

刘洁霞, 谭国飞, 吴雪君, 等. 鸭儿芹异黄酮 2'-羟化酶基因的克隆及其表达的温度响应[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 640-646.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.024

鸭儿芹异黄酮 2'-羟化酶基因的克隆及其表达的温度响应

刘洁霞, 谭国飞, 吴雪君, 许瀛之, 陈佳凯, 熊爱生

(南京农业大学园艺学院作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 以贵州野生鸭儿芹为材料, 研究了与植物抗逆境胁迫有关的细胞色素 P450 (CYP450) 家族成员异黄酮 2'-羟化酶 (*I2'H*) 基因对温度胁迫的应答和响应。利用 PCR 扩增技术克隆得到鸭儿芹异黄酮 2'-羟化酶基因 *CjI2'H*, 该基因的开放阅读框长为 1 527 bp, 可编码 508 个氨基酸, 通过 DNAMAN 软件预测其蛋白质分子质量为 1.270×10^5 , 等电点 (*pI*) 为 4.80。进化树分析结果表明 *CjI2'H* 编码的氨基酸序列在不同植物间相对保守。实时定量 PCR 结果显示鸭儿芹在 30 °C 处理下, 叶柄中 *CjI2'H* 基因的相对表达量随处理时间的增加而上升, 且在 24 h 时达到峰值; 10 °C 处理下, *CjI2'H* 基因的相对表达量明显低于高温处理。说明 *CjI2'H* 基因表达与温度胁迫存在关联性, 高温胁迫后该基因的表达响应大于低温胁迫。

关键词: 鸭儿芹; *CjI2'H* 基因; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 温度胁迫; 基因表达

中图分类号: S636.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0640-07

Cloning of isoflavone 2'-hydroxylase gene from *Cryptotaenia japonica* Hassk and its expression in response to temperature

LIU Jie-xia, TAN Guo-fei, WU Xue-jun, XU Ying-zhi, CHEN Jia-kai, XIONG Ai-sheng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The *CjI2'H* gene encoding isoflavone 2'-hydroxylase (*I2'H*), a member of the cytochrome P450 superfamily related to abiotic stress in plants, was cloned by PCR amplification from wild *Cryptotaenia japonica* Hassk of Guizhou province. Its ORF (open reading frame) length is 1 527 bp, encoding 508 amino acids. The enzyme molecular weight predicted by DNAMAN software was 1.270×10^5 , and the *pI* was 4.80. The phylogenetic analysis showed that the *CjI2'H*-encoded amino acid sequences of *I2'H* were conservative in different plant species. The expression level of *CjI2'H* gene in the petiole of *C. japonica* Hassk at 30 °C detected by quantitative real-time PCR were up-regulated and peaked at 24 h. At 10 °C, the expression level of *CjI2'H* was lower than that at high temperature. The expression of *CjI2'H* gene is related to temperature in *C. japonica* Hassk, greater under high temperature stress.

Key words: *Cryptotaenia japonica* Hassk; *CjI2'H* gene; cloning; quantitative real-time PCR; temperature stress; gene expression

收稿日期: 2015-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272175); 江苏省杰出青年基金项目 (BK20130027); 江苏高校优势学科建设项目

作者简介: 刘洁霞 (1994-), 女, 山西晋中人, 本科生, 主要从事蔬菜分子生物学研究。(E-mail) 14112307@njau.edu.cn

通讯作者: 熊爱生, (E-mail) xiongaisheng@njau.edu.cn

鸭儿芹 (*Cryptotaenia japonica* Hassk) 为伞形科 (Apiaceae) 鸭儿芹属 (*Cryptotaenia*) 的多年生草本植物。鸭儿芹为药食同源性野生蔬菜, 可全株入药,

用于治疗肿毒、尿闭和蛇咬伤等^[1-2]。在中国主要分布于华北、华东、华中、西北等一些省区,一般生长于海拔为 200~2 400 m 的凉爽潮湿半阴地带^[3]。目前,日本鸭儿芹的栽培已进入工厂化阶段,中国部分省区也已经成功驯化鸭儿芹,并开始使用其种子进行人工繁殖^[4]。在鸭儿芹栽培过程中,其品质受生长季节的温度影响较大。

异黄酮 2'-羟化酶 (*I2'H*) 是细胞色素 P450 (CYP450) 家族成员之一,该基因家族广泛分布于植物体中。这一家族的酶类不仅参与植物体的基础代谢,还参与植物的次生代谢,产生可降解外源化学药物毒性的次生代谢产物,使植物能够抵抗逆境胁迫^[5-6]。异黄酮 2'-羟化酶可参与异黄酮衍生物抗菌化合物的生物合成。在辅因子的作用下,异黄酮经 *I2'H* 的催化,其 2'-C 部位被羟化产生 2-羟基异黄酮,最终转化为植物抗毒素等黄酮类化合物^[7-8]。黄酮类物质能够提高植物抵抗寒冷、高温能力,并且对人体有多种药理作用,如降脂、降糖、抗氧化及抗癌、抗心血管疾病等^[9-10]。

本研究以贵州野生鸭儿芹为研究对象,克隆与逆境胁迫响应相关的 *CjI2'H* 基因,并以不同生长温度处理的鸭儿芹叶柄为材料,通过实时荧光定量 PCR 分析 *CjI2'H* 基因在不同温度下的表达情况,为深入研究 *CjI2'H* 基因在鸭儿芹抗寒、耐热机制中的作用提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 植物材料

2014 年 9 月将本实验室保存的贵州省野生鸭儿芹种子播种于南京农业大学伞形科蔬菜遗传与种质创新实验室实验大棚内。待植株长到四叶期时,剪取叶片组织,用锡纸包裹后,液氮速冻,用于提取总 RNA、反转录合成 cDNA 和克隆 *CjI2'H* 基因。

将棚内种植的鸭儿芹植株移至光照培养箱中,设定生长环境条件:白天和夜晚温度分别是 22 °C 和 20 °C,光照和黑暗时间均为 12 h。恢复生长 7 d 后,分别对鸭儿芹植株进行 10 °C 和 30 °C 下处理 0 h、0.5 h、1.0 h、2.0 h、4.0 h、8.0 h、12.0 h 和 24.0 h,剪取每个处理阶段健壮植株第 4 片叶的叶柄进行保存,用于提取叶柄组织中的总 RNA、反转录合成 cDNA 和荧光定量 PCR。

1.2 RNA 的提取与 cDNA 的合成

根据 RNA simple Total RNA Kit (北京 Tiangen 公司产品)试剂盒的操作说明,提取鸭儿芹叶片和叶柄组织总 RNA,室温干燥沉淀 5 min 后,加入 50 μl RNase-free 水溶解沉淀,待 RNA 完全溶解后,用分光光度计检测其纯度,并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。利用 Prime Script RT reagent Kit (大连 TaKaRa 公司产品)试剂盒,将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。cDNA 合成体系的总体积为 20 μl,反应条件及过程:将总 RNA 和 50 μmol/L Oligo (dT) 混合后,在 70 °C 下水浴 10 min;然后加入 M-MLV 反转录酶 (200 U)、dNTP (10 mmol/L)、RNase 抑制剂 (40 U, TaKaRa 公司产品) 及灭菌的双蒸水,在 42 °C 水浴中放置 60 min,再用 70 °C 水浴 15 min 以达到变性的目的。

1.3 鸭儿芹 *CjI2'H* 基因的克隆

根据从鸭儿芹转录组数据库^[11]中得到的 *CjI2'H* 序列,用 Primer Premier 5.0 设计 1 对克隆引物,上游引物序列为 5'-CATATCCCATCACTCTTGCTCTACA-3',下游引物序列为 5'-TACCAAAGT-TATCAAGCTATCAGTCA-3'。以反转录的 cDNA 为模板,使用 *Ex Taq* Kit (大连 TaKaRa 公司产品)进行 *CjI2'H* 基因的扩增,PCR 体系 (20 μl) 包括如下:cDNA 模板 1 μl,PCR mix 10 μl,10 μmol/L 正反引物各 1 μl,灭菌的 ddH₂O 7 μl。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min,然后以 94 °C 变性 50 s、58 °C 退火 50 s 和 72 °C 延伸 2 min 为条件进行 34 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物放 4 °C 冰箱中保存。

1.4 PCR 扩增产物的连接、转化和测序

用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,回收目的条带。将回收产物与 pMD19-T 载体 (大连 TaKaRa 公司产品)连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂板,于 LB 氨苄平板培养基上培养过夜。精细挑选白色单个菌落继续扩大培养,检测目的条带大小正确后送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.5 序列分析

利用 DNAMAN (Version 5.22) 软件确定 *CjI2'H* 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列并翻译成相应的氨基酸序列,利用 NCBI 数据库中的 Blast-p 进行同源比对,利用 Clustal X (Version 1.

81) 进行氨基酸序列的多重序列比对,用 SPOMA 进行二级结构预测,利用软件 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.6 实时荧光定量 PCR 和基因表达分析

根据 *CjI2'H* 序列信息,采用 Primer 5.0 设计荧光定量引物,用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因的表达情况。实时定量 PCR 采用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒(大连 TaKaRa 公司产品),根据试剂盒说明进行操作。相对定量使用参照基因的 ΔC_t 法,表达差异等于 $2^{-\Delta C_t}$, $\Delta C_t = C_{t_{\text{目标基因}}} - C_{t_{\text{actin}}}$ 。采用 iQTM5 software 和 iQTM5 Real-time PCR System 完成荧光定量 PCR。根据克隆到的 *CjI2'H* 基因序列,设计荧光定量正向引物 *CjI2'H*-GF (5'-CAGGGTAG-GTTCTCGTCCAGTT-3')和反向引物 *CjI2'H*-GR (5'-TTCGTCTAAGATTTCTCCAGTG-3')。用鸭儿芹 *actin* 基因作为内参基因^[12],其正向引物为 *actinF* (5'-CTGCAAAGAGCAGCTCTTCTGTGGA-3'),反向引物

为 *actinR* (5'-TGTAAGTTGTCTCGTGGATTCTGC-3'),目标基因与 *actin* 基因一起扩增。表达分析采用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 20.0 进行。

2 结果与分析

2.1 鸭儿芹 *CjI2'H* 基因的克隆

对克隆产物进行测序,获得全长为 1 592 bp 的 *CjI2'H* 基因序列。通过 ORF 预测,*CjI2'H* 基因编码蛋白属于 CYP450 家族成员(图 1),开放阅读框长度为 1 527 bp,可编码 508 个氨基酸(图 2),其中碱基 A、T、G、C 的总量分别为 434 个、459 个、338 个和 296 个,分别占总碱基数的 28.42%、30.06%、22.13%和 19.38%。对其蛋白质基本物理化学参数的分析预测结果显示,鸭儿芹 *CjI2'H* 蛋白质分子量为 1.2709×10^5 ,等电点(*pI*)= 4.80。通过对其氨基酸亲水/疏水性预测(图 3)可知,该氨基酸疏水性区域多于亲水性区域,该氨基酸可能属于疏水性氨基酸。

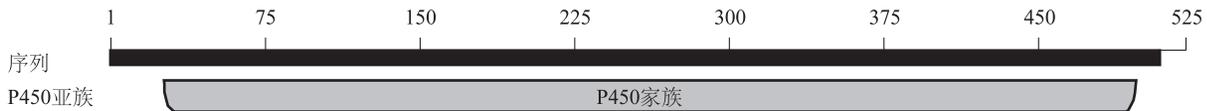


图 1 鸭儿芹 *CjI2'H* 保守域预测

Fig.1 Prediction of the conserved domain of *CjI2'H* from *Cryptotaenia japonica* Hassk

2.2 鸭儿芹 *CjI2'H* 基因碱基序列及氨基酸序列的同源性比较分析

将获得的鸭儿芹 *CjI2'H* 基因碱基序列和氨基酸序列分别与同源性较高的葡萄 (*Vitis vinifera*)、梅 (*Prunus mume*) 两物种的 *I2'H* 基因碱基序列和氨基酸序列进行比对。基因碱基序列比对结果表明鸭儿芹 *CjI2'H* 基因碱基序列与两物种的基因碱基序列一致性达到 76.93% (图 4)。三者氨基酸序列比对结果表明 *CjI2'H* 氨基酸序列与葡萄、梅两种植物的氨基酸序列一致性也高达 70.59%。三者基因的开放阅读框长度不同,编码氨基酸长度也不相同(图 5)。其中鸭儿芹的 *I2'H* 基因编码 508 个氨基酸,而葡萄的 *I2'H* 基因编码 499 个氨基酸,梅的 *I2'H* 基因编码 507 个氨基酸。三者基因碱基序列和氨基酸序列的一致性均较高,表明 *I2'H* 基因碱基序列和氨基酸序列在鸭儿芹、葡萄和梅三种植物中相对

保守。

2.3 鸭儿芹 *CjI2'H* 的进化分析

为了进一步研究鸭儿芹 *CjI2'H* 进化关系,选取 12 种物种的 *I2'H* 氨基酸序列一起构建进化树(图 6)。在进化树上,伞形科鸭儿芹和豆科的蒺藜状苜蓿、鹰嘴豆和黄芪的 *I2'H* 亲缘关系较近,而与白僵菌和尖孢镰刀菌的亲缘关系较远,且同为豆科的蒺藜状苜蓿、鹰嘴豆和黄芪以及同为真菌的白僵菌和尖孢镰刀菌分别在同一分支上,表明 *I2'H* 的氨基酸序列在同科植物的进化中比较保守。

2.4 鸭儿芹 *CjI2'H* 基因在温度胁迫下的表达

为研究鸭儿芹 *CjI2'H* 基因在不同温度胁迫下的表达情况,将生长一致的鸭儿芹植株分为 2 组,分别进行 10 °C 低温和 30 °C 高温处理,处理时间为 0 h、0.5 h、1.0 h、2.0 h、4.0 h、8.0 h、12.0 h 和 24.0 h,通过荧光定量 PCR 检测鸭儿芹叶柄中 *CjI2'H* 基

C A T A T C C C A T C A C T C T T G C T C T A C A A A T C C

1 ATGGCTATAGCTCATATTTTTATGTGTACTTCCGATCATTTTAGCTCTGTATGTGACAACACAACATTTCCTT
 M A I A H I F Y V Y L P I I L A L Y V T T Q H F L
 76 CACAAGCTCCTGAATTTCCACCTACTCCTTTTCCCTTATACCTTTAATTTGGTCACCTTTACCTCTTAAGGAAA
 H K L L L N F P P T P L I P L I G H L Y L R K
 151 CCTCTTCAGAAGACATTATCAAATCTTCAAATCTTATGGACCAGTGTTCCTCAGGGTAGGTTCTCGTCCA
 P L Q K T L S N L S N S Y G P V F F L R V G S R P
 226 GTTCTGTGTTTTCATCGGTATCAGCTGTGAAGAATGTTTTACCAAGAATGACATCAACTTTGCCAACCGGCT
 V L V V S S V S A A E E C F T K N D I N F A N R P
 301 CATCTTCTATGCAAAATACCTTGGCTACAACCTACACTAGTATTGTTGGGGACCTATGGTGATCACTGGAGA
 H L L Y A K Y L G Y N Y T S I V W G P Y G D H W R
 376 AATCTTAGACGAATTCGTCTATTGAAATCTATCATCTTATCGCTTACAGAAATATCTCATATTCGTGTTGAT
 N L R R I S S I E I L S S Y R L Q K L S H I R P
 451 GAGGTTCAAGACTGATGCACAAGTTATTTCTGTCTTGCCTGAGAATAAGTATCAACCTTTGCATATGAAACCC
 E V R R L M H K L F L S C T E N K Y Q P L H M K P
 526 GTGTTCAAGTAACTATTTCAATATCATGACTAGGATGCTGGGAAGAGGTATTTGGTGAGGATACATTA
 V F S K L I F N I M T R M I A G K R Y F G E D T L
 601 AAGTCAGAAGAGGCGAAGAGATTTCAGGAGATAATAGCTGAGTCATCTGCGTTGGCTGGAGCATCAAATATTGA
 K S E E A K R F Q E I I A E S S A L A G A S N I G
 676 GATTTATGCCAATTTGTCAGACTTTGTATTCATAAAAATGGAAAAGAGGCTCAAGAGTTTGCATAAGAAAAGA
 D F M P I V R Q F V F N K M E K R L K S L H K K R
 751 GATGATCTTGTGCAGAAGTGGATAGAAGAATTTGCAACAAAATCTCAGATGATTCTGGAGAATCAGATGAGAAA
 D D L V Q K W I E E F R N K I S D D S G E S D E K
 826 TCTATGATTGAGATTCTGTTGTCTTTGCAACATAGAGAGCCTGAATATTATACGGATGAAACTGTTAAAAGTCTC
 S M I E I L L S L Q H R E P E Y Y T D E T V K S L
 901 ATGCTGGCTCTGTTACAGGCAGGGGTCAGTACATCAGTTGATACAATGGAGTGGGCGATGGCATGCCTTCTTAAC
 M L A L L Q A G V S T S V D T M E W A M A C L L N
 976 AATCCGAACGTGCTCCACAAGGCACAAAATGAAATGACAATGTGTTTCACATAGCCGTCTGATTGATGAAGCA
 N P N V L H K A Q N E I D N C V S H S R L I D E A
 1 051 GACATGGCTGAACCTCCATATTTAAAATGCATCATTCTGTGAGACAATGCG GATGTTCCAGTAGCTCCATTCTT
 D M A E L P Y L K C I I R E T M R M F P V A P F L
 1 126 GTACCCACGAGTCATCTATGGATTCCACTGTATGTGGTTTTATGTTCCCGTAAAACATGCTATTGGTGAAC
 V P H E S S M D S T V C G F Y V P R K T M L L V N
 1 201 GTCAAAAACAATACAAAATGACCCTAATTACTGGGAAGACCCTGGAACATTTATGCCAGAGAGGTTTGAAGGTTT
 V K T I Q N D P N Y W E D P G T F M P E R F E G F
 1 276 GATGGGCAATGTGGGGTTAAGTGGATGCCATTTGGGTCAGGCAGGAGAGGATGCCCTGGAGAGGGATTGGCG
 D G A N V G F K W M P F G S G R R G C P G E G L A
 1 351 ATGCGTATAGTTGGATTGGCAATAGGATCATTGATTGCTTGGACTGGGACCGCATGGGCAAGAAATGGTT
 M R I V G L A I G S L I Q C F D W D R M G K E M V
 1 426 GACATGACCACAGCAGTGGACTGACCGCACCCATGGCTCAACCCTTAATGGCTAAGTACAGGCCCTCGTCCGACA
 D M T T G S G L T A P M A Q P L M A K Y R P R P T
 1 501 ATGGTCAACCTTCTATGCCAAATTTGA 1527
 M V N L L C Q I *
 A G A G T A T A A T T G A C T G A T A G C T T G A T A A C T T T G G T A

* 表示终止密码子,方框标记的核苷酸片段为克隆引物序列。

图2 鸭儿芹 *Cj12'H* 基因碱基序列及其编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *Cj12'H* from *C. japonica* Hassk

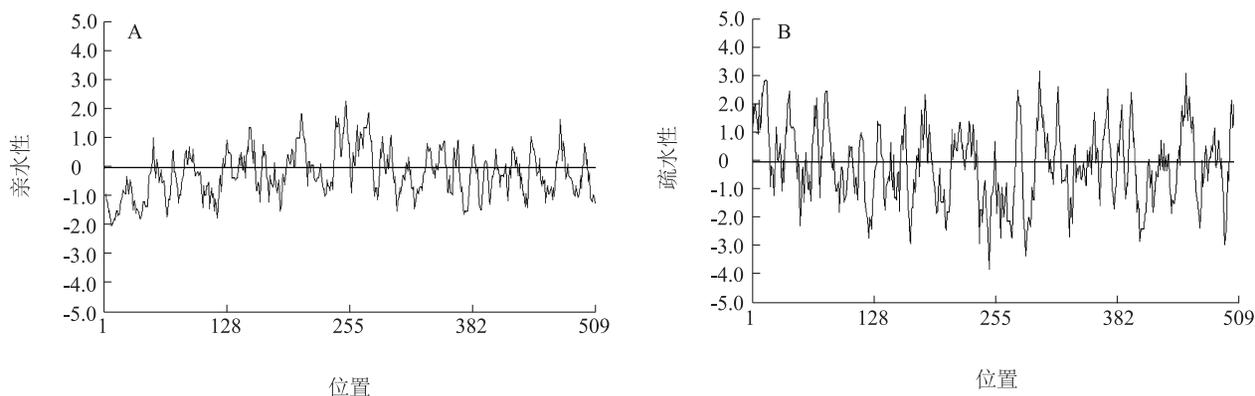


图3 鸭儿芹 *Cj12'H* 氨基酸的亲水性和疏水性

Fig.3 The hydrophilicity and hydrophobicity of *Cj12'H*-encoded amino acids of *C. japonica* Hassk

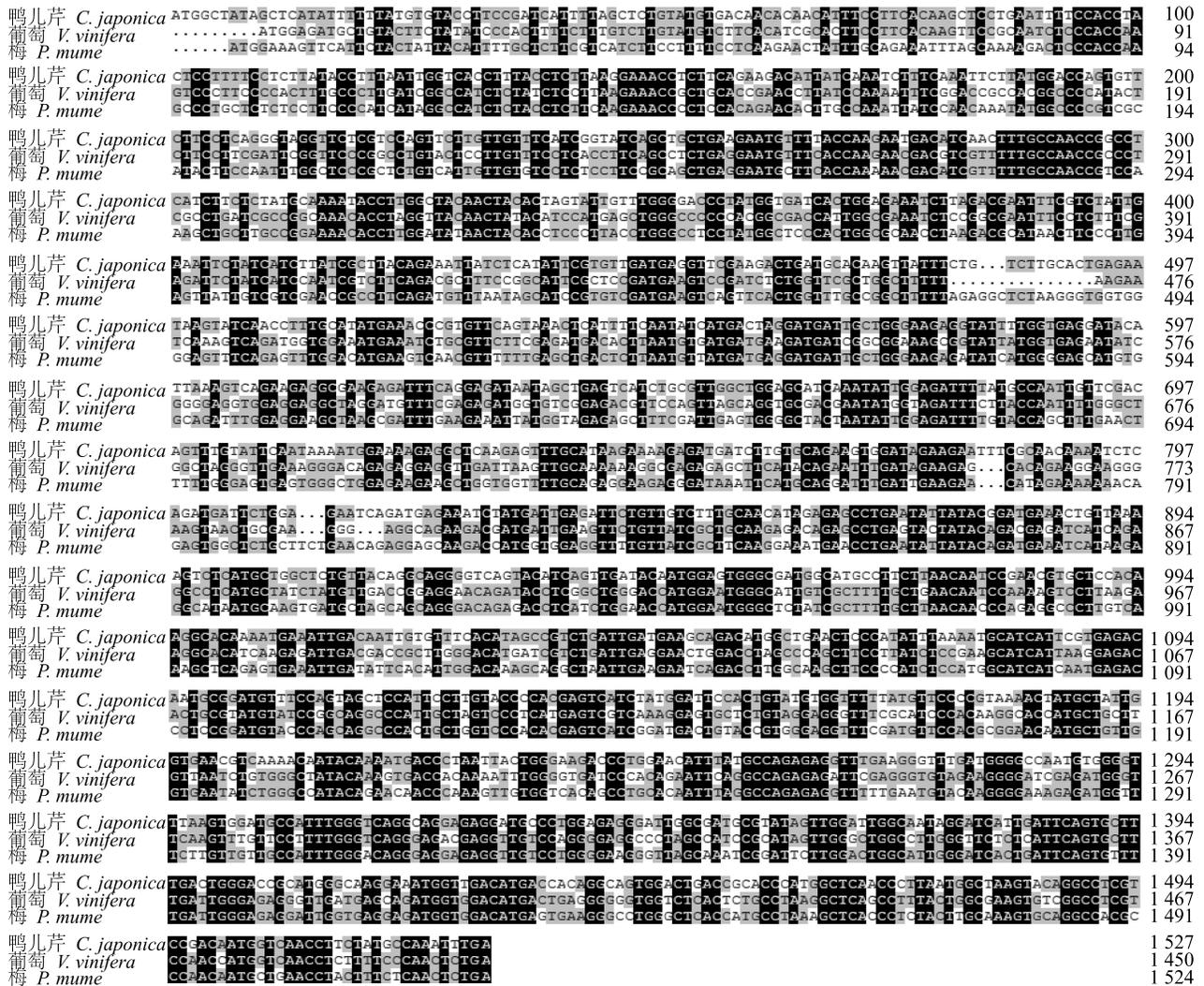


图4 鸭儿芹、葡萄和梅的 I2'H 基因序列比对

Fig.4 Alignment of gene sequences of I2'H from C. japonica Hassk, Vitis vinifera and Prunus mume

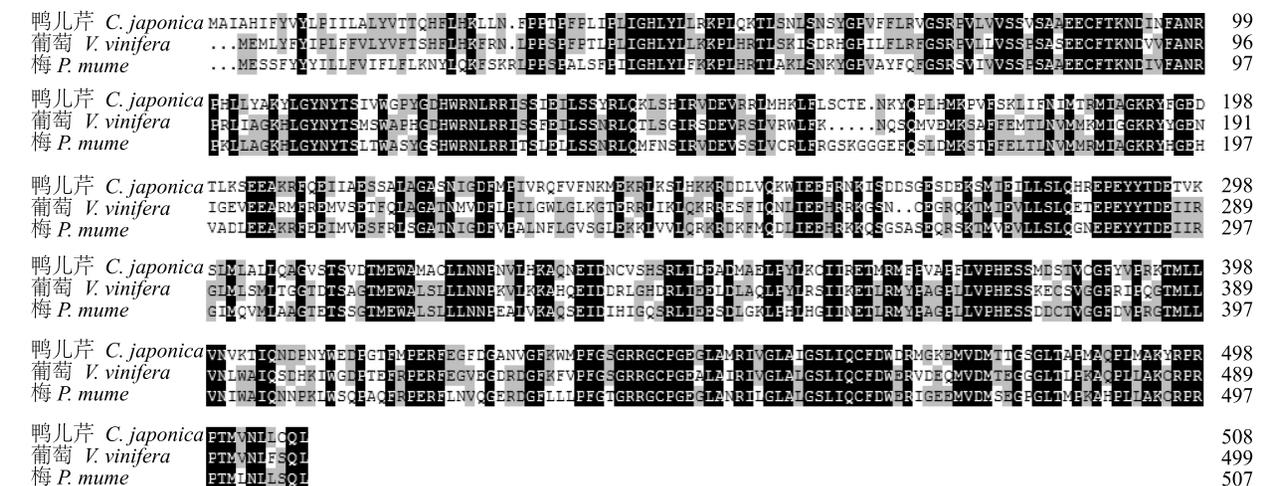
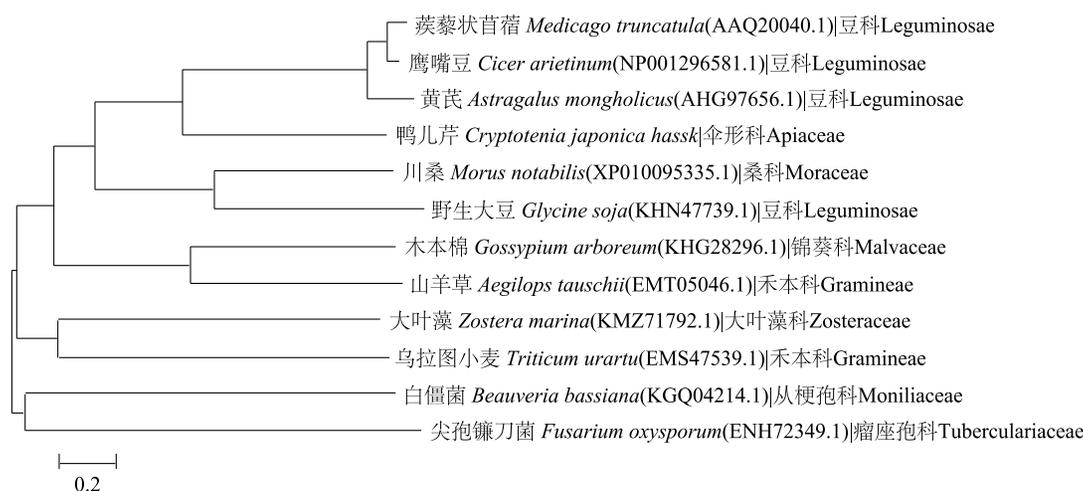


图5 鸭儿芹、葡萄和梅的 I2'H 氨基酸序列比对

Fig.5 Alignment of amino acid sequences of I2'H from C. japonica Hassk, V. vinifera and P. mume



括号内为氨基酸登录号,其他物种来源的 I2'H 氨基酸序列皆来源于 NCBI 数据库,标尺上的数字代表遗传距离。

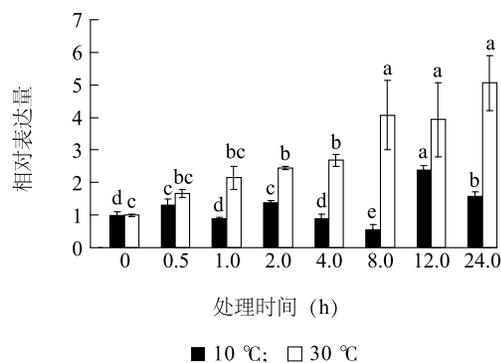
图 6 *CjI2'H* 与其他物种 I2'H 的蛋白质序列系统进化树

Fig.6 The phylogenetic tree based on amino acid sequence of I2'H of *C. japonica* Hassk and other species

因的表达量(0 h 处理为对照,设表达量为 1)。结果(图 7)表明,在 30 °C 高温处理下,*CjI2'H* 基因的相对表达量均明显高于对照,且随着处理时间的延长呈上升趋势,处理 24 h 时相对表达量达到最高,是对照的 5.07 倍。在 10 °C 低温处理下,*CjI2'H* 基因的相对表达量在处理 8 h 前没有明显增加,甚至低于对照;处理 12 h、24 h 时基因表达量显著高于对照;处理 0.5 h 与处理 2.0 h 以及处理 1.0 h 与 4.0 h 时的表达量相近,均无显著差异;处理 8 h 的相对表达量最低,仅为对照的 0.56 倍;处理 12.0 h 的表达量达到峰值,为对照的 2.4 倍。同时,鸭儿芹 *CjI2'H* 基因在低温处理下的相对表达量明显低于高温处理下的相对表达量。

3 讨论

细胞色素 P450 家族是高等植物中广泛分布的酶蛋白家族之一。本研究中的 *CjI2'H* 基因编码的酶是 CYP81E,为 CYP450 家族中的第 IV 类家族成员,它在植物苯丙烷类代谢途径中发挥着重要作用^[13-14]。多种内外因素(如寒冷、干旱、细胞缺水和 UV-B 胁迫等)均可以诱导植物体内 CYP81 家族成员基因的表达,使其在不同植物中表现出多种生物功能。异黄酮类化合物与次生代谢产物的羟化和抵抗逆境胁迫相关,还参与对有毒物质的降解^[15]。*I2'H* 基因在高温和低温处理下均可诱导植物细胞产生异黄酮 2'-羟化酶,通过一系列还原反应后产生 2-



不同小写字母表示差异达到 0.05 显著水平。

图 7 不同温度处理下鸭儿芹叶柄中 *CjI2'H* 基因的相对表达水平

Fig.7 Relative expression levels of *CjI2'H* gene in response to temperature treatments of *C. japonica* Hassk in petioles

羟基异黄酮,最终产生紫檀素、染料木素等植物抗毒素,以抵御环境胁迫对自身的伤害^[16-18]。

鸭儿芹生长的适宜温度为 15~22 °C。人工栽培下的野生鸭儿芹,其品质和生长速度都会受到温度的影响,研究不同温度下鸭儿芹叶柄组织中 *CjI2'H* 基因的表达情况有利于明确鸭儿芹对高低温胁迫的抵抗机制,为人工栽培野生鸭儿芹提供借鉴。本试验从贵州野生鸭儿芹叶组织中克隆得到 *CjI2'H* 基因,并检测其在叶柄组织中不同温度下的基因表达情况。结果表明,30 °C 高温处理下的鸭儿芹 *CjI2'H* 基因表达量要明显高于低温处理下该基因的

表达量。表明鸭儿芹在遭受高温胁迫时, *CjI2'H* 基因会有更多的表达, 产生 I2'H 催化异黄酮羟化物的形成来抵御高温, 故在高温持续处理下 *CjI2'H* 基因的表达量上升。 *CjI2'H* 基因表达量上升有利于促进植株细胞诱导产生更多抵抗外界不良环境的物质, 提高植株对高温的抗性^[13,18-20]。上述结果与鸭儿芹属于冷凉性蔬菜, 具有较耐冷的特点相吻合^[21]。

关于温度对植物生长发育过程中的调节机制研究较多, 本试验结果表明 *CjI2'H* 基因参与了鸭儿芹对温度胁迫调控过程, 且对高温胁迫表现更为敏感。鸭儿芹遭受温度胁迫时黄酮类物质合成的具体机制, 以及在鸭儿芹植株中可大量表达的异黄酮种类, 还需进一步进行相关探索与研究。

参考文献:

- [1] 喻梅, 周守标, 吴晓艳, 等. 野生鸭儿芹种子休眠特性及破除方法 [J]. 生态学报, 2012, 32(4): 1347-1354.
- [2] 吴宝成, 刘启新. 鸭儿芹及其近缘植物地被特性的栽培观察 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 125-128.
- [3] 吴宝成, 刘启新. 新型蔬菜资源鸭儿芹属植物的栽培技术研究 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(12): 2812-2816.
- [4] 孙兵, 娄玉霞, 郭水良. 野生蔬菜鸭儿芹在中国栽培的气候适应性研究 [J]. 上海农业学报, 2014, 30(1): 85-89.
- [5] 杨致荣, 毛雪, 杨致芬, 等. 细胞色素 P450 基因及其在植物改良中的应用 [J]. 遗传, 2003, 25(2): 237-240.
- [6] 赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 细胞色素与植物的次生代谢 [J]. 生命科学, 1999, 11(3): 127-131.
- [7] AKASHI T, AOKI T, AYABE S. CYP81E1, a cytochrome P450 cDNA of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.), encodes isoflavone 2'-hydroxylase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 251(1): 67-70.
- [8] WINKEL-SHIRLEY B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(3): 218-223.
- [8] 陈鸿翰, 袁梦求, 李双江, 等. 苦荞肉桂酸羟化酶基因 (*FlC4H*) 的克隆及其 UV-B 胁迫下的组织表达 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(2): 137-147.
- [10] 渠萌, 梁晓薇, 张春荣, 等. 甘草异黄酮 2'-羟化酶 cDNA 的生物信息学分析 [J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 243-246.
- [11] TAN G F, WANG F, LI M Y, et al. *De novo* assembly and transcriptome characterization: novel insights into the temperature stress in *Cryptotaenia japonica* Hassk [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(1): 1739.
- [12] 谭国飞, 王枫, 王广龙, 等. 鸭儿芹肉桂酸 4-羟化酶基因的克隆与不同温度下的表达分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1298-1304.
- [13] AYABE S I, AKASHI T. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism [J]. Phytochemistry Reviews, 2006, 5(2): 271-282.
- [14] CHEN J, YUAN H, ZHANG L, et al. Cloning, expression and purification of isoflavone-2'-hydroxylase from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao [J]. Protein Expression and Purification, 2015, 107: 83-89.
- [15] 李成磊, 赵海霞, 温国琴, 等. 苦荞细胞色素 CYP81 家族同源基因 *FlP450-R4* 的克隆、分子鉴定及其功能分析 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 181-192.
- [16] 姜晓华, 丁宇, 杨光富. 黄烷酮类植物抗毒素的研究简介 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2000, 34(4): 427-432.
- [17] 钟巍然, 柴友荣, 张凯, 等. 苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008(13): 5285-5289.
- [18] LIU C J, HUHMANN D, SUMNER L W, et al. Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome P450 81E enzymes from *Medicago truncatula* [J]. Plant Journal, 2003, 36(4): 471-484.
- [19] 龚凌霄, 倪勤学, 张英. 植物抗毒素研究进展及其作为食品功能性成分的应用前景 [J]. 天然产物研究与开发, 2012(24): 421-425.
- [20] HINDERER W, FLENTJE U, BARZ W. Microsomal isoflavone 2'-and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation [J]. FEBS Letters, 1987, 214(1): 101-106.
- [21] 方智远, 张武男. 中国蔬菜作物图鉴 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2011: 468-469.

(责任编辑: 张震林)