

原花青素的生物合成途径、功能基因和代谢工程

赵文军, 张迪, 马丽娟, 柴友荣*

西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716

Biosynthetic Pathway, Functional Genes and Metabolic Engineering of Proanthocyanidins

ZHAO Wen-Jun, ZHANG Di, MA Li-Juan, CHAI You-Rong*

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China

摘要: 原花青素(PA)广泛分布于高等植物中, 与农作物的多种品质性状密切相关。虽长期受到关注, 但其生物合成途径和主要功能基因的解析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。PA经公共苯丙烷-核心类黄酮-原花青素复合途径而合成, 先后涉及12个关键酶(PAL、C4H、4CL、CHS、CHI、F3H、F3'H、DFR、LDOX/ANS、LAR、ANR、LAC)的催化反应和3种转运蛋白(GST、MATE、ATPase)的胞内转运, 并有6种转录因子(WIP-ZF、MYB、bHLH、WD40、WRKY、MADS)参与调控PA的合成与积累。这些基因在拷贝数、表达特征、蛋白亚细胞定位、蛋白互作、突变体表型等方面具有显著特点。PA的代谢工程在牧草品质改良、农产品脱涩、油菜黄籽材料创新、葡萄和葡萄酒品质改良、茶多酚分子育种、作物抗病虫性提高、新型作物拓展等方向具有重要的应用前景, 目前仅在少数方向有所启动, 更待广泛关注和深入研究。

关键词: 生物合成途径; 功能基因; 代谢工程; 原花青素

原花青素(proanthocyanidin, PA)又叫缩合单宁(condensed tannin, CT), 是高等植物特有并广泛存在的聚多酚类化合物, 以PA单体、寡聚物或多聚物的形式存在。PA对于植物具有抗紫外线、抗病、抗虫、清除自由基、调节种子休眠和萌发等生理功能, 并影响作物的适口性、可消化性、保健价值等品质性状。PA提取物具有多方面的医疗价值, 可用于抗衰老、防治心血管疾病、防治肿瘤等(Dixon等2005)。近年来, 随着对拟南芥等植物一系列种皮色泽突变体的分子研究的深入, PA的生物合成途径、主要功能基因、分子调控机理等已基本阐明, 为通过代谢工程进行PA相关性状的植物改良奠定了基础(Xie和Dixon 2005; Lepiniec等2006)。

1 植物原花青素的生物合成途径

如图1所示, PA的生物合成是由公共苯丙烷途径、核心类黄酮-花青素途径、PA特异途径这3个连续的代谢途径构成的一个复合途径完成的。

1.1 公共苯丙烷途径 公共苯丙烷途径是指从苯丙氨酸到对羟基肉桂酸(香豆酸)的合成途径, 共有3个酶。苯丙氨酸解氨酶(PAL)脱去苯丙氨酸的氨基, 使其转化为反式肉桂酸。肉桂酸-4-羟化酶(C4H)催化反式肉桂酸4位上的羟基化, 使其转化为反式-

4-香豆酸。4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL)催化香豆酸与辅酶A的酯化结合, 使香豆酸得以活化, 可用于类黄酮、木质素等下游分支途径进一步合成各种次生物质(Chapple等1994)。

1.2 核心类黄酮-花青素途径 类黄酮是高等植物中普遍存在的次生代谢物质, 拟南芥中主要为花青素、黄酮醇和PA这三大类, 营养器官中积累花青素和黄酮醇, 种胚中积累黄酮醇, 种皮中积累PA(Chapple等1994)。作为苯丙烷途径的一个重要分支途径, 植物类黄酮途径又包含黄酮醇、花青素苷、PA、异黄酮、橙酮、鞣红等多个重要的分支途径。自查尔酮直到花青素的步骤是花青素苷分支途径和PA分支途径都必须经过的公共途径, 本文称为核心类黄酮-花青素途径。作为所有类黄酮合成的起始步骤, 查尔酮合酶(CHS)将1分子香豆酰辅酶A与3分子丙二酰辅酶A合成为1分子四羟基查尔酮, 再由查尔酮异构酶(CHI)将其转变为柚皮素, 随后由黄烷酮3-羟化酶(F3H)和类黄酮3'-羟化酶(F3'H)分别在3和3'位进行羟化并生成黄烷酮

收稿 2009-02-04 修定 2009-03-05

资助 国家“863”计划(2006AA10Z110)和国家自然科学基金(30771237)。

* 通讯作者(E-mail: chaiyourong1@163.com; Tel: 023-68250744)。

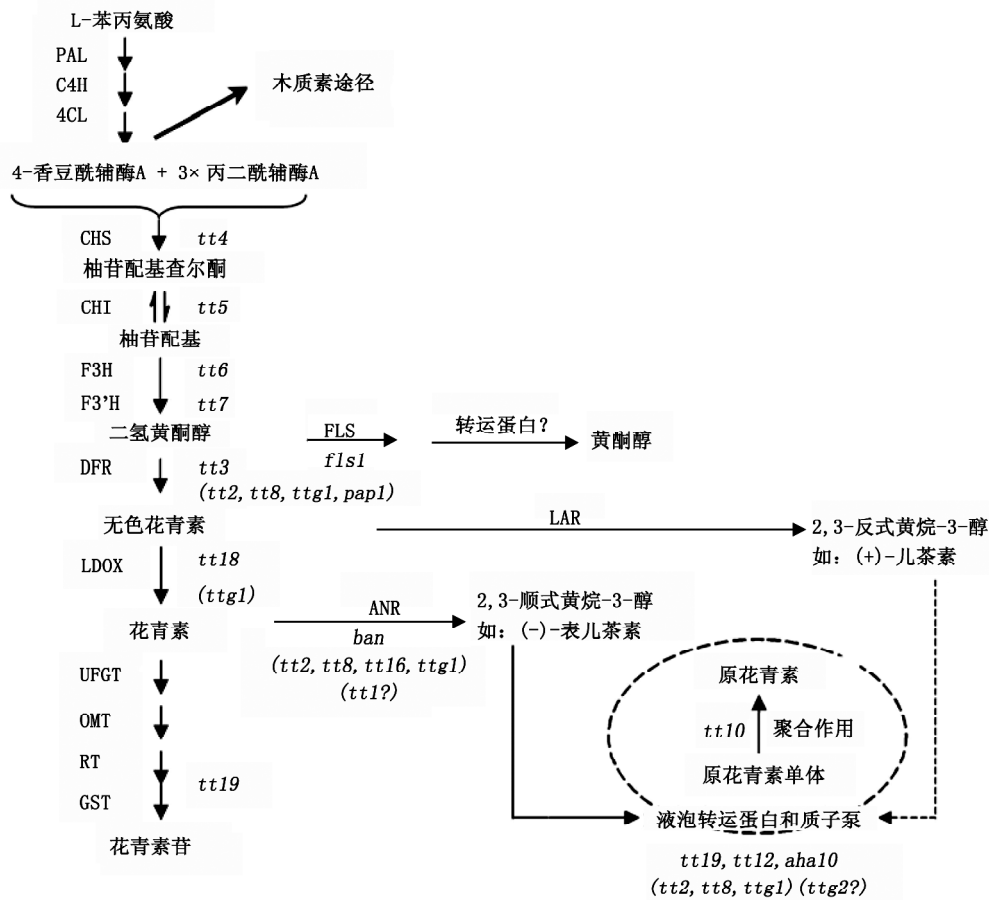


图1 花青素苷、黄酮醇和原花青素等类黄酮物质的生物合成途径[根据 Sharma 和 Dixon (2005)翻译和补充而成]

aha10: P-type H^+ -ATPase, P 类型 H^+ -ATPase; ANR: anthocyanidin reductase, 花青素还原酶; *ban*: banyuls; C4H: cinnamate 4-hydroxylase, 肉桂酸-4-羟化酶; CHI: chalcone isomerase, 查尔酮异构酶; CHS: chalcone synthase, 查尔酮合酶; 4CL: 4-coumarate:CoA ligase, 4-羟基肉桂酰辅酶A连接酶; DFR: dihydroflavonol reductase, 二氢黄酮醇-4-还原酶; F3H: flavanone 3-hydroxylase, 黄酮醇3-羟化酶; F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase, 类黄酮3'-羟化酶; FLS: flavonol synthase, 黄酮醇合酶; GST: glutathione S-transferase, 谷胱甘肽S-转移酶; LAR: leucoanthocyanidin reductase, 无色花青素还原酶; LDOX: leucoanthocyanidin dioxygenase, 无色花青素双加氧酶; OMT: *O*-methyltransferase, *O*-甲基转移酶; PAL: phenylalanine ammonia-lyase, 苯丙氨酸解氨酶; *pap1*: production of anthocyanin pigment, 产花青素色素突变体; RT: rhamnosyl transferase, 鼠李糖基转移酶; UFGT: uridine diphosphate glucose-flavonoid glucosyltransferase, 尿苷二磷酸葡萄糖-类黄酮葡萄糖基转移酶; *tt*: transparent testa, 透明种皮突变体; *ttg*: transparent testa glabrous, 透明种皮无毛突变体。

醇,它在二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)的作用下生成无色花青素,再无色花青素双加氧酶/花青素合成酶(LDOX/ANS)的催化下形成花青素(Lepiniec等2006)。在花、叶、茎表等组织中,以花青素为底物可进入花青素苷特异途径,先后经过一系列的糖基化等修饰及向液泡的转运,最终成为显红、紫等多种色调的花青素苷(Holton 和 Cornish 1995)。在种皮等组织中,以花青素为底物,进入PA特异途径(图1)。

1.3 原花青素特异途径 花青素还原酶(ANR)将花青素转化成表儿茶素(2,3-顺式黄烷-3-醇),它是一

类PA单体。在葡萄、茶叶、苜蓿、红豆草等植物中,无色花青素还原酶(LAR)可以直接将无色花青素转化成儿茶酚(2,3-反式黄烷-3-醇),但拟南芥缺乏该酶(Dixon等2005)。随后是转运和聚合,虽然具体机制尚欠明了,但综合近年来的研究进展(Pourcel等2005; Sharma 和 Dixon 2005),我们推测PA单体可能先与谷胱甘肽-S-转移酶(拟南芥中为AtGST26/AtGSTF12)结合并运向液泡膜,再由位于液泡膜上的MATE家族蛋白(拟南芥中为AtDTX41)和 H^+ -ATPase(拟南芥中为AHA10)(二者可能联合?)将其跨膜转运到液泡中,最后由漆酶

(拟南芥中为AtLAC15)等氧化酶类将其缩合成不同聚合度的PA聚合物。

2 植物原花青素生物合成的功能基因

2.1 公共苯丙烷途径的结构基因

2.1.1 PAL 我们对NCBI GenBank检索和同源比对该基因后发现(后面的基因同此法), 很多种植物的PAL基因已克隆, 如拟南芥、欧芹、番茄、烟草、菜豆、豌豆、大豆、苜蓿、马铃薯、甘蓝型油菜等。多数植物中的PAL由一个小基因家族编码, 如拟南芥中有4个成员, 甘蓝型油菜约有2~5个基因与拟南芥每个成员对应(Ni等2008)。PAL一般都有1个位置保守但长度变化较大的内含子, 唯独拟南芥的AtPAL3有2个内含子。PAL蛋白一般为700个左右氨基酸, 组成同源四聚体, 是苯丙烷途径的第一个关键酶。我们搜索SwissModel Repository后发现(后面的基因同此法), 酵母、欧芹等PAL以及动物的HAL(组氨酸解氨酶)的晶体结构已经解析, 也有人提出了反应中心和一些活性氨基酸位点。

2.1.2 C4H 已有拟南芥、玉米、烟草、高粱、矮牵牛、金鱼草、菊花、甘蓝型油菜等50种以上植物的C4H基因被克隆, 拟南芥和豌豆只有1个, 苜蓿有2个, 亚洲棉有2个以上, 绿豆、长春花等有多数(方从兵等2005)。C4H一般有2个内含子, 位置较保守。C4H构成细胞色素P450氧化酶超家族的CYP73家族, 催化反应依赖于NADPH和O₂, 蛋白一般为500个左右氨基酸, 一般认为它具有1个N-端膜锚, 具有血红素结合域、氧结合位点、ERR三联体等, 有多个底物识别位点(SRS), 蛋白为球状体, 拟南芥等植物的C4H晶体结构已经解析(Chen等2007)。

2.1.3 4CL 在大多数维管植物中4CL以基因家族的形式出现, 不同的同工酶功能各异, 拟南芥有4个4CL基因和11个4CL-like基因。拟南芥、烟草、杨树等植物4CL的研究较为深入, 红树莓、芸香、黄芩、白桦、葡萄、辣椒、丹参、欧芹、大豆等众多植物的4CL也被克隆。4CL一般有3~6个内含子, 水平同源基因间内含子的个数和位置存在差异。4CL蛋白中存在2个保守基序, 基序I为SSGTTGLPKG, 基序II为GEICIRG(Kajita等1997)。目前尚无4CL蛋白晶体结构解析的报道。

2.2 核心类黄酮-花青素途径的结构基因

2.2.1 CHS/TT4 已在拟南芥、玉米、矮牵牛、苜蓿、欧芹、金鱼草、蝴蝶兰、大豆等多种植物中被克隆, 许多植物存在一个CHS基因家族, 但不同物种CHS的拷贝数差异较大, 拟南芥只有1个。CHS的编码区约1.2 kb, 科间同源性达60%以上。除金鱼草CHS含有2个内含子外, 其余植物的CHS都只有1个内含子, 内含子位置保守但长度变异大, 外显子2比外显子1保守; CHS是类黄酮途径的第一个关键酶(Sommer和Saedler 1986; Wang等2000)。苜蓿等植物的CHS蛋白晶体结构已经解析, 蛋白的保守域和活性氨基酸位点研究较为深入。

2.2.2 CHI/TT5 已在很多植物中被克隆, 如拟南芥、烟草、矮牵牛、苜蓿、洋葱、葡萄、草莓等。植物有2类CHI基因, I型为所有植物共同, 导向核心类黄酮合成, II型为豆科植物特有并导向异黄酮合成, 两类间差异较大, 类型内部差异较小(Springob等2003)。CHI一般有2~3个内含子, 编码蛋白有200~250个氨基酸。CHI蛋白结构研究也较为深入, 已有苜蓿、大豆等种植物的CHI晶体结构得到解析。

2.2.3 F3H/TT6 自1991年从金鱼草克隆以来, 已从大麦、苹果、矮牵牛、紫花苜蓿、玉米、拟南芥、甘蓝型油菜、紫苏、银杏等种植物中克隆。GenBank中, 多数植物中克隆得到1~2条F3H基因, 拟南芥只有1条, 均具有2个内含子, 多数植物的F3H蛋白为350~380个氨基酸。F3H属于非血红素铁类型的氧化酶超家族, 催化反应需要分子O₂、Fe²⁺、2-酮戊二酸和抗坏血酸盐作为辅因子(Pelletier和Shirley 1996)。矮牵牛等植物的F3H蛋白已完成晶体解析, 三维结构呈果冻型, 反应中心位于裂口中, 结合Fe²⁺、2-酮戊二酸等的活性氨基酸位点已得到确认。F3H与同属于该超家族的FNSI(黄酮合酶I)、FLS(黄酮醇合酶)、F6H(类黄酮6-羟化酶)有一定的同源性。

2.2.4 F3'H/TT7 在拟南芥、矮牵牛、紫苏、甘蓝型油菜和多种植物中已被克隆, 多数植物中被克隆到1~2条, 但葡萄中克隆到4条, 拟南芥中只有1条。F3'H一般有1~3个内含子, 个数和位置欠保守。同C4H、F3'5'H(类黄酮3',5'-羟化酶)一样, F3'H也属于细胞色素P450超家族, 构成

CYP75B 亚家族, 并且在基因尤其是蛋白序列上与 F3'5'H 有较高的同源性, 在蛋白的一些保守基序上与 C4H 有一定的同源性。目前尚无 F3'H 蛋白晶体结构解析的报道, 但其富脯氨酸膜锚、氧结合位点、血红素结合位点、ERR 三联体等 P450 保守性基序较为明确, 并且含有 VDVKG、VVVAAS 保守基序和 F3'H 特异性的 GGEK 基序(Xu 等 2007)。

2.2.5 DFR/TT3 已在拟南芥、非洲菊、玫瑰、康乃馨、百合、葡萄、大麦等多种植物中被克隆, 多数植物中克隆了 1~3 条, 拟南芥只有 1 条, 但百脉根有 5 条; 多数具 5 个内含子, 内含子数量和位置保守。DFR 属于 DFR 超家族的脱氢酶, 一般有 337~446 个氨基酸, 不同物种间 DFR 与 NADP 结合位点“VTGAAGFIGSWLIMRLLERGY”是高度保守的(Johnson 等 1999)。DFR 中存在一个决定底物特异性的 26 个氨基酸的区域, 并已揭示了几个对酶活性非常重要的保守性残基。葡萄等植物的 DFR 蛋白晶体结构已得到解析。

2.2.6 LDOX/ANS/TT18 已从拟南芥、桃、蝶豆、洋桔梗、紫苏、葡萄、马铃薯、胡萝卜、菊科植物、圆叶牵牛、银杏、烟草、大豆等众多植物中克隆, 多数植物为 1~4 条, 但小麦有 6 条。该基因在多数植物中含有 1 个内含子, 但裸子植物银杏中有 2 个内含子, 而在单子叶植物普通小麦中没有内含子。拟南芥中该基因编码 356 个氨基酸的蛋白(Abrahams 等 2003)。同 F3H、FLS、ACC 氧化酶等一样, LDOX 也属于非血红素铁类型的氧化酶超家族, 在部分核苷酸序列尤其是蛋白一些保守性基序上与它们有一定的同源性。拟南芥等植物的 LDOX 蛋白晶体结构已经解析, 大体形状与 F3H 相似。

2.3 原花青素特异途径的结构基因

2.3.1 LAR 该基因最早在银叶山蚂蝗中基于蛋白纯化后克隆得到, 编码 382 个氨基酸, 与异黄酮还原酶具有同源性, 直接还原无色花青素而形成 2,3-反式黄烷-3-醇(儿茶酚)(Abrahams 等 2003)。葡萄、西洋梨、草莓、茶叶、百脉根、苜蓿、苹果、棉花、菜豆、火炬松、大麦等植物中也克隆了该基因, 多数为 1~2 条, 但百脉根中存在 2 个亚家族各 2 条, LAR 一般具 4 个内含子。LAR 广泛分布于高等植物, 是儿茶素类 PA 特异途径的第一个关键酶, 但奇怪的是拟南芥没有 LAR。LAR 蛋

白尚没有晶体解析的报道, 数据库中拟南芥 LAR 的三维结构实为 BAN 的。

2.3.2 ANR/BAN 已从拟南芥、西洋梨、草莓、亚洲棉、柿、葡萄、百脉根、香蕉、菜豆、苹果、银杏、茶叶、苜蓿等多种植物中克隆, 多数为 1~2 条, 拟南芥只有 1 条, 百脉根中较多; 多数具 5 个内含子, 内含子数量和位置较保守, 但草莓中只有 4 个内含子。拟南芥 ANR 基因编码 342 个氨基酸, 与 DFR 有较高的相似性, 还与 CAD (肉桂醇脱氢酶) 具有低的同源性, 属于 DFR 超家族的脱氢酶类, 是表儿茶素类 PA 特异途径的第一个关键酶, 将花青素还原为 2,3-顺式黄烷-3-醇(表儿茶酚)(Devic 等 1999; Lepiniec 等 2006)。多数植物同时具有 LAR 和 ANR, 能同时合成儿茶素和表儿茶素, 拟南芥由于缺乏 LAR 而只能合成表儿茶素。ANR 蛋白尚没有晶体解析的报道, 但基于葡萄 DFR 的三维结构, 建立了拟南芥 ANR 的三维模型。

2.3.3 GST 家族成员 TT19/AN9/Bz2 GST 在每种植物中均以基因超家族的形式出现, 如拟南芥中有 47 个成员, 水平同源基因间在多数区段上保守, 但功能各异, 主要表现在底物特异性和转运靶向(液泡、胞外等)不同(Wagner 等 2002)。拟南芥 TT19 (*AtGSTF12*) 和 *AtGSTF11*、大豆 GST22、柑桔 GST (DQ207360.1)、矮牵牛 AN9 (Y07721)、宽叶菜豆 GST (AY099257)、水稻 GST (NM_193840)、玉米 Bz2 等基因组成一个同源群, 但它们的功能却较难根据同源性来确定。TT19、AN9 与 Bz2 间虽然同源性并不高, 但据报道它们均转运花青素等类黄酮物质并定向液泡。TT19 还转运 PA (Kitamura 等 2004), 介于它们中间的 *AtGSTF11* 则被推断有可能转运硫代葡萄糖苷(Hirai 等 2005)。AN9 转化 *tt19* 突变体后恢复了花青素的积累, 但种皮中没有褐色色素的积累(Kitamura 等 2004), 表明垂直同源基因间的功能并不完全对应。尚未完成 TT19、AN9 和 Bz2 等蛋白的晶体解析, 但基于 GST 大家族的高度保守性, 可用玉米抗除草剂的 GSTIII 等的模型为模板预测出它们的三维结构。

2.3.4 MATE 家族成员 AtDTX41/TT12 拟南芥 MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 大家族由 56 个成员构成 (*AtDTX1*~*AtDTX56*), *AtDTX41/TT12* 与其他 *AtDTX* 基因的距离较远(Li 等 2002)。TT12 有 7 个内含子, 外显子编码 507 个氨

氨基酸, 蛋白有12个跨膜域用于与液泡膜结合, 在ATP存在时该蛋白使液泡膜两侧产生质子梯度, 将糖基化的黄烷-3-醇向液泡内转运, 同时将质子泵出液泡外(Debeaujon等2001; Marinova等2007)。其他植物中尚没有TT12垂直同源基因的公开报道, 不过, 葡萄中一个推定MATE蛋白(CAO069963)和水稻基因组注解的OsTT12(ABA99853)与TT12具有垂直同源性, 尤其是在跨膜域和一些跨膜域间的间隔区很保守。TT12尚没有解析三维结构, 基于其他MATE模板也预测不出。

2.3.5 ATPase家族成员AHA10 拟南芥质膜H⁺-ATPase基因家族有11个成员, 相互间有较高的同源性。AHA10(*autoinhibited H⁺-ATPase isoform 10*)基因有20个内含子, 外显子编码947个氨基酸, 其功能既是种皮中PA聚合又是早期种皮细胞中液泡发育所必须的(Baxter等2005)。在GenBank登录的矮牵牛的PH5应当是AHA10的垂直同源基因。AHA10尚未建立晶体结构, 但可基于AHA2预测其三维结构。

2.3.6 LAC家族成员LAC15/TT10 拟南芥漆酶大家族有17个成员(LAC1~LAC17), 相互间有显著的同源性。LAC15/TT10基因有5个内含子, 外显子编码565个氨基酸, 蛋白结合Cu²⁺, 具双重功能, 氧化种皮中的PA单体和木质素单体形成聚合物, 据称也参与根系伸长; TT10与水稻OsLAC1、漆树RvLAC2、欧亚槭ApLAC1、亚洲棉GaLAC1等具有较高的同源性, 后三者也参与多酚代谢, 分别氧化漆酚、木质素单体、芥子酸而形成漆、木质素聚合物、单内酯型二聚物(Pourcel等2005; Liang等2006)。TT10及类似蛋白尚未建立晶体结构, 但可基于其他二酚氧化酶模板预测其基本三维结构。

2.4 植物原花青素积累的调控基因

2.4.1 WIP-ZF亚家族成员TT1 属于拟南芥锌指蛋白超家族的WIP亚家族高度同源的6个成员之一, 有1个内含子, 外显子编码303个氨基酸, 调控内种皮细胞发育和分化, 靶基因和调控机制不明, 可能调控BAN基因等(Sagasser等2002)。大豆GmWIP1、水稻WIP1等与拟南芥WIP亚家族具有较高的同源性, 但尚不清楚具体功能。WIP亚家族缺乏三维结构解析, 目前的软件也预测不出。

2.4.2 R2R3-MYB家族成员AtMYB123/TT2 属于拟南芥R2R3-MYB超家族133个成员中的1个, 有

2个内含子, 外显子编码258个氨基酸, 蛋白N端具有R2R3-MYB DNA结合域, 特异在发育种子的内种皮中调控结构基因DFR、LDOX、ANR、TT12等的表达(Nesi等2001)。所有生物的R2R3-MYB蛋白在MYB域极其保守, 但在C-端域又极不保守。TT2等MYB因子需要通过MYB域中的特定基序与bHLH蛋白如TT8互作, 并需要WD40蛋白TTG1的参与, 才能充分发挥转录调控作用。同为十字花科的甘蓝型油菜中有3个TT2的垂直同源基因(*BnTT2-1~BnTT2-3*) (Wei等2007)。与TT2相似, 葡萄中VvMYBPA1基因在果实成熟时特异调控PA的合成, VvMYB5B基因促进发育果实中花青素和PA的合成(Bogs等2007; Deluc等2008)。TT2及类似蛋白缺乏晶体解析, 但几乎所有的R2R3-MYB蛋白均可预测出R2R3-MYB域的基本三维结构。

2.4.3 bHLH家族成员TT8 属于拟南芥bHLH(MYC)超家族161个成员中的1个, 有6个内含子, 外显子编码518个氨基酸, 蛋白C端有一个由51个氨基酸构成的bHLH DNA结合域。在TTG1的参与下, 它既可与MYB因子TT2结合, 调控种皮色素合成, 也可与MYB因子PAP1结合, 调控多种器官中花青素苷的合成, 靶基因为DFR和BAN, TT8还可调控自身的表达(Nesi等2000; Baudry等2004, 2006)。TT8及类似蛋白缺乏晶体解析, 目前的软件也预测不出。

2.4.4 WD40家族成员TTG1 是拟南芥WD-repeat(WDR)超家族237个潜在成员中的1个(van Nocker和Ludwig2003), 在3'非翻译区有1个内含子, 外显子编码341个氨基酸, 含有4个WD40重复。TTG1调控多个发育和生化途径, 包括根毛、茎叶表皮毛的形成, 植株花青素苷、种皮粘液、种皮色素的合成与积累, 并且是通过与1个MYB蛋白和1~2个bHLH蛋白形成复合物来完成的, 因此TT2和TT8的靶基因都是TTG1的靶基因, TTG1还调控另一个调控因子TTG2的表达, 但TTG1对于靶DNA序列的特异识别似乎不是必要的(Walker等1999; Baudry等2004; Dixon等2005)。虽然WD40蛋白表现出了跨越生物界的高度保守性, 但TTG1及类似蛋白缺乏晶体解析, 目前的软件也预测不出三维结构。

2.4.5 WRKY家族成员WRKY44/TTG2 是拟南芥

*WRKY*超家族75个成员中的1个,有4个内含子,外显子编码429个氨基酸,有2个*WRKY*保守域,是*WRKY*家族已知调控形态建成的唯一成员。*TTG2*调控PA的合成,靶基因尚不确定,可能有*ANR*;它还调控表皮毛分化和种皮粘液合成,在调控根表无毛细胞的发育时可能与其他基因存在冗余,但是独立于*TTG1*和*GL2*(Johnson等2002)。虽然已有拟南芥其他*WRKY*成员的蛋白三维模型,但无法预测出*TTG2*的基本三维结构。

2.4.6 *MADS*家族成员 *TT16* 是拟南芥*MADS box*超家族*B-sister*分支的一个成员,有6个内含子,外显子编码252个氨基酸,含ARABIDOPSIS BSISTER (ABS) *MADS*结构域,调控珠被细胞形状的发育,但与胚珠的功能无关,还调控内种皮中PA的合成与积累,靶基因不清楚,初步确定有*ANR*(Nesi等2002; Dixon等2005)。*TT16*缺乏晶体解析,目前的软件也预测不出三维结构。

2.4.7 花青素苷途径的类似调控蛋白 目前已从玉米、矮牵牛、金鱼草、葡萄、非洲菊、拟南芥、苹果、紫苏等多种物种中克隆了将代谢途径引向花青素苷积累的一些调控因子。*WDR*因子有矮牵牛的PhAN11、苹果的MdTTG1、玉米的PAC1、紫苏的PfWD、圆叶牵牛的InWDR1等;*R2R3-MYB*因子有拟南芥的PAP1/AtMYB75、PAP2/AtMYB90、AtMYB113、AtMYB114,玉米的C1,矮牵牛的AN2,紫苏的MYB-P1; bHLH因子有拟南芥的GL3和EGL3,玉米的R/B家族如Lc,矮牵牛的AN1和JAF13,紫苏的MYC-F3G1和MYC-RP等;它们调控由*CHS*至*LDOX*以及花青素苷特异途径的一些结构基因的表达,使细胞中积累花青素苷(Yamazaki等2003; Dixon等2005; Grotewold 2006; Gonzalez等2008)。

3 植物原花青素合成功能基因的重要共性特征

3.1 基因家族和单基因 基因组水平和基因水平的加倍及随后的歧化是植物分子进化的重要方向,许多植物的苯丙烷复合途径中的多数位点是由2个或更多的基因家族成员所编码的,家族成员间在总体结构和功能上相似,但往往在转录表达的组织特异性、诱导表达特性、蛋白活性水平、蛋白底物/顺式元件的偏好性上存在差异。但模式植物拟南芥是小基因组高等植物,其PA途径中单基因位点相对较多。拟南芥中公共苯丙烷途径的3个酶有

2个是由基因家族编码的,*PAL*由4个成员编码,*C4H*为单基因编码,*4CL*由4个成员编码,但还存在11个不具有*4CL*底物特性的*4CL-like*蛋白。拟南芥类黄酮-PA途径中,所有结构蛋白(*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*LDOX*、*ANR*、*TT19*、*TT12*、*AHA10*、*TT10*)及调控蛋白*TT1*、*TT2*、*TT8*、*TT16*、*TTG1*、*TTG2*均由单基因编码(Nesi等2001)。但是,象甘蓝型油菜这样的多倍体物种,很难有单基因位点。本课题组近几年的系统研究结果表明,甘蓝型油菜中最少有2个、最多有12个以上的垂直同源基因与拟南芥苯丙烷-类黄酮-原花青素途径的单个基因相对应(Chen等2007; Wei等2007; Xu等2007; Ni等2008)。

3.2 表达特性 植物界中,*PAL*、*C4H*、*4CL*等公共苯丙烷途径的基因具有类似组成型表达的特征,组织特异性不强,因为它们涉及多种组织中近似组成型的木质素的合成与积累,但仍以木质素、类黄酮等物质密集合成的组织中表达较丰。类黄酮途径的基因表达具有组织特异性和发育阶段性。植物的花、衰老叶片、花青素苷着色的茎叶表皮中类黄酮-花青素苷途径的基因大量表达,其他组织中表达低。开花授精后,内种皮中苯丙烷-类黄酮-花青素-原花青素复合途径的基因表达强烈,合成PA,并随着种皮的发育而转运到其他种皮细胞层中积累并聚合,而使种皮显黑褐色(野生型拟南芥为深褐色种皮)。PA合成的全套基因在植物的非种皮组织如柿子果肉、栎树种子胚、茶等植物的叶中也表达,合成并积累聚合度较低或呈单体状的PA。需要指出的是,拟南芥PA特异途径的一些基因如*ANR*、*TT12*、*AHA10*、*TT10*、*TT1*、*TT2*、*TT16*等主要在内珠被/内种皮中表达。此外,已有研究一致表明,苯丙烷-类黄酮途径的众多结构基因和调控基因均具有诱导表达特性,最典型的是受紫外线诱导而启动/上调表达,还可以受病原菌侵染、动物取食、干旱、温度胁迫、盐害等多种生物/非生物性逆境胁迫诱导而上调表达(Sharma和Dixon 2005; Lepiniec等2006)。

3.3 亚细胞定位和蛋白复合物 植物细胞蛋白纯化、表达蛋白亚细胞定位、蛋白互作研究、生物信息学预测等表明,苯丙烷-类黄酮-原花青素途径起催化反应的众多关键酶(从*PAL*直至*ANR*)是定位于细胞浆中的,并且相互之间以一种酶复合

物的形式存在,其中P450蛋白C4H、F3'H等的跨膜域与膜系统(微粒体膜、内质网膜、质膜?)结合而形成复合物的膜锚,蛋白的其余部位和其他蛋白位于胞浆中(Hrazdina和Wagner 1985; Xu等2007)。通过酶复合物的形成,一是加速了代谢途径的物质流和连续催化反应的效率,二是可能将家族蛋白中的特定成员分工后定向了特定的代谢途径,进行专一化的进化。但是,这方面还只是停留在现象观察和假说阶段,详细机制有待阐明。花青素/原花青素转运蛋白中,预测TT19和其他GST一样定位于胞浆,通过结合到靶分子而进行转运;TT12和AHA10定位于液泡膜,通过产生跨膜质子梯度而将靶分子运到液泡,但是它们是否与其他蛋白形成复合转运体尚缺乏明确报道。苯丙烷-类黄酮-原花青素途径的主要调控蛋白如TT1、TT2、TT8、TT16、TTG2等均定位于细胞核,符合转录因子的特征,虽然TTG1缺乏核定位信号,但据认为它在胞质中以与其他转录因子形成复合物的形式而被运向细胞核中。而且,多种调控蛋白往往是以一个复合物的形式与靶基因启动子的顺式元件相作用的,最著名的为WD40-MYB-bHLH模型,WD40起支架和平台作用,促进MYB与bHLH间的分子作用以及其他蛋白互作。拟南芥中,这种复合物在PA途径中为TTG1-TT2-TT8,在花青素昔途径中为TTG1-PAP-TT8,在种皮粘液合成、表皮毛发育、根毛发育中则由其他MYB和bHLH因子来取代(Lepiniec等2006; Gonzalez等2008)。

3.4 突变体表型 从酶催反应链和物质流的角度,目前所描绘的苯丙烷-类黄酮-原花青素代谢途径类似于一条水渠,其上串联性地设立了十几个闸口(图1),每个酶相当于一个闸口,任意一个闸口的关闭即任意一个酶的去功能化均可导致整个代谢途径的阻塞,PA积累受阻。对于由基因家族编码同一或相似功能的蛋白而言,基因成员间具有冗余性,单基因突变的表型效应有限。而对于单基因位点,突变可能带来显著的表型变化。基因突变的遗传和表型效应依具体位点而异,不同植物间由于基因冗余性不同而存在差异。由于植物公共苯丙烷途径一般具有基因家族冗余性,所以尚未见PAL、C4H和4CL单基因突变引起巨大表型变化的报道。奇怪的是,虽然拟南芥只有1个C4H基因,但*c4h*突变体基本能正常生长发育,而且能正常积累种皮色素,

这说明要么拟南芥中存在另外一种酶可部分代替C4H的活性,要么存在C4H的低效性绕过途径,这是苯丙烷途径中值得深入研究的重要现象。类黄酮途径的基因变异容易引起种皮、花、茎叶表面等器官着色方式的改变,拟南芥、玉米、矮牵牛、金鱼草等植物中的研究较系统。拟南芥中由于类黄酮-PA途径中的所有位点均是单基因,所以这些位点的单基因的功能失活性突变均能产生透明种皮(*transparent testa*, *tt*)和透明种皮无毛(*transparent testa glabra*, *tig*)突变体(Shirley等1995)。拟南芥核心类黄酮-花青素途径的关键酶基因*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*和*LDOX*突变失活后花青素合成之前的步骤受到阻碍,产生黄籽、灰黄籽和黄褐籽等,分别命名为*tt4*、*tt5*、*tt6*、*tt7*、*tt3*和*tt18/tds4/tt11*位点。拟南芥PA特异途径中,*ANR*基因突变使种皮中积累花青素而非PA,所以种皮显红色,又称之为*ban*突变体;*GSTF12*、*DTX41*、*AHA10*和*LAC15*基因突变后要么PA转运受阻,要么PA聚合受阻,产生黄褐籽或褐化推迟,分别命名为*tt19/tt14*、*tt12*、*aha10*和*tt10*突变体。PA途径的调控基因也是一些特定的结构基因表达所必须的,拟南芥PA途径所有已知6个调控基因的突变体*tt1*、*tt2*、*tt8*、*tt16*、*tig1*和*tig2*均使种皮色素积累受阻而表现为黄籽或黄褐籽,*tig1*和*tig2*的表皮毛和根毛发育以及种皮粘液积累受阻。PA途径的突变体除影响种皮着色外,还影响植物其他性状。叶片、未成熟果实、种子中的涩味物质为PA及其低聚物,如果柿树突变体中PA途径基因表达受阻,未成熟柿子中的涩味物质较少或没有(Lepiniec等2006)。

4 植物原花青素相关性状代谢工程进展及展望

4.1 牧草品质的改良 PA对动物营养的影响受到关注。对于单胃动物,食料中的PA总是有害的(Aerts等1999)。对于反刍动物,高浓度PA会降低草料的适口性和营养价值(Mueller-Harvey和McAllan 1992),但适当浓度的PA与蛋白的结合物可适当抑制瘤胃中的微生物,增加过瘤蛋白并使之成为动物的营养物质(Aerts等1999)。紫花苜蓿是最主要的牧草,虽在种皮中积累PA,但在叶中不积累PA,导致含蛋白质很高的牧草在瘤胃中过快地被微生物所消化,产生大量温室气体甲烷,动物容易得胀气病而死。牧草中适量的PA可以控制蛋白质的消化进

程, 增加饲料利用率, 消除动物的胀气病。在不增加羊自由采食量的前提下, 百脉根中2%~4%的PA能提高羊毛生长速度1%、体重8%、产奶量21%和产羔率15%~30%。将PA生物合成的功能基因导入到紫花苜蓿和三叶草等牧草中, 提高PA含量, 是一个不错的技术路线(Dixon等2005, 2006)。将玉米*B-Peru*和*Cl*基因转入紫花苜蓿后, 叶组织中有PA积累(Ray等2003)。随着对PA生物合成途径的深入了解, 今后需要制定更加合理的分子育种路线, 一方面消除单胃动物饲料中的PA, 另一方面使反刍动物饲料中维持合理的PA水平。

4.2 农产品的脱涩 高粱是酿造白酒的上乘原料, 但高含量的PA会在发酵中与 α -淀粉酶和蛋白酶结合, 使酶的相变温和热稳定性发生变化, 活性降低, 影响酿造(刘睿等2006)。柿子是人们钟爱的水果之一, 但柿果中的PA产生强烈的涩味和收敛作用, 影响取食口感、消化特性甚至人的胃肠功能, 因此脱涩是柿子利用的一个重要内容。全甜柿类型(PCNA)随着果实的成熟而失去涩味, 而完全涩柿类型(PCA)即使是在果实成熟后仍保留涩味。在果实发育的早期, 两种类型都带有涩味, PA合成的9个结构基因都高水平地表达。后来的果实发育中, PCNA柿子中PA合成的有关基因停止表达, PA积累突然终止, 但PCA柿子直到成熟时这9个基因同样高水平表达, PA继续积累(Ikegami等2005)。柿子中*ANR*、类丝氨酸羧肽酶(*SCPL*)等基因已经克隆, 未成熟柿子经乙醇处理不仅能直接使PA变成不可溶的物质, 还导致PA合成途径中基因表达水平的下调(Ikegami等2007)。以上只是2个典型例子, 其实许多农产品都涉及到如何消除食用器官中的涩味的问题。通过传统手段选育不含或低含PA的高粱、柿子并不容易, 因为首先必须创造PA积累相关基因突变或表达下调的基因型。随着对PA生物合成途径的深入解析, 完全可以采用代谢工程手段, 对PA途径的结构基因和调控基因进行多价沉默, 抑制PA积累, 创造转基因无涩味农产品。

4.3 油菜黄籽性状的分子育种 与黑籽油菜相比, 黄籽油菜的种皮薄, 含油量高, 油质清澈透明, 饼粕蛋白质含量高, 纤维素和多酚含量低, 饲料利用价值高, 因此国内外都把黄籽作为油菜育种的一个重要目标。种皮栅状细胞层中的色素主要为PA聚合物, 黄籽是因为种皮色素减少、种皮透明而观察到

种胚的颜色(Tang等1997)。天然的甘蓝型油菜中缺少黄籽基因型, 现有的甘蓝型油菜黄籽类型主要通过种间远缘杂交而产生, 育种周期长, 且黄籽表现型不稳定, 易随环境而变异, 选育效率低(刘后利1992)。运用代谢工程的方法, 抑制与PA积累相关基因的表达, 是创造油菜稳定黄籽性状的一个重要策略。比如, 拟南芥TT2、PAP等转录因子的基因工程操作成功地通过调节*BAN*等基因的表达而达到了修饰PA积累效果(Sharma和Dixon2005)。近5年来, 本课题组对甘蓝型油菜及其亲本物种甘蓝和白菜型中苯丙烷-类黄酮-原花青素途径的主要结构基因家族和调控基因家族进行了系统的克隆, 主要基因均获得了全长cDNA和对应的基因组序列, 通过芸薹属内种间以及芸薹属与拟南芥属间功能比较基因组学的研究, 揭示了诸多物种进化、基因进化、表达调控的规律, 对甘蓝型油菜黑籽优良品种中多个功能位点进行反义沉默后, 获得了一批种皮色素变浅的转基因株系。

4.4 葡萄和葡萄酒的品质改良 葡萄籽和葡萄皮中含有较多的PA, 葡萄和葡萄酒中的PA对健康有积极作用, 如抗氧化、清除自由基、保护心血管、抗肿瘤、抗突变、抗炎等, 也是影响葡萄酒风味和品质的重要成分(赵艳和吴坤2006)。针对鲜食和不同的酿造目的, 葡萄中的总酚、PA和花青素苷需要合理的含量, 过高和过低均不好, 而现有资源间的差异较大(李记明和贺普超2000), 因此葡萄品质改良中涉及PA等类黄酮物质的优化。此外, 葡萄籽是人工提取用于医疗和保健业的PA的最重要原料, 如何在保证葡萄和葡萄酒品质的前提下, 使葡萄籽的PA含量尽可能高(如高PA种仁), 值得探索。已从葡萄中克隆了*LAR*和*ANR*, 现在葡萄PA合成的许多基因都已克隆, 运用代谢工程调控葡萄籽和葡萄皮中PA的水平已成为可能(Bogs等2005)。

4.5 茶多酚的分子育种 茶多酚是茶叶的重要品质性状, 具有多种保健和医疗作用, 高含量是茶叶品质改良所追求的目标。茶多酚是PA的单体及聚合体形式, 茶多酚改良的本质是调控总PA含量、不同类型PA间的比例和PA聚合度。茶叶PA途径的多数基因已经克隆, 有关分子机制将会逐渐明晰, PA途径的代谢工程将用于茶多酚优化和茶叶品质改良, 或创造用于茶多酚提取的专用品种(Dixon等

2005; Xie 和 Dixon 2005)。

4.6 作物抗病虫性的提高 单宁作为蛋白变性剂、金属和有机分子络合剂、拒食剂, 是植物长期进化而来的一种重要的抗病虫机制(李雪莹等 2005)。野生植物的抗病虫性普遍强于栽培品种, 高单宁是其中一个重要原因。栽培品种在长期的人工品质选择中逐渐失去或大大降低了单宁含量, 但往往非食用器官随着食用器官一道发生了PA的下降。随着植物PA代谢途径的深度解析, 可以采用组织特异或诱导表达启动子, 使作物的非食用器官中大量积累PA, 提高抗病虫性, 而食用器官中仍然保持低或无PA。

4.7 新型作物的拓展 自然界蕴藏有丰富的野果、野种等, 但许多由于含有毒素或抗营养成分而无法作为食物资源。单宁在维管植物中含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素, 是一种主要的抗营养剂, 是许多植物资源利用的限制因素(朱南山等 2006)。例如, 橡籽仁的可利用营养价值接近或略低于玉米, 略优于稻谷, 是可利用的野生资源, 但含有较高的单宁和氢氰酸(何瑞国等 2000), 如果通过转基因降低橡籽中单宁和产氢氰酸物质, 可作为新型饲料。

单宁其实很通俗, 与农业生产、人体营养和医疗健康息息相关, 但许多人对原花青素的概念相对陌生。从前对单宁的化学结构、抗营养性、与作物性状和人体健康的关系、去除方式等进行了广泛研究, 但从分子机理的角度系统解析单宁/PA的生物合成途径, 则是近些年来随着拟南芥突变体研究的深入才成熟起来的。正因为如此, 才使我们对单宁这个旧话题有了全新的理论认识, 尤其是PA途径一系列功能基因的克隆, 使我们能够从代谢途径分子调控的角度, 为今后作物品质、抗性性状的改良来设计PA的代谢工程。

参考文献

方从兵, 宛晓春, 江昌俊(2005). 黄酮类化合物生物合成的研究进展. 安徽农业大学学报, 32 (4): 498~504
 何瑞国, 汪康民, 王玉莲, 熊统安(2000). 野生经济植物资源橡籽仁可利用价值的研究. 应用生态学报, 11 (2): 196~198
 李记明, 贺普超(2000). 中国野生葡萄重要酿酒品质性状的研究. 中国农业科学, 33 (1): 17~23
 李雪莹, 王文杰, 武永刚(2005). 植物单宁的生理作用及经济价值. 西部林业科学, 34 (1): 66~69
 刘后利(1992). 甘蓝型黄籽油菜的遗传研究. 作物学报, 18 (4):

241~249

刘睿, 潘思轶, 谢笔钧(2006). 高粱原花青素对 α -淀粉酶和蛋白酶活力影响的DSC研究. 食品与发酵工业, 32 (7): 60~62
 赵艳, 吴坤(2006). 原花青素生物学作用研究进展. 中国公共卫生, 22 (1): 110~111
 朱南山, 张彬, 李丽立(2006). 单宁的抗营养作用机理及处理措施. 中国饲料, (17): 26~29
 Abrahams S, Lee E, Walker AR, Tanner GJ, Larkin PJ, Ashton AR (2003). The *Arabidopsis* *TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J*, 35: 624~636
 Aerts RJ, Barry TN, McNabb WC (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agr Ecosyst Environ*, 75: 1~12
 Baudry A, Caboche M, Lepiniec L (2006). TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 46: 768~779
 Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39: 366~380
 Baxter IR, Young JC, Armstrong G, Foster N, Bogenschutz N, Cordova T, Peer WA, Hazen SP, Murphy AS, Harper JF (2005). A plasma membrane H^+ -ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 2649~2654
 Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol*, 139: 652~663
 Bogs J, Jaffé FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP (2007). The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol*, 143: 1347~1361
 Chapple CCS, Shirley BW, Zook M, Hammerschmidt R, Somerville SC (1994). Secondary metabolism in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz EM, Somerville CR (eds). *Arabidopsis*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 989~1030
 Chen A-H, Chai Y-R, Li J-N, Chen L (2007). Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*). *J Biochem Mol Biol*, 2: 247~260
 Debeaujon I, Peeters AJM, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2001). The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*, 13: 853~871
 Deluc L, Bogs J, Walker AR, Ferrier T, Decendit A, Merillon JM, Robinson SP, Barrieu F (2008). The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries.

- Plant Physiol, 147: 2041~2053
- Devic M, Guilleminot J, Debeaujon I, Bechtold N, Bensaude E, Koornneef M, Pelletier G, Delseny M (1999). The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J*, 19: 387~398
- Dixon RA, Sharma SB (2006). Genetic manipulation of condensed tannins. United States of America, 20060123508 [P/OL]. 2006-06-08. <http://www.uspto.gov/#>
- Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB (2005). Proanthocyanidins — a final frontier in flavonoid research? *New Phytol*, 165: 9~28
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 53: 814~827
- Grotewold E (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 761~780
- Hirai MY, Klein M, Fujikawa Y, Yano M, Goodenowe DB, Yamazaki Y, Kanaya S, Nakamura Y, Kitayama M, Suzuki H et al (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol Chem*, 280: 25590~25595
- Holton TA, Cornish EC (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071~1083
- Hrazdina G, Wagner GJ (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch Biochem Biophys*, 237: 88~100
- Ikegami A, Eguchi S, Kitajima A, Inoue K, Yonemori K (2007). Identification of genes involved in proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *Plant Sci*, 172: 1037~1047
- Ikegami A, Kitajima A, Yonemori K (2005). Inhibition of flavonoid biosynthetic gene expression coincides with loss of astringency in pollination-constant, non-astringent (PCNA)-type persimmon fruit. *J Hortic Sci Biotech*, 80: 225~228
- Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell*, 14: 1359~1375
- Johnson ET, Yi H, Shin B, Oh BJ, Cheong H, Choi G (1999). *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J*, 19: 81~85
- Kajita S, Hishiyama S, Tomimura Y, Katayama Y, Omori S (1997). Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate:coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol*, 114: 871~879
- Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A (2004). *TRANSPARENT TESTA19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J*, 37: 104~114
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 405~430
- Li L, He Z, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J Biol Chem*, 277: 5360~5368
- Liang M, Davis E, Gardner D, Cai X, Wu Y (2006). Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta*, 224: 1185~1196
- Marinova K, Pourcel L, Weder B, Schwarz M, Barron D, Routaboul JM, Debeaujon I, Klein M (2007). The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell*, 19: 2023~2038
- Mueller-Harvey I, McAllan AB (1992). Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv Plant Cell Biochem Biotechnol*, 1: 151~217
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L (2000). The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell*, 12: 1863~1878
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Stewart AJ, Jenkins GI, Caboche M, Lepiniec L (2002). The *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell*, 14: 2463~2479
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L (2001). The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, 13: 2099~2114
- Ni Y, Jiang H-L, Lei B, Li J-N, Chai Y-R (2008). Molecular cloning, characterization and expression of two rapeseed (*Brassica napus* L.) cDNAs orthologous to *Arabidopsis thaliana* phenylalanine ammonia-lyase 1. *Euphytica*, 159: 1~16
- Pelletier MK, Shirley BW (1996). Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 111: 339~345
- Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I (2005). *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, 17: 2966~2980
- Ray H, Yu M, Auser P, Blahut-Beatty L, McKersie B, Bowley S, Westcott N, Coulman B, Lloyd A, Gruber MY (2003). Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize *Lc*. *Plant Physiol*, 132: 1448~1463
- Sagasser M, Lu GH, Hahlbrock K, Weisshaar B (2002). *A. thaliana* *TRANSPARENT TESTA1* is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Gene Dev*, 16: 138~149
- Sharma SB, Dixon RA (2005). Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 44: 62~75
- Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J*, 8: 659~671

- Sommer H, Saedler H (1986). Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol Gen Genet*, 202: 429~434
- Springob K, Nakajima Y, Yamazaki M, Saito K (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288~303
- Tang Z-L, Li J-N, Zhang X-K, Chen L, Wang R (1997). Genetic variation of yellow-seeded rapeseed lines (*Brassica napus* L.) from different genetic sources. *Plant Breeding*, 116: 471~474
- van Nocker S, Ludwig P (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 4: 50~60
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol*, 49: 515~532
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell T, Esch JJ, Marks MD, Gray JC (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell*, 11: 1337~1350
- Wang J-L, Qu L-J, Chen J, Gu H-Y, Chen Z-L (2000). Molecular evolution of the exon 2 of *CHS* genes and the possibility of its application to plant phylogenetic analysis. *Chin Sci Bull*, 45 (19): 1735~1742
- Wei Y-L, Li J-N, Lu J, Tang Z-L, Pu D-C, Chai Y-R (2007). Molecular cloning of *Brassica napus* *TRANSPARENT TESTA 2* gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Mol Biol Rep*, 34: 105~120
- Xie D-Y, Dixon RA (2005). Proanthocyanidin biosynthesis — still more questions than answers? *Phytochemistry*, 66: 2127~2144
- Xu B-B, Li J-N, Zhang X-K, Wang R, Xie L-L, Chai Y-R (2007). Cloning and molecular characterization of a functional *flavonoid 3'-hydroxylase* gene from *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 164: 350~363
- Yamazaki M, Makita Y, Springob K, Saito K (2003). Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochem Eng J*, 14: 191~197