

猕猴桃花青素合成途径基因 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 的克隆与表达分析

张 亮^{1,2}, 满玉萍¹, 姜正旺¹, 王彦昌^{1,*}

(¹中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; ²中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 根据物种水平上蛋白保守序列设计特异引物, 扩增获得‘红阳’猕猴桃花青素合成途径中查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 和无色花青素双加氧酶 (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 基因的特异片段, 用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术克隆出这两个基因的 cDNA 全长, 长度分别为 1 501 bp (*AcCHS*) 和 1 381 bp (*AcLDOX*), 分别编码 389 个和 355 个氨基酸。通过比对发现 *AcCHS* 与棉花 (*Gossypium hirsutum*)、山茶 (*Camellia japonica*) 和黄蜀葵 (*Abelmoschus manihot*) 的 CHS 序列相似性较高, 达到 95%, 与葡萄 (*Vitis vinifera*) 和苹果 (*Malus × domestica*) 的相似性分别为 94% 和 93%; *AcLDOX* 与山葡萄 (*Vitis amurensis*) 和葡萄的相似性分别高达 94% 和 93%。用实时荧光定量 PCR 分析 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 在‘红阳’ (红肉)、‘金魁’ (绿肉) 和‘金农’ (黄肉) 3 种不同果肉颜色的猕猴桃内果皮中的表达, 发现 *AcCHS* 的表达量在‘红阳’果实转色期 (花后 65 d) 较高, 而在‘金农’开花后表达量呈持续下降趋势; *AcLDOX* 在‘红阳’果实发育早期呈上升趋势, 花后 65 d 后迅速下降, 在‘金魁’果实发育后期呈明显上升趋势, 在‘金农’开花后呈持续下降趋势。

关键词: 猕猴桃; 红肉; 花青素; 查尔酮合成酶; 无色花青素双加氧酶; 基因; 表达

中图分类号: S 663.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 11-2124-09

Cloning and Expression of Anthocyanin Pathway Genes, *AcCHS* and *AcLDOX*, in *Actinidia chinensis*

ZHANG Liang^{1,2}, MAN Yu-ping¹, JIANG Zheng-wang¹, and WANG Yan-chang^{1,*}

(¹Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; ²Graduated University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Based on the highly conserved sequences of other plants, counterpart sequences of CHS (chalcone synthase, CHS) and LDOX (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) of *Actinidia chinensis*, ‘Hongyang’ were obtained using the special primers. Full-length cDNAs encoding CHS and LDOX were cloned respectively from fruit of ‘Hongyang’ by RACE (rapid amplification of cDNA ends). The *AcCHS* was 1 501 bp in length, encoding 389 amino acids. *AcLDOX* was 1 381 bp in length and encoded 355 amino acids. Amino acids sequence of *AcCHS* exhibited over 95% homology with CHS of *Abelmoschus manihot*, *Camellia japonica* and *Gossypium hirsutum*. It also shared 94% and 93% homology with *Vitis vinifera* and *Malus × domestica* respectively. *AcLDOX* showed 94% and 93% identity with *Vitis amurensis*

收稿日期: 2012-05-21; **修回日期:** 2012-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3067143, 31171945)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: kiwifruit@wbcas.cn)

and *Vitis vinifera* respectively at amino acids level. The expression of *AcCHS* and *AcLDOX* in the inner pericarp of three kiwifruit cultivars with red, green and yellow color was analyzed by Real-time PCR. *AcCHS* expressed highly in flesh of ‘Hongyang’ at 65 DAF (days after flower). Expression of the gene in yellow-fleshed ‘Jinnong’ decreased permanently after flowering. Expression of *AcLDOX* increased during the early developmental stage in ‘Hongyang’, but dropped quickly after 65 DAF. Interestingly, expression of *AcLDOX* raised markedly in the late developmental stages of green-fleshed ‘Jinkui’, which was the highest among three cultivars. *AcLDOX* in ‘Jinnong’ also deregulated after flowering.

Key words: kiwifruit; red flesh; anthocyanin; CHS: chalcone synthase; leucoanthocyanidin dioxygenase; gene; expression

花青素合成代谢途径是目前研究最深入的植物代谢途径之一。关于花青素合成途径中的结构基因及环境因素对花青素积累影响的研究报道很多,尤其在矮牵牛 (*Petunia hybrida*), 金鱼草 (*Antirrhinum majus*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、苹果 (*Malus × domestica*) 等园艺植物中的研究已较为深入 (Springob et al., 2003; Ono et al., 2010; Albert et al., 2011; Lin-Wang et al., 2011; Ishiguro et al., 2012)。花青素生物合成代谢涉及多个催化酶,其中查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是植物类黄酮物质合成的第一个酶,也是植物次生代谢途径中的关键酶之一,目前已经从植物当中已经克隆到了上百个 CHS 基因的序列 (Ferrer et al., 1999; Jez & Noel, 2000; 王燕 等, 2007)。查尔酮合成酶基因的表达受 UV 照射、真菌侵染等条件诱导,且在花中特异性表达,其表达量的改变可导致一些植物花色变化 (Kreuzaler et al., 1983; Lamb et al., 1989; Elomaa et al., 1993; Kamiishi et al., 2012; Morita et al., 2012)。无色花青素双加氧酶 (leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX) 位于花青素代谢途径的下游,主要依赖 2-酮戊二酸离子和 Fe^{2+} 催化无色花青素氧化从而将无色的花青素苷转变成有色的花青素苷,对花青素的合成也至关重要 (Xie et al., 2004; Lee et al., 2010; Appelhagen et al., 2011)。

猕猴桃栽培品种的果肉颜色大多数是绿色和黄色,少数是红色。‘红阳’是目前栽培面积最广、品质最好的红肉猕猴桃品种,果实色泽鲜艳,肉质细嫩,可溶性固形物高,具有极高的经济价值 (Ferguson & Seal, 2008; 吴伯乐, 1992)。现已查明,‘红阳’等红心类型的红肉猕猴桃内果皮中呈色物质是花青素 (Montefiori et al., 2005)。

红肉猕猴桃对栽培条件要求苛刻,尤其是对环境的温度、水分等适应范围窄,在各地栽培时着色不稳定。剖析花青素途径,探索环境因子以及植物生长调节物质影响果肉着色变化的原因,将对红肉猕猴桃的栽培生产具有参考价值 (刘仁道 等, 2009)。前期的研究中已经克隆了‘红阳’猕猴桃花青素代谢途径中的基因 *AcF3H* 和 *AcDFR1* 的 cDNA 全长 (杨红丽 等, 2009; 杨俊 等, 2010)。本研究中承接上述工作,旨在通过克隆该途径中上游基因 *CHS* 和下游基因 *LDOX*, 并进一步探究它们在猕猴桃果实不同发育时期的表达变化规律,深入了解红肉猕猴桃中花青素代谢途径的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为‘红阳’(红肉)、“金魁”(绿肉)及‘金农’(黄肉)猕猴桃的内果皮,均于 2009 年采自于中国科学院武汉植物园猕猴桃资源圃。分别在开花后 0、30、65、90、120 和 150 d 采集果实(子房),‘红阳’猕猴桃增设花后 50 d。每个品种 3 个单株,每个单株作为 1 个重复,每个单株

取 5 ~ 8 个果实。取样时切除外果皮, 保留种子周围的有色内果皮区域, 然后将其切成小块混合后装于自封袋中, 并立即浸没于液氮当中, 于 -70 °C 冰箱当中保存备用。

TIANDZ 柱式植物 RNAout 试剂盒购自天泽基因公司; SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 购自 Invitrogen 公司; *Taq* 聚合酶、 Mg^{2+} 、 Mg^{2+} free buffer 均购自 TaKaRa 公司; E.Z.N.A.TM 凝胶回收试剂盒 D2500-1 购自 Omega 公司; pGEM®-T 载体和 T₄DNA 连接酶均购自 Promega 公司; Soc 培养基及 JM109 高效感受态细胞由本实验室自备; 引物的合成和核酸序列的测定由上海英骏公司完成; SMART™ RACE 试剂盒购自 Clontech 公司。荧光定量试剂盒 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 购于 Roche 公司; *E. coli* Gold 菌株 (用于制备高效感受态细胞) 来自于湖北大学生命科学学院。

1.2 特异片段扩增与全长 cDNA 克隆

利用植物花青素途径中的 CHS 及 LDOX 蛋白保守区搜索 NCBI 中华猕猴桃 EST 数据库, 筛选后拼接得到候选序列, 然后用 Primer5 软件来设计特异引物 (表 1)。提取成熟的“红阳”猕猴桃果实的内果皮总 RNA, 合成 cDNA 的第一链, 分别用特异引物扩增 CHS 和 LDOX 的 cDNA 片段, 回收产物连接到 pGEM-T 载体上, 转化后挑选阳性克隆并测序。根据克隆到的 CHS 和 LDOX 的片段设计 RACE 引物 (表 1)。实验步骤按照 RACE 试剂盒说明进行。

1.3 实时定量 PCR

根据克隆得到的 CHS 和 LDOX 的全长信息, 用 Beacon Designer7 软件来设计荧光定量分析的引物 (表 1)。抽取“红阳”内果皮总 RNA, 按照 1.2 反转录方法反转成 cDNA 模板, 电泳检测模板的质量。然后将不同样品的 cDNA 各取 2 μL 充分混合, 并以此为原溶液, 稀释 1×、2×、4× 共 3 个浓度梯度, 用于制作标准曲线。在 Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪中进行定量。每次反应做 36 管, 每个样做 3 次重复, 即每次反应 12 个样。每次反应均以“红阳”开花后 0 d 作为对照。用“Rotor-Gene 6000 Series Software”进行实时定量监控。反应完毕后软件给出标准曲线及其每个样的 *Ct* 值, 以及 *R* 值、*R*² 值和 Efficiency 值。样品表达量 = $(\text{Efficiency} + 1)^{Ct(\text{HY-DAF-0}) - Ct(\text{sample})}$; 样品相对表达量 = 样品表达量/样品 β-actin 表达量。

表 1 CHS 和 LDOX cDNA 片段、全长克隆和实时定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers used in cloning of cDNA segments and full-length sequences, and qPCR of CHS and LDOX

引物名称 Name of primer	引物序列 (5' to 3') Primer sequence (5' to 3')
Primers for segments cloning	
CHS-F1	ACCAATAGCGAGCACAAGGC
CHS-R1	ATCTCAGAGCAGACGACCAAGTA
CHS-F2	GAGGAAGTTCGAGGGGCACA
CHS-R2	ATTCTAGAGCAGACGACCAAGTA
LDOX-F1	TCAGCCATCAACAATCACTC
LDOX-R1	CGAGGGCAAATGGGTAACAG
Primers for cloning of full-length sequences	
CHS-F3	ATGGTCATGACTGTTGAGGCATAAGTCC
CHS-R3	ACCAGGGCCCACTAAGTATGCACAGA
LDOX-F2	AACGTGGTGGCAACTTAGTGGTCGGA
LDOX-R2	GCTTAATGACGTAATAAGACAGATGACCA
qPCR primers	
CHS-F4	GAAATGGTGACCGTAGGAAGT
CHS-R4	ACTCTGTCTTGTGCTCGCTC
LDOX-F3	CAATAATGCTAGCGGGCA
LDOX-R3	CTAAGCCAAGAGATAAAGCCG
Actin primers for qPCR	
β-actin-F	TGCATGAGCGATCAAGTTTCAAG AGTCATCAACCAGACATGGGACA
β-actin-R	

1.4 用于序列分析生物学软件

用 ClusterX 1.8.1 进行核酸和蛋白质序列比对, 用 MEGA5 和 Phylip 软件包构建进化树, 实时荧光定量分析软件为 Rotor-Gene 6000 Series software 1.7。

2 结果与分析

2.1 *AcCHS* 和 *AcLDOX* cDNA 全长克隆

通过特异引物扩增, 得到 2 条 CHS 的 cDNA 片段和 1 条 LDOX 的 cDNA 片段。测序结果 (图 1) 表明这 3 条片段的大小分别为 447 bp (CHS1)、567 bp (CHS2) 和 413 bp (LDOX), 测序结果也证明扩增到的 3 条 cDNA 片段和预期片段一致。

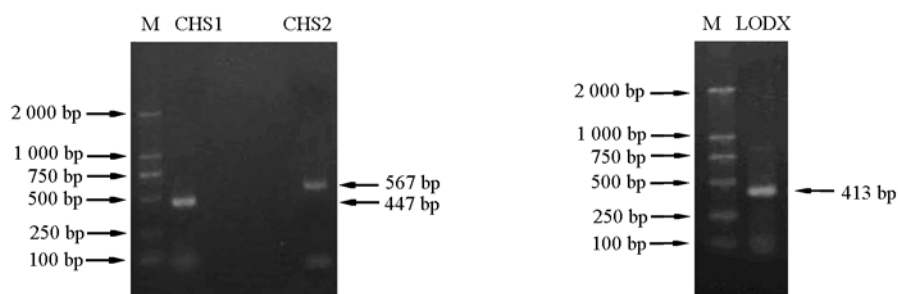


图 1 ‘红阳’猕猴桃 CHS 和 LDOX 的克隆片段

Fig. 1 Segments of CHS and LDOX cloned from inner pericarp of ‘Hongyang’

利用 RACE 技术, 克隆到 *AcCHS* 5' RACE 片段长 389 bp, 3' RACE 片段长 960 bp; *AcLDOX* 5' RACE 片段长 985 bp, 3' RACE 片段长 311 bp (图 2)。

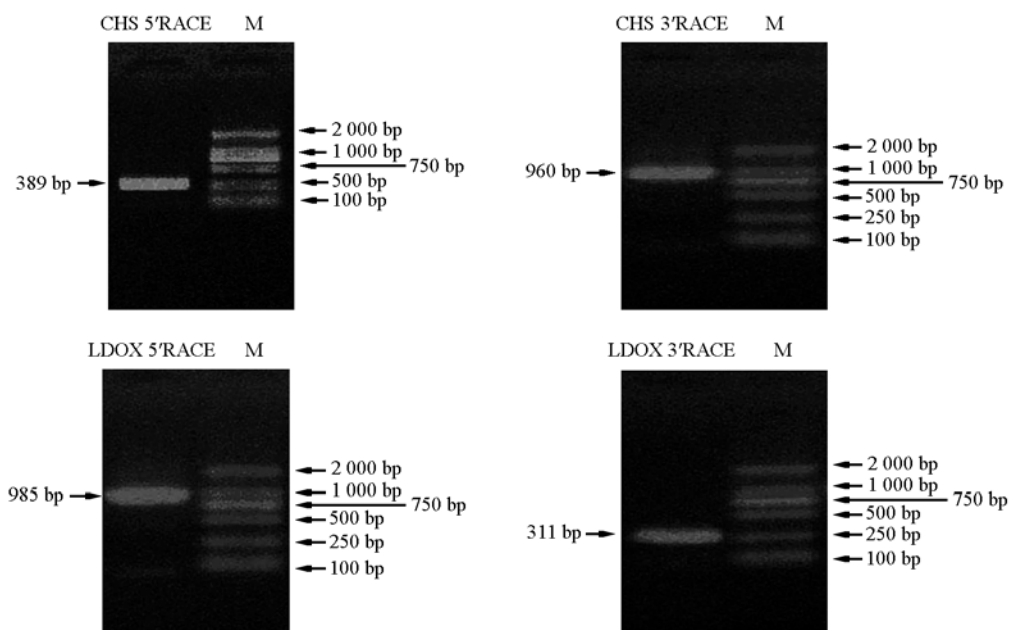


图 2 ‘红阳’猕猴桃中 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 的 RACE 克隆片段

Fig. 2 Segments of *AcCHS* and *AcLDOX* cloned from ‘Hongyang’ kiwifruit by RACE

AcCHS 基因 cDNA 全长 1 501 bp, 其开放阅读框 (ORF) 编码 389 个氨基酸 (图 3), 等电点 5.98, 分子量 42.72 kD; *AcLDOX* cDNA 全长 1 381 bp, 其开放阅读框 (ORF) 编码 355 个氨基酸 (图 4), 等电点 5.49, 分子量 39.88 kD。

```

1      GGGCACGCTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGCTCAAAGCCATCAAGGAACCACTTGATGCTAGGCAGGACATGCTCAATTTATCTAC
91     CACTCTAGCATATCTAGCCCTAGCACATAGACACCGCAAAAGCTCCGGCCACCACTAGCCTGTGAAATGGTCACTGTTGAGGAAGTCC
                                     M V T V E E V
181    GGAGGGCACAGCGGGCTGAGGGTCTGGCCACGATCATGGCGATTGGGACGTCAACCCACCTAACTGTGTTGATCAGAGCGAGTACCTGT
R R A Q R A E G L A T I M A I G T S T P P N C V D Q S E Y P
271    ACTATTACTTTCGAATTACCAACAGCGAGCATAGAGCGGAATTAAGAGAGAAGTTACGGCGCATGTGTGAAAAATCCATGATCAAGATGC
D Y Y F R I T N S E H K T E L K E K F R R M C E K S M I K M
361    GTTACATGTACTTGACTGAGGAGATCTTGAAAGAAAAACCCATATGTGTGTGCTACATGGCCCCATCACTTGATGCTAGGCAGGACATGG
R Y M Y 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
451    TGGTGTGGAAATTCCAAATGGGCAAGGAGGCTCCGCTCAAAGCCATCAAGGAATGGGGCCAGCCCAAGTCCAAAAATACCCATTTGG
V V V E I P K L G K E A A V K A I K E W G Q P K S K I T H L
541    TCTTTGTACCACTAGCGAGTTCGACATGCCGGGCGCTGACTATCAGCTCACAAGCTCCTGGTCTCCGCCGTCTGTCAAACGCCCTCA
V F C T T 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
631    TGATGTACCAACAGGGTGTCTCGTGGTGGCAGGTGTCCGCTGGCCAAGGACCTAGCAGAGAACAAACAGGGGGCCGTGACTGG
M M Y Q Q G C F A G G T V L R L A K D L A E N N K G A R V L
721    TCGTCTGCTCGAGATCACTGTCTGCTTTCTGGTGGACCCAGTGACACCCACCTCGACAGTCTGTTGGTCAAGCCTTGTGTTGGTGATG
V V C C S E I T A V T F R G P S D T H L D S L V G Q A L F G D
811    GTGCGCGGTGTTATGTTGGGGCTGACCAATCCAGAGGTTGAGAAGCCCATGTTGAGTGGTCTCGGGGCCCAAGGCTTCTTAC
G A A A V I V G A D P I P E V E K P M F E L V S A A Q T I L
901    CGGATAGCGATGGGGCCATCGATGGACATCTCCGCGAAGTGGGCTGACCTCCACCTCCTCAAGATGTTCTGGGCTTATTTCCAAGA
P D S D G A I D G H L R E V G L T F H L L K D V P G L I S K
991    ACATTGAAAAAGCGTGGCAGAGGCATTCAAGCCCTTGGGAATCTCAGACTGGAACCTCCCTCTTTGGATCGCACATCCCGGTGGGCTG
N I E K S L A E A F K P L G I S D W N S L F W I A H P G G P
1081   CTATTTGGACCAAGTGAACAAAAATGGCCCTTAAGCCCGAGAAGCTACGGGCCACGAGGCACGTGTTGAGCGAGTATGGTAACATGT
A I L D Q V E Q K L A L K P E K L R A T R H V L S E Y G N M
1171   CGAGTGCATCGGTGTTTCATACCTGATGAGATGAGGAAGAAGTCTGCGGAAGACGGGCTCAAGACCACCGGTGAGGGGCTCGAGTGGG
S S A C V L F I L D E M R K K S A E D G L K T T G E G L E W
1261   GCGTGTATTTGGGTTTGGGCTGGGCTAACTGTTGAGACTGTGGTGTCCATAGTCTGTGCACTAGTGGGCTGGTATAGCCTTGGGGCT
G V L F G F G F G P G L T V E T V V L H S L C T *
1351   TCTGTTTGTGTTTTTGTCTCCATTGTGGTGTGTGTGGGTTAAGTTGGGCTTGTGTTGCTTCCACTTGTGCGTTTGAAGTAAAG
1441   AGGCGATCTATTTATGTAGGGACTTAAATGAAATAATGCTCTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 3 *AcCHS* 的 ORF 以及推测的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA full length of *AcCHS* and its putative amino acid sequence

```

1      GGGCACGCTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGTGGTTGCGGCGAGGCGCCCGTTCTGCCTTGGCGGCGCTCCGTGTCCGTGGGGCGA
91     CTACATAATTGTCACAAATTCACACATAAGTACCGAATTACATTATAATTTAGGTGTGAAAAAATGGTGGCAACAGTGGTCGGAAC TAG
                                     M V A T V V G T R
181    GGTGGAGAGCCTAGCTAGCAGCGGGATCGAGCGATCCCCAAGGAGTACGTGCGGCCGAGGAGCTACCCAGCATCGGTAACATTTT
V E S L A S S G I E A I P K E Y V R P Q E E L T S I G N I F
271    CGAGGAAGGGAAGGAGAATGGCCACAGGTGCCACCATCGACCTGGAGGACTTGGTTCGGGAGCAGGAGAAGAGGGTGAGGGTG
E E G K K E N G P Q V P T I D L E D L V P E D E E K R V R C
361    CCATGAGGAGCTGAAGAGGGCGCGACAGAGTGGGGGTGATGCAAGTGGTGAACACCGCATACCGATCGAGCTAATGGAGCGGTGAG
H E E L K R A A T E W G V M Q V V N H G I P I E L M E R V R
451    GGTGCGGGGGCGGAATCTTCAACAGTCCGTGGAGGAGAAGGAGAAGTACGGAACGACACGCTCCGGGAACATACAAGGTATGG
A A G A E F F N Q S V E E K E K Y A N D H A S G N I Q G Y G
541    AAGTAAATGGCCAAATAATGCTAGCGGCGAGCTTGAAGTGGGAGGACTATTTCTTACCTTGTGTACCCGGAGGACAAAGGGACATGTC
S K L A N N A S G Q L E W E D Y F F H L V Y P E D K R D M S
631    CATTTGCCAAAGACACCAAGTGATTACATTCCGGCAACAAGCGCGTACGCGGAGCACCTACGAGGCCATAGCAGCAAAATCCTGTGGC
I W P K T P S D Y I P A T S A Y A E H L R G L A T K I L S A
721    TTTATCTCTGGCTTAGGACTTGAAGAGGTCGGCCCGAGAAAGAAGTTGGCGGAATGGAAGAACTCCTCCTCCAATGAAATCAACTA
L S L G L G L E E G R P E K E V G G M E E L L L Q M K I N Y
811    TTACCCAAAATGCCCCAGCCGAGCTGGCCTGGGCGTGGAAGCTCACACTGACGTTAGTGCCCTCACATTCATCCTCATAACATGGT
Y P K C P Q P E L A L G V E A H T D V S A L T F I L H N M V
901    CCCAGGACTCCAGCTATTCTACGAGGGCAATGGTAACAGCAAAATGTGTCCTGACTCCTTAGTCATGACATTGGCGATACAATGTA
P G L Q L F Y E G K W V T A K C V P D S L V M H I G D T I E
991    GATACTAAGTAATGGGAAGTACAAGAGCATTCTTACAGGGGGCTCGTGAACAAGGAAAAAGTTCGGATCTCGTGGGCGGTTTTTGGGA
I L S N G K Y K S I L H R G L V N K E K V R I S W A V F C E
1081   GCCCCCAAGGAGAAGATCATCTGAAGCGGCTCCCGGAGACAGTTCTGAGGCGGAGCCACCCCTTTACCCACCCGACCTTTGCCCA
P P K E K I I L K P L P E T V S E A E P P L Y P P R T F A Q
1171   GCATTTACCAACAGTGTTCAGGAAGACCCAGGAGCTCGGGGCTAAATGAGTCTTTTTAAATTAATGGTCATCGTCTATTATCAT
H I H H K L F R K T Q E L G A K *
1261   TGCATTTTATCCCTTAATGTCAGTCATGTGTTGTTGTTGAGTCTTGGGAGTGATTGTTGATGGCTGATGCAATAAACACGTAGAA
1351   CATTGCATTAAGTAATATATGTTCCATATTTGTTGTGGTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4 *AcLDOX* 的 ORF 以及其推测的氨基酸序列

Fig. 4 cDNA full length of *AcLDOX* and its putative amino acid sequence

2.2 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 与其它物种同源性比较

氨基酸序列比对结果表明, *AcCHS* 与葡萄 (*Vitis vinifera*)、苹果 (*Malus × domestica*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、黄蜀葵 (*Abelmoschus manihot*)、山茶 (*Camellia sinensis*) 和杜鹃 (*Rhododendron simsii*) 的 CHS 序列的同源性都达到了 90% 以上。*AcLDOX* 与山葡萄 (*Vitis amurensis*) 和葡萄的相似性分别高达 94% 和 93%。

为了确定 *AcCHS* 与 *AcLDOX* 在植物界中的进化地位, 选取不同分类单元的典型物种 (如玉米、水稻、拟南芥、棉花等) 花青素合成途径的 CHS 及 LDOX 序列进行比较。从分子进化树上可以看出 (图 5), *AcCHS* 与葡萄、山茶、莲、棉花、黄蜀葵和杜鹃花等物种花青素合成途径中的 CHS 在进化上略近 (图 5, A); *AcLDOX* 与葡萄、山葡萄、茄子和康乃馨等植物花青素合成途径中 LDOX 较近 (图 5, B), 但 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 与玉米、水稻等单子叶植物类似功能基因的进化关系较远。

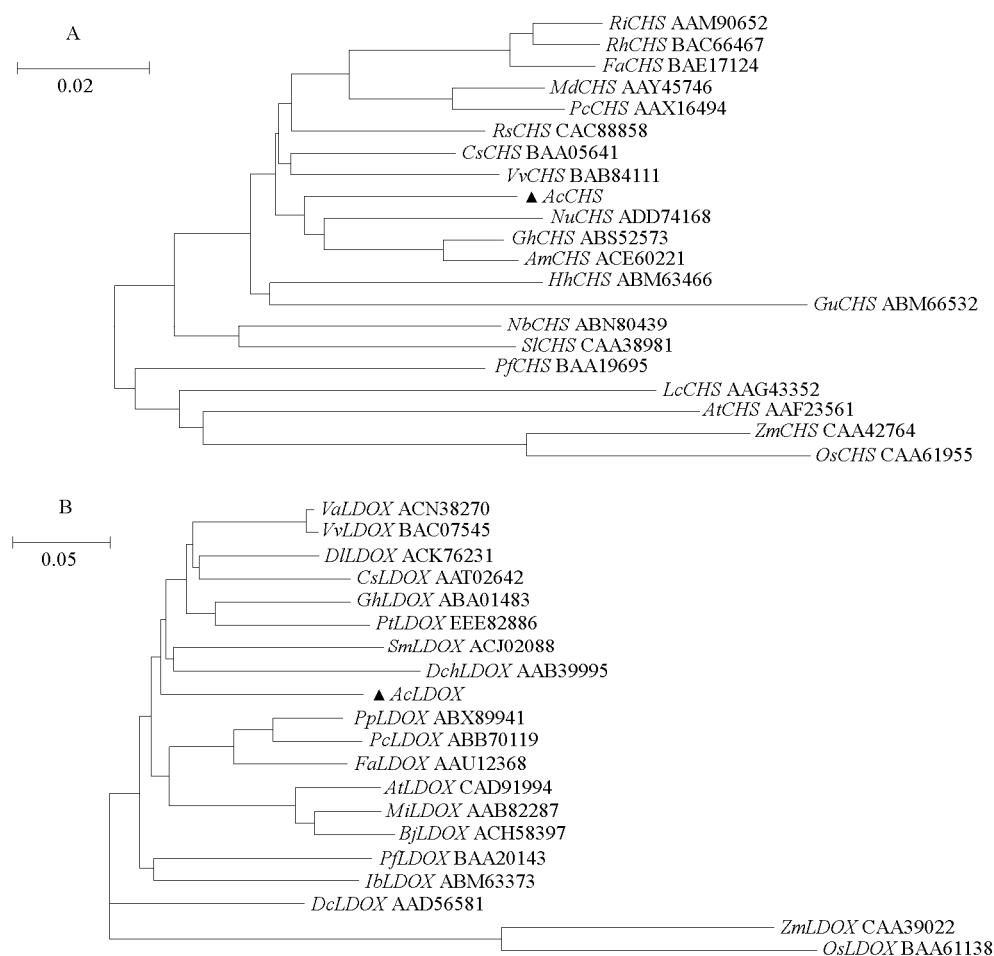


图 5 来源于 20 个物种的 CHS (A) 和 LDOX (B) 所构建的 N-J 进化树

Fig. 5 The Neighbour-joining tree of CHS (A) and LDOX (B) gene from 20 species

Am: 黄蜀葵 *Abelmoschus manihot*; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Bj: 茎瘤芥 *Brassica juncea*; Cs: 山茶 *Camellia sinensis*; Cs: 橙 *Citrus sinensis*; Dc: 胡萝卜 *Daucus carota*; Dch: 康乃馨 *Dianthus caryophyllus*; Dl: 龙眼 *Dimocarpus longan*; Fa: 草莓 *Fragaria × ananassa*; Gh: 棉花 *Gossypium hirsutum*; Gu: 甘草 *Glycyrrhiza uralensis*; Hh: 金丝桃 *Hypericum hookerianum*; Ib: 甘薯 *Ipomoea batatas*; Lc: 独行菜 *Lepidium campestre*; Md: 苹果 *Malus × domestica*; Mi: 紫罗兰 *Matthiola incana*; Nb: 烟草 *Nicotiana benthamiana*; Nu: 莲 *Nelumbo nucifera*; Os: 水稻 *Oryza sativa*; Pc: 西洋梨 *Pyrus communis*; Pf: 紫苏 *Bacillus subtilis*; Pp: 桃 *Prunus persica*; Pt: 杨树 *Populus trichocarpa*; Rh: 月季 *Rosa hybrid*; Ri: 蓖麻 *Rubus idaeus*; Rs: 杜鹃 *Rhododendron simsii*; Sl: 番茄 *Solanum lycopersicum*; Sm: 茄子 *Solanum melongena*; Va: 山葡萄 *Vitis amurensis*; Vv: 葡萄 *Vitis vinifera*; Zm: 玉米 *Zea mays*.

2.3 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 适时荧光定量表达分析

以 β -actin 作为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 分析 *AcCHS* 在‘红阳’猕猴桃果实不同发育时期的表达变化。内参基因的标准曲线为: $Y = -3.326X + 20.705$ ($R = 0.99351$, $R^2 = 0.98706$, Efficiency = 100%), 各溶解曲线为单峰, 扩增产物良好。*AcCHS* 基因的标准曲线为 $Y = -4.343X + 30.652$ ($R = 0.962000$, $R^2 = 0.92544$, Efficiency = 70%)。 *AcLDOX* 表达量的标准曲线 $Y = -4.327X + 22.702$ ($R = 0.99178$, $R^2 = 0.98363$, Efficiency = 70%)。

如图 6 所示: 在红肉猕猴桃品种‘红阳’中, *AcCHS* 在内果皮转色前表达水平较低, 转色开始期(花后 65 d)表达急剧升高并达到最大值, 其后直到花后 150 d 一直维持较低水平; 在绿肉品种‘金魁’内果皮中, *AcCHS* 的表达从开花后就开始上升, 至 30 d 达到最大值, 之后逐渐下降, 花后 120 d 降到最低, 花后 150 d 又明显升高; 在黄肉品种‘金农’中, 开花当天 *AcCHS* 的表达量最高, 此后明显下降。3 种不同果肉颜色的品种相比, *AcCHS* 在‘红阳’果实着色初期表达量明显高于其它 2 个品种, 但着色中后期, 尽管果实着色逐渐加深, 但该基因的表达并未随着果肉着色加深而升高。

图 7 表明: ‘红阳’中 *AcLDOX* 的表达量从开花当天起开始上升, 花后 65 d 出现高峰, 之后迅速下降, 到花后 150 d 下降到极低值; *AcLDOX* 的表达从‘金魁’开花期到花后 65 d 维持了较低水平, 从花后 90 d 开始持续升高, 到花后 150 d 达到最高; *AcLDOX* 在‘金农’开花当天的表达量最高, 此后明显下降。 *AcLDOX* 在 3 种不同颜色品种中表达变化趋势明显不同, 除了开始转色期(花后 65 d)‘红阳’中的表达高于其它 2 个品种, 其余发育阶段绿肉或黄肉品种反而高于红肉品种, 尤其在果实转色的后期, 该基因在绿肉品种‘金魁’果实中的表达量远高出其它 2 个品种。

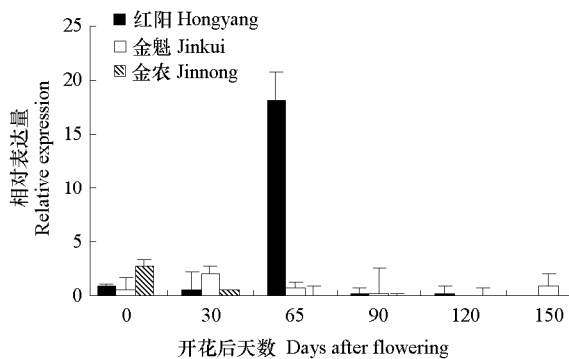


图 6 *AcCHS* 在 3 种不同果肉颜色的猕猴桃品种中的表达

Fig. 6 Expression of *AcCHS* in inner pericarp of fruits of three kiwifruit cultivars with different color

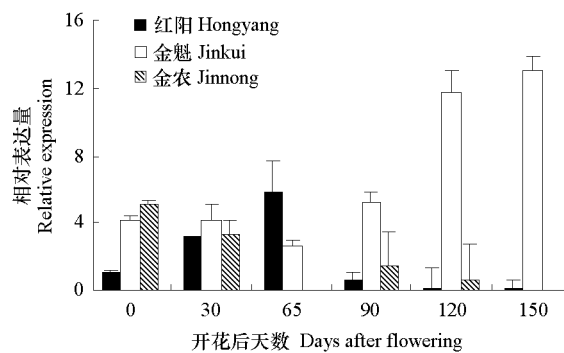


图 7 *AcLDOX* 在 3 种不同果肉颜色的猕猴桃品种中的表达

Fig. 7 Expression of *AcLDOX* in inner pericarp of fruits of three kiwifruit cultivars with different color

3 讨论

本研究中克隆了红肉猕猴桃花青素代谢途径中的上游基因 *AcCHS* 及下游基因 *AcLDOX* 的全长编码区, 并分析了这两个基因在不同果肉颜色猕猴桃品种中的表达。研究结果表明, 这两个基因不仅在红肉猕猴桃果实发育过程中表达, 在黄肉及绿肉猕猴桃中也有较高表达。此前已报道的 *AcF3H* 及 *AcDFR1* 基因也存在类似特点(杨红丽等, 2009; 杨俊等, 2010), 即在黄肉及绿肉猕猴桃中均存在较高表达。在苯丙胺途径中, 花青素与类黄酮、单宁等合成共享上游的部分途径, 而花青素合

成是其中处于下游的一个合成支路 (Aharoni et al., 2001; Deluc et al., 2006), 上游支路途径的存在可能是导致这些基因表达变化与红肉猕猴桃着色及花青素含量变化不完全一致的主要原因。Montefiori 等(2010)分离到 F3H1 和 F3H2 两个片段, 其中 F3H1 的表达变化与红肉猕猴桃‘Hort22D’内果皮着色没有明显的对应关系, 但 F3H2 的表达与开花期及果实发育过程的着色具有一致的变化趋势, 可见在猕猴桃的花青素合成途径中同一催化酶可能存在不同的转录本, 有待于分离更多的相关基因才能进一步展开分析。正常情况下, ‘红阳’果实的转色开始于开花后约 60 ~ 65 d, 此后着色逐渐加深, 在商业采收期 (约花后 120 d) 着色最深。长期栽培观察发现, ‘红阳’在其主栽区四川苍溪的低山区栽培时着色表现好, 内果皮着色深, 但在温度较高的武汉、长沙等地区, 或者海拔较低的地区, 着色很浅甚至消失, 这可能与温度等环境条件有关 (钟彩虹 等, 2007; Wang et al., 2011)。(‘红阳’*AcCHS* 和 *AcLDOX* 在开花后的 65 d 果实开始出现红色时的表达量都明显高于绿肉和黄肉品种, 表明 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 可能参与了红肉猕猴桃果肉的初始转色过程。在‘红阳’及一些黄肉品种如‘金农’及‘金水 11’开花期, 其子房内均会呈现红色, 本研究表明, ‘红阳’及‘金农’开花期子房内 *AcCHS* 表达量相应较高, 说明该基因可能还参与了这些品种开花期子房中花青素的合成过程。由于本研究中采用的都是来自武汉地区生长的‘红阳’果实样品, 果实转色期间正是高温季节, 导致果肉着色严重不良, 也可能是花青素合成途径基因表达不高的另一个重要原因。同时, *AcCHS* 与 *AcLDOX* 也是合成无色花青素与单宁类物质的共用催化酶, 绿肉猕猴桃‘金魁’中 *AcLDOX* 的表达随着果实发育和成熟迅速升高, 推测在‘金魁’中存在大量的单宁类物质或其衍生物, 但有待于进一步检测和验证。Montefiori 等 (2010) 研究认为, 猕猴桃不同颜色果肉类型的差异可能是花青素途径下游基因 *F3GT1* 的表达差异造成的, 并将该基因定位于 LG12 连锁群上, 尽管该基因一个外显子片段在作图群体中出现 1:1 的分离比, 但进一步调查表明, *F3GT1* 的分离与后代果实着色并无关系, 因此, 关于中华猕猴桃中的红肉类型与黄肉或绿肉类型之间果肉颜色差异的遗传机制尚待进一步解析。

References

- Aharoni A, De Vos C H, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol J N, O'Connell A P. 2001. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 28: 319 - 332.
- Albert N W, Lewis D H, Zhang H, Schwinn K E, Jameson P E, Davies K M. 2011. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *The Plant Journal*, 65: 771 - 784.
- Appelhaugen I, Jahns O, Bartelniewoehner L, Sagasser M, Weisshaar B, Stracke R. 2011. Leucoanthocyanidin Dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*: Characterization of mutant alleles and regulation by MYB-BHLH-TTG1 transcription factor complexes. *Gene*, 484: 62 - 69.
- Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergeat V, Decendit A, Richard T, Carde J P, Mérillon J M, Hamdi S. 2006. Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*, 140: 499 - 511.
- Elomaa P, Honkanen J, Puska R, Seppänen P, Helariutta Y, Mehto M, Kotilainen M, Nevalainen L, Teeri T H. 1993. Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Nature Biotechnology*, 11: 508 - 511.
- Ferguson A R, Seal A G. 2008. Kiwifruit/Hancock J F. Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics. Berlin: Springer: 235 - 264.
- Ferrer J L, Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, Noel J P. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural & Biology*, 6: 775 - 784.
- Ishiguro K, Taniguchi M, Tanaka Y. 2012. Functional analysis of *Antirrhinum kelloggii* flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes: Critical role in flower color and evolution in the genus *Antirrhinum*. *Journal of Plant Research*, 125: 451 - 456.
- Jez J M, Noel J P. 2000. Mechanism of chalcone synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 39640 - 39646.
- Kamiishi Y, Otani M, Takagi H. 2012. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. *Molecular Breeding*, 30: 671 - 680.

- Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, Kuhn D N, Hahlbrock K. 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of American, 80 (9): 2591 – 2593.
- Lamb C J, Lawton M A, Dron M, Dixon R A. 1989. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell, 56: 215 – 224.
- Lee G J, Kim D S, Kang S Y, Lee H J, Kim J B, Chung S J. 2010. Isolation of a leucoanthocyanidin dioxygenase (*LDOX*) gene from a spray-type chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*) and its colored mutants. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 28: 818 – 827.
- Lin-Wang K, Micheletti D, Palmer J, Volz R, Lozano L, Espley R, Hellens R P, Chagnè D, Rowan D D, Troggio M, Iglesias I, Allan A C. 2011. High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex. Plant, Cell & Environment, 34: 1176 – 1190.
- Liu Ren-dao, Huang Ren-hua, Wu Shi-quan, Yu Zhong-shu, Li Xin-xian. 2009. Changes of anthocyanin content in ‘Hongyang’ kiwifruits and effects of girdling and ABA on its accumulation. Acta Horticulturae Sinica, 36 (6): 793 – 798. (in Chinese)
- 刘仁道, 黄仁华, 吴世权, 余中树, 李新贤. 2009. ‘红阳’猕猴桃果实花青素含量变化及环剥和 ABA 对其形成的影响. 园艺学报, 36 (6): 793 – 798.
- Montefiori M, Espley R V, Stevenson D, Cooney J, Datson P M, Saiz A, Atkinson R G, Hellens R P, Allan A C. 2010. Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*). The Plant Journal, 65: 106 – 118.
- Montefiori M, McGhie T K, Costa G, Ferguson A R. 2005. Pigments in the fruit of red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (24): 9526 – 9530.
- Morita Y, Saito R, Ban Y, Tanikawa N, Kuchitsu K, Ando T, Yoshikawa M, Habu Y, Ozeki Y, Nakayama M. 2012. Tandemly arranged chalcone synthase genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. The Plant Journal, 70: 739 – 749.
- Ono E, Homma Y, Horikawa M, Kunikane-DoSi, Imai H, Takahashi S, Kawai Y, Ishiguro M, Fukui Y, Nakayama T. 2010. Functional differentiation of the glycosyltransferases that contribute to the chemical diversity of bioactive flavonol glycosides in grapevines (*Vitis vinifera*). The Plant Cell, 22: 2856 – 2871.
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. Natural Product Reports, 20: 288 – 303.
- Wang Yan-chang, Luo Bin-bin, Man Yu-ping, Huang Hong-wen. 2011. Cytology of pigmentation in red-fleshed kiwifruit cultivated in different regions. Acta Hort, 913: 229 – 234.
- Wang Yan, Xu Feng, Cheng Shui-yuan. 2007. The development of molecular biology research of chalcone synthase. Journal of Henan Agricultural Sciences, (8): 5 – 9. (in Chinese)
- 王 燕, 许 峰, 程水源. 2007. 植物查尔酮合成酶分子生物学研究进展. 河南农业科学, (8): 5 – 9.
- Wu Bo-le. 1992. Some new kiwifruit cultivars. Journal of Fruit Science, 9: 56 – 58. (in Chinese)
- 吴伯乐. 1992. 几个猕猴桃新品种. 果树科学, 9: 56 – 58.
- Xie D Y, Sharma S B, Dixon R A. 2004. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 422: 91 – 102.
- Yang Hong-li, Wang Yan-chang, Jiang Zheng-wang, Huang Hong-wen. 2009. Construction of cDNA library of ‘Hongyang’ kiwifruit and analysis of F3H expression. Hereditas, 31 (12): 1265 – 1272. (in Chinese)
- 杨红丽, 王彦昌, 姜正旺, 黄宏文. 2009. ‘红阳’猕猴桃 cDNA 文库构建及 F3H 基因的表达初探. 遗传, 31 (12): 1265 – 1272.
- Yang Jun, Jiang Zheng-wang, Wang Yan-chang. 2010. Cloning and expression of dihydroflavonol 4-reductase in *Actinidia chinensis* var. *rufopulpa*. Journal of Wuhan Botanical Research, 28 (6): 673 – 681. (in Chinese)
- 杨 俊, 姜正旺, 王彦昌. 2010. 红肉猕猴桃 DFR 基因的克隆及表达分析. 武汉植物学研究, 28 (6): 673 – 681.
- Zhong Cai-hong, Wang Zhong-yan, Bu Fan-wen, Peng Di-fei. 2007. Studies on the mechanism of red coloration in ‘Chuhong’ kiwifruit cultivar//Huang Hong-wen. Advance in *Actinidia* research (IV). Beijing: Science Press: 213 – 218. (in Chinese)
- 钟彩虹, 王中炎, 卜范文, 彭涤非. 2007. ‘楚红’猕猴桃果肉红色形成规律初探//黄宏文. 猕猴桃研究进展 (IV). 北京: 科学出版社: 213 – 218.