

郑学立, 刘生财, 谢礼洋, 等. 莴菜 *AmaDOPA5-GT* 基因的启动子克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 福建农业学报, 2015, 30(11): 1064-1070.
ZHENG X-L, LIU S-C, XIE L-Y, et al. Promoter-cloning, Protein Subcellular Localization, and Expression Analysis for *AmaDOPA5-GT* Gene of *Amaranth tricolor* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (11): 1064-1070.

莴菜 *AmaDOPA5-GT* 基因的启动子克隆、亚细胞定位及表达分析

郑学立^{1,2}, 刘生财¹, 谢礼洋¹, 程春振¹, 赖钟雄^{1*}

(1. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002; 2. 福州市蔬菜科学研究所, 福建 福州 350111)

摘要: 对获得的莴菜环多巴 5-糖基转移酶基因 (*AmaDOPA5-GT*) 进行生物信息学和蛋白亚细胞定位分析, 并利用染色体步移技术克隆该基因的启动子。亚细胞定位结果表明, *AmaDOPA5-GT* 定位于细胞膜。启动子分析结果表明 *AmaDOPA5-GT* 启动子中植物光响应元件多达 8 个, 说明光对该基因的表达影响较大。色素含量测定及实时定量 PCR 结果显示: 暗处理抑制莴菜苷合成和 *AmaDOPA5-GT* 表达; 黄光和绿光抑制莴菜苷合成但对 *AmaDOPA5-GT* 表达影响不大; 红光显著抑制莴菜苷合成但却显著诱导 *AmaDOPA5-GT* 表达; 蓝光显著促进莴菜苷合成和 *AmaDOPA5-GT* 表达。本研究可为揭示 *AmaDOPA5-GT* 基因在莴菜中的作用奠定基础并为富含甜菜红色素莴菜的莴菜育种提供线索。

关键词: 莴菜; DOPA5-GT; 启动子; 光质; 甜菜红色素合成

中图分类号: S 636.4

文献标识码: A

Promoter-cloning, Protein Subcellular Localization, and Expression Analysis for *AmaDOPA5-GT* Gene of *Amaranth tricolor*

ZHENG Xue-li^{1,2}, LIU Sheng-cai¹, XIE Li-yang¹, CHENG Chun-zhen¹, LAI Zhong-xiong^{1*}

(1. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Institute of Vegetable Science of Fuzhou, Fuzhou, Fujian 350111, China)

Abstract: Bioinformatic characteristics and protein subcellular localization of *AmaDOPA5-GT* gene in *Amaranth tricolor* were studied. The chromosome walking technique was applied to clone the gene promoter. The protein was found to be located in the cytomembrane. Eight light-responsive elements were identified in the promoter, suggesting that light might be associated with the regulation of the gene expression. The amaranthin content and quantitative real time PCR showed that darkness suppressed both betalain biosynthesis and *AmaDOPA5-GT* gene expression; red light also suppressed betalain biosynthesis, but significantly enhanced the gene expression; yellow and green light showed no effect on the gene expression, but suppressed the betalain biosynthesis; and, blue light induced both betalain biosynthesis and the gene expression. The results obtained provided a basis for further exploring the function of *AmaDOPA5-GT* in betalain biosynthesis, as well as a guideline for breeding betalain-rich amaranth.

Key words: amaranth; DOPA5-GT; promoter; light; betalain biosynthesis

莴菜种类繁多, 营养丰富, 适应性强, 种植广泛^[1-4]。近些年, 食品安全问题日益严峻, 人们对天然色素的关注越来越多。莴菜富含甜菜红色素, 其取材方便及色素的提取较为方便, 使得它渐渐替代甜菜作为一种重要的天然色素提取资源的地位。

在莴菜中, 甜菜红色素主要以莴菜苷和异形莴菜苷形式存在^[5]。甜菜红色素合成途径目前逐渐清晰, 其中涉及的主要酶和基因主要有酪氨酸酶、双加氧酶、多巴脱羧酶和糖基转移酶。糖基转移酶分为两类, 一类是甜菜苷 5-氧-糖基转移酶和甜菜苷

收稿日期: 2015-09-28 初稿; 2015-10-25 修改稿

作者简介: 郑学立 (1975-), 男, 博士生, 助理研究员, 主要从事蔬菜育种及园艺植物生物技术研究 (E-mail: 99345054@qq.com)

* 通讯作者: 赖钟雄 (1966-), 男, 研究员, 主要从事园艺植物生物技术及分子生物学研究 (E-mail: laizx01@163.com)

基金项目: 高等学校博士学科点专项新教师类科研基金项目 (20123515120009); 福建省自然科学基金项目 (2013j05045); 福建省教育厅 a 类项目 (ja12098)

6-氧-糖基转移酶, 分别利用 UDP-葡萄糖形成糖苷甜菜苷 5-氧-糖甙和甜菜苷 6-氧-糖甙; 另一类只有一个 4, 5 环多巴 5-氧-糖基转移酶, 环多巴葡萄糖苷通过其他路径进行的糖基化^[6-8]。Wyler 等^[9]发现在甜菜的幼根和老根中环多巴糖甙的含量占总甜菜红素含量的 46% 和 12%, 认为环多巴糖甙参与或涉及甜菜碱的合成途径。Sasaki 等^[10-12]在鸡冠花花朵的粗提物中观察到 cyclo-DOPA5-O-glucosyltransferase 的活性, 并认为催化 cyclo-DOPA glucoside 直接完成糖基化, 而不是在甜菜苷进行, 它导致一条新的基于酪氨酸的甜菜红素生物合成途径。DOPA5-GT 编码的基因在籽粒苋 (*Amaranthus hypochondriacus*)^[13]、鸡冠花 (*Celosia cristata*) 和紫茉莉 (*Mirabilis jalapa*)^[14]等多种石竹目植物中得到克隆。甜菜红素的合成受多种因素的影响, 其中光对色素的累积影响较大。Zhao 等^[15]通过试验表明光质和光强影响盐地碱蓬甜菜红色素的合成。光质也影响甜菜毛状根甜菜红色素的累积^[16]。在不同光质中, 蓝光比红光更有利于甜菜红色素的积累^[17]。

在本课题组之前的研究中, 以莴苣转录组测序结果作为参考^[18], 利用 RT-PCR 结合 RACE 技术成功克隆到莴苣 *AmaDOPA5-GT* 基因 (GenBank 登录号: KP174811)。DOPA5-GT 是甜菜红色合成途径中关键基因^[6-9], 为进一步挖掘该基因在莴苣苷合成过程中的作用, 本研究中对 *AmaDOPA5-GT* 基因进行了生物信息学分析, 并通过构建 *AmaDOPA5-GT-GFP* 表达载体研究该基因编码的蛋白的亚细胞定位情况。另外, 本试验利用交错式热不对称 PCR 染色体步移 (Tail-PCR) 技术对 *AmaDOPA5-GT* 启动子进行克隆并对其进行在线功能预测, 根据预测的结果, 对莴苣进行不同光质处理, 研究不同光质对 *AmaDOPA5-GT* 的表达量及莴苣苷含量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

供试红色莴苣品种为“大红莴苣”, 购于福州种子市场。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 根据前期获得的 *AmaDOPA5-GT* 基因序列 (KP174811) 利用在线软件对其进行生物信息学分析^[19]: 利用 ExPASy Prot-param 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白理化性质分析; 利用 Plant-mPLoc 软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 预测蛋白的亚细胞定位情况; 利用 ProtScale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白亲水性; 利用 NetPhos 2.0 Serve 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白磷酸化位点; 利用 SignalIP 4.1 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白信号肽; 利用 TMpred Server 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测蛋白跨膜结构; 利用 PSIPRED 软件 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测蛋白的二级结构; 利用 DNAMAN 6.0 对 *AmaDOPA5-GT* 和其他植物糖基转移酶家族的氨基酸序列进行多重比对; 利用 Mega 5 构建进化树。

1.2.2 *AmaDOPA5-GT* 亚细胞定位分析 利用 DNAMAN 6.0 软件分析该基因 ORF 区序列和载体 PCAMBIA1302-GFP 中的酶切位点并设计引物 (表 1), 以莴苣 cDNA 为模板克隆目的片段, 送测验证正确后进行载体构建和转化农杆菌。蛋白亚细胞定位参照林丽霞等^[20]的方法: 将 1 cm² 左右大小的洋葱在 MS 培养基上预培养 1 d 后, 在准备好的农杆菌悬浮液中浸泡 20 min。然后取出洋葱表皮, 内表皮朝下平铺于 MS 培养基上, 25°C 共培养 2 d。用无菌 MS 液体培养基清洗 2~3 次后在荧光共聚焦显微镜 (A1 Nikon) 观察绿色荧光蛋白信号。为区分定位结果是在细胞膜还是在细胞壁, 还需将洋葱表皮置于 30% 的蔗糖溶液中质壁分离后再观察。

1.2.3 *AmaDOPA5-GT* 基因启动子克隆与分析

以莴苣子叶为材料进行 DNA 的提取。根据 TaKaRa Genome Walking Kit 引物设计原则设计 Tail-PCR 引物 (表 1), 采用交错式热不对称 PCR 染色体步移 (Tail-PCR) 进行启动子扩增。以 Genome Walking Kit (TaKaRa) 自带上游引物 (AP1、AP2、AP3 和 AP4) 与设计的 *AmaDOPA5-GT* 基因特异引物为下游引物进行三轮热不对称 PCR 扩增, 获得该基因上游启动子序列。利用在线软件 Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 预测 *AmaDOPA5-GT* 启动子可能的转录起始位点; 利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件预测启动子顺式作用元件。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primers used in PCR

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小 /bp	退火温度 /℃	用途
AmrDOPA5-GT-GFP-F	CATGCCATGGATGGATTCAAAACAAAGCAC	1 424	63	亚细胞定位
AmrDOPA5-GT-GFP-R	GGACTAGTGCCTTACGAGAAACAATGAACCTCTAC			
AmrDOPA5-GT-Sp1	GCGAAGTGGATGCATAAAACAGAGAG	1 322	60	启动子扩增
AmrDOPA5-GT-Sp2	AATATGTTGTTGGATTGACGGCGGAG		62	
AmrDOPA5-GT-Sp3	CAGAAATGGACGGAGATGACCTTGC		62	
AmrDOPA5-GT-qF	F:CTGGAGAGTTCAAACCCGAA	195	60	荧光定量 PCR q-PCR
AmrDOPA5-GT-qR	R:CCACCCATTATCGGAACACCT			
EF-1 α	F:GGGATGCTGGTATGGTGA R:ACGGGTCAATTCTTCTTGAG	195	60	内参基因

1.2.4 莴苣幼苗培养与处理 取“大红莴苣”种子 0.25 g, 用 75% 的酒精消毒 30 s, 均匀地撒播在直径 12.4 cm 平铺有四层无菌滤纸 (含 15 mL 无菌水) 的培养皿中。在不同颜色冷光源下进行培养, 培养温度为 25℃, 光照时间 16 h · d⁻¹。不同光质处理为: 白、暖白、蓝、绿、红 (电压: 220 V, 功率: 18 W) 和暗 6 个处理。培养 7 d 后, 取幼苗用于甜菜红素测定和 RNA 提取, 每个试验重复 3 次。

1.2.5 实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析 qRT-PCR 采用 TaKaRa 公司生产 M-MLV 反转录试剂盒, 参照说明的 20 μL 标准反转录体系进行反转录合成 cDNA 第一链。以反转录产物为模板, 以 EF1 α 基因作为内参基因, 进行实时定量 RT-PCR 验证。所使用荧光定量 PCR 仪为罗氏 LightCycler480。目的基因相对表达量的计算公式如下: 基因的相对表达量 = (内参基因 E $^{\Delta C_p}$) / (目的基因 E $^{\Delta C_p}$), 其中 E 为扩增效率, ΔC_p 为各个时期 C p 值与参照时期 C p 值的差值。

1.2.6 莴苣甜菜红色素的提取与测定 称取 0.5 g 莴苣新鲜组织, 液氮中进行研磨, 研磨完迅速加入 7 mL 预冷甲醇, 剧烈振荡混匀, 于 4℃ 放置 30 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 去上清, 用双蒸水重悬沉淀, 4℃ 30 min, 12 000 r · min⁻¹ 离心取上清水相, 用紫外分光光度计在 536 nm 下测吸光值。根据甜菜红素的摩尔消光系数 5.66×10^4 计算甜菜红素的绝对含量^[13,15]。

2 结果与分析

2.1 AmaDOPA5-GT 基因生物信息学分析

根据获得的 AmaDOPA5-GT (Kp174811) 基因的 cDNA 序列进行生物信息学分析, 该基因 cDNA 全长 1 680 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 1 434 bp, 编

码 477 个氨基酸, 5'-UTR 54 bp, 3'-UTR 192 bp, Ploy A 尾巴长 31 bp。由于 PCR 扩增的 AmaDOPA5-GT 基因的 gDNA 序列与 cDNA 序列完全相同, 推测该基因没有内含子。理化性质分析结果表明: 该基因所编码的蛋白分子量为 54 084.0, 分子式为 C₂₄₃₃ H₃₇₇₀ N₆₅₆ O₆₉₆ S₂₃, 等电点 (PI) 为 6.05, 不稳定系数为 51.96, 带负电氨基酸数为 50 个, 带正电氨基酸数为 57 个, 亲水系数为 -0.231; Plant-mPLoc 在线软件预测表明: AmaDOPA5-GT 定位在细胞膜上。ProtScale 分析结果显示这个基因为亲水性蛋白; NetPhos 2.0 Serve 软件预测显示 AmaDOPA5-GT 蛋白磷酸化位点有 12 个 (Ser: 8 Thr: 1 Tyr: 3); 采用 SignalP 4.1 Server 蛋白质信号肽预测结果显示这个基因不具有信号肽; 用 TMpred Server 软件进行跨膜结构预测显示是 AmaDOPA5-GT 跨膜蛋白。用 PSIPRED 软件预测蛋白质的二级结构, AmaDOPA5-GT 由 40.38% 的 α 螺旋、14.44% 的延伸链和 45.19% 自由折叠组成。使用 DNAMAN6.0 软件对 AmaDOPA5-GT 和其他植物糖基转移酶家族的氨基酸序列进行多重比对, 在发现碳端有 1 个 44 个氨基酸残基组成的保守 UDP 结合位点 (PSPG-box, 图 1), 还有 1 个所有糖基转移酶的保守序列^[19,20], 证明该基因属于糖基转移酶家族成员。

进化树分析结果表明 AmaDOPA5-GT 与其他几个植物的 5-GT 聚在一个分支上 (图 2), 其中与同属的籽粒莴苣的 DOPA5-GT 覆盖率和相似度最高, 分别高达 100% 和 95%, 与鸡冠花、三角梅和紫茉莉的亲缘关系依次降低, 与亲缘关系最远的紫茉莉的 DOPA5-GT 的覆盖率和相似度也分别高达 98% 和 57%, AmaDOPA5-GT 次分支和 Betanidin 5-GT 的次分支相邻, 都聚到石竹目的 1 个主要分支上, 和 Casique-Arroyo 等^[13]的研究结果一致。

Amaranthus_hypoc	MESSK...TKVILLPLIAQCHIREFFLAKBLRSHTPFTISIILTTEFLMAA...NLRRQSN...NINILIDLFFNSTDNELP	72
Amaranthus_trico	MESSK...TKLILILPLIAQCHIREFFLAKBLRSHTPFTISIILTTEFLMAA...NLRRQSN...NINILIDLFFNSTDNELP	72
Bougainvillea_sp	MEYN...S.ETEFLILIPINAHGHFRESIQLALHLSTKTPFTITIILTTEFLMAA...HFFFLKLPCCPTTIRVAELFFNSTDNELP	76
Celosia_cristata	MSNSSE...TFTFLILIPINAHGHFRESIQLALHLSTKTPFTITIILTTEFLMAA...SFRRISLDNINYNLNNTIVDLPFNSTDNELP	78
Mirabilis_jalapa	MNTNIEG...ETCILILIPINAHGHFRESIQLALHLSTKTPFTISIILTTEFLMAA...SFRRISLDNINYNLNNTIVDLPFNSTDNELP	82
Amaranthus_hypoc	ENTINTEKLPILPSISIISLYFASISLEHFLHVRNHLTRHH...LDPFPICITIDFLGADNLARSIGSTGCFNTGCGAYGLAYISIW	154
Amaranthus_trico	ENTINTEKLPILPSISIISLYFASISLEHFLHVRNHLTRHH...LDPFPICITIDFLGADNLARSIGSTGCFNTGCGAYGLAYISIW	154
Bougainvillea_sp	PLVENTISQPHIHLATISFLHATISLEHFLHVRNHLTRHH...LNPFPICITIDFLGADNLARSIGSTGCFNTGCGAYGLAYISIW	159
Celosia_cristata	PLVENTISQPHIHLATISFLHATISLEHFLHVRNHLTRHH...LNPFPICITIDFLGADNLARSIGSTGCFNTGCGAYGLAYISIW	160
Mirabilis_jalapa	PLVENTEKLPILPSISIISLYFASISLEHFLHVRNHLTRHH...LNPFPICITIDFLGADNLARSIGSTGCFNTGCGAYGLAYISIW	165
Amaranthus_hypoc	THLPCRNVEDDEFLSPFPPENRKEIIRNQIHLRFLRADEGTLDDSRFECPOIKNRNCNSANLQNSIEEIEPIGFPIILRAMLKVP	237
Amaranthus_trico	MFLPHRNFDNWEFLSPFPPENRKEIIRNQIHLRFLRADEGTLDDSRFECPOIKNRNCNSANLQNSIEEIEPIGFPIILRAMLKVP	237
Bougainvillea_sp	NDLPHRNFDDEEFLSPFPPENRKEIIRNQIHLRFLRADEGTLDDSRFECPOIKNRNCNSANLQNSIEEIEPIGFPIILRAMLKVP	242
Celosia_cristata	THLPHRNFDDEEFLSPFPPENRKEIIRNQIHLRFLRADEGTLDDSRFECPOIKNRNCNSANLQNSIEEIEPIGFPIILRAMLKVP	243
Mirabilis_jalapa	NDLPHRNFDDEEFLSPFPPENRKEIIRNQIHLRFLRADEGTLDDSRFECPOIKNRNCNSANLQNSIEEIEPIGFPIILRAMLKVP	248
Amaranthus_hypoc	VMGICPLIITKENS...IED.EEQGCVVEWLNLQKCSVLYISFGSQTNTIHQQMELAKGLEESGARFLWVIRPFFGFDINGE	316
Amaranthus_trico	VMGICPLIITKENS...IED.EEQGCVVEWLNLQKCSVLYISFGSQTNTIHQQMELAKGLEESGARFLWVIRPFFGFDINGE	316
Bougainvillea_sp	VMGICPLIITSPINN...GNECV...IQLWSSQKPEISLQKCSVLYISFGSQTNTIHQQMELAKGLEESGARFLWVIRPFFGFDINGE	319
Celosia_cristata	VMGICPLIITSSNC...NNNNNDHGCIENLNLQKCSVLYISFGSQTNTIHQQMELAKGLEESGARFLWVIRPFFGFDINGE	323
Mirabilis_jalapa	VMGICPLIITSPVQHSSINNNTGAEFWQLSLKPEISLQKCSVLYISFGSQTNTIHQQMELAAGLEESSEKEFLWVIRPFFGFDINGE	331
Amaranthus_hypoc	FFPEWLPECFDERRVIERKOGKIVLWVQKFCMEIIIRNKAIEFLHHCWNLSLDEALISCEVPLIGWFLAAEQAYNSKMLVEEMGV	399
Amaranthus_trico	FFPEWLPECFDERRVIERKOGKIVLWVQKFCMEIIIRNKAIEFLHHCWNLSLDEALISCEVPLIGWFLAAEQAYNSKMLVEEMGV	399
Bougainvillea_sp	FFPEWLPECFDERRMKKEKKOGKIVLWVQKFCMEIIIRNKAIEFLHHCWNLSLDEALISCEVPLIGWFLAAEQAYNSKMLVEEMGV	402
Celosia_cristata	FFPEWLPECFDERRMKKEKKOGKIVLWVQKFCMEIIIRNKAIEFLHHCWNLSLDEALISCEVPLIGWFLAAEQAYNSKMLVEEMGV	406
Mirabilis_jalapa	FFPEWLPECFDERRMKVKKOGKIVLWVQKFCMEIIIRNKAIEFLHHCWNLSLDEALISCEVPLIGWFLAAEQAYNSKMLVEEMGV	414
Amaranthus_hypoc	VELTRGLECELSSEVVKRVEVVMRSEEGSFGCEMKKKEAEWVICCKLFLDAMKVEGHLPGCQLRSLSDEEVEFIVSKATL..	478
Amaranthus_trico	VELTRGLECELSSEVVKRVEVVMRSEEGSFGCEMKKKEAEWVICCKLFLDAMKVEGHLPGCQLRSLSDEEVEFIVSKATL..	477
Bougainvillea_sp	VELTRGLECEVKKVVEVVLMDRKGSCGCEMKKKEAEWVCKKMKDLSIRDTEYNGSFLAMEEVKAIVSIAKTSKDK	482
Celosia_cristata	VELTRGLECEVKKVVEVVLMDRKGSCGCEMKKKEAEWVICCKLFLDAMKVEGHLPGCQLRSLSDEEVEFIVSKATL..	486
Mirabilis_jalapa	VELTRGLECEVKKVVEVVLMDRKGSCGCEMKKKEAEWVICCKLFLDAMKVEGHLPGCQLRSLSDEEVEFIVSKATL..	494

图1 AmaDOPA5-GT 氨基酸序列与其他物种 DOPA5-GT 蛋白氨基酸序列多重比对结果

Fig. 1 Multiple alignment of deduced amino acid of AmaDOPA5-GT and DOPA5-GTs from other species

注: 下划线表示糖基转移酶的特征序列 (PSPG box), 方框区域为 UGT 的保守区。

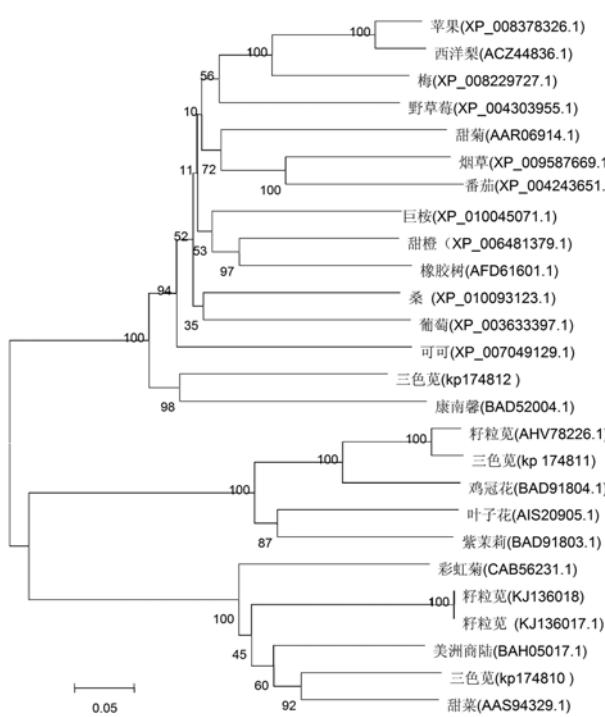


图2 AmaDOPA5-GT 与其他植物 GT 氨基酸序列的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of AmaDOPA5-GT and GTs from other plants

注: 图中分支点的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比 (%)。

2.2 AmaDOPA5-GT 亚细胞定位

亚细胞定位结果表明 AmaDOPA5-GT 定位于细胞膜上, 与在线软件预测一致。空载体融合蛋白在洋葱表皮细胞细胞膜、细胞质和细胞核等部位都有表达 (图 3)。

2.3 AmaDOPA5-GT 基因的启动子克隆

通过测序获得 1 393 bp 的序列, 其中与 AmaDOPA5-GT 基因的 gDNA 序列重叠 71 bp, 证实该片段为 AmaDOPA5-GT 基因 5' 端调控序列 (图 4)。Promoter 2.0 分析结果表明 AmaDOPA5-GT 启动子可能的转录起始位点在起始密码子上游 500 bp 位置, 可信度值为 1.050; PlantCARE 分析共预测到 29 个顺式作用元件, 有多个与植物响应的作用元件 (图 4), 其中植物光响应元件有 8 个; 茉莉酸甲酯相应元件 2 个; 水杨酸相应元件 1 个; 乙烯响应元件 1 个; 赤霉素响应元件 1 个。AmaDOPA5-GT 基因启动子中植物光响应元件数目较多, 说明光对该基因的表达影响较大。

2.4 不同光质处理对莴苣小苗甜菜红素含量和 AmaDOPA5-GT 表达的影响

在不同的光处理下, 蓝光处理中莴苣幼苗甜菜红素含量最高, 是暗处下幼苗中甜菜红素含量的 8 倍左右, 其次是白光和复合光也出现类似情况, 绿光和红光更少, 但也比暗处理条件下的多, 最少的是暗处理 (图 5A)。

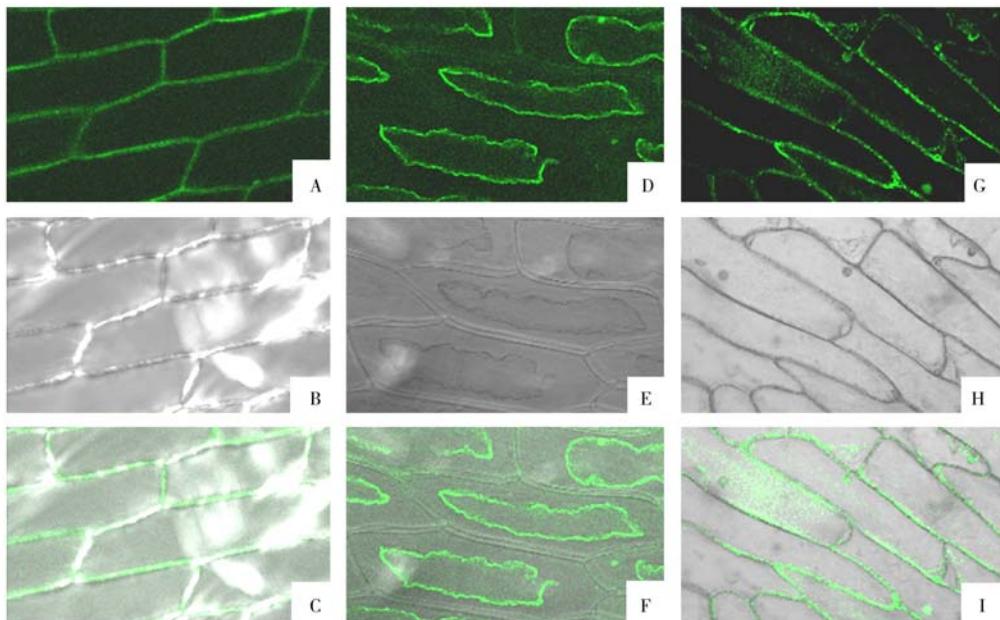


图 3 35S::AmaDOPA5-GT-GFP 蛋白亚细胞定位结果

Fig. 3 Subcellular localization of 35S::AmaDOPA5-GT-GFP protein

注: A~C 为细胞质壁分离前; D~F 为细胞质壁分离后; G~I 为载体定位结果, A、D 和 G 为荧光图, B、E 和 H 为白场图, C、F 和 I 为叠加图。

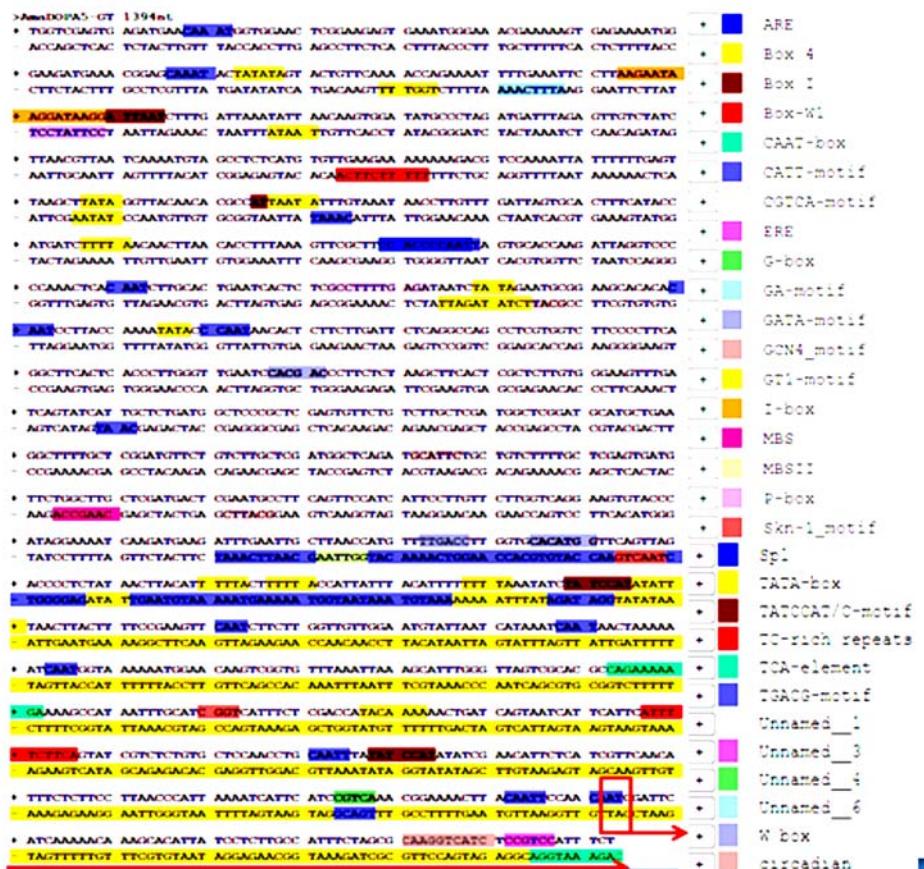


图 4 AmaDOPA5-GT 基因启动子分析结果

Fig. 4 Analysis on AmaDOPA5-GT promoter

注: 红框内碱基代表 AmaDOPA5-GT 基因起始密码子, 红箭头部分为与 AmaDOPA5-GT 基因重叠序列。

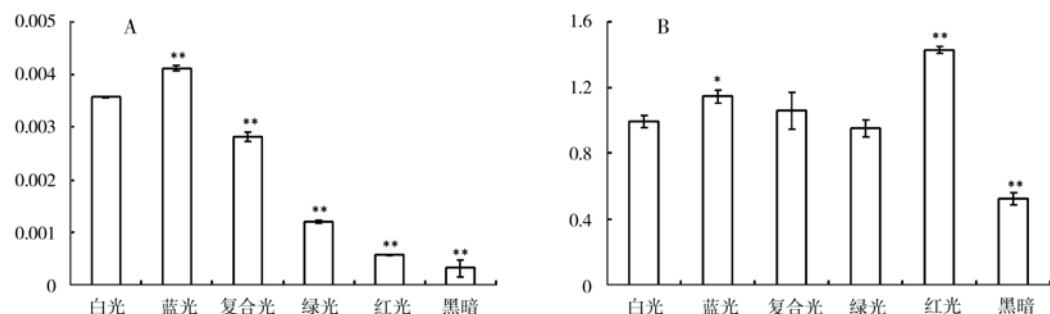


图 5 不同光照处理对莴苣幼苗莴苣昔含量 (A) 和 AmaDOPA5-GT (B) 表达的影响

Fig. 5 Effect of light of different wavelengths on amaranthin and AmaDOPA5-GT expression in Amaranth tricolor

注: * 表示差异显著 ($P\text{-value} \leq 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P\text{-value} \leq 0.01$)。

在不同光质处理下, 红光照射下, AmaDOPA5-GT 基因表达量最高, 是暗条件下幼苗中表达量的 2 倍左右, 蓝光、复合光和白光处理次之, 黑暗和绿光条件下, 该基因表达量最少 (图 5B)。

3 讨论与结论

DOPA5-GT 是甜菜红色合成途径中关键基因, 本研究对莴苣 AmaDOPA5-GT 基因进行生物信息学分析。多重比对发现 AmaDOPA5-GT 含有 1 个 44 个氨基酸残基组成的保守 UDP 结合位点^[21-22], 说明该蛋白属于糖基转移酶家族成员。亚细胞定位结果表明 AmaDOPA5-GT 蛋白定位于细胞膜上, 这可能与该蛋白的转移酶活性息息相关。

启动子分析结果表明 AmaDOPA5-GT 启动子含有大量的植物响应元件, 其中最多的是光响应元件, 说明光对 AmaDOPA5-GT 的调控起着重要的作用。为进一步研究光照对 AmaDOPA5-GT 表达的影响, 对不同光质处理下该基因表达情况进行了研究。结果表明: 在暗处理条件下, 莴苣昔含量和 AmaDOPA5-GT 基因表达均显著降低, 说明 AmaDOPA5-GT 基因表达的表达和莴苣昔的合成离不开光。在蓝光处理条件下, 莴苣中 AmaDOPA5-GT 基因表达上调和莴苣昔含量增高, 这说明短波长光源有利于色素的积累, 这一点与 Kishima 等的结果相一致^[23]。Göring^[17]在莴苣愈伤的研究也发现蓝光促进莴苣昔的累积, 而远红光反而可以逆转合成的色素。黄光和绿光处理条件下, AmaDOPA5-GT 基因表达变化不大但莴苣昔含量显著降低, 说明较长波长的光源对 AmaDOPA5-GT 基因表达的影响不大但却不利于

莴苣昔的合成。在红光处理条件下, 莴苣昔含量降低而 AmaDOPA5-GT 基因表达显著上调, AmaDOPA5-GT 基因表达水平的提高可能是由莴苣昔含量减少引起的反馈调节。另外, 光敏色素是红光的光受体, 而光敏色素也是光调节色素累积的一个途径^[24], 这也可能是 AmaDOPA5-GT 基因在红光条件下的上调表达的原因。

以上结果表明, AmaDOPA5-GT 基因在甜菜昔合成途径中发挥着重要的作用, 其表达水平受光调控明显。另外本研究还发现短波长光源(如蓝光)对莴苣昔合成的促进作用可能是通过诱导 AmaDOPA5-GT 基因的表达实现的。本研究可为揭示 AmaDOPA5-GT 在莴苣昔合成中的作用奠定基础, 并可为富含莴苣昔的莴苣育种提供线索。

参考文献:

- PEDERSEN B, KALINOWSKI L S, EGGUM B O. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 1987, 36 (4): 309—324.
- RASTOGI A, SHUKLA S. Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2013, 53 (2): 109—125.
- ACHIGAN-DAKO E G, SOGBOHOSSOU O E D, MAUNDU P. Current knowledge on *Amaranthus* spp.: research avenues for improved nutritional value and yield in leafy amaranths in sub-Saharan Africa [J]. *Euphytica*, 2014, 197 (3): 303—317.
- SOGBOHOSSOU O E D, ACHIGAN-DAKO E G. Phenetic differentiation and use-type delimitation in *Amaranthus* spp. from worldwide origins [J]. *Sci Hortic-Amsterdam*, 2014, 178: 31—42.
- CAI Y Z, SUN M, CORKE H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae* [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2005, 16 (9): 370—376.

- [6] STRACK D, VOGT T, SCHLIEMANN W. Recent advances in betalain research [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62 (3): 247—269.
- [7] GAND A-HERRERO F, GARC A-CARMONA F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments [J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18 (6): 334—343.
- [8] SAKUTA M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8 (1): 37—48.
- [9] WYLER H, MEUER U, BAUER J, et al. Cyclodopa glucoside (= (2S)-5-(β -D-glicopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.) [J]. *Helv Chim Acta*, 1984, 67 (5): 1348—1355.
- [10] KOBAYASHI N, SCHMIDT J, WRAY V, et al. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56 (5): 429—436.
- [11] SASAKI N, ADACHI T, KODA T, et al. Detection of UDP glucose: cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase activity in *four o'clocks* (*Mirabilis jalapa* L.) [J]. *Febs Lett*, 2004, 568 (1): 159—162.
- [12] SASAKI N, ABE Y, WADA K, et al. Amaranthin in *feather cockscombs* is synthesized via glucuronylation at the cyclo-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway [J]. *J Plant Res*, 2005, 118 (6): 439—442.
- [13] CASIQUE-ARROYO G, MART NEZ-GALLARDO N, DE LA VARA L G, et al. Betacyanin biosynthetic genes and enzymes are differentially induced by (a) biotic stress in *Amaranthus hypochondriacus* [J]. *Plos One*, 2014, 9 (6): e99012.
- [14] SASAKI N, WADA K, KODA T, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding an enzyme with glucosyltransferase activity for cyclo-DOPA from *four o'clocks* and *feather cockscombs* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46 (4): 666—670.
- [15] ZHAO S Z, SUN H Z, CHEN M, et al. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2010, 102 (1): 99—107.
- [16] SHIN K S, MURTHY H N, HEO J W, et al. Induction of betalain pigmentation in hairy roots of red beet under different radiation sources [J]. *Biol Plantarum*, 2003, 47 (1): 149—152.
- [17] G RING H, D RFLER M. Amaranthin accumulation in continuous red and blue light by seedlings of *Amaranthus caudatus* L [J]. *Biol Plantarum*, 1981, 23 (3): 193—197.
- [18] LIU S, KUANG H, LAI Z. Transcriptome Analysis by Illumina High-Throughout Paired-End Sequencing Reveals the Complexity of Differential Gene Expression during In Vitro Plantlet Growth and Flowering in *Amaranthus tricolor* L [J]. *Plos One*, 2014, 9: e100919.
- [19] 刘生财, 匡华琴, 谢礼洋, 等. 莴苣试管苗 *amaNACA 2-like* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 东北农业大学学报, 2014, 45 (1): 83—89.
- [20] 林丽霞, 屈莹, 徐洋, 等. 龙眼体胚发生过程生长素响应因子 *DLARF5a* 的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34 (6): 1075—1082.
- [21] VOGT T, GRIMM R, STRACK D. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-glucosyltransferase, a betanidin- and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae [J]. *Plant J*, 1999, 19 (5): 509—519.
- [22] GACHON C M M, LANGLOIS-MEURINNE M, SAINDRENAN P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10 (11): 542—549.
- [23] KISHIMA Y, SHIMAYA A, ADACHI T. Evidence that blue light induces betalain pigmentation in *Portulaca* callus [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1995, 43 (1): 67—70.
- [24] KÖHLER K H, DÖRFER M, GÖRING H. The influence of light on the cytokinin content of *Amaranthus* seedlings [J]. *Biol Plantarum*, 1980, 22 (2): 128—134.

(责任编辑: 柯文辉)