

史旻, 孙静, 陶俊. 芍药 *PIFLS* 基因生物信息学分析及对拟南芥的遗传转化[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(5): 93-100.

芍药 *PIFLS* 基因生物信息学分析及对拟南芥的遗传转化

史旻^{1,2}, 孙静², 陶俊²

(1 扬州大学 广陵学院, 江苏 扬州 225009; 2 扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:【目的】探讨类黄酮合成途径关键基因黄酮醇合酶基因 (*FLS*) 在芍药 *Paeonia lactiflora* 花色调控中的作用。【方法】克隆获得芍药 *PIFLS* 基因, 对其进行生物信息学分析, 构建 *PIFLS* 基因的过表达载体, 通过农杆菌介导的 Floral-dip 法进行拟南芥遗传转化研究。【结果】生物信息学分析表明, 芍药 *PIFLS* 基因氨基酸序列与茶树相似性较高, 存在 2 个功能结构域, 但不存在信号肽位点。芍药 *PIFLS* 蛋白预测模型揭示了其蛋白三级结构中存在 1 个 2-氧代戊二酸配体, 并与多条肽链相连接。试验成功获得了转 *PIFLS* 基因纯合拟南芥植株, GUS 染色和 PCR 鉴定证实了目的基因已经整合转基因植株基因组, qRT-PCR 分析显示, 相对于野生型, *PIFLS* 基因在遗传转化植株中显著高表达 ($P<0.05$)。色谱分析结果显示, 转 *PIFLS* 基因拟南芥植株叶片中花黄素含量显著增加 ($P<0.05$)。【结论】成功构建转 *PIFLS* 基因拟南芥, 并证明 *PIFLS* 基因可以显著影响拟南芥类黄酮合成途径。

关键词: 芍药; 类黄酮; *PIFLS* 基因; 拟南芥; 转基因植株; 遗传转化
中图分类号: S682.12; Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2018)05-0093-08

Bioinformatics analysis of *Paeonia lactiflora* *PIFLS* gene and its genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*

SHI Min^{1,2}, SUN Jing², TAO Jun²

(1 College of Guangling, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2 College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the molecular mechanism of flavonol synthase (*FLS*) gene in peony flower (*Paeonia lactiflora*) color formation. 【Method】We cloned *PIFLS* gene and carried out bioinformatics analysis. The over-expression vector of *PIFLS* gene was constructed and transformed as heterologous gene into *Arabidopsis* by floral-dip method with recombinant agrobacterium transformants. 【Result】The bioinformatics analysis results suggested that the amino acid sequence of *PIFLS* gene was highly similar with *Camellia sinensis*, and there were two structure domains but no potential signal peptide. The tertiary structure prediction of *PIFLS* protein showed that there was a 2-oxoglutaric acid ligand connecting with several peptide chains. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing homologous *PIFLS* gene were obtained successfully. GUS staining and PCR detection confirmed the integration of *PIFLS* gene into *Arabidopsis* genome, and qRT-PCR analysis showed *PIFLS* gene was expressed at significantly higher level in transgenic lines compared with wide type ($P<0.05$). Through HPLC detection, the anthoxanthin content in transgenic plants significantly increased compared with wide type ($P<0.05$). 【Conclusion】*PIFLS* gene has been transformed into *Arabidopsis*

收稿日期: 2018-02-10 网络首发时间: 2018-07-09 17:49:23
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180707.1635.004.html>
作者简介: 史旻 (1991—), 女, 硕士, E-mail: 674174041@qq.com; 通信作者: 陶俊 (1966—), 男, 教授, 博士, E-mail: taojun@yzu.edu.cn
基金项目: 江苏省农业三新工程项目 (SXGC2017-297); 江苏省优势学科基金项目 (PAPD)

successfully and it plays an important role in regulating the synthesis of flavonoids.

Key words: *Paeonia lactiflora*; flavonoid; *PIFLS* gene; *Arabidopsis thaliana*; transgenic plant; genetic transformation

芍药 *Paeonia lactiflora* 属于芍药科 *Paeoniaceae* 芍药属 *Paeonia*, 具有观赏价值, 但其颜色主要为红色系和白色系, 黄色系等品种非常稀少, 一定程度上限制了其产业发展。目前对芍药花色的改良主要集中在生理、生化水平或通过杂交选育获得新奇花色, 而对芍药花色形成的分子机制研究较少, 利用基因工程手段进行花色定向选育的研究更为少见^[1]。相关研究报道表明植物类黄酮合成途径中许多关键酶编码基因与花色调控密切相关^[1-3]。扬州大学观赏园艺课题组前期对嵌合体芍药品种‘金辉’内外瓣进行转录组测序, 结果发现在芍药类黄酮途径中黄酮醇合酶基因 (*PIFLS*) 等在黄色内瓣中较红色外瓣出现低表达, 揭示 *PIFLS* 基因等可能对芍药花色形成起到重要的调控作用^[1]。

作为类黄酮合成途径和儿茶素合成途径连接的中间桥梁, 黄酮醇合酶对植物花色呈色起重要调控作用^[4]。同时黄酮醇合酶 (Flavonol synthase, *FLS*) 基因在植物中的保守度很高, 目前研究人员已成功从矮牵牛、烟草等多个物种中克隆得到了 *FLS* 基因^[5-6]。*FLS* 能够催化植物类黄酮生物合成途径中黄酮的 C3 位, 使其发生羟基化, 最终形成不同种类的黄酮醇类化合物。黄酮醇主要存在杨梅素、槲皮素和山奈酚 3 种结构形式, 分别由 *FLS* 催化二氢杨梅素、二氢槲皮素和二氢山奈酚形成^[7]。研究发现, 利用基因沉默技术抑制洋桔梗 *FLS* 的表达, 可使花的颜色由紫色转变成红色, 并能在后代植株中稳定遗传该性状^[8]。在大豆相关研究中发现, *FLS* 基因突变能改变其花瓣颜色, 表现为单一碱基缺失导致花色从粉色变为洋红色^[9]。此外, 在矮牵牛体内抑制 *FLS* 基因的表达可使紫色花瓣变成黑紫色, 而表达正义月季的 *FLS* 基因, 使紫色的花瓣变成了浅紫色^[10]。

以上研究表明 *FLS* 基因在植物花色调控中的关键作用, 但当前对于 *FLS* 基因在芍药花色形成中潜在的调控机制尚不清楚。作为观赏价值极高的花卉植物, 如能够通过分子生物技术对其花色进行调控, 打破种内花色基因库的有限性, 培育出种内空缺的新色系, 则具有潜在市场价值。为此, 本研究构建芍药 *PIFLS* 基因表达载体, 通过遗传转化模式植物拟南芥, 并对其性状进行初步分析, 为进一步揭示

基因的生物学功能奠定基础, 为利用 *PIFLS* 基因进行芍药花色分子育种提供资料参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用扬州大学芍药种质资源圃 (32°23'N, 119°24'E) 种植的红色芍药栽培品种‘红艳争辉’为试验材料, 5 月采集盛花期的花瓣后立即置于液氮中速冻, -80 °C 超低温冰箱中保存备用。经春化的野生型拟南芥 *Col-0* 均匀点播在 1/2 MS 培养基上, 7 d 后移栽至营养土、蛭石、珍珠岩 (体积比为 2:1:1) 的混合物基质中, 在人工气候培养箱 (SANYO, MLR-359H, 日本) 中以光照 8 h (22 °C)、黑暗 16 h (18 °C) 进行短日照培养, 相对湿度控制在 70%~80%。

1.2 目的基因克隆

称取适量芍药花瓣样品在液氮中研磨均匀后按照 TaKaRa Mini BEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 说明书提取总 RNA, 经超微量紫外分光光度计 (Nanodrop100, 美国) 测定质量合格后 ($D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 约为 2.0), 立即用 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa, Japan) 合成 cDNA 的第 1 条链。参照 GenBank 收录的芍药 *PIFLS* 基因全长序列 (KM259902.3), 通过 Primer 6.0 软件设计 1 对特异性引物进行扩增 (F: 5'-TTTCAAAAAATGGAGG TGGTGGAGA-3', R: 5'-ACCTTGGTGGTATAACAA TGAGAAA-3')。所用反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的片段连接至 pEASY™-T5 载体, 转化并提取质粒 *PIFLS*-T5 后送交上海生工生物科技有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

克隆产物经测序获得芍药 *PIFLS* 基因 cDNA 序列后, 与从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线选取金花茶等植物 *FLS* 基因氨基酸序列, 利用 DNAMAN5.2.2 软件对不同物种间同源序列进行比对。同时通过 MEGA6^[11] 软件以 Neighbor-joining 法分析构建系统进化树^[12], 经过 1 000 次 Bootstrap 校

验。通过 ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 PIFLS 蛋白理化性质^[13]。利用 SMART 网络数据库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 PIFLS 蛋白功能结构域^[14]。利用 SignalP4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对其信号肽进行预测^[15]。通过 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建芍药 PIFLS 蛋白的三级结构, 预测其潜在补体位置及功能^[16]。

1.4 过表达载体构建及验证

根据获得的 *PIFLS* 基因 cDNA 序列, 结合双元表达载体 pCAMBIA1301 上的限制性酶切位点, 设计带有 *Bam*H I 酶切位点的上游引物 PIFLS-F1: 5'-CGCGGATCCATGGAGGTGGTGGAGA-3'和带有 *Kpn*I 酶切位点的下游引物 PIFLS-R1: 5'-CGGGGTACCTTATTGTGGGAGCTTGTT-3'(带有下列划线的序列为酶切位点), 以 PIFLS-T5 质粒为模板, 扩增 *PIFLS* 基因完整的 ORF。将目的片段与表达载体 pCAMBIA1301 分别进行双酶切, 回收酶切产物后用 T4 DNA 连接酶 15 ℃ 连接, 转化大肠埃希菌感受态细胞, 过夜培养后挑取单克隆菌落, 用 PIFLS-F1 和 PIFLS-R1 进行菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 提取重组质粒, 酶切鉴定并送上海生工生物科技有限公司测序, 阳性重组子命名为 pB1301-PIFLS。

1.5 拟南芥遗传转化

采用冻融法将重组质粒与空载质粒分别转化农杆菌 EHA105, 挑选经验证的阳性重组农杆菌单菌落, 保存。待拟南芥盛花期, 活化保存菌液, 接种于含 50 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 YEB 培养基中, 28 ℃, 200 r·min⁻¹ 培养 16 h 以上, 至其 *D*_{600 nm} 约为 0.7~0.8, 离心收集菌体, 用转化液 (1/2 MS 培养基, 50 g·L⁻¹ 蔗糖, 200 μL·L⁻¹ Silwet L-77 表面活性剂) 剧烈悬浮沉淀至起始体积, 装入烧杯中作为侵染液。然后采用改良的 Floral-dip 法将拟南芥花蕾在侵染液中浸泡 1 min, 保鲜膜保湿暗培养 12 h 以上后正常培养。为提高转化率, 7 d 后再次按上述方法侵染 1 次, 然后置于人工气候培养箱培养。待种子成熟后, 收取种子, 记为 T₀ 代。

1.6 转基因拟南芥的筛选与鉴定

T₀ 代种子晾干且经过 4 ℃ 低温春化、消毒后, 均匀播种于潮霉素 (25 mg·L⁻¹) 抗性平板上初步筛选 T₁ 代。2 周后将能长出真叶和根的阳性苗移栽到基质中, 做好标记。当幼苗长至 10 片左右莲座叶时, 每株剪取 3 片小叶进行 GUS 染色, 进一步对阳性植株进行验证, 排除假阳性的现象。单株收获阳性 T₁ 代转基因植株, 标成不同株系, 收获的种子记

为 T₁ 代。随后继续播种筛选, 单株收获的 T₁ 代种子已经出现性状分离。筛选抗性分离比接近 3:1 的株系继续种植于基质中, 随机选择幼苗进行 GUS 染色鉴定, 待种子成熟后单株收种, 记为 T₂ 代。用少量 T₂ 代种子经潮霉素筛选, 直到筛选后全部为抗性苗, 即得到纯合的 T₃ 代转基因株系, 做好标记并大量繁殖。

取抽薹期的初步鉴定的纯合转基因阳性拟南芥和野生型拟南芥叶片, 提取 gDNA 进行 *gus* 基因和目的基因的 PCR 检测, 引物包括 *gus*-F: 5'-TCTCCCGCTATGTATGTCGC-3', *gus*-R: 5'-TAAGGTCACGTCCAGCAAGG-3', PIFLS-F2: 5'-GCTATCTCATCCGCACAA-3', PIFLS-R2: 5'-CCAGGCTTTACACTTTATGC-3'。

同时对纯合转基因拟南芥和野生型拟南芥叶片提取总 RNA, 反转录为 cDNA 备用 (方法同“1.2”)。以 *Actin2*(AK230311.1) 为内参基因, 获得的 cDNA 为模板, 设计基因特异性引物 PIFLS-F3: 5'-GCTATCTCATCCGCACAA-3'和 PIFLS-R3: 5'-CTTCAAACCTTTCCTCTACCAG-3', 通过 Bio-Rad 公司 Real-Time System (CFX96) 进行实时定量 PCR(qRT-PCR), 检测 *PIFLS* 基因的相对表达量, 参照 SYBR®Premix Ex Taq™ 说明书进行, 基因的相对表达水平采用 2^{-△△C_t} 法进行计算^[17]。

1.7 高效液相色谱测定

采集纯合转基因拟南芥和野生型拟南芥植株叶片, 称取 0.1 g 经液氮研磨, 溶于 1 mL 提取液 (甲醇、HCl、双蒸水体积比为 70.0:0.1:29.9), 置于 4 ℃ 下 24 h。将提取液通过 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤, 供色素的定量分析使用。利用扬州大学测试中心 Agilent-2100 高效液相色谱系统, 选择 Asibut C18 TSK gel ODS-80Ts QA 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, Tosoh Co. Ltd., 日本), 设置色谱条件: 流动相: 无水乙腈、体积分数为 0.5% 的甲酸; 洗脱梯度: 甲酸的体积分数 (时间) 为 5% (0 min), 10% (30 min), 15% (50 min), 20% (60 min), 25% (65 min), 5% (75 min), 5% (90 min)。流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温保持 35 ℃, 进样量为 5 μL, 进行花黄素 (350 nm) 检测^[18]。花瓣中类黄酮含量采用标准品半定量法, 以 μg·g⁻¹ 新鲜花瓣计, 以芦丁作为标准样品根据峰面积计算花黄素类物质的含量。

1.8 数据分析

试验数据通过 SPSS 20.0(IBM, 美国) 进行分析。选择有重复测量值的一般线性模型进行单因素方差分析, 并通过 Duncan's 检验进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 芍药 PIFLS 基因克隆及生物信息学分析

以芍药品种‘红艳争辉’花瓣 RNA 反转录的 cDNA 第 1 条链为模板进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果表明, PCR 产物大小约 1 100 bp, 长度大小与预期目标相符。测序结果显示, 成功克隆获得 *PIFLS* 基因, 目的基因全长 1 073 bp, 含起始密码子、终止密码子, 包含 999 bp 的完整开放阅读框 (ORF), 编码 332 个氨基酸, 与 NCBI 公布序列一致, 可用于下一步试验。用 ProtParam 对其编码的蛋白理化特性进行分析表明, 其分子式为 $C_{1708}H_{2646}N_{452}O_{496}S_{12}$, 含有 5 314 个原子, 相对分子质量为 37 830, 理论等电点 pI 为 5.68, 含亮氨酸最多 (质量分数为 10.2%), 据此划分为不稳定性蛋白。通过将芍药与其他 22 种植物的 *FLS* 基因进行氨基酸水平上的比对, 发现芍药与茶树 *Camellia*

sinensis (DQ198089.1)、葡萄 *Vitis vinifera* (AB213566.1)、山甜菜 *Nekemias grossedentata* (KC753782.1)、苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (JX401285.1) 和洋葱 *Allium cepa* (KY369210.1) 的序列相似性分别达 77%、78%、76%、65% 和 52%。利用 MEGA6 对其构建系统进化树, 如图 1 所示, 芍药 *PIFLS* 基因编码的蛋白最先与茶树聚为一类, 在遗传进化上关系最近 (置信度 79%), 与葡萄、山甜菜亲缘关系相对较近, 而与银杏的亲缘关系相对较远。

SMART 预测发现 *PIFLS* 蛋白存在 2 个明显的功能结构域, 其中结构域 DIOX_N 位于第 41~148 位氨基酸, 结构域 2OG-Fell_Oxy 位于第 193~293 位氨基酸。进一步对其信号肽进行了预测。信号肽是引导蛋白肽链进入内质网加工的一段疏水性区域, 对蛋白的生物合成起重要作用。选用 SignalP4.1 网络数据库对 *PIFLS* 编码蛋白进行预测, 并未发现其具有潜在信号肽位点, 为非分泌性蛋白。

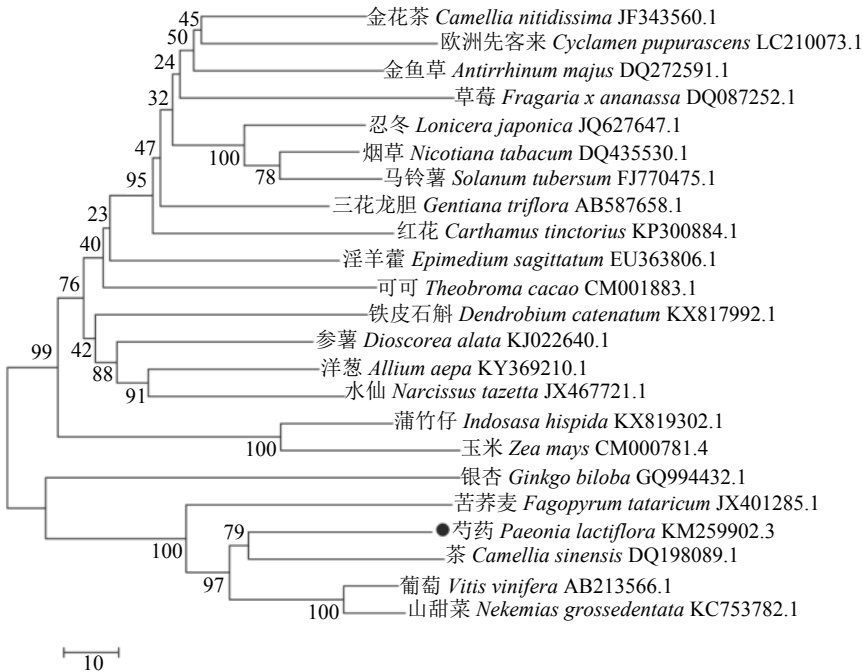


图 1 基于 *FLS* 基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on *FLS* gene

PIFLS 基因编码蛋白的三级结构通过 SWISS-MODEL 进行了预测 (图 2A), 结果显示该蛋白含 α 螺旋 32.5%, 延伸链 18.98%, 无规则卷曲 48.49%, 存在 1 个 2-氧代戊二酸配体, 该配体与 *PIFLS* 蛋白中多条氨基酸肽链相连接, 揭示其可能具有重要生物学作用 (图 2B)。

2.2 pB1301-PIFLS 过表达载体构建及验证

构建由 2×*CaMV*35S 启动子驱动的含有正向 *PIFLS* 编码区的过表达载体 pB1301-*PIFLS*, 为了确

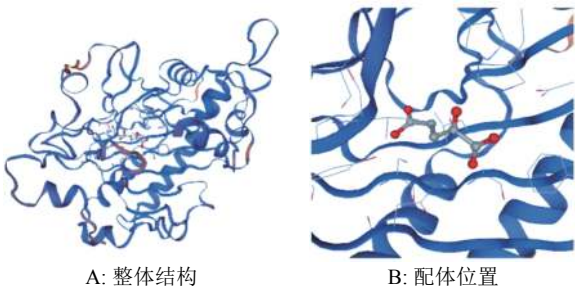


图 2 *PIFLS* 蛋白三级结构预测

Fig. 2 The tertiary structure prediction of *PIFLS* protein

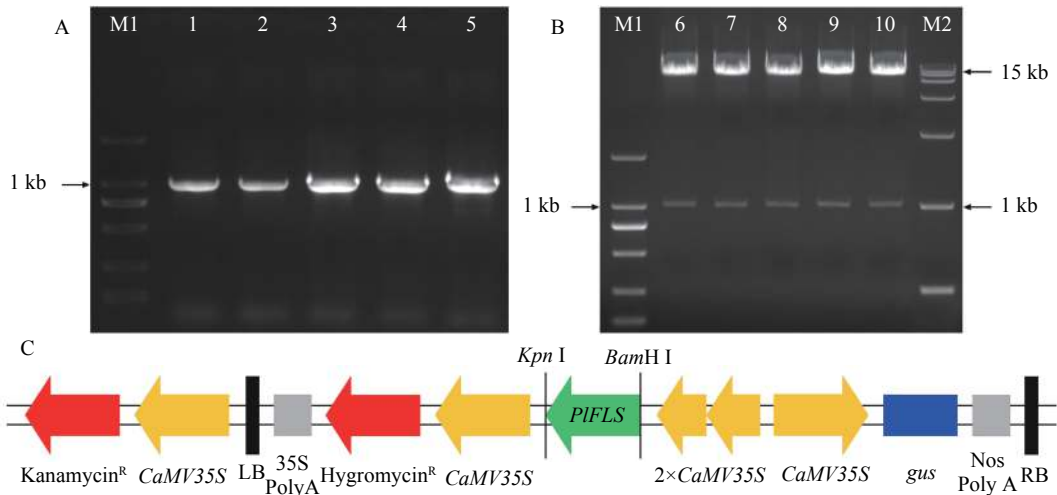
保重组克隆的正确性, 排除假阳性现象, 将转化后平板上筛选得到的单克隆进行菌液 PCR 验证, 可获得一条 1 000 bp 左右的片段 (图 3A), 长度与 *PIFLS* 基因编码区片段大小一致, PCR 验证结果为阳性。对阳性克隆的菌液提取质粒 DNA, 并对重组质粒进行 *Bam*H I-*Kpn* I 双酶切, 结果如图 3B 所示, 均酶切得到了 1 000 bp 左右的目的基因条带和 10 000 bp 左右的载体片段, 与预期结果一致。并将阳性克隆送测序公司测序, 测序分析 *PIFLS* 基因正向插入到 2×*CaMV*35S 启动子下游, 且编码区没有发生碱基突变, 证明 pB1301-*PIFLS* 过表达载体构建成功, 其结构见图 3C。

2.3 转基因拟南芥纯合株系的获得及鉴定

利用改良的 Floral-dip 法遗传转化野生型拟南芥, 转化成功的 T₀ 代种子在含有潮霉素 (25 mg·L⁻¹) 的 MS 平板上缓慢生长, 未转化的虽能发芽但长出 2 片子叶后逐渐黄化或死亡。挑选生长正常的幼苗进行移栽培养, 经 GUS 叶片组织染色出现蓝色, 排

除假阳性现象。单株收取各株系 T₁ 代种子, 均对潮霉素的抗性产生分离, 选取分离比例接近 3:1 的 T₂ 代拟南芥株系单株收种。随机对生长 15~20 d 的 T₂ 代拟南芥幼苗进行 GUS 组织化学染色分析, 野生型拟南芥未携带 *gus* 基因, 整个植株呈无色; 转化空载体和携带 *PIFLS* 的转基因拟南芥, *gus* 基因在全株表达, 呈蓝色 (图 4A), 间接说明目的基因已被整合到拟南芥基因组上。最终获得纯合转 *PIFLS* 基因拟南芥株系 3 个, 分别标记为 I、II 及 III 号, 用于后续试验。

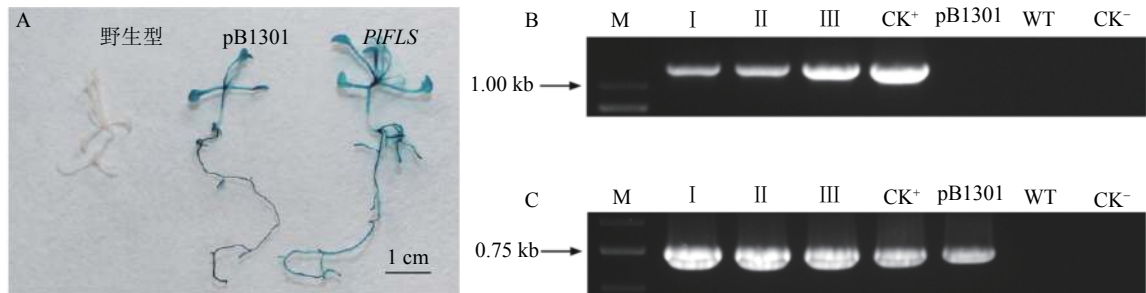
抽薹期提取 T₃ 代拟南芥 DNA 进行 PCR 鉴定, 由电泳胶图可以看出, 对目的基因进行扩增时, 转 *PIFLS* 纯合拟南芥均扩增出约 1 236 bp 的条带, 与重组质粒的 PCR 结果相同, 而转空载纯合拟南芥及野生型拟南芥均无扩增出条带 (图 4B), 初步分析 *PIFLS* 基因已整合到拟南芥的基因组 DNA 中。如图 4C 所示, 在进行 *gus* 基因检测时, 3 株转基因拟南芥扩增出与转空载对照大小一致的特异性条带,



A: pB1301-PIFLS PCR; B: 质粒 PCR; C: 载体结构示意图; M1: DL 2 000 Marker, M2: DL 15 000 Marker, 1~5: PCR 结果, 6~10: 双酶切结果

图 3 pB1301-PIFLS 超表达载体验证及结构

Fig. 3 Identification and structure of over-expression vector pB1301-PIFLS



A: GUS 染色; B: 目的基因 PCR 检测; C: *gus* 基因 PCR 检测; M: DL 2 000 Marker, I、II 和 III 为转 *PIFLS* 基因拟南芥, CK⁺: 以重组质粒为阳性对照, WT: 野生型拟南芥, CK⁻: 以无菌水为阴性对照

图 4 转 *PIFLS* 基因拟南芥的筛选及纯合株系的获得

Fig. 4 Screening of transgenic *Arabidopsis* and obtaining of homozygous *PIFLS* lines

进一步说明重组植物过表达载体成功转化拟南芥。

2.4 转基因拟南芥 qRT-PCR 分析

在内参调平的情况下，提取 T₃ 代和野生型拟南芥总 RNA，通过实时荧光定量 PCR 进一步检测 *PIFLS* 在转基因株系中的转录表达情况 (图 5)。结果表明目的基因在转空载拟南芥 (pB1301) 及野生型拟南芥中均几乎无表达，3 个转基因株系中 *PIFLS* 基因表达量均显著高于对照组拟南芥。其中，II 号和 III 号 *PIFLS* 表达量较高，显著高于 I 号株系，但 II 号和 III 号之间则差异不显著，选用于后续试验。

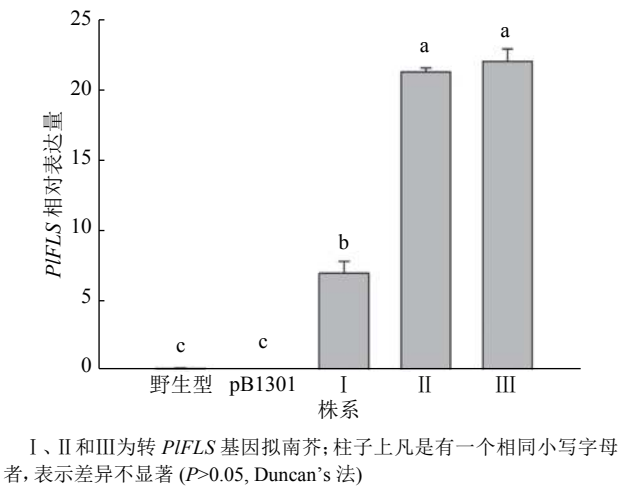


图 5 拟南芥植株 *PIFLS* 基因实时定量 PCR 分析
Fig. 5 qRT-PCR analysis of *PIFLS* gene in *Arabidopsis* plants

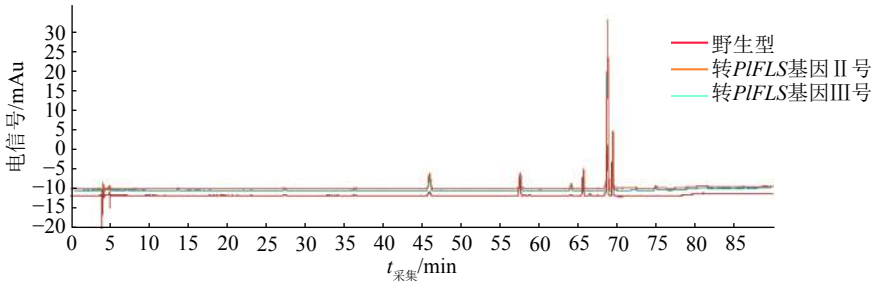


图 7 转基因拟南芥叶片花黄素含量液相色谱图
Fig. 7 HPLC chromatograms of anthoxanthin contents in transgenic *Arabidopsis* leaves

3 讨论与结论

芍药作为重要的观赏植物，花色是其商业价值的一个重要体现。目前，类黄酮合成路径相关基因在芍药花色形成过程中的调控机制研究鲜见报道，Zhao 等^[1]前期研究筛选到芍药 *PIFLS* 基因为该途径中调控芍药花色的关键基因之一。为进一步探究其生物学功能，本研究克隆芍药 *PIFLS* 基因并对其进行了序列分析，结果表明芍药 *PIFLS* 基因全长为

2.5 转基因植株叶片花黄素含量

对 T₃ 代转基因拟南芥肉眼观察结果显示 (图 6)，各植株与对照组拟南芥相比，花器官、花色没有发生可见变化，除茎干长度、莲座叶数外，叶色、叶片大小、花期等生物学特性未见显著差异。进一步通过高效液相色谱法分析转基因高表达株系 II 号和 III 号叶片的花黄素含量 (图 7)。根据计算图 7 的峰面积，*PIFLS* 基因 2 个过表达株系的叶片花黄素平均质量分数分别为 653.55 和 642.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (以鲜质量计)，均显著高于野生型对照。



图 6 转基因拟南芥表型
Fig. 6 Phenotypes of transgenic *Arabidopsis* lines

1 073 bp，包含 1 个编码 332 个氨基酸的完整开放阅读框 (999 bp)。其编码蛋白含有 5 314 个原子，理论等电点 pI 为 5.68，含亮氨酸最多 (10.2%)，为非稳定性蛋白。构建系统进化树发现芍药 *PIFLS* 基因与茶树同源性最高，该基因编码蛋白存在 2 个功能结构域，但无潜在信号肽位点。此外，其蛋白三级结构中存在 1 个 2-氧代戊二酸配体，该配体与蛋白中多条氨基酸肽链相连接，揭示其可能具有靶定位点等生物学作用。

与此同时,本研究还利用农杆菌介导法进行芍药 *PIFLS* 基因遗传转化拟南芥研究。农杆菌介导法为当前植物转基因主要方法之一,该方法技术成熟、操作简单、遗传稳定^[19],在多种植物中如石斛兰^[20]、向日葵^[21]等均得以成功应用。另外,王琰瑛^[22]和丁忠涛^[23]的研究表明在拟南芥转化试验中使用体积分数为 0.2%~0.5% 的 Silweet L-77 可以显著提高转化率。为此,本试验在参考花序浸染法的同时向转化液中添加了 200 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Silweet L-77 作为表面活性剂,使转化过程更彻底,并在盛花期前后侵染 2 次,以提高其转化效率。最后经 GUS 染色、基因组 PCR、荧光定量等检测手段鉴定,证明芍药 *PIFLS* 基因已成功转化拟南芥植株的基因组,最终获得高 *PIFLS* 基因表达的纯合拟南芥株系 3 个。

FLS 基因在花色调控中的作用研究发现,其是催化生成淡黄色或近无色黄酮醇支路的关键酶,在类黄酮途径中发挥着重要作用^[24-27]。当前研究表明,光照、组织特性等都会影响 *FLS* 基因的表达^[28-29]。黄伟伟^[30]研究发现拟南芥中 *FLS* 基因表达受到白光诱导,其研究还发现 *FLS* 基因在番茄果实着色过程中,果皮的表达量比较高,而在果肉中表达量却很低^[30]。除此以外,分子手段研究 *FLS* 基因对花色调控中发现对矮牵牛和烟草分别引入正义外源 *FLS* 基因时,其花色均明显变浅^[10, 31]。本试验中转芍药 *PIFLS* 基因拟南芥的目的基因表达量显著高于对照组,但花器官未见明显颜色改变,叶片均呈现鲜绿色。可能原因是本试验所选用拟南芥品种开白色花的哥伦比型拟南芥,不易察觉花瓣颜色变浅,从而未见明显颜色差异。

罗平^[32]在对玫瑰、矮牵牛、桃的 *FLS* 基因进行功能验证时发现,转基因烟草黄酮醇含量增加,花色苷合成被限制,导致花色均由红色变为白色。相反地, Mahajan 等^[33]沉默烟草的 *FLS* 基因后研究黄酮醇合成量变化情况发现,转基因后黄酮醇的产量降低了 20%~50%,儿茶素和表儿茶素的产量分别增加了 50%~90% 和 20%~30%。此外, Luo 等^[31]研究转正义 *FLS* 基因烟草发现与对照组相比,烟草黄酮醇含量显著高出对照组 30%~70%,花色苷的合成减少。以上报道表明 *FLS* 基因低表达或者高表达会显著影响类黄酮途径的产物,从而影响花色。为探究本试验中高 *PIFLS* 基因表达是否影响拟南芥类黄酮途径代谢产物,通过液相色谱法检测转基因拟南芥植株叶片花黄素含量,发现高 *PIFLS* 基因表达株系的花黄素含量均显著高于野生型拟南芥,推测 *PIFLS* 基因可能影响到拟南芥类黄酮合成途

径,促进了黄酮醇类等花黄素的合成。但由于本试验所用拟南芥为白花系,花序小,观察不到明显颜色变化,下一步对该基因花色调控机制的研究仍需要借助深色系模式植物进行,进一步证实其在类黄酮途径中的重要地位。

参考文献:

[1] ZHAO D, JIANG Y, NING C, et al. Transcriptome sequencing of a chimaera reveals coordinated expression of anthocyanin biosynthetic genes mediating yellow formation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.)[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 689.

[2] TOHGE T, DE SOUZA L P, FERNIE A R. Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants[J]. J Exp Bot, 2017, 68(15): 4013-4028.

[3] YANG Z Q, CHEN H, TAN J H, et al. Cloning of three genes involved in the flavonoid metabolic pathway and their expression during insect resistance in *Pinus massoniana* lamb[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(4). doi:10.4238/gmr15049332.

[4] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54(4): 733-749.

[5] 黄伟伟, 杨曦, 张常娥, 等. 烟草黄酮醇合成酶基因的克隆及其序列分析[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(6): 1059-1062.

[6] HOLTON T A, BRUGLIERA F, TANAKA Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*[J]. Plant J, 1993, 4(6): 1003-1010.

[7] 杨慧萍, 刘雅莉, 姜倩, 等. 葡萄风信子 *MaFLS* 基因克隆与表达分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(8): 1507-1513.

[8] NIELSEN K, DEROLES S C, MARKHAM K R, et al. Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in *lisianthus*[J]. Mol Breeding, 2002, 9(4): 217-229.

[9] TAKAHASHI R, GITHIRI S M, 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(1): 125-135.

[10] TSUDA S, FUKUI Y, NAKAMURA N, et al. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering[J]. Plant Biotechnol, 2004, 21(5): 377-386.

[11] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.

[12] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(30): 11030-11035.

[13] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, et al.

- Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]// The Proteomics Protocols Handbook. Clifton: Humana Press, 2005: 571-607.
- [14] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue): D257-D260.
- [15] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nat Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [16] BIASINI M, BIENERT S, WATERHOUSE A, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): W252-W258.
- [17] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [18] ZHAO D, XIA X, WEI M, et al. Overexpression of herbaceous peony miR156e-3p improves anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis thaliana* lateral branches[J]. Biotech, 2017, 7(6): 379.
- [19] 王昌陵, 王文斌, 曹永强, 等. 农杆菌介导的植物遗传转化机制研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2013(4): 56-61.
- [20] 聂小容. 石斛兰花期和花色的转基因研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [21] KIM M J, AN D J, MOON K B, et al. Highly efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Helianthus tuberosus* L.[J]. Ind Crop Prod, 2016, 83: 670-679.
- [22] 王玕瑛. 胡杨大片段基因转化拟南芥的体系优化和突变体筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- [23] 丁忠涛. 棉花抗逆相关基因 *GhDr1* 的克隆与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [24] 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(3): 259-268.
- [25] HERNÁNDEZ-VEGA J C, CADY B, KAYANJA G, et al. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Arabidopsis thaliana* involves a putative flavonol synthase[J]. J Hazard Mater, 2017, 321: 268-280.
- [26] FLORES G, DE LA PEÑA MORENO F, BLANCH G P, et al. Phenylalanine ammonia-lyase, flavanone 3 β -hydroxylase and flavonol synthase enzyme activity by a new *in vitro* assay method in berry fruits[J]. Food Chem, 2014, 153: 130-133.
- [27] LIU S, LIU L, TANG Y, et al. Comparative transcriptomic analysis of key genes involved in flavonoid biosynthetic pathway and identification of a flavonol synthase from *Artemisia annua* L.[J]. Plant Biol, 2017, 19(4): 618-629.
- [28] MATUS J T, LOYOLA R, VEGA A, et al. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*[J]. J Exp Bot, 2009, 60(3): 853-867.
- [29] NODA N, KANNO Y, KATO N, et al. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)[J]. Physiol Plantarum, 2004, 122(3): 305-313.
- [30] 黄伟伟. 烟草黄酮醇合成酶基因的分离及其序列分析[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [31] 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, 2015, 6: 1257.
- [32] 罗平. 玫瑰类黄酮合成相关基因的克隆和功能解析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [33] MAHAJAN M, JOSHI R, GULATI A, et al. Increase in flavan-3-ols by silencing flavonol synthase mRNA affects the transcript expression and activity levels of antioxidant enzymes in tobacco[J]. Plant Biol, 2012, 14(5): 725-733.

【责任编辑 庄 延】