

金花茶查尔酮异构酶基因全长克隆与表达的初步研究

周兴文^{1,2}, 李纪元^{1*}, 范正琪¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 广西玉林师范学院, 广西 玉林 537000)

摘要:利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从我国珍稀濒危植物金花茶花瓣中获得了查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, CHI)基因的 cDNA 全长, 命名为 *Cn-CHI*, GenBank 登录号 HQ269805.1。碱基序列分析表明, *Cn-CHI* 基因全长 953 bp, 包含 56 bp 的 5' 非翻译区、204 bp 的 3' 非翻译区和一个长为 693 bp 编码 230 个氨基酸的开放阅读框。氨基酸序列比对分析表明, *Cn-CHI* 基因编码蛋白与蔷薇科、杜鹃花科、茄科等植物的 CHI 蛋白同源性都在 75% 以上, 与山茶科山茶属茶树 CHI 蛋白同源性高达 99%。相对荧光定量 PCR 分析表明, *Cn-CHI* 基因在金花茶花蕾发育过程中呈现先急剧上升后平缓下降的趋势; 在花器官的不同部位中, *Cn-CHI* 基因表达量最高的是雌蕊, 其次是雄蕊, 在萼片和花瓣中的表达量较低且相差不大。

关键词:金花茶; 查尔酮异构酶基因; 序列分析; 相对定量 PCR; 表达特性

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of Chalcone Isomerase Gene cDNA from *Camellia nitidissima*

ZHOU Xing-wen^{1,2}, LI Ji-yuan¹, FAN Zheng-qi¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China)

Abstract: A full-length cDNA sequence of chalcone isomerase (CHI) gene was obtained from petals of *Camellia nitidissima* using the methods of Reverse Transcription PCR and RACE, named *Cn-CHI* (GenBank accession No. HQ269805.1). Sequence analysis indicated that *Cn-CHI* is 953bp in full length and contains a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 56 bp, a 3'-UTR of 204 bp, and an opening reading frame (ORF) of 693bp encoding a 230 predicted amino acids. Sequence alignment of amino acids revealed that *Cn-CHI* shared more than 75% homology with CHI from plants of Rosaceae, Ericaceae, Solanaceae and 99% homology with *C. sinensis*. Relative real-time PCR analysis indicated that *Cn-CHI* showed the tendency of a sharp increase at the early stage and then decreased slowly; the highest transcript abundance in carpels, and the second in stamens, the transcript of *Cn-CHI* in sepals and petals were almost at the same level.

Key words: *Camellia nitidissima*; chalcone isomerase gene; sequence analysis; relative real-time PCR; expression character

金花茶组植物隶属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* L.), 常绿灌木或小乔木, 其模式植物为金花茶(*Camellia nitidissima* Chi)^[1]。金花茶花色金黄, 具有很高的观赏价值, 在国内被誉为“茶族皇后”、“植

物界中的大熊猫”, 国外则称之为“幻想中的黄色山茶”^[2], 是培育黄色山茶花新品种的重要亲本^[3-6]。

金花茶花青苷的主要成分为槲皮黄酮-7-葡萄糖苷(Quercetin-7-glucoside)^[7], 属于类黄酮色素群。

收稿日期: 2011-06-28

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(200704028); 国家林业局“948”引进项目(2007-4-04); 国家国际合作项目(2011DFA30490)

作者简介: 周兴文(1979—), 男, 河南南阳人, 讲师, 在读博士生, 主要从事观赏植物分子育种研究。

* 通讯作者: 李纪元(1964—), 男, 湖南湘阴人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事观赏植物与花卉分子育种研究. E-mail: jiyuan_li@

查尔酮异构酶(Chalcone isomerase, *CHI*)是类黄酮合成途径中的第2个关键酶,它能催化查尔酮异构化为4',5,7-三羟基黄酮(Naringenin),该中间产物在经其它后续酶的催化下可形成其它黄酮类代谢物质^[8]。目前已从玉米(*Zea mays* L.)^[9]、矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.)^[10]、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)^[11]等很多物种中克隆到了*CHI*基因,利用基因工程手段调控查尔酮异构酶的表达来改变花色的研究也屡见报道^[12]。但有关金花茶查尔酮异构酶的研究尚未见报道。本研究利用 Reverse Transcription PCR(RT-PCR)和 RACE 技术,根据已发表的*CHI*基因保守区从金花茶花瓣中克隆到了一个*CHI*基因 cDNA 全长,命名为 *Cn-CHI*,并对该基因在金花茶花发育不同阶段以及花器官不同部位的表达特性进行了研究,旨在为进一步研究金花茶 *CHI* 基因的功能,探讨金花茶花色形成的分子机制提供理论依据,为今后合理利用基因工程技术培育山茶新品种提供理论基础及可操作基因。

1 材料与方法

1.1 材料、菌株和试剂

金花茶栽培于中国林科院亚热带林业研究所观

赏植物苗圃,于2010年2月盛开时采集花瓣,液氮处理后,保存于-80℃冰箱备用。

RNA提取试剂盒(植物RNAout)购自天泽基因公司,反转录酶(AMV)购自Fermentas公司,大肠杆菌*E. Coli* DH5 α 购自TaKaRa公司,pGEM-T Easy vector购自Promage公司,SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Cat. No. 634923)为Clontech公司产品,限制性内切酶、T₄DNA连接酶和其它工具酶均购自TaKaRa公司,质粒提取试剂盒购自Axygen公司。DNA凝胶回收试剂盒购自北京博大泰克公司,PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,测序由(上海)华大基因科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank公布的*CHI*基因的mRNA序列和CDS信息,通过分析查找*CHI*基因保守区,用软件Premier 5.0设计正、反向引物SP、AP,经PCR扩增得到该基因的保守片段并测序;根据测序结果设计RACE特异引物GSP1、GSP2,分别用于全长cDNA的3'-RACE、5'-RACE扩增;最后根据保守区、3'-RACE、5'-RACE cDNA序列的拼接结果,在3' UTR和5' UTR区域设计引物P3、P4,用于金花茶*CHI*基因cDNA全长扩增(表1)。

表1 金花茶 *Cn-CHI* 基因克隆及表达分析所用引物

引物名称	引物序列	用途
SP	5' CACGGCTATCGGAGTGTACCTC 3'	扩增保守序列
AP	5' GGCTTCGGTTTCTCCTTCA 3'	
GSP1	5' GAAAGACGGTTCTTACCTGAGACTGGG 3'	3' RACE
GSP2	5' CCAGTCTCAGGTAAGGAACCGTCTTTTCG 3'	5' RACE
P3	5' AAGAGGTGCTGAGAGAGAAAGAG 3'	扩增全长
P4	5' CACGTAACCAACTATGCCAAT 3'	
Y1	5' CGTCCAAGCCCTTCTTCCTC 3'	检测 <i>Cn-CHI</i> 表达
Y2	5' TGCAGTCTTGCCCTTCCACTT 3'	
18SF	5' GACTCAAACGCGGAAACTTACC 3'	扩增内参基因
18SR	5' CAGACAAATCGCTCCACCAAC 3'	

1.2.2 金花茶 *Cn-CHI* 基因 cDNA 全长的获得 金花茶花瓣总 RNA 提取采用 RNA 提取试剂盒(植物RNAout2.0,天泽基因公司)说明书进行操作,然后用Fermentas公司的反转录酶合成cDNA第一链,以反转录cDNA为模板用引物对SP、AP进行扩增,扩增条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s,55.4℃退火30s,72℃延伸50s,共30个循环;最后,72℃延伸7min。凝胶回收与预期目的片段大小一致的泳带,电泳检测后连接克隆载体(pGEM-T Easy vector)并转化感受态细胞(*E. Coli* DH5 α),通过蓝白斑筛选及质粒酶切鉴定阳性克隆后,送交(上海)华大基因科技有限公司测序。

根据所得的cDNA片段序列,分别设计特异性引物GSP1、GSP2,按照RACE试剂盒SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Cat. No. 634 923)说明书采用Touchdown PCR程序进行cDNA末端快速扩增,将测序所得该基因的3'和5'序列以及中间序列进行拼接得到cDNA全长,再根据所得全长设计特异引物CHI-FP、CHI-RP以总cDNA为模板进行扩增,扩增产物凝胶回收后测序,测序结果在GenBank中进行Blast分析。

1.2.3 金花茶 *Cn-CHI* 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析 利用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)提供的在线Blast进行同源序列比对分析

等,采用 ORF Finder 在线查找 *Cn-CHI* 基因 cDNA 开放阅读框。利用瑞士生物信息学研究所 (Http://cn.expasy.org) 提供的 ProtParam 软件进行氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子量、理论等电点、稳定性及平均可塑性等参数的在线分析;利用 ProtScale、HNN 软件等在线分析 α -螺旋 (Alpha-helix)、 β -转角 (Beta turn)、无规卷曲 (Random coil)、延伸链 (Extend strand) 及疏水性等。采用 SWISS-MODEL (http://www.expasy.org/swissmod) 同源建模 (Homology modeling) 预测该基因编码蛋白质的三维结构。利用软件 DNAMAN 进行 cDNA 全长电子拼接、系统发育树构建和氨基酸序列比对等。

1.2.4 金花茶 *Cn-CHI* 基因在花蕾中的相对荧光定量表达分析 用 RNA 提取试剂盒 (植物 RNAout2.0, 天泽基因公司) 提取金花茶不同发育时期花蕾 (表 2) 以及苞片、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊的总 RNA, 然后各取 1 μ g 用 Fermenta 公司的反转录酶合成 cDNA 第一链。根据所获得的 *Cn-CHI* 基因序列, 按照荧光定量引物要求设计引物 Y1、Y2, 扩增片段长度为 143 bp。以山茶 (*C. japonica* L.) 18S RNA (GenBank 登录号 U42815.1) 为内参设计其特异引

物 18SF、18SR (表 1)。反应在 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 反应试剂采用 SYBRGreen Prime-Script™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 进行 Real Time PCR 反应, 反应程式为两步法。每个试验设 3 次重复, 利用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪 Sequence Detection software 软件和 Excel 软件进行数据分析, 每个样品独立重复 3 次, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[13]。

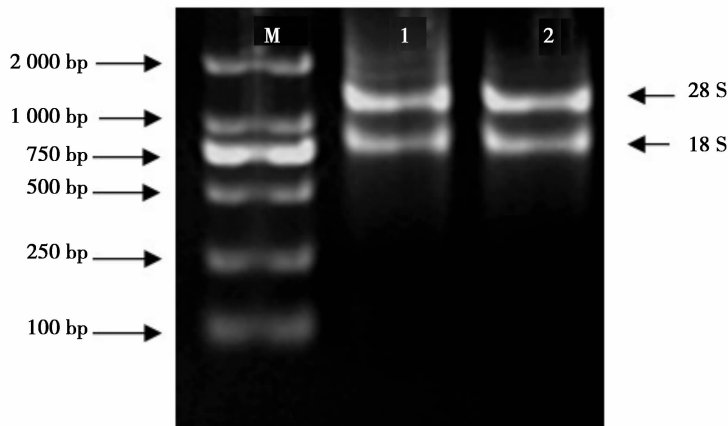
表 2 金花茶花蕾不同发育时期及状态描述

时期	花蕾直径/cm	花蕾状态	
幼蕾期	0.8 ± 0.1	闭合	浅绿
初蕾期	1.1 ± 0.1	闭合	黄绿
显色期	1.4 ± 0.1	闭合	浅黄
半开期	2.2 ± 0.2	半开	金黄
盛开期	4 ± 0.5	盛开	金黄

2 结果与分析

2.1 金花茶 RNA 提取及 *Cn-CHI* 基因全长 cDNA 的获得

金花茶花瓣总 RNA 提取见图 1。从图上可以看出, 28S 亮度约为 18S 的 2 倍, 说明提取的总 RNA 完整无降解, 质量较高, 可以满足后续试验的要求。



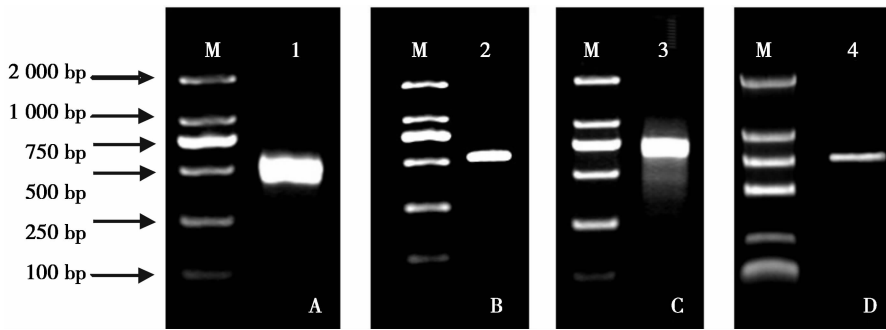
M: DNA 分子量标准 DL2000; 1, 2: RNA 样品

图 1 金花茶花瓣总 RNA 提取

2.2 金花茶 *Cn-CHI* 基因 cDNA 全长的克隆

采用同源克隆方法, 根据 *CHI* 基因蛋白保守区设计引物 SP、AP (表 1), 以金花茶花瓣 cDNA 为模板经 PCR 扩增及测序后得到一个长为 517 bp 的目的 cDNA 片段 (图 2-A)。将该片段所编码的蛋白在 NCBI 上比对, 发现与多个物种 *CHI* 基因编码的蛋白有 90% 以上的同源性。依据所得的同源特异片段序列设计 RACE 特异引物 GSP1、GSP2 分别扩增金花茶 *CHI* 基因的 3' 末端序列 (图 2-B) 和 5' 末端

序列 (图 2-C), 将测序后的 3'、5' 序列及 RT-PCR 所得中间序列拼接后得到了全长为 953 bp 的金花茶 *CHI* 基因序列, 将该基因命名为 *Cn-CHI*, 提交 Genbank, 登录号为 HQ269805.1。根据电子拼接的 *CHI* 基因 cDNA 全长和 ORF finder 分析的开放阅读框信息, 在该序列的 3' UTR 与 5' UTR 设计全长特异扩增引物, 经 PCR 扩增后得到 744 bp 的目的基因全长 (图 2-D), 测序结果表明所得序列与 *CHI* 基因电子拼接结果一致。



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: *Cn-CHI* 基因特异片段; 2: 3' RACE 扩增产物;
3: 5' RACE 扩增产物; 4: *Cn-CHI* 基因全长扩增产物

图2 金花茶 *CHI* 基因扩增电泳图

2.3 金花茶 *Cn-CHI* 基因 cDNA 核苷酸序列分析

利用 NCBI 提供的 ORF Finder 进行分析发现, 金花茶 *Cn-CHI* 基因包含一个长度为 693 bp 的开放读码框 (Open reading frame, ORF), 5' 非翻译区长 56

bp, 3' 非翻译区长 204 bp, 含有植物基因中典型的加尾信号序列 AATAA 以及 Poly(A)。表明该序列完全符合一个完整基因序列的结构特征, 是一条完整的基因序列 (图 3)。

```

1GGGGGGTCTGTCGTCTCGCCAAGAACAAGCAAGAGGTGCTGAGAGAGAAAGAGAGCAATGTCCT
1
63 CCATCACAGTCACCGTCCGTCACCCAAGTCCAGATCGAGAGCCACGTTTTCCCTCCGACT
21 P S Q S P S V T Q V Q I E S H V F P P T
123 GTGAAACCTCCGGGCACGTCCAAGCCCTTCTTCTCGGGCGGCAGGGGAGAGAGGTTG
41 V K P P G T S K P F F L G G A G E R G L
183 GAAATCCAAGGCAATTCATCAAGTTCACGGCTATCGGAGTGTACCTCGAAGATAGCGCC
61 E I Q G K F I K F T A I G V Y L E D S A
243 ATCCCGTCGCTCGCCGTTAAGTGAAGGCAAGACTGCAGAGGAGCTGACGGACTCCGTC
81 I P S L A V K W K G K T A E E L T D S V
303 GACTTTTTACAGGATATCGTCTCCGGTCCCTTTGAGAAGTTCACACAGGTGACTATGATC
101 D F F R D I V S G P F E K F T Q V T M I
363 TTGCCATTAACGGGTCAACAATACTCAGAGAAGTTACAGAAAATTGTGTTGCCTATTGG
121 L P L T G Q Q Y S E K V T E N C V A Y W
423 AAAGCAGTTGGAACCTATACTGATGCAGAGGCCAAAGCCATTGAAAAGTTTATCGAGGTC
141 K A V G T Y T D A E A K A I E K F I E V
483 TTCAAGGATGAACTTTCCSCCCCGGTGGTCTATTCTTTTACCCAATCACCCCTTGA
161 F K D E T T F P P G G S I L F T Q S P L G
543 TCATTGACGATTGCTTTCGAAAGACGGTTCCTTACCTGAGACTGGGACTVGGTGATA
181 S L T I A F S K D G S L P E T G T V V I
603 GAGAACAAACAATTGTCAGAAGCAGTGTGGAGTCAATCATCGGCAAGCACGGTGTTC
201 E N K Q L S E A V L E S I I G K H G V S
663 CCAGCAGCAAGAAGAGCTTGGCAGCCAGAATGTCAGAATTGTTGAAGGAGAAACCGCA
221 P A A K K S L A A R M S E L L K E K P A
723 GCCCAGACAGCTGCTGCTGAATAAATGATTGGCATAGTTGGTTTACGTGAGTGCTTAA
241 A Q T A A A E *
783 GTTGTGAAAAAGAAGAAATCTGTAGTTCCTTTGAAGAGATGCTATATTTATGTTCTTCC
843 TCTGTTTCATAATCTAGCTACATGTGCTTGTGGAGTGTAAATAAGAGTGGTTTTTTAC
903 TTCTACTTCAATGAATTTCTTTCTTGTCTTGCTAAAAAATAAAAAAAAAA
.....

```

方框内分别表示起始密码子和终止密码子; 下划线表示加尾信号序列; 虚线表示 Poly(A) 结构

图3 *Cn-CHI* 基因 cDNA 全长及预测的氨基酸序列

将该基因序列在 NCBI 上进行序列比对分析, 发现该基因与西红柿 (*Solanum lycopersicum* L.)、圆叶牵牛 (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth)、美洲葡萄 (*Vitis labrusca* L.)、牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 等物种查尔酮异构酶基因的相似性达 75%

以上。

2.4 金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白质的结构及功能位点分析

2.4.1 金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白质结构分析 ORF Finder 分析表明, *Cn-CHI* 基因的开放阅

读框位于 57 ~ 749 bp 区域,编码一条含有 230 个氨基酸的蛋白质。ProtParam 在线分析显示该蛋白的分子量为 24.677 kD,理论等电点(PI)为 5.41,原子总数 3 504,分子式为 $C_{1120}H_{1763}N_{277}O_{340}S_4$,无信号肽,不稳定系数 47.82,为不稳定亲水性蛋白。

金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白质二级结构以无规则卷曲为主,占 43.04%;其次为 α -螺旋,达 38.7%;延伸链占 18.26%;无 β -转角分布区域,这与其它多种植物的 *CHI* 基因编码蛋白的预测结果相似^[10]。蛋白质的功能很大程度上取决于其空间结构,其中 α -螺旋主要功能是对蛋白质骨架起到稳定作用,而无规卷曲结构决定了蛋白质的功能,特别是酶的功能部位常常处于这种构象区域,通过对蛋白质三级结构预测与分析,对理解该蛋白质功能与结构之间的关系有着非常重要的意义。从图 4 可以看出,*Cn-CHI* 基因预测的编码蛋白质三级结构与二级结构预测结果相符。

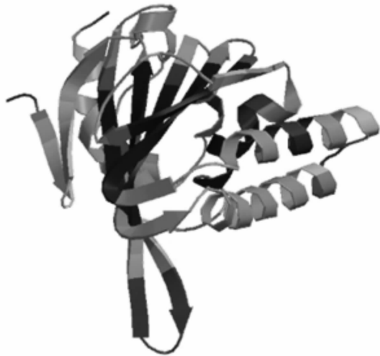
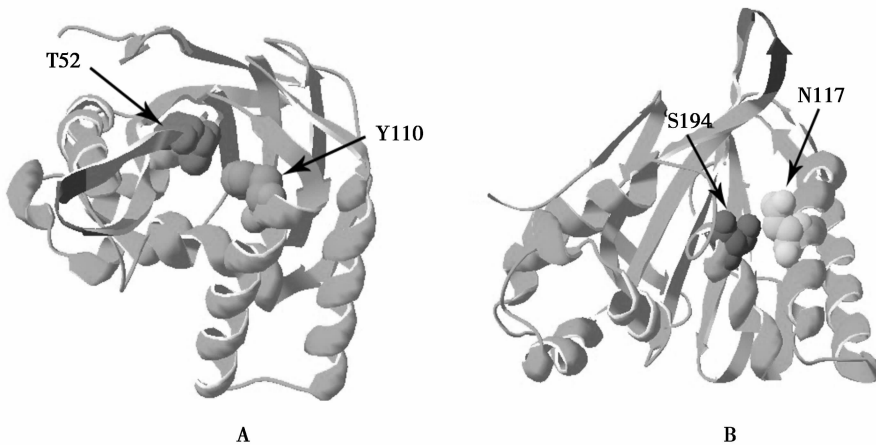


图 4 *Cn-CHI* 基因推导的编码蛋白三级结构



A: 氢键结合位点; B: 活性催化位点

图 6 *Cn-CHI* 基因蛋白功能位点三维分布

2.4.2 金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白质功能位点分析 利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域分析表明,*Cn-CHI* 基因编码的蛋白属于查尔酮超家族(图 5)。

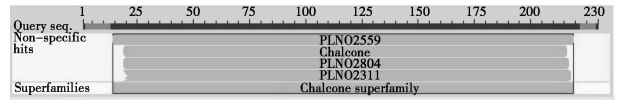
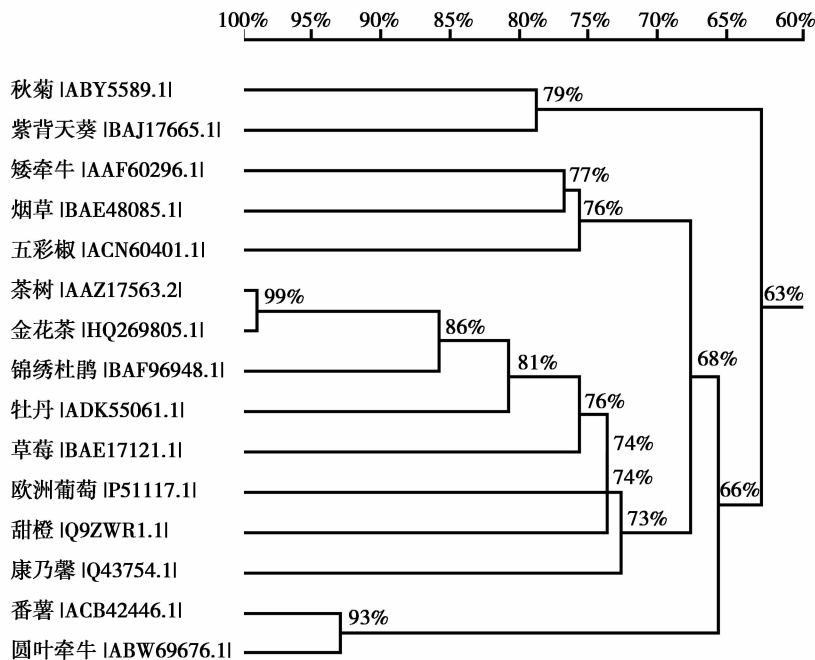


图 5 *Cn-CHI* 基因编码蛋白的保守域分析

进一步的功能位点分析表明,*Cn-CHI* 蛋白含有两个保守的氢键结合位点 Thr(T52 处)和 Tyr(Y110 处)(图 6-A),两个活性催化位点 Asn(N117 处)和 Ser(S194 处)^[14](图 6-B),底物结合位点 Arg40、Gly41、Leu42、Phe51、Ile54、Lys113、Val114^[15],这些位点高度保守且相对位置保持不变。

2.5 金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白序列多重比对与同源性分析

为查明金花茶 *Cn-CHI* 基因编码蛋白与其它物种 *CHI* 蛋白的同源性,利用 DNAMAN 软件对金花茶及其它多个物种的 *CHI* 蛋白氨基酸序列进行多序列比对,结果发现金花茶 *CHI* 蛋白与已知其它植物的 *CHI* 蛋白序列具有很高的同源性。金花茶 *CHI* 蛋白序列与山茶科山茶属植物茶树(*C. sinensis* (L.) O. Kuntze) *CHI* 蛋白同源性高达 99%,与蔷薇科(Rosaceae)、杜鹃花科(Ericaceae)、茄科(Solanaceae)等植物的 *CHI* 蛋白同源性都在 75% 以上(图 7),金花茶 *CHI* 蛋白与山茶科山茶属植物 *CHI* 蛋白的高同源性表明,*CHI* 在同属物种间的进化上是很保守的。



物种后代码为该物种 CHI 蛋白氨基酸序列的 GenBank 登录号

图7 金花茶 CHI 与其它物种 CHI 氨基酸序列的同源性分析

2.6 金花茶 *Cn-CHI* 基因在花器官中的表达分析

2.6.1 金花茶 *Cn-CHI* 基因在花不同发育时期的表达分析 以山茶 18S *rRNA* 基因为内参照基因,采用荧光定量 PCR 的方法对金花茶花不同发育时期 *Cn-CHI* 基因的表达进行了检测,结果见图 8。从相对表达量来看, *Cn-CHI* 基因在初蕾期的表达量最高,几乎是幼蕾期的 4 倍。其次为显色期,在盛开期的表达量最低。该基因整体的表达趋势为先急剧升高而后慢慢降低。

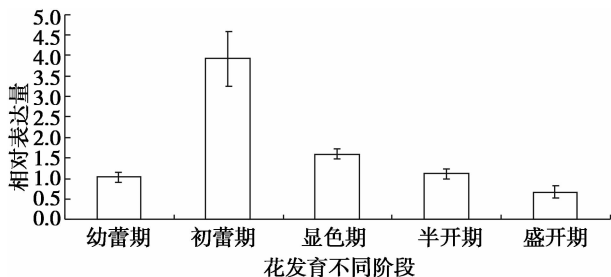


图8 金花茶花不同发育时期 *Cn-CHI* 基因的相对表达量

2.6.2 金花茶 *Cn-CHI* 基因在花器官不同部位中的表达分析 用荧光定量 PCR 的方法对金花茶花器官不同部位 *Cn-CHI* 基因的表达情况进行了检测,结果见图 9。可以看出, *Cn-CHI* 基因在雌蕊中的表达量最高,其次为雄蕊,在萼片和花瓣中的表达量比较接近。

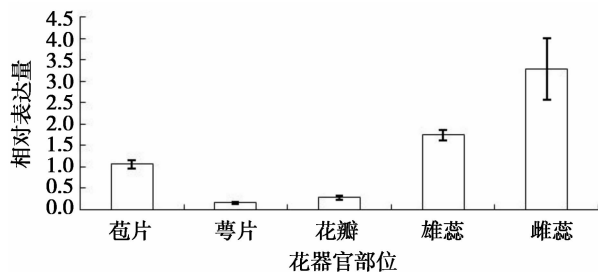


图9 金花茶花器官不同部位 *Cn-CHI* 基因的相对表达量

3 结论与讨论

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术从金花茶花瓣中成功分离出查尔酮异构酶的完整的同源基因 *Cn-CHI*。该基因包含有一个全长为 693 bp 的开放阅读框,编码 230 个氨基酸,其蛋白二级结构以无规则卷曲为主,其次为 α -螺旋,无 β -转角分布区域。蛋白质功能分析表明该基因编码的蛋白属于查尔酮超家族,具有两个保守的氢键结合位点 Thr52 和 Tyr110,两个活性催化位点 Asn117 和 Ser194,7 个底物结合位点 Arg40、Gly41、Leu42、Phe51、Ile54、Lys113、Val114,该基因编码的蛋白质与其它物种 CHI 具有极为相似的蛋白结构特征^[16]。CHI 蛋白氨基酸同源序列比对表明,金花茶 CHI 蛋白序列与山茶科山茶属植物茶树的 CHI 蛋白同源性高达 99%,

与蔷薇科、杜鹃花科、茄科等植物的 *CHI* 同源性在 75% 以上,这些结果表明 *CHI* 在不同物种之间是相对比较保守的。

通过相对荧光定量 PCR 的方法对金花茶不同发育时期及花器官不同部位中 *Cn-CHI* 基因的表达进行了研究,发现在金花茶花芽发育过程中 *Cn-CHI* 基因的表达呈现出先急剧上升而又平缓下降的趋势,说明金花茶 *Cn-CHI* 基因主要在花芽发育的早期阶段表达;对 *Cn-CHI* 基因在花器官中的表达研究发现,金花茶 *Cn-CHI* 基因在苞片、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊中均有表达,但在雌蕊中的表达量最高,在萼片和花瓣中的表达相差不大,表明金花茶 *Cn-CHI* 基因的表达具有一定的组织特异性。此外, H. I. McKhann 等对 *CHI* 基因在紫花苜蓿中的表达进行了研究,发现 *CHI* 基因在幼根和根尖中的表达量最高,在叶片、茎段中的表达量比较低^[11]。周军等对巨峰葡萄 *CHI* 基因的表达进行了研究,发现 *CHI* 基因在果皮、果肉、种子、幼叶、幼根中均有表达,但主要在花后 2~4 周的果皮中表达^[17]。本试验结合上述研究结果可以推测, *CHI* 基因主要在生命活动较旺盛的部位表达,其原因可能在于查尔酮异构酶处于植物体内类黄酮合成途径的上游,对植物生命活动所需的类黄酮等次生物质的合成具有重要的作用^[8]。

前人研究表明 *CHI* 是类黄酮合成途径中的第 2 个关键性限制因子,对植物花色素的合成具有非常重要的作用。有关植物花色的研究中,降低 *CHI* 活性可导致查尔酮在植物体内的大量积累,从而使花朵呈现黄色^[18-19],利用 RNA 干扰抑制烟草 *CHI* 活性能使花粉囊变得更黄^[20]。本试验成功分离了金花茶的 *CHI* 基因,并对该基因及其所编码的蛋白进行了功能预测分析,对其在花发育过程及花器官不同部位中的表达特性进行了研究,为进一步研究该基因的功能及其在金花茶花色形成机制中的作用奠定了基础,为山茶花色的分子育种提供了相关的理论依据和可操作基因。

参考文献:

[1] 张宏达,任善湘. 中国植物志:第四十九卷 第三分册[M]. 北京:科学出版社,1998:87-133

[2] 梁盛业. 金花茶[M]. 北京:中国林业出版社,1993:2-6

[3] Parks C R. The hybrids of *Camellia chrysantha*[J]. International Camellia Journal,1989,21(1):76-79

[4] 程金水,陈俊愉,赵世伟,等. 金花茶杂交育种研究[J]. 北京林

业大学学报,1994,16(4):55-58

[5] Parks C. Breeding progress with yellow camellias[J]. American Camellia Yearbook, 2000:9-10

[6] 西本慎一,橋本文雄,清水圭一,他. キンカチャ×ヤブツバキ種間雑種の花色[J]. 園芸学会雑誌,2004,73(2):189-191

[7] Miyajima I, Uemoto S, Sakata Y, et al. Yellow pigment of *Camellia chrysantha* flowers[J]. American Camellia Yearbook, 1985,71-80

[8] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments; anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4):733-749

[9] Grotewold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase [J]. Mol Gen Genet, 1994, 242(1):1-8

[10] van Tunen A J, Koes R E, Spelt C E, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes [J]. EMBO J, 1988, 7(5):1257-1263

[11] McKhann H I, Hirsch A M. Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips [J]. Plant Mol Biol, 1994, 24(5):767-777

[12] 凌文华,郭红辉. 植物花色苷[M]. 北京:科学出版社,2009:26-31

[13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408

[14] Jez J M, Bowman M E, Noel J P. Role of hydrogen bonds in the reaction mechanism of chalcone isomerase[J]. Biochemistry, 2002, 41(16):5168-5176

[15] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. Nature America Inc, 2000, 9(7):786-791

[16] 雷 梈,邹 祥,向 阳,等. 植物查尔酮异构酶的生物信息学分析[J]. 北方园艺,2008(2):193-197

[17] 周 军,姚泉洪,彭日荷,等. 巨峰葡萄查尔酮异构酶基因克隆与表达分析[J]. 西北植物学报,2009,29(9):1723-1729

[18] Takamura T, Tomihama T, Miyajima I. Inheritance of yellow-flowered characteristic and yellow pigments in diploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.) cultivars [J]. Scientia Hort, 1995, 64(1-2):55-63

[19] Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, et al. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(5):578-585

[20] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. FEBS Lett, 2005, 579(27):6074-6078