

毛白杨二氢黄酮醇-4-还原酶基因*PtDFR*的克隆和特性分析

武博 高凯 安新民*

(北京林业大学林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,
北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)是调控花青素合成的关键酶。DFR对底物的选择是决定植物中花色苷种类的重要因素,并在很大程度上决定花青素的比例,最终使植物呈现不同的颜色。此外,DFR基因家族中的不同成员对底物具有不同的催化效率,影响了植物中花青素的种类和含量,从而使植物组织或器官呈现不同的颜色。该文在分析已有毛白杨转录组数据的基础上,以毛白杨二氢黄酮醇-4-还原酶基因为研究对象,设计了一对PCR引物,以毛白杨基因组DNA为模板,通过PCR扩增获得了毛白杨DFR基因家族的1个成员,命名为*PtDFR*。测序结果表明,该基因序列全长为1 591 bp,包含6个外显子和5个内含子,CDS长度为954 bp,编码317个氨基酸,具有1个NADP(H)保守结构域。氨基酸序列相似性分析和进化分析表明,毛白杨与银白杨、毛果杨DFR的氨基酸相似性分别高达95.65%和94.21%,而与柑橘、枣、葡萄等7个物种DFR的氨基酸相似性达到82.14%~89.29%。转录组数据分析显示,*PtDFR*在不同组织器官中的表达量存在明显差异,萌动营养芽表达量最高,休眠营养芽最低,且不同时期雌雄花芽表达趋势相似,该研究结果将为深入探究*PtDFR*的功能奠定基础。

关键词 毛白杨;二氢黄酮醇-4-还原酶;基因克隆;表达模式

Cloning and Characterization of Dihydroflavonol-4-Reductase Gene *PtDFR* from *Populus tomentosa*

WU Bo, GAO Kai, AN Xinmin*

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding, NDRC, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, MOE, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract The choice of substrate for DFR is an important factor in determining the species of anthocyanins in plants and determines the proportion of anthocyanins to a large extent, so that the plants end up in different colors. In addition, different members of the DFR gene family have different catalytic efficiencies for substrate, so it determines the types and content of anthocyanins in plants to some extent, therefore affecting the color of plant tissues or organs. In this study, the dihydroflavonol-4-reductase gene was selected as desired gene. Based on the analysis of the existing transcriptome data of *Populus tomentosa*, we designed a pair of PCR primers, using *Populus*

收稿日期: 2019-04-08 接受日期: 2019-06-17

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2018ZX08020002-002-004)、国家林业局科技发展中心项目(批准号: KJZXSA2018030)和国家自然科学基金(批准号: 31870652、31570661)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: April 8, 2019 Accepted: June 17, 2019

This work was supported by the National Key Program on Transgenic Research (Grant No.2018ZX08021002-002-004), the State Forestry Administration Science and Technology Development Center Project of China (Grant No.KJZXSA2018030) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31870652, 31570661)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5265>

tomentosa genomic DNA as a template, and obtained one member of the *Populus tomentosa* DFR gene family by PCR amplification, and named as *PtDFR*. The sequencing results showed that the full length was 1 519 bp, composed of 5 exons and 4 introns. The CDS length was 954 bp, encoding 317 amino acids, containing one conserved domain of NADP(H). Both amino acid similarity and phylogenetic analysis showed that *PtDFR* with *Populus alba* L. and *Populus trichocarpa* is as high as 95.65% and 94.21%, while the DFR amino acid similarity with other 7 species such as *Citrus reshni*, *Zizyphus jujuba*, *Vitis vinifera* reached 89.29%-82.14%. Further transcriptome data analysis showed that the FPKM values of *PtDFR* presented big differences in tissues and organs. The FPKM value in germinating vegetative buds was the highest, conversely, the lowest in the dormant vegetative buds. The expression trends of *PtDFR* in male and female flower buds during development were similar. The results will lay a good foundation for further studying the function of *PtDFR*.

Keywords *Populus tomentosa*; dihydroflavonol-4-reductase; gene cloning; expression patterns

花青素(anthocyanin), 又称花色素, 由花色苷水解而形成, 是自然界中一类水溶性天然色素, 广泛存在于植物中, 水果、蔬菜等植物中的主要呈色物质绝大多数与其有关。自然状态下的花青素以糖苷形式存在, 花青素主要存在于植物的液泡之中, 决定着水果、蔬菜、花卉等的观赏价值和商品价值^[1]。

二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)是植物花青素合成途径的关键酶, 可以催化二氢黄酮醇, 属于NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)依赖的短链还原酶家族^[2], 又属于DFR超家族^[3]。*DFR*基因最早是从玉米中分离出来并得到鉴定的^[9], 之后在金鱼草、矮牵牛、大麦、拟南芥等多种植物中得到分离克隆^[4]。限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)带型表明, 马铃薯和番茄中的*DFR*均为单拷贝基因^[5]。

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr., *P. tomentosa*)在我国分布广泛, 是工业用材和城乡绿化的重要树种^[6]。目前, 市场上存在的红叶杨树品种——中华红叶杨等是由中林2025杨芽变培育和变异而成^[7]。彩叶杨树品种比较单一, 无法满足日益多样化的彩叶品种市场需求。尽管*DFR*基因在多种植物中研究取得重要进展, 然而迄今为止, 对于毛白杨*DFR*基因的研究尚未报道。该研究旨在克隆毛白杨二氢黄酮醇还原酶基因并对其特性进行分析。基于杨树转录组数据, 通过PCR克隆*DFR*基因, 命名为*PtDFR*, 利用生物信息学技术对序列进行了结构、进化、保守域等特性分析, 并借助转录组测序数据进一步分析该基因在杨树不同组织器官中的表达模式, 为研究*PtDFR*基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品的采集与保存 毛白杨雌雄植株分别取自北京林业大学, 雌雄花芽采集于2012年6月至2013年1月, 分别于6月25日、7月30日、8月31日、10月8日、11月2日、12月1日、1月3日采集毛白杨雌雄花芽样本, 样本包含成花诱导、花芽分化、器官分化发育等3个杨树花发育代表性阶段。营养芽样本采集分别在休眠期和萌动期进行。毛白杨根、茎、叶等组织取自毛白杨无性系TC1521组培苗。所有样本采集后液氮速冻, 保存于-80℃备用。

1.1.2 试剂与菌株 UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。pGEM-T Easy Vector(Promega)购自北京拜尔迪生物科技有限公司。TOP10大肠杆菌感受态细胞购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

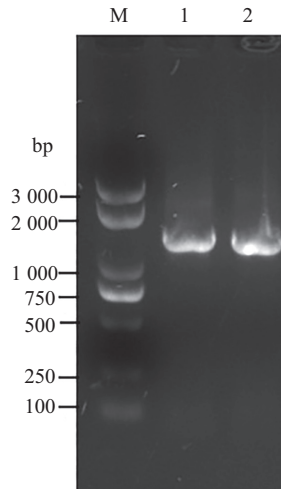
1.2 方法

1.2.1 基因组DNA、RNA的提取与转录组测序 取少量毛白杨(TC1521)组培苗叶片, 采用CTAB法提取基因组DNA, 经凝胶电泳检测质量后, 保存于-20℃备用。分别取适量冻存的毛白杨组培苗叶片、根、茎组织、花芽、营养芽样品置于预冷的研钵中, 加入液氮快速研磨至粉末, 采用CTAB法提取总RNA, DNA杂质用RQ1 DNase I(Promega)处理。转录组测序委托北京源泉宜科生物技术有限公司完成, 通过FastQC对原始fastq文件进行质控, 在删除低质量序列采用Trinity程序进行*de novo*组装。

1.2.2 毛白杨*PtDFR*基因克隆 在分析毛白杨转录组数据基础上, 根据基因功能注释信息, 参照*DFR*基因的CDS序列, 设计合成了5'端引物和3'端引物(表1)。

表1 毛白杨*DFR*基因克隆所用的引物序列Table 1 Oligonucleotide primers used for *DFR* isolation in *P. tomentosa*

基因名称	引物序列(5'→3')
Gene	Primer sequences (5'→3')
<i>PtDFR</i>	<i>PtDFR</i> -F1: ATG CTG TCC GAG CCACCG
	<i>PtDFR</i> -R1: TCA GGA CGC AGG GAC CAC T



M: DNA molecular marker; 1: PCR扩增产物; 2: 重组质粒PCR鉴定。

M: DNA molecular marker; 1: PCR product; 2: PCR identification of recombinant plasmid.

图1 毛白杨*PtDFR*基因克隆Fig.1 Cloning of *PtDFR* gene from *P. tomentosa*

用上述引物进行PCR扩增。25 μ L PCR反应体系包括1 \times PCR buffer(10 mmol/L Tris、pH8.3、50 mmol/L KCl、2.5 mmol/L MgCl₂), 50 ng毛白杨gDNA, 20 pmol/ μ L的5'端引物和3'端引物各0.5 μ L, 1 μ L ExTaq DNA聚合酶。反应先在94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 然后在94 $^{\circ}$ C变性45 s, 58 $^{\circ}$ C复性45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min条件下进行34轮循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。PCR反应结束后, 用1.2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒对目的条带进行胶回收。回收产物与pGEM-T Easy载体(Promega)连接, 连接反应过程具体为: 5 μ L 2 \times 缓冲液、4.3 μ L回收产物、0.4 μ L pGEM-T Easy载体、0.3 μ L T4 DNA连接酶, 加无菌ddH₂O至总体积为10 μ L, 于16 $^{\circ}$ C下连接2 h。取5 μ L连接产物转化100 μ L TOP10大肠杆菌感受态细胞, 阳性重组质粒通过PCR鉴定(反应条件同上)并送北京奥科生物公司完成测序。

1.2.3 生物信息分析及组织器官表达模式分析
分子特征主要用生物信息学方法进行分析。使用NCBI在线网站中的Conserved Domains Database分析保守结构域, 使用Clustalx 1.83和Bioedit软件分析序列同源性, 运用MEGA 7.0软件分析系统进化关

系, 采用Neighbor-Joining(NJ)算法Poisson模型, 选取Completed deletion模式构建系统进化树。从转录组数据中提取*PtDFR*基因表达信息, 基因表达水平的分析采用FPKM法。

2 结果与分析

2.1 *DFR*的克隆与序列分析

根据毛白杨转录组数据, 设计PCR引物, 以毛白杨基因组为模板, 通过PCR扩增获得目的片段, PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示, *PtDFR*片段长度约为1 600 bp(图1)。目的条带回收后与pGEM-T easy载体连接, 转化大肠杆菌TOP10感受态细胞, 经Amp筛选获得重组子。进一步PCR鉴定结果表明, 以重组子DNA为模板, 可扩增出与毛白杨基因组的PCR产物大小完全一致的DNA条带(图1)。说明PCR产物已经克隆入pGEM-T easy载体中。测序结果表明, *PtDFR*长度为1 591 bp, 包含6个外显子和5个内含子(图2), 编码317个氨基酸。

2.2 毛白杨*PtDFR*基因结构与特性分析

2.2.1 基因结构 根据*PtDFR*测序结果, 结合Phy-

tozome v 12.1毛果杨基因组数据, 采用 Clone manager软件绘制*PtDFR*基因的结构示意图, 该基因由6个外显子和5个内含子组成(图3)。

2.2.2 *PtDFR*编码氨基酸同源性与结构域分析
*PtDFR*编码氨基酸序列同源性比较结果如表2所示, 不同植物*DFR*编码的氨基酸序列存在着较大的差异性, 毛白杨*PtDFR*与银白杨、毛果杨*DFR*氨基酸相似性源性分别高达95.65%和94.21%, 而与柑橘、枣、葡萄、可可、桃、红叶李和桑树*DFR*氨基酸相似性介于82.14%~89.29%。

利用NCBI网站的在线Blastp软件对*PtDFR*氨基酸可能的结构域进行预测(图4A), 拥有以下可能的几个结构域: PLN02650(二氢黄酮醇还原酶)、FR_SDR_e(SDR相关蛋白)、WcaG(核苷二磷酸糖差向异构酶)、HpnA(萜烷类相关糖差向异构酶)、EpimeraseNAD(依赖性差向异构酶/脱水酶家族)。同时利用DNAMAN软件将毛白杨*PtDFR*与毛果杨PtrDFR1、PtrDFR2、PtrDFR3, 拟南芥AtDFR1氨基酸序列进行氨基酸序列多重比较(图4B), 分析结果显示, 5个蛋白都具有2个保守结构域, 分别在

```

1  ATGCTGTCCGAGCCACCGTCCGAGACCCCTGgtcagcctctttgaccatcatatcacagtttcattaaagccttggtttatgatcttc
91  tcttgttatttttccctgcacagAFAAACATGAAGAGGTGAAGCAATTTGCTGGAACTGCCAAAGGCATCAACCCACTTGCCTTTAGGAA
181 AGCTGATCTTCTGAAGAGGGGAGTTATGATGAAGCAATTCAGGGGTGCACAGGGGTGTCCTATGTGCCACTCCCATGGAATTTGAATC
271 CAAGGACCCCGAGgtatcatcatgatttctgccaagggcattaccagccttacgagagactggaatbaatttctctactatatactctgc
361 cggaaaaatccgatagccggtagcttaagcatgtttggactatgtatttgcttcattaagtaatttcgtgtagcaaaatataat
451 agtaagaacggtaattgttagtaaaatatttggaaattatagtaaatcattaatgtaaaagattttcttctctctgtggcagAACAA
541 GGTGATCAAGCCCAACATCAACGGAGTACTGGACATCATGAGAGCATGTGCCAAATCAAAAACATCAGAAAGATAAATATTACGTCATC
631 TGCAGGAATGTGGATGTTGAAGAAAGAGAAAACCAAGTGTACGATGAAAGCTGCTGAAGTGAATTTGGACTTTGTTCCAGGGTATAAAAAT
721 GACTGGATGGgttagtactatattaagcacctgattaatccccctttcttctctctgctgtataaaatcaaaacatgaatttctaatt
811 aatataaatccttaaacgtaccgtggggaccagATGTATTCCTGTCCCAAGACTTTAGCAGAGCAAGCTGCGTGGAAAGTTTGTCTGAAGAG
901 AATAACCTGGATTTTATCAGCATCATCACTCTGTGTTGTTGCCCAATTTATCATGCAATCAATGCCACCAAGTCTCCTCACAGCGCTT
991 TCACTGATCACTGgtattgcatctcctacccttttggtagtattcttaaatagtttcttgaatatgacatgggggaacaactcttt
1081 cttgcygcaacagGAAATGAAGCTCATTACGGGATTTTAAAGCAGGGACATTATGTGCACFTGGATGACCTCTGCATGCTCACATCTTT
1171 TTGTCAGAGAAATCCAAAAGCAGAGGGCCCGCTACATCTGCAACTCGGATGATGCTAACATTCACGATCTTGCCTCAATTTACTCAGAGAAA
1261 TACCCAGAAATACAAATGCCCTGATAAgcaagtttctcacctaaacaatcatagattatccttcccttgatagttattgtcctttctt
1351 tctcttggcctaattaatataatcttggatcagGTTCAAAGATATTGATGAGAAATCGCGGTGTGTTGCTTTCTCATCCAAAAGCTT
1441 GACGGACTTGGGTTTGGATTCAAAATACAGCTTGGAGGACATGTTCCGAGGTGCTGTGGAAAACATGCAGAGAAAAGGGCAATAATCCCGG
1531 TTCTCATAAGAAAACAGCCGTCGAGGAATGCAAAAAGAAAATGAAGTGTCCCTGCGTCCCTGA
    
```

大、小写字母分别代表外显子和内含子, 划线部分代表正向和反向引物。

The capital letters and lower case letters representative exons and introns respectively. Underline sequences representative forward and reverse primers.

图2 *PtDFR*序列

Fig.2 The nucleotide sequence of *PtDFR*

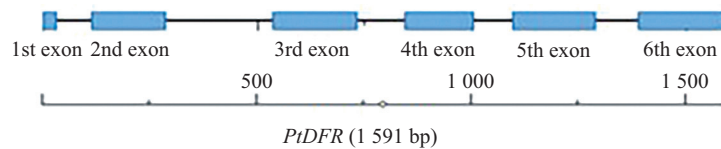


图3 *PtDFR*基因结构

Fig.3 The structure frame of *PtDFR*

表2 *DFR*编码氨基酸序列的相似性

Table 2 Similarity of *DFR*-encoded amino acid sequences

植物名	基因登录号	氨基酸相似性/%
The name of plant	Gene ID number	Amino acid similarity /%
<i>Populus alba</i>	TKS10150.1	95.65
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002300759.1	94.21
<i>Citrus reshni</i>	AGR67385.1	89.29
<i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015884708.1	88.33
<i>Vitis vinifera</i>	AAM47527.1	87.27
<i>Theobroma cacao</i>	XP_007017586.2	86.69
<i>Prunus persica</i>	AJA79073.1	86.67
<i>Prunus cerasifera</i>	ABU88896.1	85.00
<i>Morus alba</i>	AAU06584.1	82.14

99~114 bp处编码的氨基酸含有一个NADP(H)结合位点, 此为高度保守, 在花青素合成途径中具有关键作用, 以及在193~235 bp处含有一个底物特异性结合位点。

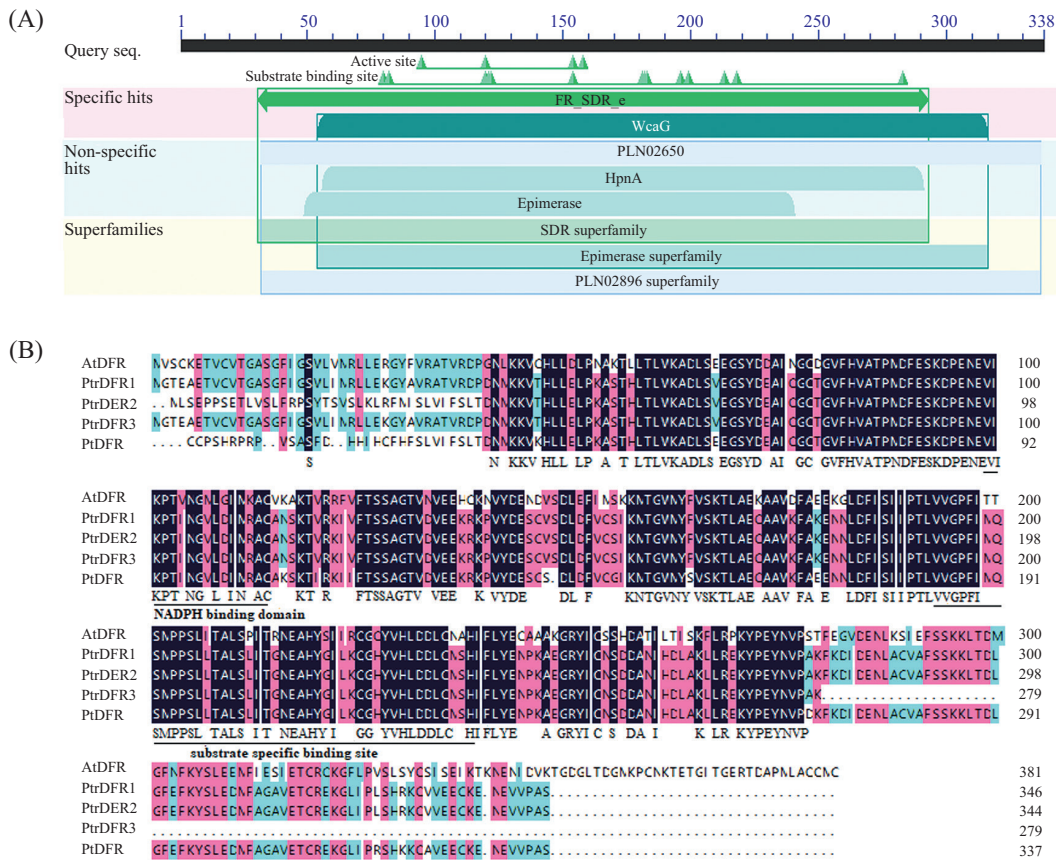
2.2.3 毛白杨 *PtDFR* 基因理化性质和功能域分析
 利用ProtParam在线网站分析PtDFR氨基酸的理化性质, 编码的蛋白质分子量为38.06 kDa, 理论等电点(theoretical pI)为5.62, 其中带负电荷的残留物总数(total number of negatively charged residues)中Asp和Glu氨基酸总数为49, 带正电荷的残留物总数(total number of positively charged residues)中Arg和Lys氨基酸总数为37。

信号肽指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的N末端的氨基酸序列, 它的存在与否可以判定mRNA翻译后的蛋白是否属于分泌蛋白, 如果属于分泌蛋白, 那翻译后的蛋白首先进入内质网加工, 此过程需要信号肽的引导, 信号肽是蛋白

质N-端富含疏水氨基酸的部分序列, 当整个蛋白进入内质网后, 信号肽就会被切除, 随后经过修饰加工后最终形成成熟肽, 分泌到胞外。利用SignalP在线分析软件对PtDFR蛋白进行信号肽预测, 预测结果(图5A)显示, PtDFR的C值为0.123, Y值为0.141, S值为0.197, 表明这个蛋白可能不具有信号肽区域(分数小于0.450表示不具信号肽), 不是分泌蛋白。

利用ProtScale在线软件预测蛋白质的亲/疏水性, 结果(图5B)所示, 显示组成PtDFR蛋白的亲水性/疏水性的最小值为-2.389、最大值为2.511, 根据数值大于0为疏水性、小于0为亲水性的规律, 在整个氨基酸序列中亲水性氨基酸的数量要多于疏水性氨基酸, 因此, 推测该蛋白为亲水性蛋白。

通过在线软件TMPred对PtDFR蛋白进行跨膜结构分析, 结果(图5C)所示, PtDFR的分数为921和949, 可能存在2个跨膜结构域(数值大于500为显著地跨膜结构域)。

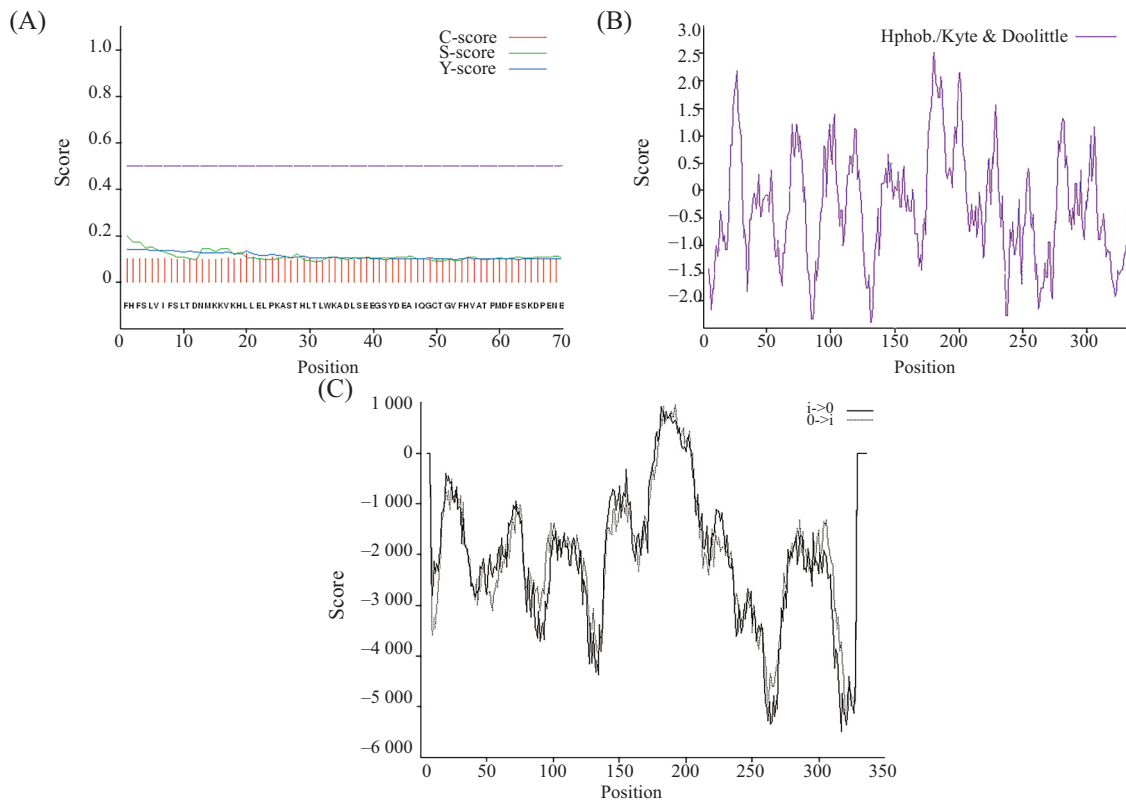


A: 毛白杨DFR蛋白的保守结构域分析; B: 毛白杨、毛果杨、拟南芥DFR氨基酸的序列比对。

A: the conserved domain of *P. tomentosa* DFR; B: amino acid sequences alignment of DFR derived from *P. tomentosa*, and *P. tricarpha* and *Arabidopsis*.

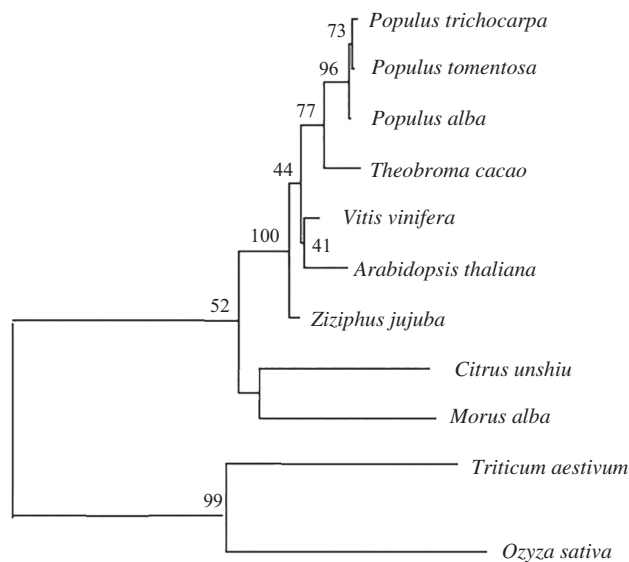
图4 毛白杨DFR保守结构域和氨基酸序列比对

Fig.4 Analysis of conserved domain in PtDFR and amino acid sequences alignment of DFR



A: *PtDFR* 信号肽; B: *PtDFR* 蛋白的亲水性/疏水性分析; C: *PtDFR* 蛋白跨膜结构域预测。
A: *PtDFR* signal peptide; B: hydrophilicity/hydrophobicity analysis of *PtDFR* protein; C: prediction of transmembrane domain of *PtDFR* protein.

图5 *PtDFR*的信号肽、亲水性/疏水性和跨膜结构域
Fig.5 Signal peptide, hydrophilic/hydrophobic and transmembrane domain of *PtDFR*



0.20

图6 毛白杨与其他植物DFR的系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of DFR from *P. tomentosa* and other plants

2.3 *PtDFR*的系统进化分析

利用MEGA 7.0将*PtDFR*和银白杨、毛果杨、拟南芥等物种的DFR氨基酸序列构建系统进化树

(图6)。进化分析表明,毛白杨与毛果杨、银白杨遗传距离最近,其次与可可、葡萄、拟南芥等双子叶植物DFR基因遗传距离较近,与柑橘、桑树、红叶

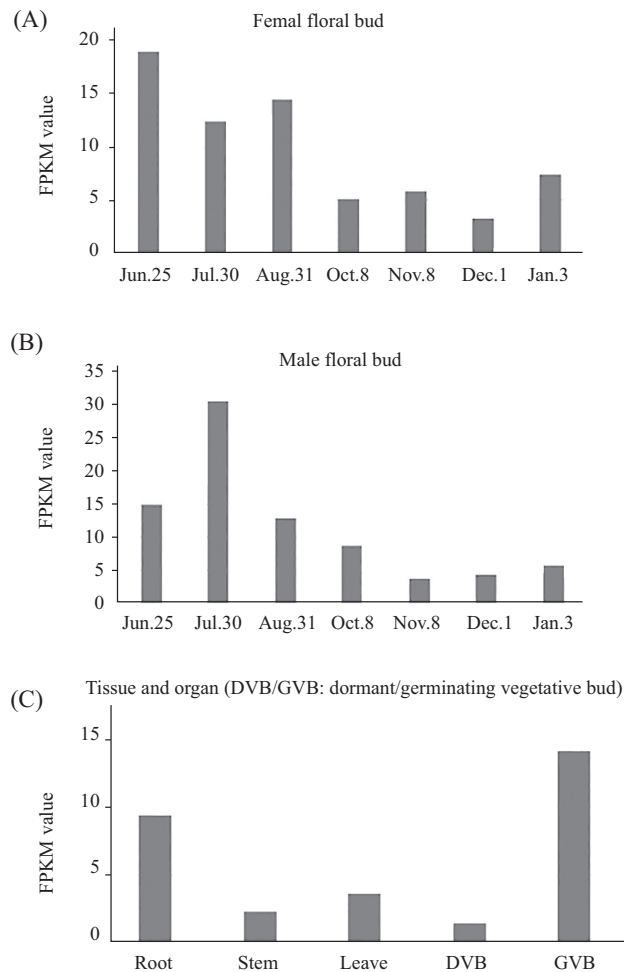


图7 *PtDFR*基因的组织器官表达特性分析

Fig.7 Analysis of tissue expression characteristics of *PtDFR* gene

李距离较远,与单子叶植物小麦、水稻距离最远。

2.4 组织特异性表达分析

转录组测序结果表明,雌花芽表达量在早期花原基形成(6月25日)表达量到达顶峰,此后在8月31日略有上升,之后总体呈现逐渐下降的趋势,且在次年1月略有上调(图7A)。雄花芽表达量从早期花原基形成(6月25日)、器官发生(7月30日)到后期发育各阶段大体呈现由高逐渐降低的表达模式,次年1月份表达略有上调(图7B)。毛白杨不同组织器官差异表达模式分析显示,*PtDFR*在萌动营养芽中表达量最高,根中其次,休眠营养芽中最低(图7C)。

3 讨论

黄酮类化合物(flavonoids)是植物天然的次生代谢产物,由2个苯环(A-B-环)通过中央3个碳原子相互连接形成具有C6-C3-C6基本结构的一系列化合

物^[8],包括花青素(anthocyanins)、黄酮(flavones)、异黄酮(isoflavones)、黄酮醇(flavonols)、黄烷醇(flavanols)、二氢黄酮(2H-favanones)等几大类^[9]。原花青素是黄酮类物质合成途径的最终产物之一,有很强的生物活性^[10],DFR的底物比较宽泛,它可催化DHK、DHQ和DHM分别生成无色天竺葵素(leucopelargonidin)、无色矢车菊素(leucocyanidin)和无色飞燕草素(leucodelphinidin),随后经ANS催化生成天竺葵素、矢车菊素和飞燕草素^[14-18]。

研究发现,毛果杨*PtrDFR*位于2号染色体上。DFR还可作为黄烷酮-4-还原酶(flavanone-4-reductase, FNR),催化柚皮素和圣草酚生成黄烷-4-醇(flavan-4-ols),进而在其他酶的作用下形成3-脱氧花青素(3-deoxyanthocyanidin),这不仅使植物呈现出橙红色,而且3-脱氧花青素及其中间代谢产物5-羟基黄酮(primuletin)还可作为防御物质抵御真菌和细

菌侵害。该研究基于转录组数据, 结合Phytozome v 12.1数据库信息, 克隆了毛白杨*PtDFR*全长基因, 其基因编码的蛋白质含有一个NADP(H)结合位点, 和一个底物特异性结合位点, 属于DFR超家族成员, 参与催化花青素等物质的合成, 并且通过Blastp在线分析软件对*PtDFR*的氨基酸序列分析得到其含有5个可能的结构域, 除了二氢黄酮醇还原酶结构域, 还包括WcaG(核苷二磷酸糖差向异构酶)、HpnA(藜烷类相关糖差向异构酶)、EpimeraseNAD(依赖性差向异构酶/脱水酶家族), 说明该基因序列有可能调控其他基因的表达。研究表明, 一些DFR可以同时催化DHK、DHQ、DHM, 但对3种底物的催化效率不同^[3]。有的DFR只能催化某种特定的二氢黄酮醇, 如草莓中DFR1只能催化DHK, 而DFR2可催化DHM和DHQ^[11]。因DFR催化的底物不同使植物出现不同的颜色, 如矮牵牛中的DFR可催化DHQ和DHM, 使其花出现蓝色, 因不能催化DHK, 而使矮牵牛不能产生砖红色的花^[12], 但MEYER等^[13]将玉米DFR转入突变为白花的矮牵牛中却产生了砖红色矮牵牛花。因此, DFR对底物的选择是决定着植物中花色苷种类的重要因素并在很大程度上决定花色苷的比例, 而使植物最终呈不同的颜色。进一步的氨基酸相似性比对分析显示, *PtDFR*与毛果杨、苹果、拟南芥等植物DFR蛋白质序列有较高的一致性。在系统进化分析中, 毛白杨与毛果杨亲缘关系最近, 其次是苹果拟南芥等双子叶植物, 与单子叶植物小麦与水稻较远, 这与植物形态分类上的情况也相一致。根据后续分析发现, *PtDFR*定位在细胞膜上, 不具有信号肽, 属于跨膜蛋白, 具有2个跨膜结构域。通过组织特异性表达分析所知, *PtDFR*在毛白杨花芽不同时期的表达量与花芽的发育过程相一致, 猜测该基因也调控毛白杨花青素的合成。该研究通过对毛白杨*PtDFR*基因的克隆、特征与进化分析, 以及组织特异性表达分析, 为进一步研究该基因家族具有重要作用。

参考文献 (References)

- [1] BALLARE C L. Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-b responses [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(4): 1725-7.
- [2] 赵启明, 李范, 李萍. 花青素生物合成关键酶的研究进展[J]. 生物技术通报(ZHAO Q M, LI F, LI P. Research advances on core enzymes of anthocyanidin biosynthesis [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 22(12): 25-32.
- [3] MARTENS S, TEERI T, FORKMANN G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants [J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(3): 453-8.
- [4] BELD M, MARTIN C, HUIITS H, et al. Flavonoid synthesis in petunia hybrida: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes [J]. *Plant Mol Bio*, 1989, 13(5): 491-502.
- [5] BONGUE-BARTELSMAN M, O'NEILL S D, TONG Y, et al. Characterization of the gene encoding dihydroflavonol 4-reductase in tomato [J]. *Gene*, 1994, 138(1/2): 153-7.
- [6] 朱之梯. 毛白杨遗传改良[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [7] 李树丽. 中华红叶杨无菌繁殖体系建立的影响因素研究[D]. 山东: 山东师范大学, 2008.
- [8] 吴继洲, 孔令义. 天然药物化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2008.
- [9] 冯欢, 易姝利, 左佳琦, 等. 基因工程及花色素合成途径在花色改良中的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学(FENG H, YI S L, ZUO J Q, et al. Progress of flower colour modification by genetic engineering and anthocyanin biosynthesis pathway [J]. *Genomics and Applied Biology*), 2014, 33(2): 445-51.
- [10] 张慧文, 张玉, 马超美. 原花青素的研究进展[J]. 食品科学(ZHANG H W, ZHANG Y, MA C M. Progress in procyanidins research [J]. *Food Science*), 2015, 36(5): 296-304.
- [11] MIOSIC S, THILL J, MILOSEVIC M, et al. Dihydroflavonol 4-reductase genes encode enzymes with contrasting substrate specificity and show divergent gene expression profiles in fragaria species [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112707.
- [12] JOHNSON E T, YI H, SHIN B, et al. *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins [J]. *Plant J*, 2010, 19(1): 81-5.
- [13] MEYER P, HEIDMANN I, FORKMANN G, et al. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene [J]. *Nature*, 1987, 330(6149): 677-8.
- [14] CHU Y X, CHEN H R, WU A Z, et al. Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes in petunia hybrida [J]. *Gmr*, 2015, 14(2): 5010-21.
- [15] KIM J, LEE W J, VU T T, et al. High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of AtDFR confers significant salt stress tolerance in *Brassica napus L* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(6): 1-10.
- [16] LIM S H, YOU M K, KIM D H, et al. RNAi-mediated suppression of dihydroflavonol 4-reductase in tobacco allows fine-tuning of flower color and flux through the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *Plant Phy Bio*, 2016, 109: 482-90.
- [17] KIM S, PARK J Y, YANG T J. Characterization of three active transposable elements recently inserted in three independent DFR-A alleles and one high-copy DNA transposon isolated from the Pink allele of the ANS gene in onion (*Allium cepa L.*) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(3): 1027-37.
- [18] HUANG B H, CHEN Y W, HUANG C L, et al. Imbalanced positive selection maintains the functional divergence of duplicated dihydroflavonol 4-reductase genes [J]. *Scientific Rep*, 2016, 6(1): 39031.