



蓝色花形成分子机理研究进展

张泰然¹, 张和臣², 武荣花^{1*}

¹河南农业大学林学院, 郑州 450002; ²河南省农业科学院园艺研究所, 郑州 450002

摘要 花色是观赏植物的重要特征, 在自然界中蓝色花占比很少, 很多观赏植物都缺少蓝色种质。因此, 研究蓝色花形成的分子机理对于蓝色花定向育种具有重要意义。研究表明, 花色的形成主要是通过花青苷积累, 花青素通过糖基化形成花青苷, 再通过酰基、甲基化修饰及金属离子络合反应, 在特定的液泡pH环境中呈现出稳定的蓝色。该文从花青苷合成与代谢途径入手, 对蓝色花形成关键基因功能、花青苷各位点酰化的影响、金属离子的作用、液泡pH值相关基因研究及蓝色花分子育种等方面进行综述。

关键词 酰化, 花青苷合成通路, 液泡pH值, 金属离子, 蓝色花, 基因工程

张泰然, 张和臣, 武荣花 (2020). 蓝色花形成分子机理研究进展. 植物学报 55, 216–227.

花色是观赏植物的一个重要表现特征(Tanaka et al., 2008), 蓝色花花卉产业中需求旺盛。然而自然界中具有蓝色花的植物数量却相对较少。以云南省为例, 全省被子植物共17 000种, 其中蓝色花植物450种, 只占全省植物资源的2.7% (杨少勇和樊国盛, 2002)。切花中, 月季(*Rosa chinensis*)和康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)尚未拥有真正意义上的蓝色花; 通过转基因手段只获得了紫色或蓝紫色种质(Tanaka et al., 1998, 2009; Sasaki and Nakayama, 2014)。菊花(*Dendranthema morifolium*)通过转基因技术于2017年获得真正意义上的蓝色花(Noda et al., 2017)。因此, 研究蓝色花形成的分子机理对于花卉新品种培育具有十分重要的意义。本文从花青苷合成与代谢途径、酰化对花青苷呈色及稳定的影响、金属离子对花青苷的作用、液泡pH值相关基因以及蓝色花分子育种等方面进行综述, 以期对蓝色花种质创建提供借鉴。

1 蓝色花形成的分子基础

作为植物色素, 花青苷在植物的花瓣呈色中起重要作用, 控制着从粉色到蓝紫色一系列花色(Zhao and Tao, 2015)。花青素分子在单体的情况下极不稳定,

易在中性或弱酸性介质中被水解失色。因此, 花青素生成的蓝色往往还需要通过糖基化形成花青苷, 之后再通过酰化、甲基化、金属离子络合、共染色和液泡pH值等条件来加强蓝色的稳定性(杨少勇等, 2003; Tanaka et al., 2009; Yoshida et al., 2009b)。

1.1 花青苷生物合成途径

花青苷合成途径是植物次生代谢的重点研究领域, 合成途径关键基因的研究对蓝色花基因工程育种有重要意义(Sasaki and Nakayama, 2014)。花青苷合成途径可分为3个主要阶段。第1阶段是通过苯丙氨酸氨裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)和4-香豆酸CoA连接酶(4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL)将苯丙氨酸转化为香豆酸-CoA。第2阶段通过查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)和查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)得到黄烷酮, 之后通过黄烷酮3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)得到二氢黄酮醇(二氢山奈酚, dihydrokaempferol, DHK), DHK可分别通过类黄酮3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮3',5'-羟化酶(flavonoid 3',5'-hydroxylase, F3'5'H)得到2种不同的二氢黄酮醇, 分别为

收稿日期: 2019-02-18; 接受日期: 2019-09-24

基金项目: 河南省农业科学院优秀青年基金(No.2020YQ17)

* 通讯作者。E-mail: 285324689@qq.com

二氢槲皮素(dihydroquercetin, DHQ)和二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)。第3阶段是通过二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol reductase, DFR)和花色素合成酶(anthocyanin synthase, ANS)催化二氢黄酮醇得到花青素(anthocyanidin), 之后通过糖基转移酶(glycosyltransferases, GT)使花青素糖基化生成花青苷(anthocyanin), 再通过酰基转移酶(acyltransferases, AT)和/或甲基转移酶(methyltransferase, MT)等修饰, 最终生成蓝色花青苷(图1) (Zhao and Tao, 2015; Bombarely et al., 2016)。

*CHS*是花青苷合成中的首个关键酶基因, 该基因编码的酶使1个分子的香豆酸-CoA与3个分子的丙二酰-CoA结合形成查尔酮。Dare等(2013)通过对苹果(*Malus × domestica*)中3种*CHS*基因进行RNAi处理, 在处理株系的根、叶和果皮等部位未检测到花青苷积累, 且二氢查尔酮与类黄酮浓度明显降低。Tai等(2014)通过对3种海棠(*Malus* sp.)植物中*CHS*和花青苷的RT-PCR分析表明二者成正比, 充分证明*CHS*在花青苷的合成积累中起重要作用。此外, 外界环境刺激对*CHS*的表达也有影响。Dehghan等(2014)通过对红花(*Carthamus tinctorius*)进行水杨酸和盐胁迫处理, *CHS*均出现表达上调。Sun等(2014)通过对香鳞毛蕨(*Dryopteris fragrans*)组培苗分别进行4℃低温、35℃高温和紫外线处理, *CHS*表达均有升高。

F3H、*F3'H*和*F3'5'H*是该途径合成中的另一组关键酶基因。自然界中大多数蓝色花的花青苷都由飞燕草素(delphinidin)组成, 而DHM是飞燕草素合成的必要底物。因此*F3'5'H*也被称为蓝色花的核心基因(Tanaka and Brugliera, 2013)。Holton等(1993)研究表明, *F3'5'H*属于细胞色素P450家族。Sato等(2011)发现*F3'5'H*启动子区域转座子的插入与缺失引起花色变化。目前, 已从多种植物中分离出*F3'5'H*基因并对其进行深入研究。在蓝色花育种中, 为避免底物竞争, 多数在导入*F3'5'H*基因的同时会对*F3'H*基因进行RNAi处理(Brugliera et al., 2013)。

DFR是具有底物特异性的酶, 不同植物中DFR的特异性表现不同(Martens et al., 2002)。康乃馨中DFR可以还原DHK、DHQ和DHM; 在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中DFR只能还原DHQ和DHM (Zhao and Tao, 2015)。Zhao等(2012)发现DFR的大量表达与花

青苷的积累呈正相关。

1.2 酰化对蓝色花形成的作用

花青苷可通过酰基转移酶以物种特异方式进行酰基化修饰。花青苷根据酰化的数量可分为单酰或多酰花青苷(杨少勇等, 2003)。由于蓝色花花青苷大多存在酰化现象, 所以花青苷的酰化一直被认为是蓝色花着色的重要步骤之一(Yoshida et al., 2009b)。花青苷的酰化由BAHD和SCPL两个不同的蛋白家族控制。BAHD家族使用酰基-CoA作为酰基供体, 在细胞质中对花青苷进行酰化修饰; SCPL家族则以酰基-葡萄糖作为酰基供体, 在液泡中进行酰化修饰(Miyahara et al., 2013; Nishizaki et al., 2013; Sasaki et al., 2014)。龙胆翠雀花素(gentio delphin)来自蓝色龙胆(*Gentiana makinoi*), 是第1个被发表的完整多酰花青苷, 龙胆翠雀花素是观赏龙胆植物蓝色花瓣的主要决定因素。龙胆翠雀花素在3位、5位和3'位3个位点上糖基化, 之后通过5位与3'位的糖苷酰化形成飞燕草素3-O-葡萄糖基-5-O-咖啡酰-葡萄糖基-3'-O-咖啡酰-葡萄糖苷的结构(图2) (Yoshida et al., 2009b)。Nakatsuka等(2010)通过RNAi技术沉默龙胆(*Gentiana* cv. 'Albireo')中负责3'与5位酰化的基因, 使植物只能产生飞燕草素3,5,3'-O-三葡萄糖苷的花青苷。酰化相关基因沉默植株的花色明显淡于野生型。这为酰化影响蓝色呈色提供了直接的体内证据。Ishii等(2017)通过对飞燕草品种的筛选得到AA7BG-GT1与AA7BG-GT2双敲除的突变体, 该突变体与野生型相比无法在7位的酰基上继续添加葡萄糖, 因此无法生成飞燕草苷(viol delphin), 其花色最终表现为淡粉色。

花青素本身很不稳定、易分解, 通过糖基化形成花青苷可以提升稳定性, 而花青苷的酰化可以大大增强稳定性。酰化的花青苷比非酰化的花青苷在高温、pH环境变化和强光等影响中稳定性更高。研究表明, 花青苷酰化的数量、位置以及种类对于花青苷的稳定及颜色有重要影响(Matsufuji et al., 2007; 李云等, 2010; Zhao et al., 2017)。Yoshida等(2000)通过碱性水解的方式从纯化的龙胆翠雀花素中分别得到3'位与5位的单酰花青苷与完全去酰基的花青苷。通过记录几种物质在水溶液中的UV-VIS光谱, 发现3'位的单酰基花青苷更蓝, 基本接近龙胆翠雀素本身。类似的结果也在蓝色新西兰蓝莓(*Dianella nigra*)浆果的花青苷分析中得到验证。

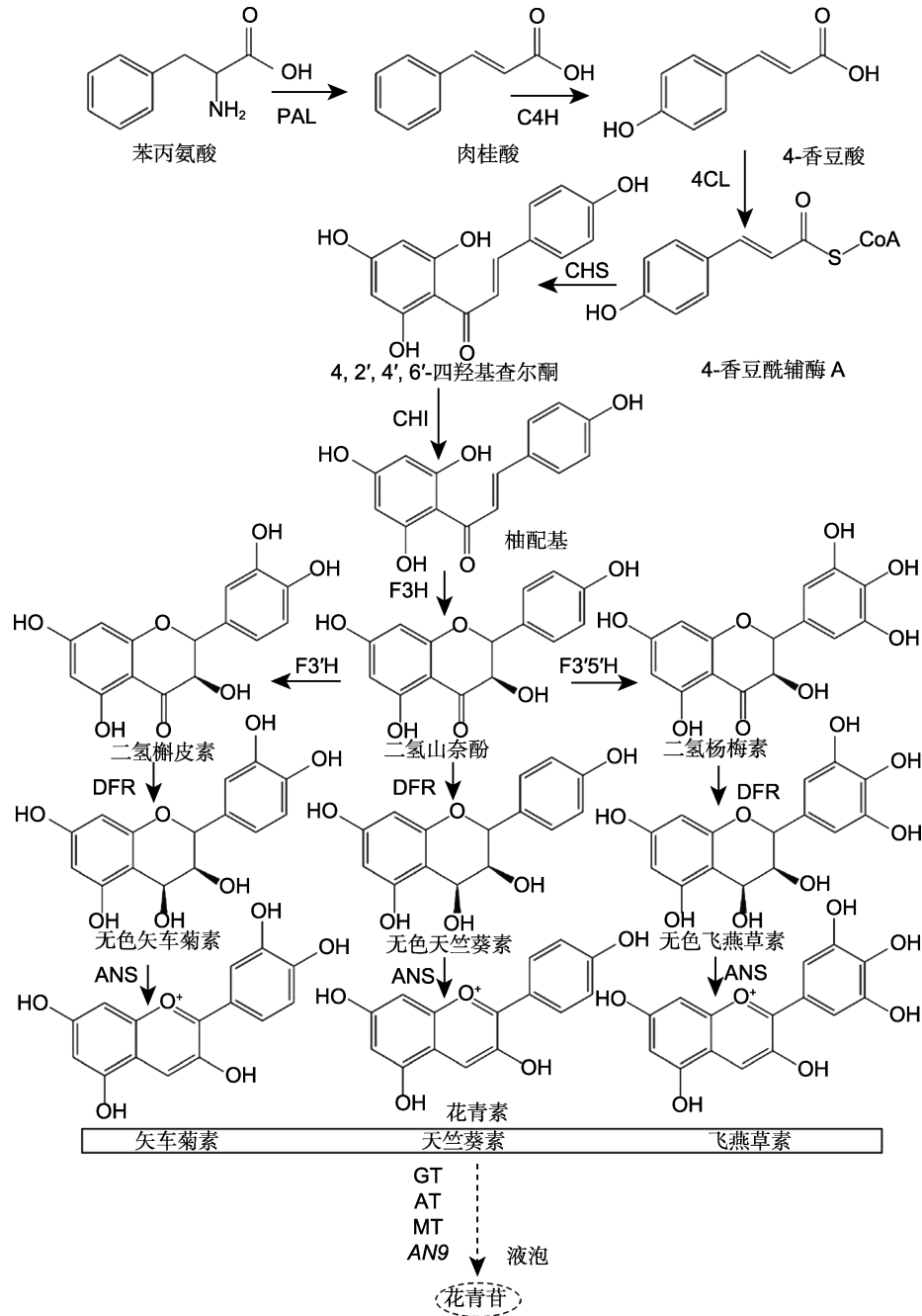


图1 花青苷生物合成途径

PAL: 苯丙氨酸氨裂解酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; 4CL: 4-香豆酸CoA连接酶; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3H: 黄酮3-羟化酶; F3'H: 类黄酮3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮3',5'-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇还原酶; ANS: 花色素合酶; GT: 糖基转移酶; AT: 酰基转移酶; MT: 甲基转移酶; AN9: 花青苷合成基因9

Figure 1 The anthocyanin biosynthetic pathway

PAL: Phenylalanine ammonialyase; C4H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-coumaroyl-CoA ligase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3H: Flavanone 3-hydroxylase; F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase; F3',5'H: Flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol reductase; ANS: Anthocyanin synthase; GT: Glycosyltransferases; AT: Acyltransferases; MT: Methyltransferase; AN9: Anthocyanin 9

蓝莓浆果中以飞燕草素-3,7,3',5'-四葡萄糖苷为基础, 含3种分别具有2-4个对香豆素-葡萄糖(p-coumaroyl-glucose, GC)单位的花色素。Bloor (2001)发现B环上的酰基堆积比A环和C环更强, 强弱排序为3',5'-GC>7-GC>3-GC。3GC与4GC两种花色素的混合是果汁深蓝色的关键(图2)。Sigurdson等(2017b)通过对矢车菊素(cyanidin)酰化的研究表明, 酰化种类与数量的不同对花青苷与金属络合物的蓝色表达有明显影响。影响作用大小为二酰化矢车菊素 λ_{\max} >单酰化矢车菊素 λ_{\max} >无酰化矢车菊素 λ_{\max} 。在二酰化矢车菊素与单酰化矢车菊素中, 随酰化种类的不同 λ_{\max} 还存在一定的差异。Nishizaki等(2013)通过酰基-葡萄糖依赖性花青素7-O-葡萄糖苷酰基转移酶(acyl-Glc-dependent anthocyanin 7-O-glucoside acyltransferase, AA7G-AT)在蓝色翠雀(*Delphinium grandiflorum* cv. 'Triton Light Blue')的花青素提取物矢车菊素3,7-O-二葡萄糖苷(cyanidin

3,7-O-diglucoside)的7位添加对羟基苯甲酰, 产物在光谱中的最大吸收波长从520 nm移动到530 nm, 证实7位酰化对蓝色花形成的作用。Sigurdson等(2018b)通过对花青苷酰基顺反的研究, 发现花青苷的顺式酰化异构体比反式酰化异构体表现出更好的蓝色, 可更有效保护花青苷免于水合反应。此外, 研究表明, 单一的花青素糖基化也可以使花青素产生蓝色, 但不同位点与数量的花青素糖基化所产生的差异十分明显(Zhao et al., 2014, 2017; Sigurdson et al., 2018a); 且单纯的糖基化产生的蓝色比酰化后花青苷产生的蓝色要弱(Nakatsuka et al., 2010; Sigurdson et al., 2016, 2017a)。

1.3 金属离子对花青苷的影响

花瓣液泡中金属离子对蓝色花的形成有重要作用。目前发现的大多数蓝色花瓣中都存在金属离子, 金属离

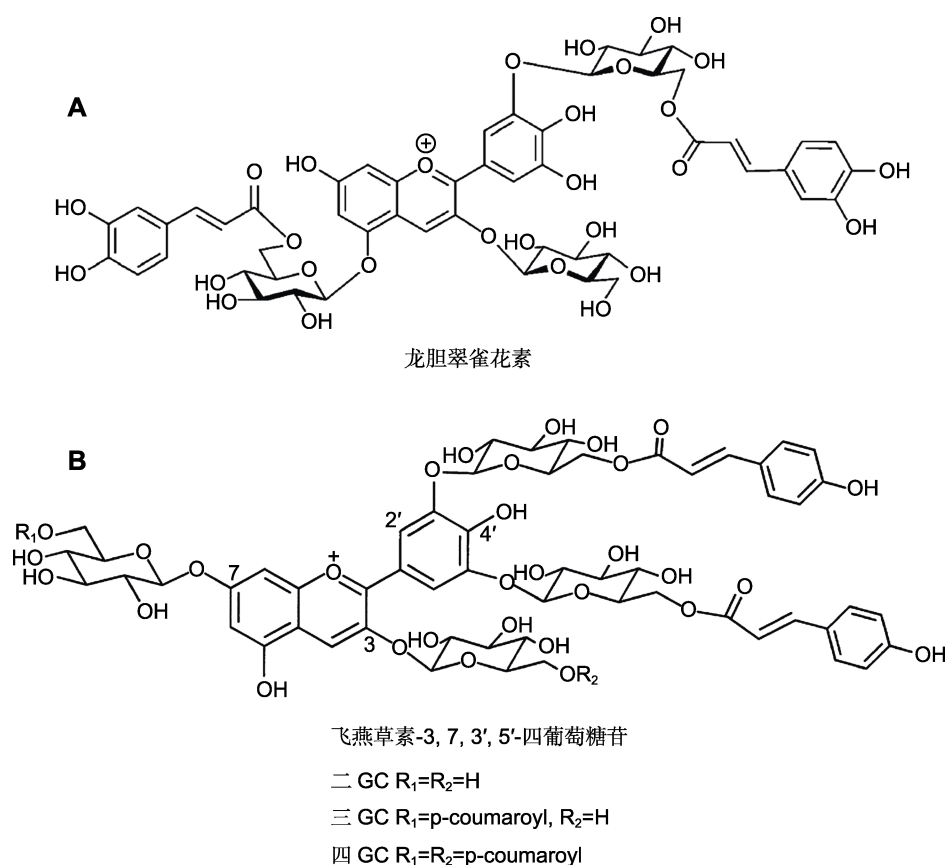


图2 花青苷酰化结构(Yoshida et al., 2000; Boor, 2001)

Figure 2 Acylated anthocyanin structure (Yoshida et al., 2000; Boor, 2001)

子被认为是蓝色花形成的一个重要组件(Tanaka et al., 2009)。研究金属离子对花青苷显色与稳定的作用对蓝色花育种十分重要。

1.3.1 金属花青苷

金属花青苷是一种自组装的超分子金属络合物, 由化学计量的花青苷、黄酮和金属离子以6:6:2的比例组合而成(图3) (Tanaka et al., 2009)。目前已经发现鸭跖草苷(commelina)、原矢车菊苷(protocyanin)、原飞燕草苷(protodelphin)、含氰鼠尾草苷(cyanosalvianin)和粉蝶花苷(nemophilin)共5种金属花青苷(表1; 图4) (Hondo et al., 1992; Kondo et al., 1994; Takeda et al., 1994; Mori et al., 2008; Yoshida et al., 2015)。鸭跖草苷和原矢车菊苷是最先被研究的2种金属花青苷, 通过解析成分, 得到2种金属花青苷的金属离子成分分别为 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} (Tamura et al., 1986; Goto and Kondo, 1991; Yoshida et al., 2009b)。Yoshida等(2009b)通过总结金属花青苷的构成, 报道了在不同发色团下, 形成蓝色花所需要的金属粒子类型, 在飞燕草素的发色团中 Mg^{2+} 就可以满足蓝色的生成; 在以矢车菊素或牵牛花素(petunidin)为发色团的情况下, 必须有 $1/6Fe^{3+}$; 天竺葵素(pelargonidin)或锦葵素(malvidin)的发色团则无法形成蓝色的金属混合物。

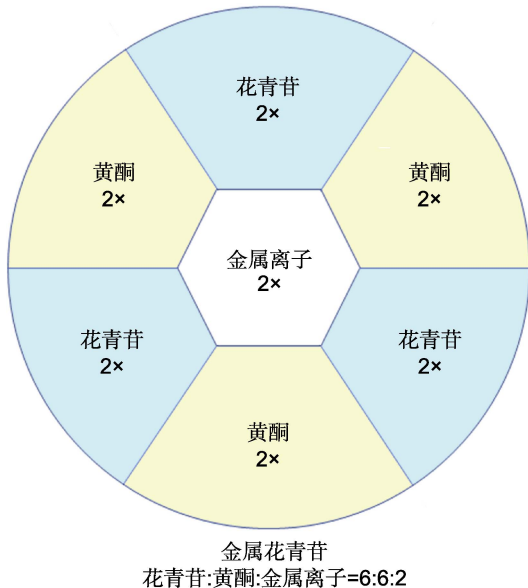


Figure 3 Formation of metalloanthocyanin (modified from Yoshida et al., 2009b)

表1 5种金属花青苷的成分(Yoshida et al., 2009a)

Table 1 Composition of five metalloanthocyanin (Yoshida et al., 2009a)

金属花青苷	来源	组成成分		
		花青苷	黄酮	金属离子
鸭跖草苷	鸭跖草 (<i>Commelina communis</i>)	A1	F1	Mg^{2+}
原矢车菊苷	矢车菊 (<i>Centaurea cyanus</i>)	A2	F2	Mg^{2+} , Fe^{3+}
原飞燕草苷	龙胆鼠尾草 (<i>Salvia patens</i>)	A1	F3	Mg^{2+}
含氰鼠尾草苷	天蓝鼠尾草 (<i>S. uliginosa</i>)	A3	F3	Mg^{2+}
粉蝶花苷	粉蝶花 (<i>Nemophila menziesii</i>)	A4	F4	Mg^{2+} , Fe^{3+}

花青苷类物质A1–A4和黄酮类物质F1–F4的化学结构见图4。

The chemical structures of anthocyanins A1–A4 and flavonoids F1–F4 are shown in Figure 4.

1.3.2 非化学计量金属络合花青苷

与金属花青苷相比, 非化学计量的金属络合物在蓝色花瓣中更为常见, 但与金属花青苷相比对花青苷稳定性的提升要小得多(Tanaka et al., 2009)。金属离子一般与B环上含有2–3羟基的花青素络合, 而单羟基花青素基本不发生这种络合反应(Sigurdson et al., 2016; Fedenko et al., 2017)。Shoji等(2007)发现郁金香(*Tulipa gesneriana*)花被的蓝紫差异是由于蓝色部分比紫色部分积累更多的 Fe^{3+} 。Sigurdson和Giusti (2014)通过向不同植物花青苷提取物中添加 $AlCl_3$, 发现所有的花青苷都与铝离子发生络合并表现出红移; 随着 $AlCl_3$ 浓度的增加, 吸光值也随之增加。Sigurdson等(2016)通过对酰化和非酰化的矢车菊素衍生物进行多种不同的金属络合, 发现所有金属离子都可使花青苷产生一定的红移与增色, 但不同金属离子产生的效果不同, 产生红移的金属离子作用大小为 $Fe^{3+} \approx Ga^{3+} > Al^{3+} > Cr^{3+} > Mg^{2+}$, 非酰化矢车菊素产生的红移要大于酰化的矢车菊素, 但最大吸光值小于酰化矢车菊素。Negishi等(2012)在绣球花(*Hydrangea macrophylla*)中鉴定了VALT和PALT1转运蛋白, 并确定这2个蛋白分别作用于液泡膜与胞质膜进行 Al^{3+} 转运。这表明金属离子转运蛋白在花青苷金属离子络合过程中起重要作用。

2 液泡pH影响呈色

2.1 液泡pH对花色的影响

液泡pH环境在花瓣的蓝色呈色中发挥重要作用。大量

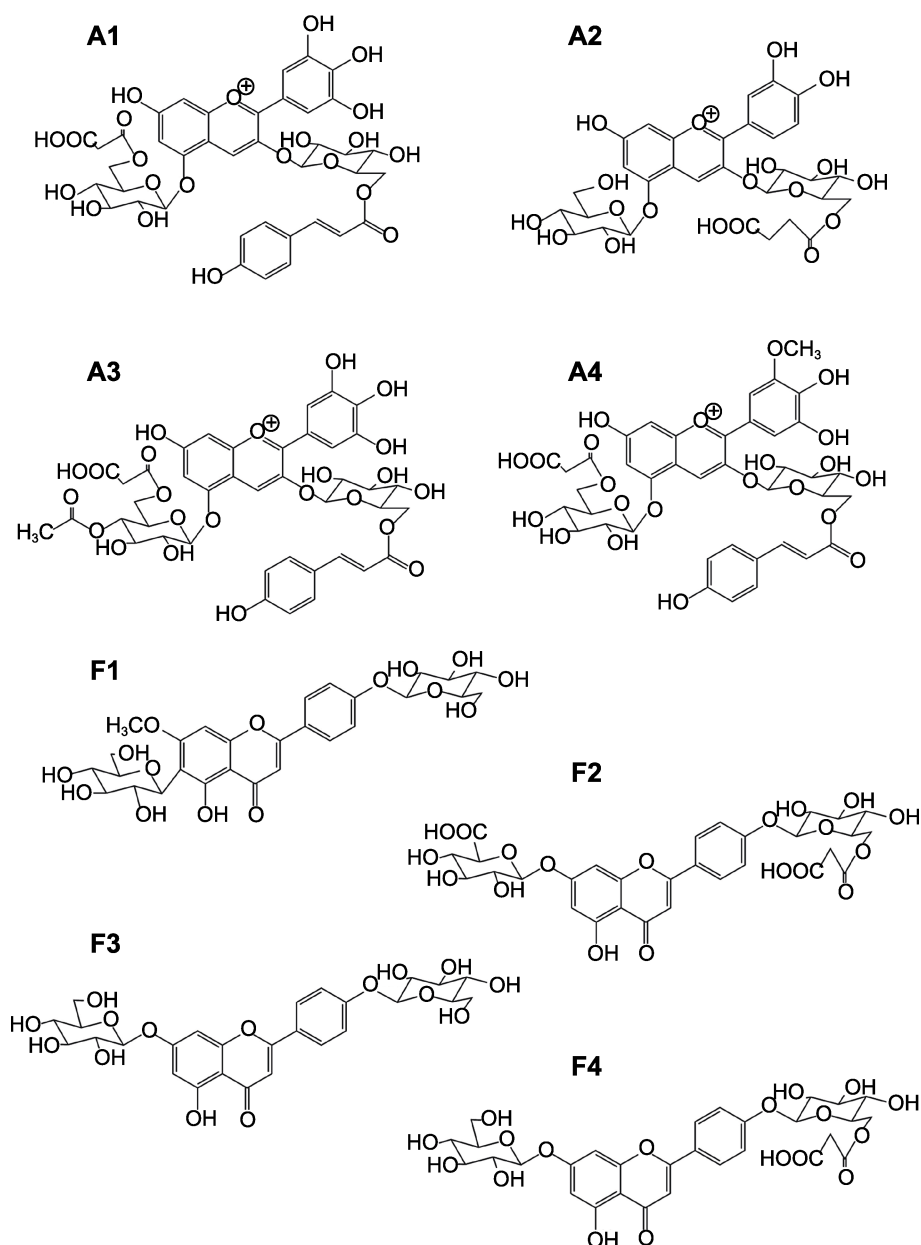


图4 金属花青苷组分结构(Yoshida et al., 2009b)

A1–A4为花青苷类物质; F1–F4为黄酮类物质。

Figure 4 Structure of metalloanthocyanin component (Yoshida et al., 2009b)

A1–A4 are anthocyanins; F1–F4 are flavonoids.

研究证明, 不同的液泡pH会使植物表现出不同的花色(Andersen and Fossen, 1995)。例如, 绣球花中, 蓝色花的pH值为4.1, 要高于红色花的3.3 (Yoshida et al., 2003)。Markham等(1997)对3种天竺葵(*Pelargonium hortorum*)进行了离体颜色的重建实验, 其中约翰逊蓝(Johnson's blue)只在pH6.6–6.8环

境下添加黄酮醇才能表现出与蓝紫色天竺葵约翰逊蓝相似的蓝色。在蓝色矮牵牛(*Ipomoea tricolor* cv. 'Heavenly Blue')中, 当花全开时颜色为蓝色, 在花苞状态则为红色, 在花发育的所有阶段, 花内花青素种类都相同, 只有液泡pH值在全开后从6.6上升到7.7 (Yoshida et al., 2009a)。Takamura和Matsazaki (2015)通过隐

性突变使仙客来(*Cyclamen persicum*)花瓣液泡pH值得以升高,在花青素种类不变的情况下实现了花色向蓝色的转变。Katsumoto等(2007)在对蓝色花分子育种的材料选择中重点强调对品种花瓣pH值的测定。Noda (2018)认为在蓝色花育种过程中引入相应的pH基因或选择pH值合适的植物材料十分重要。

2.2 调控液泡pH的相关基因

目前已知植物液泡的pH环境由PH1–PH7和InNHX1–InNHX2两组基因控制。PH1–7与H⁺的转运相关,而InNHX1–2负责K⁺/Na⁺的转运(Vlaming et al., 1983; Fukadatanaka et al., 2000)。Verweij等(2008)发现PH5编码的蛋白为定位于液泡膜上的H⁺P_{3A}-ATPase质子泵,负责向液泡运输氢离子,使液泡pH值下降。PH1最早被认为是一种编码Mg²⁺转运蛋白的基因,仅存在于细菌中(Kühlbrandt, 2004)。Faraco等(2014)通过对矮牵牛pH突变体的研究,发现PH1是一种定位于液泡膜上的P_{3B}-ATPase类型蛋白,该蛋白与PH5相互作用,可加强PH5的转运能力从而使液泡达到超酸化。PH3和PH4基因编码与转录因子AN1和AN11相互作用的WRKY和MYB蛋白,可调控PH5基因的表达(Faraco et al., 2017)。Fukadatanaka等(2000)研究表明,InNHX1和InNHX2基因编码K⁺/Na⁺的转运蛋白,可以提升液泡pH值。Ohnishi等(2005)研究表明,InNHX1在根、茎和叶中几乎不表达,开花前12个小时在花梗中开始表达;而InNHX2在根、茎和叶中表达,在花瓣中的表达逐渐增强。

3 蓝色花的分子育种

早在1987年, Meyer等(1987)就通过向矮牵牛中转入玉米(*Zea mays*) DFR基因获得了天竺葵素高表达的转基因植株,这是第1例花色转基因育种。Holton等(1993)首次从矮牵牛中分离出合成蓝色花的关键基因F3'5'H。后续研究表明,多数植物(如月季和菊花)无法产生蓝色花瓣就是由于缺少该基因。F3'5'H的发现对之后的蓝色花基因工程育种具有里程碑式的意义。Holton (2000)通过向康乃馨转入来自矮牵牛的F3'5'H和DFR,有效积累了飞燕草素,最终得到紫红色的康乃馨品种月影。Brugliera等(2013)认为,在转

基因月季中三色堇(*Viola* spp.)的F3'5'H比矮牵牛F3'5'H可更好表达并积累飞燕草素。Katsumoto等(2007)认为适合通过积累飞燕草素来实现蓝色的月季需要满足4个条件: (1) 积累共染色的黄酮醇; (2) 花瓣液泡具有较高的pH值; (3) 理想情况下,没有F3'H酶的活性; (4) 积累天竺葵素而不是矢车菊素。他们通过对筛选出的月季品种转入三色堇的F3'5'H和荷兰鸢尾(*Iris × hollandica*)的DFR基因,得到紫色月季品种掌声。Huang等(2013)指出在菊花(*Chrysanthemum × morifolium*)中单独转入F3'5'H并不能积累飞燕草素,只能表现出与菊花F3'H基因相似的功能。Brugliera等(2013)研究表明,月季CHS基因启动子和三色堇F3'5'H在转基因菊花中可以产生较高的飞燕草素,从而得到紫色的菊花。Noda等(2013)研究表明风铃草(*Campanula medium*) F3'5'H的cDNA对在菊花中积累飞燕草素具有高效作用,菊花F3'H启动子有最好的启动能力。Noda等(2017)通过转入菊花F3'H启动子控制蝶豆(*Clitoria ternatea*) CtA3'5'GT (anthocyanin 3',5'-O-glucosyltransferase)基因和风铃草F3'5'H基因,得到蓝色菊花,在转化后代中检测到3种新的花青苷,分别为矢车菊素3-O-(6"-O-丙二酰基)葡萄糖苷-3'-O-葡萄糖苷、飞燕草素3,3',5'-三-O-葡萄糖苷和飞燕草素3-O-(6-O-丙二酰基)葡萄糖苷-3',5'-二-O-葡萄糖苷(图5)。Zeinipour等(2018)提出一种可以快速辨别适合生产蓝色花月季品种的方法。该研究团队通过对30余个月季品种花瓣进行农杆菌介入的瞬时表达,评估了不同品种对载体表达转化的能力,为蓝色花育种提供了简便有效的方法。

4 展望

研究蓝色花形成的分子机理对创制蓝色花种质有重要意义。花青苷合成通路中相关基因的功能研究越来越受到重视, F3'5'H、DFR、AT及GT等重要基因陆续在各种植物中被克隆鉴定。许多研究也陆续验证了花青素糖基化、酰化、金属离子和液泡pH值对蓝色花产生的重要作用。虽然目前已经对蓝色花形成的各种机理进行了深入研究,但还存在一些需要解决的问题。(1) 单独转入F3'5'H基因很难得到蓝色花卉,在植物体内通过酰化和金属络合等方式合成蓝色的花青苷是一项解决方案。如何在植物内部构建适宜的pH环境

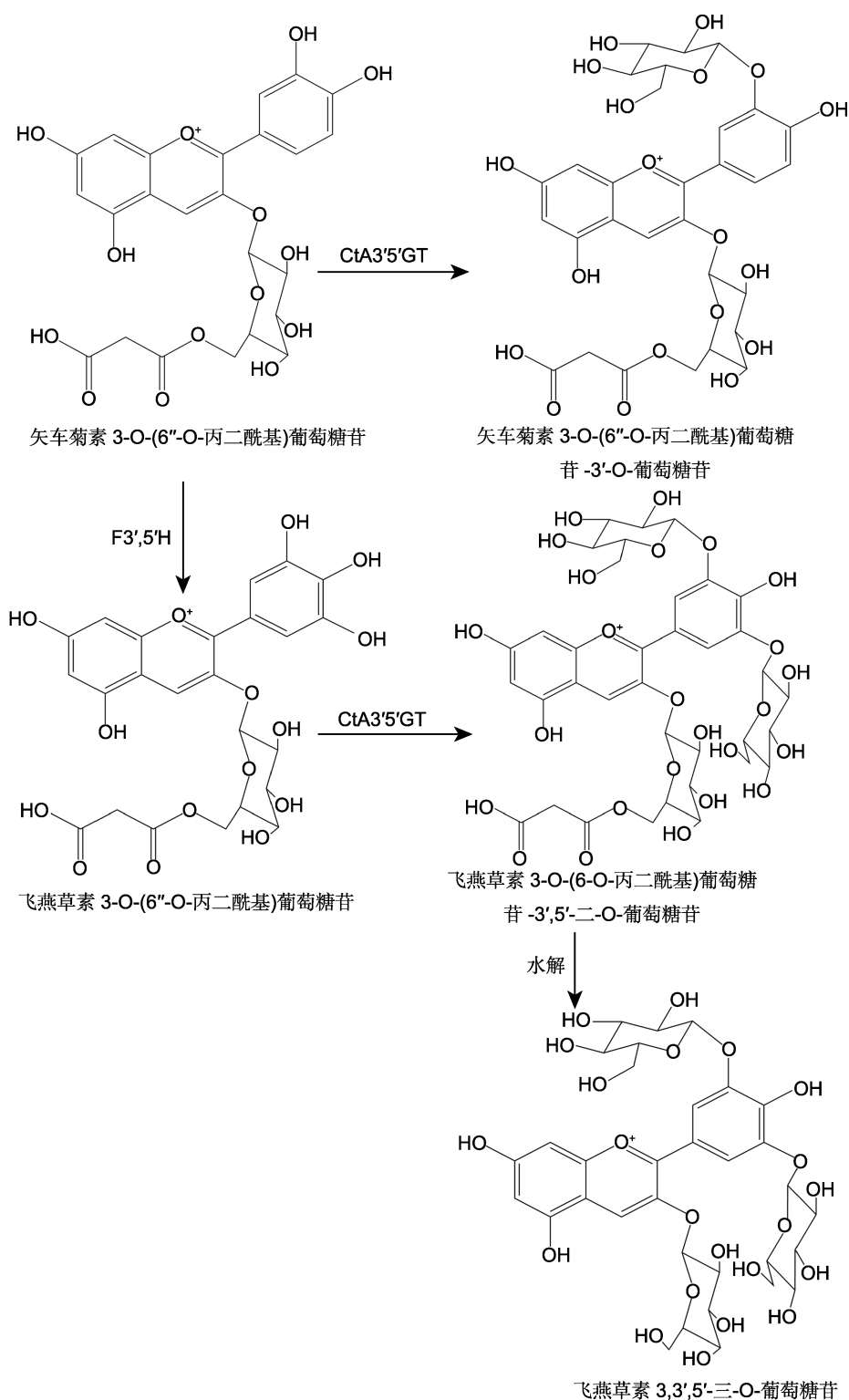


图5 转基因菊花花青苷合成途径(Noda et al., 2017)

Figure 5 The anthocyanin synthesis pathway in transgenic chrysanthemum (Noda et al., 2017)

并合成相应的花青苷将是未来创制蓝色花种质的研究方向。(2) 现有对金属络合物及酰化花青苷的研究

大多是在体外环境中进行的, 在体内环境中的验证较少, 还需要更多的体内证据。(3) $F3'5'H$ 作为飞燕草素

合成的核心基因,对蓝色花的形成起重要作用。我们研究发现,*F3'5'H*基因在生物体内十分活跃,通过研究其变化对飞燕草素合成的影响将有利于蓝色花的创制。近年来,国内也进行了大量的花色相关研究,如中国科学院植物研究所王亮生团队、北京林业大学戴思兰团队和西北农林科技大学刘雅丽团队。这些团队在芍药(*Paeonia lactiflora*)、菊花及风信子(*Muscari neglectum*)等花青苷合成通路基因鉴定、蓝色花瓣的金属元素含量测定、黄酮类化合物鉴别、液泡pH环境、花青苷合成调控的分子机理等方面做了大量有益的探索(钟培星等,2012;李慧波,2013;刘妮妮等,2014;戴思兰和洪艳,2016)。但是,在蓝色花分子育种方面,国内的研究还停留在转入*F3'5'H*基因来完成阶段,尚未得到具有蓝色花的后代种质(祁银燕,2013;曲爱爱,2016;刘爱玲,2016)。因此,关于蓝色花的分子育种还有很长的路要走。

参考文献

- 戴思兰,洪艳 (2016). 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种. 中国农业科学 **49**, 529–542.
- 李慧波 (2013). 影响单子叶植物蓝色花蓝色形成主要因子的研究. 硕士论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp. 30–45.
- 李云,赵昶灵,杨晓娜,李会容,周燕琼,苏丽 (2010). 花色苷分子结构与其稳定性以及呈色关系的研究进展. 云南农业大学学报 **25**, 712–720.
- 刘爱玲 (2016). 蓝色相关基因转化‘Robina’百合的研究. 硕士论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp. 28–31.
- 刘妮妮,姜倩,刘雅莉 (2014). 单子叶植物蓝色花基因工程育种方法研究. 见: 中国观赏园艺研究进展(2014). 青岛: 中国园艺学会观赏园艺专业委员会. pp. 158–164.
- 祁银燕 (2013). 两种单子叶植物蓝色花相关基因的功能验证. 博士论文. 杨凌: 西北农林科技大学. pp. 18–64.
- 曲爱爱 (2016). 菊花遗传转化体系建立及*VtF3'5'H*基因转化‘南农粉翠’的研究. 硕士论文. 南京: 南京农业大学. pp. 23–29.
- 杨少勇,安银岭,樊国盛,毕望富,王沙生 (2003). 蓝色花植物花色素的着色机理. 北京林业大学学报 **25**(5), 68–75.
- 杨少勇,樊国盛 (2002). 云南省蓝色花植物研究初探. 西南林学院学报 **22**(3), 11–15, 19.
- 钟培星,王亮生,李珊珊,徐彦军,朱满兰 (2012). 芍药开花过程中花色和色素的变化. 园艺学报 **39**, 2271–2282.
- Andersen ØM, Fossen T (1995). Anthocyanins with an unusual acylation pattern from stem of *Allium victorialis*. *Phytochemistry* **40**, 1809–1812.
- Bloor SJ (2001). Deep blue anthocyanins from blue *Dianella* berries. *Phytochemistry* **58**, 923–927.
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao MZ, Bapaume L, Barry CS, Bliet M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R, Bucher M, D’Agostino N, Davies K, Druege U, Dudareva N, Egea-Cortines M, Delledonne M, Fernandez-Pozo N, Franken P, Grandont L, Heslop-Harrison JS, Hintzsche J, Johns M, Koes R, Lv XD, Lyons E, Malla D, Martinoia E, Mattson NS, Morel P, Mueller LA, Muhlemann J, Nouri E, Passeri V, Pezzotti M, Qi QZ, Reinhardt D, Rich M, Richert-Pöggeler KR, Robbins TP, Schatz MC, Schranz ME, Schuurink RC, Schwarzacher T, Spelt K, Tang HB, Urbanus SL, Vandenbussche M, Vijverberg K, Vilarino GH, Warner RM, Weiss J, Yue Z, Zethof J, Quattrocchio F, Sims TL, Kuhlemeier C (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nat Plant* **2**, 16074.
- Brugliera F, Tanaka Y, Mason J (2013). Flavonoid 3',5'-hydroxylase gene sequences and uses therefor. US patent, 8445748. 2013-05-21.
- Brugliera F, Tao GQ, Tems U, Kalc G, Mouradova E, Price K, Stevenson K, Nakamura N, Stacey L, Katsumoto Y, Tanaka Y, Mason JG (2013). Violet/blue chrysanthemums—metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiol* **54**, 1696–1710.
- Dare AP, Tomes S, Jones M, McGhie TK, Stevenson DE, Johnson RA, Greenwood DR, Hellens RP (2013). Phenotypic changes associated with RNA interference silencing of chalcone synthase in apple (*Malus × domestica*). *Plant J* **74**, 398–410.
- de Vlaming P, Schram AW, Wiering H (1983). Genes affecting flower colour and pH of flower limb homogenates in *Petunia hybrida*. *Theor Appl Genet* **66**, 271–278.
- Dehghan S, Sadeghi M, Pöppel A, Fischer R, Lakes-Harlan R, Kavousi HR, Vilcinskis A, Rahnamaeian M (2014). Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Biosci Rep* **34**, e00114.
- Faraco M, Li YB, Li SJ, Spelt C, Di Sansebastiano GP, Reale L, Ferranti F, Verweij W, Koes R, Quattrocchio

- FM (2017). A tonoplast P_{3B}-ATPase mediates fusion of two types of vacuoles in petal cells. *Cell Rep* **19**, 2413–2422.
- Faraco M, Spelt C, Bliet M, Verweij W, Hoshino A, Espen L, Prinsi B, Jaarsma R, Tarhan E, de Boer AH, Di Sansebastiano GP, Koes R, Quattrocchio FM (2014). Hyperacidification of vacuoles by the combined action of two different P-ATPases in the tonoplast determines flower color. *Cell Rep* **6**, 32–43.
- Fedenko VS, Shemet SA, Landi M (2017). UV-vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: an overview of *in vitro* and *in vivo* techniques. *J Plant Physiol* **212**, 13–28.
- Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S (2000). Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* **407**, 581.
- Goto T, Kondo T (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins—flower color variation. *Angew Chem Int Ed* **30**, 17–33.
- Holton TA (2000). Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. US patent, 6080920. 2000-06-27.
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JGT, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993). Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* **366**, 276–279.
- Hondo T, Yoshida K, Nakagawa A, Kawai T, Tamura H, Goto T (1992). Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* **358**, 515–518.
- Huang H, Hu K, Han KT, Xiang QY, Dai SL (2013). Flower colour modification of chrysanthemum by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus F3'5'H* gene. *PLoS One* **8**, e74395.
- Ishii I, Sakaguchi K, Fujita K, Ozeki Y, Miyahara T (2017). A double knockout mutant of acyl-glucose-dependent anthocyanin glucosyltransferase genes in *Delphinium grandiflorum*. *J Plant Physiol* **216**, 74–78.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y (2007). Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* **48**, 1589–1600.
- Kondo T, Ueda M, Tamura H, Yoshida K, Isobe M, Goto T (1994). Composition of protocyanin, a self-assembled supramolecular pigment from the blue cornflower, *Centaurea cyanus*. *Angew Chem Int Ed* **33**, 978–979.
- Kühlbrandt W (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 282–295.
- Markham KR, Mitchell KA, Boase MR (1997). Malvidin-3-O-glucoside-5-O-(6-acetylglucoside) and its colour manifestation in 'Johnson's Blue' and other 'Blue' geraniums. *Phytochemistry* **45**, 417–423.
- Martens S, Teeri T, Forkmann G (2002). Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Lett* **531**, 453–458.
- Matsufuji H, Kido H, Misawa H, Yaguchi J, Otsuki T, Chino M, Takeda M, Yamagata K (2007). Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *J Agric Food Chem* **55**, 3692–3701.
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H (1987). A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**, 677–678.
- Miyahara T, Sakiyama R, Ozeki Y, Sasaki N (2013). Acyl-glucose-dependent glucosyltransferase catalyzes the final step of anthocyanin formation in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* **170**, 619–624.
- Mori M, Kondo T, Yoshida K (2008). Cyanosalvanin, a supramolecular blue metalloanthocyanin, from petals of *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry* **69**, 3151–3158.
- Nakatsuka T, Mishiba KI, Kubota A, Abe Y, Yamamura S, Nakamura N, Tanaka Y, Nishihara M (2010). Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *J Plant Physiol* **167**, 231–237.
- Negishi T, Oshima K, Hattori M, Kanai M, Mano S, Nishimura M, Yoshida K (2012). Tonoplast- and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant. *PLoS One* **7**, e43189.
- Nishizaki Y, Yasunaga M, Okamoto E, Okamoto M, Hirose Y, Yamaguchi M, Ozeki Y, Sasaki N (2013). *p*-Hydroxybenzoyl-glucose is a Zwitter donor for the biosynthesis of 7-polyacylated anthocyanin in *Delphinium*. *Plant Cell* **25**, 4150–4165.
- Noda N (2018). Recent advances in the research and development of blue flowers. *Breed Sci* **68**, 79–87.
- Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ohmiya A (2013). Genetic

- engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol* **54**, 1684–1695.
- Noda N, Yoshioka S, Kishimoto S, Nakayama M, Douzono M, Tanaka Y, Aida R** (2017). Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Sci Adv* **3**, e1602785.
- Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, Takada J, Inagaki Y, Iida S** (2005). Characterization of a novel Na^+/H^+ antiporter gene *InNHX2* and comparison of *InNHX2* with *InNHX1*, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol* **46**, 259–267.
- Sasaki N, Nakayama T** (2014). Achievements and perspectives in biochemistry concerning anthocyanin modification for blue flower coloration. *Plant Cell Physiol* **56**, 28–40.
- Sasaki N, Nishizaki Y, Ozeki Y, Miyahara T** (2014). The role of acyl-glucose in anthocyanin modifications. *Molecules* **19**, 18747–18766.
- 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 Rep* **30**, 929–939.
- Shoji K, Miki N, Nakajima N, Momonoi K, Kato C, Yoshida K** (2007). Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions. *Plant Cell Physiol* **48**, 243–251.
- Sigurdson GT, Giusti MM** (2014). Bathochromic and hyperchromic effects of aluminum salt complexation by anthocyanins from edible sources for blue color development. *J Agric Food Chem* **62**, 6955–6965.
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM** (2016). Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chem* **208**, 26–34.
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM** (2017a). Effects of hydroxycinnamic acids on blue color expression of cyanidin derivatives and their metal chelates. *Food Chem* **234**, 131–138.
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM** (2017b). Spectral and colorimetric characteristics of metal chelates of acylated cyanidin derivatives. *Food Chem* **221**, 1088–1095.
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM** (2018a). Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color expression of *o*-dihydroxylated anthocyanidins. *Food Chem* **268**, 416–423.
- Sigurdson GT, Tang PP, Giusti MM** (2018b). *Cis-trans* configuration of coumaric acid acylation affects the spectral and colorimetric properties of anthocyanins. *Molecules* **23**, 598.
- Sun LL, Li Y, Li SS, Wu XJ, Hu BZ, Chang Y** (2014). Identification and characterisation of *DfCHS*, a chalcone synthase gene regulated by temperature and ultraviolet in *Dryopteris fragrans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand, France)* **60**, 1–7.
- Tai DQ, Tian J, Zhang J, Song TT, Yao YC** (2014). A *Malus* crabapple chalcone synthase gene, *McCHS*, regulates red petal color and flavonoid biosynthesis. *PLoS One* **9**, e110570.
- Takamura T, Matsuzaki T** (2015). Characteristics of F1 progenies obtained by crosses between bluish-violet flowered cyclamen and other cyclamen cultivars. *Hort Res Japan* **14**, 412.
- Takeda K, Yanagisawa M, Kifune T, Kinoshita T, Timberlake CF** (1994). A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. *Phytochemistry* **35**, 1167–1169.
- Tamura H, Kondo T, Goto T** (1986). The composition of commelinin, a highly associated metalloanthocyanin present in the blue flower petals of *Commelina communis*. *Tetrahedron Lett* **27**, 1801–1804.
- Tanaka Y, Brugliera F** (2013). Flower colour and cytochromes P450. *Philos Trans Roy Soc B Biol Sci* **368**, 20120432.
- Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S** (2009). Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *Int J Mol Sci* **10**, 5350–5369.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* **54**, 733–749.
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T** (1998). Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol* **39**, 1119–1126.
- Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano GP, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F** (2008). An H^+ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nat Cell Biol* **10**, 1456–1462.
- Yoshida K, Miki N, Momonoi K, Kawachi M, Katou K, Okazaki Y, Uozumi N, Maeshima M, Kondo T** (2009a). Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. 'Heavenly Blue'. *Proc Jpn Acad Ser B* **85**, 187–197.

- Yoshida K, Mori M, Kondo T** (2009b). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat Prod Rep* **26**, 884–915.
- Yoshida K, Tojo K, Mori M, Yamashita K, Kitahara S, Noda M, Uchiyama S** (2015). Chemical mechanism of petal color development of *Nemophila menziesii* by a metalloanthocyanin, nemophilin. *Tetrahedron* **71**, 9123–9130.
- Yoshida K, Toyama Y, Kameda K, Kondo T** (2000). Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecule of gentiodelphin to blue color development. *Phytochemistry* **54**, 85–92.
- Yoshida K, Toyama-Kato Y, Kameda K, Kondo T** (2003). Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant Cell Physiol* **44**, 262–268.
- Zeinipour M, Azadi P, Majd A, Kermani MJ, Irian S, Hosseini SM, Mii M** (2018). Agroinfiltration: a rapid and reliable method to select suitable rose cultivars for blue flower production. *Physiol Mol Biol Plant* **24**, 503–511.
- Zhao CL, Chen ZJ, Bai XS, Ding C, Long TJ, Wei FG, Miao KR** (2014). Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Mol Divers* **18**, 687–700.
- Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ, Wen GS, Wei FG, Zheng Q, Wang CD, Xiao XL** (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chem* **214**, 119–128.
- Zhao DQ, Tao J** (2015). Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Front Plant Sci* **6**, 261.
- Zhao DQ, Tao J, Han CX, Ge JT** (2012). Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Mol Biol Rep* **39**, 11263–11275.

Recent Advances on Blue Flower Formation

Tairan Zhang¹, Hechen Zhang², Ronghua Wu^{1*}

¹College of Forestry of Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China

²Horticulture Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

Abstract Flower color is an important feature of ornamental plants. There are only a few plants containing blue flowers in nature; however, most of the ornamental plants lack blue varieties. Therefore, studying the molecular mechanism underlying blue flower formation has great significance for flower breeding in the future. Recent studies have revealed that flower pigmentation is mainly caused by the accumulation of anthocyanins. Anthocyanidins are catalyzed to the stable anthocyanin form by glycosylation, acylation or methyl modification. Furthermore, the pH environment and metal ions in the vacuole also influence the pigmentation. In this review paper, we summarized the progresses in the anthocyanin biosynthesis and metabolism pathways, the function of some key regulatory genes, the effect of anthocyanin acylation, the regulation by metal ion chelation and pH environment, and molecular breeding of blue flowers.

Key words acylation, anthocyanin biosynthetic pathway, vacuolar pH, metal ion, blue flower, genetic engineering

Zhang TR, Zhang HC, Wu RH (2020). Recent advances on blue flower formation. *Chin Bull Bot* **55**, 216–227.

* Author for correspondence. E-mail: 285324689@qq.com

(责任编辑: 白羽红)