引文格式：苏应威, 刘海娇, 左登鸿, 等. 叶面喷施丝氨酸缓解三七热胁迫机制初探[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2023, 38(6): 987−996. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202303008

叶面喷施丝氨酸缓解三七热胁迫机制初探*

苏应威，刘海娇，左登鸿，徐　杰，徐志贤，马　淼，杨　敏，朱书生**
(云南农业大学，农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室，
云南生物资源保护与利用国家重点实验室，云南 昆明 650201)

摘要:【目的】探索叶面喷施丝氨酸对三七热胁迫的缓解效应及潜在机制。【方法】室内利用光照培养箱设置 36 ℃ 高温处理盆栽三七 15 d，期间每 2 d 分别喷施 1 次 1、3 和 5 mmol/L 的丝氨酸溶液，处理结束后调查三七病叶率。在田间利用自然高温环境胁迫三七，每 3 d 分别喷施 1 次与室内相同浓度的丝氨酸溶液，胁迫时间延长至 30 d，调查三七病叶率以及高温对三七生物量和皂苷含量的影响。测定室内盆栽的三七抗氧化酶活性及代谢物含量变化，阐释丝氨酸缓解三七热胁迫的初步机制。【结果】喷施 3 和 5 mmol/L 丝氨酸可显著降低盆栽三七病叶率 (P<0.05)；1、3 和 5 mmol/L 丝氨酸均可显著降低田间三七病叶率 (P<0.05)，增加其单株干质量以及人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 和 Rd 含量。1 和 3 mmol/L 丝氨酸可显著提高盆栽三七叶片超氧化物歧化酶 (SOD) 活性 (P<0.05)，3 mmol/L 丝氨酸可显著提高其过氧化物酶 (POD) 活性 (P<0.05)。KEGG 富集分析表明：丝氨酸处理后一些非酶抗氧化代谢物如糖醇和氨基酸在叶片中大量积累；与植物耐热性相关的糖类物质如蔗糖和海藻糖积累量增加；三羧酸循环中重要代谢产物如柠檬酸、乌头酸和琥珀酸的积累也增加，有助于改善三七的能量供应。【结论】外源喷施丝氨酸能降低热胁迫下三七病叶率，提高三七生物量和皂苷积累，初步认为其机制与提高三七的抗氧化能力以及增强碳水化合物代谢相关。

关键词: 丝氨酸；三七；热胁迫；抗氧化物；碳水化合物代谢
中图分类号: S567.236.01　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1004–390X (2023) 06−0987−10

Preliminary Study on the Mechanism of Foliar Spraying of Serine to Alleviate Heat Stress in *Panax notoginseng*

SU Yingwei，LIU Haijiao，ZUO Denghong，XU Jie，XU Zhixian，
MA Miao，YANG Min，ZHU Shusheng
(Key Laboratory of Agrobiodiversity and Pest Management, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University,
State Key Laboratory for Conservation and Utilization Bio-resources in Yunnan, Kunming 650201, China)

Abstract: ［**Purpose**］To explore the alleviating effect and potential mechanism of foliar spraying serine on heat stress of *Panax notoginseng*. ［**Methods**］Indoor potted *P. notoginseng* plants were subjected to a 36 ℃ high-temperature treatment for 15 days using a light incubator. During the treatment period, serine solutions with concentrations of 1, 3 and 5 mmol/L were sprayed every two days,

收稿日期：2023-03-02　　修回日期：2023-11-28　　网络首发日期：2024-01-08
*基金项目：国家自然科学基金项目 (32060719)；云南省中青年后备人才项目 (202005AC160045)；云南省创新团队 (202105AE160016)；云南省农林联合重点项目 (202101BD070001-003)；云南省科技特派团 (202104BI090001)。
作者简介：苏应威 (1997—)，男，云南昆明人，在读博士研究生，主要从事生物多样性与病害控制研究。E-mail：13708485770@163.com
**通信作者 Corresponding author：朱书生 (1979—)，男，云南曲靖人，博士，教授，主要从事生物多样性控制病害研究。E-mail：shushengzhu79@126.com
网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240108.1018.003

and the rate of diseased leaves of *P. notoginseng* was investigated at the end of treatment. In the field, *P. notoginseng* was exposed to natural high-temperature conditions, and serine solution with the same concentrations as used indoors were sprayed every three days. The duration of the heat stress treatment was extended to 30 days, the rate of diseased leaves of *P. notoginseng* and the effects of high temperature on the biomass and saponin content of *P. notoginseng* were examined. Antioxidant enzyme activity and metabolite changes in indoor potted *P. notoginseng* plants were measured to elucidate the preliminary mechanism by which serine alleviates heat stress in *P. notoginseng*. ［**Results**］Spraying serine at concentrations of 3 and 5 mmol/L significantly reduced the rate of diseased leaves in potted *P. notoginseng* (P<0.05). Spraying 1, 3, and 5 mmol/L serine significantly reduced the rate of diseased leaves in field-grown *P. notoginseng* plants (P<0.05), and increased the dry weight of per plant as well as the content of ginsenosides Rg_1, Re, Rb_1, and Rd. Spraying 1 and 3 mmol/L serine significantly increased the activity of superoxide dismutase (SOD) in potted *P. notoginseng* leaves (P<0.05), while spraying 3 mmol/L serine significantly increased peroxidase (POD) activity (P<0.05). KEGG enrichment analysis showed that non-enzymatic antioxidant metabolites such as sugar alcohols and amino acids accumulated in large amounts in the leaves after serine treatment. The accumulation of heat stress-related carbohydrates such as sucrose and trehalose also increased. In addition, important metabolites in the tricarboxylic acid cycle such as citric acid, aconitic acid, and succinic acid showed increased accumulation, which contributed to improve energy supply in *P. notoginseng*. ［**Conclusion**］Exogenous foliar application of serine reduces the incidence of diseased leaves, increases biomass, and enhances saponin accumulation in *P. notoginseng* under heat stress. These effects are likely associated with improved antioxidant capacity and enhanced carbohydrate metabolism in *P. notoginseng*.

Keywords: serine; *Panax notoginseng*; heat stress; antioxidants; carbohydrate metabolism

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen] 为五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 药用植物，是中国传统名贵中药材，对血液循环系统、心脑血管系统、中枢神经系统以及免疫系统具有重要作用[1-2]。人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 和 Rd 以及三七皂苷 R_1 是三七皂苷 (*P. notognseng* saponins，PNSs) 的主要活性成分[3]。目前，三七总皂苷以注射型和片剂胶囊等剂型广泛应用于临床治疗[4]。三七属阴生植物，喜荫凉环境 (18~25 ℃)，对高温特别敏感，是典型的不耐热植物[5]。持续高温导致的热胁迫是影响植物正常生长的非生物胁迫之一，其主要机制是影响植物的光合作用，诱导过多的活性氧 (reactive oxygen species，ROS) 积累，进而导致膜脂过氧化和膜透性增加，导致细胞损伤[6]。34 ℃ 的持续高温可抑制三七超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase，SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase，POD) 的活性[7]；高温还会对三七的光系统Ⅱ(PSⅡ) 造成损伤，且高温和强光交互胁迫时会使 PSⅡ产生不可逆损伤，线性电子和环式电子传递受阻，严重影响三七光合作用[8]。更严峻的是，三七植株经高温胁迫后更易受圆斑病菌和黑斑病菌侵染[7]。全球持续变暖进一步加大了三七种植的难度。因此，探索缓解三七热胁迫的有效措施对促进三七产业可持续发展至关重要。

前人研究表明：外源施用氨基酸如支链氨基酸[9]和 γ-氨基丁酸 (γ-aminobutyric acid，GABA)[10]等有利于植物抵御非生物胁迫。外源氨基酸在调节植物对热胁迫的耐受性方面也有报道，如叶面喷施 0.5 mmol/L GABA 可显著提高草本植物匍匐翦股颖 (*Agrostis stolonifera*) 的高温耐受性[11]；采用灌根或叶面喷施 5 mmol/L 脯氨酸可显著降低热胁迫对绿豆叶片的伤害[12]。丝氨酸在生物体中起着重要作用[13]。研究表明：外源丝氨酸供应可增加盐胁迫下细胞内甜菜碱的积累，提高胁迫耐受性[14]，但丝氨酸外源应用能否缓解热胁迫对植物损伤的研究还未见报道。本研究以三七为试验

材料，探究叶面喷施外源丝氨酸对盆栽和田间高温胁迫下三七生长的影响，通过测定室内盆栽三七叶片抗氧化酶活性和代谢物含量变化阐释丝氨酸缓解三七热胁迫的潜在机制，为生产上应用丝氨酸缓解作物热胁迫提供科学的理论依据。

1　材料与方法

1.1　室内和田间试验设计

室内试验利用光照培养箱设置高温环境胁迫处理盆栽三七。参考已有研究[7-8, 15]，本研究高温胁迫温度设置为 36 ℃。将长势一致的一年生三七盆栽 (每盆 10 株) 移入光照培养箱，设置 36 ℃ (光照 9 h)/20 ℃ (黑暗 15 h) 处理 15 d。在此期间，以无菌去离子水为溶剂配置浓度为 1、3 和 5 mmol/L 的丝氨酸溶液，对照处理 (CK) 为无菌去离子水。每个处理 6 盆，每盆均匀喷洒丝氨酸溶液或无菌去离子水 3 mL 于三七叶片，每 2 d 喷洒 1 次。适时补充土壤水分，使土壤含水量保持在 25%~27%。培养箱中的花盆位置每天调换，避免温度和光照条件不均。15 d 后，调查三七的病叶数 (表现出干燥、发黄、枯萎和掉落等症状)，并计算病叶率：病叶率=病叶数/植株总叶数×100%。之后，取三七植株叶片，用液氮速冻后保存于−80 ℃ 冰箱中，用于抗氧化酶活性测定和代谢物提取。

为了验证叶面喷施外源丝氨酸对三七耐高温、生物量和品质的影响，在中国云南澜沧县 (N22.49°，E99.48°，海拔 1 560 m) 进行了田间试验。试验地点选择阳光充足的山坡种植基地，日最高温度 33~36 ℃，约持续 2 h (14:00—16:00)，日平均温度 25 ℃，整体上试验地温度较其他区域温度偏高，可认为三七受到一定程度的热胁迫。选择在半遮阳温室中生长的一年生三七幼苗为试验材料，小区面积 1.0 m×0.5 m，每个小区约 100 株幼苗。将与室内试验相同浓度的丝氨酸均匀喷洒于三七叶片，每 3 d 喷洒 1 次，试验时间延长至 30 d，其他管理措施与田间相同。以喷洒清水作为对照处理，每个处理设置 6 个重复。热胁迫结束后，统计三七的病叶数 (表现出黄斑、干枯等症状)，并计算病叶率。最后，采挖三七植株并洗净根部，在 60 ℃ 烘箱中烘干，测量全株干质量；将三七药用部位根部研磨成细粉并过 100 目筛网，于 4 ℃ 保存，以测定皂苷含量。

1.2　抗氧化酶活性测定

使用 WST-8 检测试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司，中国苏州) 测定三七叶片的 SOD 活性。取叶片 0.1 g 和提取液冰浴匀浆 1 mL，于 12000 r/min、4 ℃ 离心 10 min，取上清液加入酶标板中，按照试剂盒说明书添加反应试剂，处理完毕后用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度。使用检测试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司，中国苏州) 测定三七叶片的 POD 活性，处理方法同 SOD 活性的测定，处理完毕后用酶标仪测定波长 470 nm 处的吸光度。

1.3　代谢物的提取及变化分析

参照 JI 等[16]的方法进行代谢组分析。称取研磨的三七须根细粉 60 mg，加入预冷的提取试剂 ($V_{甲醇}$：$V_{氯仿}$：$V_{水}$=5：2：2) 1 mL，于 37 ℃ 条件下超声 30 min；然后置于 14000 r/min、 4 ℃ 条件下离心 3 min，将上清液转移至新的离心管中，在真空干燥仪中蒸发去除溶剂。加入溶解于吡啶中的 20 mg/mL 甲氧基胺盐酸盐 80 μL 对代谢物进行第 1 步衍生化，30 ℃ 反应 90 min；再加入 N-甲基-N-(三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 40 μL 进行第 2 步衍生化，37 ℃ 反应 30 min。反应结束后将样品冷却至室温，然后在 14000 r/min、4 ℃ 条件下离心 3 min，上清液转移至进样瓶中待测。

参照已报道的方法[17]，使用 GC-MS 检测须根代谢物。GC 条件： SH-Rxi-5Sil MS 色谱柱 (30.0 m×0.25 mm×0.25 μm)。起始柱温 100 ℃，保持 4 min 后，以 4 ℃/min 升温至 320 ℃，保持 8 min。载气为氦气，流速 1 mL/min，进样口温度 280 ℃，进样量 0.8 μL，进样方式为分流进样，分流比 10：1。MS 条件：EI 电离源，离子源温度 200 ℃，接口温度 280 ℃，扫描范围 *m*/*z* 45~600，采集方式 Scan，扫描间隔 0.30 s。下机数据经过 mzXML 和 Abf 两次格式转换后，在 MsDial 软件中经过数据采集、峰值检测、解卷积、定性、峰对齐和数据过滤后得到代谢物数据。通过数据基线过滤和校准、峰值对齐、去卷积分析，使用 MS-DIAL 与 Fiehn 库进行峰值识别，得到原始峰值。原始 MS-DIAL 输出的代谢物峰面积被归一化为总和，并通过 Metaboanalyst 4.0 (http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/) 中的 Pareto 方法进行对数转换和缩放。使用 Metware Cloud (https://cloud.metware.cn/#/tools/tool-form?toolId=230) 进行主成分

分析 (PCA)；使用 Metaboanalyst 4.0 进行正交偏最小二乘—判别分析 (OPLS-DA)。根据倍数变化 (fold change)>2 或<0.5 以及变量投影重要度 (variable importance for the projection，VIP)>1 筛选出差异积累的代谢物，然后映射到京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG) 数据库中的代谢通路进行分析，再根据通路影响值 (pathway impact)>0 且 P<0.05 筛选显著富集的代谢通路。使用生物信息学在线工具 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/) 进行差异代谢物和显著富集的代谢通路 Venn 分析。

1.4 皂苷提取和含量分析

根据 YANG 等[18]的方法，采用超高效液相色谱法 (UPLC) 测定一年生三七根中的皂苷含量。称取充分研磨的三七根部 0.2 g，加入 70% MeOH (体积分数) 15 mL，于 25 ℃ 下超声提取 30 min。12 000 r/min、4 ℃ 离心 5 min 后，用 0.22 μm 尼龙膜过滤器过滤上清液，用配备二极管阵列检测器 (DAD) 和 Poroshell 120 EC-C18 反相柱 (150 mm×4.6 mm，4 μm，Agilent) 的 Nexera X2 UPLC 系统 (日本岛津) 测定皂苷含量。UPLC 的参数详见参考文献 [1]。

1.5 数据统计与分析

数据通过 Excel 整理后，使用 SPSS 25 进行 ANOVA 和 Duncan’s 多重比较分析；室内盆栽试验叶片 SOD 和 POD 活性的差异分析采用 Student’s *t* 检验进行；采用 GraphPad Prism 8 绘图。

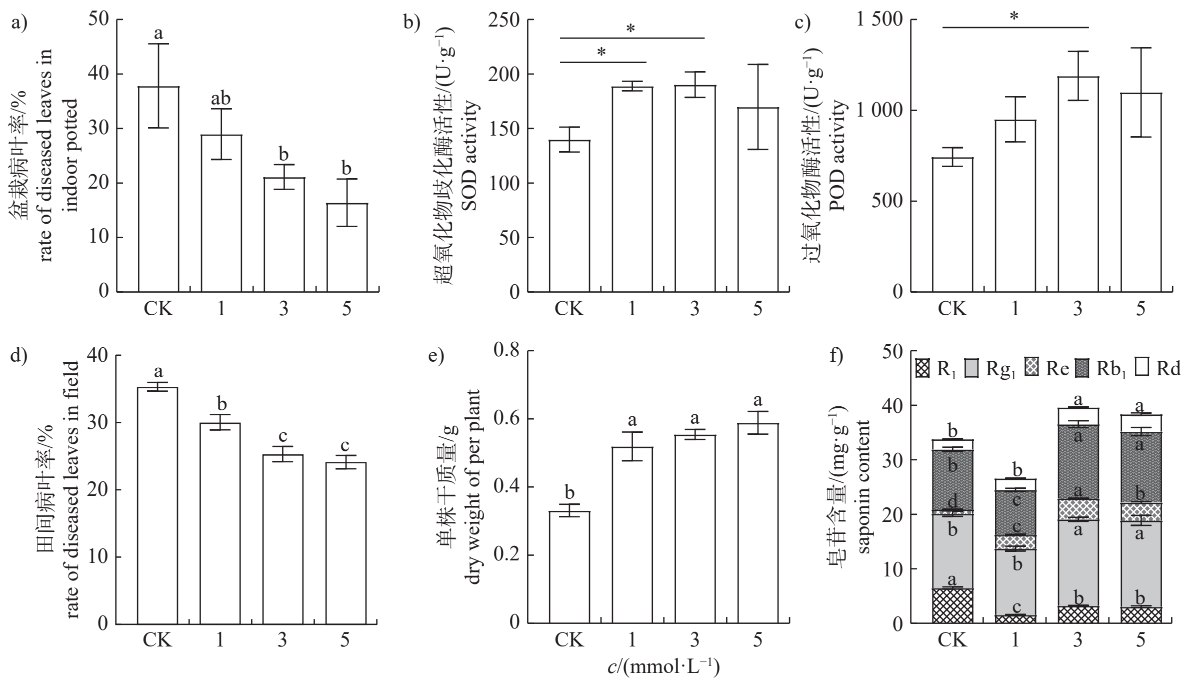
2 结果与分析

2.1 外源丝氨酸对三七热胁迫的缓解作用

经过 36 ℃ 热胁迫 15 d，3 和 5 mmol/L 丝氨酸处理可显著降低室内盆栽三七的病叶率；1 和 3 mmol/L 丝氨酸处理可显著提高其 SOD 活性，3 mmol/L 丝氨酸处理可显著提高其 POD 活性 (图 1a~c)。田间试验进一步表明：外源喷施丝氨酸可显著降低三七的病叶率，显著提高三七单株干质量 (图 1d~e)。此外，3 和 5 mmol/L 丝氨酸处理可显著提高人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 和 Rd 的含量 (图 1f)。

2.2 外源丝氨酸改变三七的代谢谱

对照组和丝氨酸处理组共鉴定到 65 种代谢



注：“*”表示两两比较差异显著 (P<0.05)；不同小写字母表示多组处理间差异显著 (P<0.05)。

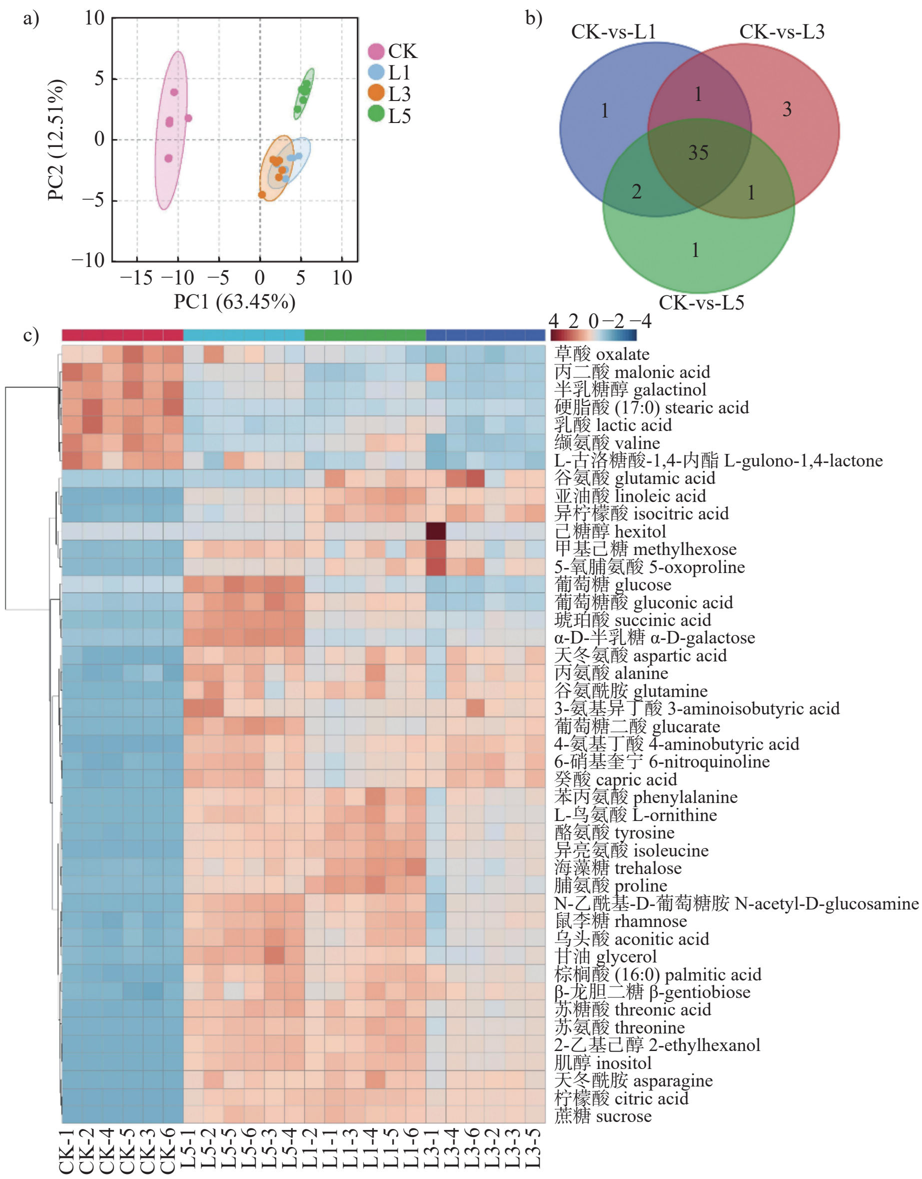
Note: “*” indicates significant differences between two comparisons (P<0.05); different lowercase letters indicate significant differences among multiple treatment groups (P<0.05).

图 1 热胁迫下外源丝氨酸叶面喷施对室内盆栽三七和田间三七的影响

Fig. 1 Effects of exogenous serine foliar spraying on the potted and field-grown *Panax notoginseng* under heat stress

物，包括 18 种糖类及其衍生物、14 种有机酸、19 种氨基酸及其衍生物、2 种多胺、2 种醇、3 种游离脂肪酸和 7 种其他代谢物。采用主成分分析 (PCA) 区分不同处理三七叶片的代谢差异，结果表明：叶片的 2 个主成分 (PC1 和 PC2) 对差异的解释率分别为 63.45% 和 12.51%，且在丝氨酸处理组和对照中明显分离 (图 2a)，表明喷施丝氨酸显著改变了高温胁迫下三七叶片的代谢谱。

CK-vs-L1、CK-vs-L3、CK-vs-L5 的 OPLS-DA 模型组中，R^2X 评分均高于 0.599，R^2Y 评分均高于 0.994，Q^2 值均大于 0.976，证实 OPLS-DA 模型可靠 (表 1)。CK-vs-L1、CK-vs-L3 和 CK-vs-L5 中分别有 39，40 和 39 个差异代谢物。在 CK-vs-L1 比较组中，有 36 个物质上调，3 个物质下调；CK-vs-L3 比较组中，有 34 个物质上调，6 个物质下调；CK-vs-L5 比较组中，有 37 个物质上调，2 个物质下调，表明外源喷施丝



注：L1、L3 和 L5 分别表示 1、3 和 5 mmol/L 丝氨酸处理组；下同。a) 代谢产物的主成分分析；b) 差异代谢物 Venn 分析；c) 差异代谢物相对含量。

Note: L1, L3, and L5 indicates 1, 3, and 5 mmol/L serine treatment group, respectively; the same as below. a) the principal component analysis of metabolites; b) the Venn analysis of differential metabolites; c) the relative content of differential metabolites.

图 2　外源喷施丝氨酸对三七代谢谱的影响

Fig. 2　Effects of exogenous serine spraying on the metabolic profile of *P. notoginseng*

表 1 OPLS-DA 模型解释率

Tab. 1 Explanation rate of OPLS-DA model

比较组 comparative groups	R^2X	R^2Y	Q^2
CK-vs-L1	0.606	0.994	0.976
CK-vs-L3	0.599	0.996	0.973
CK-vs-L5	0.609	0.994	0.979

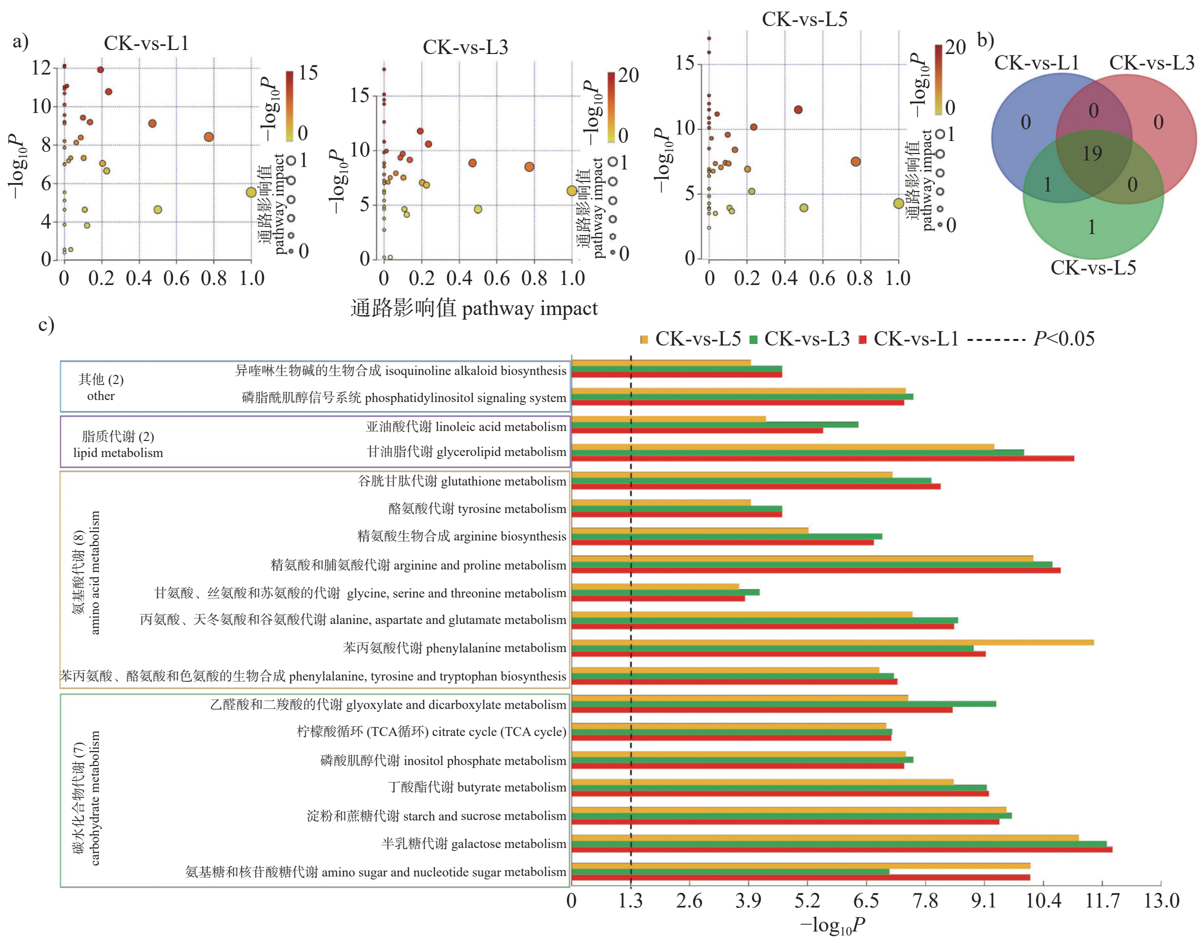
注：L1、L3和L5分别表示1、3和5 mmol/L丝氨酸处理组。

Note: L1, L3, and L5 indicate 1, 3, and 5 mmol/L serine treatment group, respectively.

氨酸可显著提高三七的代谢水平，促进代谢物质的积累。Venn 图进一步分析发现 (图 2b)：叶片中共有 44 种差异代谢物，其中 35 种共同的差异代谢物质受不同浓度的丝氨酸调节。用 1、3 和 5 mmol/L 丝氨酸处理后，大多数差异代谢物在丝氨酸处理组中具有较高的含量 (图 2c)，进一步表明外源喷施丝氨酸可显著提高三七的代谢水平，促进代谢物质积累。

2.3 外源丝氨酸增强氨基酸和碳水化合物代谢

经过 1、3 和 5 mmol/L 丝氨酸处理，叶片中分别富集到 44、46 和 46 条通路；其中通路影响值>0 且 P<0.05 的通路分别为 20、19 和 21 条 (图 3a)。3 个比较组共有代谢通路 19 条 (通路影响值>0 且 P<0.05，图 3b)，包括 7 条碳水化合物代谢途径：氨基糖和核苷酸糖代谢 (ko00520)，半乳糖代谢 (ko00052)，淀粉和蔗糖代谢 (ko00500)，丁酸酯代谢 (ko00650)，磷酸肌醇代谢 (ko00562)，三羧酸循环 (ko00020)，乙醛酸和二羧酸的代谢 (ko00630)；8 条氨基酸代谢途径：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 (ko00400)，苯丙氨酸代谢 (ko00360)，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢



注：a) 差异代谢物 KEGG 富集分析；b) 显著富集通路的 Venn 分析；c) 显著富集的通路。

Note: a) KEGG enrichment analysis of differential metabolites; b) Venn analysis of significantly enriched pathways; c) pathway commonly significantly enriched.

图 3 差异代谢物代谢通路

Fig. 3 Metabolic pathway of differential metabolites (ko00260)，精氨酸生物合成 (ko00220)，精氨酸和脯氨酸代谢 (ko00330)，酪氨酸代谢 (ko00350)，谷胱甘肽代谢 (ko00480)；2 条脂质代谢途径：亚油酸代谢 (ko00591)，甘油脂代谢 (ko00561)；2 条其他代谢途径：磷脂酰肌醇信号系统 (ko04070)，异喹啉生物碱的生物合成 (ko00950) (图 3c)。

19 条共同代谢通路中共有 24 个差异代谢物，包括 7 个糖及其衍生物、12 个氨基酸、4 个有机酸和 1 个游离脂肪酸 (表 2)。7 个糖及其衍生物主要参与碳水化合物代谢途径，其中，半乳糖和半乳糖醇参与半乳糖代谢 (ko00052)；肌醇参与半乳糖代谢 (ko000052)、磷酸肌醇代谢 (ko00562) 和磷脂酰肌醇信号系统 (ko04070)；甘油参与半乳糖代谢 (ko00052) 和甘油脂代谢 (ko00561)；海藻糖和蔗糖参与淀粉和蔗糖代谢 (ko00500)，蔗糖还参与半乳糖代谢 (ko00052)；N-乙酰基-D-葡糖糖胺参与氨基糖和核苷酸糖代谢 (ko00520)。12 个氨基酸及其衍生物主要参与氨基酸代谢，其中，丙氨酸和天冬酰胺参与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)；5-氧脯氨酸、苏氨酸和脯氨酸分别参与谷胱甘肽代谢 (ko00480)，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢 (ko00260) 以及精氨酸和脯氨酸代谢 (ko00330)；苯丙氨酸和酪氨酸分别参与苯丙氨酸代谢 (ko00360) 和酪氨酸代谢 (ko00350)，共同参与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 (ko00400)，酪氨酸还参与异喹啉生物碱的生物合成 (ko00950)；天冬氨酸参与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)，精氨酸生物合成 (ko00220) 以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢 (ko00260)；L-鸟氨酸参与精氨酸和脯氨

表 2 差异代谢物代谢通路注释结果

Tab. 2 Differential metabolites pathways annotation results

代谢物 metabolites	log_2FC			KEGG通路 KEGG pathway
	CK-vs-L1	CK-vs-L3	CK-vs-L5	
半乳糖醇 galactinol	−1.07	−1.44	−0.90	ko00052
肌醇 inositol	11.54	11.07	11.55	ko00052；ko00562；ko04070
甘油 glycerol	1.92	1.53	2.30	ko00052；ko00561
海藻糖 trehalose	3.62	2.69	3.11	ko00500
α-D-半乳糖 α-D-galactose	5.47	5.67	7.29	ko00052
蔗糖 sucrose	14.07	13.82	13.99	ko00052；ko00500
N-乙酰基-D-葡糖糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	7.92	7.32	8.13	ko00520
苯丙氨酸 phenylalanine	7.30	6.69	7.09	ko00400；ko00360
酪氨酸 tyrosine	7.00	6.33	6.71	ko00400；ko00350；ko00950
丙氨酸 alanine	1.54	1.50	1.76	ko00250
天冬酰胺 asparagine	7.93	7.61	7.79	ko00250
天冬氨酸 aspartic acid	5.35	5.27	5.57	ko00250；ko00220；ko00260
苏氨酸 threonine	7.12	6.55	7.08	ko00260
4-氨基丁酸 4-aminobutyric acid	9.62	9.91	9.95	ko00650；ko00330；ko00250
L-鸟氨酸 L-ornithine	6.58	5.85	6.39	ko00330；ko00220
脯氨酸 proline	8.55	7.29	7.93	ko00330
谷氨酸 glutamic acid	9.85	10.18	6.42	ko00650；ko00630；ko00330；ko00250；ko00220；ko00480
谷氨酰胺 glutamine	7.77	7.54	7.79	ko00630；ko00250；ko00220
5-氧脯氨酸 5-oxoproline	10.02	10.42	9.81	ko00480
草酸 oxalate	−0.70	−1.09	−0.39	ko00630
琥珀酸 succinic acid	4.06	3.63	5.00	ko00650；ko00630；ko00020；ko00250
柠檬酸 citric acid	11.04	10.75	10.89	ko00020；ko00630
乌头酸 aconitic acid	2.03	1.60	2.29	ko00020；ko00630
亚油酸 linoleic acid	7.16	6.78	6.54	ko00591

注：$log_2FC>1$表示倍数变化> 2；$log_2FC<-1$表示倍数变化<0.5。

Note: $log_2FC>1$ represents fold change> 2; $log_2FC<-1$ represents fold change<0.5.

酸代谢 (ko00330) 以及精氨酸生物合成 (ko00220)；谷氨酰胺参与乙醛酸和二羧酸的代谢 (ko00630)，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250) 以及精氨酸生物合成 (ko00220)；4-氨基丁酸参与丁酸酯代谢 (ko00650)，精氨酸和脯氨酸代谢 (ko00330) 以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)；谷氨酸参与丁酸酯代谢 (ko00650)，乙醛酸和二羧酸的代谢 (ko00630)，精氨酸和脯氨酸代谢 (ko00330)，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)，精氨酸生物合成 (ko00220) 以及谷胱甘肽代谢 (ko00480)。4 个有机酸主要参与三羧酸循环和乙醛酸循环，其中，草酸参与乙醛酸和二羧酸的代谢 (ko00630)；琥珀酸、柠檬酸以及乌头酸均参与乙醛酸和二羧酸的代谢 (ko00630) 以及三羧酸循环 (ko00020)，琥珀酸还参与丁酸酯代谢 (ko00650) 以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (ko00250)；亚油酸参与亚油酸代谢 (ko00591)。上述代谢物只有草酸和半乳糖醇积累量低于对照，其余物质积累量均高于对照，表明外源丝氨酸处理能提高三七的氨基酸代谢和碳水化合物代谢水平。

3 讨论

长时间的热胁迫会对植物造成无法逆转的损伤[19]。外源施用氨基酸是缓解植物热胁迫的有效措施。本研究发现：外源丝氨酸可有效降低热胁迫下室内盆栽三七的病叶率，提高抗氧化酶活性；降低田间三七的病叶率，提高三七单株干质量和皂苷含量。KEGG 富集分析发现：外源喷施丝氨酸可提高热胁迫下三七的氨基酸、糖及其衍生物、有机酸以及游离脂肪酸积累量。其中，提高抗氧化酶活性和代谢物积累可能是外源喷施丝氨酸缓解三七热胁迫的重要途径。

热胁迫导致植物 ROS 积累[20]。当植物体内 ROS 的清除速率低于产生速率时，会导致细胞受到氧化损伤[21]。由酶和非酶物质组成的抗氧化防御系统是植物应对非生物胁迫引起氧化损伤的基本解毒系统[22]。抗坏血酸 (ascorbic acid，AsA)—谷胱甘肽 (glutathione，GSH) 循环与其他抗氧化酶一起参与 AsA 和 GSH 的氧化还原反应，维持植物细胞中 ROS 产生和消除之间的平衡[23]。因此，植物在高温环境中的生存能力在一定程度上取决于抗氧化能力。室内试验结果显示：与清水对照 (CK) 相比，高温环境中，喷施 1 和 3 mmol/L 丝氨酸可显著提高 SOD 活性 (P<0.05)，喷施 3 mmol/L 丝氨酸可显著提高 POD 活性。氨基酸作为植物重要的初级代谢物，既可以作为渗透调节物质调节胞内渗透压，又可以合成生物碱等用于胁迫防御的次级代谢物[24-25]。研究发现：外源氮诱导植物叶片中氨基酸的积累，增强了叶片的耐热性[26]。本研究结果发现：外源丝氨酸的喷施导致多种氨基酸 (如苯丙氨酸、酪氨酸、丙氨酸等) 积累量增加，表明外源丝氨酸促进了三七叶片中氨基酸的积累。芳香氨基酸 (酪氨酸和苯丙氨酸) 是抗氧化剂多酚的合成前体，其积累可能有助于提高多酚含量进而提高三七抗氧化能力[27]；谷氨酸和天冬氨酸可以通过增强抗氧化酶活性来增强抗氧化能力[28]；4-氨基丁酸和脯氨酸可通过增强抗氧化酶活性和减少 ROS 积累来减轻逆境对植物的伤害[29]，游离脯氨酸还具有调节植物渗透及保护细胞膜结构稳定的功能[30]；谷氨酸是抗氧化剂 GSH 的合成物质之一，5-氧脯氨酸转化为谷氨酸是 GSH 再生所必需的过程[31]；谷氨酰胺和天冬酰胺也可以通过脱氨转化为谷氨酸和天冬氨酸，从而发挥抗氧化作用[32]；肌醇在对抗非生物应激的信号转导和 ROS 清除剂中发挥作用[33]。因此，提高抗氧化酶活性和积累非酶抗氧化代谢物可能是外源喷施丝氨酸提高三七耐热性的重要原因。此外，热胁迫会使植物细胞膜的流动性以及膜组分发生变化并引起膜损伤[34]，部分氨基酸 (如脯氨酸[30]、苏氨酸[35]和谷氨酰胺[36]) 具有保护细胞膜的作用，进而缓解热胁迫。

碳水化合物是植物中最丰富的代谢物之一，在植物对非生物胁迫的耐受性中起着重要作用，可作为能量来源、渗透调节剂和信号分子等[37]。本研究发现：外源喷施丝氨酸后，糖及其衍生物积累量 (肌醇、甘油、α-D-半乳糖蔗糖、N-乙酰基-D-葡萄糖胺) 均高于对照。蔗糖在热胁迫植物中可作为渗透保护剂[38]；海藻糖积累量增加可提高转基因水稻对非生物胁迫的耐受性[39]，外源海藻糖也能够减轻高温胁迫对小麦幼苗的氧化胁迫损伤[40]。此外，海藻糖能够在极端的高温、低温、高渗透压和干燥失水等不利条件下，在细胞表面形成独特的保护层，有效地保护蛋白质和核酸等重要的生物大分子结构，从而维持生命体的生命过程和生物特征[41]。在 KEGG 代谢途径中，

半乳糖醇和 α-D-半乳糖也可以直接参与或转化为 D-葡萄糖，参与糖酵解和三羧酸循环。另外，甘油是半乳糖的上游物质，间接参与合成 α-D-半乳糖。因此，碳水化合物上调对三七的能量补充以及渗透调节具有重要作用，这也可能是三七耐热性提高的原因之一。

三羧酸 (tricarboxylic acid，TCA) 循环是驱动有氧生物 ATP 合成的关键能量代谢过程[42]。乙酰辅酶 A 是 TCA 循环的起始物质，其下游物质亚油酸积累量增加，乙酰辅酶 A 的积累量也可能增加。另外，TCA 循环中的有机酸含量可反映植株的生长和代谢活性[43]，而热胁迫会降低 TCA 循环中的有机酸含量和关键酶活性，最终影响植物生长[44]。本研究中，外源喷施丝氨酸后，TCA 循环中的柠檬酸、乌头酸和琥珀酸积累量均高于对照，且与碳水化合物代谢途径被显著富集，说明外源丝氨酸可能通过增强能量代谢途径产生更多能量，进而补充三七在热胁迫期间的能量消耗。

4 结论

叶面喷施丝氨酸可显著降低室内盆栽和田间三七病叶率，提高田间三七的单株干质量和皂苷含量。丝氨酸处理后，盆栽三七的 SOD 和 POD 活性显著提高，非酶类抗氧化物质 (氨基酸和糖醇) 积累，参与产能的 TCA 循环代谢物积累增加，碳水化合物代谢水平整体提高。叶面喷施丝氨酸可能通过提高三七的抗氧化能力以及碳水化合物代谢水平增强三七耐热性，进而缓解热胁迫。

[参考文献]

[1] LIU H J, GU H R, YE C, et al. Planting density affects *Panax notoginseng* growth and ginsenoside accumulation by balancing primary and secondary metabolism[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 628294. DOI: 10.3389/fpls.2021.628294.

[2] 张洁. 中药三七的药理作用及研究进展[J]. 中国卫生产业, 2017, 14(28): 40. DOI: 10.16659/j.cnki.1672-5654.2017.28.040.

[3] XIA P G, GUO H B, RU M, et al. Accumulation of saponins in *Panax notoginseng* during its growing seasons[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 104(1): 287. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.04.045.

[4] 王俊芳, 任晓丝, 王萌. 组分中药稳定性研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4546. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.032.

[5] 罗群, 游春梅, 官会林. 环境因素对三七生长影响的分析[J]. 中国西部科技, 2010, 9(9): 7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6396.2010.09.004.

[6] SUZUKI N, MITTLER R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction[J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126(1): 45. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2005.00582.x.

[7] 全怡吉, 郭存武, 张义杰, 等. 不同温度处理对三七生理生化特性的影响及黑斑病敏感性测定[J]. 分子植物育种, 2018, 16(1): 262. DOI: 10.13271/j.mpb.016.000262.

[8] 张强皓, 张金燕, 寸竹, 等. 光强和高温对三七光系统活性的影响[J]. 植物生理学报, 2020, 56(5): 1064. DOI: 10.13592/j.cnki.ppj.2019.0475.

[9] XU L, SHOU J, GILL R A, et al. Effects of ZJ0273 on barley and growth recovery of herbicide-stressed seedlings through application of branched-chain amino acids[J]. Journal of Zhejiang University (Science B), 2019, 20(1): 71. DOI: 10.1631/jzus.B1700375.

[10] KUMAR N, GAUTAM A, DUBEY A K, et al. GABA mediated reduction of arsenite toxicity in rice seedling through modulation of fatty acids, stress responsive amino acids and polyamines biosynthesis[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 173(30): 15. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.017.

[11] LI Z, PENG Y, HUANG B R. Alteration of transcripts of stress-protective genes and transcriptional factors by γ-aminobutyric acid (GABA) associated with improved heat and drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1623. DOI: 10.3390/ijms19061623.

[12] PRIYA M, SHARMA L, SINGH I, et al. Securing reproductive function in mungbean grown under high temperature environment with exogenous application of proline[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 140: 136. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.05.009.

[13] ROS R, MUÑOZ-BERTOMEU J, KRUEGER S. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(9): 564. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.06.003.

[14] WADITEE R, BHUIYAN N H, HIRATA E, et al. Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(47): 34185. DOI: 10.1074/jbc.M704939200.

[15] 左应梅, 张金渝, 杨天梅, 等. 温度胁迫对三七光合特性及生理指标的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(12): 2147. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2017.12.05.

[16] JI J, ZHU P, CUI F C, et al. The antagonistic effect of mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone on metabolic profiling in serum and liver of mice[J]. Toxins, 2017, 9(1): 28. DOI: 10.3390/toxins9010028.

[17] LIU H J, WU J Q, SU Y W, et al. Allyl isothiocyanate in the volatiles of *Brassica juncea* inhibits the growth of root rot pathogens of *Panax notoginseng* by inducing the accumulation of ROS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(46): 13715. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c05225.

[18] YANG M, ZHANG X D, XU Y G, et al. Autotoxic ginsenosides in the rhizosphere contribute to the replant failure of *Panax notoginseng*[J]. PLoS One, 2015, 10(2): 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0118555.

[19] KOTAK S, LARKINDALE J, LEE U, et al. Complexity of the heat stress response in plants[J]. Current Opinion

in Plant Biology, 2007, 10(3): 310. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.04.011.

[20] ZANDALINAS S I, BALFAGÓN D, ARBONA V, et al. Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 953. DOI: 10.3389/fpls.2017.00953.

[21] 王译, 韩莹琰, 郝敬虹, 等. 褪黑素对高温胁迫下生菜抗氧化酶系统的影响[J]. 北京农学院学报, 2022, 37(2): 46. DOI: 10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2022.0209.

[22] HASANUZZAMAN M, HOSSAIN M A, DA SILVA J A T, et al. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor[M]//VENKATESWARLU B, SHANKER A K, SHANKER C, et al. Crop stress and its management: perspectives and strategies. Dordrecht: Springer, 2012.

[23] LI Y L, LIU Y F, ZHANG J G. Advances in the research on the AsA-GSH cycle in horticultural crops[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2010, 4(1): 84. DOI: 10.1007/s11703-009-0089-8.

[24] LESS H, GALILI G. Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1): 316. DOI: 10.1104/pp.108.115733.

[25] 张阳, 刘海涛, 张昭, 等. 生物碱的生理生态功能及影响其形成的因素[J]. 中国农学通报, 2014, 30(28): 252.

[26] JESPERSEN D, YU J, HUANG B R. Metabolite responses to exogenous application of nitrogen, cytokinin, and ethylene inhibitors in relation to heat-induced senescence in creeping bentgrass[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0123744. DOI: 10.1371/journal.pone.0123744.

[27] 左玉. 多酚类化合物研究进展[J]. 粮食与油脂, 2013, 26(4): 6. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9578.2013.04.004.

[28] FARDUS J, HOSSAIN M S, FUJITA M. Modulation of the antioxidant defense system by exogenous L-glutamic acid application enhances salt tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.)[J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 587. DOI: 10.3390/biom11040587.

[29] 贾琰, 赵宏伟, 王敬国, 等. 逆境胁迫下作物中γ-氨基丁酸代谢及作用的研究进展[J]. 作物杂志, 2014, 162(5): 12. DOI: 10.16035/j.issn.1001-7283.2014.05.005.

[30] 郝婷, 丁小涛, 金海军, 等. 高温对黄瓜生长的影响及设施栽培对策[J]. 上海农业学报, 2014, 30(2): 126. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3924.2014.02.029.

[31] XU Y, DU H M, HUANG B R. Identification of metabolites associated with superior heat tolerance in thermal bentgrass through metabolic profiling[J]. Crop Science, 2013, 53(4): 1631. DOI: 10.2135/cropsci2013.01.0045.

[32] LI X J, LIN C, O'CONNOR P B. Glutamine deamidation: differentiation of glutamic acid and γ-glutamic acid in peptides by electron capture dissociation[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(9): 3606. DOI: 10.1021/ac9028467.

[33] LI Z, YU J J, PENG Y, et al. Metabolic pathways regulated by γ-aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*)[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 6. DOI: 10.1038/srep30338.

[34] ZHAO J G, LU Z J, WANG L, et al. Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 118. DOI: 10.3390/ijms22010117.

[35] CHENG Z X, GUO C, CHEN Z G, et al. Glycine, serine and threonine metabolism confounds efficacy of complement-mediated killing[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 3325. DOI: 10.1038/s41467-019-11129-5.

[36] ZIEGLER F, SEDDIKI L, MARION-LETELLIER R, et al. Effects of L-glutamine supplementation alone or with antioxidants on hydrogen peroxide-induced injury in human intestinal epithelial cells[J]. e-SPEN, 2011, 6(4): 211. DOI: 10.1016/j.eclnm.2011.07.001.

[37] KAPLAN F, KOPKA J, HASKELL D W, et al. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2004, 136(4): 4165. DOI: 10.1104/pp.104.052142.

[38] RIZHSKY L, LIANG H J, SHUMAN J, et al. When defense pathways collide? The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1683. DOI: 10.1104/pp.103.033431.

[39] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(25): 15898. DOI: 10.1073/pnas.252637799.

[40] 王迪, 罗音, 高亚敏, 等. 外施海藻糖对高温胁迫下小麦幼苗膜脂过氧化的影响[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(7): 925. DOI: 10.7606/j.issn.1009-1041.2016.07.14.

[41] 徐云刚, 詹亚光. 植物抗旱机理及相关基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2009, 199(2): 13. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2009.02.002.

[42] SWEETLOVE L J, BEARD K F M, NUNES-NESI A, et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(8): 462. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.006.

[43] 赵秀琴, 张婷, 王文生, 等. 水稻低温胁迫不同时间的代谢物谱图分析[J]. 作物学报, 2013, 39(4): 725. DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00720.

[44] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 321. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.029.

责任编辑：何謦成