

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201805058

引文格式: 徐靖, 朱红林, 朱家红, 等. 甘薯 *IbGL3* 的克隆和表达分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(10): 1356–1362
XU J, ZHU HL, ZHU JH, et al. Cloning and expression analysis of *IbGL3* in *Ipomoea batatas* [J]. *Guihaia*, 2018, 38(10): 1356–1362

甘薯 *IbGL3* 的克隆和表达分析

徐靖¹, 朱红林¹, 朱家红², 符策强¹, 韩义胜¹,
唐力琼¹, 王敏芬, 王新华¹, 王效宁^{1*}

(1. 海南省农业科学院 粮食作物研究所, 海南省农作物遗传育种重点实验室, 农业部作物基因资源与种质创制海南科学观测实验站, 海口 571100; 2. 中国热带农业科学院 热带作物生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 紫色甘薯富含花青素, 具有较高的食用和药用价值。花青素的生物合成受到结构基因和调节基因的控制。bHLH(basic helix-loop-helix protein)转录因子能够调节多个花青素结构基因的表达, 在花青素生物合成途径中具有重要的调控作用, 但目前甘薯中还没有关于 bHLH 调控花青素生物合成的相关报道。为进一步了解 *IbGL3* 基因在甘薯花青素生物合成的功能和作用机理, 该研究根据甘薯转录组数据, 利用 RT-PCR 技术在甘薯中克隆了一个 2 120 bp 的 *bHLH* 基因 *IbGL3*, 该基因包含一个 1 878 bp 的开放阅读框, 编码 625 个氨基酸, 蛋白质分子量 69.08 kD, 理论等电点 (pI) 5.20。*IbGL3* 蛋白和其他植物中类黄酮合成相关的 bHLH 蛋白具有较高的同源性, 都包含保守的 MIR 区、bHLH 结构域和 ACT 类似结构域。系统发育进化树分析结果显示, *IbGL3* 与其他植物类黄酮相关 bHLH 蛋白聚为一类, 属于 III f 亚类成员。表达结果显示, *IbGL3* 基因在紫色甘薯中的表达量最高, 在浅紫色甘薯中的表达量次之, 在白色甘薯中表达量最低, 与花青素积累正相关, 因此推测其在甘薯花青素生物合成途径中具有重要的调控作用。

关键词: 甘薯, 花青素, bHLH 转录因子, 基因表达

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)10-1356-07

Cloning and expression analysis of *IbGL3* in *Ipomoea batatas*

XU Jing¹, ZHU Honglin¹, ZHU Jiahong², FU Ceqiang¹, HAN Yisheng¹,
TANG Liqiong¹, WANG Minfen¹, WANG Xinhua¹, WANG Xiaoning^{1*}

(1. Institute of Cereal Crops, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hainan Province, Scientific Observation Station for Gene Resources and Germplasm Creation of Hainan, Ministry of Agriculture, Haikou 571100, China; 2. Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Anthocyanin-rich purple sweet potatoes have high edible and medicinal values. Anthocyanin biosynthesis is controlled by structural genes and regulatory genes. The basic helix-loop-helix protein (bHLH) transcription factor plays an important role in anthocyanin biosynthesis by regulating multiple structural genes. However, there are no reports about

收稿日期: 2018-07-03

基金项目: 海南省科研院所技术开发专项项目 (KYYS-2018-03) [Supported by Special Program for Technology Development Hainan Provincial Research Institutes (KYYS-2018-03)]。

作者简介: 徐靖 (1981-), 女, 安徽淮北人, 硕士, 副研究员, 主要从事甘薯种质资源创新利用研究, (E-mail) jing_jing_xu@163.com。

* 通信作者: 王效宁, 研究员, 主要从事作物种质资源创新利用研究, (E-mail) wxning2599@163.com。

bHLH regulating anthocyanin biosynthesis in sweet potato. In order to further understand the function and molecular mechanism of *IbGL3* in the biosynthesis of anthocyanins in sweet potato, in this study, a *bHLH* gene named *IbGL3* was cloned in *Ipomoea batatas* based on transcriptome data and RT-PCR technology. The full-length cDNA of *IbGL3* was 2 120 bp, containing 1 878 bp opening reading frame (ORF), and encoding 625 amino acids. The encoded protein of *IbGL3* has a molecular weight of 69.08 kD and the theoretical isoelectric point (pI) of 5.20. The *IbGL3* protein had highly conserved MIR motif, bHLH domain and ACT domain, shared high identities and similar domains with bHLH proteins involved in anthocyanin biosynthesis from other plants. Phylogenetic analysis showed that *IbGL3* was clustered in the III f bHLH subgroup together with other anthocyanin-related bHLH proteins. The expression of *IbGL3* in the storage root of different sweet potato varieties was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results indicated that *IbGL3* was mainly expressed in purple-fleshed sweet potato, followed by light purple-fleshed sweet potato and weakly expressed in white-fleshed sweet potato, and its expression was positively related to the accumulation of anthocyanin *Ipomoea batatas*. The results showed that *IbGL3* may be involved in regulating anthocyanin biosynthesis in *Ipomoea batatas*.

Key words: *Ipomoea batatas*, anthocyanin, bHLH transcription factor, gene expression

花青素是一种存在于植物体内的类黄酮化合物,不仅在植物的花着色、抵御紫外线伤害、防止病原微生物侵袭等过程中起决定作用,还具有重要的营养价值和医疗保健功效 (Panche et al, 2016; Lila, 2008)。花青素生物合成途径在模式植物中已得到广泛研究,相关基因已在多种植物中得到分离 (Hichri et al, 2011; Albert et al, 2014; Wang et al, 2015)。植物类花青素生物合成主要受两类基因控制:一类是结构基因,编码与类黄酮生物合成有关的各种酶类;另一类是调节基因,其编码的转录因子通过调控多个结构基因的表达参与对类黄酮次生代谢的调控 (Hichri et al, 2011; Wang et al, 2015)。研究证实,花青素的生物合成主要受到转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 组成的 MYB-bHLH-WD40 (MBW) 转录复合体的调控 (Xu et al, 2015)。bHLH 转录因子是一类含有 basic-helix-loop-helix (bHLH) 结构域的转录因子,根据结构特征可分为 12 个亚类 (I-XII), 而调控类黄酮生物合成的 bHLH 蛋白主要集中在 III f 亚类 (Xu et al, 2015; Heim et al, 2003)。拟南芥中与调控花青素生物相关的 bHLH 转录因子主要有 TT8/AtbHLH42、GL3/AtbHLH1 和 EGL3/AtbHLH2 (Gonzalez et al, 2008)。首个调控花青素生物合成的 *bHLH* 基因在玉米中得到分离和鉴定 (Chandler et al, 1989)。目前,已在菊花 (*Chrysanthemum*)、苹果 (*Malus domestica*) 和荔枝 (*Litchi*

chinensis) 等多种植物中得到分离和鉴定,这些转录因子大都能激活多个类黄酮生物合成关键酶基因的表达 (Xiang et al, 2015; Xu et al, 2017; Lai et al, 2016)。

甘薯是世界上广泛种植的粮食和经济作物 (Hu et al, 2016)。作为一种联合国粮食农业组织推荐的健康食品,甘薯富含淀粉、纤维素及多种有益的次生代谢物,如 β 胡萝卜素和花青素 (Liu et al, 2017)。不同的甘薯品种中,紫肉甘薯富含的花青素,具有较高的食用和药用价值 (Li et al, 2013)。相对于模式植物而言,甘薯花青素生物合成和调控机理研究相对滞后,目前还没有关于 bHLH 蛋白调控花青素生物合成的相关报道 (李霞等, 2014)。在先前的研究中,笔者通过对不同肉色甘薯品种进行了比较转录组学分析,筛选到一批与花青素积累相关的差异表达基因,获得 1 条与其它植物中 GL3 高度同源的 EST 序列。本研究将克隆 *IbGL3* 基因,并对其进行生物信息学分析,检测其表达特征与花青素积累的相关性,为进一步揭示该基因在甘薯花青素生物合成中的功能和作用机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试的甘薯材料种植于海南农业科学院永发

基地。选取种植5个月后生长发育基本一致的白色、浅紫色和紫色甘薯品种的新鲜块根为实验材料用于RNA提取和花青素的测定。

1.2 花青素提取和测定

采用1%盐酸溶液作为提取液提取甘薯块根花青素,采用分光光度法测定花青素含量,具体参考刘桂玲等(2007)的方法。

1.3 核酸提取和cDNA的合成

甘薯块根中RNA提取采用天根多糖多酚植物总RNA提取试剂盒;按照Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit说明书将RNA反转录合成cDNA第一链。

1.4 基因克隆和序列分析

根据转录组数据中注释为GL3的EST序列,设计5'端特异引物PGL3F:5'-GCCCAGTTTGT-TCAAGAGCC-3'和5'端引物PGL3R:5'-AGTTAGG-GATAAACCTTTGCT-3',以甘薯cDNA为模板对*IbGL3*进行扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收目的条带与pMD19-T载体连接并转化大肠杆菌DH5 α ,通过蓝白斑筛选和菌落PCR鉴定阳性克隆,送诺赛基因公司测序。利用ExPASy在线软件(<https://www.expasy.org/>)分析预测蛋白的氨基酸组成、分子式、分子量、等电点、稳定性和亲水性等;利用PSORT(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)预测亚细胞定位;利用SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽分析;利用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜结构;利用DNAMAN软件进行氨基酸序列比对分析;利用MEGA7进行进化树分析。

1.5 基因表达分析

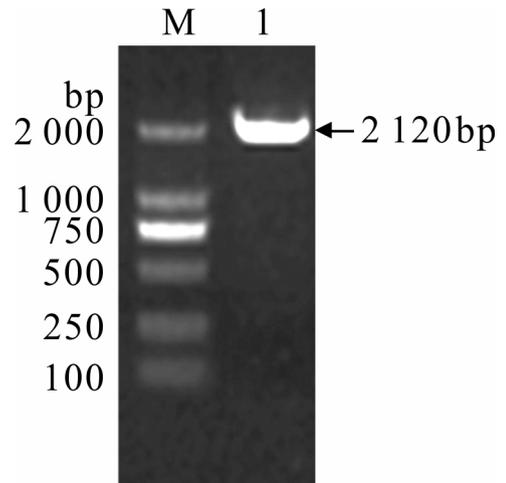
利用SYBR[®] Select Master Mix试剂盒在Mx3005P Real-Time PCR System上进行qPCR分析。内参基因为*Actin*,引物序列为ACT-F(5'-CT-GGTGTTATGGTTGGGATGG-3')和ACT-R(5'-GGGGTGCCTCGGTAAGAAG-3');目的基因引物GE3-F(5'-CATCTGGACTGCGAACTATCC-3')和GE3-R(5'-GCTGGTGATGCTGACGTTAAT-3')。qPCR反应体积20 μ L:10 μ L 2 \times SYBR mix,正反向引物各1 μ L(10 μ mol \cdot L⁻¹),1 μ L cDNA模板,7 μ L ddH₂O。qPCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,

60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环。

2 结果与分析

2.1 *IbGL3* 的克隆

根据在甘薯转录组数据中获得的*IbGL3*基因的EST序列,设计特异引物对该基因的全长序列进行扩增,获得一条2100 bp左右的特异条带(图1)。将目的片段连接到T载体上进行测序,测序结果与通过转录组测序得到结果一致,将该基因命名为*IbGL3*。本研究获得的*IbGL3*基因全长2120 bp,包含一个1878 bp完整的开放阅读框。



注: M. DL 2000 Marker; 1. PCR 扩增产物。

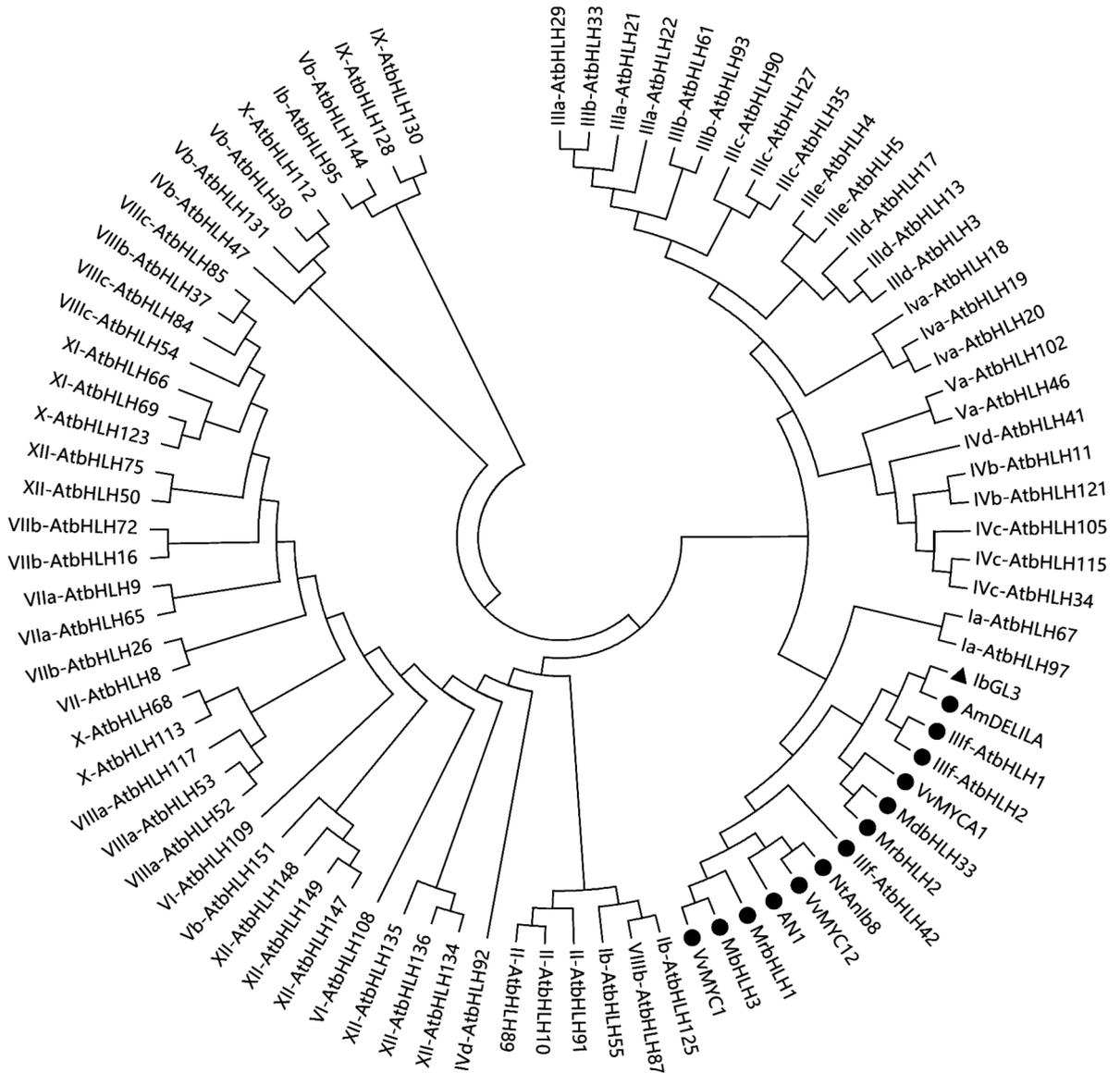
Note: M. DL 2000 Marker; 1. PCR product.

图1 *IbGL3* 的扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretic result of *IbGL3* PCR product

2.2 *IbGL3* 的分子特征

IbGL3 编码蛋白由625个氨基酸组成,其中丝氨酸(Ser)最多,有63个,占比达到10.1%。*IbGL3* 蛋白分子式为C₂₉₈₂H₄₇₈₄N₈₅₄O₉₈₂S₂₄,预测分子量为69.08 kD,理论等电点5.20,不稳定系数为43.06,被归类为不稳定蛋白;总平均疏水指数为-0.555,属于亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示*IbGL3* 定位在细胞核内的可能性最大,核定位信号(PSSKKRKASKT)位于C-端。信号肽分析显示*IbGL3* 蛋白没有信号肽,不属于分泌蛋白。跨膜结构域分析显示*IbGL3* 蛋白无跨膜结构域。



注: 三角形标示 *IbGL3*; 圆形标示其他植物花青素合成相关的 bHLHs。

Note: *IbGL3* is marked with triangle; bHLHs involved in anthocyanin biosynthesis are marked with black dots.

图 2 *IbGL3* 的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *IbGL3*

2.3 *IbGL3* 的进化和同源性分析

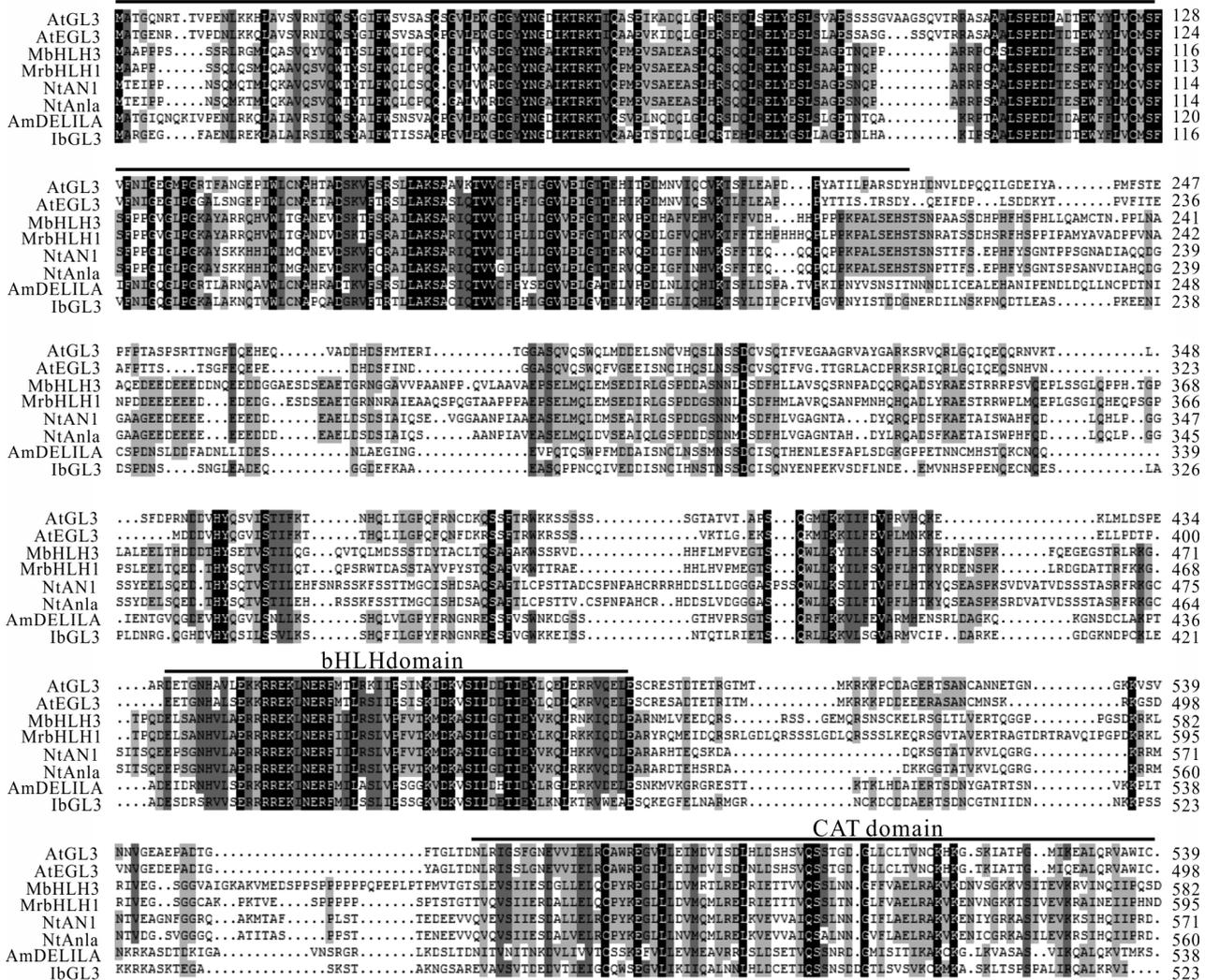
为进一步了解 *IbGL3* 的功能和进化特征, 将 *IbGL3* 氨基酸序列与拟南芥不同亚类的 bHLH 蛋白及其他植物中已鉴定的与花青素合成相关的 bHLH 蛋白一起聚类分析, 结果显示 *IbGL3* 与 TT8、GL3 和 EGL3 聚在一起, 属于 III f 亚类成员 (图 2)。目前, 在不同植物中鉴定的调控花青素生物合成的 bHLH 蛋白大都属于 III f 亚类, 这说明

IbGL3 可能具有调控甘薯花青素生物合成的功能。将 *IbGL3* 和其他调控花青素的 bHLH 蛋白进行序列比对, 发现这些蛋白都包含 3 个保守的结构域: N 端与 MYB 蛋白互作的 MIR 区、bHLH 结构域和位于 C 端的 ACT 类似结构域 (图 3)。

2.4 *IbGL3* 表达与花青素积累的相关性分析

利用定量 PCR 技术检测了 *IbGL3* 在不同肉色甘薯块根中的表达特征, 发现 *IbGL3* 在紫色甘薯中

MIR



注：划线处为保守的结构域 MIR 区、bHLH 结构域和 CAT 结构域。
 Note: Conserved MIR domain, bHLH domain and CAT domain are underlined.

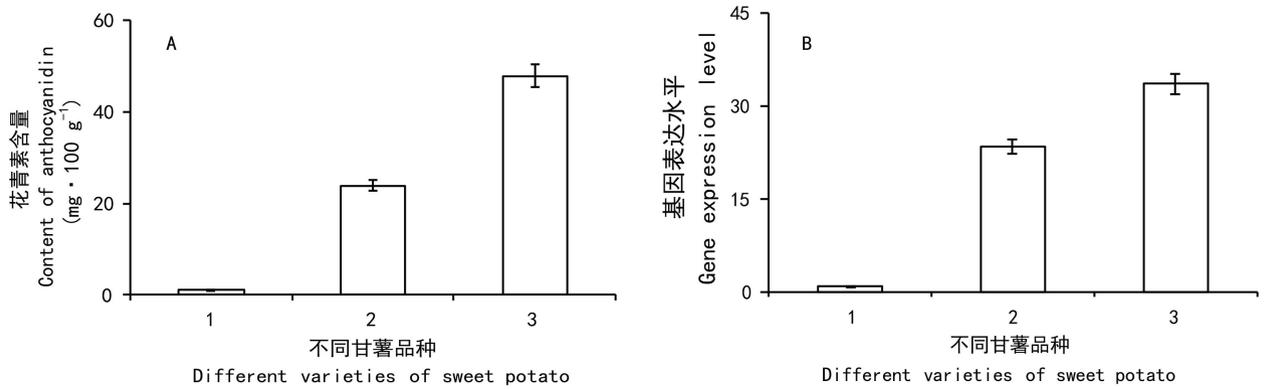
图 3 IbGL3 和其他植物花青素相关的 bHLHs 的序列比对
 Fig. 3 Alignment of IbGL3 and anthocyanin-related bHLHs from other plants

的表达量最高,在浅紫甘薯中的表达量次之,在白色甘薯中表达量最低,与甘薯花青素含量正相关(图4)。

3 讨论与结论

bHLH 转录因子是一类真核生物中存在最广泛的一大类转录因子,在植物细胞大小和命运调控、激素响应、金属体内平衡、光形态发生和花器官发育等多种生理过程中具有重要的调控作用

(Heim et al, 2003; Feller et al, 2011; Yang et al, 2017)。调节花青素生物合成的 bHLH 转录因子大都属于 III f 亚类,通过改变或过表达花青素合成相关 bHLH 基因能够影响植物体内花青素的积累 (Xu et al, 2015; Li et al, 2016; Lim et al, 2017)。本研究在甘薯中克隆一个编码 bHLH 与拟南芥 GL3 同源的基因 *IbGL3*,其编码区全长为 1 878 bp,编码 625 个氨基酸。亚细胞定位预测显示, *IbGL3* 蛋白定位在细胞核内,说明 *IbGL3* 在细胞核内发挥功能。进化分析显示, *IbGL3* 属于 III f 亚族的



注: **A.** 不同品种甘薯花青素含量; **B.** 不同品种甘薯 *IbGL3* 表达量; **1, 2** 和 **3** 分别代表白色、浅紫和紫色甘薯。

Note: **A.** Content of anthocyanin in the storage root of different sweet potato varieties; **B.** Expression of *IbGL3* in the storage root of different sweet potato varieties; **1, 2** and **3** represent white-, light purple- and purple- fleshed sweet potato respectively.

图 4 *IbGL3* 的表达与花青素积累的相关性

Fig. 4 Correlation between *IbGL3* expression and anthocyanin accumulation

bHLH 转录因子, 与其他植物中花青素合成相关的 bHLH 蛋白具有较高的同源性, 都含有保守的 MIR 区、bHLH 结构域和 ACT 结构域。bHLH 转录因子通常与 MYB 转录因子相互作用协同调控花青素的生物合成, MIR 区是 bHLH 与 MYB 蛋白互作区位于 bHLH 的 N 端 (Heim et al, 2003; Feller et al, 2011)。bHLH 结构域是 DNA 结合结构域, 能形成同源或异源二聚体, 这是 bHLH 蛋白与 DNA 结合的前提 (Heim et al, 2003; Feller et al, 2011)。ACT 类似结构域位于 C 端, 是一段富含酸性氨基酸的序列, 该区域能够与 RNA 聚合酶 II 结合并启动转录; 此外, 该区域也与 bHLH 二聚体的形成有关 (Feller et al, 2006)。功能预测分析表明 *IbGL3* 可能具有调控甘薯花青素生物合成的功能。表达分析显示, *IbGL3* 在紫色甘薯中大量表达, 在浅紫色甘薯中的表达量次之, 而在白色甘薯中表达量最低, 与花青素积累正相关, 进一步说明 *IbGL3* 可能是甘薯花青素生物合成的调控基因。下一步将进一步研究 *IbGL3* 在花青素生物合成中的生物学功能和调控机理, 为甘薯花青素生物合成遗传改良奠定基础。

参考文献:

ALBERT NW, DVIES KM, LEWIS DH, et al, 2014. A con-

served network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots [J]. *Plant Cell*, 26(3): 962–980.

CHNDLER VL, RADICELLA JP, ROBBINS TP, et al, 1989. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences [J]. *Plant Cell*, 1(12): 1175–1183.

FELLER A, HERMANDEZ JM, GROTEWOLD E, 2006. An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 281(39): 28964–28974.

FELLERA, MACHEMER K, BRAUN EL, et al, 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. *Plant J*, 66(1): 94–116.

GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT JM, et al, 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedling [J]. *Plant J*, 53(5): 814–827.

HEIM MA, JAKOBY M, WERBER M, et al, 2003. The basic helix-loop helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. *Mol Biol Evol*, 20(5): 735–747.

HICHRI I, BARRIEU F, BOGS J, et al, 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 62(8): 2465.

HU YJ, DENG LQ, CHEN JW, et al, 2016. An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars [J]. *Food Chem*, 194: 46–54.

LAI B, DU LN, LIU R, et al, 2016. Two LcbHLH transcription factors interacting with LeMYB1 in regulating late structural genes of anthocyanin biosynthesis in *Nicotiana* and *Litchi chinensis* during anthocyanin accumulation [J]. *Front Plant*

- Sci, 7(212): 166.
- LILA MA, 2008. Anthocyanins and human health; an *in vitro* investigative approach [J]. J Biomed Biotechnol, (5): 306–313.
- LI J, LI XD, ZHANG Y, et al, 2013. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices [J]. Food Chem, 136(3–4): 1429–1434.
- LIM SH, KIM DH, KIM JK, et al, 2017. A radish basic helix-loop-helix transcription factor, RsTT8 acts a positive regulator for anthocyanin biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 8: 1917.
- LI X, WANG X, LIU YJ, et al, 2014. Progress on anthocyanin biosynthesis of sweet potato [J]. Mol Plant Breed, 12(3): 567–576. [李霞, 王欣, 刘亚菊, 等, 2014. 甘薯花青苷生物合成调控研究进展 [J]. 分子植物育种, 12(3): 567–576.]
- LI Y, SHAN X, GAO R, et al, 2016. Two III f clade-bHLHs from *Freesia hybrida* play divergent roles in flavonoid biosynthesis and trichome formation when ectopically expressed in *Arabidopsis* [J]. Sci Rep, 6: 30514.
- LIU GL, LI HX, GUO BH, et al, 2007. Effects of different extraction methods on anthocyanin content detection in sweet potato [J]. Chin Agric Sci Bull, 23(4): 91–94. [刘桂玲, 李海霞, 郭宾会, 等, 2007. 不同提取方法对甘薯花青素含量测定的影响 [J]. 中国农学通报, 23(4): 91–94.]
- LIU X, XIANG M, FAN Y, et al, 2017. A root-preferential DFR-like gene encoding dihydrokaempferol reductase involved in anthocyanin biosynthesis of purple-fleshed sweet potato [J]. Front Plant Sci, 8(8227): 279.
- PANCHE AN, DIWAN AD, CHANDRA SR, 2016. Flavonoids; An overview [J]. J Nutr Sci, 5: e47.
- WANG H, LI MF, YANG Y, et al, 2015. Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits [J]. Plant Physiol J, 51(1): 29–43.
- XIANG LL, LIU XF, LI X, et al, 2015. A novel bHLH transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis in *Chrysanthemums* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) [J]. PLoS ONE, 10(11): e0143892.
- XU H, WANG N, LIU J, et al, 2017. The molecular mechanism underlying anthocyanin metabolism in apple using the *MdMYB16* and *MdbHLH33* genes [J]. Plant Mol Biol, 94(1–2): 149–165.
- XU W, DUBOS C, LEPINIEC L, et al, 2015. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. Trends Plant Sci, 20(3): 176–185.
- YANG J, GAO M, HUANG L, et al, 2017. Identification and expression analysis of the apple (*Malus × domestica*) basic helix-loop-helix transcription factor family [J]. Sci Rep, 7(1): 28.
- SEN L, SU YJ, ZHANG B, et al, 2010. Adaptive evolution of the *rbcl* gene in pteridaceous ferns [J]. J Trop Subtrop Bot, 18(1): 1–8. [森林, 苏应娟, 张冰, 等, 2010. 凤尾蕨科植物 *rbcl* 基因的适应性进化分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 18(1): 1–8.]
- SUN YL, LI QM, YANG JY, et al, 2005. Morphological variation in cones and seeds in *Abies chensiensis* [J]. Acta Ecol Sin, 25(1): 176–181. [孙玉玲, 李庆梅, 杨敬元, 等, 2005. 秦岭冷杉球果与种子的形态变异 [J]. 生态学报, 25(1): 176–181.]