

FtMYB1 转录因子调控苦荞毛状根黄酮醇合成的机理研究

伍小方^{1,2,3}, 高国应^{1,2,3}, 左倩^{1,2}, 赵辉², 张凯旋², 严明理^{1,3}, 周美亮²

(¹ 湖南科技大学生命科学学院, 湘潭 411201; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

³ 湖南科技大学经济作物遗传改良与综合利用湖南省重点实验室, 湘潭 411201)

摘要: R2R3-MYB 转录因子在植物类黄酮合成中起重要的调控作用。本研究从川荞 1 号中克隆获得一个 R2R3-MYB 家族基因 *FtMYB1*, 酵母转录激活分析显示其具有转录激活活性, 激素处理下的表达模式分析显示, *FtMYB1* 基因能够被茉莉酸甲酯 (MeJA) 和脱落酸 (ABA) 诱导表达。在苦荞毛状根中过表达 *FtMYB1* 基因, 结果表明转基因毛状根株系中总黄酮和芦丁含量显著低于野生型, 且在黄酮醇合成途径下游分别编码黄酮醇合酶 (FLS) 和鼠李糖基转移酶 (RT) 的 *FLS* 和 *RT1* 基因表达量在转基因株系中显著降低, 表明 *FtMYB1* 可能通过调控 *FLS* 和 *RT1* 的表达来抑制黄酮醇的生物合成。

关键词: R2R3-MYB 转录因子; 黄酮醇; 苦荞; 毛状根

Deciphering the Functional Basis of FtMYB1 Transcription Factor in Flavonol Biosynthesis of Tartary Buckwheat Hairy Root

WU Xiao-fang^{1,2,3}, GAO Guo-ying^{1,2,3}, ZUO Qian^{1,2}, ZHAO Hui²,

ZHANG Kai-xuan², YAN Ming-li^{1,3}, ZHOU Mei-liang²

(¹ College of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Hunan Key Laboratory of Economic Crops Genetic Improvement and Integrated Utilization, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201)

Abstract: R2R3-MYB transcription factors are known to play important regulation role in the flavonoid biosynthesis of plants. In this study, a gene *FtMYB1* belonging to the R2R3-MYB gene family was cloned from tartary buckwheat cultivar ‘Chuanqiao No.1’. The *FtMYB1* transcription factor was found to exhibit the transcriptional activation activity in yeast, and its expression of *FtMYB1* gene was induced by methyl jasmonate (MeJA) and abscisic acid (ABA) treatment. Overexpressing the *FtMYB1* gene in tartary buckwheat hairy root showed a significant reduction in contents of total flavonoid and rutin if compared with wild type. Furthermore, the expression of *FLS* and *RT1* genes, which encode for flavonol synthetase (FLS) and rhamnosyltransferase (RT) in tartary buckwheat, respectively, were significantly lower in the *FtMYB1* overexpressing hairy roots than that of wild type. Taken together, our results suggested that *FtMYB1* may function in inhibition of the flavonol biosynthesis by repressing the expression of *FLS* and *RT1* genes.

Key words: R2R3-MYB transcription factor; flavonol; tartary buckwheat; hairy root

收稿日期: 2020-01-18 修回日期: 2020-02-13 网络出版日期: 2020-02-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200118001>

第一作者研究方向为荞麦品质代谢调控研究, E-mail: 1287562997@qq.com

通信作者: 严明理, 研究方向为植物遗传与分子生物学, E-mail: ymljack@126.com

周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与品质代谢调控研究, Email: zhoumeiliang@caas.cn

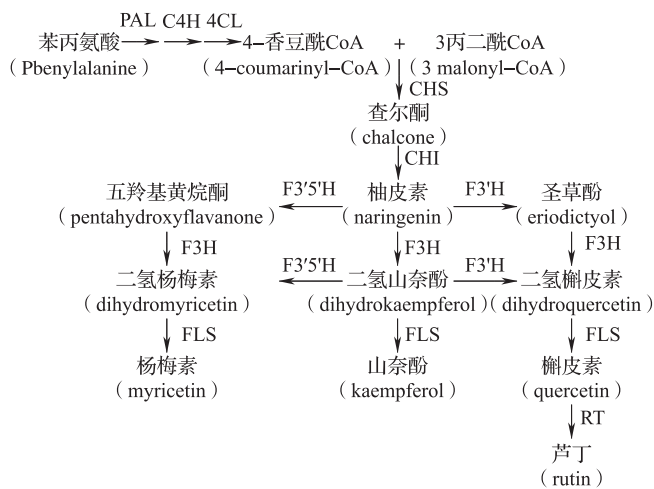
基金项目: 国家重点研发计划中国 - 欧盟国际合作重点项目 (2017YFE0117600); 国家自然科学基金面上项目 (31871536)

Foundation projects: National Key R & D Program of China (2017YFE0117600), National Natural Science Foundation of China (31871536)

黄酮醇是植物中最丰富的黄酮类化合物之一,具有抗氧化、抗癌、抗炎、抗菌等多种重要的生物活性,并且具有预防和治疗糖尿病和心血管疾病等重要的医疗功能^[1-6]。此外,黄酮醇与植物的生长发育、抵抗非生物胁迫以及色泽、口感和品质等的形成具有密切联系^[7-10]。因此,黄酮醇作为一种重要的次生代谢产物,在植物、食品以及医疗研究领域受到广泛关注。黄酮醇的生物合成是由苯丙烷类代谢途径和类黄酮代谢途径共同决定的。催化苯丙氨酸初始步骤的酶是苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸 4-羟化酶和 4-香豆酸 CoA 连接酶,这是合成羟基肉桂酸及其衍生物的必要步骤,而羟基肉桂酸及其衍生物是所有其他类型苯丙酸的前体。黄酮类化合物生物合成由查尔酮合成酶(CHS, chalcone synthetase)、查尔酮异构酶(CHI, chalcone isomerase)和黄烷酮 3-羟化酶共同催化完成,而黄酮醇的生物合成由黄酮醇合酶(FLS, flavonol synthase)、槲皮素 3-O-甲基转移酶和鼠李糖基转移酶(RT, rhamnosyltransferase)等生物合成酶催化完成(图 1)。大量研究证明,苯丙氨酸途径的酶基因主要由 R2R3-MYB 转录因子调控。Czemmel 等^[11]从葡萄中分离并鉴定了一个光诱导的 R2R3-MYB 转录因子 VvMYBF1,发现其在

开花和果实成熟过程中的表达模式与 *VvFLS1* 的表达模式一致,并且与黄酮醇的积累相关,瞬时转录激活分析证明, VvMYBF1 是黄酮醇合成的一个特异性调节因子,能够激活 *CHS*、*CHI* 以及 *FLS* 的转录。Liu 等^[12]利用 RNA 干扰技术抑制 *CsMYBF1* 基因在柑橘愈伤组织中的表达,导致许多苯丙氨酸代谢途径相关基因表达量下调,并且降低了羟基肉桂酸和黄酮醇的含量。日本龙胆 *GtMYBP3* 和 *GtMYBP4* 基因在拟南芥中的异源表达激活了内源黄酮醇生物合成基因的表达,导致幼苗中黄酮醇积累增加^[13]。在拟南芥 *MYB12* 缺失突变体和过表达株系中测定黄酮醇含量,结果显示 *AtMYB12* 的表达水平与幼苗中的黄酮醇含量紧密相关,并证明 *CHS* 和 *FLS* 是 *AtMYB12* 主要的靶基因^[14]。*AtMYB11* 是拟南芥中 *AtMYB12* 的同源基因,在外源系统中过表达时也显示出类似的功能^[15]。

荞麦属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum* Mill)的双子叶 1 年生或多年生草本植物,主要的栽培种有普通荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench)(又称甜荞),和鞑靼荞麦(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.)(又称苦荞)^[16]。荞麦富含芦丁等黄酮类化合物,作为营养膳食而备受关注。与甜荞相比,苦荞中的芦丁、槲皮素等黄酮类物质更为丰富,具有极高的药用价值和保健作用^[17-18]。目前的研究证明,苦荞 FtMYB1 是典型的 R2R3-MYB 转录因子,在烟草叶片中异源表达 *FtMYB1* 基因导致烟草叶片原花青素含量显著高于野生型,并引起一系列类黄酮生物合成基因表达量的显著变化,其中编码二氢黄酮醇 4-还原酶基因(DFR, dihydroflavonol 4-reductase)表达量上升约 5.6 倍,而 *FLS* 基因受到显著抑制^[19-21]。由于 *FLS* 是黄酮醇合成途径的第一个关键酶,我们推测 FtMYB1 可能影响黄酮醇的生物合成。因此,本研究以川荞 1 号为材料,克隆了 *FtMYB1* 基因的 CDS 全长序列,并利用实时荧光定量 PCR 检测其在不同激素诱导下的表达模式。此外,在苦荞毛状根中过表达 *FtMYB1* 基因,进一步研究其对黄酮醇生物合成的影响。



PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸 4-羟化酶; 4CL: 4-香豆酸 CoA 连接酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄烷酮 3-羟化酶; F3'H: 类黄酮 3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮 3',5'-羟化酶; FLS: 黄酮醇合酶; RT: 鼠李糖基转移酶

PAL: phenylalanine ammonia lyase, C4H: cinnamate 4-hydroxylase, 4CL: 4-coumarate: CoA ligase, CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase, F3H: flavone 3-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase, FLS: flavonol synthase, RT: rhamnosyltransferase

图 1 黄酮醇生物合成途径示意图

Fig. 1 Flavonol biosynthesis pathway

1 材料与方法

1.1 研究材料及试剂

以川荞 1 号为材料进行无菌苗的培养,用于基因克隆、激素处理和毛状根的诱导。大肠杆菌菌株 DH5 α 、酵母菌株 PJ69-4A、发根农杆菌菌株

A4、酵母转录激活载体 pAS2-1、植物过表达载体 pCAMBIA1307 均由荞麦基因资源创新研究组提供。

1.2 苦荞总 RNA 的提取及 *FtMYB1* 全长 CDS 的克隆

按照 FastPure Plant Total RNA Isolation Kit 试

剂盒的说明书来提取苦荞总 RNA, 取 500 ng 质量合格的 RNA 进行反转录。以反转录的 cDNA 为模板, 利用基因特异性引物 *FtMYB1*-F 和 *FtMYB1*-R 进行 PCR 扩增, 用于 *FtMYB1* 基因克隆的引物序列见表 1。

表 1 引物序列汇总

Table 1 Summary of primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Function
<i>FtMYB1</i> -F	ATGGTGAGAAAACCTTGC	基因克隆
<i>FtMYB1</i> -R	TCACAAATCTCCAATC	
pAS- <i>FtMYB1</i> -F	CCAGCTTTGACTCATATGATGGTGAGAAAACCTTGC	转录活性分析
pAS- <i>FtMYB1</i> -R	GCTTGGCTGCAGGTCGACTCACAAATCTCCAATC	
1307- <i>FtMYB1</i> -F	CTAGAACTAGTGGATCCATGGTGAGAAAACCTTGC	构建过表达载体
1307- <i>FtMYB1</i> -R	GCGGAGTACCCGGGTACCTCACAAATCTCCAATC	
<i>Hygromycin</i> -F	GACGTCTGTCGAGAAGTTTCTG	转基因毛状根阳性检测
<i>Hygromycin</i> -R	GGCGTCGGTTTCCACTAT	
TLF	CTCAAGCAATCAAGCATTCTAC	qRT-PCR
<i>FtMYB1</i> -QR1	AGAGCCACGGAAATCGAG	
<i>FtMYB1</i> -QF2	CCTTGAGATCCTGAACAGCA	
H3-QF	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	
H3-QR	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
<i>FLS</i> -QF	TCGATCAAGAAGGCGAGTGA	
<i>FLS</i> -QR	TTCTCCTCGATCGGAAGCTC	
<i>RT1</i> -QF	TCAAATAAGCTCGCTCCCA	
<i>RT1</i> -QR	GCTGCATTTTGTCAAGAGCG	

1.3 *FtMYB1* 的转录激活分析

采用同源重组法构建 pAS2-1-*FtMYB1* 重组载体, 并转化酵母 PJ69-4A 感受态细胞。将转化子涂布至 SD-Trp 缺陷筛选培养基上。28 °C 培养 2~3 d 后, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 将阳性菌液分别点样至 SD-Trp 和 SD-Trp/-His/-Ade 缺陷筛选培养基上。含有 pAS2-1 空载体的酵母菌株作为阴性对照。

1.4 *FtMYB1* 基因的启动子序列分析

使用在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测 *FtMYB1* 基因起始密码子上游 2000 bp 序列的顺式作用元件位点。

1.5 毛状根的诱导及转基因毛状根的鉴定

采用同源重组法构建 pCAMBIA1307-*FtMYB1* 重组载体, 并根据谈天斌等^[22]描述的方法进行发根农杆菌 A4 菌株介导的苦荞毛状根的诱导。使用 CTAB 法提取毛状根 DNA, 用于转基因毛状根的 PCR 分子鉴定。使用引物 *Hygromycin*-F/R 进行 PCR 扩增反应, 通过鉴定潮霉素基因的存在来筛选转 pCAMBIA1307 空载体 (A4-1307) 毛状根阳性

根系。使用 pCAMBIA1307 载体通用引物 TLF 作为正向引物, 基因特异性引物 1307-*FtMYB1*-R 作为反向引物进行 PCR 扩增, 筛选鉴定 pCAMBIA1307-*FtMYB1* (A4-1307-*FtMYB1*) 毛状根阳性根系, 引物序列见表 1。

1.6 毛状根总黄酮含量的测定

采用三氯化铝法^[23]在波长为 420 nm 处测定毛状根中总黄酮的含量。芦丁标准曲线的绘制: 分别吸取浓度为 0.1 mg/mL 的芦丁标准品母液 0.075 mL、0.125 mL、0.25 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入 2 mL 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液和 3 mL 1 mol/L 的乙酸钾溶液, 用 80% 甲醇定容至 10 mL。室温下静置 30 min 后, 以不加芦丁样品的溶剂为空白对照, 使用分光光度计在 420 nm 处测定吸光度。以吸光值为横坐标, 芦丁浓度为纵坐标绘制芦丁标准曲线: $Y_1 = 32.857X_1 - 0.0079$ ($R^2 = 0.9994$)。

将毛状根样品烘干至恒重后研磨粉碎, 过 40 目筛, 取 0.1 g 样品粉末置于玻璃试管中, 加入 10 mL 80% 的甲醇, 40 °C 超声提取 30 min。使用 0.22 μm

微孔滤膜将提取液过滤,精确吸取 1 mL 样品滤液加入 2 mL 0.1 mol/L 的三氯化铝溶液和 3 mL 1 mol/L 的乙酸钾溶液,用 80% 甲醇定容至 10 mL,使用分光光度计在 420 nm 处测定样品吸光度。根据标准曲线计算各样品总黄酮含量,误差值代表 3 次重复试验的标准差。

1.7 毛状根芦丁含量的测定

采用范昱等^[24]的方法,利用高效液相色谱测定毛状根中的芦丁含量。芦丁标准曲线的制备:分别吸取浓度为 0.1 mg/mL 的芦丁标准品母液 1 μ L、10 μ L、20 μ L、50 μ L、80 μ L 进样检测,记录峰面积。以芦丁含量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线: $Y_2=7734.3X_2+101250$ ($R^2=0.998$)。吸取 50 μ L 1.6 所述样品滤液上样检测,根据标准曲线计算各样品芦丁含量,误差值代表 3 次重复试验的标准差。

1.8 实时荧光定量 PCR 分析

激素诱导表达:选择生长一致的 10 d 苗龄的川荞 1 号无菌苗,转移至 MS 液体培养基中,置于摇床上震荡培养 1 d,转速为 120 rpm/min。分别加入 50 μ M 的茉莉酸甲酯 (MeJA) 和 100 μ M 脱落酸 (ABA) 于 MS 液体培养基中,在处理第 0、1、4 和 12 h 时取样。将样品迅速吸干后液氮速冻,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

关键酶基因表达量的检测:取生长状态一致的

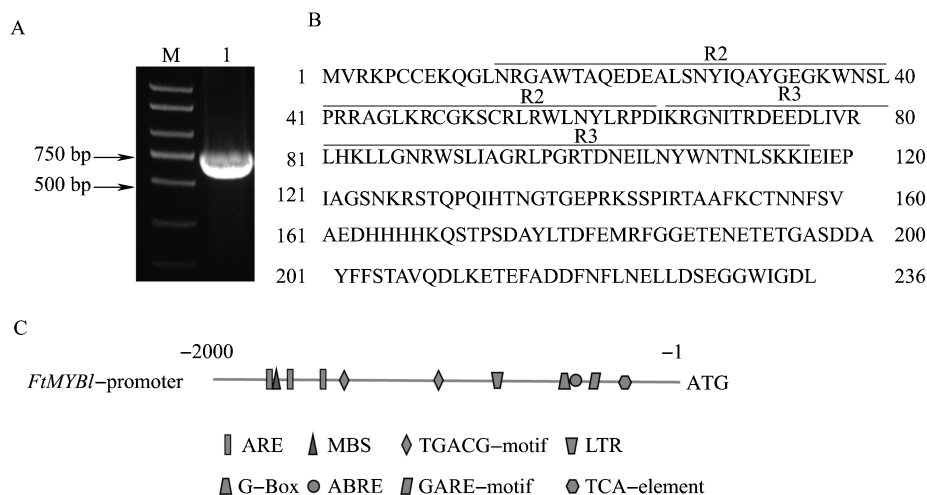
野生型和转基因毛状根,液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

提取上述各样品的 RNA,反转录后作为 qRT-PCR 模板。用于 qRT-PCR 的基因特异性引物见表 1, *H3* 作为内参基因。应用 7500 Real Time PCR System 进行实时荧光定量扩增。每个样品设置 3 个技术重复,使用 $RQ(\text{相对表达量})=2^{-\Delta\Delta CT}$ 的算法,计算目标基因的相对表达量,误差值代表 3 次重复试验的标准差。用于 qRT-PCR 的 *FLS* 和内参基因 *H3* 的引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 苦荞 FtMYB1 基因的克隆及启动子分析

以川荞 1 号 cDNA 为模板,利用特异性引物 *FtMYB1*-F/R 进行 PCR 扩增,得到编码序列全长为 711 bp 的目的片段(图 2A、B)。利用在线网站预测 *FtMYB1* 基因启动子上的顺式作用元件位点,发现其具有多个激素响应元件,包括茉莉酸响应元件 (TGACG-motif)、脱落酸响应元件 (ABRE)、赤霉素响应元件 (GARE-motif) 以及水杨酸响应元件 (TCA-element)。此外,该区域还发现一些其他胁迫响应元件,如低温响应元件 (LTR)、光响应元件 (G-Box) 以及厌氧诱导元件 (ARE) 等(图 2C)。



A: *FtMYB1* 基因 CDS 序列扩增; M: DL2000 DNA marker; 1: *FtMYB1* 基因的 PCR 扩增产物; B: *FtMYB1* 的氨基酸序列,下划线表示 R2 和 R3 MYB DNA 结合结构域; C: *FtMYB1* 基因的启动子序列分析; ARE: 厌氧诱导元件; MBS: 参与干旱诱导的 MYB 结合位点; TGACG-motif: 茉莉酸响应元件; LTR: 低温响应元件; G-Box: 光响应元件; ABRE: 脱落酸响应元件; GARE-motif: 赤霉素响应元件; TCA-element: 水杨酸响应元件

A: amplification of *FtMYB1* CDS sequence, M: DL2000 DNA marker, 1: PCR amplification of *FtMYB1* gene, B: amino acid sequence of *FtMYB1*, the R2 and R3 MYB DNA-binding domains are underlined, C: promoter sequence analysis of *FtMYB1* gene, ARE: element essential for the anaerobic induction, MBS: MYB binding site involved in drought-inducibility, TGACG-motif: MeJA-responsive element,

LTR: low-temperature-responsive element, G-Box: light-responsive element, ABRE: abscisic acid-responsive element,

GARE-motif: gibberellin-responsive element, TCA-element: salicylic acid-responsive element

图 2 苦荞 *FtMYB1* 基因 CDS 序列扩增及启动子分析

Fig. 2 CDS sequence amplification and promoter sequence analysis of *FtMYB1* in tartary buckwheat

2.2 *FtMYB1* 的转录激活分析

转录激活分析表明,所有的转化子在 SD-Trp 缺陷筛选培养基上均生长良好,而只有 pAS2-1 融合 *FtMYB1* 的转化子在 SD-Trp/-His/-Ade 缺陷筛选培养基能够正常生长,说明 *FtMYB1* 能够激活酵母 PJ69-4A 菌株基因组中报告基因 Ade 和 His 的转录(图 3)。

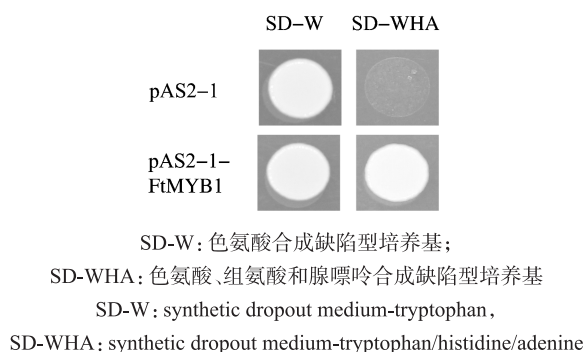


图 3 *FtMYB1* 的转录激活分析

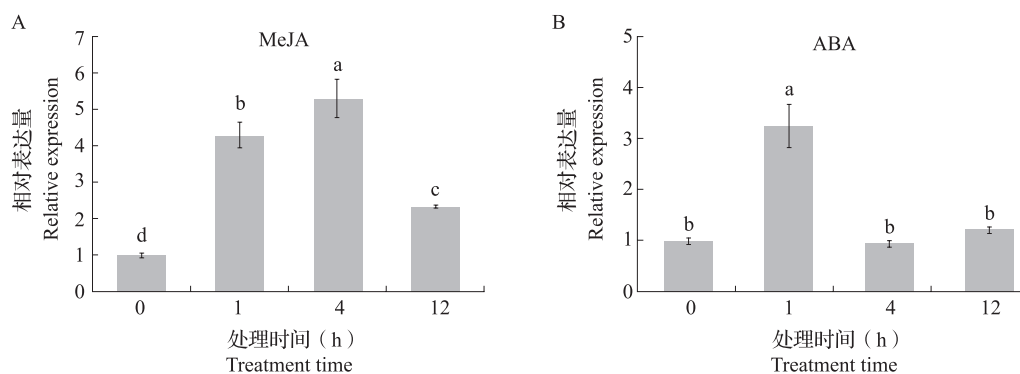
Fig. 3 Transcription activation assay of *FtMYB1*

2.3 *FtMYB1* 基因在 MeJA 和 ABA 诱导下的表达分析

根据 *FtMYB1* 基因的启动子顺式作用元件位

点预测结果, *FtMYB1* 基因可能受多种激素诱导(图 2C)。据报道,茉莉酸类物质(JAs)包括茉莉酸(JA)及其衍生物茉莉酸甲酯(MeJA)和氨基酸衍生物(如 JA-Ile),在调控次生代谢过程中发挥重要作用^[25]。此外,近年研究表明,ABA 具有调控植物中花青素的合成与积累,促进果实着色等生物学功能^[26-27]。因此,本研究分析了 *FtMYB1* 基因在 MeJA 和 ABA 诱导下的表达模式。

用 MeJA 和 ABA 分别处理 10 d 苗龄的苦荞幼苗,并在 1 h、4 h 和 12 h 时取样, qRT-PCR 检测 MeJA 和 ABA 处理不同时间的苦荞幼苗中 *FtMYB1* 的相对表达量。结果显示, *FtMYB1* 在 MeJA 处理 1 h 时被显著诱导表达,在 4 h 时表达量达到最高,约为对照组的 5.3 倍,此后开始降低。在处理 12 h 时, *FtMYB1* 的表达量约为对照组的 2.3 倍(图 4A)。ABA 诱导下的表达分析显示, *FtMYB1* 在处理 1 h 时表达量急剧上升,约为对照组的 3.2 倍,此后开始下降至对照水平(图 4B)。根据该结果推测 *FtMYB1* 可能在响应茉莉酸和 ABA 信号诱导植物次生代谢产物合成中发挥作用。



不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$)

Means with different letters along a column are significantly different ($P < 0.05$)

图 4 激素诱导下 *FtMYB1* 基因的表达模式

Fig. 4 Expression specificity of *FtMYB1* gene under hormone induction

2.4 毛状根的诱导及转基因根系的鉴定

为探究 *FtMYB1* 在黄酮醇合成途径中的作用,本研究选择转化效率高,稳定性强且生长速度快的毛状根系统验证其功能。采用谈天斌等^[22]描述的方法进行了野生型(A4)、转 pCAMBIA1307 空载体(A4-1307)和转 pCAMBIA1307-*FtMYB1* (A4-1307-*FtMYB1*) 毛状根的诱导,其诱导过程见图 5A。利用 PCR 分子鉴定筛选转基因毛状根阳性根系,结果如图 5B 所示,证明已成功获得 A4-1307 和 A4-1307-*FtMYB1* 的转基因毛状根

根系。

2.5 苦荞毛状根中过表达 *FtMYB1* 对总黄酮和芦丁的影响

选择生长状态一致的 A4、A4-1307 及 A4-1307-*FtMYB1* 毛状根进行总黄酮和芦丁含量的测定(图 6),2 个 *FtMYB1* 过表达株系中的总黄酮和芦丁含量均显著低于对照组,其中总黄酮含量分别为对照组的 0.39 和 0.37 倍,芦丁含量分别为对照组的 0.13 和 0.56 倍,表明 *FtMYB1* 可能在苦荞毛状根黄酮醇的生物合成中起负调控作用。

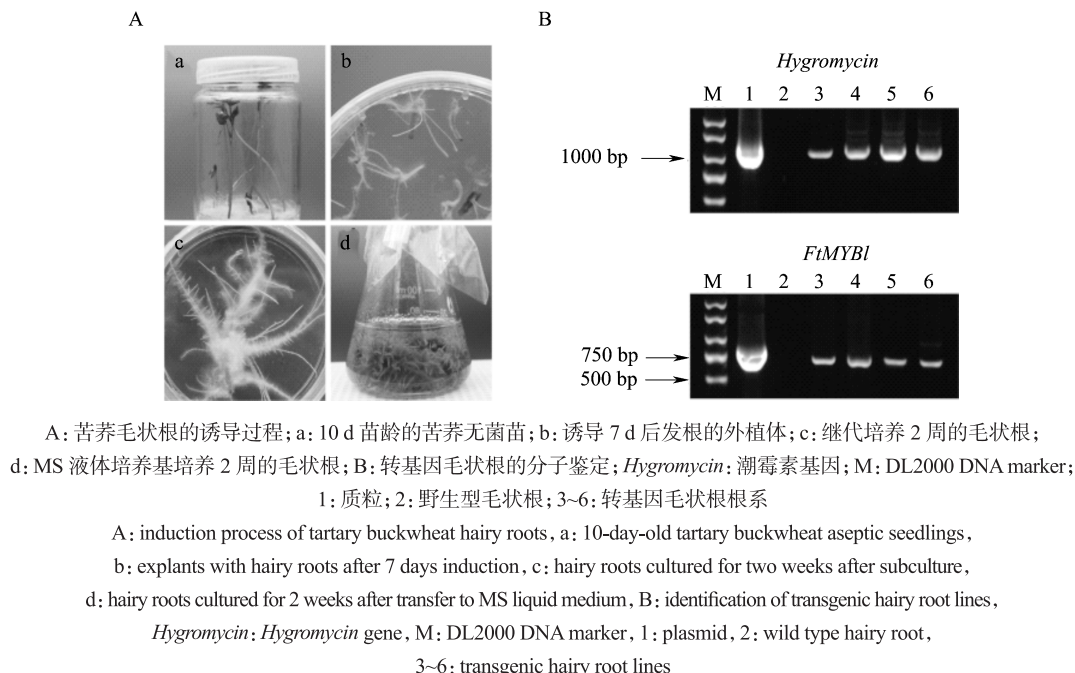
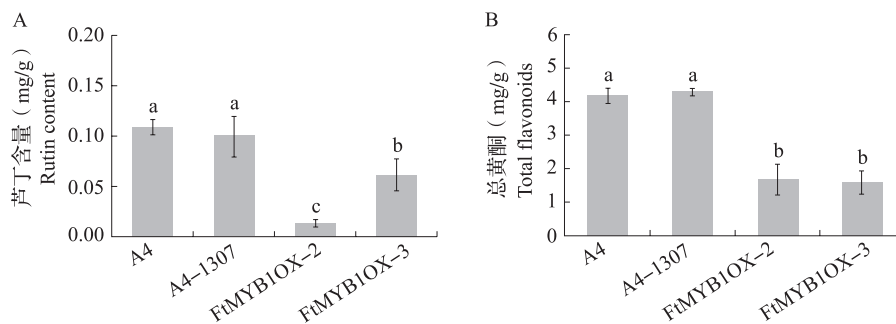


图 5 苦荞毛状根的诱导过程和转基因根系的鉴定

Fig. 5 Induction of tartary buckwheat hairy roots and identification of transgenic hairy root lines



A4: 野生型毛状根株系; A4-1307: 转空载体毛状根株系; FtMYB1OX-2/3: 转 pCambia1307-*FtMYB1* 毛状根株系。下同

A4: wild type hairy root line, A4-1307: empty vector transgenic hairy root line, FtMYB1OX-2/3: pCambia1307-*FtMYB1* transgenic hairy root line. The same as below

图 6 毛状根总黄酮和芦丁含量的测定

Fig. 6 Determination of total flavonoids and rutin content in hairy roots

在苦荞毛状根 A4、A4-1307 以及 A4-1307-*FtMYB1* 中检测 *FtMYB1* 基因及黄酮醇途径下游关键酶基因 *FLS* 和 *RT1* 的表达量,结果显示 2 个 *FtMYB1* 过表达株系中 *FtMYB1* 的表达量显著高于对照组,且 *FLS* 和 *RT1* 基因在 *FtMYB1* 过表达毛状根株系中显著下调(图 7A、B)。其中,*FLS* 在 *FtMYB1OX-2* 和 *FtMYB1OX-3* 中分别为野生型的 0.57 和 0.37 倍,该结果与 Bai 等^[21] 研究相符,在 *FtMYB1* 异源表达的烟草中 *FLS* 表达量显著低于对照。此外,*RT1* 基因表达量下降至对照的 0.63 倍左右。因此,推测 *FtMYB1* 转录因子是芦丁生物合成的抑制子,通过影响 *FLS* 和 *RT1* 的表达量从而抑制

芦丁的生物合成。

3 讨论

类黄酮又称黄酮类化合物,广泛参与植物中花色素的形成、花香的调节、抗病、抗紫外线损伤等多种生物学过程^[28]。类黄酮的生物合成由结构基因和调节基因(转录因子)协同完成,结构基因编码一系列合成酶,主要包括早期合成基因和晚期合成基因,转录因子通过结合结构基因启动子上的顺式作用元件来调控其表达水平,从而共同调控类黄酮合成途径中的不同分支^[29]。在拟南芥中,类黄酮的合成主要包括 7 个分支:花青素途径、原花青素途径、

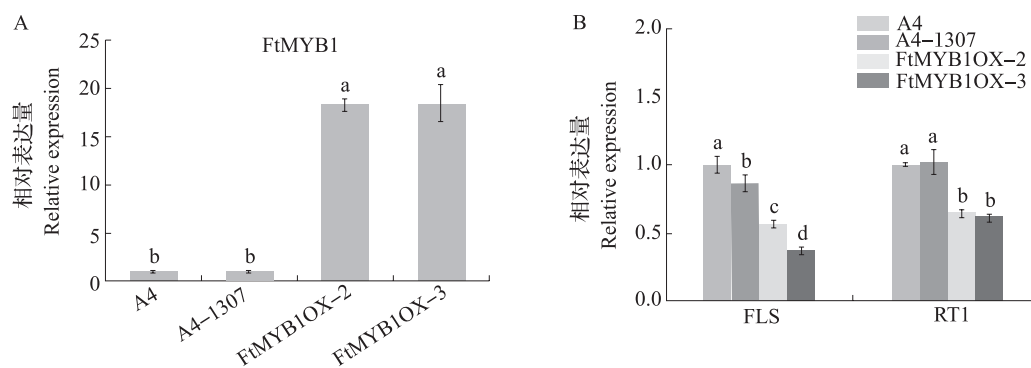


图7 苦荞毛状根黄酮醇途径关键酶基因的表达量

Fig. 7 Expression of flavonol pathway key enzyme genes in tartary buckwheat hairy roots

黄酮途径、黄酮醇途径、异黄酮和异类黄酮途径、鞣酐途径以及橙酮途径^[28]。MYB家族是参与类黄酮合成的重要的转录因子家族,根据其DNA结合结构域中不完全重复序列的数目将其分为4个亚类:1R-MYB、R2R3-MYB、3R-MYB和4R-MYB。其中,R2R3-MYB是MYB转录因子家族中最大的亚类,其在类黄酮合成中的作用已被广泛研究^[30]。

在拟南芥中,AtMYB11、AtMYB12和AtMYB111能够激活类黄酮早期合成基因的表达,而AtMYB75、AtMYB90、AtMYB113和AtMYB114能够正调控类黄酮晚期合成基因的表达,从而促进类黄酮的生物合成^[31-32]。在苹果中,紫外线照射和低温处理均能促进苹果皮中MdMYBA的表达,其表达与苹果皮中花青素的积累呈正相关^[33]。小苍兰FhMYB5能够与bHLH转录因子FhTT8L和FhGL3L相互作用,协同调控花青素和原花青素的合成,FhMYB5在烟草和拟南芥中的异源表达能够调节类黄酮途径的多个分支,并可能主要作为花青素和原花青素生物合成的调节子^[34]。据报道,苦荞*FtMYB1*基因在烟草中异源表达对原花青素含量以及相关靶基因的表达量具有显著上调的作用,而黄酮醇合成途径基因*FLS*的表达水平受到显著抑制^[21],因此,我们对*FtMYB1*转录因子在黄酮醇合成途径中的作用进行进一步研究。在苦荞毛状根中过表达*FtMYB1*基因显示,转基因毛状根中总黄酮和芦丁含量显著低于对照,并且黄酮醇合成途径基因*FLS*和*RT1*的表达量显著下调。然而,虎萌^[20]研究表明,*FtMYB1*基因异源表达的烟草叶片总黄酮含量约为对照组的2.81倍。推测可能由于*FtMYB1*转录因子在叶片中对原花青素途径的影响更为显著^[21],从而导致总黄酮含量上升。由于在毛状根中原花青素含量极低,

因此推测*FtMYB1*转录因子主要在黄酮醇途径发挥抑制作用,从而导致转基因毛状根总黄酮含量降低。

植物中的许多次生代谢产物能够在一些外源诱导因子的作用下形成并积累,如茉莉酸和ABA。茉莉酸是一种重要的植物激素,通过调节茉莉酸响应性转录因子来诱导多种次生代谢产物的生物合成^[35]。ABA作为植物中五大内源激素之一,广泛参与种子休眠、幼苗生长、非生物胁迫、花青素生物合成和果实成熟等多种生物学过程^[36-38]。Zhang等^[17]研究表明,苦荞中4个茉莉酸响应的MYB转录因子(*FtMYB13*,*FtMYB14*,*FtMYB15*和*FtMYB16*)均为芦丁生物合成的抑制子,并且*FtSAD2*和*FtJAZ1*显著促进了*FtMYBs*的抑制活性。红色甜樱桃R2R3-MYB转录因子PacMYBA能够被外源ABA诱导表达,并与花青素合成相关的bHLH转录因子协同调控花青素途径基因的表达,进而显著促进了花色素苷的积累^[27]。本研究显示*FtMYB1*在MeJA和ABA的处理下均被显著诱导表达,并推测其通过茉莉酸途径影响黄酮类化合物积累,但是其作用的分子机制需进一步研究证明。

综上所述,本研究分析了*FtMYB1*在MeJA和ABA诱导下的表达模式,结果显示2种激素处理下其表达量均被诱导表达,推测其参与MeJA和ABA调控的黄酮类化合物的生物合成。此外,在苦荞毛状根中过表达*FtMYB1*基因,结果显示总黄酮和芦丁含量显著降低,并且黄酮醇途径基因*FLS*和*RT1*表达量下调。本研究为*FtMYB1*转录因子调控苦荞毛状根黄酮醇生物合成的分子机制进行了初步解析,为后续深入研究*FtMYB1*对靶基因的调控模式奠定了基础。

参考文献

- [1] Kimura H, Ogawa S, Ishihara T, Maruoka M, Tokuyama-Nakai S, Jisaka M, Yokota K. Antioxidant activities and structural characterization of flavonol, O-glycosides from seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). *Food Chemistry*, 2017, 228: 348-355
- [2] Kim H, Seo E M, Sharma A R, Ganbold B, Park J, Sharma G, Kang Y H, Song D K, Lee S S, Nam J S. Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2013, 43 (4): 1319-1325
- [3] Cassidy A, Rogers G, Peterson J J, Dwyer J T, Lin H, Jacques P F. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2015, 102 (1): 172-181
- [4] Boudouda H B, Zeghib A, Karioti A, Bilal AR, Öztürk M, Aouni M, Kabouche A, Kabouche Z. Antibacterial, antioxidant, anti-cholinesterase potential and flavonol glycosides of *Biscutella raphanifolia* (*Brassicaceae*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 28 (1): 153-158
- [5] Valentová K, Vrba J, Banciřová M, Ulrichová J, Křen V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food & Chemical Toxicology*, 2014, 68: 267-282
- [6] Serban M C, Sahebkar A, Zanchetti A, Mikhailidis D P, Howard G, Antal D, Andrica F, Ahmed A, Aronow W S, Muntner P, Lip G Y, Graham I, Wong N, Rysz J, Banach M. Effects of quercetin on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of the American Heart Association*, 2016, 5 (7): e002713
- [7] Silva-Navas J, Moreno-Risueno M A, Manzano C, Téllez-Robledo B, Navarro-Neila S, Carrasco V, Pollmann S, Gallego F J, Del Pozo J C. Flavonols mediate root phototropism and growth through regulation of proliferation-to-differentiation transition. *The Plant Cell*, 2016, 28 (6): 1372-1387
- [8] Ferrer-Gallego R, Brás N F, García-Estévez I, Mateus N, Rivas-Gonzalo J C, de Freitas V, Escribano-Bailón M T. Effect of flavonols on wine astringency and their interaction with human saliva. *Food Chemistry*, 2016, 209: 358-364
- [9] Kang S, Zheng X Q, Liang Y R. Studies on bitter and astringent taste of tea. *Journal of Tea*, 2013, 39 (4): 338-343
- [10] Falcone Ferreyra M L, Rius S, Emiliani J, Pourcel L, Feller A, Morohashi K, Casati P, Grotewold E. Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 62 (1): 77-91
- [11] Czemmel S, Stracke R, Weisshaar B, Cordon N, Harris N N, Walker A R, Robinson S P, Bogs J. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 2009, 151 (3): 1513-1530
- [12] Liu C, Long J, Zhu K, Liu L, Yang W, Zhang H, Li L, Xu Q, Deng X. Characterization of a citrus R2R3-MYB transcription factor that regulates the flavonol and hydroxycinnamic acid biosynthesis. *Scientific Reports*, 2016, 6 (1): 25352
- [13] Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, Fujita K, Kakizaki Y, Nishihara M. Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 (18): 6505-6517
- [14] Mehrrens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 138 (2): 1083-1096
- [15] Li Y, Chen M, Wang S L, Ning J, Ding X H, Chu Z H. AtMYB11 regulates caffeoylquinic acid and flavonol synthesis in tomato and tobacco. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2015, 122 (2): 309-319
- [16] 唐宇, 邵继荣, 周美亮. 中国荞麦属植物分类学的修订. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (3): 646-653
Tang Y, Shao J R, Zhou M L. A taxonomic revision of *Fagopyrum* mill from China. *Journal of plant genetic resources*, 2019, 20 (3): 646-653
- [17] Zhang K X, Logacheva M D, Meng Y, Hu J P, Wan D P, Li L, Janovská D, Wang Z Y, Georgiev M I, Yu Zhuo, Yang F Y, Yan M L, Zhou M L. Jasmonate-responsive MYB factors spatially repress rutin biosynthesis in *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69 (8): 1955-1966
- [18] Qin P, Wang Q, Shan F, Hou Z, Ren G. Nutritional composition and flavonoids content of flour from different buckwheat cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45 (5): 951-958
- [19] 白悦辰, 陶亮, 蒙华, 李成磊, 陈惠, 吴琦. 苦荞转录因子基因 *FtMYB1* 的克隆及序列分析. *四川农业大学学报*, 2011, 29 (1): 16-21
Bai Y C, Tao L, Meng H, Li C L, Chen H, Wu Q. Clone and sequence analysis of a transcription factor gene *FtMYB1* from *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2011, 29 (1): 16-21
- [20] 虎萌. 苦荞转录因子 FtMYB1 和 FtMYB2 对烟草黄酮合成关键酶基因表达和黄酮积累的影响. 雅安: 四川农业大学, 2012
Hu M. Effects of transcription factor FtMYB1 and FtMYB2 from *Fagopyrum tataricum* on key gene's expression of flavonoid biosynthesis and flavonoid accumulation in tobacco. YAan: Sichuan Agricultural University, 2012
- [21] Bai Y C, Li C L, Zhang J W, Li S J, Luo X P, Yao H P, Chen H, Zhao H X, Park S U, Wu Q. Characterization of two tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factors and their regulation of proanthocyanidin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152 (3): 431-440
- [22] 谈天斌, 卢晓玲, 张凯旋, 丁梦琦, 廖志勇, 周美亮. *TrMYB308* 基因的克隆及在苦荞毛状根中的功能分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (6): 1542-1553
Tan T B, Lu X L, Zhang K X, Ding M Q, Liao Z Y, Zhou M L. Cloning and functional analysis of transcription factor gene *TrMYB308* in tartary buckwheat hairy roots. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (6): 1542-1553
- [23] 李为喜, 朱志华, 李国营, 刘方, 李燕, 刘三才. AICl₃ 分光光度法测定荞麦种质资源中黄酮的研究. *植物遗传资源学报*, 2008, 9 (4): 502-505
Li W X, Zhu Z H, Li G Y, Liu F, Li Y, Liu S C. Study on flavone in buckwheat determined by spectrophotometric method. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9 (4): 502-505
- [24] 范昱, 王红力, 何凤, 赖弟利, 王佳俊, 宋月, 向达兵. 后熟对苦荞籽粒营养品质的影响. *作物杂志*, 2018 (1): 96-101

- Fan Y, Wang H L, He F, Lai D L, Wang J J, Song Y, Xiang D B. Nutritional quality in seeds of tartary buckwheat affected by after-ripening. *Crops*, 2018 (1): 96-101
- [25] 姚娜,荆礼,郑汉,申业. 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. *中国中药杂志*, 2018, 43 (5): 897-908
- Yao N, Jin L, Zhen H, Shen Y. Research progress of jasmonate-responsive transcription factors in regulating plant secondary metabolism. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43 (5): 897-908
- [26] 马文瑶,程大伟,顾红,黄海娜,陈锦永,杨英军. 脱落酸 (ABA) 促进果实着色研究进展. *果树学报*, 2018, 35 (8): 1016-1026
- Ma W Y, Cheng D W, Gu H, Huang H N, Chen J Y, Yang Y J. Advances in ABA promoting fruit coloration. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35 (8): 1016-1026
- [27] Shen X, Zhao K, Liu L, Zhang K, Yuan H, Liao X, Wang Q, Guo X, Li F, Li T. A role for PacMYBA in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55 (5): 862-880
- [28] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126 (2): 485-493
- [29] Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 (2): 155-160
- [30] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weissshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010, 15 (10): 573-581
- [31] Stracke R, Ishihara H, Hup G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weissshaar B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal*, 2007, 50 (4): 660-677
- [32] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53 (5): 814-827
- [33] Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant Cell Physiology*, 2007, 48: 958-970
- [34] Li Y, Shan X, Zhou L, Gao R, Yang S, Wang S, Wang L, Gao X. The R2R3-MYB Factor FhMYB5 From *Freesia hybrida* contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1935
- [35] Zhou M, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 2016, 34 (4): 441-449
- [36] Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D. Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 2002, 14: S15-S45
- [37] Jia H F, Chai Y M, Li C L, Lu D, Luo J J, Qin L, Shen Y Y. Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*, 2011, 157 (1): 188-199
- [38] Mehrotra R, Bhalothia P, Bansal P, Basantani M K, Bharti V, Mehrotra S. Absciscic acid and abiotic stress tolerance-different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171 (7): 486-496

欢迎订阅 2021 年《中国草地学报》

《中国草地学报》是由中国农业科学院草原研究所和中国草学会共同主办的国家级草学学术期刊,主要包括草原学、牧草学、草地学和草坪学等学科领域内有关草地与牧草资源、牧草遗传育种与引种栽培、草地经营管理与改良利用、牧草生理生化、草地建设与生态保护、草地生产与饲草料加工调制、草坪绿地、草业经济与可持续发展战略等。

本刊为中国草业领域创办最早的科技期刊,现为中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊、中国科学引文数据库来源期刊,并被《中国知网》、《中国期刊网》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《万方数据—数字化期刊群》、《中文电子期刊资料服务库》、《中国科技论文与引文数据库》等多种数据库及二次文献收录。

《中国草地学报》为双月刊,大 16 开, A4 版本,国内外公开发行。国内统一刊号 CN 15 - 1344/S,国内邮发代号 16 - 32,全国各地邮局(所)均可订阅,错过订期可直接向本刊编辑部补订。

地址:内蒙古呼和浩特市乌兰察布东街 120 号

邮编:010010

电话:0471 - 4928361

电子信箱:zgcdxb @ 126.com

在线投稿网址: <http://zgcd.cbpt.cnki.net>

微信公众号:中国草地学报