

参赛队员姓名: 徐瓯源

中学: 浙江省杭州市第二中学

省份: 浙江省

国家/地区: 中国

指导教师姓名: 吴世华, 黄雄伟

论文题目: 白花蝶豆花色素缺陷基因的探寻与花色改良设计

白花蝶豆花色素缺陷基因的探寻与花色改良设计

徐瓯源

摘要:

白色花卉可以作为转基因花色改良的优良受体, 由于其不会对外源转入基因所造成的新颜色产生掩盖效应, 从而可以大大加速花卉育种的进程, 但前提条件是白花中色素合成缺陷的基因必须清楚。蝶豆是一种美丽的藤蔓花卉, 但是蝶豆的花色品种比较少, 探寻白花蝶豆花色素缺陷基因, 可以为将来转基因花色改良方案的设计提供精准的信息指南。本研究从花青素的生物合成途径入手, 利用基因分子检测技术分析了蝶豆花青素合成的一系列关键基因, 结果发现白花蝶豆中 *ANS* 基因沉默, 其它花青素合成途径基因未有表达下降与序列突变, 表明白花很有可能是 *ANS* 基因沉默造成的。在此基础上, 还对白花蝶豆的转基因花色改良方案进行了设计。

关键词: 白花蝶豆, 花色变异, 花青素, 基因, 花色改良

Discovering and using key gene from white-flowered butterfly pea for genetic engineering of flower color

Ouyuan Xu

Abstract:

White-flowered cultivars can be excellent receivers for genetic engineering-based modification of flower color, because the desired exogenous pigments are not hidden by any endogenous pigments. This approach can greatly hasten breeding of plants for floriculture, although it is essential that genetic determinants of the white flower color be known in advance. Butterfly peas (*Clitoria ternatea* L.) are beautiful climbing vine ornamental plants with few natural flower color variants. One variety produces white flowers due to defective anthocyanin biosynthesis. Identification of the underlying gene(s) could supply the information needed for genetic engineering to modify flower color. Here, a series of genes in the anthocyanin biosynthesis pathway were examined in white-flowered butterfly pea. None of these genes showed any sequence mutation in their coding regions; however, the *ANTHOCYANIDIN SYNTHASE* (*ANS*) gene exhibited silencing at the transcriptional level. These results suggested that *ANS* silencing may be responsible for defective anthocyanin biosynthesis in white-flowered butterfly pea. Based on these discoveries, several strategies for genetic engineering modification of flower color were designed using this white cultivar.

Key words: white-flowered butterfly pea, flower color mutant, anthocyanin, gene, flower color genetic modification

目录

1.研究背景	4
2.材料与方法	7
2.1 实验材料与种植	7
2.2 蝶豆花色素合成关键基因序列的获得	7
2.3 蝶豆 RNA 提取方法	7
2.4 蝶豆 cDNA 逆转录方法	8
2.5 蝶豆基因组 DNA 提取方法	8
2.6 PCR 扩增方法	9
2.7 DNA 电泳检测	10
2.8 DNA 序列测定	10
3.结果	11
3.1 三个品种蝶豆花表型观察	11
3.2 白色蝶豆中 ANS 基因沉默	12
3.3 白色蝶豆中各种花色素合成基因编码区序列未有突变	12
4.讨论	15
4.1 白花蝶豆转基因花色改良的方案设计	15
4.2 白花蝶豆 ANS 基因沉默原因	16
5.结论及创新点	16
6.致谢	17
7.参考文献	17
附图 1	18
附图 2	19
附图 3	20
附图 4	21
附图 5	22
论文贡献声明	24
指导教师与参赛队员简历	24
学术诚信声明	25

研究报告

1. 研究背景

我家有个大露台, 春夏秋冬各色花卉竞相开放, 家人都爱好收集花卉品种, 我也因此从小就喜欢摆弄花草。有一次去花店看到有蓝玫瑰在出售, 是我之前没见过的新品种, 听说是转基因造成的, 这些引起了我的好奇, 搜索文献, 我了解到原来蓝玫瑰是由于在普通玫瑰中转入了合成蓝色飞燕草素的关键基因造成的^[1]。花青素是决定花色的一类主要的类黄酮色素, 是花色多样性最主要的物质基础。自然界的神奇和基因工程的魔法吸引我仔细学习了花青素合成途径。

花青素主要有三种类型: 天竺葵素、矢车菊素及飞燕草素, 它们三者在分子结构上极为相似, 只是类黄酮分子 B 环上的羟基数目存在差异, 天竺葵素为 1 个羟基、矢车菊素 2 个羟基, 飞燕草素则含 3 个羟基(图 1)。在这 3 类花色素基础上还衍生出多种其他色素, 主要包括羟基化、甲基化、糖基化和酰基化。此外, 还有许多化合物起到共色素作用, 共色素本身几乎无色, 但可与花色素结合, 不仅可提高花色素的稳定性加深其颜色还有可能使花色素吸收波段略微红移, 进而增加了花色的多样性。总得来说天竺葵素及其衍生物往往导致橙色及红色花, 矢车菊素及其衍生物导致红和品红色, 飞燕草素及其衍生物往往导致蓝色或紫色。此外, 液泡 pH 值发生变化, 也会引起花色的改变, 通常随着 pH 值上升, 颜色逐渐由红变蓝^[2]。

天然的玫瑰花品种由于缺乏类黄酮 3'5'羟化酶(*F3'5'H*)基因, 因而不能合成蓝色的飞燕草素。日本 Suntory 公司与澳大利亚 Florigene 公司合作研究发现, 当红色系玫瑰花中转入莖菜 *F3'5'H* 基因时, 虽然体内产生了蓝色的飞燕草素, 但由于其本身产生红色系花色素的通路没有打断, 因而在其红色背景下并不能显示纯净的蓝色^[1]。他们最终在对红色系玫瑰花中转入莖菜 *F3'5'H* 基因与鳶尾二氢黄酮醇 4 还原酶(*DFR*)基因, 并且利用 RNA 干涉技术沉默玫瑰花自身 *DFR* 基因后, 创建出了世界上第一朵蓝玫瑰^[1], 并已经成功商业化释放。

类似地, 天然蝴蝶草 (*Torenia hybrida*) 中缺乏黄色品系, 日本 Suntory 公司将黄色金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的查尔酮 4'-O-糖基转移酶 C4'GT 与 金鱼草素合成酶 AS 编码基因同时转入蓝色蝴蝶草中, 让该转基因植株积累金鱼草素 (图 1)。但由于蓝色蝴蝶草中本身蓝色背景花色素的存在起着强烈的掩盖效应, 使得该转基因蝴蝶草花并不能呈现鲜黄色, 当利用 RNA 干涉技术继续将其自身的 *DFR* 基因或 *F3H* 基因沉默后, 最终成功获得了花色改良的黄色蝴蝶草^[3]。

通过这些有趣实例的学习, 我突然意识到, 在转基因花色改良中, 白花品系由于内部自身的花色素合成途径的缺陷, 不仅不会对所转入颜色产生掩盖效应, 而且能够在类黄酮合成代谢网络中, 由于原通路的中断, 可以为外源导入支路

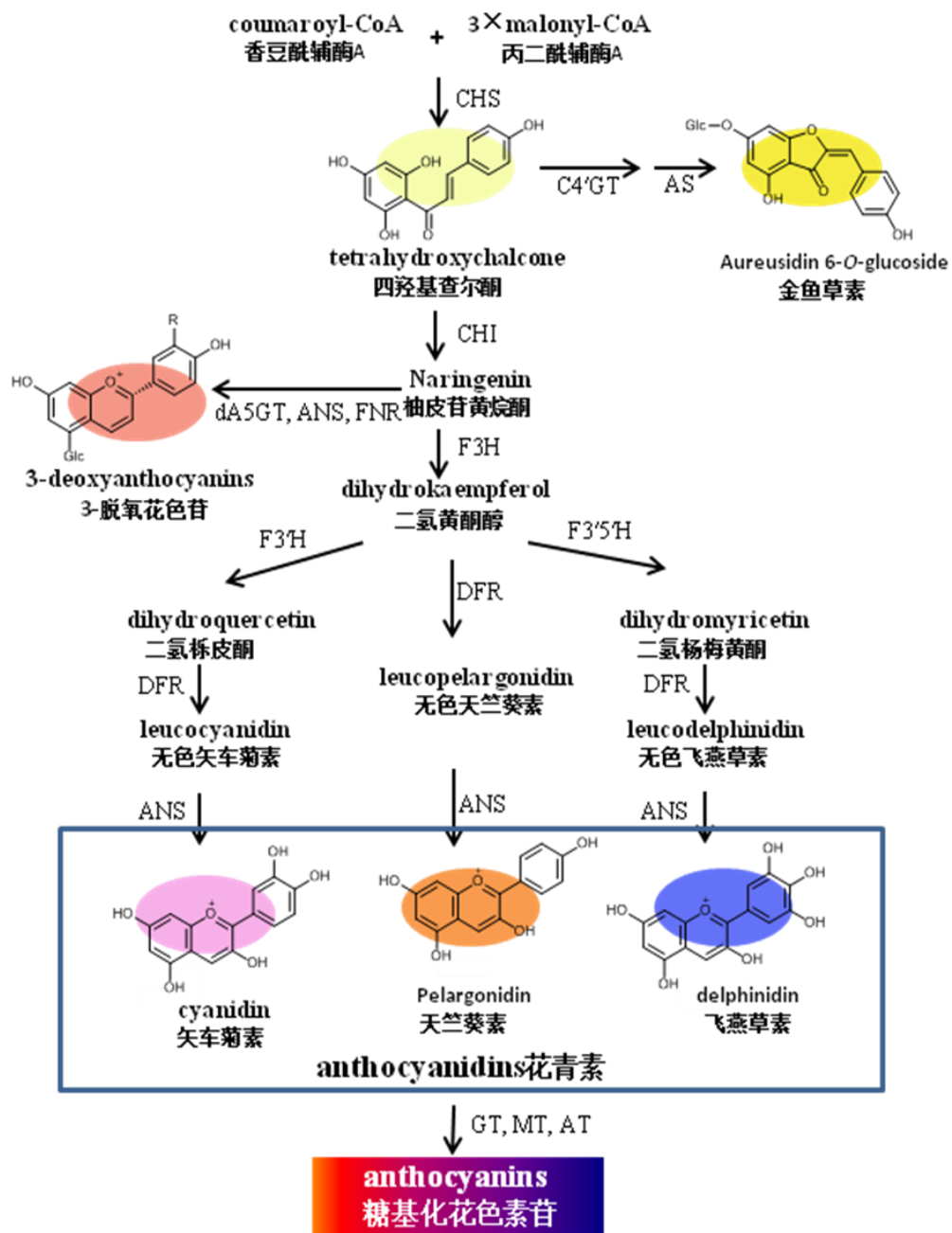


图 1 花青素合成途径 [2]

图中有颜色的化合物均用相应色彩作了指示。ANS: anthocyanidin synthase, 花色素合成酶; AS: aureusidin synthase, 金鱼草素合成酶; AT: acyltransferase, 酰基转移酶; C4'GT: chalcone 4'-O-glucosyltransferase, 查尔酮4'-O-糖基转移酶; CHI: chalcone isomerase, 查尔酮异构酶; CHS: chalcone synthase, 查尔酮合成酶; DFR: dihydroflavonol 4-reductase, 二氢黄酮醇4还原酶; F3H: flavanone 3-hydroxylase, 黄烷酮3羟化酶; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, 类黄酮3'羟化酶; F3'5'H: flavonoid 3',5'-hydroxylase, 类黄酮3'5'羟化酶; FNR: flavanone 4-reductase, 黄烷酮4-还原酶; GT: glycosyltransferase, 糖基转移酶; MT: methyltransferase, 甲基化转移酶。dA5GT: UDP-glucose:3-deoxyanthocyanidin 5-O-glucosyltransferase, UDP-葡萄糖:3-脱氧花青素5-O-糖基转移酶。

提供更多底物, 从而加强外源导入支路的花色素合成。因此, 白花品系其实可以作为一种优良的转基因花色改良的受体。但前提条件是白花品系自身的缺陷基因必须清楚, 才能有的放矢的设计花色改良。例如某白花品系如果为 *CHS* 基因缺陷, 那么导入黄色金鱼草 *CHS* 与 *AS* 基因则不能产生黄色, 而受体改为色素合成途径中位于 *CHS* 基因下游的 *CHI* 基因缺陷造成的白花品系则可以产生黄色。

3-脱氧花色苷能赋予植物鲜亮的砖红色, 是一个重要的花色改良的目标色素。从橘红色岩桐 (*Sinningia cardinalis*) 中克隆的 *dA5GT* (UDP-葡萄糖:3-脱氧花色苷 5-O-糖基转移酶) 被认为是这一目标色素的关键基因^[4]。推测从柚皮苷黄烷酮作为底物, 依次在 *FNR*、*ANS*、*dA5GT* 的催化下就可以形成鲜亮砖红色的 3-脱氧花色苷^[4] (图 1)。而最近根据体外酶活测试认为 *DFR* 酶具有双重功能性, 可以兼具 *FNR* 活性^[4]。从中我们可以设计的最佳花色改良方案是将橘红色岩桐 *dA5GT* 转入某 *F3H* 缺陷的白花品种受体中。在这一设计案例中白花受体如果是 *DFR* 缺陷或者 *ANS* 缺陷的话, 需要外源导入补充橘红色岩桐的 *DFR* 或者 *ANS* 基因, 虽然不能排除不同物种来源的 *DFR* 或者 *ANS* 具有一定的底物识别特异性的可能性, 但这仍然会带来自身原来色系回复的极大风险, 从而掩盖了外源导入的鲜亮砖红色。

综上所述, 白花品系花卉可以作为转基因花色改良的优良受体, 大大加速花卉育种的进程, 是一种重要的园艺种质资源。对白花品系花卉的色素合成缺陷基因进行鉴定, 可以为花色改良方案的设计提供信息指南。

蝶豆(*Clitoria ternatea* L.) 为豆科, 蝶形花亚科(Papilionaceae), 蝶豆属(*Clitoria*) 植物。其原产东南亚, 现广泛栽培于热带和亚热带地区。蝶豆用途较为广泛, 花中含有丰富的花青素, 不仅是蝶豆花色的主要呈色物质, 而且具有强的抗氧化作用, 在食品、茶饮及鸡尾酒调制中常作为天然色素, 很受欢迎; 此外, 蝶豆的根可以入药, 蝶豆全株还可作为绿肥与饲料。近年来, 蝶豆在园艺植物造景配置中得到越来越多的应用, 主要用于花坛、庭园围篱蔓爬、盆栽、垂吊^[5], 特别是在广东沿海一带, 常作为藤蔓观赏花卉和主要的垂直绿化植物^[6]。但是蝶豆的花色品种比较少, 目前报道的主要有 4 种花色类型: 深蓝色、浅蓝色、紫色、白色^[7]。因此对蝶豆进行花色改良具有重要意义。目前已知深蓝色蝶豆花中积累的主要花色苷是三叶蜜菜萹素(ternatins), 是飞燕草素的多聚乙酰糖链衍生物; 紫色蝶豆花中积累的主要花色苷是飞燕草素 3-6''丙二酰基葡萄糖; 白花中则不积累飞燕草素及其衍生物^[7]。但是白色蝶豆中具体哪个酶缺陷造成飞燕草素合成通路中断却未见报道, 因此我决定探寻白花蝶豆花色色素缺陷基因, 为将来转基因改良蝶豆花色奠定基础。

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料与种植

3 种蝶豆种子购自 ebay, 分别是紫色的 *Clitoria ternatea* L. var Mauve (商品名 butterfly pea single Mauve), 白色的 *Clitoria ternatea* L. var alba (商品名 butterfly pea single White) 深蓝色的 *Clitoria ternatea* L. var pleniflora (商品名 butterfly pea double blue)。2017 年冬季时种于温室 (25°C) 越冬, 3 月初移出温室, 露天盆栽, 栽培地: 杭州。

2.2 蝶豆花色素合成关键基因序列的获得

蝶豆的全基因组序列虽然尚未被测序, 但幸运的是由于蝶豆花色素合成途径备受关注, 花色素合成通路中的所有关键基因序列已经全部被克隆。在 NCBI 网站上 Nucleotide 数据库下输入蝶豆的拉丁名作为关键词, 就可以获得数据库中已经有的 279 条蝶豆基因序列, 网站链接见括号内 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Clitoria%20ternatea>)。如果增加一个关键词 flavonoid (类黄酮), 则出现 26 条与花色素合成有关的基因序列。我下载的本研究报告所用的蝶豆基因序列如下: *CHS* (GenBank 编号: AB185897), *CHI* (GenBank 编号: AB185898), *F3H* (GenBank 编号: AB185899), *DFR* (GenBank 编号: AB185901), *ANS* (GenBank 编号: AB185902), *18S rRNA* (GenBank 编号: KT876053)。根据数据库记载, 上述花色素合成有关的 5 个基因序列 (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*) 均为全长 cDNA, 来源是商品名为 double blue 的蝶豆, 这正是本研究报告所用的深蓝色辐射花冠品种。

2.3 蝶豆 RNA 提取方法

试剂准备: Trizol、RNase-free ddH₂O、氯仿、1% β-巯基乙醇 (DEPC 水配制)、5 mol/L NaCl 溶液 (DEPC 水配制)、异丙醇、75% 乙醇 (DEPC 水配制)、酚:氯仿:异戊醇 (体积比为 25:24:1)。

操作步骤:

1) 取两朵蝶豆花于液氮预冷的研钵中, 用液氮研磨成细粉末, 迅速转移至预冷的 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml Trizol 和 10 μl 1% 的 β-巯基乙醇 (能有效排除酚类物质干扰), 充分涡旋震荡, 室温下静置 5 min 使其充分裂解;

2) 12000 rpm, 4°C 离心 5 min, 弃沉淀, 按照 1 ml Trizol 加 200 μl 5 mol/L NaCl 溶液 (高盐可以有效分离出蛋白质和多糖等杂质), 摇匀后按照 1 ml Trizol 加 200 μl 氯仿, 振荡混匀后室温放置 15 min;

3) 12000 rpm, 4°C 离心 15 min, 吸取上层水相到新 2 ml 离心管, 再加入等

体积的氯仿抽提;

4) 12000 rpm, 4°C离心 15 min, 吸取上层水相到新 2 ml 离心管, 加入等体积酚:氯仿:异戊醇 (用前要先振荡混匀), 混匀后室温静置 5 min;

5) 12000 rpm, 4°C离心 15 min, 取上清至新 2ml 离心管, 按 1 ml Trizol 加 0.5 ml 异丙醇, 轻轻混匀后室温放置 5-10 min;

6) 12000 rpm, 4°C离心 10 min, 弃上清, RNA 沉淀于管底, 按 1 ml Trizol 加 1 ml 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 温和振荡离心管, 悬浮沉淀;

7) 8000 rpm, 4°C离心 5 min, 弃上清, 加 1 ml 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 温和振荡离心管, 悬浮沉淀;

8) 8000 rpm, 4°C离心 5 min, 弃上清, 通风橱晾干 5-10 min, 用 50µl RNase-free ddH₂O 溶解, 测浓度后于-80°C保存备用。

2.4 蝶豆 cDNA 逆转录方法

采用 Promega 公司 Reverse Transcription System 试剂盒 (Cat.# A3500)。为了用 18s rRNA 作为内参, 逆转录时需要用随机引物。但实际做时发现把随机引物与 Oligo dT 引物共同加入才能既满足 18s rRNA 作为内参, 又能有效扩增全长 cDNA, 因此对试剂盒的操作步骤作了调整, 具体如下:

取 5µg 的 RNA 用 RNase free ddH₂O 补足至 9.2 µl, 70°C预变性 10min 后迅速放置冰上 5min, 短暂离心后, 向管内加入以下试剂:

MgCl ₂ (25mM)	4 µl
Reverse Transcription 10x Buffer	2 µl
dNTP MIX(10mM)	2 µl
Random Primers (0.5g/ml in H ₂ O)	1µl
Oligo dT (0.5g/ml in H ₂ O)	1µl
AMV Reverse Transcriptase	0.6µl
RNase Inhibitor	0.2µl

用移液器混匀。反应条件: 37°C 60 min; 95°C 5 min 终止反应, 冰上冷却后, 样品于-20°C保存。

2.5 蝶豆基因组 DNA 提取方法

采用 Magen 公司的 HiPure Plant DNA Mini Kit 试剂盒:

- 1) 液氮研磨约 200 mg 蝶豆幼嫩叶片, 转移粉末至 2 ml EP 管中;
- 2) 立即加入 650 µl Buffer PTL 至样品中充分涡旋分散, 65°C水浴 30 min, 期间混匀多次;
- 3) 加入 650 µl 氯仿, 高速涡旋 15 秒, 多次至充分混匀; 室温 12000 rpm

离心 5min, 转移上清至新 2 ml EP 管, 加入 2 μ l RNase Solution, 颠倒混匀室温放置十分钟消化 RNA。

- 4) 加入 1.5 倍体积 Buffer PBD (无水乙醇稀释) 至上清颠倒混匀 10 次;
- 5) 将液体分次 (每次少于 600 μ l) 转入收集柱, 12000 rpm 离心 1min;
- 6) 弃滤液, 在柱子中加入 500 μ l Buffer GW1, 12000 rpm 离心 1min;
- 7) 弃滤液, 在柱子中加入 500 μ l Buffer GW2, 12000 rpm 离心 1min, 弃滤液空转 2 min, 将柱子转移到新 1.5 ml EP 管, 加入 30 μ l 预热到 65 $^{\circ}$ C 的 DNase free ddH₂O, 室温静置 3 min, 12000 rpm 离心 1min;
- 8) 将 DNA 测浓度后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

2.6 PCR 扩增方法

采用 Vazyme 公司 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase Kit.

反应体系:

2x Phanta Max Buffer	25 μ l
dNTP Mix(10mM each)	1 μ l
上游引物(10 μ M)	2 μ l
下游引物(10 μ M)	2 μ l
DNA Polymerase	1 μ l
模板 DNA	500 ng

ddH₂O add to 50 μ l

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 8 min; [95 $^{\circ}$ C 30 sec; 50 $^{\circ}$ C 30 sec; 72 $^{\circ}$ C, 30 sec-2 min]25-35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 16 $^{\circ}$ C forever。

各基因全长 cDNA 引物:

ANS-F	AGAGAGAGAAAAAAGTCATGG
ANS-R	CCCATCGACACAAATGACCAATT
CHI-F	AACAGCATAACTTCTCACCTA
CHI-R	ACAAAATGAAAACAAGTCCCA
CHS-F	CTCATACCAATCATCATGGTCAG
CHS-R	GAGTATAACAAGTCACAAGTTCC
DFR-F	ATTTCAACTTTGAAGCTAAGAC
DFR-R	ACTCAAGCTAAACCATCAATTT
F3H-F	GCTTAACAAGCATTTCAAAAA
F3H-R	CATTTATAAAATTAATATATAGG

QRT-PCR 分析利用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix ExTaq Kit 和罗氏公司生产

的 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪进行。以逆转录的 cDNA 为模板, Ct18sRNA 作为内参基因。

反应体系为:

cDNA	0.2 μ l
SYBR Green I mix	2.5 μ l
上游引物(10 μ M)	0.1 μ l
下游引物(10 μ M)	0.1 μ l
ddH ₂ O	2.1 μ l

反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; [95 $^{\circ}$ C 10 sec; 60 $^{\circ}$ C 10 sec; 72 $^{\circ}$ C, 10 sec]40 个循环; 40 $^{\circ}$ C, 30 sec 冷却。

定量 RT-PCR 引物:

ANS-qRT-F	TCTATCAAGGCAAATGGGTCA
ANS-qRT-R	AATCCCCTATGAAGAATACTCT
CHI-qRT-F	ACGATGATCTTGCCCTTAACT
CHI-qRT-R	ACTTGTCAATTGCCTTGGCTT
CHS-qRT-F	CATGTGCGAGAAGTCAATGAT
CHS-qRT-R	TGTCTTGCCTTGCATCC
DFR-qRT-F	GCGAAGATTGGTATTACATC
DFR-qRT-R	GGCAGAAGTCAACATCACTC
F3H-qRT-F	TTTCGCTTTGTGCCTATCTT
F3H-qRT-R	AGGCAACTACGTGGGATACAG
Ct18s-qRT-F	GATGCGTCGCCAGCACAAGGGC
Ct18s-qRT-R	CTGTGAACTGCGAATGGCTCAT

2.7 DNA 电泳检测

配置 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳 (将 0.5 g 琼脂糖加入 50 ml TAE 电泳缓冲液, 微波加热溶解, 稍冷却后加入 1 滴 EB, 摇匀后倒入制胶板, 冷却后拔掉梳子, 将凝胶板放入电泳槽中, 浸没于 TAE 电泳缓冲液。) PCR 扩增后的产物 50 μ l, 与 5 μ l 10 \times 上样缓冲液混合后加入上样孔, 电泳参数: 100 V, 20 min。用 BioRad 凝胶成像仪拍照。

2.8 DNA 序列测定

在紫外下切割目的条带, 用 Magen 公司的 HiPure Gel Pure DNA Kits 进行凝胶回收:

- 1) 将切割下的含目的片段的凝胶转移至 1.5 ml 离心管, 加入 200 μ l Buffer

GDP, 55°C金属浴至凝胶完全溶解(期间振荡混匀两次以加速溶解过程);

2) 将 HiPure DNA Column 套在配套的 2ml 收集管中, 把溶胶液转移至收集柱内, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 再向收集柱中加入 600 μ l Buffer GDP, 静置 1 min, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;

3) 在收集柱中加入 600 μ l Buffer DW2(经无水乙醇稀释), 至柱子中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液;

4) 在收集柱中加入 600 μ l Buffer DW2(经无水乙醇稀释), 至柱子中, 12000 rpm 离心 1 min, 弃滤液, 将柱子套回收集管, 12000 rpm 空转 2 min, 将收集柱小心转移至新 1.5 ml 离心管;

5) 加入 30 μ l 预热至 55°C 的 ddH₂O, 静置 2 min, 12000 rpm 离心 2 min, 丢弃柱子, 即得到目的 DNA 溶液, 测浓度后可于 -20°C 保存。

测序: 将上述割胶纯化回收所得 DNA 片段取出 200-300 ng, 放入离心管内, 另准备两管分别放入上游和下游引物 (10 μ M) 各 10 μ l, 填写测序单, 将 DNA 样品、上游和下游引物, 寄于铂尚生物技术有限公司杭州测序部进行测序。

3 结果:

3.1 三个品种蝶豆花表型观察

野生型蝶豆是蝶形花冠的, 它有四个颜色 (深蓝、浅蓝、紫色、白色) 的品种, 在此基础上蝶形花冠产生了园艺变种成为辐射状花冠, 目前辐射状花冠也有四个颜色 (深蓝、浅蓝、紫色、白色) 品种^[7]。

我从 ebay 上购买到了 3 个品种 (紫色、白色、深蓝) 的蝶豆种子, 生长 4 个月 after, 蝶豆开花, 三个品种的花型、花色表型见图 2. 其中浅紫色与白色品种的花型一样, 属于蝶型花冠; 而深蓝色品种的花冠呈现辐射状, 是蝶形花冠的园艺变种。



图 2:蝶豆花表型

从左至右分别是紫色、白色、深蓝的蝶豆花。

3.2 白色蝶豆中 ANS 基因沉默

根据花青素合成途径的知识背景可以知道 5 个花青素合成关键基因 (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*) 如果存在基因突变或基因沉默可以造成白花。为了探寻白花蝶豆中飞燕草素合成缺陷的原因, 我首先利用定量 RT-PCR 检查了这 5 个基因的表达。结果表明 (图 3): 与紫花品种相比, 白花蝶豆 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR* 基因的表达量均无显著差异, 但是白花蝶豆中 *ANS* 基因却处于沉默状态。此外, 在深蓝蝶豆中 *CHI*, *DFR*, *ANS* 这三个基因均比紫花与白花蝶豆有显著的表达增强。

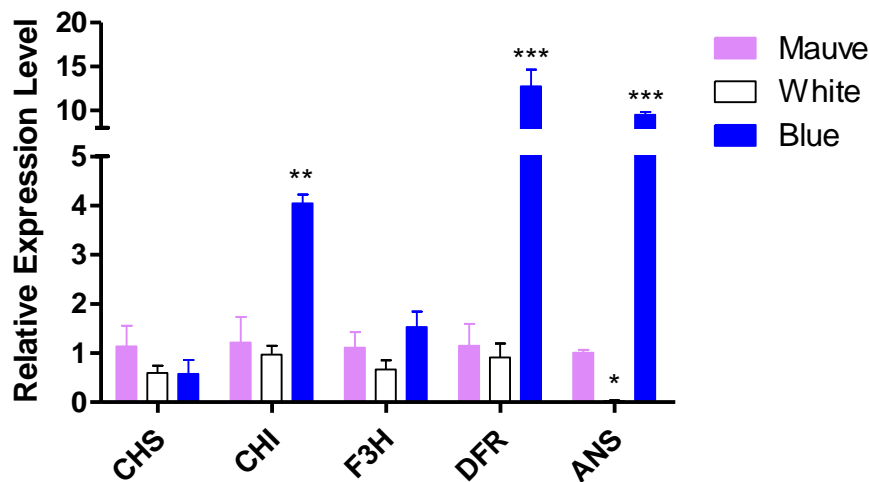


图 3 蝶豆花中各种花青素合成基因表达的相对定量

基因表达通过 RT-qPCR 进行相对定量, 并对数据进行单因素方差分析 (One Way ANOVA)。三个不同颜色品种 (紫色、白色、深蓝) 蝶豆花的定量柱形图分别用对应颜色 (紫、白、蓝) 来表示。白色或蓝色柱形图上方的星号代表与浅紫色品种之间的显著差异。*代表 ($P < 0.05$), **代表 ($P < 0.01$), ***代表 ($P < 0.001$)。误差线用标准差表示 ($n=3$)。定量 RT-PCR 相对表达量的计算用蝶豆 *18S rRNA* 作为内参。

3.3 白色蝶豆中各种花色素合成基因编码区序列未有突变

为了探寻白花蝶豆中是否有花色素合成关键基因在编码区发生突变, 造成相应的酶功能缺陷, 我们对三个蝶豆品种中 5 个花色素合成关键基因 (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*) 的全长 cDNA 进行了 PCR 扩增 (图 4) 并测序。除了白花蝶豆不能扩增到全长 *ANS* cDNA 外, 其它四个基因 (*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*) 的读码框范围在 3 个蝶豆品种中完全一致, 也与 GenBank 数据库下载的序列一致 (其中白花品种的测序结果见文末附件图 1-4)。

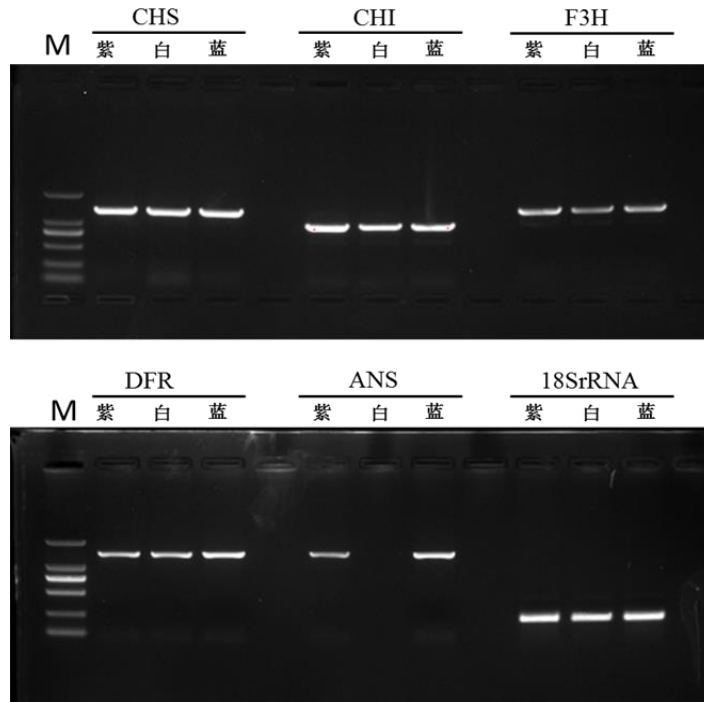


图 4: 蝶豆花中各种花色素合成基因全长 cDNA 的 PCR 扩增

以三个不同颜色品种(紫色、白色、深蓝)蝶豆花中 5 个花色素合成关键基因(*CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*) 的全长 cDNA。M 为 Takara 公司的 DL2000 DNA Marker, 条带大小从上至下依次为: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp。

为了进一步探寻白花蝶豆基因组中 *ANS* 编码区是否存在基因突变、缺失或大片段插入造成我无法检测到 *ANS* 全长 cDNA, 我以蝶豆基因组为模板, 对 *ANS* 编码区进行了 PCR 扩增(图 5) 与测序(其中白花品种的测序结果见文末附件图 5)。结果发现蝶豆的 *ANS* 基因序列与 cDNA 序列长度一样, 测序结果也证实蝶豆 *ANS* 在基因编码区内不存在内含子(图 6)。更重要的是, 测序结果也表明白花蝶豆的 *ANS* 基因编码区内不存在任何突变(图 7)。

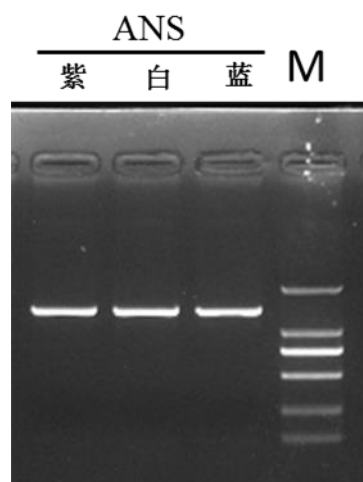


图 5: 蝶豆基因组中 *ANS* 基因的 PCR 扩增

以三个不同颜色品种(紫色、白色、深蓝)蝶豆基因组为模板, 所用引物与 cDNA 全长扩增的引物对(*ANS-F*, *ANS-R*) 相同。M 为 Takara 公司的 DL2000 DNA Marker, 条带大小从上至下依次为: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp。

```

CtANS6.seq      AGAGAGAGAAAAAAGTCAATGGGGAGTGAGGGTATTCTAGAGTTGAAAGCTTGGCGAGGAGTGGGATAGAAAGCATACC
蓝-ANS基因.seq -----ATGGGGAGTGAGGGTATTCTAGAGTTGAAAGCTTGGCGAGGAGTGGGATAGAAAGCATACC

CtANS6.seq      AAAGGAGTATGTGAGGGCAAAGGAAGAGGTAGGGAACATAGGGAACGTGTTTGAGGAGGAAAACAAAGAAGGGTGGGAAC
蓝-ANS基因.seq AAAGGAGTATGTGAGGGCAAAGGAAGAGGTAGGGAACATAGGGAACGTGTTTGAGGAGGAAAACAAAGAAGGGTGGGAAC

CtANS6.seq      AGGTTCCAACGATTGATTTGAGCGAGATAGATTTCATCGGACGAGGTTGTTAGAAAGAAGTGTCGGGAGAAGTTGAAGAAA
蓝-ANS基因.seq AGGTTCCAACGATTGATTTGAGCGAGATAGATTTCATCGGACGAGGTTGTTAGAAAGAAGTGTCGGGAGAAGTTGAAGAAA

CtANS6.seq      GCGGCGGAGGAATGGGGTGTATGCATTTGGTGAACCATGGGATACCCTCTGAGGTGATACAGAGATTGAAGAAAGCAGG
蓝-ANS基因.seq GCGGCGGAGGAATGGGGTGTATGCATTTGGTGAACCATGGGATACCCTCTGAGGTGATACAGAGATTGAAGAAAGCAGG

CtANS6.seq      GGAAGAGTTTTTCTCAACCGGTTGAGGAAAAGGAGAAGTATGCAAATGATCAAGAGTCAGGGGAGATTCAAGGCTATG
蓝-ANS基因.seq GGAAGAGTTTTTCTCAACCGGTTGAGGAAAAGGAGAAGTATGCAAATGATCAAGAGTCAGGGGAGATTCAAGGCTATG

CtANS6.seq      GAAGCAAGTTGGTAACAATCTTCTGCGCAATGGAATGGGAGGATTACTTCTCCATCTTGTTCCTGAGGAGAAA
蓝-ANS基因.seq GAAGCAAGTTGGTAACAATCTTCTGCGCAATGGAATGGGAGGATTACTTCTCCATCTTGTTCCTGAGGAGAAA

CtANS6.seq      CGCGACTTGTCTATTTGGCCTAAGGAACCTCCTTATTATACTGAGGTTACAAGTGAGTATGCAAAGAAGTTGAGAGGGCT
蓝-ANS基因.seq CGCGACTTGTCTATTTGGCCTAAGGAACCTCCTTATTATACTGAGGTTACAAGTGAGTATGCAAAGAAGTTGAGAGGGCT

CtANS6.seq      TGCAAGCAAGATACTGGAGATATTGTCTCTTGAATTGGGGTTGGAAGGTGGGAGGTTGGAGAAGGAAGTTGGTGGGTTGG
蓝-ANS基因.seq TGCAAGCAAGATACTGGAGATATTGTCTCTTGAATTGGGGTTGGAAGGTGGGAGGTTGGAGAAGGAAGTTGGTGGGTTGG

CtANS6.seq      AAGAAGTTTTGCTTCAATTAAGATCAATTAATCACTACCAATTTGTCCCAACCCAGAGCTGGCTCTTGGAGTTGAAGCTCAC
蓝-ANS基因.seq AAGAAGTTTTGCTTCAATTAAGATCAATTAATCACTACCAATTTGTCCCAACCCAGAGCTGGCTCTTGGAGTTGAAGCTCAC

CtANS6.seq      ACTGATGTAAGTTCACCTACTTTCTCATCCATAACATGGTTCCAGTCTCCAACCTTTCTATCAAGGCAAAATGGGTCAC
蓝-ANS基因.seq ACTGATGTAAGTTCACCTACTTTCTCATCCATAACATGGTTCCAGTCTCCAACCTTTCTATCAAGGCAAAATGGGTCAC

CtANS6.seq      TGCAAAATGTGTTCCCTGATTCCATTCTCATGCACATTGGTGACACCATTGAGATCCTAAGTAATGGTAAGTAC AAGAGTA
蓝-ANS基因.seq TGCAAAATGTGTTCCCTGATTCCATTCTCATGCACATTGGTGACACCATTGAGATCCTAAGTAATGGTAAGTAC AAGAGTA

CtANS6.seq      TTCTTCATAGGGGATTGGTGAACAAGGAAAAGGTTAGAATATCTTGGGCAGTGTCTGTGAACCCCTAAGGAGAAGATC
蓝-ANS基因.seq TTCTTCATAGGGGATTGGTGAACAAGGAAAAGGTTAGAATATCTTGGGCAGTGTCTGTGAACCCCTAAGGAGAAGATC

CtANS6.seq      GTTCTGCAACCACTTCTGAGCTTGTACTGAAACACAACCAACACTCTTTCCTCCTCGCACTTTTGCTCAGCATATTC A
蓝-ANS基因.seq GTTCTGCAACCACTTCTGAGCTTGTACTGAAACACAACCAACACTCTTTCCTCCTCGCACTTTTGCTCAGCATATTC A

CtANS6.seq      CCACAAAATATTCGGGAAGACTCAGGAAGCTCTCCCAAAATGATTCCAATCACATGCATAACATTTCCGAATATTTTGT
蓝-ANS基因.seq CCACAAAATATTCGGGAAGACTCAGGAAGCTCTCCCAAAATGATTCCAATCACATGCATAACATTTCCGAATATTTTGT
    
```

图 6: 蓝花蝶豆基因组中 ANS 基因序列, 与 GenBank 中记载序列的联配
 “CtANS6”为 GenBank 中所记载的蓝花蝶豆的 ANS cDNA 序列; “蓝-ANS 基因”为以蓝花蝶豆基因组为模板, ANS-F/ANS-R 为上下游引物扩增后测序所得到的 ANS 基因序列 (完整读码框范围)。序列联配在 Lasergene 软件的 MegAlign 中进行。

```

CtANS6.seq      AGAGAGAGAAAAAAGTCAATGGGGAGTGGGGTATTCGTAGAGTTGAAAGCTTGGCGAGGAGTGGGATAGAAAGCATACC
白-ANS基因.seq -----ATGGGGAGTGGGGTATTCGTAGAGTTGAAAGCTTGGCGAGGAGTGGGATAGAAAGCATACC

CtANS6.seq      AAAGGAGTATGTGAGGGCAAGGGAAGAGGTAGGGAACATAGGGAACGTGTTTGGGAGGAAAACAAAGAAGGTTGGGAAC
白-ANS基因.seq  AAAGGAGTATGTGAGGGCAAGGGAAGAGGTAGGGAACATAGGGAACGTGTTTGGGAGGAAAACAAAGAAGGTTGGGAAC

CtANS6.seq      AGGTTCCAACGATTGATTTGAGCGAGATAGATTCATCGGACGAGGTTGTTAGAAAAGAAGTGTCGGGAGAAGTTGAAGAAA
白-ANS基因.seq  AGGTTCCAACGATTGATTTGAGCGAGATAGATTCATCGGACGAGGTTGTTAGAAAAGAAGTGTCGGGAGAAGTTGAAGAAA

CtANS6.seq      GCGGCGGAGGAATGGGGTCTTATGCATTTGGTGAACCATGGGATACCCTCTGAGGTGATACAGAGATTGAAGAAAAGCAGG
白-ANS基因.seq  GCGGCGGAGGAATGGGGTCTTATGCATTTGGTGAACCATGGGATACCCTCTGAGGTGATACAGAGATTGAAGAAAAGCAGG

CtANS6.seq      GGAAGAGTTTTTCTCTCAACCGGTTGAGGAAAAGGAGAAGTATGCAAAATGATCAAGAGTCAGGGGAGATTCAAGGCTATG
白-ANS基因.seq  GGAAGAGTTTTTCTCTCAACCGGTTGAGGAAAAGGAGAAGTATGCAAAATGATCAAGAGTCAGGGGAGATTCAAGGCTATG

CtANS6.seq      GAAGCAAGTTGGCTAACAAATCTTCTGGCCAATTGGAATGGGAGGATTACTTCTTCCATCTTGTTTTCTGAGGAGAAA
白-ANS基因.seq  GAAGCAAGTTGGCTAACAAATCTTCTGGCCAATTGGAATGGGAGGATTACTTCTTCCATCTTGTTTTCTGAGGAGAAA

CtANS6.seq      GCGGACTTGTCTATTTGGCCTAAGGAACCTCCTTATTATACTGAGGTTACAAGTGAAGTATGCAAAAGAAGTTGAGAGGGCT
白-ANS基因.seq  GCGGACTTGTCTATTTGGCCTAAGGAACCTCCTTATTATACTGAGGTTACAAGTGAAGTATGCAAAAGAAGTTGAGAGGGCT

CtANS6.seq      TGCAAGCAAGATACTGGAGATATTGTCTCTTGAATTGGGGTGGAAAGTGGGAGGTTGGAGAAGGAAGTTGGTGGGTTGG
白-ANS基因.seq  TGCAAGCAAGATACTGGAGATATTGTCTCTTGAATTGGGGTGGAAAGTGGGAGGTTGGAGAAGGAAGTTGGTGGGTTGG

CtANS6.seq      AAGAACTTTTGTCTCAATTAAGATCAATTAACCTCAATTTGTCCTCAACAGAGCTGGCTCTTGGAGTTGAAGCTCAC
白-ANS基因.seq  AAGAACTTTTGTCTCAATTAAGATCAATTAACCTCAATTTGTCCTCAACAGAGCTGGCTCTTGGAGTTGAAGCTCAC

CtANS6.seq      ACTGATGTAAGTTCACCTACTTTCTCATCCATAACATGGTCCAGGTCCTCAACTTTTCTATCAAGGCAAAATGGGTCAC
白-ANS基因.seq  ACTGATGTAAGTTCACCTACTTTCTCATCCATAACATGGTCCAGGTCCTCAACTTTTCTATCAAGGCAAAATGGGTCAC

CtANS6.seq      TGCAAAATGTGTTCTGATTCCATTCTCATGCACATTGGTGACACCATTGAGATCCTAAGTAATGGTAAGTACAAGAGTA
白-ANS基因.seq  TGCAAAATGTGTTCTGATTCCATTCTCATGCACATTGGTGACACCATTGAGATCCTAAGTAATGGTAAGTACAAGAGTA

CtANS6.seq      TTCTTCATAGGGGATTGGTGAACAAGGAAAAGGTTAGAATATCTTGGGCAGTGTCTGTGAACCCCTAAGGAGAAGATC
白-ANS基因.seq  TTCTTCATAGGGGATTGGTGAACAAGGAAAAGGTTAGAATATCTTGGGCAGTGTCTGTGAACCCCTAAGGAGAAGATC

CtANS6.seq      GTTCTGCAACCACTTCTGAGCTTGTACTGAAACACAACCAACTCTTTCTCTCTCGCACTTTTGTCTAGCATATTCA
白-ANS基因.seq  GTTCTGCAACCACTTCTGAGCTTGTACTGAAACACAACCAACTCTTTCTCTCTCGCACTTTTGTCTAGCATATTCA

CtANS6.seq      CCACAAAATATTCGGGAAGACTCAGGAAGCTCTCCCAAAATGATTCCAATCACATGCATAACATTTCCGAATATTTTGT
白-ANS基因.seq  CCACAAAATATTCGGGAAGACTCAGGAAGCTCTCCCAAAATGATTCCAATCACATGCATAACATTTCCGAATATTTTGT
    
```

图 7: 白花蝶豆基因组中 ANS 基因序列, 与 GenBank 中记载序列的联配
 “CtANS6”为 GenBank 中所记载的蓝花蝶豆 ANS cDNA 序列; “白-ANS 基因”为以白花蝶豆基因组为模板, ANS-F/ANS-R 为上下游引物扩增后测序所得到的 ANS 基因序列 (完整读码框范围)。序列联配在 Lasergene 软件的 MegAlign 中进行。

4 讨论:

4.1 白花蝶豆转基因花色改良的方案设计

上述基因分子检测结果表明白花蝶豆很有可能是由于 ANS 基因沉默造成的。在此基础上, 可以对白花蝶豆的转基因花色改良方案进行设计。

将黄色金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的查尔酮 4'-O-糖基转移酶 C4'GT 与 金鱼草素合成酶 AS 编码基因同时转入白花蝶豆中, 该转基因植株预期可以积累黄色金鱼草素, 由于不会受蝶豆自身花色影响, 因而可以创制鲜黄色蝶豆新品种。

蝶豆花属于豆科植物典型的沿背腹轴的两侧对称花, 三种不同种类的花瓣--旗瓣(背花瓣)、翼瓣(侧花瓣)和龙骨瓣(腹花瓣)沿背腹轴分布。以玄参科植物金鱼草为模式, 背腹不对称性及其花瓣形态建成的分子机制已经比较清楚。主要是由3个背部花瓣决定基因 *CYC*, *DICH*, *RAD* 和1个腹部花瓣决定基因 *DIV* 共同控制。其中, 特异性表达于背部花瓣的 *CYC* 与 *DICH* 是功能冗余的两个 TCP 转录因子, 它们激活了 *RAD* 转录因子, *RAD* 可以拮抗位于背部区域的 *DIV* 的功能, 从而控制了花发育的背腹不对称性^[8]。这一机制在蝶形花亚科百脉根中具有保守性^[9], 百脉根 *CYC2* 基因也像金鱼草那样特异性表达于背部花瓣^[10]。因此利用这样背部花瓣特异性基因的启动子驱动 *ANS* 基因转入到白花蝶豆中预期可以得到背部花瓣蓝色或紫色, 而翼瓣和龙骨瓣则维持白色的双色花。如果将上述黄色金鱼草素合成相关基因前的启动子置换成这个背部花瓣特异性启动子导入白花蝶豆的话, 可以预期创建黄白双色花。

矮牵牛中分离到多种花色嵌合的自发突变体, 是由于内源转座子 *dTph1* 或 *dTph2* 插入在花色素合成相关基因内造成花瓣上的白色背景, 随着转座子跳跃离开, 造成显色区块、条纹或斑点, 最终造就了随机的嵌合花色^[11]。Liu 等^[12]利用转录因子 *R* 能够调节花色素合成途径中的多个酶的基因表达, 他们在 *CaMV35S* 启动子和 *R* 基因之间插入一个来源于拟南芥的自主性转座子 *Tag1* 后, 对烟草进行转基因, 获得了多种美丽的嵌合花色。因此将上述 *dTph1*、*Tag1* 这一类剪切粘贴型转座子插入到 *CaMV35S* 启动子与 *ANS* 基因之间, 转基因导入白花蝶豆中, 预期可以得到美丽的嵌合花色。虽然转基因当代的嵌合花斑条纹具有遗传不稳定性, 但是该株系所获得种子, 种下去后每一朵花都有可能随机出现各自特有的嵌合图案, 种植过程中随时期待惊喜, 会别具一番观赏价值。

4.2 白花蝶豆 *ANS* 基因沉默原因

在课题研究工作中我们发现白花蝶豆中 *ANS* 基因沉默。我对引起 *ANS* 基因沉默的原因很感兴趣。是其基因启动子区内存在转座子插入突变还是碱基的自发突变造成的? 如果启动子区域的基因序列没有变化, 那么是否由于 DNA 甲基化修饰而造成了基因沉默? 这些都是后续我想继续探索的。

5 结论及创新点

- 1) 明确了白花蝶豆中 *ANS* 基因沉默, 这一点在国内国际均无文献报道过。
- 2) 提出了适用于白花蝶豆的4种花色改良方案(黄色、蓝白或紫白双色、黄白双色、随机嵌合), 根据我的知识范围, 利用背部花瓣特异性基因的启动子创建双色花的策略未见有过报道。

6 致谢

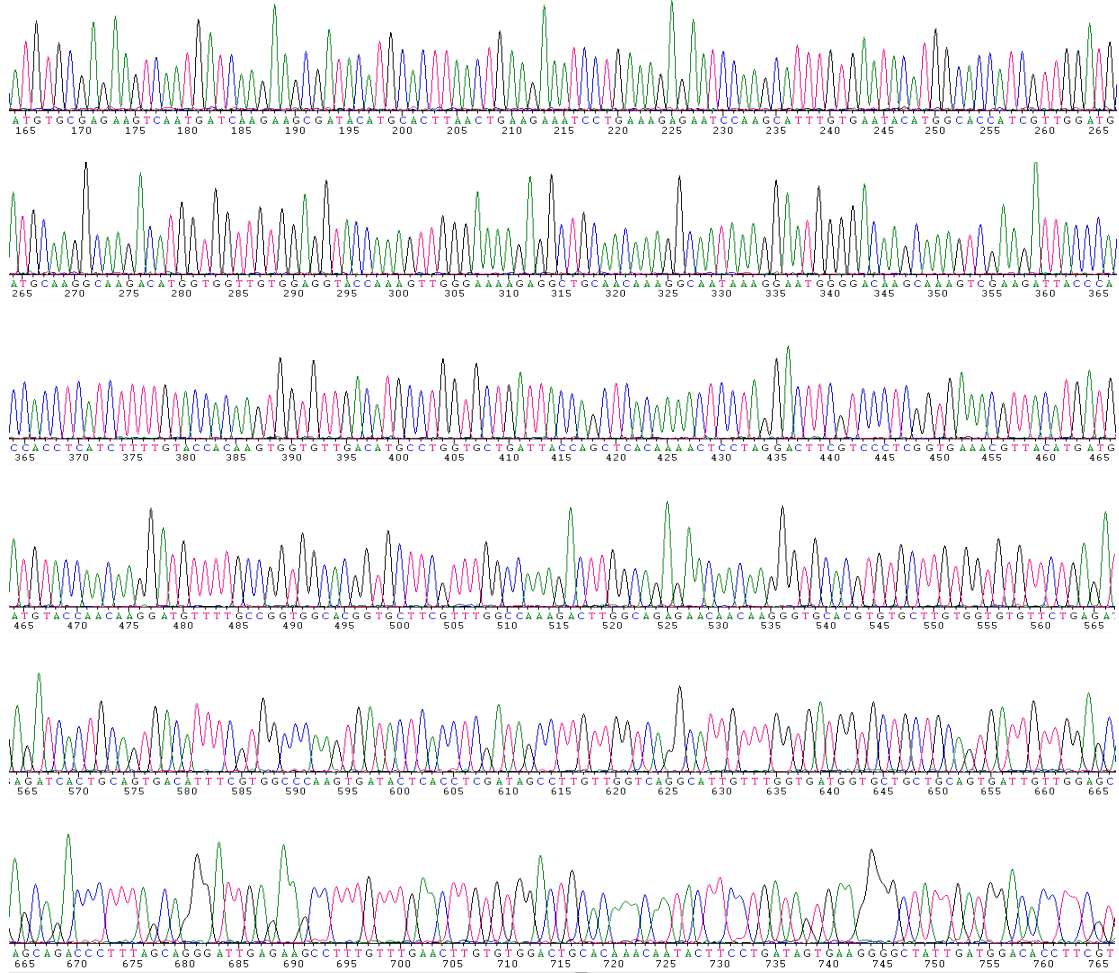
在研究过程中得到了浙江大学生命科学学院的吴世华老师与浙江省杭州第二中学黄雄伟老师的悉心指导与帮助, 在此向他们表示衷心的感谢!

7 参考文献

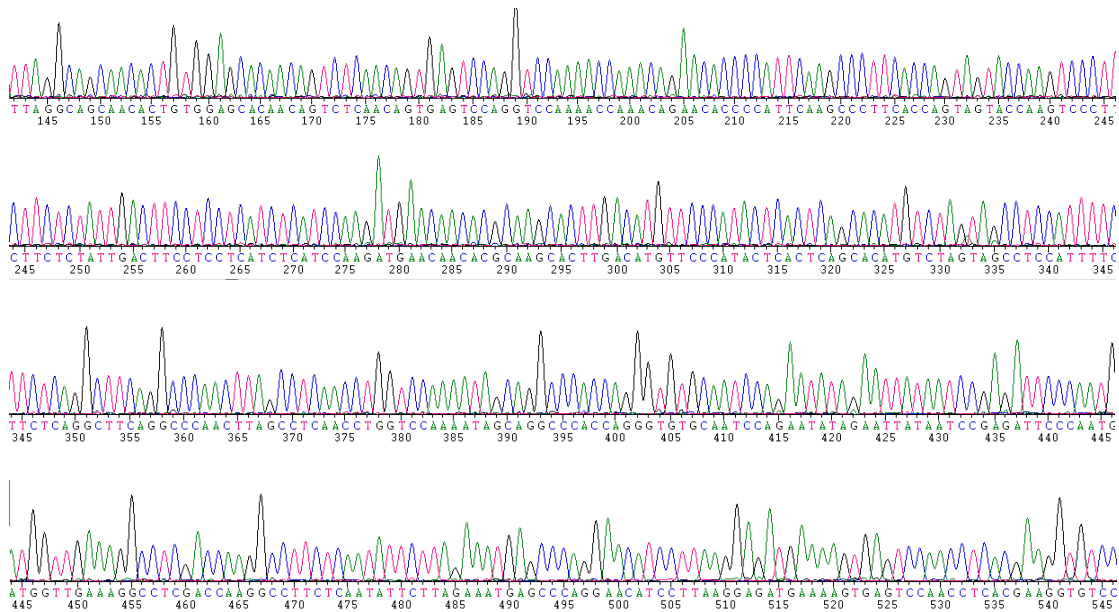
- (1) Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Tanaka Y (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48:1589–1600.
- (2) Nishihara M, Nakatsuka T, (2011) Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnol Lett.* 33:433-441.
- (3) Ono E, Fukuchi-Mizutani M, Nakamura N, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Yamaguchi M, Nakayama T, Tanaka T, Kusumi T, Tanaka Y (2006) Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Nat Acad Sci USA* 103:11075–11080.
- (4) Nakatsuka T, Nishihara M (2010) UDP-glucose:3-deoxyanthocyanidin 5-O-glucosyl transferase from *Sinningia cardinalis*. *Planta* 232:383–392.
- (5) 林茂, 唐道冥, 王华新等. 藤蔓花卉蝶豆的栽培技术[J]. 北方园艺, 2013, 18: 80—81.
- (6) 杨雪. 广州地区10种用于垂直绿化的植物绿化效果比较及种植基质筛选[J]. 广东园林, 2015(5): 36—40.
- (7) Kazuma K, Noda N, Suzuki M (2003) Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 64: 1133–1139
- (8) Susie B. Corley, Rosemary Carpenter, Lucy Copsey, and Enrico Coen (2005) Floral asymmetry involves an interplay between TCP and MYB transcription factors in *Antirrhinum*. *Proc Nat Acad Sci USA* 10:5068–5073.
- (9) Feng X.Z., Zhao Z., Tian Z.X., Xu S.L., Luo Y.H., Cai Z.G., Wang Y.M., Yang J., Wang Z., Weng L., Chen J.H., Zheng L.Y., Guo X.Z., Luo J.H., Sato S., Tabata S., Ma W., Cao X. L., Hu X.H., Sun C.R., and Luo D., 2006, Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(13): 4970-4975
- (10) 许世磊 (2010) 百脉根花发育的背腹不对称性研究。中国科学院大学;中国科学院研究生院博士学位论文
- (11) van Houwelingen A, Souer E, Spelt K et al. Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. *Plant J*, 1998, 13(1):39–50
- (12) Liu D, Galli M, Crawford NM. Engineering variegated floral patterns in tobacco plants using the *Arabidopsis* transposable elements *Tag1*. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(4):419–423

附件图 1: 对白花 CHS cDNA 上完整读码框测序结果 (996bp)

正向: 为上游引物 (CHS-F) 测序结果 (600bp)

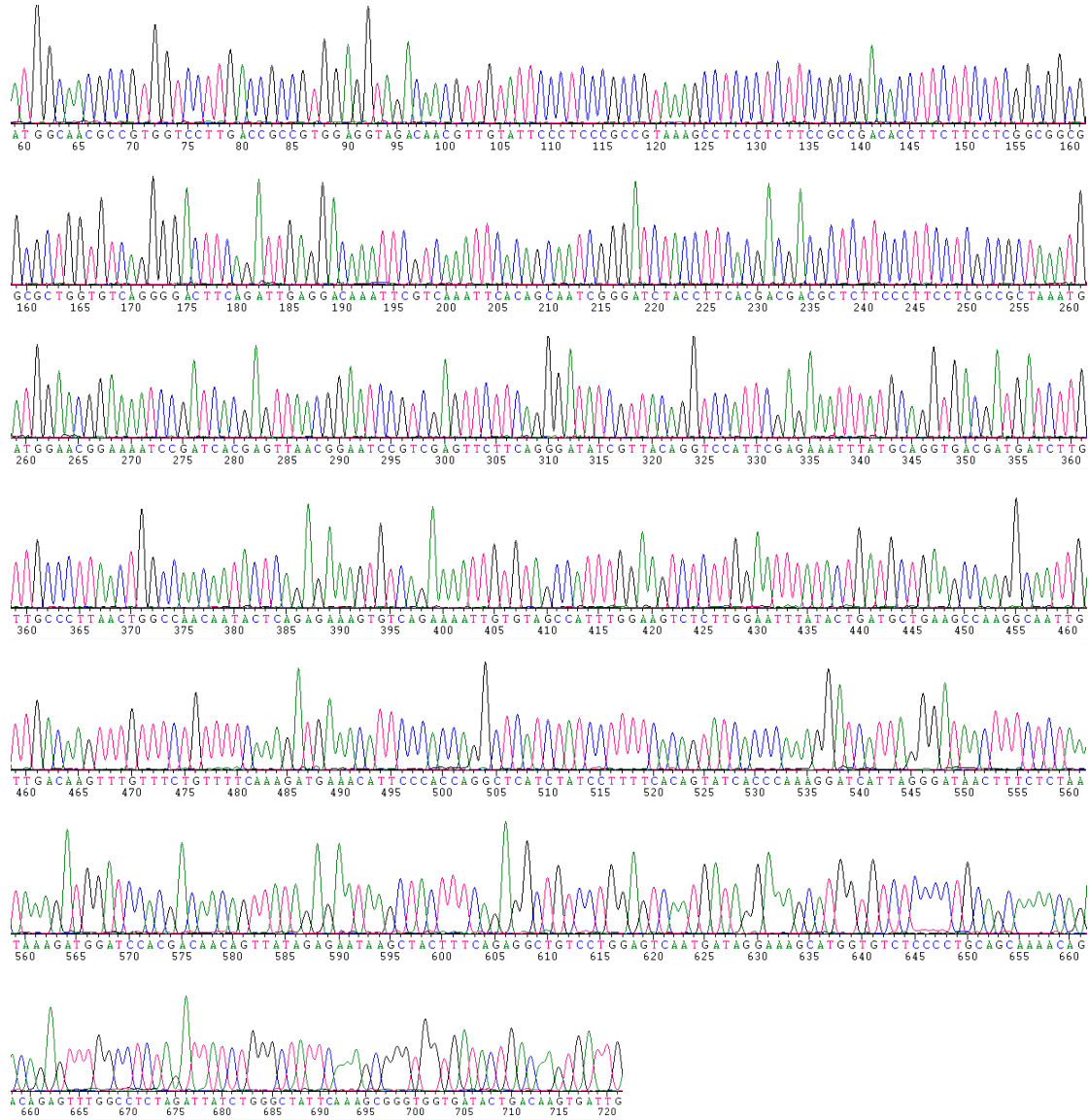


反向: 为下游引物 CHS-R 的测序结果 (400bp)



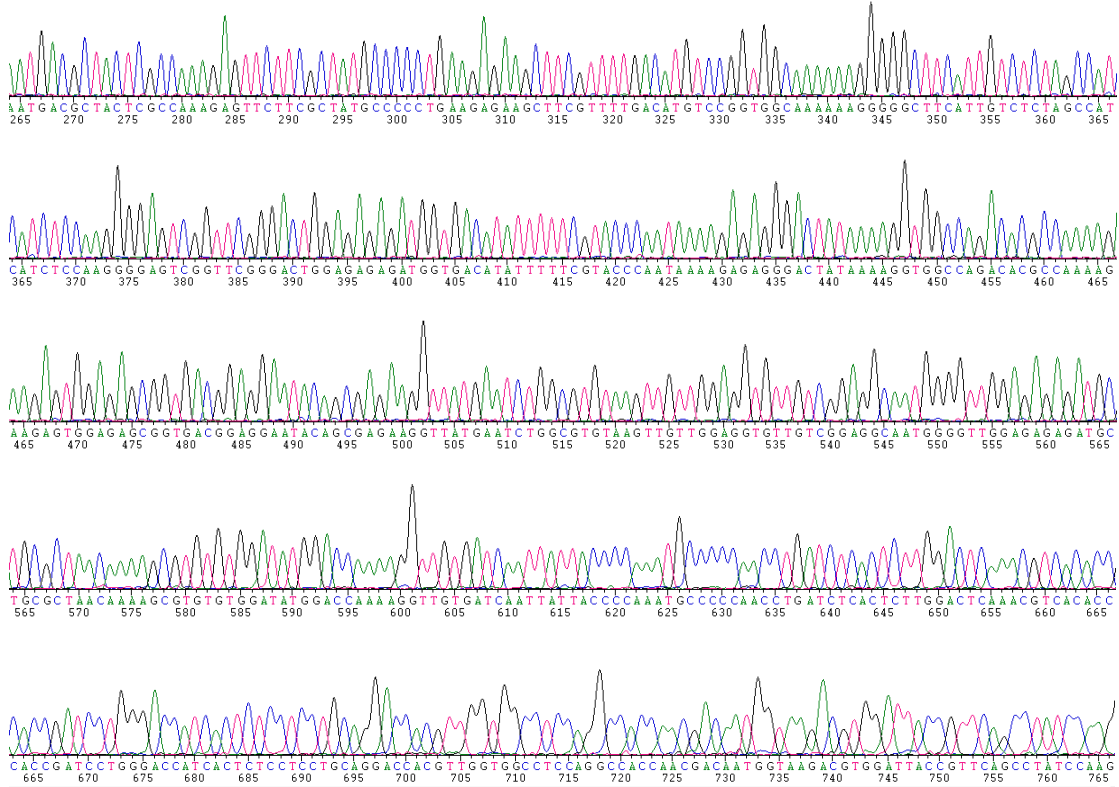
附件图 2:对白花的 CHI cDNA 上完整读码框测序结果(660bp)

正向: 为上游引物 (CHI-F) 测序结果 (660bp)

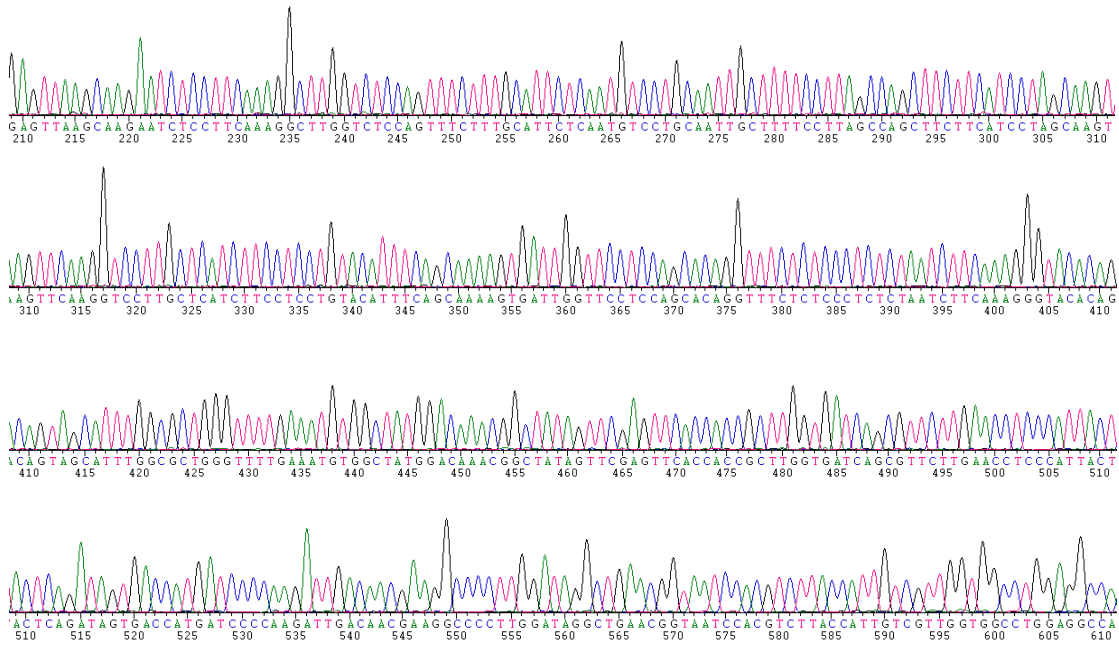


附件图 3: 对白花的 F3H cDNA 上完整读码框测序结果 (843bp)

正向: 为上游引物 (F3H-F) 测序结果 (500bp)

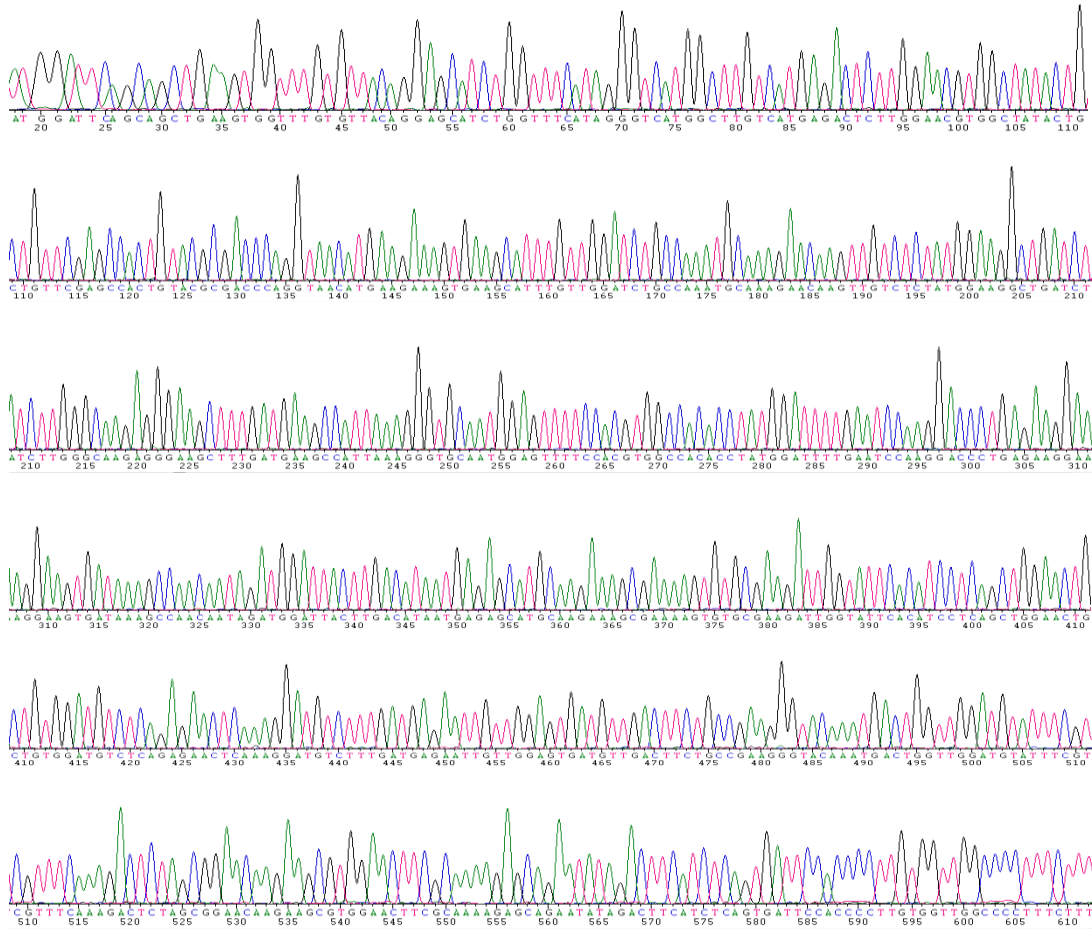


反向: 为下游引物 (F3H-R) 测序结果 (400bp)

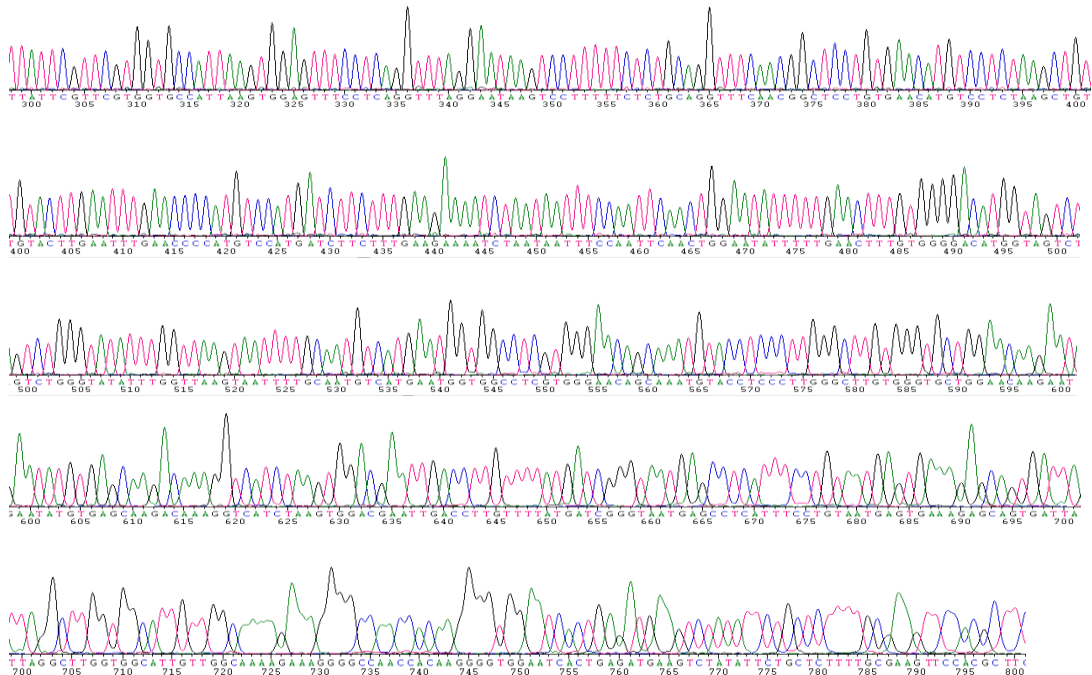


附件图 4:对白花的 DFR cDNA 上完整读码框测序结果 (1020bp)

正向: 为上游引物 (DFR-F) 测序结果 (590bp)

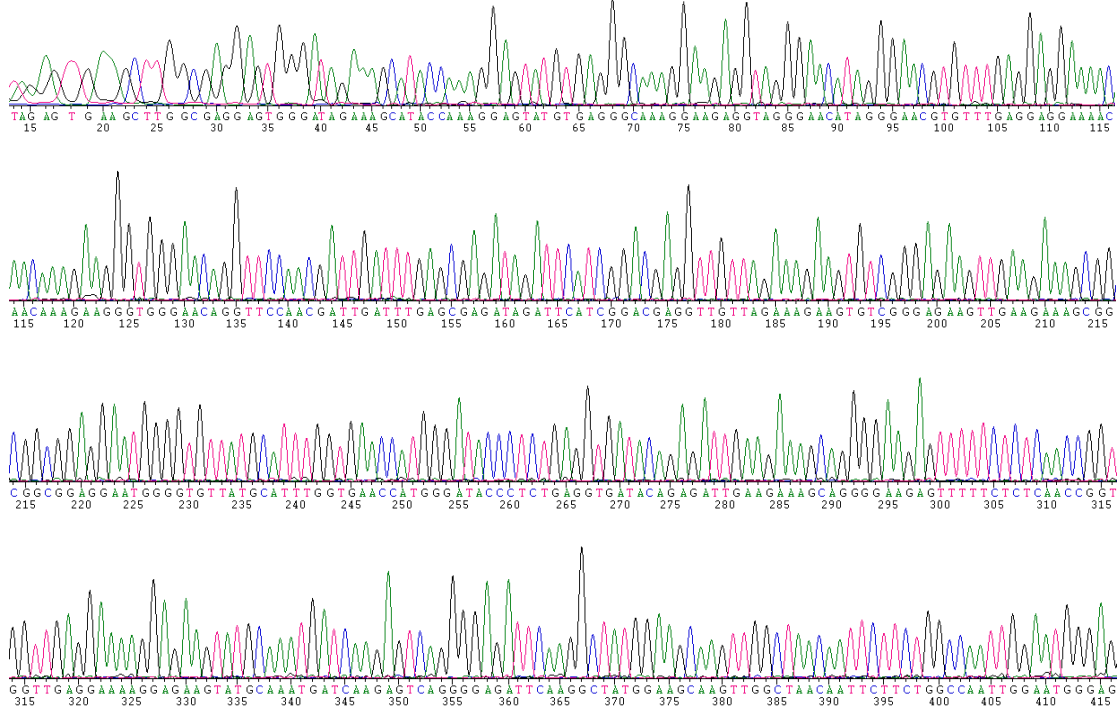


反向: 为下游引物 (DFR-R) 测序结果 (500bp), 与 DFR 序列反向互补

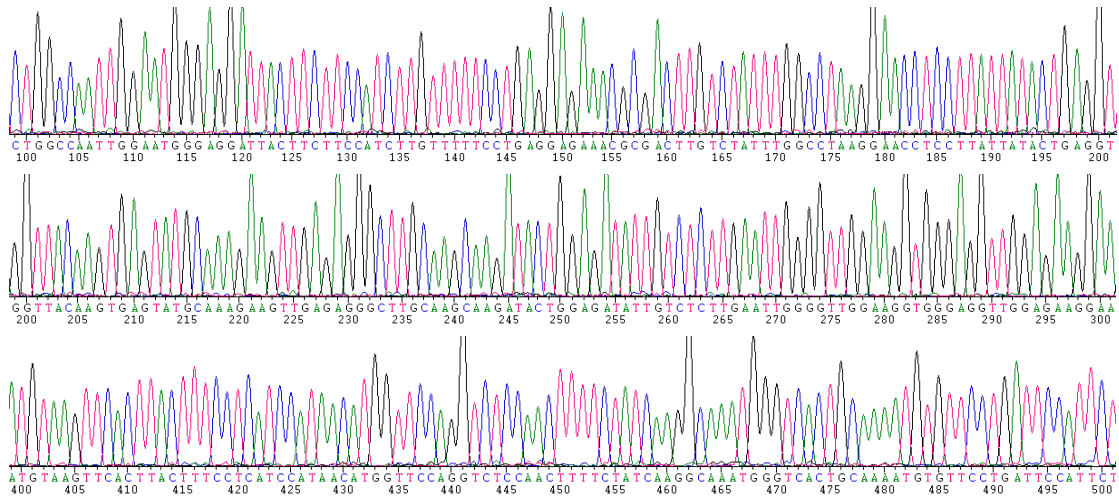


附件图 5: 白花品种基因组上 ANS 基因 (1065bp) 测序结果

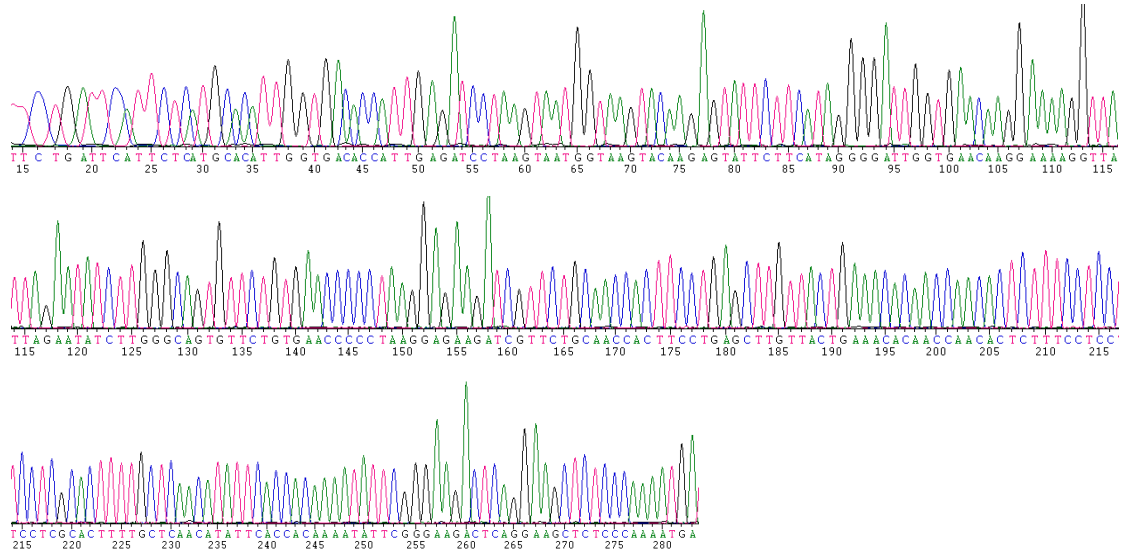
1. 引物 ANS-F 测序结果 (1-400bp)



2. 中间引物 ANS-2F 测序结果 (400-700bp), 上图 400bp 位置与下图 102bp 位置为开始重合区段



3. 中间引物 ANS-3F 测序结果 (700-1065bp), 上图 490bp 位置起, 与下图 17bp 位置为重合区段



注：为保证测序结果准确，设了两个中间引物，具体序列信息如下：

ANS-2F GATACAGAGATTGAAGAAAGC

ANS-3F CTCCAACCTTTCTATCAAGGC

论文贡献声明

本人在指导教师的悉心指导下完成了实验的初步设计、实验操作与论文初稿写作。我高中一年级时的生物老师黄雄伟是我的第一位辅导老师。黄老师是我们杭二中生物奥赛国际金牌教练。在我对花色改良着迷的时候, 黄老师辅导我学会了文献搜索, 在读文献中遇到不懂的问题向黄老师请教与讨论, 在我逐渐明晰自己想做什么课题的道路上黄老师是我的启蒙与领路人。我后面的实验阶段是在浙江大学吴世华老师实验室完成的。吴老师精通植物化学代谢网络, 在实验方法、设备使用、结果分析、论文书写中得到了吴老师的悉心指导。

指导教师与参赛队员简历

指导教师: 吴世华

吴世华, 男, 浙江大学有机化学专业博士毕业, 现为浙江大学生命科学学院副教授, 主攻植物次生代谢产物研究 (drwushihua@zju.edu.cn)。

指导教师: 黄雄伟

黄雄伟, 男, 山东大学微生物工程本科毕业, 现为浙江省杭州市第二中学高级教师, 生物奥赛国际金牌教练。

参赛队员: 徐瓯源

徐瓯源, 女, 浙江省杭州市第二中学 2019 届高中生。获得过 2018 年全国中学生生物联赛浙江省二等奖。利用寒暑假在浙江大学生命科学学院进行了“白花蝶豆花色素缺陷基因的探寻与花色改良设计”科研探索实践活动。

学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知,除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处,本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员: 徐政源

指导老师: 梁峰 黄雄伟

2018年9月5日