

# 植物原花青素生物合成及调控研究进展

苏全胜 王爽 孙玉强 梅俊 柯丽萍

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 植物基因组与彩色纤维分子改良实验室, 杭州 310018)

**摘要** 原花青素是通过类黄酮途径生成的一类多酚类化合物。原花青素具有重要的生物学功能, 不仅是植物应对生物和非生物胁迫的一种重要防御手段, 还能影响植物外观、风味和品质, 因此原花青素合成途径一直是作物性状改良的研究热点。该文主要在模式植物拟南芥研究的基础上, 综述了原花青素生物合成研究的最新进展, 讨论了原花青素遗传工程应用前景和主要限制因素, 旨在为进一步开展原花青素的研究和应用提供参考。

**关键词** 生物合成途径; 类黄酮; 原花青素; 黄烷-3-醇

## Advances in Biosynthesis and Regulation of Plant Proanthocyanidins

SU Quansheng, WANG Shuang, SUN Yuqiang, MEI Jun, KE Liping

(Laboratory of Plant Genome and Colored Fiber Molecular Improvement, School of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** Proanthocyanidins are a class of polyphenolic compounds produced through the flavonoid pathway. Proanthocyanidins have important biological functions. They act as the defense means of biotic and abiotic stresses, but also affect the plant appearance, flavor and quality. Therefore, the biosynthesis of proanthocyanidins has always been the research hotspot in crop trait improvement. This article reviews the latest progress in the research of proanthocyanidins biosynthesis on the basis of model plant *Arabidopsis thaliana*, then discuss the application prospects with main limiting factors of proanthocyanidins genetic engineering, aiming to provide a reference for further research and application of proanthocyanidins.

**Keywords** biosynthesis pathway; flavonoid; proanthocyanidin; flavan-3-ol

原花青素(proanthocyanidins, PA)又名缩合单宁, 是植物中重要的多酚类化合物<sup>[1]</sup>。PA在含有三价铁盐的酸性丁醇溶液中加热时, 黄烷键会裂解生成花青素, 故得名原花青素<sup>[2]</sup>。PA是植物应对生物和非生物胁迫(微生物病原体、昆虫和紫外线等)的一种防御手段; 也是植物色素成分, 能使拟南芥、小麦和油菜等植物的种皮以及棕色棉纤维呈现棕色。牧草中适量的PA有助于防止反刍动物的消化紊乱, 降低瘤

胃发泡引起的腹胀风险, 提高动物对牧草蛋白质的利用效率; PA能够让水果、葡萄酒和饮料等产生涩味, 影响其口感<sup>[3-5]</sup>。这些积极又重要的作用使PA成为类黄酮代谢途径研究的一个热点。

### 1 植物原花青素的结构和组成

PA是由黄烷-3-醇(flavan-3-ol)单体聚合形成的, 黄烷-3-醇具有典型的C6-C3-C6类黄酮骨架, 其中杂

收稿日期: 2020-09-24 接受日期: 2020-10-14

国家自然科学基金(批准号: U1903204、32001591)和浙江省自然科学基金(批准号: Z21C130014)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-86843335, E-mail: keliping@zstu.edu.cn

Received: September 24, 2020 Accepted: October 14, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. U1903204, 32001591) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Z21C130014)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86843335, E-mail: keliping@zstu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5446>

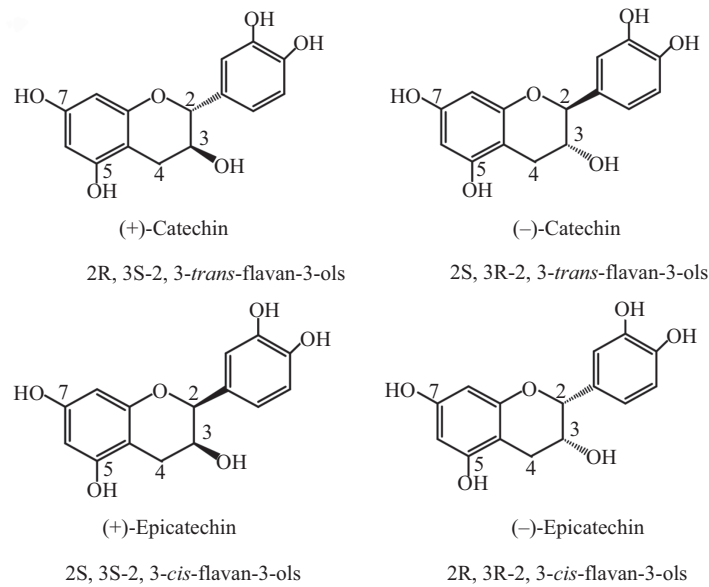


图1 儿茶素的四种非对映异构体(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 Four diastereoisomers of catechin (modified from reference [8])

环苯并吡喃环被称为C环, 稠合芳香环被称为A环, 苯基成分被称为B环<sup>[6]</sup>。由于缺少C-2位和C-3位之间的双键, 缺少C-4位的酮基, 同时在C-3号位有一个羟基, 故得名黄烷-3-醇。在分子水平上, 两个手性中心(C-2和C-3)的存在使得单个黄烷-3-醇有四种可能的构型, 如儿茶素有四种非对映异构体: (+)-儿茶素 [(+)-catechin, (+)-C]、(-)-儿茶素 [(-)-catechin, (-)-C]、(+)-表儿茶素 [(+)-epicatechin, (+)-EC]和(-)-表儿茶素 [(-)-epicatechin, (-)-EC](图1)<sup>[7-8]</sup>。常见的黄烷-3-醇单体有(+)-C、(-)-EC、(+)-没食子儿茶素 [(+)-gallocatechin, (+)-GC]、(-)-表没食子儿茶素 [(-)-epigallocatechin, (-)-EGC]、(-)-表儿茶素没食子酸酯 [(-)-epicatechin-3-gallate, (-)-ECG]和(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯 [(-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-EGCG], PA主要是由(+)-C、(-)-EC单体聚合而成<sup>[9-10]</sup>。

PA是由黄烷-3-醇单体通过不同类型黄烷键连接组成的, 根据连接键的类型, 主要分为A型和B型。B型PA通过C4-C8或C4-C6共价键连接, 如原矢车菊素B1、B2、B3和B4, B型PA是植物中主要PA类型; A型PA具有额外的C2-O-C7或C2-O-C5键, 如原矢车菊素A1和A2<sup>[11-12]</sup>。

## 2 植物原花青素生物合成途径

拟南芥一直是研究PA生物合成的主要模式植

物, PA积累在拟南芥的种皮中保护胚和胚乳, 在种子干燥过程中氧化形成棕色色素, 拟南芥PA生物合成相关基因的突变会导致PA色素的缺乏或减少, 形成黄色到淡棕色种皮颜色突变的种子<sup>[13-14]</sup>。对拟南芥一系列透明种皮(transparent testa, *tt*)和缺乏单宁种子(tannin deficient seed, *tds*)突变体的研究促进了对PA生物合成途径的了解(表1)。目前在拟南芥中共鉴定出13个PA生物合成结构基因, 其中7个基因编码结构蛋白(*AtCHS*、*AtCHI*、*AtF3H*、*AtF3'H*、*AtDFR*、*AtANS*和*AtANR*)、6个基因编码转运和聚合相关蛋白(*AtMATE1*、*AtGST26*、*AtAHA10*、*AtGFS9*、*AtUGT80B1*和*AtLAC15*)。豆科植物蒺藜苜蓿也是PA生物合成研究的另一重要模式植物, 其具有拟南芥没有的类黄酮-3',5'-羟化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, *F3'5'H*)和无色花青素还原酶(leucoanthocyanin reductase, *LAR*)基因。目前PA前体黄烷-3-醇生物合成途径已经基本明确, 但PA转运、氧化和聚合机制的全面了解仍处于起步阶段, 尤其是对PA氧化聚合的机制知之甚少, 还有待后续进一步的研究。

### 2.1 原花青素前体的生物合成途径

PA前体的生物合成与花青素共享了上游公共苯丙烷和核心类黄酮途径, 在此不再赘述。位于下游的PA特异性途径涉及两条支路和两种酶, 即LAR参与的LAR途径和花青素还原酶(anthocyanidin re-

表1 拟南芥PA生物合成相关结构基因

Table 1 PA biosynthesis related structural genes of *Arabidopsis thaliana*

突变体 Mutant	基因座 Locus	基因产物 Gene product
<i>tt4</i>	AT5G13930	AtCHS
<i>tt5</i>	AT3G55120	AtCHI
<i>tt6</i>	AT3G51240	AtF3H
<i>tt7</i>	AT5G07990	AtF3'H
<i>tt3</i>	AT5G42800	AtDFR
<i>tt11/tt17/tt18/tds4</i>	AT4G22880	AtLDOX/AtANS
<i>ban (banyuls)</i>	AT1G61720	AtANR
<i>tt12/tds3</i>	AT3G59030	AtMATE1
<i>tt14/tt19</i>	AT5G17220	AtGST26
<i>tt13/AHA10/tds5</i>	AT1G17260	AtAHA10
<i>tt9</i>	AT3G28430	AtGFS9
<i>tt15</i>	AT1G43620	AtUGT80B1
<i>tt10</i>	AT5G48100	AtLAC15

ductase, ANR)参与的ANR途径(图2), LAR和ANR途径的发现被誉为PA生物合成途径研究的里程碑<sup>[15]</sup>。

在豆科植物银叶山蚂蝗叶片中, 提取纯化得到了第一个天然LAR蛋白, 并分离得到*DuLAR*基因<sup>[16]</sup>。虽然在拟南芥中尚未发现*LAR*基因, 但拟南芥*ans*突变体中积累了大量的LAR和ANS的共同底物无色花青素, 所以拟南芥*ans*突变体如*tt18*经常被用作验证LAR功能的实验材料<sup>[17-18]</sup>。LAR可以将花青素转化为(+)-C, 这已经在体外酶学实验中得到验证<sup>[1]</sup>。然而, 在组成型过表达*LAR*的转基因植物中产生了不同的特性, 引起*LAR*在植物中实际功能差异。在不同的*LAR*基因过表达转基因植物中, 花青素、(+)-C和PA聚合物含量降低, PA单体(-)-EC或(-)-C的含量却显著增加, 还产生了大量的表儿茶素糖苷或儿茶素糖苷<sup>[16,19]</sup>。表儿茶素糖苷或儿茶素糖苷的大量产生可能是LAR参与表儿茶素糖苷或儿茶素糖苷的生物合成的原因<sup>[18]</sup>。(+) -C含量降低可能是ANS(LDOX)的作用, 因为有研究表明, (+)-C可以被ANS(LDOX)转化为花青素<sup>[20-21]</sup>。PA聚合物含量的降低以及(-)-EC增加可能是因为LAR具有裂解4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素产生(-)-EC的能力。2016年LIU等<sup>[22]</sup>发现, LAR能裂解4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素, 导致(-)-EC的释放, 即LAR能通过去除延伸单元供体4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素来控制PA聚合和延伸。4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素属于(-)-表儿茶素碳正离子缀合物, 其来源尚不清楚, 可能通过酶或非酶作用形成。(-)-C含量增加可能是植物中存

在类似于4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素的(-)-儿茶素碳正离子缀合物。

研究人员在拟南芥中首先发现了ANR途径, 拟南芥ANR基因在种皮中表达, 编码花青素还原酶, 能够催化花青素生成(-)-C、(-)-EC和(+)-EC三种立体构型的黄烷-3-醇<sup>[8,23]</sup>。茶树ANR酶的主要产物是(+)-EC以及(-)-C, 而更常见的拟南芥和蒺藜苜蓿的ANR酶的主要产物是(-)-EC<sup>[24]</sup>。值得注意的是, 以前鉴定黄烷-3-醇是通过将UV光谱和HPLC保留时间与可逆标准HPLC的真实标准品进行比较来实现的, 可分离顺式和反式异构体(如表儿茶素和儿茶素), 但不能区分对映体。因此, 缺乏立体定向测定可能是ANR产物的特异性令人费解的主要原因之一<sup>[25]</sup>。ANR具有差向异构酶活性, 首先催化花青素还原形成(-)-EC, 然后通过非酶差向异构化进一步转化为天然稀有的(+)-EC或(-)-C<sup>[26]</sup>。ANR将花青素催化还原成黄烷-3-醇的反应需要两个NADPH提供两个质子和一个H<sub>2</sub>O提供一个质子。ANR酶首先催化花青素生成flav-en-ol中间体, 然后ANR酶催化flav-en-ol中间体生成黄烷-3-醇或黄烷-3-醇碳正离子(图2), 参与PA后续的转运聚合过程<sup>[27]</sup>。综上所述可以发现, LAR和ANR酶具有底物多样性、选择性和产物特异性, 未来在这两种酶的功能彻底研究清楚的基础上, 可以通过基因工程手段产生所需要特定类型的黄烷-3-醇。

黄烷-3-醇碳正离子在PA聚合过程中起着至关重要的作用, 但是因为其不稳定的特性, 难以从植物中直接分离出来<sup>[28]</sup>。之前关于黄烷-3-醇碳正离子

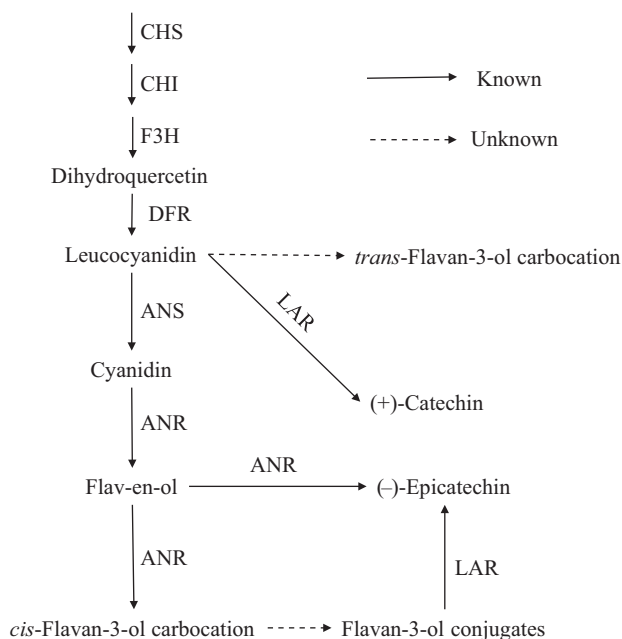


图2 PA前体的生物合成示意图(根据参考文献[18,27]修改)

Fig.2 The diagram of biosynthesis of PA precursors (modified from references [18,27])

存在的主要证据是体外化学实验,例如酸性亲核试剂(如硫醇)处理降解PA,可以捕捉到黄烷-3-醇碳正离子,黄烷-3,4-二醇(即无色花青素)可以衍生出黄烷-3-醇碳正离子,但有关植物细胞或组织提取物中是否存在黄烷-3-醇碳正离子之前是不清楚的<sup>[29-30]</sup>。最近夏涛教授团队<sup>[27]</sup>利用ANR酶学分析、PA降解和PA突变体分析、同位素标记和代谢谱分析等综合方法才证明了黄烷-3-醇碳正离子存在于植物提取物中,并参与了植物PA的生物合成。(-)-表儿茶素碳正离子是ANR将矢车菊素还原为(-)-表儿茶素或(-)-儿茶素的过程中形成的中间化合物,(-)-表儿茶素碳正离子可以直接作为PA延伸单元,也可以在其他亲核化合物存在的情况下形成黄烷-3-醇缀合物,如4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素<sup>[27]</sup>,LAR则能将4 $\beta$ -(*S*-半胱氨酰基)-表儿茶素转化为表儿茶素<sup>[22]</sup>。

## 2.2 原花青素前体结构的修饰

### 2.2.1 原花青素前体B环羟基化修饰

羟基化是通过取代官能团或氢原子引入羟基的过程,黄烷-3-醇的B环羟基化模式由类黄酮-3'-羟化酶(flavonoid-3'-hydroxylase, F3'H)或F3'5'H决定,作用于上游的核心类黄酮途径,F3'H参与原花青素B环3'位羟基化反应,F3'5'H参与原花青素B环3'5'位的羟基化反应<sup>[31]</sup>。根据羟基化模式的不同,PA可以分成不同种类,最常见的原矢车菊素具有3',4'-二羟基模式[(+)-儿茶素

和/或(-)-表儿茶素单元]延伸单元,原天竺葵素具有4'-羟基模式[(+)-阿夫儿茶素和/或(-)-表阿夫儿茶素单元]延伸单元,原飞燕草素是有3',4',5'-三羟基模式[(+)-没食子儿茶素和/或(-)-表没食子儿茶素]延伸单元<sup>[30]</sup>。PA的羟基化程度会影响其生物学活性和口感<sup>[32]</sup>。原矢车菊素和原飞燕草素含量的不同可能是影响棉纤维色泽深浅和颜色类型的重要原因,因为在白色棉纤维中PA含量约为0.06 mg/g,原飞燕草素与原矢车菊素含量相近,而棕色棉纤维中PA含量超过0.51 mg/g,原飞燕草素与原矢车菊素含量相对比例为9:1<sup>[33-34]</sup>,这意味着通过基因工程适当改变原花青素的类型和比例,可以改良彩色棉的纤维色泽。

### 2.2.2 原花青素前体没食子酰基化修饰

根据C-3位是否没食子酰基化,儿茶素可以分为酯型儿茶素和非酯型儿茶素。1983年,SAIJO<sup>[35]</sup>利用同位素示踪法技术证明了没食子酸能与非酯型儿茶素发生酰基化反应生成酯型儿茶素。2005年CROSS等<sup>[36]</sup>提出,1-*O*-没食子酰 $\beta$ -葡萄糖苷(1-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ G)在没食子酰基化过程中既是酰基受体,又是有效的酰基供体,具有双重功能。2012年LIU等<sup>[37]</sup>从茶叶中分离到两种酶,UDP-葡萄糖:没食子酰-1-*O*- $\beta$ -葡萄糖基转移酶(UDP-glucose:galloyl-1-*O*- $\beta$ -D-glucosyltransferase, UGGT)和表儿茶素:1-*O*-没食子酰- $\beta$ -葡萄糖-没食子酰转移酶(epicatechin:1-*O*-galloyl- $\beta$ -D-

glucose-*O*-galloyltransferase, ECGT)。底物没食子酸和UDP-葡萄糖在UGGT酶的反应下, 催化生成 $\beta$ G, 然后ECGT酶将 $\beta$ G上的活性酰基转移至非酯型儿茶素(-)-EC和(-)-EGC的3-*O*位上, 从而生成酯型儿茶素(-)-ECG和(-)-EGCG, 证明了 $\beta$ G具有双重功能。UGGT酶属于UDP-糖基转移酶(UDP-glycosyltransferases, UGT)家族, 2012年, KHATER等<sup>[38]</sup>在葡萄中发现了三个UGT基因*VvgGT1*、*VvgGT2*和*VvgGT3*, 它们编码的UDP-糖基转移酶可催化 $\beta$ G的合成且与PA的合成相关。橡树中的UGT84A13也被发现是催化没食子PA合成第一步反应的关键酶<sup>[39]</sup>。

**2.2.3 原花青素前体糖基化修饰** 研究表明, 糖基化是类黄酮从内质网被转运至液泡的前提条件, 表儿茶素糖苷是PA聚合的潜在前体<sup>[40]</sup>。在植物中糖苷通常由UGT形成, 表皮儿茶素糖苷形成机理最早是在蒺藜苜蓿的研究中报道, 蒺藜苜蓿糖基转移酶UGT72L1催化表儿茶素糖基化反应生成表儿茶素糖苷<sup>[41]</sup>。*UGT72L1*的表达模式和编码蛋白亚细胞定位与*MtANR*相似, *UGT72L1*在毛状根中过表达增加了PA的积累, *UGT72L1*突变部分降低了蒺藜苜蓿种子表儿茶素、表儿茶素糖苷和可溶性PA的含量<sup>[42]</sup>。在拟南芥和蒺藜苜蓿中已经鉴定出一种液泡膜定位的多药和有毒化合物排出(multidrug and toxin extrusion, MATE)转运蛋白TT12, 能优先转运表儿茶素糖苷<sup>[43]</sup>。

### 2.3 原花青素转运的三种机制

PA前体在内质网胞质侧表面合成, 然后转运至液泡进行聚合和储存<sup>[43]</sup>。PA的转运可能涉及三种协同的机制起作用: 囊泡介导、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)介导和膜转运蛋白介导的运输<sup>[44-45]</sup>。

关于囊泡介导运输, 主要有两种途径: 第一条途径是反式高尔基体网络(trans-Golgi network), 反式高尔基体网络能将PA前体从内质网直接转运到液泡; 第二条途径能导致AVIs(anthocyanin vacuolar inclusion)中酚类物质的积累, PA前体可以填充进ACPs(anthocyanin-containing prevacuolars), ACPs被转运至液泡, 并通过内质网膜衍生的胞质囊泡PVCs(prevacuolar compartments)与AVIs融合<sup>[46-47]</sup>。已有研究表明, 囊泡转运是由微管和肌动蛋白细胞骨架连接或引导的, 微管细胞骨架修饰蛋白可通过SNARE(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor at-

tachment protein receptors)、GTPase、外壳蛋白、微管结合蛋白和对接蛋白在靶膜上的微管细胞骨架修饰蛋白将其引导至液泡<sup>[48-50]</sup>。拟南芥*TT19*编码一种GST, 是拟南芥中花青素和PA积累的必需蛋白质<sup>[51]</sup>。GST能够与PA前体结合形成GST-PA复合物, PA前体既可以被GST结合保护, 避免被氧化, 也可以与向液泡周围流动的囊泡或膜转运蛋白结合转运PA前体<sup>[45]</sup>。TT19-GFP融合蛋白的研究表明, TT19不仅位于细胞质和细胞核, 还位于液泡膜<sup>[52]</sup>。与野生型种子相比, *tt19-1*种子包含的可溶性PA含量减少, 难溶性PA含量显著增加。*TT19*基因敲除会导致非GST保护的PA前体积累, 这些PA前体很容易与其他分子结合, 生成难溶性的PA<sup>[44]</sup>。PA前体可通过转运蛋白转运至液泡中, MATE转运蛋白和BLT转运蛋白可能参与PA转运<sup>[47]</sup>。拟南芥*TT12*基因被鉴定为编码一种配对转运蛋白的基因, 在蒺藜苜蓿中鉴定出*TT12*的同源基因*MATE1*, TT12和MATE1都能优先转运与PA前体表儿茶素糖苷到液泡中<sup>[43,53]</sup>。定位于高尔基体的外周膜蛋白TT19/GFS9在囊泡运输和PA转运过程以及囊泡与液泡融合过程中发挥重要的功能<sup>[54]</sup>。GFS9类似于TT19可能直接或间接保护PA免受氧化, 还可能通过液泡膜融合来促进液泡的发育, 影响膜的完整性和膜运输<sup>[54]</sup>。TT13/AHA10属于P型H<sup>+</sup>-ATP酶, 是MATE蛋白发挥作用所必需的, TT13产生跨越液泡膜的H<sup>+</sup>梯度, TT12利用这一梯度将表儿茶素糖苷转运至液泡<sup>[55]</sup>。*TT15*编码UGT8B1, 定位于液泡膜。目前还不清楚TT15如何影响PA的积累过程, TT15催化甾醇糖苷的合成, 可能是通过修饰液泡膜完整性或功能来影响PA前体的转运实现的<sup>[56]</sup>。在某些维管植物中, PA单体可能也在叶绿体类囊体中合成, 然后被诱捕进叶绿体珠状类囊体膜衍生的单宁体。相继有研究发现, 查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、肉桂酸4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)的胞质定位在叶绿体上, 这证明叶绿体具有合成PA前体的机制<sup>[57-59]</sup>。单宁体是一种在维管植物细胞内存在的细胞器, 被称为植物的单宁加工厂, 单宁体被叶绿体膜包裹出芽形成单宁穿梭体在胞质中移向液泡, 最终单宁体通过液泡膜的内陷进入液泡<sup>[60-61]</sup>。这些关于叶绿体中PA前体的生物合成、囊泡转运和单宁体运输的发现表明了PA运输机制的复杂性。

在拟南芥成熟种子中, PA定位于种皮下的细胞壁, 然而PA是如何通过液泡和质膜从内皮细胞转运出去的, 目前尚不清楚<sup>[45]</sup>。有研究人员提出, 在种子干燥过程中, 由于细胞死亡, 当液泡破裂时, PA就会被释放出来; PA也可能是通过囊泡介导和膜转运蛋白介导转运相结合的方式被释放到质外体<sup>[44,62]</sup>。

## 2.4 原花青素聚合机制

B型PA的聚合涉及亲核性的黄烷-3-醇和亲电性的黄烷-3-醇碳正离子这两个不同的单元, 一般认为黄烷-3-醇是PA聚合的起始单元, 黄烷-3-醇碳正离子作为延伸单元聚合形成二聚、寡聚或多聚体<sup>[16,22]</sup>。不同的黄烷-3-醇起始单元和黄烷-3-醇碳正离子延伸单元聚合会形成不同的PA, 比如二聚体中, (-)-表儿茶素碳正离子与(+)-儿茶素聚合生成原矢车菊素B1, (-)-表儿茶素碳正离子与(-)-表儿茶素聚合生成原矢车菊素B2, (+)-儿茶素碳正离子与(+)-儿茶素聚合生成原矢车菊素B3, (+)-儿茶素碳正离子与(-)-表儿茶素聚合生成原矢车菊素B4。与B型PA相比, A型PA的聚合机理更不明确, 有证据表明, 可能通过B型PAC的氧化从而合成A型PA<sup>[28]</sup>。如用氧化剂1,1-二苯基-2-苦基肼处理原矢车菊素B1或B2会产生原矢车菊素A1或A2<sup>[28]</sup>。

到目前为止, 拟南芥中唯一已知参与PA氧化和聚合的酶是TT10, 聚合和氧化过程中所涉及的其他酶仍有待鉴定。在目前所有*tt*突变体中, *tt10*可能是最有趣和最神秘的。*TT10*可能催化PA前体在囊泡中就聚合成寡聚体, 然后被运输到液泡中; *TT10*还可能以表儿茶素糖苷和PA寡聚体作为底物进一步催化PA链的延长; *TT10*有一个预测的信号肽被分泌

到质外体空间, PA也可以通过膜囊泡或其他机制运输到质外体空间, 在那里TT10可以将无色的PA低聚物氧化成拟南芥成熟种皮特有的棕色氧化难溶的PA<sup>[63]</sup>。*TT10*功能的阐明将有助于解析PA的转运和聚合, 是需要深入研究的目标基因。

## 3 原花青素生物合成途径的调控

### 3.1 参与原花青素合成的转录因子

PA的生物合成与植物中的其他次生代谢途径类似, 在转录水平上受到转录因子的复杂调控。拟南芥中调控PA合成的转录因子主要有: WIP[C-端有三个保守氨基酸, 色氨酸(tryptophan, W)、异亮氨酸(isoleucine, I)和脯氨酸(proline, P)]转录因子家族的TT1; MYB转录因子家族的TT2、MYB5; bHLH(basic helix-loop-helix)转录因子家族的TT8、GL3/EGL3; MADS-box转录因子家族的TT16; WD40(WD40 domain-containing proteins)转录因子家族的TTG1; WRKY(WRKY domain-containing proteins)转录因子家族的TTG2和GRAP(GRB2-related adaptor protein)转录因子家族的KAN4(KANADI 4)(表2)。

MYB、bHLH和WD40会相互作用形成MBW复合体调控植物PA的生物合成<sup>[64]</sup>。MYB转录因子决定MBW复合体结合的特异性和被激活的基因, 是复合体的核心成员, 单是转基因MYB的过表达就会明显促进PA的生物合成<sup>[32]</sup>。bHLH需要结合并通过MYB转录因子的相互作用才能调控PA的合成<sup>[65]</sup>。bHLH可能改变MYB的结合特异性, 还可能将R2R3-MYB从特定抑制剂中释放出来<sup>[14]</sup>。WD40

表2 拟南芥中调控PA合成的主要转录因子

Table 2 PA synthesis related main transcription factors in *Arabidopsis thaliana*

转录因子家族 Families	基因 Genes	基因座 Locus
WIP	<i>TT1</i>	At1g34790
	<i>TT2</i>	At5g35550
MYB	<i>MYB5</i>	At3g13540
	<i>TT8</i>	At4g09820
bHLH	<i>GL3</i>	At5g41315
	<i>EGL3</i>	At1g63650
MADS-box	<i>TT16</i>	At5g23260
WD40	<i>TTG1</i>	At5g24520
WRKY	<i>TTG2</i>	At2g37260
GRAP	<i>KAN4</i>	At5g42630

蛋白则可能通过阻止其他转录调控因子与MYB或bHLH结合, 保护MBW复合体, 在MBW三元复合体中, WD40蛋白通常位于三元复合结构的中心<sup>[66-67]</sup>。WD40具有增强MBW复合体激活的功能, 而不直接参与靶基因启动子的识别<sup>[68]</sup>。在拟南芥中, PA的合成主要是由TT2-TT8-TTG1形成的MBW复合体调控, 另外3个MBW复合体(MYB5-TT8-TTG1、TT2-EGL3-TTG1和TT2-GL3-TTG1)的作用则较小, 且具有组织特异性<sup>[69]</sup>。TT2-TT8-TTG1复合体调控*DFR*、*ANS*、*ANR*、*TT19*、*TT12*和*AHA10*的表达; MYB5-TT8-TTG1复合体仅在内皮细胞中调控*DFR*、*ANS*和*TT12*的表达; TT2-EGL3-TTG1在合点细胞中调控*DFR*、*ANS*、*ANR*和*AHA10*的表达; TT2-GL3-TTG1复合体在合点细胞中调控*DFR*的表达。MYB家族中也存在负调控PA生物合成的转录因子, MYB抑制子最初是在与一般苯丙烷代谢和花青素合成相关的研究中被发现的<sup>[70]</sup>。从机制上讲, MYB阻遏蛋白通过结合启动子区域以及MBW复合体中的bHLH辅因子起作用<sup>[32]</sup>。比如拟南芥AtMYBL2、草莓FaMYB1、矮牵牛PhMYB27、葡萄VvMYBC2-L3、VvMYBC2-L1、白三叶草TrMYB133和TrMYB134通过与bHLH蛋白竞争性结合抑制MBW复合体的形成, 抑制PA的合成<sup>[71-72]</sup>。杨树PtrMYB57与PtrbHLH131和PtrTTG1(WD40)形成了一个MBW转录抑制复合体, 抑制PA的生物合成<sup>[73]</sup>。在拟南芥中, TT1通过与TT2相互作用, 从而间接调控*CHS*、*DFR*、*ANS*和*ANR*的表达<sup>[61]</sup>; *TTG2*能直接调节编码PA转运蛋白的基因*TT12*和*AHA10*, 但*TTG2*的转录依赖于*TTG1*, 两者也互作<sup>[74]</sup>。TT16能调控*ANR*和*TT2*基因的表达<sup>[56]</sup>。TT1、TT16和TTG2除了调控PA生物合成相关基因的表达外, 还可以促进积累PA的器官和细胞的发育<sup>[75]</sup>。转录因子KAN4的过表达产生了目前唯一一个显性*tt*突变系*sk21-D*, *sk21-D*突变体中的*CHS*、*CHI*、*F3'H*、*DFR*、*LDOX*、*ANR*、*TT2*、*TT8*和*TTG1*的表达量均下降, 表明KAN4可广泛调控拟南芥中PA生物合成的相关基因<sup>[76]</sup>。

### 3.2 miRNA在原花青素生物合成中的作用

miRNA(microRNA)通过在转录后水平上调控基因的表达在PA生物合成调控网络中发挥重要作用, miRNA一般通过两种途径调控PA的生物合成: (1) 直接靶向PA生物合成结构基因转录的mRNA, 从而直接负调控PA生物合成; (2) 通过靶向其他调控

基因(如转录因子)转录的mRNA间接调控, 具体作用取决于靶向的调控基因是激活子还是抑制子<sup>[77]</sup>。拟南芥miR156通过靶向*AtSPL9*基因间接调控*ANS*、*F3'H*和*DFR*基因的表达<sup>[78]</sup>, 因为*AtSPL9*能够与MBW复合体中MYB蛋白的PAP1相互作用, 与bHLH竞争性地结合MYBPAP1<sup>[79]</sup>, *AtSPL9*极有可能通过破坏MBW转录激活复合物的稳定性调控PA的生物合成。拟南芥miR828通过靶向转录因子AtMYB113、AtMYB82和TAS4间接调控*DFR*和*ANS*基因<sup>[80]</sup>。在茶树中发现7个与PA生物合成相关的miRNA, 其中miR7814的靶基因是*CHS*, miR5240的靶基因是*DFR*, miR529d的靶基因是*CHI*, miR5559-5p的靶基因是*ANR*, miR5264的靶基因是*ANR*, miR156G-3p的靶基因是*F3'H*, miR2868的靶基因是*LAR*<sup>[81]</sup>。柿子miRN-A858b抑制与柿子中PA的生物合成相关的转录因子DkMYB19/DkMYB20的表达<sup>[82]</sup>。2015年, LUO等<sup>[83]</sup>利用高通量测序技术分析数据推测, 柿子miR395p-3p和miR858b分别调节bHLH和MYB, 在miR156j-5p的控制下受SPL的影响, 进而调节PA生物合成所涉及的结构基因, miR396g和miR2911a可能调节与PA前体糖基化和难溶性相关的靶基因。

### 3.3 原花青素生物合成的环境调控

PA的生物合成会受到环境因子的调控, 例如光照和荫庇、气体(CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>和O<sub>3</sub>)、温度、病原体(细菌和真菌)感染、紫外线(UV-A和UV-B)或太阳辐射、氮、水和磷缺乏等<sup>[15,84-85]</sup>。比如低温会诱导柿子DkMYB4表达, 由此产生PA积累<sup>[86]</sup>, 蔗糖能诱导苹果中PA积累<sup>[87]</sup>, 强光和紫外线胁迫可以诱导杨树积累高浓度的PA<sup>[88]</sup>。玫瑰花中PA1型RrMYB5和TT2型RrMYB10可经伤害和氧化诱导后表达, 从而增加了PA的积累<sup>[89]</sup>。在长白落叶松中, 机械伤害和强光会诱导LoMYB29的表达, LoMYB29通过激活PA生物合成基因, 促进PA的生物合成<sup>[90]</sup>。锈菌感染杨树会刺激水杨酸、茉莉酸和脱落酸的分泌, 并激活下游信号转导, 增加PA的积累, 从而抑制锈菌的增殖<sup>[91]</sup>。

## 4 讨论与展望

随着对拟南芥等一系列模式植物种皮颜色突变体分子机理的深入研究, 与PA紧密相关的生物合成代谢途径、主要功能基因、分子调控机制等也有所阐述, 为通过代谢工程途径进行PA相关的农艺性

状的遗传改良奠定了基础。PA遗传改良主要有以下几个方向。(1) 农产品的脱涩。PA能结合并沉淀唾液蛋白,会使柿子、茶叶和葡萄酒等农产品具有收敛性和涩味而影响口感和肠胃消化。目前有研究发现,水果的收敛性与PA的平均聚合度和没食子酰基化程度呈正相关,而与B环上的羟基化水平呈负相关<sup>[6]</sup>。(2) 农作物种皮颜色的改变。农作物的种皮会因为PA的积累而呈现深色,油菜籽粒有黄色、黑色和褐色等,其中黄籽油菜含油量高、饲用价值高、加工成本低,还更加美观。最近范楚川教授团队<sup>[92]</sup>首次利用CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向突变TT8基因,阻断了PA的积累,成功创制了具有稳定表型的黄籽甘蓝型油菜。(3) 天然彩色棉纤维色泽的改良。棕色棉纤维色素物质主要是PA及其衍生物,本课题组近几年来,对陆地棉核心类黄酮-PA途径的主要结构基因进行了克隆,利用VIGS、RNAi、CRISPR/Cas9和过表达等技术手段,杂交、自交等传统育种技术,对彩色棉纤维中PA呈色机理进行了探究,并获得了一批纤维色泽明显改良的彩色棉新品系。(4) 创制出叶片积累PA的高质量牧草品种。世界上最主要的牧草品种蒺藜苜蓿和白三叶草在叶片中不积累PA,但是适量的PA能防止反刍动物的膨胀病,增强反刍动物的营养,减少青贮饲料中的蛋白质降解,因此叶片积累PA是一个重要的农艺性状<sup>[93]</sup>。研究人员在将PA途径的正调控基因引入蒺藜苜蓿中作出了巨大的努力,但目前仍未完全成功,转基因株系叶片的PA含量要么没有增加,要么增加得不明显,这些基因主要有Lc、LAP1、MtWD40-1和MtPAR<sup>[94]</sup>。(5) 提高植物的抗病虫害能力。PA是植物重要的防御性次生代谢物,桑树MnANR和MnLAR在烟草中的异位表达提高了烟草对灰霉病的抗性<sup>[95]</sup>。过表达PtrLAR3,杨树叶片中PA显著积累,受到真菌侵染的症状显著降低,同时叶片粗提物可以显著抑制真菌的生长<sup>[96]</sup>。

PA代谢工程进一步的发展也会受到诸多因素的限制。(1) 对于许多植物,植物组织培养再生体系还未建立,无法进行遗传转化,难以获得转基因株系。(2) 由于PA代谢是一个复杂的调控代谢通路,某些植物缺乏某些PA前体物质,使单一基因的遗传操作难以实现PA含量的显著提高。(3) PA过度积累对于植物自身也是有害的,组成型启动子会驱动PA在植物各组织中大量表达影响植物正常生长甚至死亡,

所以找到合适的特异性启动子显得至关重要。(4) PA和花青素苷的生物合成都需要花青素作为前体,所以两者会形成明显的底物竞争关系。(5) 目前有关PA前体的转运和聚合机制仍不明确,有待后续进一步研究。

### 参考文献 (References)

- [1] JUN J H, XIAO X, RAO X, et al. Proanthocyanidin subunit composition determined by functionally diverged dioxygenases [J]. Nat Plants, 2018, 4(12): 1034-43.
- [2] LAI H, LIM Y, KIM K. Isolation and characterisation of a proanthocyanidin with antioxidative, antibacterial and anti-cancer properties from fern *Blechnum orientale* [J]. Pharmacognosy Mag, 2017, 13(49): 31-7.
- [3] GONZALO-DIAGO A, DIZY M, FERNANDEZ-ZURBANO P. Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(37): 8861-70.
- [4] ZHU Q, XU Y, YANG Y, et al. The persimmon (*Diospyros oleifera* Cheng) genome provides new insights into the inheritance of astringency and ancestral evolution [J]. Hortic Res, 2019, 6(1): 1-15.
- [5] LI Y J, ZHANG X Y, WANG F X, et al. A comparative proteomic analysis provides insights into pigment biosynthesis in brown color fiber [J]. J Proteomics, 2013, 78: 374-88.
- [6] HE F, PAN Q, SHI Y, et al. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants [J]. Molecules, 2008, 13(10): 2674-703.
- [7] KU Y S, NG M S, CHENG S S, et al. Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1717.
- [8] ZHAO L, JIANG X, QIAN Y, et al. Metabolic characterization of the anthocyanidin reductase pathway involved in the biosynthesis of flavan-3-ols in elite shuchazao tea (*Camellia sinensis*) cultivar in the field [J]. Molecules, 2017, 22(12): 2241.
- [9] QIAN Y, ZHAO X, ZHAO L, et al. Analysis of stereochemistry and biosynthesis of epicatechin in tea plants by chiral phase high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2015, 1006: 1-7.
- [10] WEI X, JU Y, MA T, et al. New perspectives on the biosynthesis, transportation, astringency perception and detection methods of grape proanthocyanidins [J]. Crit Rev Food Sci, 2020, 137: 109566.
- [11] KELM M A, JOHNSON J C, ROBBINS R J, et al. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase [J]. J Agr Food Chem, 2006, 54(5): 1571-6.
- [12] LUCA S V, BUJOR A, MIRON A, et al. Preparative separation and bioactivity of oligomeric proanthocyanidins [J]. Phytochem Rev, 2019, 19(5): 1093-140.
- [13] DEBEAUJON I, NESI N, PEREZ P, et al. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis testa*: regulation of differentia-



- tion and role in seed development [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2514-31.
- [14] LEPINIEC L, DEBEAUJON I, ROUTABOUL J M, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 405-30.
- [15] PENG Q, ZHU Y, LIU Z, et al. An integrated approach to demonstrating the ANR pathway of proanthocyanidin biosynthesis in plants [J]. *Planta*, 2012, 236(3): 901-18.
- [16] WANG P, ZHANG L, JIANG X, et al. Evolutionary and functional characterization of leucoanthocyanidin reductases from *Camellia sinensis* [J]. *Planta*, 2018, 247(1): 139-54.
- [17] LIU Y, SHI Z, MAXIMOVA S, et al. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase [J]. *BMC Plant Bio*, 2013, 13(1): 202.
- [18] ZHANG L, WANG P, MA X, et al. Exploration of the substrate diversity of leucoanthocyanidin reductases [J]. *J Agr Food Chem*, 2020, 68(13): 3903-11.
- [19] PANG Y, PEEL G J, WRIGHT E, et al. Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 601-15.
- [20] LIM C G, WONG L, BHAN N, et al. Development of a recombinant *Escherichia coli* strain for overproduction of the plant pigment anthocyanin [J]. *Appl Environ Microb*, 2015, 81(18): 6276-84.
- [21] WELLMANN F, GRIESSER M, SCHWAB W, et al. Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin [J]. *Febs Lett*, 2006, 580(6): 1642-8.
- [22] LIU C, WANG X, SHULAEV Y, et al. A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins [J]. *Nat Plants*, 2016, 2(12): 1-7.
- [23] DONG W, MA H, CHEN C, et al. Overexpression of the *OvBAN* gene enhances the proanthocyanidin content in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *In Vitro Cell Dev*, 2020, 56(4): 548-57.
- [24] XIE D, SHARMA S B, DIXON R A. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422(1): 91-102.
- [25] GARGOURI M, MANIGAND C, MAUGE C, et al. Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera* [J]. *Acta Crystallogr D*, 2009, 65(9): 989-1000.
- [26] PANG Y, ABEYSINGHE I S B, HE J, et al. Functional characterization of proanthocyanidin pathway enzymes from tea and their application for metabolic engineering [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161(3): 1103-16.
- [27] WANG P, LIU Y, ZHANG L, et al. Functional demonstration of plant flavonoid carbocations proposed to be involved in the biosynthesis of proanthocyanidins [J]. *Plant J*, 2020, 101(1): 18-36.
- [28] JIANG X, LIU Y, WU Y, et al. Analysis of accumulation patterns and preliminary study on the condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant [*Camellia sinensis*] [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8742.
- [29] STAFFORD H A, LESTER H H. Flavan-3-ol biosynthesis: the conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3, 4-cis-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of douglas fir [J]. *Plant Physiol*, 1984, 76(1): 184-6.
- [30] XIE D, DIXON R A. Proanthocyanidin biosynthesis-still more questions than answers [J]? *Phytochemistry*, 2005, 66(18): 2127-44.
- [31] ALSEEKH S, PEREZ DE SOUZA L, BENINA M, et al. The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function [J]. *Phytochemistry*, 2020, 174: 112347.
- [32] CONSTABEL C P. Molecular controls of proanthocyanidin synthesis and structure: prospects for genetic engineering in crop plants [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66(38): 9882-8.
- [33] HONGJIE F, YANJUN L, SHAOFANG W, et al. Molecular analysis of proanthocyanidins related to pigmentation in brown cotton fibre (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *J Exp Bot*, 2014(20): 5759-69.
- [34] 陈艳成, 吴韬, 刘海峰, 等. 新疆棕色棉纤维中原花青素的提取及鉴定[J]. *西北农业学报*(CHEN Y C, WU T, LIU H F, et al. Extraction and identification of proanthocyanidins from brown cotton fibers [J]. *Acta Agri Boreali-Occident Sin*), 2012, 21(3): 92-6.
- [35] SAIJO R. Pathway of gallic acid biosynthesis and its esterification with catechins in young tea shoots [J]. *Agri Biol Chem*, 1983, 47(3): 455-60.
- [36] NIEMETZ R, GROSS G G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(17): 2001-11.
- [37] LIU Y, GAO L, LIU L, et al. Purification and characterization of a novel galloyltransferase involved in catechin galloylation in the tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44406-17.
- [38] KHATER F, FOURNAND D, VIALET S, et al. Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(3): 1201-14.
- [39] MITTASCH J, BOTTCHER C, FROLOVA N, et al. Identification of UGT84A13 as a candidate enzyme for the first committed step of gallotannin biosynthesis in pedunculate oak (*Quercus robur*) [J]. *Phytochemistry*, 2014, 99: 44-51.
- [40] ZERBIB M. Etude de la glycosylation de flavanols dans le raisin et incidence dans les vins [D]. Montpellier: Université Montpellier, 2018.
- [41] PANG Y, PEEL G J, SHARMA S B, et al. A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 14210-5.
- [42] PANG Y, CHENG X, HUHMANN D V, et al. *Medicago* glucosyltransferase UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis [J]. *Planta*, 2013, 238(1): 139-54.
- [43] ZHAO J, DIXON R A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(8): 2323-40.
- [44] ZHAO J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(9): 576-85.
- [45] ZHAO J, PANG Y, DIXON R A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization [J]. *Plant Physiol*, 2010,

- 153(2): 437-43.
- [46] BRAIDOT E, ZANCANI M, PETRUSSA E, et al. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3(9): 626-32.
- [47] ROUSSERIE P, RABOT A, GENY-DENIS L. From flavanols biosynthesis to wine Tannins: what place for grape seeds [J]? *J Agr Food Chem*, 2019, 67(5): 1325-43.
- [48] MCDADE J R, MICHELE D E. Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(7): 1677-86.
- [49] WICKNER W. Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles [J]. *Annu Rev Cell Dev Bio*, 2010, 26(1): 115-36.
- [50] RICHTER S, GELDNER N, SCHRADER J, et al. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling [J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 488-92.
- [51] LI X, GAO P, CUI D, et al. The *Arabidopsis tt19-4* mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through a 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase [J]. *Plant Cell Environ*, 2011, 34(3): 374-88.
- [52] SUN Y, LI H, HUANG J R. *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 387-400.
- [53] DEBEAUJON I, PEETERS A J, LEON-KLOOSTERZIEL K M, et al. The *TRANSPARENT TESTA 12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(4): 853-71.
- [54] ICHINO T, FUJI K, UEDA H, et al. GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2014, 80(3): 410-23.
- [55] APPELHAGEN I, NORDHOLT N, SEIDEL T, et al. *TRANSPARENT TESTA 13* is a tonoplast P3A-ATPase required for vacuolar deposition of proanthocyanidins in *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant J*, 2015, 82(5): 840-9.
- [56] XU W, BOBET S, LE GOURRIEREC J, et al. *TRANSPARENT TESTA 16* and *15* act through different mechanisms to control proanthocyanidin accumulation in *Arabidopsis testis* [J]. *J exp bot*, 2017, 68(11): 2859-70.
- [57] CHEN J, WEN P, KONG W, et al. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development [J]. *J Plant Physiol*, 2006, 163(2): 115-27.
- [58] TIAN L, WAN S, PAN Q, et al. A novel plastid localization of chalcone synthase in developing grape berry [J]. *Plant Sci*, 2008, 175(3): 431-6.
- [59] WANG H, WANG W, ZHANG P, et al. Gene transcript accumulation, tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in developing grape berries [J]. *Plant Sci*, 2010, 179(1/2): 103-13.
- [60] BRILLOUET J, ROMIEU C, SCHOEFS B, et al. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of tracheophyta [J]. *Ann Bot*, 2013, 112(6): 1003-14.
- [61] APPELHAGEN I, LU G H, HUEP G, et al. *TRANSPARENT TESTA1* interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant J*, 2011, 67(3): 406-19.
- [62] IKEGAMI A, EGUCHI S, KITAJIMA A, et al. Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit [J]. *Plant Sci*, 2007, 172(5): 1037-47.
- [63] POURCEL L, ROUTABOUL J, KERHOAS L, et al. *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* Seed Coat [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 2966-80.
- [64] CHEN L, HU B, QIN Y, et al. Advance of the negative regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB transcription factors [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2019, 136: 178-87.
- [65] HASSANI D, FU X, SHEN Q, et al. Parallel transcriptional regulation of artemisinin and flavonoid biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(5): 466-76.
- [66] RAMSAY N A, GLOVER B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 63-70.
- [67] ZHAO J, DIXON R A. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(2): 72-80.
- [68] BAUDRY A, HEIM M A, DUBRECQ B, et al. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 39(3): 366-80.
- [69] XU W, GRAIN D, BOBET S, et al. Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed [J]. *New phytol*, 2014, 202(1): 132-44.
- [70] MA D, CONSTABEL C P. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(3): 275-89.
- [71] HUANG Y, WU Q, WANG S, et al. FtMYB8 from *Tartary buckwheat* inhibits both anthocyanin/proanthocyanidin accumulation and marginal trichome initiation [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 1-16.
- [72] JUN J H, LIU C, XIAO X, et al. The transcriptional repressor MYB2 regulates both spatial and temporal patterns of proanthocyanidin and anthocyanin pigmentation in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(10): 2860-79.
- [73] CHEN C, ZHANG K, KHURSHID M, et al. MYB transcription repressors regulate plant secondary metabolism [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2019, 38(3): 159-70.
- [74] GONZALEZ A, BROWN M, HATLESTAD G, et al. TTG2 controls the developmental regulation of seed coat tannins in *Arabidopsis* by regulating vacuolar transport steps in the proanthocyanidin pathway [J]. *Dev Biol*, 2016, 419(1): 54-63.
- [75] NESI N, DEBEAUJON I, JOND C, et al. The *TRANSPARENT TESTA 16* locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat [J]. *Plant cell*, 2002, 14(10): 2463-79.
- [76] GAO P, LI X, CUI D, et al. A new dominant *Arabidopsis* transparent testa mutant, *sk21-D*, and modulation of seed flavonoid biosynthesis by KAN4 [J]. *Plant Biotechnol J*, 2010, 8(9): 979-93.
- [77] BULGAKOV V P, AVRAMENKO T V. New opportunities for the regulation of secondary metabolism in plants: focus on

- microRNAs [J]. *Biotechnol Let*, 2015, 37(9): 1719-27.
- [78] SAMAD A F A, SAJAD M, ISMAIL I. Plant microRNAs: shaping development and environmental responses [M]. Switzerland: Springer Cham, 2020: 121-42.
- [79] GUPTA O P, KARKUTE S G, BANERJEE S, et al. Contemporary understanding of miRNA-based regulation of secondary metabolites biosynthesis in plants [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 374.
- [80] JIA X, SHEN J, LIU H, et al. Small tandem target mimic-mediated blockage of microRNA858 induces anthocyanin accumulation in tomato [J]. *Planta*, 2015, 242(1): 283-93.
- [81] SUN P, ZHANG Z, ZHU Q, et al. Identification of miRNAs and target genes regulating catechin biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) [J]. *J Integr Agr*, 2018, 17(5): 1154-64.
- [82] YANG S, ZHANG M, XU L, et al. MiRNA858b inhibits proanthocyanidin accumulation by repression of DkMYB19 and DkMYB20 in persimmon [J]. *BioRxiv*, 2019: 783431.
- [83] LUO Y, ZHANG X, LUO Z, et al. Identification and characterization of microRNAs from Chinese pollination constant non-astringent persimmon using high-throughput sequencing [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 11.
- [84] MARLES M A S, RAY H, GRUBER M Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(2): 367-83.
- [85] NGUYEN C T, TRAN G B, NGUYEN N H. The MYB-bHLH-WDR interferers (MBWi) epigenetically suppress the MBW's targets [J]. *Biol Cell*, 2019, 111(11): 284-91.
- [86] AKAGI T, TSUJIMOTO T, IKEGAMI A, et al. Effects of seasonal temperature changes on *DkMyb4* expression involved in proanthocyanidin regulation in two genotypes of persimmon (*Diospyros kaki Thunb.*) fruit [J]. *Planta*, 2011, 233(5): 883-94.
- [87] WANG P, MA G, ZHANG L, et al. A sucrose-induced MYB (SIMYB) transcription factor promoting proanthocyanidin accumulation in the tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67(5): 1418-28.
- [88] GESELL A, YOSHIDA K, TRAN L T, et al. Characterization of an apple TT2-type R2R3 MYB transcription factor functionally similar to the poplar proanthocyanidin regulator PtMYB134 [J]. *Planta*, 2014, 240(3): 497-511.
- [89] SHEN Y, SUN T, PAN Q, et al. RrMYB 5-and RrMYB 10-regulated flavonoid biosynthesis plays a pivotal role in feedback loop responding to wounding and oxidation in *Rosa rugosa* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(11): 2078-95.
- [90] LI D, HU X, LI C. Overexpression of the LoMYB29 gene of larix olgensis contributes to the regulation of proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Forestry Res*, 2019, 30(5): 1793-804.
- [91] ULLAH C, TSAI C J, UNSICKER S B, et al. Salicylic acid activates poplar defense against the biotrophic rust fungus *Melampsora larici-populina* via increased biosynthesis of catechin and proanthocyanidins [J]. *New phytol*, 2019, 221(2): 960-75.
- [92] ZHAI Y, YU K, CAI S, et al. Targeted mutagenesis of BnTT8 homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in *Brassica napus* L. [J]. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(5): 1153-68.
- [93] JONKER A, YU P. The occurrence, biosynthesis, and molecular structure of proanthocyanidins and their effects on legume forage protein precipitation, digestion and absorption in the ruminant digestive tract [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1105.
- [94] DIXON R A, LIU C, JUN J H. Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants [J]. *Curr Opin Biotech*, 2013, 24(2): 329-35.
- [95] XIN Y, MENG S, MA B, et al. Mulberry genes *MnANR* and *Mn-LAR* confer transgenic plants with resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *Plant Sci*, 2020, 296: 110473.
- [96] YUAN L, WANG L, HAN Z, et al. Molecular cloning and characterization of *PtrLAR3*, a gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Populus trichocarpa*, and its constitutive expression enhances fungal resistance in transgenic plants [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2513-24.