

研究报告 Original Papers

拟南芥*AtPAP1*基因植物表达载体构建及在烟草中遗传转化分析刘轶¹, 郑唐春^{1,2}, 代丽娟¹, 刘彩霞¹, 王庆娜¹, 曲冠证^{1,*}¹东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040; ²花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 城乡生态环境北京实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 园林学院, 北京林业大学, 北京, 100083

摘要: 为探究花青素调控基因*AtPAP1*的生物学功能, 采用PCR方法从拟南芥花序中克隆出拟南芥MYB家族*AtPAP1*基因。构建植物表达载体pROKII-*AtPAP1*, 并通过农杆菌介导的叶盘法将外源基因转入野生型烟草。检测结果表明, *AtPAP1*已成功整合入烟草基因组中, 并在mRNA水平表达。形态观察显示*AtPAP1*基因异源过量表达能显著增强转基因烟草植株花青素的积累, 致使转基因烟草的叶片、茎段和花器官等颜色发生变化, 呈现出不同程度的紫红色。

关键词: 拟南芥; *AtPAP1*; 花青素; 烟草

花青素广泛存在于植物中的一种天然水溶性色素, 属于黄酮类物质, 常见的有6种, 分别为天竺葵色素(Pg)、矢车菊色素(Cy)、牵牛花色素(Pt)、飞燕草色素(Dp)、芍药色素(Pn)、锦葵色素(Mv) (韩海华等2011; 贾赵东等2014)。在植物体内很少存在游离状态的花青素, 一般花青素常与一个或多个葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、阿拉伯糖等通过糖苷键形成花色苷, 以糖基化和酰基化两种形式存在, 通过酸性和碱性基团, 在不同酸碱度环境下呈现不同的颜色, 进而改变植物颜色(胡可等2010; Ballaré 2003; 白延红2012; 温素芳和赵秋燕2012)。研究表明花青素是植物次生代谢产物, 并且具有多种生理功能, 如在植物中, 能吸引昆虫传粉、防止植物受紫外辐射、使细胞分化等; 对于人类健康而言, 具有抗氧化、清除自由基、抑制肿瘤细胞发生和转移等作用(Hu等2007; 韩彬等2013), 具有很高的营养价值与保健价值, 受到越来越多消费者的重视(Batey 2004; 武东玲2014)。

目前, 花青素的生物合成途径研究得较为透彻。合成途径主要受两类基因调控, 分别为控制编码一系列酶的结构基因和调节结构基因表达的转录因子(贾赵东等2014)。结构基因又分为早期合成基因和晚期合成基因(杨鹏程等2012)。在花青素合成中, 经过一系列早期合成基因参与, 苯丙氨酸底物被催化为无色花色素(许志茹等2008; 宫硖等2011; 李莹等2015)。无色花色素不能稳定存在, 再经一系列晚期合成基因转化为花青素(温素芳和赵秋燕2012; 张佳慧等2015)。调控花青素合成的转录因子主要为三个家族, bHLH家族、MYB家族和

WD40家族。一般bHLH与MYB共同调节, 但一些R2R3-MYB因子不需要bHLH的辅助作用(Grotewold和Chandler 2000)。其中, 本文研究的MYB家族*PAP1* (production of anthocyanin pigment 1)基因就能够独立调控花青素的转录, 并激活上游的苯丙氨酸酶(PAL)和下游运送花青素苷的谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase) (Grotewold和Chandler 2000)。同时, 研究还发现, 一些MYB转录因子家族成员参与了花青素的生物合成, 有着广泛的生物学功能, 如参与植物激素应答、次生细胞壁木质素合成、控制植物细胞的形态和模式的建成等(Allan等2008; Hichri等2011; 陈俊和王宗阳2002)。此外MYB类转录因子在植物的次生代谢中主要在苯丙素类代谢途径中发挥作用, 例如: 珙桐*DiMYB1*基因大量表达促使类黄酮化合物累积, 从而能使幼叶呈紫色而免受紫外线伤害(戴鹏辉等2016); 转杜仲几丁质酶基因*EuCHIT1*的番茄提高了番茄植株的抗氧化能力, 从而减少灰霉病对番茄的损伤(郭林霞等2016)。*AtPAP1*是一个从拟南芥中克隆的MYB家族转录因子, 通过调控苯丙烷生物合成过程中的相关酶类来影响植物生长过程中花青素的积累。Borevitz等(2000)发现*AtPAP1*基因可以调控花青素生物合成途径中多个酶的表达, 从而激活花青素的合成, 使其在植物体中积累。由于烟草花色艳丽, 与拟南芥的白色花区别明显, 其体内的花青素代

收稿 2016-10-24 修定 2017-06-15

资助 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-12-0808)和国家自然科学基金(31370661)。

* 通讯作者(E-mail: quguanzheng@yahoo.com)。

谢途径可能与拟南芥不同。因此,利用烟草作为模式植物来表达*AtPAP1*基因,将对全面分析花青素的调控途径具有重要意义。

伴随着经济发展,生活水平的提高,人们对生活环境质量要求的提高,园林绿化越来越得到重视。绿化不但可以改变居住环境,还可以成为人文景观,而树种和花卉的选择作为园林绿化的主题成为了关键因素。利用分子育种技术,定向改变绿化树种和观赏花卉的颜色,开发彩色园艺植物,在园林绿化中具有极高的应用前景。因此,本研究通过构建pROKII-*AtPAP1*载体,利用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,探究*AtPAP1*的异源表达对转基因烟草的表型变化,为进一步的园林绿化育种提供技术支持与理论参考。

材料与方法

1 实验材料

野生型烟草(*Nicotiana tabacum* L.)组培苗、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Col-0)种子和农杆菌菌株(GV3101)均由本实验室保存;植物表达载体pROKII质粒,由山东师范大学张慧教授惠赠。

质粒提取、胶回收试剂盒购自OMEGA公司(美国);PCR相关试剂、DNA Marker、限制性内切酶*Xba* I、*Sac* I, DNA ligase Kit (2.0), TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit, PrimeScrip™ RT reagent Kit, DNA Fragment Purification Kit, SYBR Premix Ex*Taq*™ II均购自TaKaRa公司(大连);所用引物合成、测序服务由博仕生物技术有限公司完成(哈尔滨);其他实验试剂为进口或国产分析纯。

2 实验方法

2.1 目的基因的克隆

参照TaKaRa公司RNA提取试剂盒说明书,提取拟南芥花序组织的总RNA。利用Nanodrop2000分光光度计检测拟南芥RNA的纯度和浓度,取0.5 μg RNA为材料,利用PrimeScript™ RT reagent Kit试剂盒反转录合成第一链cDNA。根据拟南芥*AtPAP1*基因序列,设计特异性引物扩增目的片段,所用引物见表1。PCR反应体系为模板2 μL,引物*AtPAP1-Xba* I-F 1 μL、*AtPAP1-Kpn* I-R 1 μL、10×Buffer 2.5 μL、Ex *Taq* 0.25 μL、dNTP 2 μL,用dd H₂O补足至25 μL,反应条件为94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 45 s, 35个循环; 72°C 10 min。反应结束后,取3 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

2.2 植物表达载体的构建及农杆菌转化

用限制性内切酶*Xba* I和*Sac* I对胶回收的目的片段和pROKII质粒进行酶切反应。胶回收对应的酶切产物并用DNA ligase Kit进行连接,然后转化大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞,涂布含有卡那霉素的LB平板培养,37°C恒温培养12~16 h。然后挑取单克隆进行菌液PCR验证,并将阳性转化子送哈尔滨博仕生物技术有限公司测序。选择测序成功的菌液保存并提取质粒,利用液氮冻融法将pROKII-*AtPAP1*质粒转入到农杆菌GV3101感受态细胞内,随机挑取单克隆进行PCR检测,扩增引物pROKII-F和pROKII-R序列见表1。

2.3 烟草的遗传转化及PCR检测

参照本实验室的烟草转化体系进行植物的遗传转化(李爽等2014)。步骤包括:菌液的制备、侵染、共培养、脱菌和分化及生根培养等五部分组

表1 本实验中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	碱基序列	用途
<i>AtPAP1-Xba</i> I-F	5' ATCTCTAGAGAGATGGAGGGTTCGTCCAAAG 3'	克隆 <i>AtPAP1</i> 基因
<i>AtPAP1-Kpn</i> I-R	5' ATCGGTACCCTAATCAAATTTACAGTCTCTC 3'	克隆 <i>AtPAP1</i> 基因
pROKII-F	5' AAGACCGGCAACAGGATTC 3'	载体通用引物
pROKII-R	5' CGCACAATCCCACTATCCTT 3'	载体通用引物
<i>AtPAP1</i> -RT-F	5' CTGAGTAAGAAACATGAACCGTG 3'	qRT-PCR检测
<i>AtPAP1</i> -RT-R	5' TGTAACTGTGAAGGATCGAGG 3'	qRT-PCR检测
<i>Ntactin</i> -RT-F	5' TGTGTGGACTCTGGTGTATG 3'	qRT-PCR内参基因
<i>Ntactin</i> -RT-R	5' CGCTCGGTAAGGATCTTCATC 3'	qRT-PCR内参基因

下划线: 限制性内切酶切位点。

成。制备 $OD_{600}=0.2\sim 0.3$ 的菌液, 用菌液侵染切割成 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 大小的烟草叶片, 共培养2 d后, 在含有 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素、 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素的分化培养基上培养, 培养约3周后将抗性芽进行抽茎生长, 最后转移到生根培养基上进行生根培养。利用CTAB法提取抗性苗叶片DNA, 利用pROKII载体通用引物进行PCR反应, PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 筛选阳性转基因株系。

2.4 实时荧光定量PCR检测*AtPAP1*基因表达量

利用TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒提取生长30 d左右的不同转基因株系及野生型烟草幼苗叶片总RNA。以反转录后的cDNA为模板, 利用定量引物*AtPAP1*-RT-F和*AtPAP1*-RT-R(表1), 参考SYBR Premix ExTaq™ II反应体系, 以*Ntactin*基因为内参基因, 进行定量PCR检测。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析定量数据, 计算不同株系中*AtPAP1*基因的相对表达量。

2.5 花青素含量的测定

参照李菊梅等(2002)花青素提取方法, 对50 d大的转基因与野生型烟草叶片进行花青素含量测定。具体如下: 利用10 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸乙醇溶液, 在 60°C 水浴中浸提烟草叶片1 h。以盐酸乙醇溶液做对照液, 利用分光光度计测定提取液在530、620和650 nm波长下的光密度值。根据下列公式计算花青素含量。

花青素光密度值: $OD_\lambda=(OD_{530}-OD_{620})-0.1(OD_{650}-OD_{620})$; 花青素含量($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$)= $OD_\lambda/\varepsilon\times V/m\times 1\ 000\ 000$ 。

其中, OD_λ : 花青素在530 nm波长下的光密度; ε : 花青素摩尔消光系数 4.62×10^6 ; V : 提取液总体积(mL); m : 取样质量(g); 1 000 000: 计算结果换算成nmol的倍数。

2.6 叶绿素含量的测定

采用二甲基亚砜(DMSO)法提取叶绿素(王文杰等2009)。具体如下: 称取适量的转基因与野生型烟草叶片, 剪碎后放入试管中, 加入5 mL DMSO后在 60°C 水浴下处理3 h, 以DMSO为对照, 利用分光光度计在480、649和665 nm波长下测量光密度值。根据公式计算叶绿素含量。 $\text{Chla含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=0.005\times(12.19\times OD_{665}-3.45\times OD_{649})/\text{质量}$; $\text{Chlb含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=0.005\times(21.99\times OD_{649}-5.32\times OD_{665})/\text{质量}$; $\text{Car含量}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})=0.005\times[1\ 000\times OD_{480}-2.14\times(12.19\times OD_{665}-3.45\times OD_{649})-70.16\times(21.99\times OD_{649}-5.32\times OD_{665})]\times 220^{-1}/\text{质量}$ 。

实验结果

1 拟南芥*AtPAP1*基因的克隆及植物表达载体的构建

利用TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒提取拟南芥花序的总RNA(图1-A)。以反转录后的cDNA为模板扩增*AtPAP1*基因。*AtPAP1*基因(GenBank登录号AY519563.1)的ORF长度为747 bp, 共编码248个氨基酸, 该基因编码蛋白的分子量为28.5 kDa, 蛋白质的等电点为9.20。

利用限制性内切酶*Xba* I和*Sac* I对*AtPAP1*目的片段和pROKII载体进行双酶切反应, 用DNA ligase Kit进行连接反应, 重组载体暂命名为pROKII-

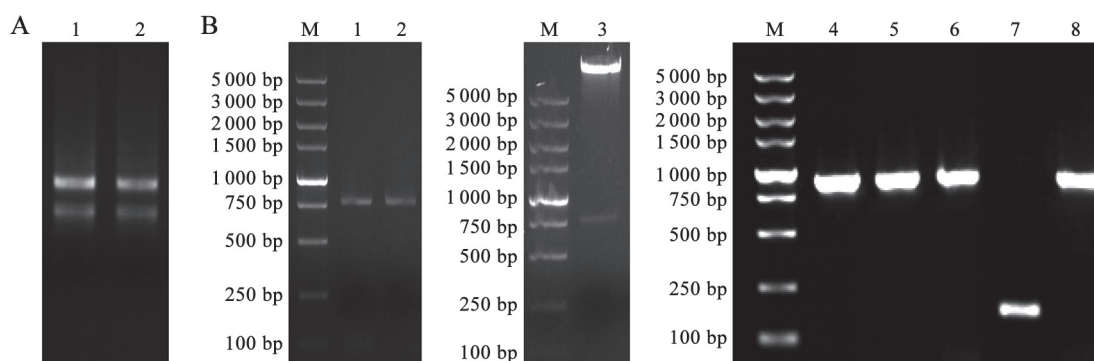


图1 植物表达载体pROKII-*AtPAP1*的构建

Fig.1 The construction of pROKII-*AtPAP1* vector

A: 拟南芥花序总RNA的琼脂糖凝胶电泳图, 1、2: 拟南芥花序总RNA; B: 植物表达载体pROKII-*AtPAP1*构建的凝胶电泳图, M: DNA marker DL5000, 1、2: *AtPAP1*基因的PCR扩增产物, 3: pROKII-*AtPAP1*质粒用*Xba* I和*Sac* I进行双酶切检测电泳图, 4~8: 5个pROKII-*AtPAP1*重组载体的PCR产物。

AtPAP1。将连接产物转化入大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞中,随机挑取单克隆经pROKII载体通用引物PCR验证并提取质粒进行双酶切检测,最终将阳性质粒送公司测序检测。测序结果表明,*AtPAP1*基因已经重组到pROKII载体上,没有碱基序列突变,pROKII-*AtPAP1*载体构建成功(图1-B)。

2 pROKII-*AtPAP1*载体在烟草中的遗传转化与检测

采用叶盘转化法,将农杆菌GV3101(pROKII-*AtPAP1*)感染烟草叶片,经过4~5周的选择培养,从叶片周围的愈伤组织分化出红色或淡红色的抗性芽(图2-A)。将抗性芽分离后,放在含有卡那抗生素的分化培养基上继代培养,得到大量从生芽(图2-B),待从生芽抽茎后,移栽至生根培养基中进行生根培养(图2-C)。

提取11个生长30 d的转基因烟草抗性苗叶片总RNA,利用实时荧光定量PCR检测*AtPAP1*基因在不同转基因株系中的相对表达量,结果如图2-D。在11个株系中均有*AtPAP1*基因表达,基因相对表达量从高到低排序依次为:L4>L1>L9>L6>L5>L8>L11>L3>L10>L7>L2。选取相对表达量不同的5个株系(L4、L9、L5、L11、L2)移栽至土

质培养基中。2周后,观察到转基因株系呈现出由绿色至紫红色的颜色变化,且与*AtPAP1*基因的表达量成正相关(图2-E)。

3 转基因植株形态学观察

选取表达量低(L2)、中(L5、L8和L11)和高(L1、L4和L9)的转基因植株和野生型植株移栽到土壤,2周左右,用显微镜分别观察叶片形态变化。与野生型相比,转基因植株随着表达量的不同均呈现出不同颜色差异变化,主要表现为叶片下表皮整体变红、主叶脉变红、下表皮上出现点状或侧叶脉变红等,而在野生型中没有发现这些变化。即*AtPAP1*基因表达量高的株系颜色遍布叶片整体,呈现出深红色(图3-B~D),表达量居中的株系呈现出浅红色(图3-F~H),而*AtPAP1*基因表达量低的株系只改变叶片局部位置(斑点状)(图3-E)。随后选取表达量低、中、高的3个转基因株系(L2、L4和L11)继续进行表型观察。当植株在土壤中生长6周左右,发现不同的表达量导致转*AtPAP1*基因烟草出现显著的表型差异。与野生型相比,高表达的转基因植株整株形态上均呈现显著颜色变化(图4-A),尤其是茎段、叶柄和叶片等部位,而低表

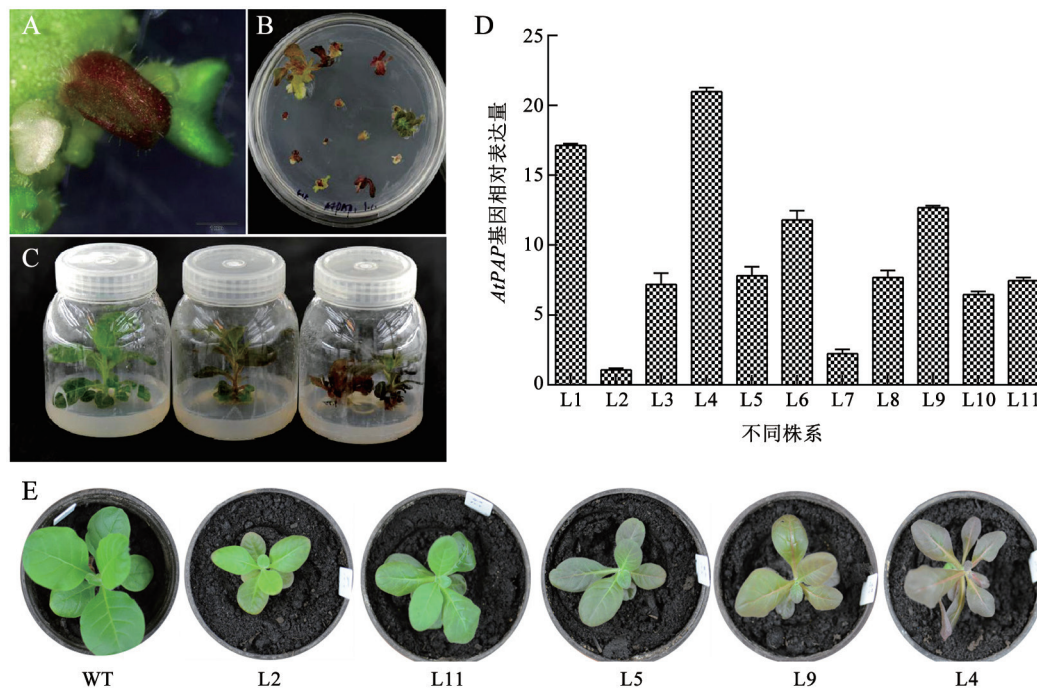


图2 转基因烟草的获得及*AtPAP1*基因在烟草中的相对表达量

Fig.2 Acquisition of transgenic tobacco and relative expression level of *AtPAP1* gene in tobacco

A: 转基因烟草抗性芽; B: 继代中的抗性芽; C: 转基因生根苗; D: 11个转基因*AtPAP1*株系的qRT-PCR检测结果; E: 移栽2周的转基因烟草组培苗。WT: 野生型烟草; L2、L11、L5、L9、L4: 5个不同转基因*AtPAP1*株系。

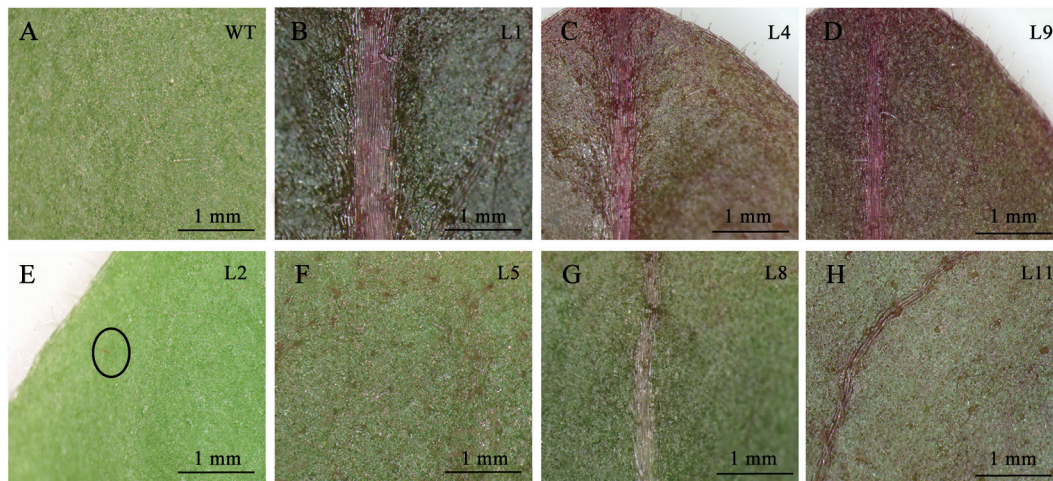


图3 野生型和转基因烟草叶片形态学观察

Fig.3 Microscope observation of wild type and transgenic tobacco

A: 野生型烟草叶片; B、C和D: 3个高表达的转基因(L1、L4和L9)叶片; E: 低表达转基因(L2)叶片 F、G和H: 3个(L5、L8和L11)中表达转基因烟草叶片。

达的转基因植株颜色变化不太明显(图4-B~D)。

转基因植株继续生长2月后, 进入繁殖期(图5-H)。在花器官形成初期, 与野生型相比, 转基因烟草的花瓣、萼片和子房颜色发生变化, 表现为花冠颜色加深, 萼片和子房变为暗红色(图5-A~D)。除了柱头和花柱颜色没有变化外, 花药由绿色变为紫红色(图5-E), 且花冠脱落后形成紫红

色的子房壁(图5-F)。有趣的是, 转基因植株种子发育正常、胚珠饱满、育性良好, 部分转基因株系种子呈现出深红色(图5-G)。

4 花青素和叶绿素含量测定

按*AtPAP1*基因表达量从高到低选取L4、L11、L2三个株系, 用盐酸乙醇溶液萃取转基因株系与野生型烟草叶片中花青素。经计算分析后, 野生

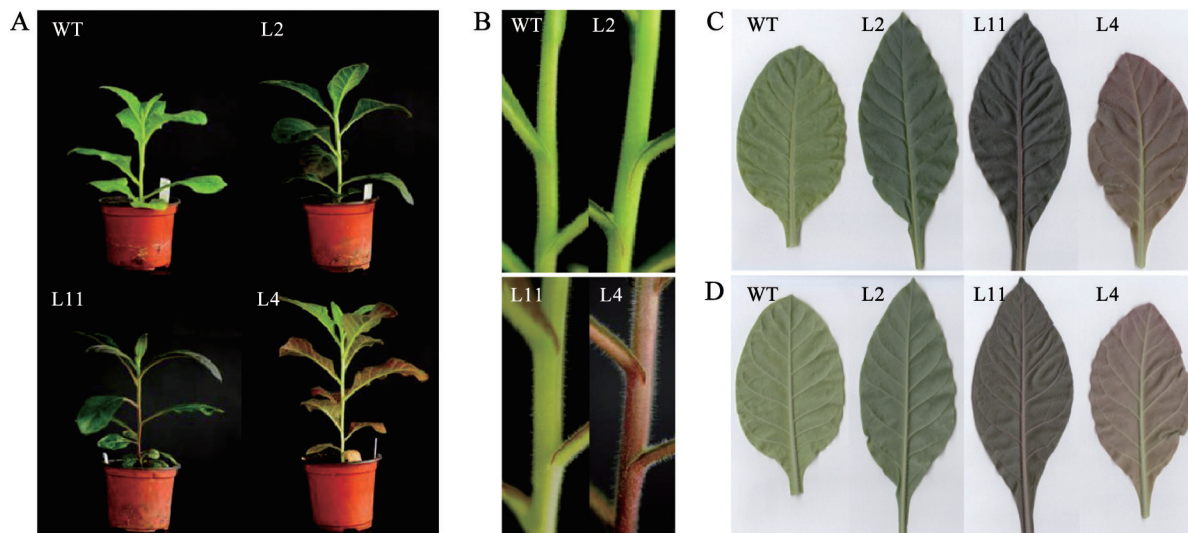


图4 转基因烟草生长中期的表型

Fig.4 Growth phenotype of transgenic tobacco

A: 移栽6周后转基因与野生型烟草整株形态; B: 转基因与野生型烟草茎段; C: 转基因与野生型烟草叶片(正面)扫描图; D: 转基因与野生型烟草叶片(反面)扫描图。WT: 野生型烟草; L2、L4、L11: 3个不同转基因*AtPAP1*株系。



图5 转基因烟草繁殖期表型观察

Fig.5 Phenotypic observation of transgenic tobacco during reproductive period

A、B: 转基因与野生型烟草花器官; C: 未开放的转基因与野生型烟草花; D: 未开放转基因与野生型烟草花纵剖; E: 转基因与野生型烟草花药; F: 转基因与野生型烟草果实; G: 转基因与野生型烟草胚珠; H: 转基因烟草与野生型烟草植株。WT: 野生型烟草; L1、L2、L4、L9、L11: 4个不同转基因*AtPAP1*株系。

型烟草中花青素含量为 $0.6378 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 转基因株系花青素含量从高到低依次为L4、L11、L2, 其中L4株系的花青素含量为 $19.7925 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 是野生型烟草的31倍(图6-A)。而叶绿素a (Chla)、叶绿素b (Chlb)和类胡萝卜素(Car)含量均为野生型烟草最高, L4、L11、L2株系呈下降趋势(图6-B~D)。其中L4株系的Chla、Chlb和Car含量均为最低, 分别是野生型烟草的58%、67%和67%, 平均叶绿素含量约为野生型烟草的62.5%。综上, *AtPAP1*基因表达量最高的L4株系中, 花青素提高了31倍, 叶绿素与野生型相比降低了约37.5%。

讨 论

对于植物次生代谢的调控, 目前在基因转录

水平上的研究较为深入, 主要包括酶基因的转录表达以及通过转录因子对代谢途径的调控作用。目前, 国内外学者已在分子水平上分离了与花青素合成相关的结构基因和调控基因, 调控花青素合成的转录因子主要包括两大类相互作用的bHLH和MYB转录因子, 并且在转录水平上研究了其表达量、时空特异性和表达特异性, 获得了花青素转基因植株(Yan等2008)。MYB转录因子超家族是植物中最大的家族之一, 拟南芥中有198个成员, 其中有64个属于MYB相关(MYB-related)基因(Chen等2006)。*AtPAP1*基因是花青素生物合成途径中的关键调控基因。Zhou等(2008)将*PAP1*基因转入烟草后, 整个转基因烟草植株组织中花青素、芍药色素和天竺葵色素的含量明显增加, 且

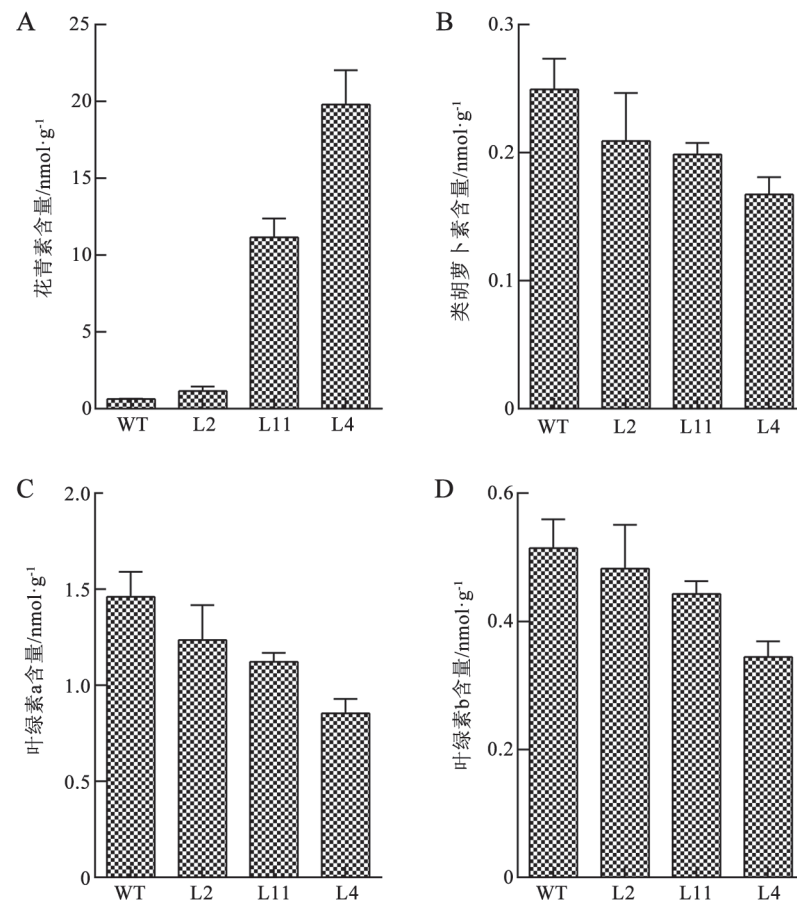


图6 转基因与野生型烟草花青素和叶绿素含量测定

Fig.6 Determination of anthocyanin and chlorophyll contents in transgenic and wild type tobacco

WT: 野生型烟草; L2、L4、L11: 3个不同转基因*AtPAP1*株系。

植株抗性增强, 烟叶焦油含量降低, 但生长势减弱, 茎秆柔软弯曲, 影响了生产上的应用。美国和以色列的科学家们合作, 成功获得了花色和花香都增强的转基因矮牵牛, 他们将拟南芥MYB家族转录因子*PAP1*转化矮牵牛, 获得了表达稳定的转基因植株, 不仅使花色加深外, 而且使花色和花香基因的转录都得到了增强(Ben等2008)。

*PAP1*基因是从拟南芥中克隆的MYB家族转录因子, 能够激活花青素生物合成途径中多个关键酶基因的表达, 从而启动花青素的合成和积累。本研究克隆拟南芥*AtPAP1*基因, 构建组成型植物表达载体(pROKII-*AtPAP1*)并转入烟草中, 使拟南芥*AtPAP1*基因异源表达。结果表明*AtPAP1*基因过表达后能改变转基因植株的颜色, 且基因表达量高的株系(L4)花青素积累量提高数十倍(图6), 且转基因烟草植株能够正常收获种子, 育性良好,

对转基因植株的后续利用及保存具有重要作用, 进而阐明*PAP1*基因过表达对烟草植株的发育影响, 为花青素在烟草品质改良的相关研究中奠定基础, 也为通过分子育种技术改变园林植物颜色, 培育彩色新品种提供了技术支持。

参考文献

- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci*, 13 (3): 99–102
- Bai YH (2012). Isolation and characterization of anthocyanin-specific pathway genes and transcription factors in tobacco [PhD thesis]. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [白延红(2012). 烟草花青素合成相关基因及转录因子基因的克隆与功能验证研究(博士论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Ballaré CL (2003). Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses. *Infect Immun*, 132 (4): 1725–1727
- Batey M (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula.

- Biochem Biokhimiia, 69 (1): 75–80
- Ben ZM, Negre-Zakharov F, Masci T, Ovadis M, Shklarman E (2008). Interlinking showy traits: co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnol J*, 6 (4): 403–415
- Borevitz JO, Xia YJ, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 12 (12): 2383–2394
- Chen J, Wang ZY (2002). Progress in the study of plant MYB transcription factors. *J Plant Physiol Mol Biol*, 28 (2): 81–88 (in Chinese with English abstract) [陈俊, 王宗阳(2002). 植物MYB类转录因子研究进展. *植物生理与分子生物学学报*, 28 (2): 81–88]
- Chen YH, Yang XY, He K, Liu MH, Li JG, Gao ZF, Lin ZQ, Zhang YF, Wang XX, Qiu XM, et al (2006). The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol*, 60 (1): 107–124
- Dai PH, Ren Y, Cao FX, Liu ZM (2016). Cloning and expression analysis of MYB transcription factor *DiMYB1* gene of *Davidia involucrata*. *Plant Physiol J*, 52 (8): 1255–1262 (in Chinese with English abstract) [戴鹏辉, 任锐, 曹福祥, 刘志明, 李萌(2016). 珙桐MYB转录因子*DiMYB1*基因的克隆及表达分析. *植物生理学报*, 52 (8): 1255–1262]
- Grotewold E, Chandler VL (2000). Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (25): 13579–13584
- Gong X, Xue J, Zhang XD (2011). Regulation genes in plant anthocyanin synthesis pathway. *Curr Biotech*, 1 (6): 381–390 (in Chinese with English abstract) [宫硇, 薛静, 张晓东(2011). 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*, 1 (6): 381–390]
- Guo LX, Dong X, Zhao DG (2016). Transgenic tomato with *chitinase* gene *EuCHIT1* improved resistance to *botrytis cinerea*. *Plant Physiol J*, 52 (5): 703–714 (in Chinese) [郭林霞, 董旋, 赵德刚(2016). 转杜仲几丁质酶基因*EuCHIT1*番茄提高对灰霉病的抗性. *植物生理学报*, 52 (5): 703–714]
- Han B, Luo LP, Chen XY, Yu XP (2013). Research progress of anthocyanin on cancer metastasis inhibition. *J Chengdu Med Coll*, 8 (1): 107–110 (in Chinese with English abstract) [韩彬, 罗丽萍, 陈祥燕, 余小平(2013). 花青素抑制肿瘤转移研究进展. *成都医学院学报*, 8 (1): 107–110]
- Han HH, Liang MZ, Wang L (2011). Research progress of anthocyanin. *J Tea*, 37 (04): 217–220 (in Chinese with English abstract) [韩海华, 梁名志, 王丽(2011). 花青素的研究进展及其应用. *茶叶*, 37 (04): 217–220]
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot*, 62: 2465–2483
- Hu C, Cai YZ, Li W, Corke H, Kitts DD (2007). Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. *Food Chem*, 104 (3): 955–961
- Hu K, Han KT, Dai SL (2010). Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors. *Chin Bull Bot*, 45 (3): 307–317 (in Chinese with English abstract) [胡可, 韩科厅, 戴思兰(2010). 环境因子调控植物花青素合成及呈色的机理. *植物学报*, 45 (3): 307–317]
- Jia ZD, Ma PY, Bian XF, Yang Q, Guo XD, Xie YZ (2014). Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 34 (7): 1496–1506 (in Chinese with English abstract) [贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 杨清, 郭小丁, 谢一芝(2014). 植物花青素合成代谢途径及其分子调控. *西北植物学报*, 34 (7): 1496–1506]
- Li JM, Chen HZ, Peng YY (2002). Study on the extraction and its stability from grape wine pomace. *J Xinjiang Univ (Nat Sci Ed)*, 19 (2): 231–233 (in Chinese with English abstract) [李菊梅, 陈红征, 彭永玉(2002). 葡萄酒皮渣中花青类色素提取及其稳定性研究. *新疆大学学报: 自然科学版*, 19 (2): 231–233]
- Li S, Zheng TC, Zang LN, Qu GZ (2014). Transformation of tobaccos with two *API* genes isolated from poplar (*Populus simonii* × *Populus nigra*). *J Anhui Agri*, 42 (8): 2278–2281, 2308 (in Chinese with English abstract) [李爽, 郑唐春, 臧丽娜, 曲冠证(2014). 小黑杨*PsnAPI*基因转化烟草的研究. *安徽农业科学*, 42 (8): 2278–2281, 2308]
- Li Y, Gao ZR, Zhang C, Li N, Liu C (2015). Research progress on the molecular regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis pathway. *Chin J Ecol*, 34 (10): 2937–2942 (in Chinese with English abstract) [李莹, 高振蕊, 张弛, 李楠, 刘琛(2015). 花青素合成途径中分子调控机制的研究进展. *生态学杂志*, 34 (10): 2937–2942]
- Wang WJ, He HS, Guan Y, Li WX, Zhang ZH, Zu YG (2009). Methodological comparison of chlorophyll and carotenoids contents of plant species measured by DMSO and acetone-extraction methods. *Bull Bot Res*, 29 (2): 224–229 (in Chinese with English abstract) [王文杰, 贺海升, 关宇, 李文馨, 张衷华, 祖元刚(2009). 丙酮和二甲基亚砷测定植物叶绿素和类胡萝卜素的方法学比较. *植物研究*, 29 (2): 224–229]
- Wen SF, Zhao QY (2012). Advances in biosynthesis pathways and regulation of anthocyanin in *arabidopsis thaliana*. *J Anhui Agri*, 40 (4): 1933–1935 (in Chinese with English abstract) [温素芳, 赵秋雁(2012). 拟南芥花青素合成途径及其调控进展. *安徽农业科学*, 40 (4): 1933–1935]
- Wu DL (2014). Over-expression of *AtPAP1* gene in tobacco and regulation of anthocyanin biosynthesis [Master's thesis]. Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [武东玲(2014). *AtPAP1*基因在烟草中的过表达及花青素合成调控(硕士论文). 郑州: 河南农业大学]
- Xu ZR, Li CL, Cui GX, Sun Y (2008). MYB protein of anthocyanin biosynthesis in plant. *Plant Physiol Commun*, 44 (3): 597–604 (in Chinese with English abstract) [许志茹, 李春雷, 崔国新, 孙燕(2008). 植物花青素合成中的MYB蛋白. *植物生理学报*, 44 (3): 597–604]
- Yan ML, Liu XJ, Liu ZS (2008). Cloning and expression analysis of dihydroflavonol-4-reductase gene in *Brassica juncea*. *Aeta Agron Sin*, 34 (1): 1–7
- Yang PC, Zhou B, Li YH (2012). The bHLH transcription factors involved in anthocyanin biosynthesis in plants. *Plant Physiol Commun*, (8): 747–758 (in Chinese with English abstract) [杨鹏

- 程, 周波, 李玉花(2012). 植物花青素合成相关的bHLH转录因子. 植物生理学报, (8): 747–758]
- Zhang JH, Hu LZ, Yang TW, Zhu ZX (2015). Sequence and evolutionary analyses of the genes encoding key enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*). J Nucl Agri Sci, 29 (7): 1292–1301 (in Chinese with English abstract) [张
- 佳慧, 胡利宗, 杨同文, 朱自学(2015). 番茄花青素合成关键酶基因的序列与进化分析. 核农学报, 29 (7): 1292–1301]
- Zhou LL, Zeng HN, Shi MZ, Xie DY (2008). Development of tobacco callus cultures over expressing *Arabidopsis PAP1/MYB75* transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. Planta, 229: 37–51

Construction of plant expression vector and genetic transformation analysis of *Arabidopsis thaliana AtPAP1* gene in *Nicotiana tabacum*

LIU Yi¹, ZHENG Tang-Chun^{1,2}, DAI Li-Juan¹, LIU Cai-Xia¹, WANG Qing-Na¹, QU Guan-Zheng^{1*}

¹State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: In order to analyze the roles of *Arabidopsis thaliana AtPAP1* gene, a cDNA sequence of homologous gene *AtPAP1* from *Arabidopsis* inflorescences was cloned by PCR. Plant overexpression vector pROKII-*AtPAP1* was constructed and transformed into wild-type tobacco by *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation to obtain transgenic tobacco overexpressing *AtPAP1*. The transgenic plants were confirmed by PCR, and the result showed *AtPAP1* gene was integrated into tobacco genome. The results of qRT-PCR detection of T₂ generation plants showed the mRNA of *AtPAP1* was transcribed in transgenic tobaccos. Morphological observation indicated that overexpression of *AtPAP1* gene could enhance the accumulation of anthocyanins in transgenic plantlets leading to color variation of transgenic leaves, stems and flower organs in different degrees of purple red.

Key words: *Arabidopsis*; *AtPAP1*; anthocyanins; tobacco (*Nicotiana tabacum*)

Received 2016-10-24 Accepted 2017-06-15

This work was supported by Program for New Century Excellent Talents in University (Grant No. NCET-12-0808) and National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370661).

*Corresponding author (E-mail: quguanzheng@yahoo.com).