

水稻花青素合成调控转录因子 OsC1 和 OsPAC1 的功能

李艳霞 林拥军 陈浩

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

摘要 从黑米品种黑帅中克隆水稻内源调控花青素合成的转录因子 OsC1 和 OsPAC1, 并导入到白米梗稻品种 Chao 2-10 和 ZH11 中超量表达, 结果显示: 在超量表达 OsC1 的 Chao 2-10 的抗性愈伤分化阶段、再生转基因植株的叶片、叶鞘、稃尖等部位观察到花青素的积累; 其他转基因材料, 如超量表达 OsC1 的 ZH11、超量表达 OsPAC1 的 Chao 2-10 和 ZH11 均未观察到花青素的积累; 利用高效液相色谱(HPLC)测定转基因水稻叶片中花青素含量, 发现主要是矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷 2 种花青素。对转基因材料中花青素生物合成相关基因的表达量进行分析发现, Chao 2-10 和 ZH11 超量表达 OsC1 后, 花青素代谢途径上的大部分结构基因上调表达; Chao 2-10 中超量表达 OsPAC1 后, *OsCHS*、*OsCHI*、*OsANS*、*OsUFGT* 上调表达, 而 *OsF3H*、*OsF3'H* 表达基本没变; ZH11 中超量表达 OsPAC1 后, *OsCHS*、*OsANS*、*OsUFGT* 上调表达, 而 *OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H* 的表达基本不变。

关键词 水稻; 花青素; 黑米; OsC1; OsPAC1

中图分类号 S 511.053 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)01-0001-09

花青素(*anthocyanin*)是一类天然植物色素, 具有重要的生物学和生理功能。花青素能吸引传粉者和种子传播者^[1], 具有清除自由基、保护植物免受强光照等作用^[2]。此外, 花青素对人类健康有重要促进作用, 研究证明花青素具有抗癌^[3]、抗炎^[4]、抗菌作用^[5], 能预防心血管疾病^[6]和糖尿病^[7], 并能保护视力^[8]。

花青素的生物合成起始于苯丙氨酸, 是苯丙烷途径的重要分支。苯丙氨酸合成花青素可分为 3 个阶段: 苯丙烷途径的开始阶段、类黄酮途径的早期阶段以及花青素途径的晚期阶段。苯丙烷途径的开始阶段包括从苯丙氨酸经肉桂酸、香豆酸、到 4-香豆酰 CoA 3 步, 分别由苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 4-羟化酶(C4H)和 4-香豆酰 CoA 连接酶(4CL)催化完成; 类黄酮途径早期阶段包括从 4-香豆酰 CoA 经查尔酮、柚皮素到二氢黄酮醇 3 步反应, 分别由查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、黄酮醇 3-羟化酶(F3H)催化完成; 花青素合成途径的晚期阶段包括从二氢黄酮醇经无色花青素到花青素

以及花青素的修饰等过程, 分别由二氢黄酮醇还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS, 也称为无色花青素双加氧酶, LDOX)催化完成; 花青素经糖基化、酰基化等修饰, 生成不同的花青素分子^[9]。

花青素代谢途径的调控主要发生在结构基因的转录水平上。通过一个或多个转录因子与结构基因启动子上相应顺式元件结合, 激活或抑制其表达^[10]。研究发现, 对花青素代谢途径起调控作用的主要是 MYB、bHLH 和 WD40 重复蛋白等三类转录因子。花青素的生物合成由 WD40-bHLH-MYB (WBM) 复合物控制, 但是调控的细节仍有待研究^[11]。

水稻中多个花青素生物合成的结构基因通过同源比对等方法相继得以分离。酵母双杂交分析显示, *OsCHS1* 能与 *OsF3H*、*OsF3'H*、*OsDFR*、*OsANS* 互作, 表明水稻中花青素生物合成酶类以多酶复合体的形式参与花青素的生物合成^[12]。目前水稻中已报道了 MYB 和 bHLH 两类调控花青素合成的转录因子。Reddy 等^[13]通过比较玉米与水稻

收稿日期: 2016-04-15

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项(2013PY062)

李艳霞, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: liyanxia@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 陈浩, 博士, 副教授, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: hchen@mail.hzau.edu.cn

的线性关系,从水稻中克隆了玉米 C1 基因(*ZmC1*)的同源基因 *OsC1*(R2R3-MYB 类转录因子)。Takahashi 等^[14]发现 *OsC1* 与水稻颖尖颜色相关;邵雅芳等^[15]发现 *OsC1* 在花中特异性表达,在其他组织(茎和叶)中不表达。*OsB1* 和 *OsB2* 是水稻中参与花青素合成调节的 bHLH 类转录因子,将 *OsB1*、*OsB2* 同时或其中任一与 *ZmC1* 共同转化水稻糊粉层细胞,可以观察到花青素斑积累,但是无 *ZmC1* 的情况下无花青素斑积累,说明 *OsB1* 和 *OsB2* 参与水稻中花青素调控且功能冗余,并且二者必须与 MYB 类转录因子互作才能发挥功能^[16]。遗传学研究表明,黑米果皮颜色由 2 个显性互补基因 *Pb* 和 *Pp* 基因共同控制,其中 *Pp* 对 *pp* 为不完全显性^[17]。水稻中参与花青素调节的 WD40 转录因子目前尚无研究报道。

玉米 PAC1 基因(*ZmPAC1*)编码 WD40 重复蛋白,为玉米糊粉层和盾片中花青素积累的必需基因^[18]。本研究利用氨基酸序列同源比对,找出水稻中相应 WD40 重复蛋白基因 LOC_Os02g45810,暂命名为 *OsPAC1*。本研究将 *OsC1* 和 *OsPAC1* 在水稻品种 Chao 2-10 和 ZH11 中超量表达,观察水稻中花青素生物合成结构基因的表达情况,确定 *OsC1* 和 *OsPAC1* 基因功能,为培育胚乳富含花青素的水稻品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和 TOP10、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105,为华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存和提供。

基因表达载体 pC1300NU 改造自载体 pCAMBIA1300,pC1300NU 上带有 Ubiquitin 启动子及 Nos 终止子,由笔者所在实验室保存。

花青素代谢途径的 2 个转录因子 *OsC1*、*OsPAC1* 以黑米品种黑帅基因组为模板扩增。黑帅属于籼稻品种,由陕西省农业科学院吴升华研究员提供。该品种在全生育期中,叶鞘、叶枕、叶耳、叶舌、茎秆、种皮等部位均观察到有花青素积累,可以从该品种中克隆花青素代谢途径相关的转录因子。

转化受体为水稻粳稻品种 Chao 2-10 和中花 11(ZH11)。Chao 2-10 属于粳稻品种,由上海师范

大学李建粤教授提供。该品种在全生育期所有组织中均未观察到花青素积累,但转入玉米的 *Lc* 基因后,白色种皮变为淡褐色,种子中总黄酮含量升高^[19],因此 Chao 2-10 是转化花青素相关转录因子的良好受体。中花 11 属于粳稻品种,是常用的遗传转化受体材料。

1.2 *OsC1* 和 *OsPAC1* 基因的克隆

用 CTAB 法提取黑帅的基因组 DNA。根据 TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 数据库中 *OsC1* 和 *OsPAC1* 基因序列,用 Primer 6.0 设计特性扩增引物,以黑帅基因组 DNA 为模板,用 *OsC1*-F、*OsC1*-R 扩增 *OsC1*,用 *OsPAC1*-F、*OsPAC1*-R 扩增 *OsPAC1* 基因。基因扩增引物及酶切位点见表 1。

表 1 本研究所用到的引物

Table 1 All primers involved in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
<i>OsC1</i> -F	<u>GGATCCGCTCAGTCTCACACCGCACAGA</u>
<i>OsC1</i> -R	<u>GGTACCGTCACGCACACAAGTTC</u> <u>GGATCCCGAGAAAGAAAGGAAG-</u> <u>CAAAGC</u>
<i>OsPAC1</i> -F	<u>GGTACCTCCACCAGACAGTTCATACA</u>
<i>OsPAC1</i> -R	<u>GGTACCTCCACCAGACAGTTCATACA</u>
<i>Hpt</i> -F	ACACTACATGGCGTGATTTTCAT
<i>Hpt</i> -R	TCCACTATCGGCGAGTACTTCT
<i>OsCHS</i> -qRT-F	TTGGGCTGGACAAGGAGAGGATGA
<i>OsCHS</i> -qRT-R	AGGACGACGGTCTCAACGGTGA
<i>OsCHI</i> -qRT-F	TACGAGAAGTAGGTCACGAT
<i>OsCHI</i> -qRT-R	TTATTTTCATTGTCAAACACGAG
<i>OsF3H</i> -qRT-F	AAGAAGGGCGGATTTCATC
<i>OsF3H</i> -qRT-R	TACGAGAAGTAGGTCACGAT
<i>OsF3'H</i> -qRT-F	ATACCATTCCGAGCAGGA
<i>OsF3'H</i> -qRT-R	TGGCAGTCATCAGTGTGA
<i>OsANS</i> -qRT-F	CGCAAGCTGTTGAGAAG
<i>OsANS</i> -qRT-R	TTATTTAGTTCTCATTCGGTTCCG
<i>OsUFGT</i> -qRT-F	CAGGAGTTGCAGGCCGAAG
<i>OsUFGT</i> -qRT-R	CGACGAACTTGGCGAAGT
<i>OsC1</i> -qRT-F	GAATTAGGAGACGGCGATGA
<i>OsC1</i> -qRT-R	TCACGCACACAAGTTCCA
<i>OsPAC1</i> -qRT-F	GCATTCCACCATCTTCTAC
<i>OsPAC1</i> -qRT-R	AAGTCATAGCGGTTCCAT
<i>Actin</i> -qRT-F	TGGCATCTCTCAGCACATTCC
<i>Actin</i> -qRT-R	TGCACAATGGATGGGTCAGA
<i>OsDFR</i> -RT-F	CGGGTTTCAGGTTACAGGTACA
<i>OsDFR</i> -RT-R	TGAAACCGGAGGGAGTAAC

注:下划线处碱基代表酶切位点 Note: The underscores representing enzyme loci.

1.3 表达载体构建

利用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切表达载体 1300NU 及基因 *OsC1* 和 *OsPAC1*, 胶回收目的基因片段, 纯化载体片段, 用 T4 连接酶连接目的基因和

载体片段。最后获得表达载体 pC1300NU-*OsC1* 和 pC1300NU-*OsPAC1*(图 1)。将构建好的表达载体 pC1300NU-*OsC1* 和 pC1300NU-*OsPAC1* 分别转化到农杆菌菌株 *EHA105* 中, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

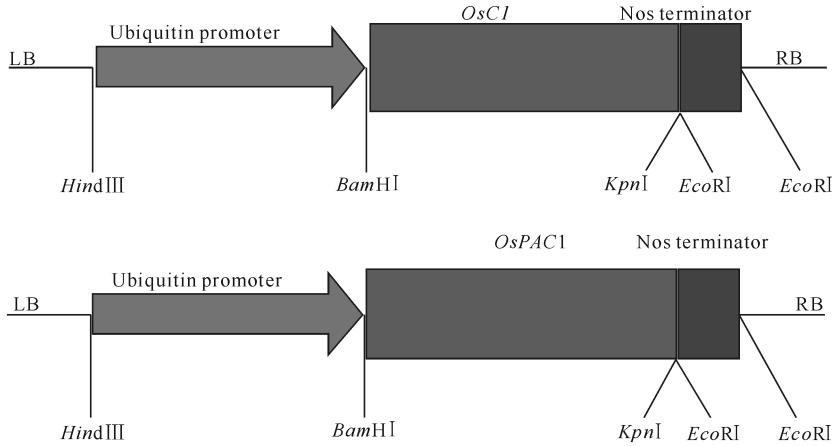


图 1 pC1300NU-*OsC1* 和 pC1300NU-*OsPAC1* 超表达载体结构示意图

Fig.1 Scheme of expression vector pC1300NU-*OsC1* and pC1300NU-*OsPAC1*

1.4 农杆菌介导的水稻遗传转化

用农杆菌介导的遗传转化法^[20]将 pC1300NU-*OsC1* 和 pC1300NU-*OsPAC1* 表达载体分别转化水稻粳稻品种 Chao 2-10 和 ZH11。

1.5 PCR 阳性检测

每株转化苗取 3~5 cm 叶片, 用 CTAB 法少量抽提水稻基因组 DNA。用 *Hpt*-F、*Hpt*-R 扩增 *Hpt* 基因片段, 预期产物大小为 550 bp。PCR 反应体系: 模板 1 μL ; $10\times$ Buffer 2 μL ; dNTPs 0.4 μL ; 引物 *Hpt*-F/R 各 0.2 μL ; *rTaq* (TaKaRa, 中国大连) 0.2 μL ; 补 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 1 s。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选出阳性单株。

1.6 Southern blotting 检测

用 Southern blotting 检测 *OsC1*、*OsPAC1* 转化植株的拷贝数, 用 CTAB 法大量抽提水稻基因组 DNA。取 8 μg 基因组 DNA, 用相应的限制性内切酶充分酶切样品基因组 DNA, 酶切产物跑 TAE 胶, 30 V 电泳 24 h。电泳结束后, 将凝胶上的 DNA 片段印迹到尼龙膜上。用 *Hpt*-F/R 扩增 *Hpt* 基因片段, 用经地高辛标记 (Roche southern blotting 试剂盒, 美国) 后的探针进行杂交, 检测拷贝数。

1.7 基因表达量检测

取转基因植株苗期的 RNA 样, 进行 Real-time PCR 检测。RNA 抽提采用 TrZol Reagent (北京全

式金公司); 采用 MLV 反转录酶 (Invitrogen 公司) 反转录 2 μg RNA 样品, 获得的 cDNA 稀释至 100 μL ; 内参基因选用 *Actin* 基因, *OsC1*、*OsPAC1* 以及花青素生物合成结构基因 Real-time PCR 检测引物见表 1。Real-time PCR 反应体系为: cDNA 1 μL ; $2\times$ Rox SYBR Green I Mix (Roche, 美国) 5 μL ; 引物 F/R: 各 0.2 μL ; 补 ddH₂O 至 10 μL 。Real-time PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s; 40 个循环。基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.8 花青素测量

花青素为水溶性色素, 抽提和测量方法参考 Zhu 等^[21]的方法。取转基因植株新鲜叶片在液氮中研磨后, 用分析天平称取 0.1 g 粉末置于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 80% 盐酸甲醇抽提液。室温 170 r/min 抽提 24 h, 10 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清过 0.22 μm 滤膜, 样品置于棕色样品瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

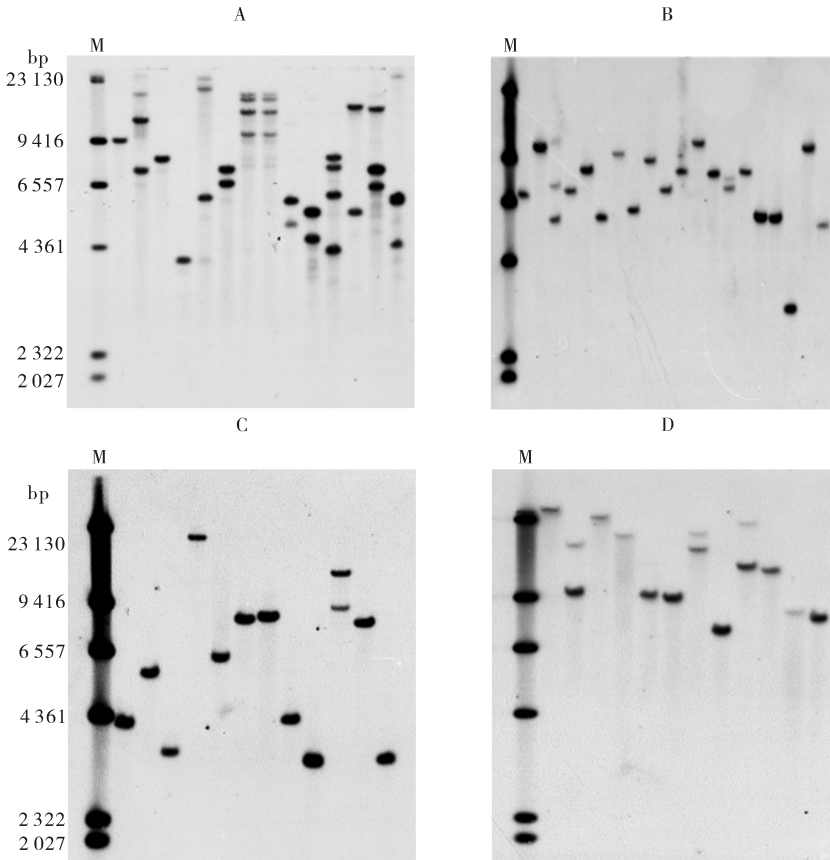
使用高效液相色谱 HPLC1260 (Agilent, 美国) 测定花青素含量。色谱条件: C18 色谱柱 (ZORB-AX SB-Aq 4.6 \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 溶液 A 为水与甲酸的混合液, $V_{\text{水}}/V_{\text{甲酸}}=100/5$, 溶液 B 为纯甲醇; 流动相设置为: 0~12 min, 20%~70% B; 12~20 min, 70%~78% B。流速 0.8 mL/min, 检测波长为 520 nm, 上样量 10 μL , 进样 3 次。

2 结果与分析

2.1 T₀代转化植株 PCR 阳性检测及拷贝数检测

通过农杆菌介导的遗传转化方法, *O_sC1* 转化 Chao 2-10(简称为 CC)和转化 ZH11(简称为 CZ)分别获得 T₀代独立转化植株 14 株和 50 株; *O_sPAC1* 转化 Chao 2-10(简称为 PC)和转化 ZH11(简称为 PZ)分别获得 T₀代独立转化植株 70 株和 55 株。

为进一步验证超表达基因的的稳定整合及拷贝数,对每个转基因家系进行了 Southern blotting 检测。经检测, *O_sC1* 转 Chao 2-10 的转基因材料有 3 个单拷贝家系, 转 ZH11 的转基因材料有 18 个单拷贝家系; *O_sPAC1* 转 Chao 2-10 的转基因材料有 11 个单拷贝家系, 转 ZH11 的转基因材料有 9 个单拷贝家系(图 2)。为确保转基因材料的遗传稳定性, 选取单拷贝家系进行后续试验。



A:CC 家系(*Hind* III 酶切); B:CZ 家系(*Hind* III 酶切); C:PC 家系(*Bam*H I 酶切); D:PZ 家系(*Hind* III 酶切)。M: λ DNA/*Hind* III Marker; 其余泳道为不同的转基因家系。A:CC families(digested by *Hind* III); B:CZ families(digested by *Hind* III); C:PC families(digested by *Bam*H I); D:PZ families(digested by *Hind* III)。M: λ DNA/*Hind* III Marker; The remaining lanes represent transgenic rice lines.

图 2 CC、CZ、PC、PZ 转基因家系 Southern blot 分析

Fig.2 Southern blot assay of the transgenic rice lines of CC,CZ,PC and PZ

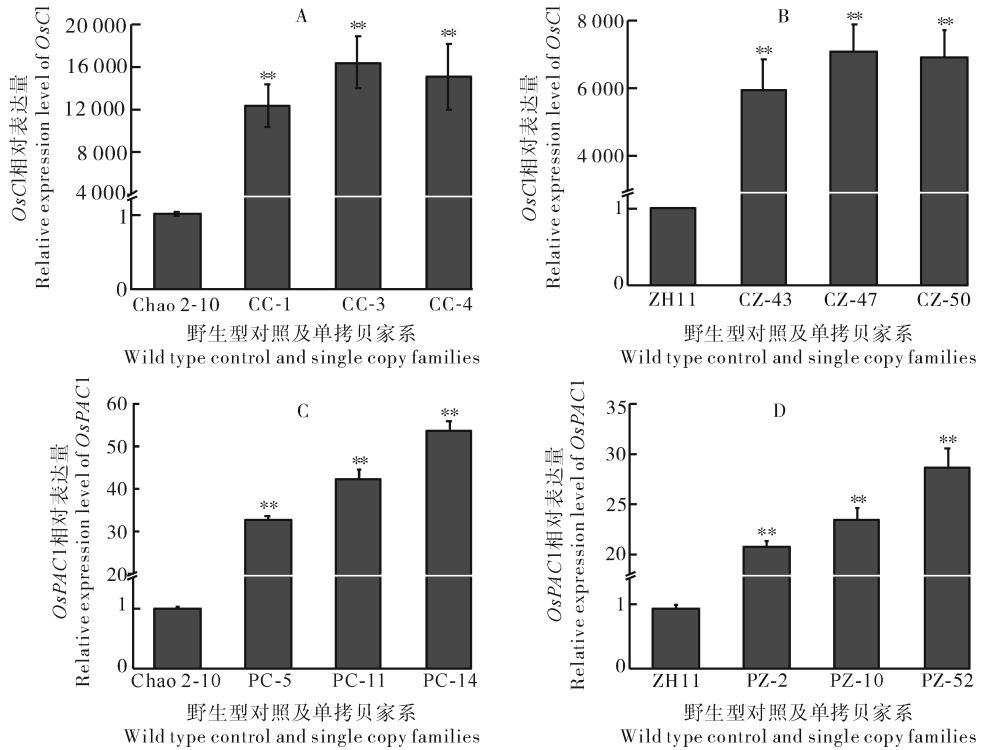
2.2 基因表达量检测

为检测超表达材料中转录因子 *O_sC1* 和 *O_sPAC1* 的表达情况, 各选取 3 个单拷贝家系进行 Real-time PCR 检测。结果显示, *O_sC1* 和 *O_sPAC1* 在 2 种受体水稻品种中均得以超量表达(图 3)。和野生型对照相比, 超表达材料 CC 中 *O_sC1* 表达水平上调了约 12 000~16 000 倍, CZ 中 *O_sC1* 表达水平

上调了约 6 000~7 000 倍, PC 中 *O_sPAC1* 表达水平上调了约 33~54 倍, PZ 中 *O_sPAC1* 表达水平上调了约 21~29 倍。

2.3 表型鉴定

O_sC1 转化 Chao 2-10 后, 在愈伤分化阶段开始观察到花青素积累, 转基因再生植株的叶鞘、叶片、稃尖等部位有花青素积累; 而转化 ZH11 后, 愈伤分



A: *OsC1* 在 CC 中表达量 (Chao 2-10 为对照); B: *OsC1* 在 CZ 中表达量 (ZH11 为对照); C: *OsPAC1* 在 PC 中表达量 (Chao 2-10 为对照); D: *OsPAC1* 在 PZ 中表达量 (ZH11 为对照)。试验设置 3 个重复。* 表示 *t* 测验 *P* 值小于 0.05, 差异显著; ** 表示 *t* 测验 *P* 值小于 0.01, 差异极显著。A: Expression level of *OsC1* in CC (Chao 2-10 serve as CK); B: Expression level of *OsC1* in CZ (ZH11 serve as CK); C: Expression level of *OsPAC1* in PC (Chao 2-10 serve as CK); D: Expression level of *OsPAC1* in PZ (ZH11 serve as CK). Statistical significance is indicated by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$), respectively.

图 3 转基因家系 *OsC1* 和 *OsPAC1* 表达量检测

Fig.3 *OsC1* and *OsPAC1* expression level analysis in transgenic lines

化阶段未观察到花青素积累,转基因植株的整个生长发育过程中也没有花青素积累。*OsPAC1* 转化 2 个品种的再生植株均没有观察到花青素积累。

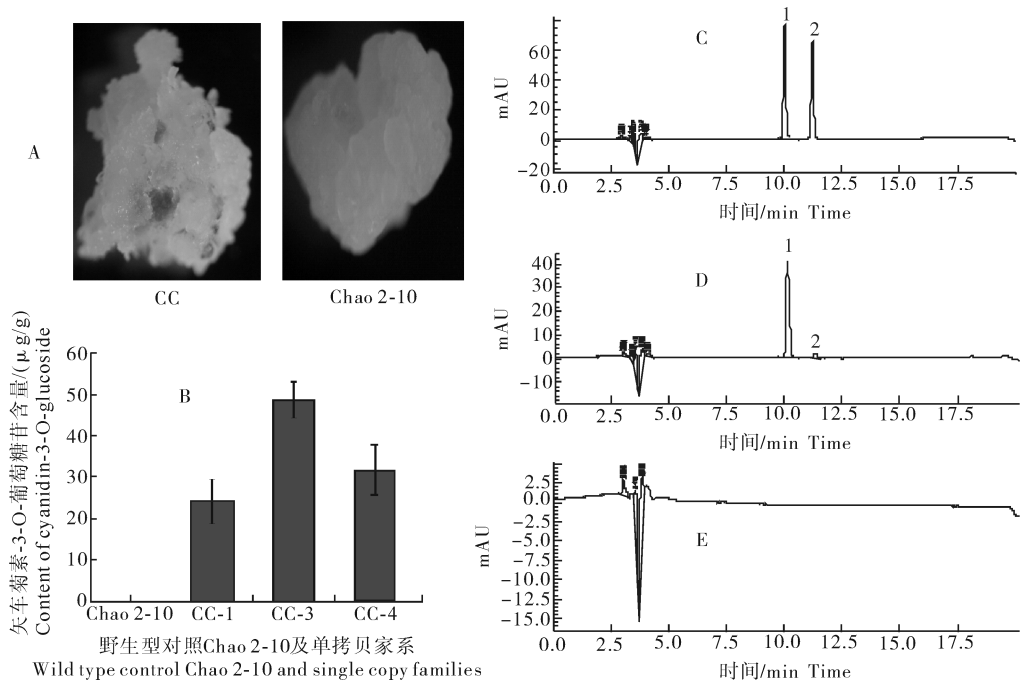
取转基因材料叶片和种子采用 HPLC 测定花青素含量,发现在 CC (*OsC1* 转化 Chao 2-10) 的叶片中有 2 种花青素积累,分别是矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷;种子中未发现花青素积累 (图 4)。

2.4 花青素生物合成途径结构基因表达量检测

为了分析 2 个转录因子对花青素生物合成途径的影响,各取 3 个单拷贝家系 3 叶期叶片的 RNA 样,对 7 个花青素生物合成途径结构基因 (*OsCHS*、*OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H*、*OsDFR*、*OsANS*、*OsUFGT*) 进行表达量分析。Real-time PCR 结果显示,和野生型对照相比,在 Chao 2-10 和 ZH11 中超量表达 *OsC1* 后,6 个花青素代谢途径结构基因均

不同程度地上调表达。其中, *OsANS* 的表达水平上调最为明显,最高上调了 235 倍;相比之下,CC 中 *OsF3H*、*OsF3'H* 上调的倍数相对较低,只有约 1.6~2.9 倍;CZ 中 *OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H* 上调倍数也较低,约 2.3~4.0 倍。和野生型对照相比,Chao 2-10 中超量表达 *OsPAC1* 后, *OsCHS*、*OsCHI*、*OsANS*、*OsUFGT* 上调表达,而 *OsF3H*、*OsF3'H* 的表达基本没变;ZH11 中超量表达 *OsPAC1* 后, *OsCHS*、*OsANS*、*OsUFGT* 上调表达,而 *OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H* 的表达基本不变 (图 5)。

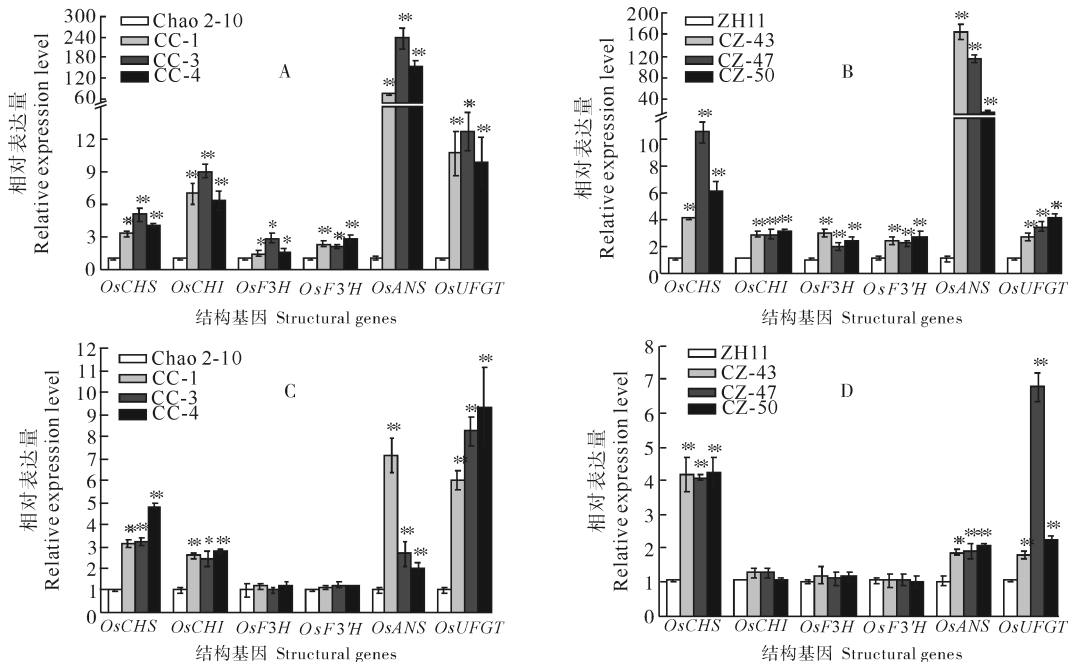
OsDFR 的本底表达量较低,Real-time PCR 不能对其进行定量检测。不过采用 RT-PCR 的方法可以检测到 *OsDFR* 的表达,但是由于所需 RT-PCR 的循环数较高 (40 cycles),难以比较其相对表达量 (图 6)。



A: CC 愈伤; B: 3 个单拷贝家系 (CC-1, CC-3, CC-4) 叶片中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷含量; C: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品 (峰 1) 和芍药素-3-O-葡萄糖苷标准品 (峰 2) HPLC 图谱; D: 转基因家系样品峰图; E: 野生型对照 Chao 2-10 样品峰图。A: Callus of CC; B: Content of cyanidin-3-O-glucoside in leaves of CC-1, CC-3, CC-4. C: HPLC chromatograms of cyanidin-3-O-glucoside standard (peak 1) and peonidin-3-O-glucoside standard (peak 2); D: HPLC chromatograms of transgenic rice samples; E: HPLC chromatograms of the wild type control Chao 2-10 samples.

图 4 CC 转基因水稻表型鉴定

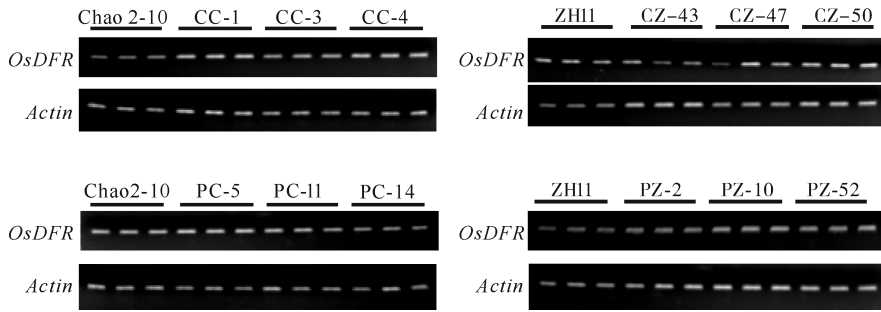
Fig.4 Phenotypic characterization of transgenic rice of CC



A, B, C, D: 分别为转基因水稻 CC、CZ、PC、PZ; 试验设置 3 个生物学重复; * 表示 t 测验 P 值小于 0.05, 差异显著; ** 表示 t 测验 P 值小于 0.01, 差异极显著。A, B, C, and D are transgenic rice CC, CZ, PC and PZ respectively. Each test has three biological replications. Statistical significance is indicated by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$).

图 5 $OsC1$ 和 $OsPAC1$ 超表达水稻中花青素生物合成途径相关结构基因表达量的检测

Fig.5 Expression level analysis of structural genes in anthocyanin biosynthetic pathway in $OsC1$ and $OsPAC1$ overexpressing rice



OsDFR 扩增循环数为 40; *Actin* 扩增循环数为 28. Amplification cycle number of *OsDFR* is 40; that of *Actin* is 28.

图 6 转基因材料中 *OsDFR* 的 RT-PCR 的检测结果

Fig.6 Expression level analysis of *OsDFR* in transgenic rice by RT-PCR

3 讨论

Gandikota 等^[22]将玉米 *C1*、*R*、和 *C2* (编码 *CHS*) 基因转化至水稻后, 在愈伤分化阶段观察到有花青素积累, 经后续验证发现使愈伤积累紫色的原因是 *C2* 基因的表达, 并且转基因植株提高了对水稻稻瘟病的抗性。Shin 等^[23]将玉米的 *C1* 和 *R-S* 基因转入水稻品种 Hwa-Young 中, 使其在胚乳中特异表达, 转基因水稻的果皮颜色由白色变为深褐色, 但没有检测到花青素积累, 只检测到其他一些类黄酮物质。

本研究使用 Chao 2-10 和 ZH11 作为转化受体, 超量表达水稻内源转录因子 *OsC1* 和 *OsPAC1*。表型观察上, 只有 CC 的愈伤组织、叶鞘、叶片、稃尖等有花青素积累, 种子中无花青素积累。其他很多野生型水稻品种如珍汕 97 等也是叶鞘或叶片等部位有花青素积累, 而种子中不含花青素。由此推断, 水稻不同组织中花青素合成的调控模式存在差异。为了达到在胚乳中积累花青素的目标, 通过比较胚乳和其他有花青素积累的组织中结构基因的表达差异, 可以判断是否是由于结构基因不表达或者是表达量低而导致种子中花青素不积累。

本研究中分子检测表明, 在 Chao 2-10 和 ZH11 中超量表达 *OsC1* 时, 除 *OsDFR* 外其余 6 个花青素生物合成途径结构基因 (*OsCHS*、*OsCHI*、*OsF3H*、*OsF3'H*、*OsANS*、*OsUFGT*) 均不同程度地上调表达; 但仅有 Chao 2-10 的叶片和叶鞘中能够积累花青素, 说明水稻品种的遗传背景对花青素的合成具有重要的影响。Chao 2-10 和 ZH11 中超量表达

OsC1 后, 花青素代谢途径基因的表达情况相同, 但表型却不同, 可以推测 ZH11 中某些花青素合成相关基因可能丧失了功能, 从而导致代谢途径中断。需要进一步的研究来确定 ZH11 中究竟缺失了哪些花青素合成相关的基因。

Ithal 等^[24]通过电泳迁移率试验发现 *OsC1* 可与 *OsDFR* 和 *OsANS* 的启动子区域的 MYB 应答元件 MREs 结合。在本试验中, 无论是在 Chao 2-10 还是 ZH11 中超量表达 *OsC1* 后, *OsANS* 都得到显著的上调表达, 可能是 *OsC1* 作用于 *OsANS* 的启动子区域, 从而直接调控 *OsANS* 的表达; 而 *OsDFR* 可能同样受到上调表达, 但由于其本底表达量很低, 本研究无法进行确认。

目前, 未见调节水稻中花青素生物合成的 WD40 类转录因子的研究报道, 本研究用玉米 *PAC1* 基因 (*ZmPAC1*) 同源比对, 在水稻中找到其同源基因, 并尝试将其超量表达至水稻, 以观察其是否参与花青素代谢途径的调节。将 *OsPAC1* 在 Chao 2-10 和 ZH11 超量表达后, 虽没有观察到明显花青素积累, 但其调控了部分代谢途径结构基因的上调表达。一般认为, *OsPAC1* 与另外 2 类转录因子 (MYB 和 bHLH) 相互作用以三元复合体的形式调节花青素的生物合成, 单独表达 *OsPAC1* 作用相对有限。已有的研究表明 *OsPAC1* 能够受生长素诱导^[25], 但具体的基因功能尚不清楚。本研究证实 *OsPAC1* 可以上调花青素代谢途径的部分结构基因, 参与了水稻花青素代谢的调控。

参 考 文 献

[1] BRADSHAW H D, SCHEMSKE D W. Allele substitution at a

- flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers[J].*Nature*,2003,426:176-178.
- [2] NEILL S O, GOULD K S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? [J]. *Functional plant biology*, 2003, 30: 865-873.
- [3] HUI C, BIN Y, YU X P, et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells *in vitro and in vivo* [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62: 1128-1136.
- [4] LEE S G, KIM B, YANG Y, et al. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF-kappaB independent of NRF2-mediated mechanism [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25: 404-411.
- [5] VISKELIS P, RUBINSKIENE M, JASUTIENE I, et al. Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* AIT.) and their press cakes [J]. *J Food Sci*, 2009, 74: 157-161.
- [6] WALLACE T C. Anthocyanins in cardiovascular disease [J]. *Adv Nutr*, 2011, 2: 1-7.
- [7] TAKIKAWA M, INOUE S, HORIO F, et al. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice [J]. *J Nutr*, 2010, 140: 527-533.
- [8] SILVAN J M, REGUERO M, DE PASCUAL-TERESA S. A protective effect of anthocyanins and xanthophylls on UVB-induced damage in retinal pigment epithelial cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7: 1067-1076.
- [9] SHI M Z, XIE D Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Recent patents on biotechnology*, 2014, 8: 47-60.
- [10] RAMSAY N A, GLOVER B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 63-70.
- [11] XU W, DUBOS C, LEPINIEC L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20: 176-185.
- [12] SHIH C H, CHU H, TANG L K, et al. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis [J]. *Planta*, 2008, 228: 1043-1054.
- [13] REDDY V S, SCHEFFLER B E, WIENAND U, et al. Cloning and characterization of the rice homologue of the maize C1 anthocyanin regulatory gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36: 497-498.
- [14] TAKAHASHI M E. Analysis on apiculus color genes essential to anthocyanin coloration in rice [J]. *J Fac Agr Hokkaido Univ*, 1957, 50: 266-362.
- [15] 邵雅芳, 徐非非, 唐富福, 等. 水稻花青素合成相关基因的时空表达研究 [J]. *核农学报*, 2013, 27(1): 9-14.
- [16] SAKAMOTO W, OHMORI T, KAGEYAMA K, et al. The *purple leaf* (PD) locus of rice: the Pl^w allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant and cell physiology*, 2001, 42: 982-991.
- [17] RAHMAN M M, LEE K E, LEE E S, et al. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-o-glucoside depositions in black rice [J]. *Journal of plant biology*, 2013, 56: 24-31.
- [18] CAREY C C, STRAHLE J T, SELINGER D A, et al. Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar transparent testa glabra1 gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant cell*, 2004, 16: 450-464.
- [19] SONG Y E, WANG X, SHEN Z W, et al. Expressing the maize anthocyanin regulatory gene *Lc* increased flavonoid content in the seed of white pericarp rice and purple pericarp rice [J]. *Russian journal of genetics*, 2013, 49: 1127-1133.
- [20] 林拥军, 陈浩, 曹应龙, 等. 农杆菌介导的牡丹江8号高效转基因体系的建立 [J]. *作物学报*, 2002, 28(3): 294-300.
- [21] ZHU F, CAI Y Z, BAO J, et al. Effect of γ -irradiation on phenolic compounds in rice grain [J]. *Food chemistry*, 2010, 120: 74-77.
- [22] GANDIKOTA M, DE KOCHKO A, CHEN L, et al. Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin genes and increased blast resistance [J]. *Molecular breeding*, 2001, 7: 73-83.
- [23] SHIN Y M, PARK H J, YIM S D, et al. Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm [J]. *Plant biotechnology journal*, 2006, 4: 303-315.
- [24] ITHAL N, REDDY A R. Rice flavonoid pathway genes, *OsDFR* and *OsANS*, are induced by dehydration, high salt and aba, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, *OsC1-MYB* [J]. *Plant science*, 2004, 166: 1505-1513.
- [25] COUDERT Y, BÉS M, VAN ANH LE T, et al. Transcript profiling of crown *rootless1* mutant stem base reveals new elements associated with crown root development in rice [J]. *BMC genomics*, 2011, 12: 1-12.

Function of transcription factor *OsC1* and *OsPAC1* regulating biosynthesis of rice anthocyanin

LI Yanxia LIN Yongjun CHEN Hao

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/National Center of Plant
Gene Research (Wuhan), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract Rice endogenous transcription factor *OsC1* and *OsPAC1*, which may regulate the biosynthesis of anthocyanidin, were isolated from black rice Heishuai and overexpressed in white rice Chao 2-10 and ZH11. Anthocyanin accumulation was observed in the resistant callus, leaves, leaf sheath, apiculus of *OsC1*-overexpressed Chao 2-10. Results of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that anthocyanins cyanidin-3-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside were accumulated in *OsC1*-overexpressed Chao 2-10. No anthocyanin accumulation were observed in other transgenic rice materials including *OsC1*-overexpressed Chao 2-10, *OsC1*-overexpressed ZH11 and *OsPAC1*-overexpressed ZH11. Expression analysis of structural genes related to the pathway of anthocyanin biosynthesis in transgenic rice showed that most of the structural genes involved in anthocyanin biosynthesis were up-regulated in *OsC1*-overexpressed Chao 2-10 and ZH11 except *OsDFR*. Expressions of *OsCHS*, *OsCHI*, *OsANS* and *OsUFGT* were up-regulated in *OsPAC1*-overexpressed Chao 2-10, but the expression levels of *OsF3H* and *OsF3'H* were not changed. Expressions of *OsCHS*, *OsANS* and *OsUFGT* were up-regulated in *OsPAC1*-overexpressed ZH11. The expression level of *OsCHI*, *OsF3H*, and *OsF3'H* kept unchanged.

Keywords *Oryza sativa*; anthocyanidin; black rice; *OsC1*; *OsPAC1*

(责任编辑: 张志钰)