

鸡爪槭叶片花青素合成酶基因 *ApANS*的克隆与表达分析

钟淮钦^{1,2,3} 陈裕德⁴ 林榕燕^{1,2,3} 罗远华^{1,2,3} 林兵^{1,2,3} 陈诗林^{3,5*}

(¹福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

³福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013; ⁴福建省农业科学院, 福州 350003;

⁵福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

摘要 花青素合成酶(anthocyanin synthetase, ANS)是花色苷合成途径末端的一个关键酶,催化无色花色素到有色花色素的转变。该研究利用RACE技术从鸡爪槭‘出猩猩’深红色叶片中克隆获得一个ANS基因,命名为*ApANS*。该cDNA序列全长1 371 bp,具有完整的开放阅读框(ORF),共1 083 bp,编码360个氨基酸,该基因编码的蛋白质具有典型的2OG-FeII-Oxy保守功能域,保守结构域中含有 α -酮戊二酸及Fe²⁺结合位点,属于 α -酮戊二酸双加氧酶家族;序列比对和系统进化分析表明,鸡爪槭*ApANS*蛋白质与同为无患子目的龙眼ANS蛋白质同源率为90%,亲缘关系最近。实时荧光定量PCR分析结果显示,*ApANS*基因在红色叶片中表达量较高,略带红色的黄色、绿色叶片中微量表达,绿色叶片中不表达;在叶片芽叶期、展叶期及呈色期具有很高的表达量,而后随着叶色的转绿,表达量急剧下降。这说明,*ApANS*在鸡爪槭叶片花色苷代谢及色泽形成过程中具有重要作用。

关键词 鸡爪槭; ANS基因; cDNA克隆; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of Anthocyanin Synthetase Gene *ApANS* in *Acer palmatum*

Zhong Huaiqin^{1,2,3}, Chen Yude⁴, Lin Rongyan^{1,2,3}, Luo Yuanhua^{1,2,3}, Lin Bing^{1,2,3}, Chen Shilin^{3,5*}

(¹Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; ²Flowers Research Center,

Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; ³Fujian Engineering Research Center for

Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013 China; ⁴Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350003, China;

⁵Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract Anthocyanin synthetase (ANS) is one of the key enzymes, involved in the end of biosynthesis pathway that converts leucoanthocyanidin into colored anthocyanidin in plants. In this study, the full-length cDNA sequence of ANS gene was obtained from crimson leaves of *Acer palmatum* ‘De-shojo’ by using RACE techniques and designated as *ApANS*. The full-length of *ApANS* was 1 371 bp, and it included a complete open reading frame of 1 083 bp, which encoded a 360-amino-acid protein. The protein was belonging to the 2-oxoglutarate dependent dioxygenase superfamily, which possessed a typical conserved structural domain of the 2-oxoglutarate and Fe²⁺-dependent oxygenase, containing 2-oxoglutarate and iron ion combination sites. Sequence alignment and phylogenetic tree analyses showed that *ApANS* was the most closely related to *Dimocarpus longan* which belonged

收稿日期: 2017-07-18 接受日期: 2017-09-18

福建省花卉苗木品种引进与研发创新项目(批准号: H2014007)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87881325, E-mail: chensl80@163.com

Received: July 18, 2017 Accepted: September 18, 2017

This work was supported by the Introduction and research innovation project of flower and nursery stock in Fujian Province (Grant No.H2014007)

*Corresponding author. Tel: +86-591-87881325, E-mail: chensl80@163.com

网络出版时间: 2017-12-04 12:20:20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1220.022.html>

to the same sapindales and shared up to 90% homology. The fluorescent quantitative PCR analysis indicated that *ApANS* was high expression in red leaves, trace expression in yellow and green leaves with slightly red and no expression in green leaves. The transcript level was highest in germinal-leaf stage, unfold-leaf stage and coloration-leaf stage. Then with turning green in leaves, the transcript level sharply declined. It's description that *ApANS* plays an important role in anthocyanin metabolism and the formation of color in leaves of *Acer palmatum*.

Keywords *Acer palmatum*; *ANS* gene; cDNA cloning; gene expression

鸡爪槭(*Acer palmatum*)是槭树科(Aceraceae)槭属(*Acer* L.)多年生落叶小乔木,原产中国,日本和朝鲜半岛也有分布。鸡爪槭是槭属植物中栽培历史最悠久、现代园艺品种最多的一个树种,因其优美的树姿、奇特的叶形、绚丽多彩的叶色及多样化的景观配置,生态、经济及观赏价值极佳,为世界著名的观赏树种,是国内外城市园林景观中重要的彩叶树种之一,应用前景广阔^[1-2]。目前,关于鸡爪槭叶片呈色机理的研究主要集中在呈色物质及其特性^[3-5]、叶色变化生理^[6-8]、环境影响因子^[9-10]等方面,而关于其花色苷生物合成途径的研究较少,大大限制了基因工程技术在槭属植物上的运用。

花青素(anthocyanidins)是类黄酮代谢途径中的重要产物,决定了大部分被子植物花、叶、果实和种皮等组织的颜色^[11-13]。花青素合成酶(anthocyanin synthetase, ANS)是花色苷生物合成途径末端的一个关键酶,它能够催化无色花青素合成有色花青素,从而使植物呈现出粉、红、紫和蓝等系列颜色^[14-15]。*ANS*基因最先是利用转座子标签法从玉米突变体中获得^[16]。Rosati等^[17]研究表明,花瓣中无色花青素是由于*ANS*基因无表达或者低表达所致。结楼草*ZjANS*基因在紫色穗尖及匍匐茎中高表达,在绿色组织中表达量明显较低^[18],证明了*ANS*是将无色花青素转变为有色花青素的关键酶基因。付婉艺^[19]、Hassani等^[20]对水母雪莲花、桃树花瓣着色的研究表明,*ANS*基因表达量与颜色积累有关。目前,*ANS*基因已从山药^[21]、马铃薯^[22]、金荞麦^[23]、荔枝^[24]、鹤望兰^[25]和菊花^[26]等不同植物中分离获得,大部分研究集中在表达分析层面^[27]。在观赏植物特别是叶片颜色变异程度较高的植物中研究较少。

本研究从鸡爪槭品种‘出猩猩’深红色叶片中克隆出*ANS*基因及其序列,进行生物学信息学分析,通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)分析其在叶片发育进程及不同叶色品种中的表达特性,旨在为进一步了解鸡爪槭*ANS*基因的生物学功能奠定

分子基础,为鸡爪槭叶色形成机理、表达调控及提高观赏性等提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

以福建省农业科学院作物研究所种质资源圃保存的鸡爪槭品种‘出猩猩’(叶片深红色)为供试材料。4月份取其深红色叶片,用于*ANS*基因克隆;3~5月份取其芽叶期、展叶期、呈色期、小绿期及绿叶期叶片(图1),用于叶片呈色过程的表达分析。同时,4月份取8个不同叶色品种‘出猩猩’、‘布加迪’(叶片紫红色)、“三季红”(叶片深紫红色)、“笠置山”(叶片砖红色,叶脉红色)、“女神”(叶片紫红色,叶脉红色)、“橙之梦”(橙色叶片边缘带淡红色)、“蝴蝶舞”(绿色斑叶边缘带粉红色)和“青枝垂”(叶片绿色)呈色期叶片,用于不同叶色间的表达分析。叶片剪取后迅速投入液氮速冻,存入-70℃冰箱保存备用。

RNA提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。实验所用的高保真酶等试剂及逆转录、凝胶回收、质粒提取等试剂盒均购自TaKaRa公司。大肠杆菌DH5 α 等菌株由本实验室保存,引物合成、测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 总RNA的提取和cDNA的克隆

采用通用植物总RNA提取试剂盒提取叶片总RNA。使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒合成cDNA第一链,保存于-80℃超低温冰箱,用于RT-PCR扩增。

根据GenBank中已报道的龙眼(FJ479616)、葡萄(EU156063)、橙子(NM001288855)和枫香(JX944786)等植物的*ANS*基因序列,设计保守区简并引物(表1),以逆转录的cDNA为模板,扩增‘出猩猩’*ANS*基因的cDNA片段。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,51.5℃退火30 s,72℃延伸60 s,35个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。

根据*ANS*基因保守区测序结果,设计3'端顺式



图1 鸡爪槭‘出猩猩’不同发育时期的叶片

Fig.1 Different growth periods of leaf in *Acer palmatum* ‘De-shojo’

特异引物ANS3’(表1), 与通用引物AUAP(表1)配对进行PCR扩增, 退火温度为54 °C。在已获得的ANS基因序列的基础上, 设计两个5’端反式特异引物ANS5’-1和ANS5’-2(表1), 以逆转录的cDNA第一链纯化、加尾液为模板, ANS5’-1配对通用引物AAP(表1)进行第一轮扩增; 以第一轮PCR产物稀释一倍液为模板, ANS5’-2配对通用引物AUAP进行第

二轮扩增。退火温度均为54 °C。根据拼接获得的ANS基因cDNA全长设计全长引物ANSO-F和ANSO-R(表1), 进行基因cDNA全长扩增, 验证已获得的序列。

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化回收目的条带, 连接到pMD19-T载体上转化, 挑取阳性克隆, PCR验证后送样测序, 获得基因序列。

表1 鸡爪槭ANS基因克隆及表达分析引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of ANS gene in *Acer palmatum*

引物名称 Primer name	引物序列(5’→3’) Primer sequence (5’→3’)	作用 Function
ANS-F	ATG CAC (C/A)TT GT(G/T/C) AAC CAT GG	For the conserved fragment
ANS-R	GGC TCA CA(G/A) AAA AC(A/T) GCC CA	
ANS3’	AAA ACA CCT GCC GAT TAC AC	3’RACE
ANS5’-1	TTC CAT ACC ACC AAC TTC CT	5’RACE
ANS5’-2	GTG TAA TCG GCA GGT GTT TT	
AP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T) ₁₇	Reverse transcription
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	3’RACE, 5’RACE
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(10) ₁₀	5’RACE
ANSO-F	ATG GTG ATT TCA TCG GTA GTA G	For the cDNA of full-length
ANSO-R	TTA GAC TTT TTT GTT GAG GAG AGC	
RTANS-F	TCA ATC GTC ATG CAC ATC GGA GAC	For the expression of <i>DtpsANS</i>
RTANS-R	AGG AGG GAA CAA TGG CGG CTC A	
Actin-F	GGA TGC CTA TGT TGG TGA CG	For the internal control
Actin-R	AGC ACT GGG TGT TCC TCT GG	

1.3 序列分析

使用GenBank中的BLAST进行基因与推导的氨基酸序列检索与功能结构域预测, 在线ExPASy蛋白分析软件中的ProtParam、ProtScale预测蛋白基本理化性质, TMHMM Server 2.0、TargetP 1.1 Server、CELLO v2.5和Prosite预测蛋白质跨膜结构、信号肽、亚细胞定位和磷酸化位点, SOPMA和SWISS-MODEL预测蛋白质二级结构及三维结构, DNAMAN进行氨基酸序列多重比对, MEGA6.06软件中的Neighbor-Joining(邻位相连法, NJ)法构建系统进化树等。

1.4 *ApANS*基因的表达分析

选择*ApANS*基因靠近5'端的一段序列设计实时荧光定量PCR引物RTANS-F和RTANS-R(表1), 选用本实验室克隆获得的鸡爪槭*Actin*基因(登录号: MF289488)作为内参基因, 设计特异引物Actin-F和Actin-R(表1)。使用ABI 7500实时荧光定量PCR仪, 以5个不同叶期及8个不同叶色品种的cDNA为模板, 参照TaKaRa公司的SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II说明书, 进行实时荧光定量分析。反应体系为20 μ L, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 94 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火34 s, 40个循环; 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火延伸1 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火延伸15 s, 绘制溶解曲线。每个样品3次重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2 结果

2.1 鸡爪槭*ApANS*基因cDNA的克隆

以鸡爪槭品种‘出猩猩’叶片总RNA逆转录获得的cDNA第一链为模板, 简并引物ANS-F和ANS-R

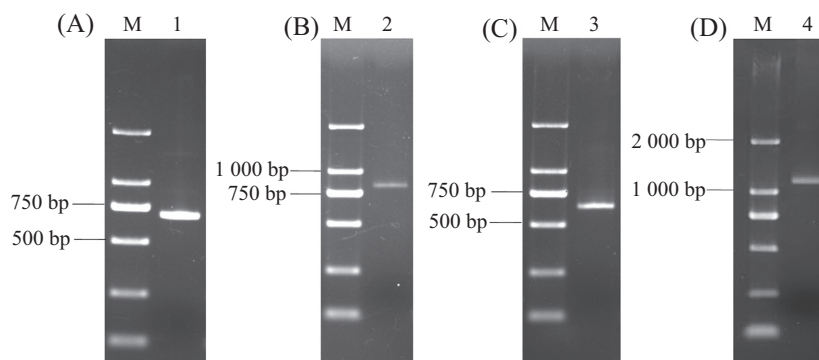
进行PCR扩增, 测序结果获得一条长度为683 bp的cDNA片段(图2A), 编码227个氨基酸。经BLAST检索分析, 该序列编码的氨基酸与柑橘、苹果杂交种和毛果杨等植物的ANS蛋白质同源性达88%~90%, 初步确定此目标片段为鸡爪槭ANS基因的保守序列。

特异引物ANS3'与通用引物AUAP配对, 进行3'端RACE扩增, 经测序得到一条长度为792 bp的3'端序列(图2B), 与保守区有4bp的重叠区段, 终止密码子后有长201 bp的3'端非编码区, 其中包括一个含25个腺苷酸的poly(A)。以cDNA第一链加同聚物尾合成第二链为模板, 特异引物ANS5'-1和ANS5'-2进行5'端RACE巢式扩增, 测序结果表明, 5'端序列长度为616 bp(图2C)。

根据获得的ANS基因保守区序列、5'端和3'端序列, 拼接出全长cDNA, 设计全长引物ANSO-F和ANSO-R进行PCR扩增, 目的片段符合预期(图2D), 经BLAST比对确证其为鸡爪槭ANS基因序列, 命名为*ApANS*。该cDNA全长1 371 bp, 具有完整的开放阅读框(第88-1 170个碱基), 编码360个氨基酸。该cDNA序列GenBank登录号为: MF460440。

2.2 鸡爪槭*ApANS*蛋白质结构分析

ProtParam和ProtScale在线软件分析表明, *ApANS*相对分子量为40.726 kDa, 理论等电点为6.05, 不稳定系数为48.98, 属于较稳定的蛋白质。氨基酸成分中, Glu、Leu含量最高均为9.7%, Cys、Trp含量最低分别为1.1%、1.4%; 总平均疏水指数(GRAVY)为-0.402, 疏水性氨基酸的数量少于亲水性氨基酸数量, 推测该蛋白质为亲水性蛋白



M: DL 2000 marker; 1: 保守区扩增产物; 2: 3'RACE扩增产物; 3: 5'RACE扩增产物; 4: ORF扩增产物。

M: DNA marker DL2000; 1: product of conserved region; 2: product of 3'RACE; 3: product of 5'RACE; 4: product of ORF.

图2 鸡爪槭*ApANS*基因的PCR扩增产物

Fig.2 PCR amplification products of *ApANS* gene in *Acer palmatum*

质。TMHMM Server 2.0对*ApANS*跨膜结构预测表明, 该蛋白质不具有跨膜区域, 属于非跨膜蛋白质。TargetP 1.1预测表明, 该氨基酸序列含有线粒体靶向肽, 不含叶绿体转运肽及分泌途径信号肽。CELLO v2.5分析发现, *ApANS*定位于细胞质的可能性最大, 可信度为4.566。Prosites预测分析发现, 该蛋白质含有4个酪氨酸激酶II磷酸化位点、3个N-乙酰化位点、1个N-糖基化位点、1个蛋白激酶C磷酸化位点和1个ArgE/dapE/ACY1/CPG2/yscS家族标签序列。

利用NCBI CDD对*ApANS*进行功能保守结构域预测, 结果表明, *ApANS*中含有PcbC功能域, 在肽链213~312位置含有一个保守的依赖 α -酮戊二酸和二价铁离子的双加氧酶超家族特征区域[2-OG-

Fe(II) oxygenase superfamily domain]。利用SOPMA对*ApANS*蛋白多肽链的二级结构预测, 该蛋白以 α -螺旋、随机卷曲为主, 延伸链为辅, 所占比率分别为36.94%、35.28%和18.33%, β -折叠所占比率最低为9.44%, α -螺旋主要集中在蛋白质的前中部和C-端, 验证了*ApANS*为稳定性蛋白质(图4)。进一步利用SWISS-MODEL对*ApANS*的三维结构进行预测, *ApANS*属于 α -酮戊二酸双加氧酶家族, 空间结构以 α -螺旋和随机卷曲为主, 这与二级结构的预测结果相符(图5)。

2.3 鸡爪槭*ApANS*蛋白质同源性及进化分析

利用NCBI Blastp及DNAMAN软件, 将*ApANS*氨基酸序列与其他17种植物的ANS进行同源性多

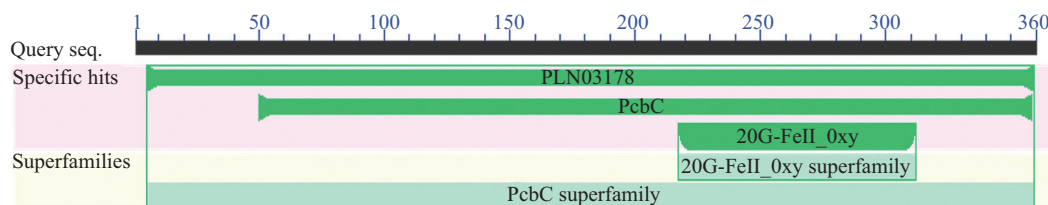
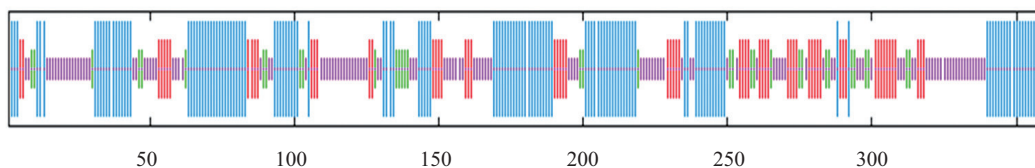


图3 鸡爪槭*ApANS*蛋白质保守结构域分析

Fig.3 Conserved domain analysis on *ApANS* protein of *Acer palmatum*



α -螺旋(蓝色); 无规则卷曲(紫色); 延伸链(红色); β -转角(绿色)。

alpha helix (blue); random coil (purple); extended strand (red); beta turn (green).

图4 鸡爪槭*ApANS*蛋白质二级结构预测

Fig.4 Predicted secondary structure for the *ApANS* protein of *Acer palmatum*

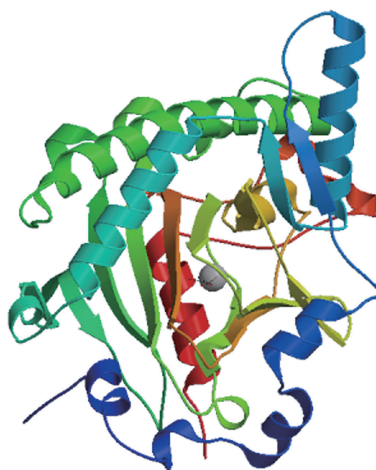
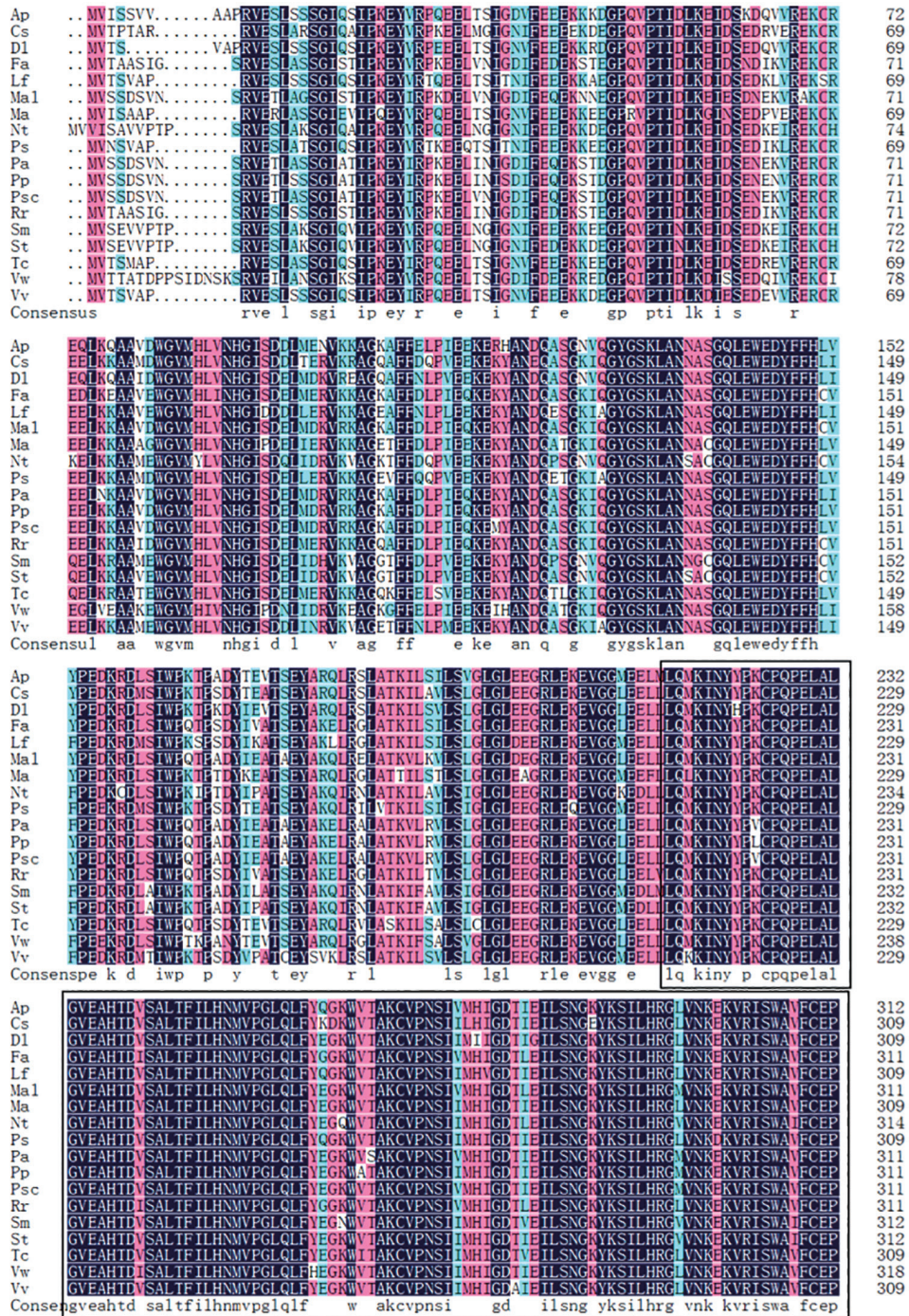


图5 鸡爪槭*ApANS*蛋白质三维结构预测

Fig.5 Predicted 3-D structure for the *ApANS* protein of *Acer palmatum*



Ap: 鸡爪槭‘出猩猩’; Cs: 橙子; Dl: 龙眼; Fa: 草莓; Lf: 枫香; Mal: 苹果; Ma: 桑树; Nt: 烟草; Ps: 牡丹; Pa: 樱桃; Pp: 桃; Psc: 油木奈; Rr: 玫瑰; Sm: 茄子; St: 马铃薯; Tc: 可可; Vw: 三色堇; Vv: 葡萄。方框区域为 α -酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶家族保守结构功能域。

Ap: *Acer palmatum* ‘De-shojo’; Cs: *Citrus sinensis*; Dl: *Dimocarpus longan*; Fa: *Fragaria x ananassa*; Lf: *Liquidambar formosana*; Mal: *Malus hybrid cultivar*; Ma: *Morus alba*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Ps: *Paeonia suffruticosa*; Pa: *Prunus avium*; Pp: *Prunus persica*; Psc: *Prunus salicina* var. *cordata*; Rr: *Rosa rugosa*; Sm: *Solanum melongena*; St: *Solanum tuberosum*; Tc: *Theobroma cacao*; Vw: *Viola x wittrockiana*; Vv: *Vitis vinifera*. The box indicates the conserved 2-OG-Fe(II) oxygenase superfamily domain.

图6 ApANS与其他植物ANS氨基酸序列多重比对

Fig.6 Multiple sequence alignment of predicted amino acid sequence of ApANS with other ANS proteins

重比对(图6), 结果表明, 该序列与龙眼(ACK76231)、苹果(AKQ98194)、橙子(AAT02642)、桑树(ALD83607)、枫香树(AGT28279)和牡丹(AIU98515)等的同源性达82%~90%。由图6还可见, ANS基因

编码的蛋白质具有1个保守结构域,属于 α -酮戊二酸- Fe^{2+} -双加氧酶家族;该保守结构域含有与 α -酮戊二酸特异性结合的精氨酸R³⁰³和丝氨酸S³⁰⁵位点2个,与 Fe^{2+} 结合具有双加氧功能的组氨酸H²³⁷、H²⁹³和天冬氨酸D²³⁹位点3个,这几个位点在不同物种中的ANS序列中高度保守。

为了进一步了解*ApANS*与其他植物ANS蛋白间的进化关系,采MEGA5.05软件的NJ法构建系统进化树,从图7可见,25种植物可以分为4大类群。第I类群包括4个亚类:第1亚类为蔷薇科植物,包括李亚科的樱桃、油木奈和桃,苹果亚科的苹果以及蔷薇亚科的玫瑰、草莓、红树莓;第2亚类为茄科植物,包括茄属的茄子、马铃薯和烟草属的烟草、枸杞属的黑果枸杞;芸香科的橙子单独为第3亚类;第4亚类为木本植物,其中槭树科的鸡爪槭与无患子科的龙眼聚在同一节点,后与梧桐科的可可、桑科的桑树聚为一小类,再与金缕梅科的枫香树、毛茛科的牡丹和葡萄科的葡萄聚为一亚类。第II类群

包括大戟科的木薯和堇菜科的三色堇。莲科的美洲黄莲单独为第III类群。单子叶植物的荷兰鸢尾、垂花百合和鹤望兰聚为第IV类。可见,ANS可将科、属等级植物区分开来,进化基本符合植物分类学分类。鸡爪槭*ApANS*与龙眼的进化关系最近,其次与同为木本植物的可可、葡萄、枫香树、桑树和牡丹的进化关系较近。这可能是由于鸡爪槭与龙眼同为无患子目,ANS可能拥有相同的功能,其进化关系近。总的来说,植物进化关系与氨基酸的比对结果基本保持一致。

2.4 鸡爪槭*ApANS*基因的表达分析

利用实时荧光定量PCR技术检测*ApANS*基因在品种‘出猩猩’叶片5个不呈色期中的相对表达量。由图8可见,随着叶片的生长发育,从鲜红的芽叶期到明亮深红的展叶期,*ApANS*基因的表达量升高;从明亮深红的展叶期到深红的呈色期,*ApANS*基因的表达量略微下降;呈色期后叶片红色逐渐褪色变淡直至完全绿色,*ApANS*基因表达量急剧减低,呈色期

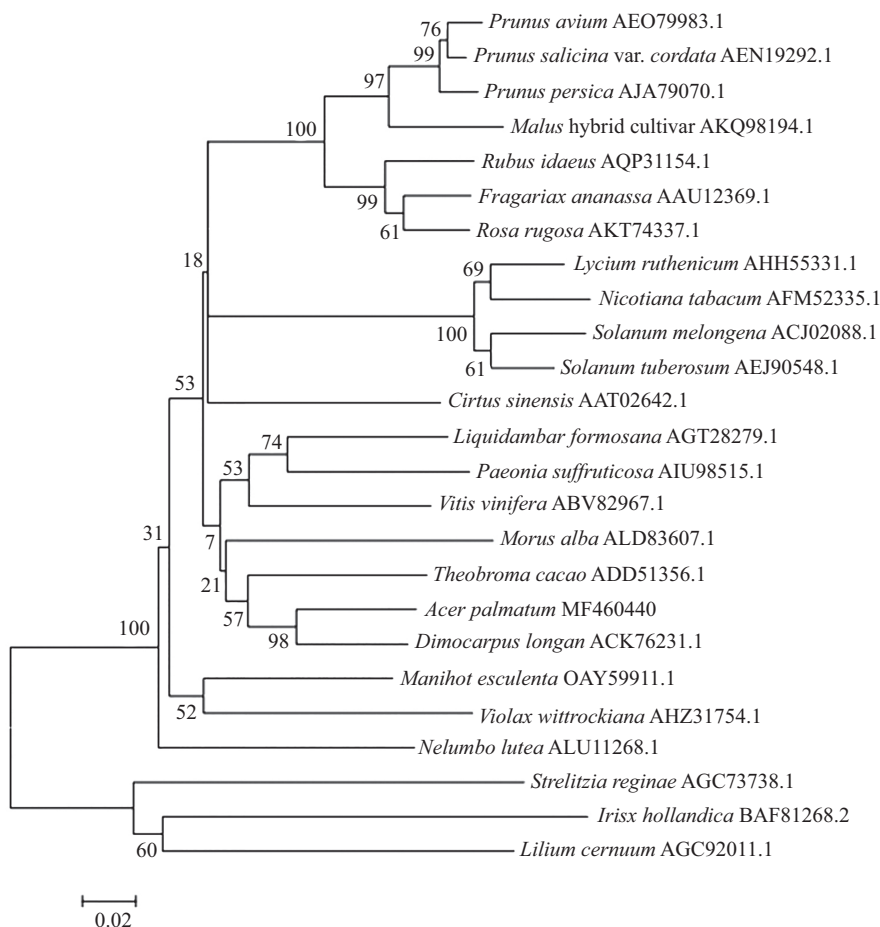
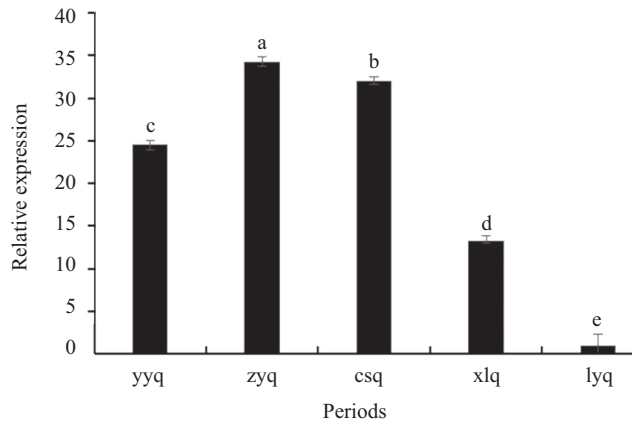


图7 鸡爪槭*ApANS*与其他25种植物ANS蛋白质的系统进化分析

Fig.7 Phylogenetic analysis of *ApANS* in *Acer palmatum* with 25 other plant ANS proteins

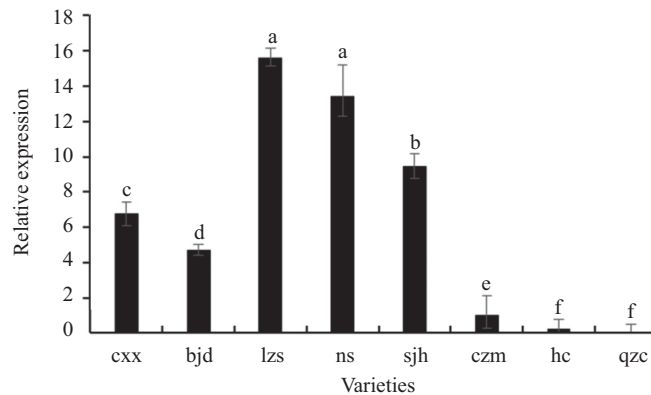


yyq: 芽叶期; zyq: 展叶期; csq: 呈色期; xlq: 小绿期; lyq: 绿叶期。不同小写字母表示有显著性差异。

yyq: germinal-leaf stage; zyq: unfold-leaf stage; csq: coloration-leaf stage; xlq: formed-leaf stage; lyq: green-leaf stage. There are significant differences between different lowercase letters.

图8 *ApANS*基因在‘出猩猩’叶片发育进程中的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *ApANS* gene in different growth periods of leaf in De-shojo



cxx: ‘出猩猩’; bjd: ‘布加迪’; lzs: ‘笠置山’; ns: ‘女神’; sjh: ‘三季红’; czm: ‘橙之梦’; hc: ‘蝴蝶舞’; qzc: ‘青枝垂’。不同小写字母表示有显著性差异。
cxx: ‘De-shohjoh’; bjd: ‘Trompenburg’; lzs: ‘Kasagi yama’; ns: ‘Ariadne’; sjh: ‘Effegi’; czm: ‘Orange Dream’; hc: ‘Butterfly’; qzc: ‘Ao-shidare’。 There are significant differences between different lowercase letters.

图9 *ApANS*基因在不同叶色品种中的相对表达量

Fig.9 Relative expression of *ApANS* gene in different leaf color varieties

的表达量为绿叶期的24.53倍; 不同叶色期中*ApANS*基因表达量与花青素的含量变化趋势具有一定的相似性。

同时, 检测*ApANS*基因在8个不同叶色品种中的相对表达量。由图9可见, *ApANS*基因在5个红色叶片品种中相对表达量较高, 表现为‘笠置山’>‘女神’>‘三季红’>‘出猩猩’>‘布加迪’; 在黄色叶品种‘橙之梦’和斑叶品种‘蝴蝶舞’中有少量表达; 在绿叶品种‘青枝垂’中不表达。

3 讨论

*ANS*基因是花色苷生物合成途径末端表达的一个关键酶基因, 它依赖 α -酮戊二酸离子和 Fe^{2+} 催化

无色花色素转化成有色花色素, 在花色、叶色形成及果实着色起着重要的调控作用^[28]。本研究采用RACE技术从鸡爪槭‘出猩猩’深红色叶片中成功分离获得一个*ApANS*基因, 该基因的cDNA开放阅读框为1 083 bp, 编码360个氨基酸。对其编码的蛋白质进行生物信息学分析, 证实了该序列是植物*ANS*基因的一员, 编码的氨基酸序列与龙眼、可可、葡萄、枫香树及油木奈的*ANS*序列同源性达84%以上, 是一个高度保守的基因家族; 编码的蛋白质含有 α -酮戊二酸- Fe^{2+} -双加氧酶家族的保守结构域和PcbC功能域, 保守结构域中含有与 α -酮戊二酸特异结合的精氨酸(Arg)、丝氨酸(Ser)及与 Fe^{2+} 结合所需的保守组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)功能位点, 这些

特征与双加氧酶家族的F3H及其他植物ANS和FLS的催化活性中心特征相一致^[17]。系统进化分析表明, *ApANS*的进化具有明显的科、属特性, 基本符合植物分类学的进化规律。从亲缘关系上看, 其与同为无患子的龙眼亲缘关系最近, 其次与同为木本植物的可可、葡萄、枫香树、桑树和牡丹进化关系较近; 与单子叶植物的荷兰鸢尾、垂花百合和鹤望兰亲缘关系最远。

植物中ANS的表达量与花青素的积累密切相关。陈跃华等^[29]研究发现, 参薯*DaANS*基因在块茎生长前期高表达, 在8月份到顶峰, 随后急剧降低。李晓艳等^[30]等研究发现, 越橘从绿果期开始直到果实成熟, *VcANS*基因的表达量逐渐增高。付婉艺^[19]研究发现, 水母雪莲花的ANS基因在红色系愈伤组织中表达水平高于白色系和绿色系。祝钦泷^[31]研究发现, 彩叶草的*SsANS*基因在红色品种茎、叶、花中有较强的表达, 且强于绿色品种。这些研究表明了ANS基因的表达在植物组织的不同发育时期及不同品种中均具有特异性。Aharoni等^[32]在草莓中通过抑制ANS基因的表达量, 使花青素的积累明显减少, 花冠由粉红色变成白色。Reddy等^[33]将ANS基因在水稻中过量表达, 使转基因植株种皮呈现紫红色。这些研究表明, ANS基因的表达量是植物组织颜色形成的重要因素之一。本研究分离获得的*ApANS*基因随着品种‘出猩猩’的叶色由鲜红(芽叶期)变明亮深红(展叶期)、接着是深红(呈色期)、然后红绿(小绿期)、最终绿色(绿叶期)的过程中, 基因的表达量先增加, 展叶期达顶峰, 呈色期后表达量急剧下降; 在不同叶色品种中, 红色叶片中表达量较高, 且不同程度的红色之间表达量存在着显著的差异; 在黄色、绿色叶片且边缘带淡红色品种中表达量相对较低; 在绿色叶片中不表达。以上结果表明, *ApANS*的表达具有一定的品种及发育时期特异性, 着色越深表达量越高, 并只在着色的组织中表达, 表达量的高低与花色素苷的积累相一致, 推测*ApANS*基因可能在转录水平上参与了鸡爪槭叶片花色素积累的分子调控。

ANS是花色素合成途径的关键酶, 通过改变ANS基因的表达来改变花色素的积累, 进而引起植物器官颜色的变化。本研究成功克隆获得鸡爪槭*ApANS*基因全长, 并对其编码蛋白质结构、同源性及其品种、组织表达特异性进行了分析。本课题组

接下来将构建*ApANS*基因原核表达载体和植物表达载体, 过量表达转化矮牵牛, 并分离MYB、bHLH和WD40等调控因子, 进一步验证*ApANS*基因在鸡爪槭叶片花色苷生物合成中的功能, 为进一步明确*ApANS*基因在鸡爪槭叶色形成中的分子调控机理奠定技术基础, 也为将来从分子水平上进行鸡爪槭品质改良提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 吕运舟, 黄利斌, 何旭东, 窦全琴. 鸡爪槭园艺品种分类及栽培研究综述. 江苏林业科技(Lü Yunzhou, Huang Libin, He Xudong, Dou Quanqin. Overview on the studies of the horticultural varieties classification and cultivation of *Acer palmatum*. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology) 2014; 41(5): 41-5.
- 2 张毅, 刘伟, 李桂祥. 世界各国的日本枫树垂枝型园艺品种资源. 中国农学通报(Zhang Yi, Liu Wei, Li Guixiang. Garden variety resources of weeping type Japanese maple in the world. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2014; 30(10): 73-82.
- 3 高东菊, 张凤娥, 仲肇森, 闫颖. 血红鸡爪槭红色素提取及稳定性. 东北林业大学学报(Gao Dongju, Zhang Feng'e, Zhong Zhaosen, Yan Ying. Red pigment extraction from *Acer palmatum* and its stability. Journal of Northeast Forestry University) 2013; 41(5): 104-7.
- 4 蔡雪雁, 李厚华, 李玲, 于航, 陈盖, 包努恩都特. 鸡爪槭叶片色素组成及叶色变化. 东北林业大学学报(Cai Xueyan, Li Houhua, Li Ling, Yu Hang, Chen Gai, Bao Nuendute. Pigment composition and leaf color change in *Acer palmatum*. Journal of Northeast Forestry University) 2015; 43(7): 63-7.
- 5 李利霞. 鸡爪槭叶色变化机制的研究(硕士论文). 重庆师范大学(Li Lixia. Study on the leaf color changes of *Acer palmatum*. Chongqing Normal University), 2015.
- 6 陈继卫, 沈朝栋, 贾玉芳, 陈曙, 柴明良. 红枫秋冬转色期叶色变化的生理特性. 浙江大学学报(农业与生命科学版)[Chen Jiwei, Shen Chaodong, Jia Yufang, Chen Shu, Chai Mingliang. Physiological changes of maple (*Acer palmatum* 'Atropurpureum') leaves during the color-changing period in autumn and winter. Journal of Zhejiang University, Agric & Life Sci] 2010; 36(2): 181-6.
- 7 黄可. 鸡爪槭叶色时序性变化与园林应用研究(硕士论文). 浙江农林大学(Huang Ke. Timing change on leaf color and garden application of *Acer palmatum*. Zhejiang agriculture and Forestry University), 2012.
- 8 楚爱香, 张要战, 王萌萌. 四种槭树属(*Acer*)植物秋色叶变化与色素含量和可溶性糖的关系. 江西农业大学学报(Chu Aixiang, Zhang Yaozhan, Wang Mengmeng. Relationships between leaf color changes, the contents of pigment and soluble sugars in leaves of four species of *Acer* in autumn. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis) 2013; 35(1): 108-11.
- 9 Deal DL, Raulston JC, Hinesley LE. Leaf color retention, dark respiration, and growth of red-leaved Japanese maples under high night temperatures. J Am Soc Horticult Sci 1990; 115(1): 135-40.
- 10 唐玲, 李倩中, 李淑顺, 刘晓宏. 秋季模拟酸雨对鸡爪槭叶片呈色相关生理的影响. 江苏农业学报(Tang Ling, Li Qianzhong, Li Shushun, Liu Xiaohong. Effects of simulated acid

- rain on related physiological indexes of leaf color of Japanese maple (*Acer palmatum* Thunb.) in autumn. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 2010; 26(6): 1357-61.
- 11 Schaefer HM, Wilkinson DM. Red leaves, insects and coevolution: a red herring? *Trends Ecol Evol* 2004; 19(12): 616-8.
- 12 Tanaka Y, Sasali N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 2008; 54(4): 733-49.
- 13 祝志欣, 鲁迎青. 花青素代谢途径与植物颜色变异. *植物学报* (Zhu Zhili, Lu Yingqing. Plant color mutants and the anthocyanin pathway. *Chinese Bulletin of Botany*) 2016; 51(1): 107-19.
- 14 Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Bio Chem* 2001; 276(28): 25797-803.
- 15 Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci* 2013; 18(9): 477-83.
- 16 Menssen A, Höhmann S, Martin W, Schnable PS, Peterson P A, Saedler H, *et al.* The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene. *EMBO J* 1990; 9(10): 3051-7.
- 17 Rosati C, Cadic A, Duron M, Ingouff M, Simoneau P. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development. *Plant Sci* 1999; 149(1): 73-9.
- 18 Ahn J H, Kim J S, Kim S, Soh H Y, Shin H, Jang H, *et al.* *De novo* transcriptome analysis to identify anthocyanin biosynthesis genes responsible for tissue-specific pigmentation in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *PLoS One* 2015; 10 (4): e0124497.
- 19 付婉艺. 水母雪莲类黄酮成分及基因表达分析(硕士论文). 西北农林科技大学(Fu Wanyi. Expression analysis and gene composition of *Jellyfish Saussurea* flavonoids. Northwest Agriculture and Forestry University), 2013.
- 20 Hassani D, Liu HL, Chen YN, Wan ZB, Zhuge Q, Li SX. Analysis of biochemical compounds and differentially expressed genes of the anthocyanin biosynthetic pathway in variegated peach flowers. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 13425-6.
- 21 周生茂, 王玲平, 向 珣, 韦本辉, 李立志, 李杨瑞, 等. 山药ANS基因的克隆和分子特性及其与花青素积累的关系. *园艺学报* (Zhou Shengmao, Wang Lingping, Xiang Xun, Wei Benhui, Li Lizhi, Li Yangrui, *et al.* Cloning and molecular characteristics of ANS gene and its correlations with anthocyanin accumulation in yam. *Acta Horticulturae Sinica*) 2009; 36(9): 1317-26.
- 22 Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physio* 2007; 143(3):1252-68.
- 23 卜星星, 雒晓鹏, 白悦辰, 李成磊, 陈 惠, 吴 琦. 金荞麦花青素合酶基因的克隆及其表达与花青素量的相关性研究. *中草药* (Bu Xingxing, Luo Xiaopeng, Bai Yuechen, Li Chenglei, Chen Hui, Wu Qi. Gene cloning of anthocyanin synthase in *Fagopyrum dibotrys* and correlation between its expression level and anthocyanin content. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*) 2014; 45(7): 985-9.
- 24 赵志常, 胡福初, 黄建峰, 胡桂兵, 杨转英, 肖 靖. 荔枝ANS基因的克隆及其序列分析. *北方园艺* (Zhao Zhichang, Hu Fuchu, Huang Jianfeng, Hu Guibing, Yang Zhuanying, Xiao Jing. Cloning and sequence analysis of ANS gene from *Litchi chinensis*. *Northern Horticulture*) 2012; 36(19): 118-21.
- 25 樊荣辉, 黄敏玲, 吴建设, 钟淮钦. 鹤望兰花青素合成酶基因SrANS的克隆及表达分析. *中国细胞生物学学报* (Fan Ronghui, Huang Miming, Wu Jianshe, Zhong Huaiqin. Cloning and expression of anthocyanidin synthase in *Strelitzia reginae* banks. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(11): 1620-5.
- 26 唐杏姣, 韩科厅, 胡 可, 孟 丽, 戴思兰. 菊花CmDFR与CmANS基因启动子序列克隆与瞬时表达分析. *生物技术通报* (Tang Xingjiao, Han Keting, Hu Ke, Meng Li, Dai Silan. Cloning and transient expression assay of CmDFR and CmANS promoters in anthocyanin pathway from *Chrysanthemum × morifolium*. *Biotechnology Bulletin*) 2012; 5: 81-8.
- 27 李小兰, 张明生, 吕 享. 植物花青素合成酶ANS基因的研究进展. *植物生理学报* (Li Xiaolan, Zhang Mingsheng, Lü Xiang. The research progress on plant anthocyanin synthetase ANS gene. *Plant Physiology Journal*) 2016; 52(6): 817-27.
- 28 Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: Molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *perilla frutescens*. *Plant J* 1999; 17(2): 181-9.
- 29 陈跃华, 许 云, 吴文婧, 刘林娅, 黄小龙, 黄东益. 参薯DaANS基因克隆及表达差异分析. *植物生理学报* (Chen Yuehua, Xu Yun, Wu Wenqiang, Liu Linya, Huang Xiaolong, Huang Dongyi. Cloning and analysis of differential expression of DaANS gene in *Dioscorea alata*. *Plant Physiology Journal*) 2015; 51(6): 853-9.
- 30 李晓艳, 裴嘉博, 张志东, 吴 林, 刘海广, 李海燕, 等. 越橘VcANS基因的克隆及表达分析. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* (Li Xiaoyan, Pei Jiabo, Zhang Zhidong, Wu Lin, Liu Haiguang, Li Haiyan, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of VcANS gene in blueberry. *Journal of Northwest A&F University, Nat Sci Ed*) 2012; 40(6): 201-9.
- 31 祝钦波. 彩叶草(*Solenostemon scutellarioides*)叶色形成相关的花青苷生物合成途径的分子调控研究(博士论文). 西南大学 (Zhu Qinbo. Studies on the molecular regulation of the anthocyanin biosynthesis related to leaf color of *Solenostemon scutellarioides*. Southwest University), 2007.
- 32 Aharoni A, De Vos CH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, *et al.* The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J* 2001; 28 (3): 319-32.
- 33 Reddy AM, Reddy VS, Scheffler BE, Wienand U, Reddy AR. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metab Eng* 2007; 9 (1): 95-111.