

MeJA对苋菜悬浮细胞类黄酮和类胡萝卜素累积及其代谢相关基因表达的影响*

刘生财[#] 潘君飞[#] 王 晓 赵春丽 赖钟雄^{**} 张梓浩

福建农林大学园艺植物生物工程研究所 福州 350002

摘 要 茉莉酸甲酯 (MeJA) 对植物生长及次生代谢产物的合成具有重要的调控作用. 为了解MeJA对苋菜细胞中类黄酮和类胡萝卜素合成的影响, 以苋菜悬浮细胞为材料, 检测不同浓度MeJA和添加时间处理对类黄酮和类胡萝卜素累积的影响, 结合实时荧光定量PCR技术, 分析类黄酮和类胡萝卜素合成相关基因表达与其累积的关系. 结果显示, 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA处理下, 苋菜悬浮细胞干重、类黄酮和类胡萝卜素产量均达到最大, 在悬浮细胞培养的第4天添加200 $\mu\text{mol/L}$ 时类黄酮和类胡萝卜素的含量和产量达到最大; 与对照 (MeJA 0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 不同浓度MeJA处理下, *PAL*、*F3H*、*CHI*、*CHS*基因表达量均极显著上调, 与类黄酮含量具有正相关性, *PDS*、*PSY*和*ZDS*基因也极显著上调表达, 与类胡萝卜素含量具有正相关性; 随着MeJA添加时间的延迟, *PAL*、*F3H*、*CHS*和*CHI*基因的表达模式与类黄酮含量无明显相关性, *PDS*和*PSY*表达模式基本一致, 且与类胡萝卜素含量的变化趋势保持一致, *ZDS*基因则出现下调表达. 本研究表明MeJA浓度和添加时间对苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜合成起着重要调控作用, 可为进一步探讨MeJA诱导苋菜悬浮细胞类黄酮和类胡萝卜素合成机制奠定基础. (图8 表1 参28)

关键词 苋菜; 悬浮细胞; MeJA; 类黄酮; 类胡萝卜素; 基因表达

CLC S636.4 : Q78

Effects of methyl jasmonate on the contents and related metabolic genes of flavonoids and carotenoids in suspension cells of *Amaranthus tricolor* L.*

LIU Shengcai[#], PAN Junfei[#], WANG Xiao, ZHAO Chunli, LAI Zhongxiong^{**} & ZHANG Zihao

Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract Methyl jasmonate (MeJA) plays an important role in the regulation of plant growth and secondary metabolite synthesis. The effects of different concentrations of MeJA and time of addition on the content and yield of flavonoids and carotenoids were studied using suspension cells of amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). The relationship between the expression of flavonoids and carotenoids-related genes and their accumulation was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results showed that the dry weight, and flavonoid and carotenoid production of amaranth suspension cells reached the maximum at 200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA treatment. The content and yield of flavonoids and carotenoids reached the maximum when MeJA was added at 200 $\mu\text{mol/L}$ on the fourth day of suspension cell culture. Under different concentrations of MeJA, the expression levels of *PAL*, *F3H*, *CHI* and *CHS* were significantly up-regulated, and were positively correlated with flavonoid content; *PDS*, *PSY* and *ZDS* genes were also significantly up-regulated and were positively correlated with carotene content. When MeJA was added later, the expression patterns of *PAL*, *F3H*, *CHS* and *CHI* genes were not significantly correlated with flavonoid content; *PDS* and *PSY* expression patterns were similar, and were consistent with the change of carotenoid content; and the *ZDS* gene was down-regulated. The concentration and addition time of MeJA played an important role in the regulation of flavonoids and carotenoids in suspension cells of amaranth. The study lays a foundation for further study on the mechanism of MeJA-induced flavonoids and carotenoids in amaranth suspension cells.

Keywords *Amaranthus tricolor* L.; suspension cells; methyl jasmonate; flavonoids; carotenoids; gene expression

收稿日期 Received: 2018-12-18 接受日期 Accepted: 2019-01-27

*福建省自然科学基金项目 (2018J01700)、福建农林大学科技创新专项基金项目 (CXZX2017174) 和福建省高原学科建设经费 (71201801101) 资助 Supported by the Fujian Natural Science Foundation (2018J01700), the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Innovation Special Fund Project (CXZX2017174) and the Program for High-level University Construction of the Fujian Agriculture and Forestry University (612014028)

[#]共同第一作者 Co-first authors

^{**}通讯作者 Corresponding author (E-mail: Laizx01@163.com)

植物次生代谢产物在植物生命活动过程中起着重要作用,且许多次生代谢产物是植物生命活动必不可少的^[1]。近年来,利用植物组织细胞培养技术生产次生代谢产物领域发展迅速,目前已实现从400多种植物中分离出超过600种次生代谢产物^[2]。茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)作为一种常用的化学诱导子^[3],对植物生长和次生代谢产物合成具有重要的调控作用^[4,5]。研究发现,茉莉酸甲酯能显著提高丹参毛状根次生代谢产物的合成和积累^[6],不同时期加入相同浓度MeJA对蒙古黄芪悬浮细胞中黄酮类化合物有显著影响,在第7天加入时含量最高^[7]。

在类黄酮代谢途径中,相关酶的基因转录水平能够影响其合成。苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia lyase, PAL)是连接初级代谢和苯丙烷代谢的关键酶,催化类黄酮代谢途径的第一步反应^[8];查尔酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)是将苯丙烷代谢途径引向类黄酮代谢途径的第一个限速酶;查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)可催化查尔酮的环化反应^[9];黄烷酮-3-羧化酶(Flavanone-3-hydroxylase, F3H)是继查尔酮合成酶和查尔酮异构酶后的第3个关键酶,可催化黄烷酮合成黄酮醇及花色素合成的底物^[10]。类胡萝卜素代谢途径的每一个步骤都是在酶的催化作用下实现的,其代谢活动受到酶活性状态的影响^[11]。牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸(Geranylgeranyl pyrophosphat, GGPP)是类胡萝卜素生物合成途径中的直接前体,两分子的GGPP在八氢番茄红素合成酶(Phytoene synthase, PSY)的催化作用下缩合成无色的八氢番茄红素;PSY酶是类胡萝卜素合成途径中的限速酶,是目前研究最多的类胡萝卜素代谢酶^[12];八氢番茄红素在八氢番茄红素脱氢酶(Phytoene desaturase, PDS)和胡萝卜素脱氢酶(Carotene desaturase, ZDS)共同催化作用下转变为红色的八氢番茄红素。

苋菜(*Amaranthus tricolor* L.)作为一种传统野生蔬菜,含有大量类黄酮、类胡萝卜素和酚类等抗氧化物质^[13-14],具有较高的药用和食用价值。植物细胞培养过程中,培养环境和外源添加物质会影响类黄酮及类胡萝卜素合成相关基因的表达水平,MeJA可以做为诱导子影响类黄酮和类胡萝卜素代谢途径中相关基因的表达^[15-16]。此外,关于苋菜愈伤组织中类黄酮和类胡萝卜素等次生代谢产物的研究报道较为罕见。因此,本研究以苋菜悬浮细胞为材料,探讨MeJA浓度和添加时间对苋菜悬浮细胞类黄酮和类胡萝卜素累积的影响,并利用荧光定量PCR技术,对其类黄酮合成相关基因PAL、F3H、CHS、CHI和类胡萝卜素合成相关基因PDS、ZDS、PSY表达模式进行研究,以期为进一步探讨MeJA诱导苋菜悬浮细胞类黄酮和类胡萝卜素累积的机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以Murashige and Skoog (MS) + 6.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 30 g/L蔗糖 + 7 g/L琼脂为培养基,在光照时长16 h/d条件下从苋菜子叶下胚轴诱导出来的愈伤组织为材料(由福建农林大学园艺植物生物工程研究所提供),并以MS

+ 6.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 30 g/L蔗糖 + 7 g/L琼脂为增殖培养基,在此光照条件下以20 d为培养周期对获得愈伤组织进行继代培养。

1.2 方法

1.2.1 苋菜悬浮细胞的继代培养 选择生长状态一致的苋菜愈伤组织,接种到MS + 3.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 30 g/L蔗糖的液体培养基中,苋菜愈伤组织接种密度为2 g/50 mL,培养20 d后用20目筛子过滤,继续转接到相同配方的液体培养基中进行继代备用,接种密度为10 mL/40 mL,10 mL悬浮细胞的鲜重为2.30 g,干重为0.12 g,保证材料初始量一致。培养条件:温度25 ℃,光强1 000 lx,光照时长12 h/d,摇床转速120 r/min。

1.2.2 不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞的处理 以无水乙醇为助溶剂,将配制好的100 mmol/L MeJA母液经0.45 μm无菌滤膜过滤后加入到液体培养基中,使得培养基中MeJA浓度为100、200、400 μmol/L,对照组加入相应浓度的乙醇。根据前期实验测定的苋菜悬浮细胞生长曲线,不同浓度MeJA在悬浮细胞培养的第4天,即细胞进入对数生长期时添加到液体培养基中,在细胞生长第16天时用滤纸过滤收集并吸干水分,部分冻存于-80 ℃冰箱,其余烘干至恒重,研究不同浓度MeJA和水杨酸(SA)对苋菜悬浮细胞干重、类黄酮及类胡萝卜素累积的影响。每种处理重复3次。

1.2.3 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞的处理 选择适合类黄酮和类胡萝卜素累积的最佳浓度的MeJA,分别在悬浮细胞培养的第0、2、4、8、12天时加入到液体培养基中,同样在细胞生长第16天时收集样品,研究MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞干重、类黄酮及类胡萝卜素累积的影响。每种处理重复3次。

1.2.4 类黄酮含量测定 参照李琨等方法^[17],略有修改。精密称取芦丁50 mg,用分析纯甲醇振荡溶解后,用双蒸水定容至500 mL,即得到100 mg/L芦丁标准溶液,准确吸取0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL芦丁标准溶液加入到10 mL的离心管中,各加入体积分数50%乙醇溶液定容至5 mL,精确加入质量分数5%的NaNO₂ 0.3 mL,摇匀后静置6 min,再加入质量分数10%的Al(NO₃)₃ 0.3 mL,摇匀静置6 min,最后再加入质量分数20%的NaOH溶液4 mL,分别用体积分数为50%的乙醇稀释至10 mL,摇匀后室温放置15 min。以不加芦丁标准溶液为空白对照,利用紫外分光光度计于波长510 nm处检测吸光度值,建立芦丁标准曲线。

参照董慧雪等测定方法^[18],采用超声波-乙醇提取法对苋菜悬浮细胞的类黄酮进行提取,稍加改动。每种处理各取3份0.3 g烘干研磨后的苋菜悬浮细胞粉末,置于带试管塞的20 mL试管中,加入体积分数为60%乙醇溶液10 mL,超声提取60 min(60 ℃,功率300 W),期间每隔20 min对样品进行颠倒混匀,超声结束后过滤冷却,将提取液用体积分数60%的乙醇溶液定容至10 mL,待测。

在10 mL离心管中加入上述提取的待测液5 mL,按照芦丁类黄酮测定的步骤对待测液进行类黄酮含量的测定。通过芦丁标准曲线,计算出样品中类黄酮的质量浓度C。

类黄酮产量(mg/瓶)=类黄酮含量(mg/g)×悬浮细胞干重(g/瓶)。

类黄酮含量 (mg/g) = $(C \times V1 \times V3)/(m \times V2)$. 其中C是类黄酮的质量浓度 (mg/mL); m 是样品的质量 (0.3 g); $V1$ 是提取时所用60%乙醇溶液体积 (10 mL); $V2$ 是待测液的吸取体积 (5 mL); $V3$ 是反应体系的体积 (10 mL).

1.2.5 类胡萝卜素含量测定 每种处理各取3份0.3 g烘干研磨后的苋菜悬浮细胞粉末, 置于具有瓶塞的锥形瓶中, 以30 mL丙酮和石油醚混合液 (体积比1:1) 共为浸提溶液, 加塞后放置在转速为100 r/min的摇床上, 遮光对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素进行浸提8 h. 浸提过滤后的溶液利用紫外分光光度计在波长445 nm下测定吸光度值.

类胡萝卜素产量 (μg/瓶) = 类胡萝卜素含量 (μg/g) × 悬浮细胞干重 (g/瓶).

类胡萝卜素含量 (μg/g) = $(A \times V \times 10000)/(A_0 \times m)$, 其中A是在波长445 nm下测定吸光度值, V 是所用提取液的体积为30 mL, A_0 是类胡萝卜素平均吸收系数2 500, m 是分析样品的质量.

1.2.6 苋菜悬浮细胞总RNA提取和cDNA的合成 苋菜悬浮细胞总RNA的提取参照多糖多酚总RNA提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 说明书进行, RNA样品完整性用浓度为1%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用超微量分光光度计 (Thermo) 检测其浓度与纯度. 采用SYBR ExScript™逆转录试剂盒 (TAKARA) 将RNA反转录为cDNA用于定量PCR分析.

1.2.7 荧光定量PCR引物设计 从本实验室构建的苋菜转录组数据库 (SRA: SSR924089-SSR924092) 中筛选出类黄酮合成相关基因PAL、F3H、CHS、CHI和类胡萝卜素合成相关基因PDS、ZDS、PSY的基因序列, 与NCBI登录的相近物种的基因序列比对验证, 找出保守区, 根据荧光定量引物设计的原则, 利用DNAMAN 7软件根据保守区设计出特异引物 (表1). 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成.

1.2.8 实时荧光定量PCR分析 将稀释至50 ng/μL的待测样品的cDNA进行混样, 分别将混匀的cDNA稀释5、25、125、625倍后作为模板, 以目的基因的特异性引物进行扩增, 每组3次重复, 采用相对定量法, 根据结果对每个目的基因制作标准曲线.

以实验室在苋菜上验证过的基因EF-1α为内参基因 (引物见表1), 利用罗氏LightCycler 480实时荧光定量PCR仪器, 对不同处理下苋菜悬浮细胞中相关基因进行qPCR分析. 反应体系为20 μL, 参照SYBR Premix Ex Taq™试剂盒 (TAKARA), 反应条件: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性10 s, 退火时间20 s (温度根据引物Tm值适当调整), 72 °C延伸12

s, 40个循环. 每个样品设置3个生物学重复, 扩增目的基因和内参基因, 3次技术重复. 基因相对表达量计算参照Liu等计算方法^[19].

1.2.9 数据统计与分析 采用EXCEL 2016和SPSS 19.0对数据进行统计和显著性分析; 采用GraphPad Prism 6.01进行绘图.

2 结果与分析

2.1 不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞干重及类黄酮和类胡萝卜素累积的影响

随着MeJA浓度的升高, 苋菜悬浮细胞的干重呈先升后降的变化趋势 (图1). 当MeJA浓度为200 μmol/L时, 悬浮细胞干重达到最大值为0.777 g, 与对照组差异极显著, 此时干重约为对照组的1.34倍; MeJA浓度为400 μmol/L悬浮细胞干重最低, 仅为0.45 g, 极显著低于对照组.

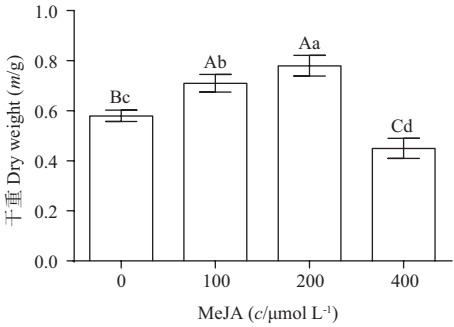


图1 不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞干重的影响. 不同大写字母表示在0.01水平存在极显著差异, 不同小写字母表示在0.05水平存在显著差异, 下同.

Fig. 1 Effect of different MeJA concentrations on the dry weight of amaranth suspension cells. Different capital letters indicate significant difference at 0.01 level and different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

随着MeJA浓度的升高, 苋菜悬浮细胞中类黄酮的含量呈逐步上升趋势, 类黄酮产量呈先升后降的趋势 (图2). 类黄酮含量在MeJA浓度为400 μmol/L时达到最高值3.084 mg/g (DW干重), 约为对照组的1.44倍, 且与各处理之间存在极显著差异; 类黄酮产量在MeJA浓度为200 μmol/L时达到最高值1.944 mg/瓶 (DW干重), 与对照组存在极显著差异, 约为对照组的1.58倍.

随着MeJA浓度的升高, 苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素含量

表1 相关基因定量PCR引物序列

Table 1 Primers for qPCR of the related genes

基因 Gene	上游序列 Upstream sequence	下游序列 Downstream sequence	退火温度 Annealing temperature (θ/°C)
PAL	TTGGTGCTACTTCTCATCGG	TGATTTCGGTTCCATTGCC	60
F3H	TTCTTTGCTCTTTTCGCCTG	GCCATCTTGAATAATCCCTGT	59
CHS	ATGGTGGTGGCTGAAGTTC	TGGTAGAGCATAAAGCGGC	59
CHI	TGGCTTCTACTTCAACATCTGC	GTTCCAAGCAAGGACAATGA	59
PDS	TGGGCATTTGGGTGAAGA	GGAAGTCGTTGGGTAGTGTG	60
ZDS	CCAGAACCTGAATGTTACAAGG	TGATTTCCACGCCTGTCA	59
PSY	TCGGTGTGGTGAAGTTTGC	ATCGCCCAGATAGCCTTTC	60
EF-1α	GGGATGCTGGTATGGTGAA	ACGGGTCATTTCTTCTCTGAG	59

和产量均呈先升后降的趋势(图2)。类胡萝卜素含量在MeJA浓度为100和200 $\mu\text{mol/L}$ 时不存在显著性,但与其他处理之间存在极显著差异,MeJA浓度为100和400 $\mu\text{mol/L}$ 时类胡萝卜素含量最高和最低,分别为44.53和35.47 $\mu\text{g/g}$ (干重),含量最高时约为对照组的1.15倍;类胡萝卜素产量在MeJA浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大,为34.17 $\mu\text{g/瓶}$ (干重),与对照组差异极显著,约为对照组的1.55倍。

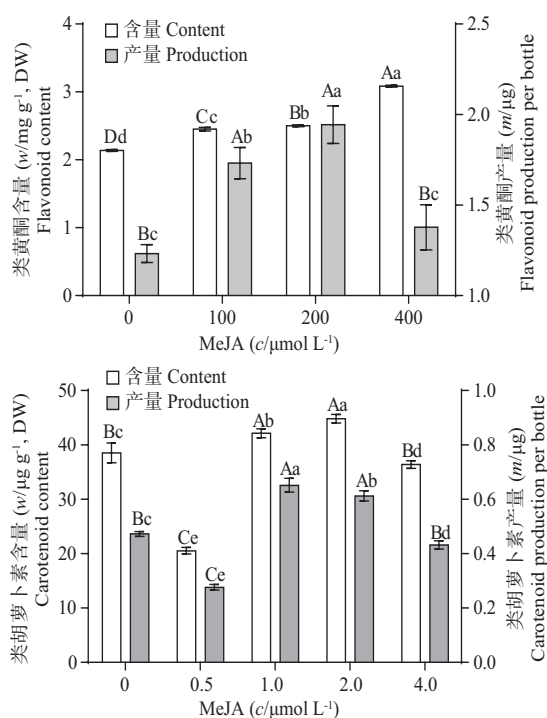


图2 不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素累积的影响。
Fig. 2 Effect of different MeJA concentrations on accumulation of flavonoids and carotenoids in amaranth suspension cells.

2.2 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞生物量及类黄酮和类胡萝卜素累积的影响

以上述筛选的最利于提高苋菜悬浮细胞生长及其类黄酮和类胡萝卜素产量的MeJA的添加浓度,即200 $\mu\text{mol/L}$,研究MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞生长及类黄酮和类胡萝卜素累积的影响。如图3所示,MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞

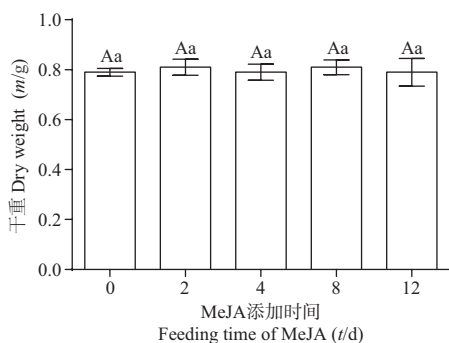


图3 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞干重的影响。
Fig. 3 Effect of different feeding time of MeJA on the dry weight of amaranth suspension cells.

干重无显著性影响。通过细胞形态观察发现,MeJA不同添加时间时,苋菜悬浮细胞出现较多的大细胞团,且细胞颜色较深。

随着MeJA添加时间的延迟,由于悬浮细胞干重无显著性变化,苋菜悬浮细胞中类黄酮含量和产量,以及类胡萝卜素含量和产量均呈先升后降的变化趋势(图4)。在第4天添加200 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA时,类黄酮的含量和产量及类胡萝卜素的含量和产量均达到最大,分别为3.747 mg/g 、2.948 mg/瓶 和60.53 $\mu\text{g/g}$ 、47.62 $\mu\text{g/瓶}$,且均与对照组存在极显著差异,此时类黄酮含量和产量分别为对照组的2.31倍和2.28倍,类胡萝卜素含量和产量分别为对照组的3.60倍和3.62倍。

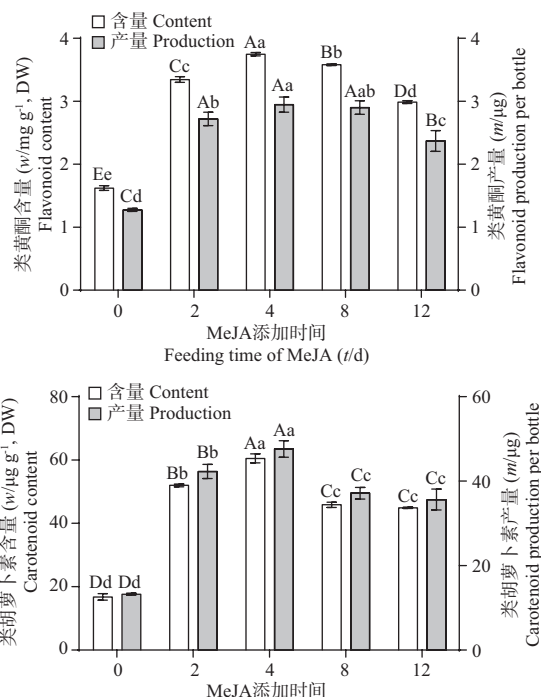


图4 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素累积的影响。
Fig. 4 Effect of different feeding time of MeJA on accumulation of flavonoids and carotenoids in amaranth suspension cells.

2.3 MeJA浓度和添加时间对苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因表达的影响

2.3.1 MeJA浓度对苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因表达的影响

不同浓度MeJA处理下苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因相对表达量如图5所示,结果表明,随着MeJA浓度的升高,*PAL*和*F3H*基因相对表达量呈上升趋势,*CHS*基因相对表达量呈先升后降的趋势变化,*CHI*基因表达量则呈先降后升的趋势变化。MeJA浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时,*PAL*和*F3H*基因相对表达量最高,与对照组差异极显著,分别为对照组的14.27倍和5.09倍;*CHS*基因相对表达量在各处理下均存在显著性差异,MeJA浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时表达量升至最高,为对照组的39.37倍,MeJA浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时表达量显著下降,但此时仍为对照组的26.81倍;在*CHI*基因相对表达量中,MeJA浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时表达量最低,与对照组不存在显著性差异,MeJA浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时表达量升至最高,与对照组差异极显著。

2.3.2 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因表达的影响 不同时间添加MeJA处理下苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因相对表达量如图6所示, 结果表明, 随着MeJA添加时间的推迟, *PAL*基因相对表达量基本呈下降趋势, *F3H*和*CHS*基因相对表达量呈先升后降再升的变化趋势, *CHI*基因的表达式则无明显变化规律. 第12天添加200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA时, *PAL*基因相对表达量降至最低, 且与各处理之间存在极显著差异, *F3H*基因的相对表达量则在第12天添加时最高, 与其他处理存在极显著差异; *CHS*基因相对表达

量在第2天时最高, 与对照组存在极显著差异, *CHI*基因相对表达量则在第8天添加时最高, 与其他处理存在显著性差异.

2.4 MeJA浓度和添加时间对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因表达的影响

2.4.1 MeJA浓度对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因表达的影响 不同浓度MeJA处理下苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因相对表达量如图7所示, 结果表明, 随着MeJA浓度升高, *PDS*和*ZDS*基因相对表达量均呈先升后降再升的变化趋势, *PSY*基因相对表达量则呈先升后降的变化趋势

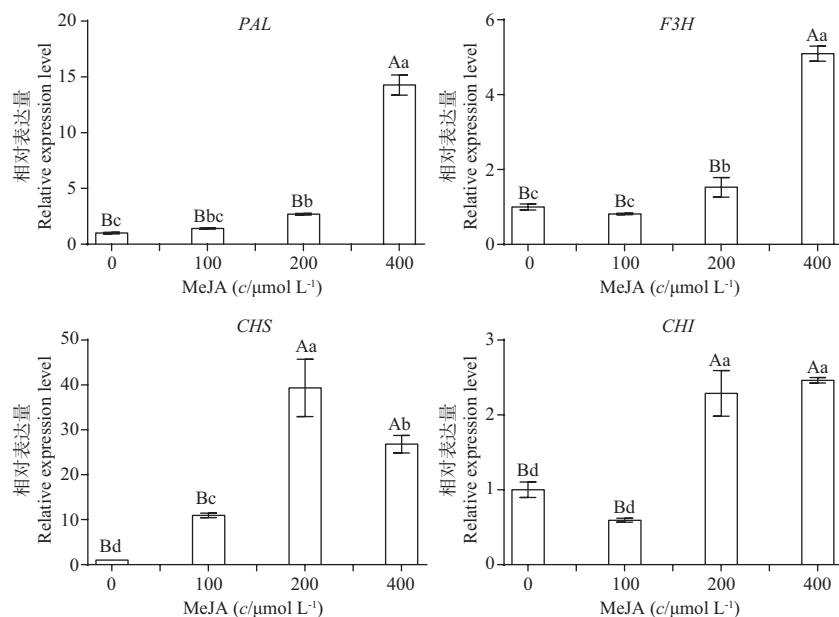


图5 MeJA浓度对苋菜悬浮细胞中类黄酮代谢相关基因表达的影响。

Fig. 5 Effect of MeJA concentration on the expression of flavonoids metabolism related genes in amaranth suspension cells.

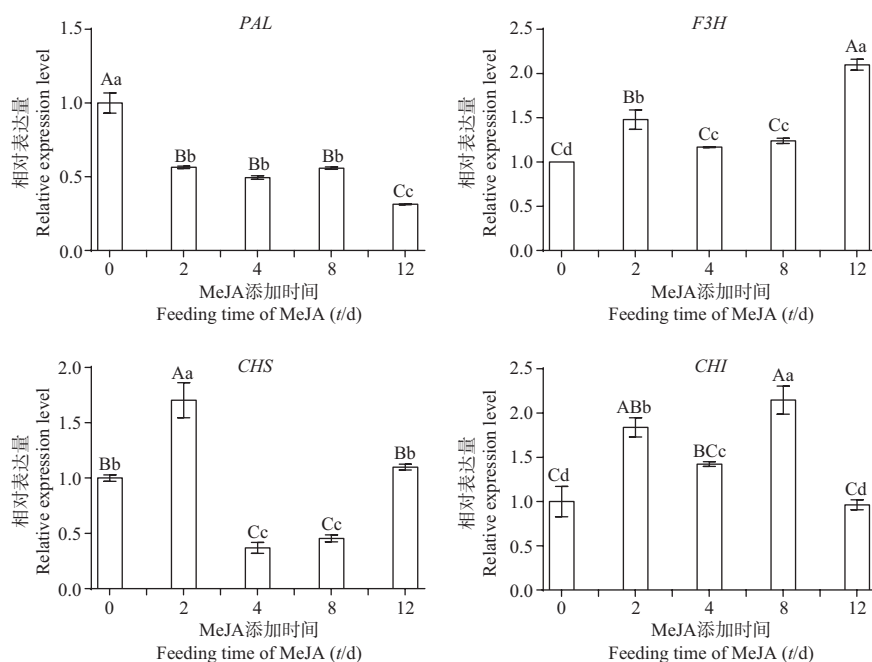


图6 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞中类黄酮代谢相关基因表达的影响。

Fig. 6 Effect of feeding time of MeJA on the expression of flavonoids metabolism related genes in amaranth suspension cells.

势。MeJA浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时, *PDS*和*ZDS*基因相对表达量最高, MeJA浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时, *PSY*基因相对表达量最高, 与对照组存在极显著差异, MeJA浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时*PSY*基因相对表达量显著下降, 在浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最低, 但仍极显著高于对照组。

2.4.2 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因表达的影响 不同时间添加MeJA处理下苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因相对表达量如图8所示, 结果表明, 随着MeJA添加时间的推迟, *PDS*和*PSY*基因相对表达量均呈先升后降的变化趋势, *ZDS*基因相对表达量则呈先降后升的变化趋势。第2天添加200 $\mu\text{mol/L}$ MeJA时, *PDS*基因相对表达量达到最高, 与对照组差异极显著, 第4天开始添加时表达量稳步下降, 第12天添加时, 表达量降至最低, 但仍高于对照组, 与对照组差异不显著; *PSY*基因相对表达量在MeJA添加时间为第4天时升至最高, 极显著高于对照组, 第12天添加时, 相对表达量极显著降低, 但仍高于对照组, 与对照组差异不显著; *ZDS*基因相对表达量在MeJA添加时间为第2天时极显著下降, 第4、8、12天添加时显著上升, 但三者变化不显著, 且显著低于对照组。

3 讨论与结论

3.1 适宜MeJA浓度和添加时间能够促进苋菜悬浮细胞生长及其类黄酮和类胡萝卜素累积

MeJA是能够调节植物生长发育, 同时能够诱导植物化学防御的诱导子^[20]。有研究表明, 外源施用150 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA能够显著提高丹参幼苗中酚酸类物质的含量^[21]。王瑜和杨世海研究发现, 150 $\mu\text{mol/L}$ MeJA和20 mg/L SA处理能显著提高

王不留行毛状根中黄酮苷的产量^[22]。不过, MeJA能够抑制王不留行毛状根的生长, 而SA对其生长作用不明显。本研究结果发现, MeJA对苋菜悬浮细胞生长及类黄酮和类胡萝卜素累积均有明显促进作用, MeJA浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 苋菜悬浮细胞干重达到最大, 此时类黄酮和类胡萝卜素产量均达到最大, 但类黄酮含量随着MeJA浓度的升高而升高, 类胡萝卜素含量则在MeJA浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高, 可能是因为类黄酮和类胡萝卜素两种次生代谢产物的合成对MeJA浓度的响应程度不同, 不同的次生代谢产物对外界条件响应不一致。

不同时间添加MeJA也会影响悬浮细胞生长及相关次生代谢产物的累积。陈林等研究发现, 在发酵不同时间添加MeJA对茯苓生物量的影响没有差异, 但对茯苓三萜合成的调控效应, 尤其是在发酵第4天时添加诱导效应最好^[23]。本研究结果表明, 随着200 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA在细胞生长不同时期(第0、2、4、8、12天)的添加, 苋菜悬浮细胞干重无显著性变化, 可能是因为MeJA抑制细胞生长, 但能促进次生代谢物的合成, 细胞观察时候也发现苋菜悬浮细胞出现较多的大细胞团, 且细胞颜色较深, 这也说明次生代谢物合成与细胞生长对营养条件及环境需求存在差异; 悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素含量均在第4天, 即悬浮细胞进入对数生长期时达到最大, 也与前人研究结果^[22]相一致。

3.2 MeJA对苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素合成相关基因表达的影响与累积基本一致

有研究发现, *CHS*基因与类黄酮合成更为紧密^[24], *PAL*基因表达水平与多酚和类黄酮化合物的积累密切相关^[25-26]。本研究结果表明, 不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞中类黄酮合成相关基因调控作用十分显著, *PAL*和*CHS*基因表达变化

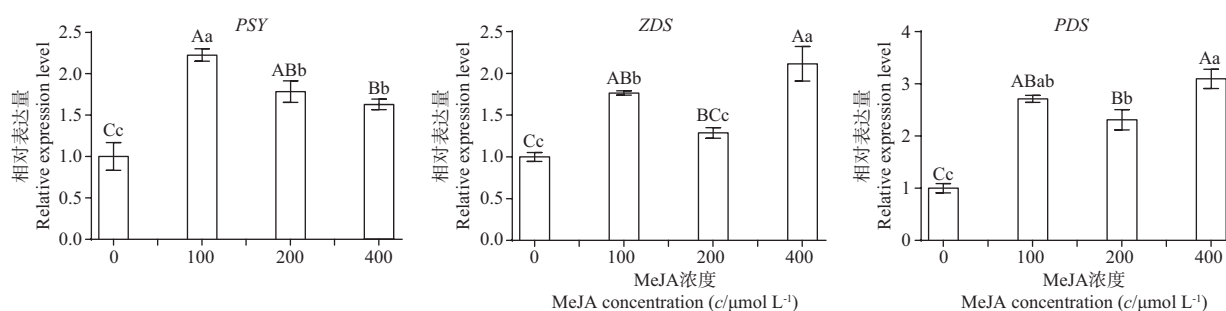


图7 MeJA浓度对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素代谢相关基因表达的影响。

Fig. 7 Effect of MeJA concentration on the expression of carotenoid metabolism related genes in amaranth suspension cells.

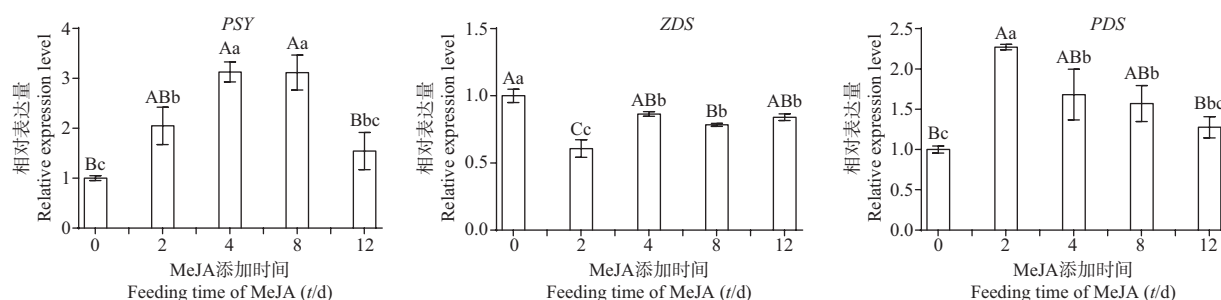


图8 MeJA添加时间对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素代谢相关基因表达的影响。

Fig. 8 Effect of feeding time of MeJA on the expression of carotenoid metabolism related genes in amaranth suspension cells.

尤为显著,这与前人研究结果相一致。随着MeJA添加时间延迟,*PAL*基因出现下调表达,且表达趋势稳步下降,*F3H*和*CHS*基因的表达模式基本一致,*F3H*、*CHS*和*CHI*基因表达均出现不同程度的上调,但三者表达趋势存在差异。宴校研究发现类黄酮含量与*F3H*、*CHS*和*CHI*基因表达量的变化趋势保持一致^[27],与本研究结果有所不同,可能是因为不同时间添加MeJA对*PAL*、*F3H*、*CHS*和*CHI*基因的诱导效果不同,从而导致相关基因参与了其他次生代谢产物的合成。

本研究结果表明,不同浓度MeJA处理下,苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因*PDS*和*ZDS*的表达模式基本一致,且与类胡萝卜素含量的变化趋势保持一致,梁敏华等研究也证实了*ZDS*基因对桃果实类胡萝卜素生物合成起到正向调控作用^[28]。*PDS*、*PSY*和*ZDS*基因与对照组相比均出现上调表达,说明不同浓度MeJA对苋菜悬浮细胞中类胡萝卜素合成相关基因调控作用十分显著,MeJA能够促进悬浮细胞中类胡萝卜素的合成。随着MeJA添加时间延迟,*PDS*和*PSY*基因表达模式基本一致,且与类胡萝卜素含量变化趋势保持一致,*ZDS*基因与对照组相比则出现下调表达,可能是因为不同时间添加MeJA促进了苋菜悬浮细胞中*ZDS*基因其他家族成员的高表达,导致*ZDS*基因表达下调。

本研究探索了MeJA对苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素累积的影响,确定了MeJA提高类黄酮和类胡萝卜素累积的最佳浓度和添加时间,并分析了类黄酮和类胡萝卜素合成相关基因的表达与累积之间的关系,为进一步探讨MeJA诱导苋菜悬浮细胞中类黄酮和类胡萝卜素合成的机制奠定了一定基础。

参考文献 [References]

- Kutchan TM. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125** (1): 58-60
- 陈月华, 朱艳, 张翔, 秦民坚. 植物细胞悬浮培养中次生代谢产物积累的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2016, **35** (3): 41-47 [Chen YH, Zhu Y, Zhang X, Qin MJ. Research progress in plant cell suspension culture for production of secondary metabolites [J]. *Chin Wild Plant Resour*, 2016, **35** (3): 41-47]
- Jiang KJ, Pi Y, Hou R, Tang KX. Jasmonate biosynthetic pathway: its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering [J]. *Chin Bull Bot*, 2010, **45** (2): 137-148
- Giri CC, 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*, 2016, **126** (1): 1-18
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures [J]. *PNAS*, 1992, **89** (6): 2389-2393
- 熊丙全, 刘冬青, 廖相建, 郑雪莲. 茉莉酸甲酯对丹参毛状根有效成分含量的影响[J]. 生物技术通报, 2018, **34** (7): 81-84 [Xiong BQ, Liu DQ, Liao XJ, Zheng XL. Effects of methyl jasmonate on active ingredient content in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, **34** (7): 81-84]
- 刘雅静. 蒙古黄芪悬浮细胞系的建立及茉莉酸甲酯对其黄酮含量的调控[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2011 [Liu YJ. Establishment of suspended cell line and effect of methyl jasmonate on flavonoids content of *Astragalus mongholicus* Bge. [D]. Huhehaote: Inner Mongolia University, 2011]
- 徐晓梅, 杨曙光. 苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, **37** (31): 15115-15119 [Xu XM, Yang SG. Advances in the studies of phenylalanine ammonialyase [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2009, **37** (31): 15115-15119]
- 单丽伟, 汪勇, 王美玲, 王中华. 大豆类黄酮生物合成关键酶*CHS*基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, **32** (11): 2164-2168 [Dan LW, Wang Y, Wang ML, Wang ZH. Cloning and expression analysis of *CHS* genes involved in the biosynthesis of flavonoids in soybean [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2012, **32** (11): 2164-2168]
- Winkelshirley B. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, **126** (2): 485-493
- 朱运钦, 乔改梅, 王志强. 植物类胡萝卜素代谢调控的研究进展[J]. 分子植物育种, 2016, **14** (2): 471-474 [Zhu YQ, Qiao GM, Wang ZQ. Research advances on metabolism regulation of plant carotenoids [J]. *Mol Plant Breeding*, 2016, **14** (2): 471-474]
- 高慧君, 明家琪, 张雅娟, 徐娟. 园艺植物中类胡萝卜素合成与调控的研究进展[J]. 园艺学报, 2015, **42** (9): 1633-1648 [Gao HJ, Ming JQ, Zhang YJ, Xu J. Regulation of carotenoids biosynthesis in horticultural crops [J]. *Acta Horticult Sin*, 2015, **42** (9): 1633-1648]
- Maiyo ZC, Ngure RM, Matasyoh JC, Chepkorir R. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, **9** (21): 3178-3182
- Stintzing F C, Kammerer D, Schieber A, Adama H. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L.[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2004, **59**(1-2): 1-8
- Wang K, Peng J, Shang H. Effect of methyl jasmonate in combination with ethanol treatment on postharvest decay and antioxidant capacity in Chinese bayberries [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58** (17): 9597
- Lyons R, Manners JM, Kazan K. Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, **32** (6): 815-827
- 李琨, 张学杰, 张德纯, 单佑习. 不同芹菜品种叶与叶柄黄酮含量及其与抗氧化能力的关系[J]. 园艺学报, 2011, **38** (1): 69-76 [Li K, Zhang XJ, Zhang DC, Shan YX. The quantitation of flavonoids in leaf and stalk of different celery cultivars and the correlation with antioxidation activity [J]. *Acta Horticult Sin*, 2011, **38** (1): 69-76]
- 董慧雪, 周燕蓉, 田奇琳, 赖恭梯, 林玉玲, 赖钟雄. 不同光质对龙眼胚性愈伤组织类黄酮含量的影响[J]. 热带作物学报, 2014, **35** (12): 2374-2377 [Dong HX, Zhou YR, Tian QL, Lai GT, Lin YL, Lai ZX. Effects of different light qualities on the contents of flavonoids of embryonic callus in *Dimocarpus longan* Lour. [J]. *Chin J Trop Crops*, 2014, **35** (12): 2374-2377]
- Liu S, Kuang H, Lai Z. Transcriptome analysis by Illumina high-throughput paired-end sequencing reveals the complexity of differential gene expression during *in vitro* plantlet growth and flowering in *Amaranthus tricolor* L [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (6): e100919
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Otter FD, Loon

- LV, Pieterse C. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation [J]. *Plant Physiol*, 2008, **147** (3): 1358-1368
- 21 王春丽, 梁宗锁, 李殿荣, 杨建利. 茉莉酸甲酯和水杨酸对丹参幼苗中蔗糖代谢和酚酸类物质积累的影响[J]. 西北植物学报, 2011, **31** (7): 1405-1410 [Wang CL, Liang ZL, Li DR, Yang JL. Effects of salicylic acid and methyl jasmonate on sucrose metabolism and phenolic compounds accumulation in *Salvia miltiorrhiza* Bunge seedlings [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2011, **31** (7): 1405-1410]
- 22 王瑜, 杨世海. 不同诱导子对王不留行毛状根生长和王不留行黄酮苷含量的影响[J]. 人参研究, 2014 (2): 51-53. [Wang Y, Yang SH. Effect of different elicitors on the growth and vaccarin of *Vaccaria segetalis* hairy roots [J]. *Ginseng Res*, 2014 (2): 51-53]
- 23 陈林, 崔培梧, 鲁耀邦, 廖彦, 张志丽, 张书航, 黄绍国, 易刚强. 茉莉酸甲酯对茯苓三萜生物合成的调控研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, **37** (6): 606-610 [Chen L, Cui PW, Lu YB, Liao Y, Zhang ZL, Zhang SH, Huang SG, Yi GQ. Study on regulation of triterpenoids biosynthesis in *Poria cocos* submerged fermentation system by methyl jasmonate [J]. *J Trad Chin Med Univ Hunan*. 2017, **37** (6): 606-61024
- 24 Pang YZ, Shen GA, Wu WS, Liu XF. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Sci*, 2005, **168** (6): 1525-1531
- 25 Zhang RQ, Zhu HH, Zhao HQ, Qing Y. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation increases phenolic synthesis in clover roots via hydrogen peroxide, salicylic acid and nitric oxide signaling pathways [J]. *J Plant Physiol*, 2013, **170** (1): 74-79
- 26 方芳, 王凤忠. 植物黄酮醇生物合成关键基因研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, **39** (14): 335-340 [Fang F, Wang FZ. Research progress on key genes of flavonol biosynthesis in plants [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, **39** (14): 335-340]
- 27 晏校. 逆境胁迫对枳实生苗类黄酮组分含量及关键酶基因表达量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011 [Yan X. The effects of environmental stresses on the content and gene expression of flavonoids in trifoliate orange [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011]
- 28 梁敏华, 杨震峰, 苏新国, 宋春波. 桃果实 ζ -胡萝卜素脱氢酶基因克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2018, **49** (5): 825-831 [Liang MH, Yang ZF, Su XG, Song CB. Cloning and expression analysis of ζ -carotene desaturase gene in peach fruit [J]. *J S Agric*, 2018, **49** (5): 825-831]