



## 研究报告 Original Papers

## 牡丹‘海黄’花瓣色斑呈色的转录及代谢机制解析

符真珠<sup>1</sup>, 袁欣<sup>1</sup>, 王二强<sup>3</sup>, 王晓晖<sup>3</sup>, 高杰<sup>1</sup>, 王慧娟<sup>1</sup>, 李艳敏<sup>1</sup>, 韩新蕊<sup>1</sup>, 师曼<sup>1</sup>, 王亮生<sup>2,\*</sup>,  
张和臣<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>河南省农业科学院园艺研究所, 郑州450002

<sup>2</sup>中国科学院植物研究所, 北京100093

<sup>3</sup>洛阳市农林科学院, 河南洛阳471026

\*共同通信作者: 王亮生(wanglsh@ibcas.ac.cn)、张和臣(zhc5128@126.com)

**摘要:** 花色是牡丹(*Paeonia × suffruticosa*)的重要观赏性状, 其中花瓣具有色斑是一些牡丹品种群的重要呈色特征。通过分析牡丹‘海黄’花瓣斑和非斑部位色素代谢组, 发现类胡萝卜素和黄酮醇类是非斑部位的主要色素, 而花青苷则是色斑呈现的关键色素。转录组及荧光定量PCR结果表明, 斑和非斑部位的差异转录本中, 植物激素信号、R2R3-MYB转录因子及色素生物合成途径相关酶基因的富集, 表明其可能参与了‘海黄’花瓣的呈色过程, 其中MYBs-SG7与黄酮醇合成酶基因FLS在非斑部位具有优势表达特性。在矮牵牛花瓣中瞬时表达MYBs-SG7基因可以特异性激活FLS基因的表达, 进一步证实了黄酮醇合成途径是‘海黄’花瓣非斑部位呈现黄色的主要途径。该研究结果不仅加深了我们对牡丹花瓣色斑呈色机制的理解, 而且为以西南牡丹作为育种亲本开展花色定向育种提供了重要的试验依据。

**关键词:** 牡丹; 色斑; 类黄酮; 类胡萝卜素; R2R3-MYB

## Transcriptional and metabolic analysis of the mechanism underlying colored blotches of tree peony ‘High Noon’ petals

FU Zhenzhu<sup>1</sup>, YUAN Xin<sup>1</sup>, WANG Erqiang<sup>3</sup>, WANG Xiaohui<sup>3</sup>, GAO Jie<sup>1</sup>, WANG Huijuan<sup>1</sup>,  
LI Yanmin<sup>1</sup>, HAN Xinrui<sup>1</sup>, SHI Man<sup>1</sup>, WANG Liangsheng<sup>2,\*</sup>, ZHANG Hechen<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Horticultural Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

<sup>2</sup>Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

<sup>3</sup>Luoyang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Luoyang, Henan 471026, China

\*Co-corresponding authors: Wang LS (wanglsh@ibcas.ac.cn), Zhang HC (zhc5128@126.com)

**Abstract:** The coloration of tree peony (*Paeonia × suffruticosa*) petals, particularly the distinctive blotches on certain cultivars, represents a pivotal ornamental trait. An analysis of the metabolome in the petals of tree peony ‘High Noon’ revealed carotenoids and flavonols as the primary pigments contributing to the coloration of non-blotched areas, whereas anthocyanins dominated the pigments of blotches. The transcriptome and qRT-PCR results showed that the enrichment of plant hormone signals, R2R3-MYB transcription

收稿 2024-05-13 修定 2024-09-20

资助 国家自然科学基金(32030095)、河南省农业科学院创新团队项目(2024TD36)和河南省农业科学院自主创新项目(2024ZC033)。

factors, and pigment synthesis pathway-related genes in the differential transcripts of blotches and non-blotches suggesting their possible involvement in the coloration process of ‘High Noon’ petals. Among them, *MYBs-SG7* and the flavonol synthase gene *FLS* exhibited pronounced expression patterns within non-blotches. Transient over-expression of *MYBs-SG7* in petunia petals specifically up-regulated the expression of *FLS*, further confirming the role of flavonols synthesis related genes in the coloration of non-blotched areas. These findings not only deepen our understanding of the molecular mechanisms governing coloration of the blotches in petals of tree peony, but also furnish invaluable insights for targeted color breeding programs, particularly those leveraging Southwest tree peony as a parental line.

**Key words:** *Paeonia × suffruticosa*; petal blotch; flavonoid; carotenoid; R2R3-MYB

牡丹(*Paeonia × suffruticosa*)是我国重要特色观赏花卉,花色丰富,花瓣基部含有色斑的品种(种)是其中一类重要的复色类型。色斑除了赋予牡丹很高的观赏价值外,也是识别牡丹品种亲本来源和品种分类的重要依据。牡丹野生种中,紫斑牡丹(*P. rockii*)以及一些滇牡丹[黄牡丹(*P. lutea*)、紫牡丹(*P. delavayi*)、狭叶牡丹(*P. potaninii*)]的花瓣具有色斑。栽培品种中,源于紫斑牡丹的后代一般都具有显著的色斑,比如西北牡丹品种和部分中原牡丹品种。一些源于滇牡丹的后代也具有色斑特征,比如一些欧美品种。关于牡丹色斑调控生理和分子机制的研究已有一些报道,但主要集中在紫斑牡丹及其后代(张晶晶等2006; Zhang等2007; Zhu等2023);而关于滇牡丹及其后代色斑呈色机制的研究还相对匮乏。

研究表明,影响牡丹花瓣呈色的主要色素包括花青苷、黄酮苷、黄酮醇苷以及类胡萝卜素等(张晶晶等2006; 杨琴等2015; Yang等2020; 邹红竹等2021),其中花青苷主要包括矢车菊素3-葡萄糖苷(cyanidin3-*O*-glucoside, Cy3G)、矢车菊素3,5-二葡萄糖苷(cyanidin 3,5-di-*O*-glucoside, Cy3G5G)、芍药花素3-葡萄糖苷(peonidin 3-*O*-glucoside, Pn3G)、芍药花素3,5-二葡萄糖苷(peonidin 3,5-di-*O*-glucoside, Pn3G5G)、天竺葵素3-葡萄糖苷(pelargonidin 3-*O*-glucoside, Pg3G)以及天竺葵素3,5-二葡萄糖苷(pelargonidin 3,5-di-*O*-glucoside, Pg3G5G)等6种(Wang等2004; 张晶晶等2006)。花青苷含量和成分在斑和非斑部位的差异是紫斑牡丹种群斑部呈色的主要原因;紫斑牡丹色斑中主要以Cy3G为主,而非斑部位则以Pn3G5G为主(张晶晶等2006; Zhang

等2007)。类胡萝卜素也是一些植物花瓣呈色的重要色素,呈色范围包括黄色、橙色至红色(张和臣等2023)。邹红竹等(2021)研究滇牡丹花瓣呈色机制发现,类胡萝卜素在其花瓣呈色过程中具有重要的补充作用。

由转录因子R2R3-MYB、bHLH、WD40构成的转录因子复合体(MBW)是调控植物花瓣呈色的重要分子模块,其中R2R3-MYB是该模块的核心因子(张和臣等2023),包括SG4、SG5、SG6以及SG20等亚家族成员。SG7成员虽然不参与MBW分子模块的形成,但其进化关系与SG4、SG20等成员较近;在拟南芥、矮牵牛中的研究表明,SG7主要调控黄酮醇的合成(Stracke 2010; Sheehan等2016)。在牡丹中研究R2R3-MYB基因分子功能表明,SG5成员*PrMYBa2*、*PsMYB114L*, SG6成员*PsMYB57*、*PsMYB58* (*PrMYBa3*), SG7成员*PrMYBa1*、*PsMYB12L*, 以及SG20成员*PsMYB2*等都参与了牡丹花瓣呈色调控,其中*PrMYBa1*、*PrMYBa2*、*PrMYBa3*等对紫斑牡丹的色斑形成具有重要调控作用(Zhang等2019, 2020, 2021, 2022; Zhu等2023)。

牡丹‘海黄’(*P. × suffruticosa* ‘High Noon’)是欧美种群的一个重要代表品种,属于滇牡丹的杂交后代,本研究以‘海黄’为材料,解析了其花瓣色斑呈现过程中的转录组和色素代谢特性。研究结果表明,黄酮醇和类胡萝卜素对非斑部位的黄色呈色起重要作用,黄酮醇起主要作用,而花青苷对色斑部位呈现红色起关键作用。色素合成相关酶基因在斑和非斑部位的表达变化是‘海黄’花瓣呈色的分子成因,其中酶基因*FLS*及调控基因*MYBs-SG7*则对非斑部位黄酮醇的合成起到了重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用试验材料为牡丹‘海黄’ (*Paeonia × suffruticosa* ‘High Noon’), 来源于河南省洛阳市农林科学院牡丹资源圃。4月中下旬分别采集3个不同花朵开放时期(S1~S3, 图1-A)的花瓣, 并将斑和非斑部位分别剪切、混匀, 液氮速冻后保存于-80°C冰箱备用。

### 1.2 色素鉴定

分别将‘海黄’3个时期花瓣的斑和非斑部位各500 mg混合样品用液氮研磨至粉末, 迅速放入含有水相(600  $\mu$ L甲醇、100  $\mu$ L无菌水)及有机相(700  $\mu$ L二氯甲烷)的2.0 mL离心管中震荡混匀, 21 130×g离心30 s。根据不同色素类型在水相和有机相中的溶解差异辨别成分, 其中类黄酮溶于水、类胡萝卜素或叶绿素溶于二氯甲烷(邹红竹等2021)。

### 1.3 色素和激素靶向代谢分析

所用样品的采集和处理方法参照第1.1、1.2节。类黄酮测试委托北京百迈客公司完成。测试完成后, 相关数据先进行归一化处理, 采取的方式是总峰面积归一化, 即每个样本代谢物除以该样本总峰面积。最后对检测到的代谢物进行定性和定量分析, 并对各组分差异倍数作对数( $\log_2$ )比较分析。

类胡萝卜素和激素代谢测定委托武汉迈特维尔生物科技有限公司完成。测试完成后将质谱数据进行色谱峰积分, 通过将积分峰面积代入标准曲线线性方程计算出样本含量。根据差异倍数Fold\_Change进行差异代谢物的筛选, 其中对照组(斑)和试验组(非斑)差异为2倍以上或0.5以下的确定为统计学差异。

### 1.4 转录组分析

用于转录组测序的样品与代谢组保持一致, 转录组测序委托北京百迈客公司进行。采用Illumina HiSeq高通量测序平台, 分别获得长链非编码RNA (LncRNA)、编码RNA (mRNA)、以及小RNA (miRNA)的原始数据(raw data)。为了更全面地获得并分析编码RNA表达特性, 分别对其进行了无参和有参(Lv等2020)分析。矫正拼接后的LncRNA、mRNA序列分别在COG、GO、KEGG、KOG、NR、

Pfam、Swiss-Prot、eggNOG等数据库中进行功能注释和聚类分析。FC (差异倍数, fold change)代表斑和非斑两类样品间基因(转录本)表达量的比值, 以 $FC \geq 2$ 作为差异标准, 表达水平存在统计学差异的称为差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)。miRNA原始数据去除接头及低质量序列后, 得到clean reads, 与牡丹参考基因组进行序列比对获取基因位置信息(mapped reads), 然后将比对得到的reads与miRBase (v22)数据库比对获取miRNA信息。

### 1.5 R2R3-MYB基因鉴定及分析

通过Blast检索获取牡丹基因组和‘海黄’转录组中类黄酮合成途径调控相关R2R3-MYB基因成员, 并对其编码的氨基酸序列通过MEGA11进行进化关系分析。拟南芥R2R3-MYB成员序列在数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中获得, 其他牡丹R2R3-MYB序列根据相关文献提供的NCBI序列号下载获得。差异表达的‘海黄’R2R3-MYB成员通过在差异转录本中检索获得。

### 1.6 荧光定量PCR

选取*CHS*、*FLS*等类黄酮合成酶基因及2个R2R3-MYB家族成员*MYBs-SG7*和*MYB96-like*进行荧光定量PCR (qRT-PCR)分析, 以确认转录组数据的可靠性。试验样本分别采取S1~S3三个时期, RNA提取采用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit试剂盒, cDNA合成采用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒, 荧光定量PCR试剂盒采用SYBR® Premix Ex Taq™ (宝生物工程有限公司, 大连)。以牡丹*Tublin*基因作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各基因的相对表达量, 每组试验设3个重复, 相关数据通过SPSS软件进行统计分析。荧光定量PCR引物见表1。

### 1.7 瞬时表达

为鉴定牡丹*MYBs-SG7*和*MYB96-like*基因的调控作用, 以矮牵牛‘W59 × axi’花瓣对其进行瞬时表达分析, 并以矮牵牛*AN2*作为阳性对照, 以空载体(EV)为阴性对照。侵染24 h后分别剪取侵染部位(检测基因、*AN2*和EV)材料用于分析类黄酮合成酶基因的表达变化。矮牵牛花瓣RNA提取采用宝生物工程有限公司的RNAiso Plus试剂盒, cDNA合

成和荧光定量PCR方法参照第1.6节, 矮牵牛内参基因选用*actin*, 所用引物见表1。

2 实验结果

2.1 ‘海黄’花瓣斑和非斑部位色素组成和含量差异分析

牡丹‘海黄’花瓣主色为黄色(非斑部位), 并在基部(斑部位)呈现明显的色斑特征。通过水相和有机相萃取花瓣不同呈色部位的色素, 结果表明, 黄色花瓣中既含有溶于水相(水溶性色素)的类黄酮, 也含有溶于有机相的(脂溶性色素)类胡萝卜素或叶绿素(图1-A)。类黄酮代谢物分析共检出339种, 其中斑与非斑部位差异代谢物167种, 含上调94种, 下调73种。显著上调的色素主要是黄酮醇苷和黄酮苷类, 而显著下调的色素主要是花青苷。与非斑中的含量相比, 斑中含有较高的矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷、芍药花素-3-葡萄糖苷、芍药花素-3,5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3,5-二阿拉伯糖苷。黄酮苷和黄酮醇苷在非斑部位的含量较大, 包括木犀草苷、报春黄苷、异野漆树苷、木犀草素、芹菜素、金合欢素等(图1-B)。类胡萝卜素靶向代谢物分析

共检出32种物质, 其中玉米黄质平均达到2.78  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (斑, 鲜重)和3.19  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (非斑, 鲜重)、黄体素平均达到8.55  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (斑, 鲜重)和4.58  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (非斑, 鲜重), 但在斑和非斑部位无统计学差异。八氢番茄红素、紫黄质二油酸酯、紫黄质-肉豆蔻酸酯-油酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯等在非斑部位含量明显较高, 与斑中的含量相比差异明显, 说明它们对非斑部位黄色呈现也起到了作用(图1-C)。

综上, ‘海黄’花瓣色素组成和含量在斑和非斑部位的差异与呈色具有典型的一致性, 即黄色花色表型主要是黄酮醇苷和类胡萝卜素共同作用的结果; 而色斑形成的关键色素是花青苷, 类胡萝卜素则起到了助色作用。

2.2 花瓣斑和非斑部位转录及激素代谢差异

对‘海黄’花瓣斑和非斑部位进行转录组测序分析, 共有1 369个编码基因转录本出现差异性表达, 含上调557个、下调812个(图2-A)。由于斑和非斑部位分别处于牡丹花瓣的基部和外围, 两个部位的细胞所处的位置信息不同, 细胞大小、细胞类型也存在很大差异, 因此与细胞生长、分化、代谢等相关的差异基因富集较多, 其中与激素合成或代谢相关的差异转录本达37个。参与类黄酮合

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

| 物种来源 | 目标基因              | 正向引物序列(5'→3')            | 反向引物序列(5'→3')            |
|------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| 牡丹   | <i>CHS</i>        | TTCTTTAGTCGGTCAGGCG      | CAAGTGTCATCAATCGCA       |
|      | <i>F3'H</i>       | TGAGTTGTTGCCGTTTGG       | CCCTTCACATTACCAGCCA      |
|      | <i>DFR</i>        | TGCTGAAACCGTGTGTGTC      | AGGGTCAAATGGGTATCCG      |
|      | <i>FLS</i>        | CATTGCTTCCAAC TCAAAGG    | CCACCATCAAACGAATCATC     |
|      | <i>MYB96-like</i> | TTGCGAGGCTTTGTCCTT       | TCTGAGTTGGTTTGGGCTG      |
|      | <i>MYBs-SG7</i>   | AACCTACAACCGCCTCACAC     | CCAACATTCCACCACCTTG      |
|      | <i>Tublin</i>     | TGATGTTGTGCGAAAGGAG      | ATCTGTTGGGTGAGTTCCG      |
| 矮牵牛  | <i>CHSa</i>       | CAACTAGTGGTGTGGACATGCC   | CACCAGCAAAGCAACCTTGTT    |
|      | <i>F3H</i>        | CTGGTGGAAGAAAGGTGGATT    | GAGTAGTCTCTTGCCCTTGTTGG  |
|      | <i>F3'H</i>       | AGCTGGACGTAGGATTTGTG     | ATGGATCAGCCCCTTGTAAG     |
|      | <i>DFR</i>        | CTCCTTGACAGCCTTGAATGG    | CAACTAGTGGTGTGGACATGCC   |
|      | <i>ANS</i>        | TCTTCCATTGTGCTTTCCCTG    | GTTGCTGGAGTGTAGTCAGTAG   |
|      | <i>FLS</i>        | AAGGAAGTGGAAGGCAAGAAAGG  | TCAAGCCCAAGCCCAAGAGA     |
|      | <i>ANR</i>        | TCTGGACGATACATTTGCTCTGC  | AAACCCGTAGGAACATCTGAAGC  |
|      | <i>5GT</i>        | CCAGTTGTGGCATTTCCTC      | CCTTTCTCTCTCCATCCATTA    |
|      | <i>actin</i>      | AGCCAACAGAGAGAAGATGACCCA | ACACCATCACCAGAGTCCAACACA |

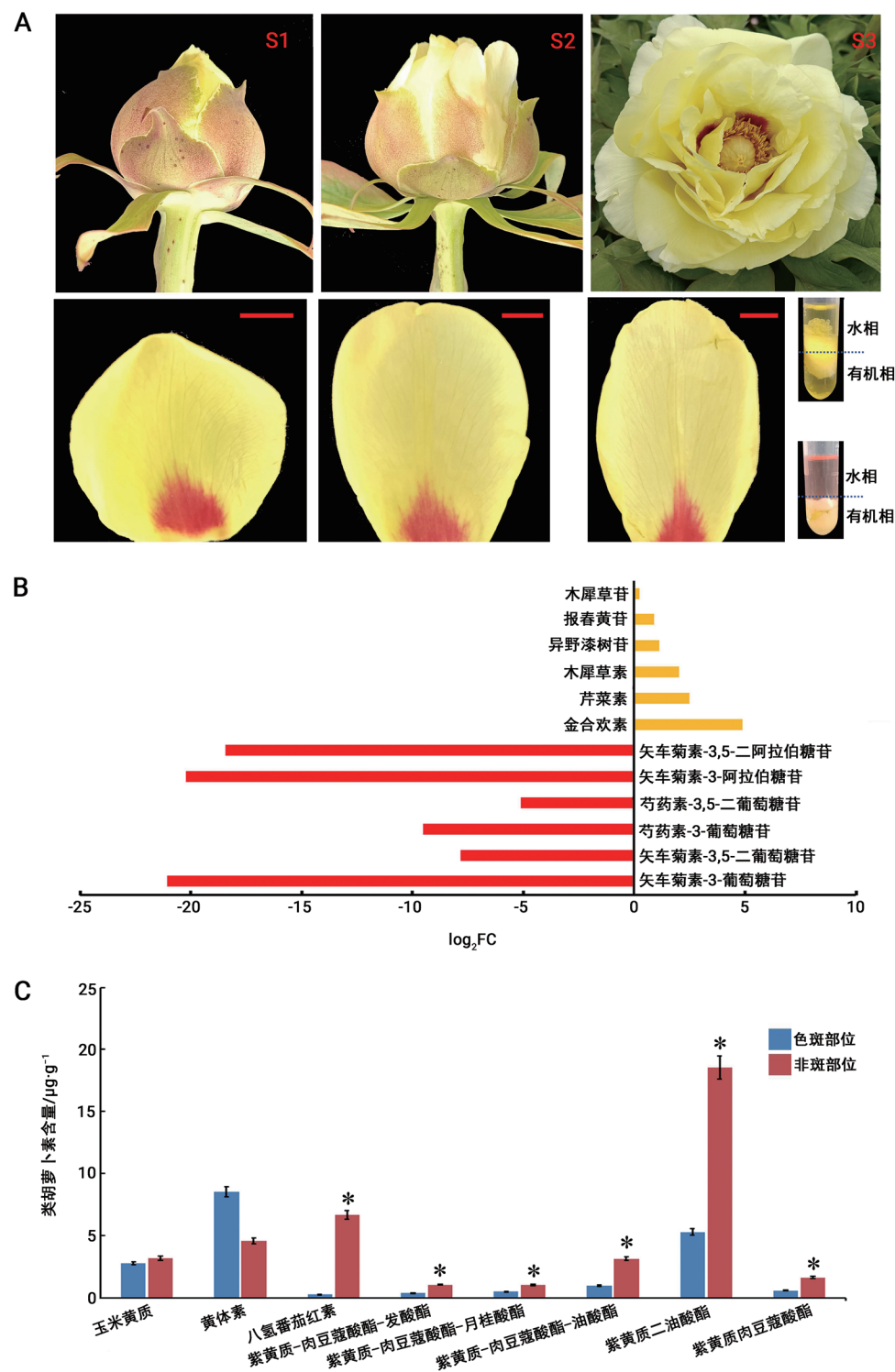


图1 牡丹‘海黄’花瓣呈色表型及色素含量分析

Fig. 1 Analysis of the color phenotype and pigment content in petals of tree peony ‘High Noon’

A: ‘海黄’花瓣呈色表型及色素类别鉴定(S1~S3代表花瓣不同发育时期, 图5同此); B: ‘海黄’斑和非斑部位类黄酮含量差异分析; C: 斑和非斑部位类胡萝卜素含量差异分析, 星号(\*)代表斑和非斑部位0.05水平下的统计学差异, 图5和6同此。

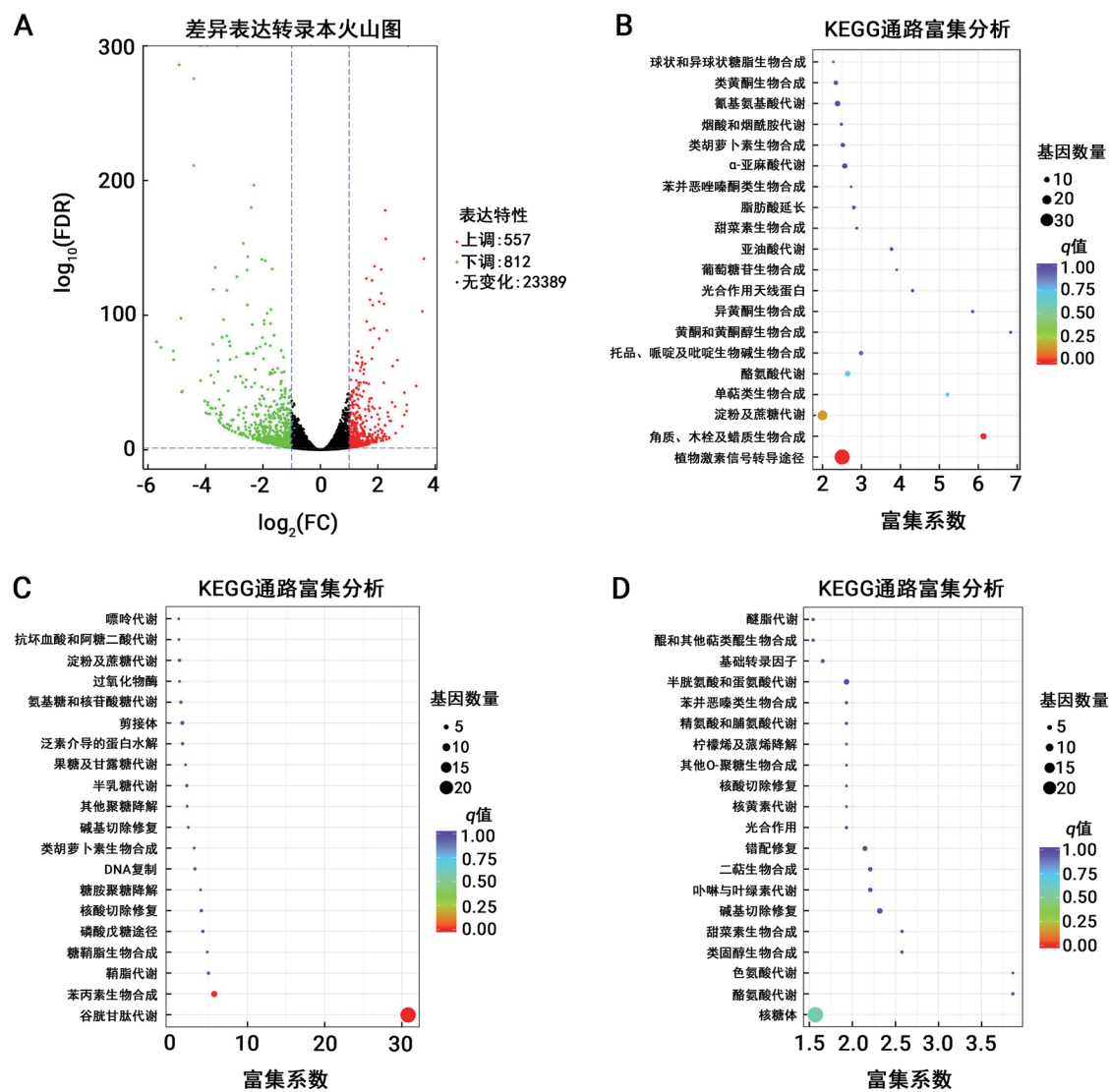


图2 ‘海黄’花瓣斑和非斑部位差异性表达转录本分析

Fig. 2 Transcriptome analysis of differential expression between the blotches and non-blotches of ‘High Noon’ petals

A: 差异表达编码基因火山图; B: 差异表达编码基因KEGG代谢通路富集分析; C: 差异表达LncRNA调控的靶基因富集分析; D: 差异表达miRNA调控的靶基因富集分析。

成的基因成员也富集较多,说明它们在‘海黄’花瓣色斑形成中可能起着重要作用(图2-B)。对获得的LncRNA进行分析,具有差异性表达的共108个(含上调66个、下调42个);LncRNA靶基因中,参与苯丙氨酸合成及谷胱甘肽代谢相关的成员富集较多。苯丙氨酸是类黄酮合成途径的前体物质,其在细胞中的积累直接关系到下游类黄酮的合成,因此

苯丙氨酸合成相关LncRNA的富集意味着其可能参与了类黄酮相关代谢物的调控过程(图2-C)。对获得的miRNA进行分析,共有59个差异表达成员,其中上调21个、下调38个,富集最多的miRNA靶基因主要与核糖体相关,但与类黄酮、激素信号或发育过程等相关的靶基因并没有富集(图2-D)。

由于参与激素合成或代谢的差异基因富集较

多, 因此我们进一步对‘海黄’花瓣斑和非斑部位的激素成分和含量进行了靶向代谢物分析, 共发现88种激素相关代谢物, 其中21种激素成分在斑和非斑部位有含量差异。生长素(indole-3-acetic acid, IAA)、细胞分裂素(BAP9G)、赤霉素(GA<sub>20</sub>)等成分在非斑部位含量明显较高, 而茉莉酸(JA)在斑中含量较高(表2)。激素代谢分析结果与转录组结果具有相关性, 说明激素及激素信号参与了‘海黄’花瓣斑和非斑部位细胞内生理活动的调控过程, 但其是否参与了‘海黄’花瓣中不同部位色素的合成调控还需要更多的生物学证据。

2.3 类黄酮和类胡萝卜素合成酶基因转录分析

类黄酮和类胡萝卜素合成酶基因在细胞内的表达强度和表达方式决定着色素成分和含量。为

此, 我们对‘海黄’花瓣斑和非斑部位相关酶基因的转录本进行了分析。结果表明, 类黄酮合成酶基因 *CHS* (psu.T.00009935.1)、*FLS* (psu.G.00021401.1) 在‘海黄’花瓣非斑部位中明显上调、而 *F3'H* (psu.T.00031891.1) 和类黄酮转运蛋白编码基因 *MATE* (psu.T.00029621.1) 则出现下调(图3-A)。由于 *FLS* 是黄酮醇合成途径中的关键酶基因, 黄酮醇相关代谢物的主要呈色特征是黄色, 因此 *FLS* 基因在非斑部位的优势表达可能是‘海黄’花瓣非斑部位呈现黄色的一个重要原因。花青苷合成途径关键基因 *DFR*、*ANS* 等表达没有检测到明显差异, 可能与转录组测序采用S1~S3三个时期的混合材料有关。类胡萝卜素合成途径出现差异表达的基因成员包括 *VDE* (psu.T.00002166.1)、*NCED* (psu.T.00020912.1、

表2 牡丹‘海黄’花瓣斑和非斑部位部分激素含量及差异特性  
Table 2 The content and differential characteristics of some hormones in the blotches and non-blotches of peony ‘High Noon’

| 指标               | 物质名称                                | 激素类型  | 激素含量/mg·g <sup>-1</sup> |        | 特性 |
|------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------|--------|----|
|                  |                                     |       | 斑                       | 非斑     |    |
| TRA              | 色胺                                  | 生长素   | 0.308                   | 7.612  | 上调 |
| IAA-Asp          | 吲哚乙酸-天冬氨酸                           | 生长素   | 1.050                   | 0      | 下调 |
| IA               | 吲哚-3-丙烯酸                            | 生长素   | 0                       | 1.642  | 上调 |
| OxIAA            | 氧化吲哚乙酸                              | 生长素   | 4.318                   | 9.248  | 上调 |
| IAA              | 吲哚-3-乙酸                             | 生长素   | 5.658                   | 12.840 | 上调 |
| 2MeScZR          | 2-甲硫基顺式玉米素核苷                        | 细胞分裂素 | 0.049                   | 0.145  | 上调 |
| iP               | N <sup>6</sup> -异戊烯腺嘌呤              | 细胞分裂素 | 0.021                   | 0.009  | 下调 |
| tZOG             | 反式-玉米素-O-β-葡萄糖苷                     | 细胞分裂素 | 2.066                   | 5.024  | 上调 |
| DHZR             | 双氢玉米素核苷                             | 细胞分裂素 | 0.076                   | 0.272  | 上调 |
| tZR              | 反式-玉米素核苷                            | 细胞分裂素 | 0.570                   | 1.368  | 上调 |
| DHZ7G            | 双氢玉米素-7-糖苷                          | 细胞分裂素 | 0.049                   | 0      | 下调 |
| iP7G             | 异戊烯腺嘌呤-7-葡萄糖苷                       | 细胞分裂素 | 0                       | 0.574  | 上调 |
| BAP9G            | 6-苄氨基-9-(A-D-吡喃葡萄糖基)嘌呤              | 细胞分裂素 | 0                       | 0.103  | 上调 |
| pT9G             | 4-[(9-β-D-吡喃葡萄糖基-9H-嘌呤-6-基)氨基]甲基}苯酚 | 细胞分裂素 | 0                       | 0.649  | 上调 |
| GA <sub>20</sub> | 赤霉素20                               | 赤霉素   | 0                       | 1.443  | 上调 |
| OPC-4            | 氧化戊烯基环戊烷丁酸                          | 茉莉酸   | 0                       | 27.793 | 上调 |
| OPDA             | 12-O-植物二烯酸                          | 茉莉酸   | 2.060                   | 0.656  | 下调 |
| JA-ILE           | 茉莉酸-异亮氨酸                            | 茉莉酸   | 0.042                   | 0.014  | 下调 |
| JA-Phe           | 茉莉酸-苯丙氨酸                            | 茉莉酸   | 0.048                   | 0.152  | 上调 |
| MeJA             | 茉莉酸甲酯                               | 茉莉酸   | 0                       | 0.673  | 上调 |
| JA               | 茉莉酸                                 | 茉莉酸   | 4.302                   | 1.474  | 下调 |

激素含量为2个试验重复的平均值。

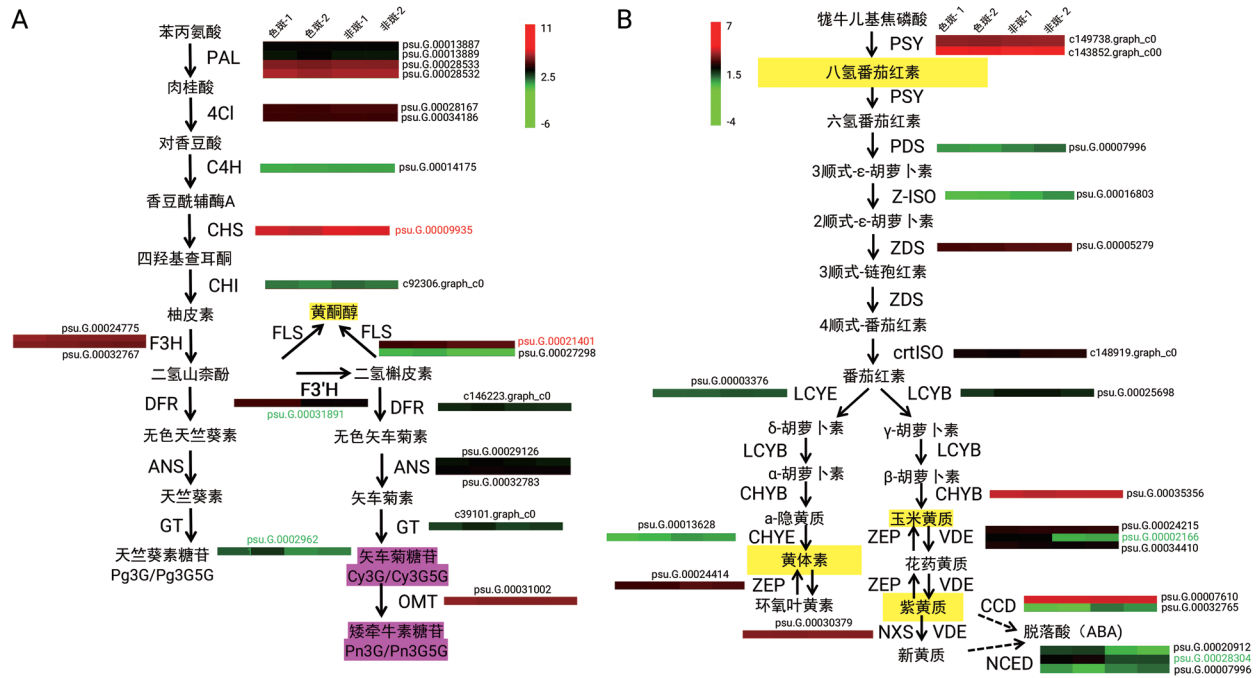


图3 类黄酮(A)及类胡萝卜素(B)合成通路相关基因在‘海黄’花瓣斑和非斑部位的表达特性

Fig. 3 Expression pattern of flavonoid (A) and carotenoid (B) synthesis pathway genes in the blotches and non-blotches of ‘High Noon’ petals

绿色至红色代表基因表达的强度愈来愈强, 绿色字体代表该基因在非斑部位的表达下调, 红色字体代表该基因在非斑部位表达上调。

psu.T.00028304.1), 两种类型基因在非斑部位的表达都出现下调。其中, *NCED*是参与类胡萝卜素代谢过程的关键基因, 两个转录本显著下调可能阻碍了紫黄质的降解, 促进了其在非斑部位的积累(图3-B)。因此, 色素合成途径关键节点基因的差异性表达是‘海黄’花瓣斑和非斑部位黄酮醇和类胡萝卜素等色素含量出现差异的重要原因, 也是色斑呈现的重要分子基础。

#### 2.4 类黄酮调控相关转录因子表达分析

R2R3-MYB是植物中存在的一类重要转录因子, 在类黄酮合成调控中起着重要作用, 主要包括SG4、SG5、SG6、SG7、SG20等亚家族成员。为此, 我们鉴定了牡丹基因组中类黄酮合成调控相关的R2R3-MYB成员, 以及‘海黄’转录组中具有差异性表达的R2R3-MYB转录本(图4-A)。其中, ‘海黄’转录组中的c144415.graph\_c0属于SG20分枝, 在非斑部位有微弱表达优势; c127652.graph\_c0属

于SG7分枝, 在非斑部位具有较强表达优势; 而属于SG4分支的psu.G.00023803、psu.G.00022074, 以及属于SG5分支的psu.G.00029217在斑和非斑部位的表达无明显差异; SG6分枝的psu.G.00033069、psu.G.00007535在斑和非斑部位都没有鉴定到转录本。另外, 我们在‘海黄’转录组中鉴定了一个R2R3-MYB转录本c135648.graph\_c0, 其在非斑部位具有明显的优势表达特性(图4-B)。在拟南芥基因组中blast检索分析c135648.graph\_c0编码基因, 发现其与拟南芥*AtMYB96*基因高度同源。

除了以上R2R3-MYB成员, 我们对MBW分子模块中的bHLH、WD40等同源基因的转录特性进行了分析, 发现bHLH (*AN1-like*)同源基因psu.G.00012090以及WD40 (*AN11-like*)同源基因psu.G.00022979、psu.G.00003102、psu.G.00021057在‘海黄’花瓣斑和非斑部位都有表达, 但无明显差异(图4-B)。

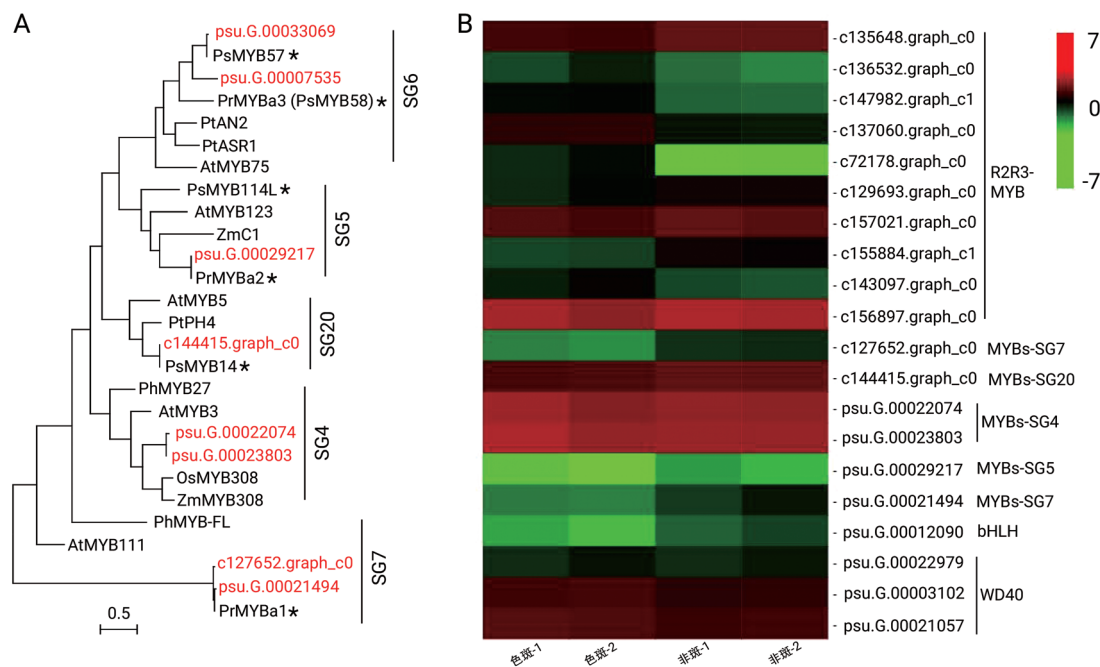


图4 ‘海黄’类黄酮调控相关基因鉴定和表达分析

Fig. 4 Identification and expression analysis of genes related to the regulation of flavonoids in ‘High Noon’  
A: 类黄酮合成调控R2R3-MYB基因成员鉴定及进化分析; B: ‘海黄’斑和非斑部位差异表达的R2R3-MYB及MBW分子模块相关成员表达特性。红色字体所述基因代表本研究鉴定的R2R3-MYB成员, 星号(\*)标记的基因代表其他研究鉴定到的牡丹R2R3-MYB成员。

2.5 荧光定量PCR验证相关基因表达特性

对*CHS*、*F3'H*、*DFR*、*FLS*、*MYB96-like*、*MYBs-SG7*等6个基因在‘海黄’花瓣中的表达特性进行荧光定量PCR分析(图5)。结果表明, *CHS*和*FLS*基因在S1~S3三个时期非斑部位都出现优势表达特性, 但随着花瓣发育其表达量逐渐下降。*F3'H*在S1~S3时期的色斑部位有优势表达特性。*DFR*在S1时期的色斑部位显著表达, 而在S3时期的斑和非斑部位表达量显著降低, 并且表达差异不再明显, 该结果也解释了S1~S3混合材料的*DFR*基因转录本无明显差异的原因。*MYB96-like*和*MYBs-SG7*基因在S1~S3三个时期的非斑部位都有优势表达。以上基因在不同花瓣发育时期的斑和非斑部位的表达特性与‘海黄’花瓣的呈色表型具有一定相关性; 即*CHS*、*FLS*基因和*MYBs-SG7*基因的优势表达与花瓣黄色表型相关, 而*DFR*和*F3'H*基因在‘海黄’花瓣斑部的优势表达则对花青苷的积累起着重要作用。

2.6 *MYBs-SG7*基因参与黄酮醇合成途径的调控

研究表明, R2R3-MYB家族SG7成员是调控以*FLS*为核心的黄酮醇合成的关键转录因子(Sheehan等2016)。以上转录组和荧光定量PCR分析均证实牡丹*MYBs-SG7*与*FLS*基因的表达趋势一致, 并在非斑部位具有优势表达特性, 说明*MYBs-SG7*可能参与调控了以*FLS*基因为核心的黄酮醇合成过程。为了进一步证实牡丹*MYBs-SG7*基因的分子调控功能, 我们以矮牵牛‘W59 × axi’花瓣侵染对其进行瞬时超表达分析, 研究其对类黄酮合成相关酶基因的调控特性(图6-A)。结果表明, 尽管*MYBs-SG7*不能诱导矮牵牛花瓣侵染部位呈现明显的呈色表型; 但是与空载体对照相比, 矮牵牛花瓣中(侵染部位)类黄酮合成酶基因*CHSa*、*F3H*、*F3'H*以及黄酮醇合成途径关键基因*FLS*的表达都出现显著上调。相应的, 花青苷合成途径关键基因*DFR*和*ANS*却没有明显变化。矮牵牛*AN2*基因作为侵染阳性对照,

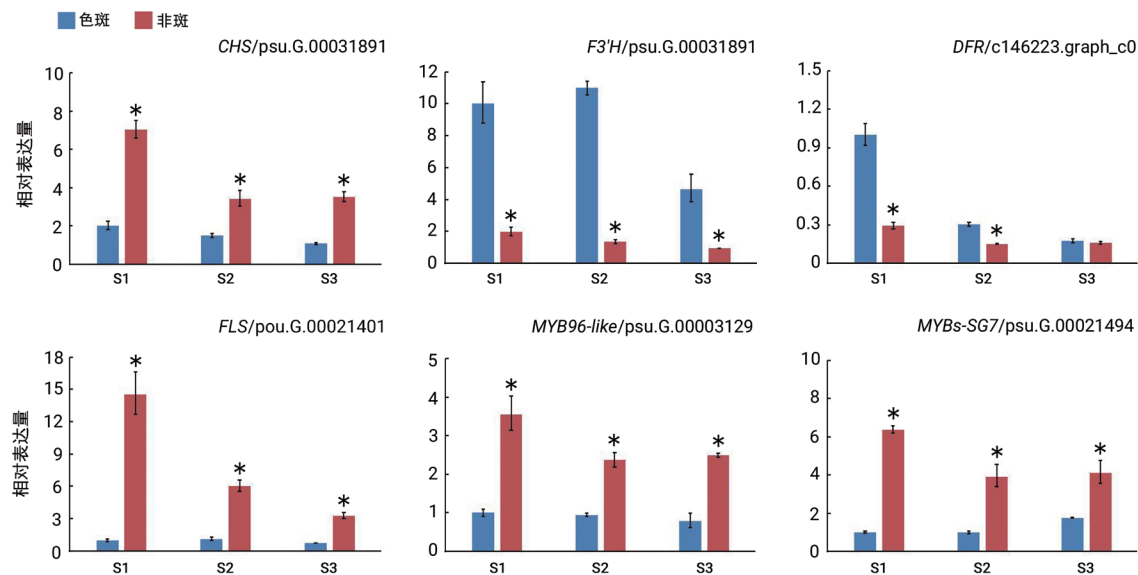


图5 qRT-PCR验证色素合成和调控相关基因表达特性

Fig. 5 Confirmation of the expression characteristics of pigment synthesis and regulation related genes by using qRT-PCR method

其瞬时表达后可以显著诱导花瓣侵染部位出现呈色表型, *DFR*和*ANS*等酶基因在侵染部位也受到强烈上调表达变化。我们对‘海黄’*MYB96-like*基因也进行了侵染分析(图6-B), 发现其可以诱导矮牵牛花瓣侵染部位呈现微弱的黄色表型, 但除了*F3'H*有微弱上调变化, 其他类黄酮合成酶基因的表达都没有明显差异, 说明*MYB96-like*对矮牵牛花瓣侵染出现的黄色表型并不是源于类黄酮的积累。

### 3 讨论

西南牡丹品种群花色变异非常丰富, 同一居群内就有黄、橙、红、紫等各种类型花色(邹红竹等2021)。西南牡丹是欧美品种群的重要亲本, 也是牡丹花瓣呈现黄色、红色、橙色等性状的重要基因来源。与西北牡丹品种群花瓣呈色特征类似, 部分西南牡丹及杂交后代的花瓣基部也具有色斑。牡丹‘海黄’是欧美品种群的重要代表性品种, 其亲本之一为紫牡丹, 花瓣主色为黄色, 并在基部有红色色斑。代谢组分析表明, ‘海黄’花瓣色斑呈色主要源于花青苷的积累。有研究表明, 西北牡丹花瓣中的花青苷成分包含Cy3G、Cy3G5G、Pn3G和Pn3-G5G等类型, 色斑呈现的主要原因是4种花青

苷在斑和非斑中的含量差异(Wang等2004; Zhang等2007)。牡丹‘海黄’花瓣色斑部位除了含有以上4种花青苷, 矢车菊素阿拉伯糖苷在斑中的含量较高, 其对色斑的形成可能也起到了重要作用。‘海黄’花瓣色斑中花青苷成分的另外一个特征是单糖型的花青苷含量较高, 说明一些酶基因的表达强度或酶活偏好性对花青苷的合成有重要影响。‘海黄’花瓣非斑部位积累的色素主要包括黄酮醇苷、黄酮苷及类胡萝卜素, 这些色素的共同作用决定其呈黄色表型。基因表达分析表明, 黄酮醇合成关键酶基因*FLS*在非斑部位具有明显表达优势, 证实*FLS*对黄酮醇类色素的积累起到了关键作用。*ANS*是花青苷合成分枝的关键酶基因, 其与*FLS*基因之间的竞争决定了类黄酮的合成方式。本研究中所分析的*ANS*转录本在‘海黄’花瓣中表达较弱, 推测该基因主要在花瓣发育的早期表达。后续研究中, 可以在‘海黄’花瓣中瞬时表达*FLS*或*ANS*, 解析两个基因对类黄酮合成方式的影响。另外, 本研究发现类胡萝卜素合成酶基因的表达变化对决定斑和非斑部位的类胡萝卜素种类和含量起着关键作用。*VDE*、*NCED*等类胡萝卜素代谢基因在非斑部位的表达下调, 是非斑部位中八氢番茄红素、紫黄质

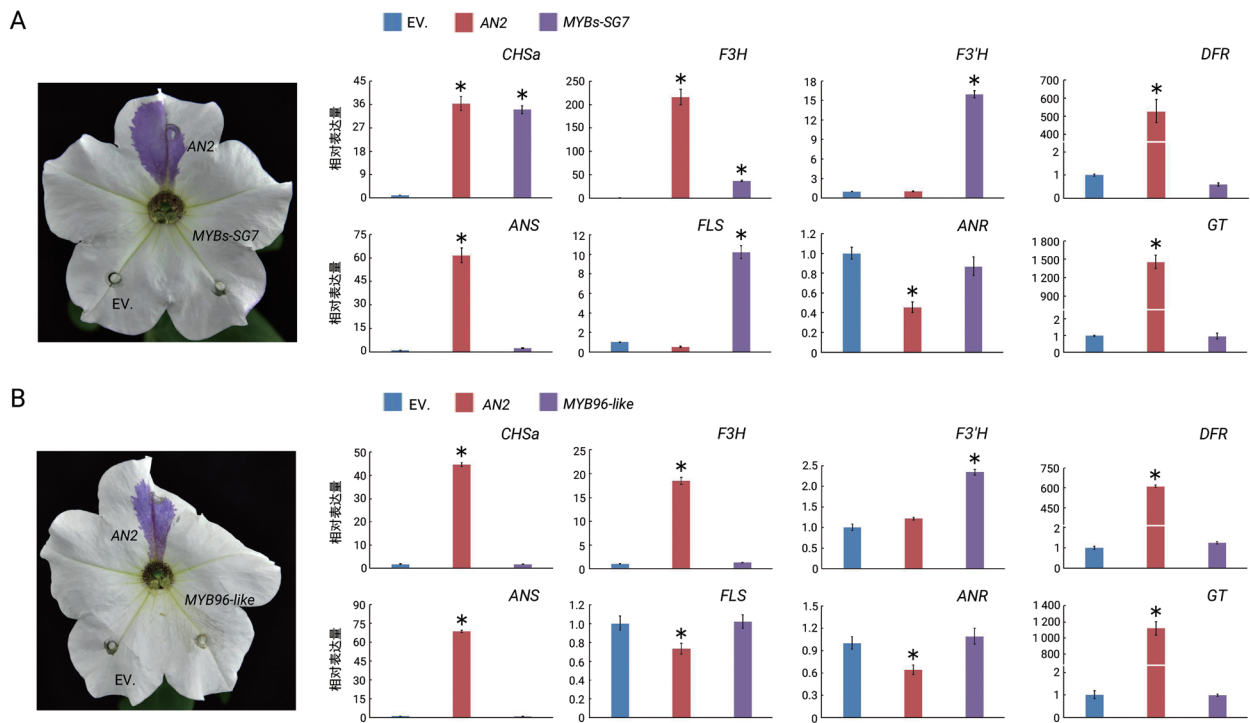


图6 矮牵牛花瓣瞬时表达鉴定MYBs-SG7和MYB96-like基因的分子调控功能  
Fig. 6 Identification of molecular regulatory functions of MYBs-SG7 and MYB96-like genes through transient expression in petunia petals

A: 矮牵牛花瓣瞬时侵染MYBs-SG7基因的呈色表型及荧光定量PCR鉴定其对类黄酮合成酶基因的诱导特性; B: 矮牵牛花瓣瞬时侵染MYB96-like基因的呈色表型及荧光定量PCR鉴定其对类黄酮合成酶基因的诱导特性。其中, 空载体(EV)作阴性对照, 矮牵牛AN2作为阳性对照。

二油酸酯、紫黄质-肉豆蔻酸酯-油酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯等成分含量较高的主要原因。因此, 牡丹‘海黄’花瓣呈色机制复杂而精妙, 涉及多种色素的协同作用, 非斑部位黄酮醇苷起主色作用而类胡萝卜素起助色作用, 斑部位花青苷起主色作用而类胡萝卜素起助色作用。

R2R3-MYB家族SG4、SG5、SG6、SG7、SG20分枝成员是参与调控类黄酮合成的重要因子, 其中SG4、SG5、SG6、SG20可与bHLH和WD40蛋白互作, 参与形成MBW分子模块。研究表明, 紫斑牡丹的花瓣呈色模式由R2R3-MYB亚家族各基因的协同表达方式和MBW分子模块形成方式决定, 属于SG7分枝成员PrMYBa1主要调控类黄酮合成早期酶基因(EBG) *PrF3H*, SG6分枝成员PrMYBa3可通过形成MBW分子模块调控晚期酶基因(LBG)

*PrDFR*和*PrANS*, 而SG5成员PrMYBa2可与PrbHLH作用, 激活斑内花青苷合成途径(Zhu等2023)。本研究在‘海黄’中鉴定发现SG7成员c127652.graph\_c0与PrMYBa1同源, 在非斑部位具有一定表达优势, 矮牵牛花瓣瞬时表达结果表明MYBs-SG7 (c12-7652.graph\_c0)除了诱导*F3H*基因表达上调, 还可以显著诱导早期酶基因*CHS*、*F3'H*以及黄酮醇合成途径关键酶基因*FLS*的表达。该结果与‘海黄’花瓣非斑部位优势积累黄酮醇苷的结果一致, 说明MYBs-SG7对‘海黄’非斑部位的呈色具有重要贡献。SG6分枝成员及MBW分子模块主要决定花青苷合成途径的调控, 牡丹中鉴定发现的SG6成员包括*PsMYB57*和*PsMYB58* (*PrMYBa3*) (Zhang等2020, 2021; Zhu等2023); 本研究中没有发现SG6成员转录本, 可能源于该基因的表达主要在花瓣发育的

早期。由于SG7成员不与bHLH和WD40蛋白互作, 独立于MBW分子模块行使调控作用, 因此‘海黄’花瓣中SG6成员及MBW模块如何参与色斑的调控还需要后续深入研究。有意思的是, 本研究还发现了一个与拟南芥MYB96同源的基因MYB96-like (c135648.graph\_c0)在非斑部位具有显著表达特征。拟南芥MYB96的主要作用是募集HDA15蛋白并抑制ABA信号的转导(Lee和Seo 2019)。由于‘海黄’斑和非斑部位ABA含量没有明显差异, 表明牡丹MYB96-like与ABA信号之间并没有直接关系。在矮牵牛花瓣瞬时表达MYB96-like基因可以诱导侵染部位呈现微弱黄色表型, 但荧光定量PCR分析表明MYB96-like基因并不能上调类黄酮酶基因的表达。因此, 关于牡丹MYB96-like是否或如何介导色素调控仍需要后续详细研究。转录组和激素靶向代谢分析发现生长素、赤霉素、细胞分裂素等成分在非斑部位的含量明显较高, 而茉莉酸含量较低; 与激素信号相关的差异表达转录本也富集较多。已有研究表明, 生长素、茉莉酸等激素信号对类黄酮的合成具有重要调控作用(Lewis等2011; Qi等2011; Naik等2022), 意味着‘海黄’花瓣的呈色过程与激素信号也可能具有相关性。

总之, 本研究解析了‘海黄’花瓣色斑和非斑部位的代谢组和转录组差异, 鉴定发现黄酮醇类及类胡萝卜素是非斑部位的主要色素; 酶基因FLS及调控基因MYBs-SG7在非斑部位的优势表达决定了非斑部位黄酮醇的积累, 而酶基因VDE和NCED的差异表达则影响了非斑部位类胡萝卜素的种类和含量。本研究基本阐明了西南牡丹和西北牡丹杂交后代在色斑呈现上的共性机制, 也发现了一些差异特征。研究结果为以西南牡丹为亲本开展花色定向育种奠定了重要理论基础。

### 参考文献(References)

- Lee HG, Seo PJ (2019). MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 10 (1): 1713
- Lewis DR, Ramirez MV, Miller ND, et al (2011). Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiol*, 156 (1): 144–164
- lv S, Cheng S, Wang Z, et al (2020). Draft genome of the famous ornamental plant *Paeonia suffruticosa*. *Ecol Evol*, 10 (11): 4518–4530
- Naik J, Misra P, Trivedi PK, et al (2022). Molecular components associated with the regulation of flavonoid biosynthesis. *Plant Sci*, 317: 111196
- Qi T, Song S, Ren Q, et al (2011). The jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23 (5): 1795–1814
- Sheehan H, Moser M, Klahre U, et al (2016). MYB-FL controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nat Genet*, 48 (2): 159–166
- Stracke R, Jahns O, Keck M, et al (2010). Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation. *New Phytol*, 188 (4): 985–1000
- Wang LS, Hashimoto F, Shiraishi A, et al (2004). Chemical taxonomy of the Xibei tree peony from China by floral pigmentation. *J Plant Res*, 117 (1): 47–55
- Yang Q, Yuan T, Sun XB (2015). Preliminary studies on the changes of flower color during the flowering period in two tree peony cultivars. *Acta Horti Sin*, 42 (5): 930–938 (in Chinese with English abstract) [杨琴, 袁涛, 孙湘滨(2015). 两个牡丹品种开花过程中花色变化的研究. *园艺学报*, 42 (5): 930–938]
- Yang Y, Sun M, Li S, et al (2020). Germplasm resources and genetic breeding of *Paeonia*: a systematic review. *Hortic Res*, 7: 107
- Zhang HC, Yuan X, Gao J, et al (2023). Mechanism of flower petal coloration and molecular breeding. *Biotechnol Bull*, 39 (5): 23–31 (in Chinese with English abstract) [张和臣, 袁欣, 高杰等(2023). 植物花瓣呈色机理及花色分子育种. *生物技术通报*, 39 (5): 23–31]
- Zhang JJ, Wang LS, Liu ZA, et al (2006). Recent advances in flower color research of tree peony. *Acta Horti Sin*, 33 (6): 1383–1388 (in Chinese with English abstract) [张晶晶, 王亮生, 刘政安等(2006). 牡丹花色研究进展. *园艺学报*, 33 (6): 1383–1388]
- Zhang J, Wang L, Shu Q, et al (2007). Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Sci Horti*, 114 (2): 104–111
- Zhang L, Yan L, Zhang C, et al (2022). Glucose supply induces PsMYB2-mediated anthocyanin accumulation in *Paeonia suffruticosa* ‘Tai Yang’ cut flower. *Front Plant Sci*, 13: 874526

- Zhang X, Xu Z, Yu X, et al (2019). Identification of two novel R2R3-MYB transcription factors, *PsMYB114L* and *PsMYB12L*, related to anthocyanin biosynthesis in *Paeonia suffruticosa*. *Int J Mol Sci*, 20 (5): 1055
- Zhang Y, Xu S, Cheng Y, et al (2020). Functional identification of *PsMYB57* involved in anthocyanin regulation of tree peony. *BMC Genet*, 21 (1): 124
- Zhang Y, Xu S, Ma H, et al (2021). The R2R3-MYB gene *PsMYB58* positively regulates anthocyanin biosynthesis in tree peony flowers. *Plant Physiol Biochem*, 164: 279–288
- Zhu J, Wang Y, Wang Q, et al (2023). The combination of DNA methylation and positive regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB and bHLH transcription factors contributes to the petal blotch formation in Xibei tree peony. *Hortic Res*, 10: uhad100
- Zou HL, Zhou L, Han LL, et al (2021). Changes of carotenoid components and expression of the related genes during petal coloring of *Paeonia delavayi*. *Acta Horti Sin*, 48 (10): 1934–1944 (in Chinese with English abstract) [邹红竹, 周琳, 韩璐璐等(2021). 滇牡丹花瓣着色过程中类胡萝卜素成分变化和相关基因表达分析. *园艺学报*, 48 (10): 1934–1944]