

可视安全标记花青素合成途径相关基因在植物转化研究中的应用进展

杜建中, 赵欣梅, 王长彪, 郝曜山, 王亦学, 张欢欢, 孙毅*

山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031

摘要:近年来有关转基因产品可能带来的环境和食品安全问题的争论多集中在作为标记基因的抗生素抗性基因以及抗除草剂基因的广泛使用。因此寻找安全、有效的标记基因替代上述有争议标记基因就显得十分必要和紧迫。花青素合成酶类及其合成调控因子可以控制植物体内的色素合成,一些转化研究已证明其转化体表型发生了颜色改变。加之花青素类物质是一些天然色素,对人类有利而无害,可以利用花青素的这些特点,将花青素合成酶类及其调控因子基因作为一类可视化、安全和有效的标记基因来转化植物。本文就可视安全标记花青素合成酶类基因及其调控基因在植物转化研究中的应用进展进行了简要介绍,以期为提高标记基因的安全性提供参考。

关键词: 可视基因;花青素;植物转化;表型变化

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2014.04.02

Advances on Visible and Bio-safe Selectable Marker Genes for Plant Transformation: the Genes for Anthocyanin Biosynthesis

DU Jian-zhong, ZHAO Xin-mei, WANG Chang-biao, HAO Yao-shan, WANG Yi-xue, ZHANG Huan-huan, SUN Yi*

The Biotechnology Researcher Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

Abstract:Controversy on environment and food safety of transgenic products mainly focused on its containing antibiotics and herbicides-tolerant genes as selectable marker genes in recent years. Therefore, it is necessary and urgent to find safer and more efficient marker genes as alternatives. Some pigments, such as anthocyanin, synthesis in plants are controlled by anthocyanin synthesis enzymes and transcriptional regulatory factors. Some studies have demonstrated that visible color changes occurred in transformed phenotype by introducing these genes into plants. In addition, the products or intermediate products in anthocyanin biosynthesis pathway are all natural pigments which are beneficial to human health. Therefore, the genes or transcriptional regulatory factors responsible for anthocyanin biosynthesis could be used as selectable marker gene in plant transformation. In this paper, we gave a brief introduction of the research progress on plant transformation with visible marker genes, which was expected to provide a reference for selectable marker safety.

Key words: visible marker; anthocyanidin; plant transformation; phenotypic modulation

自 20 世纪 80 年代植物基因工程诞生以来,人们一直将标记基因与目的基因共同导入转化细胞或植株,其中标记基因(marker gene)在植物的遗传转化过程中的作用是区分转化和非转化细胞(植株),一旦转基因植株再生成功,标记基因便失去作用^[1]。目前使用较为广泛的标记基因有

两类:除草剂抗性基因和抗生素抗性基因。随着转基因作物的商品化以及种植面积的逐年扩大,人们担心转基因农作物中的除草剂抗性基因可能会随花粉漂移而传递至杂草,从而使这些杂草对除草剂产生抗性,产生所谓的“超级杂草”而难以清除;另外转基因食品中的抗生素抗性基因可能

收稿日期:2014-07-02; 接受日期:2014-07-09

基金项目:国家自然科学基金(31240081);山西省攻关项目(20110311009)资助。

作者简介:杜建中,副研究员,硕士,主要从事植物基因工程研究。E-mail:dujianzhong1960@163.com。*通信作者:孙毅,研究员,博士生导师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:sunyi692003@163.com

通过转染肠道细菌从而造成人体内的病菌对这些抗生素产生耐药性,而产生出一些难以控制的超级细菌^[2]。目前还没有确凿可信的证据证明这些担忧是多余的,但抗性标记基因(resistant marker gene)潜在的生态环境和食用安全性的争议却越来越多。因此,从科学的态度出发,寻找适用于植物转化的安全标记基因无疑会是解决这一问题的最佳途径。

目前所发现的安全标记基因有以下几类:①代谢产物选择标记,如 6-磷酸甘露糖异构酶(PMI)基因^[3~7]、花青素合成酶(ANS)基因^[8,9]、木糖异构酶基因(*xyIA*)^[10~13]等;②耐胁迫基因,如山菠菜胆碱单氧化物酶(CMO)基因^[14~16]、甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因^[17~22];③代谢产物合成途径中调控因子基因,如玉米花青素合成途径中的 *r/b* 调控基因家族和 *c1/p1* 调控基因家族^[23,24];④绿色荧光蛋白(GFP)基因^[25~30]等。这些较安全的标记基因中,花青素合成酶类基因由于可以产生可视的转化体表型变化,因而作为标记用于筛选转化体具有其他安全标记基因所不具备的优势。

花青素是一类在植物体内合成的水溶性天然色素,属类黄酮化合物,很少以游离状态存在,通常是与一个或多个单糖或多糖结合形成花色苷,其群体较大,大约有 250 多种^[31~34],而且这些花青素类物质的颜色还会随所处环境 pH 的变化而变化, pH < 7 呈红色, pH 在 7~8 时呈紫色, pH > 11 时呈蓝色^[31],郑智^[35]还发现,木芙蓉在离体培养条件下,温度、光照和金属离子对植株的着色有显著影响。结构基因或调控基因对花青素的合成起调节作用,这些基因表达水平的变化决定了花青素在植物细胞内积累量的改变,从而使植物表型产生不同的色彩变化^[36]。这种颜色变化很容易用肉眼分辨,有利于作为对转化体选择的依据,因此控制花青素合成的酶类和调控因子基因可作为报告基因用于转基因植物研究^[37]。目前用于此类转化研究所涉及的植物包括小麦、烟草、水稻、马铃薯、草莓和花卉等。有关花青素相关基因的研究,包括研究花青素合成的结构基因和调控基因的作用、转化体表型的变化、花青素生物合成途径中各种酶的活性以及这些基因作为标记基因转化植物的可行性等,均涉及到根据转化体颜色变化来筛选得到转化体,因而这些研究进

展从不同角度为可视安全标记花青素合成酶类基因及调控基因在植物转化研究中的应用提供了依据。

1 与花青素合成酶类有关的转化研究

1.1 查尔酮合成酶

花青素生物合成代谢过程十分复杂,仅参与合成的主要催化酶类就有多个,其中查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)是植物花青素合成途径中类黄酮物质合成的第一个酶。据统计,国内外科学家已经从不同植物中克隆得到一百多个 CHS 基因的序列^[38~40]。许多研究证明查尔酮合成酶基因的表达对紫外光照射、真菌侵染等外界刺激敏感,而且具有花特异性部位表达的特性,其表达量的高低可引起植物花色的深浅变化^[41~43]。因此查尔酮合成酶合成产物颜色的变化能作为可视化标记基因来研究植物的遗传转化。

在转化研究方面, Jez 等^[39]将用紫外照射的来自欧芹(*Petroselinum hortense*)的细胞悬浮培养物的 DNA 片段(与 CHS mRNA 互补)插入质粒 pBR322,并用于转化大肠杆菌菌株 RR1,发现在照射的细胞中, CHS mRNA 含量发生剧烈变化。Elomaa 等^[44]将含有编码非洲菊 CHS 的全长反义 cDNA 连接到卸甲农杆菌,再将非洲菊叶柄切片与上述农杆菌共培养,发现在启动子 CaMV 35S 驱动下,反义 cDNA 抑制了转化体中花青素苷的合成,一些转化体的花色发生了显著变化。由于花青素衍生物的积累,百合科油点草属观赏植物的花被上有许多微红色斑点, Kamiishi 等^[45]从这类植物的花被中分离到 CHS 的全长 cDNA 克隆,并定名为 *TrCHS1*,接着他将以 *TrCHS1* 为靶标的一个 RNA 干扰子载体采用农杆菌介导法转化到油点草植株中,旨在使油点草的花色发生变化。研究结果发现,转化体依据花被颜色可分成 3 类,第一类,花被的微红斑点数与非转化植株相同;第二类,微红斑点数比非转化植株少;第三类,花被完全呈白色,没有斑点出现。

1.2 查尔酮异构酶

查尔酮异构酶(CHI, chalcone isomerase)是花青素合成途径中的另一个关键酶,产物为二羟基黄烷酮。Mehdy 等^[46]用真菌诱导子处理菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)的细胞培养物,并提取其

mRNA 构建了 11 个基因文库,用菜豆 CHI 基因产物的抗血清筛选到两个阳性克隆,这是最早利用抗体技术从法国菜豆中分离到的 CHI 基因。之后, vanTunen 等^[47]在矮牵牛中发现存在两个 CHI 基因,基因 A 和基因 B,并证明基因 A 在花冠和成熟的雄蕊中都可表达,而基因 B 仅在未成熟的花药中表达,属于位点特异表达差异。2003 年, Norimoto 等^[48]根据酶功能将植物 CHI 蛋白基因家族分成两大类,一类酶只能将查尔酮异构化为 (2S)-黄烷酮,另一类酶可将查尔酮或 6'-脱氧查尔酮都异构化为 (2S)-5-脱氧黄烷酮。

将 CHI 基因作为标记基因的转化研究方面, Muir 等^[49]用来自牵牛花的 CHI 基因构建了 pBBC50 和 pSJ89 两个质粒转农杆菌菌株 LBA4404,转化番茄 (var. FM6203),经分子检测得到转化植株,对后代植株的研究中发现转基因番茄株系的果皮中黄酮醇比对照增加 78 倍,转基因植株与对照植株的表型间没有明显差异。Nishihara 等^[50]从烟草中分离到编码 CHI 基因的 cDNA,根据序列分析,将可干扰其转录或表达的 RNA 干扰子用农杆菌介导法转入烟草植株,研究发现,转化植株的花瓣中色素沉积减少,黄酮醇类的组分也发生了变化,花粉中积累大量查尔酮,呈黄色,证实通过遗传转化方法抑制 CHI 基因可产生明显的表型差异。Li 等^[51]从风毛菊属植物的细胞培养物中分离到 CHI 基因,并转化烟草植株,采用正反双向 35S 启动子调控对 CHI 基因进行调控,引入正向 35S 启动子的转化植株中黄酮类物质积累是对照植株的 5 倍,主要是由于芸香苷的积累。而由于反向启动子抑制了内源 CHI 基因的表达,引入反向 35S 启动子的转化植株中只积累少量的黄酮类物质。Zhou 等^[52]从牡丹花中分离到 CHI 基因并转化烟草植株,获得了 T₁ 转基因植株,表型和色素分子检测证明,转化植株体内黄酮醇和黄酮的积累量是对照植株的 3 倍,花青素苷和花的颜色强度均有显著减少。

1.3 黄烷酮 3-羟化酶

黄烷酮 3-羟化酶 (F3H, flavanone 3-hydroxylase) 催化黄烷酮脱羟基生成黄酮醇。Martin 等^[53]最早从金鱼草中分离到这个酶,在大豆、玉米、茄子、苜蓿、苹果、康乃馨等不同植物中,黄烷酮 3-羟化酶多以单拷贝形式存在^[54]。

Amir 等^[55]研究发现,康乃馨品种 (Eilat) 由于缺少黄烷酮 3-羟化酶和类黄酮-3',5'-羟化酶,致使花卉只有橙色表型。它们将 F3H 的反义 cDNA 导入康乃馨品种 Eilat,试图阻止编码 F3H 的基因的表达,在转化体中发现,一些花朵原有的橙色或微红色变淡,一些花朵失去原有颜色,只有一些色素痕迹存在,转化体比对照香味更浓。Takashi 等^[56]利用两个不同的异源表达系统,酿酒酵母的微粒体部分和转基因烟草植株,研究从龙胆植物花瓣中分离的 F3H 和黄酮合成酶 II (GtFS II) 的酶活性。在酵母中表达的重组体 GtF3'H 对几个黄酮类底物在 3' 位置显示羟基化活性,而表达 GtF3'H 的转基因烟草植株中花青素浓度略有增加,花的颜色也加深;酵母中, GtFS II 重组体能够从黄烷酮合成黄酮,而在转基因烟草植株中,花色素苷和花的颜色明显减少。Jiang 等^[57]构建了一个可编码一个发夹 F3H RNA 的 RNAi 基因沉默载体,将携带 F3H RNAi 载体的农杆菌菌株 GV3101 注射到已开花授粉仍在植株上的草莓里,注射 10 d 后观察草莓的表型,同时进行 RT-PCR 和 Northern 杂交分析,结果证明,同未注射的对照相比,转化果中 F3H 减少了 70%, HPLC-MS 分析证明,果中花青素含量剧烈减少,黄酮类物质也减少了。

1.4 二氢黄酮醇 4-还原酶

二氢黄酮醇 4-还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 在花青素合成途径中催化二氢黄酮醇类底物发生还原反应,生成无色的原花色素。Heller 等^[58]研究发现 DFR 基因在植物中多以单拷贝形式存在,而 Shimada 等^[59]证明在有些植物中存在多个拷贝的 DFR 基因,不同拷贝间表现出各自的组织特异性表达特征。例如在百脉根植物中,DFR1 在结节、根、茎、叶、花和豆荚中都可表达,而 DFR2 在除了叶以外的其他组织中表达,DFR4 和 DFR5 在除了结节以外的其他组织中能表达,但是 DFR3 只在茎和叶中表达。

Rosati 等^[60]采用农杆菌介导法将来自金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的 DFR 基因和紫罗兰 (*Matthiola incana*) 的花青素合成酶基因 (*MIANS*) 顺序转化到连翘 (*Forsythia intermedia* cv 'Spring Glory') 植株中,两个基因共转化的植株的花瓣呈现一种古铜色+橙色的新颜色,这是因为花青素衍生物-花青素苷在野生的胡萝卜素黄色的背景

基础上重新积累的结果。单个基因转化的个体中花瓣的颜色没有改变,证明连翘花瓣中花青素苷合成的后面几个步骤是受多级控制的。Mori等^[61]认为,DFR是蓝色或紫色花色表达的关键酶,他们从蔓长春花的花瓣中克隆得到DFR基因的全长cDNA,并定名为*VmFHI*,当将其转化到矮牵牛花植株中时,一些转化体的花色发生了显著变化,花色由红色变成含深紫色部分的深红色,这是因为转基因植株的花瓣中积累了3',5'-羟基花青素苷的缘故,证明蔓长春花的DFR在其他植物中仍具有活性。

1.5 花青素合成酶

花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)因其可催化原花色素底物产生氧化反应而生成花青素苷,故又称作无色花色素双加氧酶,是花青素合成途径中的关键酶之一。^[62~64] Menssen等^[65]最初是从玉米的一个突变体A2中克隆到花青素合成酶的。截至目前所得到的ANS基因序列大多数包含有1个内含子和2个外显子。

此外,ANS基因在植物体内的表达具有组织特异性,Rosati等^[66]研究证明,金钟连翘中的花青素合成酶只在金钟连翘的萼片中表达,而在花药花瓣中却没有ANS的表达。Noriko等^[67]采用RNAi技术,将RNA片段导入夏堇植物体,以抑制夏堇体内ANS的表达,结果发现,转基因植株由于缺少花青素合成,其花色整体由蓝紫色变成了白色。Reddy等^[68]克隆得到一个水稻ANS cDNA,并用于转化一种水稻突变体植株,这种突变体只在其果皮中积累原花青素,但所有组织中都没有花青素苷的存在。转基因突变体植株中类黄酮和花青素苷积累增加,而原花青素相应减少,种皮呈现出紫红色。祝钦龙^[69]克隆到彩叶草花色素合成酶基因家族(*SsANS*)并用于转化烟草W38植株,发现该基因在花中表达最强,在叶片中的表达较弱,在茎和根中不表达。导入外源基因使烟草植株的花色和叶色都发生了不同的变化。

2 与花青素合成途径有关的调控因子的转化研究

随着社会发展,人们对日常生活环境美化的要求不断提高,特别是对花卉植物鉴赏能力的变

化促使花卉市场的扩大和花卉植物研究的日益深入,加之对花青素次生代谢产物在人类健康方面有益影响的进一步了解,一些与花青素的代谢合成途径及其相关的基因调控的研究越来越引起科学界的兴趣^[70]。许志茹等^[71]在总结前人的研究时,将已知的花青素合成调控因子分成三类:bHLH、MYB和WD40。夏玉凤等^[72]研究认为,大多数物种中,其花青素的合成都是由上述三类转录因子的复合体调控的,但也有个别植物其花青素合成仅需要一个调控因子就能激活,如在玉米中,鞣红的生物合成只要调控因子MYBP1存在就能被激活。

2.1 调控因子共转化

所有已知的花青素合成调节因子中,以对玉米(*Zea mays* L.)花青素苷合成调节基因的研究相对较为详细。在玉米中,根据编码花色素苷基因的转录因子的不同,可将玉米中这类调节基因分为*r/b*基因家族和*cl/pl*基因家族^[73]。Maize等^[74]研究证明,*r/b*基因家族编码的是bHLH类转录因子,组成庞大,成员众多,包含有*R-sc*、*Lc*、*Sn*和*B*等100多个基因。而编码MYB类转录因子的*cl/pl*基因家族只包含包括*Cl*和*Pl*两个基因。如上所述,这两个基因家族的基因都不能单独地行使调节功能,通常是几个基因结合在一起共同作用来调控花青素的生物合成^[75]。Doshi等^[76]将玉米花青素调控基因*Cl*和*B-Peru*基因同时导入大麦植株,并在大麦的不同组织特异性启动子驱动下来研究大麦体内花青素的合成,试图通过大麦幼胚等器官或组织的颜色变化来判断这些启动子的组织特异性表达和驱动能力。Doshi等^[77]进一步采用基因枪法将花青素苷合成调控基因*Cl*和*B-Peru*导入小麦和黑小麦植株中,两个基因受胚特异性表达启动子*Ltp1*的控制,在没有选择压时获得了转基因植株,小麦和黑小麦中可选择标记基因的转化率分别为0.93%和1.55%。但只在3个转基因小麦株系和1个转基因黑小麦株系的T₁代成熟种子中观察到有花青素苷沉积的胚,可能的原因是多位点插入或转基因重组影响了花青素苷合成基因的表达。*Cl*和*B-Peru*基因可以作为小麦和黑小麦的可视化标记。在研究调节因子的协同作用方面,Han等^[23]利用玉米花青素合成的调控基因*Pl*和*Lc*分别或共同转化匍匐剪股颖植物时发现,分别转化时,两

个基因单独调控花青素的合成,所以转基因植株上出现紫色的位置不确定,色强也有差异;若用两个因子共同转化时,转基因植株全身都呈现出紫色。

2.2 花青素合成基因表达的组织特异性调控

van de Meer 等^[78]为了研究涉及参与指导花特异性和可紫外诱导表达的查尔酮合成酶的 5'侧链调节区的调节序列,构建了一个嵌合基因,包含来自矮牵牛(*Petunia hybrida*)的 *chs* A 启动子(V30)、作为报告基因的氯霉素乙酰转移酶结构基因序列(*cat*)以及来自矮牵牛花的 *chs* A 终止子区(V30)。将这个嵌合基因和启动子 5'末端缺失的嵌合基因构建到带有 Ti 质粒的载体上,并用于转化矮牵牛植株,随后测定 CAT 活性。结果表明含有顺式作用元素的长 220 bp 的 *chs* A 启动子片段的导入,赋予转基因植株花特异性和可紫外诱导的表达;当启动子为-67~+1 的片段时,转基因矮牵牛花仍能特异性表达,但可紫外诱导部分不表达。与其他植物品种的 *chs* 基因的启动子序列进行比较,结合缺失分析和凝胶阻滞鉴定的结果,强烈证明矮牵牛中 TACP_yAT 重复(-59 和-52)参与了 *chs* A 基因的器官特异性表达的调节。杨翅春等^[79]将油菜的花瓣特异性启动子 XY355 与玉米花青素调节基因 *Lc* 共同构建的植物表达载体 pXY60,以根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法分别转化烟草(*Nicotiana tabacum*)和矮牵牛植株,观察转基因植株后代的花色发现,与非转化植株的花色比较,转基因植株花色都有所加深,转基因烟草的花色由淡红色变成了红色,转基因矮牵牛的花色由白色变化为浅紫色。赵欣梅等^[80]利用花青素合成调控因子 *CI/B-Peru* 构建了两个植物转化载体,一个载体中调控因子受胚特异性启动子控制,另一个载体中调控因子受到 CaMV35S 启动子控制。分别转化玉米幼胚,证明两个载体都能在玉米幼胚细胞中瞬时表达。黄艳岚等^[81]克隆到马铃薯花青素转录激活基因(*stmyc*),并证明该基因在马铃薯中呈组成型表达。Kortstee 等^[82]研究发现来自苹果的一个转录因子基因 MYB10 的突变体等位基因可以诱导植株全身的花青素苷合成,将该基因(包括其上游的启动子、基因编码区和终止子序列)导入苹果、草莓和马铃薯植株,检测其是否能够用作一个可视的选择标记基因以替代化学合成的标记基因,

如卡那霉素抗性标记基因。转化后,他们标记红色愈伤、红色嫩枝和红色的生长良好的植株,从苹果外植体上取样绿色和红色的枝条,用 PCR 法检测 MYB10 基因的存在。结果证明苹果外植体的红色枝条总是含有 MYB10 基因,但含有 MYB10 基因的枝条不都是红色的。转化的草莓植株显示在叶片和根部有花青素苷的积累,但在马铃薯中没有观察到花青素苷的积累,即使它带有 MYB10 基因也是如此。不过马铃薯的叶片和根部含有比对照高 4 倍的花青素苷,因此 MYB10 基因可以在苹果、草莓和马铃薯中用作选择标记基因来替代卡那霉素抗性标记基因。

2.3 色素含量和植株表型的调控

Pandey 等^[83]开发了一种转化烟草植株愈伤培养方法以表达黄酮醇特异性转录因子 *AtMYB12*,目标是得到一个可用的芸香苷资源。转基因愈伤表现为提高了生物合成途径中相关基因的表达,导致黄酮醇的积累增加,尤其是芸香苷。在愈伤生长的每一个点,转基因愈伤中芸香苷含量都比野生型对照高几倍。Butelli 等^[84]以 *Delila* 和 *Roseal* 基因为供体,转化番茄植株,得到了转化植株,转化体中两个调节基因在果实特异 *E8* 启动子驱动下,花青素合成水平提高,使番茄果实的颜色加深,成为紫色果实。Lloyd 等^[85]用玉米的花青素合成调节基因 *Lc* 来转化烟草,发现转基因烟草植株的花色发生了变化,由最初的淡红色变成转化后的深红色。与此相反,Kim 等^[86]将来自玉米的调节基因 *CI* 用于转化烟草,证明转化植株的形态表型不仅发生了变化,而且转化体的花瓣颜色变得更淡了。早在 1990 年,Napoli 等^[87]报道在将查尔酮合成酶基因导入紫色矮牵牛中,转化后代中约有 42% 的转化植株的花色是白色,或是紫白嵌合花色,与 Kim 等的研究结果接近。Napoli 等还认为发生这种现象的可能原因是导入外源 CHS 基因后,牵牛花植株内源 CHS 基因的表达受到了抑制,并将这种由于外源基因转入而导致内源同源基因以及外源基因共同受到抑制的现象称为共抑制。Shimada 等^[88]利用 Hf1 和 Hf2 调控因子基因转化矮牵牛,原本粉红色的牵牛花的转化植株中出现了紫、粉红色的嵌合花色;Liu 等^[89]将来自拟南芥的转座子 Tag1 序列插入到启动子 CaMV 35S 和玉米调节基因 R 中间,并用于转化烟草植株,发现转化体中出现多种嵌

合花色,但都未说明出现这种现象的原因。

2.4 与其他性状基因连锁转化

Liu 等^[90]认为,将可视标记基因与有关性状连锁,就能够明确分辨出含有这个性状的转基因种子,遗传修饰材料很容易与非转基因材料区分开来。来自玉米的调控花青素苷生物合成途径的基因负责指导紫色色素合成,能用于产生具有独特的、易于识别表型的转基因植株。因此用一个种子特异性玉米球蛋白启动子来驱动两个转录因子基因(*Bp* 和 *Cl*)的表达,这两个因子在胚和糊粉层组织中调节花青素苷生物合成途径,使玉米种子具有明显的紫色色素沉积。将这两个基因与除草剂抗性标记基因一起构建载体并转化玉米植株,结果证明体细胞胚得到了色素沉积,再生的转基因植株带有色素沉积种子,而且整合的 DNA 与除草剂抗性发生共分离,说明这两个调节因子基因可用作玉米转化的标记基因。宫硇等^[24]以含有报告基因 *Bi* 和 *Cl* 以及筛选标记基因 *epsp* 的植物表达载体 pBAC9009 为供体,以玉米自交系 501 的幼胚为受体,用基因枪法进行转化,幼胚分化再生植株经草甘膦抗性筛选,获得了 75 株抗性植株,其中 43 株结实获得种子, T_0 代植株有 18 株在苗期或生长阶段表现局部或全紫色,8 个结实果穗有零星的紫色种子,从外观上可直接确认为转化植株。PCR 和 RT-PCR 的分子检测及花青素含量分析表明,叶片和籽粒为紫色的玉米植株中外源目的基因已整合并且高效表达,即紫色表型与分子检测的结果高度一致。巴超杰等^[91]以草甘膦抗性基因 *epsps* 为标记基因,在原核 *Kan^r* 基因两侧引入 *Cre*(环化重组酶)基因识别的 *Lox-P* 位点,同时以编码花青素合成转录因子的 *Bi* 和 *Cl* 基因为可视化选择报告基因,构建了 Bt 杀虫蛋白基因 *CryIAb/c* 的可视化跟踪表达载体 pBAC9017。用 PDS1000/He 基因枪转化玉米(*Zea mays*)自交系 501 的幼胚和胚性愈伤组织,获得 147 个草甘膦抗性的玉米再生植株。Qiu 等^[92]为了增加产橡胶蒲公英植株的价值,通过让来自拟南芥植物的转录因子调控花青素苷色素 1(*AtPAP1*)的异源表达来开发生产橡胶蒲公英品种的红色/紫色植株。转基因植株的营养组织中总的花青素苷含量比对照平均高 48 倍,但色素沉淀是一个例外,转基因植株的表型与对照不相上下,生长活力也差不多。在 5 个转基因系中,*AtPAP1* 基因的表达水

平与总花青素苷含量高度相关,而此时天然橡胶仍正常存在,转基因并未影响天然橡胶的生产。

3 讨论

花青素的生物合成在自然界有着丰富的功能,其中重要的一点是构成多彩的花色,虫媒植物依赖其自身的花色吸引昆虫为其传花授粉。此外,花青素合成的各级产物对人类来说,不仅是无毒无害,而且还具有许多重要的生理功能。Halliwell^[93]认为花色苷具有清除氧自由基的作用,因此在一些疾病的预防方面具有重要功能^[94~96]。用花青素合成酶类基因或调控因子基因作为标记基因进行植物转基因研究,能够减少人们对使用抗生素抗性基因或抗除草剂基因作为标记基因所产生的担忧。大量的研究结果证明,植物导入花青素合成酶或合成调节因子可引起转化体着色发生改变,从而使人们无需借助任何设备就很容易方便地区分转化体和非转化体,因此花青素合成途径中的结构基因或调节基因用于转化植物具有如下优势:①无毒无害且有利于人类健康,属安全标记基因;②可以直观地从转化群体中通过转化体颜色的改变筛选到转化事件,从而使繁琐重复的转基因个体筛选工作变得方便快捷,大大缩减传统筛选方法所需的人力和物力,同时有效降低检测成本^[97]。此外,一些研究还表明,调节色素类基因的表达,积累的色素不仅使转基因植株生产产品附加值增加^[92],还能起到防治植物病虫害的效果,Pandey 等^[83]发现 *AtMYB12* 转基因植株积累增加的芸香苷,对斜纹夜蛾和棉铃虫幼虫来说是致死的或抑制其生长,用该转录因子转化植株,生成的芸香苷可防治虫害。

虽然用花青素合成酶类转化植物安全、省力,但也有其不足之处,如,花青素合成酶类或控制花青素合成基因的启动子大多是组织或器官特异性的,因此其转化载体的构建需要针对转化研究的目的做合理调配,即花卉植物多选用花特异性启动子调控,大作物多选用种子或果实特异性转录的启动子。若选用 35S 启动子,转化体的表型将发生巨大变化,如绿色植物体可能会变成紫色、深红色、甚至是黄色或无色,其结果是转化体无法正常进行光合作用;在作物上,若选用种子特异性启动子调控,会使得对转化体的筛选延迟到成熟期

或收获期,无法早期做出合理判断,这将无形中延长研究周期等。然而,这些缺点可以通过精确的实验设计加以弥补。综合考虑其利弊,以花青素基因作为报告基因的应用可以大大提高工作效率,节约检测成本,对于植物转基因研究具有重要意义。因此用花青素合成酶类基因转化植物是一种可视、安全和有效的标记基因,其应用前景十分广阔。

参 考 文 献

- [1] Puchta H. Removing selectable marker genes; taking the shortcut[J]. Trends Plant Sci., 2000, 5 (7):273-274.
- [2] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between *attP* regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. Nat. Biotechnol., 2000, 18 (4):442-445.
- [3] Negrotto D, Jolley M, Beer S, et al.. The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation[J]. Plant Cell Rep., 2000, 19(8):798-803.
- [4] Wright M, Dawson J, Dunder E, et al.. Efficient blotistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat using the phosphomannose isomerase gene, *pmi* as the selectable marker[J]. Plant Cell Rep., 2001, 20(5):429-436.
- [5] Todd R, Tague B W. Phosphomannose isomerase; a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation[J]. Plant Mol. Biol. Rep., 2001, 19(4):307-319.
- [6] 张启军,尹福强,王世全,等. 农杆菌介导 *gna* 基因对水稻的转化[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6):40-44.
- [7] 王彩芬,付永彩,朱作峰,等. 水稻遗传转化甘露糖安全筛选体系的建立[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2):41-45.
- [8] Kim S H, Lee J R, Kim S R. Characterization of an apple anthocyanidin synthase gene in transgenic tobacco plants[J]. J. Plant Biol., 2006, 49(4):326-330.
- [9] 邵莉,李毅,杨美珠,等. 查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J]. 植物学报, 1996, 38(7):517-524.
- [10] Haldrup A, Petersen S G, Okkels F T. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent[J]. Plant Mol. Biol., 1998, 37(2):287-296.
- [11] Haldrup A, Petterson S G, Okkels F T. Positive selection; a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry [J]. Plant Cell Rep., 1998, 18(1-2):76-81.
- [12] 阎淑滑,周波,赵霞,等. 以木糖异构酶基因 *xyIA* 为选择标记的 Gateway 系统植物表达载体的构建[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(1):35-38.
- [13] 丁霄,隋炯明,王晶珊,等. 以木糖异构酶基因作为选择标记的花生遗传转化[J]. 核农学报, 2012, 26(3):444-448.
- [14] 徐冰,韩烈保,姚娜,等. 草地早熟禾转 CMO-BADH 双基因和转 CMO 基因耐盐性分析[J]. 草地学报, 2008, 16(4):353-358.
- [15] 信金娜,韩烈保,刘君,等. 基因枪转化法获得草地早熟禾(*Poa pratensis* L1)转基因植株[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8):10-14.
- [16] 张守攻,韩素英,汪泉,等. 小叶杨胆碱单氧化物酶(CMO)基因的克隆与转化杂种落叶松及表达[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4):483-488.
- [17] Kishitani S, Takanami T, Suzuki M, et al.. Compatability of glycinebetaine in rice plants; evalutat ion using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley[J]. Plant Cell Eviron., 2000, 23 (1):107-114.
- [18] Ishitani M, Nakamura M, Han S Y, et al.. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in responses to osmotic stress[J]. Plant Mol. Biol., 1995, 27(2):307-315.
- [19] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, et al.. Expression of a Betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes[J]. Plant J., 1997, 11(5):1115-1120.
- [20] Hibino T, Meng Y L, Kawamitsu Y, et al.. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina*(Forsk.) Vierh [J]. Plant Mol. Biol., 2001, 45(3):353-363.
- [21] 杨晓玲,东方阳,孙耀中,等. 转 *BADH* 基因水稻幼苗抗盐性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8):1627-1632.
- [22] 陈传芳,李义文,陈豫,等. 通过农杆菌介导法获得耐盐转甜菜碱醛脱氢酶基因白三叶草[J]. 遗传学报, 2004, 31(1):97-101.
- [23] Han Y J, Kim Y M, Lee J Y, et al.. Production of purple-colored creeping bentgrass using maize transcription factor genes *Pl* and *Lc* through *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Plant Cell Rep., 2009, 28(3):397-406.
- [24] 宫碭,杨凤萍,薛静,等. 花青素合成转录因子基因在玉米中的表达研究:一种新型基因可视化跟踪表达系统[J]. 科学通报, 2012, 57(24):2285-2291.
- [25] Kim C K, Chung J D, Park S H, et al.. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult., 2004, 78(2):107-111.
- [26] Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, et al.. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids[J]. Transgenic Res., 2006, 15(2):205-217.
- [27] Nguyen T T, Nugent G, Cardi T, et al.. Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Plant Sci., 2005, 168 (6):1495-1500.
- [28] Malig A P. Engineering the plastid genome of higher plants [J]. Curr. Opin. Plant Biol., 2002, 5(2):164-172.
- [29] 杜丽,曾晓慧,周索,等. 基因转化香樟胚性愈伤组织的研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3):465-469.
- [30] 杨正安,丁玉梅,许彬,等. GFP 基因甘蓝质体表达载体构建及原核表达分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1):12-17.
- [31] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. Plant Sci., 2011, 181(3):219-229.
- [32] 赵宇瑛,张汉锋. 花青素的研究现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5):904-905, 907.
- [33] 侯夫云,王庆美,李爱贤,等. 植物花青素合成酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21):188-190.

- [34] 宫 硖, 薛 静, 张晓东. 植物花青素合成途径中的调控基因研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(6):381-390.
- [35] 郑 智. 木芙蓉花色形成的表型研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 硕士学位论文, 2009.
- [36] Zhang B, Hu Z L, Zhang Y J, *et al.*. A putative functional MYB transcription factor induced by low temperature regulates anthocyanin biosynthesis in purple kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*) [J]. Plant Cell Rep., 2012, 31(2): 281-289.
- [37] 赵昶灵, 郭维明, 陈俊愉. 植物花色呈现的生物化学、分子生物学机制及其基因工程改良[J]. 西北植物学报, 2003, 23(6):1024-1035.
- [38] Ferrer J L, Jez J M, Bowman M E, *et al.*. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis[J]. Nat. Struct. Biol., 1999, 6(8):775-784.
- [39] Jez J M, Noel J P. Mechanism of chalcone synthase. pK_a of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase [J]. J. Biol. Chem., 2000, 275(50):39640-39646.
- [40] 王 燕, 许 峰, 程水源. 植物查尔酮合成酶分子生物学研究进展[J]. 河南农业科学, 2007, (8):5-9.
- [41] Kreuzaler F, Ragg H, Fautz E, *et al.*. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80(9):2591-2593.
- [42] Lamb C J, Lawton M A, Dron M, *et al.*. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack[J]. Cell, 1989, 56(2):215-224.
- [43] Morita Y, Saito R, Ban Y, *et al.*. Tandemly arranged chalcone synthase genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida* [J]. Plant J., 2012, 70(5):739-749.
- [44] Elomaa P, Honkanen J, Puska R, *et al.*. *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation [J]. Nat. Biotechnol., 1993, 11(4):508-511.
- [45] Kamiishi Y, Otani M, Takagi H, *et al.*. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene[J]. Mol. Breed., 2012, 30(2):671-680.
- [46] Mehdy M C, Lamb C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection [J]. EMBO J., 1987, 6(6):1527-1533.
- [47] van Tunen A J, Koes R E, Speit C E, *et al.*. Cloning of two chalcone flavone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate light-regulated and differential expression of flavonoid genes[J]. EMBO J., 1988, 7(5):1257-1262.
- [48] Norimoto S, Toshio A, Shusei S, *et al.*. A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume specific 5-deoxy (iso) flavonoid in *Lotus japonicus* [J]. Plant Physiol., 2003, 131(3):941-951.
- [49] 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]. Nat. Biotechnol., 2001, 19(5):470-474.
- [50] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. FEBS Lett., 2005, 579(27):6074-6078.
- [51] Li F X, Jin Z P, Qu W Q, *et al.*. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco [J]. Plant Physiol. Biochem., 2006, 44(7-9):455-461.
- [52] Zhou L, Wang Y, Ren L, *et al.*. Overexpression of *Ps-CH11*, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult., 2014, 116(3):285-295.
- [53] Martin C, Prescott A, Mackay S, *et al.*. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. Plant J., 1991, 1(1):37-49.
- [54] Deboo G B, Albertsen M C, Taylor L P. Flavanone-3-beta-hydroxylase transcripts and flavonol accumulations are temporally coordinate in maize anthers [J]. Plant J., 1995, 7(5):703-713.
- [55] Amir Z, Tzvi T, Hagit B M, *et al.*. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene [J]. Mol. Breed., 2002, 9(1):33-41.
- [56] Takashi N, Masahiro N, Keiichiro M, *et al.*. Heterologous expression of two gentian cytochrome P450 genes can modulate the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco plants [J]. Mol. Breed., 2006, 17(2):91-99.
- [57] Jiang F, Wang J Y, Jia H F, *et al.*. RNAi-mediated silencing of the flavanone 3-hydroxylase gene and its effect on flavonoid biosynthesis in strawberry fruit [J]. J. Plant Growth Regul., 2013, 32(1):182-190.
- [58] Heller W, Forkmann G, Britsch L, *et al.*. Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to favan-3, 4 -cisdiols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis [J]. Planta, 1985, 165(2):284-287.
- [59] Shimada N, Sasaki R, Sato S, *et al.*. A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome [J]. J. Exp. Bot., 2005, 56(419):2573-2585.
- [60] Rosati C, Simoneau P, Treutter D, *et al.*. Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway [J]. Mol. Breed., 2003, 12(3):197-208.
- [61] Mori S, Kobayashi H, Hoshi Y, *et al.*. Heterologous expression of the flavonoid 3', 5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida* [J]. Plant Cell Rep., 2004, 22(6):415-421.
- [62] Xie D Y, Sharma S B, Dixon R A. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. Arch. Biochem. Biophys., 2004, 422(1):91-102.
- [63] Chung S J, Lee G J, Lee H J, *et al.*. Isolation of a leucoanthocyanidin dioxygenase (*LDOX*) gene from a spray-type chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*) and its colored mutants [J]. Korean J. Hortic. Sci., 2010, 28:818-827.
- [64] Appelhagen I, Jahns O, Bartelniewoehner L, *et al.*. Leucoanthocyanidin Dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*: Characterization of mutant alleles and regulation by MYB-BHLH-TTG1 transcription factor complexes [J]. Gene, 2011, 484(1-2):61-68.

- [65] Menssen A, Höhmann S, Martin W, *et al.* The En Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the temin generating a novel intron from sSpm element in the A2 gene[J]. EMBO J., 1990, 9(10): 3051-3057.
- [66] 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 Sci., 1999, 149(1): 73-79.
- [67] Noriko N, Masako F M, Kiyoshi M, *et al.* RNAi suppression of the anthocyanin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression[J]. Plant Biotechnol., 2006, 23(1): 13-18.
- [68] Reddy A M, Reddy V S, Scheffler B E, *et al.* Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential[J]. Metab. Eng., 2007, 9(1): 95-111.
- [69] 祝钦龙. 彩叶草 (*Solenostemon scutellarioides*) 叶色形成相关的花色素苷生物合成途径的分子调控研究[D]. 重庆: 西南大学, 博士学位论文, 2007.
- [70] 周惠, 文锦芬, 邓明华, 等. 植物花青素生物合成相关基因研究进展[J]. 辣椒杂志, 2011, (4): 1-7.
- [71] 许志茹, 李春雷, 崔国新, 等. 植物花青素合成中的 MYB 蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 597-604.
- [72] 夏玉凤, 耿晓娜, 王万双, 等. 植物花色素代谢途径改变机理及应用[J]. 生物技术通报, 2009, 10: 26-33.
- [73] Michael L R, Rajandeep S S, Robert M, *et al.* A mutator transposon insertion is associated with ectopic expression of a tenderly repeated multistory *Myb* gene *pericarp color1* of maize[J]. Genetics, 2008, 178(4): 1859-1874.
- [74] Maike S, Christiane B, Wusirika R, *et al.* The regulatory regions required for B' paramutation and expression are located far upstream of the maize *b1* transcribed sequences[J]. Genetics, 2002, 162(2): 917-930.
- [75] Goff S A, Cone K C, Fromm M E. Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins[J]. Genes Dev., 1991, 5(2): 298-309.
- [76] Doshi K M, Eudes F, Laroche A, *et al.* Transient embryo-specific expression of anthocyanin in wheat[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2006, 42(5): 432-438.
- [77] Doshi K M, Eudes F, Laroche A, *et al.* Anthocyanin expression in marker free transgenic wheat and triticale embryos[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2007, 43(5): 429-435.
- [78] van der Meer I M, Spelt C E, Mol J N, *et al.* Promoter analysis of the chalcone synthase (*chsA*) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression[J]. Plant Mol. Biol., 1990, 15(1): 95-109.
- [79] 杨翅春, 于静娟, 赵倩, 等. 玉米花青素调节基因 *Lc* 对转基因烟草和矮牵牛花色的影响[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 85-89.
- [80] 赵欣梅, 吴树彪, 王亦学, 等. 花青素合成调控因子转录因子作为直观标记的载体构建及其在玉米幼胚中的瞬间表达[J]. 生物技术通报, 2014, (4): 77-82.
- [81] 黄艳岚, 刘仕芸, 张树珍, 等. 马铃薯花青素转录激活基因 (*stmyc*) 的克隆及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 941-942.
- [82] Kortstee A J, Khan SA, Helderma C, *et al.* Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation[J]. Transgenic Rep., 2011, 20(6): 1253-1264.
- [83] Pandey A, Misra P, Chandrashekar K, *et al.* Development of *AtMYB12*-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential[J]. Plant Cell Rep., 2012, 31(10): 1867-1876.
- [84] Butelli E, Titta L, Giorgio M, *et al.* Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors[J]. Nat. Biotechnol., 2008, 26(11): 1301-1308.
- [85] Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. *Arabidopsis* and *Nicotiana glauca* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1[J]. Science, 1992, 258(5089): 1773-1775.
- [86] Kim Y. Expression analysis of maize C1 regulatory gene in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) [J]. J. Korean Soc. Hortic., 2001, 42(5): 487-491.
- [87] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. Plant Cell, 1990, 2(4): 279-289.
- [88] Shimada Y, Ohbayashi M, Nakano-Shimada R, *et al.* Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase: Specific switching of the pathway in petunia[J]. Plant Cell Rep., 2001, 20(5): 456-462.
- [89] Liu D, Galli M, Crawford N M. Engineering variegated floral patterns in tobacco plants using the *Arabidopsis* transposable element *Tag1* [J]. Plant Cell Physiol., 2001, 42(4): 419-423.
- [90] Liu Y S, Petolino J F. Pigmented maize seed via tissue-specific expression of anthocyanin pathway gene transcription factors[J]. Mol. Breed., 2006, 18(1): 57-67.
- [91] 巴超杰, 薛静, 陈绪清, 等. 利用花青素可视化跟踪表达系统快速筛选表达 *Cry1Ab/c* 基因的转基因玉米[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 59-64.
- [92] Qiu J, Sun S Q, Luo S Q, *et al.* *Arabidopsis* AtPAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic *Taraxacum officinale* [J]. Plant Cell Rep., 2014, 33(4): 669-680.
- [93] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view[J]. Nutr. Rev., 1994, 52(8): 253-265.
- [94] 方忠祥, 倪元颖. 花青素生理功能研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2001, 17(3): 60-62.
- [95] 赵德永. 植物花青素生物合成途径相关基因研究进展及其基因工程修饰[J]. 热带生物学报, 2012, 3(1): 92-98.
- [96] 龙刚, 曾佑伟, 徐良雄, 等. 若干因子对唐菖蒲花瓣提取物 DPPH 清除率的影响[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(1): 18-20.
- [97] 石少川, 高亦珂, 张秀海, 等. 植物花青素生物合成相关基因的研究及应用[J]. 植物研究, 2011, 31(5): 633-640.