

引用格式：

何展坤, 崔延春, 徐庆国, 毛东海. 水稻果皮花青素含量的全基因组关联分析 [J]. 农业现代化研究, 2023, 44(2): 370-380.  
He Z K, Cui Y C, Xu Q G, Mao D H. Genome-wide association analysis of anthocyanin content in rice seed pericarp[J]. Research of Agricultural Modernization, 2023, 44(2): 370-380.  
DOI: 10.13872/j.1000-0275.2023.0027



## 水稻果皮花青素含量的全基因组关联分析

何展坤<sup>1</sup>, 崔延春<sup>2\*</sup>, 徐庆国<sup>1\*</sup>, 毛东海<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南 长沙 410125)

**摘要:** 花青素对人类健康具有重要的保健功能, 培育富含花青素的功能性水稻品种是未来绿色健康农业发展的必然需求。然而目前与水稻果皮花青素含量相关的基因资源还十分有限, 不利于有色稻米品种的种质创新和遗传改良。为了全面发掘水稻果皮花青素的基因资源, 本研究结合花青素无损检测和全基因组关联分析方法, 以 533 份水稻种质作为供试材料, 检测到了 13 个果皮花青素含量关联 QTL 位点, 这些 QTL 位点中包含了除 *Rc*、*Rd*、*Rb* 及 *OsMYB3* 已知与花青素相关的基因外, 还包括 17 个候选基因。通过对候选基因同源性及其表达模式分析, 初步确定 8 个 *MYB* 基因与 1 个 *bHLH* 基因为新的水稻果皮花青素的候选基因。该研究结果首次全面剖析了水稻果皮花青素的遗传基础, 为健康功能性水稻品种的选育提供理论基础与基因资源。

**关键词:** 水稻; 果皮; 花青素; 全基因组关联分析; 主效 QTL

中图分类号: (S-3) 文献标识码: A 文章编号: 1000-0275 (2023) 02-0370-11

### Genome-wide association analysis of anthocyanin content in rice seed pericarp

HE Zhan-kun<sup>1</sup>, CUI Yan-chun<sup>2</sup>, XU Qing-guo<sup>1</sup>, MAO Dong-hai<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan 410125, China)

**Abstract:** Anthocyanins in plants play an important role in modulating human health. The cultivation of rice varieties rich in anthocyanins is inevitable to fulfil the demand for developing green and healthy agricultural practices in the future. However, the current genetic resources related to anthocyanin content in rice pericarp are still limited. This is not conducive to germplasm innovation and genetic improvement of colored rice varieties. To comprehensively explore the genetic resources regulating anthocyanin content in rice pericarp, noninvasive detection of anthocyanin was combined with genome-wide association analysis. Using this approach, 13 QTLs associated with anthocyanin content in the pericarp were detected in 533 rice germplasms. These QTLs included 17 candidate genes in addition to *Rc*, *Rd*, *Rb*, and *OsMYB3*. Through the analysis of homology and expression patterns of these candidate genes, eight *MYB* and one *bHLH* gene were preliminarily identified as novel candidate genes associated with anthocyanin content in rice pericarp. This study comprehensively analyzed the genetic basis of anthocyanins in rice pericarp for the first time, providing a theoretical basis and identifying novel genetic resources for the breeding of healthy functional rice varieties.

**Key words:** rice; seed pericarp; anthocyanins; genome-wide association analysis; master-effect QTL

花青素是植物的主要次生代谢产物之一, 属于类黄酮化合物, 广泛存在于高等植物如谷物、瓜果及蔬菜中, 是一种水溶性的天然色素, 具有强抗氧化性<sup>[1]</sup>。动物代谢试验表明, 食用花青素能够降低心脑血管疾病以及癌症风险<sup>[2]</sup>。陈琦等<sup>[3]</sup>研究发现,

花青素能够下调 *p53* 基因 DNA 甲基化, 抑制口腔表皮样癌细胞增殖及诱导细胞凋亡。而花青素的主要成分矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (C3G) 对于脑缺血等脑部疾病以及帕金森综合征和阿尔茨海默症都起到了有效的预防和控制作用<sup>[4-6]</sup>。此外, 花青

基金项目: 湖南省杰出青年基金项目 (2021JJ10041)。

作者简介: 何展坤 (1997—), 男, 湖南株洲人, 硕士研究生, 主要研究方向为水稻分子遗传学, E-mail: 504788201@qq.com; 通信作者: 崔延春 (1981—), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 主要研究方向为水稻分子遗传与分子机制, E-mail: cuiyanchun@isa.ac.cn; 徐庆国 (1960—), 男, 湖南岳阳人, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为作物遗传育种, E-mail: huxu0309@hunau.edu.cn。

收稿日期: 2023-01-16; 接受日期: 2023-03-21

Foundation item: Hunan Outstanding Youth Fund (2021JJ10041).

Corresponding author: CUI Yan-chun, E-mail: cuiyanchun@isa.ac.cn; XU Qing-guo, E-mail: huxu0309@hunau.edu.cn.

Received 16 January, 2023; Accepted 21 March, 2023

素还能起到降血脂的作用。Liu 等<sup>[7]</sup>通过对小鼠的研究发现,花青素能够调节小鼠肠道中的微生物群,降低小鼠的血脂,从而达到控制体重的目的。利用有色稻米中的花青素生产的复方胶囊能有效防治肝脏损伤,特别是对血脂高的人群具有明显的辅助降血脂效果<sup>[8]</sup>。

水稻是人类最为重要的粮食作物之一,世界60%以上的人口以稻米为主食。米糠中含有许多对人体有用的活性物质,在防癌、抗菌、抗氧化、预防糖尿病等具有重要的保健功效<sup>[9]</sup>。花青素在稻米果皮中的累积,会产生有色稻米,根据花青素含量的不同,可使稻米果皮呈现黑(紫)、红、黄等不同颜色,其中以黑米和红米最为常见<sup>[8]</sup>。与普通白米相比,有色稻米具有提高人体免疫力,预防疾病等功效,具有重要的营养及保健价值。随着我国居民生活水平提高,对稻米品质及健康功能性稻米的要求越来越高,水稻产业发展不仅要解决人们的温饱问题,还要满足人们对健康高品质生活的向往。因此,未来稻米产业绿色发展,必须选育开发“药食同源”有色健康功能性稻米新品种,实现有色稻米主食化及其优质功能性稻米产业的升级<sup>[10]</sup>。

功能性稻米产业的发展离不开种质资源的创新及品种的改良,而优异基因的发掘是种源创新和品种改良的关键。当前可用于健康功能性水稻品种培育的果皮花青素基因资源还十分有限。已克隆的控制水稻果皮颜色的主效基因包括 *Rc*、*Rd*、*OsKala1*、*OsMYB3* (也称为 *OsKala3*)、*OsKala4* 和 *OsTTG1* 基因<sup>[11-12]</sup>。植物组织中花青素的生物合成主要由三种转录因子 R2R3MYB、bHLH 和 WDR 组成的 MBW (MYB-bHLH-WD40) 三聚体转录因子复合物激活<sup>[13]</sup>。*Rc* 和 *OsKala4* 负责编码 bHLH 蛋白,分别控制水稻红色和黑色果皮性状<sup>[14]</sup>。*OsMYB3* 编码一个 R2R3-MYB 转录因子,是水稻果皮中花青素合成的关键基因,其在黑米中的表达水平明显高于白米,黑米中敲除该基因会导致谷物中 19 种花青素代谢物和许多其他类黄酮的显著下调<sup>[15]</sup>。*OsTTG1* 负责编码 WD40 蛋白,东兰墨米敲除 *OsTTG1* 后,其谷粒、颖尖和叶耳的花青素积累量显著减少或消失<sup>[12]</sup>。*Rd* 和 *OsKala1* 负责编码 DFR 蛋白,在花青素合成途径中负责将二氢槲皮素的羰基还原,产生不稳定的中间体无色花青素<sup>[16]</sup>。在最新的研究中揭示了 *OsKala4* 的等位基因 *OsSI* 控制水稻茎秆和颖壳的着色,在花青素合成通路中 *SI* 位于 *OsCI* 的上游,通过调控 *CI* 的表达,达到高效调控下游花青素结构基因表达的目的<sup>[17]</sup>。此外,其他已克隆的花青素相

关基因都是影响水稻叶片花青素含量,与籽粒无关,例如,水稻 *OsCI*、*OsRb* 和 *OsPI* 是水稻叶片花青素合成的关键基因<sup>[18]</sup>,其中 *CI* 和 *Rb* 基因的某些突变导致的人工选择,是造成野生稻和栽培稻叶片颜色出现性状分离的原因之一。水稻 *OsPI* 能够与 *MYB-bHLH-WD40* 互作共同调节水稻叶片中花青素生物合成基因,同时 *OsPI* 能够特异性激活花青素生物合成的上游基因<sup>[19]</sup>。由此可见,可用于健康功能性水稻种质创新及品种改良的基因屈指可数,有待更多发掘。

全基因组关联分析 (genome-wide association studies, GWAS) 是一种可以用于连锁作图、寻找特定表型性状有关的候选基因,以及揭示表型和基因型关系的一种有效方法<sup>[20]</sup>。它可直接利用自然群体在全基因组层面发掘与农艺性状关联的遗传位点,在水稻遗传改良上已被广泛应用。例如, Lu 等<sup>[21]</sup>利用 523 份水稻种质资源共定位了 17 个与水稻株型相关的 QTL, Tan 等<sup>[22]</sup>通过测量 575 份亚洲栽培稻品种在不同环境中的微量元素积累,并利用 GWAS 解析了稻米中矿质元素累积的遗传基础。然而,目前尚无水稻果皮花青素含量性状的 GWAS 研究。为此,我们开发了水稻果皮花青素含量的无损检测技术,获得 533 份水稻种质群体材料的测量数据,结合全基因组关联分析,试图剖析水稻果皮花青素含量的遗传基础,为健康功能性水稻品种的选育提供理论基础与基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与田间种植

水稻供试种质材料主要来自于东亚、东南亚和南亚的水稻产区,共 533 份亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 种质,包括 294 份籼稻 (*Oryza sativa* subsp. *indica*) 种质材料,239 份粳稻 (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) 种质材料,其中有色稻米共含有 29 份,27 份红米以及 2 份黑米。水稻种质材料分别种植于湖南省长沙市芙蓉区与海南省三亚市中国科学院亚热带农业生态研究所基地。田间种植采用随机区组,每个种质材料种植 1 行(共 8 株),株行距为 15 cm×15 cm。整个生育期田间管理按一般水稻大田生产管理措施进行。待水稻种子充分成熟后,将每行中间的 4 株水稻人工收获、脱粒后保存。为防止收种及后续处理过程中的污染,收获后的种子立即装入羊皮纸袋中密封保存。

### 1.2 水稻的花青素表型测定

为防止机械去壳导致水稻糙米的果皮受到损



伤,采用人工去壳的方式,采集 533 份水稻种质材料的糙米并保存到 EP 管中。利用活体成像仪以及分光光度计法对不同颜色稻米进行定量测量,并对两种方法所测量的数据进行相关性比较分析。

1.2.1 稻米花青素含量的植物活体成像仪分析 水稻糙米果皮花青素含量的植物活体成像仪 (VILBER FUSION FX7.EDGE SPECTRA) 分析的具体方法如下:分别从每份水稻种质材料中,挑选发育成熟饱满的糙米作为测量材料,各供试样品均采用相同的一粒白色米作为对照,然后对测量数据进行分析,以经过 535 nm 波长过滤后的可见光为光源,设置白色稻米的反射光值为“1”作固定对照,以有色稻米样品的反射光值作为其花青素的相对含量,每个样品重复测定 3 次,取平均值。

1.2.2 稻米花青素含量的分光光度计分析 水稻糙米果皮花青素含量的分光光度计分析,按照中华人民共和国农业行业标准 [NY/T 832-2004] 附录 A 黑米色素检验方法并稍做修改,具体方法如下:称取 1 g 糙米,放置于 50 ml 的离心管中,分批次加入 20 ml、20 ml、10 ml 的 1.5 mol/L 酸化乙醇 (HCL/95% 乙醇=15/85),在 80 °C 的恒温水浴锅中浸提 1 h。然后将浸提溶液采用高速离心机 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清并定容至 50 ml,采用分光光度计在 535 nm 处测定其吸光度值 (Abs)。根据以下公式计算各供试糙米样品花青素的相对含量:

$$E_{1\text{cm}, \lambda=\max 535\text{nm}}^{1\%} = \frac{A \times R}{W} \quad (1)$$

式中:  $E_{1\text{cm}, \lambda=\max 535\text{nm}}^{1\%}$  为色价,用来表示糙米样品花青素的相对含量;  $A$  表示样品溶液在 535 nm 处的吸光度值;  $R$  表示供试样品色素溶液的稀释倍数,本研究为 50 倍;  $W$  表示样品质量,单位为 g。

### 1.3 基因型检测与分析

533 份供试水稻种质材料的单核苷酸多态性 (SNP) 基因型数据,均来自 5 k 高密度 SNP 数组,利用 TASSEL 5.2.81 软件过滤掉低质量的 SNP 位点,选择最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.05,最小计数 < 150 及缺失率 ≥ 20% 后,剩余 65 523 个 SNP 用于后续的全基因组关联分析。

### 1.4 水稻种质材料的重测序

供试水稻种质材料的基因型分析,采用第二代测序技术 (Next generation sequencing, NGS) 对各供试水稻种质材料进行全基因组重测序 (Whole-genome resequencing, WGRS)。在去除低质量碱基和接头序列后,总共产生 9 627 694 000 条高质量的

读序列 (reads), 1 245.30 Gbp 的碱基数据,重测序数据从课题组已有数据中获得<sup>[22-23]</sup>。

### 1.5 全基因组关联分析

利用 TASSEL 对 50 K SNP 标记与供试水稻种质糙米果皮的表型数据间进行关联分析,为减少 GWAS 结果中的假阳性,全基因组范围阈值根据 0.05 水平的 Bonfferoni 校正法进行筛选,即全部材料中阈值为 1e-6,位点的  $P$  值小于阈值,则记为显著关联位点 (Significant association loci, SAL)。

为了比较各供试水稻种质稻米花青素含量,通过植物活体成像仪和分光光度计两种不同方法获得的糙米果皮颜色数据,进行相关性分析,并对活体成像测量的结果进行全基因组关联分析。分析采用 TASSEL 5.2.81 软件和混合线性模型算法 (MLM) 完成。GWAS 结果用 Manhattan 图和 QQ-Plot 图显示,Manhattan 图表示水稻全基因组中与花青素有关的显著位点以及  $P$  值,QQ-Plot 图表示该模型下的关联分析效果。然后在国家水稻数据中心 (<http://www.ricedata.cn>) 以及 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中,寻找已克隆或定位的与水稻花青素相关基因的位置信息,与本研究所检测的 QTL 进行共定位。

### 1.6 数据统计与分析

本研究中的数据分析采用 SPSS 13.0 进行  $T$  检验等统计分析。利用国家水稻数据中心 (<http://www.ricedata.cn>) 以及 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载候选基因的蛋白序列;rapdb 网站 (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast>) 对候选基因的蛋白序列进行同源性比对,并利用 MEGA\_11.03.13 软件进行进化树构建;利用表达谱数据库 (<http://www.bar.utoronto.ca/efprice/cgi-bin/efpWeb.cgi>) 分析候选基因在不同组织、不同时期的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻果皮花青素含量的检测

通过活体成像仪,获取不同果皮颜色水稻种质的糙米在 535 nm 波长下的显色图 (图 1)。如图 1 所示,不同果皮颜色水稻种质的糙米按照其颜色深浅依次由低到高排列,将排列第 1 位的白色米作为对照水稻种质 (图 1 A),随后对各供试水稻种质果皮颜色获取的图片分别做进一步的花青素含量的定量分析。分析过程中将水稻种质白色米对照的反射光值设为 1,各供试水稻种质有色稻米的反色光值则为 1~0 之间,其果皮颜色越深,则其反射光值越低。

同时,将测量结果与中华人民共和国农业行

业标准 [NY/T 832-2004] 的稻米花青素测量方法的结果进行对比, 二者呈现明显的负相关, 与预期一致, 即水稻种质糙米果皮颜色越深, 其反射光值越低, 其花青素含量越高。相关性分析表明, 水稻种质糙米反射光值与花青素含量两者的相关系数达到了 0.8406 (图 1D), 表明利用活体成像仪分析水稻糙米果皮花青素相对含量的方法是可行的。

### 2.2 水稻果皮花青素含量的全基因组关联性分析

水稻花青素全基因组关联性分析前, 首先利用活体成像仪对 533 个水稻种质糙米的花青素相对含量进行定量测量, 并将此表型数据结果绘制成柱形图 (图 2A)。

利用 TASSLE 软件分别对 533 份核心群体进行数据分析。首先通过群体基因型进行主成分分析 (图 2B), 发现本研究中的自然群体存在明显的群体结

构, 当使用主成份 1 和主成份 2 作散点图, 可以观察到整个群体存在明显的籼粳分化, 随后进行全基因组关联性分析, 并选择以混合线性模型 (MLM) 鉴定与控制水稻糙米果皮颜色以及花青素有关的显著遗传位点 (图 3)。根据曼哈顿图所示 (图 4), 整个基因组共检测到了 725 个与水稻糙米果皮花青素含量有关的 SAL, 由于受 7 号染色体上控制果皮颜色性状的 RC 基因连锁不平衡的影响, 7 号染色体上存在 633 个假阳性 SNP, 排除掉假阳性后共检测到了 92 个 SAL。

为了降低假阳性概率, 在 SNP 上下游 200 kb 范围内如果存在 2 个显著相关 SNP 位点则记为 1 个 QTL 位点, 对水稻花青素全基因组关联 (GWAS) 结果所检测到的 SNP 进行了 QTL 分析, 共定位到了 13 个与花青素显著相关的位点 (表 1)。将

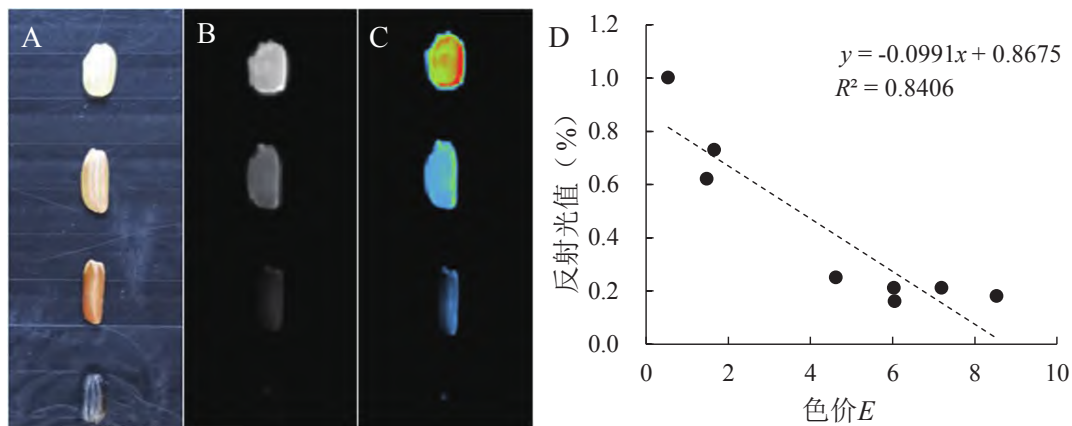


图 1 不同水稻种皮颜色表型以及相关分析

Fig. 1 Rice phenotypes and correlation analysis of different rice coats

注：图 A 为各代表性水稻种质米粒在可见光下的米粒颜色；图 B-C 为各代表性水稻种质米粒在活体成像系统 535 nm 波长下的效果图；图 D 为不同种皮颜色水稻种质花青素含量的活体成像仪与分光光度计分析结果的相关分析结果。

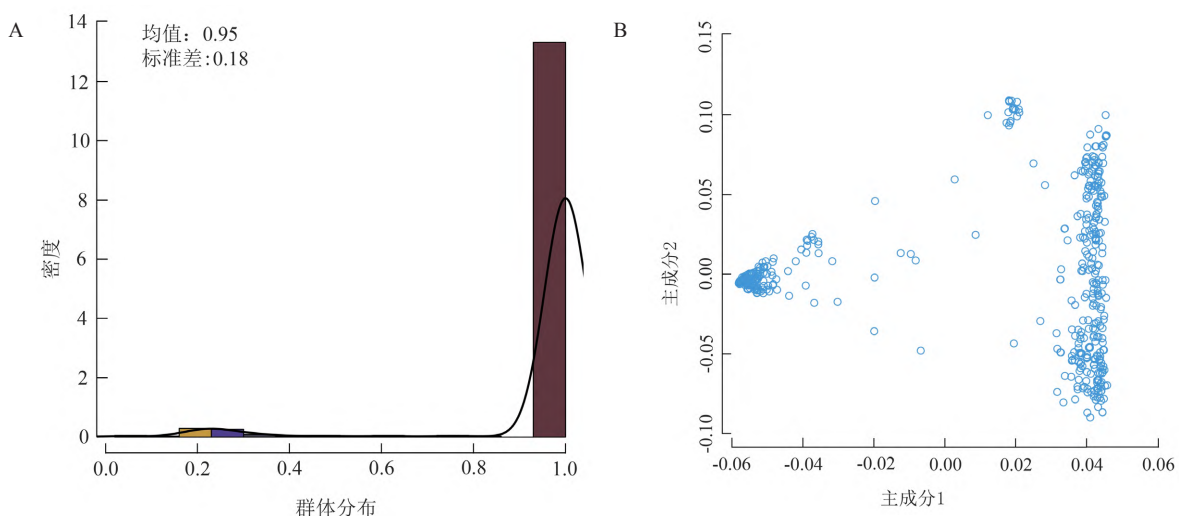


图 2 GWAS 群体表型汇总以及主成分分析

Fig. 2 GWAS population phenotypic summary and PCA

注：图 A 为活体成像定量测量数据在群体中的表型分布；图 B 为群体主成分分析。

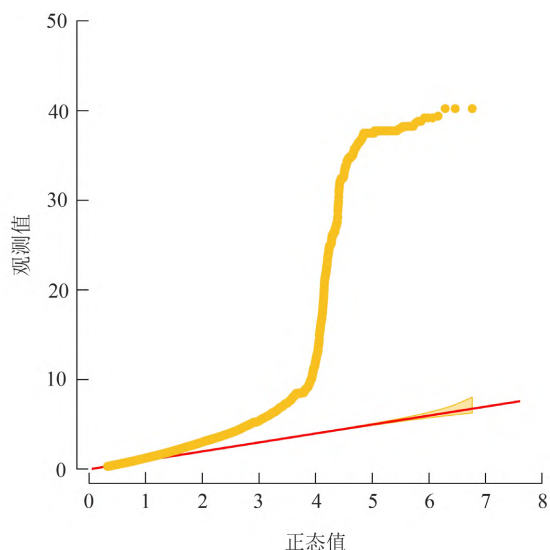


图 3 水稻果皮性状全基因组关联分析的 QQ 图 (n=533)  
Fig. 3 GWAS for rice pericarp traits was showed in quantile-quantile (QQ) plots (n=533)

定位到的 QTL 与已克隆或定位的水稻花青素相关基因进行共定位, 共定位到 21 个基因, 包括定位到了两个控制水稻果皮色泽的主效基因, 即位于 7 号染色体上 *RC* 基因与位于 1 号染色体上 *Rd* 基因, 一个参与叶片花青素合成的关键基因 *Rb*, 以及与 MYB 家族有关的 15 个基因, 其中包括 7 个已被克隆基因 (*OsRL3*、*OSMYB1*、*OSMYB3*、*OSMYB4*、*OSMYB22*、*OsMYB36b* 和 *OsMYB55*) 和 8 个未被克隆的基因 *OsMYB4-2*(LOC\_Os01g50720)、*OsMYB58-1*(LOC\_Os02g46780)、LOC\_Os02g47190、LOC\_Os02g49250、LOC\_Os02g49986、*OsMYB9-1*(LOC\_Os02g51799)、LOC\_Os02g53670 和 LOC\_Os03g13310, 此外还定位到了 *OsSRT1*、*OsMADS78* 及 *OsbHLH038* 基因。

2.3 水稻果皮花青素含量关联位点的候选基因分析

2.3.1 候选基因的同源性分析 对定位到的 MYB 家族

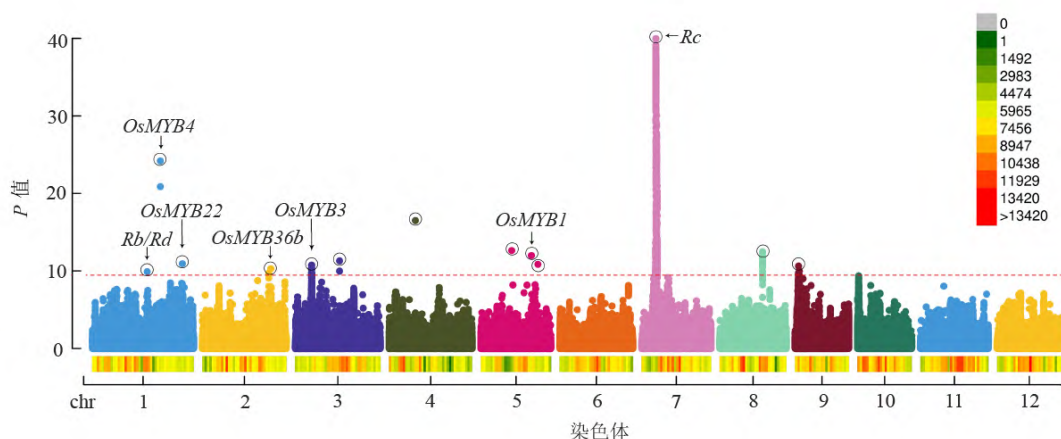


图 4 水稻糙米果皮性状全基因组关联分析的曼哈顿图 (n=533)  
Fig. 4 GWAS for rice brown rice pericarp traits was showed in Manhattan (n=533).  
注: 红色虚线以上表示与果皮颜色性状相关位点, 用黑色圆圈标注显著位点。

表 1 13 个与花青素显著相关位点  
Table 1 13 loci significantly associated with anthocyanins

QTL	SNP	Chr	位置 (bp)	置信区间起点 (Mb)	置信区间终点 (Mb)	等位基因	P 值	已知基因
SAN1.1	S1_23421339	1	23421339	22.42	25.42	A G	1.26E-10	<i>Rb/Rd</i>
SAN1.2	S1_29033017	1	29033017	28.03	29.23	G A	6.55E-25	<i>OSMYB4</i>
SAN1.3	S1_38163320	1	38163320	37.93	38.45	- C	1.30E-12	<i>OsMYB22</i>
SAN2.1	S2_29252640	2	29252640	28.35	33.40	G T	5.25E-11	<i>OsRL3/OsMYB36b</i>
SAN3.1	S3_7012549	3	7012549	6.99	8.99	A G	1.80E-11	
SAN3.2	S3_18939584	3	18939584	16.83	18.94	T C	5.06E-12	<i>OsMYB3</i>
SAN4.1	S4_11210552	4	11210552	11.11	12.21	A T	3.18E-17	<i>OsSRT1</i>
SAN5.1	S5_13149358	5	13149358	13.14	13.14	G A	2.34E-13	
SAN5.2	S5_21569614	5	21569614	21.06	21.56	T C	1.03E-12	<i>OSMYB1</i>
SAN5.3	S5_24345817	5	24345817	24.34	27.60	C T	1.40E-11	<i>OsMYB55</i>
SAN7.1	S7_6066926	7	6066926	5.91	6.68	T C	2.17E-38	<i>RC</i>
SAN8.1	S8_18285285	8	18285285	18.27	21.09	C T	3.33E-13	
SAN9.1	S9_1357492	9	1357492	1.32	1.82	A G	2.39E-11	<i>OsMADS78</i>

以及 *bHLH* 家族候选基因利用 MEGA\_11.03.13 软件进行同源性分析后发现, *MYB* 家族中的 *OsMYB4*、*OsMYB22*、*OsMYB1*、*OsMYB36b*、*OsMYB55*、*OsMYB4-2*、*OsMYB58-1*、*LOC\_Os02g49986*、*OsMYB9-1* 与已知的花青素合成相关基因 *OsMYB3* 和 *OsC1* 的同源关系较近 (图 5), *bHLH* 家族中的 *OsbHLH038* 与已知基因 *Rb* 和 *OsKala4* 同源关系较

近, 表明上述候选基因与已知花青素相关基因在功能上存在一定的相似性。

2.3.2 候选基因的表达模式分析 利用表达谱数据库对 21 个候选基因进行了表达模式分析, 在 4 个已知的与花青素相关基因中, *Rd* 基因在种子的生长发育期表达量最高 (图 6A), *Rb* 基因则在种子开始休眠后表达量上升, 且在叶片中有高表达 (图 6B),

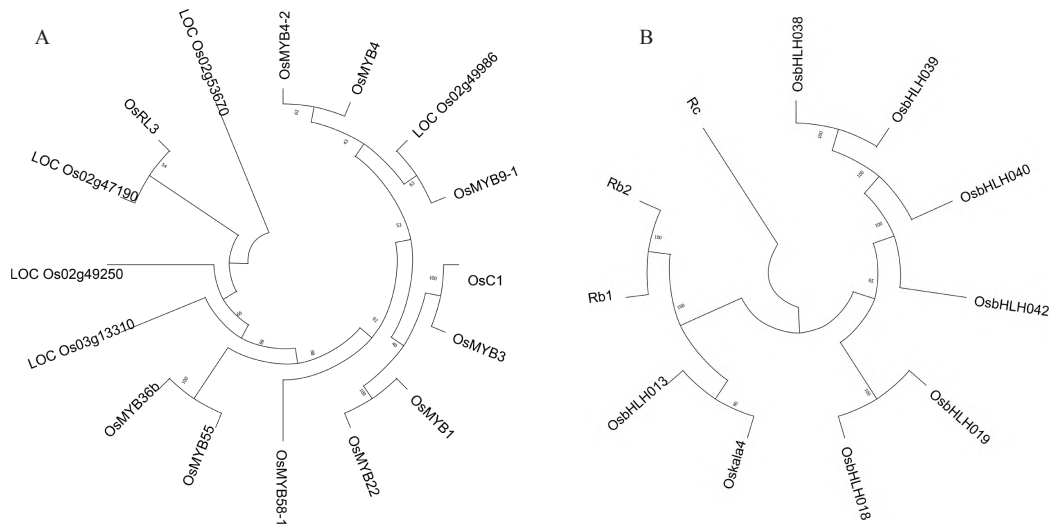


图 5 花青素候选基因中 MYB (A) 和 bHLH (B) 家族成员进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of MYB (A) and bHLH (B) family members in anthocyanin candidate genes

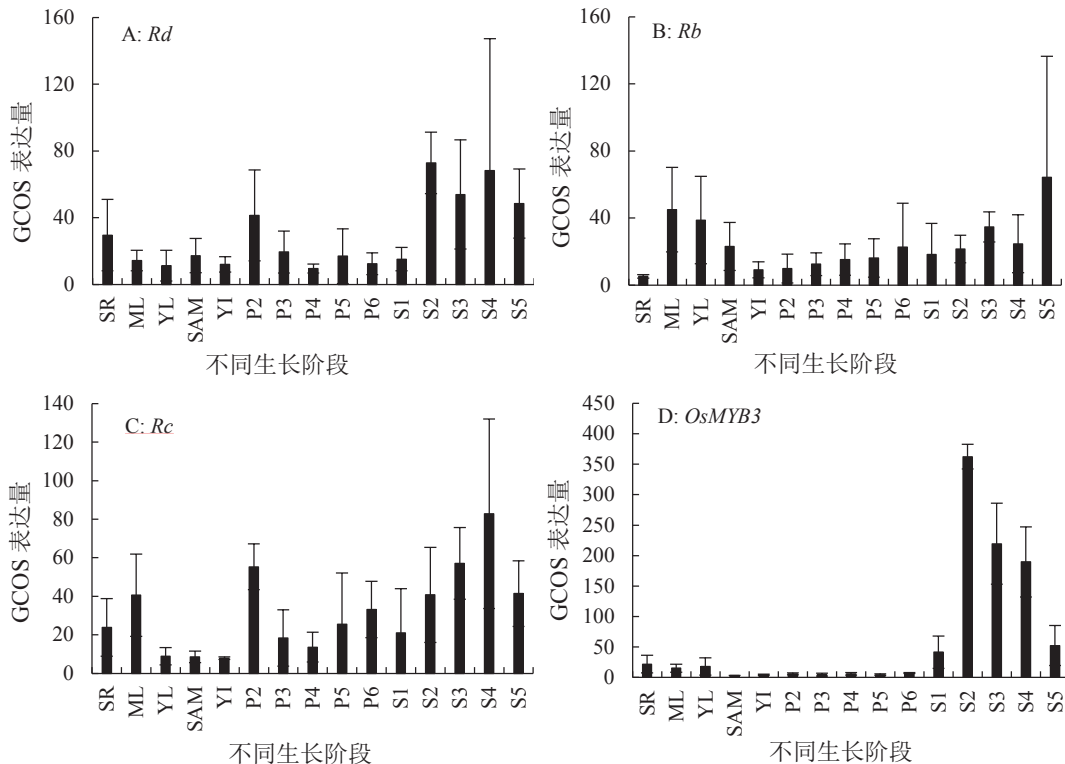


图 6 花青素主效基因表达图谱

Fig. 6 The expression profiles from anthocyanin potent gene microarray data

注: SR 为胚根, ML 为成熟叶, YL 为幼叶, SAM 为顶端分生组织和轴分生组织的萌发期, YI 为花过渡与花器官发育期, P2~P3 为减数分裂阶段, P4 为幼年小孢子期, P5 为液泡化花粉期, P6 为成熟花粉期, S1 为球形胚早期, S2 为球形胚中晚期, S3 为种子形态发生期, S4 为种子成熟期, S5 为种子耐休眠和耐脱水期。



而 *Rc* 基因在胚的发育过程中表达量逐步上升并在种子成熟期表达水平达到顶峰 (图 6C), *MYB* 家族成员中的 *OsMYB3* 基因在胚的发育过程中保持着高表达, 并随着种子发育成熟表达量逐步下降 (图 6D), 对上述四个基因的表达模式分析表明, 果皮中花青素的合成与积累与胚的发育和种子的形成有关。 *bHLH* 家族中的 *OsbHLH038* 基因在整个花粉发育期以及胚根中表达量最高, 其次是在种子发育期表达水平较高 (图 7A)。除 *OsMYB3* 外的其余 14 个 *MYB* 转录因子, 目前尚未有研究报道是否与花青素的合成有关。表达谱分析表明, *OsMYB4* 和 *OsMYB36b* 基因表达模式与 *OsMYB3* 相似, 均在种子的生长发育过程中保持高表达 (图 7B~7C), 而

*OsMYB22*、*OsMYB1* 在种子发育的球形胚早期表达量最高 (图 7D~7E), 因此, 推测它们可能与果皮中花青素的合成和积累有关。 *OsMYB58-1* 在胚根中表达量最高, 进入生殖生长期后其表达量呈现出先升后降的趋势 (图 7F), *LOC\_Os02g49250* 在胚根和整个种子发育时期表达量最高 (图 7G), *OsMYB9-1* 在胚根和叶片中表达量最高, 在种子发育后期也有一定的表达 (图 7H), *LOC\_Os03g13310* 在叶片、顶端分生组织萌发期、花粉发育期以及种子发育期都有较高表达 (图 7I), 从这四个基因在种子发育期的表达量可以推测, 它们很可能参与了果皮中花青素的调控。而其他 6 个 *MYB* 家族基因中, *OsRL3*、*LOC\_Os02g4719*、*LOC\_Os02g53670* 虽在

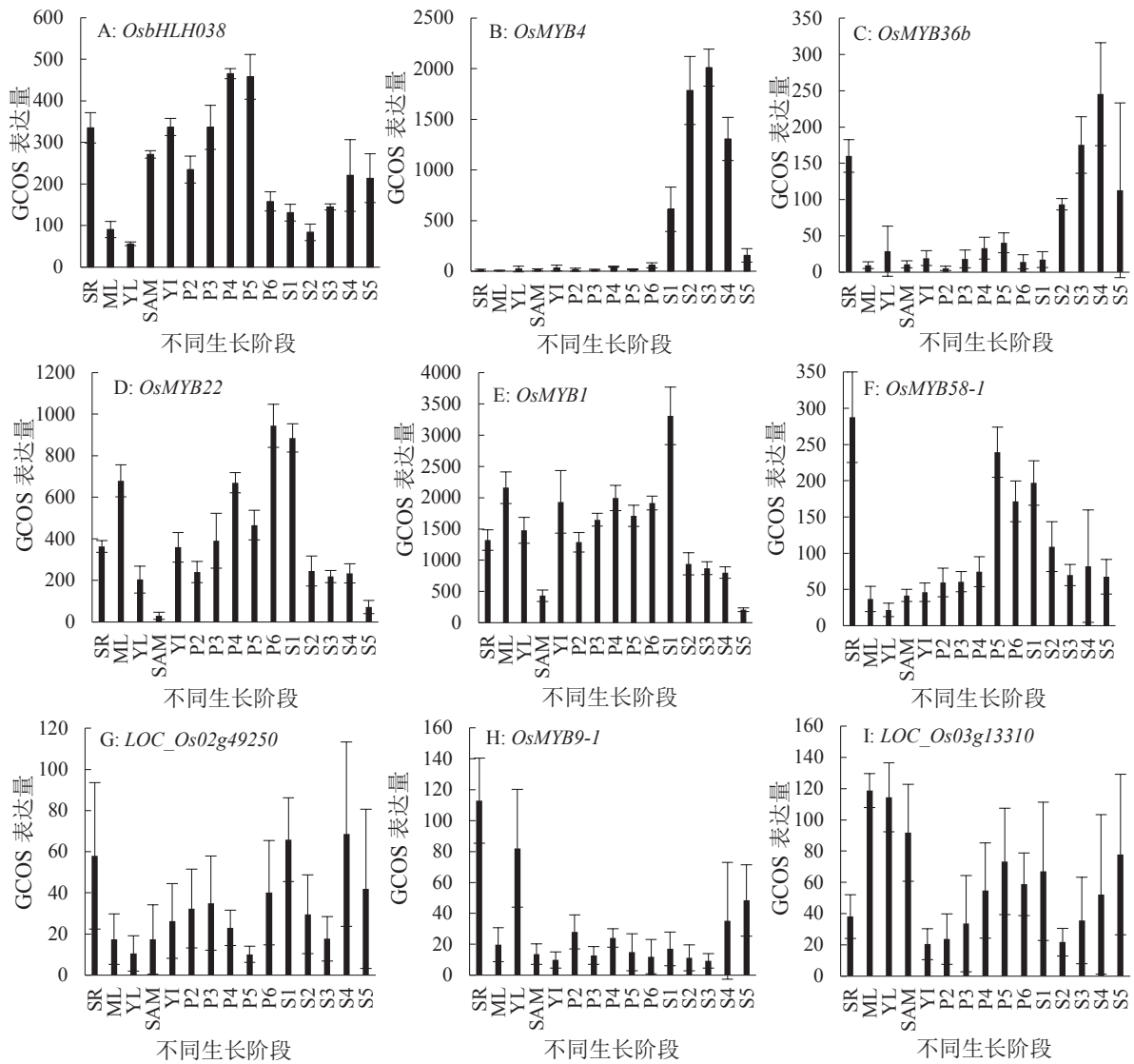


图 7 花青素候选基因表达图谱

Fig. 7 The expression profiles of anthocyanin candidate genes

注: SR 为胚根, ML 为成熟叶, YL 为幼叶, SAM 为顶端分生组织和轴分生组织的萌发期, Y1 为花过渡与花器官发育期, P2~P3 为减数分裂阶段, P4 为幼年小孢子期, P5 为液泡化花粉期, P6 为成熟花粉期, S1 为球形胚早期, S2 为球形胚中晚期, S3 为种子形态发生期, S4 为种子成熟期, S5 为种子耐休眠和耐脱水期。

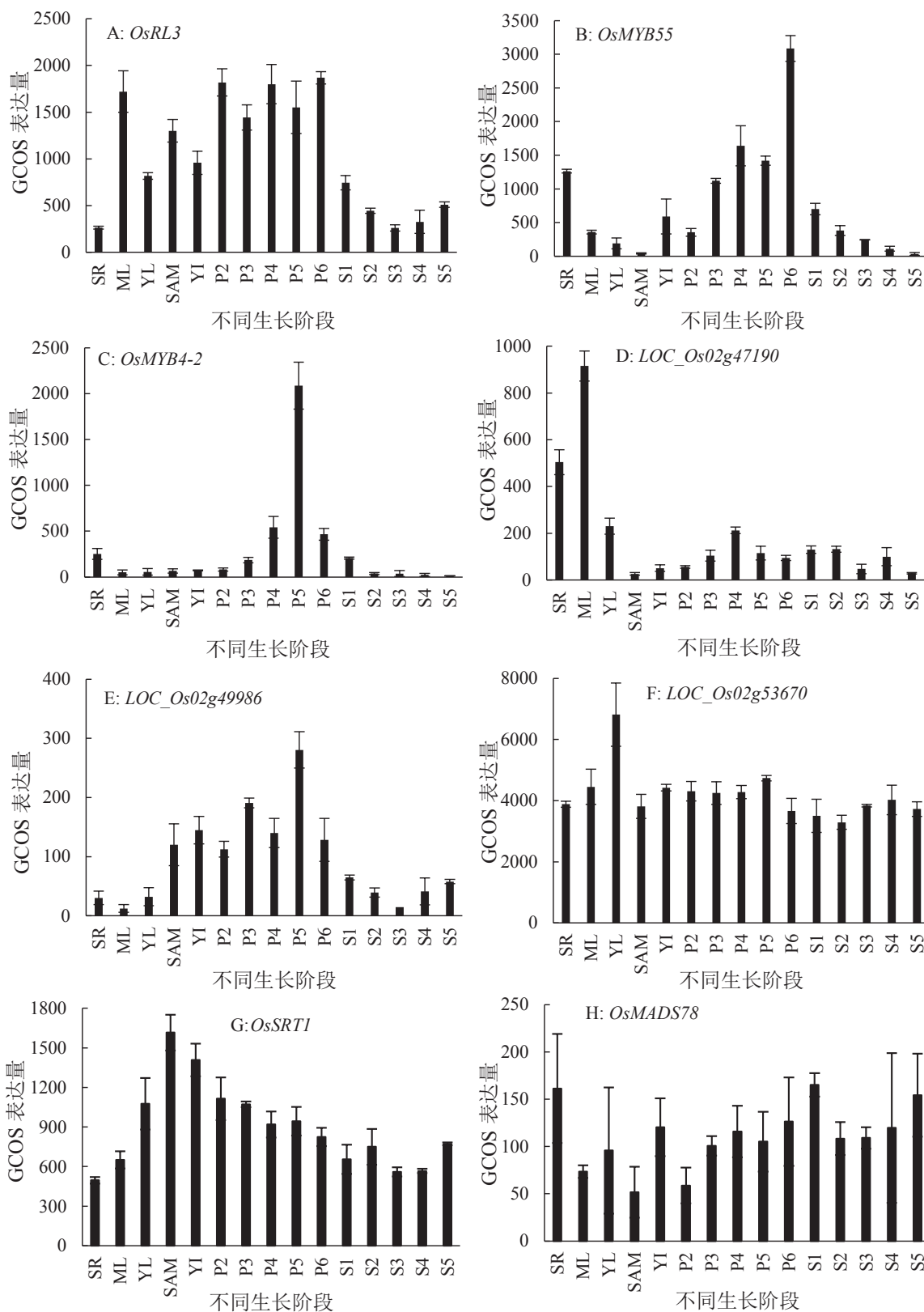


图 8 花青素非候选基因表达图谱

Fig. 8 The expression profiles of anthocyanin non-candidate genes

注:SR 为胚根,ML 为成熟叶,YL 为幼叶,SAM 为顶端分生组织和轴分生组织的萌发期,YI 为花过渡与花器官发育期,P2~P3 为减数分裂阶段,P4 为幼年小孢子期,P5 为液泡化花粉期,P6 为成熟花粉期,S1 为球形胚早期,S2 为球形胚中晚期,S3 为种子形态发生期,S4 为种子成熟期,S5 为种子耐休眠和耐脱水期。



种子中也有表达(图 8A, 8D, 8F), 但与 *OsMYB3* 的同源关系较远, *OsMYB55*、*OsMYB4-2* 与 *LOC\_Os02g49986* 基因在种子中的表达水平较低(图 8B, 8C, 8E), 因此它们作为花青素候选基因的可能性很小。*OsSRT1* 基因在茎尖分生组织和幼穗以及幼根中表达量最高(图 8G)。*OsMADS78* 是具有 M- $\alpha$  型的 MADS-box 家族基因, 该基因在花药和幼穗其次是种子中表达量最高(图 8H)。

### 3 讨论

#### 3.1 利用植物活体成像系统开发了稻米花青素的无损定量检测技术

本研究所发明的活体成像技术检测水稻花青素相对含量的方法, 具有高效、精准、无损伤、无污染的优点。此方法不仅能够节约成本, 而且能在不损伤水稻种胚的情况下完成数据的测量, 同时对所测量的数据与中华人民共和国农业行业标准[NY/T 832-2004]的传统测量方法得到的数据进行相关性分析, 发现两种方法所获得的数据间的正相关达极显著水平( $R=0.8406$ ), 进一步验证了该方法的可靠性。以往传统花青素的提取工艺主要为传统溶剂萃取法, 花青素溶剂主要包括酸化水、乙醇和甲醇等, 这种方法虽简单, 但耗时长, 且易对环境造成污染。而本研究研发的花青素含量定量分析方法是利用了光学原理, 包括最近张东方等<sup>[24]</sup>发明的利用光谱技术测量花青素含量, 刘秀英等<sup>[25]</sup>发明的高光谱遥感反演测量花青素相对含量的新方法。这些方法都能高效、无损伤、无污染地对花青素含量进行定量分析, 为植物花青素测定提供了新的技术方法参考。

#### 3.2 基于全基因组关联分析发掘了多个与水稻果皮花青素含量相关的新基因

3.2.1 已知果皮花青素相关基因的定位 本研究首次对水稻果皮花青素性状进行全基因组关联分析, 共鉴定到 13 个与果皮花青素相关的 QTL 位点, 通过对候选基因分析后, 确定了 9 个新的与花青素合成相关候选基因。在这 13 个 QTL 位点中, 包括已报道的控制水稻叶色的 *Rb* 基因以及控制水稻果皮色泽的关键基因 *Rc*、*Rd* 和 *OsMYB3*。Hu 等<sup>[26]</sup>将 *PSHI* 划分为两个紧密连接的 *bHLH* 基因 *Rb1* 和 *Rb2*, 这两个基因的异位表达导致花青素 3-O-葡萄糖苷和牡丹素 3-O-葡萄糖苷在叶片、叶鞘和果皮中大量积累, 通过进一步研究发现 *OsCI* 和 *Rb* (*Rb1* 和 *Rb2*) 之间的显性互补互作控制了水稻紫色叶鞘性状, 但目前并没有研究报道 *Rb* 基因与果皮花青

素的合成相关。*Rc* 与 *OsKala4* 基因是已报道的与水稻果皮色泽相关的基因, 分别控制红色和黑色果皮性状<sup>[27]</sup>。*OsMYB3* 编码一个 R2R3-MYB 转录因子, 与黑米中花青素的合成有关, Kim 等<sup>[27]</sup>在对黑米的研究中表明 *bHLH* 转录因子 *OsKala4* 是决定黑米性状的主效基因, 并发现 *OsMYB3* 编码的 R2R3 MYB 蛋白能够与 *OsKala4* 相互作用介导种子内部花青素生物合成基因的活化, 进而影响水稻果皮中的色素积累。定位到的这 4 个已知花青素相关基因表明我们基于花青素相对含量的全基因组关联分析方法的有效性。

3.2.2 MYB 家族候选基因的定位 除了以上 4 个已报道的与花青素有关的基因外, 还定位到了 8 个已克隆的基因, 其中 6 个是来自 MYB 转录因子家族, 分别是 *OsMYB4*、*OsMYB22*、*OsRL3*、*OsMYB1*、*OsMYB36b* 和 *OsMYB55*。已有研究表明, *OsMYB4* 与水稻耐冷性有关<sup>[28]</sup>, *OsMYB22* 参与水稻抗稻瘟病基因的调控<sup>[29]</sup>, *OsMYB1* 为水稻穗期调节的候选基因<sup>[30]</sup>, *OsMYB36b* 与水稻根部矿物质选择性吸收有关<sup>[31]</sup>, 目前尚无研究报道它们是否与花青素的合成有关。通过对候选基因蛋白同源比对及表达谱分析发现, *OsMYB4*、*OsMYB36b* 与 *OsMYB3* 的同源关系较近, 且三者表达模式基本一致, 在种子发育的五个阶段均有较高的表达, 因此, *OsMYB4*、*OsMYB36b* 为花青素合成相关候选基因的可能性极高。而 *OsMYB22*、*OsMYB1* 基因系统进化树分析表明, 同样与花青素合成相关基因 *OsMYB3* 和 *OsCI* 同源, 虽表达模式与 *OsMYB3* 不同, 但在种子不同发育阶段中都具有较高的表达水平, 推测 *OsMYB22* 和 *OsMYB1* 同样为果皮花青素合成相关的候选基因。Park 等<sup>[32]</sup>的研究表明, *OsRL3* 能够通过 ABA 信号通路促进叶片衰老并延迟盐胁迫反应, 但并无与花青素相关的报道, 而 Hiratsuka 等<sup>[33]</sup>的研究中表明 ABA 可以促进花青素的合成, 由此推断 *OsRL3* 是否能够通过调节 ABA 来影响花青素的合成, 有待进一步的验证。此外还定位到 8 个未被克隆的 MYB 家族成员 *OsMYB4-2*、*OsMYB58-1*、*LOC\_Os02g47190*、*LOC\_Os02g49250*、*LOC\_Os02g49986*、*OsMYB9-1*、*LOC\_Os02g53670* 和 *LOC\_Os03g13310*。系统进化树分析表明, 除 *LOC\_Os02g47190* 与 *LOC\_Os02g53670* 外, 其余 6 个成员与已知花青素相关基因 *OsMYB3* 同源关系较近, 结合表达谱分析发现 *OsMYB58-1*、*LOC\_Os02g49250*、*OsMYB9-1* 与 *LOC\_Os03g13310* 在种子中都具有较高的表达水平, 与 *OsMYB3* 相似, 因此, 这 4 个基因也很可能与果

皮花青素含量相关。

3.2.3 其它可能性候选基因的定位 除 *MYB* 家族成员外, 还定位到了一个 *bHLH* 基因 *OsbHLH038*, 位于4号染色体上的组蛋白去乙酰化酶基因 *OsSRT1* 以及9号染色体上的 *OsMADS78* 基因。*OsbHLH038* 是个尚未被克隆的新基因, 系统进化树分析表明, 其与已知的果皮花青素相关基因 *Oskala4* 具有一定的同源性, 且在种子中具有较高表达水平, 很可能参与果皮花青素的调控。Zhang 等<sup>[34]</sup> 的研究表明, *OsSRT1* 可以直接参与种子和幼苗中代谢相关基因的表观调控, 位于9号染色体上的 *OsMADS78* 基因能够影响水稻种子胚乳的发育进而影响种子的大小<sup>[35]</sup>, 上述两个基因都参与种子的代谢和发育, 那么猜测是否也会参与水稻果皮中的花青素合成, 尚需进一步的研究证实。

## 4 结论

1) 本研究发明了一种利用植物活体成像仪测量水稻果皮花青素相对含量的新方法。该方法具有高效、精准、无损伤、无污染等优点, 为花青素等植物色素含量的定量分析提供了新的方法参考。

2) 通过对核心群体中的花青素测量数据进行全基因组关联分析, 共定位到了包括 *Rd*、*Rb*、*Rc* 和 *OsMYB3* 基因在内的21个候选基因; 通过系统进化树及表达谱分析, 最终确定了8个 *MYB* 家族基因 *OsMYB4*、*OsMYB22*、*OsMYB1*、*OsMYB36b*、*OsMYB58-1*、*LOC\_Os02g49250*、*OsMYB9-1*、*LOC\_Os03g13310* 和1个 *bHLH* 基因 *OsbHLH038* 为新的花青素合成相关的候选基因。新的候选基因的发掘可为水稻果皮花青素含量的遗传基础研究提供参考, 对功能性水稻种质资源创新与品种改良具有重要意义。

### 参考文献:

[1] 李鲁华, 王忠妮, 任明见, 等. 谷类作物中植物激素调控花青素合成的研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(4): 62-66.  
Li L H, Wang Z N, Ren M J, et al. Research advances of anthocyanin synthesis regulated by phytohormone in cereal crops[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2022, 41(4): 62-66.

[2] Fang J. Bioavailability of anthocyanins[J]. Drug Metabolism Reviews, 2014, 46(4): 508-520.

[3] 陈琦, 李少伟, 贾宇臣, 等. 蓝莓花青素通过下调 *p53* 基因 DNA 甲基化抑制口腔癌 KB 细胞增殖及诱导细胞凋亡 [J]. 遗传, 2014, 36(6): 566-573.  
Chen Q, Li S W, Jia Y C, et al. Blueberry anthocyanins induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis of oral cancer KB cells through down-regulation methylation of *p53*[J]. Hereditas, 2014, 36(6): 566-573.

[4] Min J Y, Yu S W, Baek S H, et al. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia[J]. Neuroscience Letters, 2011, 500(3): 157-161.

[5] Strathearn K E, Yousef G G, Grace M H, et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease[J]. Brain Research, 2014, 1555: 60-77.

[6] Pacheco S M, Soares M S P, Gutierrez J M, et al. Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 56: 193-204.

[7] Liu J H, Hao W J, He Z Y, et al. Blueberry and cranberry anthocyanin extracts reduce bodyweight and modulate gut microbiota in C57BL/6 J mice fed with a high-fat diet[J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60(5): 2735-2746.

[8] 郑菲艳, 郑建华, 王洪飞, 等. 中国有色稻米功能性成分遗传与育种研究进展 [J]. 福建农业学报, 2021, 36(1): 115-123.  
Zheng F Y, Zheng J H, Wang H F, et al. Research progress on genetics and breeding of functional components in colored rice[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(1): 115-123.

[9] Friedman M. Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: Composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(45): 10626-10641.

[10] 张启发. 保障粮食安全, 促进营养健康: 黑米主食化未来可期 [J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(3): 1-2.  
Zhang Q F. Ensuring food security and promoting nutrition and health: Making black rice staple food for the future[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(3): 1-2.

[11] Maeda H, Yamaguchi T, Omoteno M, et al. Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line[J]. Breeding Science, 2014, 64(2): 134-141.

[12] Yang X H, Wang J R, Xia X Z, et al. *OsTTG1*, a WD40 repeat gene, regulates anthocyanin biosynthesis in rice[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 107(1): 198-214.

[13] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by *MYB-bHLH-WDR* complexes[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(3): 176-185.

[14] Oikawa T, Maeda H, Oguchi T, et al. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression[J]. The Plant Cell, 2015, 27(9): 2401-2414.

[15] Zheng J, Wu H, Zhao M C, et al. *OsMYB3* is a *R2R3-MYB* gene responsible for anthocyanin biosynthesis in black rice[J]. Molecular Breeding, 2021, 41(8): 51.

[16] Furukawa T, Maekawa M, Oki T, et al. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2007, 49(1): 91-102.

[17] Sun X M, Zhang Z Y, Li J J, et al. Uncovering hierarchical regulation among MYB-bHLH-WD40 proteins and manipulating anthocyanin pigmentation in rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8203.

[18] Meng L Z, Qi C Y, Wang C H, et al. Determinant factors and regulatory systems for anthocyanin biosynthesis in rice apiculi and

- stigmas[J]. Rice (New York, N Y), 2021, 14(1): 37.
- [19] Zheng J, Wu H, Zhu H B, et al. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves[J]. The New Phytologist, 2019, 223(2): 705-721.
- [20] Zhao K Y, Tung C W, Eizenga G C, et al. Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*[J]. Nature Communications, 2011, 2: 467.
- [21] Lu Q, Zhang M C, Niu X J, et al. Genetic variation and association mapping for 12 agronomic traits in indica rice[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1067.
- [22] Tan Y J, Sun L, Song Q N, et al. Genetic architecture of subspecies divergence in trace mineral accumulation and elemental correlations in the rice grain[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(2): 529-545.
- [23] Mao D H, Xin Y Y, Tan Y J, et al. Natural variation in the *HANI* gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(9): 3494-3501.
- [24] 张东方, 张君, 范晓飞, 等. 应用光谱分析无损测定茄子果皮花青素含量方法 [J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(3): 62-67.  
Zhang D F, Zhang J, Fan X F, et al. Nondestructive determination of anthocyanins in eggplant peel by spectral analysis[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2021, 44(3): 62-67.
- [25] 刘秀英, 刘晨洲, 吴姗姗, 等. 玉米叶片花青素相对含量高光谱遥感反演 [J]. 遥感信息, 2018, 33(6): 1-8.  
Liu X Y, Liu C Z, Wu S W, et al. Nondestructive inversion of anthocyanins content in maize leaves using hyperspectral remote sensing[J]. Remote Sensing Information, 2018, 33(6): 1-8.
- [26] Hu W, Zhou T H, Han Z M, et al. Dominant complementary interaction between *OsCl* and two tightly linked genes, *Rb1* and *Rb2*, controls the purple leaf sheath in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133(9): 2555-2566.
- [27] Kim D H, Yang J, Ha S H, et al. An *OsKala3*, *R2R3 MYB* TF, is a common key player for black rice pericarp as main partner of an *OsKala4*, *bHLH* TF[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 765049.
- [28] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, et al. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2004, 37(1): 115-127.
- [29] Qiu J H, Xie J H, Chen Y, et al. Warm temperature compromises JA-regulated basal resistance to enhance *Magnaporthe oryzae* infection in rice[J]. Molecular Plant, 2022, 15(4): 723-739.
- [30] Zhang W H, Sun P Y, He Q, et al. Transcriptome analysis of near-isogenic line provides novel insights into genes associated with panicle traits regulation in rice[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0199077.
- [31] Wang Z G, Zhang B L, Chen Z W, et al. Three *OsMYB36* members redundantly regulate Casparian strip formation at the root endodermis[J]. The Plant Cell, 2022, 34(8): 2948-2968.
- [32] Park D Y, Shim Y, Gi E, et al. The MYB-related transcription factor RADIALIS-LIKE3 (*OsRL3*) functions in ABA-induced leaf senescence and salt sensitivity in rice[J]. Environmental and Experimental Botany, 2018, 156: 86-95.
- [33] Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, et al. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured *in vitro*[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90(1/2): 121-130.
- [34] Zhang H, Zhao Y, Zhou D X. Rice NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase *OsSRT1* represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(21): 12241-12255.
- [35] Paul P, Dhant B K, Miller M, et al. *MADS78* and *MADS79* are essential regulators of early seed development in rice[J]. Plant Physiology, 2020, 182(2): 933-948.

(责任编辑: 王育花)