

矮牵牛花色素苷合成途径中的关键酶及其转录调控

王 蕾 韦灵林 徐 虹*

(西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要 类黄酮化合物的生物合成途径是目前研究的最清楚的植物次生代谢途径之一, 花色苷的生物合成属于类黄酮化合物的分支途径, 在一些模式植物上已经被清楚地阐明。本文综述了近年来对模式植物矮牵牛(*Petunia hybrida*)花色苷合成途径的研究结果, 重点阐述对矮牵牛中花色苷生物合成途径、合成途径中的关键酶以及这些酶转录调控的研究进展, 这些将有益于人们进一步利用基因工程的手段进行花卉的分子育种。

关键词 矮牵牛; 花色苷合成相关基因; 转录调控

花色苷的生物合成属于类黄酮化合物的分支途径, 通过细胞质和内质网膜上的一系列酶促反应而完成, 最终的产物被运送到植物的液泡中贮藏^[1,2], 花瓣的着色就是由于其表皮细胞液泡中不同种类和含量的花色苷的累积^[3]。

矮牵牛(*Petunia hybrida*)的栽培始于十九世纪三十年代前期^[4], 现在已经成为一种广泛栽培的观赏植物, 更是植物分子生物学研究中的模式植物。商业矮牵牛根据花瓣颜色主要分为三类: 红色、粉红到玫瑰红色、葡萄酒色到蓝色, 这些颜色的差异主要是由于花瓣中含有不同的花色苷。栽培矮牵牛品种的花冠中主要含有矢车菊素糖苷(红色)、芍药素糖苷(粉红到玫瑰红色)、飞燕草素糖苷(蓝色到紫色)、矮牵牛素糖苷(紫色)和锦葵色素糖苷(葡萄酒色和蓝色)5种花色苷^[5]。

控制矮牵牛花色苷生物合成的基因可以分为两类, 第一类是编码花色苷合成酶的结构基因, 第二类是负责编码调节因子、控制生物合成途径中多种酶的转录和活性的调节基因。

1 矮牵牛花色素苷的生物合成途径概述

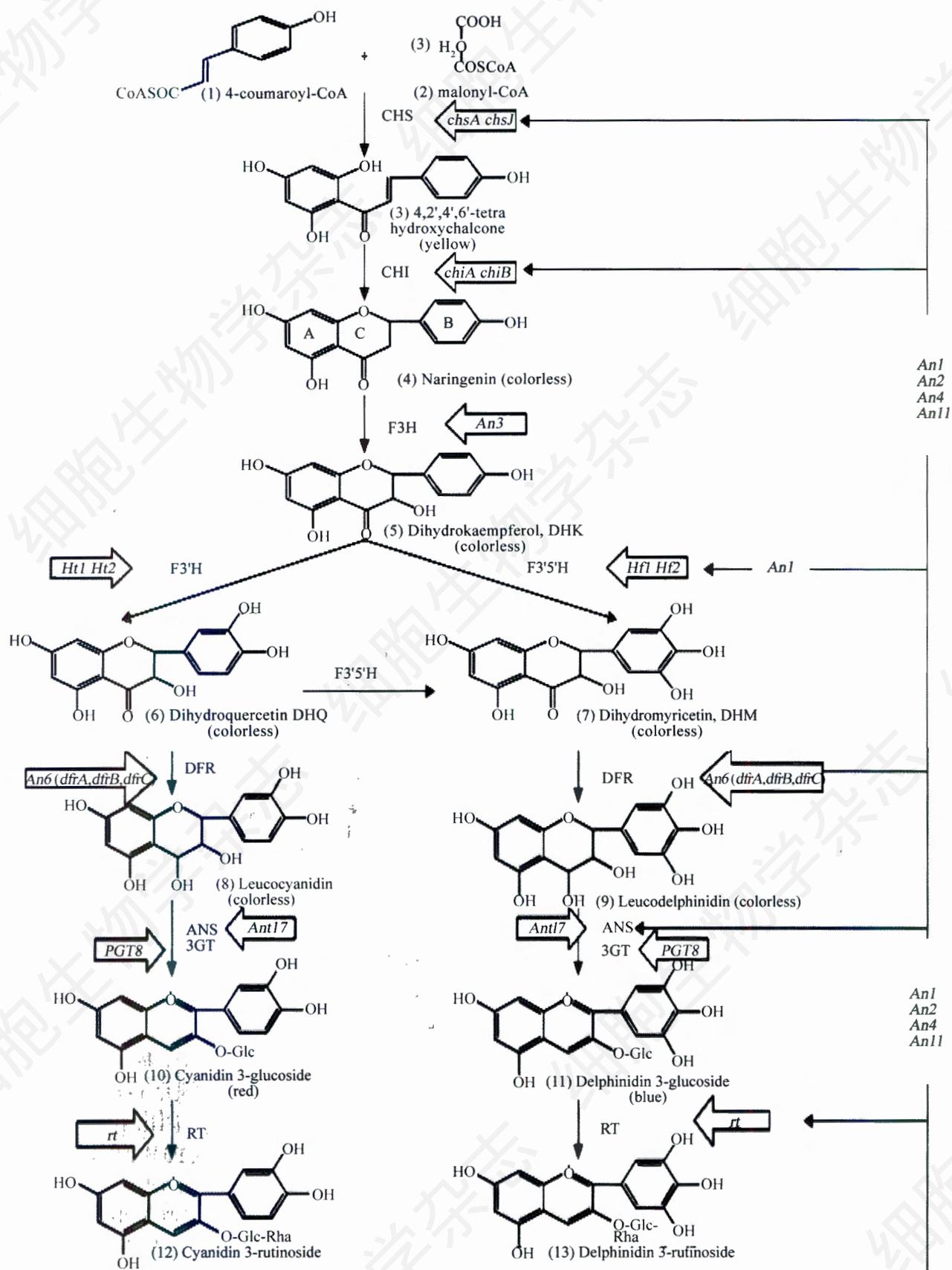
植物的花色苷生物合成途径大体相同, 在矮牵牛中, 主要的花色苷生物合成途径共有 20 种不同的有机分子参与, 需要 12 种不同的酶催化, 其中的一些酶对花色苷的合成和花的颜色起着决定性的作用, 见图 1^[3,6-8]。图 1 中 20 种有机化合物的中英文名称分别是: (1) 4-coumaroyl-CoA: 4-香豆酰 CoA; (2) malonyl-CoA: 丙二酰 CoA; (3) 4,2',4',6'-tetrahydroxy-chalcone: 4,2',4',6'-四羟基查耳酮; (4) naringenin: 柚

皮素; (5) dihydrokaempferol, DHK: 二氢山萘酚; (6) dihydroquercetin, DHQ: 二氢槲皮素; (7) dihydromyricetin, DHM: 二氢杨梅素; (8) leucocyanidin: 无色花青素; (9) leucodelphinidin: 白飞燕草苷配基; (10) cyanidin 3-glucoside: 矢车菊素糖苷; (11) delphinidin 3-glucoside: 飞燕草素葡萄糖苷; (12) cyanidin 3-rutinoside: 矢车菊素-3-芸香苷; (13) delphinidin 3-rutinoside: 飞燕草素-3-芸香苷; (14) cyanidin 3-acyl-rutinoside: 矢车菊素-3-乙酰-芸香苷; (15) delphinidin 3-acyl-rutinoside: 飞燕草素-3-乙酰-芸香苷; (16) cyanidin 3-acyl-rutinoside-5-glucoside: 矢车菊素-3-乙酰-芸香苷-5-葡萄糖苷; (17) delphinidin 3-acyl-rutinoside-5-glucoside: 飞燕草素-3-乙酰-芸香苷-5-葡萄糖苷; (18) peonidin 3-acyl-rutinoside-5-glucoside: 芍药素糖苷; (19) petunidin 3-acyl-rutinoside-5-glucoside: 矮牵牛素糖苷; (20) malvidin 3-acyl-rutinoside-5-glucoside: 锦葵色素糖苷。

在合成花色苷时, 底物丙二酰 CoA 和香豆酰 CoA 经过查耳酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、查耳酮-黄烷酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄烷酮 3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H 或 FHT)的催化生成二氢山萘酚(dihydrokaempferol, DHK)后, 整个代谢途径就出现两个分支。DHK 在黄烷酮 3'-羟化酶(flavanone 3'-hydroxylase, F3'H)的催化下首先生成二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ), 并沿着 DHQ 支路最终生成红色的矢车菊素糖苷和粉红到玫瑰红色的芍药素糖苷; 此外, DHK 在黄烷酮 3'5'-羟化酶(flavanone 3'5'-hydroxylase, F3'5'H)的催化下首先生成

收稿日期: 2009-02-04 接受日期: 2009-07-21

* 通讯作者。Tel/Fax: 029-87092262, E-mail: xuh73@163.com



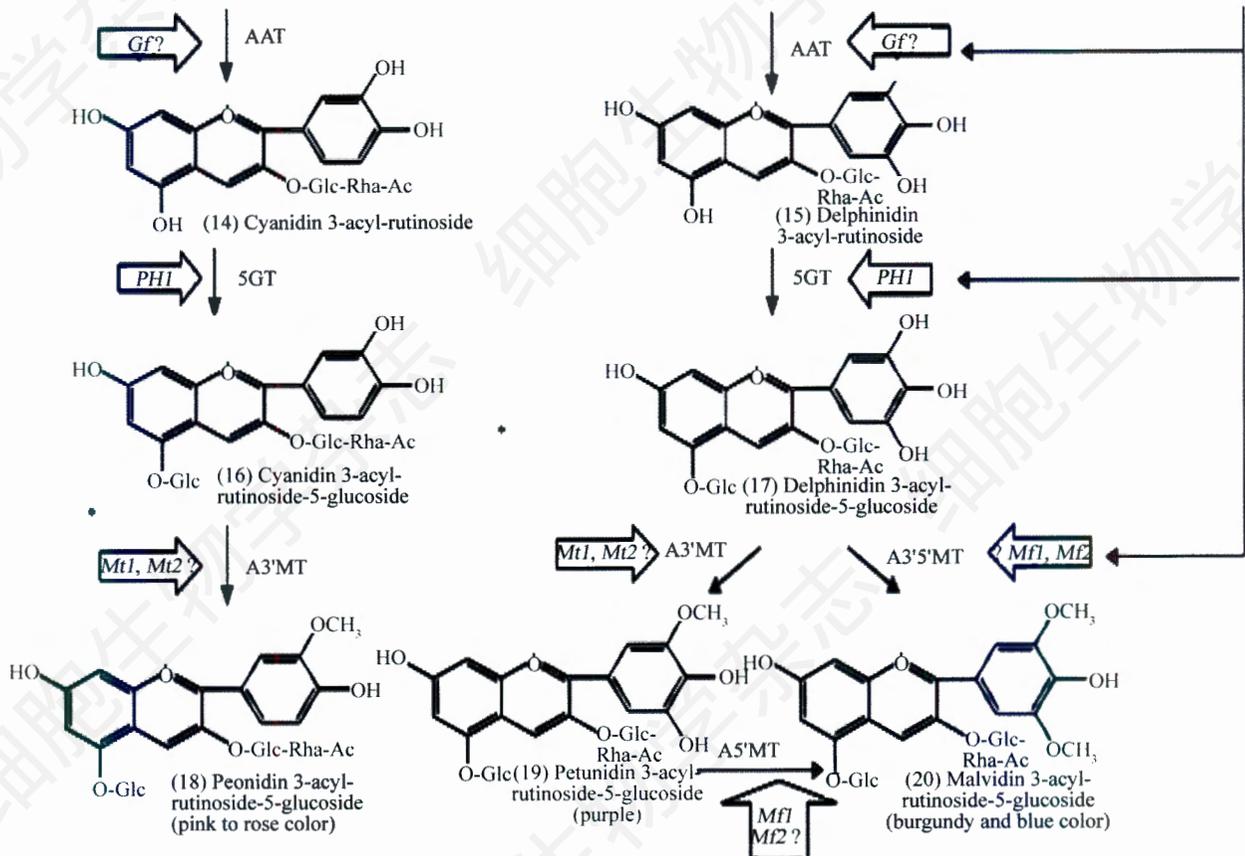


Fig.1 Enzyme and genes involved in anthocyanin synthesis in *Petunia* [3, 6-8]

Genetic loci are shown in italics, names of the structure genes are writing in arrowhead, the others are regular gene. Names of enzymes are given in bold capital letter, "?" indicate the gene unclooned.

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM), 并沿着DHM支路最终生成飞燕草素糖苷、矮牵牛素糖苷和锦葵色素糖苷。

DHQ支路中的类黄酮3-葡糖基-鼠李糖基转移酶(anthocyanidin 3-glucoside-hamnosyltransferase, RT或3-RT)是一个十分关键的酶, 如果它的活性降低, 则这个支路的反应就会在红色的矢车菊素糖苷处停止, 组织会由于积累矢车菊素糖苷而显现红色; 如果它的活性增强, 反应可以继续, 最终就可以生成粉红到玫瑰红色的芍药素糖苷^[9,10]。

DHM支路末端花色苷分子中B环的甲基化主要是由类黄酮甲基转移酶(anthocyanin methyltransferase, AMT)催化, 甲基化的位置不同就会分别产生飞燕草素糖苷、矮牵牛素糖苷以及锦葵色素糖苷三种不同的花色苷。

矮牵牛与其他植物花色苷生物合成途径的主要区别是不产生橙色到砖红色的天竺葵素糖苷^[6], 因而栽培矮牵牛品种没有橙色到砖红色的花瓣颜色。Ando等^[11]对195个商业品种进行HPLC检测, 在所有

花中没有检测到与天竺葵素糖苷相对应的峰。这是因为矮牵牛中的二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)具有强烈的底物特异性, 不能将二氢山萘酚(DHK)作为底物, 所以也不能生成相应的产物天竺葵素糖苷^[12]。

2 矮牵牛花色苷生物合成酶与其编码基因

矮牵牛花色苷生物合成过程中至少有12种酶参与, 有些酶又由多个同源基因编码, 它们共同控制着花色苷的合成。

2.1 查耳酮合成酶(CHS)

CHS是矮牵牛花色苷生物合成的第一个酶, 它催化由1分子的4-香豆酰CoA和3分子的丙二酰CoA合成黄色4,2',4',6'-四羟基查耳酮的缩合反应。矮牵牛中有12个不同的chs同源基因, 其中只有chsA和chsJ在花冠中可以转录表达^[13]。chsA只在花冠中表达, 其表达受到调节基因An1、An2和An11的调控; 而chsJ在花冠和花药中都可以表达^[14]。

2.2 查耳酮-黄烷酮异构酶(CHI)

CHI催化查耳酮分子的环化,在A环和B环之间形成C环(如图1所示),将黄色的4,2',4',6'-四羟基查耳酮转化成无色的柚皮素。尽管此反应可以自发进行,但是CHI可以将反应速率提高7~10倍^[15]。矮牵牛中有两个CHI编码基因:*chiA*和*chiB*,这两个基因的表达具有组织特异性:*chiA*在所有的花组织中表达,而*chiB*仅在未成熟的花药中表达^[16]。CHI编码基因位于Po基因位点,在*popo*型矮牵牛中,*chiA*启动子发生序列变异,*chiA*在花药中不能正常表达,引起CHI的底物四羟基查耳酮的积累,花粉表现为黄色或黄绿色^[17]。

2.3 黄烷酮3-羟化酶(F3H)

无色的柚皮素在F3H的催化下,其C环的第三位羟化,形成二氢山萘酚(DHK)。从DHK开始,整个生成途径就要分成产生红色花色苷的二氢槲皮素(DHQ)分支和产生蓝色或紫色花色苷的二氢杨梅素(DHM)分支。矮牵牛的F3H是由*An3* (*anthocyanin3*)基因位点编码^[18],1992年,Britsch等^[19]最早克隆了该基因。

2.4 黄烷酮3'-羟化酶(F3'H)

DHK的一条去路是在F3'H的催化下,其B环的3'位羟化,形成DHQ。矮牵牛花被中F3'H的编码基因有两个:*Ht1*和*Ht2*,两者都可以控制花色苷分子3'位的羟化。*Ht1*在花冠和花管中部表达,而*Ht2*仅在花管中表达^[10,20]。

2.5 黄烷酮3'5'-羟化酶(F3'5'H)

DHK的另一条代谢途径是在F3'5'H的催化下,其B环的3'和5'位羟化,形成二氢杨梅素(DHM)。此外,F3'5'H还可以催化二氢槲皮素(DHQ)B环的5'位羟化,形成DHM。矮牵牛花冠中F3'5'H的活性随花朵的发育而改变,在花蕾发育期和盛开前酶活性最高,但在已开放的花朵中活性很低。Holton等^[21]和Menting等^[22]第一次从矮牵牛中分离了编码F3'5'H的基因,由两个位点编码,分别为*Hf1*和*Hf2*。*Hf1*在花冠边缘和花筒部位表达,而*Hf2*只在花冠边缘表达,*Hf1*比*Hf2*影响花色表达的效应更强。将F3'5'H基因转入到双隐性纯和突变体*hf1hf1hf2hf2*矮牵牛中,结果转基因植株F3'5'H的活性都比野生型高,3',5'-羟化色素的含量也增加了^[1,23]。

F3'H和F3'5'H都属于细胞色素P450家族的单加氧酶^[1,23],对DHK中B环的羟化修饰是在3'位还是在3'和5'位,就决定了最后生成的花色苷是红色的还是蓝色或紫色的。因此,能使B环3'位羟化的

F3'H基因就被称为“红色基因”,而使B环3'和5'位共同羟化的F3'5'H基因则被称为“蓝色基因”。F3'H和F3'5'H在矮牵牛花色形成中是两个非常重要的酶。

2.6 二氢黄酮醇4-还原酶(DFR)

DFR可以将DHQ和DHM中的C环还原,分别生成无色花青素和白飞燕草苷配基,这一反应需要NADPH的参与^[24]。矮牵牛的DFR有很强的底物特异性,只以DHQ和DHM为底物,而不能以DHK为底物。所以,矮牵牛中无法由DHK产生砖红色的天竺葵色素苷。此外,DFR与DHQ的反应水平比DHM低^[12]。

矮牵牛的DFR基因有三个拷贝,*dfrA*、*dfrB*和*dfrC*分别位于不同的染色体上^[25],但只有*dfrA*基因在花组织中转录表达^[26]。*dfrA*由*An6*基因位点编码,其表达受到*An1*、*An2*、*An4*、*An11*这些调节基因的调控^[14,25,26]。1994年,Huits等^[26]通过遗传学分析和基因转化进行功能验证,再次证明*dfrA*位于控制矮牵牛花瓣色素形成的*An6*基因位点,*dfrA*的具有组织特异性表达的启动子活性受到*An1*、*An2*和*An4*的激活。

2.7 花青素合成酶(ANS)

花青素合成酶(*anthocyanidin synthase*, ANS或AS)或称为无色花色苷双加氧酶(*leucoanthocyanidin dioxygenase*, LDOX),是一个双加氧酶,催化无色的花色苷形成显色的花青素,显色花青素立即和类黄酮3-葡糖基转移酶(3GT)偶联,在谷胱甘肽-硫-转移酶(GST)的帮助下,被运输到液泡中,生成显色的3-糖基化花色苷,如红色的矢车菊素糖苷和蓝色的飞燕草素糖苷^[1,27]。1993年,Weiss等^[28]首先克隆到了矮牵牛的LDOX基因,命名为*Ant17*,该基因可以在花冠和花药组织中特异表达,并受到调节基因*An1*、*An2*、*An11*的调控。1995年,Holton等^[6]克隆到另一个ANS的编码基因*difA*。

2.8 类黄酮-3-O-葡糖基转移酶(3GT)和类黄酮-5-O-葡糖基转移酶(5GT)

花色苷类分子因为结构上带有裸露的羟基,在生理的pH值条件下不稳定,很容易被糖基化修饰。矮牵牛中的类黄酮葡糖基转移酶UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase(UFGT)包括两种酶:类黄酮-3-O-葡糖基转移酶(*flavonoids 3-O-glucosyltransferase*, 3GT)和类黄酮-5-O-葡糖基转移酶(*flavonoids-5-O-glucosyltransferase*, 5GT),可以将UDP-葡萄糖上的

葡萄糖基转移到花色素分子的 3 位或 5 位羟基上, 保持花色素结构的稳定^[1]。花色素的糖基化不但在改变植物花色、保持分子结构的稳定性方面有作用, 同时是花色素运输到液泡中必不可少的因素^[29]。1998 年, Yamazaki 等^[30]从矮牵牛中克隆了 3GT 的基因 *PGT8* 和 5GT 基因 *PH1*。

2.9 芳香族 - 酰基转移酶(AAT)

矮牵牛中的芳香族 - 酰基转移酶(aromatic-acyltransferase, AAT)可分别将上一步代谢产物矢车菊素 -3- 芸香苷和飞燕草素 -3- 芸香苷的 C 环 3 位乙酰化, 生成乙酰化的花色素苷。AAT 由基因 *Gf* 编码, 但矮牵牛中的 *Gf* 基因还没有被克隆^[6,9,14]。

2.10 类黄酮 3- 葡糖基 - 鼠李糖基转移酶(RT)

RT 可以将 UDP- 鼠李糖(UDP-rhamnose)上的鼠李糖基转移到 B 环 3 位上的葡萄糖基上, 对花色素苷进行糖基化修饰。RT 是由 *rt* 基因位点编码^[31], 1994 年, 矮牵牛 *rt* 基因被克隆, 该基因在花瓣、花柱和花药中都能表达, 而在叶子、茎、根、子房和萼片中不表达^[32]。在红色或肉色的矮牵牛中发现的主要的花色素苷是红色的矢车菊素糖苷^[33], 并没有继续沿着合成途径生成其他花色素苷, 说明这些矮牵牛中的 RT 活性受到抑制^[10,20]。

2.11 类黄酮 3'- 甲基转移酶(A3'MT)和类黄酮 5'- 甲基转移酶(A5'MT)

类黄酮甲基转移酶(AMT)有两种: 类黄酮 3'- 甲基转移酶(anthocyanin 3'-methyl-transferase, A3'MT)和类黄酮 5'- 甲基转移酶(anthocyanin 5'-methyl-transferase, A5'MT), 是分别将花色素苷的 3' 或 5' 位甲基化的酶, 分别由 *Mt1* 和 *Mt2*、*Mf1* 和 *Mf2* 编码^[20,34]。由于花色素苷生物合成的最后一步的甲基化程度和位置的区别, 就决定了最终生成的是锦葵色素糖苷还是矮牵牛素糖苷。至今, 矮牵牛中的 AMT 基因还没有被克隆。

除了上述这些花色素苷合成相关酶以外, 矮牵牛中的 *An9* 基因位点编码的 GST 也参与矮牵牛花色素苷的合成, *An9* 编码 I 型 GST^[35]。虽然 GST 可以将谷胱苷肽(GSH)联结到不同的底物上, 但 AN9 的作用是花色素苷类化合物的结合蛋白, 并没有在花色素苷类化合物的分子上联结谷胱苷肽, 负责将花色素苷从细胞质中运到液泡中, 花色素苷也只有转运至液泡中才能稳定积累^[6,14,35,36]。

本文总结近 20 年来从矮牵牛中克隆到的花色素苷合成途径相关的合成酶基因、部分调节基因以及这些基因在 GenBank 中的 ID 号, 见表 1^[7,21,23,28,30,32,35,37-47]。

3 矮牵牛花色素苷合成酶的转录调控

在矮牵牛花色素苷合成途径中已经鉴定出编码转录因子的调节基因: *An1* 和 *JAF13*、*An2* 和 *An4* 以及 *An11*, 分别编码三类转录因子 bHLH、R2R3-MYB、WD40^[14], 它们与花色素苷合成相关基因启动子中的顺式作用元件结合, 激活多个基因表达, 有效启动花色素苷的生物合成途径^[2,6]。*An1* 与 *An11* 可以调控所有组织中的花色素苷合成途径, *An2* 只作用于花冠组织、*An4* 只作用于花药组织, 它们可以调控从 F3H 之后, 除 F3'H 外, 所有花色素苷合成相关基因的表达^[6]。F3'H 不受调控的原因可能是其从演化上早于调控基因的出现^[23]。*An1*、*An2* 和 *An11* 还可以调节花冠表皮细胞液泡的 pH 值, 以调控花冠的颜色。

不同转录因子控制了生物合成途径的不同部分, 不同因子之间也存在着相互作用, 这些调控因子协同作用才使矮牵牛的花瓣显现出多种色彩。

此外, 在矮牵牛中, *dif-F* 基因编码的细胞色素 *b₅* (Cyt *b₅*), 也可以调节 F3'5'H 的活性和表达, 进而调节矮牵牛花色素苷的合成。F3'5'H 催化的反应是一个产生蓝色色素的关键步骤, F3'5'H 在 Cyt *b₅* 的作用下活性大大提高, 进一步产生蓝色或紫色的花色素苷。*dif-F* 基因的表达也受到 *An1*、*An2* 和 *An11* 的调控^[23]。

3.1 矮牵牛花色素苷合成的转录因子

bHLH (basic-helix-loop-helix) 类型的转录因子含有 HLH 结构域。bHLH 结构域由大约 60 个氨基酸组成, 包括两个功能区域, 一个是 N 端的主要由大约 18 个亲水碱性氨基酸组成的 DNA 结合区, 另一个是 C 端的主要由疏水氨基酸组成的 HLH 区, 这个功能区的作用是负责和其他 bHLH 类转录因子形成二聚体。bHLH 类型的转录因子已经进化为不同的分支, *JAF13* 和 AN1 分别属于不同的分支, 两者的功能也不完全相同^[8,44]。

调节基因 *An1* 编码 MYC 家族的 bHLH 类型的转录因子^[44]。bHLH 二聚化以后才能结合 DNA, 能特异识别花色素苷合成酶结构基因启动子区域的 E-BOX (CANNTG)^[1,48]。*An1* 是矮牵牛的所有组织中花色素苷合成途径所需要的调节基因, 它调控 CHS1、CHI、DFR、ANS、3GT、5GT、3RT、AMT、F3'5'H、GST 等的表达^[6,14,26], 例如, AN1 可以作为转录激活子与 DFR 基因的启动子结合, 激活花色素苷的合成。此外, AN1 还在保持矮牵牛花

Table 1 Some anthocyanin genes cloned from *Petunia hybrida*

Product	Gene	GenBank ID	Type	Time	Reference
Synthases					
CHS-A	<i>chsA</i>	S80857	mRNA	1996	[37]
CHS-J	<i>chsJ</i>	X14599	mRNA	1989	Direct submission
CHI-A	<i>chiA</i>	X14589	DNA	1989	Direct submission
CHI-B	<i>chiB</i>	X14590	DNA	1989	Direct submission
F3H(AN3)	<i>An3</i>	X70786	mRNA	1993	[28]
F3'H	<i>Ht1</i>	AF155332	mRNA	1999	[38]
F3'5'H	<i>Hf1</i>	D14588	mRNA	2001	[39]
F3'5'H	<i>Hf1</i>	DQ352142	mRNA	2006	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf1</i>	Z22545	mRNA	1993	[21]
F3'5'H	<i>Hf1</i>	EF371021	mRNA	2007	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf1</i>	X71130	mRNA	1995	[40]
F3'5'H	<i>Hf1</i>	Eu286556	DNA	2008	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf1</i>	AB196180	DNA	2007	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf1-2</i>	AB270615	DNA	2007	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf1-3</i>	AB270616	DNA	2007	Direct submission
F3'5'H	<i>Hf2</i>	Z22544	mRNA	1993	[21]
F3'5'H	<i>Hf2</i>	AB239773	DNA	2009	[41]
DFR-C	<i>dfrC</i>	S44589	DNA	1990	[42]
DFR-B	<i>dfrB</i>	Eu189078	mRNA	2008	[43]
DFR(AN6)	<i>dfr</i>	AF233639	mRNA	2000	Direct submission
ANS(LDOX)	<i>Ant17</i>	P51092	Protein	1993	[28]
3GT	<i>PGT8</i>	AB027454	mRNA	2000	[30]
5GT	<i>PH1</i>	AB027455	mRNA	2000	[30]
RT	<i>rt</i>	X71059	mRNA	1994	[32]
RT	<i>rt</i>	X71060	DNA	1994	[32]
GST(AN9)	<i>An9</i>	Y07721.1	mRNA	2006	[35]
Regulators					
AN1	<i>An1</i>	AF260918	DNA	2000	[44]
AN1	<i>An1</i>	AF260919	mRNA	2000	[44]
AN2	<i>An2</i>	EF423868	DNA	2007	[45]
AN2	<i>An2</i>	AF146702	mRNA	2000	[46]
AN11	<i>An11</i>	U94748	DNA	1998	[7]
Cyt <i>b</i> ₅	<i>dif F</i>	DQ352143	DNA	2006	Direct submission
Cyt <i>b</i> ₅	<i>dif F</i>	AY502948	mRNA	2004	Direct submission
Cyt <i>b</i> ₅	<i>dif F</i>	AF233640	mRNA	2000	Direct submission
Cyt <i>b</i> ₅	<i>dif F</i>	AF098510	mRNA	1999	[23]
JAF13	<i>jaf13</i>	AF020545	mRNA	1998	[47]

瓣细胞液泡的酸化和种皮的上表皮形态建成中起着重要的作用^[49]。AN1可以与不同的MYB转录因子结合,如AN2和PH4(调控液泡pH值),来调控胞内的不同过程^[3,8]。

JAF13也是一类bHLH类型的转录因子^[44,47],也可以激活花色苷合成途径中的结构基因,例如可以与AN2结合后,激活*dfr*的启动子,促进*dfr*的转录,累积花色苷^[47]。AN1和JAF13会形成同源或异源的二聚体来参与到转录复合体的形成^[3,8],但是,AN1和JAF13具有不同的功能,与其他蛋白质和DNA序列的结合能力也有所不同^[44]。

调节基因*An2*和*An4*都编码R2R3-MYB转录因子^[1,46,47]。R2R3-MYB类转录因子具有高度的保守的DNA结合区结构域MYB区,约由52个氨基酸组成,另外还含有一个转录激活区。MYB类转录因子具有双重功能,一方面可以与bHLH类转录因子结合成复合体直接激活结构基因的表达,另一方面可以作为激活子调控bHLH类转录因子的表达。例如,AN1的表达受到AN2和AN4的调控,AN2的过量表达促进了AN1的表达^[8]。但JAF13的表达并不受到AN2和AN4的调控。

R2R3-MYB转录因子的表达具有组织特异性。

矮牵牛中, AN2 与 AN4 可以调控花冠和花药中 CHSJ、CHI、DFR、ANS、3GT、5GT、3RT、AMT、GST 等酶的活性^[6,14,26], AN2 控制花冠中花色素苷合成相关的结构基因的转录, AN4 只在花药组织中起到调控作用^[6,14]。

在矮牵牛中还鉴定出一个只含有一个 Myb 结构域的调控基因 *MybX*^[8], 不含有转录激活区, 编码的蛋白质不是转录因子, 但 *MybX* 可以在翻译后水平, 与 AN1 和 JAF13 结合, 作为一个抑制子抑制转录复合体的活性, 从而抑制有关花色素苷的合成^[3,8]。

与 HLH 和 MYB 型转录因子仅在含有花色素苷组织中表达不同, WD40 转录因子一般都是组成型表达^[8]。WD40 具有 β 螺旋桨结构, 它包含 5 个 WD40 重复基序, 每个重复基序中由 40 个氨基酸残基组成, 包含保守的氨基和羧基终端的核心结构, 这些核心结构被短的氨基酸序列分隔开来。矮牵牛中的 *An11* 编码一种细胞质内高度保守的 WD40 重复蛋白, 是一个单拷贝基因, 无论在有色素还是无色素的组织中都可以组成型表达^[7]。 *An11* 也是所有组织中花色素苷合成的结构基因转录所需要的调节基因, 它可以调控 CHSJ、CHI、DFR、ANS、3GT、3RT、AMT 酶的活性^[6,14,26]。

3.2 矮牵牛中转录因子间的协同作用

在矮牵牛花色素苷的转录调控中, bHLH 和 MYB 型转录因子常常是成对起作用, 共同构成转录复合体, 结合在结构基因的启动子序列识别位点上, 激活结构基因的表达^[8], 如图 2 所示。这种结合作用一方面使 R2R3-MYB 结构稳定促使其激活转录, 另一方面 bHLH 能部分决定 R2R3-MYB 的组织特异性^[1]。

AN2 能与 AN1 和 JAF13 结合, 构成转录复合体, 共同调节花瓣中花色素苷生物合成途径后期阶段 DFR 位点下游多个酶编码基因的表达^[1,46,47], 所以结构基因的转录复合体中可以包括多个 HLH 和 MYB^[8]。例如, 矮牵牛的 *An1* (bHLH 类转录因子) 是 *dfr* 以及其他花色素苷结构基因转录所需要的调控基因, *An2* 编码的 Myb 结构域的激活因子能激活 *dfr* 基因的启动子, 它们共同调控矮牵牛 DFR 的表达^[8,44], 如图 2 所示。

AN1 可以与 AN2 或 AN4 结合, 也可以与其他不同的 MYB 转录因子结合(如 *Ph4*), 分别调控花冠中的花色素苷的合成、种皮表皮细胞的分裂或者液泡 pH 值的酸化等生理生化变化过程^[8]。另外, *An1* 的表达受到 *An2* 和 *An4* 编码的转录因子的调控。在叶子中, *An2* 的异位表达诱导 *An1* 的表达, 在花药中, *An1* 的

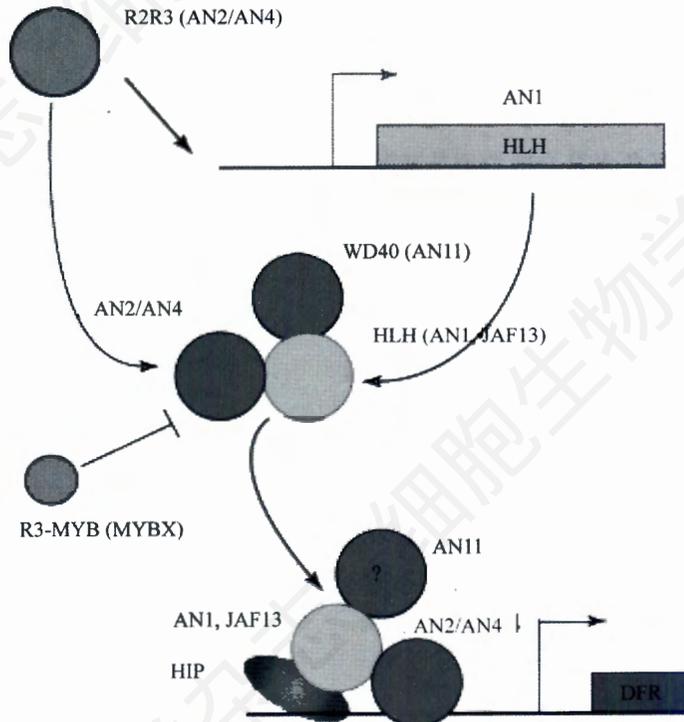


Fig. 2 Model depicting the role of MYB, HLH and WD40 regulators in transcription activation of a structural pigmentation gene (DFR)^[8] HIP indicated HLH interacting protein. Whether WD40 is present in the transcription complex on the promoter of the structural gene is unclear.

表达受 *An4* 的调控,表明 *An1* 的调控位于 *An2* 和 *An4* 调控的下游^[44]。但 *jaf13* 的转录并不受到 *An2* 和 *An4* 的调控。*MYBX* 是矮牵牛中只含有一个 *MYB* 结构域的调控基因,可以与 *AN1* 和 *JAF13* 结合,进行翻译后修饰,抑制了转录复合体的活性,从而可以使色素合成受阻^[8]。

AN11 是 DNA 结合蛋白,分布于细胞质中。遗传学分析表明,其对花色素苷合成的调控位点是位于 *An2* 的上游,可以通过翻译后修饰来调控 *An2* 的表达,作为一个保守的级联转导信号调节 *AN2* 的活性与胞内的分布,从而调控花色素苷的合成^[1,7,50]。

AN1、*AN2*、*AN11* 都可以影响多个代谢途径,包括在花冠与种皮表皮细胞的花色素苷的合成,花冠表皮细胞液泡的酸化。*AN1* 与 *AN11* 分别可以与不同的特异的 *MYB* 转录因子结合,激活不同的代谢途径。

4 小结与展望

完整的花色素苷的生物合成途径以及其转录调控机制对认识花色形成的原因有很重要的作用。矮牵牛花色素苷的生物合成途径目前已经研究的比较清楚,除了 *AAT*、*AMT* 之外的大多数相关的合成酶结构基因已经被克隆。矮牵牛中 *F3'H*、*F3'5'H*、*DFR*、*RT* 和 *AMT* 对形成不同的花色素苷有特别重要的影响,是非常关键的酶,人们可以通过调控这 5 种酶的活性来实现人为改造花色素苷的合成,从而得到特定花色的矮牵牛品种,并可以应用于其他植物的分子育种。

至今,对几个重要的花色素苷合成的调节基因已经研究的非常深入,初步建立了调控模型,但对调控机制还并没有最终清楚的阐明^[8]。调节基因是通过调节合成酶结构基因的表达,调控最终合成的花色素苷种类,不同的调控基因负责对不同组织中花色素苷生物合成酶的调节。*bHLH*、*MYB* 和 *WD40* 型转录因子间可以相互作用,结合成转录复合体,共同调控矮牵牛中的花色素苷的合成。但是对于转录因子如何与结构基因的启动子结合,是怎样结合的,如何构成转录复合体,调控结构基因的时空表达还需要进一步的深入阐明。通过对这个体系的研究,人们可以更深入的研究基因间的相互作用,以及基因的调控机制。

参考文献(References)

- [1] 张 龙,李卫华,姜淑梅,等。花色素苷生物合成与分子调控研究进展,《园艺学报》,2008, 35(6): 909-916
- [2] 吴 江,程建徽,杨夫臣。植物花色素苷生物合成的转录调控,《细胞生物学杂志》,2006, 28(3): 453-456
- [3] 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, *Plant Cell*, 2006, 18(5): 1274-1291
- [4] Paxton J. *Petunia nyctaginiflora* violacea, *Paxton 报 Mag Bot*, 1836, 2: 173
- [5] Nakajima T, Matsubara K, Kodama H, et al. Insertion and excision of a transposable element governs the red floral phenotype in commercial *petunias*, *Theor Appl Genet*, 2005, 110(6):1038-1043
- [6] Holton TA, Cornish EC. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis, *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083
- [7] 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, *Genes Dev*, 1997, 11(11): 1422-1434
- [8] Koes R, Verweij, CW, and Quattrocchio, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends Plant Sci*, 2005, 10(5): 236-242
- [9] Wiering H, De Vlaming P. Glycosylation and methylation patterns of anthocyanins in *Petunia hybrid*. I. The gene *Gf*, *Genen Phaenen*, 1973, 16(2): 35-50
- [10] Wiering H, De Vlaming P. Genetics of flower and pollen colors. In: Sink KC, ed. *Petunia*, Berlin: Springer-Verlag Press, 1984, 49-67
- [11] Ando T, Takahashi M, Nakajima T, et al. Delphinidin accumulation is associated with abnormal flower development in *petunias*, *Phytochemistry*, 2004, 65(15): 2219-2227
- [12] Forkmann G, Rahnu B. Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*, *Z Naturforsch*, 1987, 42c: 1146-1148
- [13] Koes RE, Spelt CE, Mol JN. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): differential light-regulated expression during flower development and UV light induction, *Plant Mol Biol*, 1989, 12(2): 213-225
- [14] Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HTC, et al. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes, *Plant Cell*, 1993, 5(11): 1497-1512
- [15] Li F, Jin Z, Qu W, et al. Cloning of a cDNA encoding the *Saussurea medusa* chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco, *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(7-9): 455-461
- [16] Van Tunen AJ, Koes RE, Spelt CE, et al. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light regulated and differential expression of flavonoid genes, *EMBO J*, 1988, 7(5): 1257-1263
- [17] Van Tunen AJ, Mur LA, Recourt K, et al. Regulation and manipulation of flavonoid gene expression in anthers of *Petunia*: the molecular basis of the *Po* mutation, *Plant Cell*, 1991, 3(1): 39-48
- [18] Froemel S, De Vlaming P, Stotz G, et al. Genetic and biochemical studies on the conversion of flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*, *Theor Appl Genet*, 1985, 70(5): 561-568

- [19] Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G. Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* expression of flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*, *J Biol Chem*, 1992, 267(8): 5380-5387
- [20] Wiering H. Genetics of flower colour in *Petunia hybrida* Hort, *Genen Phaenen*, 1974, 17(1-2): 117-134
- [21] Holton TA, Brugliera F, Lester DR, *et al.* Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour, *Nature*, 1993, 366(6452): 276-279
- [22] Menting JGT, Scopes RK, Stevenson TW. Characterization of flavonoid-3',5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers, *Plant Physiol*, 1994, 106(2): 633-642
- [23] Vetten N, Horst JT, Schaik HV, *et al.* A cytochrome *b5* is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(2): 778-783
- [24] 刘 娟, 冯群芳, 张 杰. 二氢黄酮醇 4-还原酶(DFR)与花色修饰, *植物生理学通讯*, 2005, 41(6): 715-719
- [25] Beld M, Martin C, Huits H, *et al.* Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes, *Plant Mol Biol*, 1989, 13(5): 491-502
- [26] Huits HS, Gerats AG, Kreike MM, *et al.* Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*, *Plant J*, 1994, 6(3): 295-310
- [27] Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, *et al.* Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis, *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 25797-25803
- [28] Weiss D, van der Luit AH, Kroon JTM, *et al.* *Petunia* homologue of the *Antirrhinum majus candi* and *Zea mays A2* flavonoid genes; homology to flavanone 3-hydroxylase and ethylene-forming enzyme, *Plant Mol Biol*, 1993, 22(5): 893-897
- [29] Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, *et al.* A glutathione *S*-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*, *Nature*, 1995, 375(6530): 397-400
- [30] Yamazaki M, Yamagishi E, Gong Z, *et al.* Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression, *Plant Mol Biol*, 2002, 48(4): 401-411
- [31] Maizonnier D, Cornu A, Farcy E. Genetic and cytological maps in *Petunia*: a sketch for chromosome VI, *Can J Genet Cytol*, 1984, 26(5): 657-663
- [32] Brugliera F, Holton TA, Stevenson TW, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the *Rt* locus of *Petunia hybrida*, *Plant J*, 1994, 5(1): 81-92
- [33] Ando T, Tatsuzawa F, Saito N, *et al.* Differences in the floral anthocyanin content of red petunias and *Petunia exserta*, *Phytochemistry*, 2000, 54(5): 495-501
- [34] Jonsson LMV, De Vlaming P, Wiering H, *et al.* Genetic control of anthocyanin-*O*-methyltransferase activity in flowers of *Petunia hybrida*, *Theor Appl Genet*, 1983, 66(3-4): 349-355
- [35] Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, *et al.* Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione *S*-transferases, *Plant Cell*, 1998, 10(7):1135-1150
- [36] Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, *et al.* AN9, a petunia glutathione *S*-transferase required for anthocyanin sequestration, is flavonoid-binding protein, *Plant Physiology*, 2000, 123(4): 1561-1570
- [37] 邵 莉, 李 毅, 潘爱华, 等. 查尔酮合酶基因的克隆、全序列分析及在大肠杆菌中的高效表达, *生物工程学报*, 1995, 11(2): 145-149
- [38] Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, *et al.* Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*, *Plant J*, 1999, 19(4): 441-451
- [39] Shimada Y, Ohbayashi M, Nakano-Shimada R. A novel method to clone P450s with modified single-specific-primer PCR, *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17(4): 355-361
- [40] Toguri T, Azuma M, Ohtani T. The cloning and characterization of a cDNA encoding a cytochrome P450 from the flowers of *Petunia hybrida*, *Plant Sci*, 1993, 94(1-2): 119-1260
- [41] Matsubara K, Chen S, Lee J, *et al.* PCR-based markers for the genotype identification of flavonoid-3',5'-hydroxylase genes governing floral anthocyanin biosynthesis in commercial *Petunias*, *Breed Sci*, 56(4): 389-397
- [42] Gerats AGM, Huits H, Vrijlandt E, *et al.* Molecular characterization of a nonautonomous transposable element (dTph1) of *Petunia*, *Plant Cell*, 1990, 2 (11): 1121-1128
- [43] Des MDL, Rausher MD. Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene, *Nature*, 2008, 454(7205): 762-765
- [44] Spelt C, Quattrocchio F, Mol JN, *et al.* *anthocyanin1* of *Petunia* encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes, *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1619-1632
- [45] Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, *et al.* Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*, *Plant Cell*, 2007, 19 (3): 779-790
- [46] Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, *et al.* Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color, *Plant Cell*, 1999, 11(8): 1433-1444
- [47] Quattrocchio F, Wing JF, 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, *Plant J*, 1998, 13(4):475-488
- [48] Lewin B. *Gene* ?, New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004, 647-651
- [49] Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, *et al.* ANTHOCYANIN1 of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar PH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms, *Plant Cell*, 2002, 14(9): 2121-2135
- [50] Dooner HK, Robbins TP. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis, *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 173-199

The Enzyme and Gene Transcription Regulation in the Biosynthesis Pathway of Anthocyanins in *Petunia hybrida*

Lei Wang, Ling-Lin Wei, Hong Xu*

(College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract Biosynthesis pathway of anthocyanins is the branch pathway of flavonoids, which is one of secondary metabolism pathways that have been extensively studied in plant. In this mini review, the whole biosynthesis pathway of anthocyanins in *Petunia hybrida* will be introduced, key enzymes and transcription regulation are highlighted. This will be very important to the studying of flower color forming and breeding on new color flower by genetic engineering.

Key words *Petunia hybrida*; anthocyanin biosynthetic genes; transcription regulation

Received: February 4, 2009

Accepted: July 21, 2009

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-29-87092262, E-mail: xuh73@163.com