

樊荣辉, 黄敏玲, 钟淮钦, 等. 香水文心兰花色相关基因的克隆及表达分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (7): 707-710.

FAN R-H, HUANG M-L, ZHONG H-Q, et al. Cloning and Expression Analysis for Color Related Genes in Flower of *Oncidium Sharry Baby*. [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (7): 707-710.

香水文心兰花色相关基因的克隆及表达分析

樊荣辉^{1,2,3}, 黄敏玲^{1,2,3}, 钟淮钦^{1,2,3}, 吴建设^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院作物研究所,福建 福州 350013;2. 福建省农业科学院花卉研究中心,福建 福州 350013;
3. 福建省特色花卉工程技术研究中心,福建 福州 350013)

摘要: 依据已发布的氨基酸保守序列设计引物,从香水文心兰 *Oncidium Sharry Baby* 红色花萼中克隆得到花色相关基因 CHS、ANS、DFR 3 个结构基因的保守序列,所获保守序列长度分别为 611、288、554 bp。序列分析表明:这 3 个结构基因与其他植物来源的花色相关基因均具有较高的同源性,分别为 77%~89%、72%~99% 和 57%~96%。半定量 RT-PCR 分析表明:3 个基因在蕾期或始花期表达量最高,盛花期表达量降低;在红色花萼中有表达,在叶片和黄色唇瓣中均没有表达。

关键词: 香水文心兰; 花色相关基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S 682.31

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis for Color Related Genes in Flower of *Oncidium Sharry Baby*.

FAN Rong-hui^{1,2,3}, HUANG Min-ling^{1,2,3}, ZHONG Huai-qin^{1,2,3}, WU Jian-she^{1,2,3}

(1. Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;
2. Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;
3. Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Three flower color related genes (CHS、ANS、DFR) were cloned from the red flower sepals of *Oncidium Sharry Baby* with homology sequence cloning. The length of their conservative sequences were 611 bp, 288 bp and 554 bp. Sequence analysis showed that these genes revealed high homology with the color related genes from other plants, ranging from 77%~89%、72%~99% and 57%~96% for CHS, ANS and DFR, respectively. Results of RT-PCR analysis showed that the transcripts of three genes were detected from red sepals but not in yellow labellum and leaves. The expression level of three genes was high in the bud and early flowering stages, and then decreased in blooming.

Key words: *Oncidium Sharry Baby*; flower color related genes; gene cloning; expression analysis

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研究热点^[1]。采用植物化学的分析方法,黄金霞等^[2]发现类黄酮是大多数花色形成的决定性色素群,其生物合成途径可以使花呈黄色、橙色、红色、紫色和蓝色^[3],相关酶和基因的研究也非常深入^[4-5]。

文心兰 *Oncidium* spp. 为兰科文心兰属植物,是热带气生兰,因分枝性良好,花形独特、花姿优美、花色亮丽而倍受人们的喜爱。研究发现文心兰红色到紫色花的发色团主要为类黄酮生物合成途径

中的花青素苷^[6]。本研究首次克隆了香水文心兰 *Oncidium Sharry Baby* 类黄酮生物合成途径中的查尔酮合成酶基因 (CHS)、花青素苷合成酶基因 (ANS) 和二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (DFR) 3 个基因的保守序列,并利用 RT-PCR 对 3 个结构基因的组织表达特异性及花发育过程的表达进行了分析。这对于了解香水文心兰花瓣着色机理具有重要意义,也为利用基因工程技术改变花色、培育新的花色品种提供技术支撑。

收稿日期: 2012-06-08 初稿; 2012-06-29 修改稿

作者简介: 樊荣辉 (1983-), 女, 研究实习员, 主要从事花卉分子育种研究 (E-mail: rhfan1012@163.com)

通讯作者: 黄敏玲 (1960-), 女, 研究员, 主要从事花卉品种选育与生物技术研究 (E-mail: pudang12@yahoo.com.cn)

基金项目: 福建省科技计划重大专项 (2010NZ0003); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD2011-20)

1 材料与方法

1.1 试验材料

以福建省农业科学院花卉研究中心种质资源圃栽培的香水文心兰 *Oncidium Sharry Baby* 品种为供试材料。取始花期整朵花, 立即用液氮冷冻并在-80℃保存, 取香水文心兰叶片、红色萼片和花瓣, 备用; 取香水文心兰花蕾始期、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试验。

1.2 总 RNA 提取及基因克隆

采用 Trizol 说明书并参照王关林和方宏筠^[7]的方法加以改进提取总 RNA。按大连宝生物有限公司的 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的方法合成 cDNA 第一链。

根据 GenBank 中检索到的 CHS、ANS、DFR 保守氨基酸序列设计简并引物 CHS-F、CHS-R (表 1), ANS-F、ANS-R, DFR-F、DFR-R 进行目的片段扩增。扩增产物采用大连宝生物有

限公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 与 PMD18-T 载体连接 (大连宝生物有限公司), 热激法转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 进行阳性克隆筛选, 并送上海生工生物工程服务有限公司测序。测序结果在 NCBI 网站上 BLAST 比对, 用 DNAMAN 软件进行序列分析。

1.3 半定量 RT-PCR 检测基因的表达

根据扩增出的 3 个花色基因保守序列, 按照半定量 RT-PCR 设计原则设计 3 对特异引物 CHS-1、CHS-2, ANS-1、ANS-2, DFR-1、DFR-2 (表 1), 获得的扩增片段分别为 212、122、288 bp。以文心兰 18s rRNA (GenBank accession number HM640779) 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 254 bp, 进行 RT-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。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 文心兰花色相关基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of flower color related gene in *Oncidium Sharry Baby*.

引物名称	引物序列	作用
CHS-F	5'-ACATGCCGG(T/C)GC(T/C)GACTACCA-3'	扩增保守片段
CHS-R	5'-GCT(G/C)GACAT(G/A)TT(C/G)CC(A/G)TACTCC-3'	
ANS-F	5'-TG(A/G)AGAT(C/A)AACTACTACCC-3'	
ANS-R	5'-GCTC(A/G)CA(A/G)AA(A/G)AC(C/G)GCCCA-3'	
DFR-F	5'-TC(G/C)AATGAAGTGCTCAGCA-3'	
DFR-R	5'-GCATCACATA(C/A)GTCATCCAAA-3'	
CHS-1	5'-TCGTCTGTTCTGAGATCACCGC-3'	检测相关基因表达
CHS-2	5'-TAAATGCCATCAATAGCCCT-3'	
ANS-1	5'-TCTCCTTCATCATCCACAACGG-3'	
ANS-2	5'-TATCTCGAGCGAGTCACCTACA-3'	
DFR-1	5'-ATTTTCCACGTGCCACACCCA-3'	
DFR-2	5'-CTCCAAGCAGCCTCTCCGCA-3'	
18s-F	5'-TGAGAGACGGCTACCACATCCA-3'	扩增内标
18s-R	5'-ACCCAACCCAAGGTCCAACATAC-3'	

2 结果与分析

2.1 文心兰花色相关基因克隆

根据已发布的花色相关基因氨基酸保守序列, 设计 3 对简并引物 (表 1), 以香水文心兰红色花瓣的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增及序列测定, 获

得 CHS、ANS、DFR 3 个结构基因的保守序列, 其长度分别为 611、288、554 bp 的 cDNA 片段 (图 1), 分别编码 203、96、188 个氨基酸。

2.2 文心兰花色相关基因的同源性分析

经 Blast 比对, 这 3 个结构基因编码的氨基酸序列与其他植物来源的蛋白有高度同源性, 其中

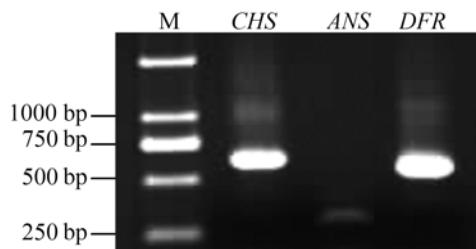


图 1 香水文心兰花色相关基因 cDNA 片段扩增电泳图谱
Fig. 1 Amplification of flower color related gene fragment in *Oncidium Sharry Baby*.

CHS 与文心兰品种‘南茜’(*Oncidium Gower Ramsey.*, ABS58499) 同源性高达 89%, 与石斛兰(*Dendrobium hybrid* cultivar., CAL15003) 同源性达 83%; ANS 与文心兰品种‘南茜’(*Oncidium Gower Ramsey.*, AET99288) 同源性达 99%, 与鸢尾(*Iris x hollandica*, BAF62629) 同源性达 75%; DFR 与文心兰品种‘南茜’(*Oncidium Gower Ramsey.*, AAY32601) 同源性达 96%, 与蕙兰(*Cymbidium hybrid* cultivar., AAC17843) 同源性达 90%。认为所获得的序列是香水文心兰 3 个结构基因保守序列。其在 GenBank 登录号分别为 JQ928171、JQ928172、JQ928173。

通过软件 MEGA4 绘制香水文心兰与非洲菊、大豆、圆叶牵牛、大丽花、月季、水稻、小麦, 文心兰品种‘南茜’*Oncidium Gower Ramsey.*、鸢尾 *Iris x hollandica*、百合 *Lilium hybrid*、石斛兰 *Dendrobium hybrid* 等植物 3 个结构基因的进化树聚类图。

从图 2 可以看出, 香水文心兰 ANS、DFR 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。DFR 与同属于文心兰品种‘南茜’和石斛兰亲缘关系最近, 分为一类; CHS、ANS 基因与文心兰品种‘南茜’亲缘关系最近, 单独聚为一类。

2.3 香水文心兰 3 个花色相关基因的表达分析

以文心兰 18S rRNA 为内参, 用半定量 RT-PCR 技术检测 3 个花色相关基因在香水文心兰花发育阶段及不同器官上的表达分析。结果表明, CHS 在文心兰蕾期和始花期表达量最高, 到盛花期减弱(图 3); ANS 和 DFR 文心兰始花期表达量最高, 到盛花期减弱。在不同器官中表达分析结果表明, CHS、ANS 和 DFR 在香水文心兰红色萼片中有表达, 在叶片和南茜黄色唇瓣中没有表达(图 4)。

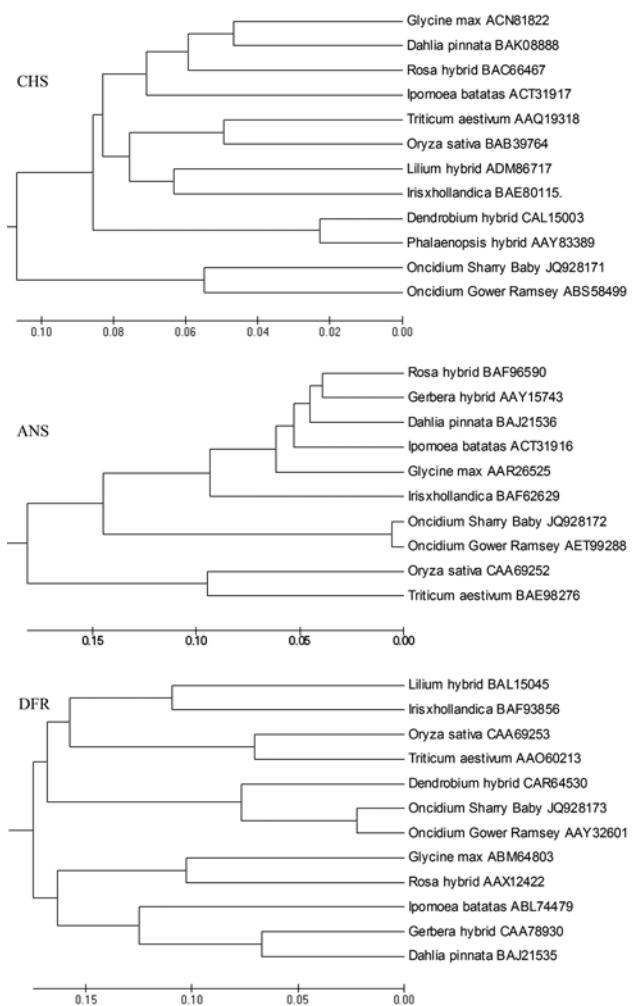


图 2 香水文心兰花色相关基因与其他植物蛋白的系统进化分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis between flower color related genes in *Oncidium Sharry Baby* with related protein of other plants

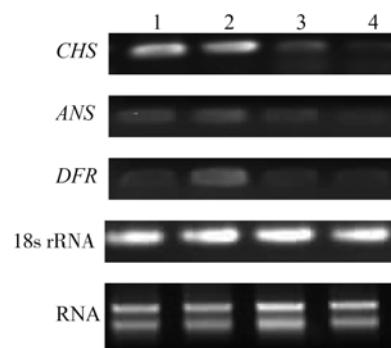


图 3 香水文心兰花发育过程中 CHS、ANS、DFR 的表达
Fig. 3 Expression of CHS, ANS, DFR in flower of *Oncidium Sharry Baby* during its development
注: 1 为花蕾期; 2 为始花期; 3 为盛花期; 4 为凋谢期

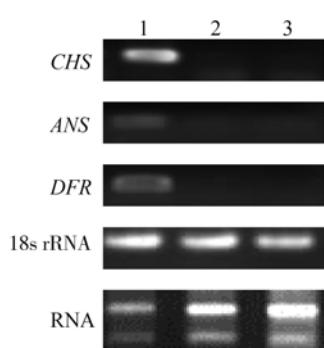


图 4 CHS、ANS、DFR 在文心兰不同材料中的表达

Fig. 4 Expression of CHS, ANS, DFR in various histotissues of *Oncidium*

注: 1 为红色萼片; 2 为 '南茜' 黄色唇瓣; 3 为叶片

3 讨 论

本研究获得了香水文心兰 CHS、ANS、DFR 基因的保守序列, 其保守序列的长度分别为 611、288、554 bp。多重比对结果表明, 这 3 个结构基因与其他植物来源的花色相关基因均具有较高同源性, 认为所获得的序列是香水文心兰 CHS、ANS、DFR 基因的保守序列。通过构建系统进化树发现, 香水文心兰 ANS、DFR 基因的进化基本符合植物分类学分类, 而香水文心兰 CHS 与文心兰南茜单独聚为一类, 这可能与文心兰复杂的系统进化有关。

Chiou 采用 Northern blot 检测出 3 个结构基因在 '南茜' 黄色唇瓣中没有表达^[6]。本研究采用半定量 RT-PCR 对香水文心兰花色相关基因不同材料表达情况进行分析发现, 3 个结构基因在红色萼片中高表达, 在叶片和 '南茜' 黄色唇瓣中均没有表达, 这进一步证明文心兰红色花的形成与类黄酮生物合成途径有关, 文心兰黄色花的形成由其他途径主导^[8]。花色相关基因在花发育不同时期的表达量不同。3 个结构基因在蕾期或始花期表达量较

高, 到盛花期表达量减弱, 这与金鱼草、观赏向日葵、苹果、矮牵牛花瓣中花色相关基因表达趋势相似^[9-11], 推测 3 个结构基因可能在转录水平上对香水文心兰红色花的形成起调控作用。

参 考 文 献:

- [1] MOL J, COMISH E, MASON J, et al. Novel coloured flowers [J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10: 198-201.
- [2] 黄金霞, 王亮生, 李晓梅, 等. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展 [J]. 植物学通报, 2006, 23 (4): 321-333.
- [3] TANAKA Y, BRUGLIERA F, KALC G, et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74 (9): 1760-1769.
- [4] SPRINGOB K, NAKAJIMA J, YAMAZAKI M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. Nat Prod Rep, 2003, 20: 288-303.
- [5] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54: 733-749.
- [6] CHIOU CY, YEH KW. Differential expression of MYB gene (OgMYB1) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium Gower Ramsey* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 66: 379-388.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] CHIOU CY, PAN HA, CHUANG YN, et al. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars [J]. Planta, 2010, 232: 937-948.
- [9] 张剑亮, 潘大仁, 周以飞, 等. 观赏向日葵花青素苷合成途径同源基因的克隆与表达 [J]. 园艺学报, 2009, 36 (1): 73-80.
- [10] KATZ A, WEISS D. Photocontrol of chs gene expression in petunia flowers [J]. Plant Physiol, 1998, 102: 210-216.
- [11] WEISS D. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals [J]. Plant Physiol, 2000, 110: 152-157.

(责任编辑: 柯文辉)