

天然棕色棉查尔酮合成酶基因(*GhCHS1*)的克隆和 实时定量表达分析

杨会娜,田新惠,李艳军,李明月,冯鸿杰,孙杰*

(石河子大学农学院/新疆兵团绿洲生态农业重点实验室,石河子 832003)

摘要:根据植物查尔酮合成酶基因保守区序列设计引物,以发育 18 d 的天然棕色棉纤维为材料,用 RT-PCR 结合 RACE 技术分离得到了一个查尔酮合成酶基因的全长 cDNA(GenBank 登录号:EU921263),将该基因命名为 *GhCHS1*。实时荧光定量 PCR 检测显示,*GhCHS1* 基因在棕色棉纤维细胞中优先表达,且在棕色棉纤维中的表达量远高于其近等基因系白色棉,但是该基因在绿色棉中几乎检测不到。这些试验结果暗示,该基因可能在棕色棉纤维色素形成中发挥重要作用。

关键词:查尔酮合成酶;天然彩色棉;实时定量 RT-PCR

中图分类号:S562.035 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)01-0042-07

Cloning and Quantitative Analysis by Real-Time RT-PCR of a Chalcones Synthase Gene(*GhCHS1*) in the Natural Brown Cotton Fibers

YANG Hui-na, TIAN Xin-hui, LI Yan-jun, LI Ming-yue, FENG Hong-jie, SUN Jie*

(College of Agriculture/The Key Oasis Eco-agriculture Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: A full-length cDNA encoding CHS was cloned from brown cotton fiber of 18 days post anthesis by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) using specific primers based on the highly conserved sequences of plant CHS that had already known. Blast search revealed that it is a new gene, and was named as *GhCHS1* (GenBank accession: EU921263). The temporal and spatial expression patterns of *GhCHS1* gene were examined by the real-time quantitative PCR with the specific primers. The expression analysis indicated that *GhCHS1* gene was preferentially expressed in brown cotton fibers during development, and the expressed levels of *GhCHS1* gene in white fibers and green fibers were very low or undetectable, which suggested that *GhCHS1* gene might play an important role in brown pigmentation of naturally brown cotton fibers.

Key words: chalcones synthase; natural colored cotton; real-time quantitative PCR

花色素苷 (anthocyanins)、原花色素 (proanthocyanidins)、鞣红 (phlobaphenes) 等多酚类化合物是植物色素物质的主要成分,它们在植物体内通过类黄酮合成途径产生^[1]。查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是生物类黄酮合成的关键限速酶,它催化丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酸基和对羟苯丙烯酰辅酶 A 的 1 个乙酸基缩合,产生柚配基查尔酮和生松素查尔酮,而柚配基查尔酮是花青甙类色素和植物黄酮类物质合成的前体^[2-3]。

大量研究表明,植物花色的变异与 CHS 基因的表达量减少以及相应的 CHS 的活性降低有关^[4-5]。同时 CHS 在植物的抗菌机制、抗胁迫、细胞的发育和分化、花色素的积累和外源基因的表达等方面也起着重要的作用^[6]。

天然彩色棉,是棉纤维自身具有天然色彩的棉花^[7]。随着健康和环保理念的深入人心,彩色棉及其纺织品发展具有广阔的市场前景^[8]。但彩色棉纤维颜色单调、着色不均匀、色牢度和色饱和

收稿日期:2009-03-30 作者简介:杨会娜(1980-),女,硕士; * 通讯作者, sunjie@shzu.edu.cn.

基金项目:国家 973 前期专项(2007CB116210),兵团科技局基础研究项目(2006JC02)

度低等问题在很大程度上限制了其利用和发展^[9-10]。因此,明确彩色棉纤维色素形成及调控的分子机制,对利用基因工程手段解决目前彩色棉品种育种难题具有十分重要的理论和现实意义。

本文根据植物 CHS 基因的保守区设计引物,从棕色棉纤维细胞中分离得到了一个查尔酮合成酶基因。实时荧光定量 PCR 检测显示,该基因在棕色棉纤维细胞中优先表达,且在棕色棉纤维中的表达量远高于其近等基因系白色棉,这些试验结果暗示该基因可能在棕色棉纤维色素形成中发挥重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。彩色棉品种新彩棉 5 号(棕色)、新彩棉 7 号(绿色)由新疆天彩股份有限公司提供,新彩棉 5 号的白色棉近等基因系 NIL-C5 为本课题组创建。2006 年播种于新疆石河子大学农学院试验站,按常规操作进行农事作业和田间管理。棉花开花当天挂牌标记棉铃,采集 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 DPA(开花后天数)棉铃,用灭过菌的镊子小心地从胚珠上剥取纤维细胞,在液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱。

在实验室内新彩棉 5 号、新彩棉 7 号和 NIL-C5 的种子经硫酸脱绒,在 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱中水培养 2 周,分别取根、下胚轴和叶,花直接从成熟植株上采集,上述材料在液氮中速冻后,保存于 -80°C 冰箱。上述材料用于 RNA 的提取。

1.1.2 试剂和菌种。反转录试剂盒选用 Invitrogen 公司的 SuperScriptTM II Reverse Transcriptase;连接试剂盒采用 Promega 公司的 pGEM-Teasy Vector;RACE 试剂盒采用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit;实时荧光定量 PCR 试剂盒 EvaGreen 购买自北京博奥生物。大肠杆菌 Top10 菌种为本实验室自备。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取。棕色棉、绿色棉及白色棉根、下胚轴、叶、花和纤维细胞的总 RNA 的提取参照孙杰等^[11]报道的方法。

1.2.2 *GhCHS1* 基因 cDNA 克隆。参照肖月华等^[12]的方法,根据 GenBank 公布的棉花 EST 序列设计 RT-PCR 引物。CHSP1:5' GTG CTC GGA GAT TAC TGC 3' 和 CHSP2:5' CAG GTC CAA ACC CAA AGA 3'。以发育 18 d 的天然棕色棉纤维总 RNA 反转录得到的单链 cDNA 为模板,扩增体系 50 μL ,包括:cDNA 2.0 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)1.0 μL ,10 \times PCR Buffer 5 μL ,MgCl₂(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)1.5 μL ,dNTP(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)1.0 μL ,Taq 酶(5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.4 μL ,ddH₂O 补足至 50 μL 。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 45 s, 50°C 退火 45 s; 72°C 延伸 1 min,30 个循环, 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后连入 pGEM-T-easy 载体,转化 Top10 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,PCR 检测后送上海生工测序。

根据得到的序列,分别设计 3'和 5'RACE 引物,3' RACE 引物:F1:5' AAG CCA GAG AAG CTA CGA GCC ACA AGG 3'、F2:5' CAG GAG AAG GAT TGG AGT GGG GAG TGC 3';5' RACE 引物:F3:5' TGG CAA GAT CGT TTG GGC TGC TGA GAC T 3'、F4:5' TGG GCC TCT CGA TTT CGG GCA CGG GGT C 3'。按 SMARTTM RACE 试剂盒说明书进行操作,分别获得 3'和 5'端序列。

1.3 荧光定量 PCR

1.3.1 引物设计和标准曲线建立。CHS 基因是一个多基因家族,为避免同一家族其它基因表达的干扰,将定量分析的一个引物设计在 5'非编码区,R1:5' GCT GTT TGT AAT CAT CCG 3'和 R2:5' ATC CAG TGA AGG AGC CAT 3',目的片段 301 bp。内参基因为 Ubiquitin (GenBank No. AI727463),R3:5' CAG ATC TTC GTC AAA ACC CT 3'和 R4:5' GAC TCC TTC TGG ATG TTG TA 3',目的片段 197 bp。将 *GhCHS1* 和内参基因 Ubiquitin(Ubi)的单克隆质粒作为 *GhCHS1* 基因和内参基因的标准品。再将标准品分别进行 10 倍梯度稀释,稀释 6 个梯度,作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,标准品 DNA 设置 2 个重复。标准曲线和基因表达水平由系统自动分析,基线由软件自动设置。

1.3.2 荧光定量 PCR 体系和数据处理。 荧光定量 PCR 体系含 2×PCR buffer 10 μL, 20×Eva-Green 染料 0.6 μL, 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.4 μL, Hot start Taq 0.3 μL, ddH₂O 11.3 μL, cDNA 2.0 μL。利用 SMART CYCLER II 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 反应程序为 95℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 15 s, 52℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s; 45 个循环, 52℃ 读取荧光值; 循环结束后, 进行溶解曲线分析。

检测每份样品的 *GhCHS1* 和 UBI 基因 CT 值, 每份样品 3 次重复, 取其平均值, 根据标准曲线计算定量结果及校正值。使用 Microsoft Excel、SPSS 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 *GhCHS1* 基因的全长 cDNA 克隆与序列分析

用引物 CHSP1 和 CHSP2 以棕色棉 18 DPA 纤维细胞 cDNA 为模板进行扩增, 得到长约 560 bp 的片段。BLAST 分析确认为植物 CHS 的核心序列。根据得到的序列, 按照 RACE 试剂盒要求分别设计 5'、3' RACE 特异引物进行巢式 PCR 反应扩增其末端序列, 拼接后得到该基因的全长 cDNA 序列。该 cDNA 全长 1524 bp, 含有一个从 104 bp 到 1270 bp, 长度为 1167 bp 的开放阅读框, 编码 389 个氨基酸 (图 1)。通过 BLAST 比对, 根据同源性将其代表的基因命名为 *GhCHS1*。该

```

1      ACGCGGGGACCTTCTGTTCTTTTTTACCATTTCATAGCATAGCAGCTTAGTCCACACCTCC
61     AACCCCCCACCACCATTGGCTGTTTGTAAATCATCCGAAAAAAGAATGGTGACCGTGGAAGA
                                           M V T V E E
121    AGTTCGTAAAGGCTCAACCGTGCCCAAGGCCCTGCCACCGTGTGGCCATCGGCACATCACC
      V R K A Q R A Q G P A T V L A I G T S T
181    CCCCCTAATTGTGTTGATCAGAGCACATACCCTGACTACTATTTCCGTATCACAAATAG
      P P N C V D Q S T Y P D Y Y F R I T N S
241    TGAGCACAAAGACCGAGTTGAAAAGAGAAGTTCAAGCGCATGTGTGAAAAATCGATGATCAA
      E H K T E L K E K F K R M C E K S M I K
301    GAAACGATACATGTACCTTACAGAAGAGATTTTGAAGAAGAATCCCAATGTATGTGAATA
      K R Y M Y L T E E I L K E N P N V C E Y
361    CATGGCTCCTTCACTGGATGCTAGGCAAGATATGGTGGTAGTTGAGGTGCCAAAAGCTAGG
      M A P S L D A R Q D M V V V E V P K L G
421    CAAAAGACGACCCACCAAGGCCATTAAGGAGTGGGGCCAGCCCAAGTCCAAAGATCACCCCA
      K E A A T K A I K E W G Q P K S K I T H
481    CCTTGTCTTTTGCACCCTAGTGGTGTGGACATGCCTGGGGCTGACTACCAGCTCACCAA
      L V F C T T S G V D M P G A D Y Q L T K
541    GCTTTTGGGCCCTCCGCCCTCCGGTTAAGCGCCTCATGATGTACCAAGTGTGCTTCCGC
      L L G L R P S V K R L M M Y Q Q G C F A
601    ACGGGGGACGGTGTCTCCGAGTGGCTAAGGACTTAGCTGAGAACAACAAGGTGCTCGTGT
      G G T V L R V A K D L A E N N K G A R V
661    ACTTGTGTGTGCTCGGAGATTACTGCTGTACCTTCCGTGGACCTAGTACACTCACCT
      L V V C S E I T A V T F R G P S D T H L
721    AGACAGTCTAGTGGGCCAAGCATTGTTTGGTGTGGTGGCCGAGCTGTTATAATCGGGGGC
      D S L V G Q A L F G D G A A A V I I G A
781    AGACCCCATGCCCCGAAATCGAGAAGCCCATGTTTGAATAAGTCTCAGTAGCCCAAAGCAT
      D P M P E I E K P M F E I V S V A Q T I
841    CTGCCAGATAGTGTGGTGCATTGATGGTCACTTCCGTGAAGTTGGGCTTACATTCA
      L P D S D G A I D G H L R E V G L T F H
901    CCTTCTTAAGGATGTTCCGGGCTTATTTTCGAAGAATATAGAGAAGAGCCGTGTAAGC
      L L K D V P G L I S K N I E K S L V E A
961    ATTTCAACCATTGGGCATATCCGATTGGAACCTCCCTTTTTTGGATTGCTCATCCAGGTGG
      F Q P L G I S D W N S L F W I A H P G G
1021   TCCAGCAATATTGGACCAGGTAGAAGCCCAAGTTAGCACTGAAGCCAGAGAAAGCTACGAGC
      P A I L D Q V E A K L A L K P E K L R A
1081   CACAAGGCACGTTCTTTTCAGAGTATGGTAACATGTCAAGTGCTTGTGTTTTATTCATTT
      T R H V L S E Y G N M S S A C V L F I L
1141   GGATGAGATGAGGAAGAATCAAGGGGAAGATGGACTTCAGACAACAGGAGAAGGATGGA
      D E M R K K S R E D G L Q T T G E G L E
1201   GTGGGAGTGCTCTTTGGGTTCCGGACCTGGCCCTCACTGTTGAGACTGTTGTGCTCCATAG
      W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S
1261   TGTGTGCTTGAGCTCAAAGTTAAACAAACATGCCTTTTTAAGTAATTGGTCTGTGCTCCA
      V A A *
1321   CTTGGCTTGCAGTTTTATCTTCTTTTTTTCCTTTTTTTAGAACTOCTATGA&ATTTGTGT
1381   GTTTATTGTTAAAGACTAGAAAGCCTTTTGATGGTGTGGGCGGGAAGCTTAAAGCCTATTCA
1441   ATTCATGTATCAACTTATATTA&ATTTATGGCAATAATAAGTTACTTTGCAAACTATTCT
1501   ACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *GhCHS1* 基因 cDNA 序列及推定氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequence and putative amino acid sequence of *GhCHS1* gene

序列是在天然彩色棉中首次被发现,GenBank 登录号为 EU921263。

2.2 *GhCHS1* 编码产物及与其它植物 CHS 同源性比较

InterPro-Scan 在线分析 *GhCHS1* 编码产物结构域和功能位点,发现其具有典型的 CHS 蛋白的保守结构域(N 末端和 C 末端)。根据 NCBI CDS 进行保守区预测,*GhCHS1* 蛋白包含类 CHS 的保守区域和柚皮素基-查尔酮合成酶保守区域。采用 ExPASy pI/Mw 程序对其氨基酸序列进行了一级结构的预测,其理论等电点 pI=6.12,分子量

Mw =42.66 kD。

用 ClustalX 软件将获得的 *GhCHS1* 基因氨基酸序列与 GenBank 上公布的其它物种 CHS 氨基酸序列进行同源性比较(图 2)。结果表明,*GhCHS1* 基因氨基酸序列与葡萄、矮牵牛、月季、梨、黄蜀葵的 CHS 基因的同源性均达到了 90% 以上。利用 DNAMAN 软件对其编码蛋白质的特征分析表明,*GhCHS1* 氨基酸序列含有在所有 CHS 和类 CHS 的酶中相同的活性位点 Cys₁₆₄,His₃₀₃,Ans₃₃₆ 和 Phe₂₁₅;5 个组成底物(对羟基苯丙烯酰辅酶 A) 结合口袋的位点 Ser₃₃₈,Thr₁₉₇,Thr₁₉₄,Glu₁₉₂

<i>GhCHS1</i>	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
AmCHS	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
RhCHS	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
PcCHS	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
VvCHS	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
RsCHS	1	MVTVEEVRKAQRAEQGPATVLAIGTSTPPNCVDQSTYPDYYFRITNSEHKTELKEKFKRMC↓
↓		
<i>GhCHS1</i>	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
AmCHS	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
RhCHS	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
PcCHS	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
VvCHS	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
RsCHS	61	EKSMIKKRYMYL TEE ILKENPNVCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQP↓
↓		
<i>GhCHS1</i>	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
AmCHS	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
RhCHS	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
PcCHS	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
VvCHS	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
RsCHS	121	KSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAEN↓
		* * * * *
<i>GhCHS1</i>	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
AmCHS	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
RhCHS	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
PcCHS	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
VvCHS	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
RsCHS	181	NKGARVLVVCSEITAVTFRGSPDTHLDSL VGQALFGDGA AAVIIGADPPEIEKPMFELV↓
		* * * * *
<i>GhCHS1</i>	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
AmCHS	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
RhCHS	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
PcCHS	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
VvCHS	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
RsCHS	241	SAAQTILPDSG&IDGHLREVGLTFHLLKDV PGLISKNIEKSLNEAFQPLGISDWNLSLFW↓
		* * * * *
<i>GhCHS1</i>	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
AmCHS	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
RhCHS	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
PcCHS	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
VvCHS	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
RsCHS	301	IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLR&TRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAEGLKLT↓
		* * * * *
<i>GhCHS1</i>	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SVTA--↓
AmCHS	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SVTA--↓
RhCHS	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SVTA--↓
PcCHS	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SVGLTA--↓
VvCHS	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SVST--↓
RsCHS	361	TGEGLEWGVLF&GFGPGLTVETVVLH&SLCT--↓
		***** ↓

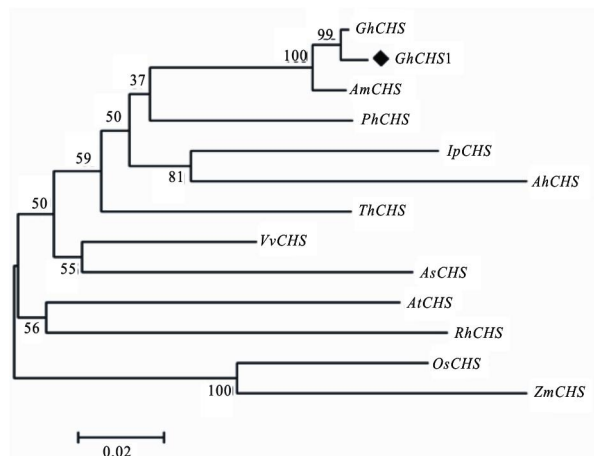
星号表示 CHS 基因保守活性位点;RhCHS: 玫瑰查尔酮合成酶 (BAC66467);PcCHS: 西洋梨查尔酮合成酶 (AAX16494);VvCHS: 葡萄查尔酮合成酶(BAB84111);AmCHS: 黄蜀葵查尔酮合成酶(ACE60221);RsCHS: 杜鹃查尔酮合成酶(CAC88858)。

图 2 不同来源植物 CHS 基因氨基酸序列同源性比较

Fig.2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of plant chalcone synthase

和 Ser₁₃₃; 7 个组成环化反应口袋的位点 Thr₁₃₂, Met₁₃₇, Phe₂₁₅, Ile₂₅₄, Gly₂₅₆, Phe₂₆₅ 和 Pro₃₇₅ 都是保守位点^[13-14]。

为明确 *GhCHS1* 蛋白与其它植物 CHS 的进化关系, 选取水稻、玉米等植物 CHS 蛋白进行序列比对, 并利用 MEGA4.1b 软件构建进化树(图 3)。结果发现, *GhCHS1* 在进化上与陆地棉、黄蜀葵最为接近, 与水稻、玉米的进化关系最远。这可能与棉花和黄蜀葵同属于锦葵科而且是双子叶植物, 而水稻、玉米是单子叶植物有关。



VvCHS: 葡萄(ABM67586); IpCHS: 圆叶牵牛(BAA20387); RhCHS: 黄雏菊(ABN79673), ZmCHS: 玉米(CAA42763); OsCHS: 水稻(BAA19186), AtCHS: 拟南芥(CAI30418); AhCHS: 花生(AAO32821), GhCHS: 陆地棉(ABS52573)。

图 3 不同物种查尔酮合成酶基因聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of CHS genes from different species

2.3 *GhCHS1* 基因的定量表达分析

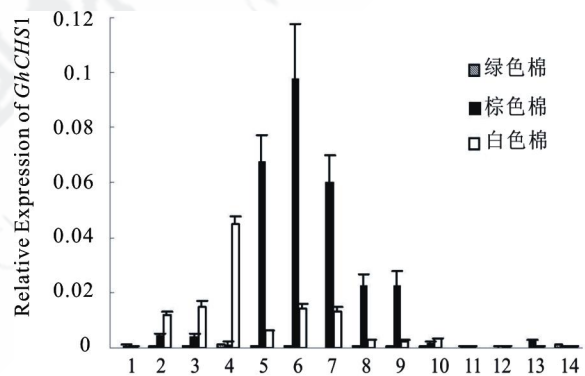
2.3.1 标准品鉴定与标准曲线。UBI 和 *GhCHS1* 基因标准曲线由系统自动生成。内标基因 UBI 的标准曲线为 $Y = -0.277X + 12.7$, 相关系数为 98.5%。

GhCHS1 基因的标准曲线为 $Y = -0.272X + 11.06$, 相关系数为 98.3%。

两条标准曲线的斜率相差不大, 相关系数都接近 1, 溶解曲线均为单峰, 扩增产物特异性非常好, 荧光曲线能够准确反映目的产物的扩增。

2.3.2 *GhCHS1* 基因 mRNA 转录水平比较。实时定量 RT-PCR 结果显示, 在棕色棉中, *GhCHS1* 基因主要在棉纤维细胞中表达, 在根、茎、叶、花的

表达都很低。在不同发育时期的纤维细胞中, 随着纤维发育表达量的迅速提高, 花后 6 d 达到最大, 然后表达量逐渐下降; 在白色棉中, *GhCHS1* 基因在根、茎、叶、花中都有表达, 除在根中的转录水平比棕色棉低以外, 其它都比棕色棉高, 尤其在花中表达量远高于棕色棉。 *GhCHS1* 基因在白色棉纤维中的表达趋势与棕色棉纤维中相同, 但转录水平显著低于棕色棉。在棕色棉开花后 6 d 的纤维中相对表达量高达 0.098, 比同时期白色棉纤维高 7 倍以上, 差异达显著水平。同时检测该基因在绿色棉中的表达情况, 发现该基因在绿色棉各组织中几乎都不表达(图 4)。基于上述 Real-time RT-PCR 检测结果, 推测 *GhCHS1* 基因表达活性与棕色棉纤维着色进程之间存在一定的相关性, 可能参与棕色棉纤维的着色过程并发挥着重要作用。



1: 根; 2: 茎; 3: 子叶; 4: 花; 5~14: 分别为开花后 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 d 的纤维细胞。

图 4 实时荧光定量 PCR 分析 *GhCHS1* 基因在棉花不同组织中的表达

Fig. 4 Real-time quantitative RT-PCR analyses *GhCHS1* expression in different cotton organs

3 结论与讨论

天然彩色棉是一类纤维细胞中含有色素物质的特殊类型棉花^[15]。近年来, 伴随彩色棉产业的发展, 彩色棉纤维中的色素组成、种类和形成机制已经成为研究热点。赵向前等^[16]通过对棕色棉纤维色素甲醇室温提取物的化学显色反应和紫外光谱吸收分析表明, 棕色棉纤维色素物质可能是黄酮类化合物, B 环上带有邻二酚羟基; 绿色棉纤维色素除黄酮类化合物外, 还含有 3 位被糖苷

化的黄酮醇化合物;詹少华等^[17]在纯化棕色棉纤维色素的基础上,通过化学性质鉴定并与已知的白色棉种皮色素比较,初步推断棕色棉色素的化学结构,认为棕色棉纤维中的色素不是类黄酮化合物,而是由单宁物质氧化形成的醌类化合物。西南农业大学利用 cDNA-AFLP 的方法分离到一个黄酮类基因片段,又根据黄酮类物质代谢过程中一些重要的酶基因的保守序列,从彩棉中分离到四个黄酮类基因,并据此推测棕色棉中的色素物质是原花青素^[12]。但由于缺乏对彩色棉纤维色素物质化学结构的直接分析和转基因验证结果,目前对天然彩色棉色素成分尚不清楚。尽管如此,多数学者推测彩色棉纤维色素可能是花青素或黄酮类物质。

类黄酮化合物是自然界中存在的最大的一类次生代谢产物,目前已知有 5000 多种,大多数具有颜色,是植物色素的主要成分^[1]。查尔酮合成酶是生物类黄酮合成的关键限速酶。很多植物的 CHS 基因已经被克隆,但有关该基因的研究大多是从改变花卉的颜色这一角度出发的,而对其在彩色棉纤维中的克隆、表达以及其对彩色棉纤维颜色调控的研究仍然是一个尚未深入的空白点。

本研究利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增技术从棕色棉纤维细胞克隆得到一个查尔酮合成酶基因 *GhCHS1*。GenBank Blast 分析发现它是首次在彩色棉中被克隆。实时荧光定量 RT-PCR 分析表明,该基因在棕色棉纤维中优先表达,且表达量远高于其近等基因系白色棉,据此推测 *GhCHS1* 可能参与棕色棉纤维色素的形成。同时检测 *GhCHS1* 基因在绿色棉中的表达情况,发现在绿色棉不同组织中该基因的表达量都很低,几乎检测不到,这暗示棕色棉和绿色棉色素可能属于不同的物质。

参考文献:

- [1] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis: a colourful model for genetic, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 485-493.
- [2] LU Xu, Zhou Wei, Gao Feng. Cloning, characterization and localization of CHS gene from blood orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Ruby[J]. *Mol Biol Rep*, 2009,36:1983-1990.
- [3] FARZAD M, Soria-Hernanz D F, Altura M, et al. Molecular evolution of the chalcone synthase gene family and identification of the expressed copy in flower petal tissue of *Viola cornuta*[J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 1127-1134.
- [4] DEROLE S C, Bradley, J M, Schwinn K E, et al. An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) flowers[J]. *Mol Breed*, 1998, 4: 59 - 66.
- [5] LUNKENBEIN S, Coiner H, De VOS C H R, et al. Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*)[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54 (6): 2145-2153.
- [6] COVERLY L C, Rausher M D. Analysis of a chalcone synthase mutant in *Ipomoea purpurea* reveals a novel function for flavonoids: amelioration of heat stress[J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12: 1113 -1124.
- [7] 杜雄明,张天真,袁有禄.有色棉的研究利用现状及展望[J]. *中国农学通报*, 1997, 13(3): 30-32.
DU Xiong-ming, Zhang Tian-zhen, Yuan You-lu. Advances and prospect of colored cotton[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 1997, 13(3): 30-32.
- [8] 杜雄明,石玉真.天然彩色棉纤维特性及开发利用[J]. *针织工业*, 2002(1): 29-33.
DU Xiong-ming, Shi Yu-zhen. Features of colored cotton fiber and its exploitation[J]. *Knitting Industries*, 2002(1): 29-33.
- [9] 华水金,王学德,赵向前,等.棕色棉纤维发育过程中碳水化合物和色素的变化特征[J]. *棉花学报*, 2008, 20(3): 239-241.
HUA Shui-jin, Wang Xue-de, Zhao Xiang-qian, et al. Dynamics of carbohydrate and pigment content during fiber development in brown-colored cotton[J]. *Cotton Science*, 2008, 20 (3): 239-241.
- [10] 李定国,聂以春,张献龙.陆地棉棕色纤维色泽的遗传分析[J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23 (6): 606-609.
LI Ding-guo, Nie Yi-chun, Zhang Xian-long. Genetic analysis of fiber color on brown upland cotton[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2004, 23(6): 606-609.
- [11] 孙杰,李艳军,李园莉,等.棉花纤维特异表达基因 *GhF1* 的分离及鉴定[J]. *棉花学报*, 2005, 17(5): 259-263.
SUN Jie, Li Yan-jun, Li Yuan-li, et al. Isolation and identification of specifically expression gene *GhF1* in cotton fiber cell[J]. *Cotton Science*, 2005, 17 (5): 259-263.
- [12] XIAO Yue-hua, Zhang Zheng-sheng, Yin Meng-hui, et al. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers[J]. *BBRC*, 2007, 358: 73-78.
- [13] HAN Ying-ying, Ming Feng, Wang Wei, et al. Molecular evolution and functional specialization of chalcone synthase superfamily from *Phalaenopsis Orchid* [J]. *Genetia*, 2006, 128: 429-438.

- [14] JIANG Chen-guang, Schommer C K, Kim S Y, et al. Cloning and characterisation of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*[J]. *Phytochemistry*, 2006, 23(67): 2531-2540.
- [15] 张 镁, 胡伯陶, 赵向前. 天然彩色棉的基础和应用[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2005:15-20.
ZHANG Mei, Hu Bo-tao, Zhao Xiang-qian. The basic knowledge and application of natural colored cotton[M]. Beijing: China Textile Press, 2005:15-20.
- [16] 赵向前, 王学德. 天然彩色棉纤维色素成分的研究[J]. *作物学报*, 2005, 31(4): 456-462.
- ZHAO Xiang-qian, Wang Xue-de. Composition analysis of pigment in colored cotton fiber[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31 (4): 456-462.
- [17] 詹少华, 林 毅, 蔡永平, 等. 天然棕色棉纤维色素光谱学特性及其化学结构初步判断[J]. *植物学通报*, 2007, 24(1): 99-104.
ZHAN Shao-hua, Lin Yi, Cai Yong-ping, et al. Preliminary deductions of the chemical structure of the pigment brown in cotton fiber[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, 24 (1): 99-104. ●

中国棉花杂志社
China Cotton Magazine House

