

TÁCH DÒNG GEN *Lc* HOẠT HÓA SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN Ở CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG (*ZEa MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)

Nguyễn Thị Khuyên, Phạm Thị Thanh Nhân*

Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Ngô nếp (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) là một trong các hạt ngũ cốc phổ biến và quan trọng tại Việt Nam, đặc biệt ở các vùng núi phía bắc. Anthocyanin được coi là một dấu hiệu stress do hạn gây ra. Sự biểu hiện của các gen cấu trúc hay các enzyme tham gia vào các phản ứng sinh tổng hợp anthocyanin ở các bộ phận cây ngô rất cần sự có mặt các nhân tố phiên mã thuộc họ Myb, Myc (hay bHLH) và WD40. Các gen thuộc họ Myb điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin ở ngô đã được nghiên cứu nhiều gồm các gen *C1*, *P1*, *Pl*. Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được nghiên cứu gồm *B*, *R*, *Sn* và *Lc* (Leaf color). Bài báo này phân tích trình tự đoạn gen *Lc* hoạt hóa sinh tổng hợp anthocyanin từ giống ngô nếp địa phương Nà Hạo (NH).

Gen *Lc* phân lập được có kích thước dài 1833bp, mã hóa cho 610 amino acid với 14 vị trí nucleotide sai khác so với trình tự NM001111869 và trình tự KJ726800; 8 vị trí sai khác so với trình tự M26227. Trình tự gen có sự tương đồng 99,23% - 99,56% so với các trình tự gen thuộc họ bHLH. Phân tử protein *Lc* suy diễn có sự tương đồng với các trình tự thuộc họ bHLH công bố trên GenBank từ 96,2% - 98% với 8 amino acid sai khác so với trình tự mã số NM001111869 và KJ726800, 5 amino acid sai khác so với trình tự mã số M26227.

Từ khóa: Anthocyanin, gen *Lc*, khả năng chịu hạn, ngô nếp địa phương, nhân tố phiên mã

Ngày nhận bài: 18/12/2018; **Ngày hoàn thiện:** 29/12/2018; **Ngày duyệt đăng:** 31/01/2019

CLONING OF GENE CONTAINING *Lc* REGULATORY GENE IN THE ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS FROM LOCAL STICKY CORN CULTIVARS (*ZEa MAYS* SUBSP. *CERATINA* (KUELSHOV) ZHUK)

Nguyen Thi Khuyen, Pham Thi Thanh Nhan*

University of Education - TNU

ABSTRACT

Sticky corn (*Zea mays* subsp. *ceratina* (Kuelshov) Zhuk) is one of the important and widely grown plants in Vietnam, especially in mountainous regions. Anthocyanin is considered as a sign of the stress caused by drought. The expression of the structural genes or enzymes involved in the anthocyanin biosynthesis in parts of maize plants needs the presence of transcription factors belonging to MYB, Myc (or bHLH) and WD40 family. Genes of MYB family regulating anthocyanin biosynthesis have been studied including *C1*, *P1*, *Pl*. While genes of Myc family (or bHLH) studied include *B*, *R*, *Sn* and *Lc* (Leaf color). This paper analyzed the sequence of the *Lc* gene which activates anthocyanin biosynthesis from Na Hao sticky cultivars (symbolized by NH). The sequence of the *Lc* gene consists of 1833 bp encoding 610 amino acids with differences in 14 positions compared with the NM001111869 and KJ726800 sequences and 8 positions compared with the M26227 sequence. They are highly similar to others in maize bHLH family (from 99.23% to 99.56%). The deductive proteins of the *Lc* gene is also homologous with others in maize bHLH family (from 96.2% to 98%) with differences in 8 positions compared with the NM001111869 and KJ726800 sequences and 5 positions compared with the M26227 sequence.

Keywords: Anthocyanin, *Lc* gene, drought tolerance, local sticky corn, transcription factor

Received: 18/12/2018; **Revised:** 29/12/2018; **Approved:** 31/01/2019

* Corresponding author: Tel: 0989 516346; Email: ptnhanbio@dhsptn.edu.vn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau lúa của nông dân vùng trung du và miền núi phía Bắc, và là cây lương thực chính của đồng bào các dân tộc thiểu số ở các vùng núi cao [2]. Trong những năm gần đây, các giống ngô nếp địa phương cho năng suất thấp ít được quan tâm phát triển, nhiều giống ngô quý hiếm bị mất dần mặc dù chất lượng hạt cao, khả năng chịu hạn tốt và phù hợp với điều kiện canh tác đất dốc của từng vùng ở miền núi. Vì vậy, việc nghiên cứu và chọn tạo các giống ngô có khả năng chịu hạn là việc làm rất cần thiết, góp phần bảo tồn nguồn gen và tạo vật liệu cho lai giống.

Anthocyanin là chất màu thiên nhiên được sử dụng an toàn trong công nghiệp chế biến thực phẩm và dược phẩm. Anthocyanin được tìm thấy trong không bào của tế bào biểu bì, mô mạch dẫn [6]. Anthocyanin được coi là một dấu hiệu stress và là một phần trong cơ chế hạn chế tác động của stress hạn gây ra. Chức năng này là do anthocyanin có khả năng chuyển hoá ROS (Reactive oxygen species) gấp 4 lần so với vitamin E, C, và làm vô hiệu hoá hầu hết các ROS và các gốc nitrogen quan trọng [12].

Sự biểu hiện của các gen cấu trúc hay các enzyme tham gia vào các phản ứng sinh tổng hợp anthocyanin ở các bộ phận cây ngô rất cần sự có mặt các nhân tố phiên mã thuộc họ Myeloblast (Myb), basic helix-loop-helix (bHLH) hay Myc và WD40 [6]. Các gen thuộc họ Myb điều hòa sinh tổng hợp anthocyanin ở ngô đã được nghiên cứu nhiều gồm các gen *C1* (Colored Aleurone 1), *P1* (Purple), *Pl* (Purple leaf). Trong khi các gen thuộc họ Myc (hay bHLH) được nghiên cứu gồm *B-Peru*, *R*, *Sn* và *Lc* (Leaf color). Các trình tự gen này trong một họ khá tương đồng với nhau [3], [10]. Tùy thuộc vào từng giống ngô mà có thể có một hoặc cả bốn gen.

Các protein này hoạt hóa các gen cấu trúc *CHS*, *CHI*, *F3H*, *DFR*, *ANS*, *Bz*, trong đó ba

gen *CHS*, *DFR* và *F3H* được coi là gen chìa khóa của quá trình sinh tổng hợp anthocyanin. Sản phẩm gen *Lc* (Leaf color) là 1 loại protein điều hòa tổng hợp các enzyme chuyển hóa tạo ra anthocyanin có màu đỏ trong các mô gân lá, lưỡi bẹ, vỏ hạt, lá bắc, mày ngô. Gen *Lc* không liên tục, đoạn mã hóa có kích thước 1830 bp mã hóa cho 610 axit amin với bốn vùng chức năng theo thứ tự: Vùng MIR gồm 252 amino acid (thuộc vị trí từ 1 đến 252, là nơi tương tác với protein MYB để tăng tốc độ phiên mã của các gen cấu trúc), vùng có tính acid gồm 160 amino acid (thuộc vị trí từ 253-410, thường là nơi tương tác với protein WD40 và PAC1), vùng bHLH gồm 52 amino acid (thuộc vị trí từ 411- 462, là vùng trung tâm hoạt động) và vùng còn lại gồm 76 amino acid (thuộc vị trí từ 463- 610). Sự gia tăng hàm lượng anthocyanin đã được ghi nhận thông qua sự biểu hiện vượt ngưỡng của gen mã hóa các nhân tố phiên mã *Lc* ở ngô [7]. Bài báo này phân tích trình tự đoạn mã hóa của gen *Lc*, là tiền đề cho việc làm sáng tỏ cơ sở phân tử liên quan đến sinh tổng hợp anthocyanin và nghiên cứu biểu hiện gen *Lc* phân lập được từ cây ngô nếp địa phương.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Giống ngô nếp địa phương Nà Hạo có mã số X06 (kí hiệu NH, được thu thập tại Tân Tiến-Tràng Định- Lạng Sơn) được Viện Nghiên cứu ngô cung cấp. Vector pBT và chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5α do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Các hóa chất Trizol® Reagent, Kit tổng hợp cDNA (First Strand cDNA Synthesis), Master mix PCR, T4 ligase, T4 ligase buffer... được mua từ hãng Invitrogen, Fermentas, Merck.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp gây hạn nhân tạo ở giai đoạn cây non ba lá theo mô tả của Lê Trần Bình & Lê Thị Muội (1998) [1].

Tách chiết và tinh sạch RNA tổng số từ thân cây ngô non bị hạn được thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất Trizol.

Tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của Kit Fermentas. Thiết kế mỗi bằng phần mềm DNASTar trên cơ sở trình tự gen *Lc* của ngô đã công bố trên ngân hàng gen (NCBI) với mã số NM-001111869. Cặp mồi được tổng hợp tại hãng Invitrogen có trình tự:

LcF: 5'-ATGGCGCTTTCAGCTTCCCGA-3'

LcR: 5'-TCACCGCTCCCTATAGCTTTG-3'

Gen *Lc* cần nhân có kích thước 1833 bp. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được tiến hành theo chương trình 94°C: 3 min 30s; (94°C: 30s; 60°C: 50s; 72°C: 1 min 20s) lặp lại 30 chu kỳ; 72°C: 10 min; 4°C: ∞. Tách dòng gen *Lc* được tiến hành bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector pBT. Xác định trình tự DNA theo phương pháp của Sanger *et al.*, (1977) [11]. Sử dụng phần mềm BioEdit để phân tích trình tự nucleotide.

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Công nghệ gen, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm- Đại học Thái Nguyên.

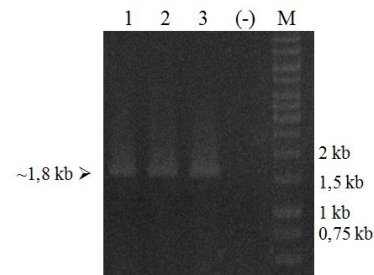
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách dòng phân tử mang gen *Lc* từ giống NH

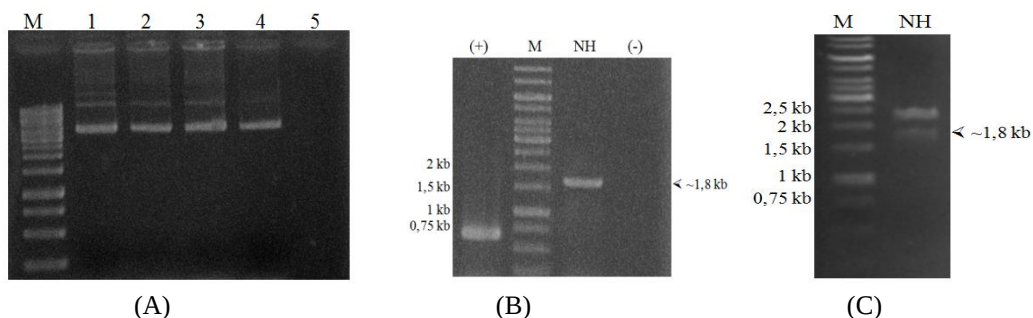
Kế thừa kết quả nghiên cứu của đề tài cấp cơ sở mang mã số CS2016-SP-15, giống ngô nếp địa phương NH là giống có khả năng chịu hạn

tốt nhất nên được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu để tách RNA tổng số. RNA tổng số của giống ngô NH được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR với mồi Oligo(dT)₁₈, cặp mồi LcF và LcR để phân lập gen *Lc*. Sản phẩm RT-PCR thu được rất đặc hiệu, có kích thước khoảng 1,8 kb (hình 1).

Sản phẩm RT-PCR gen *Lc* được gắn trực tiếp vào vector tách dòng, biến nạp vào chủng *E.coli* và cấy trên môi trường chọn lọc có carbenicillin. Kết quả kiểm tra sản phẩm plasmid, clony-PCR và phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn được trình bày ở hình 2. Kết quả điện di sau khi cắt cho thấy, đoạn DNA được khuếch đại và cắt rời ra khỏi vector tái tổ hợp có kích thước phân tử khoảng 1,8 kb, tương ứng với kích thước của gen *Lc* cần tách dòng. Như vậy, dòng plasmid tái tổ hợp của mẫu NH có mang sản phẩm PCR đã được chọn lọc.



Hình 1. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR gen *Lc*
(M: DNA marker 1kb; (-): Đối chứng âm; 1-3: Sản phẩm RT-PCR của gen *Lc*)



Hình 2. Hình ảnh điện di kiểm tra plasmid (A), sản phẩm clony-PCR (B) và sản phẩm phản ứng cắt bởi *Bam*HI (C)

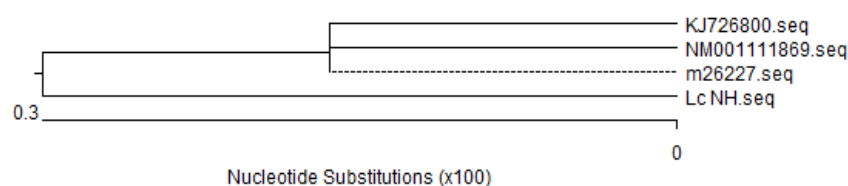
(M: DNA marker 1kb; (+): Đối chứng dương; (-): Đối chứng âm; 1-5: Plasmid của 05 dòng khuẩn lạc màu trắng; NH: Plasmid tái tổ hợp của dòng tế bào được chọn lọc)

Đặc điểm trình tự gen *Lc* của giống ngô nếp địa phương NH

Kết quả Blast cho thấy trình tự cDNA của gen *Lc* dài 1833 nucleotide và mã hóa cho 610 amino acid, tương ứng với trình tự cDNA của gen *Lc* ở giống ngô nếp địa phương NH phân lập được (hình 3).

Accession	Length	Identical	Similarity	Score	E-value	Link
Zea mays Lc regulatory protein mRNA, complete cds	3386	3386	100%	0.0	100%	M26227.1
Zea mays clone pUT3027 bHLH transcription factor (bHLH1) mRNA, partial cds	3369	3369	99%	0.0	99%	KJ726800.1
Maize SN mRNA, involved in tissue-specific anthocyanin expression	3297	3297	100%	0.0	99%	X60706.1
PREDICTED: Zea mays seed color component at R1 (R-S), transcript variant X5, mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	XM_008663066.3
PREDICTED: Zea mays seed color component at R1 (R-S), transcript variant X4, mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	XM_008663065.3
PREDICTED: Zea mays seed color component at R1 (R-S), transcript variant X3, mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	XM_008663064.3
PREDICTED: Zea mays seed color component at R1 (R-S), transcript variant X2, mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	XM_008663063.3
PREDICTED: Zea mays seed color component at R1 (R-S), transcript variant X1, mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	XM_008663061.3
Zea mays seed color component at R1 (R-S), mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	NM_001111869.2
Zea mays seed color component at R1 (R-S), mRNA	3249	3249	100%	0.0	99%	NM_001112603.2
Zea mays cultivar Red diamond bHLH protein mRNA, complete cds	3186	3186	100%	0.0	98%	KP027640.1
Maize anthocyanin regulatory R-S mRNA	3181	3181	100%	0.0	98%	X15806.1

Hình 3. Hình ảnh blast trình tự nucleotide của gen *Lc* giống NH trên NCBI



Hình 4. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa gen *Lc* của giống ngô NH với các gen thuộc họ bHLH

So sánh trình tự gen *Lc* của giống NH với các trình tự trên GenBank

Sử dụng phần mềm BioEdit để so sánh sự tương đồng giữa gen *Lc* ở giống NH và các trình tự gen trên GenBank thu được kết quả như sau: Trình tự nucleotide của gen *Lc* ở giống NH tương đồng 99,23% với trình tự DNA của gen *Lc* hoàn chỉnh được đăng kí trên GenBank với mã số MN001111869, tương đồng 99,23% với trình tự mã số KJ726800, tương đồng 99,56% với trình tự mã số M26227.

So với trình tự được phân lập từ mRNA đã đăng kí trên GenBank (mã số NM_001111869.1), trình tự gen *Lc* của giống NH khác ở 14 vị trí, thuộc các nucleotide thứ 237, 745, 746, 747, 1336, 1338, 1546, 1548, 1571, 1572, 1687, 1804, 1806 và 1821; so với trình tự mã số KJ726800 khác ở 14 vị trí, thuộc các nucleotide thứ 151, 153, 1336, 1338, 1367, 1546, 1548, 1687, 1804, 1806,

1821, 1831, 1832, 1833; so với trình tự mã số M26227 khác ở 8 vị trí, thuộc các nucleotide thứ 1336, 1338, 1546, 1548, 1687, 1804, 1806, 1821.

Phân tích sự tương đồng gen *Lc* của giống NH với các gen khác trong họ bHLH

Dựa vào các trình tự nucleotide của gen *Lc* và các gen thuộc họ bHLH tham gia sinh tổng hợp anthocyanin ở cây ngô và các đối tượng thực vật khác đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế (NCBI), trình tự gen *Lc* ở giống NH và các trình tự trên GenBank được so sánh bằng phần mềm DNASTAR. Kết quả phân tích sự tương đồng di truyền được trình bày ở hình 3. Kết quả phân tích cho thấy, trình tự nucleotide của gen *Lc* ở giống NH có sự tương đồng rất cao với trình tự gen *Lc* và *Sn* đã công bố trên GenBank (từ 99,2% đến 99,5%). Trình tự này cũng có tương đồng cao với các trình tự trong họ bHLH và R ở cây ngô.

Bảng 1. Sự sai khác về amino acid trong protein Lc suy diễn giữa giống NH với các trình tự trên GenBank

STT	Vị trí amino acid sai khác	Trình tự mã số NM001111869	Trình tự mã số KJ726800	Trình tự mã số M26227	Trình tự protein Lc của giống NH
1	51	G	R	G	G
2	79	H	Q	Q	Q
3	249	-	D	D	D
4	446	N	N	N	D
5	456	A	V	A	A
6	516	D	D	D	N
7	524	I	T	T	T
8	563	S	S	S	G
9	602	A	A	A	T
10	607	I	I	I	M
11	610	Mã kết thúc	-	Mã kết thúc	Mã kết thúc

Đặc điểm trình tự protein Lc suy diễn của giống ngô nếp địa phương NH

Trình tự nucleotide của gen mã hóa protein Lc từ giống ngô NH được suy diễn bằng phần mềm BioEdit. Phân tử protein gồm 610 amino acid với mã mở đầu là AUG quy định tổng hợp methionine (M), mã kết thúc là UAA. Sự khác nhau về trình tự amino acid suy diễn từ đoạn gen Lc giữa giống NH và các trình tự trên Gen Bank được trình bày ở bảng 1.

Như vậy, trình tự nucleotide gen Lc được phân lập từ giống NH và trình tự mã số NM001111869 trên GenBank khác nhau ở 14 vị trí nhưng chỉ có 8 amino acid khác nhau. So với trình tự KJ726800, chúng khác nhau ở 14 vị trí nhưng chỉ có 8 amino acid khác nhau. So với trình tự M26227, chúng khác nhau ở 8 vị trí nhưng chỉ có 5 amino acid khác nhau (bảng 1).

Trình tự protein Lc suy diễn của giống NH có hệ số tương đồng di truyền cao với một số trình tự trên GenBank, từ 98,6% đến 99%. Phân tích bằng hệ số tương đồng di truyền về protein Lc suy diễn thấy rằng trình tự của giống NH tương đồng cao nhất với trình tự mang mã số M26227 (99%), KJ726800 (98,8%), NM001111869 (98,6%). Qua đó thấy rằng, trình tự protein Lc suy diễn của giống NH có độ tương đồng cao với các trình tự thuộc họ gen bHLH và gen R (98,6% - 99%).

Các amino acid giống nhau giữa các trình tự protein suy diễn chủ yếu thuộc vùng có tính

axít và bHLH của nhân tố phiên mã Lc. Vùng bHLH là đặc trưng của nhóm protein MYC (bHLH) và có tính bảo thủ. Đây chính là vị trí tương tác của protein Lc với DNA để tăng tốc độ phiên mã của các gen cấu trúc mã hóa cho các enzyme tham gia trực tiếp tổng hợp anthocyanin. Vùng này có hai vị trí amino acid khác nhau (446 và 456). Như vậy, sự thay đổi amino acid của protein này có thể là nguyên nhân làm tăng hàm lượng anthocyanin và tính chịu hạn cho cây ngô [4]. Tuy nhiên để khẳng định điều này cần phải nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc và sự biểu hiện của protein trên.

Mỗi một vùng của protein nhóm bHLH có chức năng khác nhau. Vùng MIR là nơi tương tác với protein MYB. Những biến đổi ở vị trí 19 trong vùng này luôn đi kèm với sự thay đổi ở vị trí 16 lizin [12]. Trong nghiên cứu của Pattanaik và cs (2008) trên đối tượng cây tía tô (*Perilla frutescens*), sự thay thế lyzin thành methionin ở vị trí amino acid thứ 157 (K157M) đã dẫn đến hoạt động trans của protein họ bHLH và hàm lượng anthocyanin tăng lên gấp 50 lần so với đối chứng. Các tác giả tiếp tục nghiên cứu trên đối tượng cây mồm chó và cây ngô, kết quả cũng tương tự. Sự có mặt của amino acid alanin (A159 của MYC-RP trong cây tía tô, A161 của Delila trong cây mồm chó và A172 trong protein Lc của cây ngô) cũng ảnh hưởng tới hoạt động trans. Khi amino acid này bị thay thế bởi aspartic sẽ làm mất hoạt động trans đối với protein MYC- RP

và Delila, làm suy giảm nghiêm trọng hoạt động trans đối với protein Lc [9].

Vùng còn lại có 85 amino acid cuối là vùng giả định ACT, có vai trò tạo sự tương thích với DNA. Vùng này có thể điều hòa sự dimer hóa trong tế bào ngô. Các kết quả phân tích đột biến vùng này cho thấy, sự dimer hóa hoàn toàn bị loại bỏ nếu thiếu vùng 532-560, làm giảm kích hoạt của promoter A1, dẫn đến hình thành rất ít tế bào màu đỏ. Trong nghiên cứu đột biến thực nghiệm khác, khi Ser 560, GLN 562, và Ser 564 đồng thời được thay thế bằng Ala, khả năng dimer hóa của protein R bị giảm đáng kể [5]. Khi tạo đột biến thêm ba amino acid vào cấu trúc xoắn thứ hai trong vùng bHLH của protein Lc ở ngô (còn gọi là alen D12), từ amino acid 458 đến 464, kết quả thu được là sự tương tác của protein bị cản trở và làm suy giảm vai trò hoạt hóa của protein này [8].

KẾT LUẬN

Gen *Lc* phân lập được có kích thước dài 1833bp, mã hóa cho 610 amino acid với 14 vị trí nucleotide sai khác so với trình tự NM001111869 và trình tự KJ726800; 8 vị trí sai khác so với trình tự M26227. Trình tự gen có sự tương đồng 99,23% - 99,56% so với các trình tự gen thuộc họ bHLH.

Phân tử protein Lc suy diễn có sự tương đồng với các trình tự thuộc họ bHLH công bố trên GenBank từ 96,2% - 98% với 8 amino acid sai khác so với trình tự mã số NM001111869 và KJ726800, 5 amino acid sai khác so với trình tự mã số M26227.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học ĐHTN 2018-TN04-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998), *Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*, Nxb Đại học Quốc gia, Hà Nội.

2. Tổng cục thống kê (8/2017), *Niên giám thống kê 2016*, Nxb Thống kê, Hà Nội.

3. Babu M. M., Luscombe N. M., Aravind L., Gerstein M., Teichmann S. A. (2004), "Structure and evolution of transcriptional regulatory networks", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14 (3), pp. 283- 291.

4. Batool F., Sabir S. M., Rocha J. B. T., Shah A. H., Saify Z. S. and Ahmed S. D. (2010), "Evaluation of antioxidant and free radical scavenging activities of fruit extract from *Zanthoxylum alatum*: a commonly used spice from Pakistan", *Pak. J. Bot.*, 42, pp. 4299- 4311.

5. Feller A., Hernandez J. M., Grotewold E. (2006), "An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors", *J. Biol. Chem.*, 281(39), pp. 28964- 28974.

6. Gould K. S., Lister C. (2007), *Flavonoid functions in plants*, CRC Press, Boca Raton, pp. 397- 441.

7. Heather Ray, Min Yu, Patricia Auser, Laureen Blahut Beatty, Brian McKersie, Steve Bowley, Neil Westcott, Bruce Coulman, Alan Lloyd and Margaret Y Gruber (2003), "Expression of Anthocyanins and Proanthocyanidins after Transformation of Alfalfa with Maize Lc", *Plant Physiology*, 132, pp. 1448-1463.

8. Hernandez J. M. (2006), *Combinatorial transcriptional regulation of the maize flavonoid pathway: Understanding the old players and discovering new ones*, The Degree Doctor of Philosophy, The Ohio State University.

9. Pattanaik S., Xie C. H., Yuan L. (2008), "The interaction domains of the plant MYC-like bHLH transcription factors can regulate the transactivation strength", *Planta*, 227(3), pp. 707- 715.

10. Radicella J. P., Turks D., Chandler V. L. (2005), "Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize", *Plant Mol. Biol.*, 17, pp. 127-130.

11. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes C. A., Hutchison C. A., Slocombe P. M., Smith M. (1977), "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA", *Nature*, 265(5596), pp. 687-695.

12. Winkel-Shirley B. (2002), "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, pp. 218-223.