

百合花青苷分子调控研究进展

范文广, 柴佳靖, 李保豫, 田亚琴, 田 辉, 任海伟, 白 鹏, 潘香逸

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

摘要:百合(*Lilium* spp.)是多年生球根草本植物,观赏百合花姿端庄、花色多彩,是世界上最重要的观赏花卉之一,食用百合地下部分的肉质鳞茎可食用,有的种亦可入药或提取香料,是一种开发利用价值较高的植物资源。不同种类、含量的花青苷类物质分布在花被片上的不同区域形成了类型多样的观赏百合花色,食用百合鳞茎贮藏后期发生紫红色变化的现象亦主要由花青苷所引起。花青苷广泛分布于植物中,是一种重要的天然植物色素,其生物合成主要受到结构基因和调节基因的协同调控,环境因子也有一定影响,合成之后的积累则受到转运蛋白的调控。外观多样有益于提高观赏百合的观赏价值,而鳞茎色泽变化则会损害食用百合的商品价值。因此,本研究对观赏百合花和百合鳞茎的花青苷结构、生物合成途径、转录调控以及转运等方面进行回顾和总结,并对百合花青苷的研究方向提出了展望,以期后续百合花青苷分子调控机制的研究提供参考,对定向改变百合花青苷的含量和积累部位提供借鉴。

关键词:百合;花青苷;生物合成;调控

Advances in Molecular Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in *Lilium*

FAN Wenguang, CHAI Jiajing, LI Baoyu, TIAN Yaqin, TIAN Hui, REN Haiwei, BAI Peng, PAN Xiangyi

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050)

Abstract: Lily is a perennial bulbous herb. Lily is one of the most important ornamental crops in the world because of its dignified posture and colorful flowers. The underground part fleshy bulbs of the edible lily can be eaten, and some species can also be used as medicine or extract spices, therefore, lily is a plant resource with high development and utilization value. The differences of the types and contents of anthocyanins and their distribution in different areas in petals result in the color diversity of the ornamental lily and the violet red change of the edible lily bulbs at the late storage stage are mainly caused by anthocyanin accumulation. Anthocyanin is widely distributed and an important natural pigment in plants, and its biosynthesis is mainly co-regulated by structural and regulatory genes that interact with environmental factors. Anthocyanin accumulation after biosynthesis is regulated by transporter. The variety of flower color is beneficial to improve the ornamental value, while the violet red change might decrease the quality and commodity value of the edible lily bulbs. Therefore, this study reviews and summarizes the structure, biosynthetic pathway, transcriptional regulation and transport of anthocyanins of the ornamental lily flowers and edible lily bulbs, and the exploration fields and trends were conceived, in order to provide a reference for deciphering the molecular regulatory mechanism of lily anthocyanin glycosides, as well as improving its content and accumulation site.

Key words: *Lilium*; anthocyanin; biosynthesis; regulation

收稿日期: 2023-03-24 修回日期: 2023-04-23 网络出版日期: 2023-05-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230324001>

第一作者研究方向为食品科学, E-mail: fanwenguang_88@163.com

通信作者: 田亚琴, 研究方向为天然活性成分分析及功能评价, E-mail: tianyaqin19920902@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960491); 甘肃省自然科学基金(23JRRA798)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31960491); Natural Science Foundation of Gansu Province(23JRRA798)

花青苷(Anthocyanin)又名花色素苷、花青素苷,广泛分布于植物组织中,赋予根、茎、叶、花、果实等器官不同程度的粉、红、橘、蓝、紫等色泽^[1],是植物呈色的重要物质基础之一。如何高效调控花青苷的生物合成,对于改善植物外观、提高商品价值具有重要的意义。此外,在植物抵御多种生物与非生物胁迫方面花青苷也发挥着重要作用,如参与抗低温胁迫反应、吸收多余的可见光从而帮助植物免受强光损害等。

百合是百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)多年生草本植物的总称^[2],分布于北半球温带地区,约有110~115个种^[3]。依据功能可将百合分为药用百合、食用百合和观赏百合3大类^[4-5]。观赏百合种类繁多,有单色、双色、斑点等多种花被片着色类型,包括亚洲百合(*Lilium Asiatic hybrids*)、东方百合(*Lilium Oriental Hybrids*)和一些野生百合,如鹿子百合(*Lilium speciosum* Thunb.)、垂花百合(*Lilium cernuum* Komar.)、岷江百合(*Lilium regale* Wilson)等。花色和着色类型作为重要的观赏性状,影响着观赏百合的商业价值^[6]。目前已明确花青苷是斑点以及粉色、紫色观赏百合的主要呈色物质^[7-8]。食用百合以鳞茎为食用器官,是当前蔬菜市场上的热销特种类型^[9],我国食用百合品系主要有卷丹百合(*Lilium. lancifolium*)、龙牙百合(*Lilium. brownii* var. *viridulum*)以及兰州百合(*Lilium. davidii* var. *willmottiae*)等。色泽洁白是优质食用百合的评判标准之一,然而在贮藏及运输过程中鳞茎表皮极易发生紫红色变化,导致销售和加工利用的价值降低^[10],有学者认为食用百合鳞茎的这种颜色变化亦与花青苷的积累有关^[10-12]。

目前,关于观赏百合花青苷调控机理的研究缺乏系统性,百合花色改良的工作存在较大的盲目性,难以实现花色定向分子育种;对食用百合花青苷合成通路的研究方兴未艾,而要实现从分子层面抑制百合鳞茎变色需要更为完整的理论支撑。为此,本研究回顾和总结了观赏百合花和食用百合鳞茎花青苷的生物合成通路,结构基因和调节基因对花青苷合成代谢的调控,以期为观赏百合花色改良和抑制食用百合变色及相关研究提供参考。

1 百合花青苷类型及合成途径

从化学结构上来看,花青苷主要是由6种花青素(表1)和各种糖分子通过糖苷键结合形成的糖基

衍生物^[13]。花青苷的基本结构为3,5,7-羟基-2-苯基苯并吡喃(3,5,7-Hydroxy-2-phenylchroman)(图1A),因与类黄酮类物质具有相同的C6-C3-C6碳架结构和生物合成途径,也将其统称为类黄酮类化合物^[14]。不同种类的花青苷所呈现的颜色有所差异,形成了植物丰富多彩的颜色。

表1 六种常见花青素的取代基类型及颜色

Table 1 Six common anthocyanins in substituent types and colors their colors

花青素种类 Anthocyanin types	取代基1 R1	取代基2 R2	颜色 Color
矢车菊素Cyanidin	OH	H	红色
天竺葵素Pelargonidin	H	H	橘红色
飞燕草素Delphinidin	OH	OH	蓝紫色
矮牵牛素Petunidin	OMe	OH	紫红色
芍药花素Peonidin	OMe	H	紫红色
锦葵素Malvidin	OMe	OMe	蓝紫色

东方百合和亚洲百合中一些红色系品种的花被片以矢车菊素3-O-β-芸香苷(Cyanidin 3-O-β-rutinoside)为主要花青苷,矢车菊素3-O-β-芸香苷7-O-β-葡萄糖苷(Cyanidin 3-O-β-rutinoside 7-O-β-glucoside)为次要花青苷,后者仅在极少数品种中少量存在^[15-16];Lai等^[17]分析了亚洲百合中一些白、黄、橙、粉、巧克力棕色的品种,发现矢车菊素3-O-β-芸香苷主要存在于粉色和颜色更深的棕色花被片中,后者的含量高于前者,表明百合花被片色相差异与花青苷的含量正相关。此外,亚洲百合双色品种Lollypop和Tiny Padhye的上花被片分别为粉色和白色,花被基部分别呈白色和紫色,同样仅在双色百合的粉色、紫色部分检测出矢车菊素3-O-β-芸香苷,白色部分检测不出或含量极低^[18-19]。关于食用百合,Liang等^[20]对百合的紫红色鳞茎进行研究和分析,鉴定出矢车菊素-3-O-芸香苷(Cyanidin -3-O-rutinoside)等7种与呈色相关的酚类色素单体。Fan等^[11]发现与白色对照组相比,产生紫红色变化的兰州百合鳞茎中矢车菊素-3-芸香苷(Cyanidin -3-rutinoside)的积累水平显著上调。可见矢车菊素(图1B)及其衍生物是目前百合中最常见的花青苷,主要分布在花被片和鳞茎处。

迄今为止,关于花青苷在植物体内的生物合成通路已清楚透彻,其合成途径属于类黄酮代谢途径的分支。植物花青苷的生物合成大致经历3个阶段(图2):第1阶段是许多植物次生代谢的共有途径,

以苯丙氨酸为直接前体,在苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H, cinnamic acid-4-hydroxylase)和4-香豆酰-CoA 连接酶(4CL, 4-coumarate-CoA ligase)的催化下形成4-香豆酰-辅酶A,一般将该阶段称为苯丙素途径(GPP, general phenylpropanoid pathway)^[21];第2阶段以GPP途径产物4-香豆酰-辅酶A为底物,由

查尔酮合成酶(CHS, chalcone synthase)催化形成黄色的查尔酮,接着经查尔酮异构酶(CHI, chalcone isomerase)异构化查尔酮为无色的柚皮素,然后在黄烷酮羟化酶(黄烷酮3-羟化酶(F3H, flavonoid-3-hydroxylase)、黄烷酮3'-羟化酶(F3'H, flavonoid-3'-hydroxylase)、黄烷酮3'5'-羟化酶(F3'5'H, flavonoid-3'5'-hydroxylase))催化下形成无色的二

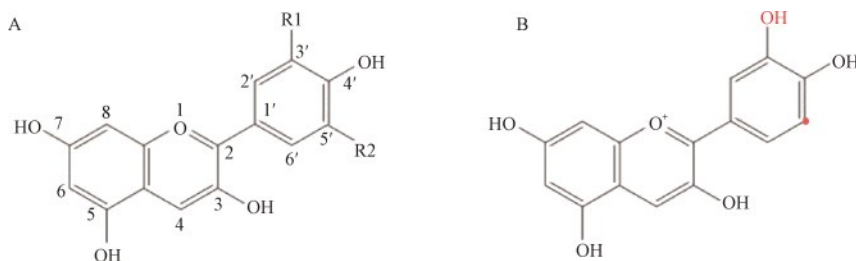
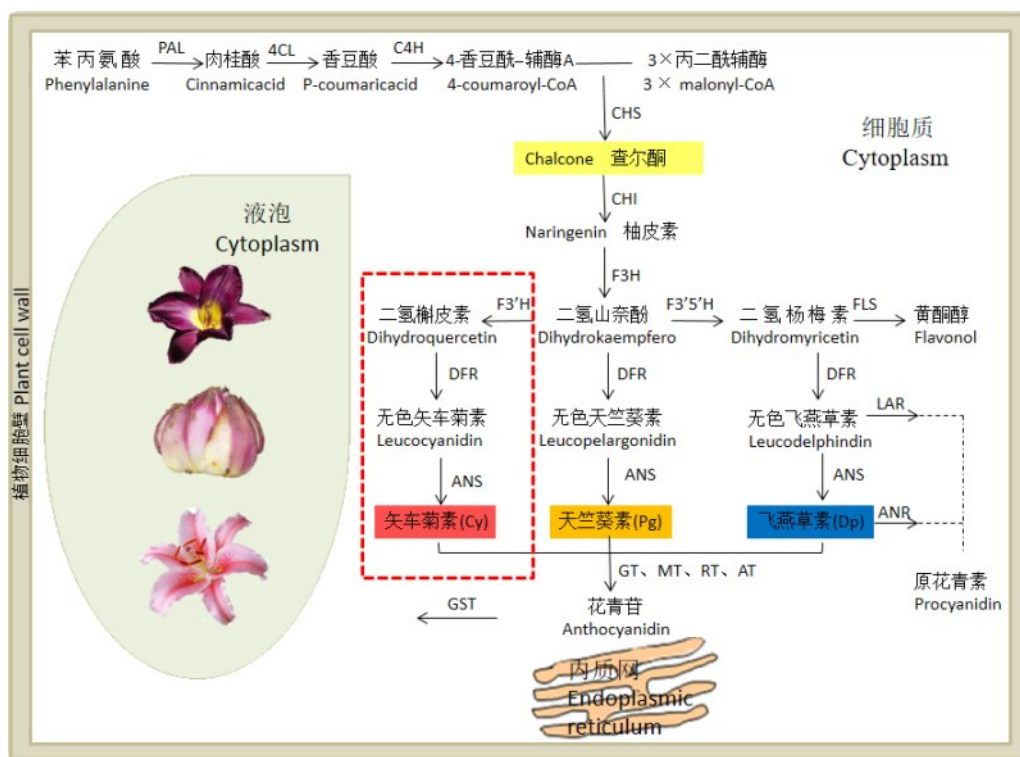


图1 花青苷(A)及矢车菊素(B)的基本结构^[14]

Fig.1 The core structure of anthocyanin(A) and cyanidin(B) ^[14]



红框显示百合中主要的花青苷合成途径;PAL:苯丙氨酸解氨酶;C4H:肉桂酸-4-羟化酶;4CL:4-香豆酰-辅酶A连接酶;CHS:查尔酮合成酶;CHI:查尔酮异构酶;F3H:黄烷酮3-羟化酶;F3'H:黄烷酮3'-羟化酶;F3'5'H:黄烷酮3'5'-羟化酶;FLS:黄酮醇合成酶;DFR:二氢黄酮醇-4-还原酶;LAR:无色花色素还原酶;ANS:花色素合成酶;ANR:花色素还原酶;GT:糖基转移酶;MT:甲基转移酶;RT:鼠李糖转移酶;AT:酰基转移酶;GST:谷胱甘肽S-转移酶

Red box shows the main anthocyanin synthesis pathway in *Lilium*; PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamic acid-4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate-CoA ligase; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3H: Flavanone-3-hydroxylase; F3'H: Flavonoid-3'-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid-3'5'-hydroxylase; FLS: Flavonol synthase; DFR: Dihydroflavonol-4-reductase; LAR: Colorless phytochrome reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; ANR: Anthocyanin reductase; GT: Glucosyltransferase; MT: Methyltransferase; RT: Rhamnosyltransferase;

AT: Acyltransferase; GST: Glutathione S-transferase

图2 花青苷生物合成途径^[24-27]

Fig.2 Anthocyanin biosynthetic pathway^[24-27]

氢黄酮醇(二氢山奈酚、二氢槲皮素、二氢杨梅素);第3阶段是各种花青苷的合成,首先由二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR, dihydroflavonol-4-reductase)催化还原二氢黄酮醇形成无色花青素^[22],然后在花青素合成酶(ANS, anthocyanidin synthase)的作用下转变无色花青素为有色的花青素,再由糖基转移酶(GT, glucosyltransferase)、甲基转移酶(MT, methyltransferase)、酰基转移酶(AT, acyltransferase)等对花青素进行加工形成结构稳定的花青苷^[23],最后在其他酶的作用下转移至液泡中。百合呈色主要是通过合成矢车菊素花青苷使花被片和鳞茎分别形成各种不同的颜色。

2 花青苷合成相关的结构基因

花青苷在植物中的生物合成由 *CHS*、*CHI* 与 *F3H* 等早期结构基因和 *DFR*、*ANS* 及 *UFGT* 等晚期结构基因所编码的酶催化完成。对花青苷结构基因的研究在植物界^[28],特别是在拟南芥^[29]、玉米^[30]、矮牵牛^[31]等模式植物中已被广泛涉及。近年来,在百合中也取得了重要的研究进展。

东方百合 Sorbonne 为富含花青苷的粉色品种,另一同种属百合 Siberia 花被片为白色, Yang 等^[32]对二者进行研究,发现几乎所有花青苷合成途径中的

结构基因,包括 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*ANS* 在 Sorbonne 花被片中的表达量显著高于 Siberia。双色百合的结构基因通过对花青苷的时空限制沉积形成双色,例如 *CHS*、*F3H*、*F3'H*、*DFR* 和 *ANS* 在 Lollypop 粉色上花被片和 Tiny Padhye 紫色花被基部的表达量远远高于二者的白色部分^[18-19]。Fan 等^[11]发现与白色对照组相比,紫红色处理组中兰州百合鳞茎的 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*ANS* 等结构基因均表达上调。

随着基因克隆技术在百合花色研究中的应用,参与百合花青苷生物合成的结构基因得以克隆和功能验证(表2)。*CHS* 属于 III 型聚酮合成酶(PKS, polyketide synthase)家族,是植物类黄酮花青苷生物合成途径中的第一个关键酶和限速酶^[33-34]。Nakatsuka 等^[35]从亚洲百合 Montreux 中获得 *CHS* 和 *DFR* 的 cDNA 克隆,通过瞬时转化试验发现 *LhCHSA*、*LhCHSB*、*LhCHSC* 在 Montreux 的有色花被片、花丝和雌蕊以及 Connecticut King 的无色素花丝和雌蕊中均可表达,而 *LhDFR* 只在两种百合的有色组织中表达,说明 *DFR* 基因与百合花青苷合成的相关性高于 *CHS* 基因;化占勇^[36]从东方百合 Sorbonne 中分离得到 *LhCHS2* 基因,利用病毒诱导的基因沉默(VIGS, virus induced gene silencing)干

表2 百合中已经分离和鉴定参与调控花青苷生物合成途径的关键结构基因 *CHS*、*DFR* 和 *ANS*

Table 2 Key structural genes including *CHS*, *DFR* and *ANS* involved in the regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway identified in *Lilium*

基因类型 Gene species	百合种类 <i>Lilium</i> types	百合品种 <i>Lilium</i> breeding	基因名称 Gene name	功能描述 Function description	参考文献 Reference
查尔酮合成酶基因 <i>CHS</i>	亚洲百合	Montreux	<i>LhCHSA</i> 、 <i>LhCHSB</i> 、 <i>LhCHSC</i>	百合有色组织及无色组织中均可表达	[35]
	东方百合	Sorbonne	<i>LhCHS2</i>	VIGS 干扰技术获得花色变化明显、花青苷含量有所降低的矮牵牛植株	[36]
	东方百合	Siberia	<i>LhCHS</i>	异源表达反义 <i>CHS</i> 转基因的本明烟草花瓣颜色变浅,正义 <i>CHS</i> 转基因的本明烟草颜色无变化	[37]
二氢黄酮醇-4-还原酶基因 <i>DFR</i>	亚洲百合	Montreux	<i>LhDFR</i>	仅表达于百合的有色组织中	[35]
	东方百合	Sorbonne	<i>LoDFR1</i> 、 <i>LoDFR2</i>	异源表达使烟草植株花色明显淡化、花冠檐由粉色变为浅粉色	[44]
	野生百合	<i>Lilium speciosum</i>	<i>LsDFR</i>	序列突变导致花被片和花药中缺乏花青苷积累	[45]
花青素合成酶基因 <i>ANS</i>	东方百合	Siberia	<i>LsANS1</i> 、 <i>LsANS2</i> 、 <i>LsANS3</i>	异源表达 <i>LsANS1</i> 、 <i>LsANS3</i> 明显促进转基因拟南芥花青苷积累, <i>LsANS2</i> 影响较小	[47]

扰技术获得镶嵌型、马赛克型和中间型3种矮牵牛花色表型,与野生型相比,花色变化明显、花青苷的含量也有所降低。陈洁等^[37]从东方百合 *Siberia* 中克隆出 *LhCHS* 基因,构建载体并转化烟草叶盘获得正义和反义 *CHS* 转基因本烟草,检测结果显示前者的花瓣颜色未见变化,后者变浅,表明 *CHS* 基因的遗传转化可以有效调控花色。*CHI* 是植物类黄酮花青苷生物合成途径中的第2个关键酶^[38]。窦晓莹等^[39]从东方百合 *Sorbonne* 中克隆出 *CHI* 基因,发现该基因在百合的花器官中相对表达量较高,并且在花被片等组织中基因表达水平在发育后期普遍高于发育早期。而随着花被片的发育,色素类物质积累也在逐渐增多,说明 *LhCHI* 基因可能影响色素积累。*F3H* 是植物类黄酮花青苷生物合成途径中的另一关键酶^[40]。张星等^[41]以 *Sorbonne* 为试验材料,成功克隆出 *F3H* 基因。通过半定量 RT-PCR 发现 *LhSorF3H* 在花被片等组织中表达明显,在茎生根、上部叶片等组织中表达较弱,而在中下部叶片等组织中基本不表达。可见 *F3H* 作为控制百合花青苷形成过程中的重要结构基因,对 *Sorbonne* 花色的形成起到一定的作用。*DFR* 位于花青苷合成途径的下游,在一定程度上决定植物合成花青苷的种类与含量^[42-43]。研究发现,转化东方百合 *Sorbonne LoDFR1* 和 *LoDFR2* 基因的烟草植株花色明显淡化、花冠檐由粉色变为浅粉色,可能是由于 *DFR* 基因导致花青苷的种类与含量发生变化所引起的^[44]。Suzuki 等^[45]在鹿子百合中检测到 *LsDFR* 基因的序列发生无义突变,导致花被片和花药中缺乏花青苷积累。*ANS* 可以将无色花青素转化为有色花青素,是花青苷合成途径末期的关键酶^[46]。杨成龙等^[47]从东方百合 *Siberia* 中克隆鉴定出 *LsANS1*、*LsANS2*、*LsANS3*,利用花序浸染法转化拟南芥并经过筛选得到阳性植株,发现在拟南芥幼苗期,相较于过量表达 *LsANS2*,过表达 *LsANS1* 与 *LsANS3* 能明显促进转基因拟南芥花青苷含量增加。*GT* 是催化形成不同颜色花青苷的重要转移酶之一。徐雷锋^[48]从亚洲百合双色品种 *Tiny Padhye* 中克隆得到 *LhUFGT* 基因,通过同源重组的方法构建得到过表达载体,发现该基因可以恢复 *3GT* 基因功能缺失的拟南芥突变体的表型,表明 *LhUFGT* 蛋白具有 *3GTs* 家族成员的酶催功能。

以上结果均表明,结构基因对百合花青苷的生物合成至关重要。在观赏百合中,*CHS*、*DFR* 和 *ANS* 等关键结构基因对花青苷积累及花被片着色

的调控作用较为显著,单个基因的沉默、序列突变或异源表达往往会对花青苷合成途径的整体稳定性产生影响,从而影响靶组织中花青苷的生物合成。而将基因克隆、过表达等研究手段应用于食用百合花青苷结构基因的研究有待进一步拓展。

3 花青苷合成的转录调控

植物花青苷的合成与积累通常由内外因子协同调控^[48]。外因通常指光照、温度等环境因素,而所谓内因,即结构基因和调节基因,调节基因所编码的转录因子通过激活或抑制 *CHS*、*DFR* 和 *ANS* 等结构基因的时空表达决定花青苷的积累水平。转录因子依据 DNA 保守结构域的不同主要分为:禽髓母细胞瘤病毒的原癌基因蛋白 (MYB, v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)、螺旋-环-螺旋 (bHLH, basic helix-loop-Helix) 蛋白、WD 40 (WD, WD repeat) 蛋白、亮氨酸拉链 (bZIP, basic region-leucine zipper) 蛋白、锌指 (zinc-finger) 蛋白和乙烯反应因子 (ERF, ethylene response factor) 5 个家族^[25]。目前,百合中主要发现 MYB 转录因子家族参与调控花青苷的生物合成,针对 bHLH、WD40 等其他调控因子的研究有限。

3.1 MYB 转录因子

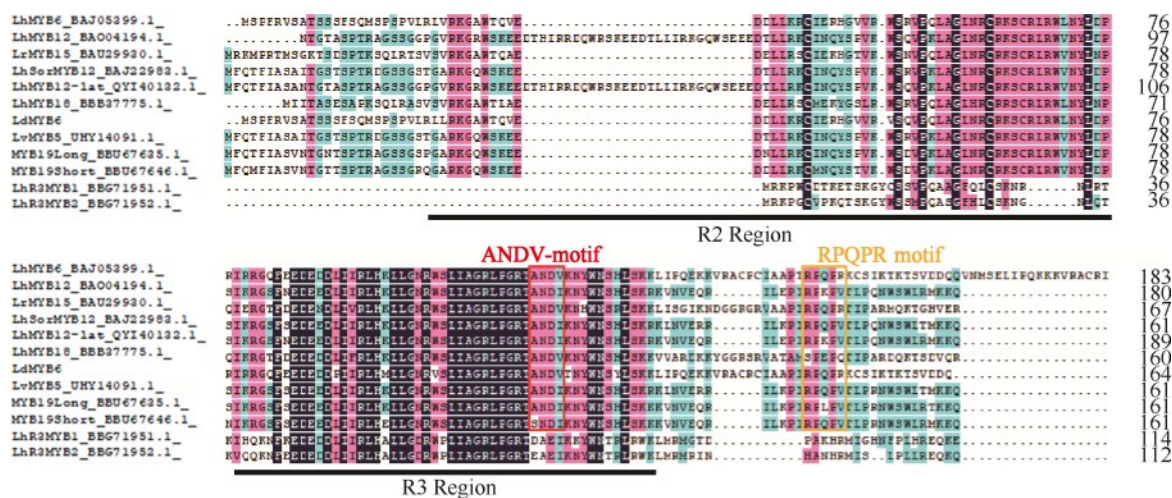
MYB 转录因子数目庞大、类别多,依据保守结构域所包含重复基序的个数可分为:1RMYB (R1/R2/R3-MYB)、2RMYB (R2R3-MYB)、3RMYB (R1R2R3-MYB) 和 4RMYB 四大类^[48-49]。其中,含有两个基序的 R2R3-MYB 在植物花青苷生物合成的遗传调控中作用最为广泛^[50]。

LhMYB12 和 *LhMYB6* 是最早发现参与调控观赏百合花青苷的转录因子。Abe 等^[16]通过对亚洲百合 *Montreux* 和 *Connecticut King* 的杂交分析证明前者花被片和突起斑点的着色由不同基因独立调控。之后的研究进一步发现,深红色突起斑点和粉色花被片分别由 *LhMYB6* 和 *LhMYB12* 调控花青苷积累形成颜色^[51]。在垂花百合中也有相似的研究结论,已发现 *LcMYB12* 基因的表达量同花青苷含量的变化相一致,在花被片呈粉白色变种型中显著低于呈粉色的普通型^[6];另一转录因子 *LcMYBSPL* 的基序同 *LhMYB12-Lat* (分离自亚洲百合 *Latvia* 的 *LhMYB12* 基因的新位点,在含斑点的被膜区表达,调控溅泼状斑点的着色^[52]) 非常相似,通过参与调控花青苷积累形成溅泼状斑点^[6]。此外,一些百合

由一种转录因子同时调控花被片与斑点的着色, 例如东方百合 Sorbonne 由 LhSorMYB12 调控花青苷形成突起斑点和使花被片着粉色^[53]。近年研究发现 MYB19Long、MYB19Short 调控一些亚洲百合和野生百合中突起斑点的着色^[54], MYB19Long 对刷痕斑点的形成也具有调控作用^[55]。LvMYB5 的基因表达水平与东方百合 Vivian 花被片的花青苷积累水平呈正相关, 沉默 LvMYB5 后百合花青苷积累减少, 粉红色花被片出现白色区域^[56]。另外, LdMYB6 分离克隆自兰州百合的鳞茎, 是食用百合中唯一报道的调控花青苷合成的转录因子基因^[57]。随着研究范围的不断拓展, 一些负调控因子也相继得到鉴定。Sakai 等^[58]发现 LhR3MYB1 和 LhR3MYB2 在单个 MYB 重复序列的下游有一个类似 AtMYBL2 的 C2 抑制基序, 过表达 LhR3MYB1 或 LhR3MYB2 基

因均可抑制烟草花青苷合成, 过表达 LhR3MYB2 基因时的抑制作用更强。而在东方百合 Vivian 中, 同时过表达 LvMYB5 和 LvMYB1 基因使 NbCHS、NbDFR 和 NbANS 的表达下调, 表明 LvMYB1 转录因子通过抑制结构基因的表达负调控花青苷的生物合成^[56]。可见, 百合花青苷的生物合成及着色主要是通过 R2R3-MYB 转录因子起到不同的调控作用, 存在少数 R3-MYB 转录因子发挥负调控作用。

通过多序列比对和构建系统发育树深入了解百合 MYB 转录因子的进化关系。由图 3 和图 4 可知, 抑制花青苷生物合成的 LhR3MYB1 和 LhR3MYB2 仅包含部分 R2 结构域, 在系统发育树上聚为一小类, 而具有促进作用的百合 R2R3-MYB 转录因子包含 ANDV 基序和 AN2 亚群的特征保守基序 RPQPR, 在系统发育树上聚为一大类, 表明它们均属于 AN2 亚群。



R2 和 R3 结构域用黑色长线标记; ANDV 基序用红色矩形框标记; AN2 亚群的保守基序 RPQPR 用黄色矩形框标记
The domains R2 and R3 were marked with black and long lines; ANDV-motif is marked with red box; The small motif RPQPR in the AN2 subgroup is marked by a black box

图 3 百合花青苷相关 MYB 转录因子的多序列比对 (部分氨基酸)

Fig.3 Multiple sequence alignment (partial amino acids) of anthocyanin related MYB TFs in *Lilium*

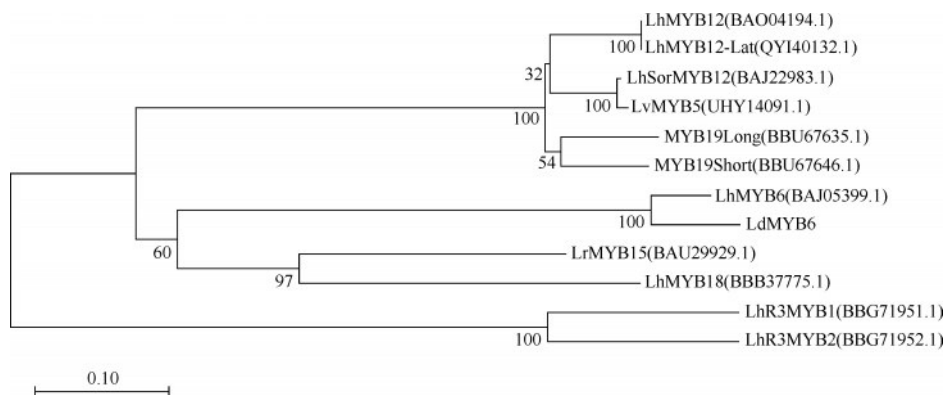


图 4 百合花青苷相关 MYB 转录因子的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of anthocyanin related MYB TFs in *Lilium*

3.2 bHLH 和 WD40 转录因子

bHLH 转录因子是仅次于 MYB 转录因子的第二大转录因子超家族^[59],广泛存在于植物中^[60]。Nakatsuka 等^[61]从亚洲百合 Montreux 中分离出 *LhbHLH1* 和 *LhbHLH2* 基因,发现 *LhbHLH1* 在花被片、子房等有花青苷积累的部位和茎等无色部位表达,而 *LhbHLH2* 只在有花青苷积累的部位表达,表明二者在百合中的表达具有组织特异性,*LhbHLH2* 与花青苷的着色关系更为密切,是调控花青苷生物合成的主要 bHLH 基因。

到目前为止,与百合有关的 WD40 蛋白的信息有限,Dou 等^[62]在东方百合 Sorbonne 中鉴定出 1 个 WD40 转录因子 LhWDR,该转录因子基因的时空表达模式与百合花被片的花青苷积累水平呈正相关,而且 LhWDR 与 *LhbHLH2* 存在相互作用,表明 LhWDR 可能以同 *LhbHLH* 转录因子互作的方式调控花青苷的生物合成。在大多数植物中,WD40 蛋白一般不具有酶活性和激活功能,而是通过与 MYB 和 bHLH 一起形成的 MBW 复合物实现对花青苷的调控^[63],因此,对 WD40 蛋白调节百合花青苷合成的机理有待进一步探索。

3.3 其他调控因子

其他转录因子家族也可能参与调控观赏百合花青苷的合成,如 WRKY 家族。WRKY 家族成员通过间接调控花青苷合成的结构基因或者直接调控花青苷的运输、植物液泡酸度,从而影响花青苷的积累^[64]。亚洲双色百合 Tiny Padhye 中,*LhWRKY44* 的表达模式与花青苷生物合成基因相似,但其在百合属植物中的功能尚不清楚,需要进一步研究^[65]。

除了 MYB 阻遏物,研究还发现微小 RNA (microRNA, miRNA) 在转录后可使花青苷的合成受到抑制,如 miR828、miR858 和 miR159 能够靶向多种植物的 R2R3-MYB 基因^[19,66]。在亚洲杂交百合双色品种 Lollypop 的花被片中,miRNA828 通过抑制 R2R3-MYB 转录激活子(*LhMYB12*)基因的表达从而减少了花青苷的积累,表明百合花双色模式的发育与 miR828/MYB12 模块的参与有关^[19]。此外,一些百合中 MYB12 基因的上调与温度对 miR828 的调控有关,例如 miR828 的积累水平在高温下降低使得亚洲杂交百合 Montreux 花被片中的花青苷色素沉着加速^[67],这与东方杂交百合在高温条件下 *LhMYB12* 的转录受到抑制,从而抑制一些时期花色苷的生物合成不同^[68]。

3.4 转录调控网络

根据在氨基酸序列上的同源性,可将调节花青苷生物合成的 R2R3-MYB 转录因子分为 AN2 和 C1 两个亚群^[17]。一般来说,AN2 亚群调控双子叶植物花青苷生物合成途径中的晚期结构基因,而在单子叶植物百合中,一些属于 AN2 亚群的正调控因子能够同时调控早期和晚期结构基因。例如 LhMYB12,通过直接激活 *LhCHS* 和 *LhDFR* 基因的启动子调控亚洲百合花被片中的花青苷合成^[17]。同样,LdMYB6 响应光信号,通过上调花青苷合成通路中的相关结构基因,如 *LdPAL*、*LdCHS* 和 *LdDFR* 的表达进而促进兰州百合鳞茎中花青苷的积累^[57]。此外,LhMYB6 和 LhMYB12-Lat 通过调控晚期结构基因 *LhDFR* 的表达调节亚洲百合斑点的色素沉着^[51-52]。LvMYB5 激活晚期结构基因 *LvANS* 的启动子以促进东方百合 Vivian 的花被片积累花青苷^[56]。除了最常见的 MBW (MYB-bHLH-WD40)三元复合物外,植物中研究最广、发现最多的调控花青苷合成途径的复合物是 MYB-bHLH 二元复合物。瞬时转化实验表明,*LhR3MYB2* 或 *LhR3MYB1* 与 *LbHLH2* 同时过表达可降低 *LhDFR* 和 *LhANS* 的表达水平,使花青苷的积累量减少^[58]。LrMYB15 的表达受光照影响,通过上调岷江百合中 *LrDFR*、*LrANS* 基因的表达促进花被片积累花青苷,与 *LrbHLH2* 协同作用时调控效果更强^[69]。亚洲百合 Grand Cru 花被片内表面上的红色斑点区域是由 LhMYB18 与 *LhbHHLH2* 共同激活 *LhDFR* 基因的启动子而积累花青苷所形成^[70]。总之,转录因子 MYB 单独或者转录因子 MYB 与 bHLH 互作通过激活或者抑制结构基因的启动子表达进一步促进或抑制花青苷的积累,从而引起颜色的变化。对结构基因的调控主要集中在 *CHS*、*DFR* 和 *ANS* 上,对 *DFR* 的调控研究最多(图 5)。

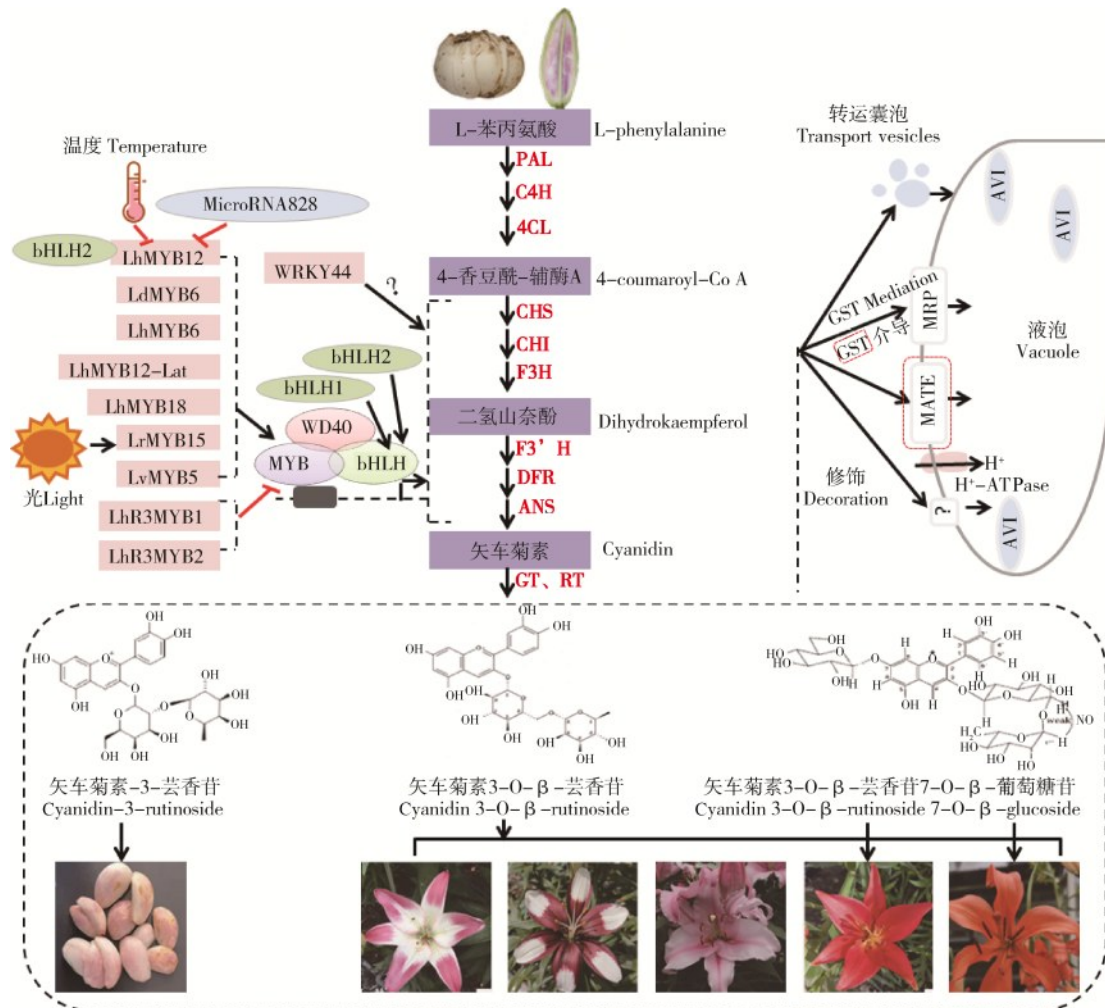
4 花青苷合成的转运

花青苷由定位于细胞质内的多酶复合体催化合成,在液泡中储存且广泛分布于植物细胞内^[71],而多酶复合体通过细胞色素单加氧酶 P450 固定在内质网上,需要在转运蛋白的作用下将花青苷从细胞质转运到液泡中才能使植物呈现出各种颜色,故与结构基因及转录因子调控花青苷的合成不同,转运蛋白负责调控花青苷的积累。研究表明,花青苷的液泡转运方式主要有 3 种^[72-73](图 5): (1) 在谷胱甘肽

转移酶(GST, glutathione S-Transferase)的协助下花青苷被靶向定位到液泡附近,液泡膜上的多药耐药抗性相关蛋白(MRP, multidrug resistance-associated protein)类转运蛋白识别后将其跨膜转运至液泡;(2)由液泡膜上的多药和有毒化合物排出家族(MATE, multidrug and toxic compound extrusion)类转运蛋白将其跨膜转运到液泡中,这个过程需要如H⁺-ATPase质子泵产生的H⁺浓度梯度;(3)由囊泡将其包裹,通过膜融合的方式进入液泡。

目前在观赏百合中已经阐明了两种转运机制

(图5): Cao等^[74]从亚洲杂交百合 Tiny Padhye 中鉴定出了 *LhGST* 基因,通过功能互补实验及 VIGS 发现 *LhGST* 与百合中花青苷的转运相关。Xu等^[75]从 Tiny Padhye 中克隆出 MATE 候选基因 *LhDTX35*,并且发现 *LhDTX35* 基因的表达模式与花被片中花青苷积累呈正相关,与此同时,拟南芥 *DTX35* 基因的功能互补也表明 *LhDTX35* 可以恢复拟南芥 *DTX35* 突变体的沉默不育和无花青苷表型。这些结果均表明, *LhDTX35* 可能参与调控百合中花青苷的积累。



红框显示百合中主要的花青苷转运蛋白; —▶: 正调控; —◀: 负调控; ?: 调控机制尚不清楚

Red box shows the major anthocyanin transporter protein in *Lilium*; —▶: Positive regulation; —◀: Negative regulation;

?: Regulatory mechanism is unclear

图5 百合花青苷生物合成的转录调控网络

Fig.5 Transcriptional regulatory network of anthocyanin biosynthesis in *Lilium*

5 总结与展望

随着研究的不断深入,对观赏百合花青苷合成通路的研究较为完善,已有许多结构基因和调控基因经过分离克隆并验证了其功能。关于食用百合花青苷合成调控的研究偏少,目前仅对调节基因 *LdMYB6* 进行分离鉴定和功能验证,结构基因尚无此类研究。减少鳞茎紫红色变化可以提高食用百合的品质和商品价值,因此充分了解鳞茎花青苷合成的调控机理很有必要,相关研究有待进一步拓展。

许多植物对调控基因的研究大多集中在 MYB、bHLH 和 WD40 三类转录因子,以及三者互作形成的 MBW 复合体上,相比之下,MBW 复合体对花青苷合成的调控作用更强,是当前的研究热点。然而在百合中,与 MYB 负调控因子、bHLH 及 WD40 转录因子相关的研究较少,尚未发现与 MBW 复合物相关的作用机制有待探索。

众所周知,花青苷的生物合成是一个极其复杂的过程,除结构基因和调节基因外,各种环境因子也与花青苷的形成与积累密切相关。而对于光照、温度、糖、PH、金属离子等外界环境因素的响应因子是如何通过与调控基因和结构基因相互作用来影响百合花青苷的合成还有很多未知之处,深入研究各环境因子在花青苷生物合成途径中的调控机制对于探明百合花青苷的调控网络具有重要意义。

参考文献

- [1] Krag I, Milenkovic D. Anthocyanins: From sources and bioavailability to cardiovascular health benefits and molecular mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(7): 1771-1783
- [2] 韩东洋,张铭芳,金鸽,杜运鹏,薛静,陈绪清,张秀海,董然. 园艺植物与百合属(*Lilium*)植物类胡萝卜素研究进展. 分子植物育种, 2022, 9(22): 1-23
Han D Y, Zhang M F, Jin G, Du Y P, Xue J, Chen X Q, Zhang X H, Dong R. Research progress on horticultural plants and *Lilium* plant carotenoids. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 9(22): 1-23
- [3] Kong Y, Wang H, Lang L, Dou X Y, Bai J R. Metabolome-based discrimination analysis of five *Lilium* bulbs associated with differences in secondary metabolites. *Molecules*, 2021, 26(5): 1340
- [4] 李晓玉,张命军. 百合属植物的研究进展. 农业开发与装备, 2019(12): 40-42
Li X Y, Zhang M J. Research progress on *Lilium* plant. *Agricultural Development and Equipment*, 2019(12): 40-42
- [5] 王震宝,师桂英,樊生丰,杨宏羽,李谋强,李天祥. 不同品种兰州百合的生长发育特性、产量特性的对比试验及综合分析. 甘肃农业大学学报, 2022, 57(3): 52-57
Wang Z B, Shi G Y, Fan S F, Yang H Y, Li M Q, Li T X. Comparative experiment and comprehensive analysis of growth, development and yield characteristics of different varieties of *Lilium davidii* var. unicolor. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2022, 57(3): 52-57
- [6] Yagishi M. White with partially pink flower color in *Lilium cernuum* var. *album* is caused by transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis genes. *Scientia Horticulturae*, 2020, 260(C): 108880
- [7] Yagishi M. High promoter sequence variation in subgroup 6 members of R2R3-MYB genes is involved in different floral anthocyanin color patterns in *Lilium* spp.. *Molecular Genetics and Genomics*, 2021, 296(4): 1005-1015
- [8] 毕蒙蒙,曹雨薇,宋蒙,唐玉超,何仁国,杨悦,杨盼盼,徐雷锋,明军. 百合花色研究进展. 园艺学报, 2021, 48(10): 2073-2086
Bi M M, Cao Y W, Song M, Tang Y C, He R G, Yang Y, Yang P P, Xu L F, Ming J. Advances in flower color research of *Lilium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(10): 2073-2086
- [9] 李霞,李永才,毕阳,马彦青. 响应面法优化兰州百合干无硫护色剂配方. 食品科学, 2014, 35(4): 16-20
Li X, Li Y C, Bi Y, Ma Y Q. Formula optimization of non-sulfur color-protective agents for dried Lanzhou lily by response surface methodology. *Food Science*, 2014, 35(4): 16-20
- [10] 蒋益虹. 影响百合色泽变化因素的研究. 中国食品学报, 2004(3): 28-31
Jiang Y H. Studies on factors affecting color change of lily. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2004(3): 28-31
- [11] Fan W G, Li B Y, Tian H, Li X, Ren H W, Zhou Q F. Metabolome and transcriptome analysis predicts metabolism of violet-red color change in *Lilium* bulbs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 102(7): 2903-2915
- [12] Huang D, Li W, Dawuda M, Huo J Q, Li C X, Wang C L, Li W B. Hydrogen sulfide reduced colour change in Lanzhou lily-bulb scales. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 176(11): 111520
- [13] 刘晓芬,李方,殷学仁,许昌杰,陈昆松. 花青苷生物合成转录调控研究进展. 园艺学报, 2013, 40(11): 2295-2306
Liu X F, Li F, Yin X R, Xu C J, Chen K S. Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(11): 2295-2306
- [14] 贾赵东,马佩勇,边小峰,杨清,郭小丁,谢一芝. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1496-1506
Jia Z D, Ma P Y, Bian X F, Yang Q, Guo X D, Xie Y Z. Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of

- plants anthocyanin. *Acta Botanica Boreal-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(7): 1496-1506
- [15] NØrbæk R, Kondo T. Anthocyanins from flowers of *Lilium* (Liliaceae). *Phytochemistry*, 1999, 50(7): 1181-1184
- [16] Abe H, Nakano M, Nakatsuka A, Nakayama M, Koshioka M, Yamagishi M. Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105(8): 1175-1182
- [17] Lai Y S, Shimoyamada Y, Nakayama M, Yamagishi M. Pigment accumulation and transcription of *LhMYB12* and anthocyanin biosynthesis genes during flower development in the Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.). *Plant Science*, 2012, 193-194: 136-147
- [18] Suzuki K, Suzuki T, Nakatsuka T, Dohra H, Yamagishi M, Matsuyama K, Matsuura H. RNA-seq-based evaluation of bicolor tepal pigmentation in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 611
- [19] Yagishi M, Sakai M. The microRNA828/MYB12 module mediates bicolor pattern development in Asiatic hybrid Lily (*Lilium* spp.) flowers. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 590791
- [20] Liang Z X, Zhang J Z, Xin C, Li D, Sun M Y, Shi L. Analysis of edible characteristics, antioxidant capacities, and phenolic pigment monomers in *Lilium* bulbs native to China. *Food Research International*, 2022, 151: 110854
- [21] Liu J, Osbourn A, Ma P. MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 2015, 8(5): 689-708
- [22] Saigo T, Wang T, Watanabe M, Tohge T. Diversity of anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis in land plants. *Current Opinion Plant Biology*, 2020, 55(C): 93-99
- [23] Dong T G, Han R P, Yu J W, Zhu M K, Zhang Y. Anthocyanins accumulation and molecular analysis of correlated genes by metabolome and transcriptome in green and purple asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Food Chemistry*, 2019, 15(271): 18-28
- [24] 孔滢, 窦晓莹, 包放, 郎新利, 白锦荣. 百合花色机理研究进展. *园艺学报*, 2015, 42(9): 1747-1759
Kong Y, Dou X Y, Bao F, Lang X L, Bai J R. Advances in flower color mechanism of *Lilium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(9): 1747-1759
- [25] 杨慧勤, 王佳丽, 李思蓁, 牛义, 汤青林, 魏大勇, 王永清, 王志敏. 茄科蔬菜花青素苷分子调控研究进展. *生物工程学报*, 2022, 38(5): 1738-1752
Yang H Q, Wang J L, Li S R, Niu Y, Tang Q L, Wei D Y, Wang Y Q, Wang Z M. Advances in the molecular regulation of anthocyanins in solanaceous vegetables. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(5): 1738-1752
- [26] Li S H, He Y J, Li L Z, Li D L, Chen H Y. New insights on the regulation of anthocyanin biosynthesis in purple *Solanaceous* fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, 2022, 297: 110917
- [27] 宋建辉, 郭长奎, 石敏. 植物花青素生物合成及调控. *分子植物育种*, 2021, 19(11): 3612-3620
Song J H, Guo C K, Shi M. Anthocyanin biosynthesis and transcriptional regulation in plant. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(11): 3612-3620
- [28] Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(9): 477-483
- [29] Christian D, Ralf S, Erich G, Bernd W, Cathie M, Loïc L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010(10): 15
- [30] Du H, Feng B R, Yang S S, Huang Y B, Tang Y X. The R2R3-MYB transcription factor gene family in maize. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e37463
- [31] Albert N M. Subspecialization of R2R3-MYB repressors for anthocyanin and proanthocyanidin regulation in forage legumes. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 23(6): 1165
- [32] Yang J, Meng J, Liu X L, Hu J S, Zhu Y T, Zhao Y R, Jia G X, He H B, Yuan T. Integrated mRNA and small RNA sequencing reveals a regulatory network associated with flower color in oriental hybrid lily. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 103-114
- [33] Austin M B, Noel J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 2003, 20(1): 79-110
- [34] 何梦媛, 姚华, 李国治, 杨茂, 沈海涛. 甘草 *CHS* 基因家族鉴定、表达特性分析及其与甘草查尔酮 A 积累的关系研究. *植物生理学报*, 2022, 58(1): 141-154
He M Y, Yao H, Li G Z, Yang M, Shen H T. Identification of *CHS* gene family and analysis of its expression characteristics in relation to the accumulation of licochalcone A in Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*). *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(1): 141-154
- [35] Nakatsuka A, Izumi Y, Yamagishi Y. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the Asiatic hybrid lily. *Plant Science*, 2003, 165(4): 759-767
- [36] 化占勇. 百合查尔酮合成酶(*CHS*)基因对花色调控影响的研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010
Hua Z Y. Research on regulation and effects of *CHS* gene from lily on pigmentation of flowers. Yangling: Northwest A&F University, 2010
- [37] 陈洁, 安利清, 王涛, 姚娜, 李潞滨, 杨凯. 百合查尔酮合成酶基因克隆及其转化烟草的花色表达分析. *西北植物学报*, 2012, 32(8): 1511-1517
Chen J, An L Q, Wang T, Yao N, Li L B, Yang K. Cloning of chalcon synthase in *Lilium* and expression analysis of flower colour changes in transgenic tobacco. *Acta Botanica Boreal-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(8): 1511-1517
- [38] Zhu J H, Zhao W, Li R S, Guo D, Li H L, Wang Y, Mei W L, Peng S Q. Identification and characterization of chalcone isomerase genes involved in flavonoid production in *Dracaena*

- cambodiana*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 616396
- [39] 窦晓莹, 郎利新, 包放, 孔滢, 尚宏忠, 白锦荣, 王乃彦. 东方百合查尔酮异构酶基因 *LhCHI* 的克隆及表达. *东北林业大学学报*, 2015, 43(9): 6-11, 17
 Dou X Y, Lang L X, Bao F, Kong Y, Shang H Z, Bai J R, Wang N Y. Cloning and expression analysis of chalcone isomerase gene *LhCHI* in Oriental hybrid lily (*Lilium* spp.). *Journal of Northeast Forestry University*, 2015, 43 (9): 6-11, 17
- [40] 段玥彤, 王鹏年, 张春宝, 林春晶. 植物黄酮-3-羟化酶基因研究进展. *生物技术通报*, 2022, 38(6): 27-33
 Duan Y T, Wang P N, Zhang C B, Lin C J. Research progress in plant flavanone-3-hydroxylase gene. *Biotech Notification*, 2022, 38(6): 27-33
- [41] 张星, 杨捷, 彭梦笛, 贾桂霞, 何恒斌. 百合黄酮-3-羟化酶基因 *LhSorF3H* 的克隆与表达. *西北植物学报*, 2017, 37(12): 2325-2331
 Zhang X, Yang J, Peng M D, Jia G X, He H B. Cloning and expression of *LhSorF3H* genes in *Lilium*. *Acta Botanica Boreo-Occidentalia Sinica*, 2017, 37(12): 2325-2331
- [42] Luo P, Ning G G, Wang Z, Shen Y X, Jin H A, Li P H, Huang S S, Zhao J, Bao M Z. Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1257
- [43] 李亚丽, 李欣, 肖婕, 李瑞玲, 杨华丽, 孙勃, 汤浩茹. 二氢黄酮醇-4-还原酶在花青苷合成中的功能及调控研究进展. *西北植物学报*, 2018, 38(1): 187-196
 Li Y L, Li X, Xiao J, Li R L, Yang H L, Sun B, Tang H R. Function and regulation characterization of dihydroflavonol 4-reductase in anthocyanin biosynthesis. *Acta Botanica Boreo-Occidentalia Sinica*, 2018, 38 (1): 187-196
- [44] 覃仁娟. 百合 *DFR* 基因克隆及功能初步鉴定. 成都: 四川农业大学, 2014
 Qin R J. Cloning and functional initial characterization of the gene encoding dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) from lily. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2014
- [45] Suzuki K, Tasaki K, Yamagishi M. Two distinct spontaneous mutations involved in white flower development in *Lilium speciosum*. *Molecular Breeding*, 2015, 35(10): 1-14
- [46] 孙玉燕, 段蒙蒙, 邱杨, 张晓辉, 沈镛, 王海平, 李锡香. 心里美萝卜花青素合成酶基因 *RsANS* 克隆及花青素生物合成相关基因表达分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(5): 889-896
 Sun Y Y, Duan M M, Qiu Y, Zhang X H, Shen D, Wang H P, Li X X. Anthocyanidin synthase gene cloning and expression analysis of anthocyanidin biosynthesis related genes in Xinlimei' Radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(5): 889-896
- [47] 杨成龙, 张洁, 方少忠, 郑益平, 林智敏. 东方百合 *ANS* 基因的克隆与对拟南芥过表达的表型分析. *分子植物育种*, 2021, 19(20): 6741-6746
 Yang C L, Zhang J, Fang S Z, Zheng Y P, Lin Z M. Cloning of *ANS* gene from Oriental lily and phenotypic analysis of overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (20): 6741-6746
- [48] 徐雷锋. 百合双色花形成的转录组分析及基因 *LhUFGT* 和 *LhSGR* 的功能研究. 北京: 中国农业科学院, 2017
 Xu L F. Transcriptome analysis of bicolor tepal development in lilies and functional analysis of *LhUFGT* and *LhSGR*. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017
- [49] Cao Y P, Li K, Li L Y, Zhao X P, Wang L H. MYB transcription factors as regulators of secondary metabolism in plants. *Biology*, 2020, 9(3): 61
- [50] Jiang C K, Rao G Y. Insights into the diversification and evolution of R2R3-MYB transcription factors in plants. *Plant Physiology*, 2020, 183(2): 637-655
- [51] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, Masuda K. Two *R2R3-MYB* genes, homologs of petunia *AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily. *Plant & Cell Physiology*, 2010, 51(3): 463-474
- [52] Yamagishi M, Toda S, Tasaki K. The novel allele of the *LhMYB12* gene is involved in splatter-type spot formation on the flower tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *The New Phytologist*, 2014, 201(3): 1009-1020
- [53] Yamagishi M. Oriental hybrid lily Sorbonne homologue of *LhMYB12* regulates anthocyanin biosyntheses in flower tepals and tepal spots. *Molecular Breeding*, 2011, 28(3): 381-389
- [54] Yamagishi M. Isolation and identification of MYB transcription factors (*MYB19Long* and *MYB19Short*) involved in raised spot anthocyanin pigmentation in lilies (*Lilium* spp.). *Journal of Plant Physiology*, 2020, 250: 153164
- [55] Yamagishi M. *MYB19LONG* is involved in brushmark pattern development in Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.) flowers. *Scientia Horticulturae*, 2020, 272: 109570
- [56] Yin X J, Zhang Y B, Zhang L, Wang B H, Zhao Y D, Irfan M, Chen L J, Feng Y L. Regulation of MYB transcription factors of anthocyanin synthesis in lily flowers. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 761668
- [57] 肖伟. 兰州百合 *LdMYB6* 基因的克隆与初步功能分析. 长春: 吉林农业大学, 2019
 Xiao W. Cloning and preliminary functional analysis of *LdMYB6* gene from *Lilium davidii* var. unicolor. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019
- [58] Sakai M, Yamagishi M, Matsuyama K. Repression of anthocyanin biosynthesis by R3-MYB transcription factors in lily (*Lilium* spp.). *Plant Cell Reports*, 2019, 38(5): 609-622
- [59] 胡若倩, 景丹龙, 郭启高, 梁国鲁. 三倍体枇杷花期调控相关的 *EjbHLH79* 基因序列和表达特性分析. *植物生理学报*, 2021, 57(6): 1300-1310
 Hu R Q, Jing D L, Guo Q G, Liang G L. Analyses of the sequence and expression of flowering-related *EjbHLH79* gene in triploid loquat. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57 (6): 1300-1310

- [60] Heim M A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey P C. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20 (5): 735-747
- [61] Nakatsuka A, Yamagishi M, Nakano M, Tasaki K, Kobayashi N. Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121(1): 84-91
- [62] Dou X Y, Bai J R, Wang H, Kong Y, Lang L X, Bao F, Shang H Z. Cloning and characterization of a tryptophan-aspartic acid repeat gene associated with the regulation of anthocyanin biosynthesis in Oriental hybrid lily. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2020, 145(2): 131-140
- [63] Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & Cell*, 2011, 2(3): 202-214
- [64] 王熙然. 草莓 *FaWRKY44* 基因克隆及功能鉴定. 成都: 四川农业大学, 2019
Wang X R. *FaWRKY44* gene cloning and function identification. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019
- [65] Xu L F, Yang P P, Feng Y Y, Xu H, Cao Y W, Tang Y C, Yuan S X, Liu X Y, Ming J. Spatiotemporal transcriptome analysis provides insights into bicolor tepal development in *Lilium* "Tiny Padhye". *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 398
- [66] Li C L, Lu S F. Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza*. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 277
- [67] Yamagishi M. High temperature enhances anthocyanin coloration in Asiatic hybrid lily flowers via upregulation of the MYB12 positive regulator. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8 (6): 769-776
- [68] Lai Y S, Yamagishi M, Suzuki T. Elevated temperature inhibits anthocyanin biosynthesis in the tepals of an Oriental hybrid lily via the suppression of *LhMYB12* transcription. *Scientia Horticulturae*, 2011, 132: 59-65
- [69] Yamagishi M. A novel R2R3-MYB transcription factor regulates light-mediated floral and vegetative anthocyanin pigmentation patterns in *Lilium regale*. *Molecular Breeding*, 2016, 36(1): 1-14
- [70] Yamagishi M. Involvement of a LhMYB18 transcription factor in large anthocyanin spot formation on the flower tepals of the Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.) cultivar "Grand Cru". *Molecular Breeding*, 2018, 38(5): 1-16
- [71] 王璐, 戴思兰, 金雪花, 黄河, 洪艳. 植物花青素苷转运机制的研究进展. *生物工程学报*, 2014, 30(6): 848-863
Wang L, Dai S L, Jin X H, Huang H, Hong Y. Advances in plant anthocyanin transport mechanism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(6): 848-863
- [72] Jian Z, Richard A D. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 2009, 15(2): 72-80
- [73] 祝志欣, 鲁迎青. 花青素代谢途径与植物颜色变异. *植物学报*, 2016, 51(1): 107-119
Zhu Z X, Lu Y Q. Anthocyanin metabolism pathways and plant color variation. *Chinese Bulletin of Botany*, 2016, 51 (1): 107-119
- [74] Cao Y, Xu L, Xu H, Yang P, He G, Tang Y, Qi X, Song M, Ming J. *LhGST* is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *Plant Cell Reports*, 2021, 40 (1): 85-95
- [75] Xu H, Yang P, Cao Y, Tang Y, He G, Xu L, Ming J. Cloning and functional characterization of a flavonoid transport-related MATE gene in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *Genes*, 2020, 11(4): 418