

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201902021

陈俊洁, 梅松, 胡彦如. 脱落酸激素诱导拟南芥幼苗中花青素的合成 [J]. 广西植物, 2020, 40(8): 1169–1180.

CHEN JJ, MEI S, HU YR. Absciscic acid induces anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. Guihaia, 2020, 40(8): 1169–1180.

脱落酸激素诱导拟南芥幼苗中花青素的合成

陈俊洁^{1,2}, 梅松¹, 胡彦如^{1*}

(1. 热带植物资源可持续利用重点实验室, 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650223; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 脱落酸(abscisic acid, ABA)激素是一类重要的生长调节物质,参与调控植物的多种生理过程。花青素(anthocyanins)是植物次生代谢产生的类黄酮化合物,对植物的生长发育和逆境胁迫响应有重要作用。该文以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为研究对象,探讨 ABA 信号对花青素生物合成的调控功能和作用机制。结果表明:外源施加 ABA 显著提高野生型幼苗茎尖中花青素的积累。相一致的是,ABA 能诱导某些与花青素合成相关的转录因子及合成酶基因的表达。遗传学分析发现,ABA 诱导花青素合成部分依赖于 MBW 复合体中的核心转录因子,如 TTG1、TT8 及 MYB75 等。初步机制研究揭示,ABA 信号途径中的 bZIP 类转录因子 ABI5 能与 TTG1、TT8 及 MYB75 等相互作用形成蛋白复合物。综上结果认为,ABA 信号诱导拟南芥幼苗中花青素的积累,并可能通过 ABI5 与 MBW 复合体协同作用调控花青素的合成。

关键词: 拟南芥, 脱落酸, 花青素, ABI5 转录因子, MBW 复合体

中图分类号: Q943 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)08-1169-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Abscisic acid induces anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings

CHEN Junjie^{1,2}, MEI Song¹, HU Yanru^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Absciscic acid (ABA) is a critical phytohormone and widely modulates various biological processes in plants. Anthocyanins are flavonoids produced by plant secondary metabolism and play crucial roles in plant growth and stress responses. Recently, several transcription factors and synthetase genes involved in anthocyanins biosynthesis have been well studied; however, the upstream regulatory signals mediating their synthesis remain to be further explored. In this study, we taken *Arabidopsis thaliana* as the research object and investigated the function and mechanism of ABA in the control of anthocyanin biosynthesis. Phenotypic analysis showed that exogenous application of ABA significantly increased the accumulation of anthocyanins in the stem ends of wild-type *A. thaliana* seedlings. Consistently, ABA induced the expression of certain transcription factors and synthetase genes associated with anthocyanin synthesis. In addition, ge-

收稿日期: 2019-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(31670281) [Supported by the National Natural Science Foundation of China 31670281] 。

作者简介: 陈俊洁(1995-), 女, 云南昭通镇雄人, 硕士, 研究方向为植物激素信号转导, (E-mail) chenjunjie@xtbg.ac.cn。

* 通信作者: 胡彦如, 博士, 研究员, 研究方向为植物激素信号转导, (E-mail) huyanru@xtbg.ac.cn。

netic analysis revealed that ABA-stimulated anthocyanin synthesis is partially dependent on core transcription factors in the MBW complex that positively regulates anthocyanin synthesis, such as TTG1, TT8, and MYB75. Preliminary mechanism studies revealed that the bZIP-type transcription factor ABI5 in the ABA signaling pathway physically interacts with TTG1, TT8 and MYB75 to form a protein complex. Taken together, this study shows that ABA signaling induces anthocyanin accumulation in *A. thaliana* seedlings and may regulate the synthesis of anthocyanins by synergizing the ABI5 with the MBW complex.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, ABA, anthocyanin, ABI5 transcription factor, MBW complex

花青素是植物次级代谢产生的一类水溶性天然色素,属于类黄酮化合物,在食品营养和医药保健中具有重要的应用价值(Peiffer et al., 2016; Wei et al., 2018)。它广泛存在于被子植物中,是植物生长过程中形成的重要成分。花青素在提高植物耐逆境胁迫能力方面发挥重要作用,对植物生长繁殖及对环境适应有重要意义(Rowan et al., 2009; Fan et al., 2016; Liang & He, 2018)。参与花青素合成途径的基因可分为结构基因和调控基因两类。结构基因包括早期生物合成基因(如 *CHS*、*CHI* 和 *F3H*)和晚期生物合成基因(如 *DFR*、*ANS* 和 *UF3GT*) (Tanaka et al., 2008; Zhang & Schrader, 2017)。目前研究发现参与花青素合成的调控基因主要编码 MYB、bHLH 和 WD40 家族蛋白(Deng & Lu, 2017; Ma & Constabel, 2019)。PAP1 为 R2R3 MYB 家族成员 MYB75,它与同源蛋白 PAP2/MYB90 协调正调节花青素合成相关基因的表达,如 *PAL*、*CHS* 和 *DFR* 等(Maier et al., 2013; Shin et al., 2015)。此外, Gonzalez et al. (2008)证明了 *MYB113* 或 *MYB114* 的过表达也导致拟南芥花色素的显著增加。TT8、GL3 和 EGL3 蛋白属于 bHLH 家族的转录因子,均与玉米的 R 转录因子同源,正调控拟南芥花青素的生物合成(Baudry et al., 2004; Escaray et al., 2017)。TTG1 属于 WD40 蛋白家族成员的 PAC1 进化枝, Koornneef(1981)报道能控制种皮颜色、花青素积累、种子粘液和根毛发育等。MYB、bHLH 和 WD40 调控因子通常形成三元 MBW 复合物发挥调节作用,直接调控花青素合成基因的表达,如 *DFR*、*BAN*、*LDOX*、*TT12*、*TT19* 和 *AHA10*(Xu et al., 2014)。深入研究花青素生物合成途径及调控信号有助于人们理解植物的相关生理机制,对改良

植物生长状况,提高作物经济效益具有潜在应用意义。

近年来,植物激素调控花青素的生物合成得到广泛关注。例如,通过施加外源激素可通过激活或抑制花青素合成相关基因的表达来控制水果中花青素的积累(Shen et al., 2014; Chen et al., 2016)。ABA 激素是植物体内重要的生长调节物质之一,它广泛参与调控植物的各种生理过程,如胚胎发育、种子休眠与萌发、幼苗生长、根系发育、果实成熟、叶片衰老,以及对干旱、高盐、高渗透压和低温等逆境胁迫的应答反应(Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Dejonghe et al., 2018; Brunetti et al., 2019)。ABA 信号途径关键转录因子 ABI5 属于 bZIP 家族成员,可被 SnRK2 激酶磷酸化,主要参与调控植物的种子萌发及萌发后生长等过程(Yu et al., 2015; Pan et al., 2018)。ABA 激素能促进某些植物果实中花青素的合成和积累(Hiratsuka et al., 2001; Jiang & Joyce, 2003; Shen et al., 2014; An et al., 2018)。但是,目前关于 ABA 调控拟南芥花青素合成的生物学功能及分子机制仍不清楚。本研究以拟南芥为实验材料,通过遗传学和分子生物学相关的实验方法探究了 ABA 对拟南芥幼苗花青素的诱导作用以及其信号调控拟南芥幼苗花青素合成的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

所有突变体都是野生型拟南芥 Columbia-0 遗传背景,突变种子 *tt8*、*myb-RNAi* 和 *pap1-D* 由杨洪全教授提供。将野生型拟南芥种子与突变体种子 *tt8*、*myb-RNAi* 和 *pap1-D*,先用 20% 的 84 消毒液漂

白 8 min 进行表面灭菌,再播种在含有 0.6%琼脂和 1%蔗糖的 1/2 MS 培养基上(pH 5.8),在 4 ℃ 春化 24 h 后置于 22 ℃ 的长日照条件下生长(光照/黑暗为 16 h/8 h)。所用 ABA 激素从 Sigma-Aldrich 公司购买,Taq DNA 聚合酶购自 Takara Biotechnology公司,其他常用试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 ABA 处理

参考 An et al.(2018)的方法,将拟南芥种子播种在添加不同浓度(0、0.25、0.5、0.75 μmol · L⁻¹) ABA 的 1/2 MS 琼脂培养基上,4 ℃ 春化 24 h 后置于长日照条件下,并在 22 ℃ 生长 6~12 d,观测幼苗花青素积累情况并取样用电子显微镜拍照。每个样品用 ABA 处理分析的生物重复不少于 3 个,且每个实验重复不少于 3 次。

1.3 花青素含量的测定

将含有 0.25 μmol · L⁻¹ ABA 的 1/2 MS 琼脂培养基上生长的 7 d 龄的幼苗,包括野生型植株 Col,突变体植株 *pap1-D*、*myb-RNAi* 和 *tt8* 在电子天平取样称重 W(g)后加入 1 mL 盐酸甲醇提取物(甲醇:盐酸体积比为 99:1),在 4 ℃ 条件下保持在暗处振荡 24 h。13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取浸出液分别在 530、657 nm 波长处测量吸光度(OD 值),花色素苷的相对含量用公式($A_{530}-0.25 \times A_{657}$) · g⁻¹ FW 计算(Xie et al., 2016)。实验至少重复 3 次。

1.4 RNA 提取和 RT-qPCR

采用 Hu & Yu(2014)的方法所述,使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从拟南芥幼苗中提取总 RNA 后逆转录成 cDNA 后进行定量实时 PCR(RT-qPCR)。第一链 cDNA 使用具有 oligo(dT)18 引物的 M-Mu LV 逆转录酶(Fermentas, EU),在 20 μL 反应体积中由 1.5 μg DNA 酶处理的 RNA 合成。使用 2×SYBR Green I master mix 在 Roche Light Cycler 480 实时 PCR 仪上进行 RT-qPCR(Hu & Yu, 2014)。拟南芥 *ACTIN2* 基因用作基因表达的内参基因。每个样品用于 RT-qPCR 分析的生物学重复至少 3 个,且对每个生物学重复分析至少有 2 个技术重复。用于检测转录物的基因特异性引物见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物 Table 1 Primers of RT-qPCR		
基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>DFR</i>	CTTCTTATACGAA-CAAGCAGCC	TGAAGGTACGTTATAT-TCGGGG
<i>UF3GT</i>	CGAGACCATTTC-CGTACAATC	CTAGAGGCGTCTTAGCTA-ACTC
<i>LDOX</i>	CTGATTCGATTGT-GATGCACAT	ACAATCTTATCCTTT-GGGGGTT
<i>MYB75</i>	AAAAAAGAGAGA-CATTACGCC	ATTAACGTCAACTTTTG-TGCGG
<i>TTG1</i>	TTCCTTCGATTG-GAACGATGTA	GCAAGTCTTAACAAAG-GCGTAT
<i>TT8</i>	ACTAAAGATAAGAG-GCTACCGC	ATGATTTACGTACGCAAT-GGTG
<i>MYB90</i>	ACTCAAGAAAAATA-ATGTTTGTGAAAA	AGGAACAATCGCAT-CAGCTTCT
<i>MYB113</i>	ATAAAAAATAGTTG-CAACGATGTCAA	TGCTGTTTCCGTAGCT-TCTGG
<i>MYB114</i>	ACTCAAGAAAAATA-ATGTTTGTGAAAA	CACGGTTCATGCTTCT-TACTCAGA
<i>HY5</i>	GTCAAAGGAAGC-GAGGGAGGAC	TGAGCTGAAACTCTGTTC-CTCAA
<i>GL3</i>	AGAAGGTGTCGGT-TAACAATGTTG	CCGATCCTTAAATTATCG-GTTAAAC
<i>EGL3</i>	ATGTGAATGTAG-GAGAAGATGAACCA	TGACAGTTAAGCAGAG-TAAACCGTC
<i>PAL</i>	CCATAAGATTG-GAGCTTTCGAG	GCCGTGAAAACCTT-GTCGAA
<i>C4H</i>	AAACAACCCCAA-CAGCTGGAA	CACTTTAGACTGTCTCG-GAGGAGG
<i>4CL</i>	AGGTTTTCAGG-TAGCTCCGG	AGTGAAGAACACTTTGTT-GATTCTCTT
<i>F3H</i>	GCCATTTTTTGAG-CAATGGG	TGAGGCGAGCAAGCTCCA
<i>TT2</i>	CTTCTCTTCTCG-GATCTCTCTCTTC	ATTACCTTGAGCAGGAAC-CAACT

1.5 酵母双杂交实验 (Y2H)

ABI5 的 CDs 全长为 1 326 bp,编码 442 个氨基酸。为验证 ABI5 蛋白与花青素合成相关蛋白的互作关系,将 ABI5 的全长序列克隆到 pGBKT7 构建质粒 BD-ABI5,参考 Chen et al.(2012)构建分段质粒:BD-ABI5¹⁻¹⁶⁴、BD-ABI5¹⁶⁵⁻²²⁰、BD-ABI5¹⁶⁵⁻⁴⁴²、BD-ABI5²²¹⁻³⁴⁹ 和 BD-ABI5³⁵⁰⁻⁴⁴²。将花青素合成相关促进因子的编码序列克隆到载体 pGADT7 中构得质粒 AD-MYB75、AD-MYB90、AD-MYB113、AD-MYB114、AD-TT8 和 AD-TTG1。参考 Xie et al.(2016)的方法,分别将其分段为 N 端和 C 端:MYB75 的第 1~122 个氨基酸为 N 端,第 123~249 个氨基酸为 C 端,构建分段质粒 AD-MYB75-N

表 2 各种表达载体构建引物

Table 2 Primers used for generating various clones

载体名称 Plasmid name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
AD-MYB90	GATTACGCTCATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ACCCGGGTGGAATTCCTAATCAAGTTC AACAGTCTCTCCATC
AD-MYB114	GATTACGCTCATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ACCCGGGTGGAATTCCTAAAAAATATCGACTTTTGGGC
AD-MYB75	GATTACGCTCATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ACCCGGGTGGAATTCCTAATCAAAATTCACAGTCTCTCCATC
AD-MYB75-N	GATTACGCTCATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ACCCGGGTGGAATTCCTTTTTCATCTTTATCTTACAACACGG
AD-MYB75-C	GATTACGCTCATATGAAACATGAACCGTGTGTAAGATAAAG	ACCCGGGTGGAATTCCTAATCAAAATTCACAGTCTCTCCATC
MYB75-nYFP	ATAGGATCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGG	ATATCTAGAATCAAAATTCACAGTCTCTCCATCG
AD-MYB113	GATTACGCTCATATGATGGGCGAATCACCCAAAG	ACCCGGGTGGAATTCCTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAA
AD-MYB113-N	GATTACGCTCATATGATGGGCGAATCACCCAAAG	ACCCGGGTGGAATTCGTTTATCATCTTCGTCTTACAGCATC
AD-MYB113-C	GATTACGCTCATATGAAGCAGCATGAACGATGCTGTA	ACCCGGGTGGAATTCCTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAA
MYB113-nYFP	ATAGGATCCATGGGCGAATCACCCAAAG	ATATCTAGAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAAAC
GAD-TT8	GAGGCCAGTGAATTCATGGATGAATCAAGTATTATCCGG	GAGCTCGATGGATCCCTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
GAD-TT8-N	GAGGCCAGTGAATTCATGGATGAATCAAGTATTATCCGG	GAGCTCGATGGATCCCGTAGCCTCTTATCTTTAGTGTGT
GAD-TT8-C	GAGGCCAGTGAATTCGTGAAAAACGGCGCCGTC	GAGCTCGATGGATCCCTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
TT8-nYFP	ATACTCGAGATGGATGAATCAAGTATTATTCGG	ATACTCGAGTAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
GAD- TTG1	GATTACGCTCATATGATGGATAATTCAGCTCCAGATTCC	ACCCGGGTGGAATTCCTAAACTCTAAGGAGCTGCATTTT
GAD- TTG1-N	GATTACGCTCATATGATGGATAATTCAGCTCCAGATTCC	ACCCGGGTGGAATTCATGAGCTATAAGCTGAGTCTCAACAAC
GAD- TTG1-C	GATTACGCTCATATGGATAAAGAGGTTTCATGACATTGCTT	ACCCGGGTGGAATTCCTAAACTCTAAGGAGCTGCATTTT
TTG1-nYFP	ATATCTAGAATGGATAATTCAGCTCCAGATTCC	ATATCTAGAAACTCTAAGGAGCTGCATTTTGTAG
GUS-nYFP	CGCGGATCC ATGGTCCGTCCTGTAGAAAC	GCTCTAGA TCATTGTTTGECTCCCTGCT
GUS-cYFP	GCTCTAGA ATGGTCCGTCCTGTAGAAAC	CGCGGATCCTCATTGTTTGCTCCCTGCT
BD-ABI5	ATAGAATTCTCAGACGAGAGTAGAGTCGTCC	ATAGGATCCTTAGAGTGACAACTCGGGTTCC
BD-ABI5 ¹⁻¹⁶⁴	ATAGAATTCTCAGACGAGAGTAGAGTCGTCC	ATAGGATCCTTATATCTCAGACCAAACCTCATCAACAG
BD-ABI5 ¹⁶⁵⁻²²⁰	ATAGAATTCATAGAGGTGCTGCTAGCGGTAAT	ATAGGATCCTTAATGTTCTCTAACCACACCAGCCTT
BD-ABI5 ¹⁶⁵⁻⁴⁴²	ATAGAATTCATAGAGGTGCTGCTAGCGGTAAT	ATAGGATCCTTAGAGTGACAACTCGGGTTCC
BD-ABI5 ²²¹⁻³⁴⁹	ATAGAATTCCCCACTAATCTAAACCTAATC AAA	ATAGGATCCTTAACCATCCACTACTCTTTTCCCTCC
BD-ABI5 ³⁵⁰⁻⁴⁴²	ATAGAATTCCCAGTGGAGAAAGTAGTGGAGAGAA	ATAGGATCCTTAGAGTGACAACTCGGGTTCC
ABI5-cYFP	ATAGAGCTCATGCTAACTAGAGAAACGAAGTTGACG	ATAGGATCCGAGTGACAACTCGGGTTCCCTC

和 AD-MYB75-C; MYB113 的第 1~123 个氨基酸为 N 端,第 124~247 个氨基酸为 C 端,构建分段质粒 AD-MYB113-N 和 AD-MYB113-C; TT8 的第 1~358 个氨基酸为 N 端,第 359~519 个氨基酸为 C 端,构建分段质粒 AD-TT8-N 和 AD-TT8-C; TTG1 的第 1~174 个氨基酸为 N 端,第 175~342 个氨基酸为 C 端,构建分段质粒 AD-TTG1-N 和 AD-TTG1-C。将融合于不同载体的质粒进行酵母双杂交实验。用于构建各种克隆的引物见表 2。

1.6 双分子荧光互补实验 (BiFC Assays)

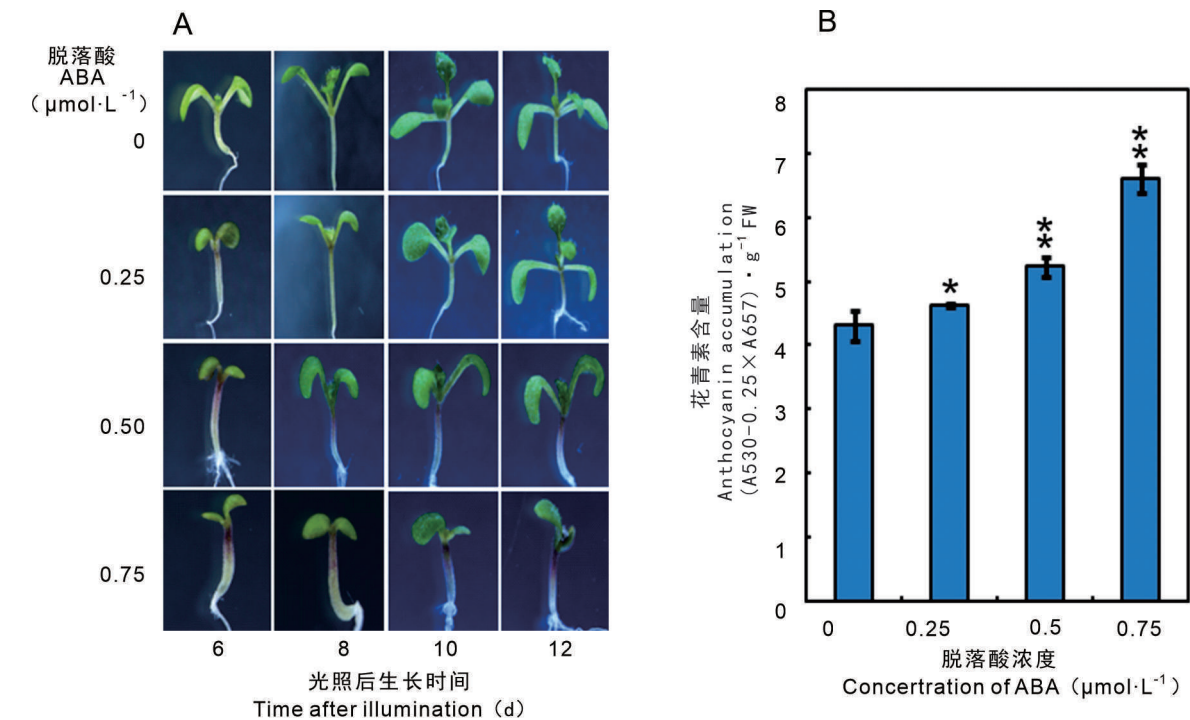
将 173 个氨基酸 N 末端增强的 YFP (nYFP) 和 64 个氨基酸 C 末端片段 (cYFP) 的 cDNA 序列进行 PCR 扩增并克隆到 pFGC5941 中分别产生 pFGC-nYFP 和 pFGC-cYFP (Kim et al., 2008)。将 ABI5 的编码序列融合于 pFGC-cYFP 中构建质粒 ABI5-

cYFP,而 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114、TT8 和 TTG1 的编码序列引入 pFGC-nYFP 以与 nYFP 形成 N 末端框内融合。将得到的质粒导入根癌土壤杆菌 (菌株 GV3101) 中,如 Hu & Yu (2014)所述进行烟草浸润,将不同质粒融合注射烟草叶片,常温放置于暗处 48 h 后用荧光染料染色,撕取注射叶片部分叶肉组织涂片,在共聚焦激光扫描显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan) 下观察 YFP 和 DAPI 荧光。本实验中用于构建各种克隆的引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 ABA 促进拟南芥幼苗中花青素的积累

将 Columbia 生态型背景的野生型 (WT) 种子播种在含有不同浓度 ABA (0、0.25、0.50、0.75



* 和 ** 分别表示不同浓度与 0 比较有显著差异 ($P<0.05$) 和极显著差异 ($P<0.01$)。
* and ** mean existing significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) compare to 0, respectively.

图 1 ABA 诱导野生型拟南芥幼苗中花青素的合成
Fig. 1 ABA induces anthocyanin synthesis in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 1/2 MS 培养基上,验证外源施加 ABA 是否能诱导花青素的合成。观察到,ABA 浓度的增加能诱导植物体花青素的积累,表现为幼苗茎尖颜色加深,呈现出紫红色的表型。进一步用显微镜观察 ABA 处理的幼苗表型,并拍摄不同天数的幼苗图片。随着 ABA 浓度的增加,野生型幼苗的生长越缓慢,幼苗茎尖花青素的积累越明显(图 1:A)。通过测量不同浓度 ABA 处理的幼苗(光下生长 6 d)中的花青素含量发现,野生型幼苗在不含 ABA 的 1/2 MS 板上花青素含量最低,在含 $0.75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 板上的花青素含量最高,随着 ABA 浓度增加花青素含量增多(图 1:B)。测量结果与观察到的花青素积累表型趋势一致。这表明外源 ABA 处理能促进拟南芥幼苗中花青素的生物合成,从而促进其在植物体内的积累,且随着 ABA 浓度的增加呈递增趋势。

2.2 ABA 诱导花青素合成相关基因的表达

PAL、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*LDOX* 和

UF3GT 等是花青素合成的关键结构基因,*MYB75*、*MYB90*、*MYB113*、*MYB114*、*TT8*、*GL3*、*EGL3*、*TTG1*、*HY5* 和 *TT2* 是控制结构基因表达的重要调节基因,它们都参与花青素合成途径的重要酶促反应,它们的表达量上升均能导致拟南芥花青素的合成途径被激活,从而使得植物体内的花青素含量上升 (Dubos et al., 2008; Gonzalez et al., 2008; Petroni & Tonelli, 2011)。对不同浓度 ABA 诱导处理的野生型幼苗进行总 RNA 提取,逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 实验,检测上述所有花青素合成结构基因和调控基因的相对表达量。图 2 结果显示,在 ABA 处理的植物中, *C4H*、*DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 等花青素结构基因的表达显著增加,且随着 ABA 浓度增加呈正相关关系。此外, *MYB75*、*MYB90*、*TT8*、*GL3*、*EGL3*、*TTG1*、*TT2* 和 *HY5* 等调节基因的表达水平也受 ABA 的诱导。这说明 ABA 激素能通过上调某些花青素合成相关基因的表达水平来诱导拟南芥幼苗中花青素的合成。

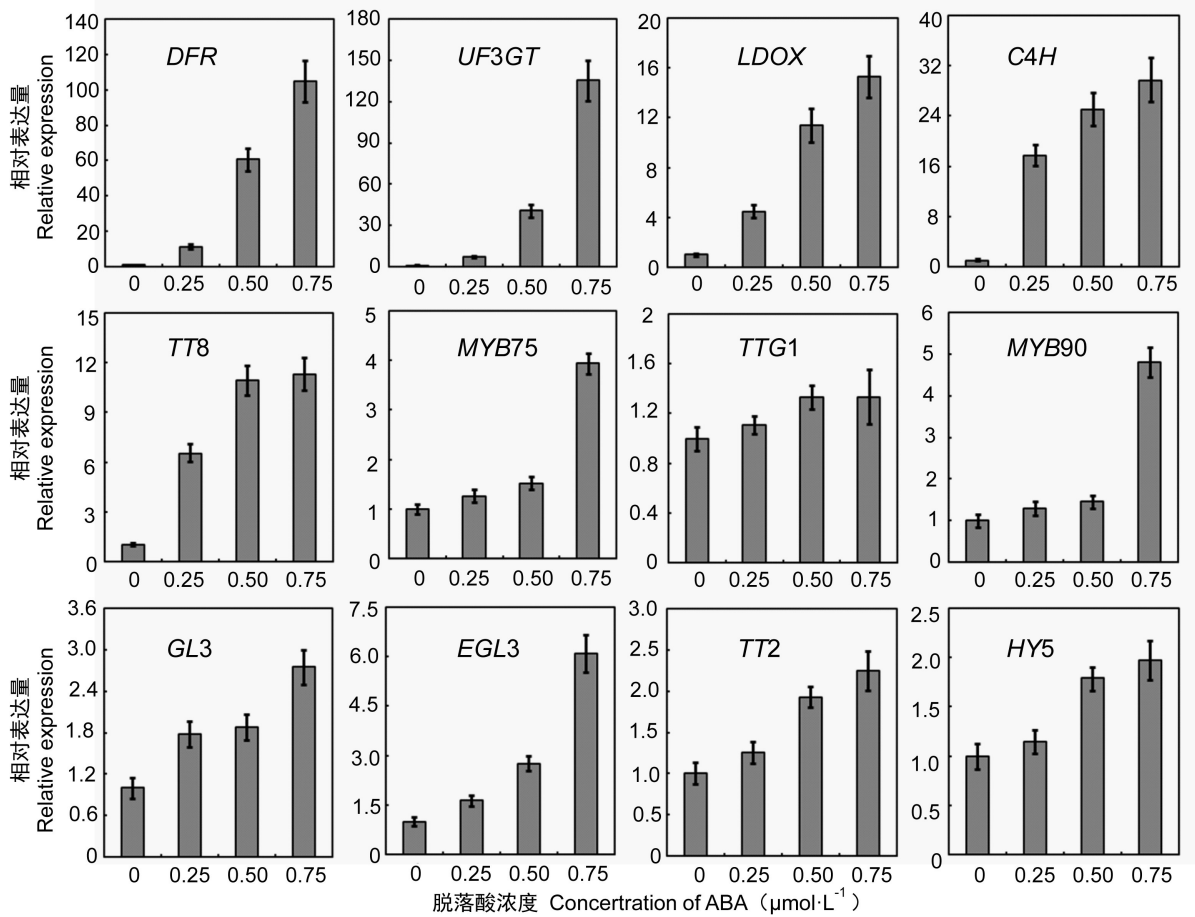


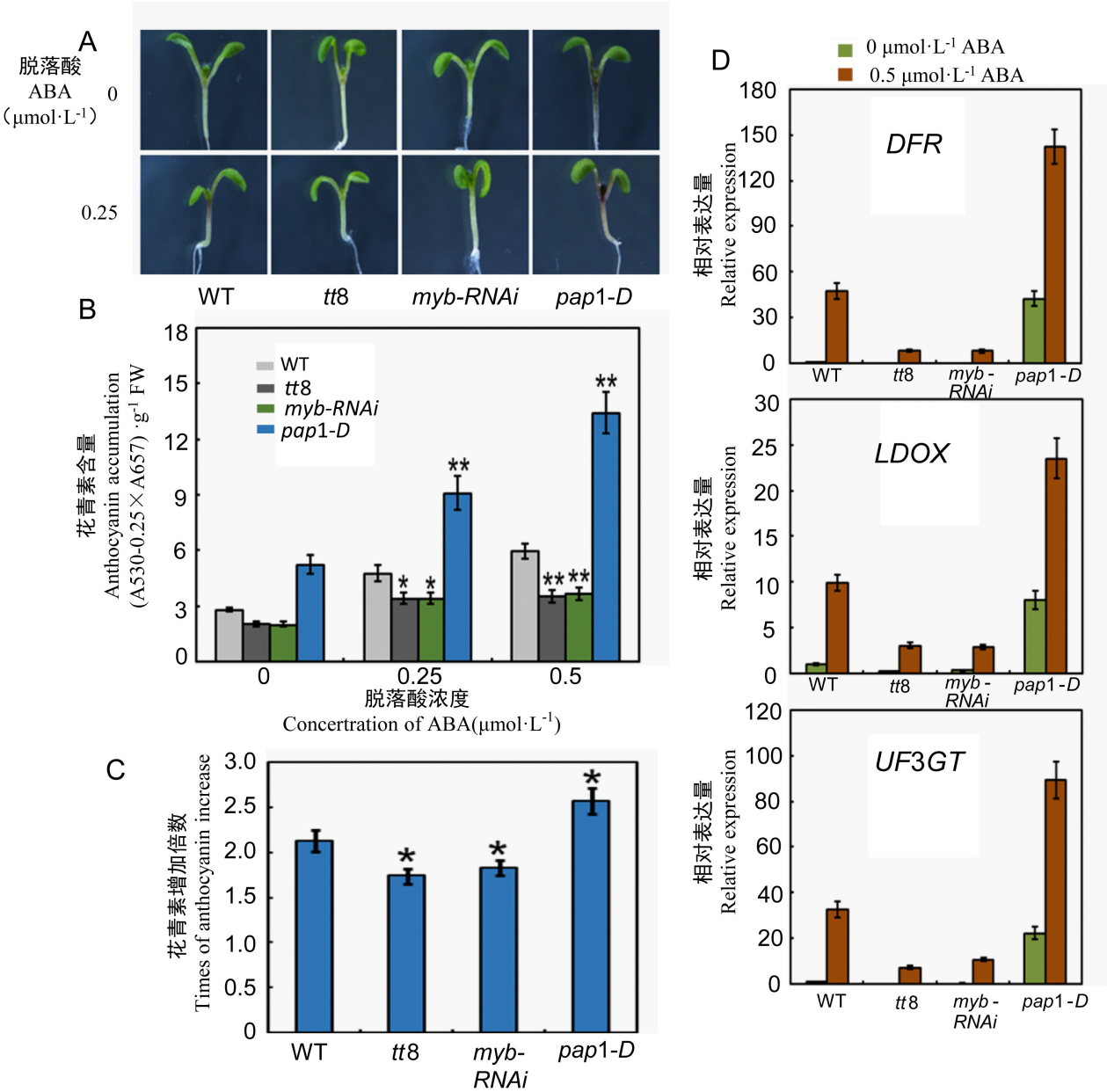
图 2 ABA 诱导拟南芥花青素合成相关基因的表达

Fig. 2 ABA induces expression of anthocyanin synthesis related genes in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings

2.3 ABA 诱导花青素的合成部分依赖于 MYB75 和 TT8 调节蛋白

本研究进一步通过遗传学实验分析了 ABA 促进花青素的合成是否依赖于上述调节蛋白的正常功能。我们收取同一批次的 Columbia 生态型背景野生型种子,花青素缺失突变体种子 *myb-RNAi* 和 *tt8*,以及花青素合成增强的植物种子 *pap1-D*,播种到具有 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 浓度的 1/2 MS 培养基上。如图 3:A 所示,光下生长 6 d 的野生型植物幼苗茎尖呈浅紫色,而突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 的幼苗无明显的颜色改变,整个茎尖以及叶片都为绿色;相反,*pap1-D* 植物茎尖的颜色明显比野生型植物更深。为了进一步验证该结果,本研究测量了相关植物中的花青素含量。图 3:B 结果表明,突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 在 0.25 和 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

L^{-1} ABA 浓度的 1/2 MS 培养基上的花青素含量明显比野生型植物低,而 *pap1-D* 植株的花青素含量显著高于野生型植物中的。进一步分析发现,野生型植物在 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 浓度的 1/2 MS 培养基上花青素与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 浓度的 1/2 MS 培养基上花青素的比值显著高于突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 相对应的比值(图 3:C)。此外,本研究还检测了花青素合成相关结构基因(如 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT*)的表达量。提取 0、0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理的野生型植物以及相关突变体植物的总 RNA,逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 实验,检测它们的相对表达量。图 3:D 结果显示,在 ABA 处理的情况下,*DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 在突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 中的相对表达量明显低于野生型植物,而在 *pap1-D* 植株中的相对表达量明显高于野生型植物。



* 和 ** 分别表示与 WT 比较存在显著差异 ($P<0.05$) 和极显著差异 ($P<0.01$)。
* and ** mean existing significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$) compare to WT, respectively.

图 3 ABA 诱导拟南芥花青素的合成部分依赖于 TT8 和 MYB75 等转录因子
Fig. 3 ABA induces anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings is dependent on TT8 and MYB75 transcription factors

这表明 ABA 促进拟南芥幼苗花青素的合成部分依赖于 MYB75 和 TT8 等调节蛋白的正常功能。

2.4 MYB75、TT8 和 TTG1 蛋白与 ABI5 转录因子相互作用

为探究 ABA 激素调控拟南芥幼苗花青素合成的分子机理,本研究使用酵母双杂交系统检测了相

关蛋白之间的相互作用关系。构建质粒 BD-ABI5 作为诱饵(Bait),构建质粒 AD-MYB75、AD-MYB90、AD-MYB113、AD-MYB114、AD-TT8 以及 AD-TTG1 作为潜在的互作猎物(Prey)。将相关的诱饵质粒和猎物质粒共转入酵母细胞中,图 4 结果显示 ABI5 与 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114、TT8 和 TTG1

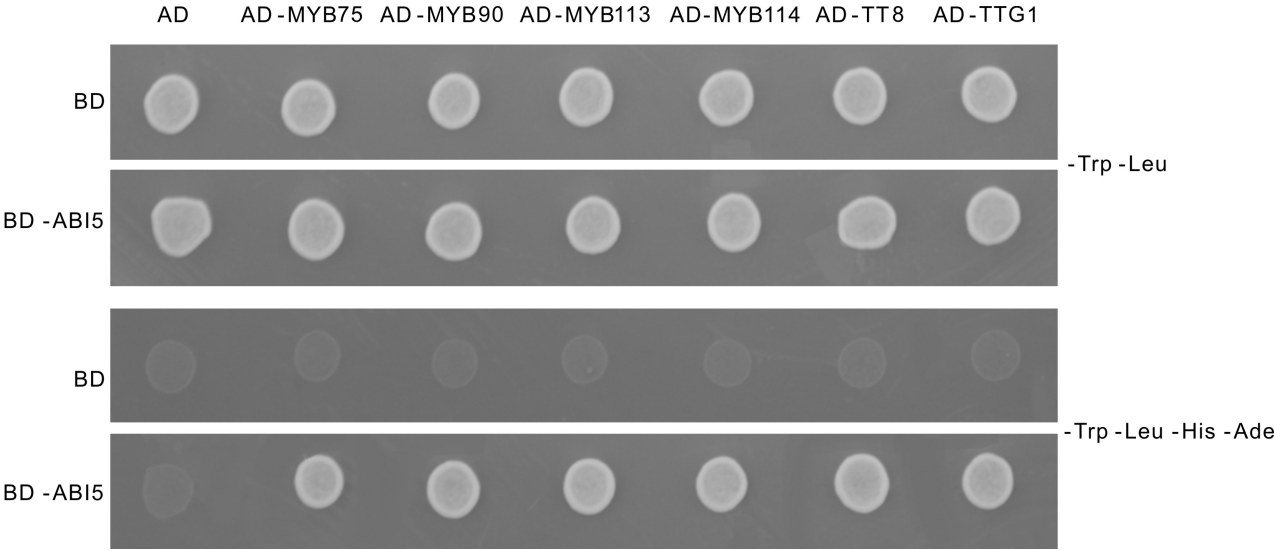


图 4 ABA 相关的 ABI5 转录因子与花青素合成相关的 TT8、MYB75 和 TTG1 等蛋白在酵母中相互作用
Fig. 4 ABA-related ABI5 transcription factor physically interacts with the anthocyanin synthesis-associated TT8, MYB75, and TTG1 proteins in yeast

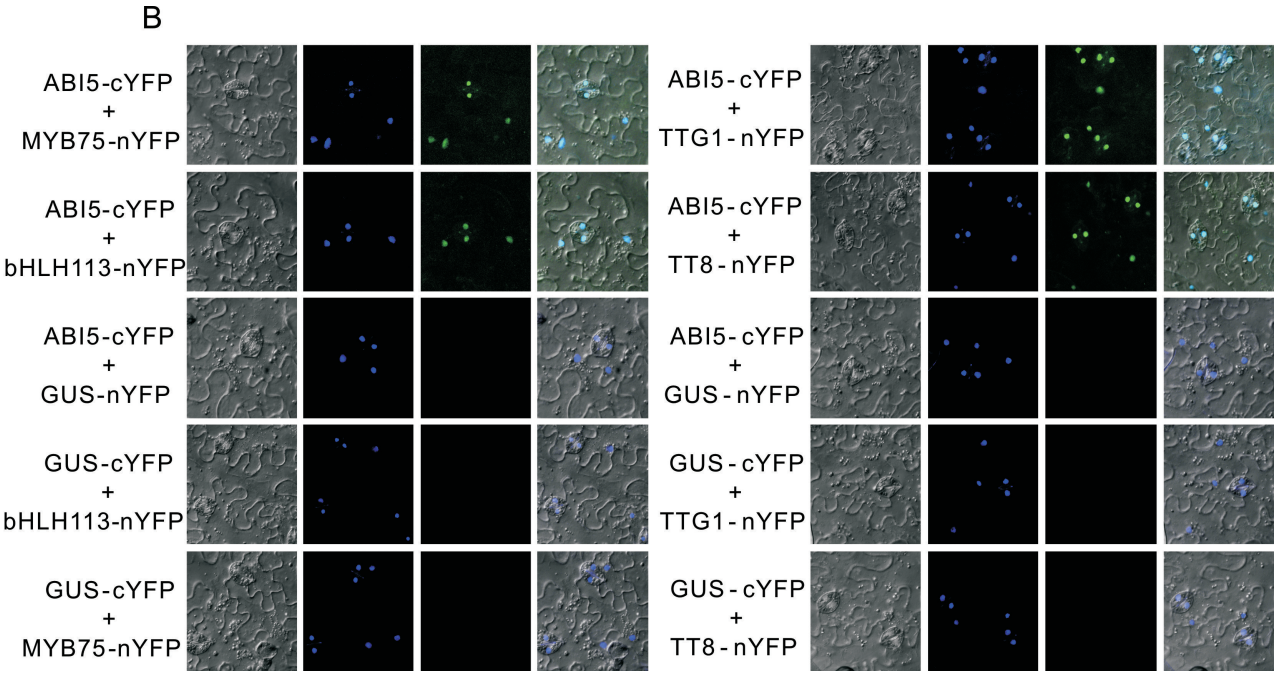


图 5 ABA 相关的 ABI5 转录因子与花青素合成相关的 TT8、MYB75 和 TTG1 等蛋白在植物细胞中相互作用
Fig. 5 ABA-related ABI5 transcription factor physically interacts with the anthocyanin synthesis-associated TT8, MYB75, and TTG1 proteins in plant cells

在酵母细胞中均有强相互作用。进一步采用双分子荧光互补实验在植物体内进行检测分析。将 ABI5 与 YFP 蛋白的 C 端融合形成 ABI5-cYFP, 将 MYB75、MYB113、TT8 和 TTG1 分别与 YFP 蛋白的 N 端融合形成 MYB75-nYFP、MYB113-nYFP、TT8-

nYFP 和 TTG1-nYFP。当 ABI5-cYFP 与 MYB75-nYFP、MYB113-nYFP、TT8-nYFP 或 TTG1-nYFP 被共转化到烟草叶片中时,能观察到强的 YFP 荧光信号(图 5)。与此对应的是,在相关的对照组中未能观察到任何荧光信号(图 5)。这表明 ABI5 转录因子

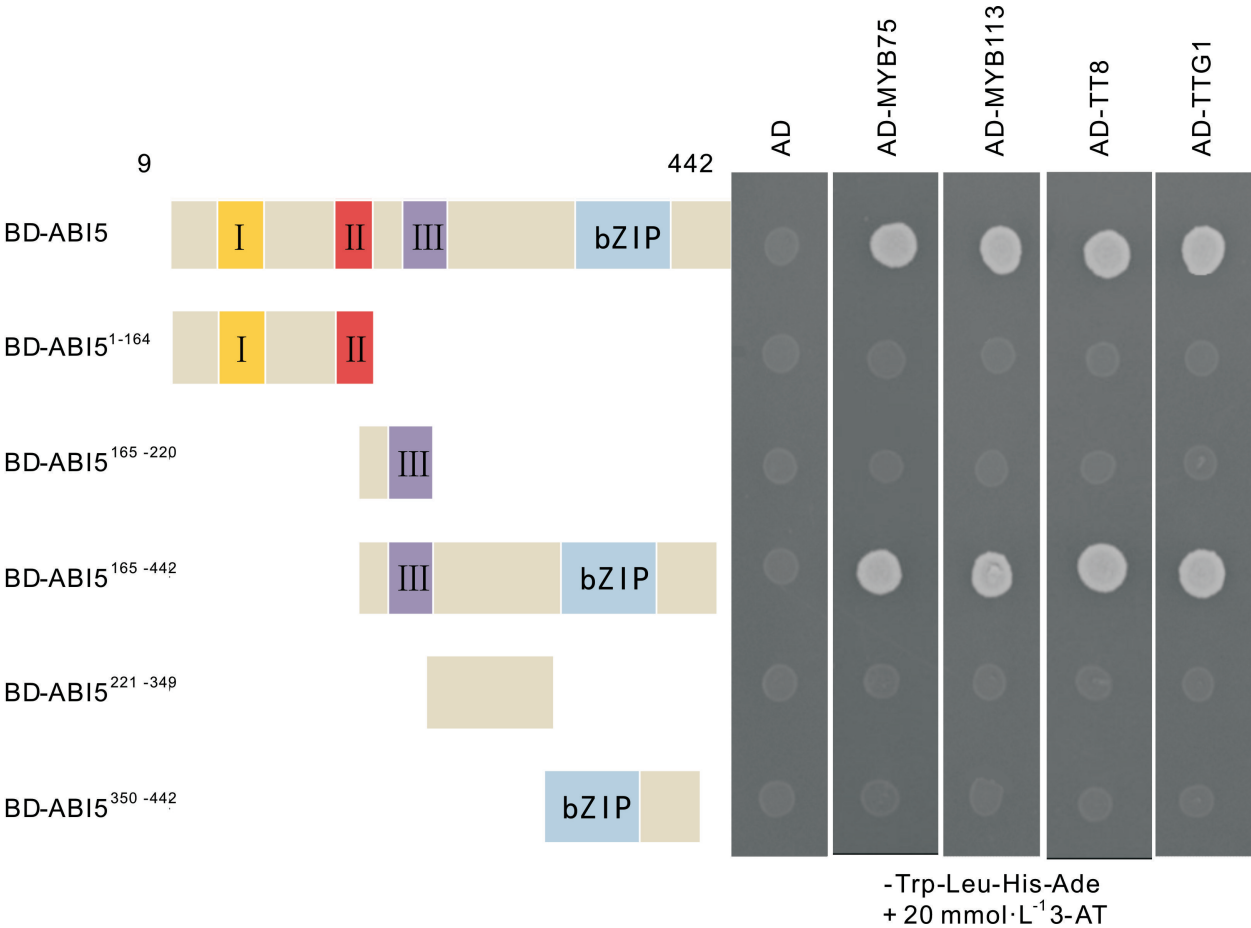


图 6 ABI5 转录因子的 C 端结构域与花青素合成相关的 TT8、MYB75 和 TTG1 等蛋白在酵母中相互作用
Fig. 6 C-terminal region of ABI5 transcription factor physically interacts with the anthocyanin synthesis-associated TT8, MYB75, and TTG1 proteins in yeast

能与花青素合成相关的 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白相互作用形成复合物。

2.5 MYB75、TT8 和 TTG1 蛋白与 ABI5 转录因子的 C 端结构域相互作用

将 ABI5 突变成若干区段,并构建成相应的诱饵质粒(图 6)。酵母双杂交实验发现,ABI5 转录因子的 C 端 278 个氨基酸(含保守的 bZIP 结构域)对于它与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白的相互作用是必须的。如图 6 所示,当 ABI5 转录因子缺失 C 端 278 个氨基酸时,它不能与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白相互作用;相反,当 ABI5 转录因子缺失 N 端 164 个氨基酸时,它仍然可以与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白的相互作用。这表明 ABI5 的 C 端氨基酸结构域介导了它与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白之间的相互作用。

2.6 ABI5 转录因子与 MYB7、MYB113 和 TTG1 的 N 端以及 TT8 的 C 端结构域相互作用

分别将 MYB75、MYB113、TT8 和 TTG1 等蛋白突变为 N 端和 C 端,并构建成相应的猎物质粒(图 7)。酵母双杂交实验发现,MYB7、MYB113 和 TTG1 的 N 端对于它们与 ABI5 转录因子的相互作用是非常重要的,当 MYB7、MYB113 和 TTG1 的 N 端缺失时,它们不能与 ABI5 相互作用(图 7)。相反,TT8 蛋白的 C 端对于它与 ABI5 转录因子的相互作用是必须的,当 TT8 的 C 端缺失时,它不能与 ABI5 相互作用(图 7)。

3 讨论与结论

在 ABA 核心信号通路中,ABA 结合 PYR/PYL/

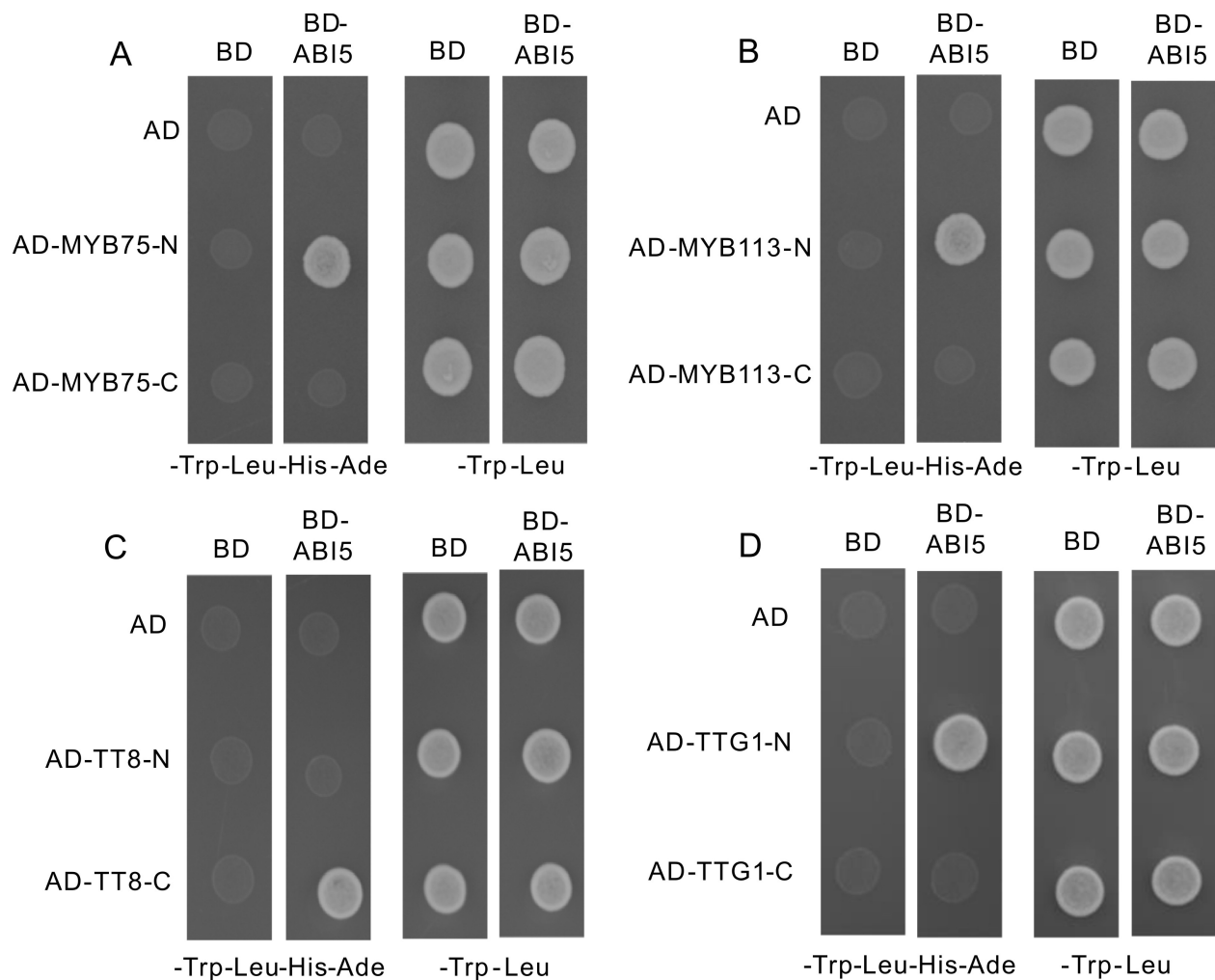


图 7 ABI5 转录因子与 MYB75 和 TTG1 的 N 端结构域在酵母中相互作用

Fig. 7 ABI5 transcription factor physically interacts with the N-terminal regions of MYB75 and TTG1 in yeast

RCAR 等受体蛋白从而诱导后者的构象变化,稳定 ABA 受体和 PP2C 磷酸酶之间的相互作用,导致 PP2C 失活和 SNF1 相关蛋白激酶(SnRK2)的去阻遏。随后,SnRK2 磷酸化并激活许多下游信号组分,如 ABI5 转录因子、离子通道和 NADPH 氧化酶等,以实现非生物胁迫耐受(Fujii & Zhu, 2009; Park et al., 2009; Bauer et al., 2013; Yu & Xie, 2017)。此外,ABA 激素能促进某些植物果实中花青素的合成和积累,从而影响果实的品质(Koyama et al., 2010; Jia et al., 2011; Shen et al., 2014; An et al., 2018)。例如,ABA 作为信号分子调控花青素合成,发挥促进甜樱桃果实成熟的作用(Shen et al., 2014)。同样,在葡萄果皮和细胞悬浮系中,外源施加 ABA 可以诱导多个花青素合成结构基因和调节

基因的表达,促进花青素的积累(Jeong et al., 2004; Gagné et al., 2011)。在 An et al.(2018)的研究中,他们发现苹果 MYB 转录因子 MdMYB1 激活花青素生物合成基因的表达也响应 ABA。Loret et al.(2008)发现 ABA 可以增强蔗糖诱导拟南芥中花青素的合成和积累,表明 ABA 和蔗糖对花青素的合成具有协同激活作用。已有少数研究表明 ABA 与植物色素或果皮颜色等存在内在联系,但 ABA 调控拟南芥花青素合成的生物学功能和分子机理仍有待深入研究。

本研究发现,ABA 处理能促进拟南芥野生型幼苗花青素的积累,花青素含量测定结果也验证了同样的结论。通过分析相关基因的表达情况,实验结果表明在 ABA 处理的野生型植物中, *C4H*、*DFR*、

LDOX 和 *UF3GT* 等花青素结构基因的表达显著增加,并且随着 ABA 浓度增加呈正相关关系。除此之外,*MYB75*、*MYB90*、*TT8*、*GL3*、*EGL3*、*TTG1*、*TT2* 和 *HYS* 等调节基因的表达水平也受 ABA 的诱导。这说明 ABA 激素能够通过上调花青素合成相关基因的表达水平来诱导拟南芥幼苗中花青素的合成。本研究进一步对花青素合成相关的突变体植物,如 *myb-RNAi*、*tt8* 和 *pap1-D*,进行了外源 ABA 激素处理。通过表型分析发现,突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 的花青素含量明显比野生型植物低,而 *pap1-D* 植株的花青素含量显著高于野生型植物中的。与此相一致的是在 ABA 处理的情况下,*DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 等结构基因在突变体植株 *myb-RNAi* 和 *tt8* 中的相对表达量明显较野生型植物低,而在 *pap1-D* 植株中的相对表达量明显较野生型植物高。综上所述,本研究认为 ABA 激素诱导拟南芥幼苗中花青素的合成可能需要 MYB75 和 TT8 等调节蛋白。

ABI5 转录因子是植物 ABA 信号转导途径中的关键转录因子之一,可以参与调控植物种子萌发以及幼苗生长等生理过程(Finkelstein, 2006; Pan et al., 2018),还可通过与其他蛋白相互作用介导不同信号途径之间的交互作用(Yu et al., 2015)。ABA 是否通过 ABI5 与花青素合成调控因子(如 MYB75、TT8 和 TTG1 等)之间发生相互作用,从而影响花青素的生物合成。本研究中,ABI5 转录因子确实能与花青素合成相关的重要调节蛋白相互作用,如 MYB 类的 MYB75、MYB90、MYB13 和 MYB114, bHLH 类的 TT8,以及 WD40 类的 TTG1。通过进行分段实验验证了 ABI5 与花青素合成相关调节蛋白发生相互作用的具体氨基酸结构域。这表明 ABI5 转录因子的 C 端 278 个氨基酸(含保守的 bZIP 结构域)对于它与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白的相互作用是非常重要的。当 ABI5 转录因子缺失 C 端 278 个氨基酸时,它不能与 MYB75、TT8 和 TTG1 等调节蛋白相互作用。本研究还进一步明确了 ABI5 转录因子与 MYB75、MYB113 和 TTG1 的 N 端以及 TT8 的 C 端相互作用。因此,本研究认为 ABA 信号途径中的 bZIP 类转录因子 ABI5 能与花青合成相关的 MYB75、TT8 及 TTG1 等蛋白相互作用形成复合物。将来通过详细分析 ABI5 转录因子相关的突变体或

高表达转基因植物有望进一步明确 ABI5 转录因子调控花青素合成的功能及可能的分子机理。本研究初步揭示了 ABA 信号途径与花青素合成之间的内在联系,进一步研究将揭示 ABA 诱导拟南芥幼苗花青素合成的调控机制。

参考文献:

- AN JP, YAO JF, XU RR, et al., 2018. Apple bZIP transcription factor MdbZIP44 regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation [J]. *Plant Cell Environ*, 41(11):2678–2692.
- BAUDRY A, HEIM MA, DUBREUCQ B, et al., 2004. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 39(3):366–380.
- BAUER H, ACHE P, LAUTNER S, et al., 2013. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis [J]. *Curr Biol*, 23(1):53–57.
- CHEN JX, MAO LC, MI HB, et al., 2016. Involvement of abscisic acid in postharvest water-deficit stress associated with the accumulation of anthocyanins in strawberry fruit [J]. *Postharvest Biol Technol*, 111:99–105.
- CHEN R, JIANG HL, LI L, et al., 2012. The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors [J]. *Plant Cell*, 24(7):2898–2916.
- DEJONGHE W, OKAMOTO M, CUTLER SR, 2018. Small molecule probes of ABA biosynthesis and signaling [J]. *Plant Cell Physiol*, 59(8):1490–1499.
- DENG YX, LU SF, 2017. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 36(4):257–290.
- DUBOS C, LE GOURRIEREC JL, BAUDRY A, et al., 2008. MYB2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 55(6):940–953.
- ESCARAY FJ, PASSERI V, PEREA-GARCIA A, et al., 2017. The R2R3-MYB *TT2b* and the bHLH *TT8* genes are the major regulators of proanthocyanidin biosynthesis in the leaves of *Lotus* species [J]. *Planta*, 246(2):243–261.
- FAN XP, FAN BH, WANG YX, et al., 2016. Anthocyanin accumulation enhanced in *Lc*-transgenic cotton under light and increased resistance to bollworm [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 10: 1–11.
- FANG HC, DONG YH, YUE XX, et al., 2019. The B-box zinc finger protein MdBBOX20 integrates anthocyanin accumulation in response to ultraviolet radiation and low temperature [J]. *Plant Cell Environ*, (1365–3040) (Electronic): T-aheadofprint.
- FINKELSTEIN RR, 2006. Studies of abscisic acid perception finally flower [J]. *Plant Cell*, 18(4):786–791.
- FUJII H, ZHU JK, 2009. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 ab-

- scisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(20):8380–8385.
- GAGNE S, CLUZET S, MERILLON JM, et al., 2011. ABA initiates anthocyanin production in grape cell cultures [J]. *J Plant Growth Regul*, 30(1):1–10.
- GONZALEZ A, ZHAO MZ, LEAVITT JM, et al., 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant J*, 53(5):814–827.
- HIRATSUKA S, ONODERA H, KAWAI Y, et al., 2001. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured *in vitro* [J]. *Sci Hortic*, 90(1–2):121–130.
- HU YR, YU DQ, 2014. Brassinosteroid insensitive 2 interacts with abscisic acid insensitive 5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 26(11):4394–4408.
- JEONG ST, GOTO-YAMAMOTO N, KOBAYASHI S, et al., 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. *Plant Sci*, 167(2):247–252.
- JIA HF, CHAI YM, LI CL, et al., 2011. Absciscic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening [J]. *Plant Physiol*, 157(1):188–199.
- JIANG YM, JOYCE DC, 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit [J]. *Plant Growth Regul*, 39(2):171–174.
- KOORNNEEF M, 1981. The complex syndrome of *ttg* mutans [J]. *Arabidopsis Inf Serv*, 18(1981):45–51.
- KOYAMA K, SADAMATSU K, GOTO-YAMAMOTO N, 2010. Absciscic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the *Cabernet sauvignon* grape [J]. *Funct Integr Genomics*, 10(3):367–381.
- LIANG J, HE JX, 2018. Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 498(4):946–953.
- LORETI E, POVERO G, NOVI G, et al., 2008. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 179(4):1004–1016.
- MA D, CONSTABEL CP, 2019. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 24(3):275–289.
- MAIER A, SCHRADER A, KOKKELINK L, et al., 2013. Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 74(4):638–651.
- NAKASHIMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, 2013. ABA signaling in stress-response and seed development [J]. *Plant Cell Rep*, 32(7):959–970.
- PAN JJ, WANG HP, HU YR, et al., 2018. *Arabidopsis* VQ18 and VQ26 proteins interact with ABI5 transcription factor to negatively modulate ABA response during seed germination [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 95(3):529–544.
- PARK SY, FUNG P, NISHIMURA N, et al., 2009. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins [J]. *Science*, 324(5930):1068–1071.
- PEIFFER DS, WANG LS, ZIMMERMAN NP, et al., 2016. Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 4(1):72–82.
- PETRONI K, TONELLI C, 2011. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs [J]. *Plant Sci*, 181(3):219–229.
- ROWAN DD, CAO MS, WANG KL, et al., 2009. Environmental regulation of leaf colour in red 35S: *PAP1 Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytol*, 182(1):102–115.
- SHEN XJ, ZHAO K, LIU LL, et al., 2014. A role for PacMYBA in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.) [J]. *Plant Cell Physiol*, 55(5):862–880.
- SHIN DH, CHO M, CHOI MG, et al., 2015. Identification of genes that may regulate the expression of the transcription factor production of anthocyanin pigment 1 PAP1/MYB75 involved in *Arabidopsis* anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 34(5):805–815.
- TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A, 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. *Plant J*, 54(4):733–749.
- WEI JY, WU HJ, ZHANG HQ, et al., 2018. Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice [J]. *Int J Mol Med*, 41(3):1608–1618.
- XIE Y, TAN HJ, MA ZX, et al., 2016. DELLA proteins promote anthocyanin biosynthesis via sequestering MYBL2 and JAZ suppressors of the MYB/bHLH/WD40 complex in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant*, 9(5):711–721.
- XU WJ, GRAIN D, BOBET S, et al., 2014. Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed [J]. *New Phytol*, 202(1):132–144.
- YU FF, WU YR, XIE Q, 2015. Precise protein post-translational modifications modulate ABI5 activity [J]. *Trends Plant Sci*, 20(9):569–575.
- YU FF, XIE Q, 2017. Non-26S proteasome endomembrane trafficking pathways in ABA signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 22(11):976–985.
- ZHANG BP, SCHRADER A, 2017. Transparent Testa Glabra 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis [J]. *Plants (Basel)*, 6(4):65.
- ZHAO DQ, TAO J, 2015. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants [J]. *Front Plant Sci*, 6:261.