

植物类黄酮物质合成中的氮素调控

范凯^{1,2}, 胡双¹, 范冬梅¹, 汪瑛琦¹, 陆娅婷¹, 王校常^{1,*}

¹浙江大学茶叶研究所, 杭州310058; ²中国科学院南京土壤所, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京210008

摘要: 类黄酮是一类广泛存在于植物中的次生代谢产物, 类黄酮物质的积累是由编码类黄酮物质的结构基因在转录因子或miRNA的调控下协同完成。氮素作为植物重要的营养元素可以影响类黄酮物质的合成。本文综述了氮素(含量/形态)对不同植物类黄酮物质合成的结构基因, 调控因子及物质积累的影响, 阐述了其可能的分子机制, 为今后利用氮素调控植物的类黄酮物质合成提供理论基础。

关键词: 类黄酮; 氮素; 结构基因; 转录因子; microRNA

类黄酮(flavonoids)化合物是植物重要的一类次生代谢产物, 在生物体内发挥着重要作用。根据其结构的差异可以分为: 查尔酮(chalcones)、黄酮(flavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷双醇(flavandiol)、花色苷 anthocyanins)、缩合单宁(condensed tannins)及异黄酮(isoflavone)等(Winkel-Shirley 2001)。类黄酮物质对于植物具有重要的生理意义, 它能够保护植物抵御紫外线和病原菌侵入(Julkunen-Tiitto 等2015; Margaria等2014), 是植物花、果实、种子颜色的主要显色物质(Iwashina 2015), 在植物和细菌相互作用中作为信号分子(Jain和Nainawatee 2002), 调节植物生长素的运输(Rusak等2010)等。另外, 类黄酮物质对于人体健康也有重要影响, 具有抗菌、消炎、抗氧化、防癌的功效, 对治疗高血压、防治心血管病也起重要作用(Duthie等2000)。因此, 如何提高类黄酮的生物合成成为研究的热点。

氮素作为植物最重要的营养元素之一, 对植物的生长发育起重要作用, 是叶绿素的主要成分之一, 也是蛋白质、核酸等重要生命物质的构成元素。另外, 氮素还直接或间接地影响氨基酸、生物碱等次生代谢产物的合成。大量研究表明, 氮素可以影响植物类黄酮物质的合成。本文对氮素影响植物类黄酮物质的合成研究进行了综述, 探讨其可能的分子机制, 为今后氮素调控类黄酮物质提供理论基础。

1 氮素对类黄酮合成相关结构基因的影响

在植物的次生代谢中, 类黄酮的生物合成途径是目前研究最为深入的次生代谢途径, 主要涉及莽草酸途径、苯丙烷类代谢途径及类黄酮代谢途径(图1)。相对而言, 苯丙烷类代谢和类黄酮代谢途径的相关基因在物种间更为保守。苯丙烷类

代谢途径主要包括苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)、肉桂酸4-羟化酶(cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)等酶, 在这些酶的作用下, 苯丙氨酸被催化成4-香豆酰-CoA (4-coumaroyl-CoA)。苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸的脱氨反应, 是苯丙烷代谢的关键酶。苯丙烷代谢途径产生的香豆酰CoA和丙二酰CoA (methylmalonyl-CoA), 在查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)作用下, 形成黄色的查尔酮(chalcone)。在查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的催化下, 形成无色的黄烷酮。黄烷酮在黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮3'-羟化酶(flavonoid 3' hydroxylase, F3'H)和类黄酮3'5'-羟化酶(flavonoid 3'5' hydroxylase, F3'5'H)的作用下, 可以形成各种二氢黄酮醇(dihydroflavonol)。二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)可以催化二氢黄酮醇形成相应的无色花青素, 再经过花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)的催化, 形成花青素。对豆科植物羽扇豆的研究发现, *DFR*基因的表达随氮素含量的提高呈现先上升后下降, 之后又回升的趋势, 表明氮素可以调控*DFR*基因的表达(王俊宏2010)。

随着基因组学技术的发展, 大量研究表明氮素可以在转录水平上影响上述编码基因的表达(表1)。拟南芥作为模式作物, 研究相对较多。

在拟南芥中, 缺氮提高了叶片中*PAL1*和*PAL2*

收稿 2016-04-13

资助 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金(08122-01215)和联合利华(中国)有限公司委托开发项目(H2015-1653)。

* 通讯作者(E-mail: xcwang@zju.edu.cn)。

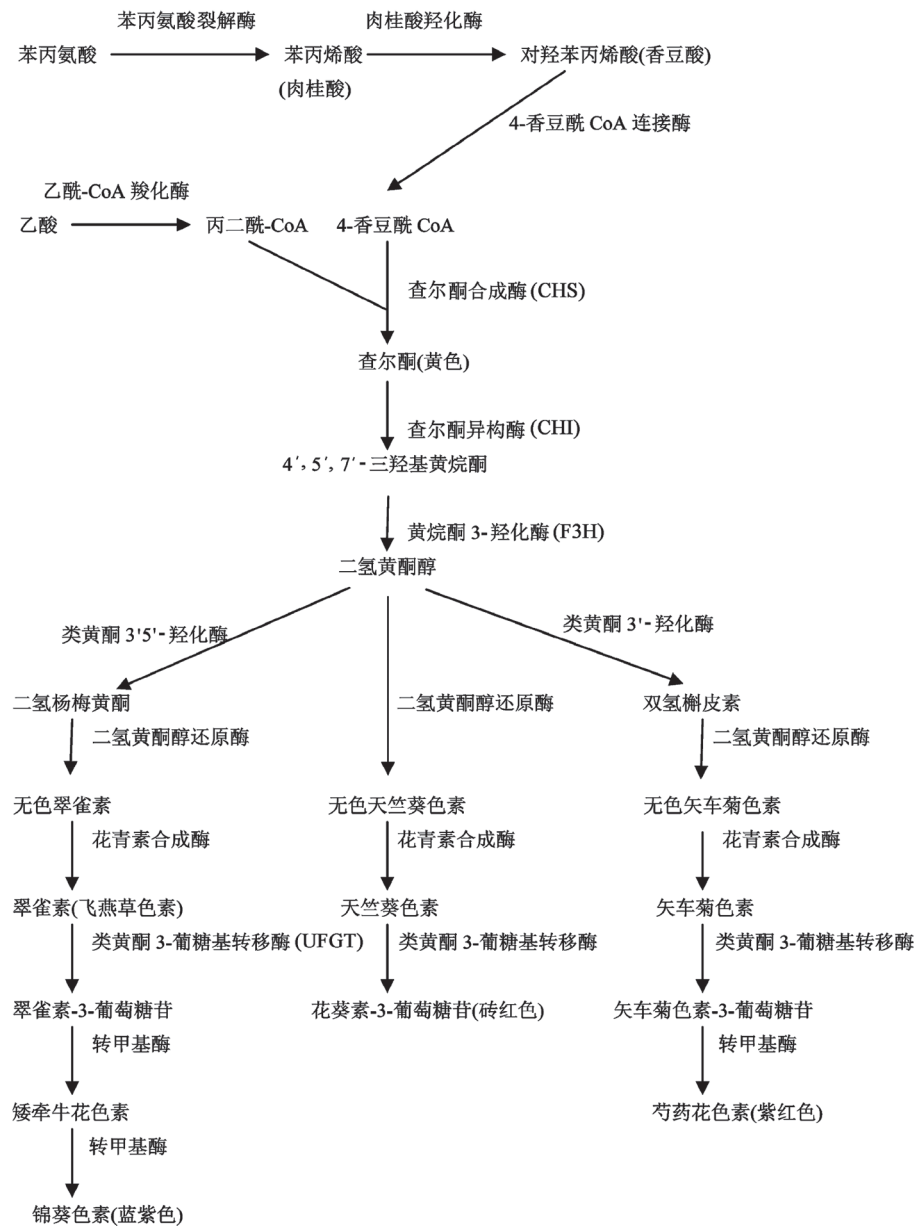


图1 植物类黄酮物质的生物合成途径

Fig.1 Biosynthetic pathway of flavonoid in plants

引自刘仕芸等(2006)文献。

基因的表达, 可达2倍, 叶片中黄酮、山奈酚类 (kaempferol)、槲皮素 (quercetin) 的含量分别提高了2、5和6倍 (Olsen等2008)。Peng等(2007)对野生型拟南芥缺氮处理25 d后, 转录组测序结果表明, 在类黄酮合成途径上游基因变化相对较小, *PAL*和*CHS*的变化均小于10倍, *CHI*和*F3H*基因变化分别为18和22倍, 而下游基因变化较为显著, *DFR*和*ANS*上调可达30倍以上。Krapp等(2011)对拟南芥进行了不同缺氮时间(2和10 d)的研究, 结果显示,

*CHS*和*DFR*基因表达在不同缺氮处理时间里显著变化。其中*CHS*基因在地上部的表达上调0.29倍和2.51倍, 而*DFR*基因可达1.11和4.21倍, 并且地上部和地下部的表达也有明显差异。在拟南芥突 *tt7* 突变体中过表达苹果的*F3'H*基因, 可以在缺氮条件下恢复紫色, 显著提高4'-羟化天竺葵素(4'-hydroxylated pelargonidin)和3',4'-羟化矢车菊素(3',4'-hydroxylated cyanidin)含量, 表明氮素可以调控*F3'H*基因表达 (Han等2010)。

表1 缺氮对植物类黄酮物质合成结构基因表达的影响

Table 1 Influence of nitrogen deficiency on expression of flavonoid biosynthesis related gene

基因	物种	处理	上升倍数	参考文献
<i>PAL</i>	拟南芥	缺氮+低温	2.0	Olsen等2008
		缺氮25 d	9.0	Peng等2007
	葡萄	着色期缺氮49 d	2.1	Soubeyrand等2014
		海棠花	离体叶片缺氮	22.3
<i>C4H</i>	拟南芥	缺氮25 d	5.4	Peng等2007
<i>4CL</i>	拟南芥	缺氮25 d	9.5	Peng等2007
<i>CHS</i>	拟南芥	缺氮25 d	7.6	Peng等2007
		缺氮10 d	2.5	Krapp等2011
	海棠花	离体叶片缺氮	36.2	高艳2014
		葡萄	着色期缺氮49 d	1.5
<i>CHI</i>	拟南芥	缺氮25 d	17.4	Peng等2007
<i>F3H</i>	拟南芥	缺氮25 d	22.6	Peng等2007
	葡萄	着色期缺氮49 d	1.7	Soubeyrand等2014
<i>F3'5'H</i>	葡萄	着色期缺氮49 d	1.7	Soubeyrand等2014
<i>DFR</i>	拟南芥	缺氮25 d	31.1	Peng等2007
	拟南芥	缺氮10d	4.2	Krapp等2011
	葡萄	着色期缺氮49 d	1.6	Soubeyrand等2014
	油菜	缺氮12 d	70.0	Koeslin等2015
<i>ANS</i>	海棠花	离体叶片缺氮	33.3	高艳2014
	拟南芥	缺氮25 d	49.2	Peng等2007
	油菜	缺氮12 d	100.0	Koeslin等2015
	海棠花	离体叶片缺氮	63.1	高艳2014

除拟南芥外,研究者对一些经济作物也进行了研究。在葡萄中,缺氮显著提高了果实*PAL2*、*CHS*、*F3H*、*F3'5'H*及*DFR*基因的表达,并且随果实的发育逐渐增强(Soubeyrand等2014)。在油菜中的研究表明,缺氮可以增强*ANS*和*DFR*基因的表达,上调可达数十倍,并且不同品种中的表现不同(Koeslin等2015)。对番茄的研究发现,缺氮显著提高了叶片中*PAL5*、*CHS2*、*F3'H*和*F3'5'H*等基因的表达(Lovdal等2010)。

由此可见,缺氮提高了大多数植物中类黄酮合成相关结构基因的表达,但不同作物、品种和部位各基因的变化趋势并不一致。*CHS*和*DFR*基因在氮素处理中变化显著,可能在氮素调控类黄酮合成过程中发挥重要作用。

2 氮素对类黄酮合成相关调控基因的影响

2.1 氮素调控类黄酮合成相关转录因子

在植物细胞中,在转录水平对生物合成途径进行调控是调节次生代谢产物的主要机制,转录因子在其中发挥重要作用(乔小燕等2009;王华等2105)。目前,应用转座子标检、T-DNA激活标签或图位克

隆等方法分离和克隆了许多转录因子,它们通过与结构基因启动子中含有的能被其识别的顺式作用元件结合,从而激活类黄酮生物合成途径中多个基因的表达,有效地启动类黄酮生物合成途径(沈忠伟等2008)。其中R2R3-MYB、bHLH和WD40途径研究的最为详尽(杨鹏程等2012;闵远琴等2010)。这些转录因子也同样受到氮素的调控。

MYB转录因子在N端具有保守的MYB结构域,根据含有结构域的个数,一般分为3种:R2R3-MYB、R1R2-MYB和MYB相关蛋白。拟南芥MYB转录因子PRODUCTION OF ANTHOYANIN PIGMENT1 (*PAP1/MYB75*)是类黄酮合成途径中*CHS*、*DFR*和*GST*的调控因子。*PAP1*及其同源基因*PAP2/MYB90*在缺氮或磷的条件下显著上调,并且添加 NO_3^- 以后迅速下调(Scheible等2004)。对野生型拟南芥叶片R3-MYBs (*CPC*、*TRY*、*ETC1*、*ETC2*、*ETC3/CPL3*、*TCL1*、*MYBL2*)转录因子在缺氮条件下的研究显示,*CPC*在缺氮条件下上调2倍;而*ETC3/CPL3*的表达上调近9倍,但*ETC3/CPL3*的敲除并不影响花青素的合成;这表明*CPC*可能在缺

氮调控花青素途径中起主要作用(Nemie-Feyissa等2014)。在野生型和过表达*PAP1*的植株中,缺氮提高了*PAP1*和*PAP2*的表达,并且*PAP2*上调更为明显,可达200倍。*MYB12*在缺氮条件下也有轻微上调。至少3种不同的*bHLH*转录因子可以调控花青素合成(Lea等2007)。对拟南芥原生质体的研究表明,在较低的铵含量和总氮含量条件下,*PAP1*、*TT8*和合成途径主要基因表达增加,表明氮素调控花青素合成途径主要通过调控*TTG1-GL3/TT8-PAP1*复合体等基因的表达(Zhou等2012)。Miyake等(2003)克隆了豆科植物百脉根*R2R3-MYB*中的*MYB101*、*MYB102*和*MYB103*,而其中*MYB101*在缺氮条件下表达与*CHS*相同,表明*LjMYB101*可能参与缺氮条件下类黄酮物质的调控。对海棠花离体叶片的研究发现,*R2R3-MYB*型转录因子*MsMYB10*在低氮条件下表达量明显升高,且表达变化与其它结构基因有较高的相似性,表明*MYB10*在低氮调控类黄酮物质合成途径中起重要作用(高艳2014)。

*bHLH*是另一类重要的转录因子,其结构域大约有60个氨基酸组成。*EGL3*和同源基因*GL3*属于*bHLH*,缺氮处理显著提高*GL3*表达,促进了野生型和突变体*egl3*花青素的合成,但没有增加突变体*gl3*花青素的积累,表明是*GL3*,而不是*EGL3*,在缺氮调控花青素的合成中起作用(Feyissa等2009)。Lea等(2007)的研究也表明在低氮胁迫下,*GL3*表达上调6倍,是氮素胁迫调控的主要元件。*PIFs*也是一类*bHLH*型转录因子,与野生型相比,低氮下*PIF4*和*PIF5*过表达植株花青素含量积累明显下降,花青素合成基因表达量也明显下降,表明*PIF4*和*PIF5*在低氮诱导花青素积累过程中起负调节作用(刘荣直2013)。

除了*MYB-bHLH-WD40*途径外,研究者还发现了另一些参与氮素调控类黄酮物质合成的转录因子,如*NLA*转录因子。在缺氮条件下,*nla*突变体不能调控花青素合成基因,从而不能合成花青素,但是会表现出提早衰老(Peng等2007)。*LBD*基因家族成员也参与花青素的合成。其中*LBD37*、*38*和*39*在花青素合成中起负调控作用,缺N/ NO_3^- 强烈抑制了过表达植株花青素合成途径中*PAP1*和*PAP2*的表达;相反N/ NO_3^- 正常条件会促进突变体植株中花青素合成基因表达,积累大量的花青素(Rubin等2009)。Soubeyrand等(2014)克隆了葡萄*LBD39*转录因子,发现其在缺氮条件下表达下调,花青素含

量提高,表明*LBD39*在氮素调控花青素合成中起抑制作用。

2.2 新的调控基因——miRNA

miRNA (microRNAs)是一类由发夹结构前体加工而成的长约21个碱基,能够对靶基因进行剪切或翻译抑制,从而起调控作用的非编码RNA。大量研究表明miRNA在植物适应各种环境胁迫中发挥重要的作用,如干旱、盐、低温和高温、UV胁迫等(朱全武等2013)。

近年来,有研究表明miRNA可参与植物花青素的调控。其中*TAS4-siRNA81*可以调控花青素合成途径中一系列MYB转录因子如*PAP1*、*PAP2*和*MYB113* (Luo等2012)。在拟南芥中过表达*miR828*,抑制了花青素合成途径中的*MYB75*、*MYB90*和*MYB113*的表达,及花青素合成中结构基因的表达,从而显著降低了花青素含量(Yang等2013)。拟南芥*miR828*缺失突变体中花青素合成增多,而过表达植株花青素含量减少,表明*miR828*负调控花青素的合成(谢焯等2013)。在番茄中,*miR828*可以调控*MYB7-like*,过表达*miR828*抑制了番茄花青素合成相关基因的表达,从而降低了花青素含量,并且受缺磷胁迫的诱导(贾小云等2015)。通过生物信息学预测的方法,研究丹参MYB转录因子,结果发现丹参的MYB转录因子可以被*miR159*、*miR319*、*miR828*和*miR858*等调控(Li和Lu 2014)。在甘薯中过表达*miR828*可以影响叶片木质素的含量(Lin等2012)。

另外一个与花青素合成相关的miRNA为*miR156*,*miR156*在植物界中高度保守,其靶基因是类被称作*SPL* (squamosa promoter binding protein-LIKE)的转录因子。大量研究表明*miR156*可以调控植物的开花、果实的成熟、植株分蘖、表皮毛的产生等各个方面(虞莎和王佳伟2014)。近年来,研究发现*miR156*还可以参与调控拟南芥花青素的合成。Gou等(2011)的研究表明,拟南芥*miR156*负调控其靶基因*SPL9*,*SPL9*通过与*PAP1*蛋白相互作用,影响了*MYB-bHLH-WD40*复合体的转录激活活性,从而抑制花青素合成基因*ANS*和*DFR*等的表达。在茎基部,*SPL*的表达量较低,花青素合成活跃,而在茎的顶端由于*SPL*高度积累,导致花青素积累受阻。Cui等(2014)研究结果也表明在不同逆境条件下(干旱、盐)*miR156*可以调控*SPL9*转录因子,从而调控*PAP1*和*DFR*基因表达,控制花青素的合成。

3 氮素对植物类黄酮物质含量的影响

氮素通过影响相关结构基因与调控基因的表达来调控植物类黄酮物质的积累。总的来说,低氮促进了类黄酮物质的积累,而高氮则抑制相应的合成。但在不同植物(品种)和不同种类的类黄酮物质变化并不相同。缺氮2 d处理的拟南芥幼苗含有更多的芦丁等类黄酮物质,当添加 NO_3^- 后,这些物质的含量又会显著下降(Scheible等2004)。在番茄中,低氮胁迫增加了根、茎和叶中羟化肉桂酸酯、黄酮和花青素的含量,降低了相对应的酚胺含量(Larbat等2014)。小白菜叶片中类黄酮和总酚的含量与施氮水平呈负相关,施氮量提高,其含量下降(朱伟锋 2008)。Kovacik和Klejdus (2014)对洋甘菊的研究表明,缺氮显著提高了叶片和根中黄酮的含量,而抑制了黄酮苷和黄酮醇的含量。在葡萄中,低氮显著增加了果实花青素的含量,其中对飞燕草色素和牵牛花色素衍生物影响最大,持续的低氮胁迫可以引起黄酮苷含量的累积增加(Soubeyrand等2014)。刘伟(2010)对菊花的研究表明,缺氮对菊花叶片和头状花序中肉桂酸无影响,但可提高花序中香豆酸的含量;全生育期缺氮可以提高叶片中苯丙氨酸的含量,生殖期缺氮可在提高头状花序中含量。大量施氮显著降低了杭白菊中黄酮类物质的总量和绿原酸的含量(Liu等2010)。大量施氮降低了苹果叶片中类黄酮物质的含量,但不同品种中表现不同(Strissel等2005)。增加氮肥量不利于叶用芥菜总酚含量的提高,槲皮素和山奈黄素在不同品种中的含量变化并不一致(李娟2005)。

不同的氮素形态同样可以影响植物类黄酮物质的含量。氮素形态对芥麦芦丁和黄酮含量的影响具有时空效应,硝态-铵态氮(硝酸铵)处理下整个植株的芦丁和黄酮产量最高(臧小云2006)。吕万祥和惠竹梅(2012)对酿酒葡萄‘赤霞珠’的研究表明,硝态氮和铵态氮混合配施处理的葡萄总酚、总花色苷、类黄酮、单宁含量均高于全硝、全铵供应处理,其中以硝铵比为75:25和50:50处理较高。杭白菊的根、茎、叶及花中总黄酮的含量在铵硝比为25:75和0:100时均较高,绿原酸和3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸的含量在铵硝比为25:75时达到最大(张朋等2014a, b)。铵态氮可以显著促进洋甘菊绿原酸的积累,增强酚酸物质代谢(Kovacik和Klejdus 2014)。对于芸苔属植物,纯铵态氮导致类黄酮类

物质含量的下降(Falovo等2011)。Cui等(2010)研究了不同铵硝比对贯叶连翘不定根培养次级代谢产物的影响,结果发现,培养基铵硝比为5:25可以产生最优的总酚和类黄酮物质。

4 氮素对茶树类黄酮物质合成的影响

作为一种重要的经济作物,茶树与大多数作物对氮的需求不同,是典型的喜铵作物。茶叶含有大量的次生代谢产物如茶多酚,含量高达鲜叶干重的18%~36%,其中儿茶素约占茶多酚总量的70%,其含量或者合成明显受到氮素的调控。

Ruan等(2010)研究了不同氮素水平对水培茶树碳氮代谢的影响,结果表明高的施氮量显著降低了茶树新梢中的总酚含量,提高了游离氨基酸含量。在大田试验中,同样也发现随施氮量的增加,茶多酚的含量有所下降(苏有健等2011;颜明娟等2014)。杨亦扬等(2013)研究发现,氮素水平显著影响儿茶素的含量,较高的施氮量降低儿茶素的含量,并且在夜间更为明显。氮素形态对茶树的类黄酮物质的含量也有显著影响。Ruan等(2007)通过在温室水培茶树的研究结果表明,在pH为5和6的条件下,供 NO_3^- 的总酚及儿茶素含量均高于供 NH_4^+ 和混合态氮。刘秀敏(2009)在大田施用的研究表明,不同季节茶多酚对氮素形态响应不同,在春茶中,硝态氮处理的茶多酚含量最高,而夏茶则是铵态氮处理最高。杜旭华(2009)对盆栽茶树的研究表明,纯硝处理的茶多酚含量较高,随铵态氮比例的增加,茶多酚含量有下降的趋势。虽然在茶树中也克隆了大量类黄酮合成相关的基因,但氮素对其基因的影响却鲜见研究。本课题组通过前期实验发现,硝态氮处理的茶树新梢儿茶素总量较高,铵态氮处理的儿茶素含量下降,类黄酮合成相关基因表达显著上调,而其中miR156发挥了重要作用(数据未发表)。

5 展望

植物类黄酮物质的合成涉及多条代谢途径,受到多种结构基因和调控基因的控制。氮素作为植物必需的大量元素,影响类黄酮物质的合成。研究类黄酮物质合成途径的结构基因和调控基因,可以从分子水平上揭示氮素调控类黄酮合成的机制,还可为今后氮素施用,遗传改良提供理论依据。目前,通过高通量测序,基因克隆技术在茶树中鉴定了大量类黄酮相关的调控基因,通过不同

措施调控这些基因的表达可以激活代谢支路中多个基因的协同表达,从而调控茶树类黄酮物质的合成。

参考文献

- Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX (2014). The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J*, 80: 1108–1117
- Cui XH, Murthy HN, Wu CH, Paek KY (2010). Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 46: 437–444
- Du XH (2009). Research on the effect of nitrogen form on growth physiology and nitrogen absorption-utilization in four tea varieties (*Camellia sinensis* L.) [PhD thesis]. Nanjing: Nanjing Forestry University (in Chinese with English abstract) [杜旭华(2009). 氮素形态对茶树生长及氮素吸收利用的影响[博士学位论文]. 南京: 南京林业大学]
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, 13: 79–106
- Fallico C, Schreiner M, Schwarz D, Colla G, Krumbein A (2011). Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy *Brassica* species. *J Agr Food Chem*, 59: 4198–4207
- Feyissa DN, Lovdal T, Olsen KM, Slimestad R, Lillo C (2009). The endogenous *GL3*, but not *EGL3*, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves. *Planta*, 230: 747–754
- Gao Y (2014). Ammonium-stress enhances biosynthesis of anthocyanin in apple (*Malus spectabilis*) [Master's thesis]. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [高艳(2014). 低氮胁迫诱导海棠花花青素积累及其基因与代谢分析[硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Gou JY, Felippes FF, Liu CJ, Weigel D, Wang JW (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell*, 23: 1512–1522
- Han YP, Vimolmangkang S, Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Zheng DM, Lygin AV, Korban SS (2010). Ectopic expression of apple F3'H genes contributes to anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis* tt7 mutant grown under nitrogen stress. *Plant Physiol*, 153: 806–820
- Iwashina T (2015). Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins. *Nat Prod Commun*, 10: 529–544
- Jain V, Nainawatee HS (2002). Plant flavonoids: signals to legume nodulation and soil microorganisms. *J Plant Biochem Biot*, 11: 1–10
- Jia XY, Liu H, Shen J, Li F, Ding N, Sun Y, Gao CY, Li RZ (2015). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in tomato by microRNA828 under phosphate deficiency. *Sci Agric Sin*, 48 (15): 2911–2924 (in Chinese with English abstract) [贾小云, 刘慧, 沈洁, 李芳, 丁娜, 孙岩, 高昌勇, 李润植(2015). MicroRNA828负调控缺磷胁迫诱导的番茄花青素生物合成. 中国农业科学, 48 (15): 2911–2924]
- Julkunen-Tiitto R, Nenadis N, Neugart S, Robson M, Agati G, Vepsalainen J, Zipoli G, Nybakken L, Winkler B, Jansen MAK (2015). Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. *Phytochem Rev*, 14: 273–297
- Koeslin-Findeklee F, Rizi VS, Becker MA, Parra-Londono S, Arif M, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Kunze R, Horst WJ (2015). Transcriptomic analysis of nitrogen starvation- and cultivar-specific leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Sci*, 233: 174–185
- Kovacik J, Klejdus B (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food Chem*, 142: 334–341
- Krapp A, Berthome R, Orsel M, Mercey-Boutet S, Yu A, Castaignes L, Elftieh S, Major H, Renou JP, Daniel-Vedele F (2011). *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant Physiol*, 157: 1255–1282
- Larbat R, Paris C, Le Bot J, Adamowicz S (2014). Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Sci*, 224: 62–73
- Lea US, Slimestad R, Smedvig P, Lillo C (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225: 1245–1253
- Li CL, Lu SF (2014). Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC genomics*: 15
- Li J (2005). Physiological mechanisms of nutritional quality and antioxidant activity influenced by nitrogen, sulphur and selenium application in leaf mustard (*Brassica juncea* Coss.) [PhD thesis]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [李娟(2005). 氮硫硒影响叶用芥菜品质及抗氧化能力的生理机制研究[博士学位论文]. 杭州: 浙江大学]
- Lin JS, Lin CC, Lin HH, Chen YC, Jeng ST (2012). MicroR828 regulates lignin and H₂O₂ accumulation in sweet potato on wounding. *New Phytol*, 196: 427–440
- Liu RZ (2013). The influence of light signal and GAs on anthocyanins accumulation induced by low nitrogen in *Arabidopsis* [Master's thesis]. Lanzhou: Lanzhou University (in Chinese with English abstract) [刘荣直(2013). 光信号和GAs在低氮诱导的拟南芥花青素积累中的作用[硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学]
- Liu SY, Huang YL, Zhang SZ (2006). Regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in plant. *Plant Physiol Commun*, 42 (4): 747–754 (in Chinese with English abstract) [刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍(2006). 植物花青素生物合成中的调控基因. 植物生理学通讯, 42 (4): 747–754]
- Liu W (2010). Effect of nitrogen, phosphorus and potassium deficiency in different growth stages on the second synthesis pathway of flavonoid in *Chrysanthemum morifolium* Ramat [PhD thesis]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘伟(2010). 不同生育期氮磷钾胁迫对菊花黄酮类化合物的代谢调控研究[博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学]

- Liu W, Zhu DW, Liu DH, Geng MJ, Zhou WB, Mi WJ, Yang TW, Hamilton D (2010). Influence of nitrogen on the primary and secondary metabolism and synthesis of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *J Plant Nutr*, 33: 240–254
- Liu XM (2009). Effects of nitrogen forms on the physiological characteristics of tea plant and tea leaf quality [Master's thesis]. Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [刘秀敏(2009). 氮素形态对茶树生理特性和茶叶品质的影响[硕士论文]. 郑州: 河南农业大学]
- Lovdal T, Olsen KM, Slimestad R, Verheul M, Lillo C (2010). Synergistic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71, 605–613
- Luo QJ, Mittal A, Jia F, Rock CD (2012). An autoregulatory feedback loop involving PAPI and TAS4 in response to sugars in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 80: 117–129
- Lv WX, Hui ZM (2012). Effect of nitrogen forms on quality of 'Cabernet Sauvignon' grape. *Northern Hortic*, 14: 5–8 (in Chinese with English abstract) [吕万祥, 惠竹梅(2012). 不同形态氮素对“赤霞珠”葡萄果实品质的影响. 北方园艺, 14: 5–8]
- Margaria P, Ferrandino A, Caciagli P, Kedrina O, Schubert A, Palmano S (2014). Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by flavescence doree phytoplasma. *Plant Cell Environ*, 37: 2183–2200
- Min YQ, Yan HF, Li YH (2010). WD40 proteins of anthocyanin biosynthesis in plant. *Plant Physiol J*, 46 (9): 863–870 (in Chinese with English abstract) [闵远琴, 闫海芳, 李玉花(2010). 花青素合成中的WD40蛋白. 植物生理学报, 46 (9): 863–870]
- Miyake K, Ito T, Senda M, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M, Akada S (2003). Isolation of a subfamily of genes for R2R3-MYB transcription factors showing up-regulated expression under nitrogen nutrient-limited conditions. *Plant Mol Biol*, 53: 237–245
- Nemie-Feyissa D, Olafsdottir SM, Heidari B, Lillo C (2014). Nitrogen depletion and small R3-MYB transcription factors affecting anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Phytochemistry*, 98: 34–40
- Olsen KM, Lea US, Slimestad R, Verheul M, Lillo C (2008). Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *J Plant Physiol*, 165: 1491–1499
- Peng MS, Bi YM, Zhu T, Rothstein SJ (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol Biol*, 65: 775–797
- Qiao XY, Ma CL, Chen L (2009). Plant flavonoid biosynthesis pathway and regulation of its important genes. *Nat Prod Res Dev*, 21 (2): 354–360 (in Chinese with English abstract) [乔小燕, 马春雷, 陈亮(2009). 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控. 天然产物研究与开发, 21 (2): 354–360]
- Ruan J, Haerdtter R, Gerendas J (2010). Impact of nitrogen supply on carbon/nitrogen allocation: a case study on amino acids and catechins in green tea *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze plants. *Plant Biol*, 12: 724–734
- Ruan JY, Gerendas J, Haerdtter R, Sattelmacher B (2007). Effect of root zone pH and form and concentration of nitrogen on accumulation of quality-related components in green tea. *J Agr Food Chem*, 87: 1505–1516
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible W (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3567–3584
- Rusak G, Cerni S, Polancec DS, Ludwig-Muller J (2010). The responsiveness of the IAA2 promoter to IAA and IBA is differentially affected in *Arabidopsis* roots and shoots by flavonoids. *Biol Plant*, 54: 403–414
- Scheible WR, Morcuend R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol*, 136: 2483–2499
- Shen ZW, Xu Y, Xia B, Li JY (2008). Transcription factors involved in plant flavonoid biosynthesis of secondary metabolism and its application in genetic engineering. *Mol Plant Breed*, 6 (3): 542–548 (in Chinese with English abstract) [沈忠伟, 许昱, 夏舜, 李建粤(2008). 植物类黄酮次生代谢物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用. 分子植物育种, 6 (3): 542–548]
- Soubeyrand E, Basteau C, Hilbert G, van Leeuwen C, Delrot S, Gomes E (2014). Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry*, 103: 38–49
- Strissel T, Halbwirth H, Hoyer U, Zistler C, Stich K, Treutter D (2005). Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biolo*, 7: 677–685
- Su YJ, Liao WY, Ding Y, Wang HS, Xia XJ (2011). Effect of nitrogen fertilization on yield and quality of tea. *Plant Nutr Fertilizer Sci*, 17 (6): 1430–1436 (in Chinese with English abstract) [苏有健, 廖万有, 丁勇, 王宏树, 夏先江(2011). 不同氮营养水平对茶叶产量和品质的影响. 植物营养与肥料学报, 17 (6): 1430–1436]
- Wang H, Li MF, Yang Y, Jin WM (2015). Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits. *Plant Physiol J*, 51 (1): 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 杨媛, 金万梅(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. 植物生理学报, 51 (1): 29–43]
- Wang JH (2010). Effects of nitrogen level on tannins in *Chamaecrasta nictitans* and cloning of *DFR* gene [Master's thesis]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [王俊宏(2010). 氮素对羽叶决明单宁含量的影响及DFR基因的克隆[硕士论文]. 福州: 福建农林大学]
- Winkel-Shirley B (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 126: 485–493
- Xie Y, Sun Y, Li DN, Huang JR (2013). MicroRNA828 negatively regulates sucrose-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 49 (2): 188–194 (in Chinese with English abstract) [谢焯, 孙毅, 李淡宁, 黄继荣(2013). 拟南芥MicroR-

- NA828负调控蔗糖诱导的花青素合成. 植物生理学报, 49 (2): 188–194]
- Yan MJ, Ling Q, Wu YQ, Zhang H, Cai SX, Chen ZC (2014). Effects of different nitrogen fertilization treatments on soil condition of tea garden and tea quality. *Ecol and Environ Sci*, 23 (3): 452–456 (in Chinese with English abstract) [颜明娟, 林琼, 吴一群, 张辉, 蔡顺香, 陈子聪(2014). 不同施氮措施对茶叶品质及茶园土壤环境的影响. 生态环境学报, 23 (3): 452–456]
- Yang FX, Cai J, Yang Y, Liu ZB (2013). Overexpression of *microRNA828* reduces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Org*, 115: 159–167
- Yang PC, Zhou B, Li YH (2012). The bHLH transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis in plants. *Plant Physiol J*, 48 (8): 747–758 (in Chinese with English abstract) [杨鹏程, 周波, 李玉花(2012). 植物花青素合成相关的bHLH转录因子. 植物生理学报, 48 (8): 747–758]
- Yang YY, Ma LF, Li XH, Ratcliffe RG, Kruger NJ, Ruan JY (2013). Metabonomic analysis on the effects of different nitrogen application rates and light/dark change on metabolism in tea leaves. *J Tea Sci*, 33 (6): 491–499 (in Chinese with English abstract) [杨亦扬, 马立锋, 黎星辉, R. George Ratcliffe, Nicholas J. Kruger, 阮建云(2013). 氮素水平对茶树新梢叶片代谢谱及其昼夜变化的影响. 茶叶科学, 33 (6): 491–499]
- Yu S, Wang JW (2014). Recent progress in miR156-mediated aging pathway in plants. *Chines Sci Bull*, 59 (15): 1398–1404 (in Chinese with English abstract) [虞莎, 王佳伟(2014). miR156介导的高等植物年龄途径研究进展. 科学通报, 59 (15): 1398–1404]
- Zang XY (2006). Effect of nitrogen nutrition on growth and flavone metabolism in common buckwheat (*F. esculentum* Moench) [Master's thesis]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [臧小云(2006). 氮素营养对荞麦生长及黄酮代谢的影响[硕士论文]. 南京: 南京农业大学]
- Zhang P, Wang KC, Cheng MC, Guo QH, Zhao XM, Li L (2014a). Effects of nitrogen form on growth and quality of *Chrysanthemum morifolium*. *J Chinese Materia Medica*, 39 (17): 3263–3268 (in Chinese with English abstract) [张朋, 王康才, 成明超, 郭庆海, 赵杰, 赵秀梅, 李丽(2014a). 氮素形态对杭白菊生长及品质的影响. 中国中药杂志, 39 (17): 3263–3268]
- Zhang P, Wang KC, Zhao J, Zhao XM, Guo QH, Chen ZX (2014b). Effects of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ N ration on secondary metabolism and disease resistance of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Nutr and Fertilizer Sci*, 20 (6): 1488–1496 (in Chinese with English abstract) [张朋, 王康才, 赵杰, 赵秀梅, 郭庆海, 陈志祥(2014b). 不同铵硝比例对杭白菊次生代谢及抗病性的影响. 植物营养与肥料学报, 20 (6): 1488–1496]
- Zhou LL, Shi MZ, Xie DY (2012). Regulation of anthocyanin biosynthesis by nitrogen in TTG1-GL3/TT8-PAP1-programmed red cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 236: 825–837
- Zhu QW, Fan K, Xie YL, Dong JF, Zhan YW, Luo YP (2013). Progress in plant cold-stress-responsive miRNAs and the application in cold resistance research of *Camellia sinensis*. *J Tea Sci*, 33 (3): 212–220 (in Chinese with English abstract) [朱全武, 范凯, 谢艳兰, 董迹芬, 詹宇雯, 骆耀平(2013). 植物低温胁迫响应miRNAs及其在茶树抗寒研究中的应用. 茶叶科学, 33 (3): 212–220]
- Zhu WF (2008). Effects of nitrogen nutrition on antioxidant contents and antioxidative activities in Chinese cabbage (*Brassica Chinensis* L.) [Master's thesis]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [朱伟锋(2008). 氮素营养对小白菜体内抗氧化物质含量和抗氧化活性的影响[硕士论文]. 杭州: 浙江大学]

Regulation of nitrogen on plant flavonoid biosynthesis

FAN Kai^{1,2}, HU Shuang¹, FAN Dong-Mei¹, WANG Ying-Qi¹, LU Ya-Ting¹, WANG Xiao-Chang^{1*}

¹Institute of Tea Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: Flavonoids are a kind of secondary metabolic compounds widely existing in plant kingdom. They possess various physiological functions, such as antioxidant activity, antibacterial and anticancer potential. Flavonoids accumulations through coordinated expression of structural genes encoding flavonoids biosynthesis which regulated by transcription factor and miRNA. Nitrogen, as an essential macronutrient, has an important effect on the biosynthesis process of flavonoids. In this article, the influence of nitrogen supply and N forms on expression of flavonoid biosynthesis gene, transcription factors and content changes were reviewed. It provides theory base for regulation of flavonoid biosynthesis by nitrogen supply.

Key words: flavonoid; nitrogen; structure gene; transcription factor; microRNA

Received 2016-04-13

This work was supported by the Open Foundation of State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (0812201215) and the Entrusted project of Unilever (China) (H20151653)

*Corresponding author (E-mail: xcwang@zju.edu.cn).