

# 鹤望兰花青素合成酶基因*SrANS*的克隆及表达分析

樊荣辉<sup>1,2,3</sup> 黄敏玲<sup>1,2,3\*</sup> 吴建设<sup>1,2,3</sup> 钟淮钦<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013; <sup>2</sup>福建省农业科学院花卉研究中心, 福州 350013;

<sup>3</sup>福建省特色花卉工程技术研究中心, 福州 350013)

**摘要** 采用RT-PCR和RACE方法从鹤望兰蓝色花瓣中克隆到1个ANS基因(*SrANS*)。该cDNA全长1 389 bp(GenBank收录号KC484623), 具有完整的开放阅读框(ORF), 共1 083个碱基, 编码361个氨基酸。与其他物种的氨基酸序列都有一定的同源性, 其中与鸢尾的ANS同源性最高, 达到74%。系统进化树分析显示, 鹤望兰*SrANS*与红掌蛋白亲缘关系较近。保守结构域预测表明, 该基因编码的蛋白具有典型的ANS蛋白功能结构域, 其保守结构域中含有铁离子及2-O-酮戊二酸结合位点, 属于2OG-FeII\_Oxy双加氧酶超家族。应用半定量PCR分析表明, *SrANS*在蓝色花瓣中高表达, 且在花发育的花蕾中期和始花期表达量最高。

**关键词** 鹤望兰; 花青素合成酶; 类黄酮生物合成; 基因克隆

## Cloning and Expression of Anthocyanidin Synthase in *Strelitzia reginae* Banks

Fan Ronghui<sup>1,2,3</sup>, Huang Minling<sup>1,2,3\*</sup>, Wu Jianshe<sup>1,2,3</sup>, Zhong Huaiqin<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; <sup>2</sup>Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou 350013, China; <sup>3</sup>Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou 350013, China)

**Abstract** In the study, the full-length cDNA sequence of ANS gene (*SrANS*) was cloned from blue petals of *Strelitzia reginae* Banks using RT-PCR and RACE techniques. The cDNA sequence was 1 389 bp and included a whole open reading frame of 1 083 bp, encoding a polypeptide of 361 amino acids. The amino acid was highly conserved compared with other ANS homologues and shared up to 74% homology with ANS from *Iris hollandica*. Phylogenetic analysis indicated that *SrANS* was more related to ANS from *Anthurium andraeanum*. The conserved structural domain analysis revealed that *SrANS* had the typical functional domains of ANS protein, containing 2-oxoglutarate and iron ion combination sites and belonging to the 2OG-Fe(II)-dependent dioxygenase superfamily. The semi-quantitative PCR analysis indicated that *SrANS* was highly expressed in mid-bud period and early flowering period, and the transcript level was highest in blue petals.

**Key words** *Strelitzia reginae* Banks; anthocyanidin synthase; flavonoid biosynthesis; gene cloning

鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)又名天堂鸟, 是旅人蕉科鹤望兰属多年生草本观赏植物, 有很高的观赏价值。其叶大姿美, 花形奇特, 是幸福和吉祥的象征, 有鲜切花之王的美称。目前, 鹤望兰属

(*Strelitzia*)栽培品种及其花色都比较单一, 需进一步丰富其花色多样性。

花色是观赏植物的重要品质特性, 培育新型花色是花卉产业的研究热点之一<sup>[1]</sup>。类黄酮被认

收稿日期: 2013-07-01 接受日期: 2013-08-20

福建省重大专项专项项目(批准号: 2010NZ0003)和福建省农业科学院科技创新团队重点科研项目(批准号: CXTD2011-20)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn

Received: July 1, 2013 Accepted: August 20, 2013

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Fujian Province (Grant No.2010NZ0003) and Technology Innovation by Fujian Academy of Agricultural Science (Grant No.CXTD2011-20)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-87586106, E-mail: pudang12@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-10-29 11:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131029.1118.003.html>

为是大多数花色形成的主要色素群<sup>[2]</sup>。花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)是类黄酮生物合成的重要催化酶, 位于花青素生物合成通路末端, 属于依赖2-酮戊二酸的双加氧酶家族, 催化无色花青素转变成花青素(苷)<sup>[3-4]</sup>。目前已从金莲翘(*Forsythia × intermedia*)<sup>[5]</sup>、文心兰(*Oncidium Gower Ramsey*)<sup>[6]</sup>、紫苏(*Perilla frutescens*)<sup>[7]</sup>、甘薯(*Ipomoea batatas*)<sup>[8]</sup>、洋葱(*Allium cepa*)<sup>[9]</sup>和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[10]</sup>等植物中分离到ANS基因。但在鹤望兰中未见报道。本实验首次克隆了*SrANS*, 并进行不同发育期及不同组织的表达分析, 为深入研究该基因的调控机制提供分子依据, 对揭示*SrANS*在鹤望兰花色形成中的作用具有重要理论意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以福建省农业科学研究院花卉研究中心苗圃栽培的鹤望兰(*Strelitzia reginae* Banks)为材料。剪取叶片、黄色花萼和蓝色花瓣, 用于基因的克隆和组织表达分析; 剪取花蕾始期、中期、始花期、盛花期的花朵, 用于花发育表达分析。材料取回后用液氮速冻, 然后于-80 °C超低温保存。

RNA提取及反转录所用试剂和pMD19-T vector均购自TaKaRa公司; Taq酶、dNTP为上海生工生物工程服务有限公司产品; RACE试剂盒购自Clontech公司; 测序及引物合成由博尚生物技术有限公司负责完成。

### 1.2 *SrANS*全长cDNA的获得

根据已登录其他物种的ANS保守氨基酸序列(鸢尾BAF62629、郁金香BAH98156、水稻CAA69252), 设计简并引物ANS-F和ANS-R(表1)。鹤望兰蓝色

花瓣总RNA的提取采用Trizol法。将RNA反转录成cDNA, PCR扩增保守序列。扩增程序为: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性40 s, 52 °C退火40 s, 72 °C延伸50 s, 35个循环; 72 °C延伸8 min。

根据所得的cDNA保守序列, 分别设计3' RACE和5' RACE特异性引物ANS-3'和ANS-5'(表1), 按照RACE试剂盒的说明书进行cDNA末端扩增。引物合成及测序工作由上海生工生物工程服务有限公司完成。

根据3段序列拼接而得的cDNA全长, 设计其全长扩增引物SrANS-F和SrANS-R(表1), 获得目的基因全长。

### 1.3 生物信息学分析

利用BLAST对克隆的目的序列进行同源分析; 使用DNASar软件寻找最大开放阅读框(ORF); 通过软件DNAMAN进行氨基酸序列分析; 应用MEGA4进行系统进化树的分析。

### 1.4 半定量PCR检测基因的表达

应用半定量RT-PCR技术检测*SrANS*基因在鹤望兰不同组织及不同花发育阶段的表达情况。依据*SrANS*基因全长序列, 设计半定量RT-PCR扩增引物B1和B2(表1), 目的条带为198 bp。以鹤望兰18s rRNA(AF069229.1)为内标, 设计内标引物18S-F和18S-R(表1), 目的条带为344 bp。

扩增程序: 94 °C变性4 min; 94 °C变性35 s, 52 °C退火35 s, 72 °C延伸40 s, 29个循环; 72 °C延伸7 min。

## 2 结果

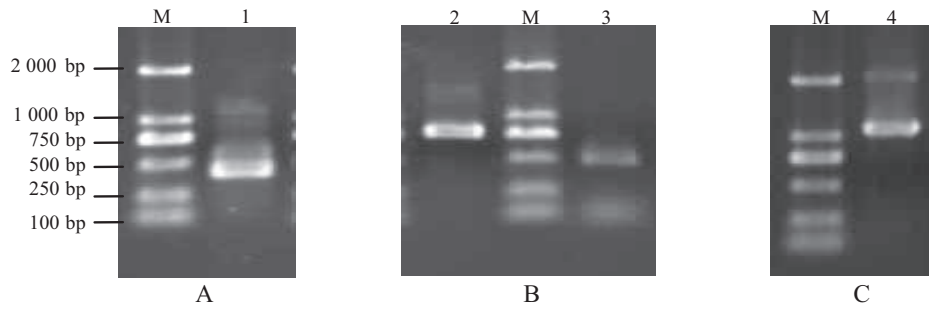
### 2.1 *SrANS*全长cDNA克隆及序列分析

应用已设计的引物ANS-F和ANS-R, 以鹤望兰始花期蓝色花瓣的cDNA为模板, 通过PCR扩增及测

表1 鹤望兰*SrANS*基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers for *SrANS* cloning and expression analysis in *Strelitzia reginae* Banks

引物名称	引物序列	作用
Primer name	Primer sequence	Funtion
ANS-F	5'-GA(A/C/G) TGG GGN GT(C/G) ATG CA-3'	For the conserved fragment
ANS-R	5'-GGG CA(C/T) (C/T)T(C/G/T) GGG TAG TAG TT-3'	
ANS-3'	5'-AGG GGA AGC TGG AGG AGG AAC TTG GA-3'	3' RACE
ANS-5'	5'-CGA CGA CTG GTC GTT GGC GTA CTG CT-3'	5' RACE
SrANS-F	5'-ATG GCC ACC AAG GTT GTG TCT GC-3'	For the cDNA of ORF
SrANS-R	5'-TCA ATT TGG GGT GTT GAA CTC CC-3'	
B1	5'-ATC GTC AAT CAC GGC ATC TCC-3'	For the expression of <i>SrANS</i>
B2	5'-CCC TCT TTC AAT CCA AGT CCC-3'	
18S-F	5'-CTG AGA AAC GGC TAC CAC AT-3'	For the internal control
18S-R	5'-ACC CAA GGT CCA ACT ACG AG-3'	



M: DNA标准分子量DL2000; 1: 保守序列; 2: 3' RACE; 3: 5' RACE; 4: ORF。

M: DNA marker DL2000; 1: the fragment; 2: 3' RACE; 3: 5' RACE; 4: ORF.

图1 鹤望兰*SrANS*基因的克隆

Fig.1 Isolation of *SrANS* gene in *Strelitzia reginae* Banks

```

1      GACAACAGCAGATCGAATCGAGGGATCGAGTCTCTTTCGAAGAGTAGCAGCAATCGTCGT
61     ACTGAAGGCTTGGAGAGAGAAATCAAGAGAGATCCAATGGCCACCAAGTTGTGTCTGCA
                                         M A T K V V S A
121    GTGCCGAGGGTGGAGATTCTGGCGAGGAGCGGCATCAATGAGATCCCCACGGAGTACATC
41     V P R V E I L A R S G I N E I P T E Y I
181    CGCCCCGAGTCGGAGCGGCTCAGCGTCCGGCGACCGGTTTCGAGGAGGTGAGGAAGACC CG
61     R P E S E R L S V G D A F E E V R K T A
241    GAGGGCCCTCAGATCCCGTGGTGGACCTCCAGGGGTTGACTCGCCGGACGAGGCAGTG
81     E G P Q I P V V D L Q G F D S P D E A V
301    CGGCTGGCGTGGAGGAGGTGAAGAAGCGGCGTCCGACTGGGGGGTGTATGCACATC
101    R L A C V E E V K K A A S D W G V M H I
361    GTCAATCACGGCATCTCCTTGGAGTTCATCGAGCAGCTGAGGAGGGTGGGGAAGGAGTTC
121    V N H G I S L E L I E Q L R R V G K E F
421    TTCGACCTGCCATCGAGCAGAAGGAGCAGTACGCCAACGACCAGTGTGCGGGGAAGATC
141    F D L P I E Q K E Q Y A N D Q S S G K I
481    CAAGGCTACGGGAGCAAGCTGGCCAACAACGCCAGTGGGCAACTCGAGTGGGAGGACTAC
161    Q G Y G S K L A N N A S G Q L E W E D Y
541    TTCTCCACCTCATATTCCCGGAGGAGAAGACCGATCTGTCCATTTGGCCTAAGCAACCA
181    F F H L I F P E E K T D L S I W P K Q P
601    TCTGACTACATCGAGGTTACTAAGGAGTTGGGAAGCAGCTGAGGGTGGTGGTCAACAA
201    S D Y I E V T K E F G K Q L R V V V T K
661    ATGCTGCAAGCTTTCCCTGGGACTTGGACTGAAAGAGGGGAAGCTGGAGGAGGAACTT
221    M L Q A L S L G L G L K E G K L E E E L
721    GGAGGGATGGAGGACCTGCTGCTTCAAGATCAACTACTACCCCATCTGCCCGCAG
241    G G M E D L L L Q M K I N Y Y P I C P Q
781    CCCGAACTCGCCCTCGGCGTCGAGGCACACACCGACGTCAGCGCCCTCTCCTTCATCTC
261    P E L A L G V E A H T D V S A L S F I L
841    CACAACATGGTCCCGGGGCTCAGGTCTACTACGGCGGCAAGTGGGTACGGCCAAGTGC
281    H N M V P G L Q V Y Y G G K W V T A K C
901    GTGCCGGACACCATCATCATGCACGTCCGGCAGTGCCTCGAGATCCTCAGCAATGGCCTC
301    V P D T I I M H V G D C L E I L S N G L
961    TACAAGAGCATCCTCCACCGGGCTCGTCAACAAGGAGAAGGTTTCGCATCTCCTGGGGC
321    Y K S I L H R G L V N K E K V R I S W A
1021   GTCTTCTGCGAACCCCAAGGATAGGATTGTGCTGACCCGCTGCAGGACGTGGTGAGC
341    V F C E P P K D R I V L T P L Q D V V S
1081   GATGACAACCCGCAAGTTCCCCCTCGACCTTCGATCAGCACATCCAGCACAAGCTC
361    D D N P P K F P P R T F D Q H I Q H K L
1141   TTCAGGAAGAGTCAAGGGGAGTTCAACACCCCAAATTGAGGTTGCAATATGTTGCAGTGC
381    F R K S Q G E F N T P N
1201   ATGTCGTCTGCCCTTCCAACGAACAATCTATCCAGTCCGTGATGCGTCTAAATTTGCAT
1261   ATGTGGCTTGCAGAGTCAAACACTTATAATTTGGTGTGCTTGTGTGTGTCGCTCTTG
1321   TTTGGTTTTCATGGCAATGCTTATGATAATATGCTAGCCTTATTCTTAAAGTTGACATC
1381   TCGCTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

起始密码子和终止密码子用下划线表示, 阴影处是保守结构域。

The translation start codon and the stop codon are underlined, and the functional domain are shadowed.

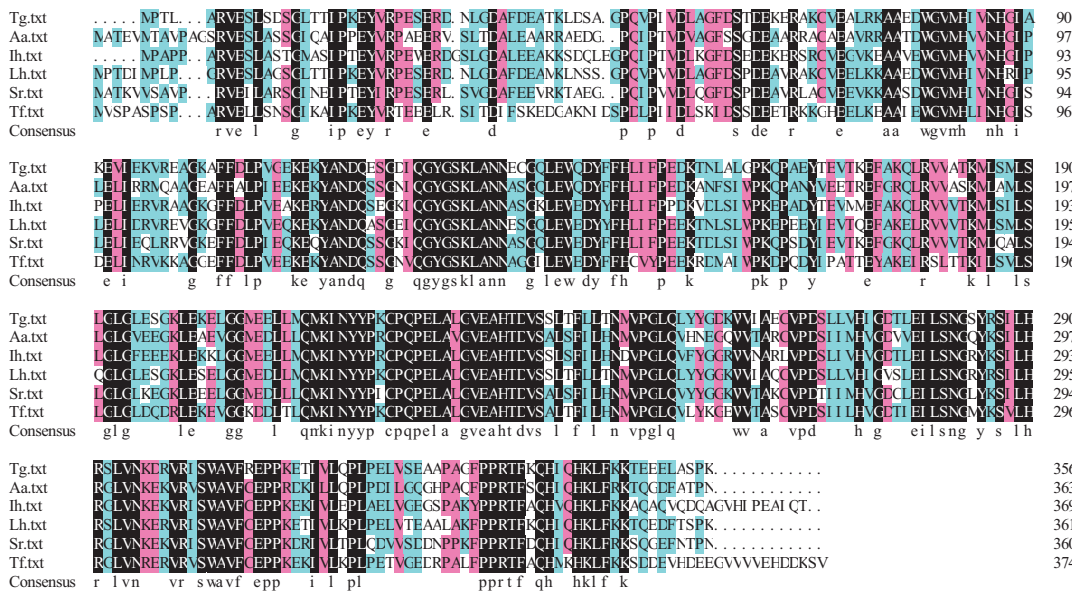
图2 *SrANS*基因cDNA的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 The complete cDNA sequence of *SrANS* and its predicted amino acid sequence

序, 获得长为437 bp的片段(图1A)。检索分析, 该片段编码的蛋白与百合ANS(BAM28976)同源性最高, 达79%。

利用末端特异性扩增引物ANS-3'和ANS-5', 经PCR扩增、克隆和测序后, 在3'端和5'端分别得到

692 bp和471 bp的片段(图1B), 与保守序列有79 bp和132 bp的重叠。将上述3段序列拼接得到*SrANS*基因全长, 并应用全长扩增引物(表1)进行PCR扩增, 最终得到1 389 bp的cDNA全长序列(图1C)。该基因含有一个1 083 bp的完整开放阅读框(第96~1 179个碱



Sr: 鹤望兰; Lh: 百合; Aa: 红掌; Ih: 鸢尾; Tg: 郁金香; Tf: 夏堇。

Sr: *Strelitzia reginae* Banks; Lh: *Lilium hybrid division*; Aa: *Anthurium andraeanum*; Ih: *Iris × hollandica*; Tg: *Tulipa gesneriana*; Tf: *Torenia fournieri*.

图3 鹤望兰*SrANS*氨基酸同源性分析

Fig.3 Homology analysis of *SrANS* in *strelitzia reginae* Banks

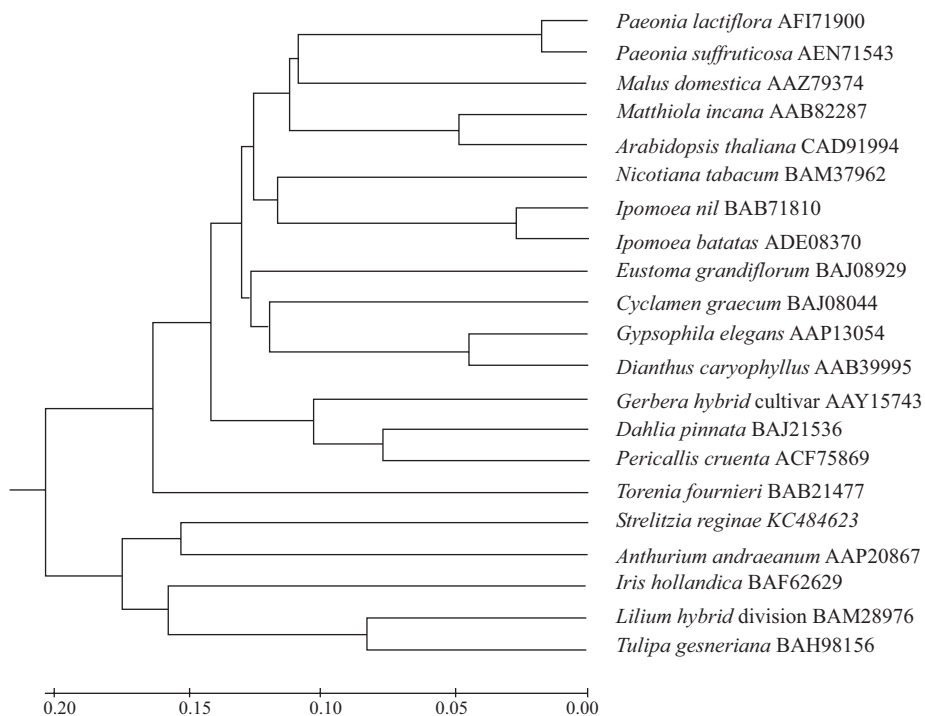


图4 鹤望兰*SrANS*与其他植物20个ANS蛋白的系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of ANS in *Strelitzia reginae* Banks with 20 other plant ANS

基), 编码361个氨基酸。5'非编码区长96 bp, 3'非编码区长210 bp。GenBank登录号KC484623。

SrANS编码的361个氨基酸分子量和等电点分别为40.56 kDa和5.08, 且具有典型的ANS蛋白的保守结构域(图2): 2OG-FeII\_Oxy功能结构域(第217~313处), 由2-O-酮戊二酸和Fe(II)-依赖的氧化酶超家族组成, 行使双加氧作用。其中有与Fe(II)结合所需的4个组氨酸(His)(第238、249、276、294处)和3个天冬氨酸(Asp)(第240、271、279处), 及与2-酮戊二酸特异结合所需的2个精氨酸(Arg)(第295、304处)。

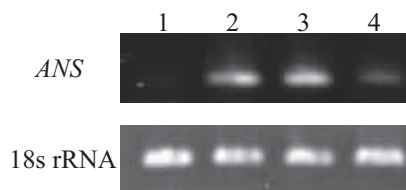
## 2.2 SrANS编码氨基酸的同源性及其系统进化树分析

利用NCBI Blastp及DNAMAN, 将SrANS推导的蛋白与其他植物ANS氨基酸序列进行比较(图3)得知, 该蛋白与鸢尾(BAF62629)、百合(BAM28976)、红掌(AAP20867)、郁金香(BAH98156)、夏堇(BAB21477)等蛋白的同源性较高, 分别达74%、73%、73%、68%、61%。

应用MEGA4.0软件对21个ANS的蛋白进行构建系统进化树, 结果显示, ANS蛋白序列的进化基本符合植物分类学的进化规律(图4), 即SrANS与单子叶植物(百合*Lilium hybrid division*、鸢尾*Iris × hollandica*、郁金香*Tulipa gesneriana*、红掌*Anthurium andraeanum*)的ANS蛋白亲缘关系较近, 聚为一支, 而与双子叶植物的ANS蛋白亲缘关系较远, 分属于不同的聚类簇中。

## 2.3 SrANS基因的表达分析

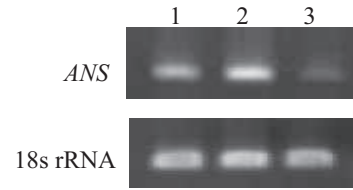
以鹤望兰18S rRNA为内标, 用半定量RT-PCR技术检测SrANS在鹤望兰不同花发育阶段的表达情况表明, SrANS在花蕾中期和始花期表达量最高, 在盛花期表达量减弱(图5)。在不同组织中表达检测结果显示, SrANS在始花期蓝色花瓣中表达量最高, 其



1: 花蕾前期; 2: 花蕾中期; 3: 始花期; 4: 盛花期。  
1: early bud period; 2: mid-bud period; 3: early flowering period; 4: blooming period.

图5 鹤望兰花发育过程中ANS的表达

Fig.5 Expression of ANS in different growth periods of flowering from *Strelitzia reginae* Banks



1: 黄色萼片; 2: 蓝色花瓣; 3: 叶片。

1: yellow sepals; 2: blue petals; 3: leaf.

图6 ANS在鹤望兰不同组织中的表达

Fig.6 Expression of ANS in different tissues of *Strelitzia reginae* Banks

次是在黄色萼片中, 在叶片中表达量最低(图6)。

## 3 讨论

花青素合成酶作为花色素苷合成通路末端的酶, 决定了花青素的累积, 在花形成及果实着色中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。ANS属于2-O-酮戊二酸和铁离子依赖的双加氧酶家族, 其保守结构域中含有的2-O-酮戊二酸和铁离子结合位点是细胞色素P450家族基因普遍存在的活性中心结构<sup>[10]</sup>, 并与花色素苷合成途径中同属此家族的黄烷酮3-羟化酶(F3H)在一些保守性基序上有一定同源性<sup>[11]</sup>。

本研究以花色素含量最高的蓝色花瓣为材料, 采用RACE技术, 成功克隆了一个鹤望兰花青素合成酶基因SrANS, 并对其编码的蛋白质进行了生物信息学分析。保守结构域分析表明, 该基因编码的蛋白具有典型的2-O-酮戊二酸和Fe<sup>2+</sup>-依赖的双加氧酶家族(2OG-FeII\_Oxy)的保守结构域。并含有双加氧酶家族基因典型特征, 有与Fe(II)结合所需的His、Asp及与2-O-酮戊二酸特异结合的Arg, 这与其他植物ANS的典型特征相一致<sup>[5]</sup>。但是, SrANS编码的保守氨基酸数目与其他植物ANS有所不同, 蒺藜苜蓿含2个His、1个Asp和1个Arg<sup>[12]</sup>, 而山药含5个His、3个Asp和2个Arg<sup>[13]</sup>。系统进化分析显示, 鹤望兰SrANS蛋白与单子叶植物的ANS蛋白聚为一支而与双子叶植物亲缘关系较远, 表明SrANS的进化基本符合植物分类学的进化规律。

本研究通过半定量RT-PCR技术对SrANS在鹤望兰花不同发育阶段及不同组织中的表达进行检测, 结果表明, 从初蕾期到始花期SrANS基因表达量逐渐增加, 盛开期表达量开始下降。说明在花发育过程中, 随着花的开放, ANS基因的表达量增大, 其催化合成花青素(苷)的量也会增加, 使得花瓣的蓝

色着色加深; 而当*ANS*基因的表达量不再增加时花色稳定, 最后随着*ANS*的表达量降低, 花瓣蓝色也变浅。Rosati等<sup>[5]</sup>采用RT-PCR和Northern blot方法对金连翘(*Forsythia × intermedia*) *ANS*的表达进行分析发现, *ANS*只在花青素苷积累的花萼中表达, 而在没有花青素苷积累花瓣和花药中未见表达。 *ANS*基因在鹤望兰蓝色花瓣中的表达量较高可能与花青素的合成有关, 推测*SrANS*可能参与了鹤望兰花色形成的分子调控。

*ANS*是花色素苷合成途径的关键酶, 可通过上调或抑制*ANS*基因的表达, 以改变花色素苷的含量或成分, 从而引起植物花色的变化。Noriko等<sup>[14]</sup>利用RNAi技术抑制蓝猪耳(*Torenia fournieri*) *ANS*基因的表达, 花色由蓝色变为白色, 且白花性状十分稳定。而Reddy等<sup>[15]</sup>在水稻中过量表达*ANS*基因, 使转基因植株花青素含量增加, 种皮呈现紫红色。因此, 本课题组今后拟通过转基因技术对*SrANS*基因进行功能验证, 并进一步阐明*SrANS*基因在鹤望兰花色形成中的作用机制, 最终为分子水平上改良鹤望兰花色奠定基础。

### 参考文献 (References)

- Mol J, Cornish E, Mason J, Koes R. Novel coloured flowers. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(2): 198-201.
- 黄金霞, 王亮生, 李晓梅, 鲁迎青. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展. *植物学通报*(Huang Jinxia, Wang Liangsheng, Li Xiaomei, Lu Yingqing. *Advances in molecular basis and evolution of floral color variation. Chinese Bulletin of Botany*) 2006; 23(4): 321-33.
- Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: Molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *Plant J* 1999; 17(2): 181-9.
- Torskangerpoll K, Andersen M. Colour stability of anthocyanidins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem* 2005; 89(3): 427-40.
- Rosati C, Cadic A, Duron M, Ingouff M, Simoneau P. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia × intermedia* reveals organ-specific expression during flower development. *Plant Sci* 1999; 149(1): 73-9.
- Chiou CY, Yeh KW. Differential expression of MYB gene (Og-MYB1) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium Gower Ramsey*. *Plant Mol Bio* 2008; 66: 379-88.
- Gong Z, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Bio* 1997; 35(6): 915-27.
- Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiol* 2007; 143(3): 1252-68.
- Kim S, Binzel ML, Yoo KS, Park S, Pike LM. Pink(P), a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. *Mol Genet Genomics* 2004; 272(1): 18-27.
- Wilmouth RC, Turnbull JJ, Welford RW, Clifton IJ, Prescott AG, Schofield CJ. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 2002; 10(1): 93-103.
- Owens DK, Crosby KC, Runac J, Howard BA, Winkel BS. Biochemical and genetic characterization of Arabidopsis flavanone-3 $\beta$ -hydroxylase. *Plant Physiol Biochem* 2008; 46 (10): 833-43.
- Pang YZ, Peel GJ, Wright E, Wang ZY, Dixon RA. Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 2007; 145: 601-15.
- 周生茂, 王玲平, 向 珣, 韦本辉, 李立志, 李杨瑞, 等. 山药*ANS*基因的克隆和分子特性及其与花青素积累的关系. *园艺学报*(Zhou Shengmao, Wang Lingping, Xiang Xun, Wei Benhui, Li Lizhi, Li Yangrui, *et al.* Cloning and molecular characteristics of *ANS* gene and its correlations with anthocyanin accumulation in Yam. *Acta Horticulturae Sinica*) 2009; 36(9): 1317-26.
- Noriko N, Masako FM, Kenishi S. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnol* 2006; 23(1): 13-7.
- Reddy AM, Reddy VS, Scheffier BE, Wienand U, Reddy AR. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metab Eng* 2007; 9(1): 95-111.