

花青素生物合成的关键酶及其调控因子

彭玉帅¹, 王如峰^{1*}, 张陆军^{2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国医药集团总公司, 北京 100191

摘要: 花青素具有抗氧化、抗炎、调节血脂、抗肿瘤等一系列生物活性, 在药物或保健品开发中显示出重要的潜力。对花青素生物合成过程中的关键酶包括苯丙氨酸解氨酶、查耳酮合成酶、查耳酮异构酶、黄烷酮 3-羟化酶、类黄酮 3'-羟化酶、类黄酮 3', 5'-羟化酶、二氢黄酮醇-4-还原酶、花色素合酶、类黄酮 3-O-糖基转移酶及其调控因子 R2R3-MYB 蛋白、bHLH 蛋白和 WD40 蛋白的研究进展进行综述。

关键词: 花青素; 生物合成; 关键酶; 调控因子; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)01-0131-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.025

Key enzymes and their regulatory factors involved in biosynthesis of anthocyanins

PENG Yu-shuai¹, WANG Ru-feng¹, ZHANG Lu-jun²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. China National Pharmaceutical Group Corporation, Beijing 100191, China

Key words: anthocyanins; biosynthesis; key enzymes; regulatory factors; phenylalanine ammonialyase

花青素 (anthocyanins) 又称花色素, 属于黄酮类化合物, 其基本结构母核是 2-苯基苯并呋喃。花青素广泛存在于植物的花、果实、种子、叶和茎中, 是植物显示不同颜色的决定性物质之一。大多数花青素在花色素基团的 3、5、7 位碳上有羟基取代, 由于其取代基位置的不同而呈现出红色、黄色、蓝色、紫色等不同的颜色^[1]。花青素是天然的可食用色素, 与其他人工色素相比, 安全无毒、无诱变作用, 并且其药理作用也逐渐明晰, 能预防心血管疾病、抗氧化、抗突变和防辐射、保护肝脏、抗癌、提高记忆力、保护视力、降血糖和抗疲劳等^[2-4], 因此, 花青素越来越受到人们的关注。花青素是植物的次生代谢产物, 其生物合成过程受一些酶及其调控因子的调控, 因此了解其生物合成过程中涉及的关键酶及其调控因子对花青素的开发和利用具有重要的意义。

1 花青素生物合成中的关键酶

花青素形成的直接前体是 4-香豆酰辅酶 A (CoA) 和 3-丙二酰 CoA, 在一系列酶的催化作用

下最终合成花青素。在其合成途径中存在一些关键酶, 包括苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase, PAL)、查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI)、黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮 3'-羟化酶 (flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)、类黄酮 3', 5'-羟化酶 (flavonoid 3', 5'-hydroxylase, F3'5'H)、二氢黄酮醇-4-还原酶 (dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、花色素合酶 (anthocyanidin synthase, ANS)、类黄酮 3-O-糖基转移酶 (flavonoid-3-O-glucosyltransferase, 3GT) 等。通过基因工程等手段调控这些酶, 可影响花青素的生物合成, 从而可改变花的颜色或进行品种改良。

1.1 PAL

PAL 催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸, 是合成花青素的起始酶^[5]。PAL 由多基因家族编码, PAL 基因的表达受自身发育和环境因素双重调控。花青素的合成必须有 PAL 的触发, PAL 既是诱导酶, 又是

收稿日期: 2013-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073018, 81274044)

作者简介: 彭玉帅 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物代谢。E-mail: pengyushuai516@sina.com

*通信作者 王如峰 Tel: (010)84738646 E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

张陆军 Tel: (010)82283732 E-mail: zhanglujun@sinopharm.com

限速酶, 光能诱导其活性的提高。杨光道等^[6]研究表明, 苹果着色期间, 随着 PAL 活性增加, 花青素的量也增加, 着色前期 PAL 活性基本上是直线增加, 后期较平稳。陈应鹏等^[7]在研究干旱与黑米中花青素量的关系时发现, 黑米中花青素的量先随干旱胁迫程度的加重而上升, 同时 PAL 活性也增加, 但是, 当干旱程度超过一定限度时花青素量开始下降, 而 PAL 活性仍然上升。说明干旱胁迫使黑米中花青素量上升, 与 PAL 活性有一定关系, 但 PAL 不是黑米花青素合成的惟一调节酶, 还可能与其他酶有关。

1.2 CHS

CHS 是花青素生物合成途径中的第 1 个关键酶, 现在已经从很多植物中克隆得到了 CHS, 如玉米、兰花、高粱、拟南芥、金鱼草、猕猴桃和豆科植物等^[8]。CHS 基因的表达受紫外照射、真菌侵染等条件诱导, 且在花中特异性表达, 其表达量的变化会影响一些植物花色的变化^[9]。骆菁菁等^[10]研究表明, 在月季中 CHS 基因为光敏感性基因, 正常光照下与遮光条件下相比, CHS 基因表达及花青素量均明显高于遮光组, 正常光照组花色为粉红色, 而遮光组为黄色。张亮等^[9]在研究红肉猕猴桃品种时发现, CHS 在内果皮转色前期表达较低, 转色开始期表达急剧升高并达到最大值, 其后直到花后 150 d 一直维持在较低水平。这表明该基因与果实颜色变化存在显著相关性。近年来基于对 CHS 基因的克隆及结构分析, 已经探索出很多基因工程的手段, 在此基础上应用于改造花色和改良植物品种。van der Krol 等^[11]通过将反义 CHS 基因导入到紫色矮牵牛中, 导致其花色苷的形成受到抑制, 最终得到开白色花的矮牵牛; Fukusaki 等^[12]以 CHS 的 mRNA 为靶点, 利用 RNA 干扰技术使夏堇中的 CHS 基因沉默后, 干扰了花色苷的正常表达, 将原蓝色花成功地改造为白色和灰白色花; Jorgenson 等^[13]对矮牵牛等植物的研究表明, 当将 CHS 多拷贝基因导入植物体内时, 导致植物内源 CHS 基因表达紊乱, 从而使花色表现出多样性。

1.3 CHI

CHI 的主要作用是催化 4-羟基查耳酮转化为柚皮素, 如果抑制其基因表达或降低其活性, 会导致 4-羟基查耳酮的大量积累。CHI 基因是由 Mehdy 等^[14]在 1987 年首次从豌豆中分离出来的, 现今已从矮牵牛、菜豆、玉米、豌豆、紫花苜蓿、翠菊和

水母雪莲等多种植物中克隆分离得到了该基因。由于 4-羟基查耳酮是合成黄色花色素的重要底物, 因此, 对 CHI 基因改造后, 多产生黄色花卉。Nishihara 等^[15]运用 RNA 干扰技术, 使烟草的 CHI 基因沉默, 发现花瓣中的黄酮类物质减少, 但是花粉中却积累了大量的查耳酮, 从而使其花瓣变成了黄色。Itoh 等^[16]将转座子插入康乃馨的 CHI 和 DFR 基因中, 使其表达受阻, 从而培育出了黄色康乃馨。

1.4 F3H

F3H 属于氧化戊二酸依赖型加氧酶, 在植物的黄酮生物合成调控中的作用非常重要。现已从矮牵牛、拟南芥、洋葱、玉米、紫花苜蓿中克隆得到了 F3H 基因。Ono 等^[17]运用 RNA 干扰技术, 使蓝紫色夏堇的 F3H 基因沉默, 从而使其花色变为白色。此外, Zuker 等^[18]将反义 F3H 导入只含天竺葵色素苷的橙色香石竹中, 抑制了 F3H 基因的表达, 从而可以得到乳黄色和黄色的香石竹。

1.5 F3'H 和 F3'5'H

F3'H 和 F3'5'H 均属于细胞色素 P450 家族的单加氧酶, 都需还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 作为辅助因子^[19]。很多植物无法合成像翠雀花一样蓝紫色的花色素, 如月季、玫瑰、郁金香、菊花、香石竹等, 就是因为其自身不含有 F3'H 和 F3'5'H 基因。因此, 运用基因工程手段, 将 F3'H 和 F3'5'H 基因导入缺乏此两种基因的植物中, 可长出非传统的蓝紫色花卉, 这已成为花卉花色的研究热点与重点。最早的 F3'5'H 转基因花卉是由 Florigene 和 Sandory 两家公司研究人员完成的, 他们将矮牵牛的 F3'5'H 和 DFR 导入白色香石竹中, 得到了紫色 Moondust 的新品种并投放市场, 获得了很大的经济效益。随后, Calgene Pacific 和 Sundory 两家公司将 F3'5'H 基因转入缺乏该基因的蔷薇中, 得到了蓝色蔷薇。Brugliera 等^[20]将三色堇 F3'5'H 基因导入月季中, 得到了蓝紫色的月季。Brugliera 等^[21]研究还表明, 在菊花中 F3'H 基因的表达可使菊花呈红色或粉色, 而 F3'5'H 基因的表达会使翠雀素积累, 从而使菊花的花瓣呈蓝色。若运用 RNA 干扰技术使内源性的 F3'H 基因沉默, 会使翠雀素的积累增加, 使菊花的花瓣呈现一种新型的蓝色。

1.6 DFR

DFR 属于脂肪滴结合蛋白 (ADPH) 依赖性短链还原酶家族, 在食品工业中, 可作为抗氧化剂和天然食用黄色素^[22]。现已从玉米、矮牵牛、非洲菊、

番茄、葡萄、紫苏、山柏杨、小麦和莲花等植物中克隆得到了 DFR 基因^[23]。通过对 DFR 基因结构的深入研究,了解其特点后,将该基因通过基因工程的手段导入其他花种中,获得了各种与天然花色不同颜色的花卉。Aida 等^[24]将 DFR 及 CHS 导入到蓝猪耳中,由于 2 种基因的导入抑制了其内源基因的表达,故花色变为白色;Johnson 等^[25]将非洲菊中能还原二氢茨非醇(DHK)的 DFR 导入到白色矮牵牛中,得到了砖红色花。通过对紫色矮牵牛和红色香石竹构建反义 DFR 植株,最后分别得到了浅粉色、白色花边和有花斑的矮牵牛和香石竹花。黄春国等^[26]通过转基因技术将 *NiDFR1* 和 *NiDFR2* 基因转入烟草后获得转基因植株烟草的花色为红色,野生型烟草的花色为白色,边缘有淡绿色或淡紫色。此外,DFR 基因在月季中同样表现出光敏感性。由此可见,通过调节 DFR 基因改造花色也是未来主要的研究方向之一。

1.7 ANS

ANS 属于 2-酮戊二酸依赖型双加氧酶,ANS 所催化的步骤在整个花青素生物合成中起着至关重要的作用,因为其主要功能是将无色花青素转化为有色花青素,而该有色产物正是整个途径中的第一个显色化合物,是花卉色彩形成的基础物质^[27]。Rosati 等^[28]对金钟连翘 ANS 的研究认为,ANS 只在萼片中表达而在其花瓣或花药中并不表达,从而导致花瓣中无花青素的合成。Noriko 等^[29]运用 RNA 干扰技术,使蓝色蝴蝶草的 ANS 基因沉默,从而选育出了白花蝴蝶草,并且能够稳定遗传。Seitz 等^[30]认为马蹄莲的佛焰苞为白色,主要是 ANS 基因未表达的结果。Huang 等^[31]研究表明,ANS 在葡萄的果实、叶子、茎、叶柄及叶芽中都有表达,在果皮中存在发育依赖性,即果实越接近成熟其表达量越高。由此可见,抑制或缺乏 ANS,则植物花的颜色会由深变浅,甚至变为无色。由此可知在花色素的生物合成中人们可以通过基因工程的手段抑制或促进该基因的表达,从而调节花卉颜色的深浅。

1.8 3GT

3GT 是花色素苷形成的最后一个酶,主要负责将不稳定的花色素转变为稳定的花色苷。研究表明^[32],3GT 一般在植物后期或果实接近成熟的转色期表达,且表达的强度与花色苷的合成呈正相关。在苹果、草莓和荔枝中已验证花色苷的积累与 3GT 活性呈正比。李兴国等^[33]研究发现,在红色葡萄中

很明显检测到 3GT 基因的表达,而在白色品种中未见其表达。表现型由白色向红色的转变,是控制 3GT 基因表达的结果,所以 3GT 基因的表达在葡萄花色苷合成中具有决定性的作用。

2 花青素生物合成的调控因子

植物花青素的合成除了受结构基因的控制之外,还受到调控基因以及环境因子的影响^[34]。目前已鉴定了 3 类参与花青素合成调控的转录因子:R2R3-MYB 蛋白、bHLH 蛋白和 WD40 蛋白。这些转录因子通过与结构基因启动子中相应的顺式作用元件结合,从而调节花青素生物合成途径中一个或多个基因的表达。在这个过程中一般是由 MYB 蛋白、bHLH 蛋白和 WD40 蛋白构成一个蛋白复合体,直接调控结构基因的转录。利用基因工程技术改变调控因子的表达也可以影响花青素的合成与积累。环境因子包括光照、温度以及糖的浓度都会对花青素的合成与积累产生影响。

2.1 MYB 蛋白

MYB 转录因子可分为 3 类:含有 1 个结构域的 R3-MYB,含有 2 个结构域的 R2R3-MYB 和含有 3 个结构域的 R1R2R3-MYB。与花青素合成相关的 MYB 转录因子通常包含 R2 和 R3 2 个基序(R2R3-MYB)或包含 R3 2 个基序(R3-MYB)。现已从许多植物中分离并鉴定了参与花青素合成调控的 R2R3-MYB 转录因子^[35],如玉米的 *CI/P1*、矮牵牛的 *AN2*、金鱼草的 *Rosea*、紫苏的 *Myb-p1* 和拟南芥的 *TT2*、*PAP1* 和 *PAP2* 等。Huang 等^[36]研究表明,在花青素的生物合成途径中,箭叶淫羊藿的 *EsMYB1* 可以与几个 bHLH 调控因子相互作用并激活 DFR 和 ANS 基因的表达,通过上调花青素生物合成途径中的重要基因来实现对花青素合成的调控。将土壤农杆菌注入到箭叶淫羊藿的叶子中,使 *EsMYBA1* 瞬时表达,也可诱导花青素的积累。在参与花青素生物合成的调控过程中,不仅含有正调控的 MYB 蛋白,还存在具有负调控作用的 MYB 蛋白^[37],如在烟草中,*FaMYB1* 的过量表达会抑制花和雄蕊中花青素和类黄酮的积累,而且这些组织中,花青素合成途径后期的催化酶基因的表达量和催化酶的量也会下降^[38];拟南芥中的 *AtMYB4* 基因在花青素的合成途径中也起到了负调控的作用,若将该基因敲除,便能够促进花青素的合成。

2.2 bHLH 蛋白

植物 bHLH 转录因子能够参与调控多种生理途

径,如花器官发育^[39]、激素应答等^[40],其中调节类黄酮和花青素的合成是bHLH转录因子最重要的功能之一。第1个bHLH蛋白(*Lc*)是从玉米中鉴定的^[41]。Song等^[42]将拟南芥中bHLHIIIId亚群(包括bHLH3、bHLH13、bHLH14、bHLH17)的基因进行遗传杂交,发现bHLH3、bHLH17二倍体,bHLH13、bHLH14、bHLH17三倍体,bHLH3、bHLH13、bHLH14、bHLH17四倍体在拟南芥中的花青素积累量与野生型的相比逐渐增多。而bHLH3、bHLH13、bHLH14、bHLH17单独过表达时则会抑制花青素的积累,即以上bHLHIIIId亚群在花青素的合成中单独作用时,起负调控因子的作用^[43]。玉米种子中bHLH蛋白可对整个花青素合成途径进行调节,但必须与MYB和WB40形成MBW复合体,共同发挥作用。圆叶牵牛中bHLH蛋白可调控花器官以及种皮花青素的合成,将bHLH基因中插入转座子会产生突变体,与野生型相比,这类突变体花色变为白色,种子的颜色也由深棕变为乳白^[44]。矮牵牛中,调节花青素合成的bHLH蛋白有2个:AN1和JAF13,其中AN1基因与结构基因DFR同源,可直接调节DFRA的表达。

2.3 WD40 蛋白

WD40重复蛋白是在植物细胞质中发现的^[45],一般含有4~16个串联重复的WD基元,每个基元含有由40个氨基酸残基组成的保守序列。目前,多种WD40重复蛋白基因已得到鉴定^[46],如矮牵牛的*AN1*、拟南芥的*TTG1*、紫苏的*PFWD*、玉米的*PAC1*和苹果的*MdTTG1*等。矮牵牛*AN1*、拟南芥*TTG1*若发生突变,则会抑制结构基因DFR的表达,从而影响花青素积累。玉米的*PAC1*与矮牵牛的*AN1*以及拟南芥的*TTG1*有相似的调节作用^[34],在*PAC1*基因缺失的突变体中,花色素苷结构基因的表达量会下调,导致种子的糊粉层没有花青素的积累,但是种皮的花青素合成并不受到影响。研究表明,在苹果中的WD40蛋白*MdTTG1*过表达时,可以使花青素生物合成途径下游的相关基因表达上调,从而使花青素积累增加。WD40蛋白的表达相当广泛,可以与bHLH类以及MYB类调控因子形成复合体共同起作用,来调节花青素的合成。但是苹果中的*MdTTG1*只与bHLH蛋白相互作用来调节花青素的合成,而不与MYB蛋白相互作用^[47]。

2.4 其他调控因子

花青素的合成除了受各种调节蛋白的影响,还

受其他各种环境因素的影响。例如,在花青素的合成过程中,不同的光质对花青素具有不同的调控作用^[48]。UV-B可以诱导花朵和叶片中花青素的合成,UV-A可以特异性诱导番茄幼苗和果实中PAL的表达和花青素的合成,但对其他植物的花青素合成影响较小。温度对花青素生物合成相关基因的表达起着至关重要的作用,是影响花青素积累的另一个主要环境因子。低温会促进花青素的合成,高温使植物分解代谢加剧,导致花青素合成减少和分解增加。夜间高温会抑制葡萄CHS、F3H、DFR、ANS和类黄酮糖基转移酶(UFGT)的表达,降低酶活性,尤其是UFGT,能导致果皮中的花青素积累减少^[49]。糖作为一种信号分子,通过特异的信号转导途径,调节花青素合成相关酶基因的表达而影响植物花青素的积累。研究表明,糖可以显著影响多种植物花青素的积累。矮牵牛花冠的着色需要糖的参与,在葡萄表皮中也发现糖会诱导大部分花青素合成相关基因的表达^[50]。

3 研究前景

近年来,有关花青素生物合成与调控机制的研究取得了很大进展,对各种因素调控花青素合成的研究也有一定的成果。理论上应是多种因素形成一个复杂的系统来调控花青素的合成,但目前的研究大多集中于单一因素上,如合成过程的某个关键酶、某个基因、某个调节蛋白或者是某种环境因素对花青素合成的影响等。多种因素对花青素合成的综合影响效应研究还较少,因此,花青素的多因素调控机制还有待于进一步研究。随着蛋白质组学以及基因组研究的不断发展,花青素合成关键酶的研究越来越深入,基因调控机制将逐渐明晰,越来越多的相关基因将得到分离与功能鉴定。这将有利于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] 胡可,韩科,戴思兰.环境因子调控植物花青素合成及呈色的机理[J].植物学报,2010,45(3):307-317.
- [2] 徐春明,庞高阳,李婷.花青素的生理活性研究进展[J].中国食品添加剂,2013(3):205-210.
- [3] 谢文利,孙静,赵艳威,等.原花青素的降血糖作用及急性毒性研究[J].中草药,2009,40(10):1615-1616.

- [4] 刘岱琳, 曹波, 张静泽, 等. 复方低聚原花青素粉抗疲劳作用的保健功效研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 198-200.
- [5] 黄鸿曼, 袁利兵, 彭志红, 等. 花青素的生物合成与环境调控研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2011(13): 118-120.
- [6] 杨光道, 段琳, 束庆龙, 等. 油茶果皮花青素、糖含量和 PAL 活性与炭疽病的关系 [J]. 林业科学, 2007, 43(6): 100-104.
- [7] 陈应鹏, 刘广娜, 闰月新, 等. 干旱胁迫对黑米花青素含量和 PAL 活性的影响 [J]. 吉林农业科技学院学报, 2012, 21(1): 8-10.
- [8] Aizza L C, Domelas M C. A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passion flowers [J]. *J Nucleic Acids*, 2011, doi: 10. 4061/2011/371517.
- [9] 张亮, 满玉萍, 王彦昌, 等. 猕猴桃花青素合成途径基因 *AcCHS* 和 *AcLDOX* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2124-2132.
- [10] 骆菁菁, 李虹, 柏斌斌, 等. 光照对月季‘光谱’花青素合成及其 CHS 和 DFR 基因表达的影响 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(1): 126-131.
- [11] van der Krol A, Lenting P, Veenstra J, et al. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation [J]. *Nature*, 1988, 333: 860-869.
- [12] Fukusaki E, Kawasaki K, Kajiyama S, et al. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by down regulation of chalcone synthase genes with RNA interference [J]. *J Biotechnol*, 2004, 111(3): 229-240.
- [13] Jorgensen R A. Cosuppression, flower color patterns and metastable gene expression states [J]. *Science*, 1995, 268(5211): 686-691.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Itoh Y, Higeta D, Suzuki A. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(5): 578-585.
- [17] Ono E, Fukuchi-Mizutani M, Nakamura N, et al. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(29): 11075-11080.
- [18] Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone3-hydroxylase gene [J]. *Molecular Breed*, 2002, 9(1): 33-41.
- [19] 赵启明, 李范, 李萍. 花青素生物合成关键酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2012(12): 25-32.
- [20] Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton T A, et al. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Htl locus of *Petunia hybrida* [J]. *Plant J*, 1999, 19(4): 441-45.
- [21] Brugliera F, Tao G Q, Tems U, et al. Violet/blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(10): 1696-1710.
- [22] 李云, 卢其能, 赵昶灵, 等. 二氢黄酮醇 4-还原酶基因的结构与功能研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(26): 15858-15861.
- [23] 刘娟, 冯群芳, 张杰. 二氢黄酮醇4-还原酶 (DFR) 与花色的修饰 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(6): 715-719.
- [24] Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, et al. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation [J]. *Plant Sci*, 2000, 153(1): 33-42.
- [25] Johnson E T, Ryu S, Yi H, et al. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase [J]. *Plant J*, 2001, 25(3): 325-333.
- [26] 黄春国, 素娟. 二氢黄酮醇-4-还原酶 (DFR) 基因在烟草中的过量表达 [J]. 山西农业科学, 2012, 40(6): 563-565.
- [27] Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(3): 288-303.
- [28] 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: 73-79.
- [29] Noriko N, Masako F M, Kiyoshi M, et al. RNAi suppression of the anthocyanidin 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): 13-17.
- [30] Seitz C, Oswald N, Forkmann G, et al. Being acyanic: an unavoidable fate for many white flowers [J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 612: 83-88.

- [31] Huang W J, Sun W, Li H, *et al.* Expression and tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in grapevine [J]. *Protoplasma*, 2011, 248: 267-279.
- [32] Ju Z G. Activities of chalcone and UDP Gal: flavonoid-3-*O*-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple [J]. *Sci Horticulturae*, 1995, 63: 175-185.
- [33] 李兴国, 于泽源. 华青苷的研究进展 [J]. 北方园艺, 2003(4): 6-8.
- [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] 郭凤丹, 王效忠, 王兴军, 等. 植物花青素生物代谢调控 [J]. 生命科学, 2011, 23(10): 938-943.
- [36] Huang W J, Sun W, Li H, *et al.* A R2R3-MYB transcription factor from epimedium sagittatum regulates the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *PLoS ONE*, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070778.
- [37] 刘守梅, 孙玉强, 王慧中. 植物 MYB 转录因子研究 [J]. 杭州师范大学学报, 2012, 11(2): 146-150.
- [38] 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.
- [39] Heisler M G, Atkinson A, Bylstra Y H, *et al.* A gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein [J]. *Development*, 2001, 128: 1089-1098.
- [40] Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Galstyan A, *et al.* PAR1 and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks [J]. *Plant Signal Behavior*, 2008, 3(7): 453-454.
- [41] 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]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 1989, 86: 7092-7096.
- [42] Song S S, Qi T C, Fan M, *et al.* The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development [J]. *PLoS Gene*, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003653.
- [43] Pauwels L, Barbero G F, Geerinck J, *et al.* NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling [J]. *Nature*, 2010, 464: 788-791.
- [44] 杨鹏程, 周 波, 李玉花. 植物花青素合成相关的 bHLH 转录因子 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(8): 747-758.
- [45] 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.
- [46] 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]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 450-464.
- [47] 闵远琴, 闫海芳, 李玉花. 花青素合成中的 WD40 蛋白 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(9): 863-870.
- [48] Guo J, Wang M. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 62(1): 1-8.
- [49] Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition [J]. *Sci Horticulturae*, 2005, 105(3): 319-330.
- [50] Wang Y, Zhang C, Li J, *et al.* Different influences of β -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of cabernet gernerisch and possible reason [J]. *Food Chem*, 2013, 140(1/2): 245-254.