广西植物 Guihaia Aug. 2026, 46(8): 1283-1293 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202504046

胡荣美, 舒合凤, 朱灵, 等, 2026. 马缨杜鹃查尔酮合酶的基因克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 46(8): 1283-1293.
Hu R M, Shu H F, Zhu L, et al., 2026. Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene from *Rhododendron delavayi* [J]. Guihaia, 46(8): 1283-1293.

马缨杜鹃查尔酮合酶的基因克隆及表达分析

胡荣美[1], 舒合凤[1], 朱　灵[1], 张习敏[1], 龚记熠[1,2], 孙　威[1,2*]

(1. 贵州师范大学 生命科学学院/植物生理与发育调控重点实验室, 贵阳 550025;
2. 西南喀斯特山地生物多样性保护重点实验室, 贵阳 550025)

摘　要: 为探究查尔酮合酶(CHS)在马缨杜鹃(*Rhododendron delavayi*)花色形成中的作用,该研究以马缨杜鹃为材料,克隆了 *RdCHS*2 编码区全长,并对其组织表达情况、体外催化活性及体内功能进行了解析。结果表明:(1)*RdCHS*2 的编码序列(CDS)全长为 1 170 bp,编码 389 个氨基酸,与其他植物 CHS 归为一类,具有 CHS 典型的保守基序。(2)基因表达分析显示,*RdCHS*2 在花葶中表达最高,在雄蕊中表达最低,随开花进程的推进其表达量呈逐渐上升趋势。(3)酶活检测显示,RdCHS2 能够分别催化丙二酰辅酶 A 与对香豆酰辅酶 A 生成柚皮素查尔酮,以及催化丙二酰辅酶 A 与肉桂酰辅酶 A 生成松属素查尔酮。(4)拟南芥 *tt*4 突变体互补实验显示,*RdCHS*2 可成功恢复拟南芥 *tt*4 突变体子叶与下胚轴中花青素苷的合成。该研究证实,RdCHS2 具有典型 CHS 活性,可参与花青素苷的合成,为今后进一步明确该基因的具体功能奠定了基础。

关键词: 花青素苷, 马缨杜鹃, 查尔酮合酶, 酶活检测, 遗传转化

中图分类号: Q943　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1000-3142(2026)08-1283-11

Cloning and expression analysis of chalcone synthase gene from *Rhododendron delavayi*

HU Rongmei[1], SHU Hefeng[1], ZHU Ling[1], ZHANG Ximin[1], GONG Jiyi[1,2], SUN Wei[1,2*]

(1. *School of Life Sciences/Key Laboratory of Plant Physiology and Development Regulation, Guizhou Normal University*, Guiyang 550025, China; 2. *Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Karst Mountain Area of Southwest of China*, Guiyang 550025, China)

Abstract: To elucidate the role of chalcone synthase (CHS) in flower color formation of *Rhododendron delavayi*, the full-length coding region of *RdCHS*2 was cloned from *R. delavayi*, and its expression profile, catalytic activity *in vitro* and biological function in *vivo* were analyzed. The results were as follows: (1) The full-length coding sequence (CDS) of *RdCHS*2 was 1 170 bp, encoding 389 amino acids. Phylogenetic analysis showed that RdCHS2 was grouped into the same clade with CHS from other plants and had typical conserved motifs of CHS. (2) Gene expression analysis showed

收稿日期: 2025-06-26　**接受日期:** 2025-08-01

基金项目: 贵州省自然科学基金项目(ZK〔2023〕270); 贵州省高等学校高山杜鹃病虫害绿色防控重点实验室项目(黔教技〔2022〕044 号); 贵州师范大学资助项目([2021]B04)。

第一作者: 胡荣美 (2000—),硕士研究生,主要从事森林资源培育研究,(E-mail)2831865990@qq.com。

*通信作者: 孙威,博士,教授,主要从事植物次生代谢与调控研究,(E-mail)sunwei889@163.com。

that the expression of *RdCHS*2 was the highest in scapes and the lowest in stamens, and its expression increased gradually as flowering progressed. (3) Enzymatic assays confirmed that RdCHS2 catalyzed the synthesis of naringenin chalcone from malonyl-CoA and *p*-coumaroyl-CoA, as well as catalyzed the synthesis of pinocembrin chalcone from malonyl-CoA and cinnamoyl-CoA. (4) Complementation experiments in *Arabidopsis thaliana tt*4 mutant demonstrated that *RdCHS*2 successfully restored anthocyanin biosynthesis in cotyledons and hypocotyls of *A. thaliana tt*4 mutant. These results show that RdCHS2 exhibits typical CHS activity and participates in the biosynthesis of anthocyanin, which lays a foundation for further clarifying the specific function of this gene.

Key words: anthocyanin, *Rhododendron delavayi*, chalcone synthase, enzyme assay, genetic transformation

马缨杜鹃属于常绿树型杜鹃,叶革质,簇生枝顶,矩圆状披针形,花序伞形顶生,花冠钟形,深红色,极富观赏价值,是贵州省百里杜鹃国家森林公园的重要植物资源之一(黄红霞,2006)。马缨杜鹃因花朵艳丽而具有较高的观赏价值,又因其叶和花均可入药而具有一定的药用价值。多部中医药典籍中记载,马缨杜鹃以花入药,可治疗骨髓炎、月经不调等多种病症(王聿晗等,2023)。花青素苷作为决定马缨杜鹃观赏与药用价值的重要物质,已被证实具有一定的医疗价值,可对阿尔茨海默病产生积极影响,改善糖尿病功能障碍,缓解非酒精性脂肪性肝病,修复肾脏功能障碍及肾小管损伤,以及作为免疫抑制剂(Hyun et al., 2019)减缓癌细胞扩散(Surangi Dharmawansa et al., 2020; Nakano et al., 2020; Li et al., 2021; Liu et al., 2021)。

查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)属于 Type Ⅲ 聚酮合酶(Type Ⅲ polyketide synthase, Type Ⅲ PKS)(Huang et al., 2024),在大部分双子叶植物中以多基因家族形式存在,主要包括 2 个外显子和 1 个内含子,且在植物的不同组织与不同发育阶段的表达模式存在差异(Ferrer et al., 1999)。CHS 以丙二酰辅酶 A 和香豆酰辅酶 A 为底物,催化生成柚皮素查尔酮,随后柚皮素查尔酮再经一系列酶的催化作用最终生成花青素苷。CHS 作为植物花青素苷合成通路上游的第一个关键酶(Wu et al., 2020),在花青素苷生物合成途径中起重要作用。现阶段已在很多高等植物中对其进行了研究。对金鱼草的研究显示,其只含有 1 个 *CHS* 基因,并且该基因的突变直接导致金鱼草花色变为白色(Sommer & Saedler, 1986)。与金鱼草相同,拟南芥中也只含有 1 个 *CHS* 基因,该基因突变后拟南芥种皮颜色由棕色变为黄色,幼苗子叶与下胚轴由紫色变为绿色,同时花粉和根的形态也发生相应改变(Chang et al., 1988; Buer & Djordjevic, 2009)。在矮牵牛的 8 个 *CHS* 基因中,只有 *CHS-A* 和 *CHS-J* 在花组织中表达,并且这 2 个基因在矮牵牛花瓣白色组织中的表达量下调,同时,抑制 *CHS-A* 的表达还导致矮牵牛不能产生花粉管(Koes et al., 1989; Koseki et al., 2005)。与矮牵牛的研究不同,抑制玉米 *CHS* 基因表达后,花粉管可以发育并进行生长,但只能维持不到 12 h,最终仍然导致玉米雄性不育(Pollak et al., 1995)。对大花君子兰和红花的研究表明,2 种植物的 CHS 均可催化香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 生成柚皮素查尔酮,且其在植物着色部位的表达量最高(刘玥等,2021;Tang et al., 2023)。综上,CHS 在植物的生长发育和颜色形成过程中均发挥了不可替代的作用。目前,关于植物 *CHS* 的研究已较为广泛,但是针对高山杜鹃 *CHS* 基因的研究仍然有限,且 *CHS* 表达模式与开花进程、花色形成机制的关联尚未见到报道。因此,开展 *RdCHS*2 基因研究将为马缨杜鹃花色形成机制解析奠定理论基础。

本研究以马缨杜鹃为材料,克隆得到 *RdCHS*2 的全长编码序列,采用生物信息学软件、实时荧光定量 PCR、体外酶活检测和拟南芥遗传转化等方法,对 *RdCHS*2 是否参与花青素苷的生物合成进行初步解析,拟探究如下问题:(1)通过 RdCHS2 蛋白的理化性质分析及其与其他物种 Type Ⅲ 聚酮合酶之间的进化关系,分析 RdCHS2 是否具有 CHS 的潜在功能;(2)分析 *RdCHS*2 在马缨杜鹃不同组织和不同开花时期的表达情况,探究该基因的时空表达特性及其与花色形成之间的关系;(3)通过体外酶活检测与拟南芥突变体互补实验证明 *RdCHS*2 是否具有 CHS 活性,在植物中是否参与花

青素苷的生物合成。本研究为今后进一步明确该基因的生物学功能及其参与花青素苷合成调控的分子机制奠定了重要基础。

1　材料与方法

1.1 试验材料

盛花期马缨杜鹃花采自百里杜鹃国家森林公园实验样地；农杆菌 GV3101、大肠杆菌 JM109、BL21(DE3)感受态购自上海唯地生物科技有限公司；哥伦比亚野生型拟南芥(wild type，WT)、*tt*4 突变体拟南芥、真核载体 pBI121 和原核载体 pET-32a(+)由本实验室提供；常规分子试剂购自天根生化科技(北京)有限公司；化学试剂购自北京索莱宝科技有限公司；引物合成与 DNA 测序由武汉金开瑞生物工程有限公司完成。

1.2 *RdCHS*2 的克隆与生物信息学分析

取马缨杜鹃盛花期花朵，提取获得符合实验要求的 RNA 并逆转录合成 cDNA。基于马缨杜鹃转录组数据，设计基因特异性克隆引物(表 1)，经 PCR 扩增、连接和测序，确认 *RdCHS*2 的核苷酸序列。

利用 Expasy-ProtParam 工具(http://web.expasy.org/protparam/)分析 RdCHS2 的理化性质，利用 MEGA 11 构建进化树，利用 MEME(http://meme-suite.org/index.html)和 TBtools 软件进行基序分析与可视化。

表 1　研究所用引物序列

Table1　Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	用途 Purpose	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)
*RdCHS*2-F	基因克隆 Gene cloning	TCTAGAGATTATGGTCACCGTCG
*RdCHS*2-R		AAACGACGCTAATGGGTGTAGC
*RdCHS*2-pET32a(+)-F		CGGGATCCATGGTCACCGTCGAGGAT
*RdCHS*2-pET32a(+)-R		CCCAAGCTTTCAAGTGCACAAACTGTG
*RdCHS*2-pBI121-F	载体构建 Vector construction	GCTCTAGAATGGTCACCGTCGAGGAT
*RdCHS*2-pBI121-R		GCGGATCC TCAAGTGCACAAACTGTG
*RdCHS*2-qRT-F		CGGGATCCCACGTACCCGGATTTCTACTT
*RdCHS*2-qRT-R		CGCTTCTTGATCATGGATTTGTC
AtCHS-qRT-F	表达分析 Expression analysis	GGCAAAGAAGCGGCAGTGAAG
AtCHS-qRT-R		ACGGAAGGACGGAGACCAAGAG

注：酶切位点[*Bam*H I(GGATCC)；*Hin*d Ⅲ(AAGCTT)；*Xba* Ⅰ(TCTAGA)]。
Note：Restriction sites [*Bam*H Ⅰ(GGATCC)；*Hin*d Ⅲ (AAGCTT)；*Xba* Ⅰ (TCTAGA)].

1.3 *RdCHS*2 基因表达量分析

提取马缨杜鹃不同组织及不同开花时期的 RNA，逆转录为 cDNA。设计 qRT-PCR 引物，内参基因使用 *RdActin*。qRT-PCR 扩增程序如下：95 ℃ 60 s；95 ℃ 5 s、60 ℃ 60 s，共 40 个循环，每个样品设置 3 个生物学重复，运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *RdCHS*2 的表达量。

1.4 *RdCHS*2 原核表达载体构建

将克隆得到的目的基因序列连接到经 *Bam*H I 和 *Hin*d Ⅲ酶切的 pET-32a(+)载体上，测序正确的质粒命名为 pET-32a(+)-*RdCHS*2，并转化至 BL21(DE3)感受态细胞。

1.5 RdCHS2 可溶性重组蛋白的制备

在 15 ℃ 培养温度条件下，对 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS*2 进行诱导时间及 IPTG 浓度的摸索。时间梯度设置为 24、36、48、60、72 h，IPTG 浓度梯度设置为 0.1、0.2、0.4、0.7、1.0 mmol · L^{-1}。诱导结束后，超声破碎细胞，离心并取上清液用于 SDS-PAGE 电泳检测。

按上述最佳诱导表达条件进行重组蛋白大量制备，用不同浓度的咪唑进行洗脱，收集相应浓度的洗脱液，离心并取上清液用于 SDS-PAGE 电泳检测，确定最佳洗脱条件。选择最佳洗脱条件对目的蛋白进行洗脱，收集纯度和浓度较高的洗脱

液进行低温透析与浓缩,随后进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶检测。

1.6 体外酶活鉴定

体外酶活检测参照 Sanmugavelan 等(2018)的方法稍作修改,酶活反应体系总体积为 200 μL,包括 pH 为 7.2 的 50 mmol · L^{-1}磷酸钾,1 mg · mL^{-1}的底物(丙二酰辅酶 A、香豆酰辅酶 A 和肉桂酰辅酶 A)和 *RdCHS*2 重组蛋白,以 BL21-pET-32a(+)空载体蛋白为对照,柚皮素查尔酮和松属素查尔酮的检测波长分别为 304、342 nm。

1.7 *RdCHS*2 真核表达载体构建

利用含有 CaMV35S 启动子和 NPTII 的 pBI121 构建拟南芥双元载体,将扩增得到的 *RdCHS*2,连接至经 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切的 pBI121 载体上,测序正确的质粒命名为 pBI121-*RdCHS*2,并转化至农杆菌。

1.8 拟南芥 *tt*4 突变体的遗传转化

将突变体 *tt*4 培养至盛花期,用蘸花法进行遗传转化,获取 T_2代种子。将 T_2代、野生型及 *tt*4 种子培育 7 d,提取 RNA,逆转录为 cDNA,以 *β-Actin* 为内参基因,进行 qRT-PCR,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$计算表达量。参照 Shin 等(2007)的方法测定花青素苷含量。

1.9 数据统计分析

所有实验均进行 3 个生物学重复,取平均值,利用 Excel 进行数据统计,利用 SPSS version 19.0 的 Tukey 法进行数据分析,利用 GraphPad Prism 8.0.1 绘图。

2 结果与分析

2.1 *RdCHS*2 的克隆与分析

以马缨杜鹃花瓣 cDNA 为模板,成功克隆获得马缨杜鹃查尔酮合酶基因 *RdCHS*2,该基因开放阅读框(open reading frame,ORF)全长为 1 170 bp,可以编码 389 个氨基酸,预测其编码的推定蛋白分子量约为 42.6 kDa,分子式为$C_{1898}H_{3037}N_{503}O_{564}S_{20}$,其中亮氨酸含量最高,占比约为 10.8%。理论等电点约为 5.72,属于较为稳定的蛋白。

将 RdCHS2 与不同类型的 Type Ⅲ 聚酮合酶构建进化树,结果表明,RdCHS2 与其他植物的 CHS 聚在一起,同时与紫花苜蓿(MsCHS)的亲缘关系最近,表明 RdCHS2 很可能属于 CHS 类型的聚酮合酶。基序分析结果显示,除 Motif 6、Motif 8、Motif 10 外,其余基序在不同物种 Type Ⅲ 聚酮合酶的基序中均具有高度保守性,其中 Motif 1-Motif 4 是典型的保守基序,可能在决定 Type Ⅲ 聚酮合酶的功能中发挥重要作用(图 1)。

将 RdCHS2 与已验证功能的 CHS 进行多序列比对,结果如图 2 所示,RdCHS2 具有 CHS 发挥功能必需的保守氨基酸与结构域,包括催化位点残基(黄色框)、决定 CHS 催化特异性的残基(紫色框),以及负责结合底物并参与形成催化口袋的残基(黑色三角形)等。

2.2 *RdCHS*2 基因表达量分析

*RdCHS*2 基因表达量分析显示,其在不同组织中均有表达,在花葶中的表达量最高,在雄蕊中的表达量最低。在马缨杜鹃开花过程中,*RdCHS*2 基因表达量呈逐渐上升趋势(图 3)。

2.3 *RdCHS*2 原核表达载体构建

将线性化的 *RdCHS*2 与 pET-32a(+)进行连接,经菌液 PCR、酶切验证、公司测序,结果(图 4)表明,原核表达载体 pET-32a(+)-*RdCHS*2 构建成功。

2.4 可溶性重组蛋白的制备与酶活检测

将 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS*2 置于 15 ℃条件下,于不同时间与不同 IPTG 浓度下进行诱导表达,结果如图 5 所示,RdCHS2 重组蛋白在 48 h 的表达量达到最大,并且后续随着时间延长表达量不再增加;在不同浓度 IPTG 诱导下,RdCHS2 重组蛋白表达量趋于一致。综上,确定 RdCHS2 重组蛋白最佳诱导表达条件如下:温度为 15 ℃,IPTG 浓度为 0.1 mmol · L^{-1},诱导表达时间为 48 h。

按上述条件对 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS*2 进行大量诱导培养,收集菌体并超声破碎后获得上清液,在低温条件下进行洗脱,透析与浓缩,结果如图 6 所示,成功获得浓度与纯度较好的可溶性重组蛋白。

将 RdCHS2 可溶性重组蛋白与不同底物进行酶活反应,结果如图 7 所示,RdCHS2 可催化丙二酰辅酶 A 和香豆酰辅酶 A 反应生成柚皮素查尔酮,也可催化丙二酰辅酶 A 和肉桂酰辅酶 A 反应生成松属素查尔酮,证明 RdCHS2 具有查尔酮合酶的功能。

2.5 *RdCHS*2 真核表达载体构建与 *tt*4 突变体的转化

将线性化的 *RdCHS*2 与 pBI121 进行连接,经菌液 PCR、酶切验证、公司测序,结果(图 8)表明,

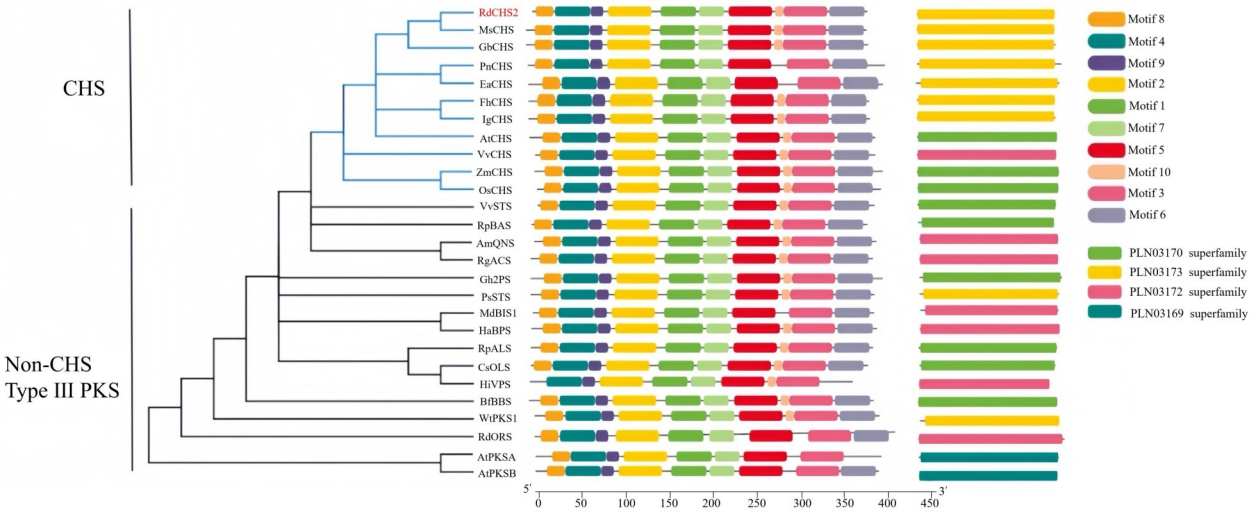
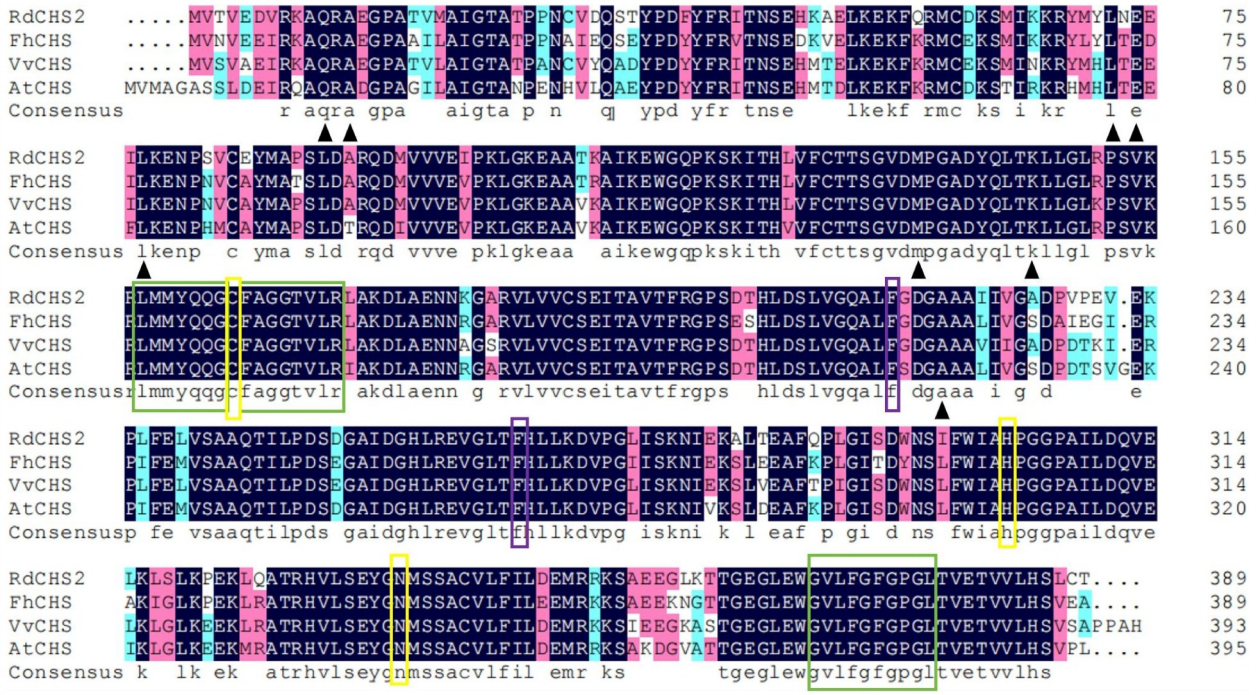


图 1　RdCHS2 基序分析

Fig. 1　Motif analysis of RdCHS2

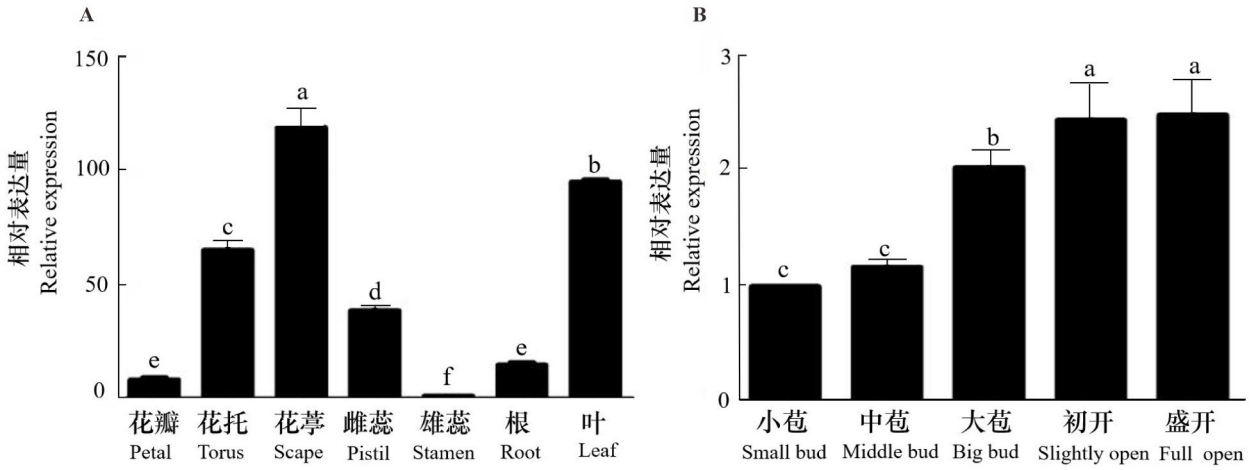


黄色框区域表示保守催化残基；紫色框区域表示决定 CHS 底物特异性的残基；绿色框区域为 CHS 高度保守域；黑色三角形上方对应的残基为与香豆酰辅酶 A 结合的重要残基和 CHS 环化反应的特异性残基。

Yellow boxed regions indicate conserved catalytic residues; purple boxed regions indicate residues that determine the substrate specificity of CHS; green boxed regions indicate highly conserved domains of CHS; the residues indicated above the black triangles are important residues for binding to coumaroyl-CoA and specific residues for the CHS cyclization reaction.

图 2　RdCHS2 的多序列比对

Fig. 2　Multiple sequence alignment of RdCHS2

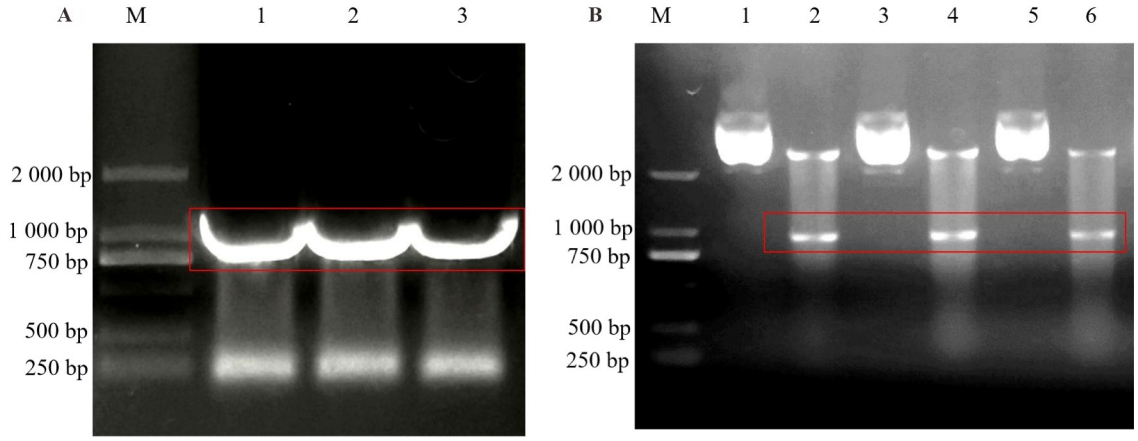


A. 不同组织 *RdCHS*2 表达量; **B**. 不同时期花朵中 *RdCHS*2 表达量。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

A. *RdCHS*2 expression in different tissues; **B**. *RdCHS*2 expression in flowers at different stages. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 3 *RdCHS*2 表达量分析

Fig. 3 Expression analysis of *RdCHS*2



红色框表示目的片段; **M**. Marker; **A**. 菌液 PCR; **B**. 双酶切验证结果。

Red box indicates target fragment; **M**. Marker; **A**. PCR of bacterial solution; **B**. Double digestion validation results.

图 4 *RdCHS*2 原核表达载体的构建

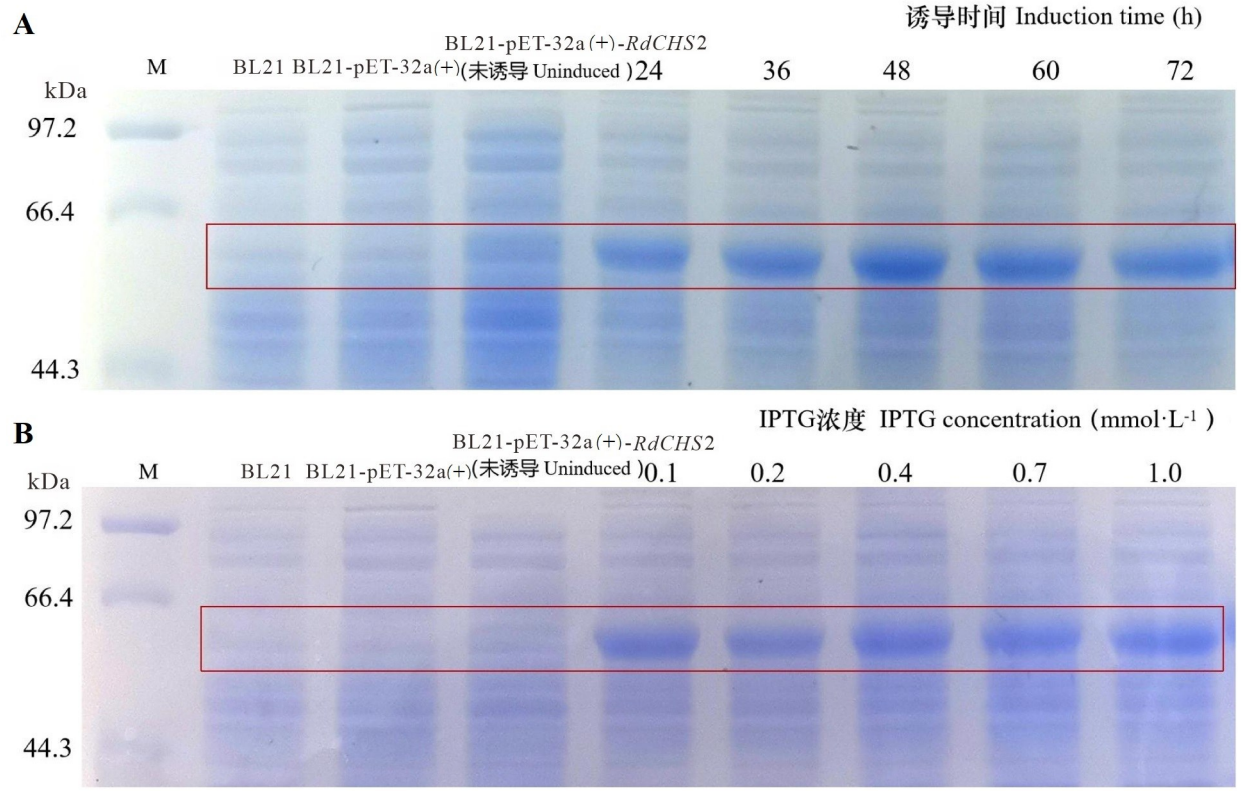
Fig. 4 Prokaryotic expression vector construction of *RdCHS*2

真核表达载体 pBI121-*RdCHS*2 构建成功。

转基因结果如图 9:A 所示,在体视显微镜下 T_2代转基因种子及其幼苗与 *tt*4 突变体相比,种皮恢复棕色,幼苗子叶及下胚轴恢复紫色,花青素苷合成恢复; qRT-PCR 结果(图 9: B、C)显示, *RdCHS*2 在转基因植株中的表达与 *AtCHS* 在野生型中的表达相似,说明 *RdCHS*2 与 *AtCHS* 具有相似的功能且均参与花青素苷的生物合成。

3 讨论与结论

关于 Type Ⅲ PKS 的研究显示,越来越多的 Type Ⅲ PKSs(除 CHS 外),如二苯乙烯合成酶(stilbene synthase, STS)、吖啶酮合成酶(acridone synthase, ACS)和 2-吡喃酮合成酶(2-pyrone synthase,2PS)等已被证明与 CHS 具有相同的催化

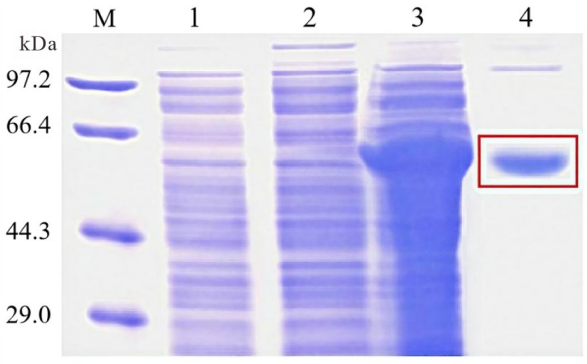


A. 不同诱导时间；**B**. 不同 IPTG 浓度。

A. Different induction time; **B**. Different IPTG concentrations.

图 5　重组蛋白诱导表达条件的确定

Fig. 5　Determination of inducible expression conditions of recombinant protein



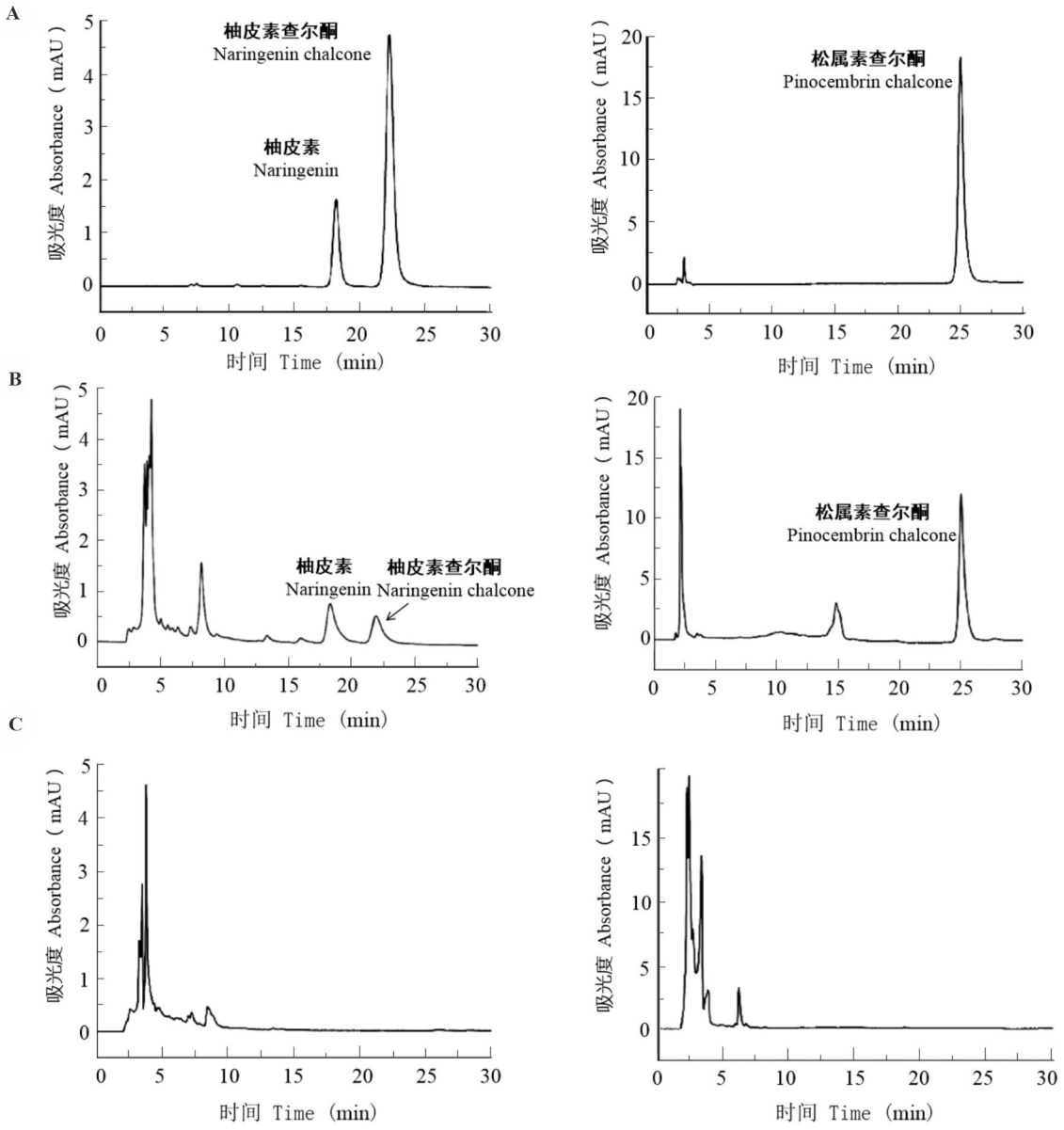
M. Marker；**1**. BL21；**2**. BL21-pET-32a（+）；**3**. 纯化前；**4**. 纯化后。

M. Marker; **1**. BL21; **2**. BL21-pET-32a (+); **3**. Before purification; **4**. After purification.

图 6　可溶性重组蛋白的纯化与浓缩

Fig. 6　Purification and concentration of soluble recombinant protein

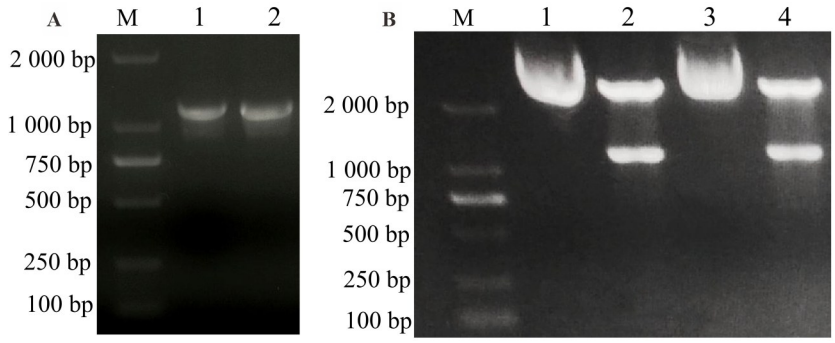
机制，只是在分子内环化方式和对起始底物的偏好性上存在差异（Martín & Liras, 2022），并且这些 Type Ⅲ PKSs 在氨基酸水平上也与 CHS 相似度较高。因此，仅通过序列相似性被判定为 CHS 的序列，实际上可能编码其他 Type Ⅲ PKSs（Ohta et al., 2022）。为了更好地区别 CHS 与其他 Type Ⅲ PKSs，特定位置的氨基酸种类可以帮助鉴定 CHS，如第 215 位和第 265 位苯丙氨酸，其作为 CHS 的看家氨基酸，在促进底物装载和适时折叠上发挥重要作用（Morita et al., 2019）。水稻中 OsCHS9 因为第 265 位苯丙氨酸被甘氨酸取代，所以检测不到 CHS 活性（Park et al., 2020）。多序列比对分析显示，RdCHS2 第 215 位和第 265 位均为苯丙氨酸，系统进化分析显示，它与已经验证功能的 CHS 聚为一类，表明 RdCHS2 在马缨杜鹃中很可能发挥典型 CHS 功能，但具体功能还需要通过实验进一步验证。



A. 标准品；**B**. 酶活产物；**C**. pET-32a (+)蛋白对照。
A. Standard; **B**. Enzyme activity product; **C**. pET-32a (+) protein control.

图 7 RdCHS2 体外酶活检测
Fig. 7 Enzymatic assay of RdCHS2 *in vitro*

大多数 *CHS* 基因在花器官中高度表达,其基因产物通常参与花青素苷的生物合成,在不含花青素苷的器官中表达的 *CHS* 基因可能在其他黄酮类化合物的生物合成中发挥重要作用,执行不同的功能(Pang et al., 2005)。例如,在余甘子中,*PeCHS* 的表达量在花朵中最低,在成熟果实和叶片中表达量最高,以致成熟果实与叶片中的无色黄酮醇及其衍生物积累最多(Singh et al., 2019);苹果 *MdCHSs* 在幼叶中表达量最高,其表达量与根皮素二氢查尔酮的形成密切相关(Yahyaa et al., 2017)。*RdCHS2* 在马缨杜鹃花葶中表达量最高,且随着花朵的开放表达量逐渐升高,与马缨杜鹃

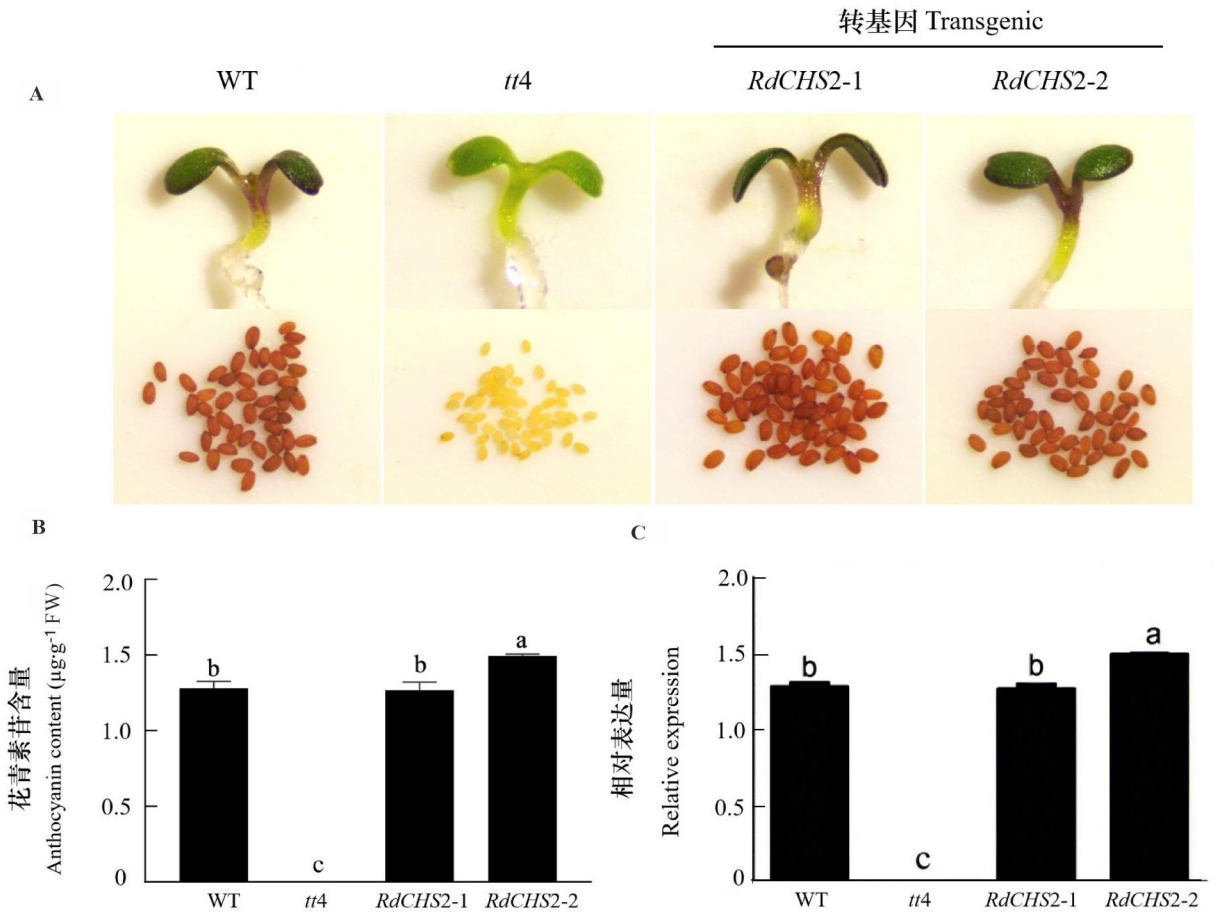


M. Marker；**A**. 菌液 PCR；**B**. 酶切验证。

M. Marker；**A**. PCR of bacterial solution；**B**. Digestion verification.

图 8　*RdCHS2* 真核表达载体构建

Fig. 8　Eukaryotic expression vector construction of *RdCHS*2



A. 表型分析；**B**. 花青素苷含量测定；**C**. 相对表达量分析。不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

A. Phenotypic analysis；**B**. Determination of anthocyanin content；**C**. Relative expression analysis. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$).

图 9　*RdCHS2* 在拟南芥 *tt4* 突变体中的功能互补

Fig. 9　Functional complementarity of *RdCHS*2 in *Arabidopsis thaliana tt*4 mutant

中花青素苷的积累模式不一致(Sun et al., 2022)。这表明 *RdCHS*2 在马缨杜鹃花色形成过程中没有发挥主要作用,或在马缨杜鹃中还存在其他 *CHS* 基因主要参与花青素苷的合成。在本研究中,RdCHS2 可催化丙二酰辅酶 A 与香豆酰辅酶 A 反应产生柚皮素查尔酮,证明 RdCHS2 确实为 CHS 且可以发挥催化作用。同时,RdCHS2 还能以丙二酰辅酶 A 和肉桂酰辅酶 A 为底物反应产生松属素查尔酮,表明其很可能是一个多功能 CHS,不仅可以参与花青素苷的合成还可以参与艾纳香素的合成,这与上述表达分析的结果相一致。然而,为进一步证明 RdCHS2 是否确实为一个多功能 CHS,还需要选择更多的底物对其催化功能进行解析。

拟南芥 *tt*4 突变体因 CHS 功能异常,类黄酮合成途径中断,导致突变体植株呈现黄色种皮与绿色子叶和下胚轴。本研究结果显示,*RdCHS*2 可以将 *tt*4 突变体种皮由黄色恢复为棕色,使幼苗由绿色恢复为紫色,证明 *RdCHS*2 的导入使拟南芥的类黄酮生物合成恢复正常,表明 *RdCHS*2 是 *AtCHS* 的功能直系同源基因,具有相似的生物学功能,在类黄酮生物合成中发挥着重要作用,这与短柄草 *BdCHS* 的研究结果(Wang et al., 2023)相同。在前期研究中,*RdCHS*1(Huang et al., 2024)的导入同样能恢复 *tt*4 突变体的表型,但其无法催化丙二酰辅酶 A 和肉桂酰辅酶 A 反应产生松属素查尔酮,这表明 *RdCHS*1 在马缨杜鹃花色形成中发挥主要作用,*RdCHS*2 可能发挥协同作用,而其更倾向于参与除花青素苷以外的其他黄酮类物质的合成。

对鸢尾(*Iris halophila*)、三角叶杨(*Populus trichocarpa*)、水母雪莲(*Saussurea medusa*)、白木香(*Aquilaria sinensis*)、龙血树(*Dracaena cambodiana*)等植物的研究发现,*CHS* 除参与花色调控外,还在植物黄酮类化合物合成,茉莉酸及细胞分裂素信号传导中发挥重要作用,并通过增强植物抗逆性,提高植物对炭疽病、灰霉病和霜霉病的抗性(Sun et al., 2011; Wang et al., 2017; 郭泽西等, 2022; Liu et al., 2025)。然而,*RdCHS*2 是否能增强植物对非生物胁迫的适应性,尚需进一步研究。

参考文献:

Buer C S, Djordjevic M A, 2009. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 60(3): 751-763.

Chang C, Bowman J L, Ddjohn A W, et al., 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(18): 6856-6860.

Ferrer J L, Jez J M, Bowman M E, et al., 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. Nature Structural Biology, 6(8): 775-784.

Guo Z X, Sun D Y, QU J J, et al., 2022. The role of chalcone synthase gene in grape resistance to gray mold and downy mildew [J]. Scientia Agricultura Sinica, 55(6): 1139-1148. [郭泽西, 孙大运, 曲俊杰, 等, 2022. 查尔酮合成酶基因在葡萄抗灰霉病和霜霉病中的作用[J]. 中国农业科学, 55(6): 1139-1148.]

Huang H X, 2006. Studies on tourism application and *Rhododendron* resource investigation in Baili Rhododendron National Forest Park [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 25. [黄红霞, 2006. 百里杜鹃国家森林公园杜鹃花属植物资源调查与旅游应用研究[D]. 北京: 北京林业大学: 25.]

Huang J, Zhao X, Zhang Y, et al., 2024. Chalcone-synthase-encoding *RdCHS*1 is involved in flavonoid biosynthesis in *Rhododendron delavayi* [J]. Molecules, 29(8): 1822.

Hyun K H, Gil K C, Kim S G, et al., 2019. Delphinidin chloride and its hydrolytic metabolite gallic acid promote differentiation of regulatory T cells and have an anti-inflammatory effect on the allograft model [J]. Journal of Food Science, 84(4): 920-930.

Koes R E, Spelt C E, Mol J N M, 1989. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrid* (V30): differential, light-regulated expression during flower development and UV light induction [J]. Plant Molecular Biology, 12: 213-225.

Koseki M, Goto K, Masuta C, et al., 2005. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'Red Star' flowers is induced by the sequence-specific degradation of the *chalcone synthase* RNA [J]. Plant and Cell Physiology, 46(11): 1879-1883.

Li L, Li J, Xu H, et al., 2021. The protective effect of anthocyanins extracted from *Aronia melanocarpa* berry in renal ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Mediators of Inflammation, 2021: 7372893.

Liu Q Q, Gu X, Zhang Y X, et al., 2025. Molecular and metabolomics analysis reveals new insight into the mechanism underlying *Iris halophila* Pall. *IhCHS*1-mediated regulation of plant salt tolerance [J]. Environmental and Experimental Botany, 229: 106080.

Liu W X, Feng Y, Yu S H, et al., 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. International Journal of Molecular Sciences, 22(23): 12824.

Liu Y, Li Y Q, Meng X Y, et al., 2021. Cloning and functional characterization of chalcone synthase genes (*CmCHS*) from *Clivia miniata* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 48(10): 1847-1858. [刘玥, 李月庆, 孟祥宇, 等, 2021. 大花君子兰查尔酮合酶基因 *CmCHS* 的克隆及其功能验证 [J]. 园艺学报, 48(10): 1847-1858.]

Martín J F, Liras P, 2022. Comparative molecular mechanisms of biosynthesis of naringenin and related chalcones in actinobacteria and plants: Relevance for the obtention of potent bioactive metabolites [J]. Antibiotics (Basel), 11(1): 82.

Morita H, Wong C P, Abe I, 2019. How structural subtleties lead to molecular diversity for the type Ⅲ polyketide synthases [J]. Journal of Biological Chemistry, 294(41): 15121-15136.

Nakano H, Wu S S, Sakao K, et al., 2020. Bilberry anthocyanins ameliorate NAFLD by improving dyslipidemia and gut microbiome dysbiosis [J]. Nutrients, 12(11): 3252.

Ohta Y, Atsumi G, Yoshida C, et al., 2022. Post-transcriptional gene silencing of the chalcone synthase gene *CHS* causes corolla lobe-specific whiting of Japanese gentian [J]. Planta, 255: 29.

Pang Y Z, Shen G A, Wu W S, et al., 2005. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. Plant Science, 168(6): 1525-1531.

Park H L, Yoo Y, Bhoo S H, et al., 2020. Two chalcone synthase isozymes participate redundantly in UV-induced sakuranetin synthesis in rice [J]. International Journal of Molecular Sciences, 21(11): 3777.

Pollak P E, Hansen K, Astwood J D, et al., 1995. Conditional male fertility in maize [J]. Sexual Plant Reproduction, 8: 231-241.

Sanmugavelan R, Teoh T C, Roslan N, et al., 2018. In vitro and in silico studies of chalcone synthase variant 2 in *Boesenbergia rotunda* and its substrate specificity [J]. Turkish Journal of Biology, 42: 213-223.

Shin J, Park E, Choi G, 2007. *PIF*3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 49(6): 981-994.

Singh K, Kumar A, Kajal M, et al., 2019. Characterization and expression analysis of *chalcone synthase* and *chalcone isomerase* genes in *Phyllanthus emblica* (L.) [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 28(1): 105-113.

Sommer H, Saedler H, 1986. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus* [J]. Molecular and General Genetics, 202: 429-434.

Sun W, Sun S Y, Xu H, et al., 2022. Characterization of two key flavonoid 3-*O*-glycosyltransferases involved in the formation of flower color in *Rhododendron delavayi* [J]. Frontiers in Plant Science, 13: 863482.

Sun Y M, Tian Q Y, Yuan L, et al., 2011. Isolation and promoter analysis of a chalcone synthase gene *PtrCHS*4 from *Populus trichocarpa* [J]. Plant Cell Reports, 30(9): 1661-1667.

Surangi Dharmawansa K V, Hoskin D W, Vasantha Rupasinghe H P, 2020. Chemopreventive effect of dietary anthocyanins against gastrointestinal cancers: A review of recent advances and perspectives [J]. International Journal of Molecular Sciences, 21(18): 6555.

Tang X H, Ren C X, Hu J, et al., 2023. Cloning, expression and activity analysises of chalcone synthase genes in *Carthamus tinctorius* [J]. Chinese Herbal Medicines, 15(2): 291-297.

Wang J, Wang X L, Zhao S F, et al., 2023. *Brachypodium* BdCHS is a homolog of *Arabidopsis* AtCHS involved in the synthesis of flavonoids and lateral root development [J]. Protoplasma, 260 (3): 999-1003.

Wang Y H, Chen Y, Huang J, et al., 2023. Cloning and analysis of *RdDFR*1 from *Rhododendron Delavayi* and preparation of soluble recombinant protein [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 41(4): 88-96. [王聿晗, 陈瑶, 黄菊, 等, 2023. 马缨杜鹃 *RdDFR*1 基因的克隆分析与可溶性重组蛋白的制备 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 41(4): 88-96.]

Wu X X, Zhang S M, Liu X H, et al., 2020. Chalcone synthase (CHS) family members analysis from eggplant (*Solanum melongena* L.) in the flavonoid biosynthetic pathway and expression patterns in response to heat stress [J]. PLoS ONE, 15(4): e0226537.

Yahyaa M, Ali S, Davidovich-Rikanati R, et al., 2017. Characterization of three chalcone synthase-like genes from apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) [J]. Phytochemistry, 140(8): 125-133.

（责任编辑　邓斯丽）