

## 发根农杆菌介导龙葵遗传转化体系优化

张静静 骆海霞 洪艳苹 赵世成\*

(哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

**摘要** 该研究旨在通过建立发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)介导的龙葵(*Solanum nigrum*)遗传转化体系,提高遗传转化效率及总黄酮含量。研究以龙葵叶片为外植体,探究菌株类型、菌液浓度等因素对龙葵毛状根诱导率的影响。基于该体系,构建重组质粒PBI121-6flag-SnCHI,通过农杆菌介导,诱导转SnCHI基因的毛状根,考察龙葵毛状根转SnCHI基因后的总黄酮含量变化。研究表明:菌株Ar.1193在OD<sub>600</sub>为1.0、侵染25 min、共培养24 h条件下,龙葵毛状根诱导率可达88.49%。对转SnCHI基因毛状根进行qRT-PCR检测,发现其基因表达水平是空白组的28.81倍;测定转SnCHI基因毛状根的总黄酮含量,发现转SnCHI基因毛状根的总黄酮含量最高达空白组的4.14倍。成功建立龙葵遗传转化体系,对SnCHI基因的功能进行研究,为同属植物的组织培养和遗传转化研究提供参考。

**关键词** 龙葵;毛状根;发根农杆菌;遗传转化体系;黄酮类化合物

中图分类号:S567 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2026.01.010

## Optimization of *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Genetic Transformation System of *Solanum nigrum*

ZHANG Jingjing LUO Haixia HONG Yanping ZHAO Shicheng\*

(College of Pharmacy, Harbin Commercial University, Harbin 150076)

**Abstract** The aim of this study was to establish an *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation system for *Solanum nigrum* (black nightshade) with the goal of enhancing transformation efficiency and increasing its total flavonoid content. Based on this system, the recombinant plasmid PBI121-6flag-SnCHI was constructed, the hairy roots of SnCHI gene transformation were induced by *Agrobacterium*-mediated pathway, and the content of total flavonoids in the hairy roots of *S. nigrum* after SnCHI gene transformation was investigated. The results showed that the induction rate of hairy roots of *S. nigrum* could reach 88.49% under the conditions of OD<sub>600</sub> value of 1.0, infection for 25 min and co-culture for 24 h. The qRT-PCR detection of transgenic SnCHI hairy roots showed that the gene expression level was 28.81 times that of the blank group. The total flavonoid content of SnCHI transgenic hairy roots was determined, and it was found that the total flavonoid content of SnCHI transgenic hairy roots was up to 4.14 times that of the blank group. The genetic transformation system of *S. nigrum* was successfully established, and the function of SnCHI gene was studied, which provided a reference for tissue culture and genetic transformation of the same genus.

**Key words** *Solanum nigrum*; hairy root; *Agrobacterium rhizogenes*; genetic transformation system; flavonoids

龙葵(*Solanum nigrum*)<sup>[1]</sup>为茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)1年生草本,属于药食同源植物。广泛分布于中国大部分地区,尤其是长江流域及南方丘陵地带。其性寒,味苦,有小毒,归肝、胃经,具

有清热解毒、消肿散结等功效,主要适用于疗疮痈肿、慢性气管炎、肿瘤等疾病<sup>[2]</sup>。龙葵化学成分复杂,主要包括生物碱<sup>[3]</sup>、黄酮<sup>[4]</sup>、多糖<sup>[5]</sup>等,具有抗炎<sup>[6]</sup>、抗癌<sup>[7]</sup>、抗肝损伤<sup>[8]</sup>、抗氧化<sup>[9]</sup>等药理作用。

基金项目:林木遗传育种国家重点实验室开放基金项目(K2017204)。

第一作者简介:张静静(2000—),女,在读硕士研究生,主要从事中药次生代谢产物方面的研究。

\* 通信作者:E-mail:zhaoshicheng@msn.com。

收稿日期:2025年6月30日。

毛状根(hairy root)为发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染植物后产生的病理状态下形成的根,也被称为发状根或发根。毛状根具有遗传稳定、生长速度快,不受病原体和除草剂的影响等优势<sup>[10]</sup>,能合成和累积次生代谢产物,Huang等<sup>[11]</sup>建立博落回毛状根诱导体系,比较毛状根与野生植物体代谢产物,发现毛状根的苜蓿异喹啉生物碱含量明显高于野生植物体;毛状根诱导已应用于多种药用植物中,如何首乌(*Polygonum multiflorum*)<sup>[12]</sup>、黄芪(*Astragalus membranaceus*)<sup>[13]</sup>、白术(*Atractylodes macrocephala*)<sup>[14]</sup>、西洋参(*Panax quinquefolium*)<sup>[15]</sup>等。

关于发根农杆菌介导的龙葵转化体系和龙葵相关基因的次生代谢调控方面的探索少有报道。本研究以无菌龙葵苗叶片为外植体,探究菌株类型、菌液浓度、侵染时间及共培养时间对毛状根诱导效率的影响;构建重组质粒PBI121-6*flag-SnCHI*,通过农杆菌介导,诱导转*SnCHI*基因的毛状根,考察龙葵毛状根转*SnCHI*基因前后的总黄酮含量变化,以期为同属植物的组织培养和遗传转化研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 植物材料

试验材料为哈尔滨商业大学药学院实验室培养的龙葵无菌苗。龙葵成熟种子,用75%乙醇消毒1 min,0.3%苯扎溴铵浸泡45 min,灭菌水清洗3~5次,无菌纸吸干水分,置于湿润的1/2MS液体培养基灭菌纸培养皿中于恒温培养箱内培养发芽,发芽种子于26 °C、8 h·d<sup>-1</sup>、光照度3 400 lx条件下培养。

#### 1.1.2 菌株和载体

所用的感受态农杆菌Ar.1193、K599、Ar.A4、Ar.Qual均购于上海唯地生物技术有限公司,保存于-80 °C;PBI121-6*flag*载体由东北林业大学林学院提供;pCloneEZ-TOPO载体购自中美泰和生物技术(北京)有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 侵染液制备

从-80 °C取出感受态发根农杆菌冰浴解冻,取50 μL加入75 mL的LB液体培养基中,在含K599、Ar.A4的培养基中加入50 μg·mL<sup>-1</sup>的链霉素

(Strep),在含Ar.1193的培养基中加入20 μg·mL<sup>-1</sup>的利福平(Rif),在Ar.A4的LB液体培养基中加入50 μg·mL<sup>-1</sup>的硫酸卡那霉素(Kan);暗光28 °C,160 r·min<sup>-1</sup>振荡培养8~72 h(依菌株调整)。待培养基浑浊后,取出2~3 mL测定其OD<sub>600</sub>。选择所需OD<sub>600</sub>的菌液,4 000 rpm离心10 min,弃上清,加入等体积1/2MS液体培养基后,用于侵染试验。

#### 1.2.2 龙葵毛状根诱导优化试验

在龙葵毛状根的诱导过程中,不同的菌株类型、菌液浓度、侵染时间及共培养时间均会对龙葵毛状根的诱导率产生影响。以无菌龙葵叶片为外植体,分别筛选发根农杆菌菌株类型(Ar.1193、K599、Ar.A4、Ar.Qual)、菌液浓度OD<sub>600</sub>(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2)、侵染时间(10、15、20、25、30、35 min)、共培养时间(0、24、48、72 h)。

取1.0~1.5 cm<sup>2</sup>大小的龙葵叶片为侵染用外植体,浸泡发根农杆菌菌液(其间轻摇,使外植体与侵染液充分接触),灭菌纸吸干多余菌液,置于1/2MS固体培养基中,28 °C黑暗条件下共培养。共培养结束后,用灭菌水清洗外植体,移至1/2MS固体除菌培养基,每7 d更换1次除菌培养基。每组处理84片外植体,每次处理重复3次,统计期间外植体变化及生根情况。

毛状根诱导率=(产生毛状根的外植体数量/84)×100% (1)

#### 1.2.3 *SnCHI*基因克隆

采用CTAB法提取毛状根DNA,PCR验证*rolB*基因和*rolC*基因,确定毛状根是由发根农杆菌诱导形成。引物如表1。提取实生苗RNA,逆转录成cDNA作为PCR反应模板。根据本课题组前期基于龙葵转录组分析得到*SnCHI*全长转录本序列,借助NCBI Primer-BLAST工具设计引物(表2)并进行PCR,胶回收产物与pCloneEZ-TOPO载体连接,转至大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α感受态细胞中,挑取单克隆菌落扩大培养,进行PCR反应验证阳性单克隆及测序比对。

表1 *rol*基因引物序列

Table 1 Primer sequences for the *rol* gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'→3')
<i>rolB</i> -F	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC
<i>rolB</i> -R	GCTCTTGCAAGTCTAGATTT
<i>rolC</i> -F	CTCCTGACATCAAACCTCGTC
<i>rolC</i> -R	TGCTTCGATTATGGGTACA

表2 目的基因扩增引物

Table 2 Primer sequences of target gene

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'→3')	产物长度 Product length/bp
<i>SnCHI</i>	<i>SnCHI</i> -F	ATGGTGAATCCTCTGGTTC	654
	<i>SnCHI</i> -R	CTGGATTGAGGGTAGCTCAC	

### 1.2.4 重组 PBI121-6flag-*SnCHI* 质粒表达载体的构建

PBI121-6flag 载体质粒用 SalI 快速内切酶切成线性载体并纯化,用酶切引物通过 PCR 反应扩增 *SnCHI*-flag 片段并胶回收纯化,将回收产物 *SnCHI*-flag 片段与线性化 PBI121-6flag 载体连接后转化大肠杆菌,涂板过夜挑单克隆振荡培养,菌液为模板进行 PCR 反应,初步验证重组质粒是否成功。阳性单克隆测序比对。引物 35S Promoter-F 5'-CCCACTATCCTTCGCAAGACC-3'; *SnCHI*-R 5'-CTGATTGAGGGTAGCTCAC-3'。

### 1.2.5 转 *SnCHI* 基因毛状根的诱导、鉴定及培养

将重组质粒 PBI121-6flag-*SnCHI* 转入感受态的农杆菌 Ar.1193 中,使用优化的遗传转化体系诱导龙葵叶片产生毛状根,同时以空白质粒的 Ar.1193 侵染为对照。提取 DNA,PCR 验证 *SnCHI* 基因、PBI121-6flag 载体及 *rolB* 基因的存在,引物同表 1 和 1.2.4。阳性毛状根于 80 mL 1/2MS 液体培养基中 26 °C 震荡培养。

### 1.2.6 龙葵转 *SnCHI* 基因的表达量及总黄酮含量分析

将阳性毛状根 RNA 反转录并进行 qRT-PCR 分析,引物如表 3。基因表达水平数据计算采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量分析。参考李凤霞<sup>[16]</sup>试验方

法,以芦丁为标准品,硝酸铝为显色剂,比色法测定转基因毛状根总黄酮含量并比较与空白组总黄酮含量差异。

表3 实时荧光定量 PCR 引物

Table 3 Primers for quantitative real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'→3')	产物长度 Product length /bp
qRT- <i>SnActin</i> -F	GCTCCTGAAGAACCCT	128
qRT- <i>SnActin</i> -R	ACGGCCTGGATAGCAACATA	
qRT- <i>SnCHI</i> -F	TACTCTGAGAAGGTGGCGGA	140
qRT- <i>SnCHI</i> -R	AAAAGGATGGAGGCACCAGG	

### 1.2.7 数据处理

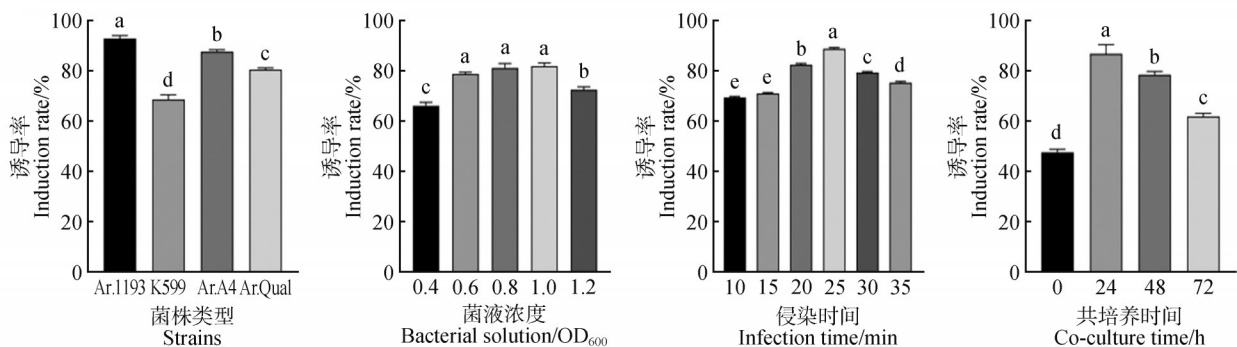
采用 Excel 2021 进行相关试验的数据记录,采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件对试验数据进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Tukey 法进行事后多重比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同因素对龙葵毛状根诱导率的影响

#### 2.1.1 不同菌株对龙葵毛状根诱导率的影响

选用 Ar.1193、K599、Ar.A4、Ar.Qual 农杆菌分别侵染龙葵叶片外植体,结果如图 1,研究发现 4 种不同菌株均可诱导出龙葵毛状根,Ar.1193(92.86%) 显著高于 Ar.A4(87.70%)、Ar.Qual(80.55%) 和 K599(68.65%)。图 2 中 Ar.1193 外植体生长状态良好,主根及侧根发达,褐化程度低;Ar.A4 和 Ar.Qual 主根较为发达,无侧根;K599(68.65%) 主根发达,但生长缓慢,无侧根,褐化程度高,因此 Ar.1193 为龙葵诱导毛状根最佳菌株。

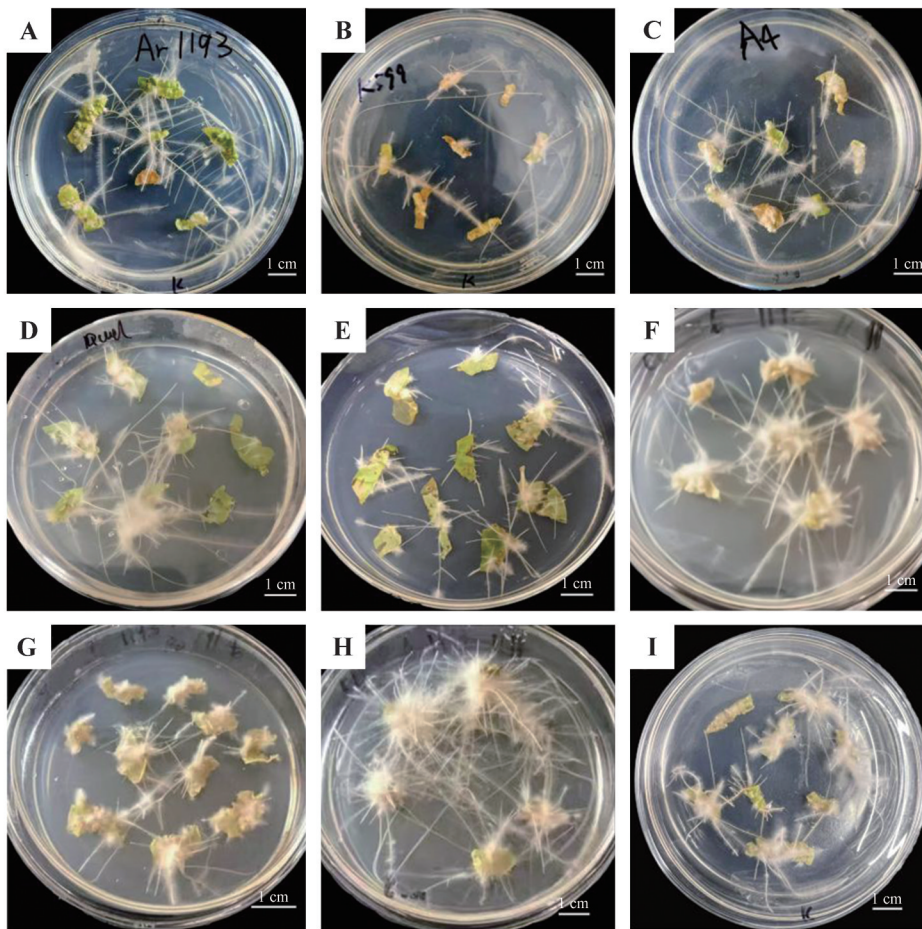


不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters were very significantly different ( $P < 0.05$ ).

图1 不同因素水平对龙葵叶片外植体生根诱导的影响

Fig.1 Effects of different factor levels on rooting induction of *Solanum nigrum* leaf explants



A~D 依次为 Ar.1193、K599、Ar.A4、Ar.Qual；E~I 菌液浓度( $OD_{600}$ )依次为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2。

A~D corresponded to Ar.1193, K599, Ar.A4, and Ar.Qual in sequence; E~I corresponded to concentrations( $OD_{600}$ ) of 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 in sequence.

图2 不同菌株及浓度对毛状根诱导率的影响

Fig.2 Effects of different strains and concentrations on hairy roots induction rate

### 2.1.2 不同菌液浓度对龙葵毛状根诱导率的影响

用 Ar.1193 不同菌液浓度( $OD_{600}$  为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2) 分别侵染龙葵叶片外植体, 结果如图 1, 5 种菌液浓度诱导率均高于 66.00%, 当菌液浓度  $OD_{600}$  为 0.4~1.0 时, 诱导率随菌液浓度增加而增加, 当  $OD_{600}$  为 1.2 时, 诱导率降低。  $OD_{600}$  为 1.2 时诱导率(72.62%)显著低于  $OD_{600}$  为 0.6(78.97%)但高于  $OD_{600}$  为 0.4(66.27%)。  $OD_{600}$  为 0.8 时诱导率(81.35%)与  $OD_{600}$  为 1.0(82.14%) 虽无显著差异, 但  $OD_{600}$  为 1.0 时诱导率较高且主根、侧根均发达, 因此  $OD_{600}$  为 1.0 为最佳诱导菌株浓度。

### 2.1.3 不同侵染时间对龙葵毛状根诱导率的影响

适宜的侵染时间可诱导出状态良好的毛状根。 选用  $OD_{600}$  为 1.0 的 Ar.1193 对龙葵叶片进行不同时间的侵染(10、15、20、25、30、35 min), 结果如

图 1, 随着侵染时间增加诱导率先增后减, 侵染 25 min 诱导率(88.89%)最高, 显著高于其他所有组, 毛状根主根和侧根生长状态佳; 故最佳侵染时间为 25 min。

### 2.1.4 共培养时间对龙葵毛状根诱导的影响

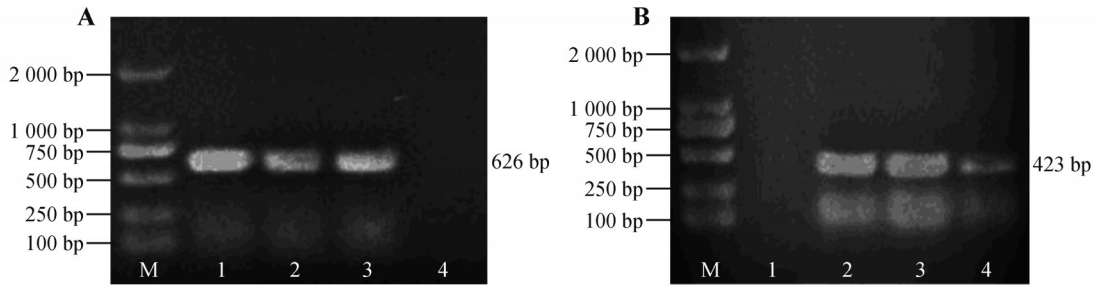
共培养时间分别为 0、24、48、72 h, 结果如图 1, 研究发现共培养 0 h(47.62%), 也可诱导出毛状根; 共培养 72 h 诱导率(61.90%)显著高于 0 h 但低于 48 h(78.57%); 在共培养 48 h 和 72 h, 毛状根生长状况较好; 共培养 24 h(86.90%)与 48 h 诱导率存在显著性差异且共培养诱导率最高、毛状根生长状况较好, 因此 24 h 为最佳共培养时间。

### 2.2 *SnCHI* 基因克隆及重组表达载体的构建

对龙葵毛状根进行 PCR 检测, 在 500~750 bp、250~500 bp 处发现与 *rolC* 基因(626 bp)、*rolB* 基因(423 bp) 条带长度一致的亮带(图 3), 即毛状根是

由发根农杆菌诱导形成;PCR扩增 *SnCHI* 基因,在 500~750 bp 间出现清晰条带,与 *SnCHI* 基因完整 ORF(654 bp)相符,PCR 扩增成功。测序比对后,获得 *SnCHI* 基因的 ORF 序列(登录号 PQ373901),包含起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA),编

码 217 个氨基酸(图 4)。重组质粒转化大肠杆菌过夜,挑取单克隆菌落进行 PCR 反应,*SnCHI* 基因序列和 PBI121-*6flag* 载体上的部分 CAMV 35S promoter 长度共为 815 bp(图 5)。凝胶电泳在 750 bp 左右出现清晰条带,重组质粒转化成功。



M. 2000 marker; A: 1~3. 诱导出的毛状根; 4. 实生苗的根; B: 1. 实生苗的根; 2~4. 诱导出的毛状根。  
M. 2000 marker; A: 1~3. Induced hairy roots; 4. Roots; B: 1. Roots; 2~4. Induced hairy roots.

图3 龙葵毛状根 *rolC*(A)、*rolB*(B)基因电泳验证结果

Fig.3 Electrophoresis verification results of *rolC* (A) and *rolB* (B) genes in *Solanum nigrum* hairy roots

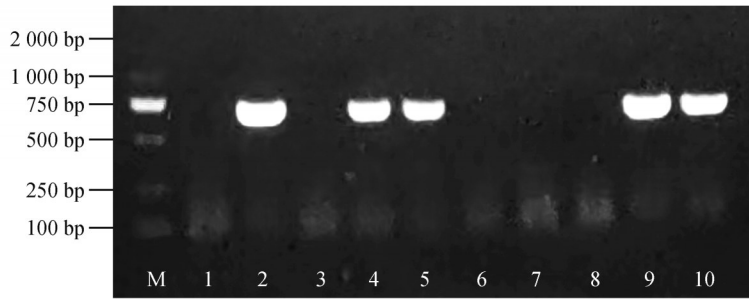
	10	20	30	40	50	60
1	ATGGTGAATCCTCCTGGTTCAAACAATACCTTCTTCTTCTGCTGGCGCAGGGAATAGAGGT					
1	M V N P P G S N N T F F L A G A G N R G					
	70	80	90	100	110	120
61	TTGGAGATTGAAGGAAAATTTGTGAAGTTACTGCGATCGGGGTGTACTTGAAGAGAGT					
21	L E I E G K F V K F T A I G V Y L E E S					
	130	140	150	160	170	180
121	GCTATTCATTCTAGCTGCTAAATGGAAAGGAAAAGCTCCGAGGAGTTGACGCATTCA					
41	A I P F L A A K W K G K S S E E L T H S					
	190	200	210	220	230	240
181	GCTGAGTCTTCAGGGATATCGTTACAGTCCGTTTGAGAAATTCACCTCGAGTGACTATG					
61	A E F F R D I V T G P F E K F T R V T M					
	250	260	270	280	290	300
241	ATCTTGCCCTTGACGGGTAGCAATACTCTGAGAAGTGGCGGAAAATGTGTTGCCTAT					
81	I L P L T G K Q Y S E K V A E N C V A Y					
	310	320	330	340	350	360
301	TGGAAAGCAATAGGAACCTACACTGATGCAGAGAGTCAGGCCATTGAAAAGTTCGTCAT					
101	W K A I G T Y T D A E S Q A I E K F V N					
	370	380	390	400	410	420
361	GTTTTCCAGAGTGAAATCTTCCCACCTGGTGCCTCCATCCTTTTACTCAATCACCCTT					
121	V F Q S E I F P P G A S I L F T Q S P L					
	430	440	450	460	470	480
421	GGTCAITGACGATTAGCTTCTCTAAAGATGATTCAGTTCCTGGCATCGGGAATGCTGTT					
141	G S L T I S F S K D D S V P G I G N A V					
	490	500	510	520	530	540
481	ATAGAGAACAACAATGTGAGAAGCAGTCTGGATTCTATAATTGGCAAGCAGGAGT					
161	I E N K Q L S E A V L D S I I G K H G V					
	550	560	570	580	590	600
541	TCCCCTGCAGCAAAGTGTAGTATTGCCAAAAGAGTAACGGAACGTGTAGAAAAGAGCAAT					
181	S P A A K C S I A K R V T E L L E K S N					
	610	620	630	640	650	
601	GCTGAGCGCCGGTTTGTGAAAACCAGGAAGTGAAGTACCCTCAATCCAGTAA					
201	A E A P V C E K P G S E L P S I Q *					

图4 *SnCHI*基因 ORF 的密码子翻译对照表

Fig.4 Codon translation alignment for *SnCHI* gene ORF

2.3 转 *SnCHI* 基因龙葵毛状根诱导、鉴定及培养  
PCR 验证转基因毛状根(图 6),扩增出 750~1 000 bp 的条带,含 *SnCHI* 基因和 PBI121-*6flag* 载体中

的部分 CaMV 35S promoter 的片段长度共同为 815 bp,与条带扩增结果一致且为农杆菌诱导的毛状根。转 *SnCHI* 基因毛状根的诱导及培养过程如图 7。

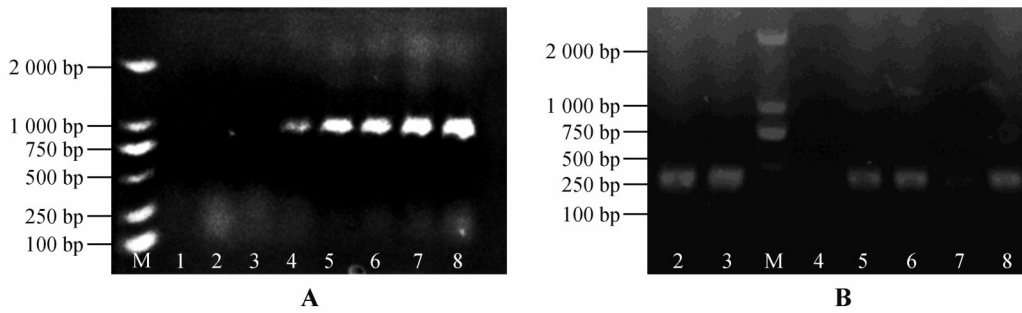


M.2 000 maker;2、4、5、9、10转化成功;1、3、6、7、8转化失败。

M.2 000 maker;2,4,5,9,10 were successfully transformed; 1,3,6,7,8 were unsuccessfully transformed.

图5 PCR鉴定重组质粒转化大肠杆菌DH5α电泳结果

Fig.5 PCR identification-based electrophoresis results of *E. coli* DH5α transformed by the recombinant plasmid

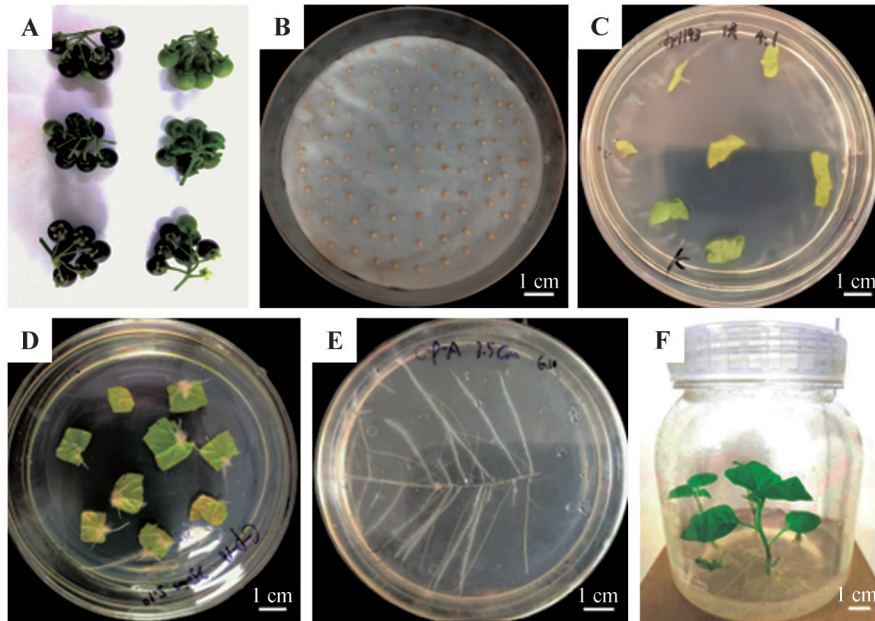


M.2000 maker;1.对照用水;2~3.空白毛状根;4~8.转*SnCHI*基因毛状根。

M.2000 maker; 1. Control water; 2-3. Blank hairy roots; 4-8. Transgenic *SnCHI* gene hairy roots.

图6 转基因龙葵毛状根中含*SnCHI*和部分CaMV 35S promoter(A)及*rolB*基因(B)的PCR鉴定结果

Fig.6 PCR identification results of transgenic *Solanum nigrum* hairy roots containing *SnCHI*, partial CaMV 35S promoter (A), and *rolB* gene (B)



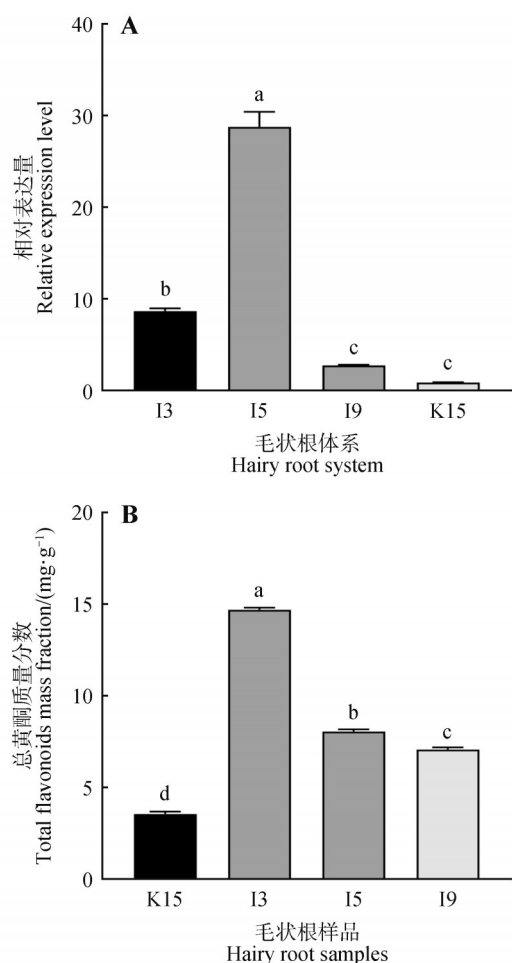
A. 龙葵果实;B. 龙葵种子;C. 优化体系下诱导毛状根;D. 除菌培养7 d初出毛状根;E. 单个转基因毛状根固体培养基培养14 d;F. 转基因苗。  
A. *Solanum nigrum* fruits; B. *Solanum nigrum* seeds; C. Induction of hairy roots in the optimized system; D. Hairy roots were first grown on day 7 of culture after removal of bacteria; E. Cultivation of a single transgenic hairy root on solid medium for 14 days; F. Transgenic seedling.

图7 转*SnCHI*基因毛状根的诱导及培养过程

Fig.7 Induction and culture of *SnCHI* transgenic hairy roots

## 2.4 *SnCHI* 基因表达及总黄酮含量分析

在获得的 3 个 *SnCHI* 转化体系中(图 8), I5 的 *SnCHI* 基因相对表达量最高, 是空白毛状根 K15 的 28.81 倍; I3、I5 的 *SnCHI* 基因相对表达量依次为空白毛状根 K15 的 8.80 倍、2.88 倍。比色法测定毛状根样品中总黄酮含量, 如图 8 中转 *SnCHI* 基因毛状根(I3、I5、I9)的总黄酮含量显著高于空白组 K15, 总黄酮含量 I3>I5>I9>K15。I3 是样品中总黄酮含量最高的体系, 总黄酮含量为  $14.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是 K15 的 4.14 倍。



A. 毛状根样品中 *SnCHI* 基因相对表达量; B. 空白毛状根和转 *SnCHI* 基因毛状根的总黄酮含量。不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

A. Relative expression of *SnCHI* gene hairy roots samples; B. Total flavonoid content of blank hairy roots and *SnCHI* gene-transformed hairy roots. Different letters were very significantly different( $P<0.05$ ).

图 8 *SnCHI* 基因表达的实时荧光定量及总黄酮含量分析  
Fig.8 Analysis of qRT-PCR expression of *SnCHI* gene and total flavonoid content

## 3 讨论

农杆菌转化法是最常用的间接转基因技术,

研究<sup>[17]</sup>发现:农杆菌介导的遗传转化不仅可以增加植物次生代谢产物含量,还可应用于植物抗逆性的生理生化机制研究。如 Kayani 等<sup>[18]</sup>利用转基因技术诱导青蒿(*Artemisia caruifolia*)毛状根,提高青蒿素的含量。Matvieieva 等<sup>[19]</sup>利用发根农杆菌对蒂氏蒿(*Artemisia tilesii*)进行遗传转化,可使细菌来源的 *rolB* 和 *rolC* 基因稳定整合到该植物基因组中,诱导毛状根形成,并发现不同蒂氏蒿毛状根系中类黄酮含量和抗氧化能力均有所增加。本研究发现,转 *SnCHI* 基因毛状根总黄酮含量有所增加,与其研究结果一致。

在发根农杆菌介导的遗传转化中,植物外植体的选择、菌株类型、菌液浓度等,均影响毛状根诱导和转化,其中菌株类型为关键因素,不同类型的菌株对毛状根遗传转化体系影响具有多维性。孙昊等<sup>[20]</sup>研究比较 Ar. Qual、C58C1、K599 和 MSU440 诱导光果柱花草(*Stylosanthes leiocarpa*)产生转基因毛状根的效果,发现在添加  $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素 B 的诱导培养基上,菌株 K599 诱导率为 23.33%,阳性率达 100%,为最佳菌株;朱雨萱等<sup>[21]</sup>用 Ar. Qual、Ar.1193、C58C1、K599 在不同处理方法下均可诱导草莓(*Fragaria×ananassa*)外植体形成毛状根且 Ar.1193 菌株的诱导效果最为显著,毛状根阳性率最高(79.41%),本研究 Ar.1193 菌株为最佳菌株且诱导率显著高于其他菌株的研究结果与之相一致。确定的最佳菌液浓度  $\text{OD}_{600}=1.0$ 、侵染时间 25 min 和较短的共培养时间 24 h,不仅保障了高诱导率,更利于降低农杆菌过度生长风险。

本研究以龙葵叶片为外植体,筛选不同影响因素以确定最佳诱导条件,建立高效遗传转化体系克隆得到 *SnCHI* 基因并获得 3 个转 *SnCHI* 基因龙葵毛状根体系,比较转 *SnCHI* 基因前后的龙葵毛状根中黄酮类成分含量变化,对 *SnCHI* 基因的功能进行研究,为同属植物的组织培养和遗传转化研究提供参考,为龙葵毛状根中其他基因功能研究和积累活性代谢产物提供技术支持和研究平台。

## 4 结论

本研究确定了  $\text{OD}_{600}$  为 1.0 的 Ar.1193 对龙葵叶片侵染时间 25 min,共培养 24 h,诱导率可达 88.49%,建立最佳龙葵遗传转化体系。对转 *SnCHI* 基因毛状根进行荧光定量 PCR 检测,发现其

基因表达水平是空白组的 28.81 倍;测定转 *SnCHI* 基因毛状根的总黄酮含量,转 *SnCHI* 基因总黄酮含量最高的是空白组的 4.14 倍,总黄酮含量显著高于原植物,这与查尔酮异构酶在类黄酮生物合成中的关键作用一致,其通过催化查尔酮环为黄酮,为后续黄酮类化合物的合成提供前体。

研究结果与甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)<sup>[22]</sup>、黄芪<sup>[23]</sup>、红花 (*Carthamus tinctorius*)<sup>[24]</sup> 等植物中 *CHI* 基因过表达可增加黄酮类化合物含量的研究趋势相符。证实了 *SnCHI* 基因在黄酮生物合成中的关键作用,为利用毛状根培养生产龙葵黄酮有效成分提供了重要的参考依据和技术支持。本研究仍存在一定局限性,仅对转基因前后总黄酮含量进行初步探究,后续将对其他成分种类、含量及变化规律进行更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] HIEU H T, 刘哲君, 万诗雨, 等. 龙葵不同药用部位及药效成分的抗肿瘤机理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2479-2482.
- HIEU H T, LIU Z J, WAN S Y, *et al.* Research progress on the anti-tumor mechanism of different medicinal sites and pharmacodynamic components of *Solanum nigrum*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2023, 34(10): 2479-2482.
- [2] 胡港, 俞赉丰, 邓羿馥, 等. 经典名方中龙葵的本草考证[J]. 中国野生植物资源, 2024, 43(3): 101-109.
- HU G, YU Y F, DENG Y J, *et al.* Herbal textual research on *Solanum nigrum* in famous classical formulas[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2024, 43(3): 101-109.
- [3] LIU L Y, YANG Y K, WANG J N, *et al.* Steroidal alkaloids from *Solanum nigrum* and their cytotoxic activities[J]. Phytochemistry, 2022, 202: 113317.
- [4] CHURIYAH C, NINGSIH S, FIRDAYANI F, *et al.* The cytotoxic, apoptotic induction, and cell cycle arrest activities of *Solanum nigrum* L. ethanolic extract on MCF-7 human breast cancer cell[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2020, 21(12): 3735-3741.
- [5] CHEN H, QI X D. Study on the effect of polysaccharides from *Solanum nigrum* Linne on cellular immune function in tumour-bearing mice[J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2013, 10(4): 41-46.
- [6] RAVI V, SALEEM T M, PATEL S S, *et al.* Anti-inflammatory effect of methanolic extract of *Solanum nigrum* Linn berries[J]. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2009, 2(2): 33-36.
- [7] FU R J, WANG X H, HU Y, *et al.* Solamargine inhibits gastric cancer progression by regulating the expression of lncNEAT1\_2 via the MAPK signaling pathway[J]. International Journal of Oncology, 2019, 54(5): 1545-1554.
- [8] RAJU K, ANBUGANAPATHI G, GOKULAKRISHNAN V, *et al.* Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* Linn against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(11): 1618-1619.
- [9] CAMPISI A, ACQUAVIVA R, RACITI G, *et al.* Antioxidant activities of *Solanum nigrum* L. leaf extracts determined in *in vitro* cellular models[J]. Foods, 2019, 8(2): 63.
- [10] BISWAS D, CHAKRABORTY A, MUKHERJEE S, *et al.* Hairy root culture: a potent method for improved secondary metabolite production of *Solanaceous* plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1197555.
- [11] HUANG P, XIA L Q, LIU W, *et al.* Hairy root induction and benzyloisoquinoline alkaloid production in *Macleaya cordata*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 11986.
- [12] HO T T, LEE J D, AHN M S, *et al.* Enhanced production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* and its metabolite discrimination using HPLC and FT-IR methods[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22): 9563-9575.
- [13] HWANG C, YAN S, CHOE Y, *et al.* Efficient hairy root induction system of *Astragalus membranaceus* and significant enhancement of astragalosides via overexpressing AmUGT15[J]. Plant Cell Reports, 2024, 43(12): 285.
- [14] ZHANG C C, GUO X Z, WANG H Y, *et al.* Induction and metabolomic analysis of hairy roots of *Atractylodes lancea*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(21): 6655-6670.
- [15] KOCHAN E, NOWAK A, ZAKŁOS-SZYDA M, *et al.* *Panax quinquefolium* L. ginsenosides from hairy root cultures and their clones exert cytotoxic, genotoxic and proapoptotic activity towards human colon adenocarcinoma cell line Caco-2[J]. Molecules, 2020, 25(9): 2262.
- [16] 李凤霞. 查尔酮异构酶基因过表达对新疆雪莲类黄酮生物合成的调控[D]. 北京: 中国科学院研究生院(植物研究所), 2006.
- LI F X. Regulation of flavonoid biosynthesis by overexpression chalcone isomerase gene in *Saussurea involu-crata*[D]. Beijing: Institute of Botany, The Chinese Academy of Science, 2006.
- [17] 屈阿艳, 曹佳琰, 王惠玉, 等. 发根农杆菌介导的叶用莴苣毛状根转化体系的建立[J]. 北京农学院学报, 2025, 40(2): 21-27.

- QU A Y, CAO J Y, WANG H Y, *et al.* Establishment of a system for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of leaf lettuce [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2025, 40(2): 21-27.
- [18] KAYANI W K, KIANI B H, DILSHAD E, *et al.* Biotechnological approaches for artemisinin production in *Artemisia* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34: 54.
- [19] MATVIEIEVA N A, MORGUN B V, LAKHNEKO O R, *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 152: 177-183.
- [20] 孙昊, 张建禹, 罗丽娟, 等. 光果柱花草转基因毛状根及其原生质体制备体系的建立 [J]. *草地学报*, 2024, 32(5): 1583-1591.
- SUN H, ZHANG J Y, LUO L J, *et al.* Development of transgenic hairy root induction and protoplast preparation systems for *Stylosanthes leiocarpa* [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(5): 1583-1591.
- [21] 朱雨萱, 姚明军, 李斌, 等. 发根农杆菌介导的草莓遗传转化体系构建 [J/OL]. *果树学报*, (2025-07-14) [2025-08-16]. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsx.20250313>.
- ZHU Y X, YAO M J, LI B, *et al.* Establishment of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in strawberry [J/OL]. *Journal of Fruit Science*, (2025-07-14) [2025-08-16]. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsx.20250313>.
- [22] 侯嘉铭, 尹彦超, 田少凯, 等. 过表达 *CHI* 基因提高甘草毛状根中黄酮类化合物含量的研究 [J]. *药学学报*, 2021, 56(1): 319-327.
- HOU J M, YIN Y C, TIAN S K, *et al.* Overexpressing of chalcone isomerase (*CHI*) gene enhances flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(1): 319-327.
- [23] 袁宇含. 膜荚黄芪查尔酮异构酶基因的克隆及表达分析 [D]. 延边: 延边大学, 2020.
- YUAN Y H. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene from *Astragalus Membranaceus* [D]. Yanbian: Yanbian University, 2020.
- [24] 陈翠平. 红花查尔酮异构酶基因的克隆表达及化学成分累积研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- CHEN C P. The cloning and expression of chalcone isomerase gene and chemical composition accumulative study in *Carthamus tinctorius* L. [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.