

• 药材与资源 •

响应 MeJA 诱导的积雪草苷合成关键结构基因的 WGCNA 筛选及表达验证

苏慧君¹, 华 亮¹, 张冰冰¹, 罗 鸣², 苗玉煊^{1,2}, 刘大会^{1,2*}, 苏 威^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

摘要:目的 筛选茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 诱导下积雪草 *Centella asiatica* 中与三萜皂苷积累密切相关的结构基因, 并阐明其表达特征。方法 采用 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理积雪草植株, 利用高效液相色谱法测定不同时间点叶片中积雪草苷与羟基积雪草苷含量变化, 并结合转录组数据开展加权基因共表达网络分析, 筛选与皂苷积累相关的关键基因模块, 进一步通过 Mfuzz 时序聚类划分基因亚簇, 并经实时荧光定量 PCR 验证候选基因表达模式。结果 MeJA 处理显著促进积雪草苷与羟基积雪草苷积累, 含量分别提高 18.28% 和 14.58%。加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 共识别 33 个共表达模块, 其中 darkred 模块与积雪草苷含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。该模块中 286 个基因经 Mfuzz 聚类划分为 4 个亚簇, 其中 Cluster 1~3 共 239 个基因显著富集于萜类骨架、倍半萜及三萜生物合成途径。从中进一步鉴定出 28 个与积雪草苷合成直接相关的结构基因, 其表达模式与皂苷积累趋势一致。qRT-PCR 验证确认 11 个参与三萜骨架合成与修饰的关键基因在 MeJA 诱导后均显著上调, 与转录组结果一致。结论 MeJA 通过协同调控 darkred 模块中 11 个关键结构基因的表达, 促进积雪草三萜皂苷生物合成。从多组学整合与实验验证角度揭示了 MeJA 对积雪草三萜皂苷积累的影响及相关基因表达特征, 为后续功能解析与品种改良提供基因资源与理论依据。

关键词: 积雪草; 茉莉酸甲酯; 积雪草苷; 结构基因; 加权基因共表达网络分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)15-6045-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.15.021

Screening and expression verification of key structural genes for asiaticoside synthesis in response to MeJA induction based on WGCNA

SU Huijun¹, HUA Liang¹, ZHANG Bingbing¹, LUO Ming², MIAO Yuhuan^{1,2}, LIU Dahui^{1,2}, SU Wei^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

Abstract: Objective This study investigated the regulatory mechanism by which methyl jasmonate (MeJA) modulates triterpenoid saponin biosynthesis in Jixuecao (*Centella asiatica*). **Methods** Plants were treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA, and temporal changes in leaf asiaticoside and madecassoside contents were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Transcriptome data were analyzed using weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) to identify modules significantly correlated with asiaticoside accumulation, followed by Mfuzz clustering to refine gene subclusters. Expression patterns of candidate key genes were validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** MeJA treatment markedly promoted asiaticoside and madecassoside accumulation, increasing their contents by 18.28% and 14.58%, respectively. WGCNA revealed 33 co-expression modules, with the darkred module displaying a highly significant positive correlation with asiaticoside content ($P < 0.01$). Mfuzz clustering subdivided the 286 genes in this module into four subclusters; Notably, 239 genes in Clusters 1–3 were significantly enriched in the terpenoid backbone biosynthesis, sesquiterpenoid biosynthesis, and triterpenoid biosynthesis pathways. Twenty-eight structural genes directly involved in asiaticoside synthesis were identified, exhibiting expression profiles closely aligned with saponin accumulation. qRT-PCR

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32500333); 湖北省中医药管理局中医药创新团队项目 (ZY2025J002); 中央本级重大增

减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

作者简介: 苏慧君, 硕士研究生, 研究方向为中药资源及其品质研究。E-mail: shj13545708117@163.com***通信作者:** 刘大会, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及其品质研究。E-mail: liudahui@hbucom.edu.cn

苏 威, 讲师, 研究方向为中药资源及其品质研究。E-mail: suwei123@hbucom.edu.cn

confirmed significant MeJA-induced upregulation of 11 key structural genes associated with triterpenoid backbone synthesis and modification, consistent with the transcriptome findings. **Conclusion** MeJA enhances triterpenoid saponin biosynthesis in *C. asiatica* through coordinated upregulation of these 11 key structural genes within the darkred module. By integrating multi-omics profiling with experimental validation, this work systematically elucidates the molecular mechanisms underlying MeJA-induced triterpenoid saponin accumulation, offering valuable candidate genes for future functional characterization and genetic enhancement of *C. asiatica*.

Key words: *Centella asiatica* (L.) Urban; MeJA; asiaticoside; structural gene; WGCNA

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 作为伞形科积雪草属多年生草本植物, 药用历史悠久^[1]。我国传统医学典籍《神农本草经》中记载, 积雪草味苦、性寒, 在治疗身体高热、恶疮溃疡等方面展现出独特疗效。现代药理研究进一步揭示了积雪草的药用潜力, 其富含的三萜皂苷类成分, 如积雪草苷、羟基积雪草苷等, 具备促进创口愈合、抗皮肤瘢痕形成、抗炎、抗氧化、抗糖尿病和神经保护等广泛的生理活性^[2], 在医药和化妆品行业领域应用广泛^[3]。

积雪草三萜皂苷的生物合成途径涉及多个关键步骤和酶的参与。目前的研究已初步揭示, 其合成起始于甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径, 这 2 条途径共同为三萜皂苷的合成提供前体物质异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)。IPP 和 DMAPP 在一系列酶的催化下, 逐步缩合形成法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), FPP 在鲨烯合酶 (squalene synthase, SQS) 的催化下缩合生成鲨烯, 鲨烯再经鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 催化氧化生成 2,3-氧化角鲨烯, 这是三萜皂苷合成的关键中间体。2,3-氧化角鲨烯在不同的氧化鲨烯环化酶 (oxidosqualene cyclase, OSC) 的作用下, 可生成多种三萜类骨架, 如 α -香树脂醇、 β -香树脂醇等, 这些骨架经过细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP450) 和糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 等的修饰, 最终形成各种结构复杂的积雪草三萜皂苷。在关键酶基因研究方面, 已有多个与积雪草三萜皂苷生物合成相关的基因被克隆和鉴定。例如, α -香树脂醇合酶基因, 其编码的酶能够催化 2,3-氧化角鲨烯环化生成 α -香树脂醇, 是积雪草三萜皂苷合成途径中的关键酶^[4]。CYP450 基因家族中的一些成员, 如 CYP716A83、CYP716C11 和 CYP714E19 等, 参与了三萜骨架的氧化修饰过程^[5], 对积雪草三萜皂苷的结构多样性和生物活性起着

决定性作用。UGT 基因家族中的 CaUGT73C7、CaUGT73C8 等基因^[6], 负责将糖基转移到三萜皂苷的特定位置, 完成糖基化修饰, 赋予其结构和功能的多样性。

茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 作为植物体内重要的信号分子, 在诱导植物次生代谢物合成方面展现出显著的调控作用, 其作用机制涉及多个层级的信号转导和转录调控途径。在信号转导途径中, MeJA 首先与受体 COI1 结合, 形成 MeJA-COI1 复合物, 该复合物能够识别并结合 JAZ 蛋白, 导致 JAZ 蛋白的降解^[7]。JAZ 蛋白是茉莉酸信号途径的抑制因子^[8], 其降解解除了对下游转录因子的抑制, 从而激活一系列与次生代谢相关基因的表达。在众多植物中, MeJA 对次生代谢物合成的诱导作用得到了广泛验证。在丹参中, MeJA 处理能够显著上调丹参酮生物合成途径中关键酶基因的表达, 如 DXS (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatesynthase)、DXR (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase)、HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) 等, 进而促进丹参酮的合成与积累^[9]。在青蒿中, MeJA 诱导青蒿素合成相关基因如 ADS (amorpha-4,11-dienesynthase)、CYP71AV1 (cytochrome P450 monooxygenase) 等的表达, 显著提高青蒿素的产量^[10]。已有研究表明, 外源施加 MeJA 能够在一定程度上提高积雪草中三萜皂苷的含量, 但其作用机制尚不明晰。

本研究以积雪草叶片为材料, 通过设置不同 MeJA 处理时间梯度, 采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定积雪草苷与羟基积雪草苷等主要三萜皂苷含量, 并结合 qRT-PCR 技术分析三萜皂苷合成途径中关键酶基因 (如 OSC、CYP450、UGT、SQS、SE 等) 的表达变化, 系统探究 MeJA 对积雪草三萜皂苷合成的诱导效应及相关基因的调控规律, 以期阐明关键基因表达与三萜皂苷积累之间的关联机制, 为深入解析积雪草三萜皂苷生物合成调控途径提供前期基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

积雪草来源于湖北中医药大学药用植物园,经湖北中医药大学刘大会教授鉴定为积雪草 *C. asiatica* (L.) Urban。选取生长一致、无病虫害的两年生苗,移栽至人工气候室中适应性培养 2 周后进行处理。MeJA 工作液浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,采用叶片喷施法均匀喷洒至叶片正反面,每株喷施 20 mL,喷施 1 次。分别于喷施后 0、6、12、24 h 采集叶片,液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续分析。每个处理设 3 个生物学重复,每个重复选取 6~10 株。

1.2 仪器与试剂

T100 型普通 PCR 仪,美国伯乐生命科学公司;Archimed R4 型实时荧光定量 PCR 仪,湖南艾科瑞生物工程有限公司;5420 型离心机,德国艾本德股份有限公司;DYCP-32B 型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;LC-2023C 3D Plus 型高效液相色谱仪,日本岛津公司;Nano-300 型微量分光光度计,杭州奥盛仪器有限公司。

本实验所用引物由生工生物工程(武汉)有限公司合成。积雪草苷(货号 B20586)、羟基积雪草苷(货号 B20969)对照品购自上海源叶生物有限公司;乙腈(货号 AS1122-801)购自安徽天地高纯溶剂有限公司;甲酸(货号 F112034)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;总 RNA 提取试剂盒(货号 AG21023),购自北京天漠科技开发有限公司;Evo M-MLV 反转录试剂盒(货号 AG11705),SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(货号 AG11701)均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

2 方法

2.1 积雪草苷含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 将不同处理时间的积雪草叶片进行真空冷冻干燥 48 h,粉碎后过 60 目筛,密封保存备用。分别精密称定 0.5 g,加入 20 mL 80%甲醇定容,称定质量,超声处理(200 W, 40 kHz) 30 min,放冷后补足失去质量,摇匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用 0.22 μm 有机滤膜滤过后用于高效液相色谱检测。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定积雪草苷、羟基积雪草苷对照品各 2 mg,用甲醇溶解并定容,得

到 2.0 mg/mL 混合对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 采用岛津高效液相色谱仪(Shimadzu HPLC)进行检测,色谱柱为 Shim-pack GIST C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)。流动相组成为 A 相为 0.1%甲酸水溶液, B 相为乙腈。采用梯度洗脱程序: 0~15 min, 90%~60% A; 15~25 min, 60%~30% A; 25~45 min, 30%~10% A; 45~55 min, 10%~90% A; 55~60 min, 10%~90% A。总运行时间为 60 min。体积流量 0.8 mL/min,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 205 nm,进样体积 10 μL 。

2.1.4 线性回归方程的绘制 精密吸取“2.1.2”项混合对照品溶液适量,制成 200、100、80、60、40、20、10 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液。以积雪草苷和羟基积雪草苷质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得积雪草苷标准曲线回归方程 $Y=1\,687.6X+12\,021$, $R^2=0.993\,0$,羟基积雪草苷标准曲线回归方程 $Y=1\,771.6X+34\,393$, $R^2=0.995\,0$,结果表明积雪草苷和羟基积雪草苷在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 重复性、精密度、稳定性及加样回收率 按照“2.1.3”项下色谱条件,对平行制备 6 份供试品溶液,及制备后 0、6、12、24、36、48 h 进样,另取一份供试品溶液,连续进样 6 次,进行重复性试验、精密度试验、稳定性试验,结果显示 $\text{RSD}<5\%$ 。积雪草苷和羟基积雪草苷的加样回收率处于 95%~105%, RSD 均 $<5\%$,表明该方法准确度良好。

2.2 RNA 提取和 cDNA 反转录

将积雪草叶片样本于液氮中迅速研磨至细粉状,采用植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,实验步骤按试剂盒说明书进行。所提取 RNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并利用 NanoDrop 超微量分光光度计测定其浓度与纯度。质量检测合格的 RNA 样品,依据反转录试剂盒说明书步骤,反转录合成 cDNA,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.3 转录组数据分析

本研究所用 MeJA 处理后积雪草叶片转录组原始测序数据已提交至 NCBI SRA 数据库,登录号为 PRJNA1121499,相关数据来源于已发表文献^[11-12]。首先使用 Fastp 对原始测序数据(raw reads)进行质控与过滤,获得高质量测序数据(clean reads)。随后,利用 HISAT2 将 clean reads 比对至积雪草参考基因组,并通过 featurecount 计算各基因的表达量,采用 TPM(transcripts per million reads)值表示。

2.4 WGCNA 与 Mfuzz 共表达网络构建及模块分析

筛选 TPM>1 且样本间变异系数 (CV) >0.1 的转录组数据进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA)。通过一步法网络构建与模块检测,生成无尺度共表达网络,设定模块最小基因数为 30,并通过合并特征向量高度相似 (相关系数>0.80) 的模块,获得最终稳定模块。为进一步精细解析关键模块内基因的时序表达模式,采用 Mfuzz 时序聚类分析对选定模块中的所有基因进行软聚类。通过模糊 C 均值聚类算法将其划分为若干具有相似表达动态的亚簇,依据隶属度>0.7 筛选每个亚簇的核心基因,从而获得在 MeJA 诱导过程中可能发挥关

键调控作用的核心基因集。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

以积雪草 *elF4α* 为内参基因,使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行 qRT-PCR 检测。使用软件 Primer Premier 5 设计特异性引物,引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 反应体系总体积 20 μL,含 10 μL 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix、上游和下游引物各 0.4 μL、cDNA 2.0 μL、ddH₂O 7.2 μL。qRT-PCR 循环参数为: 95 °C、30 s, 1 个循环; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。每个样本 3 个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 积雪草苷合成途径候选基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Candidate genes for asiaticoside synthesis pathway qRT-PCR primers

引物名称	序列 (5'-3')	引物名称	序列 (5'-3')
<i>elF4α</i> _F	GGTGGTTCCAGCGAACAGAA	<i>CasHDR</i> _RT_R	ATGATGGAATCCGCGTTC
<i>elF4α</i> _R	CCCATCTCGTCGAAGCTCAT	<i>CasGPS</i> _RT_F	TCTTTGAGCCCATGCACAAC
<i>CasHMGR</i> _RT_F	TGGGACAGTGTTCGAAATG	<i>CasGPS</i> _RT_R	AGGCAGCGATGCATAAAGAG
<i>CasHMGR</i> _RT_R	TTTGCAACCCCGATTAGTGC	<i>CasSE</i> _RT_F	CCAAGAATGGCCAAGAAGTGTG
<i>CasDXR</i> _RT_F	TTCAAGCTGGGGTTGTGTTG	<i>CasSE</i> _RT_R	AACCAACAAAGCACGATGGC
<i>CasDXR</i> _RT_R	TGGTGCTTGCTGTACTGAAC	<i>CasSS</i> _RT_F	TGGTCACGAATGCTTTGCTG
<i>CasACAT</i> _RT_F	AGGAAAGCCGGCAACAATTG	<i>CasSS</i> _RT_R	GCACAAACCGGAAGATAGCAG
<i>CasACAT</i> _RT_R	ATTGCCAGCAGTGACAGTTC	<i>CasOSC4</i> _RT_F	ACGACGGCTGTTAAGAAAGC
<i>CasFPS</i> _RT_F	TTTGATCACACCCTTGTCG	<i>CasOSC4</i> _RT_R	TGTCAATTGCTCCGCTGATG
<i>CasFPS</i> _RT_R	AAGAAGTGCACAAGCCACTG	<i>CasCYP74A</i> _RT_F	TTGCGACCTGCTTCAATTTCG
<i>CasMVK</i> _RT_F	ACGCATCAAGTCAAGCATGC	<i>CasCYP74A</i> _RT_R	TTGTACATTTCCGCCGTTG
<i>CasMVK</i> _RT_R	TCCACAGCATTGAACACAGC	<i>CasCYP74A1</i> _RT_F	AATCTTGGGCGTTGCAGAAG
<i>CasHDS2</i> _RT_F	CAGGAAAAAGACTGGCAGTGAC	<i>CasCYP74A1</i> _RT_R	TTCAGCACCTTCCAGTACCATC
<i>CasHDS2</i> _RT_R	AACTGATTTGCGGCCCAAAG	<i>CasCYP716A1a</i> _RT_F	GGCAAGCAATGTGTGAAACC
<i>CasPMK</i> _RT_F	TTCAGTGTGCGTCTTTGAGC	<i>CasCYP716A1a</i> _RT_R	AGGGTTCATATGCACTGTGC
<i>CasPMK</i> _RT_R	AGGGTTGCATATGCTGTTGC	<i>CasCYP716A1b</i> _RT_F	TCGCAGAAAGGGTTTTTGCC
<i>CasMVD</i> _RT_F	AGCATTGCTGTTTACGCTTGC	<i>CasCYP716A1b</i> _RT_R	TTCATTGCCAAAGGGGACAC
<i>CasMVD</i> _RT_R	AGTTTCCTTTTGCCGTGCAC	<i>CasCYP716A</i> _RT_F	ACCGTCTCAAGTCGCAAAAC
<i>CasHMGS</i> _RT_F	AGCCCAGCAGGTTTCAAAG	<i>CasCYP716A</i> _RT_R	TTCCCTGATGCGTTTGGATG
<i>CasHMGS</i> _RT_R	TGCCGTTCAAGTGTGTTATGC	<i>CasUGT94E5a</i> _RT_F	CACACAACAAATGGGTTGCC
<i>CasDXS</i> _RT_F	AGGCAAACCTTGTGGACTTGC	<i>CasUGT94E5a</i> _RT_R	AAATTGGGTCGCGCCATATC
<i>CasDXS</i> _RT_R	AACAAGTCTCTGCCAACAGC	<i>CasUGT94E5b</i> _RT_F	TGCCTTTGAAATGGCCAGTC
<i>CasMDS</i> _RT_F	TTTGTGCAAGCTGCTTGGTG	<i>CasUGT94E5b</i> _RT_R	TGGACGGCAGGGATTTTATAGG
<i>CasMDS</i> _RT_R	CAAGGCTGTCCACCTTTTCATG	<i>CasUGT73Ca</i> _RT_F	AGCTTCACTTCGTGTTGGTG
<i>CasIDI</i> _RT_F	TGTGGACAAACACCTGTTGC	<i>CasUGT73Ca</i> _RT_R	TCGCTGCGCCAGTATTTTC
<i>CasIDI</i> _RT_R	TCCAAAAGCTTCTCTGTGC	<i>CasUGT73Cb</i> _RT_F	ATTTGTGGTGCCGGGTTTAC
<i>CasHDS1</i> _RT_F	AACCTGCAGCAAGGAGTGTC	<i>CasUGT73Cb</i> _RT_R	TCCGTGGCTTTCAACTTGTC
<i>CasHDS1</i> _RT_R	AGTTGACCAGTCTGCGTTG	<i>CasUGT76E2</i> _RT_F	TCCTCCTCCAACCTCCATCTTG
<i>CasHDR</i> _RT_F	TTTGTGACGCCACTCAAGAG	<i>CasUGT76E2</i> _RT_R	TGGCCGAAAACCTTGCTGTG

3 结果与分析

3.1 MeJA 对积雪草叶片积雪草苷含量的影响

为明确外源诱导对积雪草次生代谢产物积累的影响,首先分析了 MeJA 处理后叶片中主要活性成分的动态变化。采用 200 μmol/L MeJA 对植株叶片进行喷施处理,并于处理后 0、6、12、24 h 分别取样,利用高效液相色谱法 (HPLC) 测定积雪草苷

与羟基积雪草苷含量变化。结果表明,MeJA 处理显著促进了 2 种三萜皂苷的积累 (图 1)。积雪草苷含量在处理后 24 h 内呈持续上升趋势,由 4.76 mg/g 提高至 5.63 mg/g (图 1-A),提高了 18.28%;羟基积雪草苷在 24 h 内逐渐积累,由 5.83 mg/g 提高至 6.68 mg/g,提高了 14.58% (图 1-B)。以上结果表明外源 MeJA 能有效激活积雪草叶片中

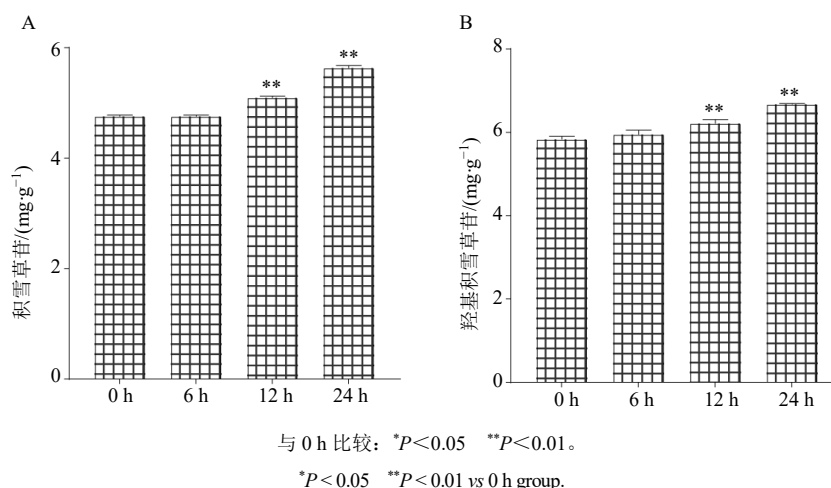


图 1 MeJA 处理对积雪草叶片中积雪草苷 (A) 与羟基积雪草苷 (B) 含量的影响

Fig. 1 Effects of MeJA treatment on contents of asiaticoside (A) and madecassoside (B) in *C. asiatica* leaves

三萜皂苷的生物合成途径,促进积雪草苷和羟基积雪草苷的积累。

3.2 转录组测序数据质控与比对分析

为从分子水平解析 MeJA 诱导积雪草三萜皂苷积累的调控机制,本研究对不同处理时间的叶片样本进行了转录组测序。所有样本的原始测序数据经 fastp 质

控过滤后, clean reads 数据量介于 $6.430 \sim 8.563 \times 10^7$, Q_{30} 碱基比例均高于 92%。进一步将 Clean reads 比对至积雪草参考基因组,结果显示各样本的比对率维持在较高水平 (96.20%~98.33%) (表 2)。上述数据表明,测序质量可靠,为后续利用 WGCNA 筛选关键共表达模块奠定了准确的数据基础。

表 2 转录组测序数据质量与比对统计

Table 2 Quality assessment and alignment statistics of RNA-seq data

样品名称	原始测序reads($\times 10^7$)	过滤后reads($\times 10^7$)	过滤后数据质量 (Q_{30} 比例/%)	比对到基因组的reads数	比对率/%
MeJA_0h_1	7.774	7.771	92.59	74.83	96.29
MeJA_0h_2	8.566	8.563	92.22	82.70	96.58
MeJA_0h_3	6.650	6.648	92.32	63.98	96.24
MeJA_6h_1	8.556	8.553	92.22	82.83	96.73
MeJA_6h_2	6.978	6.976	92.59	67.47	96.72
MeJA_6h_3	6.431	6.430	92.05	61.86	96.20
MeJA_12h_1	7.670	7.663	95.37	75.29	98.25
MeJA_12h_2	6.775	6.770	94.50	66.48	98.20
MeJA_12h_3	7.300	7.293	94.64	71.14	97.54
MeJA_24h_1	6.724	6.718	94.94	65.92	98.13
MeJA_24h_2	7.555	7.554	95.07	74.28	98.33
MeJA_24h_3	8.053	8.052	95.23	79.12	98.26

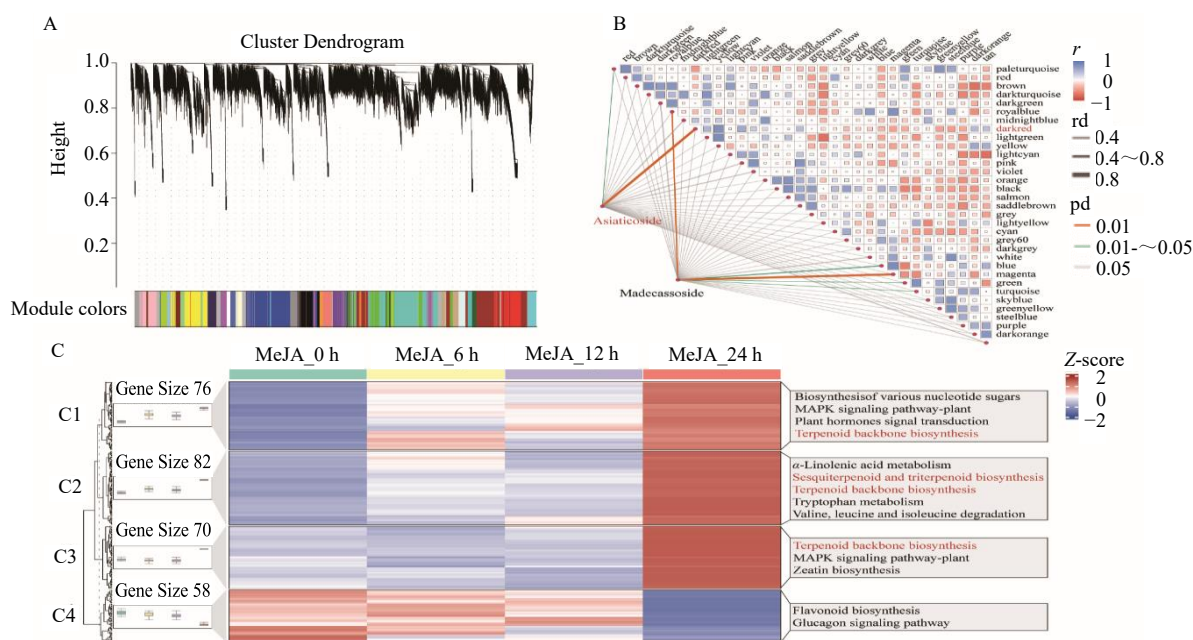
3.3 基于 WGCNA 的积雪草三萜皂苷合成相关基因模块筛选

在获得高质量转录组数据的基础上,为进一步从表达谱筛选调控三萜皂苷合成的核心基因集,开展了加权基因共表达网络分析 (WGCNA)。本研究整合了 0、6、12、24 h 4 个时间点的转录组数据,共包含 25 201 个基因。经筛选剔除低表达及低波动基因后,最终保留 23 495 个基因用于网络构建。通过构建无尺度共表达网络,所有基因被划分为 33 个共表达模块 (图 2-A)。为建立基因表达与代谢产物积累之间的直接联系,进一步通过模块-代谢物

相关性分析发现, darkred、royalblue 及 magenta 模块与积雪草苷、羟基积雪草苷含量均呈极显著正相关 ($|r| > 0.8$, $P < 0.01$) (图 2-B)。结果表明,这 3 个模块中的基因在响应 MeJA 诱导的三萜皂苷生物合成过程中发挥关键调控作用,其中 darkred 模块与积雪草苷相关性最高,用于后续功能富集分析。

3.4 关键模块的表达模式与功能通路富集分析

由于积雪草苷在 MeJA 处理后呈现显著的积累,同时其也是药典的标志性活性成分,所以进一步分析与积雪草苷显著相关的 darked 模块。利用 Mfuzz



A-MeJA 处理下基因共表达模块树形图; B-代谢物与模块相关性热图; C-4 个基因簇 (clusters) 的时间表达和 KEGG 富集结果。

A-dendrogram of gene co-expression modules under MeJA treatment; B-heatmap of correlations between metabolites and modules; C-time-course expression profiles and KEGG enrichment results of the four gene clusters.

图 2 MeJA 处理下积雪草转录组与代谢物相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of transcriptome and metabolites in *C. asiatica* under MeJA treatment

聚类将 darkred 模块中的 286 个基因划分为 4 个亚簇 (clusters, 图 2-C)。为了明确各亚簇基因的功能, 对其进行了 KEGG 通路富集分析。结果显示, cluster 1~3 (共 239 个基因) 表现出随 MeJA 诱导时间延长而协同上调的趋势, 且共同显著富集于“萜类骨架生物合成”及“倍半萜和三萜生物合成”途径。这一发现有力地证明了 darkred 模块中的多数基因直接参与了三萜皂苷的代谢调控, 构成了 MeJA 诱导下积雪草苷合成的核心候选基因集。

3.5 MeJA 诱导下积雪草苷生物合成途径关键结构基因的挖掘

基于上述功能富集结果, 从 darkred 模块中筛选出 28 个直接参与积雪草苷生物合成的候选结构基因。这些基因涵盖了三萜合成的全过程, 包括上游 MVA 和 MEP 通路的骨架构建相关基因 (如 *CasHMGR*、*CasDXS*、*CasDXR* 等)、中间关键酶基因 (如 *CasSS*、*CasSE*、*CasOSC4*) 以及末端氧化修饰与糖基化基因 (如 *CasCYPs*、*CasUGTs*)。结合热图分析 (图 3) 发现, 这 28 个基因在 MeJA 处理后的表达模式具有高度的一致性。多数上游骨架基因 (如 *CasHMGS*、*CasMVD*) 在 MeJA 诱导 6 h 后即呈现明显的上调趋势, 为下游产物合成提供了充足的前体产物支撑。下游修饰基因 (如

CasCYP716A1a、*CasUGT73Ca*) 在 24 h 维持较高水平的表达。所有候选基因的表达水平变化与“3.1”项测得的积雪草苷含量积累变化趋势基本一致 (图 1-A 和图 2)。上述结果表明, MeJA 并非通过单一基因起作用, 而是通过协同激活三萜皂苷合成通路的结构基因, 从而促进了积雪草苷的积累。

3.6 关键候选基因的表达模式验证

为验证转录组测序数据的可靠性, 并进一步确认响应 MeJA 诱导的核心调控节点, 本研究对 28 个候选结构基因进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 结果表明 *CasHMGR*、*CasDXR*、*CasACAT*、*CasFPS*、*CasMVK*、*CasMVD*、*CasHMGS*、*CasDXS*、*CasHDS1*、*CasCYP74A* 等 11 个基因在 MeJA 处理后的表达水平均显著上调, 且其转录水平的动态变化趋势与 RNA-seq 结果 (图 4) 一致。经实验验证的这 11 个基因中, 除 *CasCYP74A* 外, 其余 10 个均定位于角鲨烯 (Squalene) 生物合成的上游骨架构建阶段。结果表明外源 MeJA 对积雪草苷积累的促进作用, 可能主要源于其对三萜皂苷合成通路前期前体物的强烈驱动。

4 讨论

植物次生代谢产物的积累往往受环境信号分子的精准调控。本研究发现, 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理后, 积雪草叶片中积雪草苷和羟基积雪草苷含量

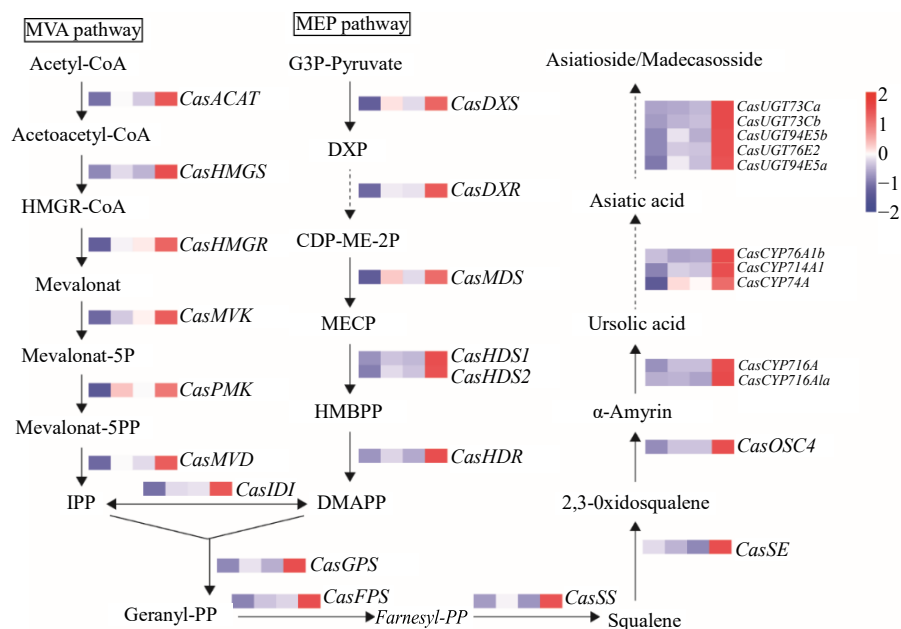
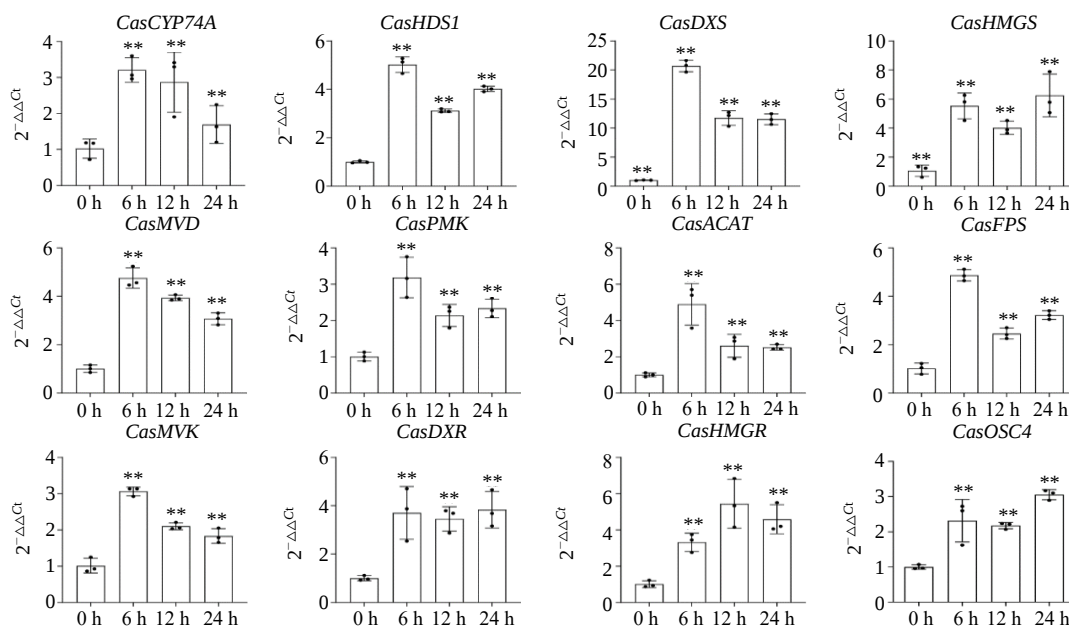


图 3 积雪草中积雪草苷生物合成途径的结构基因表达分析

Fig. 3 Expression analysis of structural genes involved in asiaticoside biosynthetic pathway in *C. asiatica*



**表示与 0 h 基因表达量相比 存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

**indicates a highly significant difference compared with the gene expression level at 0 h ($P < 0.01$).

图 4 部分结构基因 qRT-PCR 结果验证

Fig. 4 Validation of selected structural genes by qRT-PCR

显著增加 (图 1)，这与在前人研究中 MeJA 诱导各类药用植物次生代谢产物积累的模式一致^[11]。在三萜皂苷生物合成路径中，从起始的前体供给到末端的结构修饰是一个高度复杂的协同过程。本研究通过 WGCNA 筛选得到的 darkred 模块与积雪草苷

含量呈极显著正相关，进一步分析发现，该模块不仅包含了萜类合成的关键限速酶，还富集了负责结构多样化修饰的下游基因。

值得注意的是，热图分析显示 (图 3)，在 MeJA 诱导下差异表达显著且数量最多的是下游的 *CYP450*

和 *UGT* 基因家族。这表明 MeJA 对积雪草苷生物合成的促进作用并非单纯依赖于某一代谢过程,而是通过全路径协同激活实现的。MeJA 信号不仅驱动了上游骨架合成基因的表达以增加前体供给,更大幅度地增强了下游氧化和糖基化的修饰效率,确保了代谢流能顺畅地从基础骨架向最终产物转化。

高通量测序与 WGCNA 分析为解析复杂代谢途径提供了系统视角。本研究筛选出的 28 个核心结构基因覆盖了积雪草苷合成的全过程,其中 11 个基因。在下游修饰阶段,C-28 位的连续氧化和多步糖基化是决定产物种类的关键^[13]。本研究筛选得到的 5 个 *CYP450* 基因在 MeJA 诱导后均显著上调,结合其时序表达特征推测,这些基因主要参与了从 α -香树脂醇出发,历经熊果酸、2,3-二羟基熊果酸最终生成积雪草酸的连续氧化过程。随后,筛选出的 5 个 *UGT* 基因则负责执行精细的“糖基修饰指令”。根据代谢路径推导,这些 *UGT* 可能介导了从积雪草酸向积雪草酸单糖苷、二糖苷直至最终形成积雪草苷的逐级糖基化过程。这与在忍冬^[13]、丹参^[4]等研究中观察到的多基因协同调控现象相吻合,表明这种从氧化到糖基化的基因簇协同上调,可能是 MeJA 处理后积雪草中多种三萜皂苷含量同步升高的原因。

在高等植物中,所有萜类化合物的基本五碳单元是由 IPP 和 DMAPP 通过 MEP 和 MVA2 个独立的代谢途径合成。本研究中,MEP 途径的 *CasDXS* 和 MVA 途径的 *CasHMGR* 受到 MeJA 强烈诱导(图 4),且 qRT-PCR 验证其表达模式与皂苷积累趋势高度一致。在丹参的研究中,*DXS* 和 *HMGR* 已被证实是编码萜类合成通路的关键限速酶^[16]。本研究筛选得到的 *CasDXS* 和 *CasHMGR* 可能作为积雪草苷合成路径的限速酶,在 MeJA 信号转导早期快速响应,为下游 *CYP450* 和 *UGT* 提供前体积累,从而醋精实现积雪草苷的积累。

综上所述,本研究基于 MeJA 处理下积雪草叶片转录组数据,结合 WGCNA 和 Mfuzz 分析筛选出 1 个与其相关的特异性模块,并筛选出 *CasDXS*、*CasHMGR* 等 11 与积雪草苷合成密切相关的核心结构基因,为进一步探究积雪草苷响应 MeJA 诱导积累的分子机制提供前期理论基础和基因资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 56.

- [2] 秦慧真,林思,邓玲玉,等. 积雪草苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(21): 2683-2688.
- [3] 陈渝旭,许沉瑜,张婧卿,等. 积雪草在化妆品中的研究与应用进展 [J]. 中国化妆品, 2023(4): 119-124.
- [4] Song Y T, Zhang Y T, Wang X, *et al.* Telomere-to-telomere reference genome for *Panax ginseng* highlights the evolution of saponin biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(6): uhac107.
- [5] Miettinen K, Pollier J, Buyst D, *et al.* The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14153.
- [6] Han X Y, Zhao J Y, Zhou H, *et al.* The biosynthesis of asiaticoside and madecassoside reveals tandem duplication-directed evolution of glycoside glycosyltransferases in the Apiales [J]. *Plant Commun*, 2024, 5(10): 101005.
- [7] Munemasa S, Oda K, Watanabe-Sugimoto M, *et al.* The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis* guard cells. specific impairment of ion channel activation and second messenger production [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1398-1407.
- [8] Monte I, Caballero J, Zamarreño A M, *et al.* JAZ is essential for ligand specificity of the COI1/JAZ co-receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(49): e2212155119.
- [9] Li J, Li C L, Deng Y X, *et al.* Characteristics of *Salvia miltiorrhiza* methylome and the regulatory mechanism of DNA methylation in tanshinone biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2023, 10(7): uhad114.
- [10] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, *et al.* The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
- [11] Liu R, Wang Z R, Zheng J Y, *et al.* The effects of methyl jasmonate on growth, gene expression and metabolite accumulation in *Isatis indigotica* Fort [J]. *Ind Crops Prod*, 2022, 177: 114482.
- [12] Song W L, Chen B Z, Feng L, *et al.* Telomere-to-telomere genome assembly and 3D chromatin architecture of *Centella asiatica* insight into evolution and genetic basis of triterpenoid saponin biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2025, 12(5): uhaf037.
- [13] Yin X J, Xiang Y P, Huang F Q, *et al.* Comparative genomics of the medicinal plants *Lonicera macranthoides* and *L. Japonica* provides insight into genus genome evolution and hederagenin-based saponin biosynthesis [J]. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21(11): 2209-2223.
- [14] Feng L D, Yao Y J, Kang M H, *et al.* Integrated genomic, transcriptomic, and metabolomic analyses of *Ilex hylonoma* provide insights into the triterpenoid saponin biosynthesis [J]. *Plant J*, 2024, 120(3): 1176-1189.
- [15] Zhou Y, Yang Y Y, Chen L, *et al.* A MYC₂-like transcription factor regulates MeJA biosynthesis underlying flower fragrance in *Cymbidium faberi* [J]. *Ind Crops Prod*, 2025, 235: 121818.
- [16] Zhang W H, Zhang J Z, Fan Y D, *et al.* RNA sequencing analysis reveals PgbHLH28 as the key regulator in response to methyl jasmonate-induced saponin accumulation in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Hortic Res*, 2024, 11(5): uhac058.

[责任编辑 时圣明]