长春花 *CrZCTs* 转录因子调控文多灵及长春质碱合成研究

张燕妮，崔　悦#，刘　师，李芙蓉，孙小涵，于　放，刘志文*

大连工业大学生物工程学院，辽宁 大连　116034

摘　要：目的　通过分析药用植物长春花 *Cathranthus roseus* 萜类吲哚生物碱（terpenoid indole alkaloids，TIAs）合成途径上的抑制转录因子 *CrZCT1*、*CrZCT2* 和 *CrZCT3* 间的功能差异，为有效地调控 TIAs 合成提供必要的理论依据。**方法**　利用病毒诱导的基因沉默（virus induced gene silencing，VIGS）技术，采用不同的 *CrZCTs* 基因沉默组合方式，对 *CrZCTs* 进行沉默，分析 *CrZCTs* 和 TIAs 生物合成途径中关键酶基因的表达量以及文多灵和长春质碱的积累量变化。**结果**　当对 *CrZCTs* 进行单个或任意 2 个沉默时，其他未沉默处理的基因相对表达水平也均会随之下调，且 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 有相似的表达水平变化。对于 7 种不同组合的沉默处理下，5 个关键酶基因（*CrTDC*、*CrSTR*、*CrG10H*、*CrT16H* 和 *CrDAT*）的相对表达量较对照均有不同程度的上调，为对照的 1.43～14.65 倍；而文多灵和长春质碱的积累量也均显著提升，分别比对照增加 15.27%～128.24%和 12.24%～96.35%。**结论**　由于 *CrZCTs* 三者间的同源性和功能的冗余性，基因表达和生物碱的合成均表现出同时沉默 3 个基因的效果大于任意 2 个的组合大于 1 个，且 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的作用和能力相似，而 *CrZCT3* 促进和调控能力更大。

关键词：长春花；转录因子 *CrZCTs*；文多灵；长春质碱；病毒诱导的基因沉默

中图分类号：R286.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)18 - 6335 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.023

Regulation of vindoline and catharanthine biosynthesis by transcription factor *CrZCTs* in *Catharanthus roseus*

ZHANG Yanni, CUI Yue, LIU Shi, LI Furong, SUN Xiaohan, YU Fang, LIU Zhiwen

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

Abstract: Objective　To provide necessary theoretical basis for effectively regulating synthesis of terpenoid indole alkaloids (TIAs) in medicinal plant *Catharanthus roseus*, and the functional differences between the inhibitory transcription factors *CrZCT1*, *CrZCT2*, and *CrZCT3* on the synthetic pathway of TIAs were analyzed in this study. **Methods**　The virus-induced gene silencing (VIGS) technology was used to silence *CrZCTs* with different gene combinations, the relative expression levels of *CrZCTs* and five key enzyme genes in the biosynthesis pathway as well as the accumulation levels of vindoline and catharanthine were then analyzed. **Results**　Both mono- and double-silencing of *CrZCTs* all down-regulated the expression of other unsilenced treated genes when they were silenced, and the *CrZCT1* and *CrZCT2* had similar expression levels and trends. Compared to the control, the relative expression level of the five key enzyme genes (*CrTDC, CrSTR, CrG10H, CrT16H* and *CrDAT*) were all differentially up-regulated among the seven different treatments ranging from 1.43 to 14.65 fold, while the accumulation of vindoline and catharanthine was also significantly elevated, ranging from 15.27%—128.24% and 12.24%—96.35%, respectively. **Conclusion**　The three *CrZCTs* have similar functions in regulating alkaloid synthesis due to the homology and redundancy among them. Both key enzyme gene expression and alkaloid accumulation promotion effect all exhibited that simultaneous silencing of the all three genes are greater than any two genes greater than one gene, and the effects of *CrZCT1* and *CrZCT2* are similar, while *CrZCT3* has greater promotion and regulation ability.

Key words: *Cathranthus roseus* (L.) G. Don; transcription factor *CrZCTs*; vindoline; catharanthine; virus-induced gene silencing

收稿日期：2024-01-02

基金项目：辽宁省教育厅科学研究项目（LJKZ0523）

作者简介：张燕妮，硕士研究生，研究方向为药用植物的代谢调控。E-mail: zyn1998119@163.com

#共同第一作者：崔　悦，硕士研究生，研究方向为作物的抗逆和代谢调控。E-mail: 842533600@qq.com

***通信作者：**刘志文，博士，副教授，硕士生导师，研究方向为药用植物的代谢调控。E-mail: alzw@dlpu.edu.cn

长春花 *Cathranthus roseus* (L.) G. Don 是夹竹桃科长春花属中研究最为广泛的药用和观赏植物之一[1-3]。长春花中能够合成 150 多种萜类吲哚生物碱（terpenoid indole alkaloids，TIAs），包括有效的抗肿瘤成分文多灵和长春质碱等[4-6]，由于 TIAs 及其衍生物具有重要的药理特性得已在临床上广泛应用，全球的需求也正在不断增加[7-9]。然而与大多数药用植物中次生代谢物积累情况相类似，文多灵和长春质碱等 TIAs 在天然植物中含量极低，使得它们的生物提取受到限制，远远无法满足临床需求，因此如何提高它们在长春花中的含量一直备受广大科研工作者们关注[10-12]。

由于 TIAs 化学结构复杂，其化学合成或半合成的方法因程序复杂、较难控制和成本高等问题，致使它们目前还无法替代天然植物提取，进而无法实现在临床治疗中的应用[13-15]。此外，研究者们试图通过次生代谢工程等手段提高它们在细胞内的合成效率，包括在悬浮细胞及毛状根的培养过程中添加诱导子、前体化合物、以及植物激素等方法，然而这些方法的应用均具有一定的局限性，如生产成本偏高等，同时也未能有效地大幅度提高 TIAs 的积累，尚不具有商业前景[16-19]。

植物中含有众多的转录因子，已经有越来越多的转录因子被研究学者发现可以用以调控植物的次生代谢[20-22]，其主要的调控方法就是和植物次生代谢产物相关的酶基因的启动子结合，促进或抑制酶基因的表达，进而影响次级代谢产物的合成效率[23-25]。近年来，对长春花 TIAs 合成途径的代谢调控研究已经取得很大进展，多个限速酶基因已经成功被克隆并进行功能鉴定[26-27]。然而，长春花 TIAs 的合成不仅是一个复杂的合成过程，而且调控也非常复杂，受多种因素协同调节的，其中转录因子是核心的调节因子，起关键作用，想要阐明调控机制及合成过程，还需要对 TIAs 的转录因子进行深入研究[6,28]，长春花的转录因子包括增强（*ORCA2*、*ORCA3*、*BIS1*、*BPF1*、*MYC1*、*MYC2*、*WRKY* 等）和抑制转录因子（*JAZ*、*ZCTs*、*GBF1*、*GBF2* 等）[26-27]，其中，长春花 *CrZCTs*（zinc finger *Catharanthus* transcription factor）属于 Cyst/His2-type 锌指蛋白家族，它包含 3 个成员 *CrZCT1*、*CrZCT2* 和 *CrZCT3*。研究表明，*CrZCTs* 均能特异性结合到 TIAs 合成关键酶基因 *CrSTR* 和 *CrTDC* 的启动子上，并抑制二者的表达，是长春花 TIAs 合成的一个负调控因子[31-34]。序列分析表明 *CrZCTs* 基因家族的结构域中存在 1 个 EAR（Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression）抑制基因序列，这可能是抑制 TIAs 生物合成的主要原因[35]。*CrZCTs* 的功能可以抵消 *CrORCA2*、*CrORCA3* 对 *CrSTR* 和 *CrTDC* 的激活作用[34,36]。然而目前对 *CrZCTs* 转录因子之间的关系、功能和调控机制的了解却仍然有限[30,34]。

本研究主要通过 VIGS 技术，采用不同的基因沉默组合方式，分析 TIAs 合成途径关键酶基因和 *CrZCTs* 的相对表达量变化，检测文多灵和长春质碱积累量的变化，研究 *CrZCTs* 调控 TIAs 合成的功能差异和机制，为有效调控 TIAs 合成提供必要的理论依据及基因元件。

1 材料

样品由大连工业大学于放教授鉴定为健康的长春花 *C. roseus* (L.) G. Don 种子，于本实验室保存。使用 75%乙醇表面灭菌 1 min，再使用 10% $NaClO_2$ 再灭菌 10 min。然后用无菌蒸馏水冲洗种子 10 次，置于 MS 基础培养基上发芽。种子在 16 h 光照和 8 h 黑暗周期下生长，保持温度（25±2）℃。发芽 4 周后，将具有 2～3 对真叶的幼苗移植到土壤中，并在温度 25 ℃光照 15 h 条件下生长。

对照品文多灵（批号 A212A024）和长春质碱（批号 0424A022）均购自北京索莱宝科技有限公司，质量分数均≥98%。

2 方法

2.1 RNA 提取及载体构建

使用 TRIzol 试剂提取长春花叶片总 RNA，使用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA。以 cDNA 为模板，使用特异性引物（表 1），巢式 PCR 扩增目的片段 *CrZCT1*（296 bp）、*CrZCT2*（327 bp）和 *CrZCT3*（408 bp）。PCR 产物回收纯化后与 pGM-T 载体连接，构建克隆载体 pGMT-*CrZCT1*、pGMT-*CrZCT2* 和 pGMT-*CrZCT3*，并测序验证。

将验证正确的 pGMT-*CrZCT1*、pGMT-*CrZCT*2 和 pGMT-*CrZCT3* 分别用 *Xba* I/*Bam*H I、*Sac* I/*Bam*H I 和 *Sac* I/*Xho* I 双酶切。将酶切下的目的基因片段 *CrZCT1*、*CrZCT2* 和 *CrZCT3* 的 cDNA 分别与 pTRV2 载体（本实验保存）连接，构建单基因沉默载体 pTRV2-*CrZCT1* 、 pTRV2-*CrZCT2* 和 pTRV2-*CrZCT3*。将载体 pTRV2-*CrZCT1*、pTRV2-*CrZCT2* 和 pTRV2-*CrZCT3* 分别用 *Sac* I/*Bam*H I、*Sac* I/*Xho* I 和 *Xba* I/*Bam*H I 双酶切，并与上述的酶切后的

表 1 病毒诱导的基因沉默 *CrZCTs* 的克隆和 qRT-PCR 引物

Table 1 Virus-induced gene silencing (VIGS) *CrZCTs* gene cloning and qRT-PCR primers in this study

引物名称	序列 (5’-3’)	用途
CrZCT1-outside-F	TTTCCCACTCCCACCTGTAT	VIGS 片段扩增
CrZCT1-outside-R	GTTAAAAGGAAAGCCACAAAAG	
CrZCT1-VIGS-F658-*Xba* I	CGTCTAGAATTTGACGCCTGAGGACAAC	
CrZCT1-VIGS-R954-*Bam*H I	GCGGATCCGCATATTTCAAACTCATGGA	
CrZCT2-outside-F	TTCCTTGCTTTGCTTACCTC	
CrZCT2-outside-R	CTAATTCTGATGAAAGGGGAAT	
CrZCT2-VIGS-F678-*Bam*H I	GCGGATCCGGGTGAGTAAACATGCCATG	
CrZCT2-VIGS-R1005-*Sac* I	GCGAGCTCGCAACAGAAAGCAGCTGTATC	
CrZCT3-outside-F	CCGACTTGTTCTACTCCCAC	
CrZCT3-outside-R	AGAAAAGAAAGAAACGGTCCA	
CrZCT3-VIGS-F1031-*Sac* I	GCGAGCTCTGAATGGAATTCTGTTGAACAG	
CrZCT3-VIGS-R1439-*Xho* I	CGCTCGAGTCTGCTCTGTCATATCCAAGTT	
CrZCT1- F64	TTTCCCACTCCCACCTGTAT	qRT-PCR
CrZCT1-R208	CACGCCCATGTTTTTTGTTAT	
CrZCT2-F616	TGGAAAAATTGCTCCAACTG	
CrZCT2-R704	ATGGCATGTTTACTCACCCG	
CrZCT3-F13	ATTACGGGGGGAACACAC	
CrZCT3-R140	AGCTTCAAGTGCCATAGCAG	
CrACT3-F1265	CGGGTCCTTCAATTGTTCAT	
CrACT3-R1444	AAACTCATCGCCCTCCTAAG	
CrSTR-F19	TGACTTCGCCTACGCATCT	
CrSTR-R518	CATTTGAATGGCACTCCTTG	
CrTDC-F760	TTCGGCATCTCACCTCAA	
CrTDC-R916	AAATACCAAACTCGTTAGCG	
CrG10H-F323	AACGCACTCCACGGCTATT	
CrG10H-R518	CTTCTCCGCTCTGGCTATT	
CrPDS-F978	ACTTTGTATGCCCGTTGTTG	
CrPDS-R1118	TCTCCTTTGATTGCTGACCC	
CrT16H-F516	GCCGAGATGCCGATAGAGT	
CrT16H-R658	GGCGATGCTCGGCTTTTCTTC	
CrDAT-F492	ATGAATACTTACGGCGGGA	
CrDAT-R653	TCCTTGTGCTTTAGATGCCA	

下划线为酶切位点。

The underline represents the cleavage site of the enzyme.

CrZCT2、*CrZCT3* 和 *CrZCT1* 片段连接，分别构建双基因沉默载体 pTRV2-*CrZCT1-2*、pTRV2-*CrZCT1-3* 和 pTRV2-*CrZCT2-3*。使用 *Xho* I/*Bam*H I 双酶切载体 pTRV2-*CrZCT1*，并与 *CrZCT2*、*CrZCT3* 片段连接构建 3 基因沉默载体 pTRV2-*CrZCT1-2-3*。本实验所用试剂和 pGM-T 载体均来自天根生化科技有限公司，所用酶均来自宝生物工程有限公司。

2.2 病毒诱导的基因沉默

将根瘤农杆菌 GV3101（本实验室保存）在含有 25 μg/mL 利福平和 50 μg/mL 庆大霉素的溶菌肉汤（LB）固体培养基上 28 ℃培养 48 h。挑取单菌落于含有 25 μg/mL 利福平和 50 μg/mL 庆大霉素的

50 mL LB 液体培养基中，在 28 ℃摇床 180 r/min 下过夜培养，直至 A_{600}＝0.8。制备农杆菌感受态并将质粒 pTRV2-*CrZCT1*、pTRV2-*CrZCT2*、pTRV2-*CrZCT3*、pTRV2-*CrZCT1-2*、pTRV2-*CrZCT1-3*、pTRV2- *CrZCT2-3*、pTRV2-*CrZCT1-2-3*、pTRV2（对照 CK）、pTRV2-*PDS*（八氢番茄红素脱氢酶基因，表型对照）分别转化到 GV3101 中。将转化成功的 GV3101 在含有 10 mmol/L *4*-吗啉乙磺酸（MES），20 μmol/L 乙酰丁香酮和 50 μg/mL 卡那霉素的 100 mL LB 培养基中培养过夜，温度为 28 ℃，摇床转速为 180 r/min。在 4 500 r/min 下离心 10 min 收集细菌，并使用 5 mL 侵染缓冲液（10 mmol/L $MgCl_2$、20 mmol/L MES 和 200 μmol/L 乙酰丁香酮）重悬菌体，在 28 ℃摇床中 180 r/min 共培养 3 h。将含有 pTRV1 的菌株悬浮液与分别含上述 9 种质粒菌株等体积混合，轻弹混匀，再将 9 种混合菌液分别通过注射器注入长春花幼苗的顶端分生组织中。侵染后将植物在 25 ℃光照 16 h 条件下大约生长 4 周，并观察 PDS 表型，当产生可见的光漂白症状时（图 1），分别选取和收集与白色叶片相对应位置的不同处理的叶片作试验样品。



图 1　长春花 *CrPDS* 的 VIGS 表型对照

Fig. 1　VIGS phenotypic control of *CrPDS* in *Catharanthus roseus*

2.3　实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析

提取样品叶片的总 RNA，并进行反转录 cDNA，采用 qRT-PCR 分析长春花叶片中 *CrZCTs* 和 TIA 合成途径关键酶基因的表达水平，为了确保结果的准确性，引物设计均保证了扩增序列的唯一性，各引物见表 1。实时定量荧光 PCR 仪为 LightCycler 480（罗氏公司，上海），扩增条件：95 ℃、5 min；95 ℃、20 s；50 ℃、20 s；72 ℃、20 s 循环 40 次；40～70 ℃ 10 min。将得到的 C_t 值使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算，计算得到相关的 C_t 值，每个基因重复 3 次实验，并计算相关均值及误差，使用均值和误差进行分析。

2.4　生物碱提取及分析

样品称量鲜质量后，将其在液氮中冷冻并研磨成粉末，在室温下用甲醇萃取 1 h，取提取液上清真空干燥，然后重新溶解在甲醇中，重复萃取 3 次。用 0.22 μm 的滤膜滤过样品，使用沃特世 HPLC 系统（Alliance 2690）分析长春花叶片中的长春质碱及文多灵含量。色谱柱为反相 C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相分别为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液-甲醇（20∶80），等度洗脱，保留时间 1 h，检测波长分别为长春质碱 280 nm，文多灵 310 nm；体积流量 1 mL/min，进样量为 10 μL，柱温为 30 ℃。文多灵和长春质碱对照品制作标准曲线[37]，文多灵的标准曲线方程为 Y＝0.692 0 X－5.438，R^2＝0.999 9；长春质碱的标准曲线方程为 Y＝0.864 5 X－14.18，R^2＝0.999。方法学考察参考文献方法[37]，精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合要求。

2.5　数据处理与分析

所有实验进行 3 次重复，通过 Microsoft Excel 2019 软件对数据进行计算和整理，采用 SPSS 软件对数据进行方差分析和最小显著差异性检验，通过 GraphPad Prism 进行图表绘制。

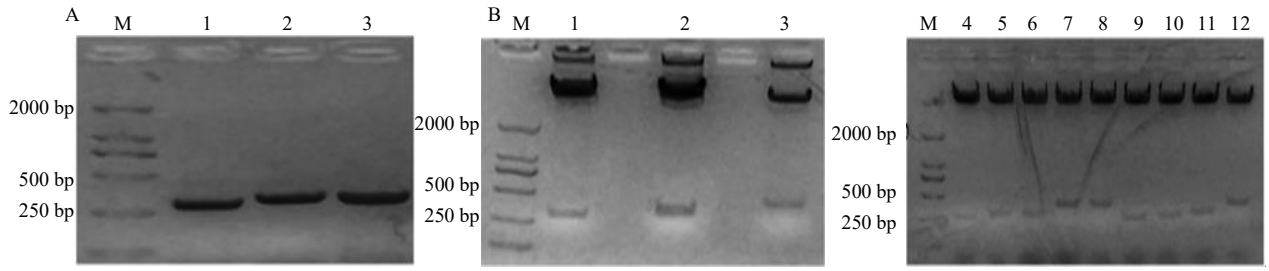
3　结果与分析

3.1　pTRV2-*CrZCTs* 载体的构建

在 3 种 *CrZCTs* 基因片段两端设计带有不同限制性内切酶的酶切位点的特异引物，然后以野生长春花 cDNA 为模版，进行巢式 PCR 扩增，分别得到 *CrZCT1*、*CrZCT2*、*CrZCT3* 基因沉默片段（图 2-A）。并成功构建了 7 种不同组合的 *CrZCTs* 沉默载体，其双酶切验证结果如图 2-B 所示，各酶切片段长度均符合相应目的基因长度。

3.2　不同沉默组合方式下 *CrZCTs* 相对表达量变化

分析了 7 种不同组合（3 种单个、3 种任意 2 个组合和 1 种 3 个 *CrZCTs* 的沉默）下的 3 种 *CrZCTs* 的相对表达量，如图 3 所示，当成功沉默其中某一个 *CrZCT1*、*CrZCT2* 或 *CrZCT3*（分别依次为空白对照的 14.78%、11.99%和 7.37%）时，相应未处理的 2 个转录因子表达量也随之显著下调（分别仅为对照的 12.77%～47.22%），此外，当仅沉默 *CrZCT1* 或 *CrZCT2* 时，*CrZCT3*（40.72%或 47.22%）的相对表达量比 *CrZCT2*（18.86%）或 *CrZCT1*（21.42%）高 1.15 倍和 1.20 倍；当仅沉默 *CrZCT3* 时，*CrZCT1*（26.96%）和 *CrZCT2*（22.77%）的相对表达量相近。

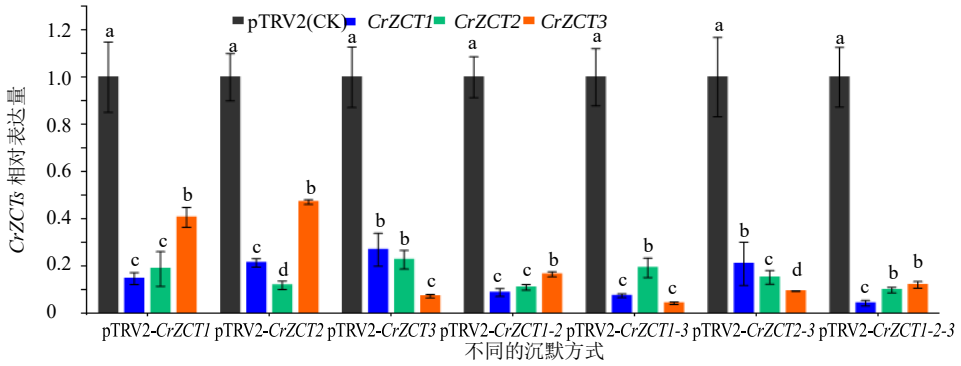


A 为 *CrZCTs* 沉默片段巢式 PCR 扩增结果：其中 1、2、3 分别表示 *CrZCT1*、*CrZCT2*、*CrZCT3* 片段；B 为 pTRV2-*CrZCTs* 重组质粒双酶切电泳验证图：其中 1、2、3 分别表示 pTRV2-*CrZCTs* 的 *CrZCT1*、*CrZCT2*、*CrZCT3* 片段，4、5 分别表示 pTRV2-*CrZCT1-2* 的 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 片段，6、7 分别表示 pTRV2-*CrZCT2-3* 的 *CrZCT2* 和 *CrZCT3* 片段，8、9 分别表示 pTRV2-*CrZCT1-3* 的 *CrZCT1* 和 *CrZCT3* 片段，10、11、12 分别表示 pTRV2-*CrZCT1-2-3* 的 *CrZCT1*、*CrZCT2* 和 *CrZCT3* 片段。

A-Nest PCR amplification results of *CrZCTs* silence fragments : lane 1, 2 and 3 represent *CrZCT1*, *CrZCT2* and *CrZCT3* respectively; B-Electropherogram of double digestion of pTRV2-*CrZCTs*: lane 1, 2 and 3 represent *CrZCT1*, *CrZCT2* and *CrZCT3* of pTRV2-*CrZCTs*. 4 and 5 represent *CrZCT1* and *CrZCT2* of pTRV2-*CrZCT1-2*. 6 and 7 represent *CrZCT2* and *CrZCT3* of pTRV2-*CrZCT2-3*. 8 and 9 represent *CrZCT1* and *CrZCT3* of pTRV2-*CrZCT1-3*. 10,11 and 12 represent *CrZCT1*, *CrZCT2* and *CrZCT3* of pTRV2-*CrZCT1-2-3*).

图 2　pTRV2-*CrZCTs* 载体构建的电泳图

Fig. 2　Electropherogram of pTRV2-*CrZCTs* vector construction



不同的小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上处理间差异显著，下同。

Lowercase letters indicate a significant difference at the 0.05 level, same as below.

图 3　不同沉默组合下 *CrZCTs* 基因相对表达量比较

Fig. 3　Relative expression of *CrZCTs* under different silencing combinations

类似的当同时沉默任意 2 个 *CrZCTs* 时，未处理的基因表达量也显著下调，且当沉默 *CrZCT1-2* 时，*CrZCT3* 较 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的相对表达量高，当 *CrZCT1-3* 或 *CrZCT2-3* 沉默时，*CrZCT2* 或 *CrZCT1* 的相对表达量相似，且均是该组合下的最高。沉默 *CrZCT1-2-3* 时，3 种转录因子的表达水平均下调。结果表现出三者间随沉默基因下调表达而下调的一致性，但下调幅度不一致，三者中 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 有相似的下调表达趋势。

3.3　TIA 合成途径中关键酶基因表达量分析

为明确 *CrZCTs* 对 TIAs 合成途径的不同影响，分析了 7 种不同沉默组合处理下 5 个关键酶基因（*CrTDC*、*CrSTR*、*CrG10H*、*CrT16H* 和 *CrDAT*）的相对表达水平。从图 4 可看出与对照组 pTRV2（CK）相比，7 种处理下均使得 *CrTDC* 的表达水平显著上升，分别依次升高了 1.76、1.91、2.12、2.61、3.00、3.32、7.69 倍，且表现为同时沉默 3 个 *CrZCTs* 的促进效果大于任意 2 个的组合大于 1 个，且单独沉默 *CrZCT1* 或 *CrZCT2* 的促进 *CrTDC* 上调间差异不显著，但且均显著小于 *CrZCT3* 的促进作用；沉默 *CrZCT1-3* 和 *CrZCT2-3* 的作用大于 *CrZCT1-2*，呈现出 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 相似的促进作用。其余 4 个基因 *CrSTR*、*CrG10H*、*CrT16H* 和 *CrDAT* 的相对表达量也均显著上调，变化范围分别为 1.43～14.65 倍、1.56～10.73 倍、1.99～9.16 倍和 1.87～12.04 倍，且 *CrZCTs* 的作用方式和表达趋势均与前述的 *CrTDC* 类似或完全一致，在此不再详细分析。

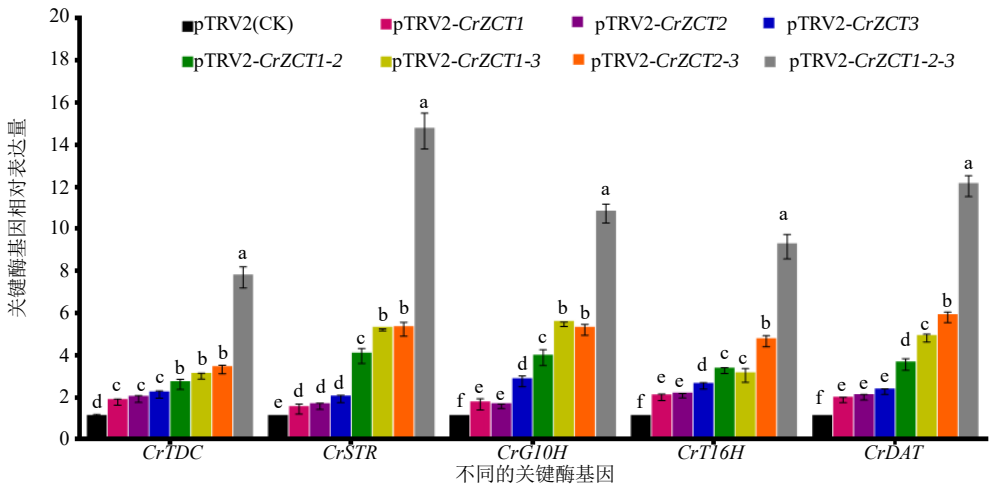


图 4　TIAs 生物合成途径上 5 个关键酶基因相对表达量

Fig. 4　Relative expression of five key enzyme genes on biosynthetic pathway of TIAs

3.4　文多灵和长春质碱含量的分析

为研究 *CrZCTs* 对 TIAs 生物合成的影响，使用 HPLC 检测不同沉默组合处理下叶片中文多灵和长春质碱的积累情况。如图 5 所示，与 pTRV2 对照相比，7 种不同处理下，文多灵的积累量分别显著增加了 15.27%、21.37%、42.74%、51.91%、64.12%、56.48% 和 128.24%。而长春质碱积累量也分别显著增加了 12.24%、11.56%、18.36%、22.31%、26.53%、32.65%和 96.35%。结果表明不同处理组合均可以促进文多灵和长春质碱的积累，但促进效果不同，且表现出与促进关键酶基因表达类似的趋势。

结合前述实验表明，3 个转录因子 *CrZCTs* 间相互协调，共同调控着酶基因的表达和生物碱的积累，且 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的作用和影响相似，而 *CrZCT3* 调控能力较 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 更强，起主要的调控作用。

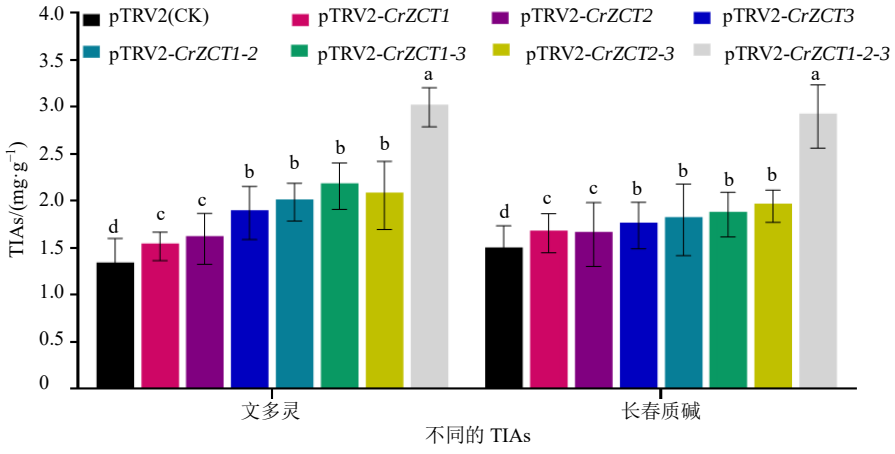


图 5　不同处理方式下叶片中文多灵及长春质碱含量

Fig. 5　Content of vindoline and catharanthine in leaves under different treatments

4　讨论

Li 等[38]应用 RNAi 技术，发现在转基因 *CrZCT-RNAi*（单个）毛状根中均降低了其余 *CrZCTs* 基因的转录水平，而在本研究中应用 VIGS 技术沉默 1 个或 2 个均会相应的降低未沉默处理的转录因子的表达水平，均表明 3 个不同的 *CrZCTs* 间存在直接或间接的相互作用和调控，但具体的作用机制还需更深入的研究。

本课题组此前已成功克隆到 3 个转录因子的全长 cDNA[39]，对 *CrZCTs* 进行分析表明分别由 178（相对分子质量 19 600）、190（相对分子质量 21 000）、259（相对分子质量 27 400）个氨基酸组

成，序列表明 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 2 个转录因子的大小和结构域等更相似，它们的功能应该更相近，而 *CrZCT3* 的 2 个锌指之间的间隔区比 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的间隔区长，表明它与 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 相比具有结合不同靶 DNA 序列的能力[31]。本研究结果也表明 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的调控的作用相似，而 *CrZCT3* 促进和调控 TIAs 能力更大。这说明锌指家族的转录因子在长春花中当其结构域中 2 个锌指结构之间的间隔区较长时，该转录因子的调控能力可能更明显。此外，Chebbi 等[40]也证明 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 而不是 *CrZCT3* 抑制 *CrHDS* 启动子活性，*CrZCT3* 的表达水平高于 *CrZCT1* 和 *CrZCT2*，调控更强。Pauw 等[31]研究发现 3 种 CrZCTs 蛋白在抑制 *CrSTR* 和 *CrTDC* 表达方面似乎功能等效，认为它们在功能上是冗余的，但每个 CrZCTs 蛋白也具有特定功能的可能性。Verma 等[35]研究也表明所有三种 *CrZCTs* 转录因子中，*CrZCT3* 是提高萜类吲哚生物碱产量的主要调控因素。在成熟的叶片中 *CrZCT3* 表达量最高，约为 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 的 2 倍，生物碱积累量反而大幅度下降[41]。本研究也表明，单独沉默 *CrZCT3* 比单独沉默 *CrZCT1* 和 *CrZCT2* 对 TIAs 的积累更有效，同时沉默 3 个转录因子后 TIAs 的积累会更高，这也进一步证明了锌指家族的转录因子在调控长春花中的 TIAs 时 *CrZCT3* 为主要负调控因素，*CrZCT1* 和 *CrZCT2* 为辅助调控因素。Li 等[29]研究也认为 *CrZCTs* 阻遏物在长春花中发挥重叠冗余但不同的功能。本研究和大量前述的研究均表明 *CrZCTs* 三者由于它们间的高度同源性，有着相似的功能，相互协调，通过与其他调控因子和关键酶基因相互作用，参与 TIAs 代谢网络的调控，影响 TIAs 的合成和积累，但三者间的调控能力各不相同，*CrZCT3* 能力更强[31,38-41]。因此推测长春花其他转录家族中具有高度同源性的转录因子可能也存在相似的功能，其中一个作为主要的调控因子，其余作为次要调控因素或作为主要调控因子的辅助因子，相互协调参与到长春花次生代谢网络的调控中。

长春花作为重要的药用植物之一，能够合成大量的治疗癌症的天然药物成分的 TIAs，然而这些天然产物含量极低，需要通过各种手段和方法促进其含量，增加产量，以更好地保护人类的生命健康。本研究基本明确了转录因子 *CrZCTs* 之间的关系和功能，为有效地调控长春花 TIAs 生物合成提供了必要的理论依据和基因元件。因此在长春花的栽培和生产上，由于序列的同源性和功能上的冗余性，当仅沉默某 1 个 *CrZCTs* 时，不足以有效的促进 TIAs 含量，只有当同时沉默 3 种 *CrZCTs* 时可以更好地减轻它们对生物碱生物合成的抑制，有效地促进 TIAs 含量，增加 TIAs 的总产量以满足不断成长的 TIAs 市场需求。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 李娅, 周海龙, 李琳, 等. 长春花 *CratpA* 基因沉默对两种生物碱合成的影响 [J]. 大连工业大学学报, 2020, 39(3): 163-168.

[2] Nishanth M J, Simon B. Understanding the possible influence of Pumilio RNA binding proteins on terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2022, 28(5): 963-969.

[3] Tonk D, Mujib A, Maqsood M, *et al*. Fungal elicitation enhances vincristine and vinblastine yield in the embryogenic tissues of *Catharanthus roseus* [J]. *Plants*, 2023, 12(19): 3373.

[4] Eng J G M, Shahsavarani M, Smith D P, *et al*. A *Catharanthus roseus* Fe(II)/α-ketoglutarate-dependent dioxygenase catalyzes a redox-neutral reaction responsible for vindolinine biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3335.

[5] Rajashekara S, Reena D, Mainavi M V, *et al*. Biological isolation and characterization of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don methanolic leaves extracts and their assessment for antimicrobial, cytotoxic, and apoptotic activities [J]. *BMC Complementary Med Ther*, 2022, 22(1): 328.

[6] Hao J, Zheng L J, Han Y D, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of TCP family genes in *Catharanthus roseus* [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1161534.

[7] 易婷, 杨四梅, 黎升倩, 等. 毛细管区带电泳同时分离分析长春花中的 4 种生物碱 [J]. 分析科学学报, 2022, 38(4): 525-528.

[8] Tang W Z, Liu X Q, He Y N, *et al*. Enhancement of vindoline and catharanthine accumulation, antioxidant enzymes activities, and gene expression levels in *Catharanthus roseus* leaves by chitooligosaccharides elicitation [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(3): 188.

[9] Li C X, Wood J C, Vu A H, *et al*. Single-cell multi-omics in the medicinal plant *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(8): 1031-1041.

[10] van Moerkercke A, Steensma P, Schweizer F, *et al*. The bHLH transcription factor BIS1 controls the iridoid

branch of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(26): 8130-8135.

[11] Uzaki M, Yamamoto K, Murakami A, *et al*. Differential regulation of fluorescent alkaloid metabolism between idioblast and lacticifer cells during leaf development in *Catharanthus roseus* seedlings [J]. *J Plant Res*, 2022, 135(3): 473-483.

[12] Mall M, Shanker K, Nagegowda D A, *et al*. Temperature-induced lipocalin-mediated membrane integrity: Possible implications for vindoline accumulation in *Catharanthus roseus* leaves [J]. *Physiol Plant*, 2023, 175(5): e13994.

[13] Wang Y Y, Yang B R, Zhang M X, *et al*. Application of transport engineering to promote catharanthine production in *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2019, 139(3): 523-530.

[14] Mahdi Y, Gerold J, Peter W, *et al*. The complexity of sound quantification of specialized metabolite biosynthesis: The stress related impact on the alkaloid content of *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochemistry*, 2021, 187: 112774.

[15] Mistry V, Darji S, Tiwari P, *et al*. Engineering *Catharanthus roseus* monoterpenoid indole alkaloid pathway in yeast [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(7): 2337-2347.

[16] Pan Y J, Lin Y C, Yu B F, *et al*. Transcriptomics comparison reveals the diversity of ethylene and methyl-jasmonate in roles of TIA metabolism in *Catharanthus roseus* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 508.

[17] Mall M, Shanker K, Samad A, *et al*. Stress responsiveness of vindoline accumulation in *Catharanthus roseus* leaves is mediated through co-expression of allene oxide cyclase with pathway genes [J]. *Protoplasma*, 2022, 259(3): 755-773.

[18] Marzban M, Farahani F, Atyabi S M, *et al*. Induced genetic and chemical changes in medicinally important plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: Cold plasma and phytohormones [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(1): 31-38.

[19] Zhang J, Hansen L G, Gudich O, *et al*. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine [J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 341-347.

[20] Cheng J N, Wang J S, Bi S T, *et al*. GLABRA 2 regulates Ethylene Overproducer 1 accumulation during nutrient deficiency-induced root hair growth [J]. *Plant Physiol*, 2024, 195(3): 1906-1924.

[21] Shui D J, Sun J, Xiong Z L, *et al*. Comparative identification of WRKY transcription factors and transcriptional response to *Ralstonia solanacearum* in tomato [J]. *Gene*, 2024, 912: 148384.

[22] Begum K, Das A, Ahmed R, *et al*. Genome-wide analysis of respiratory burst oxidase homolog (*Rboh*) genes in *Aquilaria* species and insight into ROS-mediated metabolites biosynthesis and resin deposition [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1326080.

[23] Vinay N D, Singh K, Ellur R K, *et al*. High-quality *Momordica balsamina* genome elucidates its potential use in improving stress resilience and therapeutic properties of bitter gourd [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1258042.

[24] Li J, Guo S K, Min Htwe Y, *et al*. Genome-wide identification, classification and expression analysis of *MYB* gene family in coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1263595.

[25] Ye Y, Liu R Y, Li X, *et al*. CsMYB$_6$7 participates in the flavonoid biosynthesis of summer tea leaves [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(1): uhad231.

[26] Whitmer S, van der Heijden R, Verpoorte R. Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a strictosidine synthase over-expressing transgenic cell line S1 of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2002, 69(1): 85-93.

[27] Pan Q F, Wang C Y, Xiong Z W, *et al*. CrERF5, an AP2/ERF transcription factor, positively regulates the biosynthesis of bisindole alkaloids and their precursors in *Catharanthus roseus* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 931.

[28] van Moerkercke A, Steensma P, Gariboldi I, *et al*. The basic helix-loop-helix transcription factor BIS2 is essential for monoterpenoid indole alkaloid production in the medicinal plant *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 2016, 88(1): 3-12.

[29] Li C Y, Leopold A L, Sander G W, *et al*. CrBPF1 overexpression alters transcript levels of terpenoid indole alkaloid biosynthetic and regulatory genes [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 818.

[30] Paul P, Singh S K, Patra B, *et al*. A differentially regulated AP2/ERF transcription factor gene cluster acts downstream of a MAP kinase cascade to modulate terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *New Phytol*, 2017, 213(3): 1107-1123.

[31] Pauw B, Hilliou F A O, Martin V S, *et al*. Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 52940-52948.

[32] Rizvi N F, Weaver J D, Cram E J, *et al*. Silencing the transcriptional repressor, ZCT1, illustrates the tight

regulation of terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159712.

[33] Mortensen S, Bernal-Franco D, Cole L F, *et al*. EASI transformation: An efficient transient expression method for analyzing gene function in *Catharanthus roseus* seedlings [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 755.

[34] Mortensen S, Weaver J D, Sathitloetsakun S, *et al*. The regulation of *ZCT1*, a transcriptional repressor of monoterpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Direct*, 2019, 3(12): e00193.

[35] Verma P, Khan S A, Parasharami V, *et al*. ZCTs knockdown using antisense LNA GapmeR in specialized photomixotrophic cell suspensions of *Catharanthus roseus*: Rerouting the flux towards mono and dimeric indole alkaloids [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2021, 27(7): 1437-1453.

[36] 曾俊岚, 刘万宏, 廖志华, 等. 长春花生物碱合成途径相关基因表达丰度与 MeJA 处理后基因表达差异分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(3): 1009-1020.

[37] 常博文, 刘杰, 钟鹏, 等.外源乙烯对长春花生理水平和生物碱积累的影响 [J]. 植物研究, 2018, 38(2): 284-291.

[38] Li C Y, Gibson S I. Repression of *ZCT1*, *ZCT2* and *ZCT3* affects expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic and regulatory genes [J]. *Peer J*, 2021, 9: e11624.

[39] 刘师, 吕莹, 穆贤, 等. 长春花 *ZCTs* 基因片段克隆及不同器官中表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(5/6): 2305-2310.

[40] Chebbi M, Ginis O, Courdavault V, *et al*. ZCT1 and ZCT2 transcription factors repress the activity of a gene promoter from the methyl erythritol phosphate pathway in Madagascar periwinkle cells [J]. *J Plant Physiol*, 2014, 171(16): 1510-1513.

[41] Goklany S, Rizvi N F, Loring R H, *et al*. Jasmonate-dependent alkaloid biosynthesis in *Catharanthus Roseus* hairy root cultures is correlated with the relative expression of Orca and Zct transcription factors [J]. *Biotechnol Prog*, 2013, 29(6): 1367-1376.

[责任编辑 时圣明]