

牡丹查耳酮合酶基因 *Ps-CHS1* 的克隆及其组织特异性表达

周 琳, 王 雁*, 彭镇华

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘 要: 以牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 品种 ‘彩绘’ 为试材, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法从花瓣中获得了一个牡丹查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 基因 cDNA 全长, 命名为 *Ps-CHS1*, GenBank 登录号为 GQ483511。序列分析结果表明, *Ps-CHS1* 全长 1 475 bp, 包含 82 bp 的 5'非编码区、208 bp 的 3'非编码区和一个长度为 1 185 bp 编码 394 个氨基酸的开放阅读框。氨基酸序列分析显示该基因编码的蛋白具有 CHS 家族保守存在的所有功能活性位点和特征多肽序列。序列比对和系统进化分析表明, *Ps-CHS1* 与杨柳科、锦葵科、蔷薇科等植物的 CHS 亲缘关系较近, 相似性达 90%以上。相对荧光定量 PCR 分析表明, *Ps-CHS1* 在花瓣中的表达量最高, 其次是萼片, 再次是叶片和雄蕊, 在心皮中表达量最低。

关键词: 牡丹; 查耳酮合酶基因; 相对荧光定量 PCR; 组织特异性表达

中图分类号: S 685.11

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 08-1295-08

Isolation and Tissue-specific Expression of Chalcone Synthase Gene *Ps-CHS1* in Tree Peony

ZHOU Lin, WANG Yan*, and PENG Zhen-hua

(Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: In this work, a full-length cDNA sequence of chalcone synthase (CHS) gene was obtained from petals of *Paeonia suffruticosa* ‘Caihui’ using RT-PCR and RACE, named *Ps-CHS1* (GenBank accession No. GQ483511). Sequence analysis indicated that *Ps-CHS1* is 1 475 bp in full length and contains a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 82 bp, a 3'-UTR of 208 bp, and an opening reading frame (ORF) of 1 185 bp encoding a 394 predicted amino acids residues which possessed all the conserved active sites for the CHS function as well as the family signature. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *Ps-CHS1* shared more than 90% homology with CHS from plants in Salicaceae, Malvaceae and Rosaceae. Relative real-time PCR analysis indicated that *Ps-CHS1* showed the highest transcript abundance in petals, moderate levels in sepals, low levels in leaves and stamens and the lowest levels in carpels.

Key words: tree peony; *Paeonia suffruticosa*; chalcone synthase gene; relative real-time PCR; tissue-specific expression

收稿日期: 2010-03-13; 修回日期: 2010-07-15

基金项目: 国家 ‘863’ 项目 (2006AA100109); 国家林业局 ‘948’ 项目 (2006-4-C07)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangyan@caf.ac.cn)

花色是观赏植物最重要的质量指标之一, 培育具有新型花色的花卉新品种一直是观赏植物育种领域的研究热点 (Mol et al., 1999)。采用植物化学的分析方法, 黄金霞等 (2006) 发现类黄酮是大多数花色形成的决定性色素群。目前, 类黄酮生物合成途径已基本阐明, 相关酶和基因的研究也非常深入 (Springob et al., 2003; Tanaka et al., 2008)。

在类黄酮生物合成途径中, 查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 催化 1 分子的香豆酰 CoA 与 3 分子的丙二酰 CoA 缩合形成黄色的四羟基查耳酮。四羟基查耳酮为类黄酮类化合物提供了基本碳骨架, 是一个重要的中间产物。CHS 作为生物合成途径中的第一个限速酶和关键酶, 已从多种植物中分离、纯化, 相应的蛋白结构也已明确 (Ferrer et al., 1999)。CHS 是类黄酮合成途径中分离到的第 1 个基因, 最早由欧芹悬浮细胞中获得 (Kreuzaler et al., 1983)。此后, 豆科、十字花科、旋花科等多种植物的 CHS 相继被克隆 (Tanaka et al., 2008)。研究表明, CHS 几乎在所有植物中都以多基因家族存在 (Martin, 1993), 不同 CHS 成员组织发育和环境诱导的差异表达在牵牛 (Durbin et al., 2000)、葡萄 (Goto-Yamamoto et al., 2002)、蝴蝶兰 (Han et al., 2006) 等植物中都有报道。

牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 在我国经过长期栽培选育, 目前已形成红、粉、紫、白、黄、黑、绿、蓝、复色等 9 大色系 (李嘉珏, 2006)。研究发现, 牡丹的色素属于类黄酮类化合物, 主要有花青苷、黄酮和黄酮醇的苷类 (张晶晶 等, 2006)。尽管目前在色素化学水平上对牡丹花色色素的研究已十分充分, 但对其花色形成相关基因的分离仍未见报道。研究表明, CHS 在白色瓜叶菊 (胡可 等, 2009) 及黄色观赏向日葵 (张剑亮 等, 2009) 的花瓣中均不表达。本研究中选择红色系牡丹品种‘彩绘’为试材, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术分离克隆了一个牡丹 CHS 基因全长, 并对该基因的组织表达特异性进行了分析, 旨在为进一步研究牡丹 CHS 基因的功能, 探讨牡丹花色形成的分子机制提供理论依据和基础数据, 并为今后利用基因工程技术培育具有新型花色的牡丹新品种提供可操作基因。

1 材料与方法

1.1 材料

以红色系牡丹品种‘彩绘’ (*Paeonia suffruticosa* ‘Caihui’) 为试材, 于花蕾‘透色期’ (袁涛 等, 2004) 采收自中国林业科学院北京良乡基地, 1 h 内运回实验室。短暂复水后, 取下叶片, 并将花蕾用镊子剥开, 分别取萼片、花瓣、雄蕊和心皮, 锡箔纸包好后立即用液氮速冻, 存于 -80℃ 冰箱备用。

RNA 提取所用药品均购自北京拜尔迪生物公司, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、克隆载体 pGEM-T easy、大肠杆菌 TOP10 感受态细胞、质粒 DNA 提取试剂盒和 DNase 酶等购自天根生化科技 (北京) 有限公司, SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Cat. No. 634914) 为 Clontech 公司产品, 限制性内切酶和荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScriptTM RT-PCR Kit (Cat. No. DRR063A) 购自 TaKaRa 公司。

1.2 *Ps-CHS1* 基因 cDNA 全长的获得

牡丹花瓣的总 RNA 提取采用 CTAB 法 (孟丽 等, 2006)。根据 GenBank 中检索到的 CHS 保守氨基酸序列设计一对简并引物 CHS-F 和 CHS-R (表 1), 以 DNase 酶 (RNase free) 消化处理后的 RNA 反转录产物 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。凝胶回收与预期片段大小一致 (750 bp 左右) 的泳带, 连接克隆载体并转化感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及质粒酶切

鉴定阳性克隆后，委托北京奥科生物公司进行序列测定。

根据所得的 cDNA 中间序列，分别设计特异性引物 *Ps-CHS1* 3'GSP 和 *Ps-CHS1* 5'GSP (表 1)，按照 Race 试剂盒 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行 cDNA 末端快速扩增。扩增采用 Touchdown PCR 程序，凝胶回收、产物克隆及序列测定如上所述。

为获得牡丹 *CHS* 基因全长，根据由中间序列和末端序列拼接而得的 cDNA 全长序列，设计一对特异性引物 *Ps-CHS1* F 和 *Ps-CHS1* R (表 1)，以 DNase 酶 (RNase free) 消化处理后的花瓣总 RNA 反转录产物为模板进行 PCR 扩增。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 分析。利用在线软件 ProtParam (<http://www.expasy.org>) 预测所编码蛋白的分子量、理论等电点及保守结构域等。采用 DNAMAN 软件进行多序列比对及系统进化分析。

1.3 相对荧光定量 PCR 表达分析

分别提取‘彩绘’叶片、萼片、花瓣、雄蕊和心皮等器官的总 RNA，用 DNase 酶 (RNase free) 消化基因组 DNA 后，各取 1 μg 为模板，反转录合成 cDNA 第一链。根据 *Ps-CHS1* cDNA 全长序列，按照荧光定量 PCR 引物设计原则在 *Ps-CHS1* 的 3'非翻译区附近设计一对特异引物 P1 和 P2 (表 1)，获得的扩增片段为 270 bp。以牡丹 β-微管蛋白基因 *beta-Tubulin* (GenBank accession number EF608942) 为内参，设计其特异引物 *Tub-F* 和 *Tub-R* (表 1)，获得的扩增片段为 182 bp，进行相对荧光定量分析。同时，设计牡丹 18S rRNA (GenBank accession number U42792) 的一对特异引物 18S-F 和 18S-R (表 1)，以获得的 114 bp 的扩增片段为内参照，对上述表达分析结果进行验证。

反应在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪上进行，方法参照《美国应用生物系统公司 7300/7500 实时定量 PCR 仪相对定量实验入门指南》和荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa) 说明书。反转录的反应体系为：总 RNA 2 μL (1 μg)，5 × PrimeScriptTM Buffer 4 μL，PrimeScriptTM RT Enzyme Mix 1 μL，Random primer (100 μmol · L⁻¹) 和 Oligo dT primer (50 μmol · L⁻¹) 各 1 μL，加水 (RNase free) 补足 20 μL。荧光定量 PCR 扩增的反应体系为：cDNA 模板 2 μL，2 × SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL，特异引物 (10 μmol · L⁻¹) 0.4 μL，50 × ROX Reference Dye 0.4 μL，用水补足 20 μL。采用两步法标准程序：95 预变性 30 s，95 变性 5 s，60 复性 34 s，共 40 个循环。

每个试验设 3 次重复，利用 ABI 7500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件 (2^{-ΔΔCt} 法) (Livak & Schmittgen, 2001) 和 Excel 软件进行数据分析。

表 1 牡丹 *Ps-CHS1* 基因克隆及表达分析所用引物
Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *Ps-CHS1* in tree peony

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	作用 Function
<i>CHS</i> -F	5'-CA(A/G)CCCAAGTCCAA(A/G)AT(C/T)ACCC-3'	扩增保守片段
<i>CHS</i> -R	5'-(A/T)CCCCACTC(A/C/G)AG(C/T/G)CCTTC(A/T)CC-3'	For the conserved fragment
<i>Ps-CHS1</i> 3'GSP	5'-GGAAGAGGTCACCTTGAGGAAGGAAAGGC-3'	3'RACE
<i>Ps-CHS1</i> 5'GSP	5'-CACCGGAGGTGGTACAGAAAACAAGGTG-3'	5'RACE
<i>Ps-CHS1</i> F	5'-ATGGCTTCGGTTGAAGAAATTAG-3'	扩增 cDNA 全长
<i>Ps-CHS1</i> R	5'-TCACTCACTGATTGTAATTGCAGG-3'	For the full cDNA
P1	5'-AGCAGAGAACAACAAAGGGTCACG-3'	检测 <i>Ps-CHS1</i> 的表达
P2	5'-TCAGCACCGACAATAACCGCAG-3'	For the expression of <i>Ps-CHS1</i>
<i>Tub</i> -F	5'-TGAGCACCAAGAAGTGGACGAAC-3'	扩增内标
<i>Tub</i> -R	5'-CACACGCCTGAACATCTCCTGAA-3'	For the internal control
18S-F	5'-AACCATAAACGATGCCGACCAGG-3'	扩增内标
18S-R	5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTCCC-3'	For the internal control

2 结果与分析

2.1 牡丹 *Ps-CHS1* cDNA 全长的获得及序列分析

根据 CHS 蛋白氨基酸保守序列, 设计简并引物 (表 1), 以 ‘透色期’ 牡丹花瓣的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增及序列测定, 获得一个长为 751 bp 的 cDNA 片段 (图 1, A)。BlastP 分析发现, 该片段编码的氨基酸序列与多种植物的 CHS 蛋白高度同源, 其中与葡萄 CHS (GenBank accession number BAA31259) 同源性最高, 达 93%。

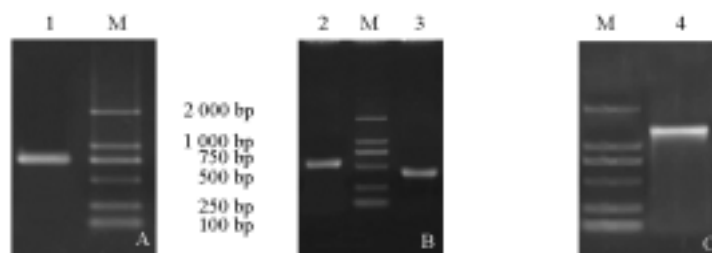


图 1 牡丹 *Ps-CHS1* 基因的 PCR 扩增电泳图

M: DNA 标准分子量 DL2000; 1: *Ps-CHS1* 特异片段扩增产物; 2: 5' RACE 扩增产物;
3: 3' RACE 扩增产物; 4: *Ps-CHS1* cDNA 全长扩增产物。

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis analysis of *Ps-CHS1* gene fragments in tree peony

M: DNA marker DL2000; 1: Amplification product of *Ps-CHS1* gene fragment; 2: Amplification product of 5' RACE;
3: Amplification product of 3' RACE; 4: Amplification product of *Ps-CHS1* full-length cDNA.

根据所得的中间片段设计末端扩增的特异引物 *Ps-CHS1* 3'GSP 和 *Ps-CHS1* 5'GSP (表 1), 经 RACE-PCR 扩增和产物克隆、测序后, 分别得到长度为 485 bp 的 5'末端和 345 bp 的 3'末端 (图 1, B)。将 RT-PCR 和 RACE-PCR 的扩增片段进行序列拼接, 并将其与全长扩增引物 (表 1) 所得的序列 (图 1, C) 进行比较, 最终获得一条长度为 1 475 bp 的 cDNA 全长序列。Blast 比对发现, 该 cDNA 序列与 *CHS* 基因同源, 命名为 *Ps-CHS1*, GenBank 登录号为 GQ483511。

利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现, *Ps-CHS1* 包含一个长度为 1 185 bp 的开放读码框 (open reading frame, ORF) 和一个 poly (A) 尾巴, 5'非翻译区长 82 bp, 3'非翻译区长 208 bp。其 ORF 编码一个含 394 个氨基酸的蛋白质, ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测所编码蛋白的分子量为 43.3 kD, 理论等电点 (pI) 为 6.19。

利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域分析表明, *Ps-CHS1* 编码的蛋白含有其他 CHS 蛋白普遍具有的两个保守域, 即 cd00831 (CHS_like, Chalcone and stilbene synthases, type III plant-specific polyketide synthases, 型聚酮合成酶) 和 COG3424 (BcsA, Predicted naringenin-chalcone synthase, 查耳酮合成酶)。进一步的功能位点分析发现, *Ps-CHS1* 含有多个查耳酮合酶起功能作用所必需的活性位点, 其中包括 7 个袋状环化位点, 即 Thr (T) \ Met (M) \ 两个 Phe (F) \ Ile (I) \ Gly (G) 和 Pro (P) (分别位于第 132、137、215、265、254、256、375 处), 3 个三联催化位点 Cys (C) \ His (H) 和 Asn (N) (第 164、303、336 处), 5 个袋状香豆酰结合位点 Ser (S) (第 133、338 处) \ Glu (E) (第 192 处) \ T194、T197 以及 CoA 结合位点 Lys (K) (第 55、62 处) 和 Arg (R) (第 58 处) (Schröder et al., 1998; Ferrer et al., 1999)。这些位点在所有 CHS 中都高度保守, 且各位点的相对位置保持不变。另外, 利用 prosite 软件分析表明, *Ps-CHS1* 还具有查耳酮合酶家族的特征多肽序列: RLMMYQQGCFAGGTVLR 和 GVLFGFGPGL (Lanz et al., 1991; Ferrer et al., 1999; Kim

et al., 2002)(图 2)。

```

1  ACATGGGATTATCAATCACCAGTTAAACAACAATCTTCAGTCTTCCACCATAAAGTCAAGTGTAAACCGAGCCC
73  AGACACACAAATGGCTTCGGTTGAAGAAATTAGAAATGCCAACGTGCTCAAGGTCCAGCCACCATTCTAGC
25  M A S V E E I R N A Q R A Q G P A T I L A
145 CATAGGCACAGCCACCCAGCTCATTATCAACCAGGCTGAGTATCCTGATTACTACTTTTCGTATCACAAA
49  I G T A T P A H F I N Q A E Y P D Y Y F R I T N
217 CAGTGAGCACAAAACAGAGTTAAAAAGAAAATTCAAGCGCATGTGTGATAAATCCATGATAAACAAACGCTA
73  S E H K T E L K E K F K R M C D K S M I N K R Y
289 TATGTACCTGACCGAAGAGATTCTCAAGGAAAATCCAAAGATGTGTGAATACATGGCACCATCTCTGGATGC
97  M Y L T E E I L K E N P K M C E Y M A P S L D A
361 ACGTCAAGACATGGTGGTTGTGCAAAATACCAAAGCTTGAAAAGAAGCAGCAACAAAGGCTATTAAAGAATG
121 R Q D M V V V E I P K L G K E A A T K A I K E W
433 GGGCCAACCCAAATCAAAATCACCCACCTTGTCTTTCTGTACCACCTCCGGTGTAGACATGCCCGCGCCGA
145 G Q P K S K I T H L V F C T F S* G V D M P G A D
505 CTACCAACTCACAAACTCCTCGGCCTCCGTCCCTCCGTAAAGAGACTCATGATGTACCAGCAAGGTTGCTT
169 Y C Q L T K L G L G L R P S V K R L M M Y Q Q G C F
577 CGCGGCGGGAGCTTCTCCGTTTGCCCAAGGATTTAGCAGAGAACAACAAGGGTCACGAGTTCTAGTCGT
193 A G G T V L R L A K D L A E N N K G S R V L V V
649 TTGCTCTGAGATCACGGCGGTGACATTTCTGTTGACCTTCGGATACTCATTTGGATTCTTTAGTCGGTCAGGC
217 C S E* I T* A V T* F R G P S D T H L D S L V G Q A
721 GCTTTTGGTGACGGTGCGGCTGCGGTTATTGTCGGTGTGATCCTGATGTCAAAATAGAGCGGTCATTGTT
241 L F G D G A A A V I V G A D P D V K I E R P L F
793 TCAAATTTGTGTCTGCCGGGCAGACAATTCTCCGGAAGTCCGACGGTGCATTGATGGACACTTGCCTGAAGT
265 Q I V S A G Q T I L P D S D G A L D G H L R E V
865 CGGTCTCATTCTTCTAATAAGATGTTCCGCTTGATTTCTAAGAACATTGAAAAAGTTTGGTTGA
289 G L T F H L L K D V P G L I S K N I E K S L V E
937 AGCTTTTAAGCCTATTGGTATAAACGACTGGAAGTTCGATATTCTGGATTGCTCATCCGGGTGGCCAGCGAT
313 A F K P I G I N D W N S I F W I A H P G G P A I
1009 TCTTGACCAAGTTGAGTTAAACTCGGATTGAAAGAGGAGAGCTCAAGAATACTAGGATGTTTGTAGTGA
337 L D Q V E L K L G L K E E K L K N T R H V L S E
1081 GTACGGGAATATGTCAAGCGCTTGTGTGCTATTTATATTAGATGAGACGAGGAAGAGGTCACCTTGAGGAAGG
361 Y G N M S* S A C V L F I L D E T R K R S L E E G
1153 AAAGGCCACCACTGTAAGGCTTGGATTGGGCTTCTCTCGGGTTTGGACCGGGTTAACTGTTGAGAC
385 K A T T G E G L D W G V L F G F G D G L T V E T
1225 CGTTGTGTTGCACAGCGTTCCTGCAATTACAATCAGTGAGTGACTCGACCGCTTGGCGAAATGGAATAAAAA
409 V V L H S V P A I T I S E
1297 TACAACAATCGGTGTCCGCGTTTATTTTGTGTTTTCGTTATGGTGATAAAAGGTTTTCAATAATGACAGCAT
1369 TTGATCATTTAATTAATTACATGTACTTATGTTAGAGAATTATGGGAATAAATGAAAGATCCAATTTCTGTT
1441 CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 *Ps-CHS1* 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

ATG 为起始密码子; TGA 为终止密码子。方框处为 7 个袋状环化位点 T132, M137, F215, I254, G256, F265 和 P375; 阴影处为 3 个三联催化位点 C164, H303 和 N336; 星号处表示 5 个袋状香豆酰结合位点 S133, E192, T194, T197 和 S338。

双下划线处为查耳酮酶家族的特征多肽序列 (RLMMYQQGCFAGGTVLR 和 GVLFGFGPGL)。

CoA 结合位点 K55, R58 和 K62 用斜体加粗体表示。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the complete cDNA of *Ps-CHS1*

Start and stop codons are underlined. The seven amino acid residues of the cyclization pocket, including the sites of T132, M137, F215, I254, G256, F265 and P375 are framed; The catalytic triad sites C164, H303 and N336 are shaded; While * denote the residues of coumaroyl pocket, including S133, E192, T194, T197 and S338. The family signatures of chalcone synthase (RLMMYQQGCFAGGTVLR and GVLFGFGPGL) are double-underlined.

The CoA binding active sites such as K55, R58 and K62 are italic and bold.

2.2 *Ps-CHS1* 编码氨基酸的同源性分析

为对牡丹 *Ps-CHS1* 与其他物种 CHS 进行同源性分析, 利用 DNAMAN 软件对包括 *Ps-CHS1* 在内的 14 个物种的 CHS 蛋白氨基酸序列进行了多重比对。结果发现, 牡丹 *Ps-CHS1* 与已知其他植物的 CHS 蛋白氨基酸序列有很高的同源性, 其中与杨柳科、蔷薇科、锦葵科等植物的亲缘关系较近, 相似性达 90% 以上; 与菊花 (ABF69124) 相似性相对较低, 为 85%。

在多重比对的基础上, 为进一步了解 *Ps-CHS1* 与其它植物 CHS 之间的进化关系, 用上述 14 个 CHS 的氨基酸序列构建了系统进化树, 结果 (图 3) 表明, *Ps-CHS1* 的进化基本符合植物分类学分类, 并具有明显的种属特性, 如同属蔷薇科的苹果 (AAX16492) 梨 (AAX16494) 月季 (BAC66467)

和草莓 (BAC66467) 等组成一个分支, 锦葵科的黄秋葵 (ACE60221) 和棉花 (ABS52573) 以及杨柳科的银白杨 (ABD24222) 和毛果杨 (XP_002303821) 分别组成各自的分支。同时, 还可以看出, 牡丹与杨柳科和锦葵科植物的亲缘关系较之与蔷薇科植物更近, 而与双子叶植物中较为进化的菊花 (ABF69124) 分别位于 2 个聚类簇中, 亲缘关系较远。

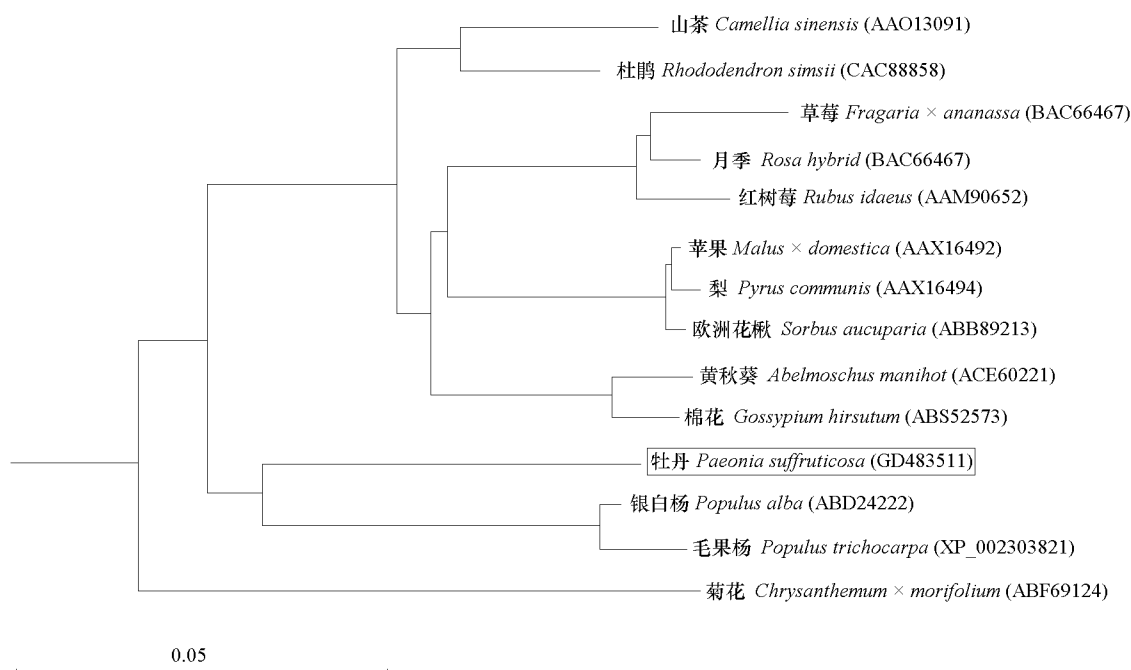


图 3 牡丹 Ps-CHS1 与其它物种 CHS 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 A phylogenetic tree of the Ps-CHS1 in tree peony and CHS proteins from other species

2.3 *Ps-CHS1* 的组织特异性表达

分别以牡丹 18S rRNA 和 β -Tubulin 基因为内参照, 采用荧光定量 PCR 的方法对牡丹不同组织中 *Ps-CHS1* 的表达进行了检测, 结果 (图 4) 表明, *Ps-CHS1* 在花瓣中的表达量最高, 其次为萼片, 再次为叶片和雄蕊, 心皮中最低。从相对表达量上来看, 花瓣中的表达水平几乎为萼片中的 5 倍, 叶片和雄蕊中的表达量相当, 但仅为花瓣中的 1/60 ~ 1/40, 而最低的心皮中表达量还不到花瓣中的 1/250。

因此, 尽管在各组织中均检测到了 *Ps-CHS1* 的转录本, 但表达量的悬殊差异说明其表达具有一定的组织特异性。

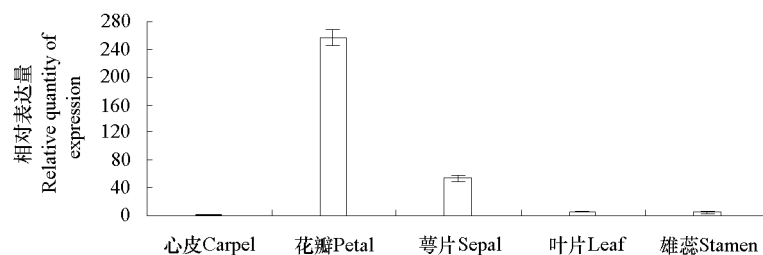


图 4 不同组织中 *Ps-CHS1* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative quantity of *Ps-CHS1* expression in different tissues

3 讨论

本研究中通过 RT-PCR 和 RACE 方法从牡丹花瓣中成功分离出 *CHS* 的同源基因 *Ps-CHS1*, 该基因编码的蛋白质具有 *CHS* 家族保守存在的所有功能位点和特征多肽序列(Lanz et al. ,1991 ;Schröder et al. , 1998 ; Ferrer et al. , 1999 ; Kim et al. , 2002)。基因序列同源性分析发现, *CHS* 编码区保守性很强, 不同科植物间核苷酸水平上的同源性超过 60%, 氨基酸水平上的同源性达 80%, 可以用于研究植物进化(王金玲和顾红雅, 2000)。本研究以包括 *Ps-CHS1* 在内的 14 个物种的 *CHS* 蛋白氨基酸序列构建了系统进化树, 结果发现, *Ps-CHS1* 的进化具有明显的种属特性, 且牡丹与杨柳科、锦葵科和蔷薇科植物的同源关系较近, 与双子叶植物中较为进化的菊花亲缘关系较远(图 3), 这与牡丹组较为原始的系统分类地位有关。

Noda 等(2004)采用 Northern blot 方法对 *CHS* 在洋桔梗花瓣、萼片、雌蕊、雄蕊、叶片和茎中的表达差异进行分析发现, *CHS* 仅在花瓣和萼片中大量表达, 在其他组织中表达量很低或没有表达。Mudalige 等(2005)发现, 除假鳞茎外, 在石斛兰根、叶、花和花蕾中都能检测到 *CHS* 的转录本。Jiang 和 Cao (2008)报道, 白菜 *BcCHS* 基因在叶、茎、萼片和雌蕊中均不表达, 仅在花瓣和花药中特异表达。本试验通过相对荧光定量 PCR 的方法对 *Ps-CHS1* 在牡丹不同组织中的表达情况进行分析发现, *Ps-CHS1* 在花瓣、萼片、叶片、雄蕊和心皮中均有表达, 但表达水平有明显差异, 其中在花色素大量积累的花瓣中表达量最高, 为表达量最低的心皮中的 250 多倍(图 4)。这与洋桔梗中的研究结果(Noda et al. , 2004)相似, 说明 *Ps-CHS1* 的表达与花青素的合成有关, 并具有一定的组织特异性, 推测 *Ps-CHS1* 可能在转录水平上对牡丹花色的形成起调控作用。

CHS 是类黄酮代谢途径中的第一个关键限制因子。目前, 通过利用正抑制、反义抑制或 RNAi 等方法抑制 *CHS* 的表达使花色素苷的合成和积累减少, 从而获得花色变浅或开白花的转基因植株的例子在矮牵牛(van der Krol et al. , 1988)、非洲菊、菊花、月季、香石竹和龙胆等植物中都有报道(Tanaka et al. , 2005 ; Nishihara et al. , 2006 ; Nakatsuka et al. , 2008)。本试验成功分离了牡丹 *Ps-CHS1* 基因, 并对其组织表达特异性进行了分析, 为进一步研究 *Ps-CHS1* 的功能及其在牡丹不同花色形成中的作用及调控机制奠定了基础。

References

- Durbin M L , McCaig B , Clegg M T. 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol Biol* , 42 : 79 – 92.
- Ferrer J L , Jez J M , Bowman M E , Dixon R A , Noel J P. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* , 6 : 775 – 784.
- Goto-Yamamoto N , Wan G H , Masaki K , Kobayashi S. 2002. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*) . *Plant Science* , 162 : 867 – 872.
- Han Y Y , Ming F , Wang J W , Wen J G , Ye M M , Shen D L. 2006. Cloning and characterization of a novel chalcone synthase gene from *Phalaenopsis hybrida* orchid flowers. *Russian Journal of Plant physiology* , 53 (2) : 223 – 230.
- 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 .
- Huang Jin-xia , Wang Liang-sheng , Li Xiao-mei , Lu Ying-qing. 2006. Advances in molecular basis and evolution of floral color variation. *Chinese Bulletin of Botany* , 23 (4) : 321 – 333. (in Chinese)
- 黄金霞, 王亮生, 李晓梅, 鲁迎青. 2006. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展. *植物学通报* , 23 (4) : 321 – 333 .
- Jiang M , Cao J S. 2008. Sequence variation of chalcone synthase gene in a spontaneous white-flower mutant of Chinese cabbage-pak-choi. *Mol Biol*

- Rep, 35 : 507 – 512.
- Kim S H , Mizuno K , Fujimura T. 2002. Regulated expression of ADP glucose pyrophosphorylase and chalcone synthases during root development in sweet potato. *Plant Growth Regul* , 38 : 173 – 179.
- Kreuzaler F , Ragg H , Fautz E , Kuhn D N , Hahlbrock K. 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 80 : 2591 – 2593.
- Lanz T , Tropf S , Marner F J , Schroeder J , Schroeder G. 1991. The role of cysteines in polyketide synthases. *J Biol Chem* , 266 (15) : 9971 – 9976.
- Li Jia-jue. 2006. Chinese tree peony , Xibei , Xinan , Jiangnan volume. Beijing : China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 李嘉珏 . 2006 . 中国牡丹品种图志 . 西北 · 西南 · 江南卷 . 北京 : 中国林业出版社 .
- Livak K J , Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* , 25 : 402 – 408.
- Martin C R. 1993. Structure , function and regulation of the chalcone synthase . *Int Rev Cytol* , 147 : 233 – 284.
- Meng Li , Zhou Lin , Zhang Ming-shu , Dai Si-lan. 2006. An efficient and economic method for preparation total RNA of petals. *Biotechnology* , 16 (1) : 38 – 40. (in Chinese)
- 孟 丽 , 周 琳 , 张明珠 , 戴思兰 . 2006 . 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法 . *生物技术* , 16 (1) : 38 – 40 .
- Mol J , Cornish E , Mason J , Koes R. 1999. Novel coloured flowers. *Curr Opin Biotechnol* , 10 : 198 – 201.
- Mudalige R G , Champagne M M , David H , Kuehnle A R. 2005. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid. *J Amer Soc Hort Sci* , 130 (4) : 611 – 618.
- Nakatsuka T , Mishiba K , Abe Y , Kubota A , Kakizaki Y , Yamamura S , Nishihara M. 2008. Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol* , 25 : 61 – 68.
- Nishihara M , Nakatsuka T , Hosokawa K , Yokoi T , Abe Y , Mishiba K , Yamamura S. 2006. Dominant inheritance of white-flowered and herbicide-resistant traits in transgenic gentian plants. *Plant Biotechnol* , 23 : 25 – 31.
- Noda N , Kanno Y , Kato N , Kazuma K , Suzuki M. 2004. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) . *Physiol Plantarum* , 122 (2) : 305 – 313.
- Schröder J , Raiber S , Berger T , Schmidt A , Schmidt J , Soares-Sello A M , Bardshiri E , Strack D , Simpson T J , Veit M , Schröder G. 1998. Plant polyketide synthases : A chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry* , 37 (23) : 8417 – 8425.
- Springob K , Nakajima J , Yamazaki M , Saito K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* , 20 : 288 – 303.
- Tanaka Y , Katsumoto Y , Brugliera F , Mason J. 2005. Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell , Tiss Org* , 80 : 1 – 24.
- Tanaka Y , Sasaki N , Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments : Anthocyanins , betalains and carotenoids. *Plant J* , 54 : 733 – 749.
- van der Krol A R , Lenting P E , Veenstra J , van der Meer I M , Koes R E , Gerats A G M , Mol J M , Stuitje A R. 1988. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* , 333 : 860 – 869.
- Wang Jin-ling , Gu Hong-ya. 2000. Present research status of *CHS* gene molecular evolution//Li Cheng-sen. *Advances in plant sciences*(III) Beijing : Higher Education Press , Springer Press : 17 – 24. (in Chinese)
- 王金玲 , 顾红雅 . 2000 . *CHS* 基因的分子进化研究现状//李承森 . 植物科学进展 : 第三卷 . 北京 : 高等教育出版社 , 施普林格出版社 : 17 – 24 .
- Yuan Tao , Zhao Xiao-zhi , Li Feng-gang , Zhao Wei. 2004. Tree peony. Beijing : China Forestry Publishing House : 127 – 132. (in Chinese)
- 袁 涛 , 赵孝之 , 李丰刚 , 赵 卫 . 2004 . 牡丹 . 北京 : 中国林业出版社 : 127 – 132 .
- Zhang Jian-liang , Pan Da-ren , Zhou Yi-fei , Wang Zhan-cheng , Hua Shu-mei , Hou Li-li , Sui Fen-fen. 2009. Cloning and expression of genes involved in anthocyanins synthesis in ornamental sunflower. *Acta Horticulturae Sinica* , 36 (1) : 73 – 80. (in Chinese)
- 张剑亮 , 潘大仁 , 周以飞 , 王占成 , 华树妹 , 侯黎丽 , 随粉粉 . 2009 . 观赏向日葵花青素苷合成途径同源基因的克隆与表达 . *园艺学报* , 36 (1) : 73 – 80 .
- Zhang Jing-jing , Wang Liang-sheng , Liu Zheng-an , Li Chong-hui. 2006. Recent advances in flower color research of tree peony. *Acta Horticulturae Sinica* , 33 (6) : 1383 – 1388. (in Chinese)
- 张晶晶 , 王亮生 , 刘政安 , 李崇晖 . 2006 . 牡丹花色研究进展 . *园艺学报* , 33 (6) : 1383 – 1388 .