

二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*)与花色的修饰

刘娟^{1,*} 冯群芳² 张杰^{1,2}

¹ 昆明理工大学生物与化学工程学院, 昆明 650224; ² 云南大学生命科学院, 昆明 650091

Dihydroflavonol 4-Reductase Gene (*DFR*) and Flower Color Modulation

LIU Juan^{1,*}, FENG Qun-Fang², ZHANG Jie^{1,2}

¹Faculty of Biologic and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; ²College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China

摘要 二氢黄酮醇4-还原酶(*DFR*)是花色苷生化合成途径中的一个关键酶,在花色的修饰中起重要作用。目前,已从多种植物中分离到了*DFR*基因。文章介绍*DFR*同源基因的结构与时空表达特性、构建的系统进化树所体现的部分单子叶与双子叶植物间亲缘关系与进化差异以及*DFR*的转基因研究进展。

关键词 *DFR*; 花色; 转基因花卉; 基因工程

花色是衡量观赏植物的重要标准之一,改变花色一直是转基因花卉研究比较热门的问题。花色主要是由类黄酮(flavonoid)、类胡萝卜素(carotenoid)和甜菜色素(betalain)三大色素决定的。而类黄酮类色素中的花色苷(anthocyanin)是影响花色的主要色素,控制着花的粉红色、红色、紫罗兰色和蓝色。二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, *DFR*)是花色苷生化合成途径中的关键酶,是一个重要的调控点。因此,*DFR*基因调控机制的研究对于了解花色苷生化合成途径和花朵显色的分子机制有重要的意义。

1 *DFR*基因的作用机制

花色苷对花色的形成起主要作用,它在花瓣中所占的比例能决定花的最终颜色。根据羟基位置和数目,它主要分为3种类型:花葵素色素苷(pelargonidin)、花青素色素苷(cyanidin)及翠雀素色素苷(delphinidin)。花色苷的生化合成包括近二十步化学反应,由许多酶催化完成(图1)^[1,2]。

3类花色苷的合成前体都是丙二酰CoA和香豆酰CoA,二者在苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase, CHS)和苯基苯乙烯酮黄烷酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的催化下形成无色的柚配质,柚配质由F3H催化成二氢槲皮醇(dihydrokaempferol, DHK),DHK可以在F3'H和F3'5'H的催化下形成二氢槲皮黄酮(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM),F3'5'H也能

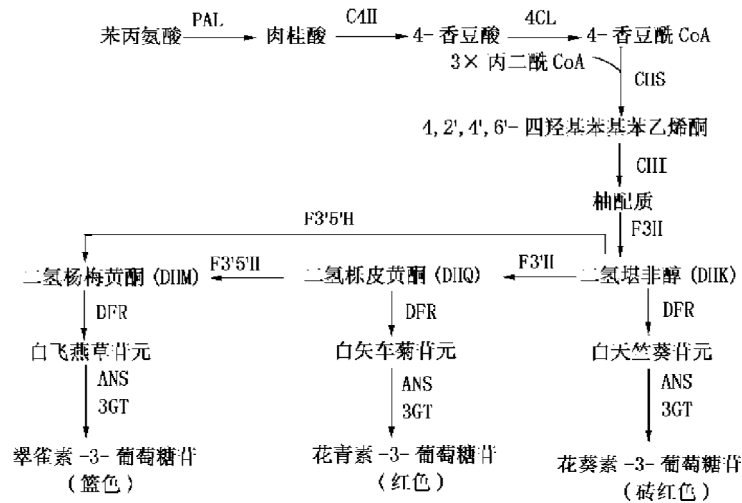
将DHQ催化成DHM。无色的DHK、DHQ和DHM在*DFR*的催化下会进一步还原成不稳定的无色花色苷(leucoanthocyanidin),然后在花色苷合成酶(anthocyanin synthase, ANS)和类黄酮3-O-糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, 3GT)的作用下合成各种花色苷。由此可见,*DFR*是将二氢黄酮醇转变为花色苷反应的第1个酶,这一反应需要NADPH。*DFR*能够分别以DHK、DHQ和DHM作为底物,但由于不同物种的*DFR*对底物选择性不同,所以合成不同的花色苷,呈现各异的花色。

2 *DFR*基因的分离与系统进化

*DFR*是一个短链还原酶,属于*DFR*超家族^[3]。1985年,O'Reilly等^[4]采用转座子标签技术从玉米和金鱼草中分离了*DFR*基因。1989年,Beld等^[5]又以金鱼草*DFR*基因为探针分离了矮牵牛*DFR*基因。随后,采用同源克隆的方法,在拟南芥、非洲菊、玫瑰、康乃馨、百合等大约10多种植物中分离了*DFR*基因(表1)。2001年,Østergaard等^[6]发现,定位于拟南芥2号染色体上的*CRL1*和*CRL2*基因编码的蛋白与*DFR*超家族的成员是高度同源的。根据系统发生的分析,*CRL1*和*CRL2*属于*DFR*超家族的一个单独的分支。

收稿 2005-06-23 修定 2005-10-17

*E-mail: juan1202@126.com, Tel: 0871-5186440

图1 花色素苷生物合成途径^[1,2]

PAL: 苯丙氨酸脱氨酶; C4H: 肉桂酸羧化酶; 4CL: 4-香豆酰CoA连接酶; CHS: 苯基苯乙酮合成酶; CHI: 苯基苯乙酮黄烷酮异构酶; F3H: 黄酮3-羟基化酶; F3'H: 类黄酮3'-羟基化酶; F3''H: 类黄酮3''-羟基化酶; ANS: 花色素苷合成酶; DFR: 二氢黄酮醇4-还原酶; 3GT: 类黄酮3-O-糖基转移酶。

表1 GenBank 部分已登录的 DFR同源基因

物种	序列长度 (氨基酸数目)	登录号
兰花 (<i>Bromheadia finlaysoniana</i> L.)	350	AF007096
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i> L.)	337	X75964
大麦 (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	354	S69616
玉米 (<i>Zea mays</i> L.)	367	X05068
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	384	M86359
矮牵牛 (<i>Petunia hybrida</i> V.)	380	X15537
非洲菊 (<i>Gerbera hybrida</i> H.)	366	Z17221
杂种月季 (<i>Rosa hybrida</i> H.)	349	D85102
翠菊 (<i>Callistephus chinensis</i> L.)	364	Z67981
金鱼草 (<i>Antirrhinum majus</i> L.)	446	X15536
番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i> M.)	379	Z18277
康乃馨 (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	360	Z67983
百合 (<i>Lilium hybrid</i> S.)	377	AB058641
裂叶牵牛 (<i>Ipomoea nil</i> L.)	403	AB006792

根据 DFR 氨基酸序列的同源性构建了部分物种的系统进化树(图2)。从图2中看出, 同属单子叶植物的大麦、玉米和兰花的 DFR 序列同源性达到 51.8%, 与双子叶植物在 48.4% 聚为一组, 单子叶植物之间 DFR 氨基酸序列的相互同源性高于与双子叶植物之间的同源性。系统进化树体现了 DFR 在单子叶与双子叶植物之间的明显区别, 因此有人认为, DFR 的趋异很可能发生在单子叶

与双子叶植物的趋异之后^[7]。

3 DFR同源基因的结构

不同物种的 DFR 氨基酸序列在很多区域有较高的同源性。在不同的物种中, DFR 与 NADP 结合位点“VTGAAGFIGSWLIMRLLERGY”是高度保守区^[8]。DFR 对不同底物的结合是由其分子中底物结合区的氨基酸序列(图3中黑框部分)所决定, 这个序列在不同物种中也是高度保守的^[9]。Johnson等^[10]发现, 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, 大多数物种在134位含有D(天冬氨酸)或N(天冬酰胺), 而蔓越橘(*Vaccinium macrocarpon* A.)在此位点则是V(缬氨酸), 因而其 DFR 酶作用底物仅限于 DHQ。在除矮牵牛外的所有以 DHK 为底物的双子叶植物中, 145位的E(谷氨酸)都是高度保守的(图3)。

根据 GenBank 上登录的资料, 裂叶牵牛(*I. nil*)与圆叶牵牛(*I. purpurea*)基因组序列都包含3个 DFR 基因: DFR-A、DFR-B 与 DFR-C, 它们呈串联排列, 并且都是由6个外显子组成, 具有相同的内含子剪切位点, DFR-B 基因比 DFR-A、DFR-C 有更长的内含子序列^[11]。此外, 双子叶植物如金鱼草、矮牵牛与拟南芥的 DFR 基因同样也是由6个外显子组成, 内含子剪切位点与牵牛花

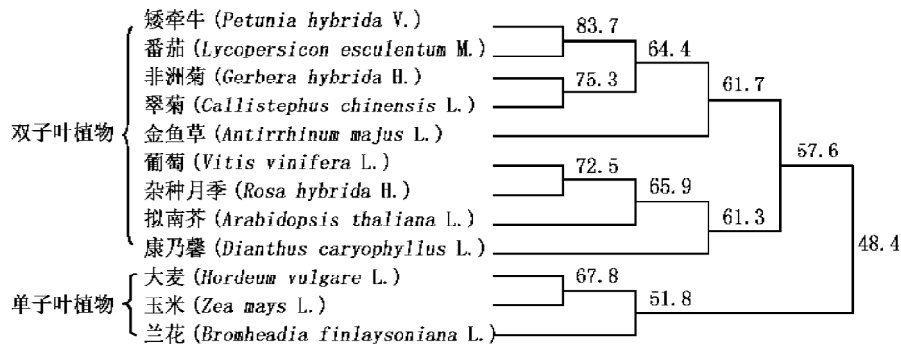


图2 不同物种DFR氨基酸序列同源性比较树系^[7]

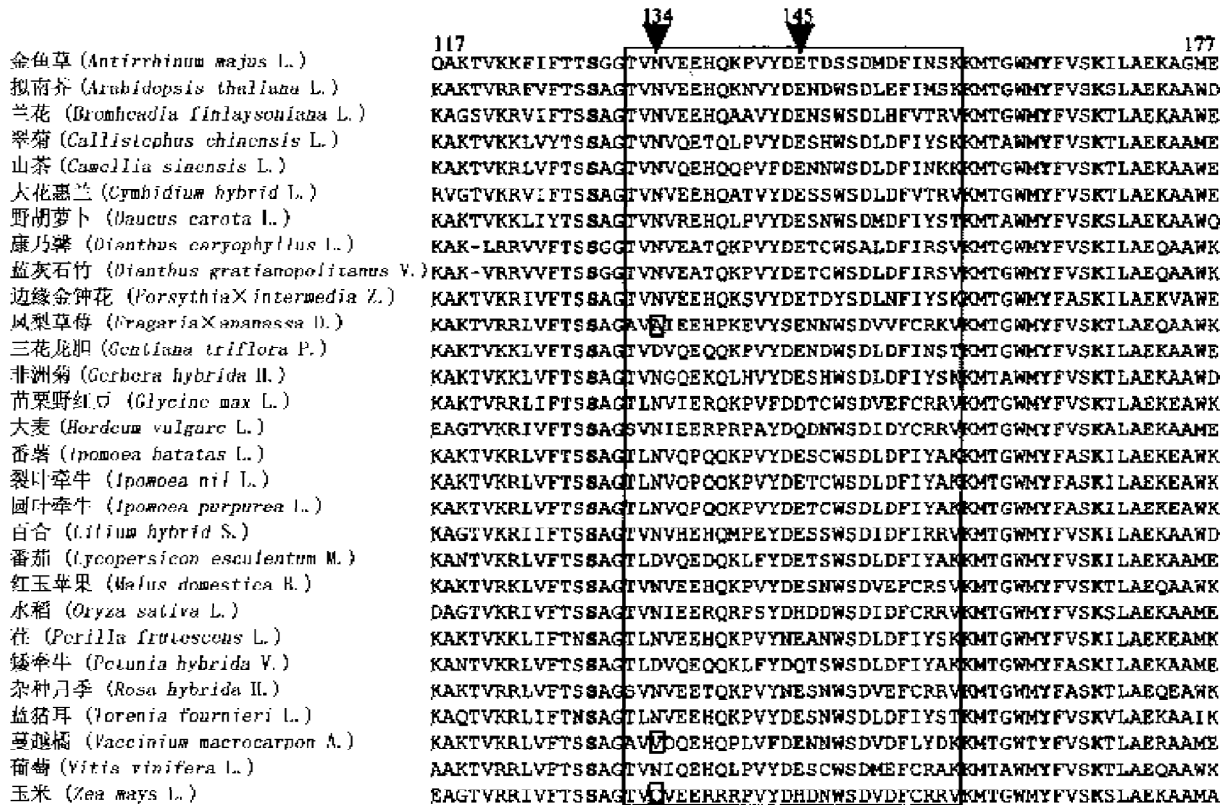


图3 DFR高度保守氨基酸序列比对分析^[9]

的是一致的。高粱基因组中含有2个DFR基因，也是呈串联排列^[11]。矮牵牛基因组中含有3个DFR基因，分别定位在2、4、6号染色体上^[12]。蔓越橘的基因组含有2个DFR基因(DFR1-1、DFR2-1)，代表两个不同的座位，在编码的氨基酸序列中，24个氨基酸有差异^[9]。由此可以看出，不同种属的DFR氨基酸序列或核苷酸序列存在一定的异同，分析DFR同源基因的结构对研究种属和种间差异很重要。

4 DFR基因的时空表达特性

不同物种的DFR基因在不同发育期与不同部位的时空表达特性也有所不同。矮牵牛的DFR-A基因在花冠、花药及种子中表达量很高，在胚珠与茎中的表达量相对较少^[12]。Inagaki等^[13,14]发现裂叶牵牛突变株的DFR-B(J)基因中含有转座因子Tpn1，此因子从DFR-B中去除后会引引起体细胞突变，因而含有Tpn1的DFR-B(J)基因会造成花色的多样性，DFR-B(J)的mRNA在幼小的花蕾中大

量累积。亚洲百合的2个植株“Montreux”(粉红色被片带有斑点)与“Connecticut King”(黄色被片无斑点)中,前者的*DFR*基因在着色的被片、花药、花丝、雌蕊和红色的鳞片大量表达,后者仅在着色的花药与红色的鳞片表达,在两个植株的未着色的叶子、茎与白色的鳞片都没有检测到*DFR*基因的表达。在“Montreux”中,*DFR*与*CHS*的表达量随着花的生长发育而增加,开花期间达到最高。可见,*DFR*基因仅在花色素苷着色的器官中表达,并且此种基因的表达与花色素苷的产生相协调^[15]。这些研究结果表明,*DFR*基因表达伴随着花瓣组织着色的进行,它的时空表达特性基本上与花朵的着色模式相一致。研究显示,不同物种的*DFR*基因表达特性对该基因的转基因遗传操作是很重要的。

5 *DFR*的转基因

对与花色相关的*DFR*基因来讲,其转基因研究不仅能了解其功能,而且有助于用各种方法(调入新基因、反义RNA、共抑制或RNAi等)实现花色的修饰,这对于日趋发展的花卉产业来说商业价值很大。1987年,Meyer等^[16]将玉米*DFR*基因导入矮牵牛RC01突变体后,使二氢槲皮醇还原,从而提供了天竺葵色素生物合成的中间产物,花色由白色变为淡砖红色。这是世界上第1例基因工程改变矮牵牛花色的实验。2000年,Aida等^[17,18]分别将反义*DFR*和*CHS*导入蓝猪耳中,结果转基因株系的花冠花色素苷含量均有不同程度的减少,产生多种新花色图案,转反义*DFR*基因株系冠檐中的花色素苷含量减少程度比冠筒的大。但由于转化株中的*DFR*基因钝化,造成大量黄酮和黄酮醇物质积累,于是蓝猪耳的花色显得更蓝。早在1990年, Van der Krol等^[19]就已将外源的*DFR*或*CHS*基因转入矮牵牛中,结果它们的表达量不仅没有增加,反而有所下降,形成白色花或彩色花瓣。2000年,Aida等^[18]又将*DFR*和*CHS*导入蓝猪耳,结果内源基因的转录受抑,转基因株系的花筒中花色素苷减少程度大于冠檐,花筒几乎完全呈现白色。可见,蓝猪耳的花色通用反义RNA和共抑制的方法已被成功修饰。2004年,Fukusaki等^[20]报道了一种有效修饰花色的新

方法——RNA干扰(RNAi),此法也可改变蓝猪耳的花色。他们用*CHS* mRNA的编码区或3'非翻译区作为RNAi的靶点,可完全或特异地诱导基因沉默,最终花色由蓝色变为白色或淡色。由此可以联想到,采用RNAi技术和通过*DFR*基因的负调控来改变花色应该也是可行的。

6 结束语

自1987年人们用基因工程技术改变花色以来,先后已分离克隆了许多与花色相关的基因,并在多种植物中成功地进行了花色基因工程技术操作,但至今仍然很难随心所欲地进行花色修饰。其原因是:花色素形成途径是一个非常复杂的代谢过程,受多种元件和因子调控。目前,三大类色素研究中,以类黄酮较多,而对类胡萝卜素与甜菜色素着色机制的了解甚少,尤其是代谢途径中各种酶在各物种体内的竞争机制以及与中间产物相互作用的研究仍然是花卉基因工程育种中需要解决的问题。另外,由于转基因在植物细胞内的多种表现(如激活、沉默等)很难控制,所以,插入基因的稳定性及其是否稳定遗传也是花卉基因育种走向商业化过程中应注意的问题。

近年来,花色基因工程的研究日益加快,已发现了一些影响花色的新基因与修饰花色的新方法,育种工作者为人们展示了五彩缤纷的花卉世界。相信今后随着基因活性调控机制的揭示和基因工程技术的不断完善,花色基因工程将有更广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39: 1119~1126
- 2 Holton TA, Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 1071~1083
- 3 Martens S, Teeri T, Forkmann G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Lett*, 2002, 531: 453~458
- 4 O'Reilly C, Shepherd NS, Pereira A et al. Molecular cloning of the *al* locus in *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J*, 1985, 4: 877~882
- 5 Beld M, Martin C, Huits H et al. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol

- 4-reductase genes. *Plant Mol Biol*, 1989, 13: 491~502
- 6 Østergaard L, Lauvergeat V, Næsted H et al. Two differentially regulated *Arabidopsis* genes define a new branch of the DFR superfamily. *Plant Sci*, 2001, 160: 463~472
- 7 Liew CF, Loh CS, Goh CJ et al. The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in the orchid, *Bromheadia finlaysoniana*. *Plant Sci*, 1998, 135: 161~169
- 8 Johnson ET, Yi H, Shin B et al. *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J*, 1999, 19: 81~85
- 9 Polashock JJ, Griesbach RJ, Sullivan RF et al. Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco. *Plant Sci*, 2002, 163: 241~251
- 10 Johnson ET, Ryu S, Yi H et al. Alteration in a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J*, 2001, 25: 325~333
- 11 Inagaki Y, Hisatomi Y, Mori T et al. Genomic organization of the genes encoding dihydroflavonol 4-reductase for flower pigmentation in the Japanese and common morning glories. *Gene*, 1999, 226: 181~188
- 12 Huits HSM, Gerats AGM, Kreike MM et al. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J*, 1994, 6(3): 295~310
- 13 Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T et al. Isolation of a suppressor-mutator/enhancer-like transposable element, Tpn1, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell*, 1994, 6: 375~383
- 14 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 chimeric flowers of Japanese morning glory and their germinal transmission to their progeny. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 499~504
- 15 Nakatsuka A, Izumi Y, Yamagishi M et al. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily. *Plant Sci*, 2003, 165: 759~767
- 16 Meyer P, Heidmann I, Forkmann G et al. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, 1987, 330: 677~678
- 17 Aida R, Yoshida K, Kondo T et al. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Sci*, 2000, 160: 49~56
- 18 Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y et al. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci*, 2000, 153: 33~42
- 19 Van der Krol AR, Mur LA, Beld M et al. Flavonoid genes in petunia: Additional of a limited number of gene copies may lead to suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990, 2: 291~299
- 20 Fukusaki E, Kawasaki K, Suzuki K et al. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference. *J Biotechnol*, 2004, 111: 229~240