

植物花青素合成代谢途径及其分子调控

贾赵东^{1,2}, 马佩勇¹, 边小峰¹, 杨清², 郭小丁¹, 谢一芝^{1*}

(1 江苏省农业科学院粮食作物研究所, 南京 210014; 2 南京农业大学 生命科学院, 南京 210095)

摘要: 植物花青素是一种天然食用色素, 具有安全、无毒的特点, 具有预防心脑血管疾病、保护肝脏与抗癌等多种重要的营养和药理功能。因此, 花青素在食品、医药保健、园艺和作物改良等方面均具有重要研究价值和应用潜力。该文综述了植物花青素合成代谢途径及其分子调控研究进展, 概述了植物花青素的生物合成、代谢以及积累过程, 重点介绍了影响植物花青素代谢的结构基因和调控基因及其作用机制, 同时展望了花青素合成代谢相关基因的研究应用前景和发展趋势。

关键词: 植物; 花青素; 合成代谢途径; 分子调控

中图分类号: Q946.83⁺6 **文献标志码:** A

Biosynthesis Metabolic Pathway and Molecular Regulation of Plants Anthocyanin

JIA Zhaodong^{1,2}, MA Peiyong¹, BIAN Xiaofeng¹, YANG Qing², GUO Xiaoding¹, XIE Yizhi^{1*}

(1 Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Plant anthocyanin is a kind of natural edible pigment, has many advantages: safety, no pollution, outstanding stability; it showed noticeable antioxidant ability, which can prevent cancer and protect the function of the liver, prevention and protection of cardiovascular and cerebrovascular diseases, and other important nutritional and pharmacological function. Therefore, anthocyanin has important research value and potential applications in food, medicine and health care, horticulture and crop improvement. Here we review recent progresses in biological functions and mechanisms of structural genes and regulator genes in anthocyanin biosynthesis and metabolic pathway, including the anthocyanin biosynthetic, metabolic and accumulative process in plant. Prospective of application prospect and development tendency accumulative process the anthocyanins genes are elucidated in the end.

Key words: plant; anthocyanin; biosynthesis metabolic pathway; molecular regulation

花青素 (anthocyanin) 是一类广泛存在于植物中的水溶性色素, 属于植物次生代谢产生的类黄酮化合物。花青素广泛存在于 27 个科 72 个属的开花植物 (被子植物) 中^[1], 其中花青素含量较高的有葡萄、山楂、松针、紫甘薯等, 目前研究最多的是葡萄和紫甘薯。花青素的基本结构为 3, 5, 7-羟基-2-苯基

苯并吡喃 (图 1), 大多数花青素在花色基元的 3-, 5-, 7-碳位上有取代羟基。由于其结构中 R1 和 R2 碳位上的取代基不同, 形成了各种各样的花青素, 目前已知有 20 种花青素, 在植物中常见的有 6 种 (表 1), 即天竺葵色素 (Pg)、矢车菊色素 (Cy)、飞燕草色素 (Dp)、芍药花色素 (Pn)、牵牛花色素 (Pt) 和锦葵

收稿日期: 2014-02-22; 修改稿收到日期: 2014-06-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划, 2012AA101204); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-11-C-03); 国家自然科学基金 (31301379); 江苏省农业科技自主创新基金 [CX(14)2005]; 江苏省科技支撑计划 (BE2013437)

作者简介: 贾赵东 (1977-), 男, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事作物分子遗传与育种研究。E-mail: jzdgood162@126.com

* 通信作者: 谢一芝, 研究员, 主要从事作物育种与良种繁育研究。E-mail: xyz@jaas.ac.cn

色素(Mv)^[1-2]。

由于含有多个酚羟基,自然条件下游离状态的花青素非常少见,而是通常与一个或多个葡萄糖、半乳糖、木糖等通过糖苷键形成花色苷。花青素主要在植物液泡中积累,是构成植物花和果实颜色的主要色素之一。大量研究表明,天然花青素对提高植物的耐逆境胁迫能力有重要作用^[3-4],同时天然花青素无毒,无诱变作用,具有预防心脑血管疾病、护肝与抗癌等多种重要的营养和药理功能^[5-6]。因此,花青素在食品、医药保健、园艺和作物改良等方面均具有重要研究价值和应用潜力。近年来由于花青素的营养保健和药理功效愈来愈受到关注,利用花青素开展天然植物色素生产以及作物品种改良意义突出,本文介绍了植物花青素合成代谢途径及其分子调控研究进展,为进一步研究花青素的生物合成、代谢调控以及植物遗传改良提供理论参考。

1 花青素生物合成代谢途径

花青素生物合成途径是植物类黄酮途径的一个分支途径,其生物合成途径在模式植物拟南芥、玉米、矮牵牛等研究中已较为清楚。一般花青素的生物合成途径见图2。苯丙氨酸是花青素和其它类黄酮物质生物合成的直接前体,花青素是在细胞质中从苯丙氨酸经一系列的酶促反应合成,由苯丙氨酸

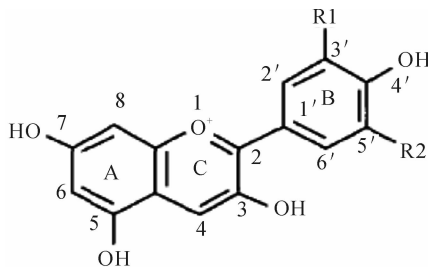


图1 花青素的结构

Fig. 1 The structure of anthocyanins

表1 6种常见的花青素及各自的取代基团

Table 1 6 kinds of anthocyanins and their substituents chemical group

花青素种类 Anthocyanin species	R1 碳位基团 R1 chemical group	R2 碳位基团 R2 chemical group
天竺葵色素(Pg) Pelargonidin	H	H
矢车菊色素(Cy) Cyanidin	OH	H
飞燕草色素(Dp) Delphinidin	OH	OH
芍药花色素(Pn) Peonidin	OMe	H
牵牛花色素(Pt) Petunidin	OMe	OH
锦葵色素(Mv) Malvidin	OMe	OMe

到花青素的合成路径被划分为三个阶段。

第一个阶段由苯丙氨酸到4-香豆酰 CoA,是苯丙氨酸在苯丙氨酸裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和4-香豆酰 CoA 连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)基因活性的调控下,经过3步酶促反应合成4-香豆酰 CoA,这是许多植物次生代谢共有的路径。PAL 催化苯丙氨酸脱氨,生成肉桂酸。PAL 是多酚类物质代谢途径中的一个限速酶,几乎存在于所有植物细胞中,被认为是植物生命代谢途径中的一个重要调控位点。植物组织和部位不同, PAL 活性也不同,通常植物中的 PAL 基因以小的基因家族形式存在。C4H 催化肉桂酸生成4-香豆酰 CoA,是第一个被克隆并验证功能的植物 P450 酶。同 PAL 基因一样, C4H 基因拷贝数在不同植物中也是不同的,它在苯基丙氨酸类代谢中起着非常重要的作用。4CL 作用于苯丙氨酸途径中最后一步反应,催化各种羟基肉桂酸生成相应的硫酯^[7]。

第二个阶段是类黄酮代谢的关键反应,由4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 到二羟黄酮醇,4-香豆酰 CoA 在查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄烷酮-3-羟化酶(flavanone-3- hydroxylase, F3H)基因活性的调控下,合成产生黄烷酮和二氢黄酮醇。CHS 催化4-香豆酸 CoA 与丙二酰 CoA 合成查尔酮,形成的查尔酮提供了合成类黄酮的基本碳骨架,故 CHS 为类黄酮和花色素合成的关键酶。CHS 基因最先从欧芹中克隆得到^[8]。植物中的查尔酮很少积累,很快被 CHI 催化转变为4',5',7'-三羟基黄烷酮。CHI 是首先被认识的黄酮类物质合成相关酶,最早是从大豆、菜豆中分离得到 CHI 基因。F3H 催化4',5',7'-三羟基黄烷酮 C3 位加上一个羟基,生成二氢黄酮醇。部分二氢黄酮醇在 F3'H、F3'5'H 的作用下 B 环 3'或3',5'位置羟基化,分别生成红色的矢车菊素和蓝紫色的翠雀素的前体物质。F3'H 和 F3'5'H 都是属于细胞色素 P450 超级家族^[9], F3'H 突变使花中积累花葵素而非花翠素,更多地呈现橙色和红色, F3'5'H 的克隆为创造植物蓝色品种提供了可能。

第三阶段是指各种花青素的合成阶段,至少有3个酶参与调控。先是二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)催化作用下生成各种无色的花色素,经花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)和类黄酮3-葡萄糖基转移酶(fla-

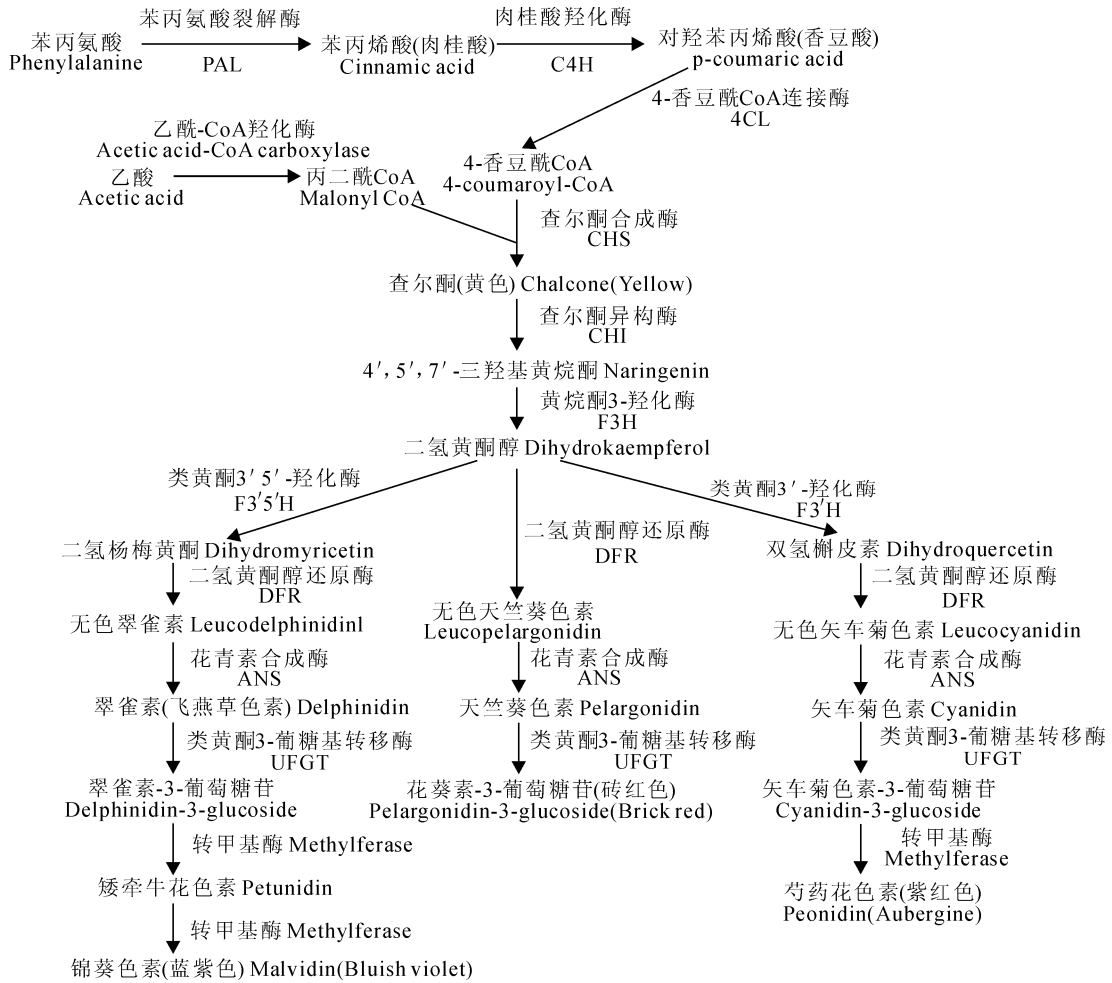


图 2 花青素生物合成途径^[2]

Fig. 2 Biosynthesis pathway of Anthocyanin^[2]

vonoid 3-O-glucosyltransferase, 3GT) 作用将无色的二氢黄酮醇转化成有色的花色素。其中 DFR 是花青素合成过程中的关键酶, ANS 负责催化无色花青素经氧化脱水形成有颜色的花青素^[10], 3GT 促使花色素苷的结构稳定。

目前植物中花青素的生物合成途径中前三个阶段已经基本明确, 主要是形成花青素基本碳骨架, 而对于花青素修饰及花色素苷的转运、积累等方面的研究才刚刚起步。花青素碳骨架的修饰包括甲基化、酰基化、羟基化、糖基化等, 不同的修饰反应就形成不同的花青素^[11]。花青素糖基转移酶(GT)决定糖基化的位置, 对植物花青素的稳定性及可溶性起着重要作用^[12]。根据糖基化的位置不同分为 3GT(UFGT)、花色苷 5-葡萄糖基转移酶(anthocyanin 5-O-glucosyltransferase, 5GT)和类黄酮 7-葡萄糖基转移酶(flavonol 7-O-glucosyltransferase, 7GT)等^[13]。第 3 位糖基化通常是花青素修饰共有的步骤, 通常 3-糖基化先于 5-糖基化^[14], 多数花青素的糖基化是通过类黄

酮-3-葡萄糖基转移酶(UFGT/3GT)实现的。此外, 在一些植物中也存在第 5 位或第 7 位的鼠李糖及其他糖类的修饰, 这些修饰是通过 7GT 及 5GT 实现的, 不同的糖基化修饰可能是一个新的花青素苷合成特异调控机制^[15-18]。许多 3GT 和 5GT 基因已经被分离到, 玉米中编码 3GT 的 Bz1 基因首先被克隆出^[19], 随后金鱼草和矮牵牛中 3GT 基因也相继被克隆。酰基化花青素具有较强的护色能力, 能有效阻止花青素水解为无色的查尔酮, 增强花青素的稳定性, 保持颜色^[10]。BAHD 家族是一类多功能的酰基转移酶, 有多种底物特异性。花青素酰基转移酶(AT)是 BAHD 家族的重要亚族, 可以把多种有机酸修饰在花青素骨架上, 以提高花青素的稳定性、水溶性及光吸收。在花青素糖基化后, AT 能催化花青素的酰基化而使大部分花色显示红色到蓝色, 在红色菊花中分离得到 3 个花青素酰基转移酶: Dm3MaT1、Dm3MaT2 和 Dm3MaT3^[5, 20-21]。甲基化修饰使得花青素的结构、颜色具有多样性。依赖

于 S-腺苷蛋氨酸的花青素甲基转移酶 cDNA 已从矮牵牛和葡萄中获得^[22-23]。

花青素经不同的羟基化、糖基化、甲基化、酰基化修饰后稳定性、水溶性及光吸收等明显提高,后被转运到液泡中并予以汇集。目前有关花青素运输与液泡聚集方面的机理尚不十分清楚,已有研究表明,谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)^[24-25]、抗多药蛋白 (multidrug resistance associated protein, MRP3) 运载^[26]、液泡自身形成机制^[27]及液泡中的花青素内涵体 (anthocyanic vacuolar inclusions, AVIs)^[28-29]、金属蛋白酶 (a 24 kDa vacuolar protein, VP24)^[30] 都与其转运和汇聚有关系。花青素分子也可以直接通过细胞膜导出的囊泡运输到贮藏液泡中,这个过程不依赖 GST 和 MRP3 的活动,这种模式在对拟南芥的研究中得到证实^[31]。在以转运子为介质的运输途径中, MATE 转运子是常见的花青素苷/H⁺ 逆向转运子,它可以携带一些花青素苷运输到液泡中^[32-33]。

2 花青素合成代谢相关基因

影响花青素代谢的基因分为结构基因和调节基因。结构基因直接编码花青素代谢生物合成途径中所需要的酶,主要包括 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 和 *UF3GT* 等,调节基因所编码的转录因子作为重要的调控因子参与调控结构基因的时空表达^[2]。在各种植物中分离出这些结构基因和调节基因,进而解析它们的具体功能成为近年来花青素相关基因研究的热点。

2.1 花青素合成代谢相关结构基因

2.1.1 查尔酮合成酶基因 查尔酮合成酶 (chalconesynthase, CHS) 催化 4-香豆酸 CoA 与丙二酰 CoA 合成查尔酮,为类黄酮提供基本的碳骨架,是类黄酮类物质合成的第一个关键酶。Kreuzaler 等^[34] 采用鉴别筛选与杂交筛选相结合的方法从欧芹中首次分离出类黄酮生物合成基因,2 年之后,矮牵牛 *CHS* 基因也成功被分离出来^[35]。目前,已从玉米、金鱼草、大豆、松树、紫罗兰、豌豆和白苏等多种植物中分离克隆了 *CHS* 基因。*CHS* 基因编码区被不同长度的内含子分隔成外显子 1 和外显子 2,其中外显子 1 较短,只编码 60 个氨基酸,长度变异较大;外显子 2 编码 340 个氨基酸,在进化中较为保守,易于排序,提供的进化信息较多^[36]。*CHS* 基因是一个多基因家族,基因的编码区和结构都十分保守,且在不同科植物间具有较高的保守性。在红

肉猕猴桃中,*CHS* 基因家族存在 3 个明显的差异片段,且在果实组织中都有表达,但是 *CHS2* 的表达量明显比 *CHS1* 和 *CHS3* 高^[37]。由于 *CHS* 基因处于花色素普遍合成途径的起始位置,因此抑制 *CHS* 基因的表达可以培育花色变淡的新花卉品种。例如 Aida 等^[38] 导入 *CHS* 的反义基因至蓝猪耳中得到花色变淡的新品种,而 Fukusaki 等^[39] 是利用 RNAi 技术使蓝猪耳中的 *CHS* 基因沉默获得白色和灰白色的转基因品种。

2.1.2 查尔酮异构酶基因 查尔酮异构酶 (chalconeisomerase, CHI) 基因编码的查尔酮异构酶是一种功能性单体,分子量约 24~29 kDa。对不同植物 *CHI* 基因的氨基酸序列分析发现其具有较高的相似性,约在 49%~82% 之间,*CHI* 基因的同源序列在植物中高度保守但与其它蛋白质不具有相似性^[5]。1987 年, Mehdy 等利用抗体技术首次从法国豌豆中分离出 *CHI* 基因^[40],随后在矮牵牛、草莓等植物中也相继克隆该基因。*CHI* 基因也是个多基因家族,在矮牵牛有 *CHIA* 和 *CHIB* 2 个 *CHI* 基因,但它们的表达方式并不相同,*CHIA* 在紫外诱导的苗和花器官组织中均能表达,而 *CHIB* 仅在未成熟的花药组织中表达^[41]。查尔酮异构酶具有种属特异性,如对甘草中 3 种 *CHI* 同工酶得以分离纯化后进行特征分析发现,其中 2 种能够以 6-羟查尔酮 (6-hydroxychalcones) 和 6-脱氧查尔酮 (6-deoxychalcones) 为底物合成异黄酮;但另外一种酶只能在类黄酮途径中转化 6-羟查尔酮^[42]。对甘草 *CHI* 同工酶的进一步分析提供了关于 *CHI* 在豆科和非豆科植物进化方面的新信息^[43]。*CHI* 基因是类黄酮化合物生物合成途径上游的关键基因之一,其表达对于调节类黄酮化合物的含量有重要作用,如将矮牵牛 *CHI* 基因在番茄中过量表达使其果皮中类黄酮化合物含量提高了 78 倍,除了果皮中和果浆中类黄酮化合物含量的变化外,其它性质均与对照无明显差别^[44]。Nishihara 等^[45] 通过 RNAi 技术将烟草中的 *CHI* 基因表达抑制后,查尔酮含量上升,花瓣中的花色素含量减少,花瓣变成黄色。在植物的花冠、球茎与花药的发育过程中,*CHI* 与 *CHS* 两种酶的积累和消失受光调控和紫外辐射诱导,并存在协同性,这种协同性是 *CHI* 基因与 *CHS* 基因 mRNA 协同表达的结果^[46]。

2.1.3 黄烷酮 3-羟化酶基因 黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 属氧化戊二酸依赖型加氧酶,反应时都要依赖 Fe²⁺、氧、2-酮戊二酸等

作为辅助因子,具有底物特异性,在植物类黄酮生物合成调控中起着关键的作用^[47]。自 1991 年由 Martinet 等^[48]首次从金鱼草中克隆得到 *F3H* 基因以来,现已从矮牵牛、拟南芥、洋葱、玉米、甘蓝型油菜、紫花苜蓿和苦荞等多种植物中克隆得到了它们对应的 *F3H* 基因序列。*F3H* 基因在矮牵牛、玉米、拟南芥和紫花苜蓿等多数植物中以单拷贝基因存在,在紫苏中则存在 2~3 个拷贝^[49]。通过对矮牵牛的研究表明,*F3H* 是一个分子量为 42 kD 的单体蛋白,其中 His220、His278、Arg222 和 Ser290 氨基酸残基对酶的活性起关键性的作用^[50]。由于黄酮 3-羟化酶的作用底物是柚皮素,因此抑制 *F3H* 的表达可以促进黄酮和异黄酮产物的合成。Wiseman 等^[51]阻断拟南芥 *F3H* 基因的表达导致黄酮和花色苷水平的下降。一个拟南芥 *F3H* 突变体已被应用于黄酮类化合物的代谢工程研究中^[52]。

2.1.4 二羟基黄酮醇还原酶基因 二羟基黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)以二氢黄酮醇(DHK: dihydrokaempferol; DHQ: dihydroquercetin; DHM: dihydromyricetin)为底物,在辅因子 NADPH 的作用下将 4 位的羰基还原为羟基,产生无色原花色苷,与 DHK、DHQ 和 DHM 等 3 种底物依次对应为无色天竺葵素,无色翠雀素和无色矢车菊素^[2],该酶是花色苷普遍生物合成途径中后期表达的第一个关键酶。O'Reilly 等^[53]1985 年采用转座子标签技术从玉米和金鱼草中分离出了 *DFR* 基因。现已从矮牵牛、非洲菊、番茄、葡萄、苜蓿、紫苏、罗莎、牵牛花、白杨、海小麦、百脉根、大白菜、茶叶和莲花等植物中克隆到该基因。*DFR* 为单基因编码,属于 NADPH 依赖性还原酶家族,是催化二氢黄酮醇转变为相应无色花色苷的关键酶。在不同的物种中,其分子中底物结合区的氨基酸序列在不同物种中高度保守,*DFR* 与 NADPH 结合位点“VTGAAGFIGSWLIM RLLERGY”是高度保守结构域^[54]。对 *DFR* 基因的组织表达已有大量的研究,结果表明不同物种的 *DFR* 基因在不同发育阶段和不同组织部位的时空表达特性有所不同,调控方式也非常复杂^[55]。

2.1.5 花色苷合成酶基因和类黄酮 3-O-糖基转移酶基因 花色苷合成酶(anthocyanin synthase, ANS)基因和类黄酮 3-O-糖基转移酶基因(flavonoid 3-O-glucosyl-transferase, UFGT)是负责花色苷生物合成过程中的最后一个步骤,在细胞质和液泡中协同作用使不稳定的花色苷转变为稳定

的花青苷^[56]。*ANS* 基因主要作用是将无色的原花色苷(leucoanthocyanidins)氧化产生有色的花色苷(anthocyanidin),该产物是花色苷合成途径中的第一个有色化合物^[5],对植物的显色形成至关重要。花色苷合成酶(*ANS*)是 2-ODD 酶。*ANS* 基因最初是 Menssen 等^[57]从玉米的 A2 突变体中鉴定并利用转座子标签技术克隆得到。目前,*ANS* 基因已在多种植物中克隆得到,如紫苏、金钟连翘、拟南芥、石竹、非洲菊和水稻等。目前报道的大多数 *ANS* 基因结构均由 1 个内含子和 2 个外显子组成,且剪接位点一致,但水稻的 *O_sANS* 却没有内含子。葡萄中的 *ANS* 基因只有 1 个拷贝^[58],紫苏中 *ANS* 基因有 2~3 个拷贝^[49],在金钟连翘中的 *ANS* 为 2 个拷贝^[9],由此推测 *ANS* 基因是由单基因或小基因家族构成。*ANS* 基因的表达具有一定的组织特异性并受外界环境条件的影响^[59]。

类黄酮 3-O-糖基转移酶是花色苷形成的最后一个酶,主要负责将不稳定的花色苷转变为稳定的花色苷,即类黄酮 3-O-糖基转移酶(3GT)将 UDP-glucose 上的葡萄糖转移到花色苷分子的 C3 羟基上,从而使花色苷的结构稳定^[60]。Schiefelbein 等^[61]最初在玉米的花药中发现 3GT 的生物活性并克隆该基因。目前,*UFGT* 基因已从花生、马鞭草、紫苏等植物中分离出来。研究表明,苹果、草莓、荔枝和梨中花色苷的积累与 *UFGT* 基因活性呈明显的正相关,在不同的品种中 *UFGT* 基因的表达量不同^[62],*UFGT* 基因表达活性的变化导致了葡萄表现型由白色向红色的转变^[63]。

2.2 花色苷合成代谢相关调控基因

调控基因编码转录因子,转录因子能够通过特异的 DNA-蛋白质和蛋白质-蛋白质相互作用激活或者抑制结构基因的时空表达,从而调节花色苷的合成。目前研究表明,参与调节花色苷合成的转录因子主要有 3 类,即 MYB、bHLH 和 WD40 蛋白,大多数植物花色苷的合成是通过 MYB-bHLH 复合物或者 3 类转录因子相互作用形成 MYB-bHLH-WD40 复合物(MBW 复合物)直接调控结构基因的转录与表达^[64]。

2.2.1 MYB 转录因子 MYB 转录因子是一类 DNA 结合蛋白,含有一段保守的 DNA 结合区域——MYB 结构域。植物的 MYB 结构域具有序列特异性,约由 52 个氨基酸构成,其中含有高度保守的氨基酸和间隔序列。这些保守的氨基酸可以使 MYB 蛋白结构域折叠成螺旋-螺旋-转角-螺旋(he-

lix-helix- turn-helix, HHTH) 结构。根据蛋白质中 MYB 结构域的个数, MYB 转录因子可以分为 3 类: (1) 单一 MYB 结构域 (R1-MYB); (2) 2 个重复 MYB 结构域 (R2R3-MYB); (3) 3 个重复 MYB 结构域 (R1R2R3-MYB)^[65]。花青素相关的 MYB 转录因子通常包含 R2 和 R3 等 2 个基序 (R2R3-MYB) 或包含 R3 一个基序 (R3-MYB)^[66]。

现已在许多植物中分离鉴定出参与花青素合成调控的 MYB 转录因子, 如玉米的 *C1/P1*、矮牵牛的 *AN2*、金鱼草的 *Rosea*、葡萄的 *VvMYBA* 和拟南芥的 *TT2*、*PAP1* 和 *PAP2* 等。1986 年 Cone 等从玉米中克隆的第一个调节花青素合成的 *C1* 基因含有 MYB 结构域, 可以特异地调节糊粉层花青素的生物合成, 玉米其它组织的花青素合成由 *P1* 基因控制, *PI* 与 *CI* 高度同源, 被看作是 *C1* 的拷贝基因^[67]。矮牵牛 *AN2* 编码的 MYB 蛋白只在花瓣边缘表达, 在功能上可以与玉米的 *C1* 互换^[68]。*PH4* 编码的 MYB 蛋白在花瓣表皮中表达, *AN4* 编码花粉囊中的 MYB 蛋白^[69], 这些 MYB 蛋白均与矮牵牛花的花青素合成相关。金鱼草花中 R2R3-MYB 转录因子 *Roseal* (*Ros1*), *Rosea2* (*Ros2*) 和 *Venosa* (*Ve*) 控制花的紫红色。而且这 3 个 MYB 蛋白在调控花青素生物合成过程中与 bHLH 蛋白相互作用。*Ros1*、*Ros2* 和 *Ve* 可以激活花青素合成过程中不同催化酶基因的表达^[70]。葡萄中的 R2R3-MYB 型转录因子基因 *VvMYB5a* 主要在果皮、果肉和种子的发育早期表达, *VvMYBA1* 在浆果皮中特异表达, 可以诱导葡萄皮花青素的生物合成, *VvMYBA1* 的激活作用需要 bHLH 蛋白协助^[71]。葡萄花青素合成酶基因 *VvUFGT* 的启动子不受 *VvMYBA1* 影响, 但是可被 *VvMYBA2* 高度激活, 且 *VvMYBA2* 不激活其他花青素合成基因^[72]。拟南芥的 *PAP1* 基因编码 MYB 转录因子, *PAP1* 基因的异常表达导致了拟南芥绝大多数器官中紫色花青素的形成。与 *C1* 序列的相似性说明, *PAP1* 和 *PAP2* 基因可能是 *CI* 基因的同家族成员^[73]。拟南芥的 *MYB12* 是发育幼苗中类黄酮生物合成的特异激活子。*MYB12* 与玉米的 *P* 因子具有高度相似性, 发挥作用时不需要 bHLH 协助, 可以激活 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS* 基因的表达, *MYB12* 不调控 *DFR* 基因的表达^[74]。从非洲菊中分离到的 *GMYB10* 与拟南芥和矮牵牛花的花青素合成调控因子具有高度同源性, *GMYB10* 与叶子、花茎和花的花青素形成相关; *GMYB10* 仅在花瓣表皮层细胞中表达, 同时 *GMYB10* 与 bHLH

型因子 *GMYC1* 相互作用, *GMYB10* 可以诱导转基因烟草花粉囊的花青素合成^[75]。*MdMYB1* 是从苹果中分离到的 R2R3-MYB 型转录因子, 在拟南芥和葡萄培养细胞中 *MdMYB1* 诱导花青素的异常表达^[76]。Ban 等^[77] 从苹果果皮中分离得到的 *MdMYBA* 其表达具有组织和品种特异性, *MdMYBA* 特异结合于花青素合酶 (*MdANS*) 的启动子; *MdMYBA* 转化苹果苗子叶的瞬时表达结果显示, 子叶上出现了微红色的点状物, 同时在转基因烟草中也积累花青素。Mano 等^[78] 从甘薯的薯块中分离得到 MYB 基因 *IbMYB1* 和 *IbMYB2s*。*IbMYB1* 特异地调节块根薯肉的 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 和 *3GT* 的表达和花青素的积累。Palapol 等^[79] 研究表明山竹果由绿色变为紫红色的成熟过程中转录因子 *GmMYB10* 表达量变化最大, 将 *GmMYB10* 与拟南芥 *AtbHLH2* 共同转化烟草, 能有效激活 *GmDFR* 和 *AtDFR* 启动子, 表明 MYB10 在调控花青素生物合成中起着重要作用。

2.2.2 碱性螺旋-环-螺旋转录因子 碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子是植物中仅次于 MYB 转录因子的第二大转录因子超家族。bHLH 转录因子蛋白结构中含有保守的 bHLH 基序, 每个 bHLH 基序约由 60 个氨基酸残基组成, 含有 2 个亚功能区, 即位于 N 末端的碱性氨基酸 DNA 结合区和 C 末端的 HLH 区。调节类黄酮和花青素合成是植物 bHLH 转录因子最重要功能之一^[80]。

Ludwig 等^[81] 发现植物中第一个 bHLH 转录因子玉米 *R1* (*RED1*) 蛋白, 无论蛋白结构还是调节结构基因表达的模式都是调节花青素合成的 bHLH 转录因子中的典型。*R1* 蛋白在调控花青素合成中的功能可能是通过形成二聚体 (bHLH 结构域和 ACT 结构域), 作为连接 R2R3-MYB 蛋白 (MIR 结构域) 和 WD40 蛋白 (WD40/AD 结构域) 的船坞蛋白 (docking protein)。并且通过 MYB-bHLH 相互作用集合未知因子结合于花青素合成基因的启动子上, 从而促进 *C1* 蛋白的转录激活活性。*R1* 蛋白还可能通过促进 *C1* 蛋白与抑制子 (*IN1* 蛋白) 分离激活 *C1* 蛋白^[82]。研究表明 *R1* 蛋白可根据目的基因启动子区的顺式元件不同, 动态形成不同构象发挥调控作用: 对于含 E-box 的 *C2* 基因 (*ZmCHS*) 和 *Bz1* 基因 (*ZmUFGT*), *R1* 可通过 bHLH 结构域形成二聚体, 在体内直接与 *C2* 和 *Bz1* 启动子区的 E-box 结合, 激活两个基因的表达,

但这种结合和激活均依赖于 R1 与 C1 的相互作用;对于不含 E-box 的 A1 基因(*ZmDFR*),R1 由 ATC 结构域形成同源二聚体,通过与 C1 的相互作用被招募到 A1 启动子区,此时 R1 还通过单体的 bHLH 结构域招募 RIF1,从而在 A1 启动子区形成 C1-R1-RIF1 转录复合物激活 A1 基因的表达^[83]。拟南芥中参与调控花青素合成的 bHLH 蛋白均聚集于 bHLH 家族第三亚组(subgroup III),有 *TT8*(AtBHLH042)、*GL3*(AtBHLH001)、*EGL3*(MYC146/AtBHLH002)和 *MYC1*(AtBHLH012);它们均能与第六亚组 R2R3-MYB 蛋白相互作用,包括 *PAP1*(AtMYB75)、*PAP2*(AtMYB90)、*MYB113*和 *MYB114*^[84]。拟南芥幼苗中 *TT8*、*GL3*和 *EGL3*的表达及其对花青素的调节功能存在部分重叠和冗余,*GL3*和 *EGL3*在调节 *F3'H*表达中的作用相当,而在调节 *DFR*和 *ANS/LDOX*的表达中 *EGL3*起主要作用^[64]。拟南芥 bHLH 蛋白主要通过参与形成 MBW 复合物调节种子原花青素以及营养器官花青素合成,例如 *TT2-TT8-TTG1*复合物促进拟南芥种子原花青素合成^[85]。矮牵牛中调节花青素合成的 bHLH 蛋白有 2 个:*AN1*和 *JAF13*。*AN1*基因与结构基因 *DFR*同源,可直接调节 *DFRA*的表达。*Quattrocchio*等^[86]通过同源克隆得到矮牵牛 *JAF13*,该基因与 *AN2*一起在叶片中瞬时表达能够激活 *DFRA*启动子,却不影响 *CHSA*和 *F3H*等早期基因的表达;且 *JAF13*与 *AN1*的功能不完全等同,因为 *JAF13*无法恢复 *AN1*突变体表型。矮牵牛的 bHLH 蛋白也类似于拟南芥是通过形成 MBW 复合物调节结构基因表达。参与形成复合物的有 WD40 蛋白 *AN11*,R2R3-MYB 蛋白 *AN2*、*AN4*以及最新发现的 *DEEP PURPLE(DPL)*和 *PURPLE HAZE(PHZ)*。MBW 复合物只能调节 *DFR*、*AN13*、*RT*、*AMT*和 *CHSJ*的表达,而不能调节 *CHSA*、*CHI*、*F3H*表达^[87]。有研究表明,矮牵牛花瓣表皮细胞中 *MYB3*可激活 *CHS*表达,且不需要 bHLH 蛋白协助^[88]。由于组成的 R2R3-MYB 蛋白不同,MBW 复合物能调节不同组织的花青素合成^[89]。葡萄中调节花青素合成的 bHLH 蛋白有 *VvMYC1*和 *VvMYCA1*。*VvMYC1*和拟南芥 *TT8*、矮牵牛 *AN1*一起聚集于 bHLH 蛋白第 IIIf-1 亚组,该亚组 bHLH 蛋白均可调控花青素和原花青素合成,而 *VvMYCA1*与拟南芥 *EGL3*和 *GL3*、矮牵牛 *JAF13*、苹果 *bHLH33*一起聚集于第 IIIf-2 亚组,该亚组 bHLH 蛋白只调节花青素的合成^[90]。

苹果花青素生物合成调控的研究表明,2 个 bHLH 蛋白 *MdbHLH3*和 *MdbHLH33*参与了花青素合成的调节,它们是 *MdMYB10*(R2R3-MYB)有效诱导花青素合成所必需的,与 *MdMYB10*相互作用后可诱导苹果果皮、果肉和叶片合成红色花青素^[91]。

2.2.3 WD40 转录因子 WD40 蛋白是一类大的蛋白家族,这类蛋白结构高度保守,一般含有 4~16 个串联重复的 WD 基元序列。WD 基元是一个高度保守的核心区域,每个 WD 基元含有大约由 40 个氨基酸残基组成的保守序列,该序列以 N 末端 11~24 个残基处 GH 二肽(Gly-His,GH)开始,C 末端以 WD 结尾(Trp-Asp,WD)^[92-93]。目前,已在矮牵牛、拟南芥、玉米、紫苏等多种植物中鉴定了花青素合成相关的 WD40 类转录因子。*De Vetten*等^[94]在矮牵牛中发现了 *AN11*,在矮牵牛 *an11*突变体中,结构基因 *DFR*的表达量下降,但只影响花的色素积累,组成型表达 *AN2*可以恢复 *an11*,恢复 *DFR*的表达活性,可见在花青素合成的调控途径中 *AN11*位于 *AN2*的上游。拟南芥 *TTG1*蛋白与矮牵牛 *AN11*具有高度的同源性^[5]。拟南芥 *TTG1*可以调控类黄酮/花青素的合成^[95]。*TTG1*通过与 bHLH 类转录因子 *GL3*、*EGL3*和 *TT8*^[96]以及 MYB 类转录因子拟南芥 *TT2*或 *PAP1*^[85,97]相互作用来实现控制花青素结构基因的时空表达^[98]。玉米 *PAC1*编码 WD40 蛋白,类似于花青素调控蛋白 *AN11*和 *TTG1*^[99-100]。*Yamazaki*等^[101]在紫苏叶子中发现了花青素合成相关的 *PFWD*蛋白,在拟南芥中过量表达 *PFWD*可以增加花青素的合成,*PFWD*含 4 个 WD 重复序列,氨基酸序列与 *AN11*和 *TTG1*分别有 81.3%和 77.8%的相似度,比较保守,*PFWD*蛋白存在许多翻译后修饰,最典型的是 N-糖基化、磷酸化以及烷基化。*PFWD*的 N 末端的一段氨基酸序列与核定位信号 NLS 序列相似,但亚细胞定位实验证明,该蛋白定位于细胞质中^[102],推测 *PFWD*可能通过与 MYC 家族蛋白共同作用,可从细胞质中转移到细胞核上,在花青素合成等信号转导途径中起着信号传递的作用。花青素合成中的 WD40 蛋白都属于同一个进化分支,并且在功能上都能通过形成特定的结构与其他蛋白质相互作用^[103]。在拟南芥 *ttg1*突变体中易位表达拟南芥 *TTG1*蛋白的类似 WD40 蛋白可以弥补突变体的很多表型,这表明这些蛋白的作用机理相似,都能与某一类蛋白结合发挥作用^[104]。遗传学分析和酵母双杂交显示,这类调控 WD40 蛋白能与 bHLH 和

MYB 类蛋白共同调控花青素的合成^[105-106]。

3 展 望

近年来,通过各种植物突变体和转基因技术分析,对植物花青素合成代谢途径以及参与花青素合成的分子调控过程有了更深入的了解。从不同物种中克隆、鉴定了很多与花青素合成相关的结构基因和调控基因,但花青素的合成代谢是个复杂的调控网络,当前的研究还不足以揭示花青素生物合成代谢的全貌。目前主要是对少数模式植物的研究较为深入,而在园艺果实、蔬菜、薯类等经济作物中,只是

对花青素合成相关酶进行了分离和初步的功能鉴定,具体的转录调控机制研究偏少。需要借助转基因技术、第二代测序技术、RNA 干涉技术、功能基因组和蛋白质组学等新技术,进一步鉴定花青素合成相关基因及其调控因子。在花青素合成代谢研究中尚有许多有待解决的问题,比如花青素的修饰、转运和积累过程,合成途径中各种转录因子的功能及其相互作用机制,外界环境因子对花青素合成的影响,植物体内花青素的降解途径等等。深入研究这些问题对理解植物花青素合成调控机制,以及利用基因工程开展作物遗传改良具有理论指导作用。

参考文献:

- [1] SARMA A D, SREELAKSHMI Y, SHARMA Ret. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation[J]. *Phytochemistry*, 1997, **45**(4): 671—674.
- [2] HOLTON T A, CORNISH E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, **7**(7): 1 071—1 083.
- [3] KIM B C, TENNESSEN D J, LAST R L. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, **15**(5): 667—674.
- [4] BALLARE C L. Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses[J]. *Plant Physiology*, 2003, **132**(4): 1 725—1 727.
- [5] SPRINGOB K, NAKAJIMA J, YAMAZAKI M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins[J]. *Natural Product Reports*, 2003, **20**(3): 288—303.
- [6] 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 (Moscow)*, 2004, **69**(1): 75—80.
- [7] FERRER J L, AUSTIN M B, STEWART JR C, et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, **46**(3): 356—370.
- [8] HERMANN A, SCHULZ W, HAHNBROCK K. Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1988, **212**(1): 93—98.
- [9] ROSATI C, CADIC A, DURON M, et al. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia* reveals organ-specific expression during flower development[J]. *Plant Science*, 1999, **149**(1): 73—79.
- [10] GUO F D(郭凤丹), WANG X ZH(王效忠), LIU X Y(刘学英), et al. Metabolic regulation of plants anthocyanin[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences (生命科学)*, 2011, **23**(10): 938—944(in Chinese).
- [11] SHI SH CH(石少川), GAO Y K(高亦珂), ZHANG X H(张秀海), et al. Progress on plant genes involved in biosynthetic pathway of anthocyanins[J]. *Bulletin of Botanical Research (植物研究)*, 2011, **31**(5): 633—640(in Chinese).
- [12] ZHANG N(张 宁), HU Z L(胡宗利), CHEN X Q(陈绪清), et al. Analysis of metabolic pathway and establishment of regulating model of anthocyanin Synthesis[J]. *China Biotechnology (中国生物工程杂志)*, 2008, **28**(1): 97—105(in Chinese).
- [13] OGATA J, ITOH Y, ISHIDA M, et al. Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus* [J]. *Plant Biotechnology*, 2004, **21**(5): 367—375.
- [14] TANAKA Y, BRUGLIERA F, CHANDLER S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, **10**(12): 5 350—5 369.
- [15] VOGT T, GRIMM R, STRACK D. Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-O-Glucosyl-transferase, a betanidin and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae[J]. *The Plant Journal*, 1999, **19**(5): 509—519.
- [16] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, HIRAOKA K, et al. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis[J]. *Planta*, 2002, **215**(6): 924—933.
- [17] SAITO R, FUKUTA N, OHMIYA A, et al. Regulation of anthocyanin biosynthesis involved in the formation of marginal picotee petals in *Petunia* [J]. *Plant Science*, 2006, **170**(4): 828—834.
- [18] KOICHIRO K, NAOKI K, KOHEI K, et al. Purification and characterization of UDP-glucose:an thocyanin-3', 5'-O-glucosyltransferase from *Clitoria ternatea* [J]. *Planta*, 2007, **226**(6): 1 501—1 509.
- [19] DOONER H K, WECK E, ADAMS S, et al. A molecular genetic analysis of insertions in the bronze locus in maize [J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1985, **200**(2): 240—246.
- [20] LUO J, NISHIYAMA Y, FUELL C, et al. Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2007, **50**(4): 678—695.
- [21] UNNO H, ICHIMAIDA F, SUZUKI H, et al. Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(21): 15 812—15 822.

- [22] BRUGLIERA F, LINDA D, KOES R, *et al.* Genetic sequences having methyltransferase activity and uses therefor: Australia, Patent Publication Number WO/03/062428[P]. 2003-07-31.
- [23] HUGUENEY P, PROVENZANO S, VERRIES C, *et al.* A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine[J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(4): 2 057–2 070.
- [24] MARRS K A, ALFENITO M R, LLOYD A M, *et al.* A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2[J]. *Nature*, 1995, **375**(6 530): 397–400.
- [25] GROTEWOLD E. The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products[J]. *Planta*, 2004, **219**(5): 906–909.
- [26] GOODMAN C D, CASATI P, WALBOT V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*[J]. *The Plant Cell*, 2004, **16**(7): 1 812–1 826.
- [27] ABRAHAMS S, LEE E, WALKER A R, *et al.* The *Arabidopsis* TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development[J]. *The Plant Journal*, 2003, **35**(5): 624–636.
- [28] ZHANG H B, WANG L, DEROLE S, *et al.* New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals[J]. *BMC Plant Biology*, 2006, **6**(1): 29.
- [29] CONN S, ZHANG W, FRANCO C. Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension culture[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(11): 835–839.
- [30] NOZUE M, BABA S, KITAMURA Y, *et al.* VP24 found in anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) of sweetpotato cells is a member of a metalloprotease family[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**(3): 199–205.
- [31] POUSTKA F, IRANI N G, *et al.* A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions[J]. *Plant Physiology*, 2007, **145**(4): 1 323–1 335.
- [32] ZHAO J, DIXON R A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-Glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(8): 2 323–2 340.
- [33] GOMEZ C, TERRIER N, TORREGROSA L, *et al.* Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters[J]. *Plant Physiology*, 2009, **150**(1): 402–415.
- [34] KREUZALER F, RAGG H, FAUTZ E, *et al.* UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1983, **80**(9): 2 591–2 593.
- [35] REIF H J, NIESBACH U, DEUMLING B, *et al.* Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*[J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1985, **199**(2): 208–215.
- [36] LIANG Y R, LIN C, WANG L R, *et al.* Cloning and expression pattern of chitin synthase (CHS) gene in epidermis of *Ectropis obliqua* Prout[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, **9**(33): 5 297–5 308.
- [37] MONTEFIORI M, ESPLEY R V, *et al.* Identification and characterisation of F3GT1 and F3GGT1, two glycosyltransferases responsible for anthocyanin biosynthesis in red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis*) [J]. *The Plant Journal*, 2011, **65**(1): 106–118.
- [38] AIDA R, KISHIMOTO S, TANAKA Y, *et al.* Modification of flower color in torenia (*Torenia fouoieri* Lind.) by genetic transformation [J]. *Plant Science*, 2000, **153**(1): 33–42.
- [39] FUKUSAKI E, KAWASAKI K, KAJIYAMA S, *et al.* Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase gene with RNA interference[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, **111**(3): 229–240.
- [40] MEHDY M C, LAMB C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection[J]. *The EMBO Journal*, 1987, **6**(6): 1 527–1 533.
- [41] VAN TUNEN A J, HARTMAN S A, MUR L A, *et al.* Regulation of chalcone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*: The use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, **12**(5): 539–551.
- [42] 刘小强. 紫肉甘薯 (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) 花色素苷生物合成的分子调控研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [43] KIMURA Y, AOKI T, AYABE S. Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, **42**(10): 1 169–1 173.
- [44] MUIR S R, COLLINS G J, ROBINSON S, *et al.* Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols[J]. *Natural Biotechnology*, 2001, **19**(5): 470–474.
- [45] NISHIHARA M, NAKATSUKA T, YAMAMURA S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene[J]. *FEBS Letters*, 2005, **579**(27): 6 074–6 078.
- [46] HOU F Y (侯夫云), WANG Q M (王庆美), LI A X (李爱贤), *et al.* Study progress on anthocyanidin synthase of plants[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2009, **25**(21): 188–190 (in Chinese).
- [47] OWENS D K, MCLNTOSH C A. Biosynthesis and function of citrus glycosylated flavonoids[M]. DAVID R. The Biological Activity of Phytochemicals, New York: Springer, 2011, 41: 67–95.
- [48] MARTINET C, PRESCOTT A, MACKAY S, *et al.* Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*[J]. *The Plant Journal*, 1991, **1**(1): 37–49.
- [49] GONG Z, YAMAZAKI M, SUGIYAMA M, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**(6): 915–927.
- [50] LUKACIN R, BRITSCH L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, **249**(3): 748–757.

- [51] WISEMAN E, HARTMANN U, SAGASSER M, *et al.* Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1998, **95**(21): 12 432–12 437.
- [52] LIU C J, BLOUNT J W, STEELE C L, *et al.* Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2002, **99**(22): 14 578–14 583.
- [53] O'REILLY C, SHEPHERD N S, PEREIRA A, *et al.* Molecular cloning of the a1 locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*[J]. *The EMBO Journal*, 1985, **4**(4): 877–882.
- [54] 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.
- [55] SHIMADA S, INOUE Y T, SAKUTA M. Anthocyanidin synthase in non-anthocyanin-producing caryophyllales species[J]. *The Plant Journal*, 2005, **44**(6): 950–959.
- [56] GAO Y H(高燕会), HUANG CH H(黄春红), ZHU Y Q(朱玉球), *et al.* Progress on plant anthocyanin biosynthesis and regulation[J]. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2012, **32**(8): 94–99(in Chinese).
- [57] MENSSSEN A, HOHMANN S, MARTIN W, *et al.* The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the temini generating a novel intron from dSpm element in the A2 gene[J]. *The EMBO Journal*, 1990, **9**(10): 3 051–3 057.
- [58] SPARVOLI F, MARTIN C, SCIENZA A, *et al.* Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape(*Vitis vinifera* L.)[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, **24**(5): 743–755.
- [59] KIM S H, LEE J R, HONG S T, *et al.* Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin[J]. *Plant Science*, 2003, **165**(2): 403–413.
- [60] VOGT T, TAYLOR L P. Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce Gametophyte-specific flavonol diglycosides[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**(3): 903–911.
- [61] SCHIEFELBEIN J W, FURTEK D B, DOONER H K, *et al.* Two mutations in a maize bronze-1 allele caused by transposable elements of the Ac-Ds family alter the quantity and quality of the gene product[J]. *Genetics*, 1988, **120**(3): 767–777.
- [62] LI J C(李俊才), LI T ZH(李天忠), WANG ZH G(王志刚), *et al.* Cloning and expression of *UFGT* gene in skin of max red Bartlett[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2010, **30**(1): 30–34(in Chinese).
- [63] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, *et al.* Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*UFGT*) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin[J]. *Plant Science*, 2001, **160**(3): 543–550.
- [64] GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT J M, *et al.* Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. *The Plant Journal*, 2008, **53**(5): 814–827.
- [65] XU ZH R(许志茹), LI CH L(李春雷), CUI G X(崔国新), *et al.* MYB proteins of anthocyanin biosynthesis in plant[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2008, **44**(3): 597–604(in Chinese).
- [66] LIN-WANG K, BOLITHO K, GRAFTON K, *et al.* An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, **10**(1): 50.
- [67] CONE K C, BURR F A, BURR B, *et al.* Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1986, **83**(24): 9 631–9 635.
- [68] QUATTROCCHIO F, WING J, VANDER WOUDE K, *et al.* Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color[J]. *The Plant Cell*, 1999, **11**(8): 1 433–1 444.
- [69] WALKER A R, DAVISON P A, *et al.* The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein[J]. *The Plant Cell*, 1999, **11**(7): 1 337–1 350.
- [70] SCHWINN K, VENAIL J, SHANG Y, *et al.* A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the Genus *antirrhinum*[J]. *The Plant Cell*, 2006, **18**(4): 831–851.
- [71] DELUC L, BARRIEU F, MARCHIVE C, *et al.* Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway[J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 499–511.
- [72] BOGS J, JAFFE F W, TAKOS A M, *et al.* The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates pro- anthocyanidin synthesis during fruit development[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**(3): 1 347–1 361.
- [73] BOREVITZ J O, XIA Y, BLOUNT J, *et al.* Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2000, **12**(12): 2 383–2 393.
- [74] MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, *et al.* The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(2): 1 083–1 096.
- [75] ELOMAA P, UIMARI A, MEHTO M, *et al.* Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots[J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**(4): 1 831–1 842.
- [76] TAKOS A M, JAFFE F W, JACOB S R, *et al.* Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiology*, 2006, **142**(3): 1 216–1 232.
- [77] BAN Y, HONDA C, HATSUYAMA Y, *et al.* Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2007, **48**(7): 958–970.
- [78] MANO H, OGASAWARA F, SATO K, *et al.* Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweetpotato[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**(3): 1 252–1 268.

- [79] PALAPOL Y, KETSA S, LIN-WANG K, *et al.* A MYB transcription factor regulates anthocyanin biosynthesis in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening[J]. *Planta*, 2009, **229**(6): 1 323—1 334.
- [80] YANG P CH(杨鹏程), ZHOU B(周波), LI Y H(李玉花). The bHLH transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis in plants[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学报), 2012, **48**(8): 747—758(in Chinese).
- [81] LUDWIG S R, WESSLER S R. Maize R gene family: Tissue-specific helix-loop-helix proteins[J]. *Cell*, 1990, **62**(5): 849—851.
- [82] HERNANDEZ J M, HEINE G F, IRANI N G, *et al.* Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3-MYB transcription factor C1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(46): 48 205—48 213
- [83] FELLER A C. Role of the maize transcription factor R in the regulation of anthocyanin biosynthesis[D]. Columbus: The Ohio State University, 2010.
- [84] ZIMMERMANN I M, HEIM M A, WEISSHAAR B, *et al.* Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins[J]. *The Plant Journal*, 2004, **40**(1): 22—34.
- [85] BAUDRY A, HEIM M A, DUBREUCQ B, *et al.* TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2004, **39**(3): 366—380.
- [86] QUATTROCCHIO F, WING J F, VA K, *et al.* Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes[J]. *The Plant Journal*, 1998, **13**(4): 475—488.
- [87] QUATTROCCHIO F, WING J F, LEPPEN H T C, *et al.* Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes[J]. *The Plant Cell*, 1993, **5**(11): 1 497—1 512.
- [88] SOLANO R, NIETO C, AVILA J, *et al.* Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB. Ph3) from *Petunia hybrida*[J]. *The EMBO Journal*, 1995, **14**(8): 1 773—1 784.
- [89] ALBERT N W, LEWIS D H, *et al.* Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning[J]. *The Plant Journal*, 2011, **65**(5): 771—784.
- [90] HICHLI L, HEPPEL S C, PILLET J, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine[J]. *Molecular Plant*, 2010, **3**(3): 509—523.
- [91] ESLEY R V, HELLENS R P, PUTTERILL J, *et al.* Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10[J]. *The Plant Journal*, 2007, **49**(3): 414—427.
- [92] NEER E J, SCHMIDT C J, NAMBU DRIPAD R, *et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins[J]. *Nature*, 1994, **371**(6 495): 297—300.
- [93] SMITH T F, GAITATZES C, SAXENA K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, **24**(5): 181—185.
- [94] DE VETTEN N, QUATTROCCHIO F, MOL J, *et al.* The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals[J]. *Genes & Development*, 1997, **11**(11): 1 422—1 434.
- [95] RAMSAY N A, GLOVER B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, **10**(2): 63—70.
- [96] ZHANG F, GONZALEZ A, ZHAO M, *et al.* A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2003, **130**(20): 4 859—4 869.
- [97] RAMSAY N A, GLOVER B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, **10**(2): 63—70.
- [98] NESI N, JOND C, DEBEAUJON I, *et al.* The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed[J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(9): 2 099—2 114.
- [99] SELINGER D A, CHANDLER V L. A mutation in the *pale aleurone color1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway[J]. *The Plant Cell*, 1999, **11**(1): 5—14.
- [100] CAREY C C, STRAHLE J T, SELINGER D A, *et al.* Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2004, **16**(2): 450—464.
- [101] YAMAZAKI M, MAKITA Y, SPRINGOB K, *et al.* Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **14**(3): 191—197.
- [102] STACEY M G, HICKS S N, VON ARNIM A G. Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1[J]. *The Plant Cell*, 1999, **11**(3): 349—363.
- [103] MIN Y Q(闵远琴), YAN H F(闫海芳), LI Y H(李玉花). WD40 proteins of anthocyanin biosynthesis in plant[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2010, **46**(9): 863—870(in Chinese).
- [104] VAN NOCKER S, LUDWIG P. The WD-repeat proteins superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function[J]. *BMC Genomics*, 2003, **4**(1): 50.
- [105] BERNHARDT C, LEE M M, GONZALEZ A, *et al.* The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root[J]. *Development*, 2003, **130**(26): 6 431—6 439.
- [106] PAYNE C T, ZHANG F, LLOYD A M. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*[J]. *Genetics*, 2000, **156**(3): 1 349—1 362.