

菜薹抽薹相关基因 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的克隆与表达特性分析

肖旭峰^{1,2}, 王恒¹, 王义林³, 曹必好², 雷建军^{2,*}

(¹江西农业大学农学院, 南昌 330045; ²华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ³江西生物科技职业学院, 南昌 330200)

摘要: 为了预测抽薹相关基因 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的功能, 通过 PCR 和 RACE 的方法克隆了菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因的 cDNA 和 gDNA 全长序列。结果表明: 该基因编码区全长 1 332 bp, 编码 312 个氨基酸残基。对应的 gDNA 全长为 2 460 bp, 含有 8 个外显子和 7 个内含子, 内含子总长为 1 042 bp, 其中第 3 个内含子最长, 为 401 bp。内含子中含有多个基本转录元件和顺式作用元件, 如光应答元件、赤霉素响应元件、参与抗性和胁迫应答元件、热响应元件、WRKY 转录因子的结合位点及干旱胁迫元件 MYB 转录因子结合位点等。利用半定量 RT-PCR 分析表达模式, 发现 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 随菜薹花芽形态逐步建成直至抽薹开花, 其表达量逐渐增强, 与其它物种 *DFR-like* 基因的表达模式更吻合, 由此预测该基因在菜薹生长发育阶段编码 *DFR-like* 酶的可能性大于编码 *AXS* 的可能性, 其功能可能与菜薹营养分生组织向花分生组织转变有关。

关键词: 菜薹; 抽薹; 基因结构; 表达

中图分类号: S 634.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 08-1575-08

Cloning and Expression Analysis of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* Gene in Flowering Chinese Cabbage

XIAO Xu-feng^{1,2}, WANG Heng¹, WANG Yi-lin³, CAO Bi-hao², and LEI Jian-jun^{2,*}

(¹College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; ²College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ³Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200, China)

Abstract: In order to predict the function of *BrcuDFR-like/BrcuAXS*, both the full-length of cDNA and genomic DNA were cloned with the method of PCR and RACE and expression pattern was investigated in flowering Chinese cabbage (*Brassica rapa* syn. *campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee). The results indicated that the cDNA with the complete coding region was 1 332 bp in length which encoded 312 putative amino acids. The corresponding gDNA was 2 460 bp in length which harbored eight exons and seven introns. The longest intron was the third intron with 401 bp in length. A computer scan disclosed that the introns harbored light-responsive element, gibberellin-responsive element, defense and stress responsiveness element, heat stress responsiveness element, WRKY and MYB

收稿日期: 2012-05-11; **修回日期:** 2012-07-12

基金项目: 江西省自然科学基金项目(2010GQN0032); 江西省教育厅青年基金项目(GJJ11084); 江西农业大学博士启动基金项目(3181)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jilei@scau.edu.cn)

binding site and so on. The semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that no detectable levels were expressed during the first stage of sampling, then transcripts were detected during the two true-leaf, the four true-leaf, the five true-leaf and the flowering stages. Based on expression analysis, it is more likely to encode DFR than AXS, and it may play a role of transition from vegetative growth to reproductive growth in flowering Chinese cabbage.

Key words: flowering Chinese cabbage; bolting; gene structure; expression

菜薹 (*Brassica rapa* syn. *campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee) 又称菜心, 是目前我国华南地区栽培规模最大的特产蔬菜之一 (蔡绵聪 等, 2010), 其品质柔嫩, 风味独特, 营养丰富, 深受广大消费者喜欢。菜薹适应性广, 生长迅速, 周年均能栽培, 因此在蔬菜淡季供应上占有重要地位。

作者前期利用 cDNA-AFLP 技术比较菜薹未抽薹转录组与抽薹转录组差异时, 筛选出 1 条长 133 bp 的表达序列标签 (EST) (肖旭峰, 2008)。经在线软件比对发现, 该序列同时与拟南芥二氢黄酮还原酶同工酶 (dihydroflavonol reductase, DFR) 及 UDP-D-芹菜糖/UDP-D-木糖合酶 (UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase, AXS) 基因的中间序列同源性均达到 90% 以上, 将该基因命名为 *BrcuDFR-like/BrcuAXS*。据相关文献报道, DFR 是植物花色苷生物合成途径中后期表达的第一个关键酶, 在不同花色形成中起着关键作用 (孟祥春 等, 2007; 胡可 等, 2009; 潘丽晶 等, 2010; 韩科厅 等, 2012; 招雪晴 等, 2012); 而 UDP-D-芹菜糖/UDP-D-木糖合酶 (AXS) 则在植物 D-芹菜糖形成过程中催化 UDP-D-葡萄糖醛酸脱羧分别形成 UDP-D-芹菜糖和 UDP-D-木糖起作用 (Ahn et al., 2006)。

本试验中通过上述 EST 片段, 采用 RACE 技术克隆出菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的 cDNA 全长, 并通过 PCR 技术扩增 gDNA 全长序列。利用生物信息学软件分析 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的全长序列、外显子和内含子结构特征, 并研究其在菜薹不同生长发育阶段的表达模式, 以期为该基因的功能预测及深入研究利用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料为菜薹早熟品种‘油青 49’和晚熟品种‘油青甜菜心 80 天’, 由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。2006 年 3 月 9 日播种于营养钵, 置于光照培养箱中。待抽薹开花后, 在菜薹茎尖部位取样, 提取总 RNA 和 gDNA。

1.2 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 全长序列扩增

DNA 的提取采用改良 CTAB 法 (曹必好 等, 2003)。总 RNA 提取按照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒说明书, cDNA 第一链合成参照 CLONTECH 公司 SMART cDNA Library Construction 试剂盒说明书。

根据 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因的 EST 序列, 设计正向特异 Primer 1 与锚定引物 UMP 扩增该基因 3' 末端, 反向引物 Primer2 及 Primer3 分别与锚定引物 UPM、NUP 进行套式扩增 5' 末端。PCR 反应的体系为: 1 μL cDNA 模板, 2.5 μL 10 \times PCR buffer, Mg^{2+} (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 0.5 μL dNTP (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL 锚定引物, 1 μL 特异引物, 0.25 μL *Tag* 聚合酶 (5 U), 18.25 μL ddH₂O。反

应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 退火温度 55 °C 或 57 °C 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环后再 72 °C 7 min 延伸。

根据拼接全长序列设计上、下游引物 Primer 4、Primer 5 进一步扩增 cDNA 与 DNA 全长序列, 扩增体系与前述一致, 反应程序则为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 50 s, 72 °C 2.5 min, 30 个循环后再 72 °C 10 min。以上所有引物序列 (表 1) 均由上海生工生物工程有限公司合成。获得的 PCR 产物纯化后与 PMD-19T 载体连接 (由日本 TaKaRa 提供)。连接产物转化受体大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 由华南农业大学园艺生物技术所提供, 蓝白斑筛选阳性克隆。碱裂解法小量提取质粒 DNA, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后, 将检测结果为阳性质粒菌的菌液送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* cDNA 和 DNA 全长序列扩增引物

Table 1 Primers used in the cloning of the full-length cDNA and DNA of *BrcuDFR-like/BrcuAXS*

引物名称	Primer	引物序列	Sequence
UMP		5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	
		5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGC-3'	
NUP		5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	
Primer 1		5'-CGGATTACAATACGCGTCTCTTG-3'	
Primer 2		5'-TGCTGTAGATAGTGCAAGAGGACGC-3'	
Primer 3		5'-TAATCCGCCGGTGTACAGATCGCCGCC-3'	
Primer 4		5'-ATTCTTTCCTCCATCCACCGAC-3'	
Primer 5		5'-CTATAAAGTAGAACCAACCACC-3'	

1.3 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 全长测序与序列分析

分析菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的 cDNA 和 gDNA 全长结构, 并在 NCBI 的 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行在线同源性检索和相似性比对; DNASTAR 软件分析内含子、外显子多态性及构建系统进化树; PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 软件分析内含子调控序列。

1.4 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 表达模式分析

依据菜薹花芽形态发育特征 (肖旭峰, 2008), 分别提取菜薹早熟品种 ‘油青 49’ 和晚熟品种 ‘油青甜菜心 80 天’ 第 1、2、4、5 片真叶期及开花期植株的总 RNA, 并反转录成第一链 cDNA 为模板, 通过半定量 RT-PCR 研究抽薹相关基因 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的表达特性。

2 结果与分析

2.1 菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的克隆

以开花期菜薹材料的第一链 cDNA 为模板, 采用 RACE 技术扩增获得了长为 1 043 bp 的 3' 片段 (图 1, 1) 和 357 bp 的 5' 片段 (图 1, 4)。3' 片段末端上共有 30 bp PolyA 尾巴, 表明扩增的 3' 末端结果完全正确。5' 序列经 Blast 比对后, 发现该序列中包含了与同源序列相对应的起始密码子 ATG, 表明扩增序列达到了 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因的 5' 末端。

分别以菜薹 gDNA 和第一链 cDNA 为模板, 用 Primer4 和 Primer5 特异引物进行 PCR 扩增, 分别获得约 1 300 bp (图 1, 6) 和 2 400 bp 两条特异带 (图 1, 7), 条带与预期大小一致。纯化产物与 T 载体连接后转化大肠杆菌, 挑取蓝、白斑提取质粒酶切, 酶切后的泳带与目的片段大小完全相

同(图 1, 10、11), 表明目的片段已克隆到载体上。将鉴定为阳性的克隆进一步测序, 结果表明: *BrcuDFR-like/BrcuAXS* cDNA 全长序列为 1 332 bp, 包含了编码 312 个氨基酸残基的 ORF 框、438 bp 的 3'非翻译区及 67 bp 的 5'非翻译区。ORF 框由 939 个碱基组成, 起始密码子位于第 68 位碱基上, 终止密码子则位于第 1 006 位碱基, 编码氨基酸残基的分子量为 35.1 kD, 蛋白等电点为 6.35。

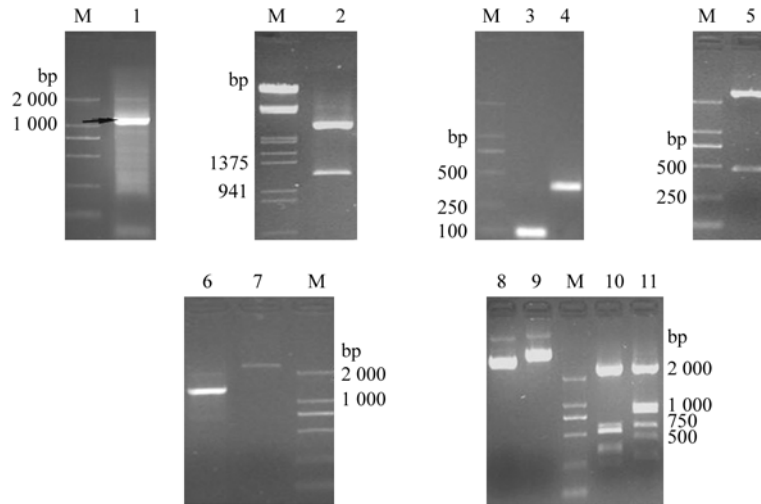


图 1 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因 cDNA 和 DNA 全长克隆

M: Marker; 1、2 为 3'-RACE 片段和重组质粒; 3~5 分别为 5'-RACE 扩增的第一、二轮产物及重组质粒;

6、7 分别为 cDNA 和 DNA 全长; 8~11 分别为 cDNA、DNA 全长重组质粒和双酶切产物。

Fig. 1 Cloning of amplified fragment into PMD-19T of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* gene

M: Marker; Lane 1 and 2 were 3'-RACE product and the recombinant plasmid; Lane 3-5 were the first, second cycle

products of 5'-RACE and the recombinant plasmid; Lane 6 and 7 were the full-length cDNA and gDNA;

Lane 8-11 were the recombinant plasmids and the digested product of the full-length cDNA and gDNA.

经 Blast 比对发现, 该序列与拟南芥、马铃薯和陆地棉的 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶核苷酸序列同源性分别达到了 91%、82%和 79%, 与拟南芥 DFR 同工酶核苷酸序列 (GenBank 登录号: BT001220) 同源性为 90%, 推导的氨基酸序列与拟南芥 DFR 同工酶相似性为 95%, 与拟南芥、陆地棉 AXS 分别为 95%和 93%。基于 cDNA 序列和氨基酸序列构建的系统进化树均显示, 菜薹与拟南芥的 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶 (AXS1 和 AXS2) 和二氢黄酮还原酶同功酶的亲缘关系较近, 与陆地棉、马铃薯等 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶相对较远 (图 2)。

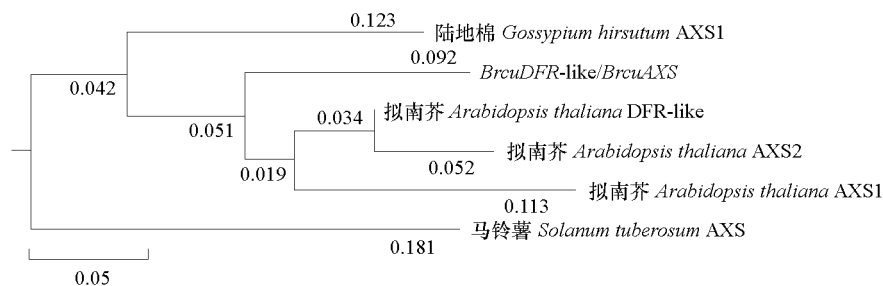


图 2 菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* sequences with other related plants

2.2 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因外显子与内含子结构特征分析

以菜薹 gDNA 为模板, 扩增的 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因组 DNA 全长序列为 2 460 bp, 从起

始密码子到终止密码子共 1 981 bp, 经在线软件 Blast 搜索未发现任何其它物种的同源序列。将 gDNA 与 cDNA 序列相比较, 发现该基因含有 7 个内含子和 8 个外显子, 其中外显子总长度为 939 bp, 内含子总长为 1 042 bp。8 个外显子中, 第 1 个外显子最长, 为 279 bp; 而 7 个内含子除第 1 和 3 内含子外, 其它内含子长度均处于 50~150 bp 之间, 但大多不符合标准的 GT-AG 内含子剪接法则(图 3)。



图 3 菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因组结构

外显子: 内含子:

Fig. 3 Genomic constructs of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* gene

Extron: Intron:

ATTCCTTTCCTCCATCCACCGACAATGGGAACAACGGAGCCGTTAGATTGGATCTGGACGGGAAGCCGATCAAGCCGCTCAGCATCTGCATGATCGGC
GCCGGCGTTTCATCGGCTTCACCTCTGCGAGAAGCTCTGAACGAGACTCCGCACAAGTGTGGCCCTCGACGTCTACAACGACAAGATCAAGCAC
CTGCTCGAGCCTGATACCTCCGAGTGGGCCGAGAGGATCCAGTTCATCGCATCAACATCAAGCATGACTCGAGGCTCGAGGGCTCGTCAAGATGGCG
GATCTAGttaaatactcttttctcctcgtaatgctgattgtacac[**tatccca**]gatctagcagatcgaattgcaaggtgtgttttagcgatttgtgata
TATC-box
gtatactcagatctgattc[**attaat**]tgaatttcaatcgtgctt[**tggttcatttgtatt**]atgtatattatcgatacgggtgctgtagcgagattgtgaatg
Box 4 Gap-box
tggttgtttgttttttgcgatgcagACGATTAATTGGCGGCGATCTGTACACCAGCGGATTACAATACGCGTCTCTTACACTATCTACAGCAAT
TTCATCGATGCTCTCCCTGTGGTatgtgttttca[**attaat**]gcagcaattcaatctttgagggatgttagttgtgtgacattgaggt[**ggtcaa**]gtat
Box 4 W-box
aggtTAAGTACTGCTCAGAGAACAACAAGCGTCTGATTCACTTCTCCACTTGTGAAGTATATGGGAAAACCATGGAAGCTTCTTCCAAGGATCATC
CTCTGCGTCAGGctctg[**cttttcttcaact**]ctgatcatgtcatttt[**tggtgtca**]agcggatcaagaagctatgttatttgtacag[**tgacaca**]ctcaactga
TC-rich repeats GCN4_motif GCN4_motif
agatggattcagagttttaatatgagattgttgttgtttagatttctttaaactcgattc[**agagagt**]agagtaagctagttctgagctgtcact
GAG-motif
atcccccttaGtagt[**ttgagaaaaat**]gtagtttatttctgcaattattttagatggctttgagtcaccaactactaccacctga[**gaagttttttt**]ttt
TC-rich repeats HSE
Ttttgcttagtattcttatgccaagt[**aaaatttagtta**]tattactagtagtactagctctgtctctgtatttattatttctgcaccactca[**cagttg**]atat
MBS II MBS
tcgtcttgtttttcaggATCCTGATTTTATGTAAGATAACATACTCCTTGCATTTTGGTCTATTGAGAAGCAGAGGTGGTCATATGCTT
GTGCTAAGCAACTGATTGAGAGGCTTGTCTATGgtacgcagttctttctatgatagaagcaaatcagtttacctagagg[**caaaagg**]atctcattttc
P-box
ttttgtttgttgaagCTGAGGGTCTGAGAATGGAAGTTCACCGTGTGAGACCGTTAACTGGATTGGACCTAGGATGGATTTTCATCCCTG
GCATTGATGGTCTAGCGAGGGTTCCTCGTCTAGCCTGCTTCAAGCAACgtatgttacatgctcggtcctatagccatataaaactgccttcttt
Tattgcctgctgcttaactt[**tttcaaa**]tttttgggggtattttcagAACCTTCTGAGGCGTGAGCCTCTCAAGCTTGTGGATGGTGGAGAATCACAGAG
Box I
AACCTTCGTCTGCATCAAAGATGCCATTGAAGCTGTCTCTTGTATGATTGtgagtt[**gcattc**]attgtttatccctgtagcatctcgttttgctgcact
CATT-motif
agttgtcaagaagttgcatct[**gaaatttctt**]gtttaataggAAAACCCAGAGAGCCAATGGGCATATCTTCAATGTAGGAAACCCAAACAATGAAG
HSE
TGACAGTAAGGCAGCTTGGGAAATGATGACCAAGGTgagaaagcttgttcaaattataaaacatctaataatgattttcgatactcaaatgctggcaaa
acaaaaattgacaggtTACTCAAAGTGAAGTGGAGAGACAGCTATAGAGATCCAACTATAGATGTGAGCTCCAAAGAATTCTATGGAGAAGGTTATG
ATGACAGCGACAAGAGAATCCCAGACATGACCATCATCAACCGTCAACTGG

图 4 菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因 gDNA 全长序列及顺式作用元件预测

大写字母表示外显子序列, 小写字母表示内含子序列; ATG 表示起始密码子, TGA 表示终止密码子。

Fig. 4 The full-length sequence of gDNA and prediction of *cis*-acting elements of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* gene

The capital letter indicates exon, the lowercase letter indicates intron; ATG indicates start codon, TGA indicates stop codon.

第 3 内含子是该基因最长的内含子,长度为 401 bp,是其它 6 个内含子平均长度的 4 倍左右(107 bp),第 2 和第 7 内含子最短,只有 79 bp。内含子中碱基的含量为 T > A > C > G,其中 A·T 碱基含量达到了 65.36%,明显高于外显子 50.86%,符合内含子 A·T 含量较高的一致特点。使用 PlantCARE 在线分析该基因内含子元件,结果表明内含子除了含有 26 个 CAAT-box、2 个 TATA-box 等基本转录元件外,还含有赋予高转录水平的顺式作用元件,如光应答元件 Box I、GAG-motif、Gap-box、CATT-motif、TCCC-motif 和 Box4 等,赤霉素响应元件 P-box 和 TATC-box,参与抗性和胁迫应答相关的顺式元件 TC-rich repeats,热响应元件 HSE, WRKY 转录因子的结合位点 W-box 及干旱胁迫元件 MYB 转录因子结合位点等(图 4)。

2.3 菜薹不同发育时期 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 的表达模式

半定量 RT-PCR 分析了目的基因在菜薹第 1、2、4、5 片真叶期及开花期的表达模式,结果表明在菜薹早熟品种‘油青 49’和晚熟品种‘油青甜菜心 80 天’不同生长发育时期的基因表达模式各异。在第 1 片真叶期时,两个品种都未检测到基因表达,在随后的第 2、4、5 片真叶期及开花期,均有不同程度的表达。据肖旭峰(2008)报道,第 2 片真叶期是标志着菜薹由营养生长转向生殖生长的过渡期。从表达模式看, *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 在菜薹整个生殖发育阶段持续表达,并随着菜薹花芽形态逐步建成直至抽薹开花,基因的表达丰度逐渐增强,最高表达量均发生在开花期(图 5),由此预测该基因的功能可能与菜薹营养分生组织向花分生组织转变有关。

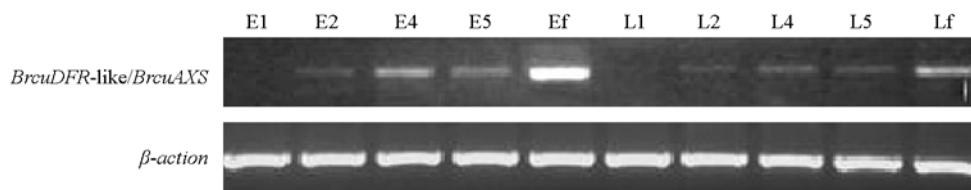


图 5 菜薹 *BrcuDFR-like/BrcuAXS* 基因表达模式

E 代表早熟品种‘油青 49’, L 代表晚熟品种‘油青甜菜心 80 天’; 1、2、4、5、f 分别表示第 1、2、4、5 片真叶期和开花期。

Fig. 5 Expression analysis of *BrcuDFR-like/BrcuAXS* in different periods of two cultivars

E, L: The early blooming variety and the late blooming variety; 1, 2, 4, 5, f: The periods of the one, two, four, five true-leaf and completed flowering.

3 讨论

DFR 是控制植物花青素生物合成途径的关键酶之一,在植物开花及果实颜色变化中发挥重要作用(招雪晴等, 2012)。目前,植物花色的形成及相关基因的作用机理已得到了广泛研究,如拟南芥、玉米、番茄、矮牵牛、葡萄等多种植物(Shirley et al., 1995; Xie et al., 2004; 郑亚东等, 2007; 慕茜等, 2011; 王廿等, 2012)。据已报道的生物信息学资料分析, *DFR* 属于单基因或小基因家族,通常不同植物的外显子和内含子存在数量多态性。双子叶植物如裂叶牵牛、圆叶牵牛、金鱼草、矮牵牛与拟南芥等 *DFR* 基因组序列包含 6 个外显子和 5 个内含子;而单子叶植物如玉米、小麦和高粱等则只有 3 个内含子, 4 个外显子;水稻 *DFR* (AB003495) 只有 2 个内含子(刘光德等, 2009)。内含子虽不编码蛋白质,但一些调控元件可能影响目的基因的表达,如增强表达水平或驱动基因表达等。菜薹属于十字花科双子叶植物,目的基因组所包含的 7 个内含子可能是植物在进化过程中不断插入的结果,但本研究中的内含子进化变化及调控机制还缺少足够证据,内含子数量差异是否可调控 *DFR* 转录也未见任何报道,尚需进一步探讨。

UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶 (AXS) 能催化 UDP-D - 葡萄糖醛酸脱羧, 分别使碳骨架重新组合引起环收缩或形成分支, 从而得到 UDP-D - 芹菜糖和 UDP-D - 木糖复合物 (Baker & Blasco, 1992)。利用烟草病毒诱导 *NbAXS1* 基因沉默(VIGS)的植株, 出现了 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶降解的细胞学效应。据相关文献报道, *NbAXS1* 在所有植物器官中都表达, 与绿色荧光蛋白组成的融合蛋白主要定位在细胞质中。一旦编码 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶的 AXS 沉默, 将导致植株矮小、叶片黄化, 伴随着分裂细胞结构和过量活性氧积聚造成的细胞坏死表现, 且受影响的叶肉细胞出现细胞壁肥厚, 壁缺口及淀粉高度聚积。完全丧失 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶功能还可能致胚或幼苗致死 (Ahn et al., 2006)。

本研究中从基因表达结果看, 该基因随菜薹花发育逐步增加, 抽薹开花期表达量最大, 符合前人对 *DFR* 的研究结果 (Nakatsuka et al., 2003)。如果目的基因在菜薹生长发育过程中行使 AXS 基因功能, UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶的逐渐上调将有利于促进 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖复合物合成, 然而该基因在第 1 片真叶期不表达或表达量极少, 显然与酶功能丧失可能导致胚或幼苗致死的表型不符, 由此基因行使 UDP-D - 芹菜糖/UDP-D - 木糖合酶功能的可能性不大。

综上所述, 目的基因编码 *DFR-like* 酶的可能性大于编码 AXS 酶, 预测其功能可能与菜薹生长发育中营养分生组织向花分生组织转变有关, 可能为花青素生物合成途径中的关键酶, 也可能是一种还原酶, 或可能是一种脱氢酶或表异构酶等, 还可能是其它有 2、3 倍酶活性的同系物等, 需进一步体外酶活性分析验证。

References

- Ahn J W, Verma R, Kim M, Lee J Y, Kim Y K, Bang J W, Reiter W D, Pai H S. 2006. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-ii deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J Biol Chem*, 281: 13708 - 13716.
- Baker M E, Blasco R. 1992. Expansion of the mammalian 3 betahydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystis disease virus. *FEBS Lett*, 301: 89 - 93.
- Cai Mian-cong, Li Shu-yi, Chen Zhen-yuan, Liao Xin-rong, Kong Xiang-liu, Wang Rong-ping, Lan Pei-ling, Feng Lu-wei. 2010. Effect of N, P and K fertilizers on yield of flowering Chinese cabbage. *Chinese Journal of Soil Science*, 41 (1): 126 - 132. (in Chinese)
- 蔡绵聪, 李淑仪, 陈真元, 廖新荣, 孔祥流, 王荣萍, 蓝佩玲, 冯露微. 2010. 菜心氮磷钾施肥效应研究. *土壤通报*, 41 (1): 126 - 132.
- Cao Bi-hao, Lei Jian-jun, Chen Guo-ju. 2003. Screening a RAPD marker related to ogura cytoplasm male sterile gene in cabbage. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 11 (6): 648 - 649. (in Chinese)
- 曹必好, 雷建军, 陈国菊. 2003. 甘蓝 Ogura 胞质雄性不育基因的 RAPD 标记筛选. *农业生物技术学报*, 11 (6): 648 - 649.
- Han Ke-ting, Zhao Li, Tang Xing-jiao, Hu Ke, Dai Si-lan. 2012. The relationship between the expression of key genes in anthocyanin biosynthesis and the color of chrysanthemum. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (3): 516 - 524. (in Chinese)
- 韩科厅, 赵莉, 唐杏皎, 胡可, 戴思兰. 2012. 菊花花青素苷合成关键基因表达与花色表型的关系. *园艺学报*, 39 (3): 516 - 524.
- Hu Ke, Meng Li, Han Ke-ting, Sun Yi, Dai Si-lan. 2009. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria*. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (7): 1013 - 1022. (in Chinese)
- 胡可, 孟丽, 韩科厅, 孙翊, 戴思兰. 2009. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析. *园艺学报*, 36 (7): 1013 - 1022.
- Liu Guang-de, Lei Xing-hua, Zhu Qin-long, Zhong Guang-chi, Guo Tie-ying, Li Yan-dong, Sui Shun-zhao, Li Ming-yang. 2009. Cloning and sequence analysis of a *DFR* gene from *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (1): 55 - 63. (in Chinese)
- 刘光德, 雷兴华, 祝钦泷, 钟光驰, 郭铁英, 李艳冬, 眭顺照, 李名扬. 2009. 金荞麦二氢黄酮醇 4 - 还原酶基因 (*FdDFR1*) 的克隆及序列分析. *中国农业科学*, 42 (1): 55 - 63.
- Meng Xiang-chun, Peng Jian-zong, Wang Xiao-jing. 2007. Anthocyanin accumulation and *CHS*, *DFR* gene expression regulated by light and sugar in *Gerbera hybrida* ray floret. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 227 - 230. (in Chinese)
- 孟祥春, 彭建纵, 王小菁. 2007. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 *CHS*、*DFR* 基因表达的影响. *园艺学报*, 34 (1): 227 - 230.

- Mu Qian, Wu Wei-min, Fang Jing-gui, Sun Xin, Shangguan Ling-fei, Zhao Mi-zhen. 2011. Genotyping *VvmybA1* in 59 grapevine cultivars and characterization of the DNA fragment sequences. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (11): 2075 - 2084. (in Chinese)
- 慕 茜, 吴伟民, 房经贵, 孙 欣, 上官凌飞, 赵密珍. 2011. 不同葡萄品种的 *VvmybA1* 基因型及其特征性 DNA 片段的序列分析. *园艺学报*, 38 (11): 2075 - 2084.
- Nakatsuka A, Izumi Y, Yamagishi M. 2003. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily. *Plant Sci*, 165: 759 - 767.
- Pan Li-jing, Zhang Miao-bin, Fan Gan-qun, Chen Wei-ting, Cao You-pei. 2010. Cloning, sequencing and prokaryotic expression of *dfR* from *Dendrobium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (1): 129 - 134. (in Chinese)
- 潘丽晶, 张妙彬, 范干群, 陈伟庭, 曹友培. 2010. 石斛兰 *dfR* 基因的克隆、序列分析及原核表达. *园艺学报*, 37 (1): 129 - 134.
- Shirley B W, Kubasek W L, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel F M, Goodman H M. 1995. Analysis of mutants deficient in flavonoid *Arabidopsis* biosynthesis. *Plant Journal*, 8 (5): 659 - 671.
- Wang Nian, Yan Jin-hui, Zhang Kai-chun, Wang Jing, Zhang Xiao-ming, Yan Guo-hua. 2012. Polymorphism of *DFR* gene intron 2 and intron 3 in sweet cherry. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (2): 320 - 329. (in Chinese)
- 王 廿, 鄢锦辉, 张开春, 王 晶, 张晓明, 闫国华. 2012. 甜樱桃 *DFR* 基因内含子 2 和内含子 3 的多态性. *中国农业科学*, 45 (2): 320 - 329.
- Xiao Xu-feng. 2008. Studies on the molecular mechanism of bolting in *Brassica rapa* syn. *campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee [Ph. D. Dissertation]. Guangzhou: South China Agricultural University. (in Chinese)
- 肖旭峰. 2008. 菜心花芽分化及抽薹的分子生物学基础研究[博士学位论文]. 广州: 华南农业大学.
- Xie D Y, Jackson L A, Cooper J D, Ferreira D, Paiva N L. 2004. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago*. *Plant Physiology*, 134 (3): 979 - 994.
- Zhao Xue-qing, Yuan Zhao-he, Tao Ji-han, Yin Yan-lei, Feng Li-juan. 2012. Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of *DFR* gene from red-flower pomegranate. *Shandong Agricultural Sciences*, 44 (2): 1 - 4. (in Chinese)
- 招雪晴, 苑兆和, 陶吉寒, 尹艳雷, 冯立娟. 2012. 红花石榴二氢黄酮醇还原酶 (*DFR*) 基因 cDNA 片段克隆及序列分析. *山东农业科学*, 44 (2): 1 - 4.
- Zheng Ya-dong, Guo Yu-long, Chen Xu, Li Yan-dong, Ou Jian-long, Li Ming-yang. 2007. Effects of *GhMADS3* gene constitutive expression on flower shape and color of petunia. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 985 - 990. (in Chinese)
- 郑亚东, 郭余龙, 陈 旭, 李艳冬, 欧建龙, 李名扬. 2007. *GhMADS3* 基因组成型表达对矮牵牛花形和花色的影响. *园艺学报*, 34 (4): 985 - 990.

征 订

欢迎订阅 2013 年《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管, 中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。刊物目标定位: 以行业导刊的面目出现, 并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围: 大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等, 信息量大, 导向性强, 技术实用。

读者对象: 各级种子管理、经营企业的领导和技术人员, 各级农业科研、推广部门人员, 大中专农业院校师生, 农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊, 大 16 开, 每期 8 元, 全年 96 元。邮发代号: 82-132。国内统一刊号: CN 11-4413/S, 国际标准刊号: ISSN 1671-895X, 全国各地邮局均可订阅, 亦可直接汇款至编辑部订阅, 挂号需每期另加 3 元。

地 址: (100081) 北京市中关村南大街 12 号 中国种业编辑部

电 话: 010-82105796 (编辑部) 010-82105795 (广告发行部)

传 真: 010-82105796 网址: www.chinaseedqks.cn

E-mail: chinaseedqks@sina.com; chinaseedqks@163.com