

黑果枸杞花青素生物合成关键基因的生物信息学分析与克隆

虎娟,张虹,蒋清安,林哲,马伟宝,陈任*

(宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室;宁夏大学 生命科学院,宁夏 银川 750021)

摘要:黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)是我国西北地区特有的道地药材,是迄今为止发现花青素含量最高的天然野生植物之一。为深入了解黑果枸杞的花青素生物合成机制,利用转录组测序方法,从黑果枸杞果皮中鉴定了参与花青素生物合成的7类关键基因,即查尔酮合酶基因、查尔酮异构酶基因、黄烷酮-3-羟化酶基因、类黄酮-3'-羟化酶基因、类黄酮-3'5'-羟化酶基因、二羟黄酮醇-4-还原酶基因和花青素合酶基因,对其进行相应核苷酸序列、氨基酸序列以及蛋白质(酶)结构特征等生物信息学分析;然后根据转录本拼接序列,利用PCR方法对该7个基因进行了全长克隆和测序验证。为黑果枸杞的遗传改良及花青素基因的利用奠定了分子基础。

关键词:花青素生物合成;转录组测序;生物信息学分析;PCR克隆;黑果枸杞

中图分类号:S718.46 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2017)06-0001-11

Bioinformatics Analysis and Cloning of the Key Genes Associated with Anthocyanin Biosynthesis from *Lycium ruthenicum*

HU Juan,ZHANG Hong,JIANG Qing-an,LIN Zhe,MA Wei-bao,CHEN Ren*

(Key Lab of the Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University;School of Life Science,Ningxia University,Yinchuan,Ningxia 750021,China)

Abstract:*Lycium ruthenicum* is a unique medicinal material in the northwestern China. It contains the highest content of anthocyanin. To understand more about the biosynthesis mechanism of anthocyanin,in the present research,seven key genes associated with anthocyanin biosynthesis in *L. ruthenicum* were identified using transcriptome sequencing. The genes including chalconesynthase, chalconeisomerase, clavonone-3-hydroxylase, flavonoid-3'-hydroxylase, flavonone-3'5'-hydroxylase, dihydvroflavonol-4-reductase and anthocyanidin synthase,and their bioinformatics in nucleotide sequences,amino acid sequences and their protein (enzyme) structures were characterized. Then the full lengths of the seven key genes were amplified by PCR according to the transcript assembly sequences,and were verified by sequencing. The research would provide a basis for genetic improvement of *L. ruthenicum* and the utilization of the genes involved in anthocyanin biosynthesis.

Key words: anthocyanin biosynthesis; transcriptome sequencing; bioinformatics analysis; PCR cloning; *Lycium ruthenicum*

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)是生长在我国西部高山沙林、荒漠河岸林、盐化沙地的一种特有沙漠药用植物,属于茄科、枸杞属多年生灌木^[1-2]。黑果枸杞素有“软黄金”之称,其果实为球形浆果,成熟时颜色为紫黑色,富含丰富的氨基酸、脂肪和花青素等^[3-5]。其花青素比一般植物花青素具有更好的生理活性^[6]。花青素属类黄酮类化合物,是植物新陈代谢中产生的二级代谢产物,是构成花瓣和果实颜

收稿日期:2017-06-22 修回日期:2017-07-17
基金项目:2013年度宁夏回族自治区科技支撑计划项目(413-0396)。
作者简介:虎娟,女,在读硕士,研究方向:植物分子生理与生物技术。E-mail:380128339@qq.com
*通信作者:陈任,男,教授,博士,研究方向:植物分子生物学与基因工程。E-mail:chenren511@163.com

色的主要色素之一,在植物的生理进程中具有重要作用^[7]。花青素是当今人类发现的有效抗氧化剂,能够保护人体免受自由基损伤。同时具有防止紫外线侵害皮肤、消除眼睛疲劳、提高免疫能力、增强心肺功能、延缓脑神经衰老、抗肿瘤等功效^[8-11]。在植物体内,花青素的生物合成起始于苯丙烷代谢途径^[12]。本研究从黑果枸杞果实中提取 RNA 进行转录组测序,从中筛选出花青素生物合成的关键基因,对其进行生物信息学分析、全长克隆和测序验证,为黑果枸杞的花青素生物合成机制研究、遗传改良和分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黑果枸杞材料采自种植于宁夏科技产业园圃(106.35°E, 38.55°N)的成熟果实。新鲜果实去除种子后装入离心管中放入超低温冰箱(−80℃)保存待用。

1.2 总 RNA 的提取

从超低温冰箱中取出保存的黑果枸杞果实,放入液氮中迅速冷却后放入 Tissue Lyser II 细胞破碎仪(德国 Qiagen)中破碎,采用 RNA prep Pure Plant Kit 试剂盒(北京天根生化科技公司)提取总 RNA。分别采用 Nanodrop 2000(美国 Thermo Fisher Scientific)、Qubit 2.0(美国 Life Technologies)和 Aglient 2100(美国 Aglient Technologies)检测 RNA 样品的纯度(OD_{260/280} 比值)、浓度和完整性(rRNA 28S/18S 比值)等。

1.3 转录组测序

转录组测序(北京百迈客生物科技)的流程为:用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA,加入 Fragmentation Buffer[40 mmol · L^{−1} 三(羟甲基)氨基甲烷醋酸盐,pH 8.1,100 mmol · L^{−1} 乙酸钾和 30 mmol · L^{−1} 乙酸镁]将 mRNA 进行随机打断;以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物合成第一条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链,利用 AMPure XP beads(美国 Beckman Coulter)纯化 cDNA;纯化后的双链 cDNA 用末端脱氧核苷酸转移酶加 A 尾并连接测序接头,然后再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择,最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。

cDNA 文库检验合格后,采用 HiSeq 2500(美国 Illumina)进行高通量测序,测序读长为 PE125。测序后对 Raw Data 进行数据过滤,获得高质量的 Clean Data。利用 Trinity 软件(英国 Broad)将 Clean Data 进行序列拼接组装,获得该物种的 Uni-

gene 库。文库质量评估合格后,使用 Blast 软件(美国 NCBI)将 Unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、GO 和 Pfam 数据库比对,获得 Unigene 的注释信息。利用 TransDecoder 软件(英国 Broad 和澳大利亚 CSIRO)预测这些 Unigene 的编码区序列(Coding Sequence,CDS)。

1.4 花青素生物合成关键基因的生物信息学分析

根据 Unigene 的碱基序列、注释信息从中筛选出黑果枸杞花青素生物合成途经的关键基因。根据预测的 CDS 氨基酸序列,首先利用 Lasergene MegAlign(美国 DNASTar)软件对属于同一基因的 Unigene 进行整理,删除重复序列和较短序列,然后利用 NCBI 在线 BLAST 搜索该基因的同源序列,从而判断该基因氨基酸序列的完整性和与其它物种的相似性;使用 Lasergene TreeView 软件构建分子系统进化树;使用 Lasergene Protean 软件预测其蛋白质的二级结构;使用 PSORT II Prediction(<http://psort.hgc.jp/form.html>)预测蛋白质的亚细胞定位;通过 Swiss-Model Workspace(<http://swissmodel.expasy.org>)对其蛋白质进行同源建模,预测其三级结构,分析这些基因的生物信息学信息^[13-14]。

1.5 花青素生物合成关键基因的全长克隆和测序验证

利用从黑果枸杞果实提取的总 RNA,参照 PrimerScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(日本 TaKaRa)说明书进行 cDNA 的合成。然后根据转录本拼接序列以及 CDS(coding sequence)预测,利用 Primer Premier 5.0 软件(美国 Premier Biosoft)设计 PCR 扩增引物(表 1),以合成的 cDNA(50 ng)为模板,采用 Phusion High-Fidelity DNA

表 1 黑果枸杞花青素生物合成关键基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primer pairs for PCR amplification of the key genes associated with anthocyanin biosynthesis in <i>L. ruthenicum</i>		
引物名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)
LrCHS-S LrCHS-A	TATCACTAGACACCTAAAAGAACCCTA TCAAACCCACAGTAGAAGACCAA	1 670
LrCHI-S LrCHI-A	GTTTGTAGGGCATAGAGGTTTGG ACCCGTC AAGGGCAAGATCATAG	597
LrF3H-S LrF3H-A	GGGGACCAAATCTTCCCTTCATT TTGGACAACGGTTGGCACTTTA	1 531
LrF3'-H-S LrF3'-H-A	AAC TTTTCTTCTTACATTATACAC CAGCAAATACAGACAATACTCAAT	2 068
LrF3'5'-H-S LrF3'5'-H-A	CCGGGAATAGTATTAAACGATA ATAGATCAAAGGTCTAAGGCAAG	1 949
LrDFR-S LrDFR-A	GGGGATCTTGTGTGTTATTTAGTC AGGCAAGCTCGCTCTTTATTTT	1 515
LrANS-S LrANS-A	ACGGAACCAATTTTGCCATCC GGGGCTCATATTCTTGTCTTCTCAA	1 527

聚合酶(美国 New England BioLabs)进行基因全长 PCR 扩增。PCR 产物直接与 pEASY-Blunt E1 Expression Vector(北京全式金生物技术)进行连接,连接产物转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)感受态细胞;随后进行菌落 PCR 鉴定,检测其阳性重组子;用 Plasmid Mini Kit I(美国 Omega Bio-Tek)试剂盒提取其质粒后送至测序验证(武汉昆泰锐生物技术)。

2 结果与分析

2.1 转录组测序

转录组测序获得了 10.83 Gb Clean Data,Q30 碱基百分比为 95.44%。组装后共获得了 79 024 条 Unigene(非重复序列基因)。其中长度在 1 kb 以上

的 Unigene 有 17 593 条。对这些 Unigene 进行功能注释,包括与 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、GO 和 Pfam 数据库的比对,共获得了 50 855 条 Unigene 的注释结果。利用 TransDecoder 软件预测得到了这些 Unigene 的 CDS 序列。

2.2 花青素生物合成关键基因的生物信息学分析

根据 Unigene 的碱基序列、注释信息,从中筛选出了花青素生物合成关键基因(表 2)。

2.2.1 查尔酮合酶 CHS 是催化类黄酮生物合成途径的第一类关键酶,其催化合成查耳酮,经 CHI、F3H、DFR 和 ANS 催化生成花青素^[15],如今已在多种植物中克隆出此基因,如拟南芥、矮牵牛、金鱼草和兰花等。序列分析表明此基因在不同植物间的保守性较高^[16-17]。测序共获得 10 个编码 CHS 的

表 2 黑果枸杞花青素生物合成关键基因

Table 2 Key genes associated with anthocyanin biosynthesis in *L. ruthenicum*

基因名称	非重复序列基因编号	含全长序列的非重复序列基因编号
<i>PAL</i>	c46663	c46663
<i>C4H</i>	c102064、c108895、c28786	c102064、c108895
<i>4CL</i>	c18455、c19449、c24288、c26178、c42115、c43729、c44081、c46586、c48656、c49731、c50015、c54258、c59126、c64752、c82806、c94711	c24288、c42115、c43729、c44081、c46586、c48656、c49731、c50015
<i>ACC</i>	c21066、c21615、c42465、c55956、c61097、c63581、c64386、c66650、c48319	c21066、c42465、c64386、c48319
<i>FLS</i>	c30040、c47271、c84477、c110094、c130887、c39936、c37438、c47092、c129107、c13513、c53255	c30040、c47271、c39936、c37438、c47092、c129107
<i>FNS</i>	c87682	c87682
<i>CHS</i>	c30915、c45480、c47154、c50668、c51806、c54719、c60477、c71756、c90676、c93939	c45480、c47154、c50668、c51806
<i>CHI</i>	c12651、c33448、c33902、c47675	c47675
<i>F3H</i>	c30040、c37438、、c39936、c47092、c47271、c50499、c69488、c129107	c30040、c39936、c37438、c47092、c50499
<i>F3'H</i>	c47546	c47546
<i>F3'5'H</i>	c48110	c48110
<i>DFR</i>	c46908	c46908
<i>ANS</i>	c34958	c34958

注:*PAL*:苯丙氨酸氨裂解酶;*C4H*:肉桂酸 4-羟化酶;*4CL*:4-香豆酸:辅酶 A 连接酶;*ACC*:乙酰辅酶 A 羧化酶;*FLS*:黄酮醇合酶;*FNS*:黄酮合酶;*CHS*:查尔酮合酶;*CHI*:查尔酮异构酶;*F3H*:黄酮醇 3-羟化酶;*F3'H*:类黄酮 3'-羟化酶;*F3'5'H*:类黄酮 3'5'-羟化酶;*DFR*:二氢黄酮醇 4-还原酶;*ANS*:花青(色)素合酶。



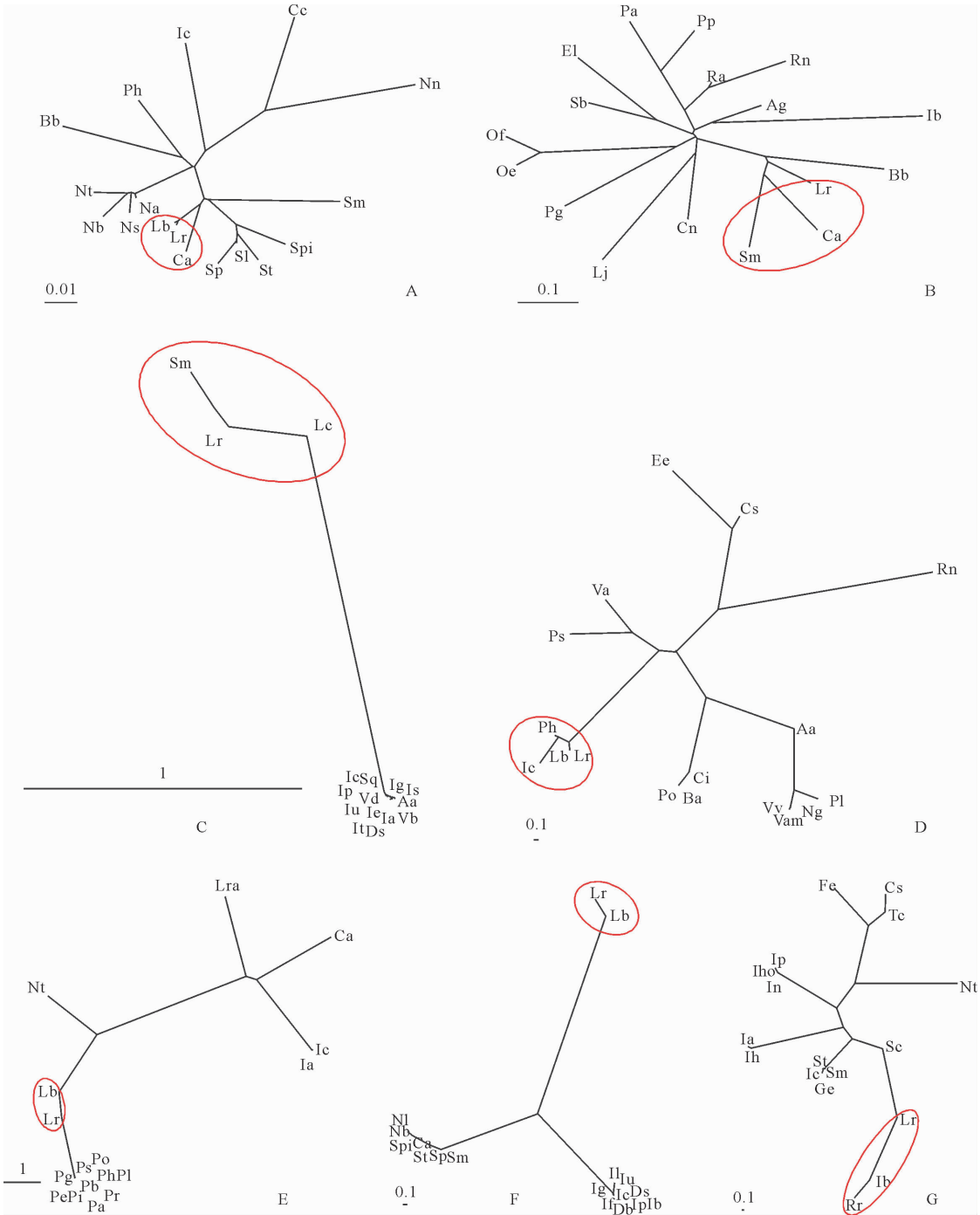
注:红色标注为活性位点。

图 1 黑果枸杞 *LrCHS1* 基因的保守序列

Fig. 1 Conserved domains in *LrCHS1* of *L. ruthenicum*

Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好和长度较长的 4 个基因,分别命名为 *LrCHS1*(c45480)、*LrCHS2*(c50668)、*LrCHS3*(c51806)和 *LrCHS4*(c47154)。其中保守性最好的是 *LrCHS1*(c45480)基因全长 1 670 bp,共编码 389 个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287795);该蛋白具有 Cys¹⁶⁴、His³⁰³ 和 Asn³⁴⁰ 3 个活性位点,同时在 156~172 位和 368~377 位氨基酸间有高度保守的“RLMMYQQGCFAGGTVLR”和“GVLFGFG-PGL”结构功能域,是查耳酮合酶家族的特征序列^[18-19](图 1);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与宁夏枸杞(*Lycium barbarum*, AFM29141. 1)、辣椒

(*Capsicum annuum*, XP_016566084. 1)和番茄(*Solanum lycopersicum*, NP_001234033. 2)的同源性分别达到 99%、98%和 97%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同属的宁夏枸杞和辣椒 CHS 蛋白亲缘关系最为较近(图 2A);根据 Lasergene Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 42. 43 kDa,等电点 pI 为 6. 12,分子式为 C₁₈₈₉ H₃₀₂₇ N₅₀₅ O₅₅₉ S₂₁,平均亲水性(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0. 058,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 37. 68,属稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α-螺旋 17 个,β-折叠 25 个(图 3A)。



注: A. Bb: *Brunfelsia brasiliensis* (AEW12813. 1); Ca: *Capsicum annuum* (XP_016566084. 1); Cc: *Camellia chekiangoleosa* (ADW11243. 1); Ic: *Ichroma cyaneum* (AIY22756. 1); Lb: *Lycium barbarum* (AFM29141. 1); Na: *Nicotiana glauca* (ACS12837. 1); Nb: *Nicotiana benthamiana* (ABN80439. 1); Nn: *Nelumbo nucifera* (ADD74168. 1); Ns: *Nicotiana glauca* (XP_009764938. 1); Nt: *Nicotiana glauca* (NP_001306791. 1); Ph: *Petunia x hybrida* (BAM17287. 1); Sl: *Solanum lycopersicum* (NP_001234033. 2); Sm: *Solanum melongena* (ANN02870. 1); Sp: *Solanum pennellii* (XP_015088482. 1); Spi: *Solanum pinnatisectum* (AAX63402. 1); St: *Solanum tuberosum* (NP_001275352. 1).

B. Ag: *Apium graveolens* (AGM46640. 1); Bb: *Brunfelsia brasiliensis* (AEV53926. 1); Ca: *Capsicum annuum* (ACN60401. 1); Cn: *Camellia nitidissima* (ADZ28513. 1); El: *Erythranthe lewisii* (AHJ80977. 1); Ib: *Ipomoea batatas* (BAA90334. 1); Lj: *Lonicera japonica* (AGE10599. 1); Oe: *Olea europaea* (AHI86005. 1); Of: *Osmanthus fragrans* (ALL27265. 1); Pa: *Prunus avium* (AJO67975. 1); Pg: *Punica granatum* (AHZ97871. 1); Pp: *Pyrus pyrifolia* (ADP09377. 1); Ra: *Ribes aureum* (CEL26666. 1); Rn: *Ribes nigrum* (CEL26667. 1); Sb: *Scutellaria baicalensis* (AMW91737. 1); Sm: *Solanum melongena* (ANN02871. 1).

C. Aa: *Acnistus arborescens* (AMQ48661. 1); Ds: *Dunalia spathulata* (AMQ48670. 1); Ia: *Ichroma australe* (AMQ48652. 1); Ic: *Ichroma cornifolium* (AMQ48654. 1); Ie: *Ichroma edule* (AMQ48656. 1); Ig: *Ichroma grandiflorum* (AMQ48666. 1); Ip: *Ichroma parvifolium* (AMQ48660. 1); Is: *Ichroma squamosum* (AMQ48667. 1); It: *Ichroma tupayachianum* (AMQ48653. 1); Iu: *Ichroma umbellatum* (AMQ48657. 1); Lc: *Lycium chinense* (AID50182. 1); Sm: *Solanum melongena* (ANN02873. 1); Sq: *Saracha quitensis* (AMQ48665. 1); Vb: *Vassobia breviflora* (AMQ48662. 1); Vd: *Vassobia dichotoma* (AMQ48655. 1).

D. Aa: *Ageratina adenophora* (ABM46853. 1); Ba: *Bidens aurea* (ACO35753. 1); Ci: *Cichorium intybus* (ACN65825. 1); Cs: *Camellia sinensis* (AKM12329. 1); Ee: *Eustoma exaltatum* (BAP94456. 1); Ic: *Ichroma cyaneum* (AIY22749. 1); Lb: *Lycium barbarum* (AGT55836. 1); Ng: *Nekemias grossedentata* (AGO02167. 1); Ph: *Pelargonium x hortorum* (AAG49315. 1); Pl: *Paeonia lactiflora* (AFI71898. 1); Po: *Pilosella officinarum* (ABC47161. 1); Ps: *Paeonia suffruticosa* (AEN71546. 1); Rn: *Ribes nigrum* (AGI16386. 1); Va: *Vaccinium ashei* (BAO58432. 1); Vam: *Vitis amurensis* (ACN38268. 1); Vv: *Vitis vinifera* (BAE47005. 1).

E. Ca: *Capsicum annuum* (XP_016548923. 1); Ia: *Ichroma australe* (AMQ48652. 1); Ic: *Ichroma calycinum* (AIY22750. 1); Lb: *Lycium barbarum* (AGT57962. 1); Lra: *Lycianthes rantonnei* (AAG49300. 1); Nt: *Nicotiana glauca* (XP_009619846. 1); Pa: *Petunia axillaris* (BAF34558. 1); Pb: *Petunia bonjardinensis* (BAF34561. 1); Pe: *Petunia exserta* (BAF34566. 1); Pg: *Petunia guarapuavensis* (BAF34567. 1); Ph: *Petunia x hybrida* (ABN42195. 1); Pi: *Petunia integrifolia* (BAF34563. 1); Pl: *Petunia littoralis* (BAF34569. 1); Po: *Petunia occidentalis* (BAF34571. 1); Pr: *Petunia reitzii* (BAF34572. 1); Ps: *Petunia scheideana* (BAF34575. 1).

F. Ca: *Capsicum annuum* (NP_001311706. 1); Db: *Dunalia brachyacantha* (AFO59586. 1); Ds: *Dunalia solanacea* (AFO59587. 1); Ib: *Ichroma baumii* (AFO59584. 1); Ic: *Ichroma calycinum* (AFO59581. 1); If: *Ichroma fuchsoides* (AFO59582. 1); Ig: *Ichroma gesnerioides* (ADV03180. 1); Il: *Ichroma loxense* (AFO59579. 1); Ip: *Ichroma parvifolium* (AFO59585. 1); Iu: *Ichroma umbellatum* (AFO59589. 1); Lb: *Lycium barbarum* (AEQ04697. 1); Nb: *Nicotiana benthamiana* (ABN80438. 1); Nl: *Nicotiana glauca* (ACS12835. 1); Sm: *Solanum melongena* (ANN02872. 1); Spi: *Solanum pinnatisectum* (AAX63400. 1); Sp: *Solanum pennellii* (XP_015065765. 1); St: *Solanum tuberosum* (NP_001274988. 1).

G. Cs: *Citrus sinensis* (NP_001275784. 1); Fe: *Fagopyrum esculentum* (ADT63066. 1); Ge: *Gypsophila elegans* (AAP13054. 1); Ia: *Ipomoea alba* (AAP82018. 1); Ib: *Ipomoea batatas* (ADE08370. 1); Ic: *Ichroma cyaneum* (AIY22762. 1); Iho: *Ipomoea horsfalliae* (ACS71531. 1); Ih: *Ipomoea hederacea* (AAP82029. 1); In: *Ipomoea nil* (BAB71806. 1); Ip: *Ipomoea purpurea* (ABW69684. 1); Nt: *Nicotiana glauca* (AFM52335. 1); Rr: *Rosa rugosa* (AKT74337. 1); Sc: *Solanum cardiophyllum* (AEJ90546. 1); Sm: *Solanum melongena* (ACJ02088. 1); St: *Solanum tuberosum* (AEJ90548. 1); Tc: *Theobroma cacao* (ADD51356. 1).

注: A: *LrCHS1*; B: *LrCHI*; C: *LrF3H*; D: *LrF3'H*; E: *LrF3'5'H*; F: *LrDFR*; G: *LrANS*

图 2 黑果枸杞花青素生物合成关键基因的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the key genes associated with anthocyanin biosynthesis in *L. ruthenicum*

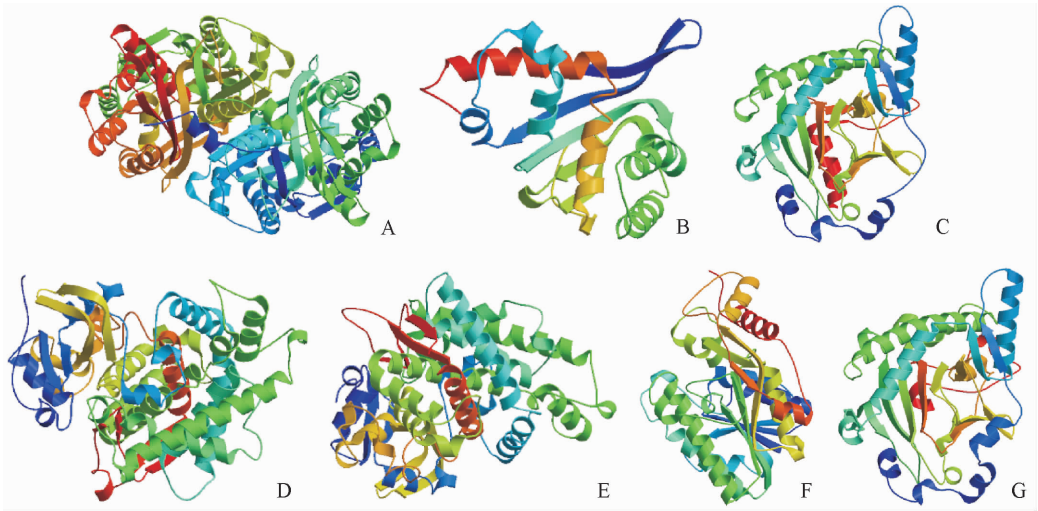
2.2.2 查尔酮异构酶 CHI 能将查尔酮分子转变为黄烷酮,其在植物中的表达影响着花的颜色,CHI 基因已在矮牵牛、葡萄等多种植物中被克隆出来,序列分析表明此基因在不同植物间的保守性较高^[20-21]。测序共获得 4 个编码 CHI 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好长度较长的 1 个基因,命名为 *LrCHI* (c47675)。该基因全长 597 bp,编码 198 个氨基酸 (GenBank 登录号为 KY287801);该氨基酸序列间存在与其他植物高度保守的活性位点^[22] (图 4);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与茄子 (*Solanum melongena*, ANN02871. 1)、辣椒 (*C. annuum*, ACN60401. 1)

和油橄榄 (*Olea europaea*, AHI86005. 1) 的同源性达到 87%、85% 和 80%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同属的茄子和辣椒 CHI 蛋白亲缘关系最为较近 (图 2B);根据 Lasergene Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 21.62 kDa,等电点 pI 为 5.89,分子式为 C₉₇₄H₁₅₂₈N₂₅₀O₂₉₅S₅,平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.125,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 38.79,属稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α-螺旋 9 个,β-折叠 3 个 (图 3B)。

2.2.3 黄烷酮-3-羟化酶 F3H 属于氧化戊二酸依赖型加氧酶家族,在有氧气、烟碱、维生素 C、Fe²⁺ 等

因子的协作下能将黄烷酮 C 环经基化形成黄酮醇化合物。这个基因最早是在金鱼草中被克隆的,目前在拟南芥、矮牵牛和玉米等多种植物中被分离和鉴定^[23]。植物中的 F3H 一般由两个外显子组成,编码 350~380 氨基酸^[24]。测序共获得 8 个编码 F3H 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好长度较长的一个基因,命名为 *LrF3H*(c50499)。该基因全长 1 531 bp,编码 366 个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287798);其中在 217~220 位和 275 位氨基酸间有保守的 Fe²⁺ 结合位点,在 199~302 位和 285~291 位氨基酸间有保守的 2OG 结合位点^[22](图 5);根据 BLAST 比对,

其氨基酸序列与中国枸杞(*L. chinense*, AID50182.1)、矮牵牛(*Petunia hybrida*, AAC49929.1)和茄子(*S. melongena*, ANN02873.1)的同源性分别达到 99%、91%和 91%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同属的中国枸杞和茄子 F3H 蛋白亲缘关系最为较近(图 2C);根据 Lasergene Protean 预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 41.06 kDa,等电点 pI 为 5.25,分子式为 C₁₈₂₄ H₂₈₉₈ N₄₉₂ O₅₅₆ S₁₄,平均亲水性(GRAVY)为-0.380,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 44.25,属不稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α-螺旋 14 个,β-折叠 11 个(图 3C)。



注:A:LrCHS1; B:LrCHI; C:LrF3H; D:LrF3'H; E:LrF3'5'H; F:LrDFR; G:LrANS

图 3 黑果枸杞花青素生物合成关键基因蛋白三级结构预测

Fig. 3 Protein 3D structure prediction of the key genes associated with anthocyanin biosynthesis in *L. ruthenicum*



图 4 黑果枸杞 *LrCHI* 基因的保守序列

Fig. 4 Conserved domains in *LrCHI* of *L. ruthenicum*

2.2.4 类黄酮-3'-羟化酶 F3'H 是类黄酮途径中的一种重要关键酶,属于细胞色素 P450 单加氧酶,目前已经从矮牵牛、拟南芥、葡萄、甘蓝和棉花等物种中被克隆出来^[25]。测序共获得 1 个编码 F3'H 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好长度较长的 1 个基因,命名为 *LrF3'H*(c47546)。该基因全长 2 068 bp,编码 515

个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287800);其氨基酸序列在 33~37 位和 443~452 位具有“LPPGP”的细胞色素 P450 保守域和“FGAGRRICAG”的 C 端血红素结合域等^[25](图 6);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与宁夏枸杞(*L. barbarum*, AGT55836.1)、蓝花曼陀罗(*Iochroma cyaneum*, AIY22749.1)和矮牵牛(*P. hybrida*, Q9SBQ9.1)的

同源性分别达到 99%、93%和 89%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同科的宁夏枸杞、蓝花曼陀罗和矮牵牛 F3′H 蛋白亲缘关系最为较近(图 2D);根据 Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 57.11 kDa,等电点 pI 为 8.72,

分子式为 C₂₅₈₅ H₄₀₈₇ N₆₉₅ O₇₁₉ S₂₂,平均亲水性 (GRA-VY)为-0.006,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 28.81,属稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α-螺旋 19 个,β-折叠 18 个(图 3D)。

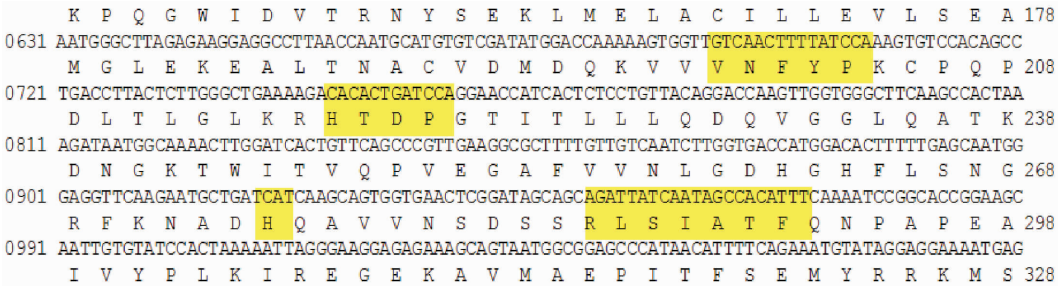


图 5 黑果枸杞 *LrF3H* 基因的保守序列

Fig. 5 Conserved domains in *LrF3H* of *L. ruthenicum*

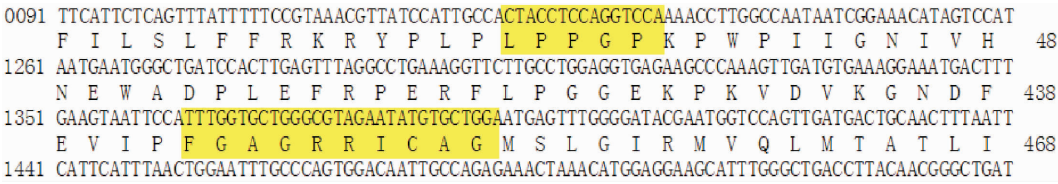


图 6 黑果枸杞 *LrF3′H* 基因的保守序列

Fig. 6 Conserved domains in *LrF3′H* of *L. ruthenicum*

2.2.5 类黄酮-3′5′-羟化酶 F3′5′H 属于细胞色素 P450 超家族 CYP75B 亚家族,一般在植物中的花中特异表达,是在蓝色花卉的颜色形成中起重要作用的酶^[26],对于它的研究有利于进行花卉分子育种。测序结果共找出 1 个编码 F3′5′H 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好长度较长的 1 个基因,命名为 *LrF3′5′H* (c48110)。该基因全长 1 949 bp,编码 508 个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287799);其氨基酸序列 437 ~ 446 位具有和其他物种高度保守的“FGAGRRICAG”血红素结合域^[27](图 7);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与宁夏枸杞(*L. barba-*

rum, AGT57962. 1)、矮牵牛 (*P. hybrida*, ABN 42195. 1)和辣椒 (*C. annuum*, XP_016548923. 1)的同源性分别达到 98%、88%和 89%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同属的宁夏枸杞 F3′5′H 蛋白亲缘关系最为较近(图 2E);根据 Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 57.18 kDa,等电点 pI 为 8.78,分子式为 C₂₅₆₀ H₄₀₆₅ N₆₉₃ O₇₁₆ S₃₁,平均亲水性 (GRAVY)为-0.094,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 38.34,属稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α-螺旋 18 个,β-折叠 27 个(图 3E)。

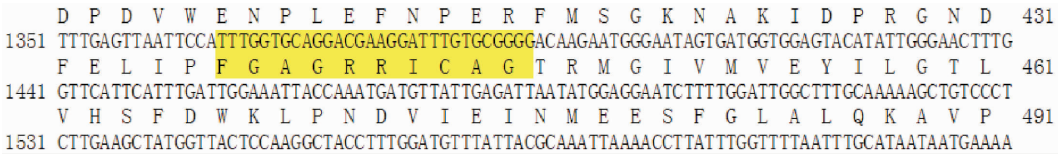


图 7 黑果枸杞 *LrF3′5′H* 基因的保守序列

Fig. 7 Conserved domains in *LrF3′5′H* of *L. ruthenicum*

2.2.6 二氢黄酮醇-4-还原酶 DFR 属于 DADPH 依赖性的还原酶家族,最早是在玉米与金鱼草中发现,研究表明它的保守性较高,在葡萄、矮牵牛中也被发现和克隆^[28-29]。二氢黄酮醇在 DFR 的催化下能还原形成无色花青素。DFR 也有使花青素在植

物中积累的作用,正是由于它的作用使得黑果枸杞富含大量的花青素。测序共获得 1 个编码 DFR 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好和长度较长的 1 个基因,命名为 *LrDFR*(c46908)。该基因全长 1 515 bp,编码 379

个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287797);LrDFR 在 19~39 位处有 1 段氨基酸序列“VTGAAGFIG-SWLVMRLLERGY”与大部分物种的 DFR 特有的、相对保守的 NADPH 结合域“VTGASGFVG-SWLVMRLLLEHG Y”非常相似,只存在 3 个氨基酸残基(下划线标注)有所差异^[30](图 8);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与宁夏枸杞(*L. barbarum*, AEQ04697. 1)、辣椒(*C. annuum*, AFL48186. 1)和马铃薯(*Solanum tuberosum*, AEN83503. 1)的同源

性分别达到 99%、92% 和 92%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与同属的宁夏枸杞 DFR 蛋白亲缘关系最为较近(图 2F);根据 Lasergene Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 42. 36 kDa,等电点 pI 为 6. 03,分子式为 C₁₉₀₉ H₂₉₈₅ N₄₉₅ O₅₆₁ S₁₆,平均亲水性(GRAVY)为 -0. 192,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 29. 90,属稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α -螺旋 18 个, β -折叠 17 个(图 3F)。



图 8 黑果枸杞 LrDFR 基因的保守序列

Fig. 8 Conserved domains in LrDFR of *L. ruthenicum*

2. 2. 7 花青(色)素合酶 ANS 是使黑果枸杞显蓝紫色的关键酶,无色花青素在 ANS 催化下能变成各种颜色的花青素,而在黑果枸杞中会产生飞燕草色素从而使黑果枸杞果实显蓝紫色^[31]。其在葡萄、拟南芥和金荞麦中也已经被克隆出来^[32]。测序共获得 1 个编码 ANS 的 Unigene,经 Lasergene MegAlign 氨基酸序列比对选择保守性较好和长度较长的 1 个基因,命名为 LrANS(c34958)。该基因全长 1 527 bp,编码 416 个氨基酸(GenBank 登录号为 KY287796);该蛋白 N 末端具有高度保守的 2OG-Fe II_Oxy 氧化酶结构域,在 236 和 292 位分别有与 Fe²⁺ 结合的保守位点,在 241 位有天冬氨酸的保守位点,在 302 和 304 位有与 2-酮戊二酸结合的保守位点,但 C 末端不具有 DIOXN 结构域^[33]

(图 9);根据 BLAST 比对,其氨基酸序列与烟草(*Nicotiana tabacum*, AFM52335. 1)、番薯(*Ipomoea batatas*, ADE08370. 1)和玫瑰(*Rosa rugosa*, AKT74337. 1)的同源性分别达到 89%、80% 和 78%;通过构建分子系统进化树表明该基因编码的蛋白与旋花科的番薯和蔷薇科的玫瑰 ANS 蛋白亲缘关系最为较近(图 2G);根据 Lasergene Protean 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量约为 46. 64 kDa,等电点 pI 为 5. 55,分子式为 C₂₀₇₄ H₃₂₆₇ N₅₅₉ O₆₃₅ S₁₄,平均亲水性(GRAVY)为 -0. 590,说明该蛋白属亲水性蛋白,其不稳定系数为 43. 77,属不稳定类蛋白质;其亚细胞定位于细胞质中,具有 α -螺旋 25 个, β -折叠 8 个(图 3G)。

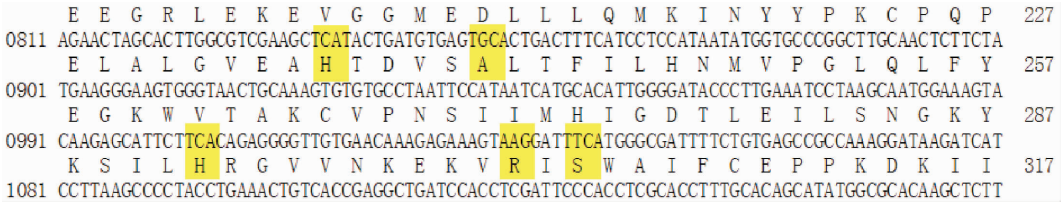


图 9 黑果枸杞 LrANS 基因的保守序列

Fig. 9 Conserved domains in LrANS of *L. ruthenicum*

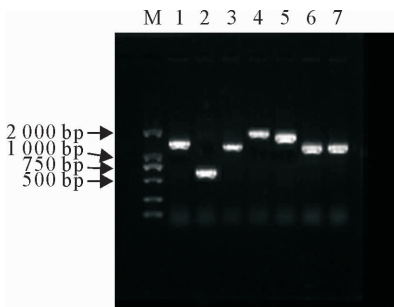
2. 3 花青素生物合成关键基因的全长克隆和测序验证

用反转录得到的 cDNA 为模板,根据转录本拼接的序列以及 CDS 预测设计引物,通过 PCR 技术扩增出上述生物信息学分析的黑果枸杞花青素生物合成的 7 个关键基因的全长(图 10),PCR 产物直接与 pEASY-Blunt E1 Expression Vector 连接、大肠

杆菌转化、菌落 PCR 检测后,提取重组质粒进行测序验证,测序结果与转录本拼接的序列完全一致。

3 结论与讨论

自 1947 年在花生仁的包衣中首先发现花青素以来,已有 500 余种不同花青素报道,存在于 27 科 72 属植物中^[34]。黑果枸杞作为我国的特有植物,其



注: M. Marker; 1. *LrCHS1*; 2. *LrCHI*; 3. *LrF3H*; 4. *LrF3'H*; 5. *LrF3'5'H*; 6. *LrDFR*; 7. *LrANS*。

图 10 黑果枸杞花青素生物合成关键基因的 PCR 扩增

Fig. 10 PCR amplification of the key genes associated with anthocyanin biosynthesis in *L. ruthenicum*

果实中含有大量花青素。而对黑果枸杞花青素的研究尚处于起步阶段,主要集中在黑果枸杞花色苷提取纯化、定量检测分析方法以及生理功能方面,关于黑果枸杞花青素生物合成途径的研究相对较少,尚未有黑果枸杞花青素生物合成关键基因方面的研究报道。本研究提取了黑果枸杞成熟果实 RNA 进行转录组测序,分析得到黑果枸杞花青素生物合成途径中的 7 类关键基因的序列并登录到 NCBI 上注册。通过 Blast 分析和构建系统进化树,发现 7 种基因编码的氨基酸序列与宁夏枸杞、辣椒、茄子和矮牵牛等同属于茄科植物的基因具有很高的同源性,其中 *LrF3'5'H* 和 *LrDFR* 基因与宁夏枸杞亲缘关系最为较近,*LrANS* 基因与旋花科番薯和蔷薇科玫瑰的亲缘关系最为较近。通过预测这些基因氨基酸的二级结构和三级结构,发现其蛋白质主要原件是 α -螺旋和 β -折叠,与拟南芥、香雪兰等物种的蛋白质结构成分相似,这些蛋白均为亲水性蛋白,且亚细胞定位均在细胞质中,其中 *LrF3H* 和 *LrANS* 属不稳定类蛋白质,其他均为稳定类蛋白质。黑果枸杞的这些基因大都具有与其他植物花青素生物合成途径相关基因的典型特点,如 *LrCHS* 具有 Cys¹⁶⁴、His³⁰³和 Asn³⁴⁰ 3 个活性位点,两段高度保守的“RLMMYQQGCFAGGTVLRL”和“GVLFQFG-PGL”结构功能域,完全符合查耳酮合酶家族的序列特征;*LrCHI* 氨基酸序列间存在与其他植物高度保守的活性位点;*LrF3H* 在 217~220 位和 275 位氨基酸间有保守的 Fe²⁺ 结合位点,在 199~302 位和 285~291 位氨基酸间有保守的 2OG 结合位点;*LrF3'H* 氨基酸序列在 33~37 位和 443~452 位具有“LPPGP”的细胞色素 P450 保守域和“FGAGRRICAG”的 C 端血红素结合域。*F3'H* 和 *F3'5'H* 基因是形成蓝色花青素(飞燕草色素)的关键酶,很多植物由于不含有此类基因而没有蓝色品

种,*LrF3'H* 和 *LrF3'5'H* 的氨基酸序列具有与其他物种保守的血红素结合域,使其颜色成为紫黑色。*DFR* 基因在大部分物种中存在相对保守“VTGAS-GFVGSWLVMRLLEHGY”NADPH 结合域,并且该区域决定底物的特异性,如非洲菊的 *DFR* 能以 DHM、DHK 和 DHQ 为底物,而矮牵牛 *DFR* 则主要催化 DHM,而对 DHK 没有转化作用,因而矮牵牛缺乏橙色的天竺葵色素^[35]。*LrDFR* 的氨基酸序列也同样存在相似的 NADPH 结合域“VTGAAG-FIGSWLVMRLLEHGY”,但其中 3 个氨基酸残基(下划线标注)与大部分物种有所差异。此差异是否与黑果枸杞形成紫黑色果实、底物特异性有关,还有待进一步酶活性和底物特异性鉴定。*ANS* 是无色花青素形成相应有色花青素的关键酶,其表达具有组织、时期和品种差异性。*LrANS* 编码的蛋白 N 末端具有高度保守的 2OG-Fe II _Oxy 氧化酶结构域,在 236 和 292 位分别有与 Fe²⁺ 结合的保守位点,在 241 位有天冬氨酸的保守位点,在 302 和 304 位有与 2-酮戊二酸结合的保守位点,但 C 末端不具有 DIOXN 结构域,可能是影响其果实颜色的主要原因。

根据转录本拼接序列以及 CDS 预测,本研究进一步以合成的 cDNA 为模板,通过 PCR 技术扩增了此 7 个关键基因的全长,其 PCR 产物分别直接与载体连接,对重组质粒测序验证表明 PCR 扩增的基因全长与转录本拼接的序列完全一致,说明转录组测序的结果正确、可靠。今后将通过融合蛋白在原核细胞内表达的方法,获取这些基因所编码的酶类并进行体外(*in vitro*)反应,验证这些基因的功能和所编码的酶的活性。

目前,植物花青素生物合成途径中的关键基因在很多植物中都已成功克隆,在调控植物次生代谢物合成方面取得了进展。在水稻突变体内过表达 *ANS* 基因研究提高花青素和黄酮的含量,导致了花青素在转化植株中有不同程度的积累^[36];通过抑制 *F3H* 基因在拟南芥中表达导致黄酮和花青素含量的下降^[37]。

花青素基因在改造花色方面的利用也取得了进展。利用 RNAi 技术抑制菊花内源 *F3'H*,通过构建大载体将月季 *CHS* 花部特异性启动子与三色堇的 *F3'5'H* 编码区连接导入菊花中,获得蓝色花转基因株系^[38];使用 RNAi 技术对龙胆中 *F3'5'H* 和 5/3'AT 进行反义抑制,转基因株系花色由蓝色变为浅蓝色^[39]。本研究对黑果枸杞花青素生物合成途径的关键基因进行了初步的生物信息学分析,可为黑果枸杞提高花青素含量等遗传改良奠定分子基

础,也可为今后利用转基因技术将黑果枸杞花青素生物合成关键基因导入到花卉,改变花卉原有的花青素生物合成途径培育新花色品种提供基因资源。

参考文献:

[1] 甘青梅, 骆桂法, 李普衍, 等. 藏药黑果枸杞开发利用的研究 [J]. 青海科技, 1997, 4(1): 17-19.

[2] 袁海静, 安巍, 李立会, 等. 中国枸杞种质资源主要形态学性状调查与聚类分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 627-633.

YUAN H J, AN W, LI L H, *et al.* The investigation and cluster analysis of main morphological characters for germplasm of Chinese wolfberry [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(4): 627-633. (in Chinese)

[3] 韩丽娟, 叶英, 索有瑞. 黑果枸杞资源分布及其经济价值 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(6): 55-57.

HAN L J, YE Y, SUO Y R. The resource and economic value of *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2014, 33(6): 55-57. (in Chinese)

[4] 柴国贤. 软黄金: 青海野生黑枸杞 [J]. 中国检验检疫, 2013(12): 45.

[5] 匡可任, 路安民. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 10.

[6] 徐春明, 庞高阳, 李婷. 花青素的生理活性研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2013(3): 205-210.

XU C M, PANG G Y, LI T. Progress in the research on physiological activities of anthocyanin [J]. Chinese Food Additives, 2013(3): 205-210. (in Chinese)

[7] 郭凤丹, 王效忠, 刘学英, 等. 植物花青素生物代谢调控 [J]. 生命科学, 2011, 23(10): 938-944.

GUO F D, WANG X Z, LIU X Y, *et al.* Metabolic regulation of plants anthocyanin [J]. Life Sciences, 2011, 23(10): 938-944. (in Chinese)

[8] 张佳慧, 胡利宗, 杨同文, 等. 番茄花青素合成关键酶基因的序列与进化分析 [J]. 核农学报, 2015, 29(7): 1292-1301.

ZHANG J H, HU L Z, YANG T W, *et al.* Sequence and evolutionary analyses of the genes encoding key enzymes involved in anthocyanins biosynthesis in Tomato [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(7): 1292-1301. (in Chinese)

[9] 林丽, 李进, 李永洁, 等. 黑果枸杞花色苷对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(8): 606-611.

LIN L, LI J, LI Y J, *et al.* Protective effect of *Lycium ruthenicum* anthocyanins on the vascular endothelial cells with oxidative injury by oxidized low-density lipoprotein *in vitro* [J]. China Pharmaceutical Journal, 2013, 48(8): 606-611. (in Chinese)

[10] MARTA R, EVA N, MARIA P, *et al.* Proanthocyanidins and the risk of colorectal cancer in Italy [J]. Cancer Causes Control, 2010, 21(2): 243-250.

[11] 王琴, 王建友, 李勇, 等. 我国黑果枸杞研究进展 [J]. 北方园艺, 2016(5): 194-199.

WANG Q, WANG J Y, LI Y, *et al.* Research progress on *Lycium ruthenicum* Murr. in China [J]. Northern Horticulture, 2016(5): 194-199. (in Chinese)

[12] SPRINGGOB K, NAKAJIMA J, YAMAZAKI M, *et al.* Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. Natural Product Report, 2003, 20(3): 288-303.

[13] 张磊, 叶志伟, 赵晨曦, 等. 沙柳 *SpsLAZY1a* 和 *SpsLAZY1b* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 西北林学院学报, 2017, 32(1): 98-105.

ZHANG L, YE Z W, ZHAO C X, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of *SpsLAZY1a* and *SpsLAZY1b* genes in *Salix psammophila* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(1): 98-105. (in Chinese)

[14] 郑程莉, 蔡永华, 朱吉彬, 等. 林麝生长激素基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 214-219.

ZHEN C L, CAI Y H, ZHU J B, *et al.* Bioinformatics analysis of *Moschus berezouskii* GH gene [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(6): 214-219. (in Chinese)

[15] 周天山, 王新超, 余有本, 等. 紫芽茶树类黄酮生物合成关键酶基因表达与总儿茶素、花青素含量相关性分析 [J]. 作物学报, 2016, 42(4): 525-531.

ZHOU T S, WANG X C, YU Y B, *et al.* Correlation analysis between total catechins (or anthocyanins) and expression levels of genes involved in flavonoids biosynthesis in tea plant with purple leaf [J]. Acta Agron. Sin., 2016, 42(4): 525-531. (in Chinese)

[16] 侯夫云, 王庆美, 李爱贤, 等. 植物花青素合成酶的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 188-190.

HOU F Y, WANG Q M, LI A X, *et al.* Study progress on anthocyanidin synthase of plants [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin. 2009, 25(21): 188-190. (in Chinese)

[17] 孙叶, 包建忠, 刘春贵, 等. 兰花花色基因工程研究进展 [J]. 核农学报, 2015, 29(9): 1701-1710.

SUN Y, BAO J Z, LIU C G, *et al.* Progresses on genetic engineering in orchid floral color [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(09): 1701-1710. (in Chinese)

[18] FERRER J L, JES J M, BOWMAN M E, *et al.* Structure of chalconesynthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis [J]. Synnature Structural Biology, 1999(6): 775-784.

[19] LANZ T, TROPF S, MARNER F J, *et al.* The role of cysteines in polyketide synthases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(15): 9971-9976.

[20] 庞红霞, 祝长青, 覃建兵. 植物花青素生物合成相关基因研究进展 [J]. 种子, 2010, 29(3): 60-64.

PANG H X, ZHU C Q, QIN J B. Advancement of plant genes related with anthocyanins synthetic biology [J]. Seed, 2010, 29(3): 60-64. (in Chinese)

[21] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 等. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1496-1506.

JIA Z D, MA F Y, BIAN X F, *et al.* Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2014, 34(7): 1496-1506. (in Chinese)

[22] 亓希武. 桑树花青素生物合成相关基因的鉴定及功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.

[23] HIMI E, MAEKAWA M, NODA K. Differential expression of three flavanone 3-hydroxylase genes in grains and coleoptiles

of wheat [J]. International Journal of Plant Genomics,2011, doi:10.1155/2011/369460.

[24] 张云洁,潘怡辰,王汝茜,等.植物花青素生物合成途径相关基因的研究进展 [J].安徽农业科学,2014,42(34):12014-12016.

ZHANG Y J,PAN Y C,WANG R Q,*et al.* Research progress of genes which relate to the biosynthetic pathway of anthocyanins [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2014,42(34):12014-12016. (in Chinese)

[25] 侯杰,佟玲,崔国新,等.植物类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)基因的研究进展 [J].植物生理学报,2011,47(7):641-647.

HOU J,TONG L,CUI G X,*et al.* Research advances of plant flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) gene [J]. Plant Physiology Journal,2011,47(7):641-647. (in Chinese)

[26] 石少川,高亦珂,张秀海,等.植物花青素生物合成相关基因的研究及应用 [J].植物研究,2011,31(5):633-640.

SHI S C,GAO Y K,ZHANG X H,*et al.* Progress on plant genes involved in biosynthetic pathway of anthocyanins [J]. Plant Research,2011,31(5):633-640. (in Chinese)

[27] 彭翼抒.棉花类黄酮 3'5'-羟化酶基因(GhF3'5'H)的功能研究 [D].重庆:西南大学,2010.

[28] 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,2012(12):25-32.

ZHAO Q M,LI F,LI P. Research advances on core enzymes of anthocyanidin biosynthesis [J]. Biotechnology Bulletin,2012(12):25-32. (in Chinese)

[29] 高燕会,黄春红,朱玉球,等.植物花青素苷生物合成及调控的研究进展 [J].中国生物工程杂志,2012,32(8):94-99.

GAO Y H,HUANG C H,ZHU Y Q,*et al.* Progress on plant anthocyanidin biosynthesis and regulation [J]. China Biotechnology,2012,32(8):94-99. (in Chinese)

[30] 郭凤丹,夏哈,袁美,等.花生二氢黄酮醇还原酶(*DFR*)的克隆及表达分析 [J].农业生物技术学报,2011,19(5):816-822.

GUO F D,XIA H,YUAN M,*et al.* Cloning of dihydroflavonol 4-reductase gene (*DFR*) from peanut and its expression analysis [J]. Journal of Agricultural Biotechnology,2011,19(5):816-822. (in Chinese)

[31] ROSATI C,CADIC A,DURON M. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development [J]. Plant Science,1999,149(2):73-79.

[32] 卜星星,雒晓鹏,白悦辰,等.金荞麦花青素合酶基因的克隆及其表达与花青素量的相关性研究 [J].中草药,2014,45(7):985-989.

PU X X,LUO X P,BAI Y C,*et al.* Gene cloning of anthocyanin synthase in *Fagopyrum dibotrya* and correlation between its expression level and anthocyanin content [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2014,45(7):985-989. (in Chinese)

[33] 王冰,王全逸,印敬明,等.野生马铃薯 ANS 同源基因的克隆及表达分析 [J].植物生理学报,2011,47(11):1103-1108.

WANG B,WANG Q Y,YIN J M,*et al.* Molecular cloning and expression analysis of an ANS homologous gene from *Solanum cardiphyllum* [J]. Plant Physiology Journal,2011,47(11):1103-1108. (in Chinese)

[34] SARMA A D,SREELAKSHMI Y,SHARMA R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation [J]. Phytochemistry,1997,45(4):671-674.

[35] 吴少华,张大生.花青素生成相关基因 DFR 的研究进展 [J].福建林学院学报,2002,22(2):189-192.

WU S H,ZHANG D S. The research advances on dfr gene of anthocyanin biosynthesis [J]. Journal of Fujian College of Forestry,2002,22(2):189-192. (in Chinese)

[36] REDDY A M,REDDY V S,SCHEFFLER B E. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids of leading to an increased antioxidant potential [J]. Metabolic Engineering,2007,9(1):95-111.

[37] WISMAN E,HARTMANN U,SAGASSER M. Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotype [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the USA,1998(95):12432-12437.

[38] BRUGLIERA F,TAO G Q,TEMS U,*et al.* Violet/blue chrysanthemums-metabolic engineering of anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colours [J]. Plant and Cell Physiology,2013,54(10):1696-1710.

[39] NAKATSUKA T,MISHIBA K I,KUBOTA A,*et al.* Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian [J]. Journal of Plant Physiology,2010,167(3):231-237.