

胭脂萝卜 *RsUFGTs* 的克隆与表达分析

杜丽娜 王 琪 王春兰 苏 睿 谭春艳 蒲 燕 陈发波 赖 彪

长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100

摘要 为确定参与胭脂萝卜花青苷生物合成的类黄酮糖基转移酶基因(*RsUFGTs*), 从萝卜基因组中筛选出 3 个候选的 *RsUFGTs* 基因, 以胭脂萝卜为材料, 克隆了 3 个 *RsUFGTs* 的开放阅读框(ORF)并进行序列及表达分析。结果表明: *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 的 ORF 长度分别为 1 383 和 1 374 bp, 分别编码 460 和 457 个氨基酸, 而 *RsUFGT3* 提前终止; 氨基酸序列比对和系统进化树分析表明 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 均含有 PSPG 保守特征结构域, 且属于 Cluster I 亚族成员; 利用实时荧光定量 PCR 分析它们在不同着色萝卜品种中的表达发现, *RsUFGT1* 在‘红心 1 号’胭脂萝卜皮和肉组织中表达量较高, 在‘满堂红’萝卜皮和‘春不老’的萝卜皮与肉中均不表达, 其表达量与花青苷含量呈正相关, 而 *RsUFGT2* 的表达则无明显规律。因此, *RsUFGT1* 可能是胭脂萝卜花青苷生物合成的重要结构基因之一。

关键词 胭脂萝卜; *RsUFGTs*; 花青苷; 基因克隆; 基因表达
中图分类号 S 631.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0001-07

胭脂萝卜属于十字花科(Brassicaceae)萝卜属(*Raphanus*)萝卜种(*Raphanus sativus* L.), 其皮和肉均呈深红色, 是重庆涪陵区的特色栽培品种, 是涪陵区的第二大特产。花青苷是植物体内重要的类黄酮类次生代谢物质, 是植物器官呈现颜色的主要色素。常见的花青苷有矢车菊素糖苷、飞燕草素糖苷、锦葵色素糖苷、天竺葵素糖苷、芍药素糖苷与矮牵牛素糖苷等 6 类。梁珊等^[1]研究发现胭脂萝卜中积累了大量的花青苷, 且主要成分为天竺葵素糖苷。花青苷的生物合成大致分为 3 个步骤: 首先, 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸氢化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和 CoA 连接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL)的作用下, 生成香豆酰 CoA; 然后香豆酰 CoA 在查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)催化下产生无色的二氢黄酮醇。最后, 二氢黄酮醇在黄烷酮-3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和黄烷酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)的催化下生成无色花青素, 进而在花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)和类黄酮葡萄糖基转移酶(UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT)的作用下由无色花青素修饰转变成成为有色的花青苷^[2]。

糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)专门负责催化糖基转移到特定的受体上^[3]。UGT 通常含有多基因家族成员, 目前在模式植物拟南芥中鉴定到了 121 个 UGT 基因^[4], 在苜蓿中鉴定到了 165 个 UGT 基因^[5], 根据类黄酮糖基转移的位置可将类黄酮糖基转移酶分为类黄酮 3-O-糖基转移酶、类黄酮 5-O-糖基转移酶和类黄酮 7-O-糖基转移酶。目前类黄酮 3-O-糖基转移酶在植物花青苷生物合成中研究较多。研究人员通过比较红色葡萄和白色葡萄品种中编码类黄酮糖基转移酶基因 *VvUFGT* 的表达水平时发现该基因只在红色葡萄样品中表达, 利用 ABA 处理提高 *VvUFGT* 的表达且促进葡萄果实花青苷的积累^[6-7]。在紫色马铃薯中, 通过基因表达分析发现 *StUFGT* 在花青苷积累中起着关键的作用^[8]。此外, 在石榴^[9]、芒果^[10]、梨^[11]、荔枝^[12]和洋葱^[13]等植物中的研究表明 UFGT 是花青苷生物合成代谢过程中的关键限速酶。

收稿日期: 2018-10-26
基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究专项(cstc2017jcyjA0001); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ1712303); 长江师范学院校级科研项目(2016KYQD20; 2016XJQN06)
杜丽娜, 博士, 讲师。研究方向: 果蔬分子生物学。E-mail: dulina05@163.com
通信作者: 赖 彪, 博士, 讲师。研究方向: 果蔬分子生物学及遗传育种。E-mail: laibiaoscaw@163.com

本研究以重庆涪陵的特色萝卜品种胭脂萝卜‘红心 1 号’为材料,利用已发表的萝卜基因组数据库,筛选获得候选的 *RsUFGTs* 基因,通过扩增和测序获得 *RsUFGTs* 基因序列并对其结构进行分析,进而利用荧光定量 PCR 技术检测其在不同颜色类型萝卜品种中的表达水平,并分析 *RsUFGTs* 基因表达和花青苷含量的相关性,获得参与胭脂萝卜花青苷生物合成的关键基因 *RsUFGT*,以期对胭脂萝卜的品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选用不同颜色类型的萝卜品种‘满堂红’(绿皮红心)‘春不老’(白皮白心)‘红心 1 号’胭脂萝卜(红皮红心)和胭脂萝卜变种红皮白心‘红心 1 号’为材料。不同品种萝卜组织编号分别为:S1,‘满堂红’萝卜皮;S2,‘满堂红’萝卜肉;S3,‘春不老’萝卜皮;S4,‘春不老’萝卜肉;S5,‘红心 1 号’皮;S6,‘红心 1 号’肉;S7,‘红心 1 号’萝卜变种皮;S8,‘红心 1 号’萝卜变种肉。

1.2 花青苷含量测定

花青苷含量的测定采用 pH 差示法,参照 Wrolstad 等^[14]方法,具体步骤为:取萝卜组织 0.1 g 样品于 3 mL 浸提液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{浓盐酸}}=85:12:3$)中,室温避光充分浸提(5~6 h)。配制缓冲液 1 和缓冲液 2,缓冲液 1:0.2 mol/L KCl-0.2 mol/L HCl(25:67,体积比),pH=1;缓冲液 2:1 mol/L NaAc-0.4 mol/L HCl(100:150,体积比),pH=5。取 0.5 mL 浸提液于试管中分别加入 2 mL 的缓冲液 1 和缓冲液 2,用紫外分光光度计测定它们在 530 nm 下的吸光值。

根据经验公式计算花青苷含量,花青苷含量= $\Delta D_{530} \times 5 \times 3 \times 445.2 / 29600 \times 0.1$ 。式中,花青苷含量,mg/g;5 为稀释倍数;3 为提取液体积,mL;445.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量;29 600 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔比吸收系数,L/mol;0.1 表示样品质量,g。

1.3 从萝卜基因组中获取候选 UFGT 基因

使用已经发表的拟南芥 UFGT(CAC01717.1)和荔枝 LcUFGT1(HQ402914)氨基酸序列在萝卜基因组(<http://www.nodai-genome-d.org>)中进行 Blast 比对, $E\text{-value} < e^{-150}$,筛选可能与花青苷生物合成相关的候选 UFGT 基因。

1.4 RNA 的提取与 cDNA 合成

使用 Magen 公司的 Hipure Plant RNA Mini Kit 试剂盒(具体方法参照说明书)进行萝卜样品 RNA 的提取。使用 DNase I (TaKaRa)消化 RNA 中残留的 DNA,具体方法参照说明书。RNA 的浓度测定和纯度分析:取 1 μL RNA 溶液稀释至 100 μL ,置于紫外核酸蛋白检测仪上测定 260、280 和 320 nm 的光密度值并计算 D_{260}/D_{280} 值。当样品 RNA 的 D_{260}/D_{280} 值为 1.80~2.00 时,用于下一步试验。总 RNA 样品浓度按下列公式计算:RNA 浓度= $D_{260} \times 40 \times 100$ 。为进一步评价总 RNA 的完整性,取 2~3 μL 总 RNA 进行 1.2%(m/V)琼脂糖凝胶电泳检测。以总 RNA 作为模板合成第一链 cDNA,反转录采用 TaKaRa 的 SuperScript One-Step RT-PCR System 试剂盒,引物为 Oligo(dT)₁₅ (TaKaRa)。cDNA 的合成参照反转录酶的说明书进行。

1.5 引物设计、基因克隆和测序

依据萝卜基因组中的 UFGT 基因信息,设计特异引物,用高保真酶(TaKaRa PrimerSTAR Max DNA Polymerase)以 cDNA 为模板扩增基因的 ORF 序列。扩增产物经电泳检测后切胶回收纯化,连接 pTOPO-Blunt Simple 载体(北京艾德莱生物科技有限公司),转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,菌液 PCR 检测正确后,提取质粒送华大基因测序。

1.6 序列比对及进化树分析

测序得到的序列通过 ExPASy 的 Translate Tool(<http://cn.expasy.org/tools/dna.html>)推导出对应的氨基酸序列,利用 Clustal X 软件对序列进行比对分析,再用 MEGA5.0 构建系统进化树^[15],分析亲缘关系。

1.7 荧光定量 PCR

Real-Time PCR 反应在 ABI QuantStudio 3 Real-Time PCR System 上进行,引物见表 1。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 35 s,40 个循环;熔解曲线分析参考 Wei 等^[16]的方法。运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据处理^[17],计算花青苷生物合成相关基因在不同样品中的表达水平。所有实验均设 3 次重复,以 ddH₂O 为阴性对照,内参基因选用 *RsRPII* 基因^[18]。

2 结果与分析

2.1 不同品种萝卜花青苷含量分析

本研究采用 pH 差示法测定了不同萝卜品种的

皮和肉组织中花青苷的含量。在胭脂萝卜‘红心 1 号’萝卜的皮(S5)中花青苷含量最高,为 1.03 mg/g,而其萝卜肉(S6)中相对较少,为 0.63 mg/g;在红皮白心的胭脂萝卜变种‘红心 1 号’萝卜皮(S7)中花青苷含量为 0.72 mg/g,而在其萝卜肉(S8)中几乎检测不到花青苷;在绿色的‘满堂红’皮(S1)中也几乎检测不到花青苷,在‘满堂红’萝卜肉中(S2)花青苷含量仅为 0.09 mg/g;在白皮白心的‘春不老’萝卜皮(S3)和肉(S4)中几乎检测不到花青苷(图 1)。

表 1 本研究中所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	用途 Usage
RsUFGT1-F	CTCCTTCACTGTATTCTCTCAC	基因扩增 Gene amplification
RsUFGT1-R	ACTCTGCTATTGTTACCAGTAATAC	
RsUFGT2-F	CTTGCTCTCCTCACAAGTCACAACC	
RsUFGT2-R	CAGCTATGGTGGACATCCATAC	
RsUFGT3-F	ATGGCCAACACCAACCAGCC	
RsUFGT3-R	TCATGTCAACCGTGAATCTCCTC	
QUFGT1-F	GGAAGAGCTGTTGAGGCTGTG	荧光定量 PCR Real-time PCR
QUFGT1-R	CAATAGAGCTTCCTTTTGCAG	
QUFGT2-F	CACGAATCAACGGGTGTGTA	
QUFGT2-R	CCCAGATAACCTCCACTGCT	
QUFGT3-F	CTACTTCCCAGCATCCAGT	
QUFGT3-R	CCCTTTAGTTTCTCCCAGTCC	
QRsRPII-F	ATCACGCTAAATGGTCTCCT	内参基因 Reference gene
QRsRPII-R	GCTGCTCTCAATCAAGTCAATC	

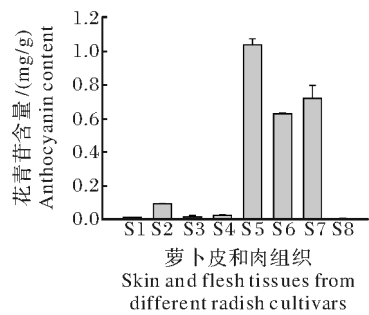


图 1 不同品种萝卜不同组织中花青苷含量
Fig.1 Anthocyanin content of different tissues from different radish cultivars

2.2 胭脂萝卜 *RsUFGT* 的 ORF 序列分析

利用 Blast 技术在萝卜基因组数据库中筛选候选的 *RsUFGT* 基因序列,比对发现萝卜基因组中有 3 个 *RsUFGT* 序列,分别命名为 *RsUFGT1*、*RsUFGT2* 和 *RsUFGT3*。根据其序列设计特异引物,以胭脂萝卜‘红心 1 号’肉质根 cDNA 为模板扩增这个 3 个基因的 ORF 序列。测序结果显示 3 个基因扩增片段长度分别为 1 383、1 374 和 1 408 bp,而 *RsUFGT3* 基因在 493 bp 处出现一个终止密码子 TAA,无法正常翻译成一个完整的蛋白。通过与基因组中组装预测的基因编码区序列比对发现该基因缺失了 889 bp,造成了移码突变(图 2)。

2.3 胭脂萝卜 *RsUFGT* 的氨基酸序列分析

RsUFGT1 编码 460 个氨基酸;*RsUFGT2* 编

码 457 个氨基酸,而 *RsUFGT3* 在 493 bp 处提前终止,仅编码 164 个氨基酸。通过核酸序列比对发现 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 与萝卜基因组中预测的序列 RSG23714.t1 和 RSG06553.t1 相似性分别为 96.2%和 99.0%,说明不同萝卜品种间基因序列差异较小。*RsUFGT1* 与拟南芥的 *UFGT* 氨基酸序列(CAC01717.1)的相似性为 73.0%,*RsUFGT2* 与拟南芥的 *UGT*(NP_197205.1)的氨基酸相似性为 (67.0%),*RsUFGT1* 与 *RsUFGT2* 氨基酸序列的相似性为 74.9%。*RsUFGT1* 与 *RsUFGT3* 氨基酸序列的相似性为 78.0%,*RsUFGT2* 与 *RsUFGT3* 氨基酸序列的相似性为 80.0%。氨基酸序列比对分析发现 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 蛋白的 C 端均含有一个由 44 个氨基酸残基构成的糖基转移酶的 PSPG Box(plant secondary product glycosyltransferase)基序(图 3)。因此,本研究从胭脂萝卜‘红心 1 号’深红色肉质根中克隆得到的 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 编码的蛋白序列具有该酶基因家族的特征序列,这进一步证明其可能为类黄酮糖基转移酶基因。

采用 ClustalX 软件和 Mega 5.0 软件进行氨基酸的多序列比对和系统进化树分析(图 4),结果显示:植物的 UDP-糖基转移酶可以分为 4 个亚族,它们分别具有不同的类黄酮糖基转移酶催化活性;Cluster I 被认为是类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶,Cluster II 被认为是类黄酮 5-O-葡萄糖基转移酶,

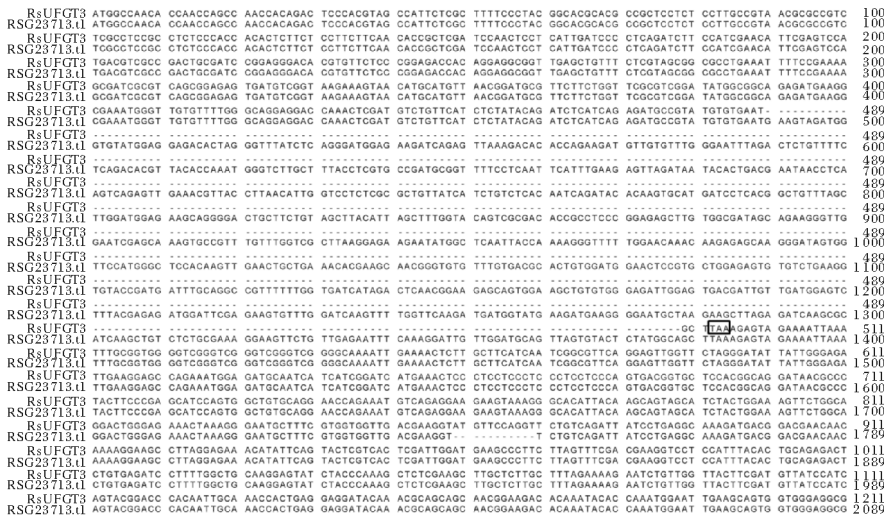
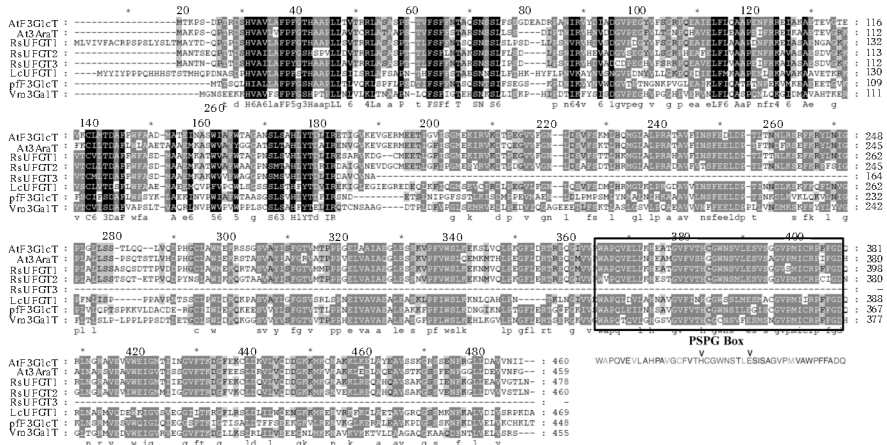


图 2 *RsUFGT3* 核苷酸序列与基因组中组装预测的基因编码区序列比较

Fig.2 Comparison of isolated *RsUFGT3* gene from ‘Hongxin No. 1’ and the original sequence from radish genome annotation



图中氨基酸序列对应的 NCBI 登录号: AtF3GlcT, NP_197207.1; At3AraT, NP_197205.1; LcUFGT1, HQ402914; Pif3GlcT, BAA89008.1; Vm3GalT, BAA36972.1. Accession number: AtF3GlcT, NP_197207.1; At3AraT, NP_197205.1; LcUFGT1, HQ402914; Pif3GlcT, BAA89008.1; Vm3GalT, BAA36972.1.

图 3 来自不同物种的类黄酮糖基转移酶氨基酸序列比对分析

Fig.3 Amino acids sequences alignment of glucosyltransferase from different species

Cluster III a 和 Cluster III b 被认为是类黄酮 7-O-葡萄糖基转移酶, Cluster IV 被认为具有催化糖基转移到类黄酮糖苷的功能^[12]; 从系统进化树可以看出 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 都属于同一个小亚族 Cluster I, 且与拟南芥的 *UGT*(NP_197205.1) 的关系最近, 意味着其可能具有类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶活性。

2.4 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 在不同萝卜品种中的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测了 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 在 4 个不同颜色品种萝卜的皮和肉组织

中的表达水平(图 5), 结果显示: *RsUFGT1* 在‘满堂红’萝卜肉(S2)、“红心 1 号”萝卜皮(S5)、“红心 1 号”萝卜肉(S6)和“红心 1 号”萝卜变种皮(S7)中有表达, 在“红心 1 号”萝卜皮(S5)表达量最高, 其次为“红心 1 号”萝卜变种皮(S7), 在“满堂红”萝卜肉(S2)中表达水平较低, 而在“满堂红”萝卜皮(S1)、“春不老”萝卜皮与肉(S3、S4)和“红心 1 号”萝卜变种肉(S8)中均没有检测到 *RsUFGT1* 基因的表达。基因表达水平与花青苷含量的相关性分析表明, *RsUFGT1* 的基因表达水平与花青苷含量呈显著正相关(图 6)。

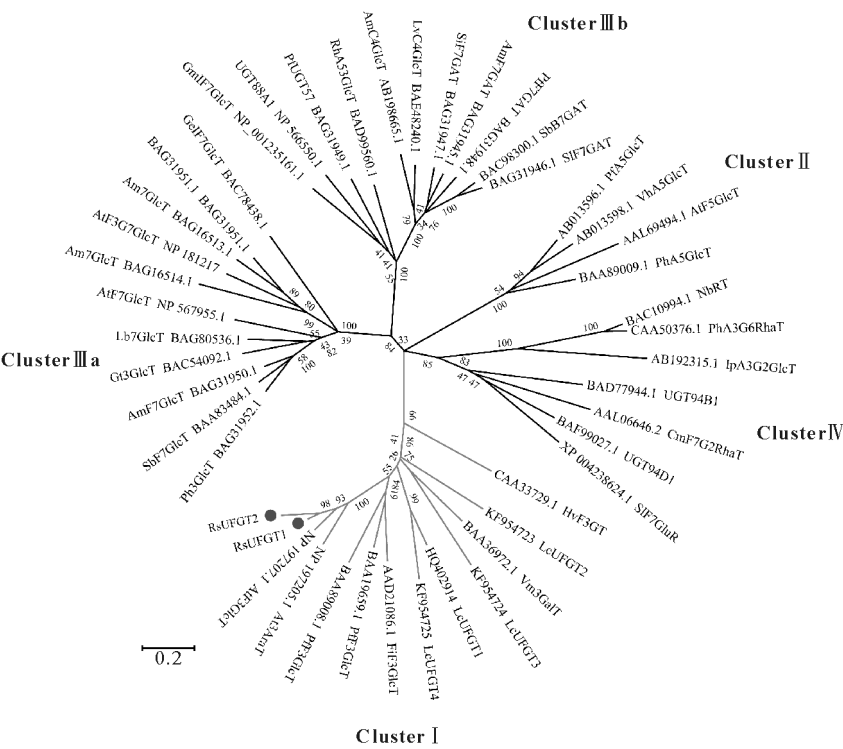


图 4 *RsUFGT*s 与其他物种类黄酮糖基转移酶基因的进化树分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of *RsUFGT*s and GTs from other species

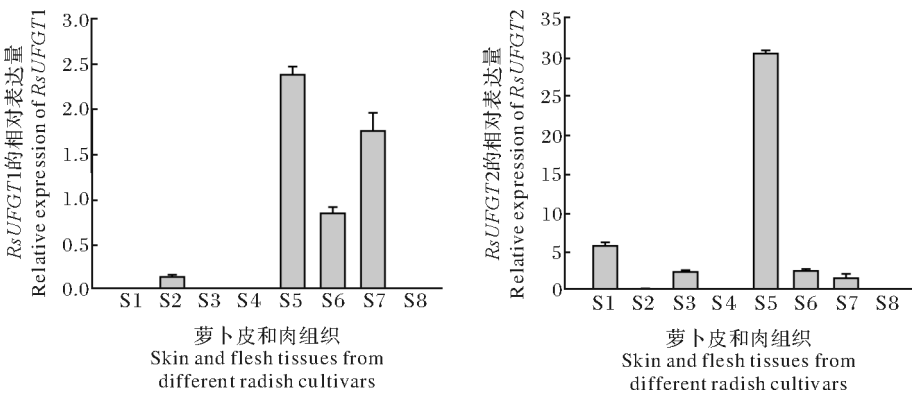


图 5 *RsUFGT*1 和 *RsUFGT*2 在不同萝卜皮和肉组织中的表达水平

Fig.5 Expression level of *RsUFGT*1 和 *RsUFGT*2 in skin and flesh of different radish cultivars

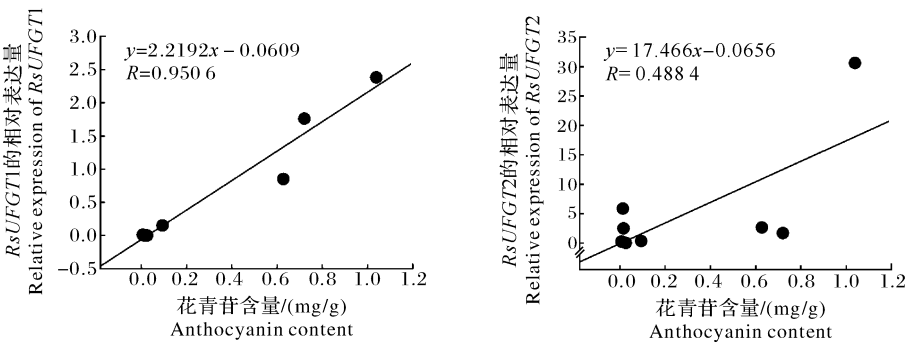


图 6 基因表达水平与花青苷含量的相关性分析

Fig.6 Correlation analyses between gene expression and anthocyanin content

RsUFGT2 在 4 种萝卜的皮组织(S1、S3、S5 和 S7)中均有表达,在‘红心 1 号’萝卜皮(S5)中的表达量最高,此外,在花青苷含量较高的‘红心 1 号’萝卜肉(S6)中有表达。相关性分析表明 *RsUFGT2* 的表达水平与花青苷含量没有明显的相关性,预示着该基因可能参与其他类黄酮糖基的转移。

3 讨 论

重庆涪陵胭脂萝卜的皮和肉组织颜色深红,利用 pH 差示法测定发现其皮和肉组织中的花青苷含量高达 1.03 mg/g 和 0.63 mg/g。UFGT 作为花青苷生物合成途径中的最后一个酶,使不稳定的花色素形成稳定的花青苷,对花青苷积累起着关键的调控作用^[8]。本研究通过生物信息学的方法从萝卜基因组中筛选了 3 个候选的 UFGT 基因,测序发现 *RsUFGT3* 基因提前终止无法翻译成完整的蛋白。氨基酸序列分析发现 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 均含有保守的 PSPG Box,该序列被认为是结合糖基供体的区域,与酶蛋白底物识别以及催化活性有关^[19]。因此,本研究克隆得到的 *RsUFGT1* 和 *RsUFGT2* 蛋白可能均具有类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶活性。

本研究分析发现, *RsUFGT1* 在花青苷含量高的组织中表达高,与花青苷的含量呈显著正相关,而 *RsUFGT2* 的表达与花青苷的含量不相关。韩振云等^[20]研究发现 3 个不同叶色的观赏海棠品种‘王族’(叶片常紫红色类)‘绚丽’(新叶红色类)和‘火焰’(叶片常绿色类)叶片中的花青苷含量也与 *McUFGT* 相对表达量变化一致。Kobayashi 等^[6]采用 Northern 杂交发现 UFGT 基因在不同颜色葡萄品种中的表达水平与花青苷含量正相关,而不同品种该基因及其启动子序列并无差异,其表达的差异可能是由上游调控基因决定的。Li 等^[12]在荔枝基因组中发现了 4 个候选的 UFGT 基因,进一步研究发现只有 *LcUFGT1* 是以飞燕草素为底物合成花青苷,且该基因的表达水平与荔枝果皮花青苷的积累趋势一致,在烟草中过表达该基因后,烟草花瓣花青苷积累量显著增加。此外,在矮牵牛中超表达来自香雪兰(*Freesia hybrida*)的 *Fh3GT1* 基因,也可促进矮牵牛花瓣中花青苷的积累^[21]。此外,系统进化分析发现,胭脂萝卜 *RsUFGT1* 与类黄酮 3-O-糖基转移酶的关系最近(图 4),推测胭脂萝卜中花青苷的主要成分是天竺葵素 3-O-糖基化的衍生物,其具体结构还需要利用核磁共振进一步确定。UFGT

可能专一性调控类黄酮的糖基化,例如,研究人员发现,日本牵牛花中主要花青苷成分为花青素-3-葡萄糖苷, UFGT 不仅仅和花青苷积累量相关,而且对花青素的糖基化和酰基化也起着重要的作用^[22]。本研究中 *RsUFGT2* 在不同品种萝卜皮组织中表达量相对较高,可能负责萝卜皮中某种类黄酮的糖基化,比如在矮牵牛中 *UGT79B31* 特异性地调控花粉的类黄酮的糖基化^[23];在草莓中, *UGT71K3* 既可以参与花青苷的生物合成,还可以影响葡萄糖酰基间苯三酚(UDP-glucose: acylphloroglucinol)的含量^[24]。因此, *RsUFGT2* 在萝卜皮组织中的具体功能还需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 梁姗,蒋子川,杨霞,等. 高效液相色谱法测定胭脂萝卜中天竺葵素含量[J]. 广州化工, 2017, 45(7): 92-93.
- [2] SPRINGOB K, NAKAJIMA J I, YAMAZAKI M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. Natural product reports, 2003, 20(3): 288-303.
- [3] BOWLES D. A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochemical society transactions, 2002, 30(2): 301-306.
- [4] LIM E K, BALDAUF I, LI Y, et al. Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis* [J]. Glycobiology, 2003, 13(3): 139-145.
- [5] MDOLO L V, BLOUNT J W, ACHNINE L, et al. A functional genomics approach to (iso) flavonoid glycosylation in the model legume *Medicago truncatula* [J]. Plant molecular biology, 2007, 64(5): 499-518.
- [6] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, et al. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin [J]. Plant science, 2001, 160(3): 543-550.
- [7] PEPPI M C, WALKER M A, FIDELIBUS M W. Application of abscisic acid rapidly upregulated UFGT gene expression and improved color of grape berries [J]. VITIS, 2008, 47: 11-14.
- [8] HU C, GONG Y, JIN S, et al. Molecular analysis of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene from purple potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Molecular biology reports, 2011, 38(1): 561-567.
- [9] 招雪晴, 李勃, 苑兆和. 石榴 *PgUFGT* 基因克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(4): 646-653.
- [10] 赵志常, 张波, 高爱平, 等. 芒果 UFGT 基因的克隆及表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 31-34.
- [11] 孟富宣, 周军, 王大玮, 等. 云南特有火把梨 UFGT 基因片段的克隆与序列分析 [J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(1): 21-27.
- [12] LI X J, ZHANG J Q, WU Z C, et al. Functional characterization of a glucosyltransferase gene, *LcUFGT1*, involved in the formation of cyanidin glucoside in the pericarp of *Litchi chinensis*

- [J]. *Physiol plantarum*, 2016, 156(2): 139-149.
- [13] 张洪伟, 梁毅, 刘小义等. 洋葱 *UFGT* 基因的克隆和表达分析[J]. 核农学报, 2015, 29(9): 1677-1686.
- [14] WROLSTAD R E, CULBERTSON J D, CORNWELL C J, et al. Detection of adulteration in blackberry juice concentrates and wines[J]. *Journal-association of official analytical chemists*, 1982, 65(6): 1417-1423.
- [15] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON D N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular biology and evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [16] WEI Y Z, HU F C, HU G B, et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19455 [2018-10-26]. <https://www.taodocs.com/p-84045991.html>.
- [17] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [18] LIM S, SONG J, KIM D, et al. Activation of anthocyanin biosynthesis by expression of the radish R2R3-MYB transcription factor gene *RsMYB1*[J]. *Plant cell reports*, 2016, 35(3): 641-653.
- [19] PAQUETTE S, MÖLLER B L, BAK S. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(3): 399-413.
- [20] 韩振云, 宋婷婷, 田估, 等. 苹果属观赏海棠 *McUFGT* 的克隆及其在不同叶色品种间的表达差异分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 301-310.
- [21] SUN W, MENG X, LIANG L, et al. Overexpression of a *Freesia hybrida* flavonoid 3-O-glycosyltransferase gene, *Fh3GT1*, enhances transcription of key anthocyanin genes and accumulation of anthocyanin and flavonol in transgenic petunia (*Petunia hybrida*) [J]. *In vitro cellular & developmental biology*, 2017, 53(5): 478-488.
- [22] MORITA Y, ISHIGURO K, TANAKA Y, et al. Spontaneous mutations of the UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene confers pale- and dull-colored flowers in the Japanese and common morning glories[J]. *Planta*, 2015, 242(3): 575-587.
- [23] KNOCH E, SUGAWARA S, MORI T, et al. UGT79B31 is responsible for the final modification step of pollen-specific flavonoid biosynthesis in *Petunia hybrida* [J]. *Planta*, 2018, 247(4): 779-790.
- [24] SONG C, ZHAO S, HONG X, et al. A UDP-glucosyltransferase functions in both acylphloroglucinol glucoside and anthocyanin biosynthesis in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) [J]. *Plant journal*, 2016, 85(6): 730-742.

Cloning and expression of *RsUFGTs* in red radish

DU Lina WANG Qi WANG Chunlan SU Rui
TAN Chunyan PU Yan CHEN Fabo LAI Biao

*School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University,
Chongqing 408100, China*

Abstract To clarify the flavonoid glycosyltransferase gene (*RsUFGTs*) involved in the biosynthesis of anthocyanin in red radish, three candidate *RsUFGTs* genes were screened from the radish genome, and the open reading frames (ORFs) of three *RsUFGTs* were cloned and sequenced and expressed. Results showed that the ORF length of *RsUFGT1* and *RsUFGT2* was 1 383 bp and 1 374 bp, encoding 460 and 457 amino acids, respectively. However, *RsUFGT3* was mutated with early termination. Protein sequence alignment and phylogenetic tree analyses indicated that *RsUFGT1* and *RsUFGT2* both contain PSPG conserved domain and belong to the same UFGT class. The results of real-time quantitative PCR analysis showed that the expression of *RsUFGT1* in ‘Hongxin No.1’ was relatively high and no expression was detected in skin of ‘Mantanghong’ and in skin and flesh of ‘Chunbulao’. The expression of *RsUFGT1* was positively correlated with anthocyanins content in tissues of different radish cultivars. However, no obvious rules of *RsUFGT2* expression were detected. It is indicated that *RsUFGT1* may be one of the important structural genes of anthocyanin biosynthesis in red radish.

Keywords red radish; *RsUFGTs*; anthocyanins; gene cloning; gene expression

(责任编辑: 张志钰)