



低温促进毛竹叶片类黄酮合成及相关基因的表达模式分析

肖晓燕, 朱成磊, 杨克彬, 刘燕, 李紫阳, 郭栋, 高志民

引用本文:

肖晓燕,朱成磊,杨克彬,刘燕,李紫阳,郭栋,高志民. 低温促进毛竹叶片类黄酮合成及相关基因的表达模式分析[J]. [热带亚热带植物学报](#), 2024, 32(1): 101-110.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4717>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[不同成熟度树葡萄叶片中类黄酮合成转录组基因分析](#)

Transcriptome Analysis of Flavonoid Synthesis Related Genes in Different Maturity Leaves of *Myrciaria cauliflora*
[热带亚热带植物学报](#). 2019, 27(6): 702-712 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4040>

[毛竹APX家族基因鉴定和表达分析](#)

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*
[热带亚热带植物学报](#). 2020, 28(3): 255-264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

[UV-B预处理诱导拟南芥耐旱性的提高](#)

UV-B-induced Drought Tolerance Improvement in *Arabidopsis thaliana*
[热带亚热带植物学报](#). 2020, 28(2): 171-176 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4104>

[UV-B辐射诱导芒果叶片抗氧化响应研究](#)

[热带亚热带植物学报](#). 2020, 28(1): 70-77 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4079>

[铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析](#)

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*
[热带亚热带植物学报](#). 2021, 29(3): 301-310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

[向下翻页，浏览PDF全文](#)

低温促进毛竹叶片类黄酮合成及相关基因的表达模式分析

肖晓燕, 朱成磊, 杨克彬, 刘燕, 李紫阳, 郭栋, 高志民*

(国际竹藤中心竹藤资源基因科学与产业化研究所, 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: 类黄酮在植物耐低温胁迫方面发挥着重要作用, 为揭示低温对毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶片中类黄酮合成的影响, 采用分光光度法测定了不同生长时期和低温胁迫下毛竹幼苗叶片中的类黄酮含量, 通过生物信息学方法对毛竹类黄酮早期生物合成关键酶基因进行了鉴定, 并用 qPCR 方法分析了其表达模式。结果表明, 随着叶片的生长, 类黄酮含量呈现先升高后降低的趋势, 而低温下, 功能叶片中类黄酮含量则呈现上调趋势, 且在 8 h 时达极显著水平。在毛竹基因组中鉴定了类黄酮早期生物合成 3 个酶基因家族共 29 个成员, 包括 20 个查尔酮合酶基因(*PeCHSs*)、8 个查尔酮异构酶基因(*PeCHIs*)和 1 个黄酮-3-羟化酶基因(*PeF3HI*), 这些基因的启动子中均含有响应低温及其他非生物胁迫的调控元件。*PeCHSs* 倾向在根和叶中表达, 而 *PeCHIs* 为组成型表达。在不同生长时期的叶片中, 仅 *PeCHS1* 表达与类黄酮的含量变化趋势一致; 而低温胁迫下, 3 个 *PeCHSs*、2 个 *PeCHIs* 和 *PeF3HI* 在功能叶片中呈上调表达, 与类黄酮含量变化趋势一致。因此, 毛竹可能通过提高类黄酮早期生物合成酶基因的表达量促进类黄酮的合成来响应低温胁迫。

关键词: 毛竹; 类黄酮; 分子特征; 低温胁迫; 基因表达

doi: 10.11926/jtsb.4717

Low Temperature Promotes Flavonoid Synthesis and Expression Pattern Analysis of the Related Genes in Leaves of *Phyllostachys edulis*

XIAO Xiaoyan, ZHU Chenglei, YANG Kebin, LIU Yan, LI Ziyang, GUO Dong, GAO Zhimin*

(Institute of Gene Science and Industrialization for Bamboo and Rattan Resources, International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration/Beijing for Bamboo & Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China)

Abstract: Flavonoids play an important role in plant resistance to low temperature stress. To reveal the effects of low temperature on flavonoid synthesis in leaves of *Phyllostachys edulis*, the content of flavonoid in leaves of bamboo seedlings at different growth stages and under low temperature stress was determined by spectrophotometric method, the key enzyme genes of early biosynthesis of flavonoid in bamboo were identified by bioinformatics methods and their expression patterns were analyzed using qPCR. The results showed that the flavonoid content increased at first and then decreased, while that in the functional leaves increased under low temperature and reached significant level at 8 hours. There were a total of 29 members, belonging to three gene families, involved in early biosynthesis of flavonoid in *P. edulis*, including 20 chalcone synthase genes (*PeCHSs*), eight chalcone isomerase genes (*PeCHIs*) and one flavanone-3-hydroxylase gene (*PeF3HI*), the promoters of these genes all contained regulatory elements in response to low temperature and other abiotic stress responses. The *PeCHSs* tended to be expressed in roots and leaves, while *PeCHIs* expressed constitutively. Only the expression

收稿日期: 2022-08-16 接受日期: 2022-10-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2200502)资助

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2021YFD2200502).

作者简介: 肖晓燕(1996年生), 女, 硕士研究生, 研究方向为毛竹生长发育的分子基础研究。E-mail: xiaoxiaoyan@icbr.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

trend of *PeCHS1* was consistent with the content of flavonoid in *P. edulis* leaves at different growth stages, while six key enzyme genes (3 *PeCHSs*, 2 *PeCHIs* and *PeF3H1*) were upregulated continuously in functional leaves under low temperature, which was consistent with the change trend of flavonoid content. Therefore, *Phyllostachys edulis* might respond to low temperature stress by increasing the expression of genes involved in early biosynthesis of flavonoid.

Key words: *Phyllostachys edulis*; Flavonoid; Molecular characteristics; Low temperature stress; Gene expression

温度影响植物的生长发育, 低温胁迫是植物生长发育中最关键的非生物胁迫之一。低温会直接影响植物的光合系统, 使植物的生长发育受到抑制, 产生冻害和冷害^[1], 严重时甚至死亡。叶片是植物最重要的光合器官, 同时也是感知外界环境变化较为敏感的器官, 能够及时对低温环境做出响应。随温度降低, 冬油菜(*Brassica rapa*)的叶面积、气孔导度、光合速率、蒸腾速率等均逐渐下降^[2]。在低温下, 菠菜(*Spinacia oleracea*)叶片的类黄酮总量增加, 增强了植株的抗逆性并使糖分积累, 叶片中的类黄酮含量与抗寒性的强弱有显著相关性^[3]。枳(*Citrus trifoliata*)实生苗的根系和叶片中的黄酮的含量随着低温胁迫时间的延长而增加, 从而增强抗氧化胁迫的能力^[4]。因此, 类黄酮在植物应对低温胁迫方面发挥着重要作用。

类黄酮是植物中一类重要的次生代谢产物, 其生物合成途径前期需要查尔酮合酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)和黄烷酮-3-羟化酶(F3H)等 3 个酶家族, 后期需要二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS), 无色花青素还原酶(ANR)和花青素还原酶(LAR)等 4 个家族参与, 经过一系列反应生成不同种类的类黄酮^[5]。研究表明, 随茉莉花(*Brunfelsia acuminata*)花瓣的颜色变浅, *CHS* 的表达量降低^[6]; 通过沉默非洲菊(*Gerbera hybrida*)中的 *GCHS1*, 花瓣颜色由粉色变为纯白色^[7]; 通过过表达牡丹(*Paeonia suffruticosa*) *CHI* 可以改变烟草(*Nicotiana tabacum*)花瓣的着色^[8]。除了参与花色的形成, 类黄酮合成相关酶基因也参与响应逆境胁迫。低温胁迫下泡核桃(*Juglans sigillata*)中的 *CHS* 显著上调表达^[9]; 芹菜(*Apium graveolens*)叶柄中的 *CHI* 和 *CHS* 酶活性在低温下显著升高^[10]; 红花草莓(*Fragaria*×*Potentilla*) *CHI* 的表达会随着温度的升高而受到抑制^[11]; 低温下拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 *CHS*、*CHI* 和 *F3H* 显著上调, 诱导了花青素的积累^[12]。过表达番茄(*Lycopersicon esculentum*)的 *F3H* 能增强烟草的耐冷性^[13]。

竹子是重要的森林资源, 具有生长快速的特点, 其光合作用、初生增粗和笋的木质化等已开展了广泛研究^[14-16]。毛竹(*Phyllostachys edulis*)是我国栽培面积最大的竹种, 已从叶片组织结构、代谢组和转录组方面对其响应低温进行了分析, 找到了类黄酮代谢途径的差异表达基因^[17-18]。另外, 研究表明毛竹中 *PeCHS* 可能受不同激素的调控^[19]。对七彩红竹(*Indosasa hispida* ‘Rainbow’)的研究表明, *IhCHS1* 和 *IhCHI1* 在幼嫩红秆中显著表达^[20-21]。因此, 对竹子类黄酮代谢及其酶基因的研究尚不够深入。本研究以毛竹叶片为材料, 研究不同生长时期及低温胁迫条件下类黄酮含量的变化趋势, 通过生物信息学的方法鉴定毛竹类黄酮早期生物合成的酶基因, 明确其分子特征与系统进化关系, 并通过 qPCR 验证关键酶基因的表达模式, 以期为深入研究基因的功能提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

将毛竹(*Phyllostachys edulis*)种子播种于草炭:蛭石=3:2 的基质中, 置于约 25 °C 的人工气候室(光 16 h/暗 8 h, 相对湿度约 80%)中培养。选择株高和长势一致的 3 个月大小的毛竹实生苗, 一部分用于采集不同生长时期的叶片, 包括卷叶(S1)、半卷叶(S2)、展叶(S3)和老叶(S4); 另一部分随机分为 4 组, 每组 4 盆, 置于 4 °C 培养箱中模拟低温胁迫处理。根据叶片类黄酮的含量变化, 选择含量最高时期的叶片作为低温处理材料, 分别在低温处理 0 (对照)、4 和 8 h 后采集叶片, 液氮速冻后置于-80 °C 冰箱中用于后续实验。

1.2 类黄酮含量测定

类黄酮的基本结构是 A 和 C 环、B 和 C 环 2 个共轭体系, 用芦丁标准品绘制标准曲线。首先制备芦丁标准品母液(1.0 mg/mL), 用 60%乙醇稀释为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 共 5 个浓度梯度,

在 510 nm 处测定吸光值, 以芦丁浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法提取叶片类黄酮并测定吸光度后, 根据标准曲线计算类黄酮含量^[22]。类黄酮含量(mg/g FW) = $(\Delta A + 0.0049) \times V \div (1.6277 \times W) \times D$, 式中, V 为提取液体积(1.5 mL); W 为样品质量(g); D 为稀释倍数, 未稀释即为 1。

1.3 基因查找与生物信息学分析

利用毛竹最新基因组数据^[23], 以水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥的 3 个类黄酮生物合成酶家族(CHS、CHI 和 F3H)的基因序列为诱饵, 利用 TBtools v1.092 软件^[24]内置的 BLASN 和 BLASTX 进行同源序列比对, 阈值 $E < 10^{-20}$ 。基于 NCBI 的 CDD 在线软件进行保守结构域分析, 保留具有完整类黄酮早期生物合成酶基因保守结构域的序列。并对 3 个类黄酮早期生物合成酶基因家族成员命名。

利用 ProtParam (<http://web.Expasy.org/protparam/>) 对类黄酮早期生物合成酶的理化性质进行分析。运用 TBtools 软件以及毛竹基因组注释文件对毛竹类黄酮早期生物合成酶基因的结构进行分析; 使用 Plant-mPLOC server 在线软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)进行亚细胞定位的预测^[25]。使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.Psb.Ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对其启动子序列(2 000 bp)中所含调控元件进行分析预测^[26]。

为探究毛竹类黄酮合成酶基因的潜在功能及不同物种间的进化关系, 从 Phytozome V.12 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)获得水稻、拟南芥、玉米(*Zea mays*)和高粱(*Sorghum bicolor*)等物种类黄酮早期生物合成酶的氨基酸序列, 利用 MEGA 7.0, 基于 p-distance 模型采用邻接法对毛竹和其他物种的序列进行比对分析, 生成系统进化树^[27], 校验参数为 1 000 次重复, 氨基酸替换模型选用 No. of

differences^[28]。

1.4 组织表达模式分析

从 NCBI Short Read Archive 下载毛竹组织(鞭、笋、根、叶片、芽和鞘)的 26 个转录组数据(登录号: SRX2408703~SRX2408728)^[23], 筛选其中类黄酮早期合成酶基因的 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments), 并用 $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ 的值作为基因的表达量, 用 TBtools 软件进行表达谱热图绘制, 可视化分析各基因的表达情况。

1.5 叶片中的定量表达分析

选择关键的毛竹类黄酮早期生物合成酶基因, 根据其基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异定量引物(表 1)。用植物 RNA 提取试剂盒(天漠, TR205-50, 中国)提取 RNA, 用反转录试剂盒反转录为 cDNA (TaKaRa, RR037A, 日本)。qPCR 试验在 qTOWER2.2 系统上进行, 体系参照 Roche Light Cycler[®] 480 SYBR Green I Master kit 试剂盒(Roche, 4707516001, 德国), 扩增程序: 95 °C 预变性 10 min, 然后 95 °C 变性 10 s, 60 °C 解链 10 s, 40 个循环。选择 *PeTIP41* 作为内参基因^[29], 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[30]计算。

2 结果和分析

2.1 毛竹叶片中类黄酮含量的变化

用芦丁标准品建立标准曲线, 回归方程为 $y = 1.6277x - 0.0049$, 相关系数为 $R^2 = 0.9999$, 表明芦丁在一定的范围内具有良好的线性关系(图 1: A)。根据芦丁标准曲线, 分别得到不同生长时期和低温胁迫下毛竹叶片的类黄酮含量。在叶片的 4 个生长时期, 类黄酮的含量存在显著差异, 随叶片的生长呈先增加后降低的趋势, 且在 S3 时达到最高(图 1: B)。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in qPCR

基因 Gene	正向序列 Forward sequence (5'~3')	反向序列 Reverse sequence (5'~3')
<i>PeCHS1</i>	TTCCCCGACCTCTACTTCCG	GCTTCTTGATGCCCGATTCT
<i>PeCHS13</i>	TCGCTTGCTCCATGTACTCG	GGCGAGGCTGTACGACTTGA
<i>PeCHS16</i>	CTTCAGGATCACAAAAGCG	GAAGGATCTCCTCCGTCAGG
<i>PeCHI1</i>	TACCTAGAGGACGAGGCGGT	GCAGTTCTCGGTACCTTCC
<i>PeCHI3</i>	GTCTAAGTATGCTTCTGTCA	CGCAGACCAAGTGACTTCTCAA
<i>PeF3H1</i>	ACCAGGCTGTGGTGAACCTCC	CGGTACATCTCCGTGAACGT
<i>PeTIP41</i>	AAAATCATTGTAGGCCATTGTCC	ACTAAATTAAGCCAGCGGGAGTG

低温处理下毛竹 S3 叶片的类黄酮含量随胁迫时间的延长而增加, 在 8 h 时显著高于对照, 差异达极显著水平(图 1: C), 这表明毛竹叶片的生长时期和低温均会影响类黄酮含量。

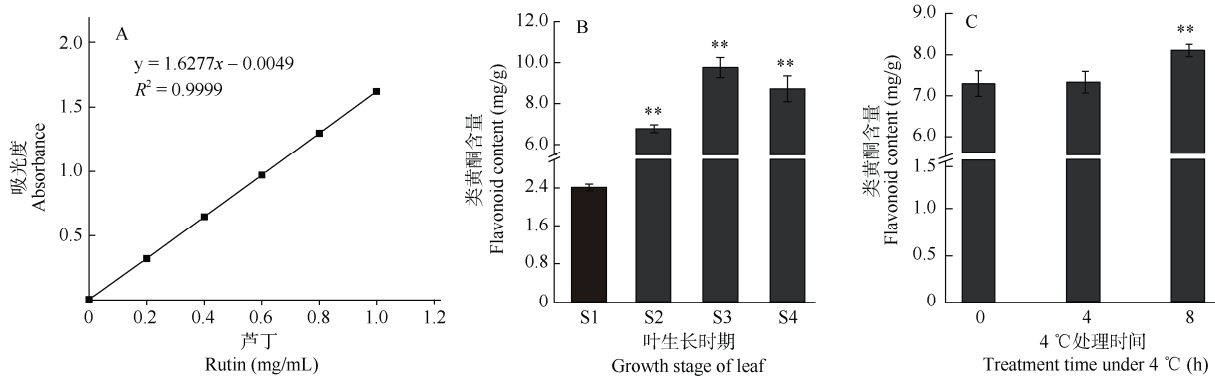


图 1 毛竹叶片的类黄酮含量。A: 芦丁标准曲线; B: 不同生长时期; C: 低温处理; S1: 卷叶期; S2: 半卷叶期; S3: 展叶期; S4: 老叶期; **: $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Flavonoid content in leaves of *Phyllostachys edulis*. A: Rutin standard curve; B: Different growth stages; C: Low temperature treatment; S1: Rolled leaf stage; S2: Half-rolled leaf stage; S3: Leaf-spreading stage; S4: Old leaf stage; **: $P < 0.01$.

2.2 类黄酮早期生物合成酶基因鉴定

毛竹叶片类黄酮的形成受到其生物合成酶基因表达的影响, 因此对毛竹中类黄酮早期生物合成酶基因进行了鉴定。经过在毛竹基因组数据库中比对分析, 共获得 29 个编码具有完整保守结构域的类黄酮早期生物合成酶的基因, 分别属于 CHS、CHI 和 F3H 家族, 分别命名为 *PeCHS1*~*PeCHS20*、*PeCHI1*~*PeCHI8* 和 *PeF3H1*。基因结构分析表明, 大部分 *PeCHSs* (14 个) 含有 1 个内含子, *PeCHS10* 的内含子数量最多(3 个), *PeCHS4*、*PeCHS5*、*PeCHS8*、*PeCHS14* 和 *PeCHS16* 均含有 2 个内含子; *PeCHIs* 内含子数量差异很大, 有 2~13 个, 其中 *PeCHI3* 最多(13 个), *PeCHI7* 最少(2 个), *PeF3H1* 有 2 个内含子(图 2)。

启动子序列分析结果表明, *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 的启动子序列中包含多种非生物胁迫响应元件, 如低温的 LTR、干旱的 MBS 和缺氧的 ARE 等(图 3: A)。*PeCHSs* 和 *PeCHIs* 的启动子中均有 STRE (逆境响应防御), 其中 *PeCHI4* 和 *PeCHI6* 的启动子最多(9 个); 多数 *PeCHSs* 和 *PeCHIs* 启动子中含有低温响应防御元件(MYB-like sequence)、逆境伤害相关(WUN-motif)和真菌诱导(W box)等; 4 个 *PeCHIs* 和 *PeF3H1* 的启动子中都含有低温响应元件(LTR); *PeCHSs* 和 *PeF3H1* 的启动子中均含有逆境响应防御元件(TC-rich repeats)。此外, 在这些序列中还鉴定到其他调控元件, 如 MYB 转录因子的结合元件, 与激素相关的响应元件等(图 3: B)。

这说明类黄酮早期生物合成基因的转录可能会受到低温及其他各种非生物胁迫的影响。

PeCHSs 编码蛋白长度为 368~461 aa, 分子量为 39.94~50.37 kDa, 理论等电点为 5.54~9.46, 亚细胞定位预测在叶绿体和细胞质中。*PeCHIs* 编码蛋白长度为 164~400 aa, 分子量为 18.75~44.92 kDa, 理论等电点为 4.83~9.26, 预测亚细胞定位均在叶绿体。*PeF3H1* 编码蛋白长度为 363 aa, 分子量为 40.23 kDa, 理论等电点为 5.38, 预测亚细胞定位在细胞质(表 2)。基因结构和蛋白理化性质的差异可能是导致基因功能不同的主要原因。

2.3 *PeCHSs* 和 *PeCHIs* 的系统进化

根据水稻中类黄酮早期生物合成 CHS 的分类构建, 毛竹 20 个 *PeCHSs* 聚类在 2 个组, 分别含有 2 个和 18 个成员, 其中分支 I 中 *PeCHS14* 和 *PeCHS16* 分别与已知功能的 *OsCHS24* 和 *OsCHS8* 高度同源, 推测它们可能具有合成查尔酮的功能(图 4: A); 分支 II 中 *PeCHSs* 与 *OsCHSs* 各成员存在不同程度的同源性, 但功能尚不确定。通过构建毛竹与其他物种 CHI 的进化分类, *PeCHIs* 在 Group I、Group III 和 Group IV 3 个组中(图 4: B), *PeCHI1* 和 *PeCHI5* 与 *ZmCHI* 聚类在 Group I 分支, 推测它们具有合成柚皮素的功能。在 F3H 的进化树中, 毛竹 *PeF3H1* 与水稻 *OsF3H* 同源性最高, 推测它们可能具有相似的功能。

2.4 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 的组织表达特性

组织表达分析在一定程度上能够验证基因的

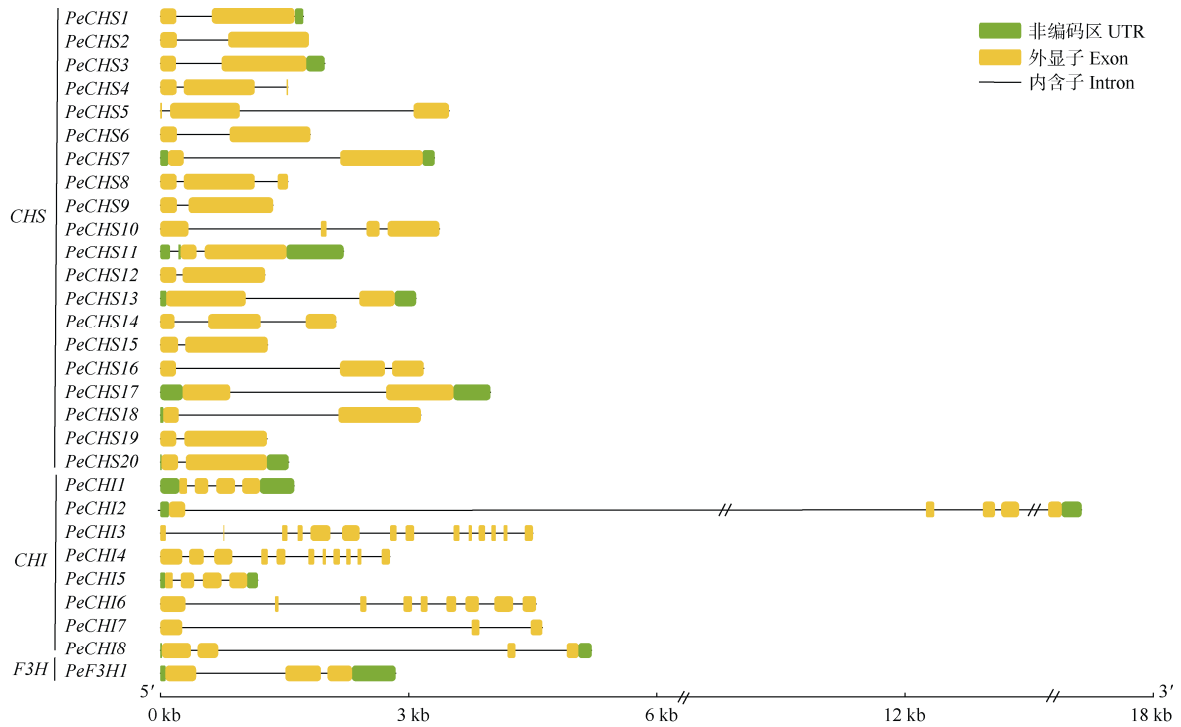


图 2 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 的基因结构

Fig. 2 Gene structure of *PeCHSs*, *PeCHIs* and *PeF3H1*

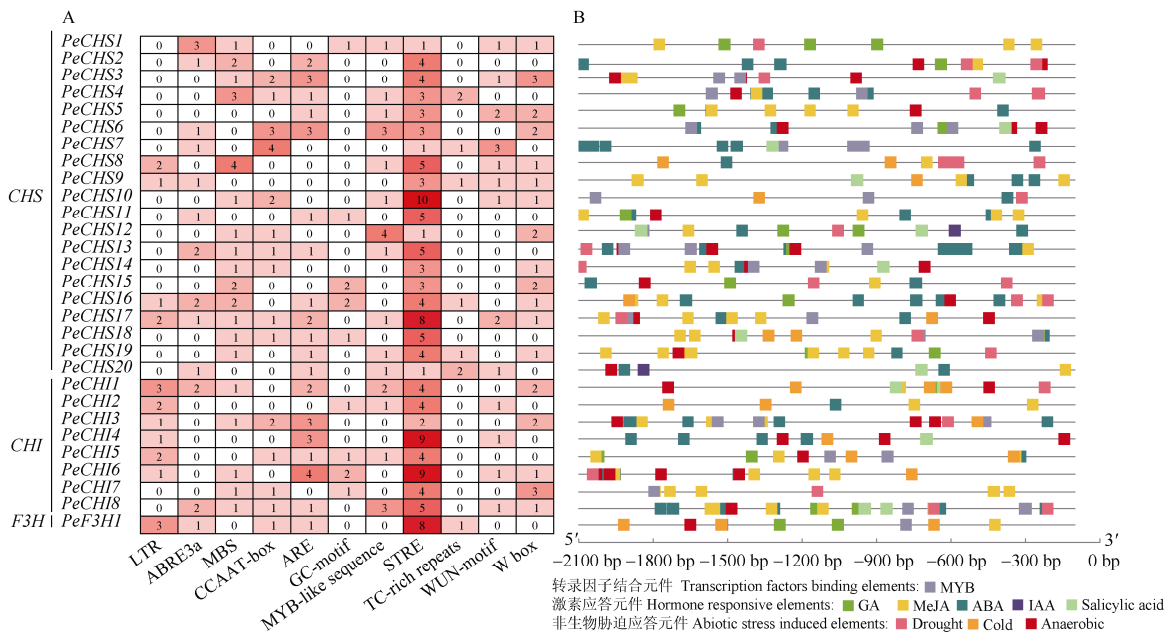


图 3 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 启动子中的顺式作用元件(A)和应答元件(B)

Fig. 3 Cis-acting elements (A) and responsive elements (B) in the promoters of *PeCHSs*, *PeCHIs* and *PeF3H1*

功能, 根据毛竹 26 个组织的转录组数据分析了类黄酮早期合成酶基因的转录水平。3 个基因家族各个成员在同一组织的不同生长时期以及不同组织中的表达模式存在差异(图 5)。PeCHSs 在毛竹的根、笋和叶的部分组织中能检测到表达, 更倾向在

根和叶中表达, 如 *PeCHS9*、*PeCHS10*、*PeCHS14* 和 *PeCHS20* 仅在叶中高表达, *PeCHS3*、*PeCHS4*、*PeCHS15* 和 *PeCHS18* 仅在根中高表达; 大部分 *PeCHSs* 基因在笋中(除 *PeCHS2* 和 *PeCHS16* 外)的表达水平较低; 而 *PeCHS6* 在 26 个组织中均没有

表 2 PeCHSs、PeCHIs 和 PeF3H1 的基本特征

Table 2 Basic characteristics of PeCHSs, PeCHIs and PeF3H1

家族 Family	蛋白 Protein	登录号 Accession No.	蛋白长度 (aa) Protein length	分子量 (kDa) Molecular weight	理论等电点 pI Theoretical pI	蛋白疏水性 GRAVY	亚细胞位置 Subcellular location
CHS	PeCHS1	PH02Gene01692	396	42.94	5.54	-0.096	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS2	PH02Gene11618	390	42.07	5.70	-0.031	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS3	PH02Gene13137	402	43.79	5.66	-0.055	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS4	PH02Gene24703	354	38.07	6.41	-0.096	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS5	PH02Gene27712	427	46.67	9.27	0.004	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS6	PH02Gene30447	390	42.31	6.08	-0.066	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS7	PH02Gene35700	393	42.01	5.89	0.036	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS8	PH02Gene37360	390	42.30	7.08	-0.068	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS9	PH02Gene38478	405	42.72	6.32	0.052	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS10	PH02Gene38479	393	41.97	9.00	-0.236	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS11	PH02Gene38613	391	42.17	5.70	0.001	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS12	PH02Gene38615	394	42.54	5.93	-0.004	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS13	PH02Gene40996	461	50.37	9.46	0.107	叶绿体/细胞质 Chloroplast/Cytoplasm
	PeCHS14	PH02Gene43021	388	42.21	5.72	-0.038	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS15	PH02Gene43281	402	43.27	6.38	-0.069	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS16	PH02Gene44458	368	39.94	6.10	-0.036	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS17	PH02Gene45959	460	51.17	9.30	-0.078	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS18	PH02Gene48527	393	41.95	6.02	0.040	细胞质 Cytoplasm
	PeCHS19	PH02Gene49028	394	42.54	5.93	-0.004	叶绿体 Chloroplast
	PeCHS20	PH02Gene50391	391	42.32	5.96	-0.017	叶绿体 Chloroplast
CHI	PeCHI1	PH02Gene06088	229	23.9	4.97	0.145	叶绿体 Chloroplast
	PeCHI2	PH02Gene30936	271	29.34	8.31	0.091	细胞膜/叶绿体 Cell membrane/Chloroplast
	PeCHI3	PH02Gene32385	400	44.50	7.06	-0.102	叶绿体 Chloroplast
	PeCHI4	PH02Gene35397	403	44.92	6.40	-0.182	叶绿体 Chloroplast
	PeCHI5	PH02Gene36286	229	24.05	4.83	0.230	叶绿体 Chloroplast
	PeCHI6	PH02Gene38403	418	46.87	7.21	-0.158	叶绿体 Chloroplast
	PeCHI7	PH02Gene41235	164	18.75	6.17	-0.330	细胞核 Nucleu
	PeCHI8	PH02Gene41236	275	29.61	9.26	-0.060	叶绿体 Chloroplast
F3H	PeF3H1	PH02Gene00407	363	40.23	5.38	-0.357	细胞质 Cytoplasm

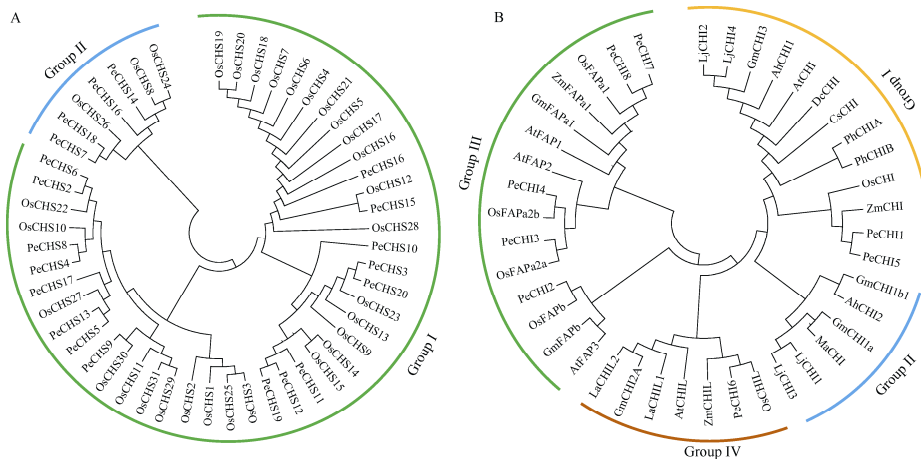


图 4 基于不同种植物的 CHS (A) 和 CHI (B) 家族成员构建的系统发育树。Pe: 毛竹; Os: 水稻; Zm: 玉米; At: 拟南芥; Gm: 大豆; La: 羽扇豆; Lj: 百脉根; Ma: 紫苜蓿; Ah: 落花生; Ph: 矮牵牛; Dc: 康乃馨; Cs: 茶树。

Fig. 4 Phylogenetic tree based on CHS (A) and CHI (B) family in different species. Pe: *Phyllostachys edulis*; Os: *Oryza sativa*; Zm: *Zea mays*; At: *Arabidopsis thaliana*; Gm: *Glycine max*; La: *Lupinus angustifolius*; Lj: *Lotus japonicus*; Ma: *Medicago sativa*; Ah: *Arachis hypogaea*; Ph: *Petunia hybrida*; Dc: *Dianthus caryophyllus*; Cs: *Camellia sinensis*.

检测到。*PeCHIs* (除 *PeCHI5* 和 *PeCHI7* 外)在各个组织中均有表达,它们可能与毛竹整个生长发育过程密切相关。*PeF3H1* 倾向在根和箨片中表达。

2.5 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 的定量分析

植物在不同生长时期和低温胁迫下的类黄酮含量会发生显著变化,以适应外界环境。根据系统进化、启动子元件和转录组数据分析,筛选获得 6 个代表基因(*PeCHS1*、*PeCHS13*、*PeCHS16*、*PeCHI1*、*PeCHI6* 和 *PeF3H1*)进行 qPCR 分析。结果表明,6 个基因随着叶片的生长表达量变化差异较大,其中 *PeCHS1* 呈现先升高后降低的趋势,与

类黄酮含量的趋势相同,在 S3 达到最高峰,表达量是 S1 的 687.7 倍;*PeCHS13*、*PeCHI1* 和 *PeF3H1* 的表达量显著下调;*PeCHS16* 呈现先下调后上调的表达趋势,在 S4 显著升高,是 S1 的 41.58 倍;而 *PeCHI6* 的表达则呈现波动变化的趋势,在 S2 和 S3 变化不显著,在 S4 时,其表达量显著上调,是 S1 的 4.57 倍(图 6: A)。经过低温胁迫后,这 6 个基因均呈现逐渐上升的表达趋势,且均在 8 h 达到峰值,与类黄酮含量表达趋势一致(图 6: B)。因此,推测他们在毛竹叶片中的类黄酮合成和抵御低温胁迫中发挥着关键作用。

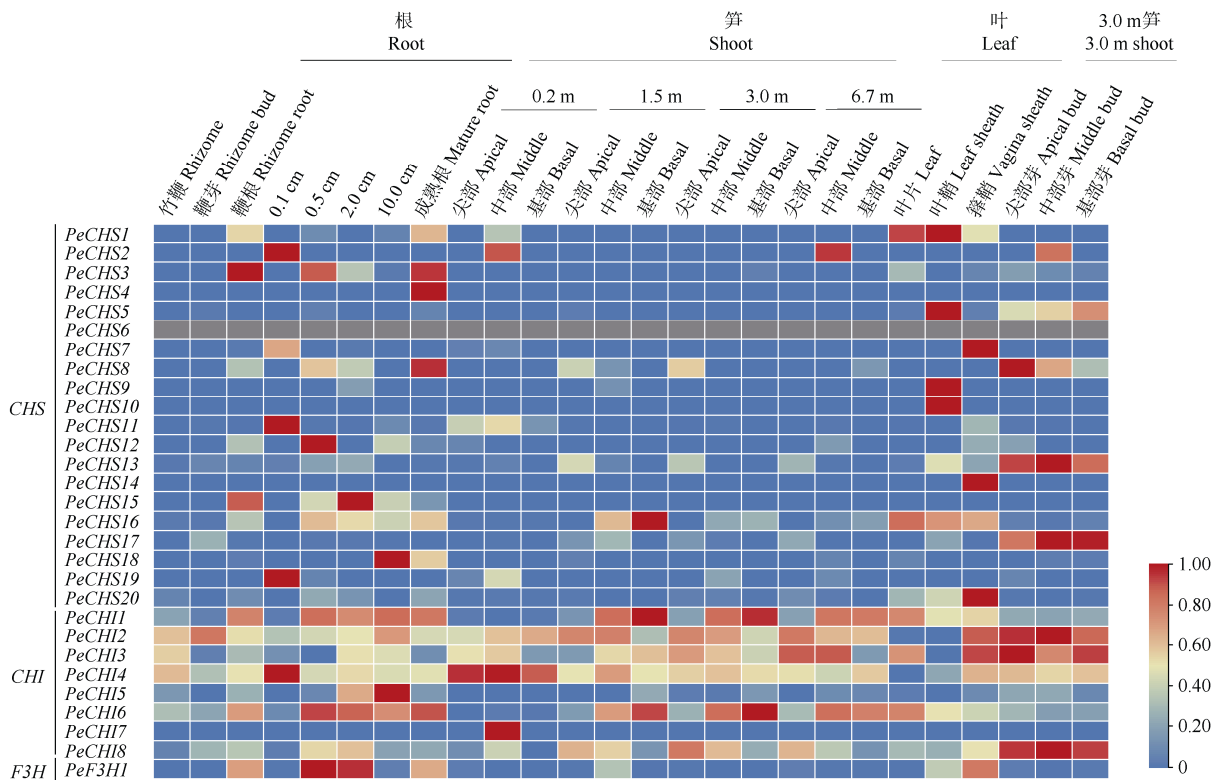


图 5 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3H1* 在毛竹 26 个组织中的表达模式

Fig. 5 Expression pattern of *PeCHSs*, *PeCHIs* and *PeF3H1* in twenty-six tissues of *Phyllostachys edulis*

3 结论和讨论

类黄酮化合物广泛存在于植物体内,是一类重要的次生代谢产物,在植物遭受低温、干旱等非生物胁迫时,类黄酮合成的相关基因被诱导表达,通过清除活性氧在植物的生长发育和逆境胁迫中发挥重要功能。毛竹广泛分布于我国长江流域及南方各省区,具有重要的经济价值,但是温度制约了毛竹生长和地理分布,尤其是冬季低温和冰冻雨雪灾

害的影响尤为严重。因此,提高毛竹抵御低温胁迫的能力是其育种的重要目标之一。本研究通过检测毛竹叶片中类黄酮含量,包括不同生长时期和 4 °C 低温处理下的功能叶片,发现类黄酮含量发生了明显变化,表明在毛竹生长发育和低温条件下类黄酮可能发挥着重要作用。通过分析类黄酮早期生物合成途径中涉及的酶基因家族成员发现,毛竹 CHS 家族成员与其它物种相似,不同分支的家族成员可能具有不同的功能。虽然 *PeCHS13* 和 *OsCHS27* 聚

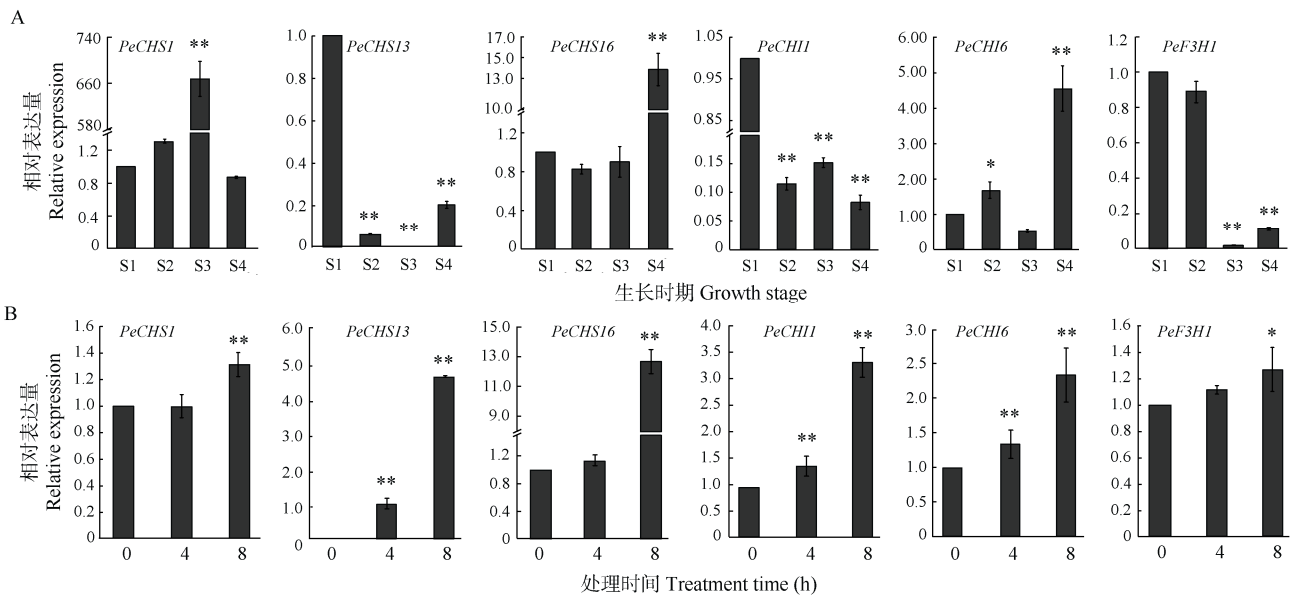


图 6 *PeCHSs*、*PeCHIs* 和 *PeF3HI* 在不同时期(A)和低温处理(B)叶片中的相对表达量。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Relative expression of *PeCHSs*, *PeCHIs* and *PeF3HI* in leaves at different growth stages (A) and under low temperature (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

类在一起,但水稻中 *OsCHS27* 缺乏 2 个保守的氨基酸而不具有催化合成类黄酮的功能^[31],因此 *PeCHSs* 的具体功能需要进一步研究。*PeCHIs* 家族的成员多于水稻和拟南芥,这与该家族基因发生过复制和扩张有关^[23]。Group I 中 *PeCHI1* 和 *PeCHI5* 与玉米和水稻中具有合成类黄酮功能的 *CHI* 在同一组; Group III 中的 *CHI* 属于脂肪酸结合蛋白(FAPs), *PeCHI2*、*PeCHI3*、*PeCHI4*、*PeCHI7* 和 *PeCHI8* 可能影响毛竹细胞中脂肪酸的生物合成及储存^[32]; Group IV 作为类黄酮产生的增强剂, *PeCHI6* 可能间接促进类黄酮的生物合成^[33]。*F3H* 家族在毛竹中只有 1 个基因,这与 *F3H* 以单拷贝形式存在,在进化上保守^[34]一致。

研究表明,类黄酮生物合成酶基因的表达具有发育时期特异性。在大豆中, *GmCHS1* 倾向于在绿叶中表达,而 *GmCHS2* 倾向于在子叶中表达^[35]。葡萄的 *CHI* 在幼叶、幼根、果实和种子中均有表达^[36]。银杏(*Ginkgo biloba*)叶片幼叶时期,虽然分生组织活跃,类黄酮合成快,但由于叶片自身的合成能力有限,因此类黄酮的含量较低;在展叶时期,叶片自身的合成能力强,类黄酮含量较高^[37]。在毛竹卷叶中的类黄酮含量最低,功能叶片中的最高,不同时期叶片中仅 *PeCHS1* 的表达与类黄酮含量一致,其它类黄酮早期生物合成基因的表达变化差异明显但没有规律, *PeCHS13* 和 *PeCHI1* 在卷叶时期表达量最高, *PeCHS16* 和 *PeCHI6* 在老叶时期表达量最

高,这可能与叶片处于不同生长时期以及类黄酮生物合成途径存在分支有关。

当受到低温胁迫时,植物体内通过上调表达类黄酮合成酶基因促进其积累来增强植物对低温的耐受性。对低温处理的桃树(*Prunus persica*)叶片进行转录组分析表明,类黄酮合成相关基因显著上调^[38];低温促进烟草叶片和苦荞麦(*Fagopyrum tataricum*)中类黄酮相关基因上调表达,从而提高类黄酮的含量^[39-40]。本研究对低温处理毛竹叶中类黄酮含量和基因表达的分析也获得了类似的结果,类黄酮含量及其合成酶基因(3 个 *PeCHSs*、2 个 *PeCHIs* 和 *PeF3HI*)的表达随着低温处理时间的延长而逐渐增加,且在 8 h 时达到峰值。然而,除 *PeCHS1* 外,其他类黄酮早期生物合成的关键酶基因在不同生长阶段叶片中的表达与类黄酮含量变化并不一致,其原因可能与叶片生长发育的复杂调控有关,有待于进一步研究。

本研究在毛竹中共鉴定到 3 个酶基因家族的 29 个成员,分别为 20 个查尔酮合酶基因(*PeCHSs*)、8 个查尔酮异构酶基因(*PeCHIs*)和 1 个黄酮-3-羟化酶基因(*PeF3HI*)。在基因结构、进化分析、理化性质、顺式作用元件和转录组数据等生物学分析的基础上,通过低温下叶片中类黄酮含量的变化和不同基因的表达差异,初步确定了 *PeCHS1*、*PeCHS13*、*PeCHS16*、*PeCHI1*、*PeCHI6* 和 *PeF3HI* 可能是毛竹类黄酮早期生物合成的关键酶基因,为进一步解

析类黄酮早期合成关键酶基因的功能和抗逆基因资源挖掘提供了参考依据。

参考文献

- [1] DING Y H, WANG M, XIE J, et al. Response to low temperature stress in plants and advances in research methods [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2019, 47(14): 31–36. [丁红映, 王明, 谢洁, 等. 植物低温胁迫响应及研究方法进展 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(14): 31–36. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.007.]
- [2] LI P, MA L, XU F, et al. Comparison of morphological and physiological responses of two different species of northern winter rapeseed before overwintering [J]. *Agric Res Arid Areas*, 2022, 40(5): 42–51. [李鹏, 马骊, 徐芳, 等. 越冬前北方不同类型强冬性冬油菜形态及生理响应研究 [J]. *干旱地区农业研究*, 2022, 40(5): 42–51. doi: 10.7606/j.issn.1000-7601.2022.05.05.]
- [3] WATANABE M, AYUGASE J. Effect of low temperature on flavonoids, oxygen radical absorbance capacity values and major components of winter sweet spinach (*Spinacia oleracea* L.) [J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(10): 2095–2104. doi: 10.1002/jsfa.6925.
- [4] YAN X. The effects of environmental stresses on the component and gene expression of flavonoids in *Trifoliate orange* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011. [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, 2011.]
- [5] XU W J, GRAIN D, BOBET S, et al. Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed [J]. *New Phytol*, 2014, 202(1): 132–144. doi: 10.1111/nph.12620.
- [6] LI M, CAO Y T, YE S R, et al. Isolation of *CHS* gene from *Brunfelsia acuminata* flowers and its regulation in anthocyanin biosynthesis [J]. *Molecules*, 2016, 22(1): 44. doi: 10.3390/molecules22010044.
- [7] HELARIUTTA Y, ELOMAA P, KOTILAINEN M, et al. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(1): 47–60. doi: 10.1007/BF00042037.
- [8] ZHOU L, WANG Y, REN L, et al. Overexpression of *Ps-CH11*, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2014, 116(3): 285–295. doi: 10.1007/s11240-013-0403-2.
- [9] WANG Y, XIAO L Y, MA T, et al. Cloning and functional analysis of chalcone synthase gene in cold-induced *Juglans sigillata* [J]. *Mol Plant Breed*, 2018, 16(2): 386–391. [王毅, 肖良俊, 马婷, 等. 低温诱导泡核桃中查尔酮合成酶基因克隆及功能分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(2): 386–391. doi: 10.13271/j.mpb.016.000386.]
- [10] ZHANG M. Effects of temperature, drought and UV-B irradiation time on celery growth and flavonoids accumulation [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. [张萌. 温度、干旱和UV-B照射时间对芹菜生长及黄酮类物质积累的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.]
- [11] LIANG J C. Response of flower color to temperature and analysis of flower color related gene expression in red-flowered strawberry [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018. [梁吉昌. 红花草莓花色对温度的响应及花色相关基因表达分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.]
- [12] ZHANG Y Q, ZHENG S, LIU Z J, et al. Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168(4): 367–374. doi: 10.1016/j.jplph.2010.07.025.
- [13] JIA H F, JIU S, ZHANG C, et al. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(10): 2045–2065. doi: 10.1111/pbi.12563.
- [14] ZHAO H S, LOU Y F, SUN H Y, et al. Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Phyllostachys edulis* in response to high light [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 34. doi: 10.1186/s12870-016-0720-9.
- [15] WEI Q, JIAO C, GUO L, et al. Exploring key cellular processes and candidate genes regulating the primary thickening growth of moso underground shoots [J]. *New Phytol*, 2017, 214(1): 81–96. doi: 10.1111/nph.14284.
- [16] YANG K B, LI L C, LOU Y F, et al. A regulatory network driving shoot lignification in rapidly growing bamboo [J]. *Plant Physiol*, 2021, 187(2): 900–916. doi: 10.1093/plphys/kiab289.
- [17] WANG H Y, GUO L, ZHA R F, et al. Histological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of cold acclimation of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaf [J]. *Tree Physiol*, 2022, 20: tpac064. doi: 10.1093/treephys/tpac064.
- [18] HUANG Z, ZHU P L, ZHONG X J, et al. Transcriptome analysis of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) reveals candidate genes involved in response to dehydration and cold stresses [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 960302. doi: 10.3389/fpls.2022.960302.
- [19] ZHANG N, BAO H, CUI B L, et al. Genomic analysis of chalcone synthase gene family of *Phyllostachys edulis* [J]. *Mol Plant Breed*, 2022, 20(3): 817–825. [章妮, 暴涵, 崔博亮, 等. 毛竹查尔酮合成酶基因家族全基因组分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(3): 817–825. doi: 10.13271/j.mpb.020.000817.]

- [20] ZHOU X, WANG C C, BI W, et al. Cloning and sequence analysis of chalcone synthase gene *IhCHS1* from *Indosasa hispida* cv. Rainbow [J]. *J Bamboo Res*, 2014, 33(3): 11–16. [周旭, 王晨晨, 毕玮, 等. 七彩红竹查尔酮合成酶 *IhCHS1* 基因的克隆与分析 [J]. *竹子研究汇刊*, 2014, 33(3): 11–16. doi: 10.3969/j.issn.1000-6567.2014.03.002.]
- [21] WANG C C, BI W, WANG J, et al. Cloning and expression analysis of *IhCHI1* from *Indosasa hispida* cv. Rainbow [J]. *J W China For Sci*, 2014, 43(2): 85–90. [王晨晨, 毕玮, 王娟, 等. 七彩红竹查尔酮异构酶基因 *IhCHI1* 的克隆与表达分析 [J]. *西部林业科学*, 2014, 43(2): 85–90. doi: 10.16473/j.cnki.xbykx1972.2014.02.018.]
- [22] XIA G H, LI X H, WANG X Y. Effect of different processing on the antioxidant activity of flavonoids from *Polygonatum odoratum* [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(3): 181–185. [夏光辉, 李新华, 王晓雅. 不同加工处理对玉竹黄酮抗氧化活性的影响研究 [J]. *食品科技*, 2018, 43(3): 181–185. doi: 10.13684/j.cnki.spkj.2018.03.034.]
- [23] PENG Z H, LU Y, LI L B, et al. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 456–461. doi: 10.1038/ng.2569.
- [24] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202. doi: 10.1016/j.molp.2020.06.009.
- [25] CHOU K C, SHEN H B. Cell-PLoc 2.0: An improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms [J]. *Nat Sci*, 2010, 2(10): 1090–1103. doi: 10.4236/ns.2010.210136.
- [26] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucl Acids Res*, 2002, 30(1): 325–327. doi: 10.1093/nar/30.1.325.
- [27] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- [28] JONES D T, TAYLOR W R, THORNTON J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences [J]. *Comput Appl Biosci*, 1992, 8(3): 275–282. doi: 10.1093/bioinformatics/8.3.275.
- [29] FAN C J, MA J M, GUO Q R, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56573. doi: 10.1371/journal.pone.0056573.
- [30] 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. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [31] PARK H L, YOO Y, BHOO S H, et al. Two chalcone synthase isozymes participate redundantly in UV-induced sakuranetin synthesis in rice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3777. doi: 10.3390/ijms21113777.
- [32] NGAKI M N, LOUIE G V, PHILIPPE R N, et al. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis [J]. *Nature*, 2012, 485(7399): 530–533. doi: 10.1038/nature11009.
- [33] MORITA Y, TAKAGI K, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation [J]. *Plant J*, 2014, 78(2): 294–304. doi: 10.1111/tpj.12469.
- [34] PELLETIER M K, SHIRLEY B W. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings: Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(1): 339–345. doi: 10.1104/pp.111.1.339.
- [35] ANGURAJ VADIVEL A K, KRYSIAK K, TIAN G, et al. Genome-wide identification and localization of chalcone synthase family in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) [J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 325. doi: 10.1186/s12870-018-1569-x.
- [36] ZHOU J, YAO Q H, PENG R H, et al. Cloning and expression analysis of *CHI* of *Kyoho* grape by semi-quantity RT-PCR [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2009, 29(9): 1723–1729. [周军, 姚泉洪, 彭日荷, 等. 巨峰葡萄查尔酮异构酶基因克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29(9): 1723–1729. doi: 10.3321/j.issn:1000-4025.2009.09.001.]
- [37] VOGT T, GUL P G. Accumulation of flavonoids during leaf development in *Cistus laurifolius* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 591–597. doi: 10.1016/S0031-9422(00)89780-0.
- [38] ZHOU P, LIN Z K, GUO R, et al. Effects of low temperature treatment on gene expression and flavonoids biosynthesis metabolism in peach (*Prunus persica*) leaves [J]. *J Agric Biotechnol*, 2021, 29(7): 1283–1294. [周平, 林志楷, 郭瑞, 等. 低温处理对桃树叶片基因表达及类黄酮合成代谢的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(7): 1283–1294. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2021.07.005.]
- [39] ZHANG G, PANG T, WANG S S, et al. Regulation of different growth temperatures on flavonoids content and their metabolic pathways in tobacco leaves [J]. *Genom Appl Biol*, 2016, 35(12): 3527–3537. [张刚, 逢涛, 王莎莎, 等. 不同生长温度对烟草叶片黄酮类化合物含量及其代谢途径的调控 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(12): 3527–3537. doi: 10.13417/j.gab.035.003527.]
- [40] SONG Y J, FENG J C, LIU D M, et al. Different phenylalanine pathway responses to cold stress based on metabolomics and transcriptomics in tartary buckwheat landraces [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(2): 687–698. doi: 10.1021/acs.jafc.1c06915.