



模拟干旱胁迫处理下北柴胡种苗 MYC2 基因的调控研究

王 晨^{1,2},胡珊群^{1,2},李 彤^{1,2},刘长利^{1,2*}

(1 首都医科大学 中医药学院,北京 100069; 2 中医络病研究北京重点实验室,北京 100069)

摘要:该研究以北柴胡一年生种苗为材料,使用质量分数为 10%、20% 的 PEG6000 营养液进行模拟干旱胁迫实验,检测北柴胡根内源信号物质 OPR、JA 含量,转录因子 *BcMYC2* 和柴胡皂苷生物合成途径中 4 个关键酶基因 *HMGR*、*IPPI*、*FPS*、 β -AS 表达量,以及柴胡皂苷 a、d 含量,探究模拟干旱胁迫下茉莉酸信号通路调控 *BcMYC2* 进而影响柴胡皂苷生物合成的机制。结果表明:(1) PEG6000 模拟干旱胁迫处理北柴胡种苗后,20% PEG6000 处理组根内 OPR 含量在 2 h 时出现峰值,10% PEG6000 处理组的根内 OPR 含量在 6 h 时出现峰值;两个胁迫组内源 JA 含量均在 2 h 时出现峰值。(2)两个胁迫处理组北柴胡根内 *BcMYC2* 相对表达量均在 2 h 处出现峰值,之后的 2~4 h 时间段内大幅度下降,且 20% PEG6000 处理组的 *BcMYC2* 相对表达量高于 10% PEG6000 处理组;其余 4 个柴胡皂苷生物合成途径关键酶基因 *HMGR*、*IPPI*、*FPS*、 β -AS 的相对表达量均在 4 h 时出现峰值,晚于 *BcMYC2* 相对表达量出现峰值的时间。(3)经模拟干旱胁迫处理后,北柴胡根内的柴胡皂苷含量在 36 d 内逐渐上升;在处理 36 d 时,20% PEG6000 处理组的柴胡皂苷含量略高于 10% PEG6000 处理组,且两处理组均显著高于对照组。研究发现,经 PEG6000 模拟干旱处理后,北柴胡根内信号物质 OPR 及 JA 含量提高,促进 *BcMYC2* 的表达,进而提高柴胡皂苷生物合成途径中的关键酶基因的表达,最终显著提高了根内柴胡皂苷的含量。

关键词:北柴胡; *BcMYC2*; 柴胡皂苷合成关键酶基因; 干旱胁迫; 柴胡皂苷

中图分类号:Q945.78; Q789; Q946.83 文献标志码:A

Regulation of MYC2 in *Bupleurum chinense* under Simulated Drought Stress

WANG Chen^{1,2}, HU Shanqun^{1,2}, LI Tong^{1,2}, LIU Changli^{1,2*}

(1 School of Traditional Chinese Medicine [TCM], Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: In this study, *Bupleurum chinense* was used as material, and the PEG6000 nutrient solution with a mass fraction of 10% and 20% was used to simulate drought stress experiments. The contents of endogenous signal substances OPR and JA, the expression of transcription factor *BcMYC2* and the key enzyme genes in the saikosaponin biosynthesis pathway, and the contents of saikosaponin a and d were detected for exploring the mechanism of jasmonic acid signaling pathway regulating *BcMYC2* and affecting saikosaponin biosynthesis under simulated drought stress. The results showed that: (1) after PEG6000 was used to simulate drought stress to treat the seedlings of *Bupleurum chinense*, the OPR content in the 20% PEG6000 treatment group showed a peak at 2 h, and the OPR content of the 10% PEG6000 treatment group peaked at 6 h. However, the endogenous JA peaked at 2 h for both treatments. (2) In both treat-

收稿日期:2021-04-22;修改稿收到日期:2021-08-28

基金项目:国家自然科学基金(81872947)

作者简介:王 晨(1995—),女,在读硕士研究生,主要从事中药资源学研究。E-mail: wangchen90022@163.com

* 通信作者:刘长利,博士,教授,博士生导师,主要从事中药资源学研究。E-mail: chaihuzy666@ccmu.edu.cn

ment groups, the relative expression of *BcMYC2* show a peak at 2 h and then decreased significantly in 2—4 h, and the relative expression of *BcMYC2* in 20% PEG6000 group was higher than that in 10% PEG6000 group. The relative expression of *HMGR*, *IPPI*, *FPS* and β -AS of the other four key enzymes of saikosaponin biosynthesis pathway reached the peak at 4 h. The peak time of relative expression of *BcMYC2* was earlier than the relative expression of these key enzyme genes. (3) Saikosaponin content in seedling roots gradually increased within 36 days after simulated drought stress. At 36 days, the content of saikosaponin in the 20% PEG6000 treatment group was slightly higher than that in the 10% PEG6000 treatment group. Studies have shown that after PEG6000 simulated drought treatment, the contents of signal substances OPR and JA in *Bupleurum chinense* DC. seedlings increased, which promoted the expression of *BcMYC2*, thereby increasing the expression of key enzyme genes in the saikosaponin biosynthetic pathway and ultimately affected the content of saikosaponin in roots.

Key words: *Bupleurum chinense* DC. ; *BcMYC2*; key enzyme genes for saikosaponin synthesis; drought stress; saikosaponin

柴胡是中国常用大宗中药材,药用历史悠久,始载于《神农本草经》,列为上品,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等功效,是中医临床治疗少阳证的首选药物。国家药典收录来源于伞形科柴胡属多年生草本植物柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)或狭叶柴胡(*Bupleurum scorzonerifolium* Wild.),其中柴胡是中药柴胡的主要基原,习称为“北柴胡”。柴胡皂苷(saikosaponin, SS)是从中药柴胡中提取的三萜皂苷类化合物,其中柴胡皂苷a、d是国家药典规定检测柴胡质量的指标性成分和国内外研究热点的生物活性成分^[1]。

茉莉酸(jasmonate acid, JA)及其衍生物茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)是植物在生物或非生物胁迫下抵御逆境条件的一个重要信号分子,它能够激活许多相关转录因子,调节植物防御反应。髓细胞组织增生蛋白(myelocytomatosis proteins, MYCs)转录因子在植物JA信号途径中处于重要位置,同时参与了多种信号途径之间的相互作用,其功能与植物激素应答、植物抗逆响应等密切相关^[2]。MYC2是植物JA信号通路中核心转录因子,当感应到来自外界的某些微生物、食草动物和机械损害、温度变化、干旱胁迫、盐胁迫等信号时,JA可在植物体内通过酶的作用甲基化生成MeJA, MeJA作为信号分子可进入植物细胞内,在细胞质中经酯酶水解成JA,进而在Jar 1 (Jasmonic acid resistant 1, Jar 1)酶的作用下与异亮氨酸(isoleucine, Ile)结合生成JA-Ile (JA-isoleucine, JA-Ile)。JA-Ile可与Skp1/Cullin 1/F-box protein COI 1(SCF^{COI})受体以及抑制蛋白(Jasmonate ZIM-domain, JAZ)结合^[3]。JAZ蛋白是MYC2的抑制剂,当两者结合在一起的时候,MYC2的转录激活作用被抑制^[4]。

JA-Ile和SCF^{COI}、JAZ蛋白结合以后,JAZ蛋白被泛素化和降解,MYC2被释放出来,进而与下游关键基因的启动子结合,调节关键酶基因的表达,从而影响植物的生长发育、对生物与非生物胁迫的反应及次生代谢产物的合成等^[5]。本课题组前期已成功克隆一条北柴胡MYC2基因(*BcMYC2*, GenBank accession number MT349674),并初步明确其可响应JA信号,参与调控柴胡皂苷的生物合成^[6]。

植物在生物或非生物胁迫下,茉莉酸信号通路被激活,内源茉莉酸类物质等信号分子含量增高,释放出相应的转录因子,激活植物次生代谢中关键酶基因的表达,促进植物次生代谢产物的合成并积累。干旱胁迫可影响植物生理功能,也是研究最多的逆境因子之一。目前在玉米^[6]、梭梭^[7]等植物中已验证转录因子可调控植物在干旱胁迫下的生理功能。因此,本研究选用聚乙二醇PEG6000作为模拟干旱胁迫渗透剂对北柴胡根部进行胁迫处理,在10%、20%浓度PEG6000胁迫处理不同时间后取样,用于检测信号物质OPR、JA含量, *BcMYC2*及各关键酶基因相对表达量,并且在胁迫0、1、3、6、12、24、36 d后取样,干燥后用于柴胡皂苷a、d含量分析,旨在探究模拟干旱胁迫下北柴胡种苗内茉莉酸信号通路调控 *BcMYC2*,进而影响柴胡皂苷生物合成的机制。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

试验材料一年生北柴胡于2020年10月采挖自北京市延庆区艾药园。经首都医科大学教授鉴定为北柴胡。Eastep Super总RNA提取试剂盒购自普洛麦格(上海)生物技术有限公司,KAPA SYBR[®] FAST Universal购自KAPA公司, FastKing RT

Kit (With gDNase) 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, Hoagland's(霍格兰氏)营养液购自雷根生物技术有限公司(北京), 聚乙二醇(PEG)6000 购自兰博利德生物技术有限公司(北京), 植物 12-氧-植物二烯酸还原酶(OPR)酶联免疫分析试剂盒购自酶免实业有限公司(江苏), 植物茉莉酸酶联免疫分析试剂盒购自酶联生物科技有限公司(上海), 磷酸缓冲盐溶液(PBS)购自 Biological Industries 公司, 柴胡皂苷 a、d 标品购自中国食品药品检定研究院, 甲醇、甲酸、氨水购自北京化工厂, 乙腈购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 模拟干旱胁迫处理

(1) 种苗选择: 将从北京市延庆区艾药园挖取的一年生北柴胡种苗清洗干净, 擦干称重, 从中挑选生长态势均一, 质量在 2.0~4.0 g 的植株备用, 将挑选后的植株置于 1/4 Hoagland's 营养液中培养 3 d, 适应环境。

(2) Hoagland's 营养液配制: 取适量的 Hoagland's 大量元素溶液、铁盐母液(400x)、微量元素母液(400x), 按 398:1:1 的比例充分混合, 即为 Hoagland's 营养液原液, 将原液与蒸馏水按 1:3 的比例充分混匀稀释得 1/4 Hoagland's 营养液。

(3) 胁迫处理液配制: 将称重后的 PEG6000 溶解于 1/4 Hoagland's 营养液中, 配置成质量分数为 10%、20% 的 PEG6000 溶液, 即为模拟干旱胁迫处理液。

(4) 胁迫处理及取样: 将北柴胡种苗分别置于对照组(1/4 Hoagland's 营养液)及含 10%、20% PEG 的 1/4 Hoagland's 营养液的 150 mL 锥形瓶中诱导, 以北柴胡根部接触营养液。分别于胁迫处理 0、2、4、6、8、10、12 h 取北柴胡根部组织, 每份样品取自 3 株不同植株, 放入离心管中, 液氮冷冻后放入 -80 °C 冰箱备用。

1.3 北柴胡根中 OPR 和内源茉莉酸含量测定

1.3.1 北柴胡根中 OPR 含量 使用植物 12-氧-植物二烯酸还原酶(OPR)酶联免疫分析试剂盒(Elisa 试剂盒)检测北柴胡根中内源 OPR 含量。将北柴胡的根解冻后精密称重装入 2 mL 离心管中, 使用球磨机研磨至粉末。向离心管中加入 1.5 mL 提取液(提取液体积比为甲醇:水:甲酸=15:4:1), 超声提取 30 min。将样品架于 80 °C 水浴锅中挥干提取液, 挥干后每份样品加入 100 μL PBS, 离心取上清液即得待测样品。按试剂盒操作步骤使用酶标仪检测毛状根中内源 OPR 含量。

结果计算: 以标准物的浓度为横坐标, OD 值为

纵坐标, 在 ElisaCalc 软件中绘制标准曲线并确定直线回归方程式。根据样品的 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。样品线性回归与预期浓度相关系数应在 0.95 以上。

1.3.2 北柴胡根中内源茉莉酸含量 以 1.3.1 中所得上清液为待测样品, 使用植物茉莉酸酶联免疫分析试剂盒检测北柴胡种苗根中内源茉莉酸含量。按试剂盒操作步骤使用酶标仪检测毛状根中内源茉莉酸含量。

结果计算: 在 Excel 工作表中, 以标准品浓度作为横坐标, 对应 OD 值为纵坐标, 绘制出标准曲线线形回归方程, 按曲线方程计算各样本浓度值。标准品线形回归与预期浓度相关系数应大于等于 0.990 0。

1.4 北柴胡根中 *BcMYC2* 及柴胡皂苷生物合成途径关键酶基因的相对表达量分析

使用 Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒提取毛状根 RNA。使用 FastKing RT Kit (With gDNase) 反转录试剂盒将其反转为 cDNA。使用 Quant Studio 5 仪器进行实时荧光定量 PCR 反应。根据基因序列利用 Primer 5.0 软件设计引物; 根据 *BcMYC2*、*Actin* (GenBank accession number FJ389747)^[8]、*HMGR* (GenBank accession number EU400217)^[9]、*IPPI* (GenBank accession number EU400218)^[10]、*FPS* (GenBank accession number EU400219)^[8]、*β-AS* (GenBank accession number EU400200)^[11] 核苷酸序列设计引物, 引物均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。使用表 1 内引物序列采用 RT-PCR 法检测 *BcMYC2* 及 *HMGR*、*IPPI*、*FPS*、*β-AS* 基因的相对表达量。

以 *Actin* 基因为内参, 将 cDNA 用无菌水稀释 10 倍为模板进行实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 反应。qRT-PCR 体系包括: 10.0 μL 2×Fast qPCR Master Mix, 0.4 μL Gene-qF, 0.4 μL Gene-qR, 1.0 μL cDNA, 0.4 μL 50×Rox Low, 7.8 μL ddH₂O, 总体积为 20.0 μL; qRT-PCR 程序为: 保温阶段: Step 1: 95.0 °C 3 min, 聚合酶链式反应阶段 Step 1: 95.0 °C, 3 s; Step 2: 60.0 °C, 30 s, 熔解曲线测定阶段 Step 1: 95.0 °C, 1 s, Step 2: 60.0 °C, 20 s, Step 3: 95.0 °C, 1 s。基因表达量运用“ $\Delta\Delta CT$ ”法^[12] 进行分析。

1.5 北柴胡根中柴胡皂苷含量测定

1.5.1 胁迫处理、取样及制备 采用 1.2 中方法用广口瓶进行模拟干旱胁迫处理, 分别于胁迫处理 0、

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
qHMGR-F	TATAACTGGCGATGTGGTGAAG
qHMGR-R	GTGGCTATGAAGATTGCAGAAC
qIPPI-F	AGGTGACATTCCCTTGGTG
qIPPI-R	AGAAGCTTCCTCTGTGCAGC
qFPS-F	CTCACACACGCAGAGGTCAA
qFPS-R	TGGGGATATGGTTGCGAAG
q β -AS-F	ACATGGCTTCGATACTCGG
q β -AS-R	ATTTTCGCTGGATGCATAGG
Actin-F	TGCCCGATGGTCAAGTTATC
Actin-R	GGATTCCCTGCAGCTCCATTG
qBeMYC2-F	TCTATGCCCTACGTGCTGTTG
qBeMYC2-R	GCGCTGGATGGTTCCCTTT

1、3、6、12、24、36 d 取北柴胡根部组织材料(每份材料取自 3 株不同植物), 将根部营养液擦干后放入-80 ℃冰箱备用。每隔 6 d 更换广口瓶中营养液, 但发现处理 12 d 后, 置于 1/4 Hoagland's 营养液中的北柴胡根出现局部逐渐腐烂现象, 取样时将腐败部分去除后放入冰箱备用。将全部样品从-80 ℃冰箱取出, 标记后装入信封中, 放入烘箱烘干。烘干后的样品使用枝剪剪成段, 放入混合型碾磨仪中粉碎 1 min 后备用。

1.5.2 柴胡皂苷含量测定 精密称取粉碎后的样品, 每份 0.2 g 左右, 提取、检测北柴胡根中柴胡皂苷 a、d 含量, HPLC 检测条件中对照品溶液取 15 μ L 进样。

(1) 对照品及供试品溶液制备: 分别精密称取柴胡皂苷 a、d 对照品 5.71、5.66 mg, 分别于 5 mL 容量瓶中用分析纯甲醇制成浓度为 1.040 mg · mL⁻¹、1.084 mg · mL⁻¹ 的溶液, 摆匀, 作为柴胡皂苷对照品溶液。精密称取全部干燥后的北柴胡根样品粉末于具塞锥形瓶中, 加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 10 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 抽滤后旋蒸回收溶剂, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摆匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液^[1]。

(2) 标准曲线的建立: 从柴胡皂苷 a 溶液中精密吸取 500、200、50、25、10 μ L 对照品溶液, 从柴胡皂苷 d 溶液中精密吸取 200、100、12.5、10、5 μ L 对照

品溶液分别置于 5 mL 容量瓶中, 并用分析纯甲醇定容至刻度, 摆匀, 滤过, 取续滤液, 得到对照品溶液, 取 15 μ L 按 HPLC 色谱条件进样, 以峰面积为纵坐标(Y), 溶液中物质的量为横坐标(X), 绘制标准曲线。柴胡皂苷 a 标准曲线为 $Y = 0.0031X - 0.0865$; 柴胡皂苷 d 标准曲线为 $Y = 0.0025X + 0.051$, $r = 0.9999$ 。

(3) HPLC 色谱条件: Agilent1200 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 检测波长为 210 nm; 流动相为纯水(A)乙腈(B); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 30 ℃; 进样量为 20 μ L; 洗脱方式为梯度洗脱, 具体梯度洗脱方式为: 0~5 min, A% 为 75%~65%, B% 为 25%~35%; 5~20 min, A% 为 65%~60%, B% 为 35%~40%; 20~30 min, A% 为 60%~40%, B% 为 40%~60%; 30~35 min, A% 为 40%~0%, B% 为 60%~100%; 35~40 min, A% 为 0%, B% 为 100%。

1.6 数据分析

使用 SPSS Statistics 17 软件中的单因素 ANOVA 分析方法, 输入数据经软件计算得 P 值, 判断数据组间是否有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 模拟干旱胁迫对北柴胡根中 OPR 含量的影响

采用 ELISA 试剂盒法测定北柴胡根中 OPR 含量, 构建的 OPR 含量标准曲线为 $Y = 0.02989 + 261.14507X$ ($R^2 = 0.98211$), 符合试剂盒中说明书要求; OPR 含量在 PEG6000 处理不同时间的表达情况如图 1 所示。其中, 对照组北柴胡根中 OPR 含量在检测期间比较稳定, 基本在 1.37~1.38 ng · g⁻¹ 范围内小幅波动。经 10%、20% PEG6000 处理 0~2 h 后, 北柴胡根内 OPR 含量呈逐渐升高趋势并高于对照组, 20% PEG6000 处理组在 2 h 处出现峰值 (1.944 ng · g⁻¹), 10% PEG6000 处理组在 2 h 处 OPR 含量为 1.471 ng · g⁻¹, 但不是该处理组的峰值。在 2~4 h 处理区间, 两处理组北柴胡根中 OPR 含量均明显下降, 大幅低于对照组。20% PEG6000 处理组内源 OPR 含量在 4 h 后逐渐上升, 之后趋于稳定; 而 10% PEG6000 处理组 OPR 含量在 4 h 后快速上升, 于 6 h 时处达到峰值 (1.548 ng · g⁻¹), 而在 6~10 h 之间再次大幅下降, 之后又上升并接近对照组水平。20% PEG6000 处理组内源 OPR 含量出现峰值的时间早于 10% PEG6000 处理

组,且峰值高于 10% PEG6000 处理组。

2.2 干旱胁迫对北柴胡根中内源茉莉酸含量的影响

采用 ELISA 试剂盒法测定北柴胡根中内源茉莉酸含量,构建的标准曲线为 $Y = 0.0425 + 10.47323X - 17.64892X^2$ ($R^2 = 0.99788$),符合试剂盒中说明书要求。检测得到的内源茉莉酸含量在 PEG6000 处理下不同时间的表达情况如图 2 所示。其中,对照组柴胡根内源茉莉酸含量在胁迫处理 0~8 h 之间逐渐下降,在 8~12 h 之间又逐渐上升。经模拟干旱胁迫处理后,北柴胡根中内源茉莉酸含量在 0~2 h 间呈逐渐升高趋势,10%、20% PEG6000 处理组均在 2 h 处出现峰值,分别达到 135.220 和 141.857 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。20% PEG6000 处理组根中内源茉莉酸含量在干旱胁迫 2~4 h 期间大幅下降,在 4~6 h 间快速上升,于 6 h 时达到第二个

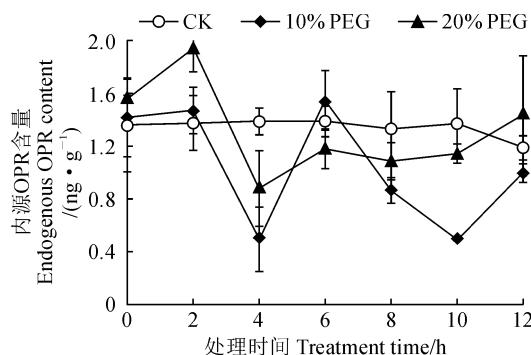


图 1 模拟干旱胁迫处理下不同时间北柴胡根中 OPR 的含量变化

Fig. 1 Changes of OPR content in the roots of *Bupleurum chinense* at different time points under drought stress

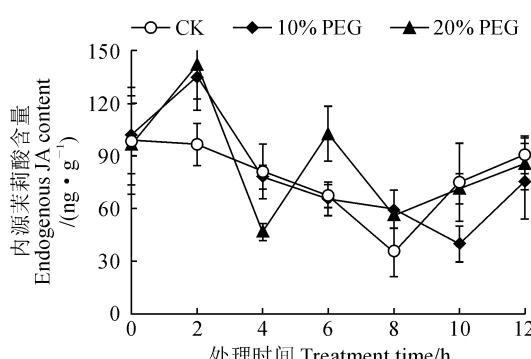


图 2 模拟干旱胁迫处理下不同时段北柴胡根中内源茉莉酸的含量变化

Fig. 2 Changes of endogenous JA content in the roots of *B. chinense* at different time points under drought stress

峰值($102.642 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$),之后再下降(6~8 h),然后缓慢上升(8~12 h)。10% PEG6000 处理组内源茉莉酸含量在处理 2 h 达峰值后逐渐下降,于 10 h 降至最低值,之后在 10~12 h 间又有所上升。

2.3 干旱胁迫对 *BcMYC2* 及柴胡皂苷生物合成途径关键酶基因的相对表达量影响

图 3, A 显示, *BcMYC2* 基因相对表达量在 PEG6000 处理 2 h 时最高,此时 20% PEG6000 和 10% PEG6000 处理组远高于对照组,而 20% PEG6000 处理又高于 10% PEG6000 处理;20% 和 10% PEG6000 处理组 *BcMYC2* 基因相对表达量在处理 2~4 h 期间大幅下降,在处理 4 h 之后小幅波动整体趋于平缓,10% PEG6000 处理的基因相对表达量在 4~8 h 间略有波动。

同时,柴胡皂苷生物合成途径中 4 个关键酶基因 *HMGR*、*FPS*、*IPPI*、 β -AS 在 20% 和 10% PEG6000 处理下的表达情况如图 3, B~E 所示。其中,20% PEG6000 处理组 4 个关键酶基因相对表达量峰值均出现在胁迫 4 h 处,而 10% PEG6000 处理组各关键酶基因表达量峰值均出现在胁迫 6 h 处,且各基因相对表达量峰值处表现为 20% PEG6000 处理组的高于 10% PEG6000 处理组,10% PEG6000 处理组又高于对照组。具体而言, *HMGR* 基因相对表达量在两个 PEG6000 处理组中峰值过后趋于稳定,而对照组的表达量在实验过程基本稳定。*IPPI* 基因相对表达量在 20% PEG6000 处理组于 4 h 达到峰值后,在 4~6 h 间快速下降,但在 6~8 h 间逐渐上升,并在 8 h 处出现第 2 个峰值,而其低于 4 h 处的峰值。*FPS* 基因相对表达量在 10% PEG6000 处理组中于 2 h 处有一个峰值,但此时的表达量远低于 6 h 处的表达量;*FPS* 基因相对表达量在 20% PEG6000 处理组于 8 h 处出现第 2 个峰值,但其表达量远低于 4 h 处的峰值。 β -AS 相对表达量在 10% PEG6000 处理组中于 2~6 h 处于较高水平,于 6~8 h 间快速下降,8~12 h 再次处于上升趋势。

以上模拟干旱胁迫处理结果表明,北柴胡根系 *BcMYC2* 表达量在处理组与对照组间有显著性差异,说明适度干旱胁迫可促进转录因子 *BcMYC2* 的表达;柴胡皂苷生物合成途径中 4 个关键酶基因 *HMGR*、*IPPI*、*FPS*、 β -AS 相对表达量在 20% PEG6000 处理 4 h 时与对照组有显著性差异,在 10% PEG6000 处理 6 h 后与对照组存在显著性差异。整体上来看,关键酶基因表达量峰值出现的时

间晚于 *BcMYC2* 基因表达量的峰值出现时间,说明 *BcMYC2* 可能参与调控关键酶基因的表达。

2.4 干旱胁迫处理对北柴胡根中柴胡皂苷含量的影响

从图 4 可知,10% 和 20% PEG6000 模拟干旱胁

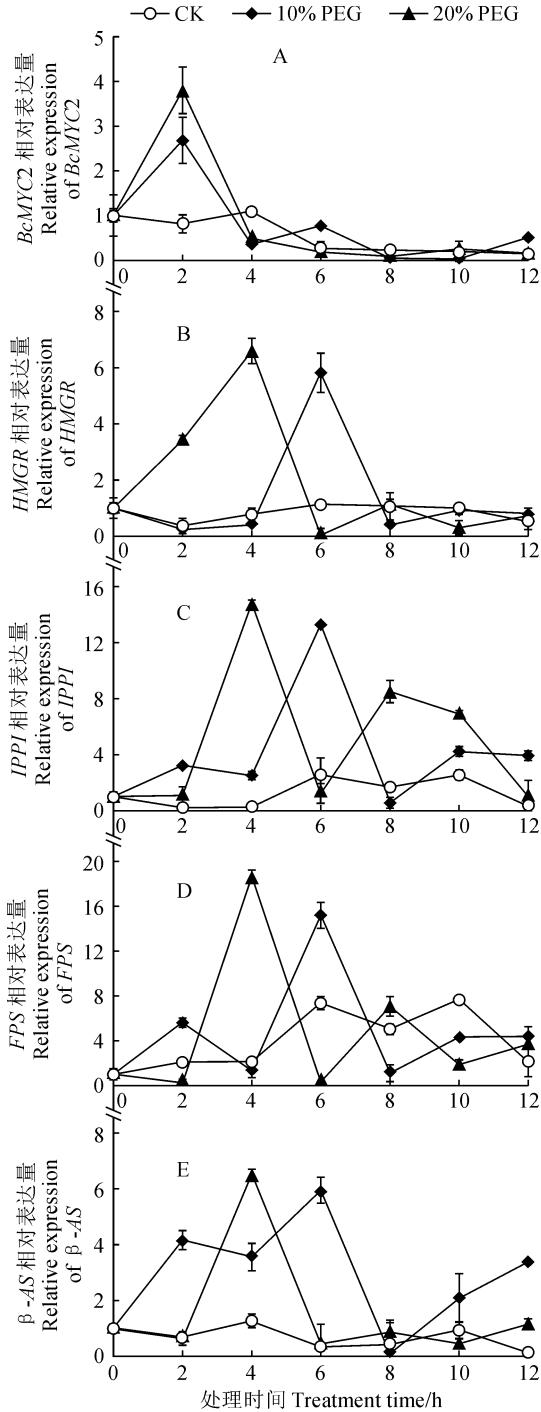
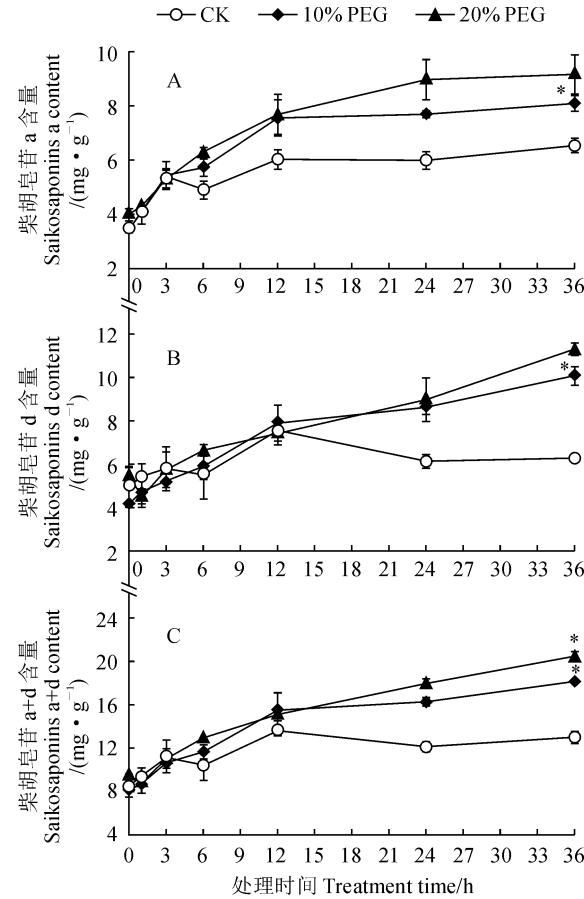


图 3 模拟干旱胁迫处理下不同时间 *BcMYC2* 基因及柴胡皂苷合成途径中关键酶基因的表达量变化

Fig. 3 Changes in expression of *BcMYC2* gene and key enzyme genes in saikosaponin synthesis pathway at different time points under simulated drought stress

迫后北柴胡根中柴胡皂苷 a、d 含量在 36 d 内表现出逐渐升高的趋势(图 4, A-C)。其中,在干旱胁迫开始时(0 d),对照组及处理组柴胡皂苷 a、d 含量均分别约为 4.0、5.0 mg·g⁻¹。在干旱胁迫期间,20% PEG6000 处理组柴胡皂苷合成速率高于 10% PEG6000 处理组和对照组,柴胡皂苷 a、d 含量整体较高。在干旱胁迫 36 d 后,柴胡皂苷 a、d 和 a+d 含量在 20% PEG6000 处理组中分别达到 9.17、11.31、20.48 mg·g⁻¹,在 10% PEG6000 处理组分别达到 8.09、10.07、18.17 mg·g⁻¹;此时两处理组各项柴胡皂苷含量明显高于相对对照组,且差异均达到显著水平。另外,干旱胁迫 12 d 时,柴胡皂苷含量积累速度下降,特别是对照组中柴胡皂苷 d 含量在胁迫 12 d 后表现出逐渐下降趋势,推测可能与北柴胡根在胁迫 12 d 后逐渐出现腐烂有关。



* 表示同期处理与对照间在 0.05 水平存在显著性差异

图 4 模拟干旱胁迫处理下不同时间北柴胡根内柴胡皂苷含量的变化

* indicates significant difference between treatment and control within same time point at 0.05 level

Fig. 4 Changes of saikosaponins in the roots of *B. chinense* at different time points under simulated drought stress

3 讨 论

植物在生物或非生物胁迫下,茉莉酸信号通路被激活,内源茉莉酸类物质等信号分子含量升高,释放出相应的转录因子,刺激植物次生代谢途径中关键酶基因的转录活性,进而促进植物次生代谢产物的合成并积累^[13]。茉莉酸及其衍生物茉莉酸甲酯等茉莉酸盐类是由亚麻酸途径衍生而来,其具有环戊酮基。茉莉酸盐类广泛存在于植物界,对其调控机理研究发现茉莉酸盐可调控多种基因的表达,主要可分为两大类:一类与植物自身的生长发育有关,如种子的萌发、花粉及花的发育、果实的成熟等;另外一类与植物的防御有关,如病虫害、机械损伤、干旱胁迫及盐胁迫等^[14]。当植物受到逆境胁迫时,抗逆基因表达可产生一些特有的次生代谢产物。这些次生代谢产物不是植物生长发育所必需的,但却在植物防御反应中发挥重要作用,也被广泛应用于药物、香料及化工产品。例如,加入外源茉莉酸可促进珍贵的药用真菌牛樟芝产生总三萜及多糖^[15]。植物方面如微型月季受茉莉酸处理后,可激发萜类次生代谢产物的合成,这些萜类化合物可用于玫瑰精油的制作^[16]。

Yu 等^[17]实验发现 bHLH 转录因子家族可与目的基因启动子区域的 E-box 或 G-box 结合(G-box 是 E-box 的其中一种),进而提高基因的表达量。E-box 是基因启动子区域上游通常存在的结构,由 CNNTG 6 个碱基排列成特殊回文序列^[18]。能够被转录因子识别并结合,进而激活基因进行转录。BcMYC2 基因表达量提高后与关键酶基因的启动子区域结合,不同基因启动子区域的 E-box 或 G-box 数量不同,所以对 HMGR、IPPI、FPS、 β -AS 基因表达量的影响有强有弱。

在本研究的模拟干旱胁迫试验中,为了给田间种植的北柴胡种苗提供适宜的人工培养条件使用了 Hoagland's 营养液, Hoagland's 营养液是植物营养液中最常用的一种配方。为了使用方便、简化操作、用量准确、减少误差,直接购买了含植物所需的大量无机元素、微量元素、铁盐、有机物的母液,使用母液

直接配制 1/4 Hoagland's 营养液。Hoagland's 营养液可提供柴胡生长所需物质,但柴胡习性是耐干旱怕水涝。本研究使用的北柴胡种苗在北京市延庆区田间肥沃疏松的砂质土壤中种植,而排水不良会导致柴胡根部发生腐烂造成死亡^[19]。因此,选择田间种植生长态势均一的北柴胡种苗置于 1/4 Hoagland's 营养液培养,会造成北柴胡根部一直处于水涝状态,在胁迫 12 d 后开始逐渐腐烂对柴胡根部柴胡皂苷 a、d 含量产生不良影响。PEG6000 可作为渗透调节剂调节 1/4 Hoagland's 营养液的渗透压模拟干旱胁迫实验,柴胡适应性较强耐干旱耐贫瘠,因此在 10%、20% PEG6000 溶液中生长态势好于 1/4 Hoagland's 营养液培养,36 d 内未出现腐烂并且根部柴胡皂苷 a、d 含量逐渐积累。韩晓伟等^[20]采用盆栽控水法对北柴胡进行干旱胁迫实验,结果显示适度干旱时(土壤饱和含水量 40%~50%)柴胡皂苷生物合成途径中的关键酶基因表达量显著提高,柴胡皂苷含量也随之提高。

干旱胁迫是常见的非生物胁迫方式,对植物的生长发育过程和次生代谢物的合成有重要影响,本实验推测当柴胡感受外界干旱胁迫信号时体内茉莉酸类化合物生物合成途径启动,JAZ 蛋白被泛素化和降解,从而激活被 JAZ 等抑制蛋白结合的 Bc-MYC2 转录因子,转录因子通过与柴胡皂苷生物合成途径上的关键酶基因启动子部分 E-box 或 G-box 结合,调控关键酶基因的表达;本实验研究结果显示,BcMYC2 转录因子在干旱胁迫 2 h 时出现峰值,4 个柴胡皂苷生物合成途径上的基因 HMGR、IP-PI、FPS、 β -AS 的相对表达量在干旱胁迫过程中均有不同程度增加,最终促进柴胡皂苷的合成并积累。本次实验中对照组在 1/4 Hoagland's 营养液中培养存在的腐败现象应在后续实验中加以改进,如可采用盆栽控水法进行干旱胁迫实验,相比将田间栽培的北柴胡置于营养液中植物更适应在土壤中生长。另外,也可直接在实验室播种北柴胡种苗或通过无菌播种的方法得到北柴胡种苗,进而在实验室条件下进行干旱胁迫实验更能保证实验条件可控,即选择的北柴胡种苗生长态势均一。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 280-281.

- [2] FU J Y, LIU L J, LIU Q, et al. ZmMYC₂ exhibits diverse functions and enhances JA signaling in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(2): 273-288.
- [3] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, et al. JAZ repress-

- or proteins are targets of the SCFCOII1 complex during jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, **448**(7 154): 661-665.
- [4] GOOSSENS J, SWINNEN G, VANDEN BOSSCHE R, et al. Change of a conserved amino acid in the MYC2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity[J]. *New Phytologist*, 2015, **206**(4): 1 229-1 237.
- [5] VALENZUELA-RIFFO F, Z ÚNIGA P E, MORALES-QUINTANA L, et al. Priming of defense systems and upregulation of MYC2 and JAZ1 genes after *Botrytis cinerea* inoculation in methyl jasmonate-treated strawberry fruits [J]. *Plants*, 2020, **9**(4): 447-461.
- [6] 张鹏钰, 王国瑞, 曹丽茹, 等. 干旱胁迫和复水处理下玉米差异表达转录因子基因分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, **28**(2): 211-222.
- ZHANG P Y, WANG G R, CAO L R, et al. Analysis of differentially expressed transcription factor genes in maize (*Zea mays*) under drought stress and Re-watering[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, **28**(2): 211-222.
- [7] 何江峰, 王力伟, 房永雨, 等. 干旱胁迫和复水处理后梭梭转录因子的转录组分析[J]. 华北农学报, 2020, **35**(1): 36-43.
- HE J F, WANG L W, FANG Y Y, et al. Transcriptome analysis on transcription factors of *Haloxylon ammodendron* under drought stress and rehydration treatment[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, **35**(1): 36-43.
- [8] 王晨, 安立成, 李剑超, 等. 北柴胡 MYC2 转录因子的克隆及茉莉酸诱导的调控分析[J]. 植物生理学报, 2021, **57**(2): 439-450.
- WANG C, AN L C, LI J C, et al. Cloning of the MYC2 transcription factor from *Bupleurum chinense* and analysis of jasmonate-induced regulation[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, **57**(2): 439-450.
- [9] 赵钰, 杨林林, 韩梅, 等. 北柴胡不同部位柴胡皂苷含量与其关键酶基因表达量的相关性研究[J]. 中草药, 2019, **50**(10): 182-190.
- ZHAO Y, YANG L L, HAN M, et al. Correlation between content of saikosaponin and expression of key enzyme genes in different parts of *Bupleurum chinense*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, **50**(10): 182-190.
- [10] 董乐萌. 北柴胡柴胡皂苷合成相关基因的分子克隆与组织表达分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [11] 隋春, 战晴晴, 魏建和, 等. 北柴胡皂苷生物合成途径关键酶 IPPI 的全长 cDNA 克隆及其序列分析[J]. 中草药, 2010, **41**(7): 1 178-1 184.
- SUI C, ZHAN Q Q, WEI J H, et al. Full-length cDNA cloning and sequence analysis of isopentenyl diphosphate isomerase involved in saikosaponin biosynthesis pathway of *Bupleurum chinense*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, **41**(7): 1 178-1 184.
- [12] 李剑超, 戚文涛, 王晨, 等. 北柴胡环阿屯醇合酶基因的全长克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, **19**(9): 2 899-2 905.
- LI J C, QI W T, WANG C, et al. Full-length clone and expression analysis of CAS gene in *Bupleurum chinense* DC. [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, **19**(9): 2 899-2 905.
- [13] 姚娜, 荆礼, 郑汉, 等. 茉莉酸信号通路中的转录因子对药用植物次生代谢调控的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, **43**(5): 897-903.
- YAO N, JING L, ZHENG H, et al. Research progress of jasmonate-responsive transcription factors in regulating plant secondary metabolism[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, **43**(5): 897-903.
- [14] 吴劲松, 种康. 茉莉酸作用的分子生物学研究[J]. 植物学通报, 2002, **37**(2): 164-170.
- WU J S, CHONG K. The molecular biology research on the action of jasmonates[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, **37**(2): 164-170.
- [15] 张知晓, 季梅, 刘凌, 等. 外源茉莉酸甲酯对牛樟芝总三萜及多糖含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, **47**(19): 133-136.
- ZHANG Z X, JI M, LIU L, et al. Impact of exogenous methyl jasmonate on total triterpenoids and polysaccharide contents of *Antrodia camphorata*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, **47**(19): 133-136.
- [16] 王启, 刘广达, 苏蕾. 水杨酸和茉莉酸甲酯对微型月季萜类次生代谢产物相关基因表达的影响[J]. 分子植物育种, 2020, **18**(3): 797-803.
- WANG Q, LIU G D, SU L. Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on expression of terpenoid secondary metabolites related genes of miniature rose[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(3): 797-803.
- [17] YU J Q, GU K D, SUN C H, et al. The apple bHLH transcription factor MdbHLH3 functions in determining the fruit carbohydrates and malate[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, **19**(2): 285-299.
- [18] SEMBDNER G, PARTHIER B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1993, **44**(1): 569-589.
- [19] 李晓微, 秦晓辉, 金萍, 等. 北方地区柴胡标准化栽培技术[J]. 特种经济动植物, 2020, **23**(2): 28-29.
- LI X W, QIN X H, JIN P, et al. Standardized cultivation techniques of bupleurum in northern area[J]. *Special Economic Animal and Plant*, 2020, **23**(2): 28-29.
- [20] 韩晓伟, 严玉平, 贾河田, 等. 干旱胁迫对柴胡皂苷合成途径关键酶基因表达的影响[J]. 中药材, 2017, **40**(12): 2 772-2 774.
- HAN X W, YAN Y P, JIA H T, et al. Effect of drought stress on gene expression of key enzymes in saikosaponin synthesis pathway[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2017, **40**(12): 2 772-2 774.