



吴晓宗,郭万旺,朱智文,等.水杨酸诱导烟草黄酮类化合物合成基因表达研究[J].轻工学报,2025,40(2):80-89.  
WU X Z, GUO W W, ZHU Z W, et al. Studies on flavonoids biosynthesis genes expression induced by salicylic acid in *Nicotiana tabacum* L. [J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(2): 80-89.  
DOI: 10.12187/2025.02.009

# 水杨酸诱导烟草黄酮类化合物合成基因表达研究

吴晓宗<sup>1</sup>, 郭万旺<sup>1</sup>, 朱智文<sup>1</sup>, 李萌<sup>1</sup>, 徐健博<sup>2</sup>, 朱若洁<sup>2</sup>, 刘志连<sup>3</sup>, 耿玉珂<sup>4</sup>

1. 郑州轻工业大学烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 湖北省烟草公司十堰市公司, 湖北 十堰 442000;
3. 石家庄市藁城区农业科学研究所, 河北 石家庄 052160;
4. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

**摘要:**为探索水杨酸(Salicylic Acid, SA)对烟草总黄酮含量及相关基因表达的影响,采用SA溶液对烟草幼苗进行4个时间点(0 h、1 h、4 h和12 h)的灌根处理,检测烟草全株总黄酮含量并进行转录组测序分析,再利用荧光定量PCR对测序分析结果进行验证。结果表明:与0 h处理样品(SA0)相比,1 h处理样品(SA1)的总黄酮含量显著上调,且高于4 h处理样品(SA4)和12 h处理样品(SA12);差异表达基因(DEGs)中,SA诱导SA1、SA4、SA12显著上调的基因重叠数目为1272个,GO功能注释和KEGG代谢通路富集显示,在SA1中显著上调的基因大多编码苯丙素代谢和异黄酮代谢途径相关的催化酶,这些酶能够参与木质素及其衍生物、黄酮类、花青素等黄酮类化合物的生物合成;荧光定量PCR中DEGs的相对表达量变化与转录组测序分析结果中相应的表达趋势一致。该研究结果可为挖掘烟草应答SA诱导的黄酮类化合物合成基因、阐明SA与黄酮类化合物生物合成途径之间的调控网络提供依据。

**关键词:**烟草;水杨酸;黄酮类化合物;转录组;调控网络

**中图分类号:**TS41<sup>+</sup>3;Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)02-0080-10

## 0 引言

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)属于经济作物和实验模式植物,在受到病害或干旱、低温等非生物胁迫时,会出现生长发育受阻的现象,严重影响烟叶的产量和品质<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是烟草中重要的次生代谢产物,不仅能影响烟草的品质,还能增加

烟草的抗逆作用,进而增强烟草对非生物胁迫的抵抗力<sup>[2]</sup>。黄酮类化合物主要包括芦丁、黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇、异黄酮、二氢异黄酮、查耳酮、花色素等,通常由苯丙素代谢途径或其分支途径合成<sup>[3]</sup>,具有C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>结构,在植物界中广泛分布。该类化合物属于效果显著的非酶系统类抗氧化剂<sup>[4-5]</sup>,能够清除植物体内过多的自由基和

收稿日期:2024-03-13;修回日期:2024-05-17;出版日期:2025-04-15

基金项目:中国烟草总公司重点研发项目(110202202038)

作者简介:吴晓宗(1981—),男,山西省应县人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为烟草栽培。E-mail: wuxzong@126.com

通信作者:耿玉珂(1983—),女,河北省邯郸市人,中央民族大学讲师,博士,主要研究方向为作物表观遗传学。E-mail: gengyuke0502@163.com

活性氧并维持其动态平衡,减少其对膜系统的伤害,且不会引起植物细胞代谢紊乱<sup>[6-7]</sup>,有利于提高植物适应环境胁迫的能力。

水杨酸(Salicylic Acid, SA)亦被称为邻羟基苯甲酸,是广泛存在于植物体内的一种小分子酚类化合物,也是一种常见的植物激素,在植物抗病、抗旱、抗高温、抗盐等应答过程中发挥着重要作用。SA可作为信号分子诱导植物启动防御机制,增强胁迫抗性<sup>[8-9]</sup>,同时介导植物体内黄酮类化合物的合成<sup>[10-11]</sup>,进而提高植物的抗氧化能力、阻止有害成分产生、促使植物生成抗病物质及加强细胞壁的稳定,赋予植物对外界逆境的耐受性。目前,已有研究者探究了SA在银杏中参与黄酮类化合物生物合成的作用及影响,并探讨了其在提高黄酮类化合物产量方面的分子调控机制<sup>[12]</sup>,但在烟草中的相关研究尚未见报道。

基于此,本文拟采用SA溶液对烟草幼苗进行不同时间点的灌根处理,基于幼苗中总黄酮含量随处理时间的变化规律,通过转录组测序分析不同处理时间下幼苗的差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs)数目变化,并进行GO功能注释和KEGG代谢通路富集,使用荧光定量PCR(qRT-PCR)对转录组测序分析结果进行验证,以期挖掘并鉴定烟草逆境响应基因及黄酮类化合物合成相关基因,为烟草抗逆优良品系培育及进一步获得次生代谢产物提供实验依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

烟草K326种子,郑州轻工业大学烟草科学与工程实验室保存;SA(纯度 $\geq 99.5\%$ ),北京酷莱博科技有限公司;Hoagland营养液,郑州轻工业大学烟草科学与工程实验室配制;氢氧化钠、无水三氯化铝、乙酸钾、乙醇、甲醇,均为分析纯,山东禹王和天下新材料有限公司;HiScript IV 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

Sartorius CPA225 D型分析天平,德国赛多利斯公司;KQ-500DB型超声仪,昆山市超声仪器有限公司;TU-1810 S型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;TIB8600型实时qRT-PCR仪,泰普生物科学(中国)有限公司;Vortex Genie 2型漩涡振荡器,美国Scientific Industries公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 烟草幼苗处理与取样** SA溶液配制:称取(0.345 3 $\pm$ 0.000 1)g SA,用乙醇在250 mL的容量瓶中进行定容并摇匀,此时SA的浓度为10 mmol/L;从中取10 mL SA溶液,用去离子水定容至200 mL并摇匀,此时SA浓度为0.5 mmol/L,备用。

挑选成熟饱满的烟草种子种植在蛭石中,培养条件为温度22℃、相对湿度35%、16 h光照培养、8 h暗培养,每隔2 d用Hoagland营养液灌溉幼苗,幼苗长至1个月,即四叶一心的时候开始移栽。选取24株移栽40 d左右、长势良好且一致的烟草苗,3株为一组(3个生物学重复),共8组,其中4组分别加入50 mL 0.5 mmol/L的SA溶液后依次灌根处理0 h、1 h、4 h和12 h,将不同处理时间的烟草苗分别记为SA0、SA1、SA4和SA12,取全株用于总黄酮含量的测定;另外4组进行同样的SA溶液灌根处理及标记后,取全株烟草苗进行液氮冷冻,用于转录组测序分析及qRT-PCR验证。

**1.3.2 总黄酮含量测定** 总黄酮标准曲线的绘制:称取芦丁(黄酮苷,黄酮类化合物中的代表性物质)标准品10 mg,用80%(如无特殊说明,百分号均指体积分数)甲醇溶液定容至10 mL,配制成芦丁标准溶液,分别吸取芦丁标准溶液0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL和3.00 mL置于10 mL的容量瓶中。再分别加入0.1 mol/L的三氯化铝溶液2 mL、1 mol/L的乙酸钾溶液3 mL,用80%甲醇溶液定容至10 mL,摇匀后室温放置30 min,同时以80%甲醇溶液为空白对照,在波长420 nm处测吸光度。以吸光度为纵坐标,芦丁质量浓度(mg/mL)为横坐标,获得标准曲线方程 $y = 2.670 0x + 0.009 1$ ,  $R = 0.999 6$ 。

取烘干至恒重的烟草全株,用研钵磨碎后过 80 目筛,取 0.1 g 粉末置于三角瓶中,加入 12.5 mL 80% 甲醇溶液提取。将三角瓶置于漩涡振荡器中振荡提取,设置温度、时间和转速分别为 60 °C、120 min 和 150 r/min。将样品过滤,取 1 mL 滤液加入 2 mL 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液、3 mL 1 mol/L 的乙酸钾溶液,最后用 80% 甲醇溶液定容至 10 mL,室温放置 30 min 后,即为待测样品。用紫外-可见分光光度计于 420 nm 波长处测定样品的吸光度,进行 3 组重复实验,结果取平均值,代入标准曲线方程计算总黄酮含量。

**1.3.3 转录组测序分析** 将 0.5 g 液氮冷冻的烟草苗全株样品送瑞普基因科技有限公司提取全株总 RNA(总量应为 0.5~1.0 µg),质检后进行转录组测序,再采用 Fastp v0.23.4 软件辅助进行测序数据质控,数据通过去除适配器、聚 N 读取或低质量读取、过滤原始读取以产生干净的读取,利用 HISAT2(2.1.0 版)对烟草基因组序列进行比对定位。

通过基因表达差异分析寻找不同组别之间的 DEGs,并揭示其分子机制。参考 Genome: [https://solgenomics.net/ftp/genomes/Nicotiana\\_tabacum\\_edwards\\_et\\_al\\_2017](https://solgenomics.net/ftp/genomes/Nicotiana_tabacum_edwards_et_al_2017),采用 StringTie 对转录本进行组装、edgeR 进行基因表达定量、DESeq2 进行 DEGs 分析,并用 FPKM(Fragments Per Kilobase Million)评估组内和组间样品基因表达特征的相关性。差异倍数(Fold Change, FC)和 P 是判断 DEGs 的两个标准,一般上调或下调 2 倍以上,且  $P < 0.05$ ,才认为该基因在两组之间发生了显著的差异变化,据此筛选出来的 DEGs,即为转录组分析得到的显著 DEGs 集。因此,定义 DEGs 的标准有 2 条:一是倍数变化(FC)  $\geq 2$  或显著性阈值  $P \leq 0.05$ ;二是 P 校正,经 Benjamini-Hochberg 校正后的  $P < 0.05$ 。

使用主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)法分析显示各组内样品之间的分离趋势,并判断不同组间样品的转录组结果是否存在差异。为了揭示响应 SA 的相关生物学过程和代谢途径,针对已鉴定的 DEGs 进行 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路富集。结合 Gene Ontology Resource 数据库进

行基因功能注释,参考 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 数据库,注释显著 DEGs 集参与的代谢通路。

**1.3.4 qRT-PCR 验证** qRT-PCR 技术能够定量评估特定基因在样品中的表达水平,可作为转录组测序分析更加精准的技术补充<sup>[13]</sup>。将 1 µg RNA 反转录成 cDNA,稀释 10 倍后作为模板进行 qRT-PCR 扩增,PCR 体系和反应程序参照试剂盒说明书。qRT-PCR 反应中,液氮冷冻的样品(研磨后)需 0.1 g,所用 RNA 质量浓度为 50 ng/µL,使用体积不超过反应总体积的 1/10。

以 *NbEF1a* 作为内参基因,选取 8 个代表性 DEGs,参考烟草基因组数据网站([https://solgenomics.net/jbrowse\\_solgenomics/?data=data%2Fjson%2FNitabEd17&loc=Nitab4.5\\_0000001%3A2393966](https://solgenomics.net/jbrowse_solgenomics/?data=data%2Fjson%2FNitabEd17&loc=Nitab4.5_0000001%3A2393966))提供的基因序列,通过 Primer 5 软件设计代表性 DEGs 的 qRT-PCR 引物序列。每个样品进行 3 次重复实验,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算代表性 DEGs 相对表达量<sup>[14]</sup>。

## 1.4 数据处理与制图

采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并比较 4 个组之间的总黄酮含量差异是否具有显著性。使用基因表达分布箱线图描述不同处理组转录组的集中程度和变异特征;通过火山图展示显著 DEGs 分布;利用 Origin 8.0 绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 处理对总黄酮合成的影响

不同 SA 处理时间对烟草样品全株总黄酮含量的影响如图 1 所示,其中,小写字母 a、b、c、d 表示存在显著差异( $P < 0.05$ ),下同。由图 1 可知,与 SA0 样品总黄酮含量(0.199 mg/mL)相比,SA1 样品总黄酮含量升高到 0.248 mg/mL( $P < 0.05$ );而 SA4 和 SA12 样品总黄酮含量分别下降为 0.174 mg/mL 和 0.166 mg/mL( $P < 0.05$ )。因此,0.5 mmol/L 的 SA 溶液灌根处理烟草 1 h 时,烟草总黄酮含量达到最高值,继续处理 4 h 和 12 h 时,总黄酮合成受到强烈抑制,其含量逐渐下降。推测 SA 短期(即 1 h 以

内)处理烟草时,可能引发类似胁迫防御的生理生化反应,促使黄酮类化合物迅速、大量累积并达到峰值;而 SA 处理烟草 4 h 和 12 h 时,这种生理生化反应逐渐减弱并遭到抑制。

## 2.2 转录组测序结果分析

### 2.2.1 不同 SA 处理时间样品基因表达分布和相关性分析

不同 SA 处理时间样品基因表达分布情况及 PCA 聚类图如图 2 所示。由图 2a)可知,12 个处理样品中 50% 基因的  $\log_{10}(FPKM)$  集中于 0.8~2.8,最大值接近 3,最小值为-1.25,平均  $\log_{10}(FPKM)$  集中于 1.00~1.25;SA0、SA1、SA4 和 SA12 各自的 3 个生物学重复的基因表达差异很小,证明样品重复性较好。由图 2b)可知,SA0、SA1、SA4 和 SA12 转录组之间存在较大差异,证明不同 SA 处理时间能导致转录组之间表现出显著差异;而同一处理组内的 3 个生物学重复之间的差异则较小,转录组重复性良好,侧面证明样品处理及转录组测序分析较为可靠。

### 2.2.2 不同 SA 处理时间样品基因表达差异分析

不同 SA 处理时间样品的基因表达差异火山图如图 3 所示,其中,火山图中每个点都代表一个特定的基因,红色的点代表基因显著上调,蓝色的点代表基因显著下调,灰色的点代表非显著性 DEGs;横坐标为基因在不同组中的表达差异倍数,数值已做了对数化处理,  $-\log_2(FC)$  越大,表达差异越显著;纵坐

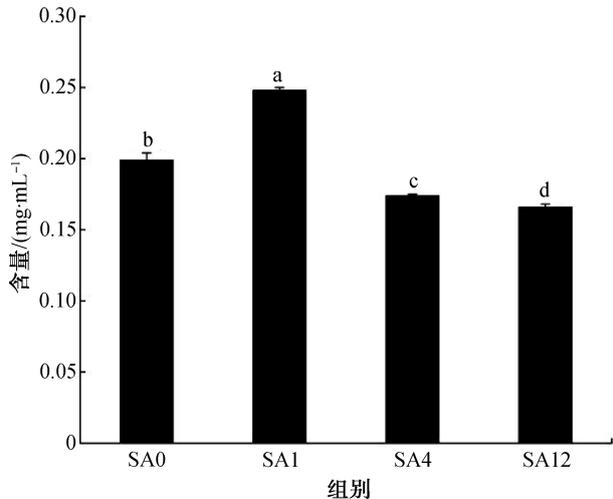


图 1 不同 SA 处理时间对烟草样品全株总黄酮含量的影响

Fig. 1 Total flavone content of tobacco samples under SA treatment with different times

标为 T 检验显著性 P 值的负对数,反映了基因表达差异的统计学显著性。由图 3 可知,相较于 SA0, SA1 中上调的基因数目显著高于下调的基因数目, SA4 中下调的基因数目逐渐增加, SA12 中下调基因数目大于上调的基因数目。表明随着 SA 处理烟草时间的延长,样品中下调基因的数目逐渐上升,即 SA 抑制基因转录具有时间依赖性。

为了鉴定烟草响应 SA 的关键基因,以 SA0 转录本为对照,分析了 SA1、SA4 和 SA12 的 DEGs。其中,SA1 共鉴定出 6154 个 DEGs,其中上调基因数目为 3520 个,下调基因数目为 2634 个;SA4 共鉴定出 8333 个 DEGs,其中上调基因数目为 3899 个,下调基因数目为 4434 个;SA12 共鉴定出 9299 个 DEGs,其中上调基因数目为 3868 个,下调基因数目为 5431 个。

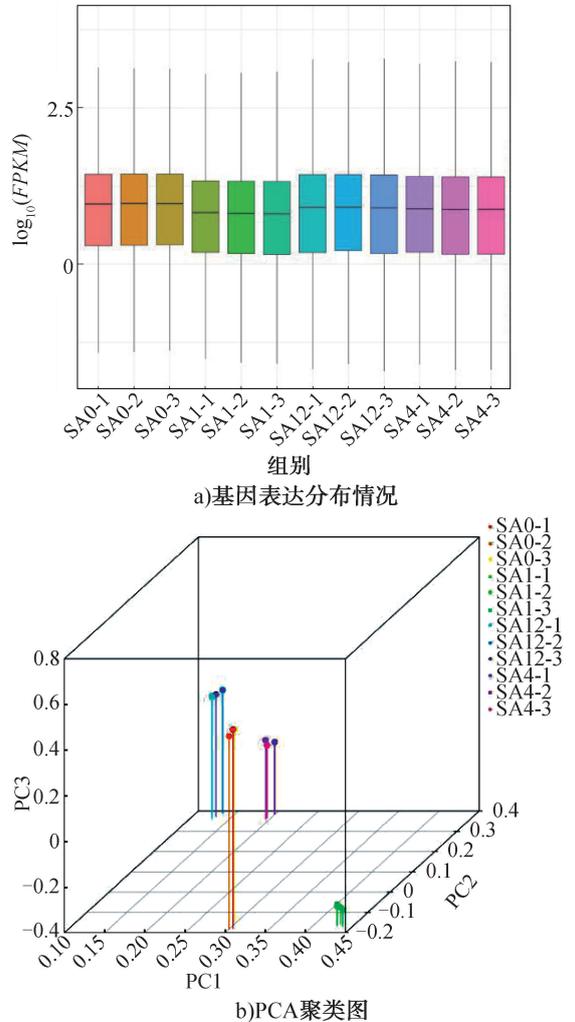


图 2 不同 SA 处理时间样品基因表达分布情况及 PCA 聚类图

Fig. 2 Distribution of gene expression in different SA treatments and PCA map between samples

不同 SA 处理时间样品基因表达 Venn 图及关键基因表达量热图如图 4 所示。图 4a) 展示了 SA1、SA4 和 SA12 中所有上调 DEGs 的重叠数量。图 4b) 中, 蓝色代表低表达基因, 红色代表高表达基因; 纵向代表样品间的聚类, 反映样品的重复性; 横向代表基因间聚类, 反映基因功能的相似性。由图 4a) 可知, SA1、SA4 和 SA12 同时存在 1272 个显著上调基因, 分别占 SA1、SA4 和 SA12 总 DEGs 数目的 36.1%、32.6% 和 32.9%。SA1、SA4 和 SA12 中不同的 DEGs 之间不仅存在表达丰度差异, 还存在生物学功能差异。基于 SA1 中的总黄酮含量高于 SA0、SA4 和 SA12(图 1), 推断在 0~1 h 的 SA 处理过程中, 影响黄酮类化合物合成的基因表达会发生明显

变化。因此, 重点分析 SA1 相对于 SA0 的 DEGs。由图 4b) 可知, 与 SA0 相比, 异黄酮生物合成和苯丙素代谢相关基因在 SA1 中显著上调, 基因编码花青素 3-O-葡萄糖基转移酶、2-类羟基异黄酮脱水酶、羧酸酯水解酶、咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶、细胞色素氧化酶 P450、苯丙氨酸解氨酶、4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶和肉桂醇脱氢酶。结合植物类黄酮生物合成网络, 可解释 SA1 总黄酮含量显著高于 SA0 的现象<sup>[15]</sup>。

**2.2.3 DEGs 功能注释分析** 不同 SA 处理时间样品 DEGs 的 GO 功能注释分析结果如图 5 所示。由图 5 可知, SA1、SA4 和 SA12 共有的 DEGs 显著富集在信号刺激响应通路, 包括对非生物胁迫的响应、

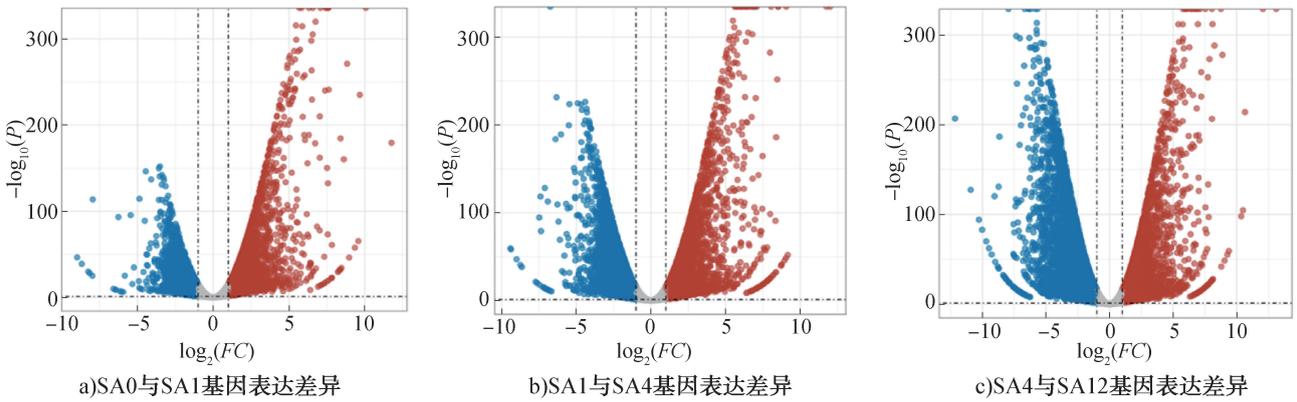


图 3 不同 SA 处理时间样品的基因表达差异火山图

Fig. 3 Volcano maps of gene expression difference treated by SA at different times

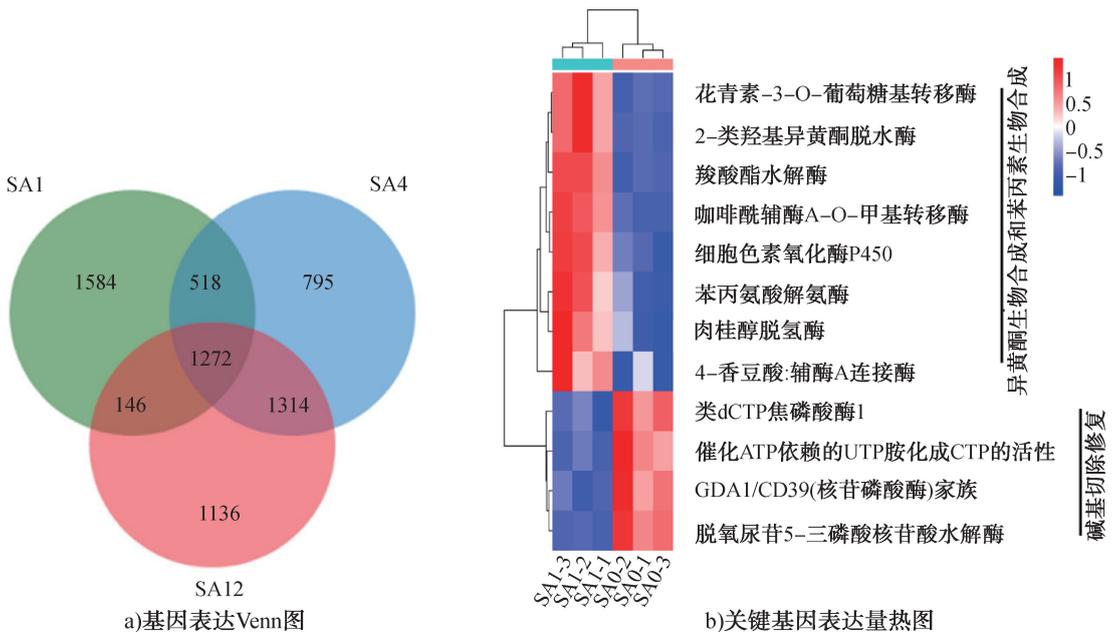


图 4 不同 SA 处理时间样品基因表达 Venn 图及关键基因表达量热图

Fig. 4 Venn diagram analysis and expression heatmap of key genes in different treatment groups

光合色素合成、光合作用、细胞生长等生物学过程。不同 SA 处理时间样品的 KEGG 代谢通路富集分析结果如图 6 所示,图中显示了 SA1、SA4 和 SA12 前 10 个重叠且差异富集最显著的 KEGG 通路。由图 6 可知,SA1、SA4 和 SA12 在 10 个代谢通路中均有显著富集,如谷胱甘肽代谢、光合作用、卟啉代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、半胱氨酸与甲硫氨酸代谢、植物激素信号转导、次级代谢等通路(图 6a))。此外,SA1、SA4 和 SA12 还富集到了其他不同的代

谢通路,对前 22 个 DEGs 富集最显著的 KEGG 通路使用柱状图进行展示(图 6b)),其中 SA1 显著富集了氮代谢和异黄酮合成代谢通路,SA4 显著富集了 ABC 转运蛋白、光合生物碳固定和碳代谢途径,SA12 则显著富集了蛋白酶辅因子生物合成及碳代谢途径。已有研究<sup>[16]</sup>表明,SA 诱导的抗性依赖于碳和氮同化物的合理利用;还有报道<sup>[17]</sup>表明,植物 ABC 转运蛋白成员 ABCG36 是一个有效的植保素 CLX 输出蛋白,它与富含亮氨酸重复序列的受体

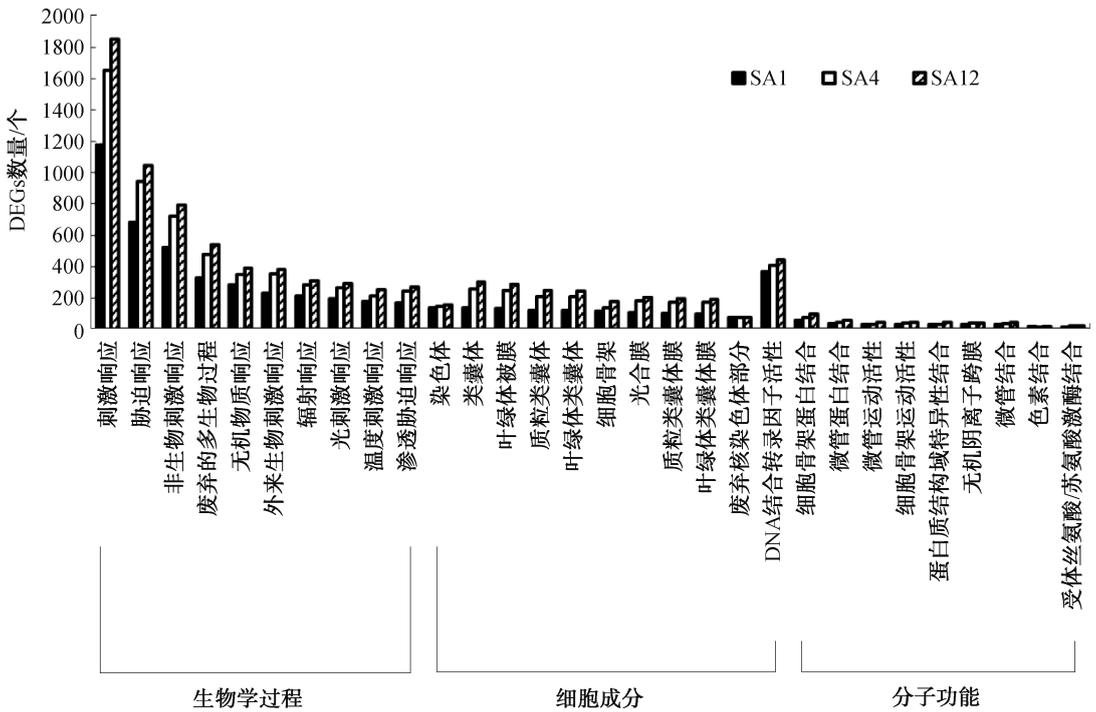


图 5 不同 SA 处理时间样品 DEGs 的 GO 功能注释分析结果

Fig. 5 GO functional annotation analysis of DEGs in different SA treatment periods

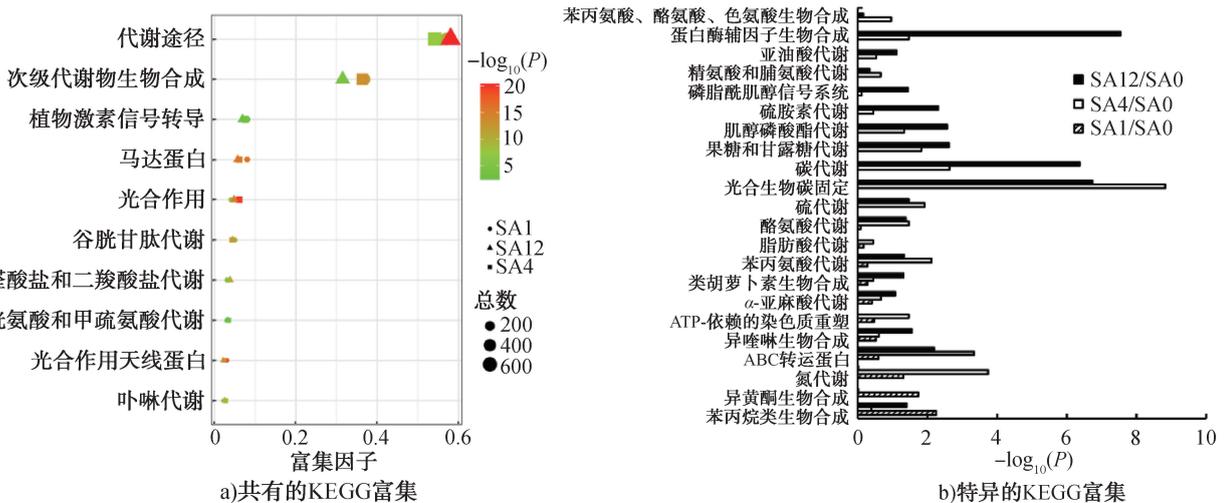


图 6 不同 SA 处理时间样品的 KEGG 代谢通路富集分析结果

Fig. 6 KEGG enrichment analysis in different SA treatment periods

激酶 QSK1 能够直接相互作用, 并受其调节。ABCG36 被 QSK1 磷酸化后可抑制生长素 IBA 的输出, 进而辅助 3H-CLX 输出, 加强植物抗病性<sup>[18]</sup>, 在大豆中, ABC 转运蛋白可被 SA 诱导上调<sup>[19]</sup>, 这为烟草响应 SA 处理的生理生化反应及分子信号转导机制的阐明提供了线索。

### 2.2.4 黄酮类化合物生物合成代谢通路基因调控

**网路分析** 黄酮类化合物代谢途径参与烟草对 SA 处理的响应如图 7 所示。由图 7 可知, 在总黄酮含量最高的 SA1 样品中, DEGs 的 KEGG 通路中富集了苯丙素类、异黄酮和花青素生物合成这 3 个途径。其中有 4 个 DEGs 参与了苯丙素类生物合成途径, 包括 Nitab4.5\_0000754g0260, 编码苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL); Nitab4.5\_0000045g0230, 编码反-肉桂酸 4-单加氧酶 (Trans-cinnamate 4-monooxygenase, CYP73A); Nitab4.5\_0002540g0090, 编码 4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-CoA ligase, 4CL); Nitab4.5\_0002815g0020, 编码肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, CAD)。这些基因的表达水平在 SA1 中显著上调, 对苯丙素类生物合成途径中的木质素及其衍生物的合成起到了促进作用。据先前报道<sup>[20]</sup>, 病原菌能够诱导自噬调节的植物防御机制来控制木质素形成, 同时伴随着植物体内 SA 含量的上升, 推测木质素的合成与 SA 的累积存在共有的调节机制。另外, 有 1 个 DEG 参与了异黄酮生物合成途径, 为

Nitab4.5\_0000180g0080, 编码 2-羟基异黄酮脱水酶 (2-hydroxyisoflavanone dehydratase-like), 该基因能够催化金雀异黄酮、大豆苷元、芒柄花黄素等次级代谢物的生物合成。还有 1 个 DEG 参与了花青素合成途径, 为 Nitab4.5\_0004371g0030, 编码花青素 3-O-糖基转化酶 (Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase), 能够分别催化矢车菊素、飞燕草素和天竺葵素生成颜色稳定的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-葡萄糖苷<sup>[21]</sup>。总之, 以上黄酮类合成相关基因的显著上调均有助于总黄酮含量的提升。这再次表明, 烟草幼苗在被 SA 诱导 1 h 时, 编码黄酮类化合物合成途径的酶基因的表达均显著上调。

### 2.3 代表性 DEGs 的 qRT-PCR 验证结果分析

为了再次证实基于转录组分析获得的具有显著性表达差异的基因变化规律, 分别对苯丙素代谢途径、异黄酮合成途径、核酸代谢途径的重要结构基因进行了 qRT-PCR 验证, 选取验证的 8 个代表性 DEGs 分别是 Nitab4.5\_0001492g0060、Nitab4.5\_0002540g0090、Nitab4.5\_0000754g0260、Nitab4.5\_0000569g0130、Nitab4.5\_0000180g0080、Nitab4.5\_0001119g0110、Nitab4.5\_0006179g0050 和 Nitab4.5\_0000441g0220, 编码蛋白分别是咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶、4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶、苯丙氨酸解氨酶、甲基转化酶、2-羟基异黄酮脱水酶、细胞色素氧化酶 P450、脱氧尿苷 5'-三磷酸核苷酸水解酶和胸苷酸

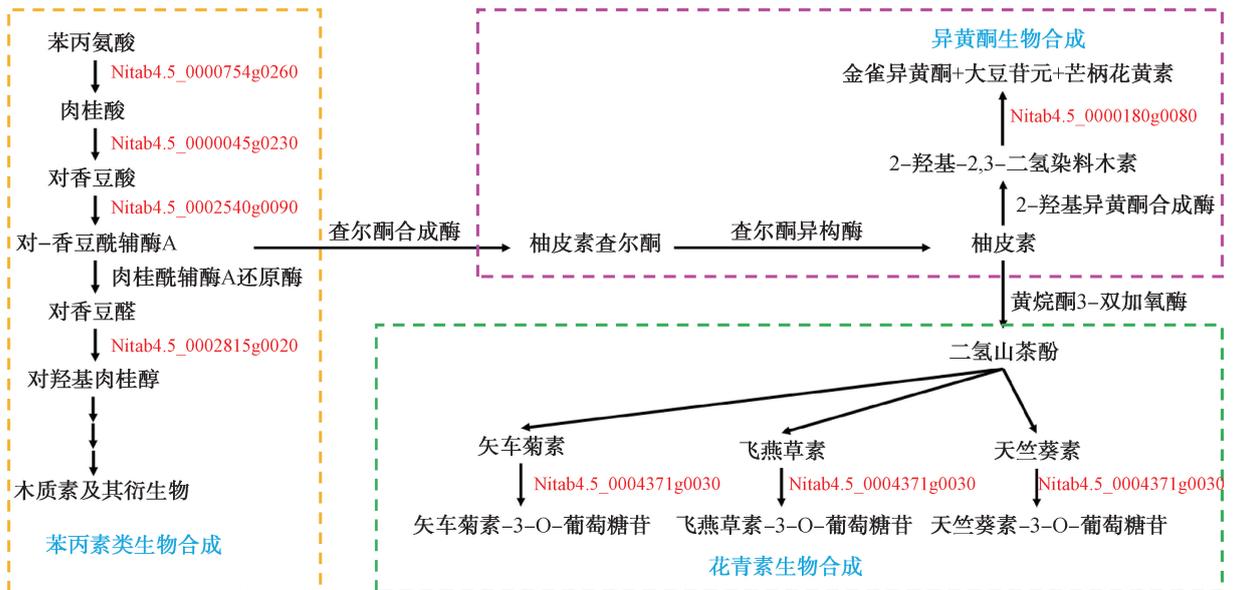


图 7 黄酮类化合物代谢途径参与烟草对 SA 处理的响应

Fig. 7 The involvement of flavonoid metabolic pathways in tobacco response to SA treatment

激酶。设计的代表性 DEGs 的 qRT-PCR 引物序列见表 1。

代表性 DEGs 的 qRT-PCR 结果如图 8 所示。由图 8 可知,与 SA0 相比,这些重要代谢途径的基因在不同 SA 处理时间下,其相对表达水平均有显著或极显著的上调和下调,与转录组测序结果一致。

不同 SA 处理时间样品基因表达量的相对变化程度如图 9 所示。由图 9 可知,在 8 个 DEGs 中,除了 Nitab4.5\_0000180g0080,其他 7 个 DEGs 的  $|\log_2(FC)|$  都大于 1,推断这 7 个 DEGs 在 3 个不同 SA 处理时间的表达水平发生了显著变化。Nitab4.5\_0000180g0080 表达水平仅在 SA1 处理条件下显著上调;而在 SA4 和 SA12 处理条件下,由于  $0 < |\log_2(FC)| < 1$ ,表达量上调不显著,只呈现上调趋势。这表明 qRT-PCR 结果与转录组测序中相应的重要结构基因表达量的相对变化趋势较为一致。

### 3 结论

本研究采用 0.5 mmol/L 的 SA 溶液分别处理

烟草幼苗 0 h (SA0)、1 h (SA1)、4 h (SA4) 和 12 h (SA12),经检测发现处理 1 h 的烟草总黄酮含量达到了最高值(0.248 mg/mL),呈极显著升高趋势;而处理 4 h 和 12 h 的烟草总黄酮含量均低于 0 h 和 1 h 处理下的总黄酮含量,呈极显著下降趋势,推测该浓度的 SA 在 1 h 内可强烈诱导黄酮类化合物的大量合成和累积,该结果可为植物在病害侵染初期产生响应的分子调控机制研究提供参考。对 SA 诱导的烟草幼苗进行转录组测序发现,SA1、SA4 和 SA12 同时存在 1272 个显著上调基因,SA1 显著上调的 3520 个 DEGs 中,除了包括非生物胁迫响应及信号转导途径、光合作用等关键基因,还涉及苯丙氨酸、苯丙素、异黄酮代谢等相关基因。DEGs 的 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路富集分析表明,SA1、SA4 和 SA12 共有的 DEGs 显著富集在信号刺激响应通路,包括对非生物胁迫的响应、光合色素合成、光合作用、细胞生长等生物学过程;谷胱甘肽代谢、光合代谢、卟啉代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、

表 1 代表性 DEGs 的 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequence of qRT-PCR primers for representative candidate genes

基因编号	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
LOC107801242( <i>NbEF1a</i> )	GACCAAGATTGACAGGCGTT	ATGACACCAACAGCAACAGT
Nitab4.5_0001492g0060	GGCTTCTGCTAAGGTTACCA	ATCCAGTGAAGACGCCGATT
Nitab4.5_0002540g0090	GGATTTC AAGTGGCTCCTGC	GCTTGAACAGCAGCATCAGA
Nitab4.5_0000754g0260	GCAGTCAAGAACACGGTGAG	GTATTCCCTGTCCACGACTCG
Nitab4.5_0000569g0130	CAAAGGGCAACGAGATGGG	GGCATAGTGAGTCCAGGTCC
Nitab4.5_0000180g0080	TCGGCTACCTATCGTTCCT	TCTGGCTCTGATTTCTGGCG
Nitab4.5_0001119g0110	CGCTGGCTTCCACATTTCCT	CAACCACACATTGAGCAAGTC
Nitab4.5_0006179g0050	GAACGGTGTTCCTGAA	ATCATAACCAGCAGAAAAGAGG
Nitab4.5_0000441g0220	GCTCTTCGTGATTCCTCGT	TGTTTCCCTTTGTGGCA

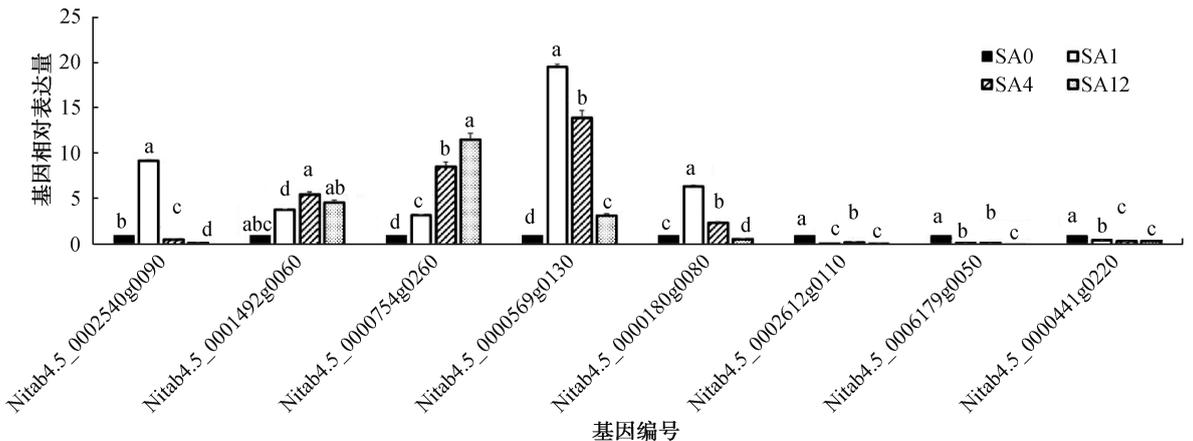


图 8 代表性 DEGs 的 qRT-PCR 结果

Fig. 8 The qRT-PCR results of representative DEGs

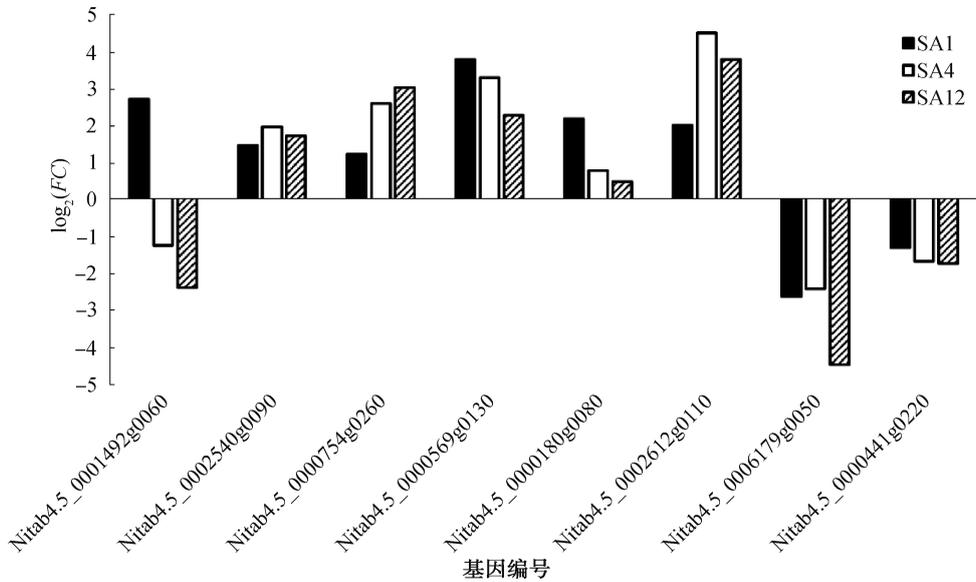


图9 不同SA处理时间样品基因表达量的相对变化程度

Fig. 9 Relative change degree of gene expression between SA treated group and control group

半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、植物激素信号转导、次级代谢等通路,该结果可为烟草响应SA处理的生理生化反应及分子转导机制的阐明提供线索。qRT-PCR验证中,代表性DEGs的表达量变化与转录组测序分析结果一致。

本文筛选到了响应SA的黄酮类化合物合成关键基因,可为改良烟草品质、快速获得次级代谢产物提供新的途径。下一步研究可利用基因编辑手段对关键基因进行修改,创制更好的遗传资源材料,研究其生物学功能并解析相关代谢网络的分子调控机理,为烟草品种改良提供基因资源。

#### 参考文献:

- [1] 李童,邓智超,刘涛,等.烟草SHMT基因家族鉴定与非生物胁迫诱导表达分析[J/OL].分子植物育种,(2024-01-03)[2024-02-17].<https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240102.1407.008>.
- [2] 刘晨,王祯,朱先约,等.烟草C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>基因的克隆与表达特性分析[J].轻工学报,2022,37(1):68-78.
- [3] PETRUSSA E, BRAIDOT E, ZANCANI M, et al. Plant flavonoids: Biosynthesis, transport and involvement in stress responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(7): 14950-14973.
- [4] CHEN Z R, DONG Y, HUANG X. Plant responses to UV-B radiation: Signaling, acclimation and stress tolerance[J]. Stress Biology, 2022, 2(1): 51.
- [5] ZHANG H M, DU X, YU J Z, et al. Comparative metabolomics study of flavonoids in the pericarp of different coloured bitter gourds (*Momordica charantia* L.) [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2022, 28(7): 1347-1357.
- [6] FERREYRA M L F, SERRA P, CASATI P. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure [J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(3): 736-749.
- [7] SHEN N, WANG T F, GAN Q, et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132531.
- [8] GOTO S, SASAKURA-SHIMODA F, YAMAZAKI M, et al. Development of disease-resistant rice by pathogen-responsive expression of WRKY45[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(4): 1127-1138.
- [9] RAI K K, RAI N, RAI S P. Salicylic acid and nitric oxide alleviate high temperature induced oxidative damage in *Lablab purpureus* L plants by regulating bio-physical processes and DNA methylation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 128: 72-88.
- [10] LIU M, KANG B S, WU H J, et al. Transcriptomic and metabolic profiling of watermelon uncovers the role of salicylic acid and flavonoids in the resistance to cucumber green mottle mosaic virus [J]. Journal of Experimental Botany, 2023, 74(17): 5218-5235.
- [11] 胡丽涛,吴能表,陈凤娟,等.水杨酸对UV-B胁迫下黄瓜荧光特性和抗氧化力的影响[J].西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(3):191-196.
- [12] 范雪娇.外源水杨酸对银杏类黄酮代谢的影响及GbMYB33功能验证[D].南京:南京林业大学,2021.
- [13] 黄中,闫茗熠,陈梦月,等.基于转录组测序和RT-

- qPCR 技术的烟草糖酯合成基因挖掘[J]. 轻工学报, 2023,38(6):78-84.
- [14] 贺诗茹. 新疆桑葚主要植物化学物含量测定及抗氧化活性的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2023.
- [15] LIU W X, FENG Y, YU S H, et al. The flavonoid biosynthesis network in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(23):12824.
- [16] MADANY M M Y, OBAID W A, HOZIEN W, et al. Salicylic acid confers resistance against broomrape in tomato through modulation of C and N metabolism[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 147:322-335.
- [17] TIAN L, WU L, ZHONG X F, et al. Genome-wide characterization of ABC transporter genes and expression profiles in red macroalga *Pyropia yezoensis* expose to low-temperature [J]. Marine Biotechnology, 2024, 26(6):1179-1193.
- [18] ARYAL B, XIA J, HU Z H, et al. An LRR receptor kinase controls ABC transporter substrate preferences during plant growth-defense decisions [J]. Current Biology, 2023, 33(10):2008-2023.
- [19] EICHHORN H, KLINGHAMMER M, BECHT P, et al. Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10):2193-2201.
- [20] JEON H S, JANG E, KIM J, et al. Pathogen-induced autophagy regulates monolignol transport and lignin formation in plant immunity [J]. Autophagy, 2023, 19(2):597-615.
- [21] HIROMOTO T, HONJO E, NODA N, et al. Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea*[J]. Protein Science, 2015, 24(3):395-407.

## Studies on flavonoids biosynthesis genes expression induced by salicylic acid in *Nicotiana tabacum* L.

WU Xiaozong<sup>1</sup>, GUO Wanwang<sup>1</sup>, ZHU Zhiwen<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, XU Jianbo<sup>2</sup>, ZHU Ruojie<sup>2</sup>, LIU Zhilian<sup>3</sup>, GENG Yuke<sup>4</sup>

1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Shiyuan Branch of Hubei Tobacco Company, Shiyuan 442000, China;

3. Shijiazhuang Gaocheng District Agricultural Science Research Institute, Shijiazhuang 052160, China;

4. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

**Abstract:** To explore the effects of salicylic acid (SA) on the total flavonoid content of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and the expression of flavonoid synthesis-related genes, SA was applied to the one-month tobacco seedlings for 0 h, 1 h, 4 h and 12 h, and the total flavonoid content of the whole tobacco plant was detected and transcriptomic analysis was performed. The results of transcriptome analysis were verified by fluorescence quantitative PCR. The experimental results showed as follows: Compared with 0 h treated sample (SA0), the total flavonoid content of 1 h treated sample (SA1) was significantly up-regulated, and higher than that of 4 h treated sample (SA4) and 12 h treated sample (SA12). Analysis of differentially expressed genes (DEGs) showed that 1272 overlapping genes among SA1, SA4 and SA12 were significantly upregulated by SA treatment, GO functional annotation and KEGG metabolic pathway enrichment displayed that most of the genes significantly upregulated in SA1 encoded catalytic enzymes related to phenylpropanoid metabolism and isoflavone metabolism pathway, which could promote the biosynthesis of flavonoids such as lignin and its derivatives, flavins and anthocyanins. Fluorescence quantitative PCR analysis showed that the relative expression changes of differential genes were consistent with the corresponding differential gene expression trends in transcriptome analysis. This study provides clues and basis for seeking the genes involved in SA-induced flavonoids synthesis in tobacco and elucidating the regulatory network between SA and flavonoid biosynthetic pathway.

**Key words:** *Nicotiana tabacum* L.; salicylic acid; flavonoid; transcriptome; regulatory network

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]