网络出版时间:2025-11-26 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.05.008

复色菊花青素生物合成关键基因探究

徐迎新,张策,刘煜光,周晓慧,史宝胜
(河北农业大学 园林与旅游学院,河北 保定 071000)

[摘 要] 【目的】明确复色菊花青素生物合成途径的关键基因,为其花斑形成的分子机制研究奠定基础。【方法】以复色菊'花洒摇滚'为研究对象,根据英国皇家园艺学会比色卡(RHSCC)结合色差仪对其花色进行数据化分析,并测定其总花青素和总黄酮含量;将同一花瓣不同颜色区域分别进行不同时期转录组测序及分析,以$P<0.05$且$\log_2|\text{fold change}|\geqslant1.5$作为条件筛选差异表达基因(DEGs),对DEGs进行GO及KEGG功能富集分析;根据注释结果筛选并鉴别花青素生物合成相关结构基因与MYB转录因子;用荧光定量PCR(RT-qPCR)技术进行验证。【结果】'花洒摇滚'系复色菊花品种,花色为紫红色系与白色系,S2时期是紫色花斑区域呈色的关键时期,花青素含量及其分布是影响紫色花斑形成的主要因素。经转录组分析,在S2时期PS2和WS2共有4 779个差异表达基因,相对于白色区域,2 506个差异表达基因在紫色区域上调表达,2 273个差异表达基因在紫色区域下调表达。GO富集分析结果显示,S2时期有3 533个DEGs注释到生物过程、分子功能、细胞组分3种功能类型,其中生物过程中的细胞过程注释到1 629个差异表达基因。KEGG富集分析结果表明,DEGs显著富集在代谢、遗传信息处理、生物系统等信号通路。根据KEGG注释结果确定类黄酮合成、花青素合成途径为花色生物合成的关键途径;结合2个代谢途径及关键时期筛选得到与花色合成途径相关的关键基因为*F3'H*、*FLS*、*DFR*、*ANS*、*MYB1*、*MYB3*,RT-qPCR验证结果与转录组分析结果一致。【结论】*F3'H*、*DFR*、*ANS*、*MYB1*、*MYB3*是正向调控花青素积累形成紫色花斑的关键基因。

[关键词] 复色菊;转录组学;花色;RT-qPCR
[中图分类号] S682.1+1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)05-0079-12

Exploration of key genes in anthocyanin biosynthesis in the multicolored *Chrysanthemum morifolium*

XU Yingxin, ZHANG Ce, LIU Yuguang, ZHOU Xiaohui, SHI Baosheng
(*College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei* 071000, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aims to identify key genes involved in the anthocyanin biosynthesis pathway of multicolored *Chrysanthemum morifolium*, thereby providing a molecular basis for elucidating the mechanisms underlying floral pigmentation patterning. 【Method】 Takes the multicolored *Chrysanthemum morifolium* 'Huasayaogun' as research object, floral coloration was quantified by using the Royal Horticultural Society Colour Chart (RHSCC) in combination with a colorimeter, and the total anthocyanin and flavonoid contents were determined. Comparative transcriptome sequencing and analysis were performed on distinct color sectors of the same ray florets across different developmental stages. Genes with $P<0.05$ and $\log_2|\text{fold change}|\geqslant1.5$ were identified as differentially expressed genes (DEGs) and subsequently subjected to GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) functional enrichment analyses. Structural genes and

[收稿日期] 2025-02-25 [修回日期] 2025-05-23
[基金项目] 河北省现代农业产业技术体系花卉创新团队建设专项(HBCT2024200201)
[作者简介] 徐迎新(2000—),女,河北承德人,在读硕士,主要从事园林植物应用研究。E-mail:15614415700@163.com
[通信作者] 史宝胜(1969—),男,河北保定人,教授,博士生导师,主要从事园林植物与应用、园林植物种质创新研究。E-mail:baoshengshi@163.com

MYB transcription factors associated with anthocyanin biosynthesis were screened and identified based on functional annotation results, and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used for validation.【Result】The multicolored chrysanthemum cultivar 'Huasayaogun' was characterized by a combination of purple-red and white color sectors. Stage S2 is the critical phase for pigmentation in the purple variegated regions, where anthocyanin accumulation and spatial distribution are the key determinants of purple spot formation. Transcriptomic analysis revealed a total of 4 779 differentially expressed genes (DEGs) between the purple (PS2) and white (WS2) sectors during Stage S2, with 2 506 DEGs upregulated and 2 273 DEGs downregulated in the purple sectors in comparison with the white sectors. The GO enrichment analysis revealed that during the S2 stage, 3 533 differentially expressed genes (DEGs) were annotated to three functional categories: biological process, molecular function, and cellular component. Within the biological process category, the subcategory cellular process was annotated with 1 629 genes. KEGG pathway enrichment analysis revealed that DEGs were significantly enriched in major functional categories, including metabolism, genetic information processing, and organismal systems, based on the KEGG database classification hierarchy. Based on integrated analysis of KEGG annotations, flavonoid biosynthesis and anthocyanin biosynthesis pathways were identified as key pathways for floral pigmentation. By analyzing the flavonoid and anthocyanin biosynthesis pathways during the critical stage of floral pigmentation, six key genes: *F3'H*, *FLS*, *DFR*, *ANS*, *MYB1*, and *MYB3*, were identified as being closely associated with pigment synthesis. RT-qPCR validation results were consistent with the transcriptomic analysis.【Conclusion】*F3'H*, *DFR*, *ANS*, *MYB1*, and *MYB3* were identified as key positive regulators driving anthocyanin accumulation and subsequent purple spot formation.

Key words: multicolored *Chrysanthemum morifolium*; transcriptomics; flower color; RT-qPCR

植物花色主要由类黄酮(flavonoids)[1]、类胡萝卜素(carotenoids)[2]和生物碱(alkaloids)构成,这3类物质是植物花色重要的次级代谢物。其中类黄酮代谢产物中的花青苷作为大多数观赏植物的主要呈色物质[3],其显色范围从橙红色(天竺葵素、矢车菊素)到紫色和粉红色(芍药素、锦葵素、飞燕草素和矮牵牛素)[4]。花色素的多样性源于花青素生物合成途径中多级酶促反应形成的特异代谢网络[5]。花色素在花瓣中的特异性积累形成特定颜色和图案的现象被称为花瓣彩斑,花瓣彩斑是植物进化、自然选择和人工选育创新的综合结果[6],在现代花卉业中具有重要意义。根据花色素在花瓣或花萼特定区域的积累特征,可将花瓣彩斑分为规则彩斑和不规则彩斑两大类。近年来,通过转录组分析逐步解析了类黄酮途径对花瓣彩斑形成的调控机制[7],但由于物种间遗传背景差异及表型可塑性特征,不同植物以及同种植物不同品种间可能存在不同的花色素代谢调控网络。

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是菊科菊属多年生宿根植物,也是中国十大名花之一[8],兼具观赏价值、药用价值和食用价值。花色是菊花的主要观赏性状之一,目前关于菊花花色研究中主要存在两个问题:一是由于栽培菊花高度杂合且遗传背景复杂,大多数为六倍体或非整倍体,通过传统杂交模式选育新品种周期较长,进程相对缓慢;二是目前鉴别的花青素代谢关键基因有限,无法科学系统地解释某些特定表型的形成机理。菊花的花色成分组成极为复杂,不同品种间也可能存在不同的花色素代谢调控网络,白色系、黄色系的舌状花中均不含花青素,主要积累黄酮类物质[9-10];而紫色系品种主要积累花青素类物质[11]。在复色菊品种'花洒摇滚'舌状花不同颜色区域内,同时存在花青素合成通路与非花青素合成通路,这种现象为解析复色菊紫色花斑形成机制提供了理想的研究条件。因此,以复色菊品种'花洒摇滚'舌状花瓣(花瓣紫红色底,边缘为白色)不同颜色区域为试验材料,从转录组层面阐明影响紫色花斑花青素积累的关键基因,进一步丰富菊花的花色研究,以期为揭示菊花花斑形成机理提供参考,也为创制复色花斑花卉新品种提供基因资源。

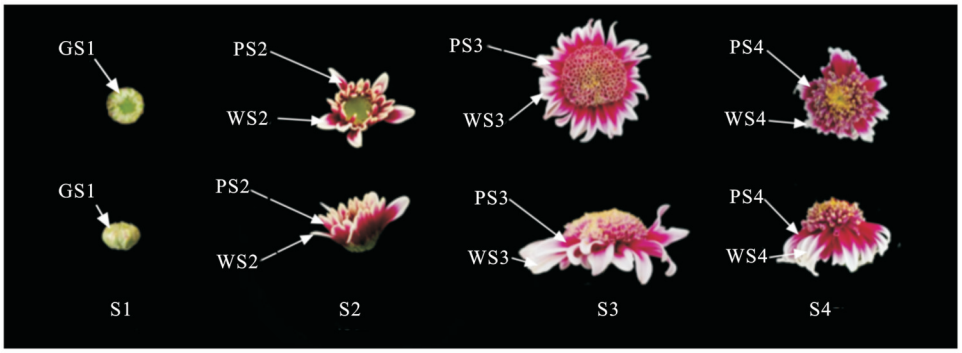
1 材料与方法

1.1 试验材料

紫白复色菊花品种'花洒摇滚'栽植于河北农业大学温室,栽培条件为:珍珠岩和营养土按体积比1∶1混合,8 h光照/16 h黑暗,昼夜温度分别为23

和 13 ℃。

选取 3 月龄以上健康生长的‘花洒摇滚’植株，根据头状花序开放阶段划分不同时期及颜色分区，其中 GS1 为绿色蕾期，PS2 为紫色初开期，WS2 为白色初开期，PS3 为紫色盛开期，WS3 为白色盛开期，PS4 为紫色衰败期，WS4 为白色衰败期（图 1）。采集不同时期及颜色分区的新鲜舌状花瓣，在低温条件下去除舌状花的基部，快速分离白色和紫色区域，在液氮中速冻，－80 ℃低温保存，用于转录组、RT-qPCR 分析及色素含量测定，每份样品均设 3 个生物学重复。转录组测序由百迈客科技股份有限公司进行。



GS1. 绿色蕾期；PS2. 紫色初开期；WS2. 白色初开期；PS3. 紫色盛开期；WS3. 白色盛开期；PS4. 紫色衰败期；WS4. 白色衰败期。
GS1. Green bud stage；PS2. Purple early bloom period；WS2. White early bloom period；PS3. Purple flowering period；WS3. White flowering period；PS4. Purple decline period；WS4. White decline period.

图 1　复色菊‘花洒摇滚’舌状花发育的不同阶段

Fig. 1　Different developmental stages of ray florets of *Chrysanthemum morifolium* ‘Huasayaogun’

1.2　试验方法

1.2.1　复色菊舌状花瓣的花色描述　在光线良好的室内，选取‘花洒摇滚’最具有典型颜色特征的舌状花 3～4 朵，对其不同颜色区域分别进行花色描述。将不同颜色区域花瓣正面朝上平置在白纸上，使用英国皇家园艺学会比色卡（RHSCC）对其花色进行测定，以 10 次 RHSCC 比色中出现频率最高的颜色为花瓣花色。

根据采样时期的划分，每个时期随机选取 5 朵健壮且长势一致的花朵，将花瓣正面中部对准色差仪的集光孔，用 CR-400 色差仪测定其舌状花不同颜色区域花瓣的明亮度（L^*值）、红度（a^*值）和黄度（b^*值），重复 5 次。

1.2.2　复色菊舌状花瓣总花青素及总黄酮含量的测定　参照 HUANG 等[12]的方法测定总花青素含量。具体为：称取各个时期植物样品 0.3 g，经液氮速冻后充分研磨，用体积分数 1% 盐酸甲醇溶液进行浸提。在 4 ℃冰箱中避光静置，每 6 h 振荡混匀 1 次，24 h 后在 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min，吸取上清液，使用酶标仪测量 530 和 650 nm 处的吸光值。参照王沙[13]的方法测定总黄酮含量。

1.2.3　复色菊舌状花瓣总 RNA 提取及 cDNA 合成　使用康为世纪的 OminiPlant RNA kit（*Dn*ase Ⅰ）全能型植物 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 提取，采用 Nanojob 2000 测定其浓度与纯度，利用 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。以提取完整且纯度良好的 RNA 作为模板，根据康为世纪一步法逆转录试剂盒说明书反转录成 cDNA。反应体系为 5×HiFiScript All-in-one qRT Master Mix 4 μL，RNA 2 μL，*RN*ase-Free water 补齐至 20 μL。反应程序为：50 ℃去 gDNA＋逆转录反应 15 min，85 ℃酶失活 5 s，反转录完毕于－20 ℃保存备用。

1.2.4　转录组测序及差异表达基因筛选　通过 Oligitex mRNA Mini Kit 从总 RNA 中使用磁珠富集复色菊 mRNA，以随机打断的 mRNA 为模板进行 cDNA 合成并纯化；将纯化的 cDNA 进行末端修复、加 A 尾、连接测序接头等操作，最终通过 PCR 富集进行 cDNA 文库的构建。文库质检合格后，使用 PE150 模式进行转录组数据测序。去除包含接头、ploy-N 和低质量序列，将得到的高质量 clean data 使用 Trinity 软件进行无参考基因组序列组装，成功获得该复色菊的 Unigene 库。对 Unigene 库进行文库质量评估、组装完整性分析，并通过对 Unigene 进行 9 大数据库功能注释，将在不同颜色区域样本组中的基因表达量进行差异表达分析、基因功能注释和功能富集等。以 $\log_2|\text{fold change}|\geqslant 1.5$ 且 $P<0.05$ 作为差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）的筛选标准，并对 DEGs 进行 GO、KEGG 富

集分析。

1.2.5 荧光定量PCR的验证 为了验证转录组数据的可靠性,以*CmEF1α*作为内参基因,在转录组数据中选取差异表达基因*F3'H*、*DFR*、*FLS*、*ANS*、*MYB1*、*MYB3*进行RT-qPCR试验。使用Primer Premier 6软件设计荧光定量引物,引物退火温度为58~60 ℃,引物长度为18~22 bp,扩增片段长度为100~150 bp,引物信息详见表1。每份样本分别设3次技术重复,按照康为世纪SuperStar Universal SYBR Master Mix试剂盒进行RT-qPCR检测。RT-qPCR反应体系:2×SuperStar Universal SYBR Master Mix 10 μL,上下游引物各0.4 μL,cDNA 1 μL,ddH_2O补齐至20 μL。RT-qPCR反应程序:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性15 s,60 ℃退火30 s,45个循环。

表1 RT-qPCR引物信息

Table 1 Information of primers for the RT-qPCR

基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
CmEF1α	TRINITY_DN6397_c0_g1	F: CTGGTGTCATCAAGCCTGGTA R: AGCCTCAGTTAGAGCCTCGT	58.2
F3'H	TRINITY_DN1229_c0_g2	F: AACCTGCCCAACCAACTACC R: CACTCGGAGCCAAGTAACCA	58.3
DFR	TRINITY_DN26442_c0_g1	F: TTGGCGGAGAAAGCAGCAT R: ACTTGGTGGGAACGAGGGA	58.6
FLS	TRINITY_DN5164_c1_g1	F: GGACGATAATTCGCTGCATGA R: ACCACCGCTACTCTCTTCCA	58.8
ANS	TRINITY_DN9765_c0_g1	F: ATCAAGCCACCAACGGACC R: GCGACACGCCTCAGAGATT	58.6
MYB1	TRINITY_DN20459_c0_g1	F: TGGGAAGGTCACCTTGTTGTG R: AGCAGCCTTCGCCATGAGT	58.3
MYB3	TRINITY_DN1671_c0_g2	F: TGTCGCAACTGCCTGATATGT R: TGCCATGTCACCACTGCTTAT	58.8

1.3 数据处理

采用Excel 2024进行试验数据的整理分析,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行花瓣不同颜色区域差异基因的相对表达量分析,使用GraphPad Prism 9进行绘图。

2 结果与分析

2.1 复色菊舌状花瓣的花色描述

利用RHSCC比色结合色差仪测定将花色数据化,对植物花色差异进行较为客观的评价。RHSCC比色结果(表2)表明,'花洒摇滚'系复色菊花品种,花色为紫红色系与白色系。由表2可知,紫色区域L^*值在PS1~PS2和PS3~PS4时期显著降低;白色区域L^*值呈现先升高后小幅度降低趋势,WS2的L^*值最大,为97.96,白色区域的花瓣颜色最明亮,更偏向于白色。

表2 复色菊舌状花瓣不同颜色区域的花色表型

Table 2 Flower color phenotypes in different color regions of ray florets in multicolored *Chrysanthemum morifolium*

时期 Periods	比色卡 RHSCC	明亮度(L^*) Brilliance	红度(a^*) Redness	黄度(b^*) Yellowness
GS1	YELLOW-GREEN GROUP 150 C	97.03±0.03 b	−3.14±0.14 f	5.10±0.06 a
PS2	RED-PURPLE GROUP 59 A	57.82±0.07 c	63.07±0.03 c	−34.29±0.07 d
PS3	RED-PURPLE GROUP 59 A	57.31±0.11 c	63.66±0.02 b	−39.11±0.18 f
PS4	RED-PURPLE GROUP 59 A	47.53±0.22 d	65.70±0.20 a	−35.43±0.03 e
WS2	WHITE GROUP NN155 C	97.96±0.01 a	−1.63±0.02 e	1.41±0.01 b
WS3	WHITE GROUP NN155 C	97.42±0.29 b	−1.60±0.07 e	1.25±0.11 c
WS4	WHITE GROUP NN155 C	97.12±0.46 b	−0.15±0.03 d	1.14±0.03 c

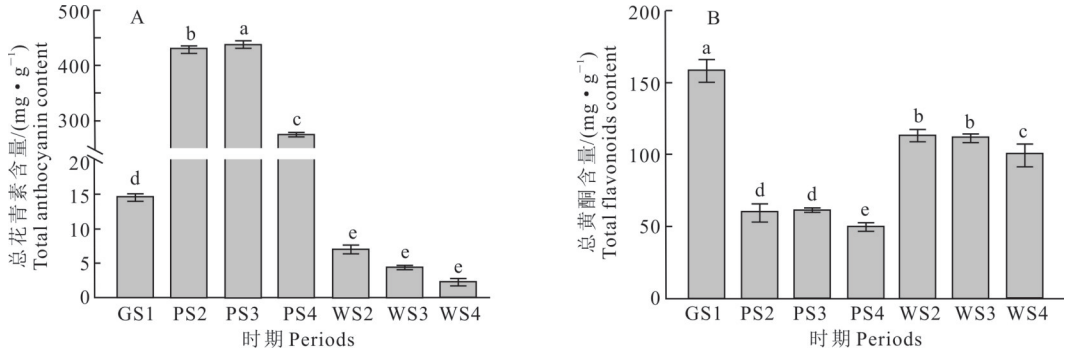
注:同列数据后标不同小写字母表示不同时期差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters after data in the same column indicate significant differences in different periods ($P<0.05$).

紫白2种颜色区域之间a^*值差异较大,紫色区域随着花瓣生长发育a^*值逐渐增大,花瓣逐渐变红,在PS4时期a^*值最大,为65.70;白色区域随着花瓣生长发育a^*值也逐渐增大。紫色区域b^*值在PS3时期最

低，为－39.11，花瓣黄度值降低使得整体颜色更偏向浅蓝紫色；白色区域随着花瓣生长发育 b^* 值逐渐降低，WS3时期白色区域花瓣颜色为白色微微发黄。

在整个发育阶段，花瓣从黄绿色逐渐变为紫红色与白色的复合花色。紫色区域与白色区域在S2时期花色差异最明显，花瓣白色区域在S2时期及以后颜色变化不明显；紫色区域在S3时期后，随着生长时期的增加有变浅的趋势。



图柱上标不同小写字母表示不同时期差异显著（$P<0.05$）。

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences between different stages ($P<0.05$).

图2　复色菊舌状花瓣不同颜色区域总花青素（A）和总黄酮（B）含量

Fig. 2　Total anthocyanin (A) and total flavonoid (B) content in different colored regions of ray florets in multicolored *Chrysanthemum morifolium*

总黄酮含量在GS1时期最高，为159.12 mg/g，各时期紫色区域的总黄酮含量显著低于白色区域。上述结果表明，总花青素含量及其分布是复色菊舌状花瓣呈色差异的重要因素。

2.3　复色菊舌状花瓣转录组基因表达的聚类分析

通过层次聚类将具有共同功能或者参与共同代谢途径的基因聚集到同一簇中，更直观地展现复色菊舌状花不同时期基因的表达差异。聚类分析结果（图3）表明，组内样品间基因表达模式的相似度较高，组内样本聚集良好，且在复色菊舌状花不同颜色区域的样本间存在显著差异。

2.4　复色菊舌状花瓣不同颜色区域DEGs的筛选

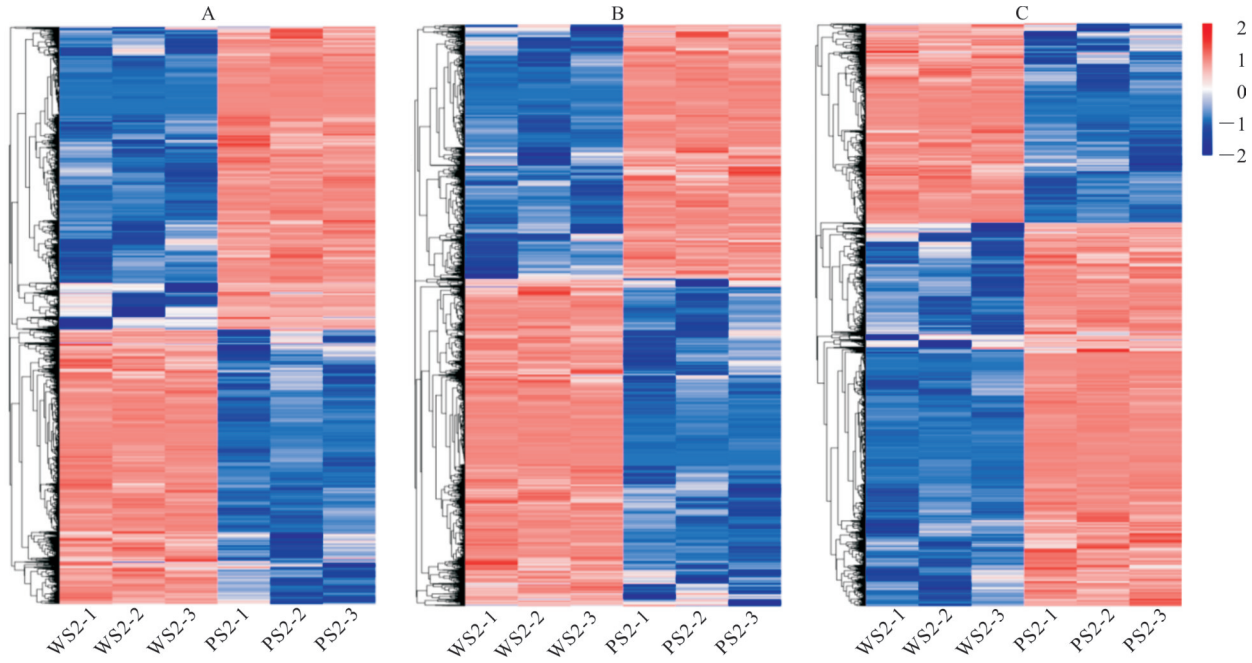
以 $\log_2|\text{fold change}|\geqslant 1.5$ 且 $P<0.05$ 作为DEGs的筛选标准，筛选在相同时期不同颜色区域中的DEGs。在S2时期中，PS2和WS2共发现4 779个DEGs，相对于白色区域，2 506个DEGs在紫色区域上调表达，2 273个DEGs在紫色区域下调表达；在S3时期中，PS3和WS3共发现4 456个DEGs，相对于白色区域，1 946个DEGs在紫色区域上调表达，2 510个DEGs在紫色区域下调表达；在S4时期中，PS4和WS4共发现4 240个DEGs，相对于白色区域，2 792个DEGs在紫色区域上调表达，1 448个DEGs在紫色区域下调表达。表明在复色菊花瓣发育的S2～S4时期，舌状花紫色区域与白色区域基因表达均存在较大差异。DEGs中含有与花色形成相关的关键基因，参与了花色素的生物合成、分布及调控等花斑形成的复杂过程。

2.5　复色菊舌状花瓣不同颜色区域DEGs的富集分析

对筛选得到的DEGs进行GO富集分析，结果表明，在S2、S3、S4时期对比中，分别有3 533，3 205，3 104个DEGs注释到生物过程、分子功能和细胞组分3个功能类型的44个组分。其中在S2、S3、S4时期，生物过程中的细胞过程分别注释到1 629，1 583，1 393个DEGs；分子功能中的催化活性注释到DEGs数目最多，分别有1 817，1 766和1 548个DGEs；细胞组分中的细胞解剖实体分别注释到1 953，1 644和1 581个DEGs。

KEGG富集分析结果（图4）发现，DEGs显著富集在代谢、遗传信息处理、生物系统和细胞过程等信号通路。在S2时期中，PS2和WS2有较多的DEGs富集在苯丙烷生物合成、花青素生物合成、类黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成途径，这些代谢通路均与花色素合成有关；在S3时期中，PS3和WS3的DEGs显著富集于苯丙烷生物合成、花青素生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、类黄酮生物

合成途径;在S4时期中,PS4和WS4的DGEs富集在苯丙烷生物合成、类黄酮生物合成途径,花青素生物合成途径不在前20条KEGG通路,但也存在DEGs显著富集。



A. PS2 vs WS2;B. PS3 vs WS3;C. PS4 vs WS4。
横坐标代表样品名称及样品的聚类结果,纵坐标代表差异基因的聚类结果。颜色代表基因在样品中的表达水平。
A. PS2 vs WS2;B. PS3 vs WS3;C. PS4 vs WS4.
The horizontal axis represents sample names and their clustering results, while the vertical axis displays differentially expressed genes and their clustering results. The color gradient indicates the expression levels of genes across samples.

图3 复色菊舌状花瓣转录组表达基因的聚类热图

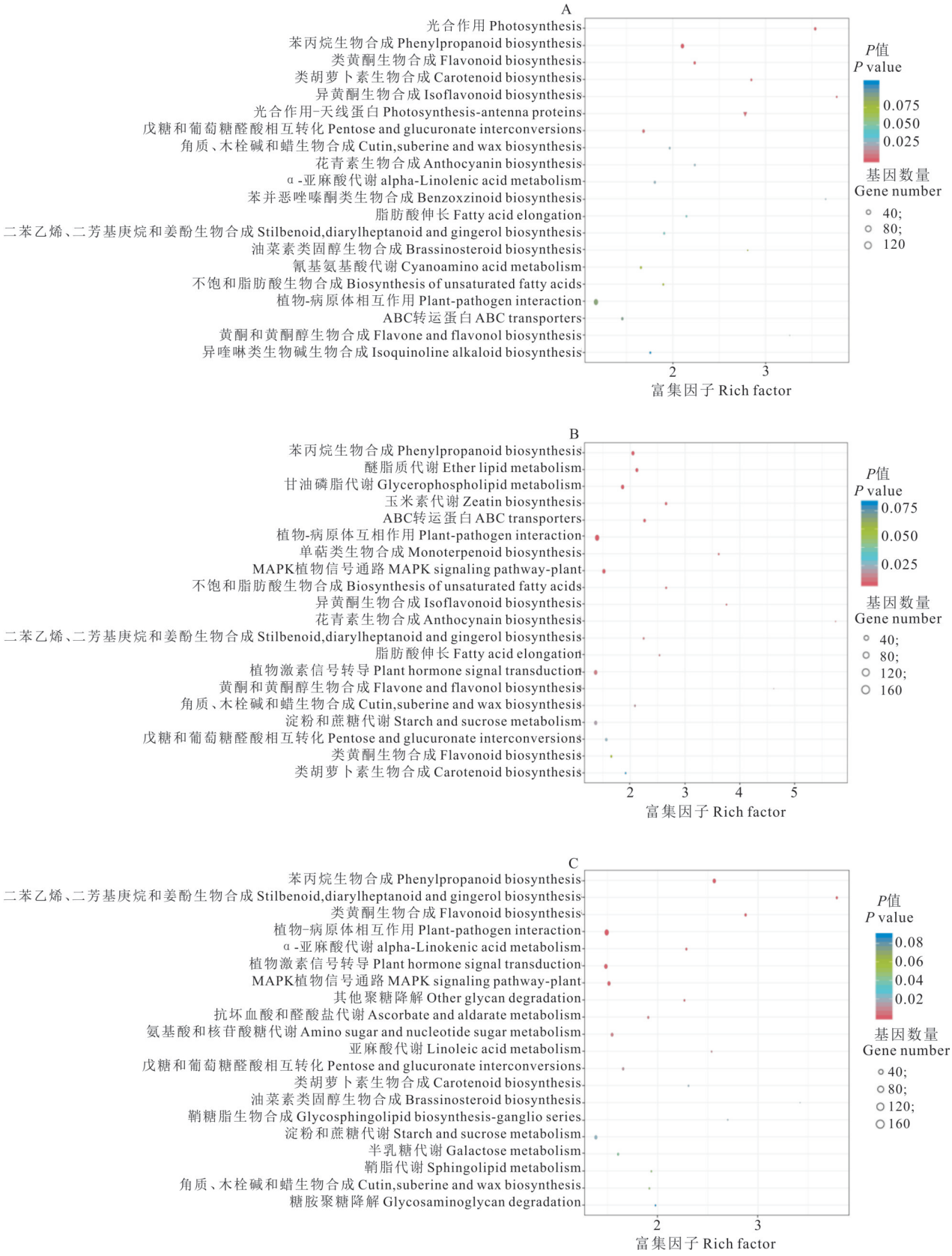
Fig. 3 Clustering heatmap of differentially expressed genes in the transcriptome of ray florets in multicolored *Chrysanthemum morifolium*

综合GO及KEGG富集分析可知,在S2、S3、S4时期紫色区域与白色区域的DEGs主要富集在类黄酮生物合成、花青素生物合成途径。紫色区域花斑呈色的代谢过程与类黄酮、花青素生物合成途径相关。因此,对类黄酮合成途径及花青素生物合成途径的DEGs进一步筛选分析。

2.6 复色菊舌状花瓣花青素合成相关DEGs的筛选

在不同颜色区域比较中,共发现了13种共43个与花青素合成相关的DEGs(表3),包括12个苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)、1个肉桂酸4-羟化酶基因(*C4H*)、4个4-香豆酸:辅酶A连接酶基因(*4CL*)、3个查尔酮合酶基因(*CHS*)、7个查尔酮异构酶基因(*CHI*)、1个黄烷酮-3-羟化酶(*F3H*)、2个类黄酮3′-羟化酶基因(*F3'H*)、2个二氢黄酮醇4-还原酶基因(*DFR*)、1个花青素合酶基因(*ANS*)、1个黄酮醇合酶基因(*FLS*)、1个黄酮合酶Ⅱ基因(*FNSII*)、1个花青素3-*O*-葡萄糖基转移酶基因(*UFGT*)、7个花青素3-*O*-葡萄糖苷6″-*O*-酰基转移酶基因(*3AT*)。

将与花青素合成相关DEGs的相对表达量进行分析,结果(图5)表明,在S2时期,相对于白色区域,*DFR*(TRINITY_DN26442_c0_g1)、*ANS*(TRINITY_DN28164_c0_g1)、*UFGT*(TRINITY_DN19655_c0_g1)、*F3'H*(TRINITY_DN18276_c0_g1)在紫色区域表达量显著升高,分别上调了12.52,9.40,2.82和1.21倍。在S3时期中,相对于白色区域,*DFR*(TRINITY_DN26442_c0_g1)、*ANS*(TRINITY_DN28164_c0_g1)、*F3'H*(TRINITY_DN18276_c0_g1)基因在紫色区域的表达量分别上调了8.22,4.17,2.92倍;相对于紫色区域,*FLS*(TRINITY_DN35951_c0_g2)在白色区域的表达量上调了3.30倍。综上可知,*F3'H*、*ANS*、*DFR*基因均在S2时期紫色区域显著高表达,表明花青素正在不断合成和积累;*FLS*基因在S3时期白色区域显著上调表达。推测这些候选基因在复色菊舌状花瓣花斑的形成过程中发挥重要作用。



A. PS2 vs WS2；B. PS3 vs WS3；C. PS4 vs WS4。

A. PS2 vs WS2; B. PS3 vs WS3; C. PS4 vs WS4.

图 4　复色菊舌状花瓣不同颜色区域 DEGs 的 KEGG 富集分析

Fig. 4　KEGG enrichment analysis of DEGs in different color regions of ray florets in multicolored *Chrysanthemum morifolium*

表 3 复色菊舌状花瓣不同颜色区域花青素合成相关差异基因

Table 3 Differentially expressed genes related to anthocyanin biosynthesis in different color regions of ray florets in multicolored *Chrysanthemum morifolium*

结构基因名称 Structural gene name	KO 数据库 ID KEGG Orthology ID	差异基因数量 DEGs number	基因 ID Gene ID
PAL	K10775	12	TRINITY_DN27724_c0_g1, TRINITY_DN47370_c0_g1, TRINITY_DN45459_c0_g1, TRINITY_DN18593_c0_g1, TRINITY_DN37878_c0_g1, TRINITY_DN37878_c0_g2, TRINITY_DN5081_c0_g1, TRINITY_DN248_c0_g1, TRINITY_DN5081_c1_g1, TRINITY_DN248_c2_g1, TRINITY_DN73398_c0_g1, TRINITY_DN64912_c0_g1
C4H	K00487	1	TRINITY_DN21809_c0_g1
4CL	K01904	4	TRINITY_DN52221_c0_g1, TRINITY_DN11515_c1_g1, TRINITY_DN2864_c0_g1, TRINITY_DN11515_c0_g1
CHS	K00660	3	TRINITY_DN44842_c0_g1, TRINITY_DN54615_c0_g1, TRINITY_DN18285_c0_g1
CHI	K01859	7	TRINITY_DN40242_c0_g1, TRINITY_DN503_c0_g2, TRINITY_DN996_c0_g2, TRINITY_DN4026_c0_g2, TRINITY_DN996_c0_g1, TRINITY_DN6700_c0_g1, TRINITY_DN18989_c0_g1
F3H	K00475	1	TRINITY_DN5164_c1_g1
F3'H	K05280	2	TRINITY_DN18276_c0_g1, TRINITY_DN55551_c0_g1
DFR	K13082	2	TRINITY_DN11007_c0_g1, TRINITY_DN26442_c0_g1
ANS	K05277	1	TRINITY_DN28164_c0_g1
FLS	K05278	1	TRINITY_DN35951_c0_g2
FNSII	K23179	1	TRINITY_DN10402_c0_g1
UFGT	K12930	1	TRINITY_DN19655_c0_g1
3AT	K21383	7	TRINITY_DN3584_c0_g1, TRINITY_DN16720_c0_g1, TRINITY_DN7806_c0_g1, TRINITY_DN42892_c0_g1, TRINITY_DN11496_c0_g1, TRINITY_DN49329_c0_g1, TRINITY_DN3839_c0_g1

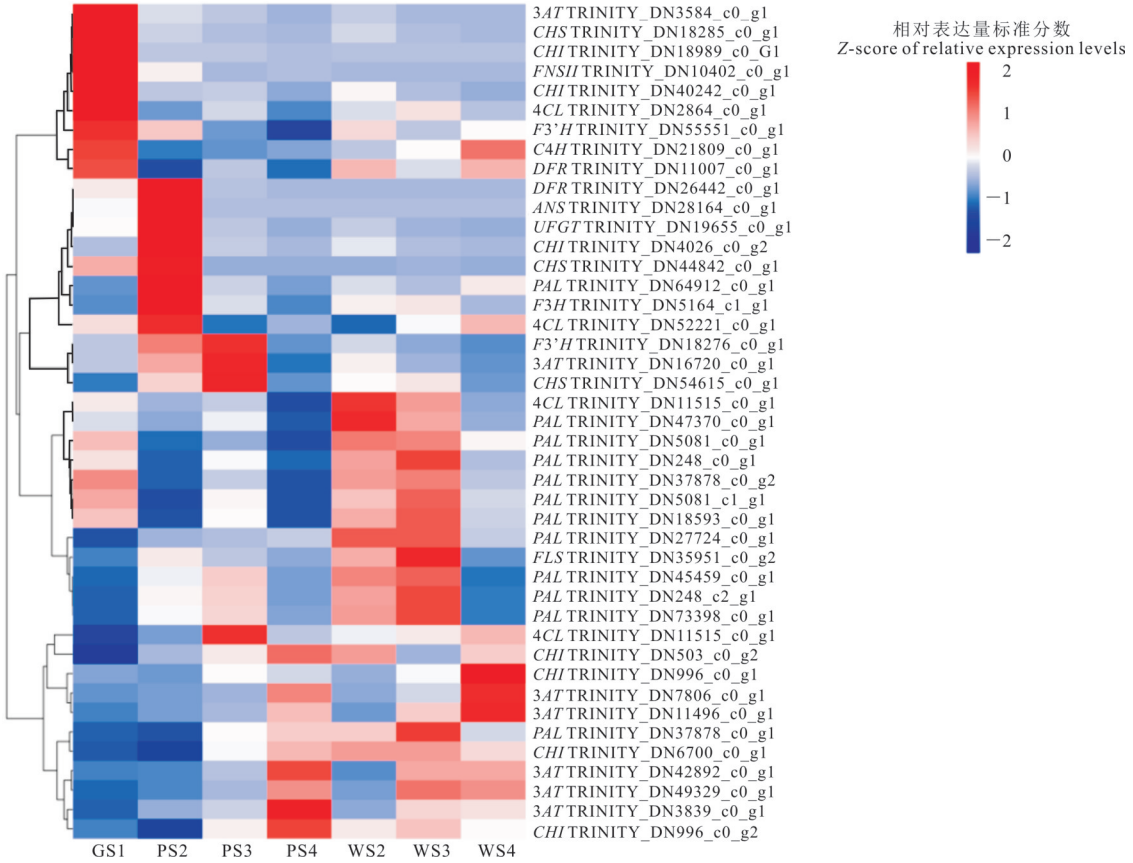


图 5 复色菊舌状花瓣花青素生物合成相关基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of anthocyanin biosynthesis-related structural genes in ray florets of multicolored *Chrysanthemum morifolium*

2.7　复色菊舌状花瓣花青素合成相关MYB转录因子的筛选

结合舌状花关键呈色时期，筛选复色菊舌状花瓣不同颜色区域差异表达的转录因子，由图6可知，在S2时期，相对于白色区域，*MYB*1（TRINITY_DN20459_c0_g1）在紫色区域的表达上调了3.78倍；S3时期，相对于白色区域，*MYB*3（TRINITY_DN1671_c0_g2）在紫色区域的表达上调了2.81倍，且其在紫色区域的相对表达量显著高于白色区域。表明*MYB*1、*MYB*3转录因子在舌状花花青素生物合成过程中起到重要调控作用。

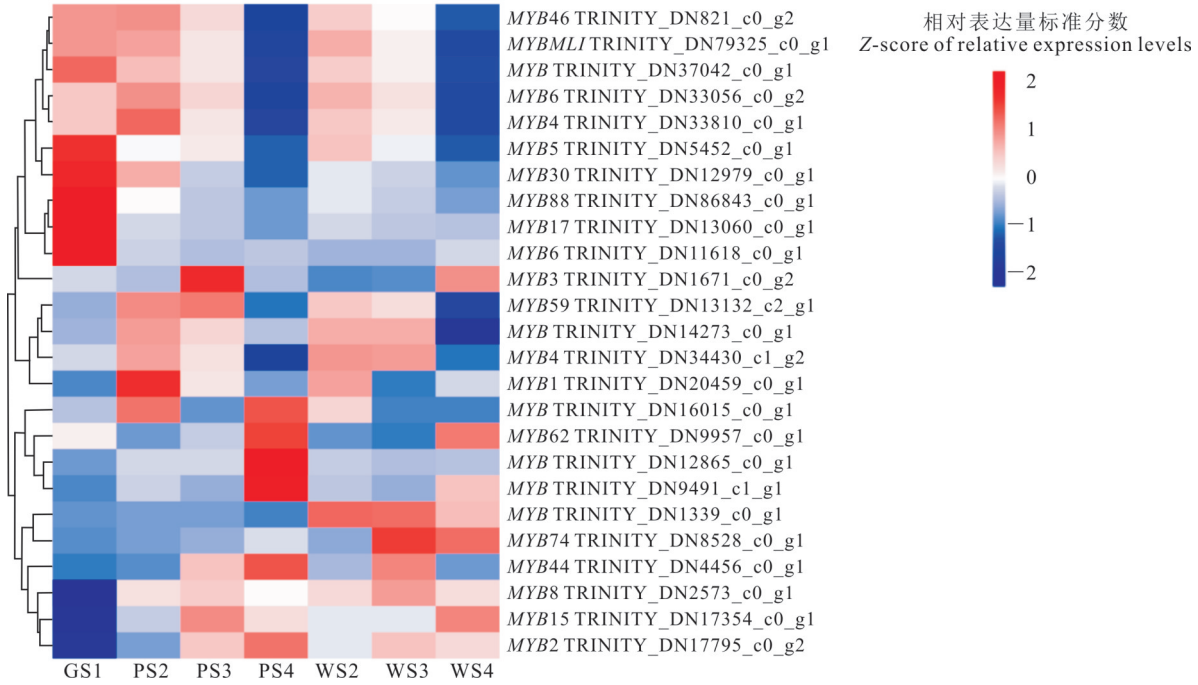


图6　复色菊舌状花瓣花青素生物合成相关转录因子的相对表达量

Fig. 6　Relative expression levels of transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in ray florets of multicolored *Chrysanthemum morifolium*

2.8　RT-qPCR验证

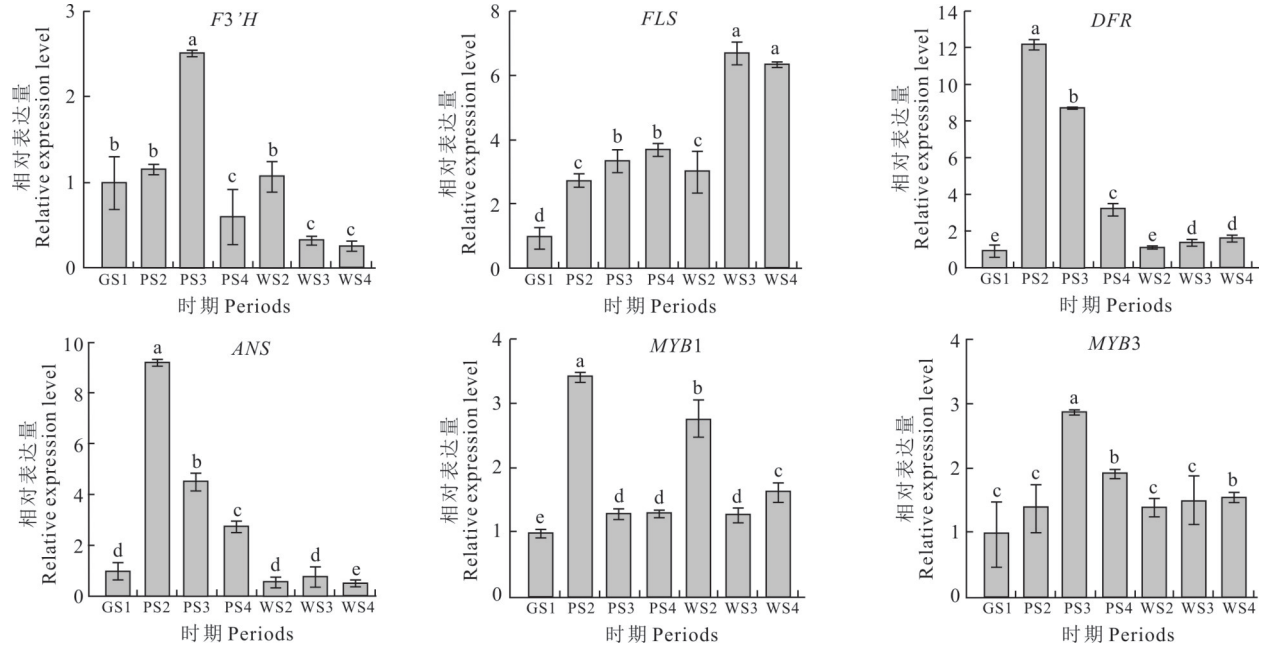
根据转录组筛选结果，对*F3'H*、*FLS*、*DFR*、*ANS*、*MYB*1、*MYB*3共6个与花色合成相关的基因进行RT-qPCR扩增。结果（图7）表明，与GS1时期相比，*F3'H*基因在PS3时期的相对表达水平最高，且与其他时期差异显著；*FLS*基因在WS3时期的相对表达水平最高，是GS1时期的6.78倍；*DFR*基因在PS2时期的相对表达水平最高，是GS1时期的12.17倍；*ANS*基因在PS2时期的表达水平最高，是GS1时期的9.24倍。*MYB*1基因在PS2时期的相对表达水平最高，为GS1时期的3.49倍；其在PS2时期之后的相对表达量均呈下降趋势，在WS2～WS4时期其相对表达量呈先降低后升高趋势。*MYB*3基因在PS2～PS4时期的相对表达水平明显高于WS2～WS3时期。

3　讨论与结论

舌状花是菊花主要的观赏部位，花瓣呈色是多种色素协同作用的结果[14]，花青素的种类及其积累模式对花瓣显色特征具有决定性影响。目前较为客观的花瓣测色方法为比色卡比色与仪器测色相结合，将表型参数数据化，能够对花瓣色彩的描述更加准确。大多数白色花瓣由于缺乏花青素或类胡萝卜素而含有大量黄酮醇和黄酮[15]，紫色花瓣呈色主要色素为花青素[16]。该复色菊特有的“双色”稳定表型表明其花青素与类黄酮生物合成在不同区域具有不同的调控机制，这为探究复色菊花斑形成的分子机制提供了理想的试验材料。

已有研究表明，规则性彩斑受基因调控[7]，花斑是花色相关基因在植物同一器官（如花瓣或花萼等）精准调控和差异表达的结果，转录组学分析能够系统揭示花色素合成通路中基因的协同表达[17-18]。本研究以复色菊‘花洒摇滚’舌状花白色区域作为对照，对紫色区域转录组进行分析。以$\log_2|\text{fold change}|\geqslant 1.5$且$P<0.05$作为阈值筛选DEGs。通过GO与KEGG富集分析发现，DEGs显

著富集在苯丙烷生物合成、类黄酮生物合成、花青素生物合成、黄酮与黄酮醇生物合成等代谢通路。这与在大花君子兰(*Clivia miniata*)中筛选得到的花色素差异代谢通路[19]一致。



图柱上标不同小写字母表示不同时期差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences between different stages ($P < 0.05$).

图7 复色菊舌状花瓣花青素生物合成相关基因的RT-qPCR验证

Fig. 7 RT-qPCR results of differentially expressed genes related to anthocyanoside biosynthesis in ray florets of multicolored *Chrysanthemum morifolium*

花青素生物合成受多级结构基因的协同调控,本研究通过转录组分析筛选得到花青素合成途径上游基因*PAL*、*C4H*、*CHS*、*CHI*、*FLS*和*F3'H*,以及花青素合成途径下游基因*DFR*、*ANS*、*UFGT*和*3AT*。这些基因通过顺序工作产生特定的花青素,导致花瓣呈现不同颜色。结构基因在开花早期高表达促进了后期花色素的合成,这一积累模式在菊花品种'日切桃红'[20]中也得到验证。GO及KEGG富集分析结果表明,这些与花色相关的DEGs显著聚集在类黄酮生物合成和花青素生物合成通路。对DEGs进行相对表达量分析,得到6个与花色合成相关的差异基因(*F3'H*、*FLS*、*DFR*、*ANS*、*MYB1*、*MYB3*),推测这些结构基因与转录因子导致黄酮类和花青素类代谢物在同一舌状花瓣不同区域差异积累。

*F3'H*基因在GS1~PS3时期表达量呈逐渐上升趋势,在PS3时期表达量最高。与GS1时期相比,该基因在PS2~PS3时期紫色区域上调表达,推测*F3'H*基因表达量增加可能促进类黄酮3'-羟化酶的活性,导致花瓣中花青素含量累积,使花瓣呈现紫色花斑。已有研究发现,*F3'H*基因表达水平与总黄酮和花青素含量显著相关,证明*F3'H*基因是花青素类化合物合成的关键基因[21-22],这与'二乔'牡丹双色花形成的原因[23]类似。表明*F3'H*是复色菊紫色花斑花青素积累过程中的重要基因。

已有研究表明,*DFR*与*FLS*基因进行合成底物二氢黄酮醇(DHK)的竞争,通过改变代谢量来改变花色[24],分别生成无色花青素和黄酮醇。在园林植物中,作为黄酮类物质合成的正向调控基因,*FLS*通常间接增强花色稳定性[25]。本研究中,*DFR*基因在紫色区域S2~S3时期表达量显著上升,使得DHK向花青素生物合成方向代谢;*FLS*基因在白色区域表达量上升,通过竞争DHK分配至黄酮醇合成途径,使得花青素合成通路受阻,最终导致花青素与黄酮类物质在特定区域积累,从而在舌状花中形成紫白复色的表型差异。*ANS*是花青素生物合成通路的最后一个关键酶基因,能将无色的花青素催化转变为有色的花色素苷[24],也是较为常见的受转录因子调控的酶基因。*ANS*基因在紫色区域S2时期的表达量最高,可能促进了花青素在舌状花紫色区域花斑处的累积。该结论与对紫薇(*Lagerstroemia indica*)的研究结果[26]一致。

研究发现，MYB转录因子参与调控类黄酮、花青素生物合成途径[27]。在软枣猕猴桃[28]、丹参[29]、牵牛花[30]中均验证了*MYB1*能够正向调控花青素的生物合成。本研究中，相对于白色区域，*MYB1*在紫色区域S2时期显著上调表达了3.78倍。表明了*MYB1*为花青素生物合成的关键调节基因，能够正向调控花青素的生物合成。已有研究表明，*MYB3*基因能够正向调控地黄的花青素生物合成[31]，对苹果黄酮类化合物花色素苷的积累起到正向促进作用[32]。本研究中，相对于白色区域，*MYB3*在S3时期紫色区域中显著高表达，推测*MYB3*对紫色区域花斑中花青素的积累起到正向调控作用。

基因通过不同发育阶段特异性表达模式调控花青素合成，紫白复色表型源于黄酮类和花青素类代谢物的差异积累。通过表型分析、转录组学分析及RT-qPCR验证表明，*F3'H*、*DFR*、*ANS*、*MYB1*、*MYB3*基因与复色菊紫色区域花斑中花青素生物合成与积累密切相关，是影响复色菊花青素在紫色区域积累的关键基因。

[参考文献]

[1] 林启芳，刘婷婷，刘洁茹，等. 紫薇属与黄薇属植物花瓣类黄酮组成及含量分析[J]. 园艺学报，2021，48(10)：1956-1968.
LIN Q F，LIU T T，LIU J R，et al. Flavonoids composition and content in petals of *Lagerstroemia* and *Heimia* species and cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica，2021，48(10)：1956-1968.

[2] VON LINTIG J. Colors with functions：elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism [J]. Annual Review of Nutrition，2010，30：35-56.

[3] LUO X N，SUN D Y，WANG S，et al. Integrating full-length transcriptomics and metabolomics reveals the regulatory mechanisms underlying yellow pigmentation in tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) flowers[J]. Horticulture Research，2021，8(1)：235-235.

[4] PATRA S，MAKHAL P N，JARYAL S，et al. Anthocyanins：plant-based flavonoid pigments with diverse biological activities [J]. International Journal of Plant Based Pharmaceuticals，2022，2(1)：118-127.

[5] SAIGO T，WANG T，WATANABE M，et al. Diversity of anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis in land plants [J]. Current Opinion in Plant Biology，2020，55：93-99.

[6] 刘晓娟，杨玉珍，周红杰，等. 园林植物彩斑现象形成机理及原因 [J]. 北方园艺，2014(3)：182-186.
LIU X J，YANG Y Z，ZHOU H J，et al. Causes and formation mechanism of variegation landscape plants[J]. Northern Horticulture，2014(3)：182-186.

[7] 齐方婷，黄河. 观赏植物花斑形成调控机制的研究进展[J]. 生物技术通报，2023，39(10)：17-28.
QI F T，HUANG H. Research advance in the regulation mechanism of flower spots formation in ornamental plant[J]. Biotechnology Bulletin，2023，39(10)：17-28.

[8] 苏江硕，贾棣文，王思悦，等. 中国菊花遗传育种60年回顾与展望[J]. 园艺学报，2022，49(10)：2143-2162.
SU J S，JIA D W，WANG S Y，et al. Retrospection and prospect of *Chrysanthemum* genetic breeding for last six decades in China[J]. Acta Horticulturae Sinica，2022，49(10)：2143-2162.

[9] 孙翊. 瓜叶菊*PCFH*基因对花青素苷合成及花色的影响[D]. 北京：北京林业大学，2011.
SUN Y. Anthocyanin biosynthesis and flower coloration controlled by cineraria *PCFH* gene[D]. Beijing：Beijing Forestry University，2011.

[10] QI F T，LIU Y T，LUO Y L，et al. Functional analysis of the *ScAG* and *ScAGL11* MADS-box transcription factors for anthocyanin biosynthesis and bicolour pattern formation in *Senecio cruentus* ray florets [J]. Horticulture Research，2022，9：uhac071-uhac071.

[11] 苏媚. 菊花花色嵌合体生物学特性及形成机理的研究[D]. 苏州：苏州大学，2011.
SU M. Study on biological characteristics and formation mechanism of flower color chimera in *Chrysanthemum*[D]. Suzhou：Soochow University，2011.

[12] HUANG W J，KHALDUN A M，LV H Y，et al. Isolation and functional characterization of a R2R3-MYB regulator of the anthocyanin biosynthetic pathway from *Epimedium sagittatum* [J]. Plant Cell Reports，2016，35(4)：883-894.

[13] 王沙. 石榴花瓣花青苷生理指标及其生物合成相关基因表达分析[D]. 南京：南京林业大学，2022.
WANG S. Analysis of physiological indicators and biosynthesis-related geneexpression gene expression of anthocyanins in *Pomegranate* petals[J]. Nanjing：Nanjing Forestry University，2022.

[14] 高浩然，滕守连，罗玉秀. 不同花色甘蓝型油菜花瓣转录组初步分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2024，52(9)：51-61.
GAO H R，TENG S L，LUO Y X. Preliminary analysis of transcriptomes of different *Brassica napus* petals[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2024，52(9)：51-61.

[15] CHEN S M，LI C H，ZHU X R，et al. The identification of flavonoids and the expression of genes of anthocyanin biosynthesis in the *Chrysanthemum* flowers [J]. Biologia Plantarum，2012，56(3)：458-464.

[16] 周慧，张凯凯，张欢，等. 茶树花青素的代谢调控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2025，16(3)：106-114.
ZHOU H，ZHANG K K，ZHANG H，et al. Research progress on the regulation of anthocyanidins metabolism in tea plant [J]. Journal of Food Safety & Quality，2025，16(3)：106-114.

[17] 刘钰婷. 瓜叶菊舌状花花斑形成中关键基因的功能解析[D]. 北京：北京林业大学，2019.
LIU Y T. Functional analysis of key genes in the formation of

color spots on ray-floret of *Senecio cruentus*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.

[18] 崔宇萌,黄河,戴思兰. 瓜叶菊花色性状形成机理的研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2024,25(5):695-703.
CUI Y M, HUANG H, DAI S L. Molecular mechanisms of flower color formation in *Pericallis hybrida*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(5): 695-703.

[19] 王冲,宋阳. 基于转录组数据解析大花君子兰花瓣花青素代谢差异[J]. 分子植物育种,2023,21(4):1093-1102.
WANG C, SONG Y. Analyze the differences in anthocyanin metabolism based on transcriptome sequencing of petal in *Clivia miniata*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(4): 1093-1102.

[20] OHMIYA A, SASAKI K, NASHIMA K, et al. Transcriptome analysis in petals and leaves of *Chrysanthemums* with different chlorophyll levels[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 202.

[21] 蔡友铭,李青竹,张永春,等. 功能花卉的利用形式及功能成分研究现状与展望[J]. 植物资源与环境学报,2025,34(1):94-105.
CAI Y M, LI Q Z, ZHANG Y C, et al. Research status and prospect of utilization forms and functional components of functional flowers[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2025, 34(1): 94-105.

[22] 江虹. 两色金鸡菊黄酮类化合物及其合成相关基因表达的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2021.
JIANG H. Study on flavonoids and biosynthesis related gene expression of *Coreopsis tinctoria* Nutt[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2021.

[23] XU Y F, SHANG W Q, ZHANG Y, et al. Multi-omics analysis reveals new insights into the bicolor flower phenotype of *Paeonia suffruticosa* 'Erqiao'[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 24: 112565.

[24] LEI T, HUANG J, RUAN H X, et al. Competition between *FLS* and *DFR* regulates the distribution of flavonols and proanthocyanidins in *Rubus chingii* Hu[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1134993.

[25] SASAKI N, MATSUBA Y, ABE Y, et al. Recent advances in understanding the anthocyanin modification steps in carnation flowers[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 163: 37-45.

[26] 陈可欣,王晓明,曾慧杰,等. 紫薇Li ANS基因的克隆和表达及与花青素含量的关系[J]. 分子植物育种,2021,19(12):3915-3922.
CHEN K X, WANG X M, ZENG H J, et al. Cloning and expression analysis of Li ANS gene and its correlations with anthocyanin accumulation in *Lagerstroemia indica*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(12): 3915-3922.

[27] 王华,李茂福,杨媛,等. 果实花青素生物合成分子机制研究进展[J]. 植物生理学报,2015,51(1):29-43.
WANG H, LI M F, YANG Y, et al. Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits[J]. Plant Physiology Communications, 2015, 51(1): 29-43.

[28] NIU B, LI Q H, FAN L J, et al. De Novo assembly of a sarcocarp transcriptome set identifies *AaMYB1* as a regulator of anthocyanin biosynthesis in *Actinidia arguta* var. purpurea[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12120.

[29] 徐文,田梅,申业,等. 丹参转录因子及相关调控蛋白研究进展[J]. 中国中药杂志,2025,50(1):58-70.
XU W, TIAN M, SHEN Y, et al. Research progress on transcription factors and regulatory proteins of *Salvia miltiorrhiza*[J]. China journal of Chinese materia medica, 2025, 50(1): 58-70.

[30] 陈寅,马风云,高嘉,等. 植物叶色变化影响因素及呈色机理研究进展[J]. 山东林业科技,2024,54(6):88-94.
CHEN Y, MA F Y, GAO J, et al. Research progress on influencing factors and mechanism of leaf color variation in plants[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2024, 54(6): 88-94.

[31] 左鑫. MYB转录因子调控3种地黄属植物花青素合成的分子机制研究[D]. 郑州:河南农业大学,2022.
ZUO X. Molecular mechanism of MYB transcription factor regulating anthocyanin biosynthesis in three *Rehmannia* species[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022.

[32] SORNKANOK V, HAN Y P, WEI G C, et al. An apple MYB transcription factor, *MdMYB3*, is involved in regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 176.

(责任编辑:陈丽)