

光调控因子HY5及HYH在蔗糖诱导花青素积累中作用

王立光, 李静雯, 叶春雷, 陈 军, 罗俊杰
(甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以拟南芥为材料, 研究了光调控因子 HY5、HYH 在蔗糖胁迫下花青素积累过程中的作用。结果表明, 蔗糖胁迫环境下诱导的花青素(Anthocyanin)的积累依赖于光, 糖胁迫诱导花青素的积累过程必须在光存在的条件下进行, 在暗处, 即使施加高浓度的糖胁迫, 也不能明显的诱导花青素的产生, 且在暗处短期内不会因胁迫时间的延长而改变花青素的积累量。在这个过程中光调控因子 HY5、HYH 起了重要作用。与野生型拟南芥 Col-0、WS 相比, 缺失突变体在糖胁迫环境下花青素积累明显减少。

关键词: 蔗糖诱导; 花青素; HY5; HYH

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)01-0021-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.01.006

Effect of Light Regulator HY5 and HYH on Sucrose-specific Induction of Anthocyanin Accumulation

WANG Liguang, LI Jingwen, YE Chunlei, CHEN Jun, LUO Junjie

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: *Arabidopsis thaliana* was used as the material, the effect of light regulator HY5、HYH on anthocyanin accumulation under sucrose stress were studied. The results indicated that the accumulation of anthocyanin induced by sucrose stress depended on light, and the process of anthocyanin accumulation induced by sucrose stress must be carried out in the presence of light. When high concentration of sucrose stress was applied in the dark, the production of anthocyanin could not be obviously induced. The experiment also proved that the accumulation of anthocyanin in the dark would not change with the prolongation of stress time in a short term. In addition, the light regulator HY5 and HYH played an important role in this process. Compared with wild type control, the anthocyanin accumulation of deletion mutants decreased significantly under sugar stress.

Key words: Sucrose-induction; Anthocyanin; HY5; HYH

植物在遭受逆境胁迫时会表现出一系列的表型特征, 通常糖胁迫时花青素的积

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 甘肃省农业科学院中青年基金(2016GAAS53); 国家现代农业产业技术体系(GARS-17-SYZ-6); 甘肃省农业科学院科技创新工程(2015GAAS02); 国家自然科学基金(31660391、31460350)。

作者简介: 王立光(1982—), 男, 山东临沂人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物分子与生理研究工作。Email: wodepengyouwlg@163.com。

通信作者: 罗俊杰(1962—), 男, 陕西华县人, 研究员, 主要从事作物栽培与生态研究工作。Email: sjsljie@gsagr.ac.cn。

执笔人: 叶春雷

累就是一个重要的表现。已有很多研究表明,花青素对植物抵抗逆境胁迫起到一定的防御作用,虽然植物本身有一套自己的防御自由基和活性氧威胁的防御系统,但是在逆境胁迫下有时这套系统不足以抵抗活性氧或者自由基的攻击,此时需要花青素发挥作用,对细胞膜和 DNA 进行保护^[1-2]。花青素的积累情况可以反映植物遭受逆境胁迫的程度,同时具有对逆境胁迫所造成的伤害进行抵御的作用。目前,一方面由于花青素的纯天然特性可以使其在生产、生活等领域得到广泛的安全利用;另一方面由于其在植物生理方面的有益作用,使对花青素的研究也得到足够的重视,尤其花青素对紫外具有特殊的防护作用,可以使植物免受紫外的伤害,故很多研究者做了大量的研究工作^[3-6]。花青素的积累受光、温度、激素等外界因素影响已被证实^[7-10]。植物光形态建成中 COP1 调节的调控因子 HY5、HYH 是参与光影响植物的一个重要的组分^[11-12],光形态建成相关的光调控因子 HY5、HYH 在逆境胁迫下对花青素的积累所起的作用也就不得不引起人们的关注。我们研究了光调控因子 HY5、HYH 在糖胁迫环境下对花青素积累的作用,为进一步研究 HY5、HYH 在调节花青素抵御逆境的作用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 植物材料与培养

以野生型拟南芥 Col-0、WS 及相应的突变体 *hy5*、*hyh*、*hy5 hyh* 为供试材料。拟南芥种子经 20%次氯酸钠消毒 13 min,用无菌水冲洗 6 次,选取均匀饱满的种子点于直径 10 cm 含有 25 mL 1/2MS 培养基的培养皿中,4 °C 暗处春化 2 d 后移入 21 °C 的温室萌发培养 4 d。用 1/2 MS 溶液配制含有不同浓度糖的培养基,对幼苗处理,进行花青素提

取测定。

1.2 花青素的提取与测定

花青素提取与测定参照 Vandebussche F 方法^[13],略有改动。取 10 mg 的整株拟南芥幼苗放入 1.5 mL 离心管,加入 300 μ L 酸性甲醇(无水甲醇与 HCl 的体积比为 99 : 1),于 4 °C 冰箱放置 24 h,取出后加入氯仿和蒸馏水各 200 μ L,稍微振荡后 5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 350 μ L 加入 700 μ L 60%(无水甲醇、HCl、水的体积比为 99 : 1 : 200/3)的酸性甲醇稀释,530 nm 波长下测定吸光值。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 软件对原始数据进行处理,通过 SPSS 20.0 软件对数据进行单因子方差分析,用新复极差法(Duncan)做显著性分析,利用软件 sigmaplot 10.0 和 Adobe Photoshop 作图。

2 结果与分析

2.1 光照条件下蔗糖对花青素的积累影响

图 1 显示了蔗糖与光对花青素积累的影响。在蔗糖与光同时存在的情况下,花青素得到了明显的积累,且随着处理天数的增加效果更为明显。在只有蔗糖或者只有光存在的情况下,花青素并未得到明显的积累,这说明蔗糖对花青素诱导的积累必须在光存在的情

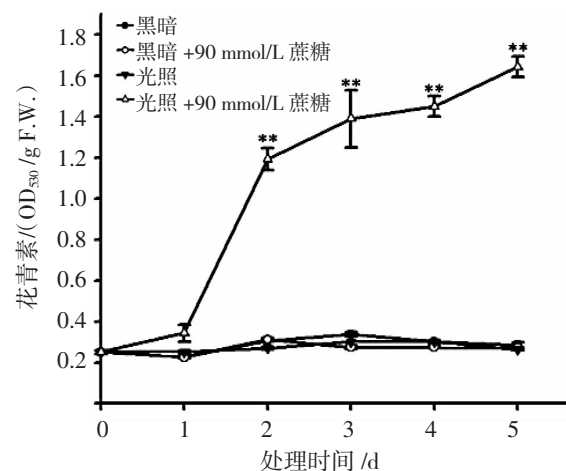


图 1 蔗糖对花青素积累的影响

况下才可以得到实现，这也与有关糖诱导调节花青素合成相关基因的研究相一致^[14-15]。

2.2 蔗糖浓度对花青素积累的影响

蔗糖浓度不同所引起的糖胁迫程度不同，对花青素积累的影响程度也就不同。为了选择合适的糖胁迫浓度，利于花青素的测定，选择 0、30、60、90、150 mmol/L 的蔗糖浓度进行观察，结果如图 2 所示。在低浓度蔗糖 (≤ 90 mmol/L) 有光存在下，随着蔗糖浓度的增加，花青素积累也随着明显增加，当蔗糖浓度达到 90 mmol/L 时花青素积累已经非常明显，当蔗糖浓度再增加时花青素含量却没有再明显升高。这说明，在 90 mmol/L 蔗糖浓度下，花青素积累已达显著效果，故未特殊说明，均采用 90 mmol/L 的蔗糖处理。从图 2 也可以看出，在暗处虽然也加入了不同浓度蔗糖，但花青素几乎没有变化，这也就进一步说明糖所诱导的花青素积累依赖于光。

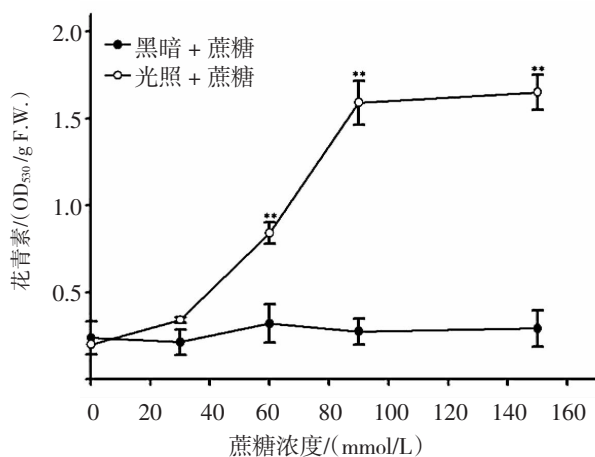


图 2 不同蔗糖浓度对花青素生成的影响

2.3 蔗糖及葡萄糖、果糖、山梨醇对花青素积累影响的比较

在植物的代谢过程中，葡萄糖、果糖是最易利用的单糖。由图 3 可知，与二糖（蔗糖）比较，在相同浓度下，对拟南芥花青素合成影响最大的是蔗糖，而非果糖或葡萄糖，这也为选取蔗糖进行处理提供了依据。

另外，无论光下还是暗处，山梨醇所造成的干旱胁迫几乎不能对花青素的积累产生影响。图 3 还显示，虽然葡萄糖或果糖在光下与对照相比花青素的积累有所增加，但是与蔗糖相比，对花青素合成的影响要微弱得多，也就是说虽然不同的糖胁迫都会导致花青素产生和积累，但是同浓度的糖的胁迫程度不同，这从花青素的积累程度可以得到验证。这 3 种糖所诱导的花青素的积累都是依赖于光的，在暗处处理的花青素含量与暗处的对照几乎相同。

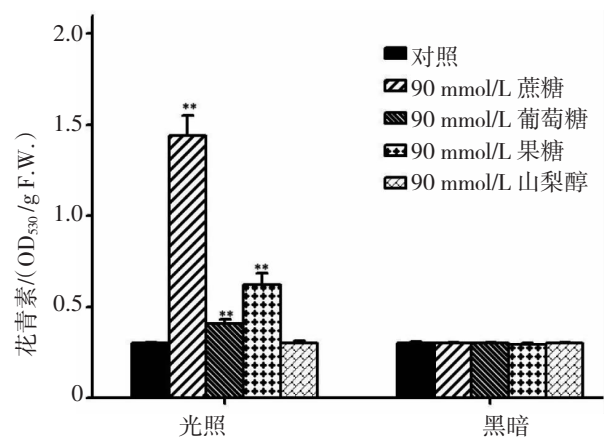


图 3 不同糖处理对花青素合成的影响

2.4 HY5、HYH 对蔗糖诱导的花青素的影响

为了进一步研究光在蔗糖诱导花青素积累中的作用，用以野生型 Col-0 为背景的突变体 *hy5* 进行观察。结果表明，当光调节因子 HY5 缺失，在蔗糖处理条件下，花青素的积累量明显减少，只有对照组花青素含量的 1/2。在未加入蔗糖条件下，突变体 *hy5* 与相应对照的花青素含量没有差别(图4)，这也就说明光调控因子 HY5 在蔗糖胁迫诱导的花青素积累过程中起一定的作用，虽然 HY5 的缺失不能完全抑制蔗糖诱导花青素的产生，但是 HY5 在此过程中的作用十分重要。

HY5 同源基因编码的光调控因子 HYH

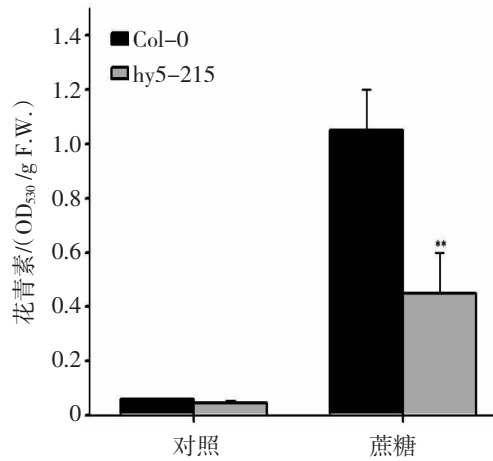


图 4 HY5 对蔗糖诱导产生花青素的影响

对 HY5 有一定的互补作用^[16]，为了进一步验证 HY5 的作用，我们采用野生型 WS 及相应的单突变体 *hyh* 和双突变体 *hy5 hyh* 进一步进行研究。图 5 的结果表明，当缺失 HYH，在光下蔗糖诱导的花青素的产生量也会较对照相应的减少，也就是说 HYH 在蔗糖诱导的花青素积累过程中也是起作用的。从图 5 中可以看出，双突变体与相应的野生型和单突变体相比较，花青素的积累量进一步降低，这也就进一步证实 2 个光调控因子在蔗糖诱导产生花青素的过程中起到了协同作用。但是，在 2 个因子都缺失的情况下，也不能完全消除蔗糖诱导产生的花青素，使花青素含量达到未胁迫的水平。这表明，除了 2 个重要的光调节因子之外，还存

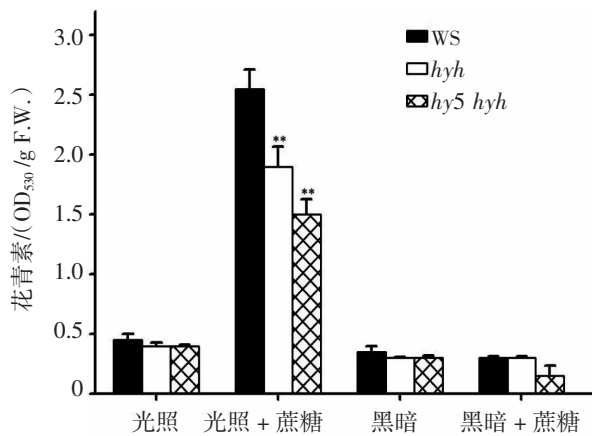


图 5 HYH 对蔗糖诱导产生花青素的影响

在其它介导途径的因子存在，有文献已经表明这些调节因子在其中的作用^[17]。

3 结论与讨论

我们通过试验研究了糖胁迫条件下花青素积累对光的要求，并进一步证实光调控因子 HY5、HYH 在这个过程当中所起的作用。结果表明，糖胁迫诱导花青素的积累过程就必须在光存在的情况下进行。在暗处时，即使施加高浓度的糖胁迫，也不能明显的诱导花青素的产生，且在暗处短期内不会因胁迫时间的延长而改变花青素的积累量。有研究认为，糖含量的增加有利于花青素的合成^[14]，但用相同浓度的葡萄糖、果糖处理时并未达到采用蔗糖处理的程度，也就是说蔗糖在为花青素合成提供糖源的同时也造成严重的糖胁迫，进而造成花青素的积累。

在负调控 HY5、HYH 的光调控因子 COP1 缺失的情况下，拟南芥突变体 *cop1* 幼苗黑暗条件下糖处理表现出明显的花青素积累现象^[18]。这是由于野生型 COP1 在暗处能迅速进入核内降解 HY5 和 HYH，而缺失突变体不具备降解能力，这也间接证明 HY5、HYH 在调控花青素积累过程中起到重要作用。我们的研究也表明，调控因子 HY5、HYH 在光下低温引起的花青素积累中具有重要作用，调节低温胁迫下花青素合成基因的表达，从而影响花青素的积累量^[19]，这与先前的研究类似。在蔗糖诱导的花青素积累过程中，光形态建成过程中的这 2 个重要调控因子也起重要作用，但并不是唯一的作用途径，这也符合植物适应复杂环境从而有多条调节路径的进化选择。

参考文献:

- [1] KEVIN S. GOULD. Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(347): 1107-1115.

- [2] MARK N. MERZLYAK. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(14): 3903–3911.
- [3] 刘 薇, 黄 瑛. 植物花青素与生物学适应性关系研究进展[J]. *作物研究*, 2005, 22(5): 319–322.
- [4] 赵云荣, 王世雷. 植物花青素研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(8): 3095–3097.
- [5] N M HUGHES, H S NEUFELD. Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*[J]. *New Phytologist*, 2005, 168: 575–587.
- [6] Velissarios-Phaedon Kytridis, Yiannis Manetas. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(10): 2203–2210.
- [7] ELENA LORETI, GIOVANNI PIVEROL. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2008, 179: 1004–1016.
- [8] FABRIZIO PIETRINI, ANGELO MASSACCI. Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: Significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation[J]. *Photosynthesis Research*, 1998, 58: 213–219
- [9] CHALKER-SCOTT L. Environmental significance of anthocyanins in plant responses[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1999, 70: 1–9.
- [10] DEMMIG-ADAMS B. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves [J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, 39: 474–482.
- [11] CHATTOPADHYAY S. Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression[J]. *Plant Cell*, 1998, 10(5): 673–683.
- [12] XING WANG DENG, PETER H QUAIL. Signalling in light-controlled development [J]. *Cell and Developmental Biology*, 1999, 10: 121–129.
- [13] VANDENBUSSCHE F, HABRICOT Y. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2007, 49: 428–441.
- [14] CINZIA SOLFANELLI, ALESSANDRA POGGI. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140: 637–646.
- [15] JIEUN SHIN, EUNAE PARK. PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49: 981–994.
- [16] JONASSEN EM, LEA US, LILLO C. HY5 and HYH are positive regulators of nitrate reductase in seedlings and rosette stage plants [J]. *Planta*, 2008, 227(3): 559–64.
- [17] SHENG TENG, JOOST KEURENTJES. Sucrose-specific Induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB 75/PAP1Gene[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1840–1852.
- [18] CHEN Q F, DAI L Y, XIAO S, *et al.* The COI1 and DFR genes are essential for regulation of jasmonate-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 49(9): 1370–1377.
- [19] ZHANG Y, Z LIU. Gibberellins negatively regulate low temperature-induced anthocyanin accumulation in a HY5/HYH-dependent manner[J]. *Plant Signal Behav.*, 2011, 6(5): 632–644.

(本文责编: 陈 珩)