

三七中花色苷合成结构基因的克隆及表达分析

熊 高¹, 王 勇¹, 胡永媛¹, 黄天卫¹, 魏富刚², 高丽芳¹, 陈中坚^{1*}

1. 文山学院文山三七研究院, 云南 文山 663099

2. 文山苗乡三七股份有限公司, 云南 文山 663099

摘 要: 目的 克隆三七 *Panax notoginseng* 的花色苷合成结构基因 (anthocyanin biosynthesis structural genes, ABSG), 研究 ABSG 的表达模式及其与相关表型的关联性。方法 利用 RT-PCR 技术克隆三七 ABSG, 进行生物信息学和表达模式分析; 使用 pH 示差法分析三七紫根的花色苷含量, 并通过 qRT-PCR 技术进行相关结构基因的关联性研究。结果 克隆获得 6 类共 8 个三七 ABSG, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度在 600~1500 bp, 均含有花色苷生物合成相关的保守结构域。进化树分析显示, 8 个基因被分为 5 个分支, 且与其他物种有较高的同源性。顺式作用元件分析表明, 三七 ABSG 启动子序列中含有多种元件, 其中光响应和转录因子类元件的数量最多。表达模式显示, 8 个基因主要分为在花发育前期阶段 (花蕾期) 高丰度表达基因和在根部高量表达基因。此外, 对三七紫根的分析发现, 相比于普通型黄白根, 其花色苷含量提高约 3 倍, *PnF3'H1* 基因和 *PnUFGT* 基因表达显著增强, 表明它们可能是参与紫根三七中花色苷形成的关键结构基因。结论 克隆获得 8 个三七 ABSG, 为该类游戏的功能机制研究和三七种质创新利用奠定基础。

关键词: 三七; 花色苷合成结构基因; 克隆; 表达分析; RT-PCR

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5707-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.025

Cloning and expression analysis of anthocyanin biosynthesis structural genes in *Panax notoginseng*

XIONG Gao¹, WANG Yong¹, HU Yong-yuan¹, HUANG Tian-wei¹, WEI Fu-gang², GAO Li-fang¹, CHEN Zhong-jian¹

1. Wenshan Sanqi Institute of Science and Technology, Wenshan University, Wenshan 663099, China

2. Wenshan Miaoxiang Sanqi Technology Co., Ltd., Wenshan 663099, China

Abstract: Objective To clone *Panax notoginseng* anthocyanin biosynthesis structural genes (ABSG) and study their expression patterns. **Methods** The complete open reading frame (ORF) of *P. notoginseng* ABSG were cloned using RT-PCR technology, and the bioinformatic method and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were used to analyze these genes. By pH differential method, total anthocyanin content was determined in purple root (PR) and yellow white root (YWR) of *P. notoginseng*. The differential expression of related structural genes in PR and YWR were analyzed by qRT-PCR. **Results** Eight ABSG belonged to six types were cloned. The ORF length of these genes was from 600 bp to 1500 bp, and they all contained conserved domains related to anthocyanin biosynthesis. Phylogenetic tree analysis showed that eight genes were divided into five branches, and these genes in *P. notoginseng* had high homology with other species. The promoter analysis of eight genes indicated that there were multiple putative cis-acting elements, among which the number of cis-acting element of light and transcription factor MYB/MYC was the most. According to the expression pattern, the eight genes were divided into two types, one was mainly highly expressed in the flowers at the early development stages (budding stage), and the other was mainly highly expressed in the roots. Furthermore, the anthocyanin content was detected to increase about three times and the expression of *PnF3'H1* and *PnUFGT* were also significantly increased in PR compared with YWR, indicating that these two genes may be the key ABSG involved in formation of anthocyanin in PR. **Conclusion** Eight ABSG were cloned in *P. notoginseng*, and its expressions were analyzed, which will provide basic knowledge for the further

收稿日期: 2021-01-09

基金项目: 云南省教育科学基金项目 (2019J0909); 云南省重大科技专项 (2016ZF001, 2018ZF011); 科技入滇专项 (2017IB038)

作者简介: 熊 高 (1989—), 苗族, 博士, 讲师, 主要从事三七育种及功能基因研究。E-mail: xgao13@163.com

*通信作者: 陈中坚, 研究员, 主要从事以三七为主的中药材栽培和育种研究。E-mail: panaxnotoginseng@126.com

functional studies of these genes and the innovative utilization of Sanqi germplasm.

Key words: *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen ex C. H.; anthocyanin biosynthesis structural genes; cloning; expression analysis; RT-PCR

花色苷属于类黄酮化合物,是植物的主要次级代谢产物之一,它不仅可保护植物免受生物和非生物胁迫^[1-2],还对人类的脑健康、抗氧化及抗炎抗癌等方面发挥作用^[3-5]。因此,培育花色苷含量高的品种一直是植物育种工作中的方向之一。花色苷是由花色苷元和糖苷结合而成的糖苷合成物,其生物合成涉及一系列负责编码花色苷合成关键酶的结构基因的表达参与,这些结构基因构成了一条植物经典的花色苷代谢路径,是花色苷生物合成的基础^[6]。在该代谢路径^[7]中:首先,以丙二酰 CoA 和香豆酰 CoA 为原料,在查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)和查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)催化下形成 4'5'7'-三羟基黄烷酮,然后经黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)作用下形成二氢山柰酚(dihydrokaempferol, DHK);此时, DHK 可作为中间产物在类黄酮 3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮 3',5'-羟化酶(flavonoid 3', 5'-hydroxylase, F3'5'H)催化下进入不同的分支途径,分别形成二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM);其次,3 个分支形成的物质在 DFR 基因编码的二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)催化下形成原花色苷,再经花色苷合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)作用转化成花色苷元,由此形成了花色苷的基本骨架。最后,经过尿苷二磷酸-葡萄糖-类黄酮-3-葡萄糖基转移酶(UDP-glucose 3-O-flavonoid glucosyltransferase, UFGT)催化生成花色苷元 3-O-葡萄糖苷,再由一系列的修饰反应形成稳定的花色苷物质。

植物中花色苷合成结构基因表达水平的改变可以直接影响花色苷的合成。以模式植物拟南芥为代表,通过对 CHS、CHI、F3H、F3'H、DFR 等基因座位进行突变,能影响种皮及茎、叶组织中紫色花色苷的累积^[8-10];同样,基于 RNAi 的基因沉默或 CRISPR/Cas9 的基因敲除技术在水稻、大豆、草莓、牵牛花中对这些基因进行功能研究,也显示了结构基因的表达水平与花色苷合成的相关性^[11-16];此外,在玫瑰花中, UFGT 基因在各组织中的表达模式与花色苷累积一致,该基因的高量表

达是玫瑰花颜色鲜艳的基础^[17]。总之,植物花色苷合成的基础是代谢路径中结构基因表达的结果,这些基因的改变可以调节花色苷的含量而影响植物组织或器官的颜色。

三七作为我国著名的中药材,除含有众所周知的皂苷成分外,也具有花色苷;花色苷含量在三七根部累积可形成紫色块根,紫根三七在生态适应和药效方面均优于普通三七^[18],高花色苷含量特性的紫根三七一直是优质三七新品种的选育目标。然而,参与三七花色苷合成的相关结构基因并未被克隆报道,尚缺乏关于对三七花色苷合成分子基础的认识。本研究通过生物信息学分析及同源克隆技术获得三七花色苷合成结构基因,利用 qRT-PCR 方法研究这些基因的时空表达模式及与紫根三七表型的关联性,以期明确参与该性状形成的关键结构基因,为进一步探究该类基因的功能机制奠定基础,对深入理解三七花色苷合成的遗传本质及相关种质资源创新具有重要意义。

1 材料与试剂

供试三七(2 年生)采集于文山三七研究院和文山苗乡三七科技公司建立的三七种质资源圃内(文山州丘北县境内),包括花蕾期(8 月初)三七的花和开花期(8 月中)三七的花、花轴、叶、茎、剪口、主根、须根等各组织,以及结果期(10 月)三七的紫根(文院紫七 1 号)和黄白根。以上组织经去离子水清洗后,立即放于液氮中冷冻, -80 °C 保存。

大肠杆菌 DH5 α 、DL5000 Maker、ExTaq 聚合酶、载体 pMD19-T、反正转录试剂盒购于 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂盒购于北京百泰克公司;DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购于杭州博日科技公司;荧光定量试剂购于上海翊圣公司;琼脂糖、琼脂粉、胰蛋白胨、氯化钠等购于上海生工有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成

下载拟南芥、水稻、棉花等物种中已鉴定的花色苷合成结构基因序列,使用 BLAST 在三七基因组本地 BLAST 数据库中进行比对,获得三七花色苷合成结构基因的预测序列,利用软件 Primer 5.0 设计引物(表 1),由北京擎科生物公司合成。

表 1 基因克隆和定量引物信息

Table 1 Primers of gene cloning and quantitative PCR

基因	全长引物	定量引物
<i>PnCHS1</i>	5'-ATGGCTACTATTTCTGTTGAGGAA-3' 5'-TCAATGAGTAATGGTAGCTGGGA-3'	5'-CAGGCTGATTATCCCGATTATT-3' 5'-GCACCTCCACAACGACCAT-3'
<i>PnCHS2</i>	5'-CCATGATCAGAAAGCGTTAC-3' 5'-CATAACCATCATCACTGAGTAATAG-3'	5'-GAGGAAGGAAAGGCAACTACG-3' 5'-GCCCCAAACCCAAACAGGA-3'
<i>PnCHI</i>	5'-ATGTCGAAGTCGCCGTCG-3' 5'-TCAAGCAGCCTTGTCATCAAAAC-3'	5'-CTTCCAACCTGGCTCCTCTATT-3' 5'-TCTTCAACAAGTCCGAAACCC-3'
<i>PnF3H</i>	5'-ATGGCTCTTTCTACGCTTTCTG-3' 5'-TCAAGCGAAAATTTCTTGTGG-3'	5'-ATCAGGTTGGTGGATTACAGGC-3' 5'-TACAGCGGGTAGACGGTTC-3'
<i>PnF3'H1</i>	5'-ATGGATTTGGCTACTACCCTA-3' 5'-CTAACTCCCATATCTAGATATCTGAT-3'	5'-ATCTTTTCTCGGCTAAGGCTCT-3' 5'-CCATTCACTCGCTCCTGCT-3'
<i>PnF3'H2</i>	5'-CATGGCTCGGACCTACGGT-3' 5'-CTCTTCTTAGGCCGCTACACA-3'	5'-GATGTGGATGGTGAGGGTGG-3' 5'-AAGGATGGAGTCGGAAGGTTT-3'
<i>PnANS</i>	5'-ATGGTGGCCACCTCAGTAGCT-3' 5'-TTAACCACCTTTAGGAGGATTATTC-3'	5'-GGGCTAAAACACCCGTTGACTA-3' 5'-CACCCACTTGCCCTTGTTAGAA-3'
<i>PnUFGT</i>	5'-ATGGGGAGTTCAGCGGAG-3' 5'-CTAAGTTGTAATCACTTCTAGTAGGCG-3'	5'-CAAAGTGTGGACTTGGTGTCTG-3' 5'-GCGATGTTAGGTTGAAGGGAC-3'
<i>PnAct2</i>		5'-GAAGCACCCTGAACCCAAAG-3' 5'-CAGCAAGGTCCAACCGAAG-3'

2.2 基因克隆

严格按照试剂盒说明书操作,分别采用植物 DNA 提取试剂盒提取三七叶片 DNA,利用百泰克 RNA 提取试剂盒提取三七各组织 RNA,并反转录为 cDNA, -20 °C 保存备用。利用设计的特异性引物分别扩增三七花色苷合成结构基因 (*PnCHS1*、*PnCHS2*、*PnCHI*、*PnF3H*、*PnF3'H1*、*PnF3'H2*、*PnANS*、*PnUFGT*) ORF 的全长序列,将 PCR 产物进行检测和胶回收,与载体 pMD19-T 进行连接,转化,筛选阳性单克隆测序。测序由北京擎科生物公司合成。

2.3 生物信息学分析

利用在线软件 GSDBS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析基因结构;使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 确定保守结构域。在三七基因组数据库中截取克隆获得的花色苷基因翻译起始位点 (ATG) 上游 2000 bp 的启动子序列,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psbuget.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子反应调控元件。采用 MEGA7.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 程序对不同物种的花色苷基因构建系统发育树。

2.4 总花色苷提取和含量测定

参考 Fuleki 等^[19]的方法进行花色苷含量的提取和测定,略有改动。取 0.5 g 新鲜三七的根组织,用液氮研磨成粉末,加入 5 mL 盐酸-甲醇提取液 (pH 3.0), 30 °C 条件下温和震荡抽提 2 h, 然后 7000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液作为花色苷提取液,

在 4 °C 下避光保存备用。取 1 mL 花色苷提取液,分别加 pH 1.0 缓冲溶液和 pH 4.5 的缓冲溶液 9 mL, 室温条件下平衡 40 min, 以蒸馏水为空白对照, 分别在波长 530 nm^[20]和 700 nm 波长处测定吸光度 A_{530} 、 A_{700} 。按以下公式进行计算:

$$\text{总花色苷量} = [(A_{530} - A_{700}) \times \text{pH } 1.0 - (A_{530} - A_{700}) \times \text{pH } 4.5] \times M \times DF \times V / (\varepsilon \times L \times mf)$$

M 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔质量; DF 为稀释倍数; V 为提取液总体积; ε 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的平均摩尔消光系数; L 为比色皿的宽度, 取 1 cm; mf 为取样量。

2.5 荧光定量表达分析

根据三七花色苷合成结构基因克隆序列设计 qRT-PCR 引物 (表 1), 分别以三七各组织 cDNA 为模板, 以三七 *Actin 2* 为内参基因, qRT-PCR 检测这些基因在不用组织中的表达水平, 3 次重复, 基因表达水平归一化处理, 使用 t 检验进行统计学分析。热图和柱形图分别使用 R 包 (pheatmap) 和 Graphpad Prism 6 进行绘制。

3 结果与分析

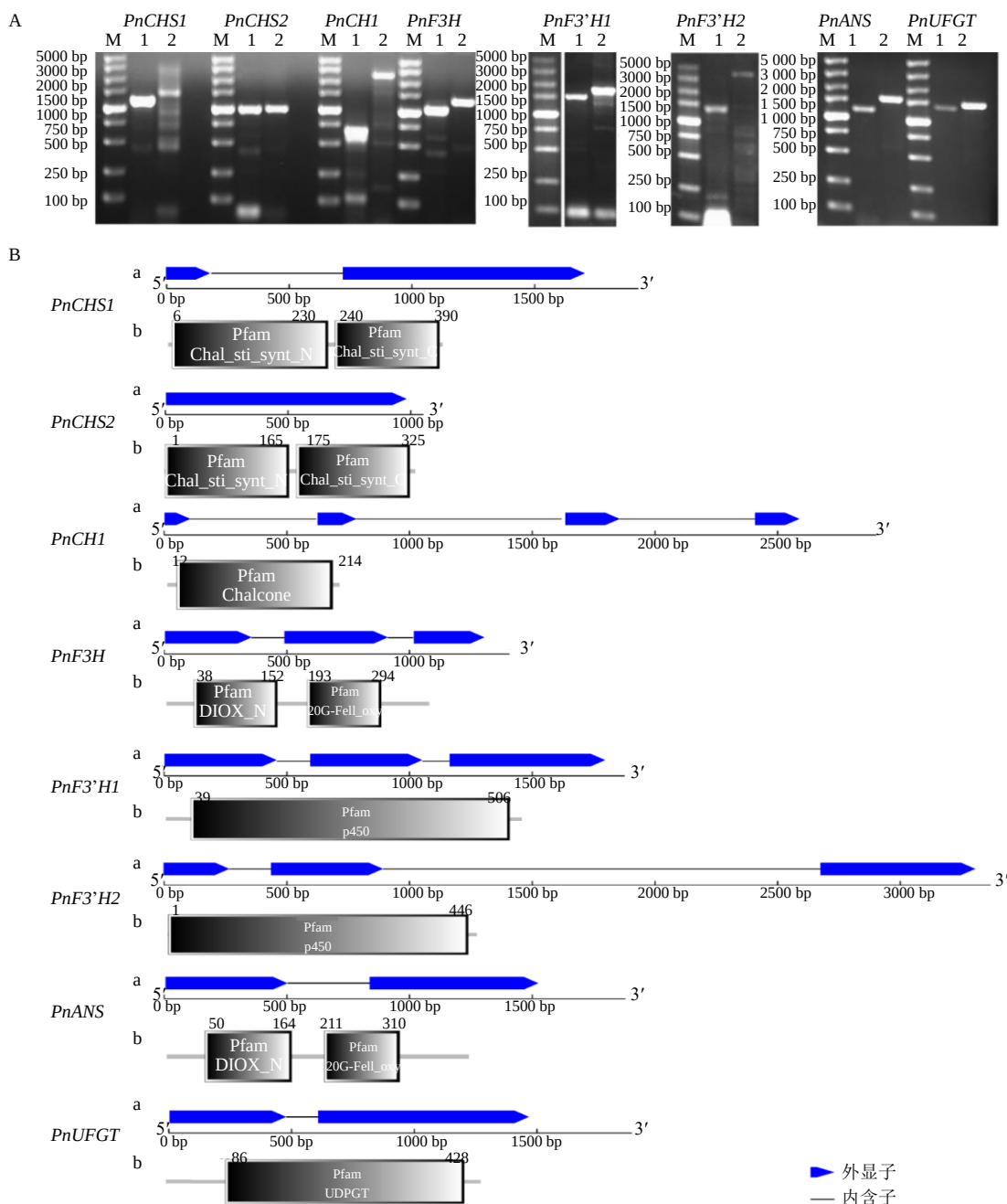
3.1 三七花色苷结构基因的克隆及生物信息学分析

基于植物经典的花色苷代谢路径, 利用其他物种中鉴定的花色苷合成结构基因序列, 在三七全基因组数据中进行 BLAST 检索, 除 *F3'5'H* 基因未检索到, 其他类型的花色苷基因均鉴定到相应的同源基因。根据预测序列设计引物, 分别以三七的 DNA 以及花或根的 cDNA 为模板, 克隆获得 6 类共 8 个三七花色苷合成结构基因, 分别命名为 *PnCHS1*、*PnCHS2*、*PnCHI*、*PnF3H*、*PnF3'H1*、*PnF3'H2*、*PnANS* 和

PnUFGT (GenBank 登录号 MN520443-MN520450), 仅 *DFR* 基因未克隆到, 图 1-A 为克隆扩增产物电泳图。这 8 个基因的外显子数在 1~4 个, 其中 *PnCHS2* 为单外显子, *PnCHI* 外显子数多达 4 个; ORF 长度在

600~1500 bp, 最长的 *PnF3'H1* 达 1575 bp, 最短的 *PnCHI* 为 672 bp (图 1-B)。

保守功能域分析显示, *PnCHS1/2* 具有查耳酮/二苯乙烯合成酶 N 端和 C 端(Chal_sti_synt_N, Chalcone



A-三七花色苷生物合成结构基因扩增产物电泳图 M-Marker 1-cDNA 为模板的扩增产物 2-基因组 DNA 为模板的扩增产物 B-基因结构和保守结构域的预测 a-基因结构 b-保守结构域

A-PCR amplification products of anthocyanin biosynthesis structural genes in *P. notoginseng* M-Marker 1-amplification products using cDNA 2-amplification products using genomic DNA B-gene structure and conserved domain prediction of anthocyanin biosynthesis structural genes in *P. notoginseng* a-gene structure b-conserved domain

图 1 三七花色苷生物合成结构基因的克隆与分析

Fig. 1 Cloning and analysis of structure gene of anthocyanin biosynthesis in *Panax notoginseng*

and stilbene synthases, N-terminal domain; Chal_sti_synt_C, chalcone and stilbene synthases, C-terminal domain) 结构域, *PnCHI* 含有一个查耳酮异构酶 (chalcone isomerase) 家族结构域, *PnF3H* 和 *PnANS* 包含一个吗啡合成 N 端的非血红素加氧酶家族 (DIOX_N, non-haem dioxygenase in morphine synthesis N-terminal) 结构域和一个 2-酮戊二酸和二价铁离子依赖型的加氧酶家族[2OG-Fe(II) Oxygenase superfamily, 2OG-FeII_Oxy] 结构域, *PnF3'H1/2* 具有细胞色素 P450 结构域, *PnUFGT* 含有一个 UDPGT 结构域 (图 1-B)。总之, 本实验鉴

定到的 8 个三七花色苷合成结构基因均包含有植物花色苷合成相关功能域。

3.2 三七花色苷结构基因系统进化分析

采用 MEGA7.0 软件对三七、拟南芥、水稻、棉花、烟草和马铃薯等物种的花色苷合成结构基因构建系统发育树, 结果显示每一类型的基因都各自聚在一起, 由于 F3H 与 ANS 关系最近, 聚为同一支, 最终形成 5 个分支, 且每一类型的基因同源性较高 (图 2), 说明三七花色苷合成结构基因与各物种之间具有较高保守性, 这表明它们在进化过程中可能功能保守。



图 2 三七花色苷生物合成结构基因进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of structure gene of anthocyanin biosynthesis in *P. notoginseng*

3.3 三七花色苷结构基因启动子顺式作用元件分析

采用 PlantCARE 在线软件分析显示, 8 个三七花色苷合成结构基因的启动子序列含有多种类型的顺式调控元件, 其中光响应顺式元件和转录因子 MYB/MYC 响应元件均存在于这些基因的启动子区

域中, 且数量最多, 说明这些基因的转录表达主要受光照和调控因子 MYB/MYC 的影响; 另外, 激素响应元件 (脱落酸、生长素、赤霉素、茉莉酸甲酯、水杨酸和乙烯)、抗逆性相关调控元件 (防御、干旱、厌氧) 和种子特异性元件呈不同情况分布于不同基因上游序列中 (表 2)。

表 2 启动子重要顺式作用元件数量分析

Table 2 Analysis on number of important cis regulatory elements of promoter

基因	元件数量										
	脱落酸	生长素	赤霉素	茉莉酸甲酯	水杨酸	乙烯	防御/胁迫	厌氧	种子特异性	光	MYB/MYC
<i>PnCHS1</i>	2	—	—	—	—	3	2	4	1	20	5
<i>PnCHS2</i>	3	—	—	2	1	1	1	—	—	6	6
<i>PnCHI</i>	—	—	—	2	—	—	2	1	—	6	3
<i>PnF3H</i>	1	—	—	—	—	—	1	3	—	13	11
<i>PnF3'H1</i>	2	2	—	—	—	2	4	1	—	10	4
<i>PnF3'H2</i>	—	—	—	2	1	—	—	1	—	3	2
<i>PnANS</i>	3	—	1	—	1	—	1	2	—	12	15
<i>PnUFGT</i>	2	—	3	—	1	4	2	1	4	10	4

3.4 三七花色苷结构基因的组织表达模式

利用 qRT-PCR 技术, 分析三七开花期 (8 月) 7 个不同组织中 8 个基因的表达模式, 结果显示, 这些基因的表达特征可分为 2 类, 一是主要在花中高量表达的基因, 为 *PnCHS1*、*PnCHS2*、*PnCHI*、*PnF3H* 和 *PnF3'H2*; 二是主要在根部高量表达的基因, 为 *PnF3'H1*、*PnANS*、*PnUFGT*, 其中剪口中主要是 *PnANS* 和 *PnUFGT*, 主根中则以 *PnF3'H1* 为主; 此外, *PnF3H* 和 *PnANS* 在茎中以及 *PnF3'H2* 在叶中存在少量表达 (图 3)。

为了解 5 个花特异性高表达基因在花期不同阶段的表达情况, 对这些基因在三七的花蕾期和开花期进行表达水平检测, 结果显示, *PnCHS1*、*PnCHI*、*PnF3H* 和 *PnF3'H2* 4 个基因主要在花蕾期中显著高表达, 而 *PnCHS2* 基因表现为在开花期显著高表达 (图 4)。

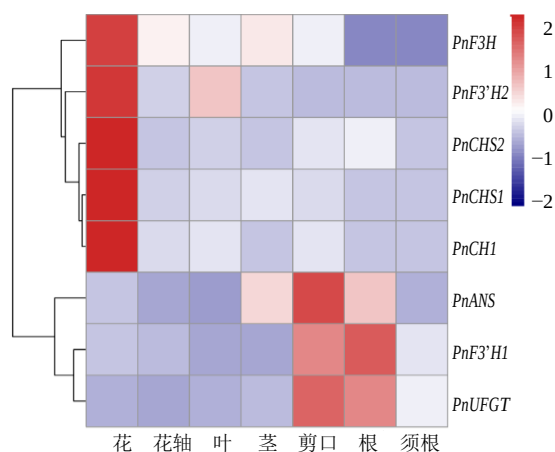


图 3 三七花色苷生物合成结构基因在多组织中的表达谱分析

Fig. 3 Expression profiling of the structure gene of anthocyanin biosynthesis in different tissues of *P. notoginseng*

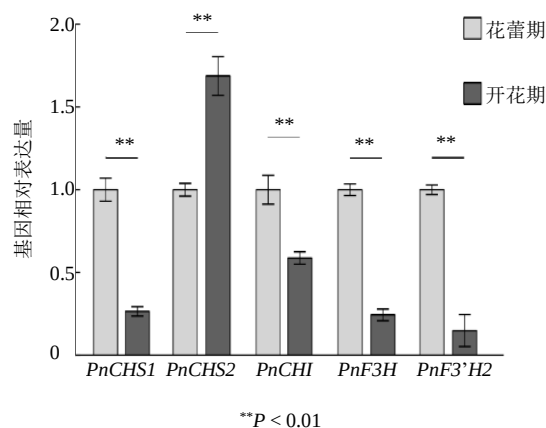
图 4 *PnCHS1*、*PnCHS2*、*PnCHI*、*PnF3H*、*PnF3'H2* 在不同花期的相对表达量

Fig. 4 Relative expressions of *PnCHS1*, *PnCHS2*, *PnCHI*, *PnF3H* and *PnF3'H2* at different flowering stages

3.5 三七花色苷结构基因在紫根三七中的表达分析

对系统选育法选育的“文院紫 1 号” (根部紫色) 品种^[21], 和普通型黄白根三七 (图 5-A) 的总花色苷分析发现, 文院紫 1 号材料的总花色苷显著增加, 约有 3 倍 (图 5-B), 说明三七根系紫色主要是花色苷累积形成, 这与前人的研究结果相似^[20]。为了研究参与紫根性状形成的关键花色苷合成结构基因, 通过 qRT-PCR 检测 3 个根部表达基因在三七紫根和黄白根中的表达, 结果显示 *PnF3'H1* 和 *PnUFGT* 在紫根中显著上调表达 (图 5-C), 说明三七紫根中花色苷累积与它们的表达水平相关, *PnF3'H1* 和 *PnUFGT* 可能是参与该性状形成的关键结构基因。

4 讨论

本研究以中药材三七为材料, 克隆鉴定了 6 类共 8 个三七花色苷合成结构基因, 其中三七 *CHS* 和 *F3'H* 各 2 个, 这与其他物种中该类型基因可分

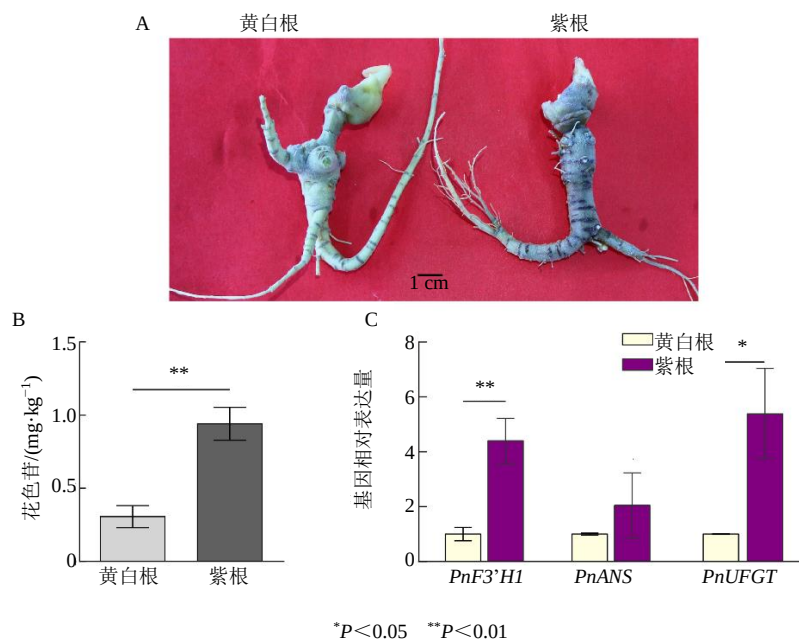


图 5 紫根与黄白根三七表型 (A)、总花色苷含量 (B) 及基因 *PnF3'H1*、*PnANS*、*PnUFGT* 表达量 (C) 的分析
Fig. 5 Analysis of *P. notoginseng* (A), total anthocyanin content (B) and expression (C) of *PnF3'H1*, *PnANS*, and *PnUFGT* in purple root and yellow-white root

离出多个基因的情况相似^[22-24]。对未克隆成功的三七 *DFR* 基因预测序列分析发现,其翻译起始位点区域的 GC 含量高,推测可能会形成复杂的二级结构导致该基因 ORF 序列较难克隆。另外,在对三七全基因组数据库进行 BLAST 检索时,未发现可催化二氢山奈酚为二氢杨梅素的 3',5'-羟化酶编码基因 *F3'5'H* 的三七同源基因,暗示三七的花色苷合成可能不涉及以二氢杨梅素为底物的途径。

结构域是蛋白质行使功能的重要区域,被称作蛋白质功能单元。植物中,CHS 蛋白的查耳酮/二苯乙烯合成酶结构域,具有将 3 分子丙二酰 CoA 和 1 分子的 4-对香豆酰-CoA 缩合形成柚皮素查耳酮的功能^[25]。CHI 的查耳酮异构酶结构域,行使催化双环柚皮素查耳酮为三环 2S-二氢基黄烷酮的作用^[26]。而 2OG-FeII_Oxy 结构域主要以亚铁离子为活性位点辅因子,2OG 为共底物,行使将二氢基黄烷酮氧化为二氢黄酮类的功能^[27-28]。此外,细胞色素 P450 结构域,广泛存在于含亚铁血红素的单加氧酶超家族中,类黄酮合成途径里主要具有将二氢山奈酚羟基化形成二氢槲皮素^[29-30],以及 UDP-葡萄糖醛酸转移酶结构域行使了糖苷化作用^[31]。通过结构功能域分析发现,克隆获得的三七花色苷相关基因,均含有参与植物花色苷合成的相关蛋白质功能单元(图 1-B);同时,进化分析显示这些基因的氨基酸

序列与其他物种的保守性高(图 2)。以上说明三七花色苷结构基因极有可能与其他物种的已知基因具有类似功能。

在分析启动子顺式作用元件时发现,三七花色苷结构基因上游存在多种环境因子的作用元件,其中光信号结合元件数量最多。前人的研究显示,在拟南芥、紫苏、矮牵牛、葡萄等多种植物中花色苷结构基因都受到光的调控^[32-35];另外,GA、JA、ABA 等激素及干旱条件下也有关于对相关结构基因诱导表达,继而影响花色苷合成的研究^[36-37]。因此,笔者推测三七花色苷合成结构基因可受外界环境信号调控来影响花色苷的合成,而光信号是最重要的环境因子之一。此外,三七花色苷结构基因启动子中均鉴定到转录因子 MYB/MYC 结合的顺式作用元件。MYB 转录因子含有 1~4 个重复单元的 MYB 结构域,是植物中最大的转录因子家族之一;MYC 转录因子属于 bHLH 类转录因子家族,含有 bHLH 保守结构域。目前,MYB 蛋白和 bHLH 蛋白作为主要的调节基因参与类黄酮物质的生物合成已在多种植物中得到研究^[11,38]。说明三七中转录因子 MYB/MYC 可能会通过结合相应的顺式元件来对花色苷相关基因进行转录调控,潜在的作用机制是未来研究的重点。

花色苷合成基因的表达特性往往与其功能密切

关联^[9,11-13,15]。根据三七花色苷合成结构基因的表达模式,推测它们主要参与了三七在花和根中花色苷的合成;同时对花不同发育时期的表达检测发现,相关结构基因主要在花蕾期高量表达,暗示三七花的花色苷合成主要在前期阶段,与滇牡丹的情况类似^[23]。另外,*PnF3H*和*PnANS*在茎中也有表达,很可能是三七紫茎(花色苷含量高)形成的关键结构基因,不过仍需进一步研究确认。值得注意的是,同一类基因*PnF3'H1*与*PnF3'H2*具有相反的表达模式,*PnF3'H1*主要参与了根部花色苷合成,而*PnF3'H2*在花和叶中起作用,这与葡萄中4个*F3'H*表现出不同表达模式类似^[22],暗示这些基因可能经历基因复制事件后发生了功能分化。此外,基因表达关联分析发现*PnF3'H1*和*PnUFGT*在高花色苷特性的紫根中高量表达,推测它们可能是紫根中花色苷形成的关键结构基因,这可为进一步明确紫根中高花色苷形成的分子基础提供了理论支撑,也为针对这2个基因开发基因特异性分子标记开展紫根性状的分子辅助育种奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Falcone Ferreyra M L, Casas M I, Questa J I, et al. Evolution and expression of tandem duplicated maize flavonol synthase genes [J]. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 101.
- [2] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, et al. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2465-2483.
- [3] Vinayagam R, Xu B J. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2015, 12: 60.
- [4] Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 81-90.
- [5] Ross J A, Kasum C M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety [J]. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22: 19-34.
- [6] Xu W, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(3): 176-185.
- [7] Dooner H K, Robbins T P, Jorgensen R A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis [J]. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 173-199.
- [8] Shirley B W, Kubasek W L, Storz G, et al. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis [J]. *Plant J*, 1995, 8(5): 659-671.
- [9] Han Y P, Vimolmangkang S, Soria-Guerra R E, et al. Ectopic expression of apple *F3'H* genes contributes to anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis* tt7 mutant grown under nitrogen stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 806-820.
- [10] Pelletier M K, Shirley B W. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings (coordinate regulation with *Chalcone synthase* and *Chalcone isomerase*) [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(1): 339-345.
- [11] Zheng J, Wu H, Zhu H, et al. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves [J]. *New Phytol*, 2019, 223(2): 705-721.
- [12] Watanabe K, Kobayashi A, Endo M, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10028.
- [13] Song C, Zhao S, Hong X, et al. A UDP-glucosyltransferase functions in both acylphloroglucinol glucoside and anthocyanin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. *Plant J*, 2016, 85(6): 730-742.
- [14] Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, et al. Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing [J]. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(6): 778-790.
- [15] Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: A rapid assay for gene function analysis [J]. *Plant J*, 2006, 48(5): 818-826.
- [16] de Vetten N, Ter Horst J, van Schaik H P, et al. A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(2): 778-783.
- [17] Sui X M, Zhao M Y, Xu Z D, et al. RrGT2, A key gene associated with anthocyanin biosynthesis in *Rosa rugosa*, was identified via virus-induced gene silencing and overexpression [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 4057.
- [18] 赵昶灵, 陈严平, 卢其能, 等. “紫三七”生态适应和药效优越性的评价 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 25(4): 592-598.
- [19] Fuleki T, Francis F J. Quantitative methods for anthocyanins [J]. *J Food Sci*, 1968, 33(1): 78-83.
- [20] Zhao C L, Wang Y, Duan C L, et al. Anthocyanin essence of the purple pigment and positive correlation of the anthocyanin content and the total ginsenoside content of

- the root Tuber of *Panax notoginseng* [J]. *Guangxi Plant*, 2008, 28(5): 661-670.
- [21] 熊高, 王勇, 胡永媛, 等. 三七育种研究综述 [J]. 文山学院学报, 2019, 32(3): 1-5.
- [22] Castellarin S D, Di Gaspero G, Marconi R, *et al.* Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): Genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin [J]. *BMC Genom*, 2006, 7(1): 1-17.
- [23] 原晓龙, 李云琴, 王毅. 滇牡丹中 3 个类查耳酮合成酶基因的克隆与表达 [J]. 浙江农业学报, 2019, 31(9): 1478-1484.
- [24] Zhang L S, Sun X M, Wilson I W, *et al.* Identification of the genes involved in anthocyanin biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis* [J]. *Genes*, 2019, 10(12): E982.
- [25] Ferrer J L, Jez J M, Bowman M E, *et al.* Structure of *Chalcone synthase* and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6(8): 775-784.
- [26] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, *et al.* Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme *Chalcone isomerase* [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 786-791.
- [27] Kawai Y, Ono E, Mizutani M. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants [J]. *Plant J*, 2014, 78(2): 328-343.
- [28] Nadi R, Mateo-Bonmatí E, Juan-Vicente L, *et al.* The 2OGD superfamily: Emerging functions in plant epigenetics and hormone metabolism [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(10): 1222-1224.
- [29] Hasemann C A, Kurumbail R G, Boddupalli S S, *et al.* Structure and function of cytochromes P450: A comparative analysis of three crystal structures [J]. *Structure*, 1995, 3(1): 41-62.
- [30] Zhou T S, Zhou R, Yu Y B, *et al.* Cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 261.
- [31] 解林峰, 任传宏, 张波, 等. 植物类黄酮生物合成相关 UDP-糖基转移酶研究进展 [J]. 园艺学报, 2019, 46(9): 1655-1669.
- [32] Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, *et al.* Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165(8): 886-894.
- [33] Albert N W, Lewis D H, Zhang H B, *et al.* Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia* [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(7): 2191-2202.
- [34] Gong Z Z, Yamazaki M, Sugiyama M, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens* [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(6): 915-927.
- [35] Matus J T, Loyola R, Vega A, *et al.* Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera* [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(3): 853-867.
- [36] Weiss D, van Blokland R, Kooter J M, *et al.* Gibberellic acid regulates *Chalcone synthase* gene transcription in the Corolla of *Petunia hybrida* [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98(1): 191-197.
- [37] Loreti E, Povero G, Novi G, *et al.* Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. *New Phytol*, 2008, 179(4): 1004-1016.
- [38] Liu Y H, Lin-Wang K, Espley R V, *et al.* Functional diversification of the potato R2R3 MYB anthocyanin activators AN1, MYBA1, and MYB113 and their interaction with basic helix-loop-helix cofactors [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(8): 2159-2176.

[责任编辑 时圣明]