

外源 ABA 对低温不同光周期下四季秋海棠 叶片花色素苷的诱导机理

郭美丽, 王佳婉, 王 珂, 靳慧慧, 张开明*

(河南农业大学林学院, 郑州 450002)

摘 要:以‘超级奥林匹克’四季秋海棠(‘Super Olympia’ *Begonia semperflorens*)为材料, 于常温(25 ℃/15 ℃)等日照条件下用 0、5、10、50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ 脱落酸(ABA)和低温(15 ℃/6 ℃)不同光周期下用 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 分别喷施各处理植株, 对不同处理下植株的花色素含量、内源激素含量及其酶活性进行比较分析, 探讨 ABA 对其叶片花色素苷合成的调控作用及其机理。结果显示: (1) 常温等日照条件下, 四季秋海棠叶片在 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理后的第 3~5 天有明显变红趋势, 且花色素苷含量和内源 ABA 含量显著增加, 而内源赤霉素(GA)含量的下降幅度较为显著, 相应的花色素苷合成关键酶和运输酶活性也显著提高。 (2) 低温条件下, 四季秋海棠叶片花色素苷积累量与光周期密切相关, 短日照处理的花色素苷积累量最大并显著高于等日照和长日照, 但等日照与长日照下花色素苷积累量无显著差异; 外源 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理均可显著提高低温不同光周期下四季秋海棠叶片的花色素苷含量。 (3) 外施 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 增加了低温下长日照和等日照处理中 DFR(二氢黄酮醇-4-还原酶)还原反应中 H 供体 NADPH 的含量, 促使 DFR 和 UFGT(糖苷转移酶)的活性上调进而增加了花色素苷的含量; 外施 ABA 处理均能够提高低温不同光周期处理组的内源 ABA 含量, 降低内源 GA 的含量, 与花色素苷的生成量相一致。研究表明, 外源 ABA 能够通过调节花色素苷合成的关键酶来影响花色素苷的合成, 外施适宜浓度 ABA 能够促进四季秋海棠叶片花色素苷的积累, 可用于实际生产中的叶片着色调控管理。

关键词: 四季秋海棠; 脱落酸; 花色素苷; 低温; 光周期

中图分类号: Q945.18; Q945.78

文献标志码: A

Mechanism of ABA-induced Anthocyanin Biosynthesis in *Begonia semperflorens* under Different Photoperiods and Low Temperatures

GUO Meili, WANG Jiawan, WANG Ke, JIN Huihui, ZHANG Kaiming*

(Forestry College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Taking the ‘Super Olympic’ *Begonia Semperflorens* as material, at room temperature (25 ℃/15 ℃) under normal sunshine condition or low temperature (15 ℃/6 ℃) under the different photoperiods, we sprayed the plants with abscisic acid (ABA). The endogenous pigment content, hormone contents and enzyme activities were comparatively analyzed to discuss the effects of exogenous ABA on anthocyanin biosynthesis and its mechanism. The results showed: (1) at room temperature and normal sunshine condition, the leaves will get red obviously on the 3th days when applying ABA (5 and 10 $\mu\text{mol/L}$). The antho-

收稿日期: 2016-05-19; 修改稿收到日期: 2016-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(311101562)

作者简介: 郭美丽(1989—), 女, 硕士, 主要从事园林植物生长发育与调控。E-mail: 1278658212@qq.com

* 通信作者: 张开明, 副教授, 硕士生导师, 主要园林植物生长发育与调控。E-mail: miss1199@126.com

cyanin content and endogenous ABA content of pigment increased significantly, while the endogenous gibberellin (GA) content decreased significantly. The anthocyanin biosynthesis and trans portation also increased significantly. (2) Under the condition of low temperature, the anthocyanin accumulation was closely related to photoperiod and the anthocyanin accumulation was the largest in short day; The anthocyanin accumulation in sunshine condition also increased, but there was no significant difference between sunshine and long sunshine. (3) The addition of 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA treatment increased the content of H donor NADPH in DFR reduction under long day and sunshine condition. Under low temperature treatment, the activities of DFR and UFGT enzymes increased and then increased the anthocyanin content. In addition, exogenous ABA treatment could increase endogenous ABA content and decrease the content of endogenous GA in low temperature and different photoperiod treatments, which was consistent with the production of anthocyanin. The results showed that exogenous ABA can affect the synthesis of anthocyanins by regulating key enzyme in anthocyanin synthesis of flowers. The application of suitable concentration of ABA can promote the *B. semperflorens* leaf anthocyanin accumulation and can be used to control leaf coloring in actual production.

Key words: *Begonia semperflorens*; abscisic acid; anthocyanin; low temperature; photoperiod

花色素苷 (anthocyanin) 是一种黄酮类次生代谢物, 是一类从红到紫到蓝的植物色素, 一般产生于植物叶片。当外界环境改变使得叶绿素遭到破坏, 其含量明显下降时, 色素也就随之而产生了^[1]。影响花色素苷生成的环境因素有很多^[2], 其中光照、温度、旱涝、营养缺乏、激素、衰老等条件下都能影响花色素苷的形成。温度一般通过影响色素合成关键酶的活性, 从而调节花色素苷的合成以及色素之间的组成和比例^[3]。温度是影响叶片中花色素苷含量的重要因素。它不仅从基因转录水平上影响花色素苷合成, 同时影响花色素苷的稳定^[4]。低温可以诱导一些植物体内花色素苷合成的相关基因的表达, 使花色素苷含量升高, 如使 PAL (苯丙氨酸解氨酶)、CHS (查尔酮合成酶)、CHI (查尔酮异构酶) 和 DFR (二氢黄酮醇-4-还原酶) 基因的转录水平升高几倍; 而高温却能抑制这些基因的表达, 使花色素苷含量降低。光照也是影响彩叶植物叶色变化最重要的环境因素。它从强度、光质和光照时间等方面影响花色素苷的合成及调节相关酶的活性^[5]。紫叶矮樱、紫叶小檗等必须在全光照下才能发挥其彩叶的最佳色彩^[6]。彩叶秋海棠的叶色在遮阴处呈暗绿色, 在全光下则呈红褐色^[7]。光照是影响花青苷合成的最重要的外部因子, 合成花青苷的 4 个关键酶, PAL、CHS、DFR、UFGT (糖苷转移酶) 都是光调节酶, 都以光敏色素为受体^[8]。已有研究表明, 外源 ABA 处理不仅可以提高果实的成熟度, 促进果实软化和后熟衰老进程, 而且在改善果实质量、促进果实着色方面也有明显的效果。

四季秋海棠 (*Begonia semperflorens*) 是城市绿

化当中应用较广的一种地被和花坛花卉, 绿叶系列的‘超级奥林匹克’品种, 能够在外界环境 (如强光、低温等) 的影响下积累花色素苷, 而使叶片变红。低温对花色素苷合成的促进是通过提高花色素苷合成相关酶的活性, 也可通过强化结构基因的表达水平、增加酶的含量来实现。脱落酸 (abscisic acid, ABA) 可提高一些植物的叶片或果实中 PAL、CHS、CHI、F3H (黄烷酮-3-羟基化酶)、UFGT 等酶的活性, 促进花色素苷合成^[9]。如刘延吉等^[10]发现 ABA 可提高南果梨 (*Pyrus ussuriensis*) PAL、CHI 活性, 促进果皮花色素苷的积累。在低温条件下, 不同光周期与外源 ABA 对花色素苷的积累是否有存在互作关系, 目前我们并不清楚。因此, 本实验中我们选用绿叶系列的‘超级奥林匹克’四季秋海棠品种作为材料, 选用最适花色素苷积累的 ABA 激素浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$), 研究外源激素 ABA 与不同光周期对花色素苷合成的影响。为花色素苷合成过程中的环境因子交叉作用的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料培养

参试材料‘超级奥林匹克’ (‘Super Olympia’) 绿叶系列的四季秋海棠品种, 种子购于郑州贝利得花卉有限公司。将种子播种于 25 cm 宽、200 个孔的穴盘内, 营养土内含有 3 : 1 : 1 (v / v / v) 泥炭、蛭石和珍珠岩混合而成的基质。生长环境为气温 25 $^{\circ}\text{C}$ / 18 $^{\circ}\text{C}$ (白天 / 夜晚)、光周期 16 h / 8 h (白天 / 夜晚)、相对湿度 70% ~ 85%, 待植株长至 3 ~ 4 片叶时, 挑选形态长势一致的幼苗分装成几组, 以备实

验处理使用。

1.2 材料处理

1.2.1 常温下不同浓度 ABA 处理 将分装的幼苗放于光照培养箱内,生长环境为 25 ℃/15 ℃(白天/夜晚)、等日照、空气相对湿度 70%~85%、光照强度 800 lx。试验设置 0、5、10、50、100、500 $\mu\text{mol/L}$ ABA 6 个浓度处理组,每组进行 4 次重复,每天于早上 9:00 和晚上 9:00 对其叶片正反面进行 2 次 ABA 喷施。分别在处理的第 0、1、3 和 5 天进行拍照,并取正常功能叶片测定相关生理指标。

1.2.2 低温不同光周期下外施 ABA 处理 根据以上实验的结论选用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 浓度,并在白天/夜晚 15 ℃/6 ℃低温、光照强度为 800 lx 环境条件下进行不同光周期处理。试验处理时要将花蕾去除,选择生长基本一致的四季秋海棠绿叶种植株。外源 ABA 处理设 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA(ABA)和不喷施对照(CK)两个水平,光周期设置长日照(L,白天/夜晚 16 h/8 h)、等日照(Q,白天/夜晚 12 h/12 h)和短日照(S,白天/夜晚 8 h/16 h)3 个水平,共组成 CK+L(对照+长日照)、ABA+L(ABA+长日照)、CK+Q(对照+等日照)、ABA+Q(ABA+等日照)、CK+S(对照+短日照)、ABA+S(ABA+短日照)6 个处理组合。每个处理 3 次重复,每个重复选取 5 盆植株进行试验,处理时间为 15 d。处理结束后取出拍照,并取足够的正常功能叶立即置于液氮中,保存在-80 ℃的冰箱内,用于测定相关生理指标。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 花色素苷含量 花色素苷含量测定参照 Mita 等^[11]的方法加以改进。取样 0.1 g 用液氮研磨,加 1% HCl 甲醇液放入 2 mL 离心管于 4 ℃下保存 24 h 待测。13 000 g 在 4 ℃离心 15 min,既可测定 530 nm 和 650 nm 处的吸光值 A_{530} 和 A_{650} ,按公式($A_{530} - 0.25 \times A_{650}$)计算花色素含量。

1.3.2 叶绿素含量 叶绿体色素含量参照 Porra^[12]的方法测定。各处理分别取 0.2 g 冻样用 2 mL 的 80% 丙酮在遮光下提取,分光光度计(SHIMADZUUV-2401PC)测量 662 nm、644 nm、445 nm 处的吸光值 A_{662} 、 A_{644} 、 A_{445} ,通过以下公式计算出叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)和类胡萝卜素(Car)的含量。

$$\text{Chla} = 9.78 \times A_{662} - 0.99 \times A_{644}$$

$$\text{Chlb} = 21.4 \times A_{644} - 4.65 \times A_{662}$$

$$\text{Car} = 4.69 \times A_{445} - 0.268 \times (\text{Chla} + \text{Chlb})$$

1.3.3 相关酶活性 (1)PAL 和 CHI 活性 取 0.3 g 冻样加入 5 mL 提取液(0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.0,0.05 mol/L 抗坏血酸,0.018 mol/L 巯基乙醇),冰浴匀浆,4 ℃下 15 000 g 离心 20 min,上清液为酶粗提液用于测定 PAL、CHI 活性。3 次取样重复。

PAL 活性测定采用 Lister^[13]的方法。取 0.5 mL 粗酶液加入 2.5 mL 的反应液(硼酸缓冲液 pH 8.8,0.01 mol/L 苯丙氨酸),置于 34 ℃反应 30 min,用三氯乙酸终止反应,在 5 000 g 离心 5 min 除去变性的蛋白质。反应生成的肉桂酸含量用在 290 nm 处的吸光值来表示。每分钟光密度变化 0.001 所需的酶量为 1 活性单位。对照实验用不加苯丙氨酸的反应液代替正常的反应液进行。

CHI 活性测定采用 Lister 等^[14]的方法进行。取 0.75 mL 的粗酶提液加入 2 mL 混合液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4,牛血清蛋白 7.5 mg/mL,50 mmol/L KCN),然后加 50 μL 1 mg/mL 的查尔酮溶液置于 34 ℃水浴 30 min,另取同量的酶提液沸水浴 10 min 为对照,测定在 381 nm 吸光值的变化来表示 CHI 的活性。每分钟光密度变化 0.001 所需的酶量为 1 活性单位。

(2)DFR 和 UFGT 活性 粗酶液提取参照 Murray^[14]报导的方法加以改进。取样品 1 g 加液氮研磨后,加入 5 mL -20 ℃的丙酮混匀离心,弃去上清液,用 4 mL -20 ℃丙酮再提取一次,沉淀用 4 mL (0.1 mol/L 硼酸缓冲液 pH 8.8,5 mmol/L 抗坏血酸)溶液提取,上清液为 DFR 和 UFGT 酶的粗提液。

DFR 活性检测实验参照 Stafford 和 Lester^[15]报导的方法。取 0.5 mL 酶提液加入 0.6 mL 反应混合液[(0.1 mol/L Tris 缓冲液(pH 7.4),1 $\mu\text{mol/L}$ 脱氢栎精(Dihydroquercetin),1 mmol/L NADPH,1 单位的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及 6 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄糖-6-磷酸)]共 1.1 mL,在 34 ℃水浴 1 h 后,用 1 mL 的乙酸乙酯提取 3 次,合并提液,然后用 0.2 mL 的蒸馏水提取 3 次。乙酸乙酯部分用氮气吹干,加入 2.5 mL 的正丁醇:盐酸(95:5 V/V)于 95 ℃水浴 30 min,在 550 nm 测定吸光值,用来表示由无色花色素(leucocyanidin)向花色素转变的量,取同量的酶提液沸水浴 10 min 为对照。每小时光密度变化 0.001 所需的酶量为 1 酶活性单位。

UFGT 活性测定参照 Lister 和 Lancaster^[14]的方法。取酶液 0.5 mL 加入 0.5 mL 的反应液

[0.05 mol/L 二甘氨酸缓冲液(pH 8.0),1 mmol/L 的槲皮素和 2.5 mmol/L 的 UDP-葡萄糖],反应液在 34 ℃水浴 30 min 后,用 0.75 mL 20% 三氯乙酸的甲醇溶液终止反应,于 5 000 r/min 离心 5 min,上清液贮藏于-20 ℃待测。用高效液相色谱检测栲精的减少量并用其表示酶活性。

(3)谷胱甘肽-S 转移酶(GST)活性 每个处理取 0.3 g 待测样品加入 1.8 mL 的硼酸缓冲液,离心后取上清液待测,利用南京建成生物工程研究所提供的谷胱甘肽-S 转移酶测定试剂盒提供的方法进行测定。

1.3.4 NADP⁺和 NADPH 含量 称取约 0.1 g 组织样品,加入 0.9 mL 酸性提取液,冰浴研磨,煮沸 5 min,冰浴中冷却后,10 000 g 4 ℃离心 10 min,取上清液至另一新的离心管中,加入等体积的碱性提取液使之中和,10 000 g 4 ℃离心 10 min,取上清液冰上保存供测定 NADP⁺含量。另外,称取约 0.1 g 组织样品,加入 0.9 mL 碱性提取液,冰浴研磨,煮沸 5 min,冰浴中冷却后,10 000 g 4 ℃离心 10 min,取上清液至另一新的离心管中,加入等体积的酸性提取液使之中和,10 000 g 4 ℃离心 10 min,取上清液冰上保存供测定 NADPH 含量。NADP⁺和 NADPH 含量测定采用苏州科铭生物技术有限公司试剂盒,按照相关试剂盒说明书进行相关操作。

1.3.5 ABA 和 GA 含量 取样之前,用自来水将叶片冲洗干净之后,称取 0.3 g 样品(用液氮速冻后保存在-80 ℃的低温冰箱中),加 2 mL 样品提取液(80%甲醇,内含 1 mmol/L BHT),在冰浴下研磨成匀浆,转入 10 mL 试管,再用 2 mL 提取液分次将研钵冲洗干净,一并转入试管中,摇匀后放置在 4 ℃冰

箱中。4 ℃下提取 4 h,1 000 g 离心 15 min(实验中离心机型号 LDZ5-2,4 000 r/min),取上清液。沉淀中加 1 mL 提取液,搅匀,置 4 ℃下再提取 1 h,离心,合并上清液并记录体积,残渣弃去。将上清液用氮气吹干,除去提取液中的甲醇,用样品稀释液定容每个处理取 0.3 g 样品样进行 ABA、GA 的酶联免疫检测,利用中国农业大学提供的 ELISA 植物激素测定试剂盒提供的方法进行。

1.4 数据分析

用 Statistic 5.0 进行差异显著性分析,用 Excel 2007 计算平均值和标准差,用 OriginPro 7.5 软件制图。

2 结果与分析

2.1 常温等日照下不同浓度外源 ABA 对四季秋海棠叶片内源激素、色素含量及相关酶活性影响

在常温(白天/夜晚:25 ℃/15 ℃)等日照条件下,叶面喷施系列浓度的 ABA 后,四季秋海棠叶片花色素苷相关合成酶(PAL、CHI、DFR、UFGT)和运输酶(GST)活性以及花色素苷、光合色素和内源激素含量发生了不同程度的变化(表 1、2)。首先,外源喷施 ABA 对四季秋海棠叶片花色素苷的诱导作用因浓度不同而异,即在低浓度下(5~10 μmol/L),随着浓度的增加,外源 ABA 对花色素苷的诱导作用逐渐增强,叶片花色素苷含量分别比对照显著增加 39.32% 和 55.06%(*P*<0.05),且在 10 μmol/L ABA 处理 5 d 之后,四季秋海棠的叶片表现出肉眼可见的红色;而当喷施的 ABA 浓度较高(50、100 和 500 μmol/L)时,这种对花色素苷的诱导作用则消失,叶片花色素苷含量比对照不同程度

表 1 常温等日照下外源 ABA 处理对四季秋海棠叶片花色素苷含量及相关酶活性的影响

Table 1 The content of anthocyanins and related enzyme activities in leaves of *B. semperflorens* under normal temperature such as sunshine with exogenous ABA

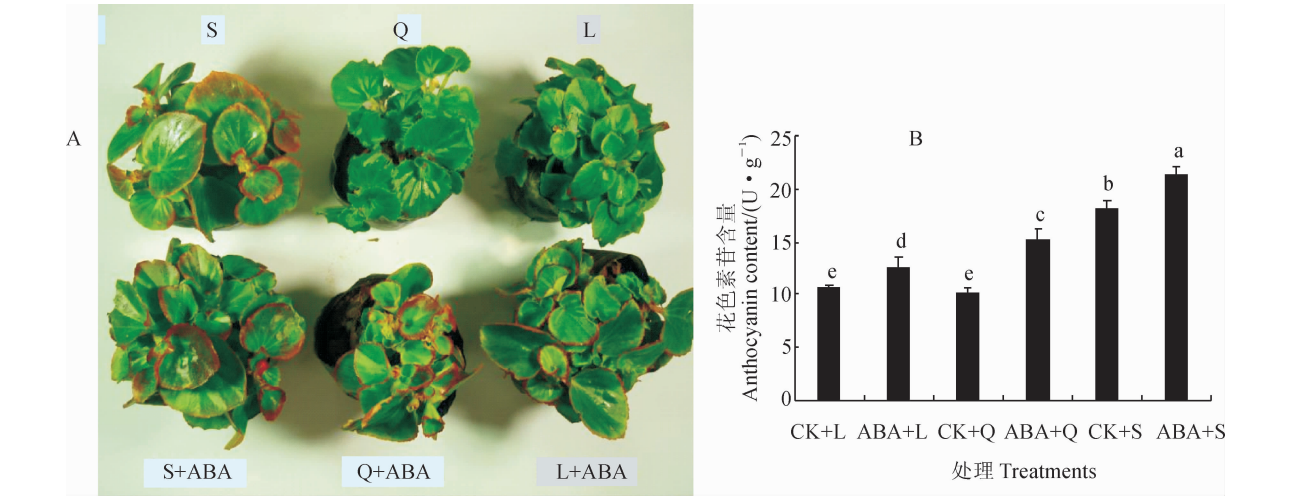
ABA 浓度 ABA concentration (μmol·L ⁻¹)	花色素苷 含量 Anthocyanin content/(U·g ⁻¹)	花色素苷相关合成酶和运输酶活性 Anthocyanin synthase and transport enzyme activity/(U·g ⁻¹)				
		PAL	CHI	DFR	UFGT	GST
0	10.68±0.44c	66.75±2.97 c	19.10±1.03 c	141.25±4.79 b	0.68±0.01 c	50.42±1.16b
5	14.88±0.39b	81.71±2.75 b	28.07±1.12 b	165.50±5.20 a	0.82±0.04 b	59.50±1.43 a
10	16.56±0.30a	105.79±2.35a	32.32±1.07a	170.25±3.77 a	1.18±0.06 a	61.26±1.73 a
50	10.18±0.22d	60.21±1.59 d	17.68±1.45 cd	129.25±6.24 c	0.66±0.03c	44.87±2.40 c
100	9.23±0.37 e	56.58±1.77e	18.07±1.49 cd	126.25±4.03c	0.63±0.05 c	43.11±1.72 cd
500	8.27±0.08 f	51.46±1.57 f	16.55±0.71d	123.50±4.65 c	0.64±0.06 c	40.59±2.24 d

注:同列不同小写字母表示处理间差异达到 0.05 显著水平;下同
Note: Different letters in the same column indicate significant differences among treatments at 0.05 level; the same as below

表 2 常温等日照下外源 ABA 处理对四季秋海棠叶片内源激素及色素苷含量的影响

Tabel 2 The content of anthocyanins and endogenos hormone in leaves of *B. semperflorens* under normal temperature such as sunshine with exogenous ABA

ABA 浓度 ABA concentration /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	内源激素含量 Endogenoushormone content/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)		光合色素含量 Photosynthetic pigment content/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	ABA	GA	Chla	Chlb	Car
0	12.06 $\pm$ 0.31 d	11.67 $\pm$ 1.05 a	2.552 $\pm$ 0.021 a	0.801 $\pm$ 0.054 a	1.722 $\pm$ 0.054 a
5	18.61 $\pm$ 0.66 a	9.10 $\pm$ 0.65 bc	2.300 $\pm$ 0.026 b	0.738 $\pm$ 0.032 b	1.722 $\pm$ 0.077 a
10	19.41 $\pm$ 0.23 a	7.11 $\pm$ 0.82 d	2.226 $\pm$ 0.039 c	0.726 $\pm$ 0.018 bc	1.621 $\pm$ 0.063 b
50	13.30 $\pm$ 1.14 cd	9.71 $\pm$ 0.73 bc	2.173 $\pm$ 0.044 c	0.683 $\pm$ 0.031cd	1.635 $\pm$ 0.032 b
100	14.43 $\pm$ 1.09 bc	10.31 $\pm$ 0.66 ab	1.916 $\pm$ 0.072 d	0.659 $\pm$ 0.007 d	1.609 $\pm$ 0.017 b
500	15.64 $\pm$ 2.80 b	8.37 $\pm$ 1.24 cd	1.722 $\pm$ 0.040 e	0.563 $\pm$ 0.020 e	1.583 $\pm$ 0.059 b



CK. 不喷施 ABA;L. 长日照(16 h/8 h);Q. 等日照(12 h/12 h);S. 短日照(8 h/16 h)。下同

图 1 低温不同光周期下外施 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 对四季秋海棠花色素苷含量的影响

CK. Control, without exogenous ABA;L. Long-day(16 h/8 h);Q. Intermediate-day(12 h/12 h);S. Short-day(8 h/16 h).

The same as below

Fig.1 Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ exogenous ABA on anthocyanin content in leaves of *B. semperflorens* under low temperature and different photoperiodic treatment

降低。其次,花色素苷合成相关的 PAL、CHI、DFR、UFGT 和运输酶 GST 活性的变化与花色素苷的含量变化特征相符:在外源喷施 ABA 浓度较低(5、10 $\mu\text{mol/L}$)时,5 种酶活性较对照显著增加,且与施用 ABA 的浓度呈正相关;而当喷施的 ABA 浓度较高(50、100 和 500 $\mu\text{mol/L}$)时,5 种酶活性与对照相比大多显著降低,部分没有显著变化。第三,外源喷施不同浓度的 ABA 之后,对植物的内源激素含量也造成不同的影响,即显著提高了内源 ABA 的含量,而显著降低了内源激素 GA 的含量,特别是 10 $\mu\text{mol/L}$ 外源 ABA 处理下,内源 ABA 显著增加了 60.93%,而内源 GA 却显著降低了 38.35%。再次,与叶片花色素苷含量变化相对应,叶片叶绿素含量(a 和 b)和类胡萝卜素含量与外源施用 ABA 的

浓度呈现显著的负相关,即随着 ABA 浓度的增加而逐渐降低,如 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 施用 5 d 后,叶绿素 a、b 含量分别比对照显著降低 32.56% 和 29.73%,类胡萝卜素则比对照显著降低 8.00%,说明喷施 ABA 能促使叶片中叶绿素降解。因此,我们在后续试验中选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 为试验浓度。

2.2 低温不同光周期下外源 ABA 对花色素苷含量及相关酶活性的影响

前期研究表明,四季秋海棠的绿叶品种‘超级奥林匹克’在秋季时叶片因积累花色素苷而变红^[16],这不仅是低温的作用^[17],也是短日照的作用,因为在不适宜光周期(长日照和等日照)下,即使给予低温也不能诱导花色素苷合成^[18]。在低温条件下(白

表 3 低温不同光周期下外施 10 μmol/L ABA 对四季秋海棠花色苷相关合成酶和转移酶活性的影响

Table 3 The anthocyanin synthase and transport enzyme activities in leaves of *B. semperflorens* under low temperature and different photoperiodic treatments with 10 μmol/L exogenous ABA

处理 Treatment	酶活性 Enzymatic activity/(U · g ⁻¹)				
	PAL	CHI	DFR	UFGT	GST
CK+L	85.03±4.33 e	35.86±3.29 c	129.75±4.27e	0.819±0.024 e	21.01±1.72 d
ABA+L	88.04±3.98 d	40.39±1.87 b	136.50±3.11d	0.881±0.033 d	25.22±2.63 c
CK+Q	82.82±1.24 e	35.61±3.45 c	130.00±3.16 e	0.827±0.034 e	20.98±1.75 d
ABA+Q	104.46±2.14 c	41.64±3.26 b	143.75±3.59 c	0.986±0.010 c	41.24±2.05 b
CK+S	112.64±4.02 b	46.07±3.68 a	152.00±3.36 b	1.304±0.011 b	42.01±2.77 b
ABA+S	122.00±5.35 a	46.72±2.07 a	161.75±2.99 a	1.548±0.024 a	58.82±2.78 a

天/夜晚:15℃/6℃),短日照处理(S)促进了四季秋海棠叶片明显变红,而同期的长日照(L)和等日照(Q)处理并未使四季秋海棠叶片变红(图 1,A);同时,短日照处理(CK+S)的花色素苷含量显著高于其余处理,分别是长日照(CK+L)和等日照(CK+Q)处理的 1.73 和 1.82 倍(图 1,B)。在同样的低温下,同时外施 10 μmol/L 的 ABA 之后,不论是短日照(ABA+S)、等日照(ABA+Q)还是长日照(ABA+L),四季秋海棠叶片都呈现肉眼可见的红色,同时它们叶片花色苷含量较相应的对照处理(单独低温处理)显著增加,但仍以短日照处理显著较高(图 1,A、B)。相应地,四季秋海棠叶片花色苷合成酶和运输酶的活性也在喷施 ABA 之后较对照(单独低温处理)显著增加,尤其是 DFR 和 UFGT 活性在长日照条件下喷施 ABA 之后分别提高了 5.20%、7.57%,在短日照条件下分别增加了 6.41%、18.71%,在等日照条件下分别提高了 10.60%和 19.20%;另外,各日照处理间相比较,仍以短日照处理叶片各相关酶活性显著较高(表 3)。这说明 ABA 在低温和不适宜光周期条件下,直接促进花色苷合成下游的 DFR 和 UFGT 酶的增加,进而促进了花色苷的合成和积累,从而验证了关于“低温短日照条件下诱导四季秋海棠叶片合成花色苷的关键物质基础可能是 ABA 积累的推测。

2.3 低温不同光周期下外源 ABA 对四季秋海棠叶片内源 ABA 和 GA 含量的影响

外源喷施 ABA 增加四季秋海棠叶片的内源 ABA 含量,而抑制内源 GA 含量,从而提高 ABA/GA 的比值(图 2)。其中,在单独低温条件下,短日照处理四季秋海棠叶片的内源 ABA 含量比长、等日照处理显著较高,而内源 GA 含量泽显著较低,从

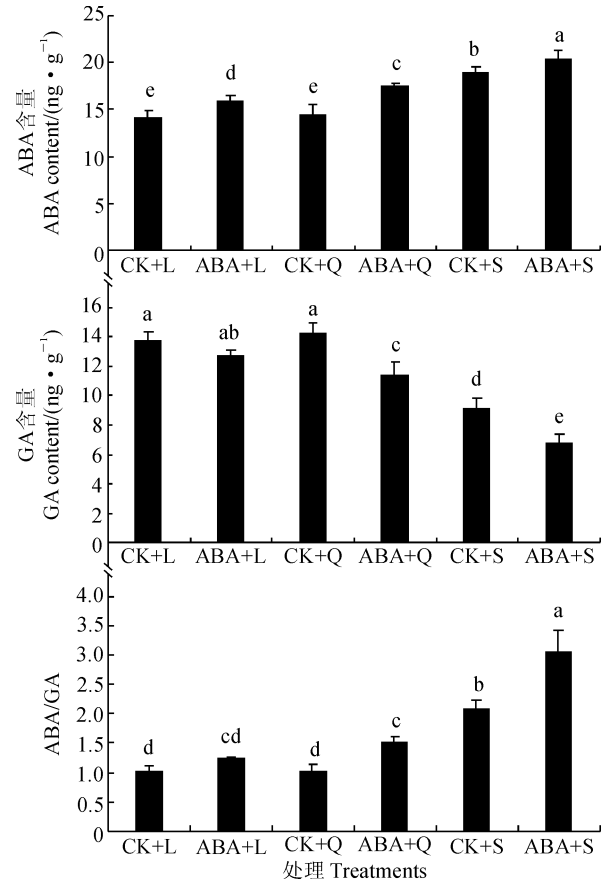


图 2 低温不同光周期下外施 10 μmol/L ABA 后四季秋海棠 ABA 和 GA 含量

Fig.2 ABA and GA contents under low temperature and different photoperiodic treatments with and without 10 μmol/L ABA on leaves of *B. semperflorens*

而致使其 ABA/GA 的比值也显著较高;与单独低温处理对照组相比较,四季秋海棠叶片内源 ABA 含量在长、等、短日照处理分别显著增加 12.35%、20.00%、10.59%,而内源 GA 含量却分别降低了 7.61%、20.00%、25.00%,内源 ABA/GA 的比值则明显上升。因此,外源 ABA 调整了植物体内源激

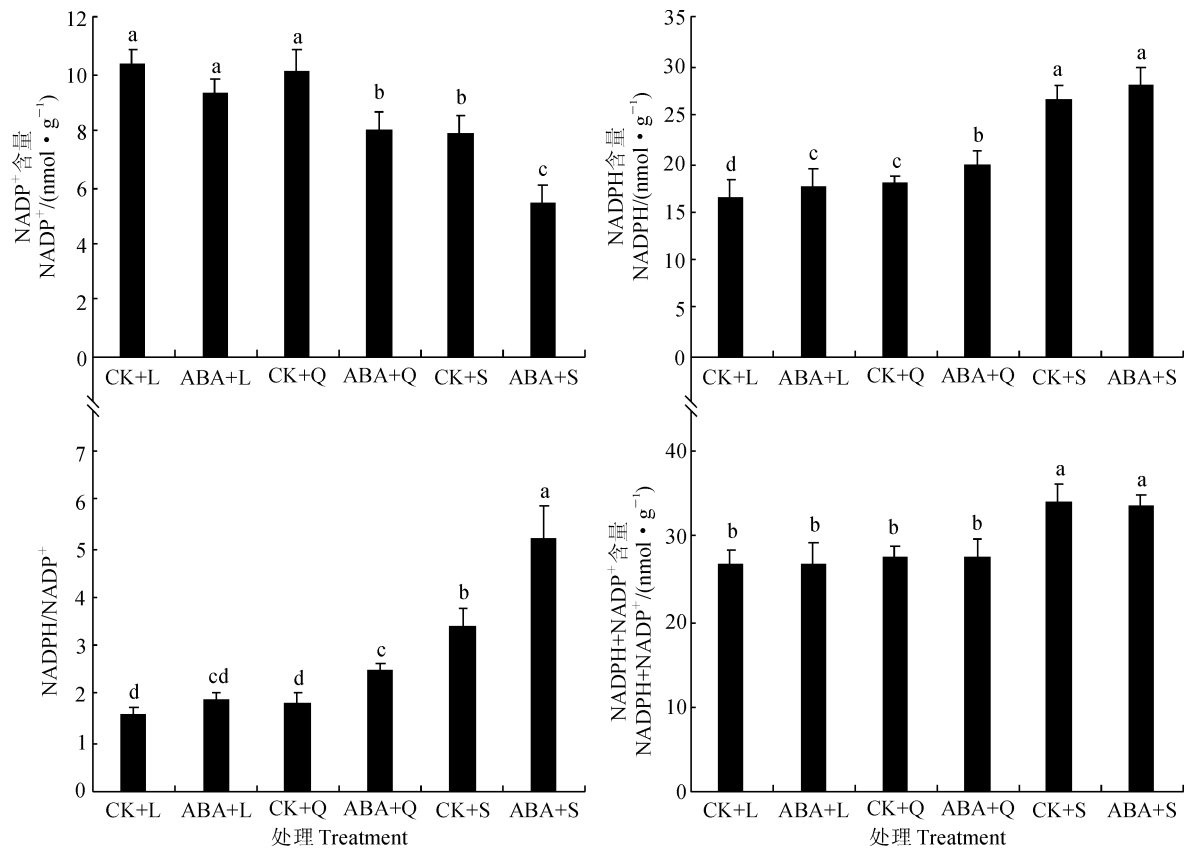


图 3 低温不同光周期下外施 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA 对四季秋海棠叶片 NADPH/NADP⁺ 比值变化

Fig. 3 NADPH/NADP⁺ ratio differences under low temperature and different photoperiodic treatments with and without 10 $\mu\text{mol/L}$ ABA on leaves of *B. semperflorens*

素的比列,使植物体内具有较高的内源 ABA 含量和较低 GA 的含量,内源 ABA/GA 的比值显著升高。

2.4 低温不同光周期下外源 ABA 对四季秋海棠叶片 NADPH 和 NADP⁺ 含量的影响

在花色素苷合成的途径中,DFR 对花色素苷的最终形成起决定性作用,其反应需要 NADPH 参与^[19]。由图 3 可知,外源 ABA 虽未显著提高低温和不适宜的光周期(长、等日照)下四季秋海棠叶片的 NADPH + NADP⁺ 的总量,但却显著增加了 NADPH 的含量(分别比对照提高了 6.58% 和 11.72%),因此 NADPH/NADP⁺ 比值显著增加。这说明外源 ABA 处理后促进植物体内的 NADP⁺ 向 NADPH 转变,因此为 DFR 催化二氢类黄酮醇生成无色花青素提供 H⁺,从而启动了 DFR 的活性,进而促进花色素苷的合成。该结果验证了我们的推测:低温下不同光周期处理对四季秋海棠叶片花色素苷的诱导差异的物质基础是 ABA,即低温短日照条件诱导四季秋海棠叶片合成花色素苷的关键物质基础是 ABA 的积累。

3 讨论

通过考察外施 ABA 对四季秋海棠花色素苷合成的影响,发现不同浓度外源 ABA 处理下四季秋海棠花色素苷合成关键酶的变化趋势与花色素苷含量的动态趋势基本相吻合,较低浓度 ABA (5~10 $\mu\text{mol/L}$) 促进花色素苷合成酶(PAL、CHI、DFR 和 UFGT)及运输酶(GST)活力的提高,进而提高了花色素苷的含量,表明 ABA 是通过调节花色素苷合成的关键酶来调控四季秋海棠叶片花色素苷的合成。而较高浓度的外源 ABA (50、100、500 $\mu\text{mol/L}$) 则对这些酶的活力没有显著影响,因此没有花色素苷的生成。

在本试验中,低浓度的外源 ABA 通过启动花色素苷合成相关的酶(PAL、CHI、DFR 和 UFGT)和运输酶(GST),显著诱导了花色素苷在四季秋海棠叶片中的合成和积累。有研究表明,ABA 的合成在果皮花色素苷的积累过程中起着关键的作用^[20],900 mg/L 的 ABA 处理能显著提高葡萄果实中的花色素苷含量^[21];雷鸣等也发现 1 000 mg/L 的

ABA 对红地球葡萄果实的花色素苷具有明显的促进作用^[22]。本试验研究表明低温、不同光周期条件下外源 10 μmol/L ABA 明显增加四季秋海棠叶片花色素苷的积累,这说明低温不同光周期条件下 10 μmol/L ABA 对四季秋海棠叶片花色素苷的积累有明显的促进作用,且花色素苷积累量与光周期密切相关,短日照时花色素苷积累量最大而长日照时积累量最小。

外施 ABA 处理能够调节植物体内 ABA 和 GA 的平衡,进而调控花色素苷的形成^[23],本试验中外源 ABA 对四季秋海棠叶片花色素苷的合成诱导可能是通过提高内源的 ABA 含量,并降低 GA 的含量来实现的。低温条件下,只有短日照启动了花色素苷合成及运输相关的酶活性,并诱导花色素苷显著积累,叶片显著变红,这可能与低温和短日照条件能显著诱导植物体内 ABA 含量增加有关。而在低温条件下,长日照和等日照处理植株体内的 ABA 含量较低,而 GA 含量较高,因此花色素苷相关的合成酶和运输酶未被启动,因此没有花色素苷的合成。

花色素苷的生物合成过程中,要通过花色素苷合成关键酶(PAL、CHI、DFR 和 UFGT)相互协调,使花色素苷合成过程顺利进行。郭磊等^[24]研究发现 ABA 参与了花色素苷合成的调控,对花色素苷合成具有促进作用。ABA 还能通过转录因子调控结构基因的表达,进而提高酶的活性,最终促进花色素苷合成。本试验中,ABA 处理后长日照和等日照下的四季秋海棠叶片花色素苷合成酶和运输酶活性显著提高,尤其是提高花色素苷合成途径中下游的 DFR 和 UFGT 活性,DFR 在花色素苷合成的途径中发挥着关键作用,与花色的产生直接相关^[25]。因此,喷施 ABA 能够诱导低温长日照和等日照处理下的四季秋海棠叶片合成花色素苷,关键因素可能在于对 DFR 活性的诱导。DFR 是将二氢黄酮醇转化为花色素反应的第一个酶,它以不同二氢类黄酮

醇为底物,利用辅因子 NADPH 中的 H 将 4 位的羰基还原为羟基^[18],以转化生成相对应的不稳定的无色花青苷元,然后这些无色花青苷元在 ANS,3GT 催化下分别形成花青素、花葵素、花翠素。因此 DFR 活性的启动与否与 NADPH 的含量有直接关系,NADPH 含量及 NADPH/NADP⁺ 比值的增加为 DFR 提供足够的 H 供体,因此能启动 DFR 活性。本试验中,低温短日照处理下叶片 NADPH 的含量较长日照和等日照处理的高,NADPH/NADP⁺ 的比例也较高,因此 DFR 活性被启动,相应地,其下游的 UFGT 活性也显著增加,花色素苷最终合成;而低温长日照或等日照处理的植株,在外源喷施 ABA 之后,NADPH 含量和 NADPH/NADP⁺ 的比例显著增加,因此 DFR 和 UFGT 被启动,诱导花色素苷合成。

本试验研究发现,低温不同光周期条件下外施 10 μmol/L ABA 增加了四季秋海棠叶片 NADPH/NADP⁺ 比值,这说明外施 ABA 增加了 DFR 还原反应的 H 供体的 NADPH 含量,这可能是提高 DFR 活性的一个重要因素。因此,DFR 对花色素苷的最终形成起决定性作用。

综上所述,不同浓度 ABA 对四季秋海棠花色素苷合成关键酶的变化趋势与花色素苷含量的动态趋势相吻合,较低浓度 ABA 促进花色素苷合成酶 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 活力的提高,进而提高了花色素苷的含量,而较高的浓度则抑制了 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 酶活力,抑制了花色素苷的生成,这说明 ABA 通过调节花色素苷合成的关键酶来影响花色素苷的合成。外源 ABA 在低温不同光周期条件下能使花色素苷含量、相关酶活性、ABA/GA 提高,但对叶绿素含量和 GA 含量却有抑制作用,尤其在低温短日照条件效果更显著。因此,ABA 处理可作为一种有效的方法,用于叶片着色机制的研究。

参考文献:

[1] 丁 锐. 国外花色素苷的研究现状与进展[J]. 汉中师范学院学报(自然科学),2004,22(2):73-78.
DING R. Advances on the research of anthocyanins at abroad [J]. Journal of Hanzhong Teachers College (Natural Science), 2004, 22(2):73-78.
[2] DOONER H K. What is anthocyanin[J]. Mol. Gen. Genet., 1983,198:136-141.

[3] 于晓南,张启翔. 观赏植物的花色素苷与花色[J]. 林业科学, 2002,38(3):147-153.
YU X N, ZHANG Q X. Anthocyanin in ornamental plant and color epress [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(3): 147-153.
[4] 张学英,张上隆,骆 军,等. 果实花色素苷合成研究进展[J]. 果树学报,2004,21(5):456-460.
ZHANG X Y, ZHANG S L, LUO J, et al. Advances in re-

- search on fruit anthocyanin synthesis [J]. *Journal of Fruit Science*, 2004, **21**(5):456-460.
- [5] 李红秋,刘石军. 光强度和光照时间对色叶树叶色变化的影响[J]. 植物研究, 1998, **18**(2):194-205.
LI H Q, LIU S J. Effects of light intensity and illumination time on leaf colour variations of coloured leaf trees [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 1998, **18**(2):194-205.
- [6] 张启翔,吴 静,周肖红. 彩叶植物资源及其在园林中的应用[J]. 北京林业大学学报, 1998, **18**(2):194-205.
ZHANG Q X, WU J, ZHOU X H. Resource of color leaf plants and its application in Gardens [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1998, **18**(2):194-205.
- [7] SMITH L B, WASSHAUSEN D C. *Begonia solimutata* a new Brazilian species whose leaf color varies with light intensity [J]. *Begonia*, 1990, 57: 151-152.
- [8] JUZ G, LIU C L, YUAN Y B. Activity of chalcone synthesis and UGP: falvonoid-3-glycosyl transferase in relation to anthocyanin synthesis in apple [J]. *Scientia Horticulturae*, 1995, 63: 175-185.
- [9] 陈文龙,赵昶灵,支伟特,等. 高等植物花色素苷生物合成调控的研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, **29**(33): 271-276.
CHEN W L, ZHAO C L, ZHI W T, *et al.* Progress of regulation of anthocyanin biosynthesis in higher plants [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, **29**(33):271-276.
- [10] 刘延吉,王 嵩,吕德国. ABA 对南果梨花色素苷含量、合成酶及信号分子的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, **40**(1): 7-10.
LIU Y J, WANG S, LÜ D G. Effect of ABA on anthocyanin, partial synthetic enzymes and signaling molecule Nanguo Pear [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2009, **40**(1):7-10.
- [11] MITA S, MURANO N, AKAIKE M, *et al.* Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars [J]. *The Plant Journal*, 1997, **11**(11): 841-851.
- [12] PORRA R J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophyll a and b [M]. *Discoveries in Photosynthesis*. Springer Netherlands, 2005: 633-640.
- [13] MURRAY J R, HACKETT W P. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. [J]. *Plant Physiology*, 1991, 97: 343-351.
- [14] LISTER C E, LANCASTER J E, WALKER J R L. Developmental Changes in Enzymes Biosynthesis in the Skins of Red and green apple cultivars [J]. *Journal of Science Food and Agriculture*, 1996, 71: 313-320.
- [15] STAFFORD H A, LESTER H H. Flavan-3-ol biosynthesis the conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3, 4-cis-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of douglas fir [J]. *Plant Physiology*, 1984, **76**(1): 184-186.
- [16] ZHANG K M, LI Z, LI Y, *et al.* Carbohydrate accumulation may be the proximate trigger of anthocyanin biosynthesis under autumn conditions in *Begonia semperflorens* [J]. *Plant Biology*, volume, 2013, 15: 991-1000.
- [17] ZHANG K M, GUO M L, HE D, *et al.* The inhibition effect and excessive carbon flux resulting from blocking anthocyanin biosynthesis under darkness in *Begonia semperflorens* [J]. *Plant Growth Regul.*, 2016, 35: 22-30.
- [18] 王 珂. 外部因素对四季秋海棠花色素苷合成的影响[D]. 郑州:河南农业大学, 2014.
- [19] 张学英,张上隆,骆 军,等. 果实花色素苷合成研究进展[J]. 果树学报, 2004, **21**(5):456-460.
ZHANG X Y, ZHANG S L, LUO J, *et al.* Advances in research on fruit anthocyanin synthesis [J]. *Journal of Fruit Science*, 2004, **21**(5):456-460.
- [20] 李 明. ABA、S3007 促进苹果果实着色的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2005:20-25.
- [21] 胡春霞,王 丽. ABA、BR 对葡萄果实花色素苷和可溶性糖的影响[J]. 鞍山师范学院学报, 2009, **11**(2):42-44.
HU C X, WANG L. Effect of ABA and BR on anthocyanin and soluble sugar of grape seeds [J]. *Journal of Anshan Normal University*, 2009, **11**(2): 42-44.
- [22] 雷鸣,吴 江,等. ABA 与 NAA 对红地球葡萄果实形状的影响[J]. 浙江农业科学, 2008, 2:153-155.
LEI M, WU J, *et al.* Effect of ABA and NAA of Hongdiqu grape fruit shape [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2008, 2:153-155.
- [23] 刘延吉,向文娟,田晓艳. 南果梨愈伤组织及花青素诱导的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, **27**(3):83-87.
LIU Y J, XIANG W J, TIAN X Y. Study on inducing callus and cyaniding of Nanguo pear [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, **27**(3):83-87.
- [24] 郭 磊,蔡志翔,张斌斌,等. 叶片喷施脱落酸对桃果实着色及相关基因表达的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, **19**(6):1463-1469.
GUO L, CAI Z X, ZHANG B B, *et al.* Effect of foliar application of ABA on fruit coloration and expression of some related genes in peach [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2013, **19**(6):1463-1469.
- [25] 周 琳,王 雁,任 磊,等. 牡丹二氢黄酮醇 4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析[J]. 植物生理学报, 2011, **47**(9): 885-892.
ZHOU L, WANG Y, REN L, *et al.* Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *PsDFR1* from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, **47**(9):885-892.