

朵丽蝶兰二氢黄酮醇4-还原酶基因*DtpsDFR*的克隆与表达分析

钟淮钦^{1,2,3} 黄敏玲^{1,2,3*} 吴建设^{1,2,3} 樊荣辉^{1,2,3} 林 兵^{1,2,3}

(¹福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; ²福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

³福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是花色素苷合成途径中的一个关键酶。该研究利用RT-PCR和RACE技术从朵丽蝶兰‘满天红’深红色花瓣中克隆获得一个*DFR*基因, 命名为*DtpsDFR*。该cDNA序列全长1 286 bp, 编码378个氨基酸。氨基酸序列分析表明, *DtpsDFR*编码的蛋白与*Bromheadia finlaysoniana*、文心兰、大花蕙兰、石斛兰等兰科植物的DFR蛋白同源性均在76%以上, 含有1个FR_SDR_e特征结构域, 存在NADPH结合基序和底物特异性结合基序, 属于NADB_Rossmann超家族; 系统进化树显示, *DtpsDFR*与*Bromheadia finlaysoniana*的DFR蛋白亲缘关系最近。实时荧光定量PCR分析结果显示, *DtpsDFR*基因的表达量随着花的发育逐渐降低, 凋谢期微量表达; 在花瓣、萼片中的表达量高于唇瓣, 在叶片和根中微量表达。

关键词 朵丽蝶兰; *DFR*基因; cDNA克隆; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of Dihydroflavonol-4-Redutase Gene *DtpsDFR* in *Doritaenopsis* Hybrid

Zhong Huaqin^{1,2,3}, Huang Minling^{1,2,3*}, Wu Jianshe^{1,2,3}, Fan Ronghui^{1,2,3}, Lin Bing^{1,2,3}

(¹Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

²Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

³Fujian Engineering Research Center of Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

Abstract Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is a key enzyme in anthocyanin biosynthesis. In this study, the full-length cDNA sequence of *DFR* gene was obtained from bright red petals of *Doritaenopsis* hybrid Queen beer ‘Red Sky’ using RT-PCR and RACE techniques and designated as *DtpsDFR*. The cDNA sequence was 1 286 bp, encoding a deduced polypeptide of 378 amino acids. Amino acid sequence analysis indicated that *DtpsDFR* protein shared more than 76% homology with DFR protein from *Bromheadia finlaysoniana*, *Oncidium*, *Cymbidium* and *Dendrobium*. *DtpsDFR* protein contains a FR_SDR_e domain, a NADPH binding motif and a substrate specificity binding site, belonging to the NADB_Rossmann superfamily. Phylogenetic analysis clearly showed that the *DtpsDFR* was more related to DFR proteins in *Bromheadia finlaysoniana*. The result of quantitative RT-PCR analysis indicated that expression levels of *DtpsDFR* gene gradually reduced with the development of flower, micro-expression in faded period. The transcript level was higher in petals and sepals than in lips, micro-expression in leaves and roots.

Key words *Doritaenopsis* hybrid; *DFR* gene; cDNA cloning; gene expression

收稿日期: 2014-05-09 接受日期: 2014-07-02

福建省自然科学基金(批准号: 2011J01121)、福建省农业科学院科技创新团队建设(批准号: CXTD-2-17)和福建省农业科学院科技创新团队项目(批准号: CXTD-2-1317)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

Received: May 9, 2014 Accepted: July 2, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2011J01121), the Development of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD-2-17) and the Project of Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD-2-1317)

*Corresponding author. Tel: +86-591-87573019, E-mail: huangml618@163.com

网络出版时间: 2014-09-26 15:02 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0160.html>

朵丽蝶兰(*Doritaenopsis hybrid*)为兰科(Orchidaceae)朵丽蝶兰属(*Doritis*), 是蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)与朵丽兰(*Doritis*)杂交形成的杂交属^[1]。虽广义上仍属于蝴蝶兰属^[2-3], 但其花色更加丰富艳丽, 花期更长, 具有更高的观赏和经济价值, 成为商业应用最多的杂交种类之一^[1], 市场份额占商品蝴蝶兰一半以上。进一步利用朵丽蝶兰进行品种改良成为了蝴蝶兰育种的热点, 探讨其花色形成分子机制具有重要的意义。

花色素苷是类黄酮生物合成的产物之一, 在关键酶基因和调节基因等的调控下, 影响着植物叶、花和果实中红色、紫色和蓝色等颜色的一系列变化, 其生物合成是目前研究最为清楚的植物次生代谢途径之一^[4]。二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)在花色形成中发挥关键作用, 是将二氢黄酮醇催化为花色素反应的第一个关键酶, 属于DFR超家族的还原酶^[5]。DFR在辅助因子NADPH的参与下, 可选择性地将底物二氢槲皮醇(dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮黄酮(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM)还原为相应的花色素苷, 从而合成不同的花色素, 呈现出各异的物种色彩^[6-7]。在矮牵牛和兰花中, DFR不能有效还原DHK, 但能有效催化DHQ和DHM, 最终导致矢车菊素和飞燕草素在花瓣中的积累, 而无天竺葵色素合成^[8-9]。目前, DFR基因已从矮牵牛^[10]、非洲菊^[11]、番茄^[12]、葡萄^[13]、百脉根^[14]、茶叶^[15]、石斛兰^[16]、马铃薯^[17]和牡丹^[18]等不同的植物物种中克隆获得, 且在花色改良上已被应用^[19-21]。

目前, 从分子水平上对朵丽蝶兰花色形成机理的研究国内鲜有报道。本实验从朵丽蝶兰品种‘满天红’深红色花瓣中克隆获得DFR基因cDNA全长, 并分析其编码氨基酸序列及其在花发育进程、不同组织中的表达特性, 旨在为进一步了解朵丽蝶兰DFR基因的生物学功能奠定分子基础, 为研究花色的形成与代谢机理及应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建省农业科学院作物研究所花卉研究中心种质资源圃保存的朵丽蝶兰品种‘满天红’(花瓣、萼片与唇瓣颜色均为深红色)为供试材料。取盛花期花瓣, 用于基因克隆; 取小花蕾(直径0.5~0.6 cm)、大花蕾(直径1.6~1.7 cm)、始花期和凋谢期花瓣, 用

于花发育过程的表达分析; 取萼片、唇瓣、叶片及根, 用于不同组织的表达分析。材料剪取后迅速投入液氮速冻后, 存入-70℃冰箱保存。

大肠杆菌DH5 α 菌株由本实验室保存; RNA提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; 实验所用其他试剂及试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成及测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 总RNA的提取和cDNA全长的克隆

采用多糖多酚植物RNA提取试剂盒提取总RNA。使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒合成cDNA第一链用于RT-PCR扩增, 反转录引物序列见表1。

根据GenBank中石斛兰(登录号: FJ426271)、大花蕙兰(登录号: AF017451)和文心兰(登录号: AY953937)等兰科植物的DFR基因序列设计一对保守区特异引物DFR-F、DFR-R(表1), 以反转录的cDNA第一链为模板进行PCR扩增。扩增程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35个循环; 72℃ 10 min, 4℃保存。

根据DFR基因保守区测序结果, 设计3'端顺式特异引物DFR3'(表1), 与通用引物AUAP(表1)配对进行PCR扩增, 退火温度为58℃。在已获得的DFR基因序列的基础上, 设计两个5'端反式特异引物DFR5'-1和DFR5'-2(表1), 以反转录的cDNA第一链纯化、加尾液为模板, DFR5'-1配对通用引物AAP(表1)进行第一轮扩增, 以第一轮PCR产物稀释一倍液为模板, DFR5'-2配对通用引物AUAP进行第二轮扩增, 退火温度为58℃。

根据拼接获得的DFR基因cDNA全长, 设计全长引物DFRO-F和DFRO-R(表1), 进行DFR基因cDNA全长克隆, 验证已获得的序列。

PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化后连接到pMD19-T载体上转化, 挑取阳性克隆, PCR验证后送样测序, 获得基因序列。

1.3 序列分析

使用GenBank中的BLAST进行基因与推导的氨基酸序列的检索与结构功能域预测; 利用DNA MAN和Primer 5.0进行序列拼接及氨基酸序列比对等; 利用BioXM 2.6对序列进行氨基酸组成、等电点等分析; 利用ProtScale、TMHMM Server 2.0、SignalP 4.1、PSORT和Prosite预测蛋白亲疏水性、跨膜区、信号肽、亚细胞定位和磷酸化位点; 利用SOPMA分析蛋白二

级结构; 利用MEGA4.0软件中的Neighbor-Joining(邻位相连法, NJ)法构建系统进化树等。

1.4 实时荧光定量表达分析

根据已获得的*DFR*基因序列设计一对特异引物RTDFR-F和RTDFR-R, *EF1a*为内参基因(表1)。采用SYBR PrimeScript RT-PCR Kit试剂盒合成cDNA第一链, 内参基因*EF1a*检测cDNA完整性后-20℃保存备用。荧光定量PCR反应体系为20 μL, 其中cDNA模板1 μL(反转录原液稀释10倍)、2×SYBR Premix Ex Taq™ II 10.0 μL、10 μmol/L上下游引物各0.8 μL、50×ROX Reference DyeII 0.4 μL、ddH₂O 6.0 μL。在ABI 7500荧光定量PCR仪上完成测定。

2 结果

2.1 *DtpsDFR*基因全长cDNA克隆与序列分析

根据GenBank中其他植物*DFR*基因保守序列设

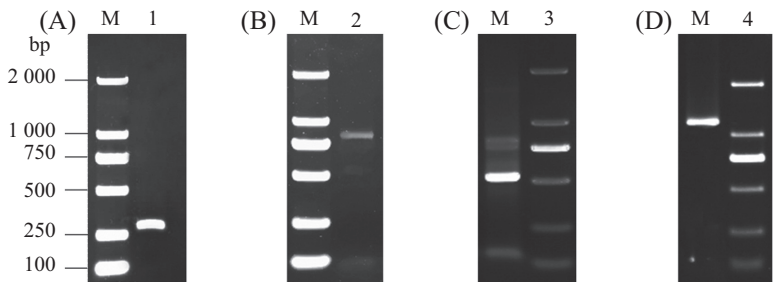
计一对特异引物DFR-F和DFR-R, 以朵丽蝶兰‘满天红’花瓣总RNA反转录的cDNA为模板, 进行PCR扩增, 测序结果获得一条长度为275 bp的cDNA片段(图1A), 编码91个氨基酸。经BLAST检索分析, 该序列编码氨基酸属于NADB_Rossmann超家族(cl09931), 与文心兰、石斛兰等兰科植物的同源性达88%~91%, 初步确定此片段为朵丽蝶兰*DFR*基因的保守序列。

根据获得的保守区序列, 设计3' RACE特异性引物DFR3'与通用引物AUAP配对, 进行3'端RACE PCR扩增, 测序得到长度为805 bp的3'端序列(图1B)。根据*DFR*基因保守区和3'端序列, 设计2个5' RACE特异反式引物DFR5'-1和DFR5'-2, 以cDNA第一链加同聚物尾合成第二链为模板进行巢式扩增, 测序得到长度514 bp的5'端序列(图1C)。

根据获得的*DFR*基因保守区、5'端和3'端序列, 拼接出全长cDNA, 并设计一对全长引物DFRO-F和

表1 朵丽蝶兰*DFR*基因克隆及表达分析引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of <i>DFR</i> gene in <i>Doritaenopsis</i> hybrid		
引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	作用 Function
DFR-F	ACT CCC ATG AAT TTT CAA TCC	For the conserved fragment
DFR-R	AAC TCC CAA GCA GCC TTC TC	
DFR3'	ACC CGA GTC AAA ATG ACC GGT TGG A	3' RACE
DFR5'-1	TTA TGA AGG AAC CCA CCA CC	5' RACE
DFR5'-2	GTG ATG AAA TTG AGG TCG CTC C	
AP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(T) ₁₇	Reverse transcription
AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	3' RACE、5' RACE
AAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(G) ₁₀	5' RACE
DFRO-F	GGA AGA AAT GGA GGA TGA GAG	For the cDNA of full-length
DFRO-R	CAG TCA AAA TAT AAC CAC GC	
RTDFR-F	TTC AAT CCA AAG ACC CTG AGA AC	For the expression of <i>DtpsDFR</i>
RTDFR-R	TTA CGC TGC CTG ACC TCT TG	
EF1a-F	AGA CCA CCA AGT ACT ACT GCA C	For the internal control
EF1a-R	CCA CCA ATC TTG TAC ACA TCC	



M: DL 2000 marker; 1: 保守区扩增产物; 2: 3' RACE扩增产物; 3: 5' RACE扩增产物; 4: 全长扩增产物。
M: DNA marker DL2000; 1: product of conserved region; 2: product of 3' RACE; 3: product of 5' RACE; 4: product of full-length.

图1 朵丽蝶兰*DtpsDFR*基因的PCR扩增结果

Fig.1 PCR amplification products of *DtpsDFR* gene in *Doritaenopsis* hybrid

DFRO-R进行PCR扩增,目的片段符合预期(图1D),经BLAST比对确证其为朵丽蝶兰*DFR*基因序列,命名为*DtpsDFR*。该cDNA全长为1 286 bp,具一个完整的开放阅读框(第17~1 152个碱基),共1 136个碱基,编码378个氨基酸;序列含16 bp的5'非编码区和134 bp的3'非编码区[含22个poly(A)]。推测其编码蛋白的分子量为43.23 kDa,理论等电点为6.52。该cDNA序列GenBank登录号为KF263660。

2.2 *DtpsDFR*基因编码蛋白结构分析

利用ProtScale分析结果表明,*DtpsDFR*蛋白在9~26、74~88、186~200、358~375等氨基酸位置存在多个可能的疏水性区域,总体来说,整个肽链中亲水性氨基酸残基的数量多于疏水性氨基酸残基,推测*DtpsDFR*具有亲水性;TMHMM跨膜结构预测表明,位于*DtpsDFR*蛋白的360~378处存在1个跨膜区域,位于疏水区内;SignalP 4.1预测表明,*DtpsDFR*蛋白没有信号肽,不属于分泌蛋白;PSORT分析发现,*DtpsDFR*蛋白定位于质膜,说明朵丽蝶兰*DFR*蛋白可能属于胞质蛋白。

利用SOPMA对*DtpsDFR*蛋白多肽链的二级结构预测。由图2可见,*DtpsDFR*蛋白以 α -螺旋(α -helix)、无规则卷曲(random coil)为主,延伸链(extended strand)为辅,分别为45.65%、35.09%和12.40%, β -转角(β -turn)所占比率最低为6.86%,验证了*DtpsDFR*属于稳定蛋白。Prosites预测分析发现,*DtpsDFR*蛋白含8个蛋白激酶C磷酸化位点、8个酪蛋白激酶II磷酸化位点、2个N-乙酰化位点和1个cAMP和cGMP依赖性蛋白激酶磷酸化位点。众多磷酸化位点的存在说明,*DtpsDFR*蛋白的功能中可逆磷酸化调控起重要作用。

2.3 *DtpsDFR*基因编码蛋白同源性分析

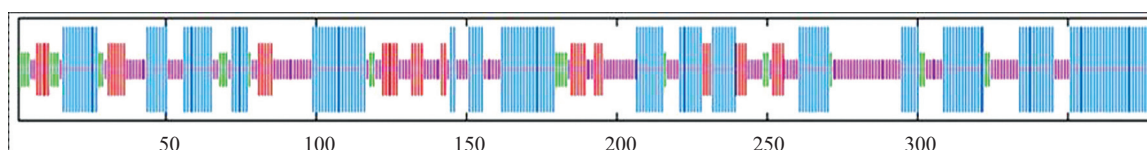
将朵丽蝶兰*DtpsDFR*基因完整开放阅读框编码的蛋白序列与其他植物*DFR*蛋白进行同源性多重对比分析(图3),该序列与*Bromheadia*

finlaysoniana(AAB62873)、石斛兰(CAR64530)、文心兰(AAY32600)和大花蕙兰(AAC17843)等兰科植物的同源性达76%~86%,与其他非兰科植物*DFR*蛋白的同源性在62%~72%之间,并含有该家族同源基因相似的中央编码区,具有典型的*DFR*蛋白功能结构域。*DtpsDFR*编码蛋白9~304位氨基酸具有类黄酮脱氢酶/还原酶FR_SDR_e结构域,属于NADB_Rossmann超基因家族,该结构域中分布着NADPH活性位点和底物特异性结合位点。由图3可见,*DtpsDFR*蛋白N-端存在一个由21个氨基酸残基构成的NADPH结合位点“VTGASGYVGSWLVKMLLRKGY”,该序列在不同植物中高度保守;还存在一个由26个氨基酸构成的底物特异性结合区“TVNVEEHQAPVYDESSWSDLNFITRV”,决定其底物的特异性,该序列在不同植物中有明显的变化。同时,*DtpsDFR*氨基酸序列在134位与145位的氨基酸分别为N(天冬酰胺)和E(谷氨酸),说明其还原底物为DHK。

为了进一步了解*DtpsDFR*与其他植物*DFR*蛋白间的进化关系,采用MEGA5.05软件的NJ法构建系统进化树(图4)。结果表明:*DFR*蛋白的进化基本符合植物分类学分类,即单子叶与双子叶植物分属于各自的聚类簇。在单子叶植物中,*DtpsDFR*与同属兰科植物的*Bromheadia finlaysoniana*、石斛兰、文心兰和大花蕙兰的*DFR*蛋白处于同一亚类,亲缘关系最近;与同为单子叶植物的小麦、玉米等禾本科作物亲缘关系最远,聚为不同亚类。在双子叶植物中,杜鹃花与菊花聚为一个亚类,甜樱桃与月季聚为同一亚类。

2.4 *DtpsDFR*基因的表达分析

利用实时荧光定量PCR技术检测*DtpsDFR*基因在花发育进程及不同组织中的相对表达量。由图5可知,在花瓣中,*DtpsDFR*基因随着花瓣的发育相对表达量逐渐降低,花朵完全开放后,花色素逐渐停止

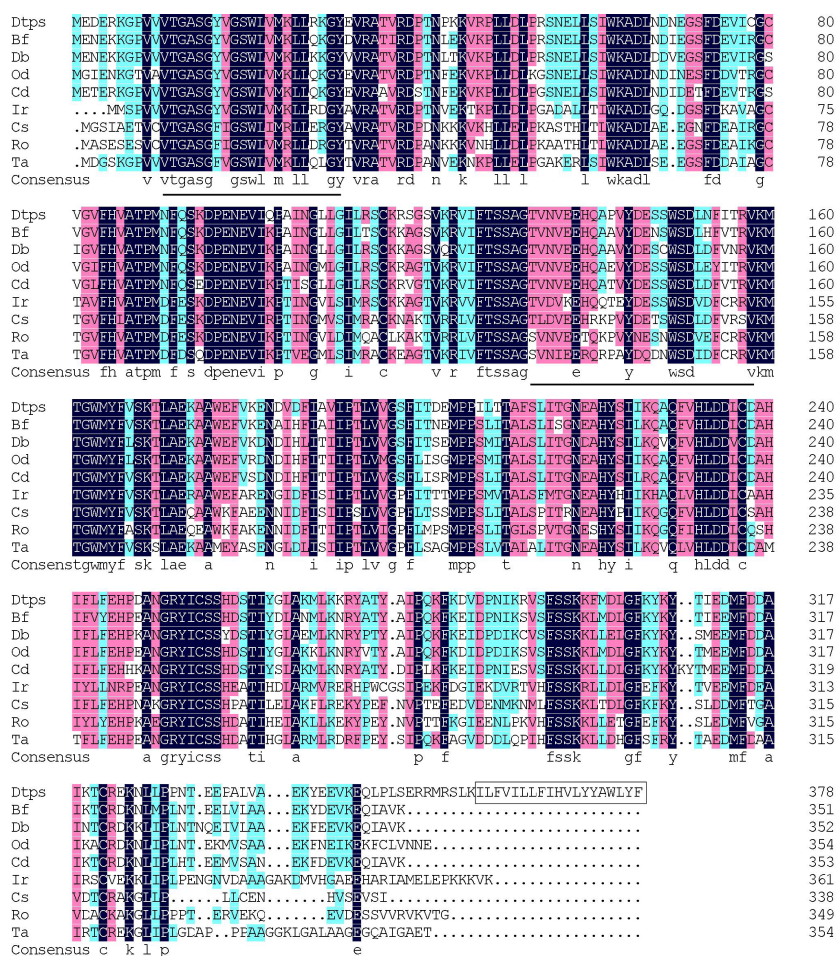


α -螺旋(蓝色); 无规则卷曲(紫色); 延伸链(红色); β -转角(绿色)。

alpha helix (blue); random coil (purple); extended strand (red); beta turn (green).

图2 朵丽蝶兰*DtpsDFR*蛋白二级结构预测

Fig.2 Predicted secondary structure for the *DtpsDFR* protein of *Doritaenopsis* hybrid



Dtps: 朵丽蝶兰‘满天红’; Bf: 地生兰; Db: 石斛兰; Od: 文心兰; Cd: 大花蕙兰; Ir: 荷兰鸢尾; Cs: 甜橙; Ro: 月季; Ta: 小麦; 第一、第二条下划线分别表示NADP(H)结合位点和底物特异性结合基序; 方框处表示DtpsDFR跨膜结构域。

Dtps: *Doritaenopsis* hybrid ‘Red Sky’; Bf: *Bromheadia finlaysoniana*; Db: *Dendrobium* hybrid cultivar; Od: *Oncidium* hybrid cultivar; Cd: *Cymbidium* hybrid cultivar; Ir: *Iris* × *hollandica*; Cs: *Citrus sinensis*; Ro: *Rosa* hybrid cultivar; Ta: *Triticum aestivum*; The first solid-underline stands for NADP(H)-binding site and the second solid-underline stands for substrate specificity site; Box stands for the DtpsDFR transmembrane domain.

图3 DtpsDFR与其他植物DFR氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of predicted amino acid sequence of DtpsDFR with other DFR proteins

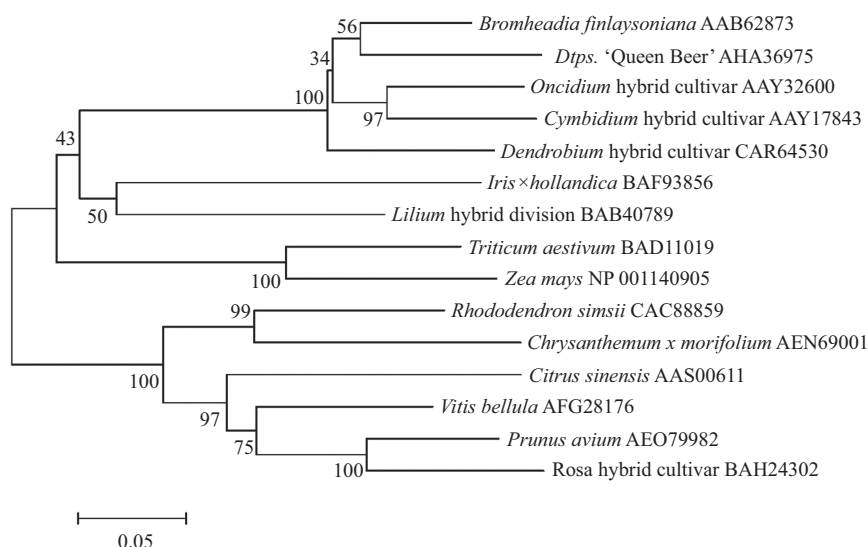
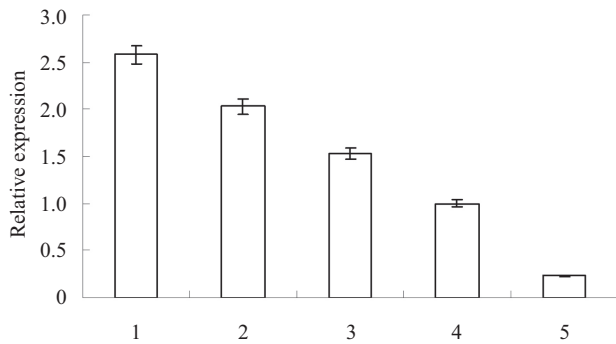


图4 朵丽蝶兰DtpsDFR与其他14种植物DFR蛋白的系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of DtpsDFR in *Doritaenopsis* hybrid with 14 other plant DFR proteins



1: 小花蕾; 2: 大花蕾; 3: 始花期; 4: 盛花期; 5: 凋谢期。

1: small bud stage; 2: big bud stage; 3: early flowering season; 4: bloom stage; 5: wither period.

图5 *DtpsDFR*基因在花发育进程中的相对表达量

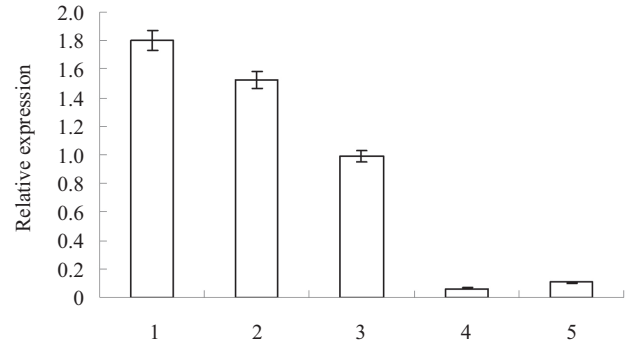
Fig.5 Relative expression quantity of *DtpsDFR* gene in different growth periods of flowering

积累, 基因停止转录, 凋谢期只有微量表达。由图6可知, *DtpsDFR*基因在花瓣、萼片中的表达量大于唇瓣, 在叶片、根中仅微量表达。

3 讨论

*DFR*基因是花色素苷生物合成途径中后期表达的第一个关键基因, 在不同花色的形成中起着重要的调控作用^[10]。本研究利用RT-PCR和RACE技术从朵丽蝶兰‘满天红’深红色花瓣中成功克隆获得*DtpsDFR*基因, 其cDNA全长为1 286 bp, 编码378个氨基酸, GenBank登录号为KF263660。DtpsDFR编码蛋白为胞质蛋白, 具有典型的DFR蛋白功能结构域, 同时含有FR_SDR_e结构域和NADB结构域; N-端存在一个NADPH结合的保守基序“VTGASGYVG-SWLVMKLLRKG Y”, 中间存在一个由26个氨基酸构成的底物特异性结合区域。

在复杂的花色素合成过程中, DFR在不同植物中特异地选择底物, 生成不同的花色素。而DFR对不同底物的结合是由底物结合区的氨基酸序列所决定的。Johnson等^[22]发现, 底物结合区中的134位与145位的氨基酸可直接影响酶的底物特异性, 大多数134位为N(天冬酰胺)的植物均能以DHK为底物合成天竺葵色素; Johnson等^[9]发现, 兰属植物的DFR不能有效还原DHK产生天竺葵素, 而使其缺乏橙色; 但*Bromheadia finlaysoniana*、石斛兰、大花蕙兰等兰属的DFR基因中均存在134位的N特异氨基酸, 这表明兰属植物的DFR底物特异性位点可能不是134位的N位点。推测可能是由于DFR和F3'H竞争相同



1: 花瓣; 2: 萼片; 3: 唇瓣; 4: 叶片; 5: 根。

1: petal; 2: sepal; 3: lip; 4: leaf; 5: root.

图6 *DtpsDFR*基因在不同组织中的相对表达量

Fig.6 Relative expression quantity of *DtpsDFR* gene in different tissues

底物DHK, 决定了DHQ和DHK的不同表达水平, 从而呈现不同的花色^[23]。本研究获得的DtpsDFR存在134位的N特异氨基酸, 但朵丽蝶兰花色素主要成分为矢车菊素, 天竺葵素含量极低, 这似乎与上面的推测相一致, F3'H和DFR之间的竞争决定了DHQ和DHK的不同表达水平。

朵丽蝶兰DtpsDFR氨基酸序列多重比较和系统进化树分析发现, DtpsDFR与其他物种来源的DFR具有较高同源性, 与*Bromheadia finlaysoniana*、石斛兰、大花蕙兰和文心兰同源性均达76%以上, 进化树聚类分析进一步证实了DtpsDFR蛋白与兰科植物的DFR蛋白亲缘关系较近, 不同植物DFR按照种属特征聚为一类。这些均证明了分离得到的DtpsDFR具有DFR蛋白典型的结构特征和生物特性。

研究表明, 不同物种的DFR基因在花发育进程及不同器官中的时空表达特性有所不同。Inagaki等^[24]发现, 裂叶牵牛突变株的DFR-B基因会造成花色的多样性, 其mRNA在幼小的花蕾中大量累积。Nakatsuka等^[25]发现, 亚洲百合粉红色品种‘Montreux’的DFR基因在着色的被片、花药、花丝、雌蕊和红色鳞片大量表达, 其表达量随着花的发育而增加, 开花达最高; 而在黄色品种‘Connecticut King’未着色的叶子、茎与白色鳞片未检测到DFR基因的表达。周琳等^[18]利用实时荧光定量PCR检测发现, 牡丹*PsDFR1*在花色素大量积累的花瓣中表达量最高, 其次是萼片和雄蕊, 再次是叶片, 心皮中表达量最低。本研究克隆获得的DtpsDFR基因的表达量随着朵丽蝶兰花的发育逐渐降低, 花朵完全开放后, 花色素逐渐停止, 到凋谢期仅微量表达;

*DtpsDFR*基因在花瓣、萼片中的表达量大于唇瓣, 在叶片、根中仅微量表达, 不同组织间的表达差异显著。以上说明, *DtpsDFR*的表达具有一定的组织特异性, 只在着色的组织中表达, 且表达量的高低与花色素苷的积累相一致, 推测*DtpsDFR*可能在转录水平上参与朵丽蝶兰花色形成的调控。

本研究成功克隆到朵丽蝶兰*DtpsDFR*基因全长, 并对其编码蛋白结构、同源性及组织表达特异性进行了分析。我们接下来的工作将构建*DtpsDFR*基因原核表达载体和植物表达载体, 转化烟草或矮牵牛, 通过基因过量表达、酶活性测定等技术, 进一步验证其在花色素生物合成中的功能, 为进一步明确*DtpsDFR*基因在朵丽蝶兰花色形成中的分子调控机理奠定了技术基础, 也为从分子水平上进行朵丽蝶兰品质改良提供理论依据。

参考文献 (References)

- Cui YY, Pandey DM, Hahn EJ, Paek KY. Effect of drought on physiological aspects of crassulacean acid metabolism in *Doritaenopsis*. *Plant Sci* 2004; 167(6): 1219-26.
- Christenson EA. *Phalaenopsis*: A Monograph. Portland: Timber Press 2001; 330.
- Tsai CC, Chiang YC, Huang SC, Chen CH, Chou CH. Molecular phylogeny of *Phalaenopsis blume* (Orchidaceae) on the basis of plastid and nuclear DNA. *Plant Syst Evol* 2010; 288(1): 77-98.
- Dixon RA, Steele CL. Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* 1999; 4(10): 394-400.
- Martens S, Teeri T, Forkmann G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *Febs Lett* 2002; 531(3): 453-8.
- Almeida J, Carpenter R, Robbins TP, Martin C, Coen ES. Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev* 1989; 3(11): 1758-67.
- 刘娟, 冯群芳, 张杰. 二氢黄酮醇4-还原酶基因(DFR)与花色的修饰. *植物生理学通讯*(Liu Juan, Feng Qunfang, Zang Jie. Dihydroflavonol 4-reductase gene (DFR) and flower color modulation. *Plant Physiology Communications*) 2005; 41(6): 715-9.
- Forkmann G, Ruhnau B. Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Z Naturforsch* 1987; 42(9): 1146-8.
- Johnson ET, Yi H, Shin B, Oh BJ, Cheong H, Choi G. *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J* 1999; 19(1): 81-5.
- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AG. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol Biol* 1989; 13(5): 491-502.
- Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH. Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase(DFR) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol Biol* 1993; 22(2): 183-93.
- Bongue-Bartelsman M, O'Neill SD, Tong Y, Yoder JI. Characterization of the gene encoding dihydroflavonol-4-reductase in tomato. *Gene* 1994; 138(1/2): 153-7.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol* 1994; 24(5): 743-55.
- Shimada N, Sasaki R, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Aoki T, et al. A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. *J Exp Bot* 2005; 56(419): 2573-85.
- Kashmir S, Sanjay K, Sudesh KY, Paramvir SA. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Plant Biotechnol Rep* 2009; 3(1): 95-101.
- 潘丽晶, 张妙彬, 范干群, 陈伟庭, 曹友培. 石斛兰*dfr*基因的克隆、序列分析及原核表达. *园艺学报*(Pan Lijing, Zhang Miaobin, Fan Ganqun, Chen Weiting, Cao Youpei. Cloning sequencing and prokaryotic expression of *dfr* from *Dendrobium*. *Acta Horticulturae Sinica*) 2010; 37(1): 129-34.
- 肖继坪, 王琼, 郭华春. 彩色马铃薯二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)基因的克隆及生物信息学分析. *分子植物育种*(Xiao Jiping, Wang Qiong, Guo Huachun. Cloning and bioinformatical analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene from pigmented potato. *Molecular Plant Breeding*) 2011; 9(6): 728-35.
- 周琳, 王雁, 任磊, 彭镇华. 牡丹二氢黄酮醇4-还原酶基因*PsDFR1*的克隆及表达分析. *植物生理学报*(Zhou Lin, Wang Yan, Ren Lei, Peng Zhenhua. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *PsDFR1* from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Plant Physiology Journal*) 2011; 47(9): 885-92.
- Tanaka Y, Fukui Y, Mizutani MF, Holton TA, Higgins E, Kusumi T. Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrid* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol* 1995; 36(6): 1023-31.
- Aida R, Yoshida K, Kondo T, Kishimoto S, Shibata M. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Sci* 2000; 160(1): 49-56.
- Rosati C, Duron M, Cadie A, Simmoneau P. Transformation of *Forsythia × intermedia* cv. 'Spring Glory' with two flavonoid pathway genes leads to anthocyanin synthesis in petals at early flowering stages. *Polyphenols Commun* 2000; 1: 57-8.
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G. Alteration of a single amino-acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J* 2001; 25(3): 325-33.
- Mudalige-Jayawickrama RG, Champagne MM, Hieber AD, Kuehnle AR. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid. *J Am Soc Hort Sci* 2005; 130(4): 611-8.
- Inagaki Y, Hisatomi Y, Iida S. Somatic mutations caused by excision of the transposable element, *Tpn1*, from the *DFR* gene for pigmentation in sub-epidermal layer of periclinally chimerical flowers of Japanese morning glory and their transmission to the progeny. *Theor Appl Genet* 1996; 92(5): 499-504.
- Nakatsuka A, Izumi Y, Yamagishi M. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily. *Plant Sci* 2003; 165(4): 759-67.