

葡萄风信子 *FLS1* 基因克隆及其表达与花色性状之间的 关联性分析

杜灵娟^{1,2}, 陈凯利^{1,2}, 刘雅莉^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室(西北农林科技大学)/农业部
西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)是类黄酮合成分支路口重要的节点酶。*FLS* 基因的表达不仅影响着黄酮醇合成,也影响着花青素苷积累和花色呈现。本研究采用 PCR 技术从葡萄风信子‘白丽人’中克隆到一条 *FLS* 基因(*MaFLS1*)。序列分析表明,*MaFLS1* cDNA 全长 1 152 bp,编码 383 个氨基酸。同源比对及进化分析表明,*MaFLS1* 属于 2-酮戊二酸与 Fe^{2+} 依赖型双加氧酶蛋白,具有典型的 FLS 蛋白功能域、DHQ 底物特异结合位点、 Fe^{2+} 和 2-酮戊二酸绑定位点;*MaFLS1* 与海枣、油棕的 FLS 同源性最高,可达 74%~75%,与拟南芥、矮牵牛等模式植物亲缘关系较远。荧光定量 PCR 分析发现,*MaFLS1* 基因在葡萄风信子中为非组织特异性表达模式,其根中表达量最高,鳞茎及花中的表达量其次,叶片中表达量最低;*MaFLS1* 在 3 个不同花色的葡萄风信子品种 5 个不同花发育时期表达差异显著,在白色品种‘白丽人’花发育的早期(S1 和 S2)时期表达较高,粉色品种‘粉日出’和蓝色品种‘亚美尼亚’晚期(S3 和 S4)表达量最高。本研究为进一步探讨葡萄风信子 *FLS* 基因在花色呈现中的功能及黄酮醇支路的分流竞争对花色的影响提供基因资源和依据。

关键词:葡萄风信子;花色;黄酮醇;*FLS* 基因;RT-PCR

中图分类号:S682.29 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2017)01-0106-08

Cloning of Flavonol Synthase Gene (*FLS1*) and Relativity Analysis of Its Expression with the Flower Color in Grape Hyacinth

DU Ling-juan^{1,2}, CHEN Kai-li^{1,2}, LIU Ya-li^{1,2*}

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas/ Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and
Germplasm Innovation in Northwest China, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Flavonol synthase (FLS) is a key node enzyme in flavonol synthesis pathway. The expression of *FLS* gene affects the syntheses of flavonol, anthocyanin and flower color. In this study, we cloned one *FLS* gene (designated as *MaFLS1*) from one white cultivar of grape hyacinth ‘White Beauty’, using the PCR technique. The full length cDNA of *MaFLS1* was 1 152 bp, which coded a 383-amino-acid protein. *MaFLS1* belonged to the 2-oxoglutarate iron-dependent oxygenase family, it had FLS functional domains, the residues binded with the DHQ substrate, ferrous iron and 2-oxoglutarate was similar with other FLSs. *MaFLS1* shared 74%—75% identity with date palm and oil palm, showing the distant relationship with model plants, like *Arabidopsis* and *Petunia*. Expression analysis indicated that *MaFLS1* expresses in roots, blubs, leaves, and flowers, with particularly high expression in roots and low expression in leaves. Express-

收稿日期:2016-09-26 修回日期:2016-10-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31471905);西北农林科技大学基本科研业务费科技创新专项(Z109021564)。

作者简介:杜灵娟,女,博士,讲师,研究方向:园林植物分子育种。E-mail:9511083@qq.com

* 通信作者:刘雅莉,女,教授,研究方向:园林植物分子育种。E-mail:lyl6151@126.com

Key words: grape hyacinth; flower color; flavonol; *FLS* gene; RT-PCR

FLS 可催化二氢黄酮醇(二氢山奈酚 DHK、二氢槲皮素 DHQ 及二氢杨梅素 DHM)合成其对应的黄酮醇类物质(山奈酚、槲皮素及杨梅素)(图 1)。FLS 属于一类大的基因家族——2-酮戊二酸依赖型双加氧酶(2-ODD),它包含了类黄酮代谢途径中 3

类不同的编码酶,即黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3 β -hydroxylase, F3H)、黄酮醇合成酶(flavone synthase, FLS)和花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)^[7]。有学者首次在矮牵牛中克隆到 *FLS* 基因并在酵母中表达^[8]。之后马铃薯(*Solanum tuberosum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、香芹(*Petroselinum crispum*)、大花洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)、草莓(*Fragaria* \times *ananassa*)、大豆(*Glycine max*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、黄芩(*Scutellaria baicalensis*)等多种植物中也克隆到 *FLS* 基因^[9-16]。此外针对 *FLS* 基因的表达变化对花色的影响展开了相关研究。最早有报道显示 *FLS* 基因表达量变化可引起矮牵牛花色变化^[8]。之后在洋桔梗中抑制本源 *FLS* 基因的表达,结果转基因植株早期花蕾中积累大量洋红色,同时其雌蕊也积累色素,此表现型在杂交后代中更为显著^[12]。在白色矮牵牛中过量表达金鱼草 *DFR* 基因或抑制矮牵牛 *FLS* 表达均可提高花青素积累量,呈现粉色花^[17]。在烟草中过量表达金花茶 *CnFLS1* 基因,可提高转基因植株中黄酮醇积累,降低花青素积累,并呈现白或浅黄花色^[18]。且研究发现 *FLS* 基因及 *DFR* 基因表达变化决定了 7 种观赏植物白色或红色花中黄酮醇和花青素积累量的变化;同时发现在

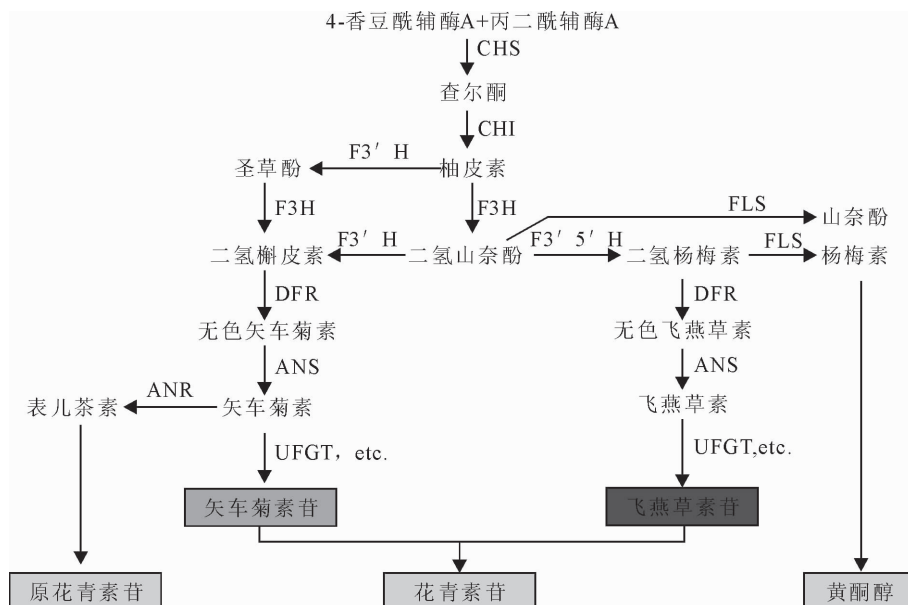


Fig. 1 The schematic diagram of flavonoid metabolic pathway in grape hyacinth

烟草中分别过量表达玫瑰、桃或矮牵牛的 *FLS* 基因,均可促进黄酮醇合成、抑制花青素积累,从而使花色变白;反之,在烟草中过量表达玫瑰或矮牵牛 *DFR* 基因,可提高内源 *DFR* 表达同时下调内源 *FLS* 基因表达,提高花青素合成,形成红色的花^[4]。这些研究证明了 *FLS* 基因在植物花色呈现过程中发挥着重要的作用,*FLS* 基因的表达与花色间存在着紧密的联系。然而,上述研究仅限于双子叶植物 *FLS* 基因的功能,有关单子叶植物 *FLS* 基因在花色形成中的功能尚未见报道。

本研究以单子叶植物葡萄风信子为研究材料,在课题组前期转录组测序的基础上,选择一条 *FLS* 基因的序列展开研究。利用 PCR 技术克隆 *FLS* cDNA 序列全长,并进行序列特征分析;并对其氨基酸序列进行同源性比对与进化分析;利用实时定量 PCR 技术分析葡萄风信子 *FLS* 基因表达模式与花色间的关系,为进一步研究葡萄风信子 *FLS* 基因在花色形成中的功能及黄酮醇支路的分流竞争对其花色的影响提供基因资源和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2015 年 3 月至 2016 年 9 月在西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室、农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室进

行。选择蓝、粉、白 3 种花色葡萄风信子品种(‘亚美尼亚’ *Muscari armeniacum*、‘粉日出’ *M. ‘Pink Surprise’* 及‘白丽人’ *M. aucheri ‘White Beauty’*) 为材料,将其种球种植于西北农林科技大学风景园林艺术学院试验田中。2015 年 4 月份采集 3 个品种 5 个不同发育时期的花^[20]、根、鳞茎、叶,液氮速冻后快速置于一 80℃ 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 葡萄风信子总 RNA 的提取与 *MaFLS1* 基因 cDNA 全长的克隆 采用 Omega 公司的植物总 RNA 快速提取试剂盒,从葡萄风信子的根、鳞茎、叶以及不同发育时期的花蕾(S1~S5)提取总 RNA,电泳检测后参照 Prime ScriptTMRT-PCR Kit 试剂盒(TaKaRa,日本)进行 RT-PCR 反应,合成 cDNA 第一链。

根据课题组前期转录组测序获得的 *FLS1* 注释序列,设计特异引物 *FLS1-F* 和 *FLS1-R*(表 1),以‘白丽人’cDNA 为模板进行全长 PCR 扩增。反应程序:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s;25 个循环,72℃ 延伸 5 min。电泳检测后回收预期大小条带的片段,连接 pMD19 载体,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞,蓝白斑筛选后,挑选阳性克隆送北京奥科生物科技有限公司测序。测序后拼接序列得到葡萄风信子的 *MaFLS1* 基因 cDNA 全长序列。

表 1 葡萄风信子 *FLS1* 基因克隆及表达分析所用的引物

Table 1 Primer sequences of <i>FLS1</i> gene used in cloning and real-time quantitative PCR		
引物名称	引物序列(5'~3')	用途
<i>FLS1-F</i>	ATGGATGAGGAACAAAAAGCCTCTTTTCTCTCTCT	cDNA amplification
<i>FLS1-R</i>	TCATGCAGCCTTCAGCGACTCCAATTG	cDNA amplification
<i>FLS1-qPCR-F</i>	CGTCGCGCATCAGATTTCAGGTAC	Real-time PCR
<i>FLS1-qPCR-R</i>	TAACGGAGCGAGCGGCAGAT	Real-time PCR
Actin-F	AACATTGAGAAAGAGTCCACCC	Real-time PCR
Actin-R	GCTTACCAGCAAAGATCAACCG	Real-time PCR

1.2.2 葡萄风信子 *MaFLS1* 基因生物信息学分析

葡萄风信子 *MaFLS1* 基因开放阅读框的查找用 NCBI 中的 ORF Finder 在线工具完成;氨基酸序列的组成成分及理化性质利用 ExPASy ProtParam 程序分析; *MaFLS1* 蛋白的亲水性/疏水性运用 ProtScale 在线工具预测; *MaFLS1* 蛋白的跨膜结构域利用 TMHMM 在线工具分析;利用 SignalP 4.1 Server 分析信号肽;用 SOPMA 软件预测 *MaFLS1* 的二级结构^[20]。用 NCBI 数据库中的 Blastp 进行同源序列的搜索,同源序列比对用 DNAMAN 软件完成;系统进化树的构建运用 MEGA5.0 软件完成^[21-23]。

1.2.3 葡萄风信子 *MaFLS1* 基因的时空表达分析

为了研究葡萄风信子 *MaFLS1* 时空表达模式及其与花色间的关系,根据 *MaFLS1* 基因序列设计实时定量 PCR 引物 *FLS1-qPCR-F* 和 *FLS1-qPCR-R*,以 *Actin* 为内参基因,进行实时定量 PCR(引物见表 1)。以反转录得到的葡萄风信子根、茎、叶,以及不同发育时期花蕾(S1~S5)cDNA 作为模板,参照荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司)说明书,在 BIO-RAD Cyclcr IQ₅ 荧光定量 PCR 仪上检测 3 个品种不同花发育时期及不同器官的 *MaFLS1* 基因的相对表达量。反应体系(20 μL)为:SYBR® Premix Ex Taq II 10 μL,PCR 正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL,cDNA 模板 1 μL(约 100 ng),ddH₂O 7.4 μL,反应程序

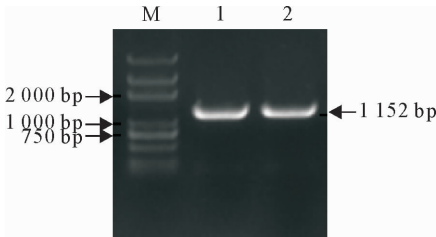
为:94 ℃ 3 min,94℃ 15 s,60℃ 30 s,45 个循环。定量 RT-PCR 软件会自动生成溶解曲线、标准曲线和扩增曲线,同时阈值(*Ct* 值)由 IQ5 软件自动产生。每个样品设置 3 个生物学重复,取平均值用 SigmaPlot 10.0 软件进行数据处理及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 葡萄风信子 *MaFLS1* 基因全长 cDNA 克隆与序列特征分析

为了解黄酮醇支路的分流竞争对花青苷合成及花色形成的影响,本研究选择黄酮醇合成途径的关键基因 *FLS* 展开研究。根据课题组前期转录组测序获得的 *FLS* 基因序列片段设计特异引物,以‘白丽人’cDNA 为模板 PCR 扩增基因全长,获得 1 条

长 1 152 bp 的条带(图 2),转化测序后序列拼接,分析其为完整的开放阅读框,具有起始密码子和终止密码子,编码 383 个氨基酸,是一条完整的基因序列(图 3)。并将该 cDNA 序列命名为 *MaFLS1*。



注:M. DNA 标准分子量;1,2. *MaFLS1* cDNA 全长扩增结果。

图 2 *MaFLS1* cDNA 全长扩增产物

Fig. 2 The full length of *MaFLS1* cDNA amplification

1	ATGGATGAGGAACAAAAAGCCTCTTTTCTCTCTAGTATTTTTTTAGCAACAGGGTGATTGTGCTTGATAGCCGAATTTGGTCGCCG
1	M D E E Q K S L F F S P S I F F S N R V I V L D S R I W S P
91	ATGGACAGCATCCAGGACTGGCCGAGACCGTCGAAGGGTGCAATCCATATCCGATAGCGGCCCCCATCATCCCCCAGCAGATATC
31	M D S I Q D W P E T V V R V Q S I S D S G T P I I P P R Y I
181	AAACCGCGTCCGAACGCCCATCTTCGATGAATCCTTGGACAACGACAACCAATCAATCTTAGCATTCCGGTCGTAGACTTCAGCCAC
61	K P P S E R P S S H E S L D N D N Q S N L S I P V V D F S H
271	CCGGACACGGTCGAGGCCGTGTCGGACGTTGACAGGGTGGGGTTCTTCAGGTTGTCAACCACGGCTAGACCCCTGCCTCATGAGG
91	P D T V E A V S D A C R G W G F F Q V V N H G V D P C L M R
361	AGAGCGAGGGAGGATTGGAGGCGCTTCTTCATCTCCCATGGAGGAGAAGCAAGTGTACGCGAACACGCCAAAACGTACAGGGGATAC
121	R A R E D W R R F F H L P M E E K Q V Y A N T P K T Y E G Y
451	GGCAGCCGCTAGGCGTAGAAAGGGGAGCCATTCTCGACTGGGAGACTACTATTTCTCCACCTCCTCCATTGTGCTCAAGAGCCAC
151	G S R L G V E R G A I L D W G D Y Y F L H L L P L C L K S H
541	AGCAAGTGGCCATCACTGCCTCCTTCCCTGAGGGGACAATCGACAGGTACGGGAAGGAGTGATAAAGTTCTGTAAAGGGTGATGGAA
181	S K W P S L P P S L R G T I D R Y G K E V I K F C E R V M E
631	TTGTGTCTTGGGATTGGGGTTGGAGGAGGGTCCCTGCAAAAAGCCTTCGGAGGGCGGAGAAGGGGGAGCTTGATCGGGTGAAT
211	L L S L G L G L E E G R L Q K A F G G A E K G G A C M R V N
721	TTCTACCCGAAGTCCCGCAGCCCGACCTCACGCTCGGCTCTCTCCCACTCTGACCCCGGCGCATCACCGTCTCTCCCGCAGCAGC
241	F Y P K C P Q P D L T L G L S S H S D P G G I T V L L P D D
811	CGCGTCAAGGGGCTTCAGGTCGCGCGGGGCGACGCTGGGTACCGTCCATTCCATCCCGACTCTTCATCGTCAACGTGCGGATCAG
271	R V K G L Q V R R G D A W V T V H S I P D S F I V N V G D Q
901	ATTCAAGTACTGAGCAACGCGGCTTACAAGAGCGTGGAGCACAGGGTGATGGTGAACGAGAGGCGGAGGTCTGTCTGTAGCCTCTTTC
301	I Q V L S N A A Y K S V E H R V M V N A E A E R L S L A F F
991	TACAACCCGAAGAGCGATCTGCGCTCGCTCCGTACCGGAGCTCGTAACCTCCGCGGCGGCGCTCTACCACTATGACCTTCGAC
331	Y N P K S D L P L A P L P E L V T P G R P A L Y Q P M T F D
1081	CAGTACCGTATGTACATCCGCAACGGGGCCCCAAGGGGAAATCGCAAGTGGAGTCGTGAAGGCTGCATGA
361	Q Y R M Y I R Q R G P K G K S Q V E S L K A A *

图 3 *MaFLS1* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *MaFLS1*

在线工具 ProtParam 分析表明,*MaFLS1* 理论分子量为 43.21 kD,理论等电点为 6.52,蛋白不稳定系数为 39.80,属于稳定蛋白。利用 ProtScale 分析,*MaFLS1* 编码的蛋白亲水性/疏水性的最大值为 2.167,最小值为-3.178,且亲水性氨基酸残基比疏水性氨基酸残基多,故推测 *MaFLS1* 基因编码的蛋白为亲水性蛋白。利用 TMHMM 预测该蛋白质的跨膜区域,发现该氨基酸无跨膜区域,属于胞内蛋白。SignalP 4.1 Server 预测显示,*MaFLS1* 编码

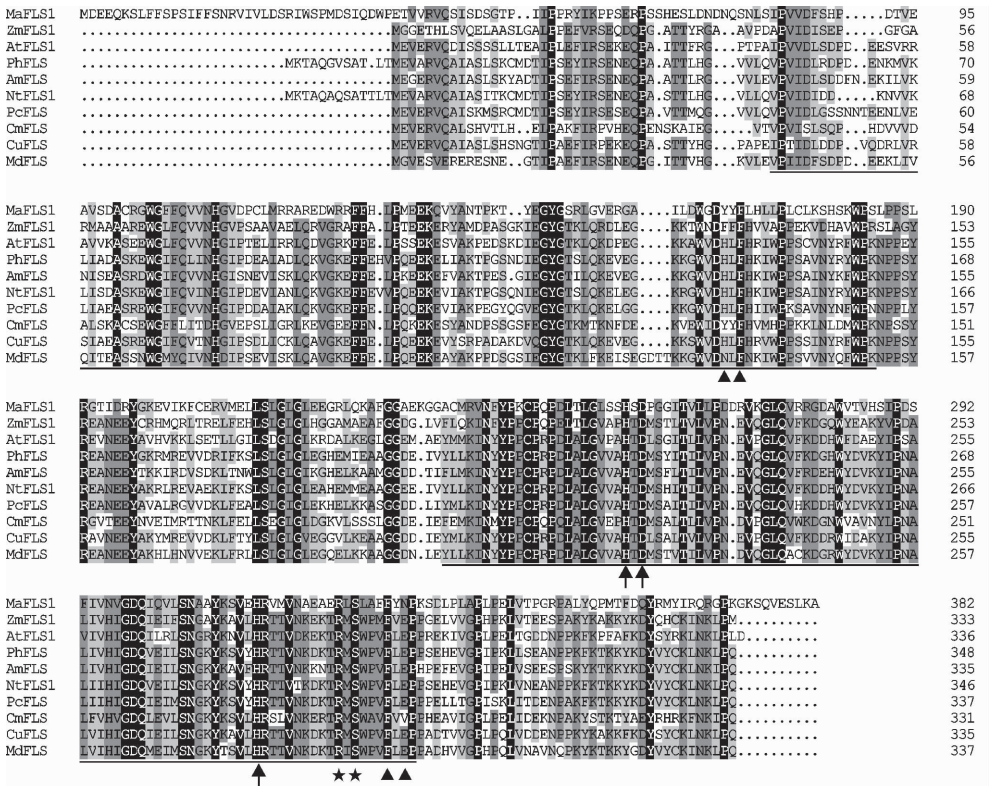
的蛋白不具有信号肽,为非分泌蛋白。用 SOPMA 软件对 *MaFLS1* 的二级结构进行预测,结果显示该蛋白二级结构包含了 22.98%的 α 螺旋、11.23%的 β 转角、39.43%无规则卷曲和 26.37%延伸链。该蛋白二级结构的主要组成为无规则卷曲、 α 螺旋与延伸链,与其他 2-ODD 蛋白家族成员类似。

2.2 *MaFLS1* 氨基酸序列同源性比对与进化分析

用 NCBI Conserved Domain Search 对 *MaFLS1* 氨基酸序列进行保守域分析,结果显示葡萄风信子的

FLS1 蛋白包含 1 个 DIOX_N 功能域(从 83 个氨基酸到 185 个氨基酸)和 1 个 2OG-FeII_Oxy 功能域(从第 235 个氨基酸到第 333 个氨基酸),且具有 2-酮戊二酸依赖型双加氧酶活性蛋白质的高保守 N 端,表明它属于 2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 依赖型双加氧酶蛋白(图 4)。并具有相对保守的 DHQ 底物特异结合位点(Tyr 167, Phe 169, Phe 330, Asn 332),2-酮戊二酸结合位点(Arg 324, Ser 326)和 Fe^{2+} 结合位

点(His 257, Asp 259, His 315)。葡萄风信子 FLS 氨基酸序列中这些高度保守的功能域及 DHQ 底物特异结合位点、 Fe^{2+} 结合位点和 2-酮戊二酸结合位点与其他物种 FLS 蛋白相似。因此,推断它在葡萄风信子黄酮醇合成过程中发挥着与其他物质 FLS 蛋白相同或相似的功能,这一推论需要进一步的试验验证。



注:氨基酸序列相同及相似部分分别用黑、灰色阴影表示;下划线位置分别为 DIOX_N 和 2OG-FeII_Oxy 功能域;DHQ 底物特异结合位点、2-酮戊二酸和 Fe^{2+} 结合位点分别用黑色三角、星号及向上箭头表示。ZmFLS1(玉米 *Zea mays* BT039956), AtFLS1(拟南芥 *A. thaliana* AAB41504.1), PhFLS(矮牵牛 *Petunia hybrida* CAA80264.1), AmFLS(金鱼草 *Antirrhinum majus* ABB53382.1), NtFLS1(烟草 *Nicotiana tabacum* ABE28017.1), PcFLS(香芹 *P. crispum* AAP57395), CmFLS(茶 *Camellia sinensis* ABM88786.1), CuFLS(蜜桔 *Citrus unshiu* AB011796), MdFLS(苹果 *Malus domestica* AY965343)。

图 4 葡萄风信子 *MaFLS1* 基因编码的氨基酸序列与其他物种 FLS 氨基酸序列的比对

Fig. 4 Blasting results of the deduced amino acid sequences of *MaFLS1* in grape hyacinth with other plants

在 NCBI 上将葡萄风信子 *MaFLS1* 氨基酸序列进行 Blastp 比对如表 2, *MaFLS1* 与海枣(*Phoenix dactylifera*)、油棕(*Elaeis guineensis*)的 FLS 同源性最高,可达 74%~75%,与小果野芭蕉(*Musa acuminata* subsp. *malaccensis*)、梅花(*Prunus mume*)、大豆、麻风树(*Jatropha curcas*)、醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*)等其他 11 种植物的同源性较高,达 62%~67%,而与拟南芥、矮牵牛等常见模式植物的同源性低。

进一步与 26 个物种的 FLS 氨基酸构建系统进化树,分析结果显示, *MaFLS1* 基因编码的氨基酸序列首先单独为一小枝,再与海枣、油棕的 FLS

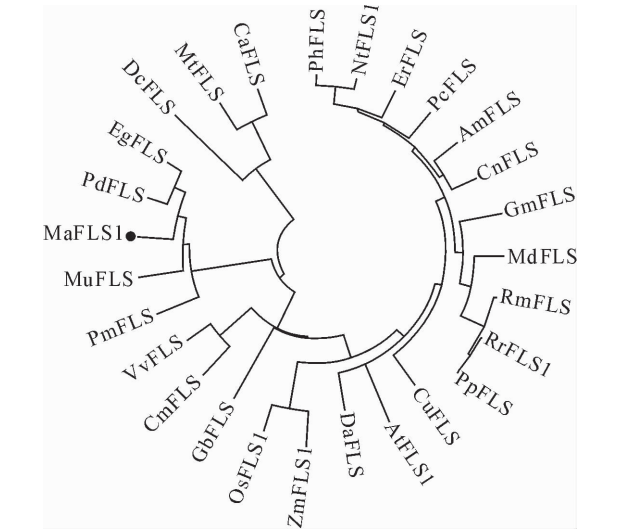
聚为一枝,最后与小果野芭蕉、梅花聚为一类,与其他物种的亲缘关系较远(图 5)。进一步推测克隆的基因属于 *FLS* 类基因,其酶学特性有待进一步确定。

2.3 葡萄风信子 *MaFLS1* 基因时空表达模式分析

为了研究 *MaFLS1* 基因在葡萄风信子不同组织中的表达情况,分别提取葡萄风信子根、茎、叶及盛花期(S4)花的总 RNA,反转录获得 cDNA,以之为模板,通过荧光定量 PCR 的方法检测 *MaFLS1* 基因在葡萄风信子不同组织中的表达情况。结果显示 *MaFLS1* 在葡萄风信子‘白丽人’根中的表达量 ZmFLS1(玉米 *Z. mays* BT039956), AtFLS1(拟南芥 *A. thaliana* 最高,约为鳞茎中表达量的 9 倍、盛

表 2 葡萄风信子 MaFLS1 与其他植物 FLS 氨基酸
序列同源性对比

Table 2 Homology analysis of MaFLS1 proteins and other FLS proteins from other species	
物种名称	同源性
海枣	75%
油棕	74%
小果野芭蕉	67%
梅花	67%
大豆	64%
麻风树	63%
醉蝶花	62%
拟南芥	29%
矮牵牛	22%



注:ZmFLS1(玉米 *Z. mays* BT039956), AtFLS1(拟南芥 *A. thaliana* AAB41504.1), PhFLS(矮牵牛 *P. hybrida* CAA80264.1), AmFLS(金鱼草 *A. majus* ABB53382.1), NiFLS1(烟草 *N. tabacum* ABE28017.1), PcFLS(香芹 *P. crispum* AAP57395), CmFLS(茶 *C. sinensis* ABM88786.1), CuFLS(蜜桔 *C. AB011796*), MdFLS(苹果 *M. domestica* AY965343), OsFLS1(粳稻‘日本晴’*Oryza sativa* ‘japonica’ NM_001054765), RrFLS1(玫瑰 *Rosa rugosa* KM099095), PpFLS(桃 *Prunus persica* KP050782), RmFLS(野蔷薇 *R. multiflora* ‘Duohua’ KP090455), GmFLS(大豆 *G. max* NP_001237419.1), CnFLS(金花茶 *C. nitidissima* ADZ28516.1), VvFLS(葡萄 *V. vinifera* BAE75810.1), GbFLS(银杏 *G. biloba* ACY00393.1), DeFLS(香石竹 *Dianthus caryophyllus* KM203112), MtFLS(蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* XP_003613111.1), CaFLS(鹰嘴豆 *C. arietinum* XP_004489776.1), PdFLS(海枣 *P. dactylifera* XP_010937853.1), EgFLS(油棕 *E. guineensis* XP_010937853.1), MuFLS(野芭蕉 *M. acuminata* ssp. *malaccensis* XP_009404656.1), PmFLS(梅花 *P. mume* XP_008233765.1), ErFLS(洋桔梗 *E. russellianum*), DaFLS(紫薯 *Dioscorea alata* AIY60790.1)。

图 5 MaFLS1 蛋白与其他物种的 FLS 蛋白的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of MaFLS1 proteins and FLS proteins
from other species

开的花中表达量 12 倍及叶片中表达量的 100 倍(图 6)。同时 *MaFLS1* 基因在根中高表达,鳞茎及花中

的表达量其次,叶片中表达量最低,在蓝色葡萄风信子‘亚美尼亚’及粉色葡萄风信子‘粉日出’中显示相同的结果。说明了 *MaFLS1* 基因在葡萄风信子中非组织特异性表达。

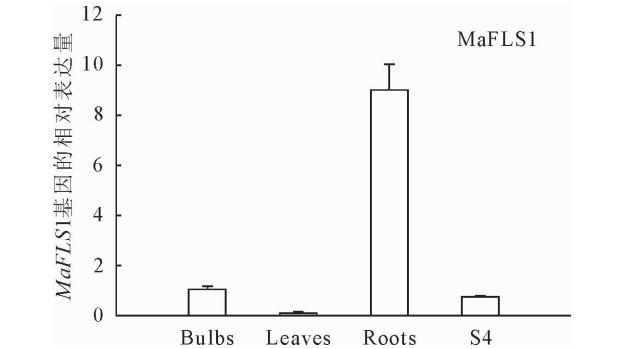


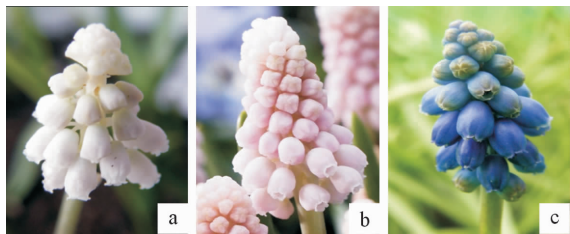
图 6 *MaFLS1* 在‘白丽人’不同组织部位的表达分析
Fig. 6 Expression pattern of *MaFLS1* in different
organs of *M. ‘White Beauty’*

此外,为了研究葡萄风信子花色形成与 *MaFLS1* 基因表达模式间的关联性,选取白色、粉色、蓝色 3 个不同花色的葡萄风信子品种‘白丽人’‘粉日出’和‘亚美尼亚’为材料(图 7),分别提取 5 个不同时期花(S1~S5)的总 RNA 反转录为 cDNA,荧光定量 PCR 检测 *MaFLS1* 的表达。结果如图 8,‘白丽人’花组织中,*MaFLS1* 在未着色的小花蕾 S1 时期开始表达,开始着色的花蕾 S2 时期表达量达到最高值,而后,转色期 S3 和完全着色的盛花期 S4 表达量降低,花开始衰败的 S5 时期又有所增加。结果说明 *MaFLS1* 在白色葡萄风信子‘白丽人’花蕾的早期表达量较高。在‘粉日出’花组织中,*MaFLS1* 则显示不同的表达模式,*MaFLS1* 在 S1 时期开始表达,随后逐渐增加,在转色期 S3 达到高峰,随后又逐渐降低,说明 *MaFLS1* 在粉色葡萄风信子‘粉日出’转色期表达量较高。在‘亚美尼亚’花组织中,*MaFLS1* 显示出类似于‘粉日出’的表达模式,早期花组织中表达量相对较低,着色后逐渐增加,不同的是其表达的高峰在完全着色的 S4 时期。上述结果说明了 *MaFLS1* 基因在不同花色的葡萄风信子呈色过程中显示出不同的表达模式。

3 结论与讨论

黄酮醇作为一类重要的辅色素物质,与花青素苷共享着类黄酮合成的前期路径,影响着花色的形成^[12,17-18]。因此,研究黄酮醇支路节点基因 *FLS* 的表达与观赏植物花色性状之间的关联性,对于花色分子育种具有重要意义。

本研究采用荧光定量 PCR 的方法检测 *MaFLS1* 基因在葡萄风信子不同组织中的表达情



注:a.‘白丽人’(M. ‘White Beauty’); b.‘粉日出’(M. ‘Pink Surprise’); c.‘亚美尼亚’(M. armeniacum)。

图 7 3 个不同花色的葡萄风信子品种

Fig. 7 Three different cultivars of grape hyacinth

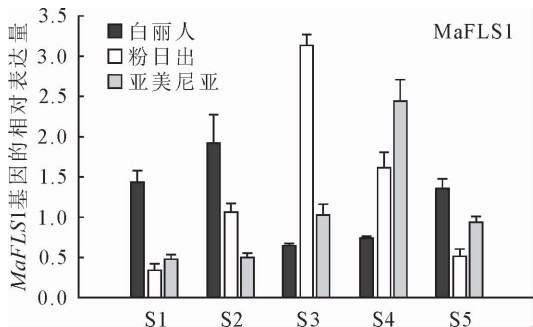


图 8 *MaFLS1* 在 3 个葡萄风信子品种 5 个花发育时期的表达分析

Fig. 8 Expression pattern of *MaFLS1* at five different stages in three different cultivars of grape hyacinth

况。结果显示 *MaFLS1* 基因在根中高表达,鳞茎及花中的表达量其次,叶片中表达量最低,说明 *MaFLS1* 基因在葡萄风信子中非组织特异性表达。同时,我们推测葡萄风信子根和鳞茎中可能会积累较多的黄酮醇类物质,例如山奈酚等;相反,其花和叶片中则黄酮醇类物质的积累量较少。此推论需要进一步利用高效液相的检测结果验证。黄芩 *SbFLS* 基因在根中高表达,茎及花中其次,而在叶片中的表达最低^[16]。因此,葡萄风信子 *MaFLS1* 基因的表达模式相似于黄芩。然而,也有许多不同的报道。例如,蜜橘 *FLS* 基因在幼叶中表达高于老叶,随着果实成熟,果皮中 *FLS* 表达量也逐渐增加^[25]。葡萄中 *FLS* 的表达随着生长发育发生变化,其中在叶片、花及果皮中高表达^[26]。拟南芥中不同的 *AtFLS* 基因表达模式不同,黄酮醇合成的关键基因 *AtFLS1* 在花芽、花及角果中高表达,而在根、幼茎及老叶中低表达;而其他 *AtFLS* 基因在所有组织中均低表达^[7]。银杏 *FLS* 在其根、茎、叶和果中均有表达,其中在成熟的叶片中表达最高,而根中表达量最低^[15]。依据不同植物中 *FLS* 基因的转录表达情况,可见 *FLS* 基因在不同的植物及植物不同组织中表达模式不同。

同时,检测了白、粉、蓝不同花色的 3 个葡萄风

信子品种 5 个不同花发育时期 *MaFLS1* 的表达情况。结果显示白色葡萄风信子品种‘白丽人’*MaFLS1* 在花发育的早期(S1 和 S2)时期表达较高,这与早期研究显示的香芹、紫罗兰、矮牵牛及康乃馨 *FLS* 酶活性仅限于早期花蕾中的报道相符^[8]。洋桔梗中也有类似的报道,其 *FLS* 基因主要在早期花芽中表达,与花瓣中总黄酮醇积累量相一致^[12],分析主要原因是花发育早期主要产生黄酮醇,而花发育的后期主要积累花青素,因此,*CHS*、*F3H*、*FLS* 早期基因主要在早期花蕾中表达,而 *DFR* 及其他晚期的花青素代谢途径编码酶基因主要在盛花期表达^[8,12];其次,可能是因黄酮醇有防御 UV-B 的伤害的功能,植物中黄酮醇主要积累在幼嫩组织中,有助于保护幼嫩组织免受伤害^[12,26]。结合早期报道,分析在白色葡萄风信子‘白丽人’呈色过程中,*MaFLS1* 在早期高表达的原因,可能是黄酮醇主要积累于早期花蕾中,利于保护幼嫩花蕾免受 UV-B 伤害。区别于白色品种,在葡萄风信子粉色品种‘粉日出’和蓝色品种‘亚美尼亚’呈色过程中,*MaFLS1* 基因的表达高峰分别出现在转色期 S3 和完全着色期 S4,推测其原因可能是这 2 个品种在花瓣开始着色时(S3),除了积累花青素苷呈现粉色、蓝色,还需积累辅色素-如黄酮醇,以稳定花色,及在蓝色品种完全呈色期(S4)加深其色调^[12]。由此可见,*FLS* 基因的表达与葡萄风信子花色的呈现有着紧密的联系。*FLS* 与 *DFR* 存在同一底物的竞争,黄酮醇又为主要辅色素之一,因此 *FLS* 基因的表达影响黄酮醇合成,同时也影响着花青素苷含量的积累和花色的呈现。

总之,本研究在单子叶植物葡萄风信子中克隆了 1 个 *MaFLS1* 基因,并对该基因特性进行了分析,利用实时定量 PCR 技术分析了葡萄风信子 *FLS* 基因在不同组织、不同花色不同发育时期的表达模式,探讨了该基因表达与花色性状之间的关系,为下一步研究该基因在花色形成中的功能及黄酮醇支路的分流竞争对葡萄风信子花色的影响提供基因资源和依据。

参考文献:

[1] 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.
HAN K T, HU K, DAI S L. Flower color breeding by molecular design in ornamentals[J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6 (1): 16-24. (in Chinese)
[2] 戴思兰,洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学,2016,49(3):529-542.
DAI S L, HONG Y. Molecular breeding for flower colors modi-

fication on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(3): 529-542. (in Chinese)

[3] AIDA R, YOSHIDA K, KONDO T, *et al.* Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the anti-sense dihydroflavonol 4-reductase gene[J]. *Plant Sci.*, 2000, 160: 49-56.

[4] LUO P, NING G, WANG Z, *et al.* Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants[J]. *Front. Plant Sci.*, 2016, 6: 1257.

[5] LI C, BAI Y, LI S, *et al.* Cloning, characterization, and activity analysis of a flavonol synthase gene *FtFLS1* and its association with flavonoid content in tartary buckwheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 5161-5168.

[6] HARBORNE J, WILLIAMS C. Advances in flavonoid research since 1992[J]. *Phytochemistry*, 2000, 55: 481-504.

[7] OWENS D K, ALERDING A B, CROSBY K C, *et al.* Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2008, 147: 1046-61.

[8] HOLTON T A, BRUGLIERA F, TANAKA Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*[J]. *Plant J.*, 1993, 4: 1003-1010.

[9] ELDIK G J, REIJNEN W H, RUITER R K, *et al.* Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*[J]. *Plant J.*, 1997, 11: 105-13.

[10] PELLETIER M K, MURRELL J R, SHIRLEY B W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *arabidopsis*-further evidence for differential regulation of early and late genes[J]. *Plant Physiol.*, 1997, 113: 1437-45.

[11] MARTENS S, FORKMANN G, MATERN U, *et al.* Cloning of parsley flavone synthase I[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 43-6.

[12] NIELSEN K, DEROLES S C, MARKHAM K R, *et al.* Anti-sense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in *lisianthus*[J]. *Mol. Breed.*, 2002, 9: 217-29.

[13] ALMEIDA J R, DAMICO E, PREUSS A, *et al.* Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 465: 61-71.

[14] TAKAHASHI R, GITHIRI S, HATAYAMA K, *et al.* A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2007, 63: 125-35.

[15] XU F, LI L, ZHANG W, *et al.* Isolation, characterization, and function analysis of a flavonol synthase gene from *Ginkgo biloba*[J]. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, 39: 2285-2296.

[16] KIM Y B, KIM K S, KIM Y J, *et al.* Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *scutellaria baicalensis* [J]. *Scientific World Journal*, 2014, 14: 149-168.

[17] DAVIES K M, SCHWINN K E, DEROLES S C, *et al.* Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase[J]. *Euphytica*, 2003, 131: 259-268.

[18] ZHOU X W, FAN Z Q, CHEN Y, *et al.* Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation[J]. *J. Bio. Sci.*, 2013, 38: 593-604.

[19] LOU Q, LIU Y, QI Y, *et al.* Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveals the role of delphinidin metabolism in flower colour in grape hyacinth[J]. *J. Exp. Bot.*, 2014, 65: 3157-3164.

[20] 焦淑珍, 刘雅莉, 姜倩, 等. 葡萄风信子二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (DFR) 的克隆与表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(5): 529-540.

JIAO S Z, LIU Y L, LOU Q, *et al.* Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene (DFR) from grape hyacinth[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(5): 529-540. (in Chinese)

[21] 杨望, 张朝红, 李树秀, 等. 葡萄 SVP 类 MADX-BOX 基因的克隆及表达分析[J]. *西北林学院学报*, 2012, 24(4): 117-123.

YANG K, ZHANG C H, LI S X, *et al.* Cloning and expression analysis of grape SVP-like MADS-BOX gene[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 24(4): 117-123. (in Chinese)

[22] 姜福星, 杨丽娟, 陈其兵, 等. 泸定百合转录组测序与特性分析[J]. *西北林学院学报*, 2015, 30(5): 143-150.

JIANG F X, YANG L J, CHEN Q B, *et al.* Transcriptome sequencing and characteristic analysis of *Lilium sargentiae*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30(5): 143-150. (in Chinese)

[23] 马辉, 韩永涛, 高玉荣, 等. 葡萄 RPW8.2 同源基因克隆与表达分析[J]. *西北林学院学报*, 2015, 30(1): 60-68.

MA H, HAN Y T, GAO Y R, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of RPW8.2 homologous gene in grapevine[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30(1): 60-68. (in Chinese)

[24] FERREYRA F M L, RIUS S, EMILIANI J, *et al.* Cloning and characterization of a UV-B inducible maize flavonol synthase[J]. *Plant J.*, 2010, 62: 77-91.

[25] MORIGUCH T, KITA M, OGAWA K, *et al.* Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development[J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 114: 251-258.

[26] FUJITA A, GOTO-YAMAMOTO N, ARAMAKI I, *et al.* Organ-specific transcription of putative flavonol synthase genes of grapevine and effects of plant hormones and shading on flavonol biosynthesis in grape berry skins[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70: 632-638.