

异黄酮在豆科植物中的作用研究进展

柯丹霞*, 侯仕博, 周兆源

(信阳师范大学 生命科学院, 河南 信阳 464000)

摘要: 介绍了异黄酮的生物合成与代谢途径, 综述了其在根瘤菌与大豆共生固氮中功能的最新研究进展, 同时也介绍了其在豆科植物中的抗病、胁迫响应等其他作用, 并展望了未来的研究方向, 期望以异黄酮的研究为突破口, 通过基因工程技术实现豆科作物改良与非豆科作物的“人工共生固氮”, 从根本上改变全球氮肥依赖格局, 促进绿色农业的可持续发展。

关键词: 共生固氮; 大豆异黄酮; 根瘤菌; 信号分子; 基因调控

中图分类号: S565.103

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research progress on the function of isoflavones in leguminous plants

KE Danxia*, HOU Shibo, ZHOU Zhaoyuan

(College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: The biosynthesis and metabolic pathways of isoflavones were reviewed, the latest research progress on their functions in symbiotic nitrogen fixation between rhizobia and soybeans were summarized, and also their other roles in leguminous plants were introduced, such as disease resistance and stress response. Furthermore, the future research directions were prospected, aiming to use isoflavone research as a breakthrough point to achieve legume crop improvement and “artificial symbiotic nitrogen fixation” in non-leguminous crops through genetic engineering technology. This could fundamentally transform the global dependence on nitrogen fertilizers and promote the sustainable development of green agriculture.

Key words: symbiotic nitrogen fixation; soybean isoflavones; *rhizobium*; signaling molecules; gene regulation

0 引言

共生固氮是豆科植物与根瘤菌之间的一种互惠共生关系。根瘤菌侵入大豆根毛后,在根部形成根瘤,并在根瘤内进行固氮作用。固氮过程需要消耗能量,根瘤菌通过生物固氮酶将大气中的氮气还原为氨,为大豆提供可直接吸收利用的氮源。同时,大豆为根瘤菌提供碳水化合物等营养物质^[1]。根瘤共生固氮满足了豆科植物对农业氮肥的需求,是最具生产力和经济效益的固氮系统^[2]。

大豆是世界上最重要的作物之一,其种子中

含有食用油(18%~20%)和高蛋白(35%~40%)。目前,世界上超过三分之一的食用油和三分之二的蛋白粉来自大豆^[3-4]。除了蛋白质和植物油,大豆还是重要生物活性化合物的主要来源,如植酸、蛋白酶抑制剂、皂苷、卵磷脂和异黄酮。其中,异黄酮作为促进健康的植物雌激素,使得大豆成为功能性食品。

异黄酮是豆科植物特有的代谢产物,其属于类黄酮类,是一类酚类化合物,由肉桂酸辅酶A等酶合成。大豆异黄酮在植物生长发育以及与微生物的互作过程中扮演着重要角色^[5-7],尤其是在根瘤菌与大豆共生固氮过程中的作用备受关注。研

收稿日期:2025-02-26;修回日期:2025-05-06;*.通信联系人,E-mail:kdx_029@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(U1904102);信阳师范大学“南湖学者奖励计划”青年项目;信阳师范大学大学生科研基金项目(2025)。

作者简介:柯丹霞(1983—),女,湖北十堰人,副教授,博士,主要从事共生固氮分子生物学研究。

引用格式:柯丹霞,侯仕博,周兆源.异黄酮在豆科植物中的作用研究进展[J].信阳师范大学学报(自然科学版),2026,39(1):164-172.

KE Danxia, HOU Shibo, ZHOU Zhaoyuan. Research progress on the function of isoflavones in leguminous plants[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2026, 39(1):164-172.

究表明,在共生固氮过程中,豆科植物一方面分泌黄酮类和异黄酮类化合物至根际,吸引根瘤菌聚集到植物根部,释放结瘤因子信号^[8-9];另一方面大豆体内异黄酮含量的增加,可以抑制植物生长素的运输,使其在结瘤起始部位累加,从而促进结瘤器官发生^[10]。因此,大豆异黄酮在豆科植物与根瘤菌的共生固氮过程中发挥重要作用。研究异黄酮在共生固氮中的作用,不仅是解析植物-微生物互作机制的突破口,也为农业绿色转型和全球粮食安全提供了创新方向。未来研究需结合基因组学、代谢组学及合成生物学手段,优化异黄酮信号通路,实现从基础科学到实际应用的跨越。

1 异黄酮生物合成与代谢

异黄酮的生物合成主要局限于豆科植物和少数其他物种。异黄酮主要是通过苯丙氨酸途径和类黄酮合成途径两个阶段合成的(图1)。异黄酮分别由类黄酮合成途径的中间底物、柚皮素和甘草素产生。柚皮素在大多数植物中都很常见,类黄酮合成途径的其他化合物,如黄酮、黄酮醇和花青素也由它衍生。类黄酮合成途径的另一种中间底物——甘草素,由查尔酮异构酶(CHI)和查尔酮还原酶(CHR)产生。CHI存在于大多数植物中,而CHR只存在于豆类中。

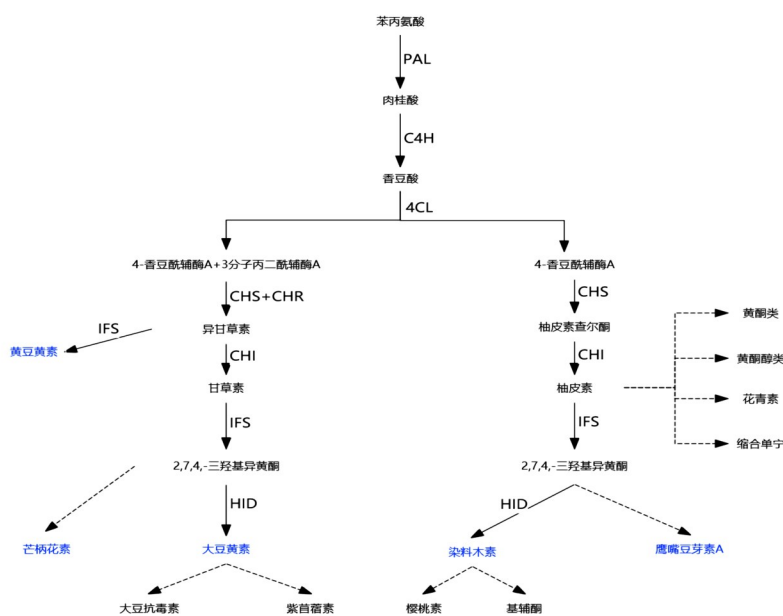


图1 异黄酮生物合成途径

Fig. 1 Isoflavone biosynthesis pathway

考虑到这些化合物与共生形成的相关性,黄酮类基因在结瘤形成过程中的差异表达是特别有趣的。与苯丙素合成有关的基因在结节实质和结节皮层高度表达。苯丙素是木质素的主要组成部分,它们是细胞壁的物理屏障或机械支撑。由于根瘤维管束是通过根瘤的内皮层发育的,而木质素的积累是必需的,因此根瘤实质中苯丙素通路基因的表达将负责根瘤维管束的合成。

一般来说,已知苯丙氨酸途径上的基因是由环境胁迫(营养缺乏、过热、病原体攻击等),并通过发育和组织特异性调控触发的^[11]。已有研究证实,存在多个上游的苯丙氨酸途径酶,即苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂

酸4-羟化酶(Cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和4-香豆酰-CoA连接酶(4-coumaryl:coalgase, 4CL)。首先PAL可以催化苯丙氨酸脱氨过程,生成反式肉桂酸,然后通过C4H催化氧化反应过程生成对香豆酸;经由4CL连接一个辅酶A,进一步形成4-香豆酰-CoA;4CL激活硫代酯化后,4-香豆酰-CoA进入类黄酮合成途径^[12]。

接下来,部分4-香豆酰-CoA和3分子的苹果酰CoA会在查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)的作用下发生缩合反应,再经过查尔酮还原酶(Chalcone reductase, CHR)催化生成异甘草素(Isoliquiritigenin);一部分的异甘草素经过异黄酮合酶(Isoflavone synthase, IFS)可生成黄豆黄素

(Glyzein);另一部分异甘草素经过查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)催化又可生成甘草素(Liquiritigenin);之后经过一系列反应过程可以生成大豆黄酮(Daidzein)^[12]。

另一部分的 4-香豆酰-CoA 经过查尔酮合酶(CHS)缩合形成柚皮苷查尔酮(Naringenin chalcone),后续由查尔酮异构酶(CHI)催化可以生成柚皮素(Naringenin);柚皮素本身作为共用底物存在于黄酮类和异黄酮类物质合成途径中,因此在这一步骤中柚皮素的去向是影响异黄酮合成的关键因素^[12]。部分的柚皮素会通过一些其他过程生成另外的非异黄酮类产物,例如:黄酮-3 羟化酶(F3H)以柚皮素为底物最终生成黄酮醇(Flavonols);因此,它与 IFS 竞争异黄酮的形成。类似的产物还有黄酮、花色素苷、凝缩类丹宁等。之后在异黄酮合酶(IFS)和 2-羟基异黄酮脱水酶(2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase, HID)的作

用下,可催化生成染料木苷(Genistein)。

2, 7, 4- 三 羟 基 异 黄 酮 (2, 7, 4-trihydroxyisoflavanone)除了可以被 2-羟基异黄酮脱水酶(HID)催化,还可以经过甲基化生成芒柄花素(Formononetin),其合成所需底物为甘草素(Liquiritigenin);或是甲基化生成鹰嘴豆芽素 A (BiochaninA),合成所需底物为柚皮素(Naringenin)。其中,关键酶以及调控节点如表 1 所示,其中 CHS(查尔酮合酶)作用特点是异甘草素分支需与 CHR(查尔酮还原酶)协同催化,而柚皮苷查尔酮分支仅需 CHS 单独作用。CHI(查尔酮异构酶)是决定黄酮类与异黄酮类代谢流向的关键酶。IFS(异黄酮合酶)作用特点是细胞色素 p450 酶、异黄酮合成的特异性酶。HID(2-羟基异黄酮脱水酶)作用特点是调控异黄酮终产物的多样性。F3H(黄酮-3 羟化酶)作用特点是与 IFS 竞争柚皮素底物,抑制异黄酮生成。

表 1 异黄酮合成关键竞争酶与调控节点

Tab. 1 Key competitive enzymes and regulatory nodes in isoflavone synthesis

| 代谢节点 | 竞争酶 | 产物方向 |
|--------------|-------------|---------------------------|
| 4-香豆酰-CoA 分支 | CHS ± CHR | 异甘草素 vs 柚皮苷查尔酮 |
| 柚皮素代谢枢纽 | IFS vs F3H | 异黄酮类 vs 黄酮醇类 |
| 2,7,4-三羟基异黄酮 | HID vs 甲基化酶 | 大豆黄酮/染料木素 vs 芒柄花素/鹰嘴豆芽素 A |

2 异黄酮在根瘤菌与大豆共生固氮过程中的作用

异黄酮类化合物是大豆根际分泌物中的重要化学信号,可以吸引根瘤菌聚集到植物根部,通过刺激根瘤菌,促使结瘤因子合成和分泌,并同时刺激根瘤共生信号转导,参与根瘤器官的生长和发育,调节根瘤的形成^[13]。而某些特定的异黄酮只诱导相容的根瘤菌产生结瘤因子,从而决定了植物与根瘤菌的共生范围^[14]。

2.1 结瘤早期信号分子

根瘤菌基因分为两类,第一类基因是参与合成细菌细胞表面胞外多糖、脂多糖和 β -1,2-葡聚糖等的基因^[15]。第二类基因是结瘤相关基因。来自植物的异黄酮类化合物是诱导结瘤基因激活的关键因子^[16-18],此过程需要转录激活蛋白 NodD 的参与。首先,植物分泌的异黄酮与 NodD 蛋白形成复合物,促进根瘤菌结瘤基因的转录。随后根瘤菌产生结瘤因子(NF, Nod factor),被植物识别从而启动根的早期结瘤反应。大豆黄酮和染料木素是大豆产生的两种特殊的异黄酮类化合物,可诱导

日本慢生根瘤菌结瘤基因的表达^[19-21]。

异黄酮通过化学诱导、基因诱导、信号转导调控及生长素平衡,在结瘤早期构建了豆科植物-根瘤菌的精准对话,是共生固氮启动不可或缺分子开关。其浓度动态和宿主特异性进一步确保了共生效率与抗病性的平衡。

异黄酮类化合物的合成基因在结瘤早期被诱导表达。研究表明,编码关键酶的基因表达会被慢生根瘤菌诱导表达,例如苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮合成酶(CHS)。查尔酮合成酶基因(*GmCHS*)参与异黄酮碱性骨架的合成;异黄酮合成酶基因(*GmIFS*)参与大豆苷元和染料木素的合成;查尔酮还原酶基因(*GmCHR*)是大豆苷元合成的关键基因^[22],这些酶参与大豆根部异黄酮类化合物的合成^[23]。在抑制大豆异黄酮合成的关键基因后,接种根瘤菌的大豆难以形成根瘤^[24-26]。利用 RNAi 技术干扰和沉默短叶紫花苜蓿异黄酮合成途径限速酶(CHS)基因,使根中异黄酮类化合物浓度降低,抑制根瘤的形成,而外源供给异黄酮类化合物前体柚皮素和甘草素可恢复短叶紫花苜

藉正常结瘤和根中异黄酮类化合物含量^[27]。在定型根瘤的结瘤过程中,异黄酮合成途径至少在四个不同的阶段被激活:第一,在一个氮营养缺乏条件下释放异黄酮类化合物作为信号化合物;第二,在Nod因子感知作为防御相关基因后不久;第三,在根瘤原基发育期间;第四,在没有已知生理功能的成熟根瘤中。

植物产生的内源性异黄酮作为根瘤菌的化学引诱剂和结瘤基因表达的诱导剂,不仅可以诱导根瘤菌结瘤因子的形成,还参与调控结瘤基因的转录表达,从而参与豆科植物的结瘤过程^[28]。大豆异黄酮作为大豆生长早期根系分泌物,大部分是以大豆苷元衍生物形式存在的。染料木素可以使根瘤菌产生的胞外多糖的组成和分子量分布发生改变,在根瘤比例的调节和根瘤的生长发育中起关键作用。异黄酮敏感根瘤菌在大豆根中大豆黄酮和染料木素浓度较低的情况下,仍能识别大豆根并正常结瘤。随着大豆根中染料木黄酮和大豆黄酮浓度的降低,根瘤数和重量减少^[29-30]。用根瘤菌接种染料木素和大豆苷元培养后的植株,可以提高大豆根瘤的干重和固氮能力^[31-34]。

2.2 生长素抑制剂

除了作为信号分子诱导结瘤基因表达以外,异黄酮还能调节植物生长素的运输^[35]。生长素是植物生长发育的重要激素,参与细胞分裂、伸长和分化等过程。在豆科植物与根瘤菌共生过程中,生长素水平的调控对于根瘤的形成和发育至关重要。在胡瓜下胚轴部位,染料木素能抑制与植物运输生长素抑制剂NPA的结合^[36]。而在大豆中异黄酮可以抑制根瘤菌感染部位生长素的极性运输,使生长素在结瘤起始部位累加,从而促进根瘤的器官发生^[10]。大豆根系分泌的异黄酮(如大豆黄酮和染料木素)既能诱导根瘤菌基因表达,又能通过抑制生长素运输增强共生信号。

外源氮素会降低根系异黄酮含量,间接减少生长素在根瘤部位的积累,抑制结瘤。而补充异黄酮可恢复生长素分布模式,促进结瘤相关基因(如*NFR1*、*ENOD93*)的表达。无论是苜蓿和白三叶草的不定型根瘤^[37-38],还是大豆的定型根瘤,其中的异黄酮都可以调节生长素的流动^[39]。但对于共生固氮过程来说,异黄酮作为慢生型大豆根瘤菌*nod*基因诱导物的作用远比调节植物生长素运输的作用更重要。异黄酮通过抑制生长素运输蛋

白,调控生长素在根部的局部浓度,促进根瘤器官发生。这一机制与异黄酮作为结瘤信号分子的功能协同作用,是豆科植物-根瘤菌共生固氮的关键环节。同时,氮素等环境因素通过影响异黄酮合成,间接调节生长素动态和结瘤效率。

2.3 与氮代谢的关系

施用氮铵、硝态氮和尿素显著降低了大豆根系中大豆苷元和染料木素的浓度,减少了根瘤数量,固氮酶活性也显著降低^[40]。氮通过抑制苯丙烷途径关键酶(PAL、C4H、IFS)的活性或表达,减少异黄酮合成,同时在高氮环境下,植物将资源优先分配给初级代谢(如蛋白质合成),导致苯丙烷途径分支的异黄酮合成受限。

研究表明,单侧供氮系统抑制大豆根系两侧异黄酮的合成和分泌,影响根瘤菌和根际根系的识别过程,从而影响大豆结瘤。说明大豆结瘤受氮的系统调控,这与根系中异黄酮的早期合成密切相关。氮素对大豆根瘤固氮的系统性抑制作用始于根瘤早期,系统地抑制了大豆根系和根系分泌物中异黄酮的浓度。单侧氮素或异黄酮处理后大豆根瘤固氮能力的变化与根系和根系分泌物中异黄酮浓度的变化一致^[41]。而外施异黄酮可部分抵消氮的抑制作用,恢复根瘤菌的结瘤信号传导和根瘤器官发生。氮素系统调控大豆根瘤固氮是否与异黄酮有关还有待进一步研究。

异黄酮在豆科植物共生固氮中扮演双重角色:既是启动结瘤的关键信号分子,又是氮代谢调控的靶点。其合成与氮水平呈负相关,通过动态平衡植物对氮源的利用策略(依赖土壤氮或共生固氮)。这一机制为优化豆科作物氮肥管理及培育高效固氮品种提供了理论依据。

3 异黄酮在豆科植物中的其他作用

异黄酮是一类黄酮类化合物,主要存在于豆科植物中,其中,大豆产生的异黄酮含量最高^[42]。异黄酮的大小和化学结构与人类雌激素相似。因此,它们通常被称为“植物雌激素”。异黄酮以糖基化形式存在于大豆中,然而,它们的生物活性来自它们的糖苷配基。

异黄酮在豆科植物中还可以充当植物抗毒素,即植物在压力或病原体攻击期间产生的化合物^[43-44]。大豆异黄酮能够帮助大豆防御致病性微生物(如大豆疫霉等),异黄酮通过诱导苯丙烷代

谢途径关键酶(如PAL、CHS)的表达,提升植物对病原攻击的响应效率。在某些情况下,豆科植物百脉根(*Lotus japonicus*)感知到非生物胁迫引发的信号转导途径与生物胁迫类似,从而刺激异黄酮的生物合成而不是黄酮醇。此外,也有报道称,在百脉根叶片中添加还原谷胱甘肽(促使植物产生抗生素)可以诱导异黄酮的生物合成,以应对生物胁迫。有趣的是,在丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)诱导的生物胁迫下,大豆异黄酮的生物合成显著增加,而黄酮醇、花青素和单宁等其他类黄酮的表达明显下调^[17]。苯丙烷衍生化合物在植物生长和发育以及防御生物和非生物胁迫方面发挥作用。异黄酮本身可能并不具有非生物胁迫功能,推测其可以通过影响其合成过程中上游的苯丙氨酸途径来间接影响非生物胁迫。

植物在低肥、金属毒害等逆境胁迫或环境改变时能够诱导异黄酮基因的表达,并通过自身的调节机制来增强对外界各种恶劣环境的适应性。同时,异黄酮也会在干旱、低温和UV-B辐射等胁迫下积累,通过抗氧化活性减轻氧化损伤。大豆 r2r3 型 MYB 转录因子基因 *GmMYB12* 参与了转基因拟南芥的类黄酮积累,并通过增加脯氨酸积累调节渗透平衡、保护膜完整性和维持 ROS 稳态提高植物对非生物胁迫的耐受性。

此外,异黄酮在植物与真菌的共生中也起着重要作用,可促进孢子萌发、菌丝形成和生长以及根内丛枝形成^[45]。在菌根共生的后期,类黄酮可能参与调节菌根的形成^[46]。特定的异黄酮可以刺激菌丝生长^[47],这些效应通常是宿主特异性的,就像植物-根瘤菌共生一样。事实上,结瘤的自调节和菌根的自调节这两个控制根瘤菌和菌根共生形成的负反馈回路可能具有共同的元素。然而,一

些植物类黄酮对真菌共生的抑制作用也有报道,无论是在菌根真菌宿主的植物中,还是在非寄主植物中^[48]。类黄酮也可以在植物-真菌相互作用的早期阶段作为防御反应积累;然而,一旦共生关系建立,真菌共生体就可以使用类黄酮作为碳源^[49]。

异黄酮不仅是豆科植物-微生物互作的核心信号分子,还在抗病、胁迫响应、代谢调控及跨物种应用中发挥多功能作用。其合成与调控机制的研究为农业抗病育种、氮高效品种选育及植物代谢工程提供了重要靶点。

4 结束语

异黄酮作为大豆根系分泌物的一种,在多个生物学过程中起着重要的作用(图2):可以调节生长素运输;作为抗病原体的植物抗毒素;与NodD蛋白形成复合物,促进*nod*基因的转录,进而形成根瘤;与固氮细菌、真菌共生。根系分泌物可以促进磷和铁的吸收,除氮外,根系分泌物还能促进其他微量元素如磷(P)和铁(Fe)的有效吸收。

利用大豆 *IFS* 基因 *IFS1* 或 *IFS2* 成功地改造了水稻、拟南芥、烟草、玉米、生菜和矮牵牛花等非豆类植物的异黄酮通路。与大豆种子相比,这些转基因植物中的异黄酮含量一直非常低。在35S启动子调控下,转大豆 *IFS* 基因的水稻植株叶片和根部均可产生异黄酮^[50]。通过将大豆异黄酮合成酶基因(*GmIFS1*)转入水稻,验证其能否合成异黄酮(染料木素)并增强对稻瘟病的抗性。该研究首次证明转基因水稻通过表达大豆 *GmIFS1* 基因合成染料木素,能有效抵抗稻瘟病菌侵染,为利用次级代谢工程培育抗病作物提供了理论依据和技术路径。异黄酮作为植物抗毒素可能诱导非特异性抗性,为开发持久抗病品种提供新策略^[51]。施加

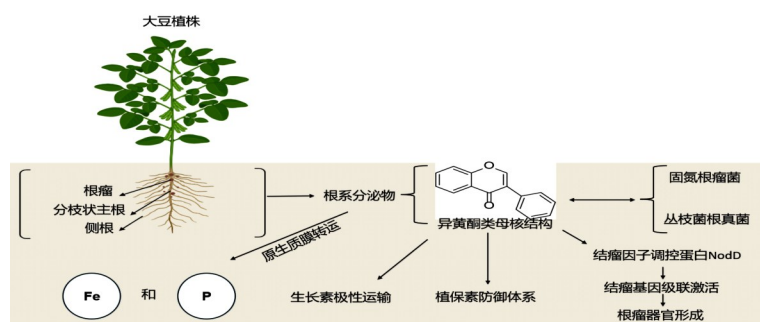


图2 大豆根系分泌物异黄酮的作用

Fig. 2 The role of isoflavones in soybean root exudates

氮素可以提高水稻等作物的氮平衡指数、叶绿素指数和类黄酮指数,使种间竞争能力得到提升^[52]。

近年来在异黄酮生物合成途径中重要酶的鉴定和表征方面取得的进展有助于提高大豆中异黄酮的含量。异黄酮水平变化的调控是一个受多种遗传和环境因素影响的复杂机制。异黄酮生物合成的转录调控是通过修饰转录因子如MYBs来增加或降低大豆中异黄酮的水平^[53-56]。例如,R1型MYB转录因子*GmMYB176*已被证明通过调节*CHS8*基因表达影响异黄酮合成。R2R3型MYB转录因子*GmMYB39*和*GmMYB100*负调控异黄酮的生物合成,而*GmMYB29*正调控异黄酮的生物合成。除此之外,通过泛素化和SUMO(Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO)化过程可以清楚了解异黄酮生物合成的翻译后调控。同样,合成代谢工程技术,如基于多基因表达载体系统(CRISPR/cas9),将用于异黄酮生物合成基因的精确表达和调控^[57]。借助这些有效工具,探究异黄酮及异黄酮合成途径与根瘤信号传导途径之间的关系,以期培育出富含大豆异黄酮、固氮效率高和适应性强等多个优良性状的特色大豆新品种,促进我国大豆产业的可持续发展。

如何提高异黄酮在豆科植物中的积累量也受到广泛关注。JIANG等^[58-59]通过RNAi介导的基因沉默探讨了*F3H*和*GmFNSII*基因对异黄酮合成的负调控。*GmFNSII*基因沉默导致大豆毛状根中染料木素积累增加。*F3H*和*GmFNSII*的基因沉默增加大豆苷元和染料木素等异黄酮的积累。GOU等^[60]改造了苜蓿中异黄酮途径基因(*CHS*、*CHI*、*IFS*和*F3H*)的不同组合,增加了异黄酮和原花青素的积累。研究发现,下调*MtF3H*并过表达*GmIFS1*、*GmCHS7*和*GmCH1A*对异黄酮、黄酮和原花青素的积累更有效。最近,MALLA等^[61]通过生物基因转移和农杆菌介导的基因转移两种方法,将*GmIFS*转入洋葱(*Allium cepa* L.)中,使其积累染料木素。结果表明,与农杆菌介导的基因转移法相比,生物基因转移法积累了62.65 nm/g FW的染料木素。因此,引入转录因子被认为对异黄酮生物合成的调控更加有效,提示其可用于豆科植物和非豆科植物异黄酮生物合成调控的新策略。此外,豆科植物可以通过与根瘤菌共生互利吸收土壤中的氮素,但大部分植物并不具备与根瘤菌共生的能力,因此,可以通过遗传转化使得非

豆科植物成为根瘤菌的宿主植物,比如通过根瘤农杆菌介导的遗传转化将*NFR1*等基因转入禾本植物如水稻中^[62]。

目前人们正在努力获得具有高异黄酮含量的大豆品种,例如通过结合BSA-seq与WGCNA、VIGS和毛根转化的方法能够有效鉴定自然群体中的异黄酮候选基因^[63],再通过dQTG.seq模型分析影响大豆异黄酮含量表型可塑性的遗传位点^[64],最终成功确定多个相关基因。此外,LIU等^[65]通过将批量分离分析测序(BSA-seq)和全基因组关联研究(GWAS)相结合,发现了一种R2R3-MYB基因家族中的*GmMYB77*,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术构建了*GmMYB77*的突变体,研究表明,*GmMYB77*对异黄酮含量负调控,通过对*GmMYB77*基因进行编辑,可直接产生丙二酰基甘草素和总异黄酮含量高的大豆材料,提高大豆的工业和膳食价值。ZHANG等^[66]通过开发大豆多重CRISPR/Cas9基因编辑系统,成功实现了对异黄酮合成竞争途径基因(*GmF3H1*、*GmF3H2*和*GmFNSII-1*)的同步敲除,显著提升了大豆异黄酮含量及对大豆花叶病毒(SMV)的抗性。该研究首次将多基因编辑技术应用于大豆代谢工程,为高产异黄酮及抗病育种提供了新材料,同时建立了高效的多靶点编辑体系,为复杂性状调控(如多基因通路互作)研究提供了技术范式。

但在某些情况下,高异黄酮含量是不可取的,例如用于婴儿营养配方的大豆,异黄酮的雌激素效应可能对婴儿发育产生不利的健康影响^[67]。因此,获得异黄酮类化合物含量减少的大豆新品种也非常重要,而确定这些化合物的生物合成途径的所有调控因素是实现这一目标的基础。在受负调节因子影响的突变体中,异黄酮含量可能升高,而在受正调节因子影响的突变体中,异黄酮含量可能降低,这两种类型的突变体都应该引起关注。异黄酮是豆科植物次生代谢的核心产物,不仅驱动共生固氮的分子对话,还通过多重机制协调植物抗逆、发育调控及生态互作,其合成与调控的复杂性(如多基因网络、环境响应)为农业和生物技术研究提供了丰富的研究方向。

异黄酮研究为豆科作物改良与非豆科植物功能拓展提供了重要突破口,未来需跨学科合作推动理论创新与技术应用,助力可持续农业与健康产业发展。随着合成生物学与纳米材料技术的突

破,未来有望实现非豆科作物的“人工共生固氮”, 下的绿色农业发展提供更具建设性的解决方案。
从根本上改变全球氮肥依赖格局,为碳中和目标

参考文献:

- [1] LIU Tengfei, LIU Zhi, FAN Jingwei, et al. Loss of lateral suppressor gene is associated with evolution of root nodule symbiosis in leguminosae[J]. *Genome Biology*, 2024, 25(1): 250.
- [2] BISWAS B, GRESSHOFF P M. The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(5): 7380-7397.
- [3] TRAN L S P, MOCHIDA K. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2010, 10(4): 447-462.
- [4] ZHANG Kaixin, LIU Shulin, LI Wenbin, et al. Identification of QTNs controlling seed protein content in soybean using multi-locus genome-wide association studies[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1690.
- [5] HARBORNE J B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27(4): 335-367.
- [6] DIXON R A. Isoflavonoids: Bbiochemistry, molecular biology and biological functions[J]. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 1999, 1: 773-823.
- [7] DIXON R A, ACHNINE L, KOTA P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence: A genomics perspective[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3(5): 371-390.
- [8] 于跃, 刘静, 邓波, 等. 外源根系分泌物对紫花苜蓿根瘤菌共生体系的影响[J]. *草地学报*, 2020, 28(1): 88-94.
YU Yue, LIU Jing, DENG Bo, et al. Effects of exogenous root exudates on symbiosis of alfalfa and rhizobium[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(1): 88-94.
- [9] ZHANG Juan, SUBRAMANIAN S, STACEY G, et al. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 171-183.
- [10] WASSON A P, PELLERONE F I, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.
- [11] DIXON R A, PAIVA N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 1085-1097.
- [12] JANSEN R C, NAP J P. Genetical genomics: The added value from segregation[J]. *Trends in Genetics*, 2001, 17(7): 388-391.
- [13] REDMOND J W, BATLEY M, DJORDJEVIC M A, et al. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*[J]. *Nature*, 1986, 323(6089): 632-635.
- [14] GARCÍA-CALDERÓN M, PÉREZ-DELGADO C M, PALOVE-BALANG P, et al. Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume *lotus japonicus*: Connections to nitrogen metabolism and photorespiration[J]. *Plants*, 2020, 9(6): 774.
- [15] IYER B, RAJKUMAR S. Host specificity and plant growth promotion by bacterial endophytes[J]. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2017, 5(2): 1018-1030.
- [16] PHILLIPS D A, TSAI S M. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes[J]. *Mycorrhiza*, 1992, 1(2): 55-58.
- [17] LIU Chengwu, MURRAY J D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update[J]. *Plants*, 2016, 5(3): 33.
- [18] AHMAD M Z, ZHANG Yanrui, ZENG Xiangsheng, et al. Isoflavone malonyl-CoA acyltransferase GmMaT2 is involved in nodulation of soybean by modifying synthesis and secretion of isoflavones [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(4): 1349-1369.
- [19] SUBRAMANIAN S, STACEY G, YU O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(2): 261-273.
- [20] BAIS H P, WEIR T L, PERRY L G, et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57(1): 233-266.
- [21] SUBRAMANIAN S, GRAHAM M Y, YU O, et al. RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(4): 1345-1353.
- [22] SUGIYAMA A, YAMAZAKI Y, YAMASHITA K, et al. Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2016, 80(1): 89-94.
- [23] ESTABROOK E M, SENGUPTA-GOPALAN C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and

- chalcone synthase during soybean nodule development[J]. *The Plant Cell*, 1991, 3(3): 299-308.
- [24] SUBRAMANIAN S, STACEY G, YU O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(2): 261-273.
- [25] WASSON A P, PELLERONE F I, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.
- [26] ZHANG Juan, SUBRAMANIAN S, STACEY G, et al. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 171-183.
- [27] WASSON A P, PELLERONE F I, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.
- [28] COOPER J E. Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5): 1355-1365.
- [29] CHO M J, HARPER J E. Effect of abscisic acid application on root isoflavonoid concentration and nodulation of wild-type and nodulation-mutant soybean plants[J]. *Plant and Soil*, 1993, 153(1): 145-149.
- [30] MIRANSARI M, SMITH D L. Overcoming the stressful effects of salinity and acidity on soybean nodulation and yields using signal molecule genistein under field conditions[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2007, 30(12): 1967-1992.
- [31] ZHANG F, SMITH D L. Preincubation of *bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(3): 961-968.
- [32] MIRANSARI M, BAHRAMI H A, REJALI F, et al. Effects of arbuscular mycorrhiza, soil sterilization, and soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) nutrients uptake[J]. *Soil and Tillage Research*, 2009, 104(1): 48-55.
- [33] DOLATABADIAN A, SANAVY S A M M, GHANATI F, et al. Morphological and physiological response of soybean treated with the microsymbiont *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein [J]. *South African Journal of Botany*, 2012, 79: 9-18.
- [34] RIVIEZZI B, CAGIDE C, PEREIRA A, et al. Improved nodulation and seed yield of soybean (*Glycine max*) with a new isoflavone-based inoculant of *Bradyrhizobium elkanii*[J]. *Rhizosphere*, 2020, 15: 100219.
- [35] 郑晓宣, 徐荣艳, 陈家宽, 等. 植物的异黄酮合酶(IFS)[J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46(4): 388-394.
ZHENG Xiaoxuan, XU Rongyan, CHEN Jiakuan, et al. Isoflavone synthase in plant [J]. *Plant Physiology Communications*, 2010, 46(4): 388-394.
- [36] JACOBS M, RUBERY P H. Naturally occurring auxin transport regulators[J]. *Science*, 1988, 241(4863): 346-349.
- [37] TAKANASHI K, TAKAHASHI H, SAKURAI N, et al. Tissue-specific transcriptome analysis in nodules of *Lotus japonicus*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(7): 869-876.
- [38] WASSON A P, PELLERONE F I, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617-1629.
- [39] PÉREZ-DELGADO C M, GARCÍA-CALDERÓN M, MÁRQUEZ A J, et al. Reassimilation of photorespiratory ammonium in *lotus japonicus* plants deficient in plastidic glutamine synthetase [J]. *PLOS One*, 2015, 10(6): e0130438.
- [40] CHO M J, HARPER J E. Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation in split-root systems of wild-type and nodulation-mutant soybean plants[J]. *Plant Physiology*, 1991, 95(4): 1106-1112.
- [41] LYU Xiaochen, SUN Chunyan, LIN Tao, et al. Systemic regulation of soybean nodulation and nitrogen fixation by nitrogen via isoflavones[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 968496.
- [42] SUGIYAMA A. The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond: A review [J]. *Journal of Advanced Research*, 2019, 19: 67-73.
- [43] RÍPODAS C, VIA V D, AGUILAR O M, et al. Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 68: 81-89.
- [44] EBEL J. Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1986, 24: 235-264.
- [45] ABDEL-LATEIF K, BOGUSZ D, HOCHER V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(6): 636-641.
- [46] HASSAN S, MATHESIUS U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(9): 3429-3444.

- [47] LAROSE G, CHÈNEVERT R, MOUTOGLIS P, et al. Flavonoid levels in Roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(12): 1329-1339.
- [48] LIU Chengwu, MURRAY J D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update[J]. *Plants*, 2016, 5(3): 33.
- [49] SOHN S I, KIM Y H, KIM S L, et al. Genistein production in rice seed via transformation with soybean IFS genes[J]. *Plant Science*, 2014, 217/218: 27-35.
- [50] POKHREL S, PONNIAH S K, JIA Yulin, et al. Transgenic rice expressing isoflavone synthase gene from soybean shows resistance against blast fungus (*Magnaporthe oryzae*)[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(10): 3141-3146.
- [51] WANG Chenglei, REID J B, FOO E. The art of self-control-autoregulation of plant-microbe symbioses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 988.
- [52] 吴昊, 陈子寒, 王俊达, 等. 氮添加对水稻与入侵杂草空心莲子草种间竞争力的影响[J]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2022, 35(1): 45-55.
- WU Hao, CHEN Zihan, WANG Junda, et al. Effects of Nitrogen addition on interspecific competitive ability between *Oryza sativa* and invasive weed *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 35(1): 45-55.
- [53] YI Jinxin, DERYNCK M R, LI Xuyan, et al. A single-repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates CHS8 gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(6): 1019-1034.
- [54] YAN Junhui, WANG Biao, ZHONG Yunpeng, et al. The soybean R2R3 MYB transcription factor GmMYB100 negatively regulates plant flavonoid biosynthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(1/2): 35-48.
- [55] BIAN Shaomin, LI Ruihua, XIA Siqi, et al. Soybean CCA1-like MYB transcription factor GmMYB133 modulates isoflavonoid biosynthesis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 507(1/4): 324-329.
- [56] JAHAN M A, HARRIS B, LOWERY M, et al. Glyceollin transcription factor GmMYB29A2 regulates soybean resistance to *Phytophthora sojae*[J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 530-546.
- [57] ZHANG Peipei, DU Hongyang, WANG Jiao, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(6): 1384-1395.
- [58] JIANG Yina, WANG Biao, LI Hui, et al. Flavonoid production is effectively regulated by RNAi interference of two flavone synthase genes from glycine max[J]. *Journal of Plant Biology*, 2010, 53(6): 425-432.
- [59] JIANG Yina, HU Yanlin, WANG Biao, et al. Bivalent RNA interference to increase isoflavone biosynthesis in soybean(*Glycine max*)[J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014, 57(2): 163-170.
- [60] GOU Lanming, ZHANG Rongxue, MA Lei, et al. Multigene synergism increases the isoflavone and proanthocyanidin contents of *Medicago truncatula*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(3): 915-925.
- [61] MALLA A, SHANMUGARAJ B, SRINIVASAN B, et al. Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis by expressing glycine max isoflavone synthase in *Allium cepa* L. for genistein production[J]. *Plants*, 2020, 10(1): 52.
- [62] 李豪. 百脉根共生固氮分子机制的研究及其在水稻中应用的探索[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- LI Hao. Function and molecular mechanisms of symbiotic nitrogen fixation in lotus japonicus and its application in rice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- [63] AZAM M, ZHANG Shengrui, HUAI Yuanyuan, et al. Identification of genes for seed isoflavones based on bulk segregant analysis sequencing in soybean natural population[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136(1): 13.
- [64] YANG Zhenhong, ZHAN Yuhang, ZHU Yina, et al. The analysis of the genetic loci affecting phenotypic plasticity of soybean isoflavone content by dQTG. seq model[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2025, 138(1): 9.
- [65] LIU Yitian, ZHANG Shengrui, LI Jing, et al. An R2R3-type MYB transcription factor, GmMYB77, negatively regulates isoflavone accumulation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(3): 824-838.
- [66] ZHANG Peipei, DU Hongyang, WANG Jiao, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(6): 1384-1395.
- [67] YAN Junhui, WANG Biao, ZHONG Yunpeng, et al. The soybean R2R3 MYB transcription factor GmMYB100 negatively regulates plant flavonoid biosynthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(1/2): 35-48.

责任编辑:任长江