

# 紫山药花青素调控基因 *DaF3H* 的克隆及表达分析

闫瑞霞, 殷剑美\*, 韩晓勇, 张培通

(江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014)

**摘要:** 以富含花青素的紫山药‘荦引紫 006’为材料, 克隆得到花青素生物合成途径中关键酶基因 *DaF3H* (KF561995), 其序列全长为 1 325 bp, 最大开放阅读框为 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸。*DaF3H* 蛋白属于水溶性的胞质不稳定蛋白, 无跨膜区和信号肽结构, 为  $\alpha$ -酮戊二酸和二价铁离子依赖型的加氧酶家族[2OG-Fe(II) Oxygenase superfamily]。氨基酸序列与胡桃 (ACR47976)、琴叶拟南芥 (CAC26921) 相似性最高, 达到 80%。*DaF3H* 在山药幼叶中表达量最高, 在成熟叶片和茎中几乎不表达。茎叶和块茎中花青素积累量增速与 *DaF3H* 表达密切相关。运用接头 PCR 法对 *DaF3H* 的启动子序列进行了克隆, 元件预测显示该序列中存在 GT-1 光调控元件以及生长素、金属离子、MYB-bZIP-MYC 等元件的结合位点, 叶片遮光处理试验表明, *DaF3H* 受光调节。

**关键词:** 山药; *DaF3H*; 花青素; 启动子克隆; 表达分析

**中图分类号:** S 632.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 04-0701-12

## Cloning and Expression Analysis of *DaF3H* Gene in Yam (*Dioscorea alata*)

YAN Rui-xia, YIN Jian-mei\*, HAN Xiao-yong, and ZHANG Pei-tong

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** *DaF3H*, a key gene of anthocyanin biosynthesis, has been isolated from ‘Yzi 006’, a purple yam cultivar riching in anthocyanins. *DaF3H* (KF561995), full sequence of 1 325 bp, had a open reading frame of 1 089 bp encoding 362 amino acids. The *DaF3H* protein belonged to soluble protein without signal peptide and transmembrane domain, and localized in cytoplasm. The conserved domain search revealed *DaF3H* belonged to the 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily. Comparative and bioinformatic analysis showed *DaF3H* was highly homologous with F3Hs from other plants, such as *Juglans regia* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea* (80%). Expression analysis indicated *DaF3H* gene had the highest relative expression level in young leaves and less in functional leaves and stems. Anthocyanins accumulated trends and *DaF3H* gene expression level were closely related in leaves, stems and storage stems of yam. Furthermore, a 502 bp nucleotide promoter sequence of *DaF3H* has been isolated by adapter PCR method and the cis-regulating element analysis predicted there were many elements regulating the expression

收稿日期: 2013 - 11 - 08; 修回日期: 2014 - 03 - 13

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX (13) 5008]

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yinjm2006@sohu.com; Tel: 025-84390860)

level of *DaF3H* in yam, such as auxin, metal ion, MYB-bZIP-MYC complex and GT-1 binding sites for light regulation which was proved by the experiment on leaves treated in dark.

**Key words:** *Dioscorea alata*; *DaF3H*; anthocyanins; promoter cloning; expression analysis

紫山药也称“紫人参”，是山药（*Dioscorea alata* L.）中的精品，因其肉质和表皮红中带紫而得名。紫山药富含花青素（anthocyanins）。花青素是迄今为止所发现的最强效的自由基清除剂，具有抗氧化衰老、抗突变、抗癌与抗动脉硬化等功能。由于花青素通常贮藏于花、叶等器官中，所以对于花青素合成的酶及其相关基因的研究多集中于这些器官，而对块茎等地下器官中的研究较少。

F3H（黄烷酮-3-羟化酶，flavanone 3-hydroxylase）属于  $\alpha$ -酮戊二酸—二价铁加氧酶家族（Rosati et al., 1999），为 NADPH 依赖型酶，是花青素合成过程中的早期酶，将黄烷酮氧化成二氢黄酮类。Zuker 等（2002）和 Liu 等（2007）通过反义抑制技术抑制 *F3H*，使花青素的合成向类黄酮类物质方向转变；章希娟等（2008）报道龙眼胚胎中 *F3H* 上调表达后异黄酮类化合物增加，*F3H* 主要通过调控类黄酮类物质的合成来调节花青素积累。Martin 等（1991）首次从金鱼草中得到 F3H 酶，随后在芜菁（许志茹 等，2008）、海棠（Shen et al., 2012）、石蒜（黄春红 等，2013）等许多作物中陆续有报道，Boss 等（1996）和 Shimada 等（2006）研究显示 F3H 是牵牛花花青素合成的关键酶。

本研究中运用 RACE 和普通 PCR 技术对山药 *F3H* 的 cDNA 序列全长进行克隆并进行生物信息学分析，同时对 *F3H* 在山药不同器官中的表达水平和花青素含量进行分析，为研究山药花青素合成、运转和积累机制奠定分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及遮光处理

供试材料为紫山药‘蕪引紫 006’（编号为 Yzi006，紫肉），种于江苏省农业科学院经济作物研究所实验基地。参照黄文华（2007）和殷剑美等（2013）对山药主要生育期的确定，分别对山药发芽期、发棵期、块茎膨大初期、膨大盛期、膨大后期和末期的叶片和块茎膨大初期、膨大盛期、膨大后期和末期的块茎取样，并于 2013 年 7 月 14 日分别取块茎膨大初期的地上部分幼叶、功能叶、幼茎、功能茎和地下块茎，液氮速冻后， $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

遮光处理：2013 年 7 月 10 日选取田间植株顶端叶龄为 5 d 的幼叶，用锡箔纸袋包裹遮光（留足空间，满足取样期间叶片的生长发育），并小心固定，对照不遮光。每个对照组和试验组均设置在 3 株不同植株上的叶片为试验重复，分别于 7 月 10 日（处理 0 d）、7 月 11 日（1 d）、7 月 13 日（3 d）、7 月 15 日（5 d）、7 月 17 日（7 d）取样，样品用液氮速冻后， $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 *F3H* 的克隆及序列分析

RNA 提取和 cDNA 第一条链的合成参照 Maria 等（2002）的方法，略有改进。

根据 NCBI 数据库中已经登录的 *F3H* 编码序列的保守区域设计 *F3H* 的上下游引物 *F3HF*/*F3HR*（表 1），PCR 扩增产物用凝胶回收试剂盒回收，pMD18-T 载体  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  连接过夜，DH5 $\alpha$  转化克隆，挑选阳性克隆菌液送交测序。

参照萨姆布鲁克和拉塞尔（2008）的 cDNA 末端快速扩增（3'RACE）方法，设计接头引物 3'-R 和接头 3'-Adapter（表 1）。PCR 扩增条件为： $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min， $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  40 min，1 个循

环; 94 °C 40 s, 58 °C 1 min, 72 °C 3 min, 31 个循环; 72 °C 15 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收目的片段, 经 DH5 $\alpha$  转化, 挑选阳性克隆菌液送交测序。

表 1 引物列表  
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>F3HF</i>	GAAGAAGAAGGAGAAGAAGTAAGA
<i>F3HR</i>	TATTTTGGTGGAAGGTGATGTGAT
<i>F3H3'SP</i>	TTGAGCAACGGTAGGT
3'-R	GACTCGAGTCGACATCG
3'-Adapter	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
Adapter 1	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT
Adapter 2	PO <sub>4</sub> -ACCAGCCC-NH <sub>2</sub>
<i>F3HSP1</i>	GATCAACCACCTGAAATATCCCCCA
<i>F3HSP2</i>	GGAATCTCATTGCTGAAGTGGTCATACG
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
<i>ActinF</i>	TTACTCATTACCACCAC
<i>ActinR</i>	TAACTCATAACTCTTCTCAACA
<i>F3HrF</i>	CTTGTTACAGGACCAGAT
<i>F3HrR</i>	CGACATTCTTGAACCTAC

采用 Bioxm 2.2 软件翻译氨基酸序列并作图; 运用 Blastp 工具进行氨基酸同源性比对, 利用 DNAMAN 6 制作序列比对图; Clustal X 进行多序列比对, MEGA 5.2 制作系统进化树; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 进行等电点分析; TMHMM Sever 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白的跨膜区; SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; SOSUI signal (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignalsubmit.html>) 预测蛋白可溶性; wolf PSORT (<http://wolfpsort.org/>) 软件在线预测蛋白的亚细胞定位; SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_seccons.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html)) 预测蛋白的二级结构; Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>) 在线预测蛋白三级结构; NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 Inter ProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 分析蛋白的结构域。

### 1.3 *DaF3H* 启动子的克隆和分析

采用 CTAB 方法 (佟兆国 等, 2008) 提取山药幼叶基因组 DNA, 并分别用 4 种内切酶 (*Dra* I、*Eco*RV、*Pvu* I、*Ssp* I) 37 °C 消化 14 h, 消化产物在 -20 °C 保存备用。长片段接头 Adapter 1 和短接头 Adapter 2 (5'端磷酸化, 3'端氨基化处理) 37 °C 连接过夜, 将消化好的基因组 DNA 和连接好的接头用 T4 Ligase 16 °C 连接 16 h, 得到的连接产物用 TE (pH 8.0) 稀释 20 倍, -20 °C 保存备用。根据 *F3H* 中间片段序列, 运用 Primer 5 设计启动子扩增的基因特异引物 *F3HSP1*/*F3HSP2*, 结合接头引物 AP1/AP2 (表 1) 采用巢式 PCR 技术进行扩增。启动子序列运用 NNPP ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 进行转录起始位点的预测; PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 工具寻找转录因子结合位点。

### 1.4 *DaF3H* 的实时荧光定量 PCR 表达分析与花青素含量的测定

根据山药中 *Actin-2* (肌动蛋白 2) 内参基因的中间片段序列, 采用 Beacon Designer 7 软件设计山药内参基因 *Actin-2* 的荧光定量引物 *ActinF/ActinR*, 根据 *DaF3H* 基因中间片段的保守序列设计荧光定量引物 *F3HrF/F3HrR* (表 1)。定量分析参照 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) 试剂说明, 采用标准的两步法程序, 在 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪 (美国) 上完成定量分析。

山药组织花青素含量的测定参照 Mehrtens 等 (2005) 的方法, 将 0.1 g 新鲜组织材料切碎加入 6 mL 提取液 (浓盐酸: 80%乙醇 = 1: 99) 浸提 10 h, 花青素含量计算公式:  $Q = (A_{530} - 0.25 \times A_{657}) / FW$  (质量)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *DaF3H* 基因编码序列全长克隆及分析

以山药幼叶 cDNA 为模板, 采用 *F3HF/F3HR* 引物扩增出一条预期长度为 1 184 bp 的片段 (图 1, A), 测序结果显示该片段与其他作物的 *F3H* 基因 cDNA 序列高度同源。以此序列设计 3'RACE 末端特异性引物 *F3H3'SP* (表 1), 用 3'-Adapter/*F3H3'SP* 扩增得到一个长度为 528 bp 的 3'末端序列 (图 1, B)。将中间片段和 3'末端片段拼接后得到 *F3H* 基因的全长为 1 325 bp。该序列经 NCBI 网站与其他作物同源性在线比对后, 确定为山药的 *F3H* 基因, 命名为 *DaF3H* (GenBank 登录号: KF561995)。

经 ORF Finder 软件在线分析确定 *DaF3H* 基因的最大开放阅读框为 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, 5'和 3'非编码区的长度分别为 35 bp 和 218 bp (3'UTR) (图 2), 其中 3'UTR 包含 2 个典型的加尾信号 AATAAA 和 AATAAT (图 2)。

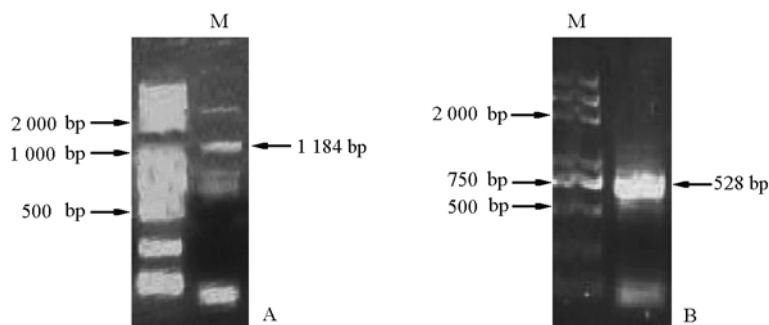


图 1 山药 *DaF3H* 的中间片段 (A) 和 3'RACE 片段 (B) PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR products of *DaF3H* core fragment (A) and 3'RACE fragment (B) in yam  
M: DNA marker DL5000.

### 2.2 山药 *DaF3H* 蛋白质的特征分析

用 ProtParam 软件在线预测 *DaF3H* 蛋白的分子式为  $C_{1814}H_{2871}N_{485}O_{541}S_{14}$ , 蛋白质分子量为 40.58 kD, 理论等电点为 5.30。氨基酸组成中亮氨酸 (Leu) 所占的比例最大, 为 9.9% (36/362); 其次是丙氨酸 (Ala), 为 8.6% (31/362), 蛋白质稳定系数为 40.74, 属于不稳定蛋白。

TMHMM 工具预测蛋白无跨膜区。SignalP 4.1 软件预测显示, *DaF3H* 蛋白不具有信号肽位点;

SOSUI signal 软件预测其属于可溶性蛋白; PSORT 软件对其进行亚细胞定位预测结果显示该蛋白为细胞质蛋白。

运用 SOPMA 预测蛋白质的结构组成为 42.54% 的随机卷曲、15.19% 的  $\beta$ -延伸、4.97% 的  $\beta$ -转角和 37.29% 的  $\alpha$ -螺旋 (图 3, A); Phyre 2 软件在线预测 *DaF3H* 蛋白的三级结构 (图 3, B)。

```

1  GAAGAAGAAGGAGAAGAAGAAGAAATCATATAATGGCAACCAACGTTCCCTTCCAACAGAGGAGACACTGAGAGGACTTTGTGAGAGATG
1  M A P T T F L P T E E T L R E D F V R D E
97  AGGATGAGAGGCCGAAGGTGGGTATGACCACTTCAGCAATGAGATTCGGTGATATCACTGGCCGAGTTGATGGAGAGGAGGGATGAGATAA
22  D E R P K V A Y D Q F S N E I P V I S L A G V D G E E R D E I R
193  GGAAGAAGATAGTTGCTGCATGTGAGGACTGGGGATATTTTCAGGTGGTTGATCATGCTGTGATATGGAGCTTGTGAAAACATGAACAGCTTG
54  K K I V A A C E D W G I F Q V V D H A V D M E L V E T M T K L A
289  CCAAAACAGTTCTTTGCTCTTCGCGGAGGAGAACTCGCTTTGATATGTCCGTGGCAAGAAGGGTGGCTTCATCGTCTCAGCGCCCTTCAGG
86  K Q F F A L P P E E K L R F D M S G G K K G G F I V S S R L Q G
385  GAGAAACAGTGGAGGACTGGAGGAAATAGTACATACTTCTCATACCAATCAAGCAAGGGACTACACAAGGTGGCCAGACAAGCCAGCGGGCT
118  E T V R D W R E I V T Y F S Y P I K A R D Y T R W P D K P A G W
481  GGATAACAGTGGTGGAGGCTACAGTGAAGTAAATGGGCTGGGCTGCACACTACTTGGCTGCTTTTTCAGAGGCTATGGGCTTGAAGAGAGG
150  I P V V E A Y S E K L M G L A C T L L G L L S E A M G L E K E A
577  CCTTGGCAAGGCTGTTTGGACATGACCAAAAGGTGCTAGTGAATTAACCAAAATGTCOCCAACTGAOCTCACTCTTGGCTTGAAGCGC
182  L A K A C L D M D Q K V V V N Y Y P K C P Q P D L T L G L K R H
673  ACACCGATCCGGTACCATCACTCTCTTGTACAGGACAGATGGGCTCCAGGCCACCAAGATGATGGCAAGTCTTGGATCAOCTTCAAC
214  T D P G T I T L L L Q D Q I G G L Q A T K D D G K S W I T V Q P
769  CAGTCGCGGAGCTTTTGTAGTCAAOCTCGGATCATGACATTTTGTAGCAAGGTAGGTTCAAGAATGCGATCATCAAGCAGTTGTGAAT
246  V A G A F V V N L G D H G H F L S N G R F K N A D H Q A V V N S
865  CAAATTACAGCGCTCTCTGATGCTACATTTTCAAGATCCGCTCCAGATGCCACTGTTTACCGCTGGCAATCCGGATGAGAAAACCGCTGC
278  N Y S R L S I A T F Q N P A P D A T V Y P L A I R D G E K P V L
961  TOGATGAACCATCAOCTTCATGGAGATGTATCGCGGAAATGGGTAGGACCTGGAGCTGGCTAGGCTCAAGAAGTTGGCCAACTGAGAAGG
310  D E P I T F M E M Y R R K M G R D L E L A R L K K L A K L E K D
1057  ACAAGCAGGACAACAAGGCGTTGATGCTGCAATTOCAACCAAGGCGCTTAATGAAATCTAGCTTGATTATTATGCTTAATGCTTATTATATTG
342  K Q D N K A V D A A I P T K G L N E I L A *
1153  GCCTTATAATCACATCAOCTTCCACCAAAATAATATCTATGTTATGAGGGTAATAATGTCATTTAGTTGGTGTACTGTTTGTTCATTTGCT
1249  TCAAAATCATGTACGCATACAACTAAATTTCTACTTTTCAAGTAATGTAAATTATTGAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 山药 *DaF3H* 的核苷酸序列和氨基酸序列分析

方框: F3H 酶活性区域; 阴影部分: 2OG-Fe (II) 功能区域;  
双下划线: Poly A 信号; 单下划线: Poly A 尾巴;  
星号: 终止密码子。

Fig. 2 Analysis of nucleotide and deduced amino acid sequence of *DaF3H* gene in yam

Box: F3H functional domain; Shadow: 2OG-Fe (II) functional domain;  
Double underline: Poly A signal; Single underline: Poly A tail;  
Asterisk: Termination codon.

InterProScan 对 *DaF3H* 蛋白进行保守结构分析, 表明 *DaF3H* 蛋白具有典型的 2OG-Fe (II) 加氧酶区域 (189~290 aa) (图 2), 与 NCBI Conserved Domain Search 预测结果相符。

该活性区域主要集中在  $\beta$  - 延伸区域 (图 3, B)。DaF3H 的 2OG-Fe (II) 加氧酶的保守区域有  $\text{Fe}^{2+}$  结合位点 (His215, His272, Asp213) 和  $\alpha$  - 酮戊二酸结合位点 (Arg281 - X - Ser283)。

NCBI Conserved Domain Search 预测结果显示 DaF3H 蛋白的保守区域中第 1 ~ 120 个氨基酸序列是 F3H 酶活性区域 (图 2; 图 3, B), 这与拟南芥等其他作物 F3H 蛋白保守区域分析结果相符。综合以上分析推断 DaF3H 蛋白属于 2OG-Fe (II) 加氧酶家族中的 F3H。

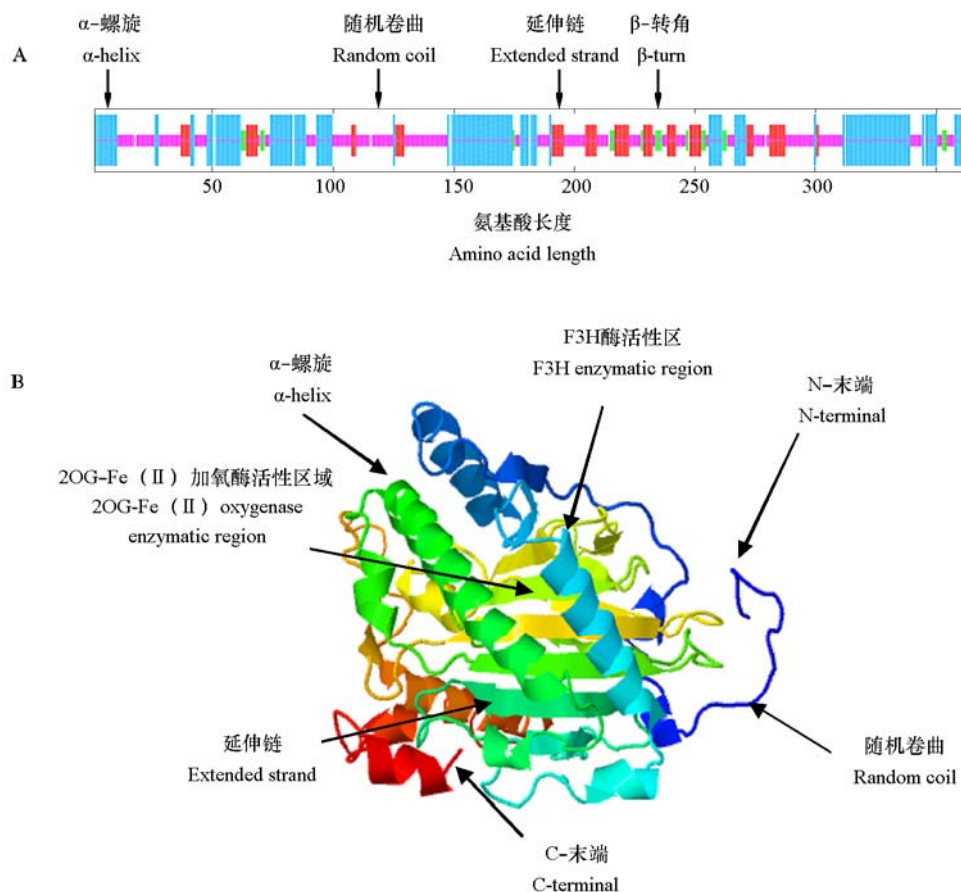


图 3 山药 DaF3H 蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B)

Fig. 3 The predicted secondary structure (A) and tertiary structure (B) of DaF3H in yam

### 2.3 同源性序列比对及系统进化分析

NCBI 蛋白比对结果显示, *DaF3H* 编码的氨基酸序列与胡桃 (ACR47976)、琴叶拟南芥 (CAC26921) 的相似性为 80%, 与拟南芥 (CAD37982)、龙胆 (BAD91806) 的相似性为 79%, 与猕猴桃 (ACL54955)、荞麦 (ADT63064)、郁金香 (AGJ50588)、牡丹 (AEN71544)、橄榄 (AEO36935)、烟草 (BAF96938) 等的相似性为 78%, 与马铃薯 (AAM48289)、玉米 (DAA35528)、甘薯 (BAA75307) 的相似性分别为 76%、75%、74%。选择物种相似性较高的序列, 用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列比对, 其一致性达到了 85.37%, 其中 2OG-Fe (II) 功能区的保守性达到了 96.67%, 并且在  $\text{Fe}^{2+}$  的结合位点和 2 - O - 酮戊二酸的结合位点都具有严格的保守性 (图 4), 说明 F3H 在各个物种之间

具有高度保守性, 这表明 *DaF3H* 编码的氨基酸序列与其他物种的 F3H 功能相同。

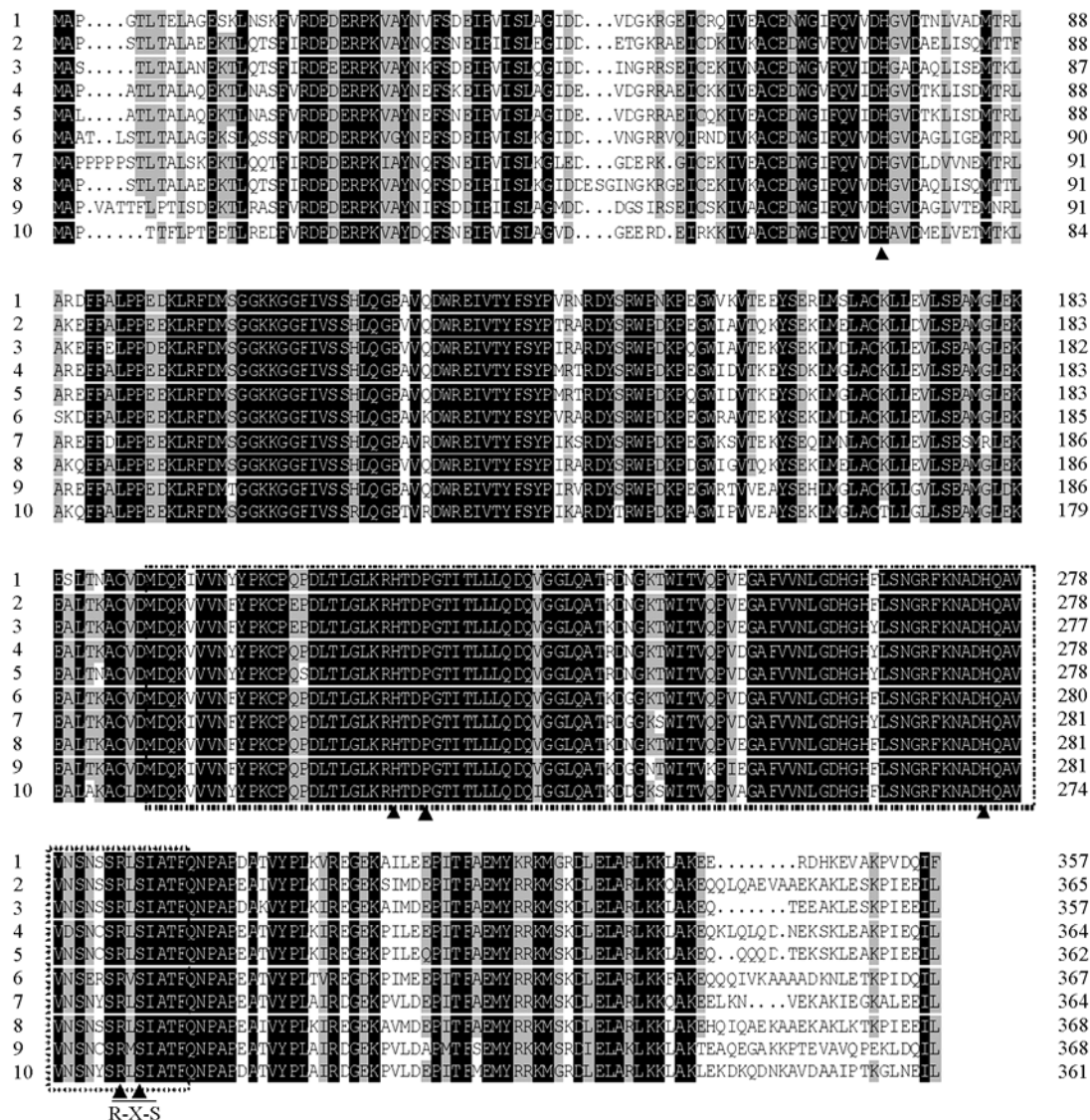


图 4 山药 *DaF3H* 基因编码的氨基酸序列与其他作物 F3H 氨基酸序列的比对

虚框: 2OG-Fe (II) 加氧酶的保守区域; 黑色三角符号: 能与  $\text{Fe}^{2+}$  结合的 His (组氨酸)、Asp (天冬氨酸) 位点和 2-O-酮戊二酸结合的 R-X-S[Arg (精氨酸)-X-Ser (丝氨酸)]保守结构; 1: 拟南芥 (AAC49176); 2: 矮牵牛 (AAC49929); 3: 马铃薯 (AAM48289); 4: 龙眼 (ABO48521); 5: 荔枝 (ADO95201); 6: 甘薯 (BAA75309); 7: 鸢尾 (BAD86791); 8: 烟草 (BAF96938); 9: 百合 (BAM28970); 10: 山药 (KF561995)。

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequences of *DaF3H* in yam and other plants

Dashed boxes: 2OG-Fe (II) oxygenase functional region; Black triangles: His (histidine), Asp (aspartic acid) residues of  $\text{Fe}^{2+}$  binding site and R-X-S[Arg (arginine)-X-Ser (serine)] of 2-O-oxoglutarate acid binding site; 1: *Arabidopsis thaliana* (AAC49176); 2: *Petunia × hybrida* (AAC49929); 3: *Solanum tuberosum* (AAM48289); 4: *Dimocarpus longan* (ABO48521); 5: *Litchi chinensis* (ADO95201); 6: *Ipomoea batatas* (BAA75309); 7: *Iris × hollandica* (BAD86791); 8: *Nicotiana tabacum* (BAF96938); 9: *Lilium hybrid division I* (BAM28970); 10: *Dioscorea alata* L. (KF561995) .

用 MEGA 5.2 软件对 DaF3H 和 27 种作物 F3Hs 进行系统进化分析。分析结果 (图 5) 显示山药 DaF3H 蛋白独立成一支, 与其他物种不能归为一类, 亲缘关系较远。

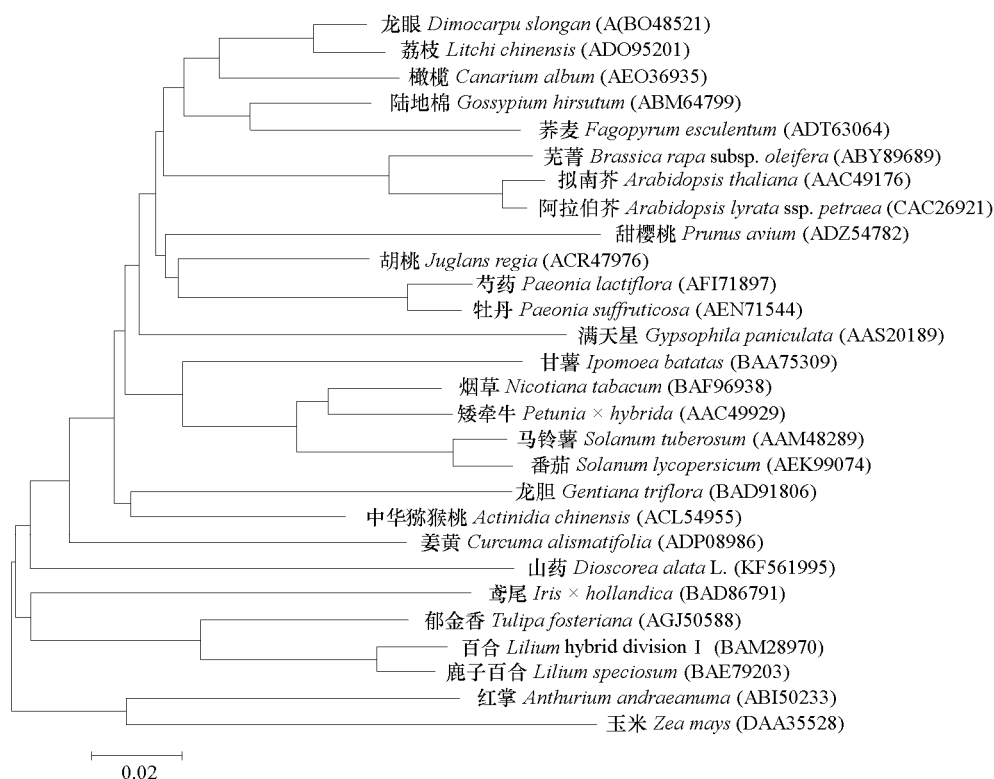


图 5 F3H 氨基酸序列的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of F3H

## 2.4 启动子顺式作用元件预测和序列分析

以 4 种内切酶 (*Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* I、*Ssp* I) 消化后的基因组为模板, 采用接头 PCR 方法扩增, 得到一个最长片段为 648 bp 的启动子序列, 序列拼接后确定启动子区域长度为 502 bp。NNPP 软件预测的假定转录起始位点为图中的 +1 bp (图 6)。Plant CARE 软件进行 *DaF3H* 基因启动子序列转录位点分析显示, 启动子中有 6 个 CAAT box (+14 bp、-7 bp、-193 bp、-202 bp、-207 bp、-348 bp) 和 6 个 TATA box (+86 bp、-36 bp、-292 bp、-298 bp、-309 bp、-380 bp)。

在这 502 bp 的启动子序列中有多个基因调控元件, 其中有 2 个光调节转录因子 GT-1 结合位点 (GRWAAW, +26 bp、-250 bp); 1 个光调节基因上游的保守序列 I-box (GATAA, +26 bp); 1 个生长素诱导元件 NtBBF1 的结合区 ACTTTA (-171 bp); 2 个细胞分裂素增强因子的结合区域 (TATTAG, -306 bp、-376 bp); 1 个 bZIP 转录因子小家族 DPBF-1/-2 结合的核心部位 (ACACNNG, +49 bp), 该部位也是 ABA 诱导元件; 1 个 MYB 结合位点 (WAACCA, -496 bp) 和 1 个 MYC 结合位点 (CANNTG, -120 bp), 二者的存在预示着 *DaF3H* 基因可能是受 MYB-bZIP-MYC 因子的调控; 3 个 GATA box (+26 bp、-109 bp、-285 bp); 1 个 CCAAT box (-197 bp); 2 个 GTAC 序列 (-200 bp、-270 bp); 2 个 poly A 酸化信号分别在 -70 bp (AATAAT)、-189 bp (AATTAAA); 1 个 W-box (TGACY, -3 bp) 等一系列元件。这表明 *DaF3H* 的表达可能受光、植物激素以及转录

调控因子的影响 (Terzaghi & Cashmore, 1995; Finkelstein & Lynch, 2000; Nishiuchi et al., 2004; Fusada et al., 2005)。

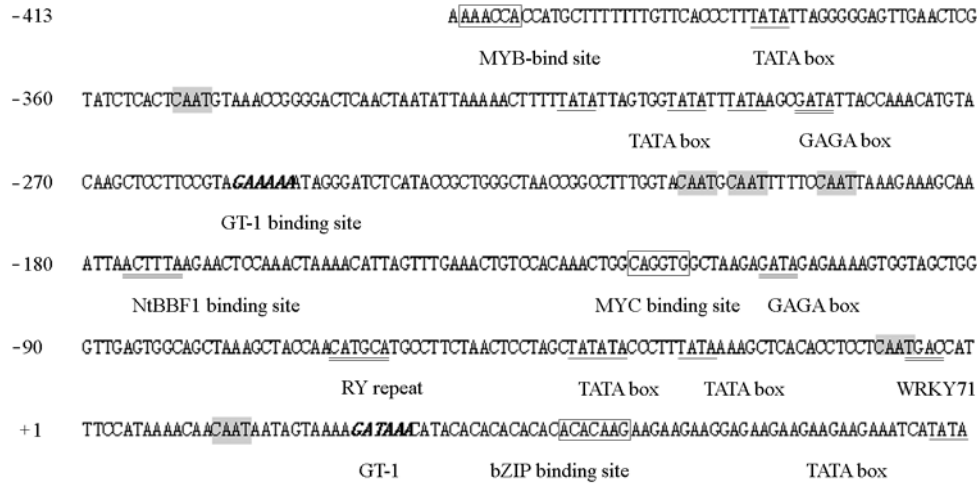


图 6 山药 *DaF3H* 启动子序列

光调控元件 GT-1 的结合位点用粗体和斜体标出; MYB-bZIP-MYC 调节因子结合位点用方框标出; TATA box 和 CAAT box 分别用单线和阴影标出; 双下划线标识 GATA box、NtBBF1、RY repeat 和 WRKY 等因子的结合位点。

Fig. 6 Promotor nucleotide sequence of *DaF3H* in yam

The light regulator GT-1 binding sites are marked by bold and italics; MYB-bZIP-MYC regulators are marked by boxes; TATA boxes and CAAT boxes are marked by single underlines and shadow es respectively; Double underlines indicate GATA box, NtBBF1, RY repeat and WRKY regulators' binding sites.

2.5 花青素含量积累和 *DaF3H* 表达分析

2.5.1 不同组织器官中花青素含量积累和 *DaF3H* 表达分析

图 7 显示, 在块茎膨大初期山药不同器官中花青素含量差异较大, 块茎显著高于其他器官; 功能叶和幼叶次之; 功能茎再次, 幼茎最低。同样 *DaF3H* 相对表达量在不同器官中差异也较大, 在幼叶、幼茎和块茎中有较高表达, 其中幼叶最高, 而在成熟叶片和茎中相对表达量极低。这表明幼叶、幼茎和块茎等具有分生能力的器官是花青素合成源器官, 而成熟叶片可能是花青素暂存器官, 成熟茎可能是花青素传导器官。

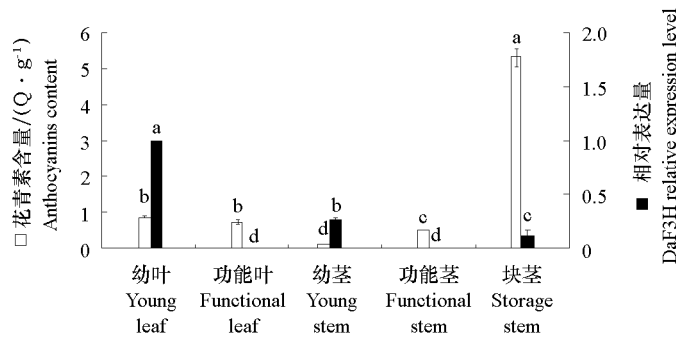


图 7 山药块茎膨大初期不同器官中花青素含量和 *DaF3H* 相对表达量

Fig. 7 Anthocyanins content and *DaF3H* relative expression level in different organs of early expansion period in yam

山药茎叶和块茎中花青素含量积累动态变化和 *DaF3H* 基因表达量的分析结果 (表 2), 茎叶的 *DaF3H* 表达在芽期最高, 发棵期有所下降, 随后又逐渐上升, 到块茎膨大初期再次达到最高, 之后逐渐下降; 茎叶的花青素积累量从芽期开始逐渐增加, 膨大后期达到最大, 之后缓慢下降; 芽期和块茎膨大初期叶片花青素的积累速率最高, 而此时茎叶 *DaF3H* 表达量也最高, 茎叶中花青素的积累速度和 *DaF3H* 表达量表现出协同性。块茎中花青素积累量随着块茎生长发育一直增加, 而 *DaF3H* 表达量在膨大初期最高, 随后表达量逐渐下降, 膨大盛期到膨大后期块茎中花青素积累速度较快, 而这两个时期 *DaF3H* 基因均表达。由上表明茎叶和块茎中花青素积累与 *DaF3H* 高表达密切相关。

表 2 山药各器官花青素积累量动态与 *DaF3H* 相对表达量分析

Table 2 Analysis of anthocyanins accumulation trends and *DaF3H* gene relative expression level in yam

部位 Position	取样时期 Sample period	花青素积累量/ (Q · plant <sup>-1</sup> ) Anthocyanins accumulation	花青素积累速率/ (Q · plant <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> ) Anthocyanins accumulated rate	<i>DaF3H</i> 相对表达量 <i>DaF3H</i> relative expression level
叶和茎 Leaf and stem	芽期 Germination	34.08 ± 0.59 d	2.27 ± 0.19 a	1.00 a
	发棵期 Jilt tendrils tillering	57.88 ± 1.42 d	0.79 ± 0.11 b	0.23 c
	膨大初期 Early expansion	145.48 ± 2.93 c	2.92 ± 0.40 a	1.02 a
	膨大盛期 Full expansion	191.02 ± 1.65 b	0.97 ± 0.14 b	0.58 b
	膨大后期 Late expansion	203.31 ± 3.06 a	0.27 ± 0.03 c	0.17 c
	膨大末期 End expansion	182.49 ± 2.38 b	- 0.46 ± 0.07 c	0.03 c
块茎 Storage stem	膨大初期 Early expansion	92.11 ± 3.56 d	6.14 ± 0.15 b	1.19 a
	膨大盛期 Full expansion	711.07 ± 13.41 c	13.75 ± 0.33 a	0.28 b
	膨大后期 Late expansion	1 382.26 ± 30.75 b	14.92 ± 0.75 a	0.01 c
	膨大末期 End expansion	1 635.97 ± 26.49 a	5.64 ± 0.91 b	0 c

注: 同一列中的不同字母表示相同部位差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same column of same position indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) .

### 2.5.2 遮光处理叶片中花青素含量积累和 *DaF3H* 表达分析

基于启动子元件中有 GT-1 光调节元件结合位点, 设计了遮光处理对山药叶片花青素含量和 *DaF3H* 表达影响的试验, 结果表明 (表 3), 在对照叶片中叶片的花青素积累从实验开始就一直增加, 在 7 d 时达到最高, 3 ~ 7 d 增加速度最快, *DaF3H* 表达量先升后降, 在 5 d 时相对表达量最高, 之后开始迅速下降, 到 7 d 则显著低于 1 d 时; 遮光处理前 3 d, 叶片中花青素含量积累未增加, 在遮光处理 5 d 开始增加, 而叶片中 *DaF3H* 的表达量在试验处理开始时即显著降低, 随后有所增加, 1 ~ 3 d 表达量几乎为 0, 5 d 时表达水平是 1 ~ 3 d 的 3.5 倍, 7 d 时则达到 1 ~ 3 d 的 8.5 倍。这表明叶片中 *DaF3H* 受光调节, 叶片花青素积累量与 *DaF3H* 表达趋势协同。

表 3 遮光处理叶片中花青素含量和 *DaF3H* 相对表达量分析

Table 3 Analysis of anthocyanins accumulation and *DaF3H* gene relative expression level in dark treated leaves

处理 Treatment	处理时间/d Treated time	花青素积累量/(Q · leaf <sup>-1</sup> ) Anthocyanins accumulation	花青素积累速率/(Q · leaf <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> ) Anthocyanins accumulated rate	<i>DaF3H</i> 相对表达量 <i>DaF3H</i> relative expression level
对照 Control	0	0.18 ± 0.01 f	0.09 ± 0.01 ab	1.00 c
	1	0.29 ± 0.02 de	0.06 ± 0.00 cd	1.24 b
	3	0.34 ± 0.03 d	0.03 ± 0.02 de	1.38 b
	5	0.57 ± 0.00 b	0.11 ± 0.01 ab	1.95 a
	7	0.77 ± 0.04 a	0.10 ± 0.02 ab	0.62 d
遮光 Dark	1	0.20 ± 0.01 f	0.01 ± 0.00 e	0 e
	3	0.21 ± 0.01 f	0 e	0 e
	5	0.27 ± 0.03 e	0.03 ± 0.02 cde	0.01 e
	7	0.41 ± 0.03 c	0.07 ± 0.03 bc	0.02 e

注: 同一列中的不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) .

### 3 讨论

本研究中用 PCR 方法结合 3'RACE 方法得到山药 *DaF3H* 基因的全长序列 (GenBank 登录号: KF561995), 最大开放阅读框为 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸。*DaF3H* 的 3'UTR 序列分析结果显示, 多条 miRNA 互补结合位点, 证明 3'UTR 区域是 miRNA 调控的重要区域 (沙龙泽 等, 2009), 生物信息学分析结果显示 *DaF3H* 蛋白属于 2OG-Fe (II) 加氧酶家族中的 F3H。与其他 27 种植物中 *F3H* 同源基因的氨基酸序列进行同源性比对发现, *DaF3H* 基因独立成一枝, 与其他物种不能归为一类, 亲缘关系较远。

RT-PCR 分析结果显示, 山药地上部分茎和叶中 *DaF3H* 基因表达主要发生在幼嫩组织, 成熟组织中基本不表达, 其中以幼叶中 *DaF3H* 基因表达量最高。茎叶和块茎 *DaF3H* 基因的表达都表现在膨大初期较高, 茎叶中花青素积累量增速动态与 *DaF3H* 基因高表达存在同步性, 这种同步性与 Deboo 等 (1995) 和 Shen 等 (2012) 分别报道的玉米花粉和海棠花瓣中 *F3H* 基因表达和花青素含量积累情况相同。幼叶叶片暗处理的试验结果表明 *DaF3H* 表达受光调节, 可以推测 *DaF3H* 的表达同时还受植物激素以及转录调控因子的影响 (Baumann et al., 1999; Lopez-Molina & Chua, 2000; Fusada et al., 2005)。暗处理试验叶片中花青素积累量增速与 *DaF3H* 的动态表达同步, 进一步说明 *DaF3H* 表达对调节山药花青素合成密切相关, 据此推测 *DaF3H* 是山药花青素合成过程中的关键基因之一。块茎中花青素含量较高, 且积累量持续增加, 而 *DaF3H* 只在膨大初期高表达, 膨大盛期和膨大后期少量表达, 这可能是由于茎叶中的花青素在膨大中后期向块茎运转所致, 其机理尚待进一步研究确认。

目前地上部分器官中花青素生物合成代谢途径及调控机理已得到较为广泛和深入的研究, 而地下器官中 *F3H* 基因的报道很少, 因此本试验今后将进一步探究山药中 *DaF3H* 基因与其他花青素合成基因的互作机制, 以便能更好的利用和改良紫山药的花青素品质。

### References

- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G. 1999. The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *rol* oncogene in plants. *Plant Cell*, 11: 323 - 333.
- Boss P K, Davies C, Robinson S P. 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 Physiology*, 111: 1059 - 1066.
- Deboo G B, Albertsen M C, Taylor L P. 1995. Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers. *Plant J*, 7 (5): 703 - 713.
- Finkelstein R R, Lynch T J. 2000. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12: 599 - 609.
- Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shimada H, Ohta H, Takamiya K. 2005. Identification of a novel cis-element exhibiting cytokinin-dependent protein binding in vitro in the 5'-region of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber. *Plant Mol Biol*, 59: 631 - 645.
- Huang Chun-hong, Gao Yan-hui, Zhu Yu-qiu, Tong Zai-kang, Jiang Xiao-feng. 2013. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene *LrF3H* from *Lycoris radiata*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (5): 960 - 970. (in Chinese)
- 黄春红, 高燕会, 朱玉球, 童再康, 姜小凤. 2013. 石蒜黄烷酮 3-羟化酶基因 *LrF3H* 的克隆及表达分析. *园艺学报*, 40 (5): 960 - 970.
- Huang Wen-hua. 2007. Yam pollution-free standardized cultivation. Beijing: China Agriculture Press: 139 - 147. (in Chinese)
- 黄文华. 2007. 山药无公害标准化栽培. 北京: 中国农业出版社: 139 - 147.
- Liu R, Hu Y, Li J, Jin Z. 2007. Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. *Metabolic Engineering*, 9 (1): 1 - 7.

- Lopez-Molina L, Chua N H. 2000. A null mutation in a *bZIP* factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 41: 541 – 547.
- Maria leonor Valderrama-Cháirez, Andrés Cruz-Hernández, Ocravio Paredes-López. 2002. Isolation of functional RNA from cactus fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 279 – 286.
- Martin C, Prescott A, Mackay S. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J*, 1: 37 – 49.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. 2005. The *Arabidopsis* transcription factor *MYB12* is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol*, 138: 1083 – 1096.
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of *NtWRKYs* and autorepression. *J Biol Chem*, 279: 55355 – 55361.
- Rosati C, Cadic A, Duron M, Ingou F M, Simoneau P. 1999. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia* × *intemedia* reveals organ-specific expression during flower development. *Plant Science*, 149: 73 – 79.
- Sambrook J, Russell D W. 2008. The condensed protocols from molecular cloning: A laboratory manual. 4th ed. Beijing: Chemical Industry Press: 281 – 284. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 2008. 分子克隆实验指南精编版. 4 版. 北京: 化学工业出版社: 281 – 284.
- Sha Long-ze, Zeng Yi, Wang Jian-bo, Xu Si-ming, Cui Su-ai. 2009. Research progress on miRNA. *The Biological Bulletin*, 44 (1): 1 – 5. (in Chinese)
- 沙龙泽, 曾毅, 王建博, 徐思明, 崔素爱. 2009. 小 RNA 分子研究进展. *生物学通报*, 44 (1): 1 – 5.
- Shen H X, Zhang J, Yao Y C, Tian J, Song T T, Geng J, Gao J P. 2012. Isolation and expression of *McF3H* gene in the leaves of crabapple. *Acta Physiol Plant*, 34: 1353 – 1361.
- Shimada S, Otsuki H, Sakuta M. 2006. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *Journal of Experimental Botany*, 21: 1 – 11.
- Terzaghi W B, Cashmore A R. 1995. Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 445 – 474.
- Tong Zhao-guo, Wang Fu-rong, Zhang Zhen, Zhao Jian-bo, Zhang Kai-chun, Yan Guo-hua, Zhou Yu, Jiang Li-jie. 2008. A method for DNA extraction from mature leaves of fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 25 (1): 122 – 125. (in Chinese)
- 佟兆国, 王富荣, 章镇, 赵剑波, 张开春, 闫国华, 周宇, 姜立杰. 2008. 一种从果树成熟叶片中提取 DNA 的方法. *果树学报*, 25 (1): 122 – 125.
- Xu Zhi-ru, Cui Xin-guo, Li Chun-lei, Sun Yan, Li Yu-hua. 2008. Cloning, sequence analysis and expression of flavanone 3-hydroxylase gene in turnip. *Molecular Plant Breeding*, 6 (4): 787 – 792. (in Chinese)
- 许志茹, 崔新国, 李春雷, 孙燕, 李玉花. 2008. 芜菁黄烷酮 3-羟化酶基因的克隆、序列分析及表达. *分子植物育种*, 6 (4): 787 – 792.
- Yin Jian-mei, Yan Rui-xia, Han Xiao-yong, Zhang Pei-tong. 2013. Dynamic characteristics of growth and development of Huangyan purple yam in southern Jiangsu. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 25 (4): 8 – 11. (in Chinese)
- 殷剑美, 闫瑞霞, 韩晓勇, 张培通. 2013. 浙江黄岩紫萼药在苏南地区的生长发育动态特征分析. *江西农业学报*, 25 (4): 8 – 11.
- Zhang Xi-juan, Xu Hong-chuan, You Xiang-rong, Li Yan, Chen Qing-xi, Chen Wei. 2008. Cloning and sequence analysis of *F3H* gene cDNA from longan embryo. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1581 – 1586. (in Chinese)
- 章希娟, 许鸿川, 游向荣, 李燕, 陈清西, 陈伟. 2008. 龙眼胚胎 *F3H* 基因的 cDNA 克隆及序列分析. *园艺学报*, 35 (11): 1581 – 1586.
- Zuker A, Tzfira T, Hagit B M, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkman G, Martens S, Inbol N S, Weiss D, Vainstein A. 2002. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding*, (9): 33 – 41.