

## 十字花科植物 DFR 蛋白的生物信息学分析

胡燕, 尹明智, 匡光炼, 黄杰, 严秋香 (遵义师范学院 生物与农业科技学院, 贵州遵义 563006)

**摘要** 采用生物信息学的方法分析已经在 GenBank 上注册十字花科植物的 DFR 基因序列及相应氨基酸序列, 并对其理化性质、结构特征、系统进化关系等进行预测。结果表明, 十字花科植物的 DFR 蛋白大部分都有 6 个外显子, 分子量 36 481.89~43 129.21 Da, 大多数蛋白亚细胞定位于叶绿体中; 除了 BnaDFRA402, 其他的 DFR 蛋白均具有酶活性部位、NADP 结合位点和底物特异结合位点, 这些保守区域形成了 5 个 motifs; 每个 DFR 蛋白均有多个磷酸化位点, 以 Ser 为主, 以 Thr 和 Tyr 磷酸化为辅; 二级结构均由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、延伸链和无规则卷曲组成, 其中  $\alpha$ -螺旋为主要结构元件。

**关键词** 十字花科; 花青素; DFR 蛋白; 生物信息学

**中图分类号** S188 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)17-0103-05

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.17.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Bioinformatics Analysis of DFR Proteins in Cruciferae Plant

HU Yan, YIN Ming-zhi, KUANG Guang-lian et al (College of Biology and Agricultural Science&Technology, Zunyi Normal University, Zunyi, Guizhou 563006)

**Abstract** The DFR gene sequences and corresponding amino acid sequences registered on GenBank in Cruciferae plants were analyzed by means of bioinformatics, their physical and chemical properties, structural characteristics and phylogenetic relationships were predicted. The results showed that most of DFR proteins in Cruciferae plants had six exons with molecular weight ranging from 36 481.89 Da to 43 129.21 Da. Most of the protein subcells were located in chloroplasts. Except BnaDFRA402, other DFR proteins had enzymatic activity sites, NADP binding sites and substrate specific binding sites, which formed five motifs. Each DFR protein had multiple phosphorylation sites, in which Ser was the dominant and Thr and Tyr were the minor. The secondary structures were composed of alpha helix, beta turn, extended strand and random coil, and alpha helix was the main structural element.

**Key words** Cruciferae; Anthocyanin; DFR protein; Bioinformatics

植物花色主要是由类黄酮、类胡萝卜素和甜菜色素三大色素决定的。花青素是一类十分重要的类黄酮化合物, 广泛分布于各种植物中, 其赋予了植物花、叶和果实各种颜色<sup>[1]</sup>, 它主要调控花、叶和果实生成红色、紫色和蓝色。花色苷合成过程中, 二氢黄酮醇转变成花色苷的反应非常复杂, 二氢黄酮醇 4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是这一转变中起作用的第一个酶, 失去 DFR 活性的突变体产生象牙色或者白色<sup>[2]</sup>。DFR 是花青素生物合成途径中的关键酶, 是一个重要的调控点。它以二氢槲皮醇(dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮黄酮(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM)为底物, 在辅因子 NADPH 的作用下将 4 位的羰基还原为羟基, 产生相应的不稳定无色花青苷元, 然后这些无色花青苷元在花色素合酶(anthocyanidin synthase, ANS)和类黄酮 3-O-糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyltransferase, 3GT)的催化下分别形成矢车菊素、天竺葵素和翠雀素<sup>[3-5]</sup>。DFR 基因调控机制的研究对于了解花色苷生物合成途径和花朵显色的分子机制有重要的意义<sup>[6]</sup>。

目前, DFR 基因在很多植物中均已被克隆, 由于 DFR 基因具有底物特异性, 利用该特点可以定向改良花的颜色<sup>[7]</sup>。自 1987 年 Meyer 等<sup>[8]</sup>将玉米 DFR 基因导入矮牵牛 RC01 突

变体使花色由白色变为淡砖红色以来, 其在改造花色方面的应用取得了很大进展<sup>[9-12]</sup>。该研究采用生物信息学的方法, 对十字花科植物 DFR 氨基酸序列的组成成分、理化特性、亚细胞定位、功能结构域等进行预测和推断, 以期为进一步研究十字花科花色苷生物合成的分子机制以及选育不同花色的植物资源提供基础资料。

### 1 材料与方法

**1.1 数据获取** 以 dihydroflavonol 4-reductase 为信息探针搜索 NCBI Gene 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), 获得十字花科植物的基因序列及编码的相应蛋白质序列。

**1.2 DFR 蛋白质序列分析及亚细胞定位** 利用 ProtParam 在线分析软件 (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测各蛋白质的相对分子量及等电点信息<sup>[13]</sup>。使用 WoLF PSORT 在线分析软件进行蛋白质的亚细胞定位 (<http://www.gen-script.com/~wolf-psort.html>)。

**1.3 DFR 蛋白质保守结构域与磷酸化位点分析** 通过 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 平台获取蛋白质保守结构域<sup>[14]</sup>; 利用 MEME Version 4.12.0 软件分析蛋白质的保守 Motif (<http://meme-suite.org/tools/meme>)<sup>[15]</sup>; 利用 NetPhos 3.1 进行蛋白质的磷酸化位点预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)<sup>[16-17]</sup>。

**1.4 DFR 蛋白质二级结构分析** 利用 SOPMA 工具 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 预测蛋白质的二级结构。

**1.5 DFR 蛋白质同源性比较及进化分析** 用 DNAMAN 8

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31501337); 贵州省科学技术厅、遵义市科学技术局、遵义师范学院联合科技基金项目(黔科合 LH 字[2016]7014 号); 贵州省高层次创新型人才培养计划(遵市科合人才[2017]11 号); 贵州省高等学校创新能力提升计划(黔教合协同创新字[2013]11)。

**作者简介** 胡燕(1985—), 女, 湖南娄底人, 讲师, 硕士, 从事油菜遗传育种研究。

**收稿日期** 2019-04-13

软件进行序列多重比对分析;使用 MEGA7.0 软件中的邻近法构建系统发育树,采用 p-distance 模型,并设置 Bootstrap 值为 1000 进行校正,生成最终的系统进化树<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 DFR 蛋白序列分析及亚细胞定位** 利用 NCBI Gene 数据库,笔者选取了 24 个来自十字花科植物的 DFR 基因,其中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 2 个、琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata*) 3 个、甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 5 个、甘蓝 (*Brassica oleracea*) 3 个、白菜型油菜 (*Brassica rapa*) 3 个、亚麻芥 (*Camelina sativa*) 5 个、萝卜 (*Raphanus sativus*) 3 个。这些蛋白质中序列最长的是 RsDFR01 (387 aa),最短的是 AtDFR0401 (326 aa);外显子数目 5~7 个,大部分都有 6 个外显子;分子质量 36 481.89~43 129.21 Da;等电点最大的为 AIDFR03 (pI=8.80),最小的是 AIDFR01 (pI=5.07),大部分 DFR 蛋白等电点呈现酸性;利用 WoLF PSORT 分析亚细胞定位表明有 2 个基因所编码的蛋白定位在细胞核,17 个定位在叶绿体,5 个定位于细胞质(表 1),可见大多数基因编码的蛋白都定位于叶绿体中。

**2.2 蛋白质保守结构域与磷酸化位点分析** DFR 蛋白属于 SDR (short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) 蛋白家族,该基因家族有 2 个高度保守功能结构域,即 NADP 的结合功能域和底物特异结合功能域。利用 NCBI 的 CDD 在线分析 24

个十字花科植物的 DFR 基因所编码蛋白的功能结构域,除了 BnaDFRA402 只发现酶活性部位和底物特异结合区域,其他的基因编码的蛋白均具有酶活性部位、NADP 结合位点和底物特异结合位点(表 2)。

利用在线软件 MEME 分析了 DFR 蛋白的保守 motif,搜索了 5 个较保守的 motifs(图 1),大部分 DFR 蛋白都含有 5 个较保守的 motifs,但 BnaDFRA402 只有 4 个 motifs,缺失 motif 1;BoDFRC702、BrDFRA302、RsDFR03 和 AIDFR03 只有 3 个,缺失 motif1 和 motif4(图 2)。从保守 motif 序列和位置来看,这些保守的 motif 均处于保守结构域中,即酶活性部位、NAD(P)结合位点和底物特异结合位点区域,也进一步说明这些位点对于 DFR 蛋白功能是保守的。

蛋白质磷酸化位点预测显示,其均含有多个磷酸化位点,平均 45 个磷酸化位点,以 BnaDFRC701 最多,有 53 个,AtDFR0401 最少,仅 30 个;3 种磷酸化类型中,以丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点最多,其中又以 BnaDFRC701 最多(32 个位点),CsDFR1801 最少(18 个位点);其次是苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点,以 AIDFR01 和 AIDFR02 最多(19 个位点),AtDFR0401 最少(8 个位点);以酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点最少(图 3)。可见,十字花科 DFR 蛋白的磷酸化以 Ser 为主,以 Thr 和 Tyr 磷酸化为辅。

表 1 该研究涉及的十字花科植物的 DFR 基因信息

Table 1 DFR gene information of Cruciferae plant involved in the study

物种 Species	基因编号 Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白长度 Protein length aa	染色体 Chromosome	外显子 数目 Exon number	分子质量 Molecular weight Da	等电点 pI	数目最多的 氨基酸 The largest number of amino acids	亚细胞定位 Subcellular location
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	834291	AtDFR0501	382	5	6	42 774.96	5.43	Leu(7.9%)	chlo
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	829695	AtDFR0401	326	4	6	36 462.97	5.88	Leu(12.6%)	chlo
琴叶拟南芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	9301555	AIDFR01	384	Un	6	42 935.95	5.07	Ser(8.3%)	nucl
琴叶拟南芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	9299065	AIDFR02	384	Un	6	43 006.09	5.13	Leu(8.1%)	nucl
琴叶拟南芥 <i>Arabidopsis lyrata</i>	9305289	AIDFR03	343	Un	5	37 691.52	8.80	Leu(11.4%)	chlo
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	106447075	BnaDFRA401	385	A4	6	43 002.17	5.81	Lys(8.1%)	chlo
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	106403158	BnaDFRC601	385	C6	6	42 925.06	5.64	Lys(7.8%)	chlo
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	106409352	BnaDFRC701	355	C7	6	40 005.92	6.57	Leu(10.4%)	cyto
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	106448797	BnaDFRA402	359	A4	5	40 038.84	5.55	Lys(8.6%)	chlo
甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	106442780	BnaDFRA301	358	A3	7	40 421.48	6.76	Ser(11.2%)	cyto
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	106315758	BoDFRC901	385	C9	6	42 886.04	5.54	Lys(8.1%)	chlo
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	106304401	BoDFRC701	355	C7	6	39 853.73	6.17	Leu(10.4%)	cyto
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	106302011	BoDFRC702	335	C7	5	36 481.89	6.71	Leu(11.0%)	chlo
白菜型油菜 <i>Brassica rapa</i>	103839279	BrDFRA901	385	A9	6	42 886.04	5.54	Lys(8.1%)	chlo
白菜型油菜 <i>Brassica rapa</i>	103861683	BrDFRA301	350	A3	6	39 257.06	6.09	Ser(10.6%)	cyto
白菜型油菜 <i>Brassica rapa</i>	103862234	BrDFRA302	335	A3	5	36 538.97	7.04	Leu(10.7%)	chlo
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	104771418	CsDFR2001	377	20	6	42 125.36	5.97	Ser(8.8%)	chlo
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	104760679	CsDFR1801	377	18	6	42 185.40	5.55	Ser(8.0%)	chlo
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	104725195	CsDFR1101	377	11	6	42 251.37	5.45	Ser(8.0%)	chlo
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	104730663	CsDFR1201	350	12	6	39 529.25	6.68	Ser(11.1%)	chlo
亚麻芥 <i>Camelina sativa</i>	104722206	CsDFR1102	351	11	6	39 698.53	7.60	Ser(10.5%)	chlo
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	108826061	RsDFR01	387	Un	6	43 129.21	5.39	Ser(8.3%)	chlo
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	108852246	RsDFR02	352	Un	6	39 557.45	6.20	Leu(10.2%)	cyto
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	108848622	RsDFR03	335	Un	5	36 681.28	8.58	Leu(10.4%)	chlo

表 2 十字花科植物的 DFR 蛋白特异位点分布

Table 2 Specific loci of DFR protein in Cruciferae plant aa

基因名称 Gene name	活性位点 Active site	NAD(P) 结合位点 NAD(P) binding site	底物结合位点 Substrate binding site
<i>AtDFR0501</i>	102~166	10~205	86~225
<i>AtDFR0401</i>	102~166	10~203	90~225
<i>AIDFR01</i>	102~168	10~203	89~225
<i>AIDFR02</i>	102~168	10~205	89~290
<i>AIDFR03</i>	99~168	10~205	90~290
<i>BnaDFRA401</i>	102~168	10~205	90~290
<i>BnaDFRC601</i>	102~168	10~205	90~290
<i>BnaDFRC701</i>	112~180	15~218	90~315
<i>BnaDFRA402</i>	78~140	—	62~265
<i>BnaDFRA301</i>	115~182	15~220	90~320
<i>BoDFRC901</i>	102~168	10~205	90~290
<i>BoDFRC701</i>	112~180	15~220	90~312
<i>BoDFRC702</i>	90~148	6~162	78~275
<i>BrDFRA901</i>	102~168	10~205	90~290
<i>BrDFRA301</i>	112~178	15~215	90~310
<i>BrDFRA302</i>	90~148	5~172	80~275
<i>CsDFR2001</i>	102~166	10~205	87~225
<i>CsDFR1801</i>	102~168	10~205	90~290
<i>CsDFR1101</i>	102~168	10~205	90~225
<i>CsDFR1201</i>	110~178	10~215	90~310
<i>CsDFR1102</i>	110~178	10~215	90~310
<i>RsDFR01</i>	102~170	10~205	90~292
<i>RsDFR02</i>	112~180	15~220	90~310
<i>RsDFR03</i>	90~148	5~170	78~275

**2.3 DFR 蛋白的二级结构预测** 利用 SOPMA 软件对 DFR 蛋白二级结构进行预测,结果如图 4 所示,24 个 DFR 蛋白的二级结构均由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、延伸链和无规则卷曲组成,其中  $\alpha$ -螺旋为主要结构元件,所占比例为 33.85%~51.85%,而  $\beta$ -转角所占比例最低,以 *CsDFR2001* 最高为 13.53%,*CsDFR1201* 最低仅为 7.43%。

**2.4 DFR 蛋白质同源性比较分析** 利用 DNAMAN 对十字花科 DFR 蛋白进行多序列比对分析,结果表明 24 个 DFR 蛋

白的氨基酸序列,由于具有种属差异,相似性为 57.16%,但在重要的结构区域序列保守性高,如 DFR 与 NADP 结合区域和底物结合区域(图 5)。

**2.5 DFR 蛋白质系统进化树的构建** 根据不同植物 DFR 蛋白氨基酸多序列比对结果,结合邻近连接法用 MEGA7.0 构建系统发育树,结果如图 6 所示,24 个 DFR 蛋白共分成两大族,其中 *AIDFR03*、*RsDFR03*、*BoDFRC702* 和 *BrDFRA302* 聚为一族,其他 20 个蛋白聚为一族。由此看出,同一种属的 DFR 蛋白并不完全聚在一起,有些甚至不在同一个族,因此该类蛋白不宜用于十字花科的亲缘关系鉴定及遗传进化分析。

### 3 结论与讨论

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。随着乡村旅游的发展,油菜花旅游逐年升温,但单一的黄色油菜花限制了其观赏价值,因此创制新花色油菜有重要意义。二氢黄酮醇 4-还原酶属于 NADPH 依赖性短链还原酶家族,又属于细胞色素 P450 家族,作为花色素苷合成的关键酶而受到广泛关注。随着测序技术的发展,公共数据量日益增加促使生物信息学成为后基因组时代用于预测和研究基因功能的重要方法。该研究应用生物信息学的方法对拟南芥、甘蓝型油菜、甘蓝、萝卜等十字花科植物的 24 个 DFR 蛋白序列的理化性质、结构特征和系统进化关系等进行预测和分析,结果表明十字花科的 DFR 蛋白均具有 NAD(P) 结合位点和底物特异结合位点,且序列较为保守,亚细胞定位主要在叶绿体,磷酸化以 Ser 为主,以 Thr 和 Tyr 磷酸化为辅,但不同种属的 DFR 蛋白序列具有一定差异,同一种属的 DFR 蛋白并不聚在一起,表明这些 DFR 在功能上也是有差异的,这些分析为该基因表达和功能研究提供了参考,也为将来研究油菜花色形成分子机制及利用基因工程技术创新彩色油菜种质资源提供了基础资料。

### Logo

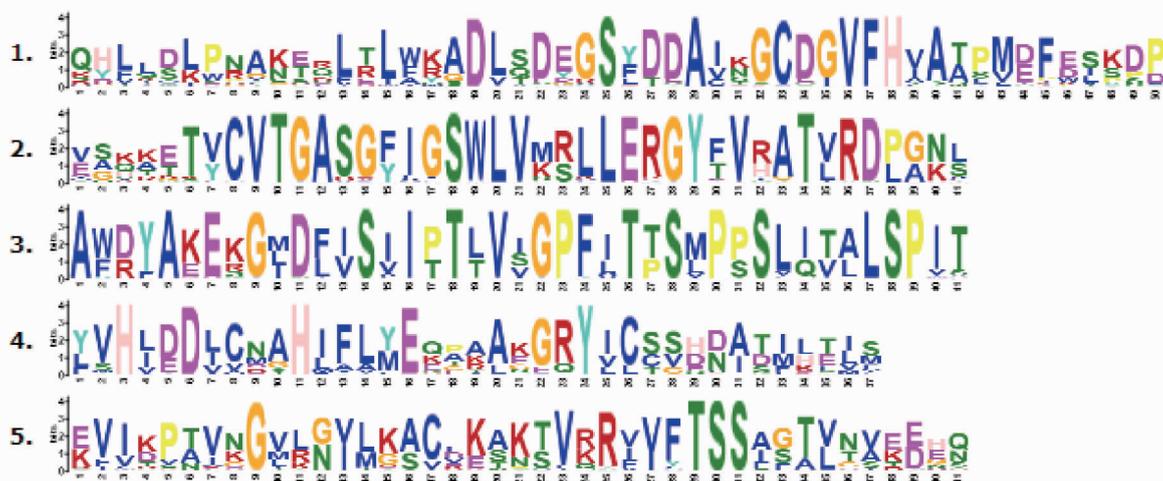


图 1 发现的 5 个 motifs

Fig.1 Discovered five motifs

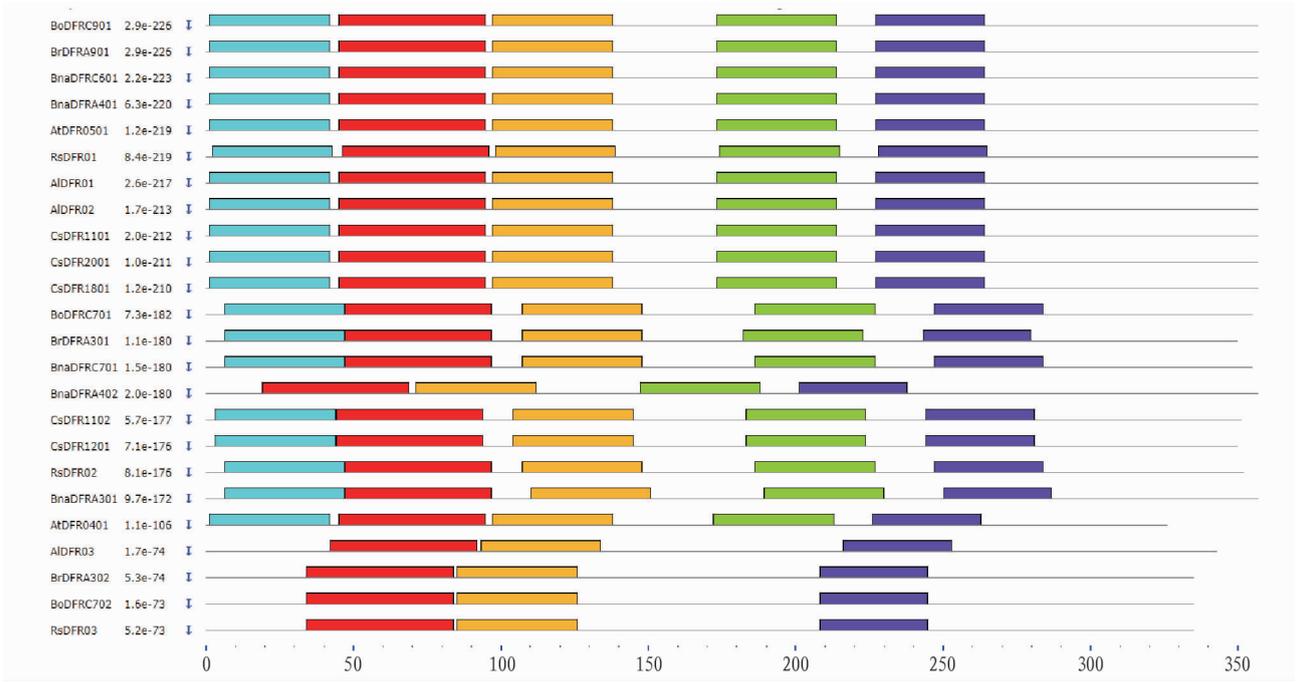


图2 motifs在DFR蛋白序列中的位点

Fig. 2 Location of motifs in DFR proteins

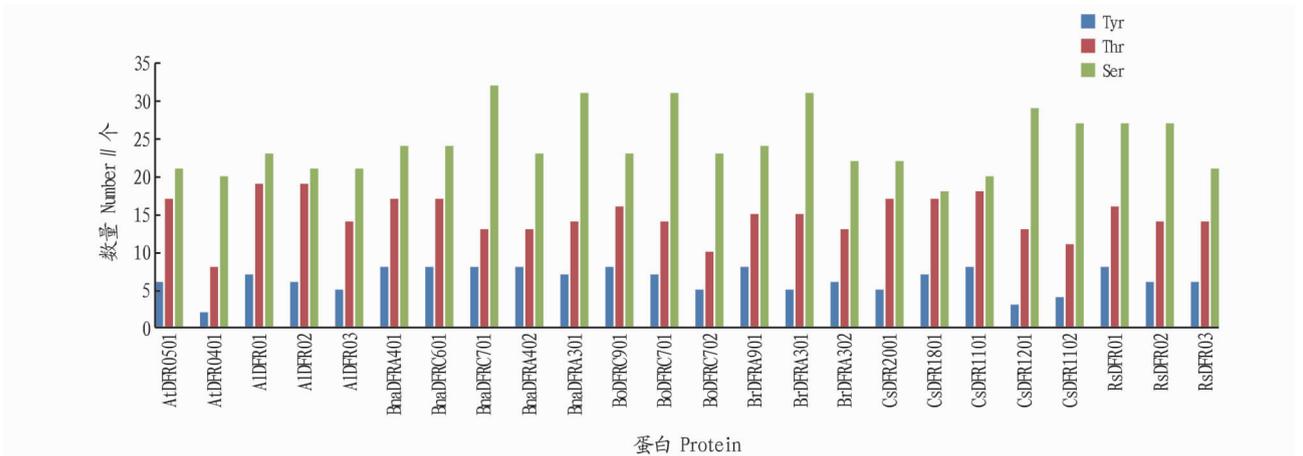


图3 十字花科植物DFR蛋白的磷酸化位点预测

Fig. 3 Phosphorylation site prediction for DFR proteins of Cruciferae plant

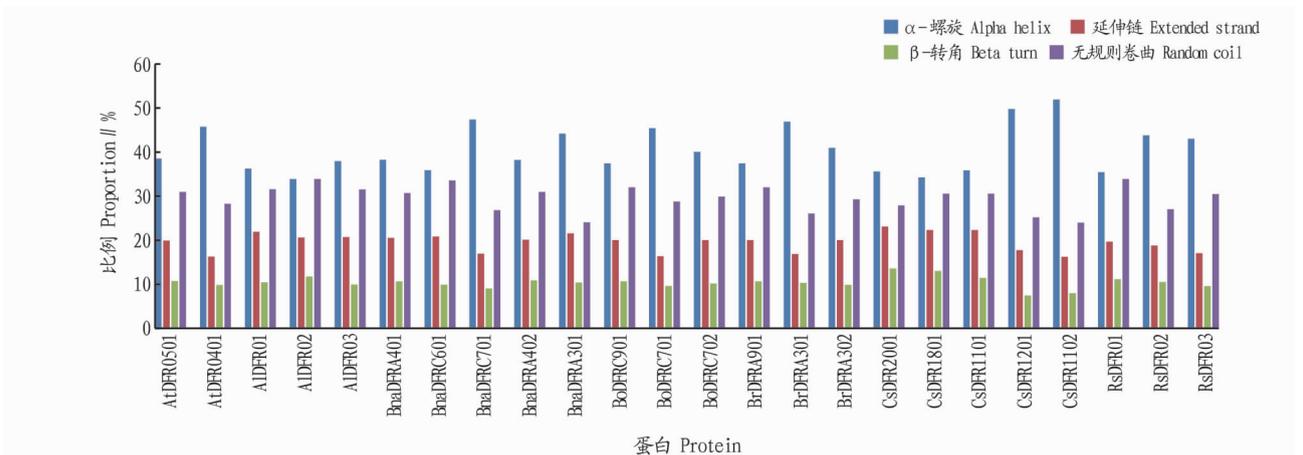


图4 十字花科植物DFR蛋白的二级结构预测结果

Fig. 4 Secondary structure prediction for DFR proteins of Cruciferae plant

ALDFR02	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
ALDFR01	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
ALDFR03	KILVTGSTGYLGARICHALLRGHSVRALVR	43
AtDFR0401	KVCVTGASGFLASWVWRLLLEGYEVIGTVR	37
AtDFR0501	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
BnaDFRA301	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	42
BnaDFRC601	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
BnaDFRC701	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	42
BnaDFRA401	TVCVTASRFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
BnaDFRA402	.....MTISN.....LRVFLA	11
BrDFRA901	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
BrDFRA301	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	42
BrDFRA302	KILVTGSSGYLGARICHALLRGHSVRALVR	32
BoDFRC702	KILVTGSSGYLGARICHALLRGHSVRALVR	32
BoDFRC701	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	42
BoDFRC901	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
CsDFR1101	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
CsDFR1102	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	39
CsDFR1201	TYCVTASGYIGSWVKSLLERGYTVHATLR	39
CsDFR1801	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
CsDFR2001	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	37
RaDFR01	TVCVTGASGFIGSWVMRLLERGYFVRATVR	38
RaDFR03	KILVTGSSGYLGARICHALLRGHSVRALVR	32
RaDFR02	TYCVTASGYIGSWVNSLLERGYTVHATLR	42
Consensus	1	

A

ALDFR02	CVKARTVRRFIFPTSSAGTVNVEE...HQKSVYDNDWSD	150
ALDFR01	CVKARTVRRFIFPTSSAGTVNVEE...HQKSVYDNDWSD	150
ALDFR03	VKETRTVCRITITSSFFALGSTDG...SVANE.....	138
AtDFR0401	CRNPSLKRIVLITSSSTVIRIRDDF.DFKIPLLESISWISV	152
AtDFR0501	CVKARTVRRFVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	150
BnaDFRA301	CLKSNSVRRVVFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKTPI	166
BnaDFRC601	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	150
BnaDFRC701	CLKSNSVRRVIFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKTPI	163
BnaDFRA401	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	150
BnaDFRA402	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	124
BrDFRA901	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	150
BrDFRA301	CLKSNSVRRVVFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKTPI	163
BrDFRA302	VEETHSVCRVITITSSFFALGSTDG...SVANE.....	130
BoDFRC702	VEETHSVCRVITITSSFFALGSTDG...SVANE.....	130
BoDFRC701	CLKSNSVRRVVFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKTPI	163
BoDFRC901	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	150
CsDFR1101	CVKARTVRRFVPTSSAGTVNVEE...HQKSVYDNDWSD	150
CsDFR1102	CLKSNSVRRVVFPTSSISALIAKDENRWRISVDETCCKARV	160
CsDFR1201	CLKSNSVRRVVFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKARV	160
CsDFR1801	CVKARTVRRFVPTSSAGTVNVEE...HQKSVYDNDWSD	150
CsDFR2001	CVKARTVRRFVPTSSAGTVNVEE...HQKSVYDNDWSD	150
RaDFR01	CDKARTVRRIVPTSSAGTVNVEE...HQKNVYDNDWSD	151
RaDFR03	VKETRTVCRITITSSFFALGSTDG...SVANE.....	130
RaDFR02	CLKSNSVRRVVFPTSSISITLAKDENRWRISVDETCCKTPI	163
Consensus	288	e

ALDFR02	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
ALDFR01	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
ALDFR03	DQVHSEEFFCTEERSRAADKIPMN.HASEG	169
AtDFR0401	E..ECKRFQVW.NAISKTLAEKAWDYAEKGG	181
AtDFR0501	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
BnaDFRA301	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	198
BnaDFRC601	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
BnaDFRC701	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	195
BnaDFRA401	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
BnaDFRA402	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	156
BrDFRA901	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
BrDFRA301	DHVLKTR...VYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	191
BrDFRA302	SCVHNERFFCTEERSRAADKIPMN.HASEG	161
BoDFRC702	DQVHSEEFFCTEERSRAADKIPMN.HASEG	161
BoDFRC701	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	195
BoDFRC901	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
CsDFR1101	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
CsDFR1102	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	192
CsDFR1201	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	192
CsDFR1801	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
CsDFR2001	EFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	182
RaDFR01	DFIMSKKMTGWYVFVSKTLAEKAWDYAEKGG	183
RaDFR03	DQVHNERFFCTEERSRAADKIPMN.HASEG	161
RaDFR02	DHVLKTRASGWYVLSRLVSEEEAFRYAKEEG	195
Consensus	y sk a g	

B

注:A.代表 NADP 的结合功能域保守序列;B.代表底物特异结合功能域保守序列

Note:A. NADP binding sites;B. Substrate specific binding sites

图 5 十字花科植物 DFR 氨基酸序列的多重比对

Fig.5 Multiple alignment of DFR amino acid sequences in Cruciferae plant

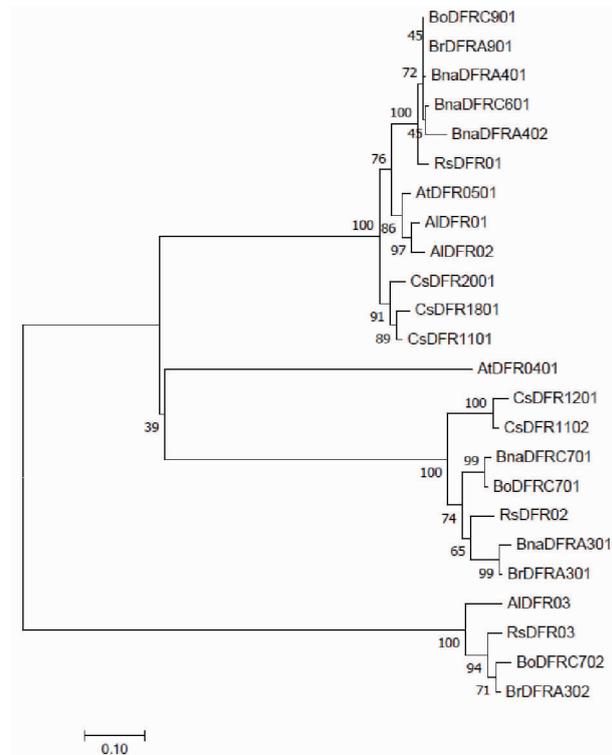


图 6 十字花科植物 DFR 蛋白的系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic tree based on DFR proteins of Cruciferae plant

参考文献

[1] 陈大志,周嘉裕,李萍.二氢黄酮醇-4-还原酶的生物信息学分析[J].生物技术通报,2010(12):206-212.

[2] 杨宏霞,曲柏宏,刘振坤,等.延边苹果梨 *PyDFR* 基因的克隆及表达分析[J].北方园艺,2015(4):99-103.

[3] 周琳,王雁,任磊,等.牡丹二氢黄酮醇-4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析[J].植物生理学报,2011,47(9):885-892.

[4] TANAKA Y,SASAKI N,OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins,betalains and carotenoids[J]. Plant J,2008,54(4):733-749.

[5] AHMED N U,PARK J I,JUNG H J,et al. Characterization of dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) genes and their association with cold and freezing stress in *Brassica rapa*[J]. Gene,2014,550(1):46-55.

[6] 刘娟,冯群芳,张杰.二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (*DFR*) 与花色的修饰[J].植物生理学通讯,2005,41(6):715-719.

[7] 虎娟,安韶雅,林哲,等.马藜 *DFR* 基因的克隆及生物信息学特征分析[J].北方园艺,2017(24):109-115.

[8] MEYER P,HEIDMANN I,FORKMANN G,et al. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene[J]. Nature,1987,330(6149):677-678.

[9] AIDA R,KISHIMOTO S,TANAKA Y,et al. Modification of flower color in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation[J]. Plant Sci,2000,153(1):33-42.

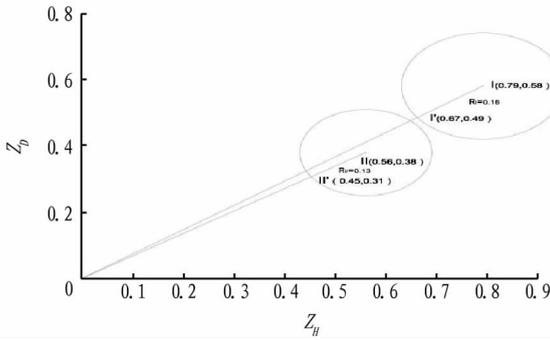
[10] ROSATI C,SIMONEAU P,TREUTTER D,et al. Engineering of flower color in *forsthyia* by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway[J]. Molecular breeding,2003,12(3):197-208.

[11] FUKUSAKI E I,KAWASAKI K,KAJIYAMA S,et al. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference[J]. J Biotechnol,2004,111(3):229-240.

[12] KATSUMOTO Y,FUKUCHI-MIZUTANI M,FUKUYI Y,et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin[J]. Plant Cell Physiol,2007,48(11):1589-1600.

[13] GASTEIGER E,GATTIKER A,HOOGLAND C,et al. ExPASy:The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. Nucleic Acids Res,2003,31(13):3784-3788.

苗木分级时参考。目前国内大多数的苗木分级研究仅限于某一地点或某区域,对于不同地点不同年度的苗木分级研究将是未来研究的一种趋势。



注: $Z_H$ 、 $Z_D$  分别为苗高和地径的标准化值,I、II级苗的最终凝聚中心分别为I和II级苗的圆心, $R_I$ 、 $R_{II}$  分别表示I级苗和II级苗的半径; $I'$ 和 $II'$ 分别代表I、II级苗的临界点

Note: $Z_H$ 、 $Z_D$  are the normalized values of seedling height and ground diameter respectively. The final agglomeration centers of I and II seedlings are the center of I and II seedlings respectively,  $R_I$ 、 $R_{II}$  respectively indicate the radius of I seedlings and II seedlings;  $I'$  and  $II'$  represent the critical point of I and II seedlings, respectively

图1 样苗临界值的确定

Fig. 1 Determination of critical value of sample seedlings

## 参考文献

- [1] 广西林业局广西林学会. 阔叶树种造林技术[M]. 南宁:广西人民出版社,1980.
- [2] 刘举,陈继富. 木兰科四种植物种子油的提取及脂肪酸成分分析[J]. 广西植物,2013,33(2):208-213.
- [3] 姜清彬,李清莹,王里,等. 四种方法对火力楠叶片油的提取分析[J]. 分子植物育种,2018,16(6):1985-2000.
- [4] 郑宝定. 不同海拔坡段生物防火林带火力楠生长情况及阻火效果分析[J]. 安徽林业科技,2013,39(1):27-29.
- [5] 薛立,薛晔,吴敏,等. 不同坡位火力楠林土壤肥力变化特征[J]. 水土保持通报,2011,31(6):51-54.
- [6] 张家武,廖利平,李锦芳,等. 马尾松火力楠混交林凋落物动态及其对土壤养分的影响[J]. 应用生态学报,1993,4(4):359-363.
- [7] 王光玉. 杉木混交林水源涵养和土壤性质研究[J]. 林业科学,2003(S1):15-20.
- [8] 刘勇. 我国苗木培育理论与技术进展[J]. 世界林业研究,2000,13(5):43-49.
- [9] 侯元兆. 现代林业育苗的理念与技术[J]. 世界林业研究,2007,20(4):24-29.
- [10] 张建国,王军辉,许洋,等. 网袋容器育苗新技术[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [11] 欧斌,马小焕,赖锦良,等. 赣南火力楠苗木质量分级指标研究[J]. 南方林业科学,2016,44(1):27-30.
- [12] 蒙彩兰,黎明,郭文福. 西南桦轻基质网袋容器育苗技术[J]. 林业科技开发,2007,21(6):104-105.
- [13] 杨斌,周凤林,史富强,等. 铁力木苗木分级研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(1):85-89.
- [14] 贾宏炎,赵志刚,蔡道雄,等. 格木轻基质容器苗分级研究[J]. 种子,2009,28(11):19-21.
- [15] 黎明,曾杰,郭文福,等. 西南桦轻基质网袋容器苗的质量评价指标[J]. 贵州农业科学,2011,39(6):178-180.

(上接第107页)

- [14] MARCHLER-BAUER A,BO Y,HAN L,et al. CDD/SPARCLE:Functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. Nucleic Acids Res,2017,45:200-203.
- [15] BAILEY T L,BODÉN M,BUSKE F A,et al. MEME SUITE:Tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic acids research,2009,37:202-208.
- [16] BLOM N,GAMMELTOFT S,BRUNAK S. Sequence-and structure-based

prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. Journal of molecular biology,1999,294(5):1351-1362.

- [17] BLOM N,SICHERITZ-PONTEN T,GUPTA R,et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J]. Proteomics,2004,4(6):1633-1649.
- [18] KUMAR S,STECHE G,TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular biology and evolution,2016,33:1870-1874.