

观赏植物花斑形成调控机制的研究进展

齐方婷 黄河

(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: 花瓣上出现的独特色彩图案又称花瓣彩斑(花斑), 花斑不仅是植物重要的观赏性状, 还能起到吸引昆虫、抵御天敌和适应环境变化等多种作用, 在生物进化上具有重要的意义。本文综述了近年来观赏植物花斑形成的相关进展, 总结了花斑形成的遗传规律和影响因素。重点描述了色素合成途径结构基因和转录因子在花斑形成中的重要作用, 即结构基因的时空特异性表达和竞争机制, 促进了不同种类的色素在花瓣中差异积累; 而转录因子通过直接或间接调控结构基因的定位表达参与花斑的形成。此外, 本文还归纳了观赏植物花斑形成中的其他调控机制, 如转录后调控、翻译后调控和甲基化等, 汇总了花斑形成的分子调控网络, 以期对观赏植物花斑形成的分子机理研究提供新视角。

关键词: 花斑形成; 类黄酮; 分子机制; 观赏植物

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0242

Research Advance in the Regulation Mechanism of Flower Spots Formation in Ornamental Plant

QI Fang-ting HUANG He

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

Abstract: Many ornamental plants have various coloration patterns on their flower petals; these flower color variations are called flower spots. Flower spot is a very important ornamental characteristic of plants and have great significance in evolutionary biology. It could help plants to attract pollinators, defend against natural enemies and adapt to environmental changes. In this paper we reviewed recent advances in the molecular mechanism of flower spots formation, and then summarized the genetic law and influencing factors of flower spots formation. Moreover, we described the important roles of structural genes and transcription factors (TFs) related to pigment synthesis in the formation of flower spots in detail, i.e., the spatiotemporal specific expression and competition mechanism of structural genes promote the pigments differential accumulation in petals. TFs participate in the coloration patterns formation by directly or indirectly regulating the positioning expressions of structural genes. Furthermore, we introduced other regulation mechanisms, such as post-transcriptional regulation, post-translation regulation and methylation, and gathered the molecular regulatory network of flower spots formation, aiming to provide a new perspective for studying the molecular mechanism of flower spots formation in plants.

Key words: flower spots formation; flavonoid; molecular mechanism; ornamental plant

花色是植物重要的观赏性状, 被子植物的花色多样性不仅体现在颜色的多变, 还包括形成一些独特的色彩图案即花瓣彩斑(花斑)。花斑一般是指花

瓣上不同区域出现的差异着色模式^[1], 能给花朵增添极大的观赏性。此外, 花朵斑部内含物具备吸收可见紫外光的特质, 使得花斑在昆虫眼中呈现特异

收稿日期: 2023-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32071826)

作者简介: 齐方婷, 女, 博士研究生, 研究方向: 花卉种质资源与遗传育种; E-mail: 18110026608@163.com

通讯作者: 黄河, 男, 博士, 教授, 研究方向: 花卉种质资源与遗传育种; E-mail: 101navy@163.com

的颜色,能够减少传粉昆虫的搜索时间^[2-3],因此,相较于单色花来说,带有花斑的品种在繁衍上占据优势地位,更能吸引传粉者如蝴蝶^[4]、苍蝇^[5]和黄蜂^[6]的注意。而一些植物也可以利用花斑来抵御食草昆虫^[7]、防护紫外线以及适应不同的温度^[8]。可以说花斑是植物进化、自然选择和人工选择的重要方向,在现代花卉业中具有重要意义^[9]。因此,对花斑形成机理的探究尤为重要,目前,色素合成途径研究较为透彻,而花斑的形成还涉及多种发育和环境信号参与,更具多变性和复杂性。已有研究对花斑形成过程中的化学物质组成和分子调控模式进行深入挖掘,就观赏植物花斑的形成提出多种模型和假说,本文对此进行总结归纳,以期促进对观赏植物花斑的深入研究。

1 花斑的分类及遗传规律

1.1 规则型花斑

花斑可分为规则型花斑和不规则型花斑两大类,规则型花斑主要包括脉络状(venation)、斑块(blotch)、点状(spots)、二色(bicolor)、花边(picotee)、星型(star)、花眼(bull-eyes)以及蜜导(nectar guide)等类型(图1-a-h)^[1],能按照遗传的基本规律进行世代传递。部分植物的花斑性状由单基因控制,在树棉(*Gossypium arboreum*)^[20]和猴面花(*Mimulus lewisii*)^[21]中发现,花斑性状在杂交子代中的分离比遵循简单的显性单基因遗传规律。夏堇(*Torenia fournieri*)在腹瓣或背瓣表现出的多种着色模式也由单基因决定且通常为显性性状^[22],而Kondo等^[23]在夏堇的一个品种中发现背瓣白色和紫色株系杂交后, F_1 花均为背瓣白色带紫边表型(半色系),半色系自交后代中白色:半色:紫色的分离比为1:2:1,属于不完全显性遗传。克拉花(*Clarkia gracilis*)中心斑点和基部斑点花朵杂交 F_1 代表现出双斑点表型, F_2 中基部斑点:双斑点:中心斑是1:2:1,为共显性遗传^[24]。

1.2 不规则型花斑

相对较为简单的规则型花斑,不规则型花斑是指花瓣上有非固定的异色散点或条纹,形成园艺学上所谓的“洒金”“跳枝”“二乔”“二色”等(图1-i-m),在牡丹(*Paeonia suffruticosa*)^[25]、桃

(*Prunus persica*)^[26]和矮牵牛(*Petunia hybrida*)^[27]中发现,转座子(transposons)或小片段插入、甲基化(methylation)和small RNA等均有可能形成不规则型花斑,其花斑性状也可以遗传给子代,但往往具有随机性和可变性,遗传过程不遵循孟德尔定律。此外,病毒感染也会导致不规则型花斑的产生,如病毒感染兰科(Orchidaceae)植物后会出现花瓣坏死、色素不均以及嵌合条纹等现象^[28],大丽花(*Dahlia pinnata*)感染了烟草坏死病毒(tobacco streak virus, TSV)后会出现杂色花^[29]。因病毒感染产生的不规则型花斑一般不能通过杂交的方式稳定遗传给后代。



a: 金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 的脉络花纹^[10]; b: 紫斑牡丹 (*P. rockii*) 的斑块^[11]; c: 杂种百合 (*Lilium* spp.) 的斑点^[12]; d: 瓜叶菊 (*Senecio cruentus*) ‘小丑’ 双色花^[13]; e: 矮牵牛花边^[14]; f: 矮牵牛星型花斑^[14]; g: 南非雏菊 (*Gorteria diffusa*) 花眼^[15]; h: 大花蕙兰 (*Cymbidium orchid*) 蜜导区域^[16]; i: 大丽花洒金^[17]; j: 跳枝桃花^[18]; k: 牡丹 ‘二乔’^[11]; m: 非洲紫罗兰 (*Saintpilia. ionantha*) 二色^[19]

a: *A. majus* showing venosa phenotype^[10]; b: blotch pattern in the *P. rockii*^[11]; c: *Lilium* spp. present spots in the petals^[12]; d: *S. cruentus* ‘Jester’ having bicolor flower^[13]; e: picotee type flower in *P. hybrida*^[14]; f: star type flower in *P. hybrida*^[14]; g: *G. diffusa* showing a unique ‘eye’ pattern in ray florets^[15]; h: *C. orchid* presenting a differential coloration in nectar guide^[16]; i: varietal coloration type in *D. variabilis*^[17]; j: *P. persica* showing two-color and variegated flowers in one single plant^[18]; k: flower in *P. suffruticosa* ‘Er Qiao’ presenting various coloration type^[11]; m: *S. ionantha* showing pink-purple flower^[19]

图1 规则和不规则型花斑

Fig. 1 Regular and irregular flower spots

2 影响花斑形成的理化因素

花斑的本质是呈色上的差异,而花色在视觉上的呈现通常是由于色素对光的选择性吸收和花内部

结构的光散射性^[30], 因此花瓣内色素物质的组成和分布是花斑形成的重要影响因素^[15]。此外, 细胞内环境(液泡 pH、金属离子及其络合物^[31]等)也影响着植物花斑的形成。

2.1 花瓣中色素的组成和分布影响花斑形成

自然界中, 植物花朵的成色主要由类黄酮(favonoids)、类胡萝卜素(carotenoids)和甜菜色素(betalains)三大类色素决定。其中, 最为广泛分布的类黄酮是形成黄、红和蓝色系花朵的重要组分, 包括花青素(anthocyanins)、黄酮(flavones)和黄酮醇(flavonols)类化合物。花青素主要分为天竺葵素(pelargonidin, Pg)、矢车菊素(cyanidin, Cy)和飞燕草素(delphinidin, Dp)三大类及其衍生色素芍药素(peonidin, Pn)、矮牵牛素(petunidin, Pt)和锦葵素(malvidin, Mv), 它们共同组成了从橙红色到蓝色的花色区间。类胡萝卜素决定了花色从黄到橙的变化区间。而甜菜色素目前主要在石竹目中发现, 参与黄色系或红色系花朵的形成^[32-33]。

色素在花瓣中的不同位置或细胞中差异积累, 使得花朵呈现独特的色彩图案。牡丹‘二乔’粉色区域主要积累 1 种芍药花素衍生物, 而红色区域积累 2 种矢车菊素衍生物和 2 种芍药花素衍生物^[25]; 克拉花花瓣有斑区积累 Cy 和 Pn, 无斑区积累 Mv^[24]。猴面花^[21]、向日葵^[34](*Helianthus argophyllus*)和金鱼草^[35]中黄酮醇和橙酮类(aurone)化合物的累积使得花朵靠近花心的部位出现不同于花瓣背景色的白色或黄色斑区。一些兰科花卉(orchids)如大花蕙兰^[16]和金黄石斛兰^[36](*Dendrobium chrysotoxum*)中花青素和类胡萝卜素在不同花瓣中差异积累并形成了丰富的彩色图案。东方黑种草(*Nigella orientalis*)花瓣发育早期只积累叶绿素, 中期类胡萝卜素含量上调, 后期花青素在花瓣特定区域汇聚, 共同组成了黄色花瓣带有绿色眼状斑点、紫红色横条纹和飞溅斑纹的复杂图案^[37]。

2.2 细胞内环境理化性质改变

花瓣细胞内部条件的改变会导致原本的色素分布出现变化, 进而产生新的花色变异。花瓣细胞内 pH 的变化会使得原本纯色的花朵出现脉络或斑块状花斑, 矮牵牛中 PH5 (*P-type H⁺-ATPase* 5) 和

ANI (*ANTHOCYANINI*) 都能通过促进局部花瓣细胞内部 H⁺ 的跨膜运输引起液泡内环境酸化, 导致了多种花斑突变体的出现^[38]。杜鹃花(*Rhododendron oldhamii*)中也发现红色花瓣上部的紫红色斑块内细胞的 pH 高于其他部分^[39]。除 pH 变化外, 高浓度的 Fe³⁺ 与山奈酚(kaempferol)类化合物形成的络合物累积是郁金香^[40](*Tulipa gesneriana*)和北海道紫堇^[41](*Corydalis ambigua*)紫色花瓣出现蓝色色素沉积的原因。

3 色素代谢途径关键结构基因影响花斑形成

3.1 结构基因的时空表达影响色素积累

色素物质在花瓣不同区域的定位积累是花斑产生的重要原因, 类黄酮的自然合成途径目前已较为清晰^[33], 因此, 花瓣中控制色素物质合成的基因的时空差异表达对花斑形成起到了关键作用, Martins 等^[24]在克拉花中发现, 花发育早期, 花斑区域 *F3'H* (flavonoid 3'-hydroxylase) 和 *DFR2* (dihydrokaempferol 2) 表达显著提高, 积累 Cy, 而在发育后期, 无斑区中 *DFR1* 和 *F3'5'H* (flavonoid-3',5'-hydroxylase) 开始表达, 并积累 Mv, 形成较浅的背景色。矮牵牛中 *CHS* (chalcone synthase) 在花瓣中的空间差异表达是星型和花边型花斑形成的原因^[14,27]。牡丹‘和谐’中一个在无斑区高表达的糖基化基因(*UDP-glycosyltransferases*, *UGT*) *PhUGT78A22*, 使得花瓣有斑区和无斑区中色素的糖基化程度不同, 引发花色差异^[42]。此外, 花青素转运基因(*glutathione S-transferase*, *GST*)也会影响花斑的形成, 在白色红斑品种的树棉中沉默 *GaGST* 后红色斑点减少^[43]。亚洲杂种百合中 *PSY* (phytoene synthase) 和 *HYB* (β -ring hydroxylase) 的差异累积导致了‘Connecticut King’和‘Virginale’花被片上分别出现橙黄色斑块和窄椭圆形斑纹^[44-45]。

此外, 结构基因的序列差异如转座子或小片段插入会改变其原有的时空表达模式, 进而产生不规则型花斑。转座子是指可从一个位置“跳跃”到另一个位置的一段 DNA 序列, 日本牵牛花(*Ipomoea nil*) *Tpn* 转座子(transposable element of *Pharbitis nil*)与花斑性状密切相关, 在 *DFR*、*EF*P (enhancer of flavonoid production) 和 *3GT* (flavonoid-3-O-

glucosyltransferas) 中分别发现 *Tpn1*、*Tpn13* 和 *Tpn10* 转座子在非编码区以及启动子区域的插入, 导致了矮牵牛花瓣斑块或者杂色花的形成^[46-48]。康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) *CHI* (chalcone isomerase) 和 *DFR* 上的 *Ac/Ds* (activator/dissociation) 超家族转座子 *dTdic1* 的插入会在花朵上产生白色的斑点或条纹^[49]。而在‘二乔’牡丹 *F3'H* 编码区的小片段插入, 会使得花瓣部分区域花青素积累减少出现杂色^[25]。

3.2 结构基因的竞争表达促进色素差异分布

色素物质的合成过程中, 会出现不同结构基因编码的酶作用于同一底物的情况, 使得结构基因之间存在竞争表达。在类黄酮代谢途径中, *FLS* (flavonol synthase) 和 *DFR* 竞争同一底物柚皮素 (naringenin), 猴面花 *DFR* 促进外侧花冠合成花青素呈红色, *FLS* 使得内侧花冠积累黄酮醇变成白色^[21]。牡丹‘二乔’双色花中粉色区域 *FLS* 的上调表达抑制了花青素的积累^[25]。*C. trapeziformis* 兰花唇瓣的斑块中 *CtrlDFR* 和 *CtrlDOX* (leucoanthocyanidin dioxygenase) 的表达上调, *CtrlFLS* 表达下调, 激活该区域花青素的合成^[50]。黄色向日葵的花心中检测到 *HaFLS1* 的高表达, 促进槲皮素苷 (quercetin) 和二咖啡基奎宁酸 (di-O-caffeoyl quinic acid, CQA) 的积累, 出现独特的 UV 着色模式^[34]。夏堇中, 有斑区 *VwDFR*、*VwF3'5'H* 和 *VwANS* (anthocyanidin synthase) 的表达量远高于非斑部, 使其形成了积累 Dp 和 Cy 的黑色斑块, 而无斑区中花青素通路在柚皮素处被阻断, 只积累二氢槲皮素 (dihydroquercetin), 呈现黄色^[51]。

4 花斑形成中的转录调控机制

在花斑形成的过程中, 结构基因的差异表达影响着不同色素物质的积累, 其受到多种转录因子的控制, 因此转录调控是整个调控网络的核心, 已有大量研究揭示了花斑形成过程中的多种转录调控机制, 主要包括单个以及多个调节基因直接或间接控制结构基因的定位表达等。

4.1 MYB 转录因子调控花斑形成

在色素合成途径中, MYB 类转录因子发挥最重要的调控作用, 其中, R2R3 类 MYB 转录因子中

的 S5 和 S6 亚家族能激活色素的合成; 而 S4 亚家族因具备 EAR (ERF-associated amphiphilic repression) 和 TLLLFR 抑制基序, 从而负调控色素积累^[52]; R3 类 MYB 转录因子则是一类花青素合成的抑制子^[53]。已有大量研究显示 MYB 转录因子参与花斑的形成, 棉花 (*Gossypium hirsutum*) BM 位点 (beauty mark) 编码的 R2R3 类 MYB 基因 *MYB113* 编码区的单碱基突变 (SNP) 导致了花瓣基部斑点的出现^[54]; 夏堇和蝴蝶兰 *TjMYB1* 内含子和 *PeMYB11* 启动子区域的转座子插入引发了多种着色模式的变化^[55-56]。百合 R2R3-MYB 转录因子 (如 *LhMYB12*、*LcMYBSPLATTER*、*LhMYB19L* 和 *LhMYB19S*) 参与双色、点状、刷痕状、凸起式等多种斑点类型的形成^[57-59], 其中, *LhMYB12* 的等位基因 *LhMYB12-Lat* 在编码区多了一段核苷酸序列的插入, 能够控制飞溅式斑点的形成^[60]; 而 *LhMYB19L* 在点状和刷痕状斑点中均能检测到表达, 但 *LhMYB19S* 仅在点状斑点中表达, 推测是因为 *LhMYB19S* 相较于 *LhMYB19L* 有一段序列的缺失以及若干 SNP^[58-59]。

MYB 转录因子能够通过直接激活或遏制花青素合成途径结构基因的表达来控制花瓣不同区域色素的积累。百合中 *LrMYB15* 通过激活 *LrANS* 和 *LrDFR* 的表达促进凸起状斑点处的色素累积^[61]。牡丹中 *PsMYB30* 和 *PrMYB5* 可以分别与 *PsANS* 和 *PrDFR* 的启动子结合来激活基因表达, 导致花瓣基部出现紫红色斑块^[62-63]。除调控花青素合成途径结构基因外, MYB 转录因子还可以通过控制类黄酮的分支代谢参与花斑的形成。猴面花的花冠喉部白色区域的形成是因为 *LAR1* (leucoanthocyanidin reductase 1) 位点编码的 R2R3-MYB 转录因子激活 *FLS* 的表达进而合成黄酮醇, 而不再积累花青素^[21]。向日葵花朵中花心部分主要积累能吸收紫外光的黄酮醇, 其在紫外光下呈现黑色, 过表达 *HaMYB111* 能够激活花心处 *HaFLS* 的表达, 促进槲皮素等黄酮醇类物质的积累, 使得深色花心范围不断扩大^[34]。MYB 转录因子还可与 bHLH (basic helix-loop-helix) 和 WD40 转录因子组成蛋白复合物 (MBW 复合体) 激活下游基因的表达, 从而共同调控色素代谢途径^[64]。彩色三叶草 (*Trifolium repens*) 中 MYB 转录因子 RED LEAF 和 RED LEAFDIFFUSE 都是通过与 bHLH 转录

因子 JAF13 结合, 正调控花青素合成促进叶脉斑纹的形成^[65]。在百合中 LhMYB18 和 LhMYB6 需要与 bHLH 转录因子相互作用激活 *DFR* 的表达进而在花被片上形成斑点^[66-67]。紫斑牡丹 PsMYB12 与 bHLH 和 WD40 蛋白组成的 MBW 复合体直接激活下游结构基因 *PsCHS* 的表达促进斑点形成^[68]。

MYB 转录因子对花青素的正向或负向的调控作用决定了色素物质的有无, 不同于纯色花, 带有花斑的花朵中不同区域积累的色素并不相同, 这需要依靠多个 MYB 转录因子的协同调控。在金鱼草中, MYB 转录因子 ROSEA1 和 ROSEA2 决定了花瓣和花蕾的呈色模式, 而 VENOSA 控制上唇瓣脉络斑纹的形成^[10, 35]; 在矮牵牛^[69]和蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.)^[70]中也发现了相似结果。克拉花 *CgMYB6* 控制背景色的形成, *CgMYB1* 控制斑点处色素积累, *CgMYB1* 在花瓣不同位置的表达分别形成了基部斑点和中部斑点, 而 *CgMYB11* 和 *CgMYB12* 是花青素合成的激活子, 它们在花瓣中的差异表达以及基因突变形成了更丰富的色彩图案, 如基部“白杯”的产生是因为 *CgMYB11* 仅在中上部表达, 而花斑基部 *CgMYB12* 的等位基因 *CgMYB12^{tr}* 出现过早的终止密码子进而不积累花青素; 而中部条纹的出现是因为 *CgMYB11* 在上部表达, *CgMYB1* 在基部表达, 而花瓣中部 *CgMYB12* 出现缺失, 只检测到 350 bp 的外显子, 最终呈白色^[71-73]。

近年来, 一些研究深入挖掘了多个 MYB 转录因子共同控制花斑形成的调控机制, Ding 等^[74]在猴面花中提出了一个由 2 个 MYB 转录因子构成的“反应-扩散”模型, 该模型由花青素激活子 NEGAN (NECTAR GUIDE ANTHOCYANIN) 和抑制子 RTO (red tongue) 组成, NEGAN 激活 *RTO* 的表达, 反之 *RTO* 能抑制 *NEGAN* 的活性, 这两个转录因子在花瓣中动态扩散并相互拮抗, 在猴面花蜜导中形成了分散斑点。后续 Zheng 等^[75]又在猴面花中鉴定出了一个 *NEGAN* 的同源基因 *MYB5a*, 发现它也能与 *RTO* 形成类似的模型, 进而调控花斑形成。这种“反应-扩散”模型通过基因之间的此消彼长来形成斑点, 这也导致形成的斑点大小不一, 呈现一种动态模式。东方黑种草中激活子 *NiorMYB113-1* 负责在花瓣中上部积累花青素, 而抑制子 *NiorMYB113-2* 能在

花瓣背景色和花青素之间形成隔绝带, 控制色素在花瓣上积累的区域和边界, 最终构建出复杂的花斑图案^[37]。

4.2 其他转录因子调控花斑形成

虽然参与色素合成的结构基因是整个花斑形成中的关键基因模块, 但是花朵的着色模式是伴随着发育进程逐步建立的, 并受环境因素影响, 因此一些参与发育进程的转录因子能够直接或者上游调控花斑的形成。MADS-box (MCM1、AGAMOUS、DEFICIENS 和 SRF-box) 转录因子中的 A 类 (APETALA1)、B 类 (PISTILATA 和 APETALA3)、C 类 (AGAMOUS) 和 E 类 (SEPALLATA) 是花器官发育的 ABCDE 模型的重要组成^[76-77]。近年来, MADS-box 转录因子被报道参与花朵差异着色模式的形成, 在卡特兰 (*Cattleya hybrid*) 中, 与唇瓣的发育和分化有关的 AP3 (APETALA3) -1/2/3/4s 和 AGL6 (AGAMOUS-like 6) -2s 也参与了上下唇瓣的差异着色^[78]。百合中抑制花被片中 B 类 MADS-box 基因 *TrihDEFa* (*DEFICIENSa*) 的表达, 会使得花瓣由红变白, 斑点变淡或消失^[79]。矮牵牛中单独沉默 C 类 MADS-box 基因 *pMADS3* 时, 深蓝色花瓣中部分区域的色素积累被抑制, 出现蓝白双色的表型^[80]。瓜叶菊中鉴定出了 2 个在白斑区高表达的 C 类 MADS-box 转录因子 ScAG (AGAMOUS) 和 ScAGL11, 它们相互作用形成二聚体, 并通过直接结合 *ScF3H1* (flavonoid 3-hydroxylase 1) 和 *ScDFR3* 的启动子来抑制花青素的积累, 最终形成花斑^[13]。

发育基因除了直接影响色素合成途径结构基因的表达外, 还可通过控制 MYB 基因的表达进而层级调控花朵着色模式的形成。在蝴蝶兰 ‘Sogo Yukidian’ 中发现斑点仅在侧萼片中出现且由 *PeMYB11* 控制, 该基因受到一个变异的 AGL6 类 MADS-box 转录因子 OAGL6-2 调控, OAGL6-2 可与 OAP3-1 结合形成蛋白复合体, 能够在改变花瓣下侧萼片结构的同时上游调控 *PeMYB11* 的表达进而形成斑点, 说明色素的差异定位积累可能是发育基因产生新功能的结果^[81]。夏堇中 CYC2 (CYCLOIDEA) 和 RAD 类 (RADIALIS-like) 转录因子 RAD1 在背侧花瓣中特异性表达, 其可直接结合 *MYB1* 基因,

抑制该基因在此区域的作用,从而影响花青素合成途径下游结构基因的转录,最终建立了夏堇腹背不对称的着色模式^[22, 82];而当 *TfCYC2* 的外显子上插入一个 *Ty1/Copia*-like 型 LTR (long terminal repeat) 逆转座子 *TORE2* 时,会导致 *TfCYC2* 和 *TfRAD1* 表达下降,白色背侧花瓣腹侧化并开始着色^[23]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 TCP4 (TEOSINTE-BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF 4) 能够直接结合叶绿素合成途径结构基因 *PORB* (protophytyl oxidoreductase) 和 *DVR* (divinyl reductase) 或者转录因子 *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1*) 的启动子来降低花瓣远端叶绿素的积累,促使 *tcp2*、*tcp3*、*tcp4*、*tcp5*、*tcp10*、*tcp13*、*tcp17* 七个基因突变体的远端花瓣的叶绿体转化为白质体,绿色花瓣尖端呈现白色^[83]。

5 花斑形成过程中的其他调控机制

目前,对于花斑的研究多集中于对转录因子的挖掘及其转录调控机制,观赏植物复杂的颜色图案模式的形成需要依靠多种调控手段的层层协作,并不局限于转录调控,而是包含了转录后调控、翻译后调控、基因序列差异以及甲基化等不同水平的调控机制(图2)。

5.1 转录后调控

转录后调控 (post-transcriptional regulation) 是指真核生物对转录出的 mRNA 进行加工,在转录后水平对基因表达起到重要的调控作用^[84],如可变剪接 (alternative splicing)、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和 microRNA (miRNA) 等均被发现能够调控观赏植物花斑的形成。可变剪接能够产生多种 mRNA,翻译出不同功能的蛋白,但也可以引起翻译的提前终止,使蛋白改变或丧失原有功能^[85],因此,在花朵着色过程中,可变剪接极易产生不规则型花斑。跳枝桃就是因为可变剪接使得 *ANS* 在红色花中有两种不同长度的转录本,而在白色花中仅检测到一种转录本^[86]。

small RNA (sRNA) 是指一类小片段的不编码蛋白的 RNA 分子,能够通过引起基因转录后沉默来参与花斑形成^[87]。在日本龙胆 (*Gentiana scabra*)^[88] 和秘鲁三角梅 (*Bougainvillea peruviana*)^[89] 的双色

花中都检测到了 sRNA 在花朵白色部位的大量累积。sRNA 又可进一步分为 siRNA 和 miRNA,植物内源性 siRNA 来源于长的双链 RNA (dsRNA),双链 siRNA 与 Argonaute (AGO) 蛋白形成基因沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex) 降解互补配对的靶 mRNA 从而抑制基因表达^[90]。siRNA 引起的基因沉默能够调控花瓣的差异色素沉着,遗传过程中的染色体重排导致了矮牵牛星型和花边型的花中存在两个头尾串联的 *CHS-A*,它们能够产生 21 nt 的 siRNA 并降解花瓣白色区域 *CHS-A* 成熟 mRNA,引起色素的差异空间积累^[14]。金鱼草花冠中一个含有 *Am4'CGT* (chalcone 4'-O-glucosyltransferase) 反向重复序列的 *SULF* 优先表达,产生 sRNA 抑制 *Am4'CGT* 的表达,使得蜜导更为醒目,以此吸引授粉者^[91]。Liang 等^[92] 在猴面花花冠中发现显性的 *YUP^L* (*YELLOW UPPER*) 等位基因能够产生靶向 MYB 转录因子 RCP2 (reduced carotenoid pigmentation 2) 的 siR-RCP2,抑制花冠中的类胡萝卜素积累,而 RCP1 可能位于 *YUP* 的上游抑制 siRNA 的产生并在蜜导中特异表达。这一发现也证明 siRNA 可能通过控制 MYB 转录因子参与花斑形成中的层级调控。

miRNA 是一类 18–25 nt 的非编码小分子,来源于具有碱基对折叠结构的初级 miRNA (pri-miRNA),成熟的 miRNA 组成 RISC 复合体,抑制靶基因的表达^[93]。miRNA-mRNA 模块参与植物着色模式的形成,miR156 能够靶向 *SPL* (*SQUAMOSA*) 基因的启动子序列,而 *SPL* 转录因子通过破坏 MBW 复合体的稳定来抑制花青素的合成,在拟南芥^[94] 和芍药 (*P. lactiflora*)^[95] 中发现,miR156-*SPL* 模块能够影响花青素在拟南芥茎秆或侧枝上的定位积累。现有研究显示,miRNA 也影响花斑的形成,蝴蝶兰品种 'Panda' 中 *PeMYB7* 和 *PeMYB11* 控制花瓣紫色斑点的形成,而靶向这两个 MYB 基因的 miR156g 和 miR858 在非斑点区域积累,抑制了花青素的合成^[96]。百合 *LhMYB12* 是花青素的激活子,在很多双色花中均能检测到其表达^[57],Yamagishi 等^[97] 发现 miR828 在百合双色花中的下半部分的积累高于上半部分,并且通过靶向 *LhMYB12* 的 mRNA 降解其转录本积累,导致花被片的下部呈现为白色。牡丹 '岛锦' 中鉴定出 2 个可能参与双色花形成的 miRNA (miR858 和

miR156a-5p)，推测其可能通过调控 *P_sMYB12* 来影响花瓣中花青素的差异积累^[98]。

5.2 翻译后调控

泛素化 (ubiquitination) 是常见的翻译后修饰，是指泛素信号被 26S 蛋白酶体识别，从而降解靶向蛋白质的过程^[99]。泛素化参与植物的多种代谢途径并影响花斑的形成，牡丹‘和谐’E3 泛素连接酶 PhRING-H2 (ring domain-containing protein) 与 PhCHS 相互作用，通过降解 PhCHS 抑制花发育后期花瓣中色素的积累，参与斑块的形成^[100]。菊花‘Noble Wine’(NW) 粉色舌状花上带有紫色斑纹，与纯紫色品种相比，NW 中编码 F-box (泛素化途径中特异识别底物的蛋白) 的基因高表达^[101]。

5.3 DNA 甲基化

DNA 甲基化是指在甲基化转移酶 (methyltransferase) 的作用下，基因组的核苷酸对的胞嘧啶上结合一个甲基基团，形成 5- 甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine)，植物中甲基化位点一般为对称的 CG 位点、CNG 位点和不对称的 CHH 位点 3 种，甲基化能够在不改变 DNA 序列的情况下，通过改变 DNA 或组

蛋白 (histone) 的结构或稳定性来调控基因表达^[102]，甲基化往往会使得基因失去原本的功能，主要参与不规则型花斑的形成。文心兰 (*Oncidium* spp.) *CHS* 基因上游启动子区域的甲基化导致基因失活，使得蜜导区域丧失了红色的色素斑点^[103]；牡丹‘岛锦’*bHLH1* 的甲基化是其花瓣呈红白双色的原因^[104]；而桃花杂色花蕾的形成是因为 *LDOX* 的甲基化降低了基因活性，花青素的合成减少^[105]。紫斑牡丹花瓣中 PrF3H 和 PrANS 启动子处于高度甲基化状态，而随着花瓣发育，其在斑部区域的甲基化水平显著降低，非斑部依旧维持较高水平，进而导致了花青素的差异积累^[106]。

6 展望

花斑促进了自然界中花色表型的多样化，显著增加了花卉的观赏和经济价值，同时也折射出被子植物在适应环境变化和提升生存能力过程中的进化趋势。因此，探究花斑形成的机理对生物多样性形成和生物进化具有重要意义。已报道的转录调控机制主要围绕类黄酮代谢通路，MYB 转录因子仍然是大多数植物花斑形成的关键转录因子，而一些发育

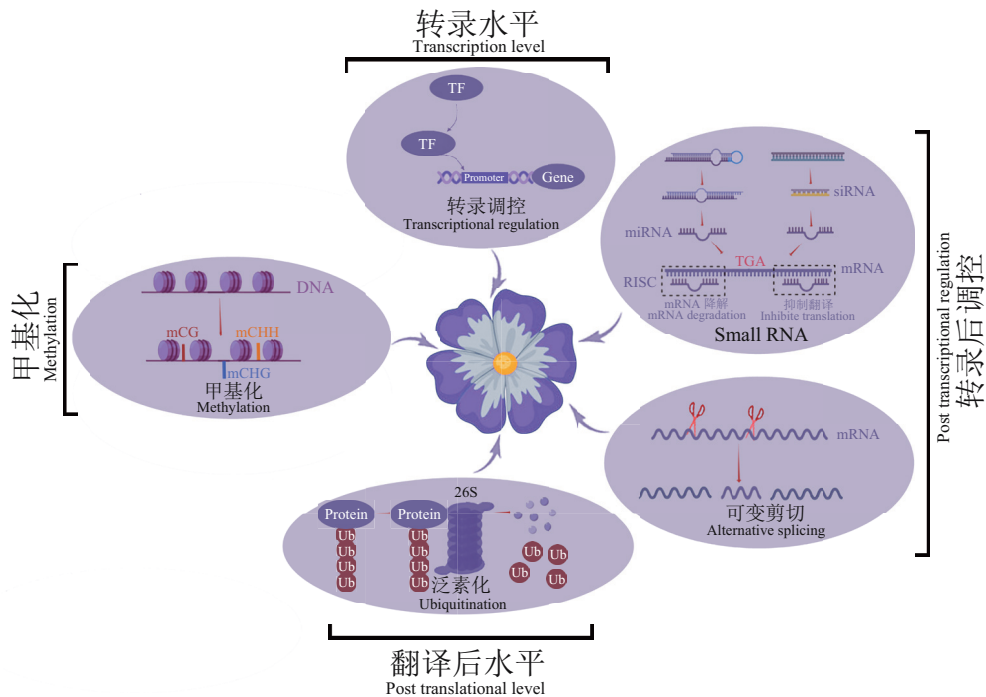


图 2 花斑形成的多种调控机制

Fig. 2 Multiple regulation mechanisms of the flower spots formation

类基因也逐渐被鉴定出具备调控花青素合成的新功能。虽然现今的研究无法提出一个完整的具有普适性的分子调控网络,但在不同植物中发现的多种调控模式极大地促进了花斑研究的进程(图2)。新的转录因子挖掘、转录因子的层级调控、生物代谢的协同选择以及套用数学模型(位置效应和“反应-扩散”等)解析花斑形成^[107]都是后续研究的诸多方向,有望能从不同角度不同层次解析并完善观赏植物花斑形成的分子机理。

参考文献

- [1] Davies KM, Albert NW, Schwinn KE. From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning [J]. *Funct Plant Biol*, 2012, 39 (8): 619-638.
- [2] Leonard AS, Papaj DR. 'X' marks the spot: the possible benefits of nectar guides to bees and plants [J]. *Funct Ecol*, 2011, 25 (6): 1293-1301.
- [3] van der Kooij CJ, Dyer AG, Kevan PG, et al. Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling [J]. *Ann Bot*, 2019, 123 (2): 263-276.
- [4] Dinkel T, Lunau K. How drone flies (*Eristalis tenax* L., Syrphidae, Diptera) use floral guides to locate food sources [J]. *J Insect Physiol*, 2001, 47 (10): 1111-1118.
- [5] Goodale E, Kim E, Nabors A, et al. The innate responses of bumble bees to flower patterns: separating the nectar guide from the nectary changes bee movements and search time [J]. *Naturwissenschaften*, 2014, 101 (6): 523-526.
- [6] Simonds V, Plowright CMS. How do bumblebees first find flowers? Unlearned approach responses and habituation [J]. *Animal Behav*, 2004, 67 (3): 379-386.
- [7] Gronquist M, Bezzerides A, Attygalle A, et al. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 98 (24): 13745-13750.
- [8] Koski MH, MacQueen D, Ashman TL. Floral pigmentation has responded rapidly to global change in ozone and temperature [J]. *Curr Biol*, 2020, 30 (22): 4425-4431.
- [9] Cooley AM, Willis JH. Genetic divergence causes parallel evolution of flower color in Chilean *Mimulus* [J]. *New Phytol*, 2009, 183 (3): 729-739.
- [10] Shang YJ, Venail J, Mackay S, et al. The molecular basis for venation patterning of pigmentation and its effect on pollinator attraction in flowers of *Antirrhinum* [J]. *New Phytol*, 2011, 189 (2): 602-615.
- [11] Zhang YZ, Cheng YW, Ya HY, et al. Transcriptome sequencing of purple petal spot region in tree peony reveals differentially expressed anthocyanin structural genes [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 964.
- [12] Yamagishi M, Toda S, Tasaki K. The novel allele of the *LhMYB12* gene is involved in splatter-type spot formation on the flower tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) [J]. *New Phytol*, 2014, 201 (3): 1009-1020.
- [13] Qi FT, Liu YT, Luo YL, et al. Functional analysis of the ScAG and ScAGL11 MADS-box transcription factors for anthocyanin biosynthesis and bicolor pattern formation in *Senecio cruentus* ray florets [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac071.
- [14] Morita Y, Saito R, Ban Y, et al. Tandemly arranged *chalcone synthase A* genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida* [J]. *Plant J*, 2012, 70 (5): 739-749.
- [15] Thomas MM, Rudall PJ, Ellis AG, et al. Development of a complex floral trait: the pollinator-attracting petal spots of the beetle daisy *Gorteria diffusa* (Asteraceae) [J]. *Am J Bot*, 2009, 96 (12): 2184-2196.
- [16] Wang L, Albert NW, Zhang HB, et al. Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium orchid* [J]. *Planta*, 2014, 240 (5): 983-1002.
- [17] Ohno S, Hosokawa M, Hoshino A, et al. A bHLH transcription factor, DvIVS, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in *dahlia* (*Dahlia variabilis*) [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62 (14): 5105-5116.
- [18] 陈丽, 薛良交, 李淑娴. 跳枝碧桃花色性状的全基因组关联分析 [J]. *园艺学报*, 2021, 48 (3): 553-565.
- Chen L, Xue LJ, Li SX. Genome-wide association study of flower color trait in *Prunus persica* f. *versicolor* [J]. *Acta Hortie Sin*, 2021, 48 (3): 553-565.
- [19] Yang SJ, Ohno S, Deguchi A, et al. The histological study in sympetalous corolla development of pinwheel-type flowers of

- Saintpaulia* [J]. *Sci Hortic*, 2017, 223: 10-18.
- [20] Erpelding JE. Genetic characterisation of the petal spot phenotype for *Gossypium arboreum* accession PI 408798 [J]. *Czech J Genet Plant Breed*, 2020, 56 (2): 79-83.
- [21] Yuan YW, Rebocho AB, Sagawa JM, et al. Competition between anthocyanin and flavonol biosynthesis produces spatial pattern variation of floral pigments between *Mimulus* species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (9): 2448-2453.
- [22] Niki T, Sasaki K, Shikata M, et al. Conversion of abaxial to adaxial petal in a *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind. ex fourn.) mutant appeared in selfed progeny of the mutable line 'flecked' [J]. *Hortic J*, 2016, 85 (4): 351-359.
- [23] Kondo M, Tanikawa N, Nishijima T. Mutation of *CYCLOIDEA* expands variation of dorsal-ventral flower asymmetry expressed as a pigmentation pattern in *Torenia fournieri* cultivars [J]. *Hortic J*, 2020, 89 (4): 481-487.
- [24] Martins TR, Berg JJ, Blinka S, et al. Precise spatio-temporal regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway leads to petal spot formation in *Clarkia gracilis* (Onagraceae) [J]. *New Phytol*, 2013, 197 (3): 958-969.
- [25] Zhang YZ, Cheng YW, Xu SZ, et al. Tree peony variegated flowers show a small insertion in the *F3'H* gene of the acyanic flower parts [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20 (1): 211.
- [26] Cheng J, Liao L, Zhou H, et al. A small indel mutation in an anthocyanin transporter causes variegated colouration of peach flowers [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66 (22): 7227-7239.
- [27] Koseki M, Goto K, Masuta C, et al. The star-type color pattern in *Petunia hybrida* 'red Star' flowers is induced by sequence-specific degradation of chalcone synthase RNA [J]. *Plant and Cell Physiol*, 2005, 46 (11): 1879-1883.
- [28] McMillan RT, Palmateer A, Vendrame WA. Survey for *Cymbidium mosaic* and odontoglossum ring spot viruses in domestic and international orchids [J]. *Phytopathology*, 2006, 96 (6): S76-S76.
- [29] Deguchi A, Tatsuzawa F, Hosokawa M, et al. Tobacco streak virus (strain dahlia) suppresses post-transcriptional gene silencing of *flavone synthase II* in black dahlia cultivars and causes a drastic flower color change [J]. *Planta*, 2015, 242 (3): 663-675.
- [30] Kay QON, Daoud HS, Stirton CH. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals [J]. *Bot J Linn Soc*, 1981, 83: 57-84.
- [31] Zhang R, Lu Y. Molecular mechanisms and natural selection of flower color variation [J]. *Bota Res*, 2016, 5 (6): 186-209.
- [32] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2006, 57: 761-780.
- [33] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. *Plant J*, 2008, 54 (4): 733-749.
- [34] Todesco M, Bercovich N, Kim A, et al. Genetic basis and dual adaptive role of floral pigmentation in sunflowers [J]. *eLife*, 2022, 11: e72072.
- [35] Schwinn K, Venail J, Shang YJ, et al. A Small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (4): 831-851.
- [36] Li J, Wang ZH. Integrative metabolomic and transcriptome analysis reveal the differential mechanisms of spot color in the lips of *Dendrobium chrysotoxum* [J]. *J Plant Biol*, 2022: 1-13.
- [37] Yuan Y, Li X, Yao X, et al. Mechanisms underlying the formation of complex color patterns on *Nigella orientalis* (Ranunculaceae) petals [J]. *New Phytol*, 2023, 237 (6): 2450-2466.
- [38] Morita Y, Hoshino A. Recent advances in flower color variation and patterning of Japanese morning glory and petunia [J]. *Breed Sci*, 2018, 68 (1): 128-138.
- [39] Huyen DTT, Van DT, Huang KL, et al. Distribution and composition of flavonols in the flowers of *Rhododendron oldhamii* maxim [J]. *J Fac Agric Kyushu Univ*, 2016, 61 (1): 37-40.
- [40] Shoji K, Miki N, Nakajima N, et al. Perianth bottom-specific blue color development in Tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48 (2): 243-251.
- [41] Yoshida K, Oniduka T, Oyama KI, et al. Blue flower coloration of *Corydalis ambigua* requires ferric ion and kaempferol glycoside [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85 (1): 61-68.
- [42] Li Y, Kong F, Liu Z, et al. PhUGT78A22, a novel glycosyltransferase in *Paeonia* 'He Xie', can catalyze the transfer of glucose to glucosylated anthocyanins during petal blotch formation [J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22 (1): 405.
- [43] Zhang S, Chen J, Jiang T, et al. Genetic mapping, transcriptomic sequencing and metabolic profiling indicated a glutathione

- S-transferase is responsible for the red-spot-petals in *Gossypium arboreum* [J]. *Theor Appl Gene*, 2022, 135 (10) : 3443-3454.
- [44] Yamagishi M. How genes paint lily flowers: regulation of colouration and pigmentation patterning [J]. *Sci Hortic*, 2013, 163: 27-36.
- [45] Wang X, Yamagishi M. Mechanisms suppressing carotenoid accumulation in flowers differ depending on the hybrid groups of lilies (*Lilium* spp.) [J]. *Sci Hortic*, 2019, 243: 159-168.
- [46] Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T, et al. Isolation of a suppressor-mutator/enhancer-like transposable element, Tpn1, from Japanese morning glory bearing variegated flowers [J]. *Plant Cell*, 1994, 6 (3) : 375-383.
- [47] Morita Y, Takagi K, Fukuchi-Mizutani M, et al. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation [J]. *Plant J*, 2014, 78 (2) : 294-304.
- [48] Morita Y, Ishiguro K, Tanaka Y, et al. Spontaneous mutations of the UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene confers pale-and dull-colored flowers in the Japanese and common morning glories [J]. *Planta*, 2015, 242 (3) : 575-587.
- [49] Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, et al. Excision of transposable elements from the *chalcone* isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (5) : 578-585.
- [50] Wong DCJ, Perkins J, Peakall R. Anthocyanin and flavonol glycoside metabolic pathways underpin floral color mimicry and contrast in a sexually deceptive orchid [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 860997.
- [51] Li Q, Wang J, Sun HY, et al. Flower color patterning in pansy (*Viola × wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanin pathway in acyanic and cyanic flower areas [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 84: 134-141.
- [52] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15 (10) : 573-581.
- [53] LaFountain AM, Yuan YW. Repressors of anthocyanin biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2021, 231 (3) : 933-949.
- [54] Abid MA, Wei Y, Meng Z, et al. Increasing floral visitation and hybrid seed production mediated by beauty mark in *Gossypium hirsutum* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20 (7) : 1274-1284.
- [55] Nishijima T, Morita Y, Sasaki K, et al. A *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind. ex fourn.) novel mutant ‘Flecked’ produces variegated flowers by insertion of a DNA transposon into an R2R3-MYB gene [J]. *J Japan Soc Hort Sci*, 2013, 82 (1) : 39-50.
- [56] Hsu CC, Su CJ, Jeng MF, et al. A *HORT1* retrotransposon insertion in the *PeMYB11* promoter causes harlequin/black flowers in *Phalaenopsis orchids* [J]. *Plant Physiol*, 2019, 180 (3) : 1535-1548.
- [57] Suzuki K, Suzuki T, Nakatsuka T, et al. RNA-seq-based evaluation of bicolor tepal pigmentation in Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1) : 611.
- [58] Yamagishi M. MYB19LONG is involved in brushmark pattern development in Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.) flowers [J]. *Sci Hortic*, 2020, 272: 109570.
- [59] Yamagishi M. Isolation and identification of MYB transcription factors (MYB19Long and MYB19Short) involved in raised spot anthocyanin pigmentation in lilies (*Lilium* spp.) [J]. *J Plant Physiol*, 2020, 250: 153164.
- [60] Yamagishi M, Ihara H, Arakawa K, et al. The origin of the *LhMYB12* gene, which regulates anthocyanin pigmentation of tepals, in Oriental and Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) [J]. *Sci Hortic*, 2014, 174: 119-125.
- [61] Yamagishi M. A novel R2R3-MYB transcription factor regulates light-mediated floral and vegetative anthocyanin pigmentation patterns in *Lilium regale* [J]. *Mol Breeding*, 2016, 36 (1) : 3.
- [62] Luan Y, Tang Y, Wang X, et al. Tree peony R2R3-MYB transcription factor PsMYB30 promotes petal blotch formation by activating the transcription of the anthocyanin synthase gene [J]. *Plant Cell Physiol*, 2022, 63 (8) : 1101-1116.
- [63] Shi Q, Yuan M, Wang S, et al. *PrMYB5* activates anthocyanin biosynthetic *PrDFR* to promote the distinct pigmentation pattern in the petal of *Paeonia rockii* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 955590.
- [64] Li CX, Yu WJ, Xu JR, et al. Anthocyanin biosynthesis induced by MYB transcription factors in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (19) : 11701.
- [65] Albert NW, Griffiths AG, Cousins GR, et al. Anthocyanin leaf markings are regulated by a family of R2R3-MYB genes in the genus *Trifolium* [J]. *New Phytol*, 2015, 205 (2) : 882-893.
- [66] Yamagishi M, Shimoyamada Y, Nakatsuka T, et al. Two R2R3-MYB genes, homologs of *petunia AN2*, regulate anthocyanin biosyntheses

- in flower tepals, tepal spots and leaves of Asiatic hybrid lily [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51 (3): 463-474.
- [67] Yamagishi M. Involvement of a LhMYB18 transcription factor in large anthocyanin spot formation on the flower tepals of the Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.) cultivar "Grand Cru" [J]. *Mol Breeding*, 2018, 38 (5): 60.
- [68] Gu Z, Zhu J, Hao Q, et al. A novel R2R3-MYB transcription factor contributes to petal blotch formation by regulating organ-specific expression of *PsCHS* in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60 (3): 599-611.
- [69] Albert NW, Lewis DH, Zhang H, et al. Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning [J]. *Plant J*, 2011, 65 (5): 771-784.
- [70] Hsu CC, Chen YY, Tsai WC, et al. Three R2R3-MYB transcription factors regulate distinct floral pigmentation patterning in *Phalaenopsis* spp [J]. *Plant Physiol*, 2015, 168 (1): 175.
- [71] Martins TR, Jiang P, Rausher MD. How petals change their spots: cis-regulatory re-wiring in *Clarkia* (Onagraceae) [J]. *New Phytol*, 2017, 216 (2): 510-518.
- [72] Lin RC, Rausher MD. R2R3-MYB genes control petal pigmentation patterning in *Clarkia gracilis* ssp. *sonomensis* (Onagraceae) [J]. *New Phytol*, 2021, 229 (2): 1147-1162.
- [73] Lin RC, Rausher MD. Ancient gene duplications, rather than polyploidization, facilitate diversification of petal pigmentation patterns in *Clarkia gracilis* (Onagraceae) [J]. *Mol Biol Evol*, 2021, 38 (12): 5528-5538.
- [74] Ding B, Patterson EL, Holalu SV, et al. Two MYB proteins in a self-organizing activator-inhibitor system produce spotted pigmentation patterns [J]. *Curr Biol*, 2020, 30 (5): 802-814.
- [75] Zheng X, Om K, Stanton KA, et al. The regulatory network for petal anthocyanin pigmentation is shaped by the MYB5a/NEGAN transcription factor in *Mimulus* [J]. *Genetics*, 2021, 217 (2): iyaa036.
- [76] Zahn LM, Feng BM, Ma H. Beyond the ABC-model: regulation of floral homeotic genes [M] // *Developmental Genetics of the Flower*. Amsterdam: Elsevier, 2006, 44: 163-207.
- [77] Saedler H, Becker A, Winter KU, et al. MADS-box genes are involved in floral development and evolution [J]. *Acta Biochim Pol*, 2001, 48 (2): 351-358.
- [78] Li BJ, Zheng BQ, Wang YJ, et al. New insight into the molecular mechanism of colour differentiation among floral segments in orchids [J]. *Commun Biol*, 2020, 3 (1): 89.
- [79] Otani M, Aoyagi K, Nakano M. Suppression of B function by chimeric repressor gene-silencing technology (CRES-T) reduces the petaloid tepal identity in transgenic *Lilium* sp. [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (8): e0237176.
- [80] Noor SH, Ushijima K, Murata A, et al. Double flower formation induced by silencing of C-class MADS-box genes and its variation among *petunia* cultivars [J]. *Sci Hortic*, 2014, 178: 1-7.
- [81] Hsu HF, Chen WH, Shen YH, et al. Multifunctional evolution of B and *AGL6* MADS box genes in orchids [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 902.
- [82] Su S, Xiao W, Guo W, et al. The CYCLOIDEA-RADIALIS module regulates petal shape and pigmentation, leading to bilateral corolla symmetry in *Torenia fournieri* (Linderniaceae) [J]. *New Phytol*, 2017, 215 (4): 1582-1593.
- [83] Zheng X, Lan J, Yu H, et al. Arabidopsis transcription factor TCP4 represses chlorophyll biosynthesis to prevent petal greening [J]. *Plant Commun*, 2022, 3 (4): 100309.
- [84] Romanowski A, Yanovsky MJ. *Circadian rhythms* and post-transcriptional regulation in higher plants [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 437.
- [85] Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway [J]. *Ann Rev Biochem*, 2007, 76: 51-74.
- [86] Yin P, Zhen Y, Li SX. Identification and functional classification of differentially expressed proteins and insight into regulatory mechanism about flower color variegation in peach [J]. *Acta Physiol Plant*, 2019, 41 (6): 95.
- [87] St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The landscape of long noncoding RNA classification [J]. *Trends Genet*, 2015, 31 (5): 239-251.
- [88] Ohta Y, Atsumi G, Yoshida C, et al. Posttranscriptional gene silencing of the chalcone synthase gene *CHS* causes corolla lobe-specific whiting of Japanese gentian [J]. *Planta*, 2022, 225 (1): 29.
- [89] Ohno S, Makishima R, Doi M. Post-transcriptional gene silencing of *CYP76AD* controls betalain biosynthesis in bracts of *bougainvillea* [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72 (20): 6949-6962.

- [90] Sunkar R, Zhu JK. Micro RNAs and short-interfering RNAs in plants [J] . J Intergr Plant Biol, 2007, 49 (6) : 817-826.
- [91] Bradley D, Xu P, Mohorianu II, et al. Evolution of flower color pattern through selection on regulatory small RNAs [J] . Science, 2017, 358 (6365) : 925-928.
- [92] Liang M, Chen W, LaFountain AM, et al. Taxon-specific, phased siRNAs underlie a speciation locus in monkeyflowers [J] . Science, 2023, 379 (6632) : 576-582.
- [93] Yang K, Han H, Li Y, et al. Significance of miRNA in enhancement of flavonoid biosynthesis [J] . Plant Biol, 2022, 24 (2) : 217-226.
- [94] Gou JY, Felippes FF, Liu CJ, et al. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor [J] . Plant Cell, 2011, 23 (4) : 1512-1522.
- [95] Zhao DQ, Xia X, Wei MR, et al. Overexpression of herbaceous peony miR156e-3p improves anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis thaliana* lateral branches [J] . 3 Biotech, 2017, 7 (6) : 379.
- [96] Zhao A, Cui Z, Li T, et al. mRNA and miRNA expression analysis reveal the regulation for flower spot patterning in *Phalaenopsis* ‘Panda’ [J] . Int J Mol Sci, 2019, 20 (17) : E4250.
- [97] Yamagishi M. microRNA828/MYB12 module mediated bicolor flower development in *Lilium dauricum* [J] . Hortic J, 2022, 91 (3) : 399-407.
- [98] Zhang XP, Jia JS, Zhao MY, et al. Identification and characterization of microRNAs involved in double-color formation in *Paeonia suffruticosa* ‘Shima Nishiki’ by high-throughput sequencing [J] . Hortic Environ Biotechnol, 2022, 63 (1) : 125-135.
- [99] Peng JM, Schwartz D, Elias JE, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination [J] . Nat Biotechnol, 2003, 21 (8) : 921-926.
- [100] Gu Z, Men S, Zhu J, et al. Chalcone synthase is ubiquitinated and degraded via interactions with a RING-H2 protein in petals of *Paeonia hybrid* ‘He Xie’ [J] . J Exp Bot, 2019, 70 (18) : 4749-4762.
- [101] Jo YD, Ryu J, Kim YS, et al. Dramatic increase in content of diverse flavonoids accompanied with down-regulation of F-box genes in a *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum* × *morifolium* (Ramat.) hemsl.) mutant cultivar producing dark-purple ray florets [J] . Genes, 2020, 11 (8) : E865.
- [102] 夏晗, 刘美芹, 尹伟伦 等. 植物 DNA 甲基化调控因子研究进展 [J] . 遗传, 2008, 30 (4) : 426-432.
- Xia H, Liu MQ, Yin WL, et al. DNA methylation regulating factors in plants [J] . Hereditas, 2008, 30 (4) : 426-432.
- [103] Liu XJ, Chuang YN, Chiou CY, et al. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium* orchid cultivars [J] . Planta, 2012, 236 (2) : 401-409.
- [104] Wang Y, Zhao M, Xu Z, et al. MSAP analysis of epigenetic changes reveals the mechanism of bicolor petal formation in *Paeonia suffruticosa* ‘Shima Nishiki’ [J] . 3 Biotech, 2019, 9 (8) : 313.
- [105] Wu XX, Zhou Y, Yao D, et al. DNA methylation of *LDOX* gene contributes to the floral colour variegation in peach [J] . J Plant Physiol, 2020, 246/247: 153116.
- [106] Zhu J, Wang YZ, Wang QY, et al. 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 [J] . Hortic Res, 2023, 10 (6) : uhad100.
- [107] Ringham L, Owens A, Cieslak M, et al. Modeling flower pigmentation patterns [J] . ACM Trans Graph, 2022, 40 (6) : 233.

(责任编辑 李楠)