

# 蓝光和蔗糖对拟南芥花色素苷积累和 *CHS* 基因表达的影响

王 曼 王小菁\*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631)

**摘要:** 以在  $20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  白光下生长 13 d 的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, Landsberg 生态型) 幼苗为材料, 采用测定叶片花色素苷含量和 Northern blot 方法, 研究蓝光与蔗糖在诱导植物花色素苷积累及相关基因表达中的作用。结果表明: 蓝光处理后, 叶片花色素苷积累随光强和照光时间的延长而增加, 突变体 *hy4* 叶片的花色素苷含量明显低于野生型 (WT), 说明隐花色素 1 (*cry1*) 是蓝光诱导花色素苷积累的主要光受体; WT 中苯基苯乙烯酮合酶基因 (*CHS*) 的表达受蓝光诱导, 处理 4 h 即有表达, 8 h 达到最高, 之后逐渐下降; 蓝光不能诱导突变体 *hy4* 中 *CHS* 基因的表达, 说明 *cry1* 介导蓝光诱导 *CHS* 基因的表达。培养基中不含蔗糖, 削弱了蓝光诱导的拟南芥叶片花色素苷的积累, *CHS* 基因表达也受到抑制。蔗糖不仅作为碳源参与蓝光诱导的花色素苷积累, 还可能作为信号分子参与蓝光诱导的 *CHS* 表达。

**关键词:** 蓝光; 拟南芥; 花色素苷; 苯基苯乙烯酮合酶基因表达; 蔗糖

中图分类号: Q947.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)03-0252-05

## Effects of Blue Light and Sucrose on Anthocyanin Accumulation and Chalcone Synthase Gene Expression in *Arabidopsis*

WANG Man WANG Xiao-jing\*

(College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** To evaluate the effects of blue light and sucrose on anthocyanin accumulation and chalcone synthase gene (*CHS*) expression, the leaves of 13-day-old seedlings of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant grown under  $20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  white light were used in the experiments. After irradiation by blue light (BL), anthocyanin content in leaves of WT increased with the increase of blue light intensity and irradiation duration. Anthocyanin content in *hy4* mutant was lower than that in WT after BL treatment, which demonstrated that cryptochrome 1 (*cry1*) mediated the BL response in anthocyanin accumulation. *CHS* gene expression detected by Northern blot in the WT leaves was induced by BL and it could be detected after 4 hours and reached a peak after 8 hours, and then the gene expression declined. BL could not induce any gene expression in *hy4* mutant indicating *cry1* is the photoreceptor mediating the blue-light-induced *CHS* gene expression. It was observed that the increase of anthocyanin and gene expression were weakened in sucrose-free medium under blue light treatment. Sucrose may act not only as an energy source but also a component in blue-light-induced signal transduction of anthocyanin accumulation and *CHS* expression.

**Key words:** Blue light; *Arabidopsis*; Anthocyanin; Chalcone synthase gene expression; Sucrose

收稿日期: 2003-09-24 接受日期: 2003-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(30170558); 教育部高等学校骨干教师资助计划

\* 通讯作者 Corresponding author

植物细胞中花色苷的积累受发育阶段、环境因子等的影响<sup>[1-3]</sup>。大量的研究表明, 依赖光的花色素苷的积累是植物光形态建成中的一个典型的高辐照反应 (high irradiance response, HIR), 光源为可见光或接近可见光范围内的光辐射<sup>[4]</sup>。1936年 Arthur 最早报道蓝光、紫外光是刺激花色苷积累的最有效的光谱<sup>[4]</sup>。我们的实验结果也表明, UV-B、蓝光、白光、远红光、红光都能在不同程度上影响拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 幼苗花色苷积累, 蓝光、UV-B 诱导效应最明显, 白光、远红光次之, 红光最弱<sup>[5]</sup>。蔗糖也是一个影响花色苷积累的重要因子。蓝光、蔗糖二者在诱导植物花色苷积累中的关系如何? 外界蓝光信号是如何被转导、进而诱导细胞中花色苷的积累? 目前还不十分清楚。本研究以拟南芥野生型 (WT) 和突变体 (*hy4*) 为实验材料, 研究蓝光、*cry1* (隐花色苷, 一种黄素受体)、*CHS* 基因、花色苷形成之间的关系, 初步探讨糖在蓝光信号转导、诱导花色苷积累中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, Landsberg 生态型) 野生型 (WT) 和突变体 (*hy4*) 为实验材料。种子从拟南芥生物研究中心 (Ohio State University) 获得, 在华南师范大学生命科学学院广东省植物发育生物工程重点实验室人工培养室繁殖后用于实验。

拟南芥 WT 和 *hy4* 的种子, 在黑暗、4℃ 下浸种 2-4 d, 用 75% 的乙醇浸泡 30 s, 无菌的蒸馏水冲洗 3 次后用 10% (v/v) 的 NaClO 浸泡 15-20 min, 再用无菌蒸馏水冲洗 5 次。种子经表面灭菌后播种于含 2% 蔗糖, 0.8% 琼脂的 B<sub>5</sub> 固体培养基上, 在 21±1℃, 光照强度为 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 的白光下培养 13 d, 然后根据实验要求进行不同处理: (1) 不同强度蓝光处理。将幼苗分别置于 10、30、50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 蓝光下处理 24 h; (2) 蓝光照射不同时间处理。将幼苗置于 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 蓝光下, 分别处理 8、16、24 h; (3) 蔗糖实验。将幼苗转到含或不含蔗糖的 B<sub>5</sub> 固体培养基中, 黑暗培养 1 h, 再移到光强 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 的蓝光下培养 24 h。在处理结束后, 取叶片进行花色苷含量测定和苯基苯乙烯酮合酶基因 (*CHS*) 表达分析。在进行蔗糖实验时, *CHS* 基因表达分析取样时间在蓝光处理 8 h 后进行。

### 1.2 花色苷含量的测定

参照 Deikman 和 Hammer<sup>[6]</sup>, Noh 和 Spalding<sup>[7]</sup> 的方法。取处理后的拟南芥叶片迅速称重 (0.05 g 左右), 置于含提取液 (各组分的体积比为 propanol: HCl: H<sub>2</sub>O=18: 1: 81) 的 1.5 ml eppendorf 管中, 封住管口, 沸水浴 3 min, 室温过夜提取花色苷, 5 800 × g 离心 3 min, 取上清液, 用 UV-2100 型分光光度计测定波长在 535 nm 和 650 nm 处的吸光值 (A), 花色苷的相对含量为 (A<sub>535</sub>-A<sub>650</sub>) g<sup>-1</sup> FW。

### 1.3 Northern blot

**RNA 的提取** 参照 Trizol 试剂盒方法。材料用液氮速冻, 在液氮中研磨成粉, 每 100 mg 组织加入 1 ml Trizol, 经氯仿去蛋白, 异丙醇沉淀 RNA, 70% 的乙醇洗涤, 干燥后, RNA 沉淀用适量的 DEPC 水溶解待用。用分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的吸收值并采用甲醛变性胶电泳对 RNA 进行纯度分析和定量。

**Northern blot** 参照彭秀玲等<sup>[8]</sup> 方法。取 RNA 15 μg, 经电泳, 转膜, 预杂交, 杂交后, 放射自显影, 得到 Northern blot 结果。

### 1.4 试剂的来源

Trizol 试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; [α-<sup>32</sup>P]dCTP 购自北京福瑞公司; 探针标记试剂盒购自 TaKaRa Biotechnology Co. Ltd; *CHS* 探针由美国 Shirley 教授赠送; 其余药品均为国产分析纯。

### 1.5 光源

以蓝色荧光灯作为光源, 透过滤膜而获得所需波长范围的光。蓝光 40W 单色荧光灯为广州灯泡厂生产, 白光为 40W 冷光型国产白色荧光灯。蓝色滤膜 (#73) 为日本クテイエン株式会社生产的截止型滤膜, 滤膜过滤光源后获得蓝光的最强波长为 456 nm, 半高宽 50 nm。光源的光强测定: 白光用 L1-6200 光合作用测定仪测定, 蓝光用日本产 Optical Power Meter TQ8210 型手持测定仪测定, 光强通过开启灯管数目和改变植物材料与光管距离来调节。

## 2 结果

### 2.1 蓝光对叶片花色苷积累的影响

从图 1, 2 可见, 以不照蓝光处理为对照, 当蓝光光强为 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 时, WT 叶片花色苷的积

累明显上升,且随着光照时间的延长,其积累呈明显上升趋势。突变体 *hy4* 叶片的花色素苷含量比 WT 低,蓝光也有诱导其叶片花色素苷积累的作用,但与 WT 相比,低光强 ( $10、30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 有刺激作用,在测试范围内,花色素苷积累表现为随蓝光强度的增加和照光时间的延长而上升。

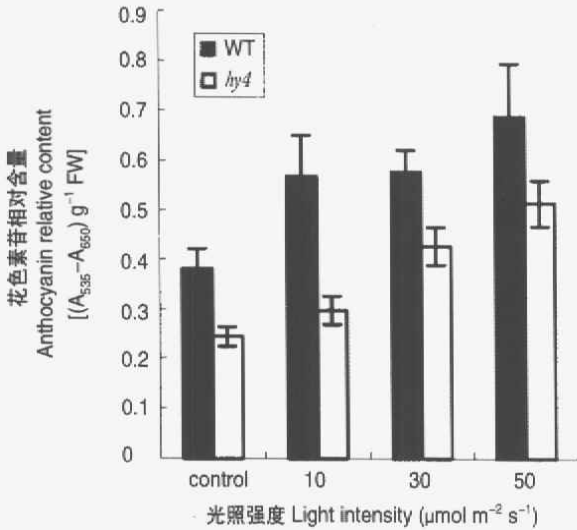


图 1 不同光强蓝光对 WT 和 *hy4* 花色素苷积累的影响  
Fig. 1 The effect of different intensity of blue light on anthocyanin accumulation in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant  
control: 未用蓝光处理 Without blue light

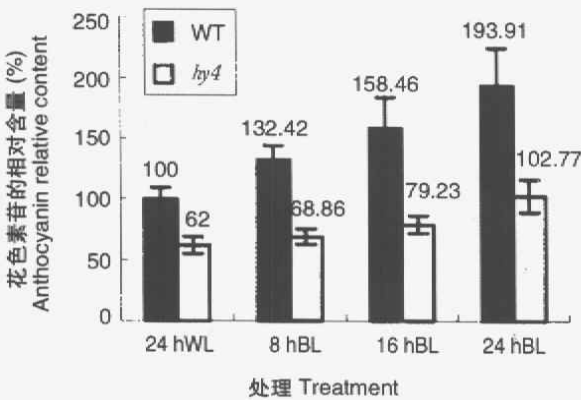


图 2 不同时间蓝光处理对拟南芥花色素苷积累的影响  
Fig. 2 Relative content of anthocyanin in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant under blue light treatment with different durations  
WL: 白光 White light; BL: 蓝光 Blue light

2.2 蓝光对叶片 *CHS* 基因表达的影响

白光对 WT 和 *hy4* 叶片的 *CHS* 基因表达几乎无影响(图 3), 蓝光有诱导叶片 *CHS* 基因表达的作用, 在光强为  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  下照光 8 h 对 WT 的

*CHS* 基因表达影响最大, 以后随光照时间的延长而削弱(图 4)。与 WT 相比, 蓝光对 *hy4* 叶片 *CHS* 基因表达的影响较小(图 3)。

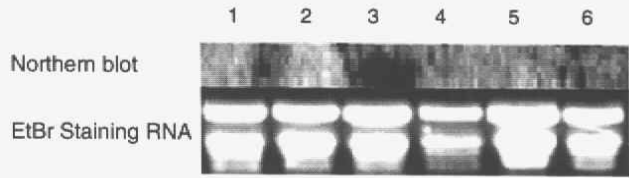


图 3 蓝光对 WT 和 *hy4* *CHS* 基因表达的影响  
Fig. 3 The effect of blue light on *CHS* expression in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant

1: WT 黑暗 WT in the dark; 2: WT 白光 WT under white light; 3: WT 蓝光 WT under blue light; 4: *hy4* 黑暗 *hy4* in the dark; 5: *hy4* 白光 *hy4* under white light; 6: *hy4* 蓝光 *hy4* under blue light.

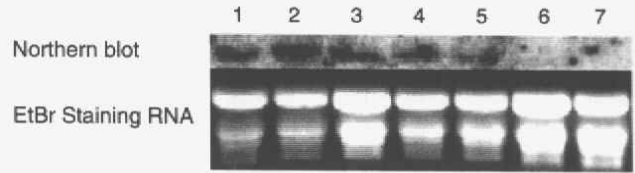


图 4 蓝光对 WT *CHS* 表达的影响  
Fig. 4 The effect of blue light on *CHS* expression in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT)

1 到 6 分别表示蓝光处理 4、8、12、16、20、24 h, 7 为对照。1 到 6: 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h 和 24 h after irradiation of blue light, respectively; 7: control.

2.3 蔗糖对叶片花色素苷积累、*CHS* 基因表达的影响

培养基中不含蔗糖会明显削弱 WT 叶片花色素苷的积累, 但对 *hy4* 则无影响(图 5)。蓝光诱导 WT 花色素苷的积累因培养基中不含蔗糖而显著削弱(图 6)。同样地, 培养基中不含蔗糖也影响了蓝光诱导的叶片 *CHS* 基因的表达(图 7)。

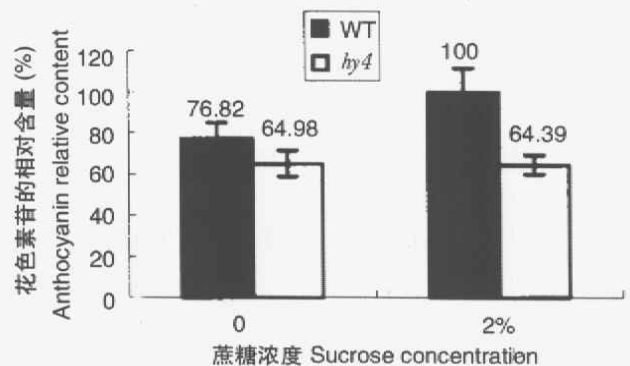


图 5 蔗糖对白光下拟南芥 WT 和 *hy4* 中花色素苷积累的影响  
Fig. 5 The effect of sucrose on anthocyanin accumulation in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant under white light

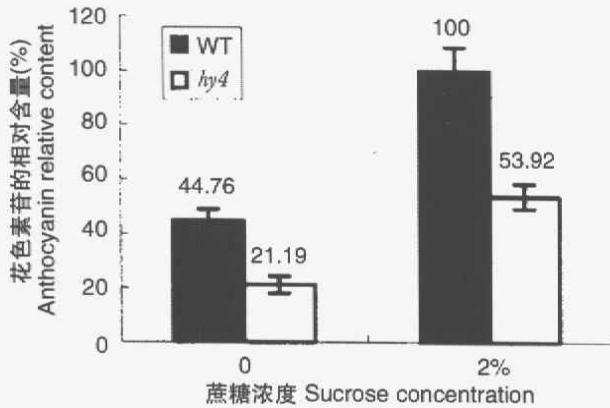


图6 蔗糖对蓝光下拟南芥 WT 和 *hy4* 中花色素苷积累的影响  
Fig. 6 The effect of sucrose on anthocyanin accumulation in the leaves of wild type *Arabidopsis* (WT) and *hy4* mutant under blue light

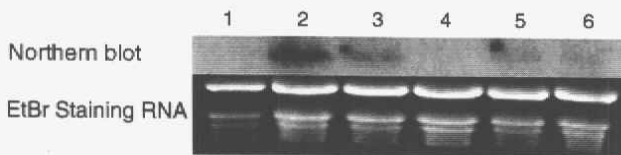


图7 蔗糖在光诱导拟南芥 *CHS* 表达中的作用  
Fig. 7 The effect of sucrose on light induced *CHS* expression in *Arabidopsis*

1: WT 白光; 2: WT 蓝光; 3: WT 蓝光无糖; 4: *hy4* 白光; 5: *hy4* 蓝光; 6: *hy4* 蓝光无糖。1, 2 and 3 represent wild type of *Arabidopsis* under white light (WL), blue light (BL), and BL with sucrose-free treatment, respectively; 4, 5 and 6 represent *hy4* mutant under WL, BL, and BL with sucrose-free, respectively.

### 3 讨论

光诱导花色素苷积累的现象在大多数植物中都存在,但在不同植物中光受体不尽相同。在白芥和番茄中,光敏色素是控制花色素苷合成的主要的光受体<sup>[9-12]</sup>,而在拟南芥中,主要光受体则是一种或多种蓝光特异性的受体。*HY4* 基因(也称 *CRY1* 基因)编码的 *CRY1* 是一种黄素蛋白受体<sup>[13]</sup>,它在蓝光反应中起着重要的作用<sup>[14,15]</sup>,拟南芥 *hy4* 突变体缺乏由蓝光刺激引起的下胚轴伸长抑制反应(野生型拟南芥幼苗在蓝光刺激下会发生下胚轴伸长的抑制反应,即下胚轴短),蓝光诱导的花色素苷积累也大大降低<sup>[13,16]</sup>。苯基苯乙烯酮合酶(*CHS*)是植物花色素苷合成过程中的一个关键酶,*CHS* 基因表达需要光的诱导<sup>[17]</sup>。本实验结果表明蓝光诱导的 *CHS* 基因表达在处理 8 h 时达到最高水平,随后下降,而花色素苷积累则表现为随处理时间的延长而

不断上升,可能是基因的表达与花色素苷的积累有一个先后顺序<sup>[18]</sup>,基因表达在前,花色素苷的积累在后,当基因的表达开始下降的时候,花色素苷的积累还是处在一个上升的趋势。突变体 *hy4* 的实验结果表明 *cry1* 是诱导拟南芥叶片花色素苷积累和 *CHS* 基因表达的主要光受体,这与前人报道相一致。我们的实验结果还表明 *hy4* 在蓝光诱导下叶片也有花色素苷的积累,据推测,除了 *cry1* 之外,拟南芥中还存在有其他蓝光受体。

糖在植物生理活动过程中一般被认为是能源、碳源和渗透物质等。蔗糖与花色素苷的积累密切相关。Ohto 等<sup>[19]</sup>的研究发现拟南芥的生长发育和着色需要蔗糖。Moalem 等<sup>[20]</sup>的研究亦表明,GA<sub>3</sub> 对牵牛花冠细胞花色素苷积累及其相关基因表达的诱导依赖于糖。本实验结果表明培养基中缺乏蔗糖,会削减拟南芥叶片花色素苷的积累,特别是蓝光诱导花色素苷的积累和 *CHS* 基因表达效应被明显地抑制,材料 *hy4* 也有相同的现象,说明蔗糖是作为花色素苷积累的重要介导物质。蔗糖是作为花色素苷合成必需的原料还是作为调控 *CHS* 基因表达和花色素苷积累的信使物质起作用,还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Weiss D. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals [J]. *Plant Physiol*, 2000, 110:152-157.
- [2] Wang M (王曼), Wang X J (王小菁). Photoreceptors of ultraviolet light and blue light and induction of *CHS* expression [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2002, 19:265-271.(in Chinese)
- [3] Wang X J (王小菁), Meng X C (孟祥春), Peng J Z (彭建宗). Regulation of flower growth and pigmentation [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报)*, 2003, 23:1105-1110. (in Chinese)
- [4] Kendrick R E, Kronenberg G H. *Photomorphogenesis in Plants* [M]. 2<sup>nd</sup> ed, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 610-628.
- [5] Chen D Q (陈大清). Effects of light and kinetin on photomorphogenesis in *Arabidopsis* seedlings [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2002. (in Chinese)
- [6] Deikman J, Hammer P E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 47-57.
- [7] Noh B, Spalding E P. Anion channels and the stimulation of anthocyanin accumulation by blue-light in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116:503-509.
- [8] Peng X L (彭秀玲), Peng H Y (彭汉英), Xie Y (谢毅), et al.

- Practical Skills in Gene Engineering [M]. 2<sup>nd</sup> ed, Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1997. 285–305. (in Chinese)
- [9] Lange H, Shropshire W Jr, Mohr H. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis [J]. *Plant Physiol*, 1970, 47:649–655.
- [10] Batschauer A, Ehmann B, Schäfer E. Cloning and characterization of a chalcone synthase gene from *mustard* and its light-dependent expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16:175–185.
- [11] Frohnmeyer H, Ehmann B, Kretsch M, et al. Differential usage of photoreceptors for chalcone synthase gene expression during plant development [J]. *Plant J*, 1992, 2:899–960.
- [12] Neuhaus G, Bowler C, Kern R, et al. Calcium/calmodulin-dependent and independent phytochrome signal transduction pathways [J]. *Cell*, 1993, 73:937–952.
- [13] Ahmad M, Cashmore A R. *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with the characteristics of a blue-light photoreceptor [J]. *Nature*, 1993, 366:162–166.
- [14] Ahmad M, Lin C, Cashmore A R. Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light-photoreceptor impair blue light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl extension [J]. *Plant J*, 1995, 8:653–658.
- [15] Jackson J A, Jenkins G I. Extension growth response and flavonoid biosynthesis gene expression in the *Arabidopsis hy4* mutant [J]. *Planta*, 1995, 197:233–239.
- [16] Ahmad M, Jarillo J A, Smirnova O, et al. Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism [J]. *Nature*, 1998, 392:720–723.
- [17] Mol J, Jenkins G I, Schfer E, et al. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15:525–557.
- [18] Chappell J, Hahlbrock K. Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor [J]. *Nature*, 1984, 311:76–78.
- [19] Ohto M, Onai K, Furukawa Y, et al. Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127:252–261.
- [20] Moalem D, Tamari G, Leitner Y, et al. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in *Petunia corollas* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:419–424.