

# 马铃薯野生种 CHS 基因 cDNA 的克隆与表达分析

卢其能<sup>1,2</sup>, 杨清<sup>2</sup>, 却志群<sup>1</sup>, 黄友明<sup>1</sup>

(1. 宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2. 南京农业大学 生命科学院, 生化与分子生物学系, 江苏 南京 210095)

**摘要:**设计简并引物,用 RT-PCR 法从马铃薯野生种 (*Solanum pinnatisectum*) 克隆到了 CHS (Chalcone synthase, 查尔酮合酶) 基因的全长 cDNA,并用半定量 RT-PCR 法进行了表达分析。序列分析表明, CHS 基因编码一个 389 个氨基酸残基的多肽,在氨基酸水平上与其他茄科植物的同源性达到 89%~93%,多重比较和系统发育分析均表明该基因为 CHS 家族中的一个新成员;检测了 CHS 基因的空间表达模式,该基因在花和匍匐茎中表达量最高,在根和块茎中没有检测到,这与花和匍匐茎呈淡紫色有花色苷合成,而根和块茎呈白色无花色苷合成是相一致的;发现在块茎中 CHS 受光诱导表达,光照后的第 3 天表达量最高,而在光照前检测不到,光照前块茎为白色,随着光照时间的延长,其表层颜色因积累花色苷而变成紫红色。

**关键词:**查尔酮合酶;花色苷;cDNA 克隆;表达谱;马铃薯野生种

**中图分类号:**S532.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)05-0017-06

## cDNA Cloning and Expression Analysis of CHS Gene from Wild Potato

LU Qi-neng<sup>1,2</sup>, YANG Qing<sup>2</sup>, QUE Zhi-qun<sup>1</sup>, HUANG You-ming<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Resources and Environment Sciences, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The degenerate primers were designed based on the published information of sequence of *Solanaceae* plants. The complete long cDNAs encoding CHS was isolated from wild potatoes (*Solanum pinnatisectum*) by RT-PCR with the degenerated primers. The sequence analysis indicated that CHS cDNA encoded a polypeptide composed of 389 amino acid residues, the deduce protein showed 89% - 93% identity with CHS of *Solanaceae* plant, and the multiple alignment and phylogenetic analysis demonstrated that it belong to a member of the corresponding CHS-subfamily enzymes; The spatial expression patterns of CHS gene in wild potato were examined by semi-quantitative RT-PCR with the specific primers. The expression analysis indicated that CHS gene were preferentially expressed in flowers and stolons, its transcripts could not detected in roots and tubers, and these were involved in accumulation of anthocyanins in slightly purple flowers and stolons, and no accumulation of anthocyanins in white roots and tubers. The response of CHS gene expression was investigated by RT-PCR analysis in wild potato tubers to white light. The transcripts of CHS gene were barely present or non-detected in the tuber skins before light induction, but light treatment increased their expression greatly. Expression of CHS was highest at 3 days after light exposure, and did not detected at 0 days after light exposure only, while tubers were only white before light treatment, it was indicated that the transcriptional activity of CHS basically correlate to anthocyanin production in tuber skins.

**Key words:** Chalcone synthase; Anthocyanins; cDNA cloning; Expression pattern; *Solanum pinnatisectum*

马铃薯是仅次于小麦、水稻和玉米的第四大粮食作物,用途广泛。马铃薯栽培种块茎的颜色除了常见的白色和黄色品种外,还有少数为红色、紫色品种,研究表明,花色苷是有色块茎颜色的决定因子,

收稿日期:2008-06-28

基金项目:江西省教育厅科技项目(2007-313);江苏省国际合作项目(BZ2003041)

作者简介:卢其能(1968-),男,江西宜春人,博士,副教授,主要从事天然色素的生物合成与基因工程的研究。

通讯作者:杨清(1959-),男,江苏涟水人,博士,教授,主要从事植物生物技术与分子生物学研究。

花色苷也存在于马铃薯薯肉、根、地下地上茎、叶片和花中<sup>[1]</sup>。马铃薯野生种(*Solanum pinnatisectum*)块茎的颜色只有白色和紫色两种,白色块茎不含花色苷,紫色块茎所含的花色苷主要为锦葵素<sup>[2]</sup>。作为食用天然色素,花色苷还具有一定的还原能力、抗脂质过氧化能力和清除自由基等方面的能力,可广泛应用于食品、医药和化妆品等行业<sup>[3]</sup>。

花色苷的生物合成途径是被最为广泛而又深入研究的植物次生代谢途径,特别在主要模式植物中已经很清楚,如拟南芥<sup>[4]</sup>、玉米和矮牵牛<sup>[5]</sup>,但是这些基因在不同种类的花色苷合成、表达水平及其组织特异性方面在大多数作物中还不清楚,有待进一步研究<sup>[6]</sup>。

花色苷属黄酮类物质,花色苷的合成从莽草酸代谢途径合成苯丙氨酸和脂肪酸合成代谢合成丙二酰 CoA 开始经苯丙烷类途径合成<sup>[7]</sup>。在花色苷的生物合成途径中,CHS 为查尔酮合酶,CHS 催化 4-香豆酸 CoA 与 3 个丙二酰 CoA 缩合成查尔酮,形成的查尔酮提供了类黄酮的基本碳骨架,故 CHS 为类黄酮和花色苷合成的关键酶,现已从多种植物中分离、纯化<sup>[8]</sup>。不同植物的 CHS 基因序列同源性很高,但功能上存在明显差异,同一植物体内也存在 CHS 多个编码基因,在不同品系中的表达活性不同<sup>[9]</sup>。CHS 是花色苷合成途径中第一个被分离的基因,最早是从欧芹(*Petroselinum hortense*)悬浮细胞得到<sup>[10]</sup>。CHS 编码区有很高的保守性,不同科植物间,在 DNA 水平上的同源性大于 60%、在氨基酸水平上的同源性达 80%<sup>[11]</sup>。马铃薯为茄科植物,CHS 基因已经从马铃薯栽培种(*Solanum tuberosum* L.)中克隆到<sup>[12]</sup>,但在马铃薯野生种中除卢其能简单报道过外<sup>[13]</sup>,未见其他报道。

本试验采用现有生物信息和分子克隆手段,参考相关资料,设计简并引物,用 RT-PCR 的方法首先从马铃薯野生种中克隆到查尔酮合酶基因的完整 cDNA。同时,发现马铃薯野生种的白色块茎能被光诱导生成花色苷而变成紫黑色,并初步探讨了其分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

本试验材料是从美国国家马铃薯种质资源库引进的马铃薯野生种(*Solanum pinnatisectum*)。该材料种植在温室的大盆钵中,在成熟期分别收集根、茎、叶、花、块茎和匍匐茎,收获后立即放入液氮中速冻,然后在 -80℃ 下贮存。从每个植株上收集 2~3 个

薯块后立即用铝铂包裹,保存在 8℃,相对湿度为 90%~95% 的条件下分别处理 0~10 d,剩余的薯块在同样的条件下,于光照强度为 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下光照处理 0~10 d。从不同处理天数的块茎中随机抽取来自光照处理和暗处理的块茎各 5 个,用直径为 5 mm 的打孔器取下薯皮用于花色苷含量的测量和基因表达分析时 RNA 的提取。基因克隆的总 RNA 从芽中提取。

### 1.2 RNA 的提取和 cDNA 克隆

用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒从见光块茎萌发的紫色芽中提取总 RNA。用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。根据从 GeneBank 上搜寻到的 CHS 基因的同源 cDNA 全长序列,重点参考茄科植物(*Solanum tuberosum*, *Petunia hybrida*, *Solanum melongena* 和 *Lycopersicon esculentum* 等)的相应 cDNA 同源序列,分别设计 CHS 基因的简并引物如下:CHS 正向引物:5'-A(T/A)G(G/C)T(C/G)AC-CGT(G/C)(G/A)AG(G/A)A(G/A/T)(T/G)(A/T)C-3'和 CHS 反向引物:5'-AAG(A/C/T)(T/A)G(C/A)(A/G/C)ACACT(G/A)TG(A/G)AG(A/C)ACAC-3',所用引物均由大连宝生物公司合成。

cDNA 第一链由 Random Primer 反转录合成后,建立如下 PCR 反应体系和循环程序:在 50  $\mu\text{L}$  的反应体系中分别加入 1  $\mu\text{L}$  cDNA 第一链模板、5  $\mu\text{L}$  的 10  $\times$ PCR Buffer、3.8  $\mu\text{L}$  的 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、1  $\mu\text{L}$  的 10 mmol/L dNTP、0.3  $\mu\text{L}$  Takara Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )、25 pmol 的正向引物和反向引物各 1  $\mu\text{L}$ ,加 35.9  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O 使总体积为 50  $\mu\text{L}$ ;PCR 循环程序 94℃ 预变性 4 min 后,于 94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 1 min 10 s,35 个循环后,最后在 72℃ 保温 6 min,取出待用。RT-PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳后,切取目标带用大连宝生物公司的琼脂糖胶 DNA 纯化试剂盒回收,回收产物连接到克隆载体 pMD 18-T 上,送上海 Invitrogen 公司测序。

### 1.3 序列分析

序列同源性比较由 GenBank 的 BLAST 程序完成(网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)、序列的 ORF 查找、翻译和酶切位点分析,序列比较由 DNAssist 软件完成(版本 2.2)下载网址为(<http://www.dnassist.org/>)、氨基酸序列的预测由 Compute PI/MW 完成(网址为 <http://www.expasy.ch/tools/>)、氨基酸序列的多重比较和 neighbor-joining 进化树由 DNA man(version 5.22)完成。

### 1.4 基因组织特异性表达与花色苷积累的检测

分别从根、茎、叶、花、块茎、匍匐茎和顶芽中按

前述方法提总 RNA 和合成 cDNA 第一链,根据已测定的 *CHS* 基因的 cDNA 全长序列设计如下特异引物:正向引物:5'-ATGGTCACCGTGGAGGATATC-3'和反向引物:5'-CTAAGATGCAACACTGTGAAGAAC-3',PCR 循环程序分别与前述基因克隆循环程序相同,仅循环次数改为 26 次。以持家基因 GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)的一段 380 bp 的序列作内标来确定 PCR 时的模板量<sup>[14]</sup>,其引物为:上游引物为 5'-CAAGGACTGGAGAGGTGG-3'和下游引物为 5'-TTCACTCGTGTGTCGACC-3',PCR 循环程序分别与前述相同,退火温度改为 50 ,循环次数为 26 次。

1.5 花色苷提取与含量的测定

用 1 % (V/V) 的盐酸甲醇溶液在 4 黑暗条件下分别浸提马铃薯的根、茎、叶、花、块茎、匍匐茎和顶芽 24 h 后,过滤,测其花色苷最大吸收波长 541 nm 处的最大吸收值和 657 nm 处的叶绿素的吸收值,用公式  $OD_{541} = OD_{541} - 0.25OD_{657}$ 来校正花色苷含量<sup>[15]</sup>。

1.6 CHS 的光诱导表达与花色苷测定

分别从光照和暗处理 0、3 和 10 d 的块茎上用打孔器取下直径为 5 mm 薯皮,提取总 RNA 和合成 cDNA 第一链,以及提取花色苷;*CHS* 基因光诱导表达分析的特异引物同上,花色苷提取与含量的测定同上。

2 结果与分析

2.1 CHS 基因的克隆

采用简并引物,通过 RT-PCR 的方法较为顺利地 从马铃薯野生种见光块茎萌发的紫色芽的总 cDNA 中克隆到了 *CHS* 基因的全长 cDNA,扩增出的 *CHS* 条带约为 1 100 ~ 1 200 bp (图 1)。可见根据现有相关资料,设计简并引物进行 *CHS* 基因的克隆是可行的。

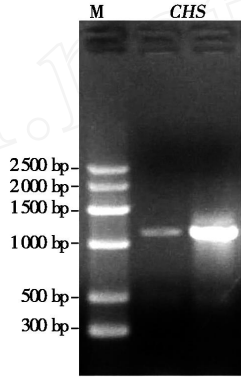


图 1 马铃薯野生种 *CHS* 的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis RT-PCR products of *CHS* from *Solanum pinatisectum*

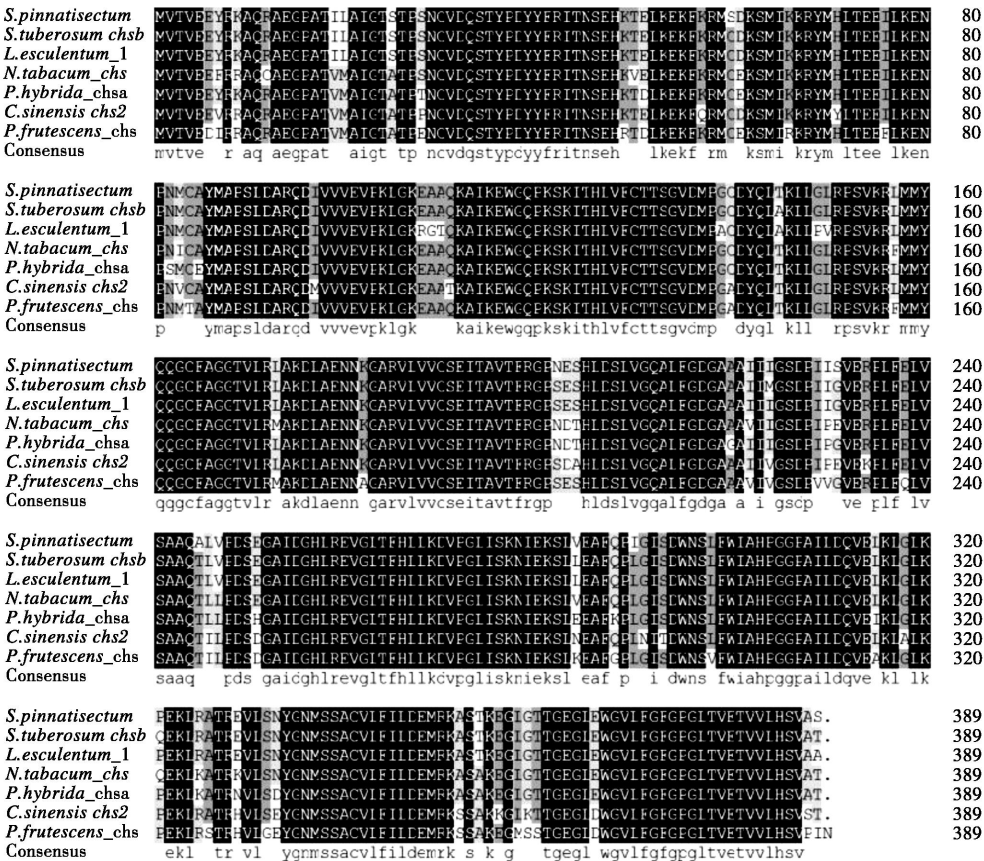


图 2 马铃薯野生种 *CHS* 的氨基酸序列与相似性较高( 85 %)的其他物种的 *CHS* 氨基酸序列的多重比较

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of *CHS*

## 2.2 CHS 的序列与功能分析

2.2.1 序列分析 测序表明扩增出马铃薯野生种的 *CHS* 条带为 1 172 bp, 包含一个全长为 1 170 bp 的阅读框 (GeneBank Accession number AY954033) 编码的多肽为 389 氨基酸残基, 分子量约为 43 kDa, pHI 为 6.3; 在蛋白水平上与来自茄科的马铃薯栽培种 (*S. tuberosum*, Q43163) 同源性最高, 达 93 %, 其次是番茄 (*Lycopersicon esculentum*, P23418) 达 92 %, 再是烟草 (*Nicotiana tabacum*, Q93XP8) 和矮牵牛 (*Petunia hybrida*, P08894), 同源性为 89 %。核苷酸水平上与马铃薯栽培种 (*S. tuberosum*, U47740) 的一致性最高, 达到了 96 %; 其次是番茄 (*Lycopersicon esculentum*, X55194) 达 95 %; 再是烟草 (*Nicotiana tabacum*, AF311783) 达 88 %。

2.2.2 氨基酸序列的多重比较 选择与马铃薯野生种 *CHS* 相似性较高 (85 %) 的其他物种相应多肽作多重比较, 可以看出, 它与同科的茄科植物同源性最高 (图 2)。*CHS* 催化 4-香豆酸 CoA 与丙二酰 CoA 缩合成查尔酮, 形成的查尔酮提供了类黄酮的基本碳骨架, 故 *CHS* 为类黄酮和花色苷合成的关键酶, 在 *CHS* 蛋白家族中, Cys164, His303, Asn336 为催化活性位点, Thr197, Ile254, Gly256, Ser338 为底物特异性位点<sup>[16]</sup>, 在 *CHS* 蛋白亚家族中的特征性保守位点 Cys162, Phe213, Phe263, His301, Asn338 和保守序列 (370GFPG)<sup>[17]</sup> 在马铃薯野生种 *CHS* 中都能找到。

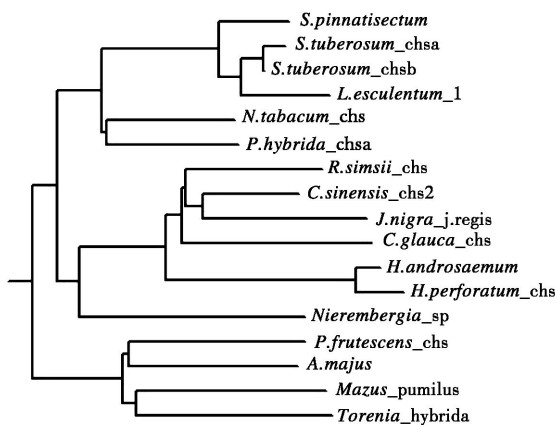


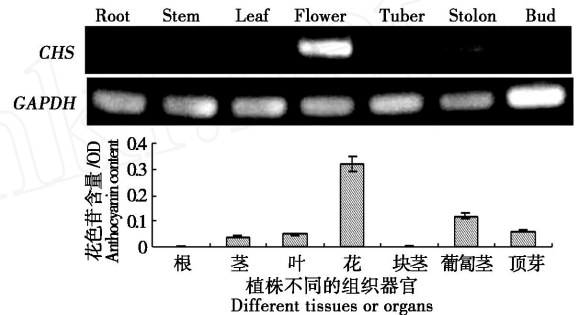
图 3 *CHS* 的系统发育分析

Fig.3 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of the CHSs

2.2.3 系统发育分析 马铃薯野生种 *CHS* 的系统发育分析, 选择了 16 个亲缘关系最密切和具有代表性的 *CHS* 蛋白, 用相邻连接法构建系统发育树状图 (图 3)。结果显示, 马铃薯野生种 *CHS* 与马铃薯栽培种的 *CHSa*、*CHSb* 和番茄 *CHS* 同属一小类, 亲缘关系最近, 而与烟草和矮牵牛同属一簇, 亲缘关系很近。而其他双子叶植物亲缘关系较远, 与单子叶植物亲缘关系最远。

## 2.3 *CHS* 的表达分析

2.3.1 空间表达分析 为了检测 *CHS* 基因在植株中不同组织和器官的表达情况及其与花色苷积累的关系, 分别从根、茎、叶、花、块茎、匍匐茎和顶芽提取总 RNA 和花色苷。用特异引物半定量 RT-PCR 分析表明, *CHS* 在花和匍匐茎的表达量比茎、叶和顶芽的表达量高, 而在根和块茎中没有检测到 (图 4), 这与花和匍匐茎呈淡紫色, 花色苷含量较高, 叶片含少量花色苷, 而根和块茎呈白色无花色苷合成和积累。

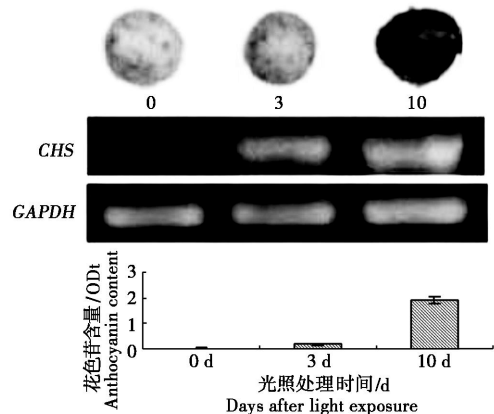


PCR 产物在 1 % 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色; GAPD 为 380 bp 的内标; 下图为不同组织器官对应的花色苷含量。

The PCR products were separated in 1 % agarose gel and visualized under UV light by EtBr staining. The loading mRNA amount was standardized by comparison with PCR product of GAPDH, which generated a 380 bp PCR product. Total anthocyanins content expressed as content per given surface area of tuber skins (down).

图 4 *CHS* 在野生种植株中不同组织和器官的半定量 RT-PCR 表达分析

Fig.4 Expression analysis of *CHS* in various tissues or organs by semi-quantitative RT-PCR



马铃薯野生种块茎的颜色变化 (上)、*CHS* 基因在块茎表皮组织中不同光照时间的表达情况和用来确定模板量的 GAPDH 内标 (中)、块茎表皮组织中不同光照时间的花色苷含量变化 (下)。

The color of *S. pinnatisectum* tuber skins change at different days after light exposure (up), the induction of the *CHS* in the tuber skin tissues at different days after light exposure and the loading mRNA amount was standardized by comparison with PCR product of GAPDH, which generated a 380 bp PCR product. (middle); Total anthocyanins content expressed as content per given surface area of tuber skins (down).

图 5 光诱导马铃薯野生种块茎 *CHS* 基因的表达和花色苷的积累

Fig.5 Temporal expression of *CHS* gene and quantification of anthocyanin pigments

2.3.2 光诱导块茎 *CHS* 基因的表达而导致花色苷

的积累 在许多植物中花色苷生物合成相关基因能被紫外光和白光诱导表达<sup>[13,18-21]</sup>。分别提取被光处理 0,3,10 d 块茎表皮中的总 RNA 和花色苷,用于检测 *CHS* 基因的表达和相应花色苷的积累情况。结果表明,*CHS* 在 0 d 时其表达没有检测到,光照第 3 天后表达量迅速增加,在光照第 10 天达到最高水平,花色苷的积累也迅速增加,薯皮颜色由白变成紫(图 5)。这表明马铃薯野生种块茎花色苷生物合成受光诱导并可能主要是通过诱导 *CHS* 的表达而造成的。

### 3 讨论

采用 RT-PCR 方法克隆到 *CHS* 基因的全长 cDNA。花色苷生物合成途径在被子植物中是很保守的,其生物合成相关基因在亲缘关系相近的物种间同样具有相当的保守性。马铃薯为茄科植物,已有证据表明,茄科中控制花色苷生物合成的相关基因在不同种属间是非常保守的<sup>[6,22,23]</sup>。由于已分别在同科的矮牵牛和番茄均已克隆到 10 多个花色苷生物合成相关基因,在茄子 (*Solanum melongena*) 和辣椒 (*Casicum spp*) 也克隆到部分花色苷生物合成相关基因<sup>[6]</sup>,再加上 GeneBank 上公布的网上的相关基因资源,使从马铃薯野生种中克隆花色苷生物合成相关基因成为可能且变得相对容易。用简并引物,通过 RT-PCR 的方法较为顺利地克隆到马铃薯野生种的紫色芽的 cDNA 中克隆到了 *CHS* 基因的全长 cDNA。这再次表明在茄科中控制花色苷生物合成的 *CHS* 基因在其 3 和 5 端是相当保守的。前人在其他植物中克隆花色苷合成相关基因时主要采用构建 cDNA 文库,然后用同源序列为探针进行扫描来获得各基因的全长 cDNA<sup>[20,24-27]</sup>。本研究表明,在有足够资料信息的前提下,完全可以采用 RT-PCR 这种花费少,省时又省力的方法在亲缘关系较近的物种间直接克隆花色苷合成相关基因的全长 cDNA。多重比较和系统发育分析均表明,*CHS* 基因编码的多肽为相应蛋白质家族中的成员,在 *CHS* 酶超家族中,Cys162, Phe213, Phe263, His301 和 Asn338 是严格保守的,而 370GFGPG 序列是高度保守的<sup>[17]</sup>,这些特点在马铃薯野生种 *CHS* 氨基酸序列中都存在。

马铃薯野生种 *CHS* 基因的空间表达存在差异。用半定量 RT-PCR 分析表明,*CHS* 基因主要在花、匍匐茎和顶芽中表达,在根和块茎中没有检测到,这与花、匍匐茎和顶芽呈淡紫色有花色苷合成,而根和块茎呈白色无花色苷合成是相一致的。这种表达模式可能与花色苷组织特异性积累相关,类似的表达模

式在紫苏 (*Perilla frutescens*)<sup>[20]</sup>、豌豆<sup>[28]</sup>、龙胆<sup>[29]</sup>和苹果<sup>[21]</sup>曾报道过。

马铃薯野生种块茎中的花色苷的积累受光诱导。*CHS* 启动子具备的顺式作用元件与相应的转录因子作用决定其表达的发育特异性及其对环境的反应<sup>[30]</sup>,如在矮牵牛的 *CHS* 家族,*CHSA* 和 *CHSJ* 的启动子中存在可控制基因在花中特异表达的元件<sup>[31]</sup>。用半定量 RT-PCR 分析了 *CHS* 基因在马铃薯野生种块茎中受光诱导后的表达及其与花色苷积累的关系,表明该基因在光诱导之前表达量很低或不表达,但在光照之后表达量显著增加。*CHS* 基因在光照后的第 3 天表达量最高,而在光照前检测不到,光照前块茎为白色,随着光照时间的延长,其表层颜色加深,花色苷开始积累,这与 *CHS* 在光诱导后的表达是一致的,这与胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 细胞培养时光诱导的情况类似<sup>[32]</sup>,而与苹果不同<sup>[33]</sup>。有研究表明,*CHS* 表达可被真菌或机械损伤诱导,或被紫外光诱导<sup>[34]</sup>,不同光质对马铃薯野生种块茎花色苷光诱导的影响还有待进一步研究。此外,花色苷的生物合成除了受多个结构基因的控制外,还受到多种调节基因的控制<sup>[35,36]</sup>。低温被认为是另一个影响花色苷积累及其基因表达的因素,它与光照一起共同影响花色苷的合成<sup>[37-39]</sup>。我们也观察到,马铃薯野生种块茎在光照条件下给予一定的低温能略微增加花色苷的积累。有关光诱导下生成的花色苷的具体种类和结构还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Burton W G. The Potato [M]. New York: Wiley Press, 1989: 328 - 329.
- [2] Lewis C E, Walker J R L, Lancaster J E, et al. Determination of anthocyanins, flavonoid and phenolic acids in potatoes. I. coloured cultivars of (*Solanum tuberosum* L.) [J]. J Sci Food Agric, 1998, 77: 45 - 57.
- [3] 徐亚民, 马越, 赵晓燕, 等. 紫苏等 4 种天然色素抗氧化能力的比较 [J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 187 - 190.
- [4] Bartel B, Matsuda S P T. Seeing red [J]. Science, 2003, 299: 352 - 353.
- [5] Holton T, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1071 - 1083.
- [6] De Jong W S, Eanneta N T, De Jong D M, et al. Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the Solanaceae [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 423 - 432.
- [7] Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. Nat Prod Rep, 2003, 20: 288 - 303.
- [8] Dixon R A, Dey P M, Lamb C J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology [J]. Adv Enzymol, 1983, 55: 239 - 291.
- [9] Schroder J, Raiber S, Berger T, et al. Plant polyketide synthase: a chalcone synthase-type enzyme which performs a com-

- densation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones[J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 8417 - 8425.
- [10] Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, *et al.* UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Perrosklinum hortense* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1983, 80: 2591 - 2593.
- [11] Ursula N K, Barzen E, Bernhardt J, *et al.* Chalcone synthase genes in plants: a tool to study evolutionary relationship [J]. *J Mol Evol*, 1987, 26: 213 - 225.
- [12] Jeon J H, Joung H, Byun S M. Characterization of two members of the Chalcone Synthase gene family from *Solanum tuberosum* L [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 348.
- [13] Lu Q N, Yang Q. cDNA cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in wild potato (*Solanum pinnatisectum*) [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5 (10): 811 - 818.
- [14] Knud L. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding cinnamoyl CoA reductase (CCR) from barley (*hordeum vulgare*) and potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161: 105 - 112.
- [15] Mancinelli A L, Rossi F, Moroni A. Cryptochrome, phytochrome, and anthocyanin production [J]. *Plant physiol*, 1991, 96: 1079 - 1085.
- [16] Samappito S, Page J, Schmidt J, *et al.* Molecular characterization of root-specific chalcone synthases from *Cassia alata* [J]. *Planta*, 2002, 216: 64 - 71.
- [17] Suh D Y, Fukuma K, Kagami J, *et al.* Identification of amino acid residues important in the cyclization reactions of chalcone and stilbene synthases [J]. *Biochem J*, 2000, 350: 229 - 235.
- [18] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 743 - 755.
- [19] Pelletier M K, Murrell J R, Shirley B W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1437 - 1445.
- [20] Gong Z Z, Yamazaki M, Sugiyama M, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a form-specific manner in *Perilla frutescens* [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 915 - 927.
- [21] Kim S H, Lee J R, Hong S T, *et al.* Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 403 - 413.
- [22] Bonierbale M W, Plaisted R L, Tanksley S D. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato [J]. *Genetics*, 1988, 120: 1095 - 1103.
- [23] Gebhardt C, Ritter E, Schachtschabel U, *et al.* RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum* [J]. *Thor Appl Genet*, 1989, 78: 65 - 75.
- [24] Yamazaki M, Yamagishi E, Gong Z, *et al.* Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia Hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression [J]. *Plant Mol Bio*, 2002, 48: 401 - 411.
- [25] Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, *et al.* Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 711 - 716.
- [26] Ford C M, Boss P K. Cloning and characterization of *Vitis Vinifera* UDP-Glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *bronze1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 9224-9233.
- [27] Yoshihara N, Imayama T, Fukuchi-Mizutani M, *et al.* cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica* [J]. *Plant Sci*, 2005, 169: 496 - 501.
- [28] Ito M, Ichinose Y, Kato H, *et al.* Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea [J]. *Mol Gen Genet*, 1997, 255: 28 - 37.
- [29] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, *et al.* Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 1309 - 1318.
- [30] Schmid J. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 619 - 631.
- [31] Koes R E, Van Blokland R, Quattrocchio F, *et al.* Chalcone synthase promoters in petunia are active in pigmented and unpigmented cell types [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 379 - 386.
- [32] Geitz J, Seitz. Induction of chalcone synthase in cell suspension culture of carrot by ultraviolet light [J]. *Planta*, 1989, 179: 323 - 330.
- [33] Lancaster J E. Regulation of skin color in apples [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1992, 10: 487 - 502.
- [34] Ryder T B, Hedrick S A, Bell J N, *et al.* Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defence enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 210: 219 - 233.
- [35] Quattrocchio F, Wing J F, van der Woude K, *et al.* Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes [J]. *Plant J*, 1998, 13: 475 - 488.
- [36] Quattrocchio F, Wing J F, van der Woude K, *et al.* Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1433 - 1444.
- [37] Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition [J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 105: 319 - 330.
- [38] Lewis C E, Walker J R L, Lancaster J E. Changes in anthocyanin, flavonoid and phenolic acid concentrations during development and storage of coloured potato (*Solanum tuberosum* L) tubers [J]. *J Sci Food Agric*, 1999, 79: 311 - 316.
- [39] Christie P J, Alfenito M R, Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings [J]. *Planta*, 1994, 194: 541 - 549.