

DIO:10.3724/SP.J.1238.2011.00139

## 拟南芥 *psc1* 突变体降低蔗糖诱导的花青素积累

袁利兵<sup>1</sup>, 张琨<sup>1</sup>, 彭志红<sup>1</sup>, 任春梅<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 以拟南芥野生型和 *psc1* 突变体为材料, 研究蔗糖(30、60、90、120、150 mmol/L)诱导花青素的积累。结果表明: 蔗糖浓度高于 60 mmol/L 时, 拟南芥 *psc1* 突变体中花青素的积累比野生型明显降低, 花青素生物合成关键基因 *DFR* 的表达量减少。在无蔗糖和有蔗糖(90 mmol/L)条件下, 添加表油菜素内酯进一步分析拟南芥 *psc1* 突变体中花青素的积累, 结果显示, 表油菜素内酯能显著增加拟南芥 *psc1* 突变体中花青素含量以及 *DFR* 基因的表达。

**关键词:** 拟南芥 *psc1* 突变体; 花青素; 蔗糖; 表油菜素内酯

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0139-04

## The *psc1* mutant reduces the accumulation of sucrose-induced anthocyanin in *Arabidopsis*

YUAN Li-bing<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, PENG Zhi-hong<sup>1</sup>, REN Chun-mei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410128, China)

**Abstract:** *Arabidopsis* wild-type and *psc1* mutant were used to investigate the anthocyanin accumulation induced by sucrose. The results showed that the anthocyanin was induced by sucrose and the expression of *DFR*, a key gene in anthocyanin biosynthesis, compared with wild-type, was clearly reduced in the *psc1* mutant when the sucrose concentration was higher than 60 mmol/L. The *psc1* mutant was treated by epibrassinolide with or without sucrose, and it was found that the application of epibrassinolide remarkably increased the sucrose-induced anthocyanin content and the expression of *DFR* gene of the *psc1* mutant as well.

**Key words:** *Arabidopsis psc1* mutant; anthocyanin; sucrose; epibrassinolide

花青素(anthocyanin)作为植物的次级代谢产物, 起吸引昆虫传粉、提高植物耐寒、抗冻、抗旱及渗透应激能力、光保护、清除自由基、抗氧化和抗病虫害等多重作用<sup>[1-4]</sup>。花青素的生物合成受多基因控制, 环境因素会造成植物体内花青素的积累<sup>[5]</sup>, 糖作为外界环境信号能诱导植物花青素的积累<sup>[6]</sup>。拟南

芥 *psc1* 突变体能够部分抑制 *coi1* 突变体对茉莉素的不敏感反应<sup>[7]</sup>, 而 *COI1* 基因在蔗糖调控花青素生物合成中有着重要作用<sup>[8]</sup>, 因此推测 *psc1* 突变体可能对蔗糖诱导的花青素积累有影响。笔者以拟南芥野生型 Col-0 和 *psc1* 突变体为材料, 研究不同蔗糖浓度下 *psc1* 突变体中花青素的积累以及花青素

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770195)

作者简介: 袁利兵(1987—), 男, 湖南郴州人, 硕士研究生; \*通信作者, rencm66@163.com

生物合成关键基因 *DFR*<sup>[9]</sup> 的表达, 并利用添加表油菜素内酯来进一步研究 *psc1* 突变体中花青素的积累。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(Col-0, WT)和 *psc1* 突变体, 由作物基因工程湖南省重点实验室植物信号传导课题组提供。表油菜素内酯(epibrassinolide, epi-BL)购自 Sigma 公司, TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒(Kit-ReverTra Ace- $\alpha$ -TM)购自 Toyobo 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植株的培养和生长条件

拟南芥 WT 和 *psc1* 突变体种子用消毒液浸泡 10 min 后, 无菌水清洗 5 次, 播种于含 30 mmol/L 蔗糖的 1/2MS 固体培养基上, 经 4 °C 暗处理 3 d 后, 转入 23 °C 光照培养 7 d(每天光照 16 h)。再将拟南芥幼苗转入新的 1/2MS 培养基, 培养基中分别含 0、30、60、90、120、150 mmol/L 蔗糖, 继续生长 5 d 后提取花青素, 同时收取幼苗, 经液氮处理后置 -80 °C 保存。将 23 °C 光照培养 7 d 的 *psc1* 突变体幼苗转至不添加或添加 10 nmol/L 表油菜素内酯的含 0、90 mmol/L 蔗糖<sup>[8]</sup>的 1/2MS 培养基, 继续光照培养, 5 d 后提取花青素, 将幼苗液氮处理后置 -80 °C 保存。花青素提取和含量测定参照文献[10]方法进行。

#### 1.2.2 RNA 的提取和 RT-PCR 分析

Trizol 法提取于 -80 °C 保存的幼苗总 RNA。RT-PCR 分析按照常规操作进行, 使用 ABI-2720 Thermal Cycler 型 PCR 仪, 采用反转录试剂盒进行逆转录, 得到 cDNA 第 1 条链。*DFR* 基因 PCR 扩增所用的引物为: 5'-ATGGTTAGTCAGAAAGAGACCG-3'和 5'-GTCTTATGATCGAGTAATGCGC-3'; 以 *ACT2* 基因为参照基因, 所用引物为: 5'-TTCCGC TCTTCTTCCAAAGCTCA-3'和 5'-AAGAGGCATC

AATTCGATCACTCA-3'。反应体系(20  $\mu$ L)为: cDNA 1  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L, dNTPs(10 mmol/L) 0.5  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L)0.3  $\mu$ L, 引物各 0.8  $\mu$ L, 补水至 20  $\mu$ L。对 *DFR* 和 *ACT2* 基因分别进行 PCR 扩增, PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 26 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 *psc1* 突变体在不同蔗糖浓度下花青素的积累

从图 1 可以看出, WT 和 *psc1* 突变体的花青素积累量随着蔗糖浓度升高而增加, 当蔗糖浓度为 30 mmol/L 时, WT 和 *psc1* 突变体中花青素积累量与无糖时相近; 浓度为 60 mmol/L 时, *psc1* 突变体中花青素含量开始低于 WT, 随着蔗糖浓度的升高, 两者的差距变得愈发明显。蔗糖浓度为 150 mmol/L 时, 花青素积累的差异尤为显著, *psc1* 突变体中花青素积累已经远低于 WT 中的, 这说明突变体 *psc1* 减少了蔗糖所诱导的花青素积累。

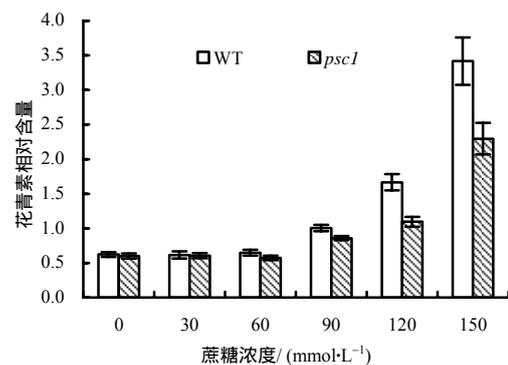


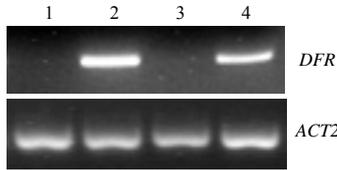
图 1 不同蔗糖浓度下拟南芥花青素的积累

Fig.1 Anthocyanin accumulation of *Arabidopsis* induction by different concentration of sucrose

### 2.2 不同浓度蔗糖处理下 *DFR* 基因的表达

选取 0 mmol/L 和 150 mmol/L 蔗糖处理的拟南芥幼苗 RNA 进行 RT-PCR 分析, 结果(图 2)显示, 在无蔗糖条件下, WT 和 *psc1* 突变体中 *DFR* 基因几

乎不表达；当蔗糖浓度为 150 mmol/L 时，*DFR* 基因得到表达，但与 WT 相比，*psc1* 突变体中 *DFR* 基因的表达较弱，这与两者花青素积累的变化趋势一致。



1、2 分别为 WT 0、150 mmol/L 蔗糖处理；3、4 分别为 *psc1* 突变体 0、150 mmol/L 蔗糖处理。

图 2 蔗糖诱导 *DFR* 基因 RT-PCR 检测结果

Fig.2 RT-PCR analysis results of *DFR* gene induction by sucrose

### 2.3 表油菜素内酯处理下 *psc1* 突变体中花青素的积累

在无糖时，添加表油菜素内酯，对拟南芥 *psc1* 突变体花青素的积累影响甚微；当培养基中蔗糖浓度为 90 mmol/L 时，添加 10 nmol/L 表油菜素内酯，拟南芥 *psc1* 突变体的花青素比未添加的有明显升高。表明表油菜素内酯促进了 *psc1* 突变体中蔗糖诱导的花青素积累。

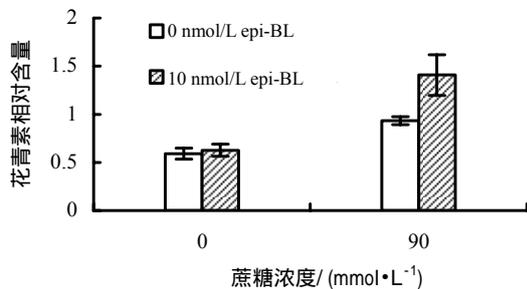
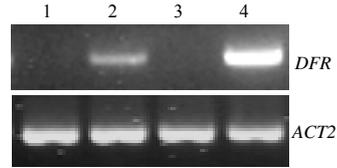


图 3 蔗糖和表油菜素内酯处理下拟南芥 *psc1* 突变体花青素的积累

Fig.3 Anthocyanin accumulation of *psc1* mutant with the treatment of sucrose and epi-BL

### 2.4 表油菜素内酯处理下 *psc1* 突变体中 *DFR* 基因的表达

通过 RT-PCR 分析(图 4)得出，当无蔗糖添加时，*psc1* 突变体 *DFR* 基因的表达量都非常低；当含有蔗糖处理时，*DFR* 基因得到表达，经 10 nmol/L 表油菜素内酯处理后，*DFR* 基因表达强烈。说明表油菜素内酯在蔗糖存在情况下促进了 *psc1* 突变体中 *DFR* 基因的表达。



1、3 分别为不添加蔗糖的 0、10 nmol/L epi-BL 处理；2、4 分别为 90 mmol/L 蔗糖下的 0、10 nmol/L epi-BL 处理。

图 4 蔗糖和表油菜素内酯处理下拟南芥 *psc1* 突变体 *DFR* 基因 RT-PCR 检测结果

Fig.4 RT-PCR analysis results of *DFR* gene of *psc1* mutant with the treatment of sucrose and epi-BL

## 3 讨论

研究表明，糖与花青素的积累密切相关<sup>[11-12]</sup>，糖作为一种信号分子，通过特异的信号传导途径调节花青素合成相关酶基因的表达，进而影响植物花青素的积累<sup>[13]</sup>。Teng 等<sup>[14]</sup>和 Solfanelli 等<sup>[15]</sup>研究发现，蔗糖能够诱导拟南芥花青素生物合成途径中的某些基因增加其表达量，使植株中花青素的含量增加。本试验用拟南芥 WT 和 *psc1* 突变体研究不同浓度蔗糖诱导花青素的积累，结果与 Baier 等<sup>[16]</sup>报道的高糖敏感突变体植株对不同蔗糖浓度表现出相应花青素积累量的研究结果一致，即蔗糖浓度影响花青素的积累。由于 *psc1* 突变体是 *DWF4* 基因的弱突变体，表现出芸薹素生物合成缺陷型突变体 *dwf4* 的部分表型<sup>[7]</sup>，因此用添加外源芸薹素表油菜素内酯进一步研究 *psc1* 突变体中蔗糖诱导花青素积累情况。研究发现，表油菜素内酯对花青素的影响需要蔗糖的参与，这与相关研究发现外源植物激素只有在糖存在时才能诱导花青素生物合成相关基因的表达<sup>[8]</sup>一致。

各种植物激素与糖相互作用形成一个复杂的信号网络，通过综合作用调节花青素的生物合成。不同激素与糖的相互作用对花青素生物合成的影响不同。在拟南芥中，茉莉素和脱落酸对蔗糖有协同作用，都增强花青素合成途径中的大部分基因的表达，而赤霉素却抑制这一类基因的表达<sup>[8]</sup>。本研究显示，*psc1* 突变体中蔗糖所诱导的花青素积累减少，并且降低蔗糖诱导的 *DFR* 基因的表达。而添加表油菜素内酯后能够促进 *psc1* 突变体中蔗糖诱导的花青素积累和 *DFR* 基因的表达。这意味着芸薹素可能与茉莉素和脱落酸一样，能协同蔗糖调节

花青素生物合成的过程。

植物体内调控花青素生物合成的基因除结构基因外,还包括编码调控花青素合成的转录因子的调节基因<sup>[17-18]</sup>,因此,激素与糖之间的相互作用对花青素积累的调控显得更为复杂。此外,植物体内激素之间彼此也存在着复杂的相互作用,*pse1*突变体中*DWF4*基因的表达缺陷及外源芸薹素表油菜素内酯在与蔗糖相互作用时是否又与内源激素系统发生复杂的相互作用,从而影响花青素的生物合成,还有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Martin C, Gerats T. Control of pigment biosynthesis genes during petal development[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(10): 1253-1264.
- [2] Dixon R A, Steele C L. Flavonoids and isoflavonoids: A gold mine for metabolic engineering[J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(10): 394-400.
- [3] Harborne J B, Williams C A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [4] Shirley B W. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 485-493.
- [5] Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1999, 70(1): 1-9.
- [6] Weiss D. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals[J]. *Physiol Plant*, 2000, 110(2): 152-157.
- [7] Ren C M, Han C Y, Peng W, et al. A leaky mutation in *DWARF4* reveals an antagonistic role of brassinosteroid in the inhibition of root growth by jasmonate in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1412-1420.
- [8] Loreti E, Povero G, Novi G, et al. Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose- induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2008, 179(4): 1004-1016.
- [9] O'Reilly C, Shepherd N S, Pereira A, et al. Molecular cloning of the *al* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*[J]. *EMBO J*, 1985, 4(4): 877-882.
- [10] Deikman J, Hammer P E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108(1): 47-57.
- [11] Moalem-Beno D, Tamari G, Leitner-Dagan Y, et al. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in petunia corollas[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(2): 419-424.
- [12] Neta-Sharir I, Shoseyov O, Weiss D. Sugars enhance the expression of gibberellin-induced genes in developing petunia flowers[J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, 109(2): 196-202.
- [13] Sheen J, Zhou L, Jang J C. Sugars as signaling molecules [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(5): 410-418.
- [14] Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, et al. Sucrose-specific induction of anthocyaninbiosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(4): 1840-1852.
- [15] Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, et al. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 637-646.
- [16] Baier M, Hemmann G, Holman R, et al. Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 81-91.
- [17] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [18] Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(3): 288-303.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾