

红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族鉴定与表达分析

马鑫彤, 朱枚桦, 王 南, 张馨月, 张庆宇, 王宇菲, 侯钰莹,
李志凌, 姚 娜*, 刘秀明*

(吉林农业大学生命科学院, 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要: 黄烷酮 3-羟化酶 (F3H)、黄酮醇合成酶 (FLS) 和花青素合成酶 (ANS) 是植物 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-*ODD*) 超级家族中的成员, 在植物类黄酮生物合成途径中起着重要的作用。本研究利用生物信息学的方法, 从红花基因组数据库中共筛选鉴定 16 个类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 基因, 这些基因编码蛋白的长度为 283 (*CtFLS2*)~442 aa (*CtANS6*), 分子质量为 32 062.05 (*CtFLS2*)~48 245.49 Da (*CtANS6*), 其编码蛋白均为亲水性蛋白。系统进化将其分为 3 个亚家族, 保守基序分析发现该家族成员均含有 H-x-D-xn-H 和 R-x-S 两个保守残基, 对上游 2 000 bp 区域顺式作用元件分析显示该家族基因受到光、温度等环境因素及水杨酸、茉莉酸甲酯等植物激素的调控, 利用 qRT-PCR 技术揭示了红花类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 家族基因成员在红花不同花期及叶片中的差异表达。本研究可为深入挖掘红花类黄酮生物合成途径上的 2-*ODD* 基因的功能奠定基础。

关键词: 红花; 类黄酮; 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)10-2858-09

Identification and expression analysis of 2-*ODD* gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower

MA Xin-tong, ZHU Mei-hua, WANG Nan, ZHANG Xin-yue, ZHANG Qing-yu, WANG Yu-fei,
HOU Yu-ying, LI Zhi-ling, YAO Na*, LIU Xiu-ming*

(Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Flavanone 3-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS) and anthocyanin synthase (ANS) are members of the 2-oxoglutarate-dependent oxygenase (2-*ODD*) superfamily, which play important functions in plant flavonoid biosynthesis. In this study, 16 2-*ODD* genes involved in flavonoid biosynthesis pathway were screened and identified from safflower genome database using bioinformatics method. The length of the proteins encoded by these genes ranged from 283 (*CtFLS2*) to 442 aa (*CtANS6*), and the molecular weight ranged from 32 062.05 (*CtFLS2*) to 48 245.49 Da (*CtANS6*). The proteins encoded by these genes were hydrophilic. Phylogeny divided it into three subfamilies, two conserved residues, H-x-D-xn-H and R-x-S, were found in this gene family using conserved motifs analysis, the analysis of *cis*-acting elements in the upstream 2 000 bp region showed that these genes might be regulated by environmental factors such as light, temperature and plant hormones such as salicylic acid, methyl jasmonate and so on. The members of the safflower 2-*ODD* gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway were analyzed by qRT-PCR, the result showed that the expression patterns of these

收稿日期: 2021-04-27; 修回日期: 2021-06-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771868); 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20190201172JC, 20190201175JC, 20150623024TC-11); 吉林农业大学大学生创新创业训练计划项目.

*通讯作者 Tel: 13174456545, E-mail: xiuming1211@163.com;

Tel: 18643129718, E-mail: yaona1103@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0633

members were different in diverse flowering period and leaf. This study can lay a foundation for further exploring the function of 2-ODD genes involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower.

Key words: safflower; flavonoids; 2-oxoglutarate-dependent oxygenase; bioinformatics; expression analysis

红花 (*Carthamus tinctorius* L.), 为1年生菊科红花属草本植物, 是我国传统的中草药, 具有活血通经、祛瘀止痛之功效, 近年来, 红花也是一种新型油用和工业资源植物^[1,2]。黄酮类化合物是红花中最主要的化学成分, 广泛存在于自然界各种植物中, 具有抗菌、杀菌和抗氧化的作用^[3,4]。文献报道称目前有大约10 000种不同的黄酮类化合物已经被分离鉴定, 这些不同的黄酮类化合物主要分为黄酮醇类、二氢黄酮醇类、异黄酮类、查耳酮类、黄烷醇类和花青素类^[5,6]。其中黄酮醇类和花青素类是两类研究较多的黄酮类化合物, 对植物自身的生长发育起着重要的作用, 例如, 黄酮醇类化合物在植物生长素运输调控方面, 抗紫外线方面都起着关键作用^[7], 花青素是高等植物花发育及花色形成的一类重要的黄酮类化合物。

对于植物中黄酮类化合物的生物合成途径目前已被阐述的较为清楚, 黄酮醇和花青素的形成处于类黄酮生物合成途径的两个分支上, 其中二氢黄酮醇是一个重要的中间代谢产物, 由黄烷酮3-羟化酶 (flavanone-3-hydroxylase, F3H) 通过催化黄烷酮所生成。黄酮醇合成酶 (flavonol synthase, FLS) 和二氢黄酮醇4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 共同竞争二氢黄酮醇这一底物, 分别生成黄酮醇和无色花青素, 无色花青素再由花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 催化生成有色的花色苷。其中, F3H、FLS和ANS基因均属于植物2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-oxoglutarate-dependent oxygenase, 2-ODD) 超级家族中的成员, 在植物类黄酮生物合成通路中属于该家族成员的还有黄酮合成酶I (FNSI) 基因, 该基因是伞形科物种中一类特有的酶类, 通过F3H基因复制而来, 与F3H基因具有高度的结构相似性^[8,9]。2-酮戊二酸依赖性双加氧酶超级家族是植物基因组中第二大酶家族, 基于氨基酸序列相似性将该基因家族中的成员分为三大类: DOXA、DOXB和DOXC, 其中类黄酮生物合成通路上的2-ODD基因属于DOXC类, 按照系统进化树将其进一步划分, F3H和FNSI基因属于DOXC28, FLS和ANS基因属于DOXC47, FLS和ANS蛋白之间具有50%~60%的序列相似性, 而与F3H或FNSI蛋白之间的序列相似性低于35%^[9,10]。

目前对植物类黄酮生物合成通路中的2-ODD家族基因的功能研究较多, Hammerbacher等^[11]在云杉中

鉴定出1个PaF3H基因, 发现该基因所编码的酶可以催化圣草酚转化成紫杉叶素, 以及云杉在受到真菌感染后PaF3H基因会被高度的表达, PaF3H基因在云杉防御化合物的生物合成中起着关键作用。Park等^[7]从水稻中分离得到OsFLS基因, 并发现OsFLS基因同时具有黄酮醇合成酶和黄烷酮3-羟化酶的活性, 是一个双功能酶, 将OsFLS基因转入烟草中, 发现转基因烟草的花瓣颜色要比野生型烟草的花瓣颜色浅, 说明OsFLS基因调控着花色。Li等^[12]从丹参中克隆了一个SmANS基因, 并通过亚细胞定位发现该蛋白在内质网、质体、高尔基体、质膜和细胞核中均有分布, 并且该基因在紫花丹参的花瓣中表达最高, 在白花丹参的花瓣中几乎不表达。虽然对植物类黄酮生物合成途径上2-ODD家族的基因有着较多的功能研究, 但对该通路上的2-ODD基因家族所有成员序列的挖掘分析鲜有相关的文献报道, 而基于红花基因组数据库对其类黄酮生物合成途径中的2-ODD基因家族成员的鉴定和分析未见有其文献报道。

本研究利用生物信息学的方法, 从红花基因组数据库中鉴定了红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD家族基因, 并分析了其理化性质、基因结构、系统进化、顺式作用元件等, 利用荧光定量PCR技术, 对鉴定出来的基因在红花的不同花期及叶片进行表达模式分析, 以期深入挖掘研究红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD家族基因的功能奠定基础。

材料与方法

材料 实验材料为红花, 种植于吉林农业大学红花试验田, 品种为“吉红一号”。于2020年7月份采取红花的幼嫩叶片及其花蕾期、初花期、盛花期和衰落期四个花期的花瓣, 用锡箔纸包好迅速放于液氮中冷冻保存, 随后放于实验室-80℃冰箱中保存备用, 用于后续的定量分析。

红花类黄酮生物合成通路2-ODD基因家族成员鉴定与理化性质分析 从本课题组保存的红花基因组数据库中调取红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD基因家族序列, 将其编码区序列利用DNAMAN软件中的翻译功能翻译成相应的氨基酸序列, 利用NCBI数据库中的CD-search和Pfam数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 对所得到的候选蛋白序列进行保守结构域的分

析, 去除不具有完整保守结构域的蛋白序列, 最终得到 16 条具有 2-*ODD* 基因家族保守结构域的蛋白序列。利用在线工具 Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族所编码的蛋白序列进行基本理化性质分析, 包括理论等电点、分子质量和不稳定系数等。利用在线工具 WOLF PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>) 和 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族所编码的蛋白进行亚细胞定位预测。

红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族系统进化分析 为了获得红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族中各成员的系统进化关系, 从 NCBI 数据库中下载了亚麻 FLS (AFN53718.1)、银杏 FLS (ACY00393.1)、水稻 FLS (BAD17324.1)、小麦 FLS (AHW49495.1)、玉米 FLS (NP_001140915.1)、高粱 FLS (EES07584.1)、拟南芥 FLS (NP_196481.1, NP_201163.1, NP_201164.1, NP_680463.1, NP_001032131.1, NP_680388.1)、可可树 FLS (EOY09743.1)、柑橘 FLS (XP_006485472.1, XP_006466183.1)、洋葱 FLS (AQR58516.1)、葡萄 FLS (BAE75807.1)、苜蓿 FLS (AES97739.1, AES71332.1)、大豆 FLS (NP_001237419.1)、海棠 FLS (AAX89401.1)、梨 FLS (ABB70118.1)、桃树 FLS (AJO70134.1)、佛手柑 FLS (ABH07784.1)、金鱼草 FLS (ABB53382.1)、洋桔梗 FLS (BAD34463.1)、马铃薯 FLS (CAA63092.1)、矮牵牛 FLS (CAA80264.1)、烟草 FLS (ABE28017.1)、向日葵 FLS (OTG15245.1)、高粱 ANS (XP_002451336.1)、玉米 ANS (NP_001106074.1)、水稻 ANS (CAA69252.1)、小麦 ANS (BAE98276.1)、洋葱 ANS (ABM66367.1, ABR24157.1)、紫苏 ANS (BAA20143.1)、彩叶草 ANS (ABP57079.1)、拟南芥 ANS (NP_194019.1)、大豆 ANS (AAR26525.1)、苜蓿 ANS (ABU40983.1)、梨 ANS (ABB70119.1)、海棠 ANS (AAD26205.1)、桃树 ANS (ABX89943.1)、佛手柑 ANS (AAU12369.1)、葡萄 ANS (NP_001268147.1)、可可树 ANS (ADD51355.1)、柑橘 ANS (NP_001275784.1)、洋桔梗 ANS (BAJ08929.2)、拟南芥 F3H (NP_190692.1)、苜蓿 F3H (ACR15123.1)、马铃薯 F3H (NP_001274930.1)、矮牵牛 F3H (AAC49929.1)、柑橘 F3H (BAA36553.1)、桃树 F3H (AQX36284.1)、烟草 F3H (AAC15414.1)、小麦 F3H (ABR13013.1)、玉米 F3H (AAA91227.1) 25 个物种中的 58 条类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 蛋白序列, 利用 MEGA-X 内置的 ClustalW 软件对以上蛋白质进行氨基酸多序列比对分析, 然后利用 MEGA-X 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, 重复次数设定为 1 000,

其他参数为系统默认值。使用 EvolView v.2 (<https://www.evolgenius.info/evolview-v2/#login>) 在线工具对进化树进行分类及注释。

红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族保守基序和基因结构分析 利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 在线软件, 对红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族所编码的蛋白质序列进行保守基序的分析, 搜索基序的数量为 10, 其余为默认值, 然后利用 TBtools 软件对其保守基序结合其系统进化树进行可视化作图。将红花类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 基因家族的 CDS 序列和其对应的转录本序列分别导入 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线网站中, 对其进行基因结构的分析。

红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族启动子顺式作用元件分析 提取红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 家族基因上游 2 000 bp 的核苷酸序列, 利用在线网站 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对获得的核苷酸序列进行顺式作用元件预测, 再利用 TBtools 软件对其进行可视化作图。

红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 家族基因表达模式分析 利用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂提取本研究所植物材料的总 RNA, 用 NanoDrop 2000 分光光度计检测所提取总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值和浓度以及用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。将符合要求的总 RNA 利用反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 说明书合成 cDNA, 其反转录产物 cDNA 总量定为 1 000 ng。以稀释 20 倍的 cDNA 为模板, *18srRNA* 为内参基因, 对红花类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 家族的基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 定量引物见表 1。qRT-PCR 的反应体系及反应条件参照莫纳公司的荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行, 利用 Agilent Mx3000P 荧光定量 PCR 仪进行反应。相对定量的计算采用 2^{-ΔΔC_t} 方法。

结果与分析

1 红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族成员鉴定

根据红花基因组数据库的注释结果, 初步注释到 29 个与红花类黄酮生物合成通路有关的 2-*ODD* 基因, 分别为黄烷酮 3-羟化酶基因 (*F3H*), 黄酮醇合成酶基因 (*FLS*) 和花青素合成酶基因 (*ANS*)。根据其相应的基因编号, 从基因组数据库中搜索得到对应的编码区序列, 再将其翻译成相应的氨基酸序列, 利用 pfam 和 NCBI CDD 进一步对这 29 个基因对应的蛋白质序列

Table 1 The qRT-PCR primers of 2-ODD gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower

Gene name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
<i>CtFLS1</i>	TTGAGGCAATGGCGAAATCG	ACCGACCTTGCAAAACATCC
<i>CtFLS2</i>	TAAACGACGTGGACGGTTTG	AAGCGTTTGAAGGAAGCTG
<i>CtFLS3</i>	GCAATGGAGCGTTCAAAGC	ACGCCAATGAAAACCGTTCC
<i>CtFLS4</i>	ACAACCTCCGCTGTCGATTG	ACCAAAAAACACGCCCCATTC
<i>CtFLS5</i>	TTGGCCAAATTAACCCGGTT	GGTTGCCAATACCACAAACGAT
<i>CtFLS6</i>	ACCATTGCTGCAAAGCCATG	TGGGATTGAAGGCAAAGTCG
<i>CtFLS7</i>	TCACCTTCCACGACTACGATTC	AGGCAACAGCGGATTAAGC
<i>CtFLS8</i>	TGGAATGGAACCCGAAACACT	GGTGCCAACCTAAACCTTGT
<i>CtANS1</i>	TTGGATGCCAGTTACACCAC	AGTTCACGGTTGCTCTATGC
<i>CtANS2</i>	ACAATGCTTGCAGCAACTC	TTGCTTTGCGTACTCTGCAG
<i>CtANS3</i>	ACGGGGTTTCACTTTTGGTG	GTTTCATTTCGTCGTCATTGCG
<i>CtANS4</i>	TGGAGACACCTTGGAGATTGTG	TTCGAGTTCACGGTTGCTC
<i>CtANS5</i>	GGAAACCAATGTGACAAGCCA	GGACGAACGTATCTGGATGGAG
<i>CtANS6</i>	AAGGTCGGATTAGGAAGCGAAG	TTCATCTAAGGTTGCCCCACC
<i>CtANS7</i>	TCGACAACGGAATGCAAGC	TGATCCCAACAGCATCCGA
<i>CtF3H</i>	ATTTGAGCAACGGCAGGTTT	TTCAACGGGTACACAATCGC
<i>18srRNA</i>	GAGAAACGGCTACCACATCCAA	TCGTTTGGAGCCCGTATTGTGA

进行保守结构域的分析, 去除不具有2-ODD保守结构域序列和不具有完整2-ODD保守结构域的序列, 最终得到红花类黄酮生物合成通路2-ODD家族相关基因共有16个, 分别命名为*CtFLS1*~*CtFLS8*、*CtANS1*~*CtANS7*和*CtF3H*(表2), 其中,*CtFLS1*和*CtF3H*基因在NCBI数据库中已有相关报道, 其登录号分别为AUH25685.1和AHY99670.1。

2 红花类黄酮生物合成通路2-ODD基因家族成员理化性质分析

通过ExPasy在线分析软件得到红花类黄酮生物合成通路2-ODD家族基因所编码蛋白的理化性质见表2。由表2可以看出红花类黄酮生物合成通路2-ODD家族基因的编码区长度为852(*CtFLS2*)~1 329 bp(*CtANS6*), 编码氨基酸的数量为283(*CtFLS2*)~442 aa(*CtANS6*), 蛋白的分子质量在32 062.05(*CtFLS2*)~48 245.49 Da(*CtANS6*)之间, 16个之中有15个2-ODD

蛋白的理论等电点在4.99(*CtANS4*)~6.21(*CtANS6*)之间, 为酸性蛋白, *CtANS7*的理论等电点为7.05, 属于中性蛋白。对16个Ct2ODD-IFB(Ct2ODD-involved in flavonoid biosynthesis)蛋白稳定系数的预测结果表明, 有7个不稳定系数大于40, 为不稳定蛋白, 剩余9个为稳定蛋白。预测结果显示红花类黄酮生物合成通路2-ODD蛋白的亲水性平均值均为负值, 表明Ct2ODD-IFB蛋白均为亲水性蛋白。利用WOLF PSORT和Cell-PLoc 2.0在线软件对红花类黄酮生物合成通路2-ODD基因家族成员进行亚细胞定位预测, 预测结果显示, 有12个Ct2ODD-IFB蛋白定位于细胞质, 占比75%。有2个预测定位于细胞核, 分别是*CtFLS7*和*CtFLS8*蛋白。*CtANS1*和*CtANS3*蛋白预测定位于叶绿体。

3 红花类黄酮生物合成通路2-ODD基因家族系统进化分析

为了研究红花类黄酮生物合成通路2-ODD基

Table 2 Information and characteristics of 2-ODD gene family involved in flavonoid biosynthesis in safflower

Gene name	Gene No.	CDS/bp	AA	MW/Da	PI	Instability index	GRAVY	Subcellular location
<i>CtFLS1</i>	CCG001867.1	1 038	345	39 310.77	5.54	44.08	-0.405	Cytoplasm
<i>CtFLS2</i>	CCG002574.1	852	283	32 062.05	5.57	46.69	-0.169	Cytoplasm
<i>CtFLS3</i>	CCG004371.1	1 146	381	42 539.30	5.76	33.32	-0.344	Cytoplasm
<i>CtFLS4</i>	CCG008793.1	1 188	395	44 376.83	5.28	31.78	-0.223	Cytoplasm
<i>CtFLS5</i>	CCG009125.1	933	310	35 446.54	5.39	32.88	-0.292	Cytoplasm
<i>CtFLS6</i>	CCG019723.1	1 083	360	41 011.45	5.67	35.71	-0.235	Cytoplasm
<i>CtFLS7</i>	CCG026271.1	1 110	369	42 043.74	5.18	37.31	-0.336	Nucleus
<i>CtFLS8</i>	CCG027375.1	1 092	363	40 399.55	5.43	39.90	-0.218	Nucleus
<i>CtANS1</i>	CCG002842.1	1 242	413	47 057.36	5.32	45.91	-0.277	Chloroplast
<i>CtANS2</i>	CCG005106.1	1 059	352	39 874.50	5.75	44.22	-0.414	Cytoplasm
<i>CtANS3</i>	CCG011007.1	1 074	357	40 673.89	5.32	42.14	-0.298	Chloroplast
<i>CtANS4</i>	CCG016255.1	990	329	37 581.32	4.99	39.15	-0.185	Cytoplasm
<i>CtANS5</i>	CCG025473.1	1 167	388	44 175.23	5.86	46.24	-0.185	Cytoplasm
<i>CtANS6</i>	CCG027374.4	1 329	442	48 245.49	6.21	45.00	-0.226	Cytoplasm
<i>CtANS7</i>	CCG031732.2	1 155	384	43 681.84	7.05	37.24	-0.216	Cytoplasm
<i>CtF3H</i>	CCG028827.1	1 086	361	40 817.41	5.57	36.41	-0.557	Cytoplasm

因家族的系统进化关系,在NCBI数据库中选取了拟南芥、向日葵、大豆等25个物种类黄酮生物合成通路上的58条2-ODD蛋白序列构建系统发育树。结果如图1所示,红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD家族被分成3个亚家族,其中, *CtF3H* 基因与其余物种中的 *F3H* 基因聚在一起,并且与烟草中的 *F3H* 基因有着较高的同源性, *CtANS2* 基因与其余物种中的 *ANS* 基因聚为一类,而其余的 *CtFLS* 基因和 *CtANS* 基因独自与亚麻中的 *FLS* 基因聚为一类。以上结果表明红花类黄酮生物合成通路上的大多数2-ODD基因与其余物种中该家族的基因有着比较远的亲缘关系。

4 红花类黄酮生物合成通路2-ODD基因家族保守基序和基因结构分析

利用MEME在线软件对红花类黄酮生物合成通路上的16个2-ODD蛋白进行保守基序的分析,保守基序鉴定的个数上限为10,分别命名为motif1~motif10。保守基序在每个Ct2ODD-IFB蛋白序列上的分布结果如图2A所示。图2A中结果显示,红花类黄酮生物合成通路所有2-ODD蛋白都具有motif4、motif5、motif1和motif2,其中motif1和motif2中分别包含与Fe²⁺离子结合的H-x-D-xn-H保守残基和与2-酮戊二酸结合的R-x-S保守残基,如图2B所示。除CtANS6和CtFLS5蛋白外,其余蛋白序列都包含motif3,除CtFLS2、CtANS6

蛋白序列不包含motif7, CtFLS5蛋白序列不包含motif6,其余蛋白序列均包含上述两个保守基序。并且上述保守基序(motif1~motif7)在每条蛋白序列上的分布位置、分布顺序和分布间隔都具有高度的一致性,由此推断这一部分红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD基因家族成员在某些生物学功能上具有相似性。此外,motif8、motif9和motif10这3个保守基序不均匀的分布在某些Ct2ODD-IFB蛋白序列中,表明红花类黄酮生物合成通路上的2-ODD蛋白在具有功能上的相似性外同样也具有功能差异性。

利用GSDS在线工具对红花类黄酮生物合成通路上的16条2-ODD基因家族成员进行基因结构分析,如图3结果显示,该家族成员基因长度介于1386(*CtFLS3*)~7731 bp(*CtANS7*)。基因的外显子与内含子研究发现,大多数*CtANS*基因的基因结构组成为5+4(外显子+内含子),*CtFLS*基因的基因结构组成比较分散,有3+2型(*CtFLS2*和*CtFLS5*)、4+3型(*CtFLS6*,*CtFLS8*和*CtFLS1*)、2+1型(*CtFLS3*和*CtFLS4*),*CtF3H*基因的基因结构组成为3+2型,此外,*CtFLS6*、*CtANS2*、*CtFLS1*和*CtFLS3*基因的上下游都具有不同长度的非编码区片段。以上研究结果表明,红花类黄酮生物合成通路2-ODD家族成员的基因结构较为多样,这预示该家族基因可能具有多种功能。

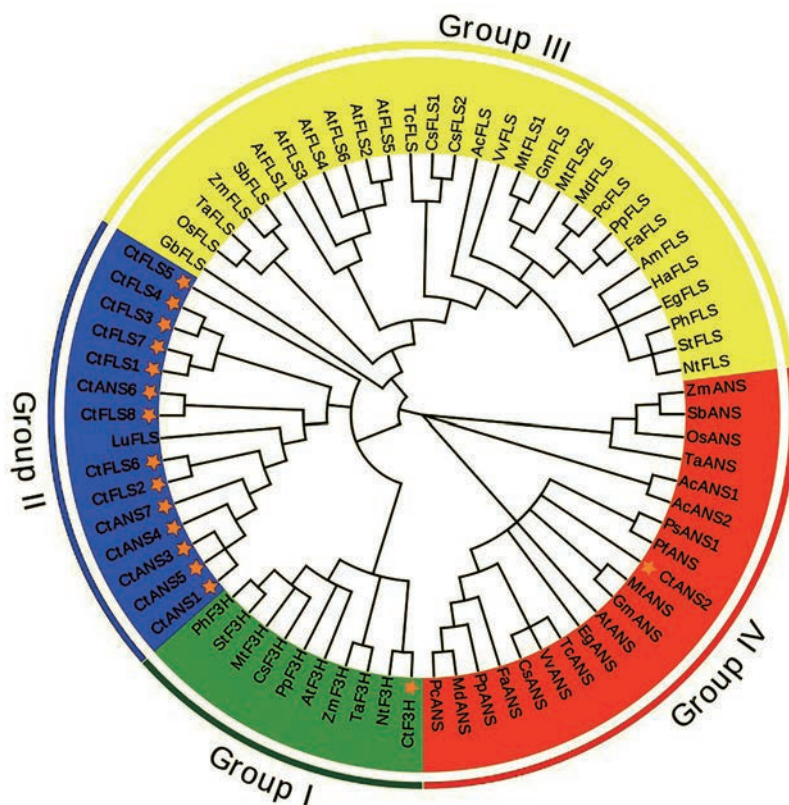


Figure 1 Phylogenetic analysis of 2-ODD gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower

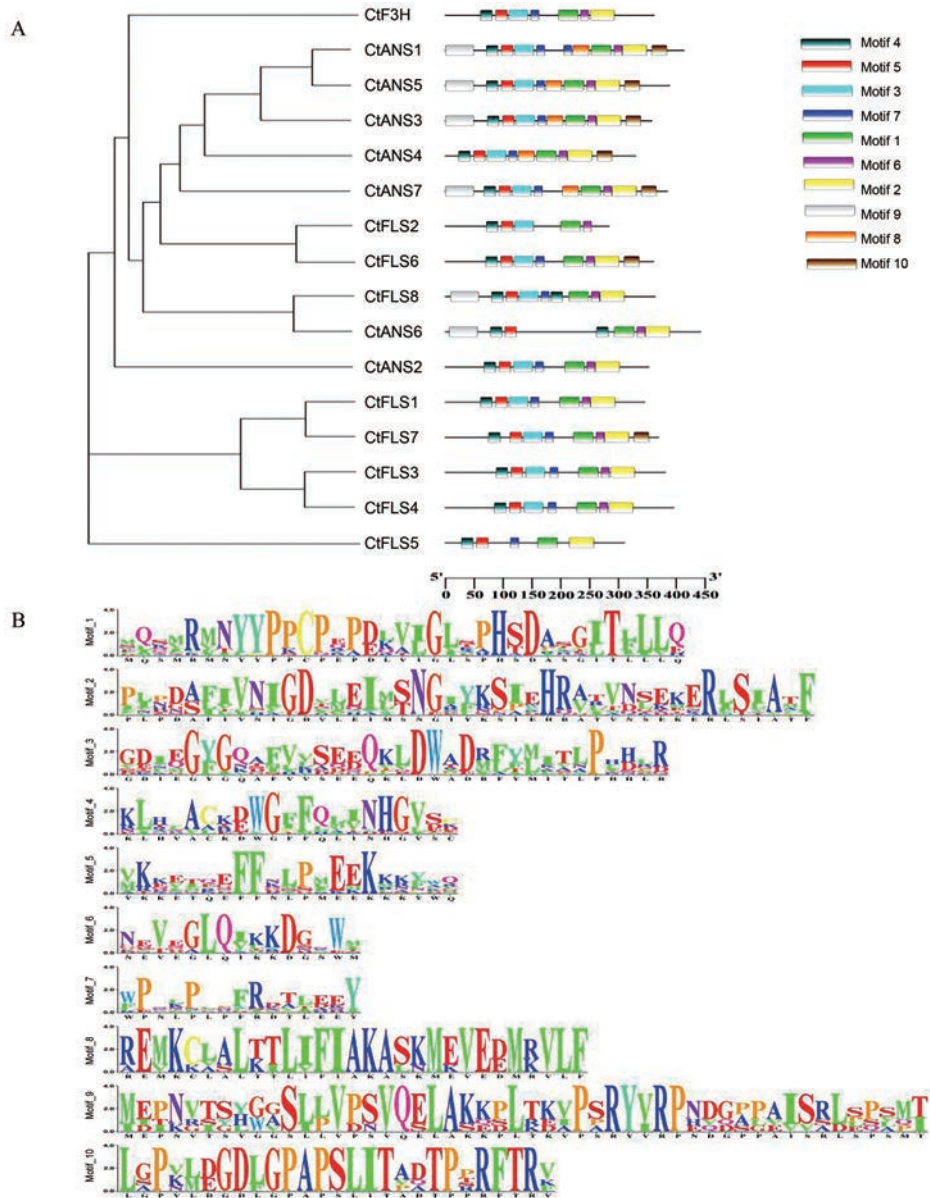


Figure 2 Conserved protein motifs of 2-ODD gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower. A: Conserved motifs distribution of Ct2ODDs-IFB protein; B: 10 conserved motif sequences of Ct2ODDs-IFB protein

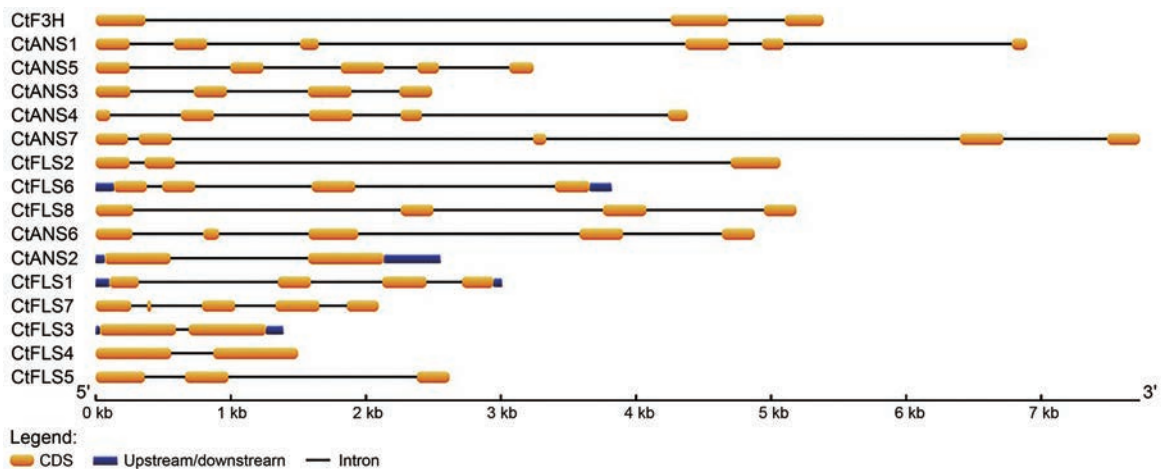


Figure 3 Gene structure of 2-ODD gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower

5 红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 基因家族启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 在线网站对红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 家族基因上游 2 000 bp 的启动子序列进行分析, 预测该家族基因的顺式作用元件。结果如图 4 所示, 红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 基因家族存在着不同种类的顺式作用元件, 如与光响应有关的元件 G-box, 与逆境胁迫相关的元件 LTR (响应低温)、TC-rich repeats (抗病和胁迫响应元件), 与植物激素调节相关的元件 TCA-element (水杨酸响应元件)、ABRE (脱落酸响应元件)、CGTCA-motif (茉莉酸甲酯诱导响应元件)、TGACG-motif (茉莉酸甲酯诱导响应元件)、TGA-element (生长素诱导元件)、P-box (赤霉素响应元件), 此外, 还具有与 MYB 转录因子相识别和结合的位点 CCGTTG、CAACAG。以上结果表明, 红花类黄酮生物合成通路上的 2-ODD 基因可能会受到光、温度及不同内源植物激素所调控, 进而去应对植物在生长发育过程中所受到的一些相关胁迫。而且 MYB 转录因子也可以与启动子区上的相关位点进行识别和结合, 进而驱动下游基因的表达。

6 红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 家族基因表达模式分析

为了研究红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 家族基因在红花不同花期及叶片中的表达模式, 利用荧光定量 PCR 技术对其家族中的基因进行表达模式的分析, 结果如图 5 所示, 红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 家族中的基因在不同花期及叶片均有不同程度的表达, *CtFLS2*、*CtFLS7*、*CtANS1*、*CtANS4*、*CtANS5*、*CtANS7* 和 *CtF3H* 基因在花蕾期表达较高, 在初花期大部分基因的表达量都较低, *CtFLS1*、*CtANS2* 和 *CtANS6* 这 3 个基

因在盛花期表达量最高, 而在其余花期的表达量都很低, *CtFLS2*、*CtFLS3*、*CtFLS4*、*CtFLS5*、*CtFLS6*、*CtFLS7*、*CtFLS8*、*CtANS3*、*CtANS5* 和 *CtANS7* 这 10 个基因在红花衰老期时表达较高, 除了 *CtFLS7*、*CtANS1*、*CtANS4* 和 *CtANS5* 这四个基因外, 其余该家族中的基因在叶片中的表达量都很低。以上研究结果表明, 红花类黄酮生物合成通路 2-ODD 基因家族中的成员可能参与不同花期的调控并且其功能存在分化。

讨论

2-ODD 超级家族是植物中第二大酶家族, 该家族成员在 DNA 去甲基化、脯氨酸羟基化、植物激素合成和特殊代谢产物合成过程中起着重要的作用^[9]。本研究从红花基因组数据库中共筛选鉴定出 16 条与类黄酮生物合成通路有关的 2-ODD 家族基因, 其中 8 条 *CtFLS* 基因、7 条 *CtANS* 基因和 1 条 *CtF3H* 基因。而该通路上的 2-ODD 基因还包括黄酮合成酶 I (*FNSI*) 基因, 但在红花基因组数据库中并未注释到这一基因, 分析其原因可能是由于红花属于菊科植物, 而目前有关文献报道称 *FNSI* 基因仅存在于伞形科物种以及水稻中^[13], 因此并未在红花基因组数据库中鉴定到这一基因。

基于生物信息学方法, 对红花中鉴定到的类黄酮生物合成通路上的 2-ODD 基因家族成员进行理化性质、系统进化、保守基序等的分析。其理化性质分析结果表明, 该家族基因编码区的平均长度为 1 096.5 bp, 氨基酸数量平均为 364.5, 均为亲水性蛋白, 并且大多数基因所编码的蛋白质定位在细胞质中, 这与大多数文献报道结果相一致^[14-16]。系统进化分析结果表明, 红花类黄酮生物合成通路上的 2-ODD 家族基因大多

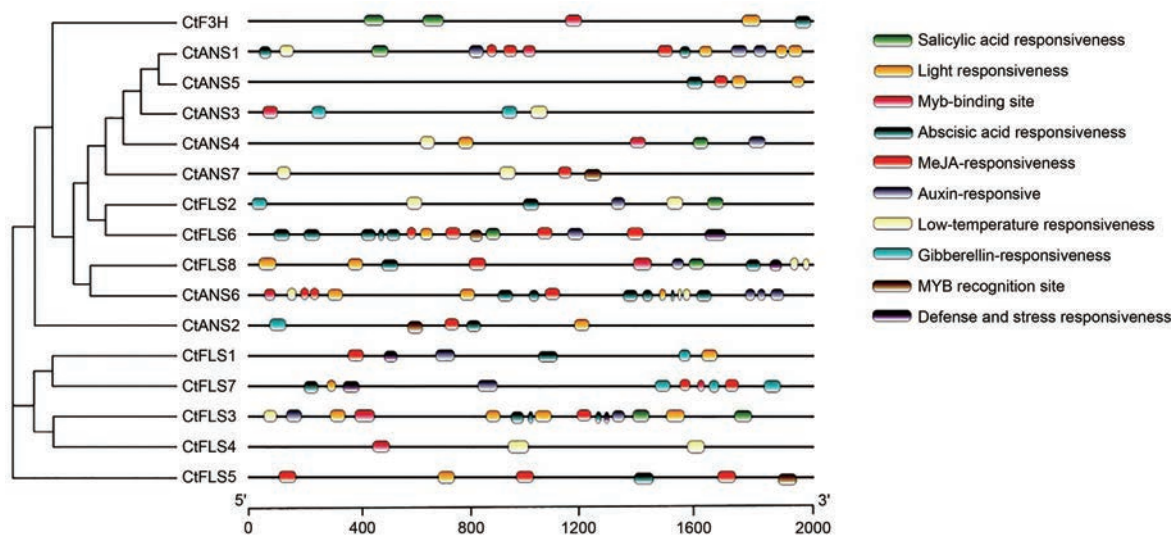


Figure 4 The cis-acting elements within the promoter of 2-ODD family genes involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower

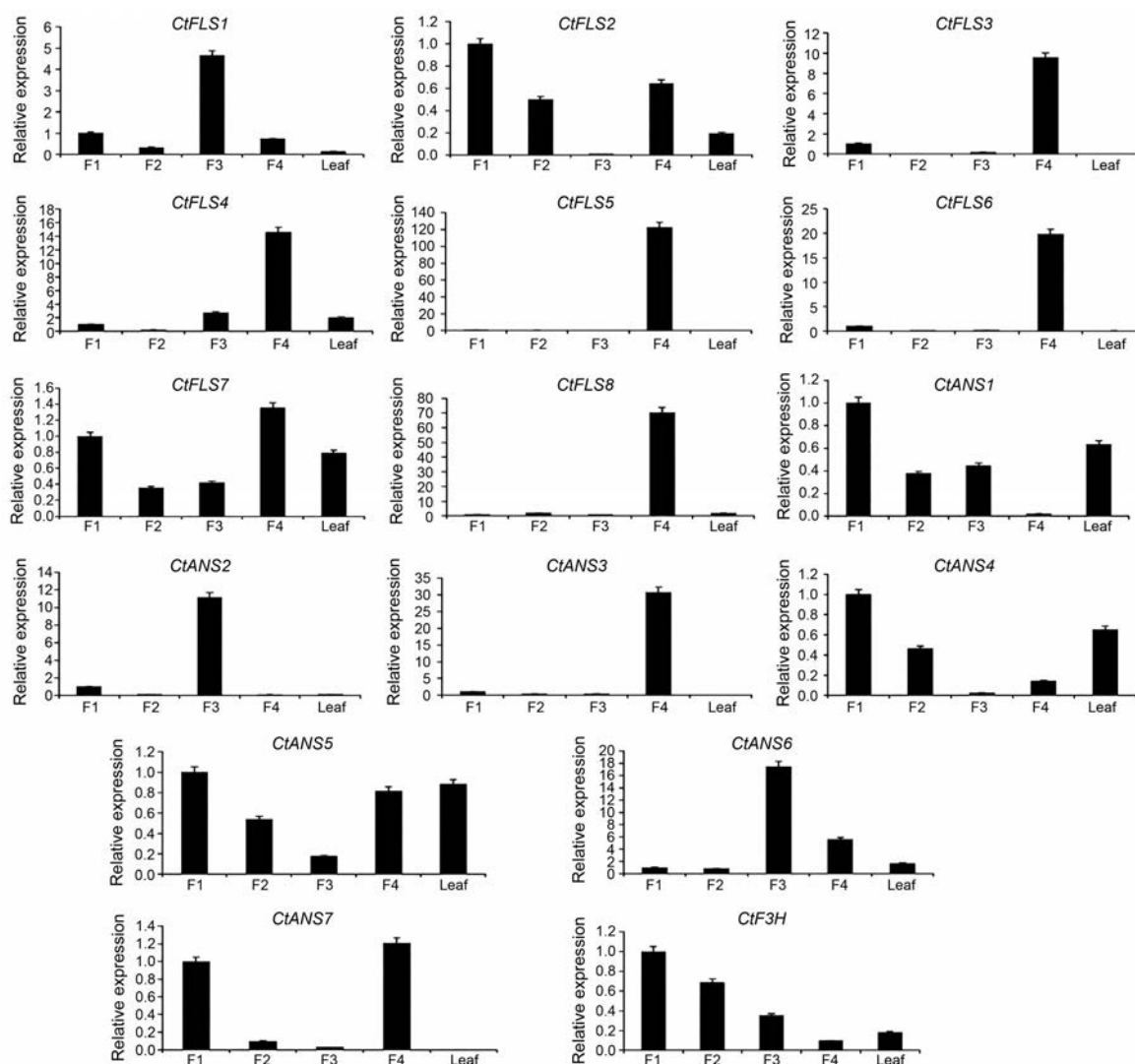


Figure 5 qRT-PCR analysis of 2-*ODD* gene family involved in flavonoid biosynthesis pathway in safflower. F1: Bud; F2: Initial; F3: Full; F4: Fading

自己聚为一类,这与文献报道中的聚类结果有所差异^[5]。分析其原因可能是由于同一物种中的 *ANS* 与 *FLS* 基因有着 50%~60% 的序列相似性^[7],而与其他物种中的 *FLS* 或 *ANS* 基因的序列相似性较低,因此红花类黄酮生物合成通路上的大多数 *FLS* 和 *ANS* 蛋白在系统进化中自己聚为一类。蛋白保守基序结果显示,红花类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 家族基因都具有两个保守基序 motif1 和 motif2,这两个保守基序上含有与 Fe^{2+} 离子结合的 H-x-D-xn-H 保守残基和与 2-酮戊二酸结合的 R-x-S 保守残基,这与 Deng 等^[17] 的研究结果相一致。基因结构分析结果表明,红花类黄酮生物合成通路上的 2-*ODD* 家族基因的外显子数量较为多样,有 2~6 个外显子不等,而有关其他物种该通路上 2-*ODD* 家族基因的文献报道,外显子数量大多是比较恒定的,为 2~3 个外显子,这可能与系统进化有关,

在系统进化树中, *CtANS2* 基因与其他物种中的 *ANS* 基因聚在一起,其基因结构表现出与其他物种中的 *ANS* 基因结构相一致的现象,其基因结构组成为 2+1 型^[5],同样, *CtF3H* 基因与其他物种中的 *F3H* 基因聚在一起,其结构组成也相同,为 3+2 型^[5,17],而其余基因的结构差异可能是由于外显子/内含子获得/丢失,外显子化/假外显子化以及插入/缺失这三种主要机制引起的,有关文献报道称重复基因在进化中所产生的结构差异非常普遍,而其基因结构的改变则会导致其基因功能的多样性^[18]。通过 qRT-PCR 分析发现,大部分 *CtFLS* 基因在红花的衰落期表达量较高,这与其他物种中的 *FLS* 基因表达量有所差异,在黄芩中分离得到的一条 *SbFLS* 基因在其根部和花中的表达量最高^[19],而在葡萄风信子中鉴定到的一个 *MaFLS* 基因主要在花发育早期表达^[20]。 *CtANS* 基因在红花的不同花期及叶片均

有不同程度的表达,本课题组前期通过转录本数据库成功克隆了一条 *CtANS* 基因,并发现该基因在红花的初花期和盛花期表达量较高^[21]。而通过基因组数据库鉴定出来的这些 *CtANS* 基因,只有 *CtANS2* 和 *CtANS6* 这两个基因在红花的盛花期表达量最高。以上结果表明,红花类黄酮生物合成通路 2-*ODD* 基因家族中的成员可能参与不同花期的调控并且其功能存在分化。

综上所述,本研究在红花基因组数据库中共筛选鉴定了 16 个与类黄酮生物合成通路有关的 2-*ODD* 基因,所编码的蛋白均为亲水性蛋白,且该家族成员均含有 H-x-D-xn-H 和 R-x-S 两个保守残基,并且该家族基因受到光、温度等环境因素及水杨酸、茉莉酸甲酯等植物激素的调控。基于 qRT-PCR 结果,红花类黄酮生物合成通路上的大部分 2-*ODD* 基因在花蕾期和衰落期的表达量较高。该研究可为深入挖掘红花类黄酮生物合成途径上的 2-*ODD* 基因的功能奠定基础。

作者贡献: 第一作者马鑫彤负责论文设计、实验、数据分析及论文撰写;通讯作者刘秀明、姚娜负责论文设计、数据分析和论文指导;朱枚桦、王南、张馨月参与实验及数据分析;张庆宇、王宇菲参与样品采集;侯钰莹、李志凌参与数据分析。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Zhao G, Wang AH. Safflower resource and its medicinal value [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2004, 23: 24-25.
- [2] Yuan QQ, Liu WY. Research progress on the active components and functional properties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2020, 41: 332-338.
- [3] Li YZ, Hu WZ, SaRen GW, et al. Research progress on antioxidant components and antioxidant mechanism of flavonoids [C]. Qingdao: Abstracts of the 15th Annual Meeting of CIFST (中国食品科学技术学会第十五届年会), 2018: 2.
- [4] Yi SY, Guan LL, Yang J, et al. Research advances in pharmacological function and development and application of *Carthamus tinctorius* L. [J]. North Hort (北方园艺), 2015, (05): 191-195.
- [5] Wang Z, Wang S, Wu M, et al. Evolutionary and functional analyses of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway in tobacco [J]. Planta, 2019, 249: 543-561.
- [6] Zhao XW, Liu PY, Liu D, et al. Research progress in structure-activity relationship of flavonoids [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 3264-3271.
- [7] Park S, Kim D, Park B, et al. Molecular and functional characterization of *Oryza sativa* flavonol synthase (OsFLS), a bifunctional dioxygenase [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67: 7399-7409.
- [8] Gebhardt YH, Witte S, Steuber H, et al. Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 β -hydroxylase by site-directed mutagenesis [J]. Plant Physiol, 2007, 144: 1442-1454.
- [9] Kawai Y, Ono E, Mizutani M. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants [J]. Plant J, 2014, 78: 328-343.
- [10] Turnbull JJ, Nakajima J, Welford RW, et al. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 β -hydroxylase [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 1206-1216.
- [11] Hammerbacher A, Kandasamy D, Ullah C, et al. Flavanone-3-hydroxylase plays an important role in the biosynthesis of spruce phenolic defenses against bark beetles and their fungal associates [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 208.
- [12] Li H, Liu J, Pei T, et al. Overexpression of SmANS enhances anthocyanin accumulation and alters phenolic acids content in *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia miltiorrhiza* Bge f. *alba* plantlets [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 1-21.
- [13] Martens S, Preuss A, Matern U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L [J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1040-1049.
- [14] Huang QL, Cai C. Bioinformatics analysis of flavonol synthase from various plants [J]. Guangdong Agric Sci (广东农业科学), 2014, 41: 140-143.
- [15] Gai JT, Huang JF, Dang ZG, et al. Identification of ANS gene in *Mangifera indica* Linnaeus and comparative analysis with other plants [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2017, 45: 43-49.
- [16] Li P, Wang RX, Wang H. Bioinformatics analysis of flavanone-3-hydroxylase (F3H) [J]. J Biol (生物学杂志), 2015, 32: 25-29.
- [17] Deng Y, Li C, Li H, et al. Identification and characterization of flavonoid biosynthetic enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae) [J]. Molecules, 2018, 23: 1467.
- [18] Xu G, Guo C, Shan H, et al. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 1187-1192.
- [19] Kim YB, Kim K, Kim Y, et al. Cloning and characterization of a flavonol synthase gene from *Scutellaria baicalensis* [J]. Sci World J, 2014, 2014: 980740.
- [20] Liu H, Su B, Zhang H, et al. Identification and functional analysis of a flavonol synthase gene from grape hyacinth [J]. Molecules, 2019, 24: 1579.
- [21] Liu XM, Yang WT, Zhao LD, et al. Cloning and expression analysis of anthocyanidin synthase in safflower [J]. Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报), 2014, 36: 766-772.