

植物花青素合成途径中的调控基因研究进展

宫 硜^{1,2}, 薛 静², 张晓东^{2*}

1. 首都师范大学生命科学院, 北京 100037

2. 北京市农林科学院农业生物技术研究中心, 北京 100097

摘要: 花青素广泛分布于高等植物中, 是一种水溶性的植物色素, 与农作物的多种品质性状密切相关。虽长期受到关注, 但其生物合成途径则是近年来随着拟南芥等植物突变体研究的深入才取得突破的。对于花、果实和种子中的花青素研究始终是热点, 近来国内外有很多关于花青素合成与基因调控发明研究的报道。随着研究的深入不仅可以为医疗保健等提供科学依据, 而且有助于其在农业生产中应用。本文综述了植物花青素基因的研究现状和发展趋势, 包括植物花青素生物合成途径, 生物合成途径中相关转录因子的调控, 以及已经分离和克隆的调控基因在功能方面的研究进展。

关键词: 花青素; 生物合成途径; 调控基因

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.06.01

Regulation Genes in Plant Anthocyanin Synthesis Pathway

GONG Xia^{1,2}, XUE Jing², ZHANG Xiao-dong^{2*}

1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China;

2. Beijing Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China

Abstract: Anthocyanin, which existed widely in higher plants, is a water soluble plant pigment, and closely related to crop quality traits. Its biosynthetic pathway and the mechanism of related regulation proteins interaction was found in recent years with the further study of the mutants of *Arabidopsis*. The research of anthocyanins in flowers, fruits and seeds is always the hot spot. Recently there are many research reported, its deepening research can provide scientific basis for health care, and help us to use in many fields. Here we give reviews on the study status of plant anthocyanin biosynthetic genes, including plant anthocyanin biosynthetic pathway, the regulation of transcription factors in biosynthetic pathway, and the regulatory genes which have been separated and cloned.

Key words: anthocyanin; synthesis pathway; regulation gene

花青素是自然界中广泛存在的一种植物色素, 因其取代基位置的不同而呈现出红色、紫色、蓝紫色和蓝色等不同的颜色, 广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实和种子中。花青素经由类黄酮途径的一个特定分支所产生。目前分离得到的花青素数目众多, 主要分为三大类: 矢车菊色素、天竺葵色素和华翠素^[1]。在自然界中, 花青素不仅可以帮助植物传粉、散播后代, 保护植物果实免受强光和紫外线的伤害^[2], 清除自由基、抗氧化、防御病原体, 也是一种新的信号抑制剂。其强大的

抗氧化能力可以预防心血管疾病、抗肿瘤、抗突变、调节免疫活性^[3], 对人类健康具有着巨大的潜在价值, 因此花青素一直是研究的热点领域。

1 花青素的生物合成途径

花青素是黄酮类代谢途径中一个分支产物, 它的直接前体是苯丙氨酸。由苯丙氨酸到形成花青素可以分为三个阶段^[4], 第一阶段是苯丙烷途径, 是许多次生代谢所共有的途径。在这一阶段

收稿日期: 2011-10-28; 接受日期: 2011-11-30

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08002-004, 2008ZX08002-002, 2008ZX08003-001, 2009ZX08003-007B)资助。

作者简介: 宫 硜, 硕士研究生, 主要从事玉米遗传育种研究。* 通讯作者: 张晓东, 研究员, 博士, 主要从事作物遗传育种研究。

E-mail: zhangxiaodong@baafs.net.cn

苷转运到液泡中,并在液泡中汇集和储存^[7]。但是花青素是如何进入到液泡中,目前尚不清楚。此外,花青素还可以通过小囊泡进入到液泡中^[8]。

2 花青素合成转录因子的调控机理

目前,对花青素的次级代谢合成途径及其相关的基因调控一直都是研究的热点。已研究较清楚的主要有三类调控因子:bHLH、MYB 蛋白和 WD40 蛋白^[9],大部分物种的花青素都是由这三类转录因子复合而成的蛋白复合体直接调控激活的,也有少数花青素合成只需要单个调控因子就能激活,如玉米中的鞣红就能被一种 MYBP1 激活^[10]。

在单子叶植物中(如玉米),主要有两类转录因子调控花青素合成,一种是与 MYB 相关的转录因子,一种是与 bHLH 相关的转录因子。他们相互作用激活调控整个花青素合成途径中的酶,如 CHS、CHI、F3H、DFR、ANS/LDOX 和 UFGT 等。

在双子叶植物中(如拟南芥),花青素生物合成酶分为两类,分别由不同的转录因子调控:①早期的生物合成基因(early biosynthesis genes, EBGs),包括:CHS、CHI、F3H、F3'H 和 FLS,依赖 R2R3-MYB 转录因子合成类黄酮物质;②晚期的生物合成基因(late biosynthesis genes, LBGs),包括:DFK、ANS/LDOX、UFGT、LAR 和 ANR,由 bHLH 转录因子、MYB 蛋白和 WD40 蛋白组成的三元复合体调控^[11]。主要产物为种子中的原花青素和植物组织中的花青素。

2.1 花器官中转录调控

在大多数双子叶植物中,花青素的合成调控依赖于 MYB 和 bHLH 的相互作用。矮牵牛的花瓣和花粉囊中的花青素是由两个不同的 MBW 蛋白复合物调控,WD40 AN11、bHLH AN1 和 R2R3-MYB AN2 复合蛋白调控花瓣内的花青素合成,WD40 AN11、bHLH AN1 和 R2R3-MYB AN4 则调控花粉囊^[12,13](见表1)。AN11不仅可以调控花

表 1 已经分离和鉴定的 MYB-bHLH-WD40 复合蛋白

Table 1 Isolated and identified MYB-bHLH-WD40 protein complex.

MYB-BHLH-WD40 复合蛋白					
		WD40	bHLH	R2R3-MYB	bHLH repressor
玉米 (<i>Zea mays</i>)	花青素(植物组织)	PAC1	B1/SN1	PL1	-
	种子	PAC1	R1	C1	IN1
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		WD40	bHLHR	2R3-MYB	1R-MYB
	花青素(植物组织)	TTG1	TT8/GL3/EGL3	PAP1/PAP2	MYB113/114 MYBL2/CPCrepressor
	原花青素(种子)	TTG1	TT8	TT2	-
矮牵牛 (<i>Petuniahybrida</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	1R-MYB
	花青素(花)	AN11	AN1/JAF13	AN2/AN4	MYBxrepressor
	原花青素(种子) pH(花)	AN11 AN11 AN1/JAF1	AN1/JAF13 3PH4MYBx	-	
蕹菜菊 (<i>Ipomoea purpurea</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	
	花青素(花) 原花青素(种子)	WDR1 WDR1	bHLH2 bHLH2	- MYB1	
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	
	花青素(浆果) 原花青素(浆果)	VvWDR1/2 VvWDR1/2	VvMYB1/VvMYBA1 VvMYB1/A1	VvMYBA1/A2Vv VvMYBPA1/PA2	MYB5a/5b VvMYB5a/5b
苹果 (<i>Malus domestica</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	
	花青素(果实)	MdTTG1	MdbHLH3/33	MdMYB10	
甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	
	花青素(胚乳)	BoWD4	OBobHLH1	PURPLE	
番茄(<i>Solanum Lycopersicon</i>)		WD40	bHLH	R2R3-MYB	
	花青素(果实)	-	-	LeANT1, LeAN2	

青素的合成而且可以控制其他细胞的分化,如花瓣中 AN11 和 AN1 可以和 R2R3-MYB PH4 相互作用激活液泡酸化。紫苏中 AN11 的功能与之相似,可以促进 MYB 和 bHLH 在细胞核上定位或调控转录后活性。牵牛花中的正负反馈调节与拟南芥相似,如 R2R3-MYB AN2 和 AN4 可以激活 bHLH AN1,而 bHLH AN1 和 WD40 AN11 激活 MYBX,这个基因编码 CPC-like,是一种 MYB 重复蛋白,可以抑制花青素合成。在不同种群中 EBGs 和 LBGs 的分类也不同,如牵牛花的 F3H 属于 EBGs,而金鱼草 F3H 属于 LBGs。在一品红中花青素是由 Rosea1 和 Rosea2 复合体激活的。噬龙花和矮牵牛的早期合成基因需要 MYB 调控因子。在天竺牡丹 MJW 中有两种突变体,一种是橘色的舌状花(MJOr),一种是黄色的(MJY)。对两种突变体不同时期的花瓣花青素结构基因和转录因子进行 RT-PCR 检测发现,MJOr 的结构基因和转录因子表达都是正常的;而 MJY 只有查尔酮合成酶和查尔酮异构酶表达是正常的,其余的结构基因都没有表达,转录因子只有 DvIVS 没有表达,其余转录因子均正常。由此分析 DvIVS 对 MJY 的花青素下游合成途径具有重要的调控功能。比较两种突变体的 DvIVS 基因序列,MJY 的 DvIVS 上的第四个内含子有一个转座子 Tdv1 属于 CACTA 超级家族^[14,15]。分析可能是 Tdv1 的作用使 MJY 的 DvIVS 序列缺失,导致其出现颜色的差异^[16]。

2.2 果实中的转录调控

红葡萄的花青素是由 VvMYBA1 和 VvMYBA2 复合蛋白调控的,它们都属于 MYB 家族,通过调控 UFGT 调控葡萄粒中花青素合成的最后一步^[17]。在白葡萄中这些基因是不表达的,直到还原转座子插入到 VvMYBA1 的启动子区域。TTG1-like 蛋白可以运输相应蛋白接近细胞核,花青素相关蛋白 WD40、bHLH (VvWDR1 和 VvMYCA1) 定位在细胞核和细胞质中^[18]。VvMYC1 与所有的葡萄 MYBs 蛋白相作用 (VvMYB5a/5b、VvMYBA11A2 和 VvMYBPA1),与拟南芥的 TT8 相似,VvMYC1 可以进行正向反馈调节自身的表达,可以用来证明 VvMYC1 和 VvMYCA1 是否同源。

MYB 基因(如 MYB1、MYBA)对红苹果花青

素的合成有重要的作用^[19]。MYB10 可以调控果实表皮和叶子花青素合成,如果使 MYB10 充分表达,则在转录水平上 MYB10 可以激活许多组织的花青素合成,但是它对花青素合成的高敏感度调控也依赖两种共表达的 bHLH apple 蛋白,Md-bHLH3 和 MdbHLH33^[20]。

近来在 *ug1* 拟南芥突变体中发现了一种 WD40 蛋白,能够影响花青素的调控,但是它与苹果的 MYB、bHLH 蛋白的相互作用还有待进一步确定。在山竹植株和果实中都有大量的花青素表达,Yossapol 等^[21]分离了 GmMYB10 转录因子的全长,GmMYB10 编码 R2R3-MYB 蛋白。与 At-bHLH 共表达可以强烈的激活 GmDFR、AmDFR 启动子,GmMYB10 和 GmUFGT 与乙烯相互作用可使果实颜色增加到第 5 阶段,当果实成熟后又逐渐减少。分析认为乙烯影响花青素合成可能通过调控因子 GmMYB10 的表达^[22]。

蔷薇科的其他物种也鉴定和分离了与苹果 MdMYB10 直系同源的 MYB 蛋白。如在梨中的 PyMYB10、山竹的 GmMYB10、中国腊梅的 MrMYB1,这些 MYB 基因对果实成熟过程花青素的积累起很重要的作用。Lin-Wang 等^[23]认为乙烯是通过 GmMYB10 影响花青素的合成。草莓中的 FaMYB10 在果实未成熟时表达量很低,当果实进入成熟阶段后其表达量是之前的 4 000 倍并同时伴随颜色的变化。而且 FaMYB10 是草莓中唯一抑制花青素合成的调控因子,用于调控草莓成熟后期的花青素平衡^[24]。覆盆子中的 VmTDR4 是与拟南芥 PAPI 同源的 MADS-box 的转录因子,可以直接或者间接的调控 R2R2-MYB 基因 VvMYB2 的表达来控制果实成熟时花青素的积累。当 VmTDR4 被沉默后,VvMYB2、CHS 和其他与花青素合成的特异性基因如 DFR、ANS 等的表达降低,花青素的产量减少 2~3 倍,而 VvMYB1-like 基因 FaMYB1 的表达却增强了,这表明 FaMYB1 和 VvMYB1 相似,它们可以形成一个激活和抑制转录因子的回路。

茄科中的番茄有 3 个 R2R2-MYB 基因 Le-MYB12、LeANT1 和 LeANT2,调控果实表皮的花青素和黄酮醇合成,其中 LeMYB12 为早期合成因子调控黄酮醇的合成^[25,26]。在辣椒中也发现了

LeANT1 的同源基因, *CaA* 基因可以在 LBG 早期激活花青素合成,但在果实成熟时类胡萝卜素会取代花青素。而在 *CaA* 缺失的辣椒突变体中,辣椒成熟后呈绿色^[27]。

许多品种果实中花青素的合成也需要光的调控,在葡萄中如果减少光照则花青素的含量就会降低,阳光刺激了 *VvMYBA1*、*VvMYB5a* 和花青素合成基因(*CHS*、*ANS/LDOX*、*UFGT* 和 *OMT* 等)的上调^[28]。

2.3 种子和其他组织中的调控

在玉米种子中, *bHLH* 和 *MYB* 都是光诱导的,但是 *MYB1* 和 *PCL* 基因的表达取决于糊粉层和果皮中花青素合成的时间^[29]。而 *MYB1* 基因的启动子是在果仁中形成的,激活花青素合成基因的二级结构且不需要 *bHLH*。*PAC1* 基因编码一个 WD40 蛋白,该蛋白在整个调控复合体中起重要作用。在 *pac1* 突变体中,只有种子中的花青素含量减少了,其他组织和器官中都没有变化,说明 *PAC1* 能够正向调节花青素的合成。相反 *INI* 基因编码 *bHLH* 可能抑制花青素的合成,在 *in1* 突变体中糊粉层中积累了大量的花青素,分析可能是 *INI* 主要编码去尾蛋白从而激活了抑制结构域。而且无论是 *PAC1* 还是 *INI* 都可以调控 *B1* 和 *Cl* 的转录水平。

在水稻中有 3 个基因控制种子中的花青素合成,但是其机构和功能还不是很清楚。紫色花椰菜的 *MYBPurple* 和 *BoBHLH* 的量要比白色花椰菜中高很多,而 *BoWD40* 是相同的^[30]。在大多数双子叶植物种子中, *LBGsde* 表达要强于 *EBCs*。在拟南芥种子中如果超表达 *pap1*,黄酮醇还原酶会大量增加,但是早期的黄酮醇合成结构基因如查尔酮合酶却没有变化,说明 *pap1* 能够调控晚期合成基因^[31],此外, *pap1* 在光的刺激下可以诱导花青素的大量合成。Yuan 等^[30]发现 *BoTT8* 和 *BoMYB2* 是决定紫甘蓝呈现紫色叶片的主要调控因子,实时定量 PCR 结果表明无论是在幼苗、幼嫩叶片和成熟叶片等不同时期,紫甘蓝 *BoTT8* 和 *BoMYB2* 的表达量要远远超出白甘蓝的含量,而其他调控因子的表达量都相似。Zhu 等^[32]发现 R3MYB 蛋白 CPC 不仅可以调控根毛和毛状体的形成而且可以和 R2R3-MYB 转录因子 *PAP1/2* 竞

争调控花青素的合成,属于抑制调控因子。CPC (*CAPRICE*)是拟南芥中的 R3-MYB 转录因子,不仅能调控根毛的分化和毛状体的萌发,还可以反馈调节花青素的合成。微矩阵分析整个基因组表明,在 3 700 个功能测试实验中,当 CPC 超表达时,有 85 个基因的表达下降了不止 3 倍,其中有 7 个基因属于花青素晚期合成结构基因^[32]。

3 已分离与克隆的花青素合成调控基因

目前,已从多种植物中分离与克隆了多个花青素合成调控基因(详见表 2)。玉米(*Zea mays* L.)花青素苷的生物合成已经有了比较深入的研究,根据所编码转录因子的不同,可以分为两个基因家族:*r/b* 基因家族和 *cl/pl* 基因家族^[53]。其中 *r/b* 基因家族编码 MYB 类转录因子, *cl/pl* 基因家族编码 *bHLH* 类转录因子。

3.1 *r/b* 基因家族

在玉米中, *r/b* 是多基因家族,含有 100 多个成员,包括 *R-sc*、*Lc*、*Sn* 和 *b* 等基因^[54]。Ludwig 等^[55]发现玉米中 *Lc* 基因是第一个在植物中发现编码具有 *bHLH* 结构域的蛋白。Consonni 等^[56]研究发现 *r(S*、*Lc* 和 *Sn*)定位在 10 号染色体, *b* 定位在 2 号染色体, *r/b* 基因家族成员的 cDNA 序列具有很高的相似性, *R-S* 与 *Lc* 的 cDNA 相似性达 95%。它们编码 *bHLH* 类蛋白,这类蛋白的部分序列与 Myc 原癌蛋白以及哺乳动物的 Myc 转录因子的碱性亮氨酸拉链(*bHLH DNA*)结合域具有同源性。Bradley 等^[57]认为 *bHLH* 蛋白是具有酸性结构域的转录激活子。Ludwig 等^[55]分析 *Lc* 基因 mRNA 序列 5'前导区时,发现上游开放阅读框架(*uORF*)的翻译是抑制下游基因表达必需的, *uORF* 成负反馈调节,当其翻译量增加时下游基因的表达减少。但是 *uORF* 本身的肽链并不介导抑制作用, *uORF* 的抑制作用是由于翻译 *uORF* 的核糖体起始无效造成的。此外体外和玉米细胞实验证明 *Lc* 基因 mRNA 5'端还存在潜在发夹结构,也能抑制下游基因的转录。 *uORF* 和 5'端合适的发夹结构是在两个水平上完全独立的介导抑制作用。在烟草、拟南芥、矮牵牛、番茄和紫色苜蓿中的转基因研究表明,由 *CaMV35S* 启动子驱动的 *Lc*

表 2 已经分离和鉴定的花青素调控基因

Table 2 Isolated and identified anthocyanin regulatory genes.

植物种类	转录因子类型	调控基因	参考文献
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	R3-MYB	<i>cpc</i>	[32]
	R2R3-MYB	<i>tt2</i> 、 <i>pap1</i> 、 <i>pap2</i> <i>gl1/wer/myb23/myb61</i>	[33]
	bHLH1	<i>myc-146</i> 、 <i>gl3</i> 、 <i>egl3</i>	[34]
	bHLH2	<i>tt8</i>	[35]
	Zn-finger	<i>tt1</i>	[36]
	WRKY	<i>ttg2</i>	[37]
玉米(<i>Zea mays</i>)	MYB	<i>c1/p1</i>	[38]
	bHLH	<i>r/b</i> <i>in1</i>	[39] [40]
	WD40	<i>pac1</i>	[41]
玉米(<i>Zea mays</i>)	MYB	<i>an2</i> 、 <i>an4</i> 、 <i>ph4</i>	[42,43]
	bHLH	<i>an1</i> 、 <i>jafl3</i>	[44]
	WD40	<i>an11</i>	[45]
金鱼草(<i>Antirrhinum majus</i>)	MYB	<i>rosea1/2</i> 、 <i>venosa</i>	[46]
	bHLH	<i>Delila</i> 、 <i>mutabilis</i>	[47]
	WD40		
紫苏(<i>Perilla frutescens</i>)	MYB	<i>myb-p1</i>	[48]
	bHLH	<i>myc-rp/gp</i> 、 <i>myc3gl</i>	[48]
	WD40	<i>pfwd</i>	[49]
草莓(<i>Fragaria ananassa</i>)	MYB	<i>famyb1</i>	[50]
	bHLH		
	WD40		
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	MYB	<i>Myba</i>	[51]
花椰菜(<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	R2R3-MYB	<i>pr</i>	[52]
Mangoteen(<i>Garcinia mangosteen</i> L.)	R2R3-MYB	<i>GmMYB1</i> / <i>GmMYB7</i> / <i>GmMYB10</i>	[21]

基因通过调控二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)、类黄酮-3',5'-羟基化酶(F3'5'H)、花色苷合成酶(ANS)、类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶(UFGT)等酶的合成增强了花色苷的积累^[58]。金鱼草的 *Del* 基因的异源表达同样能增加烟草和番茄的色素量,而与 *Lc* 相比, *Del* 对烟草的色素生成影响很小。矮牵牛的 *jafl3* 编码的 bHLH 蛋白 JAF13 与玉米的 *Lc* 和金鱼草的 *DEL* 具有高度同源性,且与 *Lc* 同源性达 55%,与 *DEL* 同源性高达 71%,因此推测 *jafl3* 是玉米中 *r* 的后裔^[59]。Ramsay 等^[60]发现拟南芥 *myc-146* 基因中 6 个内含子的位置与 *Lc*、*b* 和 *jafl3* 相同,这些基因有着共同的进化起源。拟南芥的两个 bHLH 蛋白 *GL13* 和 *MYC-146* 在不同的组织中控制花色苷的形成, *MYC-146* 在花芽和花中高度表达, *GL13* 则在根、

叶、茎、茎生叶、花芽和花中表达。对花色苷缺陷型拟南芥的 *GL13* 和 *MYC-146* 进行定位时,还发现这两个 bHLH 蛋白可能有部分冗余的功能,且它们在功能上有重叠^[60]。玉米 *Sn* 基因决定中胚轴、叶基和果皮中的色素生成。在转基因荷花(*Lotus corniculatus*)中, *Sn* 表达后花色苷含量增加,且局限于叶脉、叶基和叶柄组织,但这种作用不太显著;相反,丹宁酸含量有明显增加,且这种增加也是组织特异的,这说明花色苷和丹宁酸生物合成的调控机制有可能是一样的^[61]。

在种子中 B-Perud 启动子中近转录起始点的 176 bp 是在糊粉层充分表达的必需序列,含有两个正调控元件和两个紧密相连的负调控元件。光可以调控 *Sn* 基因的表达,功能与 *r* 和 *b* 位点相似。且 Procissi 等^[62]认为 *Sn* 转录因子可同时在

转录水平和转录后水平进行调控,其在特定的发育时期和组织中特异性的表达,并且 Sn 的差异调控花色素的组织特异沉积。*B-I* 基因是 *b* 基因的等位基因,其表达水平也可影响植物营养器官中花青素的组织特异表达,而 *B-Perud* 不仅调控色素在种子的糊粉层表达,而且能够调控植物营养器官的花青素表达。*B-I* 和 *B-Perud* 这两个等位基因虽然和 *r* 基因家族成员具有高度的同源性,与 *r* 不同的是 *B-I* 和 *B-Perud* 很少影响糊粉层和幼苗的颜色,却可以调节成熟植物组织如叶鞘和苞叶的光谱颜色^[62]。矮牵牛花 *an1* 编码 bHLH 转录因子,与 *R1* 基因家族、玉米 *in1* 位点、金鱼草 *delila*、矮牵牛 *jafl3* 以及牵牛花的 *ivs* 等编码的 bHLH 蛋白在结构上相似,都含有一个高度保守的 N-端结构域,C-端结构域保守性相对较低。

3.2 *cl/pl* 基因家族

玉米花色素苷生物合成的调控除了 *r/b* 基因家族外还需要另一个调控基因 (*cl/pl*) 的共同参与。Goff^[63] 研究表明 *cl* 和 *pl* 基因分别位于不同的染色体,编码 MYB 转录因子,其同源性高达 90%。*cl* 主要是调控糊粉层和胚的花青素合成,*pl* 则调控营养组织和花中色素的合成,光照可以诱导它们的合成。*cl* 能直接激活花色素苷合成基因的转录,可在不同的水平上调控几种结构基因的表达,如 CHS(酶水平)、DFR(mRNA 水平)和 UF3GT(酶和 mRNA 水平)。2000 年,Zhang 等^[64] 在 *pl* 的上游分离到一个 *pl* 的同源基因 *p2*,*pl* 和 *p2* 在花器官中的表达不同,前者主要在果皮、穗轴、穗颖和花丝中表达,调控红色色素的合成;*p2* 则在发育中的花粉囊和花丝中表达。它们在 ORF 区的相似性高达 98%,因此有人提出一种假设,认为 *pl* 和 *p2* 是来自一个单基因,在复制时产生分离而形成^[64]。矮牵牛花 *an2* 和 *cl* 是同源基因,能激活 *dfr* 基因的启动子。此外,在玉米 5 号染色体的长臂上还有一个专门调控谷粒色素合成的特异调控基因——*pale aleurone color1* (*pac1*),它编码一种 WD40 蛋白,在调控复合体(MBW)中起重要作用^[65]。糊粉层和小盾板中 *B-Perud* 和 *R-r* 等色素合成基因都受其影响。玉米 *pac1* 的表达不需要 *b* 或额外的 *cl/pl* 的作用,但 *pac1* 能调控 *b* 和 *cl* 的转录水平。玉米 *pac1* 与拟

南芥 *transparent testa glabra 1* (*ttg1*) 和矮牵牛 *anthocyanin-11* (*an11*) 编码的蛋白在相似,都具有 WD40 保守序列。WD40 蛋白能调控叶毛形成和色素合成的信号转导途径,与其他色素调控子相比,WD40 蛋白的保守性更强。序列比对结果显示,这 3 个蛋白的氨基酸序列高度保守,只有 PAC1 在 N 端部分微有不同,与 AN11 和 TTG1 的相似性达 62%,表明它们在系统进化树上属于同一个分枝。拟南芥的 *ttg2* 基因编码 WRKY 蛋白,但是它同时也会被 bHLH、MYB 蛋白调控,它在 5' 顺势元件调控区域有两个 MYB 蛋白结合位点,是 MYB 转录因子如 WEREWOLF, GLABRA1 和 TRANSPARENT、TESTA2 的直接靶位点^[36]。花椰菜突变体 *pr-D* 是单基因突变且是严格的表型突变,在凝乳和部分组织中呈现深紫色。*pr* 基因编码 R2R3 蛋白,Northern 杂交表明在花青素合成早期,突变体和野生型的结构基因(CHS、CHI 和 F3H)的表达量没有太大变化,但是到合成后期 *pr-D* 突变体的结构基因大量合成,野生型则没有,这说明 *pr* 基因对花青素合成的上游调控有重要作用。其启动子也具有明显的增强表达的作用^[52]。将 *Lc* 和 *cl* 转入到番茄中,结果只是黄酮醇的含量增加,Butelli 等^[66] 将金鱼草的 *Delila* (*Del*) 和 *Roseal* (*Ros1*) 转入番茄中,使番茄果实的果皮和果肉全部变紫,花青素含量显著提高。将转基因果实的粉末喂养 p53 缺失的小鼠,发现其寿命显著延长^[66]。

r/b 家族和 *cl/pl* 家族的基因都不是独立行使功能的,通常是几个基因共同作用调控花青素的合成。在酵母和玉米的瞬时表达分析表明 B 蛋白的功能区域与 C1 相互作用,研究结果证明 B 蛋白的 bHLH 区域的大部分以及末端(C 端)可以被删除,仅丢失其一小部分的功能;相反只要删除氨基端(N 端)的一小部分就会导致整个基因反式-激活转录功能的丧失。研究发现 B 蛋白的 N 端通过与 C1 蛋白的相互作用而新形成一个转录激活结构域。这种复合体的形成可以激活一种含有 GAL4 的识别位点的人工合成启动子,表明 B 蛋白和 C1 蛋白之间的这种相互作用不需要常规的目的蛋白启动子。酵母双杂交结果也证实,B 和 C1 的融合蛋白与酵母 GAL4 DNA 的结合,以

及转录激活结构域的存在。这种转录激活结构域的形成仅限于 C1 蛋白的 MYB 同源重复序列区和 B 蛋白 N 端特定区域之间的相互作用。这些研究表明在两类不同的转录因子的家族成员之间可能存在一种直接的相互作用调控玉米的花青素合成^[39]。

为了验证 C1 蛋白与 B 蛋白之间的相互作用,我们将 C1 和 *b* 基因进行了融合,结果表明,C1 蛋白与 B 蛋白之间需要一定空间距离,才能使 C1 蛋白与 B 蛋白之间的相互作用正常展开,并形成转录激活结构域。首先,通过一个酶切位点 *SalI*(5'-GTCCGAC-3') 将 *c1* 基因与 *b* 基因之间尾首相连形成融合基因 *an-cb*,正确翻译后融合蛋白靠 Val 和 Asp2 两个氨基酸连接;用 CaMV 35S 启动子驱动该融合基因,基因枪转化玉米幼胚,结果未见有花青素基因的瞬时表达。而有趣的是,采用编码 6 个 Gly 组成碳桥的方式引入 DNA 序列(18 bp),将其连接形成的融合基因 *an-cb* 用 CaMV 35S 启动子驱动并转化玉米幼胚,结果花青素基因的瞬时表达正常;融合基因瞬时表达的强度与 CaMV 35S 启动子分别驱动 *c1* 和 *b* 基因一起转化玉米幼胚的强度相同。这充分说明花青素的合成是依靠 C1 蛋白与 B 蛋白这两类不同转录因子之间的相互作用进行调控的(数据未发表)。

4 花青素的应用与前景展望

虽然目前对花青素作用机制、代谢途径及调控机理的研究较为深入^[67],已分离并分析了大量与花青素途径相关的结构基因和调控基因,花青素途径的前期、中期步骤已基本清楚,末期步骤和进化模式的研究也不断深入。但是对其发挥生理功能活性所涉及的分子结构、信号通道以及酶的认识还不够清楚,花青素的修饰、转运及汇集过程,花青素途径在其他水平上的调控机制,植物体内花青素的降解途径和其他途径的联系等还需要进一步的研究。

已有很多研究表明,花青素具有十分广泛的用途,包括:①医学上的应用。花青素是目前最有效的抗氧化剂,含有大量的活性酚羟基,是氢的供

体,能有效清除各种氢自由基。②食品上的应用。花青素是一种天然添加剂,由于其来自植物内部对人体安全无公害而备受人们的关注。③分子标记。随着对花青素的合成途径和分子调控的深入研究,对于花青素的结构、种类和表达模式越来越清楚。用花青素作为一种可视的分子标记用于转基因分子实验,就可以从颜色上清楚直观的进行转基因筛选,从而节省大量的人力、物力、财力。④在美学发面的应用。花色不仅是植物吸引昆虫和鸟类传粉的重要工具,而且也具有十分重要的美学价值。通过调控花青素的合成控制花瓣的颜色,如将矮牵牛的 *F3'5'H* 基因、*DFR* 基因转入白色康乃馨(本身缺乏 *DFR*)中,可得到淡紫色的康乃馨和深紫色的康乃馨,经检测,花瓣中积累了大量花青素,并且含有辅助色素包括黄酮醇和黄酮等。

随着基因组学研究的深入,花青素合成的调控机理逐渐明晰,越来越多的相关基因得到分离与功能验证。这将有利于我们更好地开发和利用花青素,使其应用更直接、更准确、更有效,发挥更大的医学保健作用,为人类的健康做出更大的贡献。

参 考 文 献

- [1] 李娟娟. 花青素研究进展[J]. 中山大学研究生学刊,2007,28(2):1-5.
- [2] 胡可,韩科厅,戴思兰. 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理[J]. 植物学报,2010,45(3):307-317.
- [3] 王辉,龚淑英,刘蕾. 花青素分布、合成和降解综述[J]. 茶叶,2009,35(4):203-206.
- [4] 赵文军,张迪,柴友荣,等. 原花青素的生物合成途径、功能基因和代谢工程[J]. 植物生理学通讯,2009,45(5):509-519.
- [5] 张宁,胡宗利,陈绪清,等. 植物花青素代谢途径分析及调控模型建立[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(1):97-105.
- [6] 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.
- [7] Chapple C C S, Shirley B W, Zook M, et al. Secondary metabolism in *Arabidopsis* [A]. In: Meyerowitz E M, Somerville C R (eds). *Arabidopsis* [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 989-1030.
- [8] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids[J]. Annu. Rev. Plant Biol., 2006,57:405-430.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. *Plant Sci.*, 2011,181:219-229.
- [12] Gerats T, Strommer J. *Petunia: Evolutionary Developmental and Physiological Genetics* [M] (2nd ed.). Netherlands, Nijmegen: Springer,2009.
- [13] Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, *et al.*. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix loop helix transcription factors of the anthocyanin pathway[J]. *Plant Cell*, 18,2006, 1274-1291.
- [14] Sho O, Munetaka H, Atsushi H, *et al.*. A bHLH transcription factor, DvIVS, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*) [J]. *J. Exp. Bot.*, 2011,1-12.
- [15] Schlangen K, Miosic S, Thill J, *et al.*. Cloning, functional expression, and characterization of a chalcone 3-hydroxylase from *Cosmos sulphureus* [J]. *J. Exp. Bot.*, 2010, 61: 3451-3459.
- [16] Schlangen K, Miosic S, Topuz F, *et al.*. Chalcone 3-hydroxylation is not a general property of flavonoid 3-hydroxylase[J]. *Plant Sci.*, 2009,177:97-102.
- [17] He F, Mu L, Yan G L, *et al.*. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes[J]. *Molecules*, 2010, 15:9057-9091.
- [18] Walker A R, Lee E, Bogs J, *et al.*. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes[J]. *Plant J.*, 2007, 49:772-785.
- [19] Takos A M, Jaffé F W, Jacob S R, *et al.*. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiol.*, 2006,142:1216-1232.
- [20] 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 Cell Physiol.*, 2007,48:958-970.
- [21] Yossapol P, Saichol K, Wang K L, *et al.*. A MYB transcription factor regulates anthocyanin biosynthesis in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening[J]. *Planta*, 2009,229:1323-1334.
- [22] Nagira Y, Ikgami K, Koshiha T, *et al.*. Effect of ABA upon anthocyanin synthesis in regenerated torenia shoots [J]. *J. Plant Res.*, 2006,119:137-144.
- [23] 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 Biol.*, 2010, 10:50.
- [24] Mes P J, Boches P, Myers J R, *et al.*. Characterization of tomatoes expressing anthocyanin in the fruit[J]. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 2008,133:262-269.
- [25] Boches P S, Peterschmidt B C, Myers J R, *et al.*. Breeding tomato for increased fruit phenolics[J]. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 2009,44:1055-1056.
- [26] Borovsky Y, Oren-Shamir M, Ovadia R, *et al.*. The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to Anthocyanin2 of *Petunia*[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004,109:23-29.
- [27] Jose T M, Rodrigo L, Andrea V, *et al.*. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*[J]. *J. Exp. Bot.*, 2009,60:853-867.
- [28] Eleonora C, Giuliana G, Domenico A, *et al.*. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J. Plant Physiol.*, 2008,165:886-894.
- [29] Escribano-Bailon M T, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C. Anthocyanins in cereals[J]. *J. Chromatogr.*, 2004,1054:129-141.
- [30] Yuan Y X, Chiu L W, Li L. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage [J]. *Planta*, 2009, 230:1141-1153.
- [31] Gonzalez A, Zhao M, *et al.*. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. *Plant J.*, 2008, 53:814-827.
- [32] Zhu H F, Fitzsimmons K, Khandelwal A, *et al.*. CPC, a single-repeat R3 MYB, is a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Mol. Plant*, 2009, 4: 790-802.
- [33] 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]. *Plant Cell*, 2001,13:2099-2114.
- [34] Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, *et al.*. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* [J]. 2003,130(20):4859-4869.
- [35] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, *et al.*. The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques [J]. *Plant Cell*, 2000,12:1863-1878.
- [36] Ishida T, Hattori S, Sano R, *et al.*. *Arabidopsis* TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation [J]. *Plant Cell*, 2007,19: 2531-2543.
- [37] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. *Plant Cell*, 2002, 14:1359-1375.
- [38] Cone K, Cocciolone S, Burr F, *et al.*. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *cl* that functions in the plant [J]. *Plant Cell*, 1993,5:1795-805
- [39] Goff S, Cone K, Chandler V. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for

- a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins[J]. *Genes Dev.*, 1992, 6: 864 – 875.
- [40] Burr F A, Burr B, Scheffler B E, *et al.*. The maize repressor-like gene intensifier1 shares homology with the *r1/bl* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing [J]. *Plant Cell*, 1996, 8:1249 – 1259.
- [41] 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 GLABRAL* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2):450 – 464.
- [42] 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]. *Plant Cell*, 1993, 5:1497 – 1512.
- [43] Quattrocchio F, Wing J F, van der Woude K, *et al.*. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes[J]. *Plant J.*, 1998, 13: 475 – 488.
- [44] Spelt C, Quattrocchio F, Mol J N M, *et al.*. Anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:1619 – 1632.
- [45] De Vetten N, Quattrocchio F, Mol J M, *et al.*. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals[J]. *Genes Dev.*, 1997, 11:1422 – 1434.
- [46] Martin C, Prescott A, Mackay S, *et al.*. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*[J]. *Plant J.*, 1991, 1:37 – 49.
- [47] Goodrich J, Carpenter R, Coen E S. A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species[J]. *Cell*, 1992, 68:955 – 964.
- [48] Gong Z Z, Yamagishi E, Yamazaki M, *et al.*. A constitutively expressed *Myc-like* gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1999, 41:33 – 44.
- [49] Yamazaki M, Makita Y, Springob K, *et al.*. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*[J]. *Biochem. Eng. J.*, 2003, 14:191 – 197.
- [50] Aharoni A, De Vos C H R, Wein M, *et al.*. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco [J]. *Plant J.*, 2001, 28:319 – 332.
- [51] Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, *et al.*. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis[J]. *Planta*, 2002, 215: 924 – 933.
- [52] Chiu L W, Zhou X J, Burke S, *et al.*. The Purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor[J]. *Plant Physiol.*, 2010, 154:1470 – 1480.
- [53] 葛静, 严海燕. 花色素苷形成中的基因表达和调控[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(2):374 – 380.
- [54] 刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍. 植物花青素生物合成中的调控基因[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(4):747 – 754.
- [55] Ludwig S R, Habera L F, Dellaporta S L, *et al.*. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989;86:7092 – 7096.
- [56] Consonni G, Viotti A, Dellaporta S L, *et al.*. cDNA nucleotide sequence of *Sn*, a regulatory gene in maize [J]. *Nucl. Acids. Res.*, 1992, 20(2):373.
- [57] Bradley J M, Davies K M, Deroles S C, *et al.*. The maize *Lc* regulatory gene up regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*[J]. *Plant J.*, 1998, 13(3):381 – 392.
- [58] 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.
- [59] Mooney M, Desnos T, Harrison K, *et al.*. Altered regulation of tomato and tobacco pigmentation genes caused by the *delila* gene of *Antirrhinum*[J]. *Plant J.*, 1995, 7:333 – 339.
- [60] Ramsay N A, Walker A R, Mooney M, *et al.*. Two basic-helix-loop-helix genes (*MYC-146* and *GL3*) from *Arabidopsis* can activate anthocyanin biosynthesis in a white-flowered *Matthiola incana* mutant[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2003, 52(3): 679 – 688.
- [61] Robbins M P, Paolucci F, Hughes J W, *et al.*. *Sn*, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus* [J]. *J. Exp. Bot.*, 2003, 54(381):239 – 248.
- [62] Procissi A, Piazza P, Tonelli C. A maize *r1* gene is regulated post-transcriptionally by differential splicing of its leader[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2002, 49:239 – 248.
- [63] 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.
- [64] Zhang P F, Chopra S, Peterson T. A segmental gene duplication generated differentially expressed myb-homologous genes in maize[J]. *Plant Cell*, 2000, 12:2311 – 2322.
- [65] Selinger D A, Chandler V L. A mutation in the pale aleurone color1 gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(1):5 – 14.
- [66] 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: 1301 – 1308.
- [67] 庞红霞, 祝长青, 覃建兵. 植物花青素生物合成相关基因研究进展[J]. *种子*, 2010, 29(3):60 – 64.