



张大伟,四川大学生命科学学院教授,博士生导师,现任四川大学生命科学学院副院长,教育部重要人才计划青年项目入选者,四川省学术和技术带头人,成都市人才计划入选者,四川省植物学会副理事长,四川省生物科学类教学指导委员会秘书长,中国植物学会植物生理及分子生物学专委会委员。2008年取得四川大学生物科学学士学位,2013年取得四川大学植物学博士学位。主要从事植物激素油菜素内酯调控植物生长发育和胁迫抗性的分子机制、植物激素信号与环境信号互作方面的研究,相关成果以通信作者和第一作者身份在EMBO Journal、Developmental Cell、Plant Cell、Science Advances、PNAS、Science Signaling、Plos Genetics、JIPB、New Phytologist、Plant Physiology、Plant Journal等期刊发表论文40余篇。荣获教育部学术新人奖、中国植物生理与分子生物学学会卫志明青年创新奖。主持国家自然科学基金5项、四川省科技创新人才项目。现任New Crops、Plants、BioCell、植物学报、生物学杂志和四川大学学报(自然科学版)等杂志编委。

拟南芥UBP14参与调控高光下花青素积累的分子机制研究

冯梦玲,王梦瑶,韩青,张大伟

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,成都 610064)

摘要: 高光促使植物从分子防御、代谢调整到形态重塑进行系统性主动适应,花青素在植物响应高光中起关键作用,泛素化与去泛素化修饰在蛋白质稳定性调控中起关键作用,但去泛素化酶DUBs家族在花青素积累中的功能尚不明确。本研究以拟南芥为材料,通过构建UBP14功能缺失突变体和过表达转基因植株,结合分子生物学与遗传学手段,探究UBP14在高光下调控花青素积累的分子机制。结果表明,UBP14受高光诱导表达,正调控花青素的合成与积累。UBP14与花青素合成关键转录因子MYB75相互作用,增强其对下游基因(*DFR*、*LDOX*、*UF3GT*)启动子的结合能力,并通过抑制MYB75的蛋白酶体降解来提高其蛋白稳定性。遗传分析进一步证实,UBP14是MYB75调控花青素合成所必需的关键因子。本研究揭示了UBP14稳定MYB75蛋白促进花青素积累的分子机制,为耐高光作物育种提供了理论依据。

关键词: 高光;花青素;UBP14;MYB75

中图分类号: Q945 **文献标志码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.260190

Molecular mechanism by which UB14 regulates anthocyanin accumulation under high light in *Arabidopsis thaliana*

FENG Mengling, WANG Mengyao, HAN Qing, ZHANG Dawei

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

收稿日期: 2026-04-25 修回日期: 2026-07-04 接受日期: 2026-07-08

基金项目: 中央引导地方项目(ZYYDDF2024-01); 农业产业融合发展项目(GZFCG2026-31239); 四川省自然科学基金(2026NSFSC1082)

作者简介: 冯梦玲(2002—), 女, 河南焦作人, 硕士研究生, 主要从事植物学研究. E-mail: feng596202@163.com

通信作者: 张大伟. E-mail: zhdawei@scu.edu.cn

Abstract: High light induces coordinated adaptations in plants, including molecular defense, metabolic adjustment, and morphological remodeling. Anthocyanins are important in the response to high light, while ubiquitination and deubiquitination are important for regulating protein stability. However, the function of the deubiquitinating enzyme (DUB) family in anthocyanin accumulation remains unclear. In this study, *Arabidopsis thaliana* was used, and UB14 loss-of-function mutants and overexpression lines were generated. Molecular biological and genetic methods were used to investigate the mechanism by which UB14 regulates anthocyanin accumulation under high light. UB14 expression was induced by high light, and anthocyanin biosynthesis and accumulation were positively regulated by UB14. UB14 was found to interact with MYB75, a key transcription factor in anthocyanin biosynthesis. Its binding to the promoters of the downstream genes *DFR*, *LDOX*, and *UF3GT* was enhanced, and MYB75 protein stability was increased by inhibiting its proteasomal degradation. Genetic analysis further showed that UB14 is required for the regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB75. A molecular mechanism in which UB14 stabilizes MYB75 and promotes anthocyanin accumulation was identified. A theoretical basis for breeding crops with tolerance to high light was therefore provided.

Keywords: high light; anthocyanins; UB14; MYB75

植物在自然环境中,通常会遭受强光与高温、干旱或低温等逆境叠加^[1]。高光胁迫是植物生长发育期内最常见的一类非生物逆境条件,植物吸收的光能过剩导致活性氧(Reactive oxygen species, ROS)大量积累,对植物组织造成氧化性损伤^[2]。高光通常会上调植物次生代谢途径,促进包括多酚在内的次生代谢物生物合成^[3]。作为分布最广的多酚类化合物,花青素是一种化合物的总称,是糖基化的多羟基或多甲氧基分子^[4],糖基化促使不稳定的花青素转变为稳定态,并使其在植物细胞中富集^[5]。花青素生物合成过程中,查尔酮合成酶(*CHS*)、查尔酮异构酶(*CHI*)及黄酮3-羟化酶(*F3H*)作为早期基因发挥作用;而晚期基因则包括二氢黄酮醇4-还原酶(*DFR*)、类黄酮3-O-葡萄糖基转移酶(*UF3GT*)以及花青素合成酶(*ANS*, 亦称白花青素双加氧酶 *LDOX*)等^[6-7]。这些合成相关基因在转录水平上的激活与抑制,受控于一种进化上保守的三元调控模块——MBW复合体,该复合体由R2R3-MYB、bHLH和WD40转录因子或调节蛋白共同组成^[8-9]。在参与MBW复合体的四个R2R3-MYBs转录因子中,MYB75/PAP1的功能优于其他3个MYB因子,PAP1作为花青素生物合成的关键激活因子,可提升WD40及多个结构基因的表达^[10-11],推动花青素的生成与积累。MYB转录因子通常在花青素生物合成的起始过程中起关键作用,它的表达在很大程度上受到细胞内和细胞外信号的诱导和精细调节^[12]。

磷酸化、泛素化、乙酰化及甲基化等修饰形式

在蛋白质中较为常见^[13]。泛素化(ubiquitylation)作为一种关键的翻译后蛋白修饰形式,参与了真核生物的大多数细胞过程^[14]。蛋白质泛素化是蛋白质在赖氨酸(lysine, K)残基上与泛素分子的共价修饰,该过程主要由E1活化酶、E2偶联酶及E3连接酶所组成的酶促级联反应介导^[15-17]。与泛素偶联机制相反的是一系列去泛素化酶(deubiquitylating enzymes, DUBs),它们对不同的泛素键具有广泛的特异性,通过从靶蛋白中去除泛素或缩短共轭泛素链来抵消泛素化机制^[18-19]。目前已经在拟南芥中鉴定出55个DUBs,分为七个蛋白家族:ubiquitin-specific proteases (UBPs)、ovarian tumor (OTU)、ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs)、Machado-Joseph domain (MJD)、JAB1/MPN/MOV34 (JAMM)、motif interacting with Ub-containing (MINDY)和zinc finger-containing ubiquitin peptidases (ZUPs/ZUFSPs)^[20-22]。这7个DUBs家族中,除JAMM家族是金属蛋白酶外,其余均为半胱氨酸蛋白酶^[23]。UBPs是植物中最大的一类DUBs,目前对于UBPs已经有了广泛的研究,越来越多的报道表明UBPs在植物的整个生命周期中具有多种生物学功能。拟南芥UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE14 (UBP14)属于一个包含一个基因的特定亚家族,编码UBP14的DA3 (AT3G20630)是拟南芥正常内复制和细胞和器官生长所必需的。相比于其他UBP亚家族的成员,有关AtUBP14的研究相关较少,关于UBP14如何参与植物的非生物胁迫以及在花青素生物合成与

积累过程中的生物学功能仍然是未知的。

根据之前的研究,花青素的生物合成与积累对高光表现出高度的响应^[24]。此研究发现,拟南芥去泛素化酶 UBP14 会影响高光下花青素积累,并筛选到 UBP14 会与花青素合成关键调控因子 MYB75 相互作用,因此,探究 UBP14 对花青素合成过程中的翻译后修饰影响将为植物抵抗逆境胁迫提供新思路,不仅可以拓展 UBP14 的功能,还可以为农业中培育耐高光的作物品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所采用的拟南芥植株材料,均来源于 Col-0 遗传背景。UBP14 的功能缺失突变体 *da3-1* 和过表达转基因材料 *35S::HA-FLAG-UBP14* 均为本实验室所保存。MYB75 过表达材料 *35S::GFP-MYB75* 以及 *35S::GFP-MYB75/da3-1* 和 *35S::GFP-MYB75/35S::HA-FLAG-UBP14* 转基因植株通过 GV3101 农杆菌浸染花序获得。所有转基因植株均通过抗性培养基筛选、RT-qPCR 检测和蛋白免疫印记鉴定,筛选确定为纯合子后进行后续实验。

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件

拟南芥种子在 1/2 MS 固体培养基上 4℃ 春化 2 d,之后转移到 22℃ 放置在不同的光照条件下,光周期为 16 h 光照,8 h 黑暗。对于高光诱导研究,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 为正常光照条件,210 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 则视为高光诱导条件^[25]。

烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 在土壤中以 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗的条件生长。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 Probe Gene 公司的 TRizol 总 RNA 提取试剂盒提取植物总 RNA,使用 Innovagene 公司的 inNova Uscript II All in One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 对提取到的 RNA 进行逆转录得到 cDNA,利用 qPrimerDB 网站设计引物,使用生工生物工程(上海)股份有限公司 SGExcel Fast-SYBR Mixture 配制反应体系,每组体系设置 3 个重复,采用 CFX Connect 实时系统(Bio-Rad)进行 RT-qPCR 分析。

1.2.3 酵母双杂交实验(Y2H)

将 AH109 酵母菌在 YPDA 平板上划线,28℃ 培养 2~3 d,挑取单菌落,接种于 5 mL YPDA 液体培养基,28℃ 振荡培养 14~16 h,离心(6000 r/min, 5 min)沉淀菌体,依次用 ddH₂O 清洗两次、1×TE/LiAc 清洗一次,最后用适量 1×TE/LiAc 重悬,收集感受态细胞;在离心管中依次加入 10 μL 鲑鱼精 DNA、各 5 μL 目标质粒、100 μL 感受态细胞、600 μL 40% PEG4000,混匀,28℃ 振荡孵育 40 min,42℃ 水浴热激 16 min(中间颠倒混匀 1 次),离心沉淀菌体,用 ddH₂O 清洗后,加入 100 μL ddH₂O 重悬,涂布于二缺培养基,28℃ 培养 3~4 d。挑取二缺平板上长出的单菌落,用无菌水重悬并依次稀释 10、100、1000 倍,分别取 2.5 μL 各稀释梯度的菌液,点样于二缺培养基和四缺培养基上,28℃ 培养 3~4 d,观察生长情况。

1.2.4 双分子荧光互补实验(BiFC)

将目的基因分别克隆至 nYFP 和 cYFP 载体,提取质粒后转化农杆菌 GV3101,挑取平板上长出的单菌落,于 5 mL LB 液体培养基 28℃ 振荡培养 12~14 h,离心(5000 r/min, 2 min)沉淀菌体,用 1/2 MS 液体培养基重悬。将含 nYFP 和 cYFP 的菌液等量混合,加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮,暗处静置 30 min,用去针头注射器将混合液注入烟草叶片,植物置于 22℃ 人工气候室培养 2 d 后,使用体式荧光显微镜观察 YFP 荧光信号。

1.2.5 体外 Pull-down 实验

纯化 MBP 和 MBP 标签蛋白的 beads 与等量 His 标签蛋白在 MBP 下拉结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.6% Triton, 0.2% 甘油, 2 mmol/L PMSF)中,混匀后取 50 μL 作为 Input 对照组,剩余反应液于 4℃ 持续涡旋孵育 2 h。利用 MBP 清洗缓冲液对 beads 进行 7 次清洗,收集清洗后的 beads,加入 50 μL SDS 上样缓冲液,100℃ 煮沸 8 min,通过 Western blot 对样品进行检测。

1.2.6 蛋白质免疫共沉淀实验(Co-IP)

将目的基因分别克隆至 HA-Flag(HF)和 GFP 载体,提取质粒转化农杆菌 GV3101,按 1.2.4 方法将混合液注射至烟草叶片中,取 0.5 g 烟草叶片,液氮研磨至细粉,加入 1 mL IP buffer (10 mmol/L Tris, pH 7.5, 0.5% NP-40, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, 1% plant

protease inhibitor cocktail), 4 °C 涡旋孵育 2 h。4 °C、13 000 r/min, 离心 15 min, 吸取上清, 留取 50 μ L 作为 Input, 加入 20 μ L beads, 4 °C 涡旋孵育 3 h。4 °C、2000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 加入 1 mL IP buffer 清洗, 4 °C、2000 r/min, 离心 2 min, 弃上清, 重复清洗 5 次。加入 50 μ L SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 13 000 r/min, 离心 5 min, 取上清通过 Western blot 对样品进行检测。

1.2.7 凝胶电泳迁移率实验(EMSA)

根据目的基因的结合位点设计探针引物, 合成 DNA 双链探针, 获得 DNA 双链探针后, 蛋白与 DNA 探针在 EMSA 结合缓冲液 (25 mmol/L HEPES KOH pH 8.0、50 mmol/L KCl、1 mmol/L DTT 和 10% 甘油) 中混合, 冰浴 30 min, 向反应体系中加入 4 μ L 6 $\times$ EMSA gel-loading buffer, 吸取 20 μ L 反应液上样, 用非变性聚丙烯酰胺凝胶, 设置 110V 进行电泳 45 min。将 EMSA 凝胶置于适量 1 $\times$ TBE/TGE 中, 1:10 000 的比例加入 SYBR Green EMSA nucleic acid gel stain, 避光染色 30 min, 显影。

1.2.8 染色质免疫共沉淀实验(ChIP)

主要实验步骤参考 Zhao 等人的文章^[26]。简而言之, 取 2 g 拟南芥幼苗并进行甲醛交联处理, 用于后续染色质分离。染色质在冰上经五次超声处理 (每次 15 s 开、15 s 关) 后进行免疫沉淀, 使用 20 μ L beads 进行操作。经反向交联后, 使用特定引物对 DNA 片段进行 qPCR 定量分析。

1.2.9 无细胞蛋白降解实验(Cell-free)

取 0.15 g 拟南芥幼苗, 液氮研磨至粉末, 加入 300 μ L Degradation buffer (25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、10 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、4 mmol/L PMSF、5 mmol/L DTT 和 10 mmol/L ATP), 4 °C 涡旋孵育 2 h, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 即植物总蛋白提取液。取 280 μ L 植物提取液, 加入 20 μ L 体外重组蛋白 (目的蛋白), 对照组加 50 μ mol/L MG132 (Sigma-Aldrich), 实验组加 DMSO, 混匀后 30 °C 水浴反应, 分别于 0、30、60、90 min 取样, 每次取 30 μ L 反应液。每管样品加入 10 μ L SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min。12 000 r/min, 离心 5 min, 通过 Western blot 对样品进行检测。

1.2.10 体内蛋白降解实验

将 10 d 龄拟南芥幼苗浸泡在含 1 mmol/L

CHX (SigmaAldrich) 的 1/2 MS 液体培养基中, 处理 0、1、2 h 取样, 液氮研磨至粉末, 加入 150 μ L SDS 上样缓冲液, 混匀后在 100 °C 煮沸 10 min, 13 000 r/min, 离心 5 min, 通过 Western blot 对样品进行检测。

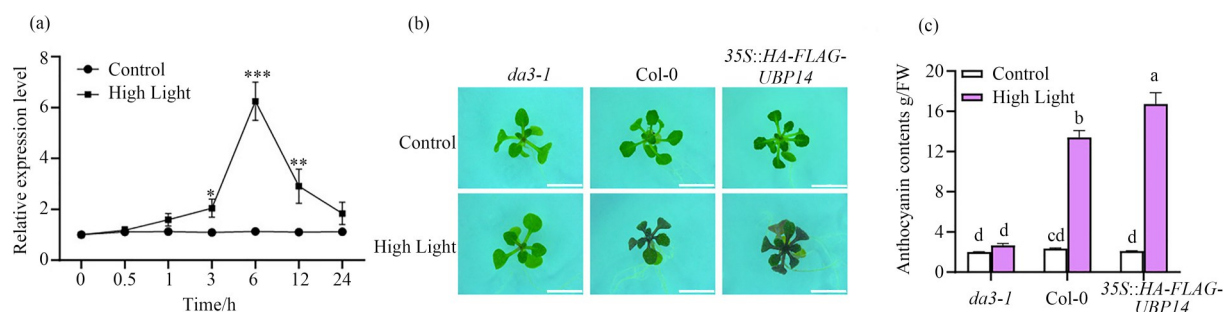
2 结 果

2.1 UB P14 促进高光下花青素的合成与积累

为探究在高光条件下拟南芥 UB P14 基因的表达模式, 我们采用正常生长 14 d 的 Col-0 进行实验, 将对照组置于普通培养箱继续培养, 实验组转入高光培养箱进行诱导处理, 分别于 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 取样。通过 RT-qPCR 检测拟南芥材料中 UB P14 的表达情况, 发现对照组中 UB P14 的基因表达水平无明显变化, 实验组中 UB P14 的基因表达量在高光诱导后逐渐升高, 在处理 1 h 后基因表达量开始明显提升, 并在 6 h 时达到峰值, 随后逐渐下降, 但表达水平依旧高于对照组 (图 1a), 说明 UB P14 受高光诱导。

为进一步探究 UB P14 对花青素积累的影响, 我们将 *da3-1*、Col-0 和 35S::HA-Flag-UB P14 材料进行对照和高光条件培养。发现对照组的三种拟南芥材料均能够正常生长, 没有积累花青素, 高光处理的实验组中, *da3-1* 幼苗几乎没有出现花青素积累, 而 Col-0 和 35S::HA-FLAG-UB P14 幼苗均有花青素积累且 35S::HA-FLAG-UB P14 显著高于 Col-0 (图 1b)。为了比较不同材料中的花青素含量, 我们提取了上述实验组和对照组 *da3-1*、Col-0 和 35S::HA-FLAG-UB P14 的花青素, 通过酶标仪检测样品在 530 nm 和 657 nm 处的吸光值, 利用公式计算得出植物的花青素含量, 结果与表型一致 (图 1c), 说明 UB P14 影响了高光诱导的拟南芥花青素积累。

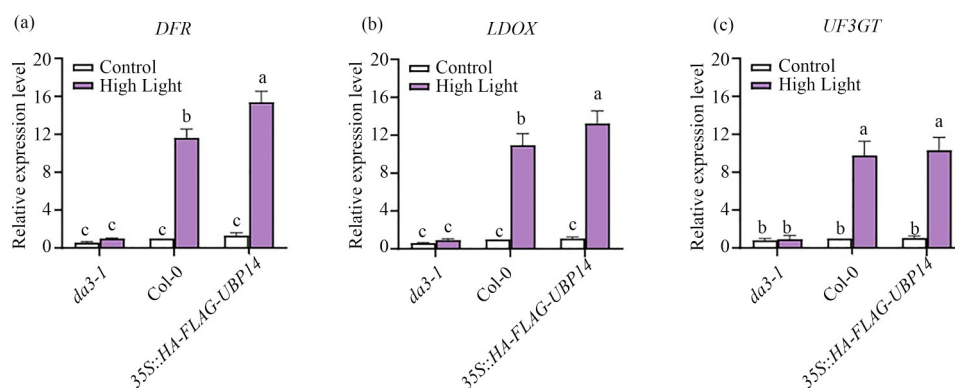
接着我们通过 RT-qPCR 实验检测了上述实验组与对照组材料中花青素晚期生物合成基因 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的转录水平。与正常条件相比, 高光处理后, *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的表达水平在 *da3-1* 材料中无明显变化, 而在 Col-0 和 35S::HA-FLAG-UB P14 材料中显著提升, 并且 *DFR* 和 *LDOX* 的基因表达量在 35S::HA-FLAG-UB P14 中显著高于 Col-0 (图 2)。



(a)提取 14 d 拟南芥 Col-0 幼苗分别在普通培养箱和强光培养箱中处理 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后的植物总 RNA 并反转录得到 cDNA,用 RT-qPCR 检测 *UBP14* 的转录水平。设定 0 h 对照样本内的 *UBP14* 转录本水平为基准值 1,所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差±SD。采用独立样本 t 检验对数据进行显著性检验,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;(b)拟南芥 *da3-1*、Col-0 和 *35S::HA-FLAG-UBP14* 在 1/2MS 固体培养基上分别置于普通培养箱和强光培养箱培养 21 d 的表型,比例尺设定为 5 mm;(c)图(b)中拟南芥花青素含量的定量分析。FW 代表鲜重,所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差±SD。图中 a、b、c、d 为基于双因素方差分析(ANOVA)结合最小显著差异法(LSD)的显著性标记($P<0.05$),不同字母表示组间差异显著,相同字母则差异不显著。下同。

图 1 UBP14 参与高光诱导的花青素积累

Fig. 1 UBP14 participates in anthocyanin accumulation triggered by high light



(a)(b)和(c)为拟南芥 *da3-1*、Col-0 和 *35S::HA-FLAG-UBP14* 在高光处理 3 wk 后 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的转录水平。以 *ACTIN8* 基因的表达水平为内参标准,以 Col-0 对照组表达数据作为参考标准,定标为 1。所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差±SD。分析结果以不同小写字母标记(同图 1)。

图 2 花青素晚期合成基因表达水平

Fig. 2 Expression levels of anthocyanin late biosynthesis genes

2.2 UBP14 与花青素合成关键转录因子 MYB75 相互作用

为了探明 UBP14 在拟南芥花青素合成途径中的调控机制,本研究首先采用酵母双杂交实验对与花青素合成代谢相关的基因进行了系统性筛选。实验结果表明,花青素合成途径的关键转录因子 MYB75 与 UBP14 存在特异性相互作用(图 3a);于是我们构建了 UBP14-nYFP 和 MYB75-cYFP 载体,利用双分子荧光互补实验检验 MYB75 和 UBP14 是否能够在体内相互作用,结果表明,只有当 UBP14-nYFP 和 MYB75-cYFP 共表达的时候才能检测到 YFP 荧光信号(图 3b);为了进一步确认 UBP14 和 MYB75 之间的相互作用,我们进行了 Pull-down 实验,利用 His-UBP14 beads 下拉 MBP-MYB75 蛋白和 MBP 标签蛋白,结果显示,His-

UBP14 可以与 MBP-MYB75 相互作用,无法与 MBP 蛋白发生相互作用(图 3 c);最后,我们将构建好的 GFP-MYB75 和 HA-Flag-UBP14 载体转入农杆菌 GV3101 感受态,注射烟草进行瞬时表达,2 d 后采集烟草叶片,用于蛋白质免疫共沉淀分析。结果表明,UBP14 能够在体内与 MYB75 发生相互作用(图 3d)。上述分析表明,无论是在体内还是体外,UBP14 与 MYB75 之间均存在相互作用。

2.3 UBP14 增强 MYB75 对花青素晚期结构基因的结合能力

我们进一步探究 UBP14 是否影响 MYB75 对下游基因的结合能力。先前的研究发现 MYB75 的关键结合基序是一个 7 bp 的 MYB 识别序列(MYB-recognizing element, MRE): ANCNNCC。于是我们对 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的启动子序列

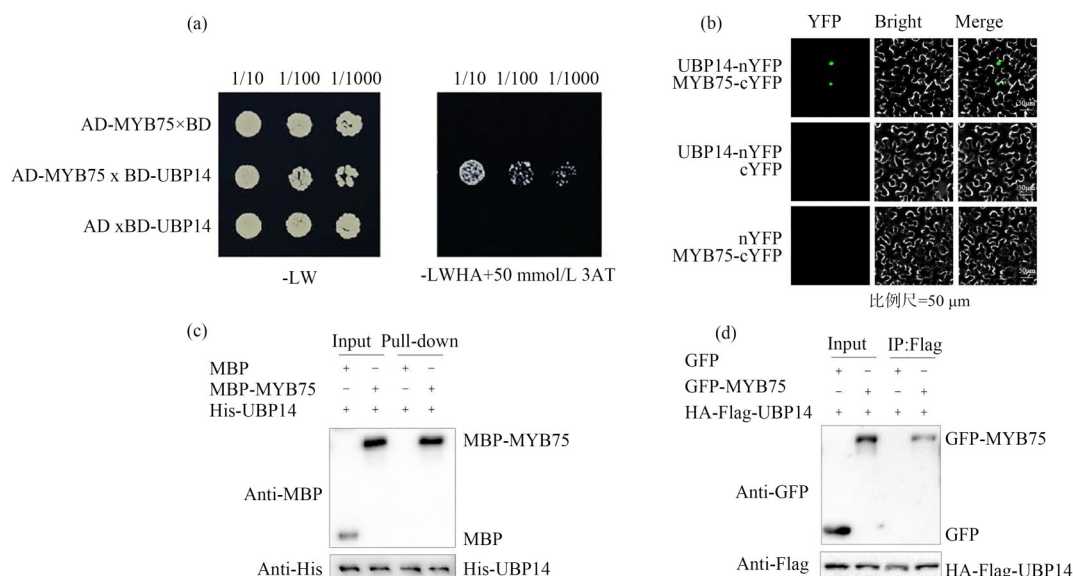


图 3 UB14 和 MYB75 相互作用

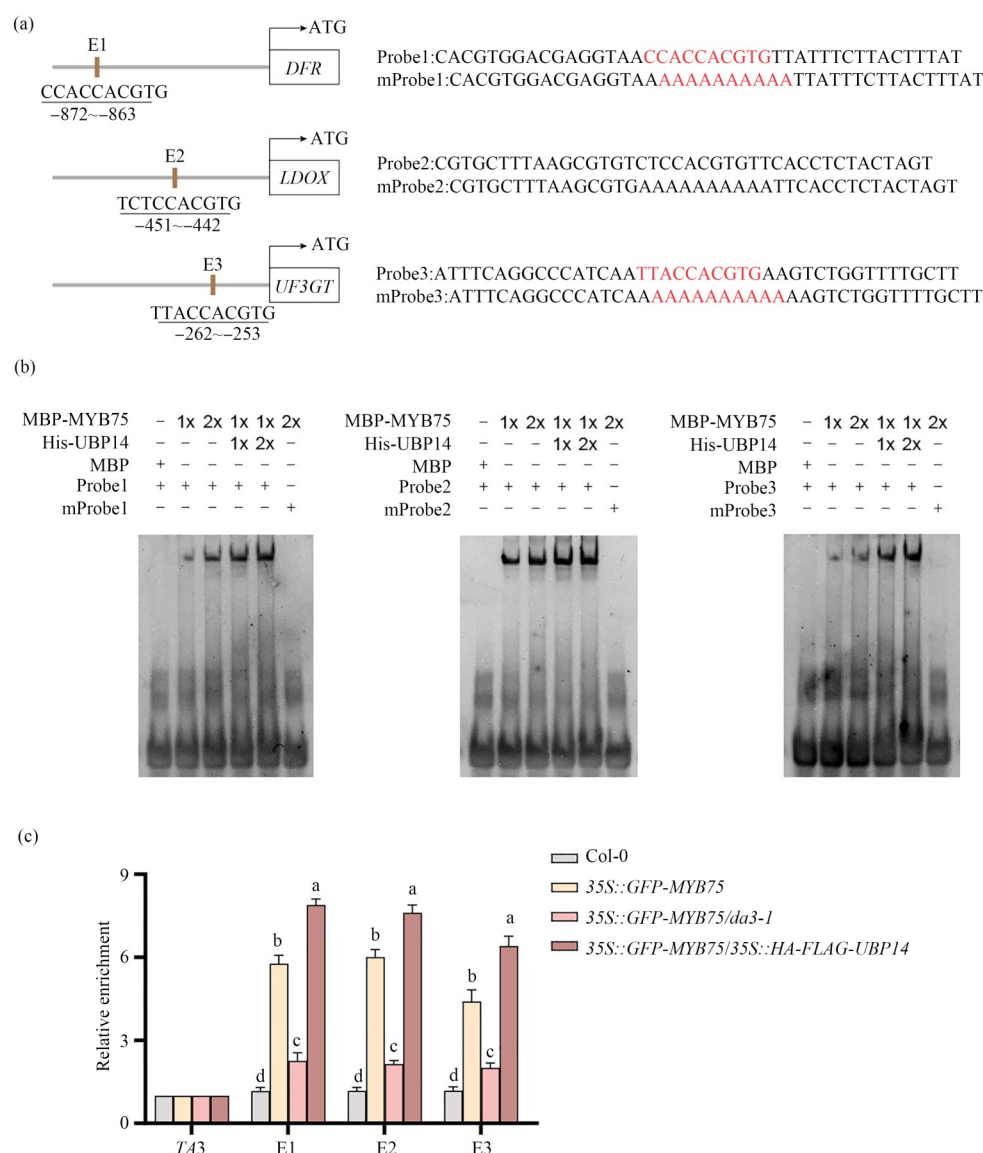
Fig. 3 UB14 interact with MYB75

进行了分析,分别在每个基因的启动子序列中选择一个MRE作为潜在结合位点,命名为E1、E2、E3,标注在对应的启动子序列上(图4a)。设计DNA探针,进行凝胶电泳迁移率实验。结果表明,加入His-UBP14重组蛋白能够增强MYB75对 DFR 、 $LDOX$ 和 $UF3GT$ 启动子的结合能力,且这一增强效果强于单独加入2×的MBP-MYB75重组蛋白(图4b)。

为了进一步证实UBP14对MYB75对下游基因启动子结合能力的影响,将Col-0作为对照组,采用染色质免疫共沉淀技术检测 $35S::GFP-MYB75$ 、 $35S::GFP-MYB75/da3-1$ 和 $35S::GFP-MYB75/35S::HA-FLAG-UBP14$ 转基因材料中MYB75对 DFR 、 $LDOX$ 和 $UF3GT$ 启动子的结合能力,实验数据表明,与 $35S::GFP-MYB75$ 材料中MYB75对 DFR 、 $LDOX$ 和 $UF3GT$ 启动子的结合能力相比,在 $35S::GFP-MYB75/35S::HA-FLAG-UBP14$ 材料中,MYB75对这些基因启动子的结合能力显著提升,而在 $35S::GFP-MYB75/da3-1$ 材料中,MYB75对这些基因启动子的结合较少(图4c)。基于上述实验结果可以得出结论:UBP14增强MYB75与下游基因启动子的结合能力。

2.4 UB14提高MYB75蛋白稳定性

为了探究UBP14对MYB75蛋白稳定性的影响,我们进行了无细胞(Cell-free)蛋白降解实验。利用Degradation Buffer提取10 d龄拟南芥 $da3-1$ 、Col-0和 $35S::HA-FLAG-UBP14$ 材料的植物总蛋白,加入MBP-MYB75重组蛋白,对照组中加26 S蛋白酶体抑制剂MG132,实验组中加DMSO,于30 °C共孵育0 min、30 min、60 min和90 min后取样,利用Western Blot检测。结果显示,在实验组(-MG132)中,MBP-MYB75能够在90 min内出现明显的降解趋势,而在对照组(+MG132)中降解趋势较为缓慢。MBP-MYB75在 $da3-1$ 中降解速率最快,在Col-0中降解速率显著慢于 $da3-1$,在 $35S::HA-FLAG-UBP14$ 中降解速率最慢(图5a、b),说明UBP14能够抑制MYB75的降解。为了进一步验证这一观点,我们将10 d龄的 $35S::GFP-MYB75$ 和 $35S::GFP-MYB75/da3-1$ 拟南芥幼苗用不同组合进行处理:蛋白质翻译抑制剂放线菌酮(Cycloheximide, CHX)与DMSO、CHX与MG132,浸泡处理0 h、1 h和2 h后取样,提取植物材料总蛋白,用GFP抗体检测。结果显示,使用CHX+DMSO处理后,MYB75蛋白在2 h内出现了明显降解趋势,且MYB75蛋白在 $35S::GFP-$



(a) *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的启动子序列示意图, 分别标注出 MYB75 的潜在结合位点序列及位置; (b) 凝胶电泳迁移率实验。Probe 为实验探针序列, mProbe 为将潜在结合位点突变为 A 的突变探针序列; (c) 染色质免疫共沉淀实验。TA3 作为内参基因, 所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差 ± SD。分析结果以不同小写字母标记(同图 1)。

图 4 UBPI4 提升 MYB75 结合下游基因的能力

Fig. 4 UBPI4 enhances the ability of MYB75 to bind to downstream genes

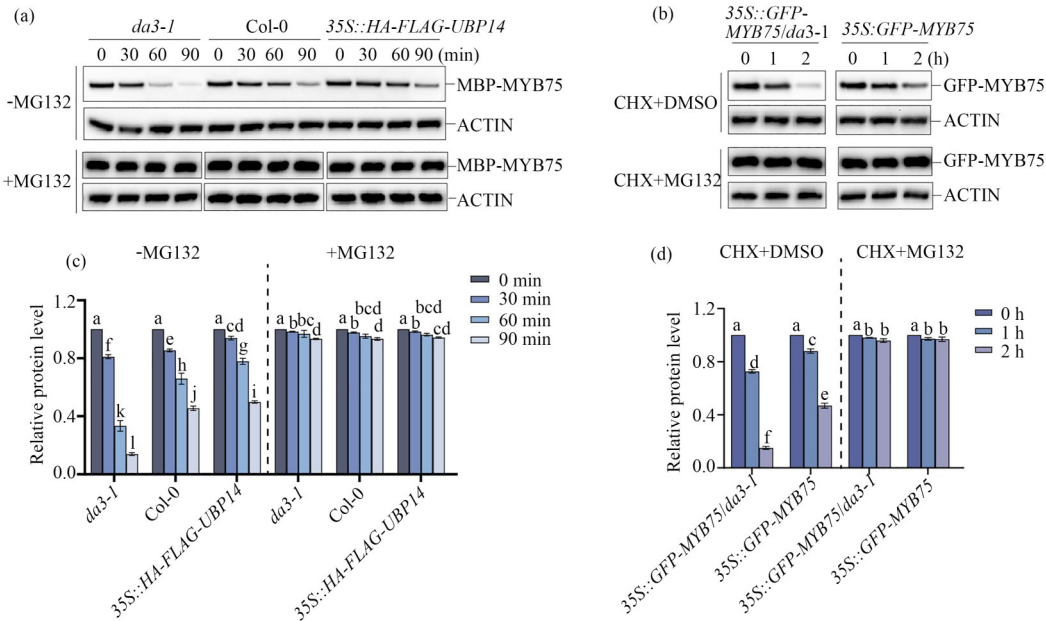
MYB75/da3-1 中的降解速率显著快于 *35S::GFP-MYB75*。在用 CHX+MG132 处理后的两种植物材料中, MYB75 蛋白的降解程度极低(图 5c, d)。以上这两个实验结果说明 UBPI4 能够提高 MYB75 的蛋白稳定性, 并且这一过程是由蛋白酶降解途径所介导的。

2.5 UBPI4 是 MYB75 调控花青素合成的重要因子

基于以上研究结果, 我们认为 UBPI4 可能在 MYB75 调控拟南芥花青素生物合成上发挥重要

作用, 因此, 我们进一步探究了 UBPI4 和 MYB75 在遗传上的关系。我们将转基因材料 *35S::GFP-MYB75*、*35S::GFP-MYB75/da3-1* 和 *da3-1*、Col-0 分别置于普通培养箱和强光培养箱中进行培养, 1 wk 后取样进行 RT-qPCR, 检测 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的表达情况。结果显示, 与对照组相比, 在强光处理后, *da3-1* 和 *35S::GFP-MYB75/da3-1* 中这三个基因的表达水平无明显变化, 且这些基因在 *da3-1* 和 *35S::GFP-MYB75/da3-1* 的表达量无明显差异(图 6)。这一结果表明, 在 UBPI4 缺失

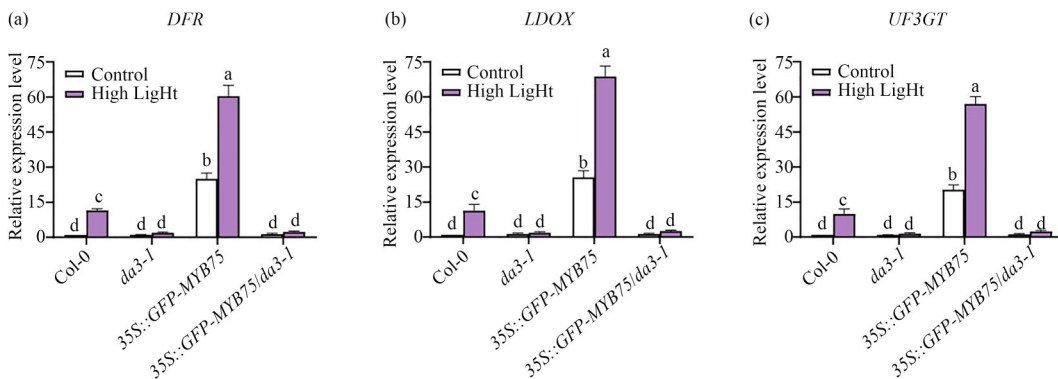
的情况下,即使过表达MYB75也无法正常诱导花青素的合成,说明了UBP14对于MYB75调控花青素合成是至关重要的。



(a)Cell-free 蛋白降解实验:实验组用DMSO处理,对照组中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ MG132,以植物总蛋白提取物中的 β -ACTIN 作为内参;(b)体内 MYB75 蛋白降解实验:将 10 d 龄的拟南芥幼苗用 1 mmol/L CHX+DMSO 和 1 mmol/L CHX+50 $\mu\text{mol/L}$ MG132 处理不同时间后取样,以植物总蛋白提取物中的 β -ACTIN 作为内参;(c)和(d)为图(a)和(b)的定量分析:以 0 min 的蛋白表达水平作为基准值 1,所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差 $\pm$ SD。分析结果以不同小写字母标记(同图 1)。

图 5 UB P14 增强 MYB75 蛋白稳定性

Fig. 5 UB P14 enhances the protein stability of MYB75



(a)(b)和(c)为拟南芥 *da3-1*、Col-0、35S::GFP-MYB75、35S::GFP-MYB75/*da3-1* 在高光处理 1 wk 后 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的转录水平。以 *ACTIN8* 基因的表达水平为内参标准,以 Col-0 对照组表达数据作为参考标准,定标为 1。所有误差棒均代表基于三组生物学重复测算出的标准差 $\pm$ SD。分析结果以不同小写字母标记(同图 1)。

图 6 UB P14 的缺失影响 MYB75 表达

Fig. 6 The absence of UB P14 affects the expression of MYB75

3 讨 论

温室效应持续加剧所驱动的全球气候变化,已导致光照强度及其光谱特性的显著改变,对植物的正常生长发育构成严峻挑战。作为适应性响应,强光可诱导植物叶片中花青素的特异性积累,

进而呈现红紫色生理表型^[24],该现象被视为植物适应性防御机制的重要组成部分,此类次生代谢产物在多重逆境下发挥广谱保护功能^[9]。本研究发现,UBP14 受高光诱导表达,且正向调控花青素的合成与积累。UBP14 作为去泛素化酶,能调控拟南芥光形态发生^[27]、细胞生长^[28]、侧根形成^[29]及

缺磷条件下根毛的发育^[30]等,本研究将 UBP14 的功能拓展至花青素次生代谢领域,进一步丰富了去泛素化酶在植物逆境响应中的调控网络。

由于花青素生物合成途径中关键结构基因的表达受到 MBW 复合体调控^[11],我们进一步探究 UBP14 与 MBW 关键组分基因 *MYB75*、*TT8* 和 *TTG1* 的关系,确定了 UBP14 与 MYB75 在植物体内存在相互作用。MYB75 作为转录因子,能够靶向结合启动子,通常作为花青素合成转录级联的开关^[12]。为解析其调控网络,我们进一步确认了 UBP14 可以显著提高 MYB75 对于花青素晚期生物合成基因启动子区域的结合能力。UBP14 缺失并未完全消除 MYB75 与靶基因启动子的结合能力,提示植物体内可能存在功能冗余的上游调控因子,能够部分补偿 UBP14 缺失所致的调控缺失,从而维持 MYB75 基础的 DNA 结合活性。

目前对于 MYB75 的表达调控研究较少,已知 MYB75 会在光形态建成时期受到 HY5 的转录激活^[31];植物在正常生长时 MYB30 会抑制 MYB75 转录,阻碍 MBW 复合体组装,维持 MYB75 较低的表达水平^[32]。现有证据表明,MYB75 的翻译后修饰以 MPK 激酶的磷酸化^[33]和 SIZ1 连接酶的 SUMO 化^[25]为主,在特定胁迫条件下增强 MYB75 蛋白稳定性,从而维持花青素合成的正常输出。然而,关于 MYB75 的泛素化和去泛素化及其生物学意义尚不清楚。鉴于 UBP14 作为去泛素化酶,我们确认了 UBP14 能够抑制 MYB75 蛋白的降解,并且这一过程是由 26S 泛素-蛋白酶体降解系统所介导的。UBP14 增强 MYB75 对下游靶基因的结合能力,又维持 MYB75 的蛋白水平,这提示 UBP14 可能通过诱导 MYB75 的积累增强其与下游基因启动子的结合。UBP14 作为去泛素化酶,其与 MYB75 的蛋白互作提示了 MYB75 的泛素化-去泛素化动态平衡在调控其蛋白稳态中的潜在重要性。MYB75 在高光下维持较高的转录活性以抵抗逆境,而在正常条件下保持较低的水平对于植物的生长发育起关键作用,因此,系统鉴定并验证靶向 MYB75 的 E3 泛素连接酶,对于植物生长-防御平衡的分子调控网络机制研究具有重要参考价值。

综上所述,本研究阐明了 UBP14 通过稳定 MYB75 蛋白并增强其与下游靶基因的结合能力,从而促进高光胁迫下花青素积累的分子机制。这

一发现不仅拓展了 UBP14 的生物学功能,也为耐高光作物育种提供了理论依据和潜在基因靶点。未来可通过鉴定 UBP14 对 MYB75 的特异性去泛素化位点,以及筛选 MYB75 的 E3 泛素连接酶,进一步阐明植物在高光或其他非生物胁迫下花青素积累的具体分子机制。

参考文献:

- [1] Lotkowska M E, Tohge T, Fernie A R, *et al.* The Arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1862-1880.
- [2] Demmig-Adams B, Adams W W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 599-626.
- [3] Xing M, Xin P, Wang Y, *et al.* A negative feedback regulatory module comprising R3-MYB repressor MYBL2 and R2R3-MYB activator PAP1 fine-tunes high light-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2024, 75(22): 7381-7400.
- [4] Yoshida K. Chemical and biological study of flavonoid-related plant pigment: current findings and beyond [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2024, 88(7): 705-718.
- [5] Pan F, Liu Y, Liu J, *et al.* Stability of blueberry anthocyanin, anthocyanidin and pyranoanthocyanidin pigments and their inhibitory effects and mechanisms in human cervical cancer HeLa cells [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(19): 10842-10853.
- [6] Ford C M, Boss P K, Høj P B. Cloning and characterization of vitis vinifera UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(15): 9224-9233.
- [7] Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071.
- [8] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 63-70.
- [9] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, *et al.* Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings [J]. *Plant J*, 2008, 53(5): 814-827.

- [10] Jiang W, Yin Q, Liu J, *et al.* The APETALA2 - MYBL2 module represses proanthocyanidin biosynthesis by affecting formation of the MBW complex in seeds of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Commun*, 2024, 5(3): 100777.
- [11] Guo Y, Li D, Liu T, *et al.* Genome-wide identification of PAP1 direct targets in regulating seed anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16049.
- [12] Wang Y, Zhou H, He Y, *et al.* MYB transcription factors and their roles in the male reproductive development of flowering plants [J]. *Plant Sci*, 2023, 335: 111811.
- [13] Ahmad Khan R, Abbas N. Role of epigenetic and post-translational modifications in anthocyanin biosynthesis: A review [J]. *Gene*, 2023, 887: 147694.
- [14] Kelsall I R. Non-lysine ubiquitylation: Doing things differently [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1008175.
- [15] Glickman M H, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.
- [16] Clague M J, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(7): 417-426.
- [17] Streich F C Jr, Lima C D. Structural and functional insights to ubiquitin-like protein conjugation [J]. *Annu Rev Biophys*, 2014, 43: 357-379.
- [18] Isono E, Kalinowska K. ESCRT-dependent degradation of ubiquitylated plasma membrane proteins in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 40: 49-55.
- [19] Swatek K N, Komander D. Ubiquitin modifications [J]. *Cell Res*, 2016, 26(4): 399-422.
- [20] Isono E, Nagel M-K. Deubiquitylating enzymes and their emerging role in plant biology [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 56.
- [21] Hermanns T, Pichlo C, Baumann U, *et al.* A structural basis for the diverse linkage specificities within the ZUFSP deubiquitinase family [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 401.
- [22] Skelly M J. The emerging roles of deubiquitinases in plant proteostasis [J]. *Essays Biochem*, 2022, 66(2): 147-154.
- [23] Clague M J, Urbé S, Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6): 338-352.
- [24] Jezek M, Allan A C, Jones J J, *et al.* Why do plants blush when they are hungry [J]. *New Phytol*, 2023, 239(2): 494-505.
- [25] Zheng T, Li Y, Lei W, *et al.* SUMO E3 Ligase SIZ1 stabilizes MYB75 to regulate anthocyanin accumulation under high light conditions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Sci*, 2020, 292: 110355.
- [26] Zhao Y, Wei F, Lao J, *et al.* Redox regulation of the transcription factor HAT1 limits basal defenses and promotes responses to infection in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Sci Signal*, 2026, 19(929): eaea8478.
- [27] Fang K, Yao X, Tian Y A, *et al.* Ubiquitin-specific protease UBP14 stabilizes HY5 by deubiquitination to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(33): e2404883121.
- [28] Xu Y X, Jin W H, Li N, *et al.* UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 14 interacts with ULTRAVIOLET-B INSENSITIVE 4 to regulate endoreduplication and cell and organ growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1200-1214.
- [29] Peng Y, Jiang S, Wang J, *et al.* Control of lateral root initiation by DA3 in *Arabidopsis* [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(1): 111913.
- [30] Li W F, Perry P J, Prafulla N N, *et al.* Ubiquitin-specific protease 14 (UBP14) is involved in root responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(1): 212-223.
- [31] Shin D H, Choi M, Kim K, *et al.* HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(10): 1543-1547.
- [32] Zhou H, He J, Zhang Y, *et al.* RHA2b-mediated MYB30 degradation facilitates MYB75-regulated, sucrose-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Commun*, 2024, 5(3): 100744.
- [33] Li S, Wang W, Gao J, *et al.* MYB75 phosphorylation by MPK4 is required for light-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(11): 2866-2883.

(责任编辑: 白林含)