

滇山茶狮子头及其芽变品种大玛瑙间花色差异分析

周麟¹, 雍清青¹, 姚响², 陈晓娟¹, 黄顺满¹, 屈燕¹

(¹西南林业大学园林园艺学院/国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心/云南省功能性花卉资源及产业化技术工程研究中心, 昆明 650224; ²昆明市绿化工程质量检测站, 昆明 650224)

摘要: 滇山茶是世界著名观赏花木, 花色是其重要的观赏性状。滇山茶狮子头花色为深红色, 而其芽变品种大玛瑙是滇山茶中唯一红白双色的名贵品种, 极具观赏价值。以上述2个品种为研究材料, 采用RHSCC比色卡比色法和色差仪测定2个品种滇山茶花蕾期和盛花期花瓣的花色表型, 并基于转录组与代谢组分析挖掘呈色相关的关键代谢物及关键基因。花青素靶向代谢分析表明, 在滇山茶2个品种中共鉴定出28种花青素代谢物, 其中狮子头与大玛瑙红色区域花瓣间没有差异代谢物, 狮子头与大玛瑙白色区域花瓣间的关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素B2、原花青素B3、阿福豆苷, 大玛瑙花瓣的红白区域关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素B2、阿福豆苷。转录组KEGG分析结果表明, 苯丙醇生物合成和类黄酮生物合成途径与大玛瑙红白双色花瓣的形成有关; 植物激素信号转导和昼夜节律-植物途径与滇山茶花色芽变有关。转录代谢联合分析共筛选出与滇山茶呈色高度相关的差异表达基因共17条, 包括4条CHS、3条HCT、2条F3'H、1条LAR、5条MYB和2条bHLH。本研究结果对进一步揭示花色芽变育种具有一定的参考意义。

关键词: 滇山茶; 花青素苷; 花色; 代谢组; 转录组

Analysis of Flower Color Difference Between *Camellia reticulata* 'Shizitou' and its Bud Mutant 'Damanao'

ZHOU Lin¹, YONG Qingqing¹, YAO Xiang², CHEN Xiaojuan¹, HUANG Shunman¹, QU Yan¹

(¹College of Landscape and Horticulture, Southwest Forestry University/Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture under National Forestry and Grassland Administration/Yunnan Engineering Research Center for Functional Flower Resources and Industrialization, Kunming 650224; ²Kunming Greening Engineering Quality Detecting Test Station, Kunming 650224)

Abstract: *Camellia reticulata* is a famous ornamental flower in the world, and its flower color is an important ornamental character. The flower color of *Camellia reticulata* 'Shizitou' is deep red, while its bud mutant 'Damanao' showing white-red mixed flower is rare with great ornamental value. In this study, both varieties were analyzed at the flower traits by RHSCC colorimetric method, and their metabolites and transcriptional profiles were examined based on transcriptome and metabolome methodologies. Anthocyanin targeted metabolic analysis detected 28 anthocyanin metabolites. There were no different metabolites between the petals of 'Shizitou' and 'Damanao' in the red region, while the main different metabolites between the white region of the petals of 'Shizitou' and 'Damanao' were centaurin-3-O-sambudigoside, proanthocyanidin B2, proanthocyanidin B3 and afotoside. The main different metabolites between white and red region of 'Damanao' petals were centaurin-3-O-sambuloside, proanthocyanidin B2 and afoside. Transcriptomic KEGG analysis showed that the genes in phenylpropanol biosynthesis and flavonoid biosynthesis pathways were related to the

收稿日期: 2023-09-06 修回日期: 2023-10-02 网络出版日期: 2023-12-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230906003>

第一作者研究方向为园林植物与观赏园艺, E-mail: 1617574776@qq.com

通信作者: 屈燕, 研究方向为园林植物资源开发与利用, E-mail: quyan@swfu.edu.cn

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2019YFD1001005); 云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-20190211)

Foundation projects: National “13th Five-Year Plan” Key Research and Development Plan Project (2019YFD100100005); Ten Thousand Talent Plans For Young Top-Notch Talents of Yunnan Province (YNWR-QNBJ-20190211)

formation of red and white bicolor petals of ‘Damanao’. Plant hormone signal transduction and circadian rhythm-plant pathway were associated with flower color bud change of *Camellia reticulata*. Transcriptional and metabolic joint analysis identified 17 differentially expressed genes highly related to the color of *Camellia reticulata*, including 4 *CHS*, 3 *HCT*, 2 *F3'H*, 1 *LAR*, 5 *MYB* and 2 *bHLH*. This study provided a reference for future breeding based on the flower color bud mutation.

Key words: *Camellia reticulata*; anthocyanin glycosides; flower color; metabolome; transcriptome

滇山茶(*Camellia reticulata* Lindl.)是中国传统花木之一,因其花大茂盛、花姿多样、花色绚丽,被誉为花中娇客^[1-2]。花色是滇山茶重要的观赏性状^[3],其原始花色为红色,通过芽变可以产生白色、粉色以及红白双色的品种。其中,滇山茶大玛瑙(*C. reticulata* ‘Damanao’)是由狮子头(*C. reticulata* ‘Shizitou’)芽变产生的品种。大玛瑙同一花冠呈现红白两种颜色,形成双色花,具有更高的观赏价值,是研究双色花形成分子机制的理想材料。

山茶属植物花色早期研究发现类黄酮是其花色的主要色素成分,其中红山茶组花瓣的主要呈色物质为花青素苷^[4-6]。目前在红山茶组植物中已检测出矢车菊素、天竺葵素、芍药花素、飞燕草素,其中以Cy型花青素苷为主^[7]。红山茶组植物Cy型花青素苷研究表明,不同物种的花青素苷成分存在明显差异。浙江红山茶(*C. chekiangolesea* Hu.)Cy结构上通常连接有3-单糖基,怒江红山茶(*C. saluenensis* Stapf ex bean.)和西南红山茶(*C. Pitardii*)Cy结构上有3,5-二糖基,窄叶西南红山茶(*C. pitardii* var. *yunnanica*)和滇山茶Cy结构上多具有3-(2-xylosyl)-单糖基^[8-11]。

目前关于双色花形成的分子机理已逐渐被阐明,但物种之间存在差异。邓娇等^[12]在双色花莲大洒锦(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)中发现调控花瓣边缘的基因同时也调控着花青素苷的积累从而形成了白色底部红色边缘的双色花。徐雷锋^[13]发现花青素苷生物合成途径上的结构基因在花被片下部特异性协同表达导致花青素苷特异性地在花被片下部积累,从而形成了下红上白的双色百合花(*Lilium* spp.)。Liu等^[14]在红黄双色文心兰(*Oncidium flexuosum* Lodd.)黄色花瓣中发现*CHS*基因启动子的高甲基化水平导致其缺乏花青素苷的积累。Yu等^[15]在山茶(*C. japonica* Linal.)中发现红色花瓣区比粉红色花瓣区的花青素积累量高,花青素生物合成、修饰和转运基因在红色条纹中高度表达。

红山茶组植物前期花色相关研究的开展为双

色滇山茶研究奠定了理论基础,目前关于芽变形成双色滇山茶的机制尚不清楚。本研究以狮子头及其芽变品种大玛瑙为研究材料,利用代谢组和转录组分析两者间的差异代谢物和差异基因,从而为滇山茶的品种改良和花色创新提供理论依据。

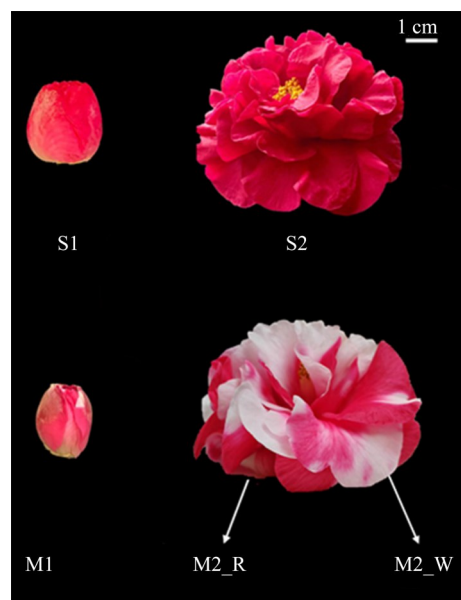
1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为滇山茶狮子头及其芽变品种大玛瑙,所有试验材料均采集于云南省昆明市西南林业大学后山苗圃基地(102°45'53"E,25°4'0"N),采集时间为2022年1月至2月。

1.2 样品采集

采集滇山茶2个品种花蕾期和盛花期花瓣,其中大玛瑙盛花期红色区域和白色区域花瓣分开采样(图1)。



S1: 狮子头花蕾期; S2: 狮子头盛花期; M1: 大玛瑙花蕾期; M2_R: 大玛瑙盛花期红色区域; M2_W: 大玛瑙盛花期白色区域; 下同
S1: *C. reticulata* ‘Shizitou’ bud stage; S2: *C. reticulata* ‘Shizitou’ blooming period; M1: *C. reticulata* ‘Damanao’ bud stage; M2_R: Red area of *C. reticulata* ‘Damanao’ in full bloom; M2_W: White area of *C. reticulata* ‘Damanao’ in full bloom; The same as below

图1 滇山茶花色表型

Fig.1 Flower color of *C. reticulata*

采集花朵后迅速将花萼和花蕊剥去,收集花瓣,用干冰保存,带回实验室后存在-80℃超低温冰箱保存,每组样品3个生物学重复,共计15个样品,送至武汉迈维生物科技有限公司进行花青素靶向代谢和转录组检测;采集新鲜花瓣用于花色表型鉴定。

1.3 花色表型鉴定

采集滇山茶2个品种花蕾期、盛花期的新鲜花瓣,在光线良好、避免直射光的条件下,用英国皇家园艺学会比色卡(RHSCC, royal horticultural society color chart)对花瓣颜色均匀部分的花色进行初步测量,重复10次,以出现频率最高的结果作为最终花色^[16]。同时利用美国爱色丽RM200QC色差仪对上述花瓣材料测色,测量其明度 L^* 值、色相 a^* 与 b^* 值,重复测定3次取平均值。

1.4 花青素的提取及定性定量分析

利用球磨仪将滇山茶2个品种花蕾期、盛花期的新鲜花瓣研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉末状;称取50 mg的粉末,溶解于500 μ L的提取液(50%的甲醇水溶液,含0.1%盐酸)中;涡旋5 min,超声5 min,离心3 min(12000 r/min, 4℃),吸取上清,重复操作1次;合并两次上清液,用微孔滤膜(0.22 μ m pore size)过滤样品,并保存于进样瓶中,用于液相色谱串联质谱(LC-MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry)分析。

超高效液相色谱(UPLC, ultra performance liquid chromatography)和串联质谱(MS/MS, tandem mass spectrometry)进行数据采集:色谱柱为ACQUITY BEH C18(1.7 μ m, 2.1 mm*100 mm);流速:0.35 mL/min;进样量2 μ L。以0.1%的甲酸水溶液(A)和0.1%的甲酸甲醇溶液(B)为流动相0 min B相比比例为5%,6 min增至50%,12 min增至95%,保持2 min,14 min降至5%,并平衡2 min;质谱分析条件:电喷雾离子源(ESI, electrospray ionization)温度550℃,正离子模式下质谱电压5500 V,气帘气(CUR, curtain gas)35 psi。在Q-Trap6500+中,每个离子对根据优化的去簇电压(DP, declustering potential)和碰撞能(CE, collision energy)进行扫描检测。基于标准品 isoReag(50%甲醇配制, 1 mg/mL)构建 MWDB(Metware database)数据库,对质谱检测的数据进行花青素化合物的鉴定。定量分析利用三重四级杆质谱的多反应监测模式(MRM, multiple reaction monitoring)分析完成。通过Analyst 1.6.3软件对检测到的数据进行定性定量分

析。用MultiaQuant软件对质谱结果进行色谱峰的积分和校正,得到不同代谢物质的含量。Orign软件用于花青素代谢物化合物分类统计,TBtools软件对代谢物进行韦恩图和聚类热图分析。以正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA, orthogonal partial least squares discriminant analysis)中筛选模型变量的变量权重值VIP \geq 1,以及 t 试验中 $P < 0.05$ 为条件筛选差异代谢物。采用SPSS软件对滇山茶2个品种各开花时期颜色参数与花瓣中原花青素、矢车菊素和黄酮类化合物进行皮尔逊(Pearson)相关性分析,显著性系数 $P < 0.05$ 且皮尔逊相关系数 $|r| \geq 0.6$ 被认定为二者之间具有相关性,利用TBtools绘制相关热图。

1.5 转录组测序及差异基因分析

首先对样品RNA质量进行检测,通过琼脂糖凝胶电泳分析RNA的完整性及是否存在DNA污染;NanoPhotometer分光光度计检测RNA纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)和(OD₂₆₀/230);Qubit 2.0荧光计测量RNA浓度;Agilent 2100生物分析仪检测RNA完整性。从总RNA中去除核糖体RNA,从而得到mRNA。随后加入fragmentation buffer将RNA打断成短片段,以短片段RNA为模板,用六碱基随机引物(Random hexamers)合成第一链cDNA,然后加入缓冲液、dNTPs(dUTP、dATP、dGTP和dCTP)和DNA polymerase I合成二链cDNA,随后利用AMPure XP beads纯化双链cDNA。纯化的双链cDNA再进行末端修复、加A尾并连接测序接头,然后用AMPure XP beads进行片段大小选择,最后进行PCR富集得到最终的cDNA文库。

通过Illumina测序平台对样品测序分析,使用DIAMOND BLASTX软件将基因序列与数据库比对,进而获得基因的注释信息。使用DESeq进行样品组间的差异表达基因分析,将 $|\log_2\text{Fold Change}| \geq 1$,且FDR < 0.05 为筛选差异基因标准。通过迈维云平台在线网站(<https://cloud.metware.cn/#/home>)进行KEGG富集分析,挑选富集最显著的20条通路条目进行展示,若富集的通路条目不足20条,则全部展示。以“转录因子”为关键词检索转录注释文件,检索所有推测的转录因子。比较分析大玛瑙红白双色花瓣间以及与其母本狮子头间的差异表达转录因子,并统计转录因子数量和类型。

1.6 联合分析

采用SPSS软件对前期筛选的差异代谢物、差

异结构基因和转录因子的数据集做皮尔逊相关分析, 显著性系数 $P < 0.05$ 且皮尔逊相关系数 $|r| \geq 0.5$ 被认定为两者之间具有相关性, 最后利用 Cytoscape 软件进行可视化构图。

2 结果与分析

2.1 滇山茶花色表型观测

RHSCC 比色卡比对结果表明, 滇山茶 2 个品种在同一时期不同品种和同一品种不同时期均存在

花色差异(表 1)。为了更加准确地评价 2 个品种滇山茶花色, 本研究利用色差仪测定了 2 个品种滇山茶不同时期花瓣的颜色参数 L^* 、 a^* 和 b^* 值。大玛瑙花蕾期 L^* 、 b^* 显著大于狮子头花蕾期, 而 a^* 显著小于狮子头花蕾期。狮子头盛花期和大玛瑙盛花期红色区域花瓣的 L^* 、 a^* 和 b^* 不存在差异性, 而与大玛瑙盛花期白色区域花瓣存在显著差异。滇山茶 2 个品种在花瓣发育过程中 L^* 、 a^* 和 b^* 均存在显著性差异, 其中大玛瑙白色区域变化最为显著。

表 1 2 个品种滇山茶的花色数据

Table 1 Flower color parameters in two cultivars of *C. reticulata*

品种 Cultivar	时期 Period	比色卡代码 RHCSS code	明度 L^*	红度 a^*	蓝度 b^*
狮子头 <i>C. reticulata</i> 'Shizitou'	S1	Strong Purplish Red 58B	42.92±1.96c	36.22±0.77b	4.45±0.41b
	S2	Moderate Red N45B	35.79±2.59d	48.57±0.72a	15.46±1.41a
大玛瑙 <i>C. reticulata</i> 'Damao'	M1	Strong Red 53C	52.80±0.74b	21.19±1.23c	7.54±0.70c
	M2_R	Strong Purplish Red 58B	37.81±3.25d	48.67±0.70a	11.40±0.26a
	M2_W	White NN155D	77.05±2.48a	0.58±0.19d	-0.06±0.17d

同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters in the same column of data indicate significant difference ($P < 0.05$)

2.2 代谢组分析

2.2.1 滇山茶花瓣中花青素代谢物定性定量分析

对狮子头及其芽变品种大玛瑙不同发育阶段的花瓣进行花青素靶向代谢组分析, 其中大玛瑙盛花期白色区域花瓣和红色区域花瓣分开检测, 2 个品种共检测到 28 种花青素化合物, 其中包括 10 种矢车菊素、4 种天竺葵素、2 种芍药花素、6 种原花青素和 6 种黄酮类化合物, 且 2 个品种各时期花青素化合物的类型相同。

对滇山茶 2 个品种不同时期的花瓣进行花青素

化合物成分比较, 发现总花青素含量 $S1 > S2 > M2_R > M1 > M2_W$, 表明花青素化合物的积累与滇山茶花色性状密切相关(表 2)。其中矢车菊素、原花青素和黄酮类化合物是滇山茶 2 个品种花瓣中的主要花青素化合物。将矢车菊素、原花青素和黄酮类化合物进行聚类分析, 发现 S1、S2、M1 与 M2_R 聚为一支, M2_W 单独一支, 其中 S1 与 S2、M1 与 M2_R 又各自聚为一小支, 表明狮子头与大玛瑙红色区域花瓣在发育过程中花青素代谢物变化相似, 与其白色区域的变化不同(图 2)。

表 2 滇山茶各时期花青素化合物的含量

Table 2 Contents of anthocyanin compounds in *C. reticulata* at different periods

时期 Period	矢车菊素 Cyanidin	天竺葵素 Pelargonidin	芍药花素 Peonidin	原花青素 Procyanidins	黄酮类化合物 Flavonoid	总含量 Total content
大玛瑙花蕾期 M1	1015.03	10.01	3.68	3611.56	962.12	5602.40
大玛瑙盛花期白色区域 M2_W	173.27	0.52	0.31	870.61	261.23	1305.94
大玛瑙盛花期红色区域 M2_R	1879.52	23.00	9.01	3860.84	1415.70	7188.07
狮子头花蕾期 S1	2922.01	42.78	13.64	5516.42	2329.14	10823.99
狮子头盛花期 S2	2503.07	31.23	11.37	4400.22	2030.59	8976.48

2.2.2 滇山茶 2 个品种间及大玛瑙品种内差异代谢物分析

为进一步筛选与滇山茶花色相关的花青素代谢物, 在矢车菊素、原花青素和黄酮类化合物的基础上筛选不同比较组间的差异代谢物。狮子

头与大玛瑙比较, S1-M1 间存在 22 种差异代谢物, S2-M2_R 间不存在差异代谢, S2-M2_W 间存在 15 种差异代谢物, 其中 S1-M1 与 S2-M2_W 共有 15 种差异代谢物(图 3), 是狮子头与大玛瑙白色区域花

瓣间主要差异代谢物。大玛瑙不同时期不同颜色比较, M1-M2_R 间不存在差异代谢物, M1-M2_W 间存在 11 种差异代谢物; M2_R-M2_W 间存在 10 种

差异代谢物, 其中 M1-M2_W 与 M2_R-M2_W 共有 8 种差异代谢物, 是大玛瑙发育过程中形成红白双色的主要差异代谢物。

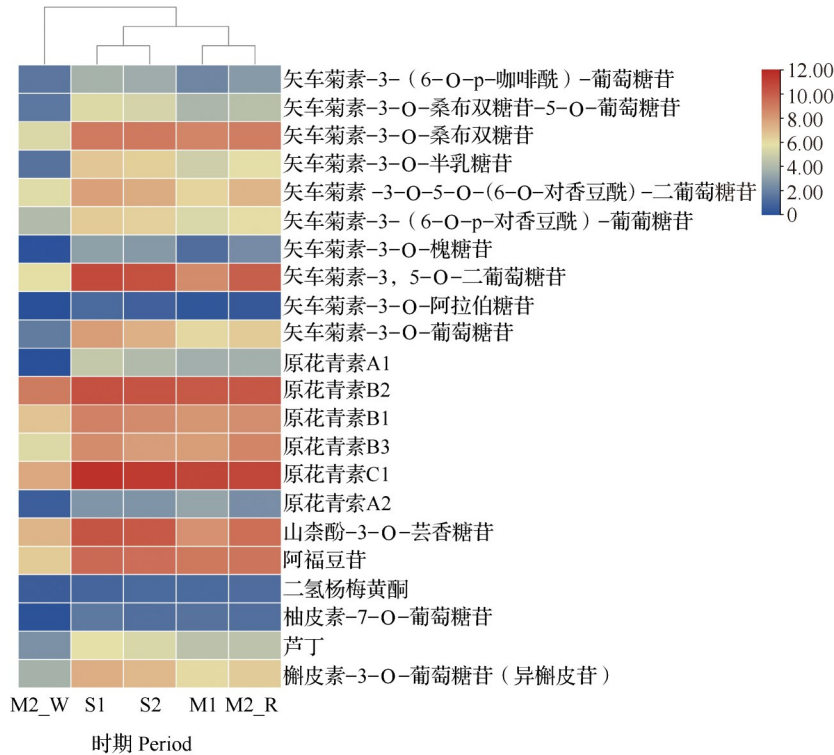
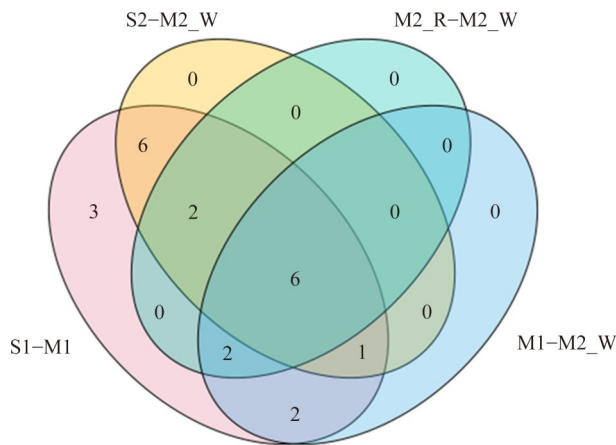


图2 花青素苷合成相关代谢物聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of metabolites related to anthocyanin synthesis



S1-M1: S1 样品与 M1 样品进行比较; S2-M2_R: S2 样品与 M2_R 样品进行比较; S2-M2_W: S2 样品与 M2_W 样品进行比较; M1-M2_R: M1 样品与 M2_R 样品进行比较; M1-M2_W: M1 样品与 M2_W 样品进行比较; 下同

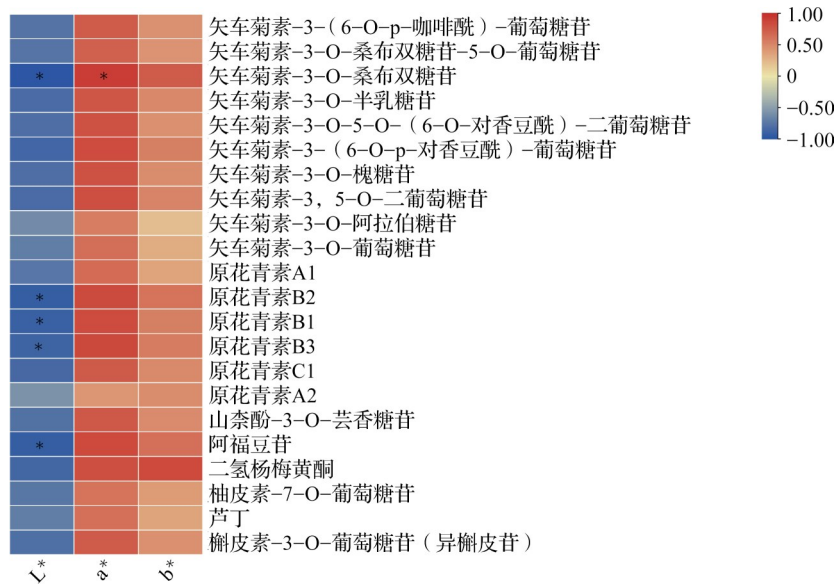
S1-M1: S1 sample is compared with M1 sample; S2-M2_R: S2 sample is compared with M2_R sample; S2-M2_W: S2 sample is compared with M2_W sample; M1-M2_R: M1 sample is compared with M2_R sample; M1-M2_W: M1 sample is compared with M2_W sample; The same as below

图3 差异代谢物韦恩图

Fig.3 Venn diagram of differential metabolites

2.2.3 花色参数和差异代谢物联合分析 通过表2 可以得出矢车菊素、原花青素和黄酮类化合物是滇山茶 2 个品种的主要呈色物质, 将这 3 类化合物进行差异分析, 发现 M2_R-M2_W 间存在 10 种差异代谢物, 其中 M1-M2_W 与 M2_R-M2_W 共有 8 种差异代谢物, 将这些差异代谢物与花色参数进行相关分析。结果表明主要差异代谢物与 L* 值呈负相关, 与 a* 值和 b* 值呈正相关, 其中阿福豆苷、原花青素 B1、原花青素 B2、原花青素 B3、矢车菊素-3-O-桑布双糖苷与 L* 值呈显著负相关; 矢车菊素-3-O-桑布双糖苷与 a* 值呈显著正相关(图 4)。

综上所述, 狮子头与大玛瑙红色区域花瓣没有关键差异代谢物; 狮子头与大玛瑙白色区域花瓣的关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素 B2、原花青素 B3、阿福豆苷; 大玛瑙红白双色形成的关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素 B2、阿福豆苷。



蓝色和红色的强度表示正和负的水平相关性。*表示在 $P < 0.05$ 水平显著相关
 Blue and red colors in the heat map indicates the level of positive and negative correlation, respectively.
 * indicate significant correlation at $P < 0.05$ level

图4 滇山茶花瓣颜色参数 L^* 、 a^* 、 b^* 值和主要差异代谢物相关性

Fig.4 Correlation of L^* , a^* , b^* values of color parameters and major differential metabolites of *C. reticulata* petals

2.3 转录组分析

2.3.1 2个品种滇山茶转录组测序质量分析 通过高通量测序及质量控制后,共获得99.56 Gb有效数

据,获得序列的Q20值均大于97.23%,Q30碱基百分比在92.80%及以上,GC含量均大于42.81%(表3)。表明测序数据可靠,可用于后续分析。

表3 滇山茶有效数据评估统计

Table 3 Effective data evaluation statistics of *C. reticulata*

样品序号 Sample No.	原始数据 Raw reads	有效数据 Clean reads	错误率(%) Error rate	G和C百分比(%) GC content	Q20(%)	Q30(%)
M1-1	46093276	44519822	0.03	44.00	97.47	92.87
M1-2	46709102	42826016	0.03	42.81	97.57	93.16
M1-3	45352142	43330496	0.03	43.40	97.54	93.05
M2_R-1	45973558	43038734	0.03	44.33	97.23	92.41
M2_R-2	47744342	44721914	0.03	44.60	97.38	92.80
M2_R-3	46768442	43573100	0.03	43.96	97.41	92.89
M2_W-1	50861110	47319610	0.03	44.60	97.42	92.86
M2_W-2	50588878	46730486	0.03	44.39	97.56	93.17
M2_W-3	45193510	42681490	0.03	44.56	97.28	92.55
S1-1	45791088	43078814	0.03	43.32	97.37	92.68
S1-2	46643488	44805418	0.03	44.30	97.43	92.81
S1-3	43199250	41318522	0.03	43.81	97.70	93.43
S2-1	46413794	43810836	0.03	43.62	97.43	92.85
S2-2	46082534	43429716	0.03	44.33	97.50	93.06
S2-3	52588554	48517252	0.03	44.09	97.40	92.81

-1、-2、-3表示3个重复

-1, -2 and -3 indicate three repetitions

2.3.2 滇山茶 2 个品种间及大玛瑙品种内差异表达

基因 为了探究红白双色滇山茶形成原因及其与母本间花色差异相关的关键差异基因,从品种间与品种内两个方面进行比较分析,共筛选出 41387 条差异表达基因。大玛瑙品种内差异表达分析表明, M1 与 M2_R 相比有 27655 条差异表达基因,其中有 13812 条在 M1 中上调表达,有 13843 条下调表达(图 5); M1 与 M2_W 相比有 28926 条差异表达基因,其中有 14359 条在 M1 中上调表达,有 14567 条下调表达; M2_R 与 M2_W 相比有 327 条差异表达基因,其中有 106 条在 M2_R 中上调表达,有 221 条下调表达。狮子头与大玛瑙品种间差异表达分析表明, S1 与 M1 相比有 1491 条差异表达基因,其中有 717 条在 M1 中上调表达,有 774 条下调表达; S2 与 M2_R 相比有 8756 条差异表达基因,其中有 3699 条在 S2 中上调表达,有 5057 条下调表达; S2 与 M2_W 相比有 9672 条差异表达基因,其中有 4140 条在 S2 中上调表达,有 5532 条下调表达。其中狮子头与大玛瑙红色区域花瓣间共有 252 条差异表达基因;狮子头与大玛瑙白色区域花瓣间共有 286 条差异表达基因;大玛瑙品种内共有 97 条差异表达基因(图 6)。

2.3.2 KEGG 功能注释分析 KEGG 富集分析结

果表明(图 7),共有 8257 条差异表达基因被定位到 146 条 KEGG 通路中,其中狮子头与大玛瑙间富集最显著的是植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)和昼夜节律-植物途径(Circadian rhythm-plant)。大玛瑙品种内富集最显著的为苯丙醇生物合成(Pheylpropanoid biosynthesis)和类黄酮生物合成途径(Flavonoid biosynthesis)。

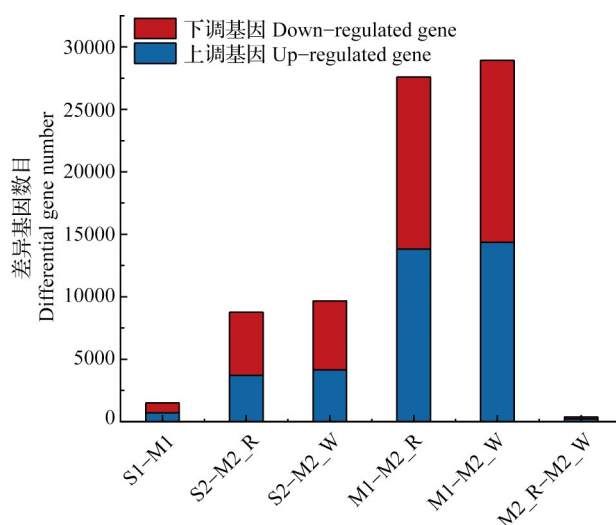
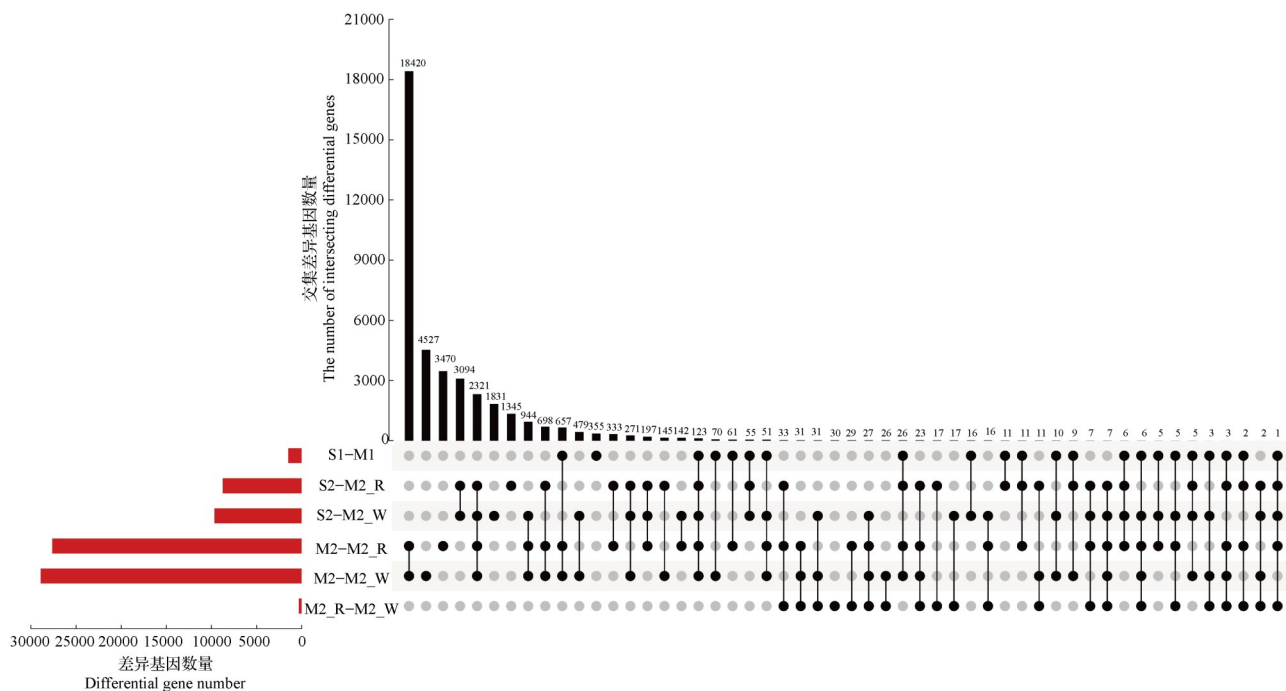


图 5 上/下调基因统计图

Fig.5 Up/Down-regulated gene statistical map

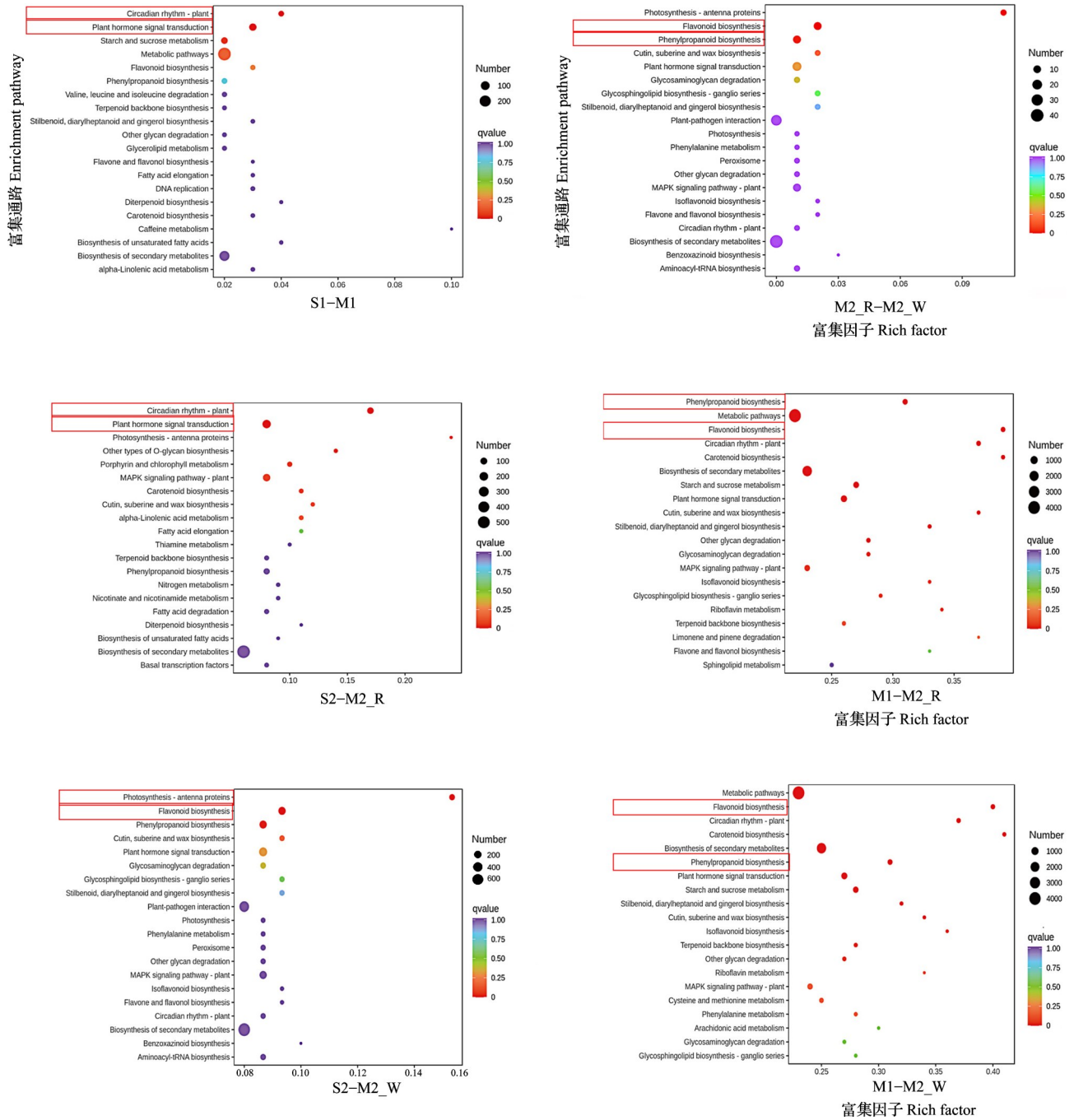


黑点表示比较组特有差异表达基因,连接线表示比较组和比较组共有差异表达基因

The black dots represent differentially expressed genes unique to the comparison group, and the connecting lines represent differentially expressed genes shared by the comparison group and the comparison group

图 6 滇山茶差异基因 UpSet 图

Fig.6 UpSet map of differential genes in *C. reticulata*



前3个图表示狮子头与大玛瑙间富集通路,图中红框表示昼夜节律-植物途径-植物激素信号转导;

后3个图表示大玛瑙品种内最富集的通路,图中红框表示类黄酮生物合成途径、苯丙醇生物合成

The first three figures represent the enrichment pathway between *C. reticulata* 'Shizitou' and *C. reticulata* 'Damanao', and the red box represents the circadian rhythm-plant and plant hormone signal transduction.

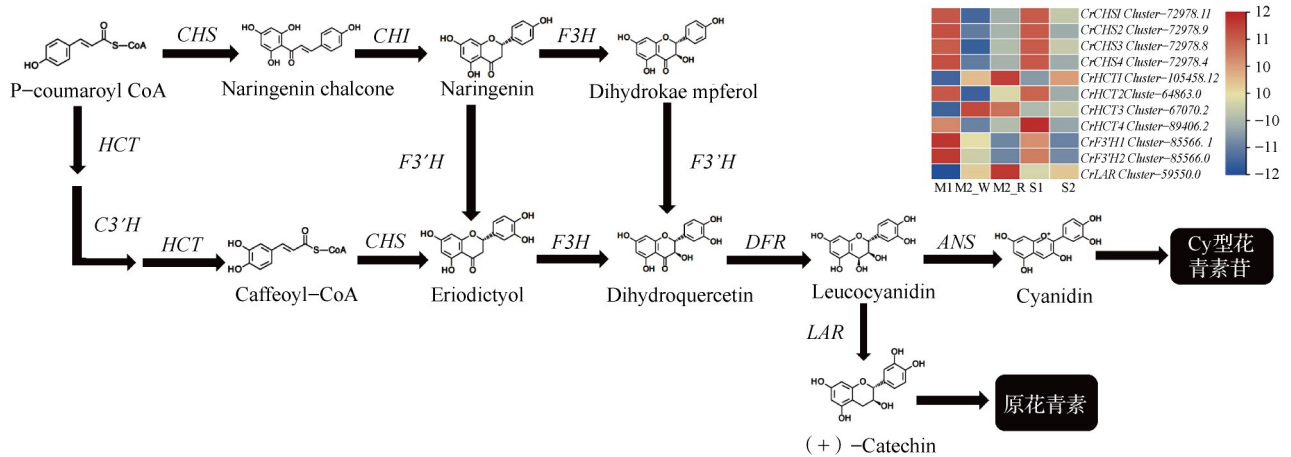
The last three figures represent the most enriched pathways in the *C. reticulata* 'Damanao' varieties, and the red boxes represent the flavonoid biosynthesis and phenylpropanol biosynthesis

图7 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.7 KEGG enrichment analysis of genes expression in pathway

2.3.2 花青素苷代谢途径差异基因筛选 花青素苷属于类黄酮化合物,选择与花青素苷合成密切相关的两条重要代谢途径,类黄酮生物合成通路和花青素生物合成通路进行分析。在狮子头与大玛瑙红色区域花瓣、狮子头与大玛瑙白色区域花瓣共有以及大玛瑙品种内差异表达基因中共筛选出11条与花青素苷合成相关的酶基因,包括4条*CHS*、4条*HCT*、2条*F3'H*、1条*LAR*。结果显示,编码同一个合

成酶的不同基因成员在不同花色、不同花发育时期的表达模式差异比较大(图8)。在花青素苷生物合成通路中,*CrCHS1*、*CrCHS2*、*CrCHS3*、*CrCHS4*、*CrHCT2*、*CrHCT4*、*CrF3'H1*和*CrF3'H2*基因在滇山茶2个品种花蕾期显著高表达。*CrHCT1*、*CrHCT2*、*CrLAR*在大玛瑙盛花期红色区域显著高表达,而*CrHCT3*在大玛瑙盛花期白色区域显著高表达,推测大玛瑙红白双色的形成与花青素苷生物合成上游基因有关。



图中热图表示花青素苷合成酶相关基因在2个滇山茶品种不同时期的表达量

The heat map shows the expression levels of anthocyanin synthase related genes in two varieties of *C. reticulata* at different periods

图8 花青素苷生物合成通路

Fig.8 Anthocyanin biosynthesis pathway diagram

植物花青素苷生物合成不仅受其合成途径的结构基因调控,还受到转录因子的调控。在狮子头与大玛瑙红色区域花瓣、狮子头与大玛瑙白色区域花瓣共有差异表达基因和大玛瑙品种内差异表达基因中共筛选到40条编码转录因子的候选差异表达基因。由图9可知筛选得到的转录因子中以MYB家族成员为主,其次是C2H2、HB等转录因子家族成员。

2.4 联合分析

已经证实MYB-bHLH-WD40(MBW)复合物参与调节植物的颜色。本研究检测到8条MYB,3条bHLH,没有检测到与WD40相关的基因(图9)。利用Cytoscape软件对上述两种转录因子以及滇山茶花青素苷合成通路上的关键差异代谢物和关键差异基因进行相关性分析(图10),结果表明,有5条MYB和2条bHLH与花青素苷合成通路的4条CHS、3条HCT、2条F3'H和1条LAR密切相关。其中*CrHCT3*与阿福豆苷、矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原

花青素B2之间存在负相关,说明*CrHCT3*可能逆向调控花青素苷的合成。

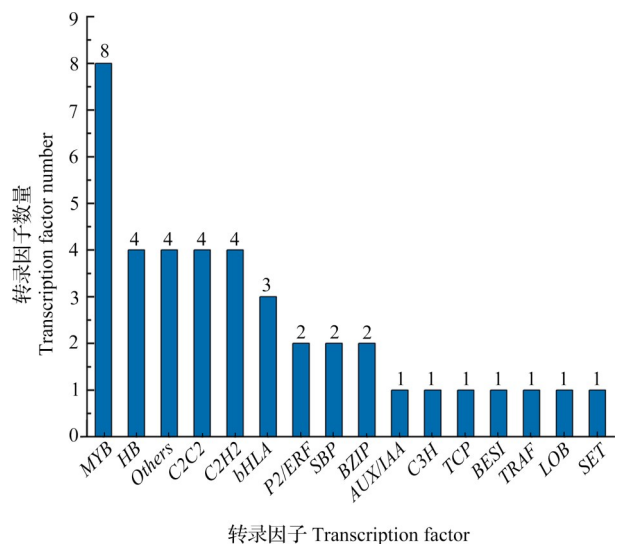
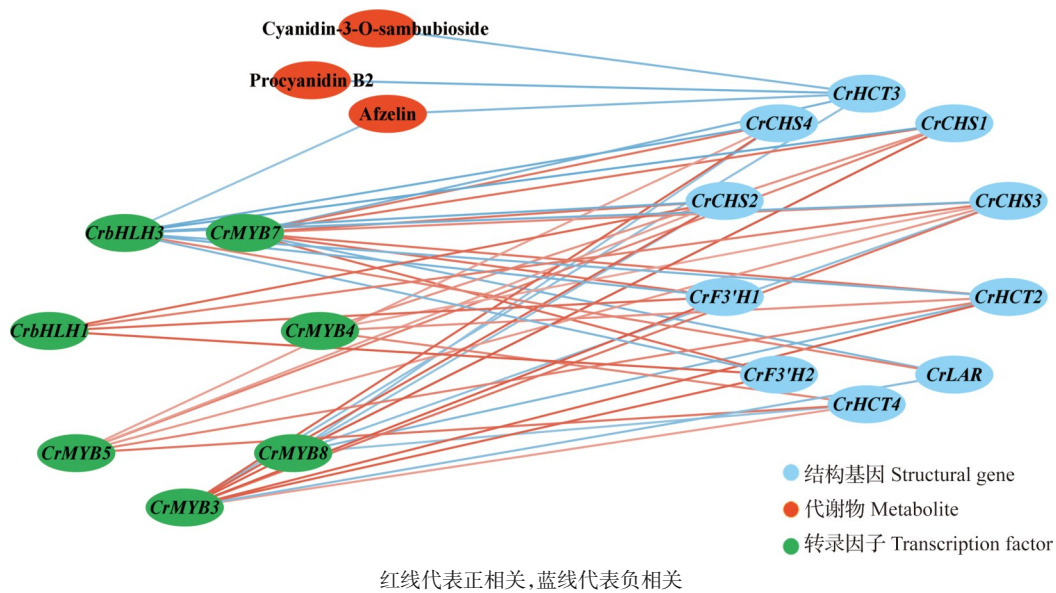


图9 转录因子家族中涉及的转录因子数量

Fig.9 Number of transcription factors involved in the transcription factor families



红线代表正相关, 蓝线代表负相关

Red lines represent positive correlations, and blue lines represent negative correlations

图 10 相关网络图

Fig.10 Correlation network diagram

3 讨论

滇山茶是世界著名观赏花木, 花色变异丰富, 其芽变选育的双色花品种花色新奇, 具有更高的观赏价值。花青素苷是植物表现不同颜色的关键物质^[17-18]。芽变育种是山茶育种的重要方法, 但到目前为止, 芽变育种形成双色花的现象还缺乏深入研究, 极大地限制了山茶花色芽变育种。本研究选取遗传背景相同的红白双色滇山茶大玛瑙及其母本狮子头为材料, 对揭示芽变形成双色滇山茶的机制更加有意义。

3.1 矢车菊素-3-O-桑布双糖苷影响滇山茶红色花色的形成

花青素化合物种类和含量的不同常会引起花色的差异。在花青素化合物中花青素苷是主要着色物质, 其余花青素化合物为辅助色素^[19-20]。研究表明矢车菊素苷与芍药花素苷一般使植物呈现红色, 飞燕草素苷一般使植物呈现蓝色到紫色^[21]。本研究中 2 个滇山茶品种红色性状花瓣在发育过程中都以矢车菊素及其衍生物为主要成分, 而矢车菊素及其衍生物在大玛瑙白色花瓣区域中含量极少。这与前人研究报道山茶属植物花瓣主要成分为 Cy 型和 Dp 型花青素苷, 且 Cy 型花青素苷广泛存在于山茶属植物红色花瓣中结果相一致^[22]。花青素代谢物与花色参数相关分析表明阿福豆苷、原花青素 B1、原花青素 B2、原花青素 B3、矢车菊素-3-O-桑布双糖苷与 L^* 值呈显著负相关, 矢车菊素-3-O-桑布双

糖苷与 a^* 值显著正相关。滇山茶狮子头与大玛瑙品种间比较, 发现狮子头与大玛瑙红色花瓣区域没有差异代谢物; 狮子头与大玛瑙白色花瓣区域的关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素 B2、原花青素 B3、阿福豆苷。复色山茶乔伊肯德里克中发现花青素苷与花瓣条纹颜色形成紧密相关^[15]。本研究大玛瑙品种内比较表明其关键差异代谢物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷、原花青素 B2、阿福豆苷。因此推测矢车菊素-3-O-桑布双糖苷极有可能是狮子头芽变形成大玛瑙和大玛瑙红白双色形成的关键呈色物质, 其余花青素化合物为辅助花色

3.2 芽变通过降低花青素代谢物表达量改变花色

芽变育种为山茶育种重要方法, 且山茶花色变异丰富, 为其花色芽变育种提供了良好的物质基础^[23-24]。本研究以狮子头及其芽变品种大玛瑙为材料, 探究芽变品种花色形成的物质基础, 发现大玛瑙白色花瓣区域与其母本狮子头花瓣中花青素化合物成分基本一致, 但部分花青素化合物含量存在差异, 这与亚美尼亚葡萄风信子 (*Muscari botryoides* L.) 白色品种检测结果相一致^[25]。表明芽变可能引起花瓣花青素苷含量发生变化, 从而影响花色。同时发现大玛瑙红色花瓣区域与其母本狮子头不仅花青素化合物成分基本一致, 其含量差异也不显著, 但狮子头盛花期花瓣中花青素化合物含量高于大玛瑙红色花瓣区域。推测大玛瑙红白双色是由于花瓣中的花青素化合物含量降低, 且部分区域显著降低而形成的。

3.3 结构基因与调控基因对滇山茶花色的影响

KEGG 分析结果表明苯丙醇生物合成、类黄酮生物合成、植物激素信号转导和昼夜节律-植物途径影响滇山茶花色的形成,与王泽涵等^[26]发现茶树花发育过程受植物激素信号转导和昼夜节律-植物途径影响结果一致,其中类黄酮生物合成途径是直接影响花青素苷合成的通路。类黄酮生物合成途径中的结构基因对滇山茶花色的形成存在影响。前人研究表明,*CHS*基因催化形成花青素苷合成通路中的有色物质查尔酮,并为后续的合成提供碳骨架^[27]。本研究中滇山茶狮子头与大玛瑙花瓣发育过程中*CHS*基因在花蕾期高表达,在盛花期下调表达,其中大玛瑙盛花期红色花瓣区域表达高于白色花瓣区域。表明*CHS*基因在滇山茶花发育前期形成花青素苷合成底物,随着发育底物合成量减少,从而影响花青素苷合成,使花色发生变化。*HCT*基因作为BAHD家族的一员,参与植物次生代谢调控与绿原酸及黄酮的合成。Besseau等^[28]在拟南芥中沉默*AtHCT*基因后,类黄酮物质的累积量提高,而李洋等^[29]在烟草中发现*NtHCT*超量表达引发芦丁及山奈酚芸香苷两种类黄酮物质含量得到大幅度提高,表明编码同一个合成酶的不同基因成员,在合成路径中发挥不同作用。本研究中*CrHCT1*、*CrHCT2*在大玛瑙盛花期红色区域显著高表达,而*CrHCT3*在大玛瑙盛花期白色花瓣区域显著高表达,说明*HCT*基因在滇山茶花青素苷合成与积累过程中可能同时参与正向和反向调控作用。

转录因子在植物花青素苷生物合成途径中也发挥重要作用,如*MYB*、*bHLH*、*WD40*等转录因子^[30]。在金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)中*AmMYB308*通过抑制花青素上游结构基因*C4H*的表达进而控制花青素的积累^[31]。本研究中发现5条*MYB*转录因子和2条*bHLH*转录因子与花青素苷生物合成的结构基因高度相关。这些转录因子可能在花瓣颜色表型表达中具有重要功能。

参考文献

[1] Fu M Y, Yang X, Zheng J R, Wang L, Yang X Y, Tu Y, Ye J B, Zhang W W, Liao Y L, Cheng S Y, Xu F. Unraveling the regulatory mechanism of color diversity in *Camellia japonica* petals by integrative transcriptome and metabolome analysis. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:685136

[2] Geng F, Nie R M, Yang N, Cai L, Hu Y C, Chen S T, Cheng X M, Wang Z L, Chen L Q. Integrated transcriptome and metabolome profiling of *Camellia reticulata* reveal mechanisms of flower color differentiation. *Frontiers in*

Genetics, 2022, 13:1059717

[3] Vela P, Salinero C, Sainz M J. Phenological growth stages of *Camellia japonica*. *Annals of Applied Biology*, 2013, 162(2): 182-190

[4] Pan L Q, Li J Y, Yin H F, Fan Z Q, Li X L. Integrated physiological and transcriptomic analyses reveal a regulatory network of anthocyanin metabolism contributing to the ornamental value in a novel hybrid cultivar of *Camellia Japonica*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(12):1724

[5] Li J B, Hashimoto F, Shimizu K. Chemical taxonomy of red-flowered wild *Camellia* species based on floral anthocyanins. *Phytochemistry*, 2013, 85:99-106

[6] Terahara N, Takeda Y, Nesumi A, Honda T. Anthocyanins from red flower tea (Benibana-cha), *Camellia sinensis*. *Phytochemistry*, 2001, 56(4):359-361

[7] Zhou C B, Mei X, Rothenberg O D, Yang Z B, Zhang W T, Wan S H, Yang H J, Zhang L Y. Metabolome and transcriptome analysis reveals putative genes involved in anthocyanin accumulation and coloration in white and pink tea (*Camellia sinensis*) flower. *Molecules*, 2020, 25(1):190

[8] Li J M, Hashimoto F, Shimizu K, Sakata Y. Anthocyanins from red flowers of *Camellia reticulata* LINDL. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71(11):2833-2836

[9] Li J M, Hashimoto F, Shimizu K, Sakata Y. Anthocyanins from red flowers of *Camellia cultivar* 'Dalicha'. *Phytochemistry*, 2008, 69(18):3166-3171

[10] Li J B, Hashimoto F, Shimizu K, Sakata Y. Anthocyanins from the red flowers of *Camellia saluenensis* Stapf ex Bean. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2008, 7(1):75-79

[11] Li J B, Hashimoto F, Shimizu K, Sakata Y. A new acylated anthocyanin from the red flowers of *Camellia hongkongensis* and characterization of anthocyanins in the Section *Camellia* species. *Journal of Plant Ecology*, 2009, 51(6):545-552

[12] 邓娇, 苏梦月, 刘雪莲, 欧克芳, 户正荣, 杨平仿. 基于转录组分析揭示双色花莲'大酒锦'花色形成机理. *园艺学报*, 2022, 49(2): 365-377

Deng J, Su M Y, Liu X L, Ou K F, Hu Z R, Yang P F. Based on transcriptome analysis, this paper reveals the formation mechanism of two-color Hualien 'Dasajin' color. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(2): 365-377

[13] 徐雷锋. 百合双色花形成的转录组分析及基因*LhUFGT*和*LhSGR*的功能研究. 北京:中国农业科学院, 2017

Xu L F. Transcriptome analysis of two-color lily flower formation and functional study of genes *LhUFGT* and *LhSGR*. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017

[14] Liu X J, Chuang Y N, Chiou C Y, Chin D C, Shen F Q, Yeh K W. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium orchid* cultivars. *Planta*, 2012, 236(2):401-409

[15] Yu S H, Liu W X, Ni S, Li J Y. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms associated with flower color formation in *Camellia japonica* 'Joy Kendrick'. *Forests*, 2023, 14(69):2-13

- [16] 吴思惠, 朱欢欢, 张俊卫, 包满珠, 张杰. 梅花不同花色品种及开花阶段类黄酮代谢物测定与分析. 中国农业科学, 2023, 56(9):1760-1774
Wu S H, Zhu H H, Zhang J W, Bao M Z, Zhang J. Determination and analysis of flavonoid metabolites in different flower colors and flowering stages of plum blossom. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(9):1760-1774
- [17] Wei K, Zhang Y Z, Wu L Y, Li H L, Ruan L, Bai P X, Zhang C C, Zhang F, Xu L Y, Wang L Y, Cheng H. Gene expression analysis of bud and leaf color in tea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 107:310-318
- [18] Khoo H E, Azlan A, Tang S T, Lim S M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 2017, 61(1):1361779
- [19] Brenda W. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126(2):485-493
- [20] Wan H H, Yu C, Han Y, Guo X L, Luo L, Pan H T, Zheng T C, Wang J T, Cheng T G, Zhang Q X, Zhang Q X. Determination of flavonoids and carotenoids and their contributions to various colors of Rose cultivars (*Rosa spp.*). *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:123
- [21] Gianfranco D, Xin J, Teresa C, Zhu C F, Lourdes G G. Differential accumulation of pelargonidin glycosides in petals at three different developmental stages of the orange-flowered gentian (*Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca*). *PLoS ONE*, 2019, 14(2):e0212062
- [22] Norio S, Masato Y, Minako Y, Toshio H. Cyanidin 3-p-coumaroylglucoside in *Camellia* species and cultivars. *Phytochemistry*, 1987, 26(10):2761-2762
- [23] Fan M L, Zhang Y, Yang M Y, Wu S, Yin H F, Li J Y, Li X L. Transcriptomic and chemical analyses reveal the hub regulators of flower color variation from *Camellia japonica* bud Sport. *Horticulturae*, 2022, 8(2):129
- [24] 李丕睿, 刘永芝, 翟敏, 郭忠仁. 山茶属华东山茶(*Camellia japonica* L.)研究进展. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6):1022-1030, 1035
Li P R, Liu Y Z, Zhai M, Guo Z R. Research progress of *Camellia japonica* L. in East China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(6):1022-1030, 1035
- [25] Lou Q, Liu Y L, Qi Y Y, Jiao S Z, Tian F F, Jiang L, Wang Y J. Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveals the role of delphinidin metabolism in flower colour in grape hyacinth. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(12):3157-3164
- [26] 王泽涵, 于文涛, 王鹏杰, 樊晓静, 刘财国, 蔡春平, 叶乃兴. 茶树花不同发育时期的转录组分析. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2022, 51(1): 46-52
Wang Z H, Yu W T, Wang P J, Fan X J, Liu C G, Cai C P, Ye N X. Transcriptome analysis of tea flower at different developmental stages. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University :Natural Science Edition*, 2022, 51(1): 46-52
- [27] Antonio H, Alejandro J H, Eva D. CHS silencing suggests a negative cross-talk between wax and flavonoid pathways in tomato fruit cuticle. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(5):e1019979
- [28] Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell*, 2007, 19(1):148-162
- [29] 李洋, 李明, 岳玮, 丁新华, 储昭辉. 烟草 *NtHCT* 基因对次生代谢物质绿原酸和类黄酮合成的影响. 中国烟草学报, 2015, 21(6):127-131
Li Y, Li M, Yue W, Ding X H, Chu Z H. Effect of *NtHCT* gene in tobacco on synthesis of chlorogenic acid and flavonoid. *Chinese Journal of Tobacco*, 2015, 21(6):127-131
- [30] Qi Y, Zhou L, Han L, Zou H, Miao K, Wang Y. PsbHLH1, a novel transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 154:396-408
- [31] Lodovico T, Angel M, Adrian P, Steve M, Francisco A C, Keith R, Cathie M. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant cell*, 1998, 10(2):135-154