

菠萝二氢黄酮醇 4-还原酶基因家族鉴定及功能初步分析

段元浩, 崔世娇, 邹幸江, 冯世鹏*

海南大学热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海南海口 570228

摘要: 菠萝 (*Ananas comosus*) 是世界第三大热带水果, 是我国热区重要的经济作物。为探究二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 基因家族在菠萝花青素积累中的作用, 为菠萝的种质改良提供理论基础, 本研究对菠萝 DFR 基因家族成员进行鉴定, 并初步分析其功能。结果显示: 在菠萝全基因组中鉴定出 17 个 *DFR* 基因 (*AcDFR1~17*), 它们不均匀地分布在 10 条染色体上; *AcDFRs* 编码的氨基酸长度在 313~378 aa 之间, 分子量在 34.73~47.74 kDa 之间, 等电点介于 5.10~8.9 之间。*AcDFRs* 蛋白二级结构主要包含 α -螺旋和 β -折叠, α -螺旋的含量在 38.73%~43.07% 之间, β -折叠在 13.24%~15.64% 之间。进化分析发现 17 个 *AcDFRs* 分成 4 个亚族。*AcDFRs* 的 motif 排列和外显子数量相似。*AcDFRs* 启动子区域含有多个顺式作用元件, 可响应光、激素、非生物胁迫和生长发育。实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *AcDFRs* 在菠萝不同组织 (根、茎、叶、花、果肉、果皮) 中的表达水平差异较大, 但大部分 *AcDFRs* 在果肉、果皮中均有较高的表达量。*AcDFRs* 的序列与预测序列基本一致, 亚细胞定位结果显示其定位于细胞质和细胞膜。本研究结果为进一步探究菠萝二氢黄酮醇 4-还原酶家族 (*AcDFR*) 基因的功能以及菠萝的品质改良提供理论参考。

关键词: 二氢黄酮醇 4 还原酶; 菠萝; 基因家族; 功能分析

中图分类号: S668.3 文献标志码: A

Identification and Preliminary Functional Analysis of Dihydroflavonol 4-Reductase (*DFR*) Gene Family of Pineapple

DUAN Yuanhao, CUI Shijiao, ZOU Xingjiang, FENG Shipeng*

School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical Biological Resources, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Pineapple (*Ananas comosus*) ranks as the world's third most important tropical fruit and is a significant economic crop in China's tropical regions. To investigate the role of the dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene family in anthocyanin accumulation in pineapple and provide a theoretical foundation for germplasm improvement, this study identified and preliminary functionally analyzed members of the pineapple DFR gene family. A total of 17 dihydroflavonol 4-reductase genes were identified in the whole genome of pineapple, which were named *AcDFR1* to *AcDFR17* and distributed unevenly on 10 chromosomes. *AcDFRs* encoded proteins ranging from 313 to 378 amino acids (aa) in length, with molecular weights between 34.73 and 47.74 kDa and isoelectric points (pI) from 5.10 to 8.9. The secondary structure of *AcDFR* proteins primarily consisted of α -helices and β -sheets, with α -helix content ranging from 38.73% to 43.07% and β -sheet content from 13.24% to 15.64%. Phylogenetic analysis revealed that the 17 *AcDFRs* formed four subfamilies. The motif arrangement and number of exons were similar among *AcDFRs*. The *AcDFR* genes promoter regions contained multiple *cis*-acting elements responsive to light, hormones, abiotic stress, growth and development. Real-time quantitative PCR analysis revealed significant expression variations of *AcDFRs* genes across different pineapple tissues (roots, stems, leaves, flowers, pulp, peel), though most genes exhibited high expression in both pulp and peel. Cloning and identification of *AcDFRs* revealed sequences largely consistent with predicted sequences. Subcellular

收稿日期 2025-10-10; 接受日期 2025-11-18

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2021XDNY117)。

作者简介 段元浩 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 菠萝遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 冯世鹏 (FENG Shipeng), E-mail: feng_shipeng@hainanu.edu.cn。

localization studies of the AcDFR1 in tobacco leaves via transient expression indicated localization to the cytoplasm and cell membrane. The findings would provide theoretical references for further investigation into the functions of the dihydroflavonol-4-reductase gene family in pineapple and for pineapple quality improvement.

Keywords: dihydroflavonol 4-reductase; pineapple; gene family; functional analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.002

菠萝 (*Ananas comosus*), 属凤梨科 (*Bromeliaceae*) 凤梨属 (*Ananas*) 的多年生草本植物, 是仅次于香蕉、芒果的世界第三大热带水果^[1]。果实颜色是水果的重要性状, 鲜艳的颜色往往更受消费者青睐^[2-3], 如红肉苹果^[4]、红心火龙果^[5]和红皮香蕉^[6]。菠萝主栽品种巴厘或台农系列的果皮均为黄色, 果肉为黄色或白色。目前, 菠萝在果实颜色性状方面选择较少, 少有的几个具有特殊颜色的品种也存在各自的局限性, 如红色果皮的菠萝品种冰糖红在成熟之后转为淡黄色^[7], 粉红色果肉的菠萝品种 *rosé* 价格高供应量小^[8]。因此, 研究菠萝果皮或果肉颜色的多元化非常有意义。

类黄酮是植物最主要的次生代谢物之一, 目前已发现 9000 余种存在于植物几乎所有的器官里, 在植物激素调节、吸收紫外线和抵抗生物^[9-10]和非生物胁迫等方面发挥重要作用^[11-13]。研究表明, 类黄酮、类胡萝卜素和甜菜色素这三类物质是植物花果呈色的主要成分^[14], 类黄酮的呈色范围最大, 涵盖从黄到紫的各种颜色^[10-15]。花色素苷是类黄酮中的主要显色物质, 它是花青素的糖苷化形式, 既能使菠萝呈现出更鲜艳的颜色, 又能够极大地提高菠萝抗性, 是影响菠萝果实品质的重要因素。

类黄酮因其种类繁多, 通过一个复杂的代谢网络分别合成, 花青素合成通路是其中的一个分支。植物在不同组织和发育时期花色素苷的含量不同, 在 7 个具有红色和白色 2 种花色的植物中, 红花的花青素含量均远高于白花^[16]; 辣椒随着果实的成熟, 其花青素含量逐渐降低^[17], 说明花色素苷的积累具有明显的基因调控和时空变化特征。二氢黄酮 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 是花青素合成途径中的关键限速酶^[18-19], DFR 的合成量直接影响下游花色素苷的积累。DFR 已经在多种植物中被鉴定及功能分析, 如缺失 DFR 基因的拟南芥突变体 TT3 表现出浅黄色的种皮和透明的下胚轴^[20], 在 TT3 中引入外缘 DFR 基因后产生了具有褐色种皮的后代^[21-22]; 过表达外源

DFR 的烟草花瓣呈现出更深的颜色, 并表现出更高的花青素水平^[22-23]; 陆地棉抑制 DFR 表达后, 其花青素含量显著降低^[24]。DFR 属于短链脱氢酶/还原酶家族 (SDR) 或 NADPH 依赖性差向异构酶家族 (Epimerase)^[12, 21], 具有 NADPH 结合位点和底物结合位点, 能催化二氢山柰酚 (DHK)、二氢槲皮素 (DHQ)、二氢杨梅素 (DHM) 3 种二氢黄酮醇形成不同的无色花青素^[25]。DFR 的底物特异性决定于第 134 位氨基酸残基, 依据该氨基酸种类不同将其分为 3 个类型^[26]: Asn 型 (天冬酰胺型) 可以催化 3 种二氢黄酮醇的转化; Asp 型 (天冬氨酸型) 对 DHQ 和 DHM 具有高度特异性; 非 Asn/Asp 型底物偏好暂未确定。

为了探索 DFR 基因在菠萝果色形成过程中的作用, 本研究对菠萝 DFR 基因家族进行较系统研究, 利用生物信息学方法鉴定菠萝 DFR 基因家族成员, 并对其理化性质进行分析; 并进一步克隆鉴定部分 DFR 基因的序列, 通过 qPCR 分析其在菠萝不同组织中的表达, 通过瞬时转染方法研究其定位情况。研究结果为揭示菠萝 DFR 基因的生物功能奠定基础, 并为后续菠萝育种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为金钻菠萝品种, 由海南省天地人生态农业股份有限公司临高基地提供, 按照该公司正常流程进行生产管理。本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由本实验室保存, 种植于海南大学苗房内, 16 h 光照, 8 h 黑暗, 正常水肥管理。

1.2 方法

1.2.1 AcDFRs 生物信息学分析 菠萝基因组数据 ASM154086v1 (F153) 和 GFF 注释文件下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻的 (*Oryza sativa*) DFR 家族蛋白序列下载于 Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 数据库, 利用 TBtools-II v 2.337 从 GFF 注释文件从菠萝基因组序列提取基因序列并转化成对应蛋白质序列, 建立本地

菠萝蛋白质数据库。利用拟南芥和水稻的 DFR 蛋白质序列分别对菠萝蛋白质数据库进行 blastp 比对，二者比对结果取并集，初步得到菠萝 DFR 基因家族候选成员。进一步利用 CDD（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>）保守结构域数据库和 Smart（<https://smart.embl.de>）数据库在结构域层面进行筛选，去除不含 DFR 家族核心结构域 FR_SDR_(cd08958)和 Epimerase(PF01370)的基因。

菠萝 AcDFRs 的氨基酸长度、分子量和等电点等理化性质通过 Expasy-ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件进行分析，使用 SOPMA（https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html）分析菠萝 DFR 蛋白的二级结构；使用 MAGA 11.0 软件采用邻接法（neighbor joining, NJ）构建系统进化树，利用 MEME Version 5.5.7（<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>）在线软件分析蛋白的保守基序，设置参数寻找 Motif 的数量为 12 个，根据全基因组注释 GFF 文件分析菠萝 DFR 家族成员的内含子和外显子等基因结构，并使用 Tbtools-II 软件对所分析的进化树、保守基序和基因结构进行可视化。使用 Tbtools-II 软件进行染色体定位以及共线性分析。提取 AcDFRs 的 CDS 上游 2000 bp 序列，利用 PlantCARE（<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>）在线软件预测启动子区域的顺式作用元件。

1.2.2 目的基因的克隆和表达载体构建 参照 GenBank 数据库中 AcDFRs 的 CDS 序列，使用

CE Design（<https://crm.vazyme.com/cetool/simple.html>）在线引物设计软件设计无缝克隆引物（表 1）。采用植物总 RNA 提取试剂盒（DP432，天根生化科技有限公司）提取金钻菠萝叶片总 RNA，用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（K1622，Thermo Fisher company）将提取的总 RNA 反转录为 cDNA，-20℃保存备用。以菠萝叶片 cDNA 为模板，用高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase（P505-d1，南京诺唯赞生物科技股份有限公司）扩增目的基因。扩增产物回收纯化，连接至 pCambia1300 线性载体（本实验室保存），将 pCambia1300-AcDFRs-GFP 转化到大肠杆菌 DH5α（DL1001，上海唯地生物技术有限公司），用抗性平板及菌落 PCR 筛选阳性菌落，挑选阳性克隆菌落扩大培养，将菌液至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序验证，将测序正确的质粒转化到农杆菌 GV3101（AC1001，上海唯地生物技术有限公司），并将鉴定阳性的菌落扩大培养后保存于-80℃冰箱。

1.2.3 AcDFRs 的表达模式分析 将整株金钻菠萝带回实验室，取不同部位组织，使用液氮研磨后提取总 RNA，反转录为 cDNA。根据 AcDFRs 的 CDS 序列使用 Primer Premier 5 软件设计荧光定量 PCR 引物，分别以菠萝不同部位 cDNA 为模板，使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix（Q711-02,Vazyme company）进行荧光定量 PCR 扩增，反应设置 3 个重复。使用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析，使用 SPSS Statistics 27 软件进行显著性分析，使用 GraphPad Prism 9 软件制图。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'）Primer sequence (5'-3')
AcDFR1F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGGGAGCAGCGGAGGAG
AcDFR1R	GCTCACCATGGATCCGGTACCTTCCGTAACATATCGGTTTCACGC
AcDFR3F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGACCATCGAAGACATTACTGCG
AcDFR3R	GCTCACCATGGATCCGGTACCGTTCTGCGAAGGAATGACCG
AcDFR6F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGGCGGAATATTGCGTGAC
AcDFR6R	GCTCACCATGGATCCGGTACCCAAAAGCCCTTTGTCTTGGAAG
AcDFR7F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGAGCGGAGTGGGGAAGTT
AcDFR7R	GCCCTTGCTCACCATGGATCCAAAGCTTACGAATCCCTTCTCTTTC
AcDFR12F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGGCGGCGGCGGCGGCG
AcDFR12R	GCTCACCATGGATCCGGTACCTTCCAGAAGACCTGCAGCTTTAT
AcDFR16F	CATATGCCCGTCGACACTAGTATGTCGATGCAGGGCAGCA
AcDFR16R	GCTCACCATGGATCCGGTACCTTTAAGGTAACCTTTGCTCTTCAAAC

1.2.4 亚细胞定位 将细胞质膜定位蛋白 RLK-RFP (细胞膜 Marker)、pCambia1300-GFP 和转入 pCambia1300-AcDFRs-GFP 的农杆菌划线培养, 挑取单菌落 28 °C 摇菌 36~48 h, 侵染前调节 OD₆₀₀=0.6。选择生长 3~4 周的健壮烟草, 将 pCambia1300-AcDFRs-GFP 和细胞膜 Marker 等比例混合后注射烟草叶背面, 同时用注射 pCambia1300 空载体的叶片做为对照, 注射后避光保存 48 h 后使用共聚焦显微镜 (LEICA/TCS SP8) 观察荧光信号。

2 结果与分析

2.1 AcDFR 基因家族的鉴定及基本信息分析

本研究通过与拟南芥、烟草 DFR 蛋白质序列比对, 结合蛋白结构域分析, 在菠萝全基因组中鉴定出 17 个 DFR 基因家族成员, 按照其在染色体上的位置, 将其命名为 *AcDFR1*~17。菠萝中共有 25 对染色体, 17 个菠萝 DFR 家族成员不均匀地分布在 10 条染色体上 (图 1), 其中 2 号和 10 号染色体分别有 2 个 *AcDFR* 基因 (*AcDFR2/3*、*AcDFR25/6*), 14 号染色体上有 3 个 *AcDFR* 基因 (*AcDFR9~11*), 19 号染色体上 4 个 *AcDFR* 基因 (*AcDFR12~15*)。AcDFR 蛋白理化性质分析结果 (表 2) 显示, *AcDFRs* 编码的氨基酸长度在 313~378 之间, 分子量在 34.73~47.74 kDa 之间, 等电点在 5.10~8.9 之间。AcDFR 蛋白质的二级结构主要包含 α -螺旋和 β -折叠, α -螺旋的含量在 38.73%~43.07% 之间, β -折叠在 13.24%~15.64% 之间。

2.2 AcDFRs 的系统进化及序列结构分析

为了解 *AcDFRs* 的进化关系及潜在功能, 将菠萝、拟南芥和甘蓝型油菜的 DFR 蛋白序列构建系统发育树。结果显示, *AcDFRs* 可分为 I、II、III、IV 4 个亚群, 亚群 I 仅包含 2 个 *AcDFRs*, 类群 II 包含 5 个 *AcDFRs*, 亚群 III 包含 2 个 *AcDFRs*, 类群 IV 包含 8 个 *AcDFRs* (图 2)。AcDFRs 蛋白的保守基序和基因结构的分析结果 (图 3) 显示, *AcDFRs* 蛋白至少含有 7 个保守基序 (Motif1、Motif2、Motif6、Motif7、Motif3、Motif10 和 Motif4), 其中 Motif1 (VCVTGASGFIASWLKLLL-QRGYTVHGTVRBPSDESKTAHL) 是 NADPH 结合位点。*AcDFRs* 基因的外显子数量在 5~7 之间, 其中, 5 个基因含有 5 个外显子, 10 个基因含有 6 个外显子, 2 个基因含有 7 个外显子。

2.3 AcDFRs 共线性分析

物种内共线性结果 (图 4A) 显示, 3 对基因具有共线性关系。结合蛋白序列分析结果, *AcDFR3* 与 *AcDFR9*、*AcDFR8* 与 *AcDFR16* 聚为一支, 且保守基序和基因结构相似, 表明 *AcDFR* 基因家族在进化过程中可能存在复制事件; *AcDFR2* 与 *AcDFR14* 关系较远, 可能在进化过程中出现染色体结构的变化, 从而导致功能上的分化。为进一步探究 *AcDFR* 基因家族成员的进化关系以及基因功能, 将 *AcDFR* 基因与水稻、烟草 DFR 基因一起构建种间共线性关系图 (图 4B)。结果显示, *AcDFRs* 与烟草之间共有 5 对基因存在共线性关系, 与水稻之间有 15 对基因存在共线性关系, 表明菠萝与水稻的亲缘关系更近。

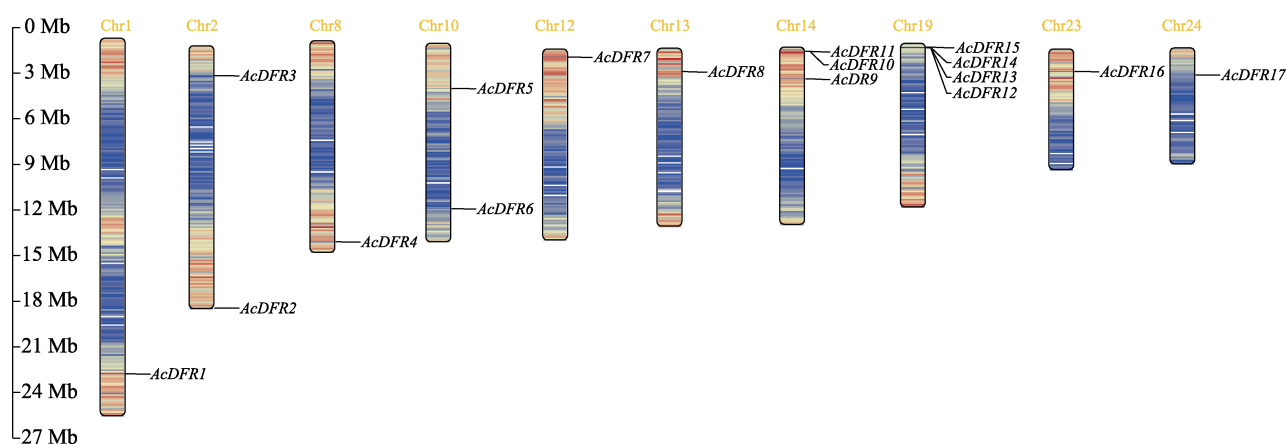


图 1 *AcDFRs* 的染色体定位

Fig. 1 Chromosome location of *AcDFR* genes

表 2 AcDFR 蛋白基本信息及二级结构
Tab. 2 Basic information and secondary structure of AcDFR proteins

基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	氨基酸 Amino acid	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	α-螺旋 Alpha helix/%	β-折叠 Beta sheet/%
AcDFR1	LOC109706489	358	39.64	5.10	39.39	13.41
AcDFR2	LOC109703922	326	36.58	6.71	40.18	15.64
AcDFR3	LOC109706538	341	37.13	6.71	39.00	14.96
AcDFR4	LOC109713612	313	34.73	5.57	38.73	14.79
AcDFR5	LOC109716157	346	38.16	5.84	40.14	13.29
AcDFR6	LOC109716805	320	35.65	6.11	42.19	15.00
AcDFR7	LOC109718406	325	35.90	6.03	40.00	16.62
AcDFR8	LOC109719617	327	35.66	6.10	39.45	14.98
AcDFR9	LOC109719871	337	36.81	7.99	39.17	14.84
AcDFR10	LOC109720164	378	41.68	6.27	41.01	14.29
AcDFR11	LOC109720167	336	36.23	5.50	42.26	13.39
AcDFR12	LOC109724550	332	36.27	6.95	41.95	13.98
AcDFR13	LOC109724551	329	35.99	5.42	43.07	14.16
AcDFR14	LOC109724552	327	36.18	5.85	40.81	14.33
AcDFR15	LOC109725209	321	35.06	5.76	41.28	14.07
AcDFR16	LOC109727758	326	36.01	5.50	40.49	14.11
AcDFR17	LOC109728810	340	37.81	8.92	41.76	13.24

2.4 AcDFRs 基因启动子顺式作用元件分析

对 *AcDFRs* 上游 2000 bp 启动子区域进行分析发现, *AcDFRs* 启动子区域的顺式作用元件按功能可分为光响应、激素响应、胁迫响应和生长发育 4 类(图 5)。数量最多的是光响应元件, 共 20 种 235 个, 大部分 *AcDFRs* 都含有 Box 4 或者 G-Box 元件; 其次是与激素有关的元件, 包括生长素、脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA)、水杨酸 (SA) 和茉莉酸甲酯 (MEJA), 其中 14 个 *AcDFRs* 共含有 54 个脱落酸响应元件 (ABRE); 胁迫响应元件包括厌氧诱导、缺氧响应、干旱和低温等元件, 值得注意的是, 全部 17 个 *AcDFRs* 都含有厌氧诱导元件 (ARE); 数量最少的是植物生长发育类响应元件。因此 *AcDFRs* 功能的行使可能受光照的影响较大, 并且可能通过多种激素对非生物胁迫产生响应, 同时可能对植物的生长发育发挥作用。

2.5 AcDFRs 在不同组织中的表达分析

通过荧光定量 PCR 对 *AcDFRs* 在金钻菠萝植株不同组织部位(根、茎、叶、花、果肉、果皮)中的表达量进行分析。结果表明, *AcDFRs* 在不同部位中表达量差异较大, 大部分基因在果肉和果皮部位有较高的表达量, *AcDFR9* 和 *AcDFR10* 分别只在花和根里有较高的表达量, *AcDFR17* 在茎里的表达量最高, 并且在根、果肉和果皮中几乎

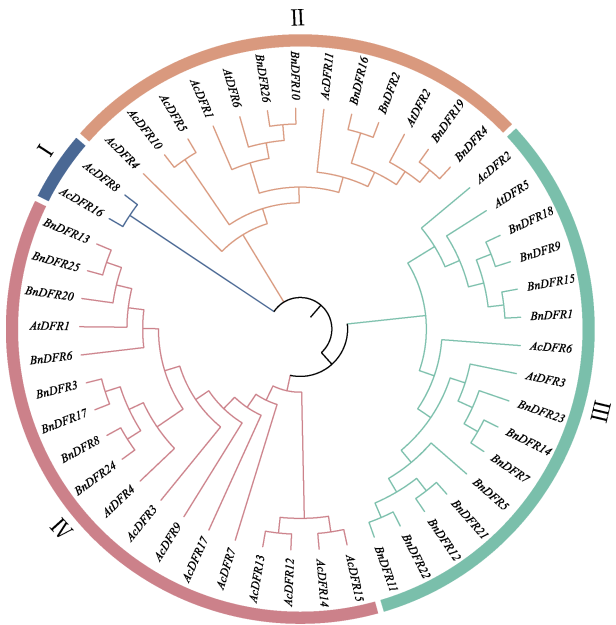


图 2 AcDFRs 系统进化树
Fig. 2 Intra species evolutionary tree

不表达, *AcDFR1*、*AcDFR3*、*AcDFR7*、*AcDFR11* 和 *AcDFR16* 在果肉部位的表达量最高, *AcDFR4*、*AcDFR6*、*AcDFR8*、*AcDFR12*、*AcDFR13*、*AcDFR14* 和 *AcDFR15* 在果皮部位的表达量最高(图 6)。

2.6 AcDFRs 的基因克隆和载体构建

根据 qPCR 结果挑选出部分在果肉和果皮中高表达的 *AcDFR* 基因, 以金钻菠萝总 RNA 反转

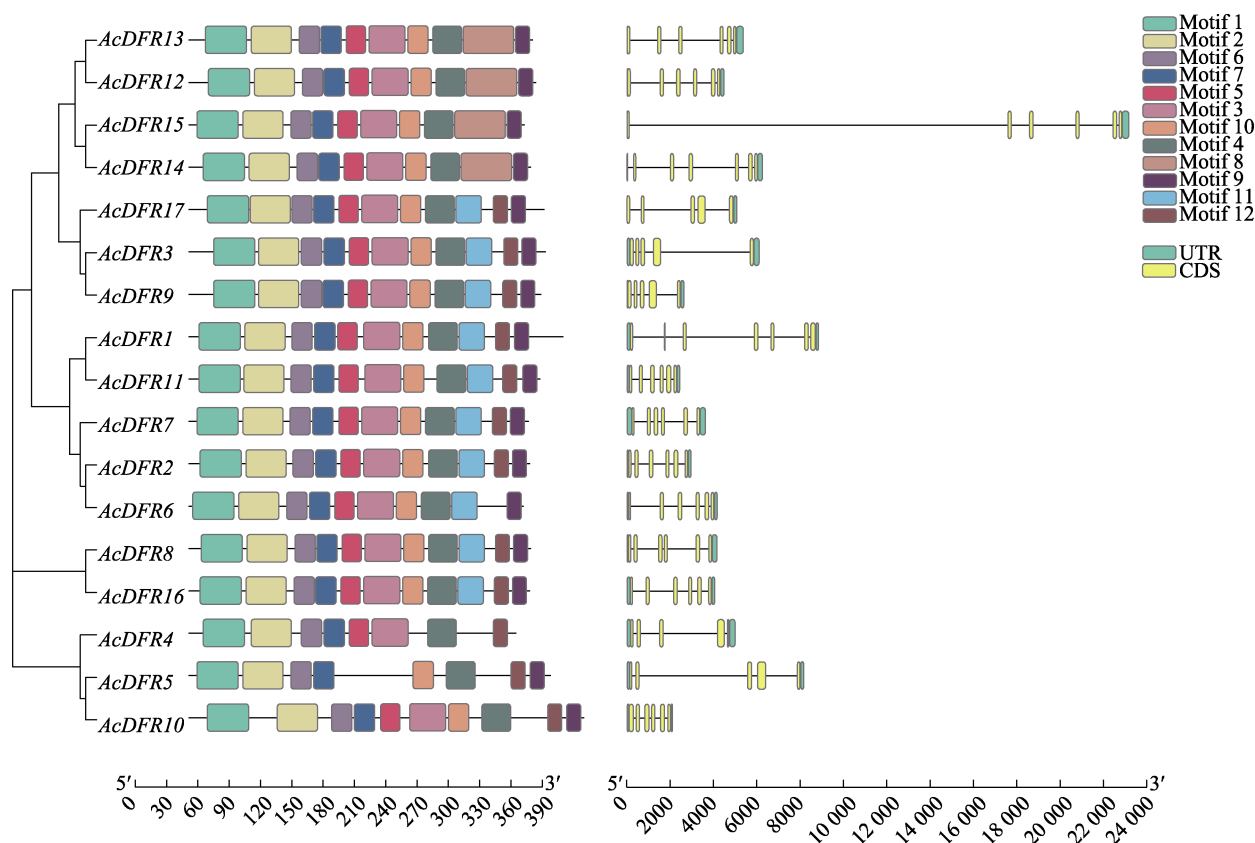


图 3 AcDFRs motif 分布和基因结构分布

Fig. 3 Motif distribution and gene structure distribution map of AcDFRs

录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测出一条特异性条带 (图 7), 将 PCR 扩增产物回收纯化, 连接 pCambia1300-GFP 载体, 转化至 DH5 α 大肠杆菌后测序。测序结果显示, *AcDFRs* 的 ORF 序列与数据库中的序列基本一致, 序列相似度均在 99%以上, 其中 *AcDFR3* 相似度最低, 为 96.46%。

2.7 *AcDFR1* 亚细胞定位

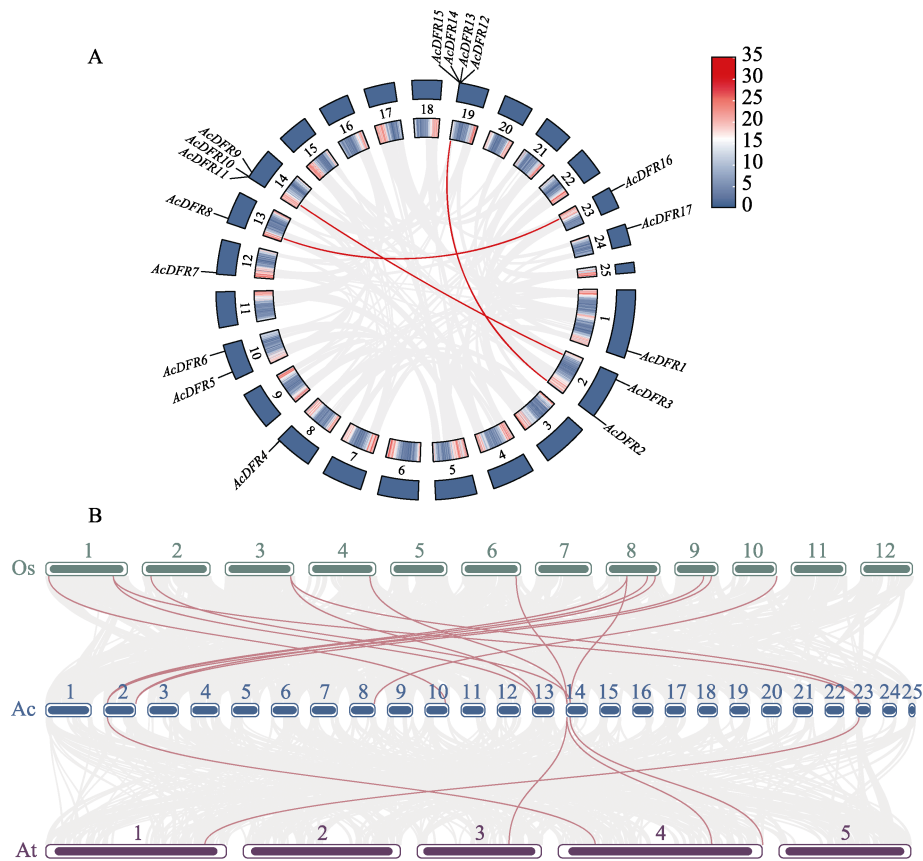
系统发育树显示, *AcDFR1* 与拟南芥中能催化无色花青素合成的 *AtDFR6* 聚类在同一分支。为明确 *AcDFR1* 蛋白在细胞中的定位, 以空载体作为对照, 将重组过表达载体和细胞膜 Marker 等比例混合后使用注射法侵染本氏烟草叶片进行瞬时表达分析。结果显示, *AcDFR1*-GFP 融合蛋白和 GFP 空载均在细胞膜、细胞质和细胞核中观察到清晰的 GFP 荧光信号 (图 8), 表明 *AcDFR1* 可能定位于细胞膜、细胞质与细胞核, 与预期结果基本一致。

3 讨论

菠萝在我国热区经济中占据重要地位, 近年

来, 我国菠萝主产区由于长期种植单一菠萝品种巴厘, 严重的品种退化导致菠萝果实品质下降, 菠萝种质抗逆性差异较大, 急需优良种质, 但目前菠萝育种仍依赖传统育种, 育种周期长效率低^[1]。本研究从菠萝全基因组中鉴定出 DFR 基因家族成员, 为菠萝品质改良提供理论基础。

本研究在菠萝基因组 (ASM154086v1) 中鉴定出 17 个 DFR 基因家族成员。基因组版本是基因家族分析的重要根基, 在菠萝“端粒到端粒 (T2T)”参考基因组序列组装和菠萝基因组数据库 (<https://ananas.watchbio.cn>) 发布后^[27], 下载最好的菠萝参考基因组版本 (GP) 对鉴定结果进行验证。在 T2T 基因组 (GP) 中鉴定到 18 个成员, 与菠萝基因组 (ASM154086v1) 中鉴定出的 17 个成员相比, 出现成员数量差异的原因可能是不同品种菠萝基因组之间的差异或不同注释方法之间的差异。*DFR* 基因已经在许多物种中被鉴定出来, 但不同的物种 DFR 家族基因的数量差异较大, 如草莓^[28]、苹果^[29]、甘蓝型油菜^[30]和银杏^[31]的 DFR 基因家族成员的数量分别为 57、96、26 和 12 个。对菠萝 DFR 基因家族成员进行



A: *AcDFR* 家族基因的共线性分析; B: 水稻、拟南芥和菠萝 DFR 基因的物种间共线性分析。
A: Collinearity analysis of *AcDFR* family genes; B: Inter species collinearity analysis of DFR genes in *O. sativa*, *Arabidopsis thaliana* and *A. comosus*.

图 4 *AcDFRs* 共线性分析
Fig. 4 Collinearity analysis of *AcDFR* genes

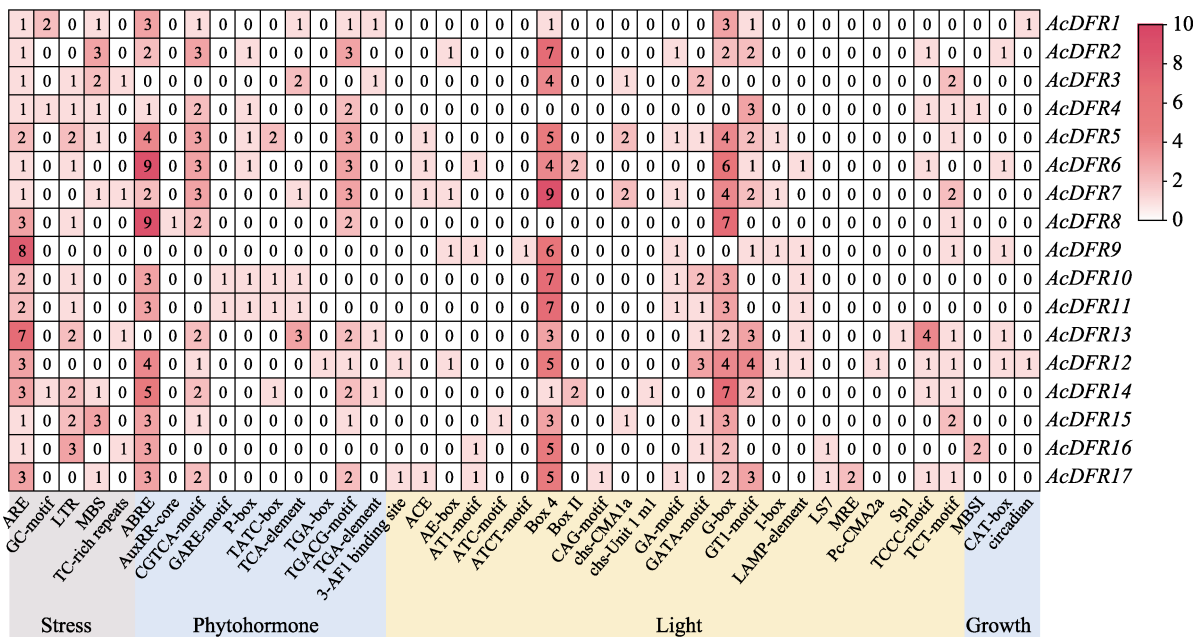
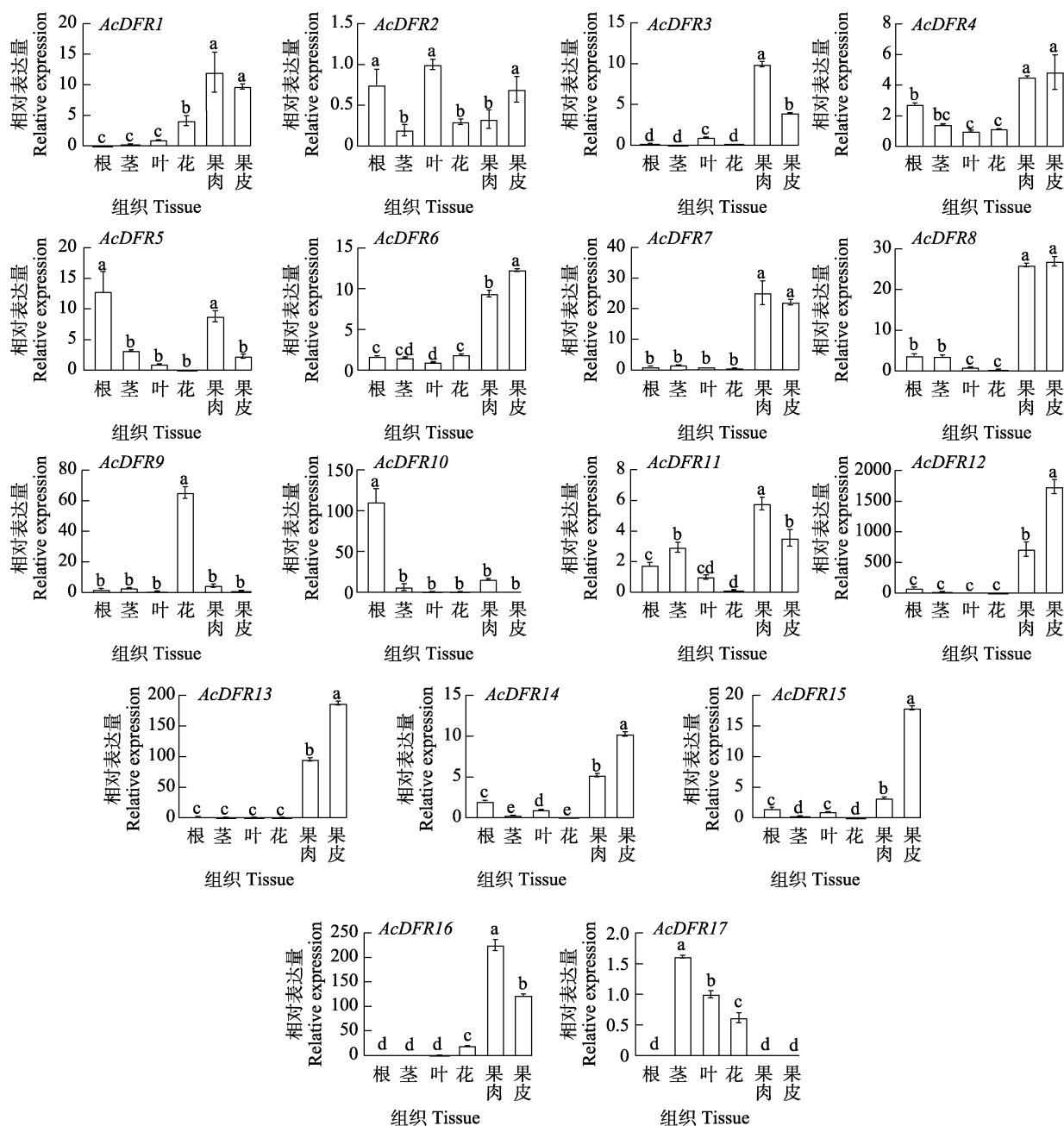


图 5 *AcDFRs* 启动子顺式作用元件
Fig. 5 Cis-acting elements of *AcDFR*s promoters

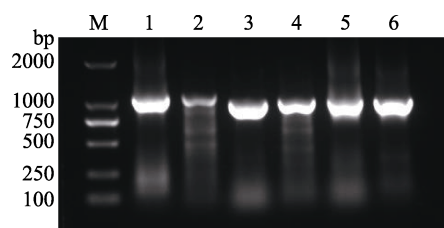


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 6 *AcDFRs* 在金钻菠萝不同组织部位的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *AcDFR* genes in different parts of 'Golden Diamond' pineapple



M: DL2000 DNA marker.

图 7 *AcDFRs* 克隆

Fig. 7 Cloning of *AcDFR* genes

生信分析发现, *AcDFRs* 不均匀分布于 10 条染色体上, 在第 19 号染色体上存在串联重复现象, 这促进了菠萝 *DFR* 家族成员的扩增。*AcDFRs* 的蛋白质长度、酸碱性、motif 和外显子数量较为相似, 但在基因结构上差异较大。

在模式植物拟南芥中发现了 6 个 *DFR* 基因, 其在花青素的生物合成中起不同的作用, 其中 *AtDFR6* 可以催化无色花青素的合成^[30]。在甘蓝

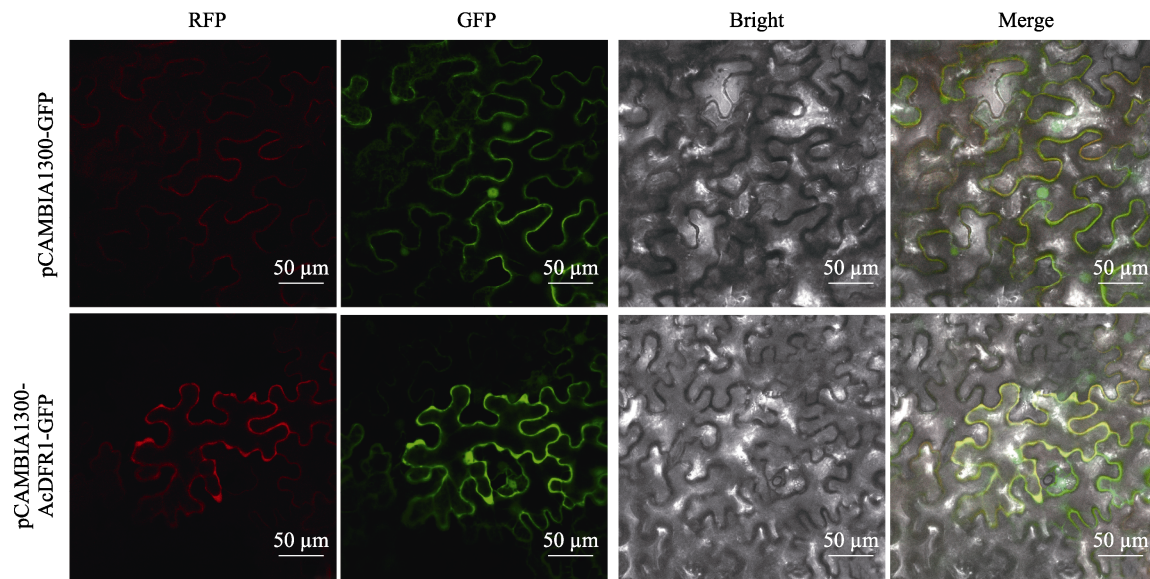


图8 AcDFR1 亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of AcDFR1

型油菜的 DFR 基因家族的研究中, *BnDFR26* 的表达水平和不同颜色油菜花瓣里的花青素含量一致, 推测其具有促进花青素合成的作用。菠萝 *AcDFR1* 与甘蓝型油菜 *BnDFR10*、*BnDFR26* 以及拟南芥 *AtDFR6* 的进化关系较近, 推测 *AcDFR1* 可能在花青素的合成中发挥关键作用。前人研究发现 *DFR* 基因的表达受光照的影响较大, 例如石斛 *DsDFR* 基因在弱光下下调明显, 同时花瓣和萼片中花青素含量降低^[32]。本研究在 *AcDFRs* 的启动子区域发现了 41 种具有响应功能的顺式作用元件, 其中含有大量的光响应元件, 表明 *AcDFRs* 功能的发挥可能受光的影响较大; 响应元件中还包括脱落酸和茉莉酸甲酯等激素响应元件以及胁迫响应元件, 表明 *AcDFRs* 可能在菠萝应对胁迫方面起重要的作用。

菠萝 DFR 基因家族成员在不同组织部位的表达量存在差异, 这种差异可能是因为 *AcDFRs* 在花青素的合成过程中发挥的作用不同所导致的。大多数 *AcDFRs* 在果肉和果皮中均有较高的表达量, 可能在抵抗紫外线或色素积累等方面发挥作用; *AcDFR5*、*AcDFR10*、*AcDFR17* 在根、茎、叶等营养器官中有较高的表达量, 可能在植株抗逆方面发挥作用。花青素的生物合成和修饰的场所主要在细胞质和内质网, 紫萼 *HvDFR*^[33] 和金花茶 *CnDFR*^[34] 定位于细胞核和细胞膜; 石蒜 *LyDFR*^[35] 定位于细胞膜、细胞质和细胞核; 管花肉苁蓉 *CtDFR*^[36] 在原生质体转化结果显示其定位在细胞质中。本研究发现 *AcDFR1* 主要定位在

细胞膜、细胞质、细胞核中, 与前人的研究基本一致。

本研究对 *AcDFR* 基因家族成员进行了生物信息学和在在不同组织中表达模式的分析, 成功克隆了菠萝 *AcDFRs*, 其序列与 NCBI 数据库中的序列基本一致。结合不同物种间的进化关系和表达模式推测, *AcDFR1* 为菠萝果实颜色性状改良的关键基因, 并且明确 *AcDFR1* 的亚细胞定位。该结果为进一步探究 *DFR* 基因在菠萝花青素积累中的功能提供理论参考。此外, 本研究尚未对 *DFR* 家族成员进行酶活验证, 菠萝 *DFR* 底物偏好尚不明确, 未来仍需进一步验证。

参考文献

- [1] 刘传和, 贺涵, 何秀古, 赖多, 匡石滋, 肖维强. 我国菠萝品种结构与新品种自主选育推广[J]. 中国热带农业, 2021(4): 13-15, 30.
LIU C H, HE H, HE X G, LAI D, KUANG S Z, XIAO W Q. Pineapple cultivar structure and extension of new independent breeding pineapple cultivars in China[J]. China Tropical Agriculture, 2021(4): 13-15, 30. (in Chinese)
- [2] ALI M M, HASHIM N, AZIZ S A, LASEKAN O. Pineapple (*Ananas comosus*): a comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products[J]. Food Research International, 2020, 137: 109675.
- [3] LUAN A P, ZHANG W, YANG M Z, ZHONG Z Q, WU J, HE Y H, HE J H. Unveiling the molecular mechanism in-

- volving anthocyanins in pineapple peel discoloration during fruit maturation[J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135482.
- [4] AO P X, MA Y, LUO K, DING Y M, ZHANG H J, XU Y, YUAN S J, ZHANG M, GUO H, LI G Y, ZHAN Y, LIU J X, ZHAO L F, ZHENG Y. Transcriptomic and metabolic profiles of apple peels of different colors[J]. Plants, 2025, 14(21): 3304.
 - [5] LI X M, TANG Y Y, LI L, LIANG G D, LI J, LIU C A, HE X M, SUN J. Comparative transcriptomic profiling in the pulp and peel of pitaya fruit uncovers the gene networks regulating pulp color formation[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 968925.
 - [6] ANURADHA C, RAMAJAYAM D, MAYILVAGANAN M, BACKIYARANI S, MOL P P, MAILRAJA V K, SINGH A, UMA S. Molecular characterization of Red banana and its somaclonal variant: a comprehensive study[J]. 3 Biotech, 2023, 14(1): 19.
 - [7] 贺军虎, 栾爱萍, 陈华蕊, 赵小青. “冰糖红菠萝”的引种选育及栽培技术[J]. 中国南方果树, 2020, 49(6): 147-149.
HE J H, LUAN A P, CHEN H R, ZHAO X Q. Introduction, breeding, and cultivation techniques of ‘red sugar pineapple’[J]. South China Fruits, 2020, 49(6): 147-149. (in Chinese)
 - [8] LOBATO-GÓMEZ M, HEWITT S, CAPELL T, CHRISTOU P, DHINGRA A, GIRÓN-CALVA P S. Transgenic and genome-edited fruits: background, constraints, benefits, and commercial opportunities[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 166.
 - [9] LEWIS J A, ZHANG B X, HARZA R, PALMER N, SARATH G, SATTTLER S E, TWIGG P, VERMERRIS W, KANG C. Structural similarities and overlapping activities among dihydroflavonol 4-reductase, flavanone 4-reductase, and anthocyanidin reductase offer metabolic flexibility in the flavonoid pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(18): 13901.
 - [10] WINKEL B S J. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 485-493.
 - [11] WEN W W, ALSEEKH S, FERNIE R A. Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2020, 55: 100-108.
 - [12] WANG J Y, ZHANG C H, LI Y S. Genome-wide identification and expression profiles of 13 key structural gene families involved in the biosynthesis of rice flavonoid scaffolds[J]. Genes, 2022, 13(3): 410.
 - [13] LEI T, HUANG J, RUAN H X, QIAN W, FANG Z, GU C Y, ZHANG N N, LIANG Y X, WANG Z Y, GAO L P, WANG Y S. Competition between FLS and DFR regulates the distribution of flavonols and proanthocyanidins in *Rubus chingii* Hu[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1134993.
 - [14] LI Y Q, LIU X X, CAI X Q, SHAN X T, GAO R F, YANG S, HAN T T, WANG S C, WANG L, GAO X. Dihydroflavonol 4-reductase genes from *Freesia hybrida* play important and partially overlapping roles in the biosynthesis of flavonoids[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 428.
 - [15] YOSHIKAZU T, NOBUHIRO S, AKEMI O. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 733-749.
 - [16] LUO P, NING G G, WANG Z, SHEN Y X, JIN H N, LI P H, HUANG S S, ZHAO J, BAO M Z. Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 1527.
 - [17] AN Y, LI N, ZHANG R L, WANG S, WANG J. Identification and characterization of DFR gene family and cloning of candidate genes for anthocyanin biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2025, 25(1): 830.
 - [18] HOLTON T A, CORNISH E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 1071-1083.
 - [19] XIE D Y, JACKSON L A, COOPER J D, FERREIRA D, PAIVA N L. Molecular and biochemical analysis of two cDNA clones encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Medicago truncatula*[J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 979-994.
 - [20] SHIRLEY B W, KUBASEK W L, STORZ G, BRUGGEMANN E, KOORNEEF M, AUSUBEL F M, GOODMAN H M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis[J]. The Plant Journal, 1995, 8(5): 659-671.
 - [21] RUAN H X, SHI X X, GAO L P, RASHID A, LI Y, LEI T, DAI X L, XIA T, WANG Y S. Functional analysis of the dihydroflavonol 4-reductase family of *Camellia sinensis*: exploiting key amino acids to reconstruct reduction activity[J]. Horticulture Research, 2022, 9: uhac098.
 - [22] SUN W, ZHOU N N, FENG C, SUN S Y, TANG M, TANG X X, JU Z G, YI Y. Functional analysis of a dihydroflavonol 4-reductase gene in *Ophiorrhiza japonica* (OjDFR1) reveals its role in the regulation of anthocyanin[J]. PeerJ, 2021, 9: e12323.
 - [23] LIU H L, LOU Q, MA J R, SU B B, GAO Z Z, LIU Y L. Cloning and functional characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene involved in anthocyanidin biosynthesis of grape hyacinth[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4743.

- [24] WANG L, ZHU Y, WANG P, FAN Q, WU Y, PENG Q Z, XIA G X, WU J H. Functional characterization of a dihydroflavanol 4-reductase from the fiber of upland cotton (*Gossypium hirsutum*)[J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 32.
- [25] JOHNSON E T, RYU S, YI H, SHIN B, CHEONG H, CHOI G. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavanol 4-reductase[J]. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2001, 25(3): 325-333.
- [26] LUO S L, WANG S P, YANG L, LUO K Y, CHENG J, NING Y, DONG Y, WANG W B. A comprehensive evolutionary analysis of the dihydroflavanol 4-reductase (DFR) gene family in plants: insights from 237 species[J]. *Genes*, 2025, 16(4): 396.
- [27] FENG J T, ZHANG W, CHEN C J, LIANG Y L, LI T X, WU Y, LIU H, WU J, LIN W Q, LI J W, HE Y H, HE J H, LUAN A P. The pineapple reference genome: telomere-to-telomere assembly, manually curated annotation, and comparative analysis[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(10): 2208-2225.
- [28] CHEN L Z, TIAN X C, FENG Y Q, QIAO H L, WU A Y, LI X, HOU Y J, MA Z H. The genome-wide identification of the dihydroflavanol 4-reductase (DFR) gene family and its expression analysis in different fruit coloring stages of strawberry[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(18): 9911.
- [29] LI W F, GAO J, MA Z H, HOU Y J, LI X, MAO J, CHEN B H. Molecular evolution and expression assessment of DFRs in apple[J]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2023, 10(1): 98.
- [30] QIAN X Z, ZHENG W Y, HU J, MA J X, SUN M Y, LI Y, LIU N, CHEN T H, WANG M Q, WANG L, HOU X Z, CAI Q A, YE Z S, ZHANG F G, ZHU Z H. Identification and expression analysis of DFR gene family in *Brassica napus* L.[J]. *Plants (Basel)*, 2023, 12(13): 2583.
- [31] LIU S, MENG Z L, ZHANG H Y, CHU Y X, QIU Y Y, JIN B, WANG L. Identification and characterization of thirteen gene families involved in flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 188(Part A): 1-15.
- [32] PRATAMA A N, GRANDMOTTET F, KONGBANGKERD A, SUJIPULI K, RATANASUT K. Low-light intensity reprogramed flower pigmentation in *Dendrobium Sonia* via downregulation of dihydroflavanol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes[J]. *Scientia Horticulturae*, 2023, 312: 111853.
- [33] QIN S, LIU Y T, CUI B Q, CHENG J L, LIU S Y, LIU H Z. Isolation and functional diversification of dihydroflavanol 4-reductase gene HvDFR from *Hosta ventricosa* indicate its role in driving anthocyanin accumulation[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2021, 17(1): 2010389.
- [34] JIANG L N, FAN Z Q, TONG R, ZHOU X W, LI J Y, YIN H F. Functional diversification of the dihydroflavanol 4-reductase from *Camellia nitidissima* Chi. in the control of polyphenol biosynthesis[J]. *Genes*, 2020, 11(11): 1341.
- [35] WANG N, SHU X C, ZHANG F J, ZHUANG W B, WANG T, WANG Z. Comparative transcriptome analysis identifies key regulatory genes involved in anthocyanin metabolism during flower development in *Lycoris radiata*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 761862.
- [36] 邱海玲, 王方明, 高博闻, 米蕊雨, 张泽坤, 杜宇, 史社坡, 屠鹏飞, 王晓晖. 管花肉苁蓉花中二氢黄酮 4-还原酶的克隆、表达分析和酶活性鉴定[J]. *药学报*, 2023, 58(4): 1079-1089.
- QIU H L, WANG F M, GAO B W, MI X Y, ZHANG Z K, DU Y, SHI S P, TU P F, WANG X H. Cloning, expression analysis and enzyme activity verification of dihydroflavanol 4-reductase from *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight flower[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2023, 58(4): 1079-1089. (in Chinese)