

瓜叶菊花色性状形成机理的研究进展

崔宇萌, 黄河, 戴思兰

(北京林业大学园林学院/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, 北京 100083)

摘要: 瓜叶菊是拥有多种花色品种资源的观赏植物, 同时具有蓝色、斑色等观赏植物中稀缺的花色表型, 不同花色品种具有多种花青素代谢途径, 解析其花色性状形成的分子机制能够为观赏植物的分子育种提供理论依据, 其中鉴定的关键基因能够为蓝色花新品种培育提供宝贵的基因资源。在对瓜叶菊多年研究的基础上, 本文从瓜叶菊特殊的花青素结构、花青素生物合成调控途径及其花色研究的主要技术手段方面, 综述了近20年来瓜叶菊花色研究的进展, 具体内容包括: (1) 瓜叶菊不同色系呈色的色素基础, 尤其是蓝色花品种中特殊的多聚酰化色素结构; (2) 多聚酰化修饰相关糖基化、酰基化修饰的瓜叶菊花青素代谢途径的基因, 以及调控花色、花斑形成的MYB、MADS-box等转录因子的功能; (3) 瓜叶菊中进行花色研究相关的高效遗传转化体系和病毒介导的基因沉默(VIGS, virus-induced gene silencing)体系, 及其在花色研究中的研究进展。本文旨在为后续瓜叶菊及其他花卉花色研究和分子育种提供参考。

关键词: 瓜叶菊; 花色; 花青素; 生物合成及调控

Molecular Mechanisms of Flower Color Formation in *Pericallis hybrida*

CUI Yumeng, HUANG He, DAI Silan

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

Abstract: *Cineraria (Pericallis hybrida)* is an ornamental plant with multiple anthocyanin metabolic pathways and has varieties showing rare flower color phenotypes such as blue and bicolor. Elucidating the molecular mechanisms underlying the formation of these flower colors can provide valuable genetic resources in breeding of ornamental plants, particularly for the development of new blue flower varieties. Based on research experiences on cineraria, the authors summarized the research progress in the past 20 years on the unique anthocyanin structure, the regulatory pathways of anthocyanin biosynthesis, and the technical approaches used in flower color research. This review mainly introduces: (1) The pigment composition of different cineraria varieties and the polyacylation structure in blue varieties; (2) The genes involved in anthocyanin metabolism pathways such as polyacylation and acylation, and the function of transcription factors such as MYB and MADS-box in regulating flower color and spot formation; (3) The efficient genetic transformation system and viral-induced gene silencing system relevant to flower color research in cineraria, as well as progress in these areas. This article would like to provide references for future research on the flower color and molecular breeding of cineraria and other ornamental plants.

Key words: cineraria; flower color; anthocyanin; flavonoid biosynthesis and regulation

收稿日期: 2023-09-25 网络出版日期: 2023-11-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230925001>

第一作者研究方向为花卉种质资源与遗传育种, E-mail: 741134661@qq.com

通信作者: 黄河, 研究方向为花卉分子生物学, E-mail: 101navy@163.com

戴思兰, 研究方向为花卉种质资源与遗传育种, E-mail: silandai@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32071826, 32171849)

Foundation project: General Program of National Natural Science Foundation of China(32071826, 32171849)

瓜叶菊(*Pericallis hybrida*)是菊科(Asteraceae)瓜叶菊属的一、二年生草本植物,是瓜叶菊属中唯一的栽培种。瓜叶菊属共16个种,属内多为草本及亚灌木,分布于加那利群岛、亚速尔群岛和马德拉群岛,岛屿间的地理隔离和生物生境的差异导致了种间差异^[1]。目前尚未有关于瓜叶菊栽培品种的倍性报道,而瓜叶菊属中已探明倍性的野生种多为六倍体($2n=60$),C值在600~800 Mbp之间^[2]。通过种间杂交获得的瓜叶菊品种具有丰富的花色,其中包括多种花斑品种及纯正的蓝色花品种。本文从花色表型、花青素合成调控机理及基因功能研究中应用的技术体系对瓜叶菊花色的研究进展进行综述,在总结近年研究成果的基础上,分析目前瓜叶菊合花色研究存在的问题,以期将瓜叶菊中的优良基因

资源应用于观赏植物花色改良育种,为花色改良分子育种提供参考。

1 瓜叶菊花色及色素成分

瓜叶菊舌状花的不同着色模式形成了复杂多样的色系,目前育种者根据该特性培育出了一系列的花色品种,如春潮、小丑、威尼斯、完美等系列品种^[3-6]。依据舌状花着色情况,可将瓜叶菊不同品种分为6个纯色系(白色系、黄色系、粉色系、红色系、洋红色系、蓝色系)和1个斑色系^[7](图1)。舌状花中主要积累类黄酮物质,即花青素、黄酮和黄酮醇。由于色素种类及含量不同,使得瓜叶菊具有高等植物几乎全部花色的色系^[8]。

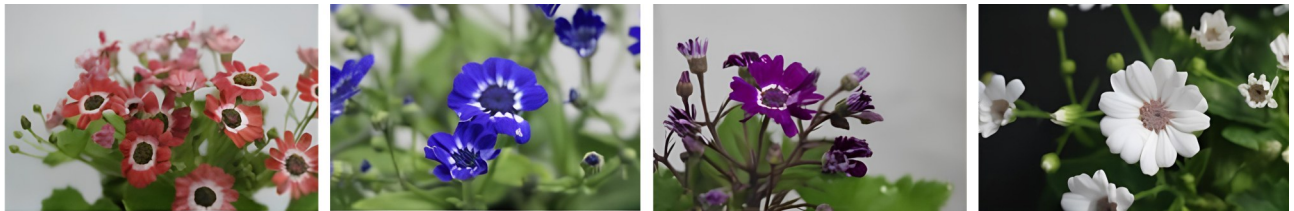


图1 瓜叶菊栽培品种的花色及形态

Fig.1 The color and morphology of cineraria cultivation

1.1 瓜叶菊色素组成

瓜叶菊白色系、黄色系的舌状花及斑色系的白色区域中均不含有花青素,主要积累黄酮类化合物^[9-10]。粉色系品种主要积累天竺葵素,洋红色系及红色系品种主要积累矢车菊素及少量飞燕草素,蓝色系品种主要积累飞燕草素及少量矢车菊素^[10-11]。瓜叶菊不同花色品种有3条花青素分支途径的代谢产物,在一些品种中包含1~2条分支途径的代谢产物。这种现象在其他观赏植物中较为少见,因此瓜叶菊成为研究观赏植物花色形成和花青素代谢的典型样本(表1)。

按照舌状花开花程度划分花序发育级别,发现在积累花青素的品种中,花青素积累量均随着花序发育过程呈现先上升后下降的趋势,并在花序发育的第二阶段(S2)花青素积累量达到最高,花青素含量的动态变化可能是瓜叶菊提高传粉效率的一种适应机制^[8]。这一色素积累模式也为后续花青素代谢相关基因的表达模式分析提供了参考依据。

表1 瓜叶菊不同花色品种中主要类黄酮化合物成分

Table 1 The main composition flavonoids in ray florets of cineraria of different colors

色系	类型	化合物名称
Color series	Type	Compound name
蓝色 Blue	花青素苷	飞燕草素苷、矢车菊素苷
洋红色 Carmine	花青素苷	矢车菊素苷、飞燕草素苷
粉色 Pink	花青素苷	天竺葵素苷
	黄酮醇	二氢山奈酚
黄色 Yellow	黄烷酮	柚皮素
白色 White	黄酮醇	二氢山奈酚
	黄烷酮	柚皮素

1.2 蓝色瓜叶菊花青素苷特殊修饰结构

随着引种驯化和有性杂交育种的不断开展,人工栽培的观赏植物具有更丰富的花色,但由于物种基因库的限制,许多花卉,如菊花、月季、康乃馨等均缺少纯正的蓝色品种,并且通过传统育种方式难以获得蓝色花。因此培育蓝色花的途径主要是从已有蓝色花中挖掘可用的基因资源,通过基因工程技术来获得^[12]。目前已在多种观赏植物中进行了

蓝色花转基因育种的尝试,研究人员在月季中过表达三色堇中的 *F3'5'H* 和鸢尾中的 *DFR*,并抑制月季内源 *DFR* 基因的表达,获得了蓝紫色系的月季品种^[13]。在蝴蝶兰中,由于其粉色品种花青素主要成分具有多聚酰化结构,因此在粉色蝴蝶兰中仅转入矢车菊 *F3'5'H* 即获得了相对接近蓝色的品种^[14]。同样,在菊花中也进行了多次蓝色花育种的尝试,目前通过向菊花中转入风铃草 *F3'5'H* 和蝶豆的糖基转移酶基因 *UA3'5'GT*,获得了飞燕草素含量较高的蓝色系菊花品种^[14]。综上,花青素修饰基因的参与为蓝色花育种提供了新的思路和途径。

观赏植物形成蓝色花的因素各有不同,在矢车菊中 Fe^{3+} 与花青素形成一种特殊的四核金属复合物,使得在其他植物中多呈现红色或砖红色的矢车菊素能够在矢车菊中形成特定蓝色花^[15]。天蓝牵牛通过液泡膜上质子泵向液泡内或向细胞质内转运质子来调控液泡 pH,使得其在花蕾期液泡 pH 较低,花瓣呈紫红色,在开放后 pH 逐渐升高,花瓣变为蓝色^[16]。此外飞燕草素与修饰基团形成复杂的衍生结构,该衍生结构是包括瓜叶菊、风铃草、飞燕草等在内的许多蓝色花形成的主要因素。

瓜叶菊具有较为稀缺的纯正蓝色品种,通过液相色谱-质谱联用(HPLC/MS, high performance liquid chromatography-mass spectrometry)分析发现,蓝色品种舌状花中的主要色素成分为飞燕草素-3-O-(6-O-丙二酰- β -D-葡萄糖)-7-O-[6-O-(4-O-(6-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖)咖啡酰)- β -D-葡萄糖]-3'-O-(6-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖),是一种具有复杂修饰结构的飞燕草素衍生物,该成分占蓝色瓜叶菊花青素总含量的 85%^[17]。在影响花青素呈色的因素中,类黄酮B环上的羟基数量和聚酰化修饰对于形成稳定呈色的蓝色花具有重要作用,同时花青素聚酰化修饰的位置也影响着花色的稳定。在很多高等植物中,花青素被芳香酰基或脂肪酰基修饰,具有多个芳香酰基修饰的花青素被称为聚酰化花青素^[18]。研究表明花青素 C3'和 A7 位上被聚酰化修饰的花青素往往表现出更稳定的蓝色,在大花飞燕草、龙胆、风铃草等蓝色花中也均鉴定到了在 C3'位或 A7 位单独位点上具有聚酰化修饰的飞燕草素^[19]。

与这些蓝色花相比,瓜叶菊苷的类黄酮基本骨架 AC 环 7 位和 B 环 3'位上均具有聚酰化修饰,其结构较为罕见。在类黄酮基本骨架的关键位置上具有多个聚酰化修饰可能是瓜叶菊形成纯正蓝色花的重要因素,较为复杂的结构可能增强了瓜叶菊中

花青素的稳定性,使得瓜叶菊苷在 pH 3.5~7 的范围内都能呈现稳定的蓝色^[20]。

2 瓜叶菊花青素的生物合成及化学结构修饰的关键结构基因

在高等植物众多次生代谢产物中,花青素的代谢途径研究较为透彻,目前对于许多观赏植物,如月季、菊花等花青素的代谢途径也解析得较为清晰,鉴定出了关键酶并分离到相关基因^[21-22]。近年来,对瓜叶菊花青素代谢相关结构基因的挖掘取得了进展,包括花青素合成基因、转运基因及糖基化和酰基化修饰过程中的相关基因。

2.1 瓜叶菊花青素合成途径中的关键结构基因

目前对于瓜叶菊舌状花中的花青素代谢途径已经进行了完整解析,鉴定出该途径上的关键酶基因,主要包括:查耳酮合酶基因(*CHS*, chalcone synthase)、查耳酮异构酶基因(*CHI*, chalcone-flavanone isomeras)、黄烷酮 3-羟化酶基因(*F3H*, flavanone 3-hydroxylase)、类黄酮-3'-羟基化酶基因(*F3'H*, flavonoid 3'-hydroxylase)、类黄酮-3',5'-羟基化酶基因(*F3'5'H*, flavonoid 3',5'-hydroxylase)、二氢黄酮醇-4-还原酶基因(*DFR*, dihydroflavonol 4-reductase)及花青素合成酶基因(*ANS*, anthocyanidin synthase)^[11]。

早期基于同源基因克隆及表达分析,在瓜叶菊中分离出了以上结构基因^[9,11,23-24]。比较不同花色舌状花中各基因的表达,发现白色瓜叶菊中 *CHS* 不表达,因此白色花的形成可能是由于上游基因受到抑制,导致了花瓣中无花青素积累。*F3'H* 仅在洋红色系中表达,*F3'5'H* 仅在蓝色系中表达,因此有色花的花色差异主要体现在 *F3'H* 和 *F3'5'H* 的表达模式上^[25]。而在舌状花的花发育过程中,花青素合成相关结构基因的表达水平在开放初期达到最高,随着进一步开放表达水平降低,至开放末期几乎不表达或表达量极低,结构基因在花发育过程中的表达模式与花青素积累模式基本一致^[23]。

作为飞燕草素合成途径中的关键基因,*F3'5'H* 是蓝色花卉育种资源的研究热点。孟丽等^[23]首次利用同源克隆的方式,在瓜叶菊蓝色花中分离得到 *F3'5'H*,并成功进行了原核表达。对比不同色系中 *F3'5'H* 的 DNA 序列,发现在无 *F3'5'H* 表达的白色系及洋红色系中,DNA 序列第一内含子上出现了一段首尾重复序列的插入,推测可能对 *F3'5'H* 的表达起调控作用^[8]。将瓜叶菊中的 *F3'5'H* 同源转化至烟草

中,转基因植株的花色出现了明显蓝移和红移,花瓣中矢车菊素的含量增加,并出现了飞燕草素^[11]。而在菊花中抑制 *CmF3'5'H* 并转入瓜叶菊中的 *F3'5'H* 后,菊花花色变红,矢车菊素含量显著增加,但极少有飞燕草素的积累^[25]。包括瓜叶菊在内,菊科植物的 *F3'5'H* 在系统进化上与紫罗兰、紫苏等其他物种的 *F3'H* 聚类,同属于 CYP75B 亚家族^[26]。这种独特的进化方式使得菊科 *F3'5'H* 可能在植物体内同时具备 3,5'-羟基化和 3'-羟基化功能,导致瓜叶菊 *F3'5'H* 在异源转化后,无法获得理想的蓝色菊花。目前在已有的报道中,使用风铃草 *CamF3'5'H* 转入菊花形成了较为明显的蓝紫色菊花品种,相比与转入瓜叶菊 *F3'5'H* 后产生的飞燕草素仅占总花青素的 35.9%,转入 *CamF3'5'H* 后飞燕草素可达到总花青素含量的 88.0%,并能够获得更为明显的蓝色系菊花品种^[27]。

2.2 瓜叶菊中花青素合成后的修饰基因

无色花青素在花青素合成酶催化下形成极不稳定的结构,需要通过糖基化修饰形成较为稳定的花青素苷,在此基础上经糖基转移酶(GT, glycosyltransferase)和酰基转移酶(AT, acyltransferase)催化,交替完成糖基化和酰基化修饰,形成具有多个芳香酰基修饰的花青素苷,即为聚酰化花青素^[2]。在观赏植物中,对于花青素尤其飞燕草素相关修饰基因的鉴定和功能分析仍较少,而蓝色瓜叶菊中具有罕见的 3'和 7位同时存在聚酰化结构的飞燕草素,因而瓜叶菊中可能蕴藏着丰富的用于蓝色花育种的修饰基因资源。

2.2.1 参与花青素糖基化的关键基因 在拟南芥中,糖基转移酶基因家族包括了 90 个以上的成员,根据糖基供体的不同,可分为两个亚家族,其中植物 UDP-糖基转移酶家族(UGT, UDP-glycosyltransferases)以尿苷二磷酸(UDP, uridine diphosphate)活化的核苷糖为供体修饰类黄酮, BGLU 家族以酰基葡萄糖作为供体特定修饰花青素^[19,28]。

糖基化修饰对于维持花青素结构稳定及蓝色花花色形成具有重要作用,目前在许多蓝色花中鉴定到了多种糖基转移酶基因,例如在三花龙胆中, *Gt5GT* 和 *GtUA3'GT* 分别特异催化飞燕草素 C5 及 C3'位葡萄糖基化,敲除两个基因后,龙胆花色由蓝色变为粉色^[29];而飞燕草中 *DgAA7GT* 催化了花青素 7 位上的葡萄糖基化^[30]。这些糖基转移酶大多具有底物特异性,并在特定位置对花青素进行

修饰。

基于转录组分析,瓜叶菊中鉴定到在有色花中特异表达的糖基化修饰基因。在瓜叶菊中沉默 *PhUGT1* 后,花青素组分中含有咖啡酰基葡萄糖基团的飞燕草素苷的含量下降^[7]。这种修饰模式与飞燕草中花青素聚酰化修饰模式相似,推测在瓜叶菊中 *PhUGT1* 可能作为双功能供体,在糖基转移酶及酰基转移酶交替催化下,最终形成复杂的聚酰化修饰花青素结构^[6]。瓜叶菊中的 *PhUGT4* 与龙胆中催化花青素 3'位糖基化的 *GtUA3'GT* 为同源基因,沉默 *PhUGT4* 后,瓜叶菊舌状花从蓝色变为粉色,推测 *PhUGT4* 催化了瓜叶菊飞燕草素中 3'位葡萄糖基化^[5]。此外通过功能验证发现, *PhBGLU12* 参与瓜叶菊中飞燕草素 7 位的第二步糖基化修饰,在抑制 *PhBGLU12* 的表达后,7 位上的糖基化反应受到抑制,检测到受体(Dp3MalG-3' CafG-7CafG)含量增加,而相应的产物含量减少^[6]。

2.2.2 参与花青素酰基化的关键基因 与糖基转移酶相似,目前在植物中鉴定出了两类酰基转移酶。第一类丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶(SCPL-AT, serine carboxypeptidase-like acyltransferases)以酰基葡萄糖为供体,目前已挖掘出部分与花青素修饰相关的酰基转移酶,如蝶豆中的 CtAT1,飞燕草中的 DgSCPL2,紫甘蓝中的 BoSCPL 等,这类酰基转移酶催化酰基转移至花青素的糖基上^[15,20]。第二类酰基辅酶 A 依赖型酰基转移酶(ACT, Acyl-CoA dependent acyltransferases)以酰基辅酶 A 为供体对花青素进行糖基化,如龙胆中的 *Gt5/3'AT* 以咖啡酰辅酶 A 为供体参与 3'和 5'位的酰化反应^[29]。

Suzuki 等^[20]在蓝色瓜叶菊中鉴定出 1 个 ACT 型花青素酰基转移酶 3MaT,其能够特异性的以丙二酰辅酶 A 为供体,催化丙二酰基团转移到花青素 3 位葡萄糖,合成花青素 3-O-葡萄糖-6"-丙二酰(Anthocyanin-3GMal)。而后在瓜叶菊中鉴定到 SCPL 型酰基转移酶 SCLP2,在瓜叶菊中沉默 *SCLP2* 基因,发现具有 3'位咖啡酰基修饰和 7 位葡萄糖基、咖啡酰基修饰结构的飞燕草素苷含量均降低,叶背由蓝色转变为暗粉色,表明 *SCLP2* 催化了瓜叶菊飞燕草素 3'和 7 位的咖啡酰基化^[6]。

瓜叶菊关键位点 A3'位与 C7 位的聚酰化修饰过程的解析,以及所筛选和鉴定出的相关基因可作为蓝色花修饰基因资源,应用于观赏植物的花色育种中。

3 瓜叶菊花青素合成后的转运机制

包括花青素在内,许多类黄酮生物合成酶位于内质网,而大多数类黄酮化合物主要存在于液泡,因此必须具有高效的运输系统跨越内膜和质膜,完成类黄酮化合物由合成到贮存的过程^[31]。目前关于花青素转运的假说包括两类,一类是基于显微镜观察提出的囊泡介导的转运;另一类是转运蛋白参与的转运过程,主要包括 ATP 结合盒转运蛋白(ABC, ATP-binding cassette transporter),多药和有毒化合物排出蛋白(MATE, multidrug and toxic compound extrusion),谷胱甘肽 S-转移酶(GST, glutathione S-transferase)^[32]。以上的不同途径可能在植物中同时存在,并不相互排斥^[31]。

许多观赏植物中解析出的花青素转运机制大多由谷胱甘肽 S-转移酶介导,例如百合中的 *LhGST*、牡丹中的 *PsGSTF3* 等通过参与花青素从内质网到液泡的转运,从而影响花青素积累及花色表型^[33-34]。但其他途径,如 MATE 及囊泡介导的转运机制仍有待研究。

金雪花等^[35]在瓜叶菊中分离出谷胱甘肽 S-转移酶基因 *PhGST3*,作为拟南芥 *AtTT19* 的同源基因, *PhGST3* 在含有花青素苷的组织中表达水平较高,并在花序发育早期表达。 *PhGST3* 的异源表达能够恢复拟南芥 *tt19* 突变体下胚轴花青素缺失的表型。在洋红色及蓝色瓜叶菊中沉默 *PhGST3* 后,矢车菊素和飞燕草素含量均下降,结合蛋白-花青素体外融合的结果,证明 *PhGST3* 对矢车菊素-3-葡萄糖苷及飞燕草素-3-葡萄糖苷的转运均具有重要作用^[36]。

4 参与调控瓜叶菊花青素积累的转录因子

花青素的合成、修饰及转运等过程受到上游转录因子的调控,参与调控花青素积累的转录因子包括 MYB、bHLH、WD40、MADS-box、bZIP、ERF 等。在调控瓜叶菊花青素方面,MYB 和 bHLH 研究较多,此外还解析了 MADS-box 成员对瓜叶菊中特殊的花斑品种着色模式的影响。

4.1 瓜叶菊中调控花青素积累的 MBW 成员

已有研究表明,MYB 是调节花青素合成的最主要的转录因子,许多已知的 MYB 转录因子都在花青素的生物合成中起正向调控作用,主要包括 R2R3-MYB 蛋白成员^[37]。在蓝色花中,一些 MYB 能够特异性调控下游基因,影响飞燕草素的积累。

例如龙胆中, *GtMYB3* 能够激活下游 *GtF3'5'H* 和 *Gt5/3'AT* 的启动子活性^[38]。葡萄风信子中, *MaMYBA* 和 *MaAN2* 激活晚期结构基因 *MaDFR* 和 *MaANS* 的启动子活性^[39]。

基于瓜叶菊蓝色舌状花转录组分析,筛选出 6 个可能参与调控花青素积累的 R2R3-MYB 成员^[17]。其中 *PhMYB3* 和 *PhMYB6* 属于第 6 亚家族的 R2R3-MYB 成员,能够正向调控瓜叶菊中的花青素积累,同时 *PhMYB3* 还通过直接激活 *PhGST3* 启动子,提高其转录活性^[33]。此外,同属于 R2R3-MYB 的 *PhMYB2* 也能够参与调控花青素合成, *PhMYB2* 激活 *PhDFR3* 的转录,进而促进瓜叶菊中花青素的积累^[40]。

除 MYB 转录因子外,MBW 复合体中的 bHLH 也被认为与植物花青素积累密切相关。大部分 bHLH 转录因子与 MYB 结合共同对花青素的生物合成进行调控,少部分 bHLH 自身也有调控花青素和原花青素合成的作用^[41]。利用转录组数据,在瓜叶菊中鉴定到了属于 bHLH IIIf 亚家族的 *PhbHLH17*,该基因与拟南芥中的 *TT8* 聚为一类,其表达模式与花青素代谢途径中的结构基因类似^[8]。利用病毒介导的基因沉默体系(VIGS, virus-induced gene silencing)在瓜叶菊中验证 *PhbHLH17* 的功能,表明 *PhbHLH17* 能够正向调控花青素代谢^[42]。此外对瓜叶菊中已知的花青素代谢调控相关的 R2R3-MYBs 与 *PhbHLH17* 进行互作验证,结果表明, *PhbHLH17* 能与 *PhMYB2* 和 *PhMYB4* 分别形成二聚体,当 *PhbHLH17* 存在时,能够进一步提高 *PhMYB2* 对 *PhDFR3* 的转录激活作用^[4]。

WD40 蛋白不直接参与靶基因启动子的特异性识别,仅有少量参与类黄酮途径的 WD40 蛋白被鉴定。目前在瓜叶菊中鉴定出的 WD40 较少,仅分离出了 *PhWD40-1* 和 *PhWD40-2*,二者在不同花色的舌状花中表达水平基本一致,并分别与葡萄中的 *VvWDR1* 和 *VvWDR2* 聚类^[8]。在瓜叶菊中尚未见关于 WD40 与 MYB、bHLH 互作形成 MBW 复合体调控花青素代谢途径的报道。

4.2 发育类转录因子 MADS-box 与瓜叶菊花斑形成

花青素的生物合成不但影响着观赏植物的花色,同时也影响花器官的着色模式,如二色、花眼、花斑、斑块、点状、以及蜜导等花斑类型^[43]。在观赏植物中,许多花斑的形成是由结构基因的差异表达受到不同转录因子的调控导致。如百合中 *LrMYB15*

通过影响 *LrANS* 和 *LrDFR* 的表达导致凸起状斑点的形成^[44]。夏堇中的 *CYC2* 和 *RADI* 能够在背侧花瓣中特异表达,通过直接结合来抑制 MYB 类转录因子,影响其对下游结构基因的转录,使夏堇形成了背腹不对称的着色模式^[45]。

瓜叶菊花斑品种中花青素在舌状花不同区域的差异积累,导致其形成了二色的花斑类型。根据洋红白斑色品种的转录组,鉴定到两个 MADS-box 类基因, *PhAG* 和 *PhAGL11*, 两者均只在舌状花的无色区域特异表达。 *PhAG* 抑制了烟草中花青素的积累,进一步在瓜叶菊花序中共同沉默 *PhAG* 和 *PhAGL11*, 发现无色区域减小。进一步通过互作验证发现, *PhAG* 和 *PhAGL11* 能够互作,并且 *PhAG* 能够直接抑制 *F3H* 启动子的活性, *PhAGL11* 抑制了 *F3H* 和 *DFR* 的表达水平^[6,10]。以上结果解释了瓜叶菊舌状花花斑形成的机理,同时证明瓜叶菊花发育相关基因能够参与调控花青素积累,从而影响花色表型。

5 瓜叶菊中用于花色相关基因研究的技术体系

相比于模式植物和作物,观赏植物中对于花色基因的挖掘和研究起步较晚,且耗时较长,其主要原因是大多观赏植物的生长周期较长,且转基因效率较低,不易获得稳定的转基因株系,导致基因功能的研究较为困难。而目前运用分子手段培育花卉新品种已成为花色研究的趋势,如何快速高效地筛选基因资源,成为观赏植物花色研究中重要的任务。目前在瓜叶菊中,主要通过瞬时沉默和稳定转化两种方式探究花色相关基因功能。

5.1 瓜叶菊中遗传转化体系的建立

高效的遗传转化体系是进行基因功能验证和开展分子育种的基础。目前在瓜叶菊中,已分别以叶片^[3]、舌状花^[46]和下胚轴^[44]为外植体建立了再生体系。不同外植体在诱导愈伤组织和植株再生时,培养基所用激素大多为萘乙酸及 6-苄氨基嘌呤,诱导率和分化率均较高,并且能够在 30 d 内诱导出愈伤组织并分化。瓜叶菊中不同花色品种间的遗传转化体系不同,以下胚轴为外植体时,大多能够较快分化和再生,结合最适培养基能够在接种 20 d 后诱导出愈伤组织,30 d 后出现不定芽^[47]。张丽^[48]建立了农杆菌 EHA105 介导法转化 *eGFP* 基因技术体系,筛选出最佳的 Kan 浓度为 40 mg/L, Tim 浓度为 200 mg/L,此外盛花期进行浸花转化能够得到较高

的结实率和转化效率。

5.2 TRV 介导的 VIGS 技术

通过 TRV 病毒诱导的基因沉默将目的基因片段插入到 TRV 病毒载体上侵染植物,利用植物同源依赖性防御机制,特异性沉默宿主内源基因,进而产生相应的生理或表型变化^[49]。VIGS 技术免于在植物中进行再生和转化,不依赖于遗传转化体系,且表型变化不经历世代,因此利用 VIGS 技术可在本源植物中进行快速高效的基因功能验证。目前 VIGS 技术已在观赏植物中广泛应用,包括验证花青素合成、花形态发育、花瓣扩张、抗性生理等相关基因的功能^[49]。

高效的 VIGS 沉默体系是利用 VIGS 技术验证基因功能的关键,而不同的物种所适用的 VIGS 体系具有差异,因此在使用该技术前,需要确定试验材料的最佳侵染方式、植物发育阶段、菌液浓度及侵染后的处理等。目前在瓜叶菊中建立了叶片和花序的 VIGS 体系,并应用于花色基因的验证^[42]。

Li 等^[42]利用花蕾注射结合真空渗透的方法,在瓜叶菊花序中建立了 VIGS 体系,以 *ANS* 为报告基因,菌液浓度 $OD_{600}=1.5$,在花蕾发育至舌状花伸出总苞初显色的阶段进行注射和抽真空,真空至压强为 0.08 Mpa,并在处理后进行 3 d 的低温和暗培养。以上处理方式可使沉默效率达到 17.4%。除舌状花外,瓜叶菊叶背同样积累花青素,液相色谱分析发现,相同品种的瓜叶菊的叶片与舌状花积累同组分的花青素^[7],因此花青素合成相关基因的研究也可以在幼嫩叶片中得到快速验证。目前已在瓜叶菊叶片中建立 VIGS 体系,以 *PDS* 和 *ANS* 为报告基因,当叶片发育至两片真叶时,真空渗透法最佳,菌液浓度 $OD_{600}=1.5$,可在侵染后 12 d 内观测到相应表型,沉默效率达到 13.2%^[42]。目前该方法已在瓜叶菊花色代谢相关基因如 *GST*^[36]、*UGT*^[6]、*SCPL*^[5]、*bHLH*^[2]、*MYB*^[36]等和白粉菌调控相关基因 *Mlo* 的功能分析中得到了应用^[50]。

6 讨论与展望

花色是观赏植物重要的性状,瓜叶菊作为着色模式丰富,且具有蓝色品种及斑色品种的花卉,对瓜叶菊花色尤其蓝色花形成机理的解析有助于未来蓝色花,尤其蓝色菊花新品种的创新。瓜叶菊中复杂的聚酰化修饰能够为现有转基因蓝色花的蓝色不稳定、不纯正提供新的思路和基因资源,此外瓜叶菊中具有多个花青素代谢通路和多种转录调

控模式, 这些模式的解析均能够为观赏植物的花色形成及调控提供理论基础。

近年来研究人员在瓜叶菊中建立了较为成熟的研究体系, 并鉴定到了许多参与花青素合成、修饰、转运及调控的基因。然而在瓜叶菊中, 仍然存在许多研究中的限制因素及尚未阐明的机制。目前已在瓜叶菊花青素苷合成代谢通路中筛选出诸多结构基因, 但针对蓝色花呈色的关键基因 *F3'5'H* 仍有待进一步研究。如尚未清晰解释瓜叶菊 *F3'5'H* 同时具有 3, 5'-羟基化和 3'-羟基化酶活性的原因, 研究者对比了不同品种中 *F3'5'H* 的 DNA 序列中内含子的差异, 但并未探究序列插入是否直接导致了 *F3'5'H* 在蓝色品种中特异表达及相关机制^[8]。花青素的合成除受到转录因子调控, 可变剪接、miRNA、泛素化、DNA 甲基化及组蛋白修饰等也参与了相关调控, 近年来已在菊花^[46]、百合^[47]等观赏植物中进行了解析。而瓜叶菊花青素的调控机制, 尤其是对瓜叶菊花斑形成的解析仅限于转录调控, 在转录后调控、表观遗传等方面, 仍有待进一步探究。除花青素外, 黄酮及黄酮醇等助色素对花色尤其蓝色花的呈色也具有重要作用, 目前尚不清楚瓜叶菊中所含有的黄酮及黄酮醇种类与含量, 以及该类物质的代谢途径和调控机制。瓜叶菊中纯正的蓝色花是否得益于适当的助色素与花青素比值, 仍需要后续的研究。

随着高通量测序技术和生物信息学分析手段的发展, 越来越多的观赏植物的基因组被测序, 这些基因组的公布和解析有利于探究重要表型性状的分子机制及其演化规律。而目前常见的瓜叶菊品种遗传背景尚不清晰, 基因组测序进展缓慢, 因此亟需在瓜叶菊中开展基因组的破译, 推动瓜叶菊花色、花型及其他观赏性状形成机理方面的研究。

参考文献

- [1] Dansereau P. Etudes Macaronésiennes I: Géographie des Crypto-games vasculaires. *Agronomica Lusitanica*, 1961, 23: 151-181
- [2] Suda J, Kyncl T, Freiová R. Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. *Annals of Botany*, 2003, 92(1): 153-164
- [3] 裴红美, 韩科厅, 胡可, 孙秋玲, 戴思兰. 瓜叶菊‘小丑’系列品种再生体系的研究. *北京林业大学学报*, 2011, 33(1): 108-114
Pei H M, Han K T, Hu K, Sun Q L, Dai S L. Plant regeneration of five color series of *Senecio cruentus* ‘Jester’. *Journal of Beijing Forestry University*, 2011, 33(1): 108-114
- [4] 罗怡柳. 瓜叶菊舌状花上不同着色区域基因表达模式分析. 北京: 北京林业大学, 2018
Luo Y L. Gene expression pattern analysis in different colored regions of cineraria (*Senecio cruentus*). Beijing: Beijing Forestry University, 2018
- [5] 李亚军. 蓝色瓜叶菊聚酰化花青素生物合成相关基因分离和功能分析. 北京: 北京林业大学, 2020
Li Y J. Isolation and functional analysis of genes involved in polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue *Senecio cruentus*. Beijing: Beijing Forestry University, 2020
- [6] 任江珊. ‘完美’蓝色瓜叶菊花青素聚酰化修饰关键基因的功能分析. 北京: 北京林业大学, 2023
Ren J S. Functional analysis of key genes related to polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue *Senecio cruentus* ‘Perfect’. Beijing: Beijing Forestry University, 2023
- [7] 孙卫, 李崇晖, 王亮生, 戴思兰, 徐彦军. 花青苷成分对瓜叶菊花色的影响. *园艺学报*, 2009, 36(12): 1775-1782
Sun W, Li C H, Wang L S, Dai S L, Xu Y J. Anthocyanins present in flowers of *Senecio cruentus* with different colors. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(12): 1775-1782
- [8] 王璐. 瓜叶菊花青素苷合成分支途径的调控机制. 北京: 北京林业大学, 2015
Wang L. Regulation mechanism of anthocyanin biosynthesis branch pathways in *Senecio cruentus*. Beijing: Beijing Forestry University, 2015
- [9] 孙翊. 瓜叶菊 PCFH 基因对花青素苷合成及花色的影响. 北京: 北京林业大学, 2011
Sun Y. Anthocyanin biosynthesis and flower coloration controlled by cineraria PCFH gene. Beijing: Beijing Forestry University, 2011
- [10] Qi F T, Liu Y T, Luo Y L, Cui Y M, Lu C F, Li H, Huang H, Dai S L. Functional analysis of the ScAG and ScAGL11 MADS-box transcription factors for anthocyanin biosynthesis and bicolour pattern formation in *Senecio cruentus* ray florets. *Horticulture Research*, 2022, 9: uhac071
- [11] Jin X H, Huang H, Wang L, Sun Y, Dai S L. Transcriptomics and metabolite analysis reveals the molecular mechanism of anthocyanin biosynthesis branch pathway in different *Senecio cruentus* cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1307
- [12] 徐清燊, 戴思兰. 蓝色花卉分子育种. *分子植物育种*, 2004, 2(1): 92-98
Xu Q J, Dai S L. Blue flowers' molecular breeding. *Molecular Plant Breeding*, 2004, 2(1): 92-98
- [13] Katsumoto Y, Fukuchi-mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton, T, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao G Q, Nehra N, Lu C Y, Dyson B, Tsuda S, Ashik T, Kusumi T, Mason J, Tanaka Y. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48(11): 1589
- [14] Noda N. Recent advances in the research and development of blue flowers. *Breeding Science*, 2018, 68: 79-87

- [15] Shiono M, Matsugaki N, Takeda K. Structure of the blue cornflower pigment. *Nature*, 2005, 436(11): 791
- [16] Yoshida K, Kondo T, Okazaki Y, Katou K. Cause of blue petal colour. *Nature*, 1995, 373: 291
- [17] Lu C F, Li Y J, Cui Y M, Ren J S, Qi F T, Qu J P, Huang H, Dai S L. Isolation and functional analysis of genes involved in polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue *Senecio cruentus*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 640746
- [18] Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10: 5350-5369
- [19] Matsuba Y, Nobuhiro S, Masayuki T, Masachika O, Yutaka A, Emi O, Haruka N, Hisakage F, Makoto T, Mikako S. A novel glucosylation reaction on anthocyanin catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *The Plant Cell*, 2010, 22(10): 3374-3389
- [20] Suzuki H, Sawada S Y, Yonekura-Sakakibara K, Nakayama T, Yamaguchi M A, Nishino T. Identification of a cDNA encoding malonyl-Coenzyme A: Anthocyanidin 3-O-glucoside 6'-O-malonyltransferase from *Cineraria (Senecio cruentus)* flowers. *Plant Biotechnology*, 2003, 20(3): 229-234
- [21] 温佳辛, 王超林, 冯慧, 李珊珊, 王亮生, 武荣花, 赵世伟. 月季花色研究进展. *园艺学报*, 2021, 48(10): 2044-2056
Wen J X, Wang C L, Feng H, Li S S, Wang L S, Wu R H, Zhao S W. Research progress on flower color of rose. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(10): 2044-2056
- [22] 韩科厅, 赵莉, 唐杏姣, 胡可, 戴思兰. 菊花花青素苷合成关键基因表达与花色表型的关系. *园艺学报*, 2012, 39(3): 516-524
Han K T, Zhao L, Tang X J, Hu K, Dai S L. The relationship between the expression of key genes in anthocyanin synthesis and the color of *Chrysanthemum*. *Acta Horticulturae*, 2012, 39(3): 516-524
- [23] 孟丽, 戴思兰. 瓜叶菊 *F3'5'H* 基因 cDNA 的克隆、序列分析及其原核表达. *分子植物育种*, 2005, 3(6): 28-34
Meng L, Dai S L. Cloning, sequencing and prokaryotic expression of *F3'5'H* cDNA from *Pericallis cruentia* (L.). *Herit. Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(6): 28-34
- [24] Huang H, Han K T, Xiang Q Y, Dai S L. Flower colour modification of chrysanthemum by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus F3'5'H* gene. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e74395
- [25] 胡可, 孟丽, 韩科厅, 孙翊, 戴思兰. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析. *园艺学报*, 2009, 36(7): 1013-1022
Hu K, Meng L, Han K T, Sun Y, Dai S L. Isolation and expression analysis of key genes involved in anthocyanin biosynthesis of *Cineraria*. *Acta Horticulturae*, 2009, 36(7): 1013-1022
- [26] Seitz C, Eder C, Deiml B, Kellner S, Martens S, Forkmann G. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3', 5'-hydroxylase in the Asteraceae family. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(3): 365-381
- [27] Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ohmiya A. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(10): 1684-1695
- [28] Yonekura-Sakakibara K, Hanada K. An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant Journal*, 2011, 66(1): 182-193
- [29] Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Tanaka H Y. Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: Anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1652-1663
- [30] Nishizaki Y, Yasunaga M, Okamoto E, Okamoto M, Hirose Y, Yamaguchi M, Ozeki Y, Sasaki N. p-hydroxybenzoyl-glucose is a zwitter donor for the biosynthesis of 7-polyacylated anthocyanin in delphinium. *The Plant Cell*, 2013, 25(10): 4150-4165
- [31] Zhao J, Dixon R A. The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 72-80
- [32] Rea Philip A. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58(1): 347-375
- [33] Cao Y W, Xu L F, Xu H, Yang P P, He G R, Tang Y C, Qi X Y, Song M M, Ming J. *LhGST* is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.). *Plant Cell Reports*, 2020, 40(1): 85-95
- [34] Han L L, Zhou L, Zou H Z, Yuan M, Wang Y. *PsGSTF3*, an anthocyanin-related glutathione s-transferase gene, is essential for petal coloration in tree peony. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 1423
- [35] 金雪花, 洪艳, 黄河, 戴思兰, 朱娜. 瓜叶菊谷胱甘肽转移酶基因 *GST* 的分离及表达分析. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1129-1138
Jin X H, Hong Y, Huang H, Dai S L, Zhu Y. Isolation and expression analysis of *GST* gene encoding glutathione S-transferase from *Senecio cruentus*. *Acta Horticulturae*, 2013, 40(6): 1129-1138
- [36] Cui Y M, Fan J W, Lu C F, Ren J S, Qi F T, Huang H, Dai S L. ScGST3 and multiple R2R3-MYB transcription factors function in anthocyanin accumulation in *Senecio cruentus*. *Plant Science*, 2021, 313: 111094
- [37] Ma D W, Reichelt M, Yoshida K, Gershenzon J, Constabel C P. Two R2R3-MYB proteins are broad repressors of flavonoid and phenylpropanoid metabolism in poplar. *The Plant Journal*, 2018, 96(5): 949-965
- [38] Nakatsuka T, Haruta K S, Pitaksutheepong C, Abe Y, Kakizaki Y, Yamamoto K, Shimada N, Yamamura S,

- Nishihara M. Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(12): 1818-1829
- [39] Chen K L, Du L J, Liu H L, Liu Y L. A novel R2R3-MYB from grape hyacinth, MaMybA, which is different from MaAN2, confers intense and magenta anthocyanin pigmentation in tobacco. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 390
- [40] Cui Y M, Fan J W, Liu F Y, Li H, Pu Y, Huang H, Dai S L. R2R3-MYB transcription factor PhMYB2 positively regulates anthocyanin biosynthesis in *Pericallis hybrida*. *Scientia Horticulturae*, 2023, 322: 112446
- [41] Feller A, Machemer K, Braun E L, Grotewold E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant Journal*, 2011, 66(1): 94
- [42] Li Y J, Liu Y T, Qi F T, Deng C Y, Lu C F, Huang H, Dai S L. Establishment of virus-induced gene silencing system and functional analysis of *ScbHLH17* in *Senecio cruentus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 147: 272-279
- [43] Davies K M, Albert N W, Schwinn K E. From landing lights to mimicry: The molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology*, 2012, 39(8): 619-638
- [44] Yamagishi M. A novel R2R3-MYB transcription factor regulates light-mediated floral and vegetative anthocyanin pigmentation patterns in *Lilium regale*. *Molecular Breeding*, 2016, 36(1): 3
- [45] Su S H, Xiao W, Guo W X, Yao X R, Xiao J Q, Ye Z Q, Wang N, Jiao K Y, Lei M Q, Peng Q C, Hu X H, Huang X, Luo D. The CYCLOIDEA-RADIALIS module regulates petal shape and pigmentation, leading to bilateral corolla symmetry in *Torenia fournieri* (Linderniaceae). *New Phytologist*, 2017, 215(4): 1582-1593
- [46] 罗怡柳, 黄河, 连璐, 戴思兰. 瓜叶菊舌状花再生体系的建立//张启翔. 中国观赏园艺研究进展2017. 北京: 中国林业出版社, 2017: 243-250
- Luo Y L, Huang H, Lian L, Dai S L. The construction of regeneration system for the ray floret of *Senecio cruentus*//Zhang Q X. *Advances in ornamental horticulture of China 2017*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2017: 243-250
- [47] 刘钰婷, 黄河, 叶繁, 戴思兰. 瓜叶菊下胚轴再生体系的建立//张启翔. 中国观赏园艺研究进展2018. 北京: 中国林业出版社, 2018: 493-501
- Liu Y T, Huang H, Ye Fan, Dai S L. The construction of regeneration system for hypocotyl of *Senecio cruentus*//Zhang Q X. *Advances in Ornamental Horticulture of China 2018*. Beijing: China Forestry Publishing House, 2018: 493-501
- [48] 张丽. 农杆菌介导的 *eGFP* 基因转化瓜叶菊技术体系研究. 长沙: 湖南农业大学, 2020
- Zhang L. Research on *Agrobacterium*-mediated transformation technical system of *eGFP* Gene in *Pericallis hybrida*. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020
- [49] 潘多, 张嵩玥, 刘芳伊, 田清尹, 杨秀莲, 王良桂, 岳远征. 病毒诱导的基因沉默技术用于植物色素代谢机制的研究进展. *生物工程学报*, 2023, 39(7): 2579-2599
- Pan D, Zhang S Y, Liu F Y, Tian Q Y, Yang X L, Wang L G, Yue Y Z. Application of virus-induced gene silencing technology to investigate the phytochrome metabolism mechanism: A review. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(7): 2579-2599
- [50] 王金刚, 吕远达, 李声影, 杨涛, 白丁, 段然, 刘岩. 瓜叶菊 *Mlo* 基因的克隆、分析及 VIGS 载体构建. *东北农业大学学报*, 2014, 45(5): 26-30
- Wang J G, Lv Y D, Li S Y, Yang T, Bai D, Duan R, Liu Y. Cloning and analysis of *Mlo* gene from *Pericallis hybrida* B. Nord. and VIGS vector construction. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2014, 45(5): 26-30