

ABA 信号通路对葡萄果皮花青苷生物合成的调控机制研究

徐献斌, 李 慧, 耿晓月, 郑 焕, 陶建敏*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要:以‘红巴拉多’葡萄为试验材料,在转色前期(约花后 6 周)用 300 mg/L 的 ABA 对果穗进行处理,以清水处理为对照;测定不同发育时期葡萄果实的单果重、可滴定酸、可溶性固性物等生理指标,同时测定果皮中总花青苷及 ABA 含量;检测不同发育时期果皮中 ABA 信号通路和花青苷生物合成相关基因表达量,克隆 6 个与花青苷生物合成相关基因的启动子,并预测启动子中的顺式作用元件,在转录调控水平上探讨 ABA 信号通路对葡萄果皮花青苷生物合成的调控作用。结果表明:(1)ABA 处理的葡萄果实可溶性固形物含量明显提高、可滴定酸含量下降。(2)ABA 处理显著提高了‘红巴拉多’葡萄果皮的着色水平以及总花青苷和 ABA 含量。(3)ABA 处理后,9 个 ABA 信号通路基因以及 6 个花青苷生物合成相关基因表达水平明显提高。(4)6 个花青苷生物合成相关基因的启动子序列中均含有多个与 ABA 响应相关的 ABRE 作用元件。研究发现,9 个 ABA 信号通路基因可能在葡萄果皮着色中发挥着重要作用,其中 2 个 VvABFs 转录因子可能直接作用于含有 ABRE 元件的花青苷生物合成相关基因的启动子序列,推测可通过调控这些基因的转录水平来调控葡萄果皮花青苷的积累。

关键词:‘红巴拉多’葡萄;ABA;花青苷;基因表达;启动子

中图分类号:Q945.6⁺5; Q789 **文献标志码:**A

Regulation Mechanism of ABA Pathway Genes on Anthocyanin Biosynthesis in Grape Skins

XU Xianbin, LI Hui, GENG Xiaoyue, ZHENG Huan, TAO Jianmin*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Present study use ‘Benibalado’ as the experimental material. In the early stage of véraison, grape clusters were treated with 300 mg/L ABA, water treated as control. The weight, titratable acid and total soluble solids of grape berries at different development stages were determined. Meanwhile, we detected the concentrations of total anthocyanins and endogenous hormone ABA in grape skins. The expression of ABA signaling pathway and anthocyanin biosynthesis related genes in skins of different development stages were observed by qRT-PCR. Promoters of 6 anthocyanin biosynthesis related genes were cloned by PCR, the *cis*-acting elements in these promoters were predicted to exploring the mechanism of ABA promoted grape skin coloring and anthocyanin accumulation of ‘Benibalado’ grape at transcriptional regulation level. The results showed that: (1) ABA treatment significantly increased the total soluble sol-

收稿日期: 2020-12-07; 修改稿收到日期: 2021-02-23

基金项目: 国家现代农业葡萄产业技术体系(CARS-29); 江苏农业产业技术体系(JATS[2020]398); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201723); 国家自然科学基金(31901975; 31972384); 江苏省农业科技自主创新资金[CX(19)2029]

作者简介: 徐献斌(1996-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事果树生理与分子生物学研究。E-mail: 2018104021@njau.edu.cn

* 通信作者: 陶建敏, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄栽培育种及分子技术的研究。E-mail: taojianmin@njau.edu.cn

id while decreased titratable acid of 'Benibalado' grape. (2) ABA treatment significantly increased the anthocyanin content and endogenous ABA content in the skin of 'Benibalado' berries. (3) After ABA treatment, the expression levels of 9 ABA signaling pathway genes and 6 anthocyanin biosynthesis related genes of 'Benibalado' grape skins were significantly increased. (4) The results of *cis*-acting element analyzing showed that the promoter sequences of above six anthocyanin biosynthesis related genes contained several ABRE motif which were reported related to ABA signal response. In summary, the results suggested that 9 ABA signaling pathway genes may play important roles in grape skins coloring, two of them (VvABFs) may directly works with the promoter sequence of anthocyanin biosynthesis related genes, which are abundant of ABRE elements to positive regulate the transcription level of downstream genes and eventually modulate the skins coloring and anthocyanin accumulation of grape.

Key words: 'Benibalado' grape; ABA; anthocyanin; gene expression; promoter

葡萄(*Vitis* L.)是一种重要的果树作物,鲜食葡萄在世界上被广泛种植^[1]。葡萄果皮颜色是衡量葡萄商品性的重要指标之一。但是一些红色的鲜食葡萄品种,常常因为环境条件不理想或管理措施不到位而达不到较好的着色条件,部分葡萄成熟期的果实不能充分着色^[2]。一般认为,红色或黑色葡萄果皮的着色与花青苷积累相关,目前对花青苷的合成和调控已有深入的研究^[3]。在生产上外源施用 ABA 来促进葡萄着色已开始应用,ABA 促进花青苷的生物合成和果实着色也已有文献报道,但其具体的分子机理还不清楚^[4-6]。

前人研究表明,ABA 信号通路由 ABA 受体(PYL/RCAR)、2C 型蛋白磷酸酶(PP2C)、SnRK2 激酶、ABRE 元件结合因子(AREB/ABFs)组成^[7-8]。在缺乏 ABA 的情况下,PP2Cs 通过相互作用和去磷酸化使 SnRK2s 蛋白失去活性^[9]。在 ABA 存在的情况下,PYL/RCAR 与 PP2Cs 相互作用,破坏了 PP2Cs 与 SnRK2s 的相互作用,SnRK2s 可以自磷酸化而活化,从而结合下游的 AREB/ABFs 转录因子^[10]。AREB/ABFs 通过结合下游基因启动子中的 ABRE 元件,来激活下游基因的表达,从而调控一系列生理过程,如抗逆、果实成熟、花青苷积累等^[8,11-12]。在葡萄中,研究者们已经从 ABA 信号通路中分离和鉴定出了 PYL/RCAR、PP2C、SnRK2 和 AREB/ABFs 基因^[8,13]。而调控花青苷生物合成的 ABA 信号通路基因仍需要进一步的筛选和鉴定。

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术,对候选的 ABA 信号通路基因和花青苷生物合成相关基因的表达规律进行分析,同时对 6 个花青苷生物合成相关基因启动子进行克隆和顺式作用元件分析,筛选可能调控葡萄果皮花青苷生物合成的 ABA 信号通路基因,以及 ABA 信号通路基因可能直接调控的下游基因。本研究在转录水平上探讨 ABA 信号通

路调控葡萄果皮花青苷生物合成的机理,旨在为生产上外源施用 ABA 促进葡萄果实着色应用提供理论依据和指导。

1 材料和方法

1.1 材料处理和样品采集

试验于 2019 年在南京农业大学汤山葡萄基地进行。以'红巴拉多'葡萄为试验材料,选择树体长势一致的植株,树形为平架棚"H"型整形,栽培管理等同常规。

在果实的转色前期(花后第 6 周),在预实验基础上选用 300 mg/L ABA 溶液处理'红巴拉多'葡萄果穗,以清水处理为对照。处理和对照各随机处理 40 穗葡萄果穗,处理后每隔 7 d 取样 1 次,直到果实成熟(处理后 35 d)。所取样品部分进行生理指标测定,部分样品用手术刀片剥取果皮,液氮速冻后-80 °C 保存备用。

1.2 果实品质测定

单果重量使用电子天平测定,可溶性固形物含量采用 PAL-1 手持式糖度计测定,可滴定酸含量采用酸碱滴定法测定。葡萄果实赤道部位两面的果面色泽采用柯尼卡美能达 CR-400 便携式色差仪测定,主要包括 L(亮度)、a(红绿色差)、b(黄蓝色差)、c(色彩纯度)、h(综合颜色)值。以上生理指标的测定均采用 3 次生物学重复,每次测定至少使用 10 个随机选取的葡萄果粒。

1.3 果皮花青苷的提取和测定

总花青苷的提取参照 Jia 等^[14]的方法并加以改进:取待测的葡萄果皮样品,用液氮研磨成粉末,称取 1.0 g 样品粉末,加入 10 mL 含 1% 盐酸的甲醇溶液,4 °C 黑暗条件中静置 24 h,10 000 r/min 高速离心 10 min,沉淀反复浸提 2 次,合并上清液,用 0.22 μm 滤膜过滤后合并上清液待测。参照 You 等^[15]的方法

使用 pH 示差法进行总花青苷含量的测定。

1.4 果皮 ABA 含量测定

取待测的葡萄果皮样品,用液氮研磨成粉末,称取 1.0 g 样品粉末,加入 10 mL 含 80% 的甲醇溶液,4 °C 黑暗中静置 12 h,10 000 r/min 高速离心 10 min,沉淀反复浸提 2 次,合并上清液,加入 0.2 g PVPP,在 4 °C 恒温摇床中 120 r/min 振荡 1 h,离心后取上清液过 C₁₈ 小柱。使用冷冻干燥器进行冻干后,再加入 1 mL 80% 的甲醇溶解,用 0.45 μm 滤膜过滤后合并上清液待测。

HPLC 条件:所用仪器为 3200 Qtrap 高效液相色谱-串联三重四级杆质谱联用仪(AB SCIEX),色谱柱:phenomenex Kinetex[®] XB-C₁₈ (100×3 mm, 2.6 μm); 流动相:A 泵溶液:0.1% 甲酸水溶液,B 泵溶液:甲醇。洗脱条件:0~1 min,5% B;1~4 min,5% B~95% B;4~8 min,95% B;8~8.1 min,95% B~5% B。流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL。

1.5 基因表达分析

对 9 个 ABA 信号通路相关基因及转录因子,6 个花青苷生物合成相关基因及转录因子进行基因表达分析。

1.5.1 RNA 提取和 cDNA 合成 总 RNA 的提取采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN),所有操作按照说明书进行。取 2 μL RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 样品的质量。用 Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer 检测 RNA 浓度。取 1 μg 检验合格的 RNA 样品,用反转录试剂盒(TaKaRa)进行 cDNA 的合成。

1.5.2 qRT-PCR 分析 qRT-PCR 引物使用 Beacon Designer 7.0 软件(Premier Biosoft International, USA)设计,引物见表 1。所有引物均用 PCR 扩增、电泳和溶解曲线进行测试以保证引物特异性。使用 ABI-7300 系统进行 qRT-PCR,反应体系按 SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa)说明书进行。以 *VvActin* 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量^[16]。

1.6 启动子克隆和顺式作用元件分析

利用多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)从‘红巴拉多’葡萄叶片中提取基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板,引物见表 2,克隆 6 个花青苷生物合成相关基因的启动子序列,PCR 产物连接到 pClone007 Blunt Simple 载体上,转化 DH5α 大肠杆菌,挑取阳性菌落,经测序验证得

表 1 荧光引物设计序列

Table 1 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因(转录因子)名称 Gene name and transcription factor	正向引物 Forward primer(5'→3')	反向引物 Reverse primer(5'→3')	NCBI 登录号 Accession number
<i>VvCHI</i>	CGTTATTTAATCGGTATACACC	CTTCGGGGATATGGCTGCA	LOC100233078
<i>VvDFR</i>	GTCACCAGCCGACCGTAGC	ACTTCTCAAAAATGATCCGGGG	LOC100233141
<i>VvLDOX</i>	GAGTTGAGAGCTTGTCCAGCAGTGG	GGACCACCTCGTCCTCAGACTCAAT	LOC100233142
<i>VvUFGT</i>	TGGTGCTGACGCATTCAT	CCCCATCTCTGCTGCCATATC	LOC100233099
<i>VvMYBA1</i>	TTATCGCAAAGCCTCAGGACAG	TCCCAGAAGCCCACATCAA	LOC100233098
<i>VvMYBA2</i>	AGACGGAAGTTGCACGAAGT	AGGGAGTAGAGTATGAATGCAAGA	LOC100232838
<i>VvPYL1</i>	CTCAGCCGGAGTTCCAAGAG	GAGTAGGGAGGAGCATTGGC	LOC100267793
<i>VvPP2C3</i>	GCCAAAGATTCACCCACCTA	AGCCAAATGGATTTCGATCAC	LOC100241147
<i>VvPP2C4</i>	TGGGCTTTGGGATGTTATGT	TGTGCAGGAGTCTCATCAGC	LOC109121390
<i>VvPP2C8</i>	AGTGTTTGATCCTGGCAAGC	CCTGCGCATTCAGACACATA	LOC100247958
<i>VvPP2C9</i>	TTAAAGCCCTTCGTGAGCTG	GACACCACGTCCCACAGAC	LOC100255251
<i>VvSnRK2.1</i>	CCTGCAAAGAGGATCACCAT	GGTGCAATTCCCCGTAGTTA	LOC100243594
<i>VvSnRK2.2</i>	TTTTTGTGGCAAACCCAGAT	CAGCTTCTCCATCCATCAT	LOC100232851
<i>VvABF1</i>	GCAACCTTCCATATACTC	GGAGGATGTCATATTCTG	LOC100243434
<i>VvABF2</i>	ATCTACTCGCTGACCTTTGA	CAAATATCCACCAGCCACAA	LOC100232889
<i>VvActin</i>	TACAATTCATCATGAAGTGTGATG	TTAGAAGCACTTCCTGTGAACAATG	LOC100246825

表 2 启动子克隆引物设计序列

Table 2 Primer sequences of promoter clone

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer(5'→3')	反向引物 Reverse primer(5'→3')	NCBI 登录号 Accession number
<i>VvCHI</i>	CGTTATTTAATCGGTATACACC	CTTCGGGGATATGGCTGCA	LOC100233078
<i>VvDFR</i>	GTCACCAGCCGACCGTAGC	ACTTCTCAAAAATGATCCGGGG	LOC100233141
<i>VvLDOX</i>	TGTTTGCCACGTCCATTTC	ACTTGTTTTCCCTTCCCTTTCTCT	LOC100233142
<i>VvUFGT</i>	AACTTTTCGGTATCATGCG	GGTTGGAATGGGGGATGTTAC	LOC100233099
<i>VvMYBA1</i>	GTCATTTGGGATACAGAACCGT	CCATGCACCCTTTCTAACTCTTA	LOC100233098
<i>VvMYBA2</i>	ATTGCTGCCTCTATATTAAGCTCT	CGAGTCAACTCAACACAAGAGA	LOC100232838

到阳性克隆。将克隆得到的启动子序列用 Plant-CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件分析。

1.7 数据处理

本研究平均值、标准差、标准曲线计算制作使用 Graph Pad Prism 5.0 软件 (<https://www.graphpad.com/>) 进行,相关性分析和单因素方差分析使用 SPSS 25.0 软件 (SPSS Inc. USA) 完成。

2 结果与分析

2.1 外源 ABA 处理对‘红巴拉多’葡萄果实品质的影响

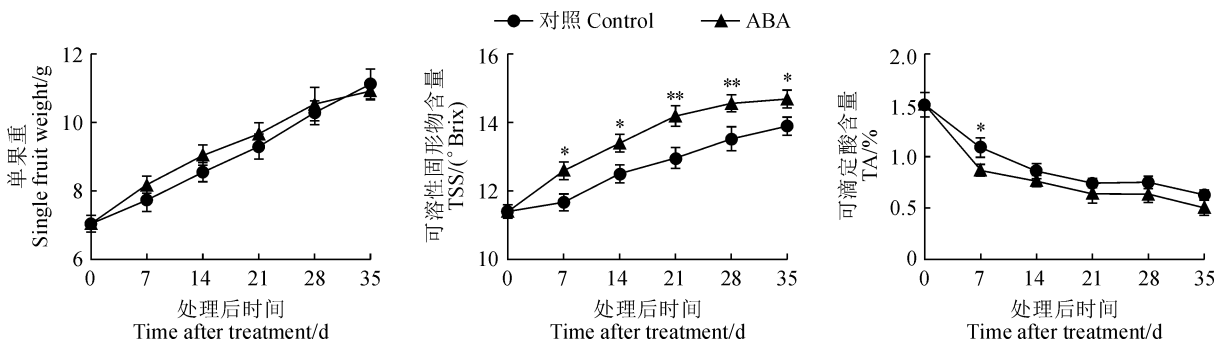
图 1 显示,随着‘红巴拉多’葡萄果实逐渐成熟,ABA 处理和对照果实单果重和可溶性固形物含量均不断增加,而其可滴定酸含量却持续降低;与同期对照相比,ABA 处理单果重和可溶性固形物含量大多不同程度增加,而其可滴定酸含量却不同程度降低,且可溶性固形物含量增幅均达到显著水平。可见,ABA 处理使得‘红巴拉多’葡萄单果重增速变快,果实可溶性固形物含量显著增加,可滴定酸含量

降低,表明 ABA 处理对‘红巴拉多’葡萄果实品质有改善提高作用。

2.2 外源 ABA 处理对‘红巴拉多’葡萄果皮色泽及总花青苷含量的影响

L、a、b、c 和 h 值分别代表亮度、红绿色差、黄蓝色差、色彩纯度和综合颜色指标。图 2 显示,随着果实的逐渐成熟,处理和对照‘红巴拉多’葡萄果皮的 a 值均呈增加的趋势,且 ABA 处理始终显著高于同期对照,其余颜色指标值均持续降低,且 ABA 处理始终显著低于同期对照。可见,ABA 处理显著提高了‘红巴拉多’葡萄果皮的 a 值,却显著降低了其 L 值、b 值、c 值和 h 值,即 ABA 处理显著提高了‘红巴拉多’葡萄果皮的红绿色差,降低了亮度、黄蓝色差、色差纯度和综合颜色指标,使得红色逐渐呈现,促进了果皮着色。

同时,ABA 处理也显著提高了‘红巴拉多’葡萄果皮总花青苷含量(图 2)。其中,在 ABA 处理后 21 d 内,随着葡萄果实成熟进程,果皮总花青苷含量不断增加,而后趋于稳定,成熟后期略有降低;而对照组果皮总花青苷含量一直维持在较低水平,果皮难以着色,这可能与高温、光照不足的外部环境条件有



* 和 ** 分别表示同期处理与对照间在 0.05 和 0.01 水平存在显著性差异,下同

图 1 ABA 处理下‘红巴拉多’葡萄果实品质的变化

* and ** indicate significant difference between treatment and control at 0.05 and 0.01 levels, respectively; the same as below

Fig. 1 The fruit quality of ‘Benibalado’ grape after ABA treatment

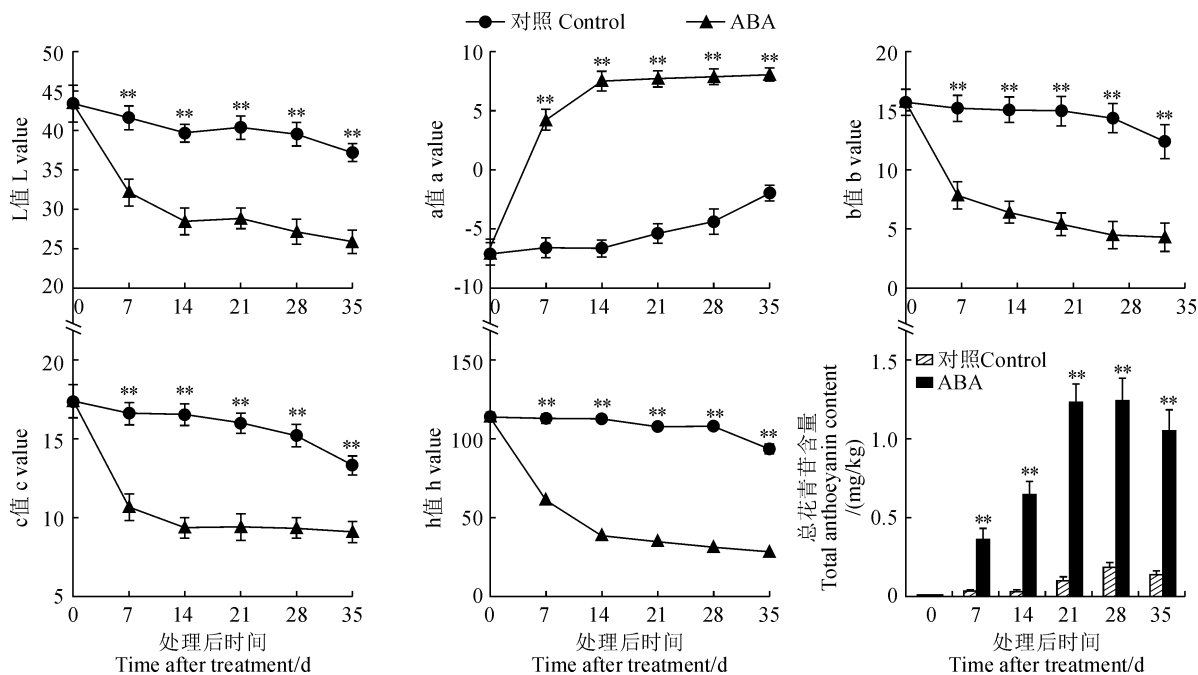


图2 ABA处理后‘红巴拉多’葡萄果皮色差和总花青苷含量变化

Fig. 2 The color difference and total anthocyanin content change in the skins of ‘Benibalado’ grape after ABA treatment

关。以上结果说明外源 ABA 处理促进了‘红巴拉多’葡萄果皮着色和花青苷积累,从而提高了葡萄果实的外观品质。

2.3 外源 ABA 处理对‘红巴拉多’葡萄果皮内源脱落酸含量的影响

图3结果表明,与对照组相比,‘红巴拉多’葡萄果皮内源 ABA 含量在外源 ABA 处理后极显著提高,且在处理后第7天达到最高水平,后随处理时间逐渐下降,而对照组 ABA 含量基本保持在较低水平。其中,ABA 处理组和对照组的花青苷水平也在处理后第7天开始出现显著差异,但峰值出现在第28天(图2),这说明处理组葡萄果皮内源 ABA 和花青苷含量均呈先升后降的单峰曲线,两者含量水平的变化高度相关,但内源 ABA 峰值出现时间早于花青苷,变化不完全同步。在外源 ABA 处理35 d后,处理组果皮的内源 ABA 含量仍极显著高于对照组,又说明外源 ABA 处理对葡萄果皮内源 ABA 含量的影响是一个长期的过程。

2.4 外源 ABA 处理对‘红巴拉多’葡萄果皮中相关基因表达的影响

2.4.1 ABA 信号通路基因表达规律 图4表明,外源 ABA 处理后,‘红巴拉多’葡萄果皮中9个 ABA 信号通路相关基因及转录因子表达量均随着处理时间表现出先升后降的变化趋势,且均比对照组显著提高。其中,*VvSnRK2.2*、*VvPP2C3*、*VvPP2C8*、

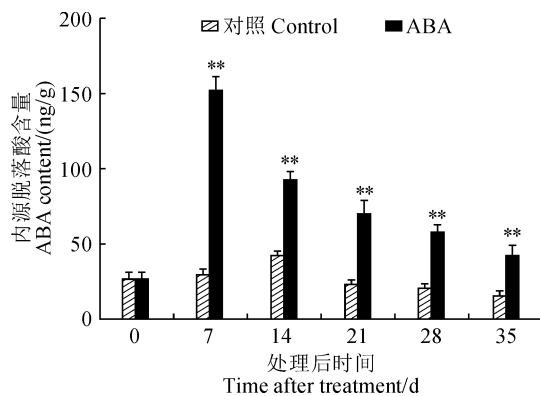


图3 ABA处理下‘红巴拉多’葡萄果皮内源 ABA 含量的变化

Fig. 3 The endogenous ABA content in skins of ‘Benibalado’ grape after ABA treatment

VvABF1、*VvABF2* 相对表达量在外源 ABA 处理后第7天达到最高水平,*VvPYL1*、*VvSnRK2.1*、*VvPP2C9* 在处理第14天达到最高水平,这与‘红巴拉多’葡萄果皮内源 ABA 含量变化趋势有相似的变化规律。

2.4.2 花青苷生物合成相关基因表达规律 ABA 处理后‘红巴拉多’葡萄果皮中花青苷生物合成相关基因表达分析结果(图5)显示,4个花青苷生物合成结构基因(*VvCHI*、*VvDFR*、*VvLDOX*、*VvUFGT*)和2个调控花青苷生物合成重要的转录因子(*VvMYBA1*、*VvMYBA2*)相对表达量也大多随着

处理时间表现出先升后降的变化趋势,且均比对照
组显著提高,并均在处理第 7 天达到最高水平。这

种表达模式也与‘红巴拉多’葡萄果皮内源 ABA 含
量变化趋势相似。

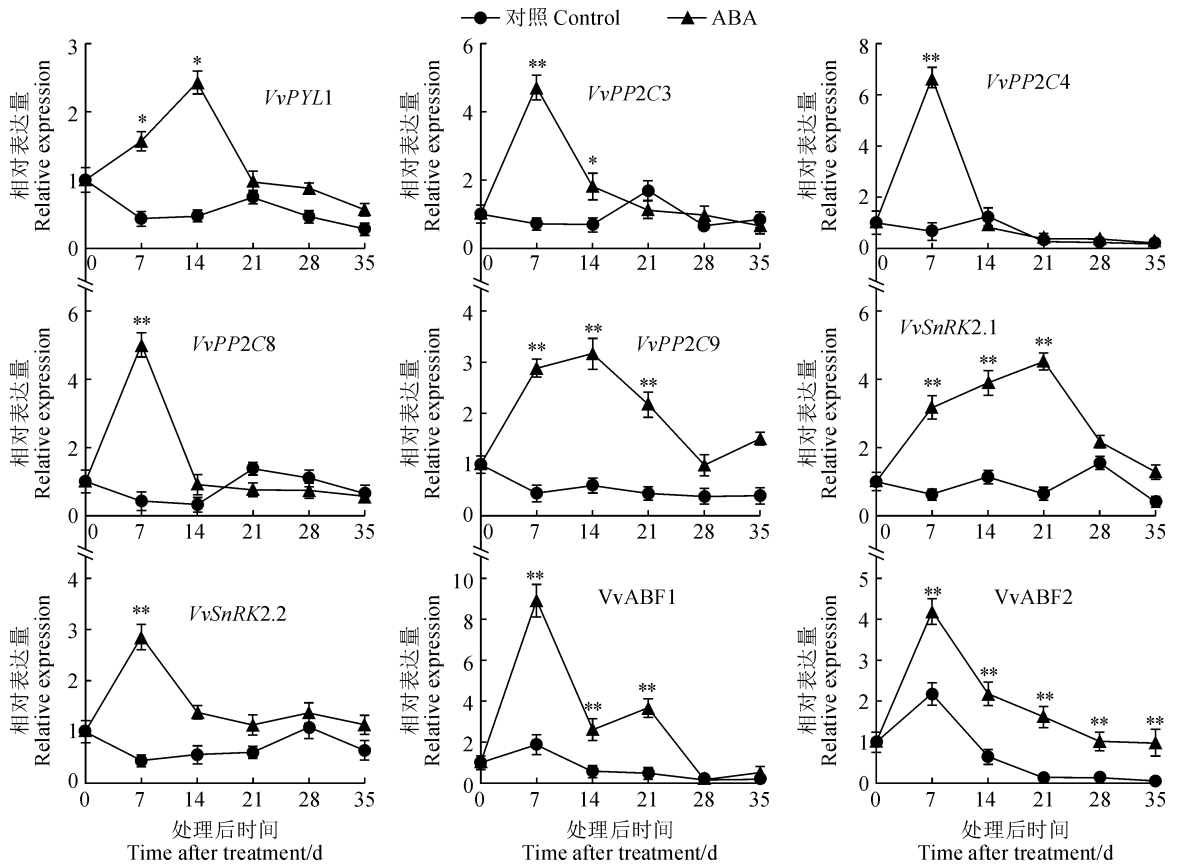


图 4 外源 ABA 处理后‘红巴拉多’葡萄果皮 ABA 信号通路基因及转录因子表达变化

Fig. 4 Expression of transcription factor and genes related to ABA signaling pathway in skins of ‘Benibalado’ grape after exogenous ABA treatment

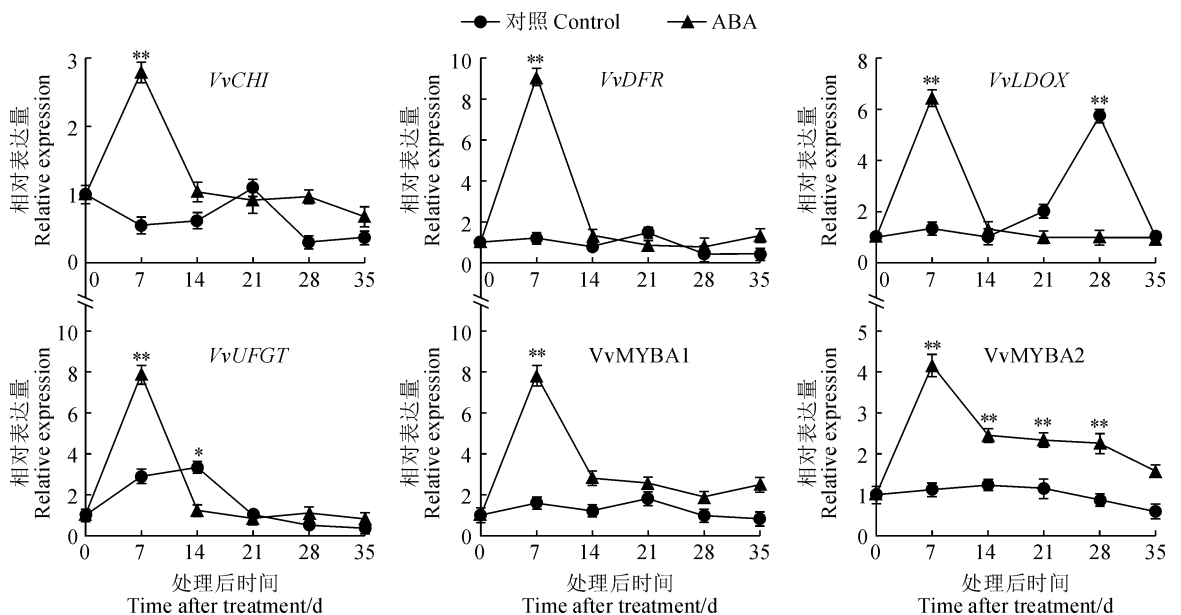


图 5 外源 ABA 处理后‘红巴拉多’葡萄果皮花青苷生物合成相关基因及转录因子表达变化

Fig. 5 Expression of transcription factor and genes related to anthocyanin biosynthesis in skins of ‘Benibalado’ grape after exogenous ABA treatment

2.4.3 内源 ABA 含量与相关基因表达的关系 如表 3 所示,外源 ABA 处理后,‘红巴拉多’葡萄果皮 9 个 ABA 信号通路基因相对表达量与其内源 ABA 含量变化均显著或者极显著正相关,且相关系数均在 0.55 以上,说明这些 ABA 信号通路基因可能受到 ABA 的调控而表达,可能在 ABA 促进葡萄果皮花青苷生物合成过程中发挥着重要作用;同时,葡萄

表 3 ‘红巴拉多’葡萄果皮内源 ABA 含量与 ABA 信号通路和花青苷生物合成相关基因相对表达量相关性

Table 3 Correlation between the content of ABA and expression of genes related to ABA pathway and anthocyanin biosynthesis in skins of ‘Benibalado’ grape

基因及转录因子 Gene and transcription factor	对照 Control	ABA 处理 ABA treatment
<i>VvPYL1</i>	0.186	0.574*
<i>VvPP2C3</i>	-0.176	0.921**
<i>VvPP2C4</i>	0.779**	0.842**
<i>VvPP2C8</i>	-0.419	0.850**
<i>VvPP2C9</i>	0.346	0.789**
<i>VvSnRK2.1</i>	0.341	0.568*
<i>VvSnRK2.2</i>	-0.259	0.886**
<i>VvABF1</i>	0.339	0.912**
<i>VvABF2</i>	0.406	0.946**
<i>VvCHI</i>	0.209	0.851*
<i>VvDFR</i>	0.417	0.842*
<i>VvLDOX</i>	-0.234	0.840*
<i>VvUFGT</i>	0.707**	0.862*
<i>VvMYBA1</i>	0.197	0.930*
<i>VvMYBA2</i>	0.513*	0.929**

注: * 表示显著($P \leq 0.05$), ** 表示极显著($P \leq 0.01$)

Note: * indicates significant ($P \leq 0.05$), ** indicate extremely significant ($P \leq 0.01$)

表 4 启动子顺式作用元件分析

Table 4 Analysis of *cis*-acting elements of promoter

启动子名称 Promoter name	克隆长度 Clone fragment length/bp	ABRE 元件数量 Number of ABRE
Pro <i>VvCHI</i>	1 854	4
Pro <i>VvDFR</i>	1 580	3
Pro <i>VvLDOX</i>	1 757	4
Pro <i>VvUFGT</i>	1 515	2
Pro <i>VvMYBA1</i>	1 715	7
Pro <i>VvMYBA2</i>	1 179	5

果皮 6 个花青苷生物合成相关基因相对表达量也与其内源 ABA 含量均为极显著正相关,且相关系数均在 0.84 以上,进一步证明了花青苷生物合成和内源 ABA 含量变化的密切相关性,也说明这些花青苷生物合成相关基因可能受到 ABA 信号的调控而表达,从而促进葡萄果皮花青苷的生物合成。

2.5 花青苷生物合成相关基因启动子克隆及顺式作用元件分析

利用 PCR 技术对 6 个花青苷生物合成相关基因启动子序列进行了克隆(表 4),6 个序列均被成功克隆。顺式作用元件分析结果(表 4)表明,这 6 个基因的启动子序列均含有多个与 ABA 响应相关的 ABRE 响应元件(ABA-responsive-element)。其中,*VvMYBA1* 启动子含有 7 个 ABRE 元件,*VvMYBA2* 启动子含有 5 个 ABRE 元件,*VvCHI* 和 *VvLDOX* 启动子均含有 4 个 ABRE 元件,*VvDFR* 启动子含有 3 个 ABRE 元件,*VvUFGT* 启动子含有 2 个 ABRE 元件。ABRE 元件是 ABF 转录因子识别和结合的位点,启动子区域含有多个 ABRE 元件说明这些花青苷生物合成相关基因可能是 ABA 信号通路中 ABFs 转录因子直接调控的下游基因。

3 讨论

在中国南方地区避雨栽培模式下,葡萄果实着色难成为一个普遍的问题^[17]。许多鲜食葡萄品种的转色期在梅雨季,高温、光照不足的环境条件使葡萄果皮难以着色^[2,18],从而严重影响了葡萄的市场接受度和商品经济价值^[19]。本研究使用 300 mg/L 的 ABA 在‘红巴拉多’葡萄转色期处理葡萄果穗,提高了葡萄果实的可溶性固形物含量、果皮的总花青苷含量,降低了果实可滴定酸含量,提高了果实品质,并且使得果实提早成熟,这与前人研究结果相一致^[6,20-21]。

ABA 在非呼吸跃变型果实的成熟过程中发挥着至关重要的作用,如草莓^[22]、蓝莓^[23-24]、葡萄^[25]、荔枝^[26]等。在果实的发育中,内源 ABA 含量在转色前期开始快速上升,在着色、糖分积累、果实软化等果实成熟过程中起着关键作用^[8,26-27]。研究表明,外源施用蔗糖、24-表油菜素内酯、乙烯利以及尿囊素等物质来促进花青苷积累和果皮着色时,均提高了内源 ABA 含量,这些作用可能是 ABA 依赖性的^[28-31]。而 Jia 等^[32]利用 RNAi 基因沉默技术,下调草莓 ABA 生物合成的关键基因 *FaNCED1* 的表达,导致内源 ABA 含量下降和果实不着色,进一步

说明了内源 ABA 含量与花青苷生物合成高度相关。本研究结果表明,ABA 处理组和对照组果皮内源 ABA 含量在处理第 7 天出现最大差异,而葡萄果实的可溶性固形物、可滴定酸、果皮总花青苷含量和色差指标也是在处理后第 7 天出现了显著差异,说明这些生理指标的迅速变化可能是由内源 ABA 含量变化引起的,由此推测外源 ABA 通过提高内源 ABA 含量加快了葡萄果实的成熟过程。同时,ABA 处理后的葡萄果皮内源 ABA 含量在不同发育时期均显著提高,表明外源 ABA 处理对果皮内源 ABA 含量的影响是一个长期的过程。前人研究表明,ABA 的半衰期在植物组织中大约只有 1.0~15.5 h^[33]。外源 ABA 处理 35 d 后,处理组葡萄果皮中的内源 ABA 含量仍高于对照组,可能是由于 ABA 的正反馈调节机制或液泡中贮藏非活性形式的 ABA-GE (ABA 葡萄糖酯) 能力的增强所引起。

近年来,ABA 信号转导机制在模式植物拟南芥中的研究取得了较大的突破和进展^[34-35]。葡萄中参与 ABA 信号转导的相关基因也逐渐被鉴定出来,这些基因广泛参与 ABA 调控的生理过程^[8,12]。ABA 受体基因 *VvPYL1* 在葡萄果实中瞬时表达可以促进花青苷的积累^[36]。*VvSnRK2.1*、*VvSnRK2.6* 分别与 *VvPPC1*、*VvPP2C2*、*VvPP2C3* 和 *VvPP2C4*、*VvPP2C8*、*VvPP2C9* 互作,在葡萄抵抗非生物胁迫中发挥着重要作用^[7]。*VvABF2* 在拟南芥中过表达可以提高其植株抵抗非生物胁迫的能力,在番茄中过表达可以使得转基因植株果实软化和提早成熟^[8,11]。除 *VvPYL1* 之外,ABA 信号通路中参与调控花青苷生物合成的基因仍未得到有效的鉴定。本研究对侯选的 ABA 信号通路中的 9 个基因进行实时荧光定量 PCR 分析,结果表明 1 个 *PYL*、4 个 *PP2C*、2 个 *SnRK2* 和 2 个 *ABF* 转录因子在 ABA 处理后相对表达量显著升高,说明外源 ABA 处理显著增强了 ABA 信号的转导。其中 *VvPP2C3*、*VvPP2C4*、*VvPP2C8*、*VvSnRK2.2* 在处理第 7 天相对表达量达到最高水平,*VvPYL1*、*VvPP2C9*、*VvSnRK2.1* 在处理第 14 天相对表达量达到最高水平,说明 ABA 信号的转导可能在这两个时期较为活跃。进一步的相关性分析表明,这些基因的相对表达量与内源 ABA 含量变化显著正相关,可能受到内源 ABA 的诱导。另外,在外源 ABA 处理 7 d 后,葡萄果实的着色水平和总花青苷含量也显著提高,充分说明 ABA 信号通路基因可能参与调

控葡萄果皮花青苷生物合成这一生理过程。

葡萄果皮花青苷生物合成主要是通过类黄酮途径,这个过程由多个结构基因和转录因子参与^[37-38]。本研究中,外源 ABA 处理上调了葡萄果皮中 *VvCHI*、*VvDFR*、*VvLDOX*、*VvUFGT* 等 4 个结构基因和 *VvMYBA1*、*VvMYBA2* 两个转录因子的表达,且表达水平均在处理后第 7 天达到峰值,表达模式与内源 ABA 含量及部分 ABA 信号通路中的基因相似。本研究中实时荧光定量 PCR 和相关性分析结果表明,外源 ABA 处理后,6 个与花青苷生物合成相关基因的相对表达水平与果皮中内源 ABA 含量变化极显著正相关;进一步对这 6 个基因的启动子序列顺式作用元件分析,发现它们的启动子序列都含有多个 ABRE 元件。ABRE 元件是 ABA 信号通路下游的 ABF 转录因子识别和结合的位点,ABF 转录因子结合 ABRE 元件从而激活下游基因的表达,是 ABA 介导的一系列生理过程的重要环节^[39]。在葡萄中鉴定出 *VvABF1* 和 *VvABF2* 两个 ABFs 转录因子,它们的启动子受到 ABA 信号的显著激活^[40]。*VvABF2* 转录因子只能结合含有 ABRE 元件的启动子序列,并在 ABA 的作用下激活启动子序列,从而调控下游基因的转录^[8]。基因的表达受到上游转录因子的调控,因此在 ABA 信号和花青苷生物合成之间存在着一条调控途径。*VvABFs* 可能是 ABA 信号通路中调控花青苷合成的重要转录因子,而启动子含有多个 ABRE 元件的 6 个花青苷生物合成相关基因可能是 ABA 信号直接调控的靶基因。ABA 信号通过调控这些基因的转录水平来调控‘红巴拉多’葡萄花青苷积累和果皮着色。*VvABFs* 是否能直接结合并激活这些基因的启动子尚需进一步的实验验证。

综上所述,本研究发现使用 300 mg/L 的 ABA 处理葡萄果穗,有效提高了‘红巴拉多’葡萄的生理品质,显著促进了葡萄果皮的着色和花青苷积累,并根据测定的内源 ABA 含量、ABA 信号通路相关基因和花青苷生物合成相关基因表达模式以及启动子顺式作用元件分析,在转录水平上探讨了 ABA 信号调控葡萄果皮着色及花青苷积累的机理。ABA 信号通路对葡萄果皮中花青苷生物合成调控可能的机制是:外源 ABA 处理后引起内源 ABA 含量的变化,促进了 ABA 信号通路基因的表达和 ABA 信号转导,ABA 信号通路下游的 2 个 *VvABFs* 转录因子可能直接作用于含有 ABRE 元件的花青苷生物合成相关基因的启动子序列,通过调控这些基因的转

录水平来调控‘红巴拉多’葡萄果皮着色及花青苷积累。本研究结果为 ABA 促进花青苷积累机理的研

究和生产中施用外源 ABA 促进葡萄果实着色提供了理论依据和参考。

参考文献:

- [1] 管乐, 亓桂梅, 房经贵. 世界葡萄主要品种与砧木利用概述[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019, (1): 64-69.
- GUAN Y, QI G M, FANG J G. A summary of main varieties of grapevine and the adoption of rootstock in the world[J]. *Sino-overseas Grapevine & Wine*, 2019, (1): 64-69.
- [2] KOYAMA R, ROBERTO S R, DE SOUZA R T, et al. Exogenous abscisic acid promotes anthocyanin biosynthesis and increased expression of flavonoid synthesis genes in *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca* table grapes in a subtropical region[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 323.
- [3] 孙欣, 韩键, 房经贵, 等. 葡萄浆果着色分子机理的重要研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, 48(4): 333-342.
- SUN X, HAN J, FANG J G, et al. Important research progress of coloring molecular mechanisms in grape berry[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(4): 333-342.
- [4] 姚晨涛, 孙晓, 张凤文, 等. S-诱抗素处理对巨峰葡萄果实花青素含量及品质的影响[J]. 中国果树, 2019, (5): 41-45.
- YAO C T, SUN X, ZHANG F W, et al. Effects of S-ABA on ‘Kyoho’ grape anthocyanin content and fruit quality[J]. *China Fruits*, 2019, (5): 41-45.
- [5] 于淼, 刘海峰, 王军. ABA对葡萄花色苷合成相关基因表达的影响[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 29-35.
- YU M, LIU H F, WANG J. Effects of ABA on expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grapevine[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(1): 29-35.
- [6] 李芳菲, 王莎, 谷世超, 等. 叶面喷施 ABA 和 PDJ 对‘巨峰’葡萄果实着色及品质的影响[J]. 果树学报, 2020, 37(3): 362-370.
- LI F F, WANG S, GU S C, et al. Effects of foliar application of ABA and PDJ on the coloration and quality of ‘Kyoho’ grape berry[J]. *Journal of Fruit Science*, 2020, 37(3): 362-370.
- [7] BONEH U, BITON I, SCHWARTZ A, et al. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera* [J]. *Plant Science*, 2012, 187: 89-96.
- [8] NICOLAS P, LECIURIEUX D, KAPPEL C, et al. The basic leucine zipper transcription factor ABSCISIC ACID RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR2 is an important transcriptional regulator of abscisic acid-dependent grape berry ripening processes[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 365-383.
- [9] HUBBARD K E, NISHIMURA N, HITOMI K, et al. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions[J]. *Genes Development*, 2010, 24: 1 695-1 708.
- [10] KLINGLER J P, BATELLI G, ZHU J K. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(12): 3 199-3 210.
- [11] LIU J Y, CHU J J, MA C J, et al. Overexpression of an ABA-dependent grapevine bZIP transcription factor, *VvABF2*, enhances osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38: 587-596.
- [12] HU B, LAI B, WANG D, et al. Three LcABFs are involved in the regulation of chlorophyll degradation and anthocyanin biosynthesis during fruit ripening in *Litchi chinensis* [J]. *Plant Cell Physiology*, 2019, 60: 448-461.
- [13] 何红红, 路志浩, 马宗桓, 等. 葡萄 PP2C 家族基因的鉴定与表达分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 1 237-1 250.
- HE H H, LU Z Z, MA Z H, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the PP2C gene family in *Vitis vinifera* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(7): 1 237-1 250.
- [14] JIA H R, ZHANG Z B, ZHANG S H, et al. Effect of the methylation level on the grape fruit development process[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2020, 68: 2 099-2 115.
- [15] YOU Q, CHEN F, WANG X, et al. Analysis of phenolic composition of Noble muscadine (*Vitis rotundifolia*) by HPLC-MS and the relationship to its antioxidant capacity[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77: 1 115-1 123.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR[J]. *Methods*, 2002, 25(4): 402-408.
- [17] 李为福, 何建军, 谢兆森, 等. 外源脱落酸对巨玫瑰葡萄着色及浆果品质的影响[J]. 中国南方果树, 2012, 41(1): 22-26.
- LI W F, HE J J, XIE Z S, et al. Effect of exogenous abscisic acid on the coloration and quality of ‘Jumeigui’ grape[J]. *South China Fruits*, 2012, 41(1): 22-26.
- [18] RYU S, HAN J, CHO J G, et al. High temperature at veraison inhibits anthocyanin biosynthesis in berry skins during ripening in ‘Kyoho’ grapevines[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2020, 157: 219-228.
- [19] RYBKA A C P, FREITAS S T D, NETTO A F, et al. Central composite rotatable design approach to optimize ‘Italia’ raisin drying conditions[J]. *Comunicata Scientiae*, 2016, 6(4): 454.
- [20] 程云, 吴欣欣, 李百健, 等. 外源脱落酸对魏可葡萄果实着色及品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 163-166.
- CHENG Y, WU X X, LI B J, et al. Effects of exogenous abscisic acid on fruit coloring and quality of ‘Wink’ grape

- [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, **42**(10): 163-166.
- [21] 马文婷,王振平. 脱落酸和乙烯利对‘蛇龙珠’葡萄果实品质及花色苷的影响[J]. 西北农业学报, 2015, **24**(5): 81-88.
MA W T, WANG Z P, Effects of ABA and ETH on grape quality and anthocyanin of Cabernet Gernischt[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2015, **24**(5): 81-88.
- [22] LUO Y, GE C, LING Y, *et al.* ABA and sucrose co-regulate strawberry fruit ripening and show inhibition of glycolysis[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2019, **295**(2): 1-18.
- [23] CHHUNG S W, YU D J, OH H D, *et al.* Transcriptional regulation of abscisic acid biosynthesis and signal transduction, and anthocyanin biosynthesis in ‘Bluecrop’ highbush blueberry fruit during ripening[J]. *PLOS One*, 2019, **14**(7): e0220015
- [24] OH H D, YU D J, CHUNG S W, *et al.* Abscisic acid stimulates anthocyanin accumulation in ‘Jersey’ highbush blueberry fruits during ripening[J]. *Food Chemistry*, 2018, **244**: 403-407.
- [25] WHEELER S, LOVEYS B, FORD C, *et al.* The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid[J]. *Australian Journal of Grape & Wine Research*, 2010, **15**(3): 195-204.
- [26] HU B, LI J Q, WANG D, *et al.* Transcriptome profiling of *Litchi chinensis* pericarp in response to exogenous cytokinins and abscisic acid[J]. *Plant Growth Regulation*, 2018, **84**(3): 437-450.
- [27] LAURENT G D, DAVID R Q, ALAIN D, *et al.* Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay[J]. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 212.
- [28] ZHAI X, ZHANG Y, KAI W, *et al.* Variable responses of two *VIMYBA* gene promoters to ABA and ACC in Kyoho grape berries[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, **211**: 81-89.
- [29] LUO Y, GE C, LING Y J, *et al.* ABA and sucrose co-regulate strawberry fruit ripening and show inhibition of glycolysis[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2020, **295**(2): 421-438.
- [30] YALI Z, CHUNLONG Y, SHICHENG R, *et al.* Exogenous 24-epibrassinolide interacts with light to regulate anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Molecules*, 2018, **23**(1): 93.
- [31] MORIYAMA A, NOJIRI M, WATANABE G, *et al.* Exogenous allantoin improves anthocyanin accumulation in grape berry skin at early stage of ripening [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2020, **253**: 153-253.
- [32] JIA H F, CHAI Y M, LI C L, *et al.* Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening [J]. *Plant Physiology*, 2011, **157**(1): 188-199.
- [33] CREELMAN R A, GAGE D A, STULTS J T, *et al.* Abscisic acid biosynthesis in leaves and roots of *Xanthium strumarium*[J]. *Plant Physiology*, 1987, **85**(3): 726-732.
- [34] KANG M, LEE S, ABDELMAGEED H, *et al.* Arabidopsis stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway[J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, **40**(5): 702-716.
- [35] CHAN Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*[J]. *Genomics*, 2012, **100**(2): 110-115.
- [36] GAO Z, LI Q, LI J, *et al.* Characterization of the ABA receptor *VIPYL1* that regulates anthocyanin accumulation in grape berry skin [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 592.
- [37] SPARBOLI F, MARTIN C, SCIENZA A, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **24**(5): 743-755.
- [38] CZEMMEL S, HEPPEL S C, BOGS J. R2R3 MYB transcription factors: key regulators of the flavonoid biosynthetic pathway in grapevine [J]. *Protoplasma*, 2012, **249**: 109-118.
- [39] FUJITA Y, FUJITA M, SATOH R, *et al.* AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(12): 3 470-3 488.
- [40] 刘金义. 葡萄 bZIP 转录因子家族的全基因组鉴定、表达分析及 *VvbZIP45/VvbZIP08* (AREB/ABF 类) 基因的功能研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2014.

(编辑:裴阿卫)