

观赏向日葵八氢番茄红素脱氢酶基因*PDS*的 cDNA克隆与表达特性分析

吴建设^{1,2,3} 钟淮钦^{1,2,3} 黄敏玲^{1,2,3*}

(¹福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

³福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 采用RT-PCR和RACE技术从观赏向日葵‘闽葵3号’黄色花瓣中克隆到类胡萝卜素合成途径关键基因*HaPDS*的cDNA, 该cDNA全长2 017 bp, 具有一个1 710 bp的完整开放阅读框(ORF), 编码一个570个氨基酸的蛋白质。序列分析表明, *HaPDS*编码的氨基酸序列与其他植物的*PDS*蛋白具有很高的同源性, 在N-端有一个辅助因子结合结构域, C-端有一个类胡萝卜素结合域。系统进化树分析显示, 观赏向日葵*HaPDS*与万寿菊、菊花蛋白亲缘关系较近。实时荧光定量RT-PCR技术分析表明, *HaPDS*基因在花发育的盛花期表达量最高; 不同组织中的表达量舌状花瓣>苞片>叶片>绿色管状花>黑色管状花; 随着基因表达量的增加, 花色由白色到黄色、金黄色转变。

关键词 观赏向日葵; 八氢番茄红素脱氢酶; 类胡萝卜素; 基因克隆; 表达特性

Cloning and Expression Analysis of Phytoene Desaturase Gene in Ornamental Sunflower

Wu Jianshe^{1,2,3}, Zhong Huaiqin^{1,2,3}, Huang Minling^{1,2,3*}

(¹Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; ²Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; ³Fujian Engineering Research Center of Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

Abstract The *HaPDS* gene cDNA sequence involved in carotenoids synthesis was cloned from the yellow petals of Ornamental Sunflower ‘MinKui 3’ using RT-PCR and RACE techniques. The cDNA sequence consists of 2 017 bp with an intact open reading frame of 1 710 bp, encoding a polypeptide of 570 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *HaPDS* protein was highly homologous to other *PDS* proteins from different species. The putative protein sequence has a cofactor binding-domain in N-terminal, and a carotene binding-domain in C-terminal. Phylogenetic analysis indicated that *HaPDS* was more related to *PDS* of *Tagetes erecta* and *Chrysanthemum x morifolium*. Quantitative RT-PCR analysis indicated that *HaPDS* showed the highest transcript abundance in full bloom. *HaPDS* was highly expressed in ray florets, bracts and leaves, but lowly expressed in tubular florets. With the increasing in the amount of *MkPDS* relative expression, colour changed from white to yellow and golden transition.

Key words ornamental sunflower; phytoene desaturase; carotenoids; gene cloning; expression patterns

收稿日期: 2013-08-02 接受日期: 2013-09-30

福建省科技重大专项(批准号: 2010NZ0003、2012NZ0002)、福建省农科院科技创新团队建设(批准号: CXTD-2-17)、福建省农科院科技创新团队项目(批准号: CXTD-2-1317)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

Received: August 2, 2013 Accepted: September 30, 2013

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (Grant No.2010NZ0003, 2012NZ0002), the Development of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD-2-17), the Project of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD-2-1317)

*Corresponding author. Tel: +86-591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

网络出版时间: 2013-11-12 12:40 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1240.003.html>

观赏向日葵(*Helianthus annuus* L.)因其颜色鲜艳、花朵亮丽、力度感好、纯朴自然、寓意忠诚和追求光明,广泛应用于切花、盆花、庭院美化及花境营造等领域,是一种时尚、高雅的观赏花卉,受到国内消费者的喜爱。福建省农业科学院作物研究所育成并通过福建省农作物品种审定委员会认定的无花粉观赏向日葵新品种‘闽葵3号’花瓣呈柠檬黄色,可作切花生产和景观种植,应用前景广阔^[1]。但其复杂的花色形成分子机理尚不明确。

花色直接关系到观赏植物的观赏价值和商业价值,培育新花色品种一直是育种领域的研究热点^[2]。类胡萝卜素是决定花色的三大类群色素之一,使花瓣呈现黄色、橙色或红色^[3-5]。八氢番茄红素脱氢酶(PDS)是影响类胡萝卜素合成的限速酶之一,参与线状类胡萝卜素生物合成^[4]。PDS基因与PSY、ZDS等协调作用,在转录水平上调控花或果实中类胡萝卜素的积累^[6]。因此,研究PDS基因对整个花代谢途径研究具有重要的意义。

目前,观赏向日葵类胡萝卜素生物合成途径中PDS基因的克隆与鉴定未见报道。本研究首次从观赏向日葵新品种‘闽葵3号’中克隆获得PDS基因的cDNA,分析其全长序列及表达规律,旨在为进一步了解观赏向日葵八氢番茄红素脱氢酶PDS基因的调控功能奠定分子基础,为进一步研究黄色花的形成与代谢机理及应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建省农科院作物研究所自育的观赏向日葵新品种‘闽葵3号’(柠檬黄色)、“闽日1号”(黄色)、“闽葵1号”(黄橙色)、“闽葵4号”(黄色)及引进品种‘GS08’(金黄色)、“CS”(浅黄白色)、“红色复调”(紫红色)、“红柠檬”(红黄复色)等8个品种为供试材料。取盛花期花瓣,用于基因克隆及不同花色品种的表达分析;取‘闽葵3号’蕾期、始花期、盛花期和凋谢期花瓣,用于花发育过程的表达分析;取绿色管状花、黑色管状花、苞片和叶片,用于不同组织的表达分析。

大肠杆菌DH5 α 菌株由本实验室保存, RNA提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司, 实验所用其他试剂及试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物合成及测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 总RNA的提取和cDNA的克隆

采用多糖多酚植物RNA提取试剂盒提取总RNA。使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒合成cDNA第一链用于RT-PCR扩增, 反转录引物序列见表1。

根据GenBank中其他植物的PDS基因序列设计一对保守区简并引物PDS-F、PDS-R(表1), 以反转录的cDNA第一链为模板进行PCR扩增。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 70 s, 35个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。

根据观赏向日葵PDS基因保守区测序结果, 设计3'端顺式特异引物PDS3'(表1), 与通用引物AUAP(表1)配对进行PCR扩增, 退火温度为58 °C。

在已获得的PDS基因序列的基础上, 设计两个5'端反式特异引物PDS5'-1和PDS5'-2(表1), 以反转录的cDNA第一链纯化、加尾液为模板, PDS5'-1配对通用引物AAP(表1)进行第一轮扩增, 以第一轮PCR产物稀释一倍液为模板, PDS5'-2配对通用引物AUAP进行第二轮扩增。退火温度分别为58 °C和60 °C。

根据拼接获得的PDS基因cDNA全长, 设计开放阅读框(ORF)引物HaPDS-F和HaPDS-R(表1), 进行PDS cDNA ORF克隆, 验证已获得的序列。

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化连接到pMD18-T载体上转化, 挑取阳性克隆, PCR检测后送至测序, 获得基因全长序列。

表1 观赏向日葵HaPDS基因克隆及表达分析引物
Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of HaPDS gene in Ornamental Sunflower

引物名称	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence(5'→3')
PDS-F	TC(C/T) ATG AT(A/T) TTT GC(A/T) ATG CCA A
PDS-R	AT(A/G) ACT GG(A/C/T) AC(A/C/T) CCA ACT AA
PDS3'	CCC GAA GAT TGG AAA CCG CTT
PDS5'-1	CAG AAT GTC AAC TGG AGT AGC A
PDS5'-2	GGC AAC ACA TCT GGG AAG TCA A
AP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T) ₁₇
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGG GGG GGG
HaPDS-F	AGG TAA AGT TCC CGT GCG ATG A
HaPDS-R	CAC AAC AAA CGC CTG TGC TCA T
RTPDS-F	CTG GAG AGT TTA GTC GCT TTG A
RTPDS-R	GTC AGC ATT TCA TTG TTC CTC A
EF1a-F	AGA CCA CCA AGT ACT ACT GCA C
EF1a-R	CCA CCA ATC TTG TAC ACA TCC

1.3 序列分析

使用GenBank中的BLAST进行基因序列的检索, 使用DNAMAN和Primer5进行引物设计、序列拼接及氨基酸序列比对等, 使用BioXM对序列进行氨基酸组成、等电点等分析, 使用MEGA4.0软件中的Neighbor-Joining(邻位相连法, NJ)法构建系统进化树。

1.4 实时荧光定量表达分析

根据已获得的*PDS*基因序列设计一对特异引物RTPDS-F和RTPDS-R, *EF1a*为内参基因(表1)。采用SYBR PrimeScript RT-PCR Kit合成cDNA第一链, 内参基因*EF1a*检测cDNA完整性后于-20℃保存备用。荧光定量PCR反应体系为20 μL, cDNA模板1 μL(反转录原液稀释10倍)、2×SYBR Premix Ex Taq™ II 10.0 μL、10 μmol/L上下游引物各0.8 μL、50×ROX Reference Dye II 0.4 μL、ddH₂O 6.0 μL。在ABI 7500 荧光定量PCR仪上完成测定。

2 结果

2.1 观赏向日葵*HaPDS*基因全长cDNA克隆

根据GenBank中其他植物*PDS*基因保守序列设计一对简并引物PDS-F和PDS-R, 以观赏向日葵‘闽葵3号’总RNA反转录获得的cDNA第一链为模板, 进行PCR扩增, 测序表明获得了一条长度为653 bp的cDNA片段(图1A), 编码217个氨基酸。经BLAST检索分析, 该序列的编码氨基酸与万寿菊(AAG10426)和长春花(AFK29791)的*PDS*基因同源性分别达95%和87%, 初步确定此片段为观赏向日葵*PDS*基因的保守序列。

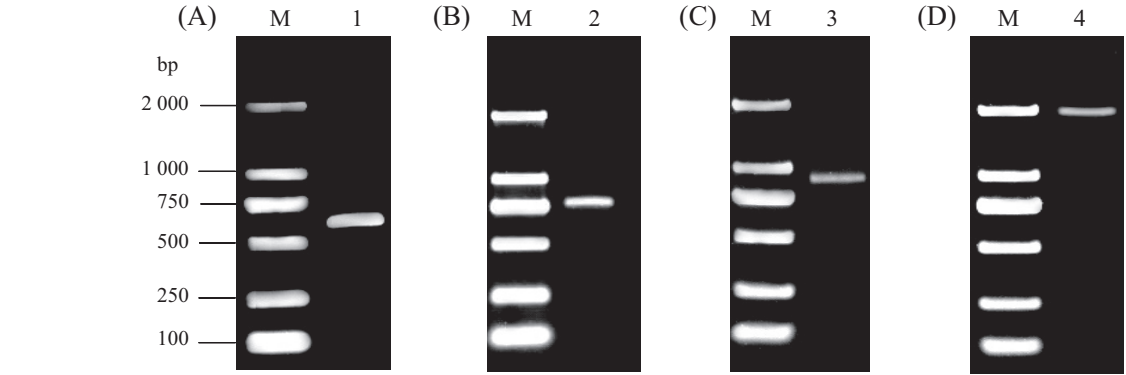
根据获得的*PDS*基因保守区序列, 设计3’RACE的特异性引物PDS3’, 与通用引物AUAP配对, 进行3’端RACE PCR扩增, 测序结果表明3’端序列长734 bp(图1B), 与保守区有65 bp的重叠区段, 该序列在终止密码子后有长152 bp的3’端非编码区, 其中包括一个含17个腺苷酸的poly(A)。

根据获得的*PDS*基因保守区和3’端测序结果, 设计2个5’RACE的特异反式引物PDS5’-1和PDS5’-2, 以cDNA第一链加同聚物尾合成第二链为模板进行巢式扩增, 测序结果表明, 5’端序列长793 bp(图1C), 该片段与保守区cDNA有68 bp的重叠区段, 扣除重叠序列和加同聚物尾序列, 实际大小为695 bp。

根据获得的*PDS*基因保守区序列、5’端和3’端序列结果, 拼接出全长cDNA, 设计ORF引物HaPDS-F和HaPDS-R进行PCR扩增, 目的片段符合预期, 长1 980 bp(图1D), 确证其为观赏向日葵*PDS*基因序列, 命名为*HaPDS*。该cDNA全长2 017 bp, 具有完整的开放阅读框(第153~1 862个碱基), 共1 710个碱基, 编码570个氨基酸, 编码产物的分子量为63.564 kDa, 推测的理论等电点为7.04。含有152 bp的5’非编码区和155 bp的3’非编码区。该cDNA序列GenBank登录号为: KF263656。

2.2 观赏向日葵*HaPDS*基因氨基酸序列结构分析

NCBI中P-Blast程序对*HaPDS*基因编码区氨基酸序列分析表明: *PDS*与八氢番茄红素脱氢酶/原卟啉原氧化酶/β-胡萝卜素脱氢酶等蛋白质家族的保守结构域均有较高的同源性。Prosite在线数据库对蛋白质结构预测分析发现: *HaPDS*基因序列含酪蛋白激酶 II 磷酸化位点11个、酪氨酸激酶磷酸化位点2



M: DNA标准分子量DL2000; 1: 保守区扩增产物; 2: 3’RACE扩增产物; 3: 5’RACE扩增产物; 4: ORF扩增产物。
M: DNA marker DL2000; 1: product of conserved region; 2: product of 3’RACE; 3: product of 5’RACE; 4: product of ORF.

图1 观赏向日葵*HaPDS*基因的PCR扩增
Fig.1 PCR amplification of *HaPDS* gene in Ornamental Sunflower

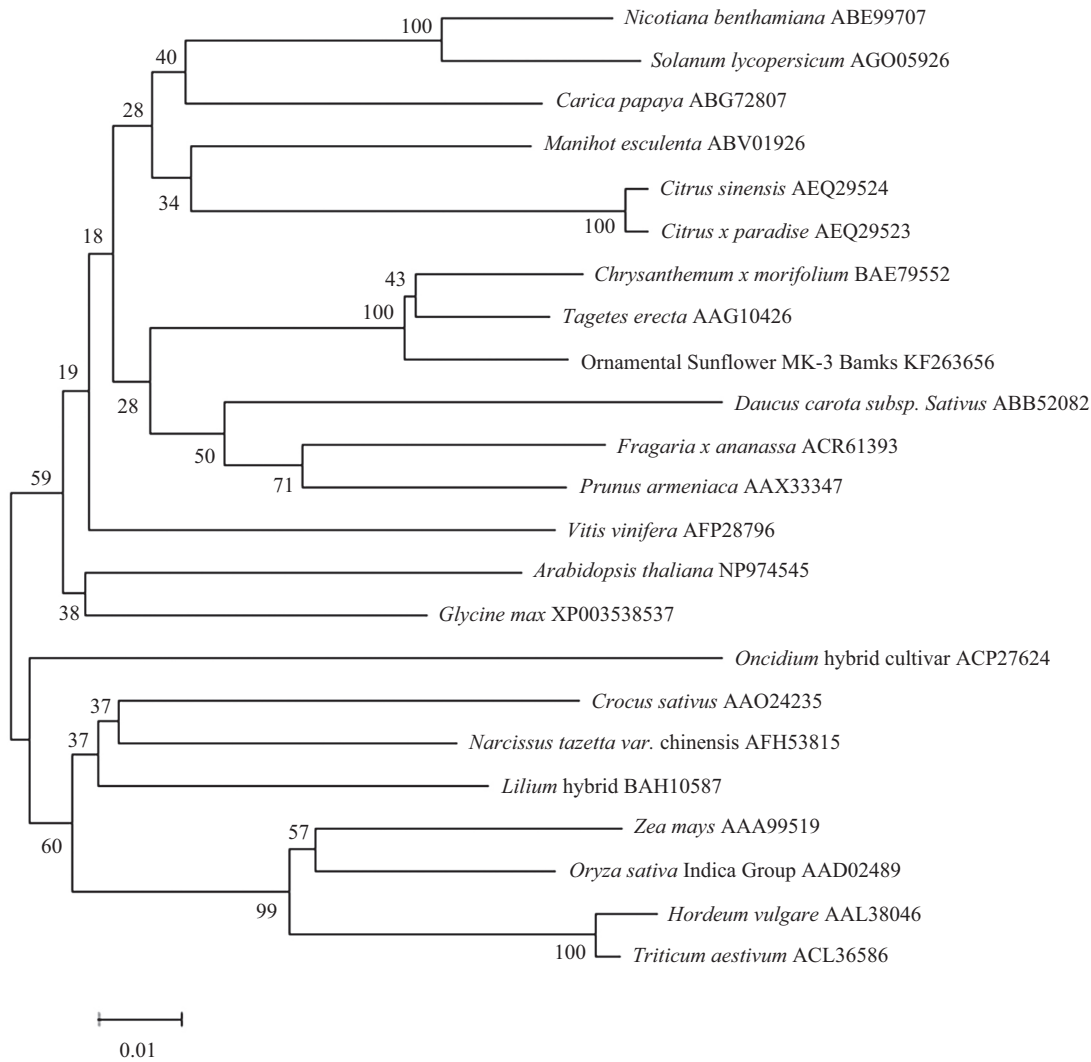


图3 观赏向日葵*HaPDS*与其他22种植物*PDS*蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *HaPDS* in Ornamental Sunflower with 22 other plant *PDS*s

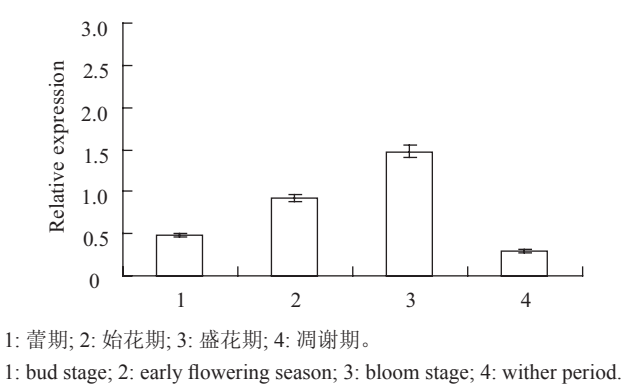


图4 *HaPDS*基因在花发育进程中的相对表达动态
Fig.4 Relative expression profiles of *HaPDS* gene in different growth periods of flowering

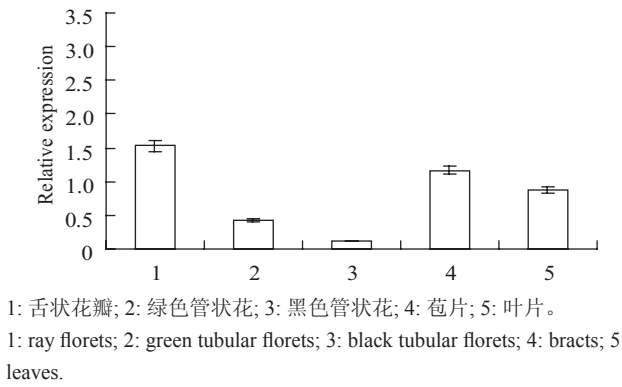
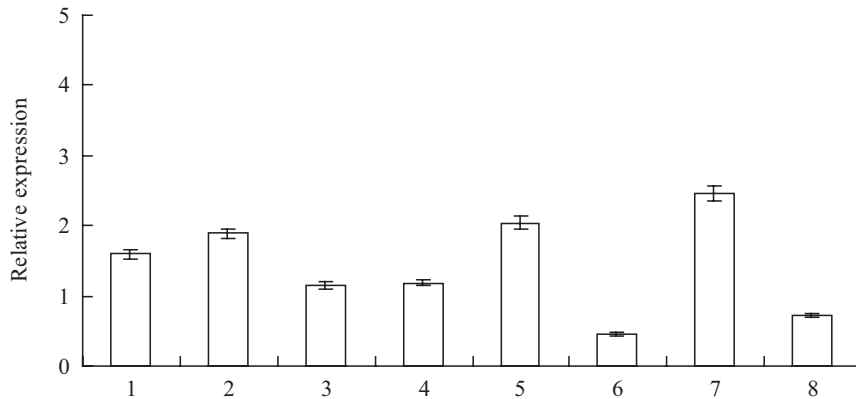


图5 *HaPDS*基因在不同组织中的相对表达动态
Fig.5 Relative expression profiles of *HaPDS* gene in different tissue

观赏向日葵新品种‘闽葵3号’花发育进程、不同组织及不同花色中的相对表达量。由图4可见, *HaPDS*基因随着花发育进程表达量逐渐增加, 到盛花期达最

高, 凋谢期微量表达。由图5可见, *HaPDS*基因的相对表达量舌状花瓣>苞片>叶片>绿色管状花>黑色管状花。由图6可见, 在黄色系品种中, 随着*PDS*基



1: 闽葵3号; 2: 闽日1号; 3: 闽葵1号; 4: 闽葵4号; 5: GS08; 6: CS; 7: 红色复调; 8: 红柠檬。

1: MinKui 3; 2: MinRi 1; 3: MinKui 1; 4: MinKui 4; 5: GS08; 6: CS; 7: red polyphony; 8: procut redlemon bicolor.

图6 *HaPDS*基因在不同花色品种中的相对表达动态

Fig.6 Relative expression profiles of *HaPDS* gene in different varieties

因的表达量增加,花瓣颜色逐渐加深,以金黄色品种‘GS08’表达量最高,浅黄白品种‘CS’表达量最低;紫红色品种‘红色复调’*PDS*基因表达量高于黄色系品种。

3 讨论

类胡萝卜素生物合成是植物体内类异戊二烯代谢途径的一个分支。八氢番茄红素脱氢酶(PDS)是类胡萝卜素生物合成途径中的重要限速酶, PDS催化八氢番茄红素连续两次脱氢生成 ζ -胡萝卜素,然后在ZDS催化下, ζ -胡萝卜素脱氢生成链孢红素继而进一步脱氢生成番茄红素^[7]。目前已从万寿菊^[8]、胡萝卜^[9]、中国水仙^[10]、文心兰^[11]、草莓^[12]、拟南芥^[13]、及玉米^[14]等植物中分离到该基因, 这些*PDS*基因的cDNA长1 900~2 300 bp, 编码551~582个氨基酸。

本研究采用RT-PCR与RACE方法成功克隆了观赏向日葵‘闽葵3号’*HaPDS*基因全长, 该cDNA全长2 017 bp, 具有完整的开放阅读框(第153~1862个碱基), 共1 710个碱基, 编码570个氨基酸。多重比对结果表明, 该序列完整的开放阅读框推导的氨基酸序列与万寿菊(AAG10426.1)、杏(AAX33347.1)、中国水仙(AFH53812.1)和玉米(AAA99519.1)等序列均具有较高同源性, 分别达88%、82%、77%和74%; 且存在一些共同的功能结构区域, 一个是靠近N-端的二核苷酸结合基元, 该结合基元为所有类胡萝卜素脱氢酶和顺-反异构酶的共同特征, 而二核苷酸被认为是保证这些酶催化活性所必需的辅助因子^[15]; 另一个是靠近C-端推测的类胡萝卜素结合结构域^[16], 其作用与底物结合有关。构建的植物PDS蛋白的系

统进化树表明, *HaPDS*与同为菊科的菊花、万寿菊亲缘关系最近, 与胡萝卜、杏及草莓等的亲缘关系较近, 与单子叶植物的文心兰、中国水仙及东方百合等的亲缘关系较近, 总体上, 此进化树与植物分类学分类基本一致。

通过实时荧光定量PCR对*HaPDS*基因在观赏向日葵花发育进程、不同组织及不同花色品种中的表达情况分析发现, *HaPDS*基因随着花发育进程表达量逐渐增加, 到盛花期达最高, 与文心兰的表达方式一致^[11]; 在不同组织中表达量舌状花瓣>苞片>叶片>绿色管状花>黑色管状花; 在黄色系品种中, 随着表达量的增加, 花瓣颜色逐渐加深, 金黄色品种‘GS08’表达量最高, 浅黄白品种‘CS’表达量最低。推测*HaPDS*在观赏向日葵类胡萝卜素积累和花的显色中可能起重要作用。

本研究成功克隆到了观赏向日葵‘闽葵3号’*HaPDS*基因全长, 并对其编码氨基酸结构、同源性及组织表达特异性进行了分析, 为进一步研究*HaPDS*的调控功能及其在观赏向日葵黄色花形成中的代谢机理奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 吴建设, 黄敏玲, 钟淮钦, 罗远华, 叶秀仙, 林 兵. 无花粉观赏型向日葵新品种‘闽葵3号’的选育. 福建农业学报(Wu Jianshe, Huang Minling, Zhong Huaiqin, Luo Yuanhua, Ye Xiuxian, Lin Bing. Breeding of a new pollen-free ornamental sunflower variety, Minkui3. Fujian Journal of Agricultural Science) 2011; 26(4): 577-82.
- 2 Mol J, Cornish E, Mason J, Koes R. Novel coloured flowers. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(2): 198-201.

- 3 周琳, 王雁, 彭镇华. 黄色花形成机制及基因工程研究进展. 林业科学(Zhou Lin, Wang Yan, Peng Zhenhua. Advances in study on formation mechanism and genetic engineering of yellow flowers. *Scientia Silvae Sinicae*) 2009; 45(2): 111-7.
- 4 王玉萍, 刘庆昌, 翟红. 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用. 分子植物育种(Wang Yuping, Liu Qingchang, Zhai Hong. Expression and regulation of genes related to plant carotenoid biosynthesis and their application in plant gene engineering. *Molecular Plant Breeding*) 2006; 4(1): 103-10.
- 5 Ohmiya A. Diversity of carotenoid composition in flower petals. *Japan Agricultural Research Quarterly* 2011; 45(2): 163-71.
- 6 Kato M, Koma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* 2004; 134(2): 824-37.
- 7 Breitenbach J, Sandmann G. (zeta)-Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 2005; 220(5): 785-93.
- 8 Moehs CP, Tian L, Osteryoung KW, Dellapenna D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol Biol* 2001; 45(3): 281-93.
- 9 Just BJ, Santos CA, Fonseca ME, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): Isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* 2007; 114(4): 693-704.
- 10 陈段芬, 彭镇华, 高志民. 中国水仙八氢番茄红素脱氢酶基因(PDS)的克隆及表达分析. 分子植物育种(Chen Duanfen, Peng Zhenhua, Gao Zhimin. Cloning and expression analysis of PDS gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *Molecular Plant Breeding*) 2008; 6(3): 574-8.
- 11 Chiou CY, Pan HA, Chuang YN, Yeh KW. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in floral tissues of *Oncidium* cultivars. *Planta* 2010; 232: 937-48.
- 12 朱海生, 李永平, 温庆放, 林琚. 草莓八氢番茄红素脱氢酶基因pds的克隆及特征分析. 园艺学报(Zhu Haisheng, Li Yongping, Wen Qingfang, Lin Hui. Cloning and characterization of pds gene in *Fragaria* × *ananassa*. *Acta Horticulturae Sinica*) 2011; 38(1): 55-60.
- 13 Scolnik PA, Bartley GE. Phytoene desaturase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1993; 103(4): 1475.
- 14 Hable WE, Oishi KK. Maize phytoene desaturase maps near the viviparous5 locus. *Plant Physiol* 1995; 108(3): 1329-30.
- 15 Frigaard NU, Maresca JA, Yunker CE. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J Bacteriol* 2004; 186(16): 5210-20.
- 16 Pecker I, Chamovitz D, Linden H. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *J Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(11): 4962-6.