

低温胁迫下蒙古黄芪差异表达基因分析

华梦艺*, 顾卓雅*, 殷甘强, 王伟, 南蓬**

复旦大学生命科学学院, 上海200438

摘要: 温度是调控植物生长发育和代谢产物积累的重要因素。为了研究温度调控蒙古黄芪次生代谢产物积累的分子机制, 本文基于转录组测序结果对常温和低温组的蒙古黄芪幼苗基因表达水平进行对比分析。结果表明: 相对于常温组, 低温组差异表达基因共3 896个, 其中表达上调和下调的基因数目分别为2 420和1 476个。关键基因差异表达分析显示, 低温组异黄酮代谢途径中大部分关键基因表达量都显著上调, 而植物激素合成转导途径中的关键基因表达模式各有不同。由此可见, 低温胁迫能够促进蒙古黄芪中部分药用成分的合成, 同时能改变部分内源植物激素的合成和转导, 从而使其更好的适应低温环境。

关键词: 蒙古黄芪; 低温胁迫; 异黄酮; 植物内源激素; 差异表达基因

蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao] 是我国最重要的中药材之一, 有广泛的生理和药理活性, 能增强机体免疫力, 清除自由基, 在保护心肌细胞、增强心肌活力、抗肿瘤等方面有广泛应用 (陈国辉和黄文凤 2008)。黄芪皂苷 (主要是黄芪甲苷) 和黄芪异黄酮 (主要为毛蕊异黄酮及其糖苷) 是衡量蒙古黄芪质量优劣的标准, 其含量高低与黄芪药材的品质密切相关 (刘靖等 2011; 张蕾等 2012)。然而, 不同产地的蒙古黄芪药用有效成分的差异很大, 具有明显的道地性 (梁瑾等 2013; 王雪洁等 2011)。山西为蒙古黄芪的主产地之一, 黄芪品质居全国首位 (刘亚明等 2001), Ma 等 (2002) 曾报道了山西的蒙古黄芪中毛蕊异黄酮及其糖苷的含量随季节的变化情况, 这两种化学成分在气温最高和光照最强的 7 月含量最低, 而在 9~10 月含量最高, 推测这两个月份的温度差异可能对次生代谢产物积累有较大的影响。Pan 等 (2015) 发现, 蒙古黄芪转移至低温后, 毛蕊异黄酮含量显著提升。因此, 适当的低温处理很可能是提高蒙古黄芪有效成分的重要因素。

据文献报道, 适当低温对于植物生长以及代谢产物的积累非常重要 (Blackshaw 和 Entz 1995; 李小康 2011)。但目前关于低温对于植物, 特别是药用植物的次生代谢产物合成调控的分子机制研究却鲜有涉及。本研究中我们以培养 100 d 的蒙古黄芪幼苗为材料, 低温胁迫 (6°C) 处理组做为实验组, 正常温度 (20°C) 处理组为对照组, 利用 Illumina Hiseq2000 进行转录组测序分析, 旨在探究低温胁迫调控蒙古黄芪生长发育和次生代谢产物合成的分子机制。这些研究将为稳定和控制蒙古黄芪药

材质量提供科学依据, 也为今后利用植物基因工程技术提高蒙古黄芪的品质奠定理论基础。

材料与方法

1 材料

本研究实验材料为 20°C 盆栽培养 100 d 的蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao] 幼苗。为了消除个体差异, 我们选择长势相近且良好的蒙古黄芪随机分为实验组和对照组。实验组移动至 6°C 环境中进行低温处理, 对照组维持在 20°C 培养环境, 并于 12 h 时选取实验组和对照组中各 5 株植株混合后速冻保存于 -80°C。

2 方法

2.1 RNA 的提取和质量检测

使用 Trizol 试剂 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司, 卡尔斯巴德, CA, 美国) 分别提取实验组和对照组总 RNA, 并用 Bioanalyzer 2100 及 Agilent RNA 6000 Nano Kit 对总 RNA 的完整性和纯度进行分析。

2.2 cDNA 文库构建与转录组测序

cDNA 文库由杭州联川生物科技有限公司承担构建, 库检合格的文库用 Illumina Hiseq2000 进行测序, 测序读长为单端 50 bp。

2.3 测序数据分析

将原始数据去除垃圾序列后, 获得有效数据 clean reads。使用 Bowtie 软件将 clean reads 与目标黄芪转录组数据库进行比对 (Chen 等 2015), 得到

收稿 2016-12-26 修定 2017-03-10

资助 国家自然科学基金 (8137963)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者 (E-mail: nanpeng@fudan.edu.cn)。

mapped data。使用RPKM值度量基因表达的丰度值,用于差异表达量的确定与分析。将差异表达基因分别与GO、KEGG、Swiss-Prot、Nr、Pfam数据库比对,进行基因的功能、类别,以及所在通路的注释。使用Perl语言及R语言对后续数据进行生物信息学分析及绘图展示。

实验结果

1 RNA提取质量检测

经Bioanalyzer 2100及Agilent RNA 6000 Nano Kit对总RNA的完整性和纯度进行分析后,得到实验组(6°C, 12 h)和对照组(20°C, 12 h)的RIN值, rRNA 28S/18S值, OD₂₆₀与OD₂₈₀比值(表1)。根据表达谱文库建立的RNA质量评定标准, RIN值 ≥ 7 , rRNA 28S/18S ≥ 0.7 同时OD_{260/280} ≥ 1.8 的样品完整度和纯度符合建库要求。对两组样品总RNA进行质量评价,所有指标均符合建库标准。

表1 总RNA质量评测结果

Table 1 The quality evaluation of total RNA

处理	总质量/ μg	RIN	rRNA 28S/18S	OD _{260/280}
实验组	24.13	8.2	1.6	2.10
对照组	23.75	8.2	1.6	2.13

表2 表达谱测序质量和产量分析

Table 2 Quality and yield analysis of digital gene expression profile

处理	raw reads数	clean reads数	$\geq Q30\%$	CG含量/%	比对到参考转录组的reads数/比对率	总unigene数
对照组	11 438 348	11 433 579	96.39	42.88	10 390 077/90.87%	186 324
实验组	11 851 505	11 835 907	96.37	42.26	1 068 377/90.27%	186 324

Prot、Nr以及Pfam数据库进行比对和注释。统计结果显示,差异表达的3 896个基因中,比对到GO数据库中的有1 484个,KEGG数据库中的有457个,Swiss-prot数据库有1 708个,Nr数据库有2 757个,Pfam数据库有2 079个。

3.1 差异表达基因的GO富集分析

差异表达基因进行GO富集分析,结果显示,1 484个GO注释的差异表达基因富集到了235个GO条目下。根据GO功能不同,显著富集的GO条目分为细胞组分、基因分子功能、生物过程三大类,每大类功能下分别包含27、97、111个GO条目。

2 测序数据的组装与质量分析

通过高通量测序仪获得原始数据,统计原始测序量。结果显示,碱基质量超过Q30的比例均在95%以上,且CG含量均在50%左右,说明测序组装效果较好,符合后续分析要求。对组装结果符合要求的原始数据进行预处理,得到clean reads。对照组和实验中, clean reads分别占原始reads (raw reads)的99.87%和99.96%, unique reads占原始reads数的99.55%和99.69%,也表明表达谱文库构建和测序质量较高。

使用Bowtie软件将得到的clean reads与实验室已有的蒙古黄芪转录组数据库(Chen等2015)进行比对。结果显示,两组样品均有90%以上的reads能匹配至参考序列,说明测序精度较高。各样品的数据如表2所示。

3 差异表达基因的筛选和注释

使用RPKM法计算基因表达水平(Mortazavi等2008), Fold Change表示实验组与对照组RPKM比值,将 $|\text{Fold Change}| \geq 2$, $P\text{-value} < 0.05$ 的基因定义为差异表达基因。以此标准筛选到的低温胁迫下差异表达基因共3 896个,其中表达上调和表达下调的基因数目分别为2 420和1 476个。

将差异表达基因分别与GO、KEGG、Swiss-

对每大类GO功能下的主要条目进行统计(图1),结果显示,在生物过程类功能中,差异表达基因主要涉及盐胁迫应答、运输、胁迫应答、翻译、脱落酸刺激应答等生物过程;在细胞组分功能中,差异表达基因主要分布于胞外区域、细胞壁、植物型细胞壁、核糖体等条目;在分子功能中,差异表达的基因则在蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、氧化还原酶活性、协同转运载体活性等功能中有显著富集。

对富集的GO功能进行进一步分析后发现(图2),类黄酮化合物合成、入核转运、植物激素应

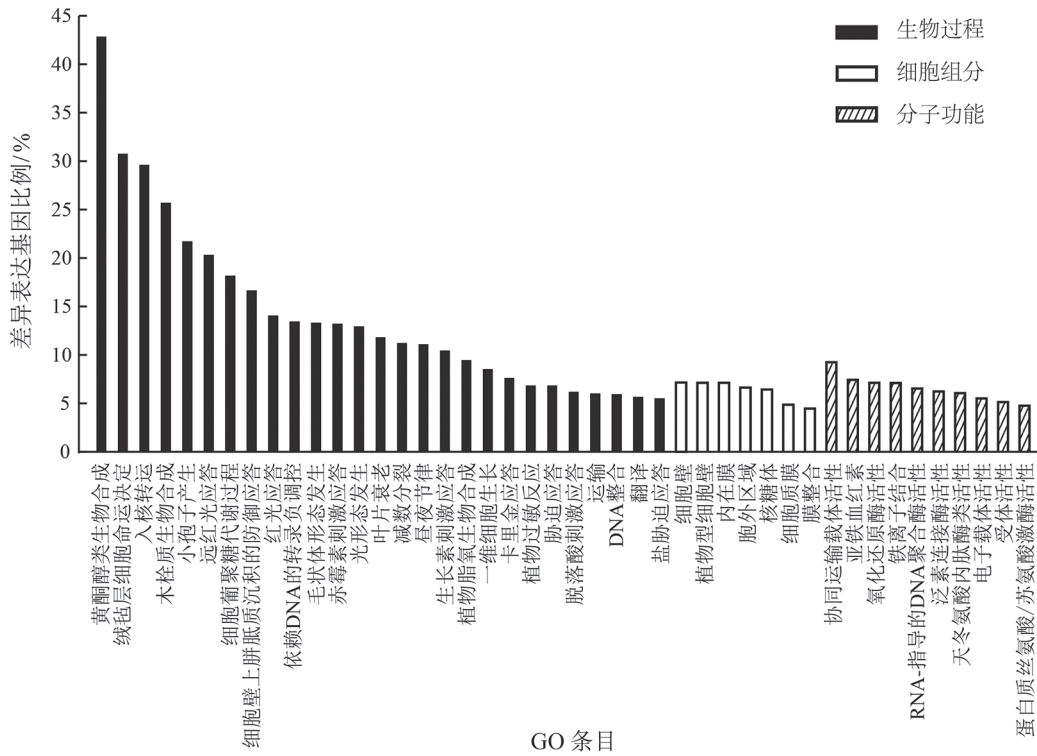


图1 差异表达基因GO富集分类统计图

Fig.1 GO enrichment analysis classification of differentially expressed genes (DEGs)

纵坐标表示指定GO条目下差异表达基因数与全部基因数的比值。

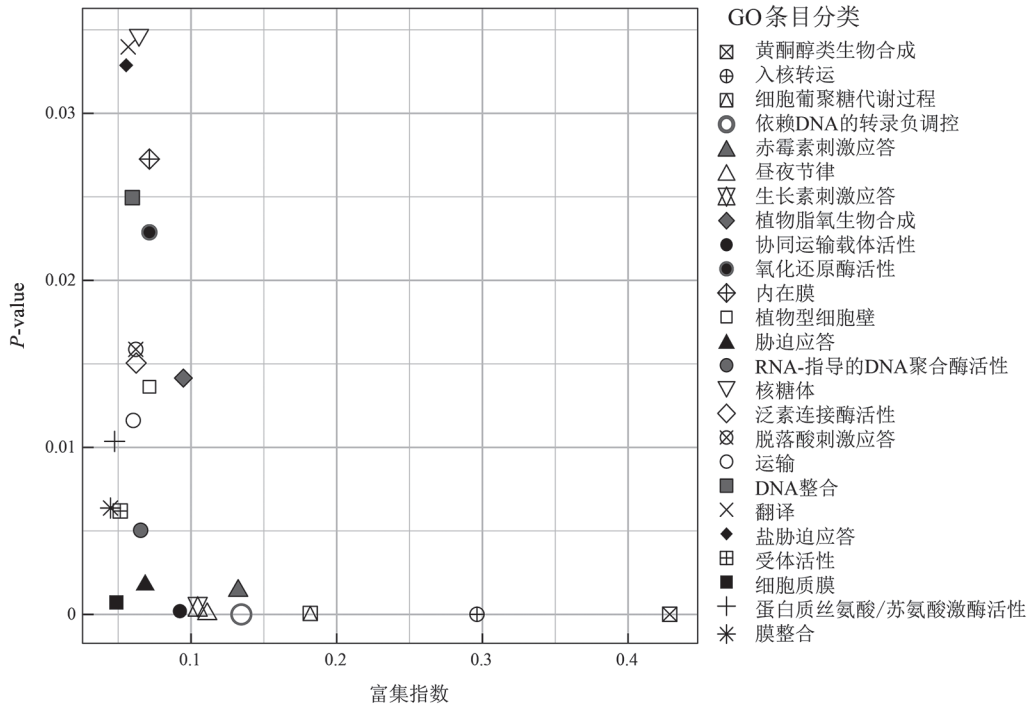


图2 差异表达基因GO富集散点图

Fig.2 Scatter plot for GO enrichment results

散点图中, 横坐标代表富集指数, 数值越大说明富集程度越高, 纵坐标代表富集程度的可靠性, 数值越小说明可靠程度越高, 图4同此。

答、胁迫应答等功能显著富集程度以及可信度较高,说明这些功能的差异表达基因在蒙古黄芪低温胁迫应答中发挥重要作用。

3.2 差异表达基因的KEGG富集分析

在KEGG数据库中对差异表达基因进行功能注释和分类,457个有KEGG注释的差异表达基因共分布在206个不同的KEGG代谢通路中。206条通路分析显示,差异表达基因主要集中在次生代谢产物合成、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、脂质代谢、外源性物质的生物降解和代谢、环境适应这几大类代谢通路中(图3)。

进一步对KEGG通路进行富集分析,统计得到低温胁迫下显著富集KEGG通路共有14条(图4),可分为七大类:(1)植物初生代谢相关通路,包括戊糖和葡萄糖醛酸酯互变、亚油酸和 α -亚麻酸代谢;(2)植物次生代谢相关通路,包括苯丙氨酸代谢、吲哚生物碱的生物合成、黄酮和黄酮醇类化合物生物合成、异喹啉(类)生物碱生物合成以及油菜素类固醇合成;(3)能量代谢相关通路,包括光合作用和甲烷代谢;(4)细胞生长和死亡相关通路,主要涉及细胞凋亡过程;(5)环境适应相关通路,主要涉及植物昼夜节律调节;(6)外源物质的降解和生物

代谢;(7)细胞群落相关通路,主要涉及细胞间隙连接。从图4的富集散点图能清楚地发现,低温胁迫下,大部分次生代谢途径以及生物昼夜节律相关的功能基因有显著富集,说明这些途径中的基因对于低温胁迫的响应更为快速。

3.3 关键基因的差异表达分析

3.3.1 低温胁迫对黄芪次生代谢途径中关键基因的影响

由KEGG功能分类统计结果(图3)可知,差异表达基因主要分布在次生代谢产物合成、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、脂质代谢等功能的KEGG通路中。对这几大类KEGG通路内的差异表达基因数量和表达情况进行统计(表3),结果显示,我们关注的大部分通路中上调基因的数量几乎都多于下调基因的数量。

黄酮代谢和萜类代谢是蒙古黄芪最重要的两条次生代谢途径,能产生多种重要的药用成分。统计结果显示,在黄酮和黄酮醇类化合物生物合成、类黄酮生物合成、萜类化合物骨架生物合成等KEGG通路中,上调基因数全部多于下调基因数,说明低温胁迫能显著提高这些次生代谢产物合成途径中大部分基因的表达量。

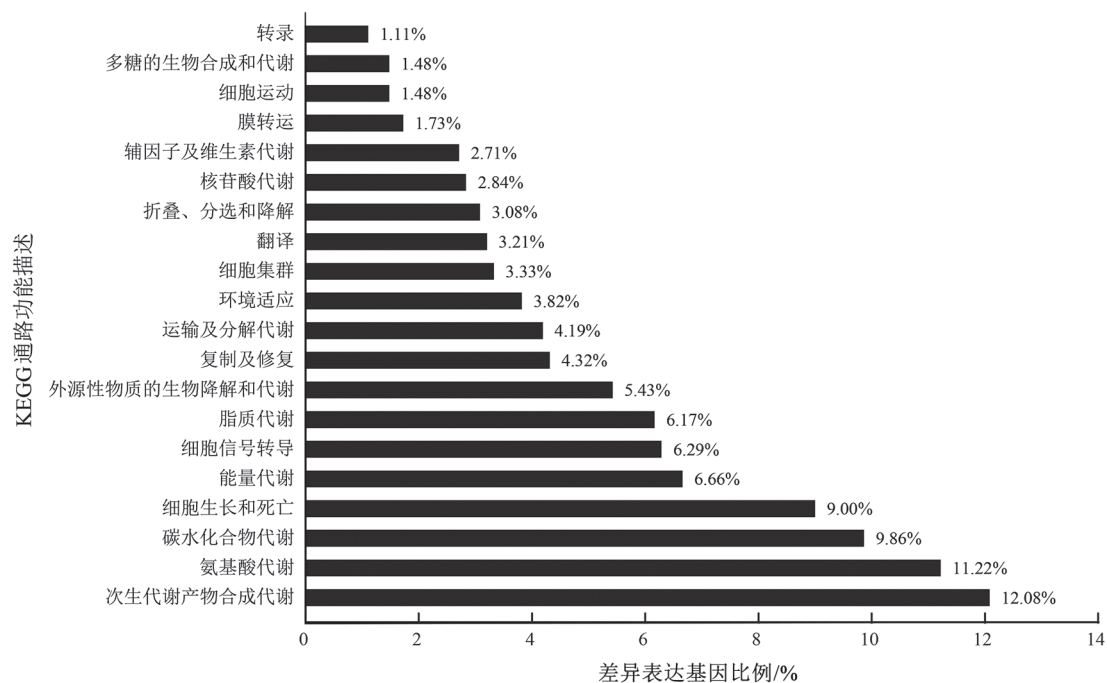


图3 差异表达基因的KEGG功能分类统计图

Fig.3 KEGG function classification of differentially expressed genes

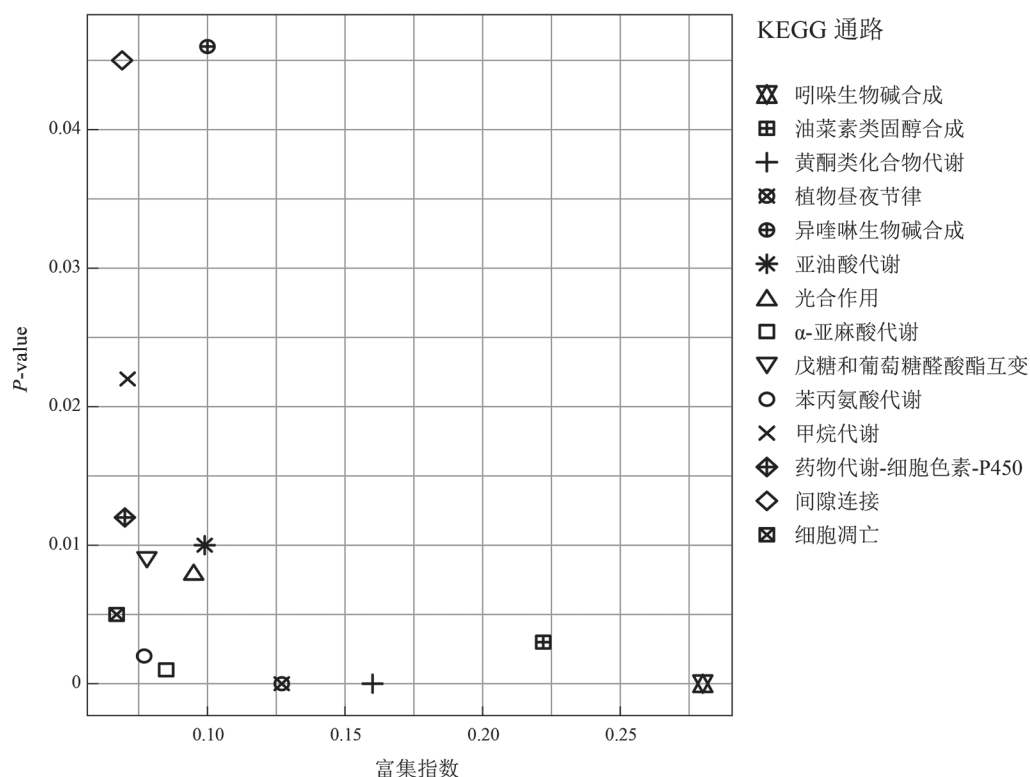


图4 差异表达基因的KEGG通路富集散点图
Fig.4 Scatter plot for KEGG enrichment results

统计分析黄酮代谢和萜类代谢途径中关键酶的编码基因表达情况(表4), 结果显示, 在低温胁迫下, 类黄酮代谢途径中限速酶苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、4-香豆素辅酶A (4-coumarate:CoA ligase, 4CL)、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、异黄酮合酶(isoflavone synthase, IFS)基因表达量显著增加; 三萜代谢途径上游的2C-甲基-D-赤藓醇2,4-环焦磷酸合成酶(2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, ISPF)基因表达量也上调, 只有下游关键基因环阿屯醇合成酶(cycloartenol synthase, CAS)基因表达量相对下降。这些结果说明, 低温胁迫条件下, 异黄酮的合成量提升, 而三萜代谢途径虽然上下游基因的调控方向不同, 但也受到了低温显著的影响。

3.3.2 低温胁迫对黄芪内源激素合成和代谢关键基因的影响

植物内源性激素除了调控植物的正常生长发育, 还参与到了植物对于逆境胁迫的响应。在研究低温对于黄芪内源激素相关基因表达影响时发现, 不

同激素的合成代谢基因有着不同的表达模式(表5)。

在生长素信号途径中, 吲哚乙酸酰胺合成酶3.5 (gretchen hagen 3.5, GH3.5)和3.6 (GH3.6)、极性运输内输载体(auxin transporter-like protein 2, LAX2)、输出载体(auxin efflux carrier component 1c, PIN1C)基因表达量上调, 而其合成途径中的关键酶吲哚-3-乙酰醛氧化酶(indole-3-acetaldehyde oxidase, AO2)基因表达量相对下调。在赤霉素信号途径中, 介导赤霉素失活的赤霉素双加氧酶7 (gibberellin 2-beta-dioxygenase 7, GA2OX7)基因表达量上调, 合成途径中的限速酶赤霉素20-氧化酶1 (gibberellin 20 oxidase 1, GA20OX1)基因表达下调。在乙烯信号途径中, 促进乙烯合成的氨基环丙烷羧酸氧化酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase1, ACO1)基因、转导过程中的乙烯正调控因子(ethylene-insensitive 2, EIN2)、乙烯响应因子4 (ethylene-responsive transcription factor 4, ERF4)、乙烯响应因子7 (ethylene-responsive transcription factor 7, ERF7)基因表达量在低温组中都有显著上调, 而转导负调控因子组成型三重反应蛋白1 (constitutive

表3 部分KEGG途径中差异表达基因调控情况及数量统计

Table 3 Quantitative statistics analysis and regulation of DEGs in the selected KEGG pathways

KO编号	通路名称	通路描述	下调	上调
ko00360	苯丙氨酸代谢	氨基酸代谢	3	13
ko00270	半胱氨酸和甲硫氨酸代谢	氨基酸代谢	2	13
ko00350	酪氨酸代谢	氨基酸代谢	1	5
ko00380	色氨酸代谢	氨基酸代谢	2	4
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢	氨基酸代谢	3	2
ko00480	谷胱甘肽代谢	氨基酸代谢	1	7
ko00460	氰基氨基酸代谢	氨基酸代谢	2	4
ko00944	黄酮和黄酮醇类化合物生物合成	次生代谢产物合成与代谢	1	7
ko00901	吲哚生物碱生物合成	次生代谢产物合成与代谢	1	6
ko00950	异喹啉生物碱生物合成	次生代谢产物合成与代谢	1	3
ko00940	苯丙烷生物合成	次生代谢产物合成与代谢	4	17
ko00945	芪类化合物的合成	次生代谢产物合成与代谢	1	8
ko00941	类黄酮生物合成	次生代谢产物合成与代谢	0	5
ko00906	类胡萝卜素生物合成	次生代谢产物合成与代谢	0	6
ko00900	萜类化合物骨架生物合成	次生代谢产物合成与代谢	0	5
ko00903	柠檬烯和松萜降解	次生代谢产物合成与代谢	1	8
ko00100	类固醇生物合成	次生代谢产物合成与代谢	1	3
ko00040	戊糖和葡萄糖醛酸酯互换	碳水化合物代谢	2	9
ko00520	氨基糖和核苷酸糖代谢	碳水化合物代谢	0	9
ko00500	淀粉和蔗糖代谢	碳水化合物代谢	3	16
ko00010	糖酵解	碳水化合物代谢	1	5
ko00620	丙酮酸代谢	碳水化合物代谢	3	4
ko00592	α -亚麻酸代谢	脂质代谢	3	12
ko00591	亚油酸代谢	脂质代谢	2	5
ko01040	不饱和脂肪酸生物合成	脂质代谢	3	2
ko00564	甘油磷脂	脂质代谢	1	4

表4 蒙古黄芪次生代谢途径中关键基因的表达

Table 4 Expression data of key genes in secondary metabolic pathway of *A. membranaceus*

基因编号	基因名称	表达情况	基因注释	表达量	
				低温组	对照组
p26079.1	<i>CAS</i>	下调	环阿屯醇合酶	3.94	66.11
p64074.1	<i>IFS</i>	上调	异黄酮合酶	9.82	1.49
p49588.1	<i>ISPF</i>	上调	环焦磷酸合成酶	18.77	3.22
p49588.2	<i>ISPF</i>	上调	—	18.97	3.25
p58574.1	<i>PAL2</i>	上调	苯丙氨酸解氨酶	109.80	24.13
p72883.1	<i>CHS3</i>	上调	查尔酮合成酶	79.30	18.18
p72203.3	<i>4CL5</i>	上调	4-香豆素辅酶A	33.52	9.45
p54352.1	<i>FLS</i>	上调	黄酮醇合成酶	67.65	11.49

triple response 1, CTR1)基因的表达则有显著下调。茉莉酸合成过程中的关键酶亚油酸9S-脂氧合酶家族4 (linoleate 9S-lipoxygenase 4, LOX1.4)、亚油酸9S-脂氧合酶家族2 (linoleate 9S-lipoxygenase 2, LOX1.2)基因的表达量显著上调, 而与茉莉酸甲

酯合成直接相关的茉莉酸甲酯甲基转移酶(jasmonic acid carboxyl methyltransferase, JMT)基因也几乎只在低温胁迫实验组中表达。这些实验数据都说明了低温胁迫对于蒙古黄芪的内源激素合成和信号转导有显著的影响。

表5 蒙古黄芪内源激素合成代谢相关的关键基因表达情况

Table 5 Expression data of key genes in phytohormone metabolic and biosynthesis pathway of *A. membranaceus*

基因编号	基因名称	表达情况	基因功能	表达量	
				低温组	对照组
p64499.2	<i>ERF7</i>	上调	乙烯响应蛋白-7	48.58	14.57
p63184.1	<i>ERF4</i>	上调	乙烯响应蛋白-4	25.13	4.79
p67699.3	<i>ERF4</i>	上调	乙烯响应蛋白-4	13.22	2.65
p41460.1	<i>EIN2</i>	上调	乙烯信号途径中的正调控组分	25.56	3.99
p66017.1	<i>EIN2</i>	上调	乙烯信号途径中的正调控组分	32.53	7.62
p73556.1	<i>CTR1</i>	下调	乙烯信号途径中的负调控组分	0.46	40.30
p60019.1	<i>ACO1</i>	上调	氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶, 促乙烯合成	128.74	10.88
p76057.16	<i>PINIC</i>	上调	生长素极性运输外输载体	21.03	2.55
p74188.3	<i>LAX4</i>	上调	生长素极性运输内输载体	20.52	4.56
p74188.2	<i>LAX2</i>	上调	生长素极性运输内输载体	22.71	4.15
p74188.4	<i>LAX2</i>	上调	生长素极性运输内输载体	20.82	3.39
p70430.1	<i>GH3.6</i>	上调	生长素氨基酸化合成酶, 介导生长素失活	47.57	1.33
p367486.1	<i>GH3.5</i>	上调	生长素氨基酸化合成酶, 介导生长素失活	31.37	3.20
p61768.1	<i>AO2</i>	下调	吲哚-3-乙酰胺氧化酶, 促进生长素合成	9.06	63.82
p61138.1	<i>LOX1.4</i>	上调	脂氧合酶, 茉莉酸合成早期基因	426.09	67.22
p73510.5	<i>LOX1.4</i>	上调	脂氧合酶, 茉莉酸合成早期基因	335.35	51.31
p55923.1	<i>LOX1.2</i>	上调	脂氧合酶, 茉莉酸合成早期基因	517.12	146.92
p73847.3	<i>JMT</i>	上调	茉莉酸甲酯甲基转移酶, 促茉莉酸甲酯合成	1.62	0.01
p42649.2	<i>GA2OX7</i>	上调	赤霉素双加氧酶7, 介导赤霉素失活	12.42	0.16
p70039.4	<i>GA2OX1</i>	下调	赤霉素20-氧化酶, 促赤霉素合成的关键酶	0.37	6.08

讨 论

已经有大量实验证明, 低温胁迫对植物活性氧代谢、光合作用、呼吸作用、氮代谢、氨基酸代谢等生理过程有显著影响(Lyons 1973; 董万鹏等2015)。同时, 低温胁迫对植物的次生代谢产物的累积模式的改变也发挥一定的作用(Wang等2007)。

1 低温对于蒙古黄芪异黄酮代谢途径影响

蒙古黄芪的毛蕊异黄酮及其糖苷含量是衡量其药用价值的关键指标, 也是异黄酮代谢途径的重要产物。蒙古黄芪的异黄酮代谢途径是苯丙烷类代谢途径的一个重要分支。大量研究表明, 多数植物在遭受低温、干旱、紫外辐射以及高盐度胁迫时, 苯丙氨酸代谢途径作为防卫系统发挥抗逆境作用, 其中的关键基因会显著表达(Hartley和Firn 1989)。

PAL是负责将苯丙氨酸转化为其他次生代谢产物的第一个酶, 被认为是黄酮类化合物合成代谢途径中最关键的限速酶(Liu等2006)。在本研究中, 低温组蒙古黄芪PAL的表达量是对照组的5.1

倍, 说明低温显著诱导了PAL的表达。这与成熟香蕉和肋果沙棘中的研究结果一致(Wang等2007; 张宏涛等2015)。

4CL是催化苯丙烷代谢总途径中最后一步反应的酶, 催化4-香豆酸及其衍生物转化为相应的CoA酯, 从而进入木质素、异黄酮、花青素等代谢支路(李莉等2007)。Christie等(1994)在研究低温对于玉米花青素代谢关键基因表达影响时发现, 6 h低温胁迫能使得玉米幼苗中4CL转录水平大幅度增加, 而对烟草多酚代谢的研究则发现低温能抑制4CL的表达(杨慧芹等2015)。在本研究中, 低温组中4CL的表达量比对照组增加了3.89倍。这些结果说明在不同植物中低温胁迫引起4CL表达水平的改变趋势不完全一致, 这可能与不同植物的遗传背景以及生境差异有关, 同时也反映出, 4CL在植物应对温度降低时的调控网络中发挥的作用不同。

Pan等(2015)关于蒙古黄芪毛蕊异黄酮及其糖苷积累的研究表明, 将蒙古黄芪移至低温环境时, IFS的表达水平有显著提升。本研究中, 低温实验组的IFS表达量是对照组表达量的7.3倍。IFS催化

底物柚皮素或甘草素转化为7,4'-二羟基异黄酮或5,7,4'-三羟基异黄酮,它是进入异黄酮合成途径的第一个酶,促进底物向异黄酮的合成,也是异黄酮途径的限速酶(Hakamatsuka等1998)。因此本研究结果提示,蒙古黄芪异黄酮代谢途径在低温胁迫下得到了显著激活。

综上,在本研究中,苯丙氨酸代谢途径以及异黄酮代谢途径中的关键酶基因的表达量都有显著提升。这一方面说明,这些代谢通路在蒙古黄芪应对低温胁迫时发挥重要作用,另一方面也提示,低温胁迫能够显著提高异黄酮代谢途径中基因的表达量,从而加速蒙古黄芪中具有药用价值的毛蕊异黄酮及其糖苷的合成积累。

2 低温对于蒙古黄芪内源激素信号途径影响

低温胁迫不仅影响黄酮类次生代谢产物的合成积累,对于植物内源激素的合成转导也有很大的影响。目前越来越多的证据显示,多种内源激素都在植物的低温胁迫应答中发挥重要作用(丁杨林等2015)。在蒙古黄芪中,内源植物激素在低温胁迫应答以及促进药用成分积累上也有一定作用。在本研究中,生长素以及茉莉酸合成和转导相关基因在蒙古黄芪中的表达模式值得关注。

茉莉酸类物质作为内源信号分子在多种逆境胁迫中也发挥了重要作用(冯孟杰等2015)。大量的研究都证明,低温胁迫下,茉莉酸类物质可以抑制活性氧的产生速率,增加可溶性蛋白的含量,从而保护膜结构的完整性,维持正常的生理代谢,提高植物对于低温的抗性。除此之外,茉莉酸类化合物也被发现可以提高PAL的表达,从而促进苯丙氨酸代谢(宾金华等2000;蔡昆争等2006;朱家红和彭世清2006)。

在本研究中,低温组茉莉酸合成途径中的脂氧合酶LOX1.2和JMT表达显著提高,说明低温胁迫下,蒙古黄芪的茉莉酸类化合物合成增多,一方面增强了蒙古黄芪的抗逆境能力,另一方面也促进了次生代谢产物的合成和积累。

生长素在植物的整个生命周期中发挥着重要的调节作用,同时也与非生物逆境胁迫有着紧密的关系。研究发现,低温能抑制苹果中生长素的合成(罗慧珍等2016),拟南芥中介导生长素失活的GH3家族基因的高表达对于提高植株的抗冻能力

有一定作用(Park等2007)。本研究中,低温胁迫下蒙古黄芪中催化吲哚乙醛生成生长素的AO2显著下调表达,而生长素早期响应基因GH3.5、GH3.6则显著上调,提示蒙古黄芪内源性生长素的含量可能在低温胁迫下相应降低,这些与前人研究也保持一致。

有趣的是,大部分研究者发现,低温主要通过影响生长素向外运输载体PIN2、PIN3的分布从而抑制生长素在根部的运输,影响根的向地性生长(Shibasaki等2009)。在本实验中,PIN2、PIN3基因并未有显著差异表达,而PIN1C载体基因和LAX2、LAX4载体基因在低温组中表达也有提高。PIN1C载体主要负责介导生长素从地上部分运输到根部并在根部向顶运输(Blilou等2005;Wisniewska等2006;郑元等2013),而LAX2、LAX4载体则是生长素极性运输的内输载体。因此,PIN1C、LAX2、LAX4的高表达说明低温影响了生长素在蒙古黄芪细胞间的极性运输,可能加速了生长素向根部的运输。生长素能促进根部细胞的伸长,而蒙古黄芪的根部则是储藏药用成分的重要场所,也是其最有价值的药用部位。在本研究中低温影响了生长素在根中的极性运输,因而也可能在一定程度上影响了有效药用成分的累积模式。这项结果对后续研究生长素的极性运输与蒙古黄芪有效成分累积的关系有很大参考价值。

综合以上分析,我们发现,低温胁迫能提高蒙古黄芪异黄酮代谢途径关键基因的表达,从而促进有效次生代谢产物的产生。同时,低温也能诱导相关内源激素的合成,促进它们在蒙古黄芪内的信号转导,一方面使得植株能快速适应低温,另一方面也能在一定程度上刺激异黄酮代谢途径关键基因的表达。本实验通过转录组表达谱分析挖掘出了蒙古黄芪有效化合物积累过程中的关键基因,并阐述了低温胁迫调控蒙古黄芪次生代谢产物合成积累的分子机制,对于后续进一步研究昼夜温差调控蒙古黄芪有效成分累积的分子机制,科学改造基因获得更高产量的药用化合物奠定了基础。

参考文献

- Bin JH, Jing S, Huang SQ, Pan RC (2000). The relationship between methyl jasmonate induced anthracnose resistance of tobacco

- seedlings and phenylalanine ammonia-lyase activity and cell wall substances. *Acta Phytophysiol Sin*, 26 (1): 1–6 (in Chinese with English abstract) [宾金华, 姜胜, 黄胜琴, 潘瑞焱(2000). 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗炭疽病与PAL活性及细胞壁物质的关系. *植物生理学报*, 26 (1): 1–6]
- Blackshaw RE, Entz T (1995). Day and night temperature effects on vegetative growth of *Erodium cicutarium*. *Weed Res*, 35 (6): 471–476
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, 433 (7021): 39–44
- Cai KZ, Dong TX, Xu T (2006). The physiological roles and resistance control in stress environment of jasmonates. *Ecol Environ*, 15 (2): 397–404 (in Chinese with English abstract) [蔡昆争, 董桃杏, 徐涛(2006). 茉莉酸类物质(JAs)的生理特性及其在逆境胁迫中的抗性作用. *生态环境*, 15 (2): 397–404]
- Chen GH, Huang WF (2008). Progress in pharmacological effects of compositions of *Astragalus membranaceus*. *Chin J New Drug*, 17 (17): 1482–1485 (in Chinese with English abstract) [陈国辉, 黄文凤(2008). 黄芪的化学成分及药理作用研究进展. *中国新药杂志*, 17 (17): 1482–1485]
- Chen J, Wu XT, Xu YQ, Li YX, Zhong Y, Chen JK, Li X, Nan P (2015). Global transcriptome analysis profiles metabolic pathways in traditional herb *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *BMC Genomics*, 16 (Suppl 7): S15
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194 (4): 541–549
- Ding YL, Shi YT, Yang SH (2015). Molecular mechanisms of plant responses to cold stress. *Sci Chin Life Sci*, 27 (3): 398–405 (in Chinese with English abstract) [丁杨林, 施怡婷, 杨淑华(2015). 植物响应低温胁迫的分子机制研究. *生命科学*, 27 (3): 398–405]
- Dong WP, Luo C, Long XQ, Hu J, Li Y (2015). Effect of low temperature stress on physiological indexes of cold resistance of *Passiflora edulis*. *Plant Physiol J*, 51 (5): 771–777 (in Chinese with English abstract) [董万鹏, 罗充, 龙秀琴, 胡静, 李燕(2015). 低温胁迫对西番莲抗寒生理指标的影响. *植物生理学报*, 51 (5): 771–777]
- Feng MJ, Xu H, Zhang H, Zhu Y (2015). Recent progress in jasmonates regulation of plant growth and development. *Plant Physiol J*, 51 (4): 407–412 (in Chinese with English abstract) [冯孟杰, 徐恒, 张华, 朱英(2015). 茉莉素调控植物生长发育的研究进展. *植物生理学报*, 51 (4): 407–412]
- Hakamatsuka T, Mori K, Ishida S, Ebizuka Y, Sankawa U (1998). Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata* in honour of professor G. H. Neil towers 75th birthday. *Phytochemistry*, 49 (2): 497–505
- Hartley SE, Firm RD (1989). Phenolic biosynthesis, leaf damage, and insect herbivory in birch (*Betula pendula*). *J Chem Ecol*, 15 (1): 275–283
- Li L, Zhao Y, Ma JL (2007). Recent progress on key enzymes: PAL, C4H, 4CL of phenylalanine metabolism pathway. *Chin J Bioinformatics*, 5 (4): 187–189 (in Chinese with English abstract) [李莉, 赵越, 马君兰(2007). 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL研究新进展. *生物信息学*, 5 (4): 187–189]
- Li XK (2011). Effect of difference DIF on leaf color of *Populus × euramericana* Zhonghong. *J Henan Agri Sci*, 40 (9): 119–122 (in Chinese with English abstract) [李小康(2011). 不同昼夜温差对红杨叶色的影响. *河南农业科学*, 40 (9): 119–122]
- Liang J, Liu XH, Ren Y, Feng SL (2013). Simultaneous determination of five compounds in Radix Astragali by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. *Chin J Pharm Anal*, 33 (2): 210–213 (in Chinese with English abstract) [梁瑾, 刘小花, 任远, 封士兰(2013). HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪中5个成分的含量. *药物分析杂志*, 33 (2): 210–213]
- Liu J, Yang H, Zhu XM, Zhao ZZ, Chen HB (2011). Comparative study of wild and cultivated Astragali Radix in Daqingshan district in Wuchuan of Neimenggu. *Chin J Chin Mat Med*, 36 (12): 1577–1581 (in Chinese with English abstract) [刘靖, 杨华, 朱雪梅, 赵中振, 陈虎彪(2011). 内蒙古武川县大青山地区蒙古黄芪野生品与栽培品的比较研究. *中国中药杂志*, 36 (12): 1577–1581]
- Liu YM, Niu YZ, Feng QJ, Niu X (2001). Comparison of qualities of three kinds of *Huangqi* & exploration of industrialization development of native *Shanxi Huangqi*. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 16 (4): 263–265 (in Chinese with English abstract) [刘亚明, 牛燕珍, 冯前进, 牛欣(2001). 三种黄芪质量比较及山西道地黄芪的产业化发展分析. *中国医药学报*, 16 (4): 263–265]
- Liu R, Xu S, Li J, Lin Z (2006). Expression profile of a PAL gene from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis. *Plant Cell Rep*, 25 (7): 705–710
- Luo HZ, Deng S, Zhang CF, Xiao R, Wang H, Meng YP, Cao QF (2016). Differentially expressed gene analysis of apple (*Malus domestica*) anther under low temperature induction. *Plant Physiol J*, 52 (3): 259–268 (in Chinese with English abstract) [罗慧珍, 邓舒, 张春芬, 肖蓉, 王卉, 孟玉平, 曹秋芬(2016). 低温诱导下苹果花药差异表达基因分析. *植物生理学报*, 52 (3): 259–268]
- Lyons JM (1973). Chilling injury in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 24: 445–466
- Ma XQ, Shi Q, Duan JA, Dong TT, Tsim KW (2002). Chemical analysis of Radix Astragali (*Huangqi*) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. *J Agric Food Chem*, 50 (17): 4861–4866
- Mortazavi A, Williams BA, Mccue K, Schaeffer L, Wold B (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5 (7): 621–628
- Pan H, Li XB, Cheng X, Wang XQ, Fang CM, Zhou TS, Chen JK (2015). Evidence of calycosin-7-O-β-D-glucoside's role as a major antioxidant molecule of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao plants under freezing stress. *Environ Exp Bot*, 109: 1–11
- Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeone J, Yun J, Kim SY, Kim JM, Lee YH, Park CM (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabi-*

- dopsis*. J Biol Chem, 282 (13): 10036–10046
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A (2009). Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms. Plant Cell, 21 (12): 3823–3838
- Wang XJ, Sun HF, Xie DS, Wu B, Qin XM (2011). Comparison of the content of major flavonoids in the introduced and cultivated Radix Astragali. Bull Bot Res, 31 (3): 358–362 (in Chinese with English abstract) [王雪洁, 孙海峰, 谢道生, 武滨, 秦雪梅 (2011). 引种栽培黄芪药材中主要黄酮类成分含量比较研究. 植物研究, 31 (3): 358–362]
- Wang Y, Chen JY, Jiang YM, Lu WJ (2007). Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase in relation to chilling tolerance in harvested banana fruit. Postharvest Biol Tec, 44 (1): 34–41
- Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Benkova E, Scheres B, Friml J (2006). Polar PIN localization is sufficient to direct auxin flow in plants. Science, 312 (5775): 883
- Yang HQ, Wang SS, Zhang JB, He DH, Ma WG, Pang T, Gong M (2015). Differential response and comparison of polyphenols metabolism in tobacco seedling under the stresses of drought and low temperature. Genom Appl Biol, 34 (3): 645–654 (in Chinese with English abstract) [杨慧芹, 王莎莎, 张建波, 郝大海, 马文广, 逢涛, 龚明 (2015). 烟草多酚代谢对干旱和低温胁迫的响应差异及其比较. 基因组学与应用生物学, 34 (3): 645–654]
- Zhang HT, Chen W, Li XW, Su X, Sun K (2015). The activity of key enzymes related to flavonoids in test-tube plantlets of *Hippophae neurocarpa* under low temperature. Nor Hortic, (10): 5–8 (in Chinese with English abstract) [张宏涛, 陈纹, 李小伟, 苏雪, 孙坤 (2015). 低温胁迫下肋果沙棘试管苗黄酮类化合物合成关键酶的活性. 北方园艺, (10): 5–8]
- Zhang Q, Gao WY, Man SL (2012). Chemical composition and pharmacological activities of Astragali Radix. J Chin Mat Med, 37 (21): 3203–3207 (in Chinese with English abstract) [张蕾, 高文远, 满淑丽 (2012). 黄芪中有效成分药理活性的研究进展. 中国中药杂志, 37 (21): 3203–3207]
- Zheng Y, Zhou AP, Liu YK, He CZ (2013). The polar transport and regulatory mechanism of auxin in plants. J Yunnan Univ, 28 (6): 878–884 (in Chinese with English abstract) [郑元, 周安佩, 刘玉鲲, 何承忠 (2013). 植物生长素极性运输及调控机制的研究进展. 云南农业大学学报, 28 (6): 878–884]
- Zhu JH, Pen SQ (2006). Jasmonic acid and its signal transmission. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 26 (10): 2166–2172 (in Chinese with English abstract) [朱家红, 彭世清 (2006). 茉莉酸及其信号传导研究进展. 西北植物学报, 26 (10): 2166–2172]

Analysis of differentially expressed gene profile under chilling stress in *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao

HUA Meng-Yi*, GU Zhuo-Ya*, YIN Gan-Qiang, WANG Wei, NAN Peng**

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: Temperature plays an important role in regulating the growth and development of plants as well as the accumulation of metabolites. To investigate the molecular mechanism of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao under chilling stress, we analyzed the seedlings under normal/low temperature treatment by high-throughput transcriptome sequencing. A total of 3 896 differentially expressed genes (DEGs) were screened out in low-temperature group compared to the normal-temperature group, among which 2 420 genes were up-regulated and 1 476 genes were down-regulated. The DEGs involved in the isoflavonoids metabolic pathways were all up-regulated, indicating that the synthesis of isoflavonoids increased in low temperature. Besides, the phytohormone relative genes showed diversified regulation variation under chilling stress, suggesting various functions of phytohormone in responding chilling stress. Taken together, our study found that the low-temperature stimulus can promote the synthesis of some pharmaceutical components in *A. mongolicus* and alter the expression profile of phytohormone to adapt to chilling environment.

Key words: *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao; chilling stress; isoflavonoids; phytohormone; differentially expressed genes

Received 2016-12-26 Accepted 2016-03-10

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 8137963).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: nanpeng@fudan.edu.cn).