

七彩红竹二氢黄酮醇4-还原酶基因*IhDFR1*的克隆及表达分析

缪福俊¹, 陈剑¹, 孙浩², 王毅¹, 王晨晨³, 原晓龙¹, 杨宇明¹, 王娟^{1,*}

¹云南省林业科学院, 国家林业局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育重点实验室, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 昆明650201; ²中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳110016; ³西南林业大学林学院, 昆明650224

摘要: 二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)是植物花色苷合成途径中的关键酶, 在植物花色的形成过程中起重要作用。依据七彩红竹转录组数据设计特异引物, 采用RT-PCR技术从七彩红竹中克隆获得了一个新的DFR基因cDNA全长, 命名为*IhDFR1* (登录号为KF728205)。序列分析结果表明, *IhDFR1*基因cDNA全长945 bp, 编码314个氨基酸。生物信息学预测显示, 该基因编码的蛋白具有典型的DFR蛋白功能结构域, 存在2个特异结合位点, 属于非Asn/Asp型DFR酶, 与禾本科植物中的DFR具有较高的相似性。对不同发育时期七彩红竹的*IhDFR1*基因进行时空表达的结果显示, 只有在竹秆颜色呈现红紫色时, *IhDFR1*基因才有表达。以上结果初步显示*IhDFR1*蛋白可能作为一个重要的酶参与竹秆花色苷的代谢调控, 同时为进一步研究七彩红竹花色苷产生的分子机理和综合开发利用奠定了基础。

关键词: 七彩红竹; 花色苷; 二氢黄酮醇4-还原酶; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of Dihydroflavonol 4-Reductase Gene *IhDFR1* from *Indosasa hispida* cv. 'Rainbow'

MIAO Fu-Jun¹, CHEN Jian¹, SUN Hao², WANG Yi¹, WANG Chen-Chen³, YUAN Xiao-Long¹, YANG Yu-Ming¹, WANG Juan^{1,*}

¹Key Laboratory for Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, State Forestry Administration, Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650201, China; ²Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ³College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is a key enzyme in the anthocyanins biosynthesis pathway, and plays a critical role in flower pigmentation. The gene-specific primers were designed according to the transcriptome sequencing data, and the full-length cDNA of a novel DFR gene was cloned from *Indosasa hispida* cv. 'Rainbow' with the method of reverse transcription PCR. This novel gene was named as *IhDFR1* (GenBank accession No. KF728205). Sequence analysis indicated that *IhDFR1* was 945 bp in length and encoded a protein with 314 amino acids. Bioinformatics analysis showed that *IhDFR1* had the typical functional domains of DFR protein, containing two specific binding sites and belonging to the non-Asn/Asp DFR. The *IhDFR1* was homologous with the DFRs from the gramineous plants. The temporal-spatial expression analysis based on different growth stages indicated that the *IhDFR1* was expressed only in the reddish violet culms. The results above preliminarily suggested that the *IhDFR1* might be an important enzyme governing anthocyanin metabolism, and lay a theoretical basis for further exploration of molecular mechanism of anthocyanins and for the comprehensive exploitation and utilization of *I. hispida* cv. 'Rainbow'.

Key words: *Indosasa hispida* cv. 'Rainbow'; anthocyanins; dihydroflavonol 4-reductase; gene expression

七彩红竹为禾本科大节竹属植物, 是蒲竹仔的产花色苷变种, 主要分布于云南南部景洪、勐腊、普洱、江城等地, 海拔在1 700 m以下(王娟等2012; 徐永椿1991)。我们于2009年在云南普洱发现当地自然分布的蒲竹仔群落中偶见竹秆中下部出现不同程度的红色至红紫色, 经鉴定, 在分类上应属大节竹属的蒲竹仔变种, 具有重要的观赏价值和潜在的商业开发价值。而出现红色秆性状

的居群, 并非是种属差异导致, 而是因样本收集地环境因子诱发基因突变所致, 其诱发因子目前未知(王娟等2012)。花色苷是植物次生代谢过程

收稿 2013-11-11 修定 2014-03-24

资助 云南省基础研究重点项目(2013FA054)、云南省自然科学基金(2009CD073)、云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2010CI016)、国家林业局“948”项目(2008-4-30)。

* 通讯作者(E-mail: schima@163.com; Tel: 0871-65822842)。

中产生的一类水溶性天然食用色素,是构成花瓣、果实和茎秆颜色的主要色素之一,还具有一定的营养和药理作用(Singh等2009;卢钰等2004)。然而,在花色苷合成过程中,二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)对花色苷的最终形成起决定性作用,是一个重要的调控点(符红艳等2012; Dick等2011; 陈大志等2010)。DFR是依赖二氢槲皮醇(dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮黄酮(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM) 3种底物,分别生成无色花葵素、无色花青素和无色翠雀素,在花色苷合成酶的作用下又分别合成花葵素(橙色-砖红色)、花青素(红色-粉色)和翠雀素(蓝色-紫色)(张龙等2008)。研究表明,不同物种的DFR对底物选择性不同,合成了不同的花色苷,呈现出各异的花色,如矮牵牛(*Petunia hybrida*)的DFR缺乏还原底物DHK活性,所以其花瓣缺少橙色,而大丁草(*Gerbera anandria*) DFR能还原DHK,其花瓣就能产生橙色(潘丽晶等2010; Polashock等2002)。依据DFR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,依据第134位氨基酸残基的不同将DFR分为3类(李春雷等2009; Johnson等2001)。第一类为Asn型DFR,在绝大多数植物DFR中第134位氨基酸残基为N;第二类为Asp型DFR,其在134位上存在一个D,此类DFR不能有效地将DHK还原成无色花葵素,导致缺少橙色,如矮牵牛的花瓣;第三类是DFR的第134位氨基酸残基既不是D,也不是N,称为非Asn/Asp型。研究表明,非Asn/Asp型DFR酶的作用底物仅限于底物DHQ,合成红色的花色苷,如蔓越橘(*Vaccinium macrocarpon*)的第134位氨基酸残基为V,属非Asn/Asp型DFR,致使其花和果实为红色(刘娟等2005)。

目前,除本课题组发表了一篇在高山箭竹——

棉花竹(*Fargesia fungosa*)中发现花色苷的论文(彭桂莎等2011)外,尚无其他有关竹子产花色苷的报道。七彩红竹的发现为竹类植物中研究花色苷代谢流提供了极好的试验材料。本研究以七彩红竹为材料,采用RT-PCR方法,克隆了七彩红竹DFR基因的cDNA全长,并对其编码蛋白的结构特征及其在不同生长时期竹秆中的表达特性进行了分析,旨在为进一步研究*IhDFR1*基因功能和探讨七彩红竹红紫色秆形成的分子机制提供理论依据。

材料与方法

1 材料

七彩红竹(*Indocalamus hispidus* cv. 'Rainbow')采自云南省林业科学院温室棚,根据其竹秆颜色变化情况,分为7个不同的生长时期:第1和第2时期为幼嫩顶端时期,基本组织和表皮都不显颜色;第3时期为中间秆段,基本组织为红紫色,表皮不显色;第4时期为中间秆段,基本组织和表皮都显红紫色;第5时期为中间秆段,基本组织略带红紫色,表皮显红紫色;第6时期为成熟老秆,基本组织不显色,表皮显红紫色;第7时期为成熟老秆,基本组织和表皮都不显红紫色(图1)。分别采集7个时期的竹秆组织,经液氮速冻后于-80℃保存备用。

2 方法

2.1 cDNA克隆和基因表达

采用TRNzol Reagent试剂盒(TIANGEN公司)提取各样品中的总RNA。用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa公司)试剂盒扩增cDNA。

RT-PCR采用第4时期竹秆的RNA为模板扩增cDNA,上游引物F为:5'-ATGTGTCCGGCGCC-GGCGGCATCGGGTAAG-3',下游引物R为:5'-CTAATCCAACCTCTCCATATATTCCACTGGC-3'。

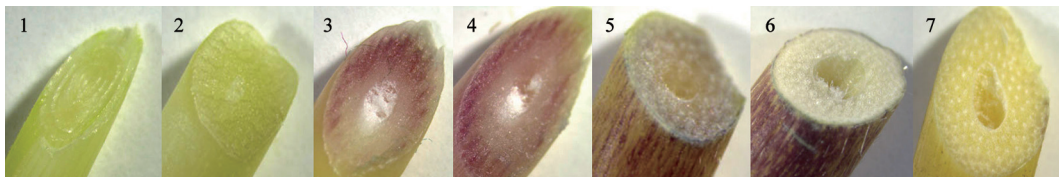


图1 七彩红竹不同生长时期的竹秆横切面图

Fig.1 The cross profile of *I. hispidus* cv. 'Rainbow' in different growth stages

数字1~7分别代表7个不同的生长时期。

反应体系为: 1 μ L cDNA、1 μ L上游引物F、1 μ L下游引物R、9.5 μ L ddH₂O、12.5 μ L PrimeSTAR Max DNA Premix (2 \times)。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s; 30个循环。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 将预期片段经DNA回收试剂盒(上海生工公司)切胶回收后, 连接载体pEASY-Blunt转入Trans1-T1感受态细胞中, 挑取阳性克隆, 用菌液PCR法(M13F、M13R引物)鉴定重组子, 确认包含重组子的克隆, 送上海生工公司用M13F、M13R引物测序。

半定量RT-PCR分别采用7个时期的RNA为模板扩增cDNA, 上游引物F为: 5'-GGGAGAGG-AGGTGAA-3', 下游引物R为: 5'-CGGGGTCTTT-GGATT-3'。Actin上游引物F为: 5'-ATGGCTGAA-GAGGATATCCAGC-3'; 下游引物R为: 5'-TYCCATGCCAATAAAAGATGGCTG-3'。反应体系为: 1 μ L cDNA、1 μ L上游引物F、1 μ L下游引物R、9.5 μ L ddH₂O、12.5 μ L PrimeSTAR Max DNA Premix (2 \times)。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s; 30个循环。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2 生物信息学分析

测序结果用DNAMAN去除载体后拼接得到*InDFR1*基因全长。使用NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中Conserved Domain Database数据库搜索*IhDFR1*蛋白的结构功能域; 理化性质的预测借助ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)在线工具完成; 利用MEGA3软件进行聚类分析; 信号肽预测由SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp/>)完成; 亚细胞定位由WoLF PSORT (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>)完成; 利用SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/swiss-model.html>)在线工具分析蛋白质的三维结构, 并用PROCHECK (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/saves/>)在线工具构建拉氏图。

实验结果

1 七彩红竹*InDFR1*基因全长cDNA的克隆

七彩红竹*InDFR1*基因扩增结果如图2-A所示, 阳性克隆检测结果如图2-B所示, 经测序*InDFR1*基因cDNA全长为945 bp, 编码一个长314个氨基酸的

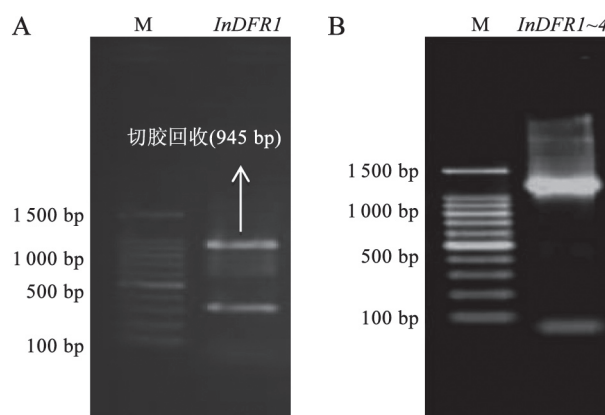


图2 *InDFR1*基因PCR扩增产物的电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis of *InDFR1* PCR amplification products

A: RT-PCR扩增产物; B: 阳性克隆扩增产物。

蛋白质, 后续的生物信息学预测分析表明, 克隆的cDNA序列编码DFR蛋白, 因此将该基因命名为*InDFR1*, GenBank登录号为KF728205。

2 *IhDFR1*蛋白生物信息学分析

2.1 *IhDFR1*基因序列和蛋白结构域预测分析

*IhDFR1*基因cDNA全长及推测的氨基酸序列见图3。蛋白结构功能域的预测分析表明, *IhDFR1*蛋白有1个典型的NADB-Rossmann超家族(superfamily)保守结构域, 存在2个结合位点(图3): 一个是NADP特异性结合位点(VMDASGPLGHALVDRLLRRGY), 而该位点是NADP依赖型DFR关键酶的特征性结构域, 在已知的DFR氨基酸序列中均有发现; 另一个是底物特异性结合位点(TMEREVVFTSSVTAVVWKENHKLVDFAF), 属于短链的脱氢酶及还原酶(SDR)家族(图4)。DFR对不同底物的结合由其分子中底物结合区的氨基酸序列所决定, 这个序列在不同物种中也是高度保守的。*IhDFR1*基因编码的蛋白中第134位氨基酸残基为R, 属于非Asn/Asp型DFR酶。

2.2 *IhDFR1*蛋白质的理化性质预测

利用ProtParam在线软件预测*IhDFR1*蛋白的理化性质, 结果表明其分子式为C₁₅₀₅H₂₃₄₉N₄₁₃O₄₆₂S₂₁, 相对分子量34 293.9 Da, 等电点5.35 (酸性蛋白), 脂肪系数78.66, 半衰期30 h, 不稳定参数31.25。根据不稳定参数值在40以下才是稳定蛋白的标准(薛庆中2010), *IhDFR1*蛋白是一种较稳定的蛋白

```

1 ATGTGTCCGGCCGGCCGGCATCAGGTAAGAGCGTGTGCGTCATGGACGCCTCCGGCCCGTGGGCCACGCCCTC
1 M C P A P A A S G K S V C V M D A S G P L G H A L
76 GTCGACCCGGTCTCCGCGGGCTACACCGTCCACGCCACCTACACCCACCACGCAGACCAAGACGACCAA
76 V D R L L R R G Y T V H A A T Y T H H A D Q D D Q
26 GACTCCGAGTCGCTGCTGAGGCAGCTGTCTCGTGTGAGCGGCGACAAACAGCAGCGGCTCAAGGTGTCCAG
151 D S E S L L R Q L S S S C S G D K Q Q R L K V F Q
51 GCCGACCCCTTCGACTACCACACCATCGCGGGCCGCTCCGCGGCTGCTCCGGCCCTTCTGCATGTTGACGACG
226 A D P F D Y H T I A G A V R G C S G L F C M F S T
76 CCCCACGACCAGGCCACCTGCGACGAGGCGATGGCTGAGATGGAGGTGCGCGCGGCGCACAAACGTGCTGGAGGCG
301 P H D Q A T C D E A M A E M E V R A A H N V L E A
101 TGCCGCGACGAGACCATGGAGAGGGTCTGCTTTCACCTCCTCCGTCACCGCCGTCGCTGGAAGGAGAACCAC
376 C A Q T E T M E R V V F T S S V T A V V W K E N H
126 AAGCTCGTCGACGCCTTCGACGAGAAGAACTGGAGCGAGCTCAGCTTCTGCAGGAAATTCAGCTGTGGCATGTG
451 K L V D A F D E K N W S E L S F C R K F K L W H A
151 CTGGCCAAGACTGTTCGAGAGAAGACGGCCTGGGCGTTGGCCATGGACAGAGGAGTGGACATGGTGGCCATCAAC
526 L A K T L S E K T A W A L A M D R G V D M V A I N
176 GCCGGCTGCTACCGGGCCGGGGCTACCGCCGCCACCCCTACCTCAAGGGAGCCCGACATGTCAGGAGAC
601 A G L L T G P G L T A A H P Y L K G A P D M Y E D
201 GGCGTCTCTGTCACCGTCGACGTCGACTTCTCGCCGACGCCACGTGGCCGTCTACGAGTCCCCACGGCGTAC
676 G V L V T V D V D F L A D A H V A V Y E S P T A Y
226 GGCCGCTACCTCTGCTCAACAATGCCGTGTGCGGGCCGAGGATGCAGTGAAGCTGGCCAGATGCTCTCCCA
751 G R Y L C F N N A V C G P E D A V K L A Q M L S P
251 TCCGCTCCGCGCTCCCAACAGTGTGAGCTGAGCTGATCCACAGAGGATTCCAGACAAGAAGTGAACAA
826 S A P R S P P S D E L K V I P Q R I Q D K K L N K
276 CTCATGGTGGAGTTGCCAGTGAATATATGGAGAGTTGGATTAG
901 L M V E F A S G I Y G E L D *
301

```

图3 *IhDFR1*基因cDNA全长及推测的氨基酸序列

Fig.3 Complete cDNA and deduced amino acid sequences of *IhDFR1*

下划线表示NADP结合位点; 双下划线表示底物结合特异性位点。

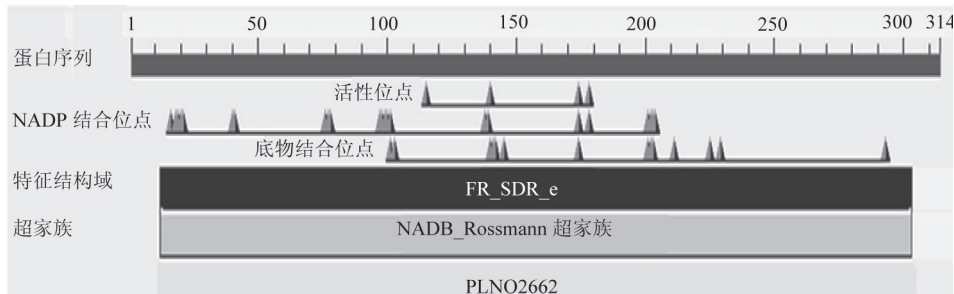


图4 *IhDFR1*蛋白保守结构域的预测分析

Fig.4 The analysis of conserved domain prediction of *IhDFR1* protein

质。SignalP软件分析结果表明,该蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白,可能在细胞质中合成,不进行蛋白转运。进而采用WoLF PSORT软件进行亚细胞定位,结果显示*IhDFR1*蛋白在细胞质中合成。

2.3 *IhDFR1*蛋白质三维结构预测

利用SWISS-MODEL在线软件预测*IhDFR1*蛋白质的三级结构,并用PyMOL软件对建模结果进行处理,结果显示,三级结构的构象呈现致密球状结构(图5-A)。另外,利用PROCHECK在线软件分析同源建模结果,可见该蛋白质残基的二面角位于黄色核心区域(图5-B),表明其空间结构稳定,建模结果可靠。

2.4 *IhDFR1*基因编码氨基酸的同源比对分析

将*IhDFR1*基因编码的氨基酸在NCBI数据库中Blastp后,选取二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、玉米(*Zea mays*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、粗山羊草(*Aegilops tauschii*)、大豆(*Glycine max*)、乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) 7个物种构建聚类树(图6)可见,在相似性为54%水平上分为两大类,其中*IhDFR1*基因编码的氨基酸序列与玉米、粗山羊草、二穗短柄草、乌拉尔图小麦等单子叶禾本科植物DFR的氨基酸序列亲缘关系最近,属Asn型DFR,与二穗短柄草DFR相似性高达82%,与大豆、蒺藜苜蓿、葡萄等亲缘关系较远,相似性为68%。

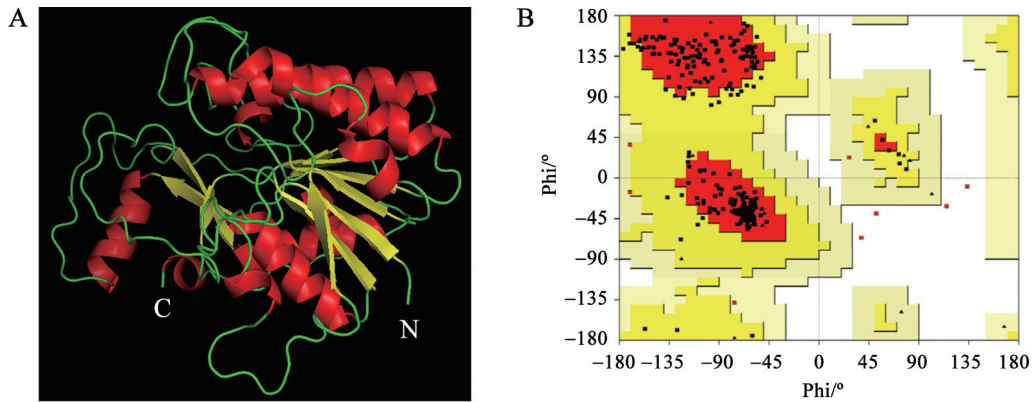


图5 *IhDFR1*蛋白的三维结构模型(A)及拉氏构象图(B)

Fig.5 The putative 3D structure (A) and Ramachandran plot (B) of *IhDFR1* protein

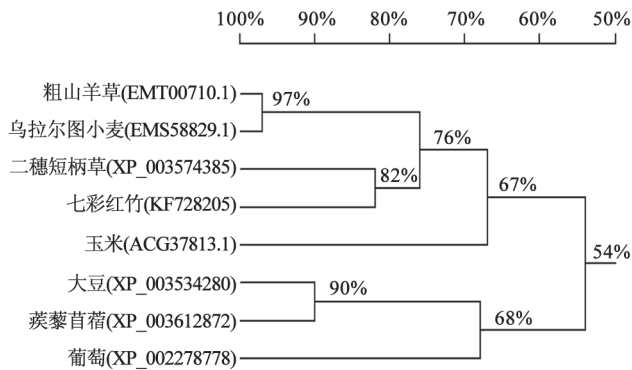


图6 *IhDFR1*蛋白与其他物种DFR蛋白的聚类分析

Fig.6 Phylogenetic tree analysis of the *IhDFR1* and DFR proteins from other species

3 *IhDFR1*基因的表达特性分析

以Actin作为内参, 通过半定量RT-PCR检测七彩红竹7个不同生长时期竹秆组织中*IhDFR1*基因的表达, 结果表明, *IhDFR1*基因在竹秆不显红紫色的幼嫩时期(即第1、2、7时期)不表达, 在第3~6时期都有表达, 其中在第3和4时期表达最强(图7)。可见, *IhDFR1*基因的表达与七彩红竹7个时期的竹秆颜色变化相对应, 竹秆颜色呈现红紫色时基因表达, 反之, 基因不表达, 表明*IhDFR1*基因与竹秆呈红紫色的变化紧密相关。

讨论

本研究采用RT-PCR和生物信息学方法对七彩红竹的花色素苷途径中的关键酶DFR的基因进行克隆和序列分析, *IhDFR1*蛋白属于酸性稳定的非分泌蛋白, 不存在信号肽。研究结果与樊云芳

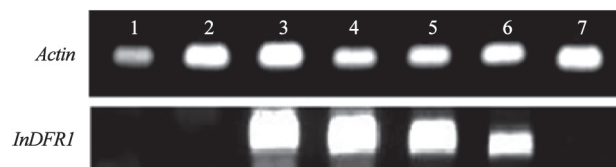


图7 *IhDFR1*基因在七彩红竹茎部的时空表达分析

Fig.7 Temporal-spatial expression of *IhDFR1* gene in the culms of *I. hispidula* cv. 'Rainbow'

数字1~7分别代表7个不同的生长时期。

等(2011)对宁夏枸杞(*Lycium barbarum*) *LbDFR1*和周琳等(2011)对牡丹(*Paeonia suffruticosa*) *PsDFR1*基因的研究结果一致, 说明植物的DFR蛋白不具有信号肽, 是非分泌蛋白。从而推断DFR蛋白可能在细胞质中合成, 不进行蛋白转运, 牡丹的PsDFR1蛋白定位于质膜。IhDFR1蛋白具有典型的DFR蛋白功能结构域, 存在2个结合位点, 不同植物的DFR氨基酸序列在2个特异区域有较高的同源性, DFR氨基酸序列中的NADP结合位点是高度保守的, 由26个氨基酸序列组成的底物特异性结合区也高度保守(覃建兵等2012; Petit等2007)。IhDFR1蛋白第134位氨基酸残基为R, 属于非Asn/Asp型DFR酶, 前人的研究表明非Asn/Asp型DFR酶的作用底物仅限于底物DHQ, 合成红色的花色素苷, 由此可以从底物选择特异性结合位点的角度解释七彩红竹红色秆个体产生的原因, 可能是由于编码第134位氨基酸的碱基发生突变而导致浦竹仔产生红色秆。这说明七彩红竹出现花色素苷性状并非种属差异导致, 而是由于样本收集地环境因子诱发基因突变所致(王娟等2012), 相比来自其他种源地的植株,

七彩红竹*IhDFR1*基因是否发生变异(包括启动子和编码区域),还有待后续进一步的研究。

*IhDFR1*蛋白三级结构的构象呈现致密球状结构,空间结构稳定。陈大志等(2010)研究唇形亚纲植物*DFR*基因的结果表明,*DFR*基因的空间结构分为松散C-末端和致密球状结构两个部分。*DFR*与NADPH辅助因子的底物结合区域都在致密球状结构中。*IhDFR1*蛋白与单子叶禾本科植物(玉米、粗山羊草、二穗短柄草、乌拉尔图小麦)的*DFR*亲缘关系最近,说明该基因在进化上比较保守,而单子叶植物的*DFR*均为Asn型*DFR*,进一步证实非Asn/Asp型*DFR*极有可能是由于地理隔离等原因由Asn型进化而来的说法(张龙等2008)。另外,七彩红竹*IhDFR1*基因的在竹秆不同时期的表达情况不同,且与竹秆颜色的变化有关联,但其分子机制还有待研究。以上研究结果为后期七彩红竹花色苷的开发利用和培育具有较高观赏价值的竹种提供了理论依据。

参考文献

- 陈大志,周嘉裕,李萍(2010). 二氢黄酮醇4-还原酶的生物信息学分析. 生物技术通报, (12): 206~212
- 符红艳,于晓英,廖祯妮(2012). 观赏植物*DFR*基因的研究进展. 天津农业科学, 18 (6): 14~19
- 李春雷,崔国新,许志茹,李玉花(2009). 植物二氢黄酮醇4-还原酶基因的研究进展. 生物技术通讯, 20 (3): 442~445
- 刘娟,冯群芳,张杰(2005). 二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*)与花色的修饰. 植物生理学报, 41 (6): 715~719
- 卢钰,董现义,杜景平,李永强,王明林(2004). 花色苷研究进展. 山东农业大学学报, 35 (2): 315~320
- 樊云芳,陈晓军,李彦龙,戴国礼,曹有龙(2011). 宁夏枸杞*DFR*基因的克隆与序列分析. 西北植物学报, 31 (12): 2373~2379
- 潘丽晶,张妙彬,范干群,陈伟庭,曹友培(2010). 石斛兰*dfR*基因的克隆、序列分析及原核表达. 园艺学报, 37 (1): 129~134
- 彭桂莎,杨宇明,孙浩,张怀璧,王娟(2011). 棉花竹*FsMyb1*基因的生物信息学研究. 西部林业科学, 40 (4): 6~11
- 覃建兵,唐亚萍,曾卫军(2012). 新疆雪莲*DFR*基因的分离及同源遗传转化. 植物研究, 32 (6): 695~700
- 王娟,孙浩,彭桂莎,王明月,熊智,张兴波,孙茂盛,杨宇明(2012). 浦竹仔红色秆变异个体的rDNA ITS序列及系统发育研究. 西部林业科学, 41 (1): 1~6
- 徐永椿(1991). 云南树木图志(下册). 昆明: 云南科技出版社, 1482~1488
- 薛庆中(2010). DNA和蛋白质序列数据分析工具. 北京: 科学出版社, 75~106
- 张龙,李卫华,姜淑梅,朱根发,王碧青,李洪清(2008). 花色苷生物合成与分子调控研究进展. 园艺学报, 35 (6): 909~916
- 周琳,王雁,任磊,彭镇华(2011). 牡丹二氢黄酮4-还原酶基因*PsDFR1*的克隆及表达分析. 植物生理学报, 47 (9): 885~892
- Dick CA, Buenrostro J, Butler T, Carlson ML, Kliebenstein DJ, Whittall JB (2011). Arctic mustard flower color polymorphism controlled by petal-specific down regulation at the threshold of the anthocyanin biosynthetic pathway. PLoS One, 6 (4): e18230
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G (2001). Alteration in a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. Plant J, 25 (3): 325~333
- Petit P, Granier T, Estaintot BL, Manigand C, Bathany K, Schmitter JM, Lauvergeat V, Hamdi S, Gallois B (2007). Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. J Mol Biol, 368 (5): 1345~1357
- Polashock JJ, Griesbach RJ, Sullivan RF, Vorsa N (2002). Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) and expression in transgenic tobacco. Plant Sci, 163 (2): 241~251
- Singh K, Kumar S, Yadav SK, Ahuja PS (2009). Characterization of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. Plant Biotechnol Rep, 3 (1): 95~101