

喜盐鸢尾花色形成关键基因的克隆及表达分析

徐凌云, 王俊丽, 周宜君

(中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘要:喜盐鸢尾(*Iris halophila* Pall.)及其变种蓝花喜盐鸢尾(*I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov)因耐盐碱及其多种花色而具有盐碱地园艺开发价值。本文根据喜盐鸢尾内轮花被转录组测序结果,利用基因特异性引物从这2种植物中分别克隆了编码查尔酮合成酶(*CHS*)、查尔酮异构酶(*CHI*)、类黄酮-3',5'-羟化酶类(*F3'5'H-like*)等基因的部分片段,并对它们在内轮花被中的表达水平进行实时定量PCR分析。序列分析结果确认在喜盐鸢尾中所克隆的*CHS*(311 bp)、*CHI*(457 bp)、*F3'5'H-like*(496 bp)3个基因(部分)未见文献报道与NCBI等数据库记录。其中*F3'5'H-like*基因与经典的属于细胞色素P450 CYP75A亚家族的*F3'5'H*不同,而与万带兰的*F3'5'H-like*同属于CYP76AB亚家族,为一类新的蓝花相关基因。实时定量PCR表达分析结果表明,与黄花的喜盐鸢尾相比,蓝花喜盐鸢尾中*CHS*与*F3'5'H-like*显著上调表达,可能是其花色不同于喜盐鸢尾的主要原因。

关键词:喜盐鸢尾;蓝花喜盐鸢尾;查尔酮合成酶;查尔酮异构酶;类黄酮-3',5'-羟化酶类

Cloning and Expression Analysis of Anthocyanin Biosynthetic Genes from *Iris halophila* (Iridaceae)

XU Ling-yun, WANG Jun-li, ZHOU Yi-jun

(College of Life & Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081)

Abstract: *Iris halophila* Pall. and its variety *I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov are potential horticultural plants for arid and saline-alkali land because of their drought and salt tolerant characteristics and various flower color. In order to elucidate the mechanism of different pigmentation in these two species, we cloned 3 partial segments of key genes relating to anthocyanin biosynthesis, named chalcone synthase (*CHS*), chalcone isomerase (*CHI*) and flavonoid-3',5'-hydroxylase like (*F3'5'H-like*), from perianth of young flowers of these two *Iris* plants. Retro-transcription PCR method were employed in cloning and gene-specific primers were designed based on a transcriptome sequencing. The expression of these 3 genes were characterized by a real-time PCR assay. Sequence analysis showed that these 3 genes were first reported in *I. halophila* Pall. . Among these genes, *F3'5'H-like* was different from the classical *F3'5'H* which belonged to CYP75A subfamily of cytochrome P450 superfamily, it was a homolog of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. *F3'5'H-like* gene which belonged to a new subfamily CYP76AB, a novel type of blue flower related genes. Expression analysis indicated that compared with in the yellow flowered *I. halophila* Pall. , *CHS* and *F3'5'H-like* were up-regulated in *I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov and responsible for its blue-violet flowers.

Key words: *Iris halophila* Pall. ; *I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov; chalcone synthase; chalcone isomerase; flavonoid-3',5'-hydroxylase like

收稿日期:2016-02-25 修回日期:2016-04-13 网络出版日期:2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1419.028.html>

基金项目:国家自然科学基金项目(31370356);中央民族大学一流大学一流学科项目(YLDX01013、2015MDTD08C)

第一作者研究方向为植物分子生物学。E-mail: lingyunforever@126.com

通信作者:周宜君,研究方向为植物抗逆生理与分子生物学。E-mail: zhouyijun@muc.edu.cn

喜盐鸢尾(*Iris halophila* Pall.)属于鸢尾科鸢尾属琴瓣鸢尾亚属,是该亚属在我国分布的唯一物种,分布于甘肃、新疆等地,其生境为草甸草原、山坡荒地、砾质坡地及潮湿的盐碱地^[1]。喜盐鸢尾原变种为黄花,而它的一个变种蓝花喜盐鸢尾(*Iris halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov)^[1]花为蓝花,且花色从淡蓝色至蓝紫色不等,是研究鸢尾属植物花色生物合成途径与调控机制等的理想材料。喜盐鸢尾抗病虫、耐盐碱,对重金属铅及其他金属离子有一定的积累及耐受能力^[2],且有绿期长、花型奇特、叶形优美等特点,在盐碱、干旱地区的园林绿化应用方面具有潜在的开发价值。此外,由于耐盐碱植物种质资源十分匮乏,在有限的种质资源基础上,通过花色基因工程培育耐盐园林植物新品系对盐碱地园林绿化具有重要意义,而喜盐鸢尾的丰富花色为基因发掘提供了可能。

鸢尾属植物因色彩绚丽多彩而得属名 *Iris*,意为彩虹女神^[3]。目前已基本明确鸢尾属蓝紫色系花(蓝色、紫色、栗色等)色素主要是飞燕草色素;非蓝色系花(橙色、黄色、粉红色等)色素主要是类胡萝卜素^[4]。T. Mizuno 等^[5]对3个荷兰鸢尾栽培品种的研究发现,总黄酮(Total flavone, F)与总飞燕草色素(Total delphinidin, A)比例(F/A比)是导致鸢尾花色从紫色到蓝色变化的关键,通过人为改变F/A比例,培育出了新花色品种。然而鸢尾属花被色素生物合成途径,尤其是飞燕草色素生物合成途径关键基因报道较少。

研究表明,植物次生代谢产物类黄酮可决定淡黄色至蓝色的广泛色系^[6],其中花青素是多数被子植物花、果实及叶中橙红色至红色、紫色至蓝色色调的主要组成成分。花青素生物合成(图1)始于苯丙氨酸裂解酶,经过3步酶促反应合成4-香豆酰 CoA。查尔酮合成酶(CHS, chalcone synthase)是催化植物类黄酮物质合成的第1个酶,催化合成四羟基查尔酮,是花青素生物合成途径的关键酶之一。Y. Morita 等^[7]研究证实CHS在紫外、真菌侵染等诱变或诱导下,在花中表达量发生显著改变可导致植物花色的改变。四羟基查尔酮进一步被查尔酮异构酶(CHI, chalcone isomerase)异构化为柚皮素(naringenin, 5-羟基黄酮)。四羟基查尔酮是合成黄色花色素的重要底物,CHI表达受到抑制后导致四羟基查尔酮的积累,从而使花色呈现为黄色。T. A. Holton 等^[8]将柚皮素经类黄酮-3-羟化酶(F3H, flavonone 3-hydroxylase)催化形成黄酮醇(二氢槲皮醇)后,花

青素合成形成3条支路,其中类黄酮-3',5'-羟化酶(F3'5'H, flavonoid 3',5'-hydroxylase)催化类黄酮β环3位与5位的羟基化而合成3',5'-羟基花色素,将花青素生物合成导向最终产生飞燕草色素的支路,使花色呈现蓝色,是蓝色花青素合成的关键酶,其编码基因F3'5'H被称为蓝色基因(blue gene)而广受关注。类黄酮-3'-羟化酶(F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase)催化类黄酮β环3位的羟基化而将花青素生物合成导向最终产生矢车菊色素的支路。

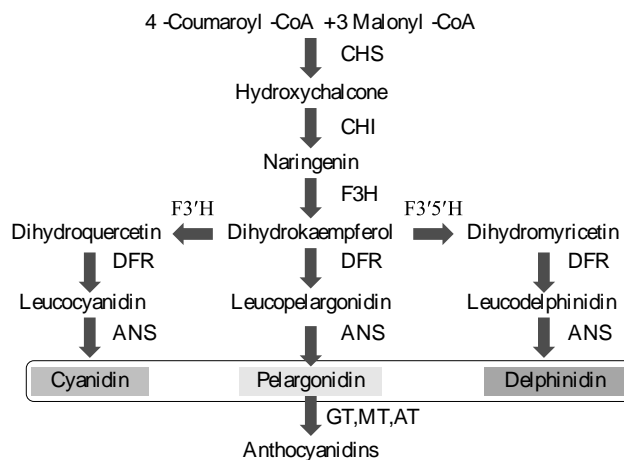


图1 花青素生物合成途径与花中积累的主要黄酮类化合物^[9-10]

Fig. 1 Anthocyanin biosynthetic pathway and flavonoid compounds accumulated in flowers^[9-10]

本研究通过克隆编码喜盐鸢尾查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、类黄酮-3',5'-羟化酶(F3'5'H)等花青素生物合成的关键基因,并通过比较这些基因在喜盐鸢尾(黄色花)及蓝花喜盐鸢尾(蓝紫色花)花被中的表达,旨在为深入了解喜盐鸢尾花被颜色形成机制及鸢尾属耐盐植物的花色定向遗传改造积累基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究试验材料为喜盐鸢尾(*Iris halophila* Pall., 黄色花)与蓝花喜盐鸢尾(*I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov, 蓝色花),采集自中国科学院植物研究所植物园。取完全发育但未开放的幼花,剥离出开始着色的内轮花被(inner perianth),液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。

1.2 基因克隆与表达分析

试验材料的总RNA提取、反转录、定量PCR等

试验分别采用天根生化科技北京有限公司的 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒、FastQuant cDNA 第 1 链合成试剂盒与 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒并按说明书操作。

F3'5'H 等目标基因扩增采用东洋坊 KOD-PLUS new 高保真 DNA 聚合酶;PCR 引物与定量 PCR 引物(以 Tubulin 为内参),均采用 primer3 设计(http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi),基因克隆 PCR 引物序列及定量 PCR 引物序列见表 1。采用天根生化科技北京有限公司超薄 DNA 纯化或胶回收试剂盒、pLB 零背景快速克隆试剂盒等进行 PCR 产物纯化与连接。连接产物转化本实验室自行制备的 TOP10 感受态细胞,转化子送上海桑尼生物科技有限公司进行测序。目的基因扩增 PCR 条件如下:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 20 s,68 °C 延伸 30 ~ 60 s(视扩增片段长短而定),共 40 个循环;68 °C 延伸 10 min。定量 PCR 条件如下:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

表 1 喜盐鸢尾与蓝花喜盐鸢尾 *F3'5'H* 等目标基因 PCR 扩增引物序列

Table 1 The PCR and qPCR primer sequences for target genes of *Iris halophila* Pall. and *I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov

基因名称	引物名称	引物序列
Gene name	Primer name	Primer sequence
<i>CHI</i>	CHI-F	5'-TCTTGGGMMMGGTCTYAC-3'
	CHI-R	5'-AACMACRTTMCATTCTC-3'
<i>CHS</i>	CHS-F	5'-AAGATGGTGAGCTTGGAGG-3'
	CHS-R	5'-GCTGGTGCTGCAGAAGAC-3'
	CHS-q-F	5'-CTTGAGCAGGTGGAACGTG-3'
	CHS-q-R	5'-GAAAGGCCGATATTCGAGATGGT-3'
<i>CHS-2</i>	CHS-2-F	5'-CCAAGGACCTCGCTGAGAACA-3'
	CHS-2-R	5'-TCGATATGATGCCCGGAACG-3'
<i>F3'5'H</i>	F3'5'H-F	5'-TGATGCTGATGGTTGTGACC-3'
	F3'5'H-R	5'-CCGAAAGGTATCAGCTCGAA-3'
	F3'5'H-q-F	5'-GATGCTGATGGTTGTGACCTACTGA-3'
	F3'5'H-q-R	5'-GTATCGCTCCCGGCAACAAAGTA-3'
<i>Tubulin</i>	Tubulin-F	5'-ATTCCTCCAGATAACTTTG-3'
	Tubulin-R	5'-TCCTATCCGGTACTCT-3'
	Tublin-q-F	5'-TGTTAGAAAGGAGCCAGAGAATTG-3'
	Tublin-q-R	5'-CAGTGTTCCTACCATACAGATCCAGTC-3'

1.3 序列分析

序列分析采用 BLASTX 搜索 NCBI 蛋白质数据库,根据同源序列搜索结果初步确定克隆序列的功能,同时确定所克隆序列的正确开放读码框(ORF, open reading frame)。从搜索结果集中选择部分与鸢尾属亲缘关系由近至远的植物,将相应多肽序列构成一个新数据集,利用 MEGA 7.0 进行分子系统发育分析^[11]。分子系统发育树建立使用基于 JTT 矩阵的最大似然法,采用启发算法,初始树根据序列两两比较的距离矩阵,利用 N-J 算法使用 JTT 模型产生^[12]。

2 结果与分析

2.1 花色形成关键基因的克隆

根据本研究室所进行的喜盐鸢尾内轮花被转录组测序结果(该测序委托上海派森诺生物科技有限公司完成),设计了 5 对用于扩增 *F3'5'H* 等目标基因的基因特异引物(表 1),分别以蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢尾内轮花被的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。测序与序列分析结果表明:从蓝花喜盐鸢尾、喜盐鸢尾中克隆获得的 *F3'5'H* 基因片段长度分别为 496 bp 和 498 bp,分别命名为 *IhsF3'5'H* 与 *IhF3'5'H* (GenBank 登录号分别为 KU714946 与 KU714945), *CHS* 基因片段长度分别为 311 bp 和 326 bp,分别命名为 *IhsCHS* 与 *IhCHS*, (GenBank 登录号分别为 KU714942 与 KU714943), *CHI* 基因片段长度分别为 457 bp 和 461 bp,分别命名为 *IhsCHI* 与 *IhCHI* (GenBank 登录号分别为 KU714940 与 KU714941),另外采用引物 CHS-2 从喜盐鸢尾中克隆得到 420 bp 片段,命名为 *IhCHI2* (GenBank 登录号 KU714944)。喜盐鸢尾 *CHS*、*CHI* 和 *F3'5'H* 基因 RT-PCR 产物结果如图 2 所示,序列长度均与预期相符。

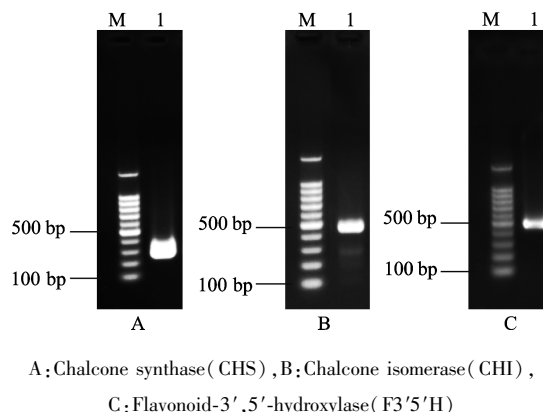


图 2 喜盐鸢尾 *CHS*、*CHI* 和 *F3'5'H* 基因 RT-PCR 克隆结果
Fig. 2 *CHS*, *CHI* and *F3'5'H* genes cloned by RT-PCR in *Iris halophila* Pall.

2.2 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 序列分析

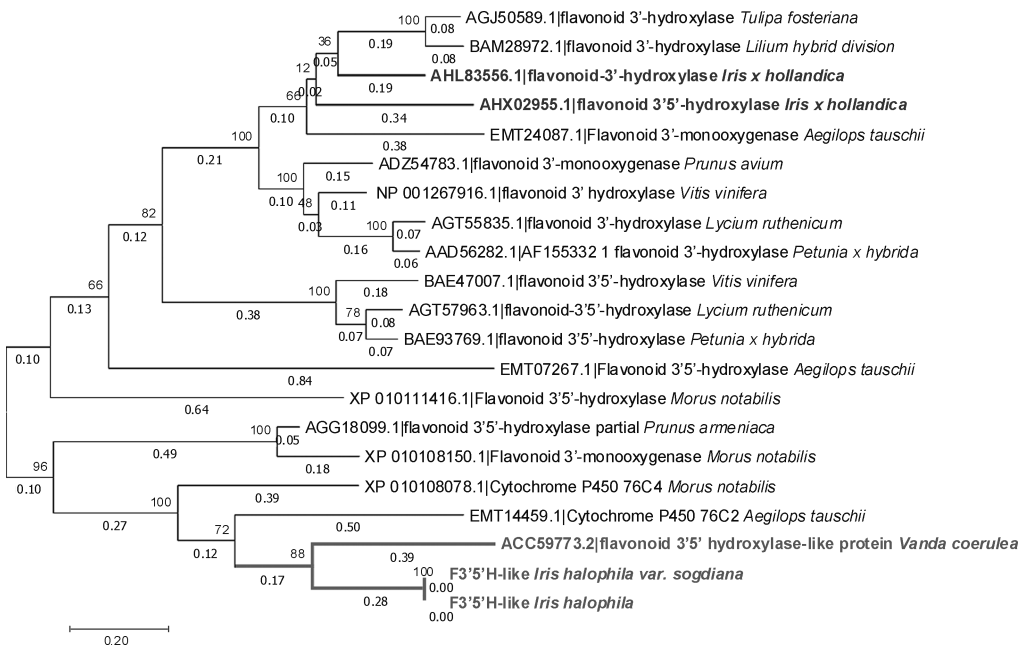
F3'5'H 片段的 BLASTX 比对结果见表 2, 根据 BLASTX 结果发现正确的读码框后翻译出多肽序列, 并将部分相似性最高的搜索结果加入部分典型 *F3'5'H* 和 *F3'H* 多肽序列为对照构建模拟系统发育树见图

3。序列分析结果显示, *IhF3'5'H* 克隆片段的 65 ~ 496 bp 区段具有典型 p450 超家族 (pfam00067) 成员特征, E-value 为 6.5e-30, 与川桑 (*Morus notabilis* C. K. Schneid., XP_010108078.1) 细胞色素 P450 CYP76C2 的氨基酸水平相似性为 56%; 同时, 克隆片

表 2 克隆基因片段 Blastx 比对结果

Table 2 BLASTX results of cloned fragments

目标基因 Targeting gene	BLAST results 序列搜索结果			
	登录号 Accession No.	分值 Score	E 值 E-value	功能注释 Annotation
<i>F3'5'H</i>	XP_010108078.1	190	5e-54	Cytochrome P450 76C4 [<i>Morus notabilis</i>]
	EMT14459.1	185	3e-53	Cytochrome P450 76C2 [<i>Aegilops tauschii</i>]
	ACC59773.2	187	4e-53	flavonoid 3',5' hydroxylase-like protein [<i>Vanda coerulea</i>]
<i>CHS-1</i>	BAE53636.1	176	8e-51	chalcone synthase [<i>Iris germanica</i>]
	AKA43763.1	174	1e-50	CHS1 [<i>Iris domestica</i>]
	PDB:4WUM_A	175	1e-50	Chain A, X-ray Crystal Structure Of Chalcone Synthase From <i>Freesia Hybrida</i>
<i>CHS-2</i>	PDB:4WUM_A	255	8e-81	Chain A, X-ray Crystal Structure Of Chalcone Synthase From <i>Freesia Hybrida</i>
	BAE53636.1	252	1e-79	chalcone synthase [<i>Iris germanica</i>]
	P48387.1	248	5e-78	RecName: Full = Chalcone synthase 2; AltName: Full = Naringenin-chalcone synthase 2
<i>CHI</i>	AHL83557.1	278	3e-92	chalcone isomerase type 4 [<i>Iris x hollandica</i>]
	BAS69337.1	235	2e-75	chalcone isomerase [<i>Lilium speciosum</i>]
	AHY20030.1	232	5e-74	chalcone isomerase [<i>Tulipa fosteriana</i>]



分支上的数值表示该分支的自展支持率, 下面的数值表示分支的相对长度

Numbers above the branch indicate the bootstrap value of the clade, and numbers below the branch indicate relative length of clade

图 3 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 基因与其他植物 *F3'5'H* 及 *F3'H* 基因的模拟系统发生分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of *F3'5'H* and some *F3'H* gene from *I. halophila* Pall. and other homologues plants

段的 44 ~ 496 bp 区段具有 p450 超家族的类黄酮-3', 5'-羟化酶 (PLN00110) 保守域结构, E-value 为 1.40e-42。克隆片段的推定多肽序列与万带兰 (*Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.) F3'5'H-like (ACC59773.2) 的相似度较高, 为 57%, 但与荷兰鸢尾 (*Iris x hollandica*) F3'5'H (AHX02955) 的相似度较低, 仅为 47%, 与其他经典的 F3'5'H 序列相似性亦均低于它与万带兰 F3'5'H-like 的相似度。根据上述序列比对结果, 本研究将 F3'5'H 克隆片段定名为喜盐鸢尾 F3'5'H-like 基因。蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢尾 F3'5'H-like 的核苷酸水平相似度为 99%, 氨基酸序列的相似度为 100%。系统发生树分析结果表明荷兰鸢尾 F3'5'H 序列为错误注释, 它实际与 F3'H 具有更高的同源性, 并且没有其他研究结果证明它具有 F3'5'H 功能, 而鸢尾属中亦没有已知确定功能的 F3'5'H 或其他注释为 F3'5'H 的序列。因此, 本文所克隆的喜盐鸢尾 F3'5'H-like 序列为鸢尾属中首次报道。

本研究所克隆的 F3'5'H-like 基因推定的氨基酸序列与属于 CYP75A 亚家族的 F3'5'H 的保守区序列比较见图 3。从 NCBI 蛋白质数据库选取了 CYP75A 亚家族的全部 7 个命名成员 (A1 ~ A7), 并以 CYP75B 亚家族的全部 2 个命名成员 (B1 ~ B2) 为对照, 同时选择了不同科属中属于 CYP75A 亚家族的多肽序列, 共 37 条序列 (包括来自万带兰的 F3'5'H-like 与本研究所克隆的 2 条序列), 植物种类包括了毛茛科、堇菜科、虎耳草科、蝶形花科、小檗科、山茶科、锦葵科、葡萄科、报春花科、夹竹桃科、杜鹃花科、车前科、龙胆科、苦苣苔科、茄科、马鞭草科、桔梗科、兰科、芭蕉科等 19 科植物。BLAST 分析表明, *lhF3'5'H-like* 基因在氨基酸水平上与上述属于 CYP75A 亚家族蛋白等同率为 43% ~ 52%, 相近率 (positive) 为 64% ~ 69%, 与 CYP75B 亚家族 2 个命名成员等同率为 43% ~ 45%, 相近率为 65%。利用 MEGA7.0 所提供的 MUSCLE 序列比对方法进行了比对, 结果发现本研究所克隆的 F3'5'H-like 接近于 C 末端, 在这个区域中, 经典 F3'5'H 有 4 个高度保守的基序 (图 4 黑框标出), 即 NIKALLLNLFAGT-DTSSSAIEW 基序、RKHPSTPLNLPR 基序、RLSVNI-WAIGRD 基序和近 C-末端的 KIDPRGNDPFLIPF 基序。序列比对结果表明, 在这 4 个高度保守的基序中, 喜盐鸢尾既与属于 CYP75A 的经典 F3'5'H 不同, 也与属于 CYP75B 的 F3'H 不同, 而与万带兰中分离到的 F3'5'H-like 更为相近 (表 3)。利用这个数

据集使用 MEGA7.0 的最小进化距离方法构建的系统发生树, 仍然将万带兰与喜盐鸢尾分为一组而与 CYP75A 和 CYP75B 分开 (图 5, 其中 CYP75A 分支包括了图 4 数据集中全部 32 个 CYP75A 成员, 限于篇幅未展开)。结果表明, 本研究所克隆的喜盐鸢尾 F3'5'H-like 并不属于典型 F3'5'H 酶所归属的 CYP75A 亚家族, 而是与万带兰的 F3'5'H-like 同属 CYP76AB 亚家族, 是细胞色素 P450 超家族 CYP76 家族 AB 亚家族的新成员, 也是已知该亚家族的第 2 个成员。

2.3 喜盐鸢尾 CHS 基因片段的克隆

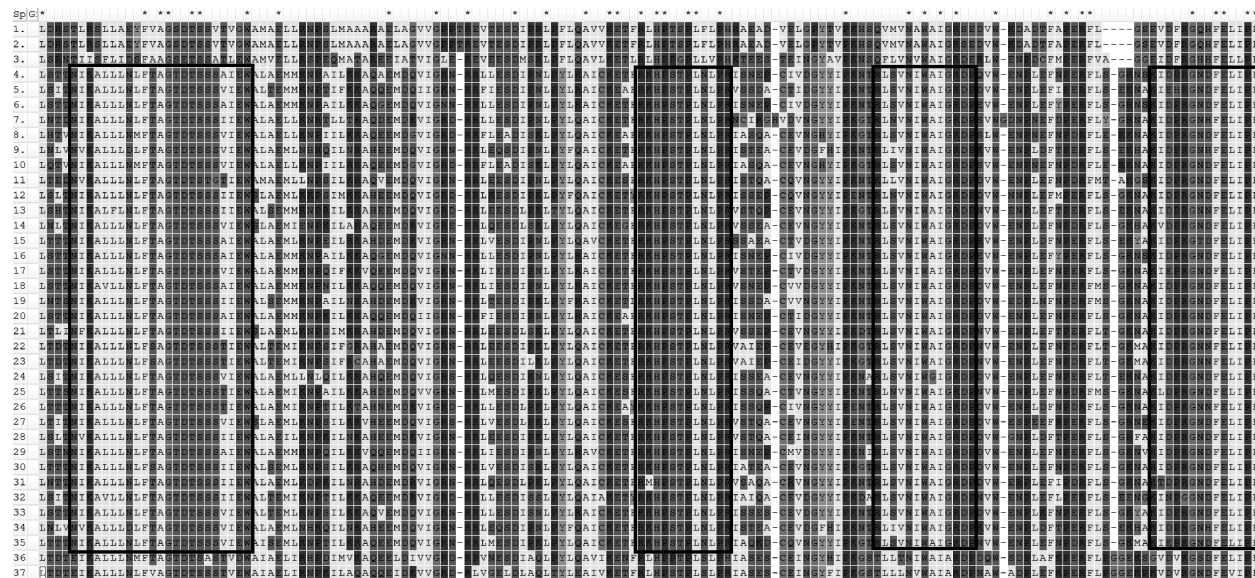
CHS 片段的 BLASTX 比对结果见表 2, 序列分析表明, 蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢尾 CHS 的核苷酸水平相似度为 96%, 氨基酸序列的相似度为 97%。BLASTX 比对分析发现, 克隆片段 37 ~ 309 bp 区段具有典型查尔酮合成酶 (CHS, PLN03170) 家族特征, E-value 为 7.46e-51。同时, 克隆片段与德国鸢尾 (*Iris germanica* L.) CHS (BAE53636.1) 氨基酸序列的相似性高达 93%, 并定位于德国鸢尾 CHS (AB219147.1) 核苷酸序列的 2 ~ 429 bp 区域。与射干 (*I. domestica* (L.) Goldblatt & Mabb.) CHS (AKA43763.1)、红檵木 (*Loropetalum chinense* (R. Br.) Oliv. var. *rubrum* Yieh) CHS (AFG25049.1) 的氨基酸序列相似性分别为 92% 和 85%。因此, 确定克隆片段为喜盐鸢尾 CHS 部分区段。

以 CHS-2 引物从喜盐鸢尾中获得 420 bp 片段, BLAST 分析确定克隆片段的 20 ~ 418 bp 区段属于 CHS (PLN03173) 家族, E-value 为 2.33e-78, 与德国鸢尾 (*Iris germanica* L.) CHS (BAE53636.1) 的氨基酸序列相似性达 88%, 该克隆片段定位于德国鸢尾 CHS (AB219147.1) 的 533 ~ 866 bp 区域, 表明本研究所克隆的 2 个片段为同一基因的上下游不同片段。

2.4 喜盐鸢尾 CHI 基因片段的克隆

CHI 片段的 BLASTX 比对结果见表 2, 蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢尾 CHI 的核苷酸水平相似度为 99%, 氨基酸序列的相似度为 99%, 序列比对结果显示, 克隆片段的 3 ~ 455 bp 区域与查尔酮异构酶 (CHI, PLN02804) 高度相似, E-value 为 6.88e-71, 可确定克隆片段为喜盐鸢尾 CHI。

克隆片段与荷兰鸢尾 (*Iris x hollandica*, AHL83557.1) CHI4 的氨基酸序列相似性为 95%, 此外, 克隆片段与鹿子百合 (*Lilium speciosum* Thunb., BAS69337.1) 的相似性为 80%, 与福斯特郁金香 (*Tulipa fosteriana* Irving, AHY20030.1) 的相似性为 77%。



Black box indicate conserved motifs in CYP75A subfamily. Species and GI number;1:*Iris halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov,2:*Iris halophila* Pall. ,3;*Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. ,4:CYP75A1 *Petunia x hybrida* hort. ex E. Vilm. (GI:1345642) ,5:C75A2 *Solanum melongena* L. (GI:584998) ,6:CYP75A3 *Petunia x hybrida* hort. ex E. Vilm. (GI:1345643) ,7:CYP75A4 *Gentiana triflora* Pall. (GI:5915817) ,8; CYP75A5 *Eustoma exaltatum* (L.) Salisb. ex G. Don subsp. *russellianum*(Hook.) Kartesz (GI:5915818) ,9;CYP75A6 *Campanula medium* L. (GI:5915819) ,10:CYP75A7 *Eustoma exaltatum* (L.) Salisb. ex G. Don subsp. *russellianum*(Hook.) Kartesz (GI:5915820) ,11:*Strelitzia reginae* Aiton (GI:442775394) ,12:*Glycine max* (L.) Merr. (GI:351726952) ,13:*Epimedium sagittatum* (Siebold & Zucc.) Maxim. (GI:294471383) ,14: *Cyclamen persicum* Mill. (GI:260447265) ,15;*Saintpaulia hybrid cultivar* (GI:310772437) ,16;*Petunia x hybrida* hort. ex E. Vilm. (GI:94467216) ,17;*Solanum tuberosum* L. (GI:568215379) ,18;*Lycium ruthenicum* Murray (GI:531831274) ,19; *Penstemon spectabilis* Thurb. ex A. Gray (GI:721609500) ,20: *Iochroma cyaneum* (Lindl.) M. L. Green ex G. H. M. Lawr. & J. M. Tucker (GI:723634331) ,21;*Ribes nigrum* L. (GI:471329056) ,22;*Delphinium grandiflorum* var. *chinense* Fisch. ex DC. (GI:613405133) ,23;*Aconitum vilmorinianum* Kom. (GI:390432312) ,24;*Rhododendron x pulchrum* Sweet (GI:256574656) ,25;*Antirrhinum kelloggii* Greene (GI:305682481) ,26;*Glandularia x hybrida* (Groenl. & Rimpler) G. L. Nesom & Pruski (GI:47524484) ,27;*Vitis vinifera* L. (GI:86156246) ,28;*Gossypium hirsutum* L. (GI:30421433) ,29;*Lycianthes rantonnei* (Carrière) Bitter (GI:12231884) ,30; *Vinca major* L. (GI:270156570) ,31;*Camellia sinensis* (L.) Kuntze (GI:62955864) ,32; *Viola x wittrockiana* Gams (GI:160948488) ,33; *Nierembergia* sp. NB17 (GI:22759901) ,34; *Campanula medium* L. (GI:1785488) ,35; *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (GI:3954807) ,36; CYP75B1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (GI:27151499) ,37;CYP75B2 *Petunia x hybrida* hort. ex E. Vilm. (GI:27151498)

图 4 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 基因产物与 CYP75A 与 CYP75B 保守序列比较

Fig.4 Comparison of conserved domains between the deduced amino acids from *IhF3'5'H-like* and members of CYP75A and CYP75B subfamily

表 3 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 基因产物与 CYP75A、CYP75B 和 CYP76AB 保守基序比较

Table 3 Comparison of conseverd motif CYP75A,CYP75B,CYP76AB and F3'5'H-like in *Iris* plants

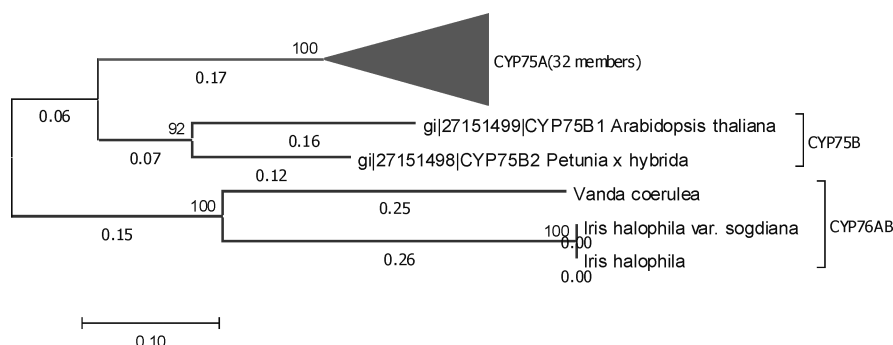
基因家族	基序 1	基序 2	基序 3	基序 4
Gene family	Motif 1	Motif 2	Motif 3	Motif 4
CYP75A	NIKALLNLFTAGTDTSSSAIEW	FRKHPSTPLNLPR	RLSVNIWAIGRDP	KIDPRGNDFFELIPF KIDPRGNNFELIPF
CYP75B	<u>E</u> IKALLN <u>M</u> FTAGTDT <u>S</u> ASTVDW	FR <u>L</u> HPPTPL <u>S</u> LP <u>H</u>	<u>T</u> LLN <u>V</u> WAI <u>A</u> RD <u>P</u>	K <u>V</u> D <u>V</u> RGNDFFEVIPF
CYP76AB	<u>T</u> IS <u>F</u> LIDS <u>F</u> A <u>G</u> SETSSATLEW	<u>L</u> RLHPGP <u>L</u> LVPH	<u>Q</u> FLVN <u>V</u> WAI <u>G</u> RD <u>P</u>	<u>E</u> ID <u>F</u> RG <u>H</u> HHFELLPF
Iris F3'5'H-like	<u>T</u> LR <u>S</u> LLAEYFVAGSDTSSVTVGW	FR <u>L</u> HPT <u>S</u> PL <u>F</u> LP <u>H</u>	<u>Q</u> VMVN <u>A</u> WAI <u>G</u> RD <u>P</u>	<u>E</u> <u>V</u> D <u>F</u> RG <u>Q</u> H <u>F</u> ELIPF

阴影和具有下划线的字符表示与 CYP75A 不同的序列,斜体表示不同于 CYP75A 和 CYP75B 但与 CYP76AB 相同的序列
Shading and underlined characters indicating different with CYP75A,and italic residuals indicating different with both CYP75A and CYP75B but same as CYP76AB

2.5 蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢尾 *CHS*、*F3'5'H* 在幼花中的表达分析

以喜盐鸢尾 Tubulin 为内参,采用定量 PCR 方法检测 *CHS*、*F3'5'H-like* 在蓝花喜盐鸢尾与喜盐鸢

尾中的表达发现,在完全发育但未开放的幼花中, *CHS* 表达量在蓝花喜盐鸢尾中比其在(黄花)喜盐鸢尾中高 5.27 ± 0.28 倍 ($n=6, P=0.00$); *F3'5'H-like* 表达量在蓝花喜盐鸢尾中比其在(黄花)喜盐鸢



该分析中使用的数据集与图 3 是相同的,分支 CYP75A 包括 32 个成员。

进化树是通过最小进化法构建的。bar 值表示距离,分支上的数字表示自举值

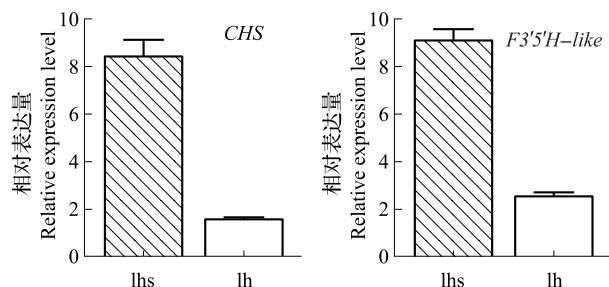
Data set used in this analysis is the same with Fig. 3, and branch CYP75A is collapsed with 32 members.

Tree is constructed with minimum evolution with bootstrap 500 times. bars indicates distance, and numbers above the branches indicate bootstrap value

图 5 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 基因与 CYP75A 与 CYP75B 亚家族的系统发生比较

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *IhF3'5'H-like* compared with Cytochrome P450 subfamily 75A and 75B

尾中高 3.71 ± 0.19 倍 ($n = 3, P = 0.00$), 表达量差异达到统计学极显著水平 (图 6)。另外, 与 qRT-PCR 所用同一批次材料所得到的转录组分析结果中, 在黄花与蓝花样本中累计组装得到 35543 条 Unigene, 其中只有 2 条注释为 *F3'5'H* 或 *F3'5'H-like*, 其中注释为 *F3'5'H* 的序列是根据 GenBank 数据库中荷兰鸢尾 *F3'5'H* 而得到的, 而荷兰鸢尾 *F3'5'H* 经过本文序列分析是错误注释, 它实际上是 *F3'H*。换言之, 在转录组测序结果中, 只有 1 条即 *F3'5'H-like* 可能将花青素合成导向飞燕草色素合成支路, 该转录本蓝花材料与黄花材料的 RPKM 值之比超过 100。综合转录组测序结果与 qRT-PCR 结果, 可以推断 *CHS*、*F3'5'H-like* 在蓝花喜盐鸢尾的蓝色色素合成中起关键作用。



lhs; *Iris halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov, lh; *Iris halophila* Pall.

图 6 *CHS* 和 *F3'5'H-like* 基因在喜盐鸢尾与蓝花喜盐鸢尾中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *CHS* and *F3'5'H-like* genes in *I. halophila* Pall. var. *sogdiana* (Bung) Grubov and *I. halophila* Pall.

3 讨论

喜盐鸢尾及其变种蓝花喜盐鸢尾是鸢尾属中较

少的几个花色有明显差异而且遗传十分稳定的天然种类之一, 而其他表型特征则高度一致, 从分子生物学角度看, 原变种实际上是蓝花变种的天然花色突变体, 而从传统分类学上, 因黄色花的喜盐鸢尾发现并定名较早, 因此将蓝花喜盐鸢尾定名为喜盐鸢尾的变种, 这种花色的稳定差异为通过正向遗传学分析其基因型的差异提供了绝佳的研究材料, 对解析鸢尾属花色苷积累机理有很大帮助, 这也是选择该植物进行研究的重要原因。然而由于喜盐鸢尾缺乏遗传图谱, 没有条件开展图位克隆, 本研究中通过内轮花被组织特异的比较转录组测序分析 (未发表数据), 发现了一些表达差异的线索, 根据转录组测序结果设计了基因特异引物, 以获得相关基因。

PCR 扩增片段经序列比对确认, 分别是蓝花喜盐鸢尾与黄花喜盐鸢尾的 *CHS*、*CHI*、*F3'5'H-like* 部分区段。上述 3 个基因与其他植物中的同源基因构建系统发生树可以发现, 喜盐鸢尾的相关基因与鸢尾科植物相似度最高, 其次是天门冬目 (Asparagales, 或百合目 Liliales), 与其他植物相似性最低, 该结果与喜盐鸢尾目前主流分类一致。

3.1 喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 是不同于典型 *F3'5'H* 的新蓝花基因

蓝花基因 *F3'5'H* 编码类黄酮-3', 5'-羟基化酶, 是花青素合成途径中的关键酶, 是蓝色色素形成所必不可少的关键基因。M. Koseki 等^[13] 采用反义 RNA 技术, 降低 *F3'5'H* 表达水平, 成功改变了花瓣中飞燕草素的含量, 使目标植物花瓣颜色从紫色转变为预期的白色。Y. Tanaka^[14] 在抑制蓝色夏堇花 *F3'5'H* 与 *F3'H* 表达的同时, 过量表达月季或天竺

葵的 *DFR* (编码二氢黄酮醇 4-还原酶), 成功获得了以天竺葵色素苷为主的粉红色花。由此可见, 抑制 *F3'5'H* 表达可使蓝花失去蓝色色素, 而导入外源 *F3'5'H* 或其他导致飞燕草素积累的基因可获得蓝色花, 淡紫色到深紫色的康乃馨新品种和玫瑰新品种就是利用该策略获得的^[14-15]。蓝色月季也是通过将三色堇的 *F3'5'H* 转入月季, 使转基因植株花瓣积累飞燕草色苷为配基的花青素^[16-17]。对于花瓣中含花青素苷的植物而言, 具有花青素合成途径中的大多数基因, 只是缺乏 *F3'5'H* 而未显蓝紫色。向此类植物中转入 *F3'5'H*, 可导致飞燕草色素苷的积累, 从而获得蓝紫色花色品种^[18]。

喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 基因在 BLASTX 搜索结果中出现较多的并不是经典的 *F3'5'H* 基因, 除了万带兰的 *F3'5'H-like* 基因外, 更多的是预测的牻牛儿苗醇-8-羟化酶基因。本研究所克隆的 *F3'5'H-like* 基因片段与 NCBI 公布的荷兰鸢尾 *F3'5'H* 基因同源性也很低 (氨基酸水平相似性 47%), 而与万带兰的相似性却高达 59%。利用荷兰鸢尾 *F3'5'H* 序列进行 BLASTP 搜索, 在搜索结果中多数却为 *F3'H*。为了检验这个结果, 选择了几种典型的单子叶植物与双子叶植物的 *F3'5'H* 与 *F3'H* 序列, 包括了鸢尾科、百合科、禾本科、兰科、茄科、葡萄科和桑科的代表植物, 与本研究获得的分别来自喜盐鸢尾和蓝花喜盐鸢尾的 *F3'5'H-like* 序列以及万带兰的序列构成一个混合数据集, 利用 MEGA 7.0 进行了模拟系统发育树构建。结果显示, 这些序列分为 3 组, 即 *F3'5'H* 组、*F3'H* 组和由本研究克隆序列与万带兰的序列组成的第 3 组, 其中荷兰鸢尾的 *F3'5'H* 与其他的 *F3'H* 出现在同一个分支中, 由此基本可以确定荷兰鸢尾的 *F3'5'H* 属于错误注释, 它应该属于 *F3'H* 家族。

经典的 *F3'5'H* 基因属于细胞色素 P450 超家族的 CYP75 家族 A 亚家族 (CYP75A), 第 1 个成员是从矮牵牛中克隆得到的, 后来人们所发现的 *F3'5'H* 基因亦均属这个亚家族, 而菊科的 *F3'5'H* 则是来源于 CYP75B (*F3'H* 属于这个亚家族) 的复制并获得了新功能^[9]。万带兰 *F3'5'H-like* 由 K. Ratanasut 等^[19] 根据已知的 *F3'5'H* 基因保守序列通过简并引物从万带兰的蓝色花瓣中获得, 但序列分析发现既与 CYP75A 亚家族同源性较低 (氨基酸水平 32% ~ 35%), 又与 *F3'H* 所属的 CYP75B 亚家族较低 (氨基酸水平 34% ~ 36%), 但是与 CYP76C 亚家族同源性略高 (氨基酸水平 41% ~ 44%), 因此细胞色素 P450 命名委员会将其正式分类为一个新的亚家族

CYP76AB, 该基因也称为 *CYP76AB1*, 为该亚家族的第 1 个成员。K. Ratanasut 等^[19] 发现 *CYP76AB1* 的表达水平变化与万带兰从花蕾期至花谢期蓝色花色素的积累水平变化完全一致。尽管缺乏直接的生化证据, 但是它的功能与万带兰的花瓣蓝色花青素密切相关, 在序列中也含有类黄酮-3', 5'-羟化酶 (PLN00110) 保守域结构, 因此称为 *F3'5'H-like*, 即一类不同于经典 *F3'5'H* 的蓝花相关基因的新类型。

喜盐鸢尾 *F3'5'H-like* 克隆片段与万带兰 *F3'5'H-like* (ACC59773.2) 的相似性为 57%, 而转录组数据中组装的该基因片段 (815 bp) 与万带兰 CYP76AB1 全长的氨基酸水平等同率为 59%, 相近率为 72% (未发表数据), 说明本研究所克隆的该基因属于 CYP76AB 亚家族, 这是被子植物所报道的第 2 个 CYP76AB 成员, 也是在兰科之外的植物中首次报道, 对鸢尾属植物蓝色花色的形成机理研究及花色改造具有重要意义。

3.2 *F3'5'H-like* 与 *CHS* 的差异表达导致花色差异

本研究所克隆的 *F3'5'H-like* 序列片段中, *lhsF3'5'H-like* 与 *lhF3'5'H-like* 核苷酸水平等同率为 99%, 分别在 157 与 433 位点有 2 个 A→G 点突变, 但皆为同义突变 (CCA→CCG 脯氨酸与 GCA→GCG 丙氨酸); *lhsCHI* 与 *lhCHI* 相比在 449 位点有另外 1 个同义突变, 另外在第 8、9 位点有一处 AC→CA 的突变, 可能来自 1 次倒位或 2 次独立突变, 但是在氨基酸水平上, 第 8 位的突变为同义突变 (GGA→GGC, 甘氨酸), 而第 9 位突变导致了氨基酸从组氨酸到天冬酰胺的突变 (CAT→AAT), 在包含 PLN02804 结构域的成员中, 该位点并非高度保守位点。荧光定量 PCR 的结果显示, *F3'5'H-like* 与 *CHS* 在蓝花喜盐鸢尾中表达比喜盐鸢尾分别高 3.71 倍和 5.27 倍。因此, 蓝花喜盐鸢尾花被中的蓝色色素积累很可能由 *F3'5'H*、*CHS* 基因高表达导致飞燕草色素积累导致。喜盐鸢尾 (黄花) 中虽然 *CHS*、*F3'5'H* 表达量较低, 但这 2 个基因仍有表达。除此之外, 喜盐鸢尾飞燕草色素合成是否中断于位于 *F3'5'H* 上游的黄烷酮 3-羟化酶 (*F3H*)、二氢黄酮醇还原酶 (*DFR*), 或下游的将无色飞燕草素转化为飞燕草素的花青素合成酶 (*ANS*) 等步骤或存在其他代谢通路, 有待后续研究确定。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004

- [2] 韩玉林. 铅与盐胁迫对喜盐鸢尾生长及生理抗性的影响[J]. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1649-1653
- [3] Kandeler R, Ullrich W R. Symbolism of plants; Examples from european-mediterranean culture presented with biology and history of art. June; Lilies[J]. J Exp Bot, 2009, 60(7): 1893-1895
- [4] Jeknić Z, Jeknić S, Jevremović S, et al. Alteration of flower color in iris germanica L. 'Fire bride' through ectopic expression of phytoene synthase gene(*crtb*) from *Pantoea agglomerans*[J]. Plant Cell Rep, 2014, 33(8): 1307-1321
- [5] Mizuno T, Yabuya T, Kitajima J, et al. Identification of novel c-glycosylflavones and their contribution to flower colour of the dutch iris cultivars [J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 72: 116-124
- [6] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54(4): 733-749
- [7] Morita Y, Saito R, Ban Y, et al. Tandemly arranged chalcone synthase a genes contribute to the spatially regulated expression of sirna and the natural bicolor floral phenotype in *petunia hybrida* [J]. Plant J, 2012, 70(5): 739-749
- [8] Holton T A, Tanaka Y. Blue roses—a pigment of our imagination? [J]. Trends Biotechnol, 1994, 12(2): 40-42
- [9] Tanaka Y, Brugliera F. Flower colour and cytochromes p450[J]. Philos T R Soc B, 2013, 368(1612): 20120432
- [10] He H, Ke H, Keting H, et al. Flower colour modification of chrysanthemum by suppression of F3'H and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus* F3'5'H gene [J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e74395
- [11] Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, doi:10. 1093/molbev/msw054
- [12] Jones D, Taylor W, Thornton J. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences[J]. Bioinformatics, 1992, 8(3): 275-282
- [13] Koseki M, Goto K, Masuta C, et al. The star-type color pattern in *petunia hybrida* 'red star' flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(11): 1879-1883
- [14] Tanaka Y. Flower colour and cytochromes p450 [J]. Phytochem Rev, 2006, 5(2-3): 283-291
- [15] Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, et al. Genetic engineering in floriculture[J]. Plant Cell Tiss Organ, 2005, 80(1): 1-24
- [16] Chandler S, Tanaka Y. Genetic modification in floriculture[J]. Crit Rev Plant Sci, 2007, 26(4): 169-197
- [17] Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(11): 1589-1600
- [18] 韩科厅, 胡可, 戴思兰. 观赏植物花色的分子设计[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 16-24
- [19] Ratanasut K, Wongkhamprai B, Maknoi S. Expression of a CYP76AB1 correlates with the sequential white-blue-white colour transition of *Vanda coerulea* petals [J]. Biol Plantarum, 2011, 55(2): 353-356