

doi:10.11983/CBB25166

# ApWRKY33 调控 ApDFR 基因表达影响红枫叶色变化的机制解析

张军<sup>1</sup>, 金小军<sup>1</sup>, 方彬<sup>3</sup>, 金松恒<sup>2</sup>, 董彬<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> 同创工程设计有限公司, 绍兴 312000; <sup>2</sup> 浙江农林大学暨阳学院, 诸暨 311800; <sup>3</sup> 浙江农林大学风景园林与建筑学院, 杭州 311300

**摘要** 红枫(*Acer palmatum*)是重要的彩叶植物, 常用于城镇绿化。光照是影响花青素合成的重要环境因子之一, 明确光照对红枫叶色的影响对其育种具有重要意义。通过自然条件调查和人工遮光处理, 发现遮光后红枫的叶片变绿, 花青素含量显著下降。转录组测序和荧光定量表达结果表明, 调控花青素合成通路基因(*ApC4H*、*ApCHS*、*ApF3'H*、*ApDFR* 和 *ApANS*)的表达显著下调; 同时, 鉴定出 8 个 WRKY 转录因子成员在遮光后也出现差异表达。通过酵母单杂交和双荧光素酶实验进一步发现, *ApWRKY33* 转录因子能够直接结合在 *ApDFR* 基因的启动子上, 抑制 *ApDFR* 基因的表达。实验证实 *ApWRKY33* 能够响应光照, 遮光后通过抑制 *ApDFR* 的表达进而限制了红枫叶片花青素的合成, 使叶色变绿。研究结果将为解析红枫叶色变化的分子机理以及分子育种提供理论依据。

**关键词** 彩叶植物, 红枫, 花青素, 基因调控

张军, 金小军, 方彬, 金松恒, 董彬 (2026). *ApWRKY33* 调控 *ApDFR* 基因表达影响红枫叶色变化的机制解析. 植物学报 61, 1–10.

彩叶植物因其叶色多变、色彩鲜明, 在城镇绿化中应用普遍并占据重要地位, 为城市环境美化提供了丰富的观赏和生态价值(孔杨勇, 2011; 车佳航等, 2024)。植物叶色的形成与多种色素的含量和比例相关, 其中花青素(anthocyanin)的积累是决定植物组织或器官红、紫等色调的核心因素(鲁迎青和祝志欣, 2016)。花青素属于黄酮类次生代谢产物, 由苯丙烷途径合成(Silva et al., 2017), 不仅参与抵抗紫外辐射和清除活性氧, 而且能够增强植物对低温、干旱等环境胁迫的适应能力(Pojer et al., 2013; Li and Ahammed, 2023)。花青素代谢受到遗传和环境的三重调控(胡可等, 2010)。环境因子中, 光照被认为是影响花青素合成或降解的关键因素之一(Ma et al., 2021)。充足的光照或特定光质通常能促进花青素生物合成, 增强叶片或果实的色泽(Ma et al., 2021); 而遮荫或低光条件则会导致花青素含量下降, 从而使原本鲜艳的叶片逐渐转为绿色(Lu et al., 2015)。但是不同物种对光照的反应表现各异, 这也是彩叶植物叶色多样性的重要分子基础。

花青素合成涉及一系列关键酶, 包括苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸羟化酶(cinnamate hydroxylase, C4H)、查尔酮合成酶(chalcone synthetase, CHS)、黄酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3'H)、二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)以及花青素合成酶(anthocyanin synthetase, ANS)等, 其中 DFR 和 ANS 在花青素合成过程中起决定作用(Sharma et al., 2024; 车佳航等, 2024)。除结构基因外, 转录因子在花青素合成过程中也发挥重要作用, 主要包括 MYB、bHLH 以及 WRKY 家族成员, 它们单独或协同其它转录因子调节结构基因的表达, 从而影响花青素积累(Lloyd et al., 2017; Saigo et al., 2020; Li et al., 2022)。在这些转录因子中, WRKY 家族因其广泛参与植物次生代谢与逆境响应而备受关注(Javed and Gao, 2023; Li et al., 2025)。WRKY 蛋白通过识别并结合靶基因启动子上的 W-box 元件发挥调控功能。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, WRKY33 能够直接结合 DFR 启动子并抑制其表达, 从而在特定条件下降低花青素的积累(Tao et al., 2024)。相反, 在梨(*Pyrus spp.*)中, PyWRKY26 能够与 MYB、bHLH 等转录因子形成复合物, 促进花青素合成相关基因的转录, 进而增强果实的红色表型(Li et al., 2020)。类似地, 在苹果(*Malus domestica*)中, MdWRKY71 在 5-氨基乙酰丙酸处理下被诱导表达, 进而激活花青素合成途径, 提高果实的着色程度(Zhang et al., 2025)。这说明 WRKY 因子在不同植物和不同环境下可能发挥不同的调控作用。

收稿日期: 2025-09-16; 接受日期: 2025-12-06

基金项目: 浙江农林大学科研发展基金(No.2017FR016)

\* 通讯作者。E-mail: dongbin@zafu.edu.cn

红枫(*Acer palmatum*)是典型的彩叶树种,以其红色或紫红色叶片而闻名,其叶色变化与花青素积累密切相关(黄可等, 2012)。然而,关于光照调控红枫花青素合成的分子机制仍不清楚。本研究以红枫为实验材料,探讨了遮光处理对其叶色及花青素含量的影响;与此同时,对遮光后花青素合成通路中 *ApC4H*、*ApCHS*、*ApF3H*、*ApDFR* 和 *ApANS* 等结构基因的转录水平进行了检测;还发现 WRKY 家族成员 *ApWRKY33* 在遮光条件下表达量显著升高,进一步的实验表明, *ApWRKY33* 可直接结合 *ApDFR* 基因的启动子,可能通过抑制 *ApDFR* 的表达负调控花青素合成。本研究揭示了光照通过转录因子 *ApWRKY33* 影响红枫叶片花青素代谢的分子机制。研究结果不仅为理解红枫叶色变化提供了新的实验证据,也为彩叶树种的分子育种提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红枫(*Acer palmatum* 'Atropurpureum')为槭树科(Sapindaceae)槭属(*Acer*)植物,是一种常见的彩叶树种,属于落叶小乔木或灌木。本研究材料均保存于浙江农林大学(120.1581°E, 30.2421°N)校园内,环境温度为 25±5℃。选取树形及长势一致(树高为 2–4 m,冠幅 3–6 m)、无病虫害的红枫 6 株。在 8–11 月,选取叶色鲜红、叶形完整的叶片 3–6 片,用锡纸进行遮光处理 30 天。设 3 次生物学重复。另外,采用手持光照强度仪(高森,德国)对荫蔽和空旷环境的光照强度进行测定,分别在树体周围测定 3 个点,3 次技术重复;同时使用鱼眼相机对红枫树冠进行拍照。

### 1.2 叶片色彩参数测定

在室内自然光散射光源下,使用英国皇家园艺比色卡(Royal Horticultural Society Color Chart, RHSCC)对遮光处理前后的叶片进行颜色鉴定。为了方便后续对叶片色彩的量化分析,按照国际照明委员会(International Commission on Illumination, CIE)统一规定的 CIEL\*a\*b\* 颜色空间系统,在 C/2°光源下,利用色差仪 CR400 (柯尼卡美能达,日本)对叶片的明度(L\*)、红绿度(a\*)和黄蓝度(b\*)进行测定。每个样品设 3–6 次技术重复,3 次生物学重复。

### 1.3 叶片色素显色反应

参照胡可等(2010)的方法测定色素类型。取 0.1 g 新鲜叶片,置于研钵中,缓慢加入液氮并进行充分研磨。之后将研磨的粉末分别加入到含有 5 mL 石油醚、10%盐酸和 30%氨水的 3 个玻璃试管中,充分混合后过滤,将过滤后的溶液滴在白色点样板上,观察其颜色并拍照记录。

### 1.4 叶绿素和类胡萝卜素含量测定

称 0.1 g 新鲜叶片,在液氮中将叶片研磨至粉末状,将粉末加入到含有 2 mL 95%乙醇的离心管,4℃过夜,期间多次颠倒混匀。粉末颜色变白后,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 分钟,分离上清液,取 200 μL 加入酶标板中,利用酶标仪分别在 663 nm 和 645 nm 处测定吸光值。用 95%乙醇作为空白对照。设 3 次生物学重复。叶绿素和类胡萝卜素含量计算公式如下:

$$\begin{aligned}\text{Chl a (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= 13.95A_{663} - 6.88A_{649} \\ \text{Chl b (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= 24.96A_{649} - 7.32A_{663} \\ \text{Car (mg}\cdot\text{L}^{-1}) &= (1\ 000A_{470} - 2.05A_{649} - 114.8A_{663})/245 \\ \text{Chl (mg}\cdot\text{g}^{-1}) &= (C\cdot V\cdot N)/1\ 000W\end{aligned}$$

式中,  $A_{663}$ 、 $A_{649}$  和  $A_{470}$  为萃取液在 663 nm、645 nm 和 470 nm 处的吸光值。 $\text{Chla}$ 、 $\text{Chlb}$ 、 $\text{Car}$  和  $\text{Chl}$  分别表示叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和总叶绿素的含量;  $C$  为色素浓度(mg),  $V$  为萃取液体积(mL),  $N$  为稀释倍数,  $W$  为嫩叶鲜重(g)。每个样品设 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

### 1.5 花青素含量测定

称 0.5 g 叶片,缓慢加入液氮的同时将样品研磨成粉末,加入 6 mL 提取试剂(甲醇:水:甲酸:三氟乙酸=70:27:2:1, v/v/v/v)中,4℃避光静置 24 小时。超声 30 分钟后,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 分钟,提取上清液,用 0.22 μm 有机系滤膜过滤,取 200 μL 加入酶标板中,利用紫外可见分光光度计测定提取液在 530 nm 与 657 nm 处的吸光值。花青素含量计算公式如下:

$$\text{花青素含量 } A_n = (A_{530} - 0.25A_{657})/M$$

式中,  $A_{530}$  和  $A_{657}$  为在 530 nm 和 657 nm 波长下的吸光值,  $M$  为样品质量(g)。每个样品设 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

### 1.6 RNA 提取及转录组测序

取 0.5 g 遮光处理和未遮光处理(对照)的叶片,使用 FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit 试剂盒(诺唯赞,南京)提取总 RNA。为确保 RNA 的质量,使用 2100 Bioanalyzer RNA Nano (Agilent, 美国)进行 RNA 质量检测,确保 RNA 的  $OD_{260/280} \geq 1.8$ , 浓度  $\geq 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。利用提取的 RNA 进行转录组文库构建,通过广州基迪奥生物科技有限公司的 DNBSEQ-T7 平台(华大,中国)进行测序。利用已发表的基因组(Chen et al., 2023)作为参考基因组,基因的表达量使用每千碱基外显子每百万映射读数(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, RPKM)进行计算和分析(Ye et al., 2025),差异基因通过  $|\log_2(\text{Ratio})| \geq 1$  和  $P \leq 0.001$  进行筛选。

### 1.7 基因表达定量分析

使用 HiScript IV All-in-One Ultra RT SuperMix for qPCR 试剂盒(诺唯赞,南京)逆转录合成 cDNA,使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(诺唯赞)进行基因表达检测。qRT-PCR 反应体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ ,包括 1.0  $\mu\text{L}$  cDNA 模板,5  $\mu\text{L}$  Taq Mix,上、下游引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ ,3.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序:95°C 预变性 5 分钟;95°C 变性 5 秒,60°C 退火 30 秒,72°C 延伸 30 秒,45 个循环。每组样品设置 3 个生物学重复。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算基因相对表达量。

### 1.8 酵母单杂交实验

通过 CTAB 法提取红枫叶片的 DNA,根据 *ApDFR* 基因的启动子序列设计引物,获得 *ApDFR* 基因 ATG 上游 800 bp 片段。将 *ApDFR* 启动子片段通过 *KpnI/SalI* 双酶切位点克隆至 pLacZi 诱饵载体。将 *ApWRKY33* 的 CDS 序列通过 *EcoRI/XhoI* 位点插入到已线性化的 pGADT7 载体中,获得 pGADT7-*ApWRKY33* 质粒。将上述重组载体共转化酵母菌株 EGY48 (Y1H 系统 YH3010, Coolaber 公司),通过在 SD/-Trp-Ura 培养基及 SD/-Trp-Ura+80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  X-Gal ( $\beta$ -半乳糖苷酶检测)培养基上进行筛选与分析,以 pHis2-*ApDFR*pro 和 pGADT7-GUS 的组合作为对照。

### 1.9 双荧光素酶实验

将 *ApWRKY33* 全长编码序列(不含终止密码子)通过 *NheI/XhoI* 双酶切位点连接到 pORE-R4 载体。同时,将 *AcUFGT* 基因起始密码子上游 1.2 kb 的启动子区段插入 pGreenII0800-LUC 的 *XhoI/BamHI* 位点。重组质粒转化至农杆菌 GV3101 (含 pSoup-p19 辅助质粒)后,将 *ProApDFR*-LUC 菌液( $OD_{600}=0.8$ )分别与 35S::*ApWRKY33*、Empty Vector 侵染液 1:1 (v/v)混匀,注射 4 周龄本氏烟草第 3-4 片叶。暗培养 24 小时后转移至光下继续培养 48 小时,使用多功能成像系统(FUSION-FX7, VILBER, 法国)采集荧光信号图像,并通过 GLOMAX 20 化学发光检测仪(Promega, 美国)计算 LUC/REN 比值。

### 1.10 数据分析

使用 SPSS Statistics 软件进行单因素方差检验。使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 遮光对红枫叶色表型的影响

研究表明,在自然环境下,遮光会显著影响红枫叶色的变化(图 1)。当红枫周围被高大的植物或建筑物遮挡时(光照强度为  $285.2 \pm 16$ ),其叶色逐渐变绿(图 1A);在空旷无遮挡环境下(光照强度为  $13392.0 \pm 1805.3$ ),红枫的叶色表现出鲜艳的红色(图 1B)。与无遮蔽相比,遮光后红枫叶片的明度  $L^*$  和黄蓝色度  $b^*$  显著上升,饱和度  $C^*$  和红绿度  $a^*$  显著下降(表 1)。为了模拟自然遮光对红枫叶色的影响,我们使用锡箔纸对完全未遮蔽的红枫叶片进行包裹遮光处理,发现红色叶片明显变绿(图 2A);根据 CIEL\*a\*b\* 颜色空间系统,遮光前和遮光后明显分别聚集在一起,与自然条件遮荫类似,遮光处理后饱和度  $C^*$  和红绿度  $a^*$  下降,明度  $L^*$  和黄蓝色度  $b^*$  上升(图 2B)。以上结果说明遮光能够显著影响红枫叶色的变化。



图 1 自然条件下不同遮蔽程度对红枫叶色的影响

(A) 周围乔木对红枫叶色的影响; (B) 无遮蔽条件下红枫叶色

Figure 1 Effects of different shading conditions on the leaf color of *Acer palmatum* under natural conditions (A) Influence of surrounding arbor trees on the leaf color of *A. palmatum*; (B) Leaf color of *A. palmatum* under non-shading conditions

表 1 遮光后红枫叶色指标变化

Table 1 Leaf color indexes of *Acer palmatum* under shading conditions

| Group          | Brightness $L^*$ | Saturation $C^*$ | Red-green degree $a^*$ | Yellow-blue degree $b^*$ |
|----------------|------------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| After shading  | $37.2 \pm 0.5$   | $20.8 \pm 0.3$   | $-5.2 \pm 2.0$         | $20.1 \pm 2.0$           |
| Before shading | $32.7 \pm 0.6$   | $30.4 \pm 0.5$   | $27.7 \pm 5.0$         | $12.6 \pm 2.0$           |

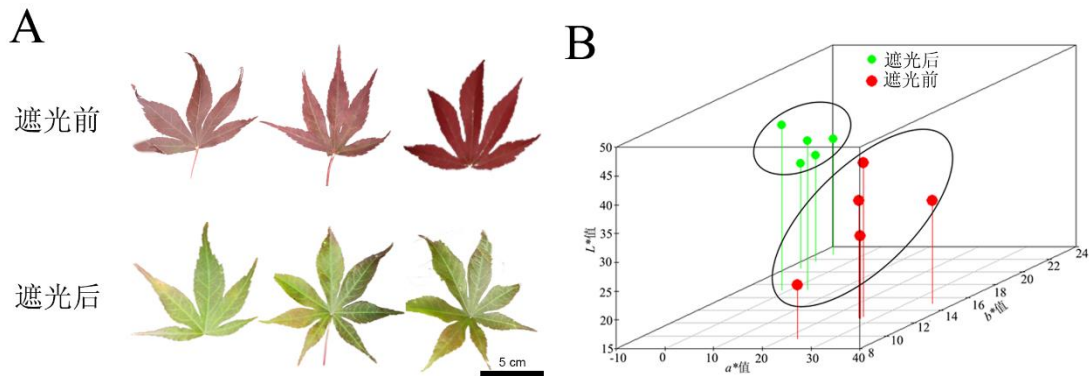


图 2 模拟遮光后红枫的叶色变化

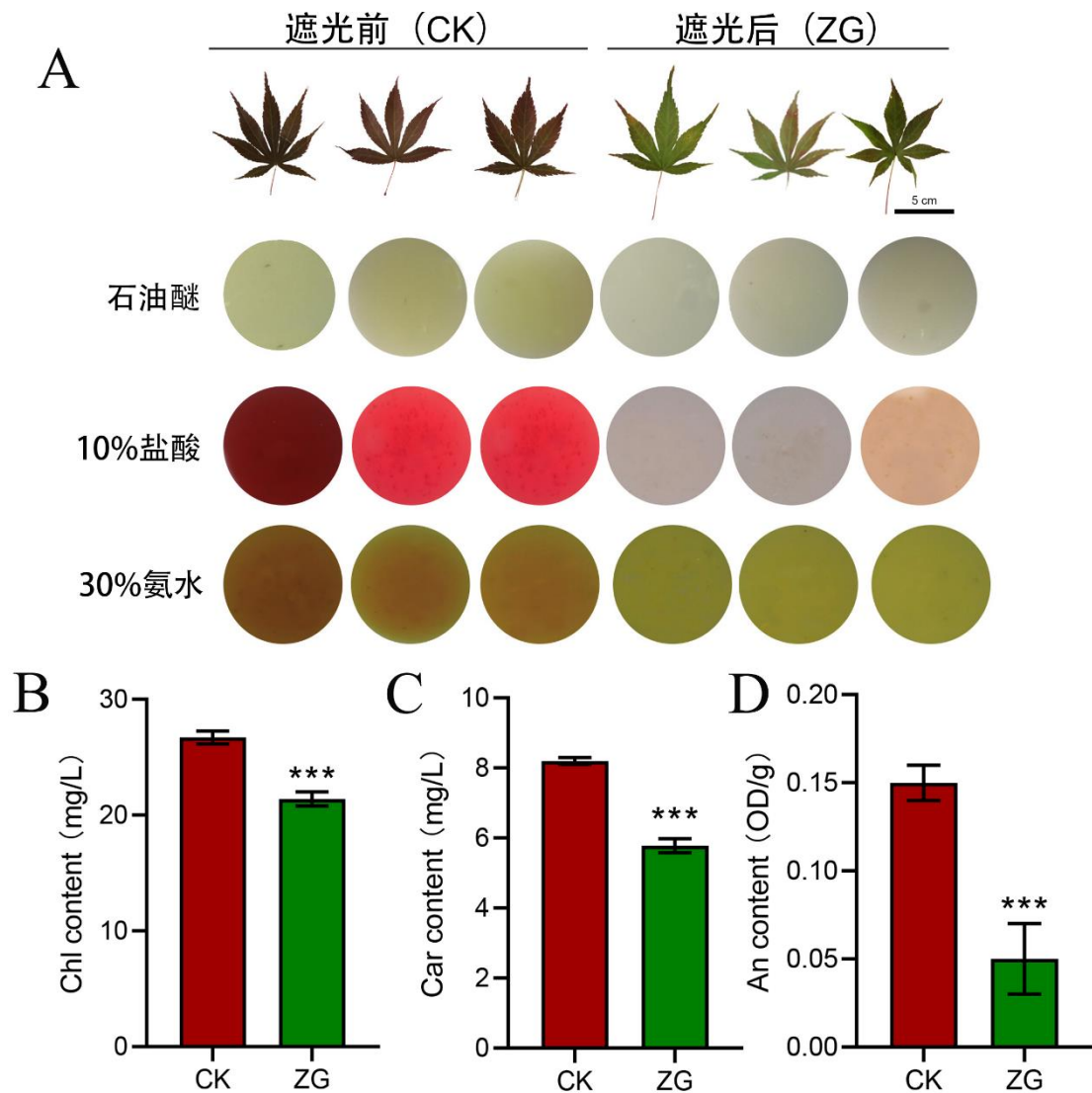
(A) 模拟遮光后红枫叶色表型; (B) 模拟遮光后红枫叶色指标变化

Figure 2 Changes of *Acer palmatum* leaf color after simulated shading

(A) Leaf color phenotype of *A. palmatum* after simulated shading; (B) Variation in leaf color indices of *A. palmatum* leaves after simulated shading

## 2.2 遮光对红枫叶片色素含量的影响

为了确定遮光前后叶片相关色素类型的变化,对遮光处理前后的叶片进行了显色反应。与遮光处理前相比,遮光处理后石油醚、10%盐酸和30%氨水的提取液颜色明显变淡,表明遮光降低了红枫叶片色素合成。盐酸提取液在遮光后退色程度最为明显,表明遮光明显降低了叶片中花青素含量(图 3A)。此外,叶片色素含量测定结果表明,与遮光处理前相比,遮光处理后叶绿素、类胡萝卜素和花青素含量均降低,其中叶绿素含量降低了 19.8% (图 3B),类胡萝卜素含量降低了 29.5% (图 3C),花青素含量降低了 66.7% (图 3D)。这说明遮光处理后的叶色变化主要由花青素含量降低所引起。



**图 3** 遮光前后红枫叶片的显色反应及色素含量变化

(A) 遮光前后红枫叶片的显色反应; (B)–(D) 遮光前后红枫叶片总叶绿素(B)、类胡萝卜素(C)以及花青素(D)含量的变化。\*\*\*表示处理间差异极显著( $P<0.001$ )

**Figure 3** Colorimetric response and pigment content changes in red maple leaves after shading (A) Colorimetric response of red maple leaves after shading; (B)–(D) Changes in total chlorophyll (B), carotenoid (C), and anthocyanin (D) contents in red maple leaves after shading. \*\*\* indicates extremely significant differences among treatments ( $P<0.001$ )

### 2.3 遮光对花青素合成基因以及 WRKY 基因的表达影响

为了探究影响红枫叶色变化的分子机理,我们对遮光处理后叶片进行转录组测序,共获得了 45 699 个基因,平均长度为 1 055 bp (图 4A),通过 $|\log_2(\text{Ratio})|\geq 1$ 和 $P\leq 0.001$ 分析获得上调表达基因 416 个,下调表达基因 655 个(图 B, C)。同时,对花青素合成通路基因的表达模式进行了分析。结果表明,与对照相比,花青素代谢通路基因 *ApC4H*、*ApCHS*、*ApF3'H*、*ApDFR* 和 *ApANS* 显著下调表达(

表),进一步证实遮光后红枫叶片花青素合成基因受到抑制,使花青素含量下降。此外,我们发现在 8 个差异表达的 WRKY 家族成员中(表),*ApWRKY33* 基因上调最为显著。定量表达进一步验证了这些基因在遮光处理后的表达变化,其结果与转录组测序结果一致(图 5)。

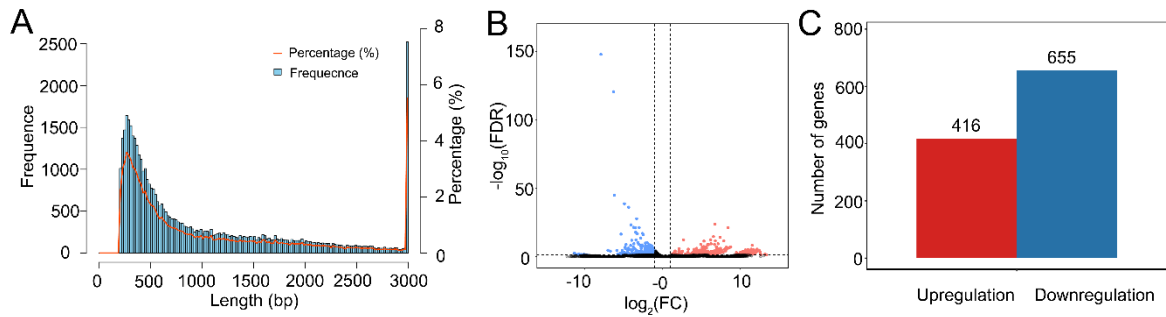


图 4 转录组测序情况

(A) 基因长度分布; (B) 差异表达基因的分布; (C) 上调和下调基因的数目

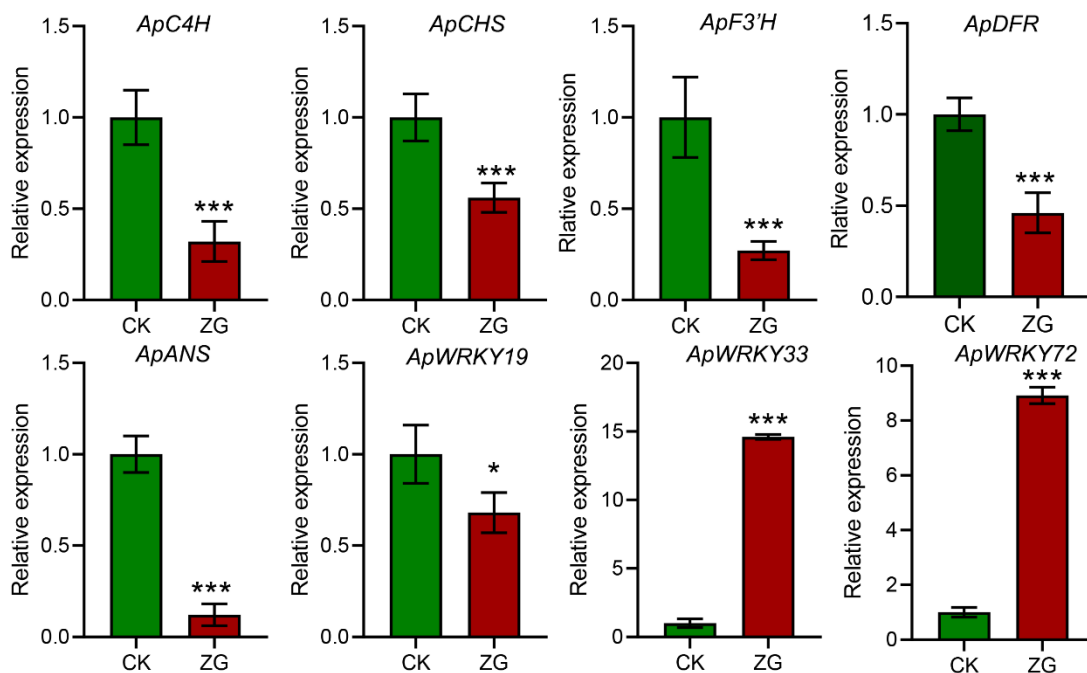
Figure 4 Transcriptome sequencing overview

(A) Gene length distribution; (B) Distribution of differentially expressed genes; (C) Numbers of upregulated and downregulated genes

表 2 遮光处理对花青素合成以及 WRKY 基因表达的影响

Table 2 Effects of shading treatment on anthocyanin biosynthesis and WRKY gene expression

| Gene name                    | Expression |         | Change fold | P-value   |
|------------------------------|------------|---------|-------------|-----------|
|                              | CK         | Shading |             |           |
| <b>Anthocyanin synthesis</b> |            |         |             |           |
| <i>ApC4H</i>                 | 1.38       | 0.70    | -1.0        | 9.00E-03  |
| <i>ApCHS</i>                 | 190.04     | 30.40   | -2.6        | 1.49E-04  |
| <i>ApF3'H</i>                | 83.79      | 37.12   | -1.2        | 1.25E-02  |
| <i>ApDFR</i>                 | 43.48      | 17.94   | -1.3        | 1.57E-02  |
| <i>ApANS</i>                 | 186.23     | 47.80   | -2.0        | 3.06E-02  |
| <b>WRKY family genes</b>     |            |         |             |           |
| <i>ApWRKY33</i>              | 0.17       | 1.18    | 2.8         | 5.12E-03  |
| <i>ApWRKY72</i>              | 3.04       | 14.58   | 2.3         | 1.15E-06  |
| <i>ApWRKY40</i>              | 8.82       | 20.20   | 1.2         | 6.79E-03  |
| <i>ApWRKY75</i>              | 6.56       | 13.79   | 1.2         | 7.17E-03  |
| <i>ApWRKY65</i>              | 16.96      | 35.23   | 1.1         | 1.61E-02  |
| <i>ApWRKY51</i>              | 10.14      | 20.63   | 1.0         | 1.49 E-02 |
| <i>ApWRKY19</i>              | 1.10       | 0.241   | -2.2        | 8.01E-03  |
| <i>ApWRKY50</i>              | 0.076      | 0.001   | -6.2        | 8.13E-03  |



**图 5** 遮光处理后花青素合成以及 WRKY 基因的定量表达分析

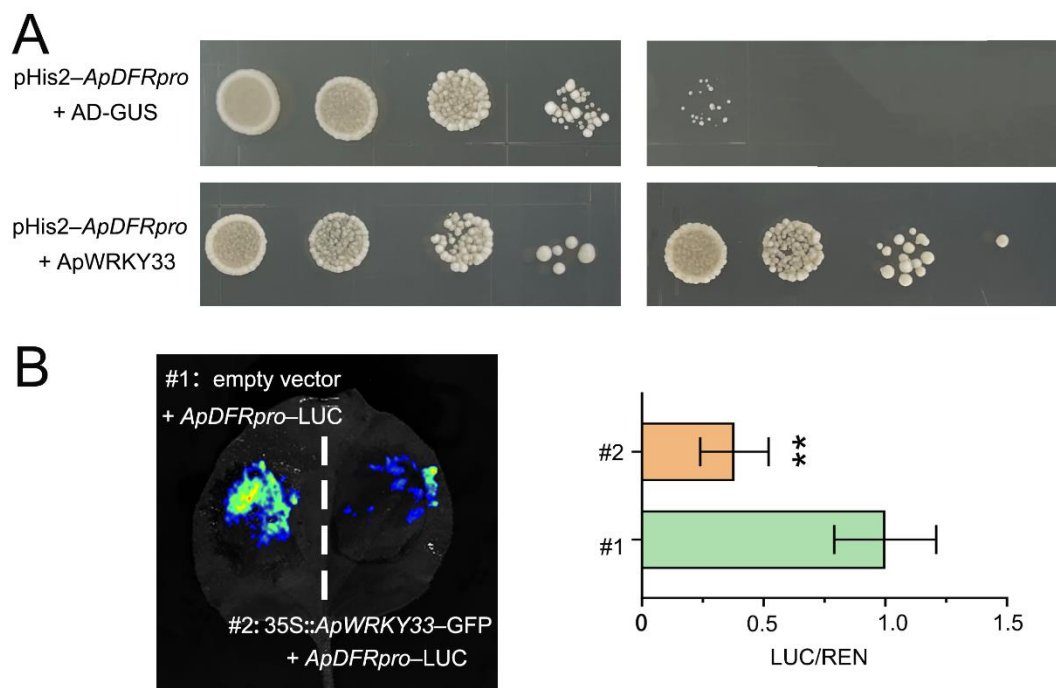
\*表示处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*\*表示处理间差异极显著( $P<0.001$ )。

**Figure 5** Quantitative analysis of anthocyanin biosynthesis and WRKY gene expression after shading treatment

\* indicates significant differences among treatments ( $P<0.05$ ). \*\*\* indicates extremely significant differences among treatments ( $P<0.001$ ).

#### 2.4 *AcWRKY33* 转录因子调控 *AcDFR* 基因的表达

为了进一步验证 *ApWRKY33* 对花青素合成基因的调控作用, 采用酵母单杂交和双荧光素酶进行验证(图 6)。酵母单杂交实验结果显示, 转化后的酵母细胞在不添加 3-AT 的 SD/-Trp-His-Leu 平板上正常生长; 当 3-AT 浓度为  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, *pHis2-*ApDFRpro** 与 AD-GUS 共转后的酵母细胞在 SD/-Trp-His-Leu 平板上生长受抑制, 但是 *pHis2-*ApDFRpro** 与 AD-*ApWRKY33* 共转后的酵母细胞则能够正常生长(图 6A)。双荧光素酶实验结果显示, 与对照组相比, *ApDFRpro-LUC* 与 *35S::ApWRKY33-GFP* 组合的荧光信号强度较低, 表现为抑制调控(图 6B)。因此, 我们认为 *ApWRKY33* 转录因子能够直接结合在 *ApDFR* 基因启动子上, 并抑制其表达。



**图 6** *ApWRKY33* 调控 *ApDFR* 基因的表达的酵母单杂(A)和双荧光素酶(B)分析

\*\*表示处理间差异显著( $P<0.01$ )。

**Figure 6** Yeast one-hybrid (A) and dual-luciferase (B) assays of *ApWRKY33* regulation of *ApDFR* gene expression.

\*\* indicates significant differences among treatments ( $P<0.01$ )

### 3 讨论

彩叶植物在园林绿化中应用普遍, 而叶色的形成与光照有着密切关系(张潇和汪莹, 2015)。本研究通过遮光实验结合分子检测手段, 揭示了光照影响红枫叶片花青素的合成, 并进一步确定了 *ApWRKY33* 对 *ApDFR* 基因的负调控作用。研究结果为理解红枫叶色转变以及彩叶植物的分子育种提供了依据。

在自然条件下, 我们发现在光照充足的地方, 红枫叶片鲜艳、亮红, 而被建筑、乔木遮蔽的区域, 叶片则明显偏绿(图 1)。实验结果显示, 遮光处理后, 红枫叶片花青素含量显著下降, 叶片红色逐渐褪去(图 2, 图 3)。这与苹果、葡萄(*Vitis vinifera*)等果实在低光条件下着色不足的表型高度一致(Guan et al., 2016; Mei et al., 2023)。由此推测, 红枫的花青素合成也依赖性于光照(Araguirang and Richter, 2022)。尽管遮光同时降低了叶绿素和类胡萝卜素的含量, 但花青素含量降幅最大(图 3), 这意味着光照可能直接调控花青素合成, 花青素含量的降低是叶色由红转绿的关键因素。转录组和 qRT-PCR 结果表明, 遮光显著下调了花青素

合成通路中的多个结构基因的表达(表 2; 图 5), 导致花青素含量降低。在花青素生物合成中, DFR 是控制二氢黄酮醇还原为花色苷的关键酶, 常被认为是影响花青素积累量的“限速因子”(Sharma et al., 2024)。因此, 红枫 *ApDFR* 表达量的下降, 与遮光后叶片花青素含量减少可能具有直接对应关系。另外, *ApC4H*、*ApCHS* 和 *ApF3'H* 等上游基因也出现下调表达, 这说明遮光影响了整个花青素代谢通路。

在模式植物拟南芥中, Tao et al (2024) 发现 *AtWRKY33* 是磷营养依赖性的调控花青素生物合成负调控因子, 磷饥饿使 *AtWRKY33* 蛋白水平下降, 从而减弱对 *DFR* 表达的抑制作用, 最终促使拟南芥中花青素的积累。在红枫中, 转录组测序和 qRT-PCR 结果显示, *ApWRKY33* 在遮光条件下显著上调表达(表 2; 图 5), 说明遮光促进了 *ApWRKY33* 基因的表达。同时, 酵母单杂交和双荧光素酶实验表明, *ApWRKY33* 能够结合在 *ApDFR* 启动子上并抑制其表达(图 6)。这表明在红枫中 *ApWRKY33* 负调控 *ApDFR* 的表达, 用于在光照不足时主动减少花青素合成。在弱光环境下, 植物的能量供应有限, 减少对花青素等非必需次生代谢产物的投入, 红枫很可能也采取了这种节能适应策略。这一策略与拟南芥 *AtWRKY33* 调控策略有一定的区别, 后者更多的是一种胁迫耐受性调控。另外, 在苹果和梨等果树中, 一些 *WRKY* 家族成员却表现为促进花青素合成的功能(Alabd et al., 2022; Xu et al., 2023; Bai et al., 2024)。这种差异说明 *WRKY* 家族成员在花青素调控中具有高度的功能分化, 不同成员甚至同一成员在不同物种、不同环境下可能表现不同的作用模式。因此, 我们推测, 在光照充足时, 红枫叶片中 *ApWRKY33* 表达水平较低, *ApDFR* 得以高效转录, 花青素大量积累, 使叶片呈现红色; 在遮光条件下, *ApWRKY33* 表达上调, 结合 *ApDFR* 启动子并抑制其转录, 导致花青素含量减少, 叶片转绿。

综上, 本研究揭示了 *ApWRKY33*-*ApDFR* 模块在红枫叶色调控中的作用, 未来可进一步解析光信号上游如何激活 *ApWRKY33*, 并利用 ChIP-seq 等技术在全基因组范围内鉴定其下游靶标, 以完善调控网络。通过蛋白互作研究, 可探明其功能特异性的分子基础。最终, 利用遗传转化体系在体内验证该模块功能, 并借助基因编辑等技术开展分子育种, 培育叶色性状稳定、观赏价值更高的彩叶新品种。

## 作者贡献声明

董彬, 金松恒: 构思并设计实验; 方彬: 完成实验, 分析数据并提供技术支持; 张军, 金小军: 完成实验, 撰写论文。

## 参考文献

- Alabd A, Ahmad M, Zhang X, Gao Y, Peng L, Zhang L, Ni J, Bai S, Teng Y (2022). Light-responsive transcription factor PpWRKY44 induces anthocyanin accumulation by regulating PpMYB10 expression in pear. *Hortic Res* **9**, uhac199.
- Araguirang GE, Richter AS (2022). Activation of anthocyanin biosynthesis in high light—what is the initial signal? *New Phytol* **236**, 2037–2043.
- Bai Y, Shi K, Shan D, Wang C, Yan T, Hu Z, Zheng X, Zhang T, Song H, Li R (2024). The WRKY17-WRKY50 complex modulates anthocyanin biosynthesis to improve drought tolerance in apple. *Plant Sci* **340**, 111965.
- Che JH, Li WN, Qin YZ, Chen JH (2024). Research progress of leaf color variation mechanism in woody plants. *Chin Bull Bot* **59**, 319–328. (in Chinese)
- 车佳航, 李纬楠, 秦英之, 陈金焕 (2024). 木本植物叶色变异机制研究进展. *植物学报* **59**, 319–329.
- Chen Z, Lu X, Zhu L, Afzal SF, Zhou J, Ma Q, Li Q, Chen J, Ren J (2023). Chromosomal-level genome and multi-omics dataset provides new insights into leaf pigmentation in *Acer palmatum*. *Inter J Biol Macromol* **227**, 93–104.
- Guan L, Dai Z, Wu BH, Wu J, Merlin I, Hilbert G, Renaud C, Gomès E, Edwards E, Li SH (2016). Anthocyanin biosynthesis is differentially regulated by light in the skin and flesh of white-fleshed and teinturier grape berries. *Planta* **243**, 23–41.
- Hu K, Han KT, Dai SL (2010). Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors. *Chin Bull Bot* **45**, 307–318. (in Chinese)
- 胡可, 韩科厅, 戴思兰 (2010). 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理. *植物学报* **45**, 307–318.
- Huang K, Wang XD, Liu YF, Liu M (2012). Leaf color changes in *Acer palmatum*

- 'Atropurpureum' and relations to pigment content. *J Zhejiang AF Univ* **29**, 734–738. (in Chinese)
- 黄可, 王小德, 柳翼飞, 刘猛 (2012). 红枫春季叶色变化与色素含量的相关性. *浙江农林大学学报* **29**, 734–738.
- Javed T, Gao SJ** (2023). WRKY transcription factors in plant defense. *Trend Genet* **39**, 787–801.
- Kong YY** (2011). Study on the species resource of acer in china and its landscape utilization. *Northern Hort* (14), 83–85. (in Chinese)
- 孔杨勇 (2011). 我国槭树属植物种质资源及其园林应用研究. *北方园艺* (14), 83–85.
- Li C, Wu J, Hu KD, Wei SW, Sun HY, Hu LY, Han Z, Yao GF, Zhang H** (2020). PyWRKY26 and PylHLH3 cotargeted the PyMYB114 promoter to regulate anthocyanin biosynthesis and transport in red-skinned pears. *Hortic Res* **7**.
- Li C, Yu W, Xu J, Lu X, Liu Y** (2022). Anthocyanin biosynthesis induced by MYB transcription factors in plants. *Inter J Mol Sci* **23**, 11701.
- Li Y, Li Z, Xu C, Wang Q** (2025). WRKYs as regulatory hubs of secondary metabolic network: diverse inducers and distinct responses. *Plant Commun*.
- Li Z, Ahammed GJ** (2023). Plant stress response and adaptation via anthocyanins: a review. *Plant Stress* **10**, 100230.
- Lloyd A, Brockman A, Aguirre L, Campbell A, Bean A, Cantero A, Gonzalez A** (2017). Advances in the MYB-bHLH-WD repeat (MBW) pigment regulatory model: addition of a WRKY factor and co-option of an anthocyanin MYB for betalain regulation. *Plant Cell Physiol* **58**, 1431–1441.
- Lu Y, Zhang M, Meng X, Wan H, Zhang J, Tian J, Hao S, Jin K, Yao Y** (2015). Photoperiod and shading regulate coloration and anthocyanin accumulation in the leaves of malus crabapples. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **121**, 619–632.
- Lu YQ, Zhu ZX** (2016). Plant color mutants and the anthocyanin pathway. *Chin Bull Bot* **51**, 107–119. (in Chinese)
- 鲁迎青, 祝志欣 (2016). 花青素代谢途径与植物颜色变异. *植物学报* **51**, 107–119.
- Ma Y, Ma X, Gao X, Wu W, Zhou B** (2021). Light induced regulation pathway of anthocyanin biosynthesis in plants. *Inter J Mol Sci* **22**, 11116.
- Mei Z, Li Z, Lu X, Zhang S, Liu W, Zou Q, Yu L, Fang H, Zhang Z, Mao Z** (2023). Supplementation of natural light duration promotes accumulation of sugar and anthocyanins in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit. *Environ Exp Bot* **205**, 105133.
- Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS** (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comp Rev Food Sci Food Safe* **12**, 483–508.
- Saigo T, Wang T, Watanabe M, Tohge T** (2020). Diversity of anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis in land plants. *Curr Opin Plant Biol* **55**, 93–99.
- Sharma H, Sharma P, Kumar A, Chawla N, Dhatt AS** (2024). Multifaceted regulation of anthocyanin biosynthesis in plants: a comprehensive review. *J Plant Growth Regul* **43**, 3048–3062.
- Silva S, Costa E, Calhau C, Morais R, Pintado M** (2017). Anthocyanin extraction from plant tissues: a review. *Critic Rev Food Sci Nutr* **57**, 3072–3083.
- Tao H, Gao F, Li L, He Y, Zhang X, Wang M, Wei J, Zhao Y, Zhang C, Wang Q** (2024). WRKY33 negatively regulates anthocyanin biosynthesis and cooperates with PHR1 to mediate acclimation to phosphate starvation. *Plant Commun* **5**, 100821.
- Xu PY, Xu L, Xu HF, He XW, He P, Chang YS, Wang S, Zheng WY, Wang CZ, Chen X, Li LG, Wang HB** (2023). MdWRKY40 is directly promotes anthocyanin accumulation and blocks MdMYB15L, the repressor of MdCBF2, which improves cold tolerance in apple. *J Integr Agric* **22**, 1704–1719.
- Ye Y, Lu X, Kong E, Wang Q, Shen L, Zhong S, Wang Y, Xiao Z, Deng J, Zhao H** (2025). OfWRKY17-OfC3H49 module responding to high ambient temperature delays flowering via inhibiting OfSOC1B expression in *Osmanthus fragrans*. *Hortic Res* **12**, uhae273.
- Zhang L, Tao H, Zhang J, An Y, Wang L** (2025). 5-aminolevulinic acid activates the MdWRKY71-MdMADS1 module to enhance anthocyanin biosynthesis in apple. *Mol Hort* **5**, 10.
- Zhang X, Wang Y** (2015). Research progress on the coloration mechanism of colorful

plants and influencing factors of anthocyanins. *J Sichuan Forest Sci Technol* **36**(1), 28–30. (in Chinese)

张潇, 汪莹 (2015). 彩叶植物呈色机理与影响花色素苷因素研究进展. 四川林业科技 **36**(1), 28–30.

## Mechanistic Analysis of ApWRKY33-mediated Regulation of *ApDFR* Expression in Leaf Color Variation of *Acer palmatum*

Jun Zhang<sup>1</sup>, Xiaojun Jin<sup>1</sup>, Bin Fang<sup>3</sup>, Songheng Jin<sup>2</sup>, Bin Dong<sup>3\*</sup>

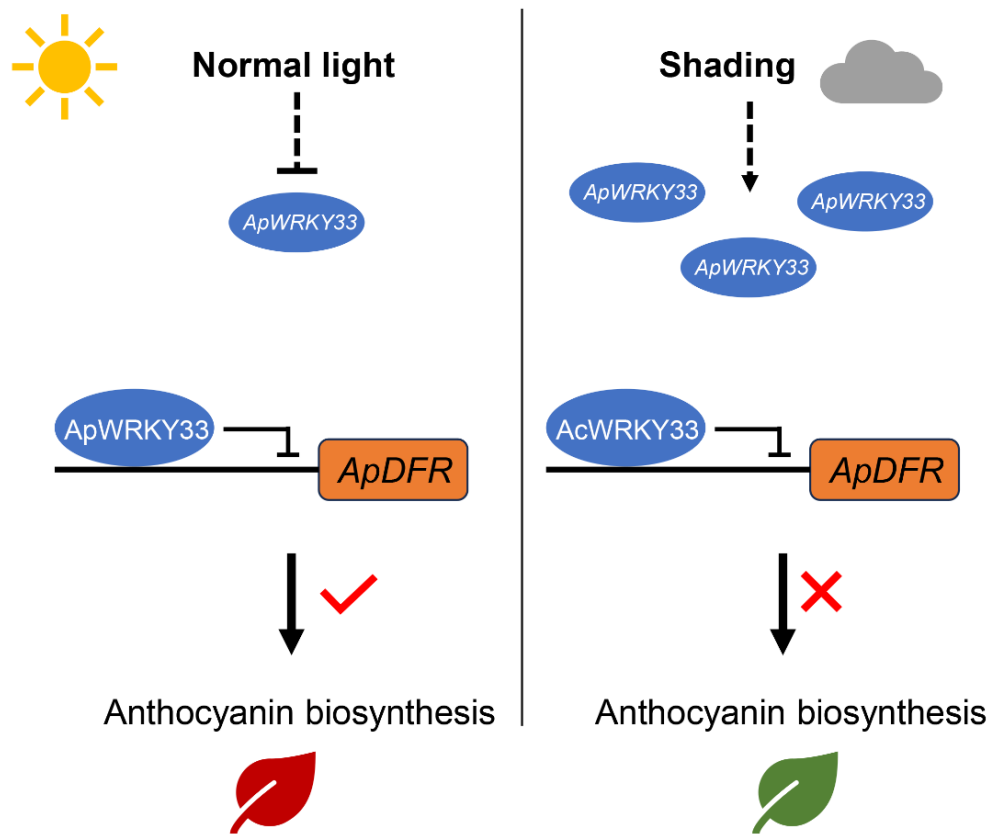
<sup>1</sup>Tongchuang Engineering Design Co., Ltd., Shaoxing 312000, China; <sup>2</sup>Jiyang College of Zhejiang A&F University, Zhuji 311800, China; <sup>3</sup>College of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

**INTRODUCTION:** The formation of plant leaf color is associated with the content and proportion of various pigments, among which the accumulation of anthocyanin serves as a key factor determining red, purple, and similar hues in plant tissues or organs. *Acer palmatum* is an important color-leafed plant widely used in urban landscaping. Clarifying the impact of light on the leaf color of red maple holds significant importance for its breeding.

**RATIONALE:** Anthocyanin metabolism is dually regulated by genetic and environmental factors. Among environmental factors, light is considered a key element influencing anthocyanin synthesis or degradation. Different plant species exhibit varying responses to light, which constitutes an important molecular basis for the diversity of leaf coloration in colored-leaf plants. Anthocyanin biosynthesis involves a series of key enzymes, and these structural genes are regulated by transcription factors, including WRKY. However, the regulatory functions of WRKY transcription factors vary significantly across different species.

**RESULTS:** Through field observations and shading treatments, it was observed that the leaves of *Acer palmatum* turned green after shading, with a significant decrease in anthocyanin content. Transcriptome sequencing and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) results indicated that the expression of key genes involved in the anthocyanin biosynthesis pathway (*ApC4H*, *ApCHS*, *ApF3'H*, *ApDFR*, and *ApANS*) was significantly downregulated. Concurrently, eight WRKY transcription factor members were identified as differentially expressed after shading. Further yeast one-hybrid and dual-luciferase assays demonstrated that the ApWRKY33 transcription factor can directly bind to the promoter of the *ApDFR* gene and inhibit its expression. The experiments confirmed that ApWRKY33 responds to light signals and represses anthocyanin biosynthesis by downregulating *ApDFR* under shading.

**CONCLUSION:** This study reveals the role of the ApWRKY33-*ApDFR* module in regulating leaf color in red maple. Future research should focus on elucidating how upstream light signals activate ApWRKY33 and employing techniques such as ChIP-seq to genome-wide identify its downstream targets, thereby refining the regulatory network. Protein interaction studies could help clarify the molecular basis of its functional specificity. Ultimately, the function of this module should be validated in vivo through genetic transformation systems, while molecular breeding techniques such as gene editing should be utilized to develop new cultivars of colored-leaf plants with stable leaf color traits and enhanced ornamental value.



**ApWRKY33-mediated regulation of *ApDFR* expression affecting anthocyanin biosynthesis in *Acer palmatum***

**Key words** colorful-leaf plants, *Acer palmatum*, anthocyanin, gene regulation

**Zhang J, Jin XJ, Fang B, Jin SH, Dong B (2026).** Mechanistic analysis of ApWRKY33-mediated regulation of *ApDFR* expression in leaf color variation of *Acer palmatum*. *Chin Bull Bot* **61**, 1–10.

\* Author for correspondence. E-mail: dongbin@zafu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)