

甘菊 *CiCOL5a* 基因的克隆与表达分析

陈东亮^{1,2}, 罗 昌^{1,2}, 程 曦^{1,2}, 黄丛林^{1,2}

(1. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097;

2. 农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京 100097)

摘 要:以甘菊为试材,采用基因克隆及生物信息学方法,克隆了甘菊 *CiCOL5a* 基因并对其进行了生物信息学分析及表达分析。结果表明:该基因共编码 347 个氨基酸,编码序列中含有 2 个保守的 B-Box 结构域和 1 个 CCT 结构域,属于 CO 家族的 I 类基因。NCBI Blastp 分析与进化树分析均显示,该基因编码产物与拟南芥 CO 家族中 *AtCOL5* 相似性最高,故将该基因命名为 *CiCOL5a*。实时定量分析显示,*CiCOL5a* 为组成型表达,且在叶中表达量最高。在花芽膨大的过程中,*CiCOL5a* 基因的表达逐渐升高,并在露色时达到最大值,之后逐渐降低,表明 *CiCOL5a* 在甘菊开花过程中可能发挥着重要功能。

关键词:菊花; *Constans like* 基因; 开花调控; 表达分析

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0103-05

菊花是我国传统的十大名花之一,也是当前世界四大鲜切花之一。除具有极高的观赏价值,菊花还具有茶用、食用、药用等经济价值。花是植物最复杂的器官,也是菊花最主要的经济器官。植物开花是一个极其复杂的过程,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的研究表明,植物开花主要存在 4 种调控途径:光周期途径(photoperiod pathway)、春化途径(vernalization pathway)、赤霉素途径(gibberellin pathway)和自主途径(autonomous pathway)^[1],4 种途径都涉及复杂的、相互交错的基因表达和调控网络,其中光周期途径是最重要也是机理研究最清楚的一条调控途径^[2]。研究表明,在光周期调控途径中,*Constans*(CO)类基因发挥着非常重要的作用,其能够接收节律钟信号,直接调控开花基因 *FLOWERING LOCUS T*(*FT*)的表达,启动植物的开花进程^[3]。

CO 家族为多基因家族,目前从模式植物拟南芥中共分离到 17 个 CO 家族基因,水稻(*Oryza sativa*)中的 CO 家族成员则共有 16 个^[4]。根据蛋白结构特征,ROBSON 等^[5]将 CO 家族蛋白分为 3 类,I 类蛋白含有 2 个 B-Box 结构域和 1 个 CCT 结构域;II 类蛋白含有 1 个 B-Box 结构域和 1 个 CCT 结构域,III 类蛋白则含有 1 个 B-Box 和 1 个高度异化的 CCT 结构域,每个大类又可根据差异进一步分为若干亚类。在众多的 CO 家族蛋白中,只有少数的功能得到研究,大部分成员功能尚不清楚。

菊花是典型的短日照植物,光周期在菊花开花过程中扮演着非常重要的调控作用。甘菊是栽培菊花的近源野生种(*Chrysanthemum lavandulifolium*),由于其二倍体特性,常被当做菊属植物研究的模式材料。该研究从甘菊叶片中克隆得到 1 条 CO 家族 I 类基因,并利用实时定量 PCR 技术检测了其在甘菊不同组织和不同时期花器官中的表达情况,以期为进一步揭示菊花花发育调控的分子机理提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以北京市农林科学院生物中心北郎中菊花种质资源圃保存的甘菊(*Chrysanthemum lavandulifolium*)无性系为试材。2015 年 4、5 月取甘菊脚芽进行扦插,生根后栽植于直径 20 cm 塑料花盆中(基质蛭石:草炭:园土=1:2:1),每盆 3 株。于塑料大棚正常培养至自然开花,

第一作者简介:陈东亮(1984-),男,河北邯郸人,博士,助理研究员,研究方向为花卉分子育种。E-mail:dlchen1984@126.com

责任作者:黄丛林(1969-),男,四川仁寿人,博士,研究员,现主要从事花卉育种与产业化关键技术等研究工作。E-mail:conglinhuang@hotmail.com

基金项目:北京市科委资助项目(D161100001916004,Z151100001015007);北京市农林科学院创新资助基金资助项目(KJ CX20140109,KJ CX20140202);北京市农林科学院科技创新团队基金资助项目(JNKST201610)。

收稿日期:2016-05-05

将花芽至完全开花的花朵划分为 5 个阶段(图 1),依次为Ⅰ小花蕾期(花蕾较小,鳞状苞片完全包裹)、Ⅱ大花蕾期(花蕾较大,鳞状苞片顶部打开)、Ⅲ花胎期(花蕾刚开始露色)、Ⅳ半开期(舌状花开放,管状花刚开始或即将开始

散粉)、Ⅴ盛花期(管状花全部开放,花粉完全散尽),以及甘菊处于盛花期的根、茎、叶、舌状花和管状花等共 10 个样本,每个样本设置 3 个生物学重复,液氮速冻后,保存于-80℃备用。

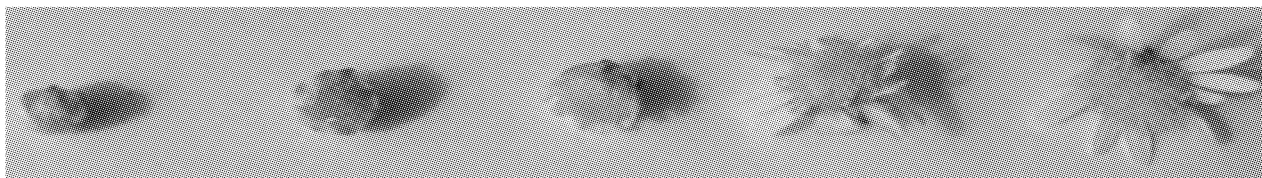


图 1 不同时期花与花蕾取样标准

Fig. 1 Sample standard of flower and bud in different periods

1.2 试验方法

1.2.1 *CiCOL5a* 基因的克隆 利用 TIANGEN 新型植物基因组提取试剂盒提取甘菊叶片 DNA。利用 TaKaRa mini Kit 试剂盒提取提不同样品的总 RNA, Promega 公司反转录试剂盒制备 cDNA。根据课题组转录组测序获得的 *Constans*(*CO*) 基因同源序列设计 ORF 扩增引物,上游引物为 COL5-F: 5'-ATGGTGGATAACACTGATG-3', 下游引物为 COL5-R: 5'-TCAAAAAGATGGAACAA-CA-3'。分别以甘菊 cDNA 和甘菊 DNA 为模板,利用 PrimerSTAR HS 高保真酶(TaKaRa)进行 PCR 扩增,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,目的片段回收并连接于克隆载体 pGEM T-Easy(Promega 公司),热击转化大肠杆菌 DH5 α 感受态(全式金),阳性克隆经酶切检测后,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.2 生物信息学分析 利用 DNASTAR 5.01 软件对序列进行简单分析。Motif Scan 在线软件分析蛋白功能结构域。利用 MEGA 4.0 软件构建基于同源蛋白序列的系统进化树。

1.2.3 实时定量表达分析 根据基因序列设计实时定量 PCR 引物, *CiCOL5a*-F: 5'-TCCAGTTATGACGATTCCA-3', *CiCOL5a*-R: 5'-TGTTCTGATGCTGTACCCT-3'。分别以甘菊根、茎、叶以及不同时期的花蕾及花等 cDNA 为模板,并以甘菊 *MTP* 基因为内参^[6],利用 ABI7300 PCR 仪和 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒进行实时定量 PCR 分析。PCR 扩增体系: 2 \times SYBR Premix Ex Taq 10 μ L, 引物 *CiCOL5a*-F, *CiCOL5a*-R 各 0.4 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹), 模板 cDNA 2 μ L 用水补充至 20 μ L。采用标准 2 步法反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 共 45 个循环。每个样品设置 3 次重复, 数据采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行分析^[7]。

2 结果与分析

2.1 *CiCOL5a* 基因的克隆

以甘菊叶片 cDNA 为模板,利用引物 COL5-F 和 COL5-R 扩增得到一个大小与预期一致的条带。经回收测序,对测序结果分析显示,该序列与转录组拼接的模板序列仅有 2 个碱基的差异,表明克隆到的序列为预期的 *CO* 同源序列。该序列含有完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 总长 1 044 bp, 共编码 347 个氨基酸。经 NCBI Blastp 分析,其编码产物与其它植物的 COL5 蛋白相似性最高,但与已经报道的甘菊 *CiCOL5* (NCBI 及原文献均未能获得相关序列信息)在长度上有明显区别^[8],故将该试验获得的基因命名为 *CiCOL5a*。*CiCOL5a* ORF 序列在 NCBI 进行注册,收录号为 KU180188。*CiCOL5a* 基因序列及其推导的氨基酸序列如图 2 所示。以 DNA 为模板克隆获得了其对应的 DNA 序列,经与 cDNA ORF 序列比对发现,其在编码框中部含有一个 162 bp 的内含子(图 3),这与拟南芥 *AtCOL5* 基因的 88 bp 的内含子多了将近 1 倍。

2.2 生物信息学分析

DNASTAR 软件分析表明,*CiCOL5a* 蛋白预测的分子量为 38.56 kDa,等电点为 7.502,含有强碱性氨基酸 42 个,强酸性氨基酸 41 个,疏水性氨基酸 113 个,极性氨基酸 98 个。Motif Scan 结构域分析显示,该蛋白含有 2 个高度保守的 B-Box 结构域和 1 个 CCT 结构域(图 2、3),符合 I 类蛋白特征,进一步表明 *CiCOL5a* 为 *CO* 家族中的 I 类基因。

基于同源蛋白,构建了 *CiCOL5a* 蛋白与其它植物中 COL5 蛋白以及拟南芥 17 个 *CO* 家族蛋白的系统进化树。由图 4 可知,参与建树的所有其它植物 COL5 都最先与拟南芥中的 COL5 聚合在一起,进一步证明该试验获得的基因序列为 COL5 基因。在参与建树的 COL5 序

```

1  ATGGTGGATAACACTGATGGTTGTGGTACCAAGTCTTTTCCGTTAGGGTGGACCGCTATCGCAAAACCTGC
   M V D N T D G C G T K S F P L G W T A I A K P C
73  GACTCGTGCAAGTCCACCTCAGCAATACTATTTTGTCTACGGACAACTTCACTTGTGTATAGCGTGTGAC
   D S C K S T S A I L F C R T D K L H L C I A C D
145 GTGAAATACACGGTCACACGAAACACGAGCGTGTGGATGTGTGAAGTTTGTGAACAGTCAGCCGCGACT
   V K I H G H T K H E R V W M C E V C E Q S A A T
217 GTTACATGCAAGGCAGACGTTGCTGCTCTATGTGTACATGTGATAGAGACATCCACTCTGTGAACCCCTC
   V T C K A D V A A L C V T C D R D I H S V N P L
289 GCGCGTAGACACGAGCGGGTCTTATTTGTTCCCTTTATGACTCAGCTGAAGATGTAGTGAGGCTTGTAAAT
   A R R H E R V P I V P F Y D S A E D V V R L A N
361 CTGACAGCTGAAATTTTGAACCAACCAATAGTAAGTGACGTACGTGTGATGTCACGACTAGTATGCTATGTT
   L T A E I L T Q P I V S D V T C D V T T S M H V
433 CAATATCCTTTGGATGTTCTCAAGTGATGGTAAAGTCGGCTGATCTATTTTCGGATCGTTTATTTGATTTT
   Q Y P L D V P Q V M V K S A D L F S D R L D F
505 GGGCTTCGCGATTCCGTCACATGTTTTATTTCAACCTGAATATAGAGCCCGCGCTGTTCCGATACAAACAACA
   G F A I P S H V L F Q P E Y R A R A V P I Q T T
577 ACGGGTCCAGTTATGACGATTCCACCTCTAGGGCCACCGATACAACTGTTGATCATAAACAGTGGCAACT
   T G P V M T I P P L L G P P I Q T V D H K P V A T
649 CGAACCCTTACATGATGATTACACGAGTTCTACTACGAACCAATCGCATAGCCTTAGTGTATCTTCTACT
   R T P Y M M D Y T S S T T N Q S H S L S V S S T
721 TCAATTGATGAGGTACAGCATCAGAACAAAGCTCGATAGTAGACATATCCTATCCATTAGTACTACCCGCC
   S I D E G T A S E Q S S I V D I S Y P L V L P A
793 ATCAATAACGAAAGAGTTTTCGCGAGCAGATAGAGAGGCTAGAGTTTGGAGTACAAGGAGAAAGGAAG
   I N N E K K F S A A D R E A R V L R Y K E K R K
865 AACAGAAAGTATGACAAGAAGATTCGATATGCTTCACGAAAAGCGTACGACAGACAAAGCCGAGGATCAAA
   N R K Y D K K I R Y A S R K A Y A E T R P R I K
937 GGCCGGTTCGTGAAGCAATGGAGTCAGCGCGGAGGATCGAGATCCGTGCTTGTTCACAGCCGTATGTGGT
   G R F V K Q M E S A A E D R D P C L F T A V C G
1009 GGCGAGGTGGAGTATGGTGTGTTCCATCTTTTGA
      G E V E Y G V V P S F *

```

注:下划线标注的是2个B-Box结构域,双下划线标注的是CCT结构域。

Note: Two B-Box domain are underlined; CCT domain is marked by double underline.

图2 *CiCOL5a* 基因编码序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *CiCOL5a*

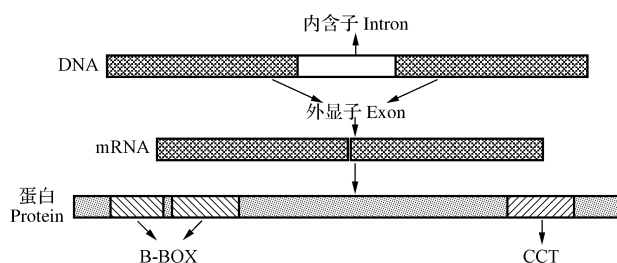


图3 *CiCOL5a* DNA、mRNA 及蛋白结构

Fig. 3 DNA, mRNA and protein structure of *CiCOL5a*

列中,甘菊与菊亚纲植物首先聚合在一起,再与十字花科等其它植物聚在一起,这与分类学的描述基本一致,表明 *COL5* 基因多态性可用于植物进化与分类学研究的参考。

2.3 表达分析

以甘菊 *MTP* 为内参基因,对甘菊不同组织及不同时期花芽和花中 *CiCOL5a* 基因的表达进行了分析。由图5可知, *CiCOL5a* 在叶片中的表达量最高,远远高于其它组织,这与其它植物中的I类CO基因的表达模式类似。同时,对不同发育时期花芽和花中 *CiCOL5a* 的表达进行了分析,随着花芽的膨大, *CiCOL5a* 表达逐渐增加,在花苞开始露色时表达达到最高峰,之后随着花的开放逐渐降低,这表明 *CiCOL5a* 可能在甘菊开花过程中的色素合成、花粉发育等某个生理过程中发挥着功能。

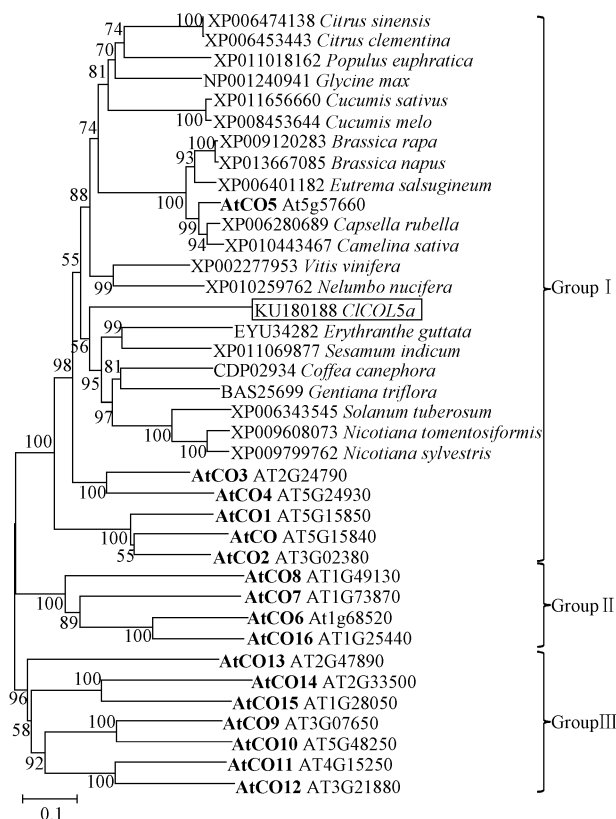
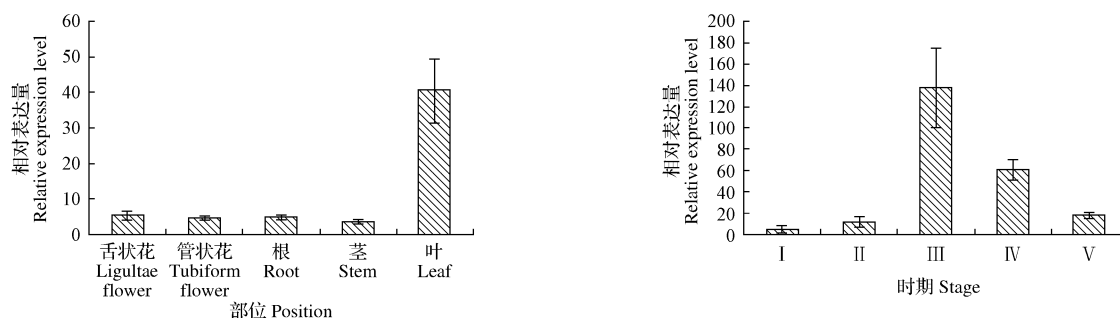


图4 基于CO蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on CO proteins

图5 *CiCOL5a* 在不同组织和不同时期花芽中的表达Fig. 5 Expression pattern of *CiCOL5a* in different tissues, flower and bud in different periods

3 结论与讨论

CO 基因是高等植物中普遍存在的一类基因。大量研究表明,CO 类基因在感受节律钟变化、调控开花时间的过程中发挥重要作用^[9-12]。除此之外,部分 CO 家族基因还被证明参与了侧根形成、分枝特性、果实成熟等发育进程^[13-15]以及植物的非生物胁迫逆境反应等^[16]。

菊花中 CO 家族基因的研究起步较晚。2011 年,田素波等^[17]首次从菊属植物中克隆得到一个 CO 家族 I 类基因,该基因与其它植物 I 基因类似,受短日照诱导表达。之后,FU 等^[8]从甘菊中克隆了 11 条 CO 类基因,其中 I 类 CO 基因 5 个,II 类 4 个,III 类 2 个。通过进一步的表达分析和在模式植物拟南芥中的过表达,证明了甘菊 I 类基因 *CiCOL5* 在短日照下可以促进开花^[8]。

该研究中获得的 *CiCOL5a* 基因的编码蛋白含有 2 个 B-Box 和 1 个 CCT 结构域,属于 CO 家族 I 类基因。在拟南芥 17 个 CO 家族成员中,*CiCOL5a* 蛋白与 *AtCOL5* 相似性最高,而与报道的 *CiCOL5* 差异明显,故将该基因命名为 *CiCOL5a*。*CiCOL5a* 与 FU 等^[8]报道的菊花 CO 蛋白在氨基酸链长度和 NCBI Blast 的 E-value 值等特征上都存在一定差异,遗憾的是由于无法从原论文或公共数据库获得相关序列,因此无法将序列进行直接比较。

与其它 I 类 CO 基因类似,*CiCOL5a* 也为组成型表达,并在叶片中表达量最高,表明其可能与拟南芥 *AtCOL5* 等具有类似的在叶中表达,诱导 *FT* 表达,进一步引起开花的功能。该试验中,在甘菊开放初始,CO 在花中的表达是急剧增加的,并在露色时达到最大值,之后随着花朵的开放,其表达逐渐降低,这表明 *CiCOL5a* 基因可能在甘菊开花过程中,对花瓣色素形成、花粉发育等过程中发挥着一定的作用。

参考文献

- [1] KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCO C, BLANKESTIJN-DE V H, et al. Genetic interactions among later flowering mutants of *Arabidopsis*[J]. Genetics, 1998, 148(2): 885-892.
- [2] 丁焱, 戴思兰, 马月萍. 高等植物成花的光周期调控[J]. 北方园艺, 2009(9): 106-110.
- [3] IMAIZUMI T, KAY S A. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence[J]. Trends Plant Sci, 2006, 11(11): 550-558.

- [4] SIMON G, DUNFORD R P, GEORGE C, et al. The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2003, 131(4): 1855-1867.
- [5] ROBSON F, COSTA M M, HEPWORTH S R, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants[J]. Plant J, 2001, 28(6): 619-631.
- [6] FU J, WANG Y, HUANG H, et al. Reference gene selection for RT-qPCR analysis of *Chrysanthemum lavandulifolium* during its flowering stages[J]. Mol Breeding, 2013, 31(1): 205-215.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN D T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001(25): 402-408.
- [8] FU J, YANG L, DAI S. Identification and characterization of the *CONSTANS-like* gene family in the short-day plant *Chrysanthemum lavandulifolium*[J]. Mol Gene Genomics, 2015, 290(3): 1039-1054.
- [9] PUTTERILL J, ROBSON F, LEE K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors[J]. Cell, 1995, 80(6): 847-857.
- [10] CHENG X F, WANG Z Y. Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 2005, 43(5): 758-768.
- [11] YANG S, WEERS B D, MORISHIGE D T, et al. *CONSTANS* is a photoperiod regulated activator of flowering in *Sorghum*[J]. BMC Plant Biol, 2014, 14(1): 1-15.
- [12] HASSIDIM M, HARIR Y, YAKIR E, et al. Over-expression of *CONSTANS-LIKE 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*[J]. Planta, 2009, 230(3): 481-491.
- [13] DATTA S, HETTIARACHCHI G H, DENG X, et al. *Arabidopsis* *CONSTANS-LIKE 3* is a positive regulator of red light signaling and root growth[J]. Plant Cell, 2006, 18(1): 70-84.
- [14] WANG H, ZHANG Z, LI H, et al. *CONSTANS-LIKE 7* regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis*[J]. J Exp Bot, 2013, 64(4): 1017-1024.
- [15] CHEN J, CHEN J Y, WANG J N, et al. Molecular characterization and expression profiles of *MaCOL1*, a *CONSTANS-like* gene in banana fruit[J]. Gene, 2012, 496(2): 110-117.
- [16] MIN J H, CHUNG J S, LEE K H, et al. The *CONSTANS-like 4* transcription factor, *AtCOL4*, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis*[J]. J Integr Plant Biol, 2015, 57(3): 313-324.
- [17] 田素波, 林桂玉, 郑成淑, 等. 菊花花发育基因 *CmCO* 和 *CmFT* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1129-1138.

川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶的原核表达与条件优化

宋 婧, 朱 建 全, 张 泉 宝, 张 赶, 周 嘉 裕

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘 要:以川芎咖啡酸-3-O-甲基转移酶基因(LCCOMT)为表达对象,将含有 6 * His 标签的 LCCOMT 基因连接 pET28a 表达载体后转化大肠杆菌 BL21,采用原核表达的方法,优化了 LCCOMT 基因的表达条件。结果表明:当诱导时间为 4 h, IPTG 终浓度为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导温度为 37°C 时,重组 LCCOMT 蛋白的表达量达到最大。溶解性检测结果表明, LCCOMT 重组蛋白以可溶性蛋白的形式存在,占总蛋白的 9%,该试验可为 LCCOMT 的大规模表达纯化奠定基础。

关键词:川芎;咖啡酸-3-O-甲基转移酶;原核表达;条件优化

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0107-04

基于植物体内阿魏酸的合成途径,已获知咖啡酸-3-O-甲基转移酶(caffeic acid 3-O-methyl transferase, COMT)能够催化咖啡酸和以 S-腺苷甲硫氨酸为底物合成阿魏酸^[1-3]。川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)是四川省著名道地药材,其根茎是传统中药^[4-6]。阿魏酸是川芎的主要活性成分^[7-8]。因其具有独特的药理作用和

生物活性,且毒性较低,在医药、保健品、化妆品原料和食品添加剂等领域有极其广泛的应用前景。目前阿魏酸可通过提取、化学合成、水解及微生物转化等 4 类方法获得。提取法与化学合成法均会使用大量的化学溶剂,污染环境;水解法需要首先提取获得阿魏酸酯,再利用水解制备阿魏酸,也会使用大量的化学溶剂,污染环境;微生物发酵法由于体系成分复杂因而分离纯化成本高。与前几种方法相比较,酶转化法具有环境友好、成本低、产品安全性高等特点。课题组在前期研究中,已从川芎根茎中克隆获得了川芎 COMT 基因的全长 cDNA 序列(LCCOMT, GenBank 登录号 No. KR106206),构建了重组表达载体 pET28a-LCCOMT。为提高 pET28a-LCCOMT 在大肠杆菌 BL21 的表达水平,该研究参考有关文献,研究了诱导温度、起始 OD_{600} 值、IPTG 诱导浓度

第一作者简介:宋婧(1995-),女,本科,研究方向为生物学。E-mail: 1344366035@qq.com.

责任作者:周嘉裕(1976-),女,博士,副教授,研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: spinezhou@home.swjtu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31371232, 31500276);成都市科技技术研发资助项目(2015-HM01-00051-SF);国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201510613063)。

收稿日期:2016-04-22

Clone and Express Analysis of *CiCOL5a* in *Chrysanthemum lavandulifolium*

CHEN Dongliang^{1,2}, LUO Chang^{1,2}, CHENG Xi^{1,2}, HUANG Conglin^{1,2}

(1. Beijing Agro-biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2. Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing 100097)

Abstract: Taking *Chrysanthemum* as test material, the *CiCOL5a* gene was cloned and analyzed. The results showed that this gene encoded a protein of 347 amino acids containing two B-Box domains and one CCT domain, which indicated that it belonged to the CO family group I. Both the results of NCBI Blastp and phylogenetic tree based on CO proteins showed it was mostly closed to *AtCOL5* gene than other member of the family, so it was named as *CiCOL5a*. Relative real time PCR analysis showed that *CiCOL5a* expressed in all the tested tissues, with the highest level in leaf. In the process of flowering, the expression of *CiCOL5a* gene was gradually increased, and reached the maximum level at pigmented stage, and then decreased gradually, which indicated that *CiCOL5a* might play an important role in the development of flower in *Chrysanthemum*.

Keywords: *Chrysanthemum*; *Constans like* gene; flowering regulation; express analysis