

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201401011

王毅, 王晨晨, 周旭 等. 七彩红竹类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及功能分析[J]. 广西植物 2015, 35(2):244-249
 Wang Y, Wang CC, Zhou X *et al.* Cloning and functional analysis of a flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene from *Indosasa hispida*[J]. *Guihaia* 2015, 35(2):244-249

七彩红竹中类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及功能分析

王毅^{1,2}, 王晨晨^{1,3}, 周旭^{1,3}, 毕玮^{1,2}, 杨宇明^{1,2}, 王娟^{1,2*}

(1. 云南省林业科学院 国家林业局云南珍稀濒危森林植物繁育和保护重点实验室, 昆明 650201; 2. 云南林业科学院, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 昆明 650201; 3. 西南林业大学, 昆明 650224)

摘要: 类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (Flavonoid-3-O-glucosyltransferase, 3GT) 是花青苷 (Anthocyanins) 生物合成途径中的关键酶, 它主要负责将不稳定的花色苷转变为稳定的花色苷, 虽然目前已经从其他植物中克隆获得类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶, 但是对竹子中的类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶并不清楚。该文以产生花青素的七彩红竹 (*Indosasa hispida* McClure cv. Rainbow) 为材料, 首先通过 3GT 的同源比对后设计 3GT 基因特异引物, 获得 3GT 基因片段; 然后运用 RT-PCR 及 RACE 技术从七彩红竹茎中克隆得到完整的 3GT 基因 (lh3GT)。结果表明: lh3GT 基因的 cDNA 全长序列为 1 730 bp, 含有 1 个 1 425 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 474 个氨基酸; 系统进化分析显示, 七彩红竹 3GT 与其他禾本科植物的 3GT 聚类到同一个分支; 该基因推断的蛋白与水稻 (*Oryza sativa*) 3GT 蛋白的相似性为 69%, 与二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 3GT 的相似性为 67%; 经氨基酸序列比对, 推断七彩红竹 3GT 含有糖基转移酶基因家族特有的结构域 PSPG-box; 半定量 PCR 的结果显示, 七彩红竹 3GT 基因在微红的幼茎中大量表达, 而在其他组织中并不表达, 说明 lh3GT 具有组织表达特异性。该结果为今后深入研究七彩红竹花色苷的形成机理、鉴定 lh3GT 酶活性以及利用 lh3GT 基因培育竹子新品种奠定了基础。

关键词: 七彩红竹; 3GT; cDNA 克隆; 基因表达分析

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)02-0244-06

Cloning and functional analysis of a flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene from *Indosasa hispida*

WANG Yi^{1,2}, WANG Chen-Chen^{1,3}, ZHOU Xu^{1,3},
 BI Wei^{1,2}, YANG Yu-Ming^{1,2}, WANG Juan^{1,2*}

(1. The Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China; 2. The Key Laboratory of Forestry Plant Cultivation and Utilization, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China; 3. Southwest Forestry University, Kunming 650204, China)

Abstract: Flavonoid-3-O-glucosyltransferase (3GT) is the key enzyme in anthocyanins biosynthesis, which transforms unstable anthocyanidins into stable anthocyanins. The function of Flavonoid-3-O-glucosyltransferase in bamboo is unclear, although many flavonoid-3-O-glucosyltransferases from other plant had been reported, so far. *Indosasa hispida*

收稿日期: 2014-06-23 修回日期: 2014-08-21

基金项目: 云南省应用基础研究重点项目 (2013FA054); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目 (2010CI016); 云南省科技计划项目 (20141A013)。

作者简介: 王毅 (1981-) 男, 四川广安人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物学和分子生物学研究, (E-mail) 22825818@qq.com。

通讯作者: 王娟, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物多样性保护生态学和竹类植物的微观研究, (E-mail) schima@163.com。

McClure cv. Rain bow is of few bamboo species which can produce anthocyanins in culm. Therefore *I. hispida* McClure cv. Rain bow is very important material to reveal the function of Flavonoid -3-O-glucosyltransferase in bamboo and the mechanism of anthocyanins biosynthesis in bamboo. Therefore it is first step to clone 3GT gene from *I. hispida* McClure cv. Rain bow. First gene special primers of 3GT were obtained based on the homology analysis of reported flavonoid -3-O-glucosyltransferase and the RNA was extracted from young red culm which produce anthocyanins part in *I. hispida* McClure cv. Rain bow by Trizol method. And then gene fragment of *I. hispida* McClure cv. Rainbow was cloned with special primers of 3GT. According to the obtained fragment sequence, the primers were designed, which were used in rapid amplification of cDNA ends (RACE). Next the 3' end and 5' end sequence of 3GT were obtained by RACE, the full length gene of lh3GT was assembled by ATG software. Finally, the full length gene of lh3GT was cloned from *I. hispida* McClure cv. Rainbow by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). ORF analysis program was used to confirm open reading frame, MEGA software was used to construct phylogenetic tree, the DNAMAN software was used in Homology analysis and semi RT-PCR was applied in gene expression profile. The results showed that the cDNA sequence of lh3GT consisted of 1 425 bp open reading frame (ORF) which encodes 474 amino acid, lh3GT and 3GT from Poaceae were grouped in same clade, the deduced protein of 3GT from *I. hispida* McClure cv. Rain bow shared 69% identities with 3GT of *Oryza sativa* and shared 67% identities with 3GT of *Brachypodium distachyon*. Homology analysis showed that deduced lh3GT protein had a glycosyltransferase signature domain PSPG-box. Expression profiling with semi RT-PCR analysis revealed that lh3GT was expressed in young red culm and was not expressed in old culm and leaf young leaf and shoot. This implied that the expression of lh3GT from *I. hispida* McClure cv. Rain bow showed obvious tissue specificity. This study will provide useful information to reveal mechanism of anthocyanins biosynthesis in *I. hispida* McClure cv. Rainbow in future. lh3GT gene can be transformed into *Escheria coli*, and heterologous expression obtain lh3GT protein and detect the enzyme activity of lh3GT and it can also be transformed into *Arabidopsis thaliana* or *Oryza sativa*, the function of lh3GT will be confirmed by heterologous expression. The obtained lh3GT also can be implied in bamboo breeding or other horticultural plants by genetic engineering.

Key words: *Indosasa hispida* McClure cv. Rainbow; flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene; cDNA clone; gene expression analysis

花色苷是花青素与各种单糖结合形成的花青素稳定存在形式。花青素属黄酮类化合物,广泛存在于植物的花、果实、种子、叶和茎中,是植物呈现五颜六色的物质基础 (Aizza *et al.*, 2011; 赵启明等, 2012)。目前对花青素的生物合成途径已有深入的研究,比如对矮牵牛的花,金鱼草的花,葡萄皮以及玉米粒中的花青素代谢过程已经非常清楚。花青素代谢过程中的结构基因以及调控基因也已被成功应用于改变花色以及获得新的花色 (Katsumoto *et al.*, 2007; Nishihara *et al.*, 2011)。花青素生物合成的基因可以分为两类:一类是负责合成花青素基本结构的基因,另一类是负责存储花青素或其他黄酮类化合物的基因 (Zhao *et al.*, 2012)。其中,糖基化是花青素后修饰的关键酶之一,通过糖基化形成的花色苷让花青素具有更强的稳定性。类黄酮 3-O-糖基转移酶是花色苷形成的最后一个酶,主要负责将不稳定的花青素转变为稳定的花色苷,即类黄酮 3-O-糖基转移酶 (3GT) 将 UDP-glucose

上的葡萄糖转移到花青素分子的 C3 羟基上,从而使花色苷的结构稳定。3GT 基因不仅仅增加花青素的水溶性以及稳定性,在改变花色方面也起重要作用 (Yoshida *et al.*, 2000)。最近,研究人员还发现荔枝中的 3GT 还可以调节花青素生物合成 (Zhao *et al.*, 2012)。

七彩红竹 (*Indosasa hispida* McClure cv. rainbow) 是禾本科 (Poaceae) 竹亚科 (Bambusoideae) 大节竹属 (*Indosasa*) 浦竹仔 (*Indosasa hispida*) 中选育的园艺植物新品种。其竹秆中下部出现不同程度的红色至紫红色,叶片上有黄条纹。通过项目组前期研究其红色物质主要是花色苷 (王娟等, 2012)。虽然目前已经从许多植物中成功分离出花色苷生物代谢过程中的 3GT 基因,比如天山雪莲 (唐亚萍等, 2012)、荔枝 (Zhao *et al.*, 2012)、小苍兰 (Sui *et al.*, 2011),但是在竹亚科植物中尚未见报道。本文通过同源性设计引物获得基因片段,并利用 RACE 方法获得全长的七彩红竹 3GT 基因。

1 材料与方方法

1.1 材料

七彩红竹 (*Indosasa hispida* McClure cv. Rain-bow) 种植于云南省林业科学院苗圃内。pESY-T3 克隆试剂盒及感受态细胞均购自北京全式金公司; LA-Taq 酶、3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase、5'-Full RACE Kit with TAP 以及 Reverse Transcriptase M-MLV 购自大连宝生物公司; Trizol 试剂购自上海生工。DNA 提取试剂盒购自天根公司。

1.2 克隆七彩红竹 3GT 基因片段

从 NCBI 数据中下载类黄酮 3-O-糖基转移酶的基因序列,用 DNAMAN 软件分析其保守区域,根据保守区域设计特异引物 FlhGT 和 RlhGT(表 1)。用 DNA 提取试剂盒提取七彩红竹 DNA,并以 DNA 为模板,FlhGT 和 RlhGT 为引物扩增 3GT 基因片段。反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,54 °C 45 s,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。扩增的 PCR 产物胶回收后连接到 pEASY-T3 载体中,经酶切鉴定送上海生工有限公司测序。对测序结果 Blast 进行比对后,确认获得七彩红竹 3GT 基因片段。

表 1 文中所用引物序列
Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Purpose
FlhGT	AGCAGCCGGCGCGGTTCGGTGGT	基因片段克隆 Gene fragment clone
RlhGT	CCAGCTCCAGTGTCCATCCA	
3RACRGTF1	TCGACCAGAT CCGGGAGATA	3'-RACE
3RACRGTF2	AAGACACCGTGGAAGTCAAGGA	
5RACRGTF1	CTGCATACTCTGTAGGTCGA	5'-RACE
5RACRGTF2	CCTATCTCTCCCGCTCACT	
lh3GTF0	ATGGCTCCACCTGAAATGCT	全长 cDNA 开放阅读框克隆 cDNA ORF Clone
lh3GTR0	TTAATTAGCCTTGAGCTTGGCA	
FGTt	TGGACGCGGGCTTCCCTCTT	RT-PCR 检测 RT-PCR detection
RGTt	CTCCTTCAACTTCTCCCTA	
Factin	GAAGCTCCTG GCATCCATGA	RT-PCR 内参 RT-PCR control
Ractin	AACTGACCTGACGACCTAGA	

1.3 七彩红竹 3GT 基因的 3'RACE 和 5'RACE

以七彩红竹微红幼茎的 RNA 为模板,按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 及 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒说明书合成 5'端及 3'端完整的七彩红竹 cDNA 第一链。根据获得的 3GT 基因片段序列设计 5'和 3'RACE 引物(表 1),用 5'-Full RACE Kit with TAP 试剂盒和 3'-Full

RACE Core Set with PrimeScript RTase (TaKaRa) 对七彩红竹 3GT 基因片段的 5'和 3'基因片段进行克隆。

1.4 cDNA 全长扩增

依据 cDNA 拼接序列,设计 3GT 基因特异引物 lhGTF0 和 lhGTR0,以微红幼茎的 cDNA 为模板,lhGTF0 和 lhGTR0 为引物,扩增七彩红竹 3GT 基因 cDNA 开放阅读框全长序列。反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,58 °C 45 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增的 PCR 产物胶回收后连接到 pEASY-T3 载体中。并测序验证所克隆得到的全长 cDNA。

1.5 七彩红竹 3GT 基因 cDNA 序列及其编码蛋白氨基酸的序列分析

采用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 工具和 DNAMAN 软件将七彩红竹 3GT 与数据库其他植物 3GT 基因进行核酸和氨基酸的同源序列比对,多序列的比对由 ClusterW 程序完成。并用 MEGA 4.0.2 软件的邻位相连算法 (Neighbor-joining) 1 000 次自举 (boot straping) 绘制出进化树图像。

1.6 七彩红竹 3GT 基因表达分析

以获得的 3GT 基因序列为模板设计特异引物 FGTt 和 RGTt(表 1)。采用液氮研磨法,用 Trizol 试剂分别提取七彩红竹的幼叶(第一片展开叶)、老叶(从根部开始往上第一片完整叶)、微红色的幼茎(当年生)、老茎(一年生)以及竹笋的总 RNA。并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量后,将 RNA 保存在 -80 °C 超低温冰箱。cDNA 合成参照 Prime Script 1st Stand cDNA Synthesis 试剂盒(宝生物工程有限公司,大连)的说明书操作,将 cDNA 保存在 -20 °C 冰箱。以特异引物 FGTt 和 RGTt 检测 3GT 基因在不同组织的表达情况,同时以 actin 为内参。

2 结果与分析

2.1 七彩红竹 3GT 基因片段的分析

根据已知植物 3GT 基因同源序列,运用生物信息软件设计的七彩竹 3GT 基因特异引物进行 PCR 扩增,纯化此扩增产物并进行测序,结果获得 1 个 480 bp 的基因片段(图 1)。经 Blast 分析发现该片段与禾本科玉米的花青素葡糖基转移酶 (GenBank Accession No. NP_001148936) 高度同源,相似性达

到 80% , 与水稻的 3GT (GenBank Accession No. BAD54637. 1) 基因相似性为 77% , 表明实验获得的 cDNA 片段为目的基因类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因片段。

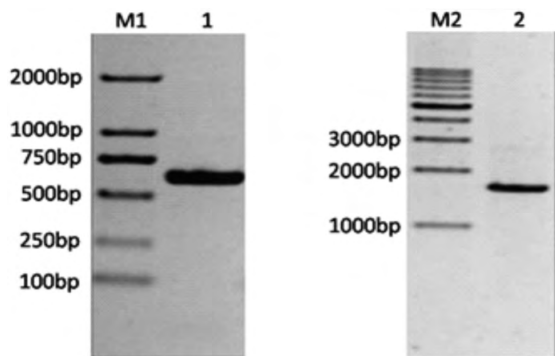


图 1 七彩红竹 3GT 基因克隆 PCR 扩增 M. 2 k DNA 分子标记; 1. 基因片段克隆; 2. 3'RACE 结果; 3. 5'RACE 结果。

Fig. 1 PCR product of 3GT gene clone M. 2k DNA marker (TransGen); 1. Product of primers FlhGT and RlhGT; 2. Product of 3GT 3'RACE; 3. Product of 3GT 5'RACE.

2.2 七彩红竹 3GT 全长 cDNA 的克隆与序列分析

依据七彩红竹中 3GT 基因片段的核苷酸序列设计特异引物, 用 RACE 技术克隆目的基因的 3' 和 5' cDNA 末端序列, 测序结果表明: 其大小分别为 743 bp 和 1 421 bp (图 1)。对获得的基因片段序列进行拼接后, 获得全长为 1 730 bp 的 cDNA 序列。利用软件分析获得 cDNA 开放阅读框, 并根据该序列设计含有起始密码子的特异引物 lh3GTF0 和含终止密码子的特异引物 lh3GTR0, 并以七彩红竹微红嫩茎 cDNA 为模板, PCR 扩增获得 1 422 bp 的 cDNA 完整的开放阅读框, 并命名为 lh3GT。将此 1 422 bp 片段与 3GTcDNA 拼接序列进行比对分析, 分析结果显示两序列一致, 这表明七彩红竹 3GT 基因 cDNA 拼接序列正确。其 5' 含有 145 bp 的非编码区, 3' 端含有 162 bp 的非编码区, 这表明七彩红竹 3GT 基因的 cDNA 序列完整 (GenBank Accession No. KJ477332)。

2.3 lh3GT 氨基酸序列分析

根据七彩红竹 3GT 基因 cDNA 全长序列推测其编码 474 个氨基酸残基。以七彩红竹 3GT 氨基酸序列与来其他四种不同物种的类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶氨基酸序列进行序列比对分析, 推测七彩红竹类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶含有一个由 44 个氨基酸残基构成的糖基转移酶的保守域 PSPG。图

2 中虚线框部分, 该保守序列被认为是结合糖基供体的区域。这表明从七彩红竹中克隆得到的基因 3GT 具有类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因家族所具有的序列特征, 进一步证明其为类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因。

2.4 lh3GT 系统进化树分析

七彩红竹 3GT 与其他植物的 GT 氨基酸序列的系统进化 (图 3) 结果表明: 七彩红竹 3GT 与禾本科类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶聚为一类, 从系统进化树可以看出七彩红竹 lh3GT 与二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) 的 3GT 基因及玉米 (*Zea mays*) 的 3GT 的亲缘关系较近 (图 3)。

2.5 lh3GT 基因的转录模式分析

利用 lh3GT 基因的特异引物 FGTt 和 RGTt, 通过 RT-PCR 检测 lh3GT 在七彩红竹不同组织中的表达情况。从图 4 中可以看出, lh3GT 基因只有在微红的嫩茎中才会表达, 而前期的研究表明微红的嫩茎中有大量花色苷的沉积。此结论暗示 lh3GT 基因参与七彩红竹中花色苷的合成。

3 讨论

竹子作为中国风景园林的重要组成部分, 色彩斑斓的竹子新品种具有巨大的市场价值 (张新明, 1999)。国外已有将荧光蛋白转入竹子中, 获得具有荧光的竹子新品种的相关报道 (Singh *et al.*, 2013)。这意味着利用基因技术手段获得竹子新品种将成为可能。而获得与色素相关的基因资源是培育色彩斑斓竹子新品种的第一步。本研究通过前期的研究及野外调查, 发现在浦竹仔等竹子中也存在花色苷。由于目前对花色苷生物合成的研究主要是集中在花卉植物以及模式植物, 对竹子花色苷的生物合成尚不清楚。因此, 本文对七彩红竹中的花青素合成关键酶, 类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (3GT) 进行研究, 为了解竹子花青素生物合成, 获得多彩的竹子新品以及利用竹子基因资源提供重要基础。

类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶 (3GT) 是花色苷合成的最后一个酶, 此酶影响着花青素的稳定以及决定着植物的颜色 (Yoshida *et al.*, 2000)。目前虽然对模式植物以及一些花卉中的 3GT 已有较深入的研究, 并且已应用于生产实践。但对禾本科, 尤其是竹子类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶尚未见报道。

Ih3GT	——MAPPEMLSSGEQD——RGAPHVVFIPsAGMGLHPFFRFITALSS—HDVDISVV 50
Os3GT	——MAPPTVLSNGEPDSRRRRARPHVVFVPSAGMGHLLPFFRFI GALSA—HDVDISVV 53
ZM3GT	——MAPPATNSPGEVDS—GGRPHVMFIPsAGMGLIPFFRFIAALAG—QSVDISVV 51
At3GT	——MPTSGDASGALP——HPHVLLPSAGMGLVPSRLAVLSLSPGHGCGVSVA 49
Bd3GT	MADLAAMPNSGEQQGRDA—PAPPHLVFVPSAGMGHLLPFFRFIADLAN—ENVEISVV 55
	* * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	TVLPTVTTAEADHFAALFTALPRIRRNFNLLPLDASAFPG—ADPFFLRWESLRSSAHL 108
Os3GT	TVLPTVSAAEADHFAARLFDQDFPSIRRVDFNLLPLDASEFPG—ADPFFLRWEALRRSMHL 111
ZM3GT	TVLPTVSAAEEDYFTSLFAALPRVRRVLDLHLLPFDASKLPSNDRDPFVLRWEALRRSAHL 111
At3GT	TVLPTVSSAESAHLDALFGACPAVRRLDHFLAPFDASEFPG—ADPFFLRFEAMRRSAPL 107
Bd3GT	TALPTVSAEAHFAADLFAAFPRIIRRIDFNLLPFDSEAFPG—ADPFFLRWESLRSSAQL 113
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	LGPLLAGATPSMSAVITDVTLASQVIPVKDELHLSCHILFPSSTTMLSVCAYFPPTYLDG 168
Os3GT	LAPATAGVSPRATAVVDVTLVSHVNIAPK—DLRLQCHVLFISSATMMSLCSYFPIYLDN 170
ZM3GT	LGPLIAGAAPRVSAVITDVTLTSHVPIAK—ELGVQCHVLPSSATMLSLAYTPVHIDK 170
At3GT	LGPLLAGAG—ALALVTDIALASVVPVAR—DLRLPCYVLTASAAMLSLVCVHFPAYLDA 164
Bd3GT	LGPLIAAAVPRASAVVDVTLASQVIPKDELNLPCHILFISCATMLSLVAYFPVYLDG 173
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	—ANADHVSDVDVPGVRRFTKATLPQALHDPNNLFTKQFVANGRGFTKADGFLNTFEAL 227
Os3GT	—KDAEADVGDIDIPGVRRLKRSWLPQPLDLKLFKQFIDNGREVVKTDGVLINTFDAL 229
ZM3GT	KAEQGSIDVDIPGVCRIPQSCLPQVLLHDLKLFKQFIANGREIINADGFLVNTFDAL 230
At3GT	—NAGGPVGDVDPGVYRVPKASIPQALHHPHFLFTQFVANGRELAKADGLLVNSFDAF 222
Bd3GT	—AKADHLVGDVDIPGVLRLPVSSPPQVLRNPSLFTKQFIANGRTIAKSDGILVNTFRAL 232
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	EPEAIAALRGGKVIPCFPPVFTVGPLKSMIPAESK———AGAGSPMAWLDEQPA 278
Os3GT	EPVALAALRDGKVIKGFPPVFAVGPYSSLASEKKAAD———ADQSSALAWLDQPA 281
ZM3GT	EPVALAALRDGKVVPGFPPVYAIIGPLMSQQNSVDEGGKE———EGSGSPVWLDEQPA 284
At3GT	EPEAIAALRNGSVAAGFPPVFSVGPLAPVSFSASEPP———ENQADYMRWLEAQA 274
Bd3GT	EPEALSALNSGKVVPGFPPVYAVGLPKSSITMTSTGSSDKDEGAAGGSPMAWLDEQPA 292
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	RSVYVYAFGNRCATVLDQIREIAAGLEASSFRFLWVVKTTVVDRDRETVL—LKDVLGDGF 336
Os3GT	RSVYVYAFGNRTVSNQDLREIAAGLEASGCRFLWILKTTVVDRDEAAAGVDRVLDGDF 341
ZM3GT	RSVYVYAFGNRCVSHDQIREIAAGLEASNCRFLWVVKTTVVDRDDSAV—LTELLEGEF 342
At3GT	RSVYVYVFGSRKATSKDQRELAVGLEASGHRFLWVVKSTVVDRDDEAE—LSELLGEGF 332
Bd3GT	GSVYVYAFGNRHGVSLEQIREIAAGLEASGCGFLWVVKTTVVDRDRETAEL—LEDVLRGRF 350
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	LERTQGRGLVTKAWVDQEAVLNHPAVGLFLSHSGWNSVLEAAAGVPLLAWPRLGHHVN 396
Os3GT	MERVKGRGMVTKWVDQEAVLGHPAVGLFLSHSGWNSVTEAAAAGVPLLAWPRLGHRVA 401
ZM3GT	LERVQGRGLVTKAWVDQEAALLKHPAMGLFLSHSGWNSVTEAAAASVPLLAWPRLGHRVN 402
At3GT	LERVQGRGMVTKWVDEEVLKQESIGLFI SHCGWNSVTEAAANGLPVLAWPRLGHRVN 392
Bd3GT	LGRVTGRGLVTKWVDQEAVLQHPAVGLYL SHAGWNSVTEAAYGVPLLVWPTAGLQIRVI 410
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	ATAMVSGGVVMEHWSWDGEDRLVSGEEIGEKLVKEMADETVRRARVAKVREEAAKAVDE 456
Os3GT	ATVASSGVGVWMEQWSWDGEEWLVSGEEIGGKVKEMADDAVRERAAGVGEAAKAVAE 461
ZM3GT	AMVTVSGGVVMEHWSWDGEDWLVTVGVEIAKKVKEVMSDEAVRARTTRTAEAAKAVAE 462
At3GT	AGVVARSGLVWEERWSWEGEETVSGHNI AEKVKVMADKTVRNKAVSVQDAAAEAVAD 452
Bd3GT	ATVVASAGFGLWMEHWDWES—LVSGAEIGEKVKEVMGNEGIKARAAGVSEAAKAVAE 467
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ih3GT	GGSTYRSMQEFVAKLKA——— 474
Os3GT	GGTSRTSMLEFVAKLKA——— 479
ZM3GT	GGTSYRSMEEFISSVKATVAS— 483
At3GT	GGTSYRSLAQFVQRCDLSVSK 474
Bd3GT	GGSSHRSMQEFVAKLKPSTT— 487
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

图 2 七彩红竹和其他物种 3GT 氨基酸序列比对分析 Os3GT: 水稻 (EAZ00582); ZM3GT: 玉米 (AFW76997); At3GT: 山羊草 (EMT12332); Bd3GT: 二穗短柄草 (XP_003560863)。所有蛋白序列中的保守氨基酸都用“*”标记, 有两个变化的氨基酸位点用“.”标记, 虚线框区域表示蛋白活性位点。

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of UF3GTs Os3GT: *Oryza sativa* (EAZ00582); ZM3GT: *Zea mays* (AFW76997); At3GT: *Aegilops tauschii* (EMT12332); Bd3GT: *Brachypodium distachyon* (XP_003560863). Amino acid residues conserved among all sequences are marked with an asterisk; variability between two amino acid residues is marked with a dot. Dotted line regions indicate the catalytic amino acid residue in the active site.

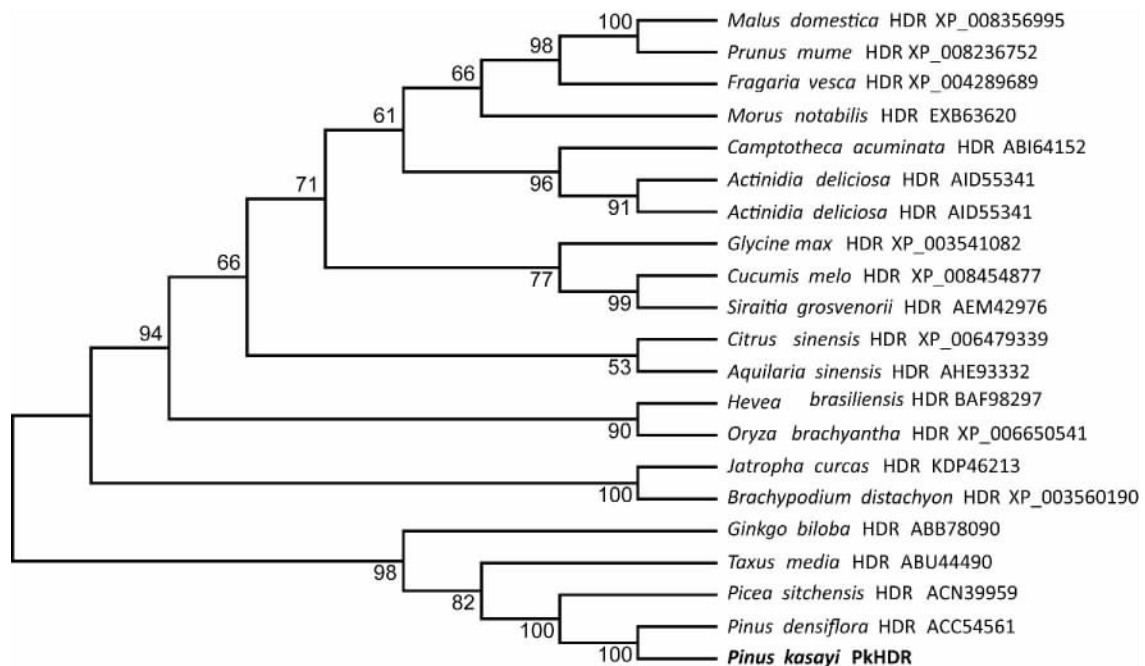


图 3 Ih3GT 与其他不同物种间 3GTs 系统进化树 近邻相接法构建的系统进化树是用 MEGA4 软件基于已经在 Genbank 里公布的类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶构建。

Fig. 3 Phylogenetic tree of the GTs Neighbor-joining tree was constructed using MEGA4 based on amino acid of anthocyanidin 3-O-glucosyltransferases which were published on GenBank.

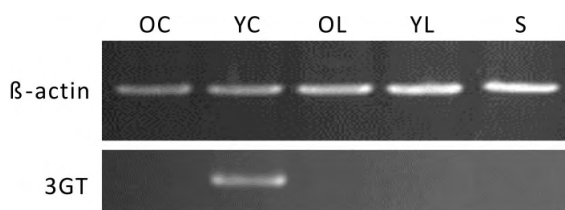


图 4 七彩红竹 3GT 基因在不同组织中的表达 OC: 老秆; YC: 幼秆; OL: 老叶; YL: 幼叶; S: 笋

Fig. 4 RT-PCR analysis of 3GT expression in different organs of *I. hispidula* Transcripts were amplified using gene specific primers with the PCR products separated using 1% agarose gel. OC: Old culm; YC: Young culm; OL: Old leaf; YL: Young leaf; S: Shoot.

本文以能够产生花青素的七彩红竹为材料, 根据其他植物 3GT 基因的保守区域设计同源引物, 以及利用 RACE 等方法获得七彩红竹 3GT 基因全长序列, 并将 3GT 完整的开放阅读框克隆到载体 pEASY-T3 中。通过生物信息学分析确定其为类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶, 同时, 利用半定量 PCR 确认 3GT 在微红的嫩茎中表达, 证明其与七彩红竹花色苷合成相关。本研究为未来深入研究七彩红竹花色苷形成机理, 鉴定 Ih3GT 酶活性以及利用 Ih3GT 基因培育竹子新品种奠定基础。

参考文献:

- Aizza LCB, Dornelas MC. 2011. A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers [J]. *J Nucleic Acids*, DOI:10.4061/2011/371517
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y *et al.* 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin [J]. *Plant Cell Physiol* **48**(11):1 589-1 600
- Nishihara M, Nakatsuka T. 2011. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants [J]. *Bio-technol Lett* **33**(3):433-441
- Singh SR, Singh R, Kalia S *et al.* 2013. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities [J]. *Physiol Mol Biol Plants* **19**(1):21-41
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M *et al.* 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. *Nat Prod Rep* **20**(3):288-303
- Sui X, Gao X, Ao M *et al.* 2011. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Freesia hybrida* [J]. *Plant Cell Rep* **30**(7):1 209-1 218
- Tang YP (唐亚萍), Yuan H (原慧), Qin JB (覃建兵). 2012. Identification and characterization of a flavonoid-3-O-glucosyltransferase gene from *Saussurea involucreta* (天山雪莲 UDP-葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及功能分析) [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报) **28**(6):705-714
- Vogt T, Jones P. 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family [J]. *Trends* (下转第 212 页 Continue on page 212)

- acids in apple trees and their effects on zinc uptake and distribution under zinc deficiency (缺锌苹果树有机酸与锌吸收分配的关系) [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学) **43**(16):3 381–3 391
- López-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V *et al.* 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils [J]. *Plant Sci*, **160**:1–13
- McCray JM, Matocha JE. 1992. Effects of soil water levels on solution bicarbonate, chlorosis and growth of sorghum [J]. *J Plant Nutr* **15**:1 877–1 890
- Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls [J]. *Agronomie* **23**:375–396
- Nisperos-Carriedo MO, Buslig BS, Shaw PE. 1992. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC [J]. *J Agr Food Chem* **40**:1 127–1 130
- Oliveira AP, Pereira JA, Andrade PB, *et al.* 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf [J]. *Food Chem* **111**: 393–399
- Ollat N, Laborde W, Neveux M *et al.* 2003. Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*Vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and bicarbonate nutrition [J]. *J Plant Nutr* **26**:2 165–2 176
- Qin R, Hirano Y, Brunner I. 2007. Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn [J]. *Tree Physiol* **27**:313–320
- Rees TAP. 1990. Plant Physiology Biochemistry and Molecular Biology [M]. London: Longman Group: 106–143
- Rehman HU, Aziz T, Farooq M *et al.* 2012. Zinc nutrition in rice production systems: a review [J]. *Plant Soil* **361**:203–226
- Rose MT, Rose TJ, Pariasca-Tanaka J *et al.* 2011. Revisiting the role of organic acids in the bicarbonate tolerance of zinc-efficient rice genotypes [J]. *Funct Plant Biol* **38**:493–504
- Ryan PR, Delhaize E, Jones DL. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:527–560
- Sweetlove LJ, Beard KF, Nunes-Nesi A *et al.* 2010. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle [J]. *Trends Plant Sci* **15**(8):462–470
- van Rensen JJS. 2002. Role of bicarbonate at the acceptor side of photosystem II [J]. *Photosynth Res* **73**:185–192
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E *et al.* 2003. Root exudation and rhizosphere biology [J]. *Plant Physiol* **132**:44–51
- Wang P, Zhou R, Cheng JJ *et al.* 2007. LC determination of trace short-chain organic acids in wheat root exudates under aluminum stress [J]. *Chromatographia* **66**:867–872
- Wu LJ (吴柳杰), Zhang YX (张永先), Ling GZ (凌贵芝), *et al.* 2014. Secretion of organic acids from root apices under Al stress in rye and wheat (铝胁迫下黑麦和小麦根尖分泌有机酸的研究) [J]. *Guihaia* (广西植物) **34**(4):455–459
- Wu YY (吴沿友). 1997. The Synthetic Study on Karst Adapted plant—*Orychophragmus violaceus* (喀斯特适生植物诸葛菜综合研究) [M]. Guiyang (贵阳): Guizhou Science and Technology Press (贵州科技出版社): 1–25
- Wu Y, Li P, Zhao Y *et al.* 2007. Study on photosynthetic characteristics of *Orychophragmus violaceus* related to shade-tolerance [J]. *Sci Hortic Amsterdam* **113**:173–176
- Wu YY (吴沿友), Li XT (李西腾), Hao JC (郝建朝), *et al.* 2006. Study on the difference of the activities of carbonic anhydrase in different plants (模拟干旱胁迫下构树和桑树的生理特征比较) [J]. *Guihaia* (广西植物) **4**:366–369
- Wu YY (吴沿友), Liu CQ (刘丛强), Wang SJ (王世杰). 2004. The Study on Adaptability to Karst of *Orychophragmus violaceus* (诸葛菜的喀斯特适生性研究) [M]. Guiyang (贵阳): Guizhou Science and Technology Press (贵州科技出版社): 1–43
- Wu YY, Wu XM, Li PP *et al.* 2005. Comparison of photosynthetic activity of *Orychophragmus violaceus* and oil-seed rape [J]. *Photosynthetica* **43**(2):299–302
- Wu YY (吴沿友), Xing DK (邢德科), Liu Y (刘莹). 2011. The characteristics of bicarbonate used by plants (植物利用碳酸氢根离子的特征分析) [J]. *Earth Environ* (地球与环境) **39**: 273–277
- Xu XY (徐晓燕), Yang YE (杨肖娥), Yang YA (杨玉爱). 2001. Studies on the effect of HCO_3^- on distribution of main organic acids in root zones and the relation to rice cultivar adaptation to zinc deficiency (重碳酸氢根对水稻根区重要有机酸分布的影响与水稻品种耐缺 Zn 关系的研究) [J]. *Acta Agronomica Sin* (作物学报) **27**(3):387–391
- Zhao K (赵宽), Wu YY (吴沿友). 2014. Characteristics of low molecular weight organic acids of roots, stems and leaves and root exudates in four species seedlings (4种植物幼苗根茎叶及根系分泌物中低分子量有机酸的特征) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报) **34**(5):1 002–1 007

(上接第 241 页 Continue from page 241)

Plant Sci **5**(9):380–386

- Wang J (王娟), Sun H (孙浩), Peng GS (彭桂莎), *et al.* 2012. Phylogenetic study on anthocyanin produced mutant of *Indosasa hispida* based on rDNA ITS sequences (浦竹仔红色秆变异个体的 rDNA ITS 序列及系统发育研究) [J]. *J West Chin For Sci* (西部林业科学) **41**(1):1–6
- Yoshida K, Toyama Y, Kameda K *et al.* 2000. Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecule of gentiodelphin to blue color development [J]. *Phytochemistry* **54**(1):85–92
- Zhang XM (张新明). 1999. Function and development tendency of

- ornamental bamboo in gardening (观赏竹在园林绿化中的功用及其发展方向) [J]. *J Bamboo Res* (竹子研究汇刊) **18**(4):24–26
- Zhao ZC, Hu GB, Hu FC *et al.* 2012. The UDP glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UGFT) gene regulates anthocyanin biosynthesis in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) during fruit coloration [J]. *Mol Biol Rep* **39**(6):6 409–6 415
- Zhou QM (赵启明), Li F (李范), Li P (李萍). 2012. Research advances on core enzymes of anthocyanidin biosynthesis (花青素生物合成关键酶的研究进展) [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报) **12**:25–32