

曹芳芳,李 娟,刘海峰. 山葡萄 *DFR* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):34-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.009

山葡萄 *DFR* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

曹芳芳,李 娟,刘海峰
(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

摘要:应用 RT-PCR 和 SMART RACE 等技术克隆山葡萄二氢黄酮醇 4-还原酶基因的全长 cDNA 序列,结果表明,该基因全长 1 362 bp,包括 1 014 bp 的完整开放阅读框,推测其编码 337 个氨基酸。该基因表达产物相对分子质量为 37.50 ku,等电点为 5.95,是稳定蛋白,不包含信号肽。蛋白质疏水性分析结果表明,DFR 疏水性最大值为 2.511,最小值为 -2.267,平均值为 -0.146,整体表现为亲水性。二级结构分析结果表明,DFR 的二级结构主要以 α -螺旋 (35.31%) 和不规则卷曲 (46.29%) 为蛋白最大量的结构元件。对不同植物 DFR 氨基酸序列进行多重比对发现,同源性较高,DFR 与 NADPH 结合区域和底物结合区域都表现出高度保守。用推导的氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源性比较,其氨基酸序列与欧亚种葡萄、大豆、矮牵牛等植物的 DFR 氨基酸序列两两比对的相似性系数分别为 98%、76%、74%。

关键词:山葡萄;二氢黄酮醇 4-还原酶;克隆;序列分析

中图分类号: S663.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0034-05

山葡萄 (*Vitis amurensis*) 为葡萄科葡萄属多年生藤本植物,植株似葡萄而细小。山葡萄是葡萄属中最抗寒的一个种,是葡萄属植物抗性育种的珍贵资源,已被多个国家和地区所重视。山葡萄是一种经济价值很高的野生经济植物,成熟后的果实味甜酸,富含果汁,可生食,用山葡萄浆果酿造的葡萄

酒品质优良,是我国东北地区葡萄酒工业的主要原料。葡萄酒具有预防心脑血管疾病的作用,原花青素^[1]是其中最主要的作用成分。研究表明,原花青素存在较强的抗氧化活性和抗癌活性,对降低毛细血管的渗透性有重要的药理作用。葡萄酒的品质与葡萄中原花青素的含量有直接关系^[2]。花青素类化合物也是植物中可溶性天然色素的主要来源,因此研究花色苷植物资源有重要意义。花青素直接或间接影响果实的外观颜色形成,在合成花青素过程中^[3],DFR (dihydroflavonol 4-reductase,二氢黄酮醇-4-还原酶)起决定性作用。DFR 反应需要 NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)的参与。DFR 依赖 DHM(dihydromyricetin,二氢杨梅黄酮)、DHK(dihydrokaempferol,二氢槲非醇)、DHQ(dihydroquercetin,二氢槲皮素)

收稿日期:2015-06-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260067)。

作者简介:曹芳芳(1989—),女,吉林松原人,硕士研究生,主要从事山葡萄基因克隆研究。E-mail:caofangfang1207@163.com。

通信作者:刘海峰,博士,副教授,从事山葡萄分子生物学研究。E-mail:shiyanshiqixiang@163.com。

为 11.2、15.4、4.8 ku。Western blotting 结果显示,目的蛋白能被特异性抗体识别,本研究结果为进一步研究 Erp 的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rodwell T C, Moore M, Moser K S, et al. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(6): 909-916.
- [2] Camacho L R, Ensergueix D, Perez E, et al. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis[J]. Molecular Microbiology, 1999, 34(2): 257-267.
- [3] Berthet F X, Raugier J, Lim E M, et al. Characterization of the mycobacterium tuberculosis erp gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures[J]. Microbiology, 1995, 141(9): 2123-2130.
- [4] Bigi F, Alito A, Fisanotti J C, et al. Characterization of a novel *Mycobacterium bovis* secreted antigen containing PGLTS repeats[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(7): 2581-2586.

- [5] de Mendonca - Lima L, Picardeau M, Raynaud C, et al. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria[J]. Microbiology, 2001, 147(8): 2315-2320.
- [6] 马佳丽,郝秀静,赵 东,等. 结核分枝杆菌输出重复蛋白 8 基序突变体的构建及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(9): 1072-1079.
- [7] Kocincová D, Soudén B, de Mendonça - Lima L, et al. The Erp protein is anchored at the surface by a carboxy-terminal hydrophobic domain and is important for cell-wall structure in *Mycobacterium smegmatis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 191-196.
- [8] WHO Global tuberculosis control surveillance, planning, financing[R]. World Health Organization, 2013.
- [9] Cosma C L, Klein K, Kim R, et al. *Mycobacterium marinum* Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(6): 3125-3133.
- [10] Martinez V, Carcelain G, Badell E, et al. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein, in tuberculosis patients and healthy individuals[J]. BMC Infectious Diseases, 2007, 7(1): 1471-1482.

tin,二氢栎皮黄酮)3 种底物,它们结构相似,只在 B 苯环上的羟基数目上不同,DFR 将 DHM、DHK、DHQ 底物还原,分别生成相应的无色花翠素、无色花葵素、无色花青素^[4],通过后续途径最终将无色的二氢黄酮醇转化合成有色花色素^[5]。不同物种 DFR 对 3 种底物具有选择特异性^[6],所以能合成不同的花色素^[7],导致植物呈现出不同的花色、果色。*DFR* 基因最早由 O'Reilly 等于 1985 年从金鱼草(*Antirrhinum majus*)和玉米(*Zea mays*)中分离得到^[8]。目前,研究人员已经从许多不同的植物中成功分离出 *DFR* 及其他基因^[9],但对山葡萄中的 *DFR* 研究尚未见报道。本研究以山葡萄为试验材料,利用 RACE(rapid – amplification of cDNA ends)等方法^[10]克隆 *DFR* 全长基因,成功得到山葡萄 *DFR* 基因的 cDNA 全长序列,并进行生物信息学分析以及序列比对,旨在为分析及调控山葡萄中花色苷的合成提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试材山葡萄双丰(*V. amurensis* ‘Shuang Feng’)采自国家山葡萄种质资源圃,采摘无病虫害、饱满的成熟期果粒,立即置于液氮中冷冻,–80 ℃冰箱中保存,取其果皮作为供试材料。

1.1.2 试剂材料 Tris – HCl、CTAB、EDTA、LiCl、β – 巯基乙醇、DEPC 水、AMP、IPTG、*X – gal* 为 AITiresco 分装试剂;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 – α、pMD19 – T 载体、*Taq* 酶、Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购于 Omega 公司;反转录酶 SuperScript II 购自 Invitrogen 公司;SMARTTM RACE 试剂盒购于 Clonteeh 公司;其他试剂为国产分析纯。引物由英俊生物技术有限公司合成,DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 登录 NCBI 网站,根据 GenBank 中已登陆的 *DFR* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列,通过多序列比对确定其共有的保守区,利用 Primer 6.0 设计 1 对特异引物(用来扩增目的片段):VAmDFRs,5′ – TCATCGGTTCATGGCTGGT C – 3′;VAmDFRa,5′ – CAGTTATGAGGCTTGGAGGC – 3′。

1.2.2 山葡萄果皮总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 采用改良的 CTAB 法^[11]提取山葡萄果皮中的总 RNA。用紫外分光光度计测定其 *D*_{230 nm}、*D*_{260 nm}、*D*_{280 nm} 及总 RNA 浓度,用 1% TAE 检测 RNA 的完整性。按照 Invitrogen 公司的 SuperScript II 反转录酶试剂盒说明书,以 Oligo(dT)20 为引物,总 RNA

为模版,进行逆转录反应合成 cDNA 第 1 条链。

1.2.3 PCR 扩增目的基因片段 PCR 扩增反应体系如表 1 所示。

表 1 PCR 扩增反应体系

成分	加样量(μL)
cDNA	2.0
ExTaq Buffer(10 ×)	5.0
dNTP Mixture(2.5 mol/L)	4.0
<i>Taq</i>	0.4
VAmDFRs(10 μmol/L)	1.0
VAmDFRa(10 μmol/L)	1.0
ddH ₂ O	36.6
总计	50.0

扩增反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 退火 2 min,72 ℃ 延伸 7 min,35 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收纯化目的片段。

1.2.4 5′ – RACE 和 3′ – RACE 片段的获得 用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 方法进行 RACE cDNA 扩增。根据保守区测序结果,克隆中间片段的引物可以继续用于 RACE,其中 VAmDFRs 用作 3′ – RACE 引物,VAmDFRa 用作 5′ – RACE 引物。继续扩增所得到的程序,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物确定条带。

1.2.5 目的片段的回收和连接 按照胶回收试剂盒说明书对 PCR 产物的 DNA 片段进行回收、连接与转化。将回收的 DNA 片段与 pMD – 19 载体连接,16 ℃ 连接 3 h。反应体系为 pMD – 19 载体 0.5 μL DNA 片段 4.5 μL,Solution I 5 μL。

1.2.6 转化 将 DH5 – α 感受态细胞解冻后,取 50 μL 加入 10 μL 连接产物,冰浴 30 min;取出后热激 90 s,置于冰上 2 ~ 3 min;加入预热的 LB 液体培养基 300 μL,37 ℃ 190 r/min 培养 1 h;取适量菌液,涂布于含有 AMP、*X – Gal*、IPTG 的 LB 固体培养基平板上,37 ℃ 培养箱中倒置培养过夜。次日,挑白色单克隆置于 37 ℃ 培养箱中,200 r/min 培养 12 h。随后进行菌液 PCR 检测,将成功克隆的菌样测序。

1.3 *VamDFR* 基因序列及推测蛋白质的生物信息学分析 用 DNASTAR 软件查找 *VamDFR* 基因的开放阅读框(ORF)并推导其氨基酸序列;利用 NCBI 的 BLAST 程序检索数据库,对 *VamDFR* 基因全长 cDNA 序列及其氨基酸序列进行比对分析。利用在线软件(表 2)进行生物信息学分析,采用 GeneDoc 软件进行多序列比对,并用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

表 2 生物信息学分析数据库网址

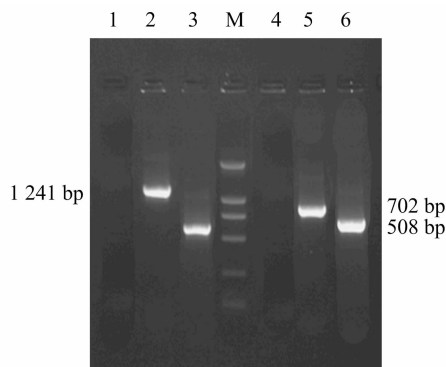
软件	功能	网址
ProtParam	蛋白质理化性质	http://web.expasy.org/protparam/
NCBI Blast	蛋白保守区预测	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast .
ProtScale	蛋白亲/疏水性分析	http://web.expasy.org/cgi – bin/protscale/protscac .
TMHMM	跨膜结构域分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
SignalP	蛋白信号肽预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
HNN	蛋白二级结构预测	https://npsa – prabi.ibcp.fr/cgi – bin/

2 结果与分析

2.1 山葡萄 *VamDFR* 基因 cDNA 全长的克隆及序列分析

采用改良的 CTAB 法提取成熟期葡萄果皮中的总 RNA,总 RNA 质量合格,无降解。将其反转录合成 cDNA 模板,用 *DFR* 基因引物 VAmDFRs、VAmDFRa 进行 PCR 扩增,获得目

的特异条带,约 580 bp,与预期片段大小相近。产物经连接转化,筛选测序后获得保守序列片段,用 NCBI/BLAST 程序进行同源搜索,结果与 *Vitis vinifera* 基因的相似性为 98%。参照 RACE 试剂盒说明,以逆转录分别合成的 5'-RACE-Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板,GSP 与 UPM 为引物,分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增,结果如图 1 所示。以 3'-RACE-Ready-cDNA 为模板,DFRs 与 UPM 为引物扩增得到 1 241 bp 条带。以 5'-RACE-Ready-cDNA 为模板,DFRa 与 UPM 为引物扩增得到约 702 bp 条带。阳性对照反应应用 GSP1、GSP2 为引物进行扩增,得到与预期大小相同(约 580 bp)的条带。阴性对照单引物扩增,没有条带产生。



M—DL2000; 1—5'-RACE 阴性对照; 2—5'-RACE 产物;
3—5'-RACE 阳性对照; 4—3'-RACE 阴性对照;
5—3'-RACE 产物; 6—3'-RACE 阳性对照

图1 5'-RACE和3'-RACE反应结果

将 5'-RACE 和 3'-RACE 测序结果应用 Vector NTI Ssuire 9.0 软件去除载体序列后拼接获得 cDNA 全长。应用 DNASTar 软件对获得的山葡萄 *DFR* 进行开放阅读框分析,并将其推导为相应的氨基酸序列,结果显示,该基因全长 1 362 bp,包括 1 014 bp 完整开放阅读框、76 bp 5'-非翻译区、272 bp 3'-非翻译区,推测其编码 337 个氨基酸,GenBank 登录号为 FJ645768,将其命名为 *VamDFR*。

2.2 *VamDFR* 基因编码蛋白质理化性状分析

利用 ProParam 工具在线预测分析 *VamDFR* 基因编码蛋白的理化性质,发现该蛋白由 337 个氨基酸组成,分子量(MV)为 37.50 ku,等电点值为 5.95。正电荷残基(精氨酸+赖氨酸)37 个,负电荷残基(天冬氨酸+谷氨酸)42 个,不稳定指数 34.68,脂肪指数 81.31,表明 *VamDFR* 基因蛋白属于稳定蛋白质。

2.3 *VamDFR* 蛋白保守区预测

利用 NCBI 的 BlastP,在蛋白保守区数据库对山葡萄 *VamDFR* 基因进行蛋白保守区预测,*VamDFR* 有多个保守域,如 cd05193 (AR_like_SDR_e)、PLN02583 (PLN02583)、pfam01073 (3Beta_HSD) 等,该基因应属于 *DFR* 超基因家族^[12](图 2)。

2.4 *VamDFR* 蛋白的亲水性分析

利用 ProtScale 程序分析了山葡萄 *VamDFR* 蛋白氨基酸序列的亲水性/疏水性(图 3)。图中纵坐标为氨基酸标度值,横坐标为氨基酸序列位置。依据氨基酸分值越低亲水性越强,分值越高疏水性越强的规律,结果显示,*VamDFR* 疏水性最大值为 2.511,最小值为 -2.267,疏水性平均值为

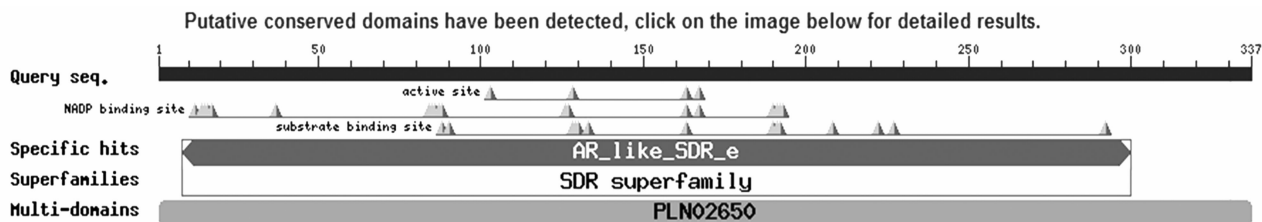


图2 *VamDFR* 基因编码蛋白的功能域分析

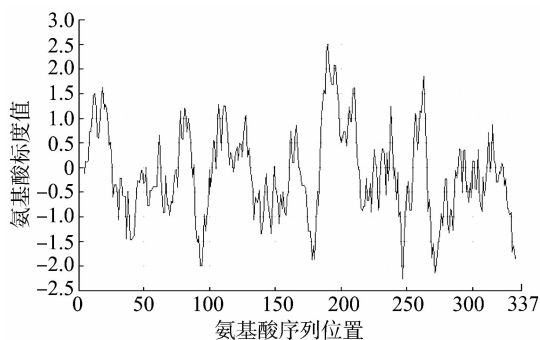


图3 *VamDFR* 蛋白序列的亲水性分析图

-0.146;可明显看出疏水性最大值在第 168 位点,值为 1.900;最小值在第 145 位点,值为 -2.722;总平均亲水性指数为 -0.146,整体表现为亲水性。

2.5 *VamDFR* 蛋白的跨膜结构域分析

根据 TMHMM 和 Tmpred Server 网站分析,超过 500 分的

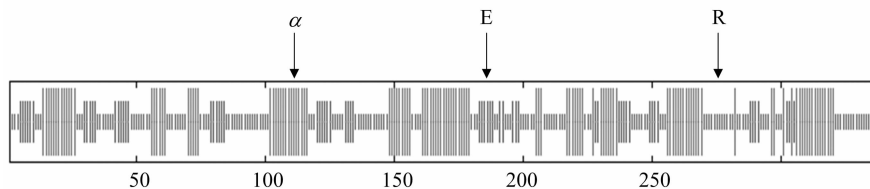
才被认为显著。从分析结果中可以得出,*VamDFR* 蛋白无跨膜螺旋,所以可推测 *VamDFR* 不含有跨膜结构域。

2.6 *VamDFR* 蛋白的信号肽预测及二级结构分析

利用 SignalP4.1 Server 对山葡萄 *VamDFR* 基因蛋白进行信号肽预测,结果表明,*VamDFR* 基因编码的蛋白不具有信号肽。利用网上资源 HNN 在线预测 *VamDFR* 二级结构(图 4),结果显示,该蛋白的二级结构由 35.31%的 α -螺旋、46.29%的不规则卷曲和 18.40%的延伸链组成。

2.7 山葡萄 *VamDFR* 编码蛋白质的同源性及进化分析

用推导的氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源性比较,其氨基酸序列与欧亚种葡萄(*V. vinifera*, X75964)、圆叶葡萄(*V. rotundifolia*, KC460268)、苹果(*Malus domestica*, XM_008379159)、大豆(*Glycine max*, NM_001251683)、飞燕草(*Delphinium grandiflorum*, LC029441)和矮牵牛(*Petunia hybrida*, X15537)等植物的 *DFR* 氨基酸序列两两比对的相似性系数分别为 98%、98%、81%、76%、77%、74%,多序列比对结

图4 *VamDFR* 基因编码蛋白的二级结构预测

果见图 5。

山葡萄 (*V. amurensis*, FJ645768)、欧亚种葡萄 (*V. vinifera*, X75964)、圆叶葡萄 (*V. rotundifolia*, KC460268)、苹果 (*M. domestica*, XM_008379159)、大豆 (*G. max*, NM_001251683)、飞燕草 (*D. grandiflorum*, LC029441) 和矮牵牛 (*P. hybrida*, X15537) *VAmDFR* 中含有与 NADPH 结合的保守基序 (V8 - Y30)^[13] 和 26 个氨基酸组成的底物特异结合的保守基序 (T131 - K156), 其中 N132 和 E144 直接影响 DFR 的底物特异性, 不同物种存在一定差异, Q138、Y142、D149、F152 非常保守^[7]。这些位点在结构和功能上均与已知的葡萄 *VvDFR* (CAA72420) 及其他 DFR 蛋白相似, 而且都在相同或相近的位置, 从而可推断 *VAmDFR* 属于 NADPH 依赖的还原酶家族

中的二氢黄酮醇 4 - 还原酶。

用 MEGA 4 软件对该基因及其他植物的 DFR 氨基酸序列进行多序列比对, 绘制分子进化树, 结果 (图 6) 表明, 山葡萄 *VAmDFR* 氨基酸序列与欧亚种葡萄 (*V. vinifera*, X75964)、圆叶葡萄 (*V. rotundifolia*, KC460268)、美国蔓藤 (*A. grossedentata*, KC753780)、棉花 (*G. hirsutum*, EF187441)、脐橙 (*C. sinensis*, NM_001288931) 可归为一类, 亲缘关系较近; 与水稻 (*O. sativa*, AF134807)、玉米 (*Z. mays*, NM_001158995)、小麦 (*T. aestivum*, AY209183)、荠菜 (*B. juncea*, GU230159)、拟南芥 (*A. thaliana*, M86359)、飞燕草 (*D. grandiflorum*, LC029441) 等亲缘关系较远。

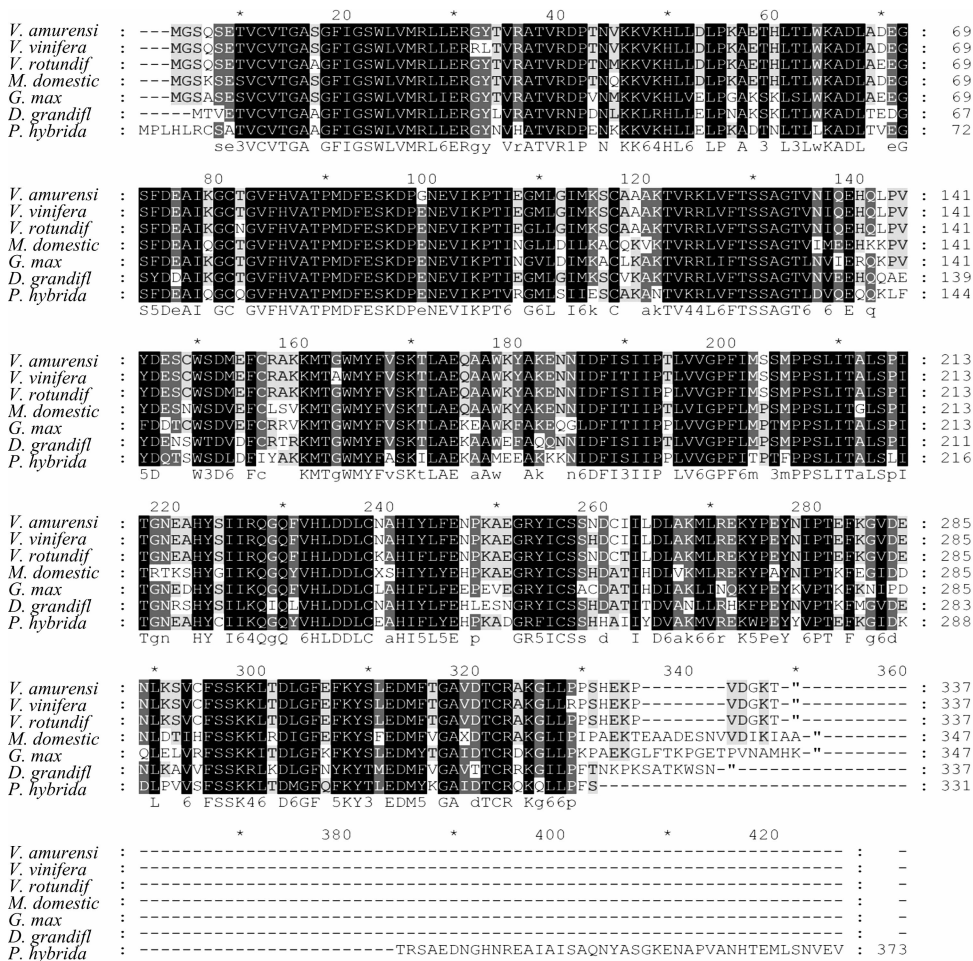


图5 DFR 氨基酸序列的多序列比对

3 结论与讨论

植物的花色和果色主要受花色素直接或间接控制, DFR 是合成花色素的关键酶, 因此研究 DFR 意义重大, DFR 是

单基因编码的 NADPH 依赖性短链还原酶家族^[14]。对不同物种的 *DFR* 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较, 发现有 2 个保守区域, 其中底物特异性选择结构域是由 26 个氨基酸组成^[15]。DFR 分子中底物结合区的氨基酸序列决定它对不同

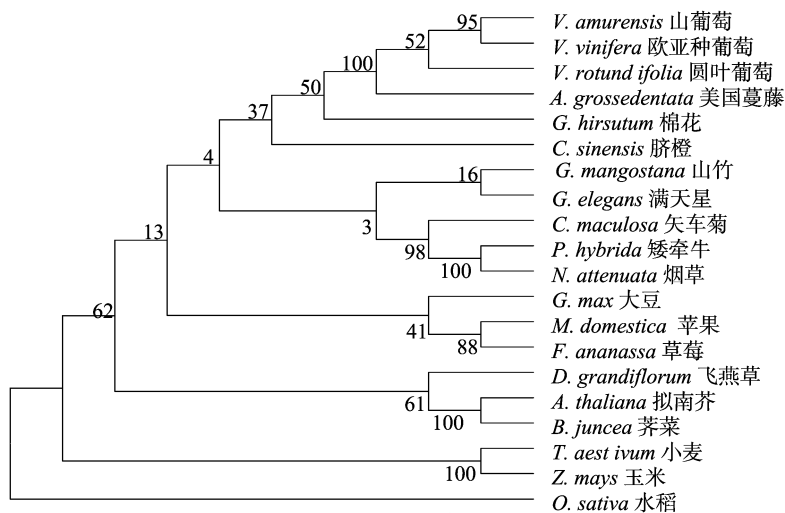


图6 DFR 构建的分子进化树

底物的结合,此序列在不同物种中也是高度保守的^[16]。研究表明,保守区域中存在的 132、141 位氨基酸对酶的底物特异性有很大影响,大部分的物种在 132 位是 D(天冬氨酸)或 N(天冬酰胺)。当 132 位氨基酸为 D 时是 ASP 型 DFR,为 N 时是 ASN 型 DFR,也存在少数既不是 D 也不是 N 的,被称作非 ASP/ASN 型 DFR^[7]。Johnson 等在矮牵牛中发现,它的 132 位氨基酸为天冬氨酸,它的 DFR 主要催化 DHM,其次是 DHQ,而对 DHK 则无作用^[7],不能利用 DHK 为底物生成天竺葵素,但许多 132 位是天冬酰胺的植物能利用 DHK 作为底物^[17]。本试验克隆得到的山葡萄 DFR 基因编码的氨基酸在 132 位是 N,为 ASN 型,推测它能够催化 DHK 生成无色花葵素,也有报道在山葡萄果皮中检测到花葵素^[18],更加确定了笔者这一观点。有关山葡萄花色素组成成分的报道中也有花青素、花翠素的存在,由此推测 DFR 基因可能不是单拷贝,而是多基因拷贝。

参考文献:

- [1] 盛慧,彭军,李运. 葡萄和葡萄酒中聚合色素的测定[J]. 酿酒科技,2005,3(3):83-86.
- [2] 吴巍,程秀凤. 葡萄酒中原花青素的测定[J]. 食品研究与开发,2011,32(11):102-103.
- [3] 刘闯萍,王军. 葡萄花色苷的生物合成[J]. 植物生理学通讯,2008,44(2):363-377.
- [4] Holton T A, Comish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. The Plant Cell,1995,7(7):1071-1083.
- [5] 刘娟,冯群芳,张杰. 二氢黄酮醇 4-还原酶基因(DFR)与花色的修饰[J]. 植物生理学通讯,2005,41(6):715-719.
- [6] Seo J, Kim S W, Kim J, et al. Co-expression of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase accelerates decolorization in transgenic Chrysanthemum Petals[J]. Journal of Plant Biology, 2007,50(6):626-631.
- [7] Johnson E T, Ryu S, Yi H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase[J].

The Plant Journal,2001,25(3):325-333.

- [8] O'reilly C, Shepherd N S, Pereira A, et al. Molecular cloning of the al locus of Zea mays using the transposable elements En and Mu1[J]. The EMBO Journal,1985,4(4):877-882.
- [9] 刘海峰,杨成君,于森,等. 山葡萄 UDP-葡萄糖:类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因(3GT) cDNA 的克隆和分析[J]. 植物生理学通讯,2009,45(8):748-752.
- [10] 唐克轩,开国银,张磊,等. RACE 的研究及其在植物基因克隆上的应用[J]. 复旦学报:自然科学版,2002,41(6):704-709.
- [11] Li B, Wang B, Tang K, et al. A simple and convenient approach for isolating RNA from highly viscous plant tissue rich in polysaccharides[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 49(2): 101-105.
- [12] Wrolstad R E. Anthocyanin pigments: bioactivity and coloring properties[J]. Food Science,2004,69(5):419-425.
- [13] Johnson E T, Yi H, Shin B, et al. Cymbidium hybrida dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins[J]. The Plant Journal,1999,19(1):81-85.
- [14] 李春雷,崔国新,许志茹,等. 植物二氢黄酮醇 4-还原酶基因的研究进展[J]. 生物技术通讯,2009,20(3):442-445.
- [15] Beld M, Martin C, Huits H, et al. Flavonoid synthesis in Petunia hybrida: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes[J]. Plant Molecular Biology,1989,13(5):491-502.
- [16] Polashock J, Griesbach R J, Sullivan R F, et al. Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco[J]. Plant Science,2002,163(2):241-251.
- [17] 吴少华,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.
- [18] 赵权. 葡萄酚类物质及其物合成相关结构基因表达[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.