

植物花斑形成分子机理研究进展

尚 啸, 王 健*, 李 琴, 龚 胜, 孙海燕, 张玄兵

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南大学园艺园林学院, 海口 570228)

摘 要: 综述了近年来对植物花斑形成分子机理的研究进展, 总结了与花斑形成相关的花色素合成催化酶基因与调节基因, 探讨了转座子、启动子、RNA 干扰、甲基化、病毒等对花斑形成的作用, 并提出了花斑形成分子机理推测模型图, 以期为进一步认识花斑形成的分子机理, 开展花斑育种奠定理论基础。

关键词: 花斑; 花色素合成催化酶基因; MYB 转录因子; 转座子; RNA 干扰

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 07-1485-10

Research Advance in the Molecular Mechanisms of Plant Flower Blotch Formation

SHANG Xiao, WANG Jian*, LI Qin, GONG Sheng, SUN Hai-yan, and ZHANG Xuan-bing

(Key Laboratory of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources (Hainan University), Ministry of Education; College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Flower blotch is an important characteristic of flower ornamental traits. In previous researches the components and biosynthetic pathway of the pigment of the flower blotch have been understood well. This paper reviewed the recent research advance in the molecular mechanisms of flower blotch formation. The anthocyanidin synthesis catalase genes and regulatory genes related in the flower blotch were summarized, and the roles for the flower blotch formation of transposon, promoter, RNA interference, methylation and virus were discussed. A schematic diagram of the molecular mechanisms of flower blotch formation was calculated for a better understanding of the mechanisms, which would promote the theory study for the breeding about flower blotch.

Key words: flower blotch; anthocyanidin synthesis catalase genes; MYB transcription factor; transposon; RNA interference

观赏植物的花斑是指在花瓣或花萼上大小、形态和位置基本固定的色斑(程金水, 2000), 如三色堇(*Viola × wittrockiana*)、文心兰(*Oncidium hybridum*)、紫斑牡丹(*Paeonia rockii*)等花瓣或花萼基部的深色色斑, 广义的花斑应该还包括其他同一花冠上具有不同颜色的区域。迄今为止, 文献中提到关于花斑的主要类别包括: 点状花斑(spot)(Yamagishi, 2010)、花边(marginal picotee)(Saito et al., 2007)、星型(star type)(Koseki et al., 2005)、二色(bicolor)(Koseki et al., 2005;

收稿日期: 2014-01-07; 修回日期: 2014-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060265、31260488); 海南大学中西部计划学科建设项目(ZXBJH-XK008)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wjhna@163.com)

Morita et al., 2012)、复杂色 (variegated) (Xu et al., 2010)、条纹 (stripe) (Xu et al., 2010)、斑块 (blotch) (Endo, 1954; Zhang et al., 2007)、小丑型 (harlequin phenotype) (Ma & Pooler, 2009) 等, 其中小丑型特指花瓣中心存在较大深色斑块的类型。花斑的大小、颜色和分布对于这些植物的观赏价值有重要影响。

现有研究表明, 花斑形成的理化基础主要是某些色素成分 (特别是花色素) 在花瓣或花萼特定区域的积累。比如三色堇白底紫斑的 ‘Mont Blanc’ 和黄底紫斑的 ‘Rhinegold’ 的花斑部分的组成色素是矢车菊素 - 对 - 香豆素糖苷 (cyanidin-p-coumarylglycoside) 和飞燕草素 - 3: 5 - 对 - 香豆素酰 - 葡萄糖鼠李糖苷 (delphinidin-3: 5-p-coumarylglucorhamnoside) (Endo, 1959); 紫斑牡丹的花斑是由于矢车菊素糖苷在花斑基部积累造成的 (Zhang et al., 2007); 文心兰花萼与花瓣上同时含有花青素苷和类胡萝卜素, 类胡萝卜素主要是堇菜黄质 (violaxanthin) 的全反和 9 - 顺异构体, 花青素苷主要是矢车菊素 (cyanidin) 及其甲基衍生物芍药花素 (peonidin) 如芍药素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (peonidin-3-O-glucoside)、锦葵素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (malvidin-3-O-glucoside)、飞燕草素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (delphinidin-3-O-glucoside) 和矢车菊素 - 3 - O - 葡萄糖苷 (cyanidin-3-O-glucoside) (Hieber et al., 2006; Chiou & Yeh, 2008)。因此, 花色素在花瓣上分区堆积的分子机理是花斑形成原因的研究重点。

1 与花斑形成相关的基因

1.1 花色素合成催化酶基因对花斑形成的影响

花色素的形成和分布主要受两大类型基因的控制, 一类是各种花色素合成的催化酶基因 (张龙等, 2008), 另一类是与催化酶基因表达相关的调控基因 (Clegg & Durbin, 2000; Zufall & Rausher, 2003; Ben-Simhon et al., 2011; Petroni & Tonelli, 2011)。现有的研究表明, 植物花斑的形成是由于这些花色素基因在花瓣或其他成花部位上的差异性表达导致的。

花色素合成催化酶基因是花色素生物合成的基础。花色素苷在植物体内生物合成途径现在已经研究得较为清楚 (张宇 等, 2008)。花斑的形成是由于色斑区与非色斑区花色素含量或种类不同造成的, 大量的研究结果证实由于花色素合成催化酶基因在不同区域的表达差异导致了色斑的形成。同时还证明不同植物花斑形成的相关花色素合成催化酶基因存在差异, 一些种类是由于单个花色素合成催化酶基因表达的差异, 如矮牵牛 (*Petunia hybrida*) ‘Red Star’ 中白色星状色斑的形成原因是 *CHS-A* 基因表达被抑制 (Koseki et al., 2005), 蝴蝶兰小丑型花瓣品种 ‘Everspring Fairy’ 中大块的紫色色斑主要是 *DFR* 基因在色斑区特异性表达导致 (Ma & Pooler, 2009), *F3'5'H* 基因表达差异导致的色斑现象也有报道 (Sato et al., 2011)。另外一些则有两个或以上的花色素合成催化酶基因表达的差异, 如在文心兰无斑的花瓣和萼片中, 基因 *OgCHI* 和 *OgDFR* 表达被遏制, 是其色斑形成的基础 (Chiou & Yeh, 2008); 而在百合 (*Lilium* spp.) ‘Sorbonne’ 中, *LhCHSA*、*LhCHSB* 和 *LhDFR* 花色素合成催化酶基因在花被片的色点部位以及有色斑的中心部位和中间部位高度表达, 在无色斑的边缘区域则表达量很少 (Yamagishi, 2010)。由此可见, 色斑的形成往往只需要在色斑区与非色斑区有一个或者数个花色素合成催化酶关键基因表达的差异, 而不需要所有的花色素合成催化酶基因都存在表达上的明显差异。

除了仅由于空间的表达差异而形成花斑的情况外, 最近 Martins 等 (2013) 对柳叶菜科 (Onagraceae) 植物 *Clarkia gracilis* 花斑的研究表明, 花色素合成催化酶基因表达的时空差异, 也可导致花斑的产生。*Clarkia gracilis* 花瓣花色素合成催化酶基因中, *F3'H*、*F3'5'H*、*DFR1* 在花瓣所

有区域都表达, 但 *F3'H* 只在花斑形成早期表达, *F3'5'H*、*DFR1* 只在花斑形成后期表达; *DFR2* 只在色斑区域表达, 且只在早期表达。这样 *F3'H* 与 *DFR2* 在花斑形成早期只在色斑区的表达产生了矢车菊素, 形成了初步的色斑; *F3'5'H*、*DFR1* 后期的表达则产生了锦葵色素, 使得色斑颜色加深。这一结果表明, 花斑花色素合成催化酶基因表达的时间和空间的组合相当精巧 (Glover et al., 2013; Martins et al., 2013)。

1.2 花色素调节基因对花斑形成的影响

目前已知至少有 3 类调节因子控制花青素代谢途径, 包括 MYB 转录因子 (Quattrocchio et al., 1998)、bHLH 型转录因子 (Ludwig & Wessler, 1990; Spelt et al., 2002) 和 WD40 重复蛋白 (de Vetten et al., 1997)。这 3 类调节基因相互作用, 单独调节或者形成 MYB-bHLH-WD40 复合体 (MBW) 共同调节花色素苷的生物合成, 其调控模式已被广泛研究 (Petroni & Tonelli, 2011)。在花斑的形成过程中, 这些调控基因可以调节花色素合成催化酶基因在不同区域的表达水平, 从而导致色斑的形成, 其中最为经典的例子是金鱼草花冠花色的分布模式。影响金鱼草花色分布的主要调节因子有 4 大类: Delila (Del)、Mut、Rosea (Ros) 和 Venosa (Ve)。其中前二者是 bHLH 型调控因子, 后二者是 MYB 调控因子。Del 影响花冠管部的色素形成; Mut 影响冠檐的花色形成; Ros 有两类, Ros1 和 Ros2, 影响管部和冠檐的花色形成, 而 Ve 主要影响管部和冠檐脉络处色素的形成 (Schwinn et al., 2006)。不同的调节基因间存在复杂的相互作用, 如 Ros2 只能在冠檐部与 Del 互作而不能与 Mut 互作, Ve、Ros1 则可以和 Mut 在冠檐部互作, 不同的互作模式导致金鱼草冠檐部、花管部产生不同的色块或条纹 (Schwinn et al., 2006; Shang et al., 2011)。

相对而言, 在这 3 类调控因子中, 人们最关注 MYB 类调控因子对花色的调节, 其对花斑形成的作用也研究最多。MYB 家族转录因子是指含有 MYB 结构域的一类非常保守的转录因子。在植物中常见的 MYB 转录因子属于 R2R3 类型 (Jin & Martin, 1999), 但是也有 3 个重复区域 (Braun & Grotewold, 1999; Kranz et al., 2000) 或 1 个重复区域的 (Dubos et al., 2010; Yi et al., 2010; Zhai et al., 2010)。此外, 在拟南芥中还发现存在 R1R2R1R2-MYB 蛋白这种含 4R 重复结构的转录因子 (Stracke et al., 2001)。目前的研究结果显示, 调节花色素苷合成与色斑形成相关的 MYB 因子主要是 R2R3 类型 (许志茹 等, 2008; Gao et al., 2011; Petroni & Tonelli, 2011), 但是单一 R 重复结构的 MYB 因子也有调控花色素形成的功能 (Dubos et al., 2008; Zhang et al., 2009)。

MYB 转录因子调节花色素苷基因具有组织特异性 (Cone et al., 1986; Quattrocchio et al., 1999, 2006; Elomaa et al., 2003); 可以调节多个花色素合成催化酶基因, 而某个花色素苷基因也可能受多个 MYB 类调节因子的调控 (Jackson et al., 1991; Schwinn et al., 2006; Chiou & Yeh, 2008); MYB 类调节因子对花色素合成催化酶基因多数是正调控 (Elomaa et al., 2003; Chiou & Yeh, 2008; Yamagishi, 2010), 偶尔也有负调控 (Zhang et al., 2009; Gao et al., 2011); 既可以和 bHLH、WD40 类转录因子共同作用调控基因的表达, 也可以单独对基因进行调控 (Petroni & Tonelli, 2011)。

MYB 因子作用于植物花冠从而导致花斑出现的例子较多。Chiou 和 Yeh (2008) 对文心兰的研究发现, 文心兰花瓣和花萼中的 R2R3 型 MYB 转录因子基因 *OgMYB1* 仅在有色斑的区域表达, 而且当用粒子轰击的方式将 *OgMYB1* 导入无色斑区域时, 会诱导 *OgCHI* 和 *OgDFR* 的表达, 从而导致色斑的出现。Zhang 等 (2009) 将单 R 类型的 MYB 转录因子基因 *AtCAPRICE* 转入烟草后获得了全部或者部分抑制色素表达的植株, 其中部分植株形成了中肋有色素的色斑表型, 而这些转基因植株的 *NtDFR*、*NtANS* 和 *Nt3GT* 的表达受到了较强抑制。Yamagishi 等 (2010) 在研究东方百合 (*Lilium* spp.) ‘Montreux’ 的 MYB 转录因子时发现, LhMYB6 转录因子特异地在花被片的斑点部位表达, 对百合的色斑形成起调节作用。东方百合 ‘Sorbonne’ 的另一个 MYB 转录因子基因 *LhSorMYB12*

对色斑的形成也有调节作用：*LhSorMYB12*、*LhCHSA*、*LhCHSB* 和 *LhDFR* 在花被片的色点部位以及有色斑的中心部位和中间部位高度表达，而在无色斑的边缘区域则表达量很少，说明 *LhSorMYB12* 的低量表达导致了花色素合成催化酶基因的表达量降低，进而使得边缘区域花色素苷积累含量较低（Yamagishi, 2010）。Nakatsuka 等（2011）利用嵌合阻遏基因沉默技术（Chimeric repressor gene-silencing technology, CRES-T）阻遏了日本龙胆（*Gentiana triflora* 和 *G.scabra* 的杂交种）花色素苷调节基因 *GtMYB3* 表达，两株转基因植株中出现了花瓣基部颜色变浅的色斑类型，这些植株花瓣浅色区域中的 *F3H*、*F3'5'H*、*DFR* 和 *ANS* 基因的表达被强烈抑制，同时 *FNSII* 在浅色区域的表达量增加，使黄烷酮（flavanone）转化为黄酮（flavone）的效率更高，因此黄酮合成途径的竞争力远大于花色素苷合成途径，从而形成了色斑。Ma 和 Pooler（2009）研究发现蝴蝶兰小丑型花瓣品种 ‘Everspring Fairy’ 中大块的紫色色斑主要是花色素苷相关基因 *MYB* 和 *DFR* 在色斑区表达所致，而与花色相关的基因 *MYC* 和 *wd* 在色斑区与非色斑区都不表达。Shang 等（2011）研究发现金鱼草的花冠上脉络状条斑是由基因 *Venosa* 决定，该基因编码 R2R3MYB 型转录因子（Schwinn et al., 2006）。最近 Matsubara 等（2012）发现矮牵牛 ‘Celebrity White’（CY-WT）在紫外线下呈现出肉眼不可见的条斑模式：在暗的花檐背景下沿着中肋有 5 条亮条纹。研究表明，暗背景富含类黄酮，而亮条纹处则只有痕量类黄酮，取而代之的主要是肉桂酸衍生物咖啡酸和 *p*-香豆酸。与全暗的品种 ‘Celebrity Blue’ 相比，CY-WT 主要是 *MYB* 类调节基因 *AN2* 及其目标基因 *CHS-J* 和 *DFR* 的表达显著减少，此外，在 CY-WT 的暗背景与亮条纹间检测到了基因 *CHS-A* 的 RNA 干涉现象——RNA 的降解及 *CHS-A* 的 siRNA，说明这种肉眼不可见的条纹色斑是由于 *ANS* 表达的缺失及 *CHS-A* 干涉共同形成的。以上研究表明，*MYB* 类转录因子对花被色斑的调节是通过一个或多个花色素苷基因进行正向或负向的组织特异性的表达调控来实现的，而且往往是单独发挥作用，与 bHL、WD40 等协同作用的例子较少。其他影响花色素合成的调节基因如与烟草中 LIM 家族的转录因子 Ntlim1（Kaothien et al., 2002）、大豆中能够特异性活化 *CHS* 基因的 bZIP 家族转录因子 G/HBF（Dröge-Laser et al., 1997）等类似的其他调节基因，虽然也有可能参与花斑的形成，但目前尚未见报道。

除了上述花色素合成催化酶基因与调节基因外，Sasaki 等（2012）研究发现，康乃馨（*Dianthus caryophyllus*）中谷胱甘肽 S 转移酶（GST）也可能与花色的积累及色斑的形成相关。Han 等（2012）发现苹果中花青素还原酶（anthocyanidin reductase, ANR）在烟草中过表达可以抑制烟草的 *CHI* 和 *DFR* 表达，形成白色或者红白相间的花斑类型。由此表明，色斑形成的分子机理可能不仅仅局限于花色素合成的催化酶基因与调节基因，与花色形成、转运、还原等相关的基因也可能是花斑产生的分子基础。

2 转座因子与花斑的形成

转座因子插入色素基因及其不精确的剪切会导致色素基因的异常表达，从而形成色斑，这方面的研究开展较早，报道也较多。转座因子既可以作用于花色素合成催化酶基因，也可以作用于花色素调节基因，插入的区域也是多样的，既可以插入基因外显子，也可以插入内含子，还有插入基因启动子的报道。

目前报道较多的是转座因子作用于花色素合成催化酶基因导致色斑。Enrico 等（1986）发现金鱼草 *pallida* 基因（*DFR* 类基因）的启动子区域插入一个 *Tam3* 转座子后，转座子的不精确剪切会导致花冠色素分布不均匀，从而形成不规则色斑。Clegg 和 Durbin（2000）认为圆叶牵牛（*I. purpurea*）白色花冠上的紫色斑块是由于转座子 *Tip100* 插入 *CHS-D* 的内含子和 5'侧翼序列导致的，而牵牛（*I. nil*）无色花冠上红色圆点的形成则是由于 *Tpn2* 插入了 *CHI* 基因造成的。Galego 和 Almeida（2007）

发现柳穿鱼属 (*Linaria*) 的 *DFR* 基因中存在属于 CACTA family 的转座子 (*Tll*, Transposon *Linaria* 1), 该转座子可以抑制 *DFR* 基因的表达, 从而使花色呈现象牙白色。当花瓣表皮细胞中的 *Tll* 被不规则剪切时, 就会在象牙白色的花瓣上出现红色的组织, 导致不规则花斑的出现。Xu 等 (2010) 发现大豆 (*Glycine max*) 的 *DFR2* 基因的第 2 个内含子中插入了 1 个 20 548 bp 的 CACTA-like 转座子, 导致旗瓣上出现了紫色的色斑和条纹, 而当转座子剪切并插入 *DFR2* 基因的启动子则导致全白色及花瓣基部出现深紫色色斑的两类变异。同样, Takahashi 等 (2012) 发现大豆 *F3'5'H* 基因的第 1 个外显子中插入了 3 883 bp 的 CACTA-family 转座因子 *Tgs1*, 从而导致了色斑的出现。Sato 等 (2011) 发现非洲紫罗兰 (*Saintpaulia*) 复色品种 ‘Thamires’ 在组织培养过程中容易发生花色变异, 形成不具色斑的类型。深入研究后发现, 在复色品种的 *F3'5'H* 基因启动子中插入了 1 个属于 *hAT* 超级家族的转座子, 是其花斑形成的原因。转座因子作用于花色素调节基因导致色斑的报道较少。Ohno 等 (2011) 发现大丽花 (*Dahlia variabilis*) 中 1 个 bHLH 转录因子 *DvIVS* 参与了花色调节, 而 *DvIVS* 的第 4 个内含子插入了 1 个 CACTA 型的转座子 *Dahlia variabilis* 1 (*Tdv1*), 从而导致了色斑的形成。从上述报道可知, 导致花斑出现的转座子主要是 CACTA 型的转座子与 *hAT* 超级家族的转座子, 它们都是以 DNA-DNA 方式转座的转座子。

3 启动子特异性与花斑的形成

已有研究表明, 植物花色素苷结构基因的组织特异性表达的重要分子基础是组织特异性启动子。较早的关于花色素苷基因启动子的特异表达的研究是 Schmid 等 (1990) 利用大豆 *CHS* 基因启动子 12 kb 片段驱动的 GUS 基因转化烟草, 发现其表达仅限于花瓣的表皮。同时 Koes 等 (1990) 对矮牵牛 *CHSA* 和 *CHSJ* 启动子进行了比较详细的研究, 发现其中存在可控制基因在花中特异表达的元件。Ohl 等 (1990) 克隆分析了拟南芥 *PAL* 基因启动子。Annadana 等 (2002) 克隆了菊花中的 *UEP1* 启动子, 并与矮牵牛中的 *chs-A*、锌指转录因子 *EPF2-5* 等的启动子进行了比较分析, 发现 *UEP1* 启动子驱动的 GUS 基因在菊花的舌状花和管状花中表达量很高, 并远超组成性启动子 *CaMV35S*; Han 等 (2005) 克隆了蝴蝶兰中的 *CHS* 基因 *Pchs*, 发现 *Pchs* 在花瓣、唇瓣、萼片等部位特异表达, 分析表明 *Pchs* 启动子含有顺势作用元件, 可能是其特异表达的原因之一。在启动子特异性与花斑形成的相关性研究方面, Nakatsuka 等 (2007) 利用不同组织特异性启动子构建 *CHS* 的 RNA 干扰体系, 结果表明组成型表达的 *CaMV35S: CHSir* 转化的烟草花色全白, 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 特异启动子构建的 *rolC: CHSir* 转化的烟草略微显红色, 龙胆特异启动子构建的 *gentian GtCHS: CHSir* 转化烟草后只干扰了花朵上部的红色, 花瓣喉部的颜色得以保持, 形成了类似花斑的类型。由此表明, 启动子的组织特异性可以用于类似花斑品种的构建, 这也间接证明启动子特异型对于花斑的形成具有重要作用。

4 RNA 干扰在花斑形成中的作用

Koseki 等 (2005) 发现矮牵牛 (*Petunia hybrida*) ‘Red Star’ 中白色星状色斑的形成原因是基因 *CHS-A* 的 RNA 干扰造成白色区域的色素合成受阻。Morita 等 (2012) 进一步研究发现矮牵牛的二色 (bicolor) 花朵类型 (如 Picotee 和 Star 型) 的形成是因为两个首尾相连的 *CHSA* 的等位基因 *PhCHS-A1* 和 *PhCHS-A2* 的 RNA 干扰引起的转录后沉默造成的。Matsubara 等 (2012) 研究矮牵牛 ‘Celebrity White’ (CY-WT) 在紫外线下呈现出肉眼不可见的星状条斑模式时, 检测到了基因 *CHS-A* 的 RNA 干扰现象——RNA 的降解及 *CHS-A* 的 *siRNA*, 说明这种肉眼不可见的条纹色斑也有 *CHS-A*

干涉的原因。Hosokawa 等（2013）发现矮牵牛花朵呈现不稳定的红-白色品种‘Magic Samba’也是由于白色区域的 *CHSA* 基因的转录后沉默造成的，而且红白斑的比例与磷的含量密切相关，当植株缺磷时，花冠上白色区域扩大，而白色区域除 *CHSA* 基因之外的其他花色素合成催化酶基因表达量增加，推测缺磷诱导 *CHSA* 转录后沉默，从而引起了白色区域的扩大。

5 DNA 甲基化导致的花斑形成

DNA 甲基化在花色素合成与调节中的作用已有较多报道，但 DNA 甲基化对花斑形成作用的研究还很少见。Liu 等（2012）研究了文心兰有色斑品种‘Gower Ramsey’和无色斑品种‘Honey Dollp’后，发现其主要差异是基因 *OgCHS* 在‘Honey Dollp’中无表达，而且不表达是由上游启动子区域甲基化引起的：有色斑品种‘Gower Ramsey’的 *OgCHS* 基因启动子无甲基化。由此可见花色素催化酶基因的甲基化也可以导致表达效率显著下降，从而形成花斑。

6 病毒与花斑的形成

病毒感染可引起斑驳的色斑。现有的研究表明，病毒感染导致叶片、种皮或者花瓣等出现色斑主要是因为病毒中可以产生对某些色素基因的转录后沉默（posttranscriptional gene silencing, PTGS）或者 RNAi 起抑制作用的蛋白，从而使这些色素基因得以表达，产生色斑（Senda et al., 2004）。Teycheney 和 Tepfer（2001）用 CMV-R、potato potyvirus Y (PVY-nysa)、tobacco etch potyvirus (TEV-CAA10) 感染矮牵牛‘Starmania’，引起花瓣中白色部分出现不规则色点，其原理就是病毒抑制了矮牵牛 *CHS-A* 基因的 RNA 干扰，使色素在白色部分得以积累。Koseki 等（2005）研究发现矮牵牛（*Petunia hybrida*）‘Red Star’中白色星状色斑的形成原因是 *CHS-A* 的 RNA 干扰，造成白色区域的色素合成受阻，利用 RNA 干扰抑制病毒 cucumber mosaic virus O strain (CMV-O) 接种植株后，可以将白色星状斑恢复为红色。以上研究表明，病毒的沉默抑制蛋白（viral silencing suppressor protein）基因可能是病毒导致花斑形成的分子基础。

7 问题与展望

花色素的合成与调节已经成为植物分子生物研究的热点，花斑的形成实际上是此类研究的一个特殊领域。因为花冠上色斑部分与非色斑部分的组织具有十分相似的遗传、表达和结构特征，因此对色斑与非色斑的对比研究具有很大的便利，对于揭示花色素的细微调节和表达具有十分积极的意义，因而近年来关于花斑的研究逐渐增多。但是总体来说，花斑分子机理的研究还处于起步阶段，一些关键性的问题尚待解决，比如色斑的大小和位置是如何决定的，色斑的形成是否受到外界因素如光照、温度、水分等影响，如果有影响，将如何影响等。

Koseki 等（2005）在研究矮牵牛‘Red Star’中白色星状色斑的时候提出了一个假设——星状花红白分明的界限是由于 *CHS-A* 基因的 RNA 干扰的小 RNA 或者包含 RNA 的信号分子从花瓣中脉向两侧扩散，含量依次降低，当边缘达到 RNA 干扰发生的阈值时，则此处成为红白二色的分界线。但这一假设尚未获得证实，而且也不适用于非 RNA 干扰导致的花斑。从本课题组的研究来看，一些具有固定色斑的花卉，如三色堇，其花斑的发育过程首先是花瓣基部的多处脉络处着色，然后沿着脉络逐渐向两边扩散，最终形成一块完整的色斑，但是色斑边缘通常不超过脉络的最长处范围，这提示这类固定色斑的大小与花瓣上的脉络密切相关，但是是从脉络上合成了相关色素再向两边扩

- (4): 437 – 445.
- Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Nadler-Hassar T, Trainin T, Bar-Ya'akov I, Borochoy-Neori H, Holland D. 2011. A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis TTG1* and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development. *Planta*, 234 (5): 865 – 881.
- Braun E L, Grotewold E. 1999. Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol*, 121 (1): 21 – 24.
- Cheng Jin-shui. 2000. Garden plant genetics and breeding. 1 ed. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 程金水. 2000. 园林植物遗传育种学. 1 版. 北京: 中国林业出版社.
- Chiou C Y, Yeh K W. 2008. Differential expression of MYB gene (*OgMYB1*) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey. *Plant Mol Biol*, 66 (4): 379 – 388.
- Clegg M T, Durbin M L. 2000. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. *PNAS*, 97 (13): 7016 – 7023.
- Cone K C, Burr F A, Burr B. 1986. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (24): 9631 – 9635.
- de Vetten, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. 1997. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals. *Genes*, 11: 1422 – 1434.
- Dröge-Laser W, Kaiser A, Lindsay W P, Haikier B A, Loake G J, Doemer P, Dixon R A, Lamb C. 1997. Rapid stimulation of a soybean proteinserine kinase that phosphorylates a novel Bzip DNA-binding protein G/HBF, during the induction of early transcription dependent defenses. *EMBO J*, 16: 726 – 738.
- Dubos C, Le Gourrierec J, Baudry A, Huep G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul J M, Alboresi A, Weisshaar B, Lepiniec L. 2008. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55 (6): 940 – 953.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 15 (10): 573 – 581.
- Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert V A, Laitinen R A, Teeri T H. 2003. Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Physiol*, 133 (4): 1831 – 1842.
- Endo T. 1954. Biochemical and genetical investigations of flower color in Swiss Giant Pansy, *Viola × Wittrockiana* Gams I: Inter-relationships of pigment constituents occurring in ten varieties. *Jap J Bot*, 14: 187 – 193.
- Endo T. 1959. Biochemical and genetical investigations of flower color in swiss giant pansy, *Viola × Wittrockiana* Gams III: Dominance relations in F₁ hybrids, with special reference to flower color and anthocyanin pigment constituents. *Jpn J Genet*, 34 (4): 116 – 124.
- Enrico S C, Rosemary C, Cathie M. 1986. Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 47 (2): 285 – 296.
- Galego L, Almeida J. 2007. Molecular genetic basis of flower colour variegation in *Linaria*. *Genetical Research*, 89: 129 – 134.
- Gao J J, Shen X F, Zhang Z, Peng R H, Xiong A S, Xu J, Zhu B, Zheng J L, Yao Q H. 2011. The myb transcription factor MdMYB6 suppresses anthocyanin biosynthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106 (2): 235 – 242.
- Glover B J, Walker R H, Moyroud E, Brockington S F. 2013. How to spot a flower. *New Phytologist*, 197: 687 – 689.
- Han Y P, Vimolmangkang S, Soria-Guerra R E, Korban S S. 2012. Introduction of apple *ANR* genes into tobacco inhibits expression of both *CHI* and *DFR* genes in flowers, leading to loss of anthocyanin. *Journal of Experimental Botany*, 63 (7): 2437 – 2447.
- Han Y Y, Ming F, Wang J W, Ye M M, Shen D L. 2005. A novel chalcone synthase gene from phalaenopsis orchid that alters floral morphology in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 193 – 194.
- Hieber A D, Mudalige-Jayawickrama R G, Kuehnle A R. 2006. Color genes in the orchid *Oncidium* Gower Ramsey: Identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta*, 223 (3): 521 – 531.
- Hosokawa M, Yamauchi T, Takahama M, Goto M, Mikano S, Yamaguchi Y, Tanaka Y, Ohno S, Koeda S, Doi M, Yazawa S. 2013. Phosphorus starvation induces post-transcriptional *CHS* gene silencing in *Petunia* corolla. *Plant Cell Reports*, 32 (5): 601 – 609.
- Jackson D, Culianez M F, Prescott A G, Roberts K, Martin C. 1991. Expression patterns of *MYB* genes from *Antirrhinum* flowers. *Plant Cell*, 3

- (2): 115 – 125.
- Jin H, Martin C. 1999. Multifunctionality and diversity within the plant *MYB2* gene family. *Plant Mol Biol*, 41: 577 – 585.
- Kaothien P, Kawaoka A, Ebinuma H, Yoshida K, Shinmyo A. 2002. A PAL box binding factor, control promoter activity of the horseradish wound-inducible peroxidase gene. *Plant Molecular Biology*, 49: 591 – 599.
- Koes R E, van Blokland R, Quattrocchio F, van Tunen A J, Mol J. 1990. Chalcone synthase promoters in petunia are active in pigmented and un-pigmented cell types. *Plant Cell*, 2: 379 – 386.
- Koseki M, Goto K, Masuta C, Kanazawa A. 2005. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'Red Star' flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA. *Plant Cell Physiol*, 46 (11): 1879 – 1883.
- Kranz H, Scholz K, Weisshaar B. 2000. *c-MYB* oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J*, 21 (2): 231 – 235.
- Liu X J, Chuang Y N, Chiou C Y, Chin D C, Shen F Q, Yeh K W. 2012. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium* orchid cultivars. *Planta*, 236: 401 – 409.
- Ludwig S, Wessler S R. 1990. Maize R gene family: Tissue-specific helix-loop-helix proteins. *Cell*, 62: 849 – 852.
- Ma H, Pooler M. 2009. Anthocyanin regulatory/structural gene expression in *Phalaenopsis*. *J Amer Soc Hort Sci*, 134 (1): 88 – 96.
- Martins T R, Berg J J, Blinka S, Rausher M D, Baum D A. 2013. Precise spatiotemporal regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway leads to petal spot formation in *Clarkia gracilis* (Onagraceae). *New Phytologist*, 197: 958 – 969.
- Matsubara K, Kei S B, Koizumi M, Kodama H C, Ando T. 2012. RNA silencing in white petunia flowers creates pigmentation patterns invisible to the human eye. *Journal of Plant Physiology*, 169: 920 – 923.
- Morita Y, Saito R, Ban Y, Tanikawa N, Kuchitsu K, Ando T, Yoshikawa M, Habu Y, Ozeki Y, Nakayama M. 2012. Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 70 (5): 739 – 749.
- Nakatsuka T, Pitaksuthepong C, Yamamura S, Nishihara M. 2007. Induction of differential flower pigmentation patterns by RNAi using promoters with distinct tissue-specific activity. *Plant Biotechnol Rep*, 1 (4): 251 – 257.
- Nakatsuka T, Saito M, Yamada E, Nishihara M. 2011. Production of picotee-type flowers in Japanese gentian by CRES-T. *Plant Biotechnology*, 28 (2): 173 – 180.
- Ohl S, Hedrick S A, Chory J, Lamb C J. 1990. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 837 – 848.
- Ohno S, Hosokawa M, Hoshino A, Kitamura Y, Morita Y, Park K I, Nakashima A, Deguchi A, Tatsuzawa F, Doi M, Iida S, Yazawa S. 2011. A bHLH transcription factor, DvIVS, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). *Journal of Experimental Botany*, 62 (14): 5105 – 5116.
- Petroni K, Tonelli C. 2011. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Sci*, 181 (3): 219 – 229.
- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R. 2006. 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*, 18 (5): 1274 – 1291.
- Quattrocchio F, Wing J F, van der Woude K, Mol J N, Koes R. 1998. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: Species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J*, 13 (4): 475 – 488.
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R. 1999. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell*, 11 (8): 1433 – 1444.
- Saito R, Kuchitsu K, Ozeki Y, Nakayama M. 2007. Spatiotemporal metabolic regulation of anthocyanin and related compounds during the development of marginal picotee petals in *Petunia hybrida* (Solanaceae). *J Plant Res*, 120: 563 – 568.
- Sasaki N, Nishizaki Y, Uchida Y, Wakamatsu E, Umemoto N, Momose M, Okamura M, Yoshida H, Yamaguchi M, Nakayama M, Ozeki Y, Itoh Y. 2012. Identification of the glutathione S-transferase gene responsible for flower color intensity in carnations. *Plant Biotechnology*, 29: 223 – 227.
- Sato M, Kawabe T, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M. 2011. Tissue culture-induced flower-color changes in Saintpaulia caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 3', 5' hydroxylase (F3'5'H) promoter. *Plant Cell Reports*, 30 (5): 929 – 939.

- Schmid J, Doerner P W, Clouse S D, Dixon R A, Lamb C J. 1990. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic *Tobacco*. *The Plant Cell*, 2 (7): 619 – 631.
- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 18 (4): 831 – 851.
- Senda M, Masuta C, Ohnishi S, Goto K, Kasai A, Sano T, Hong J S, MacFarlane S. 2004. Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. *Plant Cell*, 16 (4): 807 – 818.
- Shang Y J, Venail J, Mackay S, Bailey P C, Schwinn K E, Jameson P E, Martin C R, Davies K M. 2011. The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum*. *New Phytol*, 189 (2): 602 – 615.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. 2002. *ANTHOCYANIN1* of *Petunia* controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant Cell*, 14: 2121 – 2135.
- Stracke R, Werber M, Weissshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*, 4 (5): 447 – 456.
- Takahashi R, Morita Y, Nakayama M, Kanazawa A, Abe J. 2012. An active CACTA-Family transposable element is responsible for flower variegation in wild soybean *Glycine soja*. *Plant Gen*, 5: 62 – 70.
- Teycheney P Y, Tepfer M. 2001. Virus-specific spatial differences in the interference with silencing of the *chs-A* gene in non-transgenic petunia. *Journal of General Virology*, 82: 1239 – 1243.
- Xu M, Brar H K, Grosic S, Palmer R G, Bhattacharyya M K. 2010. Excision of an active CACTA-Like transposable element from *DFR2* causes variegated flowers in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Genetics* January, 184 (1): 53 – 63.
- Xu Zhi-ru, Li Chun-lei, Cui Guo-xin, Sun Yan. 2008. MYB protein of anthocyanin biosynthesis in plant. *Plant Physiology Communications*, 44 (3): 597 – 604. (in Chinese)
- 许志茹, 李春雷, 崔国新, 孙 燕. 2008. 植物花青素合成中的 MYB 蛋白. *植物生理学通讯*, 44 (3): 597 – 604.
- Yamagishi M. 2010. Oriental hybrid lily Sorbonne homologue of *LhMYB12* regulates anthocyanin biosyntheses in flower tepals and tepal spots. *Molecular Breeding*, 28 (3): 381 – 389.
- Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. 2010. Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant Cell Physiol*, 51 (3): 463 – 474.
- Yi J, Derynck M R, Li X, Telmer P, Marsolais F, Dhaubhadel S. 2010. A single-repeat MYB transcription factor, GmMYB176, regulates *CHS8* gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Plant J*, 62 (6): 1019 – 1034.
- Zhai H, Bai X, Zhu Y, Li Y, Cai H, Ji W, Ji Z, Liu X, Li J. 2010. A single-repeat R3-MYB transcription factor MYBC1 negatively regulates freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 394 (4): 1018 – 1023.
- Zhang J J, Wang L S, Shu Q Y, Liu Z A, Li C H, Zhang J, Wei X L, Tian D K. 2007. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Scientia Horticulturae*, 114 (2): 104 – 111.
- Zhang Long, Li Wei-hua, Jiang Shu-mei, Zhu Gen-fa, Wang Bi-qing, Li Hong-qing. 2008. Progress of molecular basis of biosynthesis and transcriptional regulation of anthocyanins. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (6): 909 – 916. (in Chinese)
- 张 龙, 李卫华, 姜淑梅, 朱根发, 王碧青, 李洪清. 2008. 花色苷生物合成与分子调控研究进展. *园艺学报*, 35 (6): 909 – 916.
- Zhang Ning, Hu Zong-li, Chen Xu-qing, Hou Xiao-shu, Li Yong, Chen Guo-ping. 2008. Analysis of metabolic pathway and establishment of regulating model of anthocyanin synthesis. *China Biotechnology*, 28 (1): 97 – 105. (in Chinese)
- 张 宁, 胡宗利, 陈绪清, 侯晓姝, 李 勇, 陈国平. 2008. 植物花青素代谢途径分析及调控模型建立. *中国生物工程杂志*, 28 (1): 97 – 105.
- Zhang W, Ning G, Lv H, Liao L, Bao M. 2009. Single MYB-type transcription factor AtCAPRICE: A new efficient tool to engineer the production of anthocyanin in tobacco. *Biochem Biophys Res Commun*, 388 (4): 742 – 747.
- Zufall R A, Rausher M D. 2003. The genetic basis of a flower color polymorphism in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Journal of Heredity*, 94 (6): 442 – 448.