

津田芜菁 *BrEGL3* cDNA 的克隆及表达分析

闫海芳*, 李玉花*, 孙佰贺, 许道琦, 聂唯天, 刘振华, 闵远琴

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘 要: EGL3 (Enhancer of Glabra3) 蛋白是一种 bHLH 类蛋白, 是一类重要的转录调节因子。为阐释 *BrEGL3* 在‘津田’芜菁 (*Brassica campestris* L. ssp. *rapifera* ‘Tsuda’) 花青素生物合成中的调控作用, 根据拟南芥 *EGL3* 基因序列信息设计兼并引物, 克隆获得了‘津田’芜菁 *EGL3* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *BrEGL3*, 其 GenBank 登录号为 HM208589。序列分析结果显示, *BrEGL3* 全长 1 794 bp, 包含编码 597 个氨基酸的开放阅读框, 分子量约为 66.8 kD。氨基酸结构分析显示该蛋白含有 DNA 结合域, 该结合属于螺旋—环—螺旋家族。氨基酸对比分析表明, *BrEGL3* 与萝卜 *EGL3* 蛋白相似性最高, 其次为拟南芥中的 *EGL3*。荧光定量 PCR 检测 *BrEGL3* 在芜菁不同组织中的表达结果表明, 该基因在有花青素合成的红色芜菁根皮中表达量最高。

关键词: 芜菁; *EGL3*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S 631.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 03-0487-08

Cloning and Expression Analysis of Enhancer of Glabra3 (*BrEGL3*) in *Brassica campestris* L. ssp. *rapifera* ‘Tsuda’

YAN Hai-fang*, LI Yu-hua*, SUN Bai-he, XU Dao-qi, NIE Wei-tian, LIU Zhen-hua, and MIN Yuan-qin
(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Enhancer of Glabra3 (EGL3) is a bHLH protein that is an important transcript factor in plant. In order to elucidate the regulation mechanism of EGL3 in ‘Tsuda’ anthocyanin biosynthesis, cDNA of *EGL3* gene was isolated from this plant by the method of RT-PCR using degenerate primers designed according to *Arabidopsis EGL3* (GenBank accession No. NM202351). This gene was named *BrEGL3* (GenBank accession No. HM208589). *BrEGL3* was 1 794 bp in full length open reading frame (ORF) encoding 597 amino acids with the molecular weight of 66.8 kD. Software prediction results showed that *BrEGL3* contained a DNA helix-loop-helix binding domain. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *BrEGL3* shared the highest similarity with *Raphanus sativus* *EGL3* and the lowest similarity with *Lotus angustissimus* *EGL3*. Quantitative-PCR analysis showed that the *BrEGL3* was the highest expressed in the in red root epidermis of turnip.

Key words: *Brassica campestris* L. ssp. *rapifera*; *EGL3*; gene cloning; expressing analysis

EGL3 (Enhancer of Glabra3) 蛋白属于 bHLH 类蛋白, 具有典型的螺旋—环—螺旋 (helix - loop - helix,

收稿日期: 2010 - 12 - 20; 修回日期: 2011 - 02 - 21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30730078); 中央高校基本科研业务费专项 (DL09BA09)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: icyhf@yahoo.com; lyhshnn@126.com; Tel: 0451-82191783)

HLH) 结构域, bHLH 转录因子以二聚体形式结合到序列特异 DNA (CANNTG) 上, 调控基因的表达 (Fan et al., 2004; Lewin, 2005)。

EGL3 在植物体内调控花青素生物合成途径后期基因的表达。花青素合成的直接前体是苯丙氨酸, 依次经过苯丙氨酸脱氨酶 (PAL), 苯基苯乙烯酮合成酶 (CHS), 苯基苯乙烯酮黄烷酮异构酶 (CHI), 黄烷酮 3-羧化酶 (F3H), 黄烷酮 3', 5'-羧化酶 (F3'5'H), 黄烷酮 3'-羧化酶 (F3'H), 二氢黄烷醇 4-还原酶 (DFR), 花色素合成酶 (ANS), 花青素还原酶 (ANR) 等一系列酶的催化而成的。其中 PAL、CHS、CHI 和 F3H 属于前期基因, DFR、ANS、ANR 等属于后期基因 (Holton & Cornish, 1995)。而 EGL3 调控其中 DFR 基因的表达调控, 过量表达 EGL3 的转基因拟南芥中, 这两个基因的表达都增加了 (Nesi et al., 2000)。EGL3 还与其它调控因子 PAP1/2, TTG1 蛋白一起形成复合体共同调控 DFR 基因的表达调控 (Dugassa et al., 2009)。此外 EGL3 还在根细胞生长, 毛状体发育和粘液分泌等途径中发挥功能 (Bernhardt et al., 2003, 2005)。

在前期研究 UV-A 光诱花青素合成中发现, ‘津田’芜菁中存在特殊调节途径特异地调控花青素的合成, 因此 EGL3 作为花青素合成调控因子, 克隆该基因和研究该基因的表达特性就尤为重要 (Zhou et al., 2007)。

本研究中根据已经报道的拟南芥序列, 设计引物, 通过 RT-PCR 扩增克隆获得芜菁 EGL3 基因 cDNA 片段, 对该基因在芜菁不同组织中的表达做了分析。

1 材料与方法

1.1 材料处理

以温室中生长至 2 个月的 ‘津田’芜菁 (*Brassica campestris* L. ssp. *rapifera* ‘Tsuda’) 膨大根的白色根皮、红色根皮、根肉、叶片、花瓣和花蕾为试验材料, 放在液氮中速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱中贮存待用。

取温室中生长至 2 个月的 ‘津田’芜菁膨大根的白色根皮 (1 cm × 1 cm)、红色根皮 (1 cm × 1 cm)、与根皮等质量的根肉、叶片、花瓣和花蕾, 置于色素提取液 (含 1% 盐酸的甲醇溶液中, 4 °C 放置 24 h (Kawabata et al., 1999))。用紫外分光光度计扫描吸收曲线, 测定在 530 nm 具有最高光吸收值。测定样品在 530 nm 的光吸收, 以 OD 值表示花色素苷的含量, 色素含量测定生物学重复 3 次。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

以芜菁膨大根的白色根皮、红色根皮、根肉、叶片、花瓣和花蕾为试验材料, 采用上海宝生生物公司的 Trizol 试剂提取该组织总 RNA, 进行 RNA 质量和浓度检测后取红色根皮 1 μg 的总 RNA 用于 cDNA 第 1 链的合成。

1.3 BrEGL3 的 cDNA 克隆与序列测定

参照 TaKaRa 公司的 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链。以拟南芥 EGL3 基因 (GenBank accession No. NM202351) 核酸序列为参考设计完整 cDNA 序列 PCR 引物: BrEGL3-F: 5'-CATTATAGAAGAAACAATG-3', BrEGL3-R: 5'-TATAAACCTTGAATCCTTA-3', 用 cDNA 第一链为模板。

PCR 条件为: 94 °C 3 min 预变性, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个扩增循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶检测、回收目的条带, 与 pGEM-T 载体 (TIANGENE)

连接, 16 °C 过夜。连接产物转化到大肠杆菌 TOP10, 在 X-gal/ IPTG 琼脂糖平板上挑选白色克隆, 由宝生物 (大连) 有限公司完成序列测定。测序引物分别为: pGEM-T 载体引物 T7, SP6, 再设计引物 F: 5'-AGCTCCTCATGGAACCTTA-3', R: 5'-TTTCATCTCCAACCTTAT-3', 完成全长测序。

1.4 芜菁 *BrEGL3* 基因生物信息学分析采用的方法

BrTTG1 基因生物信息学分析采用下列方法: (1) *BrTTG1* 基因序列同源性比对由 NCBI 的 nucleotide BLAST 程序进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。 (2) *BrTTG1* 保守性功能域分析由 NCBI 的 protein BLAST 程序进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。 (3) 氨基酸的多序列比较用 Clustalx 进行, 并用 BOXSHADE 软件进行处理, 保守位点参考 (2) 中的功能域列表 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>)。 (4) 进化树的构建由 DNAMAN-Tree View 程序完成。

1.5 芜菁 *BrEGL3* 在芜菁不同组织中的表达

用 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, 美国) 检测 *BrEGL3* 基因在芜菁膨大根的白色根皮、红色根皮、根肉、叶片、花瓣和花蕾的表达。

BrEGL3 引物为: *BrEGL3*-F, 5'-CTCAGACGTTTGTGGAGCA-3'; *BrEGL3*-R, 5'-CGAGATCACGCCTTGGTAAT-3'。内标 *BrACTIN* 引物为: *BrACTIN*-F, 5'-GCTCAGTCCAAGAGAGGTATTC-3'; *BrACTIN*-R, 5'-GCTCGTTGTAGAAAGTGTGATC-3'。所用的试剂为 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, 日本)。

10 μL 反应体系中包括 5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™], 0.2 μL ROX Reference Dye (50 ×) (TaKaRa, 日本), 4.5 μL ddH₂O (TIANGEN, 中国), 1/6 μL cDNA, 1/3 μL 引物混合物 (正向引物和反向引物, 10 μmol · L⁻¹)。

采用的 Real-Time PCR 程序如下: 95 °C 30 s 预变性, 40 个扩增循环 (95 °C 10 s, 60 °C 31 s), 最后是一个从 60 °C 加热到 90 °C 的溶解过程。以 *BrActin* 的转录表达水平为内参, 目的基因相对转录表达水平的计算参照 Bogs 等 (2005) 的方法, 公式为 $2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{Actin})$ 。每个样品设 3 个生物学重复试验。

2 结果与分析

2.1 芜菁 *BrEGL3* 基因的 cDNA 克隆及序列分析

以拟南芥基因 *EGL3* 序列为参考紧邻起始密码和终止密码设计引物, 得到了芜菁 *BrEGL3* 基因的 cDNA 序列 (图 1)。

该基因全长 1 794 bp, 编码 597 个氨基酸的开放阅读框, 分子量约为 66.8 kD。

氨基酸结构分析显示该蛋白约 403 ~ 459 处含有 DNA 结合域, 该结合域属于螺旋—环—螺旋家族 (结果未显示)。

螺旋—环—螺旋结构域的特征是含有 DNA 结合域, E-box/N-box 特异性位点, 二聚体作用面 3 个保守区: 其中的 DNA 结合域决定了该转录因子的特异性, 即能够特异地调控哪些基因的表达; Glu 负责与 E-box (CANNTG) 结合, Pro 负责与 N-box (CACGC/AG) 结合; 二聚体作用面则在二聚化中起作用。对于 *BrEGL3* 而言, 氨基酸序列比较, 保守性分析结果 (图 2) 显示: 特点 1 中标*的氨基酸为 DNA 结合区, 特点 2 中标*的氨基酸 E 与 E-box (CANNTG) 结合, 特点 3 中标*的氨基酸则在转录因子二聚化中起作用。

```

1  atggctgctgtagaaaacagaacgggtgccggaagctctaaagaagcacctcgctgtttca
   M A A V E N R T V P E S L K K H L A V S
61  gttcgaaacattcaatggagttacggaatcttttgggtctgtctctgcttctcaaccagga
   V R N I Q W S Y G I F W S V S A S Q P G
121 ctgttgggaatggggagatggatactacaatggagacattaagacgaggaagacgggttcaa
   L L E W G D G Y Y N G D I K T R K T V Q
181 gcacgcgaagtcaaagctgaccaattgggtctttgagagaagtgagcagcttagagagctt
   A S Q V K A D Q L G L E R S E Q L R E L
241 tacgaatctctctccctcgcggaatcttcaacctcctgtggttctcaggctcactagacgg
   Y E S L S L A E S S T S C G S Q V T R R
301 gcttccgcgcctctctctctctccggaagatctcaccgacactgagtggttttacttagta
   A S A A S L S P E D L T D T E W F Y L V
361 tgcattgtcttttgtcttcaacattgggtgaaggaattcccgggggagcgttggcggaacggg
   C M S F V F N I G E G I P G G A L A N G
421 caaccaatatggctatgtaacgctcataccgccgatagcaaagtcttctactcgctctctt
   Q P I W L C N A H T A D S K V F T R S L
481 ctgcgaaaaagtgccttcgcttttgacagtggtttgcttcccatttcttggaggagttctt
   L A K S A S L L T V V C F P F L G G V L
541 gagatcggcacgaccgaacatgttgcagagaacttaaactgatacaatgcgtgaagaca
   E I G T T E H V A E N L N V I Q C V K T
601 ttgttcttgaagctcctcatggaactttatcagcgagatccgattatcaagaaattttc
   L F L E A P H G T L S A R S D Y Q E I F
661 gaacctttaagcaacgataaatacatcccagtggttcggaactgaagcttttccgacaact
   E P L S N D K Y I P V F G T E A F P T T
721 tctacaagcgtgtatgagcaagaaccagatgatcatgattcgttcatcaacgggtggtggt
   S T S V Y E Q E P D D H D S F I N G G G
781 gcattctcaggtagagctggcagtttgtgggtgaagaactcagtaactgccttcaccaa
   A S Q V Q S W Q F V G E E L S N C L H Q
841 ccgcttaattccagcgcactgcgtttctcagacggttggtagcaactgggagagctctct
   P L N S S D C V S Q T F V G A T G R V S
901 tgtggcccaagaaagagtaagagtaaaagggttaggtcagattcaagaacagagtaaccgt
   C G P R K S K S Q R L G Q I Q E Q S N R
961 gtaaacaatggacgatgatgttcattaccaaggcgtgatctcgacgattttcaaaacaaca
   V N M D D D V H Y Q G V I S T I F K T T
1021 catcagctaattctcggaccgcagtttcataacttgataaagcgggtcaagtttcacgcgg
   H Q L I L G P Q F H N L D K R S S F T R
1081 tggaggaggtcatcatcatcgtctgcaaaatcgttaggagagaagtcacaaaacatgtta
   W R R S S S S S A K S L G E K S Q N M L
1141 aagcaaatgtttttgaggttctcctcggtatgcacaaaaggacacacccgaagatagcgg
   K Q I V F E V P R M H Q K D T P E D S G
1201 tataaggttggagatgaaaccgcgaaccacgccttgtccgagaggaaacgccgtgagaaa
   Y K V G D E T A N H A L S E R K R R E K
1261 ctgaatgacggttcacatgacgttgatcaatgattccttcgatttagtagatcgataaaa
   L N D R F M T L R S M I P S I S K I D K
1321 gtgtcgattcttgatgatacagattgagtatcttcaagaactgaaagacgggttcaagaa
   V S I L D D T I E Y L Q E L Q R R V Q E
1381 ttggaatcttgcagagaatctaccgatacagaaatgcgaatggctatgaagaggaagaaa
   L E S C R E S T D T E M R M A M K R K K
1441 ccggatgggtgaagatgaaagcgcctcggttaattgtttgaacaacaagaggaaggagag
   P D G E D E S A S A N C L N N K R K E S
1501 gatataggagaagatgaaccggctgataccgggttatgctggttcaaccgataatttgagg
   D I G E D E P A D T G Y A G L T D N L R
1561 atcggttctgttggcaatgaggtggttattgagcttaggtgtgcttggagagaagggata
   I G S F G N E V V I E L R C A W R E G I
1621 ttgcttgagataatggatgttattagtgcacctcaatttggattctcactcggttacagtc
   L L E I M D V I S D L N L D S H S V Q S
1681 ccaaccggggatgggttattgtgtttaactgtcaattgcaagcataaagggacaaaaata
   P T G D G L L C L T V N C K H K G T K I
1741 gccacaacaggaatgattcaagatgcacttcaacgagttgcatggatatgttaa 1794
   A T T G M I Q D A L Q R V A W I C *

```

图 1 茺菁 *BrEGL3* cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and deduced protein sequence of *BrEGL3* from 'Tsuda'

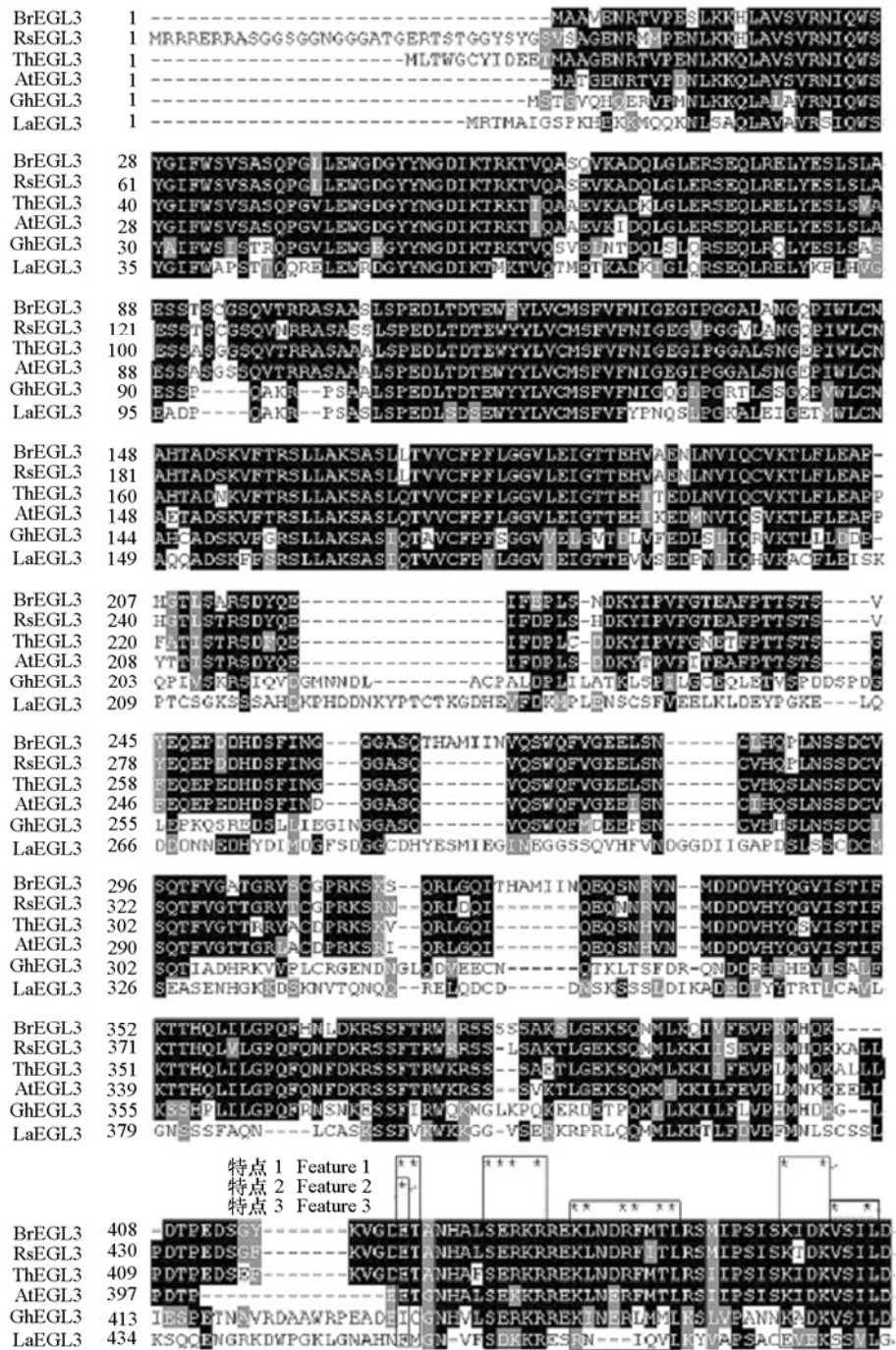


图 2 芜菁 *BrEGL3* 与其他已知 *EGL3* 基因氨基酸序列相似性比较

相同的氨基酸残基用黑色阴影显示, 保守位点用灰色阴影显示, 不同的氨基酸以白色表示; 上述序列分别来自芜菁 *BrEGL3* (HM208589), 萝卜 *RsEGL3* (AAD03489), 盐芥 *ThEGL3* (BAJ34303.1), 拟南芥 *AtEGL3* (NP_176552.1), 陆地棉 *GhEGL3* (AAK19613.1), 尖齿百脉根 *LaEGL3* (ABM69182.1)。特点 1 为 DNA 结合功能域, 特点 2 为 E-box/N-box 特异性位点, 特点 3 为二聚体接合面。

Fig. 2 Alignment of full amino acid sequences from *BrEGL3* and others *EGL3*

The same amino acid is highlighted in black shadow, the conserved amino acid is highlighted in gray shadow and the different amino acid is highlighted in white shadow. The references for the amino acid sequences are: *Brassica campestris* L. ssp. *rapifera*, *BrEGL3* (HM208589); *Raphanus sativus*, *RsEGL3* (AAD03489), *Thellungiella halophila*, *ThEGL3* (BAJ34303.1), *Arabidopsis*, *AtEGL3* (NP_176552.1), *Gossypium hirsutum*, *GhEGL3* (AAK19613.1); *GhEGL3* (AAK19613.1), *Lotus angustissimus*, *LaEGL3* (ABM69182.1). The feature 1 is DNA binding region, feature 2 is E-box specificity site, feature 3 is dimerization interface.

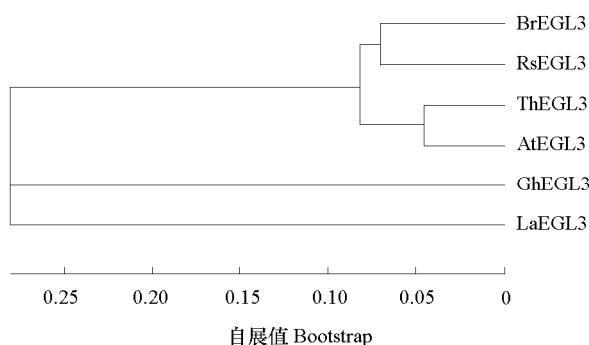


图 3 BrEGL3 进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of BrEGL3 in various plant species

氨基酸序列比较和进化树分析结果（图 2、图 3）显示，BrEGL3 和萝卜 RsEGL3 相似性和同源性最高，相似性高达 62.14%。同源性最低的为尖齿百脉根（19.76%）。芜菁 BrEGL3 与萝卜、盐芥、拟南芥的 EGL3 在进化上属于同一个分支，陆地棉和尖齿百脉根则属于另外两个分支。

2.1 芜菁不同组织中花青素含量检测

温室中长至 2 个月的芜菁，对不同组织中花青素含量进行检测，结果表明在光下生长的芜菁表皮花青素含量最高，而在根肉中有微量花青素合成，而在其他白色根皮、叶片、花瓣、和花蕾中几乎没有花青素合成（图 4）。

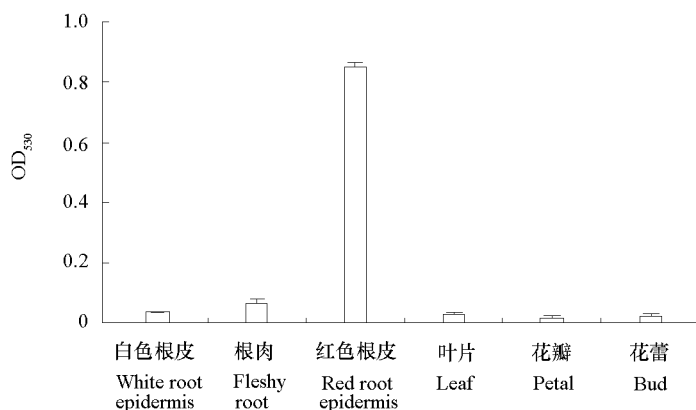


图 4 芜菁不同组织中花青素含量

Fig. 4 Content of anthocyanin in various 'Tsuda' tissues

2.2 芜菁 BrEGL3 基因组织特异性表达

提取芜菁不同组织来源的总 RNA，以芜菁的 *Actin* 基因作为内参照，对 *BrEGL3* 基因进行定量 PCR 分析。

结果(图 5)显示:津田芜菁 *BrEGL3* 基因在产生大量花青素的红色根皮部大量表达,说明 *BrEGL3* 基因的表达与花青素的合成直接相关,在芜菁根部肉质中表达次之,有少量表达,而此部分与大量花青素合成的根皮紧邻,也有微量花青素合成(图 4; 闫海芳, 2003)。而在无花青素合成的白色根皮、叶片、花瓣、花蕾中的表达则很少。说明基因的表达有较高的组织表达特异性。

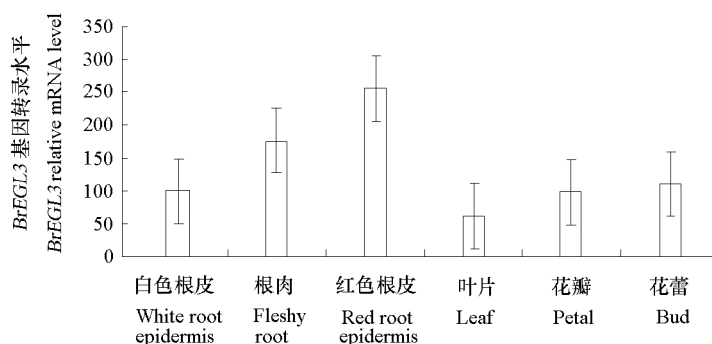


图 5 定量 PCR 分析芜菁不同组织 *BrEGL3* 基因表达

Fig. 5 Expression of *BrEGL3* gene in various 'Tsuda' tissues by Quantitative-PCR assay

3 讨论

本研究克隆了芜菁花青素合成 bHLH 类调控因子基因 *BrEGL3*, 该基因的 cDNA 序列含有一个 1 794 bp 的开放读码框, 编码一个 597 个氨基酸的蛋白质。氨基酸序列分析表明, 该蛋白包含 bHLH 类蛋白的特点: DNA 结合区, E-box 结合位点, 二聚化氨基酸序列。这些特点与已报道的 bHLH 类调控因子结构相似 (Fan et al., 2004; Lewin, 2005)。同源性分析结果表明, 芜菁 *BrEGL3* 与萝卜 *EGL3* 的同源性最高, 与萝卜、盐芥、拟南芥的 *EGL3* 在进化上属于同一个分支。通过上述研究为芜菁 *BrEGL3* 的调控机理和功能研究提供了研究依据。

植物体内调控花青素生物合成相关结构基因的转录激活有两种调控方式, 一种是不依赖 bHLH 转录因子的 MYB 转录因子和 WD40 蛋白二元复合体协同调控; 另一种是 MYB 转录因子、bHLH 转录因子和 WD40 蛋白三元复合体协同调控 (Wilailak et al., 2002; Hernandez et al., 2004), 其中 TTG1 通过与 bHLH 类转录因子 GL3 (*glabra3*), *EGL3* (*enhancer of glabra3*) 和 TT8 (Zhang et al., 2003) 以及 MYB 类转录因子拟南芥 TT2 (*transparent testa2*) 或 PAP1 (*production of anthocyanin pigment1*) (Bernhardt et al., 2003; Baudry et al., 2004; Ramsay & Glover, 2005) 相互作用来实现控制花青素结构基因的时空表达 (Nesi et al., 2001)。在津田芜菁中 *BrEGL3* 可能是参与第二中调控模式调控花青素的合成, 在津田芜菁有花青素大量合成的根皮中大量表达 (图 4; 闫海芳, 2003)。而在有少量花青素合成的根肉中有少量表达, 在其它无花青素合成的组织中则表达量很低, 芜菁中 *EGL3* 的功能与花青素的合成是密切相关的。基因表达的调控通常发生在细胞核中, 但在 *BrEGL3* 基因序列分析中并没有发现核定位信号, *BrEGL3* 蛋白不是在信号肽指引的方式下进入细胞核的, 而是以其他的方式进入细胞核来实现对花青素合成相关基因的表达调控。在拟南芥根表皮细胞中, *EGL3* 蛋白还参与了表皮细胞消亡和表皮细胞排列图案的结构 (Bernhardt et al., 2003, 2005), 而在芜菁无花青素合成的其他组织中, *BrEGL3* 基因也有少量或者微量表达, 可能该蛋白也在表皮细胞的生长发育、毛状体发育中发挥作用, 这些也是下一步要研究的内容。

总之, *BrEGL3* 基因的克隆, 以及对该基因在芜菁中不同组织中表达的分析为进一步研究 *EGL3* 在芜菁中的功能, 进一步探讨花青素合成的调控机理奠定了基础。

References

- Baudry A, Heim M A, Dubreucq B, Caboche M, Weissshaar 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.
- Bernhardt C, Lee M M, Gonzalez A, Zhang F, Lloyd A, Schiefelbein J. 2003. The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3*

- (EGL3) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development*, 130 (26): 6431 – 6439.
- Bernhardt C, Zhao M, Gonzalez A, Lloyd A, Schiefelbein J. 2005. The bHLH genes GL3 and EGL3 participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development*, 132 (2): 291 – 298.
- Bogs J, Downey M O, Harvey J S, Ashton A R, Tanner G J, Robinson S P. 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.
- Dugassa F, Trond L, Kristine O, Rune S, Cathine L. 2009. The endogenous GL3, but not EGL3, gene is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves. *Planta*, 230 (4): 747 – 754.
- Fan C Z, Purugganan M D, Thomasa D T, Wiegmann B M. 2004. Heterogeneous evolution of the *Myc*-like anthocyanin regulatory gene and its phylogenetic utility in *Cornus* L. (Cornaceae). *Mol Phyl Evol*, 33: 580 – 594.
- Hernandez J M, Heine G F, Irani N G, Feller A, Kim M G, Matulnik T, Chandler V L, Grotewold E. 2004. Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C₁. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 48205 – 48213.
- Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071 – 1083.
- Kawabata S, Kusahara Y, Li Y, Sakiyama R. 1999. The regulation of anthocyanin biosynthesis in *Eustoma grandiflorum* under low light conditions. *J Japan Soc Hort Sci*, 68 (3): 519 – 526.
- Lewin B. 2005. Genes VIII. Yu Long, Jiang Song-min, Zhao Shou-yuan, Trans. Beijing: Science Press: 725 – 729. (in Chinese)
- Lewin B. 2005. 基因 VIII. 余 龙, 江松敏, 赵寿元译. 北京: 科学出版社: 725 – 729.
- 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 (10): 1863 – 1878.
- 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 (9): 2099 – 2114.
- Ramsay N A, Glover B J. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity trends. *Plant Sci*, 10 (2): 63 – 70.
- Wilailak P, Christos G, Erich G. 2002. Transposon insertions in the promoter of the *Zea mays* *al* gene differentially affect transcription by the Myb factors P and C₁. *Genetics*, 161 (2): 793 – 801.
- Yan Hai-fang. 2003. Mechanism of light environment influencing the expression of correlated genes in biosynthesis pathway of anthocyanin [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 闫海芳. 2003. 光环境影响花青素合成途径中相关基因的表达机制 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne C T, Lloyd A. 2003. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130: 4859 – 4869.
- Zhou B, Li Y H, Xu Z R, Yan H F, Homma S, Kawabata S. 2007. Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *Journal of Experimental Botany*, 58 (7): 1771 – 1783.