

甘薯查尔酮异构酶基因 *IbCHI* 的克隆和表达特性

饶莉萍^{1,2}, 苏文瑾^{1,2}, 刘 意^{1,3}, 宋天晓^{1,2}, SOVIGUIDI Deka Reine Judess¹,
张文英^{2,①}, 杨新笋^{1,①}

(1. 湖北省农业科学院粮食作物研究所, 湖北 武汉 430064; 2. 长江大学农学院, 湖北 荆州 434025; 3. 海南大学园艺学院, 海南 海口 570228)

摘要: 根据甘薯 [*Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.] 转录组数据, 从甘薯品种‘福莱薯 7-6’ (‘Fucaishu 7-6’) 中克隆获得 1 个编码查尔酮异构酶的基因, 命名为 *IbCHI*; *IbCHI* 基因全长 732 bp, GC 含量为 55.19%, 共编码 243 个氨基酸。生物信息学分析结果表明: 在 *IbCHI* 基因编码的氨基酸序列第 12 至第 214 位包含 1 个 Chalcone 结构域; *IbCHI* 蛋白分子式为 C₁₁₅₆H₁₈₃₁N₂₉₁O₃₅₁S₇, 理论相对分子质量为 25 646.41, 理论等电点为 pI 5.25, 并可能具有 1 个跨膜螺旋区, 定位于细胞核和细胞膜上; 其氨基酸序列中包含 24 个带正电荷和 27 个带负电荷的氨基酸残基, 丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸和甘氨酸所占比例较高, 半胱氨酸所占比例最低; *IbCHI* 蛋白的不稳定指数和总亲水性平均系数分别为 38.49 和 0.074, 表明 *IbCHI* 蛋白是一种稳定的亲水性蛋白质; *IbCHI* 蛋白二级结构中, α 螺旋、随机卷曲、延伸链和 β 转角所占比例分别为 39.51%、31.69%、20.16% 和 8.64%。多重比对结果显示: *IbCHI* 基因与同属种类圆叶牵牛 (*I. purpurea* Lam.) 和牵牛 [*I. nil* (Linn.) Roth] *CHI* 基因编码的氨基酸序列高度相似 (相似度 90% 以上), 且在系统发育树上聚为同一支。*IbCHI* 基因启动子区包含启动子基本元件 TATA-box 和 CAAT-box, 以及胁迫响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和光响应元件等 26 个顺式作用元件。qRT-PCR 分析结果表明: *IbCHI* 基因在供试 4 个甘薯品种 ‘EC15’、‘EC16’、‘福莱薯 18’ (‘Fucaishu 18’) 和 ‘福莱薯 7-6’ 的根、茎、茎尖和叶中均有表达, 但其在不同品种和器官间的相对表达量存在明显差异, 其中, ‘福莱薯 7-6’ 茎和叶中 *IbCHI* 基因的相对表达量显著高于其他 3 个品种。经干旱 (质量体积分数 30% PEG6000) 和盐 (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) 处理后, *IbCHI* 基因的相对表达量随处理时间的延长均呈先下降后上升的趋势, 并在处理 24 h 后该基因的相对表达量显著 ($P < 0.05$) 升高。综合分析结果表明: 甘薯 *IbCHI* 蛋白属于 Chalcone 超级家族, 具有较高的保守性; *IbCHI* 基因的表达具有组织和品种特异性, 且在调控甘薯对非生物胁迫的响应过程中起重要作用。

关键词: 甘薯; *IbCHI* 基因; qRT-PCR; 亚细胞定位; 表达特性; 非生物胁迫

中图分类号: Q943.2; S531 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)06-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.06.01

Cloning and expression characteristics of chalcone isomerase gene *IbCHI* from *Ipomoea batatas* RAO Liping^{1,2}, SU Wenjin^{1,2}, LIU Yi^{1,3}, SONG Tianxiao^{1,2}, SOVIGUIDI Deka Reine Judess¹, ZHANG Wenying^{2,①}, YANG Xinsun^{1,①} (1. Food Crops Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 2. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. Horticulture College, Hainan University, Haikou 570228, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(6): 1-10

Abstract: According to transcriptome data of *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam., a gene named *IbCHI* encoding chalcone isomerase was cloned from *I. batatas* ‘fucaishu 7-6’; the full length of *IbCHI* gene is 732 bp, the GC content is 55.19%, and a total of 243 amino acids are encoded. Bioinformatics analysis result shows that there is a Chalcone domain at the position from 12th to 214th of amino acid sequence

收稿日期: 2020-04-24

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD1000700; 2018YFD1000705); 湖北省技术创新专项(对外科技合作类)(2018AHB012); 国家现代甘薯产业技术体系建设项目(CARS-11-C-15)

作者简介: 饶莉萍(1996—), 女, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事甘薯遗传育种方面的研究工作。

①通信作者 E-mail: wyzhang@yangtzeu.edu.cn; yangxinsun013@163.com

encoded by *IbCHI* gene; the molecular formula of IbCHI protein is $C_{1156}H_{1831}N_{291}O_{351}S_7$, the theoretical relative molecular mass is 25 646.41, the theoretical isoelectric point is pI 5.25, and there may be a transmembrane helix region located on the nucleus and cell membrane; there are 24 positively charged and 27 negatively charged amino acid residues in its amino acid sequence, the proportion of alanine, serine, valine and glycine is higher, while that of cysteine is the lowest; the instability index and average coefficient of total hydrophilicity of IbCHI protein are 38.49 and 0.074, respectively, indicating that IbCHI protein is a stable hydrophilic protein; in the secondary structure of IbCHI protein, the proportion of α -helix, random coil, extended chain and β -turn is 39.51%, 31.69%, 20.16% and 8.64%, respectively. Multiple alignment result shows that the amino acid sequence encoded by *IbCHI* gene are highly similar (similarity more than 90%) to those encoded by *CHI* gene from the same genus of *I. purpurea* Lam. and *I. nil* (Linn.) Roth, and cluster into the same branch in phylogenetic tree. The promoter region of *IbCHI* gene contains 26 cis-acting elements including promoter common element of TATA-box and CAAT-box, and stress-responsive element, MeJA-responsive element and light-responsive element, etc. The qRT-PCR analysis result shows that *IbCHI* gene is expressed in root, stem, stem tip and leaf of four test *I. batatas* cultivars of 'EC15', 'EC16', 'Fucaishu 18' and 'Fucaishu 7-6', but there are obvious differences in its relative expression among different cultivars and organs, in which, the relative expression of *IbCHI* gene in stem and leaf of 'Fucaishu 7-6' is significantly higher than that of other three cultivars. After drought (mass volume fraction of 30% PEG6000) and salt ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) treatments, the relative expression of *IbCHI* gene shows a tendency to first decrease and then increase with the elongation of treatment time, and increases significantly ($P < 0.05$) after treatment for 24 h. The comprehensive analysis results show that IbCHI protein belongs to Chalcone superfamily and has relatively high conservation; *IbCHI* gene expression has tissue and cultivar specificity, and plays an important role in regulating *I. batatas* response to abiotic stress.

Key words: *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.; *IbCHI* gene; qRT-PCR; subcellular location; expression characteristics; abiotic stress

甘薯 [*Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.] 是世界第七大粮食作物^[1], 富含花青素、胡萝卜素和类黄酮等多种活性成分^[2-3], 具有口感好、保健功效强和供应周期长等优点, 药用和食用价值显著。非生物胁迫是影响甘薯生长发育、产量和品质的重要因子, 如干旱和盐胁迫可导致甘薯细胞膜结构损害, 破坏其体内水分平衡, 对甘薯植株的生长发育产生不利影响, 进而影响甘薯的产量和品质^[4]。

类黄酮成分具有多种生理功能, 广泛存在于植物的花瓣、花粉、花萼、果实、种子和茎等组织^[5-9], 可调控植物生长发育, 并在植物应对环境胁迫方面发挥重要作用^[10-13]。查尔酮异构酶 (CHI, chalcone isomerase) 是类黄酮化合物生物合成途径中较早被发现的酶之一^[14], 而查尔酮异构酶基因 *CHI* 能够调控查尔酮异构酶的积累, 进而影响类黄酮的合成^[15-18], 在植物生长发育、色素积累和抗逆性等方面作用显著^[19-20]。Watkinson 等^[21]发现, 在干旱条件下栽培马铃薯 [*Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (Juz. et Bukasov) Hawkes] 的类黄酮合成途径相关酶基因表达量明显增加, 且在严重或中等干旱条件下不同品系间这些基因的表达量存在差异, 说明类黄酮对马铃薯

的耐旱性有明显的影响效应; 在小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 中也获得了类似的研究结果^[22]。在盐胁迫条件下, 水稻 (*Oryza sativa* Linn.)^[23] 和甘蔗 (*Saccharum officinarum* Linn.)^[24] 等作物体内一些与类黄酮代谢途径相关的基因表达量上调。在干旱和盐胁迫条件下, 枳 (*Citrus trifoliata* Linn.) 实生苗的 *CHI* 基因表达量和类黄酮含量均有上调趋势^[25]; 苦荞 [*Fagopyrum tataricum* (Linn.) Gaertn.] 的 *CHI* 基因表达量也上调, 显示苦荞的抗盐和抗旱能力增强^[26]。

甘薯在生长过程中常面临高温和干旱等逆境条件, 且其部分种植区域土壤盐碱化严重, 导致甘薯产量和质量下降。通过改变甘薯 *CHI* 基因表达模式, 调控类黄酮在甘薯中的积累, 能增强甘薯抗逆性, 但关于 *CHI* 基因如何调控甘薯中类黄酮物质积累从而增强其抗逆性目前尚未有明确的研究结果。鉴于此, 作者以甘薯转录组数据为基础, 筛选出 1 个与类黄酮积累密切相关的 *CHI* 基因, 并从甘薯品种 '福莱薯 7-6' ('Fucaishu 7-6') 叶片中克隆获得该基因, 采用生物信息学、qRT-PCR 及亚细胞定位等方法分析该基因的结构特征和表达特性, 以期明确 *CHI* 基因与甘薯抗逆性的关系, 为甘薯品种的遗传改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的4个甘薯品种‘EC15’、‘EC16’、‘福菜薯18’(‘Fucaishu 18’)和‘福菜薯7-6’均种植于湖北省农业科学院粮食作物研究所盆栽场。于2017年7月26日取品种‘福菜薯7-6’成熟叶片约5 g,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于基因克隆;于2019年7月17日取栽植20 d的甘薯品种‘EC15’、‘EC16’、‘福菜薯18’和‘福菜薯7-6’的根、茎、茎尖和叶,液氮速冻后置于-80℃冰箱中保存,用于qRT-PCR分析。

取‘福菜薯18’的胚性愈伤组织,在含 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA的MS固体培养基上诱导生成试管苗,并继代至MS固体培养基上,在温度28℃、光照度2 000~3 000 lx、光照时间 $16\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 的条件下培养4周;取30株长势基本一致的完整试管苗,用无菌水洗净残留培养基,移至1/2Hoagland溶液中,在上述培养条件下驯化培养3 d;用含质量体积分数30%PEG6000和 $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl的1/2Hoagland溶液分别处理驯化的试管苗,以模拟干旱和盐处理,各处理15株;在处理的0(对照)、1、6、12和24 h,每个处理组取3株苗,用液氮速冻并研磨成粉,置于-80℃冰箱中保存,用于qRT-PCR分析。

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin)品种‘W38’和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株pCambia1300由中国农业大学农学院实验室提供;RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、凝胶回收试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞DH5 α 、pMD19-T质粒载体、LA Taq聚合酶、DNA marker DL2000和TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。CFX96荧光定量PCR仪购自美国BIO-RAD公司,FV3000激光共聚焦显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和*IbCHI*基因克隆 以‘福菜薯7-6’的叶片为试材,用通用植物总RNA提取试剂盒提取总RNA,用反转录试剂盒反转录成cDNA第1链,-20℃保存、备用。

在甘薯野生种基因组网站(<http://sweetpotato.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)上,利用转录组测

序获得的Gene ID进行检索,获得*IbCHI*基因的编码区(CDS)序列。利用Primer Premier 5.0软件设计该序列的特异性引物,正向引物序列为5'-ATGTCTGC GCCGCCGTG-3',反向引物序列为5'-CTATTGGAG ACGACCGCTTGTG-3',采用该引物进行PCR扩增,获得*IbCHI*基因。

扩增体系总体积50.0 μL ,包含cDNA模板2.0 μL 、 $2.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 8.0 μL 、LA Taq聚合酶0.5 μL 、 $10\times$ buffer (Mg^{2+})5.0 μL 、 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各1.0 μL 以及重蒸水32.5 μL 。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s、55℃退火1 min、72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸10 min。PCR扩增产物用质量体积分数1%琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的片段;对回收片段分别进行连接、转化以及阳性克隆筛选,送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测序。

1.2.2 生物信息学分析 利用NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的BLASTx功能,检索与*IbCHI*基因编码的氨基酸序列的同源序列,用DNAMAN V6.0软件对同源氨基酸序列进行多重比对;用MEGA 7.0软件构建同源序列系统进化树(neighbor-joining, bootstrap 1 000);用ExPASy程序(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析*IbCHI*基因编码的氨基酸序列的理论相对分子质量和理论等电点;用SMART程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测*IbCHI*基因编码的氨基酸序列的结构域;用SOPMA程序(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和SWISS-MODEL程序(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)预测*IbCHI*蛋白的二级和三级结构;用TMPred程序(https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)预测*IbCHI*蛋白的跨膜结构,同时用WoLFPSORT程序(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)预测*IbCHI*蛋白的亚细胞定位。用PlantCARE程序(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析*IbCHI*基因5'端上游2 000 bp启动子区的顺式作用元件,并用GSDS 2.0程序(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘图。

1.2.3 qRT-PCR分析 用Primer 3.0程序(<https://primer3.ut.ee/>)设计*IbCHI*基因的荧光定量特异性引物,正向引物*IbCHI*-Fq序列为5'-GAAACTGCGTT GCTTCTGGAAA-3',反向引物*IbCHI*-Rq序列为5'-

CAAGGGGTGATTGAGTGAAGAAAAT-3'; β -actin 基因为内参基因,正向引物序列为 5'-AGCAGCATGAAGATTAAGGTTGTAGCAC-3',反向引物序列为 5'-TGGAAAATTAGAAGCACTTCCTGTGAAC-3'。参照 TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,每个样品 3 次重复。

qRT-PCR 反应体系总体积为 20.0 μ L, 包含 cDNA 模板 3.0 μ L、2 $\times$ TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix 10.0 μ L、10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 正向和反向引物各 0.4 μ L 以及 Nuclease-free water 6.2 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火 15 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[27] 计算各样品中 *IbCHI* 基因的相对表达量。

1.2.4 重组载体构建及亚细胞定位 以带有 GFP 荧光标签的 pCAMBIA1300 为亚细胞定位载体,采用双酶切技术构建 *IbCHI* 基因的亚细胞定位重组载体。从克隆载体上扩增 *IbCHI* 基因的 CDS,正向引物 *IbCHI*-F(*Kpn* I)序列为 5'-GGGGTACCATGTCTGCCGCCGTG-3',反向引物 *IbCHI*-R(*Xba* I)序列为 5'-GCTCTAGATTTGGAGACGACCGCTTGTG-3',同时利用 *Kpn* I 和 *Xba* I 对 pCAMBIA1300-GFP 载体进行双酶切,电泳分离后回收目的片段,备用。

将载体与目的片段重组连接,并将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中。摇菌培养 6~8 h 后,吸取已转化的感受态细胞 100 μ L,均匀涂抹在含 50 mg $\cdot$ L⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜;挑选单克隆,PCR 验证后测序。利用 DNAMAN V6.0 软件进行序列分析,保存测序正确的菌液;提取 pCAMBIA1300-GFP-*IbCHI* 重组质粒,冻融法转化根癌农杆菌,PCR 筛选阳性菌液。

采用根癌农杆菌介导的烟草瞬时表达系统进行亚细胞定位。在 8~9 枚叶期(未萌生花芽)的本氏烟草植株上选取生长良好的叶片,将携带表达载体 pCAMBIA1300-GFP-*IbCHI* 的根癌农杆菌菌液注射至叶片中,置于温度 28 $^{\circ}$ C、光照度 2 000~3 000 lx、光照时间 16 h $\cdot$ d⁻¹ 的条件下培养 36 h。将侵染后的本氏烟草叶片置于激光共聚焦显微镜下观察 GFP 表达情况。

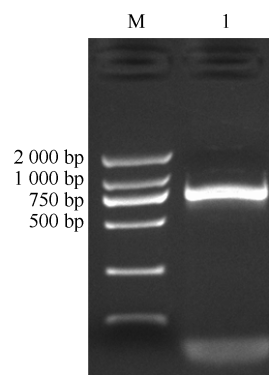
1.3 数据处理和分析

采用 EXCEL 2020 和 SPSS 22.0 统计分析软件进行数据统计和图表制作。

2 结果和分析

2.1 *IbCHI* 基因的克隆和生物信息学分析

2.1.1 *IbCHI* 基因克隆分析 以‘福菜薯 7-6’ cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到 1 条全长 732 bp 的目的片段(图 1),片段长度与预期结果一致,命名为 *IbCHI* 基因,编码 *IbCHI* 蛋白。*IbCHI* 基因序列的 GC 含量为 55.19%,共编码 243 个氨基酸;在其氨基酸序列的第 12 至第 214 位包含 1 个 Chalcone 结构域(图 2),说明 *IbCHI* 蛋白属于 Chalcone 超级家族。



M: DNA marker; 1: *IbCHI* 基因 *IbCHI* gene.

图 1 甘薯 *IbCHI* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

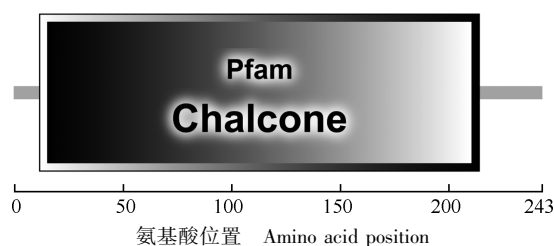
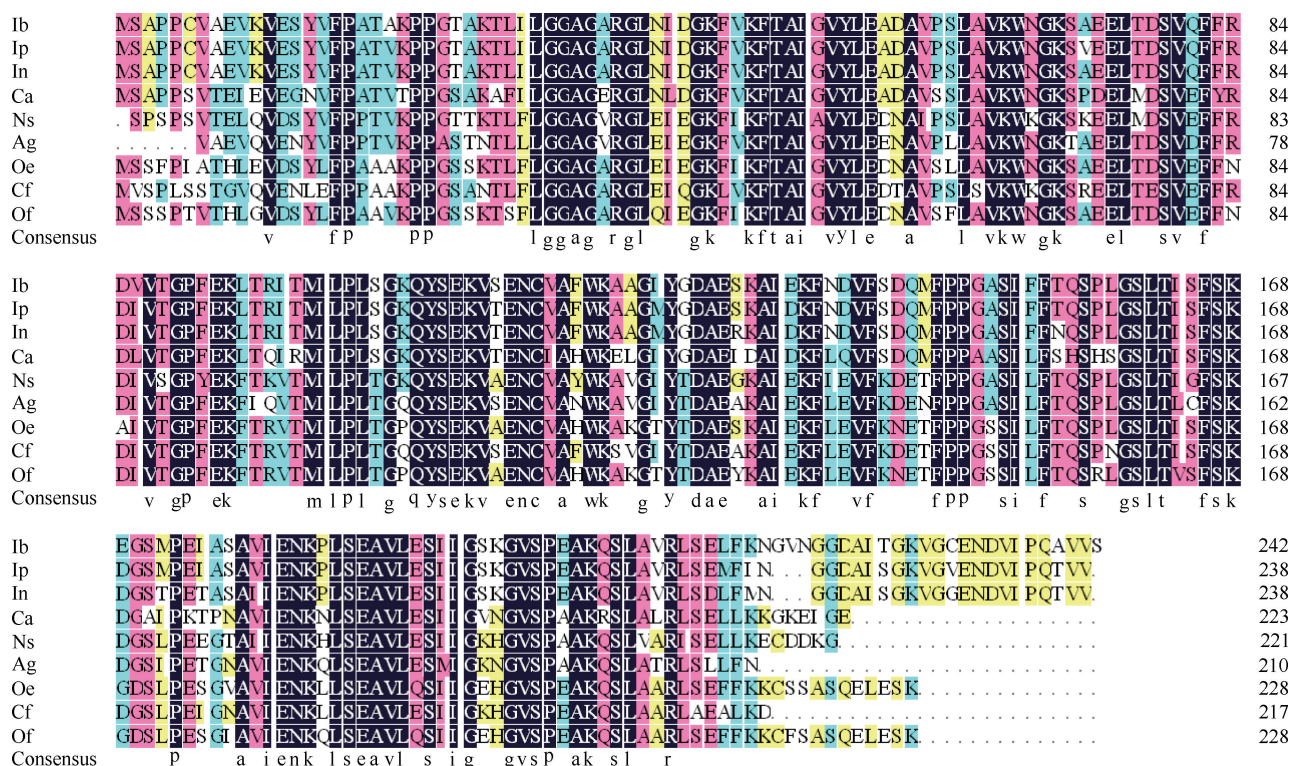


图 2 甘薯 *IbCHI* 基因编码的氨基酸序列的结构域预测结果

Fig. 2 Prediction result of domain in amino acid sequence encoded by *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

2.1.2 氨基酸序列的多重比对和同源性分析 多重比对结果(图 3)显示:*IbCHI* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中一些植物 *CHI* 基因编码的氨基酸序列相似性存在差异,其中,*IbCHI* 基因编码的氨基酸序列与同属种类圆叶牵牛(*Ipomoea purpurea* Lam.)和牵牛[*I. nil* (Linn.) Roth] *CHI* 基因编码的氨基酸序列相似性较高,均在 90% 以上;而与其他科种类,如灯

图3 甘薯 *IbCHI* 基因与其他植物 *CHI* 基因编码的氨基酸序列的多重比对结果Fig. 3 Multiple alignment result of amino acid sequences encoded by *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam. and *CHI* gene from other species

灯笼椒 (*Capsium annuum* Linn.)、蓝果树 (*Nyssa sinensis* Oliv.)、芹菜 (*Apium graveolens* Linn.)、油橄榄 (*Olea europaea* Linn.)、川黔千金榆 (*Carpinus fangiana* Hu) 和木犀 [*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.] 等 *CHI* 基因编码的氨基酸序列相似性均在 70% 以下。

利用 MEGA 7.0 软件对 *IbCHI* 基因与其他植物 (上述 8 个同源性较高的植物) 的 *CHI* 基因编码的氨基酸序列进行系统进化分析, 结果 (图 4) 显示: *IbCHI* 基因与同属种类圆叶牵牛和牵牛 *CHI* 基因编码的氨基酸序列聚为一支, 同源性较高; 与其他植物 *CHI* 基因编码的氨基酸序列明显分离, 亲缘关系较远。总体上看, 不同植物种类的 *CHI* 蛋白表现出明显的种属特性, 同科同属植物的亲缘关系更近。

2.1.3 *IbCHI* 蛋白的结构和理化性质 对 *IbCHI* 基因编码的氨基酸序列进行结构预测和理化性质分析, 结果表明: *IbCHI* 蛋白分子式为 $C_{1156}H_{1831}N_{291}O_{351}S_7$,

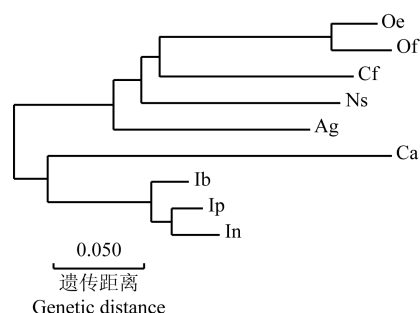
理论相对分子质量为 25 646.41, 理论等电点为 pI 5.25; 其氨基酸序列包含 24 个带正电荷的氨基酸残基 [精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys)] 和 27 个带负电荷的氨基酸残基 [天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu)]。氨基酸序列组成中, 丙氨酸 (Ala)、丝氨酸 (Ser)、缬氨酸 (Val) 和甘氨酸 (Gly) 所占比例较高, 分别为 10.3%、9.9%、9.5% 和 9.1%; 半胱氨酸 (Cys) 所占比例最低, 仅为 1.2%。 *IbCHI* 蛋白的不稳定指数和总亲水性平均系数分别为 38.49 和 0.074, 表明 *IbCHI* 蛋白是一种稳定的亲水性蛋白质。

蛋白质二级结构 (图 5) 和三级结构 (图 6) 预测结果显示: *IbCHI* 蛋白含有 39.51% 的 α 螺旋、31.69% 的随机卷曲、20.16% 的延伸链和 8.64% 的 β 转角, 他们间次分散在整个蛋白质序列中。在该蛋白质的三级结构中, 48% 的氨基酸残基结构置信度达到 88%。

亚细胞定位和跨膜结构域的预测结果显示:

IbCHI 蛋白最可能位于细胞质中,其次是细胞外、细胞核、细胞骨架和高尔基体,且存在 1 个跨膜螺旋区。表明 IbCHI 蛋白可以进行跨膜运输,从而在细胞核以及细胞核以外的区域表达。

2.1.4 IbCHI 基因启动子区功能分析 对 *IbCHI* 基因 5'端上游 2 000 bp 启动子序列进行分析,结果(表 1 和图 7)表明:*IbCHI* 基因启动子序列包含典型的真核生物启动子基本元件 TATA-box 和 CAAT-box,以及胁迫响应元件 MYB、STRE、W box、MYC 和 ERE,茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif,光响应元件 G-box、AT-rich element、Box 4、GGA-motif、I-box、LAMP-element、TCT-motif 和 LTR,昼夜节律调控元件 circadian,组织特异性表达元件 CAT-box 和 GCN4-motif,激素响应元件 ABRE 和 P-box,植物防御响应元件 as-1,蛋白质代谢调节元件 O2-site, MYBHv1 结合位点 CCAAT-box 和厌氧诱导元件中的



Ib: 甘薯 *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.; Ip: 圆叶牵牛 *I. purpurea* Lam.; In: 牵牛 *I. nil* (Linn.) Roth; Ca: 灯笼椒 *Capsium annuum* Linn.; Ns: 蓝果树 *Nyssa sinensis* Oliv.; Ag: 芹菜 *Apium graveolens* Linn.; Oe: 油橄榄 *Olea europaea* Linn.; Cf: 川黔千金榆 *Carpinus fangiana* Hu; Of: 木犀 *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.

图 4 甘薯 *IbCHI* 基因与其他植物 *CHI* 基因编码的氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam. and *CHI* gene from other species

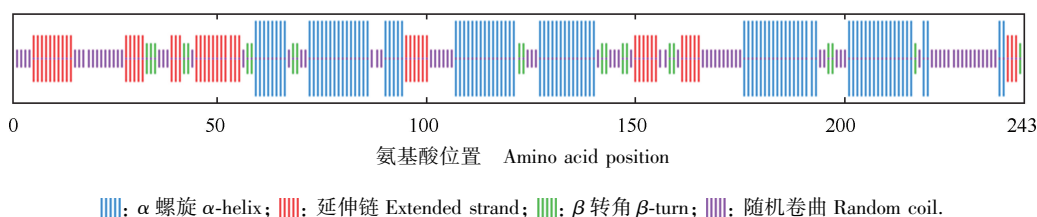


图 5 甘薯 *IbCHI* 蛋白的二级结构预测结果

Fig. 5 Prediction result of secondary structure of *IbCHI* protein from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

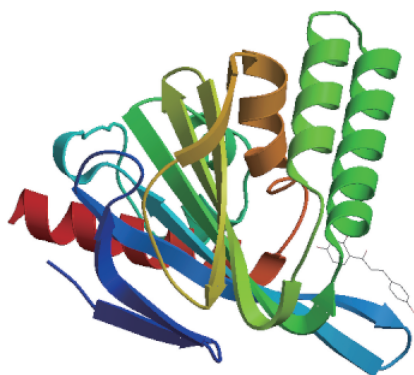


图 6 甘薯 *IbCHI* 蛋白的三级结构预测结果

Fig. 6 Prediction result of tertiary structure of *IbCHI* protein from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

类增强因子 ARE 等 26 种顺式作用元件。

2.2 IbCHI 基因的相对表达量分析

2.2.1 IbCHI 基因表达的组织特异性 供试的 4 个甘薯品种试管苗的根、茎、茎尖和叶中 *IbCHI* 基因的

相对表达量见表 2。结果显示:*IbCHI* 基因在各品种的根、茎、茎尖和叶中均有表达,但相对表达量存在明显差异,*IbCHI* 基因的相对表达量在‘福菜薯 7-6’的茎中最高、在‘EC15’的茎尖中最低。在‘EC15’根、茎、茎尖和叶中,*IbCHI* 基因的相对表达量无显著差异;在‘EC16’中,*IbCHI* 基因在茎和茎尖中的相对表达量显著($P<0.05$)高于根和叶;在‘福菜薯 18’中,*IbCHI* 基因在根中的相对表达量显著高于茎、茎尖和叶;在‘福菜薯 7-6’中,*IbCHI* 基因在茎中的相对表达量显著高于根和茎尖,*IbCHI* 基因在叶中的相对表达量与其他器官无显著差异。不同品种间,*IbCHI* 基因在‘福菜薯 18’根中的相对表达量显著高于其他 3 个品种;*IbCHI* 基因在‘福菜薯 7-6’茎和叶中的相对表达量显著高于其他 3 个品种;*IbCHI* 基因在各品种茎尖中的相对表达量存在显著差异,以在‘EC16’茎尖中最高。说明 *IbCHI* 基因在催化类黄酮合成过程中具有组织和品种的特异性。

表 1 甘薯 *IbCHI* 基因启动子区的调控元件预测结果
Table 1 Prediction result of regulatory element in promoter region of *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

编号 No.	元件 Element	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
1	TATA-box	TATA	77	核心启动子元件 Core promoter element
2	CAAT-box	CAAT	43	启动子基本顺式作用元件 Promoter common <i>cis</i> -acting element
3	MYC	CATGTG	4	低温响应元件 Low-temperature responsive element
4	LTR	CCGAAA	1	低温响应元件 Low-temperature responsive element
5	ERE	ATTTTAAA	2	干旱诱导元件 Drought induction element
6	ARE	AAACCA	1	厌氧诱导元件 Anaerobic induction element
7	TCT-motif	TCTTAC	1	光响应元件 Light-responsive element
8	LAMP-element	CTTTATCA	1	光响应元件 Light-responsive element
9	AT-rich element	ATAGAAATCAA	1	光响应元件 Light-responsive element
10	I-box	ATGATAAGGTC	1	光响应元件 Light-responsive element
11	GGA-motif	GGAGACGCTTTGT	1	光响应元件 Light-responsive element
12	G-box	CAGACGTGGCA	3	光响应元件 Light-responsive element
13	Box 4	ATTAAT	7	光响应元件 Light-responsive element
14	W box	TTGACC	6	胁迫响应元件 Stress-responsive element
15	STRE	AGGGG	2	胁迫响应元件 Stress-responsive element
16	MYB	CAACCA	2	胁迫响应元件 Stress-responsive element
17	ABRE	ACGTG	4	脱落酸响应元件 Absciscic acid responsive element
18	as-1	TGACG	2	植物防御响应元件 Plant defense responsive element
19	circadian	CAAAGATATC	1	昼夜节律调控元件 Circadian control element
20	TGACG-motif	TGACG	2	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA-responsive element
21	CGTCA-motif	CGTCA	2	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA-responsive element
22	O2-site	GATGATGTGG	2	玉米醇溶蛋白代谢调节元件 Zein metabolism regulation element
23	CCAAT-box	CAACGG	1	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site
24	P-box	CCTTTTG	1	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element
25	CAT-box	GCCACT	1	分生组织表达元件 Meristem expression element
26	GCN4-motif	TGAGTCA	1	胚乳表达元件 Endosperm expression element

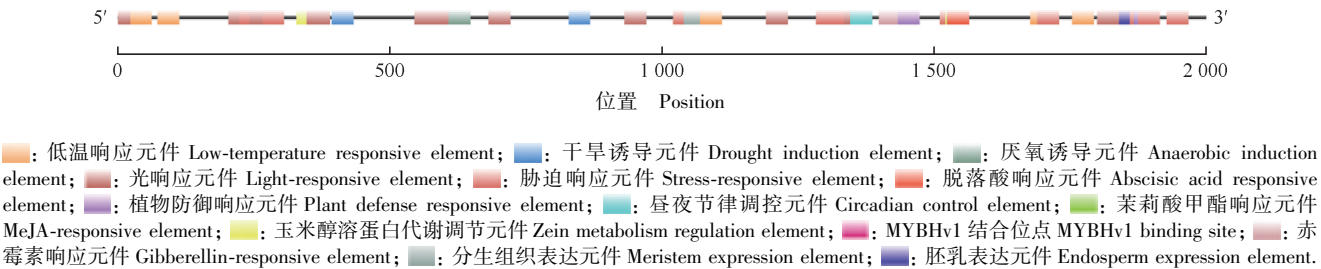


图 7 甘薯 *IbCHI* 基因启动子区调控元件的分布顺序
Fig. 7 Distribution order of regulatory element in promoter region of *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.

表 2 不同甘薯品种各器官中 *IbCHI* 基因的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm SD$)
Table 2 Comparison on relative expression of *IbCHI* gene from each organ of different cultivars of *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam. ($\bar{x} \pm SD$)

品种 Cultivar	不同器官中 <i>IbCHI</i> 基因的相对表达量 ¹⁾ Relative expression of <i>IbCHI</i> gene from different organs ¹⁾			
	根 Root	茎 Stem	茎尖 Stem tip	叶 Leaf
EC15	0.299±0.155Ba	0.179±0.101Ba	0.078±0.040Da	0.253±0.066Ba
EC16	0.385±0.161Bb	2.069±0.395Ba	1.930±0.130Aa	0.373±0.126Bb
福菜薯 18 Fucaishu 18	1.000±0.000Aa	0.507±0.061Bb	0.575±0.089Cb	0.261±0.076Bc
福菜薯 7-6 Fucaishu 7-6	0.356±0.086Bb	11.594±5.524Aa	1.087±0.201Bb	5.128±2.381Aab

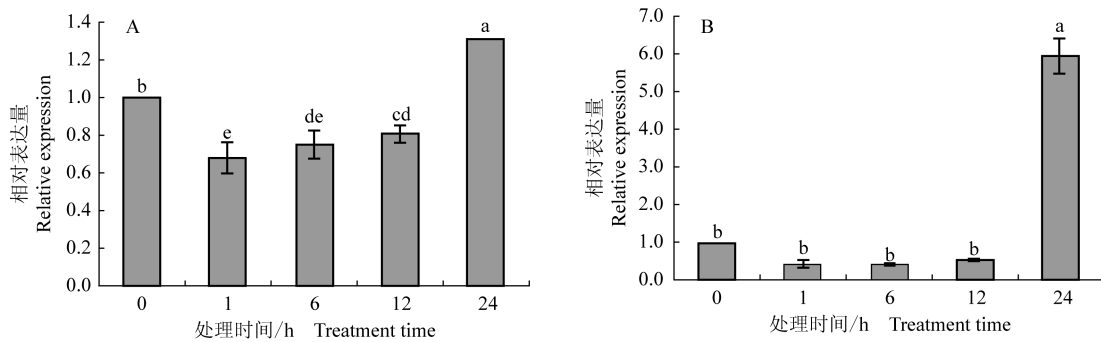
¹⁾ 同行中不同的小写字母表示同一品种不同器官间差异显著 ($P<0.05$) Different lowercases in the same row indicate the significant ($P<0.05$) difference in the same cultivar among different organs; 同列中不同的大写字母表示同一器官不同品种间差异显著 ($P<0.05$) Different uppercases in the same column indicate the significant ($P<0.05$) difference in the same organ among different cultivars.

2.2.2 干旱和盐胁迫对 *IbCHI* 基因相对表达量的影响 采用质量体积分数 30%PEG6000 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 分别模拟干旱和盐胁迫条件对‘福菜薯 18’进行 0~24 h 处理, *IbCHI* 基因相对表达量的变化见图 8。结果表明:在干旱和盐胁迫条件下, *IbCHI* 基因的相对表达量随处理时间的延长均呈先下降后上升的趋势(图 8-A, B)。在干旱胁迫条件下, 处理 1、6 和 12 h 后 *IbCHI* 基因的相对表达量呈上升趋势, 但较对照(处理 0 h)显著降低; 处理 24 h 后 *IbCHI* 基因的相对表达量则显著升高。在盐胁迫条件下, 处理 1、6 和

12 h 后 *IbCHI* 基因的相对表达量较对照有所降低, 但无显著差异; 处理 24 h 后 *IbCHI* 基因的相对表达量则显著升高。推测在干旱和盐胁迫 24 h 后, 甘薯体内的 *IbCHI* 基因应激表达以参与对逆境胁迫的抵御过程。

2.3 *IbCHI* 基因的亚细胞定位

用 *IbCHI* 基因瞬时表达载体 pCambia1300-GFP-*IbCHI* 和空载体 pCambia1300-GFP(对照) 分别转化本氏烟草表皮细胞, 并借助绿色荧光蛋白信号确定目标蛋白质在细胞内的分布。结果(图 9)显示:

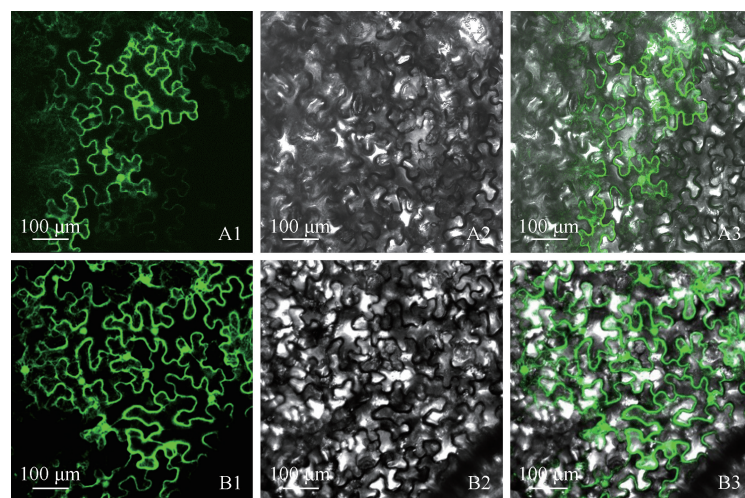


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

A: 干旱处理(质量体积分数 30%PEG6000) Drought treatment (mass volume fraction of 30% PEG6000); B: 盐处理($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) Salt treatment ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl).

图 8 干旱和盐胁迫条件下甘薯 *IbCHI* 基因相对表达量的变化

Fig. 8 Change in relative expression of *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam. under conditions of drought and salt stresses



A: 转化空载体 pCambia1300-GFP 的表皮细胞(对照) Epidermal cells transformed with empty vector pCambia1300-GFP (the control); B: 转化 *IbCHI* 基因瞬时表达载体 pCambia1300-GFP-*IbCHI* 的表皮细胞 Epidermal cells transformed with transient expression vector of *IbCHI* gene pCambia1300-GFP-*IbCHI*. 1: 绿色荧光视野 Green fluorescence field; 2: 明视野 Bright field; 3: 重合视野 Merged field.

图 9 甘薯 *IbCHI* 基因在本氏烟草表皮细胞中的亚细胞定位结果

Fig. 9 Result of subcellular localization of *IbCHI* gene from *Ipomoea batatas* (Linn.) Lam. in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* Domin

在转 pCAMBIA1300-GFP-*IbCHI* 载体的本氏烟草细胞内,绿色荧光信号在细胞膜和细胞核中明显,这一结果部分印证了 *IbCHI* 蛋白的亚细胞定位预测结果。

3 讨论和结论

查尔酮异构酶(CHI)能够催化底物查尔酮或 6'-脱氧查尔酮分子内环化反应,广泛存在于植物的根、茎、叶和种子中^[28-32]。在甘薯品种‘福莱薯 7-6’中克隆获得的 *IbCHI* 基因全长 732 bp,编码 243 个氨基酸,其氨基酸序列的第 12 至第 214 位氨基酸间包含 1 个Chalcone 结构域,与同属种类圆叶牵牛和牵牛 *CHI* 基因编码的氨基酸序列相似度达到 90%以上,且在基于 *CHI* 基因编码的氨基酸序列构建的系统进化树中也与同属种类聚在一起,表明在进化过程中 CHI 蛋白的氨基酸序列具有保守性。在 *IbCHI* 蛋白的二级结构中, α 螺旋、延伸链、随机卷曲和 β 转角所占比例分别为 39.51%、20.16%、31.69%和 8.64%,这与吴彦庆等^[33]对芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.) CHI 蛋白二级结构的预测结果类似,表明不同物种来源的 CHI 蛋白在二级结构上可能具有一定的保守性。

上述研究结果显示:*IbCHI* 基因在不同品种甘薯的根、茎、茎尖、叶中均可表达,但相对表达量存在明显差异,说明 *IbCHI* 基因的表达具有组织特异性,这可能与甘薯不同部位类黄酮的积累和分布差异有关^[34]; *IbCHI* 基因的相对表达量在甘薯不同品种间也存在差异,与甘薯各品种的基因型不同有关,导致 *IbCHI* 基因的表达具有品种间的差异性。在干旱(质量体积分数 30%PEG6000)和盐(0.2 mol · L⁻¹ NaCl)条件下处理 0~24 h, *IbCHI* 基因的相对表达量总体上明显升高,说明该基因的表达与甘薯对非生物胁迫抗性的调控相关。在 *IbCHI* 基因启动子区的调控元件中包含多个逆境响应元件,这也佐证了该基因参与了对逆境胁迫的抵御过程。

植物的类黄酮代谢是一个复杂的生理过程,受到多种酶的综合调控。高等植物抵抗逆境的过程非常复杂,本研究仅对甘薯品种‘福莱薯 7-6’ *IbCHI* 基因进行了克隆和生物信息学分析,但 *IbCHI* 基因对甘薯体内类黄酮代谢的作用机制尚待进一步研究,有关甘薯 *IbCHI* 基因表达与其抗逆性的关系还需从生理生化等方面进行深入研究。

参考文献:

- [1] 许蒙蒙,关二旗,卞科,等. 甘薯淀粉的理化特性、生产与应用[J]. 粮食与饲料工业, 2015(1): 23-27.
- [2] 杨海东,郭彦东,贺山峰. 甘薯营养成分和药用价值分析[J]. 河南农业, 2011(1): 49, 59.
- [3] 陈选阳,张招娟,郑佳伟,等. 水培对叶菜型甘薯茎尖营养品质与硝酸盐含量的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(17): 3736-3742.
- [4] 王福琴,侯夫云,秦桢,等. 甘薯耐非生物胁迫的分子生物学研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(1): 221-226.
- [5] JAAKOLA L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(9): 477-483.
- [6] LIN Y, JIANG L, CHEN Q, et al. Comparative transcriptome profiling analysis of red- and white-fleshed strawberry (*Fragaria × ananassa*) provides new insight into the regulation of the anthocyanin pathway[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(9): 1844-1859.
- [7] LI X, MA H, HUANG H, et al. Natural anthocyanins from phytoresources and their chemical researches[J]. Natural Product Research, 2013, 27(4/5): 456-469.
- [8] TANAKA Y, BRUGLIERA F. Metabolic engineering of flower color pathways using cytochromes P450[M]//YAMAZAKI H. Fifty Years of Cytochrome P450 Research. Tokyo: Springer, 2014: 207-229.
- [9] MANO H, OGASAWARA F, SATO K, et al. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato[J]. Plant Physiology, 2007, 143: 1252-1268.
- [10] ZHOU C, LU H, PISLARIU C, et al. From model to crop: functional analysis of a *STAY-GREEN* gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement[J]. Plant Physiology, 2011, 157: 1483-1496.
- [11] YOUNG N D, UDVARDI M. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12: 193-201.
- [12] DEAVOURS B E, DIXON R A. Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa[J]. Plant Physiology, 2005, 138: 2245-2259.
- [13] OH M M, TRICK H N, RAJASHEKAR C B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166: 180-191.
- [14] BOLAND M J, WONG E. Purification and kinetic properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean[J]. European Journal of Biochemistry, 1975, 50: 383-389.
- [15] MUIR S R, COLLINS G J, ROBINSON S, et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of 7 flavonols[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 470-474.
- [16] LI F-X, JIN Z-P, ZHAO D-X, et al. Overexpression of the

- Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 553–560.
- [17] KIM S, JONES R, YOO K S, et al. Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272: 411–419.
- [18] NISHIHARA M, NAKATSUKA T, YAMAMURA S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579: 6074–6078.
- [19] MA D, SUN D, WANG C, et al. Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 60–66.
- [20] WANG H, HU T, HUANG J, et al. The expression of *Milletia pinnata* chalcone isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* salt-sensitive mutants enhances salt-tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14: 8775–8786.
- [21] WATKINSON J I, HENDRICKS L, SIOSON A A, et al. Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles[J]. *Plant Science*, 2006, 171: 745–758.
- [22] 冯虎元, 安黎哲, 陈书燕, 等. 增强 UV-B 辐射与干旱复合处理对小麦幼苗生理特性的影响[J]. *生态学报*, 2002, 22(9): 1564–1568.
- [23] WALIA H, WILSON C, CONDAMINE P, et al. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 822–835.
- [24] WAHID A, GHAZANFAR A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163: 723–730.
- [25] 晏 校. 逆境胁迫对枳实生苗类黄酮组分含量及关键酶基因表达量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学园艺林学学院, 2011: 40–42.
- [26] 侯伶俐, 杨雄榜, 董雪妮, 等. 逆境胁迫对苦荞花期总黄酮含量及关键酶基因表达的影响[J]. *核农学报*, 2016, 30(1): 184–192.
- [27] 李晓旭, 郭 存, 刘 成, 等. 普通烟草 *NtNAC072* 基因的克隆、鉴定及表达模式分析[J]. *烟草科技*, 2019, 52(3): 10–17.
- [28] 张声祥, 施圆圆, 王晨凯, 等. 异叶天南星查尔酮合成酶和异构酶基因的克隆及蛋白的结构性质分析[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 1799–1807.
- [29] 王 蕊, 李彦慧, 郑 健. 紫丁香查尔酮异构酶基因 *SoCHI* 的克隆及表达分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2018, 27(3): 11–17.
- [30] LIU Y, ZHAO S, WANG J, et al. Molecular cloning, expression, and evolution analysis of type II *CHI* gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Development Genes and Evolution*, 2015, 225(1): 1–10.
- [31] 张水明, 涂佳丽, 阿不都热扎克·依沙克, 等. 桂花查尔酮异构酶 *OfCHI* 基因的克隆与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(9): 1728–1734.
- [32] 许本波, 谢伶俐, 李加纳, 等. 甘蓝型油菜 *BnCHI-1* 基因的克隆和表达特征分析[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(2): 142–149.
- [33] 吴彦庆, 赵大球, 王 静, 等. 芍药查尔酮异构酶基因 (*CHI*) 克隆、密码子偏好性分析以及蛋白结构功能预测[J]. *华北农学报*, 2016, 31(2): 71–80.
- [34] RALSTON L, SUBRAMANIAN S, MATSUNO M, et al. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137: 1375–1388.

(责任编辑: 郭严冬)

《植物资源与环境学报》启事

为了扩大科技期刊的信息交流、充分实现信息资源共享,《植物资源与环境学报》已先后加入“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据—数字化期刊群”和“中文科技期刊数据库”等网络文献资源数据库,凡在本刊发表的论文将编入数据库供上网交流、查阅及检索,作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另付。如作者不同意将文章收编入数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《植物资源与环境学报》编辑部目前仅接受网上投稿,投稿网址为 <http://zwzy.cnbg.net>; 投稿咨询电话: 025-84347014; E-mail: zwzybjb@163.com; QQ: 2219161478。