

# 石榴着色相关蛋白DFR的生物学信息分析

白云赫, 张文颖, 贾海锋, 纠松涛, 房经贵, 王晨\*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

**摘要:**【目的】对DFR蛋白进行生物学分析,以了解石榴DFR蛋白的生物学信息,以及石榴DFR蛋白与其他物种DFR蛋白的亲缘关系。【方法】通过生物信息学方法对石榴DFR蛋白(PgDFR)以及不同亲缘关系的19个物种进行分析,并重点对荞麦DFR蛋白(FeDFR)、拟南芥DFR蛋白(AtDFR)与石榴DFR蛋白的氨基酸组成、蛋白质理化性质、二级结构、三级结构、结构域以及motif进行分析。【结果】DFR进化树表明,在20种物种中,FeDFR与PgDFR亲缘关系较近,AtDFR与PgDFR的亲缘关系较远;在二级结构中,PgDFR、FeDFR、AtDFR均以无规则卷曲为主,但是其所占的比例存在一定的差异,其中AtDFR所占比例达到56%以上,PgDFR和FeDFR所占的比例比较接近,均为48%左右;PgDFR、FeDFR和AtDFR蛋白的三级结构无明显差异;PgDFR、FeDFR和AtDFR蛋白结构域显示,都含有PLN02896超家族,但是AtDFR却还含有PgDFR和FeDFR所没有的PLN02650结构域;在20种物种DFR蛋白的motif元件中,石榴DFR蛋白的motif数量和位置与大多数物种的相似,表明亲缘关系较近,而拟南芥DFR蛋白的motif数量和位置与其他物种差异较大,说明亲缘关系较远。【结论】PgDFR蛋白与其亲缘关系较近的FeDFR蛋白高度相似都具有较强的保守性,而与其亲缘关系较远的AtDFR蛋白差异较大,可能会有不同的功能。因此,本研究结果阐释了石榴DFR蛋白的进化与功能保守性,为进一步认识石榴DFR蛋白的生物学功能及其对花色苷调控研究奠定工作基础,也为其他植物着色机制研究提供一定的参考。

**关键词:** 石榴;着色;PgDFR蛋白;生物信息学分析

中图分类号: S665.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)Suppl.-056-09

## Biological information analysis of the protein——DFR protein in *Punica granatum*

BAI Yunhe, ZHANG Wenying, JIA Haifeng, JIU Songtao, FANG Jinggui, WANG Chen\*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** 【Objective】*Punica granatum* has been cultivated for more than 2 000 years in our country. The color and luster have great influence on fruit quality, and the appearance of color is closely related to flavonoid metabolism. Anthocyanin is an important flavonoid compound. In the pathway of anthocyanin synthesis, two hydrogen brass 4- reductase (DFR) plays an important role in the regulation of anthocyanin synthesis. The biological analysis of DFR protein was conducted to understand the biological information of pomegranate DFR protein and the relationship between pomegranate DFR protein and other species DFR protein. 【Methods】In this paper, we analyzed pomegranate DFR protein (PgDFR) and 19 related species by bioinformatics methods, and elaborate FeDFR, AtDFR and PgDFR's amino acid composition, protein physical and chemical properties, two stage structure, three stage structure, domain and motif. 【Results】DFR phylogenetic tree shows that FeDFR is closely related to PgDFR in 20 species, and AtDFR is far from PgDFR; in the two stage structure, PgDFR, FeDFR and AtDFR are from random coil, but there are some differences in the proportion of AtDFR, the proportion reached 56%, the proportion of PgDFR and FeDFR are relatively close, about 48%; no significant difference between the three level structure of

收稿日期: 2017-08-10 接受日期: 2017-09-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费自主创新重大专项(自然科学)(KYTZ201602);农业部果树育种技术重点实验室开放课题(NBY-201508-1)

作者简介: 白云赫,男,在读硕士研究生,研究方向:果树分子生物学与功能基因组学。E-mail: 2943729209@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: wangchen@njau.edu.cn

PgDFR, FeDFR and AtDFR protein; PgDFR, FeDFR and AtDFR protein domain showed that its contain PLN02896 superfamily, but AtDFR is also the PLN02650 domain containing PgDFR and FeDFR had no motif element in the analysis; 20 species of DFR protein in motif, the number and location of pomegranate DFR protein and most species are similar, that is close genetic relationship, and the motif number and location of DFR protein in Arabidopsis and other species differences that distantly related. 【Conclusion】These results show that the PgDFR protein is highly conserved with its close relative FeDFR protein, while the AtDFR protein, which is far from its phylogenetic relationship, may have different functions. Therefore, the results of this study explains the evolution and function of conservative pomegranate DFR protein, for further understanding the biological function of pomegranate DFR protein and its regulation on basic work lay on anthocyanins for other plants, coloring mechanism research to provide certain reference

**Key words:** Pomegranate; Coloration; PgDFR protein; Bioinformatics analysis

石榴(*Punica granatum* L.)属于石榴科石榴属,为多年生落叶乔木或灌木,是最早发现的可食用水果之一<sup>[1]</sup>,更是一种重要的园林绿化树种。石榴的色泽呈现与类黄酮代谢密切相关,其中,花色苷是广泛存在于被子植物的一类重要类黄酮物质,是植物叶、花、果呈色的物质基础<sup>[2]</sup>。花色苷是花青素与糖以糖苷键结合而成的一类化合物,具有类黄酮的典型结构<sup>[3]</sup>。迄今为止已发现的花青素有20种,石榴中主要有6种,分别是天竺葵色素(pelargonidin)、矢车菊色素(cyaniding)、花翠素(delphinidin)、芍药色素(peonidin)、牵牛色素(petunidin)和锦葵色素(malvidin)等<sup>[4]</sup>。花色苷合成代谢涉及多个结构基因、调节基因的相互作用,基因编码的酶决定了花色苷合成的种类<sup>[5]</sup>。而花色苷的显色作用受到DFR等基因的调控。DFR是花色苷生物合成途径中的关键酶,它以二氢黄酮类物质为底物,在辅因子NADPH的作用下,产生矢车菊素、天竺葵素、飞燕草等3种无色原花色苷<sup>[6]</sup>,进一步转化为有色花青素,使植物呈现颜色。

石榴是一古老的果树,原产于伊朗、阿富汗等中亚地区,现广泛栽培于热带、亚热带地区<sup>[7]</sup>。2000多年前沿丝绸之路传入我国,在长期栽培驯化过程中,形成了丰富的品种资源,具有丰富的遗传多样性<sup>[8]</sup>。石榴是深受各国人民喜爱的一种传统果树,果实具有极高的营养保健功效而成为重要的功能水果,果皮、果汁、种子等提取物的氧化活性研究备受重视<sup>[9]</sup>。近年来,由于石榴具有多种医疗保健作用受到人们越来越多的重视<sup>[10]</sup>。其中,花青苷具有显著的抗氧化、抗炎、抑菌、防止肝脂肪积聚及变性、防治心血管疾病、抑制多种癌细胞生长等多种生理活性,在

食品、医药、化妆等领域有着广泛的应用前景<sup>[11]</sup>。笔者分析了石榴DFR蛋白在20种植物中系统进化,并重点对比了石榴及其近缘的荞麦、较远亲缘的拟南芥DFR蛋白的氨基酸组成、理化性质、二级结构、三级结构、结构域和motif元件,分析其功能的保守性与进化,为进一步认识石榴DFR蛋白的生物学功能及其在石榴着色机制的调控作用奠定工作基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 DFR蛋白系统进化树的构建

通过NCBI数据库登陆石榴GenBank登录号KC430327,获得石榴DFR蛋白的氨基酸序列,并通过Blastp检索石榴DFR蛋白与其他物种DFR蛋白的同源性,然后选取不同的物种,通过MEGA-5.1软件构建石榴与其他物种的系统进化树。

### 1.2 DFR蛋白理化性质的分析

用ExPaSy提供的在线Protparam软件(<http://web.expasy.org/tools/protparam.html>)进行氨基酸数目与组分、理论等电点、蛋白质疏水性、稳定性等分析。

### 1.3 DFR蛋白二级结构分析

通过在线数据库PrdictProtein(<https://www.predictprotein.org/home>)预测分析 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲。

### 1.4 DFR蛋白三级结构分析

利用在线数据库Expasy提供的SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)构建DFR蛋白的三级结构。

### 1.5 结构域分析

采用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)进行预测DFR蛋白的结构域。

## 1.6 Motif 分析

利用在线 MEME 网站 (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 对石榴及其它 17 个 DFR 蛋白的氨基酸序列进行模序分析。设定参数最大宽度值为 50, 最小宽度值为 6, 模序量小于 20 个, 其余参数的设置均为默认。

## 2 结果与分析

### 2.1 DFR 蛋白系统进化树的构建

为了认识石榴 DFR 蛋白与其他物种中同源蛋白的亲缘关系, 以及石榴 DFR 蛋白的特征, 本研究构建了石榴和其他 19 个物种的 DFR 蛋白的进化树 (图 1)。从系统进化树中可以看出, 该进化树分为两大组, 其中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 单独为一组, 而另外 19 个为另一组, 但该组又有两个分支, 石

榴 DFR 蛋白与荞麦 (*Fagopyrum esculentum*)、苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum*) 组成一分支, 余下的植物芒果 (*Mangifera indica*)、甜橙 (*Citrus sinensis*)、巨安 (*Eucalyptus grandis*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、美洲山杨 (*Populus tremuloides*)、三角叶杨 (*Populus trichocarpa*)、圆叶葡萄 (*Vitis rotundifolia*)、西洋梨 (*Pyrus communis*)、山楂 (*Crataegus monogyna*)、苹果 (*Malus domestica*)、砂梨 (*Pyrus pyrifolia*)、甜樱桃 (*Prunus avium*)、核桃 (*Juglans regia*)、牡丹 (*Paeonia suffruticosa*)、杜鹃 (*Rhododendron simsii*)、番木瓜 (*Carica papaya*) 等 16 个同源蛋白组成另一分支。由进化树可知, 石榴 DFR 蛋白与拟南芥同源蛋白亲缘关系较远, 而与荞麦的亲缘关系较近。基于此, 笔者选择与石榴 DFR 蛋白亲缘关系较近的荞麦 (FeDFR) 和亲缘

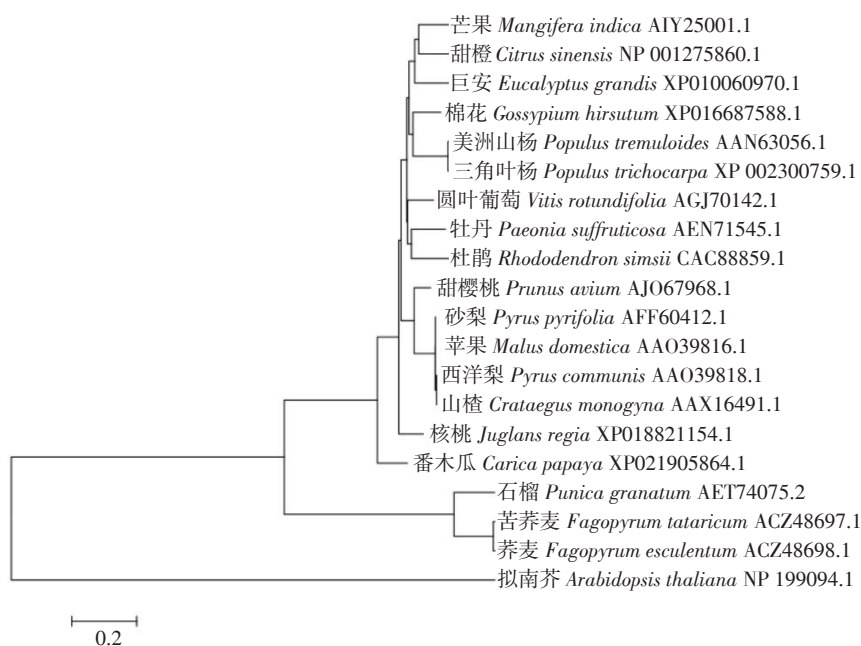


图 1 石榴与其近缘物种 DFR 蛋白的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of pomegranate and its related species

关系较远的拟南芥 (AtDFR) 与石榴 DFR 蛋白进行对比分析, 进一步鉴定它们之间的进化进程与保守性特征。

### 2.2 理化性质预测分析

PgDFR 蛋白的分子式为  $C_{1667}H_{2594}N_{446}O_{484}S_{18}$ , 分子质量为 5 209; 该蛋白质的相对分子质量为 37 204.71, 理论等电点 (pI) 为 6.29, 带负电荷的残基总数 (Asp + Glu) 为 43 个, 带正电荷的残基总数 (Arg + Lys) 为 39 个。FeDFR 蛋白的分子式为  $C_{1723}H_{2675}N_{445}O_{512}S_{23}$ , 分子质量为 5 378; 该蛋白质的相

对分子质量为 38 553.25, 理论等电点 (pI) 为 5.60, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 47 个, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 39 个。AtDFR 蛋白的分子式为  $C_{1907}H_{2986}N_{492}O_{579}S_{22}$ , 分子质量为 5 986; 该蛋白质的相对分子质量为 42 774.96, 理论等电点 (pI) 为 5.43, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 50 个, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 41 个 (表 1)。其中 AtDFR 蛋白的氨基酸个数最多, 为 382 个, PgDFR 蛋白的氨基酸数最少为 327 个, FeDFR 蛋白的氨基酸数居中, 为 341 个, 与 AtDFR 蛋白的氨基酸数接近; AtDFR 的

表 1 PgDFR、FeDFR 和 AtDFR 理化性质的比较

Table 1 PgDFR, FeDFR and AtDFR comparison of physical and chemical properties

项目 Item	石榴 DFR 蛋白 PgDFR	荞麦 DFR 蛋白 FeDFR	拟南芥 DFR 蛋白 AtDFR
氨基酸数 Amino acid number	327	341	382
等电点 Isoelectric point	6.29	5.60	5.43
相对分子质量 Relative molecular mass	37 204.71	38 553.35	42 774.96
负电荷残基数 Residual base of negative charge	43	47	50
正电荷残基数 Positive residual base number	39	39	41
分子式 Molecular formula	C <sub>1 667</sub> H <sub>2 594</sub> N <sub>446</sub> O <sub>484</sub> S <sub>18</sub>	C <sub>1 723</sub> H <sub>2 675</sub> N <sub>445</sub> O <sub>512</sub> S <sub>23</sub>	C <sub>1 907</sub> H <sub>2 986</sub> N <sub>492</sub> O <sub>579</sub> S <sub>22</sub>
分子质量 molecular mass	5 209	5 378	5 986
不稳定参数 Unstable parameter	38.84s	35.59s	36.85s
亲疏水性 Hydrophilic hydrophobicity	-0.327(亲水 Hydrophobicity)	-0.242(亲水 Hydrophobicity)	-0.225(亲水 Hydrophobicity)

注: s 表示稳定蛋白。亲疏水性正值为疏水性蛋白,负值为亲水性蛋白。

Note: s indicates stable protein. Positive value of hydropathy indicates hydrophobic protein, negative value of hydropathy indicates hydrophilic protein.

分子质量和相对分子质量高于 PgDFR 和 FeDFR 的相对分子质量和分子质量;PgDFR 和 FeDFR 的带正电荷数相同,低于 AtDFR 的带正电荷数;PgDFR 和 FeDFR 带负电荷数低于 AtDFR 的带负电荷数,因此可初步得出 PgDFR 与 FeDFR 的亲缘关系较近,与 AtDFR 的亲缘关系较远。

PgDFR 蛋白共由 327 个、20 种氨基酸组成,其中亮氨酸(Leu)所占比例最高,达 8.30%;而半胱氨酸

(Cys)和色氨酸(Trp)所占的比例最低,各占 1.80%。FeDFR 蛋白共由 341 个、20 种氨基酸组成,其中缬氨酸(Val)所占比例最高,达 8.50%;而谷氨酰胺(Gln)和色氨酸(Trp)所占的比例最低,各占 1.50%;AtDFR 蛋白共由 382 个、20 种氨基酸组成,其中亮氨酸(Leu)所占比例最高,达 7.90%;而色氨酸(Trp)所占的比例最低,为 1.30%(表 2)。

应用 ProScale 在线软件,对 PgDFR、FeDFR、

表 2 PgDFR、FeDFR 和 AtDFR 氨基酸组成比较

Table 2 PgDFR, FeDFR and AtDFR amino acid composition comparison

名称 Name	简称 Abbreviation	个数 Number			比例 Ratio/%		
		PgDFR	FeDFR	AtDFR	PgDFR	FeDFR	AtDFR
丙氨酸 Ala	A	17	19	23	5.20	5.60	6.00
精氨酸 Arg	R	15	12	12	4.60	3.50	3.10
天冬酰胺 Asn	N	14	15	16	4.30	4.40	4.20
天冬氨酸 Asp	D	17	19	22	5.20	5.60	5.80
半胱氨酸 Cys	C	6	9	8	1.80	2.60	2.10
谷氨酰胺 Gln	Q	8	5	10	2.40	1.50	2.60
谷氨酸 Glu	E	26	28	28	8.00	8.20	7.30
甘氨酸 Gly	G	19	21	24	5.80	6.20	6.30
组氨酸 His	H	11	8	7	3.40	2.30	1.80
异亮氨酸 Ile	I	17	16	24	5.20	4.70	6.30
亮氨酸 Leu	L	27	25	30	8.30	7.30	7.90
赖氨酸 Lys	K	24	27	29	7.30	7.90	7.60
甲硫氨酸 Met	M	12	14	14	3.70	4.10	3.70
苯丙氨酸 Phe	F	18	18	19	5.50	5.30	5.00
脯氨酸 Pro	P	18	15	16	5.50	4.40	4.20
丝氨酸 Ser	S	23	23	29	7.00	6.70	7.60
苏氨酸 Thr	T	18	21	29	5.50	6.20	7.60
色氨酸 Trp	W	6	5	5	1.80	1.50	1.30
酪氨酸 Tyr	Y	7	12	12	2.10	3.50	3.10
缬氨酸 Val	V	24	29	25	7.30	8.50	6.50

AtDFR 蛋白质疏水性预测(图 2)。结果显示,PgDFR 蛋白亲水性最大值为-3.35,疏水性的最大值为 2.50,且亲水性氨基酸略多于疏水性氨基酸,因此该蛋白为亲水性氨基酸;FeDFR 蛋白的疏水性最大

为 2.50,亲水性最大值为-2.24,且疏水性氨基酸多于疏水性氨基酸,所以该蛋白为亲水性蛋白;AtDFR 蛋白疏水性的最大值为 2.50,亲水性最大值为-2.41,且亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,所以



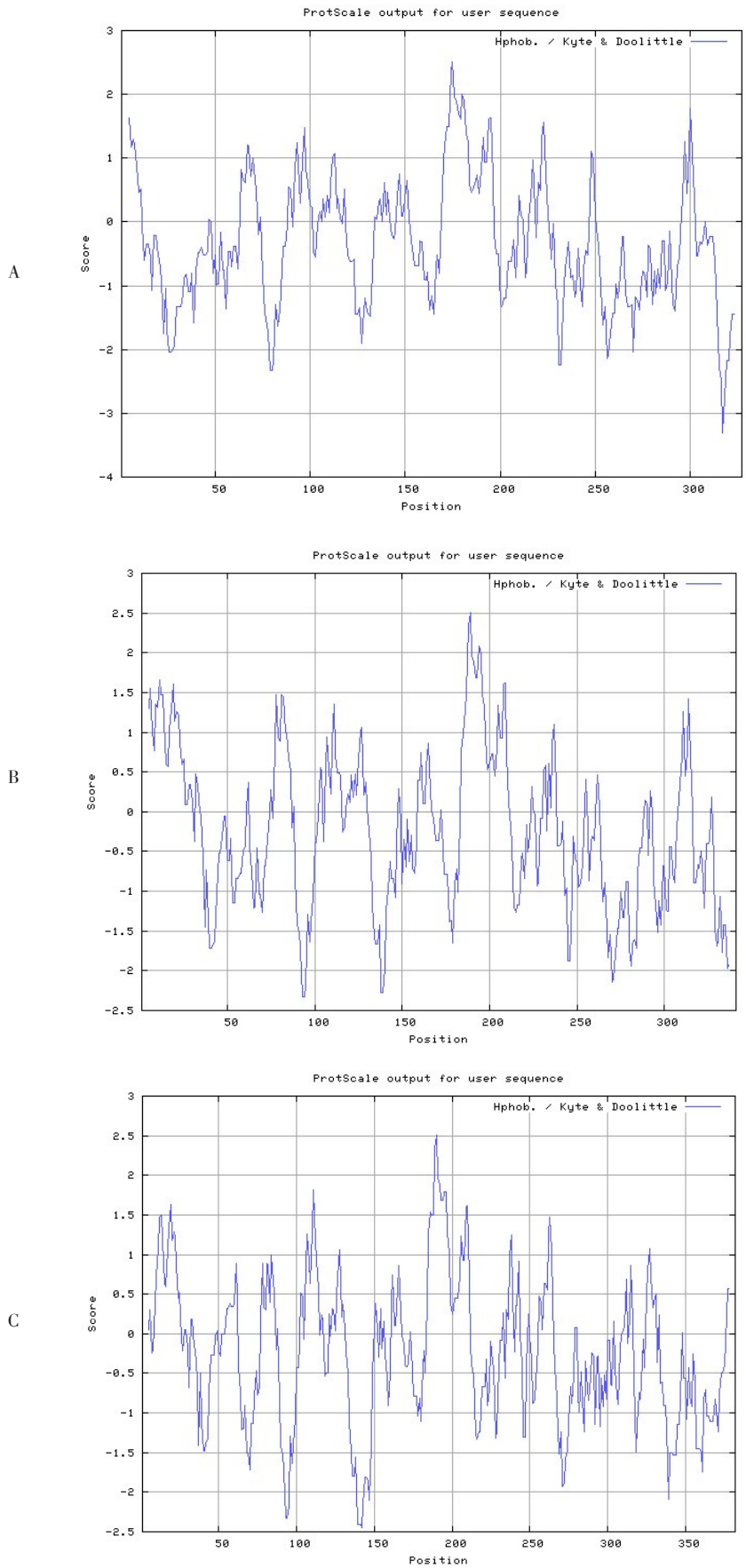


图 2 PgDFR、FeDFR、AtDFR 亲疏水性

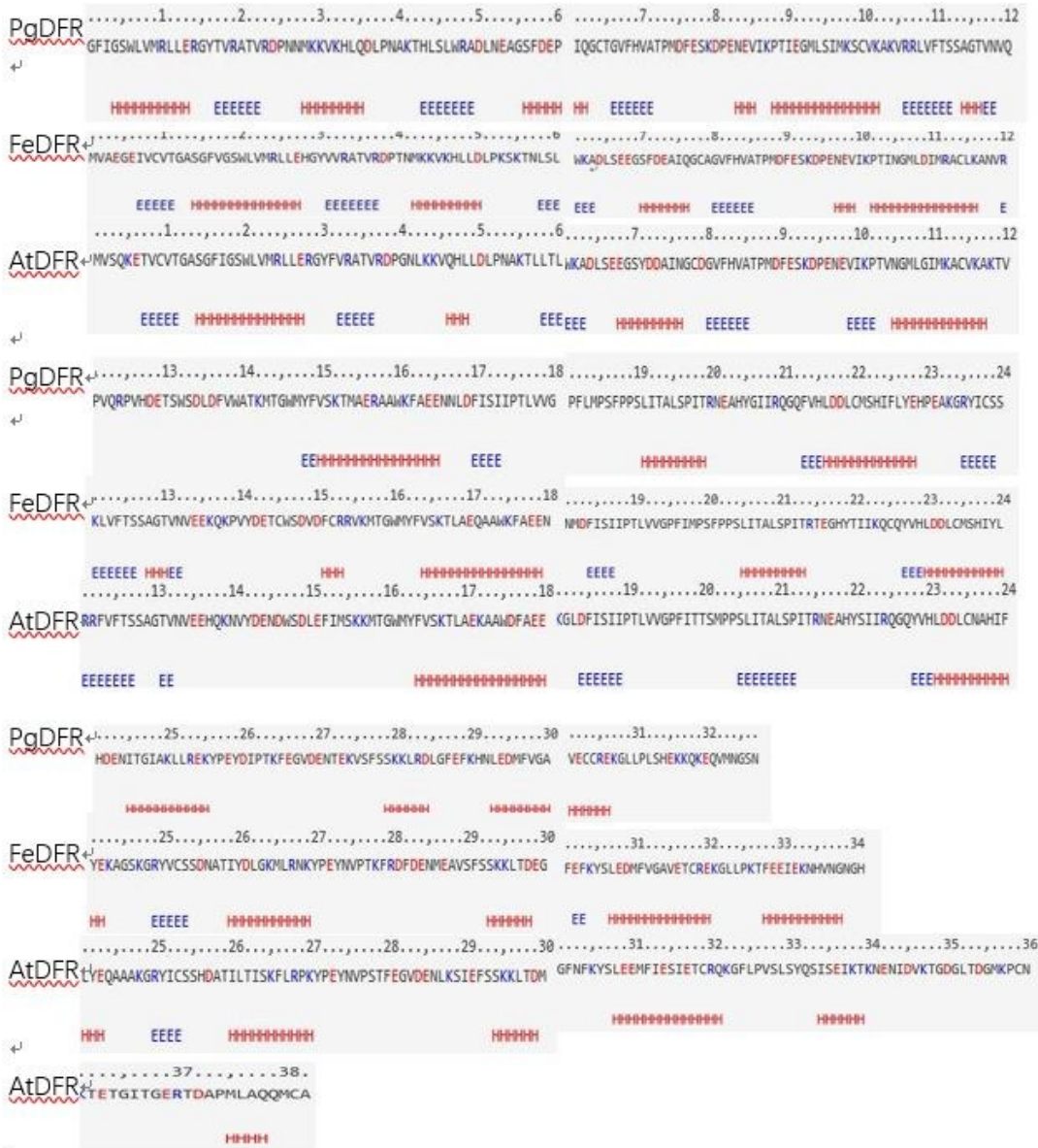
Fig.2 PgDFR, FeDFR, AtDFR hydrophobicity-hydrophilicity

该蛋白为亲水性蛋白。

### 2.3 二级结构预测分析

蛋白质的二级结构是肽链经过折叠和缠绕的方式形成的,二级结构主要有 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲。PgDFR蛋白的二级结构预测表明

$\alpha$ -螺旋占35.17%, $\beta$ -折叠占12.84%,无规则卷曲占51.99%;FeDFR蛋白的二级结构预测表明 $\alpha$ -螺旋占39.30%, $\beta$ -折叠占13.78%,无规则卷曲占46.92%;AtDFR蛋白的二级结构预测表明 $\alpha$ -螺旋占28.80%, $\beta$ -折叠占14.66%,无规则卷曲56.54%(图3,表3)。



H.  $\alpha$ -螺旋; E.  $\beta$ -折叠; L. 无规则卷曲。  
H.  $\alpha$ -helix; E.  $\beta$ -fold; L. Irregular curl.

图3 PgDFR、FeDFR、AtDFR 二级结构比较

Fig. 3 PgDFR, FeDFR, AtDFR two structure comparison diagram

表3 PgDFR、FeDFR、AtDFR 二级结构成分

Table 3 PgDFR, FeDFR, AtDFR two stage structure component

成分 Component	PgDFR	FeDFR	AtDFR
$\alpha$ -螺旋 Alpha helix	35.17%	39.30%	28.80%
$\beta$ -折叠 Beta folding	12.84%	13.78%	14.66%
无规则卷曲 Random crimp	51.99%	46.92%	56.54%

对比分析可知,三个蛋白中 $\beta$ -折叠所占的比列较为接近,PgDFR最低,AtDFR最高,FeDFR居中;虽然在无规则卷曲中PgDFR所占的比列居中,而PgDFR蛋白和FeDFR蛋白在 $\alpha$ -螺旋中所占的比例较高,AtDFR所占的比例较低,从而间接说明PgDFR蛋白与FeDFR蛋白的亲缘关系较近,与AtD-

FR 蛋白的亲缘关系较远。

## 2.4 三级结构预测分析

蛋白质三级结构是指多肽链在二级结构或者超二级结构甚至结构域的基础上,进一步盘绕、折叠,

依靠次级键的维系固定所形成的特点空间结构。蛋白质三级结构有利于对蛋白功能和作用机制的研究。图 4-A、4-B、4-C 分别为 PgDFR、FeDFR、AtDFR 的三级结构图。从图 4 中可以看出,三个蛋白三级

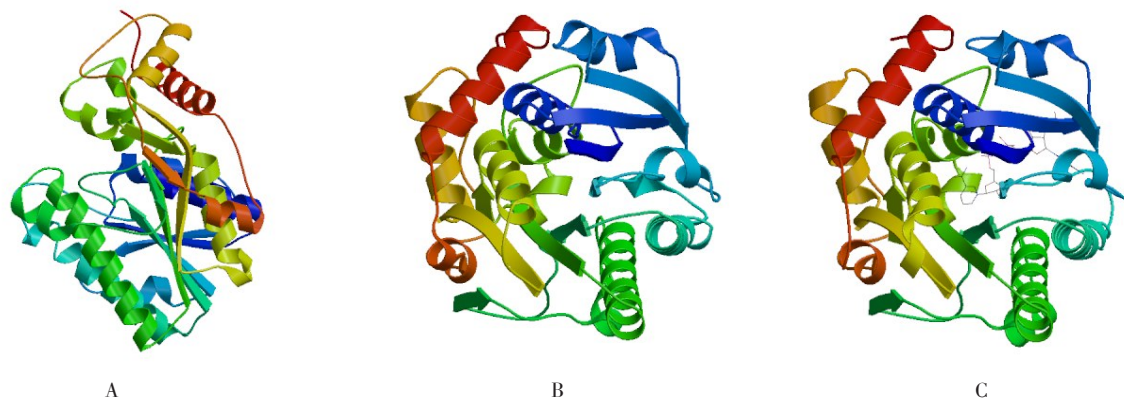


图 4 PgDFR、FeDFR、AtDFR 的三级结构图

Fig.4 PgDFR, FeDFR, AtDFR three stage structure diagram

结构无明显差异。

## 2.5 结构域预测分析

结构域是在蛋白质三级结构内的独立折叠单元,是生物大分子中具有特异结构和独立功能的区域。图 5 为 PgDFR、FeDFR、AtDFR 结构域的比较,结果表明,PgDFR、FeDFR、AtDFR 都含有 PLN02896 超家族蛋白,但 PgDFR 蛋白的 PLN02896 超家族蛋白的长度最短,为 1~315 个氨基酸,而 AtDFR 蛋白的

PLN02896 超家族蛋白的长度最长,为 1~350 个氨基酸,FeDFR 蛋白的 PLN 超家族蛋白的长度居中,为 1~325 个氨基酸,同时也表明石榴 DFR 蛋白与荞麦亲缘关系较近,而与拟南芥较远;此外 AtDFR 蛋白中还有 PgDFR 和 FeDFR 不具有的 PLN02650 结构域;这进一步说明,AtDFR 蛋白与 PgDFR、FeDFR 蛋白保守性较低,而后者具有较高的保守性,同时也表明 PgDFR 与 FeDFR 蛋白亲缘关系较近,与 AtDFR

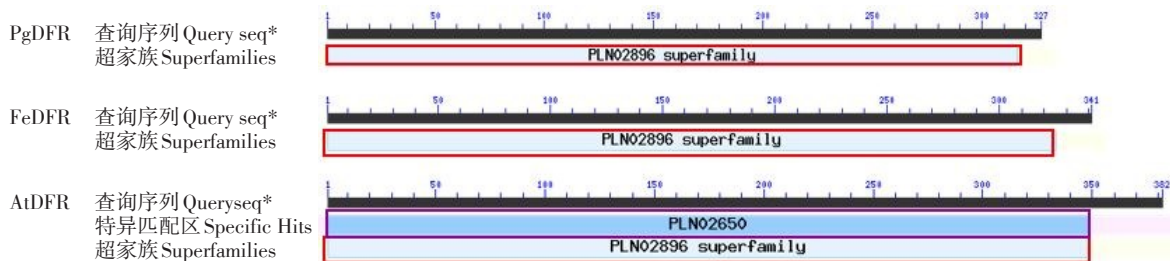


图 5 PgDFR、FeDFR、AtDFR 结构域的比较

Fig. 5 PgDFR, FeDFR, AtDFR structural domain competitive

蛋白的亲缘关系较远。

## 2.6 Motif 元件预测分析

Motif 是蛋白质分子中具有特定空间构象和特定功能的结构成分,具有特殊功能的超二级结构。通过 MEME 在线 motif 预测结果如图 6、表 4 所示,DFR 蛋白 motif 数量变化为 11~15 个。从图中可以得知,除拟南芥(20 号)外,其他 19 个物种(包括石榴)的 motif 数量和类型基本相同,而拟南芥的 motif

数量多于前 19 个物种,且 motif 的排序也有很大差异;石榴、砂梨、西洋梨、山楂、美洲山杨、三角叶杨、核桃的 motif 数量相同,且 motif 种类相差不多,亲缘关系较近;杧果、甜橙、苹果、番木瓜、杜鹃的 motif 数量为 11 个,且杧果和甜橙、苹果和番木瓜的 motif 排列、位置都相同;巨安、甜樱桃、棉花的 motif 数量为 12 个,且 motif 仅有 1 个不同。以上分析再次验证了石榴所在的 19 个物种 DFR 蛋白亲缘关系较近,而拟

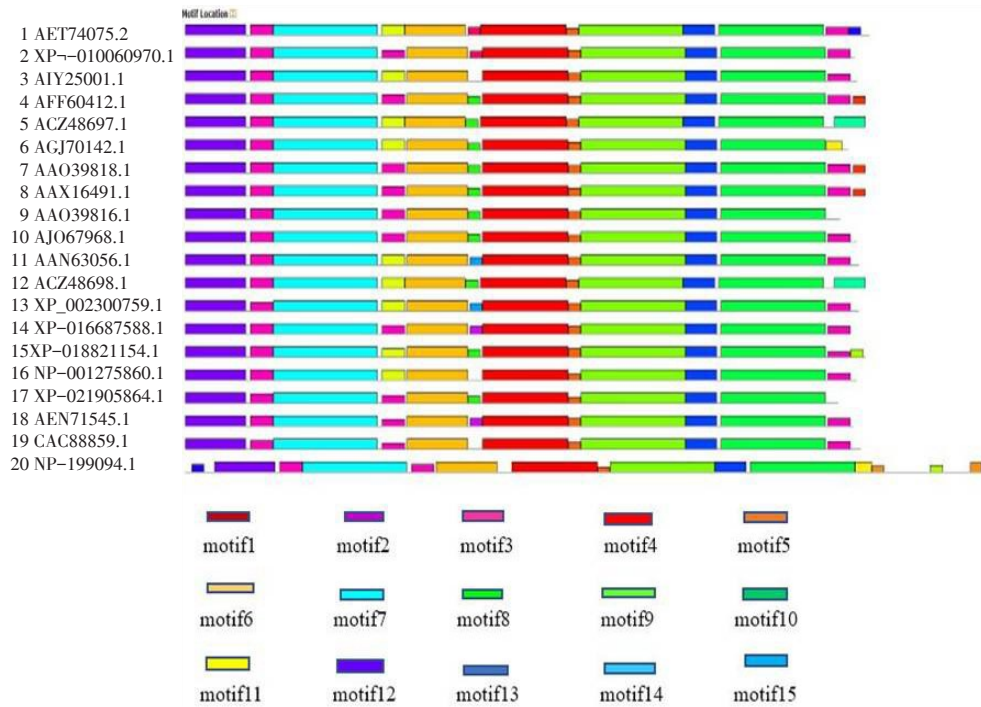


图 6 20 种 DFR 蛋白 motif 图  
Fig. 6 Motif of 20 kinds of DFR protein

表 4 20 个种 DFR 蛋白 motif 分布  
Table 4 Distribution of 20 kind of DFR protein

物种 Species	motif 元件 motif element														
石榴 <i>Punica granatum</i>	12	2	7	11	6	3	1	5	9	13	10	2	13		
巨安 <i>Eucalyptus grandis</i>	12	2	7	2	6	3	1	5	9	13	10	2			
杧果 <i>Mangifera indica</i>	12	2	7	11	6	1	5	9	13	10	2				
砂梨 <i>Pyrus pyrifolia</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10	2	4		
苦荞麦 <i>Fagopyrum tataricum</i>	12	2	7	11	6	8	1	5	9	13	10	14			
圆叶葡萄 <i>Vitis rotundifolia</i>	12	2	7	11	6	8	1	5	9	13	10	11			
西洋梨 <i>Pyrus scommunis</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10	2	4		
山楂 <i>Crataegus monogyna</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10	2	4		
苹果 <i>Malus domestica</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10				
甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10	2			
美洲山杨 <i>Populus tremuloides</i>	12	2	7	11	6	8	15	1	5	9	13	10	2		
荞麦 <i>Fagopyrum esculentum</i>	12	2	7	11	6	8	1	5	9	13	10	14			
三角叶杨 <i>Populus trichocarpa</i>	12	2	7	11	6	8	15	1	5	9	13	10	2		
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	12	2	7	2	6	2	1	5	9	13	10	2			
核桃 <i>Juglans regia</i>	12	2	7	11	6	8	1	5	9	13	10	2	9		
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	12	2	7	11	6	1	5	9	13	10	2				
番木瓜 <i>Carica papaya</i>	12	2	7	2	6	8	1	5	9	13	10				
牡丹 <i>Paeonia suffruticosa</i>	12	2	7	2	6	2	1	5	9	13	10	2			
杜鹃 <i>Rhododendron simsii</i>	12	2	7	2	6	1	5	9	13	10	2				
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	13	12	2	7	2	6	1	5	9	13	10	11	5	9	5

南芥的 DFR 与前 19 个物种及石榴的亲缘关系较远。

### 3 讨论

DFR 蛋白是花色苷合成途径中的关键酶,同时,花色苷的合成过程还受到相关基因的调控,所以花

色苷量的多少对植物器官色泽的形成具有十分重要的意义。在复杂的花色苷合成过程中,呈现不同颜色色素的积累有赖于不同酶、基因的活性。花青素的生物合成最主要是由二氢黄酮 4-还原酶 (DFR)、丙氨酸解氨酶 (PAL)、查尔酮合成酶



(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、类黄酮3-羟化酶(F3H)、类黄酮3'羟化酶(F3'H)、花青苷合成酶(ANS)等多种酶调控的<sup>[12]</sup>。

黄酮类物质主要有二氢黄酮、异黄酮、黄酮、儿茶素、花青素、黄酮和原花青素几大类,且在植物的果实、叶以及花中大量积累<sup>[13]</sup>。二氢黄酮醇还原酶是花色素苷合成途径中后期表达的第一个关键酶,在不同花色形成中起着重要的作用,由于不同物种的DFR对底物选择不同,所以合成的花色素不同,呈现的花色各异<sup>[14]</sup>。O'Reilly等<sup>[15]</sup>采用转座子标签技术首次从玉米(*Zea mays*)中分离克隆出DFR基因。之后,又采用同源克隆的方法相继从矮牵牛(*Petunia hybrida*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、百合(*Lilium hybrid*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)、草莓(*Fragaria × ananassa*)、葡萄和大麦(*Hordeum vulgare*)等10多种植物中分离出了DFR基因,并进行了功能研究<sup>[16]</sup>。石榴作为花果兼用树种,其花色苷相关的色泽研究尤其重要,尽管如此,石榴花色苷方面研究仍然颇少,笔者从DFR蛋白进化、结构、及功能域等方面开展分析能够为进一步研究石榴DFR蛋白的生物学功能及其调控石榴花色苷的分子机制奠定一定的工作基础。

笔者以石榴DFR蛋白为研究对象,结合其它植物的DFR蛋白开展进化分析,不仅为近缘物种提供参考,也证明了石榴物种与模式植物拟南芥较远的亲缘关系,它们之间可能具有不同的功能,这也表明了石榴上开展DFR蛋白研究的重要性。另一方面,通过进化分析,可知道在石榴上开展相关研究可参考哪些已有报道。进一步的DFR蛋白结构分析、功能域及motif鉴定验证了石榴DFR蛋白亲缘关系较近与较远的物种。在其他研究中也报道,DFR蛋白能够提高总黄酮含量及其抗氧化活性,且抗氧化活性与基因的表达水平呈正相关<sup>[17]</sup>。随着分子生物学的不断进步和研究的不断深入,DFR蛋白已经在如上所述的数10种植物中分离,但是石榴中尚未见报道,本研究为进一步认识石榴DFR在其花色苷调控的分子机制奠定一定的工作基础。

#### 参考文献 References:

- ZHAO X Q, YUAN A H, FENG L J, FANG Y M. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate[J]. Journal of Plant Research, 2015, 128:687-696.
- TANAKA Y, OHMIYA A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2):190-197.
- DAO T T H, LINTHBORST H J M, VERPOORTE R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance[J]. Phytochemistry Reviews Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 2011, 10(3):397-412.
- 李巨秀, 张小宁, 李伟伟. 不同品种石榴花色苷、总多酚含量及抗氧化活性比较研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23):143-146. LI Juxiu, ZHANG Xiaoning, LI Weiwei. Comparative study on anthocyanin, total polyphenol content and antioxidant activity of pomegranate in different varieties[J]. Food Science, 2011, 32(23):143-146.
- 刘晓芬, 李方, 殷学仁, 徐昌杰, 陈昆松. 花青苷生物合成转录调控研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(11):2295-2306. LIU Xiaofen, LI Fang, YIN Xueren, XU Changjie, CHEN Kunsong. Advances in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(11):2295-2306.
- HOLTON T A, CORNIS E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1071-1083.
- HOLLAND D, HATIB K, BAR-YA AKOV I. Pomegranate: botany, horticulture, breeding[J]. Horticultural Reviews, 2009, 35(2): 127-191.
- YUAN Z, YIN Y, QU J, ZHU L, LI Y. Population genetic diversity in Chinese pomegranate(*Punica granatum* L.) cultivars revealed by fluorescent-AFLP markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(12): 1061-1071.
- SING R P, MURTHY K N C, JAYAPRAKASHA G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate(*Punica granatum*) peel and seed extract in vitro models[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(1): 81-86.
- 冯玉增, 胡清波. 无公害农产品高效生产技术丛书: 石榴[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 5-6. FENG Yuzeng, HU Qingbo. High efficiency production technology of non polluted agricultural products: Punicagranatum[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2007: 5-6.
- 赵贝塔. 不同石榴品种花色苷的提取、纯化工艺及抗氧化活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014. ZHAO Beita. Study on extraction, purification and antioxidant activity of anthocyanins from different pomegranate varieties[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014.
- 张龙, 李卫华, 姜淑梅, 朱根发, 王碧青, 李洪清. 花色素苷生物合成与分子调控研究进展[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 909-916. ZHANG Long, LI Weihua, JIANG Shumin, ZHU Genfa, WANG Biqing, LI Hongqing. Advances in anthocyanin biosynthesis and molecular regulation[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(6): 909-916.
- KOSE R, VERWEIJ W, QUATTROCCHIO F. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5):236-242.
- 招雪晴, 苑兆和, 陶吉寒, 尹艳蕾, 冯立娟. 红花石榴二氢黄酮醇还原酶(DFR)基因 cDNA 片段克隆及序列分析[J]. 山东农业科学, 2012, 44(2):1-4. ZHAO Xueqing, YUAN Zhaohe, TAO Jihan, YIN Yanlei, FENG Lijuan. Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of two hydrogen white reductase (DFR) gene from safflower pomegranate [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2012, 44(2):1-4.
- O'REILLY C, SHEPHERD N S, PEREIRA A. Molecular cloning of the al locus in *Zea mays* using the transposable elements[J]. Embo Journal, 1985, 4(3):877-882.
- KUMAR V, NADDA G, KUMAR S, YADAV S K. Transgenic tobacco overexpressing tea cDNA encoding Dihydroflavonol 4-Reductase and Anthocyanidin Reductase induces early flowering and provides biotic stress tolerance[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65535.
- 李军, 赵爱春, UNUHOZA, 王茜玲, 刘长英, 鲁成, 余茂德. 桑树 MaDFR 的克隆及功能分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(22): 4515-4532. LI Jun, ZHAO Aichun, UNUHOZA, WANG Qianling, LIU Changying, LU Cheng, YU Maode. Cloning and functional analysis of mulberry MaDFR[J]. Chinese Agricultural Science, 2014, 47(22): 4515-4532.