

参与植物次生代谢调控的转录因子及其在植物次生代谢遗传改良中的应用

何水林

(福建农林大学作物学院, 福建 福州 350002)

摘要: 转录因子与结构基因的结合, 激活合成基因的表达是次生代谢物合成途径启动前的重要分子事件, 对植物次生代谢起着十分重要的调节作用。转录因子可激活次生代谢物合成途径中多个基因协同表达, 从而有效启动次生代谢途径。因此, 转录因子为揭示植物次生代谢调控机制提供重要工具, 转录因子的基因工程可为植物次生代谢的遗传改良提供有效的手段。

关键词: 转录因子; 植物次生代谢; 遗传改良; 综述

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)04-0374-07

Transcription Factors Involved in Plant Secondary Metabolism and Its Application in Plant Secondary Metabolic Engineering

HE Shui-lin

(College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A brief review is given of the progress of the studies on transcription factors in plants under the following headings: transcription factor genes involved in plant secondary metabolism, transcriptional control of plant secondary metabolism, and the application of transcription factor gene engineering in genetic improvement of secondary metabolites.

Key words: Transcription factor; Plant secondary metabolism; Genetic improvement; Review

无论是植物基因的诱导型表达还是组成型表达, 均有赖于转录因子对其表达的激活。转录调节是植物基因表达调节的重要环节之一。转录因子的分子生物学及其在植物发育、适应、进化中的作用研究已取得了不少进展。改变转录因子的表达往往可导致植物中该转录因子所控制性状的较大改变, 因此, 转录因子基因工程是颇具应用价值的植物遗传操作手段^[1]。

次生代谢与植物对环境的适应性及其产品品质的优劣密切相关。转录因子在植物次生代谢调节上也起着十分重要的调节作用。从转录因子的分子生物学入手研究植物次生代谢的调节, 不仅有利于从分子水平上阐明植物次生代谢的调节机制, 还可为实施植物次生代谢途径的遗传改良提供有效手段。本文对植物

次生代谢有关转录因子的分子生物学及其在植物次生代谢遗传改良上的应用研究进展进行简要综述。

1 与植物次生代谢有关的转录因子基因

1.1 植物次生代谢转录因子基因的分离与鉴定方法

随着分子生物学和基因工程技术的迅猛发展, 已开发了许多可用于转录因子分离与功能鉴定的方法。转录因子基因分离方法主要有转座子标记^[2-3]、T-DNA 激活标签法^[6-8]、酵母单杂交法、图位克隆法^[9]、同源序列法^[10]。转录子基因功能鉴定方法有: (1) 瞬间表达法(two-hybrid assays), 又称顺式元件分析法, 通过构建两套表达载体即指导转录因子基因高效表达的效应载体(effector vector)及目标启动子

收稿日期: 2003-07-02 接受日期: 2003-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170638); 福建省自然科学基金重大项目(2002F009)资助

和报告基因嵌合的报告载体(reporter vector), 将这两个载体共转化植物细胞或酵母细胞, 检测共转化细胞内报告基因表达以分析转录因子对特定启动子的作用^[4,11-13]; (2) 功能缺失或功能增加法(T-DNA 激活标签), 即通过改变转录因子基因的表达, 分析植物表型的变化来鉴定转录因子的功能。该方法又可分为突变体和转基因植株功能分析法。突变体法主要有利用转座子标签或 T-DNA 激活标签法、反义抑制法、双链 RNA 法等; 一旦获得转录因子基因的转化植株, 可通过异常过量表达法^[4,14]和诱导法^[15]来鉴定转录因子的功能。DNA 阵列或基因芯片为全面快速检测植物转录因子的表达特性、确定其所控制的下游基因, 并为分析转录因子功能提供了有力的工具, 这一方法已在植物次生代谢有关的转录因子功能鉴定中得到应用^[16]。

1.2 已分离的与植物次生代谢物合成有关的转录因子及调节基因

次生代谢物生物合成途径涉及的反应步骤多,

且次生代谢物在植物组织中含量一般较低, 检测难度大, 因而对与植物次生代谢有关的转录因子的分离、鉴定困难较大。迄今已从拟南芥、矮牵牛花、玉米等作物中分离、鉴定了 MYB、MYC、bZIP 蛋白、WD40 蛋白、锌指蛋白等控制次生代谢的转录因子基因(表 1), 多局限于花色、种皮颜色等表型易于检测的性状, 控制这些性状的转录因子基因便于应用转座子标签、T-DNA 激活标签或图位克隆等方法进行分离。

研究表明, 同一种植物甚至不同植物调节同一类次生代谢的转录因子基因间具有相似的结构和功能。玉米 *c1/pl1(MYB)* 基因家族的 *c1* 和 *pl1* 的编码序列及其功能几乎相同。*rl/b1* 家族的各个基因也具有高度同源性, *rl* 和 *b1* 虽然编码相似的蛋白, 但它们的组织结构不同, *b1* 等位基因一般为单基因, 而 *rl* 的等位基因遗传上较为复杂, 由多个决定花青素合成方式的等位基因所构成^[30,38]; 不同植物中控制花青素合成的转录因子基因之间也表现出一定的同源性。例如水稻 *OsMYB3*、矮牵牛 *tt2*、*AN2*、玉

表 1 已克隆和鉴定的与植物次生代谢有关的转录因子基因

Table 1 The isolated and identified transcription factor genes involved in plant secondary metabolism

转录因子基因	植物	基因家族	分离或鉴定方法	功能	参考文献
<i>ORCA2</i>	长春花	1P2 域蛋白	one-hybrid 杂交	抑制 <i>STR</i> 响应 JA 和诱发因子表达	[17]
<i>ORCA3</i>	长春花	1P2 域蛋白	T-DNA 激活标签	参与吲哚萜类生物碱合成调控	[4]
<i>PAP1</i>	拟南芥	<i>R2R3 MYB</i>	T-DNA 激活标签、超量表达	参与花青素合成调控, 可控制上下游合成基因表达	[6]
<i>PAP2</i>	拟南芥	<i>R2R3 MYB</i>	EST, 超量表达	参与花青素合成调控	[6]
<i>OSB1</i>	水稻	<i>bHLH</i> 蛋白	cDNA 文库同源克隆	控制水稻花青素合成	[18]
<i>TTG1</i>	拟南芥	<i>WD40</i> 蛋白	图位克隆	在向下游转录因子信号传递中起作用控制花青素及叶片、茎根毛状物发育及种子黏液合成	[19]
<i>an2</i>	矮牵牛花	<i>R2R3 MYB</i>	转座子标签	控制类黄酮合成途径中下游的基因的表达控制花青素的合成和花色	[5]
<i>an11</i>	矮牵牛花	<i>WD40</i> 重复蛋白	转座子标签克隆	控制类黄酮合成途径中下游基因表达	[20]
<i>an1</i>	矮牵牛花	<i>bHLH</i> 蛋白	转座子标签	可直接激活 <i>dfrA</i> 基因, 参与花青素合成控制	[21]
<i>jaf13</i>	矮牵牛花	<i>bHLH</i> 蛋白	同源序列	控制 <i>dfrA</i> 基因表达, 参与花青素合成调控	[22]
<i>del</i>	金鱼草	<i>bHLH</i> 蛋白	转座子标签	参与花青素合成调控	[23]
<i>ant1</i>	番茄	<i>MYB</i>	T-DNA 激活标签, 超量表达	对花青素合成上、下游基因及糖基化、花青素向液胞运输有关酶的编码基因均具有控制作用	[8]
<i>Lc</i>	玉米	<i>bHLH</i> 蛋白	同源克隆	与花青素合成有关	[24]
<i>TT16</i>	拟南芥	<i>MADS</i> 域蛋白	T-DNA 标签	参与 proanthocyanidin 合成调控	[25]
<i>B</i>	玉米	<i>bHLH</i> 蛋白	同源克隆	参与玉米花青素合成调控	[26]
<i>Sn</i>	玉米	<i>bHLH</i> 蛋白	遗传分析、同源克隆	控制幼苗和植物细胞中花青素组织特异性沉积	[27]
<i>Hopi</i>	玉米	<i>rl</i>	同源克隆、瞬时转化检测	控制花青素在角质鳞片依赖于发育合成	[28]
<i>Cl</i>	玉米	<i>MYB</i> 蛋白	转座子标签瞬时表达检测	控制花青素合成	[29]
<i>Pl</i>	玉米	<i>MYB</i> 蛋白	同源克隆、瞬时表达检测	控制花青素合成	[30]
<i>ANL2</i>	拟南芥	homeodomain 蛋白	转座子标签	控制花青素的积累和根系发育	[31]
<i>TTG2</i>	拟南芥	<i>WRKY</i> 转录因子	转座子标签	控制拟南芥的毛状体、单宁酸和黏液合成	[32]
<i>tt1</i>	拟南芥	锌指蛋白	转座子标签	参与 proanthocyanidin 合成调控	[33]
<i>tt2</i>	拟南芥	<i>R2R3 MYB</i>	T-DNA 标签, 超量表达	控制类黄酮合成下游基因表达	[2]
<i>BZI-1</i>	烟草	<i>bZIP</i> 蛋白质	cDNA 文库, 瞬时表达	参与苯丙烷代谢途径的调控	[34]
<i>CPRF</i>	欧芹	<i>bZIP</i>	cDNA 文库	调节 <i>CHS</i> 基因表达对光的响应	[35]
<i>Ntlim1</i>	烟草	锌指蛋白	Southwestern screening	参与烟草木质素合成调控	[36]
<i>MybA</i>	葡萄	<i>Myb</i> 转录因子	cDNA 克隆、序列分析与瞬时表达	参与花青素合成调控	[37]

米 *Cl*、*P*、拟南芥的 *PAP1*、*tt2* 等参与花青素合成调节的 *R2R3 MYB* 转录因子基因推导氨基酸序列间均表现出一定的相似性,以 *R2R3 DNA* 结合区域相似程度最高。*tt2* 与 *OsMYB3*、*Cl*、玉米 *P*、*AN2*、*PAP1* 的 *R2R3 DNA* 结合区域氨基酸序列分别有 82%、74%、67%、66% 和 65% 的相似性^[2]。

2 转录因子对植物次生代谢的控制

2.1 转录因子对植物次生代谢的调节作用

特定次生代谢物合成与否、合成量的多少是植物在发育调控下及各种生物或非生物诱发因子的诱导作用下,由其合成途径中的多个酶活性表达所决定,受诱发因子作用下的信号传递、转录因子活性、重要合成基因表达等多个环节的影响。其中转录因子与次生代谢物合成有关结构基因(以下均简称合成基因)结合,激活合成基因的表达是次生代谢物合成途径启动前的重要分子事件,它不仅决定特定次生代谢物合成、积累量的多少,还决定次生代谢物合成的时间、空间分布以及对环境条件的响应。例如,玉米 maysin 的合成和积累量受到转录因子 *p1* 及结构基因 *c2* 和 *whp1* (*CHS* 的编码基因)、*chi* (*CHI* 的编码基因)、*pr1*、*al* 及其它一些基因的控制。其中 *p1* 可解释 maysin 变异的 58.0%,并表现出加性效应,其它位点对玉米 maysin 含量的影响均不及 *p1* 转录因子^[39]。植物次生代谢的合成基因和调节基因多以基因家族形式存在,与植物次生代谢的时空调节有关。以矮牵牛花为例,*an2* 的表达仅限于花冠,而 *an11* 的表达无组织特异性^[520]; *BAN* (编码 proanthocyanidin 合成的关键酶花色苷还原酶的基因)受调节基因的控制,其表达具有明显时空变化,*tt2*、*tt8*、*ttg1* 三个调节基因控制 *BAN* 表达,*tt1* 和 *tt16* 影响其表达的空间特异性,而 *ttg2* 对 *BAN* 的表达没有影响^[40]。*ttg1* 与拟南芥的叶片、茎和根上的毛状物发育、种子黏液及花青素的合成有关^[19]。矮牵牛花的 *AN1* 和 *AN11* 的表达无组织特异性,而 *AN2* 的表达仅仅局限于花冠边沿^[21]。*Sn* 控制幼苗和植物细胞中控制花青素组织特异性沉积^[27]。*Hopi* 控制玉米角质鳞片花青素依赖于萌发的合成^[28]。玉米 *c1* 仅在种子糊粉层、小盾板、胚胎的花青素合成中必需,而 *pl1* 在整个植株和果皮、外种皮上花青素的合成均起调节作用^[37]。

此外,转录因子也参与了次生代谢对生态环境的响应调节。例如,*pl-bol3* (一个转入了 *MYB* 转录

因子基因的玉米植株)中的外源 *MYB* 转录因子基因在光和激动素作用下的表达类似于花青素的积累及有关结构基因的表达。*Sn1-bol3* (一个 *bHLH* 基因)的表达受几种光质的光作用诱导,但对激动素的作用却没有响应。在糊粉层中,白、红和蓝色光可有效的刺激花青素积累和 *MYB* 相关基因 *Cl* 的表达,而上述 *bHLH* 基因则呈组成型表达^[41]。说明,转录因子在植物次生代谢响应外界不同环境因子及在植物组织、器官特异性表达方面起某种调节作用。

2.2 转录因子对植物次生代谢调节的分子机制

转录因子对植物次生代谢的调节是通过与合成基因启动子上相应的顺式作用元件结合而实现的。合成基因启动子中均含有转录因子能够识别的顺式作用元件。例如,*CHS* 基因启动子中的 *MRECHS* (*MYB* recognition element) 和 *ACECHS* (ACGT-containing element) 都与光诱导 *CHS* 基因的表达有关。其中 *MRECHS* 可与来源不同的 *MYB* 转录因子特异性结合以启动基因对光的响应^[42];*ACECHS* 则可与 *CPRF bZIP* 转录因子 *CPRF1* 和 *CPRF4* 结合,在光激活 *CHS* 表达中起调节作用^[43-45]。玉米 *Cl* 和 *B* 转录因子对花青素合成基因 *al* 表达的调节作用与 *al* 启动子中特定的顺式作用元件有关^[11]。*ORCA2* 能与长春花 *STR* 基因启动子中一个类似于 GCC 盒的顺式作用元件特异性结合,在 *STR* 基因响应茉莉酸或诱发因子过程中发挥重要作用^[17]。*ORCA3* 对 *STR* 基因响应茉莉酮酸酯表达的控制是通过直接与 *STR* 基因启动子中 *JERE* 结合而实现的^[4]。

植物次生代谢物合成基因启动子中顺式作用元件具有保守性,以苯丙烷代谢途径为例,*PAL*、*4CL* 及 *CHS* 基因启动子的最近端区域中均发现存在 G 盒(CACGTG)和 H (CCTACC)盒^[4647]。*bZIP* 蛋白家族可与 G 蛋白结合^[4849],*MYB* 转录因子则可与 H 盒结合^[5051]。*Cl* 和 *B* 可与玉米花青素生物合成途径中 *al*、*a2*、*bz1* 和 *bz2* 等基因启动子中保守的 ARE 区域结合^[11,52]。一个转录因子通过激活次生代谢物合成途径中多个合成基因表达,可有效地启动次生代谢物的合成途径、促进次生代谢物的合成。例如,玉米 *R* 和 *Cl* 转录因子控制从 *CHS* 到花色苷-3-葡萄糖基转移酶等花青素合成途径中下游多个酶的编码基因的表达。矮牵牛花的转录因子 *an2* 和 *an11* 均可控制类黄酮合成途径中下游基因的表达,控制花青素的合成和花色^[520]。长春花 *ORCA3* 的表达可导致 *TDC*、*STR*、*SGD*、*CPR* 和 *D4H* 等 *TIA* 次生代谢物合成

基因的协同表达^[4]。

由于植物次生代谢物种类繁多,次生代谢途径反应步骤多,转录因子对植物次生代谢的调控机制较为复杂,既有一个转录因子调节一种次生代谢产物的现象^[8],也有两种或两种以上转录因子或其它调节基因相互作用,相互配合,共同调节特定次生代谢产物合成的现象^[53,54]。玉米花青素的合成至少有20个基因参与,其中合成基因 *c2*、*chi*、*f3h*、*a1*、*a2*、*bz1*、*bz2* 等被 *r1/b1* 和 *c1/pl1* 或更多调节基因家族协同控制^[54]。*C1* 和 *P1* 需要 *bHLH* 蛋白 *R* 和 *B* 的配合以激活玉米类黄酮生物合成基因的表达^[55]。在金鱼草和矮牵牛花中也存在 *MYB* 蛋白与 *bHLH* 蛋白相互配合以激活花色素合成的现象^[20,21]。拟南芥和矮牵牛花的 *MYB* 转录因子还需要 WD40 蛋白 *ttg1* 和 *an11* 的配合以控制类黄酮的合成^[20,56]。*an1* 可直接激活 *dfrA* (编码 dihydroflavonol 4-reductase) 表达。在叶片中 *an2* 的超量表达可激活 *an1*。但在花药中, *an1* 的表达依赖于 *an4* (一个与 *an2* 相似的 *MYB* 蛋白) 的协同,通过控制类黄酮合成途径中下游基因的表达共同控制色素的合成、液胞 pH 及种皮的发育^[21]。

3 转录因子基因工程在次生代谢基因遗传改良中的应用

3.1 植物次生代谢遗传改良的意义

已从植物中鉴定出多达 100 000 种次生代谢物,估计仅占植物次生代谢物总量的 10% 左右^[57],其中蕴含多种与作物适应环境、抗病、抗虫、优质等密切相关的资源。例如,根据已有的研究结果,作物中的白藜芦醇、类黄酮等具有抗氧化剂、抗炎、抗癌等多种功能;农产品中的单宁对其蛋白质的营养价值具有显著的不利影响;植物中的萜类物质或生物碱类物质可充当植保素以提高植物抗性,又可充当他感活性物质,对作物周围的植物产生相生、相克作用,或是充当重要的活性成分,增进人类的健康。若牧草中的木质素过高,则降低牧草的饲用价值,而木材中的木质素过高,则不宜作造纸的原料。因此,提高植物有用次生代谢物含量或降低不利次生代谢物的含量,是提高植物对环境的适应能力、提高农产品品质的一个有效途径。

但是植物次生代谢途径受到有关基因严密的时间、空间转录表达调控,特定有用次生代谢物含量

往往很低。运用组织培养、细胞培养技术和通过环境条件的改变来提高有用次生代谢物的努力也不不同程度地受到限制。

3.2 转录因子基因工程是开展植物次生代谢遗传改良的有效途径

利用基因工程技术进行植物次生代谢的遗传改良,提高有用次生代谢物的含量是近十多年来国际生物学界研究的一个热点,随着次生代谢合成途径中有关结构基因不断被克隆,利用合成基因进行基因工程的研究报道不断增多。但是,由于次生代谢途径的复杂性,往往难以找出决定某一代代谢物合成量的关键(限制)基因。而且,即便克服了某个酶活性对次生代谢的限制,可能其它诸如底物供应、产物浓度的反馈抑制、其它酶的活性制约等又可能上升为限制因子。在多数情况下单个关键酶基因的遗传操作往往难以大幅度改变特定次生代谢物的产量。从理论上说,通过转录因子基因的表达的调节可以激活特定代谢支路中多个基因的协同表达,而且,转录因子还可激活不同植物中相似次生代谢物合成基因的表达^[58],这就意味着可将特定植物中分离的转录因子基因在不同的植物中进行转化,有效地提高转基因植物中目标次生代谢物的含量。实践已经证明这是一条可行的途径,例如,将一个 *MYB* 转录因子基因置于 CMV35S 的控制之下,转入拟南芥中,从获得的 5 000 个转化株系中筛选出一个营养器官全生育期紫色素含量均很高的转基因株系^[6];玉米花青素合成的转录因子基因 *Lc* 在苜蓿中表达,可改变苜蓿中花青素合成对环境的响应^[14];玉米 *C1*、*Lc* 转录因子在烟草、拟南芥^[59]、矮牵牛花^[60]、番茄^[61]中表达均不同程度地提高了花青素的产量;在番茄果肉中表达玉米转录因子 *Lc* 和 *C1* 转录因子基因,使原本不含类黄酮的番茄果肉中类黄酮次生代谢物的合成基因表达,酶活性提高,类黄酮次生代谢物含量有不同程度的提高^[62]。*PAP1* 和 *PAP2* 在转基因烟草中超量表达,导致烟草色素产量增加,花瓣颜色加深^[9]; *Sn* 在百脉根(*Lotus corniculatus*)中超量表达(CaMV35S-*Sn*),对花青素合成的影响很微弱,且主要局限于叶中脉、叶基和叶柄,但却大大促进了叶片中缩合的单宁酸聚合体的合成^[63]。

4 小结

特定次生代谢物合成与否、合成量的多少主要

是通过其合成途径中的多个合成酶活性表达所决定的,这些合成酶的活性表达受到相应的转录因子及其它调控基因的调节,其中,转录因子对合成基因的转录激活是植物次生代谢最为重要的调节环节之一。转录因子通过激活植物次生代谢物合成途径中多个合成基因的表达,可有效地启动或关闭次生代谢物合成途径,从而调节特定次生代谢物的合成。转录因子的基因工程是植物次生代谢遗传改良的有效途径,随着植物次生代谢调控机制的阐明,特别是随着调节特定次生代谢物合成的转录因子的分离和鉴定,转录因子基因工程将为人类开发利用植物次生代谢物这一巨大的宝库提供有效的手段。

参考文献

- [1] Liu L, White M J, MacRae T H. Transcription factors and their genes in higher plants: Functional domains, evolution and regulation [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 262:247-257.
- [2] Meissner R C, Jin H L, Cominelli E, et al. Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in *R2R3 MYB* genes [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1827-1840.
- [3] Nesi N, Jond C, Debeaujon I, et al. The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an *R2R3 MYB* domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed [J]. *Plant Cell*, 2001, 13:2099-2114.
- [4] Fits L V D, Memelink J. *ORC13*, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, 289(5477):295-297.
- [5] Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, et al. Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1433-1444.
- [6] Borevitz J O, Xia Y, Blount J, et al. Activation tagging identifies a conserved *MYB* regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:2383-2394.
- [7] Fits L V D, Hilliou F, Memelink J. T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species [J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(6):513-521.
- [8] Mathews H, Clendennen S K, Caldwell C G, et al. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport [J]. *Plant Cell*, 2003, 15:1689-1703.
- [9] Bender J, Fink G R. A Myb homologue, *1TR1*, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Genetics*, 1998, 95(10):5655-5660.
- [10] Chen J(陈俊), Zhu Y(朱英), Wang Z Y(王宗阳). Cloning and expression analysis of *MYB* cDNA in rice [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*(植物生理和分子生理学报), 2002, 28(4):267-274. (in chinese).
- [11] Lesnick M L, Chandler V L. Activation of the maize anthocyanin gene *a2* is mediated by an element conserved in many anthocyanin promoters [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:437-445.
- [12] Jin H, Cominelli E, Bailey P, et al. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis* [J]. *EMBO J*, 2000, 19(22):6150-6161.
- [13] Yanagisawa S. The transcriptional activation domain of the plant-specific *Dof1* factor functions in plant, animal, and yeast cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42:813-822.
- [14] Ray H, Yu M, Auser P, et al. Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize *Lc* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132:1448-1463.
- [15] Bruce W, Folkerts O, Garnaata C, et al. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors *CRC* and *P* [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:65-80.
- [16] Sablowski R W M, Meyerowitz E M. A homologue of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA* [J]. *Cell*, 1998, 92:93-103.
- [17] Menke F L H, Champion A, Kijne J W, et al. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, *ORCA2* [J]. *EMBO J*, 1999, 18:4455-4463.
- [18] Sakamoto T, Ohmori T, Kageyama K, et al. The purple leaf (PI) locus of rice: the *PI(w)* allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(9):982-991.
- [19] Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, et al. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1337-1350.
- [20] de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, et al. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals [J]. *Genes Dev*, 1997, 11:1422-1434.
- [21] Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, et al. Anthocyanin1 of petunia encodes a basic-helix loop helix protein that directly activates structural anthocyanin genes [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:1619-1631.
- [22] Quattrocchio F, Wing J F, van der Woude K, et al. Analysis of *bHLH* and *MYB*-domain proteins: Species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes [J]. *Plant J*, 1998, 13:475-488.
- [23] Goodrich J, Carpenter R, Coen E S. A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species [J]. *Cell*, 1992, 68:955-964.
- [24] Ludwig S R, Habera L F, Dellaport S L, et al. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:7092-7096.

- [25] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, et al. The *TRANSPARENT TESTA16* 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):2463–2479.
- [26] Chandler V R, Radicella P J, Robbins T P, et al. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of *B* utilizing *R* genomic sequences [J]. *Plant Cell*, 1989, 1:1175–1183.
- [27] Tonelli C, Consonni G, Faccio D S, et al. Genetic and molecular analysis of *Sn*, a light-inducible, tissue specific regulatory gene in maize [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 225:401–410.
- [28] Petroni K, Cominelli E, Consonni G, et al. The tissue specific expression of the maize regulatory gene *Hopi* determines germination-dependent anthocyanin accumulation [J]. *Genetics*, 2000, 155: 323–336.
- [29] Cone K C, Burr F A, Burr B. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 83:9631–963.
- [30] Cone K C, Cocciolone S M, Burr F A, et al. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant [J]. *Plant Cell*, 1993, 5:1795–1807.
- [31] Kubo H, Peeters A J M, Aarts M G M, et al. *ANTHOCYANIN-LESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1217–1226.
- [32] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a *WRKY* transcription factor [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6):1359–1375.
- [33] Sagasser M, Lu G H, Hahlbrock K, et al. *A. thaliana* *TRANSPARENT TESTA1* is involved in seed coat development and defines the *WIP* subfamily of plant zinc finger proteins [J]. *Genes Dev*, 2002, 16:138–149.
- [34] Heinekamp T, Kuhlmann M, Lenk A, et al. The tobacco *bZIP* transcription factor *BZI-1* binds to G-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes *in vitro*, but it is not involved in their regulation *in vivo* [J]. *Mol Genet Genom*, 2002, 267(1):16–26.
- [35] Weisshaar B, Armstrong G A, Block A, et al. Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness [J]. *EMBO J*, 1991, 10(7):1777–1786.
- [36] Kawaoka A, Ebinuma H. Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco *LIM* protein [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1149–1457.
- [37] Kobayashi S, Ishimaru M, Hiraoka K, et al. *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis [J]. *Planta*, 2002, 215(6):924–933.
- [38] Cone K C, Cocciolone S M, Moehlenkamp C A, et al. Role of the regulatory gene *pl* in the photocontrol of maize anthocyanin pigmentation [J]. *Plant Cell*, 1993, 5:1807–1816.
- [39] Byrne P F, McMullen M D, Snook M E, et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129:661–677.
- [40] Debeaujon I, Nesi N, Perez P, et al. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis testa*: Regulation of differentiation and role in seed development [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11):2514–2531.
- [41] Piazza P, Procissi A, Jenkins G I, et al. Members of the *c1/pl1* regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128:1077–1086.
- [42] Feldbrugge M, Sprenger M, Hahlbrock K, et al. A novel plant protein containing a DNA-binding domain with one *MYB* repeat, interacts *in vitro* with a light-regulatory promoter unit [J]. *Plant J*, 1997, 11(5):1079–1093.
- [43] Sprenger-Haussels M, Weisshaar B. Transactivation properties of parsley proline-rich *bZIP* transcription factor [J]. *Plant J*, 2000, 22 (1):1–8.
- [44] Kircher S, Ledger S, Hayashi H, et al. A novel plant *bZIP* protein of the *CPRF* family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 257(6):595–605.
- [45] Feldbrugge M, Sprenger M, Dinkelbach M, et al. Functional analysis of a light-responsive plant *bZIP* transcriptional regulator [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(11):1607–1621.
- [46] Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, et al. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light-responsive *cis*-acting elements [J]. *EMBO J*, 1989, 8:1641–1648.
- [47] Ohl S, Hedrick S A, Chory J, et al. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:837–848.
- [48] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant *bZIP* proteins gather at *1CGT* elements [J]. *FASEB J*, 1994, 8:192–200.
- [49] Menkens A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the *GBF* family of *bZIP* proteins [J]. *Trends Biochem*, 1995, 20:506–510.
- [50] Sablowski R W M, Baulcombe D C, Bevan M. Expression of a flower-specific *Myb* protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic expression of a target promoter [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:6901–6905.
- [51] Sablowski R W M, Moyano E, Culianez-Macia F A, et al. A flower-specific *Myb* protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes [J]. *EMBO J*, 1994, 13:128–137.
- [52] Tuerck J A, Fromm M E. Elements of the maize *a1* promoter required for transactivation by the anthocyanin *B1C1* or phlobaphene *P* regulatory genes [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:1655–1663.
- [53] Goff S A, Cone K C, Chandler V L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins [J]. *Genes Dev*, 1992, 6:864–875.

- [54] Mol J, Grotewold E, Koes R. How genes paint flowers and seeds [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3:212-217.
- [55] Mol J, Jenkins G I, Schäfer E, et al. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1996, 15:525-557.
- [56] Larkin J C, Walker J D, Bolognesi-Winfield A C, et al. Allele-specific interactions between *ug* and *gl* during trichome development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 1999, 151: 1591-1604.
- [57] Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 75:225-233.
- [58] Tamagnone L, Merida A, Parr A, et al. The *AmMYB308* and *AmMYB330* transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2):135-154.
- [59] Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1* [J]. *Science*, 1992, 258:1773-1775.
- [60] Bradley J M, Davies K M, Derolles S C, et al. The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of petunia [J]. *Plant J*, 1998, 13:381-392.
- [61] Goldsbrough A P, Tong Y, Yoder J I, et al. *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato [J]. *Plant J*, 1996, 9:927-933.
- [62] Bovy A, Ric de Vos, Kemper M, et al. High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14:2509-2526.
- [63] Robbins M P, Paolucci F, Hughes J W, et al. *Su*, a maize *bHLH* gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(381):239-248.