

孙蓉, 刘桃, 潘凯越, 等. 三角梅二氢黄酮醇-4-还原酶基因的克隆及表达特异性分析 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (1): 33–39.

SUN R, LIU T, PAN K Y, et al. Cloning and Expression of *BsDFR* in *Bougainvillea spectabilis* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (1): 33–39.

三角梅二氢黄酮醇-4-还原酶基因的克隆及表达特异性分析

孙 蓉, 刘 桃, 潘凯越, 刘 姗*, 刁 毅, 曾道萍

(攀枝花学院生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000)

摘要: 【目的】克隆分析三角梅 (*Bougainvillea spectabilis*) 二氢黄酮醇-4-还原酶 (Dihydroflavonol-4-reductase, DFR) 基因 (*BsDFR*), 探讨其在三角梅苞片呈色中的作用。【方法】基于三角梅转录组数据, 利用 PCR 技术克隆 *BsDFR* 基因, 并通过生物信息学工具分析其分子特性; 通过分子对接技术预测 *BsDFR* 底物特异性; 采用实时荧光定量 PCR 分析该基因在不同颜色三角梅中的表达量差异。【结果】三角梅 *BsDFR* 基因 (GenBank ID: ON417750) 编码区全长 987 bp, 编码 328 个氨基酸。*BsDFR* 理论相对分子质量为 36.48 kDa, 等电点 pI 为 6.33; 具有 DFR 特有的 NADPH 及底物特异结合位点, 属于 Asn 型 DFR; 不具有跨膜结构及信号肽, 定位于细胞质中; 二级结构中 α 螺旋占比最多, 三级结构预测显示为二聚体蛋白。底物对接模拟预测 *BsDFR* 对二氢山柰酚 (Dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮素 (Dihydroquercetin, DHQ) 和二氢杨梅素 (Dihydromyricetin, DHM) 3 种底物均具有催化活性, 与结构分析相吻合。进化树分析其与石竹目 (Centrospermae) 植物聚为一类。qRT-PCR 分析发现其在橙色系三角梅中含量较高, 进一步推测其主要底物为 DHK, 催化生成橙色系花青素 (天竺葵素) 的前体物质——无色天竺葵素苷元。【结论】*BsDFR* 基因是一个典型的植物二氢黄酮醇-4-还原酶基因, 主要与橙色系三角梅苞片色素合成有关。

关键词: 三角梅; *BsDFR* 基因; 生物信息学; 表达量分析

中图分类号: Q781; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 01-0033-07

Cloning and Expression of *BsDFR* in *Bougainvillea spectabilis*

SUN Rong, LIU Tao, PAN Kaiyue, LIU Shan*, DIAO Yi, ZENG Daoping

(College of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

Abstract: 【Objective】The dihydroflavonol-4-reductase (DFR) gene in bracts of *Bougainvillea spectabilis* was cloned and characterized to study the role it plays in color formation. 【Method】*BsDFR* was cloned based on the transcriptome data on the ornamental plant to study the related bioinformatics. Molecular docking technology was employed to predict the substrate specificity, and qRT-PCR applied to examine the relative transcription levels of the genes in *B. spectabilis* of different colors.

【Result】The full-length coding sequence of *BsDFR* (GenBank ID: ON417750) was 987 bp encoding 328 amino acids. The protein had a calculated molecular weight of 36.49 kDa and an isoelectric point of 6.33. It had the NADPH and substrate specific binding sites unique to DFR of Asn type without a transmembrane structure or signal peptide. The subcellular localization of the protein indicated it to be cytoplasmic. Alpha helices were the most abundant secondary structure of the protein, while the tertiary structure was a dimer. A substrate docking simulation, consistent with the structural analysis, predicted *BsDFR* to possess a catalytic activity on dihydrokaempferol, dihydroquercetin, and dihydromyricetin. The phylogenetic tree analysis grouped it along with caryophyllales plants. High expression of the gene was found in the orange *B. spectabilis* by qRT-PCR. It was speculated that the main substrate to be DHK, which was catalyzed by *BsDFR* into leucopelargonidin, a precursor of orange-colored anthocyanidin—pelargonidin. 【Conclusion】*BsDFR* in *B. spectabilis* had typical molecular characteristics of the plant dihydroflavonol-4-reductase, which is associated with the pigment synthesis in the bracts of orange *B. spectabilis*.

Key words: *Bougainvillea spectabilis* Willd; dihydroflavonol-4-reductase gene; bioinformatics; expression analysis

收稿日期: 2023-09-26 修回日期: 2023-11-10

作者简介: 孙蓉 (1987—), 女, 博士, 讲师, 主要从事干热河谷特色植物资源的开发利用研究, E-mail: sunrong@pzhu.edu.cn

* 通信作者: 刘姗 (1980—), 女, 博士, 教授, 主要从事植物次生代谢相关研究, E-mail: liushan@pzhu.edu.cn

基金项目: 四川省自然科学基金面上项目 (2023NSFSC0145); 大学生创新创业训练计划项目 (S202311360061)

0 引言

【研究意义】三角梅 (*Bougainvillea spectabilis*) 学名叶子花, 又称勒杜鹃、九重葛, 是石竹目 (Centrospermae) 紫茉莉科 (Nyctaginaceae) 叶子花属 (*Bougainvillea*) 藤类植物。三角梅茎秆粗壮, 枝条下垂, 带有弯刺, 无毛或疏生绒毛^[1]。三角梅原产于巴西, 20世纪80年代在中国广泛种植, 后由于其对各种土壤和气候条件的极大适应能力成为了世界上最具有观赏价值的花卉之一。据统计, 三角梅已成为中国22个地区的代表花卉^[2]。三角梅花期长、花色鲜艳, 观赏价值高, 因此常被用作园艺花卉。作为景观植物, 三角梅新异花色的培育是育种者的研究热点。研究表明植物的花色主要由类黄酮、类胡萝卜素和甜菜色素三类物质决定, 其中花青素呈色范围最大, 从浅黄色到红色、紫色和蓝色, 分布最广泛, 自然界绝大多数植物果实和花色是由属于类黄酮的花青苷引起的^[3]。因此克隆分析其合成途径关键酶基因对花色调控具有重要意义。

【前人研究进展】二氢黄酮醇-4-还原酶 (Dihydroflavonol-4-reductase, DFR) 是花青素合成支路的关键酶, DFR 可分别以二氢山柰酚 (Dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮素 (Dihydroquercetin, DHQ) 和二氢杨梅素 (Dihydromyricetin, DHM) 为底物, 还原产生不同的无色花青素苷元, 其底物特异性决定了最终植物花青素的种类和含量^[4,5], 使植物呈现不同的花色和果色。例如将非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 中能催化 DHK 的 DFR 基因转入矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 后, 使浅红色的矮牵牛转变为砖红色^[6]。Gutterson^[7] 将矮牵牛的 *F3'5'H* 和 *DFR* 基因引入无 *DFR* 基因的白色康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) 中, 成功培育出蓝紫色康乃馨。Aida^[8] 通过在蓝猪耳 (*Torenia fournieri*) 导入反义 *DFR* 基因, 使得其花更蓝。

【本研究的切入点】本课题组前期已对三角梅花青素合成上游途径关键酶 *BsCHS* 基因^[9] 和 *BsF3H* 基因^[10] 进行了克隆分析, 但对于中后期酶还未有报道, 本研究以第二分支点上的 *DFR* 基因为研究目标, 有助于解析三角梅花青素合成途径。

【拟解决的关键问题】通过转录组数据, 克隆三角梅 *BsDFR* 基因, 并通过生物信息学工具分析其分子特征, 利用分子对接模拟预测该基因的特异性底物, 结合该基因在不同颜色三角梅苞片中的表达情况, 推测该基因在三角梅苞片呈色中的作用, 为三角梅花色改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以单色单层苞片中白色的新加坡大白 (*B.*

glabra Singapore White)、红色的花叶大红 (*B. × buttiana* Brilliant Variegata)、黄色的黄蝶 (*B. × spectoglabra* Ratana Yellow)、粉红色的中国丽人 (*B. × buttiana* China Beauty)、橙色的宝老橙 (*B. × buttiana* Baolao Cheng) 及紫色的安格斯 (*B. glabra* Elizabeth Angus) (图1) 为试验材料。选择上述各三角梅一年生完全木质化、粗细长短相近的枝条扦插于沙土中, 当插条长8 cm左右、根系3条以上且根长5 cm以上时移栽至营养土中, 缓苗20 d后, 移至光时间最长的地方, 培养至盛花期用于后续试验。以安格斯嫩叶为材料进行基因克隆, 各色三角梅苞片为材料进行荧光定量PCR分析。



图1 盛花期不同品种三角梅

Fig. 1 Various *Bougainvillea* cultivars at blooming stage

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 反转录

上述样品采集后立即放入液氮中, 随后储存于-80 °C超低温冰箱。利用 RNAPrep Pure 植物总RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取叶片及苞片总RNA。分别利用FastKing cDNA第一链合成试剂盒(去基因组, 天根生化科技有限公司)和PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser

(Perfect Real Time, TaKara) 合成 cDNA 第一链, 用于基因克隆和 qRT-PCR 试验。

1.2.2 DFR 基因的克隆

根据实验室测得的三角梅叶片转录组数据 (Bioproject: PRJNA820559), 筛选 DFR 基因序列, 并设计特异引物 DFR-F 和 DFR-R (表 1)。以嫩叶 cDNA 为模板, 利用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TaKaRa) 扩增 DFR 基因, 25 μ L 反应体系中 PrimeSTAR Max 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 10.5 μ L; PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min 以充分扩增。采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (增强型, 天根生化科技有限公司) 纯化回收 PCR 产物, 并将其转交至成都有康生物技术有限公司进行测序分析。

表 1 引物信息
Table 1 Primers applied

引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
DFR	F: ATGAGTGGAGGAGAAGAGCAAG	基因克隆 Gene cloning
DFR	R: TAAACTCTCCACTGTATCCTTGA	
18S	F: CAGAACATCTAAGGGCATCACA	
18S	R: TAGTTGGTGGAGCGATTGTCT	荧光定量 Gene expression
DFRq	F: AAGGCTCTGATGTGATGTGGTATG	
DFRq	R: ACTATCGTTGAGGGTTGGTTGC	

1.2.3 序列特异性分析

利用相应在线工具及线下软件对测序获得序列的分子特征进行分析。首先利用 BLASTN/P (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 DNAMAN 软件进行多序列比对, 获得序列相似性; 再通过 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析该基因蛋白质的理化性质; 然后经过 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)、SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) SWISS-MODEL (<https://swiss-model.expasy.org/>) 和 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 等在线软件预测其结构特性; 最后采用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树, 分析其进化关系。

1.2.4 底物特异性分析

利用 Discovery Studio 2019 Client 软件 Libdock 功能对 BsDFR 和 DHK、DHQ、DHM 等 3 种底物进行

对接分析, 获得 BsDFR 的催化偏好底物。

1.2.5 荧光定量 PCR 分析

参照 TB Green[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus, TaKaRa) 试剂盒, 以不同花色三角梅盛花苞片 cDNA 为模板, 18S rRNA 为内参, DFRq 为引物 (表 1), 检测不同花色三角梅苞片中 BsDFR 基因表达量差异。25 μ L 反应体系: 12.5 μ L TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus), 上下游引物各 5 pmol, 模板 80 ng, ddH₂O 补齐。反应程序采用试剂盒推荐的两步法。反应结束后通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量, 每个样品设置 3 个生物学重复和 3 次技术重复。

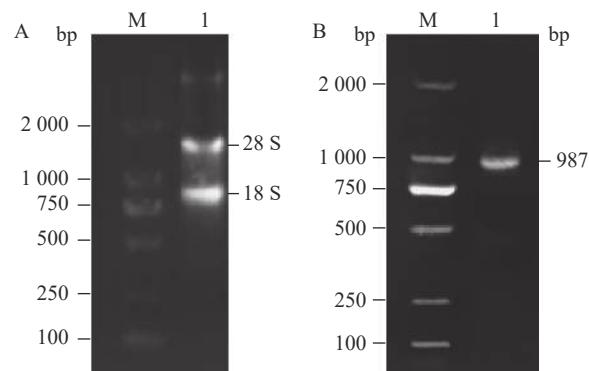
1.3 数据处理

利用 SPSS 20.0 进行显著性分析, Origin 2018 绘图。

2 结果与分析

2.1 BsDFR 基因的克隆

以三角梅转录组注释信息库的基因名称和功能注释为基础, 筛选出一条 DFR 基因序列, 通过 BLAST 比对发现此基因序列完整且与其他植株 DFR 基因同源, 利用此序列设计引物, 扩增得到一条长为 987 bp 的 cDNA 序列 (图 2), 编码 328 个氨基酸, 测序结果与预期一致, 将其命名为 BsDFR, 提交 GenBank, 登录号为 ON417750。



A 图中, M: D2000 DNA Marker; 1: RNA 样品; B 图中, M: D2000 DNA Marker; 1: 目的条带。

In Fig. A, M: D2000 DNA marker; 1: RNA sample. In Fig. B, M: D2000 DNA marker; 1: target band.

图 2 RNA 提取及 PCR 扩增

Fig. 2 Electrophoresis of RNA and PCR amplification products

2.2 BsDFR 的理化性质

采用 ProtParam 在线分析软件预测, 得到 BsDFR 编码蛋白质的理论相对分子质量为 36.48 kDa, 等电点 pI 为 6.33, 含量最多的氨基酸为亮氨酸 (Leu) 为 9.1%, 其次为缬氨酸 (Val), 为 8.2%, 含量最少的氨基酸为色氨酸 (Trp), 为 1.5%。BsDFR 中负电荷

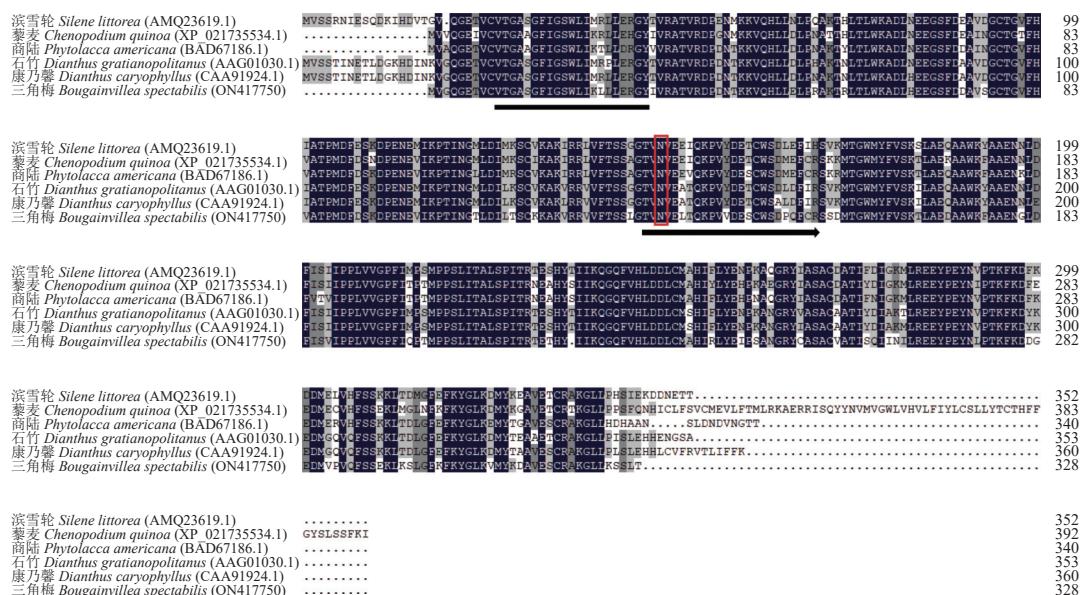
残基数为39, 正电荷残基数为37, 分子式C₁₆₃₈H₂₅₈₅N₄₂₅O₄₈₂S₁₇, 总原子数5147, 不稳定指数(II)及平均总亲水系数分别为37.51和-0.087, 表明BsDFR为稳定的亲水性蛋白。

2.3 BsDFR的结构特性分析

2.3.1 保守基序

通过BLASTp比对显示, BsDFR与其他植物中DFR蛋白相似度较高(69%~82%)。其中与中央种子目商陆(*Phytolacca americana*)的相似性最高。功

能域预测表明BsDFR属于NADPH依赖性短链还原酶家族, 具有多个NADP(H)结合位点。与同目植物多序列比对结果(图3)也证明BsDFR在N端存在2个DFR所特有的高度保守基序, 即NADPH结合区域和底物特异性结合区域。根据DFR分类规律^[11], 当DFR134位(对应于非洲菊DFR的氨基酸序列)是天冬酰胺(N)时, 其为Asn型。因此推测BsDFR为Asn型(图3), 对DHK、DHQ和DHM均具有催化能力。



下划线: NADPH结合区域; 箭头线: 底物特异性结合区域; 红色方框: 134位天冬酰胺。

Under lined is NADPH binding site; arrow lined, substrate specificity site; red boxed, Asn134.

图3 BsDFR与其他植物DFR多序列比对

Fig. 3 DFR amino acid sequences of *B. spectabilis* and other plants

2.3.2 跨膜结构及信号肽

通过ProtComp 9.0在线系统预测显示BsDFR在细胞质中的评分为8.3分, 推测其定位于细胞质中。而跨膜结构及信号肽的预测结果也与此相符, BsDFR不具有跨膜结构和信号肽序列, 属于非分泌型蛋白。

2.3.3 二级结构

利用SOPMA对BsDFR的二级结构进行分析, 如图4所示, BsDFR中有135个氨基酸参与形成 α 螺旋(41.16%), 113个氨基酸参与形成无规则卷曲的

形成(34.45%), 51个氨基酸参与形成延伸链(15.55), 最后29个氨基酸与 β 转角(8.84%)有关。InterProScan检索功能结构域显示BsDFR属于NAD(P)结合结构域超家族(IPR036291)中的NAD依赖性差向异构酶/脱水酶(IPR001509), 与BLASTp比对结果及多序列比对结果相吻合。

2.4 BsDFR的底物特异性分析

通过同源建模的方法在SWISS-MODEL系统选择相似性较高的葡萄(*Vitis vinifera*)中的3bxx.1.A二氢黄酮醇-4-还原酶晶体结构为模板, 构建BsDFR

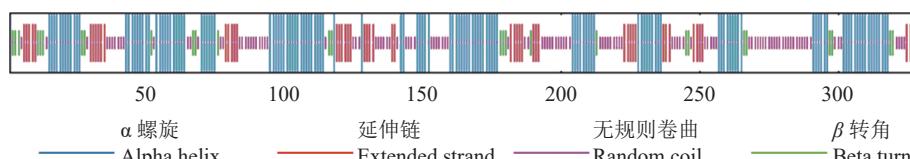
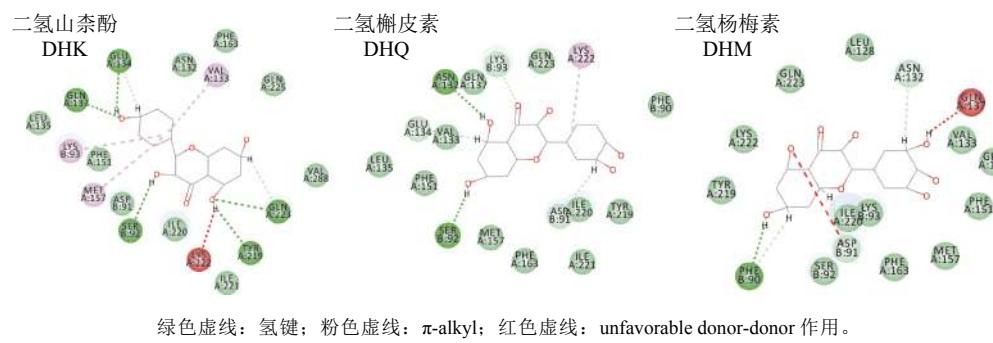


图4 BsDFR二级结构预测

Fig. 4 Predicted secondary structure of BsDFR

三级结构, 结果显示 BsDFR 为二聚体蛋白 (图 5), 二级结构中 α 螺旋含量较高, 与二级结构预测结果一致。通过 Discovery Studio 2019 Client 模拟 BsDFR 与 3 种底物的结合情况, 根据图 6 可知, BsDFR-DHK 模型中 SerB92、GluA134、GlnA137、TyrA219、GlnA223 与底物形成氢键; BsDFR-DHQ 模型中 SerB92、AsnA132 与底物形成氢键; BsDFR-DHM 模型中 PheB90 与底物形成氢键。综上, BsDFR 与 3 种底物均具有结合能力, 而与 DHK 结合更紧密, 因此推测 BsDFR 底物特异性更偏爱于 DHK。



2.5 BsDFR 的系统进化关系分析

根据已公布的高等植物 DFR 序列, 以单子叶植物白苇兰 (*Bromheadia finlaysoniana*) 的 DFR 序列为外类群, 从 NCBI 下载石竹目 (Caryophyllales) 石竹科 (Caryophyllaceae)、商陆科 (Phytolaccaceae)、苋科 (Amaranthaceae)、蓼科 (Polygonaceae)、豆目 (Fabales) 豆科 (Fabaceae)、葡萄目 (Vitales) 葡

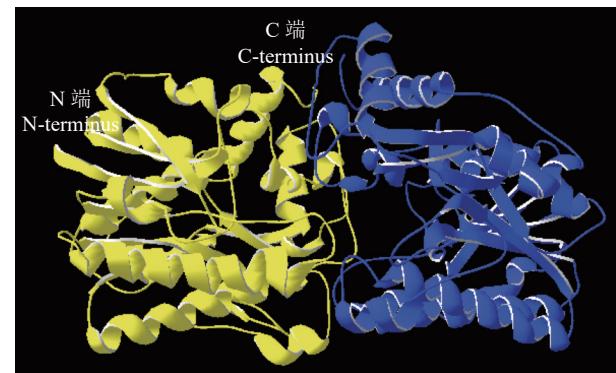


图 5 BsDFR 蛋白的三级结构

Fig. 5 Tertiary structure of BsDFR

萄科 (Vitaceae) 以及蔷薇目 (Rosales) 蔷薇科 (Rosaceae) 植物的 DFR 序列与推导的三角梅 BsDFR 构建系统进化树, 结果显示 (图 7) 石竹目植物聚为一类, 蔷薇目植物聚为一类, BsDFR 归类于石竹目, 其中与商陆亲缘关系较近, 总的来说符合系统进化规律。

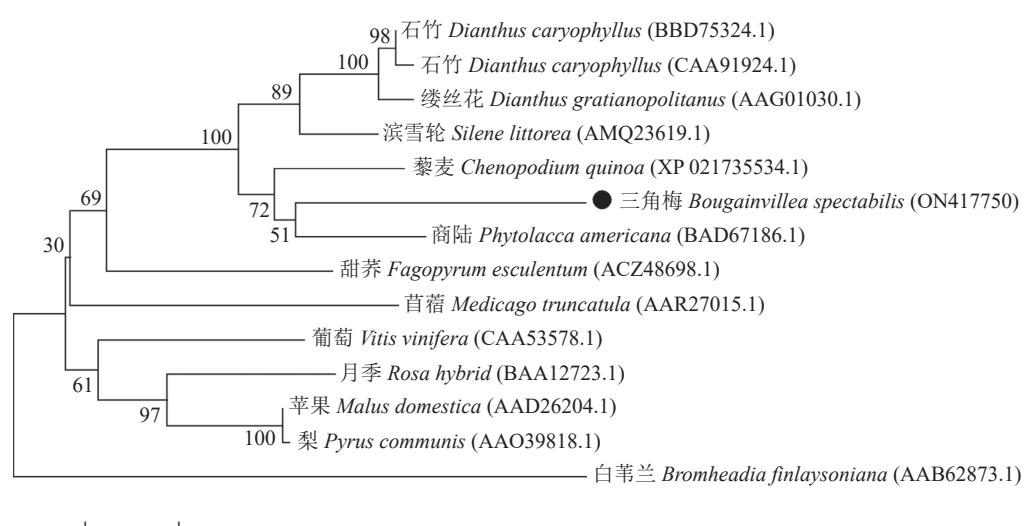
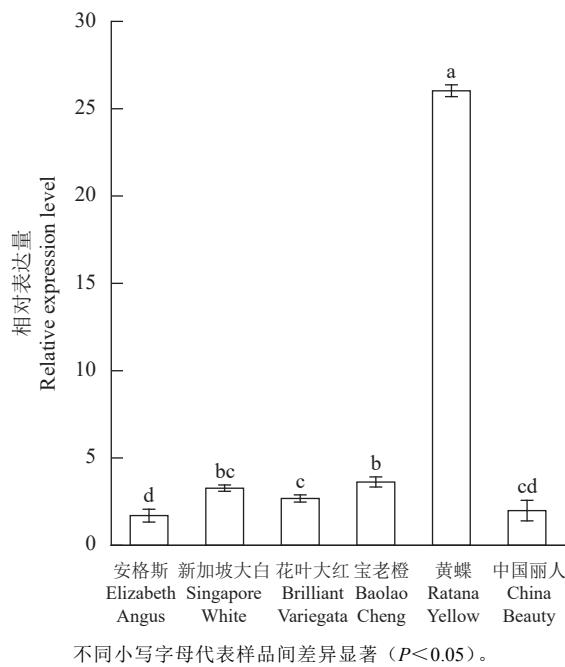


图 7 BsDFR 与其余植物 DFR 同源蛋白系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic relationships between BsDFR and DFRs from other plants

2.6 BsDFR 在不同花色三角梅苞片中的表达情况

由图8可知, *BsDFR* 基因在黄色三角梅中表达量远远高于其他颜色, 是紫色三角梅的15.3倍。总的来说, *BsDFR* 基因在不同颜色三角梅中表达量从高到低依次为黄色的黄蝶>橙色的宝老橙>白色的中国丽人>紫色的安格斯。结合分子对接的推测结果, 表明 *BsDFR* 主要作用底物为二氢山柰酚, 催化形成橙色系花青素——天竺葵素前体物质, 无色天竺葵素苷元。



不同小写字母代表样品间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences between samples ($P<0.05$).

图8 *BsDFR* 在不同颜色三角梅盛花期苞片中的表达量差异
Fig. 8 *BsDFR* expressions in *B. spectabilis* of different colors at blooming stage

3 讨论

3.1 三角梅中的花色素

三角梅属于石竹目紫茉莉科植物, 该目植物的花色主要由甜菜色素含量及种类决定。Stafford^[12]曾认为甜菜色素和花青素是不能在同一植物中共存的, 直到2006年Grotewold^[3]发现积累甜菜色素的植物也可以合成黄酮、黄酮类化合物, 甚至原花青素, 而缺乏一些重要的关键酶可能是它们不能合成花青素的原因。本课题组也在前期研究中发现三角梅具有花青素合成上游途径关键酶 *BsCHS* 基因^[9] 和 *BsF3H* 基因^[10], 且与花色有一定的相关性。结合本研究结果表明, 三角梅具有合成花青素的能力。

3.2 DFR 在植物花色中的作用

DFR 处于花青素苷代谢的第二个分支点上, 其与黄酮醇合成酶 (Flavonol synthase, FLS) 竞争决定

花青素苷和黄酮醇的生成^[13-15]。而其底物特异性影响着植物最终的花色表现, 由其催化生成的无色矢车菊素苷元、无色天竺葵素苷元和无色飞燕草素苷元分别是红色系矢车菊素、橙色系天竺葵素和蓝色系飞燕草素的前体物质。由于不同植物中 DFR 对底物的特异性选择, 导致自然界中一些植物缺少某些色系的花色, 例如大花蕙兰 (*Cymbidium hybrida*) 无橙色花^[16], 玫瑰 (*Rosa hybrida*) 缺少蓝紫色花^[6]等。

本课题组前期研究结果表明三角梅颜色由花青素、甜菜色素和类胡萝卜素3种色素决定, 不同的比例, 使其呈现不同的颜色^[17]。结合荧光定量结果显示黄蝶中 *BsDFR* 基因表达量高于宝老橙, 是由于黄蝶中黄酮含量 (花青素类) 相对宝老橙高, 宝老橙颜色主要由甜菜黄素和类胡萝卜素决定, 因此 *BsDFR* 基因表达量相对低; 而白色三角梅中花青素含量是6个品种中最高的, *BsDFR* 基因表达量也较高; 花叶大红、中国丽人中黄酮含量同样较高, 然而与其颜色相关的花青素为红色系的矢车菊素; 安格斯中黄酮含量最低, 其花色主要由甜菜红素和类胡萝卜素决定, *BsDFR* 基因表达量也最低。研究结果进一步说明 *BsDFR* 可能主要催化底物为 DHK, 使其在橙色系特别是黄色三角梅中表达量较高, 证明了其催化偏爱性与植物花色的关系。

3.3 DFR 基因的特征

Johnson 等^[18]的研究结果表明 DFR 第134位氨基酸残基的类型是其分类的依据, 当DFR134位为天冬酰胺 (Asn, N) 时为1类, Asn型; DFR134位为天冬氨酸 (Asp, D) 时为2类, Asp型; DFR134位既不是Asn也不是Asp时为3类, 非Asn/Asp型; 它们的主要差异在于能否以DHK为底物。本研究通过多序列比对发现 *BsDFR* 属于1类型, 而分子对接结果也表明其具有催化 DHK 的能力, 二者结果相吻合。

4 结论

本研究克隆获得的 *BsDFR* 基因符合植物 DFR 基因特征, 预测对3种底物 DHK、DHQ 和 DHM 均具有催化活性, 其中与 DHK 结合最为紧密, 与橙色系色素合成相关, 在三角梅花色改良研究中有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] 徐夙侠, 王亮生, 舒庆艳, 等. 三角梅属植物的生物学研究进展 [J]. 植物学通报, 2008, 43 (4): 483-490.
- [2] XU S X, WANG L S, SHU Q Y, et al. Progress of study of the biology of the resource plant *Bougainvillea* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*,

- 2008, 43 (4) : 483–490. (in Chinese)
- [2] 常圣鑫, 杨光穗, 陈金花, 等. 世界三角梅产业发展历史及趋势 [J]. 热带农业科学, 2018, 38 (1) : 71–77.
- CHANG S X, YANG G S, CHEN J H, et al. Development history and tendency of *Bougainvillea* industry all over the world [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2018, 38 (1) : 71–77. (in Chinese)
- [3] GROTEWOLD E. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 761–780.
- [4] HELLER W, FORKMAN G, BRITSCH L, et al. Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3, 4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis [J]. *Planta*, 1985, 165 (2) : 284–287.
- [5] MARTENS S, TEERI T, FORKMAN G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants [J]. *FEBS Letters*, 2002, 531 (3) : 453–458.
- [6] TANAKA Y, BRUGLIERA F, CHANDLER S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10 (12) : 5350–5369.
- [7] GUTTERSON N. Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression [J]. *HortScience*, 1995, 30 (5) : 964–966.
- [8] AIDA R, YOSHIDA K, KONDO T, et al. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene [J]. *Plant Science*, 2000, 160 (1) : 49–56.
- [9] 孙蓉, 刘姗, 高静雷, 等. 三角梅CHS基因的克隆及表达分析 [J]. *西北农业学报*, 2021, 30 (10) : 1565–1572.
- SUN R, LIU S, GAO J L, et al. Cloning and expression analysis of *CHS* gene from *Bougainvillea spectabilis* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2021, 30 (10) : 1565–1572. (in Chinese)
- [10] 孙蓉, 刘姗, 高静雷. 三角梅黄烷酮3-羟化酶基因的克隆及表达分析 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38 (11) : 122–128.
- SUN R, LIU S, GAO J L. Cloning and expression analysis of flavanone 3-hydroxylase gene from *Bougainvillea spectabilis* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38 (11) : 122–128. (in Chinese)
- [11] 于婷婷, 倪秀珍, 高立宏, 等. 高等植物二氢黄酮醇-4-还原酶基因研究进展 [J]. *植物研究*, 2018, 38 (4) : 632–640.
- YU T T, NI X Z, GAO L H, et al. Advances in study of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) genes of higher plants [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, 38 (4) : 632–640. (in Chinese)
- [12] STAFFORD H A. Anthocyanins and betalains: Evolution of the mutually exclusive pathways [J]. *Plant Science*, 1994, 101 (2) : 91–98.
- [13] 胡可, 孟丽, 韩科厅, 等. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2009, 36 (7) : 1013–1022.
- HU K, MENG L, HAN K T, et al. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36 (7) : 1013–1022. (in Chinese)
- [14] NIELSEN K, DEROLES S C, MARKHAM K R, et al. Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus [J]. *Molecular Breeding*, 2002, 9 (4) : 217–229.
- [15] DAVIES K M, SCHWINN K E, DEROLES S C, et al. Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase [J]. *Euphytica*, 2003, 131 (3) : 259–268.
- [16] 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]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1999, 19 (1) : 81–85.
- [17] 钟晓缘, 刘姗, 孙蓉, 等. 三角梅苞叶色彩参数和色素含量分析及蓝色转基因受体的筛选 [J]. *西北植物学报*, 2022, 42 (4) : 646–655.
- ZHONG X Y, LIU S, SUN R, et al. Screening of blue transgenic receptor varieties in *Bougainvillea spectabilis* based on the analysis of color parameters and pigment content [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2022, 42 (4) : 646–655. (in Chinese)
- [18] JOHNSON E T, RYU S, YI H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2001, 25 (3) : 325–333.

(责任编辑: 张梅)