

毛白杨花青素合酶基因的克隆与特性分析

姚建忠*

(山西省桑干河杨树丰产林实验局林业科技服务中心, 朔州 038399)

摘要 花青素合酶(anthocyanidin synthase, ANS)是植物中花青素合成代谢途径的关键酶之一, 它可以催化无色花青素转化为有色花青素这一关键步骤。为了研究毛白杨花青素合酶基因功能并最终利用其进行叶色基因工程改良, 在分析已有毛白杨转录组数据的基础上, 设计了两对PCR引物, 以毛白杨叶片基因组DNA为模板, 采用PCR技术分离克隆了毛白杨ANS基因两个成员, 命名为*PtANS1*、*PtANS2*。测序结果表明, 基因序列全长分别为1 694 bp、1 820 bp, CDS长度均为1 083 bp, 编码360个氨基酸, 两者氨基酸序列一致性为88.3%, 相似性达到91.9%。结构分析表明, *PtANS1*和*PtANS2*均包含2个外显子和1个内含子, 基因结构高度相似, 二者氨基酸序列中均包含有1个2OG-FeII_Oxy保守域, 但分别定位于1号和3号染色体上。氨基酸序列同源性和进化分析表明, *PtANS1*和*PtANS2*与可可、荔枝、葡萄和拟南芥的距离较近, 具有较高的同源性。进一步的转录组数据分析显示, *PtANS1*和*PtANS2*在不同组织器官中的表达趋势十分相似, 但两者的表达量存在明显差异, 在各组织器官中*PtANS2*与*PtANS1*相对表达量比值为5~506, 推测*PtANS2*基因可能在杨树色素合成及其他生理生化功能方面发挥着更重要的作用。这一重要发现将为进一步深入探究杨树花青素合酶基因的功能奠定良好的基础。

关键词 毛白杨; 花青素合酶; 基因克隆; 表达模式

Molecular Cloning and Characterization of Two Genes Encoding Anthocyanin Synthase from *Populus tomentosa*

Yao Jianzhong*

(Forestry Science and Technology Service Center of Sangganhe Poplar High Yield Forest Experiment Bureau Shanxi Province, Shuozhou 038399, China)

Abstract Anthocyanidin synthase (ANS) is one of crucial enzymes in anthocyanin biosynthesis pathway in plants, which catalyzes proanthocyanidins to be converted into anthocyanins. In order to identify the function of anthocyanin synthase gene in poplar and improve leaf color of poplar by genetic engineering approach, based on the analysis of previous poplar transcriptome data, two pairs of PCR primers were designed, PCR was performed to amplify two members of ANS gene family by using genomic DNA of *Populus tomentosa* as template, named as *PtANS1*, *PtANS2*. The sequencing results showed that the full-length of *PtANS1* and *PtANS2* were 1 694 bp and 1 820 bp, respectively, which encoding 360 amino acids, and share two 88.3% identity and 91.9% similarity for two amino acid sequences. Structural analysis showed that both *PtANS1* and *PtANS2* contained 2 exons and 1 intron, shared highly similar for gene structures, but located on chromosome 1 and 3, respectively. The two amino

收稿日期: 2017-11-28 接受日期: 2017-12-29

国家科技重大专项(批准号: 2018ZX08021001-002-004)和国家重点研发计划课题(批准号: 2016YFD0600403)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13703508611, E-mail: yaojianzhong188@163.com

Received: November 28, 2017 Accepted: December 29, 2017

This work was supported by National Science and Technology Major Project of China (Grant No.2018ZX08021001-002-004) and National Key Research and Development Program of China (Grant No.2016YFD0600403)

*Corresponding author. Tel: +86-13703508611, E-mail: yaojianzhong188@163.com

网络出版时间: 2018-03-09 17:04:01 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1703.024.html>

acid sequences contained a conserved domain of 2OG-FeII_Oxy. Homology analysis and phylogenetic analysis indicated that *PtANS1* and *PtANS2* were close to cacao, litchi, grape and *Arabidopsis*. The transcriptome data by mining revealed that the expression trends of *PtANS1* and *PtANS2* in different tissues is pretty similar, but the FPKM value presented big differences between *PtANS1* and *PtANS2*. The ratio range of FPKM value of *PtANS2* to one of *PtANS1* is 5-506. It suggested that *PtANS2* played a more important role in the pigment synthesis and its physiological function. The important finding will lay a good foundation for further study its function.

Keywords *Populus tomentosa*; anthocyanidin synthase; molecular cloning; expression patterns

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)主要分布在我国北京、河北、山东、河南、山西、陕西、甘肃、宁夏回族自治区、安徽、江苏等10省100万平方公里的黄、淮海流域,具有生长迅速、干性好、抗逆性强等优良特性,是工业用材和城乡绿化的重要树种^[1]。近年来,随着我国经济的快速发展,生态文明建设提出了“延绿增彩”的更高要求,彩叶树种的市场需求日趋上升。目前,市场上的红叶杨树品种——中华红叶杨等是由中林2025杨芽变培育和变异而成^[2],其叶色突变分子机制尚不清楚。同时,仅有个别杨树彩叶品种,无法满足不同地区多样化彩叶品种的市场需求。因此,开展毛白杨花青素合成相关基因的克隆及其特性研究,不仅对于鉴定该基因功能、解析杨树红叶突变分子机制具有重要的理论意义,同时可为基因工程改良创制新的杨树彩叶新品种提供有价值的功能基因。

花青素合酶(anthocyanidin synthase, ANS)属2-酮戊二酸依赖型双加氧酶,又称无色花青素双加氧酶(leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX),位于花青素合成途径的最后阶段,主要催化将无色花青素转化为有色花青素,是花青素合成途径的关键酶之一。已有研究表明,龙胆白色花突变体中没有检测到ANS基因的转录本^[3];白色石榴是由于石榴ANS基因编码区插入突变引起的^[4];葡萄风信子*MaAN2*在烟草中的异位表达导致烟草叶片、花萼、花瓣、花药、柱头等积累大量的花青素而变为红色^[5];树莓ANS基因编码区5 bp的插入突变使得氨基酸翻译提前终止,从而导致树莓果实色素的减少^[6]。迄今为止,已从拟南芥、银杏、山药、可可、百脉根等多个物种中克隆得到了ANS基因^[7-11]。Huang等^[12]克隆了毛果杨*PtrDFR1*、*PtrDFR2*基因并对其特性进行了分析。然而,关于杨树ANS基因的研究尚未见报道。本研究旨在克隆毛白杨花青素合酶基因并对其特性进行分析。在分析杨树转录组数据的基础上,利用

PCR技术从毛白杨基因组中克隆得到ANS基因家族两条全长序列,命名为*PtANS1*和*PtANS2*,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,通过转录组测序技术进一步分析了这两个基因在杨树不同组织器官中的表达模式,为深入研究*PtANS1*和*PtANS2*基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

毛白杨雌雄植株分别定植于北京林业大学苗圃,雌雄花芽采集于2012年6月至2013年2月,涵盖了杨树花发育过程的成花诱导、花芽分化、器官分化发育的8个代表性阶段,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、2月17日采集毛白杨雌雄花芽样本。在休眠期和萌动期采集营养芽样本。毛白杨根、茎、叶等组织取自毛白杨无性系TC1521组培苗。上述样本采后液氮速冻,保存-80℃备用。

1.2 植物基因组DNA的提取

取约2 g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-20℃备用。

1.3 植物总RNA的提取与转录组测序

分别取适量毛白杨组培苗叶片、根、茎组织以及前述花芽、营养芽样本置于预冷的研钵中,加入液氮快速研磨至粉末,采用CTAB法提取总RNA,痕量DNA用RQ1 DNase I(Promega)处理,经质控定量后送北京源宜基因科技股份有限公司进行转录组测序分析。cDNA文库和RNA-seq样品的制备用Illumina公司的试剂盒。使用Illumina测序HiSeq™ 2000平台进行测序。污染的评估是通过随机抽取每个原始测序数据集(raw dataset)中500 000 reads与NCBI的数据库进行比对进行的。通过FastQC对原始fastq文件进行质控,在删除低质量序列和超过10%的Q<20碱基

的reads之后, 将全部有效的reads建池, 采用Trinity程序进行*de novo*组装。

1.4 毛白杨花青素合酶基因的克隆

根据Phytozome v12.1数据库毛果杨(*Populus trichocarpa*)同源基因*PtANS1*(Potri.001G113100.1)、*PtANS2*(Potri.003G119100.1)设计目的基因扩增引物(表1)。PCR扩增体系20 μL, 包括10×PCR缓冲液2.0 μL, 2 mmol/L dNTPs 1.6 μL, 10 μmol/L上、下游引物各0.4 μL(引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成), gDNA模板2 μL, 5 U/μL LA Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司)0.2 μL, ddH₂O 13.4 μL。PCR热循环条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 最后72 °C延伸7 min, 4 °C保存。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 用DNA凝胶回收试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)回收目的片段。将回收产物与pGEM-T Easy载体(Promega公司)连接, 连接体系为: 2×缓冲液5 μL, 回收PCR产物4.3 μL, pGEM-T Easy载体0.4 μL, T₄DNA连接酶0.3 μL, 加无菌ddH₂O至总反应体系体积10 μL, 在16 °C下连接过夜。取2 μL连接产物转化50 μL TOP10大肠杆菌感受态细胞(北京博大泰克生物基因技术有限公司), 然后加1 mL LB液体培

养基, 放入37 °C恒温摇菌培养(200 r/min)1 h。取出菌液在4 °C下4 000 r/min离心4 min, 吸掉上清800 μL, 使管内剩余200 μL左右, 轻轻悬浮细菌, 取100 μL培养液涂于含氨苄(100 mg/L)的LB平板上, 37 °C过夜倒置培养。次日挑取单菌落, 经PCR检测, 挑选阳性克隆送至北京奥科生物技术有限责任公司进行序列测定。

1.5 生物信息分析及组织器官表达模式分析

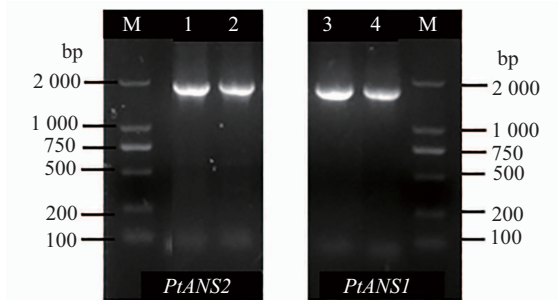
分子特征主要用生物信息学方法进行分析。使用Phytozome v12.1毛果杨基因组数据库进行基因结构及染色体定位, 使用Conserved Domains Database (NCBI)分析保守结构域, 使用Clustalx1.83和Bioedit软件分析序列同源性, 运用MEGA6.0软件分析系统进化关系, 采用Neighbor-Joining(NJ)算法的Poisson模型, 选取Completed deletion模式构建系统进化树。基因表达水平的分析采用FPKM法^[13]。

2 结果

2.1 *ANS*基因的克隆与序列分析

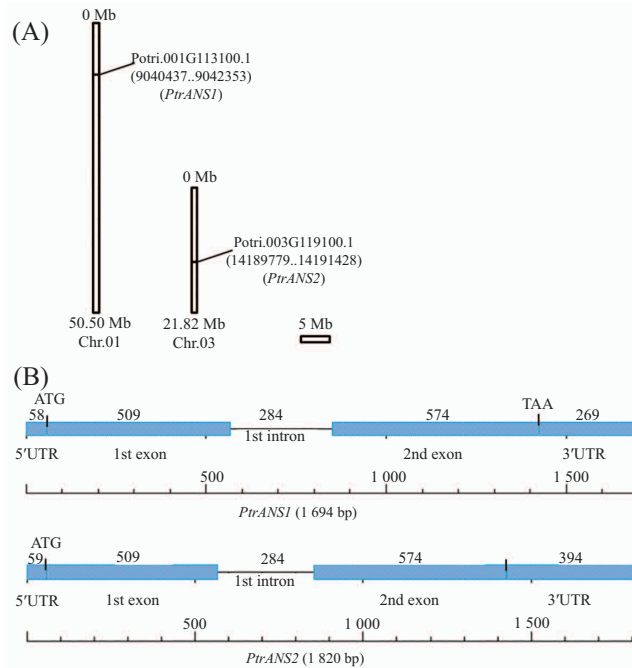
根据Phytozome v12.1毛果杨数据库, 设计*ANS*基因PCR引物, 以毛白杨基因组为模板, 通过PCR扩增获得目的片段, PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶

表1 用于毛白杨 <i>ANS</i> 基因克隆的PCR引物		
Table 1 The PCR primers used for amplification of <i>ANS</i> gene from <i>P. tomentosa</i>		
基因 Gene name	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequences
<i>PtANS1</i>	<i>PtANS1F</i>	5'-TGT GTG CTT TGA AAG CAA AAT TC-3'
	<i>PtANS1R</i>	5'-GAC CTT GCA ATA AGG AGA AAA GAC-3'
<i>PtANS2</i>	<i>PtANS2F</i>	5'-CGA TTT TGT GTT CGC AAA AGA T-3'
	<i>PtANS2R</i>	5'-GAA AGC AAG TGC ATC GGA AT-3'



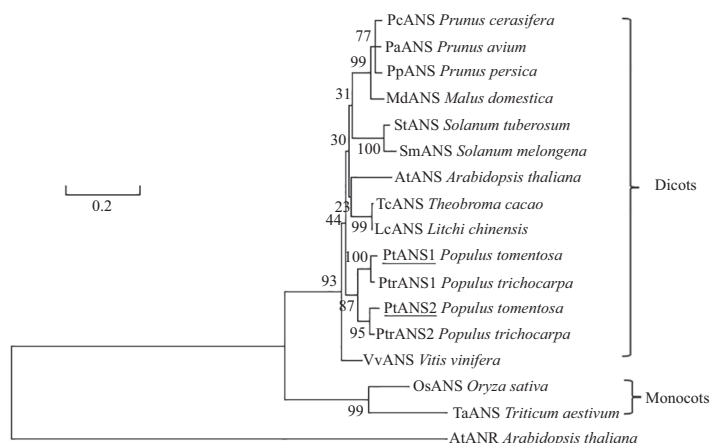
M: DL 2000 marker; 1: *PtANS2* PCR产物; 2: *PtANS2*重组质粒PCR鉴定; 3: *PtANS1* PCR产物; 4: *PtANS1*重组质粒PCR鉴定。
M: DL2000 marker; 1: *PtANS2* PCR product; 2: PCR identification of *PtANS2* recombinant plasmid; 3: *PtANS1* PCR product; 4: PCR identification of *PtANS1* recombinant plasmid.

图1 毛白杨*PtANS1*和*PtANS2*基因的克隆
Fig.1 Gene clone of *PtANS1* and *PtANS2* from *P. tomentosa*

A: 毛果杨*PtrANS1*和*PtrANS2*的染色体定位; B: 毛白杨*PtANS1*和*PtANS2*的基因结构。A: the physical locations of *PtrANS1*, *PtrANS2*; B: the structure frame of *PtANS1* and *PtANS2*.图3 杨树*ANS1*和*ANS2*基因结构与染色体定位Fig.3 The structures and physical locations of *ANS1* and *ANS2*图4 *PtANS1*和*PtANS2*与其他植物ANS家族蛋白质部分氨基酸序列比对(红色框部分表示2OG-FeII_Oxy保守域)Fig.4 Alignment of amino acids encoded by *PtANS1*, *PtANS2* with homologous proteins of other plants (the red frame indicates conserved 2OG-FeII_Oxy domain)

TcANS、葡萄(*Vitis vinifera*) *VvANS*(ADO95202.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtANS*(ABV82967.1)所编码的氨基酸同源性分别为96.9%、88.0%、

83.0%、82.0%、75.0%(图4)。*PtANS2*与毛果杨(*P. trichocarpa*) *PtrANS.2*(XP_002304452.1)、*PtrANS.1*(XP_002298081.1)、可可(*Theobroma cacao*) *TcANS*、



櫻桃李: *Prunus cerasifera* (AEI99590.1); 甜櫻桃: *Prunus avium* (NP_001274859.1); 桃: *Prunus persica* (AMK01806.1); 蘋果: *Malus domestica* (AF117269); 馬鈴薯: *Solanum tuberosum* (ABU88895.1); 茄子: *Solanum melongena* (AJO67970.1); 擬南芥: *Arabidopsis thaliana* (ABV82967.1); 可可: *Theobroma cacao* (AJA79070.1); 荔枝: *Litchi chinensis* (ADD51355.1); 毛果楊: *Populus trichocarpa* (XP_002298081.1); 毛果楊: *Populus trichocarpa* (XP_002304452.1); 葡萄: *Vitis vinifera* (ADO95202.1); 水稻: *Oryza sativa* (CAA69252.1); 小麥: *Triticum aestivum* (BAE98276.1); 擬南芥: *Arabidopsis thaliana* (Q9SEV0.2)。

图5 PtANS1和PtANS2与其他植物ANS蛋白质系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of PtANS1, PtANS2 and members of ANS proteins in other flowering plants

葡萄(*Vitis vinifera*) *VvANS*(ADO95202.1)、擬南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AtANS*(ABV82967.1)所編碼的氨基酸同源性分別為96.0%、89.4%、85.0%、83.0%、75.0%。功能域的預測表明, 這些蛋白質序列含有ANS蛋白質的結構域, 推導的氨基酸序列含有2-酮戊二酸-Fe²⁺-雙加氧酶家族的保守結構域, 行使雙加氧作用, 其中包括與2-酮戊二酸特異結合的精氨酸及與Fe²⁺結合的保守組氨酸和天冬氨酸(圖4)。

2.3 进化关系分析

為了研究PtANS1和PtANS2與其他植物LDOX/ANS類似蛋白質的遺傳進化關係, 以擬南芥*AtANR*蛋白質為外類群(Out group), 使用MEGA 6.0軟件構建了蛋白質系統進化樹(圖5)。結果表明, 所有基因編碼的蛋白質聚為兩大類, 即雙子葉植物支(Dicots)和單子葉植物支(Monocots), 毛白楊PtANS1和PtANS2與毛果楊PtrANS.1和PtrANS.2遺傳距離最近, 與可可(*Theobroma cacao*)和荔枝(*Litchi chinensis*)及葡萄(*Vitis vinifera*)、擬南芥(*Arabidopsis thaliana*)的距離較近, 與茄科植物和薔薇科植物距離較遠, 與單子葉植物水稻(*Oryza sativa*)、小麥(*Triticum aestivum*)的ANS蛋白質距離最遠。

2.4 基因表达模式分析

轉錄組測序結果表明, *PtANS1*在根中表達量最高, 其次是在萌動的营养芽中較高, 在莖、葉和休眠营养芽中轉錄水平很低(圖6A)。在雌花芽發育過

程中, *PtANS1*表達模式呈現從早期花原基形成(6月25日)、器官發生(7月30日)到後期發育各階段由高逐漸降低的表達模式, 在次年2月份表達略有上調(圖6B)。在雄花芽的整個發育過程中, 在早期花原基形成階段表達量最高, 之後不斷下降(圖6C)。與*PtANS1*相對應的是, *PtANS2*在根、莖、葉、休眠和萌動的营养芽、雌雄花芽發育過程各階段中, 總體上表達量比*PtANS1*高出很多, 範圍在5~506倍之間(圖6)。在根、萌動的营养芽中表達量很高, 在莖、葉和休眠营养芽中表達量較低(圖6D)。在雌花芽的發育過程中, 呈現先期上升、之後逐漸下降的趨勢(圖6E)。在雄花芽的發育過程中則呈現從早期花原基形成(6月25日)階段到後期各時期從表達量最高逐漸下調的表達模式(圖6F)。綜上所述, 一個顯著的特徵是, 在各組織器官、花芽各發育階段*PtANS2*的表達量明顯高於*PtANS1*。

3 讨论

黃酮類化合物(flavonoids)是植物天然的次生代謝產物, 是由2個苯環(A-B-環)通過中央3個碳原子相互連接形成具有C6-C3-C6基本結構的一系列化合物^[14], 包括花青素(anthocyanins)、黃酮(flavones)、異黃酮(isoflavones)、黃酮醇(flavonols)、黃烷醇(flavanols)、二氫黃酮(2H-favanones)等幾大類^[15]。原花青素是黃酮類物質合成途徑的最終產物之一,

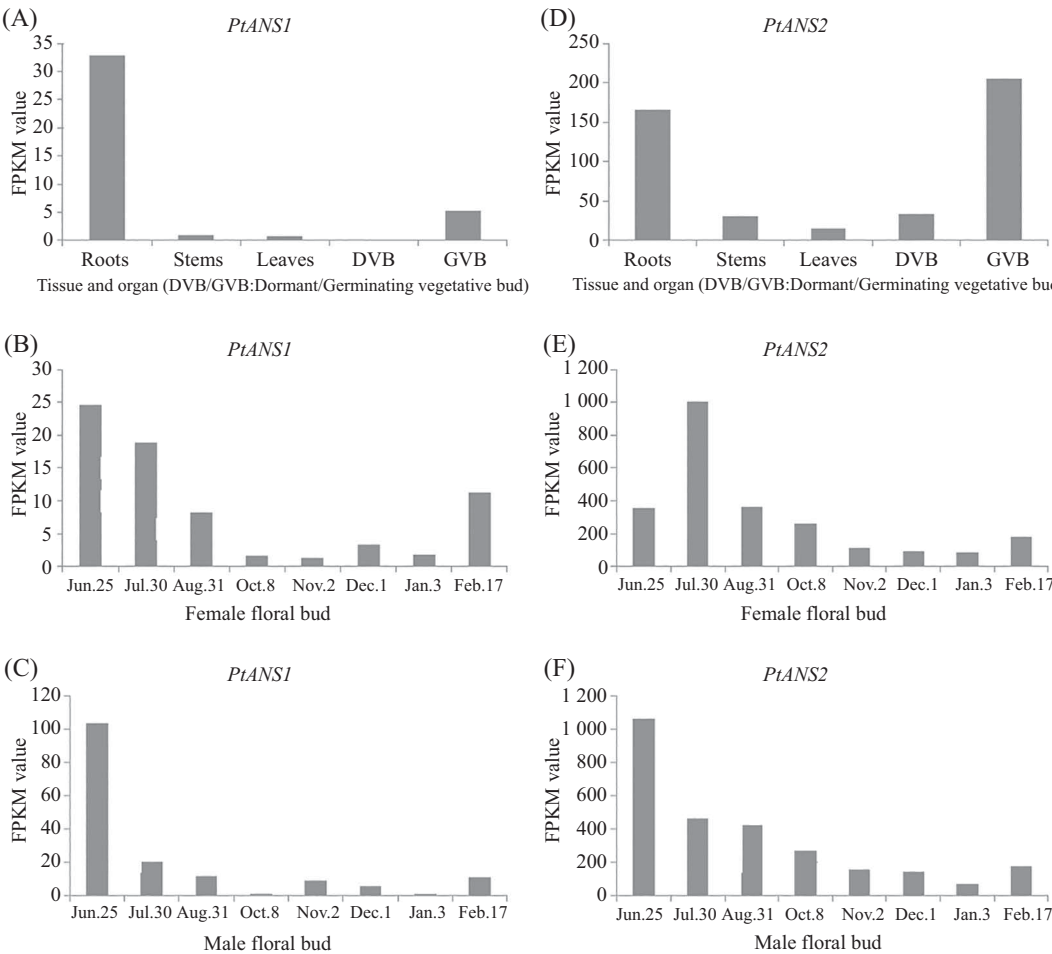


图6 毛白杨*PtANS1*和*PtANS2*基因的组织器官表达特性分析

Fig.6 Expression patterns of *PtANS1* and *PtANS2* in different tissues and organs of *P. tomentosa*

有很强的生物活性^[16]。ANS是在原花青素的合成途径中的关键调节酶之一,催化无色花青素变为红色的矢车菊色素(cyanidin)、砖红色的天竺葵色素(pelargonidin)、蓝色的飞燕草色素(delphinidin)等色素^[17-18]。苹果MYB10对苹果花青素合成途径的关键酶具有正向调控的作用,苹果ANS基因的表达受苹果MYB10调控,与果皮花青素的合成与积累密切相关^[19]。毛果杨*PtrMYB119*在杂种杨树中的过量表达,导致杨树花青素合成途径*PtrPAL*、*Ptr4CL*、*PtrCHS*、*PtrCHI*和*PtrANS*等基因的表达系统性上调,叶片中花青素积累明显增多而呈显不同程度的红色^[20]。

本研究基于转录组数据,结合Phytozome v12.1数据库信息,克隆了毛白杨*PtANS1*和*PtANS2*全长基因,二者在结构上具有高度的一致性,其基因编码的蛋白质均包含2OG-FeII_Oxy氧化酶结构域(216-311),属于2-酮戊二酸-Fe²⁺-双加氧酶超家族成员。该家族成员以含有Fe结合的HXD结构域和结合2-酮

戊二酸的RXS结构域,参与催化花青素、黄酮类等的合成^[8,21]。进一步的同源比对分析显示, *PtANS1*和*PtANS2*与可可、拟南芥、葡萄等植物ANS蛋白质序列有较高的一致性。系统发育分析也显示, *PtANS1*和*PtANS2*与双子叶植物的ANS可以聚为一支,可可和荔枝及葡萄、拟南芥的距离较近,可能执行类似的生物学功能,参与植物花青素的合成。研究表明,黄酮类物质、花青素在植物不同组织器官中的分布存在特异性^[22]。山药(田薯)块茎中各时期的*Da-ANS1*表达量、ANS酶活性与花青素含量呈现一致性^[9],观赏海棠中McANS在叶中的表达趋势和花青素苷含量变化趋势也十分一致^[23]。细花非洲缬草(*Fedia graciliflora*)中病毒介导的*FgANS*基因沉默,使得花形变大,花冠筒口变宽、敞开^[24]。在黄树莓(*Rubus idaeus* L.)中ANS等位基因中5个碱基的插入引发基因突变,导致氨基酸翻译的提前终止,从而减少了树莓果实中花青素的积累^[25]。毛白杨各组织转录组分析结果显示,

*PtANS1*和*PtANS2*在不同组织器官中的表达虽然呈现相似或相近的趋势,但*PtANS2*表达量比*PtANS1*高出5~506倍,预示着*PtANS2*可能在色素合成及其他生理生化功能方面发挥着更重要的作用,为深入研究该基因的功能奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 朱之梯. 毛白杨遗传改良. 中国林业出版社(Zhu Zhidi. Genetic improvement of *Populus tomentosa*. China Forestry Press), 2006.
- 2 李树丽. 中华红叶杨无菌繁殖体系建立的影响因素研究. 山东师范大学(毕业论文)(Li Shuli. Studies Oil the factors affected the foundation of *Populus x euramericana* CV. Zhonghuahongye sterile breeding line. Shandong Normal University), 2008.
- 3 Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, Yamamura S. Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. *Plant Sci* 2005; 169: 949-58.
- 4 Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Trainin T, Harel-Beja R, Bar-Ya'akov I, Borochoy-Neori H, *et al.* A "White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX; ANS) gene. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142777.
- 5 Chen K, Liu H, Lou Q, Liu Y. Ectopic expression of the grape hyacinth (*Muscari armeniacum*) R2R3-MYB transcription factor gene, MaAN2, induces anthocyanin accumulation in tobacco. *Front Plant Sci* 2017; 8: 965.
- 6 Rafique MZ, Carvalho E, Stracke R, Palmieri L, Herrera L, Feller A, Malnoy M, *et al.* Nonsense mutation inside anthocyanidin synthase gene controls pigmentation in yellow raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Front Plant Sci* 2016; 7: 1892.
- 7 Wilmouth RC, Turnbull JJ, Welford RWD, Clifton IJ, Prescott AG, Schofield CJ. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 2002; 10(1): 93-103.
- 8 Xu F, Cheng H, Cai R, Li LL, Chang J, Zhu J, *et al.* Molecular cloning and function analysis of an anthocyanidin synthase gene from *Ginkgo biloba*, and its expression in abiotic stress responses. *Mol Cells* 2008; 26(6): 536-47.
- 9 周生茂, 王玲平, 向 珣, 韦本辉, 李立志, 李杨瑞, 等. 山药ANS基因的克隆和分子特性及其与花青素积累的关系. 园艺学报 (Zhou Shengmao, Wang Lingping, Xiang Xun, Wei Benhui, Li Lizhi, Li Yangrui, *et al.* Cloning and molecular mharacteristics of ANS Gene and its correlations with anthocyanin accumulation in yam. *Acta Horticulturae Sinica*) 2009; 36(9): 1317-26.
- 10 Liu Y, Shi Z, Maximova S, Payne MJ, Guiltinan MJ. *Proanthocyanidin synthesis* in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase. *BMC Plant Biol* 2013; 13: 202.
- 11 马 兰. 百脉根花青素合酶基因(LcANS)的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学(Ma Lan. Cloning and expression analysis of anthocyanidin synthase gene (*LcANS*) from *Lotus corniculatus*. *Genomics and Applied Biology*) 2017; 36(7): 2926-33.
- 12 Huang Y, Gou J, Jia Z, Yang L, Sun Y, Xiao X, *et al.* Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa*. *PLoS One* 2012; 7(2): e30364.
- 13 Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; 28(5): 511-5.
- 14 吴继洲, 孔令义. 天然药物化学. 北京: 中国医药科技出版社 (Wu Jizhou, Kong Lingyi. *Tianran Yaowu Huaxue*. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China), 2008.
- 15 冯 欢, 易姝利, 左佳琦, 谢佳恒, 黄 萱. 基因工程及花色素合成途径在花色素改良中的研究进展. 基因组学与应用生物学 (Feng Huan, Yi Shuli, Zuo Jiaqi, Xie Jiaheng, Huang Xuan. Progress of flower colour modification by genetic engineering and anthocyanin biosynthesis pathway. *Genomics and Applied Biology*) 2014; 33(2): 445-51.
- 16 张慧文, 张 玉, 马超美. 原花青素的研究进展. 食品科学 (Zhang Huiwen, Zhang Yu, Ma Chaomei. Progress in procyanidins research. *Food Science*) 2015; 36(5): 296-304.
- 17 Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 2008; 54(4): 733-49.
- 18 Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 2003; 299(5605): 396-9.
- 19 Telias A, Lin-Wang K, Stevenson DE, Cooney JM, Hellens RP, Allan AC, *et al.* Apple skin patterning is associated with differential expression of MYB10. *BMC Plant Biol* 2011; 11: 93.
- 20 Cho JS, Nguyen VP, Jeon HW, Kim MH, Eom SH, Lim YJ, *et al.* Overexpression of PtrMYB119, a R2R3-MYB transcription factor from *Populus trichocarpa*, promotes anthocyanin production in hybrid poplar. *Tree Physiol* 2016; 36(9): 1162-76.
- 21 Lukacin R, Britsch L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3beta-hydroxylase. *Eur J Biochem* 1997; 249(3): 748-57.
- 22 Wang H, Wang W, Zhang P, Pan Q, Zhan J, Huang W. Gene transcript accumulation, tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in developing grape berries. *Plant Sci* 2010; 179: 103-13.
- 23 田 杰, 沈红香, 张 杰, 姚允聪, 宋婷婷, 耿 慧. 苹果属观赏海棠McANS基因克隆与不同叶色品种间表达差异分析. 园艺学报 (Tian Ji, Shen Hongxiang, Zhang Jie, Yao Yuncong, Song Tingting, Geng Hui. Cloning of *McANS* gene in *Malus crabapple* and expression analysis in different cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*) 2010; 37(6): 939-48.
- 24 Berger BA, Ricigliano VA, Savriama Y, Lim A, Thompson V, Howarth DG. Geometric morphometrics reveals shifts in flower shape symmetry and size following gene knockdown of CYCLOIDEA and ANTHOCYANIDIN SYNTHASE. *BMC Plant Biol* 2017; doi: 10.1186/s12870-017-1152-x.
- 25 Rafique M Z, Carvalho E, Stracke R, Palmieri L, Herrera L, Feller A, *et al.* Nonsense mutation inside anthocyanidin synthase gene controls pigmentation in yellow raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Front Plant Sci* 2016; doi: 10.3389/fpls.2016.01892.