

• 药材与资源 •

茉莉酸甲酯对三七叶总黄酮含量及其应答基因表达量的影响

李莹^{1,2,3}, 张广辉^{1,2}, 王前^{1,2,3}, 范伟^{1,2*}, 杨生超^{1,2*}

1. 云南农业大学西南中药材种质创新与利用国家地方联合工程研究中心, 云南 昆明 650201

2. 云南农业大学云南省药用植物生物学重点实验室, 云南 昆明 650201

3. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201

摘要:目的 研究茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 对三七叶总黄酮含量的影响, 探究其在转录水平上对类黄酮生物合成以及茉莉酸 (jasmonate, JA) 信号通路关键酶基因的调控模式。方法 使用不同浓度 (0、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 的 MeJA 喷施一年生三七叶片 7 d, 测定植株生物量以及叶片总黄酮含量; 基于 MeJA 处理的一年生三七叶转录组数据, 挖掘类黄酮生物合成与 JA 信号通路中关键酶基因, 并分析它们在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 处理 7、14 d 后的表达模式; 使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 喷施一年生三七叶片, 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测类黄酮生物合成与 JA 信号通路中关键酶基因在处理 0、2、4、6、10、14 h 后的相对表达量。结果 不同浓度 MeJA 处理均显著提高一年生三七叶总黄酮的含量, 但对其生物量的影响并未达到显著水平。外源 MeJA 诱导了三七中类黄酮生物合成和 JA 信号通路关键酶基因的表达。其中, 类黄酮生物合成基因 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*F3H*、*FLS* 和 *IFS* 呈现上调表达, 而 *CHS* 和 *CHI* 呈下调表达; JA 信号通路基因 *LOX*、*AOS*、*AOC*、*OPR*、*ACX*、*MEP*、*KAT*、*JAR1*、*JAZ* 和 *MYC* 都呈上调表达。研究发现, 当三七受到外源 MeJA 诱导时, *JAZ* 阻遏蛋白介导了 JA 信号对类黄酮生物合成基因表达模式的影响。结论 外源 MeJA 对一年生三七叶总黄酮含量的正向调控主要是通过增强 JA 信号通路基因 *JAZ* 和 *MYC*, 以及类黄酮生物合成基因 *PAL*、*C4H*、*4CL* 和 *IFS* 的表达来实现的。

关键词: 三七; 茉莉酸甲酯; 类黄酮; 基因表达; 茉莉酸信号通路

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0631-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.031

Effect of methyl jasmonate on total flavonoids content and expression of responsive genes in *Panax notoginseng* leavesLI Ying^{1,2,3}, ZHANG Guang-hui^{1,2}, WANG Qian^{1,2,3}, FAN Wei^{1,2}, YANG Sheng-chao^{1,2}

1. National & Local Joint Engineering Research Center on Germplasms Utilization & Innovation of Chinese Medicinal Materials in Southwest, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Yunnan Key Laboratory of Medicinal Plant Biology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

3. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To study the effect of methyl jasmonate (MeJA) on total flavonoids content in *Panax notoginseng* leaves and explore the transcriptional regulation mode of MeJA on key enzyme genes in flavonoid biosynthesis and jasmonate (JA) signaling pathway. **Methods** Different concentrations (0, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$) of MeJA were used to spray one-year-old *P. notoginseng* leaves for 7 d to determine biomass and total flavonoids content in leaves; Based on the transcriptome data of one-year-old *P. notoginseng* leaves treated with MeJA, the key enzyme genes in flavonoid biosynthesis and JA signaling pathway were mined, the expression patterns of which were analyzed after treatment with 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA for 7 and 14 d; The one-year-old *P. notoginseng* leaves were sprayed with 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA, and the relative expression levels of key enzyme genes in flavonoid biosynthesis and JA signaling pathway were detected by real-time quantitative PCR (qPCR) at 0, 2, 4, 6, 10 and 14 h after treatment. **Results** Different

收稿日期: 2022-08-07

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702500); 云南省科技厅科技计划项目 (202102AA310048); 云南省重大科技专项 (2019ZF011-1); 云南省科技厅科技计划项目 (202102AE090042-01)

作者简介: 李莹 (1981—), 女, 博士研究生, 研究方向为三七种质资源评价与利用。Tel: 15758800015 E-mail: lynn163@163.com

*通信作者: 杨生超, 教授, 博士生导师。E-mail: shengchaoyang@163.com

范伟, 教授, 博士生导师。E-mail: fanwei1128@aliyun.com

concentrations of MeJA significantly increased the content of total flavonoids in one-year-old *P. notoginseng* leaves, but the effect on biomass was not significant. Exogenous MeJA induced the expression of key enzyme genes in flavonoid biosynthesis and JA signal pathway in *P. notoginseng*. Among them, the flavonoid biosynthetic genes *PAL*, *C4H*, *4CL*, *F3H*, *FLS* and *IFS* were up-regulated, while *CHS* and *CHI* were down-regulated; *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR*, *ACX*, *MEP*, *KAT*, *JAR1*, *JAZ* and *MYC* involved in the JA signaling pathway were all up-regulated. These results found that JAZ repressor mediated the effect of JA signal on the expression pattern of flavonoid biosynthetic genes when *P. notoginseng* was induced by exogenous MeJA. **Conclusion** The positive regulation of exogenous MeJA on total flavonoid content in one-year-old *P. notoginseng* leaves was mainly achieved by enhancing the expression of *JAZ* and *MYC* involved in JA signaling pathway and flavonoid biosynthetic genes *PAL*, *C4H*, *4CL* and *IFS*.

Key words: *Panax notoginseng* (Bur K.) F. H. Chen; methyl jasmonate; flavonoids; gene expression; jasmonate signaling pathway

三七 *Panax notoginseng* (Bur K.) F. H. Chen 为五加科人参属多年生草本植物, 其根、茎、叶、花均可入药, 在我国作为滋补药和止血药已被广泛使用 400 多年^[1]。现代医学研究表明, 三七可治疗心脑血管、神经与免疫系统等疾病^[2-3]。至今已经从三七中分离到 200 多个化合物, 主要包括三萜皂苷、类黄酮、三七素、多糖和微量元素^[1]。目前关于三七的研究主要集中于三萜皂苷, 其他活性成分则鲜有关注。研究表明, 三七总黄酮具有较强的抗氧化和抗菌潜力, 它可以直接扩张动脉血管、有效抑制人类肝脏细胞增殖^[4-7]。但是, 当前三七类黄酮并未得到充分地开发与应用, 富含类黄酮的三七茎叶在生产中通常作为废弃物被丢弃, 因此研究三七类黄酮的积累规律以及探究其生物合成的调控机制显得尤为重要。

化学诱导子被广泛应用于诱导药用植物中次生代谢产物的生物合成, 如茉莉酸类 (jasmonates, JAs)、水杨酸 (salicylic acid, SA)、乙烯 (ethylene, ET) 等^[8]。其中 JAs 包括茉莉酸 (jasmonate, JA) 及其环状前体和衍生物, 具有促进衰老、抑制生长以及诱导次生代谢产物生物合成等生理作用^[9]。茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 作为 JA 最佳衍生物之一, 可以有效促进药用植物中类黄酮的生物合成, 如黄芩 *Scutellaria bornmuelleri* Georgi、红花 *Carthamus tinctorius* L. 和黄花夹竹桃 *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. 等^[10-12]。研究表明, 外源 MeJA 处理可以显著增强类黄酮生物合成和 JA 信号通路基因的表达, 且它们与黄酮含量存在着直接正向关系。本研究利用不同浓度的 MeJA 喷施一年生三七叶片, 研究 MeJA 对三七的生物量和叶片总黄酮含量的影响; 基于本课题组前期转录组数据, 研究在 MeJA 不同处理时间后类黄酮生物合成和 JA 信号通路基因的表达模式, 探索 MeJA 对类黄酮生物合成的调控机制, 为今后三七叶资源的开发和利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

试验材料为生长在自然环境下遮阴棚中的一年生三七, 本实验选择出苗后约 100 d 的健康植株进行处理。试验地点位于云南省文山州丘北县 (103°14'E、23°84'N), 海拔 1569 m, 年平均气温 16.1 °C, 正常年降雨量 1008 mm, 全年无霜期 250~320 d。

MeJA 购自 Sigma-Aldrich 公司 (批号 392707, 质量分数 ≥95%); 对照品芦丁 (批号 wkq00348, 质量分数 ≥98%) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 分析纯甲醇 (批号 12801001)、乙醇 (批号 12803401)、磷酸 (批号 12704101)、氢氧化钠 (批号 10103101)、亚硝酸钠 (批号 10102501)、硝酸铝 (批号 11200301) 购自西陇化工股份有限公司; RNA 提取试剂盒 (HiPure HP Plant RNA Mini Kit, 货号 R4165) 购自广州美基生物科技有限公司; 反转录试剂盒 (HiScript III RT SuperMix for Qpcr, 批号 R323-01) 和 qPCR 试剂盒 (ChamQ™ Universal SYBR Qpcr Master Mix, 批号 Q711-02/03) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 仪器

Sorvall Legend Micro 21 型离心机、NanoDrop 2000 超微量分光光度计和 QuantStudio 5 (ABI) qPCR 仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); LabYeah 型多功能涡旋混匀仪 (上海百赛生物技术有限公司); RADWAG Wagi Elektroniczne 分析天平 (RADWAG 公司); 101-2AD 型电热鼓风干燥箱 (南通嘉程仪器有限公司)。

2 方法

2.1 MeJA 溶液处理与样品采集

2.1.1 MeJA 的配制 分别将不同体积的原液溶于 0.2 mL 的 20% 乙醇助溶, 最终配制成不同浓度 MeJA 溶液。

2.1.2 MeJA 的处理 田间试验采用随机区组设计, 每个处理设置 3 次重复, 每个小区面积为 0.5 m×0.5 m, 喷施 MeJA 溶液体积为 200 mL, 约包含 150 株植株。于 2021 年 6 月, 分别使用浓度 0、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 喷施一年生三七叶片, 连续喷施 7 d, 每天喷施 2 次 (6:00~7:00 和 19:00~20:00), 用于生物量和总黄酮含量的测定; 使用浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 喷施一年生三七叶片 (只喷施 1 次), 处理时间分别为 0、2、4、6、10 和 14 h, 用于 qPCR 检测。

2.1.3 样品采集 每个小区随机取 10 株完整植株, 洗净后 55 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干, 用于生物量的测定; 每个小区随机取 50 株的叶片, 55 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干后碾磨粉碎过 45 目筛, 用于总黄酮含量的测定; 每个小区取 5 株的叶片, 混合后立即使用液氮封存, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于 qPCR 检测。

2.2 生物量和总黄酮含量的测定

2.2.1 生物量的测定 分别称量经不同浓度 MeJA 处理后一年生三七完整植株干质量。

2.2.2 总黄酮含量的测定 总黄酮含量的测定采用紫外分光光度法。精确称取芦丁对照品, 用 65%乙醇配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的芦丁对照品溶液。分别精确量取对照品溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mL 置于 25 mL 量瓶中, (1) 加 65%乙醇至 12.5 mL; (2) 加入 5%亚硝酸钠溶液 0.8 mL, 摇匀, 静置 5 min; (3) 加入 5%硝酸铝溶液 0.8 mL, 摇匀, 静置 6 min; (4) 加入 4%氢氧化钠溶液 5 mL; (5) 用 65%乙醇定容, 摇匀, 静置 10 min。以 65%乙醇作为空白对照, 用紫外分光光度计在 510 nm 处测定吸光度 (A) 值。建立芦丁浓度 (Y) 与 A 值 (X) 的线性关系曲线, 得回归方程式: $Y=0.012\ 1+11.45\ X$, $r=0.999\ 3$, 在 0.02~0.10 mg/mL 内呈良好线性关系。分别称取经不同浓度 MeJA 处理后一年生三七叶粉末状样品 5 g, 用 65%乙醇 50 mL 浸泡 2 h, 超声波振荡提取 3 次, 每次振荡 15 min, 静置 1 h 后获得三七叶提取液。取 0.1 mL 提取液经 0.22 μm 滤头滤过后加入 25 mL 量瓶中, 按建立标准曲线的方法测定 A 值, 根据回归方程计算三七叶总黄酮含量。

2.3 类黄酮生物合成和 JA 信号通路关键酶基因的挖掘

在前期研究中, 本课题组以一年生三七叶为材料, 用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 处理 7 d 和 14 d 后进行转录组测序。本研究以该转录组数据为基础, 提取

出注释为类黄酮生物合成和 JA 信号通路的关键酶基因, 并选择 Reads Per Kilobase per Million mapped reads (RPKM) 值 > 10 的基因进行表达谱分析, 最后筛选出每个基因家族中 RPKM 值最大的一条 unigene 进行 qPCR 分析 (MeJA 处理 0、2、4、6、10、14 h)。本研究挖掘的类黄酮生物合成关键酶有苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase, PAL)、肉桂酸 4-羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸乙酰辅酶 A 连接酶 (4-coumaric acid: CoA ligase, 4CL)、查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS)、查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、黄酮醇合酶 (flavonol synthase, FLS) 和异黄酮合酶 (isoflavone synthase, IFS); JA 信号通路关键酶有脂氧合酶 (lipoxygenases, LOX)、丙二烯氧化物合酶 (allene oxide synthase, AOS)、丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, AOC)、12-氧植物二烯酸还原酶 (12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR)、乙酰辅酶 A 氧化酶 (acyl-CoA oxidase, ACX)、多功能酶 (multifunctional protein, MFP)、3-酮脂酰辅酶 A 硫解酶 (3-ketoacyl-CoA thiolase, KAT)、茉莉酸酰胺基合成酶 (jasmonate resistant 1, JAR1)、茉莉酸 ZIM 结构域蛋白 (jasmonate ZIM-domain protein, JAZ)、转录因子 MYC (The bHLH transcription factor myelocytomatosis proteins, MYC)。

2.4 qPCR 分析

2.4.1 RNA 的提取 使用 HiPure HP Plant RNA Mini Kit 试剂盒提取一年生三七叶片总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计分别检测 RNA 的质量和浓度。使用 HiScript III RT SuperMix for Qpcr 试剂盒将 Total RNA 反转录为 cDNA, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.4.2 引物的设计 根据转录组组装结果中的 CDS 序列, 利用软件 Primer 5 设计基因 qPCR 扩增引物, 并委托擎科生物科技有限公司合成引物, 扩增产物大小在 100~200 bp, 引物序列见表 1。

2.4.3 qPCR 检测体系的建立 以不同 MeJA 处理的一年生三七叶片的 cDNA 为模板, SYL8 为内参基因, 分别对表 1 中基因进行 qPCR 扩增, 重复 3 次, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析结果。PCR 反应体系为: DEPC 水 8.2 μL , SYBR qPCR Master Mix 10 μL , 正反引物各 0.4 μL , cDNA 模板 1.0 μL , 共 20 μL

表 1 基因序列引物

Table 1 Gene sequence primers

基因	ID	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>PAL</i>	Unigene0024904	GGCAACAAAATGGGACTGC	ATCCGCTTCACCTCATCCA
<i>C4H</i>	Unigene0013805	GATTCCCCTTTTGGTCCCTC	CCTGAAGTCATTTCGGTTAGCC
<i>4CL</i>	Unigene0021921	AAGGGGTGATGTTGACGCA	CAGCCCACAAAGTAATACCGA
<i>CHS</i>	Unigene0052050	TTGAGGAAATCCGCAAAGC	CGGGATAATCAGCCTGATACAC
<i>CHI</i>	Unigene0008416	GAGATTGGATTTTCAAGGGAGG	AGTTGGCTAAGGAGGAGATGGT
<i>FLS/F3H</i>	Unigene0017204	GATCCAATACCTCCAGCAGA	TTTCGGTCTCACCACCCTGT
<i>IFS</i>	Unigene0015368	TCTTGTCCTGGGAGTGGGTT	CTCTGCTTTGGGCATAGTAAGG
<i>LOX</i>	Unigene0036446	AGGAAGATCCAAAAGCACCG	GGCTGACGTAGTCTGTAACCCA
<i>AOS</i>	Unigene0040918	GAATCCAACAGTCGGAACAA	GCCACGTCAATCTCGAAAGAA
<i>AOC</i>	Unigene0021992	TAGCCCTGCTTACCTTCGTTT	GCCGTTATTCCAATCCTCTTCT
<i>OPR</i>	Unigene0008111	ATTTACGCCTCCACGACGAC	TCTCAACCCCATCAAAACCAG
<i>ACX</i>	Unigene0039990	CTGCCCTCAATATGCCTCC	ACACTTTGCCGCCCTCT
<i>MFP</i>	Unigene0018974	GCGGTATCAAGTCATCTGGAAT	TTCTTCTGAATCTGGTTGGGTG
<i>KAT</i>	Unigene0016855	TAGTTGTTGGCACTGTTTGGC	TGTTGACGGTTCTGATAGGCAC
<i>JAR1</i>	Unigene0036001	CAGAAATGGGGTCTTGATGGA	CCGGTGAGAATTGGGGAAAC
<i>JAZ</i>	Unigene0017139	CCCCAACTCCGTGAACATCT	TTCCCTTGCTTGCTAACAGC
<i>MYC</i>	Unigene0022156	GCAGCCGATTCTTGGTGTAT	ATGTTTGGGAGGTGGGGTCT
<i>SYL8</i>	内参基因	CAATGACCAACCCACGACCT	TCTCGCCGAAGAAGAACGTC

Unigene0017204 同时被注释到基因 *FLS* 和 *F3H*

Unigene0017204 is annotated to both gene *FLS* and *F3H*

的反应体系。PCR 反应条件为：预变性 95 °C、30 s；循环反应 95 °C、10 s，60 °C、30 s，40 个循环；溶解曲线 95 °C、15 s，60 °C、60 s，95 °C、15 s。

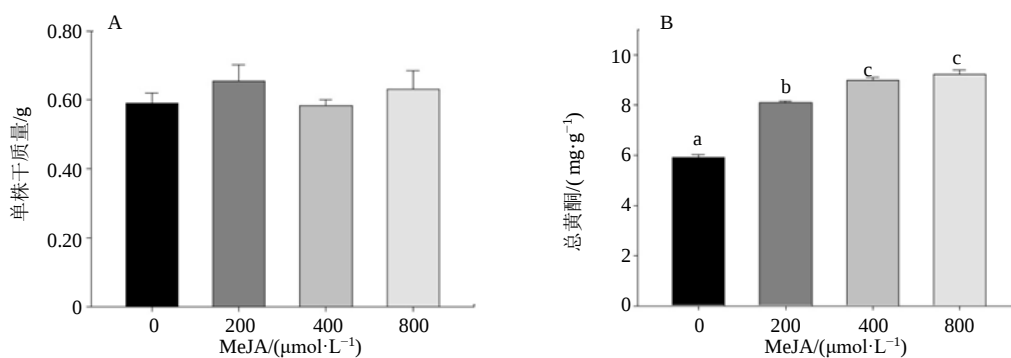
2.5 数据分析

本研究使用的转录组数据来自于本课题组的前期研究。试验所得数据采用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 完成统计分析，图表的制作使用 SigmaPlot10.0、TBtools v1.068 和 Adobe Illustrator CC 2014。

3 结果与分析

3.1 MeJA 对三七生物量的影响

经过不同浓度 MeJA 处理后，与对照（0 μmol/L）相比，一年生三七植株的生物量略有提高。由图 1-A 可见，一年生三七植株的干质量在 200 μmol/L 时最高，比对照增加了 10.85%，但并未达到显著水平。结果表明，浓度为 200~800 μmol/L 的 MeJA 处理并不影响一年生三七的生长。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letter indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

图 1 不同浓度 MeJA 处理对一年生三七植株生物量 (A) 和叶片总黄酮含量 (B) 的影响

Fig. 1 Effects of MeJA concentration on plant biomasses (A) and total flavonoids in leaves (B) of *P. notoginseng*

3.2 MeJA 对三七叶总黄酮含量的影响

不同浓度的 MeJA 处理均显著提高一年生三七叶总黄酮的含量。由图 1-B 可见, 经过 MeJA 处理后, 总黄酮含量随着 MeJA 浓度的增加而升高, 从 5.91 mg/g (0 $\mu\text{mol/L}$) 增至 9.21 mg/g (800 $\mu\text{mol/L}$)。在 200、400 和 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 处理后, 一年生三七叶总黄酮含量显著性增加 ($P < 0.05$), 它们分别比对照提高了 36.72%、51.82%、55.77%。当 MeJA 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 一年生三七叶总黄酮含量不再呈显著性增加(相比于 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA)。因此, MeJA 能够有效促进一年生三七叶中总黄酮的积累, 但当 MeJA 浓度大于 400 $\mu\text{mol/L}$ 时总黄酮的含量不再明显增加。

3.3 MeJA 处理下三七类黄酮生物合成关键酶基因的表达模式分析

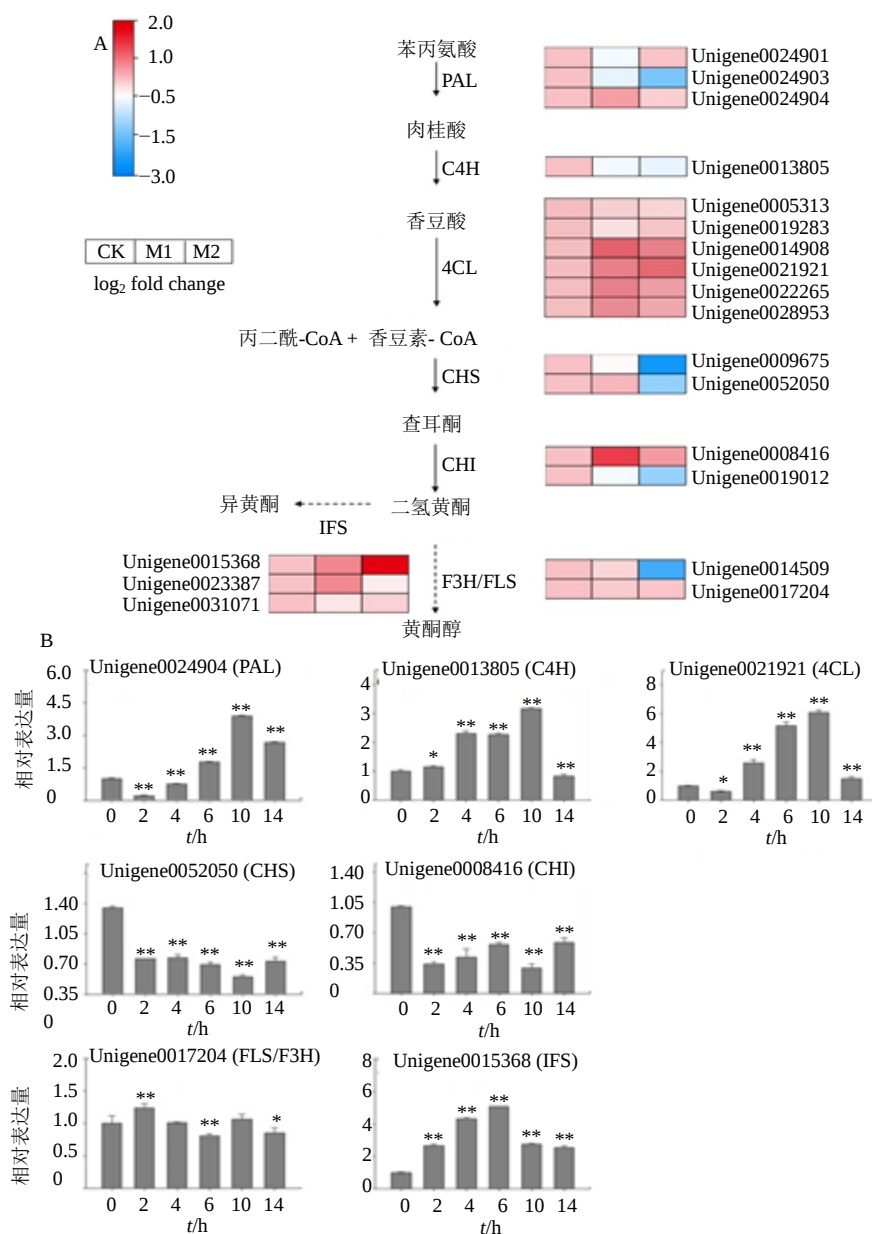
3.3.1 类黄酮生物合成关键酶基因的鉴定与表达分析 如图 2-A 所示, 类黄酮生物合成来源于苯丙烷途径, 苯丙氨酸在 PAL、C4H 和 4CL 催化作用下合成香豆酰-CoA, CHS 以 1 分子香豆酰-CoA 和三分子丙二酰-CoA 为前体生成查耳酮, CHI 将查耳酮转化为二氢黄酮(柚皮素), 二氢黄酮在异黄酮合酶和黄酮醇合酶等的作用下形成各类黄酮(图 2-A)。本研究在转录组数据中共鉴定到 19 个差异基因(differentially expressed genes, DEGs)参与类黄酮生物合成途径。其中参与前体化合物香豆酰-CoA 生物合成的 DEGs 有 10 个, 分别是 3 个 PAL、1 个 C4H 和 6 个 4CL; MeJA 处理 7 d 和 14 d 后, 多个 4CL 表达量升高, 而 PAL 和 C4H 的表达量降低。另外, 在类黄酮生物合成的下游基因中, 有 9 个 DEGs 在转录组数据中被注释到, 包括 2 个 CHS、2 个 CHI、2 个 F3H/FLS 和 3 个 IFS; MeJA 处理 7 d 和 14 d 后, CHS、CHI 和 F3H/FLS 均呈下调表达, 而 IFS 呈上调表达, 尤其是 Unigene0015368 (IFS) 的 FPKM 值在 MeJA 处理 14 d 后比对照增加了 3.09 倍(图 2-A)。该结果表明, 对 MeJA 呈正向响应的类黄酮生物合成基因 4CL 和 IFS 与类黄酮的积累密切相关。

3.3.2 类黄酮生物合成候选基因 qPCR 的表达分析 为了进一步探明 MeJA 对三七类黄酮生物合成基因表达量的影响, 本研究从转录组分析结果中获得 7 个候选基因, 包括 Unigene0024904 (PAL)、Unigene0013805 (C4H)、Unigene0021921 (4CL)、

Unigene0052050 (CHS)、Unigene0008416 (CHI)、Unigene0017204 (FLS/F3H) 和 Unigene0015368 (IFS)。在 MeJA 处理 0、2、4、6、10、14 h 后, 采用 qPCR 检测了以上 7 个候选基因的表达量。结果表明, 类黄酮生物合成基因的相对表达量在 MeJA 处理后均呈显著性变化, 其中, PAL 和 4CL 的相对表达量下降后升高, 并在 10 h 达到峰值; C4H 和 IFS 的相对表达量逐渐升高, 并分别在 10 h 和 6 h 达到峰值; 4CL 和 IFS 的相对表达量在 MeJA 诱导后明显升高, 分别为 6.08、5.06, 而 F3H/FLS 的相对表达量在 MeJA 处理后变化较小。相反, CHS 和 CHI 在 MeJA 处理后呈显著性下调表达(图 2-B)。因此, 外源 MeJA 的诱导正向调控了 PAL、C4H、4CL 和 IFS 的表达, 负向调控了 CHS 和 CHI 的表达, 而对 F3H/FLS 表达的影响较小。该结果进一步表明, 对于 MeJA 促进一年生三七叶类黄酮积累, 4CL 和 IFS 可能具有较大贡献。

3.4 MeJA 处理下三七 JA 信号通路中关键酶基因的表达模式分析

如图 3 所示, 内源 JA 的生物合成在 2 个细胞器中完成, 首先不饱和脂肪酸在叶绿体中合成氧化二烯酸(OPDA), 之后在过氧化物酶体中转化为 JA。接下来, JA 在细胞质中代谢为不同的衍生物, 如茉莉酸-异亮氨酸复合物(JA-Ile)或 MeJA 等。当 JA-Ile 作为信号物进入细胞核时, 阻遏蛋白 JAZ 被降解从而释放出转录因子 MYC, 最终调控了下游 MeJA 应答基因的表达(图 4)。本研究在转录组数据中共鉴定到 39 个 DEGs 参与 JA 信号通路。其中内源 JA 生物合成基因有 24 个, 包括 7 个 LOX、1 个 AOS、1 个 AOC、2 个 OPR、5 个 ACX、6 个 MEP 和 2 个 KAT。经过 MeJA 处理 7 d 和 14 d 后, 除 AOS 以外的 6 个基因均呈现出上调表达, 尤其是被注释为 LOX 的 Unigene003644, 它的 RPKM 值在 MeJA 处理 14 d 后是对照的 73.20 倍。在接下来的 JA 信号通路中, 共鉴定到 15 个 DEGs, 包括 2 个 JAR1、7 个 JAZ 和 6 个 MYC, 其中有 11 个基因在 MeJA 处理 7 d 和 14 d 后呈上调表达, 尤其是被注释为 JAZ 的 unigene0017139 以及被注释为 MYC 的 unigene0022156, 它们的 RPKM 值在 MeJA 处理 14 d 后分别是对照的 64.62 和 108.62 倍。该结果表明, 外源 MeJA 的刺激导致了三七 JA 信号通路基因呈上调表达, 尤其是 LOX、JAZ 和 MYC。



*差异显著 ($P < 0.05$), **差异极显著 ($P < 0.01$); M1 和 M2 分别表示用 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 处理 7 d 和 14 d, 而 CK 表示用 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MeJA 处理 14 d; 以 CK 作为参照计算 RPKM 值的 log₂ 倍数用于创建热图

*significant ($P < 0.05$), **extremely significant ($P < 0.01$); M1 and M2 represent treatment with $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA for 7 and 14 d, respectively, while CK represents treatment with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA for 14 d. log₂ fold changes of RPKM values calculated using the CK as a control were used to create the heatmap

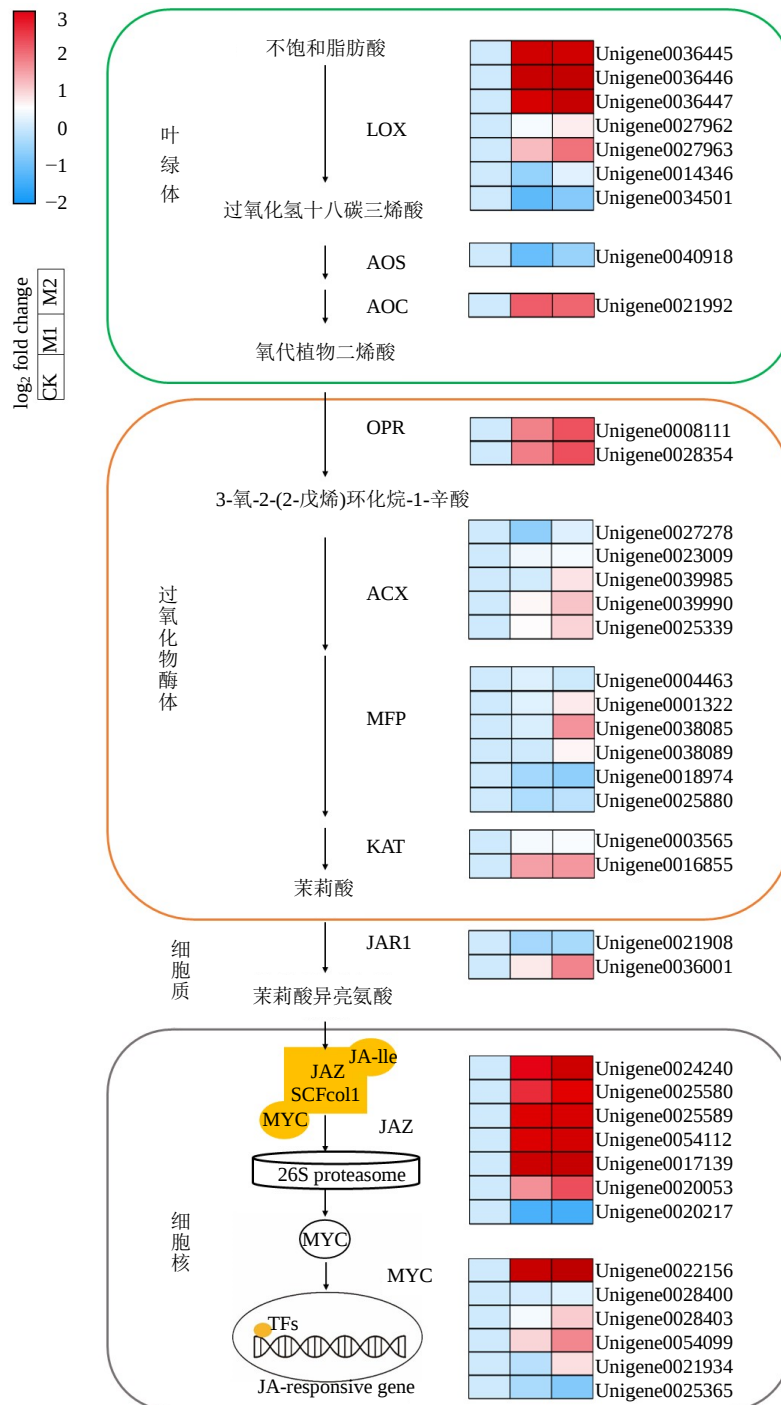
图 2 MeJA 处理下三七叶黄酮生物合成基因转录组的表达谱 (A) 和 qPCR 的表达 (B) 分析

Fig. 2 Analysis of transcriptome expression profile (A) and qPCR expression (B) of flavonoid biosynthetic genes in *P. notoginseng* leaves under MeJA treatment

4 讨论

MeJA 是高等植物体内一种重要的信号分子, 在植物的次生代谢调控中起着重要的作用, 被广泛应用于提高药用植物中次生代谢产物的含量^[13-14]。本研究使用不同浓度 MeJA 喷施了一年生三七叶片, 结果表明 MeJA 可以显著提高一年生三七叶总

黄酮的含量, 但对其生物量的影响并未达到显著水平, 该结果与前人研究结果一致^[15-16]。然而, MeJA 作为逆境响应激素, 过高的浓度会抑制生长, 同时降低次生代谢产物含量^[17-18]。因此该结果也表明了 $200 \sim 800 \mu\text{mol/L}$ 为一年生三七适宜的 MeJA 浓度。另外, 大量研究结果表明, 外源 MeJA 可以显著提



M1 和 M2 分别表示用 MeJA 处理 7 d 和 14 d, 而 CK 表示用 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 处理 14 d, 以 CK 作为参照计算 RPKM 值的 $\log_2$ 倍数用于创建热图

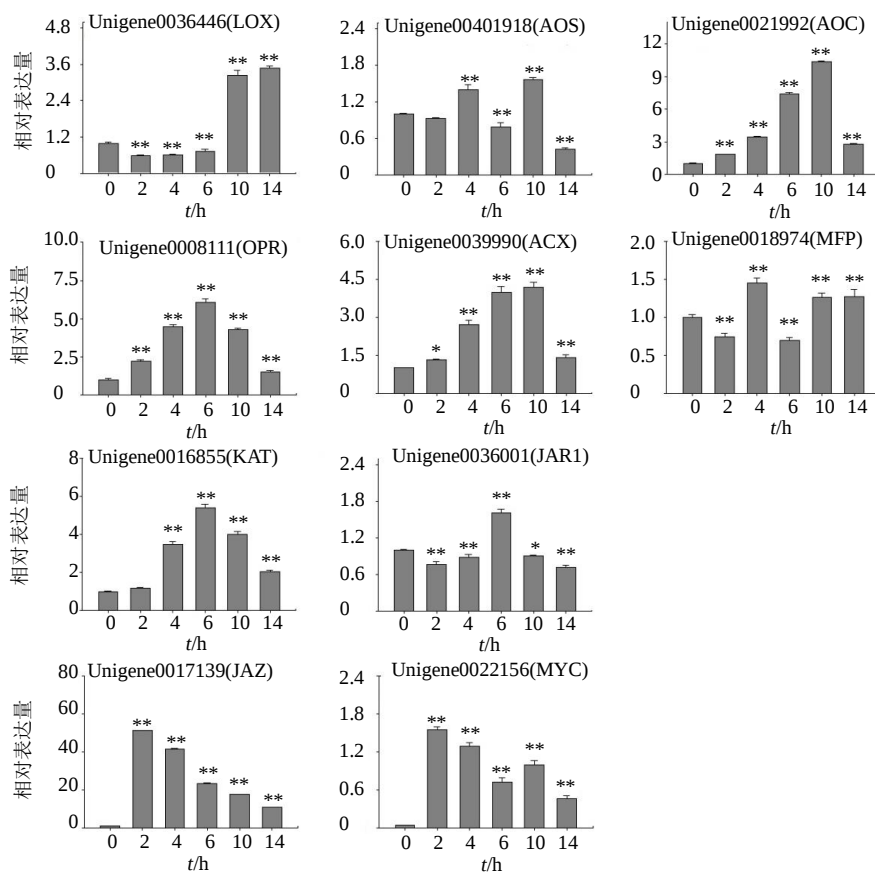
M1 and M2 represent treatment with MeJA for 7 and 14 d, respectively, while CK represents treatment with 0 $\mu\text{mol/L}$ MeJA for 14 d. $\log_2$ fold changes of RPKM values calculated using the CK as a control were used to create the heatmap

图3 MeJA处理下三七叶JA合成通路基因转录组的表达谱

Fig. 3 Analysis of transcriptome expression profile of JA signal pathway genes in *P. notoginseng* leaves under MeJA treatment

高类黄酮生物合成基因的转录水平^[19-20]。为了进一步探索 MeJA 对三七类黄酮生物合成基因转录水平的调控模式,本研究基于转录组测序和 qPCR 结果,

分析了类黄酮生物合成关键酶基因的表达水平, 结果表明基因 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*F3H*、*FLS* 和 *IFS* 对 MeJA 呈现出正向应答, 而 *CHS* 和 *CHI* 却对 MEJA



*差异显著 ($P < 0.05$), **差异极显著 ($P < 0.01$)

*significant ($P < 0.05$), **extremely significant ($P < 0.01$)

图4 MeJA处理下三七叶中JA合成信号通路关键酶基因的qPCR表达分析

Fig. 4 Analysis of transcriptome qPCR expression of JA signal pathway genes in *P. notoginseng* leaves under MeJA treatment

呈负向应答。研究发现, 其中参与重要前体化合物香豆酰-CoA生物合成的基因 *PAL*、*C4H* 和 *4CL* 对 MeJA 的响应较为强烈。因此, 认为对于 MeJA 促进一年生三七总黄酮生物合成, 苯丙烷代谢途径上游基因 *PAL*、*C4H* 和 *4CL* 做出了较大的贡献, Ahn 等也得到类似的研究结果^[21-22]。然而, Tuan 等^[23]认为 MeJA 更加强烈地诱导了 *CHI* 和 *CHS* 上调表达, 对 *PAL*、*C4H*、*4CL* 在转录水平上的影响却很小。以上研究结果暗示了 MeJA 具有不同的调节模式, 且在不同条件下表现出不同规律。此外, 在本研究中还发现 MeJA 诱导了 *IFS* 显著性上调表达, 却微弱地影响了 *FLS* 的表达。该结果与 Li 等^[24]的研究结果一致, 研究表明 MeJA 处理可以强烈激活异黄酮合成酶 (*IFS*) 的活性, 促使中间产物二氢黄酮转化为异黄酮而不是黄酮。因此, 推测三七中外源 MeJA 的诱导更利于异黄酮的积累。

在 JA 信号通路中, JAZ 阻遏蛋白作为信号开关

发挥着重要作用。当植物受到外源 JAs 或外界环境刺激后, JAZ 蛋白被泛素化降解, 同时释放出转录因子, 最终 JA 应答基因的表达模式被重新调整^[25]。研究表明, 外源 MeJA 处理可以显著提高人参中 JAZ 的表达量^[26]。本研究中三七 JAZ 在转录水平上也快速响应了外源 MeJA。此外, 本研究从基因响应的顺序上对外源 MeJA 的诱导机制进行了探索, 结果表明, JAZ 相对表达量在 2 h 时已达 51.12; 而类黄酮和内源 JA 生物合成基因对 MeJA 的强烈应答多发生在 6 h 或者 10 h, 并且这些基因的相对表达量在 0.20 (*CHS*) ~ 10.38 (*AOC*), 远远低于 JAZ 表达水平。Shoji 等^[27]的研究结果表明, 外源 MeJA 对基因表达模式的影响是由 JAZ 蛋白介导的。因此, 推测在三七中外源 MeJA 在转录水平上直接促进了 JAZ 的表达, 从而启动了 JA 信号通路, 最终导致次生代谢产物的积累。另外, 转录因子在 JA 信号调控次生代谢基因表达中也起着重要的作用,

其中研究报道较多的为 MYC 家族, 在 JA 信号通路中它直接调控着药用植物中类黄酮、生物碱和青蒿素等次生代谢产物的生物合成^[28]。然而, 关于人参属植物中 JA 信号介导下转录因子的研究却鲜有报道。2013 年 Sun 等^[29]的研究表明, 经过 MeJA 处理后 PqWRKY1 正向调节西洋参中人参皂苷生物合成。2019 年, Lin 等^[30]研究发现对 MeJA 应答的转录因子 MYB2 与达马烯二醇合酶 (dammaranediol synthase, DDS) 基因的启动子结合, 调控了人参皂苷的生物合成^[31]。结合本课题组前期研究结果, 推测候选基因 MYC (Unigenes0022156) 很可能调控着三七中次生代谢产物的生物合成, 包括人参皂苷和类黄酮, 这为转录因子调控人参属植物次生代谢产物生物合成的研究提供了必要基础。

综上所述, 外源 MeJA 激活了植物 JA 信号, 它显著提高了一年生三七叶总黄酮的含量, 在转录水平上调整了类黄酮生物合成基因和 JA 信号通路基因的表达。本研究为今后进一步研究外源诱导子对三七次生代谢的诱导机制提供了依据, 同时为解析三七中类黄酮生物合成途径提供了分子基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang T, Guo R X, Zhou G H, *et al.* Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 234-258.
- [2] 王楠, 万建波, 李铭源, 等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(5): 787-790.
- [3] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [4] Gould K. S. and Lister C, Flavonoid Functions in Plants, in: Andersen M. and Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* [M]. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006(8): 397-442
- [5] Ververidis F, Trantas E, Douglas C, *et al.* Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health [J]. *Biotechnol J*, 2007, 2(10): 1214-1234.
- [6] 李媛, 李强, 姜泽. 三七中黄酮类成分的研究进展 [J]. *齐鲁药事*, 2012, 31(2): 109-111.
- [7] Hong J, Hu J Y, Liu J H, *et al.* *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids from *Panax notoginseng* flowers [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(16): 1260-1266.
- [8] Giri C C, Zaheer M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: Recent trends and a sky eye view appraisal [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2016, 126(1): 1-18.
- [9] Pauwels L, Inzé D, Goossens A. Jasmonate-inducible gene: What does it mean? [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(2): 87-91.
- [10] Gharari Z, Bagheri K, Danafar H, *et al.* Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over-expression of MYB7 and FNSII2 genes [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 148: 35-44.
- [11] Chen J, Wang J, Wang R, *et al.* Integrated metabolomics and transcriptome analysis on flavonoid biosynthesis in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under MeJA treatment [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 353.
- [12] Mendoza D, Cuaspid O, Arias J P, *et al.* Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2018, 19: e00273.
- [13] Premathilake A T, Ni J B, Shen J Q, *et al.* Transcriptome analysis provides new insights into the transcriptional regulation of methyl jasmonate-induced flavonoid biosynthesis in pear calli [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 388.
- [14] Chen R B, Li Q, Tan H X, *et al.* Gene-to-metabolite network for biosynthesis of lignans in MeJA-elicited *Isatis indigotica* hairy root cultures [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 952.
- [15] Dučaiová Z, Sajko M, Mihaličová S, *et al.* Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation [J]. *Plant Growth Regul*, 2016, 79(1): 81-94.
- [16] Abdi G, Shokrpour M, Karami L, *et al.* Prolonged water deficit stress and methyl jasmonate-mediated changes in metabolite profile, flavonoid concentrations and antioxidant activity in peppermint (*Mentha × piperita* L.) [J]. *Not Bot Horti Agrobo*, 2018, 47(1): 70-80.
- [17] Kuźma Ł, Bruchajzer E, Wysokinska H, *et al.* Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(6/7): 406-410.
- [18] Danaee M, Farzinebrahimi R, Kadir M A, *et al.* Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus*

- pulcher* [J]. *Braz J Bot*, 2015, 38(2): 265-272.
- [19] Kianersi F, Abdollahi M R, Mirzaie-asl A, et al. Biosynthesis of rutin changes in *Capparis spinosa* due to altered expression of its pathway genes under elicitors' supplementation [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2020, 141(3): 619-631.
- [20] 谭政委, 李磊, 杨红旗, 等. 茉莉酸甲酯诱导和不同花色红花中羟基红花黄色素 A 积累差异的机制分析 [J]. *药学报*, 2020, 55(12): 2982-2988.
- [21] Ahn S Y, Kim S A, Cho K S, et al. Expression of genes related to flavonoid and stilbene synthesis as affected by signaling chemicals and *Botrytis cinerea* in grapevines [J]. *Biol Plant*, 2014, 58(4): 758-767.
- [22] Concha C M, Figueroa N E, Poblete L A, et al. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 70: 433-444.
- [23] Tuan P A, Kim Y S, Kim Y, et al. Molecular characterization of flavonoid biosynthetic genes and accumulation of baicalin, baicalein, and wogonin in plant and hairy root of *Scutellaria lateriflora* [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(8): 1639-1647.
- [24] Li L, Gong X Y, Ren H K, et al. Increased polyphenols and antioxidant activity of rice bean (*Vigna umbellata* L.) sprouts induced by methyl jasmonate: The promotion effect of methyl jasmonate on rice bean sprouts [J]. *Food Sci Technol*, 2019, 39(Suppl 1): 98-104.
- [25] Ruan J J, Zhou Y X, Zhou M L, et al. Jasmonic acid signaling pathway in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2479.
- [26] 张儒, 谭时泉, 张变玲, 等. MeJA 响应的人参 PgJAZ1 基因克隆、表达与功能分析 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(10): 1964-1975.
- [27] Shoji T, Ogawa T, Hashimoto T. Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI₁ and JAZ genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(7): 1003-1012.
- [28] Afrin S, et al. JA-mediated transcriptional regulation of secondary metabolism in medicinal plants [J]. *Sci Bull*, 2015, 60(12): 1062-1072.
- [29] Sun Y Z, Niu Y Y, Xu J, et al. Discovery of WRKY transcription factors through transcriptome analysis and characterization of a novel methyl jasmonate-inducible PqWRKY1 gene from *Panax quinquefolius* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2013, 114(2): 269-277.
- [30] Liu T, Luo T, Guo X Q, et al. PgMYB2, a MeJA-responsive transcription factor, positively regulates the dammarenediol synthase gene expression in *Panax ginseng* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2219.
- [31] Li, Y, Lin Y, Jia B, et al. Transcriptome analysis reveals molecular mechanisms underlying methyl jasmonate-mediated biosynthesis of protopanaxadiol-type saponins in *Panax notoginseng* leaves [J]. *J Plant Biology*, 2021(65): 29-42.

[责任编辑 时圣明]