



牡丹叶片红色消退过程中色素变化 及相关基因表达分析

段晶晶, 罗建让*, 李 想, 张庆雨, 张延龙

(西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: 该研究以牡丹品种‘满园春光’的叶片为材料, 测定不同叶色时期叶片中黄酮醇、花青素、原花青素、叶绿素和类胡萝卜素含量, 利用 RHSCC 和色差仪测定牡丹叶片红色消退过程中不同时期的叶色表型, 采用 qRT-PCR 测定不同时期叶片中类黄酮合成相关基因的表达, 并分析叶片色素与类黄酮合成相关基因表达之间的关系, 以揭示牡丹春季叶片红色消退的潜在原因, 为牡丹春季叶片红色消退分子调控机制的研究提供基因资源。结果表明: (1) 随着牡丹叶片发育, 紫红色消失, 黄绿色逐渐形成, 并且叶正面和叶背面呈现出两种不同的颜色变化。其中, 叶背面的 RHSCC 值、L*、a* 值要高于叶正面, 而 b*、C* 值则低于叶正面。 (2) 牡丹红叶期叶片中富含花青素和原花青素, 而非红叶期叶片中富含黄酮醇、叶绿素和类胡萝卜素。 (3) 结构基因 *PsDFR* 和 *PsANS* 表达量与花青素含量变化趋势一致, 而 *PsFLS* 和 *PsANR* 基因表达量分别与黄酮醇含量、原花青素含量变化一致。 (4) 转录因子基因 *PsMYB113* 表达量与花青素含量呈显著正相关关系, *PsMYB4* 表达量与花青素含量呈显著负相关关系, *PsMYBF1* 表达量与黄酮醇含量呈显著正相关关系。研究发现, 花青素合成减少是牡丹春季叶片紫红色褪去的主要原因; 牡丹叶片花青素合成减少是 *PsDFR*、*PsANS*、*PsFLS* 等结构基因协同表达的结果, 而 *PsMYB113*、*PsMYB4*、*PsMYBF1* 可能是调控这些结构基因表达的重要转录因子。

关键词: 牡丹; 叶片; 色素; 结构基因; 转录因子

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

Analysis of Pigment Changes and Related Gene Expression during the Red Faded of Tree Peony Leaves in Spring

DUAN Jingjing, LUO Jianrang*, LI Xiang, ZHANG Qingyu, ZHANG Yanlong

(College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: We used leaves of tree peony ‘Manyuan Chunguang’ as the materials to determine the contents of flavonol, anthocyanin, proanthocyanidin, chlorophyll, and carotenoid in different leaf color stages. RHSCC and Colorimeter were used to measure the leaf color phenotype; the expression level of flavonoid biosynthesis genes in different leaf color stages were detected by qRT-PCR, and the relationships between pigments and flavonoid biosynthesis genes were analyzed. The potential causes of red faded in tree peony leaves were analyzed, and which provided genetic resources for further study on the molecular mechanism of this phenomenon. The results showed: (1) with the development of the tree peony leaves, the purplish-red color was disappeared, the yellow-green color was gradually appeared, and the adaxial (upper) and ab-

收稿日期: 2018-06-25; 修改稿收到日期: 2018-09-17

基金项目: 陕西省自然科学基金(2018JM3011); 林业公益性行业专项(201404701)

作者简介: 段晶晶(1994—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事园林植物资源与应用研究。E-mail: duanjingjing0612@163.com

* 通信作者: 罗建让, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园林植物资源与应用研究。E-mail: luojianrang@nwfau.edu.cn

axial (lower) surface of leaves showed two different color changes. The RHSCC value, L^* and a^* values on the abaxial (lower) surface of leaves were higher than that of the adaxial (upper) surface, while the b^* and C^* values were lower than that of the adaxial (upper) surface. (2) The purplish-red leaf was rich in anthocyanin and proanthocyanidin, while yellow-green leaf was rich in chlorophyll, carotenoid and flavonol. (3) The expression levels of *PsDFR* and *PsANS* were consistent with the change trend of anthocyanin content, while the expression level of *PsFLS* and *PsANR* were consistent with the trend of flavonol content and proanthocyanidin content, respectively. (4) The expression pattern of *PsMYB113* was significantly and positively correlated with the anthocyanin content, while the expression pattern of *PsMYB4* was significantly and negatively correlated with the anthocyanin content; the expression pattern of *PsMYBF1* was significantly and positively correlated with the flavonol content. The study found that leaf purplish-red color faded was mainly caused by the decrease of anthocyanin content, and the decrease of anthocyanin content was the result of the coordinated expression of structure genes such as *PsDFR*, *PsANS*, *PsFLS* in the later developmental stages of tree peony leaves. In addition, *PsMYB113*, *PsMYB4*, *PsMYBF1* may be the important transcription factors that regulated the above mentioned structure genes.

Key words: tree peony; leaf; pigments; structure genes; transcription factors

植物器官,比如花瓣、果实和叶片的呈色主要是由于植物体中积累的色素所导致的。植物体中主要有 3 类色素:类黄酮、叶绿素和类胡萝卜素^[1-2]。叶绿素包括叶绿素 a 和叶绿素 b,是植物绿色器官呈色的主要色素。类胡萝卜素通常和叶绿素共同存在于植物的叶片中,使植物呈现黄色至橘色^[3-5]。类黄酮主要包括花青素、黄酮醇、原花青素等^[1],它们能使植物的花瓣、叶片、果实、种子及其他组织呈现橘黄、红色至蓝色等一系列的颜色。其中,花青素是主要的色素物质,黄酮醇作为辅助色素也发挥着重要作用^[6-7]。

类黄酮的合成代谢主要受两类基因控制:一类是结构基因,它们直接编码类黄酮生物合成酶类物质,其中包括查耳酮合成酶基因(*CHS*)、查耳酮异构酶基因(*CHI*)、黄酮酮羟化酶基因(*F3H*)、类黄酮酮羟化酶基因(*F3'H*)、二氢黄酮醇还原酶基因(*DFR*)、花青素合成酶基因(*ANS*)、黄酮醇合成酶基因(*FLS*)、无色花青素还原酶基因(*LAR*)、花青素还原酶基因(*ANR*)等;另一类是调节基因(转录因子基因),它们能够调节类黄酮生物合成结构基因表达的强度、程式以及色素在空间和时间上的积累^[8]。近年来的研究表明,类黄酮的生物合成过程主要受转录水平的调控。主要有 3 大类转录因子参与了类黄酮合成的调控,它们分别为 MYB、bHLH、WD40。在这 3 类转录因子中,MYB 是调控类黄酮生物合成的主要转录因子,而 bHLH、WD40 通常作为辅助转录因子,与 MYB 蛋白形成复合体,增强 MYB 转录因子对类黄酮合成的调控能力^[9-10]。

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)是中国的十大传统

名花之一,享有国色天香的美誉。然而牡丹花期短且集中,因此具有更长观赏时间的彩色叶牡丹品种培育将是今后牡丹育种的一个重要方向。作为春色叶植物,牡丹新生叶片呈现紫红色,随着叶片的发育,紫红色逐渐褪去。通过对牡丹春季叶片红色消退机制的研究将有助于人们采取相应措施干扰该过程,进而培育红色叶牡丹品种。目前,在牡丹上,人们的研究多集中在牡丹花瓣类黄酮色素成分分析及相关基因克隆^[11-14]、籽油成分分析及籽油提取工艺研究^[15-16],而对牡丹春季叶片红色消退过程中色素水平及相关基因的研究未见报道。

本研究以牡丹品种‘满园春光’叶片为材料,通过紫外分光光度法,测定了牡丹春季叶片红色消退过程中不同时期叶片中花青素、原花青素、黄酮醇、叶绿素及类胡萝卜素含量,根据课题组前期转录组数据筛选得到的类黄酮合成相关结构基因与转录因子基因的序列设计引物,利用荧光定量 PCR 检测类黄酮生物合成相关结构基因与转录因子基因的表达量,明确二者在牡丹叶片红色消退过程中与相应色素含量的相关性,探究类黄酮生物合成相关基因的表达对牡丹春季叶片红色消退的影响,为全面解析牡丹春季叶片红色消退分子机制的研究提供基础数据,也为日后采用分子手段进行红色叶牡丹品种定向培育提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验以生长在西北农林科技大学牡丹资源圃中的牡丹品种‘满园春光’为研究材料。于 2017 年

3月至4月采集牡丹‘满园春光’4个不同叶色时期(S1,叶正面、叶背面均为紫红色;S2,叶正面仅叶边缘为紫红色,叶基部有黄绿色显现,叶背面为紫红色;S3,叶正面紫红色完全消失,叶背面仅叶边缘为紫红色;S4,叶片完全呈现出黄绿色)的叶片样本。为避免其他生物体(节肢动物、真菌、细菌)对基因表达的影响,仅采集健康的、无菌无病虫害的组织。所有的叶片样本采集后用锡箔纸包好,立即用液氮冷冻,然后保存在-80℃冰箱用于后续RNA提取以及叶片中色素含量的测定。

1.2 叶色表型测定

分别使用英国皇家园艺学会比色卡(Royal Horticultural Society Colour Chart, RHSCC)及色差仪(CR-400, Japan)对牡丹‘满园春光’不同时期的叶片颜色进行定性和定量分析。通过测定颜色参数明度(L^*)、红度(a^*)及蓝度(b^*)值,计算出色度(C^*),计算公式为 $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ 。每个时期的叶片重复测定3次。

1.3 叶片色素的提取与测定

1.3.1 叶绿素及类胡萝卜素 称取约0.1g的叶片样品,将叶片于液氮中研磨成粉末,加入10mL 80%丙酮,超声波提取30min,然后置于4℃冰箱密闭黑暗萃取24h,12000 r/min离心10min,取上清液,过滤定容至10mL。用酶标仪测定440、645和663nm波长下的吸光度值,并计算叶绿素、类胡萝卜素的含量。设置3个生物学重复。

1.3.2 花青素及黄酮醇 用1%盐酸甲醇配制0.1mg·mL⁻¹矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3)标准液和2mg·mL⁻¹芦丁(Rutin)标准液,准确吸取标准液0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL置于10mL离心管中,1%盐酸甲醇定容至10mL,以0号为空白,分别测定上述标准溶液在波长530和350nm处的吸光度。以标准液浓度为x轴,吸光度值为y轴,绘制标准曲线。

将叶片于液氮中研磨成粉末,称取约0.1g叶片样品,加入10mL 1%盐酸甲醇(97mL甲醇+3mL 36%盐酸),超声波提取30min,然后置于4℃冰箱密闭黑暗萃取24h,12000 r/min离心10min,取上清液,过滤定容至10mL。用酶标仪测定530和350nm波长下的吸光度,根据标准曲线,计算花青素及黄酮醇的含量。设置3个生物学重复。

1.3.3 原花青素 将叶片置于研钵中,用液氮将其研磨成粉末,称取约0.1g叶片粉末,加入1mL 60%乙醇,用超声提取法进行提取,超声功率300

W,破碎5s,间歇8s,提取30min,25℃12000 r/min离心10min,吸取上清液,过滤,60%乙醇定容至1mL。用60%乙醇提取液将原花青素标准品配成10mg·mL⁻¹母液,标准液梯度稀释为5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156、0.078、0.039、0.02、0.01mg·mL⁻¹的标准溶液。根据植物原花青素含量检测试剂盒(Solarbio)使用说明书,分别对空白管(40μL H₂O+160μL工作液)、标准管(40μL标准液+160μL工作液)、测定管(40μL样本+160μL工作液)和对照管(40μL样本+160μL H₂O)加样,工作液为11%盐酸与香草醛1:1混合液。混匀后,30℃水浴30min,立即于96孔板中检测500nm处吸光度值,计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。以 ΔA 标准为y轴,标准溶液浓度为x轴绘制标准曲线。根据标准曲线得到样品浓度,计算出原花青素含量。设置3个生物学重复。

1.4 牡丹叶片总RNA提取与cDNA合成

采用北京天根公司的RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒,对牡丹‘满园春光’4个不同时期的叶片进行总RNA提取。分光光度计测定其浓度及凝胶电泳检测其完整性之后,以1μg总RNA为模板,参照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser的说明书进行反转录,合成cDNA第一链。首先,加入2μL 5×gDNA Eraser Buffer,1μL gDNA Eraser以及相应体积的RNA,ddH₂O补足至10μL,42℃2min以去除基因组DNA;第二步,进行反转录反应,加入10μL第一步反应液,1μL PrimeScript^{RT} Enzyme Mix I,1μL RT Primer Mix,4μL 5×PrimeScript Buffer 2,4μL RNase-Free dH₂O,总反应体系为20μL,PCR程序设置为:37℃15min;85℃5s;4℃保存。

1.5 qRT-PCR 表达分析

为研究牡丹‘满园春光’叶片类黄酮生物合成途径中结构基因与转录因子基因的表达对叶色的影响。根据课题组前期转录组数据筛选的可能与叶片类黄酮合成相关的5个转录因子(*PsMYB113*、*PsMYB4*、*PsMYBF1*、*PsbHLLH1*、*PsWD40-1*)基因序列以及注释为*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*DFR*、*ANS*、*FLS*、*LAR*、*ANR*的基因序列^[17],设计实时定量PCR特异性引物,以*Ubiquitin*为内参基因,进行实时定量PCR(表1)。以反转录得到的牡丹‘满园春光’不同时期叶片(S1~S4)的cDNA作为模板,参照TaKaRa公司的荧光定量试剂盒SYBR®

Premix Ex Taq™ II 说明书,在 Step One Plus 荧光定量 PCR 仪上检测牡丹‘满园春光’不同时期叶片中的转录因子基因与结构基因的相对表达量。反应体系(20 μL)为:SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL,PCR 上游、下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL,cDNA 模板 0.8 μL,ROX 染液 0.4 μL,ddH₂O 7.2 μL,反应程序为:95 ℃,30 s;95 ℃ 5 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。溶解曲线由软件自动生成,使用 2^{-ΔΔCT} 方法计算基因相对表达水平,设置 3 个生物学重复。

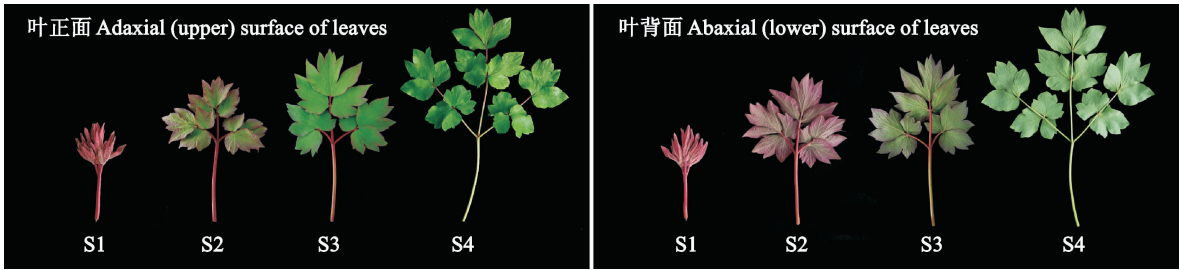
2 结果与分析

2.1 牡丹‘满园春光’春季叶色特征

牡丹‘满园春光’的叶片在春季呈现出明显的颜色变化,其新生叶片为紫红色,随着叶片发育,紫红色消失,黄绿色逐渐形成,并且叶正面和叶背面呈现出 2 种不同的颜色变化(图 1)。为明确牡丹不同时期的叶色表型,分别采用 RHSCC 和色差仪对牡丹‘满园春光’4 个不同发育时期的叶片颜色进行定性和定量描述,其中 L* 为明度,L* 值越大表示亮度

表 1 牡丹‘满园春光’荧光定量表达分析所用引物
Table 1 Gene specific primers used for qRT-PCR analysis in *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’

引物名称 Primer name	上游引物 Forward primer(5'→3')	下游引物 Reverse primer(5'→3')
PsUbiquitin	GACCTATACCAAGCCGAAG	CGTTCAGCACCACAATC
PsMYBF1	CAAAACCTACAACGCCTCAC	TGCTCTCTCTCTCCTCACAAC
PsMYB113	GCTGTAGATTGAGGTGGTTGA	TCTTCTTGTTAGGTGTGTGT
PsMYB4	TTGACCCTAATAACCATCGCC	TCAAGATTCAAGTCAAGCGAG
PsbHLH1	GCTTCAATCCTTACCGATACA	TCAATCAAAACATCCCGCTCT
PsWD40-1	TCCTCACTTCGCAAATCCTCC	TCAACCACACCCCTCTCCACA
PsCHS	CTGCTATCATCATTTGGTTCGG	GTCGCTTGTTAGTTTTTCGGGT
PsCHI	CTATTCTTTTCACACAGACACC	TGCTTCCCTATGATCGACTCC
PsF3H	CGAAATCCCAATCATCTCCCT	TATTTACGCCAATCTCGCAC
PsF3'H	TGATGTTGATGGAGAGGGTGG	GCTAGGATTTTAGGGTGTCGG
PsDFR	GAGAATATGAGGAAGGTGAAG	ACACGAAATACATCCATCCAG
PsANS	ACCAGCATCACCAACATCTTC	GCATATTTCTCCTTCTCTTCC
PsFLS	CATAATCTCGCTATCTCATCC	GCATAATTCTCCTTCTCCTCC
PsANR	ATGGCTGGTCCTTCACTTACT	CGAAATGGATATGGAACCTGA
PsLAR	TTGCTTCTTGCCCTACTTTG	GTCCTCGGTTATGGTTTGTCT



S1. 叶正面、叶背面均为紫红色;S2. 叶正面仅叶边缘为紫红色,叶基部有黄绿色显现,叶背面为紫红色;
S3. 叶正面紫红色完全消失,叶背面仅叶边缘为紫红色;S4. 叶片完全呈现出黄绿色;下同

图 1 牡丹‘满园春光’不同叶色时期的叶片表型

S1. Both the adaxial (upper) and abaxial (lower) surface of leaves were purplish-red; S2. The abaxial (lower) surface of leaves and the edge on the adaxial (upper) surface of leaves were purplish-red, the leaf base on the adaxial (upper) surface of leaves were yellow-green; S3. The purplish-red on the adaxial (upper) surface of leaves was completely disappeared, only the edge on the abaxial (lower) surface of leaves were purplish-red; S4. The leaves were completely appeared yellow-green. The same as below

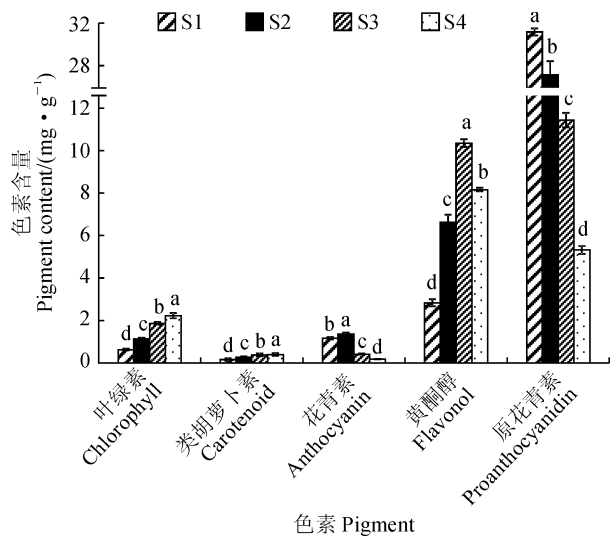
Fig. 1 The leaf phenotype of *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’ in different leaf color stages

越高; a^* 为红度, $+a^*$ 表示偏红, $-a^*$ 表示偏绿; b^* 为蓝度, $+b^*$ 表示偏黄, $-b^*$ 表示偏蓝, 结果如表 2 所示。叶背面与叶正面的 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 值基本呈现出一致的变化趋势。其中, 两者的 L^* 、 b^* 值随着叶片的发育逐渐升高, 在 S4 时期达到最高, 而叶片 b^* 值的升高则表明随着叶片的发育叶片颜色逐渐变黄; 叶片 a^* 值呈现出逐渐降低的趋势, 并在叶片发育初期时最大, 叶片颜色最红, 随着叶片发育 a^* 值降低, 叶片颜色也逐渐变绿, 这与肉眼所见的颜色变化规律基本一致; 叶片 C^* 值随着叶片发育则呈现出先降低后升高的趋势, 在 S4 时期最高。总体而言, 牡丹‘满园春光’叶背面的 L^* 、 a^* 值要高于叶正面, 而 b^* 、 C^* 值则低于叶正面(表 2)。

2.2 牡丹春季叶片不同发育时期各类色素含量

对牡丹‘满园春光’不同发育时期叶片中叶绿素、类胡萝卜素、花青素、原花青素及黄酮醇含量测定, 结果如图 2 所示。首先, 牡丹‘满园春光’叶片中的黄酮醇含量呈现先上升后略微下降的趋势, 其含量从 S1 至 S3 时期逐渐升高, 并且在 S3 时期达到最高($10.34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); S4 时期的黄酮醇含量低于 S3 时期, 但仍显著高于前 2 个时期。其次, 叶片花青素含量在前 2 个叶色时期都相对较高, 且在 S2 时期最高($1.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 而在后 2 个时期(S3、S4)相对较低, 并以 S4 时期最低($0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), S2 时期叶片中花青素含量约为 S4 时期的 7.6 倍, 这与肉眼所观察到的叶片颜色变化基本一致, 表明叶片颜色表型的变化与叶片中花青素含量的变化正相关。再次, 叶片中原花青素含量从 S1 至 S4 时期呈现出逐

渐下降的趋势, 其含量在 S1 最高, S4 最低, 且各叶色时期之间均差异显著。最后, 牡丹叶片叶绿素和类胡萝卜素含量均随着牡丹叶片的发育而逐渐升高, 并在 S4 时期达到最高值, 分别为 2.23 和 $0.41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。可见, 牡丹‘满园春光’春季叶片发育初期呈现紫红色是由于叶片中含有大量的花青素, 而含少量叶绿素和类胡萝卜素; 在叶片发育后期, 由于叶片中花青素合成减少, 叶绿素、类胡萝卜素及黄酮醇



不同小写字母表示叶色时期间 Duncan 检验在 0.05 水平有显著性差异;下同

图 2 牡丹‘满园春光’不同叶色时期叶片中的色素含量
The different normal letters indicate significant difference among stages at 0.05 level by Duncan test. The same as below
Fig. 2 The pigment contents at different color stages of *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’ leaves

表 2 牡丹‘满园春光’不同叶色时期叶片的颜色参数
Table 2 Leaf color parameters of *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’ in different leaf color stages

叶片 Leaf	时期 Stage	颜色 [¶] Color	L [*]	a [*]	b [*]	C [*]
叶正面 Adaxial (upper) surface of leaves	S1	59A	31.49±0.43c	12.37±0.73a	4.34±0.40a	13.11±0.82c
	S2	135C	34.19±0.13b	−5.35±0.41b	11.44±0.06b	12.63±0.12c
	S3	141B	38.76±1.28a	−14.41±0.30c	21.40±0.99c	25.80±0.95b
	S4	141A	40.07±0.45a	−16.24±0.34d	23.17±0.79d	28.30±0.58a
叶背面 Abaxial (lower) surface of leaves	S1	59A	31.49±0.43d	12.37±0.73a	4.34±0.40d	13.11±0.82b
	S2	59C	41.24±1.21c	3.35±0.77b	8.96±0.74c	9.60±0.71c
	S3	59D	44.36±0.25b	−1.59±0.40c	11.36±0.45b	11.49±0.51b
	S4	148D	59.51±1.11a	−11.92±0.54d	18.25±1.10a	21.74±1.15a

注: 同列数值后不同字母表示叶色时期间在 0.05 水平 Duncan 检验有显著性差异。[¶]该栏表示的是不同时期叶片的颜色, 由英国皇家园艺比色卡测定

Note: The different letters within the same column indicate significant difference among color stages at 0.05 level by Duncan test. [¶] This column indicates the leaf color at different stages, determined by the Royal Horticultural Society Colour Chart

的大量合成,从而导致紫红色褪去,黄绿色显现。

2.3 类黄酮合成相关结构基因在牡丹不同时期叶片中的表达模式

为探究类黄酮合成相关结构基因与牡丹叶色之间的关系,利用实时荧光定量 PCR 测定了类黄酮生物合成途径中 9 个结构基因在不同时期叶片中的表达量,结果见图 3。首先,*PsCHS*、*PsCHI*、*PsF3H*、*PsF3'H*、*PsDFR*、*PsANS* 基因相对表达量在牡丹叶片不同发育时期均基本呈现出相同的先升高后降低的变化趋势,并均在 S2 时期达到最大值。其中 *PsCHS*、*PsCHI*、*PsDFR*、*PsANS* 基因表达量均在 S4 时期最低,且除 *PsCHI* 外均显著低于前 3 个时期的表达量,而 *PsF3H*、*PsF3'H* 的表达量在 S1 时期最低,均显著低于后期(S2~S4)的表达量。*PsDFR*、*PsANS* 在 S2 时期表达量最高,其次为 S1 和 S3 时期,S4 时期的表达量最低,这与叶片花青素含量的变化趋势一致,且呈极显著正相关(表 3),表明 *PsDFR*、*PsANS* 可能是牡丹叶片花青素合成的重要结构基因。其次,*PsANR* 基因的表达量从 S1 到

S4 时期呈现出逐渐降低的趋势,与原花青素含量的变化趋势一致,呈极显著正相关,而与黄酮醇含量、花青素含量呈极显著负相关(表 3),说明 *PsANR* 可能是牡丹叶片中原花青素合成的重要结构基因。再次,*PsLAR* 基因的相对表达量从 S1 到 S4 时期呈现出逐渐上升的趋势,其表达量在 S1 时期最低,S4 时期最高,且各发育时期期间差异显著。同时, *PsLAR* 基因的相对表达量与花青素含量、原花青素呈极显著负相关(表 3)。另外,*PsFLS* 基因的表达量从 S1 到 S3 逐渐升高,在 S4 时期时低于 S3 时期,但是高于前 2 个时期,且与叶片中黄酮醇含量的变化趋势呈极显著正相关,而与花青素含量、原花青素含量呈显著负相关(表 3),表明 *PsFLS* 可能是牡丹叶片黄酮醇合成的重要结构基因。

2.4 类黄酮合成相关转录因子基因在牡丹不同时期叶片中的表达模式

由图 4 可知,*PsMYBF1* 相对表达量在 S1 时期最低,在 S3 时期的表达量最高,S3 时期的表达量约为 S1 时期的 2.5 倍,S4 时期的表达量略低于 S3 时

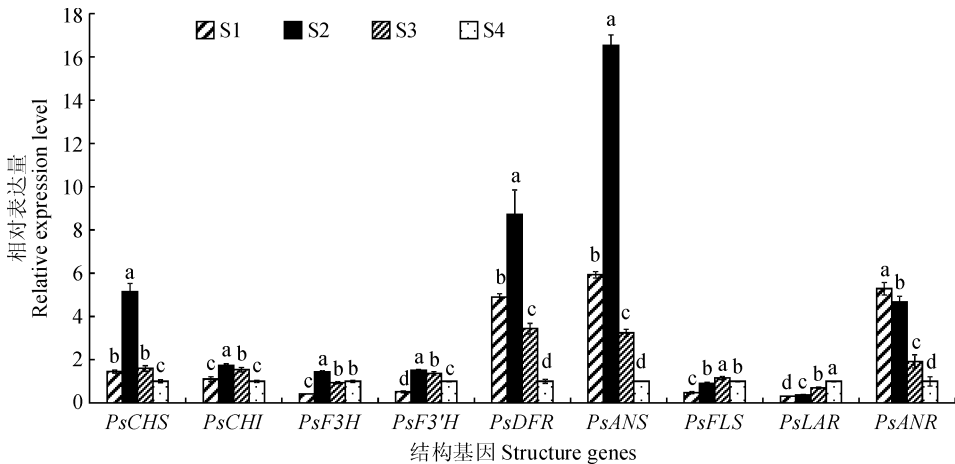


图 3 牡丹‘满园春光’不同叶色时期叶片中类黄酮合成结构基因的相对表达量

Fig. 3 Expression pattern of structure genes involved in flavonoid synthesis at different color stages in *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’ leaves

表 3 牡丹叶片结构基因表达量与类黄酮含量的相关系数

Table 3 Correlation coefficient between structure gene expression level and flavonoid contents in leaves of *P. suffruticosa*

类黄酮 Flavonoid	结构基因 Structure gene								
	<i>PsCHS</i>	<i>PsCHI</i>	<i>PsF3H</i>	<i>PsF3'H</i>	<i>PsDFR</i>	<i>PsANS</i>	<i>PsFLS</i>	<i>PsLAR</i>	<i>PsANR</i>
黄酮醇 Flavonol	0.080	0.317	0.523	0.714**	-0.339	-0.281	0.984**	0.677*	-0.809**
花青素 Anthocyanin	0.714**	0.442	0.078	-0.190	0.913**	0.860**	-0.607*	-0.948**	-0.949**
原花青素 Proanthocyanidin	0.502	0.259	-0.201	-0.262	0.685*	0.686*	-0.668*	-0.977**	0.990**

注: ** 和 * 分别表示在 0.01 和 0.05 水平上显著相关;下同

Note: ** and * indicate significant correlation at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same as below

期。*PsMYBF1* 表达量在叶片不同发育时期的变化趋势与叶片中黄酮醇含量、*PsFLS* 表达量的变化呈显著正相关(表 4), 这表明 *PsMYBF1* 可能在牡丹叶片黄酮醇生物合成过程中有重要调控作用。同时, *PsMYB113* 的表达量在牡丹叶片发育过程中呈现先上升后下降的趋势, 并在 S2 时期最高, 在 S4 时期表达量最低, S2 时期的表达量约为 S4 时期的 25 倍, 而 S1、S3 时期的表达量显著低于 S2 时期, 但显著高于 S4 时期。总体而言, *PsMYB113* 在牡丹叶片红叶期的表达量相对较高, 而在绿叶期的表达量相对较低, 其表达模式与牡丹叶片中花青素含量、*PsDFR*、*PsANS* 表达量的变化趋势一致, 且呈显著

正相关(表 4), 表明 *PsMYB113* 可能对牡丹叶片花青素合成起正向调控作用。再次, *PsMYB4* 的表达量从 S1 到 S4 时期呈现出逐步上升的趋势, 其表达量在 S1 时期最低, S4 时期最高, S4 时期的表达量约为 S1 时期的 5 倍, 与叶片中花青素、*PsDFR*、*PsANS* 表达量呈良好的负相关性(表 4), 表明 *PsMYB4* 可能对牡丹叶片花青素合成起负向调控作用。另外, *PsbHLH1* 在 S2 时期的表达量最高, 在 S1 和 S3 时期的表达量差异不显著, 但均显著高于 S4 时期。*PsWD40-1* 的表达量在 S3 时期最高, S4 时期最低, 总体呈现先升高后下降的趋势, 且在各叶色时期间均差异显著。

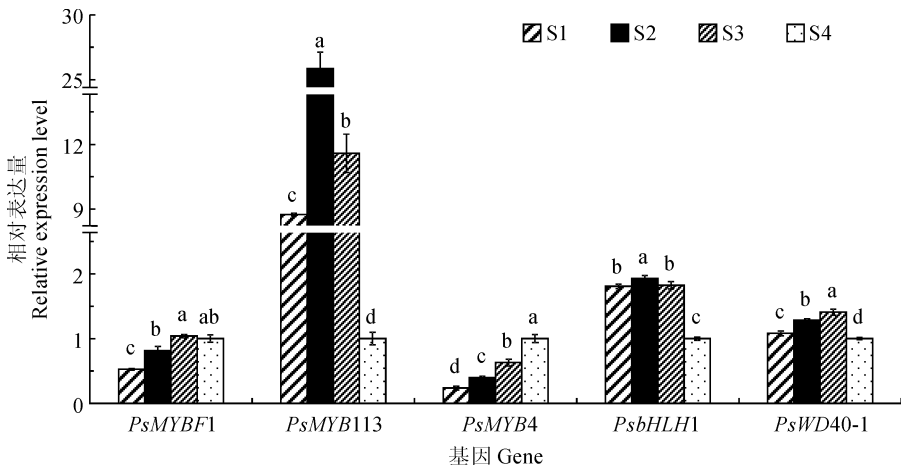


图 4 牡丹‘满园春光’不同叶色时期叶片中转录因子基因的表达量

Fig. 4 Expression pattern of transcription factor gene at different color stages in *P. suffruticosa* ‘Manyuan Chunguang’ leaves

表 4 牡丹叶片转录因子基因表达量与结构基因表达量、类黄酮含量的相关系数

项目 Item	<i>PsMYBF1</i>	<i>PsMYB113</i>	<i>PsMYB4</i>	<i>PsbHLH1</i>	<i>PsWD40-1</i>
<i>PsCHS</i>	−0.116	0.940 **	−0.418	0.551	0.409
<i>PsCHI</i>	0.176	0.869 **	−0.340	0.695 *	0.823 **
<i>PsF3H</i>	0.525	0.605 *	0.258	0.035	0.387
<i>PsF3'H</i>	0.638 *	0.614 *	0.203	0.230	0.699 *
<i>PsDFR</i>	−0.431	0.946 **	−0.751 **	0.789 **	0.426
<i>PsANS</i>	−0.328	0.946 **	−0.597 *	0.645 *	0.346
<i>PsFLS</i>	0.966 **	0.030	0.678 *	−0.214	0.523
<i>PsLAR</i>	0.674 *	−0.678 *	0.972 **	−0.856 **	−0.258
<i>PsANR</i>	−0.860 **	0.585 *	−0.931 **	0.714 **	0.039
黄酮醇 Flavonol	0.963 **	−0.053	0.677 *	−0.222	0.523
花青素 Anthocyanins	−0.737 *	0.766 **	−0.885 **	0.749 **	0.161
原花青素 Proanthocyanidin	−0.873 *	0.589	−0.953 **	0.733 **	0.062

3 讨 论

类黄酮代谢过程受多个结构酶基因的控制,如 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H*、*FLS*、*DFR*、*ANS* 等。其中, *FLS* 催化二氢黄酮醇合成相对应的黄酮醇类物质, *DFR* 催化二氢黄酮醇形成无色花青素, *ANS* 催化无色花青素形成有色花青素。现有研究表明, *DFR*、*ANS* 等类黄酮合成后期结构基因是控制花青素合成的关键基因,而 *FLS* 是控制黄酮醇合成的关键基因^[18-19]。 *FLS* 和 *DFR* 之间存在着竞争关系,二者竞争同一底物二氢黄酮醇(图 5)。大量研究表明, *DFR* 和 *FLS* 基因的表达,关系着花青素合成途径和黄酮醇合成途径对代谢流的竞争,影响各自支路的代谢强弱,最终影响着花青素苷和黄酮醇的生成量^[20]。在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中,将 *FLS* 基因反义表达,降低了矮牵牛花瓣中的黄酮醇含量,同时增加了花青素的含量^[21]。在烟草中过表达海棠 (*Malus crabapple*)、玫瑰 (*Rosa rugosa*)、桃 (*Prunus persica*)、金花茶 (*Camellia nitidissima*) 中的 *FLS* 基因,其转基因植物体内黄酮醇含量显著升高,而花青素含量则显著降低,颜色变浅,而过表达 *DFR* 基因则会下调内源 *FLS* 基因的表达量,降低黄酮醇含量,同时增加了花青素含量,使植物体颜色变深^[22-23]。由此推测, *PsDFR*、*PsANS* 在牡丹叶片发育后期的低表达,影响了叶片中花青素的合成与积累。同时, *PsFLS* 在后期的高表达促使大部分二氢黄酮醇朝着黄酮醇途径的方向发展,叶片中合成大量的黄酮醇类物质。

类黄酮生物合成的调控主要在转录水平进行^[24]。调控类黄酮物质生物合成的转录因子主要有 MYB、bHLH、WD40,而 MYB 是调控类黄酮生物合成的最重要转录因子。金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中的 MYB 基因 *Rosea1* 和 *Venosa*,能激活花青素合成结构基因 *CHI*、*F3H*、*F3'H*、*FLS*、*DFR* 和 *ANS* 的表达,从而影响花青素积累^[25]。番薯 (*Ipomoea batatas*) 中的 *IbMYB1* 能特异地调控地下块根中结构基因 *CHS*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 的表达,从而影响花青素的合成^[26]。在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中, *LeANT1* 能够调控 *CHS*、*CHI*、*DFR* 等结构基因的表达,进而控制花青素的合成与积累^[27]。从苹果 (*Malus domestica*) 中分离到的 *MdMYB1* 能够调控果皮中结构基因 *MdDFR*、*MdANS* 的表达以及花青素的生物合成,并且与花青素积累、*MdDFR*、*MdANS* 的表达正相关^[28]。本

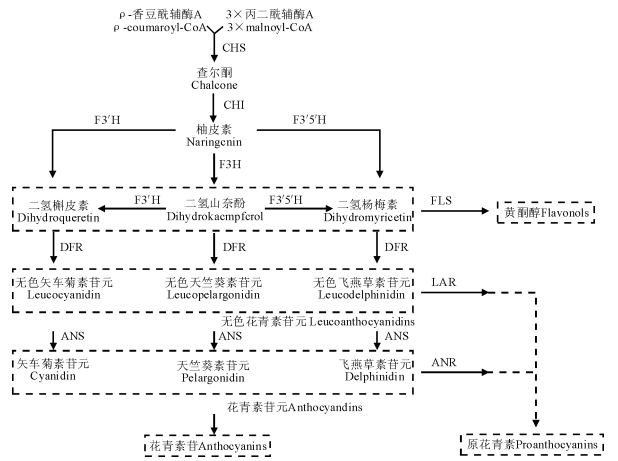


图 5 类黄酮生物合成途径简图

Fig. 5 The biosynthetic pathway of flavonoids
研究中, *PsMYB113* 的表达模式与 *PsDFR*、*PsANS* 表达量、花青素含量的变化趋势呈良好的正相关性,表明 *PsMYB113* 可能对牡丹叶片花青素合成起正向调控作用。

在 MYB 转录因子当中,与黄酮醇合成相关的 MYB 转录因子一般不具有与 bHLH 相互作用的基序,该类转录因子通常单独发挥作用,从而调节黄酮醇物质的合成^[20],如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的 *AtMYB12* 或 *AtMYB111* 均能独立地激活黄酮醇合成相关基因如 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*FLS* 的表达^[29]。在葡萄 (*Vitis vinifera*) 中, *VvMYB5a* 和 *VvMYB1* 能够调控黄酮醇生物合成相关结构基因的表达和体内黄酮醇的合成积累^[30-31]。本研究中, *PsMYB1* 表达量的变化趋势与牡丹叶片中黄酮醇水平、*PsFLS* 表达量的变化趋势基本一致,并且呈显著正相关,表明 *PsMYB1* 可能是调控牡丹叶片黄酮醇合成的重要转录因子。

调控类黄酮合成的 MYB 转录因子,并非全都是对类黄酮物质的合成起转录激活作用,有些 MYB 转录因子则起着负向调控作用。如拟南芥中的 *AtMYB12*,该基因的表达能够下调拟南芥体内花青素合成相关结构基因表达,从而抑制花青素的合成^[32]。同时,在拟南芥中过表达 *AtMYB3*、*AtMYB6* 会引起花青素含量的下降,说明 *AtMYB3*、*AtMYB6* 可能对拟南芥花青素的合成起抑制作用^[33]。 *FaMYB1* 是草莓 (*Fragaria ananassa*) 中发现的抑制花青素合成的转录因子基因,该基因的表达与花青素的积累呈负相关,在烟草中过表达 *FaMYB1* 会抑制烟草体内花青素的积累,同时也降低了黄酮醇的含量^[34]。 *MdMYB6* 是从苹果中鉴定出的 MYB 转录因子基因,该基因在拟南芥中的过

表达抑制了植株体内花青素的合成与积累,同时下调了花青素合成相关结构基因的表达^[35]。本研究中,*PsMYB4*的表达模式与牡丹叶片花青素含量及花青素合成重要结构基因*PsDFR*、*PsANS*表达量的变化趋势呈显著负相关性,暗示*PsMYB4*可能对牡丹叶片花青素合成起负向调控作用。

综上所述,推测牡丹‘满园春光’春季叶片红色消退的可能机制为:在牡丹叶片发育前期,环境因子(低温)诱导*PsMYB113*的高表达,*PsMYB113*的表达激活了*PsDFR*、*PsANS*的表达,牡丹新叶中大量合成花青素(花青素可以提高植物的抗寒性),使叶片呈现紫红色;随着叶片发育,相应环境因子发生变

化(温度升高),该因子诱导*PsMYB4*的表达,而抑制*PsMYB113*的表达,*PsMYB4*的高表达抑制了*PsDFR*、*PsANS*的表达,进而使花青素合成减少。同时,*PsMYBF1*的高表达激活了*PsFLS*的大量表达,进而与*PsDFR*竞争底物,使本该合成花青素的二氢黄酮醇大量流向黄酮醇合成的方向,从而使牡丹叶片中花青素的合成进一步减少。与此同时,叶片中叶绿素与类胡萝卜素的大量合成削弱了花青素对牡丹叶片颜色的影响。上述因素相互叠加从而导致了牡丹叶片紫红色逐渐消退,黄绿色形成。但该调控假设有待后续研究进一步验证。

参考文献:

[1] GROTEWOLD E. The genetics and biochemistry of floral pigments[J]. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, **57**: 761-780.

[2] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. *The Plant Journal*, 2008, **54**(4): 733-749.

[3] FAMBRINI M, MICHELOTTI V, PUGLIESI C. Orange, yellow and white-cream: inheritance of carotenoid-based colour in sunflower pollen [J]. *Plant Biology*, 2010, **12** (1): 197-205.

[4] LUO J, SHI Q, NIU L, *et al.* Transcriptomic analysis of leaf in tree peony reveals differentially expressed pigments genes [J]. *Molecules*, 2017, **22**(2): 324.

[5] LI S, LI Q, RONG L, *et al.* Analysis of the transcriptome of green and mutant golden-yellow leaves of *Acer palmatum* Thunb. using high-throughput RNA sequencing[J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, **90** (4): 388-394.

[6] ZHAO D, TAO J, HAN C, *et al.* Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(12): 11 263-11 275.

[7] 李卫星,杨舜博,何智冲,等. 植物叶色变化机制研究进展[J]. 园艺学报, 2017, **44**(9): 1 811-1 824.

LI W X, YANG S B, HE Z C, *et al.* Research advances in the regulatory mechanisms of leaf coloration[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, **44**(9): 1 811-1 824.

[8] 邢文,金晓玲. 调控植物类黄酮生物合成的 MYB 转录因子研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(3): 689-696.

XING W, JIN X L. Recent advances of MYB transcription factors involved in the regulation of flavonoid biosynthesis[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, **13**(3): 689-696.

[9] 刘晓芬,李方,殷学仁,等. 花青苷生物合成转录调控研究进展[J]. 园艺学报, 2013, **40**(11): 2 295-2 306.

LIU X F, LI F, YIN X R, *et al.* Recent advances in the transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(11): 2 295-2 306.

[10] ALLAN A C, HELLENS R P, LAING W A. MYB transcription factors that colour our fruit [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, **13**(3): 99-102.

[11] ZHAO D, TANG W, HAO Z, *et al.* Identification of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in two colored tree peony flowers [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, **459**(3): 450-456.

[12] 张晶晶,王亮生,刘政安,等. 牡丹花色研究进展[J]. 园艺学报, 2006, **33**(6): 1 383-1 388.

ZHANG J J, WANG L S, LIU Z A, *et al.* Recent advances in flower color research of tree peony [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, **33**(6): 1 383-1 388

[13] 周琳,王雁,任磊,等. 牡丹二氢黄酮醇 4-还原酶基因 *PsDFR1* 的克隆及表达分析[J]. 植物生理学报, 2011, **47** (9): 885-892.

ZHOU L, WANG Y, REN L, *et al.* Cloning and expression analysis of Dihydroflavonol 4-Reductase gene *PsDFR1* from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, **47**(9): 885-892.

[14] ZHANG C, WANG W, WANG Y, *et al.* Anthocyanin biosynthesis and accumulation in developing flowers of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) ‘Luoyang Hong’ [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, **97**: 11-22.

[15] 韩雪源,张延龙,牛立新,等. 不同产地‘凤丹’牡丹籽油主要脂肪酸成分分析[J]. 食品科学, 2014, **35**(22): 181-184.

HAN X Y, ZHANG Y L, NIU L X, *et al.* Fatty acid composition of ‘Fengdan’ peony seed oils from different growing regions [J]. *Food Science*, 2014, **35**(22): 181-184.

[16] 白章振,张延龙,于蕊,等. 不同方法提取‘凤丹’牡丹籽油品质比较[J]. 食品科学, 2017, **38**(1): 136-141.

BAI Z Z, ZHANG Y L, YU R, *et al.* Comparison of differ-

ent extraction methods for seed oil from the ‘Fengdan’ peony cultivar[J]. *Food Science*, 2017, **38**(1): 136-141.

[17] LUO J, DUAN J, HUO D, *et al.* Transcriptomic analysis reveals transcription factors related to leaf anthocyanin biosynthesis in *Paeonia qiui* [J]. *Molecules*, 2017, **22** (12): 2 186.

[18] 侯泽豪,王书平,魏淑东,等. 植物花青素生物合成与调控的研究进展[J]. 广西植物, 2017, **37**(12): 1 603-1 613.

HOU Z H, WANG S P, WEI S D, *et al.* Anthocyanin biosynthesis and regulation in plants [J]. *Guihaia*, 2017, **37** (12): 1 603-1 613.

[19] 戴思兰,洪 艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, **49**(3): 529-542.

DAI S L, HONG Y. Molecular breeding for flower colors modification on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, **49**(3): 529-542.

[20] 曹运琳,邢梦云,徐昌杰,等. 植物黄酮醇生物合成及其调控研究进展[J]. 园艺学报, 2018, **45**(1): 177-192.

CAO Y L, XING M Y, XU C J, *et al.* Biosynthesis of flavonol and its regulation in plants[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, **45**(1): 177-192.

[21] HOLTON T A, BRUGLIERA F, TANAKA Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia-hybrida* [J]. *Plant Journal*, 1993, **4**(6): 1 003-1 010.

[22] LUO P, NING G, WANG Z, *et al.* Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **6**(1): 1 257.

[23] TIAN J, HAN Z, ZHANG J, *et al.* The balance of expression of dihydroflavonol 4-reductase and flavonol synthase regulates flavonoid biosynthesis and red foliage coloration in crabapples[J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**(7): 12 228.

[24] TANAKA Y, BRUGLIERA F, KALC G, *et al.* Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2010, **74**(9): 1 760-1 769.

[25] SCHWINN K, VENAIL J, SHANG Y J, *et al.* A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*[J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(4): 831-851.

[26] MANO H, OGASAWARA F, SATO K, *et al.* Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato[J]. *Plant Physiology*, 2007, **143**(3): 1 252-1 268.

[27] MATHEWS H, CLENDENNEN S K, CALDWELL C G, *et al.* Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport[J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1 689-1 703.

[28] TAKOS A M, JAFFE F W, JACOB S R, *et al.* Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. *Plant Physiology*, 2006, **142**(3): 1 216-1 232.

[29] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, *et al.* MYB transcription factors in Arabidopsis[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, **15**(10): 573-581.

[30] DELUC L, BARRIEU F, MARCHIVE C, *et al.* Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway[J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 499-511.

[31] CZEMMEL S, STRACKE R, WEISSHAAR B, *et al.* The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries[J]. *Plant Physiology*, 2009, **151**(3): 1 513-1 530.

[32] MATSUI K, UMEMURA Y, OHME-TAKAGI M. AtMYB12, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis [J]. *Plant Journal*, 2008, **55**(6): 954-967.

[33] ROWAN D D, CAO M, LIN-WANG K, *et al.* Environmental regulation of leaf color in red 35S : PAP1 *Arabidopsis thaliana* [J]. *New Phytologist*, 2009, **182**(1): 102-115.

[34] AHARONI A, De VOS C, WEIN M, *et al.* The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco[J]. *Plant Journal*, 2001, **28**(3): 319-332.

[35] GAO J, SHEN X, ZHANG Z, *et al.* The MYB transcription factor MdMYB6 suppresses anthocyanin biosynthesis in transgenic Arabidopsis[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2011, **106**(2): 235-242.

(编辑:裴阿卫)