



邓涪元, 乔中全, 王小明, 等. 紫薇 *LiHY5* 基因的克隆、亚细胞定位与不同光质下的表达分析[J]. 江西农业大学学报, 2022, 44(6): 1546–1554.

DENG F Y, QIAO Z Q, WANG X M, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *LiHY5* gene in *Lagerstroemia indica* under different light quality[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2022, 44(6): 1546–1554.

紫薇 *LiHY5* 基因的克隆、亚细胞定位 与不同光质下的表达分析

邓涪元¹, 乔中全², 王小明², 李春霞¹, 陆柳淑¹, 李雪露¹, 何 钢^{1*}

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南省林业科学院 林木无性系育种湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要:【目的】Elongated hypocotyl 5 (*HY5*) 是调节植物生理和生物过程中的主要调节因子, 它可以接收上游光信号, 通过与下游花青素生物合成基因启动子区域相结合激活其转录, 进而促进植物色素的积累。为探究 *LiHY5* 基因在紫薇花青素合成中的功能以及对不同光质的响应, 在紫薇中克隆出 *HY5* 基因, 并利用生物信息学手段预测基因的结构以及在不同光质处理下的表达特征, 为紫薇的色彩选育和种植栽培提供科学的理论依据。【方法】根据紫薇转录组数据成功克隆出 *LiHY5* 基因, 并用生物信息学软件分析其保守结构域、空间结构、同源蛋白序列等; 同时分析了在不同时长的光质处理下 *LiHY5* 基因的相对表达量, 并探究了 *LiHY5* 基因与不同时长光处理下花青素含量的关系; 最后瞬时转化至烟草叶片中进行亚细胞定位。【结果】*LiHY5* 基因的编码序列长 510 bp, 编码 169 个氨基酸, 含有一个 bZIP 结构域; 三级结构预测有典型碱性亮氨酸拉链结构; *LiHY5* 与石榴的 *HY5* 氨基酸序列亲缘关系最近, 达到了 88.17%; 激光共聚焦显微镜观察烟草叶片中绿色荧光分布, 结果显示 *LiHY5* 蛋白定位于细胞核中。通过提取不同时间光处理的紫薇叶片花青素发现, 不同时间的光处理下花青素含量均有上调, 且均呈现先上升后下降的趋势。其中红蓝组合光>红光>蓝光>白光。实时荧光定量 PCR 结果表明 *LiHY5* 基因在不同光质影响下表达量有所差异, 其中红蓝组合光在 14 d 时表达量显著升高, 28 d 时基因表达量降至最低; 相关性分析结果显示 *LiHY5* 基因的表达量与花青素的含量相关系数为 0.603, 说明紫薇中 *LiHY5* 基因的表达量与花青素的含量具有相关性。【结论】*LiHY5* 基因属于 bZIP 转录因子, 其表达受到不同光质的影响, 由此推测该基因参与并促进紫薇花青素的合成。

关键词: 紫薇; *LiHY5*; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S685.99 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2022)06-1546-09

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *LiHY5* Gene in *Lagerstroemia indica* under Different Light Quality

DENG Fuyuan¹, QIAO Zhongquan², WANG Xiaoming²,
LI Chunxia¹, LU Liushu¹, LI Xuelu¹, HE Gang^{1*}

收稿日期: 2022-06-21 修回日期: 2022-08-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1001000)

Project supported by the National Key R&D Project(2019YFD1001000)

作者简介: 邓涪元, orcid.org/0000-0002-6631-012X, 812464469@qq.com; *通信作者: 何钢, 教授, 主要从事植物生物化学与分子生物学、经济林木生物技术及林下药物资源开发与利用研究, orcid.org/0000-0002-7843-1500, hegang262@163.com。

(1.College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Tree Clone Breeding, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract: [Objective] Elongated Hypocotyl 5 (*HY5*) is a major regulator of plant physiological and biological processes. It can receive upstream light signals and activate transcription by binding to the promoter region of the downstream anthocyanin biosynthesis gene, thus promoting the accumulation of plant pigments. In order to explore the function of *LiHY5* gene in anthocyanin synthesis of *Lagerstroemia indica* and its response to different light quality, *HY5* gene was cloned from Crape myrtle, and its structure and expression characteristics under different light-quality treatment were predicted by the bioinformatics method, thus providing scientific theoretical basis for color selection and cultivation of *Lagerstroemia indica*. [Method] *LiHY5* gene was successfully cloned from *Lagerstroemia indica* transcriptomic data, then its conserved domain, spatial structure and isogeny protein sequence were analyzed by using bioinformatics software. The transcript levels of *LiHY5* gene under different light quality treatments were analyzed, and the relationship between *LiHY5* gene and anthocyanin content under different light-quality treatments was explored. Finally, Agrobacterium was injected into tobacco leaves for subcellular localization. [Results] The coding sequence length of *LiHY5* gene was 510bp, translated into 169 amino acids and containing a bZIP conservative domain; The tertiary structure was predicted to have typical alkaline leucine zipper structure. *LiHY5* was closely related to the *HY5* amino acid sequence of *Punica granatum*, reached 88.17%. The green fluorescent protein in tobacco leaves was observed by laser confocal microscope. The results manifested that *LiHY5* protein was localized in the nucleus. Anthocyanins were extracted from the leaves of Crape myrtle under different time of light treatment. It was found that the anthocyanin content showed a trend of increasing first and then decreasing under different time of light treatment. The content demonstrated with the highest increase under the red and blue combined light, followed by red light, blue light and white light. Real-time quantitative PCR demonstrated the expression quantities of *LiHY5* gene were different under the influence of different light quality. The expression levels of *LiHY5* gene were dramatically increased at day 14 under red-blue combination light, and decreased to the lowest at day 28. The correlation analysis results revealed that the correlation coefficient between *LiHY5* gene expression level and anthocyanin content was 0.603, indicating that there was a correlation between *LiHY5* gene expression level and anthocyanin content in Crape myrtle. [Conclusion] *LiHY5* is a bZIP transcription factor, and its expression is affected by different light quality. Therefore, it is speculated that this gene is involved in and promotes anthocyanin synthesis in Crape myrtle.

Keywords: *Lagerstroemia indica*; *LiHY5*; subcellular localization; expression analysis

【研究意义】植物在生长发育过程中表现出不同的颜色主要取决于花青素和叶绿素。花青素是自然界一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,植物中的主要呈色物质大部分与之有关。花青素属于黄酮类化合物,不同种类的花青素呈现的颜色不同,因此花青素的含量与种类直接影响着园艺植物的观赏品质。紫薇(*Lagerstroemia indica*)属于桃金娘目(*Myrtales*)千屈菜科(*Lythraceae*)紫薇属(*Lagerstroemia*),落叶或常绿灌木或小乔木^[1-2]。紫薇品种繁多、色彩丰富,因其通常在盛夏开花且花期较长,故被广泛用于公园、庭院建设和城市道路的绿化与装饰等。近年来随着人们生活品质的提高,丰富多样的园林绿化正成为城市建设的主流,因此对紫薇色彩的研究与选育具有重要的意义。【前人研究进展】植物对于光的依赖,不仅是因为植物光合作用需要光作为能量,光也是作为激活植物生长发育相关基因的重要信号之一。植物通过不同的光感受器感知光信号,并影响多种发育过程,包括幼苗光形态发生,种子发芽以及避荫和光周期反应。植物已经进化出复杂的光调节转录网络,这些转录网络介导着光发育变化^[3]。Elongated hypocotyl 5 (*HY5*)是光信号通路中的关键转录因子之一,它隶属于bZIP转录因子家族,通过直接与光诱导基因的启动子结合参与调控光形态建成、叶绿体发育和色素积累等生物学过程^[4-6]。在拟南芥中,

*AtHY5*在介导光激活花青素积累和*CHS*基因表达方面发挥了积极作用,*AtHY5*可以直接激活*CHS*、*DFR*等花青素结构基因启动子促进花青素积累。在体外,*AtHY5*通过G-box基序特异性结合*CHS1*启动子的最小光响应启动子单元^[7]。苹果中的*MdHY5*可以结合转录因子*MdMYB10*基因启动子区域的G-box元件,进而调控花青素合成途径中关键结构基因的表达,这表明*MdHY5*能与转录因子的上游元件相互作用,从而直接或间接促进苹果花青素的合成^[8];在血橙中,血橙果皮中花青素的积累由*CsRuby1*启动子内的G-Box(CACGTC)调节。*HY5*通过与G-Box结合来正向调节MYB家族*Ruby1*的转录^[9]。此外,草莓^[10]、葡萄^[11]、桃^[12]和茄子^[13]等多种植物中的其他*HY5*基因也被证明能促进光诱导的花青素的生物合成和积累。【本研究切入点】‘丹红紫叶’是由湖南省林业科学院以美国紫叶紫薇为试验材料,选育出的优良新品种^[14]。‘丹红紫叶’叶色稳定,在正常光照下幼嫩时期叶片为紫红色,叶片展开后颜色由紫红色加深至黑紫色,成熟叶片叶色维持在稳定的黑紫色不变^[15]。【拟解决的关键问题】鉴于*HY5*基因在植物光信号转导过程中的重要性,本研究通过紫薇转录组数据,克隆出1个*LiHY5*基因,并进行基因结构分析与不同光质影响下的基因表达量的测定,同时在烟草中进行了亚细胞定位。为深入研究紫薇*LiHY5*基因的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物材料:试验所用‘丹红紫叶’紫薇种植于湖南省林业科学院试验林场。选择红光(R,730 nm)、蓝光(B,450 nm)、红蓝组合光(R:B,1:1)处理,以白光(W)作为对照。LED光源用扎带固定在植株顶部,用黑色遮光布遮挡,植株与光源距离可调,光暗周期的温度为25℃/16℃,光照时间用计时器设定为12 h/d(06:00—18:00)。选取长势基本一致无病斑、虫害的扦插苗(苗高约40 cm),剪去多余的枝条,单株移栽到装有育苗基质的塑料盆中,每个光源处理10株,每种处理植株重复3次,置于不同LED光源下,7,14,21,28 d后随机剪下较嫩的叶片,液氮速冻,-80℃保存备用。

试剂与载体:RNA提取试剂盒、连接试剂盒和质粒小提试剂盒均购自北京艾德莱生物科技有限公司;2×Rapid Master Mix高保真酶、逆转录试剂盒、荧光定量试剂均购自诺唯赞生物公司;*Kpn* I和*Bam* H I快切酶、T4 DNA连接酶购自Takara公司;大肠杆菌DH5α感受态细胞购自上海唯地生物公司。

1.2 引物设计

根据紫薇转录组数据,筛选出一条unigene序列片段,用Primer Premier 5软件根据编码序列从两端设计上下游特异引物*LiHY5*-F、*LiHY5*-R进行基因克隆。同时依据CDS序列设计荧光定量PCR的引物和带有*Kpn* I和*Bam* H I酶切位点的引物连接植物载体pCambia1300-35S-GFP(表1)。

表1 试验所用引物
Tab.1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	用途 Purpose
<i>LiHY5</i> -F	ATGCAAGAGCAGGCCACGAG	克隆
<i>LiHY5</i> -R	CGAGGACCCATCAGCATTAGAAC	克隆
<i>LiHY5</i> - <i>Kpn</i> I-F	GGGGTACCATGCAAGAGCAGGCCACGAG	构建载体
<i>LiHY5</i> - <i>Bam</i> H I-R	CGGGATCCCGAGGACCCATCAGCATTAGAAC	构建载体
<i>LiHY5</i> -q-F	TAGAGGAGCGACTTTCCACATTG	qPCR
<i>LiHY5</i> -q-R	TTACGAGGACCCATCAGCATTAG	qPCR
<i>Li18S</i> -F	GGGCATTCGTATTTCATAGTCAGAG	qPCR
<i>Li18S</i> -R	CGGCATCGTTTATGCTTGAGA	qPCR

1.3 紫薇*LiHY5*基因的克隆

按照多糖多酚复杂植物RNA提取试剂盒说明书提取‘丹红紫叶’紫薇叶片总RNA,并检测RNA的质量。将无降解的RNA直接反转录合成cDNA并稀释。按照以下反应体系进行扩增:cDNA 2.0 μL,克隆

引物 *LiHY5*-F、*LiHY5*-R 各 0.5 μL , 2 $\times$ Rapid Master Mix 10 μL , ddH₂O 补足体积至 20 μL 。扩增程序按照高保真酶说明书设置,退火温度 63 $^{\circ}\text{C}$, 33 个循环。PCR 产物纯化后连接转化,挑单菌落并小摇 6 h,选择浑浊菌液进行 PCR,将电泳条带大小与目的基因一致的菌液,送至华大基因公司进行测序。

1.4 *LiHY5* 基因的生物信息学分析

将 *LiHY5* 基因编码序列翻译成氨基酸序列后,利用 NCBI 结构域预测软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测 *LiHY5* 蛋白保守结构域;运用 ExPASy 在线分析软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)对 *LiHY5* 蛋白的理化性质进行分析;SignalP5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)分析其是否带有信号肽位点, TMHMM2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)预测蛋白质跨膜结构区域;利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析蛋白质二级结构;利用 Swiss-Model(<https://swissmodel.expasy.org/>)建立蛋白质三维空间结构模型, Pymol 对蛋白质三维图像进行处理;imageJ 对荧光图像进行优化;DNAMAN 对不同的植物进行序列比对;MEGA11 构建系统进化树。

1.5 *LiHY5* 基因的亚细胞定位

将 *LiHY5* 基因的编码序列双酶切与 pCambia1300-35S-GFP 质粒连接,转化至大肠杆菌并测序,得到序列正确的 pCambia1300-35S-*LiHY5*-GFP 重组质粒,转化至 EHA105 农杆菌,将含有农杆菌的注射液注射至烟草下表皮,暗处理 2 d 后,光照 1 d。轻轻撕取注射孔附近的烟草叶片下表皮并将其放置在显微镜下观察。

1.6 花青素的提取

精准称取‘丹红紫叶’紫薇不同光质处理下的新鲜叶片 0.1 g 并剪碎,放入 10 mL 离心管中,用 0.1% 的盐酸甲醇溶液定容至 5 mL,用封口膜封住,放入冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸提 24 h,直至溶液呈紫色,叶片呈无色,每个样品重复 3 次。在波长 530 nm 处测量浸提液的吸光度,并计算出花青素含量。相对含量 $A = \text{吸光度} \times 0.01$,花青素相对含量(mg/g) = $\text{OD}_{530} / \text{g} \cdot \text{FW}$ 。

1.7 不同光质下 *LiHY5* 基因的表达量

为了探究 *LiHY5* 基因在不同光质下的表达水平,利用荧光定量 PCR 进行基因表达量的检测。根据 *LiHY5* 基因编码序列设计荧光引物(表 1),以白光作为样本对照,18S 基因作为内参基因。每个样品模板连续稀释 4 倍、16 倍、64 倍、256 倍后计算扩增效率,反应体系和扩增程序按照说明书设定,选择标准程序并选择 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 进行数据分析。

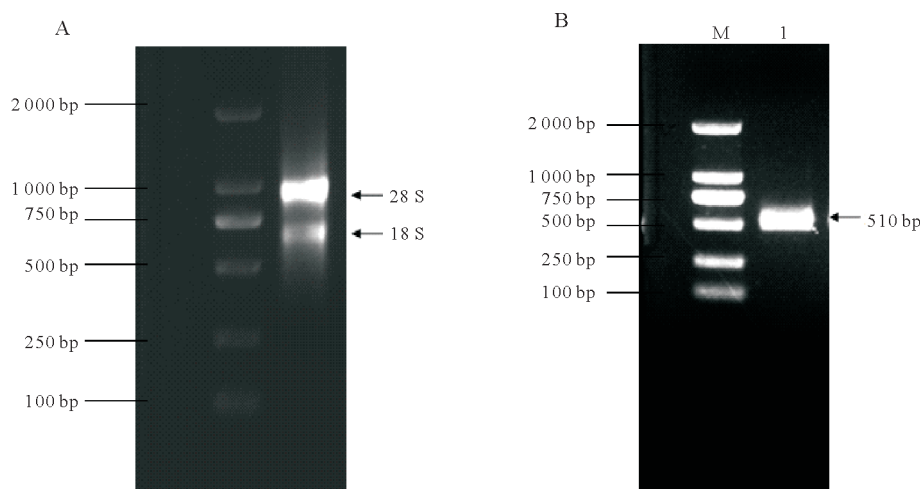
2 结果与分析

2.1 *LiHY5* 基因的克隆

提取‘丹红紫叶’紫薇幼嫩叶片总 RNA(图 1A),通过电泳图显示 28S、18S 条带清晰且 28S:18S=2:1,说明 RNA 无污染降解,可以进行后续实验。将‘丹红紫叶’紫薇总 RNA 进行反转录得到 cDNA。设计 *LiHY5*-F、*LiHY5*-R(表 1)为克隆引物,扩增得到清晰且单一的目的片段(图 1B)。经过测序得到 510 bp 的序列,与目的片段相似度 94.78%,通过 NCBI 中 BLAST 比对,与数据库中多种植物的 *HY5* 基因具有较高的同源性,因此将紫薇该基因命名为 *LiHY5*。

2.2 *LiHY5* 基因的理化性质与保守结构域预测

LiHY5 基因的 CDS 序列长 510 bp,编码 169 个氨基酸。将其放入 ExPASy 预测蛋白基本理化性质,结果显示该蛋白分子式为 C₇₅₅H₁₂₇₇N₂₆₃O₂₆₇S₄,分子量 18 439.29 Da,理论等电点 pI 为 9.80,总原子个数为 2 566,氨基酸含量占比最多是精氨酸和丝氨酸,为 12.4%。不稳定指数为 59.42,为不稳定蛋白质。带负电残基总数为 25,带正电残基总数为 30,脂肪系数为 59.59。亲水性指数-1.143,属于亲水性蛋白。信号肽位点预测 *LiHY5* 无信号肽位点,同时预测显示 *LiHY5* 没有跨膜结构,故不属于膜蛋白。利用 NCBI 在线分析工具 Conserved Domain Search 在线分析 *LiHY5* 蛋白的保守结构域,结果显示如图 2,该蛋白在第 92~143 位存在典型的 bZIP-HY5-Like 特定位点,属于 bZIP 超家族。bZIP 结构含有亮氨酸拉链结构和碱性结构域,可参与高等植物的光转录调控。



M:DL2 000 DNA Marker;A:‘丹红紫叶’总 RNA 提取;B:LiHY5 基因的克隆

M:DL2 000 DNA marker;A:extraction of total RNA from *Lagerstroemia indica* leaves;B:cloning of *LiHY5* gene

图 1 *LiHY5* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *LiHY5* gene PCR products



图 2 *LiHY5* 蛋白保守结构域预测

Fig.2 Prediction of conserved domain of *LiHY5* protein

2.3 *LiHY5* 蛋白空间结构预测

LiHY5 蛋白的二级结构预测结果分析如图 3,*LiHY5* 蛋白 169 个氨基酸中 87 个氨基酸形成无规则卷曲,占 51.48%;80 个为 α 螺旋,占 47.34%; β 转角和延伸链只有 1 个,均只占 0.59%。蛋白质三级结构预测见图 4,*LiHY5* 蛋白三维图像呈典型亮氨酸拉链结构,与 bZIP 转录因子的空间结构一致。

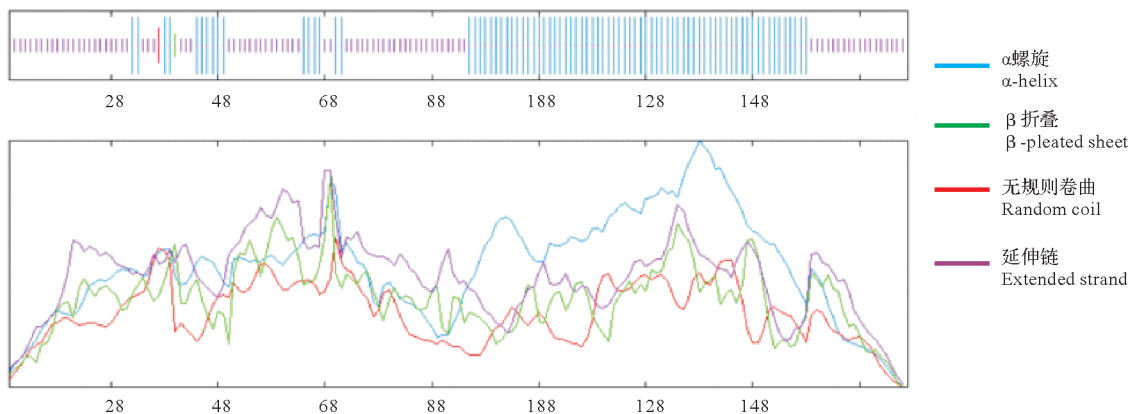


图 3 *LiHY5* 蛋白质二级结构预测

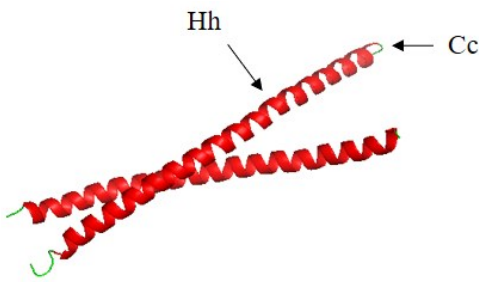
Fig.3 Secondary structure prediction of *LiHY5* protein

2.4 *LiHY5* 蛋白多序列比对与系统进化分析

将石榴 (XP_031407456.1)、蒲桃 (XP_030440254.1)、玫瑰木 (XP_030548349.1)、大桉 (XP_010048982.1)、毛果杨 (XP_002308656.1)、甜樱桃 (XP_021827650.1)、橙子 (KAH9760741.1)、白桦 (AHY20043.1)、月季 (XP_024165510.1)、大麻 (XP_030495238.1)、沙梨 (QRR19189.1)、枣 (XP_015868446.1)12 种 HY5 蛋白序列与紫薇 HY5 蛋白序列比对分析,总相似性达到 85.32%(图 5),其中与石榴的蛋白序列相似度最高,达到 88.17%。

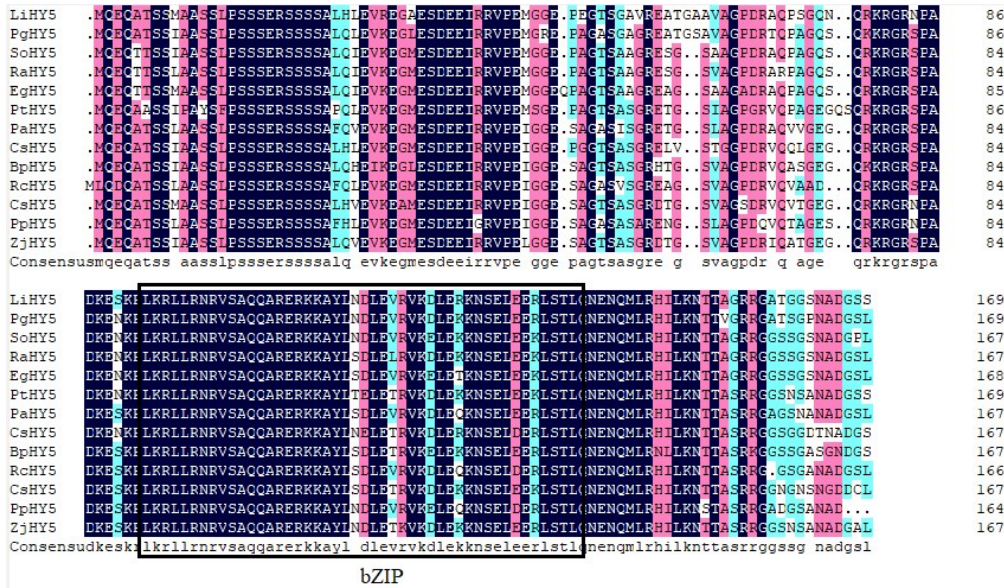
选择石榴 *Punica granatum*、大桉 *Eucalyptus grandis*、栓皮栎 *Quercus suber*、橙子 *Citrus sinensis*、蓖麻

Ricinus communis、蒲桃 *Syzygium oleosum*、玫瑰木 *Rhodamnia argentea*、毛果杨 *Populus trichocarpa*、白桦 *Betula platyphylla*、枣 *Ziziphus jujuba*、月季 *Rosa chinensis*、大麻 *Cannabis sativa*、沙梨 *Pyrus pyrifolia*、甜樱桃 *Prunus avium*、番木瓜 *Carica papaya* 一共 15 种植物的 HY5 蛋白序列作为参照,采用 Neighbor Joining 法构建系统发育树,并利用 Bootstrap 进行检测,采用重复抽样 1 000 次。进化分析结果显示(图 6),紫薇与石榴、蒲桃、大桉、玫瑰木亲缘关系较近,*LiHY5* 与石榴 *PgHY5* 归为同一分支,说明二者的同源蛋白可能具有相似的功能。



红色为 α 螺旋(Hh),绿色为无规则卷曲(Cc)。
Red is α Helix, green is Random coil.

图 4 *LiHY5* 蛋白质三级结构预测
Fig.4 Prediction of *LiHY5* protein tertiary structure



黑框代表 bZIP 保守结构域;Li:紫薇;Pg:石榴;So:蒲桃;Ra:玫瑰木;Eg:大桉;Pt:毛果杨;Pa:甜樱桃;Cs:橙子;Bp:白桦;Rc:月季;Cs:大麻;Pp:沙梨;Zj:枣。

The black box represents the bZIP conservative domain;Li: *Lagerstroemia indica*; Pg: *Punica granatum*; So: *Syzygium oleosum*; Ra: *Rhodamnia argentea*; Eg: *Eucalyptus grandis*; Pt: *Populus trichocarpa*; Pa: *Prunus avium*; Cs: *Citrus sinensis*; Bp: *Betula platyphylla*; Rc: *Rosa chinensis*; Cs: *Cannabis sativa*; Pp: *Pyrus pyrifolia*; Zj: *Ziziphus jujuba*.

图 5 不同物种 HY5 蛋白的氨基酸序列对比

Fig.5 Comparison of amino acid sequences of HY5 proteins in different species

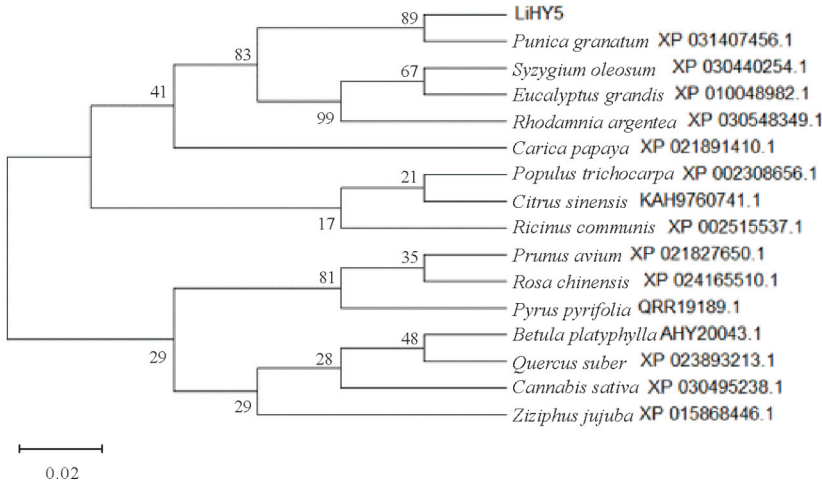
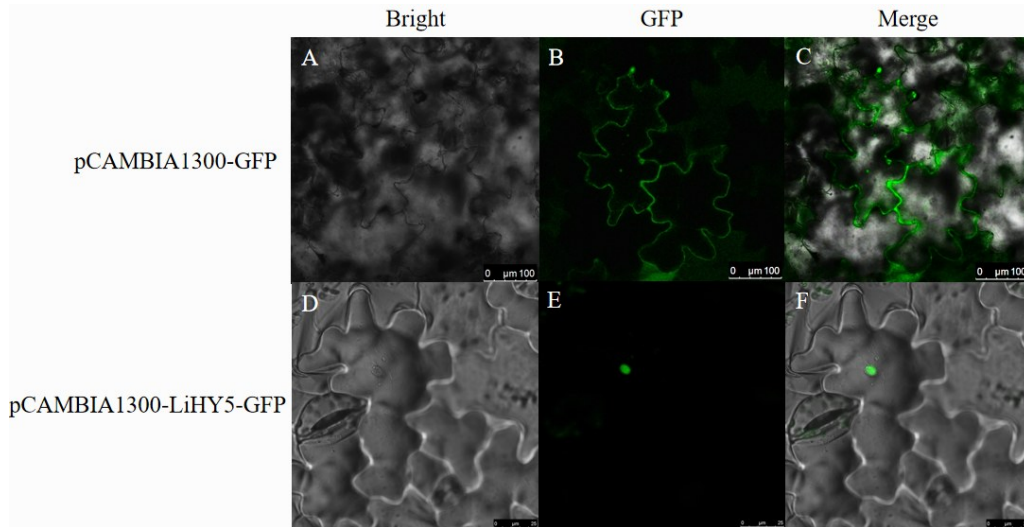


图 6 不同植物 HY5 氨基酸序列的进化分析

Fig.6 Evolutionary analysis of HY5 amino acid sequences in different plants

2.5 *LiHY5* 基因的亚细胞定位

亚细胞定位预测显示 *LiHY5* 蛋白定位于细胞核中,为验证紫薇 *LiHY5* 基因在细胞中的位置,采用双酶切法构建了 *LiHY5*-pCambia1300-35S-GFP 重组载体。将重组载体双酶切并转化农杆菌,采用农杆菌介导法转化烟草叶片进行亚细胞定位。结果显示,空载中荧光主要分布在细胞膜和细胞质中;转化带有 *LiHY5* 基因的质粒注射至烟草叶片中,荧光主要分布在细胞核中(图7)。



A、D 为明场;B、E 为荧光信号;C、F 为叠加场。

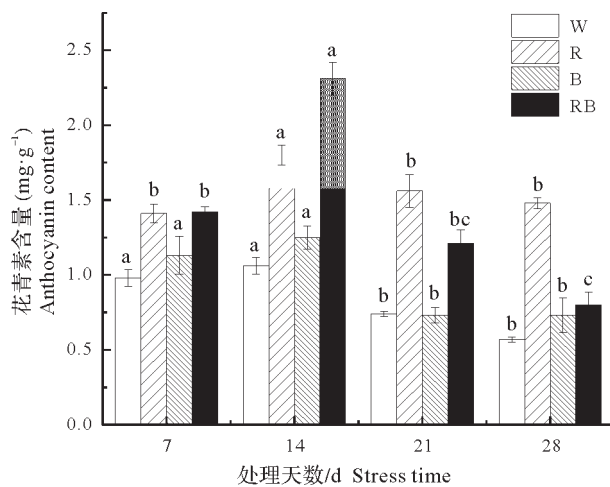
A and D are bright field; B and E is fluorescence signal; C and F is the merge field.

图7 *LiHY5* 基因的亚细胞定位

Fig.7 Subcellular localization of *LiHY5* gene

2.6 紫薇叶片花青素含量与 *LiHY5* 基因表达量相关性分析

为探究 *LiHY5* 基因表达量与花青素含量的关系,笔者提取了不同时间光处理的紫薇叶片花青素。由图8可知:不同时间的光处理下花青素含量均有上调,且均呈现先上升后下降的趋势。其中红蓝组合光>红光>蓝光>白光,红蓝组合光影响最为显著,在 14 d 时含量最高,28 d 时花青素含量降至最低,在不同时

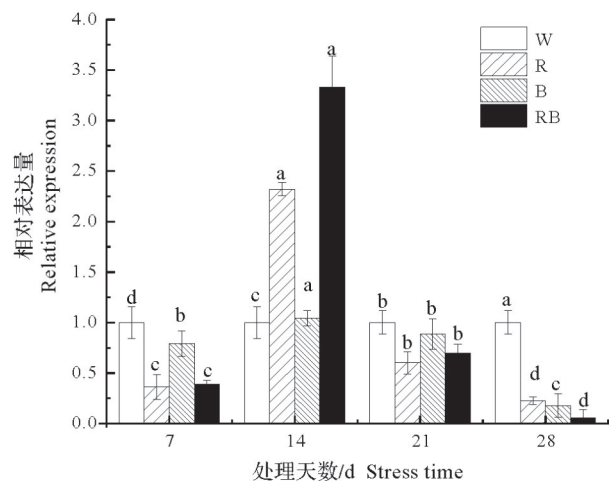


W: 白光;R: 红光;B: 蓝光;RB: 红蓝组合光;
柱上无相同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

W: white light; R: red light; B: blue light; RB: red and blue combined light. There was no same lowercase letter on the column, indicating significant difference ($P<0.05$).

图8 ‘丹红紫叶’紫薇叶片花青素含量

Fig.8 Anthocyanin content in leaves of *Lagerstroemia indica*



W: 白光;R: 红光;B: 蓝光;RB: 红蓝组合光;
柱上无相同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

W: white light; R: red light; B: blue light; RB: red and blue combined light. There was no same lowercase letter on the column, indicating significant difference ($P<0.05$).

图9 *LiHY5* 基因在不同光处理下的基因表达量

Fig.9 Gene expression of *LiHY5* gene under different light treatments

间段均高于其他光处理。说明不同光质的处理能促进紫薇叶片花青素的积累。通过 qPCR 技术检测 *LiHY5* 基因在红光、蓝光以及红蓝组合光下的基因表达量,以白光作为对照,结果如图 9 所示。由图 9 可知 *LiHY5* 基因表达量在不同光的处理下呈先升高后降低趋势,在 7 d 时 3 种不同颜色的光基因表达量均有下调,14 d 时红光和红蓝光表达量明显上调,28 d 时下调至最低。这些结果说明不同光质均对 *LiHY5* 基因的表达有影响。其中,红蓝组合光>红光>白光>蓝光,说明红光和红蓝光在 14 d 时对 *LiHY5* 基因发挥了积极的作用;而蓝光在 28 d 的处理下花青素含量和基因表达量对比白光差别不大,说明短时间的蓝光对 *LiHY5* 基因影响效果不明显。

通过分析紫薇叶片花青素含量与 *LiHY5* 基因相对表达量的相关性,结果表明紫薇叶片花青素的含量与 *LiHY5* 基因的相对表达量相关系数为 0.603,说明紫薇中花青素的含量与 *LiHY5* 基因的相对表达量相关性显著。花青素含量与 *LiHY5* 基因相对表达量呈线性关系。

3 结论与讨论

HY5 基因在植物幼苗生长发育中起着重要作用,并且是光形态发生的正调节因子。近年来对 *HY5* 基因的研究日益增多,*HY5* 基因的功能也逐渐被人们发掘:*HY5* 基因不仅感知光信号参与色素积累,也有研究报道 *HY5* 基因诱导了植物幼根的发育^[16]、控制冷诱导基因的表达以促进植物的冷适应^[17]。在幼苗发育中,*HY5* 直接与细胞核中 COP1 相互作用,负性调节其活性^[18]。COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1) 是一种具有 WD-40 重复序列的环指蛋白,与 *HY5* 作用相反,其核丰度受光负调控。在黑暗下 COP1 定位在细胞核,与 *HY5* 蛋白相互作用后,COP1 可作为泛素蛋白连接酶 E3 聚集 E2 泛素结合酶,靶向 *HY5* 和其他底物进行泛素化并随后被蛋白酶体降解;在可见光下,COP1 与上游光感受器相互作用抑制自身功能,COP1 随后在细胞核泛素化并被排出到核外^[19]。

花青素属于黄酮类化合物,广泛存在植物花序和果实中。花青素色素是植物颜色的主要决定因素,可使植物呈现红色和紫色,是成熟果实中传粉者的视觉信号^[20]。*HY5* 在花青素生物合成的控制中扮演着十分重要的角色。核内的 *HY5* 等光形态建成正调控因子将积累并激活 R2R3 MYBs 转录因子和类黄酮合成途径中的结构基因,结合基因启动子区域的顺式作用元件,从而在光照条件下促进植物花青素等类黄酮物质合成^[21]。

紫薇作为重要的园艺观赏植物,通过研究紫薇花色形成机制实现紫薇颜色的多样对观赏育种以及满足市场需求有重要的意义。本研究成功克隆得到了紫薇 *LiHY5* 基因,长度 510 bp,由 169 个氨基酸组成,含有典型的 bZIP-*HY5*-Like 保守结构域。系统进化分析显示 *LiHY5* 与石榴 PgHY5、蒲桃 SoHY5 氨基酸序列亲缘关系最近,可能是由于它们都属于桃金娘目,因此发挥相似的功能。亚细胞定位结果说明 *LiHY5* 基因在核内发挥功能,这与转录因子的基本特征相符合,与马媛等^[22]对日本结缕草的亚细胞定位结果一致。花青素含量在不同时间的光质影响下先升高后降低,说明短时间内不同光质的干预可以促进花青素的合成,但 28 d 时均降低。推测可能是由于单一光质的影响使得紫薇生长受到限制。qPCR 结果显示不同时间、不同光质处理对 *LiHY5* 基因影响较大,且与花青素含量的相关性较高,说明光照尤其是红蓝组合光可以促进紫薇 *LiHY5* 基因的表达与花青素的合成。这与前人对草莓的研究结果类似^[23]。本研究对 *LiHY5* 基因进行了初步的预测分析,为接下来验证 *LiHY5* 基因的功能、探究紫薇遗传转化体系提供理论基础。

致谢:长沙市杰出创新青年培养计划(kq2106090)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] 彭婵,李振芳,马林江,等.紫薇属种间杂种 SSR 分子鉴定与遗传分析[J].北方园艺,2020(13):83-90.
PENG C, LI Z F, MA L J, et al. Identification and genetic analysis in *Lagerstroemia* interspecific hybrids using SSR markers [J]. Northern horticulture, 2020(13):83-90.
- [2] 林启芳,刘婷婷,刘洁茹,等.紫薇属与黄薇属植物花瓣类黄酮组成及含量分析[J].园艺学报,2021,48(10):1956-1968.
LIN Q F, LIU T T, LIU J R, et al. Flavonoids composition and content in petals of *Lagerstroemia* and *Heimia* species and cultivars [J]. Horticultural plant journal, 2021, 48(10):1956-1968.

- [3] JIAO Y, LAU O S, DENG X W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants[J]. Nature reviews genetics, 2007, 8(3): 217-230.
- [4] OSTERLUND M T, HARDTKE C S, WEI N, et al. Targeted destabilization of *HY5* during light-regulated development of *Arabidopsis*[J]. Nature, 2000, 405: 462-466.
- [5] ZHANG Y Q, ZHENG S, LIU Z J, et al. Both *HY5* and *HYH* are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(4): 367-374.
- [6] XIAO Y T, CHU L, ZHANG Y M, et al. *HY5*: a pivotal regulator of light-dependent development in higher plants[J]. Frontiers in plant science, 2021, 12: 989.
- [7] ANG L H, CHATTOPADHYAY S, WEI N, et al. Molecular interaction between *COP1* and *HY5* defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development[J]. Molecular cell, 1998, 1(2): 97.
- [8] AN J P, QU F J, YAO J F, et al. The bZIP transcription factor MdHY5 regulates anthocyanin accumulation and nitrate assimilation in apple[J]. Horticulture research, 2017, 4(1): 17-23.
- [9] HUANG D, YUAN Y, TANG Z Z, et al. Retrotransposon promoter of Ruby1 controls both light and cold-induced accumulation of anthocyanins in blood orange[J]. Plant cell and environment, 2019, 42(11): 3092-3104.
- [10] LI Y, XU P B, CHEN G Q, et al. FvbHLH9 functions as a positive regulator of anthocyanin biosynthesis by forming a *HY5*-bHLH9 transcription complex in strawberry fruits[J]. Plant cell and physiology, 2020, 61(4): 826-837.
- [11] SUN L, LI S C, TANG X P, et al. Transcriptome analysis reveal the putative genes involved in light-induced anthocyanin accumulation in grape 'Red Globe' (*V. vinifera* L.)[J]. Gene, 2020, 728: 1-21.
- [12] ZHAO Y, MIN T, CHEN M J, et al. The photomorphogenic transcription factor PpHY5 regulates anthocyanin accumulation in response to UVA and UVB irradiation[J]. Frontiers in plant science, 2021, 11: 603178.
- [13] LI J R, LI G Z, et al. Combined transcriptomic and proteomic analysis constructs a new model for light-induced anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Plant cell and environment, 2017, 40(12): 3069-3087.
- [14] 李永欣, 王小明, 乔中全, 等. 紫叶紫薇引种试验[J]. 湖南林业科技, 2018, 45(6): 68-71.
- LI Y X, WANG X M, QIAO Z Q, et al. Introduction experiments of purple-leaf crape myrtles[J]. Hunan forestry science technology, 2018, 45(6): 68-71.
- [15] QIAO Z Q, LIU S S, ZENG H J, et al. Exploring the molecular mechanism underlying the stable purple-red leaf phenotype in *Lagerstroemia indica* cv. Ebony Embers[J]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(22): 5636.
- [16] YANG Y, LIU H T. *Arabidopsis* coordinated shoot and root responses to light signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant communications, 2020, 1(2): 100026.
- [17] CATALÁ R, MEDINA J, SALINAS J. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(39): 16475-16480.
- [18] HOLM M, MA L G, QU L J, et al. Two interacting bZIP proteins are direct targets of *COP1*-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*[J]. Genes and development, 2002, 16(10): 1247-1259.
- [19] ZORATTI L, KARPPINEN K, LUENGO E A, et al. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits[J]. Frontiers in plant science, 2014, 5: 534.
- [20] STRACKE R, ISHIHARA H, HUEP G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling[J]. Plant journal, 2007, 50(4): 660-677.
- [21] 赵亚男, 张会灵, 张中华, 等. 转录因子 *HY5* 在植物花青素合成中的调控作用[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 22(3): 670-677.
- ZHAO Y N, ZHANG H L, ZHANG Z H, et al. The regulatory role of transcription factor *HY5* in mediating anthocyanin biosynthesis in plant specie[J]. Journal of plant genetic resources, 2022, 22(3): 670-677.
- [22] 马媛, 杨卓雄, 董笛, 等. 日本结缕草 *ZjHY5* 的克隆、亚细胞定位及转录自激活检测[J]. 草地学报, 2022, 30(3): 560-567.
- MA Y, YANG Z X, DONG D, et al. Cloning, subcellular localization and autonomous transcriptional activation testing of transcription factors *ZjHY5* in *Zoysia japonica*[J]. Acta agrestia Sinica, 2022, 30(3): 560-567.
- [23] ZHANG Y T, HU W J, PENG X R, et al. Characterization of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in two strawberry genotypes during fruit development in response to different light qualities[J]. Journal of photochemistry and photobiology B: biology, 2018, 186: 225-231.