

拟南芥转录因子 Ethylene-insensitive3( EIN3 )  
抑制花青素的合成

徐梦珂<sup>1 2</sup> 李 丹<sup>1 2</sup> 孟来生<sup>1 2\*</sup> 蒋继宏<sup>1 2</sup>

( 1. 江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点, 徐州 221116 ; 2. 江苏师范大学生命科学学院, 徐州 221116 )

**摘 要** Ethylene-insensitive3( EIN3 )和 EIN3-like1( EIL1 )蛋白是乙烯信号转导途径中一类重要的核转录因子。花青素是植物中的一类水溶性天然色素, 在植物的许多生理过程中起重要作用。本研究以拟南芥双突变体 *ein3-1eil1-3* 为研究材料, 通过 RT-PCR 技术确定了拟南芥双突变体 *ein3-1eil1-3* 中 *EIN3* 和 *EIL1* 基因均已被敲除, 单突变体 *ein3-1* 中的 *EIN3* 基因被敲除。通过肉眼定性观察发现突变体 *ein3-1eil1-3* 的种子和叶片内均呈紫色。通过紫外分光光度计定量分析发现, 花青素积累量也明显比突变体 *ein3-1* 和野生型多。通过 *GUS* 染色发现 *EIN3* 启动子主要在花、柱头、成熟花粉、种子胚和果荚等组织中有较强的表达。这与突变体 *ein3-1eil1-3* 的种子和叶片内均呈紫色并花青素含量增高一致。因此, 拟南芥转录因子 *EIN3* 可能与 *EIL1* 共同参与抑制花青素的合成。

**关键词** Ethylene-insensitive3( EIN3 ); Ethylene-insensitive3-like 1( EIL1 ); 花青素; 拟南芥

中图分类号: Q786 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2018.01.018

*Arabidopsis thaliana* Transcription Factor  
Ethylene-insensitive3( EIN3 ) Inhibits the Synthesis of Anthocyanins

XU Meng-Ke<sup>1 2</sup> LI Dan<sup>1 2</sup> MENG Lai-Sheng<sup>1 2\*</sup> JIANG Ji-Hong<sup>1 2</sup>

( 1. The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou 221116 ; 2. College of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116 )

**Abstract** Ethylene-insensitive3( EIN3 ) and EIN3-like1( EIL1 ) proteins are important nuclear transcription factors in ethylene signal transduction pathways in higher plants. In plants, anthocyanins are one of the water-soluble natural pigments, and they play an important role in the growth and development of plants. We used the *Arabidopsis thaliana* double mutant *ein3-1eil1-3* as the research material. Firstly, we identified the mutants of *ein3-1eil1-3* and *ein3-1* by RT-PCR. The direct observation indicated that the seeds and leaves of the *ein3-1eil1-3* were purple. By ultraviolet spectrophotometer analysis, the anthocyanin accumulation in *ein3-1eil1-3* mutant was significantly higher than that in the *ein3-1* mutant and wild-type. *GUS* staining showed that *EIN3* was mainly expressed in flowers, stigma, mature pollen, seed embryo and siliques, which was consistent with that anthocyanin accumulation of seeds and leaves was high in mutant *ein3-1eil1-3*. Thus, *A. thaliana* transcription factor *EIN3* as well as *EIL1* is involved in the suppression of the anthocyanin synthesis.

**Key words** ethylene-insensitive3( EIN3 ); ethylene-insensitive3-like 1( EIL1 ); anthocyanins; *Arabidopsis thaliana*

花青素属于黄酮类化合物, 是植物体中的一类水溶性天然色素。花青素在植物的许多生理过程中起重要作用, 例如可以在植物的营养组织中产生光保护屏障, 是授粉和种子传播中的视觉吸

基金项目: 农业科技( 农业高技术攻关项目 )( KC16NG063 )  
第一作者简介: 徐梦珂( 1993— ), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学方面的研究。

\* 通信作者: E-mail: menglsh@jssu.edu.cn  
收稿日期: 2017-05-11

Foundation item: Agricultural Science and Technology( Agricultural High-tech Project )( KC16NG063 )  
First author introduction: XU Meng-Ke( 1993— ), female, postgraduate student, whose main research is molecular biology.

\* Corresponding author: E-mail: menglsh@jssu.edu.cn  
Received date: 2017-05-11

引子,并且可以作为防御反应中的抗菌剂和拒食剂<sup>[1]</sup>。植物表皮细胞的液泡中可以大量储存花青素,有利于降低植物细胞的冰点,防止植物体受低温胁迫<sup>[2-3]</sup>。因此,对花青素的研究具有重要意义。

目前,植物中的花青素生物合成途径已得到深入研究。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和其他一些非模式植物例如金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)和矮牵牛(*Petunia hybrida*)等中,如查耳酮合酶、查耳酮异构酶(CHI)、黄烷酮3-羟化酶和类黄酮3'-羟化酶(F3'H)<sup>[4]</sup>等在不同的类黄酮素子通路中十分常见的早期生物合成基因(EBGs)会被二氢黄酮醇4-还原酶、无花色素加成酶、花青素还原酶<sup>[5]</sup>和UDP葡萄糖:类黄酮3-O葡萄糖基转移酶等后期生物合成基因(LBGs)诱导<sup>[6-7]</sup>。在拟南芥<sup>[8]</sup>中发现,形成亚微管的细胞隔壁可以积聚大量的花青素<sup>[9]</sup>。发现拟南芥TT19可作为载体将花青素从细胞质中转移到叶绿体中。最近孟<sup>[10-11]</sup>等发现拟南芥转录共激活子AN3(ANGUSTIFOLIA3)是花青素生物合成的正向调控因子,an3敲除突变体种子叶片等器官上花青素含量明显减少。AN3的下游靶标基因是YODA,它编码MAPKKK激酶,YODA也是新发现的花青素生物合成的负向调控因子<sup>[11]</sup>。AN3和YODA构成糖信号转导通路调控花青素的生物合成<sup>[11]</sup>。此外,AN3与COP1(Constitutive Photomorphogenic1),编码一个泛素化酶,构成光信号转导通路调控花青素的生物合成<sup>[10]</sup>。

Ethylene-insensitive3(EIN3)和EIN3-like(EIL)蛋白是乙烯信号转导途径中一类重要的核转录因子。乙烯是一种经典的植物激素,影响着植物生长发育的许多进程。目前已经从多种高等植物中分离得到EIN3基因,包括水稻、拟南芥和烟草等。EIN3是植物特异性核转录因子,可以启动乙烯应答的下游转录级联反应<sup>[12]</sup>。葡萄糖通过植物葡萄糖传感器己糖激酶(HXK1)增强其降解,并且乙烯可以增强其稳定性<sup>[12]</sup>。拟南芥基因组中有5个EIN3同源物(EIL1至EIL5),其中EIN3和EIL1是最密切相关的。EIL1的过表达补充了ein3突变体,并导致乙烯反应途径的组成型激活<sup>[13]</sup>。而ein3eil1双突变体表现对乙烯不敏感<sup>[14]</sup>,说明二者在乙烯信号转导中发挥了重要作用。据报道,EIN3/EILs转录因子可以影响乙烯诱导的叶片和根系等的生长进程:拟南芥ein3突变体的莲座叶生长受阻和叶片衰老表型在外源乙烯的作用下

均得到一定程度的缓解<sup>[13]</sup>,而ein3eil1双突变体的子叶的绿化率则明显减弱<sup>[15]</sup>;EIN3/EILs转录因子还影响花的形态发育<sup>[15]</sup>。研究发现过量表达EIN3、EIL1的拟南芥植株会有雌蕊突出的表型<sup>[16]</sup>,Yin X R<sup>[17]</sup>、Hiraga S<sup>[18]</sup>等也发现EIN3参与抗盐、抗冻、抗机械胁迫等的功能。EIN3也参与调控叶片衰老和抗冻等<sup>[19-20]</sup>。而目前关于EIN3是否参与调控花青素合成的研究较少。

在本研究中,我们以拟南芥双突变体ein3-1eil1-3为研究材料,定性和定量分析显示,与野生型和ein3-1单突变体相比,这个双突变体花青素积累量明显增加。进一步,利用GUS染色发现EIN3启动子(EIN3pro-GUS)主要在花、柱头、成熟花粉、种子胚和果荚等组织中有较强的表达。EIN3在这些器官中表达支持了花青素在ein3-1eil1-3的几种器官中积累。该研究结果初步说明拟南芥转录因子EIN3可能与EIL1共同参与负调控花青素的合成,为完善花青素合成的分子调控机制提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

#### 1.1.1 植物材料

本研究所用到的拟南芥材料均为哥伦比亚(Columbia)生态型背景,有拟南芥野生型Col-0突变体ein3-1eil1-3由南方科技大学郭红卫教授提供,突变体ein3-1由拟南芥生物研究中心(ABRC)(俄亥俄州立大学,俄亥俄州哥伦布市)提供。

#### 1.1.2 实验试剂

UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒;AMV第一链cDNA合成试剂盒;PCR(Taq)扩增试剂盒。以上试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 植物生长条件

将种子在4℃下放置3天,然后播种到固体Murashige和Skoog(MS)培养基上,该培养基含有0.8%琼脂和1%蔗糖,pH5.8。将播撒种子的培养基放置在21±2℃,16h/8h的光/黑暗循环的培养室中。两周后将培养基中的幼苗移栽于土盆中,置于上述同等条件的培养室中继续培养。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 引物设计

TUB4 F 5'-GACGCTTCATCTCGTCC-3'; R 5'-GTAAACGTAGGTGAGTCCA-3',基因登陆号为:

AT5G44340。

EIN3 : F :5'-ATGTTTAATGAGATGGGAAT-3' ;  
R 5'-CTGCTTCTGCTGCATTCCATC-3'。

EIL1 : F :5'-TTCCTCCACATCTCTCGATGT-3' ;  
R 5'-CCTTCTCGGAATAATACCATAA-3' )。

1.3.2 RT-PCR

通过 Trizol 试剂从拟南芥叶片组织中提取总 RNA。使用 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒对总 RNA 样品进行逆转录产生 cDNA 样品 ,并将其用作基于 RT-PCR 的基因表达分析的模板。

1.3.3 花青素含量的测定

将相对样品放置于 500 mL 的 1% HCl 的甲醇溶液( v/v )中 ,然后在 4℃ ,黑暗 ,温和震荡的条件下过夜培养获得花青素提取物。在该过程之后 ,加入 300 mL 水和 300 mL 氯仿并混合到提取物中 , 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 min ,2900 × g 离心 2 min。在 530 和 657 nm 下测量上清液的吸光度 ,通过 A530-0.25A657 公式测定花青素浓度<sup>[ 21 ~ 22 ]</sup>。

1.3.4 载体构建

通过启动子分析 ,插入 0.5 kB 的启动子片段构建 EIN3( At3G20770 )启动子-GUS 载体 ,扩增引物为( P1-ggggacaagttgtacaaaaagcaggct AACAAATGT-GTC GAAGAACGTG ,P2-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt AGATCAGGAAGATAGATCATAG )。这些片段被扩构建到 pCB308R 质粒上<sup>[ 23 ]</sup> ,载体如图 1 所示。之后通过农杆菌转化野生型拟南芥 ,转基因植物通过抗生素卡那筛选 ,从而获得含有 EIN3pro-GUS 的转基因植株 ,并通过多代筛选获得含有 EIN3pro-GUS 的纯合体种子 ,供 GUS 测试用。

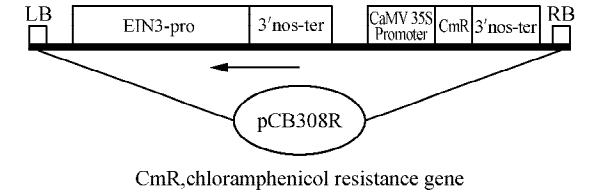


图 1 pCB308R 质粒载体示意图  
Fig.1 Vector diagram of plasmid pCB308R

1.3.5 GUS 测定

样品( 携带并表达 EIN3pro-GUS 的转基因拟南芥植株的花 ,胚胎等 )在 1 mmol · L<sup>-1</sup> X-gluc ,60 mmol · L<sup>-1</sup> NaPO<sub>4</sub> 缓冲液 ,0.4 mmol · L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub> Fe ( CN )<sub>6</sub> /K<sub>4</sub> Fe ( CN )<sub>6</sub> 和 0.1% ( v )Triton X-100 的溶液中染色 ,接着 37℃ 培养 6 ~ 8 h。然后在 30% ,

50% ,70% ,90% 和 100% 梯度浓度的乙醇中浸泡约 10 min 去除叶绿素。最后 ,使用 HIROX 三维视频显微镜在相关放大倍数下拍摄材料。

1.3.6 观察种子和叶片

使用 HIROX 三维视频显微镜拍摄成熟的干种子和新鲜叶片的叶背部分。

2 实验结果

2.1 RT-PCR 结果分析

根据方法 1.3.1 使用持家基因 TUB4 引物和被测基因 EIN3 ,EIL1 的引物对突变体 ein3-1eil1-3 ein3-1 和野生型( Col-0 )进行 RT-PCR 分析验证。由图 1 可知通过 RT-PCR 实验证实了拟南芥双突变体 ein3-1eil1-3 中 EIN3 和 EIL1 基因均已被敲除 ,突变体 ein3-1 中的 EIN3 基因已被敲除。

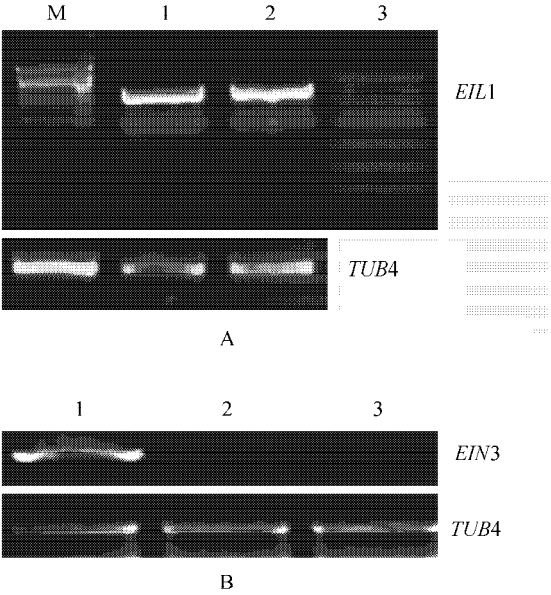


图 2 RT-PCR 检测 EIN3 和 EIL1 基因的缺失 M. Marker ;1. 野生型 2. 突变体 ein3-1 3. 突变体 ein3-1eil1-3  
Fig.2 Detection of EIN3 and EIL1 gene deletion by RT-PCR M. Marker ;1. Col-0 ;2. Mutant ein3-1 ;3. Mutant ein3-1eil1-3

2.2 突变体 ein3-1eil1-3 的种子和幼苗叶片中花青素积累量增加

通过在 HIROX 三维视频显微镜下 ,观察突变体 ein3-1eil1-3 ein3-1 和野生型( Col-0 )拟南芥成熟的干种子 ,发现在突变体 ein3-1eil1-3 中有部分种子颜色较深 ,但并没有在突变体 ein3-1 和野生型中发现这种现象( 图 3 :A ~ C )。同时又观察了 15 天龄的拟南芥幼苗的叶片 ,发现也只有突变体

*ein3-1eil1-3* 的叶片呈紫色( 图 3 :D ~ F )。定性观察显示 ,*ein3-1eil1-3* 很可能积累了大量花青素。为了进一步验证这个结论是否正确 ,我们用紫外分光光度计对双突变体的叶片进行定量测定 ,发

现突变体 *ein3-1eil1-3* 比突变体 *ein3-1* 和野生型幼苗的花青素积累量显著增高( 图 4 )。这些数据表明 *EIN3* 和 *EIL1* 可能共同参与反向调节花青素的生物合成。

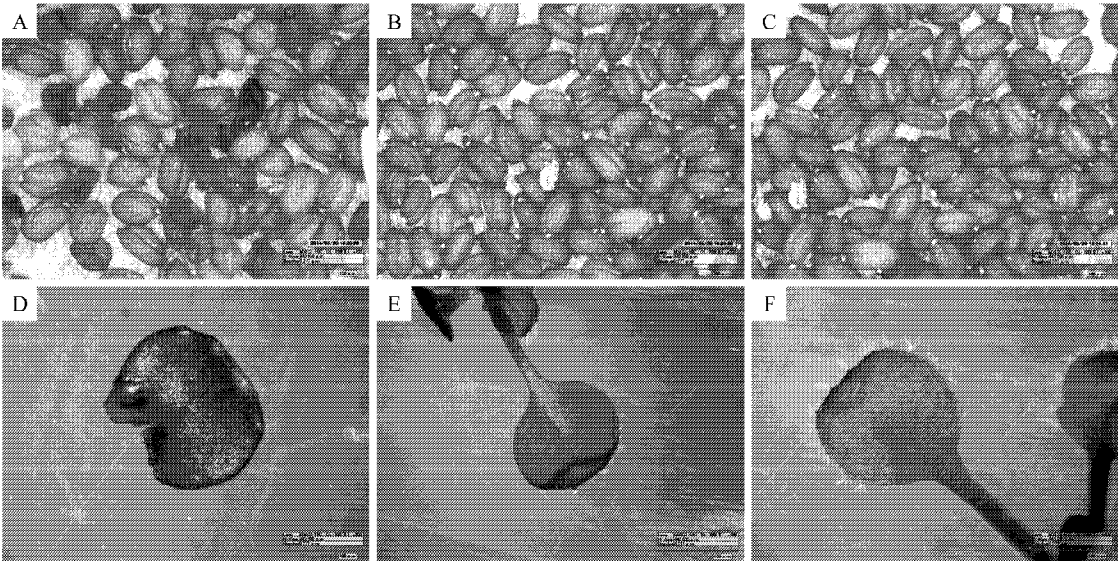


图 3 *ein3-1eil1-3* 的种子和幼苗叶片在白光( 16 h 光/8 h 黑暗)下生长时 ,花青素积累量增加 A ~ C. 突变体 *ein3-1eil1-3* *ein3-1* 和野生型( Col-0 )拟南芥成熟的干种子 ;D ~ F. 15 d 龄的突变体 *ein3-1eil1-3* *ein3-1* 野生型( Col-0 )拟南芥幼苗叶片的叶背部分 材料来自至少 5 个以上独立传播的植株 ,放大倍率相同。

Fig.3 *ein3-1eil1-3* seeds and seedlings leaves had increase anthocyanin accumulation when grown under white light( 16 h of light/8 h of darkness ) A - C. Representative mature dry seeds *ein3-1eil1-3* *ein3-1* wild-type( Col-0 ); D - F. Representative seedlings leaves *ein3-1eil1-3* *ein3-1* wild-type( Col-0 ) Materials were from at least five independently propagated lines ,magnifications are the same.

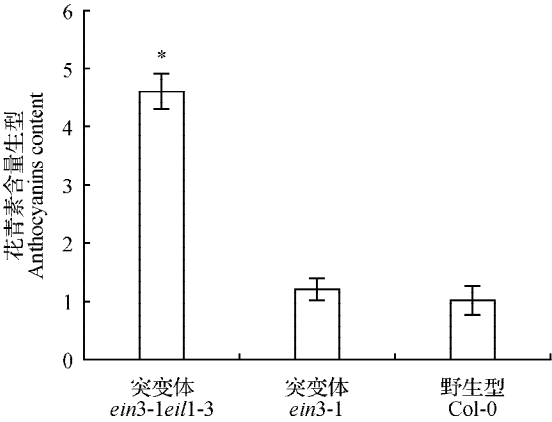


图 4 柱状图显示了 15 天龄的突变体 *ein3-1eil1-3* , *ein3-1* 野生型( Col-0 )拟南芥幼苗之间的花青素积累量的差异 材料来自至少五个以上独立传播的植株 ,野生型花青素含量指定为 1.0(  $n > 10$  ; \* 为  $P < 0.05$  )。

Fig.4 Bar graph exhibiting the difference in the anthocyanin accumulation between the 15-day-old *ein3-1eil1-3* *ein3-1* ,wild-type( Col-0 ) And wild-type is set as 1.0 ;Error bars represent SD(  $n > 10$  );Heteroscedastic t-test analysis showed significant difference( \* is  $P < 0.05$  ) .

2.3 EIN3 的表达分析

既然花青素能够在双突变体 *ein3-1eil1-3* 种子上和叶片上积累 ,那么 *EIN3* 是否在这些组织中表达。以大约 0.5 k B 的 *EIN3* 启动子和 GUS 报告基因融合( *EIN3pro-GUS* )转化的转基因拟南芥作为材料进行 GUS 组织化学染色 ,检测 *EIN3* 启动子的表达 ,实验结果表明 *EIN3* 启动子主要在花、柱头、成熟花粉、种子胚和果荚等生殖器官组织中有较强的表达( 图 5 ) 这个结论证明了我们以上的推测。

3 讨论

Rabino I<sup>[21]</sup>发现一些环境因子如光照、温度 , 和 Shan X<sup>[24]</sup>发现的茉莉酸甲酯以及 Deikman J<sup>[25]</sup>发现的细胞分裂素均可以通过调控花青素合成途径中结构基因的表达水平变化 ,以此改变拟南芥植物细胞中花青素含量的累积。近几年来 ,人们发现了植物体内一些转录因子也可以调控花青素的生物合成 ,并且这种调控作用是多种因子共同作用的结果。Ramsay N A<sup>[26]</sup>研究表明 ,调控花青素生物合成途径的转录因子主要包括 3 个基因家

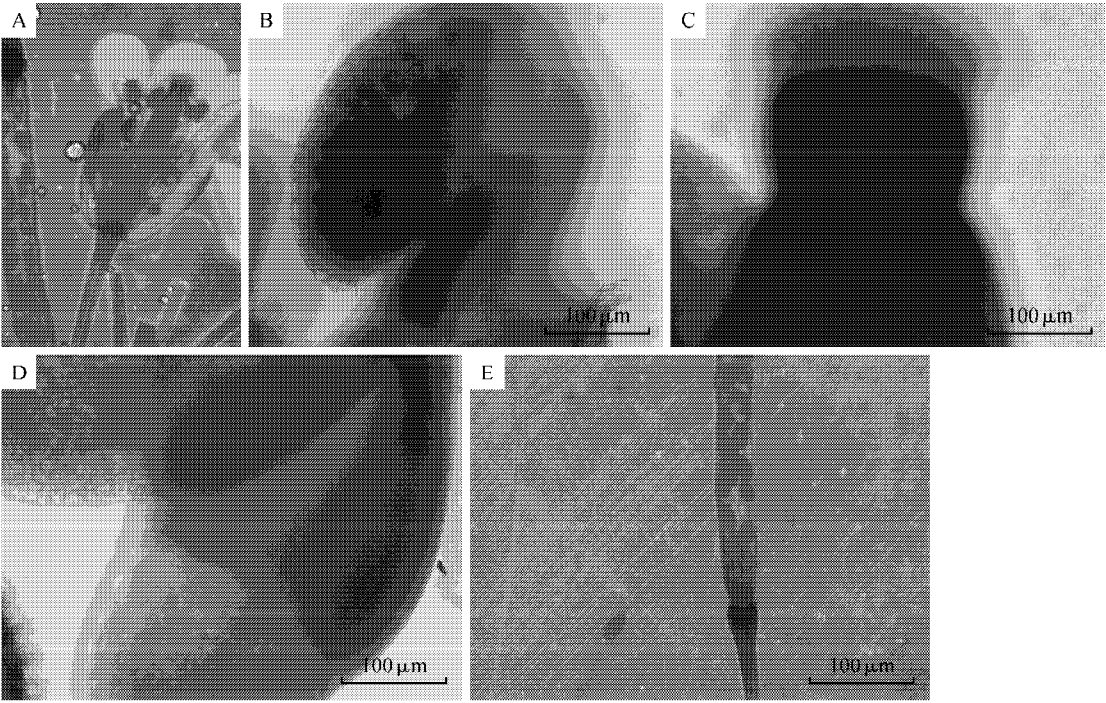


图5 EIN3 的表达分析 *EIN3pro-GUS* 在种皮( A )花( B )成熟花粉( C )柱头( D )种子胚( E )果荚中表达

Fig. 5 *EIN3* expression analysis Expression of *EIN3pro-GUS* in flower( A ) ,pollen( B ) ,stigma( C ) ,seed embryo( D ) ,capsule( E )

族,即 MYB、bHLH 和 WD40 家族。大部分的转录因子是通过转录激活调控来发挥功能。在拟南芥中 ,Borevitz J O 等<sup>[27]</sup>研究发现与花色相关的重要转录因子 PAP1 和 PAP2 ,是一大类正调控因子。而目前只在拟南芥中发现 ICX1 是 CHS 表达的负调控因子<sup>[28]</sup> ,AtMYB4 是 R2R3-MYB 的转录抑制因子<sup>[29]</sup> ,MYB 的负调控因子 MYBL2、MYB4<sup>[30]</sup>以及 Pauwels L 等<sup>[31]</sup>在 2011 年发现的 JAZ( Jasmonate-ZIM Domain )蛋白可以作用于 MBW 三聚体复合物 ,从而抑制花青素合成。植物激素茉莉酸启动的转录因子 MYC2 与 EIN3 相互作用 ,减弱 EIN3 的转录活性 ,从而抑制乙烯增强的顶端钩曲率<sup>[32~33]</sup>。在矮牵牛中也发现 ,R3-MYB 蛋白 PhMYBx 属于花青素合成的负调控因子<sup>[34]</sup>。

在本实验中我们发现只有突变体 *ein3-1eil1-3* 的种子和叶片呈紫色 ,且花青素积累量明显高于突变体 *ein3-1* 和野生型。通过 GUS 组织化学染色表明 *EIN3* 启动子主要在花、柱头、成熟花粉、种子胚和果荚等生殖器官组织中有较强的表达。*EIN3* 和 *EIL1* 基因共同缺失的突变体中花青素含量的增高表明拟南芥转录因子 *EIN3* 可能与 *EIL1* 共同参与抑制花青素的合成。是花青素合成的负调控

因子的新成员。为完善花青素生物合成的分子调控机制提供了新的思路 ,但是 EIN3 转录因子抑制花青素合成的具体的调控机制尚不明确 ,还需进一步研究。MBW( MYB/bHLH/TTG1 )蛋白复合体被认为是在花青素生物合成的调节子<sup>[35]</sup>。尽管在本研究中我们发现 EIN3/*EIL1* 是花青素生物合成的负向调控子。然而 ,核转录因子 EIN3/*EIL1* 的下游靶标基因到底编码 MBW 蛋白复合体中的哪个或哪些基因尚未知道。另外 ,EIN3/*EIL1* 与下游基因构成的信号转导通路是由什么信号介导的也未知。我们知道 EIN3 核转录因子既是糖信号分子也是乙烯信号分子<sup>[36]</sup>。因此 ,核转录因子 EIN3/*EIL1* 与下游靶标基因构成的信号转导通路或许由糖信号分子或乙烯信号分子介导。当然这些只是初步推测 ,具体通过 RT-PCR ,ChIP ,EMSA ,分子遗传等技术从不同角度验证下游靶标基因及信号分子是什么。这也是我们将来工作的重点。

完善花青素生物合成的分子调控机制不仅可以丰富植物次级代谢的理论基础 ,也可以通过基因工程、代谢工程等生物技术手段提高果实和蔬菜的食用价值和品质。同时也为实现人工调控工业化生产花青素提供科学依据和理论基础。

## 参 考 文 献

1. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics ,biochemistry ,cell biology ,and biotechnology [ J ]. Plant Physiology 2001 ,126( 2 ) :485 – 493.
2. Kramer G F ,Norman H A ,Krizek D T ,et al. Influence of UV-B radiation on polyamines ,lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber[ J ]. Phytochemistry ,1991 ,30 ( 7 ) 2101 – 2108.
3. Krol M ,Gray G R ,Hurry N P A ,et al. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings[ J ]. Canadian Journal of Botany ,1995 ,73( 8 ) :1119 – 1127.
4. 许志茹 ,马静 ,崔国新 ,等. 茺菁类黄酮 3'-羟化酶基因的功能鉴定及启动子初步分析[ J ]. 植物研究 2015 ,35 ( 4 ) 572 – 582.  
Xu Z R ,Ma J ,Cui G X ,et al. Functional identification and promoter preliminary analysis of Flavonoid 3'-hydroxylase genes in turnip[ J ]. Bulletin of Botanical Research 2015 ,35( 4 ) 572 – 582.
5. 武传建 ,戚晓 ,李仁赛 ,等. 甘薯 *IbANR* 基因的多态性分析[ J ]. 江苏师范大学学报 :自然科学版 2017 ,35( 1 ) :31 – 33.  
Wu C J ,Qi X ,Li R S ,et al. Polymorphic analyses of *IbANR* gene from sweetpotato[ J ]. Journal of Jiangsu Normal University :Natural Science Edition 2017 ,35( 1 ) 31 – 33.
6. Pelletier M K ,Murrell J R ,Shirley B W. Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*: further evidence for differential regulation of ' early ' and ' late ' genes [ J ]. Plant Physiology , 1997 ,113( 4 ) :1437 – 1445.
7. 石少川 ,高亦珂 ,张秀海 ,等. 植物花青素生物合成相关基因的研究及应用[ J ]. 植物研究 2011 ,31( 5 ) :633 – 640.  
Shi S C ,Gao Y K ,Zhang X H ,et al. Progress on plant genes involved in biosynthetic pathway of anthocyanins [ J ]. Bulletin of Botanical Research 2011 ,31( 5 ) :633 – 640.
8. Pourcel L ,Irani N G ,Lu Y H ,et al. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments [ J ]. Molecular Plant 2010 ,3( 1 ) 78 – 90.
9. Sun Y ,Li H ,Huang J R ,et al. *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts[ J ]. Molecular Plant 2012 ,5( 2 ) 387 – 400.
10. Meng L S. Transcription coactivator *Arabidopsis* ANGUSTIFOLIA3 modulates anthocyanin accumulation and light-induced root elongation through transrepression of Constitutive Photomorphogenic1[ J ]. Plant ,Cell and Environment , 2015 ,38( 4 ) 838 – 851.
11. Meng L S ,Li Y Q ,Liu M Q ,et al. The *Arabidopsis* ANGUSTIFOLIA3-YODA gene cascade induces anthocyanin accumulation by regulating sucrose levels[ J ]. Frontiers in Plant Science 2016 ,7 :1728.
12. Yanagisawa S ,Yoo S D ,Sheen J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants [ J ]. Nature 2003( 6957 ) 521 – 525.
13. Chao Q M ,Rothenberg M ,Solano R ,et al. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins[ J ]. Cell ,1997 ,89( 7 ) :1133 – 1144.
14. Alonso J M ,Stepanova A N ,Solano R ,et al. Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis* [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003 ,100( 5 ) 2992 – 2997.
15. Zhong S W ,Zhao M T ,Shi T Y ,et al. EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of *Arabidopsis* seedlings[ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009 ,106( 50 ) 21431 – 21436.
16. Cao W H ,Liu J ,He X J ,et al. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses[ J ]. Plant Physiology 2007 ,143( 2 ) 707 – 719.
17. Yin X R ,Allan A C ,Zhang B ,et al. Ethylene-related genes show a differential response to low temperature during ' Hayward ' kiwifruit ripening[ J ]. Postharvest Biology and Technology 2009 ,52( 1 ) 9 – 15.
18. Hiraga S ,Sasaki K ,Hibi T ,et al. Involvement of two rice ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE genes in wound signaling[ J ]. Molecular Genetics and Genomics ,2009 ,282 ( 5 ) 517 – 529.
19. Li Z H ,Peng J Y ,Wen X ,et al. ETHYLENE-INSENSITIVE3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in *Arabidopsis*[ J ]. The Plant Cell , 2013 ,25( 9 ) 3311 – 3328.
20. Shi Y T ,Tian S W ,Hou L Y ,et al. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*[ J ]. The Plant Cell 2012 ,24( 5 ) 2578 – 2595.
21. Rabino I ,Mancinelli A L. Light ,temperature and anthocyanin production[ J ]. Plant Physiology ,1986 ,81( 3 ) 922 – 924.

22. 沈维亮 靳艳玲 丁凡 等. 紫薯加工废水中花青素的快速分离方法[ J ]. 江苏师范大学学报 : 自然科学版 , 2016 34( 4 ) 25 – 28.  
Shen W L , Jin Y L , Ding F , et al. A simple method of anthocyanin isolation from wastewater of purple sweet potato [ J ]. Journal of Jiangsu Normal University Natural Science Edition 2016 34( 4 ) 25 – 28.
23. Meng L S , Yao S Q. Transcription co-activator *Arabidopsis* ANGUSTIFOLIA3( AN3 ) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of *YODA* ( *YDA* ) [ J ]. Plant Biotechnology Journal , 2015 , 13( 7 ) : 893 – 902.
24. Shan X Y , Zhang Y S , Peng W , et al. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [ J ]. Journal of Experimental Botany , 2009 , 60( 3 ) 3849 – 3860.
25. Deikman J , Hammer P E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana* [ J ]. Plant Physiology , 1995 , 108( 5 ) 47 – 57.
26. Ramsay N A , Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [ J ]. Trends in Plant Science 2005 , 10( 2 ) 63 – 70.
27. Borevitz J O , Xia Y J , Blount J , et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis [ J ]. The Plant Cell , 2000 , 12( 12 ) : 2383 – 2394.
28. Springob K , Nakajima J I , Yamazaki M , et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [ J ]. Natural Product Reports , 2003 , 20( 3 ) : 288 – 303.
29. Jin H L , Cominelli E , Bailey P , et al. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis* [ J ]. The EMBO Journal , 2000 , 19( 22 ) 6150 – 6161.
30. Matsui K , Umemura Y , Ohme-Takagi M. AtMYBL2 , a protein with a single MYB domain acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* [ J ]. The Plant Journal 2008 55( 6 ) 954 – 967.
31. Pauwels L , Goossens A. The JAZ proteins : A crucial interface in the jasmonate signaling cascade [ J ]. The Plant Cell 2011 23( 9 ) 3089 – 3100.
32. Song S S , Huang H , Gao H , et al. Interaction between MYC<sub>2</sub> and ETHYLENE INSENSITIVE<sub>3</sub> modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis* [ J ]. The Plant Cell 2014 26( 1 ) 263 – 279.
33. Zhang X , Zhu Z Q , An F Y , et al. Jasmonate-activated MYC2 represses ETHYLENE INSENSITIVE3 activity to antagonize ethylene-promoted apical hook formation in *Arabidopsis* [ J ]. The Plant Cell 2014 26( 3 ) 1105 – 1117.
34. Koes R , Verweij W , Quattrocchio F. Flavonoids : A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [ J ]. Trends in Plant Science , 2005 , 10( 5 ) : 236 – 242.
35. Qi T C , Song S S , Ren Q C , et al. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [ J ]. Plant Cell 2011 23( 5 ) 1795 – 1814.
36. Yoo S D , Cho Y H , Tena G , et al. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling [ J ]. Nature 2008 451( 7180 ) 789 – 795.