

乌头DFR基因的克隆与表达特征分析

李媛, 李伟, 王奎玲, 刘庆超, 姜新强, 刘庆华*

青岛农业大学园林与林学院, 山东青岛266109

摘要: 二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)是花青素合成途径中的关键酶。本研究以乌头(*Aconitum carmichaeli*)不同开放时期的花蕾为材料, 测定其花青素含量, 并采用同源克隆和cDNA末端快速扩增(RACE)技术从乌头花中获得了DFR基因cDNA全长, 命名为*AcDFR* (GenBank登录号KY272864)。结果显示, 乌头花青素含量随着花的开放呈先上升后下降的趋势。*AcDFR*的cDNA全长为1 233 bp, 开放阅读框为1 014 bp, 预测编码337个氨基酸。氨基酸序列比对显示, *AcDFR*在NADPH结合区域和底物结合区域都高度保守, 属于NADB_Rossmann超家族。系统进化分析表明, *AcDFR*与翠雀(*Delphinium grandiflorum*) DFR亲缘关系最近。*AcDFR*主要在乌头的花中表达, 在根、茎、叶中几乎不表达, 其表达量与花青素含量的变化呈正相关, 随着不同的开花级数呈现先上升后下降的趋势。

关键词: 乌头; DFR; 基因克隆; 表达分析

花是观赏植物的主要观赏部位, 其中花色是其重要观赏性状, 也是吸引传粉者的主要因素之一(Shrestha等2013; Shang等2011)。在植物的花和果实中最常见的色素就是花青素(王华等2015; Morita等2014; Tanaka等2008)。花青素是植物次生代谢的主要产物, 包括类黄酮、异黄酮、花青素、黄酮和原花青素, 这些物质为植物提供了丰富多彩的颜色(Dixon和Steele 1999)。

在花青素合成途径中, 二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是控制花青素生物合成的关键酶之一, 它能催化二氢黄酮醇(二氢山奈酚、二氢槲皮素和二氢杨梅素)生成无色的花色素(无色天竺葵素、无色矢车菊素和无色飞燕草素), 从而进一步形成橙色的天竺葵素、砖红色的矢车菊素和蓝紫的飞燕草素, 因此DFR在花青素合成途径中起着至关重要的作用(Huang等2012; Piero等2006; Shimada和Ayabe 2005)。研究发现, DFR基因具有组织表达特异性, 矮牵牛(*Petunia hybrida*) DFR-A在花药中的表达量最高, 其次是初开和盛开花瓣中, 花蕾中的表达量较低, 而在叶中表达量最低(褚云霞等2014); 在牡丹(*Paeonia suffruticosa*)中, *PsDFR1*在花色素大量积累的花瓣中表达量最高, 接下来依次是萼片、雄蕊和叶片, 在心皮中表达量最低(周琳等2011)。

目前, 通过DFR的分离和遗传转化来改变植物的花色已取得了一定进展。在矮牵牛(Beld等1989)、金鱼草(*Antirrhinum majus*) (Martin等1991)、风信子(*Hyacinthus orientalis*) (祁银燕等2009)、七彩红竹(*Indosasa hispida* cv. 'Rainbow') (缪福俊等

2014)、翠雀(*Delphinium grandiflorum*) (Miyagawa等2015)和刺葡萄(*Vitis davidii*) (赖呈纯等2016)等许多植物中分离鉴定了DFR的同源基因。其中, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过量表达小麦(*Triticum aestivum*)的*TaDFR*导致花色素苷的显著积累(Dong等2016)。通过RNAi抑制烟草(*Nicotiana tabacum*) DFR基因的表达, 可使花瓣中的花青素含量减少, 花瓣由粉红色变成浅粉色和白色(Lim等2016)。在蓝眼菊(*Osteospermum hybrida*)中, 在RNAi抑制类黄酮3',5'-羟化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, F3'5'H)表达的同时导入非洲菊DFR基因, 获得了在花中主要积累天竺葵色素的转基因植物(Steinbach等2007)。

乌头(*Aconitum carmichaeli*)作为药用植物在中国栽培历史悠久, 分布广泛, 花呈稀缺的蓝紫色。目前对乌头中DFR基因的报道还未见到。本研究以乌头为材料, 在测定花发育过程中花青素含量变化的基础上, 采用cDNA末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆获得了DFR同源基因, 命名为*AcDFR*, 并分析了*AcDFR*的表达与花青素含量之间的关系, 以为观赏植物的花色改良提供依据。

材料与方法

1 植物材料

以日照五莲山的野生乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx.)为供试材料, 于2016年9月下旬采集

收稿 2017-06-26 修定 2017-11-10

资助 山东省农业良种工程重大课题(2313215)。

* 通讯作者(E-mail: lqh6205@163.com)。

根、茎、叶及7个不同发育时期的花(S1, 完全未着色的花蕾; S2, 上萼片开始着色的花蕾; S3, 侧萼片开始着色的花蕾; S4, 完全着色未开放的花蕾; S5,

正在开放的花; S6, 花完全开放但花药未成熟; S7, 花完全开放且花药成熟)(图1), 在液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱保存备用。

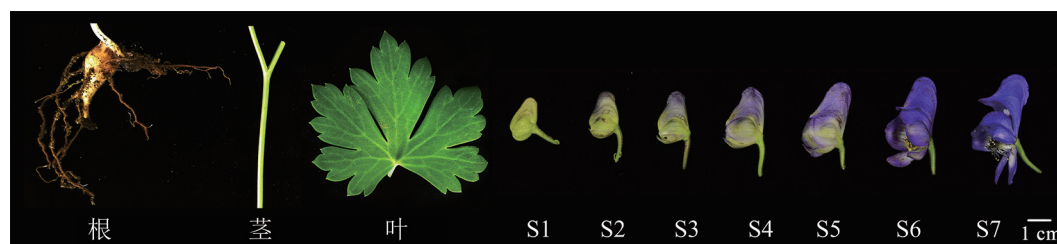


图1 乌头根、茎、叶及花发育的7个时期

Fig.1 Root, stem, leaf and seven stages of flower development of *A. carmichaeli*

2 方法

2.1 花青素含量测定

乌头花青素提取与测定参考崔超军等(2006)报道的方法, 称取各时期新鲜的花0.1 g, 液氮研磨后用1%盐酸甲醇法 4°C 避光过夜提取, 紫外分光光度计分别测定波长为530和650 nm处的吸光度, 按公式 $A_{530}-0.25\times A_{650}$ 计算花青素苷的相对含量, 3次生物学重复。

2.2 RNA提取和反转录

供试材料总RNA的提取参照百泰克多糖多酚植物总RNA快速提取试剂盒说明书操作, 利用琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测RNA的完整性及浓

度。参照PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(TaKaRa)说明书进行cDNA的第一链合成。

2.3 *AcDFR*基因的全长克隆

根据GenBank上发表的其他物种DFR的序列, 在其保守区通过Primer Premier 5软件设计简并引物jbDFR-F和jbDFR-R (表1)进行扩增, 获得基因的中间片段。以AP1为引物进行反转录, 通过巢式PCR和降落PCR技术, 用锚定引物AUAP1和特异引物进行3'-RACE扩增。以随机引物Oligo(dT)进行反转录合成第一链cDNA, 通过TdT加多聚dC尾巴, 然后用PCR产物纯化试剂盒(上海生工)纯化, 通过巢式PCR和降落PCR技术, 用锚定引物和特异

表1 本文中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

名称	序列(5'→3')	用途
AP1	GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₁₈	反转录
AUAP1	GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACG	
APC	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGGG	锚定
APD	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
jbDFR-F	TGGYTVGTSATGMRGCTWCT	中间片段扩增
jbDFR-R	AARTACATCCAACWCCDGTCTCTT	
AC-DFR-3' inner	GCAGGACTAAAAAGATGACCG	3'-RACE
AC-DFR-3' outer	GCTTGTTCCTCACTTCGTCTGCCG	
AC-DFR-5' inner	GCTTGTTCCTGGCATTCCGCA	5'-RACE
AC-DFR-5' outer	TTCTCGGGGTCTTTGGATTTCG	
qcAC-DFR-F	CTCTCCTCAACACTACTCA	全长cDNA扩增
qcAC-DFR-R	TAGTTTAGACCTATCAATCACAT	
qAB-Actin-F1	GTTGGGATGGGACAAAAAGGAT	Real-time PCR
qAB-Actin-R1	CCCTGTTAGCCTTTGGGTTCA	
qAC-DFR-F3	AACGGGGTTATGTTGTCAGGG	
qAC-DFR-R3	TCATTCTCGGGGTCTTTGGA	

引物进行5'-RACE扩增。将获得的保守区序列、3'-RACE和5'-RACE的测序结果进行拼接,根据拼接得到的基因cDNA全长设计包含完整ORF的引物,进行*AcDFR*全长cDNA克隆,并验证已获得的序列。

2.4 *AcDFR*基因的生物信息学分析

开放阅读框查找和核苷酸翻译等使用DNA-MAN6及DNATOOL软件;BLAST相似性搜索在NCBI数据库中进行;应用DNAMAN6对同源氨基酸进行多序列比对,用MEGA 5.2软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,校验参数Bootstrap重复1 000次。*DFR*蛋白的基本理化性质、亲水性/疏水性、跨膜结构及二级结构分别通过在线软件ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析获得。

2.5 半定量及实时荧光定量PCR表达分析

分别提取乌头不同组织及不同时期花瓣样品的总RNA,用PrimeScrip RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)进行反转录合成cDNA第一链。以组成型表达的细胞激动蛋白基因(β -actin)作为内参基因。半定量反应程序为94°C预变性5 min;94°C变性30 s,55°C退火30 s,72°C延伸45 s,28个循环;72°C延伸10 min。荧光定量反应体系及程序参考SYBR Premix Ex Taq II试剂盒说明书(TaKaRa),所用仪器为StepOnePlus Real-Time PCR System (ABI)。每个样品3次生物学重复,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析,显著性差异分析采用SPSS 22.0软件。

实验结果

1 花不同发育时期花青素相对含量的变化

乌头花不同发育时期(S1~S7)花青素相对含量的测定结果显示:在花完全开放但花药尚未成熟期(S6)含量最高,为1.278;在花蕊发育前期(S1和S2)最低,均为0.267。花青素相对含量的整体变化趋势为从未着色的花蕊期开始到花完全开放(S1~S6)逐渐上升,之后小幅下降(图2),表明花青素含量与花蕾着色的深浅呈正相关。

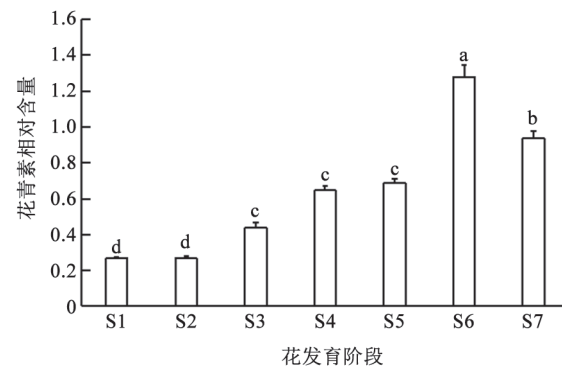


图2 乌头花不同发育时期花青素含量

Fig.2 The anthocyanin content in different flower developmental stages of *A. carmichaeli*

不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

2 *AcDFR*全长cDNA的克隆

以乌头花瓣总RNA的反转录产物为模板,利用简并引物进行RT-PCR,得到了432 bp的中间片段(图3-A)。根据保守序列设计引物进行3'和5'-RACE扩增,经过两轮巢式PCR反应,分别得到长度为741 bp的3'末端和242 bp的5'末端(图3-B和C)。将这两条序列与中间片段序列进行拼接后设计扩增cDNA

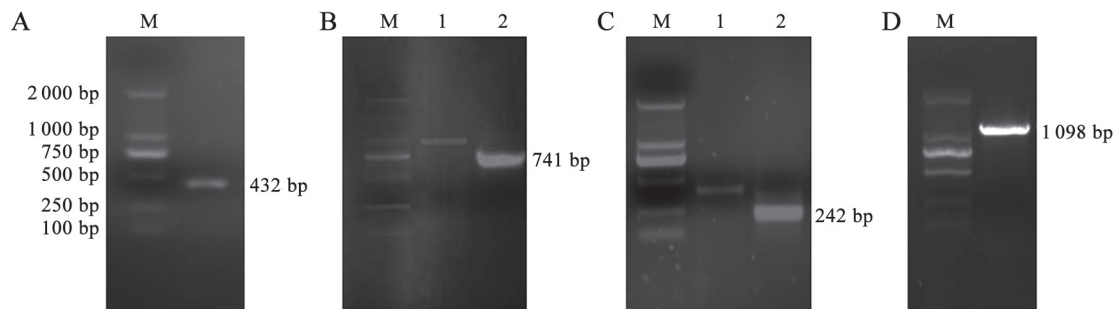


图3 *AcDFR*基因的克隆

Fig.3 Cloning of *AcDFR* gene

A: 中间片段; B: 3'-RACE; C: 5'-RACE; D: cDNA序列。M: DNA marker DL2000; 1: 第一轮PCR产物; 2: 第二轮PCR产物。

全长的引物qcAC-DFR-F和qcAC-DFR-R, 通过高保真PCR扩增得到1 098 bp的cDNA序列(图3-D), 与预期大小相符。开放阅读框为1 014 bp, 编码337个氨基酸。该序列命名为*AcDFR*, GenBank登录号KY272864。

3 *AcDFR*生物信息学分析

利用ProtParam对*AcDFR*进行蛋白质基本理化性质预测与分析, 推测结果显示分子量为38.02 kDa, 分子式为 $C_{1707}H_{2684}N_{446}O_{503}S_{16}$, 等电点为6.02, 不稳定系数为42.37, 属于不稳定蛋白, 总平均亲水性(GRAVY)为-0.192, 脂肪系数为89.35。ProtScale结果显示, *AcDFR*为亲水性蛋白。在线TMHMM Server 2.0预测的整个蛋白无跨膜结构, 是非分泌型蛋白。SOPMA分析*AcDFR*蛋白的主要二级结构元件为 α -螺旋(α -helix)、无规则卷曲(random coil)和 β -折叠(β -sheet), 分别占37.98%、30.56%和23.44%; 而 β -转角(β -turn)则占8.01%, 散布于整个蛋白质中。

BLAST分析发现, *AcDFR*氨基酸序列与GenBank中其他植物DFR的氨基酸序列有较高的相似性, 该序列与翠雀(BAQ36608)和枫香(*Liquidambar*

formosana, AGT28278)相似性达到87%和78%, 与枣(*Ziziphus jujuba*, XP_015884705)、刺葡萄(AHK-10250.1)和芍药(*Paeonia lactiflora*, AFI71899.1)的相似性均为76%。多重比对分析发现, *AcDFR*含有与NADPH结合的保守基序和26个氨基酸组成的底物特异结合区(图4), 该区域决定底物的特异性且在不同植物中相对保守, 因此*AcDFR*属于NADB_Rossmann超家族。

为了分析*AcDFR*与其他DFR同源蛋白的系统进化关系, 将*AcDFR*与其他13种植物DFR同源蛋白进行多重序列比对和系统进化分析。结果显示, *AcDFR*与翠雀和莲(*Nelumbo nucifera*)聚为一类, 并与翠雀DFR的亲缘关系最近, 而与拟南芥、萝卜和亚麻亲缘关系最远(图5)。

4 *AcDFR*的表达分析

利用半定量PCR和qRT-PCR检测乌头根、茎、叶以及不同发育时期花蕾中*AcDFR*基因的表达情况。结果表明, *AcDFR*在各根、茎、叶中几乎没有表达, 主要集中在花中表达, 说明该基因具有组织表达特异性。在未着色的花蕾中*AcDFR*表达量较低, 随着花的着色表达量逐渐上升, 在完全开

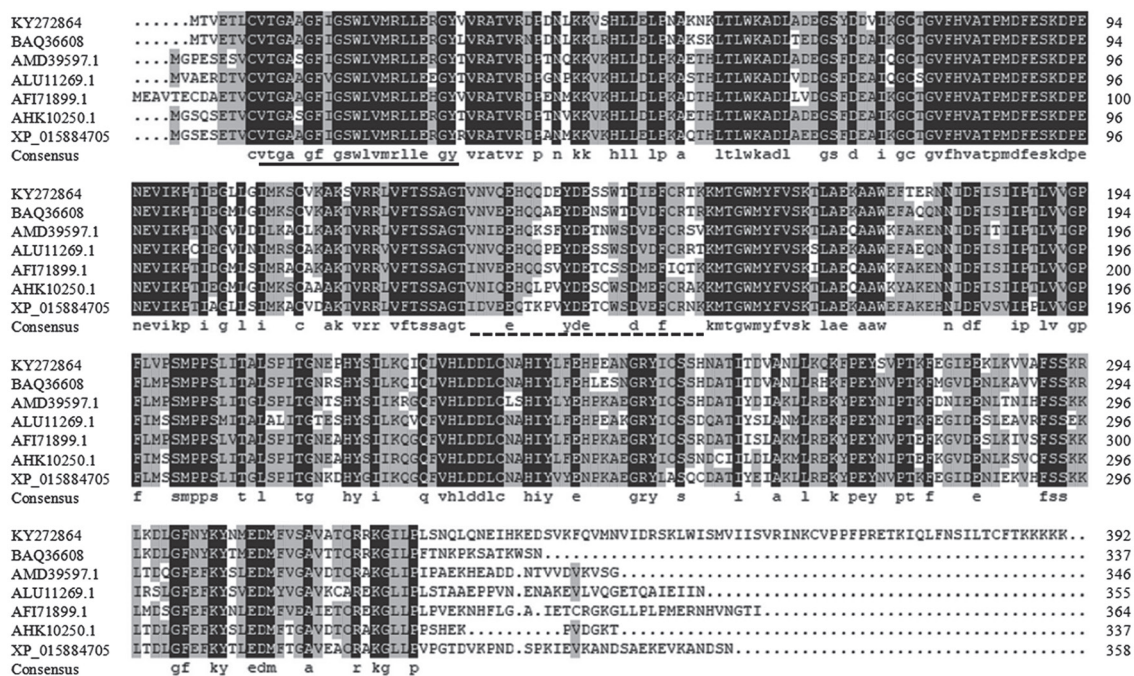


图4 *AcDFR*与其他植物DFR氨基酸序列比较

Fig.4 Amino acid sequence alignment among *AcDFR* and DFRs from other plant species

KY272864: 乌头(*Aconitum carmichaeli*); BAQ36608: 翠雀(*Delphinium grandiflorum*); AMD39597.1: 李(*Prunus salicina*); ALU11269.1: 莲(*Nelumbo nucifera*); AFI71899.1: 芍药(*Paeonia lactiflora*); AHK10250.1: 刺葡萄(*Vitis davidii*); XP_015884705: 枣(*Ziziphus jujuba*)。NADPH结合位点和底物特异性区结合区分别用实线和虚线下划线表示。

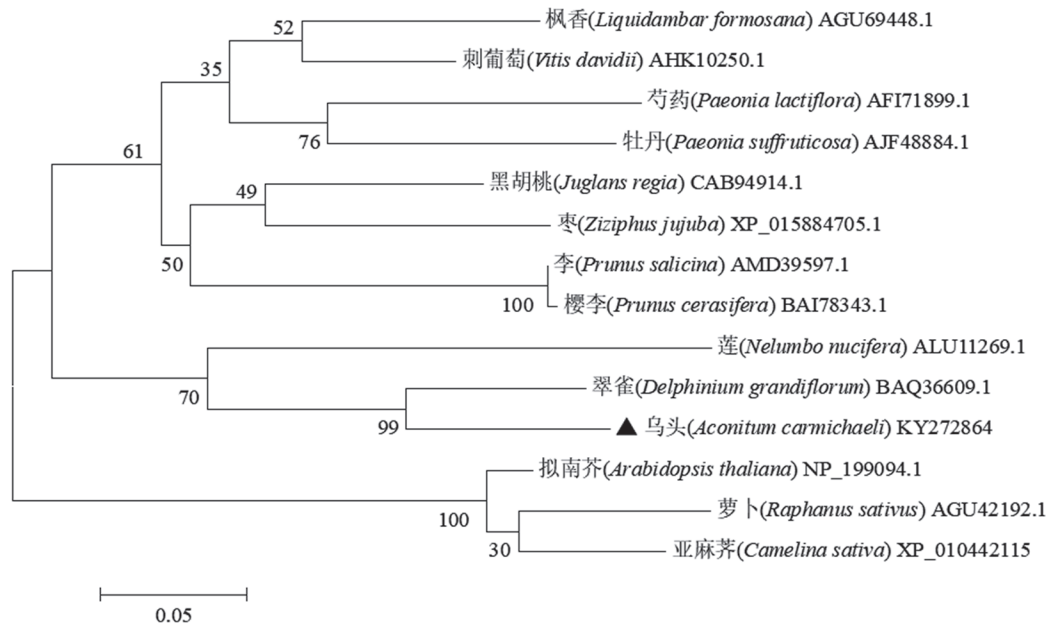


图5 不同物种DFRs的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis among different DFRs

放的花中(S6)表达量达到最高,随后小幅下降(图6和7)。用软件SPSS Statistics分析乌头花青素含量

与*AcDFR*基因表达量之间的相关性,结果表明,不同花发育时期*AcDFR*表达量与花青素含量呈正相关, Pearson相关系数为0.911 ($P < 0.01$)。由此推测, *AcDFR*的表达量影响花青素的合成,从而影响着色的着色。

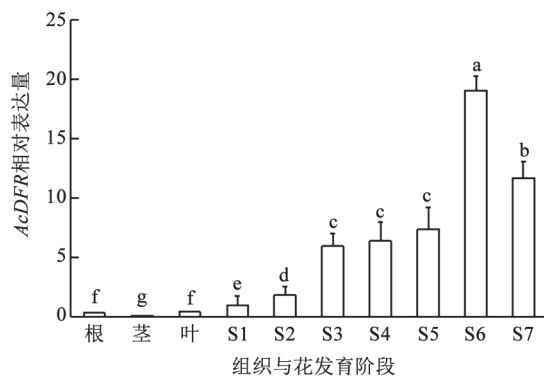
图6 *AcDFR*的半定量PCR表达分析Fig.6 Semi-quantitative PCR analysis of *AcDFR*

图7 *AcDFR*在乌头不同组织和花不同发育时期的表达
Fig.7 *AcDFR* expression pattern in different tissues and different flower developmental stages of *A. carmichaeli*

不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

讨论

乌头中花青素含量与花的着色大体一致,随着花蕾颜色的加深,花青素含量逐渐增加。在花发育早期阶S1~S5,花青素含量变化较小,相关花青素合成基因开始被激活; S6和S7时期花完全开放,花青素含量迅速积累,可能与花青素合成基因的大量表达有关。

本研究采用RACE技术,获得乌头的*AcDFR*基因cDNA,全长1 233 bp,开放阅读框1 014 bp。多重序列比对结果表明, *AcDFR*预测编码的蛋白质与翠雀具有最高相似性,达87%。系统进化树分析显示, *AcDFR*与同属于毛茛科的翠雀聚为一支,亲缘关系最近,说明*DFR*基因在进化过程中比较保守。*DFR*蛋白的特异结合区决定了底物的特异性,并且在不同植物中相对保守(Polashock等2002)。结合区中的133位氨基酸对酶的底物特异性影响很大。野生非洲菊*DFR*蛋白的133位氨基酸为天冬酰

胺(Asn), 该基因转化矮牵牛后, 花主要产生飞燕草素, 花色为紫罗兰色; 而当133位氨基酸突变成亮氨酸时, 花色变成白色, 主要产生矢车菊素(Johnson等2001)。本研究中*AcDFR*编码的多肽链133位氨基酸同样是天冬酰胺, 推测其能够催化二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)产生飞燕草素, 最终产生蓝紫色的花。

*DFR*基因具有组织表达特异性。研究发现, 葡萄风信子*MaDFR2a*和*MaDFR2b*均在未着色的花蕾时期开始表达, 随着花色加深, 在完全着色的花中表达最高, 此后逐渐降低, 而在根、茎和叶中微量表达(焦淑珍等2014)。*AcDFR*在乌头中的表达也呈现相似规律, 主要集中在花中表达, 在根、茎、叶中表达量较低, 且随着花发育表达量呈先迅速上升后小幅下降的趋势。另外, 钟淮钦等(2014)发现, 在朵丽蝶兰(*Doritaenopsis hybrid*)中*DtpsDFR*表达量的高低与花青素的积累相一致; 本研究中乌头*AcDFR*也表现出相同的现象, 并且*AcDFR*的表达量与花青素含量呈正相关。由此可见, *DFR*基因表达模式与植物器官的着色是一致的, 对花青素的合成及积累起着关键作用。因此, 通过导入外源*DFR*基因实现花色的修饰是具有可行性的。

参考文献

- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AGM (1989). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes. *Plant Mol Biol*, 13 (5): 491–502
- Chu YX, Chen HR, Pan JS, Wu AZ, Cai R, Deng S (2014). Isolation and expression analysis of *DFR-A* gene from *Petunia hybrida*. *Chin Agricul Sci Bull*, 30 (10): 163–169 (in Chinese with English abstract) [褚云霞, 陈海荣, 潘俊松, 吴爱忠, 蔡润, 邓珊(2014). 矮牵牛*DFR-A*基因的克隆与表达分析. 中国农学通报, 30 (10): 163–169]
- Cui CJ, Li JM, Chen JY, Zhang RZ, Zhu QL (2016). Isolation and expression analysis of an anthocyanin transport-related *NtAN9* gene from *Nicotiana tabacum*. *Acta Bota Boreal-Occid Sin*, 36 (7): 1337–1342 (in Chinese with English abstract) [崔超军, 李嘉敏, 陈君宇, 张润钊, 祝钦泷(2016). 烟草花青素昔转运相关基因*NtAN9*的分离与表达分析. 西北植物学报, 36 (7): 1337–1342]
- Dixon RA, Steele CL (1999). Flavonoids and isoflavonoids—a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci*, 4 (10): 394–400
- Dong HS, Choi MG, Kang CS, Park CS, Choi SB, Park YI (2016). Overexpressing the wheat dihydroflavonol 4-reductase gene *TaDFR* increases anthocyanin accumulation in an *Arabidopsis dfr* mutant. *Genes Genomics*, 38 (4): 333–340
- Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K (2003). A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, 63 (1): 15–23
- Huang Y, Gou J, Jia Z, Yang L, Sun Y, Xiao X, Song F, Luo K (2012). Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol 4-reductase from *Populus Trichocarpa*. *PLoS ONE*, 7 (2): e30364
- Jiao SZ, Liu YL, Lou Q, Jiang L (2014). Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene (*DFR*) from grape hyacinth (*Muscari armeniacum*). *J Agric Biotechnol*, 22 (5): 529–540 (in Chinese with English abstract) [焦淑珍, 刘雅莉, 姜倩, 姜玲(2014). 葡萄风信子二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*)的克隆与表达分析. 农业生物技术学报, 22 (5): 529–540]
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G (2001). Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J Cell Mol Biol*, 25 (3): 325–333
- Lai CC, Huang XG, Gan HC, Pan H, Fan LH (2016). Cloning and bioinformatics of *DFR* gene in *Vitis davidii* Foex. *Fujian J Agric Sci*, 31 (7): 683–689 (in Chinese with English abstract) [赖呈纯, 黄贤贵, 甘煌灿, 潘红, 范丽华(2016). 刺葡萄*DFR*基因克隆及生物信息学分析. 福建农业学报, 31 (7): 683–689]
- Lim SH, You MK, Kim DH, Kim JK, Lee JY, Ha SH (2016). RNAi-mediated suppression of dihydroflavonol 4-reductase in tobacco allows fine-tuning of flower color and flux through the flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Physiol Biochem*, 109: 482–490
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J*, 1 (1): 37–49
- Miao FJ, Chen J, Sun H, Wang Y, Wang CC, Yuan XL, Yang YM, Wang J (2014). Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *IhDFR1* from *Indosasa hispida* cv. 'Rainbow'. *Plant Physiol J*, 50 (4): 447–452 (in Chinese with English abstract) [缪福俊, 陈剑, 孙浩, 王毅, 王晨晨, 原晓龙, 杨宇明, 王娟(2014). 七彩红竹二氢黄酮醇4-还原酶基因*IhDFR1*的克隆及表达分析. 植物生理学报, 50 (4): 447–452]
- Miyagawa N, Miyahara T, Okamoto M, Hirose Y, Sakaguchi K, Hatanoto S, Ozeki Y (2015). Dihydroflavonol 4-reductase activity is associated with the intensity of flower colors in delphinium. *Plant Biotechnol*, 32 (3): 4445–4452
- Morita Y, Takagi K, Fukuchi-Mizutani M, Ishiguro K, Tanaka Y, Nitasaka E, Nakayama M, Saito N, Kagami T, Hoshino A, et al (2014). A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *Plant J Cell Mol Biol*, 78 (2): 294–304
- Piero ARL, Puglisi I, Petrone G (2006). Gene characterization, analysis of expression and *in vitro* synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Phytochemistry*, 67 (7): 684–695
- 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
- Qi YY, Liu YL, Li L, Wang YJ (2009). Cloning and sequencing full-length cDNA of *DFR* gene in hyacinthus. *Chin Agric Sci Bull*, 25 (24): 62–67 (in Chinese with English abstract) [祁银燕, 刘雅莉, 李莉, 王跃进(2009). 风信子*DFR*基因全长cDNA的克隆及序列分析. 中国农学通报, 25 (24): 62–67]
- Seitz C, Vitten M, Steinbach P, Hartl S, Hirsche J, Rathje W, Treutter D, Forkmann G (2007). Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. *Phytochemistry*, 68 (6): 824–833
- Shang Y, Venail J, Mackay S, Bailey PC, Schwinn KE, Jameson PE, Martin CR, Davies KM (2011). The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. *New Phytol*, 189 (2): 602–615
- Shimada N, Ayabe SI (2005). A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. *J Exp Bot*, 56 (419): 2573–2785
- Shrestha M, Dyer AG, Boydgerny S, Wong BB, Burd M (2013). Shades of red: bird-pollinated flowers target the specific colour discrimination abilities of avian vision. *New Phytol*, 198 (1): 301–310
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J*, 54 (4): 733–749
- Wang H, Li MF, Yang Y, Jin WM (2015). Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits. *Plant Physiol J*, 51 (1): 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 杨媛, 金万梅(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. 植物生理学报, 51 (1): 29–43]
- Zhong HQ, Huang ML, Wu JS, Fan RH, Lin B (2014). Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *DtpsDFR* in *Doritaenopsis* hybrid. *Chin J Cell Biol*, 36 (10): 1375–1381 (in Chinese with English abstract) [钟淮钦, 黄敏玲, 吴建设, 樊荣辉, 林兵(2014). 朵丽蝶兰二氢黄酮醇4-还原酶基因 *DtpsDFR* 的克隆与表达分析. 中国细胞生物学学报, 36 (10): 1375–1381]
- Zhou L, Wang Y, Ren L, Peng ZH (2011). Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene *PsDFR1* from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Plant Physiol J*, 47 (9): 885–892 (in Chinese with English abstract) [周琳, 王雁, 任磊, 彭镇华(2011). 牡丹二氢黄酮醇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]

Cloning and expression analysis of *DFR* gene in *Aconitum carmichaeli*

LI Yuan, LI Wei, WANG Kui-Ling, LIU Qing-Chao, JIANG Xin-Qiang, LIU Qing-Hua*

College of Landscape Architecture and Forestry, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is a key enzyme in the biosynthesis pathway of anthocyanin. The anthocyanin content of seven developmental stages of *Aconitum carmichaeli* flowers were detected in this study. And a full-length cDNA sequence of *DFR* gene was obtained from the flower with homology-based cloning and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) method, named *AcDFR* (GenBank accession No. KY272864). The results showed that anthocyanin content was first increased and then decreased along with the opening of flowers. The full-length cDNA sequence of *AcDFR* was 1 233 bp in length and contained 1 014 bp open reading frame encoding 337 amino acids. Multiple sequence alignment showed that *AcDFR* protein contained an NADPH binding domain and a substrate binding site domain, which belonged to NADB_Rossmann superfamily. Phylogenetic tree analysis indicated that *AcDFR* had the closest relationship with *DFR* of *Delphinium grandiflorum*. *AcDFR* was mainly expressed in flowers, whereas was rarely expressed in leaf, stem or root of *A. carmichaeli*. And the positive correlation between *AcDFR* expression level and anthocyanin content, showed a trend of increasing and declining later with the different developmental stages of flower.

Key words: *Aconitum carmichaeli*; *DFR*; gene cloning; expression analysis

Received 2017-06-26 Accepted 2017-11-10

This work was supported by the Agriculture Improved Variety Project of Shandong Province (Grant No. 2313215).

*Corresponding author (E-mail: lqh6205@163.com).