and h6h genes of hairy roots

对照组相比, 除 MJ 处理对 pmt 基因的表达没有显著性影响外, 其他 3 种诱导子均能显著地刺激 pmt 基因的表达, YE 刺激 pmt 基因表达的效果最为明显, 达到对照组的 242.22%, 且与其他诱导处理组均存在显著性差异。其次, MJ 处理同样也没有刺激 trl 基因的表达, 反而抑制了该基因的表达, 但不存在显著性。而其他 3 组诱导子却显著地提高了 trl 基因的表达, YE 诱导的效果同样最明显; 最后, 与对照组相比, 4 种诱导子均提高了 h6h 基因的表达, 刺激程度为 MJ>AgNO₃>SA>YE, MJ 对该基因的诱导效果最强烈, 且与其他诱导组均存在显著性差异, 而 YE 处理与对照组相比虽然也刺激了 h6h 基因的表达, 但 2 组之间并不存在显著性差异。

4 讨论

4.1 诱导子对颠茄毛状根生长及托品烷类生物碱的影响

诱导子通常可以作为一种信号而被植物细胞膜上的受体所识别并与其结合, 结合后引起细胞膜及细胞内发生一系列级联反应, 合成与植物素有关的酶或使其活性发生变化, 从而使植物基因表达发生变化, 进而导致植物素的合成与积累^[9]。本实验研究发现 MJ 的添加使托品烷类生物碱的产量受到了抑制, 这与 MJ 对丹参次生代谢产物的影响不同^[10], 可能是因为颠茄与丹参次生代谢合成的途径不同, 丹参合成途径中关键酶基因 C4H、PAL、TAT 等对 MJ 的敏感性较强^[11]。AgNO₃ 抑制了颠茄毛状根的生长, 但其使托品烷类生物碱的含量提高了。从实验结果来看, AgNO₃ 主要是影响了 trl 基因的表达, 使颠茄次生代谢途径中托品酮在 trl 的催化下得到高效

利用, Xiao 等^[12]用 Ag⁺处理丹参毛状根后, 也发现在 mRNA 水平上到第 6 天时基因 PAL 转录达到最高峰。有研究发现 SA 对同一细胞系内不同化合物的影响也不相同, 如夏芳等^[13]发现 SA 作为诱导子添加到东莨菪碱植物中发现, SA 作为诱导子可以提高细胞培养体系中东莨菪碱的含量, 但对莨菪碱的合成影响不是很大。这与本实验研究的结果相似, 本实验在低浓度处理下 (25、50 μmol/L) 东莨菪碱的含量较对照有显著性的增加。YE 可通过活化次生代谢产物相关酶的活性来提高植物特定次生代谢产物的积累^[14]。YE 的添加使植物初生代谢过程中的 G6PDH 活性的增加, G6PDH 是磷酸戊糖途径的第一个关键酶, 该酶在诱导子对植物生长影响的作用表现为可以提供更多的辅酶 II (NADPH), 促进植物的初生代谢, 从而使植物的生长量增加^[15]。同时 NADPH 也可以降解对细胞有伤害的活性氧或过氧化物, 磷酸戊糖途径的加快也可以促进活性氧的降解^[16]。这些都有利于细胞的生长及次生代谢产物的积累。本研究中 YE 组是干、鲜质量增加最多的一组, 托品烷类生物碱产量的增加也相对可观。

通过添加上述 4 种不同的诱导子发现, 诱导子对颠茄毛状根的生长及托品烷类生物碱的合成影响均不相同, 这可能是因为不同的诱导反应与植物细胞的自身结构或细胞膜上的受体种类、数量、分布及生长状态均有关系。也有可能是因为颠茄毛状根的生长不需要激素, 具有激素自主化的特点, 其内源细胞分裂素水平的不一样导致植物对不同诱导子的反应也不相同。也有可能诱导子本身的信号转导途径及作用位点不同密切相关。另外, 有研究^[17]同时将 Ag⁺和 YE 添加到丹参培养基中, 对次生代谢产物丹参酮和丹酚酸的合成积累产生了良好的效果, 故本课题组下一步拟将研究 2 种或多种因子互作对颠茄毛状根次生代谢的影响。

4.2 诱导子对颠茄毛状根生长过程中部分生理指标的影响

诱导子对植物的影响, 既包括对初生代谢的调节, 也包括对次生代谢的调节。初生代谢能为次生代谢提供能量和一些小分子化合物原料, 是次生代谢的基础, 因此, 影响初生代谢的因素也会影响次生代谢, 植物的初生代谢情况在一定程度上反映了次生代谢的强度。本研究中, MJ、AgNO₃ 和 SA 这 3 种诱导子主要是影响了颠茄毛状根的碳代谢, 为次生代谢提供更多的底物。YE 则对其氮代谢产生了影

响, 氮代谢中的氨基酸代谢与托品烷类生物碱的合成密切相关, 鸟氨酸和精氨酸为代谢的前体物质, 可以推测 YE 的添加可能增多了毛状根中生物碱合成的前体物质使莨菪碱和东莨菪碱的产量升高。MDA 是植物生物膜氧化的产物, 它的含量可以作为植物受诱导子细胞结构受到影响的重要指标。另外, MDA 可与蛋白质反应形成西佛碱, 使得蛋白质交联, 破坏蛋白质、核酸等的结构^[18]。MJ、AgNO₃ 和 SA 导致了 MDA 含量的增多, 不利于颠茄细胞的正常生长, 而结果显示, YE 的添加并未破坏毛状根细胞结构及细胞膜的正常功能, 有利于其生长代谢, 与后面的毛状根的生长情况/生物碱产量及基因表达量结果一致。

4.3 诱导子对颠茄毛状根生长过程中关键酶基因表达的影响

诱导子能在植物体内诱发或抑制特定代谢, 直接影响到次生代谢物的产量, 可有效改善具生物活性化合物的次生代谢情况^[19]。有研究报道, 在罂粟悬浮细胞培养的过程中添加真菌诱导子后, 诱导子显著地诱导了 8 种生物碱合成基因中的 7 个基因的转录^[20]。在本研究中, YE 对颠茄生长及 *pmt* 基因表达的影响在 4 组中最显著, 这也可以从一方面验证 *pmt* 基因的功能, 即 *pmt* 基因在联系初生代谢(多胺合成)和次生代谢(TAs 合成)中起着枢纽作用。MJ 虽然能诱导 *h6h* 基因的表达, 但上游的 2 个关键基因都处于抑制状态, 故导致最终产物合成受阻。AgNO₃ 和 YE 是本实验中促进托品烷类生物碱合成的良好诱导子, 它们的主要作用在于使 *pmt* 基因和 *h6h* 基因高水平表达, 且加强植物的初生生长, 由此推测 *pmt* 基因和 *h6h* 基因在整个代谢途径中比 *h6h* 基因更具有决定性作用, 重金属 Ag⁺ 和 YE 均可作为颠茄毛状根培养过程中促进有效药用物质合成的诱导子。

参考文献

- [1] Chi J. Motion sickness patch making a comeback [J]. *Drug Topics*, 2004, 161: 21.
- [2] Zárate R, Hermosin B, Cantos M, *et al.* Tropane alkaloid distribution in *Atropa baetica* plants [J]. *J Chem Ecol*, 1997, 23(8): 2059-2066.
- [3] 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]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 143(4): 309-315.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analyt Bioch*, 1976, 72: 248-254.
- [5] 刘海英, 王华华, 崔长海. 可溶性糖含量测定 (蒽酮法) 实验的改进 [J]. *实验室科学*, 2013, 16(2): 19-20.
- [6] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines [J]. *Plant Sci*, 2000, 151(1): 59-66.
- [7] 强 玮, 王亚雄, 张巧卓, 等. 颠茄托品烷生物碱合成途径基因表达分析与生物碱积累研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(1): 52-58.
- [8] 李文兵, 王燕凌, 李 芳, 等. 水分胁迫下多枝桧柳体内活性氧与保护酶的关系 [J]. *新疆农业大学学报*, 2007, 30(1): 30-34.
- [9] 肖春桥, 高 洪, 池汝安. 诱导子促进植物次生代谢产物生产的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(5): 473-476.
- [10] 肖 莹. 丹酚酸类成分生源合成的调控研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [11] Koehler G, Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of secondary metabolites in plants [J]. *Plant*, 207, 172(5): 861-880.
- [12] Xiao Y, Gao S, Di P-lithospermic acid B is more responsive to silve ions (Ag⁺) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Biosci Rep*, 2010, 30(1): 33-40.
- [13] 夏 芳, 李厚华, 付春祥, 等. 水母雪莲查尔酮合酶基因的克隆、表达及酶活分析 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27(9): 1363-1370.
- [14] Chen H, Chen F. Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(7): 710-717.
- [15] 徐春明, 陈 兵, 欧 元. 酵母提取物对水母雪莲悬浮培养合成紫丁香苷的影响 [J]. *北京工商大学学报*, 2009, 27(3): 1-4.
- [16] Fahrendorf T, Ni W, Shorosh B S, *et al.* Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(5): 885-900.
- [17] Wang Y, Shen Y, Shen Z, *et al.* Comparative proteomic analysis of the response to silver ions and yeast extract in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 107: 364-374.
- [18] 刘 晶, 蔡勇健, 吴 伟, 等. 丙二醛氧化对大豆蛋白功能性质的影响 [J]. *中国油脂*, 2014, 39(6): 41-44.
- [19] Almagro L, Sabater-Jara A B, Belchi-Navarro S, *et al.* Effect of UV Light on Secondary Metabolite Biosynthesis in Plant Cell Cultures Elicited with Cyclodextrins and Methyl Jasmonate [M]. Murcia: InTech, 2011.
- [20] Peter J F, Sang-Un P. Developmental and inducible accumulation of gene transcripts involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(1): 177-186.