

## 水稻花色素苷合成调节基因 *hrd1(t)* 的鉴定

刘永柱, 罗文龙, 黄翠红, 陈立凯, 王 慧, 陈志强, 郭 涛

(华南农业大学/国家植物航天育种工程技术研究中心, 广州 510642)

**摘要:**【目的】对籼稻种质 *hrd1* 紫叶性状进行遗传分析和基因定位。【方法】在特籼占 13 与 02428 杂交后代中获得籼稻紫叶材料 *hrd1*。对 *hrd1* 主要农艺性状及表型进行观察; 配制 *hrd1* 与 02428 的  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $BC_1F_1$  群体, 观察紫叶与绿叶性状的分离情况, 明确其遗传模式; 进一步利用  $F_2$  群体实现紫叶性状基因的精细定位和候选基因筛选。【结果】*hrd1* 在 2 叶期的叶尖出现紫色, 并逐步扩散至全株大部分组织, 成熟期农艺性状与对照 (特籼占 13) 具有较大差异。*hrd1* 叶绿素含量正常, 花色素苷含量显著高于对照。遗传分析表明其紫叶性状受 1 对隐性核基因 *hrd1(t)* 控制, 该基因位于第 4 染色体 InDel 标记 HRD10 和 HRD21 之间, 物理距离为 32.5 kb。对该区域候选基因测序, 发现 *hrd1* 在 LOC\_Os04g50660 基因 (编码 WD 和 G-beta 重复域蛋白) 的第 3 外显子发生单碱基突变 (A C), 导致其编码的第 196 位氨基酸由对照的赖氨酸变为苏氨酸。【结论】*hrd1(t)* 编码 WD40 类转录因子, 可能参与花色素合成调控。

关键词: 水稻; 紫叶; 花色素苷; WD40 转录因子

## Characterization of the Regulatory Gene *hrd1(t)* Involved in Anthocyanin Biosynthesis

LIU Yong-zhu, LUO Wen-long, HUANG Cui-hong, CHEN Li-kai, WANG Hui, CHEN Zhi-qiang, GUO Tao

(South China Agricultural University/National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study is to conduct genetic analysis and gene mapping for the purple leaf character of rice germplasm *hrd1* (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). 【Method】 The regulatory gene *hrd1*, is a rice germplasm with purple leaf which originated from the hybrids of two green leaf accessions Texianzhan 13 and 02428. Major agronomic traits of *hrd1* was firstly investigated, and the segregation ratio of purple and green leaf characters was assayed by using the  $F_1$ ,  $F_2$  and  $BC_1F_1$  populations derived from the crosses of *hrd1* and 02428. Fine mapping for the gene contributed to purple leaf character was further conducted by using  $F_2$  population, and the candidate gene was identified. 【Result】 The purple character initiates on leaf apex of *hrd1* at the 2<sup>nd</sup> leaf stage and gradually spreads to most parts of the whole plant. At the ripening stage, the agronomic trait of *hrd1* was significantly different from the control cultivar (Texianzhan 13). Chlorophyll content was equal between *hrd1* and the control, while the anthocyanin content in *hrd1* was much higher than that in control. A recessive gene named *hrd1(t)* controls the purple leaf character in *hrd1* according to genetic analysis, and it was mapped to a 32.5 kb region on chromosome 4 between InDel markers HRD10 and HRD21. By sequencing for genes within the mapped region, a single base mutation (A to C) was found in the 3<sup>rd</sup> exon of LOC\_Os04g50660 (encoding a WD and G-beta repeats containing protein), which leads to the predicted amino acid at position 196 converts from lysine in control to threonine in *hrd1*. 【Conclusion】 *hrd1(t)* encodes a WD40-class transcription factor and may be involved in a regulatory mechanism of pigments.

Key words: rice; purple leaf trait; anthocyanin; WD40 regulatory gene

收稿日期: 2013-03-25; 接受日期: 2013-06-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31200250) \ 国家“863”计划课题 (2012AA101201) \ 广东省科技计划项目 (2011A020102004, 2011010001892)

联系方式: 刘永柱, E-mail: lively@scau.edu.cn. 罗文龙, E-mail: lovenlong@163.com. 刘永柱和罗文龙为同等贡献作者。通信作者郭涛, E-mail: guo.tao@vip.163.com; 通信作者陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界上重要的粮食作物, 其播种面积和总产量在作物中占据重要位置<sup>[1]</sup>。绝大部分栽培稻植株并不表现特殊颜色, 但是有色水稻的一个或几个部分呈现紫色、棕色或黑色。这种颜色的呈现是由于花色素苷在水稻特定组织中的累积所导致。花色素苷是重要的类黄酮化合物, 在 UV 保护、病虫害抗性反应、抗氧化、信号传导方面均有重要价值<sup>[2]</sup>, 也是研究基因互作的理想性状。作为单子叶模式植物, 深入了解水稻中花色素苷的合成途径及调控机理, 在水稻分类、遗传育种和多基因互作机理研究中具有重要价值。【前人研究进展】已有研究表明, 花色素苷生物合成受 2 类基因的共同控制: 一类是结构基因, 编码生物合成途径中所需要的酶<sup>[3]</sup>, 包括 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*F3'5'H*、*DFR*、*ANS*、*3GT* 等<sup>[4-10]</sup>; 另一类是调节基因, 其编码的转录因子调控结构基因的时空表达, 包括 R2R3-MYB 蛋白、MYC 家族的 bHLH 蛋白、WD40 蛋白基因家族。这两类基因共同作用, 控制着花色素苷在植物中的分布<sup>[11-12]</sup>。利用同源克隆, 水稻中已鉴定出 *CHS*、*CHI*、*ANS*、*DFR* 的同源基因<sup>[13-15]</sup>。此外, 在粳稻中已报道 4 个花色素苷转录因子 (*OsCl*、*OsB1* 和 *OsB2*、*Rc*), 其中, *OsCl* 编码 MYB 类转录因子, 被定位于第 6 染色体<sup>[16]</sup>; *Rc* 位于第 7 染色体 编码 bHLH 转录因子<sup>[17]</sup>; *OsB1* 和 *OsB2* 编码 bHLH 转录因子, 它们共同构成了第 4 染色体上的 *P<sup>W</sup>* 位点<sup>[18]</sup>。【本研究切入点】与粳稻相比, 籼稻中花色素苷的研究集中于表型鉴定和遗传分析, 目前尚未见到调节基因的克隆及功能研究报告。【拟解决的关键问题】本研究在特籼占 13 与 02428 杂交后代中获得籼稻紫叶材料 *hrd1*, 并从表型、遗传、基因定位等方面对其进行分析, 在明确 *hrd1* 紫叶性状遗传模式基础上, 利用分子标记实现花色素苷相关基因精细定位, 并筛选出候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

籼稻紫叶种质 *hrd1* (*Oryza sativa* L. ssp *indica*) 来源于籼稻品种特籼占 13 与广亲和材料 02428 的杂交后代, 经过 5 年的观察, 其紫叶性状稳定遗传。绿叶品种特籼占 13 (简称 TXZ, *Oryza sativa* L. ssp *indica*), 是广东省佛山市农科所选育的籼稻品种, 来源于特青 2 与粳籼 89 的杂交后代; 02428 为广亲和籼稻绿叶品

种, 性状稳定。

### 1.2 田间种植方法

2010 年至 2011 年在华南农业大学科研教学试验基地水稻育种试验田进行试验材料的种植和考察。早季 3 月 3 日播种, 4 月 3 日移栽; 晚季 7 月 23 日播种, 8 月 5 日移栽。田间小区种植 *hrd1*、TXZ、02428, 小区种成 7 株 × 7 株 (单株植), 株行距 20 cm × 20 cm, 小区间行距 40 cm, 设 3 次重复, 大田常规水肥管理。

### 1.3 叶绿素含量测定

*hrd1*、TXZ 和 02428 在分蘖期 (1<sup>st</sup>)、拔节期 (2<sup>nd</sup>)、孕穗期 (3<sup>rd</sup>)、抽穗期 (4<sup>th</sup>) 各取样 1 次, 共 4 次。叶片擦净表面污物, 剪碎 (去掉中脉); 称取剪碎的新鲜样品 0.5 g, 共 3 个重复, 分别放入 25 mL 棕色三角瓶; 加入 95% 的丙酮: 乙醇=2:1 的水溶液 15 mL, 用保鲜膜封口; 放入暗室浸泡提取 24 h, 其中摇动数次; 定容至 25 mL, 摇匀; 把叶绿体色素提取液倒入光径 1 cm 的比色杯内, 以 95% 的丙酮: 乙醇=2:1 的水溶液为空白, 使用 SHIMADZU UV-1800 分光光度计, 在波长 663 nm 和 645 nm 下测定吸光度。根据公式计算叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量。

计算公式为:

$$\text{叶绿素 a (mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(12.7 \times \text{OD}_{663} - 2.69 \times \text{OD}_{645}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{叶绿素 b (mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \frac{(20.9 \times \text{OD}_{645} - 4.68 \times \text{OD}_{663}) \times V}{1000 \times W}$$

总叶绿素 (mg·g<sup>-1</sup>) = 叶绿素 a + 叶绿素 b (V: 混合液体积 (mL); W: 样品质量 (g))

### 1.4 总花色素苷含量测定

*hrd1*、TXZ 和 02428 在分蘖期 (1<sup>st</sup>)、拔节期 (2<sup>nd</sup>)、孕穗期 (3<sup>rd</sup>)、抽穗期 (4<sup>th</sup>) 各取样 1 次, 共 4 次。擦净叶片表面污物, 剪碎 (去掉中脉); 用分析天平称取等量 (0.1 g), 用剪刀分别将每个材料剪成 1—3 mm 长的小段, 加入冷的 5 mL 含 1% (v/v) 盐酸的甲醇溶液, 4 浸提 24 h; 6 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清, 稀释定容至 15 mL, 使用 SHIMADZU UV-1800 分光光度计, 测定 530 nm 最大吸收峰的值; 分别计算出 3 个材料叶片中总花色素苷的含量, 用 OD530/g·FW 作为花色素苷单位。

### 1.5 遗传分析及作图群体的构建

2010 年早季, 以 *hrd1* 为母本, 02428 为父本, 配制正反杂交组合获得相应 F<sub>1</sub> 种子; 2010 年晚季种植 F<sub>1</sub>, 同时与 02428、*hrd1* 进行回交得到 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 种子; 2011 年早季种植 F<sub>2</sub> 及 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, 利用 F<sub>2</sub> 分离群体进行

紫叶性状遗传分析和基因初步定位；2011 年晚造扩大基因定位群体，进行基因精细定位。

### 1.6 DNA 提取及 PCR 检测

采用 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取水稻基因组 DNA。PCR 扩增体系含 2 × PCR Reaction Mix 10 μL (含 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、3 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、400 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP)、Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL、引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1 μL、模板 DNA 1 μL，超纯水补至 20 μL。反应条件为 94 5 min；94 30 s，55 30 s，72 30 s，35 个循环；72 7 min。扩增产物经 8.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电泳缓冲液 1 × TBE，电压 75V，时间 2.5 h)，0.1% AgNO<sub>3</sub> 染色，BIORAD 凝胶成像系统观察、照相、读带。

### 1.7 SSR 标记及 InDel 标记

选择已公布的 SSR 标记用于基因定位，引物序列来自 <http://www.gramene.org/>。按照 Shen 等<sup>[20]</sup>的方法，在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上对粳稻日本晴和籼稻 93-11 已公布的核苷酸序列进行 BLAST 比对，在已定位区间内寻找插入缺失 5—20 bp 的序列，根据其上下游序列设计 InDel 标记引物。

### 1.8 连锁分析

采用 Michelmore 等<sup>[21]</sup>提出的近等基因池分析法筛选突变基因连锁标记。在 F<sub>2</sub> 群体中随机挑选 10 个绿叶表型植株和 10 个紫叶表型植株，分别取等量 DNA 混合，构建 2 个基因池。通过引物筛选寻找基因池间扩增有差异的标记，再用分离后代单株验证该多态性标记是否真正与目标基因连锁。利用 MAPMAKER 作图软件构建目标基因区域的连锁图谱。通过 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org/>) 查找与突变基因紧密连锁标记在水稻基因组 (日本晴) 上的位置，构建覆盖目的基因的物理图谱。用禾本科基因组自动注释系统 (<http://www.gramene.org/>) 预测候选区域的基因组序列可能的编码区 (coding sequence, CDS)。

### 1.9 定位区间内候选基因的序列扩增及分析

从 RGP 网站获得各基因碱基序列及其上下游各 2 kb 左右的碱基进行引物设计。PCR 扩增体系为 2 × PCR Reaction Mix 10 μL (含 100 mmol·L<sup>-1</sup> KCl、20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、3 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、400 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP)、Taq 酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.4 μL、引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1 μL、模板 DNA 2 μL，超纯水补至 20 μL。采用 TOYOBO 公司生产的 KOD Plus Taq 酶进行扩增。反应条件为 94 5 min；94 15 s，58—60 30 s，68

3.1 min 或 4.5 min，30 至 35 个循环；68 10 min。纯化后 PCR 产物序列的测定由北京奥科鼎盛生物科技有限公司和上海美吉生物医药科技有限公司同时完成。利用正反向引物进行双向测序，然后根据双向测序结果，拼接出其完整序列。序列拼接利用 DNASTar 软件的 SeqMan 模块完成。对拼接出野生型和突变体中完整序列的 ORF，进行序列比对。多序列比对采取 ClustalX 软件进行；以 TreeView 软件显示比对结果。

## 2 结果

### 2.1 *hrd1* 表型特征

*hrd1* 叶片、柱头、穗茎、稃尖均表现较明显紫色。这种紫色首先在 2 叶期的叶尖出现，随着植株的发育，逐步扩散至全株大部分组织 (图 1)。*hrd1* 与绿叶材料 (TXZ 和 02428) 4 个时期的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量见表 1。从分蘖期开始，*hrd1* 叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量均呈现逐渐升高的趋势，并在抽穗期达到最高值。在抽穗期，*hrd1* 的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量显著高于 02428 和 TXZ，表明 *hrd1* 色素的累积和叶绿素含量变化无关。随着植株发育，*hrd1* 叶片花色素苷含量逐渐升高，在孕穗期达到最高值，这与田间叶片由绿色逐渐转变为紫色的表型是一致的；与绿叶材料相比，除分蘖期外，其余 3 个时期 *hrd1* 的花色素苷含量均显著高于两者 (表 1)。

### 2.2 *hrd1* 紫叶性状遗传分析

*hrd1* 与 02428 的正反交组合 F<sub>1</sub> 均表现为绿叶，说明控制紫叶性状的基因为核基因，不受细胞质的影响；*hrd1* 和 02428 杂交 F<sub>2</sub> 表现为绿叶紫叶的分离，其比例符合 3 : 1 (表 2)。进一步利用 *hrd1* 与 02428 F<sub>1</sub> 与 *hrd1* 回交，其 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 符合 1 : 1 的分离比例 (表 2)。以上结果说明 *hrd1* 紫叶性状由 1 对隐性核基因控制。

### 2.3 紫叶性状调节基因 *hrd1(t)* 的精细定位及候选基因筛选

由前述的遗传分析可知，*hrd1* 紫叶性状由 1 对隐性核基因控制，将该基因暂命名为 *hrd1(t)*。利用 408 对 SSR 标记 (均匀分布在 12 条染色体) 进行亲本间 (02428 和 *hrd1*) 多态性分析，筛选出 107 对亲本间存在多态性的标记。用上述 107 对多态性引物筛选 (*hrd-1* × 02428) F<sub>2</sub> 的紫叶、绿叶基因池 (以亲本作参照)，检测出第 4 条染色体上的标记 RM308、RM404 与紫叶表型有明显连锁。进一步利用第 4 染色体上多态性 SSR 标记分析从 F<sub>2</sub> (*hrd1* × 02428) 群体挑出的 329 个紫叶单株，确定了 *hrd1(t)* 位于第 4 染色体上。通过作图软件 Mapmaker 3.0



A : 灌浆期 *hrd1* 与 TXZ 的表型 (左 TXZ , 右 *hrd1*) ; B : *hrd1* 在分蘖期、拔节期、孕穗期、抽穗期叶片形态 (从上至下) ; C : *hrd1* 穗部表现 ; D : *hrd1* 开花时柱头外露  
 A: Phenotype of *hrd1*(right) and TXZ(left) in filling stage; B: *hrd1*'s leaf morphology from tillering stage, jointing stage, booting stage, heading stage; C: Spike of *hrd1*; D: *hrd1* show stigma exsertion when bloom

图 1 *hrd1* 表型特征

Fig. 1 Phenothpe of *hrd1*

表 1 *hrd1*、TXZ 和 02428 4 个发育时期的叶绿素及花色素苷比较

Table 1 The comparison of chlorophyll and anthocyanin between *hrd1*, TXZ and 02428 (4 developmental stages)

材料 Material	时期 Stage	叶绿素 A Chlorophyll A (mg·g <sup>-1</sup> )	叶绿素 B Chlorophyll B (mg·g <sup>-1</sup> )	总叶绿素 Total chlorophyll (mg·g <sup>-1</sup> )	花色素苷 Anthocyanin (OD <sub>530</sub> /g·FW)
<i>hrd1</i>	1 <sup>st</sup>	5.0**	1.4**	6.4**	2.92
	2 <sup>nd</sup>	7.7	2.5	10.2	8.27**
	3 <sup>rd</sup>	6.3	2.0	8.3	17.73**
	4 <sup>th</sup>	9.4**	3.3*	12.7*	8.94**
02428	1 <sup>st</sup>	9.1	2.2	11.3	2.15
	2 <sup>nd</sup>	7.6	3.1	10.7	1.68
	3 <sup>rd</sup>	8.3	2.1	10.4	2.11
	4 <sup>th</sup>	8.7	3.0	11.7	3.26
TXZ	1 <sup>st</sup>	8.6	2.8	11.4	3.11
	2 <sup>nd</sup>	8.7	2.8	11.5	2.69
	3 <sup>rd</sup>	7.0	2.1	9.1	2.87
	4 <sup>th</sup>	7.0	2.3	9.3	4.52

\**P* < 0.05 差异显著; \*\**P* < 0.01 差异极显著 \**P* < 0.05 significant difference; \*\**P* < 0.01 very significant difference

表 2 F<sub>2</sub> 及 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 的表型分离情况

Table 2 Phenotypic segregation of F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> populations

组合 Combinations	表型 Phenotypes		实际比例 Actual ratio	理论比例 Theoretical ratio	χ <sup>2</sup>
	绿叶 Green leaf	紫叶 Purple leaf			
( <i>hrd1</i> /02428) F <sub>2</sub>	2154	742	2.90 : 1	3 : 1	0.60
( <i>hrd1</i> /02428// <i>hrd1</i> ) BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	15	13	1.15 : 1	1 : 1	0.14

χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub>=3.84, *v*=1, 当 χ<sup>2</sup> < χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub>, 表示差异不显著 χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub>=3.84, *v*=1, χ<sup>2</sup> < χ<sup>2</sup><sub>0.05</sub>, show no significant difference

对各标记的检测结果进行连锁分析，将 *hrd1(t)* 初步定在 SSR 标记 RM317 和 RM17467 之间，与两标记间遗传距离分别为 3.3 和 4.1 cM (图 2-A)。

为实现 *hrd1(t)* 基因精细定位，根据已公布的日本晴和 9311 的水稻基因组序列，开发多对位于 RM317 和 RM17467 之间的 InDel 标记，对亲本进行多态性分析，最终获得 6 个标记在两亲本间表现出多态性 (表 3)。利用这 6 个 InDel 标记对 (*hrd1* × 02428) F<sub>2</sub> 群体中挑出的 2 273 个紫叶单株进行连锁分析，逐步减小定位区间，最终将 *hrd1(t)* 定位在 BAC 克隆 AL662952 上 InDel 标记 HRD10 和 HRD21 之间，该区域物理距离为 32.5 kb (图 2-B)。

### 2.4 *hrd1(t)* 定位区域的基因注释分析

*hrd1(t)* 精细定位在 BAC 克隆 AL662952 上 InDel 标记 HRD10 和 HRD21 之间的 32.5 kb 区段内。通过 GRAMENE 数据库对 *hrd1(t)* 的定位区域进行基因预测分析，此区间内共包含 6 个注解基因 (图 2-B)。设计引物对定位区域内的 6 个基因进行测序，定位区间内只有 1 个基因 LOC\_Os04g50660 在野生型 (特籼占 13、日本晴、02428) 和 *hrd1* 间存在差异。*hrd1* 在 LOC\_Os04g50660 基因的第 3 外显子发生单碱基

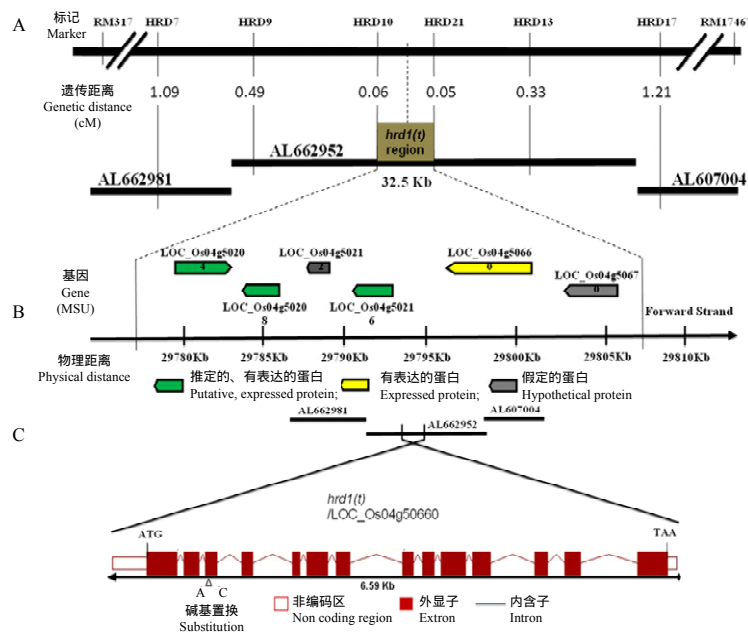
突变 (A→C)，野生型品种在该位点为 A，而 *hrd1* 则为 C (图 2-C)。

利用高分辨率熔解曲线 (high resolution melting analysis, HRM) [22] 分析了不同材料间此位点的差异。*hrd1* 在 LOC\_Os04g50660 基因 A→C 的突变，导致该区域双链 DNA 熔解温度升高。针对该 SNP 位点设计 1 对 HRM 标记 HRD50660，对 *hrd1*、23 个绿叶材料、

表 3 用于 *hrd1(t)* 基因定位的 InDel 引物信息

Table 3 InDel primer information used for gene mapping of *hrd1(t)*

标记名称 Markers	引物序列 Primer pairs (5'-3')	产物大小 Amplification size (bp)
HRD7	CGACTAAACTCGTCCTCGTTTT TGATTAGTGGTGCAGTTTAGTG	238
HRD9	ACTAACAAGGGTCAGGGTCTCA TAGGTACAGCTAGGCAGCGTTT	233
HRD10	CTACTCTGTTGTGAGCGTGGA ATGCTACTCCATCGTTCTGTAA	177
HRD21	GTTGCCTGGCCCTCTAT CATCAAGCCTACGCTCAACTC	177
HRD13	CTGTATGACACCTGCCGTAAGT ATGACGTTTCGCCCTATCTGTAT	191
HRD17	TGCAAGGACTGATCAACATGG GCGACGGTTGCTATACTCCTTA	196



A: *hrd1(t)* 精细定位在第 4 染色体 InDel 标记 HRD10 和 HRD21 之间; B: 通过 GRAMENE 数据库预测 32.5 kb 定位区域内有 6 个候选基因。C: *hrd1(t)* 结构及突变体 *hrd1* 的碱基突变位点  
A: *hrd1(t)* was fine mapped to the interval between InDel markers HDR10 and HRD21 in chromosome 4; B: Six putative genes were annotated in the 32.5 kb mapping region in GRAMENE database; C: Gene structure with the mutated site of *hrd1(t)*

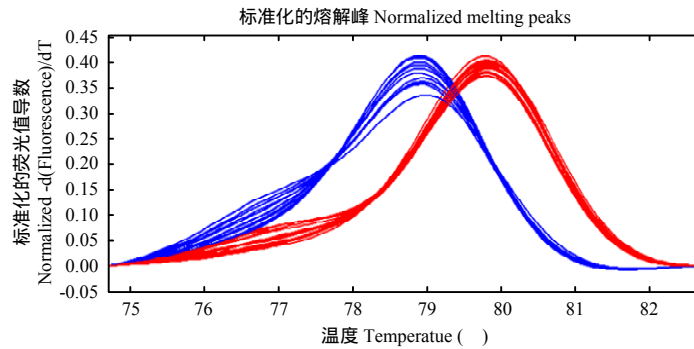
图 2 *hrd1(t)* 的精细定位

Fig. 2 Fine mapping of *hrd1(t)* gene

345 个 F<sub>2</sub> 群体的紫叶个体进行基因分型。结果表明, *hrd1* 与 345 个 F<sub>2</sub> 群体的紫叶个体溶解曲线一致(图 3 红色曲线), 其溶解温度相对较高(79.8 ) ; 而 23 个绿叶材料的溶解曲线一致(图 3 蓝色曲线), 其溶解温度为 78.9 。因此, *hrd1* 在 LOC\_Os04g50660 基因 SNP 突变与紫叶表型共分离, 从而确定该基因就是 *hrd1(t)* 的候选基因。

根据 GRAMENE 数据库的注释信息, LOC\_Os04g50660 基因编码区序列共 6.59 kb, 由 14

个外显子和 13 个内含子构成, 转录本全长 3 190 bp。为确认 LOC\_Os04g50660 是 *hrd1(t)* 的候选基因, 设计引物扩增该基因的 cDNA 并测序(cDNA 产物 2 780 bp, 引物 F: 5'-CGCAGCAAAACCCTAGCCTC-3', 引物 R: 5'-GCAGCTACAAAATTGGTGGTGCG-3'), 在 *hrd1* 的 cDNA 中同样检测到 A→C 的突变。*hrd1* 在该基因第 3 外显子 A→C 突变, 导致 LOC\_Os04g50660 翻译的氨基酸序列在第 196 位由赖氨酸变为苏氨酸(图 4)。



蓝色代表绿叶材料溶解曲线; 红色代表紫叶材料溶解曲线 Blue shows the melting curve of green leaf rice; Red shows the melting curve of purple leaf rice

图 3 利用 HRM 分析 *hrd1*、F<sub>2</sub> 群体的紫叶个体、绿叶材料的基因型

Fig. 3 Genotyping of *hrd1*, purple plants from F<sub>2</sub> population and green leaf materials by using HRM

```

1 ATGGCTTCGTCGCAGGGCCCTCARGAAGAACTACCGCTGCGACCCGCTGGCTGCAGCAGTTC
1 -M--A--S--S--Q--G--L--K--K--N--Y--R--C--D--R--S--L--Q--Q--F--
61 TACACGGGCGGGCCGTCGCGCGICGGGAGCTCTCCCGGAGGCGCGAAGGCGAAGICGAA
21 -Y--T--G--G--F--F--A--V--G--S--S--F--G--G--G--E--G--E--V--E--
121 GGAGGCGAGGCCGAGGCCGAGGCGTTCCTCGCGIGCGCCCTGCGGCGGGGAGGICGCGCCIG
41 -G--G--E--A--E--A--E--A--F--L--A--C--A--C--G--G--E--V--R--L--
181 GTGTCCGCCCGACCGCTCCGCCATCGGGGAGCCGATCGAGGCGCAAAACGAGGCCGTC
61 -V--S--A--A--D--A--S--A--I--G--E--P--I--E--G--E--N--E--A--V--
241 ACGGCGCTCGCGCTGICCCCCGACTCCCGCCTCCTCTTACCGCGGGGCACAGTAGGCTT
81 -T--A--L--A--L--S--P--D--S--R--L--L--F--T--A--G--H--S--R--L--
301 ATTCGAGTCTGGGACCTCGCGTCCCGCAGTTCACACGCGAGCTGGAGGGGCACGATGGT
101 -I--R--V--W--D--L--A--S--R--T--C--T--R--S--W--K--G--H--D--G--
361 CCTATTAGGGCCATGGCCTGCCCATGCTTCTGTTGGGTTGCTTGCAACTGCTGGAGCAGAC
121 -F--I--R--A--K--A--C--H--A--S--G--G--L--L--A--I--A--G--A--D--
421 AAAAAGGATGCGGTTGGGATGTTGATGGTGGTTTTCACACATTTCTTTAGAGGCCAC
141 -K--K--V--C--V--W--D--V--D--G--G--F--C--I--H--F--F--R--G--H--
481 GCAGGTGTTGIGACGACGTGTTAAGTTCACAAAGATCCGAAGCCCTTCTGCTATTTTCT
161 -A--G--V--V--I--I--V--M--F--H--K--D--P--K--R--L--L--L--F--S--
541 GGAAGTGAAGATGCCACTGTGAGAGTTTGAACCTTGAAGCAAAAGTGTGTCGCTGIG
181 -G--S--E--D--A--T--V--R--V--W--N--L--E--S--K--K--C--V--A--V--
601 CTGAAAGAGCATTTTTCAGCTGTGACATCATTAGCCCTTATCTGAAGATGGACAAACATTG
201 -L--K--E--H--F--S--A--V--T--S--L--A--L--S--E--D--G--Q--T--L--

```

图 4 *hrd1(t)* 相对于野生型在第 196 个氨基酸的突变情况

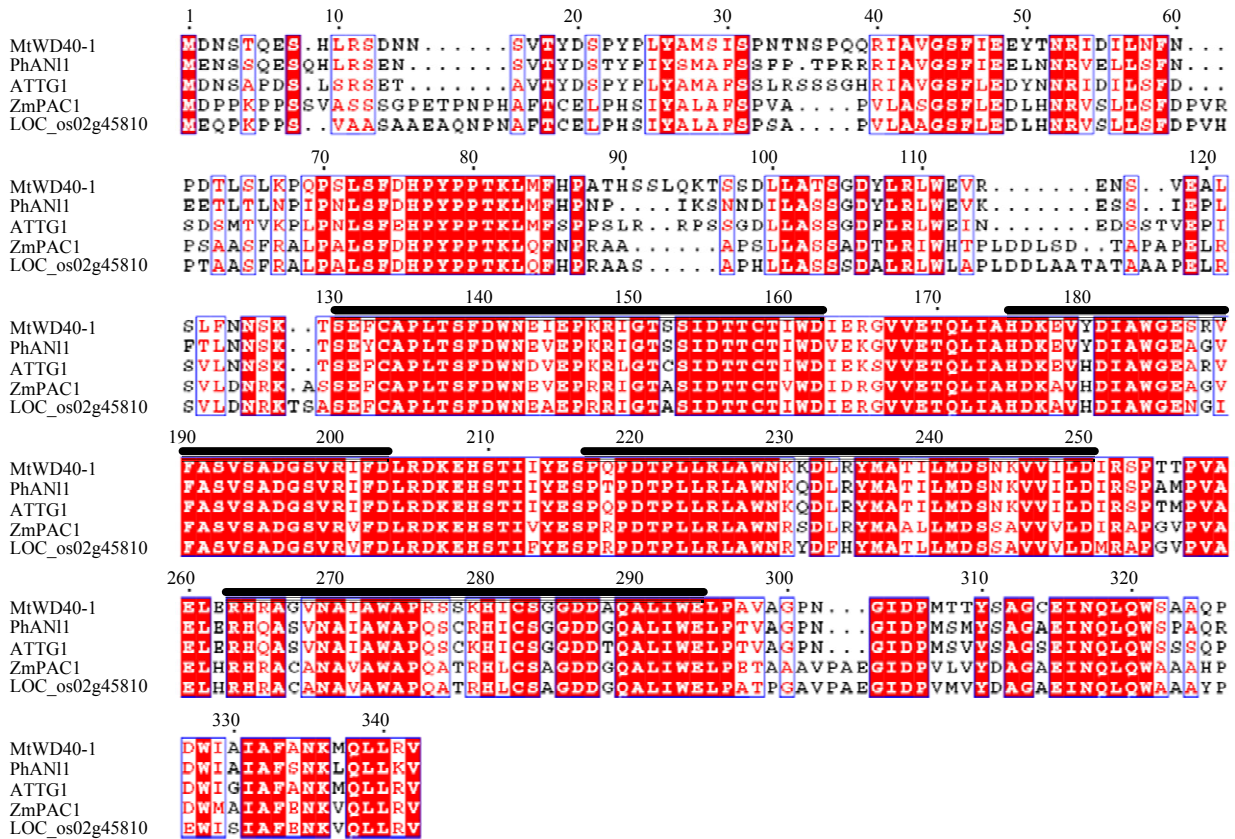
Fig. 4 The mutation of 196<sup>th</sup> protein amino acid between *hrd1(t)* and WT



### 2.5 *hrd1(t)* 的蛋白序列分析

*hrd1(t)* 的 ORF 全长 2 676 bp 编码 891 个氨基酸，含有 10 个 WD40 重复结构域。WD-40 重复结构域（也称为 WD 或  $\beta$ -传递蛋白重复单位）由约 40 个氨基酸残基构成，通常由甘氨酸 Gly-组氨酸 His(G-H) 开始，色氨酸 Trp-天冬氨酸 Asp(W-D) 残基结束。若干个这样的重复单位构成一个被称为 WD 结构域的蛋白质

功能区域。根据 GRAMENE 数据库的注释信息 *hrd1(t)* 编码的蛋白共包含 10 个 WD 重复域（图 5，黑色水平线区），末端含有一个参与核内 rRNA 加工的小亚基加工体 Utp13 结构（SS\_processome\_Utp13，pfm：PF08625；图 5，绿色水平线区），表明 *hrd1(t)* 蛋白主要在细胞核内行使调控作用。*hrd1(t)* 编码蛋白的氨基酸替换发生第 4 个 WD40 单元（图 5，蓝色三角示）。



黑色横线下为 10 个 WD 重复区，绿色横线下为 Utp13 结构区，蓝色三角指出了 *hrd1(t)* 氨基酸突变点  
Ten WD repeats was under black lines, Utp13 region was under green line, and the mutation in *hrd1(t)* was indicated with blue triangle

图 5 *hrd1(t)* 推测的蛋白结构域及其与水稻 *ATT1* 同源基因的比较

Fig. 5 Putative protein domains of *hrd1(t)* gene and its alignment to rice *ATT1* homolog

## 3 讨论

在不同的紫色水稻品种中发现了多种色素的分布模式，一些品种在叶缘、叶鞘、叶枕和节间有颜色，而有些品种只在叶缘和叶枕中累积花色素<sup>[23]</sup>。在多种植物中，这种花色素累积的组织特异性已被证明由 R2R3-MYB<sup>[24-26]</sup>、bHLH<sup>[27]</sup>和 WD40<sup>[28-32]</sup>转录因子 3 大类基因家族调节。由 bHLH、MYB 和 WD40 家族蛋白

所形成的三元复合体（MBW 复合体），其功能在模式植物拟南芥中已得到详细阐述<sup>[33]</sup>。MYB 调控 bHLH 转录，两者形成 bHLH-MYB 复合体并通过识别 WD40 蛋白特定位点形成一个包含 WD40 蛋白的复合体；其中，WD40 重复蛋白作为反应平台促进蛋白与蛋白之间的相互作用。MBW 复合体特异识别结构基因启动子位点，与之结合进而启动结构基因的表达。

目前，在水稻中报道的花色素转录因子有 4 个

(*OsCl*、*OsB1* 和 *OsB2*、*Rc*)，其中 *OsCl* 编码 MYB 类转录因子，该基因是玉米 *Cl* 基因的同源基因，被定位于第 6 染色体<sup>[16]</sup>；*Rc* 位于第 7 染色体 编码 bHLH 转录因子<sup>[17]</sup>；*OsB1* 和 *OsB2* 编码 bHLH 转录因子，它们共同构成了 *P<sup>w</sup>* 位点<sup>[18]</sup>。*P<sup>w</sup>* 位点是控制水稻叶片组织花色素合成的调节因子，该基因不但可以使除了节间之外所有气生组织着色，而且还表现紫色种皮<sup>[34]</sup>，*P<sup>w</sup>* 被定位于水稻第 4 染色体 26.21 Mb 的位置。本研究将控制水稻叶片色素形成的调节因子 *hrd1(t)* 定位于第 4 染色体，其候选基因为 LOC\_Os04g50660。与野生型比较，*hrd1(t)* 在第 3 外显子发生了 A→C 的变异，导致编码氨基酸由赖氨酸变为苏氨酸。对比前人研究结果，推测 *hrd1(t)* 可能是一个新的花色素苷调节因子，原因如下：(1) 目前已报道的花色素苷转录因子所控制的表型均与 *hrd1(t)* 不同。如 *OsCl* 只使茎尖边缘染色，*Rc* 控制稃壳中积累原花色素，*P<sup>w</sup>* 使种皮、节间、叶片等部位呈现紫色，而 *hrd1(t)* 控制花色素苷在除稃壳、种皮外的其它部位分布；(2) 在第 4 染色体上已报道的转录因子只有 *P<sup>w</sup>* 位点，该位点位于 26.21 Mb，与 *hrd1(t)* 在 29.98 Mb (29988189—29981604) 的位置差距甚远，两者不可能是同一基因；(3) *P<sup>w</sup>* 编码 bHLH 类转录因子，而 *hrd1(t)* 编码 WD40 类转录因子，两者在调节功能上具有很大差别。bHLH 与 MYB 类转录因子互作来调节基因表达，而 WD40 通常为 bHLH 与 MYB 类转录因子互作提供反应平台<sup>[35]</sup>。在植物中，已经报道了数个与花色素合成调控相关的 WD40 蛋白基因，如拟南芥的 *AtTTG1* (*Transparent Testa Glabra 1*)<sup>[28]</sup>、苜蓿的 *MtWD40-1*<sup>[32]</sup> 以及玉米的 *ZmPAC1*<sup>[31]</sup> 等，水稻中尚无 WD40 类花色素苷转录因子的报道。以玉米 *ZmPAC1* 在水稻基因组中进行 BLASTP 检索，在第 2 染色体上的 LOC\_Os02g45810 与 *ZmPAC1* 相高度相似 (相似度为 86.27%) 的同源基因。通过序列比对发现，该基因在不同物种间十分保守，特别是在 4 个 WD 重复区的差异很小。*AtTTG1* 除了调控花色素的合成外，还在拟南芥多个发育和生化途径中发挥重要的调节作用<sup>[28, 35-37]</sup>。LOC\_Os02g45810 作为 *AtTTG1* 的同源基因，可能也参与了多个生物学途径。将 *hrd1(t)* 候选基因与 LOC\_Os02g45810 进行比对，结果表明，两者的序列差异很大。基因定位结果也显示，*hrd1* 紫叶调控基因定位在第 4 染色体，说明 LOC\_Os02g45810 对 *hrd1* 花色素积累无直接调控作用。

截止目前，只有拟南芥的 WD40 类似蛋白 TTG1 得到了清楚阐释。*AtTTG1* 编码的 TTG1 蛋白有 341

个氨基酸，具有 4 个 WD40 重复，形成 1 个包含 7 个刀锋状单位的圆环状  $\beta$ -螺旋结构<sup>[28]</sup>。TTG1 不具备核内定位信号，它可能的功能是作为 bHLH 和 MYB 类转录因子互作平台。*AtTTG1* 具有系列等位基因，*ttg1-9* 是其功能缺失型突变体，该突变体第 282 位的丝氨酸突变为苯丙氨酸，导致产生半透明种皮的突变表型。这一结果暗示该位置可能是重要的蛋白结合位点，缺少此位点会影响 bHLH 和 MYB 类转录因子结合的稳定性，进而导致花色素苷合成被阻断<sup>[38]</sup>。丝氨酸是亲水性的极性氨基酸，而苯丙氨酸是疏水性的非极性氨基酸，是否氨基酸性质的变化导致了 *ttg1-9* 中结合位点的丧失？与前人研究比较，本研究中 *hrd1(t)* 所编码蛋白质在第 196 位由赖氨酸变为苏氨酸，苏氨酸是与丝氨酸相近的亲水性极性氨基酸；此外，已有报道认为 WD40 重复单位是蛋白-蛋白互作的识别位点<sup>[39-43]</sup>，本研究中 *hrd1(t)* 所编码蛋白质的氨基酸替换恰好发生在第 4 个 WD40 重复单位。结合前人研究，推测 *hrd1(t)* 可能通过蛋白互作的方式调控花色素苷的合成。此假设是否合理，需要更多试验验证，目前，正在利用酵母双杂系统筛选与 *hrd1(t)* 互作的蛋白。

## 4 结 论

籼稻 *hrd1* 紫叶性状受 1 对隐性核基因 *hrd1(t)* 控制，将其定位于第 4 染色体并筛选出候选基因 LOC\_Os04g50660。与野生型比较，*hrd1(t)* 在候选基因第 3 外显子发生了 A→C 的变异，导致 196 位氨基酸由赖氨酸变为苏氨酸；蛋白序列分析表明，该替换发生在第 4 个 WD40 重复单位。*hrd1(t)* 编码 WD40 类转录因子，可能参与花色素苷合成调控。

## References

- [1] 程式华. 中国超级稻育种技术的创新与发展. 作物杂志, 2012, 6: 1-3.  
Cheng S H. Innovation and development of techniques for super-rice breeding in China. *Crops*, 2012, 6: 1-3. (in Chinese)
- [2] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 485-493.
- [3] Winkel-Shirley B. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1399-1404.
- [4] Austin M B, Noe L J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Products Report*, 2003, 20: 79-110.



- [5] Yamazaki M, Nakajima J, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuha M, Saito K. Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 987-995.
- [6] Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson S P. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 279-291.
- [7] Jeong S T, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 2006, 170(1): 61-69.
- [8] Castellarin S D, Di Gaspero G, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillard S, Adam-Blondon A F, Testolin R. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): Genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 2006, 7: 12.
- [9] Shimada S, Inoue Y T, Sakuta M. Anthocyanidin synthase in non-anthocyanin-producing Caryophyllales species. *The Plant Journal*, 2005, 44(6): 950-959.
- [10] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, Yamamura S. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants. *Plant Science*, 2005, 168(5): 1309-1318.
- [11] Ramsay N A, Glover B J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 63-70.
- [12] Xie D Y, Sharma S B, Wright E, Wang Z Y, Dixon R A. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 2006, 45(6): 895-907.
- [13] Reddy A R, Scheffler B, Madhuri G, Srivastava M N, Kumar A, Sathyanarayanan P V, Nair S, Mohan M. Chalcone synthase in rice (*Oryza sativa* L.): Detection of the CHS protein in seedlings and molecular mapping of the *chs* locus. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32: 735-743.
- [14] Druka A, Kudrna D, Rostoks N, Brueggeman R, von Wettstein D, Kleinhef A. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): Physical, genetic and mutation mapping. *Gene*, 2003, 302: 171-178.
- [15] Reddy A M, Reddy V S, Scheffler B E, Wienand U, Reddy A R. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metabolic Engineering*, 2007, 9: 95-111.
- [16] Saitoh K, Onishi K, Mikami I, Thidar K, Sano Y. Allelic Diversification at the *C* (*OsCI*) locus of wild and cultivated rice: Nucleotide changes associated with phenotypes. *Genetics*, 2004, 168: 997-1007.
- [17] Sweeney M T, Thomson M J, Pfeil B E, McCouch S. Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *The Plant Cell*, 2006, 18(2): 283-294.
- [18] Kawahigashi H, Hirose S, Iwai T, Ohashi Y, Sakamoto W, Maekawa M, Ohkawa Y. Chemically induced expression of rice *OSB2* under the control of the *OsPRI.1* promoter confers increased anthocyanin accumulation in transgenic rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(4): 1241-1247.
- [19] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [20] Shen Y J, Jiang H, Jin J P, Zhang Z B, Xi B, He Y Y, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, Yu Q B, Liu H J, Chen D H, Gao J H, Huang H, Shi T L, Yang Z N. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiology*, 2004, 135(3): 1198-1205.
- [21] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [22] Vossen R H, Aten E, Roos A. High-resolution melting analysis (HRMA)-more than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 2009, 30(10): 1-7.
- [23] Kinoshita T, Takahashi M. The one hundredth report of genetical studies on the rice plant. Linkage studies and future prospects. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 1991, 65(1): 1-61.
- [24] Czempl S, Stracke R, Weissshaar B, Cordon N, Harris N N, Walker A R, Robinson S P, Bogs J. The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYBF1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1513-1530.
- [25] 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*. *The Plant Journal*, 2008, 55(6): 954-967.
- [26] Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verriès C, Cheynier V, Romieu C. Ectopic expression of *VvMybPA2* promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 1028-1041.
- [27] Matus J T, Poupin M J, Cañón P, Bordeu E, Alcalde J A,

- Arce-Johnson P. Isolation of WDR and bHLH genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 2010(72): 607-620.
- [28] Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Blundell T L, Esch J J, Marks M D, Gray J C. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 1999, 11(7): 1337-1350
- [29] Kanokporn S, Yukiko M, Mami Y, Kazaki S. A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(3): 485-495
- [30] De V N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes and Development*, 1997, 11: 1422-1434.
- [31] Carey C C, Strahle J T, Selinger D A, Chandler V L. 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*. *The Plant Cell*, 2004, 16(2): 450-464.
- [32] Pang Y, Wenger J P, Saathoff K, Peel G J, Wen J, Huhman D, Allen S N, Tang Y, Cheng X, Tadege M, Ratet P, Mysore K S, Sumner L W, Marks M D, Dixon R A. A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1114-1129.
- [33] Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J M, Lloyd A M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 2008, 53: 814-827.
- [34] Wataru S, Taku O, Keisuke K, Chikara M, Akira S, Minoru M, Kazuhiko N, Masahiko M. The *Purple leaf(Pl)* locus of rice: The *Pl<sup>tr</sup>* allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, 2001, 42(9): 982-991.
- [35] Van N S, Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: Conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics*, 2003, 4: 50.
- [36] Maes L, Inze D, Goossens A. Functional specialization of the *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in *Arabidopsis* rosette leaves. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1453-1464.
- [37] Suganuma T, Pattenden S G, Workman J L. Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes and Development*, 2008, 22(10): 1265-1268.
- [38] Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A. The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development*, 2008, 135(11): 1991-1999.
- [39] Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R, Smith T F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 1994, 371(6495): 297-300.
- [40] Smith T F, Gaitatzes C, Saxena K, Neer E J. The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(5): 181-185.
- [41] Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: Structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(14): 2085-2097.
- [42] Seet B T, Dikic I, Zhou M M, Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(7): 473-483.
- [43] Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell*, 2011, 2(3): 202-214.

(责任编辑 李莉)