

广西植物

Guihaia

ISSN 1000-3142, CN 45-1134/Q

《广西植物》网络首发论文

题目: ERF-VII转录因子 RAP2.12 调控淹水诱导拟南芥幼苗花青素合成
作者: 吴旻, 都洁, 胡彦如
网络首发日期: 2025-06-16
引用格式: 吴旻, 都洁, 胡彦如. ERF-VII转录因子 RAP2.12 调控淹水诱导拟南芥幼苗花青素合成[J/OL]. 广西植物.
<https://link.cnki.net/urlid/45.1134.Q.20250616.0913.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI:10.11931/guihaia.gxzw202412039

ERF-VII 转录因子 RAP2.12 调控淹水诱导拟南芥幼苗花青素合成

吴旻^{1,2}, 都洁^{1,2}, 胡彦如^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 热带植物资源可持续利用重点实验室, 昆明 650223;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 淹水胁迫导致植物缺氧从而影响植物的生长发育。已有研究表明淹水会诱导植物积累花青素, 但其分子机制尚不明确。为解析 ERF-VII 家族转录因子在淹水诱导花青素合成中的作用及其调控机制, 该研究以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为研究对象, 分析相关材料在淹水处理条件下花青素积累情况, 并采用酵母双杂交、BiFC 等实验验证 RAP2.12 与 MYB75 蛋白的相互作用关系。此外, 为明确其调控途径, 从遗传学和分子层面对 RAP2.12 调控花青素合成的功能进行了系统分析。结果表明: (1) 淹水促进花青素积累的过程依赖于 MBW 复合体。(2) ERF-VII 转录因子家族成员 RAP2.12 能够与 MYB75 蛋白相互作用, 并且二者协同激活花青素合成基因 (*DFR*、*LDOX*) 的转录。(3) *rap2.2.3.2.12* 突变体对淹水诱导的花青素积累不敏感, 而 (*MA*)*RAP2.12-HA* 高表达植株对淹水诱导的花青素积累超敏感, 表明其调控花青素合成过程。(4) 遗传学分析结果进一步表明, 在淹水胁迫条件下, RAP2.12 对花青素积累的调控作用主要依赖 MYB 转录因子家族。综上所述, RAP2.12 通过与 MYB75 相互作用, 调控拟南芥幼苗在淹水胁迫下的花青素合成与积累。该研究拓展了 ERF-VII 转录因子在植物低氧适应中的功能, 为解析植物应对淹水胁迫的分子机制及农作物育种提供了理论依据。

关键词: 拟南芥, 淹水, 花青素, RAP2.12, MYB75

中图分类号: Q943 文献标识码: A

ERF-VII transcription factor RAP2.12 regulates submergence-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings

WU Min^{1,2}, DU Jie^{1,2}, HU Yanru^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32270613)。

第一作者: 吴旻 (2001—), 硕士, 研究方向为植物激素调控与环境适应性, (E-mail) wumin22@mailsucas.ac.cn。

***通信作者:** 胡彦如, 博士, 研究员, 研究方向为植物激素调控与环境适应性, (E-mail)

huyanru@xtbg.ac.cn。

Abstract: Submergence stress, a major environmental constraint in agriculture, causes oxygen deficiency in plant tissues, thereby impairing plant growth, development, and survival. One notable adaptive response of plants to submergence is the accumulation of anthocyanins — flavonoid pigments with strong antioxidant properties that help mitigate reactive oxygen species (ROS)-induced damage. These compounds also play important roles in stress signaling and metabolic reprogramming. Although enhanced anthocyanin accumulation under submergence has been observed in multiple plant species, the underlying regulatory mechanisms, particularly at the transcriptional level, remain poorly understood. To clarify the molecular mechanism of submergence-induced anthocyanin biosynthesis, this study investigated the role of ERF-VII (Ethylene Response Factor group VII) transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Anthocyanin levels were measured in various genotypes exposed to submergence stress. In addition, protein-protein interaction assays, including yeast two-hybrid (Y2H) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC), were conducted to examine physical interactions between ERF-VII members and known regulators of anthocyanin biosynthesis. The results were as follows: (1) Anthocyanin accumulation under submergence depends on the MBW complex, composed of MYB, bHLH, and WD40 proteins, which serves as a central regulatory hub in flavonoid biosynthesis. (2) RAP2.12 physically interacts with MYB75, MYB90, and MYB113, and these interactions synergistically activate the expression of anthocyanin biosynthetic genes such as *DFR* and *LDOX*, indicating a transcriptional co-activation mechanism. (3) The *rap2.2 2.3 2.12* triple mutant exhibits reduced sensitivity to submergence-induced anthocyanin accumulation, while (*MA*)*RAP2.12-HA* overexpression lines show hypersensitivity, indicating that RAP2.12 promotes anthocyanin biosynthesis under submergence and acts as a positive regulator in this stress-adaptive pathway. (4) Genetic analysis reveals that the regulatory function of RAP2.12 is primarily dependent on MYB transcription factors, as RAP2.12 alone cannot activate downstream gene expression in the absence of functional MYB proteins. In conclusion, RAP2.12 regulates anthocyanin biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* seedlings under submergence stress by physically interacting with MYB75 and other MYB family members. It enhances the transcriptional activity of the MBW complex, thereby promoting the expression of key structural genes in the anthocyanin biosynthetic pathway. These findings expand our understanding of the roles of ERF-VII transcription factors in plant adaptation to hypoxic environments. Furthermore, this work provides novel insights into how environmental signals are integrated through transcriptional regulators to coordinate secondary metabolism and stress responses. It also offers promising targets for molecular breeding strategies aimed at enhancing submergence tolerance in crops.

Key words: *Arabidopsis*, submergence stress, anthocyanin, RAP2.12, MYB75

水是植物维持正常生命活动所必需的物质 (Ishibashi et al., 2018; Reed et al., 2022; Pan et al., 2023)。环境水分过多会造成淹水胁迫, 影响植物气体交换, 导致植物缺氧 (Jackson 2008; Sasidharan & Voesenek, 2015)。缺氧不仅会影响植物的生长发育, 还可能对其生存造成威胁。为响应淹水胁迫, 植物需要感知环境中氧气浓度的变化。N-末端途径 (N-end rule pathway) 是植物感知氧气变化的重要方式 (Kunkowska et al., 2023; Rovere et al., 2023; Eysholdt-Derzso et al., 2024)。在低氧条件下, ERF-VII 蛋白家族 N 末端的 Met 不能被氧化降解, 进而入核促进下游缺氧应答基因 *HRGs* (*Hypoxia-responsive genes*) 表达, 提高植物低氧耐受性 (Gibbs et al., 2014; Weits et al., 2014; Giuntoli & Perata, 2018)。当植物遭受淹水胁迫时, RAP2.12

作为此家族中的核心转录因子发挥了重要的作用。具体而言, RAP2.12 能感知氧气变化并稳定积累, 通过结合缺氧响应元件直接调控一系列低氧响应基因, 促进植物生理和代谢适应 (Licausi F et al., 2011; Gasch et al., 2015; Paul et al., 2016;)。而 RAP2.12 中 AP2 结构域, 在结合缺氧响应元件时发挥重要功能 (Yano et al., 2017; Ballichatla et al., 2024; Chen et al., 2024)。此外, RAP2.12 还在常氧条件下广泛参与植物多种生理过程, 如种子萌发、主根生长、氧气运输、抗病以及营养物质利用等生理过程 (Tsai et al., 2023; Liu et al., 2024; Safavi-Rizi et al., 2024; Schippers et al., 2024)。综上, RAP2.12 在植物应对淹水胁迫时发挥了十分重要的功能。

花青素是植物重要的次生代谢产物, 能增强植物对逆境的适应能力。花青素的合成受到苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、二氢黄酮醇-4 还原酶 (dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、黄酮类 3-O-葡萄糖基转移酶 (UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UF3GT)、无色花青素双加氧酶 (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 等多种酶的调控 (Zhao et al., 2023)。上述酶受到由 MYB (Myeloblastosis)、bHLH (basic helix-loop-helix) 和 WDR (WD-repeat protein) 组成的 MBW 复合体的精密调控 (Gonzalez et al., 2009; Bhargava et al., 2010; Hu et al., 2020)。MBW 复合体的主要成员包括 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8, 过表达上述基因的转基因植株花青素积累量提高, 而敲除或干扰上述基因表达的转基因植株花青素积累量降低 (Lloyd et al., 2017; Wei et al., 2019; Zheng et al., 2019)。综上所述, 花青素的生物合成受到多种酶和转录因子的精细调控。这些调控机制确保了植物能够有效地响应外界环境变化。因此, 植物在遭遇多种非生物逆境时, 往往会积累大量的花青素, 从而增强其耐受性 (Trojak & Skowron, 2017; Zheng et al., 2021; Zhou et al., 2020; Dabravolski & Isayenkov, 2023)。例如, 拟南芥在缺磷条件下, PHR (Phosphate starvation response) 与 MYB75 互作促进花青素合成, 增强植物对低磷的耐受性 (Li et al., 2023); 拟南芥在遭受盐胁迫时, ECBP (EIN3-BINDING F-BOX protein) 与 MYB75 互作促进拟南芥花青素合成, 帮助其抵御盐胁迫 (Li et al., 2022)。近期研究表明, 淹水也能诱导花青素的积累 (Castellana et al., 2024), 但其分子机制尚不明确。RAP2.12 在淹水诱导花青素积累的过程中发挥了何种作用值得进一步的探究。本研究以拟南芥为实验材料, 利用分子生物学和遗传学方法, 探究了淹水调控拟南芥幼苗花青素合成的分子机制。本研究以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为研究对象, 依托分子生物学和遗传学方法, 探讨淹水胁迫下 ERF-VII 转录因子对花青素合成的调控机制。具体而言, 拟回答以下科学问题: (1) 淹水胁迫是否通过 ERF-VII 转录因子调控花青素的积累; (2) RAP2.12 转录因子如何调控花青素合成相关基因的表达。

1. 材料与方法

1.1 材料

本文中使用的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 生态型为哥伦比亚型 (Columbia, Col-0)。所使用的烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 为四倍体野生型本氏烟草。所使用的花青素合成缺陷突变体 *tt8* (NW111)、花青素合成含量提高突变体 *PAP1-D* (CS3884) 来源于俄亥俄州立大学的拟南芥资源中心, 花青素合成缺陷突变体 *myb-RNAi* 由杨洪全教授提供, *rap2.2* *rap2.3* *rap2.12* 三突变体由 *rap2.2* (salk-010265c)、*rap2.3* (salk-030459c) 和 *rap2.12* (salk-047306c) 杂交获得, 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 由野生型拟南芥转化获得。

1.2 植物材料种植及淹水处理条件

用 20% 次氯酸钠溶液将拟南芥种子消毒后播种于含 1% 蔗糖的 1/2 MS 固体培养基 (pH 5.8)。置于 4 °C 春化, 处理 2 d。春化完成后转移到 26 °C 光照培养间的长日照环境 (16 h 光照/8 h 黑暗) 进行培养。选取生长 3 d 的幼苗, 光照淹水处理 12 h, 以待后续相关实验。

烟草使用相同的方式消毒后，在培养基中培养 8 d，移栽并放置在具有短日照条件的 26 °C 光照培养室内（8 h 光照/16 h 黑暗）。

1.3 花青素积累量测定

取淹水处理的拟南芥幼苗，同时取未淹水处理的拟南芥幼苗作为对照，分别称重，记录其重量 W (g)，加入花青素提取液（甲醇：盐酸 = 99：1）1 mL，4 °C 黑暗 12 h，吸取上清液。使用分光光度计测量 530 nm、620 nm 和 650 nm 3 个特定波长下提取液的分光光度值（ OD_{530} 、 OD_{620} 和 OD_{650} ）。花青素含量计算公式如下： $((OD_{530} - OD_{620}) - 0.1 \times (OD_{650} - OD_{620}) / (4.62 \times 10^6)) \times (1 / W) \times 1000000$ 。

1.4 材料总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 Solabio 公司的 Trizol 试剂对材料进行总 RNA 提取，反转录后以备实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 (Han et al., 2020)。RT-qPCR 实验所用的引物详情列于表 1，实验使用拟南芥中的 *ACTIN2* 基因作为内参。

表 1 RT-qPCR 引物

Table 1 Primers used in RT-qPCR

引物	引物序列 (5' - 3')
Primer	Primer sequence (5' - 3')
<i>ACTIN2</i> -F	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT
<i>ACTIN2</i> -R	TTTCCCGCTCTGCTGTTGT
<i>DFR</i> -F	TGGTGGTCGGTCCATTTCAT
<i>DFR</i> -R	GAGAGAGCGCGGTGATAAGG
<i>LDOX</i> -F	TCCGGGTTTGCAGCTTTTC
<i>LDOX</i> -R	ATCAGGAACACATTTTGCAGTGA
<i>UF3GT</i> -F	TGGAGGTGGCGGTTGAA
<i>UF3GT</i> -R	CTTTGCCGCGAGAACCA

1.5 酵母双杂交实验 (Y2H)

为筛选可能与 RAP2.2、RAP2.3 和 RAP2.12 相互作用的花青素合成调控因子，使用酵母双杂系统 (Hu et al., 2019)。将 RAP2.2、RAP2.3 与 RAP2.12 的全长编码序列克隆到 pGBKT7 载体，并构建分段质粒 BD-RAP2.12¹⁻¹⁸⁷、BD-RAP2.12¹²⁴⁻¹⁸⁷ 和 BD-RAP2.12¹⁸⁸⁻³⁵⁹。将编码花青素合成的调控因子 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8 的全长编码序列克隆到 pGADT7 载体，并构建分段质粒 AD-MYB75¹⁻¹²² 和 AD-MYB75¹²³⁻²⁴⁸，构建酵母双杂交实验所需载体的引物见表 2。

1.6 双分子荧光互补实验 (BiFC Assays)

将 RAP2.12、RAP2.12¹⁻¹⁸⁷、RAP2.12¹⁸⁸⁻³⁵⁹ 和 GUS 的编码序列融合于 pFGC-cYFP 中。将 MYB75、MYB75¹⁻¹²²、MYB75¹²³⁻²⁴⁸ 和 GUS 的编码序列融合于 pFGC-nYFP 中。转化农杆菌 (GV3101) 后，等体积比混合，注射到烟草叶片中。于黑暗湿润的环境中培养 48 h 后，取叶片 DAPI 染色后，使用激光共聚焦显微镜观察，BiFC 实验载体构建引物见表 2。

表 2 载体构建引物

Table 2 Primers for Vector Construction

引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
<i>AD-MYB75</i> -F	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
<i>AD-MYB75</i> -R	ATAGAATTCCTAATCAAATTTACAGTCTCTCCATC
<i>AD-MYB75</i> ¹⁻¹²² -F	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
<i>AD-MYB75</i> ¹⁻¹²² -R	ATAGAATTCCTTTTTCATCTTTATCTTACAACACGG
<i>AD-MYB75</i> ¹²³⁻²⁴⁸ -F	ATACATATGAGAGACATTACGCCCATTCTTAC
<i>AD-MYB75</i> ¹²³⁻²⁴⁸ -R	ATAGAATTCCTAATCAAATTTACAGTCTCTCCATC
<i>AD-MYB90</i> -F	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
<i>AD-MYB90</i> -R	ATAGAATTCCTAATCAAGTTCAACAGTCTCTCCATC
<i>AD-MYB113</i> -F	ATACATATGATGGGCGAATCACCCAAAG
<i>AD-MYB113</i> -R	ATAGAATTCCTAATTCAGTTCTAAAGTCTCTTCATCAAA
<i>AD-MYB114</i> -F	ATACATATGATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
<i>AD-MYB114</i> -R	ATAGAATTCCTAAAAAATATCGACTTTTGGGC
<i>AD-TT8</i> -F	ATAGAATTCATGGATGAATCAAGTATTATTCCGG
<i>AD-TT8</i> -R	ATAGGATCCCTATAGATTAGTATCATGTATTATGACTTGGTG
<i>BD-RAP2.2</i> -F	ATAGAATTCATGTGTGGAGGAGCTATAATCTCCGA
<i>BD-RAP2.2</i> -R	ATAGGATCCTCAAAAAGTCTCCTTCCAGCATGAAATT
<i>BD-RAP2.3</i> -F	ATAGAATTCATGTGTGGCGGTGCTATTATTTC
<i>BD-RAP2.3</i> -R	ATAGGATCCTTACTCATACGACGCAATGACATCATC
<i>BD-RAP2.12</i> -F	ATAGAATTCATGTGTGGAGGAGCTATAATATCCGA
<i>BD-RAP2.12</i> -R	ATAGGATCCTCAGAAGACTCCTCCAATCATGGAAT
<i>BD-RAP2.12</i> ¹⁻¹⁸⁷ -F	ATAGAATTCATGTGTGGAGGAGCTATAATATCCGA
<i>BD-RAP2.12</i> ¹⁻¹⁸⁷ -R	ATAGGATCCAGCCTTCATGTTTTCTTCAGGGAAAT
<i>BD-RAP2.12</i> ¹²⁴⁻¹⁸⁷ -F	ATAGAATTCCAGTACCGAGGGATTAGGCAAC
<i>BD-RAP2.12</i> ¹²⁴⁻¹⁸⁷ -R	ATAGGATCCAGCCTTCATGTTTTCTTCAGGGAA
<i>BD-RAP2.12</i> ¹⁸⁸⁻³⁵⁹ -F	ATAGAATTCAATTCTCAGAAACGCTCTGTGAAGG
<i>BD-RAP2.12</i> ¹⁸⁸⁻³⁵⁹ -R	ATAGGATCCTCAGAAGACTCCTCCAATCATGGAAT
<i>MYB75</i> -nYFP-F	ATAGGATCCATGGAGGGTTCGTCCAAAGG
<i>MYB75</i> -nYFP-R	ATATCTAGAATCAAATTTACAGTCTCTCCATCG
<i>MYB75</i> ¹⁻¹²² -nYFP-F	TATCTCTCTCGAGCTTTCGCGAGCTCATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGCTG C
<i>MYB75</i> ¹⁻¹²² -nYFP-R	CCATGGTGGCGATGGATCTTCTAGACTTTTTTCATCTTTATCTTACAACAC GG
<i>MYB75</i> ¹²³⁻²⁴⁸ -nYFP-F	TATCTCTCTCGAGCTTTCGCGAGCTCAGAGACATTACGCCCATTCTTAC
<i>MYB75</i> ¹²³⁻²⁴⁸ -nYFP-R	CCATGGTGGCGATGGATCTTCTAGACTAATCAAATTTACAGTCTCTCCA TC
<i>GUS</i> -nYFP-F	ATAGGATCCATGGTCCGTCCTGTAGAAACC
<i>GUS</i> -nYFP-R	ATATCTAGATTGTTTGCCTCCCTGCTGC
<i>RAP2.12</i> -cYFP-F	TATCTCTCTCGAGCTTTCGCGAGCTCATGTGTGGAGGAGCTATAATATCC G

<i>RAP2.12</i> -cYFP-R	CGGGTACCGGATCCCTCGAGATCTAGAGAAGACTCCTCCAATCATGGAA TG
<i>RAP2.12</i> ¹⁻¹⁸⁷ -cYFP-F	TATCTCTCTCGAGCTTTCGCGAGCTCATGTGTGGAGGAGCTATAATATCC G
<i>RAP2.12</i> ¹⁻¹⁸⁷ -cYFP-R	CGGGTACCGGATCCCTCGAGATCTAGAGAAATTCACCTTAGCTTTAGAT CCAC
<i>RAP2.12</i> ¹⁸⁸⁻³⁵⁹ -cYFP-F	TATCTCTCTCGAGCTTTCGCGAGCTCCCTGAAGAAAACATGAAGGCTAA T
<i>RAP2.12</i> ¹⁸⁸⁻³⁵⁹ -cYFP-R	CGGGTACCGGATCCCTCGAGATCTAGAGAAGACTCCTCCAATCATGGAA TG
<i>GUS</i> -cYFP-F	ATATCTAGAATGGTCCGTCCTGTAGAAACC
<i>GUS</i> -cYFP-R	ATAGGATCCTTGTTTGCCTCCCTGCTGC

1.7 基因 ID

本文所涉及到的拟南芥基因的 ID 如下: *RAP2.2*, AT3G14230; *RAP2.12*, AT1G53910; *MYB75*, AT1G56650; *MYB90*, AT1G66390; *MYB113*, AT1G66370; *MYB114*, AT1G66380; *TT8*, AT4G09820; *DFR*, AT5G42800; *LDOX*, AT4G22880; *UF3GT*, AT5G54060。以上基因相关信息均来自 The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) 数据库。

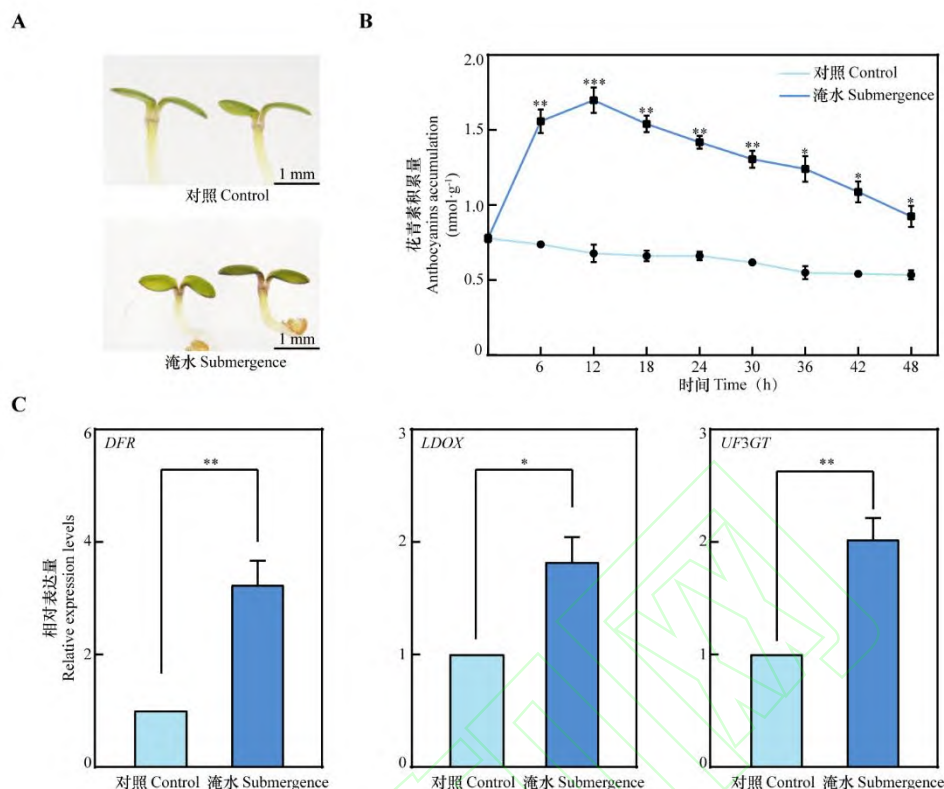
1.8 数据处理与分析

文章中数据使用 GraphPad 8.0 进行数据分析,使用 GraphPad 8.0 与 Adobe illustrator 2020 进行图片制作。仅有一种材料则选用 Paired t-test 分析差异显著性,若涉及多种材料则选择 Two-way ANOVA 分析差异显著性。

2.结果与分析

2.1 淹水促进拟南芥幼苗花青素积累

为验证淹水促进拟南芥幼苗积累花青素,本文对培养基上生长 3 d 的野生型拟南芥幼苗进行淹水处理,结果显示淹水显著增强幼苗花青素积累(图 1: A)。为明确花青素积累与淹水时间的相关性,本文进行了时间动力学实验。结果表明,淹水诱导的花青素积累在 12 h 内迅速上升并达到峰值,随后逐渐下降(图 1: B)。与此同时,花青素合成相关基因 *DFR*、*LDOX* 和 *UF3GT* 的表达水平亦显著上调(图 1: C)。以上结果均表明,淹水能够促进拟南芥幼苗花青素积累。



A. 野生型拟南芥幼苗淹水前后表型； **B.** 正常生长与淹水处理的野生型拟南芥幼苗花青素积累量变化趋势； **C.** 野生型拟南芥幼苗淹水前后花青素合成相关酶编码基因的表达量。星号表示统计学显著性差异：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

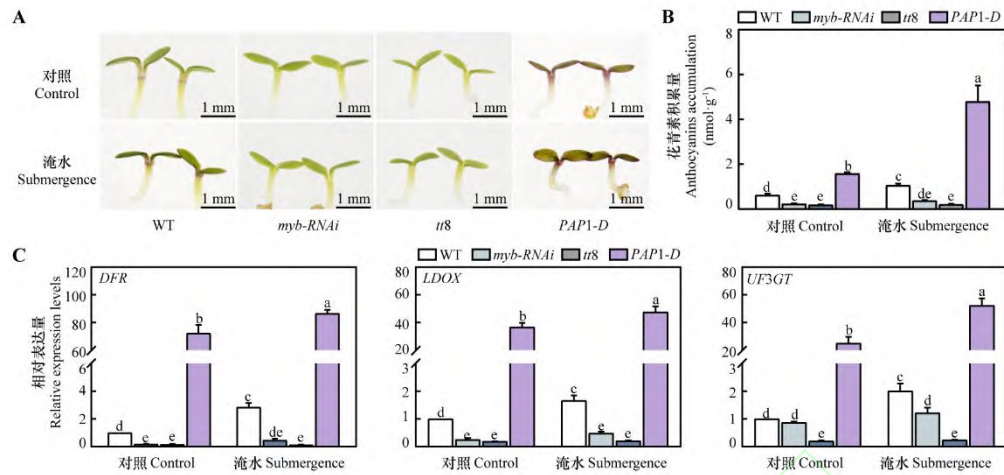
A. Phenotypic analysis of wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings before and after submergence; **B.** Trends in anthocyanin content of wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings under normal growth and submergence stress conditions; **C.** Expression levels of genes which encoding enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings before and after submergence. Asterisks indicate significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 1 淹水促进花青素积累

Fig.1 Submergence promotes anthocyanin accumulation

2.2 淹水促进花青素积累依赖于 MBW 复合体

为明确淹水诱导的花青素积累是否依赖于 MBW 复合体。本文比较了 *myb-RNAi*、*tt8* 和 *PAP1-D* 突变体在淹水处理下的花青素积累情况。结果表明，野生型和 *PAP1-D* 突变体幼苗在淹水处理后花青素积累量显著提高，而 *tt8* 与 *myb-RNAi* 突变体无显著变化（图 2: A、B）。进一步 RT-qPCR 的结果显示，野生型与 *PAP1-D* 淹水后花青素合成相关酶编码基因的表达量显著提高，但 *tt8* 与 *myb-RNAi* 中这些基因未出现显著变化（图 2: C）。花青素含量与基因表达量两组数据变化趋势一致。上述结果表明，淹水诱导的拟南芥幼苗花青素积累依赖于 MBW 复合体。



A. WT, *PAP1-D*, *tt8*, *myb-RNAi* 幼苗淹水前后表型； **B.** WT, *PAP1-D*, *tt8*, *myb-RNAi* 幼苗淹水前后花青素积累量； **C.** WT, *PAP1-D*, *tt8*, *myb-RNAi* 幼苗淹水前后花青素合成相关酶编码基因的表达量。不同字母表示组间差异具有统计学显著性 ($P < 0.05$)，下同。

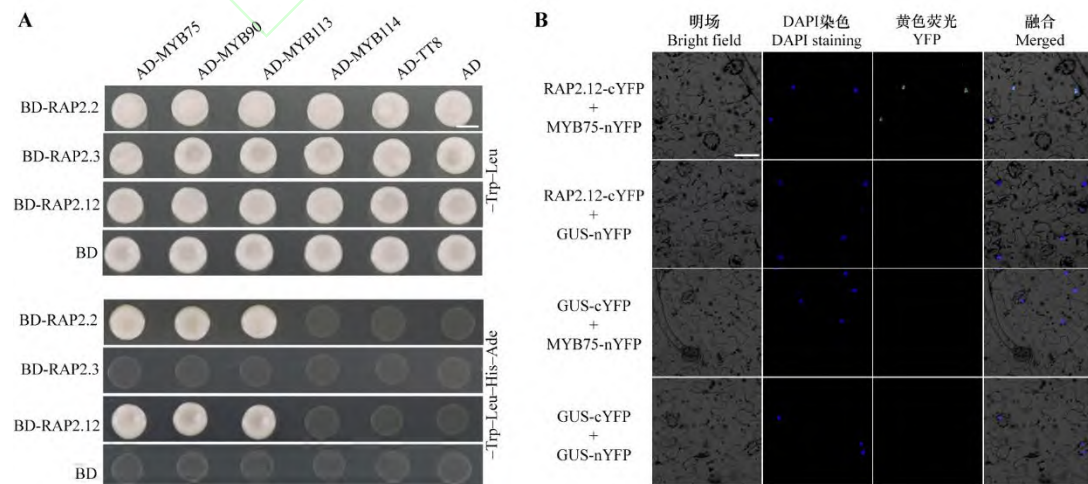
A. Phenotypic comparison of seedlings of WT, *PAP1-D*, *tt8*, and *myb-RNAi* before and after submergence treatment; **B.** Accumulation of anthocyanin content in seedlings of WT, *PAP1-D*, *tt8*, and *myb-RNAi* before and after submergence treatment; **C.** Expression levels of genes which encoding enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in seedlings of WT, *PAP1-D*, *tt8*, and *myb-RNAi* before and after submergence treatment. Groups marked with different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$), the same below.

图 2 淹水促进花青素积累通过 MBW 复合体

Fig. 2 Submergence promotes anthocyanin accumulation through the MBW complex

2.3 RAP2.12 与 MYB75 蛋白相互作用

为探究 RAP2.2、RAP2.3 和 RAP2.12 是否参与淹水诱导的花青素积累，本文使用酵母双杂交实验验证 RAP2.2、RAP2.3 和 RAP2.12 能否与花青素合成的关键调控因子 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8 相互作用。结果表明，RAP2.2 和 RAP2.12 与 MYB75、MYB90 和 MYB113 存在相互作用，而 RAP2.3 与以上调控因子间不存在相互作用(图 3: A)。进一步通过 BiFC 实验验证 RAP2.12 与 MYB75 在烟草细胞核中可发生互作(图 3: B)。以上结果表明，RAP2.12 可能通过与 MYB75 互作参与花青素积累调控过程。

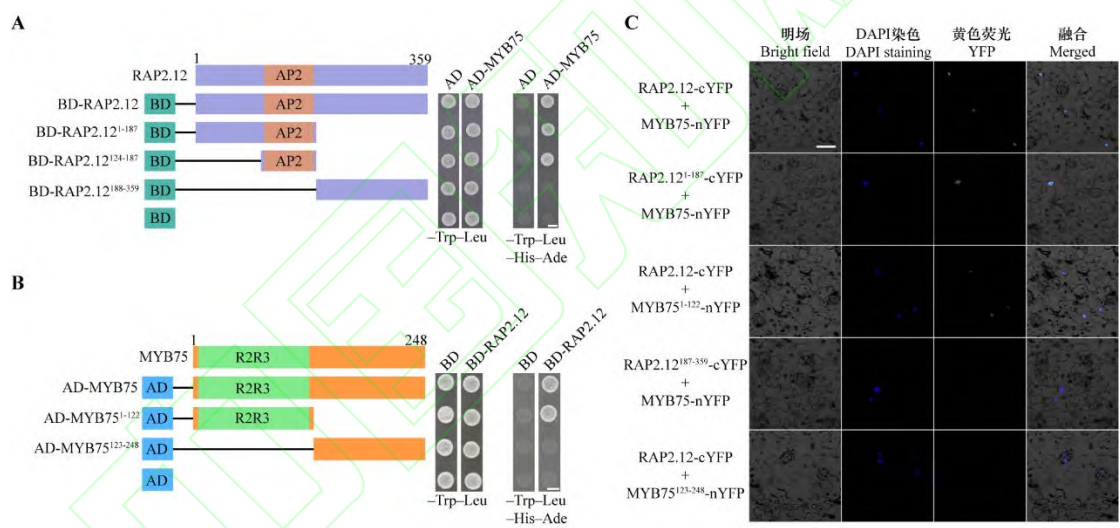


A. RAP2.2、RAP2.3 和 RAP2.12 与花青素合成的关键调控因子 MYB75、MYB90、MYB113、MYB114 和 TT8 的酵母双杂互作结果, 标尺 = 2.5 mm; **B.** RAP2.12 与 MYB75 双分子荧光互补实验结果, 标尺 = 20 μm 。
A. Yeast two-hybrid interaction results between RAP2.2, RAP2.3, and RAP2.12 and key regulatory factors in anthocyanin biosynthesis MYB75, MYB90, MYB113, MYB114, and TT8; scale bar = 2.5 mm; **B.** RAP2.12 and MYB75 bimolecular fluorescence complementation assay results, scale bar = 20 μm .

图 3 RAP2.12 与 MYB75 存在相互作用
 Fig. 3 RAP2.12 interacts with MYB75

2.4 RAP2.12 与 MYB75 蛋白相互作用的结构域

为确定介导 RAP2.12 与 MYB75 蛋白相互作用的区段, 将两者分别进行分段, 随后利用酵母双杂交进行验证。结果显示, BD-RAP2.12¹⁻¹⁸⁷ 和 BD-RAP2.12¹²⁴⁻¹⁸⁷ 与 MYB75 存在相互作用, BD-RAP2.12¹⁸⁸⁻³⁵⁹ 与 MYB75 不存在相互作用 (图 4: A)。这表明 AP2 结构域可能介导了 RAP2.12 与 MYB75 之间的相互作用。此外, AD-MYB75¹⁻¹²² 与 RAP2.12 发生相互作用 (图 4: B), 表明 R2R3 结构域可能介导了 MYB75 与 RAP2.12 之间的相互作用。本文利用双分子荧光互补 (BiFC) 实验, 对上述结果进行进一步验证, 发现 RAP2.12¹⁻¹⁸⁷-cYFP 与 MYB75¹⁻¹²²-nYFP 在植物细胞核内发生相互作用 (图 4: C)。综上, AP2 结构域与 R2R3 结构域是 RAP2.12 和 MYB75 相互作用所必需的。



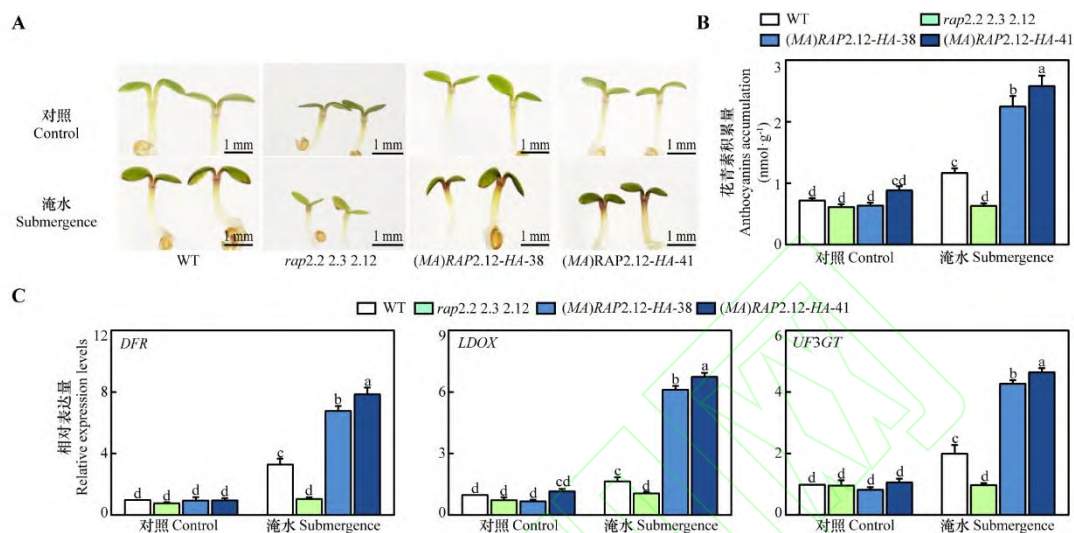
A. RAP2.12 分段与 MYB75 酵母双杂互作结果, 标尺 = 2.5 mm; **B.** MYB75 分段与 RAP2.12 酵母双杂互作结果, 标尺 = 2.5 mm; **C.** MYB75 与 RAP2.12 互作区段双分子荧光互补实验结果, 标尺 = 20 μm 。
A. Yeast two-hybrid interaction results between RAP2.12 fragments and MYB75; scale bar = 2.5 mm; **B.** Yeast two-hybrid interaction results between MYB75 fragments and RAP2.12; scale bar = 2.5 mm; **C.** Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay results for the interaction domains of MYB75 and RAP2.12; scale bar = 20 μm .

图 4 RAP2.12 与 MYB75 蛋白相互作用的结构域
 Fig. 4 Interaction regions between RAP2.12 and MYB75

2.5 RAP2.12 正调控淹水胁迫下的花青素积累

为验证 RAP2.12 是否参与淹水介导的花青素合成。对 35S:(MA)RAP2.12-HA 和 rap2.2、rap2.3、rap2.12 突变体在淹水处理后的表型、花青素积累量及花青素合成相关酶编码基因的表达量进行分析。结果表明, 野生型幼苗在淹水处理后花青素积累量显著提高, rap2.2 2.3 2.12 幼苗在淹水前后花青素积累量无显著差异, 但过表达 RAP2.12 的拟南芥植株在淹水处

理后花青素含量较野生型拟南芥进一步提高（图 5: A、B）。这表明 *RAP2.12* 正调控淹水胁迫下的花青素积累随后，本文检测了野生型和突变体幼苗花青素合成相关酶编码基因在淹水前后的表达水平。结果显示，野生型幼苗在淹水处理后花青素合成相关酶编码基因的表达量显著提高，但突变体幼苗在淹水处理后花青素合成相关酶编码基因的表达量未有显著变化，过表达 *RAP2.12* 的拟南芥幼苗在淹水处理后花青素合成相关酶编码基因的表达量较野生型进一步提高（图 5: C）。以上结果表明，*RAP2.12* 可能正向调控淹水促进花青素合成的过程。



A. WT、35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* 幼苗淹水前后表型； **B.** WT、35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* 幼苗淹水前后花青素积累量； **C.** WT、35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* 幼苗淹水前后花青素合成相关酶编码基因的表达量。

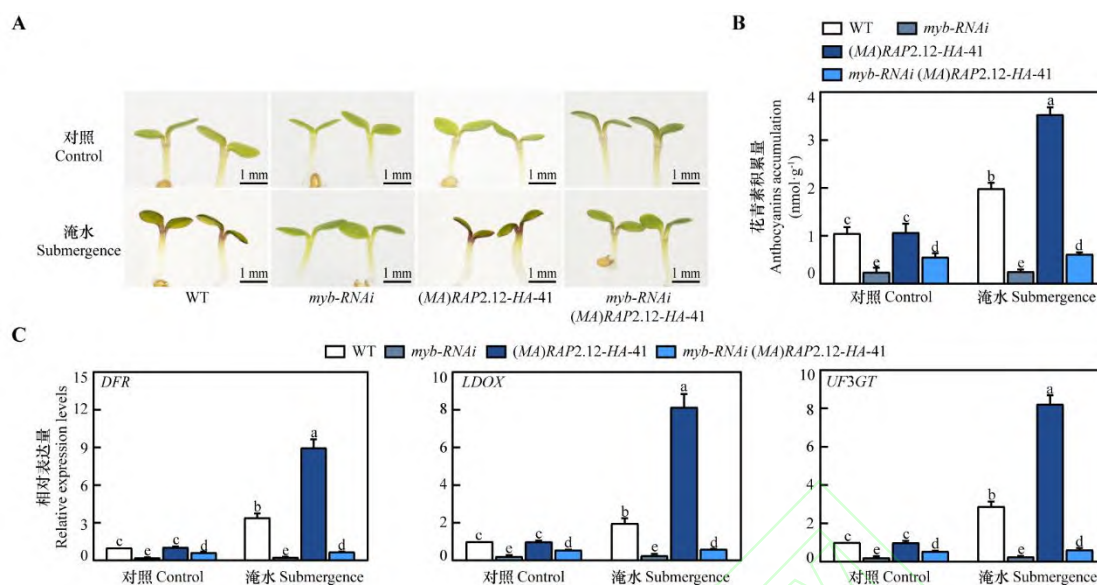
A. Phenotypic analysis of seedlings of WT, 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* before and after submergence; **B.** Anthocyanin accumulation levels in seedlings of WT, 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* before and after submergence; **C.** Expression levels of genes which encoding enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in seedlings of WT、35S:(*MA*)*RAP2.12-HA* 和 *rap2.2 2.3 2.12* before and after submergence.

图 5 *RAP2.12* 正调控淹水胁迫下的花青素积累

Fig. 5 *RAP2.12* positively regulates anthocyanin accumulation under submergence stress

2.6 *RAP2.12* 促进淹水胁迫下花青素的积累主要依赖于 MYB 转录因子家族

为进一步明确 *RAP2.12* 与 MYB75 之间的遗传关系，本文构建了 *myb-RNAi* 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 杂交材料并对其表型进行分析。发现在对照组中，*myb-RNAi* 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 与 *myb-RNAi* 幼苗的花青素积累量明显低于野生型（图 6: A、B）。在淹水处理后，野生型与 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 幼苗的花青素积累量显著升高，但 *myb-RNAi* 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 与 *myb-RNAi* 幼苗在淹水处理后花青素积累量无显著差异（图 7: A-B）。RT-qPCR 结果显示，淹水处理后，野生型与 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 拟南芥幼苗花青素合成相关酶编码基因的表达量显著提高，但 *myb-RNAi* 35S:(*MA*)*RAP2.12-HA-41* 与 *myb-RNAi* 幼苗花青素合成相关酶编码基因的表达量无显著变化（图 6: C）。以上结果表明，*RAP2.12* 促进淹水胁迫下花青素的积累主要依赖于 MYB 转录因子家族。



A. WT、35S:(MA)RAP2.12-HA-41、myb-RNAi 和 myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 幼苗淹水前后表型； **B.** WT、35S:(MA)RAP2.12-HA-41、myb-RNAi 和 myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 幼苗淹水前后花青素积累量； **C.** WT、35S:(MA)RAP2.12-HA-41、myb-RNAi 和 myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 幼苗淹水前后花青素合成相关酶编码基因的表达量。

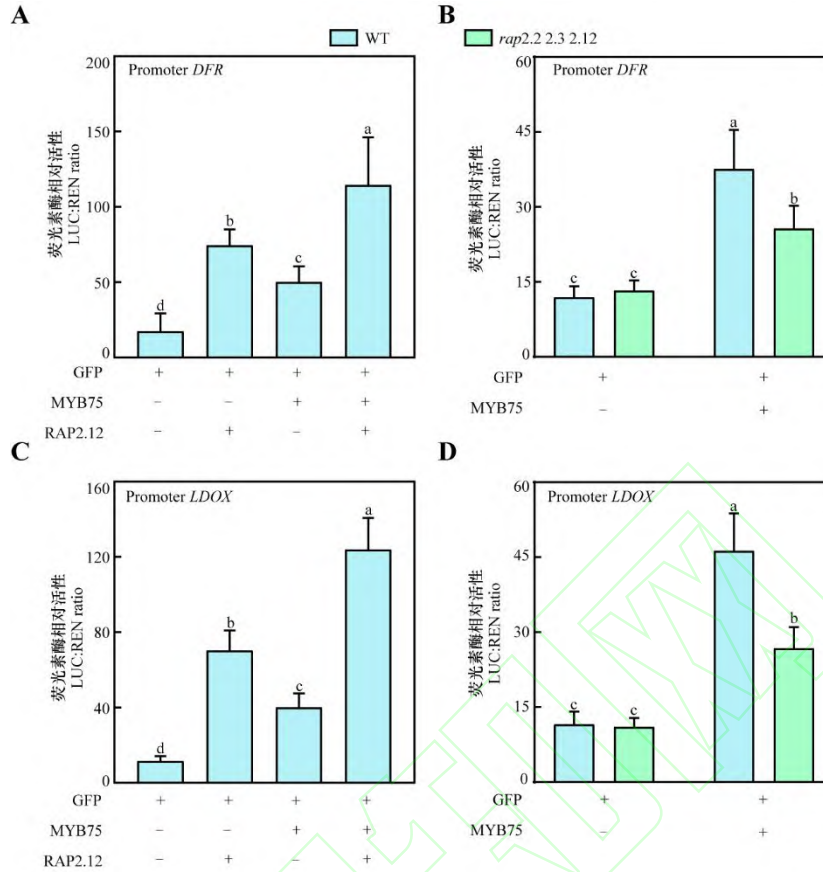
A. Phenotypic analysis in seedlings of WT, 35S:(MA)RAP2.12-HA-41, myb-RNAi, and myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 before and after submergence; **B.** Anthocyanin accumulation levels in seedlings of WT, 35S:(MA)RAP2.12-HA-41, myb-RNAi, and myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 before and after submergence; **C.** Expression levels of genes which encoding enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in seedlings of WT, 35S:(MA)RAP2.12-HA-41, myb-RNAi, and myb-RNAi 35S:(MA)RAP2.12-HA-41 before and after submergence.

图 6 淹水胁迫下 RAP2.12 促进花青素积累依赖于 MYB

Fig. 6 RAP2.12 promotes anthocyanin accumulation in a MYB-dependent manner under submergence stress

2.7 RAP2.12 与 MYB75 协同促进花青素合成相关酶编码基因的转录

为进一步探究 RAP2.12 促进拟南芥幼苗在淹水下积累花青素的分子机制，本文利用原生质体实验分析其与 MYB75 的协同调控作用。结果显示，RAP2.12 与 MYB75 均能显著激活 DFR 和 LDOX 的转录；且共同表达时激活效应增强（图 7：A、C），这表明 RAP2.12 和 MYB75 间可能存在协同作用。为进一步验证 RAP2.12 和 MYB75 间存在协同作用，进一步在 rap2.2 2.3 2.12 突变体中分析 MYB75 对目标基因的激活能力，发现其转录激活作用明显减弱（图 7：B、D）。这一结果表明，RAP2.12 是 MYB75 调控淹水下花青素合成的关键协同因子。



A. WT 中不同处理组对 *DFR* 转录活性的影响；**B.** WT 和 *rap2.2 2.3 2.12* 中不同处理组对 *DFR* 转录活性的影响；**C.** WT 中不同处理组对 *LDOX* 转录活性的影响；**D.** WT 和 *rap2.2 2.3 2.12* 中不同处理组对 *LDOX* 转录活性的影响。

A. The impact of different treatment groups on the transcriptional activity of *DFR* in the WT; **B.** The impact of different treatment groups on the transcriptional activity of *DFR* in the WT, *rap2.2 2.3 2.12*; **C.** The impact of different treatment groups on the transcriptional activity of *LDOX* in the WT; **D.** The impact of different treatment groups on the transcriptional activity of *LDOX* in the WT, *rap2.2 2.3 2.12*.

图 7 RAP2.12 与 MYB75 协同促进花青素合成相关酶编码基因的转录

Fig.7 RAP2.12 and MYB75 synergistically promote the transcription of genes which encoding enzymes involved in anthocyanin biosynthesis

3 讨论与结论

在植物的生长过程中，可能会遭遇多种非生物逆境，例如低温、干旱以及盐胁迫等（He et al., 2018; Zhang et al., 2023）。花青素作为一种重要的非酶促抗氧化剂，在植物应对多种胁迫时均发挥着重要作用（Zhou et al., 2020; Kaur et al., 2023; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2024）。淹水胁迫作为植物面临的重要非生物胁迫之一，也会促进花青素积累（Castellana et al., 2024）。然而，其分子调控机制尚不明晰。本文研究首次揭示了 ERF-VII 家族中的主效转录因子 RAP2.12 在这一过程中发挥的关键作用，初步揭示了其与 MYB 家族转录因子之间的调控关系。

花青素的合成在高等植物中高度保守，均受到 MBW 复合体的精密调控，尤其是 MYB 转录因子家族在花青素合成调控过程中发挥着关键作用（Zhou et al., 2020; Naing & Kim, 2021; Li et al., 2023）。在进行相关研究后发现淹水胁迫下的花青素合成也依赖于此家族转录因子。这进一步表明 MYB 转录因子家族在胁迫下花青素合成调控过程中发挥重要作用。

MYB 转录因子家族均包含保守的 R2R3 结构域，此结构域是 MYB 转录因子发挥作用所必需的结构域，多种胁迫下的花青素合成也依赖于此结构域，本文研究也发现淹水胁迫下的花青素合成也依赖于此结构域，进一步表明 R2R3 结构域是 MYB 转录因子家族的核心结构域（Zhou et al., 2020; Li et al., 2023; 杨甲等, 2023）。

ERF-VII 转录因子家族在植物遭受淹水胁迫时发挥重要功能，RAP2.12 被认为是其中最关键的转录因子（Gasch et al., 2015）。研究发现淹水胁迫下的花青素积累也依赖于 RAP2.12，进一步证明 RAP2.12 在淹水胁迫下的重要功能。但由于 ERF-VII 家族成员存在功能冗余（Eysholdt-Derzsó et al., 2024），且 RAP2.2 也与 MYB75 产生互作，因此，RAP2.2 与 RAP2.12 在调控花青素合成的过程中是否存在功能冗余仍有待进一步探索。RAP2.12 可帮助植物适应低氧环境，AP2 结构域在此过程中发挥关键作用（Boyer 1982; Paul et al., 2016; Giuntoli et al., 2017; Seok et al., 2022）。本文研究发现 RAP2.12 和 MYB75 转录因子在植物细胞核中相互作用，二者互作与 AP2 结构域密切相关。进一步佐证 AP2 结构域是 RAP2.12 发挥功能所必需的结构域。此外，我们的研究还进一步探讨了 RAP2.12 如何调控花青素合成相关基因的表达。已有研究表明 MYB75 能结合到 *DFR*、*LDOX* 的启动子，调控花青素积累（Zheng et al., 2019）。而 RAP2.12 能进一步增强 MYB75 对下游 *DFR*、*LDOX* 的转录激活作用，这与遗传实验结果一致。这表明 RAP2.12 并非直接结合花青素合成基因的启动子，而是通过调控 MYB75 的功能来影响其下游基因的表达。进一步明确了当植物遭受淹水胁迫时 RAP2.12 通过 MYB75 调控淹水胁迫下的花青素合成。但酵母双杂结果显示，RAP2.12 也与 MYB113 产生互作，MYB113 是否也通过此方式调控淹水胁迫下的花青素合成有待进一步探究。

花青素合成及其调控分子通路在多种植物中的高度保守性（Sunil & Shetty, 2022; Jiang et al., 2024）。在作物育种领域，由于花青素积累的表型易于肉眼辨识，因此花青素也被用作作物育种中的表型标记（Du et al., 2020）。本文研究发现拟南芥幼苗在淹水处理后花青素含量显著提高，结合花青素合成通路的保守性，此研究结果有望利用于作物育种的表型标记。同时，高花青素含量的作物具有较高的抗逆性（Qin et al., 2021; Wang et al., 2021），本文研究也发现花青素含量也于淹水处理时间呈现正相关性，也暗示花青素在植物应对淹水胁迫时发挥了重要的作用。对于淹水胁迫促进花青素积累的机制进行深入探究有较高应用于作物育种的可能性。

综上所述，本文研究发现在植物遭受淹水胁迫时，RAP2.12 与 MYB75 在细胞核中相互作用，协同促进下游花青素合酶基因的转录，最终促进淹水胁迫下的花青素积累。本文阐明了 RAP2.12 作为 ERF-VII 家族关键因子在调控花青素合成基因表达及其胁迫响应中的双重功能，并揭示了其具体的分子调控机制。此外，考虑到花青素积累的表型特征易于直观识别，未来可利用 RAP2.12 和 MYB75 的互作关系，构建可用于分子育种的标记系统，以实现耐淹水作物的高效筛选和定向培育。

参考文献:

- BALLICHATLA S, GOKULAN CG, BARBADIKAR KM, et al., 2024. Impairment in a member of AP2/ERF and F-box family protein enhances complete panicle exertion in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 75(5): 5611-5626.
- BHARGAVA A, MANSFIELD SD, HALL HC, et al., 2010. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem [J]. Plant Physiology,

154(3): 1428-1438.

- BOYER JS, 1982. Plant productivity and environment [J]. *Science*, 218(4571): 443-448.
- CASTELLANA S, TRIOZZI PM, DELL'ACQUA M, et al., 2024. Environmental genome-wide association studies across precipitation regimes reveal that the E3 ubiquitin ligase MBR1 regulates plant adaptation to rainy environments [J]. *Plant Communications*, 5(12): 101074.
- CHEN G, SHAO T, ZHOU Y, et al., 2024. Analysis of the aging-related AP2/ERF transcription factor gene family in *Osmanthus fragrans* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15): 8025.
- DABRAVOLSKY SA, ISAYENKOV SV, 2023. The role of anthocyanins in plant tolerance to drought and salt stresses [J]. *Plants (Basel)*, 12: 2485.
- DU M, ZHOU K, LIU Y, et al., 2020. A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato [J]. *The Plant Journal*, 102(6): 1090-1100.
- EYSHOLDT-DERZSÓ E, HAUSE B, SAUTER M, et al., 2024. Hypoxia reshapes *Arabidopsis* root architecture by integrating ERF-VII factor response and abscisic acid homeostasis [J]. *The Plant Cell and Environment*, 47(12): 2879-2894.
- GASCH P, FUNDINGER M, MÜLLER JT, et al., 2015. Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 28(1): 160-180.
- GIBBS DJ, ISA NM, MOVAHEDI M, et al., 2014. Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors [J]. *Molecular Cell*, 53(3): 369-379.
- GIUNTOLI B, LICAUSI F, VAN VEEN H, et al., 2017. Functional balancing of the hypoxia regulators RAP2.12 and HRA1 takes place in vivo in *Arabidopsis thaliana* plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 8: 591.
- GIUNTOLI B, PERATA P, 2018. Group VII ethylene response factors in *Arabidopsis*: Regulation and physiological roles [J]. *Plant Physiology*, 176(2): 1143-1155.
- GONZALEZ A, MENDENHALL J, HUO Y, et al., 2009. TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation [J]. *Developmental Biology*, 325(2): 412-421.
- HAN X, ZHANG M, YANG M, et al., 2020. *Arabidopsis* JAZ proteins interact with and suppress RHD6 transcription factor to regulate jasmonate-stimulated root hair development [J]. *The Plant Cell*, 32(4): 1049-1062.

- HE M, DING CQ, 2018. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance [J]. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1771.
- HU CH, WANG PQ, ZHANG PP, et al., 2020. NADPH oxidases: The vital performers and center hubs during plant growth and signaling [J]. *Cells*, 9: 1-16.
- HU Y, HAN X, YANG M, et al., 2019. The transcription factor INDUCER OF CBF EXPRESSION1 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and DELLA proteins to fine-tune abscisic acid signaling during seed germination in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 31(7): 1520-1538.
- ISHIBASHI Y, YUASA T, IWAYA-INOUE M, 2018. Mechanisms of maturation and germination in crop seeds exposed to environmental stresses with a focus on nutrients, water status, and reactive oxygen species [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1081: 233-257.
- JACKSON MB, 2008. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress [J]. *Annals of Botany*, 101(2): 229-248.
- JIANG L, CHEN J, QIAN J, et al., 2024. The R2R3-MYB transcription factor ZeMYB32 negatively regulates anthocyanin biosynthesis in *Zinnia elegans* [J]. *Plant Molecular Biology*, 114(1): 48.
- KAUR S, TIWARI V, KUMAR A, et al., 2023. Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture [J]. *Journal of Biotechnology*, 361: 12-29.
- KIM SK, KIM SY, PARK HY, et al., 2020. OsERF115, an AP2/ERF transcription factor, modulates plant development and stress responses [J]. *Plant Science*, 292: 110382.
- KUMIMOTO RW, SIRIWARDANA CL, GAY J, et al., 2010. The NF-YC3 and NF-YC4 transcription factors regulate *Arabidopsis* seed germination under salt stress [J]. *Plant Physiology*, 154(4): 1677-1691.
- KUNKOWSKA AB, FONTANA F, BETTI F, et al., 2023. Target of rapamycin signaling couples energy to oxygen sensing to modulate hypoxic gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(3): e2212474120.
- LEE WJ, JEONG CY, KWON J, et al., 2016. Drastic anthocyanin increase in response to *PAP1* overexpression in *fls1* knockout mutant confers enhanced osmotic stress tolerance in

- Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell Reports, 35(11): 2369-2379.
- LICAUSI F, KOSMACA M, WEITES DA, et al., 2011. Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization [J]. Nature, 479(7373): 419-422.
- LICAUSI F, VAN DONGEN JT, GIUNTOLI B, et al., 2010. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect *Arabidopsis* growth and survival under low-oxygen conditions [J]. The Plant Journal, 62(2): 302-315.
- LI C, NGUYEN V, LIU J, et al., 2017. Mutations in the *Arabidopsis* *PP2A-C5* gene suppress the *hsp90.2* mutant phenotype by restoring R gene expression [J]. The Plant Cell, 29(5): 1145-1163.
- LI H, HE K, ZHANG Z, et al., 2023. Molecular mechanism of phosphorus signaling inducing anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 196: 121-129.
- LI J, TERZAGHI W, DENG XW, et al., 2012. *Arabidopsis* hypoxia signaling pathways revealed by integrative transcriptome meta-analysis [J]. Plant Physiology, 159(3): 1223-1234.
- LIU J, JUNG C, XU J, et al., 2016. *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses [J]. The Plant Cell, 28(7): 1982-1996.
- LIU M, KHAN S, ZWIAZEK JJ, 2024. Overexpression of *Nicotiana tabacum* *PIP1*; 3 enhances root aeration and oxygen metabolism in canola (*Brassica napus*) plants exposed to root hypoxia [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 216: 109122.
- LLOYD A, BROCKMAN A, AGUIRRE L, et al., 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 [J]. Plant and Cell Physiology, 58(8): 1431-1441.
- LU CA, HO THD, HSIEH TJ, et al., 2002. A transcriptional activator AtMYB2 is involved in *Arabidopsis* abscisic acid and drought responses [J]. Plant Physiology, 130(2): 618-626.
- NAING AH, KIM CK, 2021. Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses [J]. Environmental and Experimental Botany, 172: 1711-1723.
- PAN J, WANG H, YOU Q, et al., 2023. Jasmonate-regulated seed germination and crosstalk with other phytohormones [J]. Journal of Experimental Botany, 74(4): 1162-1175.
- PAUL MV, IYER S, AMERHAUSER C, et al., 2016. Oxygen sensing via the ethylene response

- transcription factor RAP2.12 affects plant metabolism and performance under both normoxia and hypoxia [J]. *Plant Physiology*, 172(1): 141-153.
- QIN L, SUN L, WEI L, et al., 2021. Maize *SRO1e* represses anthocyanin synthesis through regulating the MBW complex in response to abiotic stress [J]. *Plant Journal*, 105(4): 1010-1025.
- REED RC, BRADFORD KJ, KHANDAY I, 2022. Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate [J]. *Heredity (Edinburgh)*, 128(6): 450-459.
- ROVERE M, PUCCIARIELLO C, CASTELLA C, et al., 2023. Group VII ethylene response factors, MtERF74 and MtERF75, sustain nitrogen fixation in *Medicago truncatula* microoxic nodules [J]. *Plant Cell and Environment*, 46(3): 607-620.
- SADOWSKA-BARTOSZ I, BARTOSZ G, 2024. Antioxidant activity of anthocyanins and anthocyanidins: a critical review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3): 1-21.
- SAFAVI-RIZI V, UHLIG T, LUTTER F, et al., 2024. Reciprocal modulation of responses to nitrate starvation and hypoxia in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1): 2300228.
- SASIDHARAN R, VOESENEK LA, 2015. Ethylene-mediated acclimations to flooding stress [J]. *Plant Physiology*, 169(1): 3-12.
- SCHIPPERS JHM, VON BONGARTZ K, LARITZKI L, et al., 2024. ERFVII-controlled hypoxia responses are in part facilitated by MEDIATOR SUBUNIT 25 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 120(2): 748-768.
- SEOK HY, TRAN HT, LEE SY, et al., 2022. *AtERF71/HRE2*, an *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor gene, contains both positive and negative cis-regulatory elements in its promoter region involved in hypoxia and salt stress responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1): 1-20.
- SUNIL L, SHETTY NP, 2022. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(5): 1783-1798.
- TROJAK M, SKOWRON E, 2017. Role of anthocyanins in high-light stress response [J]. *World Scientific News*, 81: 150-168.
- TSAI KJ, SUEN DF, SHIH MC, 2023. Hypoxia response protein HRM1 modulates the activity of mitochondrial electron transport chain in *Arabidopsis* under hypoxic stress [J]. *New*

Phytologist, 239: 1315-1331.

- WANG F, JI G, XU Z, et al., 2021. Metabolomics and transcriptomics provide insights into anthocyanin biosynthesis in the developing grains of purple wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69: 11171-11184.
- WEI Z, CHENG Y, ZHOU C, et al., 2019. Genome-Wide identification of direct targets of the TTG1-bHLH-MYB complex in regulating trichome formation and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 20: 3550.
- WEITS DA, GIUNTOLI B, KOSMACZ M, et al., 2014. Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway [J]. Nature Communications, 5: 3425.
- YANO K, AOKI S, LIU M, et al., 2017. Function and evolution of a *Lotus japonicus* AP2/ERF family transcription factor that is required for development of infection threads [J]. DNA Research, 24: 193-203.
- YANG JJ, YANG ML, HU YR, 2023. Circadian clock PRR proteins stimulate anthocyanin synthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. Guihaia, 43(4): 676-87. [杨甲甲, 杨米连, 胡彦如, 2023. 生物钟 PRR 蛋白促进拟南芥幼苗中花青素的合成 [J]. 广西植物, 43(4): 676-87.]
- ZHAO Y, JIANG C, LU J, et al., 2023. Research progress of proanthocyanidins and anthocyanidins [J]. Phytotherapy Research, 37: 2552-2577.
- ZHANG Y, XU J, LI R, et al., 2023. Plants' response to abiotic stress: mechanisms and strategies [J]. International Journal of Molecular Sciences, 24(13): 10915.
- ZHENG J, WU H, ZHAO M, et al., 2021a. *OsMYB3* is a R2R3-MYB gene responsible for anthocyanin biosynthesis in black rice [J]. Molecular Breeding, 41: 51.
- ZHENG T, TAN W, YANG H, et al., 2019. Regulation of anthocyanin accumulation via MYB75/HAT1/TPL-mediated transcriptional repression [J]. PLOS Genetics, 15: e1007993.
- ZHOU L, HE Y, LI J, et al., 2020. CBFs function in anthocyanin biosynthesis by interacting with MYB113 in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Plant Cell Physiology, 61: 416-426.