

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2020.06.013

红花檵木两个查尔酮合成酶的克隆及生物信息学分析

李彩虹^{1,2}, 荣朵艳^{1,2}, 廖晓珊^{2,3}, 张邦跃^{1,2}

(1. 湖南工业大学 生命科学与化学学院, 湖南 株洲 412007;

2. 湖南工业大学 百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心, 湖南 株洲 412007;

3. 株洲市农业科学研究所, 湖南 株洲 412007)

摘要: 为了研究红花檵木花青苷生物合成的分子机制, 克隆了红花檵木两个查尔酮合成酶 *LcCHS*s 基因, 并对克隆的两个基因进行了生物信息学分析。利用 RT-PCR 技术, 克隆得到红花檵木 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因, 其中 *LcCHS1* 的开放阅读框 (ORF) 为 1 170 bp, 编码 389 个氨基酸, *LcCHS2* 的 ORF 为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸。两个 *LcCHS*s 的氨基酸序列与来源于茶树 (*Camellia sinensis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 等植物 CHSs 的氨基酸序列一致性超过 83%, 且两个 *LcCHS*s 的氨基酸序列中参与 CHS 酶类催化的 3 个残基 (Cys164、His303 和 Asn336) 和两段 CHS 酶类重要序列 (“RLMMYQQGCFAGGTVLR” 和 “GVLFQFGPGL”) 均严格保守, 表明 CHS 在进化功能上的保守性。三级结构预测表明两个 *LcCHS*s 都能形成同源二聚体, 且两个 *LcCHS*s 蛋白的空间结构非常相似。

关键词: 红花檵木; 查尔酮合成酶; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q78; S687.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2020)06-0092-07

引文格式: 李彩虹, 荣朵艳, 廖晓珊, 等. 红花檵木两个查尔酮合成酶的克隆及生物信息学分析 [J]. 湖南工业大学学报, 2020, 34(6): 92-98.

Cloning and Bioinformatic Analysis of Two Chalcone Synthases from *Loropetalum Chinense* var. *Rubrum*

LI Caihong^{1,2}, RONG Duoyan^{1,2}, LIAO Xiaoshan^{2,3}, ZHANG Bangyue^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;

2. Hunan Provincial Engineering Research Center of Lily Germplasm Resource Innovation and Deep Processing,

Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;

3. Zhuzhou Agricultural Science Research Institute, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: In view of an investigation of the molecular mechanism of anthocyanin biosynthesis from *Loropetalum chinense* var. *rubrum*, a bioinformatical analysis has been made of the two chalcone synthase genes *LcCHS*s cloned from *Loropetalum L. chinense* var. *rubrum*. By adopting RT-PCR method, *LcCHS1* and *LcCHS2* genes of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* have been cloned, with 1 170 BP the open reading frame (ORF) of *LcCHS1*, encoding 389 amino acids, and with 1 182 BP the ORF of *LcCHS2*, encoding 393 amino acids. The amino acid sequences identity of two

收稿日期: 2020-08-10

基金项目: 湖南省科技厅基金资助项目 (2016NK2097), 株洲市科技局科学计划基金资助项目 (株科发 [2017]68 号), 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ50135), 株洲市科技人才托举工程基金资助项目 (2019TJ-06)

作者简介: 李彩虹 (1991-), 女, 山西朔州人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为植物分子育种,

E-mail: 1918586120@qq.com

通信作者: 张邦跃 (1985-), 男, 广东丰顺人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事植物分子育种方面的教学与研究,

E-mail: cauzhang@163.com

LcCHSs are above 83% to other plant CHSs, such as *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*. The catalytic triad (Cys164, His303 and Asn336) and two important sequences of CHS enzyme, “RLMMYQ QGCFAGGTVLR” and “GVLF GFGPGL”, are highly conserved, indicating a functional conservation of CHS during evolution. Tertiary structure prediction shows that both LcCHSs can form homodimers, with the spatial structures of the two LcCHSs proteins being very similar.

Keywords: *Loropetalum chinense* var. *rubrum*; chalcone synthase; gene cloning; bioinformatics analysis

1 研究背景

红花檵木 (*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 整株富含红色花青苷物质, 观赏价值高, 是我国南方地区常用的园林绿化植物^[1-2]。1905年 Molish 首次发现了花青苷晶体, 花青苷是由花色素与各种糖形成的糖苷, 它的基本结构是 3, 5, 7-三羟基-2-苯基苯并吡喃。花青苷的生物合成途径在矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilmorin)、金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 等模式植物上已经取得了较大的进展。花青苷元的合成是花青苷生物合成的核心。目前, 花青苷在植物体内的合成途径已经基本明确, 其合成途径是类黄酮物质合成的一个分支。红花檵木中, 花青苷物质也是决定其观赏价值的关键因素, 在植物的花、叶、果皮等组织的着色过程中起着重要作用, 同时也参与植物响应生物与非生物胁迫过程^[3]。因此, 通过开展红花檵木的花青苷物质合成研究, 不仅对深入了解红花檵木花青苷的合成途径提供依据, 而且也对促进红花檵木的育种具有现实意义。在植物花青苷生物合成过程中, 查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是第一个限速酶, 催化底物 4-香豆酰 CoA 和丙二酰-CoA 发生反应, 包括了三个步骤的反应过程: 底物的加载反应、丙二酰基脱羧反应和 3 次聚酮化合物延伸反应, 从而环化形成花青苷物质的基本骨架^[4-5]。

目前, 科研工作者已经对很多植物中 CHSs 的生物学功能进行了研究, 特别是其在花青苷物质生物合成过程中的功能取得了较多的研究成果。CHS 作为花青苷合成途径的第一个关键酶类, 对花青苷物质的积累是必需的。在发生基因共抑制 (cosuppression) 或自然沉默的矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中, *PhCHS-A* 基因在花朵部分区域的表达受到抑制, *PhCHS-A* 受抑制的部分区域不合成花青苷而显白色, 从而形成双色花^[6]。利用噬脂酶能够抑制矮牵牛 *PhCHS-A* 的转录后沉默, 从而促进花朵中花青苷物质的合成^[7]。对双色花的大丽花 (*Dahlia variabilis*) 的研究也表明, *DvCHS2* 基因在花朵部

分区域发生了转录后沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS), 从而造成同一朵花形成红白双色花, 而在富含类黄酮叶片中 *DvCHS2* 基因的表达量也远远高于那些低类黄酮含量的叶片^[8]。通过 RNAi 下调蓝猪耳 (*Torenia hybrida*) 的 *ThCHS* 基因的表达, 花朵的颜色由蓝色变为浅色或白色^[9]。干扰苹果 (*Malus × domestica*) 中 *MdCHSs* 基因的表达, 转基因株系的茎、花瓣及果皮中不能生成花青苷而表现为绿色, 同时二氢查尔酮和类黄酮含量也在转基因株系中急剧降低^[10-11]。利用病毒诱导基因沉默 (virus induced gene silencing, VIGS) 技术瞬时干扰猕猴桃中 *AeCHS* 基因的表达, *AeCHS* 基因表达下调的花瓣颜色变浅、花青苷含量降低^[12]。此外, 海棠 (*Malus crabapple*) 的 *McCHS*^[13]、香雪兰 (*Freesia hybrid*) 的 *FhCHS1*^[14] 和紫丁香 (*Syringa oblata* Lindl.) 的 *SoCHS*^[15] 也与相应植物中花青苷物质的积累紧密相关, 这些基因的异源过表达可导致转基因植株花朵颜色变深。

本文基于红花檵木叶片转录组测序数据, 筛选到两个 *CHS* 同源基因, 分别命名为 *LcCHS1* 和 *LcCHS2*。其中 *LcCHS1* 与之前报道的 *LcwrCHS1* 的核苷酸序列一致性很高^[16], 但 *LcwrCHS1* 只有本文中 *LcCHS1* 的部分 ORF (open reading frame, ORF) 序列, 且 *LcwrCHS1* 基因的推导氨基酸缺乏 CHS 酶的特征序列 (“GVLF GFGPGL”)。通过对转录组测序结果分析所筛选到的 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因的克隆及生物信息学分析, 将有利于提升对红花檵木花青苷生物合成机制的了解, 为进一步开发红花檵木的经济价值以及红花檵木品种的改良创造条件。

2 材料与方法

2.1 试验材料

供试红花檵木为多年生扦插苗, 种植于湖南工业大学校园内; 植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒, 购自北京艾德莱生物科技有限公司; PrimeSTAR GXL DNA 高保真酶和 M-MuLV 逆转录酶, 购自宝日医生

物技术有限公司。

2.2 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

利用植物多糖多酚总 RNA 提取试剂盒,按照试剂盒上的提取方法提取红花檵木叶片(50~100 mg/次)的总 RNA,并以总 RNA 为模板,利用 Oligo dT18 引物及 M-MuLV 逆转录酶,在 42 °C 下延伸 1 h 合成第一链 cDNA,并置于 -20 °C 冰箱备用。

2.3 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因克隆

基于已经完成的红花檵木转录组测序结果,利用其注释数据从中筛选到两个查尔酮合成酶 CHS 同源基因序列,分别命名为 *LcCHS1* 和 *LcCHS2*。这两个基因的转录组测序结果序列中都包含了完整的开放阅读框(ORF),其中 *LcCHS1* 基因的 ORF 为 1 170 bp, *LcCHS2* 基因的 ORF 为 1 182 bp。利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因 ORFs 序列上、下游特异引物 CHS1-F (5'-GCACCTCATTCTCTCTTCT-3')、CHS1-R (5'-TTTTGACTTTCCGACAGCCT-3')、CHS2-F (5'-AGAAGATAAAGAGAGTGAAGCAG-3') 和 CHS2-R (5'-TCATGAACTAATAATGAGCCATGAC-3'),以第一链 cDNA 为模板,利用高保真酶扩增 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 的 cDNAs 片段。PCR 体系为 25 μL,扩增程序为:预变性 95 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 68 °C 90 s, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 10 °C 保存。PCR 产物送测序公司进行第一代测序反应,以确定 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因的编码框。

2.4 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件对 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因的 ORFs 及编码氨基酸序列进行分析,获得基因的核苷酸及氨基酸对应表;采用 NCBI-BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 2 个 *LcCHSs* 同源序列进行搜索,获得氨基酸的同源序列,利用

DNAMAN 软件对 *LcCHSs* 与其他植物 CHS 同源氨基酸序列进行多序列比对,并分析氨基酸序列中的催化位点及关键结构域;利用 MEGA6 软件和邻接法(neighbor-joining method)进行 *LcCHSs* 与多种双子叶及单子叶植物 CHS 同源氨基酸的系统进化树构建;利用 SWISS-MODEL 在线网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)对 *LcCHSs* 蛋白质三级结构进行建模,并对 2 个同源蛋白的结构相似性进行分析。

3 结果与分析

3.1 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因序列分析

以红花檵木的 cDNA 为模板,CHS1-F 和 CHS1-R 为引物进行 PCR 扩增反应扩增 *LcCHS1* 基因的 cDNA 序列,CHS2-F 和 CHS2-R 为引物扩增 *LcCHS2* 基因的 cDNA 序列,产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 的 cDNAs 产物大小分别为 1 357 bp 和 1 242 bp (图 1,其中, M, Marker; 带 1, *LcCHS1* cDNA 的 PCR 产物; 带 2, *LcCHS2* cDNA 的 PCR 产物),且 cDNAs 片段均包含了完整的 ORFs 序列。图 2 为 *LcCHSs* 基因的核苷酸序列及其推导氨基酸序列图。

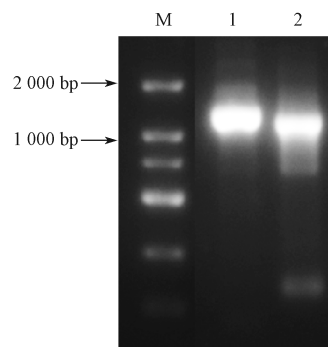


图 1 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因的 PCR 扩增图

Fig. 1 PCR amplification picture of *LcCHS1* and *LcCHS2* genes

```

1  ATGGTAACCGTCGAGGAGGTTTCGTAGAGCCCAACGGGCGCAGAGTCCGGCCACGATCATGGCCATCGGCACGGCAACTCCGCCAATTGTCTCGAGCAA
1  M V T V E E V R R A Q R A E G P A T I M A I G T A T P P N C V E Q
100 AGCACGTATCCTGATTACTTTTCGCATCAGCAATAGCGAGCACAACCGGAGCTTAAGGAAAAGTTTCAGCGCATGTGTGATAAATCGATGATTAAG
34  S T Y P D Y Y F R I T N S E H K T E L K E K F Q R M C D K S M I K
199 AAGCGTTACATGCACCTTGACAGAGGAGATCTTGAAGAAAACCCCAACGTTGTGTGCATACATGGCACCTTCATTGGATGCTAGACAAGACATGGTGGTG
67  K R Y M H L T E E I L K E N P N V C A Y M A P S L D A R Q D M V V
298 GTAGAAGTGCAGCAAGCTCGGCAAGAAAGCAGCCCAAGCAATCAAGGAATGGGGCAACCAAGTCCAAGATCACCCACCTTCGTTTGTACCAACC
100 V E V P K L G K E A A T K A I K E W G Q P K S K I T H L V F C T T
397 AGCGGTGTTGACATGCCGGTGCCGACTACCAAGCTCACGAAGCTCCTCGGCTCCGTCATCCGTCAAGCGACTCATGATGTACCAACAAGGTTGCTTT
133 S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L R P S V K R L M M Y Q Q G C F
496 GCGGTGGGCACTGTTCTCCGTTTGGCAAGGATCTCGCTGAGAACCAACAAAGGCGCCGCTGCTCTGTTGTTTGTCTGAAATTACCGCAGTCACCTTC
166 A G G T V L R L A K D L A E N N K G A R V L V V C S E I T A V T F
595 CGAGGCCCGAGTGTGCTCATCTTGACAGTTTGGTGGTCAAGCATTGTTTGGTGTGATGGTGCAGCTGCACCTATAGTTGGTTCGGACCCAGTTCAGGT
199 R G P S D A H L D S L V G Q A L F G D G A A A L I V G S D P V P G
694 GTCGAGAAACCATTTGTCGAGATGGTTTCTCGGGCCCAACCATTTCTCCGATAGCGAAGGTGCTATTGATGGACACCTTCGGGAGGTGGGATTGACA
232 V E K P L F E M V S A A Q T I L P D S E G A I D G H L R E V G L T
793 TTCCATCTTCTTAAGGATGTGCTGGGCTCATTTTGAAGAACATCGAAAAGAGCCTAAACGAAGCCTTCAACCTTTGGGAATTCGGATTGGAACCTCA
265 F H L L K D V P G L I S K N I E K S L N E A F Q P L G I S D W N S
892 CTTTACTGGATTGCACCCCGGTGGGCTGTATATTGGATCAAGTAGAGGCCAAGTTAGCCCTAAAACCCGAAAAGCTCCGAGCTACACGTCACGTTG
298 L Y W I A H P G G P A I L D Q V E A K L A L K P E K L R A T R H V
991 CTTAGCGAGTACGTAACATGTCGAGCGCGTGTCTATTATTTTGGATGAAATCGGGAAGAAGTCAGCCGAGGAGGGGCTTCAGACCACTGGTGAG
331 L S E Y G N M S S A C V L F I L D E M R K K S A E E G L Q T T G E
1090 GGGCTCGAGTGGGGTGTGCTCTTTGGGTTGGACAGGGCTCACTGTTGAGACTGTGGTCTCATAGTGTGCTGCTTTAA
364 G L E W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S V P V *

```

a) *LcCHS1*

1 ATGGCATCAGTTGAAGAAATCAGAAAGGCCAGAGAGCTGAGGGTCCAGCCACGATCTAGCAATTGGCACAGCTACACCCACAATTGTGTACCAA
1 M A S V E E I R K A Q R A E G P A T I L A I G T A T P H N C V Y Q
100 GCTGACTACTCTGATTACTTTCTGATCACCACAGCGAGCAGATGACCGAGCTAAAGAGAAAGTTCAAGCGGATGTGTGACAAATCCATGATAAAG
34 A D Y P D Y Y F R I T N S E H M T E L K E K F K R M C D K S M I K
199 AAACGATACATGCATTGACTGAAGAAATCTGAAAGAAAACCCCAAAATCTGCGAATACATGGCTCCGTCTCTTGATGCTCGTCAAGATATGGTGGTA
67 K R Y M H L T E E I L K E N P K I C E Y M A P S L D A R Q D M V V
298 GTAGAGGTCCAAAATTTGGGCAAGCAGCAACAAAGCCATCAAAGATGGGGCCAGCCAAAATCCAAAATCACCACCTCGTTTTCTGCACAAC
100 V E V P K L G K E A A T K A I K E W G Q P K S K I T H L V F C T T
397 TCCGGCTCGACATGCCGGCGCGGATTACAGCTCACAACAACTGCTCGGACTCCGCCCTCCGTTAAAGACTCATGATGTACCAACAGGGATGTTTC
133 S G V D M P G A D Y Q L T K L L G L R P S V K R L M M Y Q Q G C F
496 GCCGGCGCACCTTCTCGTCTCGTAAAGATTAGCCGAGAACACCGCGCGCTCGTGTCTCTGCTGTTTGTTCGGAGATTACAGTGTCACTTTC
166 A G G T V L R L A K D L A E N N A G A R V L V V C S E I A V T F
595 CGTGGACCTCCGATTCCCAITTTGGATTCTTATGGGTCAAGCTCTGTTTGGGGATGGAGCAGCTGCGGTCTAATTGGGGCTGACCCAGATCCGAAA
199 R G P S D S H L D S L V G Q A L F G D G A A A V I I G A D P D P K
694 ATCGAAGTCTCTGTTTCAACTCGTCTCGCGGCTCAGACGATTCTCCCTGACTCGGATGGAGCCATTGATGGGCATTGAGTGAAGTGGTCTTACA
232 I E R P L F Q L V S A A Q T I L P D S D G A I D G H L R E V G L T
793 TTTCAITTTACTGAAAGATGTTCTGGGTGATTCTAAGAACATGAAAACTCACTCAATGAAGCTTCAAACCCATTGGAATCAGTGTGGAACCTCG
265 F H L L K D V P G L I S K N I E K S L N E A F K P I G I S D W N S
892 CTCTTCTGGATCGCTCACCAGGTTGGTCCCGGATTCTTGACCAGGTTGAAGCTAAGCTCGGTTTGAAGAGGAGAACTCAGAGCAACTCGCCAGAT
298 L F W I A H P G G P A I L D Q V E A K L G L K E E K L R A T R Q V
991 CTGAGCGAGTATGGAAACATGTCGAGTCTGTTGTTTGTATCTTGAAGTGAAGGAGAAAGTCTCTTGAAGAGGAGAAAGTACCCTGGAGAA
331 L S E Y G N M S S A C V L F I L D E V R K K S L E E G K V T T G E
1090 GGATTGGATTGGGTGTTCTGTCTCGGTTCCGGCTTACCGTTGAGACAGTGTGTTTACACAGTGTCCCTGCAGTCACGACTCACTGA
364 G L D W G V L F G F G P G L T V T V V L H S V P A V T T H *

b) *LcCHS2*

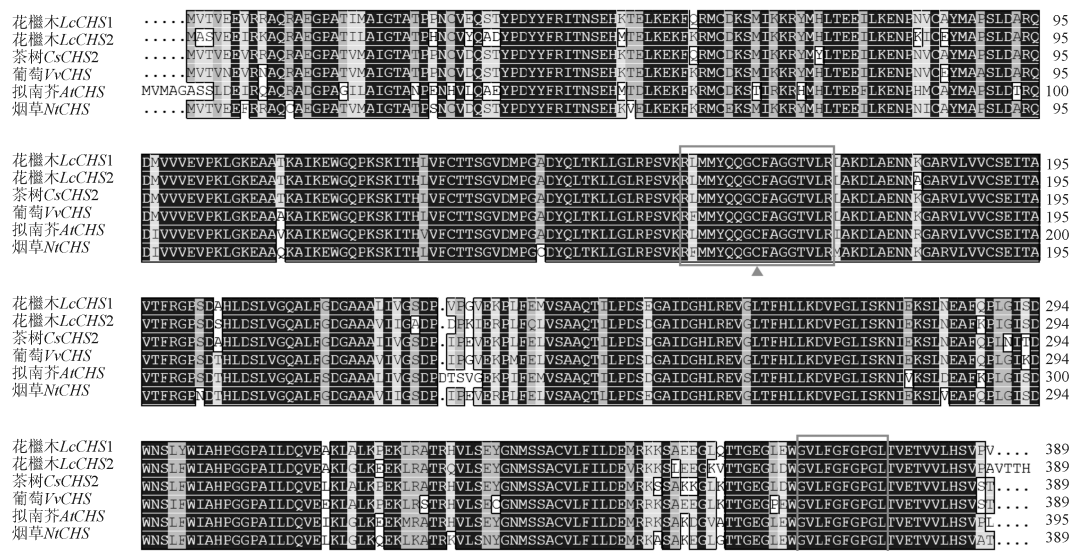
图2 *LcCHSs* 基因的核苷酸序列及其推导氨基酸序列Fig. 2 Nucleotide sequence with its deduced amino acid sequence of *LcCHSs* gene

对 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 基因的 ORFs 序列进行分析表明, *LcCHS1* 的 ORF 全长为 1 170 bp, 编码 389 个氨基酸 (图 2a); *LcCHS2* 的 ORF 全长为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸 (图 2b)。

3.2 同源性比对及系统进化树构建

利用 DNAMAN 软件, 将红花檵木 *LcCHS1*

和 *LcCHS2* 的氨基酸序列与其他植物 CHSs 进行氨基酸多序列比对, 结果如图 3 所示。其中, 三角形标记处代表三元催化残基 “Cys164、His303 和 Asn336”; 方框代表 CHS 功能活性部位 “RLMMYQQGCFAGGTVLR” 和 CHS 家族特征序列 “GVLFQGFPGPL”。

图3 *LcCHSs* 与其他植物 CHSs 氨基酸多序列比对Fig. 3 Multiple alignment analysis of *LcCHSs* with other plant CHSs

红花檵木 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 之间的氨基酸序列一致性为 89.3%。同时, 红花檵木 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 与多种植物 CHSs 氨基酸序列具有非常高的序列一致性, *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 与茶树 *CsCHS2* (*Camellia sinensis*, XP_028080516.1)、葡萄 *VvCHS* (*Vitis vinifera*, AEP17003.1)、拟南芥 *AtCHS* (*Arabidopsis thaliana*, AAB35812.1)、

烟草 *NtCHS* (*Nicotiana tabacum*, NP_001312634.1) 氨基酸序列一致性均超过 83%。将氨基酸序列与以前的研究结果^[16]进行比较分析, 表明在 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 的氨基酸序列中, 参与催化的 3 个残基 (Cys164、His303 和 Asn336) 严格保守。同时, 2 个 *LcCHSs* 均包含有保守的 CHS 酶功能活性位点 “RLMMYQQGCFAGGTVLR” (156~172) 和 CHS

酶特征序列“GVLFQFGPGL”(368~377)。

利用MEGA6和邻接法,并将bootstrap设置为1 000次重复,对LcCHSs和多种双子叶植物以及单子叶植物的CHSs蛋白进行系统进化树构建,具体包括茶树*CsCHS2*、葡萄*VvCHS*、拟南芥*AtCHS*、烟草*NtCHS*、核桃*JsCHS*(*Juglans sigillata*, ASU91339.1)、榴莲*DzCHS1*(*Durio zibethinus*, XP_022721946.1)、毛果杨*PtCHS1*(*Populus trichocarpa*, XP_002303821.2)、矮牵牛*PhCHS-A*(*Petunia hybrida*, P08894.1)、牡丹*PsCHS*(*Paeonia suffruticosa*, AEK70333.1)、芍药*PtCHS*(*Paeonia lactiflora*, AEK70334.1)、玉米*ZmCHS*(*Zea mays*, NP_001142246)、水稻*OsCHS*(*Oryza sativa*, BAB39764.1)、小麦*TaCHS*(*Triticum aestivum*, AAQ19321.1)。如图4所示,2个LcCHSs在系统进化上与双子叶植物CHSs蛋白的亲缘关系较近,与单子叶植物的CHSs蛋白的亲缘关系较远。其中红花檵木的*LcCHS1*蛋白与来源于茶树和葡萄的CHSs蛋白的亲缘关系较近,*LcCHS2*蛋白与来源于牡丹和芍药的CHSs蛋白的亲缘关系较近。

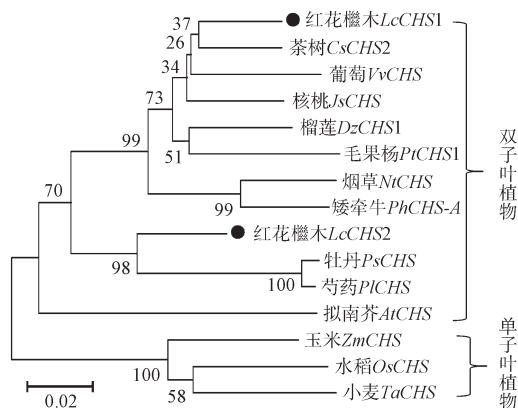
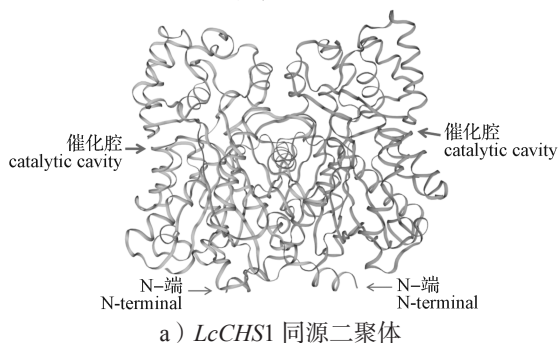


图4 LcCHSs系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of LcCHSs

3.3 LcCHSs蛋白三级结构预测

利用SWISS-MODEL在线软件对红花檵木的*LcCHS1*和*LcCHS2*蛋白进行三级结构预测,以拟南芥*AtCHS*蛋白的晶体结构为模型,进行红花檵木LcCHSs的三级结构建模,结果如图5所示。



b) *LcCHS2*与*LcCHS1*单体三级结构相似性分析

图5 LcCHSs蛋白三级结构预测结果

Fig. 5 Tertiary structure prediction of LcCHSs protein

*LcCHS1*能够形成同源二聚体,且预测的催化活性部位位于二聚体的外侧(图5),*LcCHS2*蛋白也形成同源二聚体形式。*LcCHS1*蛋白单体与*LcCHS2*蛋白单体的三级结构高度相似,其多肽链空间结构高度重叠,表明2个LcCHSs蛋白功能的保守性。

4 试验结果讨论

CHS是类黄酮生物合成途径的第一个限速酶,其活性影响着多种类黄酮物质的生物合成,因此CHS基因对于植物花色形成、植物生长发育及抗性形成都会产生影响^[6-10,17]。利用自然或转基因材料研究,已证实了来源于矮牵牛、大丽花、苹果、猕猴桃等植物的CHSs在花青苷物质的合成过程中有重要的作用^[6-15]。CHS基因表达变化会影响类黄酮物质的合成,从而改变植物细胞对生长素的转运能力、影响植株的生长发育及对生长素类除草剂的抗性^[9-10,18],影响了细胞的扩张^[19]及木本植物中木质部的形成^[20]。CHS基因还参与了植物对非生物胁迫抗性的建立,例如紫茎泽兰的*EaCHS1*参与抗盐性的形成^[21],桑葚的CHS基因参与耐盐、耐热及耐旱性的形成^[22]。

本研究克隆了2个红花檵木LcCHSs基因,分别编码389和393个氨基酸,2个LcCHSs氨基酸序列一致性非常高,达89%。2个LcCHSs的氨基酸长度与多种植物的CHSs相近,例如茶树*CsCHS2*(389个氨基酸)、葡萄*VvCHS*(389个氨基酸)、烟草*NtCHS*(389个氨基酸)、拟南芥*AtCHS*(395个氨基酸),且氨基酸序列一致性均超过83%。同时,氨基酸序列中参与催化的3个残基(Cys164、His303和Asn336)、两段CHS重要序列“RLMMYQQGCFAGGTVLR”(156~172)和“GVLFQFGPGL”(368~377)都在两个LcCHSs中高度保守,这表明了两个LcCHSs功能的保守性。在之前的研究中,已经有*LcCHS1*蛋白的报道

(GenBank: AFG25049.1), 其氨基酸全长为 232, 该蛋白缺乏 CHS 的特征序列“GVLFQFGPGL”, 经过序列比对, 证实 *LcCHS1* 为本文 *LcCHS1* (389 个氨基酸) 的部分序列, 这可能是由于利用 RACE 技术进行 *LcCHS1* 的 cDNA 扩增时没有完全扩增到两端, 或者是由于 mRNA 发生了可变剪切, 造成了编码框的改变。

系统进化树分析结果表明, 红花檵木两个 LcCHSs 分别与不同植物 CHSs 的亲缘关系较近, 但考虑到两者之间氨基酸序列的一致性很高, 且通过三级结构建模也证实了两者蛋白空间结构非常相似, 推测 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 蛋白可能存在功能冗余。但两个 LcCHSs 在红花檵木花青苷生物合成的功能还需要进一步研究, 特别是基因的时空表达及响应环境的表达差异。在植物中, CHS 基因的表达受到多种内、外在因子的诱导, 例如 JA (jasmonic acid)、ABA (abscisic acid)、SA (salicylic acid)、紫外线 B、干旱、低温等^[21-27], 这是由于类黄酮在植物响应并抵御生物或非生物胁迫中起重要作用, 而作为类黄酮生物合成的第一个关键酶往往会被快速诱导表达。同时, 为了能更好地了解 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 的功能, 还需要对基因的体内调控机制开展研究, 包括转录调控、转录后调控和翻译后调控, 例如海棠中的转录因子 McMYB4/5 可能参与 McCHS 的活性转录调控^[13], 矮牵牛和大丽花的小 RNAs 介导了 *PhCHS-A* 和 *DvCHS2* 的转录后调控^[6,8], 而蛋白水解酶 KFBCHS 调控 CHS 蛋白质翻译后的降解进程^[28]。通过对 *LcCHS1* 和 *LcCHS2* 响应内外因子的表达特征分析、以及体内分子调控机制的研究, 将能够更好地了解这两个 LcCHSs 基因在红花檵木叶色形成、响应环境变化及生长发育中的作用。

参考文献:

- [1] 黄瑞康, 杨金桂, 贺中华, 等. 红檵木资源调查研究[J]. 湖南农业科学, 1998(4): 44-45.
HUANG Ruikang, YANG Jingui, HE Zhonghua, et al. The Resource Investigation of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*[J]. Hunan Agricultural Sciences, 1998(4): 44-45.
- [2] 彭闰珉, 于晓英. 湖南檵木属植物的园林应用现状调查与分析[J]. 天津农业科学, 2012, 18(6): 152-155.
PENG Runmin, YU Xiaoying. Investigation and Analysis of the Landscape Application Present Situation of *Loropetalum* in Hunan Province[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2012, 18(6): 152-155.
- [3] DIXON R A, PAIVA N L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism[J]. The Plant Cell, 1995: 1085-1097.
- [4] PANDITH S A, RAMAZAN S, KHAN M I, et al. Chalcone Synthases (CHSs): The Symbolic Type III Polyketide Synthases[J]. Planta, 2019, 251(1): 15.
- [5] LIOU G, CHIANG Y C, WANG Y, et al. Mechanistic Basis for the Evolution of Chalcone Synthase Catalytic Cysteine Reactivity in Land Plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(48): 18601-18612.
- [6] KASAI M, MATSUMURA H, YOSHIDA K, et al. Deep Sequencing Uncovers Commonality in Small RNA Profiles Between Transgene-Induced and Naturally Occurring RNA Silencing of Chalcone Synthase-A Gene in Petunia[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 63.
- [7] BAN Y, MORITA Y, OGAWA M, et al. Inhibition of Post-Transcriptional Gene Silencing of Chalcone Synthase Genes in Petunia Picotee Petals by Fluacrypyrim[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(5): 1513-1523.
- [8] OHNO S, HORI W, HOSOKAWA M, et al. Post-Transcriptional Silencing of Chalcone Synthase is Involved in Phenotypic Lability in Petals and Leaves of Bicolor Dahlia (*Dahlia Variabilis*) 'Yuino' [J]. Planta, 2018, 247(2): 413-428.
- [9] FUKUSAKI EI, KAWASAKI K, KAJIYAMA S, et al. Flower Color Modulations of Torenia Hybrida by Downregulation of Chalcone Synthase Genes with RNA Interference[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 111(3): 229-240.
- [10] DARE A P, TOMES S, JONES M, et al. Phenotypic Changes Associated with RNA Interference Silencing of Chalcone Synthase in Apple (*Malus × Domestica*)[J]. The Plant Journal, 2013, 74(3): 398-410.
- [11] DARE A, HELLENS R. RNA Interference Silencing of CHS Greatly Alters the Growth Pattern of Apple (*Malus × Domestica*)[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(8): e25033.
- [12] LI Y K, CUI W, QI X J, et al. Chalcone Synthase-Encoding AeCHS is Involved in Normal Petal Coloration in *Actinidia Eriantha*[J]. Genes, 2019, 10(12): 949.
- [13] TAI D Q, TIAN J, ZHANG J, et al. A Malus Crabapple Chalcone Synthase Gene, MCCHS, Regulates Red Petal Color and Flavonoid Biosynthesis[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110570.
- [14] SUN W, MENG X Y, LIANG L J, et al. Molecular and Biochemical Analysis of Chalcone Synthase from Freesia Hybrid in Flavonoid Biosynthetic Pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119054.
- [15] WANG Y, DOU Y, WANG R, et al. Molecular Characterization and Functional Analysis of Chalcone Synthase from *Syringa Oblata* Lindl. in the Flavonoid Biosynthetic

- Pathway[J]. Gene, 2017, 635: 16–23.
- [16] 许威, 于晓英, 陈己任, 等. 红花檵木 CHS 基因的克隆与序列分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(1): 24–28.
- XU Wei, YU Xiaoying, CHEN Jiren, et al. Cloning and Sequence Analyzing of Chalcone Synthase Gene in *Loropetalum Chinense* var. *Rubrum*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(1): 24–28.
- [17] DAO T T H, LINTHORST H J M, VERPOORTE R. Chalcone Synthase and Its Functions in Plant Resistance[J]. Phytochemistry Reviews, 2011, 10(3): 397–412.
- [18] PETTINGA D J, OU J J, PATTERSON E L, et al. Increased Chalcone Synthase (CHS) Expression is Associated with Dicamba Resistance in *Kochia Scoparia*[J]. Pest Management Science, 2018, 74(10): 2306–2315.
- [19] WANG C C, FU D Q. Virus-Induced Gene Silencing of the Eggplant Chalcone Synthase Gene During Fruit Ripening Modifies Epidermal Cells and Gravitropism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2623–2629.
- [20] ZUK M, DZIAŁO M, RICHTER D, et al. Chalcone Synthase (CHS) Gene Suppression in Flax Leads to Changes in Wall Synthesis and Sensing Genes, Cell Wall Chemistry and Stem Morphology Parameters[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 894.
- [21] CHEN L J, GUO H M, LIN Y, et al. Chalcone Synthase EaCHS1 from *Eupatorium Adenophorum* Functions in Salt Stress Tolerance in Tobacco[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 885–894.
- [22] WANG C H, ZHI S, LIU C Y, et al. Isolation and Characterization of a Novel Chalcone Synthase Gene Family from Mulberry[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 115: 107–118.
- [23] YU H N, WANG L, SUN B, et al. Functional Characterization of a Chalcone Synthase from the Liverwort *Plagiochasma Appendiculatum*[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(2): 233–245.
- [24] 何春艳, 甘露, 闫蒙举, 等. 草地早熟禾查尔酮合成酶基因 *PpCHS1* 克隆、功能与表达分析[J]. 中国草地学报, 2018, 40(4): 8–15.
- HE Chunyan, GAN Lu, YAN Mengju, et al. Cloning, Functional and Expression Analysis of Chalcone Synthase Gene *PpCHS1* in Kentucky Bluegrass[J]. Chinese Journal of Grassland, 2018, 40(4): 8–15.
- [25] 张变玲, 黄雪梅, 刘心怡, 等. 人参查尔酮合成酶基因 *PgCHS1* 的克隆与表达分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(12): 2010–2017.
- ZHANG Bianling, HUANG Xuemei, LIU Xinyi, et al. Cloning and Expression Analysis of Chalcone Synthase Gene *PgCHS1* in *Panax Ginseng*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2018, 40(12): 2010–2017.
- [26] 马立功, 张匀华, 孟庆林, 等. 向日葵查尔酮合成酶 *HaCHS* 基因的克隆与逆境应答[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(1): 19–26.
- MA Ligong, ZHANG Yunhua, MENG Qinglin, et al. Cloning and Stress Response of Chalcone Synthase Gene in Sunflower(*Helianthus Annuus*)[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(1): 19–26.
- [27] 朱宇佳, 郭宏, 孙涛, 等. 苦蕒查尔酮合成酶编码基因 (*PaCHS1*) 的克隆及表达谱分析[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(5): 757–762, 764.
- ZHU Yujia, GUO Hong, SUN Tao, et al. Cloning and Expression Profile Analysis of a Chalcone Synthase Gene (*PaCHS1*) from *Pichia Alopecuroides*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2018, 59(5): 757–762, 764.
- [28] ZHANG X B, ABRAHAN C, COLQUHOUN T A, et al. A Proteolytic Regulator Controlling Chalcone Synthase Stability and Flavonoid Biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2017, 29(5): 1157–1174.

(责任编辑: 申 剑)