

药用菊花中绿原酸合成途径关键酶基因的克隆及表达分析

武立伟, 汪涛, 郭巧生*, 周欣悦, 严佳敏, 刘婧, 邹庆军, 张文燕, 王蕊

南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要:目的 探究淹水胁迫对杭菊绿原酸合成途径中的关键酶香豆酰基喹酸酯 3'-单加氧酶 (C3'H) 和莽草酸羟基肉桂酰基转移酶 (HCT) 基因的表达和活性成分的影响。方法 使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法基于杭菊转录组数据库克隆 HCT 和 C3'H 基因各 2 个, 其中 C3'H 酶的 2 个基因 CmC3'H1、CmC3'H2, HCT 酶的 2 个基因 CmHCT1、CmHCT2, 并进行生物信息学分析; 同时在杭菊花芽分化期进行淹水胁迫, 以 β -actin 为内参基因, 使用 qRT-PCR 检测以上 4 个基因的相对表达量; 然后使用 HPLC 法测定杭菊这 4 个基因的下游产物及其他指标成分含量。结果 通过研究获得了 4 条基因的完整开放阅读框, 并且预测其氨基酸序列的相对分子质量和理论等电点 (pI), 同时构建蛋白质三级结构模型。qRT-PCR 结果显示在花芽分化期对杭菊进行持续 3 d 的淹水处理会导致以上 4 个基因在不同生长时期内的表达显著变化。HPLC 结果显示淹水处理后的杭菊 C3'H 和 HCT 所催化形成的下游产物绿原酸含量显著高于对照组, 同时发现其他 2 种指标成分木犀草苷和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸含量也显著高于对照组。结论 杭菊在淹水胁迫下可以通过调节 4 种基因的表达来调控下游产物的合成, 从而对淹水胁迫做出应答, 而且花芽分化期进行淹水胁迫可以显著增强杭菊活性成分的积累。

关键词: 杭菊; C3'H; HCT; 基因克隆; 淹水胁迫; 多酚有机酸; 活性成分

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12 - 2959 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.032

Cloning and expression of key enzyme genes for chlorogenic acid synthesis in *Chrysanthemum morifolium*

WU Li-wei, WANG Tao, GUO Qiao-sheng, ZHOU Xin-yue, YAN Jia-min, LIU Jing, ZOU Qing-jun, ZHANG Wen-yan, WANG Rui

Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: To investigate the effects of the expression of coumaroylquinic acid 3'-monooxygenase (C3'H) and shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase (HCT) in the chlorogenic acid-producing pathway and active ingredients in *Chrysanthemum morifolium* under flooding stress, we cloned two C3'H genes which were CmC3'H1 and CmC3'H2 and two HCT genes which were CmHCT1 and CmHCT2 by the RT-PCR from *Hangju* and conducted bioinformatics analysis. During the flower bud differentiation stage, we flooded the *C. morifolium* and then used β -actin as the reference gene to detect the relative expression of the four genes by the qRT-PCR. Finally, the content of downstream products and other indicators of these four genes in *C. morifolium* were measured by HPLC. We obtained the four genes' complete open reading frame and predicted the relative molecular mass of the amino acid sequence and the theoretical isoelectric point (pI). And the protein tertiary structure models were constructed. The qRT-PCR results showed that flooding the *C. morifolium* for 3 days during the flower bud differentiation stage resulted in significant expression changes of the four genes at different growth stages. The results of HPLC showed that chlorogenic acid, the downstream product catalyzed by the C3'H and the HCT, was significantly higher than that in the control group. It was also found that the content of luteoloside and 3,5-*O*-di-caffeoylquinic acid was also significantly higher than those of the control group. Therefore, *C. morifolium* regulates the synthesis of downstream products by regulating the expression of the four genes under flooding stress, thereby responding to flooding stress. And the flooding stress during flower bud differentiation can significantly enhance the accumulation of active ingredients of *C. morifolium*.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; C3'H; HCT; gene clone; flooding stress; polyphenol organic acid; active ingredients

收稿日期: 2018-11-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81503180); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (KJQN201643, KYZZ201608)

作者简介: 武立伟 (1997—), 男, 满族。E-mail: 14415117@njau.edu.cn

*通信作者 郭巧生, 教授。Tel: (025)84395980 E-mail: gqs@njau.edu.cn

杭菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 为菊科菊属多年生草本植物, 目前栽培和引种最广泛的是其中的杭菊品系中的早小洋菊, 原产浙江桐乡, 以干燥头状花序入药, 为常用中药材, 具有散风清热、平肝明目、清热解毒等功效, 用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花等症, 是《中国药典》2015 年版“菊花”项收录的 5 大品系(杭、毫、滁、贡、怀)之一^[1-2]。杭菊中含有多种活性成分^[3-4], 《中国药典》2015 年版规定木犀草苷、绿原酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸等黄酮、酚酸类成分作为其质量指标。绿原酸等成分也被证明具有抗氧化、抗菌、抑制基因突变、抗肿瘤、抗艾滋病病毒(HIV)等活性, 同时对在治疗胃溃疡和糖尿病等方面也表现了较好的显著疗效^[3-4]。植物的生长会受到各种逆境胁迫的影响, 淹水胁迫便是其中的一种。根据实地调查结果, 每年 8 月正值原产地桐乡的台风季节, 早小洋菊将不可避免遭遇一定程度的淹水胁迫, 同时 8 月中下旬正值早小洋菊花芽分化的特殊生理^[5-6], 是其药用部位形成的关键期。植物在淹水胁迫中会出现许多形态、生理和次生代谢等方面的变化。前期杭菊品质研究发现, 原产地杭菊在药材商品性状和活性指标成分上较引种区域有优势, 尤其是黄酮类成分含量^[7]。而产生这些变化的根本原因是植物在逆境中基因和酶的调控作用。

经研究对莽草酸羟基肉桂酰基转移酶(shikimate *O*-hydroxycinnamoyltransferase, HCT, EC2.3.1.133)活性分析表明, HCT 属于 BAHD 乙酰转移酶超家族, 能够催化莽草酸或奎尼酸与香豆酸和咖啡酸成酯, 对莽草酸的亲和力更高^[8]。此外, 还发现 HCT 能催化咖啡酰莽草酸水解, 形成咖啡酰辅酶 A 和莽草酸。最近的功能分析表明, 拟南芥中 HCT 基因沉默导致绿原酸合成受阻, 植株矮化, 表明 HCT 是绿原酸合成的关键酶^[9]。在绿原酸合成途径中, HCT 可以催化羟基化香豆酰辅酶 A 与莽草酸或奎宁酸反应, 最终生成绿原酸, 并且还可以逆向催化 5-*O*-咖啡酰奎尼酸酯生成咖啡酰辅酶 A^[10]。另一个被认为参与绿原酸生物合成的关键酶为香豆酰基喹酸酯(香豆酰基莽草酸酯)3'-单加氧酶 [coumaroylquinic acid (coumaroyl shikimate) 3'-monooxygenase, C3'H, EC1.14.13.36], 2001 年 Schoch 等^[11]通过功能基因组的方法, 首次证明从拟南芥中分离得到的 CYP98A3 是 C3'H 基因, 证实

C3'H 属于 P450 蛋白家族, 在木质部中表达。在多个物种中都有报道, 除拟南芥外, 在朝鲜蓟中也发现了 CYP98A49 蛋白与绿原酸和木质素合成相关^[11-13]。但是在拟南芥中并没有发现绿原酸, 这说明在绿原酸的 3 种合成途径中^[14], 有 1 条途径 C3'H 可能并不是直接催化生成绿原酸, 而是合成过程的中间酶。其中在绿原酸合成途径中, C3'H 可以催化对位香豆酰奎宁酸生成绿原酸, 也可以催化对位香豆酰基莽草酸生成咖啡酰莽草酸进而反应生成绿原酸。

1947 年 Rudkin 等^[15]首先揭示了绿原酸的结构式, 是含有苯丙烷骨架结构的多酚有机酸类成分, 同时绿原酸又为药典规定的菊花的主要指标成分。因此, 本研究使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法基于杭菊转录组数据库克隆 HCT 和 C3'H 基因, 然后对处于花芽分化期的杭菊进行淹水处理, 研究淹水胁迫对杭菊 HCT 和 C3'H 基因表达及其下游产物含量的影响, 同时探讨淹水胁迫与其活性成分积累的关系。

1 材料

1.1 样品

材料采自于南京农业大学药用菊花种质圃, 经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定为杭菊品系中的早小洋菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 'Zaoyang'。8 月 25 日花芽开始分化对材料进行淹水胁迫处理, 具体方法如下: 将盆栽杭菊放入塑料桶内, 加水使水面没过盆栽土壤表面 3~5 cm, 淹水同时遮阴, 挑选生长状况一致的植株设置处理组和对照组, 各设 3 组, 每组 3 个重复。3 d 后解除胁迫, 撤水后再遮阴 2 d。从处理原点开始, 以后每隔 15 d 采集 1 次, 一直到落花期, 采集样品时选择生长一致的花芽或头状花序, 液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱保存, 用于提取 RNA; 当杭菊到收获期时参照郭巧生等^[16]药用菊花头状花序开放程度标准采集舌状花开放 70%、管状花开放 50% 的花序, 60 °C 烘干后用于测定活性成分含量。

1.2 仪器与试剂

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司); ABI StepOne Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司); PTC-200 PCR 仪、Alpha-1506 型紫外-可见分光光度计(美国 Alpha 公司)。木犀草苷(批号 20150916)、绿原酸(批号 20150709)和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号 20131110), 质量分

数 $\geq 98\%$ ，购于中国食品药品检定研究院；植物 RNA 提取试剂盒（TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit）、定量用反转录试剂盒（PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser）、克隆用反转录试剂盒（PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit）、荧光定量试剂盒（SYBR[®] Premix Ex TaqTM-Tli RNaseH Plus）、胶回收试剂盒（TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0）、高保真酶（PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase）均购自宝生物工程（大连）有限公司；克隆使用 TRANS pESAY-Blunt Cloning Kit 购自南京百斯凯科技有限公司；DNA 测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成；寡核苷酸引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

按照 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 用户使用说明书中简单植物组织裂解标准操作规程提取杭菊的总 RNA，同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳评价 RNA 质量，选择电泳条

带清晰无降解的总 RNA 进行反转录。使用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 中的 Random 6 mers 引物反转录克隆用的 cDNA 第 1 链，使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除 gDNA 并反转录用于荧光定量的 cDNA。

2.2 CmC3'H1、CmC3'H2、CmHCT1 和 CmHCT2 完整开放阅读框 (ORF) 克隆

从本课题组所得到的杭菊转录组数据库中筛选得到基因序列，使用 Primer 5 从序列 ORF 区 2 端设计引物（表 1）采用 qRT-PCR 方法从杭菊中克隆这 2 个基因的全长开放读码框。以克隆用的 cDNA 为模板，使用 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 进行 PCR 扩增，20 μL 的反应体系中 $5\times$ PrimeSTAR GXL Buffer 4 μL ，dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1.6 μL ，正、反引物 (10 mmol/L) 各 1 μL ，cDNA 模板 1 μL ，PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 0.4 μL ，灭菌蒸馏水 11 μL 。反应程序为 98 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s，68 $^{\circ}\text{C}$ 、90 s，35 个循环，68 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 5 min。

表 1 克隆及 qRT-PCR 引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for cloning and qRT-PCR

名称	序列 (5'-3')	用途
cC3'H1-F	ATGCTCCCTCACAAGGCCA	基因克隆
cC3'H1-R	TTACATATCCACAGCGATGCGTTTGT	基因克隆
cC3'H2-F	CGGATCCATGGCCCTCCTAGCTCTCC	基因克隆
cC3'H2-R	GTCGACTCATGCTGGCACTCGCTTGTAC	基因克隆
cHCT1-F	ATGCCTTCATCCTCCAAAGTTGC	基因克隆
cHCT1-R	TTACGATACATATTGCATAAACTCTTGGT	基因克隆
cHCT2-F	ATGAGTCCCAACCTACAAGTGAATGT	基因克隆
cHCT2-R	CTATCTCTTGCCACTCAAAATCATAGTTGG	基因克隆
qC3'H1-F	CTCCGGCTAACGGGTTGAGT	qRT-PCR
qC3'H1-R	ACCGCTTCCAGAGGAGTTCG	qRT-PCR
qC3'H2-F	ACTGGTGGTGACAGGAACA	qRT-PCR
qC3'H2-R	GGCCATTGCCCATTCCTACTG	qRT-PCR
qHCT1-F	CTTGGCGGGCGTCTTTCAAC	qRT-PCR
qHCT1-R	TCGACACCGGAATCATCGCA	qRT-PCR
qHCT2-F	ACCGCACTATGGGCTCTCAC	qRT-PCR
qHCT2-R	ACGAACCAACGACCCGTCA	qRT-PCR
actin-F	ACAAGTCTGAACGGGAAAT	内参基因
actin-R	TCATAGACGGCTGGAAAAGG	内参基因

PCR 产物经胶回收纯化后直接使用 pESAY-Blunt Cloning Kit 进行平末端连接, 进一步转化到感受态大肠杆菌 Trans-T1 中, 挑取阳性克隆进行扩大培养, 然后进行菌落 PCR 验证。验证通过的菌液直接送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序, 测序结果与转录组数据比对, 并通过 GenBank 进行 BLAST 比对。

2.3 生物信息学分析

将基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别在 NCBI 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行核苷酸序列比对 (BLASTn)、氨基酸序列比对 (BLASTp); 用 Prot Param 程序 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测该氨基酸序列的相对分子质量和理论等电点 (pI); 利用 SWISS-MODEL 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 构建蛋白质三级结构模型。

2.4 qRT-PCR 分析

使用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 qRT-PCR 分析, 使用金斯瑞公司在线定量引物设计软件 (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) 设计荧光定量分析的引物 (表 1), 扩增产物为 170 bp, 退火温度为 59 °C。反应体系按照 SYBR® Premix Ex Taq™-Tli RNaseH Plus 说明书配制, 每个反应重复 3 次, 在 ABI StepOne Real-Time PCR System 进行, 结束后进行熔解曲线分析。以 β -actin 作为内参基因进行相对定量, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2.5 活性成分含量测定

2.5.1 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品、木犀草苷对照品、3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70% 甲醇制成含绿原酸 35 $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草苷 25 $\mu\text{g/mL}$ 、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 80 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液, 即得 (10 °C 以下保存)。

2.5.2 供试品溶液的制备 取样品粉末 (过 1 号筛) 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 45 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5.3 样品测定 木犀草苷、绿原酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸含量使用高效液相法测定, 液相条件参照《中国药典》2015 年版^[1]。绿原酸、木犀草苷和 3,5-*O*-

二咖啡酰基奎宁酸线性方程依次为 $Y=84.274 X+4.021 3$, $r^2=0.903 3$; $Y=314.53 X+4.779 8$, $r^2=0.982 0$; $Y=98.932 X+13.265$, $r^2=0.972 5$ 。

2.6 数据分析

采用 Stst2 方差分析软件对实验数据进行统计和分析。

3 结果与分析

3.1 基因的克隆和序列分析

使用试剂盒法提取杭菊总 RNA, 经凝胶电泳检测结果显示降解较少且 RNA 纯度较高, 已达到 RT-PCR 扩增和 qRT-PCR 要求。

通过 RT-PCR 方法得到了杭菊 C3'H 基因 2 个: CmC3'H1 (Genbank 号 MH261358)、CmC3'H2 (Genbank 号 MH261359), HCT 基因 2 个: CmHCT1 (Genbank 号 MH261360)、CmHCT2 (Genbank 号 MH261361)。其中 CmC3'H1 总长 747 bp, 其中 ORF 长 429 bp, 编码 142 个氨基酸, 相对分子质量 15 800, 理论等电点值 (pI) 7.02, 同时构建了蛋白的 3D 模型 (图 1)。CmC3'H2 基因总长 1 799 bp, 其中 ORF 长 1 533 bp, 编码 510 个氨基酸, 蛋白相对分子质量 57 900, pI 为 8.99, 同时构建了蛋白的 3D 模型 (图 2)。

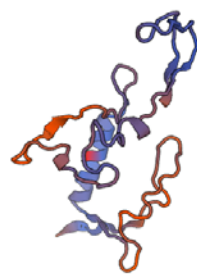


图 1 CmC3'H1 蛋白质三级结构预测模型

Fig. 1 Three-dimensional structures of deduced CmC3'H1 protein

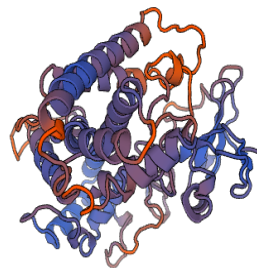


图 2 CmC3'H2 蛋白质三级结构预测模型

Fig. 2 Three-dimensional structures of deduced CmC3'H2 protein

CmHCT1 基因总长 1 494 bp, 其中 ORF 长 1 377 bp, 编码 458 个氨基酸, 蛋白相对分子质量 50 800, pI 值为 9.06, 同时构建了蛋白的 3D 模型 (图 3)。
CmHCT2 基因总长 1 582 bp, 其中 ORF 长 1 416 bp, 编码 471 个氨基酸, 蛋白相对分子质量 52 200, pI 值为 5.66, 同时构建了蛋白的 3D 模型 (图 4)。

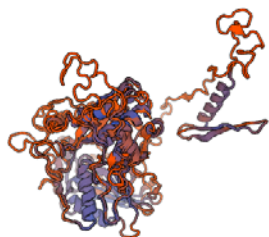


图 3 CmHCT1 蛋白质三级结构预测模型

Fig. 3 Three-dimensional structures of deduced CmHCT1 protein

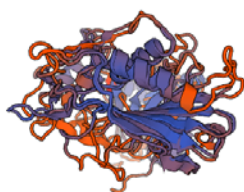
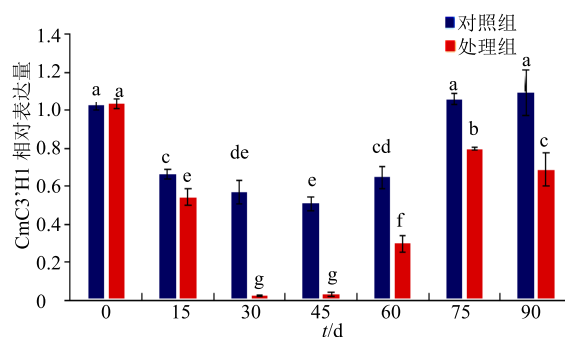


图 4 CmHCT2 蛋白质三级结构预测模型

Fig. 4 Three-dimensional structures of deduced CmHCT2 protein

3.2 淹水胁迫对杭菊 CmC3'H1 基因和 CmC3'H2 基因表达的影响

本实验使用 β -actin 作为内参基因, 运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算淹水胁迫后杭菊花芽 (花序) 中的 C3'H 基因在不同生长时期的相对表达量 (图 5、6)。结果显示, 相对于对照组, 处理组的 CmC3'H1 基因对淹水胁迫的响应一直处于下调水平, 且在不同时期下调程度有波动, 在处理后 30 d 时的下调水平最大达到 96.4%, 同时发现对照组和处理组的 CmC3'H1 基因的表达量均呈现随着菊花生长和开放的程度先下降后上升; 对照组和处理组杭菊 CmC3'H2 基因的表达量在不同时期下均具有显著差异, 呈现先下调再上调再下调的趋势, 其中处理组在淹水后 60 d 内 CmC3'H2 基因的表达量显著低于对照组, 在 60~75 d 开始上调, 但并不显著, 75 d 后又开始下调一直持续到盛花期, 在第 15 天时基因表达量下调程度最大, 相对表达量比对照组低 93.5%, 75 d 时上调程度最大, 比对照组高 12.0%。



不同字母表示差异显著, * $P < 0.05$, 下同

Different letters indicate significant differences, * $P < 0.05$, same as below

图 5 淹水胁迫处理后杭菊不同时期 CmC3'H1 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of CmC3'H1 in different periods after flooding stress

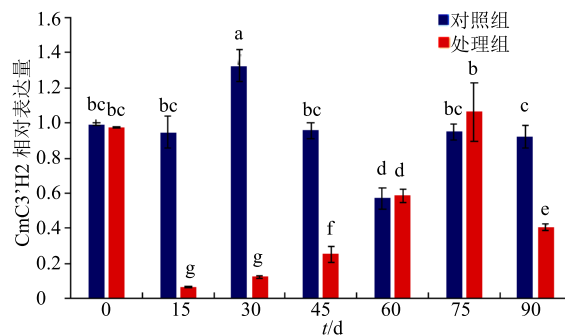


图 6 淹水胁迫处理后杭菊不同时期 CmC3'H2 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of CmC3'H2 in different periods after flooding stress

3.3 淹水胁迫对杭菊 CmHCT1 和 CmHCT2 基因表达的影响

使用 β -actin 作为内参基因, 运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算淹水胁迫后杭菊花芽 (花序) 中的 HCT 基因在不同生长时期的相对表达量 (图 7、8)。结果显示对照组和处理组杭菊 CmHCT1 基因的表达量在不同时期均具有显著差异, 呈现先下调再上调的趋势, 其中处理组在淹水后第 30 天 CmHCT1 的表达量显著低于对照组, 但从 30 d 后开始显著上调, 一直持续到盛花期, 在第 30 天时基因表达量下调程度最大, 相对表达量比对照组低 46.4%, 45 d 时上调程度最大, 比对照组高 71.2%; 相对于对照组, 处理组的 CmHCT2 基因对淹水胁迫的响应一直处于下调水平, 且在不同时期下调程度有波动, 在处理后第 15 天时下调水平最大达到 84.7%。

3.4 淹水胁迫对 C3'H 和 HCT 所催化的下游产物绿原酸含量的影响

HPLC 法测定收获期采收的菊花的绿原酸量, 结果显示淹水处理能够显著提高由 C3'H 和 HCT 催化形成的绿原酸的量, 从 1.545% 增加到 1.761% (图 9)。

3.5 淹水胁迫对杭菊其他活性成分含量的影响

为了探讨淹水胁迫对杭菊指标成分含量的影

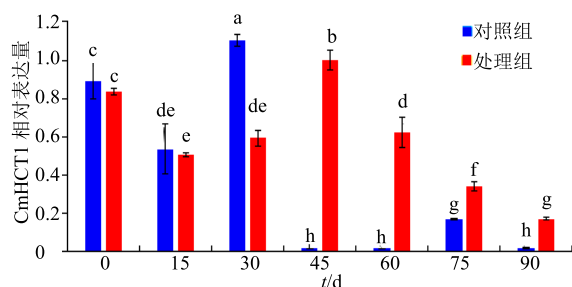


图 7 淹水胁迫处理后杭菊不同时期 CmHCT1 的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of CmHCT1 in different periods after flooding stress

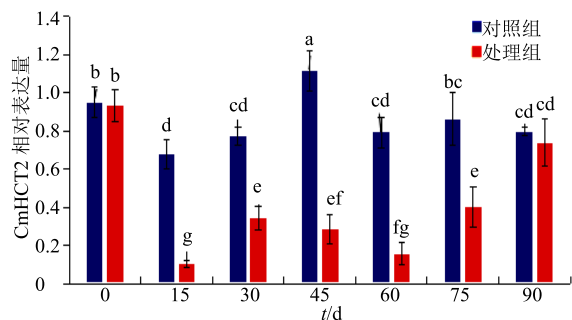


图 8 淹水胁迫处理后杭菊不同时期 CmHCT2 的相对表达量

Fig. 8 Relative expression of CmHCT2 in different periods after flooding stress

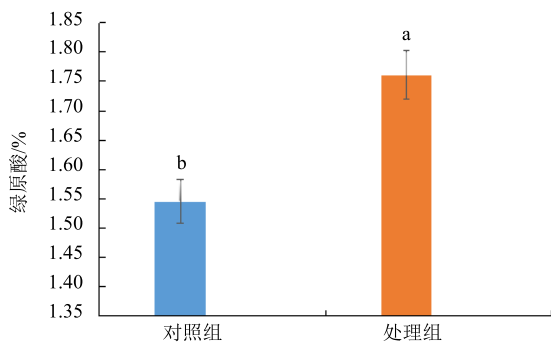


图 9 淹水胁迫下杭菊 C3'H 和 HCT 所催化下游产物绿原酸的质量分数

Fig. 9 Relative content of chlorogenic acid product catalyzed by C3'H and HCT after flooding stress

响, 本实验按照药典标准检测了杭菊其他 2 种指标成分, 结果显示淹水处理能够显著提高木犀草苷和 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的含量, 其中木犀草苷含量从 0.252% 增加到 0.378%, 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸从 2.584% 增加到 2.755% (图 10)。同时发现, 对照组和处理组的指标成分均符合药典标准。

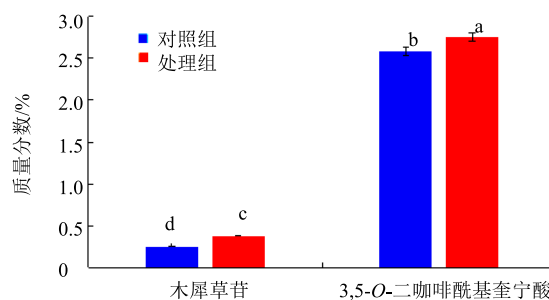


图 10 淹水胁迫下杭菊其他指标成分含量

Fig. 10 Relative content of other active ingredients after flooding stress

4 讨论

4.1 淹水胁迫对 CmC3'H1、CmC3'H2、CmHCT1、CmHCT2 基因表达的影响

实验结果显示在花芽分化期对杭菊进行持续 3 d 的淹水处理会导致 CmC3'H1、CmC3'H2、CmHCT1、CmHCT2 基因在不同生长时期内发生显著的表达变化, 且在不同时期调控程度有波动。其中, 相对于对照组, 处理组的 CmC3'H1 对淹水胁迫的响应一直处于下调水平, 在处理 30 d 时的下调水平最大。对照组和处理组杭菊 CmC3'H2 基因的表达量呈现先下调再上调再下调的趋势, 其中处理组在淹水后 60 d 内的表达量显著低于对照组, 从 60~75 d 后开始上调, 但并不显著, 75 d 后又开始下调一直持续到盛花期。对照组和处理组杭菊 CmHCT1 基因的表达量呈现先下调再上调的趋势, 其中处理组在淹水后第 30 天的表达量显著低于对照组, 但从 30 d 后开始显著上调, 一直持续到盛花期。相对于对照组, 处理组的 CmHCT2 基因对淹水胁迫的响应一直处于下调水平, 在处理 15 天时下调水平最大。

结合基因表达量与指标成分的相对含量, 绿原酸的相对含量与 CmC3'H1、CmC3'H2 和 CmHCT2 的相对表达量在整体上变化趋势相反, 与 CmHCT1 的相对表达量在整体上变化趋势相同。在下游产物相对含量与基因的表达量关系方面, 有研究也有过类似的结论, 其研究发现茶树

叶片氨基酸组分与 GS、GDH 酶基因表达有如下关系:茶氨酸、丙氨酸、赖氨酸含量与 GS 酶基因相对表达量呈负相关,而茶氨酸与 GDH 酶基因表达呈正相关^[17]。同一个基因的表达量会有上调、下调的变化以及上、下调程度的变化,推测是因为淹水胁迫对基因的表达产生了影响,在植物生长发育的不同阶段,酶催化形成的产物含量会随着植物的需求变化,而且 HCT 又是 C3'H 的上游酶,两者之间的底物与产物存在联系,有着反馈调节和负反馈调节,这些因素就导致了上述的变化。经过淹水胁迫后, C3'H 酶的 2 个基因 CmC3'H1 和 CmC3'H2 在表达趋势上相同,说明这 2 个基因的表达对淹水胁迫做出的应答相同,推测这 2 个基因对酶起到相同的作用;而 HCT 酶的 2 个基因 CmHCT1 和 CmHCT2 在表达趋势上相反,说明这 2 个基因的表达对淹水胁迫做出的应答不同,推测这 2 个基因对酶起到不同的作用。同时实验结果表明短期的淹水胁迫会对杭菊这 4 个基因的表达产生持续性的影响,证明短期的淹水胁迫会很大程度上影响杭菊绿原酸合成途径中的底物水平和对应酶的活性。

4.2 淹水胁迫对杭菊活性成分的影响

首先《中国药典》2015 年版规定的杭菊的 3 种指标成分均属于次生代谢产物,且中药材的活性成分大多为次生代谢产物,本研究发现花芽分化期对杭菊进行淹水胁迫可显著增强这 3 种成分的积累。谭勇等^[18]发现中度的水分胁迫可以提高菰蓝根部靛玉红含量积累,且有大量研究表明物理、化学胁迫会引起植物体内次生代谢物质的增加^[19-20],这与本研究的结论相一致。这可能是因为花芽分化期处于药用部位生长的特殊时期,在这个阶段进行淹水胁迫导致了光合作用受阻,初生代谢减弱,同化产物减少,导致次生代谢增加,合成了大量前体物质积累在植物体内,解除胁迫后花芽逐渐发育生长成头状花序,利用前期积累的物质生成了大量有效成分。

4.3 道地品质与逆境的关系

活性成分即特定的次生代谢产物是药用植物品质的物质基础,而次生代谢产物是药用植物对环境应答的产物,同时药用植物对“逆境”的胁迫应答造就了特定的次生代谢产物,即所谓“逆境效应”有助于药材道地品质的形成^[21-22]。药用植物品质与环境形成息息相关^[23],杭菊目前以浙江桐乡所产的为道地药材,而桐乡每年 8 月中下旬不可避免地会

遭受到一定程度的淹水胁迫,结合本研究结果可以推断花芽分化期的淹水胁迫可能是杭菊道地品质形成的重要因素之一。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 邵清松, 郭巧生, 李育川, 等. 药用菊花 HPLC 图谱分析及其模式识别研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2330-2334.
- [3] Wang T, Zhu Z B, Guo Q S, *et al.* Variation in major flavonoids glycosides and caffeoylquinic acids during florescence of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. 'Hangju' genotypes [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 47: 74-79.
- [4] Wang T, Xi M Q, Guo Q S, *et al.* Chemical components and antioxidant activity of volatile oil of a Compositae tea (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) from Mt. Kunlun [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 67(4): 318-323.
- [5] 刘波. 杏香兔耳风活性成分研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2005.
- [6] 张鞍灵, 马琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-174.
- [7] 石万里, 姚毓璆. 菊花花芽分化初步研究 [J]. 园艺学报, 1990, 17(4): 309-312.
- [8] 倪月荷, 汪觉先. 菊花栽培与鉴赏 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000.
- [9] Hoffmann L, Maury S, Martz F, *et al.* Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 95-103.
- [10] Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, *et al.* Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme shikimate/quinic hydroxyl cinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(6): 1446-1465.
- [11] Schoch G, Goepfert S, Morant M, *et al.* CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36566-36574.
- [12] Franke R, Humphreys J M, Hemm M R, *et al.* The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant J*, 2002, 30(1): 33-45.
- [13] Moglia A, Comino C, Portis E, *et al.* Isolation and mapping of a C3'H gene (CYP98A49) from globe artichoke, and its expression upon UV-C stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(6): 963-974.
- [14] 何柳, 陈士林. 植物中绿原酸合成途径研究进展 [J]. 药物生物技术, 2013, 20(5): 463-466.

- [15] Rudkin G O, Nelson J M. Chlorogenic acid and respiration of sweet potatoes [J]. *J Am Chem Soc*, 1947, 69(6): 1470-1475.
- [16] 郭巧生, 汪涛, 程俐陶, 等. 药用菊花不同栽培类型总黄酮动态积累研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1237-1239.
- [17] 林郑和, 钟秋生, 陈常颂, 等. 茶树叶片 *GDH*、*GS*、*GOGAT* 基因的克隆及荧光定量 PCR 分析 [J]. 茶叶科学, 2012, 32(6): 523-529.
- [18] 谭勇, 梁宗锁, 董娟娥, 等. 水分胁迫对菘蓝生长发育和有效成分积累的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(1): 19-22.
- [19] 黄璐琦, 郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.
- [20] Yang D F, Ma P D, Liang X, *et al.* PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Physiol Planta*, 2012, 146(2): 173-183.
- [21] 黄璐琦. 分子生药学 [M]. 第 2 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006.
- [22] Huang L Q, Guo L P, Ma C Y, *et al.* Top-geoherbs of traditional Chinese medicine: Common traits, quality characteristics and formation [J]. *Front Med*, 2011, 5(2): 185-194.
- [23] Liu L, Zhu Z B, Guo Q S, *et al.* Variation in contents of major bioactive compounds in *Glechoma longituba* related to harvesting time and geographic distribution [J]. *J Med Plant Res*, 2012, 6(1): 122-128.