

郭梦鸽,秦孝天,陈瑞丹. 6个朱砂梅品种花色苷合成结构基因及转录因子编码基因的表达模式分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(2): 367-375.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.019

6个朱砂梅品种花色苷合成结构基因及转录因子编码基因的表达模式分析

郭梦鸽¹, 秦孝天¹, 陈瑞丹^{1,2,3,4,5,6}

(1.北京林业大学园林学院,北京 100083; 2.花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室,北京 100083; 3.国家花卉工程技术研究中心,北京 100083; 4.城乡生态环境北京实验室,北京 100083; 5.园林环境教育部工程研究中心,北京 100083; 6.林木花卉遗传育种教育部重点实验室,北京 100083)

摘要: 为明晰朱砂梅品种群梅花花色表型差异形成的分子调控机制,以花色由浅至深呈梯度变化的6个朱砂梅品种为试验材料,利用色差仪和分光光度计测定不同品种盛花期花瓣的花色表型及花色苷含量,通过荧光定量PCR及相关性分析,对花色苷合成结构基因(*PmCHS*、*PmCHI*、*PmF3H*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmANS*、*PmUFGT*)及转录因子编码基因(*PmMYB1*、*PmbHLH3*)的转录特性进行探究。结果表明,各品种间花瓣花色苷含量与花色红度的变化趋势一致;*PmMYB1*、*PmbHLH3*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT*的相对表达量与花色苷含量呈极显著正相关;转录因子编码基因*PmMYB1*与*PmbHLH3*的相对表达量呈极显著正相关,且均与结构基因*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT*的表达水平呈显著或极显著正相关。推测转录因子编码基因*PmMYB1*、*PmbHLH3*通过正向调控结构基因*PmF3'H*、*PmDFR*和*PmUFGT*的表达从而调控朱砂梅花瓣的呈色。

关键词: 梅花; 花色苷; 结构基因; 转录因子; 荧光定量PCR

中图分类号: S685.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)02-0367-09

Analysis of the expression pattern of structural genes and transcription factors encoding genes related to the anthocyanin synthesis in six cultivars of *Prunus mume* Cinnabar Purple Group

GUO Meng-ge¹, QIN Xiao-tian¹, CHEN Rui-dan^{1,2,3,4,5,6}

(1. School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, Beijing 100083, China; 3. National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083, China; 4. Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 100083, China; 5. Engineering Research Center of Landscape Environment of Ministry of Education, Beijing 100083, China; 6. Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing 100083, China)

Abstract: To clarify the molecular regulatory mechanism for the formation of phenotypic differences in flower color of *Prunus mume* Cinnabar Purple Group, six varieties of *P. mume* Cinnabar Purple Group with gradient changes in flower color

from light to dark were used as the test materials. The floral color phenotypes and anthocyanin contents of petals of different varieties at full-bloom stage were determined by colorimeter and spectrophotometer, respectively. The transcriptional characteristics of the structural genes for anthocyanin synthesis (*PmCHS*, *PmCHI*, *PmF3H*, *PmF3'H*, *PmDFR*, *PmANS*, *PmUFGT*) and the transcription factors

收稿日期: 2023-02-17

基金项目: 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程项目(2019KJC0210)

作者简介: 郭梦鸽(1998-),女,河南平顶山人,硕士研究生,研究方向为花卉种质资源与遗传育种。(E-mail) 513735355@qq.com

通讯作者: 陈瑞丹, (E-mail) chenruidan@163.com

encoding genes (*PmMYB1*, *PmbHLH3*) were analyzed by qRT-PCR and correlation analysis. The results showed that the change trend of anthocyanin content in petals among the varieties was consistent with that of flower color redness. The relative expression of *PmMYB1*, *PmbHLH3*, *PmF3'H*, *PmDFR* and *PmUFGT* were highly significantly and positively correlated with anthocyanin content. The relative expression of transcription factors encoding genes *PmMYB1* and *PmbHLH3* were highly significantly and positively correlated, and all of them were significantly or highly significantly and positively correlated with the expression levels of the structural genes *PmF3'H*, *PmDFR* and *PmUFGT*. It is hypothesized that the transcription factors encoding genes *PmMYB1* and *PmbHLH3* regulate the expression of the structural genes *PmF3'H*, *PmDFR* and *PmUFGT* and thus regulate the color presentation of the petals of *P. mume* Cinnabar Purple Group.

Key words: *Prunus mume*; anthocyanin; structural genes; transcription factors; qRT-PCR

花色苷属于类黄酮类次生代谢产物,是植物中广泛存在的一类色素^[1-2]。花色苷是使花瓣、果实、叶片、根茎等植物器官呈现红、黄、蓝、紫等丰富色彩的主要色素^[3],不仅在植物繁殖方面起重要作用,在提高植物抗逆性及人类医疗保健方面也发挥着不可替代的作用^[4-5]。植物花色苷生物合成途径较复杂,参与其合成的基因主要分为 2 类,一类是直接编码花青素合成途径中相关酶类的结构基因,包括 *CHS*、*CHI*、*DFR*、*ANS*、*UFGT*、*F3'H*、*F3H*、*F3'5'H* 等^[6]。另一类是调节基因,主要是通过调控相关结构基因的表达,进而控制花色苷的积累^[7]。目前已在非洲菊(*Gerbera hybrid*)、矢车菊(*Centaurea cyanus*)、桃(*Prunus persica*)、苹果(*Malus domestica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、西洋梨(*Pyrus communis*)等作物的研究^[8-12]中证实,花色苷合成相关基因在调控植物器官的呈色方面发挥着重要作用。但不同植物及同一植物不同品种间的着色特性、基因转录特性又有所不同。探究植物花色苷合成相关基因的表达模式对明晰植物呈色的分子机理及分子辅助育种具有重要意义。

梅花(*Prunus mume*)作为中国传统的名花花木,其花期特早,花香宜人,树姿苍劲,深受人们喜爱,常被用作园林观赏树种^[13-14]。花色是决定梅花观赏价值的重要品质性状,花色育种是梅花品种改良的主要方向^[2]。当前梅花花色的研究正处于由表及里的深入探索阶段。赵昶灵等^[15]、吴欣欣^[16]的研究结果表明,花色苷是梅花花瓣呈色的主要色素。张芹等^[2]通过定性和定量分析,得出梅花花瓣花色苷合成通路主要为矢车菊素分支,并从梅花中克隆得到 *PmMYB1* 基因,在烟草中过表达后使其花瓣红色加深,证实了转录因子编码基因 *PmMYB1* 在花色苷合成途径中起正向调控作用。截至目前,关于梅花花色的研究有限,梅花花色苷生物合成相关基因的表达模式尚不清楚,梅花花色苷生物合成的分子调控机制尚未明确。

鉴于此,本研究以花色不同的 6 个梅花品种为试验材料,对梅花花色苷生物合成相关结构基因(*PmCHS*、*PmCHI*、*PmF3H*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmANS*、*PmUFGT*)与调节基因(*PmMYB1*、*PmbHLH3*)的转录特性及表达模式进行探究,以初步明晰梅花花色表型差异形成的分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

梅花研究者公认花色最深的梅品种是朱砂品种群的乌羽玉,为方便明晰梅花花色差异形成的原因,本研究选择同品种群中花色由浅至深呈明显梯度变化的 6 个梅品种[白朱砂(*P. mume* Bai Zhusha)、粉晕朱砂(*P. mume* Fenyun Zhusha)、白须朱砂(*P. mume* Baixu Zhusha)、豫西朱砂(*P. mume* Yuxi Zhusha)、卢氏艳朱砂(*P. mume* Lushi Yan Zhusha)、乌羽玉(*P. mume* Wu Yuyu)]作为研究对象,2022 年 3 月前往豫西梅园采集其盛花期花瓣,用液氮冷冻保存。

1.2 花瓣表型测定

使用上海首立实业有限公司提供的 NF555 分光色差仪对 6 个朱砂梅品种盛花期花瓣的 L^* 、 a^* 、 b^* 值进行测定,每个品种随机取 3 朵花,每朵花 3 次重复。其中, L^* 表示亮度; a^* 表示红色到绿色的范围, a^* 为正值表示颜色偏红, a^* 为负值表示颜色偏绿; b^* 表示黄色到蓝色的范围, b^* 为正值表示颜色偏黄, b^* 为负值表示颜色偏蓝。彩度(C^*)和色相角(h)的计算参考夏溪等^[17]的方法。

1.3 花瓣花色苷的提取与含量测定

在花瓣中少量多次加入液氮进行研磨直至花瓣呈细小粉末状,取 0.1 g 花瓣粉末用离心管进行分装,然后加入浸提液(甲醇:盐酸=99:1,体积比)5 ml,置于 4℃ 冰箱避光浸提 24 h,每隔 8 h 均匀摇晃 1 次,

确保花瓣粉末可以完全接触到浸提液直至花瓣粉末颜色近于白色,随后将离心管置于离心机中配平,13 000 r/m离心 3 min,抽取、过滤上清液到新的离心管中,接着使用紫外分光光度计测定 OD_{530} 值。参考倪钟^[18]的方法计算花色苷含量,单位用mg/g表示,每个样本 3 次重复。

1.4 总 RNA 提取及反转录

使用北京天漠科技开发有限公司提供的植物 RNA 提取试剂盒进行各品种盛花期花瓣的总 RNA 提取,然后使用凝胶成像系统 GIS-500(杭州米欧仪器有限公司产品)和超微量核酸仪 FC-1100(杭州遂真生物技术有限公司产品)对提取的总 RNA 浓度及纯度进行检测,最后按照苏州宇恒生物科技有限公司生产的 UEIris RT mix with DNase-All-in-One(R2020)试

剂盒提供的说明书进行反转录得到 cDNA。

1.5 荧光定量检测

利用常州福生生物技术有限公司提供的 96 孔荧光定量 PCR 仪进行荧光定量转录水平检测,荧光试剂为 StarLighter SYBR Green qPCR Mix(Universal),反应体系为:荧光试剂 10.0 μ l,cDNA 模板 1.0 μ l,上游引物和下游引物各 0.5 μ l,ddH₂O 8.0 μ l。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。以 *PmActin* 作为内参基因对目的基因(*PmCHS*、*PmCHI*、*PmF3' H*、*PmF3H*、*PmDFR*、*PmANS*、*PmUFGT*、*PmMYB1*、*PmbHLH3*)进行相对定量分析。使用 Primer Premier 5.0 软件对已公布的相关基因序列进行引物设计,具体引物信息见表 1。试验设置 3 次重复。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>PmCHS</i>	ACCCACCTTGACAGTTAGTG	TGTCGGGAAGGATGTTTG
<i>PmCHI</i>	CGTTAACTGGAAGGGCAAGAC	ACCTTCTCCGAGTATTGCTTG
<i>PmF3H</i>	TCGTAAACCCAGCAAAGGAG	AGCCTGTACTCGTTGAATGTC
<i>PmF3' H</i>	AGACAGTGAACCTGGCTCAG	ACAACCATCTCCTTGAACTCG
<i>PmDFR</i>	CTCACAGAGGAAGCAGCATTTAGA	CCTTGGAAGTGAGAAATGGACC
<i>PmANS</i>	TTCTATGAAGGCAAGTGGGTC	TCCTTGTTCCACCATTCCTCTG
<i>PmUFGT</i>	TCATTCTTCAGCACTTCACAATCC	CCATCAGCCACATCAAACACC
<i>PmMYB1</i>	GAAACAGGTGGTCATTGATTGCT	TTCAGGCGAGAATCCGTC
<i>PmbHLH3</i>	TGGGTGAATGAAGAAGACAGGG	ACCAGGCGGCCTAACCAAGT
<i>PmActin</i>	TGCTGAGGACATTCAACCCC	TCTGACCCATACCAACCATAACAC

1.6 数据分析

用 Excel 16 和 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析,并用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同品种朱砂梅花瓣表型分析

图 1 为盛花期白朱砂、粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂、乌羽玉 6 个梅花品种的花朵,其花瓣颜色分别为粉白色、浅粉色、粉色、粉红色、亮红色和暗红色。

由表 2 可知,6 个梅花品种中,显示红度的 a^* 和表示彩度的 C^* 均是暗红色品种乌羽玉最高,粉白色品种白朱砂最低。显示黄蓝度的 b^* 值是粉白色

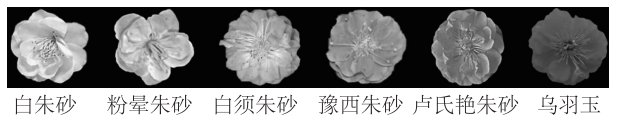


图 1 盛花期不同品种的朱砂梅花朵

Fig.1 Petals of different *Prunus mume* Cinnabar Purple Group cultivars in full-flowering period

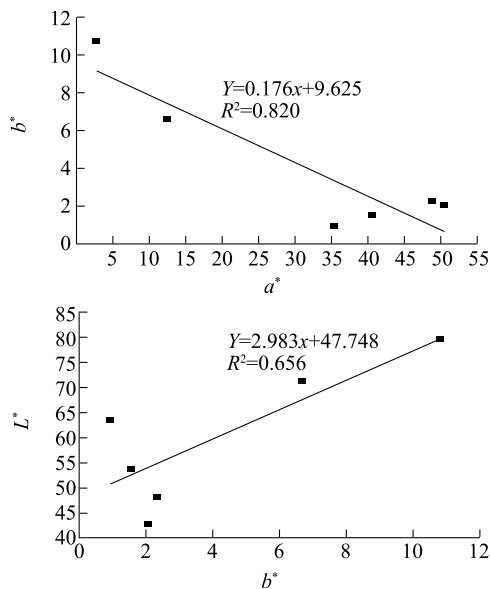
品种白朱砂最高,粉色品种白须朱砂最低。与亮度相关的 L^* 是粉白色品种白朱砂最高,暗红色品种乌羽玉最低。6 个梅花品种花色表型参数值间的线性拟合曲线(图 2)显示, a^* 与 L^* 、 C^* 与 L^* 均呈显著负相关,这表明本研究中朱砂梅花瓣的红度和彩度越高,亮度越低。

表 2 不同品种朱砂梅花色表型参数

Table 2 Flower color phenotype parameters of different *Prunus mume* Cinnabar Purple Group cultivars

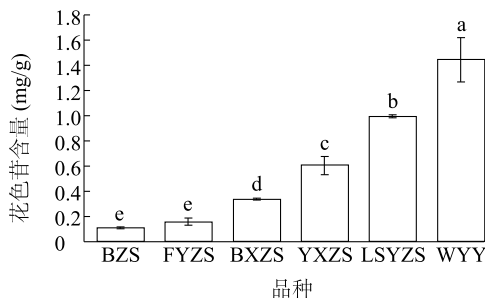
品种	国际照明委员会 (CIE) 表色系统指标				
	L^*	a^*	b^*	C^*	h (°)
白朱砂	79.65	2.57	10.73	11.03	1.34
粉晕朱砂	71.26	12.45	6.63	14.11	0.49
白须朱砂	63.40	35.28	0.97	35.29	0.03
豫西朱砂	53.65	40.56	1.56	40.59	0.04
卢氏艳朱砂	48.22	48.73	2.31	48.78	0.05
乌羽玉	42.68	50.55	2.06	50.59	0.04

L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 分别表示花色表型参数中的亮度、红度、黄度和彩度; h 表示色调。



L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 分别代表花色表型参数中的亮度、红度、黄度和彩度。

图 2 国际照明委员会 (CIE) 表色系统参数间的相关关系

Fig.2 Correlation between the International Commission on Illumination (CIE) coloration parameters of *Prunus mume*

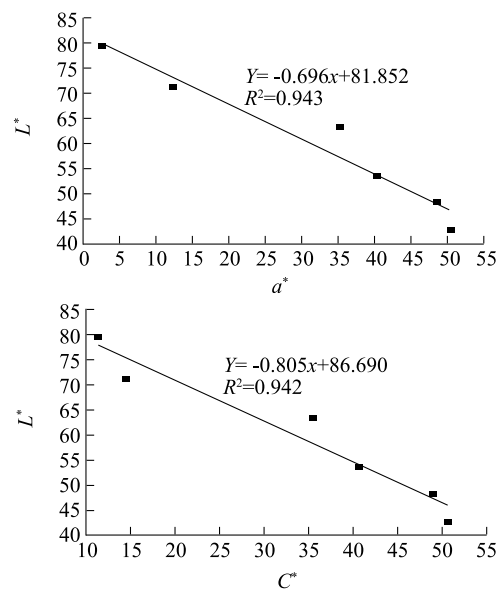
BZS: 白朱砂; FYZS: 粉晕朱砂; BXZS: 白须朱砂; YXZS: 豫西朱砂; LSYZS: 卢氏艳朱砂; WYY: 乌羽玉; 不同小写字母代表不同品种在 0.05 水平差异显著。

图 3 不同品种朱砂梅花瓣花色苷含量变化

Fig.3 Changes of anthocyanin contents in petal of different cultivars of *Prunus mume* Cinnabar Purple Group

2.2 不同品种朱砂梅花瓣花色苷含量分析

对比分析白朱砂、粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂、乌羽玉的盛花期花色表型参数(表 2)及花色苷含量(图 3),发现不同品种朱砂梅花瓣花色苷含量的变化趋势与花色的红度变化趋势一致,其中白朱砂花色红度最小,其花瓣花色苷含量最低,仅为 0.1 mg/g;而乌羽玉花色红度最大,其花瓣花色苷含量也最高,约为白朱砂的 13 倍。除白朱砂与粉晕朱砂花瓣花色苷含量差异不显著外,其余 4 个品种朱砂梅的花色苷含量差异达显著水平。这表明本研究中的朱砂梅花瓣花色苷含量与花色红度呈一定程度的正相关。

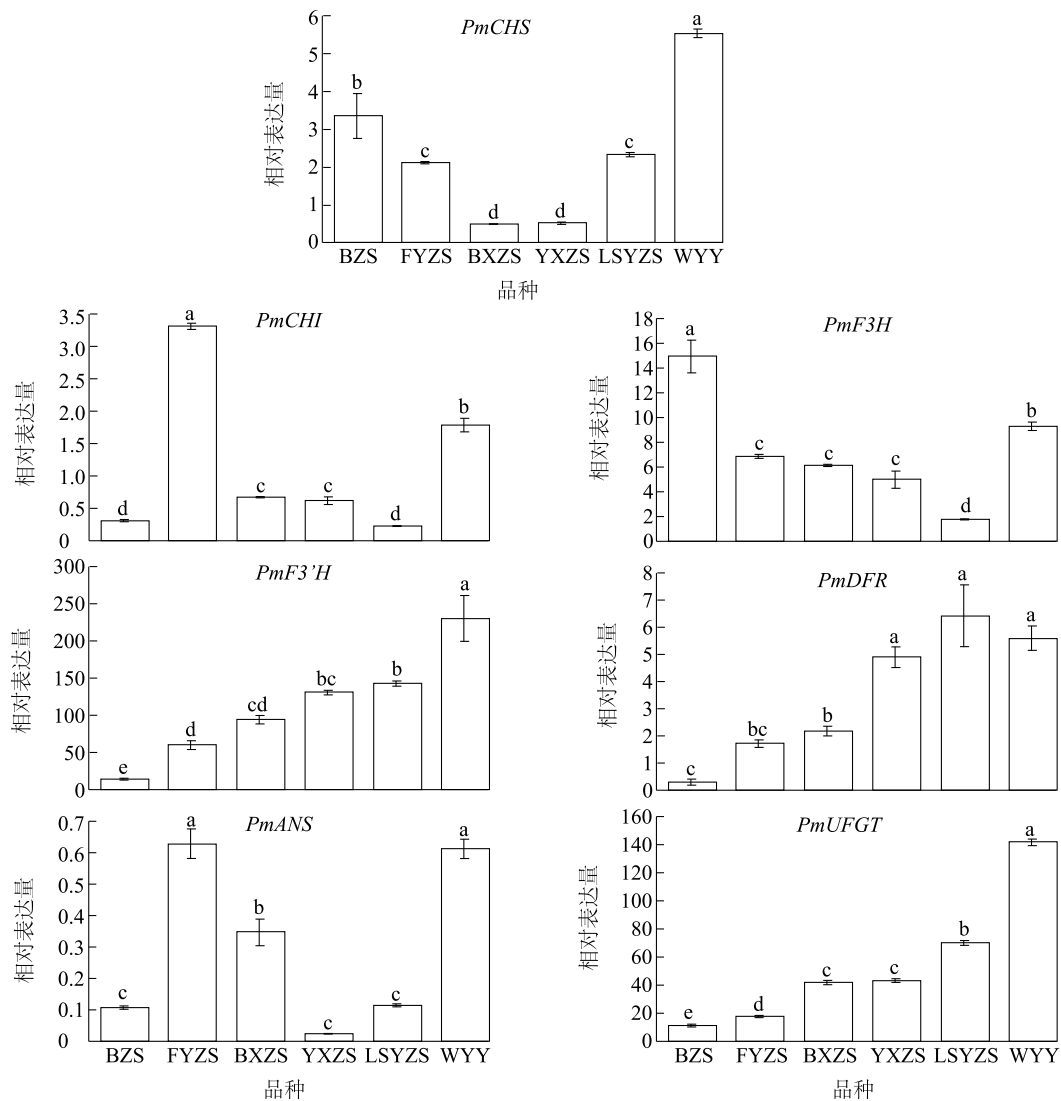


2.3 不同品种朱砂梅花瓣花色苷合成结构基因的转录特性

6 个朱砂梅品种由于花瓣中花色苷含量的不同导致花色表型差异显著,为探明花色苷合成途径与朱砂梅花瓣呈色的关系,本研究对花色苷生物合成相关的 7 个结构基因 ($PmCHS$ 、 $PmCHI$ 、 $PmF3'H$ 、 $PmF3H$ 、 $PmDFR$ 、 $PmANS$ 和 $PmUFGT$) 进行了实时荧光定量分析,结果(图 4)显示, $PmF3'H$ 、 $PmUFGT$ 这 2 个结构基因在不同品种朱砂梅花瓣中的相对表达量与花色苷含量(图 3)变化趋势一致。 $PmDFR$ 基因在亮红色品种卢氏艳朱砂中的相对表达量稍高于在暗红色品种乌羽玉中的相对表达量,但两者差异不显著,这可能是受自身品种特性或其他方面因

素影响,整体上 *PmDFR* 基因在各品种中相对表达量也与其花瓣花色苷含量变化趋势一致。*PmF3'H* 在粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂和乌羽玉中的相对表达量分别是白朱砂的 4.3 倍、6.9 倍、9.5 倍、10.4 倍和 16.7 倍。*PmDFR* 在粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂和乌羽玉中的相对表达量分别是白朱砂中的 5.4 倍、6.9 倍、15.3

倍、20.1 倍和 17.5 倍。*PmUFGT* 在粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂和乌羽玉中的相对表达量分别是白朱砂的 1.6 倍、3.9 倍、4.0 倍、6.5 倍和 13.2 倍。其余 4 个结构基因 *PmCHS*、*PmCHI*、*PmF3H* 和 *PmANS* 的相对表达量与其花瓣花色苷含量的变化趋势明显不一致。



BZS:白朱砂;FYZS:粉晕朱砂;BXZS:白须朱砂;YXZS:豫西朱砂;LSYZS:卢氏艳朱砂;WYY:乌羽玉。不同小写字母代表不同品种在 0.05 水平差异显著。

图 4 不同品种朱砂梅花瓣花色苷合成基因的相对表达量

Fig.4 Relative expression levels of anthocyanin synthesis genes in petals of different *Prunus mume* Cinnabar Purple Group varieties

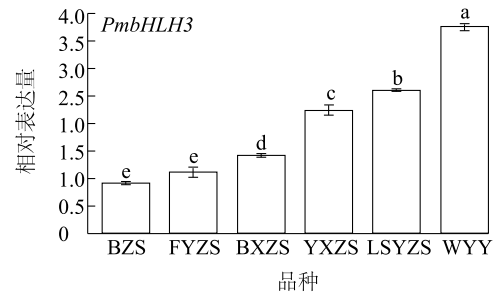
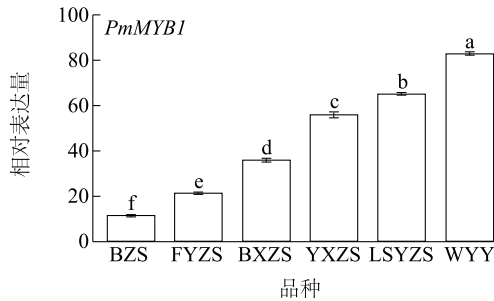
2.4 不同品种朱砂梅花色苷合成转录因子 *Pm-MYB1*、*PmbHLH3* 的转录特性

对比分析 *PmMYB1* 和 *PmbHLH3* 的相对表达量

(图 5),以花色红度最小的白朱砂为参照,粉晕朱砂、白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂和乌羽玉盛花期 *PmMYB1* 的相对表达量分别是白朱砂的 1.8 倍、

3.1 倍、4.8 倍、5.6 倍和 7.1 倍;这 5 个品种盛花期的 *PmbHLH3* 的相对表达量依次是白朱砂的 1.2 倍、1.5 倍、2.4 倍、2.8 倍和 4.0 倍。

PmMYB1 和 *PmbHLH3* 在各品种朱砂梅盛花期花瓣中的相对表达量均随花色苷含量的变化而变化,这与另外 3 个结构基因 (*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT*) 相对表达量的变化趋势基本相同。其中,



BZS:白朱砂;FYZS:粉晕朱砂;BXZS:白须朱砂;YXZS:豫西朱砂;LSYZS:卢氏艳朱砂;WYY:乌羽玉。不同小写字母代表不同品种在 0.05 水平差异显著。

图 5 不同品种朱砂梅花瓣花色苷合成转录因子编码基因 *PmMYB1*、*PmbHLH3* 的相对表达情况

Fig.5 Relative expression levels of anthocyanin synthetic transcriptional factors encoding genes *PmMYB1* and *PmbHLH3* in petals of different *Prunus mume* Cinnabar Purple Group cultivars

2.5 不同品种朱砂梅花色苷含量及基因相对表达量的相关性分析

为进一步明确朱砂梅品种花色苷合成基因的表达模式,对不同品种朱砂梅花瓣花色苷含量及基因相对表达量进行了相关性分析,结果(表 3)表明, *PmMYB1*、*PmbHLH3*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的相对表达量与花色苷含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。且 *PmMYB1* 的相对表达量与 *PmbHLH3*、*PmF3'H*、*PmDFR* 的相对表达量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),与 *PmUFGT* 的相对表达量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。 *PmbHLH3* 的相对表达量与 *PmMYB1*、*PmF3'H*、*PmUFGT* 的相对表达量呈极显著正相关 ($P < 0.01$),与 *PmDFR* 的相对表达量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。这表明,结构基因 *PmF3'H*、*PmUFGT*、*PmDFR* 及转录因子编码基因 *PmMYB1*、*PmbHLH3* 的表达与朱砂梅花瓣中花色苷的积累密切相关。

3 讨论

花色苷的组成成分和含量是影响植物器官呈色的主要因素^[19-20]。本研究结果表明花色由浅至深

转录因子编码基因 *PmMYB1* 在各品种间的相对表达量差异显著,而转录因子编码基因 *PmbHLH3* 在白朱砂和粉晕朱砂间的相对表达量差异不显著,在白须朱砂、豫西朱砂、卢氏艳朱砂和乌羽玉间的相对表达量差异显著,这与各品种间盛花期花瓣的花色苷含量的差异显著性高度一致。

表 3 各品种朱砂梅花瓣中花色苷含量及基因相对表达量间的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of anthocyanin content and gene relative expression of different *Prunus mume* Cinnabar Purple Group cultivars

类别	<i>PmMYB1</i> 相对表达量	<i>PmbHLH3</i> 相对表达量	花色苷含量
<i>PmMYB1</i> 相对表达量	1.000	0.978 **	0.995 **
<i>PmbHLH3</i> 相对表达量	0.978 **	1.000	0.989 **
<i>PmCHS</i> 相对表达量	0.345	0.526	0.418
<i>PmCHI</i> 相对表达量	-0.116	-0.043	-0.142
<i>PmF3'H</i> 相对表达量	0.979 **	0.976 **	0.972 **
<i>PmF3H</i> 相对表达量	-0.484	-0.312	-0.410
<i>PmDFR</i> 相对表达量	0.941 **	0.878 *	0.927 **
<i>PmANS</i> 相对表达量	0.091	0.182	0.076
<i>PmUFGT</i> 相对表达量	0.913 *	0.961 **	0.929 **

** 表示在 0.01 水平上显著相关,* 表示在 0.05 水平上显著相关。

呈梯度变化的 6 个朱砂梅品种盛花期花瓣花色苷含量存在明显差异,且与花色的红色程度呈正相关,这与赵昶灵等^[15]的研究结果一致。花色苷合成相关结构基因的表达对花色苷的积累起决定性作用。 *F3'H* 是花色苷合成通路第二阶段的关键酶编码基

因之一^[21]。大量学者相继在苹果^[8]、月季(*Rosa hybrida*)、三色堇(*Viola tricolor*)^[22]、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)等^[23]植物的花色苷研究中证实,过表达 *F3'H* 基因能够使转基因株系花瓣中花色苷含量增加从而使花瓣红色程度加深。*DFR* 基因作为花色苷生物合成途径第三阶段的入口酶,最初是从玉米(*Zea mays*)^[24]中克隆出来的,之后又相继在油菜(*Brassica campestris*)^[25]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[26]等植物中被分离,大量研究结果都已证明其在花色苷生物合成中起重要作用。例如,杨宁宁^[27]将在金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)中克隆得到的 *ArDFR1* 基因和 *ArDFR3* 基因转入烟草中,可使转基因株系花瓣花色加深。相同的试验结果在对毛果杨(*Populus trichocarpa*)^[28]和燕子花(*Iris laevigata*)^[29]的研究中也有报道。*UFGT* 基因是花色苷生物合成途径末端至关重要的一个酶基因,它主要负责将不稳定的花青素糖基化变成稳定的花色苷^[30]。对苹果^[31]、梨^[32]和葡萄^[33]的果皮花色苷的研究结果表明,*UFGT* 是调控红色果皮花色苷合成的关键基因,其活性与果皮中花色苷的积累存在显著正相关。在本研究的6个朱砂梅品种花瓣中,*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 基因的相对表达量与花色苷含量呈正相关,这与前人在其他植物中的研究结果基本一致^[22-33],而 *PmCHS*、*PmCHI*、*PmF3H* 和 *PmANS* 这4个结构基因的相对表达量与花色苷含量无明显相关性。由此推测,结构基因 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 在朱砂梅花瓣的花色苷合成中起重要的调控作用。

在花色苷生物合成途径中,结构基因的表达水平通常受到转录因子编码基因(*MYB*、*bHLH*、*WD40*、*MYC*等)的调控^[7],*MYB* 是植物花色苷合成结构基因最重要的调节因子,也是高等植物中数量最大的基因家族之一。在不同植物中,*MYB* 基因的表达模式不同,它既能单独对结构基因起调控作用,也能与其他转录因子编码基因(*bHLH*、*WD40*等)形成复合物共同调控结构基因的表达。牛铁泉等^[33]通过酵母杂交技术证明,在葡萄果实发育过程中 *VvMYBA1* 通过调控下游结构基因 *VvUFGT*、*VvDFR* 的表达,从而促进果皮中花色苷的积累。紫甘蓝(*Brassica oleracea*)叶片中花色苷的积累则是由转录因子编码基因 *BoMYB2* 通过调控下游结构基因 *DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 的表达而获得

的^[34]。金鱼草(*Antirrhinum majus*)中 *MYB* 转录因子编码基因 *Rosea1* 的过量表达显著上调结构基因 *F3'H*、*DFR*、*ANS* 和 *UFGT* 的表达,导致金鱼草花瓣中花色苷大量积累^[35]。类似的,茄子(*Solanum melongena*)中 *SmMYB113* 的过量表达显著提高了花色苷的含量及下游基因 *SmCHS* 和 *SmDFR* 的表达水平^[36]。张芹等^[2]在烟草中过表达 *PmMYB1* 基因使烟草花的红色程度明显加深。从本研究结果来看,*PmMYB1* 的相对表达量与花色苷含量具有极显著正相关性,随着各品种朱砂梅花瓣红色程度的加深,*PmMYB1* 的相对表达量在逐渐增加,这与张芹等^[2]的研究结果是一致的。

转录因子 *MYB* 与 *bHLH* 相互作用共同调节花色苷的合成已经在多种作物中被证实。在拟南芥中,*AtMYB75* 和 *AtMYB90* 需要与 *bHLH* 转录因子协同作用,共同控制结构基因 *CHS*、*DFR* 等的表达^[37]。在苹果中,转录因子 *MdMYB10* 通过与 *Md-bHLH3/33* 相互作用来增强结构基因 *MdDFR* 的表达,使苹果果肉颜色变红^[38]。本研究通过相关性分析发现,转录因子编码基因 *PmMYB1* 与 *Pm-bHLH3* 的表达存在极显著正相关,且均与结构基因 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的表达呈显著正相关。由此推测,在朱砂梅品种群中,转录因子编码基因 *PmMYB1* 的表达与转录因子编码基因 *Pm-bHLH3* 的表达间存在某种关联,且正向调控下游结构基因 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的表达。为明晰这一调控过程,今后还需对 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 启动子进行克隆,利用酵母杂交技术从蛋白质层面分析结构基因(*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT*)及转录因子编码基因(*PmMYB1*、*Pm-bHLH3*)间的互作情况,以进一步明晰朱砂梅品种花色形成差异的分子机理。

4 结 论

梅花品种可分为11个品种群^[12],其中属朱砂品种群的乌羽玉花色最深。选择同品种群中花色具有深浅变化的6个朱砂梅品种进行梅花花色表型差异的探究,可有效避免由于梅花品种群的不同而产生的试验误差。本研究中,通过对6个朱砂梅品种盛花期花瓣的花色表型、花色苷含量及相关基因的相对表达量的综合分析发现,朱砂梅花瓣的红色和彩度越高,亮度越低,且花色苷含量

与花色红度呈现一定的正相关。*PmMYB1*、*PmbHLH3*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的表达水平与花色苷含量呈极显著正相关,且转录因子编码基因 *PmMYB1* 和 *PmbHLH3* 的表达水平与结构基因 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的表达水平呈显著正相关,这与前人研究结果^[33-38] 基本一致,推测 *PmMYB1*、*PmbHLH3*、*PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 这 5 个基因在朱砂梅花瓣呈色方面起重要调控作用。除此之外,本研究中还发现转录因子编码基因 *PmMYB1* 和 *PmbHLH3* 的表达强度呈极显著正相关。在本研究中,推测转录因子编码基因 *PmMYB1* 和 *PmbHLH3* 通过正向调控下游结构基因 *PmF3'H*、*PmDFR*、*PmUFGT* 的表达,从而促进朱砂梅花瓣花色苷的积累,使花瓣红度加深。本研究初步明晰了朱砂梅花瓣花色苷合成相关结构基因及转录因子的表达模式,为进一步探究梅花花色表型形成差异的分子调控机制及利用分子生物技术辅助梅花花色育种提供了依据。

参考文献:

- [1] 赵宇瑛,张汉锋.花青素的研究现状及发展趋势[J].安徽农业科学,2005,33(5):904-905.
- [2] 张芹,徐宗大,赵凯,等.梅花花青素苷调控基因 *PmMYB1* 的分离及功能分析[J].林业科学,2018,54(10):64-72.
- [3] GOTO T, KONDO T. Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1991, 30(1):17-33.
- [4] SMERIGLIO A, BARRECA D, BELLOCCO E, et al. Chemistry pharmacology and health benefits of anthocyanins[J]. Phytotherapy Research, 2016, 30(8):1265-1286.
- [5] 刘恺媛,王茂良,辛海波,等.植物花青素合成与调控研究进展[J].中国农学通报,2021,37(14):41-51.
- [6] PETRONI K, TONELLI C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. Plant Science, 2011, 181(3):219-229.
- [7] 朱婷婷,梁东,夏惠. *R2R3-MYB* 调控果实花色苷合成的研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(4):985-991.
- [8] 侯杰,佟玲,崔国新,等.植物类黄酮 3'-羟化酶(*F3'H*)基因的研究进展[J].植物生理学报,2011,47(7):641-647.
- [9] HAN Y, VIMOLMANGKANG S, SORIA-GUERRA R E, et al. Ectopic expression of apple *F3'H* genes contributes to anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis* tt7 mutant grown under nitrogen stress[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2):806-820.
- [10] 花扬,吕昕羽,张瑜,等.桃 *MYB* 转录因子调控花青素合成的研究进展[J].现代农业科技,2022(2):75-79.
- [11] CASTELLARIN S D, GASPERO G D, MARCONI R, et al. Col-our variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin[J]. BMC Genomics, 2006, 7(12):1-17.
- [12] FISCHERT T C, GOSCH C, PFEIFFER J, et al. Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*) [J]. Trees, 2007, 21(5):521-529.
- [13] 唐桂梅,黄国林,曾斌,等.梅花种质资源研究进展[J].湖南农业科学,2020(5):108-111.
- [14] 彭婷,王艺琴,陈曼曼,等.梅花 *PmWRKY40* 基因的克隆及其表达分析[J].华中农业大学学报,2019,38(5):71-78.
- [15] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉.梅花花色色素种类和含量的初步研究[J].北京林业大学学报,2004(2):68-73.
- [16] 吴欣欣.‘复瓣跳枝’梅花瓣呈色相关蛋白质组与转录组分析[D].南京:南京农业大学,2014.
- [17] 夏溪,龚睿,张春英.不同颜色锦绣杜鹃花瓣中花青素苷组成及呈色机制[J].江苏农业学报,2022,38(1):207-213.
- [18] 倪钟.红色系抗寒梅花杂交及后代与亲本花色表型差异探究[D].北京:北京林业大学,2021.
- [19] 孙晓红,刘源霞,孙欣,等.红肉苹果果实发育过程中花青苷含量变化及其合成相关基因表达分析[J].植物生理学报,2017,53(8):1507-1514.
- [20] 田鹏,苏艳丽,康保珊,等.两个红梨品种花色苷合成相关基因及转录因子 *MYB10* 表达模式分析[J].江苏农业学报,2015,31(1):166-171.
- [21] 何秋玲.长筒石蒜花色变异的分子基础[D].南京:南京林业大学,2009.
- [22] 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.
- [23] 范月婷,辛士超,畅娇,等.橡胶树 *F3'H* 基因克隆及功能分析[J].热带作物学报,2020,41(9):1733-1740.
- [24] Q'REILLY C, SHEPHERD N S, PEREIRA A, et al. Molecular cloning of the *al* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mul* [J]. The EMBO Journal, 1985, 4(4):877-882.
- [25] LI Y T, LI J N, CHAI Y R, et al. Cloning and sequence analysis of a *DFR* gene from *Brassica campestris* L. var. *oleifera* DC [J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(4):485-492.
- [26] LU Q N, YANG Q, ZOU H W. Effects of cerium on accumulation of anthocyanins and expression of anthocyanin biosynthetic genes in potato cell tissue cultures [J]. Journal of Rare Earths, 2006, 24(4):479-484.
- [27] 杨宁宁.金线莲花青素 *DFR* 基因筛选与克隆及功能分析[D].杭州:浙江农林大学,2021.
- [28] HUANG Y, GOU J Q, JIA Z C, et al. Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa* [J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30364.
- [29] 阿尔达克·库万太.燕子花 *DFR* 基因的克隆及其功能初探[D].哈尔滨:东北林业大学,2019.
- [30] SPRINGOB K, NAKAJIMA J, YAMAZAKI M, et al. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins [J].

- Natural Product Report, 2003, 20: 288-303.
- [31] 刘金, 魏景立, 刘美艳, 等. 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系[J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1235-1242.
- [32] 李俊才, 李天忠, 王志刚, 等. ‘红巴梨’果皮 *UFGT* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2010, 30(1): 30-34.
- [33] 牛铁泉, 董燕梅, 刘海霞, 等. 葡萄果实 *MYBA1* 与 *UFGT*、*DFR* 的作用机制[J]. 中国农业科学, 2018, 51(12): 2368-2377.
- [34] YUAN Y, CHIU L W, LI L. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage[J]. Planta, 2009, 230(6): 1141-1153.
- [35] DAVIES K M, SCHWINN K E. Transcriptional regulation of secondary metabolism[J]. Functional Plant Biology, 2003, 30(9): 913-925.
- [36] ZHOU L, HE Y J, LI J, et al. CBFs function in anthocyanin biosynthesis by interacting with *MYB113* in eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Plant Cell Physiol, 2020, 61(2): 416-426.
- [37] ZIMMERMANN I M, HEIM M A, WEISSHAAR B, et al. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* *MYB* transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins[J]. The Plant Journal, 2004, 40(1): 22-34.
- [38] ESPLEY R V, BRENDOLISE C, CHAGNE D, et al. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples[J]. Plant Cell, 2019, 21(1): 168-183.

(责任编辑:陈海霞)