

黄酮类物质的生物合成及对干旱胁迫响应的研究进展

白禹¹, 卯丹², 王继玥^{2*}

(1. 贵阳学院生态文明城市建设研究中心, 贵州贵阳 550005; 2. 贵阳学院生物与环境工程学院, 贵州贵阳 550005)

摘要 通过阐述黄酮类物质生物合成、代谢调控以及参与干旱胁迫响应的研究进展, 提出了从多组学层面联合分析逆境胁迫下基因转录以及转录调控过程, 这将有助于深入理解植物对逆境胁迫响应的分子机制, 从而为品种改良和产品开发提供理论参考。

关键词 黄酮类物质; 生物合成; 代谢调控; 干旱胁迫响应

中图分类号 Q 945 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)16-0024-03

Research Progress on the Flavonoids Biosynthesis and Its Response to Drought Stress

BAI Yu¹, MAO Dan², WANG Ji-yue^{2*} (1. Research Center of Ecological Civilization City Construction, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005; 2. School of Biological and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005)

Abstract The research progress on flavonoids biosynthesis, metabolism regulation and the response to drought stress were summarized, and a joint analysis of multi-omics levels to study gene transcription and transcriptional regulation under stress was proposed, which will help deeper understanding of plant diversity. It aims to provide a theoretical reference for breed improvement and product development.

Key words Flavonoids; Biosynthesis; Metabolism regulation; Response to drought stress

黄酮类物质广泛存在于植物各器官中, 参与花、果实和种子颜色的形成, 保护植物抵御紫外线伤害和防止病原微生物侵袭。黄酮类化合物具有抗氧化、抗癌、防治动脉硬化、降低心肌耗氧量、抗衰老、增强机体免疫力等功能, 现已广泛应用于医药和食品行业, 具有较高的经济价值^[1]。近年来, 随着类黄酮医疗保健功能的逐步阐释, 以及合成生物学的兴起, 掀起了一股研究类黄酮代谢途径和调控机理的热潮。

植物次生代谢物在种属间的差异与其环境选择高度相关, 外界环境可诱导植物体内次生代谢产物的合成、积累以及转运。其中, 水分对植物体内次生代谢的影响尤为重要, 与各类有效成分含量密切相关^[2]。大量研究证实植物体内类黄酮含量与其抗逆性直接相关, 增加植物类黄酮的含量能增强植物抵御干旱、寒冷、高盐等逆境胁迫的能力^[1-4]。分析黄酮类物质在环境胁迫下的积累模式和变化规律, 将有利于解析其生物合成的调控途径, 从而为品种改良和产品开发提供理论参考。笔者概述了黄酮类物质的生物合成以及对干旱胁迫响应的研究进展, 为进一步研究黄酮类物质的应用提供基础生物学资料。

1 黄酮类化合物的生物合成与代谢调控

Gul 等^[3]分析认为, 黄秋葵具有的抗氧化、清除自由基、抑菌和抑制细胞增生的作用, 可能主要与其富含黄酮多酚类物质有关。黄酮类化合物是植物在长期进化中为抵御恶劣的生存环境、动物和微生物等侵袭而形成的一大类次生代谢产物, 在多种植物的根、茎、叶、花、果中均有分布, 其成分主要为黄酮醇、黄酮、异黄酮和花色苷等。黄酮类化合物的药效成分包括大豆异黄酮、黄芩黄酮、槲皮素、淫羊藿苷、水

飞蓟素等, 具有抗氧化、抗衰老、增强免疫力、抗癌等作用^[1-2]。黄酮类化合物在植物体内中具有组织、发育和环境因子特异性, 参与防御生物与非生物胁迫、生殖过程的信号转导等过程。在植物遭受干旱、高温、辐射等非生物胁迫时, 通过合成黄酮类化合物来消耗过剩的磷酸丙糖、ATP 和 NADPH, 形成能量安全阀, 以减轻非生物胁迫所造成的损伤^[1-2]。最近, Wen 等^[4]基于全基因组关联的代谢组学, 分析了玉米酰基化胍丁胺、酰基化腐胺、色胺、黄酮等物质的代谢途径与遗传机理, 这为研究植物次生代谢产物合成的分子机理提供了新的思路和方法。

1.1 生物合成 代谢组学研究表明植物次生代谢产物的合成总是在变化, 正如遗传多样性造成不同品种和生态型的代谢表型存在数量和性质的差异^[5]。虽然对植物次生代谢进行了大量的研究, 但只有黄酮类化合物的生物合成途径是较为清晰的, 其中许多关键酶已经克隆, 如苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (CA4H) 和 4-香豆酸 CoA 的连接酶 (4CL) 等。黄酮类化合物的生物合成主要是通过苯丙烷代谢途径来实现的^[6]。起始底物 4-香豆酰-CoA 和丙二酰-CoA 在查尔酮合成酶 (CHS) 的作用下形成查耳酮, 再由查耳酮异构酶催化查耳酮生成 4,5,7-三羟黄酮醇, 作为代谢的主要产物再进入其他不同的代谢途径, 进而形成不同的黄酮类物质。CHS 是苯丙烷系代谢途径中含量较丰富的酶之一, 该酶在植物体内的转录受到高浓度肉桂酸的抑制, 但高浓度的香豆酸可以促进其表达^[2]。查尔酮异构酶 (CHI) 是植物黄酮类代谢途径上游的关键酶, 决定黄酮醇的合成。黄酮醇合成酶 (FH3) 是黄酮醇分支途径的核心酶, 通过催化黄酮醇类底物生成二氢山奈素 (DHK), 进而影响黄酮醇和花色苷的合成, 是类黄酮代谢途径的中枢。黄酮醇合成酶 (FLS) 催化二氢黄酮醇分别生成山奈素、杨梅素和槲皮素等黄酮醇。而二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 主要是将二氢黄酮醇催化生成无色天竺葵素、无色矢车菊素和无色翠雀素等无色花色苷。研究表明, FLS 和 DFR 竞争二氢黄酮醇底物, 在矮牵牛、康乃馨和

基金项目 贵州省大学生创新创业项目“黄秋葵种质资源遗传多样性分析”“干旱胁迫下黄秋葵花中 MBY 转录因子的基因表达模式分析”。

作者简介 白禹 (1986—), 男, 四川宜宾人, 讲师, 博士, 从事生物信息学研究。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事生物化学与分子生物学研究。

收稿日期 2018-04-09

紫罗兰的无色花中,FLS 的活性比较高,但在花青素开始合成时,FLS 的活性明显降低^[7]。说明植物可通过抑制黄酮醇的合成来促进花青素的合成,或者抑制花青素的合成以提高黄酮醇的含量。花色素合成酶(ANS)是植物类黄酮生物合成中后期表达的关键酶,主要催化无色的原花色素氧化产生有色的花色素,已在多种植物中克隆了 ANS 相关基因^[8]。揭示编码这些关键酶的基因功能对于理解植物黄酮类化合物的代谢通路及其调控机制具有重要的意义。

黄酮类化合物通常以糖苷或其他共轭体的形式存在,通过细胞内的特殊载体蛋白,运输到液泡中累积^[5]。植物花粉中也含有黄酮类化合物,凤仙花叶绿体中黄酮类化合物的含量高达 2%。黄酮类化合物在植物体内分布不均匀,往往集中于某些特定的组织或器官中。慈竹叶中的总黄酮含量显著大于枝和秆中,分别是枝的 4.30 倍、秆的 11.35 倍^[9]。大豆萌芽后 5 d 时,幼苗的根部组织、胚轴以及子叶中都是以异黄酮为主要成分,而初生的叶片组织中则以糖基黄酮醇类为主^[5]。黄酮类化合物含量的器官差异可能与植物器官所承担的功能有关,而其组织特异性可能与代谢相关酶的分布、含量以及活性的组织差异性有关^[9]。黄酮类化合物的组织和器官特异性对于药用植物的栽培育种具有重要的意义。通过栽培条件的优化选择,在确保植物正常生长的前提下,使特定组织或器官中黄酮类化合物累积,适时的采收,从而显著提高药用植物的利用效率。

1.2 代谢调控 研究表明,编码类黄酮合成相关酶基因(*CHS*、*FLS*、*FH3*、*DFR*、*ANS*)的表达会受到 MYB、MYC、bZIP 蛋白、WD40 蛋白和锌指蛋白等转录因子的调控。这些转录因子通过结合类黄酮生物合成关键酶基因启动子中的顺式作用元件,进而影响相应基因的表达,从而实现类黄酮生物合成的调控。目前已在拟南芥、玉米、矮牵牛、梨、苹果、葡萄、烟草^[10-11]等植物中克隆了与类黄酮生物合成相关的调控基因。

2R-MYB 转录因子广泛参与植物苯丙烷代谢途径^[12-13],对类黄酮的生物合成有重要的调控作用^[14]。杜海等^[15]研究表明,大豆 *Gm MYB042* 基因的表达受干旱、高盐、低温和 UV-B 胁迫的诱导,该基因参与调控植物对逆境胁迫的应答过程;该基因参与类黄酮生物合成的调控,其 C 端保守氨基酸基序和锌指结构对其功能具有转录抑制作用,可以影响类黄酮的代谢合成。许锋等^[16]研究表明,银杏叶中黄酮类物质的积累与 *CHS* 基因的转录水平相关,提示 *CHS* 基因可能在黄酮类物质代谢过程发挥关键的调节作用。王旭等^[17]首次在黄秋葵中克隆到查尔酮合成酶基因(*CHS*),序列分析表明,其推断的氨基酸序列含有 CHS 蛋白的标签序列 GFGPG 以及 4 个保守活性位点 Cys164、Phe215、His303、Asn336,黄秋葵果实、花、叶片中均有该基因的表达,但在整个生育期中都是花中表达量最高。Mehrtens 等^[18]研究表明,拟南芥 FLS 基因的表达受 R2R3 型 MYB 转录因子的调控,AtMYB11、AtMYB12、AtMYB111 分别在拟南芥不同的组织中表达。韦康等^[19]利用数字表达谱技术发现茶树花瓣、休眠芽、萌芽中

大量表达类黄酮合成途径相关基因,在 MYB、bHLH、MADS、GST、WD40、Homeodomain 基因家族中找到 12 个基因可能参与花瓣中类黄酮生物合成的调控,9 个基因可能参与芽中类黄酮生物合成的调控。

在调控类黄酮生物合成中,一些转录因子可通过与其他蛋白的相互作用来共同激活结构基因的转录。玉米 C1 转录因子与 bHLH 蛋白互作,共同激活 *DFR* 基因和 *3GT* 基因,可调控花青素的合成。Huang 等^[20]从淫羊藿中分离到一个新 MYB 转录因子——EsAN2,可与 4 个 bHLH 蛋白互作调控花青素的合成。Zimmermann^[21]等研究发现,拟南芥 MYB 蛋白 R3 重复区域有一段保守的信号([DE]Lx2[RK]x3Lx6Lx3R),是 MYB 和 bHLH 蛋白互作的结构基序,可借此预测 MYB 蛋白和 bHLH 蛋白的互作。在矮牵牛、拟南芥等一些植物中还存在着 MYB、bHLH 和 WD40 这 3 种蛋白以 MYB-bHLH-WD40(MBW)三元复合体模式参与类黄酮生物合成的调控^[22]。在拟南芥中发现至少有 4 种 MBW 复合体参与调控种皮中原花色素的积累,其中 TT2-TT8-TTG1 主要调控花青素下游合成途径中关键酶基因的表达,而 TT2-EGL3、GL3-TTG1 复合体负责调控花青素还原酶基因的表达^[23]。

2 黄酮类物质对干旱胁迫的响应

干旱、高盐等非生物胁迫会使植物产生大量活性氧,从而诱导合成黄酮类化合物以避免细胞氧化损伤。黄酮类化合物还可以与铜等金属离子结合,从而降低金属离子对胞质结构的破坏。因此,植物通过调节体内抗氧化物质含量来抵抗干旱胁迫。Song 等^[24]克隆了枸杞中 *LcF3H* 基因,转基因试验显示 *LcF3H* 基因可通过增强烟草的抗氧化能力而增加其抗干旱胁迫的能力。

目前,有关干旱胁迫对植物黄酮类物质含量影响的研究结果不尽相同^[25-27]。孙坤等^[26]研究发现,随干旱胁迫程度增强,沙棘叶片总黄酮含量呈现先下降后上升的趋势,其与 PAL、C4H 和 4CL 酶活性呈负相关。王改利等^[27]研究表明,适宜的干旱胁迫可促进酸枣叶片中黄酮类物质的合成。而汪贵斌等^[25]研究表明,土壤水分对银杏叶中黄酮类化合物积累的影响不显著。虽然黄秋葵比一般蔬菜耐旱、耐高温,但在严重高温和干旱条件下其出苗率、植株的生长发育以及开花等过程都受到抑制,进而影响荚果发育过程,降低结实率,导致减产^[27]。这些研究结果提示黄秋葵对水分胁迫可能存在一定的耐受范围,不同生长和发育期以及不同组织和器官对水分的需求不同,因此对不同程度的水分胁迫的响应也存在差异。而通过添加水杨酸和抗坏血酸,能显著缓解干旱胁迫对黄秋葵种子萌发和幼苗生长的危害^[28]。

3 基因表达与环境胁迫

细胞活动是连续的动态过程,基因转录是其最显著的活动之一。嵌在转录中的遗传信息被翻译成蛋白质以参与特定的代谢反应,而一些没有翻译的转录本,则参与转录和转录后水平的调控^[29-30]。因此,研究基因表达调控对于理解细胞内各种代谢活动至关重要。在逆境条件下细胞可通过抑

制转录减少某些有害物质在细胞内的累积,同时也会激活相应抗性基因的表达,合成不同的次生代谢产物,以抵抗逆境胁迫^[31]。目前,大量研究集中于逆境胁迫下的转录机制研究,通过生物技术手段调控植物次生代谢过程,以及培育抗逆境胁迫植物等方面。Bhardwaj等^[32]利用RNA-seq技术获取了油菜幼苗干旱和高温胁迫下的全基因组表达谱,发现大量转录因子下调表达,这些转录因子主要分属于热激蛋白(hsf)和脱水反应元件(含有DREB)家族。侯伶俐等^[33]研究发现,在干旱、NaCl、UV-B胁迫下苦荞的根、茎、叶、花中总黄酮含量均显著升高,且与CHI、F3H、FLS、FLS1基因表达量的变化趋势相一致。Matsuda等^[34]基于代谢组学分析指出,水稻黄酮苷结构的多样性主要是由于芹黄素等不同配基的修饰产生的。

4 展望

由于植物抗性受多基因多层次调节控制,因此,从多组学层面研究逆境胁迫下基因转录以及转录调控过程,将有助于深入理解植物对逆境胁迫响应的分子机制。今后,可利用多组学技术联合分析植物在干旱胁迫下类黄酮等次生代谢产物的遗传、代谢以及表达调控机制,从而为植物品种改良、植物药用成分的开发利用提供参考。

参考文献

[1] 秦晓晓.苹果属观赏海棠类黄酮种类、代谢及生物活性分析[D].重庆:西南大学,2016.

[2] 诸姮,胡宏友,卢昌义,等.植物体内的黄酮类化合物代谢及其调控研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版),2007,46(S1):136-143.

[3] GUL M Z, BHAKSHU L M, AHMAD F. Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging, antimicrobial and antiproliferative activities using *in vitro* assays[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, 38(11): 1-12.

[4] WEN W W, LI D L X, et al. Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights[J]. Science foundation in China, 2015, 5(2): 32.

[5] CARRENO-QUINTERO N, BOUWMEESTER H J, KEURENTJES J J B. Genetic analysis of metabolome-phenotype interactions: From model to crop species[J]. Trends in genetics, 2013, 29(1): 41-50.

[6] MIERZIAK J, KOSTYN K, KULMA A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment[J]. Molecules, 2014, 19(10): 16240-16265.

[7] NAKATSUKA A, MIZUTA D, KII Y, et al. Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea[J]. Scientia horticulturae, 2008, 118(4): 314-320.

[8] 晏校. 逆境胁迫对枳实生苗类黄酮组分含量及关键酶基因表达量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.

[9] DOXIN R A, PAIVA N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. Plant cell, 1995, 7(7): 1085-1097.

[10] ZHANG W, NING G G, LV H Y, et al. Single MYB-type transcription factor AtCAPRICE: A new efficient tool to engineer the production of anthocyanin in tobacco[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2009, 388(4): 742-747.

[11] PATTANAIK S, KONG Q, ZAITLIN D, et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco[J]. Planta, 2010, 231(5): 1061-1076.

[12] LEGAY S, SIVADON P, BLERVACQ A S, et al. *EgMYB1*, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar[J]. New phytologist, 2010, 188(3): 774-786.

[13] SONBOL F M, FORNALÉ S, CAPELLADES M, et al. The maize *ZmMYB42* represses the phenylpropanoid pathway and affects the cell wall structure, composition and degradability in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant molecular biology, 2009, 70(2): 283-296.

[14] STRACKE R, ISHIHARA H, HUEP G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling[J]. The plant journal, 2007, 50(1): 660-677.

[15] 杜海, 冉凤, 马珊珊, 等. *GmMYB042* 基因对类黄酮生物合成的调控作用[J]. 作物学报, 2016, 42(1): 1-10.

[16] 许锋, 程水源, 程述汉, 等. 银杏查尔酮合成酶基因表达的时间进程[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(4): 309-317.

[17] 王旭, 韩春乐, 周亚楠, 等. 黄秋葵查尔酮合成酶基因 *AeCHS* 的克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 561-567.

[18] MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, et al. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant physiology, 2005, 138(2): 1083-1096.

[19] 韦康, 王丽鸾, 成浩, 等. 基于数字表达谱对茶树类黄酮合成、调控相关基因表达的研究[J]. 茶叶科学, 2014, 34(2): 195-203.

[20] HUANG W J, KHALDUN A B M, LV H Y, et al. Isolation and functional characterization of a R2R3-MYB regulator of the anthocyanin biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum*[J]. Plant cell reports, 2016, 35(4): 883-894.

[21] ZIMMERMANN I M, HEIM M A, WEISSHAAR B, et al. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins[J]. The plant journal, 2004, 40(1): 22-34.

[22] VIOLA I L, CAMOIRANO A, GONZALEZ D H. Redox-dependent modulation of anthocyanin biosynthesis by the TCP transcription factor TCP15 during exposure to high light intensity conditions in *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 2015, 170(1): 74-85.

[23] XU W J, DUBOS C, LEPINIEC L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes[J]. Trends in plant science, 2015, 20(3): 176-185.

[24] SONG X J, DIAO J J, JI J, et al. Molecular cloning and identification of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Lycium chinense*, and its overexpression enhances drought stress in tobacco[J]. Plant physiology and biochemistry, 2016, 98(1): 89-100.

[25] 汪贵斌, 郭旭琴, 常丽, 等. 温度和土壤水分对银杏叶黄酮类化合物积累的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(11): 3077-3083.

[26] 孙坤, 张宏涛, 陈纹, 等. 干旱胁迫对枳实沙棘(*Hippophae neurocarpa*) 试管苗叶片黄酮类化合物代谢的影响[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2015, 51(3): 72-78.

[27] 王政利, 魏忠, 贺少轩, 等. 土壤干旱胁迫对酸枣叶片黄酮类代谢及某些生长和生理指标的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(3): 1-8.

[28] BAGHIZADEH A, HAJMOHAMMADREZAEI M. Effect of drought stress and its interaction with ascorbate and salicylic acid on okra (*Hibiscus esculents* L.) germination and seedling growth[J]. Journal of stress physiology & biochemistry, 2011, 7(1): 55-65.

[29] DING Y F, TAO Y L, ZHU C. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants[J]. Journal of experimental botany, 2013, 64(11): 3077-3086.

[30] SUNKAR R, LI Y F, JAGADEESWARAN G, et al. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. Trends in plant science, 2012, 17(4): 196-203.

[31] SAITO K. Phytochemical genomics: A new trend[J]. Current opinion in plant biology, 2013, 16(3): 373-380.

[32] BHARDWAJ A R, JOSHI G, KUKREJA B, et al. Global insights into high temperature and drought stress regulated genes by RNA-Seq in economically important oilseed crop *Brassica juncea*[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 1-15.

[33] 侯伶俐, 杨雄榜, 董雪妮, 等. 逆境胁迫对苦荞花期总黄酮含量及关键酶基因表达的影响[J]. 核农学报, 2016, 30(1): 184-192.

[34] MATSUDA F, NAKABAYASHI R, YANG Z G, et al. Metabolome-genome-wide association study dissects genetic architecture for generating natural variation in rice secondary metabolism[J]. The plant journal, 2015, 81(1): 13-23.