

doi:10.11983/CBB25146

调控类黄酮合成的牡丹 R2R3-MYB 转录因子鉴定与分析

符真珠¹, 袁欣¹, 高杰¹, 王二强², 王晓晖², 李艳敏¹, 王慧娟¹, 王亮生³,
李珊珊^{3*}, 张和臣^{1*}

¹河南省农业科学院园艺研究所, 郑州 450002; ²洛阳市农林科学院, 洛阳 471026; ³中国科学院植物研究所, 北京 100093

摘要 牡丹是我国著名特色观赏花卉, 花色是决定其观赏和经济价值的重要性状。类黄酮化合物是牡丹花瓣呈色的主要色素。本研究基于杨山牡丹和大花黄牡丹基因组, 对参与类黄酮合成的 R2R3-MYB 转录因子家族中 SG4、SG5、SG6、SG7 和 SG20 等亚组成员进行了系统分析, 包括进化关系、氨基酸序列特征和内含子插入模式等。结果显示, 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 成员在进化上呈现多元化特征, 这可能与其功能分化密切相关。通过矮牵牛花瓣瞬时表达体系, 初步明确了不同 R2R3-MYB 类型在类黄酮合成调控中的功能特性。其中, SG6 亚组主要调控以 ANS 为核心的花青素合成途径; SG5 亚组主要参与以 ANR 为关键节点的原花青素合成; SG7 亚组则主要调控以 FLS 为代表的黄酮醇合成通路; 而牡丹 SG4 亚组成员 MYBs-SG4a 仍保留正向调控类黄酮合成的能力。此外, 研究发现不同成员之间存在竞争或协作关系, 协同参与类黄酮合成结构基因的表达调控。本研究为理解植物 R2R3-MYB 家族的进化与功能多样性提供了新的视角, 也为牡丹花色分子育种奠定了理论基础。

关键词 牡丹, R2R3-MYB, 类黄酮, 花色

符真珠, 袁欣, 高杰, 王二强, 王晓晖, 李艳敏, 王慧娟, 王亮生, 李珊珊, 张和臣 (2026). 调控类黄酮合成的牡丹 R2R3-MYB 转录因子鉴定与分析. 植物学报 **61**, 1–15.

牡丹 (*Paeonia* × *suffruticosa* Andrews) 被誉为“花中之王”, 隶属于芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*) 牡丹亚属 (*Paeonia* subg. *Moutan*) (Zhou et al., 2021), 是一种原产于中国的著名观赏花卉。花色是评价牡丹观赏价值的重要指标, 也是其品种分类的关键依据之一。研究表明, 牡丹花瓣的呈色物质包括类黄酮和类胡萝卜素等。其中, 类黄酮化合物主要有花青素苷、黄酮苷及黄酮醇苷等。花青素苷是形成牡丹红、粉、紫、黑等色系的关键成分; 而黄酮苷与黄酮醇苷则对部分牡丹品种的黄色至橙色色系具有重要贡献 (刘磊等, 2019; 符真珠等, 2024)。在类黄酮合成调控分子网络中, 涉及 R2R3-MYB、bHLH、WD40 和 WRKY 等多个转录因子家族, 其中 R2R3-MYB 家族是类黄酮合成途径的关键调控因子。不同 R2R3-MYB 成员在功能上的分工与协作, 共同决定了类黄酮合成的时间、部位、组分与含量 (Koes et al., 2005; Lloyd et al., 2017)。

参与类黄酮合成调控的 R2R3-MYB 转录因子包括 SG4 (Sub-Group 4)、SG5、SG6、SG7、SG20 等亚组成员。在矮牵牛 (*Petunia hybrida*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等模式植物中研究表明, SG5、SG6 和 SG7 等亚组成员分别特异性调控原花青素、花青素、黄酮醇等分支代谢途径 (Nesi et al., 2001; Monda et al., 2018; Quattrocchio et al., 1999)。矮牵牛 SG20 亚组成员 PH4 可通过调控膜蛋白编码基因 PH1 和 PH5 的表达, 并介导液泡环境酸化, 进而影响花瓣呈色 (Quattrocchio et al., 2006)。而 SG4 成员如矮牵牛 PhMYB27 和拟南芥 AtMYB3, 虽然在进化上与 SG5、SG6、SG7、SG20 等亚组成员相近, 但它们对类

收稿日期: 2025-08-11; 接受日期: 2025-12-06

基金项目: 国家自然科学基金 (No.32030095)、河南农科学院创新团队 (No.2024TD36)、河南省联合基金 (No.242301420128) 和中央引导地方科技发展资金 (No.Z20241471128)

* 通讯作者。 E-mail: shshli@ibcas.ac.cn; zhc5128@126.com

黄酮合成主要起负调控作用(Albert et al., 2014; LaFountain and Yuan, 2021)。近年来,关于牡丹 R2R3-MYB 基因功能的研究也取得一系列进展。Zhang 等(2019)在牡丹‘岛锦’(*P. suffruticosa* ‘Shimanishiki’)中鉴定的两个 R2R3-MYB 成员 *PsMYB114L* 与 *PsMYB12L* 在烟草中进行异源超表达,结果表明二者均能正向调控花青素的合成。在牡丹‘二乔’(*P. suffruticosa* ‘Eqiao’)中,SG6 亚组成员 *PsMYB57* 与 *PsMYB58*(Zhang et al., 2020, 2021),以及牡丹‘太阳’(*P. suffruticosa* ‘Tai Yang’)中的 SG20 成员 *PsMYB2*(Zhang et al., 2022),均被证实能够正向调控花青素的合成。本团队在牡丹‘海黄’(*P. suffruticosa* ‘High Noon’)中发现的 MYBs-SG7(*PsMYB30*)则属于 SG7 亚组,对花瓣非斑区域的黄酮醇合成具有重要调控作用(Luan et al., 2022; Fu et al., 2024)。最近,在紫斑牡丹中鉴定出三个参与色斑形成的 R2R3-MYB 成员 *PrMYBa1-3*,分别隶属于 SG7、SG5 和 SG6 亚组;它们在调控类黄酮合成结构基因方面既存在功能差异,也具有协同效应(Zhu et al., 2023)。此外,Huo 等(2020)在卵叶牡丹(*P. qiui*)叶片中鉴定的 *PqMYB4*,以及 Luan 等(2024)在‘海黄’花瓣中鉴定的 *PsMYB308*,均属于 SG4 亚组,研究显示它们对花青素的合成具有抑制作用。

以上关于牡丹 R2R3-MYB 基因功能的研究,为解析牡丹花瓣呈色机理奠定了重要基础。然而,现有研究存在基因命名不统一、功能分析系统性不足等问题。因此,对各基因成员进行系统梳理并深入开展功能研究十分必要。本研究基于杨山牡丹(*P. ostii*)和大花黄牡丹(*P. ludlowii*)的基因组数据,系统鉴定了参与类黄酮合成调控的 R2R3-MYB 家族成员,包括 SG4、SG5、SG6、SG7 和 SG20 等亚组,并对其进化关系、保守氨基酸序列及内含子数量等特征进行了分析。在此基础上,依据系统进化关系对鉴定的 R2R3-MYB 成员进行了统一命名,并利用矮牵牛花瓣瞬时超表达体系初步揭示了不同成员在类黄酮合成调控中的功能特点。类黄酮合成调控研究是开展牡丹花色育种的前提和基础。本研究结果可为今后指导牡丹花色育种提供数据支持,同时可为揭示 R2R3-MYB 家族的进化特性提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究分析的 R2R3-MYB 基因家族成员来源于杨山牡丹(*P. ostii*; 基因组数据: <https://ftp.cngb.org/pub/CNSA/data5/CNP0003098/CNS0560369/CNA0050666/>; Yuan et al., 2022) 和大花黄牡丹(*P. ludlowii*; 基因组数据: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.23537670>; Xiao et al., 2023)的基因组,以及滇牡丹(*P. delavayi*)全长转录组。瞬时表达试验所用矮牵牛材料为‘W59×axi’株系,该株系为矮牵牛野生型 *Petunia axillaris* 和品系 W59 的杂交后代,花瓣白色,可作为瞬时超表达研究 R2R3-MYB 基因功能的理想材料(Fu et al., 2020)。

1.2 试验方法

1.2.1 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 基因成员鉴定及进化树构建

牡丹 R2R3-MYB 基因成员通过 BLAST 搜索基因组数据库并进行筛选获得。拟南芥 R2R3-MYB 序列取自 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>),其它物种的序列则根据已发表文献中的 NCBI 登录号获取(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。系统发育树采用 MEGA11 软件构建,使用全长氨基酸序列进行多序列比对后,以最大似然法(Maximum likelihood)建树,并进行 1000 次 Bootstrap 重复以验证树结构的可靠性。

1.2.2 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 基因结构及编码氨基酸序列分析

根据牡丹 R2R3-MYB 基因成员在基因组中的注释信息,利用 TBtools 软件对其在染色体中的位置进行定位,并标注基因外显子-内含子结构。

氨基酸结构域及基序分析通过 MEME 数据库(<http://meme-suite.org/meme/>)进行预测,序列比对利用 MEGA11 软件进行分析。

1.2.3 矮牵牛花瓣瞬时表达及荧光定量 PCR 分析

以刚开放的矮牵牛 ‘W59×axi’ 花瓣为试材进行瞬时浸染。MYBs-SG5a 基因相关载体来源于中科院植物所王亮生团队(Zhu et al., 2023), MYBs-SG4a、MYBs-SG6a、MYBs-SG6b、MYBs-SG7 克隆于牡丹 ‘海黄’。R2R3-MYB 基因序列首先通过 gateway 系统 BP 反应构建至 pDNOR207 中间载体, 再经 LR 反应重组至植物超表达载体 pK2GW2.0/rf, 最终将重组载体转化至农杆菌菌株 *Ag11* 用于后续花瓣浸染。每组浸染花瓣中, 阴性对照为空载体 pK2GW2.0/rf(EV), 阳性对照为矮牵牛 AN2 或牡丹 MYBs-SG6a(二者均能使浸染部位产生可见表型)。每组试验共浸染 10 个花瓣, 48 h 后分别收集浸染部位组织, 液氮速冻(韩新蕊等, 2025)。将同一基因浸染、混合收集的花瓣样品研磨后, 平均分成三份用于 RNA 提取。RNA 提取使用宝生物 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒, cDNA 合成使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒。

利用所获 cDNA 进行荧光定量 PCR 分析, 通过检测类黄酮合成途径中关键基因(*CHSa*、*F3H*、*DFR*、*ANS*、*FLS*、*ANR*)的表达变化, 以评估牡丹 R2R3-MYB 相关基因的转录调控活性。荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应采用宝生物 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒, 以矮牵牛 *actin* 基因作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量, 并利用 SPSS 软件进行统计分析。试验所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table1 Primer sequences

Gene	Forward primer (5'–3')	Forward primer (5'–3')	Annealing Temperature (°C)	Amplicon Length (bp)
<i>CHSa</i>	CAACTAGTGGTGTGGACA TGCC	CACCAGCAAAGCAACCTTGTT	60	111
<i>F3H</i>	CTGGTGGCAAGAAAGGT GGATT	GAGTAGTCTCTTGCCCTTGTT GG	60	115
<i>DFR</i>	TGGAAGTCCAAAGGCT GATA	CTCCTTGACAGCCTTGAATGG	60	96
<i>ANS</i>	TCTTCCATTGTGCTTTCC CTG	GTTGCTGGAGTGTAGTCAGTA G	60	79
<i>FLS</i>	AAGGAAGTGGAAAGGCAA GAAAGG	TCAAGCCCAAGCCCAAGAGA	60	191
<i>ANR</i>	TCTGGACGATACATTTGC TCTGC	AAACCCGTAGGAACATCTGAA GC	60	98
<i>actin</i>	AGCCAACAGAGAGAAGA TGACCCA	ACACCATCACCAGAGTCCAAC ACA	60	138

2 结果与分析

2.1 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 成员鉴定和进化分析

本研究利用杨山牡丹和大花黄牡丹基因组数据, 对类黄酮合成调控相关的 R2R3-MYB 转录因子中 SG4、SG5、SG6、SG7 和 SG20 等 5 个亚组成员进行了鉴定。结果显示, 杨山牡丹基因组中包含 13 个成员, 但 SG20 亚组中未鉴定到相应成员; 大花黄牡丹基因组包含 14 个成员, 各亚组均有分布。上述 5 个亚组成员均有相关研究报道, 且其功能被证实与类黄酮合成调控密切相关。为便于对牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 基因进行归类及后续分子功能的比较分析, 本研究依据亚组分类特征及基因数量分布规律, 对所有鉴定出的成员进行了系统命名, 并将已报道的基因与新命名成员建立了明确的对应关系(表 2)。

进化分析表明, 在 SG4 亚组中, 两个牡丹基因组均包含 6 个成员, 其数量明显多于拟南芥和矮牵牛中的同源基因。其中, MYBs-SG4a、MYBs-SG4b、MYBs-SG4c 和 MYBs-SG4d 与拟南芥 *AtMYB3* 聚类到同一进化分支, 而 MYBs-SG4e 和 MYBs-SG4f 则与矮牵牛 *PhMYB27* 聚类到另一分支。在 SG5 亚组中, 两种牡丹的成员数量同样显著多于拟南芥和矮牵牛。具体而言, 杨山牡丹基因组含有 MYBs-SG5a、MYBs-SG5b 和 MYBs-SG5c 共 3 个成员, 但未发现 MYBs-SG5d; 而大花黄牡丹基因组则含有 4 个成员, 其中 MYBs-SG5c 与 MYBs-SG5d 的进化关系相近。需要指出的是, 牡丹 ‘岛锦’ MYB114L 及同源基因 Pos.gene15494/PL-1G123590.1、Pos.gene59100/PL-4G194730.1 与拟南芥 *AtMYB22*、

AtMYB66、AtMYB0 关系较近。基于这一结果, Zhang 等(2019)将 MYB114L 归类于 SG5 亚组是不恰当的。在 SG20 亚组中, 杨山牡丹基因组未发现相关成员, 而大花黄牡丹则鉴定到一个成员。综上表明, 牡丹 R2R3-MYB 基因在各亚组间的成员数量分布不均, 其中 SG4、SG5 等亚组表现出明显的成员扩张现象, 与拟南芥、矮牵牛等模式植物具有不同的进化特征 (图 1)。

表 2 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 家族成员

Table2 The members of flavonoid-regulated R2R3-MYB transcription factors in tree peony

Gene name	<i>P. ostii</i> locus ID	<i>P. ludlowii</i> locus ID	<i>P. delavayi</i> transcript ID	Protein length (aa)	Intron count	Previously described name	References
MYBs-SG4a	Pos.gene13402	PL-3G145120.1	PB-Z_transcript_21975	252/255/255	1/1	PsMYB308/MYBs-SG4	Luan et al., 2024, Zhang et al., 2024
MYBs-SG4b	Pos.gene83574	PL-UG115510.1	/	226/221	1/1	/	
MYBs-SG4c	Pos.gene7953	PL-5G204300.1	/	306/300	2/2	/	
MYBs-SG4d	Pos.gene41057	PL-5G145470.1	/	278/273	2/2	/	
MYBs-SG4e	Pos.gene48725	PL-2G127160.1	/	230/230	2/2	PqMYB4	Huo et al., 2020
MYBs-SG4f	Pos.gene2057	PL-3G286170.1	/	247/218	2/2	/	
MYBs-SG5a	Pos.gene60727	PL-5G103930.1	/	284/275	1/1	PrMYBa2	Zhu et al., 2023
MYBs-SG5b	Pos.gene20616	PL-3G180680.1	/	291/284	2/2	/	
MYBs-SG5c	Pos.gene41493	PL-4G194880.1	/	304/315	2/2	/	
MYBs-SG5d	/	PL-4G194770.1	/	315	2	/	
MYBs-SG6a	Pos.gene83936	PL-2G128040.1	/	199/266	0/2	PsMYB57	Zhang et al., 2020
MYBs-SG6b	Pos.gene28744	PL-2G127760.1	/	341/235	4/3	PsMYB58	Zhang et al., 2021
MYBs-SG6c	Pos.gene10809	/	PB-Z_transcript_107097	216/266	2	PrMYBa3	Zhu et al., 2023
MYBs-SG7	Pos.gene7708	PL-3G267120.1	PB-Z_transcript_128516/ PB-Z_transcript_73389	379/373/379/244	2/2	PrMYBa1/ PsMYB12L	Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2023; 符真珠等, 2024
MYBs-SG20	/	PL-5G177490.1	PB-Z_transcript_98143/ PB-Z_transcript_24158	304/305/305	1	PsMYB2	Zhang et al., 2022
	Pos.gene15494	PL-1G123590.1	/	199/199	2/2	PsMYB114L	Zhang et al., 2019
	Pos.gene59100	PL-4G194730.1	/	339/229	3/3	/	

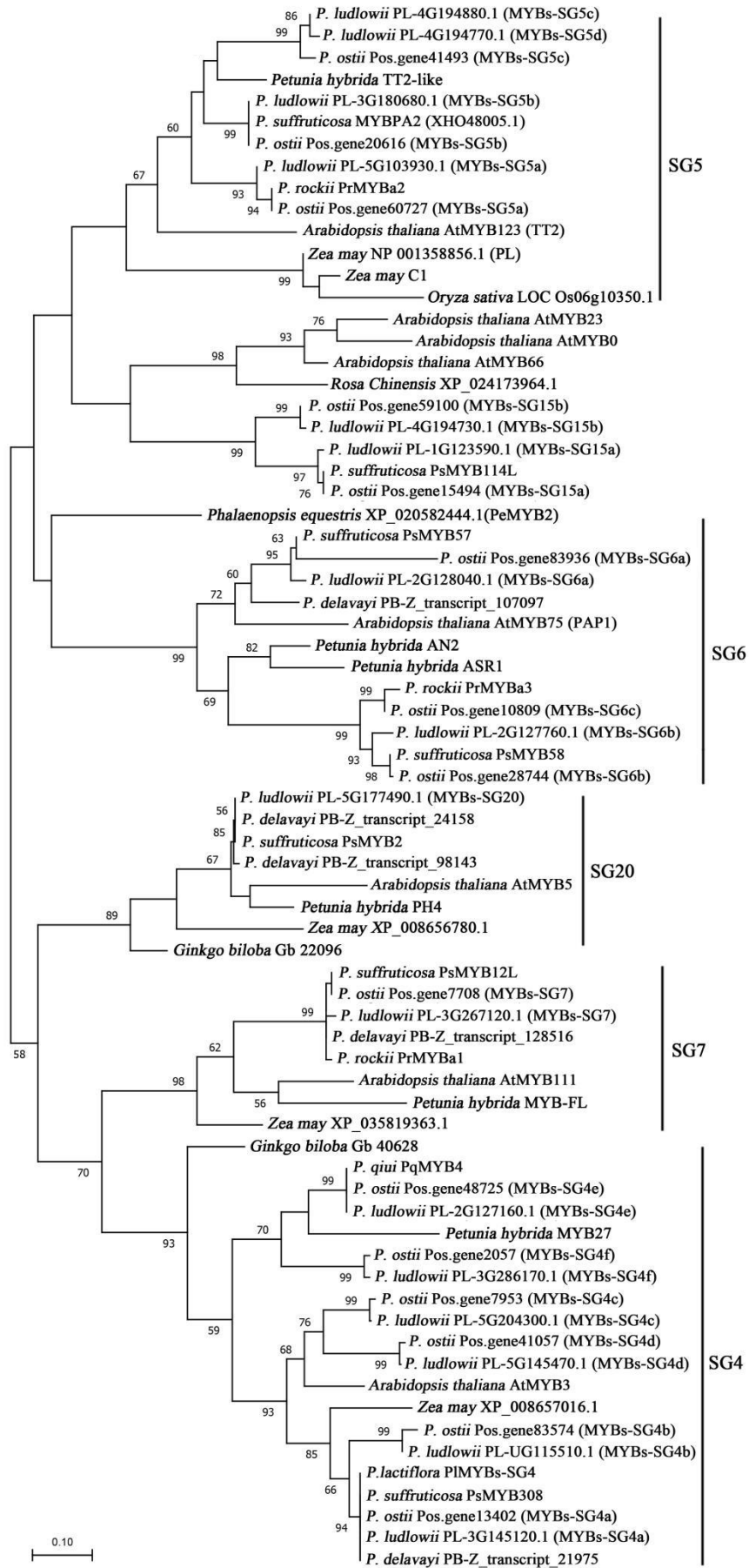


图 1 类黄酮调控相关 R2R3-MYB 成员间进化关系分析

Figure 1 Analysis of evolutionary relationships among flavonoid regulatory-associated R2R3-MYB gene members

2.2 牡丹 R2R3-MYB 成员基因组分布特征

对牡丹中鉴定出的 R2R3-MYB 家族成员进行染色体定位分析, 结果显示其在各染色体上呈不均匀分布(图 2)。在杨山牡丹基因组中, Chr01 上没有类黄酮调控 R2R3-MYB 相关成员; Chr02 上分布有 MYBs-SG4b、SG4c、SG4d 以及 MYBs-SG5a; Chr03 上包含 MYBs-SG4a、MYBs-SG5b 和 MYBs-SG7; Chr04 上则集中了全部 3 个 SG6 亚组成员(MYBs-SG6a、b、c)以及 MYBs-SG4e; Chr05 上定位有 SG5 亚组的 MYBs-SG5c 和 MYBs-SG5d。大花黄牡丹中 R2R3-MYB 成员的分布模式与杨山牡丹基本一致, 但其特有的 MYBs-SG20 定位于 Chr2(该染色体原编号为 Chr5)。此外, 基于两种牡丹基因组比对分析可进一步明确, 大花黄牡丹中的 MYBs-SG4b 应定位至 Chr2。

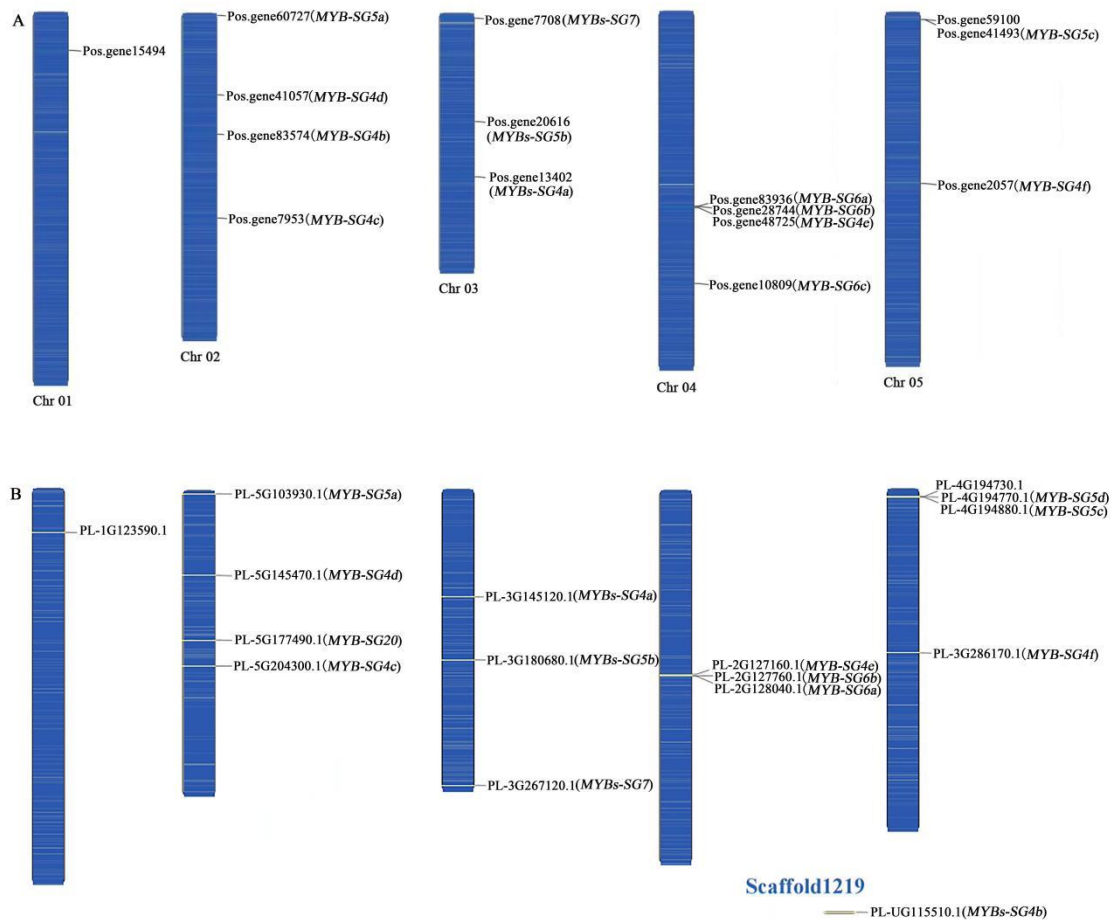


图 2 牡丹中鉴定的 R2R3-MYB 家族成员在染色体上的分布特征

其中, 以杨山牡丹的染色体编号为准, 大花黄牡丹染色体编号做了对应调整。

Figure 2 Distribution characteristics of the R2R3-MYB genes on chromosomes in *P. ostii* and *P. ludlowii*. The chromosome numbering of *P. ludlowii* was standardized to that of *P. ostii*.

2.3 牡丹类黄酮调控 R2R3-MYB 基因成员内含子特征分析

在牡丹 R2R3-MYB 家族中, 参与类黄酮调控的 SG4 亚组成员表现出不同的内含子插入方式, MYBs-SG4a 和 MYBs-SG4b 仅包含一个内含子; 与拟南芥 *AtMYB3* 和矮牵牛 *PhMYB27* 等被子植物 SG4 亚组通常具两个内含子插入情况一样, MYBs-SG4c 至 MYBs-SG4f 等 4 个成员则含有两个内含子。在 SG5 亚组中, MYBs-SG5a 的第一个内含子插入位置较为保守, 但第二个内含子在该成员中丢失; 而在 MYBs-SG5b、MYBs-SG5c 和 MYBs-SG5d 中, 第二

个内含子尽管插入位置保守,但其长度存在显著差异。**SG6** 亚组成员则进一步展现出种间多样性。杨山牡丹中的 **MYBs-SG6a** 不含内含子,而在大花黄牡丹中则含有两个内含子;杨山牡丹中的 **MYBs-SG6b** 包含 4 个内含子,而在大花黄牡丹中则含有 3 个(图 3)。综上所述,这些结果不仅揭示了牡丹 **R2R3-MYB** 基因在内含子插入方面具有多样性特征,也反映出牡丹基因组的复杂性。

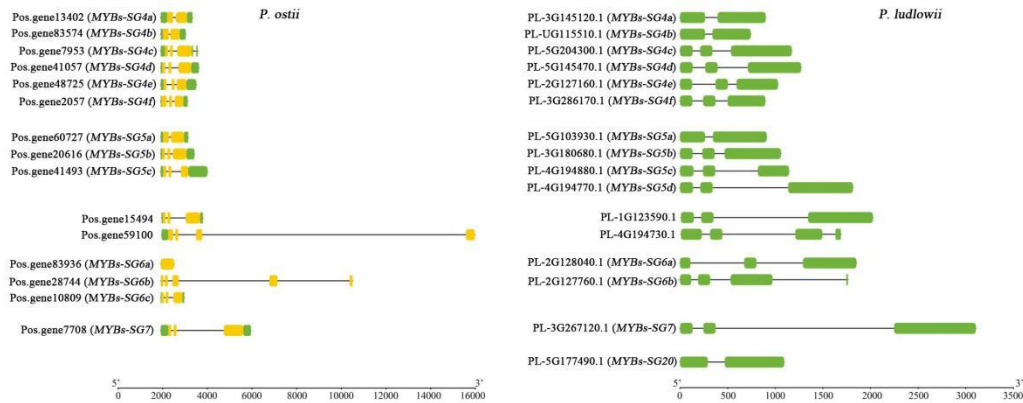


图 3 牡丹类黄酮调控相关 **R2R3-MYB** 基因内含子插入特性分析(直线表示内含子序列,黄色和绿色实框表示外显子序列,标尺表示序列长度 bp)

Figure 3 Analysis of intron insertion of flavonoid regulatory-associated **R2R3-MYB** genes in tree peony (Solid lines represent intron sequences; yellow and green solid boxes represent exon sequences; scale bar indicates sequence length in bp)

2.4 牡丹类黄酮调控 **R2R3-MYB** 成员编码氨基酸序列分析

R2R3-MYB 转录因子的 **N** 端区域决定 **DNA** 结合特异性及调控靶基因类型。研究发现,除杨山牡丹的 **MYBs-SG6a** 成员缺失该区域相关序列外,其余所有鉴定到的蛋白均包含完整的典型 **R2R3** 结构域,这是该类转录因子与靶基因启动子结合的核心功能模块。进一步分析发现,不同亚组成员在保守基序(motif)组成上存在差异。所有 **SG5**、**SG7** 亚组成员以及部分 **SG4** 成员在其 **N** 前端额外含有一个相对保守的 **motif 1**;而 **SG4** 与 **SG20** 亚组成员则在后端共同含有一个保守的 **motif 3**。**R2R3-MYB** 转录因子的 **C** 端区域主要决定其转录激活特性。尽管该区域在不同成员间的序列长度和保守性存在差异,但在 **SG4**、**SG5**、**SG6**、**SG7** 和 **SG20** 各亚组内部,仍存在一些特征性的 **motif 4-10** 保守基序(图 4)。

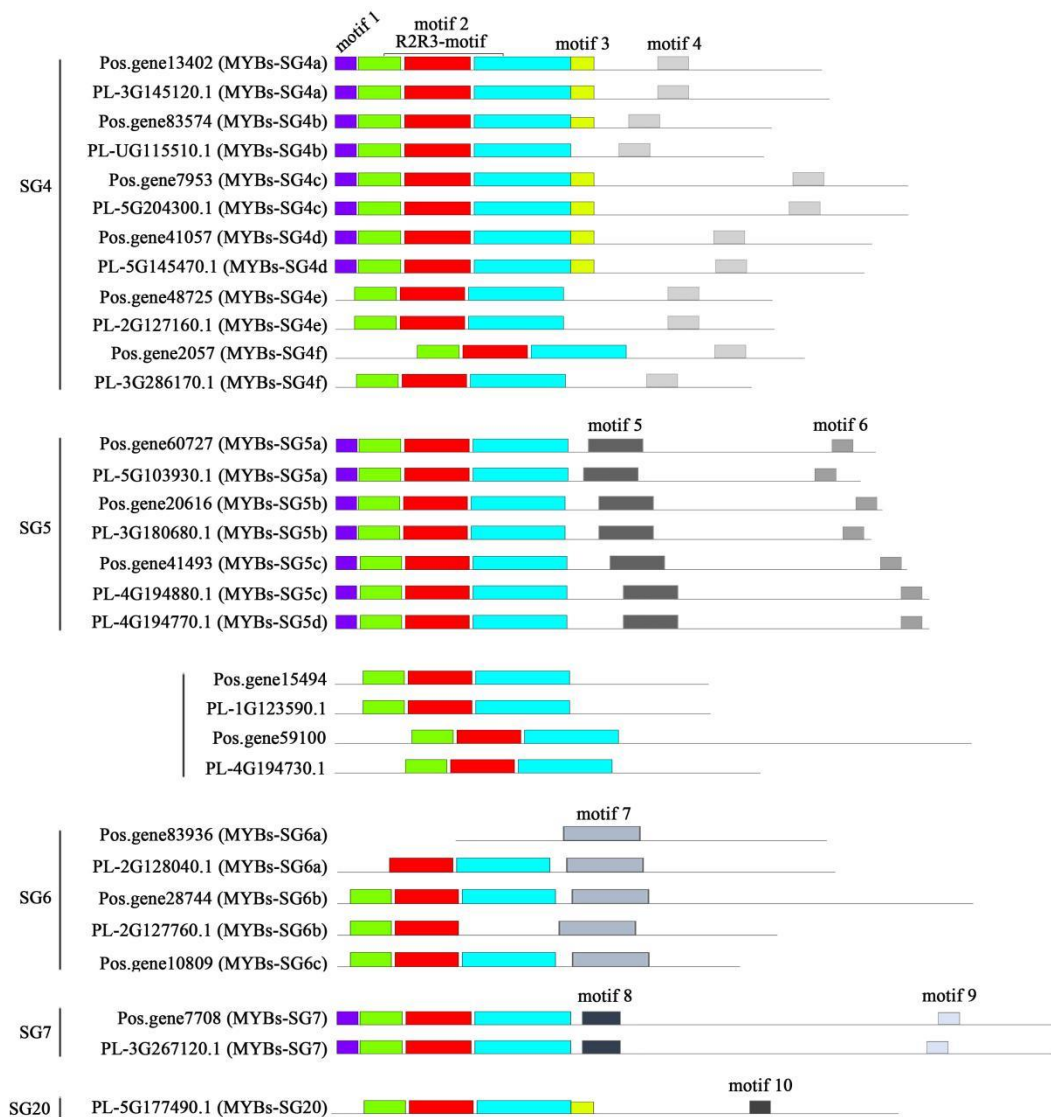


图 4 牡丹类黄酮调控相关 R2R3-MYB 转录因子编码氨基酸基序分析

其中, N 端含 motif 1-motif 3 基序, C 端则含亚组内相对保守的 motif 5-motif 10 基序。

Figure 4 Analysis of amino acid sequences encoded by flavonoid regulatory-associated R2R3-MYB genes in tree peony

The N-terminus primarily contains motif 1-motif 3, while the C-terminus contains subgroup-specific relatively conserved motif 5-motif 10.

对牡丹 R2R3-MYB 各成员 N 端氨基酸序列的比对分析进一步揭示了亚组间的特异性(图 5)。分析表明,除了已识别的保守基序,不同亚组内还拥有独特的保守氨基酸位点。SG4 亚组特征性地包含一个保守的半胱氨酸(C)、苯丙氨酸(F)和赖氨酸/精氨酸(K/R)位点;而 SG6 亚组则包含一个保守的半胱氨酸(C)、酪氨酸(Y)和赖氨酸/精氨酸(K/R)位点。此外,除 SG7 亚组,其它亚组成员在 N 端均含有一个典型的([E/D]_{Lx2}[K/R]_{x3}L_{x6}L_{x3}R)基序,该基序被认为介导与 bHLH 和 WD40 蛋白的互作。然而,牡丹中的 MYBs-SG4c 和 MYBs-SG4d 在该基序的关键位点发生了改变,其是否影响与 bHLH/WD40 的互作能力及功能仍需后续研究。

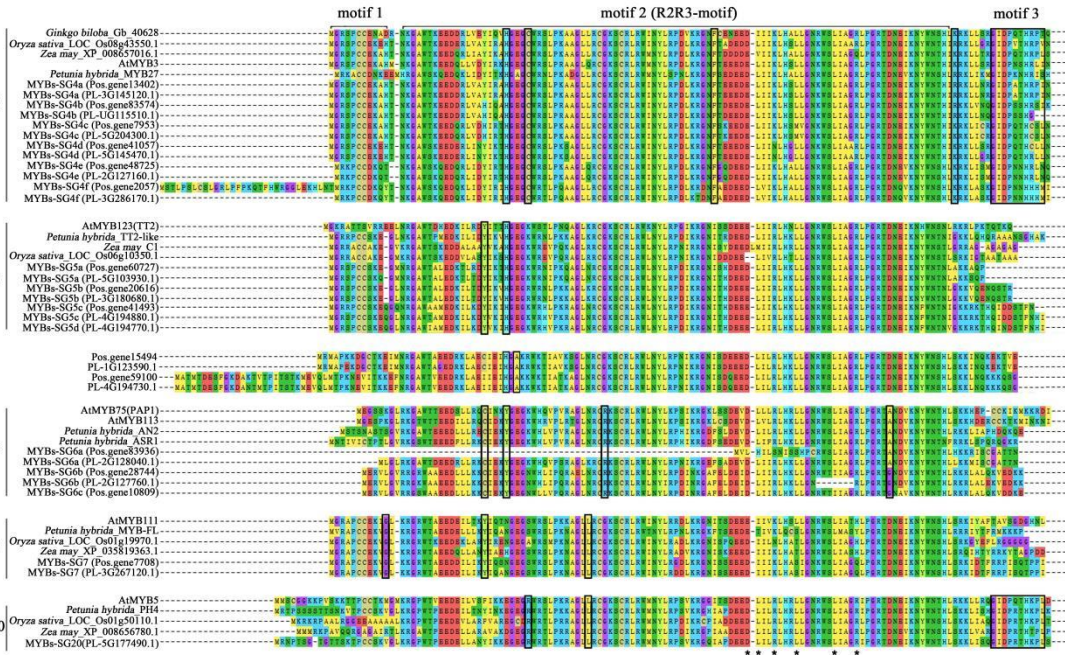


图 5 牡丹类黄酮相关 R2R3-MYB 转录因子的 N 端保守基序及其亚组内相对保守氨基酸位点分析
图中以黑框标示的为亚组内相对保守的单个氨基酸位点，底部星号表示与 bHLH 互作的 [E/D]L_{x2}[K/R]_{x3}L_{x6}L_{x3}R 基序。

Figure 5 Analysis of the N-terminal conserved motifs and the relatively conserved amino acid sites within subgroups of flavonoid-related R2R3-MYB transcription factors in tree peony
The individual amino acid sites are marked by black boxes, and the asterisks at the bottom indicate the [E/D]L_{x2}[K/R]_{x3}L_{x6}L_{x3}R motif responsible for bHLH interaction.

2.5 牡丹 R2R3-MYB 基因调控特性分析

为揭示不同类型牡丹 R2R3-MYB 基因间的调控特性，在矮牵牛‘W59×axi’花瓣中利用注射浸染法(Agroinfiltration)分别瞬时超表达了 *MYBs-SG4a*、*MYBs-SG5a*、*MYBs-SG6b* 和 *MYBs-SG7* 基因，并分析了其对类黄酮合成结构基因表达的影响。结果表明：*MYBs-SG4a* 能在浸染部位呈现微弱黄色表型，并正向调控浸染部位 *CHSa*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 等基因的表达，同时下调 *ANR* 和 *FLS* 的表达；而 *MYBs-SG5a*、*MYBs-SG6b* 和 *MYBs-SG7* 均未产生可见表型，但 *MYBs-SG5a* 可特异性激活以 *ANR* 为核心的基因表达，*MYBs-SG7* 则特异性激活以 *FLS* 为核心的基因表达。与 *MYBs-SG6a*(王校晨等, 2024)相比，*MYBs-SG6b* 因 N 端关键氨基酸位点改变，其激活矮牵牛类黄酮合成的能力显著减弱(*MYBs-SG6a* 单独注射可诱导呈色)。进一步共注射试验发现，*MYBs-SG6a* 与 *MYBs-SG6b* 组合或 *MYBs-SG6a* 与 *MYBs-SG6c* 组合时，其诱导的呈色表型相较于 *MYBs-SG6a* 与空载体对照(*MYBs-SG6a* + EV)组合注射显著减弱，表明 *MYBs-SG6b*、*MYBs-SG6c* 与 *MYBs-SG6a* 在细胞内存在转录调控上的竞争关系。此外，*MYBs-SG6a* 与 *MYBs-SG4a* 共注射时，注射部位呈现与单独注射 *MYBs-SG4a* 一样的微弱黄色表型，表明 *MYBs-SG4a* 与 *MYBs-SG6a* 相比，*MYBs-SG4a* 对类黄酮合成结构基因具有更强的转录调控竞争优势(图 6)。

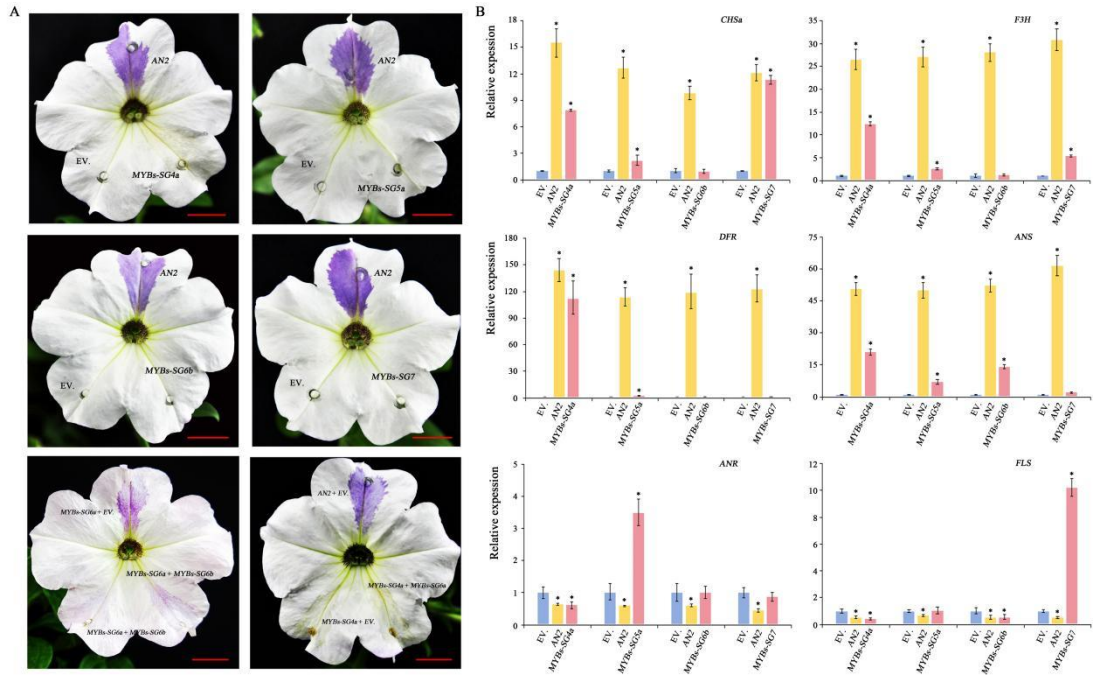


图 6 牡丹 R2R3-MYB 基因调控功能解析

(A) 矮牵牛花瓣中瞬时表达 R2R3-MYB 基因的表达特征，其中以矮牵牛 AN2 或牡丹 MYBs-SG6a 基因作为浸染阳性对照、空载体 EV 作为阴性对照；(B) 在矮牵牛花瓣瞬时超表达牡丹 R2R3-MYB 对类黄酮合成结构基因表达的影响，其中星号表示差异显著性

Figure 6 Functional analysis of R2R3-MYB gene regulation in tree peony

(A) Phenotypic characteristics of R2R3-MYB genes transiently expressed in petunia petals, with petunia AN2 or tree peony MYBs-SG6a as the positive control and empty vector (EV) as the negative control; (B) Induction of flavonoid biosynthetic structural genes by transient overexpression of tree peony R2R3-MYB genes, where asterisks indicate significant differences

3 讨论

牡丹基因组中与类黄酮调控相关 R2R3-MYB 转录因子，在 SG4、SG5、SG6 等亚组中成员数量相对较多，并且类型丰富。这种亚组内的类型多样性体现在多个方面，包括内含子/外显子结构的变异、进化分支的多样性以及氨基酸序列关键位点的差异等。具体到 SG6 亚组，本研究发现 MYBs-SG6a 的氨基酸序列特征与调控功能均与矮牵牛中的 AN2 高度相似。相比之下，MYBs-SG6b 和 MYBs-SG6c 在 N 端关键氨基酸位点发生改变，导致其在矮牵牛花瓣瞬时表达体系中对类黄酮合成结构基因的激活能力显著弱于 MYBs-SG6a。这种调控功能的差异，可能源于 SG6 亚组成员在进化过程中对下游靶基因产生的适应性分化。已有研究表明，虽然 MYBs-SG6b(即 PrMYB3a)在异源系统矮牵牛中表现功能减弱，但能够有效激活牡丹本源 DFR 与 ANS 基因的启动子(Zhu et al., 2023)。因此，该基因在矮牵牛中表现出的激活能力减弱，可能反映了物种特异性的调控基因与靶基因之间的适应性。

在 SG4 亚组中，两种牡丹基因组均鉴定出 6 个成员。系统分析显示，MYBs-SG4a 和 MYBs-SG4b 仅具有 1 个内含子，而 MYBs-SG4c-f 等则与拟南芥、矮牵牛等被子植物的同源基因结构类似，具有 2 个内含子。功能实验表明，在矮牵牛花瓣中瞬时表达牡丹 MYBs-SG4a 能够正向调控类黄酮合成结构基因的表达，这一功能与拟南芥 AtMYB3 和矮牵牛 PhMYB27 所报告的负调控作用相反。拟南芥 AtMYB3 可抑制木质素和花青素生物合成途径中的上游基因 PAL、C4H 和 4CL 的表达(Zhou et al., 2017); 而矮牵牛 PhMYB27 同样作为负调控因子，在花青素合成中发挥“分子刹车”作用(Albert et al., 2011)。已有研究指出，R2R3-MYB 转录因子对类黄酮合成的正向调控功能可能源于对环境的适应性，且在进化历史上出现较早(Albert et al., 2018)。本研究发现牡丹 MYBs-SG4a 在矮牵牛花瓣瞬时表达时仍保留正向调控能力，表明其在某种程度上维持了较为原始的类黄酮调控模式。

已有研究表明, SG4、SG5、SG6 和 SG20 等亚组的成员均能够与 bHLH 和 WD40 蛋白相互作用, 形成以 MBW 复合体为核心的类黄酮调控机制(Broun, 2005; Lloyd et al., 2017)。其中, SG5 亚组主要调控以 ANR 为核心节点的原花青素合成途径; SG6 亚组则主要调控以 ANS 为核心的花青素合成; 而 SG4 和 SG20 亚组也可通过差异性调控部分类黄酮结构基因的表达, 影响类黄酮类物质的积累(Li et al., 2009; Gonzalez et al., 2008)。SG7 亚组虽不参与 MBW 复合体的形成, 但其对黄酮醇物质的积累具有重要调控作用; 与其它亚组成员相比, 既表现出一定的功能冗余, 也存在调控目标或强度上的差异(Mehrtens et al., 2005; Stracke et al., 2007)。本研究通过在矮牵牛花瓣中瞬时表达牡丹 R2R3-MYB 基因进一步证实, 它们在调控类黄酮合成过程中存在功能上的交互作用。比如, 牡丹 SG6 亚组中 MYBs-SG6a 的调控功能可受到同亚组成员 SG6b 和 SG6c 的影响; 而在相同表达条件下, SG4 亚组的 MYBs-SG4a 对类黄酮合成路径的竞争性调控能力显著强于 MYBs-SG6a。

中科院植物所王亮生团队在紫斑牡丹中的研究表明, 不同 R2R3-MYB 成员间也具有协作关系。SG7 亚组的 PrMYBa1(对应 MYBs-SG7)可与 SG5 亚组的 PrMYBa2(对应 MYBs-SG5a)相互作用, 形成“MM”分子模块, 并可显著激活 *PrF3H* 基因的表达(Zhu et al., 2023)。我们在滇牡丹花瓣中鉴定发现了 *MYBs-SG4a*(PB-Z_transcript_21975)、*MYBs-SG6c* (PB-Z_transcript_107097)、*MYBs-SG7* (PB-Z_transcript_128516/PB-Z_transcript_73389)、*MYBs-SG20* (PB-Z_transcript_98143/PB-Z_transcript_24158) 等转录本(表 1); 牡丹这些 R2R3-MYB 基因或转录本在同一组织或细胞中的表达特性及其竞争关系, 都可能直接或间接影响下游类黄酮合成结构基因的表达, 进而在整体上决定类黄酮物质的积累。

4 结论

本研究在整合前人研究结果及对牡丹基因组数据分析的基础上, 系统鉴定了牡丹中参与类黄酮调控的 R2R3-MYB 成员, 对其进行了统一命名和生物信息学分析, 并利用矮牵牛花瓣瞬时表达体系初步揭示了不同成员在类黄酮合成中的调控特性, 为后续开展这些基因的系统性功能解析与比较研究奠定了重要基础。

作者贡献声明

符真珠, 袁欣, 高杰: 完成实验并撰写论文; 王二强, 王晓辉: 实验材料采集; 李艳敏, 王慧娟: 生物信息数据分析及文献整理; 王亮生: 提出论文改进建议; 李珊珊, 张和臣: 实验设计及论文构思。

参考文献

- Fu ZZ, Yuan X, Wang EQ, Wang XH, Gao J, Wang HJ, Li YM, Han XR, Shi M, Wang LS, Zhang HC (2024). Transcriptional and metabolic analysis of the mechanism underlying colored blotches of tree peony ‘High Noon’ petals. *Plant Physiol J* **60**, 1524–1536. (in Chinese)
- 符真珠, 袁欣, 王二强, 王晓辉, 高杰, 王慧娟, 李艳敏, 韩新蕊, 师曼, 王亮生, 张和臣 (2024). 牡丹‘海黄’花瓣色斑呈色的转录及代谢机制解析. *植物生理学报* **60**, 1524–1536.
- Han XR, Yuan X, Gao J, Wang LS, Wang XH, Jia WQ, Fu ZZ, Zhang HC (2025). Identification of TCP gene family and functional analysis of *TCP15a* of tree peony. *Chin Bull Bot* DOI: 10.11983/CBB25005. (in Chinese)
- 韩新蕊, 袁欣, 高杰, 王亮生, 王晓辉, 贾文庆, 符真珠, 张和臣 (2025). 牡丹TCP基因家族鉴定及*TCP15a*功能分析. *植物学报* DOI: 10.11983/CBB25005.
- Liu L, Zhao DQ, Tao J (2019). Research progress on influential factors and regulation of tree peony flower color formation. *Plant Physiol J* **55**, 925–931. (in Chinese)

- 刘磊, 赵大球, 陶俊 (2019). 牡丹花色形成影响因子及其调控研究进展. 植物生理学报 **55**, 925–931.
- Wang XC, Fu ZZ, Xuan X, Gao J, Wang HJ, Li YM, Li BY, Zhang HC** (2024). Molecular functional analysis of *MYBs-SG6c* gene regulating petal coloring in tree peony. *Mol Plant Breeding* <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241017.0932.004>. (in Chinese)
- 王校晨, 符真珠, 袁欣, 高杰, 王慧娟, 李艳敏, 李保印, 张和臣 (2024). 牡丹 *MYBs-SG6c* 基因调控花瓣呈色的分子功能解析. 分子植物育种 <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241017.0932.004>.
- Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Schwinn KE, Jameson PE, Davies KM** (2011). Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *Plant J* **65**, 771–84.
- Albert NW, Davies KM, Lewis DH, Zhang H, Montefiori M, Brendolise C, Boase MR, Ngo H, Jameson PE, Schwinn KE** (2014). A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *Plant Cell* **26**, 962–980.
- Albert NW, Thrimawithana AH, McGhie TK, Clayton WA, Deroles SC, Schwinn KE, Bowman JL, Jordan BR, Davies KM** (2018). Genetic analysis of the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals that R2R3-MYB activation of flavonoid production in response to abiotic stress is an ancient character in land plants. *New Phytol* **218**, 554–566.
- Broun P** (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 272–279.
- Fu ZZ, Shang HQ, Jiang H, Gao J, Dong XY, Wang HJ, Li YM, Wang LM, Zhang J, Shu QY, Chao YC, Xu ML, Wang R, Wang LS, Zhang HC** (2020). Systematic identification of the light-quality responding anthocyanin synthesis-related transcripts in *Petunia* petals. *Hortic Plant J* **6**, 428–438.
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM** (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **53**, 814–827.
- Huo D, Liu XC, Zhang Y, Duan JJ, Zhang YL, Luo JR** (2020). A novel R2R3-MYB transcription factor PqMYB4 inhibited anthocyanin biosynthesis in *Paeonia qiui*. *Int J Mol Sci* **21**, 5878.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F** (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* **10**, 236–242.
- LaFountain AM, Yuan YW** (2021). Repressors of anthocyanin biosynthesis. *New Phytol* **231**, 933–949.
- Li SF, Milliken ON, Pham H, Seyit R, Napoli R, Preston J, Koltunow AM, Parish RW** (2009). The *Arabidopsis* MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis. *Plant Cell* **21**, 72–89.
- Lloyd A, Brockman A, Aguirre L, Campbell A, Bean A, Cantero A, Gonzalez A** (2017). Advances in the MYB-bHLH-WD repeat (MBW) pigment regulatory model: addition of a WRKY factor and co-option of an anthocyanin MYB for betalain regulation. *Plant Cell Physiol* **58**, 1431–1441.
- Luan YT, Tang YH, Wang X, Xu C, Tao J, Zhao DQ** (2022). Tree peony R2R3-MYB transcription factor PsMYB30 promotes petal blotch formation by activating the transcription of the anthocyanin synthase gene. *Plant Cell Physiol* **63**, 1101–1116.
- Luan YT, Tao J, Zhao DQ** (2024). Synergistic actions of 3 MYB transcription factors underpin blotch formation in tree peony. *Plant Physiol* **196**, 1869–1886.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B** (2005). The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **138**, 1083–1096.
- Mondal SK, Roy S** (2018). Genome-wide sequential, evolutionary, organizational and expression analyses of phenylpropanoid biosynthesis associated MYB domain transcription factors in *Arabidopsis*. *J Biomol Struct Dyn* **36**, 1577–1601.

- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L** (2001). The *Arabidopsis* *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099–2114.
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R** (1999). Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433–1444.
- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R** (2006). PH4 of *Petunia* is an R2R3-MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell* **18**, 1274–1291.
- Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrrens F, Niehaus K, Weisshaar B** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J* **50**, 660–677.
- Xiao PX, Li Y, Lu J, Zuo H, Pingcuo G, Ying H, Zhao F, Xu Q, Zeng X, Jiao WB** (2023). High-quality assembly and methylome of a Tibetan wild tree peony genome (*Paeonia ludlowii*) reveal the evolution of giant genome architecture. *Hortic Res* **10**, uhad241.
- Yuan JH, Jiang SJ, Jian JB, Liu MY, Yue Z, Xu JB, Li J, Xu CY, Lin LH, Jing Y, Zhang XX, Chen HX, Zhang LJ, Fu T, Yu SY, Wu ZY, Zhang Y, Wang CZ, Zhang X, Huang LB, Wang HQ, Hong DY, Chen XY, Hu YH** (2022). Genomic basis of the giga-chromosomes and giga-genome of tree peony *Paeonia ostii*. *Nat Commun* **13**, 7328.
- Zhang XP, Xu ZD, Yu XY, Zhao LY, Zhao MY, Han X, Qi S** (2019). Identification of two novel R2R3-MYB transcription factors, PsMYB114L and PsMYB12L, related to anthocyanin biosynthesis in *Paeonia suffruticosa*. *Int J Mol Sci* **20**, 1055.
- Zhang YZ, Xu SZ, Cheng YW, Wang J, Wang XX, Liu RX, Han JM** (2020). Functional identification of *PsMYB57* involved in anthocyanin regulation of tree peony. *BMC Genet* **21**, 124.
- Zhang YZ, Xu SZ, Ma HP, Duan XJ, Gao SX, Zhou XJ, Cheng YW** (2021). The R2R3-MYB gene *PsMYB58* positively regulates anthocyanin biosynthesis in tree peony flowers. *Plant Physiol Biochem* **164**, 279–288.
- Zhang LL, Yan L, Zhang C, Kong X, Zheng YQ, Dong L** (2022). Glucose supply induces *PsMYB2*-mediated anthocyanin accumulation in *Paeonia suffruticosa* ‘Tai Yang’ cut flower. *Front Plant Sci* **13**, 874526.
- Zhou ML, Zhang KX, Sun ZM, Yan ML, Chen C, Zhang XQ, Tang YX, Wu YM** (2017). LNK1 and LNK2 corepressors interact with the MYB3 transcription factor in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **174**, 1348–1358.
- Zhou SL, Xu C, Liu J, Yu Y, Wu P, Cheng T, Hong DY** (2021). Out of the Pan-Himalaya: evolutionary history of the Paeoniaceae revealed by phylogenomics. *J Syst Evol* **59**, 1170–1182.
- Zhu J, Wang YZ, Wang QY, Li B, Wang XH, Zhou X, Zhang HC, Xu WZ, Li SS, Wang LS** (2023). The combination of DNA methylation and positive regulation of anthocyanin biosynthesis by MYB and bHLH transcription factors contributes to the petal blotch formation in Xibei tree peony. *Hortic Res* **10**, uhad100.

Identification and Analysis of R2R3-MYB Transcription Factors Involved in Flavonoid Biosynthesis in Tree Peony

Zhenzhu Fu¹, Xin Yuan¹, Jie Gao¹, Erqiang Wang², Xiaohui Wang, Yanmin Li¹, Huijuan Wang¹, Liangsheng Wang³, Shanshan Li^{3*}, Hechen Zhang^{1*}

¹Horticultural Research Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

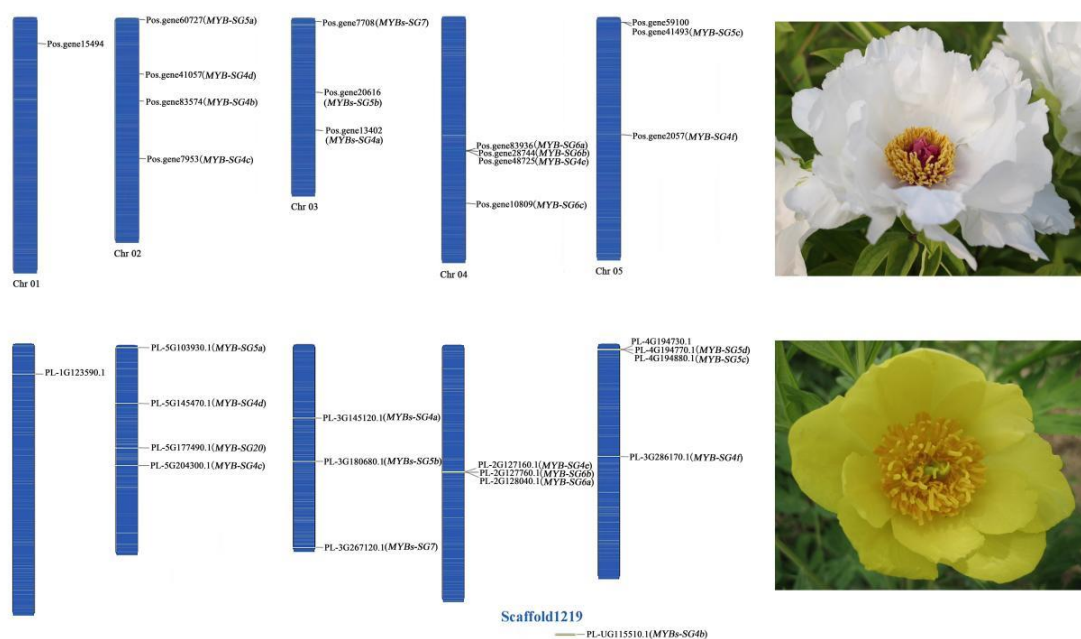
²Luoyang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Luoyang 471026, China; ³Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

INTRODUCTION: Tree peony (*Paeonia × suffruticosa* Andrews) is a renowned ornamental plant in China, whose floral color- a key determinant of its economic and aesthetic value- is predominantly governed by flavonoid pigments.

RATIONALE: To systematically elucidate the molecular basis of flavonoid regulation in tree peonies, this study focused on the R2R3-MYB transcription factor family, specifically members of the SG4, SG5, SG6, SG7, and SG20 subgroups, which are known to be involved in flavonoid biosynthesis. We integrated genomic resources from *P. ostii* and *P. ludlowii* to conduct a comprehensive analysis of their evolutionary relationships, amino acid sequence features, and intron insertion patterns.

RESULTS: The flavonoid-related R2R3-MYB members in tree peonies exhibited remarkable evolutionary diversity, which likely underpins their functional divergence. A transient expression assay in petunia petals revealed distinct regulatory roles for different subgroups. SG6 members primarily regulated the anthocyanin biosynthetic pathway centered on ANS; SG5 members were mainly involved in proanthocyanidin biosynthesis via ANR; and SG7 members predominantly influenced flavonol synthesis by modulating *FLS* expression. Notably, MYBs-SG4a, one member of the SG4 subgroup, retained the ancestral capacity to positively regulate flavonoid synthesis. Furthermore, we identified both competitive and collaborative interactions among different R2R3-MYB members, which collectively fine-tune the expression of structural genes in the flavonoid pathway.

CONCLUSION: This study provides novel insights into the evolutionary and functional diversification of the R2R3-MYB family in plants. The findings establish a foundational framework for understanding the complex regulatory network of flavonoid biosynthesis in tree peonies and offer valuable theoretical guidance for molecular breeding aimed at floral color improvement.



The chromosomal distribution characteristics of R2R3-MYB transcription factors regulating flavonoid biosynthesis in tree peony. The genes are unevenly distributed across the chromosomes. Chr02 harbors *MYBs-SG4b*, *SG4c*, *SG4d*, and *MYBs-SG5a*; Chr03 includes *MYBs-SG4a*, *MYBs-SG5b*, and *MYBs-SG7*; Chr04 is concentrated with all three members of the SG6 subgroup (*MYBs-SG6a*, *b*, *c*) as well as *MYBs-SG4e*; Chr05 contains the SG5 subgroup members *MYBs-SG5c* and *MYBs-SG5d*.

Key words tree peony, R2R3-MYB, flavonoids, flower color

Fu ZZ, Yuan X, Gao J, Wang EQ, Wang XH, Li YM, Wang HJ, Wang LS, Li SS, Zhang HC (2025). Identification of candidate genes for rice resistance to bacterial blight via QTL mapping and gene expression analysis. *Chin Bull Bot* **61**, 1–15.

* Authors for correspondence. E-mail: shshli@ibcas.ac.cn; zhc5128@126.com

通讯作者简介

李珊珊，副研究员，博士，中国园艺学会牡丹芍药分会副秘书长。主要从事芍药属种质资源收集、评价与可持续利用及重要性状品质形成机制研究。先后主持或承担国家重点研发计划子课题、国家自然科学基金等项目10余项，在 *Plant Physiology*、*Plant Journal*、*Horticulture Research*等SCI刊物发表论文40余篇，授权发明专利4项，授权国家林草局审定牡丹新品种15个，国际登录芍药属新品种5个。

张和臣，研究员，博士，中国花卉协会专家委员会委员，河南省林业局林草品种审定委员会委员。主要从事牡丹、芍药等观赏植物花瓣呈色机理、分子设计育种、种苗组培快繁及栽培生理研究。先后主持国家自然科学基金、省自然科学基金等项目40余项，获省部级科技进步二等奖2项、三等奖1项，发表论文40余篇，授权发明专利10余件。