

# 苹果黄酮醇合成酶基因 *MdFLS1* 的克隆、 生物信息学分析及催化活性鉴定

刘 晓, 路 静, 郝 玉 金, 由 春 香\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院·作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘要:**【目的】在‘嘎拉’苹果中克隆黄酮醇合成酶基因 *MdFLS1* 全长, 对其进行生物信息学分析, 研究其表达特点和催化活性。【方法】利用 RT-PCR 和 PCR 克隆 *MdFLS1* 的全长, 测序后运用多种生物信息学手段对其序列进行分析, 运用 qRT-PCR 的方法研究其表达模式, 原核诱导获得 MdFLS1 蛋白, 并利用高效液相色谱鉴定其催化活性。【结果】苹果 *MdFLS1* 基因包含 1 014 bp 完整的开放阅读框, 编码 337 个氨基酸, 理论等电点为 5.48, 预测分子质量为 38.12 ku。苹果 *MdFLS1* 基因定位于基因组 8 号染色体上, 属于  $\alpha$ -酮戊二酸依赖性双加酶家族。系统进化树分析表明, FLS 在不同物种间具有高度的氨基酸序列保守性; 其中, 苹果 MdFLS1 与甜樱桃 PaFLS 亲缘关系最近。苹果 MdFLS1 蛋白整体表现为亲水性,  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲是其最大的结构元件。分析苹果 MdFLS1 氨基酸序列发现其不含信号肽和转运肽, 没有跨膜结构域, 预测其定位于细胞质中。分析 *MdFLS1* 的启动子区域发现含有激素信号、生物和非生物胁迫响应顺式作用元件。*MdFLS1* 在苹果不同组织中都有表达, 在叶中表达量最高, 在茎中表达量较低。原核诱导并纯化了 MdFLS1 蛋白, 鉴定了 MdFLS1 的催化活性。【结论】*MdFLS1* 的表达明显受高盐胁迫、低温、干旱和 ABA 的诱导, 并且具有催化活性。

**关键词:** 苹果; MdFLS1; 生物信息分析; 表达分析; 原核表达

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)08-0905-12

## Cloning, bioinformatics analysis and catalytic activity identification of *MdFLS1* gene in apple

LIU Xiao, LU Jing, HAO Yujin, YOU Chunxiang\*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University · State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an 271018, Shandong, China)

**Abstract:**【Objective】Flavonol biosynthesis pathway is an important component of the metabolic pathways and catalyzes the formation of flavonol. Flavonol synthase (FLS) plays an important role in flavonol synthesis and improves their resistance to drought and salt. The function of flavonol synthase (FLS) is of great significance to the fruit quality in apple. Therefore, the flavonol synthase gene was cloned from ‘Gala’ apple (*Malus × domestica* Borkh.) and the expression and catalytic activity were studied.【Methods】The full-length of the gene *MdFLS1* was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR). The sequences were obtained and analyzed by various bioinformatics methods. The ProtParam online software was applied to analyze the nucleotides, amino acid physical and chemical characteristics, and protein affinity/hydrophobicity analysis. The protein conserved domain was predicted by the website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The protein sec-

收稿日期: 2018-03-09 接受日期: 2018-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(31471854); 山东省自然科学基金重大基础研究项目计划(ZR2017ZC0328); 山东省现代农业产业技术体系创新团队岗位专家(SDAIT-06-03)

作者简介: 刘晓, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树分子生物学。Tel: 18805488757, E-mail: 740969549@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15069897490, E-mail: youchunxiang@sdau.edu.cn

ondary structure and tertiary structure analysis of MdFLS1 was completed by the SOPMA online software and SWISS MODEL online software, respectively. The protein signal peptide and transmembrane domain of MdFLS1 were predicted by TargetP1.1 and TMHMM software. 18 plant *FLS* genes nucleotide sequences were found in the GenBank database of NCBI. The phylogenetic tree of MdFLS1 protein and was constructed homologous sequence of different species by MEGA 7 software. The expression pattern of *MdFLS1* was studied by qRT-PCR. MdFLS1 protein was obtained through prokaryotes by IPTG inducing, and its catalytic activity was determined by HPLC.【Results】Sequence analysis showed that the length of *MdFLS1* gene contained 1 014 bp bases and encoded 337 amino acids. The molecular mass of MdFLS1 protein was 38.12 ku. And theoretical pI was 5.48. The glutamic acid (Glu) and valine acid (Val) were rich in amino acids. The unstable coefficient of the MdFLS1 protein was 38.94 in apple, and it belonged to the stable protein. The value of its grand average of hydropathicity (GRAVY) was -0.506, indicating that it was a hydrophilic protein. The *MdFLS1* gene was located on chromosome 8 and belonged to the family of alpha ketopantoyl diacid dependent double adding enzyme, containing a heme oxygenase domain in the N-terminal. The tenth arginine had the lowest score -3.113 and was the strongest hydrophilic. The 176th phenylalanine had the highest score 1.825 and was the strongest hydrophobic. The whole polypeptide chain was shown to be hydrophilic. SOPMA online software analysis showed that the two second structure of MdFLS1 protein was composed of 29.38% alpha helix, 24.33% elongation chain, 12.46% beta corner and 33.83% irregular crimp. Therefore, alpha helix and irregular crimp were the largest structural elements in the overall structure of protein MdFLS1, while the extended chain and the beta angle were relatively dispersed in the whole polypeptide chain. SWISS MODEL indicated that the protein MdFLS1 was mainly composed of alpha helix and irregular curl. The amino acid sequence analysis of MdFLS1 by TargetP1.1 online tool showed that it did not contain signal peptide and transport peptide. The results of TMHMM online software analysis indicated that the whole MdFLS1 protein in apple was located outside the membrane, and there was no transmembrane domain. The online software predicted that the apple MdFLS1 was located in the cytoplasm. The amino acid sequence and phylogenetic tree comparison showed that FLS had a highly conserved amino acid sequence in different species. The results indicated that the protein MdFLS1 could be more closely related to sweet cherry, strawberry, peach, rose, and the similarity rates were 99.11%, 79.06%, 77.88%, and 78.17%, respectively. The genetic relationship of MdFLS1 was farther to *Arabidopsis*, *Camellia assamica*, *Acacia confusa* Merr., and the similarity rates were less than 60%. Quantitative real-time PCR analysis demonstrated that the gene *MdFLS1* was mainly expressed in leaves. Promoter *cis*-element prediction of apple *MdFLS1* showed that there were many hormone responsive regulatory elements, such as ABA response element ABRE, salicylic acid responsive element TCA-element and gibberellin responsive element P-box; environmental factor response elements, such as light response elements of Box 4 and G-box; circadian rhythm regulation element circadian; abiotic stress response elements, such as drought responsive element HSE response element MBS and heat in the promoter of *MdFLS1*. These results indicated that *MdFLS1* could respond to various environmental stress such as drought, salt stress, light, circadian rhythm and plant hormones, and affect plant growth and development. The protein MdFLS1 was obtained by prokaryotic induction. And the catalytic activity of MdFLS1 was verified by high performance liquid chromatography.【Conclusion】The biological information of the apple flavonol synthetase was preliminarily understood. The *MdFLS1* might be involved in various hormonal signal responses and abiotic/biological stresses. The *MdFLS1* in apple would respond to abiotic stresses

such as ABA, low temperature, high salinity and drought. The *MdFLS1* protein had catalytic activity *in vitro*. The genetic transformation of the apple *MdFLS1* gene into different plant materials is on the way.

**Key words:** Apple; *MdFLS1*; Bioinformatics analysis; Expression analysis; Prokaryotic expression

植物积累多种次生代谢产物以适应不同的环境<sup>[1]</sup>。类黄酮是一大类次生代谢产物,具有多种功能:有些是细胞结构成分,有些参与花和果实着色,有些参与生物和非生物胁迫响应,有些参与保持人体健康<sup>[2]</sup>。大部分类黄酮化合物通过苯丙氨酸代谢途径产生,主要有查尔酮、黄酮、黄酮醇、花青苷和原花青苷等,其中黄酮醇的种类最为丰富<sup>[3-4]</sup>。黄酮醇具有较高的保健功能,如抗氧化、抗癌、抗菌消炎、预防心脑血管疾病和糖尿病等,食用黄酮醇含量较高的食物有利于保持人体健康<sup>[5-7]</sup>。

黄酮醇等类黄酮化合物的代谢途径已经在多种植物中被充分研究。黄酮醇生物合成是类黄酮代谢的一个重要分支。其合成途径为4-香豆酰-CoA和丙二酰-CoA,在查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)催化下产生柚皮素查耳酮,然后在查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)的作用下生成柚皮素,柚皮素在多种黄烷酮羟化酶,如F3H的催化下生成二氢黄酮醇。二氢黄酮醇是花青素和黄酮醇的共同底物,此时,类黄酮代谢出现2个分支,一支在二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)催化下产生无色花青素,最终形成花青苷和原花青苷;另一支则在黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)的作用下生成黄酮醇<sup>[8]</sup>。因此,黄酮醇合成酶FLS是黄酮醇合成的关键酶。主要的二氢黄酮醇有二氢杨梅素、二氢槲皮素和二氢山萘酚,相应的黄酮醇为杨梅素、槲皮素和山萘酚。

黄酮醇合成酶(FLS)在许多植物中已有广泛研究,其全长首先在矮牵牛中被克隆到<sup>[9]</sup>。在矮牵牛黄酮醇合成酶RNA干扰株系中,黄酮醇含量明显降低,花瓣着色增加<sup>[9]</sup>。在模式植物拟南芥中共有6个黄酮醇合成酶基因,分别为*FLS1~FLS6*<sup>[10]</sup>。其中*FLS1*的活性最高,研究也最充分;*FLS3*的活性次之,研究较少,其他黄酮醇合成酶活性较低。拟南芥中过量表达*AtFLS1*并未提高拟南芥中的黄酮醇含量,甚至有轻微降低<sup>[11]</sup>。研究发现过量表达*AtFLS1*使拟南芥种子着色变浅,进一步用液相色谱分析过量表达株系中的黄酮醇组分,发现槲皮素的含量显

著高于山萘酚;在野生型拟南芥中,山萘酚的含量要高于槲皮素,两者恰好相反。拟南芥中黄酮醇合成酶有6种,可以推测不同的拟南芥黄酮醇合成酶具有底物催化特异性<sup>[11]</sup>。另外,小麦中的黄酮醇合成酶也有被充分研究。小麦中也有多个黄酮醇合成酶,其中*TaFLS1*在抵抗逆境中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。在拟南芥中过量表达小麦*TaFLS1*显著提高了对盐的抗性,降低了体内活性氧水平,提高了活性氧清除酶的活性。小麦*TaFLS2*在抗旱中起重要作用,在拟南芥中过量表达*TaFLS2*提高了拟南芥对干旱的抵抗能力,其作用机制为减少叶片水分散失<sup>[13]</sup>。

苹果是我国人民非常喜爱的一种水果,我国苹果栽培面积和产量均具世界首位。苹果中含有大量的类黄酮化合物,是人体摄入类黄酮的重要途径<sup>[14]</sup>,是黄烷醇和黄酮醇最主要的膳食来源<sup>[15]</sup>。目前对苹果中类黄酮化合物的研究大部分只局限于成分的分析,比如种类和含量等,已经取得了一些成果。研究表明果皮中的类黄酮含量和种类明显高于果肉,苹果果实中的类黄酮种类和含量会随果实发育过程发生变化,黄酮醇的含量逐渐降低,相关基因的表达也会随之改变<sup>[16-18]</sup>。

苹果中的类黄酮化合物合成酶对苹果类黄酮化合物的形成的有至关重要的最用,非常有必要进行充分的研究。黄酮醇在类黄酮化合物中种类最多,活性最高<sup>[19-20]</sup>,对苹果中的黄酮醇合成酶进行克隆并对其进行研究对于提高苹果抗逆性和果实品质有非常重要的理论和应用价值。笔者通过与拟南芥中的*FLS1*进行比对,在苹果中克隆了黄酮醇合成酶基因*MdFLS1*,对其进行生物信息学分析,并对其表达模式进行研究,诱导 $MdFLS1$ 蛋白,验证其具有催化活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与处理

本研究所用‘嘎拉’苹果种植在山东农业大学园艺试验站(山东泰安)。检测 $MdFLS1$ 组织表达模式所用的样品包括生长根、1 a(年)生茎段、成熟叶片、



初花时的花和花后 60 d 的果实, 取样后用液氮冷冻备用。分别用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl、低温 ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )、 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ABA 和  $6\%(\omega)$  PEG6000 (模拟干旱) 处理‘嘎拉’组培苗, 分时间段 (0、0.5、1、3、6、12、24 h) 取样, 用液氮速冻保存备用。

### 1.2 总 RNA 的提取和 qRT-PCR

采用 RNA 提取试剂盒 (植物总 RNA 提取试剂盒, TIANGEN) 提取样品的总 RNA, 利用反转录试剂盒 (PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit, TaKaRa) 获得 cDNA。使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 稀释后检测苹果中 *MdFLS1* 的表达量。以苹果 18S RNA 为内参基因, 前引物序列:  $5' \text{-ACACGGGGAGGTAGTGACAA-3'}$ , 后引物序列:  $5' \text{-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'}$ 。定量分析特异引物序列为前引物:  $5' \text{-AACCACTGTGAACAAGGATA-3'}$ , 后引物:  $5' \text{-CATAGTCGCCGTACTTCTT-3'}$ 。反应体系为  $20 \text{ } \mu\text{L}$ , 具体为:  $2 \times \text{UltraSYBR Mixture}$  (康维世纪)  $10.0 \text{ } \mu\text{L}$ , 上游引物 ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \text{ } \mu\text{L}$ , 下游引物 ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \text{ } \mu\text{L}$ , cDNA  $1.0 \text{ } \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $7.0 \text{ } \mu\text{L}$ 。每个样本 3 次重复。实时荧光定量 qRT-PCR 反应条件:  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $10 \text{ min}$ ,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $15 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $15 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $45 \text{ s}$ , 40 个循环, 反应结束后, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行定量数据分析。

### 1.3 苹果 *MdFLS1* 基因的克隆和生物信息学分析

在 National Center of Biotechnology Information 数据库 (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索序列, 设计出 1 对引物,  $5' \text{-ATGGGAGTGGAGTCTGTGGAG-3'}$  和  $5' \text{-TTATTGGGGAAGCTTGTTAATC-3'}$ , 以从‘嘎拉’组培苗获得的 cDNA 为模板, 采用 PCR 进行基因全长扩增。PCR 反应程序为:  $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ,  $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $60 \text{ s}$ , 35 个循环;  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  后延伸  $10 \text{ min}$ 。PCR 反应结束后, 产物用  $1.5\%(\omega)$  的琼脂糖凝胶进行电泳, 并用试剂盒 (MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0, TaKaRa) 回收目条带, 连接 pMD18-T 克隆载体进行测序。将测出的 DNA 序列在软件 EditSeq 中翻译成氨基酸序列, 使用 ProtParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析基因的核苷酸比例和相应氨基酸的理化特征; 采用 <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php> 预测基因组结构; 使用 NCBI 的 CDD 工具 ([http://www.ncbi.nlm.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白保守功能域; 蛋白亲/疏水性分析使用 ProtScale 在线工具 (<http://web.expasy.org/protscale/>); 蛋白质二级结构分析使用 SOPMA 在线软件 ([http://npsa.pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa.pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)); 利用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质的三维结构; 采用 TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测苹果 *MdFLS1* 蛋白的信号肽和跨膜结构域; 利用 <https://open.predictprotein.org/> 预测亚细胞定位。在 NCBI 的 GenBank 数据库中找到了 18 种植物 *FLS* 基因的核苷酸序列, 分别为忍冬 *Lonicera japonica* (AFJ44313.1)、马铃薯 *Solanum tuberosum* (ACN81826.1)、欧芹 *Petroselinum crispum* (Q7XZQ6.1)、洋桔梗 *Eustoma exaltatum* (AAF64168.1)、苦荞 *Fagopyrum tataricum* (AEC33116.1)、金花茶 *Camellia nitidissima* (ADZ28516.1)、大豆 *Glycine max* (NP001237419.1)、苹果 *Malus domestica* (AAD26261.1)、甜樱桃 *Prunus avium* (AFO67943.1)、草莓 *Fragaria ananassa* (AAZ78661.1)、桃 *Prunus persica* (AJO70134.1)、蔷薇 *Rosa multiflora* (AJP36706.1)、洋葱 *Allium cepa* (AAO63023.1)、橄榄 *Canarium album* (ATL75654.1)、蜜柑 *Citrus unshiu* (Q9ZWQ9.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (AAM64397.1)、野茶树 *Camellia sinensis* (ABA54917.1) 和台湾相思树 *Acacia confusa* (AFA55179.1)。使用 MEGA 7 软件进行氨基酸序列同源比对, 构建系统进化树。

### 1.4 原核表达

以测序正确的基因连接 pMD18-T 的载体为模板, 使用平端快速克隆酶 (TransStart<sup>®</sup> FastPfu Fly DNA Polymerase, TransGen) 进行克隆, PCR 反应程序为:  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $2 \text{ min}$ ,  $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $20 \text{ s}$ ,  $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $20 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $30 \text{ s}$ , 20 个循环;  $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $5 \text{ min}$ 。回收产物连接 pEASY<sup>®</sup> Blunt Expression Vector (TransGen), 连接体系为回收产物  $4 \text{ } \mu\text{L}$ , 载体  $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。将构建好的载体转化到大肠杆菌 Trans5 $\alpha$  (TransGen) 感受态细胞。挑取阳性克隆测序正确后提取质粒转化 BL21 表达感受态细胞 (TransGen)。未加入 IPTG 时取样, 作为 0 h 样品, 然后加入 IPTG 至终浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  进行诱导。分别在诱导至 1、3 和 6 h 时取样, 每次取样  $1 \text{ mL}$ ,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心收集菌体。

诱导完成后的大量菌体离心,加入细胞裂解液,用超声波细胞粉碎机破碎,然后再次高速离心,分别取样上清和沉淀进行检测。

### 1.5 苹果黄酮醇合成酶体外催化活性检测

以二氢槲皮素(花旗松素,分析标准品,≥98%,阿拉丁)为底物检测苹果黄酮醇合成酶的催化活性。反应体系为100 μL体系,包括70 μL粗蛋白提取物,10 μL NADPH(20 mmol·L<sup>-1</sup>)和20 μL二氢槲皮素(50 mmol·L<sup>-1</sup>),室温反应40 min,然后用100 μL甲醇终止反应。反应混合物室温11 000 r·min<sup>-1</sup>离心4 min,吸取上清上样液相色谱仪检测。反应产物检测用槲皮素标准品(槲皮素,分析标准品,≥98%,阿拉丁)。以水为空白对照,检测反应体系在对应底物出峰时间上是否有峰带出现。

### 1.6 启动子顺式作用元件分析

利用数据库 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测苹果 *MdFLS1* 基因启动子上的顺式作用元件,从数据库 NCBI 中找到苹果 *MdFLS1* 基因,选择起始密码子上游2 000 bp作为启动子进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果黄酮醇合成酶基因 *MdFLS1* 的克隆

用设计的特异引物在‘嘎拉’苹果中克隆到1条大约1 000 bp的条带(图1),与预期大小基本一致。测序结果表明苹果 *MdFLS1* (Sequence ID: NP\_001306179.1) 含有一个1 014 bp的开放阅读框,(A+T):(C+G)为52.07:47.93,编码337个氨基酸。通过网站 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测其分子质量为38.12 ku,理论等电点为5.48,表明

苹果 *MdFLS1* 蛋白显酸性。在其肽链氨基酸的组成上,谷氨酸(Glu)和缬氨酸(Val)的含量较为丰富。苹果 *MdFLS1* 蛋白的不稳定系数为38.94,属于稳定类蛋白质。其 Grand average of hydropathicity (GRAVY)值为-0.506,表明它是亲水性蛋白。

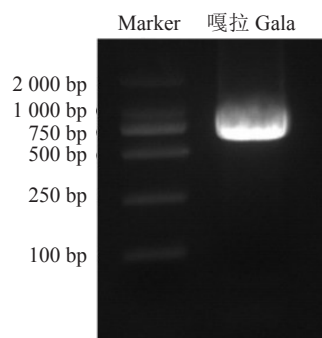


图1 苹果 *MdFLS1* 基因编码区全长的 RT-PCR 扩增  
Fig. 1 RT-PCR amplification of the coding sequence of *MdFLS1* in apple

### 2.2 基因结构及蛋白质功能域分析

苹果 *MdFLS1* 基因定位于基因组8号染色体上,没有内含子(图2)。预测了苹果 *MdFLS1* 蛋白的功能域和功能,结果表明,苹果 *MdFLS1* 蛋白整体具有合成酶结构,含有PcbC超级家族结构域,表明它属于α-酮戊二酸依赖性双加氧酶家族;N-端具有非血红素加氧酶结构域(图3)。

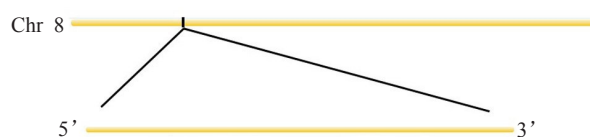


图2 苹果 *MdFLS1* 基因的染色体定位和基因组结构  
Fig. 2 Chromosomal location and genomic structure of the *MdFLS1*

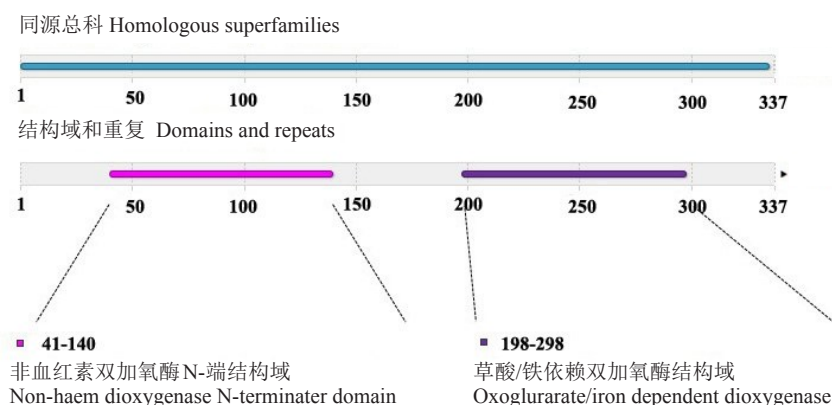


图3 苹果 *MdFLS1* 蛋白保守功能域示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the conserved functional domain of *MdFLS1* protein in apple

### 2.3 苹果 MdFLS1 蛋白的亲/疏水性及二级、三级结构预测

采用 ProtScale 在线工具分析苹果 MdFLS1 蛋白亲/疏水性, 结果显示, 多肽链酸的最低分值为 -3.113, 是第 10 位的精氨酸, 该位点亲水性最强; 最高的分值为 1.825, 是第 176 位的苯丙氨酸, 该位点疏水性最强。多肽链整体表现为亲水性(图 4)。

SOPMA 在线软件分析表明, 苹果 MdFLS1 蛋白的二级结构由 29.38% 的  $\alpha$ -螺旋、24.33% 的延伸链、12.46% 的  $\beta$ -转角和 33.83% 的不规则卷曲组成(图 5)。所以从整体结构看  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲是苹果 MdFLS1 蛋白最大的结构元件, 而延伸链和  $\beta$ -转角则相对分散于整条多肽链中。利用 SWISS

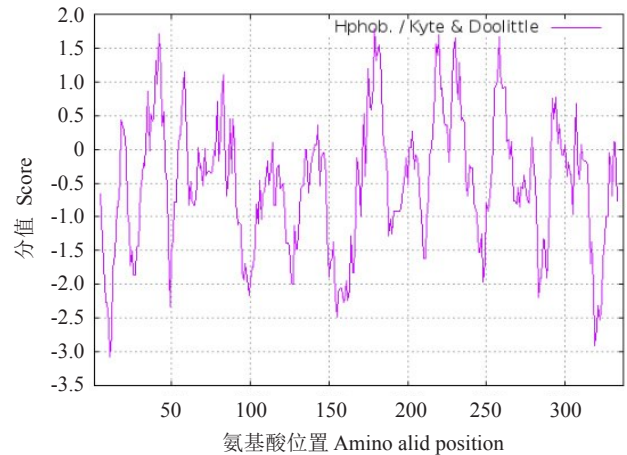
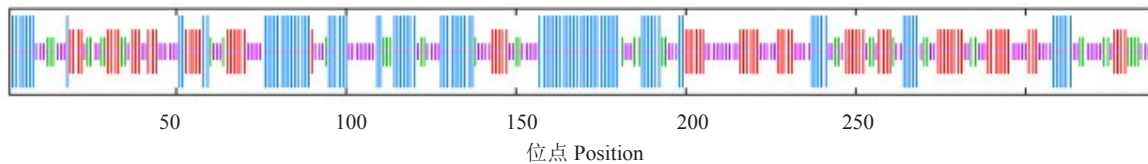


图 4 苹果 MdFLS1 蛋白亲/疏水性分析示意图

Fig. 4 Schematic diagram of MdFLS1 protein affinity/hydrophobicity analysis in apple



蓝色代表 $\alpha$ 螺旋; 紫色代表规则卷曲; 红色代表延伸链; 绿色代表 $\beta$ 转角。

Blue represents alpha helix; Purple represents random coil; Red represents extended strand; Green represents beta turn.

图 5 苹果 MdFLS1 蛋白二级结构模拟图

Fig. 5 Secondary protein structure of MdFLS1 in apple

MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测了苹果 MdFLS1 的三级结构, 很明显该蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲组成(图 6)。



图 6 MdFLS1 蛋白三级结构预测

Fig. 6 Tertiary structure of protein of MdFLS1 in apple

### 2.4 苹果 MdFLS1 蛋白的信号肽、转运肽和跨膜结构分析以及亚细胞定位预测

信号肽和转运肽的分析可以辅助预测蛋白质的

亚细胞定位。利用 TargetP1.1 在线工具分析苹果 MdFLS1 氨基酸序列发现, 它不含有信号肽和转运肽。

是否具有跨膜结构域决定蛋白质能否在质膜上定位, 因此跨膜结构域的预测也对蛋白的亚细胞定位非常重要。TMHMM 在线软件分析结果表明, 苹果 MdFLS1 蛋白不存在跨膜结构域, 整体均位于膜外。

根据以上数据, 推测苹果 MdFLS1 蛋白定位于细胞质中。用 <https://open.predictprotein.org/> 在线软件预测了苹果 MdFLS1 的亚细胞定位, 结果表明其定位于细胞质中。

### 2.5 苹果 MdFLS1 进化树分析

通过进行氨基酸序列比对以及进化树分析, 苹果 MdFLS1 与甜樱桃 (AFO67943.1)、草莓 (AAZ78661.1)、桃 (AJO70134.1)、蔷薇 (AJP36706.1) 的同源性较高, 相似率分别为 99.11%、79.06%、77.88%、和 78.17%, 表明 MdFLS1 与这些物种的亲缘关系较近; 与拟南芥 (AAM64397.1)、野茶树 (ABA54917.1)、台湾相思树



(AFA55179.1)的亲缘关系较远,相似率均低于60% (图7)。

### 2.6 启动子顺式作用元件分析

利用网站 PlantCARE 预测了苹果 *MdFLS1* 启动

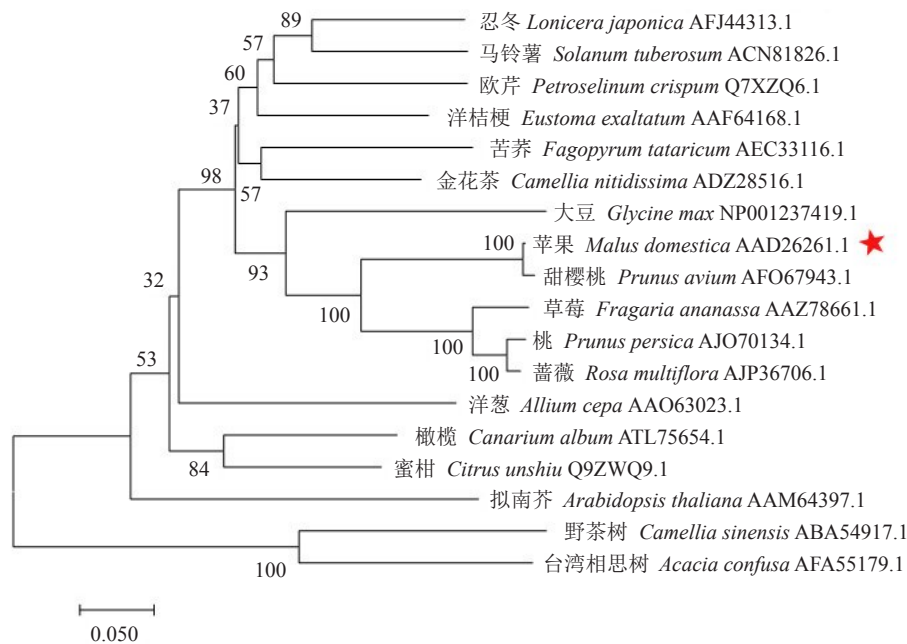


图7 苹果 *MdFLS1* 蛋白和其他物种 FLS 蛋白的系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree of apple *MdFLS1* and FLS proteins of other species

子上的顺式作用元件,发现有多种激素响应相关的调控元件,如 ABA 响应元件 ABRE、水杨酸响应元件 TCA-element 和赤霉素响应元件 P-box;环境因子响应元件,如光响应元件 Box 4 和 G-box;昼夜节律

调控元件 circadian;非生物胁迫响应元件,如干旱响应元件 MBS 和热响应元件 HSE(表1)。以上结果表明, *MdFLS1* 可以对干旱、盐胁迫、光、昼夜节律和植物激素等多种外界条件作出响应,可能对植物生长

表1 *MdFLS1* 基因上游调控序列重要顺式作用元件分析

Table 1 Some important *cis*-acting regulatory elements in the upstream regulatory sequences of *MdFLS1*

顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory elements	序列 Sequence	位点功能 Function of site	位置 Location
ABRE	ACGTGGC	脱落酸响应元件	-822
	TACGTG	<i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	-893
CGTCA-motif	CGTCA	茉莉酸响应顺式作用元件	-782
		<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	+377
			+647
			+519
			+1 632
ERE	ATTTCAAA	乙烯响应元件 Ethylene-responsive element	-1 156
GARE-motif	AAACAGA	赤霉素元件	+1 900
	GCCACT	Gibberellin-responsive element	-974
HSE	AGAAAATTCG	高温胁迫响应元件 <i>Cis</i> -acting element involved in heat stress responsiveness	-44
G-Box	CACGTT	光响应调控元件	+824
	CACGTA	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	-893
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	防卫胁迫响应元件	+558
		<i>Cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness	-1 788
TCA-element	GAGAAGAATA	水杨酸顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness	+1 073
MBS	TAACTG	干旱诱导 MYB 结合位点	-191
		MYB binding site involved in drought-inducibility	-1 062

发育和响应非生物胁迫具有重要作用。

## 2.7 *MdFLS1* 的表达分析

*MdFLS1* 在根、茎、叶、花和果中都有表达, 在叶和根中表达量较高, 在茎中表达量较低(图 8)。根据启动子分析结果, *MdFLS1* 对多种植物激素和非生物胁迫可能有响应。分别用 NaCl、ABA、低温和干旱处理野生型苹果苗, 定量检测 *MdFLS1* 的表达量变化情况。结果表明, *MdFLS1* 受盐、ABA、低温和干旱诱导, 且有类似的表达模式。 *MdFLS1* 对 ABA 和 NaCl 处理都表现出先升高, 在大约在 1 h 到达峰值, 而后在 3 h 时稍下降, 然后在 6 h 再次升高达到更高的峰值, 最后下降的趋势; 在干旱处理下, *MdFLS1* 的表达先逐渐升高, 在 3 h 到达峰值, 然后逐渐下降; 低温处理时, *MdFLS1* 在 3 h 前表达较低,

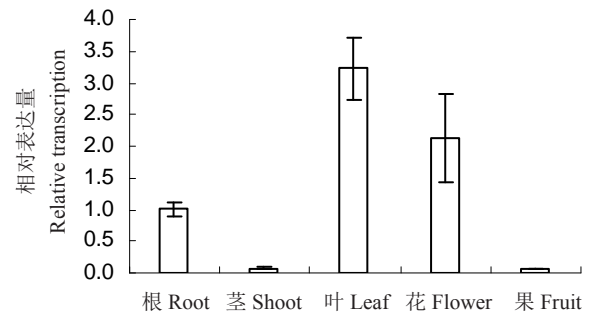


图 8 *MdFLS1* 基因在苹果不同组织中的表达水平

Fig. 8 Expression of *MdFLS1* gene in different tissues of apple

而在 3 h 之后一直维持较高的表达。综合以上结果, 苹果 *MdFLS1* 对 NaCl 和干旱处理的响应最为强烈(图 9)。

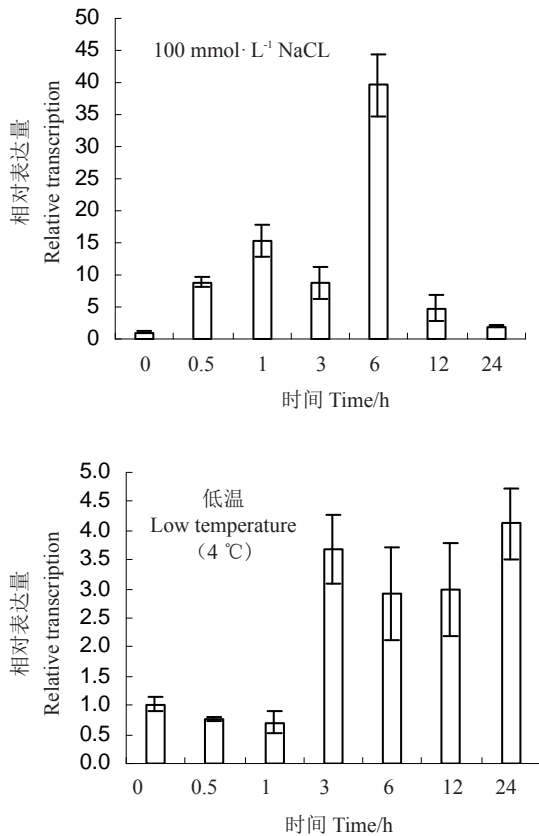


图 9 *MdFLS1* 基因在非生物胁迫下的表达水平

Fig. 9 Expression patterns of *MdFLS1* gene under abiotic stress

## 2.8 *MdFLS1* 的原核诱导表达

拟南芥中有 6 个 FLS, 但并非都有催化活性, 为证明克隆到的苹果中的 *MdFLS1* 具有催化活性, 将二氢黄酮醇转化为黄酮醇, 构建原核表达载体, 在体外诱导蛋白进行验证。如图 10 所示, 0 h 样品, 即未

加入 IPTG 时, 没有特异条带产生, 经 IPTG 诱导后开始出现特异条带, 且条带随诱导时间的延长逐渐变亮。载体所携带的 His 标签大小为 0.84 ku, 图上显示的蛋白大小约为 40 ku, 诱导蛋白的实际大小为 39.16 ku, 与 *MdFLS1* 预测蛋白的大小(38.12 ku)接



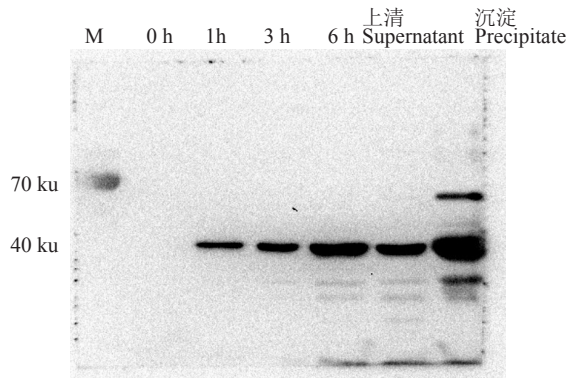
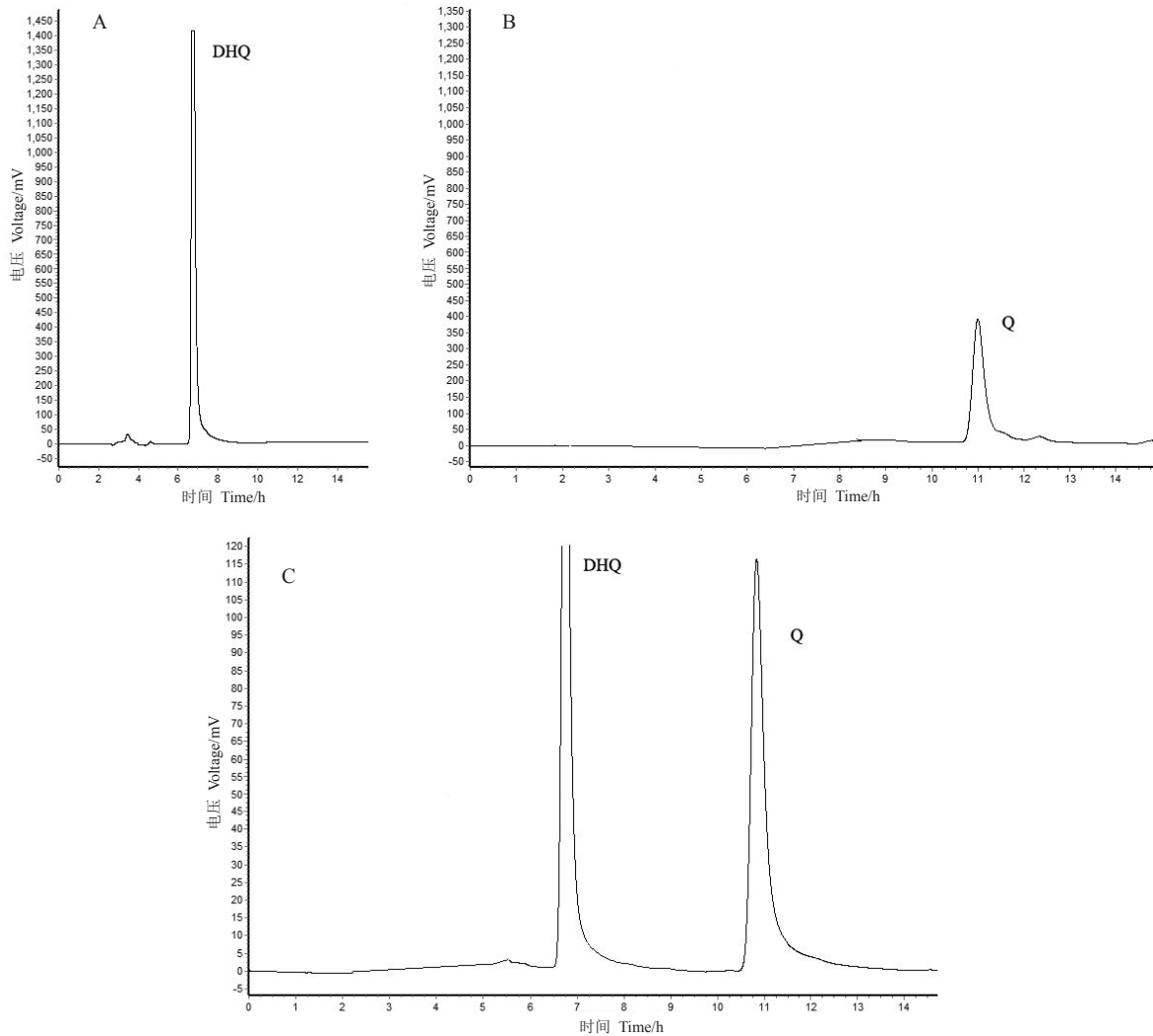


图 10 苹果 *MdFLS1* 的原核表达  
Fig. 10 Prokaryotic expression of *MdFLS1*

近。此外,诱导产生的 *MdFLS1* 蛋白在上清和沉淀中都存在,在沉淀中较多,主要以包涵体的形式存在。

### 2.9 *MdFLS1* 体外催化活性检测

Ullah 等<sup>[2]</sup>在研究番茄果实着色机制时使用了体外原核诱导的番茄二氢黄酮醇 4-还原酶(PnDFR),结合高效液相色谱分析来检测其催化活性。参考 Ullah 的方法进行苹果黄酮醇合成酶活性检测,用二氢槲皮素(DHQ)和槲皮素(Q)作为标样,用无菌超纯水作为空白对照,用液相色谱仪检测 2 种物质的出峰时间,反应体系使用实验方法中的体系。观察比较酶促反应后产物的出峰时间,并与标准品的出峰时间进行比对<sup>[14]</sup>。结果如图 11 所示,二氢槲皮素(DHQ,图 11-A)标准品的出峰时间为 7 min 左右,槲皮素(Q,图 11-B)标准品的出峰时间为 11 min 左右。以二氢槲皮素为底物进行的反应所得到的产物大约在 11 min 时间出峰(图 11-C),通过与标准品的



A、B. 标样峰图; C. 反应后峰图。DHQ. 二氢槲皮素; Q. 槲皮素。  
A, B. Standard substances; C. Reaction extract. DHQ. Dihydroquercetin; Q. Quercetin.

图 11 HPLC 分析 *MdFLS1* 体外酶活功能  
Fig. 11 HPLC profiles of *in vitro* enzymatic of activity assay of *MdFLS1*

峰图比较发现,出峰时间与槲皮素标准品出峰时间相同,这说明MdFLS1能催化二氢槲皮素生成槲皮素。

### 3 讨 论

黄酮醇是植物体内重要的次生代谢物质,在植物抵抗外界不良环境中扮演非常重要的作用。例如,它可以调节植物花和果实的色泽,作为信号分子在植物和微生物的间相互作用中传递,抵抗病菌。有些黄酮醇还具有抵抗昆虫和食草动物侵袭的作用。植物体内积累黄酮醇可以防止植物因干旱、高盐、重金属和紫外等非生物胁迫受到伤害<sup>[15]</sup>。黄酮醇还对人体健康有重要的保健作用,因其具有较强的抗氧化活性,可以清除体内自由基<sup>[5]</sup>,另外研究还发现黄酮醇具有抗肿瘤,抗血管增生等作用<sup>[6-7]</sup>。提高植物体内黄酮醇含量有助于提高其对生物和非生物胁迫的抗性,提高作物可食用部分的黄酮醇含量,有利于增进人体健康。

前人对部分物种的FLS进行过简单的生物信息分析,发现不同物种的FLS有较高的保守性,无论是ORF长度还是GC含量差异都不大<sup>[21]</sup>。本研究对苹果中的MdFLS1进行了较为充分的生物信息分析,结果表明MdFLS1定位于苹果基因组8号染色体上,并且没有内含子。该蛋白N端为 $\alpha$ -同戊二酸依赖性双加酶结构域,C端为酮戊二酸/铁离子依赖加氧酶结构域,另外对其蛋白的三级结构进行了预测。蛋白质的跨膜结构和信号肽以及转运肽等对其亚细胞定位和功能有重要的影响。本研究发现苹果MdFLS1没有跨膜结构域以及信号肽和转运肽,预测其亚细胞定位于细胞质中。李伟在研究小麦中TaFLS1的定位时,意外地发现其在细胞核中也有定位<sup>[22]</sup>。小麦FaFLS1蛋白加上GFP标签大小超过了64 ku,而且小麦TaFLS1不含核定位信号,理论上不能在核质间穿梭,但是用激光共聚焦显微镜观察时确实发现在核中也发现了强烈的荧光信号,且比细胞质中多。作者推测TaFLS1在细胞核中有重要的作用,调控其他基因的转录和表达。真核生物的转录和表达一般由转录因子进行调控,在表观遗传学中组蛋白乙酰化/去乙酰化酶也可以调控基因的表达,未见资料次生代谢物合成酶能调控基因表达。不过大量研究表明,类黄酮化合物合成酶之间可以互作,调控类黄酮化合物的结构和种类<sup>[23]</sup>。

启动子分析表明,MdFLS1对多种非生物胁迫有响应。类黄酮化合物是植物体内重要的次生代谢物,已有研究表明,类黄酮化合物在植物抵抗非生物胁迫方面有重要作用,抗盐的水稻品种和抗旱的马铃薯品种体内类黄酮化合物含量较高<sup>[24-25]</sup>,干旱和ABA处理花生能显著提高类黄酮代谢相关基因的表达量<sup>[26]</sup>。用ABA处理拟南芥能诱导拟南芥类黄酮代谢相关基因的表达量升高,如AtCHS、AtDFR和AtFLS1等,这表明类黄酮参与拟南芥对非生物胁迫的响应<sup>[11]</sup>。研究表明苹果MdFLS1能响应多种非生物胁迫,诱导其表达量升高,推测MdFLS1参与苹果对非生物胁迫的抵抗,结合其他物种中的研究,过量表达MdFLS1能提高植物对非生物胁迫的抗性。

植物中的基因可能有多个拷贝,但并非所有都有功能。Chhana Ullah等在研究杨树中无色花色苷还原酶(leucoanthocyanidin reductase, LAR)的功能时,通过数据库比对发现杨树中存在3个同源基因,分别为PnLAR1~PnLAR3,作者通过高效液相色谱质谱联用技术分析了三者的活性,发现PnLAR1~PnLAR3的活性依次升高<sup>[27]</sup>。在苹果中可能有多个FLS,本研究只克隆了其中一个,并通过高效液相色谱分析,验证了其具有催化活性,而苹果中的其他FLS还有待于进一步研究和分析。

花青苷是苹果果实色泽的主要成分,其生物合成也属于类黄酮代谢过程<sup>[28]</sup>。花青苷和黄酮醇的生物合成具有相同的底物,二者的合成存在竞争的关系,这一现象已在多种植物中验证存在,这与FLS和DFR(Dihydroflavonol 4-reductase,二氢黄酮醇还原酶)的相对表达量有关。在研究不同品种的猴面花(Mimulus)着色差异的过程中,Yuan等通过图位克隆的方法筛选到一个潜在的R2-R3 MYB转录因子,然后将该基因克隆出来过量表达,并且获得了RNAi的株系,比较了过表达株系和表达抑制株系的着色情况,发现过量表达该基因导致花色变深,检测了类黄酮代谢相关基因的表达量,发现FLS的表达被显著抑制,而RNAi株系中,FLS的表达量较高,这表明该转录因子抑制FLS了的表达,促进了花青苷的生物合成<sup>[29]</sup>;在野苹果(Crabapples)中存在FLS和DFR的动态平衡,这种平衡关系使苹果叶片正常着色。研究使用了两个不同的海棠品种,正常条件下叶片分别为红色和绿色。研究发现随着发育时间的变化,DFR的表达水平均逐渐降低,而FLS的表达量

在红色叶片品系中先升高后降低,在绿色品系中一直处于较高的水平。DFR在花青苷的合成中起重要作用,抑制红色叶片品系中DFR的表达,叶片变为绿色,相应地FLS在绿色品系叶片着色中发挥作用<sup>[30]</sup>。

综上所述,*MdFLS1*在苹果中可能存在多方面的生物学功能,如参与抵抗非生物胁迫,调控苹果中花青苷的积累等,非常有必要进行充分的研究。接下来的工作就是获得转基因植物材料,比如苹果愈伤组织、拟南芥和苹果苗等,对*MdLFS1*的功能进行验证。

## 4 结 论

了解苹果黄酮醇合成酶的生物学信息,启动子分析表明*MdFLS1*可能参与多种激素信号响应和生物胁迫,定量PCR表明苹果*MdFLS1*响应ABA、低温、高盐、干旱等非生物胁迫;原核诱导了苹果MdFLS1蛋白,并且证明其具有催化活性。接下来的研究主要是将苹果*MdFLS1*基因转入不同的植物材料,验证它的功能。

## 参考文献 References:

- [1] KUHN B M, GEISLER M, BIGLER L, RINGLI C. Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 585-595.
- [2] ULLAH C, UNSICKER S B, FELLEBERG C, CONSTABEL C P, SCHMIDT A, GERSHENZON J, HAMMERBACHERA A. Flavan-3-ols are an effective chemical defense against rust infection[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(4): 1560-1578.
- [3] BÖHM H, BOEING H, HEMPEL J, RAAB B, KROKE A. Flavonols, flavone and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases[J]. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 1998, 37(2): 147-163.
- [4] HARBORNE J B, WILLIAMS C A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [5] LEE B H, JUNG S M, LEE J H, KIM J H, YOON I S, LEE J H, CHOI S H, LEE S M, CHANG C G, KIM H C, HAN Y S, PAIK H D, KIM Y M, NAH S Y. Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I[J]. *Molecules & Cells*, 2005, 20(1): 69.
- [6] KIM J D, LIU L, GUO W, MEYDANI M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17(3): 165-176.
- [7] KIM Y H, LEE Y J. KIM Y H, LEE Y J. TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, 100(4): 998-1009.
- [8] BRENDA W S. Flavonoid biosynthesis. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 485-493.
- [9] HOLTON T A, BRUGLIERA F, TANAKA Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*[J]. *The Plant Journal*, 1993, 4(6): 1003-1010.
- [10] OWENS D K, ALERDING A B, CROSBY K C, BANDARA A B, WESTWOOD J H, WINKEL B S J. Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(3): 1046-1061.
- [11] NGUYEN N H, KIM J H, KWON J, JEONG C Y, LEE W, LEE D, HONG S W, LEE H. Characterization of *Arabidopsis thaliana* FLAVONOL SYNTHASE 1, (*FLS1*) -overexpression plants in response to abiotic stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 103: 133-142.
- [12] 杨欢欢. 黄酮醇在植物盐胁迫应答中的作用[D]. 济南: 山东大学, 2015.  
YANG Huanhuan. The role of flavonol in salt resistance[D]. Jinan: Shandong University, 2015.
- [13] 齐月英. 小麦黄酮醇合成酶基因 *TaFLS2* 在植物抗旱和发育中的作用[D]. 济南: 山东大学, 2016.  
QI Yueying. The role of flavonol synthase gene *TaFLS2* in drought resistance and development[D]. Jinan: Shandong University, 2016.
- [14] 聂继云, 吕德国, 李静, 刘凤之, 李萍. 苹果果实中类黄酮化合物的研究进展[J]. *园艺学报*, 2009, 36(9): 1390-1397.  
NIE Jiyun, LÜ Deguo, LI Jing, LIU Fengzhi, LI Ping. Advances in studies on flavonoids in apple fruit [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(9): 1390-1397.
- [15] HERTOGE M G L, HOLLMAN P C H, KATAN M B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(1992): 2379-2383.
- [16] 周兰. 苹果果实发育中类黄酮含量变化以及相关基因的研究. [D]. 郑州: 中国农业科学院郑州果树研究所, 2013.  
ZHOU Lan. Study on concentration changes and related genes of flavonoids in apple[D]. Zhengzhou: Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, 2013.
- [17] 汪晓谦. 红肉苹果酚类代谢及其对逆境的相应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.  
WANG Xiaqian. Phenolic metabolism of red-fleshed apples and its response to stress[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2015.
- [18] LISTER C E, LANCASTER J E, SUTTON K H. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 64(2): 155-161.

- [19] JAMES A M, MA D, MELLWAY R D, GESELL A, YDSHIDA K, WALLKER V, TRAN L, STEWART D, REICHEL T M, SUVANTO J, JUHA-PEKKA S, GERSHENZON J, SÉGUIN A, CONSTABEL C P. MYB115 and MYB134 transcription factors regulate proanthocyanidin synthesis and structure[J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(1): 154.
- [20] WANG L, RAN L, HOU Y, TIAN Q, LI C, LIU R, FAN D, LUO K M. The transcription factor MYB115 contributes to the regulation of proanthocyanidin biosynthesis and enhances fungal resistance in poplar[J]. *New Phytologist*, 2017, 215(1): 1-10.
- [21] 黄琼林, 蔡春. 不同植物黄酮醇合成酶 FLS 的生物信息学分析[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(13): 140-143.  
HUANG Qionglin, CAI Chun. Bioinformatics analysis of flavonol synthase from various plants[J]. *Agricultural Science in Guangdong*, 2014, 41(13): 140-143.
- [22] 李伟. 小麦类黄酮合成途径基因 *TaFLS1* 与 *TaANS1* 的逆境应答机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.  
LI Wei. Study on mechanisms of *TaFLS1* and *TaANS1* of *Triticum aestivum* in abiotic stress response[D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [23] FUJINO N, TENMA N, WAKI T, ITO K, KOMATSUZAKI Y, SUGIYAMA K, YAMAZAKI Y, YOSHIDA S, HATAYAMA M, YAMASHITA S, TANAKA Y, MOTOHASHI R, DENESIOUK K, TAKAHASHI S, NAKAYAMA T. Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2018, 94(2): 1-5.
- [24] WATKINSON J I, HENDRICKS L, SIOSON A A, VASQUEZ-ROBINET C, STROMBERG V, HEATH LS, SCHULER M, BOHNERT H J, BONIERBALE M, GRENE R. Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles[J]. *Plant Science*, 2006, 171(6): 745-758.
- [25] 孙利. 不同花生品种类黄酮积累及其合成酶活性对干旱胁迫的响应[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.  
SUN Li. Response on the accumulation of flavonols and synthetase activities among different peanut cultivars to drought stress [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013.
- [26] FINOCCHIARO F, FERRARI B, GIANINETTI A. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype[J]. *Journal of Cereal Science*, 2010, 51(1): 28-34.
- [27] ULLAH C, UNSICKER S B, Fellenberg C, CONSTABEL C P, SCHMIDT A, GERSHENZON J, HAMMERBACHER A. Flavan-3-ols are an Effective Chemical Defense against Rust infection[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(4):842.
- [28] XIE X B, SHEN L I, ZHANG R F, ZHAO J, CHEN Y C, ZHAO Q, YAO Y X, YOU C X, ZHANG X S, HAO Y J. The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples[J]. *Plant Cell & Environment*, 2012, 35(11): 1884-1897.
- [29] YUAN Y W, REBOCHO A B, SAGAWA J M, STANLEY L E, JR B H. Competition between anthocyanin and flavonol biosynthesis produces spatial pattern variation of floral pigments between *Mimulus* species[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(9): 2448.
- [30] TIAN J, HAN Z, ZHANG J, HU Y J, SONG T, YAO Y. The balance of expression of dihydroflavonol 4-reductase and flavonol synthase regulates flavonoid biosynthesis and red foliage coloration in crabapples[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12228.