

# 低温对牡丹切花花色和花青素苷合成的影响

牡丹妮, 张超, 高树林, 董丽

(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/北京林业大学园林学院, 北京 100083)

**摘要:**以牡丹洛阳红(*Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’) 开放级别为蕾开期的切花为材料, 研究不同温度(22 ℃、15 ℃和4 ℃)处理对切花花色和花青素苷合成的影响。结果表明:与22 ℃处理相比, 15 ℃和4 ℃处理切花花色明度下降、红度和彩度增加, 花瓣花青素苷含量增加。对花青素苷合成相关基因表达量分析的结果表明:15 ℃和4 ℃低温促进与花青素苷合成相关的 *PsCHS1*、*PsCH11*、*PsF3'HI*、*PsANS1*、*PsDFR1*、*PsMYB2*、*PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因的表达。低温对花青素苷上游合成途径中 *PsCHS1* 和 *PsCH11* 基因进行调控; 下游合成途径中 *PsDFR1*、*PsANS1* 和 *PsF3'HI* 基因对低温的响应相对敏感, 4 ℃处理后基因的表达量大幅上调, 且显著高于15 ℃处理组。上述所提到的结构基因和调节基因均是受低温调控的关键基因, 进而影响牡丹洛阳红切花花青素苷合成与积累。

**关键词:**牡丹洛阳红; 低温; 花青素苷; 结构基因; 调节基因

## Effect of Low Temperature on Flower Color and Anthocyanin Biosynthesis in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*) ‘Luoyang Hong’ Cut Flower

DU Dan-ni, ZHANG Chao, GAO Shu-lin, DONG Li

(Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding/National Engineering Research Center for Floriculture/Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment/College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

**Abstract:** The cut flowers of *Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ were used as materials. Effects of different temperature treatments (22 ℃, 15 ℃ and 4 ℃) on flower color and anthocyanin biosynthesis were researched. The results showed that: compared with 22 ℃, flowers under 15 ℃ and 4 ℃ treatments showed lower lightness, higher redness, higher chroma and increased anthocyanin accumulation. Color quality was obviously better than that of 22 ℃ treatment. qRT-PCR was used to analyze the relative expression levels of anthocyanin biosynthetic genes and results showed that 15 ℃ and 4 ℃ treatments promoted anthocyanin biosynthesis in the cut flowers via the promotion of related genes transcription (*PsCHS1*, *PsCH11*, *PsF3'HI*, *PsANS1*, *PsDFR1*, *PsMYB2*, *PsbHLH1* and *PsbHLH3*). Low-temperature mainly regulated and controlled anthocyanin biosynthesis by upstream gene *PsCHS1* and *PsCH11*. Downstream genes *PsDFR1*, *PsANS1* and *PsF3'HI* were sensitive to low-temperature, which had the biggest increase transcription by 4 ℃ treatment. The above mentioned structural and regulatory genes were the important key of the anthocyanin biosynthesis.

**Key words:** *Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’; low temperature; anthocyanin; structural genes; regulatory genes

收稿日期: 2015-03-04      修回日期: 2015-04-20      网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1547.038.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31572164)

第一作者研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: 286620701@qq.com

通信作者: 董丽, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: dongli@bjfu.edu.cn

花色是观赏植物最重要的观赏性状之一,也是切花最重要的采后品质之一。花青素苷是被子植物花色表达的主要呈色物质<sup>[1]</sup>。迄今为止对花青素苷合成途径的解析已较为清楚,其生物合成途径涉及多个代谢步骤,由查尔酮-黄烷酮异构酶(*CHI*)、查尔酮合成酶(*CHS*)等多种酶催化完成<sup>[2]</sup>。结构基因和调节基因两类基因共同构成了花青素苷合成途径的分子调控网络,控制花青素苷生物合成<sup>[3]</sup>。花青素苷的合成与呈色受到环境因子的调节,环境因子通过调控花青素苷合成途径上的相关结构基因和调节基因的表达,影响植物器官中花青素苷的合成与积累。光、温度、水分、糖类物质、土壤 pH 值和激素等外界环境因子均会影响观赏植物花青素苷的合成和呈色<sup>[4]</sup>。

目前,芍药(*Paeonia lactiflora*)等多种观赏植物的花青素苷合成途径已被解析<sup>[5]</sup>。但是对于牡丹(*Paeonia suffruticosa*)的研究仅有对 6 个结构基因(*PsCHS1*、*PsCH1*、*PsF3H1*、*PsF3' H1*、*PsANS1*、*PsDFR1*)和 5 个调节基因(*PsWD40-1*、*PsWD40-2*、*PsMYB2*、*PsbHLH1*、*PsbHLH3*)的分离和表达<sup>[6-8]</sup>,可见牡丹花色形成的分子机理研究仍处于初级阶段<sup>[9-10]</sup>。虽然国内外对牡丹品种和野生种的花青素苷种类和构成有一定的研究,但只是在化学色素的水平上<sup>[11]</sup>。另外,牡丹切花普遍存在褪色现象,无法呈现原本的颜色,这与其花青素苷含量低有关。然而,低温会诱导花青素苷合成相关基因的表达,使花青素苷含量升高。前人研究发现 15 ℃ 的低温条件对长叶车前(*Plantago lanceolata*)花瓣中花青素苷积累有促进作用<sup>[12]</sup>,在菊花花青素苷合成途径中,温度主要通过调控下游基因 *DFR* 和 *ANS* 的表达量影响花瓣中花青素苷的合成和呈色<sup>[13]</sup>。为此,本研究以牡丹洛阳红切花为材料,研究低温对切花花色和花青素苷含量的影响,并通过分析花青素苷合成相关的 5 个调节基因和 6 个结构基因的表达量,解析牡丹洛阳红切花在开放过程中花青素苷的合成受低温调控的分子机制,为后续利用采后手段提高牡丹洛阳红切花花色品质奠定理论基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

试验材料为牡丹洛阳红开花级别为蕾开期的 S1 级<sup>[14]</sup>切花,取自河南省洛阳市孟津县朝阳镇卫坡村。

## 1.2 低温处理

在蒸馏水中重新剪切花枝至 20 cm 瓶插于盛有 100 mL 的 0.5 mg/L 次氯酸钠溶液中。试验进行以下处理:设定温度为 15 ℃ 和 4 ℃,对照组温度为 22 ℃。各处理均设定光照强度 40 μmol/(m<sup>2</sup>·s),相对湿度 50%。各处理均瓶插 30 枝采后切花,每天定时更换瓶插液。每 2 d 在瓶插液中剪枝约 1 cm 以防止伤口处微生物大量繁殖堵塞导管。

待各处理切花开放至不同级别(表 1)时进行随机取样,测定花色表型后分别称取约 0.2 g 中层花瓣(从外到内第 4~6 轮花瓣)用锡箔纸包好,标记重量,液氮速冻后保存于 -80 ℃,用于花青素苷含量的测定及基因表达的分析。每个级别的取样各重复 3 次。

表 1 牡丹洛阳红切花不同发育级别的性状描述<sup>[14]</sup>

Table 1 Characteristic description of different developmental stages in *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ cut flower<sup>[14]</sup>

级别 Stage	形状描述 Characteristic description
蕾开期(S1)	花蕾顶端开始微裂,花蕾开始发宣,花瓣已显色,萼片松动,俗称“松口”。
破绽期(S2)	萼片松开但直立,包住花苞,花瓣从萼片中露出部分占整个花朵的 1/2。
初开期(S3)	萼片较松散外翻,倾斜向上包理,花瓣仍为合拢状,隐约可见花心。
半盛开期(S4)	萼片完全水平,外层花瓣向上形成 120~150° 的夹角。
盛开期(S5)	萼片完全开展,并个别下垂,外层花瓣与花茎垂直甚至弯曲向下,花瓣完全开展,松散状,达到最大花径,可以清楚地看见雄蕊或花心,达到最佳观赏状态。

## 1.3 花色表型测定

对不同处理的各个开放级别切花的花色进行测定。使用色差仪(NF333 spectrophotometer, Nippondenshoku)对各处理切花中层花瓣中部进行花色测量,记录花色参数明度( $L^*$ )、红度( $a^*$ )和蓝度( $b^*$ )值。每个处理测量 3 枝切花,单枝切花重复测定 5 次。通过测定的  $a^*$ 、 $b^*$  值,计算出彩度  $C^*$  值<sup>[15]</sup>,公式如下: $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ 。测量数据经 Excel、SPSS 统计分析。

## 1.4 总花青素苷的提取与含量测定

参考 A. Nakatsuka 等<sup>[16]</sup>花青素苷测定方法,每

个处理每个级别测量 3 朵花, 每朵花称取约 0.2 g 中层花瓣, 将花瓣于液氮中研磨, 加入 10 mL 1% (v/v) 盐酸甲醇溶液, 4 ℃ 条件下静置 24 h。离心过滤取上清液, 用分光光度计 Beckman DU-800 (Beckman Instruments, Fullerton, CA) 测定波长 526 nm 下提取液中的吸光度 (OD), 除以样品鲜重得到最终花青素苷含量。测量数据经 Excel、SPSS 统计分析。

1.5 花瓣总 RNA 的提取和花青素苷合成关键基因的表达

课题组前期对牡丹洛阳红花瓣进行转录组测序, 分离了相关结构基因和调节基因 cDNA 全长序列, 对各调节基因编码的氨基酸序列保守区域及其

系统进化树进行了分析, 筛选出与牡丹洛阳红花青素苷合成相关的调节基因<sup>[11]</sup>, 以此做为本研究的目的基因。采用 CTAB 法<sup>[17]</sup>提取各个样品的总 RNA, 参照 Promega 公司 M-MLV 反转录酶说明书反转录合成 cDNA 后保存于 -20 ℃ 备用。采用 Bio-Rad Miniopticon Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 进行目标基因实时荧光定量 PCR 表达分析。各目标基因登录号及表达分析所用引物见表 2, 以牡丹 *Psub-iquitin* 基因为内参<sup>[18]</sup>, 进行荧光定量 PCR 反应, 每个样品设 3 次重复。荧光值由 Bio-Rad CFX 2.0 软件直接读取, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行数据分析<sup>[19]</sup>。测量数据经 Excel、SPSS 统计分析。

表 2 牡丹洛阳红花青素苷合成相关基因序列登录号及表达分析所用引物<sup>[11]</sup>

基因	登录号	引物名称	引物序列 (5'-3')
Gene	Accession number	Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>PsbHLH1</i>	KJ466970	B1-F	TAAAGCGAGCAATACACCAAATAAT
		B1-R	GGTGAACCTGGGATTCTCTCTAACT
<i>PsbHLH3</i>	KJ466972	B3-F	GTCCATTTCATTAGGCAACCAG
		B3-R	GAATACAAACGACATGCACACCA
<i>PsWD40-1</i>	KJ466973	W1-F	GACATCCGCTTTCGACGCT
		W1-R	AGTTGTTCAATCTCTGCCCCTGC
<i>PsWD40-2</i>	KJ466974	W2-F	CCAACTCCGCTTCCTCACTTC
		W2-R	CTCAACCACACCCCTCTCCAC
<i>PsMYB2</i>	KJ466975	M2-F	GGTGCTCTTGATTGCTGGGAG
		M2-R	TCTGTTGGATTTGGGTTAGGGCTG
<i>PsCHS1</i>	KJ466964	CHS1-F	AGCAGAGAACAACAAAGGGTCACG
		CHS1-R	TCAGCACCGACAATAACCGCAG
<i>PsCHI1</i>	KJ466965	CHI1-F	AAATTCCCACCTGGTTCTTCTATTTC
		CHI1-R	CTCCTTTGACCTTATCCATCCTTCA
<i>PsF3H1</i>	KJ466966	F3H1-F	CCCAAGGTAGCCTACAACCAA
		F3H1-R	GAAAATCCCCCAGCTTTCACA
<i>PsF3'H1</i>	KJ466967	F3' H1-F	AAC TTGTTACAGGCAGGGACT
		F3' H1-R	GGCTTGGGCTAGGATTTTAGG
<i>PsDFR1</i>	KJ466968	DFR1-F	TGATAAAGCCAACAATAAATGGAATG
		DFR1-R	CACTCCAGCAGGTTTCGTCATACAC
<i>PsANS1</i>	KJ466969	ANS1-F	GCCCTCACTTTTCATCCTCCACAAC
		ANS1-R	AAAAGTGGCCACGAAATCCTTACCT

2 结果与分析

2.1 低温对切花花色的影响

不同温度处理后目测发现各处理对牡丹洛阳红切花花色影响不同。当切花开放至盛花期 (S5) 时, 与 22 ℃ 处理相比, 4 ℃ 和 15 ℃ 处理均使切花花色加深。4 ℃ 与 15 ℃ 处理切花花色相比, 目测无明显差异。

使用色差仪对切花中层花瓣中部花色测量的结果表明 (表 3), 各处理明度 ( $L^*$ ) 在切花破绽期 (S2)、初开期 (S3) 时无明显差异, 而在切花开放至半盛开期 (S4)、盛花期 (S5) 期间, 4 ℃ 和 15 ℃ 处理切花明度  $L^*$  值显著小于对照组。4 ℃ 处理与 15 ℃ 处理相比切花明度  $L^*$  值无明显差异。

各处理切花红度 ( $a^*$ ) 在切花开放至初开期 (S3) 时即出现差异有统计学意义。初开期至盛开

期(S3~S5)期间,4℃处理和15℃处理切花 $a^*$ 值均显著高于22℃对照组。4℃处理与15℃处理切花相比,破绽期至盛花期(S2~S5)期间红度 $a^*$ 值无明显差异。

各处理切花蓝度( $b^*$ )值在切花破绽期至盛花期(S2~S5)期间均呈现先升高后降低的趋势,并在半盛花期(S4)时达到最大。总体来看,4℃处理的切花 $b^*$ 值在初开期至盛花期(S3~S5)期间均高于其他处理,并在个别点达到差异有统计学意义;15℃处理切花 $b^*$ 值在盛花期(S5)时显著低于对照组。

花瓣的彩度( $C^*$ )最能体现花朵的整体色彩水

平。4℃和15℃处理切花 $C^*$ 值在整个切花开放进程中呈逐渐上升趋势,且在初开期至盛花期(S3~S5)期间显著高于对照组。表明4℃和15℃处理切花均在初开期至盛花期(S3~S5)期间显著提高了切花彩度。4℃处理与15℃处理切花相比无差异。

综上可知,4℃和15℃处理切花明显降低花色明度,增加花色红度和彩度,加深切花花色,从而提高了牡丹洛阳红切花花色品质。4℃处理与15℃处理切花相比,明度、红度和彩度均无明显差异,温度越低切花蓝度值越大。这与目测的切花表型变化结果相一致。

表3 牡丹洛阳红切花不同温度处理下花色 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 和 $C^*$ 值分析  
Table 3 Analysis of *P. suffruticosa* 'Luoyang Hong' cut flower color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $C^*$  values at different temperature treatments

开花级别 Developmental stages	处理条件 Treatments	表色系统 Color system			
		明度	红度	蓝度	彩度
		$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$
S2	4℃	54.19 ± 1.59a	39.25 ± 1.35a	-21.53 ± 1.96ab	44.89 ± 1.67a
	15℃	53.50 ± 1.07a	40.72 ± 1.40a	-23.70 ± 0.95a	45.38 ± 1.18a
	22℃	56.56 ± 1.75a	38.19 ± 1.45a	-23.52 ± 1.23a	41.97 ± 1.39ab
S3	4℃	53.70 ± 1.28a	40.70 ± 1.13a	-19.51 ± 0.64b	45.11 ± 1.20a
	15℃	53.39 ± 1.78a	40.65 ± 1.00a	-23.59 ± 0.97a	46.07 ± 1.13a
	22℃	54.02 ± 1.23a	38.46 ± 1.15b	-23.93 ± 1.04a	42.01 ± 0.67b
S4	4℃	56.63 ± 1.17b	41.11 ± 1.29a	-17.04 ± 0.70b	46.32 ± 1.32a
	15℃	56.82 ± 1.17b	40.08 ± 2.00ab	-23.27 ± 1.34a	46.37 ± 1.10a
	22℃	60.45 ± 1.57a	35.07 ± 1.46c	-22.39 ± 1.02a	43.67 ± 1.06b
S5	4℃	55.62 ± 2.40b	41.82 ± 1.12ab	-21.49 ± 0.67b	47.16 ± 1.24a
	15℃	51.65 ± 0.97b	44.29 ± 2.63a	-25.42 ± 1.32a	48.16 ± 0.78a
	22℃	58.94 ± 1.20a	34.65 ± 1.34c	-22.84 ± 0.92b	42.80 ± 1.17b

不同小写字母表示同一树种不同处理在0.05水平差异有统计学意义。数据表示为平均值±标准误(N=3)。下同  
Different normal letters mean significant difference among the different temperature treatment at 0.05 levels. Vertical bars represent standard errors of 3 replicates. The same as below

2.2 低温对切花总花青素苷含量的影响

对不同处理下牡丹洛阳红切花在发育过程中总花青素苷含量测定后发现,各处理切花花青素苷含量在切花开放期间均呈现逐渐升高的趋势。4℃和15℃处理切花花青素苷含量在破绽期至盛花期(S2~S5)期间均高于22℃对照组。4℃处理与15℃处理切花相比花青素苷含量无明显差异(图1)。此结果与不同处理下切花花色变化趋势基本相一致。

2.3 低温对牡丹洛阳红切花花青素苷合成关键基因表达量的影响

2.3.1 不同处理对牡丹切花花青素苷合成相关调节基因表达量的影响 以牡丹 *Psubiquitin* 基因作为内参基因,通过实时荧光定量PCR法对牡丹花青

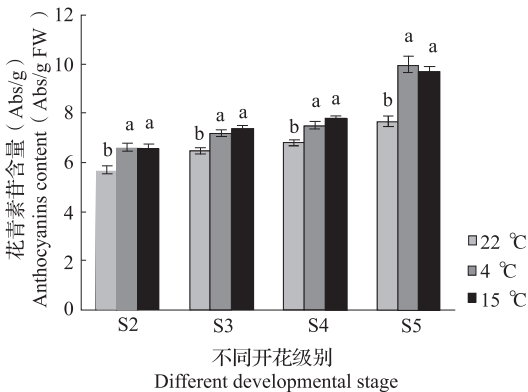


图1 牡丹洛阳红切花不同温度处理下花青素苷含量  
Fig.1 Relative accumulation of anthocyanin in *P. suffruticosa* 'Luoyang Hong' cut flower at different temperature treatments



素苷合成相关的调节基因 *PsMYB2*、*PsWD40-1*、*PsWD40-2*、*PsbHLH1*、*PsbHLH3* 表达量进行分析。结果如图 2 所示,破绽期(S2)、初开期(S3)时,4℃处理切花 *PsbHLH1*、*PsbHLH3* 和 *PsbMYB2* 基因表达量均显著高于对照组。破绽期(S2)时,15℃处理切花 *PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因表达量显著高于对照组,且与 4℃处理相比无明显差异。初开期(S3)时,15℃处理切花 *PsbHLH1* 和 *PsbMYB2* 基因表达量均

显著高于对照组,且与 4℃处理相比无明显差异。半盛花期(S4)时,4℃和 15℃处理切花 *PsbHLH3* 基因显著高于对照组。盛花期(S5)时,4℃和 15℃处理切花 *PsbHLH1* 基因显著高于对照组。整体来看,*PsbHLH3* 和 *PsMYB2* 基因的表达量呈现逐渐下降的趋势,且表达量峰值均在破绽期(S2)。各处理比较发现 *PsWD40-1* 和 *PsWD40-2* 基因的表达量在切花开放期间均无明显差异。

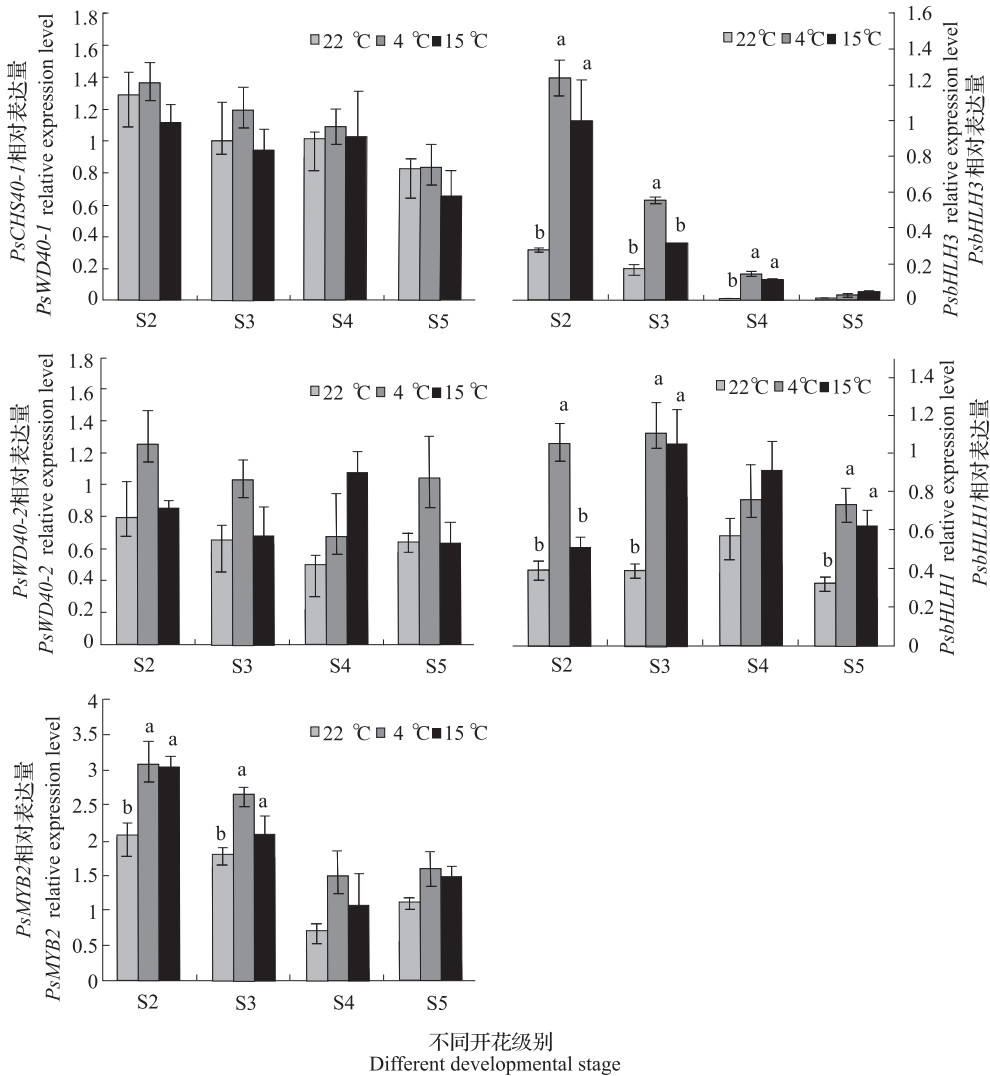


图 2 牡丹洛阳红切花不同温度处理下花青素苷合成调节基因的相对表达量分析

Fig. 2 Relative expression level analysis of regulatory genes involved in anthocyanin synthesis of *P. suffruticosa* 'Luoyang Hong' cut flower at different temperature treatments

**2.3.2 不同处理对牡丹切花花青素苷合成相关结构基因表达的影响** 对花青素苷代谢途径中相关结构基因表达量进行分析的结果如图 3 所示,破绽期(S2)时,4℃处理切花 *PsCHS1*、*PsCH11* 和 *PsF3'H1* 基因表达量均显著高于对照组;相同级别,15℃处理切花 *PsCHS1* 和 *PsCH11* 基因表达量

显著高于对照组,*PsF3'H1* 基因表达量显著低于 4℃处理而与对照组切花相比无明显差异。初开期(S3)时,4℃处理切花 *PsCHS1*、*PsCH11* 和 *PsANS1* 基因表达量显著高于对照组,*PsF3'H1*、*PsANS1* 和 *PsDFR1* 基因表达量显著高于 15℃处理。半盛花期(S4)时,4℃和 15℃处理切花

*PsCHS1*、*PsCHI1* 和 *PsDFR1* 基因表达量均显著高于对照组。盛开期 (S5) 时, 4 ℃ 处理切花 *PsCHS1*、*PsCHI1* 和 *PsDRF1* 基因表达量均显著高于对照组; 相同级别, 15 ℃ 处理切花 *PsF3'H1* 和 *PsDFR1* 基因显著高于对照组。牡丹洛阳红切花

开放过程中, 各处理结构基因 *PsCHS1*、*PsCHI1*、*PsF3H1* 和 *PsDFR1* 的表达量均呈现逐渐下降的趋势, 其中 *PsDRF1* 和 *PsANS1* 的表达量峰值均在初花期 (S3)。各处理比较发现 *PsF3H1* 基因的表达量无明显差异。

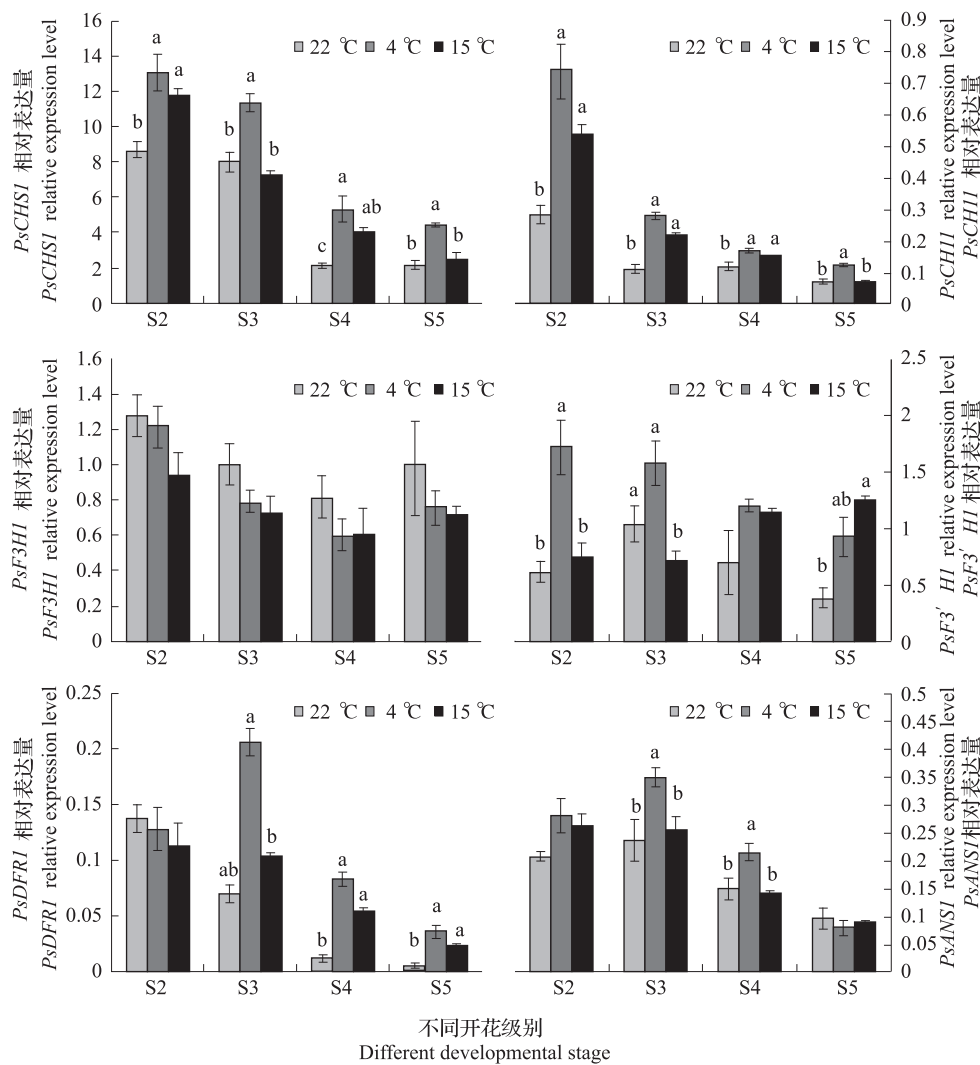


图3 牡丹洛阳红切花不同温度处理下花青素苷合成结构基因的相对表达量分析

Fig. 3 Relative expression level analysis of structural genes involved in anthocyanin synthesis of *P. suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ cut flower at different temperature treatments

3 讨论

本研究发现 4 ℃ 和 15 ℃ 的低温条件增加了牡丹洛阳红切花花瓣花青素苷含量, 改善切花花色品质, 表现为降低花色明度和增加花色红度、彩度。低温对花青素苷含量的促进作用在其他物种中也有报道, 如离体葡萄<sup>[20]</sup> 和紫菀 (*Aster tataricus* ‘Sungai’)<sup>[21]</sup>。温度不仅影响花青素苷的合成, 也影响花青素苷的稳定性。所以低温可能促进花青素苷的

生成, 同时也可能抑制花青素苷的降解。例如, 在 15 ℃ 低温条件下, 长叶车前花瓣中能够积累更多花青素苷, 而在 27 ℃ 较高温度下, 花青素苷含量有较大减少。这是因为较高的温度加速花青素苷的降解, 而低温会减缓花青素苷的降解速率<sup>[5]</sup>。

花青素苷在植物细胞中的含量与植物花青素苷合成结构基因的表达水平有着紧密的联系<sup>[22-23]</sup>。低温诱导花青素苷合成结构基因的表达, 使花青素苷含量升高, 如可使花青素苷合成上游途径中 *CHS*

和 *CHI* 基因的转录水平升高几倍。在牡丹洛阳红切花开放前期 (S2、S3), 与 22 °C 处理相比, 4 °C 和 15 °C 处理下的 *PsCHS1* 和 *PsCHI1* 表达水平有明显的上调, 说明低温促进了切花花青素苷合成结构基因中 *PsCHS1* 和 *PsCHI1* 的表达。推测低温主要调控牡丹洛阳红切花花青素苷上游合成途径中的 *PsCHS1* 和 *PsCHI1* 来影响花青素苷的积累。E. J. Huh 等<sup>[24]</sup> 研究发现花青素苷下游合成途径中的 *DFR* 和 *ANS* 基因对温度的响应很敏感。本研究发现 4 °C 处理下的 *PsF3'H1*、*PsDFR1* 和 *PsANS1* 基因的表达量在 S3 时期均显著高于 15 °C 处理。说明低温对牡丹洛阳红切花花青素苷下游合成途径的 *PsF3'H1*、*PsDFR1* 和 *PsANS1* 基因的响应也很敏感, 温度越低, 相关基因对温度的敏感度越强。这也可能是因为离体切花对温度因子的刺激相对较敏感。由上述分析可以得出, 低温主要对花青素苷合成相关结构基因中的 *PsCHS1*、*PsCHI1*、*PsF3'H1*、*PsDFR1* 和 *PsANS1* 进行调控来影响牡丹洛阳红切花花青素苷的积累, 这些基因高丰度的表达是导致切花花青素苷含量增加、花色加深的原因。韩科厅等<sup>[25]</sup> 对菊花的研究发现, 花青素苷合成基因表达出现峰值的时间比花青素苷含量出现峰值的时间早, 说明花青素苷合成相关基因的高表达对花青素苷的积累有持续性作用。从而解释了牡丹洛阳红切花开放后期 (S4、S5) 相关基因表达量逐渐下降, 而花青素苷仍保持高含量的原因。

调节基因在转录水平上对花青素苷的调控在许多植物中得到揭示<sup>[26-27]</sup>。随着转录因子对温度的响应, 花青素苷的最终积累量也会发生不同程度的变化。bHLH 蛋白以二聚体的形式结合到特异的 DNA 序列上来调控下游基因的表达<sup>[28]</sup>。比较分析本研究中 *PsbHLH1*、*PsbHLH3* 调节基因和下游结构基因 *PsDFR1*、*PsANS1*、*PsF3'H1*、*PsF3'H1* 表达量发现, 低温显著促进了 *PsbHLH1*、*PsbHLH3* 调节基因和下游结构基因 *PsDFR1*、*PsANS1*、*PsF3'H1* 的表达。其中 *PsbHLH3* 基因表达量的峰值比 *PsDFR1* 出现早一个开花级别; 而 *PsbHLH1* 基因未找到类似明显规律。另外, X. B. Xie 等<sup>[29]</sup> 研究发现苹果 *MdbHLH3* 转录因子可以结合到 *MdDFR* 的启动子, 上调此结构基因的表达。由此推测 *PsbHLH3* 对牡丹洛阳红切花花青素苷下游合成途径中的结构基因 *PsDFR1* 的表达起着正调控作用。Y. Ban 等<sup>[30]</sup> 对苹果 (*Malus domestica*) 果皮研究发现 *MdMYBA* 转录因子与 *ANS* 的启动子结合, 受到低温诱导后会促进果皮花

青素苷含量增加。本研究中, 低温处理显著促进了牡丹洛阳红切花花青素苷合成相关的调节基因 *PsMYB2* 和结构基因 *PsCHS1*、*PsCHI1*、*PsANS1*、*PsF3'H1* 的表达。分析发现 *PsMYB2* 基因表达量的峰值比 *PsANS1* 出现早一个开花级别。进而推测受低温影响后, *PsMYB2* 对牡丹洛阳红花青素苷下游合成途径中的结构基因 *PsANS1* 的表达起着正调控作用。然而, *PsMYB2* 和 *PsbHLH3* 调节基因在花青素苷合成途径中是否对上述相应结构基因起到关键性作用还需进一步研究验证。由于转录因子间的复杂互作及该作用的时空差异性, 目前仅在部分模式植物体内揭示了其转录调控机制<sup>[2]</sup>。牡丹洛阳红体内与花青素苷合成相关的调节基因如何发挥作用还需深入探讨。

综上所述, 低温使牡丹洛阳红切花花色明度下降, 红度和彩度增加, 花瓣花青素苷含量增加。分析与花青素苷合成相关基因的表达量得出, 低温通过调控与花青素苷合成相关的 *PsCHS1*、*PsCHI1*、*PsF3'H1*、*PsANS1*、*PsDFR1*、*PsMYB2*、*PsbHLH1* 和 *PsbHLH3* 基因的表达量来影响花青素苷的积累与合成。另外, 下游合成途径中 *PsDFR1*、*PsANS1* 和 *PsF3'H1* 基因对低温的响应相对敏感, 4 °C 处理后基因的表达量大幅上调, 且显著高于 15 °C 处理组。此研究为后续利用采后手段提高牡丹洛阳红切花花色品质奠定了理论基础, 对切花花色改良的研究具有十分重要的意义。长时间的低温处理能够增加切花花瓣花青素苷的含量并改善花色, 然而短时间低温处理能否也有积极的效果需后续研究验证。

## 参考文献

- [1] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments[J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57(1): 761-780
- [2] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. Plant J, 2008, 54(4): 733-749
- [3] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. Plant Sci, 2011, 181(3): 219-229
- [4] Weiss D, Schonfeld M, Halevy A H. Photosynthetic activities in the petunia corolla[J]. Plant Physiol, 1988, 87(3): 666-670
- [5] 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]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 11263-11275
- [6] 周琳, 王雁, 彭镇华. 牡丹查耳酮合酶基因 *Ps-CHS1* 的克隆及其组织特异性表达[J]. 园艺学报, 2010, 37(8): 1295-1302
- [7] 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
- [8] 张超, 高树林, 牡丹妮, 等. 牡丹 WD40 类转录因子基因 *PsWD40-1* 和 *PsWD40-2* 的分离与序列分析[J]. 生物技术通报, 2014, 45(2): 85-90

- [9] Stiles E A, Cech N B, Dee S M, et al. Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata* [J]. *Physiol Plant*, 2007, 129(4): 756-765
- [10] Nozaki K, Takamura T, Fukai S. Effects of high temperature on flower colour and anthocyanin content in pink flower genotypes of greenhouse chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) [J]. *J Hort Sci Biotechnol*, 2006, 81(4): 728-734
- [11] Zhang C, Wang W N, Wang Y J, et al. Anthocyanin biosynthesis and accumulation in developing flowers of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) ‘Luoyang Hong’ [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2014, 97: 11-22
- [12] Zhang C, Fu J X, Wang Y J, et al. Glucose supply improves petal coloration and anthocyanin biosynthesis in *Paeonia suffruticosa* ‘Luoyang Hong’ cut flowers [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2015, 101: 73-81
- [13] Wang X, Cheng C, Sun Q, et al. Isolation and purification of four flavonoid constituents from the flowers of *Paeonia suffruticosa* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1075(1-2): 127-131
- [14] 郭闻文, 董丽, 王莲英, 等. 几个牡丹切花品种的采后衰老特征与水分平衡研究 [J]. *林业科学*, 2004, 40(4): 89-93
- [15] Voss DH. Relating colorimeter measurement of plant color to the royal horticultural society colour chart [J]. *HortScience*, 1992, 27(12): 1256-1260
- [16] Nakatsuka A, Mizuta D, Kii Y, et al. Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea [J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 118(4): 314-320
- [17] 孟丽, 周琳, 张明妹, 等. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法 [J]. *生物技术*, 2006, 16(1): 38-40
- [18] 王彦杰, 董丽, 张超, 等. 牡丹实时定量 PCR 分析中内参基因的选择 [J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(5): 521-528
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [20] Azuma A, Yakushiji H, Koshita Y, et al. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions [J]. *Planta*, 2012, 236(4): 1067-1080
- [21] Shaked-Sachray L, Weiss D, Reuveni M, et al. Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment [J]. *Physiol Plant*, 2002, 114(4): 559-565
- [22] Collette V E, Jameson P E, Schwinn K E, et al. Temporal and spatial expression of flavonoid biosynthetic genes in flowers of *Anthurium andraeanum* [J]. *Physiol Plantarum*, 2004, 122(3): 297-304
- [23] Noda N, Kanno Y, Kato N, et al. Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) [J]. *Physiol Plantarum*, 2004, 122(3): 305-313
- [24] Huh E J, Shin H K, Choi SY, et al. Thermosusceptible developmental stage in anthocyanin accumulation and color response to high temperature in red chrysanthemum cultivars [J]. *Korean J Hort Sci*, 2008, 26(4): 357-361
- [25] 韩科厅, 赵莉, 唐杏娇, 等. 菊花花青素苷合成关键基因表达与花色表型的关系 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(3): 516-524
- [26] Yamagishi M. Oriental hybrid lily Sorbonne homologue of *Lh-MYB12* regulates anthocyanin biosyntheses in flower tepals and tepal spots [J]. *Mol Breeding*, 2011, 28(3): 381-389
- [27] Jiang R, Tian J, Song T, et al. The *Malus crabapple* transcription factor *McMYB10* regulates anthocyanin biosynthesis during petal coloration [J]. *Sci Horric-Amstersam*, 2014, 166(1): 42-49
- [28] Fan C, Purugganan M D, Thomas D T, et al. Heterogeneous evolution of the *Myc-like* Anthocyanin regulatory gene and its phylogenetic utility in *Cornus* L. (Cornaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 33(3): 580-594
- [29] Xie X B, Li S, Zhang R F, et al. The bHLH transcription factor *MdbHLH3* promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(11): 1884-1897
- [30] Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, et al. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 958-970

(上接第 294 页)

- [17] 郑玉红. 中国薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 周生翅组 (Sect. *Enantiophyllum*) 的系统学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006
- [18] 吴宝成, 杭悦宇, 赵亚美, 等. 薯蓣属植物花结构与花形态 [C]//全国系统与进化植物学研讨会暨第九届系统与进化植物学青年研讨会论文摘要集. 北京: 植物学报编辑部, 2006
- [19] 胡适宜. 被子植物胚胎学 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982
- [20] Herr J M. Embryology and taxonomy in B M Johri (Ed), *Embryology of angiosperms* [M]. Berlin: Springer Verlag, 1984, 649-650
- [21] 杨弘远. 水稻生殖生物学 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005: 19-69
- [22] 冯玲枫. 细叶连蕊茶和短柄细叶连蕊茶大小孢子发生及其雌雄配子体发育的研究 [D]. 浙江: 浙江师范大学, 2011
- [23] Dahlgren R, Clifford H T. The Monocotyledons: A comparative study [M]. London: Academic Press Inc. Ltd, 1982
- [24] 潘芝梅, 郑小艳, 滕元文. 早美丽李雌雄蕊败育过程的解剖学观察 [J]. *果树学报*, 2009, 26(1): 43-47
- [25] Burd M. Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set [J]. *Bot Rev*, 1994, 60(1): 83-139
- [26] 杨培周, 郭海滨, 赵杏娟, 等. 广东高州普通野生稻生殖特性的研究 II. 胚囊育性、胚囊发育、胚胎发生和胚乳发育 [J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(2): 136-143
- [27] 黄云, 王洪波, 李庆, 等. 山药炭疽病研究—工炭疽病的症状及其病原鉴定 [J]. *西南农业大学学报: 自然科学版*, 2004, 26(1): 44-46, 54
- [28] 尤淑芬, 叶娇, 潘程远. 柑橘雌性不育研究进展 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2011, 33(1): 1-3