



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：玉米花青素合成相关基因的鉴定及表达分析  
作者：李淑君，付忠军，郝芸茜，袁亮，祁志云  
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240918001  
收稿日期：2024-09-18  
网络首发日期：2024-11-13  
引用格式：李淑君，付忠军，郝芸茜，袁亮，祁志云. 玉米花青素合成相关基因的鉴定及表达分析[J/OL]. 植物遗传资源学报.  
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240918001>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 玉米花青素合成相关基因的鉴定及表达分析

李淑君<sup>1</sup>, 付忠军<sup>1</sup>, 郝芸茜<sup>2</sup>, 袁亮<sup>1</sup>, 祁志云<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>重庆市农业科学院玉米研究所, 重庆 401329; <sup>2</sup>长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 涪陵 408000)

**摘要:** 紫玉米 (*Zea mays* L.) 含有较高的花青素和其他功能性植物化学物质, 广泛应用于功能食品和医药等行业, 为玉米产业带来了较大的经济效益。为探究紫玉米中花青素生物合成的调控机制, 利用生物信息学方法, 从玉米全基因组数据库中鉴定出分布于 10 条染色体上的 83 个花青素生物合成相关基因 (*ZmABGs*)。系统发育树将这些基因分为五组。*ZmABGs* 启动子区的顺式作用元件分析表明, *ZmABGs* 基因在参与激素信号通路和胁迫响应中起重要作用。通过对玉米不同组织的表达分析发现, 与非授粉组织相比, 多个 *ZmABGs* 基因在授粉组织中表达, 尤其是在玉米种皮中。利用 qRT-PCR 技术对与粒色相关的 15 个关键 *ZmABGs* 基因在籽粒发育不同时期的表达分析表明, 调控基因 (*ZmPAP1-b* 和 *ZmLDB38-a*) 及其靶结构基因 (*ZmF3H-b*, *ZmDFR-b*, *ZmCHS-b*, *ZmF3'H*, *ZmPAL1-b*, *ZmPAL1-l* 和 *Zm4CH-c*) 的共同上调可能促进了紫玉米 Zi 2-1 在籽粒发育早期阶段 (授粉后 10~34 d) 的花青素积累, 而在后期发育阶段 (授粉后 34~46 d) 这些 *ZmABGs* 则表现出下调。本研究结果有助于更好地了解玉米中花青素积累的遗传机制和调控网络, 同时为促进高花青素玉米品种的选育提供一定的理论基础。

**关键词:** 玉米; 花青素生物合成相关基因; qRT-PCR

## Whole-Genome Identification and Comparative Expression

### Analysis of Anthocyanin Biosynthetic Genes in Maize

LI Shujun<sup>1</sup>, FU Zhongjun<sup>1</sup>, HAO Yunxi<sup>2</sup>, YUAN Liang<sup>1</sup>, QI Zhiyun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Maize Research Institute, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329;

<sup>2</sup>School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Fuling, Chongqing, 408000)

**Abstract:** Purple corn (*Zea mays* L.) contained a higher anthocyanins and other functional phytochemicals, and was widely used in function food and pharmaceutical industries, thereby ranked a higher economic benefits for the corn industry. To explore the regulatory mechanism of anthocyanin biosynthesis pathway in purple corn, 83 *Zea mays* anthocyanin biosynthetic genes (*ZmABGs*) were identified using bioinformatic approach, classified into 5 groups by phylogenetic tree, which were widely and randomly distributed in 10 chromosomeins. Cis-acting elements analysis of *ZmABGs* in the promoter region indicated that the potential role of *ZmABGs* involved in hormone signaling pathways and responsive to different stress.. In addition, more *ZmABGs* genes were expressed in pollinated organ samples than un-pollinated organ samples, especially for corn pericarp through expression analysis of different tissues. qRT-PCR showed that the upregulation of regulatory genes (*ZmPAP1-b* and *ZmLDB38-a*) together with its target structure genes (such as *ZmF3H-b*, *ZmDFR-b*, *ZmCHS-b*, *ZmF3'H*, *ZmPAL1-b*, *ZmPAL1-l* and *Zm4CH-c*) might promote the anthocyanin accumulation in Zi2-1 at early stages (10–34 days), while the down-regulation of those *ZmABGs* at late developmental stages (34–46 days). Taken together, our results gain insight into better understanding of the genetic mechanisms and regulatory network of anthocyanin accumulation in maize, and providing a theoretical basis for promoting the breeding of high anthocyanin maize varieties.

**Key words:** *Zea mays* L., anthocyanin biosynthetic genes, qRT-PCR

玉米(*Zea mays*)作为全球广泛种植的主要作物之一, 不仅为人类和动物提供食物, 还可用于生物燃料<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2024-09-18

第一作者研究方向为 玉米遗传育种, E-mail :272245217@qq.com

通信作者: 付忠军, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail : world.12345@163.com

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目 (CSTB2022TIAD-KPX0008); 重庆市科研机构绩效激励引导专项 (cstc2022xj180028)

**Foundation projects:** The Chongqing Technical Innovation and Application Development Special Project (CSTB2022TIAD-KPX0008); Performance Incentive and Guidance Project for Chongqing Scientific Research Institutions (cstc2022xj180028)

迄今为止，通过人工驯化产生了大量不同颜色籽粒的玉米品种。这些品种的籽粒中积累了不同类型和水平的类黄酮化合物，包括玉米素、槲皮素、单宁和花青素等<sup>[2]</sup>。花青素作为最重要的类黄酮化合物之一，对植物组织的色素沉积起着至关重要的作用。紫玉米因花青素含量高而备受关注，其花青素合成途径的研究在不断推进<sup>[3,4]</sup>。研究发现，紫玉米花青素的合成主要由结构基因和调控基因决定。结构基因在花青素含量高的组织比含量低的组织中富集得更多<sup>[5]</sup>，包括苯丙氨酸解氨酶（*PAL*）、二氢黄酮醇 4-还原酶（*DFR*）、查尔酮合酶（*CHS*）、查尔酮类异构酶（*CHI*）、黄烷酮 3'-羟化酶（*F3'H*）、黄烷酮 3-羟化酶（*F3H*）等基因，这些基因直接参与花青素生物合成途径<sup>[6-8]</sup>。其中，72%的结构基因上调表达以调节花青素的合成，转录组测序发现，在授粉后 34 天表现出最高的表达水平<sup>[9]</sup>。控制花青素合成的调控基因主要是一些转录因子，通过调控结构基因的表达水平从而调节花青素的合成。目前鉴定出参与花青素调控的主要是转录因子 MYB、bHLH 和 WD40。这三类转录因子可单独作用，也可相互结合形成 MYB-bHLH-WD40 三元转录因子复合体（MBW 复合体）共同调控花青素合成的结构基因<sup>[10]</sup>，且该复合体激活结构基因的能力比单独的转录因子强。研究表明，调控花青素合成的转录因子表达具有组织特异性<sup>[11,12]</sup>。*ZmC1* 是首个被克隆的植物花青素合成调控因子，调节玉米籽粒糊粉层的色素沉积，而随后分离出的与 *ZmC1* 高度相似的 *pl* 基因影响着植物的花和营养组织的着色<sup>[13]</sup>，这两个都属于 MYB 转录因子。玉米中的 *Lc* 基因属于 bHLH 转录因子，该基因负责调控种皮中花青素的累积<sup>[14]</sup>。bHLH 型蛋白 *in1*(intensifier1)被鉴定是玉米花青素合成的隐性增强因子，与 *R1* 和 *B1* 具有高度的序列相似性<sup>[15,16]</sup>。其中，部分 *R1* 和 *B1* 等位基因在种皮和糊粉层中发挥作用<sup>[17]</sup>。属于 MYB 型和 bHLH 家族的 *ZmC1* 和 *ZmR1* 的过表达可以增加小麦种质中的花青素含量<sup>[18]</sup>，表明花青素含量可以通过转录因子调节结构基因的表达水平来增加。

然而，迄今为止，紫玉米花青素合成途径的调控机制尚未完全阐明，这在一定程度上阻碍了紫玉米品种的选育。因此，为鉴定玉米中的花青素生物合成相关基因（*ZmABGs*），研究这些 *ABGs* 在不同颜色玉米籽粒发育过程中的基因表达模式，本研究对 *ZmABGs* 进行了全基因组鉴定，并对在籽粒发育过程中参与颜色变化相关的候选基因 *ZmABGs* 的表达进行分析，研究结果将为玉米花青素生物合成途径的转录调控提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为紫玉米自交系 Zi2-1、黄玉米自交系渝 P369，均由重庆市农业科学院提供。于 2023 年春季种植于重庆市九龙坡区皇田试验站。每个材料种植面积 88m<sup>2</sup>，行长 10 m，行宽 8.8 m，行距 55 cm，株距 30 cm。试验过程中水肥管理、病虫害防治等与当地大田玉米生产管理一致。授粉时将牛皮纸袋套在穗部，直至采样后结束。授粉后对两个材料各挑选授粉时间相同的果穗悬挂吊牌，于授粉后 10、14、18、22、26、30、34、38、42 和 46 d 10 个时期分期用镊子挑取果穗中部籽粒，每个样品取 3 个果穗混样，作为 3 次生物学重复。选取 10 粒拍照观察，其余样品置于试管中液氮速冻，随即放入 -80℃ 冰箱保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 玉米花青素生物合成相关基因 *ABGs* 的鉴定和特征分析 从玉米基因组数据库（Index of /Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0 (maizegdb.org)）中下载玉米 *ABGs* 基因家族的蛋白质序列。从 TAIR（<https://www.arabidopsis.org/>）网站下载拟南芥 *ABGs* 基因家族的蛋白质序列作为查询，使用本地 BLASTP 对玉米 *ABGs* 蛋白进行搜索。将候选基因提交到 NCBI CDDhit（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>）网站验证其保守结构域。使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)<sup>[19]</sup> 分析 *ZmABGs* 蛋白质的长度、等电点和分子量。

通过 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>)<sup>[20]</sup> 和 TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)<sup>[21]</sup> 预测亚细胞定位和跨膜位置。

1.2.2 玉米 ABGs 基因家族成员的特征分析 使用 TBtools 分析 *ZmABGs* 在玉米不同染色体上的位置，并对结果进行可视化<sup>[22]</sup>。采用姚瑶等人的方法评估 *ZmABGs* 的基因拷贝数和共线性分析<sup>[23]</sup>。采用 MEGA11 软件邻接法 (NJ, neighbor joining) 构建系统发育树，检验参数 Bootstrap 重复 100 次。利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析 *ZmABGs* 蛋白质序列保守基序，保守域数目上限设置为 15。利用 TBtools 分析 *ZmABGs* 基因结构。利用 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在 *ZmABGs* 基因上游 1500 bp 预测其启动子区域的顺式作用元件<sup>[24]</sup>，并通过 TBtools 对生成的结果进行可视化分析。利用 STRING 网站 (<http://string-db.org>) 和 Cytoscape 软件分别构建和美化 *ZmABGs* 蛋白-蛋白相互作用网络图<sup>[25]</sup>。

1.2.3 *ZmABGs* 转录表达模式分析 利用 qTeller MaizeGDB 中提供的玉米不同组织 (胚、胚乳、未授粉节间、未授粉叶片、种皮、授粉节间和叶片) 在授粉后 18 d 的转录组数据，分析 *ZmABGs* 基因在玉米各组织中的表达水平。表达量经  $\log_2$  转化后，利用 Ttools 绘制转录组数据表达热图。

1.2.4 qRT-PCR 验证 提取授粉后 10、14、18、22、26、30、34、38、42 和 46 d 玉米籽粒的 RNA 进行实时定量 PCR 验证。采用 EZNA plant RNA kit 试剂盒提取总 RNA，合成相应的 cDNA。选择差异表达的 *ZmABGs* 基因进行 qRT-PCR 分析。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物，引物序列见表 1。以 *GAPDH* 基因 (GenBank 接入号: GenBank: X07156.1) 作为内参基因。qRT-PCR 的仪器为 Applied Biosystems 公司的 StepOne Real-Time PCR System，扩增体系为 20  $\mu$ L: 正/反向引物各 1  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR Green Realtime PCR Master Mix 5  $\mu$ L, 无酶水 7  $\mu$ L。扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$ <sup>[26]</sup> 法计算目的基因相对于内参基因的表达水平，每个试验重复 3 次。

表 1 籽粒发育过程中与颜色变化相关的候选 *ZmABGs* qRT-PCR 分析引物列表

**Table 1. List of primers for qRT-PCR analysis of candidate *ZmABGs* in color change during the developmental process of grains**

基因名称 Gene name		引物序列 (5'—3') Primer sequences (5'—3')	基因编号 Genetic ID
<i>Zm-qRT-ZmGAPDH</i>	正向	CCATCACTGCCACACAGAAAAC	GenBank: X07156.1
	反向	AGGAACACGGAAGGACATACCAG	
<i>Zm4CL1-f</i>	正向	GTTGCAAAGGAGGTCGTGTT	Zm00001eb389420_T002
	反向	TGTGTGTTGTCACCTGCTTGG	
<i>ZmC4H-c</i>	正向	CCTATCATCGGCATCACCCCT	Zm00001eb346150_T001
	反向	CGATCTGGTTGCTGAACTGG	
<i>ZmCHI-a</i>	正向	CTCGAGATCGGAGGCAACTT	Zm00001eb062510_T001
	反向	ATCGTCACCCTCGTGA ACTT	
<i>ZmDFR-b</i>	正向	TCGTCATGAAGCTCCTCCAG	Zm00001eb159020_T001
	反向	GGTCCATCAATGGCTTCGTC	
<i>ZmF3H-b</i>	正向	ACTTCTCGTACCCGGTGAAG	Zm00001eb067380_T002
	反向	ACCACCTTCTGGTCCATGTC	
<i>ZmPAL1-b</i>	正向	ATCGCCAACAGGATCAAGGA	Zm00001eb077230_T001
	反向	CAGGAACACCTTGTGCACT	
<i>ZmPAL1-i</i>	正向	ATCGAAGTGATCCGCTTTC	Zm00001eb247630_T001
	反向	TGGGAGTTCCTGGAAGTTG	
<i>ZmPAP1(MYB75)-b</i>	正向	GTGCACCAACAACCTGTAGCA	Zm00001eb328600_T001
	反向	ACGTAGTCGGACCACTTGTAG	
<i>ZmPAP1(MYB75)-l</i>	正向	CCAACTACATTGCGGAGCAC	Zm00001eb328600_T002
	反向	TCCTCCTTGGAGATGTTCCC	
<i>ZmLBD38-a</i>	正向	GACGATCGACCCGGTGAG	Zm00001eb108240_T001
	反向	GTCGAGAACGTCGAGCAC	
<i>ZmF3'H-b</i>	正向	GAACGGGATCATCAGGGAGA	Zm00001eb245960_T001
	反向	GAGGTTTCAGGAGAAGTGCCT	
<i>ZmTTG1-a</i>	正向	GCTCTGTTCCGCTCTTTGAT	Zm00001eb242340_T001
	反向	TGATGGTGGCCATGTACCTT	
<i>ZmMYB12-b</i>	正向	ATAAGGTGCAGCAGAATGCC	Zm00001eb273580_T003
	反向	GCGTTGAAAGGCTCCTTCTT	
<i>ZmCHS-b</i>	正向	ATACCGGAGACCAAGCATGT	Zm00001eb129220_T001
	反向	CTCCCTGGAAGGGTTGAAGT	
<i>ZmFLS1-b</i>	正向	GTCAATGGTACGAGGCCAAG	Zm00001eb256000_T002
	反向	CATGACATCCGCGTCTTCTC	

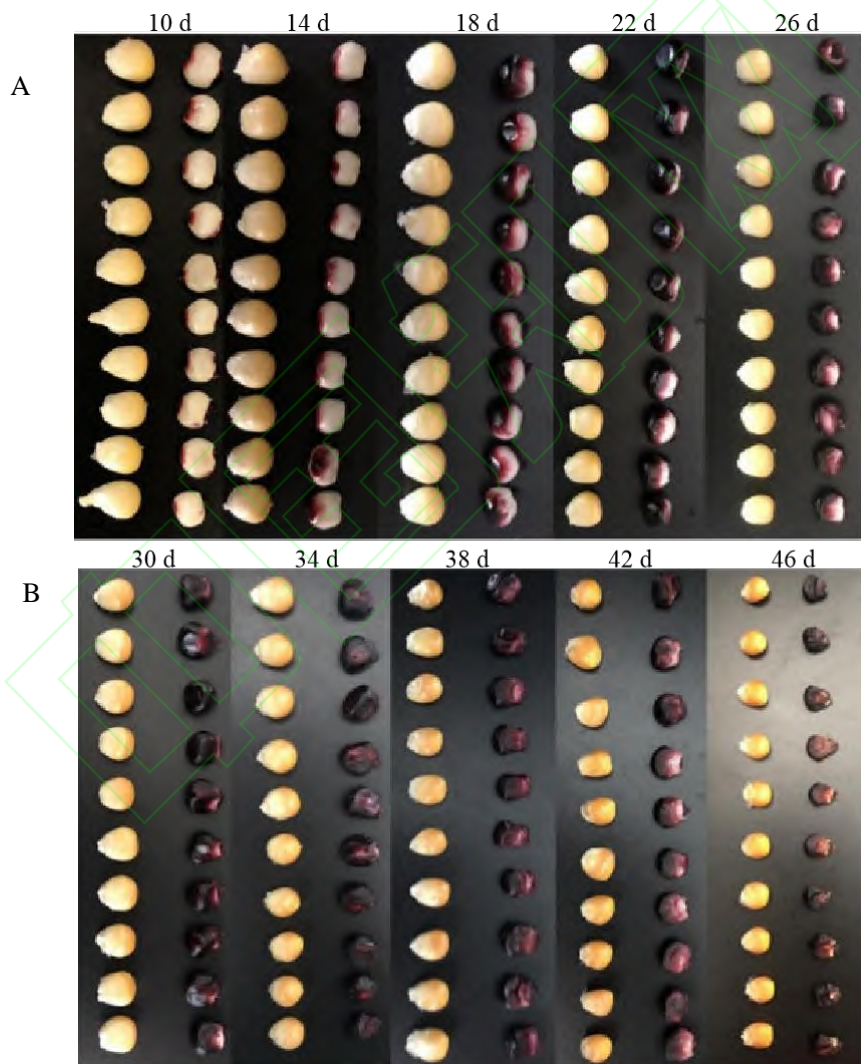
### 1.3 数据分析

采用 SPSS20.0 软件进行方差分析, 评估不同样品间基因相对表达水平的差异, 数值以平均值  $\pm$  标准差表示。Duncan's 法对各测定数据进行多重比较, 不同的字母表示在  $P=0.05$  水平上存在显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 籽粒颜色表型鉴定

观察籽粒发育过程中颜色的动态变化。由图 1 可以看出, Zi 2-1 的籽粒颜色从授粉后 10 d 到 46 d 逐渐深化, 授粉后 14 d 时籽粒顶端发现少量色素沉积, 随后向四周扩散; 授粉后 30 d 左右, 色素在籽粒的各个部分均有沉积。而渝 P369 的籽粒颜色从授粉后 10 d 至 46 d 并未看到明显变化, 仅在种皮中表现出常见的黄色。



A:紫玉米 Zi 2-1; B:黄玉米渝 P369; d: 授粉后天数。下同

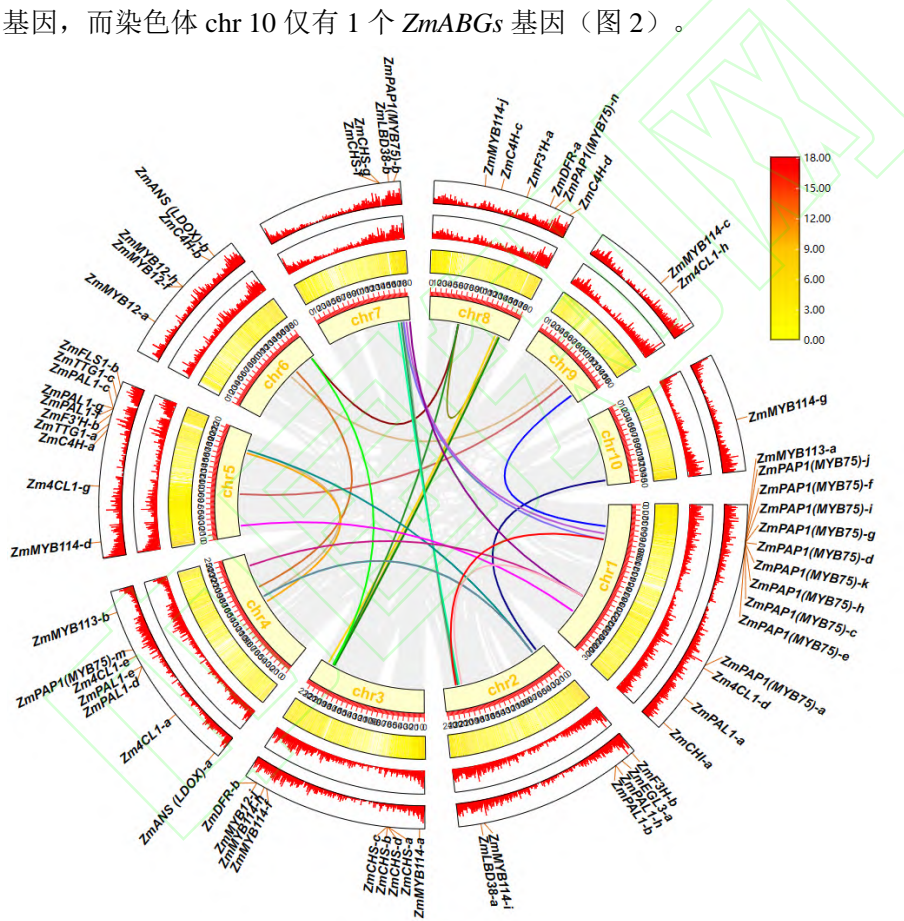
A:Purple corn Zi 2-1,B:Yellow corn Yu P369, d: Days after pollination.The same as below

图 1 紫玉米 Zi 2-1 和黄玉米渝 P369 籽粒发育过程中的颜色变化

**Fig.1 Color change during the developmental process of grains in purple corn Zi 2-1 and yellow corn Yu P369**

## 2.2 *ZmABGs* 基因的全基因组鉴定与特征分析

本研究在玉米中共鉴定出 83 个 *ZmABGs* 基因，包括 42 个结构基因和 41 个调控基因。其中，*FLS* 家族基因 (*FLS2*、*FLS4*、*FLS5*、*FLS6*)、*CPC*、*MYB111* 和 *MYB113* 在玉米中尚未被鉴定，而在拟南芥中已被鉴定出，这些基因可能在玉米基因组的全基因组多倍体化后丢失。玉米中 *ZmABGs* 基因的数量是拟南芥的两倍，表明全基因组多倍体化和异源多倍体化可能在玉米中广泛存在。83 个 *ZmABGs* 蛋白的长度为 198~719 个氨基酸，等电点为 4.78 ~10.48 kDa，蛋白质分子量为 2.16~7.74 KD。亚细胞定位预测显示，多数 *ZmABGs* 调控基因蛋白位于细胞核中，而结构基因除 *ZmC4H*、*ZmF3'H* 和 *Zm4CL* 家族的蛋白位于细胞膜中，其他均位于细胞质中。跨膜结构分析发现，仅 *ZmF3H-a*、*ZmF3H-b*、*ZmDFR-a*、*ZmC4H-d*、*ZmMYB12-b*、*ZmF3'H-a* 和 *ZmANS (LOOX)-b* 分布在跨膜区。83 个 *ZmABGs* 基因在不同的染色体上分布不均匀。其中，染色体 chr 1 上有 14 个 *ZmABGs* 基因，而染色体 chr 10 仅有 1 个 *ZmABGs* 基因 (图 2)。



灰色区域：玉米基因组中的所有共线性区域；淡黄色区域：玉米染色体的部分 (chr1-chr10)；基因密度：热图沿每条矩形、直线和条形；多色线：片段重复的 *ZmABGs* 基因对

The gray areas indicate all synteny blocks in the maize genome,; Faint yellow blocks indicate parts of the maize chromosomes (chr1-chr10); The gene density on each chromosome is depicted by the heatmap along each rectangle, line and bar; The multicolored lines indicate segment duplicated *ZmABGs* gene pairs

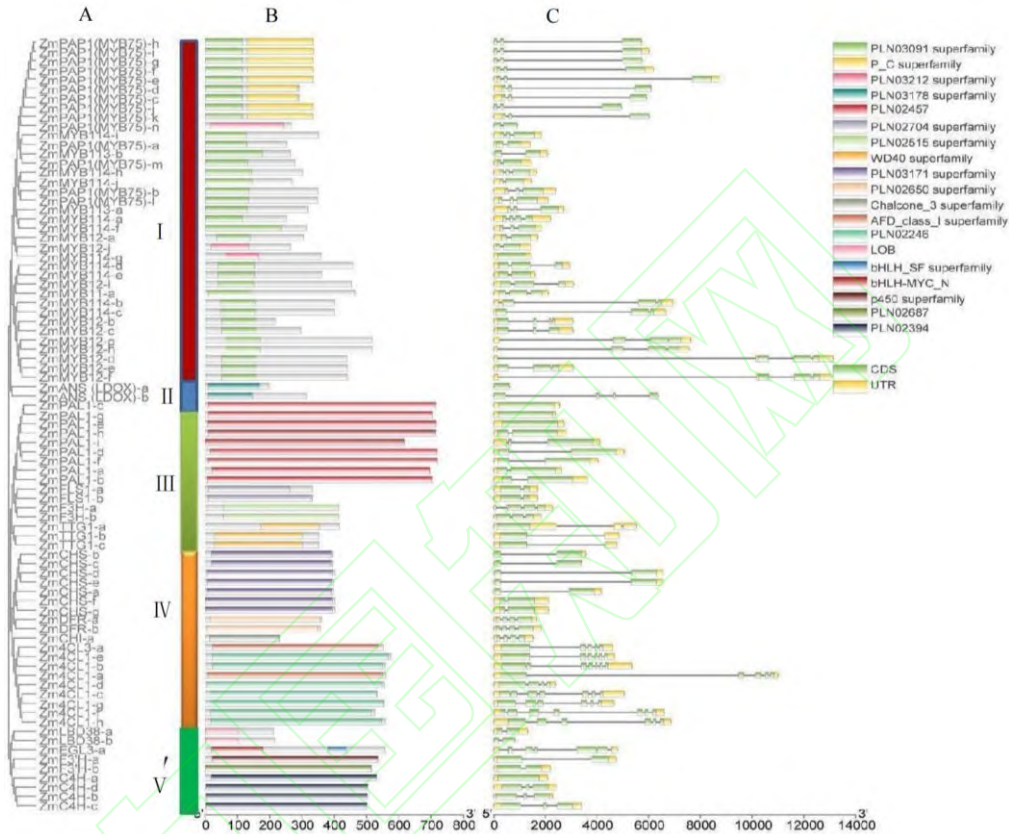
图 2 玉米 10 条染色体上 *ZmABGs* 基因的染色体定位及 *ZmABGs* 基因染色体间关系的共线性分析

**Fig.2 Chromosomal locations of *ZmABGs* genes on 10 chromosomes of maize and synteny analysis of interchromosomal relationships of *ZmABGs* genes**

## 2.3 *ZmABGs* 基因结构

根据系统发育树结果将 83 个 *ZmABGs* 基因分为五组。其中，由 *ZmPAP1 (MYB75)*、*ZmMYB14*、*ZmMYB113*、*ZmMYB114*、*ZmMYB11* 和 *ZmMYB12* 家族组成的第一组成员数量最多，包含 37 个成

员，而第二组最少，仅包含两个 *ZmANS* 家族成员（图 3A）。除 *ZmPAP1* (*MYB75*)-c~*ZmPAP1* (*MYB75*)-k 和 *ZmEGL3-a* 基因有两个结构域外，其他 *ZmABGs* 基因均有一个结构域（图 3B）。外显子-内含子结构显示，外显子数量为 0~4 个，66 个 *ZmABGs* 基因有 2 个外显子，7 个 *ZmABGs* 基因缺少外显子；*ZmPAL*、*ZmFLS1*、*ZmF3H* 和 *ZmTTG1* 家族具有相似的外显子-内含子结构，被归为第三组，*ZmCHS*、*ZmDFR*、*ZmCHI* 和 *Zm4CL* 家族被归为第四组，*ZmLBD*、*ZmC4H*、*ZmEGL3* 和 *ZmF3'H* 被归为第五组（图 3C）。



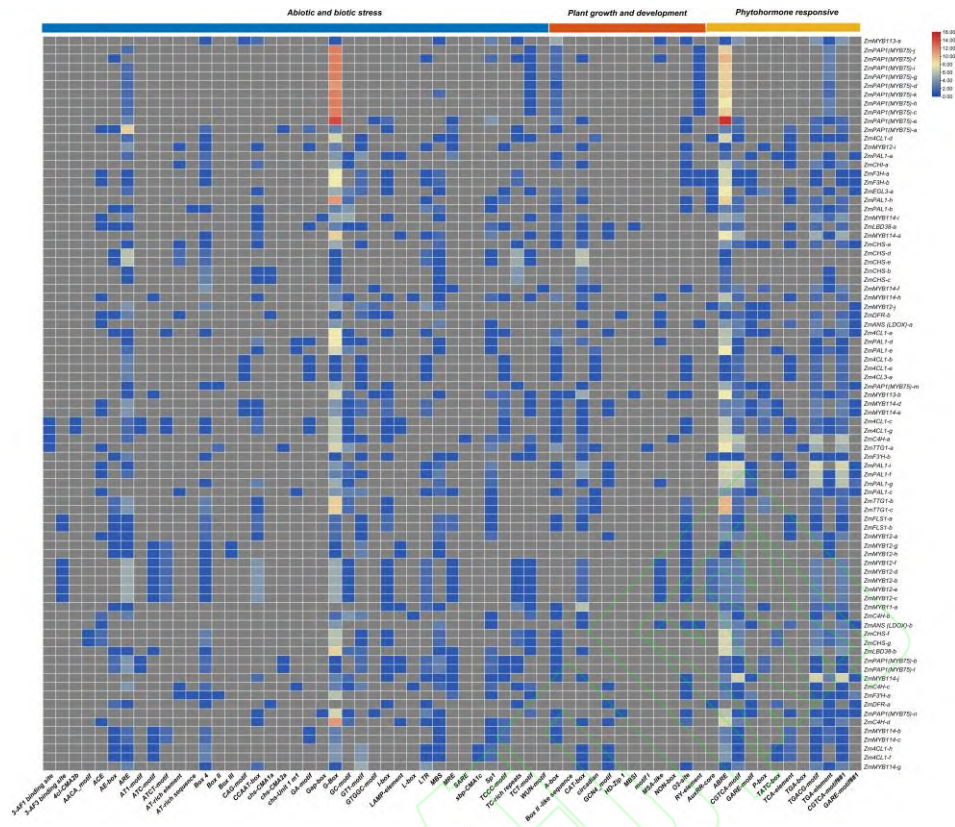
A: 基于玉米 *ABGs* 蛋白的全长序列，使用 MEGA 11 软件构建的系统发育树；B: *ZmABGs* 的区域由粉色、绿色和黄色框突出显示；C: 玉米 *ABGs* 基因外显子-内含子结构；绿色框：未翻译的 5' 和 3' 区；黄色框：外显子；黑线：内含子  
A: The phylogenetic tree was constructed based on the full-length sequences of maize *ABGs* proteins using MEGA 11 software; B: The *ZmABGs* domains are highlighted by pink, green and yellow boxes; C: Exon-intron structure of maize *ABGs* genes; Green boxes: untranslated 5'- and 3'-regions; Yellow boxes: exons; black lines indicate introns

图 3 *ZmABGs* 基因的结构分析  
Fig.3 Structural analysis of *ZmABGs* genes

#### 2.4 *ZmABGs* 启动子特征分析

对 *ZmABGs* 的启动子区域中的顺式作用元件进行预测（图 4），发现 *ZmABGs* 基因启动子区域中分布着大量顺式作用元件，主要包括植物激素响应、非生物和生物胁迫、生长素响应三种类型。其中，许多与植物激素响应相关的元件分布在大部分 *ZmABGs* 基因启动子区域，尤其是脱落酸响应元件，茉莉酸甲酯响应元件。此外，厌氧诱导响应元件和光响应元件也被广泛发现（图 4）。其他 *ZmABGs* 启动子中的顺式元件参与了非生物胁迫反应，包括 18 个参与防御和应激应答响应顺式调节元件 *ProZmABG*，以及参与低温反应的顺式调控元件。这些结果表明 *ZmABGs* 基因在参与激素信号通路和胁迫响应中起重要作用。





不同的颜色：不同类型的顺式元件；框中的颜色强度和数量：ZmABGs 基因中顺式元件的数量

Different colors: Different type of cis-elements; The color intensity and number in the box: The numbers of cis-element in these ZmABGs genes

图 4 ZmABGs 基因上游 1.5 kb 区域的顺式元件分析

Fig.4 Cis-element analysis of the upstream 1.5 kb region of ZmABGs genes

## 2.5 ZmABGs 与 MBW 复合体的相关性分析

为研究 MBW 复合体调控 ZmABGs 基因表达的机制，对 MYB、bHLH 和 WD40 TFs 三类转录因子家族与 ZmABGs 基因间的相关性进行分析。结果显示，ZmbHLH15 的表达与其他 ZmABGs 转录本之间呈显著或极显著正相关。ZmPAP1(MYB75)-b 与除 ZmC4H-c、Zm4CL1-g、ZmbHLH46 和 ZmFBX2 外的其他转录本间呈显著或极显著正相关。ZmSEC31A 与除 ZmC4H-c、Zm4CL1-g、ZmFBX2 和 ZmDCAF 的其他基因转录本间表现显著或极显著正相关，结构基因 ZmPAL1-d 与除 ZmCOP1b 外的其他转录本间也表现出正相关(图 5)。相关性分析结果表明，大多数 MBW 复合体参与了授粉后玉米不同组织中花青素生物合成过程。

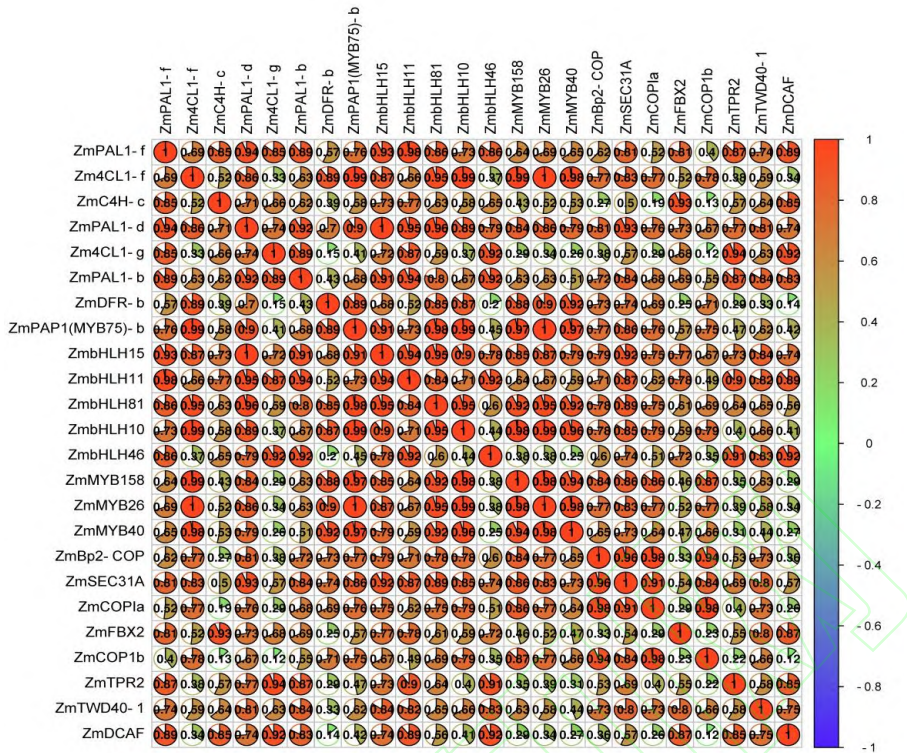


图5 ZmABGs 与 MBW 复合体的相关性分析

Fig.5 Correlation analysis between ZmABGs and MBW complex

### 2.6 ZmABGs 结构基因与 MBW 复合体蛋白-蛋白相互作用分析

构建包含 ZmABGs 结构基因与 MYB、bHLH 和 WDR 转录因子相互作用的网络图 (图 6)。结果表明, 结构基因 *ZmEGL3-a*、*ZmFLS1-b*、*ZmANS*、*ZmCHS-g*、*ZmC4H-d*、*ZmF3H-b*、*ZmF3'H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmPAL1-i* 和 *ZmPAL1-b* 能与 MYB 家族基因 (*ZmMYB40-b*、*ZmPAP1 (MYB75)-a*、*ZmPAP1(MYB75)-l* 和 *ZmMYB12-d*) , bHLH 家族基因 (*ZmbHLH46-a*、*ZmbHLH46-b*) 和 WDR 家族基因 (*ZmFBX2-d*、*ZmLBD38-a* 和 *ZmLBD38-b*) 相互作用。其中, MYB 转录因子在 R3 MYB 域 '(D/E)Lx2(R/K)x3Lx6Lx3R' 中均存在一个与 bHLH 转录因子相互作用的基序, 使得它们能够与 bHLH 相互作用形成 MBW 复合物。研究发现, 当氮源充足时, *LBD37/38/39* 蛋白抑制激活拟南芥花青素生物合成的 *R2R3-MYB* 基因 *PAP1* 和 *PAP2* 表达。由此推测上述结构基因可能受由 bHLH 家族基因 (*ZmbHLH46-a*、*ZmbHLH46-b*) 和 WDR 家族基因 (*ZmFBX2-d*) 相互作用的 R3-MYB 复合物 (*ZmMYB40-b*、*ZmPAP1 (MYB75)-a*、*ZmPAP1(MYB75)-l* 和 *ZmMYB12-d*) 调控, 并受 *ZmLBD38-a* 和 *ZmLBD38-b* 负调控, 从而参与玉米花青素的生物合成。

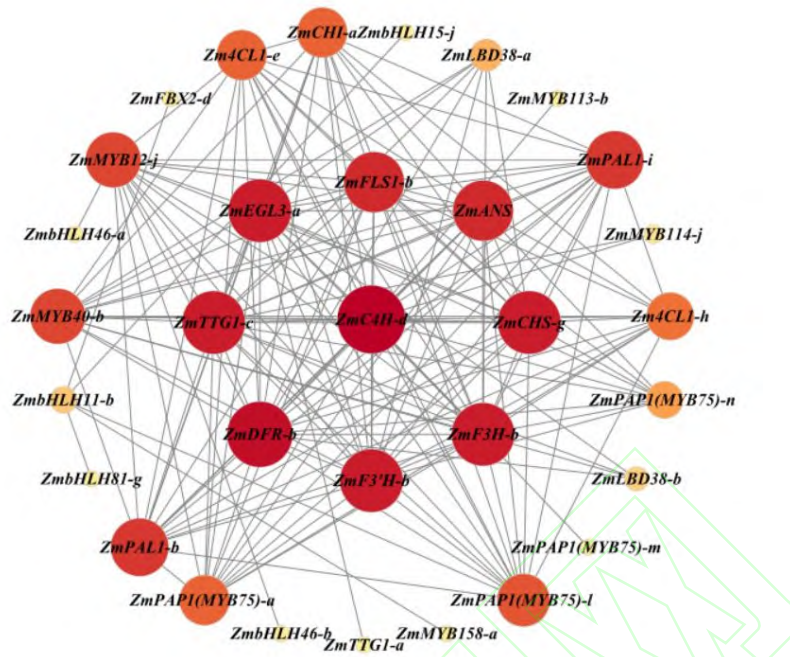


图 6 *ZmABGs* 结构基因与 MBW 复合体蛋白-蛋白互作网络

Fig.6 Prediction and protein-protein interaction of *ZmABGs* and their MYB-bHLH-WDR (MBW) complex interacting proteins

### 2.7 *ZmABGs* 在不同组织中的表达分析

为研究 *ZmABGs* 基因在玉米不同组织中的表达情况，对授粉后 18 d 的胚、胚乳、未授粉节间、未授粉叶片、种皮、授粉节间和叶片中 *ZmABGs* 的表达进行分析。结果表明，59 个 *ZmABGs* 基因在玉米不同组织中表达水平存在较大差异(图 7)。其中，*ZmC4H-c*、*ZmTTG1-a* 和 *ZmPAP1(MYB75)-m* 在胚中表达量较高 (FPKM  $\geq 5$ )，*ZmMYB12-b*、*ZmMYB12-h* 和 *ZmMYB12-g* 在胚乳中表达量较高；*ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-d*、*ZmPAL1-b*、*ZmC4H-c*、*Zm4CL1-c*、*Zm4CL1-a*、*ZmF3'H-a*、*ZmMYB12-a*、*ZmMYB12-b* 和 *ZmMYB114-a* 在未授粉节间表达量较高，*ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-c*、*ZmC4H-c*、*Zm4CL1-c*、*ZmCHI-a* 和 *ZmF3'H-b* 在未授粉叶片中表达量较高。与其他组织样本中各转录物的表达相比，*ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-d*、*ZmPAL1-b*、*Zm4CL1-f*、*ZmC4H-c*、*Zm4CL1-c* 和 *ZmCHI-a* 在种皮中显著表达。授粉节间中 *ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-d*、*ZmPAL1-b*、*Zm4CL1-c*、*Zm4CL1-g*、*ZmC4H-c*、*Zm4CL1-a*、*ZmF3'H-a*、*ZmMYB12-a*、*ZmMYB12-b* 和 *ZmMYB114-a* 的表达量较高，授粉叶片中 *ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-c*、*ZmC4H-c*、*Zm4CL1-c*、*Zm4CL1-g*、*ZmF3'H-b* 和 *ZmMYB12-a* 的表达量较高。与非授粉组织相比，多个 *ZmABGs* 基因在授粉组织中表达，尤其是在玉米种皮中。

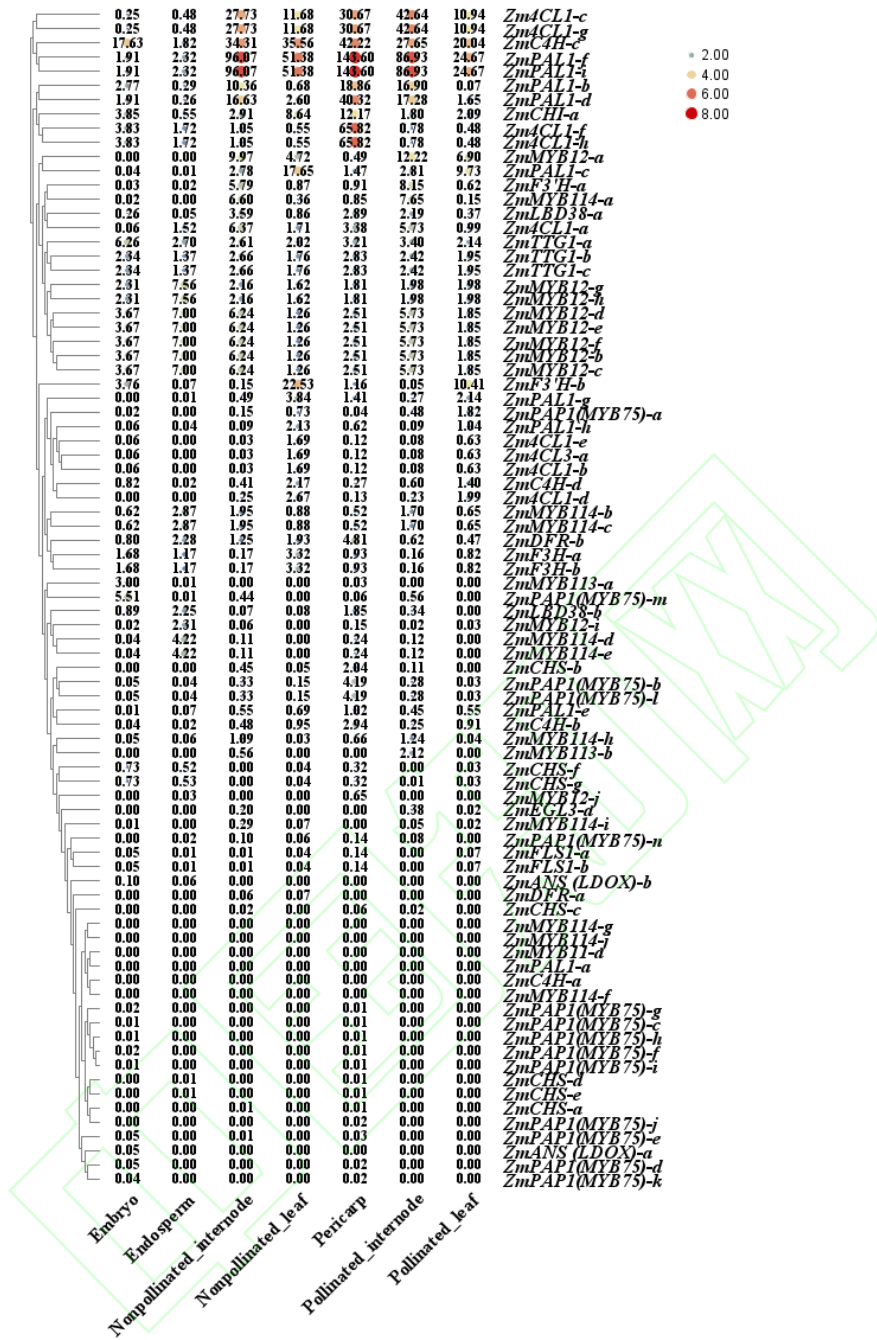


图 7 授粉后 18 d *ZmABGs* 基因在玉米不同组织中的差异表达

Fig.7 The expression profile of *ZmABGs* genes in different tissues of maize on the 18th day after pollination

## 2.8 籽粒发育中与粒色变化相关的 *ZmABGs* 基因的表达分析

对与粒色变化相关的 15 个候选 *ZmABGs* 基因（包括 5 个调节基因和 10 个结构基因）在两种不同粒色玉米籽粒发育过程中的表达进行分析。结果显示 Zi 2-1 中，与授粉后 10 d 相比，*ZmF3H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmCHS-b*、*ZmF3'H* 4 个基因随着籽粒的发育呈显著差异表达，且在授粉 30-38 d 达到峰值，表达水平非常高（图 8a、8b、8c、8d）；*ZmPAL1-b*、*ZmPAP1-b*、*ZmPAL1-L*、*ZmC4H-c*、

*ZmLDB38-a* 5 个基因随着籽粒的发育中等表达（图 8e、8f、8g、8h、8j）；*ZmCHI-a*、*ZmPAP1-l*、*Zm4CL-f*、*ZmFLS1-b*、*ZmTTG1-a* 和 *ZmMYB12-b* 6 个基因的表达水平在各个时期均偏低（图 8i、8k、8l、8m、8n、8o）。15 个候选基因除 *ZmCHI-a* 外，在渝 P369 籽粒发育的各个时期表达水平均极低甚至不表达，*ZmCHI-a* 在渝 P369 中的各个时期的表达量均高于 Zi 2-1。

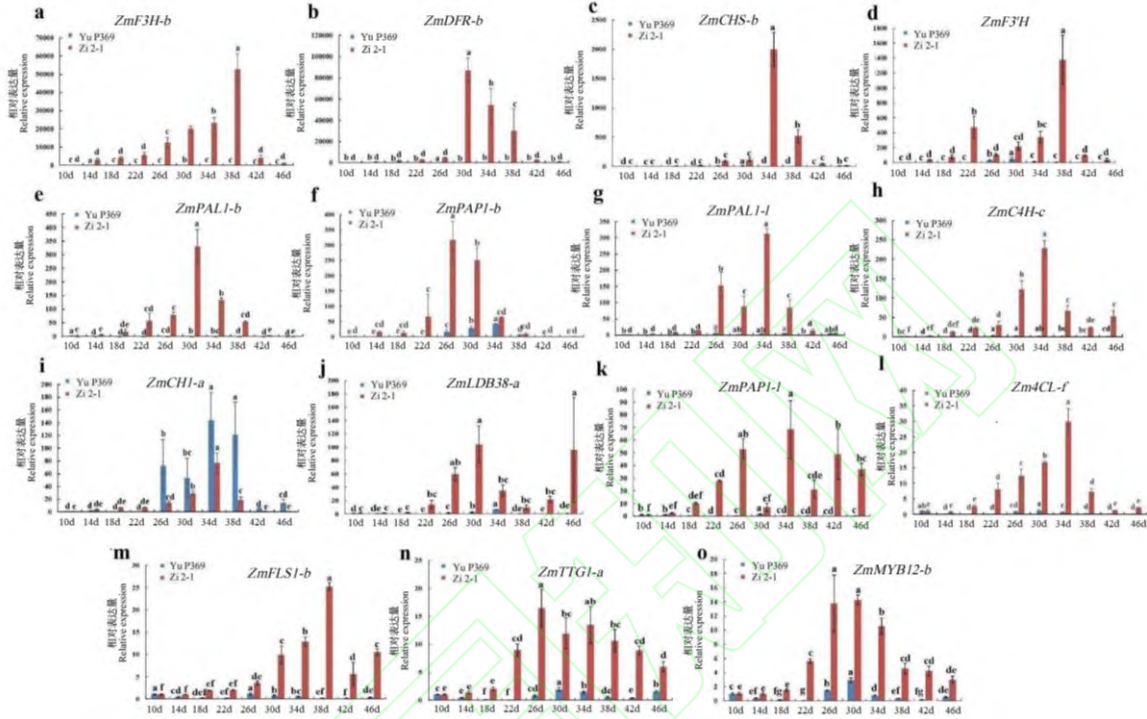


图 8 两个自交系籽粒发育过程中与颜色变化相关的 15 个候选 *ZmABGs* 基因的表达谱

**Fig.8 Expression profiles of 15 candidate *ZmABGs* genes involved in color change during the developmental process of grains in two different maize inbred lines**

### 3 讨论

紫玉米籽粒中含有丰富的花青素，能够促进人体生理活性而备受人们喜爱。目前，许多植物中与花青素合成相关的基因已经被鉴定与分析<sup>[28-30]</sup>。但紫玉米花青素生物合成相关基因的报道较少，其确切功能尚不清楚。本研究通过生物信息学方法，基于玉米全基因组数据，共鉴定出 83 个 *ZmABGs*，其数量与白菜（73 个）<sup>[31]</sup>和甘蓝（81 个）接近<sup>[32]</sup>，但少于芥菜（129 个）<sup>[33]</sup>，比拟南芥（41 个）多一倍，表明玉米中可能存在全基因组多倍体化和异源多倍体化，这与甘蓝型油菜<sup>[34]</sup>和芥菜<sup>[33]</sup>中的发现相一致，推测在进化过程中这些基因可能发生了基因复制事件。83 个 *ZmABGs* 基因不均匀地分布在 10 条染色体上。其中，第 1 条染色体的 *ZmABGs* 成员数量最多。基于序列同源性和分类，构建系统发育树，将 83 个 *ZmABGs* 基因分为五组。结果表明，第 I 组的 *ZmABGs* 数量最多，且都是 MYB 转录因子家族成员。

花青素生物合成基因包括苯丙烷途径基因、早期生物合成基因、晚期生物合成基因、转运基因和调控基因（正向和负向）<sup>[35]</sup>，花青素的生物合成是由调控基因及其响应的结构基因的协同表达决定<sup>[36]</sup>。本研究通过对 MYB、bHLH 和 WD40 TFs 三类转录因子家族与 *ZmABGs* 基因间相关性

分析发现,大多数 MBW 复合体参与了授粉后玉米不同组织中花青素生物合成途径,花青素积累机制受到转录因子的调控。研究发现,它们可以正向调控花青素的合成,也能抑制其合成<sup>[37,38]</sup>。近年来, bHLH、R2R3-MYB、WRKY 和 WD40 等调控基因在苹果<sup>[39]</sup>、苦荞<sup>[40]</sup>、百合<sup>[41]</sup>及其他植物中得到广泛鉴定<sup>[42]</sup>。其中, *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *FLS1* 基因的表达可能由 R2R3-MYB 蛋白(*MYB11*、*MYB12* 和 *MYB111*) 激活<sup>[43]</sup>。在苹果中, *MdDFR*、*MdUFGT* 和 *MdMYB* 基因可能通过与这些基因的启动子序列结合而受到 *MdbHLH2* 基因的调控<sup>[44]</sup>。本研究通过蛋白-蛋白互作 (PPI) 分析表明,结构基因 *ZmABGs* (*ZmEGL3-a*、*ZmFLS1-b*、*ZmANS*、*ZmCHS-g*、*ZmC4H-d*、*ZmF3H-b*、*ZmF3'H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmPAL1-i* 和 *ZmPAL1-d*) 可能通过与 bHLH 家族基因 (*ZmbHLH46-a*、*ZmbHLH46-b*) 和 WDR 家族基因 (*ZmFBX2-d*) 互作的 R3-MYB 复合体进行正向调控,同时受到 *ZmLBD38-a* 和 *ZmLBD38-b* 的负向调控,从而参与玉米花青素的生物合成。

本研究利用玉米不同组织在授粉后 18 d 的转录组数据,分析了 *ZmABGs* 基因的表达情况。从表达热图可以看出,这些基因在不同组织中的表达存在显著差异,多数基因在授粉组织器官中表达量高于未授粉组织,在种皮中表现尤为突出,如 *Zm4CL1-c*、*ZmC4H-c*、*ZmPAL1-i*、*ZmPAL1-d*、*Zm4CL1-f* 等,这对维持种皮花青素生物合成的过程至关重要;多数基因在胚、胚乳以及未授粉组织中表达水平低或不表达,推测这些组织器官中花青素合成可能存在负调控机制。qRT-PCR 分析发现, Zi 2-1 中 7 个结构基因 (*ZmF3H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmCHS-b*、*ZmF3'H*、*ZmPAL1-b*、*ZmPAL1-l* 和 *Zm4CH-c*) 在籽粒发育过程中显著高表达,且变化趋势较为一致,在授粉后 30-38 d 时表达水平达到峰值,随后逐渐下降,而在渝 P369 中表达水平极低甚至不表达。2 个结构基因 (*ZmPAP1-b* 和 *ZmLDB38-a*),在 Zi 2-1 籽粒发育时期呈现出由低到高再下降的表达趋势。籽粒发育中 Zi 2-1 的色素变化趋势表现出授粉后 10 d 至 30 d 逐渐沉积,34 d 后趋于稳定,渝 P369 的籽粒颜色未见显著变化,这与他们的花青素生物合成相关基因的表达情况较为一致。在油菜类植物中,过表达 *AtDFR* 可导致花青素的积累<sup>[45]</sup>。*AtTT19* 是将花青素从细胞质转运至液泡膜的重要调控因子,tt19 突变体在大麦中能够蓄积花青素<sup>[46]</sup>。营养组织中, *DFR*、*ANS*、*UFGT* 和 *TT19* 的表达依赖于 MBW 三元复合体 (R2R3-MYB、bHLH 和 WDR 蛋白) 的转录活性<sup>[47]</sup>。与 *ZmTTG1-a* 的表达水平相比,调控基因 (*ZmPAP1-b* 和 *ZmLDB38-a*) 是紫玉米籽粒发育中调控颜色变化的重要调节因子。调控基因 (*ZmPAP1-b* 和 *ZmLDB38-a*) 及其靶结构基因 (*ZmF3H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmCHS-b*、*ZmF3'H*、*ZmPAL1-b*、*ZmPAL1-l* 和 *Zm4CH-c*) 的共同上调表达可能促进了紫玉米 Zi 2-1 籽粒早期发育阶段 (授粉后 10~34 d) 的花青素积累,而在后期发育阶段 (授粉后 34~46 d) 这些 *ABGs* 则表现出下调表达。因此,我们推测结构基因 (*ZmF3H-b*、*ZmDFR-b*、*ZmCHS-b*、*ZmF3'H*、*ZmPAL1-b*、*ZmPAL1-l* 和 *Zm4CH-c*) 与调控基因 (*ZmPAP1-b* 和 *ZmLDB38-a*) 是紫玉米籽粒发育过程中影响花青素合成的重要调控因子。

## 参考文献

- [1] Torney F, Moeller L, Scarpa A, Wang K.. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, 18(3): 193–199
- [2] Gomez-Cano L, Gomez-Cano F, Dillon F M, Alers-Velazquez R, Doseff A I, Grotewold E, Gray J. Discovery of modules involved in the biosynthesis and regulation of maize phenolic compounds. *Plant Science*, 2020, 291: 110364
- [3] Chatham L A, Juvik J A. Linking anthocyanin diversity, hue, and genetics in purple corn. *G3(Bethesda)*, 2021, 11 (2): jkaa062
- [4] Paulsmeyer M N, Vermillion K E, Juvik J A. Assessing the diversity of anthocyanin composition in various tissues of purple corn (*Zea mays* L.). *Phytochemistry*, 2022, 201:113263
- [5] Kaur, R., Singh, A. Coloured maize and its unique features. *Maize* (Boca Raton: CRC Press), 2022, 247–284

- [6] 张利苹, 王俊玲, 李振华, 李新畅, 王梅, 王红霞, 杨鑫雷, 穆国俊. 花生红色种皮花青素生物合成转录-代谢组学联合分析. 植物遗传资源学报, 2024, 25(10): 1767-1780
- ZHANG L P, WANG J L, LI Z H, LI X C, WANG M, WANG H X, YANG X L, MU G J. Transcriptomics-Metabolomics combined analysis highlight the anthocyanin biosynthesis mechanism of red esta in peanut (*Arachis hypogaea L.*). Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(10): 1767-1780
- [7] Liu W X, Feng Y, Yu S H, Fan Z Q, Li X L, Li J Y, Yin H F. The flavonoid biosynthesis network in plants. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22 (23): 12824
- [8] Kaur S, Tiwari V, Kumari A, Chaudhary E, Sharma A, Ali U, Garg M. Protective and defensive role of anthocyanins under plant abiotic and biotic stresses: An emerging application in sustainable agriculture. Journal of Biotechnology. 2023; 361: 12-29
- [9] Ming H N, Wang Q, Wu Y, Liu H M, Zheng L M, Zhang G F. Transcriptome analysis reveals the mechanism of anthocyanidins biosynthesis during grains development in purple corn (*Zea mays l.*). Journal of Plant Physiology, 2021, 257: 153328
- [10] Sharma M, Cortes-Cruz M, Ahern K R, McMullen M, Brutnell T P, Chopra S. Identification of the *pr1* gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize. Genetics, 2011, 188 (1): 69–79
- [11] Cone K C, Cocciolone S M, Burr F A, Burr B. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant. Plant Cell, 1993, 5(12): 1795–1805
- [12] Chatham L A, Juvik J A. Linking anthocyanin diversity, hue, and genetics in purple corn. G3(Bethesda), 2021, 11 (2): jkaa062
- [13] 胡锦涛, 李素贞, 马旭辉, 柳小庆, 谢珊珊, 江海洋, 陈茹梅. 玉米花青素生物合成代谢调控. 生物技术通报, 2024, 40(6): 34-44
- Hu J J, Li S Z, Ma X H, Liu X Q, Xie S S, Jiang H Y, Chen R M. Regulation of maize anthocyanin biosynthesis metabolism. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(6): 34-44
- [14] Li T C, Wang Y T, Dong Q, Wang F, Kong F, Liu G H, Lei Y L, Yang H Y, Zhou Y B, Li C. Weighted gene co-expression network analysis reveals key module and hub genes associated with the anthocyanin biosynthesis in maize pericarp. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1013412
- [15] Cone K C. Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. Plant Cell Monogr, 2007, (8): 121–139
- [16] Chatham L A, Paulmeyer M, Juvik J A. Prospects for economical natural colorants: insights from maize. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 132(11): 2927–2946
- [17] Portwood J L, Woodhouse M R, Cannon E K, Gardiner J M, Harper L C, Schaeffer M L, Schaeffer M L, Walsh JR, Sen T Z, Cho K T, Schott D A. MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D1146–D1154
- [18] Riaz B, Chen H, Wang J, Du L P, Wang K, Ye X G. Overexpression of maize *ZmC1* and *ZmR* transcription factors in wheat regulates anthocyanin biosynthesis in a tissue-specific manner. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (22): 5806
- [19] Garg V K, Avashthi H, Tiwari A, Jain P A, Ramkete P W, Kayastha A M, Singh V K. MFPPPI - Multi FASTA ProtParam interface. Bioinformatics, 2016, 12(2):74-77
- [20] Horton P, Park K J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K. WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue):W585-587
- [21] Krogh A, Larsson B, Heijne G, Sonnhammer E L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(3):567-80
- [22] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y H, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202
- [23] Yao Y, Carretero-Paulet L, Van de Peer Y. Using digital organisms to study the evolutionary consequences of whole genome duplication and polyploidy. PLOS One, 2019, 14(7): e0220257
- [24] Lescot M, Dhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1):325-327
- [25] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-2504
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [27] Kim J T, Yi G, Chung I M, Son B Y, Bae H H, Go Y S, Go Y S, Ha J Y, Baek S B, Kim S L. Timing and pattern of anthocyanin accumulation during grain filling in purple waxy corn (*Zea mays L.*) suggest optimal harvest dates. ACS Omega, 2020, 5(25): 15702-15708
- [28] Zhang L, Su W Q, Tao R, Zhang W Y, Chen J J, Wu P Y, Yan C H, Jia Y, Larkin R M, Lavelle D, Truco M J, Chin-Wo S R, Michelmore R W, Kuang H H. RNA Sequencing provides insights into the evolution of lettuce and the regulation of flavonoid biosynthesis. Nature Communications, 2017, 8 (1): 2264
- [29] Yan C H, An G H, Zhu T, Zhang W Y, Zhang L, Peng L Y, Chen J J, Kuang H H. Independent activation of the *BoMYB2* gene leading to purple traits in *Brassica oleracea*. Theoretical and Applied Genetics, 2019, 132 (4): 895–906
- [30] Castillejo C, Waurich V, Wagner H, Ramos R, Oiza N, Muñoz P, Triviño J C, Caruana J, Liu Z C, Cobo N, Hardigan M A, Knapp S J, Vallarino J, Osorio S, Martín-Pizarro C, Posé D, Toivainen T, Hytönen T, Oh Y, Barbey C R, Whitaker V M, Lee S, Olbricht K, Sánchez-Sevilla J, Amaya I. Allelic variation of *MYB10* is the major force controlling natural variation in skin and flesh color in strawberry (*Fragaria* spp.) fruit. Plant Cell, 2020, 32 (12): 3723–3749
- [31] Guo N, Cheng F, Wu J, Liu B, Zheng S N, Liang J L, Wang X W. Anthocyanin Biosynthetic Genes in *Brassica rapa*. BMC Genomics, 2014, 15(1): 426

- [32] Guo N, Han S, Zong M, Wang G X, Zheng S N, Liu F. Identification and differential expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in leaf color variants of ornamental kale. *BMC Genomics*, 2019, 20 (1): 564
- [33] Zhang D W, Liu L L, Zhou D G, Liu X J, Liu Z S, Yan M L. Genome-wide identification and expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in *Brassica Juncea*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(5): 1250–1260
- [34] Chalhou B, Denoeud F, Liu S, Parkin I A., Tang H B, Wang X Y, Chiquet J, Belcram H, Tong C B, Samans B, Corr ea M. Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345 (6199): 950–953
- [35] Shi M Z, Xie D Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology*, 2014, 8:47–60
- [36] Ma H M, Pooler M, Griesbach R. Anthocyanin regulatory/structural gene expression in *Phalaenopsis*. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 2009, 134 (1): 88–96
- [37] Zhang Y Z, Xu S Z, Ma H P, Duan X J, Gao S X, Zhou X J, Cheng Y W. The R2R3-MYB gene *PsMYB58* positively regulates anthocyanin biosynthesis in tree peony flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 164: 279–288
- [38] Paulsmeyer M N, Juvik J A. R3-MYB repressor Mybr97 is a candidate gene associated with the Anthocyanin3 locus and enhanced anthocyanin accumulation in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136(3): 55
- [39] Zhang L Y, Hu J, Han X L, Li J J, Gao Y, Richards C M, Zhang C X, Tian Y, Liu G M, Gul H, Wang D J, Tian Y, Yang C X, Meng M H, Yuan G P, Kang G D, Wu Y L, Wang K, Zhang H T, Wang D P, Cong P H. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1494
- [40] Wang L, Deng R Y, Bai Y C, WU H L, LI C L, WU Q, ZHAO H X. Tartary buckwheat R2R3-MYB gene *FtMYB3* negatively regulates anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2775
- [41] 武琼, 刘佳鑫, 赵琰杰, 梁蕤, 韩美玲, 李超, 杜方.百合 bHLH 家族系统进化和花香相关基因克隆及表达分析. *植物遗传资源学报* 2024, 25(5): 5813-823
- WU Q, LIU J X, ZHAO Y J, LIANG R, HAN M L, LI C, DU F. Evolutionary of bHLH transcription factor family in *Lilium* and cloning and expression analysis of floral scent related genes. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25(5): 813-823
- [42] Li, S. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: fine-tuning of the MYB-bHLH-WD40 (MBW) complex. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, 9 (1): e27522
- [43] Shi M Z, Xie D Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology*, 2014, 8(1): 47–60
- [44] Xie X B, Li S, Zhang R F, Zhao J, Chen Y, Zhao Q, Yao Y X, You C X, Zhang X S, Hao Y J. The bHLH transcription factor *MdbHLH3* promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35 (11): 1884–1897
- [45] Kim J, Lee W J, Vu T T, Jeong C Y, Hong S W, Lee H. High accumulation of anthocyanins via the ectopic expression of *AtDFR* confers significant salt stress tolerance in *Brassica napus* L. *Plant Cell Reports*, 2017, 36 (8): 1215–1224
- [46] Sun Y, Li H, Huang J R. *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Molecular Plant*, 2012, 5 (2): 387–400
- [47] Xu W J, Grain D, Gourrierc J L, Harsco   E, Berger A, Jauvion V, Scagnelli A, Berger N, Bidzinski P, Kelemen Z, Salsac F, Baudry A, Routaboul J, Lepiniec L, Dubos C. Regulation of flavonoid biosynthesis involves an unexpected complex transcriptional regulation of TT 8 expression, in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2013, 198 (1): 59–70