

心里美萝卜花青素合成酶基因 *RsANS* 克隆及 花青素生物合成相关基因表达分析

孙玉燕^{1,2}, 段蒙蒙¹, 邱 杨¹, 张晓辉¹, 沈 镒¹, 王海平¹, 李锡香¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021)

摘要:花青素合成酶(ANS, anthocyanidin synthase)是植物花青素合成的关键酶,催化无色花色素转变成有色花色素。本研究从心里美萝卜 HX12Q-49 中克隆获得了花青素合成酶基因 *RsANS* (GenBank 登录号: KR262954)。该基因全长 1137 bp, 包含 2 个外显子和 1 个内含子; 开放阅读框 1071 bp, 编码 356 个氨基酸。同源性分析显示 *RsANS* 蛋白与大白菜、甘蓝和芥菜 ANS 蛋白同源性较高。qRT-PCR 表明 *RsANS* 在心里美萝卜 5 个不同发育时期均有表达, 且在破肚期表达量最高。通过对花青素合成途径其他 8 个结构基因和 3 个调控基因表达进行分析, 结果显示心里美萝卜中 *bHLH* 转录因子在不同发育时期的表达模式与 *RsANS*、*CHI*、*DFR* 和 *UFGT* 基本一致, 即在破肚期的表达量最高; *WD40* 转录因子的表达与 *CHS* 类似, 其表达量在芽期、破肚期、膨大前期和膨大盛期逐渐上升, 随后在成熟期下降。

关键词:心里美萝卜; 花青素合成酶; 基因克隆; 表达分析

Anthocyanidin Synthase Gene Cloning and Expression Analysis of Anthocyanidin Biosynthesis Related Genes in 'Xinlimei' Radish (*Raphanus sativus* L.)

SUN Yu-yan^{1,2}, DUAN Meng-meng¹, QIU Yang¹, ZHANG Xiao-hui¹,
SHEN Di¹, WANG Hai-ping¹, LI Xi-xiang¹

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: Anthocyanin synthase (ANS) catalyzes the conversion of colorless leucoanthocyanins into colored anthocyanins, which is a key enzyme in the anthocyanin biosynthetic pathway. The *RsANS* gene (GenBank accession number: KR262954) was isolated from 'Xinlimei' radish 'HX12Q-49' in present study. The full length of *RsANS* was 1137 bp and included 2 exons and 1 intron. The cDNA length of *RsANS* was 1071 bp and encoded a polypeptide of 356 amino acids. Homology analysis showed that *RsANS* had close relationship with ANS from Chinese cabbage, kohlrabi and mustard. qRT-PCR validation of *RsANS* revealed that it expressed at five developmental stages and reached the peak at cortex splitting stage. Furthermore, the expression level of another 8 functional genes and 3 regulatory genes at different developmental stages were investigated. The results showed that the expression pattern of *bHLH* transcription factor was similar to that of *RsANS*, *CHI*, *DFR* and *UFGT*, which peaked at cortex splitting stage. The expression pattern of *WD40* transcription factor was similar to that of *CHS*, which gradually increased at seedling, cortex splitting, early expanding and rapid expanding stages, then decreased at mature stage.

Key words: 'Xinlimei' radish; anthocyanin synthase; gene cloning; expression analysis

收稿日期: 2015-10-21 修回日期: 2015-11-19 网络出版日期: 2016-08-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160812.1317.042.html>

基金项目:“十二五”国家科技支撑项目(2013BAD01B04-1、2012BAD02B01); 国家高技术研究发展计划项目(2012AA021801-4); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2013-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

第一作者研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: sy1111@126.com

通信作者: 李锡香, 研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: lixx0612@163.com

花青素 (anthocyanidin) 是植物中重要的一类黄酮类代谢物, 主要以糖苷的形式存在于细胞液泡内, 使花和果实呈现不同的颜色^[1]。花青素具有吸引昆虫授粉和种子传播、使植物免受 UV 伤害、避免病原菌侵染等重要的生理功能^[2]。此外, 花青素还具有预防癌症、炎症和心血管疾病的保健功能^[3]。近年来, 能产生天然花青素的心里美萝卜 (*Raphanus sativus* L. 2 n = 2 × = 18) 越来越受欢迎, 是研究花青素生物合成及调控不可多得的资源。心里美萝卜所富含的花青素类型主要是天竺葵素 (pelargonidin), 多作为水果食用^[4]。由于心里美萝卜花青素的含量高、水溶性强、提取简便、色泽艳丽, 因此被称为花青素的天然生物反应器。提取的花青素与人工合成的 Food Red No. 40 类似, 具有较高的稳定性, 被广泛用于食品天然色素添加剂^[5]。

参与萝卜花青素生物合成代谢途径的基因包括结构基因和调控基因。结构基因编码合成代谢途径相关的酶类, 直接参与花青素的合成; 而调节基因通过其表达的蛋白调控结构基因的表达^[6]。苯丙氨酸 (phenylalanine) 经苯丙氨酸裂解酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、肉桂酸羟化酶 (C4H, cinnamate-4-hydroxylase) 和香豆酰-CoA-连接酶 (4CL, 4-coumarate-CoA ligase) 的催化形成 4-香豆素-CoA (4-coumaroyl-CoA)^[7], 这三步为苯基丙酸类物质生物合成途径的共有环节^[8]。随后 4-香豆素-CoA 经查尔酮合成酶 (CHS, chalcone synthase)、查尔酮异构酶 (CHI, chalcone isomerase)、黄烷酮-3-羟化酶 (F3H, flavanone 3-hydroxylase)、二氢黄酮醇-4-还原酶 (DFR, dihydroflavonol 4-reductase)、花青素合成酶 (ANS, anthocyanin synthase) 和 UDP 葡萄糖: 类黄酮-3-O-糖苷转移酶 (UFGT, UDP glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase) 的依次催化形成稳定的天竺葵苷^[9]。根据这些结构基因在花青素合成途径的顺序及调控其功能的转录因子, 可将它们分成 2 组, 一组为早期合成基因 (EBGs, early biosynthesis genes), 包括 CHS、CHI 和 F3H; 一组为晚期合成基因 (LBGs, late biosynthesis genes), 包括 ANS、DFR 和 UFGT。除 UFGT 外, 花青素合成途径的其他结构基因的部分和完整 CDS 序列在萝卜中已被克隆并提交到 NCBI 数据库, 如 *RsPAL* (AB087212 和 KC751562, partial)、*RsC4H* (HQ641568, partial)、*Rs4CL* (HQ641569, partial)、*RsCHS* (AB087209 和 KC751563, partial; AB436782 和 AF031922, complete)、*RsCHI* (AB087208 和 KC751564, partial;

AF031921, complete)、*RsF3H* (AB087211 和 KC751565, partial)、*RsDFR* (KC751566 和 AB087210, partial; KF280272, complete) 和 *RsANS* (AB087206 和 KC751567, partial)。调控植物花青素生物合成的转录因子包括 MYB、bHLH 和 WD40 蛋白, 它们或形成 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 复合体^[13], 或各自起作用^[14]。如 MYB 和 bHLH 转录因子在番茄中过表达对花青素积累的影响不同, MYB 抑制花青素的积累, 而 bHLH 促进花青素的合成和积累^[15]。WD40 基因参与石榴发育过程中的花青素生物合成的调控, 其表达水平与 DFR 和 ANS 的表达相关联^[16]。目前 MYB 和 bHLH 转录因子的部分 CDS 序列已提交至 NCBI 中, 其序列号分别为 DQ538391 和 JN625953。对花青素合成途径的结构基因和调控基因的表达模式进行分析对于了解花青素生物合成的基因表达及转录因子对结构基因的调控至关重要。

花青素合成酶 (ANS, anthocyanin synthase) 催化花青素生物合成的倒数第 2 步, 依赖于 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 离子催化无色花色苷转化为有色花青素, 是花青素生物合成途径的关键步骤^[17]。C. Rosati 等^[18]从美国金钟连翘 (*Forsythia × intermedia*) 中克隆获得 ANS 基因及启动子序列, 证明花瓣中无色花青素苷积累是由于缺少 ANS 基因的表达。ANS 基因的突变与洋葱 (*Allium cepa* L.) 的粉色性状相关, 其表达量在粉色洋葱中显著降低^[19]。ANS 突变是导致龙胆花 (*Gentiana triflora* Pallas) 变为白色的重要原因^[20]。而 ANS 过表达使水稻 (*Oryza sativa* L.) 植株中的类黄酮物质和花青素的积累增加, 种皮呈现紫红色^[21]。此外, ANS 基因的表达水平决定海棠果 (*Malus spp.*) 花瓣中花青素的含量^[22]。由此可见, ANS 基因的结构变异或表达水平差异对植物花青素的合成及积累至关重要。目前 ANS 基因的完整序列在紫肉甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)^[23]、芥菜 (*Brassica juncea* (L.) Czernajew)^[24]、埃塞尔比亚芥 (*Brassica carinata* A. Brann)^[25] 和黑醋栗 (*Ribes nigrum* L.)^[17] 等作物中均被克隆出来, 在萝卜中还未见 ANS 的完整序列。本研究参照基因组测序材料 36-2 (白皮白肉) 的注释信息^[26], 获得注释为花青素合成酶的基因 *Rsa10014262*, 以此设计引物从心里美萝卜 HX12Q-49 中克隆到花青素合成酶基因 *RsANS*, 并对不同发育时期花青素合成途径的结构基因和调控基因的表达进行分析。该研究为解析心里美萝卜肉质根的花青素积累机制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为绿皮红肉的心里美萝卜自交系 HX12Q-49。于 2012 年秋季播种于中国农业科学院蔬菜花卉研究所廊坊基地,分别在芽期、破肚期、膨大前期、膨大盛期和成熟期对肉质根进行取样,其对应时间分别为播种后 10 d、19 d、40 d、61 d 和 75 d。其中 10 d 和 19 d 的样品为 5 株完整根的混样,40 d 样品为 3 株肉质根 1/8 纵切的混样,61 d 和 75 d 的样品为 3 株肉质根 1/16 纵切的混样,样品先后用自来水和蒸馏水冲洗干净,置于液氮中速冻,于 -80°C 冰箱保存备用。

Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、克隆载体 pEASY-T1、大肠杆菌感受态细胞 *Trans*-T1 和用于荧光定量检测的 $2 \times$ TransStart top Green qPCR SuperMix 购于北京全式金生物技术有限公司,用于基因克隆的 $2 \times$ Taq PCR MasterMix 购于北京博迈德科技发展有限公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购于北京天根生化科技有限公司,引物序列由生工生物过程(上海)股份有限公司合成。

1.2 *RsANS* 基因的克隆

采用 Trizol 法分别提取心里美萝卜 5 个不同发育时期的肉质根总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计测定 RNA 的浓度和质量。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 高质量的 RNA,利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。同时利用改良的 CTAB 法^[27]提取心里美萝卜叶片基因组 DNA。

根据白萝卜 36-2 的基因组注释信息,获取注释为 *ANS* 的基因 Rsa10014262,据此设计 5'和 3'引物,命名为 *RsANS*-F (ATGTTGCCGTTGAAAGAGTTG) 和 *RsANS*-R (TTAATCCTTTTCTCAGATAC)。分别以心里美萝卜的肉质根 cDNA 和叶片的基因组 DNA 为模板进行 *RsANS* 基因的扩增。PCR 扩增体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$:上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,模板 DNA ($50\text{ ng}/\mu\text{L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, $2 \times$ Taq PCR MasterMix $10\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为: 95°C 预变性 4 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min,35 个循环; 72°C 延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收,与 pEASY-T1 载体连接进行 T-A 克隆。测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件推导基因编码的氨基酸序列;利用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)对 *RsANS* 蛋白的分子量、等电点和亲水性进行分析;利用 PSORT 工具 (<http://www.psорт.org>)进行亚细胞定位预测;用 ProtFun 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)预测蛋白质的功能分类;利用在线软件 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>)对 *RsANS* 蛋白的二级结构进行预测;通过 NCBI Conserved Domains (NCBI-CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白保守域预测。利用 NCBI 中 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线分析心里美萝卜 *RsANS* 和其他物种 *ANS* 蛋白的同源性;并利用 MEGA 4.1 软件的 Neighbor-Joining (测试方法选用 bootstrap,重复次数设为 1000)构建 *RsANS* 蛋白与其他物种 *ANS* 蛋白的进化树。

1.4 基因表达分析

利用 Primer Premier 5 软件分别对花青素生物合成途径的 9 个结构基因 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*UFGT* 和 3 个调控基因 *bHLH*、*MYB*、*WD40* 设计荧光定量 PCR 引物,引物序列及其在 NCBI 或萝卜基因组中的编号见表 1。以 26 s (Accession number: AY366932) 作为内参基因 (26s-F: AACACCCCTTTGTGGTTCTAGGT; 26s-R: GC-CCTCGACCTATTCTCAAACCT)^[28]。qRT-PCR 的仪器为 ABI StepOne Real-Time PCR System,反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$:模板 cDNA $2.0\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $2 \times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix $10\text{ }\mu\text{L}$, Passive Reference Dye $0.4\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 15 s, 55°C 退火 15 s, 72°C 延伸 10 s,40 个循环。试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量^[29]。将心里美萝卜在芽期的表达量设为 1,其他样品的表达量均与其进行比较,并利用 SAS 8.0 软件进行差异显著性分析,每个试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 心里美萝卜 *RsANS* 基因克隆

分别以心里美萝卜的叶片基因组 DNA 和肉质根 cDNA 为模板,经 PCR 扩增获得目的片段并测序(图 1)。结果分析显示该基因的 DNA 全长为 1137 bp,包含 2 个外显子(exon 1 为 497 bp,exon 2 为 574 bp)和 1 个内含子(intron 为 66 bp),CDS 区域的长度为 1071 bp。

表 1 qRT-PCR 所用引物及序列

Table 1 Primers and their sequences used for qRT-PCR

基因名称	基因编号	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	扩增长度(bp)
Gene name	Gene ID	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplified length(bp)
<i>PAL</i>	AB087212	AATAACGGTCTTCCGTCGAATTT	TAACCGGATTGGCTAGGTA	124
<i>C4H</i>	HQ641568	AATCATGACGGTTCCTTCTTCA	TCAGGATTCCTTCACGTCCTC	105
<i>4CL</i>	HQ641569	AGGTATGATCTGAGCTCGGTGAG	CTTGGTCTTGAATGGGTCTTTTG	180
<i>CHS</i>	AF031922	GAGATCAGAAAGGCACAGAGAGC	TAGTCAGGATACTCGGCTTGAG	101
<i>CHI</i>	AF031921	TCTTCCGTGAAATCGTCATAGGT	CCAAGAACCTCTCCACTGCTTTA	171
<i>F3H</i>	AB087211	TCCTGAGGAGAAACTGAAGTTCG	CGTCACGATCTCTCTCCAATCTT	109
<i>DFR</i>	KF280272	ACCGGATGGATGTATTTTCATGTC	ATGATGGAGTAATGTGCCTCGTT	194
<i>ANS</i>	Rsa10014262	GAGCCTGACCGTATTGAGAAAGA	CAAACCTGGAACCATGTTGTGTA	168
<i>UFGT</i>	Rsa10018705	TGCTTTACCTCGTGCTCAT	ATCGTCCACTGGTGTAGTATCTG	144
<i>bHLH</i>	JN625953	TTGACGGACACTGAATGGT	CCTTGTCGTTGTGCCTAT	232
<i>MYB</i>	DQ538391	TTGAGGCGATGCATTGATAAGTA	TATGAAGCCGGAGAAGAAGATCA	175
<i>WD40</i>	Rsa10018294	GACATAACCAACGACTCACC	TCTCAGAAGGGCTTCACC	142

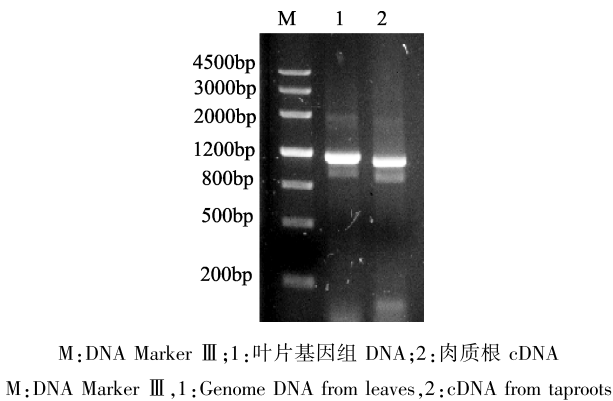


图 1 ANS 在心里美萝卜的扩增

Fig.1 Amplification of ANS in ‘Xinlimei’ radish

2.2 心里美萝卜 *RsANS* 基因的生物分析

经 DNAMAN 分析,心里美萝卜 *RsANS* 基因

编码 356 个氨基酸。ProtParam 软件预测 *RsANS* 蛋白质的分子量为 40.5 kD,等电点为 5.17, GRA-VY 为 -0.387,属于亲水性蛋白。利用 PSORT 软件和 ProtFun 软件进行预测,表明 *RsANS* 蛋白定位于细胞质的可能性为 75%,并且具有翻译及编码裂解酶的功能。*RsANS* 蛋白的二级结构包括 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链,所占的比重分别为 36.23%、50.56% 和 13.20%。利用 NCBI-CDD 对 *RsANS* 蛋白的结构域进行分析,显示 *RsANS* 为 PLN03178(花青素合成酶)多域蛋白,包含吗啡合成 N-端非血红素双加氧酶亚家族(DIOX_N)(第 47~160 位)和 2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶亚家族(2OG-Fe II Oxy)(第 211~307 位)两个保守结构域(图 2)。

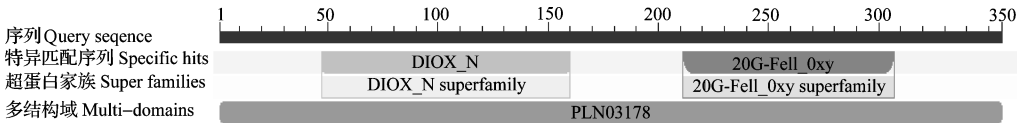
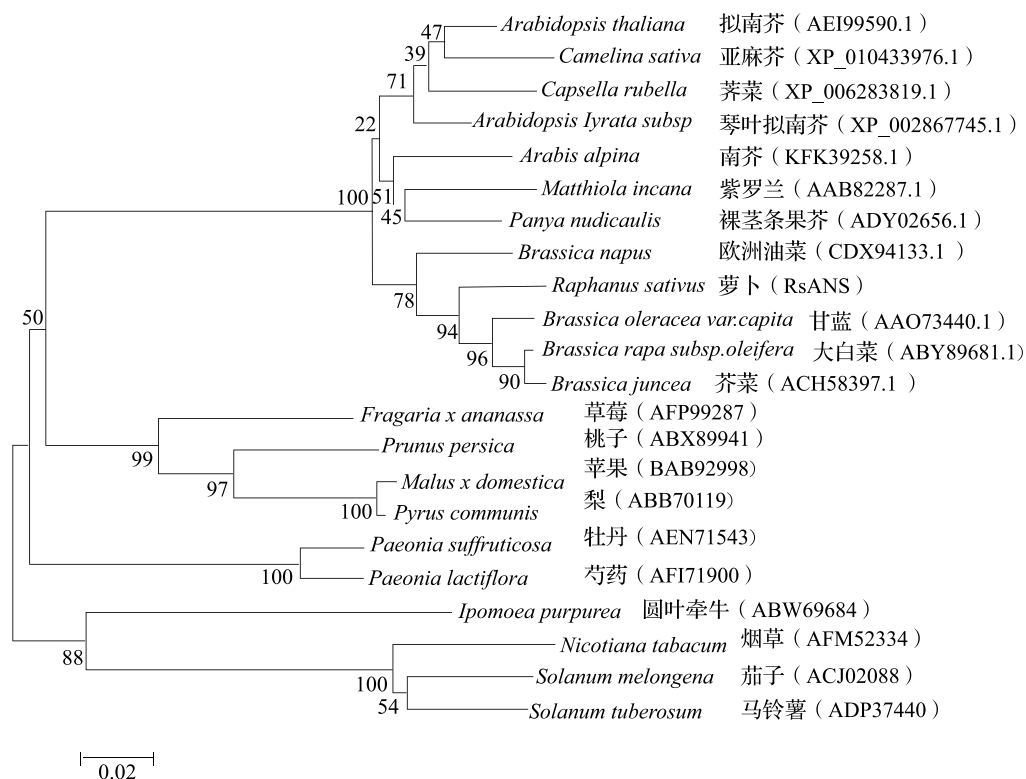


图 2 *RsANS* 蛋白保守域预测

Fig.2 Conserved domain prediction of *RsANS* protein

通过 NCBI 数据库在线 Blastp 比对表明 *RsANS* 蛋白与大白菜、甘蓝和芥菜的 *ANS* 蛋白氨基酸的一致性最高,达到 96%,与欧洲油菜次之,为 93%。利用 MEGA 4.1 对 *RsANS* 和其他 21 个物种的 *ANS* 蛋白构建系统进化树,探讨它们之间的系统进化关系。由图 3 可以看出,这 21 个物种根据其亲缘关系远近可以聚为 4 个分支,其中 *RsANS* 与其他 11 个十字

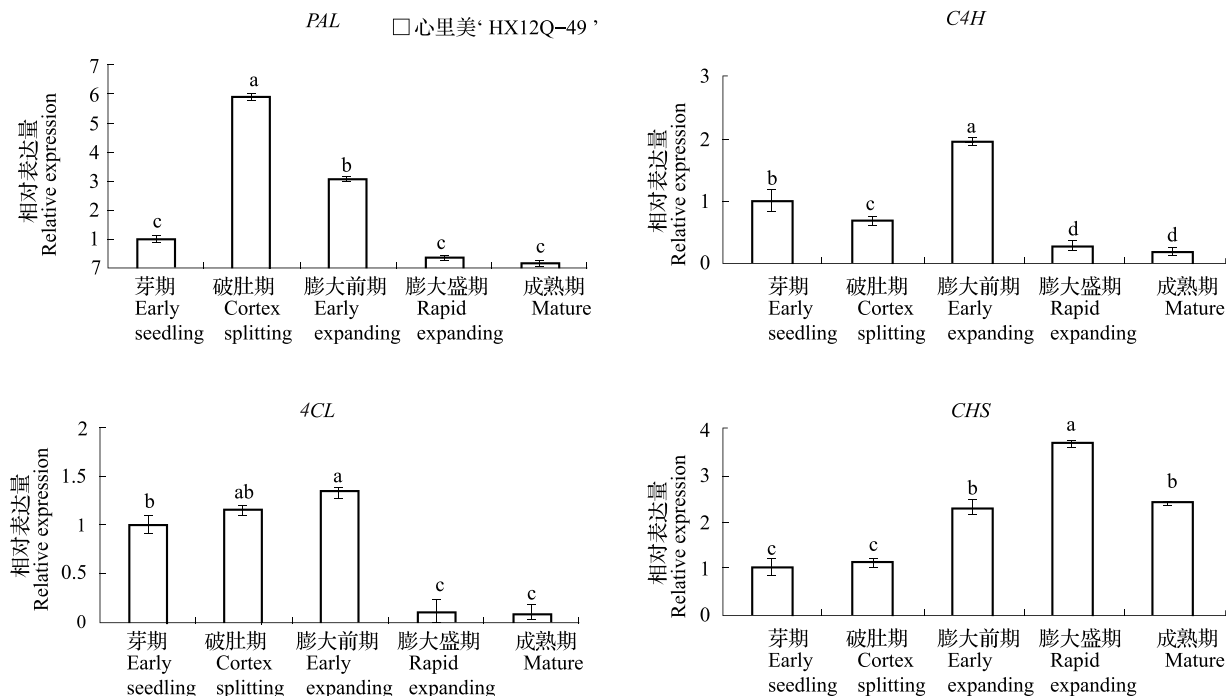
花科物种包括大白菜、芥菜、甘蓝和欧洲油菜等聚在一个分支,与 *RsANS* 亲缘关系最近;蔷薇科的草莓、桃子、苹果和梨聚在一个分支,与 *RsANS* 所在分支的成员亲缘关系次之;芍药科的牡丹和芍药聚为一支,与 *RsANS* 亲缘关系稍远;茄科的圆叶牵牛、烟草、茄子和马铃薯与 *RsANS* 所在分支的成员亲缘关系最远。

图3 *RsANS* 及同源氨基酸序列的关系分析Fig. 3 Phylogenetic relationship of amino acid sequences among *RsANS* and its homologous proteins

2.3 花青素生物合成途径基因的表达分析

利用 qRT-PCR 对 *RsANS* 在心里美萝卜 5 个不同发育时期的表达进行 qRT-PCR 分析。结果显示

RsANS 在心里美萝卜肉质根的 5 个不同发育阶段均有表达,其表达量在破肚期大幅上升至峰值,随后在膨大前期、膨大盛期和成熟期逐渐下降(图 4)。



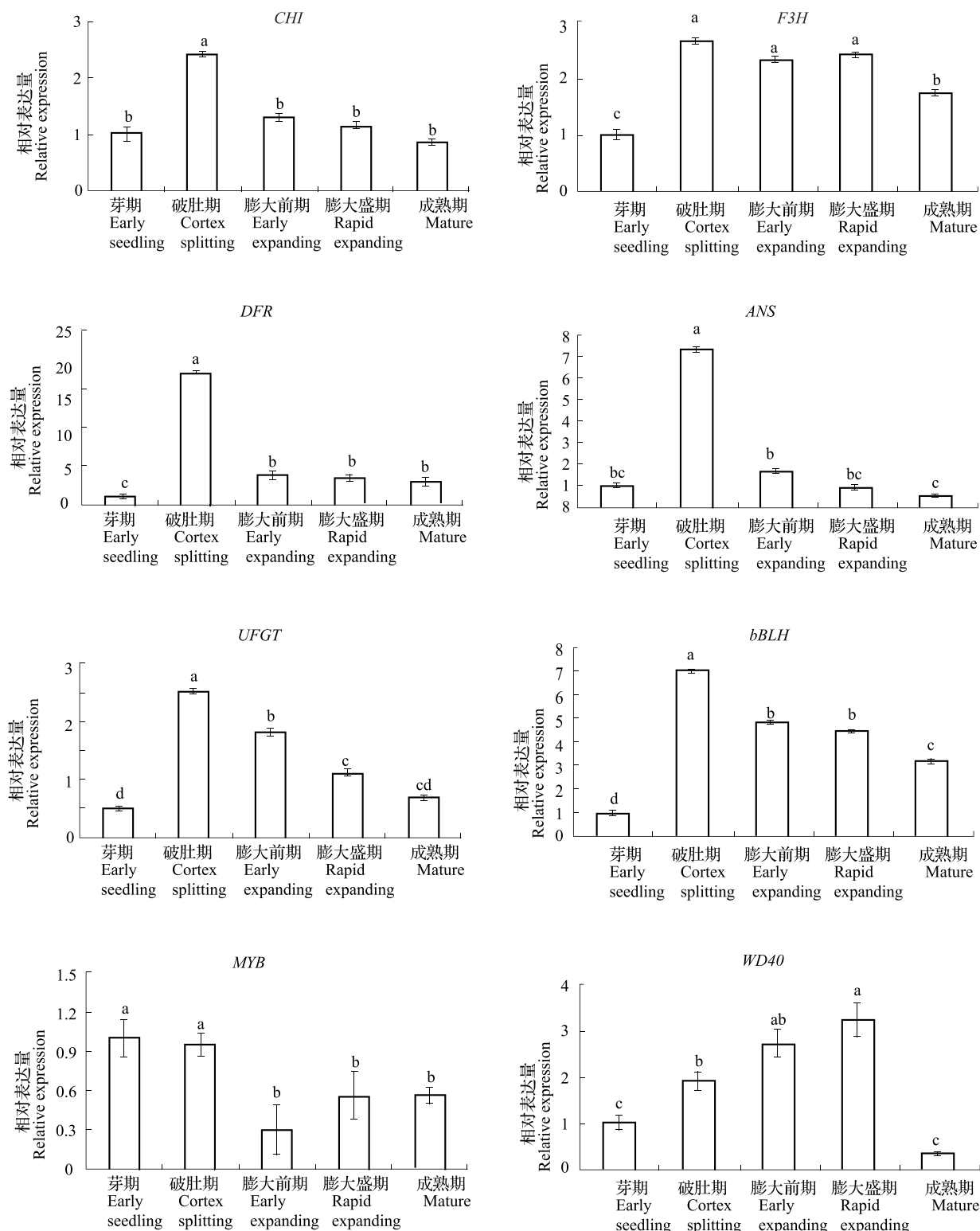


图4 花青素合成途径结构基因和调控基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of functional and regulatory genes involved in anthocyanidin biosynthesis

对花青素合成途径的其他 8 个结构基因 (*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 和 *UFGT*) 和 3 个调控基因 (*bHLH*、*MYB* 和 *WD40*) 进行 qRT-PCR 检测 (图 4)。发现 *PAL*、*C4H* 和 *4CL* 作为苯基丙酸

类生物合成的共有环节基因,表现为相近的表达模式,即在心里美萝卜的不同发育时期均有表达,且在芽期、破肚期和膨大前期的表达量较高。心里美萝卜 *CHS* 的表达量在芽期、破肚期、膨大前期和膨大

盛期逐渐上升至峰值,随后在成熟期降低。*CHI*、*DFR* 和 *UFGT* 在心理美萝卜的表达模式与 *RsANS* 类似,其表达量在破肚期达到最高后,在膨大前期、膨大盛期和成熟期逐渐下降。*F3H* 在心理美萝卜的表达量在破肚期达到最高,在膨大前期、膨大盛期和成熟期虽然有所下降,但仍维持相对较高的表达量。

作为花青素生物合成的调控基因,*bHLH*、*MYB* 和 *WD40* 在不同发育时期的表达模式不同(图 4)。*bHLH* 在心理美萝卜的表达量在破肚期达到峰值后,在膨大前期、膨大盛期和成熟期逐渐下降,其表达模式与 *CHI*、*DFR*、*UFGT* 和 *RsANS* 相近;*MYB* 在心理美萝卜的 5 个不同发育时期表达量相对较低且差异不大;*WD40* 在心理美萝卜的前 4 个时期的表达量逐渐上升,在成熟期下降,其表达模式与 *CHS* 相似。

3 讨论

花青素合成酶依赖于 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 离子将无色花色素氧化为有色花青素,催化花青素生物合成的倒数第 2 步,是花青素生物合成途径的关键步骤^[17]。*ANS* 基因的结构变异和表达水平直接影响植物中花青素的积累过程。*ANS* 基因的突变与洋葱(*Allium cepa* L.)的粉色性状相关,并且其表达量在粉色洋葱中显著降低^[19];*ANS* 基因在红色花瓣玉兰花中的表达水平比白色花瓣玉兰花高出 26 倍^[30]。在心理美萝卜中克隆获得 *RsANS* 基因,经推导的氨基酸序列与白萝卜存在 4 个氨基酸的差异,其中白萝卜的第 89、163、319 和 349 位氨基酸分别为天冬氨酸、苏氨酸、天冬氨酸和谷氨酸,在心理美萝卜中分别变异为谷氨酸、缬氨酸、谷氨酸和天冬氨酸(结果未显示),这种变异可能是导致二者根肉色不同的关键因素之一。

对花青素合成途径的 9 个结构基因和 3 个调控基因的表达模式及其相互关系进行分析,发现它们之间的表达既存在差异,又存在协同关系。结构基因的表达水平对花青素的合成和积累至关重要,红皮葡萄中 *PAL*、*CHI*、*CHS*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 的表达水平要显著高于白葡萄^[12]。*PAL*、*C4H* 和 *4CL* 作为苯基丙酸类物质生物合成的共有途径,不仅参与花青素的生物合成,还参与黄酮、芥子酸酯、木质素和木质醇等代谢产物的生物合成^[7,32-33],它们在心理美萝卜不同发育时期均有表达且表达模式类似。*RsANS* 作为花青素生物合成途径的关键基因,在心理美萝卜的表达模式与上游基因 *CHI* 和

DFR 及下游基因 *UFGT* 基本一致,说明 *RsANS* 的转录活性不仅受上游产物的影响,还影响其下游基因的表达。这 4 个基因的表达峰期均出现在肉质根开始膨大及花青素开始积累的破肚期,可能为花青素积累的早期响应基因。*CHS* 和 *F3H* 作为 *RsANS* 的上游基因,在心理美萝卜的表达峰值略滞后于 *CHI*、*DFR*、*RsANS* 和 *UFGT*,但与心理美萝卜的根肉着色范围扩展和深度加深一致,可能为花青素生物合成的中后期响应基因。

bHLH、*MYB* 和 *WD40* 转录因子对花青素的生物合成具有重要的调控作用^[14]。*MYB* 转录因子在苹果中过表达激活 *CHI*、*CHS*、*UFGT* 和 *ANS* 基因的转录,进而促进花青素的积累^[34]。*MYB* 和 *bHLH* 转录因子对番茄中花青素积累的影响不同,*MYB* 抑制花青素的积累,而 *bHLH* 促进花青素的合成和积累^[15]。*WD40* 蛋白通过与 *bHLH* 而非 *MYB* 相互作用调控苹果的花青素积累^[35]。本研究中,心理美萝卜 *ANS*、*CHI*、*DFR* 和 *UFGT* 的表达模式与 *bHLH* 基本一致,即在 5 个发育时期均有表达,且在破肚期的表达量最高,而与 *MYB* 相关性不强,说明 *bHLH* 可能通过调控 *RsANS*、*CHI*、*DFR* 和 *UFGT* 的基因表达促进肉质根花青素的积累。*WD40* 在心理美萝卜中的表达模式与 *CHS* 类似,即在表达量在芽期、破肚期、膨大前期和膨大盛期逐渐上升,随后在成熟期下降,预示 *WD40* 可能调控 *CHS* 基因的表达。

参考文献

- [1] Hu C, Gong Y, Jin S, et al. Molecular analysis of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene from purple potato (*Solano tuberosum*) [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 561-567
- [2] Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 923-933
- [3] Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1301-1308
- [4] Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways [J]. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19: 190-197
- [5] Rodriguez-Saona L E, Giusti M M, Wrolstad R E. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems [J]. J Food Sci, 1999, 64: 451-456
- [6] Yuan Y, Chiu L, Li L. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage [J]. Planta, 2009, 230: 1141-1153
- [7] Hu Y L, Gai Y, Yin L, et al. Crystal structures of a Populus tomentosa 4-coumarate: CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms [J]. Plant Cell, 2010, 22: 3093-3104
- [8] Huang J, Gu M, Lai Z, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress [J]. Plant Physiol, 2010, 153: 1526-1538
- [9] Saito K, Kobayashi M, Gong Z, et al. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of

- Perilla frutescens* [J]. Plant J, 1999, 17: 181-189
- [10] Peters D J, Constabel C P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. Plant J, 2012, 32: 701-712
- [11] Zhao Y, Yao B, Zhang M, et al. Comparative analysis of differentially expressed genes in Sika deer antler at different stages [J]. Mol Biol Rep, 2012, 40: 1665-1676
- [12] Kobayashi S, Ishimaru M, Ding C K, et al. Comparison of UDP glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*UGT*) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin [J]. Plant Sci, 2012, 160: 543-550
- [13] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. Trends Plant Sci, 2005, 10: 63-70
- [14] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [J]. Plant Sci, 2005, 10: 236-242
- [15] Wada T, Kunihiro A, Tominaga-Wada R. *Arabidopsis* CAPRICE (MYB) and GLABRA3 (bHLH) control tomato (*Solanum lycopersicum*) anthocyanin biosynthesis [J]. PLoS One, 2014, 9: e109093
- [16] Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Nadler-Hassar T, et al. A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis* TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development [J]. Planta, 2011, 234: 865-881
- [17] Li X G, Wang J, Yu Z Y. Cloning of an anthocyanidin synthase gene homolog from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and its expression at different fruit stages [J]. Genet Mol Res, 2015, 14: 2726-2734
- [18] Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia* × *intermedia* reveals organ-specific expression during flower development [J]. Plant Sci, 1999, 149: 73-79
- [19] Kim S, Binzel M L, Yoo K S, et al. Pink (P), a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase [J]. Mol Genet Genome, 2004, 272: 18-27
- [20] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Two different mutations are involved in the formation of white-flower edgientian plants [J]. Plant Sci, 2005, 169: 949-958
- [21] Reddy A M, Reddy V S, Scheffler B E, et al. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential [J]. Metab Eng, 2007, 9: 95-111
- [22] Zhang J, Han Z, Tian j, et al. The expression level of anthocyanidin synthase determines the anthocyanin content of crabapple (*Malus* sp.) petals [J]. Acta Physiol Plantarum, 2015, 37: 109
- [23] Zhou W, Huang C, Gong Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of an ANS gene encoding anthocyanidin synthase from purple-fleshed sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 28: 133
- [24] Yan M, Liu X, Guan C, et al. Cloning and expression analysis of an anthocyanidin synthase gene homolog from *Brassica juncea* [J]. Mol Breeding, 2010, 28: 9483
- [25] Yan M, Ding S, Liu L, et al. Cloning and expression analysis of an anthocyanidin synthase gene homologue from *Brassica carinata* [J]. J Genet, 2014, 93: 513-516
- [26] Zhang X, Yue Z, Mei S, et al. A de novo genome of a Chinese radish cultivar [J]. Horticulture Plant J, 2015, doi: 10.16420/j. issn. 2095-9885. 2016-0028
- [27] Fulton T M, Chunwongse J, Tanksley S D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants [J]. Plant Mol Biol Rep, 1995, 13: 207-209
- [28] Park N I, Xu H, Li X, et al. Anthocyanin accumulation and expression of anthocyanin biosynthetic genes in radish (*Raphanus sativus*) [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 6034-6039
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [30] Shi S G, Li S J, Kang Y X, et al. Molecular characterization and expression analyses of an anthocyanin synthase gene from *Magnolia sprengeri* Pamp [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175: 477-488
- [31] Boss P K, Davies C, Robinson S P. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes [J]. Plant Mol Biol, 1996, 32: 565-569
- [32] Russells D W. The metabolism of aromatic compounds in higher plants [J]. J Biol Chem, 1971, 246: 3870-3878
- [33] Schilmiller A L, Stout J, Weng J K, et al. Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2009, 60: 771-782
- [34] Vimolmangkang S, Han Y, Wei G, et al. An apple MYB transcription factor, MdMYB3, is involved in regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 176
- [35] An X H, Tian Y, Chen K Q, et al. The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation [J]. J Plant Physiol, 2012, 169: 710-717

欢迎订阅 2017 年《中国水稻科学》、《Rice Science》

《中国水稻科学》(ISSN 1001-7216, CN 33-1146/S) 为中国水稻研究所主办的全国性学术期刊。本刊为中文核心期刊、中国科学引文索引数据库核心期刊、中国科技核心期刊,也是国内外 30 多种数据库和检索期刊的文献源。在全国和地方期刊评比中,《中国水稻科学》多次获优秀期刊奖,曾两度被评为全国优秀科技期刊,荣获第三届国家期刊奖(百种重点期刊),并入选中国期刊方阵双百期刊、中国精品科技期刊、百种中国杰出学术期刊和中国百强报刊。

本刊主要报道以水稻为研究对象的未经发表的原始论文。所设栏目包括研究报告、研究简报、研究快报、研究简讯、实验技术、学术专论、文献综述等。读者对象为国内外从事水稻科研、教学、生产和管理的有关人员。同时,还办有《Rice Science》(水稻科学)(ISSN 1672-6308, CN 33-1317/S)。

双月刊,每期定价 20.00 元,全年 120.00 元,邮发代号 32-94,国外代号 Q6533。读者可在各地邮政局订阅,也可向编辑部订阅。《Rice Science》为双月刊,每期定价 15.00 元,全年 90.00 元,境外 15 美元(全年 90 美元),自办发行,请读者直接向编辑部订阅。

地址:杭州市体育场路 359 号中国水稻研究所内

邮编:310006

电话:0571-63370278(63371017)

E-mail: cjsr@263.net; li@ricescience.org; rs@ricescience.org