



UV-B 处理对大豆异黄酮合成影响及 *GmUVR8* 基因克隆与表达分析

张 艺¹, 于存浩², 马晓红¹, 姚陆铭¹, 武天龙¹, 王 彪¹

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为了探究 UV-B 辐射对大豆异黄酮合成调控的分子机理, 本研究以 UV-B 辐射处理大豆 V1 期幼苗, 采用 HPLC 和定量 PCR 方法分别测定处理前后各部位异黄酮含量和基因的表达, 并克隆出 *GmUVR8* 光受体基因。发现 UV-B 辐射处理大豆 V1 期幼苗 8 h 后, 叶中总异黄酮含量提高 1.3 倍, 大豆苷元和染料木素分别提高 15.8 和 16.5 倍。大豆根、茎和叶中 CHS 和 IFS 基因对 UV-B 反应的时间和强度存在明显差异, *CHS11* 在处理 2 h 后表达量增加 38.4 倍, *IFS1* 和 *IFS2* 基因的最高表达量分别比处理前增加 4.7 和 18.3 倍。克隆出了大豆中编码 UVR8 光受体的 *GmUVR8a*、*GmUVR8b* 和 *GmUVR8c* 基因, 其氨基酸序列与拟南芥 *AtUVR8* 的同源性为 74%; *GmUVR8a*、*GmUVR8b*、*GmUVR8c* 基因在叶中表达存在显著差异, 以 *GmUVR8b* 表达量最高。结果表明在大豆中 UV-B 辐射可能通过多种 UVR8 光受体调控苯基丙酸类途径关键酶基因的表达, 进而影响异黄酮的合成。

关键词: 大豆; UV-B; UVR8 光受体; 异黄酮; 基因表达; 基因克隆

Analysis of Isoflavone Synthesis Influenced by UV-B Treatment and Cloning of *GmUVR8* Gene in Soybean

ZHANG Yi¹, YU Cun-hao², MA Xiao-hong¹, YAO Lu-ming¹, WU Tian-long¹, WANG Biao¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to explore molecular mechanism of soybean isoflavone synthesis influenced by UV-B radiation, isoflavone accumulation and gene expression levels in different parts of V1 stage, seedlings under UV-B treatment were investigated by HPLC and quantitative real-time PCR respectively, and genes encoding UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) photoreceptor were also cloned. The accumulation of total isoflavones in leaves of soybean V1 stage was increased by 1.3 times under 8 h UV-B radiation, and daidzein, genistein improved by 15.8 and 16.5 times respectively. The transcripts of CHS and IFS exhibited obvious difference response to time after UV-B stress, and *CHS11* was increased 38.4 times after 2 h treatment, and the highest expression levels of *IFS1* and *IFS2* increased by 4.7 and 18.3 times respectively. The coding sequences of UVR8 photoreceptor *GmUVR8a*, *GmUVR8b* and *GmUVR8c* were cloned from soybean, the encoding protein had 74% homology in amino acids with *AtUVR8*, their expression levels in leaves showed significant difference, and *GmUVR8b* displayed the highest transcripts among those genes. The results indicated that UV-B radiation might regulate synthesis of soybean isoflavones through multiple UVR8 light receptors which affect the expression of key enzymes in phenylpropanoid pathway.

Keywords: soybean; UV-B; UVR8 photoreceptor; isoflavones; gene expression; gene clone

异黄酮是主要存在于豆科植物体内的具有 C6/C3/C6 基本骨架结构的黄酮类次生代谢物质, 是少数豆科植物特有的具有重要生物学功能的次生代谢产物, 通过苯丙烷类代谢途径合成^[1-2]。目前在大豆中共发现 12 种异黄酮, 依据主要存在形式分为游离型的苷元 (Aglycon) 和结合型的糖苷 (Glucoside) 两类。游离型苷元为其生理活性成分, 占总量的 2% ~ 3%, 主要种类有大豆苷元、黄豆黄素和染料木素。以糖苷形式存在的异黄酮约占总量的 97% ~ 98%, 又可分为葡萄糖甙、乙酰基葡萄糖甙、丙二酸单酰基葡萄糖甙等类别^[3]。大豆异黄酮作为重要的酚类次生物质主要通过苯丙烷类代

谢途径合成^[4]。其合成主要分为两个阶段: 第一阶段, 以苯丙氨酸为底物, 经过苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamate-4-Hydroxylase, C4H)、4-香豆酸: 辅酶 A 连接酶 (4-Coumarate: Coenzyme A Ligase, 4CL) 催化生成了黄酮类物质的共同生物合成前体 p-香豆酰-CoA (p-coumarate CoA); 第二阶段, 该合成前体在查尔酮合酶 (Chalcone Synthase, CHS) 和查尔酮还原酶 (Chalcone Reductase, CHR) 的催化下生成柚皮素查尔酮 (Naringenin Chalcone) 或异甘草素 (Isoliquiritigenin), 而后柚皮素查尔酮或异甘草素在查尔酮异构酶 (Chalcone Isomerase, CHI) 的酶促反

收稿日期: 2021-06-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31871645)。

第一作者: 张艺 (1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆分子生物学研究。E-mail: gloriashang@sjtu.edu.cn。

通讯作者: 王彪 (1973—), 男, 博士, 副教授, 主要从事豆类育种和大豆分子生物学研究。E-mail: wangbiao@sjtu.edu.cn。

应中合成甘草素或柚皮素,最后在异黄酮合酶 (Isoflavone Synthase, IFS) 的催化下形成大豆异黄酮苷元,即染料木素、大豆苷元和黄豆黄素,游离苷元在 UGT(尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶)、AT(乙酰基转移酶)和 MT(丙二酰基转移酶)的催化下形成葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型、丙二酰基葡萄糖异黄酮。上述第二阶段反应主要存在于豆科植物,是异黄酮生物合成的特征途径,途径中关键酶在大豆中由多基因编码,如目前发现的大豆查尔酮合酶基因有 14 个^[5],将苯丙烷代谢途径引入到异黄酮代谢支路的关键酶异黄酮合酶由 *IFS1* 和 *IFS2* 两个基因编码^[6]。

异黄酮合成途径中关键酶 PAL、C4H、CHS、CHI 和 IFS 等编码基因的表达受众多因素影响,紫外处理对异黄酮合成影响尤为明显^[7]。Ultraviolet-B(UV-B)是波长区间为 280~315 nm 的紫外光,UV-B 辐射会对植物的生理代谢、光合作用、生物量积累、植物蛋白及核酸产生直接或间接的影响。低强度的 UV-B 照射可作为信号因子参与植物光形态的建成,调节下胚轴伸长和子叶伸展,调控叶片光合作用与生物节律,引导植株体内可吸收紫外光的类黄酮的合成。高强度的 UV-B 辐射则会给植物细胞造成不可逆的永久性伤害。在大豆生产方面,紫外辐射造成大豆植株矮化,叶片数和叶面积显著减少,蒸腾速率减弱,光合作用受阻,随着辐射强度增加大豆干物质积累下降,最终导致大豆生物量减少,产量大幅下降^[8]。

UVR8(UV RESISTANCE LOCUS 8)是在筛选对 UV-B 胁迫表现敏感的突变体时被发现的,拟南芥 *uvr8* 突变体与野生型相比,子叶和第一对真叶出现部分坏死的现象,在移除 UV-B 胁迫后,野生型可以很快恢复,而突变体植株没有恢复迹象并继续坏死^[9]。2011 年, Razzini 等^[10]利用酵母异源表达系统证实了 UVR8 是植物体内特有的 UV-B 光受体,具有特异性作用。此后,研究者们从模式植物拟南芥着手解析 UVR8 蛋白的结构并揭示其作用机制。在施加 UV-B 处理之前,UVR8 晶体结构为完全对称的同源二聚体,受到 UV-B 照射后,两个色氨酸 W285、W233 的吡啶环电子受到激发,从而降低了两个与之相邻的精氨酸 R286、R338 的稳定性,而 R286、R338 正是维持单体间氢键的关键氨基酸,最终 UVR8 二聚体解离为两个单体^[11]。解聚后的 UVR8 单体与 E3 泛素连接酶(Constitutively Photomorphogenic 1, COP1)结合,其复合物再与 SPA(Suppressor of phyA-105)蛋白结合,启动对转录因子 HY5 的调控,从而影响植物光形态的建成^[12]。在移除 UV-B 后,UVR8 可以自行恢复基态^[13-15]。

近年来 UVR8 受 UV-B 诱导的应答机制研究结果表明 UVR8 蛋白在植物体内的结构与功能具有高度保守性。罗秋兰等^[16]利用生物信息学方法系统分析了大豆 *GmUVR8* 基因及其编码蛋白质的特性,预测大豆中存在 4 个 *GmUVR8* 蛋白质 *GmUVR8a*、*GmUVR8b*、*GmUVR8c* 和 *GmUVR8d*,均为亲水性蛋白质,包含多个保守的 RCC1 结构域,形成了完整或不完整的七叶 β -折叠的结构,同源序列比对认为 *GmUVR8c* 与拟南芥最为相似。根据以上分析结果,本研究以大豆品种天隆一号为材料,研究 UV-B 处理前后其根、茎和叶等不同部位异黄酮的积累,检测根、茎和叶等部位异黄酮合成途径中关键 CHS 和 IFS 基因的表达。以 cDNA 为模板扩增大豆各 *GmUVR8* 基因,初步分析 UV-B 处理前后其在叶中表达量的变化情况,以期为高异黄酮大豆种质创制提供理论参考,对阐明 UV-B 辐射影响大豆异黄酮合成的分子机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料大豆栽培品种天隆一号为中国农业科学院油料作物研究所培育。采用 UV-B 302 nm (Philips)灯管进行紫外处理。植物基因组 RNA 提取试剂盒(货号: B518631)和 cDNA 第一链合成试剂盒(货号: B532445)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试验设计

将天隆一号大豆种子于人工气候室中,白天温度 26 °C,夜晚温度 22 °C,光周期 13 h(光)/11 h(暗),采用红、黄、蓝三色 LED 光源,光照强度 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。第一个三出复叶完全展开后,用 302 nm 紫外光,6.8 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ 强度分别处理 2,4,6 和 8 h。每个处理设 3 个生物学重复。取各个处理时期大豆根、茎和叶,用锡纸包裹后液氮速冻,放入 -80 °C 冰箱保存,用于测定异黄酮含量和提取 RNA。分别检测 UV-B 处理前和处理 8 h 后大豆异黄酮含量,分析 UV-B 处理前和处理后不同时间异黄酮合成途径关键酶 CHS 和 IFS 编码基因表达量变化情况。

以 cDNA 为模板克隆 *GmUVR8a*、*GmUVR8b*、*GmUVR8c* 和 *GmUVR8d* 基因并进行氨基酸序列同源分析,同时检测 UV-B 处理前后大豆根、茎和叶基因表达量。

1.3 方法

1.3.1 大豆异黄酮提取及含量测定 异黄酮提取方法:将 5 mL 提取溶液[0.1% 乙酸(V/V)和 70% 乙醇(V/V)水溶液]加入 10 mL 带盖的离心管中,

记录质量 W1。将待测材料在液氮中磨成粉末,加 100 mg 样品于 5 mL 提取溶液,并记录质量 W2,过夜震荡,4 °C, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜,滤液置于 4 °C 冰箱保存待用。

使用 HPLC 法测定异黄酮含量。色谱条件: Phenomenex C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5.0 nm); 流动相为甲醇:水 (30:70, V/V); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 进样

量: 10 μL^[17]。设 3 个生物学重复,委托中国农业科学院作物科学研究所完成测定。

1.3.2 基因克隆 以 UV-B 处理的大豆叶为材料,提取总 RNA,反转录成 cDNA,以大豆基因组数据库 Wm82. a2. V1 中 *GmUVR8* 基因序列为参考,使用 DNAMAN 5.2 软件设计引物(表 1),扩增产物转化到 DH5α 中,委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 基因克隆所用引物

Table 1 The primers for gene amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')	扩增片段长度 Amplification fragment length/bp	基因编号 Accession No.
GmUVR8a-F	ATTATGAAATGTTATTTTGATGGACAATAC	1449	Glyma.04G209600
GmUVR8a-R	CATTATCGTCTAACGGAAATTTGG		
GmUVR8b-F	GGCAACTTGTGTACCTAGACTATAGAG	1314	Glyma.05G194400
GmUVR8b-R	ATGTGCTATCAATTGACATGACTTTTC		
GmUVR8c-F	AATGCTGCACTCTTCAAGTCTACTCTT	1425	Glyma.06G156400
GmUVR8c-R	TTATGCATCATTCTCGTCTAACGG		
GmUVR8d-F	ATGTTGAAAGAGTCGCCGAGAC	1017 (predicted)	Glyma.08G002200
GmUVR8d-R	TTAAGGGACACTGGTATCATGCTCA		

1.3.3 基因表达量分析 根据测序所获得的 *GmUVR8* 基因核苷酸序列以及 NCBI 中大豆的 CHS 和 IFS 基因序列设计特异定量 PCR 引物(表 2),检

测经 UV-B 处理前后 V1 期幼苗各部位中 *GmUVR8a*、*GmUVR8b*、*GmUVR8c* 以及 CHS 与 IFS 的表达情况。

表 2 *GmUVR8*、CHS 与 IFS 定量扩增引物

Table 2 The primers for quantitative analysis of *GmUVR8*, CHS and IFS

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')	扩增片段长度 Amplification fragment length/bp
qGmUVR8a-F	CAAGGTCTAAGGATAAAGCAAAT	175
qGmUVR8a-R	TTTTGATAGGAACCTCCCTTAAAC	
qGmUVR8b-F	AATCACTAAAGATGGGAATTTGT	180
qGmUVR8b-R	GTGTATAATCCACCAGAAGATGA	
qGmUVR8c-F	CAAGGTCTAAGGATAAAGCAAAT	175
qGmUVR8c-R	TTTTGATAGGTACTCCCTGAAAT	
qCHS1-F	AAGCGATACATGTACTTAAACGA	168
qCHS1-R	AAAAGATGAGATGGGTAATCTTG	
qCHS2-F	CTATCTAGGATGGTGAGTGTGA	154
qCHS2-R	AACTTTTCTTTGAGCTCAGTCAT	
qCHS3-F	AATGAAGAAATCCTGAAAGAGAA	150
qCHS3-R	AAAAGATGAGATGGGTAATCTTG	
qCHS4-F	ACTTAAACGAAGAGATCCTGAAG	155
qCHS4-R	AAAAGATGAGATGGGTAATCTTG	
qCHS5-F	AAGCGATACATGTACTTAAACGA	168
qCHS5-R	AAAAGATGAGATGGGTAATCTTG	
qCHS6-F	AGGAAGAAGTCAATAGAAAATGG	146
qCHS6-R	AATACATTTTCAAACAGACGTG	
qCHS7-F	AGATCTTGAAAGAGAATCCAAAC	138
qCHS7-R	ATCAAGTGGGTAATCTTTGACTT	

续表 2

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	扩增片段长度 Amplification fragment length/bp
qCHS8-F	TAGACGGTGAAAAATGTATATG	139
qCHS8-R	GATCGAACTCAATTACAAAATCA	
qCHS9-F	AGGAAGAAATCAATAGAAAATGG	168
qCHS9-R	AGAAAAGAGAAAAGATTTGCTGTC	
qCHS10-F	AGGAAGAAGTCAATAGAAAATGG	165
qCHS10-R	ATGAAGCAAAAGAGAAGGAATAC	
qCHS11-F	AGGAAGAAGTCAATAGAAAATGG	146
qCHS11-R	AATACATTTTTTCAAACAGACGTC	
qIFS1-F	AAGGTTGGAAGTATGAGAAGAG	175
qIFS1-R	GTAATTTTGATCTCCATGGTCTC	
qIFS2-F	ACACTCAAAACCTTCCATTACATT	137
qIFS2-R	CTACTTGCCATACATTGAAGAGA	

使用天根生化科技(北京)有限公司的 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green) 荧光定量 PCR 试剂盒,使用 iQ5 实时荧光定量 PCR 仪(BioRad, USA)进行定量 PCR 分析。反应体系为:5 μL SYBR PreMix,上、下游引物各 0.2 μL ,cDNA 模板 1 μL ,用 ddH₂O 定容至 10 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,40 个循环。以大豆 *actin* 基因(GenBank accession:V00450.1)为内参,每个样品设 3 个生物学重复。

1.3.4 序列比较 从 NCBI 中获得 AtUVR8 蛋白质序列,运用 DNAMAN 5.2 软件进行同源分析,将其与克隆出的 *GmUVR8a*、*GmUVR8b*、*GmUVR8c* 基因编码蛋白序列比对。

1.4 数据分析

使用 Excel 2016 完成数据处理和方差分析。

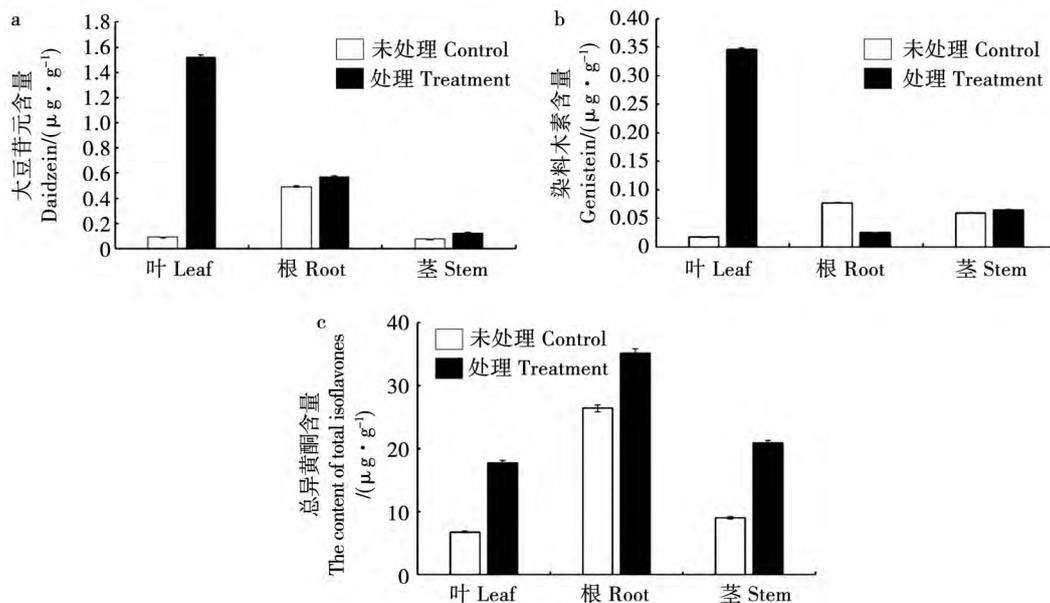


图 1 UV-B 处理前后根、茎和叶中大豆苷元 (a)、染料木素 (b) 和总异黄酮 (c) 的含量
Fig. 1 The content of daidzein (a), genistein (b) and total isoflavones (c) in the root, stem and leaf before and after UV-B treatment

2 结果与分析

2.1 UV-B 处理对大豆异黄酮含量的影响

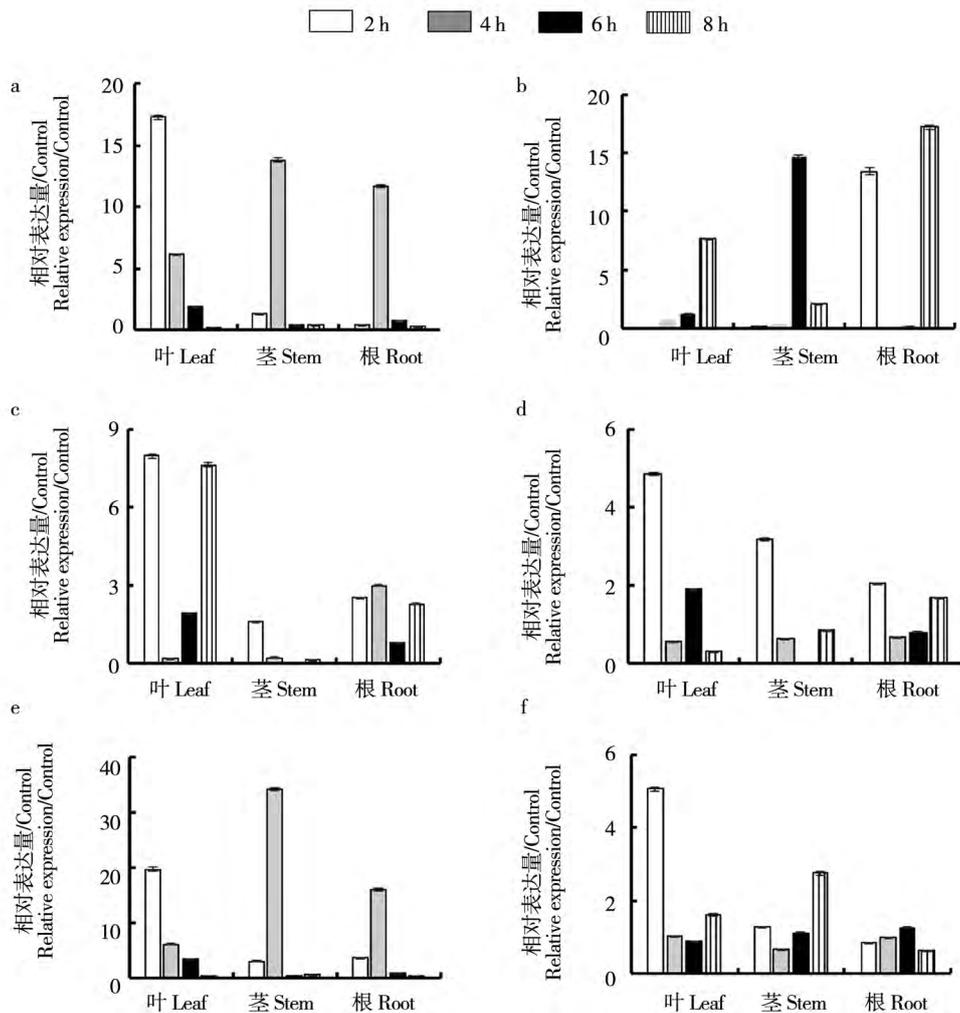
如图 1 所示,紫外光处理对天隆一号大豆根、茎和叶的异黄酮游离苷元积累的影响存在差异。在大豆的 3 种游离型苷元中,黄豆黄素在 UV-B 处理前后都没有检测到,但染料木素和大豆苷元含量处理前后发生显著变化。大豆叶片中染料木素经 UV-B 处理 8 h 后含量提高 16.5 倍,大豆苷元提高 15.8 倍;根与茎中染料木素和大豆苷元含量偏低,在处理前后变化不明显,如在茎中大豆苷元和染料木素分别从 0.08 和 0.06 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 0.13 和 0.07 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,差异不显著(图 1a 和 b)。

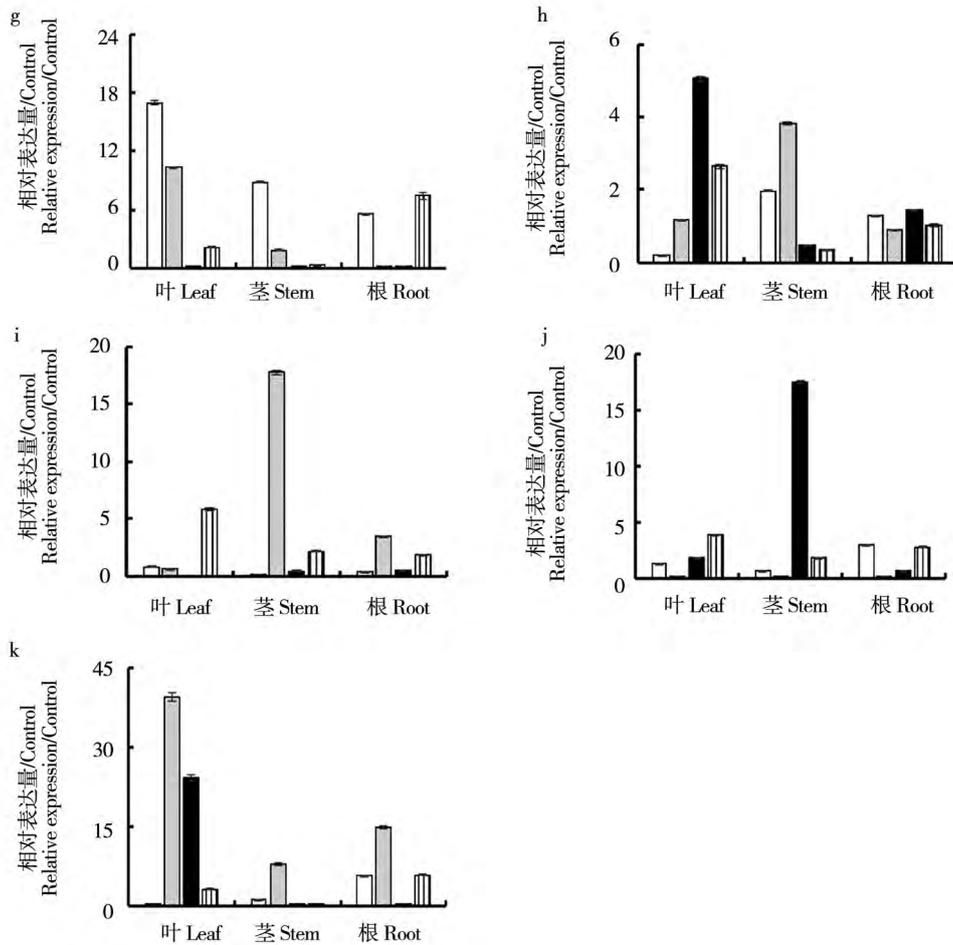
UV-B 处理 8 h 后,大豆的根、茎和叶的总异黄酮含量显著提高,增加 0.33 ~ 1.61 倍。茎中的异黄酮含量变化最大,增加 1.61 倍;而根中异黄酮含量变化相对较少,但也增加 0.33 倍。根中总异黄酮含量最高,达到 $35.19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;茎中的含量最低,为 $17.74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (图 1c)。结果说明紫外处理显著提高了大豆各部位总异黄酮的积累,但仍然以根中为最高。

2.2 UV-B 处理对异黄酮合成途径关键基因表达量的影响

如图 2 所示,紫外光处理后不同时期各 CHS 基因表达量变化情况不同,不同 CHS 基因对紫外处理响应的快慢与强度均不相同。在叶中,处理后 *GmCHS1*、*GmCHS3*、*GmCHS4*、*GmCHS5*、*GmCHS6* 和 *GmCHS7* 基因的表达量迅速升高,2 h 后达到最高,分别是处理前的 17.3、8.0、4.8、19.7、5.1 和 17.0 倍;*GmCHS8* 基因在 6 h 达到最高,是处理前的 5.1 倍;*GmCHS2*、*GmCHS9* 和 *GmCHS10* 基因在 8 h 达到最

高,分别是处理前的 7.6、5.9 和 3.9 倍;*GmCHS11* 基因变化幅度最大,在 UV-B 处理 4 h 后达到最高,为处理前的 39.4 倍。在茎中,*GmCHS3*、*GmCHS4* 和 *GmCHS7* 基因在处理 2 h 表达量最高,分别是对照的 1.6、3.7 和 8.8 倍;*GmCHS1*、*GmCHS5*、*GmCHS8*、*GmCHS9* 和 *GmCHS11* 基因在处理 4 h 后表达量最高,分别是处理前的 13.8、34.3、3.8、17.8 和 7.9 倍;*GmCHS2* 和 *GmCHS10* 基因在处理 6 h 达到最高,分别比处理前增加 14.7 和 17.5 倍;*GmCHS6* 基因在处理 8 h 达到最高,为处理前的 2.8 倍。在根中,*GmCHS2*、*GmCHS4*、*GmCHS7* 和 *GmCHS10* 基因处理 2 h 达到最高,分别是处理前的 13.4、2.0、5.5 和 3.0 倍;*GmCHS1*、*GmCHS3*、*GmCHS5*、*GmCHS9* 和 *GmCHS11* 基因处理 4 h 后达到最高,分别是处理前的 11.7、3.0、16.1、3.5 和 14.9 倍;*GmCHS8* 和 *GmCHS10* 基因在 6 h 达到最高,分别为对照的 1.3 和 1.4 倍。





注: a ~ k. *GmCHS1* ~ *GmCHS11*。
 Note: a-k. *GmCHS1*-*GmCHS11*.

图 2 UV-B 处理不同时间大豆不同部位 CHS 基因的表达量

Fig. 2 The expression of CHS gene in different soybean parts treated by UV-B for different times

如图 3 所示,UV-B 处理后两个大豆中异黄酮合酶基因 *GmIFS1* 和 *GmIFS2* 在根、茎和叶中的表达情况不同,其中 *GmIFS1* 基因表达量分别是处理前的 1.7, 3.5 和 5.7 倍; *GmIFS2* 基因分别是处理前的 3.6, 9.0 和 19.3 倍。

2.3 *GmUVR8* 基因克隆及分析

2.3.1 基因克隆及氨基酸序列同源分析 以天隆一号大豆叶为材料,克隆出了 *GmUVR8a*、*GmUVR8b* 和 *GmUVR8c* 基因,但 *GmUVR8d* 未能成功扩增。

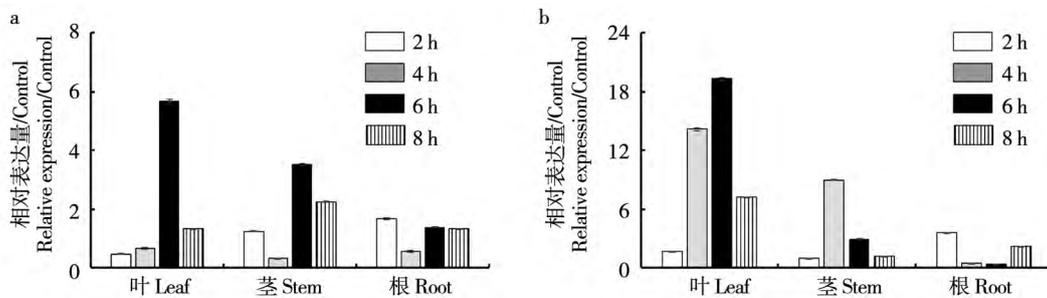


图 3 大豆 *GmIFS1* (a) 和 *GmIFS2* (b) 基因在 UV-B 处理不同时间的表达量

Fig. 3 The expression levels of soybean *GmIFS1* (a) and *GmIFS2* (b) gene treated by UV-B for different times

同源分析如图4所示, GmUVR8a和GmUVR8c的氨基酸序列高度同源, 相似性达到90%以上, GmUVR8b与GmUVR8a和GmUVR8c同源度为77%, 与拟南芥AtUVR8的同源度为74%。

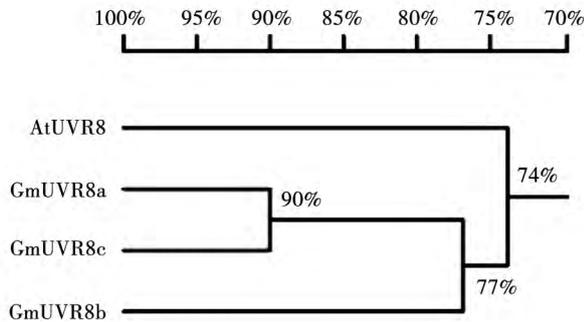


图4 大豆与拟南芥UVR8受体氨基酸序列的比较
Fig. 4 The comparison of amino acid sequences among UVR8 receptors obtained from soybean and *Arabidopsis thaliana*

2.3.2 GmUVR8基因组织表达分析 如图5所示, UV-B处理2h后, GmUVR8a、GmUVR8b和GmUVR8c基因在大豆根、茎、叶中的表达存在明显差异, 3个基因的表达量均以根中为最高, 其次是叶, 茎中最低; 不同基因在同一部位的表达也存在差异, 叶和茎中GmUVR8b基因表达量较高, 根中GmUVR8a基因表达量最高。

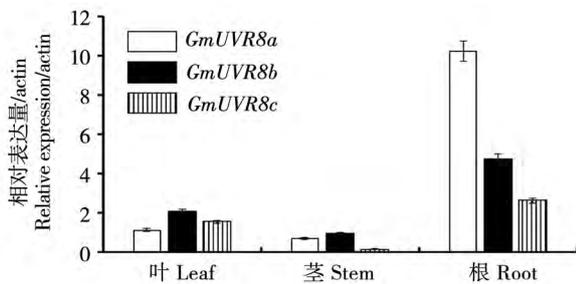


图5 GmUVR8a、GmUVR8b和GmUVR8c基因在不同部位的相对表达

Fig. 5 The relative expression level of GmUVR8a, GmUVR8b and GmUVR8c gene in different soybean parts

3 讨论

大豆是我国主要的农业经济作物之一, 环境中紫外辐射对大豆的生理生化有显著影响。大豆异黄酮是少数豆科植物特有的重要次生代谢产物, 在大豆响应紫外胁迫中起重要作用。紫外辐射影响大豆的生长发育, 使植株高度降低, 叶片面积减小, 生物量下降等, 降低大豆的产量, 但能够促进大豆类黄酮化合物合成, 提高植物对病虫害的抵抗力^[18]。UV-B辐射增加了植物叶片的花青素、类黄酮和可溶性酚类物质的积累, 在UV-B辐射到达叶

绿体等敏感目标前, 主要集中于叶片表皮细胞的这些物质通过吸收UV-B辐射起到屏蔽太阳辐射的作用, 减少UV-B辐射进入植物体内, 保证植物免受紫外辐射伤害。沈雪峰等^[7]发现, 在UV-B辐射条件下, 幼苗叶片中的可溶性酚类物质增加14.8%。本研究结果发现, UV-B辐射处理使大豆天隆一号V1期幼苗叶片中总异黄酮含量提高1.3倍, 特别是在UV-B处理条件, 异黄酮游离型苷元染料木素、大豆苷元分别提高了16.5和15.8倍。

植物中的黄酮类化合物可以有效清除紫外线对DNA的损伤, 其中色素类的黄酮醇和花青苷可以对UV起到过滤作用^[19]。适量的UV-B可以促进植物体内黄酮类化合物的积累, 但是过量的UV-B辐射对植物构成非生物胁迫, 高剂量UV-B会抑制类黄酮的合成^[20]。CHS是植物次生代谢途径中黄酮类物质合成的关键酶, 在大豆芽苗菜UV-B处理5d以后, CHS8表达量仍高于对照2.56倍^[21]。IFS是合成异黄酮的关键酶, 大豆中异黄酮合酶由IFS1和IFS2两个基因编码, 能够在转录水平对异黄酮的生物合成进行调控^[5], 在苜蓿中, 紫外处理能够使IFS1、IFS2、IFS3基因表达水平显著提高^[22]。本研究发现大豆CHS和IFS基因的表达受UV-B胁迫影响显著, 但各个基因响应的程度与时间存在明显差异。

罗秋兰等^[15]认为大豆中存在4个GmUVR8蛋白质, 包含多个保守的RCC1结构域, 含有完整或不完整的七叶 β -折叠的结构。大豆中编码UVR8的基因有4个, 分别为GmUVR8a、GmUVR8b、GmUVR8c、GmUVR8d, 长度不一, 分别位于4条染色体上。本研究以大豆天隆一号的cDNA为模板, 设计特异性引物, 扩增出GmUVR8a、GmUVR8b、GmUVR8c3个基因, 基因序列与预测结果一致。在叶中, 这3个基因表达量有显著差别, 以GmUVR8b为最高。GmUVR8d没有扩增, 可能其与预测的序列差异较大, 也有可能是供试大豆材料品种原因造成的。

4 结论

UV-B处理大豆V1期幼苗后, 根、茎和叶中的总异黄酮含量显著提高, 增加0.33~1.61倍不等, 茎中异黄酮含量变化最大, 叶次之, 而根中异黄酮含量变化相对较小, 但根中总异黄酮含量最高, 茎中最低。CHS和IFS基因表达与处理时间密切相关, 各基因表达谱明显不同。从大豆天隆一号中克隆出编码UVR8受体的GmUVR8a、GmUVR8b和GmUVR8c基因, 基因序列与预测一致, 编码蛋白与拟南芥AtUVR8的同源性为74%。GmUVR8a、GmUVR8b和GmUVR8c基因在叶中的表达水平存在

显著差异,以 *GmUVR8b* 为最高。研究结果对阐明 UV-B 调控异黄酮合成的机理具有一定意义。

参考文献

- [1] ZHONG M, JIAN S, KAI S, et al. Health efficacy biosynthesis of soybean isoflavones and germplasm discovery, genetics and breeding[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(7): 1208-1213.
- [2] YU O, SHI J, HESSION A O, et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(7): 753-763.
- [3] 周文红, 郭咪咪, 李秀娟, 等. 大豆异黄酮提取及其生物转化的研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2019, 27(5): 37-42. (ZHOU W H, GUO M M, LI X J, et al. Research progress of extraction and biotransformation of soybean isoflavones [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2019, 27(5): 37-42.)
- [4] 陈宣钦, 张乐, 徐慧妮, 等. 大豆异黄酮生物合成关键酶及其代谢工程研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(7): 133-138. (CHEN X Q, ZHANG L, XU H N, et al. Key enzymes in soybean isoflavones biosynthesis and its metabolic engineering [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(7): 133-138.)
- [5] CHENG H, YU O, YU D. Polymorphisms of *IFSI* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds[J]. *Plant Science*, 2008, 175(4): 505-512.
- [6] VADIVEL A K A, KRYSIAK K, TIAN G, et al. Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 325.
- [7] 沈雪峰, 董朝霞, 陈勇. 硅和紫外辐射对大豆幼苗生理特性的影响[J]. *大豆科学*, 2014, 33(6): 857-860. (SHEN X F, DONG Z X, CHEN Y. Effects of silicon and ultraviolet radiation on physiological characteristics of soybean seedlings[J]. *Soybean Science*, 2014, 33(6): 857-860.)
- [8] 郑有飞, 颜景义, 杨志敏. 紫外线辐射增加对大豆的影响及其估算[J]. *应用气象学报*, 1995, 6(4): 442-448. (ZHENG Y F, YAN J Y, YANG Z M. Impact of enhanced ultraviolet radiation on soybean production and its estimation[J]. *Quarterly Journal of Applied Meteorology*, 1995, 6(4): 442-448.)
- [9] KLIEBENSTEIN D J. *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1): 234-243.
- [10] RIZZINI L, FAVORY J J, CLOIX C, et al. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein [J]. *Science*, 2011, 332(6025): 103-106.
- [11] WU D, HU Q, YAN Z, et al. Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8[J]. *Nature*, 2012, 484(7393): 214-219.
- [12] LI X, CHUNG L W, MOROKUMA K, et al. Theoretical study on the UVR8 photo-receptor; Sensing ultraviolet-B by tryptophan and dissociation of homodimer [J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2014, 10(8): 3319-3330.
- [13] HEIJDE M, ULM R. Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photo-receptor UVR8 to the homodimeric ground state [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(3): 1113-1118.
- [14] JENKINS H G I. Rapid Reversion from monomer to dimer regenerates the ultraviolet-B photoreceptor UV RESISTANCE LOCUS8 in intact *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 547-555.
- [15] CHRISTIE J M, ARVAI A S, BAXTER K J, et al. Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges [J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1492-1496.
- [16] 罗秋兰, 王潮岗, 胡章立. 大豆 UV-B 光受体 *GmUVR8* 基因的生物信息学分析 [J]. *大豆科学*, 2018, 37(2): 192-196. (LUO Q L, WANG C G, HU Z L. Bioinformatics analysis of *GmUVR8* gene of soybean UV-B photoreceptor [J]. *Soybean Science*, 2018, 37(2): 192-196.)
- [17] 张海军, 苏连泰, 李琳, 等. 高效液相色谱法 (HPLC) 测定大豆异黄酮含量的研究 [J]. *大豆科学*, 2011, 30(4): 672-675. (ZHANG H J, SU L T, LI L, et al. Determination of isoflavones in soybean by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Soybean Science*, 2011, 30(4): 672-675.)
- [18] 戚楠楠, 张晓燕, 苏娜娜, 等. UV-A 诱导大豆芽苗菜下胚轴中花青苷积累的分子机理 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(12): 2408-2416. (QI N N, ZHANG X Y, SU N N, et al. Molecular mechanism of anthocyanin accumulation in soybean sprout hypocotyls induced by UV-A [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(12): 2408-2416.)
- [19] GROVER S, OLIVER Y, RUI Z, et al. Intricate environment-modulated genetic networks control isoflavone accumulation in soybean seeds [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 105.
- [20] PANDEY A, AGRAWAL S B. Ultraviolet-B radiation; A potent regulator of flavonoids biosynthesis, accumulation and functions in plants [J]. *Current Science*, 2020, 119(2): 176-185.
- [21] 齐学会, 陈沁, 刘媛媛, 等. 紫外光 B 对大豆芽苗菜下胚轴酚类物质合成的影响 [J]. *营养学报*, 2016, 38(4): 397-401. (QI X H, CHEN Q, LIU Y Y, et al. Effect of UV-B on the synthesis of phenolic substances in the hypocotyls of soybean sprouts [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2016, 38(4): 397-401.)
- [22] KADUCOVÁ M, MONJE-RUEDA M D, GARCÍA-CALDERÓN M, et al. Induction of isoflavonoid biosynthesis in *Lotus japonicus* after UV-B irradiation [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 236: 88-95.