

杭菊 DFR 基因克隆及其在花中表达特征分析

陈璐, 汪涛, 郭巧生*, 张晓明, 宋玲珊

南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 克隆杭菊 *Chrysanthemum morifolium* 二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 基因, 并研究其在花芽分化期及开花期不同时期的表达特征。方法 根据已报道的菊花 *Chrysanthemum morifolium* DFR 基因序列设计引物, 通过荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术从杭菊头状花序中扩增出目的基因片段, 连接、转化、挑取阳性克隆测序并拼接; 采用基于内参基因的相对定量 PCR 方法, 分析该基因表达量特征。结果 得到全长 1 152 bp 的杭菊 DFR 基因, 最大开放阅读框 1 029 bp, 共编码 342 个氨基酸。NCBI 上进行 Blast 比对, 该基因与其他植物的 DFR 基因有很高的同源性。RT-PCR 表明该基因在花芽分化时期不同阶段以及开花期不同时期花不同部位中表达量均有差异。花芽分化时期杭菊 DFR 基因在 50 d 表达量最高; 开花期该基因在时期 I 的管状花中表达量最高, 在时期 II 的花序托中表达量最低。结论 克隆得到杭菊 DFR 基因 cDNA 序列, 该基因表达存在时间和空间上的差异, 表达量在花蕾膨大成熟到舌状花开放 30% 的时间段内最高。该结果为进一步进行该基因在杭菊中的表达与催化产物的关系和调控机制研究奠定了基础。

关键词: 杭菊; DFR 基因; 实时定量 PCR; 荧光定量 PCR; 基因克隆

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1187-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.021

Analysis on cloning of dihydroflavonol 4-reductase gene in capitulum of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Hangju' and its expression characteristics

CHEN Lu, WANG Tao, GUO Qiao-sheng, ZHANG Xiao-ming, SONG Ling-shan

Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective To clone the dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene from the capitulum of *Chrysanthemum morifolium* and study its expression at different stages of flower bud differentiation period, and in different periods of flowering in different tissues. **Methods** Two pairs of primers were designed according to the reported DFR gene sequences of *C. morifolium*, target fragments were amplified by RT-PCR, connected, and transformed, then positive cloning was detected by PCR and then sequenced. **Results** Sequencing results showed that 1 152 bp sequence was acquired with the largest open reading frame of 1 029 bp, which encoded 342 amino acids. Blast comparison was carried out on NCBI. The gene had higher homology compared with the DFR from other species. The sequence of DFR gene was cloned from *C. morifolium*. Quantitative PCR showed that the gene expressions were different at different stages of flower bud differentiation period, and in different periods of flowering in different tissues. The highest expression of DFR gene was at day 50 of stages of flower bud differentiation period; And in flowering the highest expression of DFR gene is in tubular flowers in the period I and the lowest expression is in the receptacle in period II. **Conclusion** The DFR gene of *C. morifolium* cv. 'Hangju' is cloned. The expression of DFR gene is different both in time and in space. The highest expression is in the period from the buds mature to the capitulum open completely.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Hangju'; dihydroflavonol 4-reductase; RT-PCR; qPCR; gene cloning

菊花为菊科植物菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 具有疏风清热、平肝明目、清热解毒之功效^[1-2]。杭菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. 'Hangju' 是药用菊花的主要栽培类型之

一^[3], 主要化学成分包括黄酮类、挥发油类、绿原酸类等^[4]。黄酮类化合物 (flavonoids) 是一类来自于丙二酰辅酶 A 和苯丙氨酸次生代谢产物^[5], 广泛分布于植物界, 对植物的生长、发育、开花、结果

收稿日期: 2015-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503180)

作者简介: 陈璐 (1989—), 女, 硕士, 南京农业大学园艺学院中药材研究所读硕士, 研究方向为中药资源利用与开发。

E-mail: 2013104127@njau.edu.cn

*通信作者 郭巧生 Tel: (025)84395980 E-mail: gqs@njau.edu.cn

以及抗菌防病起重要作用^[6]。其中,花青素是一类水溶性天然色素,广泛存在于植物界^[7]。它不仅控制植物花、果皮等的颜色,同时具有抗衰老、抗氧化、抗动脉硬化等作用,是目前发现的最强的自由基清除剂^[8-9]。二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)是花青素合成过程的关键酶,催化二氢黄酮醇,如二氢槲皮素、二氢槲皮素和二氢杨梅素分别生成无色天竺葵素、无色矢车菊素和无色翠雀素^[10]。目前,对 DFR 基因研究集中在园艺植物花色或果实颜色等相关问题,对药用植物品质形成相关研究比较少见。而对杭菊的研究多集中在生理、化学、种质资源及组织培养等方面^[2,11-15],对遗传特征与品质形成关系研究尚停留在初步探索阶段,尚未见杭菊 DFR 基因相关报道。本实验采用 RT-PCR 扩增法从杭菊头状花序中克隆得到杭菊 DFR 基因,并对其表达量特征进行分析,为进一步进行该基因在杭菊中表达与催化产物的关系和调控机制研究奠定基础。

1 材料

实验材料采自于浙江桐乡药用菊花种质圃,于 2014 年 6 月定植于南京农业大学药用菊花种质圃,经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定为药用菊花栽培类型杭菊 *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Hangju';自花芽分化开始每隔 10 d 取 1 次样品,直到花蕾膨大成熟;参照郭巧生等^[16]药用菊花头状花序开放程度标准(表 1),将杭菊开花期分为 4 个时期,分别采摘各时期舌状花、管状花和花序托, -80 °C 保存备用。

表 1 杭菊头状花序开放程度分级标准

Table 1 Flowering degree standard for capitulum of *C. morifolium* cv. 'Hangju'

等级	舌状花开放度	管状花开放度
时期 I	开放 30%	未开放
时期 II	开放 50%	开放 30%
时期 III	开放 70%	开放 50%
时期 IV	全部开放	全部开放

Trizol (Invitrogen); 反转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、pMD-19T Vector、大肠杆菌感受态细胞(DH5 α)、工具酶等(TaKaRa Bio, 中国大连); PCR 引物(上海立菲生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 RNA 提取与鉴定

利用 Trizol 法提取总 RNA。提取后用琼脂糖凝

胶电泳检测 RNA 的质量,并使用核酸蛋白检测仪检测所提 RNA 的浓度和纯度。

2.2 cDNA 合成和 PCR 扩增目的片段

取 10 μ L RNA 作为模板,按照反转录试剂盒说明书进行反转录得到 cDNA 第一链。根据 GenBank 报道的菊花 DFR 的 CDS 全序列(GenBank 登录号 GU324979)设计 DRF-1F: 5'-ATGAAAGAAGACT-CACCAGCCA-3'和 DFR-1R: 5'-GGGACTGATAAAT-GGACCAACA-3'; DFR-2F: 5'-ACATTGGCGGAGA-AAGCAG-3'和 DFR-2R: 5'-AAACACATTCCCAG-TCCCG-3' 2 对引物并委托上海立菲生物技术有限公司合成;以 cDNA 为模板扩增 2 段目的片段,PCR 反应体系为 E $\times$ Taq 0.2 μ L、10 $\times$ Taq buffer 2 μ L、Mg²⁺(25 mmol/L) 2 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L、DFR-1F/DFR-2F (10 μ mol/L) 0.5 μ L、DFR-1R/DFR-2R (10 μ mol/L) 0.5 μ L、cDNA 模版 2 μ L、ddH₂O 15.8 μ L,总体积为 25 μ L。PCR 反应条件:预变性 94 °C、3 min, 94 °C 变性、30 s, 58 °C、退火 1 min, 72 °C 延伸、90 s, 30 个循环,72 °C 补充延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收和纯化。

2.3 杭菊 DFR 基因的克隆

将回收的目的片段与 pMD-19T Vector 载体连接;转化 DH5 α , 含氨苄青霉素 LB^{amp} 培养基上涂板培养,蓝白斑选择阳性克隆,进行 PCR 检测后 DNA 序列测序。

2.4 杭菊 DFR 基因序列的验证

根据测序后拼接的 DFR 基因全序列设计引物 primer3-F: 5'-GACTCACCAGCCATTGTATG-3'和 primer3-R: 5'-TCACCAAGTATGCTCTTTGC-3',以 cDNA 为模板扩增目的基因,反应条件和反应体系均与“2.2”项相同。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化;纯化产物经连接、转化后蓝白斑挑取阳性克隆经 PCR 检测后进行测序。最后将测序结果与拼接结果进行比对。

2.5 生物信息学分析

将测序结果拼接得到杭菊 DFR 基因,在 NCBI 上进行 Blast 比对,并与已公开的其他植物 DFR 基因进行同源性分析,根据完整开放阅读框(ORF)预测氨基酸序列并构建系统进化树。

2.6 杭菊花中 DFR 基因表达量分析

荧光定量 PCR (qPCR) 分析杭菊花芽分化过程和开花期不同时期舌状花、管状花、花序托的

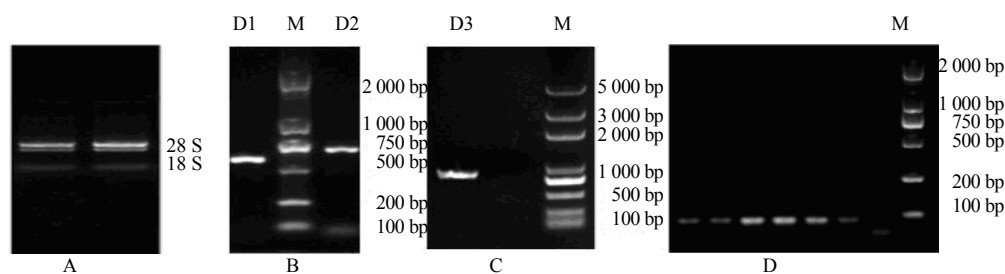
DFR 基因表达量。根据杭菊 DFR 基因设计荧光定量 PCR 引物 primer-F: 5'-GACATTATGGAAGGCG-GATT-3' 和 primer-R: 5'-GTGGCAACATGAAACA-CTC-3' 进行 qPCR, 扩增产物长度为 85 bp; 选择 actin 作为内参基因, 设计引物: primer (actin) -F: 5'-ACAAGTCTGAACGGGAAAT-3' 和 primer (actin) -R: 5'-TCATAGACGGCTGGAAAAGG-3', 扩增产物为长度为 196 bp。PCR 反应体系: SYBR Premix E×Taq™ (2×) 10 μL; primer-F 和 primer-R 均为 0.4 μL (10 μmol/L); cDNA 模板 2 μL; ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL; ddH₂O 6.8 μL。以 actin 作为内参, 设 3 个重复, 以 ROX 作为荧光校正; 预变性 95 °C、30 s 后 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环; 熔解曲线为 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s, 每升高 0.3 °C, 采集 1 次荧光信号, 重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 杭菊 DFR 基因 cDNA 全长克隆

利用 Trizol 法从杭菊中提取总 RNA, 经凝胶电泳检测结果显示 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰 (图 1-A) 且前者亮度约为后者 2 倍, 说明所提取 RNA 完整性较好; 经核酸蛋白检测仪检测 A_{260}/A_{280} 值为 1.92, A_{260}/A_{230} 值为 2.06, 说明 RNA 纯度较高, 已达到 RT-PCR 扩增和 qPCR 要求。

根据菊花 DFR 基因 (GenBank 登录号: GU324979) 的 CDS 全序列分别设计 2 对引物, 以杭菊 cDNA 为模板分别进行扩增和测序 (图 1-B), 将测序结果拼接得到 1 条全长为 1 152 bp 的杭菊 DFR 基因序列。根据已得到的 DNA 序列设计引物, 扩增得到的片段长度为 1 152 bp (图 1-C), 测序后结果与拼接得到的目的基因完全一致。



M-Marker D1-目的基因片段 1 D2-目的基因片段 2 D3-目的基因全长 A-杭菊总 RNA 提取凝胶电泳 B-杭菊 DFR 基因 RT-PCR 扩增凝胶电泳 C-杭菊 DFR 基因全序列 PCR 扩增的凝胶电泳 D-荧光定量 PCR 引物特异性验证的琼脂糖凝胶电泳

M-Marker D1-target gene fragment 1 D2-target gene fragment 2 D3-target gene fragment 3 A-agarose gel electrophoresis of total RNA of *C. morifolium* cv. 'Hangju' B-agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju'; C-agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of full-length sequence of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju'; D-agarose gel electrophoresis of specific verification of qPCR primers

图 1 相关电泳图

Fig. 1 Related electrophotogram

3.2 杭菊 DFR 基因的生物信息学分析

已得到的杭菊 DFR 基因序列在 NCBI 上进行序列比对分析, 发现该序列与菊花 DFR 基因序列同源性为 99%, 说明该基因确实为杭菊 DFR 基因。序列分析表明, 该基因包含一个长度为 1 029 bp 的 ORF, 共编码 342 个氨基酸 (图 2)。根据在线分析软件 (<http://web.expasy.org/>), 该蛋白的相对分子质量约为 38 440, 理论等电点 (pI) 为 6.09。根据在线分析软件 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 预测该蛋白的二级结构, 结果表明该蛋白由 134 个 α -螺旋、62 个延伸链、36 个 β -折叠和 110 个自由卷曲相连接 (图 3)。

3.3 杭菊 DFR 基因的同源性及系统进化树分析

NCBI 在线对杭菊 DFR 基因编码的氨基酸序列与其他物种 DFR 基因编码的氨基酸序列进行比对分析, 通过 MEGA 6.06 软件, 采用 Test

Neighbor-Joining 法构建系统进化树 (图 4)。结果表明, 杭菊 DFR 基因编码氨基酸序列与菊科其他植物 DFR 基因编码氨基酸序列同源性很高, 其中与菊花的 DFR 基因编码氨基酸序列的同源性高达 98%, 大丽花 *Dahlia pinnata* Cav. 86%, 向日葵 *Helianthus annuus* L. 84%; 与其他科属植物也有较高的同源性, 同源性均在 72%~80%。从进化树上可看出杭菊 DFR 基因编码氨基酸与菊科的菊花、大丽花、向日葵、矢车菊 *Centaurea maculosa* L.、雪莲 *Saussurea involucre* Kar. et Kir.、红凤菜 *Gynura bictor* DC.、非洲菊 *Gerbera jamesonii* Bolus. 的 DFR 基因编码氨基酸在进化关系上较近, 与其他科属如杜鹃花 *Rhododendron simsii* Planch.、猕猴桃 *Actinidia chinensis* Lindl. 等的 DFR 基因编码氨基酸在进化关系上较远; 同科属间进化保守。

```

1  TTTCTCAAGAAGACTCACCAGCCATTGTATGTGCTACTGGAGCTTCCGGTTTCATTGGTT
1  M K E D S P A I V C V T G A S G F I G
61  CATGGCTCGTTATGAGACTACTCGAACGTGGCTATATTGTTCTGCTACTGTTCTGTGACC
20  S W L V M R L L E R G Y I V R A T V R D
121  CTGGTGACATGAAAAAGGTGAAACATTGCTTGAACCTCCAAAAGCCGAAACAACTTGA
40  P G D M K K V K H L L E L P K A E T N L
81  CATTATGGAAGCGGATTAGCGCTAGAAGGAAGTTTGTATGAAGCCATTGAAGGTTGCC
60  T L W K A D L A L E G S F D E A I E G C
241  ATGGAGTGTTCATGTTGCCACCCCTATGGACTTTGAGTCCAAGGACCCCTGAGAACGAAA
80  H G V F H V A T P M D F E S K D P E N E
301  TCATAAGCCAACAATCGACGGTGTATTAAGCATCATAAGATCATGTTTAAAGCTAAAA
100  I I K P T I D G V L S I I R S C V K A K
361  CAGTCAAGAACTGGTGTTCACCTCTCTGCTGGGACTGTTAAGTACAAAAACAGCAAG
120  T V K K L V F T S S A G T V N V Q K Q Q
421  TTCGGTCTATGATGAGTCACTGGAGCGATCTGGACTTCATCTACTCCAAAAAATGA
140  V P V Y D E S H W S D L D F I Y S K K M
481  CAGCCTGGATGATTTCTGTGCAAAAACATTGGCGGAGAAAGCAGCATGGAAAGCAACAA
160  T A W M Y F V S K T L A E K A A W K A T
541  AGGAAAATAACATTGATTTTATTAGTATCATACCAACGTTAGTTGTTGGTCCATTAAATCA
180  K E N N I D F I S I I P T L V V G P L I
601  GTCCCTCGTTCTACCAAGTCTCATGACCGCACTTCTTTGATCATTGGAGCGGAATCAC
200  S P S F S P S L M T A L S L I I G A E S
661  ATTATTCGATTATTAAGCAATGTCAATACGTTTCATTGGATGATCTTTCGAGAGTCATA
220  H Y S I I K Q C Q Y V H L D D L C E S H
721  TATATCTCTATGAGCAACCAAGCCGAGGAGATACATCTGCTCTTCACATGATGCCA
240  I Y L Y E Q P K A E G R Y I C S S H D A
781  CCATTCATCAATTAGCAAAAAATGATCAAGGAGAAATGGCCAGAGTATCAAGTTCCAGCTA
260  T I H Q L A K M I K E K W P E Y Q V P A
841  AGTTTGAGGGGATCGATGATGAGATACCGATAGTTTCTTTTCATCAAGAAGTTAACCG
280  K F E G I D D E I P I V S F S S K K L T
901  ACATGGGGTCAAGTTTAAATATGATTTCGAGGAGATGTTTCAGAGGAGCAATCAAAAGTT
300  D M G F K F K Y D F E E M F R G A I K S
961  GTAAAGAGAAAGGATTACTTCCATATTCACAAACGAGACGAGGAGGAGGACTCAGCTCGT
320  C K E K G L L P Y S T N E T K E G L S S
1021  CTCATCTC[AC]TAACAAAGGCGGACACTACGAAGAGGAAAAGTTACAGATTATCCATAA
340  S H L *
1081  GGTGGCAACCCACCCCTTAGTCTCTAGCAAAGAGCATACTTGGTGAATAATCCACAT

```

方框中为起始密码子和终止密码子

Initiation codon and termination codon in boxes

图 2 杭菊 DFR 基因 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju' and its predicted amino acid sequence

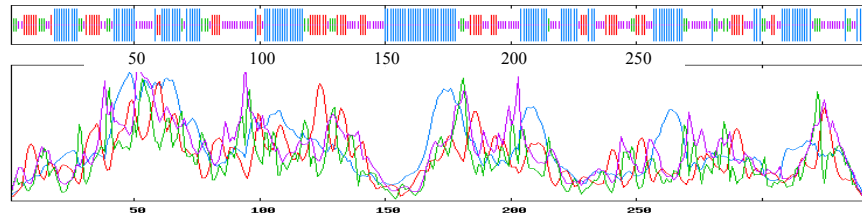


图 3 杭菊 DFR 基因编码氨基酸二级结构预测

Fig. 3 Secondary structure prediction of *C. morifolium* cv. 'Hangju' DFR gene

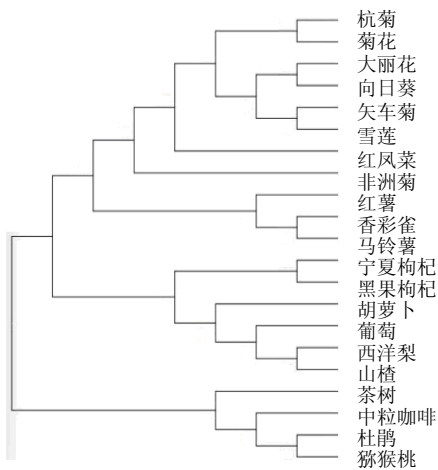


图 4 杭菊 DFR 基因编码的氨基酸序列与其他物种 DFR 基因编码氨基酸序列构建的进化树

Fig. 4 Phylogenetic trees based on amino acid sequences of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju' and other plants

3.4 杭菊 DFR 基因表达量特征分析

qPCR 分析花芽分化过程的 DFR 基因相对表达量 (图 5), 经 PCR 检测引物特异性良好 (图 1-D)。结果表明花芽分化时期, 0~20 d DFR 基因表达量无明显变化, 20~50 d, DFR 基因的表达量上调显著; 50 d 时, DFR 基因的表达量达到最高值。qPCR 分析开花期不同时期杭菊舌状花、管状花、花序托的 DFR 基因相对表达量 (图 6)。各部位 DFR 基因表达量在开花期不同时期有差异; 同时期花不同部位中 DFR 基因相对表达量也有差异。其中 DFR 基因在时期 I 的管状花中的表达量最高, 在时期 II 的花序托中表达量最低; DFR 基因在管状花中的表达量均高于同一时期在舌状花和花序托中的表达量; DFR 基因在花的同一部位的表达量随花期均呈现先降低后增高的趋势, 但增高和降低的时间不完全同步。

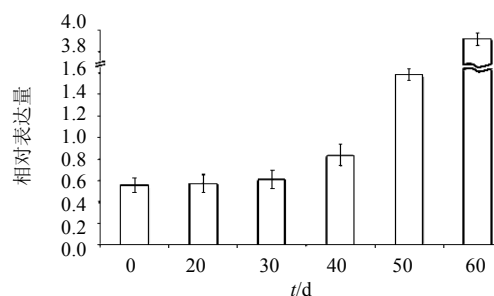


图 5 杭菊 DFR 基因在花芽分化过程的相对表达量

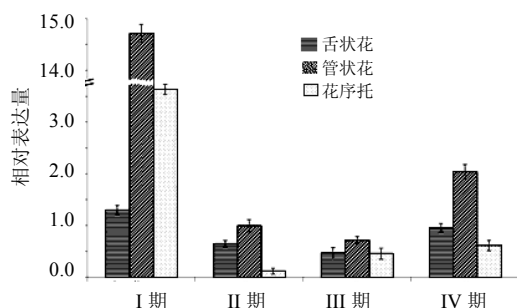
Fig. 5 Relative expression of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju' in flower bud differentiation

图 6 杭菊 DFR 基因在开花期不同时期不同部位的相对表达量

Fig. 6 Expression of DFR gene in *C. morifolium* cv. 'Hangju' in different tissues in different blossom of periods

4 讨论

花青素作为黄酮类化合物的一种, 不仅直接调控植物的花、果实、种子的颜色, 同时还有一定的药理作用, 如抗肿瘤、降血糖等^[17-18], 因此它不仅影响杭菊的外在品质, 也影响其内在品质, 具有很高的开发利用价值。DFR 是 DFR 超家族中的一条短链还原酶^[19], 作为花青素代谢途径中的关键酶之一, 已经从玉米、金鱼草、拟南芥和矮牵牛等多种植物中克隆得到^[20-21]。本实验通过 RT-PCR 技术首次克隆得到了杭菊 DFR 基因的 cDNA 序列, 为今后对杭菊花青素合成代谢途径的深入研究提供了基础。

基因克隆方法包括 RT-PCR 扩增法、RACE 技术及筛选 cDNA 文库等。RT-PCR 扩增法因实验设计简单、易操作、结果稳定、可靠性高而成为首选。许志茹等^[22]通过 RT-PCR 扩增法克隆得到了茼蒿 DFR 基因。袁定阳等^[23]利用此方法克隆得到籼稻叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长。因此本实验采用 RT-PCR 扩增法克隆杭菊 DFR 基因方法可行、结果可靠。通过基因序列的比对以及编码氨基酸序列的比对, 表明该基因进化比较保守, 特别是在同科属

之间非常保守, 这与柳爱玲等^[24]的研究结果一致。

qPCR 技术被广泛应用于核酸浓度的定量、环境监测、基因转录检测、生物分类和植物病原物鉴别等方面, 在医院研究中也用于中药的研究^[25]。在研究基因表达量上该技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、自动化程度高等优点^[26]。本实验通过 qPCR 技术研究了杭菊花中 DFR 基因的表达量特征。结果表明 DFR 基因的表达存在时间和空间上的差异; 从花芽开始分化到头状花序完全开放的过程中, 杭菊 DFR 基因在花蕾成熟膨大到舌状花开放 30% 的时间段内表达量最高; 杭菊 DFR 基因在花芽分化时期主要在成熟膨大的花蕾中表达, 而在花芽分化初期表达量较低, 开花期则主要在管状花中表达, 这些部位都是杭菊的着色部位, 由此推测 DFR 基因可能在植物组织的着色部位表达量较高, 这与焦淑珍等^[27]的研究结果一致。孟春祥等^[28]研究发现光照可诱导非洲菊 DFR 基因的表达。由此推测杭菊 DFR 基因在开花期时期 IV 的表达量高于时期 II、时期 III, 可能是由于随着花瓣开放程度的增加, 光照面积增加而使 DFR 基因的表达量升高。而杭菊 DFR 基因表达量在时期 II 出现显著减少可能与一些内部转录因子有关。各部位 DFR 基因表达量不完全同步也可能是受到其他环境因素和内部因素的影响。

本实验克隆得到了杭菊 DFR 基因的序列, 证实了该基因在花中表达存在时间和空间差异; 研究结果结合相关文献内容推测, 杭菊 DFR 基因表达量可能与着色部位发育过程和光照诱导等因素有关; 在花中的表达模式如何受到环境因子和内部因子的调控, DFR 基因的表达量又如何影响花青素合成等问题仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 邵清松, 郭巧生, 李育川, 等. 药用菊花 HPLC 图谱分析及其模式识别研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2330-2334.
- [2] 黄 莺, 王康才, 张 媛, 等. 药用菊花种间杂交及 F₁ 代鉴定研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 783-787.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 邵清松, 郭巧生, 张志远. 药用菊花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1971-1975.
- [5] 汪秋安, 周 冰, 单 杨, 等. 天然黄酮类化合物的抗氧化活性和提取技术研究进展 [J]. 化工生产与技术, 2004, 11(5): 29-32.

- [6] 杨文婷, 刘秀明, 张雪萌, 等. 红花黄酮醇合成酶基因片段的克隆及表达分析 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 250-254.
- [7] 丁悦, 吴秋云, 宋勇, 等. 植物体内花青素累积的外源调控机制研究进展 [J]. 中国农学通报, 2014, (19): 86-91.
- [8] Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, *et al.* Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20: 288-303.
- [9] Bagchi D, Sen C K, Bagchi M, *et al.* Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2004, 69(1): 75-80.
- [10] 郭凤丹, 夏晗, 袁美, 等. 花生二氢黄酮醇还原酶基因 (DFR) 的克隆及表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(5): 816-822.
- [11] Shao Q S, Guo Q S, Deng Y M, *et al.* A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(6): 1160-1169.
- [12] Wang T, Zhu Z B, Guo Q S, *et al.* Variation in major flavonoids glycosides and caffeoylquinic acids during florescence of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. 'Hangju' genotypes [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 47: 74-79.
- [13] Wang T, Guo Q S, Mao P F. Flavonoid accumulation during florescence of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. 'Hangju' genotypes [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 55: 79-83.
- [14] 郭巧生, 王涛, 程俐陶, 等. 不同栽培类型药用菊花黄酮类成分比较分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 756-759.
- [15] 毛鹏飞, 郭巧生, 汪涛. 药用杭菊扦插育苗技术研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1611-1614.
- [16] 郭巧生, 汪涛, 程俐陶, 等. 药用菊花不同栽培类型总黄酮动态积累研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1237-1239.
- [17] 崔建, 李晓岩. 花青素抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(13): 310-315.
- [18] 马淑青, 吕晓玲, 范辉. 紫甘薯花色苷对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响 [J]. 营养学报, 2010, 32(1): 88-90.
- [19] Martens S, Teeri T, Forkmann G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants [J]. *Febs Lett*, 2002, 531(3): 453-458.
- [20] O'Reilly C, Shepherd N S, Pereira A, *et al.* Molecular cloning of the *al* locus in *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mul* [J]. *EMBO J*, 1985, 4(4): 877-882.
- [21] 少华, 张大生. 花青素生成相关基因 DFR 研究进展 [J]. 福建林学院学报, 2002, 22(2): 189-192.
- [22] 许志茹, 刘通, 崔国新, 等. 芜菁二氢黄酮醇 4-还原酶基因的克隆与功能鉴定 [J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 687-700.
- [23] 袁定阳, 余东, 谭炎宁, 等. RT-PCR 克隆水稻叶绿素 *a/b* 结合蛋白基因全长 cDNA 及序列 *in silico* 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(2): 173-177.
- [24] 柳爱玲, 沈欣杰, 刘芸, 等. 甜樱桃黄酮醇合成酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(2): 56-63.
- [25] 付春华, 陈孝平, 余龙江. 实时荧光定量 PCR 的应用和进展 [J]. 激光生物学报, 2005, 14(6): 466-471.
- [26] 刘小荣, 张笠, 王勇平. 实时荧光定量 PCR 技术的理论研究及其医学应用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2): 329-332.
- [27] 焦淑珍, 刘雅莉, 娄倩, 等. 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 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(5): 529-540.
- [28] 孟春祥, 彭建宗, 王小菁. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 CHS、DFR 基因表达的影响 [J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 227-230.