

苦荞 *FtFLS1* 基因的功能和遗传多样性分析

欧阳屹南^{1,2}, 刘洋^{2,3}, 彭佳师¹, 陈媛媛^{2,4}, 赵辉², 贺玉婷¹, 赵星宇¹, 唐新科¹, 周美亮²

(¹湖南科技大学生命科学与健康学院/经济作物遗传改良与综合利用湖南省重点实验室, 湘潭411201; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京100081; ³西南大学农学与生物科技学院, 重庆400700; ⁴长江大学农学院, 湖北荆州434025)

摘要:前期苦荞转录组分析显示了一个介导黄酮类物质合成相关的黄酮合成酶基因 *FtFLS1*。为进一步了解 *FtFLS1* 基因的结构、功能和基因多样性,本研究通过同源比对和保守序列分析筛选得到苦荞 *FLS* 基因家族共104个成员,其根据同源性和结构域分为10个亚族, *FtFLS1* 属于DF8亚族。同时,启动子分析结果显示上游1500 bp启动子序列中有2个MeJA响应元件,据此,本研究分析了 *FtFLS1* 在苦荞不同器官中的表达量差异及其在MeJA不同处理时间下苦荞中的表达量差异,结果显示, *FtFLS1* 在茎和叶中的表达相近且均要明显高于其在根中的表达,同时 *FtFLS1* 在苦荞中的表达也随着MeJA处理时间的增加而显著提高。为进一步验证 *FtFLS1* 的功能,本研究克隆了 *FtFLS1* 的CDS序列,以此构建 *FtFLS1* 的过表达苦荞毛状根株系并检测了它们的黄酮类物质含量,结果显示,相对于正常诱导的苦荞毛状根, *FtFLS1* 的过表达毛状根明显积累了3类黄酮合成酶的下游产物:山奈酚、槲皮素和芦丁,而黄酮合成酶的底物二氢山奈酚和二氢槲皮素的含量明显降低。此外,本研究还分析了200份不同群体苦荞中 *FtFLS1* 基因的多样性,结果显示:北方群体、南方群体和喜马拉雅野生群体均拥有明显不同的 *FtFLS1* 基因型分布,其中北方群体和南方群体呈现明显的分化,研究结果为探索 *FtFLS1* 介导的黄酮类物质合成以及了解荞麦驯化过程提供了思路 and 参考。

关键词: 苦荞; 黄酮合成酶; 基因家族; 毛状根; 基因多样性

Function and Genetic Diversity Analysis of *FtFLS1* from Tartary Buckwheat

OUYANG Yinan^{1,2}, LIU Yang^{2,3}, PENG Jiashi¹, CHEN Yuanyuan^{2,4}, ZHAO Hui², HE Yuting¹, ZHAO Xinyu¹, TANG Xinke¹, ZHOU Meiliang²

(¹School of Life and Health Sciences, Hunan University of Science and Technology/ Hunan Key Laboratory of Economic Crops Genetic Improvement and Integrated Utilization, Xiangtan 411201; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400700; ⁴College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei)

Abstract: The transcriptome analysis of tartary buckwheat identified a flavonol synthase gene *FtFLS1*. In order to further understand its structure, function and diversity in tartary buckwheat genome, we identified 104 members of *FLS* gene family with 10 subgroups, in which *FtFLS1* was found in DF8 subgroup. Promoter analysis revealed two MeJA response elements at the upstream of 1500 bp sequence. We analyzed the expression of *FtFLS1* in different organs and its response to MeJA treatments. The transcriptional level of *FtFLS1* in stems and leaves was comparable but higher in roots. Expression of *FtFLS1* also increased significantly with the treatment of MeJA. We subsequently cloned the CDS sequence of *FtFLS1*, and then generated *FtFLS1* over-expressed hairy root lines of tartary buckwheat and detected their flavonoid content. Over-expression

收稿日期: 2023-02-26 修回日期: 2023-03-10 网络出版日期: 2023-03-30

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230226001>

第一作者研究方向为荞麦分子机制研究, E-mail: 910553160@qq.com

通信作者: 唐新科, 研究方向为荞麦化感作用机制研究, E-mail: xinketang@126.com

周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与产量品质研究, E-mail: zhumeiliang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1000700, 2019YFD1000703)

Foundation project: National Key R&D Program of China(2019YFD1000700, 2019YFD1000703)

transformants over accumulated the downstream products of *FLS*, which including kaempferol, quercetin and rutin, while the contents of dihydrokaempferol and dihydroquercetin, the substrates of brass synthetase, decreased significantly. Furthermore, we analyzed the diversity of *FtFLS1* gene in different populations of tartary buckwheat, and found that Northern landraces, Southwestern landraces and Himalayan wild accessions present obvious differentiation. The results are helpful for understanding the *FtFLS1*-mediated synthesis of flavonoids and the domestication process of buckwheat.

Key words: tartary buckwheat; flavonol synthase; gene family; hairy root; gene diversity

荞麦属于蓼科(*Polygonaceae*)荞麦属(*Fagopyrum*)植物,其栽培种主要包括苦荞(*Fagopyrum tataricum* (L.)Gaertn.)和甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)^[1]。由于荞麦生育周期短,具有良好的抗逆性以及营养物质丰富的特性,目前在全世界地区广泛种植。苦荞中的黄酮类物质含量远远高于甜荞^[2],近年来,市面上荞麦粗加工产品以荞麦米和荞麦粉为主。研究表明,荞麦中丰富的黄酮类物质,尤其是黄酮醇,具有降血脂、降血糖、抗衰老等功效,因此广泛应用于食品保健等行业,苦荞中黄酮醇的合成和功能备受关注^[3]。

类黄酮代谢途径属于苯丙烷类代谢途径,它的一个重要分支便是黄酮醇代谢途径,其中黄酮合成酶(*FLS*, flavonol synthase)是黄酮醇代谢途径的重要节点^[4]。*FLS*属于FeII/2-酮戊二酸盐依赖性双加氧酶家族,它包含两个高度保守的蛋白结构域DIOX_N(pfam: PF14226)和2OG-FeII_Oxy(pfam: PF03171),分别位于其CDS序列的N端和C端^[5-6]。*FLS*的底物是二氢山奈酚和二氢槲皮素,它们在*FLS*的催化下发生去饱和反应形成山奈酚和槲皮素,这两者也是大部分类黄酮物质的前体,在下游不同酶的催化下山奈酚和槲皮素的羟基被加上不同的基团形成各类黄酮醇物质^[7-10]。*FLS*催化的酶活反应在黄酮醇合成通路中十分关键。*FLS*酶活性最初在1984年报道于辐射处理过的欧芹(*Petroselinum hortense*)悬浮细胞^[11],随后,在红蓝花(*Carthamus tinctorius* L.)^[12]、紫山药(*Dioscorea alata* L.)^[13]、金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)^[14]等植物中不断有报道相继验证了*FLS*酶在不同物种中的活性,并探究其功能和影响因素,但鲜有对苦荞*FLS*基因的研究报道。此外,有研究指出,脱落酸(ABA)及茉莉酸甲酯(MeJA)等植物激素可以通过调控*FLS*参与的黄酮醇合成通路影响植物体内芦丁等黄酮醇物质的合成和积累^[15]。

以芦丁为代表的黄酮醇是评价苦荞黄酮类物质含量的主要成员,其含量的高低直接决定苦荞品

质的优劣^[16],因此,提高芦丁物质的合成和积累是苦荞分子育种的主要方向之一。本研究依据中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源创新研究组200份苦荞种质资源的测序数据结果^[17],筛选了1个苦荞黄酮合成酶基因并命名为*FtFLS1*,对其进行遗传分析、功能预测和生物多样性分析,初步探讨了*FtFLS1*的生物学功能和群体分化规律。

1 材料与方法

1.1 苦荞*FtFLS1*的生物信息学分析

苦荞*FLS*基因家族的筛选:在tair网站(https://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=general&action=new_search)上搜索*FLS*,得到7个拟南芥*AtFLS*家族基因。用Tbtools软件将7个*AtFLS*蛋白序列在苦荞全CDS序列中进行比对筛选得到138个*AtFLS*相似的苦荞基因ID(参数: NumofThreads: 2, E-value: 1e-5)。根据138个苦荞基因ID,用Tbtools软件提取蛋白序列,用MEME网站(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>, 参数 number of motifs: 10)进行保守基序(motif)分析,去除差异较大的序列ID,筛选得到106个苦荞序列ID。再在Smart网站(<https://smart.embl.de/#>)中上传106个苦荞蛋白序列,结合Pfam网站(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)进行蛋白结构域(domain)分析,去除蛋白结构域差异较大的序列,筛选得到104个苦荞序列ID为最终的苦荞*FLS*基因家族序列ID。

基因家族的系统发育和结构分析:将提取得到的苦荞*FLS*基因家族成员的蛋白序列,与拟南芥的7个*AtFLS*蛋白序列一起用MEGA-X软件进行聚类分析绘制进化树(Neighbor-joining; bootstrap method with 1000 Replications),iTOL网站(<https://itol.embl.de/>)美化进化树。根据蛋白序列对苦荞*FLS*基因家族进行motif分析和domain分析,具体步骤和参数同上,同时用Tbtools提取苦荞*FLS*基因

家族的上游 1500 bp 序列作为启动子序列, 将其上传至 Plant Care 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 分析其启动子元件。最后, 将得到的进化树文件、motif 文件、domain 文件和启动子分析文件一起用 Tbttools 软件可视化, 得到基因家族系统分析进化树和结构分析图。

1.2 苦荞材料的种植

本研究采用的苦荞品种为由中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源创新研究组提供的品苦 1 号。实验室种植条件: 品苦 1 号种子剥去外壳, 用 10% 次氯酸钠溶液浸泡 7 min, 再用 75% 的乙醇溶液浸泡 5 min, 无菌水洗 5~6 次, 将洗净的种子放在灭菌滤纸上吸干水分后整齐摆放在 MS 培养瓶中, 于光周期 16 h/8 h、温度 25 °C、湿度 75% 的组培间培养。

1.3 苦荞 RNA 提取及 cDNA 合成

选取长势良好的 14 d 左右的苦荞幼苗 100 mg,

液氮速冻后使用打样机破碎。采用 Trizol 法提取总 RNA, 并以此 RNA 为模板, 使用 HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 进行反转录合成 cDNA。

1.4 *FtFLS1* 基因的克隆及序列分析

FtFLS1 是由中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源创新研究组提供的茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理的苦荞转录组数据, 通过基因表达量变化筛选得到^[17], 根据基因的 ORF 区设计特异性引物 (表 1), 以苦荞 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得目标基因的 CDS 序列。将 PCR 产物纯化回收, 连接至 Zero TOPO-Blunt Simple 平末端克隆载体上并转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态中, 测序获得带有 *FtFLS1* CDS 全长的中间载体, 命名为 T-*FtFLS1*。

表 1 引物序列汇总

Table 1 Summary of primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5' -3') Primer sequence (5' -3')	用途 Function
T- <i>FtFLS1</i> -F	ATGGAGGTTGAAAGAGTTCAA	基因克隆
T- <i>FtFLS1</i> -R	CTACTGTGGGAGCTTGTTAAT	
<i>FtFLS1</i> -qPCR-F	TATCCACCATGCCACAACC	qRT-PCR
<i>FtFLS1</i> -qPCR-R	CAGCACCTCAATCTGATCTCCA	
FtH3-qPCR-F	GAAATTCGCAAGTACCAGAAGAG	qRT-PCR 内参基因
FtH3-qPCR-R	CCAACAAGGTATGCCTCAGC	
1307- <i>FtFLS1</i> -F	gtatctagaactagtggatccATGGAGTTGAAAGAGTTCAA	构建过表达载体
1307- <i>FtFLS1</i> -R	gtcgacggtatcgataagcttCTGTGGGAGCTTGTTAATCTT	
TLF	ctcaagcaatcaagcattctac	p1307 通用引物
1307-R	tatctgggaactactcacacatta	

大写字母为基因序列, 小写字母为载体序列

Uppercase letters are gene sequences and lowercase letters are vector sequences

1.5 *FtFLS1* 基因的差异表达分析

荧光定量 PCR 的设计与步骤: 以 *FtH3* 作为荧光定量 PCR 的内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量, 根据 *FtH3* 和 *FtFLS1* 的 CDS 序列设计特异性 qPCR 引物 FtH3-qPCR-F/R 和 *FtFLS1*-qPCR-F/R (表 1)。

基因表达的组织特异性分析: 取新鲜的品苦 1 号嫩苗 (12 d) 的不同部位 (根、茎、叶), 依次用天根 RNA Easy Fast 植物组织 RNA 快速提取试剂盒 (DP452) 和诺唯赞 cDNA 反转试剂盒 (HiScript III

All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR) 提取 RNA 并反转录为 cDNA, 3 次生物学重复, 于 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上检测基因表达量, 测定结果以根为对照进行数据分析作图。荧光定量 PCR 条件: 使用诺唯赞 qPCR 试剂盒 (Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix); 反应体系为 10 μ L: 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 5.0 μ L, qPCR 正向、反向引物各 0.2 μ L (10 μ mol/L), 模板 cDNA 0.5 μ L, ddH₂O 4.1 μ L。

MeJA 处理的表达差异性分析: 无菌培养的品

苦1号幼苗生长至真叶期,取3株长势一致的无茵苗放入MS液体培养基中,室温120 r/min摇床上培养1 d。用MeJA(50 $\mu\text{mol/L}$)处理0 h、1 h、4 h和12 h^[18](对照组使用相同浓度和体积的二甲基亚砷(DMSO)同时间处理),提取RNA,反转录cDNA,以*FtH3*为内参基因进行荧光定量PCR,3次生物学重复,于ABI 7500实时荧光定量PCR仪上检测基因表达量。反应体系同基因表达的组织特异性分析,最后以内参基因的CT值为第一次 Δt ,对照组*FtFLS1*的CT值为第二次 Δt 计算*FtFLS1*的相对表达量。

1.6 过表达载体构建和农杆菌介导的苦荞毛状根遗传转化

1.6.1 过表达载体的构建 以pCAMBIA1307-myc作为过表达载体,选取*Bam*HI和*Hind*III酶切位点进行酶切;设计含有相同酶切位点同源臂的引物,以T-*FtFLS*质粒为模板扩增,随后经过胶回收和同源重组,得到含有酶切黏性末端的*FtFLS*序列片段,同源重组连接线性化载体和目的片段,转化大肠杆菌并测序后得到过表达载体,命名为1307-*FtFLS1*。

1.6.2 苦荞毛状根的转化和遗传鉴定 将1307-*FtFLS1*载体转化至发根农杆菌A4中,农杆菌侵染毛状根以及转基因毛状根的鉴定参考康珍等^[19]的方法。鉴定引物为TLF和1307-*FtFLS1*-R,为避免扩增荞麦基因组中已有的*FtFLS1*序列,这对引物的扩增片段包括1307载体序列和*FtFLS1*基因序列。

1.6.3 过表达毛状根黄酮成分及总黄酮含量的测定 将阳性毛状根和对照置于MS液体培养基中两周左右,待长出足够的量后取出毛状根,放置70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜烘干,用研钵研磨粉碎,放入玻璃试管中,以1 g:25 mL的料液比混合粉末和80%甲醇,总黄酮提取条件为50 $^{\circ}\text{C}$ 超声破碎40 min,超声频率为40 KHz。静置10 min后吸取上清2 mL,0.22 μm 有机滤膜过滤,使用LC-QQQ液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(Aglient1290-6495)测定黄酮类物质含量。色谱条件:固定相为硅胶填料的Agilent SB-C18色谱柱(2.7 μm , 2.1 mm \times 75 mm),流动相A相为含有0.1%甲酸的超纯水,B相为含有0.1%甲酸的乙腈;洗脱梯度为:0 min B相比例为5%,9 min内B相比例线性增加到95%,并维持1 min,10~11 min时B相比例降为5%,并以5%平衡至14 min;流速为0.35 mL/min,柱温为40 $^{\circ}\text{C}$,进

样量为2 μL 。质谱条件:采用电喷雾离子化(ESI)方式,载气:氮气(N_2);载气温度:300 $^{\circ}\text{C}$;干燥气体流速:8.0 L/min;雾化器压力:35 psi;毛细管电压:3.5 kV;毛细管出口电压:175 V;锥孔电压:65 V;碰撞能量:10~50 V;质荷比:50~1000。

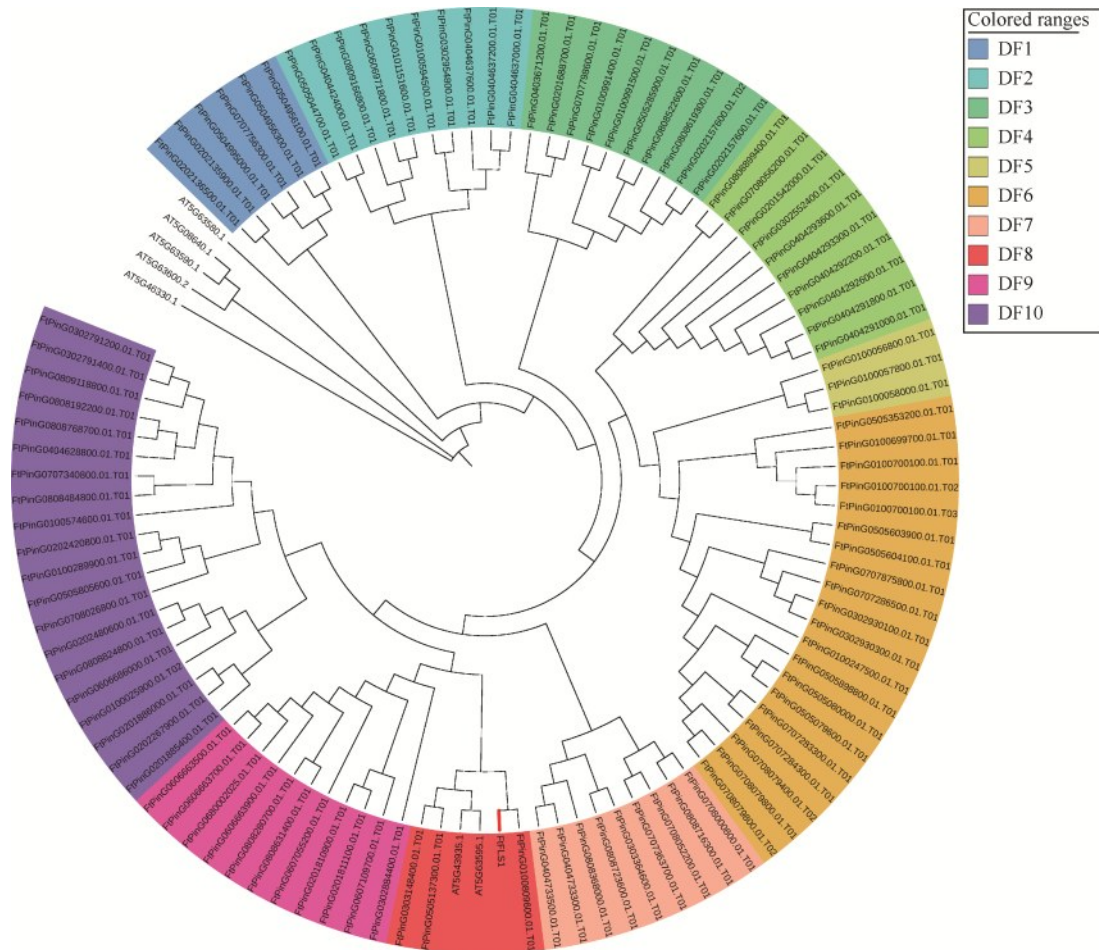
1.6.4 *FtFLS1*基因在苦荞中的多样性分析 通过分析前期重测序工作所建立的数据库^[17],选择200份2019年凉山收取的材料对苦荞*FtFLS1*基因进行简单单核苷酸多态性分析,其由14份喜马拉雅野生群体、106份北方栽培群体和80份南方栽培群体组成。简单单核苷酸多态性分析步骤:用Linux系统调用Candihap软件进而从数据库中提取*FtFLS1*基因型数据,再用Excel、Office进行分析作图。

2 结果与分析

2.1 *FtFLS1*的基因家族和序列分析

根据MeJA处理的苦荞转录组数据,通过基因表达量变化^[17],筛选得到了1个受到显著诱导的黄酮合成酶基因家族成员,并将其命名为*FtFLS1*。为了解其基因家族类型和基因结构,从苦荞基因组中初步筛选了104个*FLS*基因家族成员(图1)。相对于拟南芥*FLS*基因家族的7个成员,苦荞*FLS*基因家族成员高达104个,均包含在黄酮合成酶中分别位于N端和C端的高度保守的蛋白结构域序列DIOX_N和2OG-FeII_Oxy,DIOX_N包括保守基序motif 8、motif 3和motif 10,其中motif 3为核心保守基序;2OG-FeII_Oxy包括保守基序motif 2、motif 5、motif 9、motif 1和motif 4,其中motif 1为核心保守基序(图2)。根据保守基序的位置、数量和种类的不同,结合系统发育分析,将苦荞*FLS*基因家族初步聚类为10个亚家族,其中*FtFLS1*属于DF8亚家族(图1,图2)。

在所有苦荞*FLS*家族成员中仅有DF8亚家族在系统发育分析结果中与两个拟南芥*FLS*基因(AT5G63595.1和AT5G43935.1)聚为一支,说明DF8亚家族与拟南芥进化关系最近,同源性最高(图1)。而在DF8亚家族中,*FtFLS1*的两个蛋白结构域DIOX和2OC-FeII高度保守,均含有所有对应的保守基序的同时,*FtFLS1*相对于其他3个DF8亚家族成员基因序列长度最短,为1424 bp,仅有1个内含子,其中CDS序列长度为996 bp,占基因总长度的69.96%。

图1 苦荞中 *FLS* 基因家族的系统发育分析Fig.1 Phylogenetic analysis of *FLS* gene family in *F. tataricum*

提取 *FtFLS1* 上游 1500 bp 的序列, 分析其顺式作用元件的类型, 去除常见的启动子元件 (TATA-Box)、增强子元件 (CAAT-Box) 及少数功能描述模糊的元件进行作图。结果如图 3 和表 2, *FtFLS1* 启动子序列包含了 6 个环境相关的元件 (光调控相关元件 3 个、厌氧调控元件 2 个、低温响应元件 1 个), 4 个激素响应元件 (生长素响应元件 1 个、MeJA 响应元件 2 个、ABA 响应元件 1 个), 2 个参与胚乳发育的顺式作用元件, 1 个参与防御和应激的调控元件以及 1 个 MYBHv1 结合位点。由此得出, MeJA (茉莉酸甲酯) 响应调控元件是 *FtFLS1* 1500 bp 启动子序列中最多的激素响应元件, 且茉莉酸是常见的调控黄酮合成通路的激素^[15]。

2.2 *FtFLS1* 基因的表达特性分析

2.2.1 *FtFLS1* 基因的组织特异性表达

FtFLS1 基因在不同的组织中表达量有显著差异, 表现出明显的组织特异性。*FtFLS1* 在根中的表达量最低, 在茎中的表达量最高且为根中的 5.58 倍, 而叶中的表达量与茎中接近, 约为根中的 5.28 倍 (图 4)。*FtFLS1*

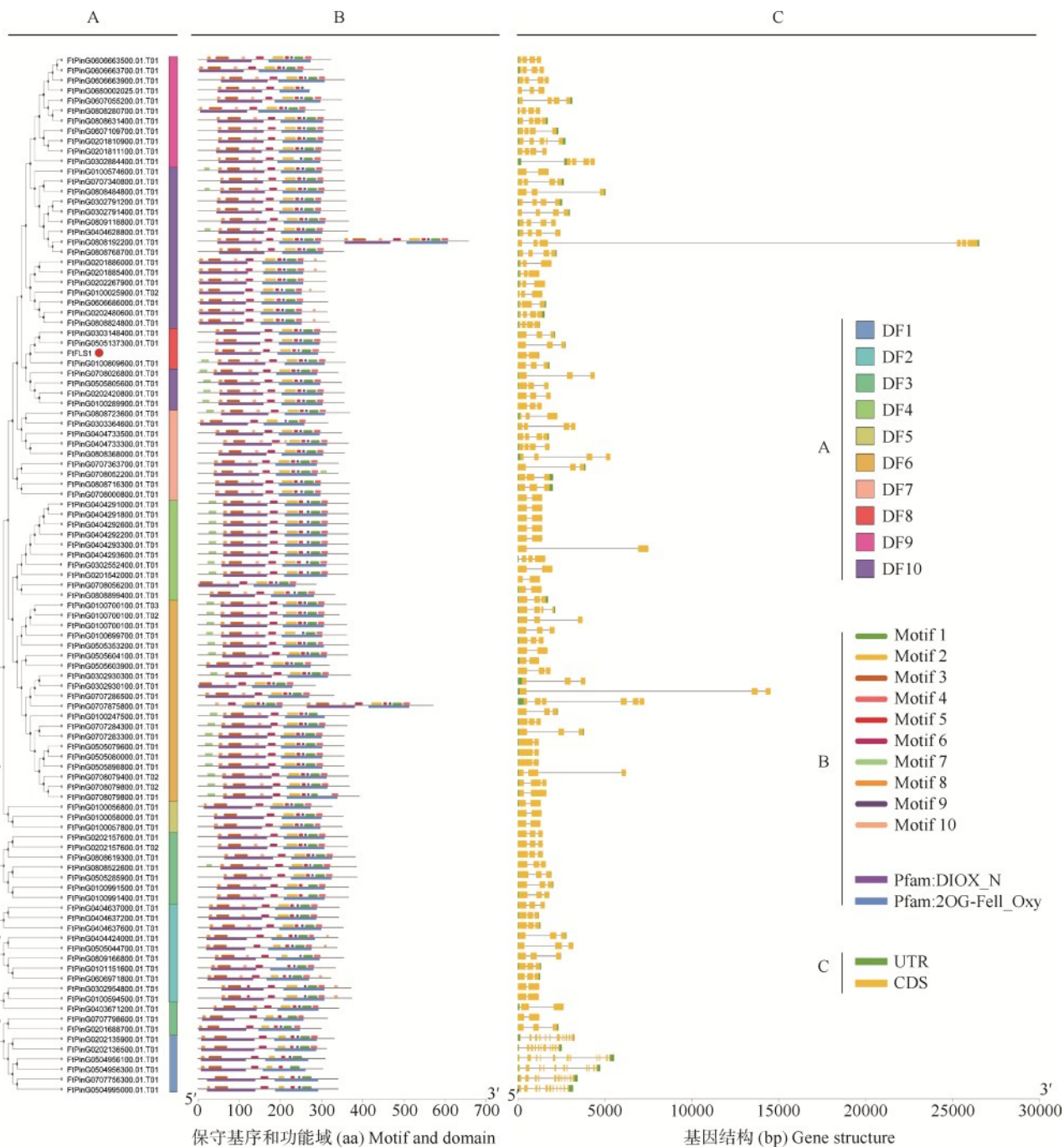
在茎和叶的特异性表达很有可能与荞麦在茎和叶中大量积累黄酮物质的现象关系密切。

2.2.2 激素诱导转录组中 *FtFLS1* 基因的表达分析

对真叶期的苦荞幼苗进行茉莉酸甲酯 (MeJA) (50 $\mu\text{mol/L}$) 诱导, 以 DMSO 处理相同时间的真叶期苦荞幼苗为对照。与启动子分析结果以及转录组分析结果一致的是, 随着处理时间的增加 *FtFLS1* 基因的表达量呈现显著增长的趋势, 在 MeJA 处理 1 h 时, *FtFLS1* 基因表达量无明显变化, 处理 4 h 时, 基因表达量显著提高, 为 0 h 的 4.5 倍, 处理 12 h 时基因表达量约为 0 h 的 9 倍 (图 5)。

2.3 *FtFLS1* 过表达毛状根中黄酮含量检测

在苦荞 *FtFLS1* 过表达毛状根株系的构建中 (图 6A), 通过 DNA 鉴定得到了 4 个过表达毛状根株系 (图 6B)。用无载体 A4 菌浸染的毛状根作为对照, 对 4 个 *FtFLS1* 过表达毛状根株系进行黄酮类物质检测。结果显示, 过表达毛状根中山奈酚和槲皮素的含量显著升高, 二氢山奈酚和二氢槲皮素的含量明显降低。二氢槲皮素含量由 9.97 $\mu\text{g/g}$ 降低到



A: 苦荞 *FLS* 基因家族的系统发育树和ID,不同亚群分类同图1; B: 基因的保守基序(上)和蛋白保守结构域(下)分析; C: 基因结构分析; 红色标注为 *FtFLS1*

A: Phylogenetic tree and ID of *FLS* gene family in Tartary buckwheat, and the classification of different subgroups was the same as Fig.1; B: Analysis of conserved motifs (top) and conserved domains of proteins (bottom); C: Analysis of gene structure; *FtFLS1* with red spot

图2 苦荞 *FLS* 家族的基因结构分析

Fig.2 Genetic structure analysis of tartary buckwheat *FLS* family

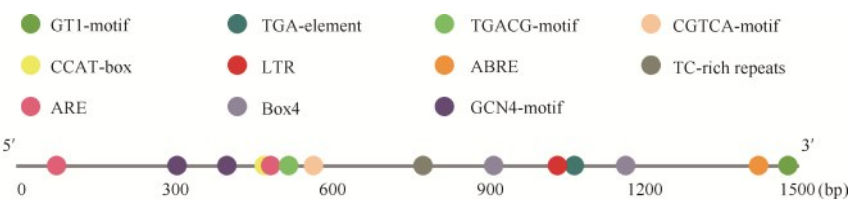


图3 *FtFLS1* 启动子结构

Fig.3 The structure of *FtFLS1* promoter

3.16 $\mu\text{g/g}$, 而槲皮素则由 11.37 $\mu\text{g/g}$ 提高至 40.74 $\mu\text{g/g}$; 二氢山奈酚含量由 8.38 $\mu\text{g/g}$ 降低为 1.85 $\mu\text{g/g}$, 而山奈酚的含量则由 0.54 $\mu\text{g/g}$ 提高至 3.57 $\mu\text{g/g}$ (图 7B、C)。与对照组芦丁含量相比, 过表达株系毛状根中含量提高至 616 $\mu\text{g/g}$ (图 7D)。初步判定, 在 *FtFLS1* 过表达毛状根中, 过量的 *FtFLS1* 酶能够加速下游黄酮合成途径的进行, 通过氧化去氢促进如槲皮素、山奈酚和芦丁等黄酮合成途径下游产物的积累。

2.4 *FtFLS1* 基因的多样性分析

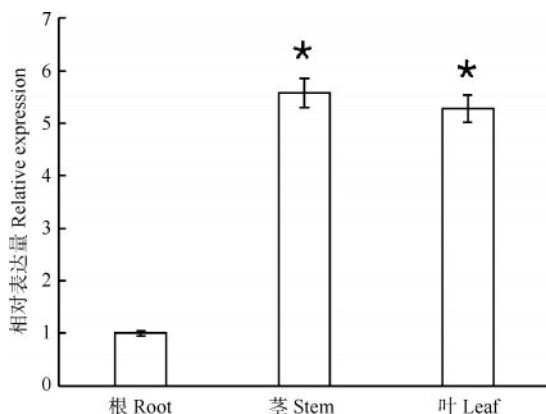
为了探究 *FtFLS1* 在不同苦荞群体的基因型分布, 利用前期对 200 份苦荞种质资源的简单单核苷酸多态性分析的数据^[17], 提取了 *FtFLS1* 的相关数据进行基因多样性分析。在对苦荞材料的分析期

间, 仅在基因组位置 8265553 上得到 1 个与 *FtFLS1* 相关的 SNP 位点, 位于 *FtFLS1* 起始密码子上游 879 bp 处 (图 8 A)。在此 SNP 位点上, 200 份苦荞种质材料共有 3 种基因型, 分别为: Hap1 (G/G) 130 个、Hap2 (G/A) 54 个、Hap3 (A/A) 16 个, 每个基因型在 3 种群体中均有分布 (表 3)。通过对这 200 份种质资源 3 种基因型的黄酮含量做差异性分析^[17], 发现 Hap1 的黄酮含量均要明显高于 Hap2 和 Hap3, 而 Hap2 和 Hap3 的黄酮含量基本一致 (图 8B)。初步推断 Hap1 为高黄酮基因型, 其包含的种质资源最多, 为 130 份, 由 9 份喜马拉雅野生群体、81 份北方栽培群体和 40 份南方栽培群体组成 (表 3)。

表 2 *FtFLS1* 基因启动子序列中的顺式作用元件

Table 2 *Cis-elements in FtFLS1 gene promoter sequence*

位点名称 Site name	序列 Sequence	元件数量 Quantity of element	位点功能 Function of site
GT1-motif	GGTTAA	1	光调控元件
CCAAT-box	CAACGG	1	MYBHv1 结合位点
ARE	AAACCA	2	厌氧调控元件
TGA-element	AACGAC	1	生长素响应元件
LTR	CCGAAA	1	参与低温响应调控元件
Box 4	ATTAAT	2	光响应元件的 DNA 分子结合区域
TGACG-motif	TGACG	1	MeJA 响应调控元件
ABRE	CGTACGTGCA	1	ABA 响应调控元件
GCN4-motif	TGAGTCA	2	参与胚乳发育的顺式作用元件
CGTCA-motif	CGTCA	1	MeJA 响应调控元件
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	1	参与防御和应激反应调控元件

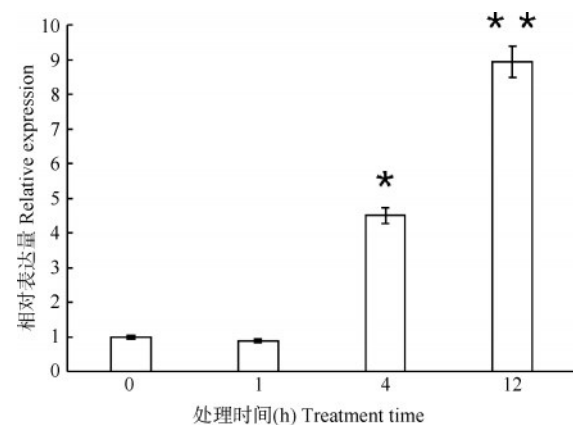


显著性差异分析为 *t* 检验, * 表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著; 下同

The analysis of significant difference was the *t*-test, * means significant difference at $P < 0.05$ level; The same as below

图 4 不同组织中 *FtFLS1* 基因的差异表达

Fig.4 Differential expression of *FtFLS1* gene in different tissues

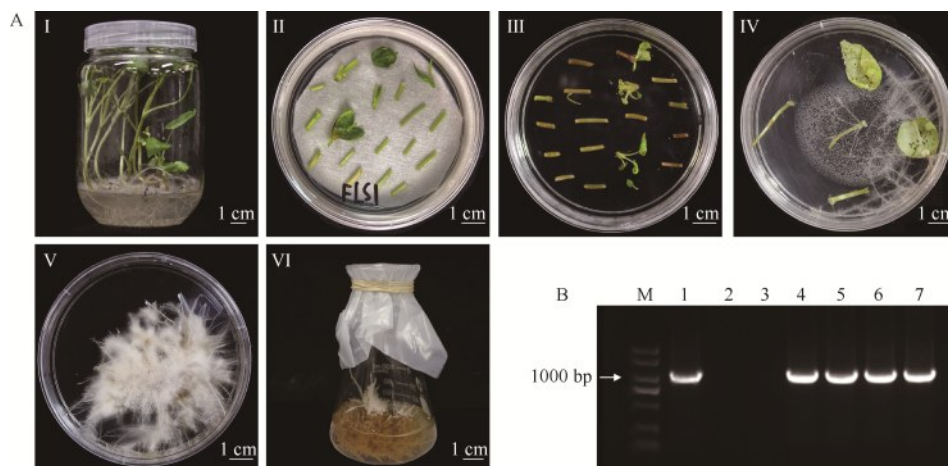


** 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著

** means significant difference at $P < 0.01$ level

图 5 不同时间 MeJA 诱导下 *FtFLS1* 基因的差异表达

Fig.5 Differential expression of *FtFLS1* gene induced by MeJA at different time



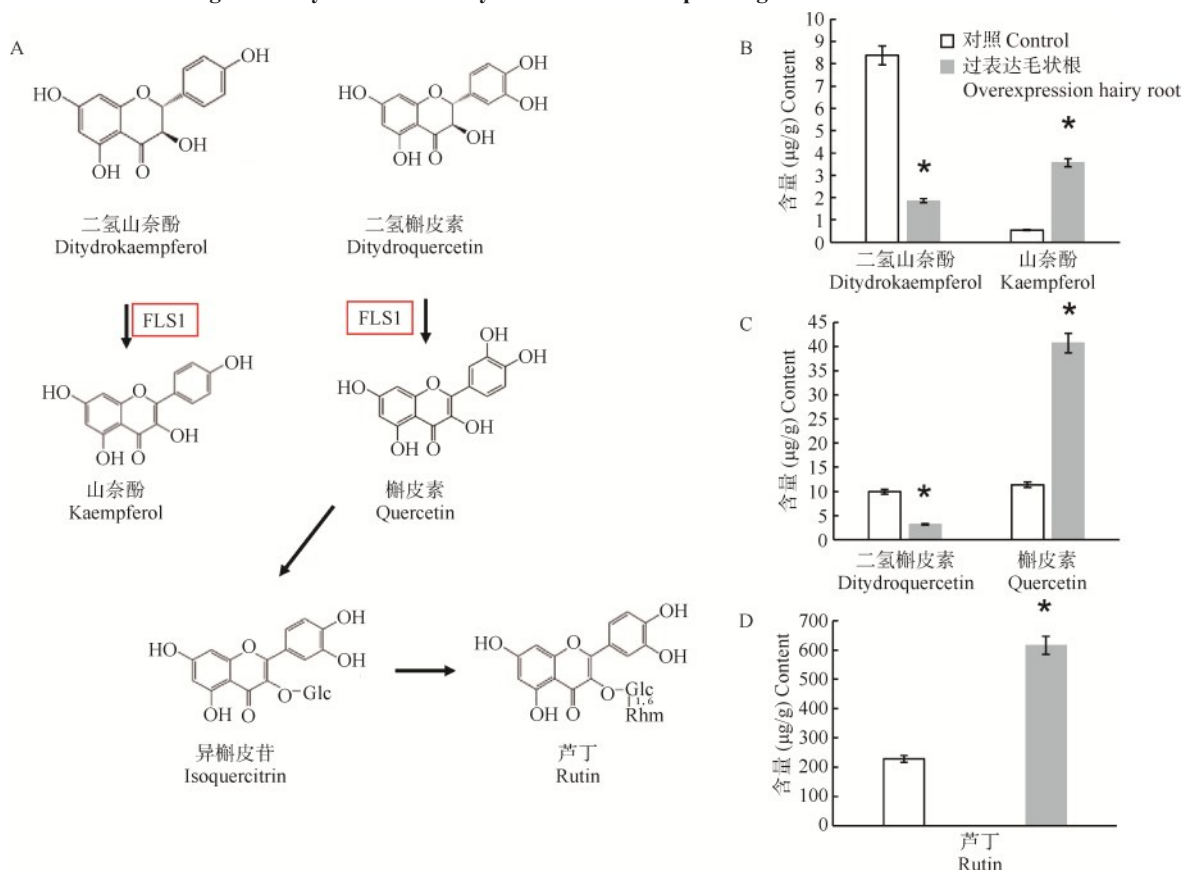
A: 毛状根侵染, 传代和震荡培养示意图; I: 苦荞无菌苗; II: 外殖体进行A4浸染后MS培养基滤纸培养; III: 外殖体转移至MC板; IV: MC板上的外殖体长出可以转移的毛状根; V: MC板上毛状根正常生长15 d左右; VI: 毛状根在MS液体培养基中振荡培养; B: 毛状根DNA PCR检测的凝胶图; 1为1307-*FtFLS1*质粒; 2-3为同批次不含1307-*FtFLS1*质粒的A4农杆菌侵染的对照组毛状根示例; 4-7为*FtFLS1*过表达毛状根

A: Diagram of hairy root infection, passage and shock culture; I: Sterile tartary buckwheat seedlings; II: Exophytes were incubated on MS medium filter paper for 2 d after A4 dyeing; III: Exonites transfer to MC plate; IV: The exonites on the MC plate grow hairy roots that can be transferred; V: The hairy roots on the MC plate grew normally for about 15 days; VI: Hairy roots oscillated in MS liquid medium;

B: The gel map of hairy root DNA PCR detection; 1 is the 1307-*FtFLS1* plasmid; 2-3 were hairy roots infected by A4 without 1307-*FtFLS1* plasmid in the same batch; 4-7 were hairy roots with *FtFLS1* overexpression

图6 过表达 *FtFLS1* 苦荞毛状根的获得

Fig.6 Hairy roots of Tartary buckwheat overexpressing *FtFLS1* were obtained

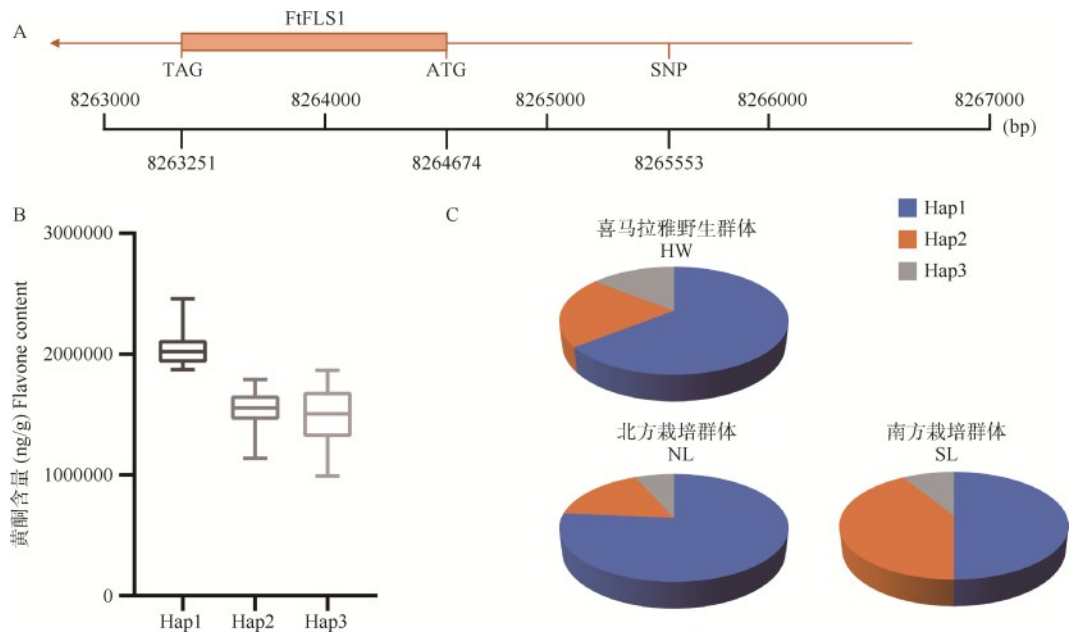


A: 黄酮代谢通路(红色方框内为 *FLS1*); B、C和D: 毛状根黄酮类物质含量测定

A: The metabolic pathway of flavonoids (*FLS1* is indicated in the red box); B, C and D: Determination of flavonoids in hairy roots

图7 毛状根黄酮类物质含量测定及黄酮部分代谢途径

Fig.7 Determination of flavonoids in hairy roots and part of the metabolic pathway of flavonoids



A: *FtFLS1* 基因的 SNP 位点, 橙色方框为 *FtFLS1* 的基因序列; B: 黄酮类物质含量分析; C: *FtFLS1* 三种基因型在不同苦荞群体中的分布
A: SNP location of *FtFLS1* gene, the orange box is the gene sequence of *FtFLS1*; B: Flavonoid content analysis; C: Distribution of three genotypes of *FtFLS1* in different Tartary buckwheat populations, in which HW was the Himalayan wild population, NL was the northern cultivated population and SL was the southern cultivated population, the same as below

图 8 3 种苦荞群体的 *FtFLS1* 基因型分析

Fig.8 Genotypes of *FtFLS1* in three Tartary buckwheat populations

表 3 *FtFLS1* 基因的多样性分析

Table 3 Diversity analysis of *FtFLS1* gene

基因型编号 Number of haplotype	基因型类型 Type of haplotype	种质数量 Quantity of varieties	群体数量 Landraces		
			喜马拉雅野生群体 HW	北方栽培群体 NL	南方栽培群体 SL
Hap1	G/G	130	9	81	40
Hap2	G/A	54	3	18	33
Hap3	A/A	16	2	7	7

通过对不同群体的 *FtFLS1* 基因型分析, 本研究发现 3 种群体的基因型分布明显呈现不同特点。高黄酮基因型 Hap1 占比最高的是北方群体, 为 76.42%, 其次是喜马拉雅野生群体 64.29%、南方群体 50%; Hap2 占比由高到低依次是南方群体 41.25%、喜马拉雅野生群体 21.43% 和北方群体 16.98%; Hap3 占比由高到低依次是喜马拉雅野生群体 14.29%、南方群体 8.75% 和北方群体 6.60% (图 8 C)。由此得出: 野生群体相较于栽培群体 Hap3 基因型占比更高; 而在栽培群体中, 南方群体相较于北方群体 Hap2 占比更高, 但北方群体高黄酮基因型 Hap1 的占比明显高于南方群体。

3 讨论

FLS 在植物中高度保守且由多拷贝基因编码,

不同植物 *FLS* 基因的多拷贝序列数量不同, 其表达量、催化效率和底物偏爱性与黄酮醇在植物组织中的含量、种类和分布密切相关^[20]。通过拟南芥的 6 个 *FLS* 基因比对筛选, 本研究初步得到了 104 个 *FtFLS* 序列 ID。通过系统发育和基因结构分析又将其分为 10 个分支。据此推测苦荞庞大的 *FLS* 基因家族可能是苦荞具有高含量、多种类黄酮醇物质的特性的原因之一。

此外, *FLS* 表达的时空特异性一直是 *FLS* 基因功能研究的重点话题之一。柑橘 (*Citrus unshiu*) 中 *CitFLS* 的表达与发育时期密切相关, 在幼嫩时期的表达量显著高于成熟时期, 并与黄酮醇的积累量变化趋势一致^[21]。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中的 *FLS* 同源基因也表现出显著的组织特异性, 对烟草中的 *FLS* 基因进行沉默之后, 烟草体内槲皮素的含

量下降了25%~93%^[22-23]。在本研究中,*FtFLSI*在苦荞幼苗中的表达主要集中在茎和叶中,表现出明显的组织差异性。而黄酮醇物质是常见的逆境胁迫积累物质,*FLS*的表达模式也与植物在生长中受到的逆境胁迫息息相关。Martínez-Lüscher等^[24]研究发现葡萄*VvFLS*基因能够受低温、紫外线的诱导表现出高表达性,促使葡萄中的黄酮醇含量提高。据此推测,*FLS*在苦荞幼苗茎上部相对于根的高表达可能与茎上部受到阳光日常照射有关联。Stracke等^[25]的研究也表明,对萌发的拟南芥照射白光,对*AtFLS*的组织差异表达影响较大,最终导致黄酮醇的积累发生变化。

植物中许多次生代谢产物都能够受到一些外源诱导因素的作用,比如茉莉酸或者脱落酸^[26]。茉莉酸是一种重要的植物激素,在调节植物体内对胁迫响应的同时也能防御病虫害^[27]。茉莉酸及其循环前体和衍生物统称为茉莉酸类物质(JAs, Jasmonates),属于一种已被证明可以诱导编码酶的基因表达的氧化脂质,对于各种次生代谢物质的催化具有重要作用^[28]。JAs主要通过结合相应的转录元件来调控下游基因的表达,最终决定相关代谢产物的合成。黄伟等^[29]对油菜过表达毛状根进行MeJA(50 μmol/L)诱导,结果发现处理组的黄酮含量显著增加。Zhang等^[30]利用转录组测序技术,挖掘出一组受MeJA诱导的参与调控芦丁合成的关键基因,证明了MeJA参与了芦丁的合成代谢途径,在蛋白或者转录水平调控代谢通路中的转录因子。对*FtFLSI*的启动子进行分析,发现了多个激素、环境和生长相关的启动子元件,其中MeJA响应因子是*FtFLSI*最多的激素响应的启动子元件,且MeJA处理的苦荞黄酮含量变化结果显示*FtFLSI*表达量随MeJA处理时间显著增加。

荞麦的种植历史可以追溯到4000多年前^[31],但仍处于早期驯化阶段,存在严重的碎粒和倒伏现象。荞麦属于蓼科荞麦属,共有21种。栽培苦荞根据其野生近缘种的发现和鉴定、文献证据和传统饮食文化被认为起源于中国西南部并被驯化^[32]。本研究数据来源的200份材料包括一个喜马拉雅野生群体和两个栽培群体,即北方群体和南方群体。*FtFLSI*的基因型分析显示3个群体依次拥有高Hap3占比,高Hap1占比和高Hap2占比。据此推测,*FtFLSI*基因型的分化源自苦荞群体生长环境的变化,北方栽培的条件使高黄酮含量的Hap1*FtFLSI*基因型在群体中占比更高。本实验室在前

期工作^[1]中指出两种栽培群体很可能源自于喜马拉雅野生群体,并报道了栽培群体的两次独立的驯化事件。鉴于此,北方群体和南方群体不同的*FtFLSI*基因型体现了北方和南方不同的人工栽培的驯化方向,也说明了*FtFLSI*作为人工驯化的农艺性状相关基因的可能性。

4 结论

本研究初步筛选了104个苦荞*FLS*基因家族成员,共分为10个亚家族,其中*FtFLSI*属于DF8亚家族。在*FtFLSI*的启动子序列分析中,其包含在内的2个MeJA响应元件显示了JA信号通路调控*FtFLSI*表达的可能性,这一结果在之后的MeJA激素处理实验中得到验证,随着MeJA处理时间的增加,*FtFLSI*的表达量可以提高至4~9倍,同时,*FtFLSI*也显示了在根中表达量极低的组织表达特异性。此外,本研究还分析了不同群体苦荞中*FtFLSI*基因的多样性,结果显示:北方群体、南方群体和喜马拉雅野生群体均拥有明显不同的*FtFLSI*基因型分布,其中北方群体的高黄酮基因型Hap1占比最高。

参考文献

- [1] Zhang K X, He M, Fan Y, Zhao H, Gao B, Yang K L, Li F L, Tang Y, Gao Q, Lin T, Quinet M, Janovská D, Meglič V, Kwiatkowski J, Romanova O, Chungoo N, Suzuki T, Luthar Z, Germ M, Woo S H, Georgiev M I, Zhou M. Resequencing of global tartary buckwheat accessions reveals multiple domestication events and key loci associated with agronomic traits. *Genome Biology*, 2021, 22(1): 23
- [2] Zou L, Wu D, Ren G, Hu Y, Peng L, Zhao J, Garcia-Perez P, Carpena M, Prieto M A, Cao H, Cheng K W, Wang M, Simal-Gandara J, John O D, Rengasamy K R R, Zhao G, Xiao J. Bioactive compounds, health benefits, and industrial applications of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(5): 657-667
- [3] Bai C Z, Feng M L, Hao X L, Zhong Q M, Tong L G, Wang Z H. Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 19040-19048
- [4] 黄琼林,蔡春.不同植物黄酮醇合成酶*FLS*的生物信息学分析. *广东农业科学*, 2014, 41(13): 3, 140-143, 151
Huang Q L, Cai C. Bioinformatics analysis of flavonol synthase from various plants. *Guangdong Agricultural Science*, 2014, 41(13): 3, 140-143, 151
- [5] Hagel J M, Facchini P J. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy.

- Nature Chemical Biology, 2010, 6(4): 273-275
- [6] Aravind L, Koonin E V. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology*, 2001, 2(3): 7
- [7] 孙欣光, 张洁, 庞旭, 陈晓娟, 张涛, 刘曙晨, 余利岩, 马百平. 天然黄酮苷的代谢途径研究进展. *中草药*, 2020, 51(11): 3078-3089
- Sun X G, Zhang J, Pang X, Chen X J, Zhang T, Liu S C, Xu L Y, Ma B P. Advances in metabolism of natural flavonoid glycosides. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(11): 3078-3089
- [8] 甘蓓, 杨红玉. 拟南芥中类黄酮代谢途径及其调控. *安徽农业科学*, 2008(13): 5290-5292, 5304
- Gan B, Yang H Y. Metabolic approach of flavonoids and its regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008(13): 5290-5292, 5304
- [9] 黄启秀, 曲延英, 倪志勇, 姚正培, 艾海提, 陈全家. 海岛棉类黄酮代谢通路相关基因的克隆及序列分析. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(10): 4414-4422
- Huang Q X, Qu Y Y, Ni Z Y, Yao Z P, Ai H T, Chen Q J. Cloning and sequence analysis of related genes involved in flavonoids metabolism pathway in *Gossypium barbadense* L. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(10): 4414-4422
- [10] Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie A R. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 48(2): 123-152
- [11] Britsch L, Heller W, Grisebach H. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*, 1981, 36(9-10): 742-750
- [12] Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 151(1): 27-43
- [13] 闫瑞霞, 龚义勤, 殷剑美, 韩晓勇, 张培通, 柳李旺. 紫山药黄酮醇合成酶 *DaFLS1* 基因的克隆和表达分析. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1448-1455
- Yan R X, Gong Y Q, Yin J M, Han X Y, Zhang P T, Liu L W. Cloning and expression analysis of *DaFLS1* gene in purple yam (*Dioscorea alata* L.). *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(6): 1448-1455
- [14] 蒋洁, 白悦辰, 李成磊, 陈惠, 吴琦. 金荞麦黄酮醇合成酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. *中草药*, 2013, 44(14): 1974-1978
- Jiang J, Bai Y C, Li C L, Chen H, Wu Q. Cloning of flavonol synthase gene from *Fagopyrum dibotrys* and its expression in *Escherichia coli*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2013, 44(14): 1974-1978
- [15] Li Y, Chen X, Wang J, Zou G, Wang L, Li X. Two responses to MeJA induction of R2R3-MYB transcription factors regulate flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *PLoS ONE*, 2020, 15(7): e0236565
- [16] Luthar Z, Germ M, Likar M, Golob A, Vogel-Mikuš K, Pongrac P, Kušar A, Pravst I, Kreft I. Breeding buckwheat for increased levels of rutin, quercetin and other bioactive compounds with potential antiviral effects. *Plants (Basel)*, 2020, 9(12): 1638
- [17] Zhao H, He Y, Zhang K, Li S, Chen Y, He M, He F, Gao B, Yang D, Fan Y, Zhu X, Yan M, Giglioli-Guivarc'h N, Hano C, Fernie A R, Georgiev M I, Janovská D, Meglič V, Zhou M. Rewiring of the seed metabolome during Tartary buckwheat domestication. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(1): 150-164
- [18] 杨洪兵, 孙萍. 外源水杨酸和茉莉酸对荞麦幼苗耐盐生理特性的效应. *植物生理学报*, 2012, 48(8): 767-771
- Yang H B, Sun P. Effects of exogenous salicylic acid and jasmonic acid on physiological traits of salt tolerance in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seedlings. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(8): 767-771
- [19] 康珍, 杨迪, 郝彦蓉, 卢翔, 周美亮, 方正武. 苦荞转录因子 *FtMYB41* 的克隆及功能分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(3): 895-905
- Kang Z, Yang D, Hao Y R, Lu X, Zhou M L, Fang Z W. Molecular cloning and functional analysis of transcription factor *FtMYB41* in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(3): 895-905
- [20] 郑雪莲, 李嘉仪, 杨俊, 郑国华. 枇杷黄酮醇合成酶 *FLS* 基因表达与黄酮醇积累的相关性分析. *福建农业科技*, 2019, 5: 1-6
- Zheng X L, Li J Y, Yang J, Zheng G H. Correlation analysis between flavonol synthetase genetic expression and flavonol accumulation in loquat. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2019, 5: 1-6
- [21] Moriguchi T, Kita M, Ogawa K, Tomono Y, Endo T, Omura M. Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum*, 2002, 114(2): 251-258
- [22] Park S, Kim D H, Yang J H, Lee J Y, Lim S H. Increased flavonol levels in tobacco expressing *AcFLS* affect flower color and root growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 1011
- [23] Mahajan M, Joshi R, Gulati A, Yadav S K. Increase in flavan-3-ols by silencing flavonol synthase mRNA affects the transcript expression and activity levels of antioxidant enzymes in tobacco. *Plant Biology*, 2012, 14(5): 725-733
- [24] Martínez-Lüscher J, Sánchez-Díaz M, Delrot S, Aguirreolea J, Pascual I, Gomès E. Ultraviolet-B radiation and water deficit interact to alter flavonol and anthocyanin profiles in grapevine berries through transcriptomic regulation. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(11): 1925-1936
- [25] Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weishaar B. Differential regulation of closely

- related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant Journal*, 2007, 50(4): 660-677
- [26] Zhou M, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(4): 441-449
- [27] Perez A C, Goossens A. Jasmonate signalling: A copycat of auxin signalling? *Plant, Cell and Environment*, 2013, 36(12): 2071-2084
- [28] Memelink J, Verpoorte R, Jan W K. ORCAnization of jasmonateresponsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(5): 212-219
- [29] 黄伟, 高国应, 吴金锋, 刘丽莉, 张大为, 周定港, 成洪涛, 张凯旋, 周美亮, 李莓, 严明理. 芥菜型油菜BjA09.TT8和BjB08.TT8基因调节类黄酮的合成. *作物学报*, 2022, 48(5): 1169-1180
- Huang W, Gao G Y, Wu J F, Liu L L, Zhang D W, Zhou D G, Cheng H T, Zhang K X, Zhou M L, Li M, Yan M L. Regulation of flavonoid synthesis by BjA09.TT8 and BjB08.TT8 genes in *Brassica juncea*. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(5): 1169-1180
- [30] Zhang K, Logacheva M D, Meng Y, Hu J, Wan D, Li L, Janovská D, Wang Z, Georgiev M I, Yu Z, Yang F, Yan M, Zhou M. Jasmonate-responsive MYB factors spatially repress rutin biosynthesis in *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8): 1955-1966
- [31] Hunt H V, Shang X, Jones M K. Buckwheat: A crop from outside the major Chinese domestication centres? A review of the archaeobotanical, palynological and genetic evidence. *Vegetation History and Archaeobotany*, 2018, 27(3): 493-506
- [32] Tomiyoshi M, Yasui Y, Ohsako T, Li C Y, Ohnishi O. Phylogenetic analysis of *AGAMOUS* sequences reveals the origin of the diploid and tetraploid forms of self-pollinating wild buckwheat, *Fagopyrum homotropicum* Ohnishi. *Breeding Science*, 2012, 62(3): 241-247