

参薯*DaANS*基因克隆及表达差异分析

陈跃华, 许云, 吴文墙, 刘林娅, 黄小龙, 黄东益*

海南大学农学院, 海口570228

摘要: 通过研究参薯块茎花青素合成途径中*DaANS*基因的功能以为参薯分子育种打下基础。利用RT-PCR与RACE技术从参薯块茎中扩增得到1 320 bp的花青素合成酶cDNA序列, 其编码356个氨基酸, 命名为*DaANS* (登录号为KP729182)。基因组序列全长1 534 bp, 具有一个内含子。使用荧光定量PCR技术对参薯不同组织及其块茎不同发育时期的*DaANS*基因相对表达量进行测定。结果表明: *DaANS*基因具有明显的组织特异性和时空性, 不同组织中块茎表达量最高, 且在块茎生长的前期具有很高的表达量, 在8月份到顶峰, 随后急剧降低。

关键词: 花青素; 参薯; 花青素合成酶; 基因克隆; 实时荧光定量PCR

Cloning and Analysis of Differential Expression of *DaANS* Gene in *Dioscorea alata*

CHEN Yue-Hua, XU Yun, WU Wen-Qiang, LIU Lin-Ya, HUANG Xiao-Long, HUANG Dong-Yi*

College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: The function of *DaANS* gene in anthocyanin biosynthesis pathway was studied to lay the foundation for molecular breeding of *Dioscorea alata*. In this paper, the cDNA sequence of *DaANS* gene (1 320 bp) was cloned by RT-PCR and RACE techniques from the tuber of *D. alata*. The gene was named as *DaANS* (accession number: KP729182) encoding a protein of 356 amino acids. The full-length of DNA sequence was 1 534 bp, containing one intron. The relative expression of *DaANS* was determined by real-time quantitative PCR in six different organizations and different developmental stages of tubers. The results showed the expression of *DaANS* gene had obvious characters of space and time. The expression of tuber was the highest in different tissues. And the early stage of tuber growth had a high amount of expression, in August to the peak, and then decreased sharply.

Key words: anthocyanidin; *Dioscorea alata*; anthocyanidin synthase; gene cloning; real-time quantitative PCR

参薯(*Dioscorea alata*)又称大薯、脚板薯, 属薯蓣科薯蓣属, 是一年生或多年生缠绕性藤本植物, 我国主要分布在云南、海南、广西等西南地区。其块茎富含淀粉, 是西非各国的重要粮食作物。参薯块茎由于花青素和其他次生代谢产物含量的差异呈现白色、白中带紫、紫色等不同颜色。花青素也称花色素(anthocyanidin), 属多酚类化合物, 在医疗保健、食品添加剂、观赏园艺等方面均具有重要价值。因此块茎中花青素的含量是参薯的重要品质特征, 研究花青素代谢途径中关键酶的基因及其表达量十分重要。在不同物种中, 主导花青素积累的关键酶有所差异, 主要包括F3H、DFR、ANS、GT等(Boss等1996; Shimada等2006)。在参薯块茎中主导花青素含量的关键因素是花青素合成酶基因的表达量。

花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)

作为花青素生物合成途径后期中的关键酶, 催化无色花青素的脱水氧化形成有色的花青素(Saito等1999)。目前, 花青素合成酶基因已经从紫苏(*Perilla frutescens*) (Gong等1997)、洋葱(*Allium cepa*) (Kim等2004)、鹤望兰(*Strelitzia reginae*) (樊荣辉等2013)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Wilmouth等2002)等植物中分离克隆出来。国内外对于参薯的研究, 主要集中在抗病种质的筛选保存、离体种质资源收集(Mignouna等2002)、分离提取花青素及鉴定。Narina等(2011)对参薯的EST进行标记, 构建了遗传连锁图谱。许云等(2014)采用参薯带节茎段

收稿 2015-03-20 修定 2015-06-03

资助 2013年海南省重大科技专项(ZDZX2013023)和海南大学地方服务项目(HDSF201304)。

* 通讯作者(E-mail: dioscorea@163.com; Tel: 0898-66279037)。

诱导类原球茎。但在分子水平上对参薯中花青素合成酶基因的研究未见报道。本研究从参薯紫色块茎中克隆获得花青素合成酶基因*DaANS*, 并对基因及其编码蛋白序列进行分析; 同时采用实时荧光定量PCR技术对该基因在参薯不同组织以及块茎不同生长时期的基因表达量进行检测和分析, 为深入研究*DaANS*基因的调控机理提供分子依据, 以期对参薯块茎花青素形成的分子机理研究奠定基础。

材料与方 法

1 材料

实验材料为参薯(*Dioscorea alata* Linn.)云南品系, 种植于海南大学农学院农业部薯蓣种质资源圃中, 从7月份开始选择长势相似的植株3株, 采集相同发育时期的不同组织和不同时期的块茎(于7月份开始, 每隔1个月采收块茎一次), 液氮速冻后于-80 °C条件下保存备用。

3' RACE和5' RACE试剂盒及反转录试剂盒、pMD18-T载体、*LA Taq*酶、dNTP均购自TaKaRa公司; HiFi *Trans Taq*酶购自北京全式金生物技术有限公司; 引物合成及测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2 总RNA和DNA提取及cDNA第一链的合成

采用改良的CTAB-LiCl法提取参薯块茎总RNA。利用Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis试剂盒(Fermentas公司)以提取的总RNA为模板合成3' RACE和5' RACE的cDNA第一链。采用

CTAB法提取参薯叶片总DNA。

3 参薯*DaANS*基因cDNA序列的克隆

查找NCBI上登录的植物花青素合成酶基因保守区段序列, 设计引物ANS1F、ANS1R (表1)用来扩增cDNA中间序列, 随后以中间序列设计3'端引物ANS3'-1、ANS3'-2 (表1) (周生茂等2009), 扩增*DaANS*基因的3'端序列; 以5'端引物ANS5'-1、ANS5'-2 (表1), 扩增*DaANS*基因的5'端序列。

依据RACE试剂盒(TaKaRa公司)说明, 对RNA加帽处理后, 进行套式PCR。反应条件为94 °C预变性5 min; 94 °C变性1 min, 分别于55、57 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 30个循环; 72 °C延伸5 min。PCR产物经电泳后, 取目标片段回收、纯化与pMD18-T载体连接, 转化感受态细胞后, 筛选送测序。用DNAMAN软件拼接测序结果, 获得参薯块茎花青素合成酶基因全长cDNA序列。

4 参薯*DaANS*基因cDNA和DNA全长序列的获得

根据拼接的结果, 设计了*DaANS*基因全长引物ANS4F、ANS4R (表1), 以上述提取的参薯块茎cDNA为模板, 扩增花青素合成酶基因的cDNA全长序列。随后以上述提取的参薯块茎基因组DNA为模板, 扩增花青素合成酶基因的DNA全长序列。PCR反应条件为95 °C预变性3 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min。PCR产物经电泳后, 取目标片段回收、纯化与pMD18-T载体连接, 转化感受态细胞后, 筛选送测序。

表1 引物序列及退火温度

Table 1 The primer sequences and annealing temperatures

引物名称	序列 (5'→3')	退火温度/°C
ANS1F	TNCAAATGAARATMAYTACTACCCAA	55
ANS1R	CARAANACMGCCCAWGAAYCCTNACC	55
ANS3'-1	AGTGTCTCAACCCAGTCTCG	56
ANS3'-2	GTGTGTGCCTGACTCCATTGT	56
ANS5'-1	CTTGACAGGCCATTGGTGAG	55
ANS5'-2	GCACACACTTGGCCGTGACCC	55
ANS4F	TCTTCATCGAGAAAACAAAGCCTAC	60
ANS4R	TTATTTAGACTGACTCAATCACCATG	60
Q-ANS-F1	GCAATAGACCAAATCCCCACC	60
Q-ANS-R1	CGCACCTCCTCAACGCAC	60
18S-Q-F	GGGCATTCGTATTTCATAGTCAGAG	60
18S-Q-R	CGGCATCGTTTATGGTTGAGA	60

5 参薯*DaANS*基因的同源性及进化分析

从NCBI中下载其他植物*ANS*基因编码的氨基酸序列,使用DNAMAN软件对氨基酸进行多重序列比对,分析保守的功能结构域。使用MEGA 5.0对所选氨基酸序列进行进化树的构建,对*ANS*氨基酸同源性及进化进行分析。

6 参薯*DaANS*基因不同组织及块茎不同时期的特异性表达

分别提取参薯不同组织的总RNA以及不同时期的块茎的总RNA。使用Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (宝生物工程(大连)有限公司)反转录合成cDNA第一链备用。

使用荧光定量PCR (real-time quantitative PCR) 检测基因的相对表达量。设计引物Q-ANS-F1、Q-ANS-R1 (表1)扩增目标基因,预测产物长度是174 bp,退火温度60 °C;以18S RNA作为内参基因,引物序列为18S-Q-F、18S-Q-R (表1),预测产物长度是180 bp。标准品cDNA和待测样品均设置3次重复。

实验结果

1 参薯*DaANS*基因的克隆及结构分析

保守区段序列设计的引物扩增得到约230 bp的片段(图1-A),经DNAMAN和BLAST比对分析,该序列为*DaANS*基因cDNA序列的同源片段。依据3' RACE试剂盒说明,进行套式PCR,获得约700 bp的片段(图1-B)。利用5' RACE特异性引物和试剂盒

自带的5' RACE Outer Primer、5' RACE Inner Primer进行套式PCR,获得约为800 bp的片段(图1-C)。根据3' RACE和5' RACE测序结果拼接得到参薯花青素合成酶基因全长cDNA序列为1 424 bp (图1-D),命名为*DaANS*。

利用*DaANS*基因全长引物ANS4F、ANS4R,以参薯块茎cDNA为模板,扩增得到1 320 bp的cDNA序列,包含完整ORF (1 071 bp),3'端和5'端的非翻译区长度分别为187和62 bp。起始密码子位于5'端的63~65 bp处。在3'末端存在TAAATAAA的加尾信号。*DaANS*基因序列经分析后,具有完整的5'和3'末端,确认是参薯花青素合成酶基因的全长序列。以参薯块茎DNA为模板,扩增得到1 534 bp的基因序列。两者序列比对后发现,参薯*DaANS*基因含有一个内含子(图2)。与预测的完整ORF比对,将ATG起始密码子定义为首位,内含子则位于508~621 bp。同时外显子和内含子的边界均满足“GT-AG”规则,且与NCBI中已经报道研究的葡萄具有相似的剪接位点和基因结构。

*DaANS*基因的完整阅读框架编码356个氨基酸(图3),其分子量和理论等电点(PI)分别为40.22 kDa和5.81,带有51个负电荷残基(Asp+Glu)和44个正电荷残基(Arg+Lys)数目,其消减系数(Abs)为1.094。

2 参薯*DaANS*基因的同源性及进化分析

从NCBI中下载下列植物的*ANS*基因编码的氨基酸序列,用DNAMAN软件进行氨基酸多重序列比

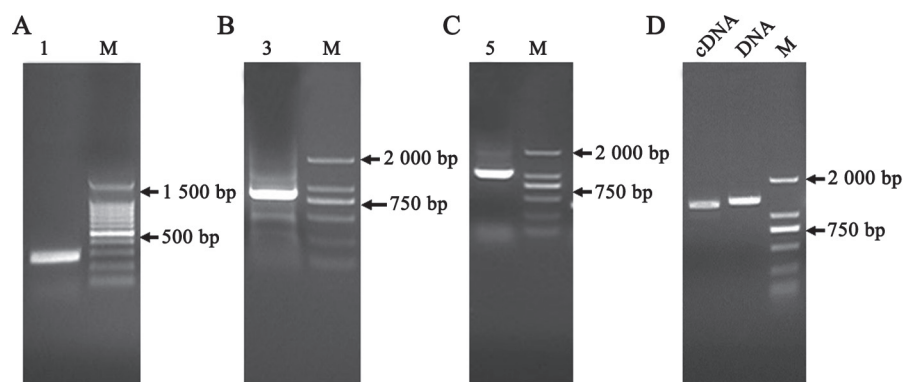


图1 *DaANS*基因的扩增结果

Fig.1 The PCR amplification results of *DaANS* gene

A: *DaANS*基因保守序列的扩增结果; B: *DaANS*基因的3'端扩增结果; C: *DaANS*基因的5'端扩增结果; D: *DaANS*基因cDNA和DNA全长扩增结果; M: DL2000 marker。

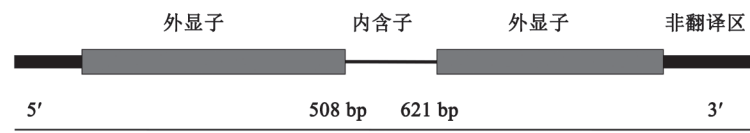


图2 参薯*DaANS*基因的结构分析
Fig.2 The structure analysis of *DaANS* gene

```

MATKVFVPRVESLARSQIDQIPTEYVRPESERDHLGDALEAEKKSVMNGPQIPIIDIKMFDSDDEAVRKQCVEEVRSAA
VNWGVMHIVGHGIPAELIDRLREAGKRFFDLPLEEKEKYANDQSSGMIQGYGSKLANNASQLEWEDYFFHLMFP
ENQTNLSIWPRYPPDYTEVTKEFAKELRVVMTKMFNLLSLGVGLPAEKLEAEAGGMENILLQMKINYYPKCPQPSL
AVGVEAHTDVSRLSFILHNNVPLQVVFYDGKWVTAKCVPDSIVVHVHGSLEILTNGLYKSVLHRGLVNEKEKVRISW
AVFAEPDKEKVLRLPELVSDAAPPKYELRTFAQHVROKLFKKEQEAATK*

```

图3 参薯*DaANS*编码的氨基酸一级结构
Fig.3 The primary structure of *DaANS* protein amino acids

对后发现, *ANS*基因编码的蛋白质具有2个保守结构域(图4)。DIOX-N超家族(Gln51~Pro163)是高度保守的N端结构。另一个保守结构域(Leu212~Pro311)属于2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶家族。其中包含2个精氨酸(Arg241和Arg293), 可以特异性与2-酮戊二酸结合; 另含保守组氨酸4个(His236、His247、His274和His292)、天冬氨酸3个(Asp258、Asp269和Asp277), 可以与Fe²⁺结合, 具有双加氧的功能。

利用参薯*DaANS*编码的氨基酸序列与所选植物进行比对构建进化树, 分析发现*ANS*基因编码的氨基酸具有64%~73%的较高同源性。在单子叶植物中, *ANS*基因编码的氨基酸与旅人蕉科的鹤望兰同源性最高, 达到73%。在双子叶植物中与滇藏木兰(AHU88620.1)、甜樱桃(AEO79983.1)、柰(AEN19292.1)同源性最高, 达到68%。构建的进化树显示参薯与蔷薇科的甜樱桃、巴旦木、旋花科的甘薯以及木兰科的滇藏木兰聚为一小类, 在和十字花科的紫罗兰、拟南芥、芥菜以及石蒜科的石蒜聚于一亚类, 最后才和圆叶牵牛、可可、鸢尾等其他物种归为一大类; 分析发现在进化树上同科植物基本上处于同一个分支。但是甘薯(ADE08370.1)没有归类到旋花科, 不能被区分开来。总的来说氨基酸的比对结果与植物进化关系基本保持一致。

3 参薯*DaANS*基因在不同组织以及块茎不同时期的表达分析

以参薯功能叶的*DaANS*基因表达量定为“1”,

依据相对定量公式作图, 得到*DaANS*基因在不同组织中的表达结果(图6-A)。实验结果表明, *DaANS*基因在顶芽、茎、块茎、嫩叶中均有表达。其中块茎的*DaANS*基因表达量最高, 是顶芽、茎、嫩叶中基因表达量的40倍左右。不同组织中*DaANS*基因表达量与花青素的含量变化趋势具有一定的相似性。从表观特征也可以发现, 颜色较深的组织中花青素含量较高, 同时*DaANS*基因的表达量也较高, 这表明*DaANS*基因的相对表达量与花青素积累两者之间存在相同的趋势走向。同时也可以发现*DaANS*基因的表达具有明显的组织特异性, 在块茎中的表达量最高。

以*DaANS*基因在11月份的表达量作为对照, 得到块茎*DaANS*基因不同时期的表达结果(图6-B)。实验结果表明*DaANS*基因主要在块茎形成的前期大量表达, 积累花青素。在8月份块茎膨大的时期, *DaANS*基因的表达量达到顶峰, 随着花青素含量积累的增加以及块茎的膨大, *DaANS*基因的表达量急剧降低, 在12月份采收期的时候, 基因的表达量有所增加(比11月份增加了0.05)。在植株的生长前期, 代谢旺盛, 各种酶的活性都比较高, *DaANS*基因在前期的高表达量可能与此有一定的关联。从图6中可以发现*DaANS*基因的表达量存在明显的时空性。

讨 论

花青素合成酶是花青素合成通路末端的酶,

<i>Dioscorea alata</i>	VGVNHI VGHGI PAELI DRLREAGKRFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Strelitzia reginae</i> AGC73738.1	VGVNHI VNHGI SLELI EQLRRVGRKRFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Lilium cernuum</i> AGC92011.1	VGVNHI VNHRI PLELI DRVREVGKGFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Iris x hollandica</i> BAF62629.1	VGVNHI VNHGI PPELI ERVRAAGKGFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Lilium</i> spp. BAM28976.1	VGVNHI VNHRI PLELI DRVREVGKGFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Lycoris chinensis</i> AGD99672.1	VGVNHI TNHGI SQELI EKVRVAVGKGFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Magnolia sprengeri</i> AHU88620.1	VGVNHI I NHGI SVELMNRVRI AKRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Prunus avium</i> AEO79983.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Prunus salicina</i> var. <i>cordata</i> AEN19292.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Prunus persica</i> AJA79070.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Prunus domestica</i> AHZ30597.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> AAO73440.1	VGVNHLI NHGVPVELMNRVRRKSGEFPGLPVEBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Ipomoea batatas</i> ADE08370.1	VGVNHLVNHGI PEELTGRVRAAGEGFFGQPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Matthiola incana</i> AAB82287.1	VGVNHLI NHGI PVDLNMRVRRKSGEFPGLPVEBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Pyrus communis</i> AGL50919.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69683.1	VGVNHLVNHGI PEELTGRVRAAGEGFFGQPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Brassica juncea</i> ACH58397.1	VGVNHLI NHGVPVELMNRVRRKSGEFPGLPVEBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> ADK37750.1	VGVNHLI NHGVPVELMNRVRRKSGEFPGLPVEBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69684.1	VGVNHLVNHGI PEELTGRVRAAGEGFFGQPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69682.1	VGVNHLVNHGI PEELTGRVRAAGEGFFGQPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Pyrus communis</i> ABB70119.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Theobroma cacao</i> ADD51356.1	VGVNHLVNHGI SDELMNRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Arabidopsis thaliana</i> AEI99590.1	VGVNHLI NHGI PADLNMRVRRKAGRAFFDFLPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Ipomoea horsfalliae</i> ACS71531.1	VGVNHLVNHGI PEELTGRVRAAGEGFFGQPI EBEKQYANDQSSCKI CGYGSKLANNASGQLEVEDYFFHLMFPENQTNLS	80
<i>Dioscorea alata</i>	I VPRYPPDYTEVTKFAKELRVVTKMFLNSLGLVGLPAE. KLEAEAGGMENI L L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Strelitzia reginae</i> AGC73738.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Lilium cernuum</i> AGC92011.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Iris x hollandica</i> BAF62629.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Lilium</i> spp. BAM28976.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Lycoris chinensis</i> AGD99672.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	160
<i>Magnolia sprengeri</i> AHU88620.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Prunus avium</i> AEO79983.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Prunus salicina</i> var. <i>cordata</i> AEN19292.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Prunus persica</i> AJA79070.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Prunus domestica</i> AHZ30597.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> AAO73440.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Ipomoea batatas</i> ADE08370.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Matthiola incana</i> AAB82287.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Pyrus communis</i> AGL50919.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69683.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Brassica juncea</i> ACH58397.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> ADK37750.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69684.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Ipomoea purpurea</i> ABW69682.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Pyrus communis</i> ABB70119.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Theobroma cacao</i> ADD51356.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Arabidopsis thaliana</i> AEI99590.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159
<i>Ipomoea horsfalliae</i> ACS71531.1	I VPKQPSDYI EVTKFGRQLRVVTKMLQALSLGLGLEEG. KLEBEELGMDLL L QMKI NYYPKQPPELAVGVEAHTDV	159

图4 *DaANS*蛋白序列与其他植物ANS蛋白序列比对部分结果Fig.4 Sequence alignment of deduced *DaANS* and other plant ANS proteins

*ANS*基因编码蛋白质的2个保守结构域, 一个是DIOX-N超家族, 位于Gln51~Pro163, 另一个是2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶家族, 位于Leu212~Pro311。选用的植物为: 鹤望兰(*Strelitzia reginae*)、垂花百合(*Lilium cernuum*)、荷兰鸢尾(*Iris x hollandica*)、百合(*Lilium* spp.)、中国石蒜(*Lycoris chinensis*)、滇藏木兰(*Magnolia sprengeri*)、布氏稠李(*Prunus avium*)、木奈(*Prunus salicina* var. *cordata*)、巴旦木(*Prunus persica*)、欧洲李(*Prunus domestica*)、甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)、红薯(*Ipomoea batatas*)、紫罗兰(*Matthiola incana*)、西洋梨(*Pyrus communis*)、圆叶牵牛(*Ipomoea purpurea*)、芥菜(*Brassica juncea*)、白花甘蓝(*Brassica oleracea* var. *alboglabra*)、紫花牵牛(*Ipomoea purpurea*)、裂叶牵牛(*Ipomoea purpurea*)、杜梨(*Pyrus communis*)、可可(*Theobroma cacao*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、王妃藤(*Ipomoea horsfalliae*); 图5同。

决定了花青素的累积, 在果实着色及花色形成中具有重要作用。无色花青素在花青素合成酶的催化下生成有色花青素, 随后与3-O-葡萄糖基转移酶结合, 运输到液泡中, 形成显色的3-O-糖苷化花青素(Nakajima等2001), *ANS*基因最早是从玉米的A2突变体中利用转座子标签技术鉴定和克隆得到的(Menssen等1990)。近年来已从紫苏、洋葱、鹤望兰、拟南芥等植物中分离克隆到*ANS*基因。

*ANS*基因在参薯块茎中的表达量高可能与花

青素的合成有关, 推测*DaANS*可能参与了参薯块茎花青素积累的分子调控。在对彩叶草的研究中发现, *ANS*基因在红色品种茎、叶、花中有较强的表达, 且强于绿色品种(祝钦波2004)。Nakamura等(2006)利用RNA干扰技术抑制蓝猪耳*ANS*基因的表达, 使得蓝色花朵变成白色花朵, 且遗传性状十分稳定。Aharoni等(2001)在草莓研究中通过抑制*ANS*基因的表达量, 使得粉红色的花冠变成白色, 明显减少花青素的积累, 表明基因的表达量是植

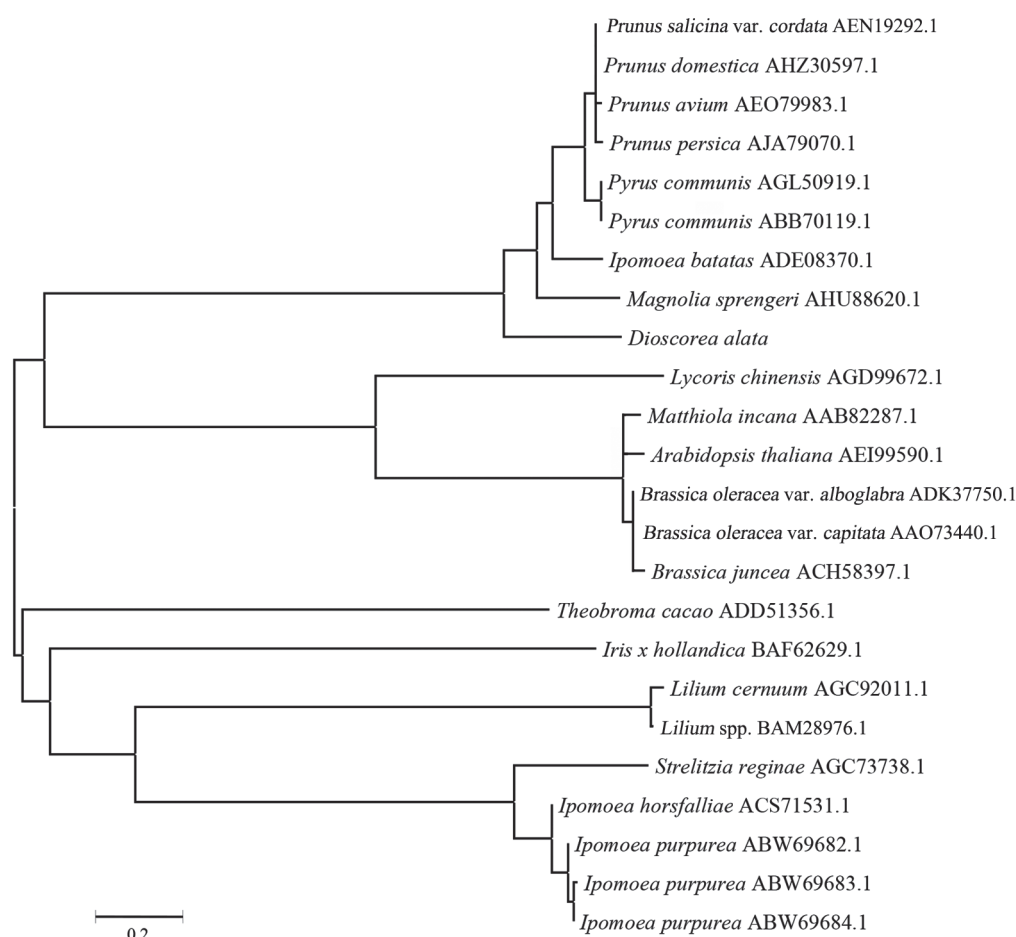
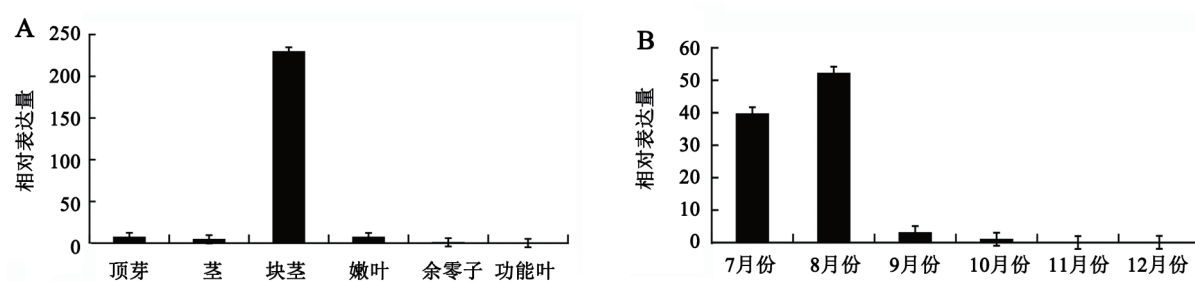


图5 ANS氨基酸系统进化关系

Fig.5 Phylogenetic analyses of ANS

图6 参薯*DaANS*基因相对表达量Fig.6 The relative expression levels of *DaANS* gene in *D. alata*

A: *DaANS*基因在不同组织中的表达结果; B: *DaANS*基因在块茎不同时期的表达结果。

物颜色变化形成的重要因素之一。而Reddy等(2007)将*ANS*基因在水稻中过量表达,使转基因植株种皮呈现紫红色。Rosati等(2003)则研究*ANS*基因和*CHS*基因两者之间的协同表达对金钟连翘花朵颜色的影响,得出须同时转入两个基因才可以

改变花色,而转入单个基因则不改变花色。表明两者是花青素合成途径的主要结构基因,两者之间的协同表达对于花青素的积累具有重要作用。近年来,转录因子对于花青素生物合成作用方面的研究已经取得了一定的进展。在今后的研究中,

需要更多关注MYB、bHLH和WD40作用的调控网络以及微小RNA对调控基因表达的作用(王华等2015)。

ANS是花色素合成途径的关键酶, 可通过改变ANS基因的表达来改变花色素的含量, 进而引起植物器官颜色的变化。因此, 本课题组欲通过转基因技术对*DaANS*基因进行功能验证, 为参薯分子育种打下基础, 对调控和增加花青素形成以及改善膳食营养和创新参薯品种具有重要意义。

参考文献

- 樊荣辉, 黄敏玲, 吴建设, 钟淮钦(2013). 鹤望兰花青素合成酶基因*SrANS*的克隆及表达分析. 中国细胞生物学学报, 35 (11): 1620~1625
- 王华, 李茂福, 杨媛, 金万梅(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. 植物生理学报, 51 (1): 29~43
- 许云, 高艳强, 高洪昌, 夏赟, 吴文端, 黄东益(2014). 大薯类原球茎的离体诱导及再生体系的建立. 植物生理学报, 50 (7): 1027~1032
- 周生茂, 王玲平, 向珣, 韦本辉, 李立志, 李杨瑞, 方锋学, 曹家树(2009). 山药ANS基因的克隆和分子特性及其与花青素积累的关系. 园艺学报, 36 (9): 1317~1326
- 祝钦泷(2004). 彩叶草(*Solenostemon scutellarioides*)叶色形成相关的花青苷生物合成途径的分子调控研究[博士论文]. 重庆: 西南大学
- Aharoni A, De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JN, O'Connell AP (2001). The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J*, 28 (3): 319~332
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol*, 111 (4): 1059~1066
- Gong Z, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K (1997). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol*, 35 (6): 915~927
- Kim S, Binzel ML, Yoo KS, Park S, Pike LM (2004). *Pink (P)*, a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. *Mol Genomics*, 272 (1): 18~27
- Menssen A, Hohmann S, Martin W, Schnable PS, Peterson PA, Saedler H, Gierl A (1990). The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the temini generating a novel intron from a dSpm element in the *A2* gene. *EMBO J*, 9 (10): 3051~3057
- Mignouna HD, Dansi A, Zok S (2002). Morphological and isozymic diversity of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of Cameroon. *Genetic Resour Crop Evol*, 49: 21~29
- Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K (2001). Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Biol Chem*, 276 (28): 25797~25803
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Miyazaki K, Suzuki K, Tanaka Y (2006). RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnol*, 23 (1): 13~17
- Narina SS, Buyyarapu R, Kottapalli KR, Sartie AM, Ali MI, Robert A, Hodeba MJ, Sayre BL, Scheffler BE (2011). Generation and analysis of expressed sequence tags (ESTs) for marker development in yam (*Dioscorea alata* L.). *BMC Genomics*, 12: 100
- Reddy AM, Reddy VS, Scheffler BE, Wienand U, Reddy AR (2007). Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metab Eng*, 9 (1): 95~111
- Rosati C, Simoneau P, Treutter D, Poupard P, Cadot Y, Cadic A, Duron M (2003). Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway. *Mol Breeding*, 12: 197~208
- Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M (1999). 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*. *Plant J*, 17 (2): 181~189
- Shimada S, Otsuki H, Sakuta M (2006). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *J Exp Bot*, 58 (5): 957~967
- Wilmouth RC, Turnbull JJ, Welford RW, Clifton IJ, Prescott AG, Schofield CJ (2002). Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure*, 10 (1): 93~103