

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 (Chalcone Synthase, 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 *RdCHS2* 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) *RdCHS2* 的 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) 表达分析显示, *RdCHS2* 在花萼中表达最高, 雄蕊中表达最低, 伴随开花过程中表达量呈逐渐上升趋势。(3) 酶活检测显示, *RdCHS2* 可分别催化丙二单酰辅酶 A (malonyl-CoA) 与对香豆酰辅酶 A (*p*-coumaroyl-CoA) 生成柚皮素查尔酮 (naringenin chalcone), 催化丙二单酰辅酶 A 与肉桂酰辅酶 A (cinnamoyl-CoA) 生成松属素查尔酮 (pinocembrin chalcone)。(4) 突变体互补实验显示, *RdCHS2* 可成功恢复拟南芥 *tt4* 突变体子叶与下胚轴中花青素苷的合成。该研究结果表明, *RdCHS2* 具有查尔酮合酶活性, 可以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

Cloning and expression analysis of *RdCHS2* from

Rhododendron delavayi

HU Rongmei¹, SHU Hefeng¹, ZHU Ling¹, ZHANG Ximin¹, GONG Jiyi^{1,2}, SUN Wei^{1,2*}

(1 Key Laboratory of Plant Physiology and Development Regulation/School of Life Science, 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 *RdCHS2* was cloned using *R. delavayi* as materials, meanwhile, its expression profile, catalytic activity *in vitro* and biological function *in vivo* were analyzed. The results were as follows: (1) The full length CDS of *RdCHS2* was 1170 bp encoding 389 amino acids. Phylogenetic analysis displayed that *RdCHS2* was grouped into the

基金项目: 贵州省自然科学基金 (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。

same clade with CHS from other plants and had typical conserved motifs of CHS. (2) Gene expression analysis showed that the transcript of *RdCHS2* was highest in scapes and lowest in stamens, and its expression level increased gradually during flowering. (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* *tt4* mutant demonstrated that heterologous expression of *RdCHS2* successfully restored anthocyanin biosynthesis in cotyledons and hypocotyls. These results show that *RdCHS2* exhibits typical CHS activity and participates in the biosynthesis of anthocyanin, which lay a foundation for further clarifying the specific function of this gene in the future.

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

马缨杜鹃属于常绿树形杜鹃，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。《植物志》等多部中医药典籍中记载，马缨杜鹃以花入药，可用于治疗骨髓炎、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，被证明具有一定的医疗价值，可以对阿尔兹海默病产生积极影响，降低糖尿病的功能障碍，改善非酒精性脂肪肝病，修复肾脏功能障碍及肾小管损伤，作为免疫抑制剂（Hyun et al., 2019）减缓癌细胞扩散（Surangi et al., 2020; Nakano et al., 2020; Li et al., 2021; Liu et al., 2021）。

查尔酮合酶（CHS）属于 Type III 型聚酮合酶（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 为底物反应产生柚皮素查尔酮，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，如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（Tai et al., 2014）；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）。而在矮牵牛的 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部分的表达量下调，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、红花的研究表明，两种植物的 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，同时其在植物着色部位的表达量最高（刘玥等，2021; Tang et al., 2023）。综上，查尔酮合酶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 *RdCHS2* 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 *RdCHS2* 的全长编码区，采用生物信息学软件、实时荧光定量 PCR、体外酶活检测、拟南芥遗传转化等方法，对 *RdCHS2* 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与其他物种 Type III 型聚酮合酶之间的进化关系，分析 *RdCHS2* 是否具有查尔酮合酶的潜在功能；（2）分析 *RdCHS2* 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马缨杜鹃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 *RdCHS2* 是否具有查尔酮合酶活性，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 WEIDI 公司；真核载体 pBI121、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 *RdCHS2* 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、测序确认 *RdCHS2* 核苷酸序列。

利用 ExPASy-Protparamtool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *RdCHS2* 的理化性质，MEGA 11 构建进化树，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

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	用途 Purpose	引物序列 (5'→3') Primer sequence
<i>RdCHS2</i> -F	基因克隆 Gene cloning	TCTAGAGATTATGGTCACCGTCG
<i>RdCHS2</i> -R		AAACGACGCTAATGGGTGTAGC
<i>RdCHS2</i> -pET32a(+)-F		CGGGATCC ATGGTCACCGTCGAGGAT
<i>RdCHS2</i> -pET32a(+)-R		CCCAAGCTT TCAAGTGCACAACTGTG
<i>RdCHS2</i> -pBI121-F	载体构建 Vector construction	GCTCTAGA ATGGTCACCGTCGAGGAT
<i>RdCHS2</i> -pBI121-R		GCGGATCC TCAAGTGCACAACTGTG
<i>RdCHS2</i> -qRT-F		CGGGATCCACGTACCCGGATTCTACTT
<i>RdCHS2</i> -qRT-R		CGCTTCTTGATCATGGATTGTGTC
<i>AtCHS</i> -qRT-F	表达分析 Expression analysis	GGCAAAGAAGCGGCAGTGAAG
<i>AtCHS</i> -qRT-R		ACGGAAGGACGGAGACCAAGAG

注：酶切位点： *Bam*H I: GGATCC; *Hind* III: AAGCTT; *Xba* I: TCTAGA。

Note: Restriction sites: *Bam*H I: GGATCC; *Hind* III: AAGCTT; *Xba* I: TCTAGA.

1.3 *RdCHS2* 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 Real-time PCR 引物，内参基因使用 *RdActin*。Real-time PCR 扩增程序为：95 °C 60 s; 95 °C 5 s、60 °C 60 s，共 40 个循环，每个样品设置 3 个生物学重复，运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 *RdCHS2* 的表达量。

1.4 *RdCHS2* 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 *Hind* III 酶切的 pET-32a(+)载体上，经测序正确的质粒命名为 pET-32a(+)-*RdCHS2*，并转化 BL21(DE3)感受态细胞。

1.5 *RdCHS2* 可溶性重组蛋白的制备

在培养温度为 15 °C 条件下，对 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS2* 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）的方法稍做修改，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（丙二单酰辅酶 A、香豆酰辅酶 A 和肉桂酰辅酶 A）和 *RdCHS2* 重组蛋白，用 BL21-pET-32a(+)空载体蛋白作为对照，柚皮素查尔酮和松属素查尔酮检测波长分别为 304、342 nm。

1.7 *RdCHS2* 真核表达载体构建

利用含有 CaMV35S 启动子和 NPTII 的 pBI121 构建拟南芥二元载体，将扩增得到的 *RdCHS2*，连接至经 *Xba* I 和 *Bam*H I 酶切的 pBI121 载体上，经测序正确的质粒命名为

pBI121-RdCHS2，并转化至农杆菌。

1.8 拟南芥 *tt4* 突变体的遗传转化

将突变体 *tt4* 培养至盛花期，用蘸花法进行遗传转化，获取 T₂ 代种子。将 T₂ 代、野生型及 *tt4* 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 Shine 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，用 Excel 进行数据统计，用 SPSS version 19.0 的 Turkey 法进行数据分析，利用 GraphPad Prism 8.0.1 绘图。

2 结果与分析

2.1 RdCHS2 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成酶基因 *RdCHS2*，该基因 ORF 全长为 1 170 bp，可以编码 389 个氨基酸，翻译形成推定蛋白分子量约为 42.6 kD，分子式为 C₁₈₉₈H₃₀₃₇N₅₀₃O₅₆₄S₂₀，其中 Leu 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 型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* 很可能属于查尔酮合酶类型的聚酮合酶。基序分析结果显示，除 Motif 6、Motif 8、Motif 10 外，其余 motif 在不同物种 Type III 类聚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 型聚合酶的功能中发挥重要作用（图 1）。

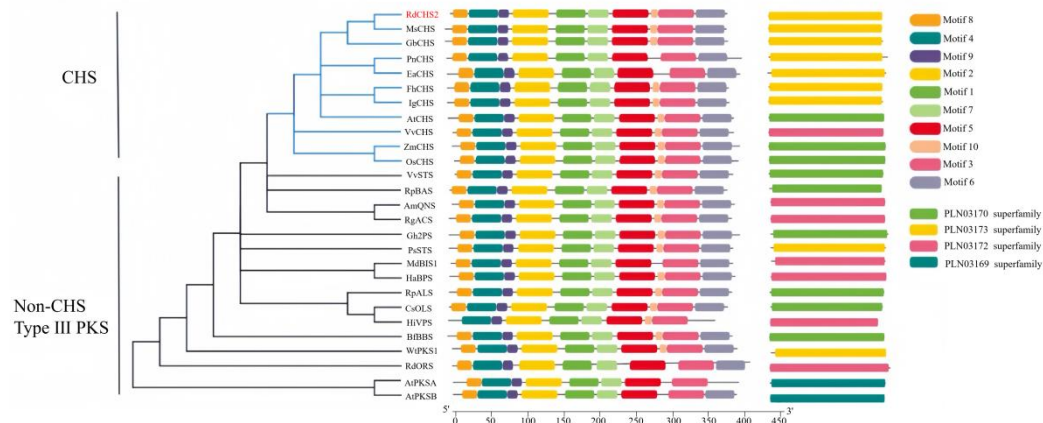
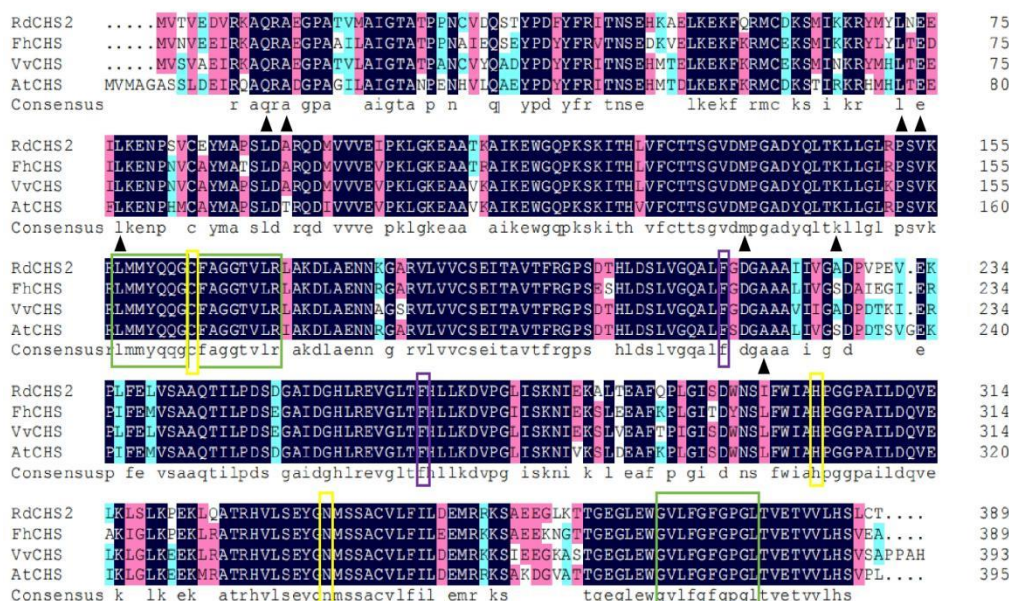


图 1 RdCHS2 基序分析
Fig. 1 Motif analysis of RdCHS2

将 *RdCHS2* 与已验证功能的查尔酮合酶进行多序列比对，结果如图 2 所示，*RdCHS2* 具有查尔酮合酶发挥功能必须的保守氨基酸与结构域。例如，催化位点残基（黄色框），决定 CHS 催化特异性的残基（紫色框），负责结合底物参与形成催化口袋的残基等（黑色三角形）。



黄色框表示 3 个保守催化残基；紫色框表示决定 CHS 底物特异性的残基；绿色框表示 CHS 的高度保守域；黑色三角形表示与香豆素基辅酶 A 结合的重要残基和 CHS 环化反应的特异性残基。

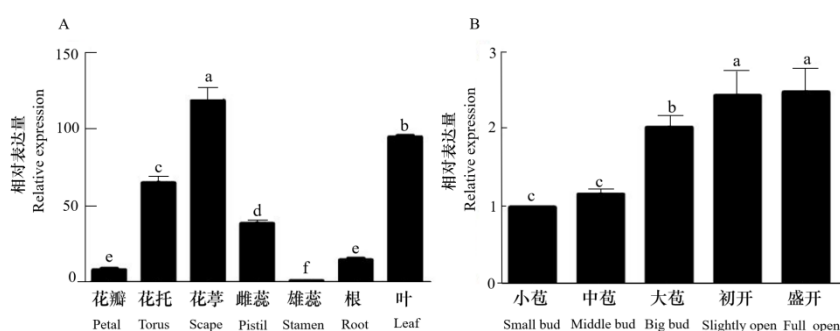
Yellow box indicates three conserved catalytic residues; Purple box indicates residue that determines the specificity of the CHS substrate; Green box indicates highly conserved domain of CHS; Black triangle indicates important residue binding to coumarin CoA and specific residue for CHS cyclization reaction.

图 2 RdCHS2 的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of RdCHS2

2.2 RdCHS2 基因表达量分析

RdCHS2 基因表达量分析显示，其在不同组织中均有表达，在花萼中的表达量最高，在雌蕊中的表达量最低；同时在马缨杜鹃开花过程中，*RdCHS2* 的表达量呈逐渐上升趋势（图 3）。



A. 不同组织 *RdCHS2* 表达量；B. 不同时期花朵中 *RdCHS2* 表达量。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

A. *RdCHS2* expression in different tissues; B. *RdCHS2* expression in flowers at different stages. Different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

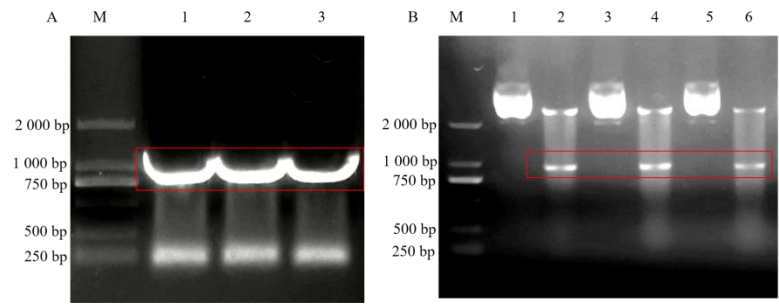
图 3 *RdCHS2* 基因表达量分析

Fig. 3 Expression analysis of *RdCHS2*

2.3 RdCHS2 原核表达载体构建

将线性化的 *RdCHS2* 与 pET-32a(+) 进行连接，经菌液 PCR、酶切验证、公司测序，表

明原核表达载体 pET-32a(+)-*RdCHS2* 构建成功（图 4）。



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

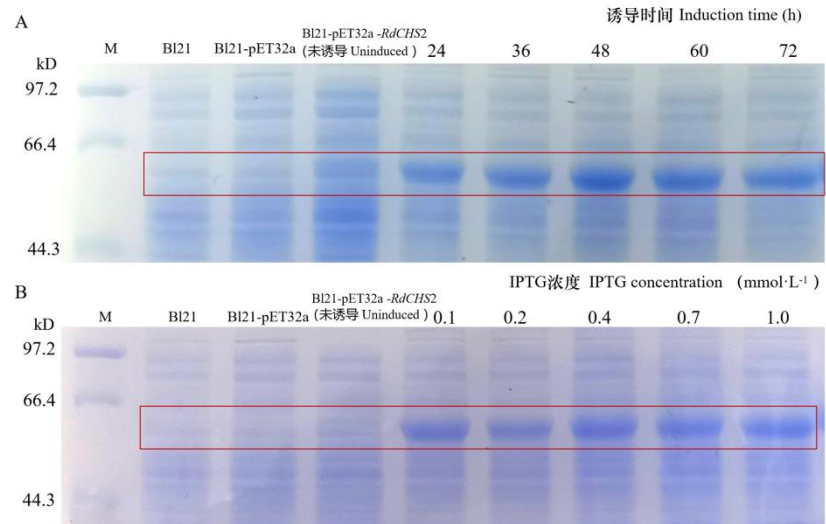
Red box indicates destination clip; **M.** Marker; **A.** PCR of bacterial solution; **B.** Double digestion validation results.

图 4 *RdCHS2* 原核表达载体的构建

Fig. 4 Prokaryotic expression vector construction of *RdCHS2*

2.4 可溶性重组蛋白的制备与酶活检测

将 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS2* 置于 15 °C，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 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为 15 °C，IPTG 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹，诱导表达时间为 48 h。



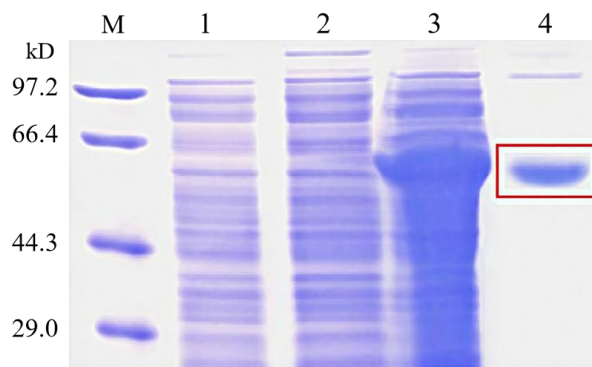
A. 不同诱导时间；**B.** 不同 IPTG 浓度。

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

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

按上述条件对 BL21-pET-32a(+)-*RdCHS2* 进行大量诱导培养，收集菌体超声破碎后获得上清液，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。



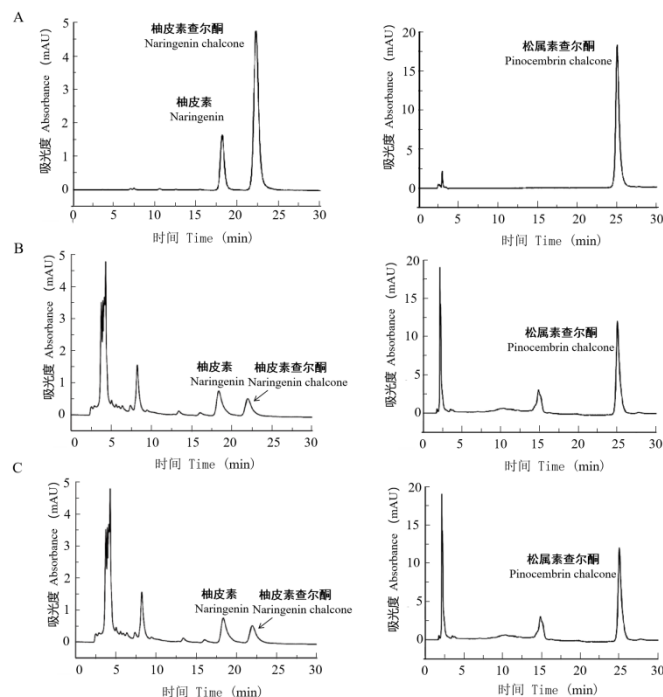
M. Marker; 1. BL21; 2. BL21-pET-32a (+); 3. 纯化前; 4. 纯化后。

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

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 反应产生柚皮素查尔酮；同时也可催化丙二酰辅酶 A 和肉桂单酰辅酶 A 产生松属素查尔酮，证明 RdCHS2 具有查尔酮合酶的功能。



A. 标准品; B. 酶活产物; C. pET-32a (+) 蛋白对照。

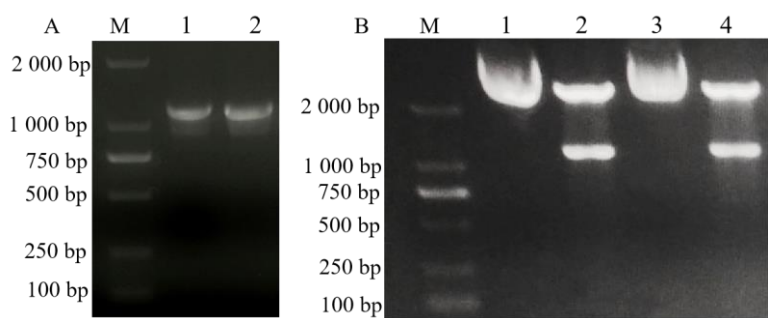
A. Standard; B. Enzyme activity product; C. pET-32a (+) protein control.

图 7 RdCHS2 体外酶活检测

Fig. 7 Enzyme assay of RdCHS2 *in vitro*

2.5 RdCHS2 真核表达载体构建与 *tt4* 突变体的转化

将线性化的 RdCHS2 与 pBI121 进行连接，经菌液 PCR、酶切验证、公司测序，结果表明，真核表达载体 pBI121-RdCHS2 构建成功（图 8）。



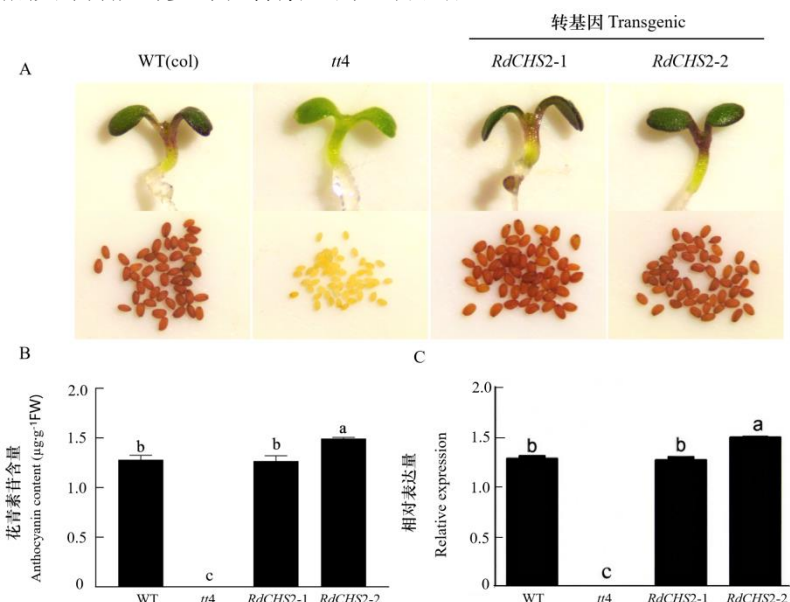
M. Marker; A. 菌液 PCR; B. 酶切验证。

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 *RdCHS2*

转基因结果如图 9 显示，在体式显微镜下 T_2 代转基因种子及其幼苗与 *tt4* 突变体相比，种皮恢复棕色，幼苗子叶及下胚轴恢复紫色，花青素苷合成成功恢复；Real-time PCR 结果显示，*RdCHS2* 在转基因植株中的表达与 *AtCHS* 在野生型中的表达相似，说明 *RdCHS2* 与 *AtCHS* 具有相似的功能均参与花青素苷的生物合成。



A. 表型分析; B. 总花青素苷含量测定; 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 total anthocyanin content; C. Relative expression analysis. Different letters present 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 *RdCHS2* in *Arabidopsis tt4* mutant

3 讨论与结论

关于聚酮合酶 (PKS) 的研究显示，越来越多的 PKSs (除 CHS 外)，如二苯乙烯合成酶 (STS)、吡啶酮合成酶 (ACS) 和 2-吡咯酮合成酶 (2PS) 等已经被证明与 CHS 具有相同的催化机制，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 (Juan & Paloma, 2022)，并且这些 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 PKSs (Yuka et al., 2022)。为了更好地区别 CHS 与其他 PKSs，特定位置的氨基酸种类可以帮助鉴定 CHS，如第 215 位和 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 (Mprita et al., 2019)。水稻 OsCHS9 因为第 265 位苯丙氨酸被甘氨酸取代，便检测不到 CHS 活性 (Park et al., 2020)。多序列比对分析显示，RdCHS2 第 215 位和 265 位均为苯丙氨酸，同时系统进化分析显示，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 的功能，但具体功能还需要通过实验进一步验证。

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的生物合成，在不含花青素的器官中表达的 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* 在马缨杜鹃花萼中表达量最高，且随着花朵的开放表达量逐渐升高，与马缨杜鹃中花青素苷的积累模式不一致 (Sun et al., 2022)。这表明 *RdCHS2* 在马缨杜鹃花色形成过程中没有发挥主要作用，或者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 并且可以发挥典型的催化作用。但同时 *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，这一结果与上述表达分析的结果相一致。当然为进一步证明 *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 *tt4* 突变体由于查尔酮合成酶功能异常，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。本文研究结果显示，*RdCHS2* 可以将 *tt4* 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 *RdCHS2* 的导入使拟南芥的类黄酮生物合成恢复正常，表明 *RdCHS2* 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，这与茶树 *CsCHS*、短丙草 *BdCHS* 的研究结果相同 (Li et al., 2024; Wang et al., 2017)。在前期研究中，*RdCHS1* (Huang et al., 2024) 的导入同样能恢复 *tt4* 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 *RdCHS1* 在马缨杜鹃花色形成中发挥主要作用，*RdCHS2* 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 除了对植物花色起到重要调节作用外，还具有促进植物黄酮类化合物合成，介导茉莉酸及细胞分裂素信号传导途径，加强植物抗逆性，提高植物对炭疽病、灰霉病和霜霉病的抗性等功能 (Sun et al., 2011; Wang et al., 2017; Guo et al., 2022; Liu et al., 2025)，然而 *RdCHS2* 是否能增强植物对非生物胁迫的适应性还有待进一步研究。

参考文献:

- BUER CS, DJORDJEVIC MA, 2009. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 60(3): 751-763.
- CHANG C, BOWAMN JL, DDJHON AW, et al., 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(18): 6856-6860.
- DARE AP, TOMES S, JONES M, et al., 2013. Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus × domestica*) [J]. Plant Journal, 74(3): 398-410.
- FERRER JL, JEZ JM, BOWMAN ME, et al., 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. Nature Structural Biology, 6(8): 775-784.
- GUO ZX, SUN DY, QÜ JJ, 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 HX, 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 *RdCHS1* is involved in flavonoid biosynthesis in *Rhododendron delavayi* [J]. Molecules, 29(8): 1822.
- HYUN KH, GIL KC, KIM SG, 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.
- JUAN FM, PALOMA L, 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, 11(1): 82.
- KOES RE, SPELT CE, MOL JNM, 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(2): 213-225.
- KOSEKI M, GOTO K, MASUTA C, et al., 2005. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'red Star' fowers 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(1): 7372893.

- LIU L, LI YQ, MENG XY, 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.]
- LIU QQ, GU X, ZHANG YX, et al., 2025. Molecular and metabolomics analysis reveals new insight into the mechanism underlying *Iris halophila* Pall. *IhCHS1*-mediated regulation of plant salt tolerance [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 229(1): 106080.
- LIU W, FENG Y, YU S, et al., 2021. The flavonoid biosynthesis network in plants [J]. *International Journal of Molecular Science*, 22(23): 12824.
- MPRITA H, WONG CP, 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, SAKAO K, et al., 2020. Bilberry anthocyanins ameliorate NAFLD by improving dyslipidemia and gut microbiome dysbiosis [J]. *Nutrients*, 12(11): 3252.
- PANG Y, SHEN G, WU W, et al., 2005. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Science*, 168(6): 1525-1531.
- PARK HL, YOO Y, BHOO SH, 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, HANSEN K, ASTWOOD J, et al., 1995. Conditional male fertility in maize [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 8(7): 231-241.
- REIMOLD U, KRÖGER M, KREUZALER F, et al., 1983. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme [J]. *The EMBO Journal*, 2(10): 1801-1805.
- SANMUGAVELAN R, TEOH TC, 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(3): 213-223.
- SHIN J, PARK E, CHOI G, 2007. *PIF3* 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(3): 105-113.
- SUN W, SUN SY, 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(5): 863482.
- SUN YM, TIAN QY, LI Y, et al., 2011. Isolation and promoter analysis of a chalcone synthase gene *PtrCHS4* from *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Cell Reports*, 30(9): 1661-1667.

- SURANGI D, DAVID H, VASANTHA R, 2020. Chemopreventive effect of dietary anthocyanins against gastrointestinal cancers: A review of recent advances and perspectives [J]. International Journal of Molecular Science, 21(18): 6555.
- TAI D, TIAN J, ZHANG J, et al., 2014. A *Malus* crabapple chalcone synthase gene, *McCHS*, regulates red petal color and flavonoid biosynthesis [J]. PLoS ONE, 9(10): e110570.
- TANG X, REN C, HU J, et al., 2023. Cloning, expression and activity analyses of chalcone synthase genes in *carthamus tinctorius* [J]. Chinese Herbal Medicines, 15(2): 291-297.
- WANG CH, ZHI S, LIU CY, et al., 2017. Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 115(6): 107-118.
- WANG YH, CHEN Y, HUNAG J, et al., 2023. Cloning and analysis of *RdDFR1* from *Rhododendron Delavayi* and preparation of soluble recombinant protein [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 41(4): 1-9. [王聿晗, 陈瑶, 黄菊, 等, 2023. 马缨杜鹃 *RdDFR1* 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): 1-9.]
- WU XX, ZHANG SM, LIU XH, 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.
- YUKA O, GO A, CHIHARU Y, et al., 2022. Post-transcriptional gene silencing of the chalcone synthase gene *CHS* causes corolla lobe-specific whiting of Japanese gentian [J]. Planta, 255(1): 29.