花青素合成转录因子基因在玉米中的表达研究: 一种新型基因可视化跟踪表达系统

宫硇^{①②†}, 杨凤萍^{①†}, 薛静^{①†}, 陈绪清^①, 张立全^①, 李向龙^①, 张晓东^{①②*}

① 北京市农林科学院, 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097;

② 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhangxiaodong@baafs.net.cn

2012-01-05 收稿, 2012-04-19 接受

国家重大科技专项(2008zx08002-004, 2008zx08002-002, 2008zx003-001, 2009zx08009-030B, 2009zx08003-007B)资助

摘要 花青素是一种水溶性的黄酮类物质, 可使植物呈现出红、蓝、紫和红紫等颜色. 外源花青素代谢调控基因的表达可使花青素在植物细胞内积累, 使植物体外观上表现出色彩的变化, 易于观察, 因此可作为报告基因用于植物转基因研究, 快速报告细胞、组织、器官或植株是否被转化. 本研究用花青素代谢调控基因 *Bi* 和 *Cl* 作为报告基因, 以 *eps* 作为筛选标记基因, 构建了植物表达载体 pBAC9009. 基因枪转化玉米自交系 501 的幼胚, 经过除草剂草甘膦抗性筛选和分化再生, 获得了转化再生植株 75 株, 其中 43 株获得结实种子. T_0 代植株有 18 株在苗期或生长阶段表现局部或全紫色, 8 个结实果穗有零星的紫色种子, 从外观上可直接确认为转化植株. 结合 PCR 和 RT-PCR 的分子检测及花青素含量分析, 表明叶片和籽粒为紫色的玉米植株中外源目的基因已整合并且高效表达, 即紫色表型与分子检测的结果高度一致. 该结果表明我们成功建立了以花青素基因作为报告基因的植物转基因可视化跟踪表达系统. 该系统的应用可以大大提高工作效率, 节约检测成本, 对于植物转基因研究具有重要意义.

关键词

玉米

可视化标记

花青素

转录因子基因

花青素(anthocyanin)属于类黄酮类化合物, 广泛存在于植物叶片、花瓣、果实中, 使植物呈现出红、蓝、紫和红紫等颜色. 20 世纪 90 年代以来, 植物花青素的提取、生物合成、代谢途径及其调控机制的相关研究成为生命科学研究热点之一^[1]. 已有研究表明, 不同植物中的花青素生物合成受 2 类基因的共同控制: 一类是结构基因, 其编码花青素生物合成途径中所需的酶; 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. 目前已从玉米、金鱼草、矮牵牛、葡萄、苹果、紫苏、拟南芥等植物中分离并克隆了部分与花青素生物合成相关的结构基因与调节基因^[2].

在这些基因中, 玉米(*Zea mays* L.)花青素苷调节基因的研究比较深入. 因编码的转录因子不同, 花青素苷调节基因可以分为 2 个基因家族, 即 *r/b* 基因家族和 *cl/pl* 基因家族^[3]. 其中 *r/b* 基因家族编码 bHLH 类转录因子, 含有 100 多个成员, 包括 *R-sc*, *Lc*, *Sn* 和 *B* 等基因^[4]. *cl/pl* 基因家族编码 MYB 类转录因子, 包括 *Cl* 和 *Pl* 这 2 个基因. *r/b* 家族和 *Cl/Pl* 家族的基因都不是独立行使功能的, 通常是几个基因共同作用调控花青素的合成^[5]. 1922 年, 在玉米种子中发现了位于玉米第 9 条染色体的短臂上的 *C* 位点(colored aleurone 1), 编码 MYB 类蛋白, 主要调控种子糊粉层和胚中的花青素合成, 在玉米植株上不起作用^[6,7].

而 *B* 基因(R2, SC1, *gsy1*)是在 1959 年 Coe^[8]首次提出来的,该基因位于玉米第 2 条染色体短臂上,编码 bHLH 蛋白^[8,9]. Goff 等人^[10]已经证实,玉米中花青素生物合成途径转录因子 bHLH 蛋白 B 与 MYB 蛋白 C1 需要通过 N 末端相互作用来共同调控植物组织中花青素的产生. Han 等人^[11]在利用玉米花青素合成途径的转录因子调控基因 *Pl* 和 *Lc* 分别或共同转化时也得到了类似的结果. 这 2 个基因单独调控时,转基因植株会在不同的部位不同程度显示紫色, *Lc* 基因的调控作用比 *Pl* 基因更强一些,但在共同作用的情况下,会使整个转基因植株呈现紫色. Doshi 等人^[12]利用玉米花青素调控基因 *C1* 和 *B-peru* 基因同时在大麦不同的组织特异性启动子驱动下调控花青素的合成,通过颜色直观地反应出这些启动子在小麦幼胚等器官的组织特异性和驱动能力.

上述研究结果表明,恰当运用花青素合成调控基因,可以为植物转基因研究建立一套新型的可视化示踪系统. 本研究正是利用玉米 *Bi* 基因和 *C1* 基因构建植物表达载体,建立了以花青素作为可视化证据的植物转基因视踪系统. 该系统利用植株是否产生花青素作为其是否转基因的依据,较以前的转基因分子检测更加直观、便捷.

1 材料与方法

(i) 材料. 玉米自交系 501 由北京农业生物技术研究中心作物遗传育种实验室提供, pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、卡那霉素(Kan)、RNA 提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; DNA 回收试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司; 限制性内切酶购自大连宝生物工程有限公司, Promega, New England Biolabs 和 Fermentas; 普通生化试剂购自 Sigma, Promega 公司或国产. 基因枪型号为 PDS1000/He (BioRad).

(ii) 可视化表达载体的构建. 利用 PCR 方法,从玉米基因组中克隆出 *Bi* 基因和 *C1* 基因,利用 T4 DNA 连接酶连接到 pGEM-T easy 载体上,经酶切和测序检验正确后,用于构建植物表达载体 pBAC9009 (图 1). 该表达载体以 CaMV 35S 启动子和玉米 *Adhl* 基因 Intron1 驱动的 *EPSP* 基因作为抗性选择标记,以 CaMV 35S 启动子驱动的 *Bi* 基因和 *C1* 基因作为可视化筛选标记基因. 除此之外,该载体在 Kan 抗性基因的一侧插入了 *hsp70* 基因启动子热诱导表达的 *cre* 酶

图 1 可视化植物表达载体 pBAC9009 结构示意图

基因(重组酶基因),在 Kan 抗性基因和 *cre* 酶基因的两端分别含有 2 个同向的 loxP 位点(重组酶识别序列),以便在基因枪获得的转基因植株基因组中删除 Kan 抗性基因.

(iii) 玉米基因枪转化. 取授粉后 12 d 左右的玉米优良自交系 501 果穗,经 75%乙醇表面消毒后挑取其幼胚接种到诱导培养基(N6 基本培养基 + 10 mg/L AgNO₃ + 100 mg/L 肌醇 + 2 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂)上,暗培养 3~5 d 后诱导出胚性愈伤组织. 纯化好的 pBAC9009 载体调整浓度为 1 μg/μL,按 Zhang 等人^[13]方法制备基因枪微弹,轰击胚性愈伤组织,5 d 后将愈伤组织转移到含有草甘膦的筛选培养基(诱导培养基中加入 1 mg/L 草甘膦)上培养 20 d 左右,然后选取生长正常的愈伤组织转移到分化培养基(N6 基本培养基 + 0.5 mg/L AgNO₃ + 100 mg/L 肌醇 + 1.5 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂 + 0.5 mg/L 草甘膦)上,分化的幼苗进行壮苗后移栽到温室.

(iv) 转基因玉米 T₀ 和 T₁ 代植株的 PCR 检测. 用改良 CTAB 法提取转基因玉米 T₀ 代植株叶片、种子以及 T₁ 代植株叶片的基因组 DNA,根据 35S 启动子序列设计上游引物为 5'-TCCACTgACGTAA-gggAT-3',根据 *B* 基因序列设计下游引物为 5'-TggACCAgAAgAgggCAT-3',扩增的目的片段大小为 792 bp. 非转基因植株为阴性对照, pBAC9009 为阳性对照,水为空白对照. 反应体系为: ddH₂O 17.3 μL, DNA (1 μg/μL) 1 μL, 10×PCR Reaction Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL. 反应程序为: 95℃变性 3 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min. 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

(v) 转基因玉米 T_1 代植株的 RT-PCR 检测. 用北京艾莱德生物技术有限公司的 RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒提取 RNA, 反转录以 oligod(T) 为引物. 反应体系为: 模板 RNA (约 1 μ g), oligod(T) 2.0 μ L, ddH₂O 7.5 μ L, 5 $\times$ MLV Buffer 4 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, MLV 1 μ L, RRI 0.5 μ L. 反应程序如下: 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 冰上放置 5 min, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min. 反转后放入 -20 $^{\circ}$ C 保存.

Actin 基因为内参基因, 上游引物为 5'-ACC-TCACCgACCTAATg-3', 下游引物为 5'-CCTAAA-CCTTTCTgACCCAAT-3', 扩增目的片段大小为 217 bp. *Bi* 基因上游引物为 5'-CgCTAgAggATgCCTggA-TAAT-3', 下游引物为 5'-gAgggAACCAACgACTTg-AgAA-3', 扩增目的片段大小为 357 bp. *Cl* 基因上游引物为 5'-TggACgAgCAAggAggACgATg-3', 下游设计引物为 5'-CCTgTggAggCggATgATgAgA-3', 扩增产物大小为 200 bp. 非转基因植株为阴性对照, 反应体系为: ddH₂O 20 μ L, cDNA 1 μ L (1 μ g/ μ L), 2 $\times$ Mix 25 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L. 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s. 3 个基因的反应循环数分别为 28, 30 和 30. 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

(vi) 转基因玉米 T_1 代植株叶片的总花青素苷含量的测定. 取新鲜转基因玉米 T_1 代植株的叶片, 参照吕晓玲等人^[14]的方法提取总花青素: (1) 精确称取植物叶片, 将样品冰冻后, 用快速破碎仪磨碎; (2) 用 2 mL pH 1.0 的 KCl (50 mmol/L) 和 150 mmol/L HCl 萃取总花青素, 同时另外取新的离心管用 2 mL pH 0.5 的 NaAc (400 mmol/L) 和 240 mmol/L 的 HCl 的混合液浸提样品; (3) 4 $^{\circ}$ C 12000 $\times$ g 离心 15 min; (4) 在 510 nm 条件下测量吸光度值, 按以下公式计算总花青素苷 Amount (mg/g FW) 的含量:

$$\text{Amount (mg g}^{-1}\text{ FW)} = (A_{510}(\text{pH } 1.0) - A_{510}(\text{pH } 0.5)) \times 484.8/24.825 \times \text{稀释因子}.$$

(vii) 转基因玉米 T_1 代植株种子的总花青素苷含量的测定. 取转基因玉米 T_1 代植株种子, 参照崔丽娜等人^[15]的方法提取总花青素: (1) 称取一定重量的紫色玉米粒, 研磨成粉末; (2) 浸提在 1% 的 HCl 甲醇溶液中, 50 $^{\circ}$ C 水浴 1.5 h, 浸提 2 次; (3) 在 25 $^{\circ}$ C 条件下, 6000~8000 r/min 离心 15 min; (4) 在 510 nm 条件下测吸光度值, 按以下公式计算总花青素苷 Amount (mg/g FW) 的含量:

$$\text{Amount (mg/g FW)} = A_{510}(\text{pH } 1.0) \times 484.8/24.825 \times \text{稀释因子}.$$

2 结果与分析

2.1 转基因玉米的获得

用基因枪转化玉米自交系 501 的幼胚, 经过 1 mg/L 草甘膦筛选、分化后共获得 T_0 代转化植株 75 株, 有 43 株结实. 转化 pBAC9009 载体的愈伤大多呈现紫色(图 2(b)), 而转化空载体 pBAC823 的愈伤呈现

图 2 转化 pBAC9009 载体后的愈伤组织表型
(a) 转化空载体 pBAC823 的玉米愈伤组织; (b) 转化 pBAC9009 载体的玉米愈伤组织; (c) pBAC9009 载体的瞬时表达

正常的黄绿色(图 2(a)). 这一结果说明, 35S 启动子调控下的 *Bi* 和 *Cl* 基因在转化的愈伤中就可以发挥作用, 致使愈伤组织呈现紫色. 部分愈伤组织在转化后仍呈现黄绿色, 这可能跟转化率和基因枪转化的完整性有关. 此外, 将 pBAC9009 载体转入玉米幼胚的瞬间表达实验表明, 在 24 h 后该载体能够行使其功能, 使部分玉米幼胚细胞变成紫色(图 2(c)). T_0 代结实的 43 个株系中有 18 个株系叶片呈现紫色而且收获了紫色种子(图 3).

2.2 转基因玉米 T_0 代植株的 PCR 检测

以 35S 启动子和 *Bi* 基因设计上下游特异引物, 对 T_0 代植株和种子分别进行了 *Bi* 基因片段的 PCR 检测, 部分植株检测结果见图 4. 非转基因对照和空白水没有扩增出条带, 而阳性质粒和大部分转基因植株扩增出了 792 bp 的目标片段, 表明外源基因已整合到玉米基因组中, PCR 检测结果与紫色植株的表型一致.

2.3 转基因玉米 T_0 代植株种子的 PCR 检测

由于收获的转基因阳性植株的果穗颜色不纯合, 有黄色和紫色(图 3(d))两种, 故使用同样的 PCR 检测引物, 分别对 T_0 代阳性植株获得的黄色和紫色种子进行 *Bi* 基因片段的 PCR 检测, 检测结果见图 5. 阳性质粒和紫色种子(图 5, 7~12)可以扩增出 792 bp 的目

图 3 愈伤组织的诱导、分化与转基因玉米幼苗的田间种植
(a) 玉米幼胚在诱导培养基上诱导愈伤组织; (b) 分化出苗; (c) 移栽;
(d) 部分紫色的结实种子

图 4 转基因 T_0 代植株外源 *B* 基因片段的 PCR 检测
M, 100 bp plus; +, 阳性质粒 pBAC9009; 0, H_2O ; -, 阴性对照(CK);
1~12, 转基因玉米 T_0 株系

图 5 转基因 T_0 代植株种子外源 *B* 基因片段的 PCR 检测
M, 100 bp plus; +, 阳性质粒 pBAC9009; 0, H_2O ; -, 阴性对照(CK);
1~6, 转基因玉米 T_0 黄色种子; 7~12, 转基因玉米 T_0 紫色种子

标片段, 图 5 中 1~6 为黄色籽粒, 同非转基因对照和空白一致, 没有扩增出阳性条带. 这一结果充分表明, 分子水平的 PCR 检测结果与可视的紫色种皮表型完全一致.

2.4 转基因玉米 T_1 代植株的田间表现及 PCR 检测

将 T_0 代获得的紫色种子种到田间, 观察植株的整个生长周期, pBAC9009 转基因 T_1 代植株株高和株型与对照相比变化不大, 整体表现为紫色(图 6(b)); 植株的各个部位, 如雄穗、叶片和苞叶(图 6(c)~(e))也同样表现出紫色. 由此可见, 外源花青素合成调控基因 *Bi* 和 *Cl* 基因的共同作用可以使整个植株紫色化, 这与 Han 等人^[1]的研究结果是一致的. 目前, 部分植株所获得 T_1 代种子见图 6(f). 分子水平上, 继续对 T_1 代植株进行 *B* 基因片段的 PCR 跟踪检测, 部分植株检测结果见图 7, 非转基因对照和空白水没有扩增出带, 而阳性质粒和紫色转基因植株均扩增出了目标片段. 综合表型观察和分子水平的检测结果, 转基因植株的颜色表征已经稳定地遗传给后代. 这个可视

图 6 T_1 代 pBAC9009 转基因植株的田间表型
(a) pBAC9009 转基因植株 T_1 代分离后表现为正常的植株; (b)
pBAC9009 转基因植株 T_1 代分离后表现为紫色植株; (c)~(e) 分别为
pBAC9009 转基因紫色植株的雄穗、叶片和苞叶; (f) 收获纯合的种子

图7 转基因 T_1 代植株种子外源 B 基因片段的 PCR 检测
M, 2 kb plus; 0, H_2O ; -, 阴性对照(CK); +, 阳性质粒 pBAC9009; 1~5, 转基因玉米 T_1 株系

化跟踪表达系统, 作为外在的对转基因植株的判定直观、准确且简便易行。

2.5 RT-PCR 的检测结果

为进一步确认转基因植株的颜色表型是外源花青素调控基因的作用结果, 我们在基因转录的水平上分别对 Bi 基因和 Cl 基因做了 RT-PCR 检测验证(图8)。此验证是以组成型表达的 $Actin$ 基因作为内标参照。在内参相同的条件下, 转基因植株的 cDNA 均扩增出了相应的目标片段, 说明外源的 Bi 基因和 Cl 基因能够进行正常转录。由此, 进一步说明了转基因植株外在的紫色表型是外源花青素调控基因作用的结果。

2.6 转基因玉米植株 T_1 代叶片花青素含量测定

花青素是一种水溶性色素, 合成后会在液泡中积累, 使细胞变成红色或紫色。为了进一步证明外源花青素合成调控转录因子对花青素合成的调控作用, 我们选取了 T_1 代转基因玉米中紫色的叶片, 检测其总花青素的含量。可以看出(图9), 转基因植株叶片的花青素含量均明显高于对照, 其中样品1的含量高于对照40倍, 说明花青素合成转录因子基因 Bi 和 Cl 在转基因玉米中获得了高效表达, 并调控了花青素合成相关基因, 最终在细胞内合成并积累了大量的花青素, 使转基因植株发生了颜色变化。

2.7 转基因玉米植株 T_1 代种子花青素含量测定

在 T_1 代中我们得到了5个纯和的紫色果穗(图

图8 T_1 代转基因玉米 RT-PCR 结果

CK, 对照 501; 1~9, 转基因植株 1~9; $ZmCl$, 玉米 Cl 基因; $ZmBi$, 玉米 Bi 基因; $ZmActin1$, 玉米管家基因

图9 转基因玉米叶片花青素含量
(a) 花青素总含量; (b) 总花青素提取含量分析; CK, 非转基因玉米; L1~L5, 转基因玉米样品

6(f)), 对得到的紫色果穗进行花青素含量测定。转基因植株种子的花青素含量整体为对照的50倍之多(图10)。

3 讨论

目前, 在植物转基因过程中, 外源基因对植物受体细胞的转化频率很低, 因此, 为了从数量庞大的受

图10 转基因玉米种子花青素含量

(a) 花青素总含量; (b) 总花青素提取含量分析; (c) 玉米种子样品。L1~L10, 转基因玉米样品; CK, 非转基因玉米

体细胞群中得到真正转化细胞,必须使用合适的特异性选择标记基因^[16].在转基因研究中应用较多的报告基因是 *GUS* 和 *GFP*^[17]. *GUS* 基因的表达产物可用于组织化学分析、酶活性检测和细胞定位等,但进行组织学检测时,因为要对材料进行固定、保温和脱色等处理,在一定程度上具有破坏性,而且有的植株中存在 *GUS* 本底也会表达影响结果.同时 *GUS* 基因还受到植物生长周期的影响,当植物组织衰老时表达会发生变化,影响检测结果. *GFP* 基因是另一种常见的报告基因,编码一种天然的发光蛋白.该蛋白的优点是可以进行活体检测,不用破坏植物组织,且不受生物类型、基因型、细胞和组织类型的限制,不需要底物和辅助因子的参与.但是当 *GFP* 蛋白含量较高时,转化细胞的再生能力下降,说明 *GFP* 对细胞具有一定的毒害作用^[18]. Haseloff 等人^[19]发现, *GFP* 在核质和胞质中时很难获得再生植株,而当 *GFP* 在内质网中则能够得到再生植株,使 *GFP* 的使用受到限制.在众多的植物遗传转化报告基因中,花青素代谢调节基因是最方便的一种.不仅不用伤害转基因植株的组织细胞,使珍贵的转基因苗得以保存,而且对转基因再生植株没有毒害作用^[20].花青素导入植物细胞之后,经过表达后会在液泡中积累,使细胞变成红色或紫色,用一般的解剖镜甚至肉眼即可观测,便于早期筛选转基因材料,无需对植物的检测部位进行特殊处理或选择特殊仪器进行观察.将这类基因应用到植物遗传转化的操作上,可以有效地减少转化后的分子检测工作,目的性强,实验结果的准确度和可信度都可以大为提高.另外,在基因功能研究方面,根据该基因在植株上的表现,能够直观地反映出基因共抑制、转基因沉默等转基因植株可能出现的

重大问题.

本研究的 RT-PCR 结果表明,作为阴性对照的 501 中没有表达 *Bi* 基因和 *CI* 基因,我们构建的载体成功地使本来应该在玉米苞叶和玉米叶脉表达的 *Bi* 基因和在玉米糊粉层和胚芽中表达的 *CI* 基因表达于玉米植株的叶片中,说明通过利用外源 *Bi* 基因和 *CI* 基因对植株本身进行花青素合成的调控是切实可行的,并且可以将其很好地应用到转基因植株及其后代的筛选工作中.

本研究成功构建了以花青素基因作为报告基因的植物转基因可视化跟踪表达系统,而且获得了 *T₁* 代植株的纯合种子,虽然还需进一步的侧交验证,但已基本证明该跟踪系统是切实可行的.但是我们在研究中也发现,紫色种子的颜色深浅不一,分析可能有以下几个原因:首先,采用基因枪法转化玉米,转入的外源基因拷贝数不是单拷贝,致使基因表达水平不同,甚至可能造成基因沉默;第二,插入位点不同也会影响外源基因的表达;第三,玉米籽粒的颜色受多基因控制,籽粒颜色深浅不一可能与受体的遗传背景有关^[21].我们所选用的基因是调控花青素在糊粉层中形成的,而且受体材料 501 的种皮是黄色的,因此在适当的遗传背景下,可以有紫色、红色和棕红色素形成,从而使籽粒表现出不同颜色.但是紫色糊粉层的出现需要至少 9 个显性基因,其中 *BZ1*, *BZ2* 中若有一个处于隐性状态,糊粉层中就产生棕色素及极其微量的紫色素,混合成为古铜色. *BZ1*, *BZ2* 都处于隐性状态,则不再产生色素^[22].而 *In* 的作用在于提高花青素的含量,从而使颜色加深.有 *In* 的组合颜色深,没有 *In* 的组合颜色就浅. *In* 也能使果皮变成棕色^[23].具体的原因还有待于进一步的深入研究.

参考文献

- Holton T A, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 1071–1083
- 宫破, 薛静, 张晓东. 植物花青素合成途径中的调控基因研究进展. *生物技术进展*, 2011, 1: 381–390
- Michael L R, Rajandeev S S, Robert M, et al. A mutator transposon insertion is associated with ectopic expression of a tenderly repeated multistory *Myb* gene pericarp color1 of maize. *Genetics*, 2008, 178: 1859–1874
- Maize S, Christiane B, Wusirika R, et al. The regulatory regions required for B paramutation and expression are located far upstream of the maize b1 transcribed sequences. *Genetics*, 2002, 162: 917–930
- Goff S A, Cone K C, Fromm M E. Identification of functional domains in the maize transcriptional activator *CI*: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev*, 1991, 5: 298–309
- Chen S M, Coe E H. Control of anthocyanin synthesis by the *C* locus in maize. *Biol Gen*, 1977, 15: 333–346
- Coe E H Jr. Compound versus bifunctional nature of the *C* locus in maize. *Genetics*, 1964, 50: 571–578

- 8 Coe E H Jr. A regular and continuing conversion-type phenomenon at *b* locus in maize. *Maydica*, 1959, 24: 49–58
- 9 Radicella J P, Turks D, Chandler V L. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 127–130
- 10 Goff S A, Cone K C, Chandler V L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: Evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev*, 1992, 6: 864–875
- 11 Han Y J, Kim Y M, Lee J Y, et al. Production of purple-colored creeping bentgrass using maize transcription factor genes *Pl* and *Lc* through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 397–406
- 12 Doshi K M, Eudes F, Laroche A, et al. Transient embryo-specific expression of anthocyanin in wheat. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2006, 42: 432–438
- 13 Zhang X D, Li D M, Xu W Y, et al. Development of transgenic wheat by biolistic bombardment transferring Basraresistance gene and novel HMW Gluten in subunit genes. *Acta Agric Boreali-Sin*, 1997, 12: 133–136
- 14 吕晓玲, 王冀, 龚鹏飞. 紫玉米芯色素提取工艺条件研究. *食品研究与开发*, 2006, 27: 76–78
- 15 崔丽娜, 董树亭, 高荣岐, 等. 玉米籽粒花色苷色素提取方法研究. *山东农业科学*, 2008, 7: 84–86, 96
- 16 李文凤, 季静, 王罡, 等. 提高转基因植物标记基因安全性策略的研究进展. *中国农业科学*, 2010, 43: 1761–1770
- 17 宋希强, 李绍鹏, 吴志彪, 等. 转基因植物标记基因研究进展. *热带作物学报*, 2003, 24: 87–92
- 18 刘继红, 邓秀新. GFP 及其在植物学研究中的应用. *生命的化学*, 2001, 21: 225–226
- 19 Haseloff J, Siemerling K R, Prasher D C, et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2122–2127
- 20 肖兴国, 张爱民, 聂秀玲. 转基因小麦的研究进展和展望. *农业生物技术学报*, 2000, 8: 111–116
- 21 刘振华, 闫海芳, 李玉花. 副突变对花青素生物合成途径的调控. *生命的化学*, 2009, 29: 750–753
- 22 Sheila M C. Pigment synthesis in maize aleurone from precursors fed to anthocyanin mutants. *Biol Gen*, 1978, 16: 226–233
- 23 Burr F A, Burr B, Scheffler B E, et al. The maize repressor-like gene intensifier1 shares homology with the r1/b1 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell*, 1996, 8: 1249–1259

Expression of foreign transcription genes *Bi* and *Cl* on anthocyanin synthesis pathway in maize: A novel expression system of visual tracking for transgene

GONG Xia^{1,2}, YANG FengPing¹, XUE Jing¹, CHEN XuQing¹, ZHANG LiQuan¹, LI XiangLong¹ & ZHANG XiaoDong^{1,2}

¹ Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing 100097, China;

² College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Anthocyanin is a kind of water-soluble flavonoids, which make the plants showing red, blue, purple, red purple or other colors. Expression of the metabolic regulation gene causes the accumulation of anthocyanins in plant cells, and makes the plant organs change color, easy to observe. In this paper, using *Bi* and *Cl* gene which involved in anthocyanin synthesis pathway as a visual reporter, and glyphosate resistant gene *epsp*, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3 phosphate synthase, as a selection marker, plant expression vector pBAC9009 was constructed. Immature embryos and embryogenic callus of several excellent maize inbred lines were transformed with biolistic bombardment. Undertaking *in vitro* culture steps of callus induction, glyphosate resistance selection, differentiation and plant regeneration, 75 transgenic plants were regenerated, and 43 ears of corn were harvested. There are 18 T₀ lines expressed parts or whole purple on the seedling or the growth stage, 8 ears of these lines with scattered purple seeds. Analysis of PCR, RT-PCR and anthocyanin content showed that exogenous genes were well integrated in the genome of maize and efficiently expressed in the purple leaves and seeds. In conclusion, we successfully constructed a visual tracking system for transgene which make the transformed plants can be easily distinguished from their appearance, only by its color appearance at the early stage. Application of the system can greatly improve efficiency of transgene, and save costs. It is very important for plant transgenic research.

maize, visual marker, anthocyanin, transgenic

doi: 10.1360/972012-25