

荫蔽信号对大豆幼苗异黄酮合成的影响

秦雯婷^{1,2}, 丰宇瑞¹, 雷震¹, 杨才琼^{1,2}, 吴海军^{1,2}, Nasir Iqbal¹, 杨文钰^{1*}, 刘江^{1,2*}

¹农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室; ²四川农业大学生态农业研究所, 成都 611130

摘要: 荫蔽导致植物所受红光/远红光(R/FR)比值下降,为探究荫蔽对大豆幼苗异黄酮合成的影响,本试验以耐荫性差异显著的大豆品种“ND12”和“C103”幼苗为研究材料,分别施以不同比例红光/远红光(R/FR)处理,对其叶片、下胚轴、根系中异黄酮积累量及关键酶基因表达情况进行比较研究。结果表明,低R/FR条件下,强耐荫品种“ND12”叶片中总异黄酮及染料木素GE的含量极显著上升,下胚轴中极显著下降,弱耐荫品种“C103”则相反。同时,低R/FR使强耐荫品种“ND12”叶片中异黄酮合成关键基因*IFS2*、*4CL*、*C4H*和*CHI*的表达量极显著上调,其变化趋势与异黄酮积累变化规律一致,而弱耐荫品种“C103”则存在较大差异。荫蔽信号诱导耐荫型大豆品种异黄酮合成,并在受胁迫部位叶片中大量积累。本研究初步揭示了荫蔽信号(低R/FR)对苗期大豆异黄酮的调控规律,为研究大豆异黄酮响应荫蔽信号的调控机理奠定了基础。

关键词: 荫蔽;大豆;异黄酮;代谢;基因表达

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.003

Effect of Shading Signal on Isoflavone Biosynthesis of Soybean Seedling

QIN Wen-ting^{1,2}, FENG Yu-rui¹, LEI Zheng¹, YANG Cai-qiong^{1,2}, WU Hai-jun^{1,2},
NASIR Iqbal¹, YANG Wen-yu^{1,2*}, LIU Jiang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest, Ministry of Agriculture;

²Institute of Ecological Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: The reduction in the ratio of red light (R) to far-red light (FR) is an important signal of shade stress. In the present study, an experiment was conducted to study the effect of normal and low R/FR irradiation on the isoflavone contents of two soybean varieties: high shade-tolerance species ‘ND12’ and low shade-tolerance species ‘C103’. Relative expression levels of key genes, which encoded isoflavone synthetic enzymes in leaves, hypocotyls and roots were also studied. The results indicated that compared with seedlings under normal light, low R/FR increased total contents of isoflavone and genistein significantly in the leaves of ‘ND12’, but decreased in hypocotyls; while the opposite result was obtained in ‘C103’. Expression of isoflavone synthesis key genes, including *IFS2*, *4CL*, *C4H* and *CHI* correlated with isoflavone accumulation under low R/FR irradiation. Shading signal induced isoflavone accumulation particularly in leaves of shade-tolerance varieties. This study preliminary clarified the shading signal (low R/FR) that how to control the rules of isoflavone accumulation in soybean seedlings. This study laid a foundation to research regulation mechanism of soybean isoflavone response to shading signal.

Key words: shading; soybean; isoflavone; metabolism; gene expression

异黄酮是大豆中一类重要的次生代谢产物,主要以葡萄糖苷、丙二酰基葡萄糖苷、乙酰基葡萄糖苷和游离苷元等形式存在。大豆异黄酮以苯丙氨酸为起始物质,在苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL)等一系列酶的催化下,形成苯丙烷类成分合成共同前体物

p-香豆酰辅酶A(p-coumarate CoA),之后在查尔酮异构酶(CHI)和异黄酮合酶(IFS)的催化下形成12种不同的异黄酮^[1]。

大豆异黄酮不仅具有多种对人体有益的生物活性^[2],同时,在植物的生长中也起着重要作用,其具体表现为对自身正常生长的保护及对外界不利因素的抵抗。已有研究表明,大豆异黄酮可以作为植物与微生物间的信号分子,诱导大豆根瘤菌结瘤基因的表达以及对疫霉根菌侵染的响应^[3]; Eyal^[4]等发现,大豆异黄酮作为植物抗毒素抑制真菌活性时,仅

收稿日期: 2017-03-10 接受日期: 2017-05-02

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31401329);

中国博士后科学基金面上项目(2014M560724)

* 通信作者 E-mail: jiangliu@sicau.edu.cn; mssiyangwy@sicau.edu.cn

0.005% ~ 0.01% 的游离异黄酮含量就可以显著抑制真菌活动。另外,植物体内异黄酮还具有抵御非生物逆境胁迫等作用^[5],如异黄酮含量高的大豆具有较好的抗盐^[6]、抗紫外线辐射^[7]和抗旱特性,异黄酮在抵抗外界光胁迫^[8]和抗氧化防御^[9]中也具有重要作用。

自然界中,由于光梯度的存在,使得许多植物一生不可避免地处于一定程度的荫蔽中^[10]。在自然条件下,当植物生长在低植被密度的环境中时,其所受光照的质量相对稳定,R/FR 约为 1.2 ~ 1.5。但当植被密度增加,或者有其它植物靠近时,由于相邻植被的叶绿素过滤红光(R, $\lambda = 600 \sim 700 \text{ nm}$),反射远红光(FR, $\lambda = 700 \sim 800 \text{ nm}$),使得 R/FR 值下降到 0.5 以下^[11]。大量研究表明,荫蔽信号(低 R/FR 值)影响植株的正常生长,导致植物茎秆变细、株高增加、干物质积累量减少^[12];同时,荫蔽对植物次生代谢物的合成与积累也起到了重要的调控作用^[13],但不同耐荫性的植物对其敏感度不同。植物响应荫蔽胁迫的作用机制,前人较多关注内源激素、光受体及光合生理特性等方面,而对于荫蔽信号对植物次生代谢调控的研究少见报道。本文通过水培试验,采用补充远红光,降低 R/FR 值,研究低 R/FR 光照条件对大豆异黄酮生物合成的影响,以期对大豆异黄酮响应荫蔽信号的调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为强耐荫大豆品种“ND12”和弱耐荫大豆“C103”^[14],由四川省南充市农业科学院提供。

1.2 试验设计

试验于 2016 年 3 ~ 6 月在四川农业大学成都校区人工气候室进行。本试验采用两因素随机区组设计,因素一为不同荫蔽信号(R/FR)处理,模拟正常

光照条件下 R/FR 值为 1.25 (CK),补充远红光后 R/FR 比值为 0.35 shading,采用 Field Scout[®] 红光/远红光度计(Spectrum, USA)测 R/FR 值;因素二为不同大豆品种。挑选颜色鲜亮、颗粒饱满、大小均匀、成熟度好的种子,清洗干净,并用 70% 的酒精消毒。试验材料先采用盆栽种植,用土为营养基质,反复混匀、保证每盆土壤均匀一致,每盆播种 5 粒,每种材料栽种 10 盆,待大豆幼苗生长至 VE 期时移栽,运用水培法培养幼苗^[15]。水培过程中每天测定营养液 pH 值,确保其在 6 左右;每隔两小时通气一次,确保根系的正常生长。至 VC 期时,利用远红光 LED 灯补充远红光,降低 R/FR 值,期间保持一致的有效光合辐射。光周期为 12 h,白天温度 25 °C,夜间温度 15 °C。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 异黄酮含量测定

待大豆幼苗生长至 V1 时期,取第一出复叶、下胚轴和根,于液氮中迅速冷冻固定并碾磨粉样后,采用液相色谱-质谱联用的方法进行异黄酮含量的测定^[16]。

1.3.2 荧光定量 PCR 分析

采用植物 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取植物 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后反转录合成 cDNA;cDNA 均一化后作为实时定量 PCR 模版,以 *Actin4* 为内参基因。优化后的 PCR 反应程序为:95 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 5 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 20 s,40 循环;PCR 反应后缓慢升至 95 °C,绘制溶解曲线。各基因的扩增引物见表 1,每个基因设 3 次技术重复。所用反转录酶购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;SYBR Green Brilliant II master mix 购自宝生物工程有限公司;其它试剂购自生工生物工程(上海)有限公司。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Real-time PCR primer pairs for isoflavone synthetic enzyme genes

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	PCR 产物长度 PCR product length/bp
<i>Actin4</i>	GTGTCAGCCATACTGTCCCATT	GTTTCAAGCTCTFGCTCGTAATCA	214
<i>C4H</i>	ATGGGGCAGCGTAATCTC	AAGAAGGGGACGGTTCATG	197
<i>4CL</i>	CGGTGATGTTGGCTATGTAGAT	GCAATGGAGGGATGGCTTA	135
<i>CHI</i>	GAGAACAAGGCTGTATCAGCG	AGCCACAAGAAAGAAAGGAGA	192
<i>IFS2</i>	GCCCTGGACTCAATCTGG	CAAGACTATGTGCCCTTGG	171

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2013 软件整理数据、绘图; 采用 SPSS Statistics 22 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 荫蔽信号对大豆幼苗异黄酮含量的影响

对耐荫性显著差异的 2 个大豆品种的根、下胚轴、叶部异黄酮的积累量进行统计分析, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 光环境对大豆幼苗异黄酮的积累影响显著, 但不同的耐荫性大豆其异黄酮变化趋势存在差异。对于弱耐荫品种“C103”, 降低 R/FR 值, 其叶片和下胚轴中总异黄酮的积累量均极显著下降, 而根中的总异黄酮的积累量则呈显著上升的趋势。在强耐荫品种“ND12”中, 其下胚轴中总异黄酮的积累量与“C103”一致, 呈现极显著下降的趋

势, 叶部和根中的积累量则与“C103”呈相反的变化趋势, 并且这种趋势在“ND12”中得到了明显的加强。

染料木素(GE)是大豆异黄酮中生物活性较强的典型化合物, 在植物抵抗外界胁迫中发挥着重要的作用^[17]。由图 1 可以看出, 弱耐荫品种“C103”中, 不论叶部、下胚轴或是根中, GE 和总异黄酮的积累变化趋势刚好相反; 而在强耐荫品种“ND12”中, 其变化趋势则均保持一致。降低 R/FR 值后, “ND12”的下胚轴中几乎检测不到 GE 的存在, 但却在叶部出现大量的积累; 而“C103”中情况则刚好相反, 其中, GE 在根中大量积累, 而叶部的含量则较低。不论是总异黄酮还是 GE 含量, 强耐荫型大豆品种“ND12”均呈现出更大的变化幅度。

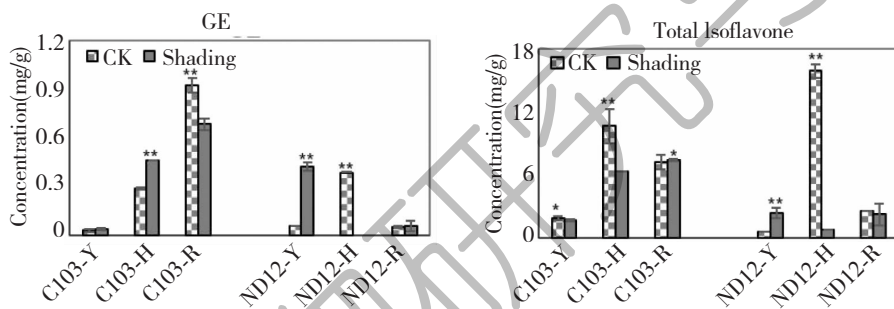


图 1 低 R/FR 对大豆异黄酮含量的影响

Fig. 1 Accumulation of isoflavone under shading treatment

Y-叶片 Leaf; H-下胚轴 Hypocotyl; R-根 Root

2.2 异黄酮合成相关基因对荫蔽信号的响应

由图 2 可知, 低 R/FR 条件下, 大豆异黄酮合成关键酶基因的表达量在不同部位、不同耐荫性大豆品种间均存在显著差异; 对于强耐荫品种“ND12”, 低 R/FR 使得其异黄酮合成关键基因 *4CL*、*C4H*、*CHI* 和 *IFS2* 在叶中的表达量均极显著上调, 且远远高于在下胚轴和根部的表达量; 其中, 分支关键酶——异黄酮合酶的合成基因 *IFS2* 的表达量在叶部、下胚轴和根部均呈现极显著上升的趋势。

对于 *4CL* 和 *C4H*, 其在弱耐荫品种“C103”中表达量的变化趋势与“ND12”中基本一致, 但 *CHI* 和 *IFS2* 的表达量则与“ND12”相比存在较大差异, 且在“C103”根部关键基因的表达量要高于其在下胚轴和叶中的表达。另外, *CHI*、*IFS2* 在叶部和下胚轴中的表达量均发生极显著的下降, 而在根中则极显著上升, 该趋势与总异黄酮的积累变化趋势相同

(图 1)。

3 讨论与结论

低 R/FR 光环境对植物次生代谢物具有重要影响, 徐凯^[18]等研究表明, 类胡萝卜素的含量与红光/远红光(R/FR)比值呈负相关关系。本研究分析比较了 2 个耐荫性差异显著的大豆品种在低 R/FR 处理下叶部、下胚轴和根中异黄酮含量及其关键酶基因的表达量的变化趋势。结果显示, 低 R/FR 处理下, 强耐荫品种“ND12”中总异黄酮及染料木素的含量在叶部极显著升高, 而在下胚轴和根中则极显著下降; 而弱耐荫品种“C103”中, 除下胚轴外, 其余部位的积累量则呈现与“ND12”完全相反的变化趋势。AraKirakosyan^[19]等认为, 光敏色素在其中发挥着重要的调控作用, 当植物体内的光敏色素感受到低 R/FR 信号时, 将刺激异黄酮合成相关基因在根中表

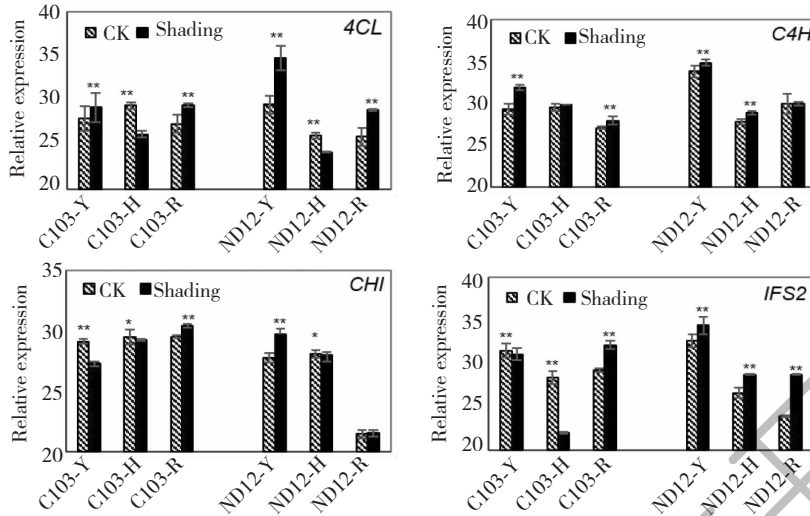


图2 大豆异黄酮合成关键酶基因的表达量

Fig. 2 Expression of isoflavone related key genes under shading treatment

Y-叶片 Leaf; H-下胚轴 Hypocotyl; R-根 Root

达,导致异黄酮积累量上升,但品种间存在差异。Alba R^[20]等的试验同样证实,低 R/FR 对植物次生代谢物的积累具有明显的调控作用,如番茄中番茄红素的积累等,这在 Hemm MR^[21]等研究低 R/FR 会导致拟南芥中苯丙烷合成通路活性上调中已得到证实。本研究说明,强耐荫品种“ND12”感知荫蔽信号(低 R/FR)后,会增加其直接感受胁迫部位,即叶部的异黄酮积累量。

本研究中,低 R/FR 条件下,相对弱耐荫大豆“C103”,强耐荫大豆“ND12”异黄酮合成下游关键酶基因的表达量在根部极显著提高,但积累量却极显著下降。已有研究表明,异黄酮合成下游关键酶基因,如 *IFS2*,其表达活性高低和异黄酮最终积累量呈显著正相关关系,若使 *IFS2* 沉默,则异黄酮的合成将几乎被完全抑制^[22]。这表明,荫蔽胁迫下,强耐荫型大豆叶片中积累的异黄酮可能来源于其他部位的转移。叶片作为大豆直接感受光信号的主要器官,对外源光质变化更为敏感^[23],低 R/FR 下,强耐荫大豆品种叶片中可积累更多的异黄酮,这与其耐荫生理或有密切关系,大豆可能通过异黄酮在受胁迫部位的积累来抵御逆境伤害,这与 Gutierrez^[24]及我们前期干旱胁迫的研究结果相似^[25],但其调控机理还有待进一步研究。

此外,荫蔽胁迫下,不同耐荫型大豆品种下胚轴中异黄酮积累量的变化趋势十分类似,其为异黄酮在根、叶间的转移提供了传输通道,而外界胁迫加速

了这种转移,类似情况同样出现在外源施加除草剂的胁迫中^[23]。荫蔽胁迫下,“ND12”中异黄酮主要从根中转移至叶部积累,使其呈现耐荫特性;而“C103”则刚好相反,异黄酮主要在根中大量积累,于此同时,大豆下胚轴伸长,表现出避荫特性。因此,低 R/FR 胁迫下异黄酮积累部位的不同,可能是大豆重要的耐荫机制之一。对于耐荫品种“ND12”,其主要活性成分 GE 的变化趋势和总异黄酮积累量的变化趋势一致,则进一步证实了上述假设。

另外,异黄酮合成起始酶基因在不同耐荫性品种中的表达量变化趋势相同,而异黄酮合成分支的关键酶基因 *IFS2* 的表达趋势则呈现相反的变化趋势。*IFS2* 是大豆异黄酮合成途径中最重要的调控基因之一,其在低 R/FR 胁迫下不同耐荫型大豆品种中的表达差异,可能是大豆苗期耐荫性差异表现的重要原因。与正常光相比,低 R/FR 对大豆异黄酮合成积累的影响因品种本身的差异而有所不同。众多研究表明,不同光质对同类次生代谢产物的影响在不同植物中存在差异,这可能与其本身光敏感性有关^[26]。当外界逆境胁迫(低 R/FR)发生,但还未对植物造成伤害时,植物感知到逆境信号后,即通过调整其内部次生代谢物的转移、积累,对即将或者可能出现的伤害表现出耐荫或避荫反应。这可能是植物通过次生代谢调控应对逆境胁迫的一种重要生理响应机制。

参考文献

- 1 Yu O, Mcgonigle B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *AdvAgron*, 2005, 86:147-190.
- 2 Setchell KDR, Brown NM, Desai P, *et al.* Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, 2001, 131: 1362S-1375S.
- 3 Stafford HA. Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Bot Rev*, 1997, 63:27-39.
- 4 Eyal H, Galit E, Pnina M, *et al.* Only a minority of broad-range detoxification genes respond to a variety of phytotoxins in generalist *Bemisia tabaci* species. *Sci Rep*, 2015, 5:75.
- 5 Naim M, Gestetner B, Zilkah S, *et al.* Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *J Agric Food Chem*, 1974, 22:806-810.
- 6 Zhou S, Zhou M, Zhang S, *et al.* Isoflavone accumulation in wild soybean under saline conditions and its ecological significance. *J Plant Ecol*, 2007, 31:930-936.
- 7 Martínez-Lüscher J, Torres N, Hilbert G, *et al.* Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry*, 2014, 102:106-114.
- 8 Aisyah S, Gruppen H, Madzora B, *et al.* Modulation of isoflavonoid composition of *Rhizopusoryzae* elicited soybean (*Glycine max*) seedlings by light and wounding. *J Agric Food Chem*, 2013, 61:8657-8667.
- 9 Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, *et al.* Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot*, 2015, 119:54-62.
- 10 Valladares F, Niinemets U. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Ann Rev Ecol Syst*, 2008, 39:237-257.
- 11 Roig-Villanova I, Martínez-García JF. Plant responses to vegetation proximity: A whole life avoiding shade. *Front Plant Sci*, 2016, 7:236-244.
- 12 Ruberti I, Sessa G, Giolfi A, *et al.* Plant adaptation to dynamically changing environment; the shade avoidance response. *Biotechnol Adv*, 2012, 30:1047-1058.
- 13 Liu J, Yang CQ, Zhang Q, *et al.* Partial improvements in the flavor quality of soybean seeds using intercropping systems with appropriate shading. *Food Chem*, 2016, 207:107-114.
- 14 Wu XL(武晓玲), Liang HY(梁海媛), Yang F(杨峰), *et al.* Comprehensive evaluation and screening identification indexes of shade tolerance at seedling in soybean. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2015, 48:2497-2507.
- 15 Zhou T, Du Y, Ahmed S, *et al.* Genotypic differences in phosphorus efficiency and the performance of physiological characteristics in response to low phosphorus stress of soybean in southwest of China. *Front Plant Sci*, 2016, 7:1-13.
- 16 Wu H, Deng J, Yang C, *et al.* Metabolite profiling of isoflavone and anthocyanin in black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seed by HPLC-MS and geographical differentiation analysis in Southwest China. *Anal Method*, 2016, 9:792-802.
- 17 Wei H, Bowen R, Cai Q, *et al.* Antioxidant and antipromotion-aleffects of the soybean isoflavone genistein. *Exp Biol Med*, 1995, 208:124-130.
- 18 Xu K(徐凯), Guo YP(郭延平), Zhang SL(张上隆). Effect of light quality on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in strawberry leaves. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38:369-375.
- 19 Ara K, Peter K, Randall LN, *et al.* Isoflavone levels in five soybean (*Glycine max*) genotypes are altered by phytochrome-mediated light treatments. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:54-58.
- 20 Alba R, Pratt LH. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol*, 2000, 123:363-370.
- 21 Hemm MR, Rider SD, Ogas J, *et al.* Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J*, 2004, 38:765-778.
- 22 Lozovaya VV, Widholm JM. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. *Planta*, 2007, 225:665-679.
- 23 Malik NS, Pence MK, Calvert HE, *et al.* Rhizobium infection and nodule development in soybean are affected by exposure of the cotyledons to light. *Plant Physiol*, 1984, 75:90-94.
- 24 Gutierrezgonzalez JJ, Guttikonda SK, Tran LSP, *et al.* Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51:936-948.
- 25 Qin WT(秦雯婷), Zhang J(张静), Wu HJ(吴海军), *et al.* Effects of drought stress on isoflavones metabolism of soybean seedling. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2016, 27:3927-3934.
- 26 Afreen F, Zobayed SM, Kozai T. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 43:1074-1081.