

· 研究报告 ·

SmGGPPS2对丹参酮合成的影响

化文平^{1,2}, 陈尘^{3,4}, 智媛², 刘莉¹, 王喆之², 李翠芹^{2*}

¹陕西学前师范学院生命科学与食品工程学院, 西安 710061; ²陕西师范大学生命科学院, 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 710062; ³陕西省西安植物园, 西安 710068; ⁴陕西省植物资源保护与利用工程技术研究中心, 西安 710068

摘要 香叶基香叶基焦磷酸合酶(GGPPS)是植物二萜类次生代谢物合成过程中的重要调控位点。在药用模式植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中, GGPPS基因家族成员SmGGPPS2的生物学功能及其在丹参酮有效成分合成过程中的作用尚不明确。分别在丹参植株中过表达和RNA干涉SmGGPPS2基因, 并对转基因丹参中丹参酮含量和丹参酮合成相关基因表达量以及转基因植物生理指标进行检测, 结果表明, 过表达SmGGPPS2株系中的丹参酮IIA和铁锈醇等脂溶性成分含量高于野生型; RNA干涉SmGGPPS2株系中的丹参酮IIA和铁锈醇等脂溶性成分含量均低于野生型。调节表达SmGGPPS2后, 丹参株系中SmHMGR1和SmCPS1等多个关键酶基因的表达都呈现明显的变化。此外, 调节表达SmGGPPS2还影响丹参植株抗性。以上结果表明, SmGGPPS2在丹参酮等萜类物质的合成中起重要的调控作用。

关键词 丹参, GGPPS, 丹参酮, 基因表达

化文平, 陈尘, 智媛, 刘莉, 王喆之, 李翠芹 (2019). SmGGPPS2对丹参酮合成的影响. 植物学报 54, 217–226

香叶基香叶基焦磷酸合酶(Geranylgerany Pyrophosphate Synthase, GGPPS) (EC: 2.5.1.29)催化法尼基焦磷酸(Farnesyl Diphosphate, FPP)和异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl Diphosphate, IPP)缩合反应, 生成20碳的香叶基香叶基焦磷酸(Geranylgerany Pyrophosphate, GGPP)。GGPP则是合成叶绿素、类胡萝卜素、赤霉素、香叶基化蛋白和维生素E侧链等二萜类物质的前体物质(Chang et al., 2006)。因而催化合成GGPP的GGPPS在调控二萜类物质代谢途径中发挥重要作用(Aharoni et al., 2003; Han et al., 2006; Chen et al., 2015)。近年来, GGPPS基因在植物次生代谢物合成中的调控功能和生理功能备受关注。例如, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过表达甘薯(*Ipomoea batatas*) IbGGPPS基因不仅增加其类胡萝卜素含量, 同时增强了植株抗渗透胁迫能力(Chen et al., 2015)。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中异源表达向日葵(*Helianthus annuus*) HaGGPPS基因使其赤霉素含量升高, 促进植物生长(Tata et al., 2016)。

丹参是我国大宗中药材之一, 其药源植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*)是次生代谢研究的药用模式植物。近年来, 有关丹参次生代谢物合成中相关基因的研究及调控已成为国内药用植物的研究热点。探明丹参GGPPS基因功能, 可为揭示丹参酮类药用成分(二萜类衍生物)的合成调控机制奠定基础。近年来, SmGGPPS1、SmGGPPS2和SmGGPPS3三个丹参GGPPS家族基因被克隆(张蕾, 2009; Kai et al., 2010; Hua et al., 2012; Ma et al., 2012; 化文平等, 2014)。其中SmGGPPS1和SmGGPPS3都具有GGPPS合酶活性。SmGGPPS1主要参与叶绿素等物质的合成, 还参与调控丹参酮的合成(Kai et al., 2010; Hua et al., 2012); SmGGPPS3在丹参各器官中均有表达, 但在根中表达量最高, 推测其与根中萜类物质的合成相关(化文平等, 2014)。而SmGGPPS2主要在丹参成熟植株的根和花中表达, 推测其可能参与丹参花中类胡萝卜素的合成, 且不具有GGPPS合酶活性(张蕾, 2009; 化文平等, 2014)。SmGGPPS2基因的

收稿日期: 2018-10-22; 接受日期: 2019-02-19

基金项目: 国家自然科学基金(No.31800259, No.31870276)、国家重点研发计划“中医药现代化研究”专项(No.2018YFC1706504)、陕西省教育厅科学研究基金(No.17JK0182, No.2015JK1177)、中央高校基本科研业务费专项资金(No.GK201706009)和陕西省自然科学基金基础研究计划(No.2018JQ3033, No.2018JZ3001)

* 通讯作者。E-mail: licuiqin16@snnu.edu.cn

生物学功能尚不确定,其在丹参酮等有效成分合成过程中的作用也不明确。本研究通过探讨SmGGPPS2表达对丹参中丹参酮含量、丹参酮合成相关基因表达和转基因丹参的抗性生理指标等的影响,旨在阐明SmGGPPS2在丹参酮合成调控中的作用及其生物学功能。

1 材料与方法

1.1 植物材料及主要试剂

用于遗传转化的植物材料为陕西师范大学西北濒危药材资源开发国家工程实验室保存并继代3—4周的丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)无菌苗。所用pART27、pKANNIBAL等载体以及大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌EHA105等菌株均为本实验室保存。本实验所用的各种限制性内切酶均购自TaKaRa公司(大连)。

丹参酮IIA (tanshinone IIA)对照品购自中国药品生物制品检定所。2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol)以及色谱级甲醇和乙腈分别购自Sigma-Aldrich和Fisher Scientific公司。

1.2 SmGGPPS2的克隆及序列分析

通过对丹参转录组数据库(Hua et al., 2011)进行筛选和比对,发现unigene16962 (920 bp)与蔓花生(*Arachis duranensis*)和木豆(*Cajanus cajan*)等植物的GGPPS编码基因序列的相似性在75%以上,将该序列命名为SmGGPPS2。经检测该序列与张蕾(2009)报道的SmGGPPS2序列一致。采用Primer 5.0软件设计SmGGPPS2基因全长引物OG2S和OG2R (分别含KpnI和BamHI酶切位点)(表1)。以丹参cDNA为模板,PCR扩增得到SmGGPPS2序列。PCR扩增体系为:10 μ L 2 \times PCR mix (天根,北京),2 μ L模板cDNA,上、下游引物各1 μ L,以ddH₂O补足至20 μ L。以61 $^{\circ}$ C为退火温度,延伸90秒,共扩增30个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,回收目标片段并连入pMD-19T载体,转入大肠杆菌DH5 α 进行测序验证。

1.3 植物表达载体的构建

提取含SmGGPPS2的大肠杆菌质粒,以限制性内切酶BamHI和KpnI切割后将SmGGPPS2片段连入

pKANNIBAL质粒,构建中间表达载体OG2-K。中间载体经NotI单酶切后连入pART27载体,经检测和验证后获得表达载体OG2PS。

以SmGGPPS2中长197 bp的非保守区域的片段作为RNA干涉目标片段,使用Primer Premier 5.0软件设计2对特异性引物(G2i1S和G2i1R、G2i2S和G2i2R)(表1)。以含SmGGPPS2的大肠杆菌质粒为模板,分别扩增正向和反向干涉片段。将测序验证正确的扩增产物依次连入pKANNIBAL质粒,构建RNA干涉SmGGPPS2的中间表达载体pK-G2i。载体pK-G2i经NotI单酶切后连入pART27载体,经检测和验证后获得RNA干涉SmGGPPS2的表达载体pK-G2Pi。

1.4 转基因植株的获得及基因表达量检测

将OG2PS和pK-G2Pi质粒分别转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105后,以叶盘转化法转化丹参(Yan and Wang, 2007)。按照实验室前期建立的实验方法提取转基因丹参植株DNA (化文平等, 2016)。以CaM 35S启动子为检测目标(引物为35SF和35SR)(表1),检测载体片段是否整合入丹参基因组DNA (化文平等, 2016)。取至少3株转基因株系幼嫩叶片3—4片,提取RNA后采用实时荧光定量PCR技术对转基因株系中SmGGPPS2及丹参酮合成相关基因的表达量进行检测,引物序列见表2。每个样品设3次技术重复及2次生物学重复。检测和数据处理方法如前所述(化文平等, 2016),采用比较CT法进行相对定量分析(Vandesompele et al., 2002)。采用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析。用Tukey test方法分析各样品间基因表达差异的显著性($P < 0.05$)。

1.5 转基因株系中丹参酮含量的测定

将丹参转基因株系移栽至温室。3个月后取转基因株系(OG2-3和IG2-18)和野生型(WT)的根(每转基因株系至少取样5株作为1个样品),洗净后在低温下烘干至恒重,充分研磨,过40目筛。精确称取0.10 g粉末,用5 mL无水乙醇提取,滤液过0.22 μ m膜,备用。

采用GC-MS (ISQTrace Ultra, Thermo, 美国)方法检测转基因(OG2-3和IG2-18)和野生型(WT)株系中丹参酮类化合物含量。采用本实验室建立的样品提取方法及色谱检测条件进行实验,具体步骤见Chen等(2016)。每个样品做3次生物学重复、3次技

表1 本研究中载体构建及检测所用引物
Table 1 Primers used for vector construction and detection in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
OG2S (<i>KpnI</i>)	<u>GGGGTACCGCGAAGAGCGTGGAAGC</u> -AGA
OG2R (<i>Bam</i> HI)	CGGGATCC <u>GGCAATAGCAATCAAGGG</u> AGCA
G2i1S (<i>Eco</i> RI)	CGGAATTC CTCCTCTCAACCTCTGTCAAACTC
G2i1R (<i>Kpn</i> I)	<u>GGGGTACCTCATCTGGACCACTGCC</u> -TCC
G2i2S (<i>Bam</i> HI)	CGGGATCC CTCCTCTCAACCTCTGTCAAACTC
G2i2R (<i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTTCATCTGGACCACTGCC-TCC
35SF	GCCGTGAAGACTGGCGAACA
35SR	AGGAAGGGTCTTGCGAAGGATAGT

下划线表示引物中的限制性酶位点。
The sites for restriction enzymes in primers were underlined.

术重复。通过工作站谱库(NIST/EPA/NIH 2014 (Wiley Technology, NJ, USA)), 并参考王海燕等(2011)的研究结果确定待测物质成分。为进一步考察丹参脂溶性成分的变化, 采用已建立的HPLC方法(化文平等, 2016)测定丹参酮IIA的含量。数据统计方法同1.4节。

1.6 转基因株系抗性生理指标检测

转基因丹参中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、

脯氨酸(proline, Pro)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的检测参照南京建成生物研究所对应的测定试剂盒说明书进行。样品采集方法同1.5节。每个样品做2次生物学重复、3次技术重复。采用SPSS 16.0软件中一维方差分析法进行数据统计分析。数据统计方法同1.4节。

2 结果与讨论

2.1 *SmGGPPS2*转基因株系的获得

将验证无误的*SmGGPPS2*植物过表达和RNA干扰载体通过叶盘转化法转化丹参无菌苗, 在含有卡那霉素的筛选培养基上培养并得到转基因丹参株系。以插入序列中CaM 35S序列为检测片段, 初步筛选得到7个*SmGGPPS2*过表达阳性株系(图1A)和8个RNA干扰*SmGGPPS2*阳性株系(图1B), 各转基因株系与野生型表型无差异。进一步检测mRNA水平的表达, 发现过表达株系中3、4和6号株系(分别标记为OG2-3、OG2-4和OG2-6)中*SmGGPPS2*的表达量较高(图2A); 在RNA干扰株系中3、4和18号株系(分别标记为IG2-3、IG2-4和IG2-18)中*SmGGPPS2*的表达较低(图2B), 其中3号和4号RNA干扰株系的干涉效率达到85%, 18号株系干涉效率达70%(均相对于野生型)。

表2 本研究中qPCR检测所用引物
Table 2 Primers used for qPCR in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Primer name	Sequence (5'→3')
ActinS	AGGAACCAACCGATCCAGACA	SmDXS1S	TGAGAGCGACTACGACTGCTTTGG
ActinR	GGTGCCCTGAGGTCCTGTT	SmDXS1R	CCCATCCAGATTGGCAGTAGGC
SmHMGR1S	GCAACCATCTACTCTCGTCCCA	SmDXS2S	GGTCGAGGAAGTGGAGGGATTG
SmHMGR1R	GTGCTCCATGAGCTGCATCAG	SmDXS2R	CGTCAGGATTTCTGTCGGATA
SmHMGR2S	GGGTTCAACTACGAGGCCATACTG	SmDXS3S	CACGAATGGGCTGCCAAAAT
SmHMGR2R	TGTTTGTGCTCGCCACCAGG	SmDXS3R	CCATCGAATCCAATGAAGCCAC
SmHMGR3S	AGTCTCGTGATGTCCCTGCTCG	SmGGPPS1S	GGGGCTATTTGGGAGGTGGAA
SmHMGR3R	GCCTCAACCTGCTTGGCGTA	SmGGPPS1R	CAGCAGCTTGGGATACGTGGTC
SmIPI1S	AGCGTGATCCAAATCCAGAC	SmGGPPS2S	CGGTCTCTCTCAACCTCTGTCAA
SmIPI1R	GATAGCTTCAAGCCCCCTCA	SmGGPPS2R	CTCCTTCATCTGGACCACTGCCT
SmCPS1S	ATGGATGGGCAGCAGCAGTAAA	SmGGPPS3S	GGCCAGTGCTCTGCTGTCTGTG
SmCPS1R	CGTCCTCAACAACGTCCTGATGTATT	SmGGPPS3R	TCGGCCACCTCCATCGCTT

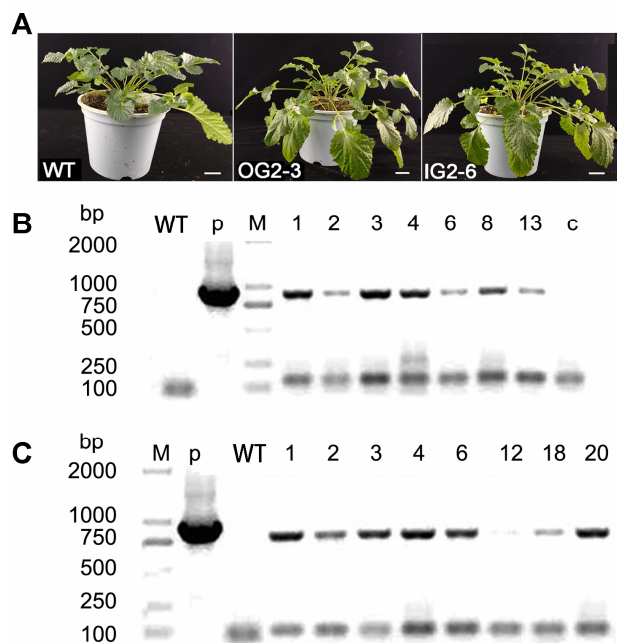


图1 丹参转基因株系及其DNA水平的PCR检测

(A) *SmGGPPS2*过表达代表性株系(OG2-3)、*SmGGPPS2* RNA干涉表达代表性株系(IG2-6)及野生型对照(Bar=2 cm); (B) *SmGGPPS2*过表达转基因株系(1-13); (C) *SmGGPPS2*-RNAi转基因株系(1-20)。M: DNA标准量DL2000; WT: 野生型; c: 阴性对照; p: 阳性对照

Figure 1 Phenotypes and PCR-screening of the transgenic lines of *Salvia miltiorrhiza*

(A) *SmGGPPS2*-overexpression transgenic line (OG2-3), *SmGGPPS2*-RNAi transgenic line (IG2-6), and wild type (Bar=2 cm); (B) *SmGGPPS2*-overexpression transgenic lines (1-13); (C) *SmGGPPS2*-RNAi transgenic lines (1-20). M: DNA marker DL2000; WT: Wild type; c: Negative control; p: Positive control

2.2 过表达和RNA干涉*SmGGPPS2*对丹参脂溶性成分积累的影响

在转基因丹参提取物GC-MS检测结果(图3)中, 选择11种(A-K)含量较高的物质, 以峰面积作为含量表征。经比较, 我们发现在丹参过表达株系中大多数脂溶性成分含量都高于野生型, 其中铁锈醇(C)、丹参酮IIA (G)和隐丹参酮(H)的含量显著高于野生型对照株系; 在RNA干涉株系中检测到的脂溶性成分多数低于野生型, 其中铁锈醇(C)、单棕榈酸甘油(D)、邻苯二甲酸二异辛酯(E)、丹参酮IIA (G)和 β -谷甾醇(K)的含量明显低于野生型(图4A)。

HPLC分析结果显示, 过表达*SmGGPPS2*后, 转基因丹参株系中丹参酮IIA含量明显增加; 在RNA

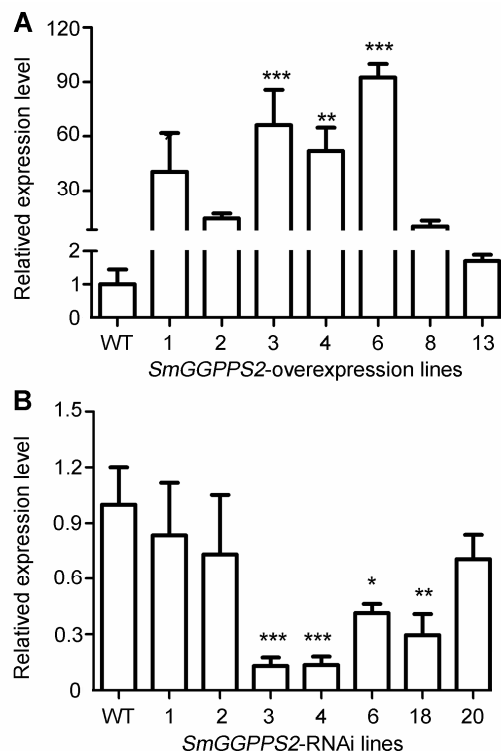


图2 *SmGGPPS2*在丹参过表达(A)和RNA干涉(B)株系中的表达 WT: 野生型。* 差异显著($P<0.05$); ** 差异显著($P<0.01$); *** 差异显著($P<0.001$)。数据均进行归一化处理。

Figure 2 Expression of *SmGGPPS2* in overexpression (A) and RNAi (B) *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines

WT: Wild type. * Significant differences ($P<0.05$); ** Significant differences ($P<0.01$); *** Significant differences ($P<0.001$). The data are normalized.

干涉*SmGGPPS2*的IG2-3和IG2-4株系中丹参酮IIA含量明显下降, IG2-18株系中丹参酮IIA含量变化不明显(图4B)。

2.3 过表达和RNA干涉*SmGGPPS2*对丹参酮合成途径相关基因表达的影响

依据丹参高通量测序数据(Hua et al., 2011)获得的丹参萜类主干合成途径关键酶基因, 设计引物检测调节*SmGGPPS2*表达后丹参转基因株系中萜类物质合成途径中关键酶基因的表达情况。结果(图5)显示: 在过表达*SmGGPPS2*的丹参株系中, *SmHMGR1*、*SmHMGR2*、*SmDXS2*、*SmDXS3*、*SmFPS*、*SmGGPPS1*和*SmCPS1*等关键酶基因的表达都明显上调, 而*SmHMGR3*、*SmDXS1*、*SmDXS3*和*SmCPS2*等

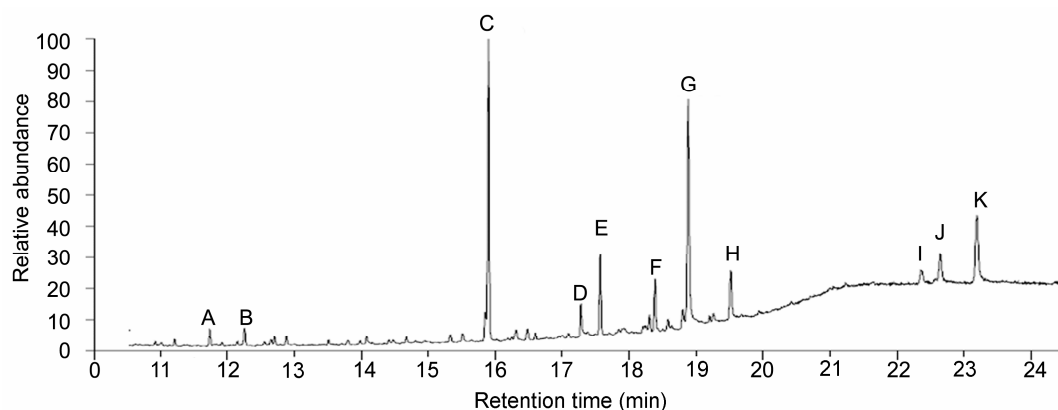


图3 GC-MS检测转基因丹参提取物总离子流色谱峰

A: 邻苯二甲酸二异丁酯; B: 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione; C: 铁锈醇; D: 单棕榈酸甘油; E: 邻苯二甲酸二异辛酯; F: 羟基陶塔酚; G: 丹参酮IIA; H: 隐丹参酮; I: 菜油甾醇; J: 豆甾醇; K: β -谷甾醇

Figure 3 GC-MS chromatogram of *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines

A: Phthalic acid diisobutyl ester; B: 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione; C: Ferruginol; D: b-monopalmitin; E: Diisooctyl phthalate; F: 7 β -hydroxytatarol; G: Tanshinone IIA; H: Cryptotanshinone; I: Campesterol; J: Stigmasterol; K: β -sitosterol

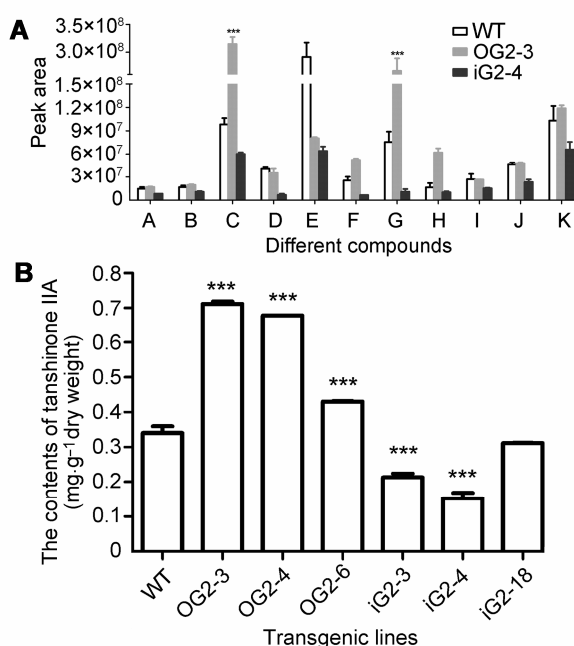


图4 转基因丹参株系脂溶性提取物中不同成分含量比较(A)及不同转基因丹参株系中丹参酮IIA含量(B)

A-K同图3。WT: 野生型。*** 差异显著($P < 0.001$)

Figure 4 Contents of different ingredients from fat-soluble extract in transgenic lines (A) and contents of tanshinone IIA in different transgenic lines (B) of *Salvia miltiorrhiza*
A-K see Figure 3. WT: Wild type. *** Significant differences ($P < 0.001$)

关键酶基因表达变化不明显。在RNA干涉 *SmGGPPS2* 的丹参株系中, *SmDXS2*、*SmHMGR1*和*SmCPS1*等基因呈现下调趋势, *SmIPI*、*SmHMGR3*、*SmGGPPS3*和*SmDXS1*的表达则呈上调趋势, 但不显著, *SmGGPPS1*、*SmFPS*、*SmHMGR2*、*SmDXS3*、*SmCPS1*和*SmCPS2*的表达无显著变化。

2.4 过表达和RNA干涉*SmGGPPS2*对植株抗性的影响

GGPPS是萜类物质合成途径中的关键酶, 对植物中二萜类物质合成具有重要的调节作用。研究表明, 丹参酮等二萜类物质具有明显的抗氧化活性(Lin and Hsieh, 2010), 且类胡萝卜素等二萜类物质含量的增加又可影响植株的渗透胁迫抗性(Chen et al., 2015)。本研究中, 我们对转基因株系SOD、MDA和POD等抗氧化指标和渗透胁迫指标脯氨酸进行了测定, 结果显示, 在RNA干涉*SmGGPPS2*的丹参株系中, SOD活性和MDA含量明显低于野生型, POD活性和脯氨酸含量明显高于野生型。在过表达*SmGGPPS2*的丹参株系中, SOD和POD活性及脯氨酸含量均无明显变化, 但MDA含量明显高于对照(图6)。以上结果表明, *SmGGPPS2*的表达影响丹参抗逆性, 特别是对其抗氧化能力有一定影响。

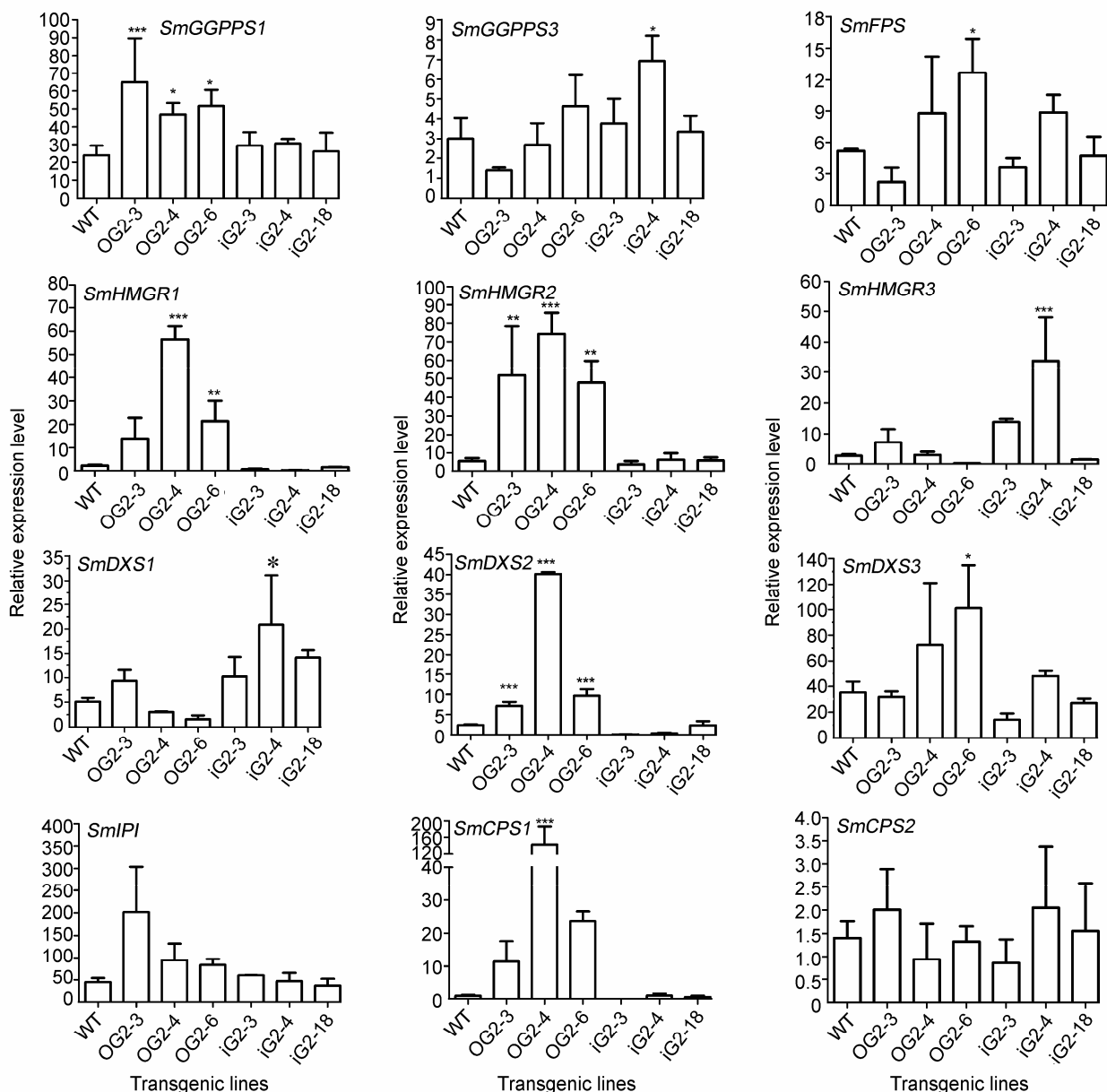


图5 转基因丹参株系中丹参酮合成途径相关基因的表达水平

WT: 野生型。* 差异显著 ($P<0.05$); ** 差异显著 ($P<0.01$); *** 差异显著 ($P<0.001$)

Figure 5 Relative expression levels of genes involved in tanshinones biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines
WT: Wild type. * Significant differences ($P<0.05$); ** Significant differences ($P<0.01$); *** Significant differences ($P<0.001$)

2.5 讨论

GGPPS在植物二萜类产品的合成中起重要调控作用 (Chen et al., 2015; Tata et al., 2016)。前期研究已从丹参中克隆得到3个GGPPS基因。其中*SmGGPPS1*存在于质体类细胞器中, 主要在丹参叶中表达; 在丹

参中过表达*SmGGPPS1*, 丹参酮含量明显升高(Kai et al., 2010; Hua et al., 2012; 化文平等, 2014)。*SmGGPPS3*在根部的表达最高, 可能定位于线粒体并参与丹参根中丹参酮类物质合成(化文平等, 2014)。*SmGGPPS2*主要在丹参成熟植株的根和花中表达, 推测其可能主要参与花中类胡萝卜素的合成; 但在醇

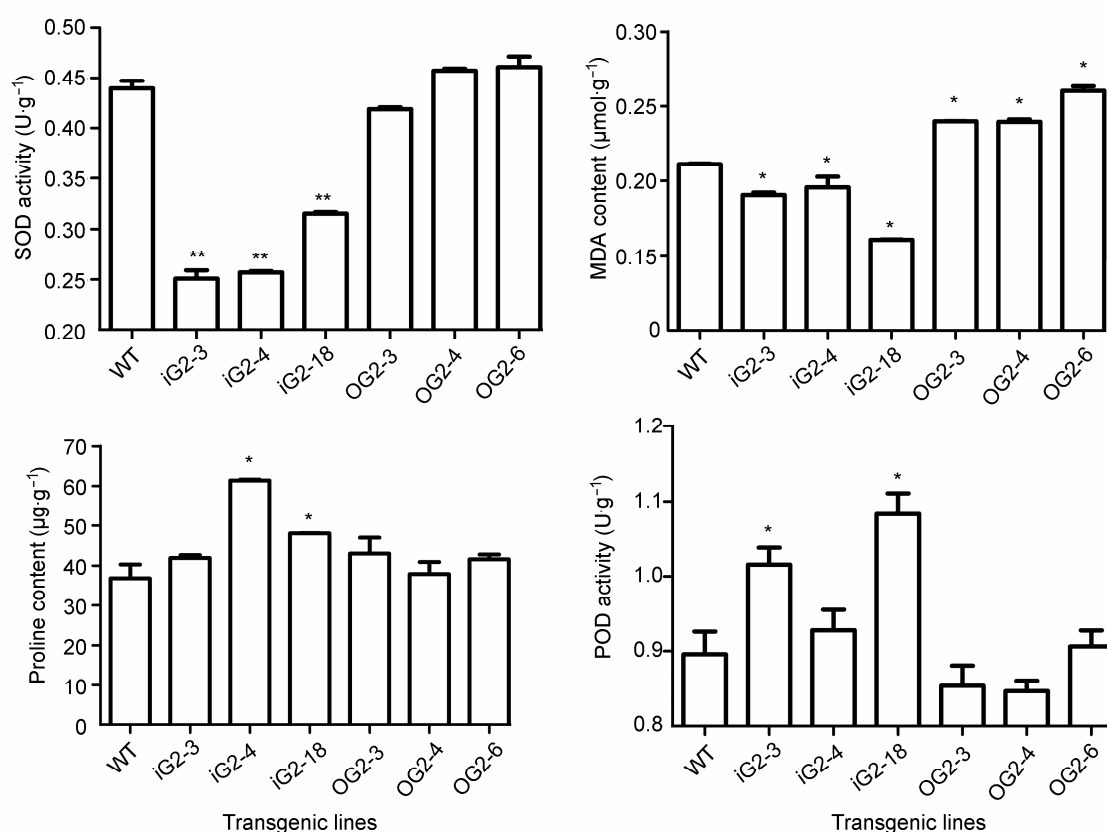


图6 不同丹参转基因株系抗逆生理指标

SOD: 超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛; POD: 过氧化物酶; WT: 野生型。* 差异显著($P < 0.05$); ** 差异显著($P < 0.01$)

Figure 6 The resistance physiological indexes of different *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines

SOD: Superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde; POD: Peroxidase; WT: Wild type. * Significant differences ($P < 0.05$); ** Significant differences ($P < 0.01$)

母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行全长*SmGGPPS2*基因功能互补验证,显示其无法发挥GGPPS的功能(张蕾, 2009)。我们在丹参中过表达*SmGGPPS2*后,发现丹参酮IIA等多种萜类产物的含量显著升高;在RNA干涉*SmGGPPS2*的丹参株系中,多种萜类成分含量都明显降低。上述结果表明,*SmGGPPS2*在丹参植株中有调节萜类物质合成的功能。其在酵母中异源表达不显示功能,可能是由于在酵母细胞中缺乏*SmGGPPS2*蛋白加工步骤或成分。

在过表达*SmGGPPS1*的发根丹参株系中,总丹参酮含量增高近1.5倍(Shi et al., 2016)。在丹参中过表达*SmGGPPS2*后,丹参酮IIA含量是对照株系的2倍(图4B)。铁锈醇是从GGPP到丹参酮类化合物合成的重要中间产物(Ma et al., 2015)。本研究中的GC-

MS检测结果表明,在过表达*SmGGPPS2*丹参中丹参酮IIA和铁锈醇的含量显著高于野生型对照;RNA干涉*SmGGPPS2*的丹参株系丹参酮IIA和铁锈醇等萜类物质含量明显低于野生型对照。这表明*SmGGPPS2*的表达量与丹参酮IIA和铁锈醇等物质的含量呈一定程度的正相关。

已有研究表明,*SmDXS2*、*SmHMGR1*、*SmHMGR2*和*SmCPS1*等基因在丹参酮的合成中发挥重要调控作用(Kai et al., 2011; Cheng et al., 2014; Shi et al., 2014; Cui et al., 2015)。在过表达*SmGGPPS1*的发根丹参株系中,*SmCPS1*基因的表达明显上调(Shi et al., 2016)。本研究表明,在过表达*SmGGPPS2*的丹参株系中,*SmHMGR1*、*SmHMGR2*、*SmDXS2*、*SmDXS3*、*SmFPS*和*SmCPS1*等关键酶基因的表达

均明显上调;在RNA干涉*SmGGPPS2*的丹参株系中,*SmDXS2*、*SmHMGR1*和*SmCPS1*等基因呈现下调趋势。同时,在过表达*SmGGPPS2*时,*SmGGPPS1*的表达也呈上调趋势;而RNA干涉*SmGGPPS2*时,*SmGGPPS3*有补偿性上调趋势。由此推测*SmGGPPS2*的表达可能通过影响*SmDXS2*、*SmHMGR1*和*SmCPS1*等基因进一步影响丹参酮的合成。

调节GGPPS的表达不仅影响植物次生代谢物的合成,也可能影响植物的抗性。在拟南芥中过表达马铃薯(*Solanum tuberosum*) GGPPS基因,不仅改变其类胡萝卜素等萜类物质的含量,还影响植物对渗透胁迫的抗性,导致转基因株系中SOD活性增强,MDA含量降低(Chen et al., 2015)。类胡萝卜素等二萜类物质是GGPPS的下游产物,具有明显的抗氧化活性(Young and Lowe, 2001)。丹参中丹参酮等有效成分也具有明显的抗氧化活性(Lin and Hsieh, 2010)。在本研究中过表达*SmGGPPS2*虽然引起丹参中丹参酮等物质含量升高,但可能由于类胡萝卜素含量呈下降趋势(变化不显著,数据未显示),影响转基因株系的脂膜抗氧化能力;在RNA干涉*SmGGPPS2*株系中,POD活性、脯氨酸含量和脂膜抗氧化能力有所提升,这可能是由于GGPPS家族其它成员的补偿表达或其它相关代谢通路的增强所致,具体机制尚需进一步研究。

过表达*SmGGPPS2*的丹参株系中*SmDXS2*、*SmHMGR1*和*SmCPS1*等丹参酮合成途径关键酶基因显著上调表达,而RNA干涉*SmGGPPS2*丹参株系中*SmDXS2*、*SmHMGR1*和*SmCPS1*等丹参酮合成途径关键酶基因显著下调表达;过表达*SmGGPPS2*丹参株系中铁锈醇和丹参酮IIA含量显著上升,而RNA干涉*SmGGPPS2*丹参株系中铁锈醇和丹参酮IIA含量显著下降,表明*SmGGPPS2*可能通过调节上述丹参酮合成途径关键酶基因的表达参与丹参酮等萜类物质的合成调控。同时,*SmGGPPS2*的表达变化也影响丹参的抗性。

参考文献

- 化文平, 刘文超, 王喆之, 李翠芹 (2016). 干涉丹参*SmORA1*对植物抗病和丹参酮类次生代谢的影响. 中国农业科学 49, 491–502.
- 化文平, 宋双红, 智媛, 王喆之 (2014). 丹参*SmGGPPS3*基

- 因的克隆及表达分析. 植物科学学报 32, 50–57.
- 王海燕, 李玉琴, 王广旭 (2011). 白花丹参脂溶性成分超临界二氧化碳流体萃取与气相色谱-质谱分析. 医药导报 30, 978–981.
- 张蕾 (2009). 丹参牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸合酶基因的克隆与功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院. pp. 27–40.
- Aharoni A, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel WJ, Verstappen FWA, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15, 2866–2884.
- Chang TH, Guo RT, Ko TP, Wang AHJ, Liang PH (2006). Crystal structure of type-III geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and the mechanism of product chain length determination. *J Biol Chem* 281, 14991–15000.
- Chen C, Zhang Y, Qiakefu K, Zhang X, Han LM, Hua WP, Yan YP, Wang ZZ (2016). Overexpression of tomato *Prosystemin* (*LePS*) enhances pest resistance and the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *J Agric Food Chem* 64, 7760–7769.
- Chen W, He SZ, Liu DG, Patil GB, Zhai H, Wang FB, Stephenson TJ, Wang YN, Wang B, Valliyodan B, Nguyen HT, Liu QC (2015). A sweetpotato geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene, *lbGGPS*, increases carotenoid content and enhances osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 10, e0137623.
- Cheng QQ, Su P, Hu YT, He YF, Gao W, Huang LQ (2014). RNA interference-mediated repression of *SmCPS* (*Copalylidiphosphate synthase*) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of *SmCPS*. *Biotechnol Lett* 36, 363–369.
- Cui GH, Duan LX, Jin BL, Qian J, Xue ZY, Shen GA, Snyder JH, Song JY, Chen SL, Huang LQ, Peters RJ, Qi XQ (2015). Functional divergence of diterpene synthases in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Physiol* 169, 1607–1618.
- Han JL, Liu BY, Ye HC, Wang H, Li ZQ, Li GF (2006). Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. *J Integr Plant Biol* 48, 482–487.
- Hua WP, Song J, Li CQ, Wang ZZ (2012). Molecular cloning and characterization of the promoter of *SmGGPPs* and its expression pattern in *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep* 39,

5775–5783.

- Hua WP, Zhang Y, Song J, Zhao LJ, Wang ZZ** (2011). *De novo* transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. *Genomics* **98**, 272–279.
- Kai GY, Liao P, Zhang T, Zhou W, Wang J, Xu H, Liu YY, Zhang L** (2010). Characterization, expression profiling, and functional identification of a gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Salvia miltiorrhiza*. *Biotechnol Bioproc Eng* **15**, 236–245.
- Kai GY, Xu H, Zhou CC, Liao P, Xiao JB, Luo XQ, You LJ, Zhang L** (2011). Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metab Eng* **13**, 319–327.
- Lin TH, Hsieh CL** (2010). Pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) on cerebral infarction. *Chin Med* **5**, 22.
- Ma XH, Ma Y, Tang JF, He YL, Liu YC, Ma XJ, Shen Y, Cui GH, Lin HX, Rong QX, Guo J, Huang LQ** (2015). The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Molecules* **20**, 16235–16254.
- Ma YM, Yuan LC, Wu B, Li XE, Chen SL, Lu SF** (2012). Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot* **63**, 2809–2823.
- Shi M, Luo XQ, Ju GH, Li LL, Huang SX, Zhang T, Wang HZ, Kai GY** (2016). Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering. *J Agric Food Chem* **64**, 2523–2530.
- Shi M, Luo XQ, Ju GH, Yu XH, Hao XL, Huang Q, Xiao JB, Cui LJ, Kai GY** (2014). Increased accumulation of the cardio-cerebrovascular disease treatment drug tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by the enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 1-deoxy-Dxy-lulose 5-phosphate reductoisomerase. *Funct Integr Genom* **14**, 603–615.
- Tata SK, Jung J, Kim YH, Choi JY, Jung JY, Lee IJ, Shin JS, Ryu SB** (2016). Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering and increased seed yield. *Plant Biotechnol J* **14**, 29–39.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.
- Yan YP, Wang ZZ** (2007). Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Cell Tiss Org* **88**, 175–184.
- Young AJ, Lowe GM** (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* **385**, 20–27.

Effect of *SmGGPPS2* Expression on Tanshinones Biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*

Wenping Hua^{1,2}, Chen Chen^{3,4}, Yuan Zhi², Li Liu¹, Zhezhi Wang², Cuiqin Li^{2*}

¹Department of Life Sciences and Food Technology, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710061, China; ²Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; ³Xi'an Botanical Garden, Xi'an 710068, China; ⁴Shaanxi Engineering Research Centre for Conservation and Utilization of Botanical Resources, Xi'an 710068, China

Abstract Geranylgerany pyrophosphate synthase (GGPPS) is an important regulator in the plant diterpenoid biosynthesis pathway. The *GGPPS* gene family plays a critical role in the development of the medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. However, the biological function of *SmGGPPS2*, especially in the biosynthesis of tanshinone or other active ingredients, is still unclear. For functional investigation, *SmGGPPS2* expression was up- or down-regulated in *S. miltiorrhiza* plants via overexpression or RNA interference, respectively. Then we detected the content of tanshinones, the expression of genes related to tanshinone biosynthesis, and the physiological indexes of transgenic *S. miltiorrhiza* plants. The content of fat-soluble components, such as tanshinone IIA and ferruginol, was increased significantly in *SmGGPPS2*-overexpressed lines compared with the wild type, and the content of fat soluble-components was lower in *SmGGPPS2*-RNAi lines than those in the wild type lines. With the regulation of *SmGGPPS2*, the expression of key enzyme genes related to tanshinone biosynthesis in *S. miltiorrhiza*, such as *SmHMGR1* and *SmCPS1*, was changed. In addition, the regulation of *SmGGPPS2* expression also affected the resistance of *S. miltiorrhiza*. Our results indicate that *SmGGPPS2* plays an important regulatory role in tanshinone biosynthesis.

Key words *Salvia miltiorrhiza*, GGPPS, tanshinone, gene expression

Hua WP, Chen C, Zhi Y, Liu L, Wang ZZ, Li CQ (2019). Effect of *SmGGPPS2* expression on tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Chin Bull Bot* **54**, 217–226.

* Author for correspondence. E-mail: licuiqin16@snnu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)