园 艺 学 报 2013，40（2）：373－379
Acta Horticulturae Sinica
http: // www. ahs. ac. cn
E-mail: yuanyixuebao@126.com

鹤望兰八氢番茄红素脱氢酶基因 *SrPDS* 的克隆及表达分析

黄敏玲*，樊荣辉

（福建省农业科学院作物研究所，福建省农业科学院花卉研究中心，福建省特色花卉工程技术研究中心，福州 350013）

摘 要：采用RT-PCR和RACE方法从鹤望兰黄色花萼中克隆到类胡萝卜素合成途径关键基因*SrPDS*，该 cDNA 全长 2 069 bp，具有完整的开放阅读框（ORF），共 1 746 个碱基，编码 581 个氨基酸。氨基酸同源性分析表明，*SrPDS* 推导的氨基酸序列与已报道的其他植物的 PDS 蛋白具有很高的同源性。系统进化树分析显示，鹤望兰 SrPDS 与番红花首先聚为一类，其次与百合、水仙 PDS 蛋白亲缘关系较近。应用半定量 PCR 分析表明，*SrPDS* 在黄色花萼和叶片中高表达，在蓝色花瓣和根中低表达；且在花发育的始花期表达量最高，表明该基因在黄色花萼发育过程中起着重要作用。

关键词：鹤望兰；八氢番茄红素脱氢酶；类胡萝卜素生物合成；基因克隆

中图分类号：S 682.31 **文献标志码**：A **文章编号**：0513-353X（2013）02-0373-07

Cloning and Expression Analysis of Phytoene Desaturase in *Strelitzia reginae* Banks

HUANG Min-ling* and FAN Rong-hui

（*Institute of Crop Sciences*，*Fujian Academy of Agricultural Sciences*，*Flowers Research Center*，*Fujian Academy of Agricultural Sciences*，*Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture*，*Fuzhou* 350013，*China*）

Abstract：The *SrPDS* gene cDNA sequence involved in carotenoids synthesis was cloned from the yellow sepals of *Strelitzia reginae* Banks using RT-PCR and RACE techniques. The cDNA sequence consists of 2 069 bp with an intact open reading frame of 1 746 bp，encoding a polypeptide of 581 amino acids. Homology analysis showed that the deduced SrPDS protein was highly homologous to other PDS proteins from different plants. Phylogenetic analysis indicated that *SrPDS* was clustered together with PDS of *Crocus sativus* firstly and was more related to PDS of *Narcissus tazetta* and *Lilium hybrid* division. The semi-quantitative PCR analysis indicated that *SrPDS* showed the highest transcript abundance in early flowering season and *SrPDS* was highly expressed in leaves and yellow sepals，but lowly expressed in blue petals and root. The results indicated that *SrPDS* played an important role in the growth of yellow sepals.

Key words：*Strelitzia reginae* Banks；phytoene desaturase；carotenoids synthesis；gene cloning

收稿日期：2012－09－29；**修回日期**：2013－01－09

基金项目：福建省科技重大专项项目（2010NZ0003）；福建省农业科学院科技创新团队重点科研项目（CXTD2011-20）；福建省农业科学院青年人才创新基金项目（2011QC-15）

* E-mail：pudang12@yahoo.com.cn

鹤望兰（*Strelitzia reginae*）又称天堂鸟，为旅人蕉科鹤望兰属多年生观赏植物，原产南非，现世界各地广为引种栽培。因其叶色青翠，花色艳丽，姿态奇特，花期长久，成为名贵的观赏花卉。目前鹤望兰栽培品种的花色比较单一，仅有黄色花萼蓝色花瓣的几个品种。培育新型花色的花卉新品种一直是观赏植物育种研究的热点（Mol et al.，1999）。类胡萝卜素（careteniod）可以使花呈亮黄色、橙色或红色（王玉萍 等，2006；Ohmiya，2011），研究表明，水仙、文心兰、百合、鸢尾等花卉的橙黄色花主要由类胡萝卜素生物合成途径控制（Valadon & Mummery，1968；Ootani & Hayashi，1982；Chiou et al.，2010；Yamagishi et al.，2010）。八氢番茄红素脱氢酶（PDS）是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一。该酶催化八氢番茄红素脱氢生成 9, 9'－二顺式－ζ－胡萝卜素，再经由ζ－胡萝卜素脱氢酶（ZDS）和类胡萝卜素异构酶（CRTISO）生成番茄红素，进而合成其它下游类胡萝卜素（朱长甫 等，2004）。在黄花龙胆、金盏菊等以类胡萝卜素为主要色素的植物中，PDS 基因的表达增强与花中类胡萝卜素含量呈正相关（Sun et al.，1998）。该基因与八氢番茄红素合酶（PSY）基因、ζ－胡萝卜素脱氢酶（ZDS）基因等协调作用，在转录水平上调节花中类胡萝卜素的积累（Kato et al.，2004）。Tinoi 等（2006）报道，与鹤望兰同属于姜目的美人蕉的黄色花中主要色素为类胡萝卜素，但在鹤望兰中未见相关报道。本研究中首次克隆了 *SrPDS* 基因全长，并利用 RT-PCR 对 *SrPDS* 的组织表达特异性及在花发育过程中的表达进行了分析，旨在为进一步研究鹤望兰 *SrPDS* 调控功能奠定基础，对揭示 *SrPDS* 基因在鹤望兰类胡萝卜素合成及花色形成中的作用具有重要理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建省农业科学院花卉研究中心种质资源圃栽培的鹤望兰（*Strelitzia reginae* Banks）品种为供试材料。取始花期黄色花萼，立即用液氮冷冻并在－80 ℃保存，用于基因克隆；取始花期蓝色花瓣，立即用液氮冷冻并在－80 ℃保存，用于基因鉴定；取叶片、黄色花萼、蓝色花瓣，茎、根液氮冷冻，－80 ℃保存，用于不同组织的表达分析；取花蕾始期、花蕾中期、始花期、盛花期的整朵花，迅速投入液氮中速冻后放入－80 ℃冰箱保存，用于花发育过程的表达分析。

大肠杆菌菌株 DH5α 由本实验室保存。RNA 提取所用试剂、M-MLV 反转录酶、pMD19-T vector 和 DNA 回收试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司。SMART^{TM} RACE cDNA Amplification Kit 为 Clontech 公司产品。引物合成及测序工作由上海生工生物工程服务有限公司完成。

1.2 *SrPDS* 全长 cDNA 的获得

黄色花萼总 RNA 的提取采用 Trizol 法。根据 GenBank 中检索到的 PDS 保守氨基酸序列设计一对简并引物 PDS-F 和 PDS-R（表 1），以 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 5 min；94 ℃变性 30 s，53 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 40 s，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。凝胶回收与预期片段大小一致（700 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 PCR 扩增鉴定阳性克隆后，进行测序。

根据所得的 cDNA 中间序列，分别设计特异性引物 PDS-3′GSP2 和 PDS-5′GSP1（表 1），按照 Race 试剂盒 SMART^{TM} 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。

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 SrPDS-F 和

SrPDS-R（表 1），验证已获得的序列。

提取蓝色花瓣总 RNA，以 SrPDS-F 和 SrPDS-R 为引物，验证其序列是否与黄色花萼中相同。

1.3　生物信息学分析

用 BLAST 对克隆序列进行同源检索后，确认为花色相关基因的同源序列；用 ORF finder 寻找最大开放阅读框（ORF）；用 BioXM 对克隆序列进行氨基酸组成、等电点分析；通过软件 DNAman 和 Bioedit 进行氨基酸序列比对；利用 MEGA4.0 软件进行系统进化树的构建。

1.4　半定量 PCR 检测基因的表达

通过半定量 PCR 检测 *SrPDS* 基因在花萼、花瓣、叶片、花蕾始期，花蕾中期，始花期，盛花期的特异性表达。根据 *SrPDS* 全长序列，按照半定量 PCR 设计原则设计一对特异引物 P1 和 P2（表 1），获得的扩增片段为 251 bp。以鹤望兰 18S rRNA（GenBank accession number：AF069229.1）为内参，设计其特异引物 18S-F 和 18S-R（表 1），获得的扩增片段为 250 bp，进行半定量 PCR 分析。

PCR 的扩增条件为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，53 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共 29 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1　鹤望兰 *SrPDS* 基因克隆及表达分析所用引物

Table 1　Primers used to isolate and analyze the expression of *SrPDS* gene in *strelitzia reginae* Banks

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	作用 Function
PDS-F	5′-ATGCC(A/T)AACAA(G/A)CCAGGAG-3′	扩增保守片段
PDS-R	5′-TCAGTTT(C/T)CT(A/G)TCAAACCATA-3′	For the conserved fragment
PDS-3′GSP2	5′-AACCCCGATGGAACCGTGAAACACTT-3′	3′RACE
PDS-5′GSP1	5′-AAGTGTTTCACGGTTCCATCGGGGTT-3′	5′RACE
SrPDS-F	5′-CTCTCACCCTCTCCCAATCTCG-3′	扩增 cDNA 全长
SrPDS-R	5′-GGTAATGGAGACTGAATCATCA-3′	For the full cDNA
P1	5′-TTTTCATTGCCATGTCCAAG-3′	检测 *SrPDS* 的表达
P2	5′-AAAGTGTTTCACGGTTCCAT-3′	For the expression of *SrPDS*
18S-F	5′-CTGAGAAACGGCTACCACAT-3′	扩增内标
18S-R	5′-ACCCAAGGTCCAACTACGAG-3′	For the internal control

2　结果与分析

2.1　*SrPDS* 全长 cDNA 克隆及序列分析

利用一对简并引物 PDS-F 和 PDS-R（表 1），以鹤望兰黄色花萼总 RNA 逆转录的 cDNA 第 1 条链为模板，PCR 扩增获得一个长为 670 bp 的 cDNA 片段（图 1，A）。经 BLAST 分析，该片段编码的氨基酸序列与多种植物的 PDS 蛋白高度同源，其中与水仙 PDS（AFH53812）同源性最高，达 91%。认为所获得的序列是鹤望兰 PDS 的保守序列。

利用 3′RACE 和 5′RACE 的特异性引物 PDS-3′GSP2 和 PDS-5′GSP1，经 RACE-PCR 扩增和产物克隆、测序后，分别得到长度为 823 bp 的 3′末端和 1 272 bp 的 5′末端（图 1，B），与中间序列分别有 202 bp 和 494 bp 的重叠区段，经 BLAST 检索认为它是鹤望兰 *PDS* 的 3′端和 5′端序列。

将上述 3 段序列根据重叠区域进行拼接得到 *SrPDS* 基因全长，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 2 069 bp 的 cDNA 全长序列。该基因具有

完整的开放阅读框（第 194 ~ 1 939 个碱基），共 1 746 个碱基，编码 581 个氨基酸，编码产物的分子量为 65.06 kD，理论等电点为 8.28。含有 193 bp 的 5′非编码区和 130 bp 的 3′非编码区。该 cDNA 序列已登录 GenBank，登录号为：JX117875。

以鹤望兰蓝色花瓣总 RNA 逆转录的 cDNA 第 1 条链为模板，以全长引物进行扩增，所得 cDNA 全长序列与黄色花萼相同。

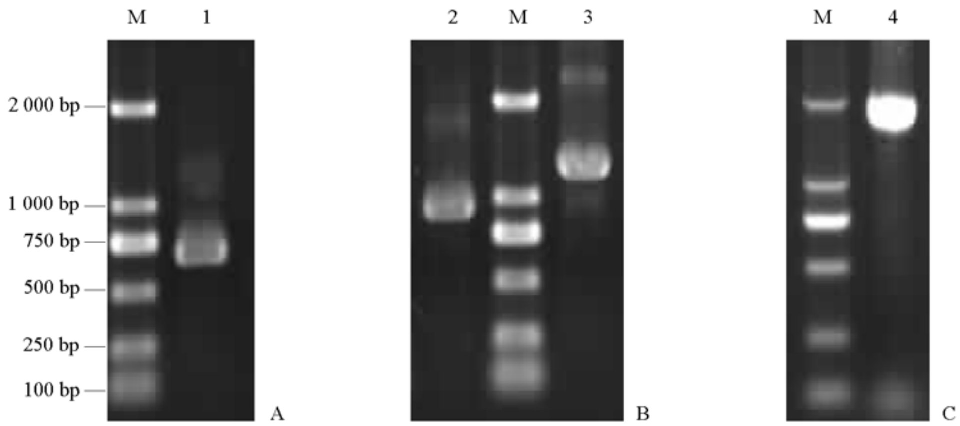

图 1　鹤望兰 *SrPDS* 基因的克隆

M：DNA DL2000；1：*SrPDS* 中间片段扩增产物；2：3′RACE 扩增产物；3：5′RACE 扩增产物；4：*SrPDS* cDNA 全长扩增产物。

Fig. 1　Isolation of *SrPDS* gene in *Strelitzia reginae* Banks

M：DNA DL2000；1：Product of *SrPDS* gene fragment；2：Product of 3′RACE；3：Product of 5′RACE；4：Product of *SrPDS* full-length cDNA.

2.2　*SrPDS* 编码氨基酸的同源性分析

将*SrPDS*完整的开放阅读框推测的氨基酸序列与其他植物PDS氨基酸序列进行同源性比较(图2)得知，该序列与柑橘（AEQ29521）、杏（AAX33347）、番红花（AAO24235）、拟南芥（AEE83394）、水仙（AFH53812）、籼稻（AAD02489）、文心兰（ACP27624）等序列的同源性分别达 86%、84%、83%、81%、81%、81%、79%。

推导出的 *SrPDS* 氨基酸序列含有一个保守的二核苷酸结合域（GXGX2GX3AX2LX3GX6 EX5GG）和一个类胡萝卜素结合域。

在多重比对的基础上，为进一步了解 *SrPDS* 与其它植物 *PDS* 之间的进化关系，应用 MEGA4.0 软件对 23 个 *PDS* 的氨基酸序列进行了系统进化树构建。

结果（图 3）表明，*PDS* 基因的进化基本符合植物分类学分类，即单子叶和双子叶植物分属于各自的聚类簇。

SrPDS 与单子叶植物番红花 *Crocus sativus*、水仙 *Narcissus tazetta*、百合 *Lilium* hybrid division、玉米 *Zea mays*、小麦 *Triticum aestivum*、大麦 *Hordeum vulgare* 和籼稻 *Oryza sativa* Indica 等的 PDS 蛋白聚为一支，亲缘关系较近，与双子叶植物的 PDS 蛋白为并列的分支，亲缘关系较远。

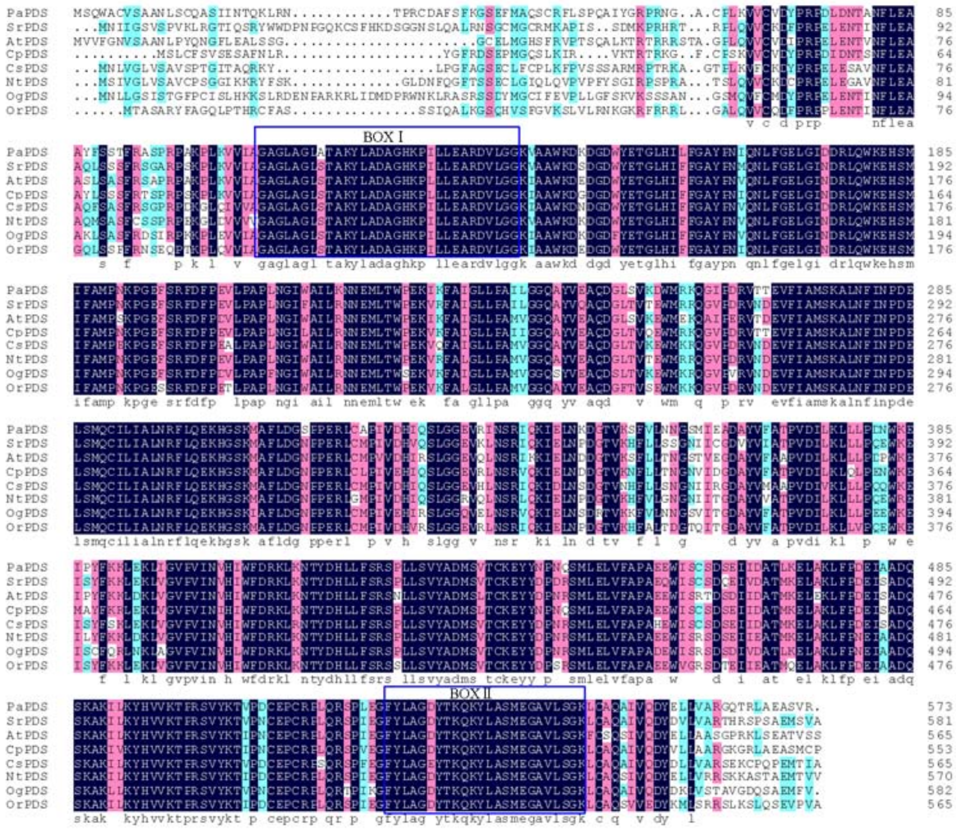

图 2　鹤望兰 SrPDS 氨基酸同源性分析

Sr：鹤望兰；At：拟南芥；Cp：柑橘；Cs：番红花；Nt：水仙；Og：文心兰；Or：籼稻；Pa：杏；

BOXⅠ：二核苷酸结合域，BOXⅡ：类胡萝卜素结合域。

Fig. 2　Homology analysis of SrPDS in *Strelitzia reginae* Banks

Sr：*strelitzia reginae* Banks；At：*Arabidopsis thaliana*；Cp：*Citrus × paradise*；Cs：*Crocus sativus*；Nt：*Narcissus tazetta*；Og：*Oncidium* Gower Ramsey；Or：*Oryza sativa* Indica；Pa：*Prunus armeniaca.*

BOXⅠindicates the dinucleotide-binding domain，BOXⅡ indicates the carotenoid-binding domain.

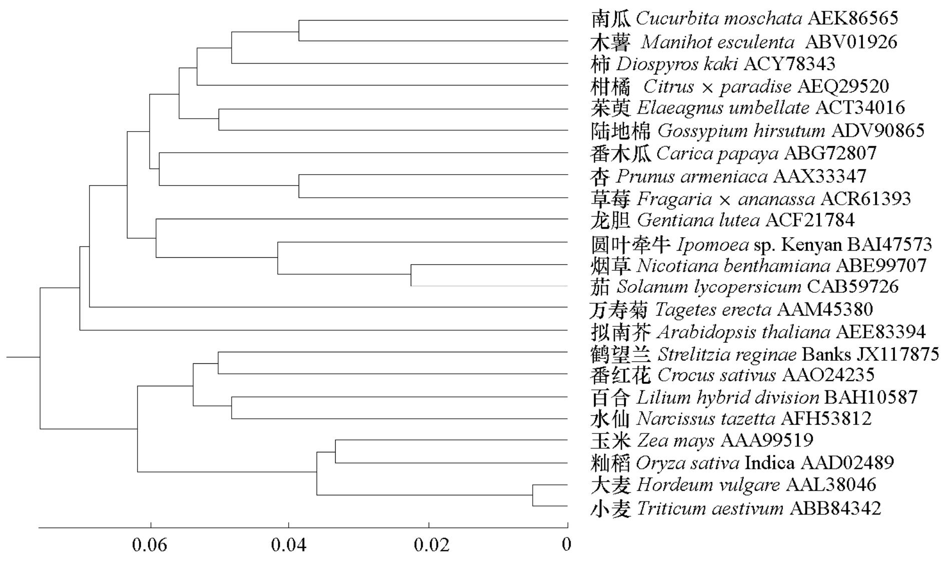

图 3　鹤望兰 SrPDS 与其它植物 22 个 PDS 蛋白的系统进化分析

Fig. 3　Phylogenetic analysis of PDS in *Strelitzia reginae* Banks with 22 other plant PDSs

2.3 *SrPDS* 基因的表达分析

以鹤望兰 18S rRNA 为内参，用半定量 PCR 技术检测 *SrPDS* 在鹤望兰花发育阶段及不同组织上的表达分析。结果表明，*SrPDS* 在鹤望兰开花的花蕾中期表达量逐渐增加，到始花期达到最高，在盛花期呈减弱趋势（图 4）。在不同组织中表达分析结果表明，*SrPDS* 在黄色花萼中表达量最高，其它依次是叶片、茎、蓝色花瓣，在根中表达量最低（图 5）。

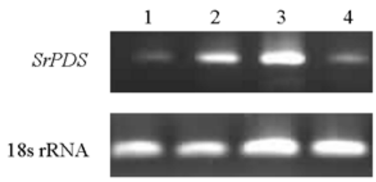

图 4 鹤望兰花发育过程中 *SrPDS* 的表达

1：花蕾前期；2：花蕾中期；3：始花期；4：盛花期。

Fig. 4 Expression of *SrPDS* in different growth periods of flowering from *Strelitzia reginae* Banks

1：Bud early；2：Bud mid；3：Early flowering season；4：Bloom stage.

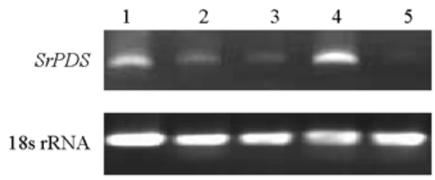

图 5 *SrPDS* 在鹤望兰不同组织中的表达

1：叶片；2：茎；3：黄色萼片；4：蓝色花瓣；5：根。

Fig. 5 Expression of *SrPDS* in different tissue of *Strelitzia reginae* Banks

1：Leaf；2：Stem；3：Yellow sepals；4：Blue petals；5：Root.

3 讨论

本研究中通过 RT-PCR 和 RACE 方法成功克隆了 *SrPDS* 基因全长，该 cDNA 全长 2 069 bp，具有完整的开放阅读框（第 194 ~ 1 939 个碱基），共 1 746 个碱基，编码 581 个氨基酸。多重比对结果表明，SrPDS 与番红花（AAO24235）、水仙（AFH53812）、籼稻（AAD02489）的 PDS 均具有较高同源性，分别达 83%、81%、81%。通过构建系统进化树发现，鹤望兰 SrPDS 与单子叶植物的 PDS 蛋白聚为一支。

Zhu 等（2002）采用 Northern blotting 方法分析发现，在龙胆中，PDS 基因在花和叶中均有表达，在茎中没有表达。棉花的 PDS 基因花和叶片中大量表达，在根中和茎中几乎不表达（徐大伟 等，2011）。文心兰的 PDS 基因在花和叶片中均有表达，在根中的表达量最低；并且在花发育的整个过程都有表达，在盛花期表达量最高（Chiou et al.，2010）。

本试验中通过半定量 RT-PCR 的方法对 *SrPDS* 在鹤望兰不同组织表达情况进行分析发现，*SrPDS* 在黄色花萼中表达量最高，在蓝色花瓣和根中表达量很低，推测 *SrPDS* 的表达与黄色花的形成有关，蓝色花的形成受其它途径控制。在文心兰中，黄色花的形成受类胡萝卜素途径控制，红色花的形成受类黄酮途径控制（Chiou & Yeh，2008；Chiou et al.，2010），推测在鹤望兰中有相同的表达模式。这种表达模式的形成，可能与上游调控基因有关。

对鹤望兰花发育过程中的表达情况进行分析发现，*SrPDS* 在花蕾中期表达增加，到始花期表达量最高，盛花期减弱，说明 *SrPDS* 在花发育初期高表达，且在鹤望兰黄色花萼发育过程中起着重要作用，推测 *SrPDS* 可能在转录水平上对鹤望兰黄色花的形成起调控作用。

植物类胡萝卜素是许多花和果实中的主要色素，对园艺植物的观赏性起着重要的作用，该酶表达受到抑制后，会导致八氢番茄红素的累积，最终影响类胡萝卜素的合成，所以 PDS 在植物的花和果实显色中起着重要作用（Bartley & Scolnik，1995；Zhu et al.，2002；Kato et al.，2004）。迄今已从烟草、柑橘、水稻、水仙、番茄、文心兰、龙胆、草莓等植物中克隆到 PDS 基因（Zhu et al.，2002；

陈段芬　等，2008；Chiou et al.，2010；朱海生　等，2011）。本试验中成功分离到鹤望兰 *SrPDS*，并对其组织表达特异性进行了分析，为进一步研究 *SrPDS* 的功能及其在鹤望兰黄色花形成中的作用及调控机制奠定了基础。

References

Bartley G E，Scolnik P A. 1995. Plant carotenoids：Pigments for photoprotection，visual attraction，and human health. Plant Cell，7 (7)：1027－1038.

Chen Duan-fen，Peng Zhen-hua，Gao Zhi-min. 2008. Cloning and expression analysis of *PDS* gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Molecular Plant Breeding，6 (3)：574－578. (in Chinese)

陈段芬，彭镇华，高志民. 2008. 中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因（*PDS*）的克隆及表达分析. 分子植物育种，6 (3)：574－578.

Chiou C Y，Yeh K W. 2008. Differential expression of MYB gene（*OgMYB1*）determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey. Plant Mol Biol，66：379－388.

Chiou C Y，Pan H A，Chuang Y N. 2010. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. Planta，232：937－948.

Kato M，Ikoma Y，Matsumoto H，Sugiura M，Hyodo H，Yano M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. Plant Physiol，134 (2)：824－830.

Mol J，Cornish E，Mason J，Koes R. 1999. Novel coloured flowers. Curr Opin Biotechnol，10：198－201.

Ohmiya A. 2011. Diversity of carotenoid composition in flower petals. Japan Agricultural Research Quarterly，45 (2)：163－171.

Ootani S，Hayashi K. 1982. Further search for watersoluble carotenoids in yellow flowers of several plants. Res Inst Evolut Biol Sci Rep，1：71－76.

Sun Z R，Cunningham Jr F X，Gantt E. 1998. Diferential expression of two isopentenyl pyropbosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. Proc Natl Acad Sci，USA，95 (19)：11482－11488.

Tinoi J，Rakariyatham N，Deming R L. 2006. Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected flowering plants in the north of Thailand. Chiang Mai J Sci，33：327－334.

Valadon L R G，Mummery R S. 1968. Carotenoids in floral parts of a narcissus，a daffodil and a tulip. Biochemical Journal，106 (2)：479－484.

Wang Yu-ping，Liu Qing-chang，Zhai Hong. 2006. Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering. Molecular Plant Breeding，4 (1)：103－l10. (in Chinese)

王玉萍，刘庆昌，翟　红. 2006. 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用. 分子植物育种，4 (1)：103－110.

Xu Da-wei，Zhang Yu-liang，Tan Gen-jia. 2011. Molecular cloning and expression analysis of *GhPDS1* gene in *Gossypium hirsutum*. Cotton Science，23 (3)：200－204. (in Chinese)

徐大伟，张雨良，檀根甲. 2011. 棉花八氢番茄红素脱氢酶 *GhPDS1* 基因的克隆与表达谱分析. 棉花学报，23(3)：200－204.

Yamagishi M，Kishimoto S，Nakayama M. 2010. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. Plant Breeding，129 (1)：100－107.

Zhu C，Yamamura S，Koiwa H，Nishihara M，Sandmann G. 2002. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. Plant Molecular Biology，48 (3)：277－285.

Zhu Chang-fu，Chen Xing，Wang Ying-dian. 2004. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology，30 (6)：609－618. (in Chinese)

朱长甫，陈　星，王英典. 2004. 植物类胡萝卜素生物合成及其相关基因工程中的应用. 植物生理与分子生物学学报，30(6)：609－618.

Zhu Hai-sheng，Li Yong-ping，Wen Qing-fang，Lin Hui. 2011. Cloning and characterization of *pds* gene in *Fragaria* × *ananassa*. Acta Horticulturae Sinica，38 (1)：55－60. (in Chinese)

朱海生，李永平，温庆放，林　珲. 2011. 草莓八氢番茄红素脱氢酶基因 *pds* 的克隆及特征分析. 园艺学报，38 (1)：55－60.