

花色苷生物合成关键酶基因在植物基因工程中的应用

杨晓娜 (保山学院资源与环境学院, 云南保山 678000)

摘要 文中主要论述了花色苷的合成途径及途径中所涉及的关键酶基因在植物基因工程中的应用, 为花色苷在基因工程的应用提供基础资料。

关键词 花色苷; 关键酶; 基因工程

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02866-04

Application of Anthocyanins Biosynthesis Key Enzyme Gene in Plant Gene Engineering

YANG Xiao-na (College of Resources and Environment, Baoshan University, Baoshan, Yunnan 678000)

Abstract The biosynthesis way for anthocyanins and the application of involved key enzyme gene in plant gene engineering were reviewed, which will provide basic data for application of biosynthesis in gene engineering.

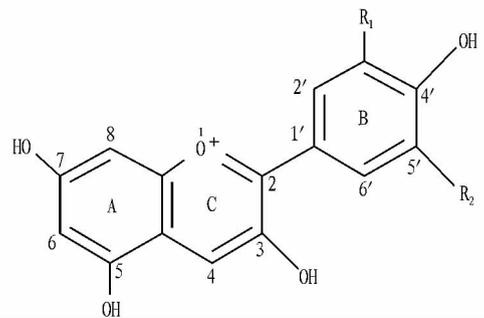
Key words Anthocyanins; Key enzyme; Gene engineering

花色苷类化合物是类黄酮(Flavonoid)合成途径的有色末端产物, 主要积累在花瓣表皮细胞的液泡内, 是影响花和果实颜色的主要色素^[1]。天然花色苷糖苷配基, 即苷元, 基本结构为3,5,7-三羟基苯并吡喃(图1)。在花色素A环的5,7位和C环的3位上的羟基均可以糖苷键的形式与糖结合形成花色苷, 另外在R₃和R₄位上的基因也可与糖结合, 且由于结合糖位置、数量、种类的不同, 形成的花色苷种类也不同, 因此天然存在的花色苷种类极多^[2]。在高等植物中已鉴定出6种基本的天然花色素^[3](图1), 即花青素、天竺葵色素、飞燕草素、芍药色素、锦葵色素和牵牛花色素^[4-5]。

以往对植物花色苷的研究主要集中在提取方法和苷元鉴定方面, 而对植物花色苷关键酶基因克隆的研究较少。近年来, 作为花色改良、植物育种、绿色食品开发的重要物质, 花色苷在基因工程中的应用日益受到重视, 笔者在文中就花色苷生物合成途径中的关键基因在植物基因工程中的应用进行简要综述。

1 花色苷的生物合成

花色苷生物合成的遗传学研究始于孟德尔的豌豆花色遗传研究, 即将基因位点与易于观察的色彩变异联系起来进行研究。20世纪80年代末至90年代初, 植物花色苷代谢途径已研究较为成熟^[6](图2)。其由“一般苯丙烷类途径”合成^[7], 经历3个阶段: 第1阶段是由苯丙氨酸(Phenylalanine)合成香豆酰 CoA(4-Coumaroyl-CoA)的过程, 这是许多次生代谢共有的, 该步受苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性调控; 第2阶段是由香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA(Malonyl CoA)合成二氢黄酮醇(Dihydroflavonol)的过程, 该阶段是类黄酮代谢的关键反应; 第3阶段是各种花色素的合成, 其中至少2个酶即二氢黄酮醇4-还原酶(Dihydroflavonol-4-reductase, DFR)和类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶(Flavonoid-3-glucosyltransferase, 3GT)能将无色的二氢黄酮醇转化成有色的花色素, 且二氢黄酮醇4-还原酶可催化二氢黄



注: R₁ = H, R₂ = H 时为天竺葵色素或花葵素(Pelargonidin, Pg); R₁ = OH, R₂ = H 时为矢车菊色素或花青素(Cyanidin, Cy); R₁ = OH, R₂ = OH 时为飞燕草色素或花翠素或翠雀素(Delphinidin, Dp); R₁ = OCH₃, R₂ = H 时为芍药色素或甲基花青素(Peonidin, Pn); R₁ = OCH₃, R₂ = OH 时为牵牛花色素(Petunidin, Pt); R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃ 时为锦葵色素或二甲基花翠素(Malvidin, Mv)。

图1 6种花色素的分子结构

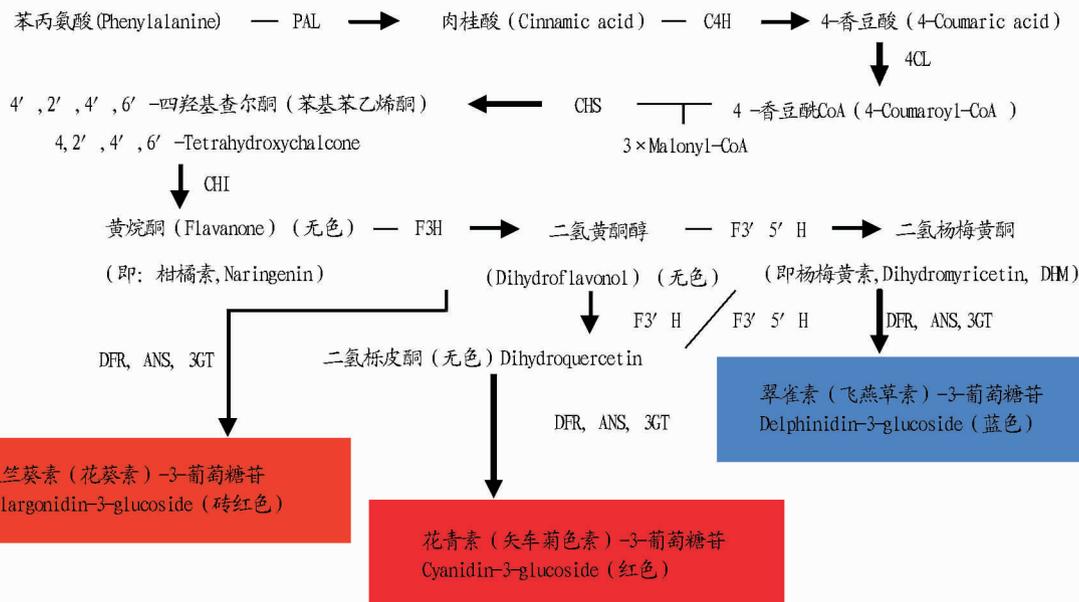
酮醇进一步还原成无色花色素, 再经氧化、脱水和糖基化, 不同的无色花色素即变为有色的花色苷(砖红色的花葵素、红色的花青素、蓝色的飞燕草色素)。这些花色苷还可进一步糖基化、甲基化和酰基化形成不同的产物。

2 花色苷生物合成途径中的关键酶

影响花色苷代谢的基因分为结构基因和调节基因2类。其中结构基因(Structural gene)直接编码花色苷代谢生物合成的酶类; 调节基因(Regulator gene)控制结构基因的表达强度和表达方式^[8]。

2.1 查尔酮合酶 查尔酮合酶是类黄酮生物合成途径中的第1个酶, 它催化3个来自CoA的醋酸残基和1分子的p-香豆酰(P-coumarone)反应, 生成4',2',4',6'-四羟基查尔酮。

自1983年荷兰芹(*Petroselinum crispum* L.)的CHS序列发表后^[9], 到目前为止, 已从多种双子叶、单子叶和裸子植物中克隆了CHS, 如玉米、高粱(*Sorghum vulgare* L.)、兰花(*Cymbidium goeringii* L.)、矮牵牛(*Petunia hybrida* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)、松树(*Pinus sylvestris* L.)等。这些报道中的CHS都属于多基



注: 苯丙氨酸解氨酶 (PAL, Phenylalanine ammonia-lyase); 肉桂酸羟化酶 (C4H, Cinnamate 4-hydroxylase); 4-香豆酸 CoA 连接酶 (4CL, 4-Coumarate CoA ligase); 查尔酮合酶 (CHS, Chalcone synthase); 查尔酮异构酶 (CHI, Chalcone isomerase); 黄烷酮-3-羟化酶 [F3H (or FHT), Flavanone 3-hydroxylase (or flavanone 3 β -hydroxylase)]; 类黄酮-3'-羟化酶 (F3'H, Flavonoid 3'-hydroxylase); 类黄酮-3'-5'-羟化酶 (F3'5'H, Flavonoid 3', 5'-hydroxylase); 二氢黄酮醇-4-还原酶 (DFR, Dihydroflavonol 4-reductase); 花青素合酶 [ANS (or AS), Anthocyanidin synthase (or leucoanthocyanidin dioxygenase, LDOX)]; 类黄酮-3-O-转葡萄糖基酶 (3GT, UDP-glucose: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase)。

图2 高等植物花色苷生物合成途径

因家族。1998年, Kobayashi等发现, 从三花龙胆 (*Gentiana triflora* Pall.) 中克隆得到的 *CHS* 启动子可在矮牵牛的花瓣唇部特异性表达^[10]。2001年, Aida等将 *CHS* 反义基因转入蓝猪耳 (*Torenia fournieri* L.) 中, 得到具有波浪边缘的花朵^[11]。2010年, 霍凤梅等克隆了洋葱 (*Allium cepa* L.) 的查尔酮合酶基因 *AcCHS1* 和 *AcCHS2*, 其中 *AcCHS1* 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列大小为 1 182 bp, 编码 393 个氨基酸残基; *AcCHS2* 的开放阅读框序列大小为 1 176 bp, 编码 391 个氨基酸残基, 且在同等条件下, *AcCHS2* 的表达水平明显高于 *AcCHS1*^[12]。

2.2 查尔酮异构酶 查尔酮异构酶催化由查尔酮生成 (2S)-柚皮素 (2S-naringenin) 的反应^[13]。编码该酶的基因 *CHI* 是一个多基因家族, 单倍体基因组 (Haploid genome) 中含有 *CHI* 的 2 个拷贝 *CHI A* 和 *CHI B*。*CHI A* 在所有开花组织中均表达, 不含内含子; *CHI B* 仅在花药 (Anther) 中表达。

1987年, 研究者利用抗体技术 (Antibody technology) 首次从法国豌豆 (*Pisum sativum* L.) 中分离出 *CHI*^[14], 随后陆续从矮牵牛、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)、玉米、豌豆、苜蓿 (*Medicago sativa* L.)、翠菊 (*Callistephus chinensis* L.) 等多种植物中克隆到 *CHI*。2003年, Shimada等发现, *CHI* cDNA 序列的同源性 (Homology) 一般为 42% ~ 65%, 即使在同一物种间不同类型的 *CHI* 差异也较大^[15]。2005年, Nishihara等通过抑制 *CHI* 活性, 使康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.)、翠菊、仙客来 (*Cyclamen persicum* L.) 花朵颜色变为黄色^[13]。2009年, 许志茹等克隆了津田芜菁 ('Tsuda' *Brassica campestris* L.) 和赤丸芜菁 ('Yurugi Akamam' *Brassica campestris* L.) 的查尔酮

异构酶基因, 并研究其表达特性, 证明这 2 个基因的表达受 UV-A 诱导^[16]。因此, 通过抑制查尔酮异构酶活性而积累查尔酮或查尔酮衍生物是得到黄色花卉的主要途径。

2.3 黄烷酮-3-羟化酶 黄烷酮-3-羟化酶属氧化戊二酸依赖型加氧酶 (Oxoglutarate dependent dioxygenases) 家族, 是黄烷酮、儿茶酸 (Catechin)、原花青素 (Proanthocyanidins) 和花青素代谢途径的关键酶, 需二价铁离子、氧气和抗坏血酸烟碱作为共因子^[17]。其催化 4, 5, 7-三羟基黄烷酮 (Naringenin) 生成二氢黄酮醇。由于二氢黄酮醇是黄酮醇和花色素的共同前体, 因此 F3H 是位于类黄酮合成通路分支点处的关键酶。在矮牵牛中, 该酶由 369 个氨基酸组成, 其中 His220、His278、Arg222、Ser290 残基对酶的活性起至关重要的作用^[18-20]。目前已从拟南芥、矮牵牛、玉米、金鱼草、茄子 (*Solanum melongena* L.)、苜蓿、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、柑橘 (*Citrus reticulata* L.)、康乃馨、翠菊等植物中克隆到 *F3H*。研究表明, *F3H* 在大多数物种中仅以单拷贝形式存在^[21-23]。1991年, Martin等对 *F3H* 的调控研究发现, 已有 3 个调节位点 Del、Eluta 和 Rosea 在金鱼草中被鉴定, 这 3 个位点的突变均会导致 *F3H* 表达量的下降^[24]。目前木本果树中 *F3H* 的研究远远落后于模式植物^[25]。

2.4 类黄酮-3'-羟化酶和类黄酮-3', 5'-羟化酶 类黄酮-3'-羟化酶和类黄酮-3', 5'-羟化酶都属于细胞色素 (Cytochrome) P₄₅₀ 酶家族, 分别催化黄酮的 B 环 3' 和 3', 5' 位置的羟化, 生成红色的花青素和蓝色的翠雀素^[26]。

在矮牵牛、拟南芥、紫苏 (*Perilla frutescens* L.)、甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 和其他植物中, 编码 *F3'H* 的 cDNA 序

列已被克隆,其相关的转录调控基因也被发现。在拟南芥中,种子颜色突变体 *ut7* 的种子由原本的深棕色变为浅棕色,也是由于 *F3'5'H* 被破坏之故^[27]。

在矮牵牛中,有2个拷贝编码 *F3'5'H:Hf1* 和 *Hf2*,其中 *Hf1* 对花色的贡献更大。在茄子、龙胆 (*Gentiana scabra* L.) 和草原龙胆 (*Eustoma grandiflorum* L.) 等植物中,也有相关基因序列的报道^[28]。由于 *F3'5'H* 是催化合成使花朵成为蓝色的关键色素翠雀素的酶,因此其多被用于基因工程育种,使天然不能合成翠雀素的观赏花卉产生蓝色花朵。Mol 等^[29] 与 Tanaka 等^[30] 将矮牵牛的 *F3'5'H* 和 *DFR* 导入一种可积累二氢山萘酚 (Dihydrokaempferol) 的白色康乃馨突变株内,导致翠雀素的积累,从而培育出淡紫色的 'Moondust-TM' 和深紫色 'Moonshadow-TM' 2 个康乃馨品系。*F3'5'H* 也被称为蓝色基因^[31],因此 *F3'5'H* 调控机理的研究是蓝色花分子育种的研究重点,也是当前国际花卉育种的研究热点。目前已从草原龙胆、仙客来 (*Cyclamen persicum* L.)、大豆、马铃薯、毛果杨 (*Populus trichocarpa* L.) 等植物组织中克隆到 *F3'5'H* 的全长 cDNA。

1993年, Toguri 根据茄子 *CYP75* 序列构建探针 (Probe), 从牵牛花蕾的 cDNA 文库中克隆了一个同源基因^[32], 该基因与茄子 *CYP75* 序列有 82% 的同源性, 说明这 2 个基因同属于 *CYP75* 家族, 并且试验只在合成飞燕草色素的矮牵牛植株中检测到此基因的转录产物, 说明此基因编码合成 *F3'5'H*。同年, Holton 等根据 *CYP* 酶家族保守的血红素结合区域设计简并引物, 从矮牵牛花瓣构建的 cDNA 文库筛选了 2 个阳性克隆。自 1996 年 Holton 等分离了矮牵牛的全长 *F3'5'H* 后, 其他研究人员利用同源克隆的方法相继在龙胆科 (*Gentianaceae*)^[33-34]、长春花 (*Catharanthus roses* L.)^[35]、风铃草 (*Campanula medium* L.)^[36]、蝴蝶草属 (*Torenia*)^[37]、蔓长春花 (*Vinca major* L.)^[38] 等约 13 种植物中分离到了 *F3'5'H*。

2003年, 张林玲等^[39] 从 '紫蓝色' 品系的矮牵牛总 DNA 中, 克隆到编码 *F3'5'H* 的 *Hf1* 和 *Hf2*, 将基因正向插入到植物表达中间载体中, 通过土壤农杆菌介导的方法转化 '淡粉色' 品系的矮牵牛, 得到 PCR 阳性植株, 序列分析表明: *Hf1* 全长 2 797 bp, 包括 3 个外显子, 2 个内含子, 其中一个开放阅读框编码 506 个氨基酸; *Hf2* 全长 2 223 bp, 包括 3 个外显子, 2 个内含子, 其中一个开放阅读框编码 509 个氨基酸。2005年, 徐碧玉等^[40] 从蓝色矮牵牛花瓣提取 RNA, 采用反转录 PCR (Reverse transcription PCR, RT-PCR) 方法获得了编码 *F3'5'H* 的 *Hf1* 和 *Hf2*, 将 *Hf2* 连接于 35S 启动子的下游, 构建了植物表达载体, 转化铁饱百合 (*Lilium longiflorum* L.), 获得经 PCR 筛选的转化植株, 序列分析表明, *Hf1* 长度为 1 514 bp, 编码 504 个氨基酸, *Hf2* 长度为 1 530 bp, 编码 510 个氨基酸^[40]。同年, Chun 等^[41] 从紫色马铃薯的叶片克隆到全长 1 530 bp 的 cDNA。2009年, 王琳等^[42] 通过 RT-PCR 从蓝色牵牛花花瓣中克隆类黄酮-3', 5'-羟基化酶基因全长 cDNA 为 1 773 bp, 该 cDNA 的 28 ~ 1 548 bp 位置上含一个开放阅读框和一个终止密码子, 编码 506 个氨基酸。

2.5 二氢黄酮醇-4-还原酶 二氢黄酮醇-4-还原酶是一个短链还原酶, 属 *DFR* 超家族^[43]。*DFR* 是花色苷生化合成途径中的关键酶, 是一个重要的调控点, 它是将二氢黄酮醇转变为花色苷反应的第 1 个酶, 这一反应需要 NADPH。*DFR* 能分别以二氢茨非醇 (Dihydrokaempferol, DHK)、二氢槲皮素 (Dihydroquercetin, DHQ) 和二氢杨梅黄酮 (Dihydromyricetin, DHM) 作为底物, 但因为不同物种的 *DFR* 对底物选择性不同, 所以最终合成了不同的花色苷, 呈现各异的颜色^[44]。

1985年, O'Reilly 等采用转座子标签技术从玉米和金鱼草中分离了 *DFR*^[45]。1989年, Beld 等以金鱼草 *DFR* 为探针分离了矮牵牛 *DFR*^[46]。1994年, Huits 等研究得出: 矮牵牛中包含 3 种不同的 *DFR* (*dfrA*、*dfrB*、*dfrC*), 但只有 *dfrA* 在花中转录, 同时他们用限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 作图技术和互补试验证实了 *dfrA* 对应 *An6* 座位^[47]。1995年, Tanaka 等从玫瑰 (*Rosa rugosa* L.) 花瓣中克隆 *DFR*, 转入淡粉红色矮牵牛中, 结果产生了矮牵牛缺乏的橙红色花葵素^[7]。1999年, Johnson 等将兰属 (*Cymbidium*) *DFR* 转入矮牵牛品系中, 发现兰属的 *DFR* 不能有效还原二氢茨非醇, 从而导致花葵素的缺乏^[48]。2007年, Petit 等鉴定了葡萄 *DFR* 的晶体结构, 发现它是由 3 个亚基组成的复合物, 具有专门的 NADPH 结合域^[49]。

2.6 花青素合酶 花青素合酶是位于花色苷合成通路末端的酶, 催化了无色花色苷向花色苷的转化。*ANS* 在催化反应时会选择携带有 1 个 'β-face' 碳, 3-羟基基团的二氢黄酮醇为底物, 并通过 'α-face' 脱水作用生成萘二醇。*ANS* 和 *F3H* 一样, 属氧化戊二酸依赖性加氧酶家族, 与类黄酮合成途径中黄酮醇合成酶 (Flavonol synthase, FLS) 具有保守的同源关系^[50]。

2003年, Carlo 等将 *CHS* 和 *ANS* 同时转入美国金钟连翘 (*Forsythia intermedia* L.), 获得了具有深橙黄色花朵的新品种, 而分别转入这 2 种基因则无改变花色的效果^[51]。2005年, Nakatsuka 等发现 *ANS* 的突变是导致龙胆花变为白色的重要原因^[52]。Wellmann 等在拟南芥中得到了 *ANS* 的晶体结构, 发现其活性位点是 1 个金属离子、共底物 (Cosubstrate) 和 2 分子的底物类似物 (Substrate analog) 共同构成的多复合体, *ANS* 首先在紫苏中被克隆^[53]。

2.7 类黄酮-3-转葡萄糖基酶 目前发现至少存在 3 个酶, 即二氢黄酮醇还原酶、花青素合成酶及类黄酮-3-*O*-转葡萄糖基酶 (Flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, 3GT) 参与最后阶段花青素的合成, 能将无色的二氢黄酮醇转化成有色的花色苷^[54]。

1985年, Dooner 等利用 *Ac* 转座子标签技术从玉米中分离出类黄酮 3-*O*-葡萄糖基转移酶的 *Bzl*^[55]。1991年, Martin 等以玉米的 *Bzl* 为探针从金鱼草中分离得到 3GT, 克隆 pJAM338^[24]。1995年, Tanaka 等从矮牵牛分离出 3GT^[33]。

3 结语

随着科技的发展, 人们对食品添加剂的安全性越来越重视, 至今合成色素的使用种类和数量已大幅度下降。因此,

开发和应用天然色素已成为世界食用色素发展的总趋势^[56],同时,天然色素的分子机制研究也越来越受重视,相信未来在彩色花卉的生产、绿色食品的开发与利用中,花色苷将倍受青睐。

参考文献

- [1] HOLTON T A, CORNISH E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1071-1083.
- [2] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [3] 卢钰, 董现义, 杜景平, 等. 花色苷研究进展[J]. *山东农业大学学报*, 2004, 35(2): 315-320.
- [4] HARBORNE J B. Flavonoids: distribution and contribution to plant color [C]//GOODWILL T W. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London and New York: Academic Press, 1965: 251-271.
- [5] DOONER H K, ROBBINS T P, JORGENSEN R A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis[J]. *Annual Review of Genetics*, 1991, 25: 173-199.
- [6] 葛静, 严海燕. 花色苷形成中的基因表达和调控[J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(2): 374-380.
- [7] TANAKA T, FUKU Y, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al. Molecular cloning and characterization of Rosa hybrid a dihedron flavones 4-reductase gene [J]. *Plant Cell Physiology*, 1995, 36(16): 1023-1031.
- [8] 陈丽. 植物转录因子的结构和功能[J]. *植物生理学通讯*, 1997, 3(6): 401-409.
- [9] REIMOLD U, KROEGER M, KREUZALER F, et al. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthasemes senger RNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme[J]. *EMBO Journal*, 1983, 2(10): 1801-1805.
- [10] KOBAYASHI H, OIKAWA Y, KOIWA H, et al. Flower-specific gene expression directed by the promoter of a chalcone synthase gene from *Gentiana triflora* in *Petunia* hybrida[J]. *Plant Sci*, 1998, 131(2): 173-180.
- [11] AIDIA R, KISHIMOTO S, SHIBATA M. A transgene locus is required for wavy-patterned flowers of transgenic *Torenia yournieri* plants[J]. *Annals Botany*, 2001, 87: 405-409.
- [12] 霍凤梅, 缪军, 张一卉, 等. 洋葱查尔酮合成酶基因的分子克隆和表达分析[J]. *山东农业科学*, 2010(5): 1-4.
- [13] NISHIHARA M, NAKATSUKA T, YAMAMURA S, et al. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6074-6078.
- [14] MEHDY M C, LARNB C J. Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor wounding and infection[J]. *EMBO Journal*, 1987, 6(6): 1527-1533.
- [15] SHIMADA N, AOKI T, SATO S, et al. A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume specific 5-deoxy (iso) flavonoids in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(3): 941-951.
- [16] 许志茹, 崔国新, 李春雷, 等. 津田芡菁和赤丸芡菁查尔酮异构酶基因的克隆及表达特性[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(1): 62-65.
- [17] MELDGAARD M. Expression of chalcone synthase, dihydroflavonol reductase and flavanone-3-hydroxylase in mutants of barley deficient in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 695-706.
- [18] BRITSCH L, RUHNAN-BRICH B, FORKMANN G. Molecular cloning sequence analysis and invitro expression of flavanone 3beta-hydroxylase from *Petunia hybrida* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 5380-5387.
- [19] LUKACIN R, BRITSCH L. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3-beta-hydroxylase [J]. *European Journal Biochemistry*, 1997, 249(3): 748-757.
- [20] LUKACIN R, GRONING I, PIEPER U, et al. Site-directed mutagenesis of the active site serine 290 in flavanone 3-beta-hydroxylase from *Petunia hybrida* [J]. *European Journal Biochemistry*, 2000, 267(3): 853-860.
- [21] DEBOO G B, ALBERTSEN M C, TAYLOR L P. Flavonone 3-beta-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in Maize anthers[J]. *Plant Journal*, 1995, 7(5): 703-713.
- [22] CHARRIER B, CORONADO C, KONDOROSI A, et al. Molecular characterization and expression of alfalfa flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol-4-reductase encoding genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29(4): 773-786.
- [23] PELLETIER M K, SHIRLEY B W. Analysis of flavanone 3-hydroxylase in Arabidopsis seedlings Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(1): 339-345.
- [24] MARTIN C, PRESCOTT A, MACKAY S. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Plant Journal*, 1991(1): 37-49.
- [25] 张大生, 崔丽洁, 王景明, 等. 红巴梨 3h 基因的克隆及植物表达载体的构建[J]. *南京林业大学学报*, 2005, 29(2): 65-68.
- [26] JEONG S T, HASHIZUME K, ESAKA M, et al. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 61-69.
- [27] XUA B B, LIA J N, ZHANG X K, et al. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 164: 350-363.
- [28] SHIMADA Y, NAKANO-SHIMADA K, OHBAYASHI M, et al. Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants [J]. *FEBS Lett*, 1999, 461(3): 241-245.
- [29] MOL J, CORNISH E, MASON J, et al. Novel colored flowers [J]. *Curr Opin Biotech*, 1999, 10: 198-201.
- [30] TANAKA Y, TSUDA S, KUSUMI T. Metabolic engineering to modify flower color [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(11): 1119-1126.
- [31] HOLTON T A, TANAKA Y. Blue roses—a pigment of our imagination [J]. *Trends Biotechnology*, 1994, 12: 40-42.
- [32] TOGURI T, UMEMOTO N, KOBAYASHI O, et al. Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyls tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23(5): 933-946.
- [33] TANAKA Y, YONEKURA K, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al. Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora* [J]. *Plant Cell Physiology*, 1996, 37(5): 711-716.
- [34] NIELSEN K M, PODIVINSKY E. cDNA cloning and endogenous expression of a Flavonoid 3',5'-hydroxylase from petals of *lisianthus* (*Eastoma grandiflorum*) [J]. *Plant Science*, 1997, 129: 167-174.
- [35] KALTENBACH M, SCHRODER G, SCHMELZER E, et al. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-specific expression in plants [J]. *Plant Journal*, 1999, 19(2): 183-193.
- [36] OKINAKA Y, SHIMADA Y, NAKANO-SHIMADA R, et al. Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium* [J]. *Biosci Biotechnology Biochemistry*, 2003, 67(1): 161-165.
- [37] AIDA R, YOSIDA K, KONDO T, et al. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense transformation [J]. *Plant Science*, 2000, 160: 49-56.
- [38] MORI S, KOBAYASHI H, HOSHI Y, et al. Heterologous expression of the flavonoid-3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida* [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 415-421.
- [39] 张林玲, 金志强, 苏伟. 类黄酮 3'5'羟基化酶基因的克隆及转化矮牵牛 [J]. *科学技术与工程*, 2003, 4(3): 352-355.
- [40] 徐碧玉, 刘菊华, 金志强. 类黄酮 3',5'羟基化酶基因的克隆及转化铁炮百合 [J]. *园艺学报*, 2005, 32(6): 1051-1055.
- [41] CHUN S J, HELEN M, GRIFFITHS D M, et al. The potato Plocus codes for flavonoid 3',5'-hydroxylase [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2005, 110(2): 269-275.
- [42] 王琳, 向太和. 矮牵牛 F3'5'H 全长 cDNA 的克隆及花特异启动子介导表达载体的构建 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2009, 17(4): 358-364.
- [43] MARTENS S, TEERI T, FORKMANN G. Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants [J]. *FEBS Letter*, 2002, 531: 453-458.
- [44] 刘娟, 冯群芳, 张杰. 二氢黄酮醇 4-还原酶基因 (DFR) 与花色的修饰 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(6): 715-719.
- [45] O'REILLY C, SHEPHERD N S, PEREIRA A, et al. Molecular cloning of the al locus in *Zea mays* using the transposable elements En and Mu1 [J]. *EMBO Journal*, 1985, 4: 877-882.
- [46] BELD M, MARTIN C, HUIJS H, et al. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: Partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 13(5): 491-502.

育期^[8]。多数品种以及平均值在低于 1 620.0 m 海拔时,千粒重随海拔的降低而增加,在高于 1 620.0 m 时,千粒重以保山为低谷,随海拔的升高而呈“V”型分布。有效穗数在低于 1 430.0 m 时,随海拔的降低而增加;在高于 1 620.0 m 时,有效穗随海拔的升高而增加。在海拔低于 1 460.0 m 时,成穗率随海拔的升高而增加,且总体上成穗率高于海拔 1 430.0 m 以上的。当海拔高于 1 430.0 m 后,成穗率与海拔不呈线性关系,海拔差异较小的各试点成穗率存在较大差异。同一海拔,各品种间成穗率差异较大。有效穗、成穗率受品种遗传因素影响,同时受当地小气候影响,特别是各试验点湿度、温度、风速等。产量不随海拔的增高而增加或降低,低海拔的文山、红河及中海拔的保山、高海拔的大理总体产量较低,各品种产量在不同海拔点变幅较大,且品种与品种间的最高产和最低产变幅均较大。可能由于云南各地气候存在小气候,各地平均最低气温高低不一,使得昼夜温差随海拔的变化而变化,影响小麦的净光合速率和夜间呼吸速率,从而导致产量不随海拔的变化而呈规律变化^[9]。此外,试验地点的土壤类型、肥力水平、栽培措施等都会对产量的变化产生一定影响。

各海拔点主要性状与产量的关联度均不同,关联度与海拔的变化没有呈现明显的线性关系。海拔相近的中海拔各性状与产量的相关性基本一致,但海拔相当的低海拔和高海拔各性状与产量的相关性差异较大。不同海拔下各经济性状与产量关联度的变幅差异较大。海拔的变化对温度、湿

度、日照、风速等均有影响,以及播种期和品种类型不同,小麦各性状在不同海拔的表现不一致^[10],对产量的贡献也不一致。

不同品种由于适应性不同产量构成因素不同,在不同海拔的产量构成不同,今后应加大品种的广适性试验,以便该品种发挥出更大的应用价值。该研究仅以海拔为主要研究对象,没有充分考虑气候、土壤等因素,研究具有一定的局限性,今后应综合考虑其他影响因子,提高研究结果的可参考性。

参考文献

- [1] 吴东兵,曹广才,强小林,等.生态高度与小麦品质的关系[J].麦类作物学报,2003,23(2):47-51.
 - [2] 吴姝,张树源,沈允钢.昼夜温差对小麦光合特性的影响[J].西北植物学报,1998,18(1):103-109.
 - [3] 程加省,于亚雄,杨金华,等.旱地小麦品种抗旱性的生理生化指标分析及评价[J].大麦与谷类科学,2007(3):30-32.
 - [4] 程加省,于亚雄,勾宇宏,等.云南旱地小麦品种的抗旱性研究[J].云南农业大学学报,2007,22(1):13-16.
 - [5] 唐启义.实用统计分析及其DPS数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002.
 - [6] 李家修,张成琦,赵致,等.纬度和海拔对我国西南高原地区小麦生长发育的影响[J].贵州农学院学报,1993,12(2):7-19.
 - [7] 曹广才,吴东兵,李家修,等.纬度和海拔对小麦生长发育的影响[J].西南农业学报,1993(2):1-11.
 - [8] 王力,李凤霞,徐维新,等.青海高原不同海拔高度区小麦生长对气候变暖的响应[J].气候变化研究进展,2011,7(5):324-329.
 - [9] 程士斌,赵阳林,盛守龙,等.春小麦穗分化不同阶段对小穗数的影响[J].现代农业科技,2010(22):62-63.
 - [10] 谭亚玲,洪汝科,陈金凤,等.海拔高度对不同水稻品种生长的影响研究[J].种子,2009(7):27-30.
-
- (上接第 2869 页)
- [47] HUIJS H,GERATS A,KREIKE M,et al. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*[J]. Plant Journal, 1994,6(3):295-310.
 - [48] JOHNSON E T,YI H,SHIN B,et al. Cymbidium hybrid a dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins[J]. Plant Journal,1999,19(1):81-85.
 - [49] PETIT P,GRANIER T,LANGLOIS B,et al. Crystal structure of grape dihydro flavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis[J]. Journal of Molecular Biology,2007,368(1):1345-1357.
 - [50] ROSATI C,CADIC A,DURON M,et al. Molecular characterization of t heanthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development[J]. Plant Science,1999,149:73-79.
 - [51] CARLO R,PHILIPPE S,DIETER T,et al. Engineering of flower color in *forsythia* by expression of two independently-transformed dihydroflavonol-4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway[J]. Molecular Breed,2003,12:197-208.
 - [52] NAKATSUKA T,NISHIHARA M,MISHIBA K,et al. Two different mutations are involved in the formation of white flowered gentian plants[J]. Plant Science,2005,169:949-958.
 - [53] WELLMANN F,GRIESSER M,SCHWAB W,et al. Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin[J]. FEBS Letters,2006,580:1642-1648.
 - [54] 刘仕芸,黄艳岚,张树珍.植物花青素生物合成中的调控基因[J].植物生理学通讯,2006,42(4):747-754.
 - [55] DOONER H K,WECK E,ADAMS S,et al. A molecular genetic analysis of insertions on the bronze locus in maize[J]. Molecular Genetics, 1985, 200:240-246.
 - [56] LI H J,ZHOU X M,ZHANG W Q. Effect of Enhanced Ultraviolet-B Radiation on Photosynthetic Pigments and Flavonoids in the Leaves of Grapevine[J]. Agricultural Science & Technology,2011,12(12):1849-1852.