

文章编号: 1000-8551(2016)01-0184-09

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

侯伶俐¹ 杨雄榜¹ 董雪妮¹ 丁梦琦¹ 朱雪梅² 邵继荣¹¹ 四川农业大学生命科学学院, 四川 雅安 625014; ² 四川农业大学资源与环境学院, 四川 成都 611130

摘要: 为探究花期苦荞在逆境胁迫下的总黄酮含量变化及其响应机理, 以川荞3号为材料, 研究了盐(NaCl)、干旱(PEG-6000)及UV-B 3种逆境胁迫对苦荞花期各组织中总黄酮含量的影响, 及黄酮合成关键酶基因(*CHI*、*F3H*、*FLS*、*FLS1*)表达量与花期总黄酮含量之间的关系。结果表明: 3种胁迫处理后, 根、茎、叶、花中的总黄酮含量均有不同程度的增加。在NaCl胁迫下, 根、茎、叶、花中的总黄酮含量明显增加, 且在12 h时叶中达到最高值(160.0 mg·g⁻¹); 当采用PEG-6000处理后, 苦荞的根、茎、叶、花中的总黄酮含量均显著升高, 且叶、花对PEG-6000胁迫较其它组织敏感; UV-B胁迫也能显著提高苦荞根、茎、叶中的总黄酮含量, 且叶中总黄酮含量变化最大, 但花中总黄酮含量却呈极显著下降。Real-time PCR分析表明, 在上述逆境胁迫下*CHI*、*F3H*、*FLS*及*FLS1*基因的mRNA量在茎、叶、花中的变化与总黄酮含量变化趋势相一致, 推测这些基因可能在花期苦荞对逆境胁迫的适应中发挥重要作用。本研究结果可为解析苦荞在逆境下的响应机制和通过基因工程培育高黄酮苦荞新品种提供理论依据。

关键词: 苦荞; 总黄酮含量; 花期; 逆境胁迫; 基因表达

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2016.01.0184

苦荞(*Fagopyrum tataricum*)为蓼科荞麦属一年生双子叶草本植物, 在我国主要分布于黄土高原及西南地区^[1-2]。苦荞被誉为21世纪的营养食品, 其最重要的生物活性成分为黄酮类化合物, 主要包括芦丁、槲皮素、异槲皮素和花青素等, 其中芦丁占总黄酮含量的70%~85%^[3-4]。研究发现黄酮类化合物不仅在植物激素信号及有性繁殖、促进花粉管和种子萌发、参与植物抗逆等方面具有重要作用^[5], 还在人体保健与疾病治疗等方面具有重要作用^[6-7]。

黄酮类化合物的合成与积累量取决于其合成途径中的关键酶, 它们在植物次生代谢物合成途径中往往位于代谢支路分叉口或次生代谢物合成途径的下游。精确控制黄酮合成途径分支上关键酶基因的表达及其酶活, 能进一步决定代谢流的流向。查尔酮异构酶(chalcone isomerase, *CHI*)是黄酮类化合物生物合成途径上游的关键酶^[8]。洋葱中*CHI*基因的失活导致斛皮素含量显著下降^[9]; 大麦中*CHI*基因的缺失导致原

叶中类黄酮含量明显减少^[10]。黄酮醇合成酶(flavonol synthase, *FLS*)、黄酮醇合成酶1(flavonol synthase 1, *FLS1*)和黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, *F3H*)属于依赖2-酮戊二酸的双加氧酶家族^[11-12]。*FLS*可以催化二氢黄酮醇作为异黄酮和花青素等黄酮类物质的共同前体, 同时, 二氢黄酮醇还可以在二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, *DFR*)作用下生成无色花色素。由于*FLS*与*DFR*都以二氢黄酮醇为底物, 因此可以通过抑制花色素的合成而增加黄酮醇的生成, 或者通过抑制黄酮醇的合成来提高花色素的含量, 从而得到不同的目的产物。*F3H*是黄烷酮分支点的一个核心酶, 催化柚皮素生成, 目前发现*F3H*有几种不同的表达模式, 其中在拟南芥中可与其上游的*CHS*、*CHI*等基因协同表达^[13]。

目前, 国内外关于荞麦黄酮类化合物的研究在提取、测定方面已有较多报道, 关于荞麦不同生育时期主要器官的黄酮含量与变化研究、不同播种期及不同纬

收稿日期: 2014-07-22 接受日期: 2015-06-29

基金项目: 四川省重点攻关课题(04NG001-015)

作者简介: 侯伶俐, 女, 主要从事荞麦资源的保护与应用研究。E-mail: houlingli815@126.com

通讯作者: 邵继荣, 男, 教授, 主要从事生物技术研究。E-mail: shaojr007@163.com

度、海拔、温度、光照等生态因子与荞麦及其籽粒黄酮含量之间的相关性研究也已相当深入和广泛^[14-17]。然而,荞麦在生长发育过程中,还会受到自然界各种逆境胁迫的影响,如盐渍、干旱、辐射等,由于黄酮是一类重要的次生代谢产物,其合成、积累与植株的生长环境密切相关并参与植物的抗逆过程,是植物抵抗外界不利环境的重要保护机制,但关于逆境胁迫下荞麦黄酮含量及其相关基因表达变化的研究较少。前期通过研究川荞3号整个生育期(芽期、苗期、花期、成熟期)总黄酮含量变化情况,发现苦荞花期总黄酮含量最高^[18]。为了探究花期苦荞在逆境胁迫下的应答反应机理,本研究以川荞3号为材料,研究盐(NaCl)、干旱(PEG-6000)及UV-B 3种非生物逆境胁迫对花期苦荞各组织中总黄酮含量的影响,同时利用 Real-time PCR 技术,分析黄酮合成途径中相关酶基因在逆境胁迫下的表达变化,从分子水平上探讨总黄酮含量与相关酶基因表达之间的关系,以期为解析苦荞应答环境胁迫的分子机制,通过基因工程手段调控苦荞黄酮代谢过程,培育高黄酮合成特性的苦荞新品种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

苦荞品种川荞3号,其种子由四川省凉山州西昌农业科学研究所李发良老师惠赠。

1.2 主要试剂

芦丁标准品($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$)购自四川瑞进特科技有限公司,用于RNA提取的液相RNase清除剂、柱式植物RNAout 3.0试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,其他试剂如逆转录试剂盒 PrimeScriptTM RT

reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 均购自于宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 苦荞的栽培、处理及样品采集 供试材料川荞3号于夏秋季节种植在四川农业大学农场气象站内。选取花期(种子萌发后约45 d,50%以上的花蕾盛开)长势一致的植株,分别用100 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液、30% PEG-6000 溶液和UV-B(302 nm,辐射强度为0.1 mW·cm⁻²)处理,对照组(CK)为正常培养。采集胁迫处理12 h和24 h后花期苦荞的根、茎、叶及花各6份,其中3份置于60℃恒温箱烘干至恒重,用于提取总黄酮,另3份迅速装入采集袋,用锡箔纸包装后冻存于-80℃,用于提取RNA。

1.3.2 苦荞总黄酮的提取和测定 参考Liu等^[16]的方法提取上述采集的花期苦荞各组织中的总黄酮,并基于AlCl₃比色法^[17]制备标准曲线来测定总黄酮含量。

1.3.3 总RNA的提取及cDNA第1链的合成 按照柱式植物RNAout 3.0试剂盒中说明书提取苦荞麦花期的根、茎、叶、花的总RNA,利用琼脂糖凝胶(1%)电泳和NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific,上海)测定所提取的RNA浓度和纯度。以oligo-dT引物进行cDNA的反转录,将合成的cDNA保存于-20℃冰箱中,备用。

1.3.4 QRT-PCR检测 以反转录获得的cDNA为模板进行Real-time PCR检测(Bio-Rad 中国公司,上海),每个样品重复3次。以组蛋白H3基因作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算Ct值,分析查尔酮异构酶(CHI)、黄酮-3-羟化酶(F3H)、黄酮醇合酶(FLS)和黄酮醇合酶1(FLS1)mRNA的相对表达水平。引物序列见表1。

表1 黄酮合成相关基因QRT-PCR引物序列
Table 1 QRT-PCR primer sequence of flavonoid-related biosynthesis genes

基因 Gene	Genbank 登录号 Genbank accession	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size/bp
CHI	HQ003251.1	F: ACTTTGAGGAATCCGCTGTGAC R: AGGGCTTCAACATGGTGATCTGTA	144
F3H	HQ003252.1	F: GCTAAACCCAAGACTCTGACTGC R: AAATCTCGTCCCTCTTTCCTCC	169
FLS1	JX401285.1	F: GAGCATTCTTCACAGGAGTTTG R: TGCAGATTTTCTTCATTGACCAGC	127
FLS	JF274262.1	F: AAGGAGGAGTACGCCAAACC R: AGGAGGCCAAATTCTATGAAAA	123
H3	HM628903.1	F: CGCAGAAAGTACCAGAAGAGCAC R: GAGAGCAGACACAGCAGAGC	113

1.3.5 数据分析与处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计、差异显著性分析,利用 Origin 8.5 进行绘图。图中数据为 3 次重复的平均值 \pm 标准误。

2 结果与分析

2.1 逆境胁迫对花期苦荞总黄酮含量的影响

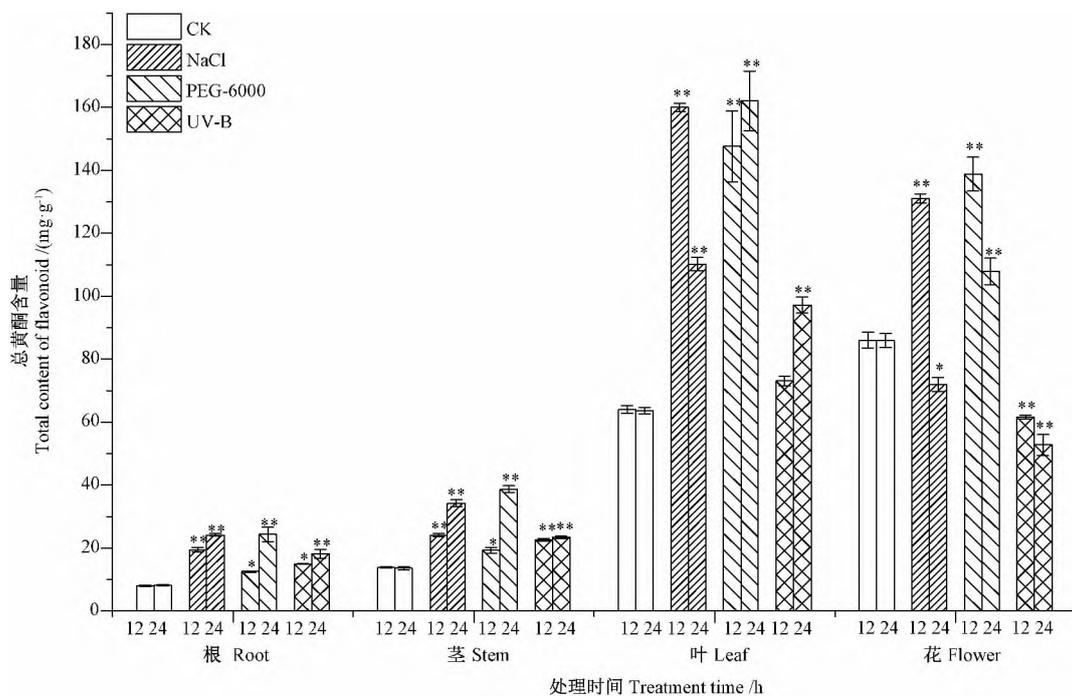
图 1 表明,花期苦荞总黄酮主要集中在叶和花中。在 NaCl 胁迫处理 12~24 h 后,花期苦荞的根、茎、叶中总黄酮含量显著升高,且在 12 h 后叶中总黄酮含量达到最高值($160.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$),与 CK 相比差异达极显著;花中总黄酮含量在 12 h 后比 CK 高了 52.26%,但在 24 h 后却比 CK 降低了 16.49%。与 CK 相比,PEG-6000 胁迫处理 12~24 h 后,花期苦荞的根、茎、叶及花中总黄酮含量均显著升高,尤其是在处理 24 h 后叶中总黄酮含量达 $162.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,比 CK 增加了 153.28%,差异达极显著。UV-B 胁迫处理 12~24 h 后,花期苦荞的根、茎、叶中总黄酮含量均显著增加,在处理 24 h 后分别比 CK 增加了 126.93%、69.57% 和 52.03%;然而,花中的总黄

酮含量却呈极显著下降趋势,在处理 24 h 后总黄酮含量相比 CK 降低了 38.68%。

2.2 花期苦荞黄酮合成相关基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应

2.2.1 *CHI* 基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应 由图 2 可知,与 CK 相比,3 种胁迫处理后,根中 *CHI* 基因表达量变化不大。NaCl 胁迫后,茎中 *CHI* 基因表达量在处理 24 h 后显著提高,叶、花中 *CHI* 基因表达量在处理 12~24 h 后期间均极显著提高,且 12 h 后花中 *CHI* 基因表达量最高(24.940)。PEG-6000 胁迫处理 24 h 后,茎、叶、花中 *CHI* 基因表达量均极显著增加。在 UV-B 胁迫处理后,茎中 *CHI* 基因表达量变化不明显,24 h 后 *CHI* 基因表达量在叶中极显著增加而花中极显著减少。

2.2.2 *F3H* 基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应 NaCl 胁迫处理 12~24 h 后,花期苦荞的根中 *F3H* 基因表达量显著降低(图 3),与 CK 相比差异达极显著;茎中 *F3H* 基因表达量先极显著减少(0.247)后极显著增加(2.000);叶、花中 *F3H* 基因表达量先极显著增加后显著减少,12 h 后叶中 *F3H* 基因表达量最



注: ** 表示与对照组差异极显著 ($P < 0.01$); * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: ** indicates the very significant difference between treatment group and control group at 0.01 level.

* indicate the significant different at 0.05 level. The same as following.

图 1 逆境胁迫对花期苦荞总黄酮含量的影响

Fig. 1 Influence of stress on the content of total flavonoids of *Fagopyrum tataricum* during florescence

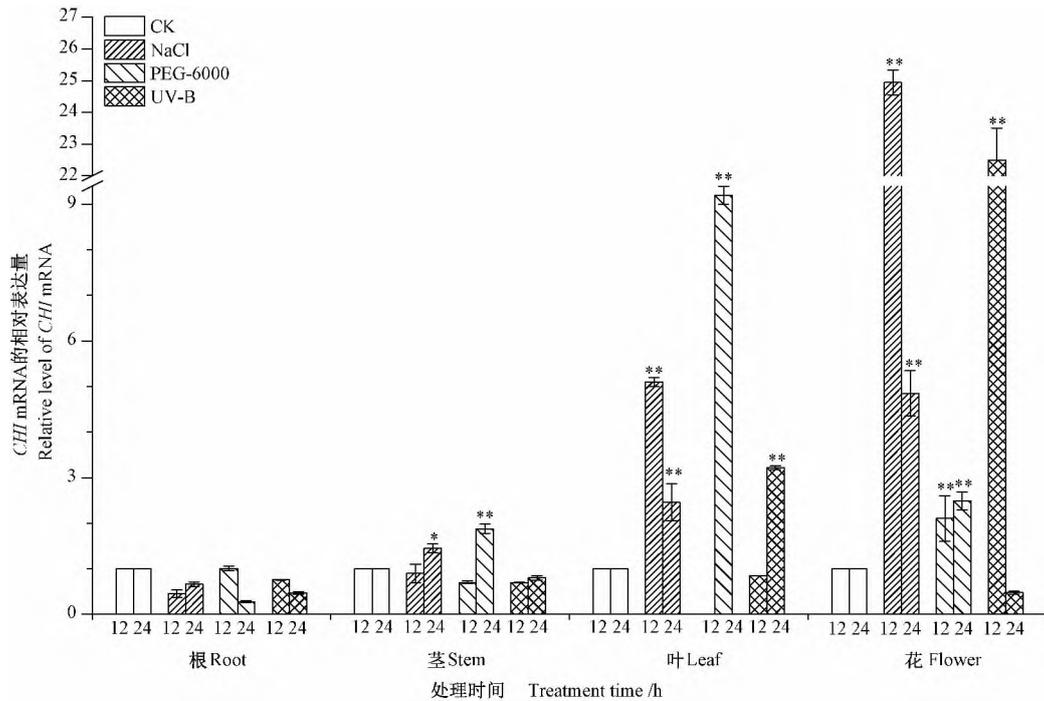


图 2 CHI 基因对 NaCl、PEG - 6000 和 UV-B 胁迫的响应

Fig. 2 Response of CHI gene to NaCl, PEG - 6000 and UV-B stress

高(12.370)茎中 F3H 基
 达量先极显
 F3H 基因表
 处理 12 ~ 24
 少; 茎、叶中
 24 h 后叶中
 而, 处理 24
 (0.252)。
 2.2.3 FLS
 响应 由图
 中 FLS 基因
 因表达量先
 叶、花中 FL
 12 h 后花中

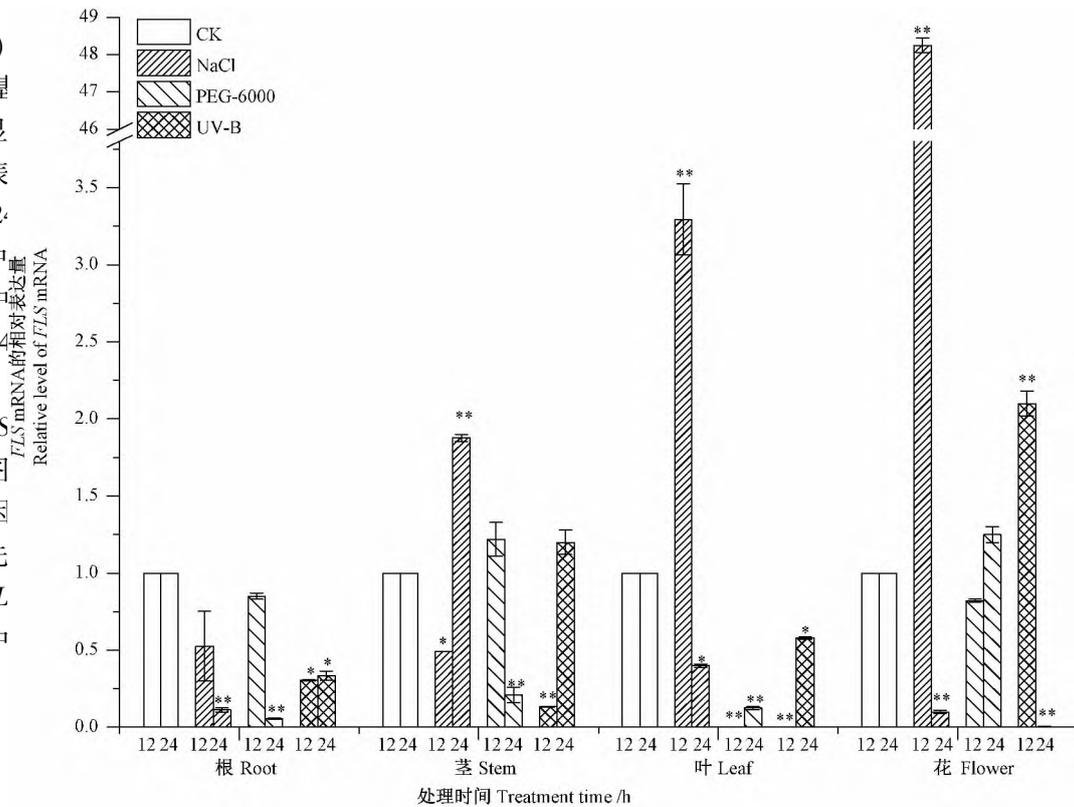


图 4 FLS 基因对 NaCl、PEG - 6000 和 UV-B 胁迫的响应

Fig. 4 Response of FLS gene to NaCl, PEG - 6000 and UV-B stress

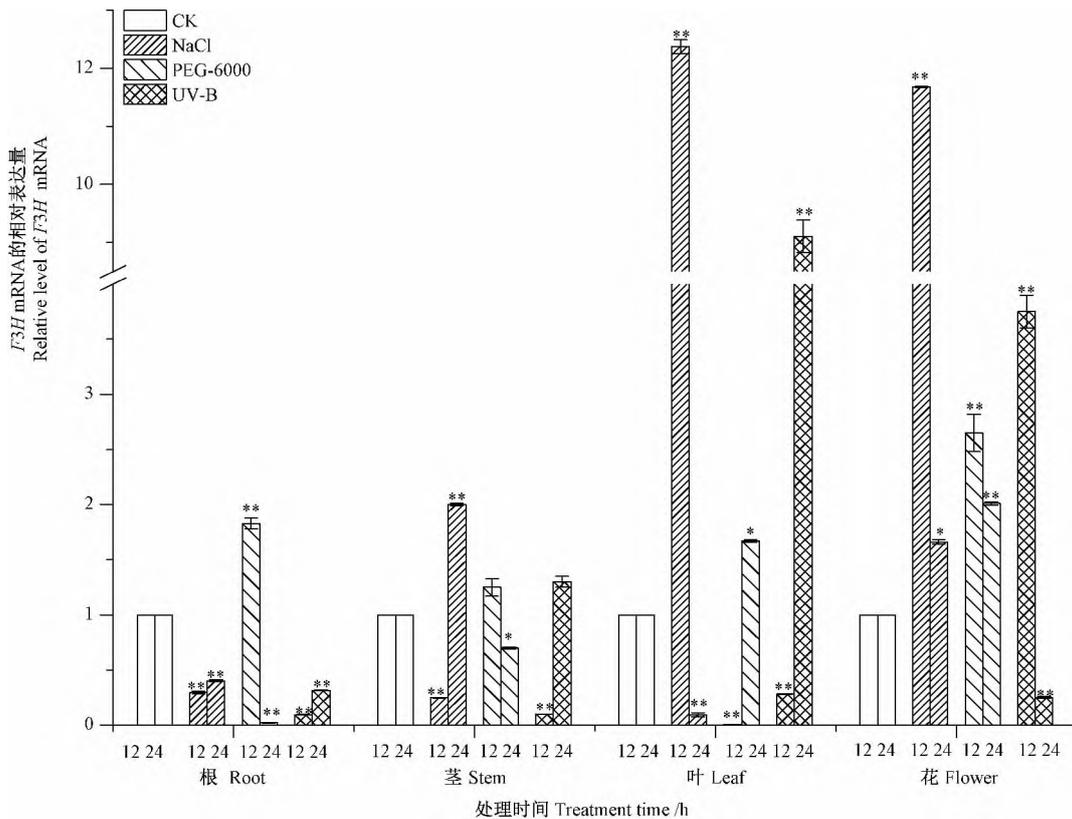


图3 *F3H* 基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应

Fig. 3 Response of *F3H* gene to NaCl, PEG-6000 and UV-B stress

比,PEG-6000胁迫处理12~24 h后,花期苦荞根、叶中 *F3H* 基因表达量减少,12 h后叶中 *F3H* 基因表达量最低(0.001);茎中 *F3H* 基因表达量先增加(1.220)后极显著减少(0.210);花中 *F3H* 基因表达量先减少(0.820)后增加(1.250)。UV-B胁迫处理12~24 h后,花期苦荞根、叶中 *F3H* 基因表达量减少;茎中 *F3H* 基因表达量先极显著减少(0.133)后有所增加(1.200);花中 *F3H* 基因表达量先极显著增加(2.100)后极显著减少(0.005)。

2.2.4 *F3H* 基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应 NaCl胁迫处理12~24 h后,花期苦荞根中 *F3H* 基因表达量相比 CK 极显著降低,茎、叶、花中 *F3H* 基因表达量均增加,在12 h后叶中 *F3H* 基因表达量最高(31.080)。与 CK 相比,PEG-6000胁迫处理后,花期苦荞根中 *F3H* 基因表达量先显著增加(1.820)后减少(0.920);茎、花中的 *F3H* 基因表达量均有所增加,在12 h后茎中 *F3H* 基因表达量最高(6.050);叶中 *F3H* 基因表达量先降低(0.950)后增加(1.680)。UV-B胁迫处理12~24 h后,花期苦荞根、茎、花中 *F3H* 基因表达量先增加后减少,在12 h后花中 *F3H* 基因表达量最高(2.820);叶中 *F3H* 基

因表达量极显著增加,在12 h后叶中 *F3H* 基因高达44.560(图5)。

3 讨论

植物中的黄酮种类已超过9000种,它们能以游离态或与糖苷相结合的形式生成种类繁多、构型复杂、生物学功能丰富的黄酮衍生物^[19-20]。通过调控黄酮类化合物的合成和积累,植物能够对不同的逆境作出应答。Li等^[21]研究表明,黄酮能提高植物的耐受性,降低紫外辐射对细胞的损伤。Solovchenko等^[22]通过UV-B胁迫光敏苹果试验,发现苹果皮细胞中的黄酮醇能作为有效的“过滤器”过滤掉大部分UV-B辐射,说明黄酮类化合物在植物对逆境胁迫的应答中具有重要作用。

本研究结果表明,花期苦荞叶和花中的总黄酮含量最高。在NaCl胁迫下,12 h后根、茎、叶、花中总黄酮含量均明显升高,表明黄酮在花期苦荞盐胁迫应答中具有重要作用^[23]。但是,在24 h后花中总黄酮含量却比CK降低了16.49%,苦荞花中黄酮含量先增加后下降,可能与外界刺激诱导黄酮合成中间产物并参

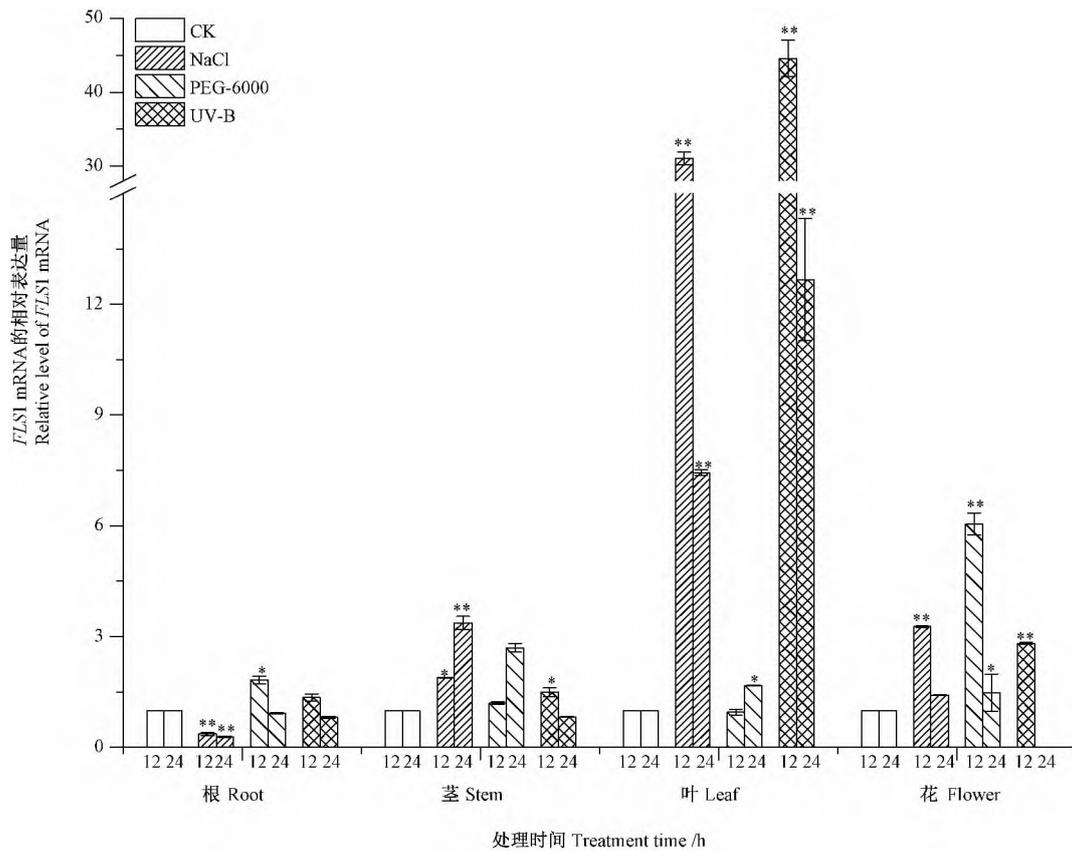


图5 *FLS1* 基因对 NaCl、PEG-6000 和 UV-B 胁迫的响应

Fig. 5 Response of *FLS1* gene to NaCl, PEG-6000 and UV-B stress

与合成花青素等色素有关^[24]。在 PEG-6000 胁迫下,苦荞花期的根、茎、叶、花中的总黄酮含量均明显增加,且叶、花对外界环境的变化和胁迫较其它组织敏感。蔡娜等^[25]采用水分胁迫苦荞,结果显示水分胁迫能促使苦荞总黄酮和芦丁的合成与积累。Suzuki 等^[26]采用干旱胁迫处理苦荞叶子,发现苦荞叶子芦丁含量增加了 122%,说明适当的 NaCl、PEG-6000 胁迫可诱导黄酮的合成与积累。有研究表明,采用 UV-B 胁迫处理苦荞叶子,苦荞叶中芦丁含量增加了 129%^[26],说明黄酮类化合物与植物抵抗 UV-B 辐射具有重要关系,且不同器官对 UV-B 胁迫的应答有所差异。本研究发现,在 UV-B 胁迫下,花期苦荞根、茎、叶中的总黄酮含量均明显增加,且叶中总黄酮含量变化最大,但花中的总黄酮含量却显著减少。究其原因可能是 UV-B 辐射诱导产生的黄酮代谢中间产物被用于黄酮代谢支路花青素等色素的合成。王龙飞^[27]在研究胡枝子花青素中发现,UV-B 辐射胁迫下,花青素大量积累,且胁迫时间越长胁迫强度越大,花青素含量越高,说明 UV-B 辐射下部分黄酮合成前体物可能被诱导用于花青素支路代谢。

此外,本试验中,花期苦荞各组织中黄酮代谢途径受 NaCl、PEG-6000、UV-B 胁迫的调节,叶和花中的总黄酮含量变化比根和茎中的显著。可能由于植物的根主要负责吸收和运输矿质元素等,非合成代谢的主要区域,茎主要是起营养传输功能。UV-B 胁迫下,根、茎均不是主要的刺激感知区域,因此根、茎中的总黄酮含量较少。叶是合成代谢的主要区域,花是生殖期(花期)植株生长的中心,在受到外界不良刺激时,叶、花会快速合成黄酮类化合物,并迅速向其它组织运输来进行自我防御;花中合成了大量的色素类物质消耗部分黄酮类化合物,结果导致花中总黄酮比叶中含量低^[28]。

植物黄酮合成途径由多条代谢支路交错连接而成,包含多个酶基因,这些酶基因的表达高度依赖于组织类型和对内部或外部信号的响应。*CHI* 基因是催化合成黄酮类物质基本骨架代谢途径的上游酶基因。Kim 等^[9]研究发现,大麦和洋葱 *CHI* 缺失突变体中的黄酮量急剧下降。Muir 等^[29]发现矮牵牛 *CHI* 基因在番茄中的过量表达导致番茄果皮中黄酮类化合物含量

提高了78倍。Zhou等^[30]研究发现,UV处理使得津田茺菁 *CHI* 基因的表达量和花青素的含量增加。本试验发现,3种胁迫处理后 *CHI* 基因表达量的增加与黄酮含量升高在一定时间段呈正相关,这与朱灿灿等^[31]在银杏黄酮研究中的结果类似。3种胁迫处理下 *F3H* 基因在苦荞各组织中的含量随时间变化均很显著,表明苦荞 *F3H* 基因积极响应胁迫刺激。UV-B胁迫下苦荞各组织中 *F3H* 基因表达量与处理时间存在相关性,这与许志茹等^[32]利用UV处理津田茺菁时 *BrF3H* 基因的表达模式相似。*F3H* 基因突变后拟南芥植株黄酮的表达量减少、对盐的抗性减弱;烟草中过量表达 *CsF3H* 基因能提高其对盐的耐受能力,表明 *F3H* 基因可能参与了盐胁迫的调控网络^[33-34]。黄酮醇合成酶基因 *FLS* 是黄酮类化合物合成通路中的重要基因,直接决定着苦荞黄酮类化合物的积累量。Stracke等^[35]研究发现,拟南芥 *fls1* 突变株中黄酮含量急剧下降,花青素含量大量积累。Kim等^[36]在用UV-B处理大豆时发现, *GmFLS* 表达量增加,黄酮含量增加。Li等^[37]用NaCl处理北海T8和北海T10,结果显示黄酮醇合成酶基因 *FLS1* 和 *FLS* 的表达量分别下调和上调。Ferreira等^[38]用UV-B处理玉米B73植株,发现 *ZmFLS1* mRNA受UV-B强烈诱导,其含量增加了20倍。李伟等^[39]研究发现,PEG处理小麦根部能上调 *TaFLS1* 表达量,推测其与小麦抗逆性相关。黄酮类化合物的合成途径中 *F3H*、*FLS* 和 *FLS1* 均属于催化形成黄酮类化合物特异性代谢下游关键酶基因,逆境胁迫下这3种基因与黄酮含量均出现相应变化,表明花期苦荞黄酮含量的变化与其表达水平有着直接关系。因此,不同器官中响应胁迫的主要基因不尽相同,其表现形式也各有差异。

本研究发现,NaCl胁迫12h后 *CHI*、*F3H*、*FLS*、*FLS1* 基因的mRNA在叶、花中表达量均显著增加,且叶中总黄酮含量最高;PEG-6000胁迫根中 *F3H*、*FLS1* 基因12h后、茎中 *FLS1*、*CHI* 基因24h后、叶中 *CHI*、*F3H*、*FLS1* 基因24h后、花中 *CHI*、*F3H*、*FLS1* 基因12~24h后表达量均显著上调,并导致花期苦荞根、茎、叶及花中的总黄酮含量均显著升高;UV-B胁迫24h后叶中 *CHI*、*FLS1* 基因表达量上调,且花期苦荞根、茎、叶中的总黄酮含量均显著增加,这可能是黄酮合成途径中其他基因表达发生变化所致。*CHI*、*F3H*、*FLS*、*FLS1* 基因可能是花期苦荞黄酮合成途径中响应这3种逆境胁迫的关键酶基因,尽管它们在表达模式上存在差异,即根中 *F3H*、*FLS1*、茎、叶、花中 *CHI*、*F3H*、*FLS*、*FLS1* 基因分别起主要作用。本研究发现,

PEG-6000处理12h后,叶中总黄酮含量与所检测的4个相关基因表达量不一致,根、茎中相关基因表达量明显提高,而总黄酮含量增加较少。其原因可能是花期苦荞根、茎向叶中输送黄酮类化合物合成前体,且输送通道中存在的相关黄酮合成酶,在输送过程中完成黄酮类化合物的合成,从而引起叶中总黄酮含量的增加。PEG-6000处理24h后,苦荞叶中基因表达量有所提高,且根、茎中总黄酮含量显著增加。可能是根、茎向叶中输送的前体减少,诱导了叶中相关基因的表达,以维持一定的总黄酮含量来抵抗或耐受逆境。综上所述,逆境胁迫下黄酮合成关键酶基因与黄酮合成的关系较为复杂,进一步研究代谢途径中所有酶基因及其产物含量才能更好地阐明这一问题。

4 结论

花期苦荞在盐(NaCl)、干旱(PEG-6000)及UV-B胁迫处理后,根、茎、叶、花中的总黄酮含量均有不同程度的升高,且花期总黄酮主要集中在叶和花中,说明适当的胁迫处理有利于花期,尤其是在叶、花中迅速大量积累黄酮类化合物。利用Real-time PCR对黄酮合成相关酶基因的表达进行检测,发现在上述逆境胁迫下 *CHI*、*F3H*、*FLS* 及 *FLS1* 基因的mRNA量在茎、叶、花中的变化与总黄酮含量变化趋势相一致,推测 *CHI*、*F3H*、*FLS*、*FLS1* 基因可能在苦荞的花期对这3种逆境胁迫的响应中起重要作用,进一步验证后可通过生物工程手段运用于抗逆及高黄酮合成特性苦荞新品种的培育和研发。

参考文献:

- [1] 张玉金,叶俊,张智勇,智宇航. 苦荞育种现状与探讨[J]. 内蒙古农业科技, 2008, (3): 90-91
- [2] 侯野敏子,孙小军,徐正进. 世界荞麦研究动向[J]. 世界农业, 1992, (1): 25-26
- [3] 周萌,李明,丁新华,李晓明,储昭辉. 不同番茄品种中类黄酮和咖啡酰奎尼酸含量测定及与抗氧化能力相关分析[J]. 核农学报, 2014, 28(4): 662-669
- [4] Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 572-584
- [5] Bradshaw H, Schemske D W. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers[J]. Nature, 2003, 426(6963): 176-178
- [6] Atmani D, Chaher N, Atmani D, Berboucha M, Debbache N, Boudaoud H. Flavonoids in human health: from structure to biological activity[J]. Current Nutrition & Food Science, 2009, 5

- (4): 225 – 237
- [7] Hertog M G L, Hollman P C H, Katan M B, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study [J]. *The Lancet*, 1993, 342(8878): 1007 – 1011
- [8] Lister C, Lancaster J, Walker J. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 71(3): 313 – 320
- [9] Kim S, Jones R, Yoo K S, Pike L M. Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(4): 411 – 419
- [10] Reuber S, Jende-Strid B, Wray V, Weissenböck G. Accumulation of the chalcone isosalipurposide in primary leaves of barley flavonoid mutants indicates a defective chalcone isomerase [J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 101(4): 827 – 832
- [11] Britsch L. Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1990, 282(1): 152 – 160
- [12] Britsch L, Dedio J, Saedler H, Forkmann G. Molecular characterization of flavanone 3 beta-hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 217(2): 745 – 754
- [13] Pelletier M K, Winkel-Shirley B. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(1): 339 – 345
- [14] 安守强. 栽培环境对荞麦黄酮含量的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007
- [15] 唐宇, 赵钢. 荞麦中黄酮含量的研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2001, 19(4): 352 – 354
- [16] Liu B, Zhu Y. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids [J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78(2): 584 – 587
- [17] Kreft S, Štrukelj B, Gaerscik A, Kreft I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(375): 1801 – 1804
- [18] 杨雄榜. 不同胁迫对生长期苦荞黄酮积累及其合成相关酶基因表达的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012
- [19] 王鹏姬, 高金锋, 苏旺, 高小丽, 王鹏科, 冯佰利. 培养条件对荞麦愈伤组织生长及黄酮合成的影响 [J]. *核农学报*, 2013, 27(5): 591 – 597
- [20] 罗庆林, 邵继荣, 胡建平, 柏大全. 荞麦中类黄酮的研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2008, 25(2): 160 – 164
- [21] Li J, Ou-Lee T M, Raba R, Amundson R G, Last R L. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation [J]. *The Plant Cell Online*, 1993, 5(2): 171 – 179
- [22] Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(389): 1977 – 1984
- [23] Lim J H, Papk K J, Kim B K, Jeong J W, Kim H J. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1065 – 1070
- [24] 秦玉芝. 拟南芥 CIPK14 和 EGY1 基因作用于胁迫应答和光反应中的生化分析 [D]. 长沙: 湖南大学, 2008
- [25] 蔡娜, 淡荣, 陈鹏. 水分胁迫对苦荞幼苗黄酮类物质含量的影响 [J]. *西北农业学报*, 2008, 17(4): 91 – 93
- [26] Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y. Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves [J]. *Plant Science*, 2005, 168(5): 1303 – 1307
- [27] 王龙飞. UV-B 辐射及干旱胁迫对三种胡枝子叶片光合特性及花青素含量的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013
- [28] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1085 – 1097
- [29] Muir S R, Collins G J, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric-De-Vos C H, van-Tunen A J, Verhoeven M E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 470 – 474
- [30] Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S. Ultraviolet a-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(7): 1771 – 1781
- [31] 朱灿灿, 曹福亮, 汪贵斌, 耿国民. 干旱胁迫下银杏叶黄酮含量与黄酮类代谢关键酶基因表达之间的关系 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(增刊): 2610
- [32] 许志茹, 崔国新, 李春雷, 孙燕, 李玉花. 茺菁黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆、序列分析及表达 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6(4): 787 – 792
- [33] 孙鹏. 拟南芥黄烷酮-3-羟化酶调控非生物胁迫抗性机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014
- [34] Mahajan M, Yadav S K. Overexpression of a tea flavanone 3-hydroxylase gene confers tolerance to salt stress and *Alternaria solani* in transgenic tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 85(6): 551 – 573
- [35] Stracke R, De Vos R C, Bartelniewoehner L, Ishihara H, Sagasser M, Martens S, Weishaar B. Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the in vivo involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase [J]. *Planta*, 2009, 229(2): 427 – 445
- [36] Kim Y B, Kim K, Kim Y, Tuan P A, Kim H H, Cho J, Park S U. Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *Scutellaria baicalensis* [J]. *Scientific World Journal*, 2014, 2014(14): 980740 – 980746
- [37] Li X H, Kim Y B, Kim Y B, Kima Y, Zhao S C, Kim H H, Chung E, Lee J H, Park S U. Differential stress-response expression of two flavonol synthase genes and accumulation of flavonols in tartary buckwheat [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(18): 1630 – 1636
- [38] Ferreyra M L F, 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 [J]. The Plant Journal, 2010, 62(1): 77-91

[39] 李伟. 小麦类黄酮合成途径基因 *TaFLS1* 与 *TaANS1* 的逆境应答机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2011

Effect of Environmental Stresses on the Contents of Total Flavonoids and Corresponding Gene Expression in *Fagopyrum tataricum* During Florescence

HOU Lingli¹ YANG Xiongbang¹ DONG Xueni¹ DING Mengqi¹ ZHU Xuemei² SHAO Jirong¹

(¹ College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014;

² College of Resources and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130)

Abstract: In order to investigate the influence of environmental stress on flavonoid metabolism and the molecular mechanisms underlying this response, the effects of salt (NaCl), drought (PEG-6000), and UV-B radiation on the contents of total flavonoids during florescence of *Fagopyrum tataricum* (Chuanqiao No. 3) were examined. Treatments with all the three stress resulted in an increase in the total amount of flavonoids in roots, stems, leaves, and flowers by different degrees. Under NaCl and PEG-6000 treatments, the total flavonoids in all of these tissues were increased, while the highest value reached 160.0 mg·g⁻¹ in leaves at 12 hours in NaCl stress. Besides, the leaves and flowers were more stress-sensitive than other tissues by PEG-6000 treatment. The total contents of flavonoids were also increased in roots, stems and leaves by UV-B stress and it went up to the highest level in leaves, while decreased evidently in flowers. Further study by real-time PCR revealed that changes in gene expression of *CHI*, *F3H*, *FLS* and *FLS1* were consistent with that of the total flavonoids, suggesting these genes might play an important role in the adaptation of *Fagopyrum tataricum* to environmental stresses during florescence. Our results will provide new clues for tartary buckwheat breeding through transgenesis and have great potential for agricultural applications.

Keywords: *Fagopyrum tataricum*, total flavonoids content, florescence, stress, gene expression