

黄牡丹 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 转录因子基因的克隆与表达

史倩倩^{1,2}, 周琳², 王雁^{2*}, 翟立娟¹, 李龙¹

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所, 国家林业局 林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要:以云南野生黄牡丹为试验材料,根据已构建的云南野生黄牡丹花瓣转录组数据库提供的 WDR40 蛋白的 Unigene 筛选得到 19 个与花色素合成相关的 WDR40 蛋白同源性高的 Unigene 序列,命名为 *PlWDR1*~19. 通过氨基酸序列比较和系统进化树分析,发现 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 可能参与调控黄牡丹的花色素合成。*PlWDR3* 的 ORF 包含 1 个 1 032 bp 的开放阅读框,编码 1 个 344 个氨基酸的蛋白,与苹果 MdTTG1 的亲缘关系最近,相似性达 83.29%;*PlWDR18* 的 ORF 包含 1 个 1 035 bp 的开放阅读框,编码 1 个 345 个氨基酸的蛋白,与葡萄 VvWDR2 相似性最高,达 93.77%。相对荧光定量 PCR 分析表明,*PlWDR3* 在黄牡丹和紫牡丹的不同时期的表达模式基本相似,在黄牡丹和紫牡丹圆桃期表达量最高,在初开期表达量最低;*PlWDR18* 在黄牡丹花发育初期呈上升趋势,在透色期达到最高峰,然后下降,在初开期达到最小值;在紫牡丹花发育初期亦呈上升趋势,在圆桃期达到最大值,然后逐渐下降,在盛开期降到最小值。*PlWDR18* 在黄牡丹和紫牡丹花的各个发育时期的表达量均高于 *PlWDR3* 的表达量。推测 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 参与黄牡丹花色形成的调控,为今后深入探讨黄牡丹花色形成机制奠定基础。

关键词:黄牡丹;WDR40;花色素合成;基因克隆;表达分析

中图分类号:S718.46 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2017)03-0097-07

Isolation and Expression of *PlWDR3* and *PlWDR18* Transcription Factor Genes in *Paeonia lutea*

SHI Qian-qian¹, ZHOU Lin², WANG Yan^{2*}, ZHAI Li-juan¹, LI Long¹

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: In this study, 19 unigene sequences that shared high homology with WDR40 transcription factor protein involved in plant anthocyanin biosynthesis were obtained from previous-constructed petal transcriptome database of *Paeonia lutea* and named *PlWDR1*—19. *PlWDR3* and *PlWDR18* were considered to be related to regulate anthocyanin biosynthesis by comparing analysis of amino acid sequence and phylogenetic tree analysis. And *PlWDR3* contained a 1 032 bp ORF encoding 344 amino acid residues and *PlWDR18* contained a 1 035 bp ORF encoding 345 amino acid residues, which both contained the typical WD40 structural domain. The predicted protein sequence of *PlWDR3* shared high similarity with MdTTG1 (83.29%), and *PlWDR18* shared 93.77% similarity with VvWDR2. Relative real-time PCR analysis indicated that *PlWDR3* showed similar expression pattern in different periods of *P. lutea* and *P. delavayi*, and reached the highest abundance at stage 2 while it reached the lowest level at stage 3. And *PlWDR18* rose at the beginning stages of *P. lutea* with the peak at stage 3 and then declined while it had the highest expression level

收稿日期:2016-10-09 修回日期:2017-01-17

基金项目:国家“863”计划(2011AA10020701);西北农林科技大学 2015 年博士科研启动项目(Z109021611)。

作者简介:史倩倩,女,讲师,博士,研究方向:花卉遗传改良。E-mail:shiqianqian2005@163.com

* 通信作者:王雁,女,研究员,博士,博士生导师,研究方向:园林植物应用。E-mail:chwy8915@sina.com

at stage 2 and then declined with the lowest level at stage 5. The results also showed that *PlWDR18* expressed the higher abundance than *PlWDR3* in all samples. In conclusion, we inferred that *PlWDR3* and *PlWDR18* might associate with the regulatory of anthocyanin biosynthesis in *P. lutea* and this would provide the basis for insight into the molecular mechanisms underlying tree peony yellow flower pigmentation.

Key words: *Paeonia lutea*; WDR40; anthocyanin biosynthesis; gene cloning; expression analysis

类黄酮是植物中最主要的一类花色素, 可以使其叶片、花和果实等呈现白色、黄色和蓝色等色彩^[1]。类黄酮的生物合成主要受结构基因和调控基因共同调控^[2], 调控类黄酮生物合成的调控基因主要包括 *R2R3-MYB*、*bHLH* 和 *WD40* 重复蛋白^[3]。WDR (WD repeat) 蛋白非常保守, 包含 4~16 个串联重复的 WD 基元, 其核心区域由 40 个氨基酸残基组成, 序列 N 末端 11~24 个残基处以 GH 开始, C 末端结尾为 WD^[4]。植物中的在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中首次发现 WDR 蛋白 AN11。在矮牵牛 AN11 突变体中 *DFR* 基因的表达量受 AN11 的调控而下降, 进而对花色素的合成起到调控作用^[5]。随后玉米 (*Zea mays*) *PAC*、紫苏 (*Perilla frutescens*) *PfWD*、牵牛 (*Ipomoea nil*) (*IpWDR1*、*IpWDR2*)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) *MtWD40*、葡萄 (*Vitis vinifera*) *VvWDR1* 和 *VvWDR2*、石榴 (*Punica granatum*) *PgWD40* 等植物的 WD40 蛋白也都相继被发现与花色素合成有关^[3,6-15]。

黄牡丹 (*Paeonia lutea*) 是中国西南地区特有的野生种, 为芍药科 (Paeoniaceae) 芍药属 (*Paeonia*) 牡丹组 (Sect. Moutan) 的落叶亚灌木, 不仅具有极高的观赏价值和药用价值, 而且具有珍稀的牡丹黄色花改良育种的基因资源^[16-17]。目前牡丹花色形成相关研究主要集中在中原牡丹品种的花色素合成相关结构基因的克隆^[18-20], 花色素合成相关转录因子的鉴定^[21-23] 及各栽培种群和部分野生种的花色素成分^[24-28], 但黄牡丹花色素合成途径的 WDR 转录因子的相关研究鲜见报道。本研究拟以前期获得的黄牡丹转录组数据库为基础, 结合 RACE 技术, 克隆并筛选与花色素合成相关的候选 WDR 转录因子, 分析其在黄牡丹和紫牡丹 (*P. delavayi*) 花的不同开放时期的表达模式, 以探究 WDR 转录因子在黄牡丹花色素合成过程中的作用, 为牡丹黄色花品种创新提供理论依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年 4 月 25 日至 5 月 10 日, 于云南省香格里拉县城滑雪场附近 (27°57'N, 99°35'E), 采集黄牡丹和紫牡丹的 5 个开放时期 (stage 1: 硬蕾期、stage

2: 圆桃期、stage 3: 透色期、stage 4: 初开期、stage 5: 盛花期) 的花瓣^[20,22], 取下后分别用锡箔纸包好, 液氮速冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.2 基因全长序列的克隆

根据黄牡丹转录组数据库^[29] 中的 WDR 转录因子 Unigene 序列, 利用 PrimerPremier5.0 软件设计特异引物 (表 1)。以 1 μg 总 RNA 为模板^[30], 按照 Promega 的 M-MLV 反转录说明书进行反转录。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶检测, 凝胶回收后连接到 Takara 的 PMD-T19 载体上, 再转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 经阳性筛选鉴定后, 送北京热默尔科技公司进行测序。

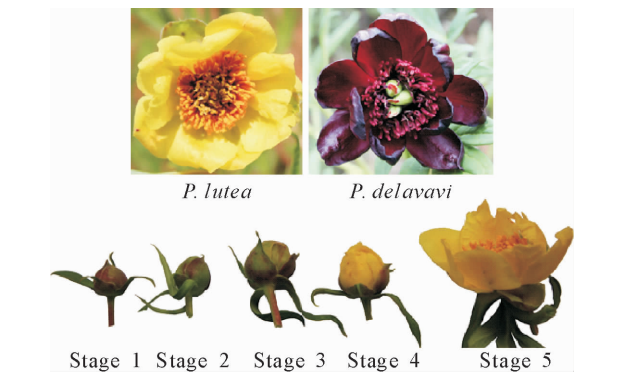


图 1 试验材料

Fig. 1 The materials for this experiment

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI 数据库中的 ORF Finder 软件预测基因开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及翻译氨基酸序列, 并通过 ExPASy Protparam 运用 Compute pI/Mw 软件预测基因编码蛋白的等电点和分子量, 利用 DNAMAN6.0 软件进行氨基酸相似性比对, 在线 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/.wrpsb.cgi> 预测编码蛋白保守结构域。利用 MEGA5.3 软件的邻位相连法构建系统进化树^[31]。

1.4 qRT-PCR 表达分析

利用 qRT-PCR 法分析 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 在黄牡丹和紫牡丹花不同开放时期的表达模式, 引物序列见表 1。具体操作方法和流程参照 Takara 公司的 STBR PremixScript™ RT-PCR Kit 荧光定量试剂盒说明书在 ABI 7500 实时定量 PCR 仪上进行^[20,22]。

表 1 黄牡丹 *PlWDR* 基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 Primers used to isolate and analyze the expression of *PlWDR*

作用	引物名称	Unigene ID	引物序列(5'-3')	
分离基因	<i>PlWDR3</i>	CL8324. Contig1	CTTTCCTTTGAGCACCTTATCCACCA	3'
	<i>PlWDR5</i>	Unigene1712_All	AATGGGGCAGTAGTGGCTCGTGTT	3'
	<i>PlWDR6</i>	CL8772. Contig1	GACGCAAGACATTACGATGACGACCG	3'
	<i>PlWDR12</i>	CL12573. Contig2	ATGCAGCTATATCATCATCCCTGCTCTTTG	3'
	<i>PlWDR13</i>	CL7021. Contig1	CAAGAGCCGAAACAACCTTAGAATGCC	5'
	<i>PlWDR18</i>	Unigene264_All	TCAGGACGGGTCAGACGAGCAGCAA	3'
	<i>PlWDR19</i>	Unigene4100	ACTCTTCCGCTTTGGCAGTTTTGA	3'
qRT-PCR	<i>PlWDR3</i>	CL8324. Contig1	TTCGCAAATCCTCCGATCTC/GCTCGACCTCATTCCAATCG	
	<i>PlWDR18</i>	Unigene264_All	TACCAACTCATCGCTCACG/TCCAACCAAACGAACCAAG	
	<i>Helicase</i>	CL6029. Contig2	GAGTGCGGGTTGAATCGTTG/AAGATTTCTGGATAGGTCTGTGGC	

2 结果与分析

2.1 黄牡丹花色素合成相关 WDR 转录因子的筛选

从黄牡丹花瓣转录组中发现 19 个 Unigene 与 WDR 重复蛋白同源性较高(表 2),分别命名为 *PlWDR1*~*19*。序列比对发现 CL8324. contig1(*PlWDR3*)和 Unigene264(*PlWDR18*)分别 Blastx 比对为“transparent testa glabra 1 [*Prunus persica*]”和“WD repeat 2 [*Vitis vinifera*]”,因此,推测这 2 个 Unigene 序列可能参与了花色素生物合成的调控。

将该 19 个 *PlWDR* 成员与已经鉴定了调控花色素合成的 WDR 转录因子,如矮牵牛 *PhAN11*、拟南芥 *AtAN11*、玉米 *PAC*、紫苏 *PfWD*、牵牛 *IpWDR1* 和 *IpWDR2*、紫花苜蓿 *MtWD40*、葡萄 *VvWDR1* 和 *VvWDR2*、石榴 *PgWD40*(图 2)聚类分析可见:*PlWDR3* 与石榴 *PgWD40*、玉米 *ZmWD40*、苹果 *MdTTG1*、葡萄 *VvWDR1* 和矮牵牛 *PhAN11* 聚为一大枝;*PlWDR18* 与葡萄 *VvWDR2* 先聚类在一起,然后与拟南芥 *AtAN11* 聚为一大分枝;说明 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 可能参与调控花色素的合成。

表 2 WDR 基因相关的 19 个 Unigene 基本信息

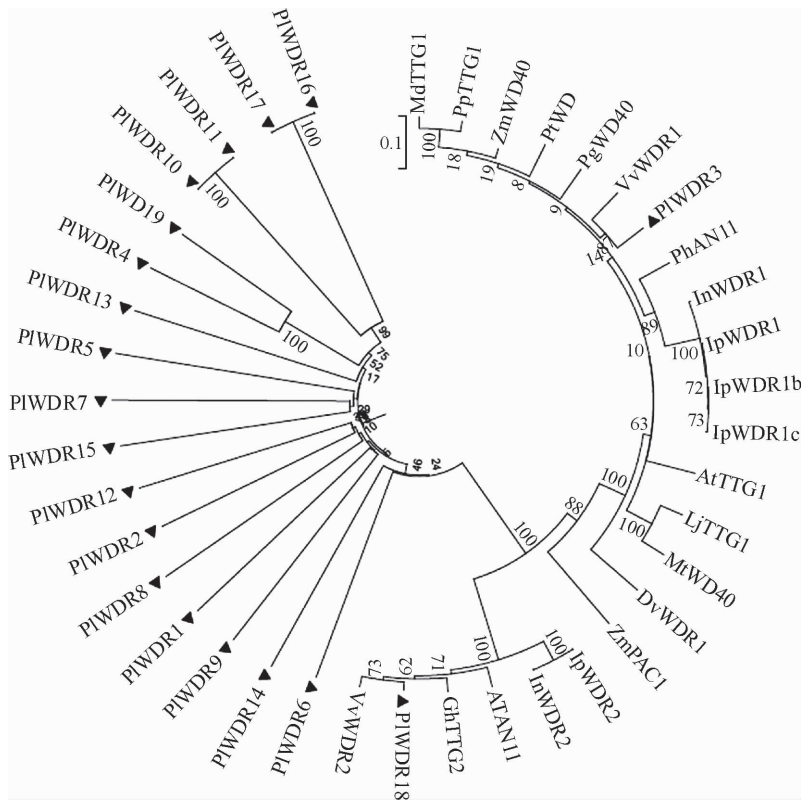
Table 2 19 Unigenes related on transcription factor WD40

基因	Unigene 编号	Unigene 长度/bp	Blastx 比对结果
<i>PlWDR1</i>	CL9660. Contig1	2 399	WD-40 repeat protein-like isoform 3,partial [<i>Theobroma cacao</i>]
<i>PlWDR2</i>	CL6304. Contig1	1 014	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]
<i>PlWDR3</i>	CL8324. Contig1	1 029	transparent testa glabra 1 [<i>Prunus persica</i>]
<i>PlWDR4</i>	CL14600. Contig1	1 746	WD-repeat protein,putative [<i>Ricinus communis</i>]
<i>PlWDR5</i>	Unigene1712_All	1 704	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein [<i>Theobroma cacao</i>]
<i>PlWDR6</i>	CL8772. Contig1	1 257	WD-40 repeat-containing protein MSI1 [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR7</i>	CL8092. Contig1	2 361	WD-repeat protein,putative [<i>Ricinus communis</i>]
<i>PlWDR8</i>	CL9146. Contig2	1 344	uncharacterized WD repeat-containing protein
<i>PlWDR9</i>	CL11003. Contig1	1 338	WD repeat and SOF domain-containing protein 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
<i>PlWDR10</i>	CL11409. Contig2	2 289	WD and tetratricopeptide repeat protein,putative isoform 2 [<i>Theobroma cacao</i>]
<i>PlWDR11</i>	CL11414. Contig1	2 688	WD-repeat protein,putative [<i>Ricinus communis</i>]
<i>PlWDR12</i>	CL12573. Contig2	1 044	WD-repeat protein,putative [<i>Ricinus communis</i>]
<i>PlWDR13</i>	CL7021. Contig1	2 025	WD repeat-containing protein 70-like [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR14</i>	CL11822. Contig4	1 041	WD repeat-containing protein 85 isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR15</i>	CL11915. Contig2	2 796	WD repeat-containing protein 44-like [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR16</i>	CL14569. Contig1	1 071	WD repeat-containing protein 55 [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR17</i>	Unigene55_All	1 977	WD repeat-containing protein 91 homolog [<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>]
<i>PlWDR18</i>	Unigene264_All	1 032	WD repeat 2 [<i>Vitis vinifera</i>]
<i>PlWDR19</i>	Unigene4100	1 338	WD repeat-containing protein 26 [<i>Vitis vinifera</i>]

2.2 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* cDNA 序列分析

经序列分析发现 *PlWDR3* cDNA 包含 1 个 1 032 bp ORF 和 1 个 poly(A)尾巴,186 bp 的 5'非编码区,248 bp 的 3'非编码区,编码 1 个含 344 个氨基酸的蛋白质(图 3-A),分子量(Mw)为 38. 502

kD,理论等电点(pI)为 4. 95。 *PlWDR18* cDNA 包含 1 个 1 035 bp ORF 和 1 个 poly(A)尾巴,382 bp 的 5'非编码区,197 bp 的 3'非编码区,编码 1 个含 345 个氨基酸的蛋白质(图 3-B),Mw 为 38. 781 kD,pI 为 4. 65。



注: PpTTG1: ACQ65867; MdTTG1: AAF27919; ZmWD40: AAR01949; PgWD40: ADV40946; PtWD: Xp002318500; VvWDR1: ABF66625; VvWDR2: ABF66626; AtAN11: AAC18912; AtTTG1: NMI22360; PhAN11: AAC18941; InWDR1: AB232779; InWDR2: AB232780; IpWDR1: AB232777; IpWDR2: AB232778; MtWD40: ABW08112; LjTTG1: BAH28880; DvWDR1: AB601007; ZmPAC1: AAM76742; GhTTG2: AAM95643; ScWD1: NP015077

图 2 PIWDR1-19 与其他植物 WDR40 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 2 A phylogenetic tree of the PIWDR1~19 of *P. lutea* and WDR proteins of other plants

两者编码蛋白的保守结构域为 WD40 结构域, 包括 WD40 superfamily, COG2319, PLN00181, PTZ00420。在 PIWDR3 的 WD40 保守域的特异位点包括由 27 个氨基酸残基组成, 包括第 102、107、112、113、129、151、156、162、163、175、176、193、197、203、204、216、217、238、243、251、252、265、266、285、289、294、295 个氨基酸; 第 167~204 个氨基酸序列为 WD 域 G- β 重复序列(图 3A)。在 PIWDR18 的 WD40 保守域的特异位点包括由 26 个氨基酸残基组成, 包括第 102、111、112、127、150、155、161、162、174、175、192、196、202、203、215、216、237、242、249、250、263、264、283、287、293、294 个氨基酸; 第 255~294 个氨基酸序列为 WD 域 G- β 重复序列(图 3B)。

同源性分析发现黄牡丹 PIWDR3 和 PIWDR18 氨基酸序列相似度为 60.34%, 2 者与已知的花色形成相关的 WDR 蛋白氨基酸序列均有不同程度的同源性, 其中 PIWDR3 与苹果 MdTTG1 和葡萄 VvWDR1 相似性最高, 分别为 83.29% 和 82.44%, 与玉米 ZmWD40 相似性最低, 为 53.54%; 另外, PIWDR18 与葡萄 VvWDR2 和陆地棉 GhTTG2 相似性最高, 分别达 93.77% 和 92.63%; 其次与拟南芥

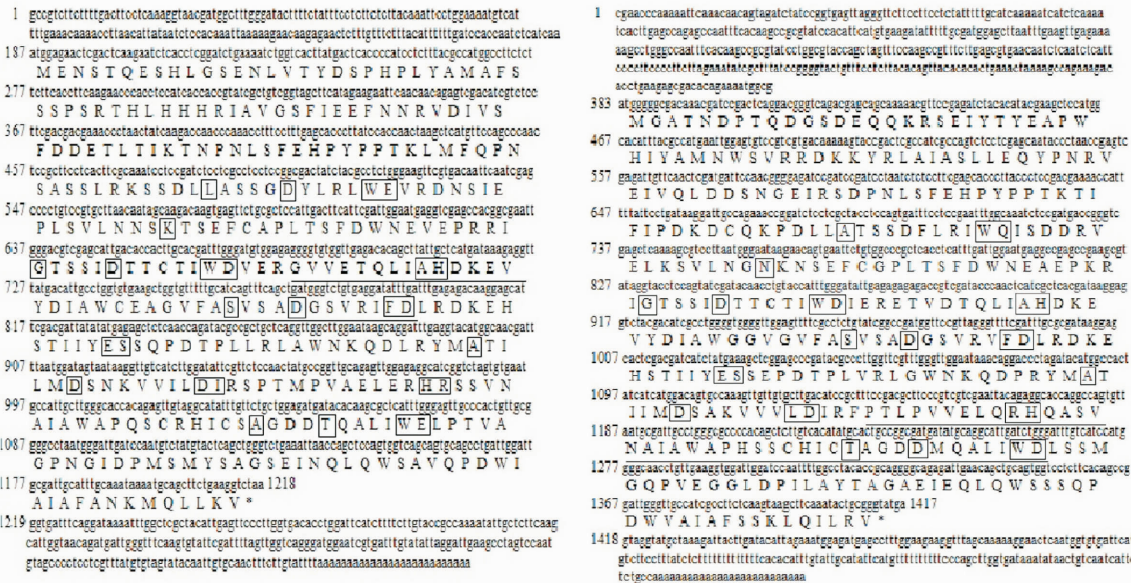
AtAN11 相似性也较高, 分别为 90.93%; 与玉米 ZmWD40 相似性最低, 为 43.63%(图 4)。氨基酸同源性分析与系统进化树(图 2)分析结果一致, 说明 PIWDR3 和 PIWDR18 转录因子参与调控了黄牡丹花色素的合成。

2.3 表达模式分析

采用 qRT-PCR 方法分析 *PIWDR3* 和 *PIWDR18* 在黄牡丹和紫牡丹花的不同发育时期(图 5)中的表达模式, 两者在黄牡丹和紫牡丹花的不同开放时期具有相似的表达模式, 均在圆桃期表达量最高, 在初开期最低; 而其在黄牡丹的初开期和盛开期的表达量极显著高于紫牡丹。*PIWDR18* 在不同发育时期的表达模式分析表明, 在紫牡丹的‘硬蕾期’和‘圆桃期’的表达量极显著高于黄牡丹, 而在紫牡丹的‘透色期’的表达量极显著低于黄牡丹。总体分析发现 *PIWDR18* 在黄牡丹和紫牡丹的各个发育时期的表达量均高于 *PIWDR3* 的表达量(图 5)。

3 结论与讨论

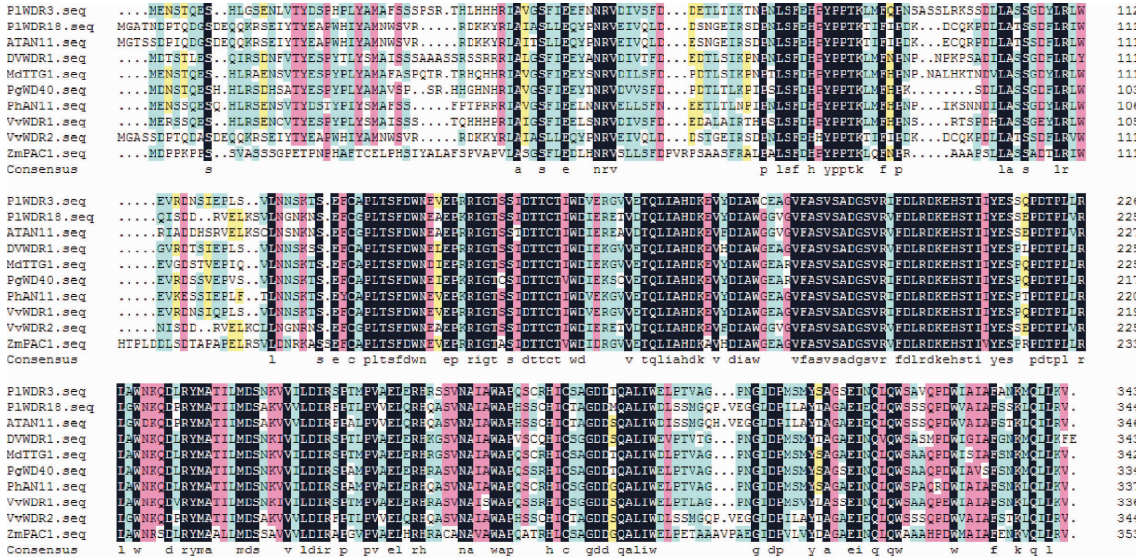
WD40 重复蛋白是一类古老的蛋白家族, 结构高度保守, 具有 4 个保守 WD40 结构域, 序列在不



注: A: *PtWDR3*; B: *PtWDR18*; 方框处为 WD40 保守域的特异位点; 单下划线为 WD 域 G-β 重复序列

图 3 *PtWDR3* 和 *PtWDR18* 基因序列及氨基酸序列

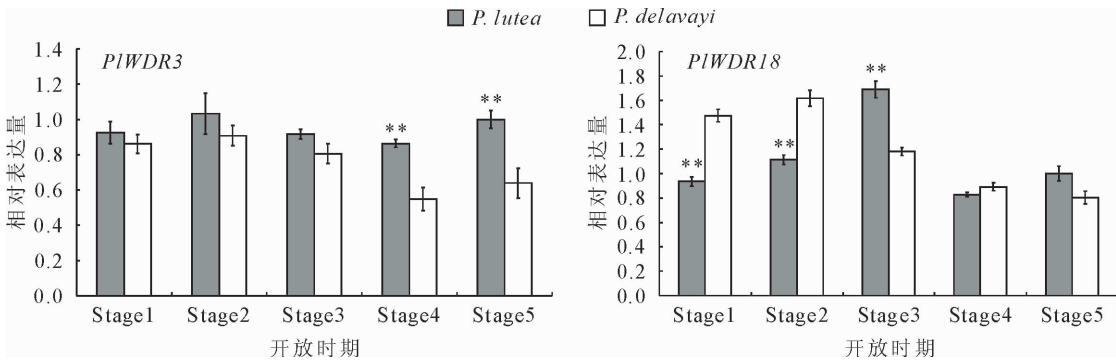
Fig. 3 Nucleotide and amino acid sequences of *PtWDR3* and *PtWDR18*



注: *AtAN11*: 拟南芥, *DvWDR1*: 大丽花, *PgWD40*: 石榴, *MdTTG1*: 苹果, *PhAN11*: 矮牵牛, *VvWDR1*、*VvWDR2*: 葡萄, *ZmPAC1*: 玉米。

图 4 *PtWDR3* 和 *PtWDR18* 与其他植物 WDR 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 4 Homology comparison of *PtWDR3* and *PtWDR18* in *P. lutea* and WDR protein of other plants



注: * * 表示黄色花和紫色花间在 0.01 水平上差异极显著。

图 5 *PtWDR3* 和 *PtWDR18* 转录因子在黄牡丹和紫牡丹中的相对表达量

Fig. 5 Relative quantity of *PtWDR3* and *PtWDR18* in *P. lutea* and *P. delavayi*

同植物中也十分保守^[9,32]。本研究分离得到的 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 基因所推测编码的蛋白序列也具有 WD40 蛋白家族典型的 4 个保守 WD40 结构域,表明黄牡丹 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 基因为 WD40 类转录因子基因。目前,关于 WD40 蛋白的研究较为深入,尤其在拟南芥,矮牵牛等模式植物中,发现 TTG1/AN11 类型的 WD40 蛋白在种子表皮花色素苷和原花色素苷的合成与积累等发挥重要的作用^[3,33-37]。*MdTTG1* 结合 *MdbHLH* 调控苹果的花色素代谢^[37],*VvMYCA1* 和 *VvWDR1* 的表达模式与葡萄浆果中的花色素积累模式一致^[13]。金鱼草的花色素调控基因 WD40 主要调节花色素代谢通路的下游基因,而对上游基因 *CHS* 和 *CHI* 的调控作用甚微^[38]。石榴中的 WDR40 蛋白 PgTTG 也被证明在果实发育过程中调控花色素合成途径的下游结构基因的表达^[6]。本研究发现 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 均聚类在 TTG1/AN11 类型的 WDR40 蛋白分支上,而且两者在黄色花和紫红色花花瓣颜色开始变化时高丰度表达,因此,可以推测他们参与黄牡丹花瓣花色素生物合成的转录调控,这与 *PsDFR1* 在中原牡丹的黄色花瓣的‘透色期’表达量最高,然后逐渐降低,而在墨紫红色花瓣的整个着色过程中都保持较一致的表达水平基本一致^[19]。推测 *PlWDR3* 和 *PlWDR18* 可能通过调控 *PlDFR1*, 调控黄牡丹花瓣的花色素代谢。

但是,目前对模式植物的研究表明花色素合成是由 R2R3-MYB、bHLH 和 WD40 蛋白组成的 MBW 复合体调控的^[39-40]。如在拟南芥种子中,MBW 复合体(TT2-TT8-TTG1)促进了原花色素合成^[8],MBW 复合体(PAP1-GL3-TTG1)协同调控 *PAL*、*CHS*、*DFR* 和 *GST* 的表达^[10]。因此,*PlWDR3* 和 *PlWDR18* 转录因子参与调控了黄牡丹的花色形成,与 R2R3-MYB 转录因子和 *bHLH* 转录因子的协调起作用模式仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 黄金霞,王亮生,李晓梅,等. 花色变异的分子基础与进化模式研究进展[J]. 植物学通报,2006,23(4):321-333.
HUANG J X,WANG L S,LI X M,*et al.* Advances in molecular basis and evolution of floral color variation [J]. Chinese Bulletin of Botany,2006,23(4):321-333 (in Chinese).

[2] HOLTON T A,CORNISH E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Cell,1995,7(7):1071-1083.

[3] RAMSAY N A,GLOVER BJ. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity [J]. Trends Plant Sci. ,2005,10(2):63-70.

[4] 史倩倩,周琳,李奎,等. 植物花色素合成的转录调控研究进展

[J]. 林业科学研究,2015,28(4):570-576.

SHI Q Q,ZHOU L,LI K,*et al.* Transcriptional regulation involved in anthocyanin biosynthesis in plants [J]. Forest Research,2015,28(4):570-576 (in Chinese).

[5] DE VETTEN N,QUATTROCCHIO F,MOL J,*et al.* The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals [J]. Gene. Dev. ,1997,11(11):1422-1434.

[6] BEN-SIMHON Z,JUDEINSTEIN S,NADLER-HASSAR T,*et al.* A pomegranate (*Punica granatum* L.) WD40-repeat gene is a functional homologue of *Arabidopsis* TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development [J]. Planta,2011,234(5):865-881.

[7] TAHERI A,JAVASANKAR S,CLINE J A,*et al.* A WD-repeat gene from peach (*Prunus persica* L.) is a functional ortholog of *Arabidopsis thaliana* transparent testa glabra1 [J]. In Vitro Cell. Dev- Pl. ,2012,48(1):23-29.

[8] BAUDRY A,HEIMEIM M A,DUBREUCQ B,*et al.* TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of banyuls and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J. ,2004,39:366-380.

[9] NEER E J,SCHMIDT C J,NAMBUDRIPAD R,*et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [J]. Nature,1994,371:297-300.

[10] NESI N,DEBEAUJON I,JOND C,*et al.* The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques*[J]. Plant Cell,2000,12(10):1863-1878.

[11] CAREY C C.,STRAHLE J T.,SELINGER D A. ,*et al.* Mutations in the *pale aleurone color* 1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar transparent testa glabra1 gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell,2004,16(2):450-464.

[12] YAMAZAKI M,MAKITA Y,SPRINGOB K,*et al.* Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. Crispa [J]. Biochem. Eng. J. ,2003,14(3):191-197.

[13] MATUS J T,POUPIN M J,CANÓN P,*et al.* Isolation of *WDR* and *bHLH* genes related to flavonoid synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plant Mol. Biol. ,2010,72(6):607-620.

[14] MORITA Y,SAITOH M,HOSHINO A,*et al.* Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, *bHLH* and *WDR* transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory[J]. Plant Cell Physiol. ,2006,47:457-470.

[15] PANG Y,WENGER J P,SAATHOFF K,*et al.* A WD40 repeat protein from *Eedicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development [J]. Plant Physiol. ,2009,151(3):1114-1129.

[16] 王志芳,王雁,岳桦. 珍稀资源:黄牡丹[J]. 中国城市林业,2007,5(2):59-60.

WANG Z F,WANG Y,YUE H. Current status of researches

on rare species *Paeonia lutea* [J]. Journal of Chinese Urban Forestry, 2007, 5(2): 59- 60 (in Chinese).

[17] 李宗艳,张海燕. 黄牡丹表型变异及多样性研究[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(4): 117-122.

LI Z Y, ZHANG H Y. Morphological variation and diversity in populations of *Paeonia lutea* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(4): 117-122(in Chinese).

[18] ZHOU L, WANG Y, REN L, *et al.* Overexpression of *PtCHI1*, a homologue of the chalcone isomerase gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*), reduces the intensity of flower pigmentation in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Tiss. Org. Culture, 2014, 16 (3): 285-295.

[19] ZHOU L, WANG Y, PENG Z. Molecular characterization and expression analysis of chalcone synthase gene during flower development in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Afr. J. Biotechnol. , 2011, 10(8): 1275-1284.

[20] 史倩倩,周琳,王雁. 云南野生黄牡丹谷胱甘肽转移酶(GST)基因的分离及表达分析[J]. 林业科学, 2014, 50(12): 63-72.

SHI Q Q, ZHOU L, WANG Y. Isolation and expression analysis of GST gene encoding glutathione S-transferase of *Paeonia delavayi* var. *lutea* wild population in Yunnan[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 10(8): 1275-1284 (in Chinese).

[21] 张超,董丽. 牡丹 bHLH 类转录因子基因的分离与序列分析[J]. 中国科技论文在线, 2014.

[22] 史倩倩,周琳,李奎,等. 云南野生黄牡丹 *Pt bHLH3* 转录因子基因的克隆与表达[J]. 林业科学研究, 2015, 28 (4): 488-496.

SHI Q Q, ZHOU L, LI K, *et al.* Isolation and expression of *Pt bHLH3* transcription factor genes in *Paeonia lutea* [J]. Forest Research, 2015, 28 (4): 488- 496 (in Chinese).

[23] 张超,高树林,杜凡妮,等. 牡丹 WD40 类转录因子基因 PsWD40-1 和 PsWD40-2 的分离与序列分析[J]. 生物技术通报, 2014(2): 85-90.

[24] WANG L S, HASHIMOTO F, SHIRAISHI A, *et al.* Phenetics in tree peony species from China by flower pigment cluster analysis [J]. J. Plant Res. , 2001a, 114: 213-221.

[25] WANG L S, SHIRAISHI A, HASHIMOTO F, *et al.* Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars[J]. J. Plant Res. , 2001, 114(1113): 33-43.

[26] 张晶晶,王亮生,刘政安,等. 牡丹花色研究进展[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1383-1388.

ZHANG J J, WANG L S, LIU Z A, *et al.* Recent advances in flower color research of tree peony [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(6): 1383- 1388 (in Chinese).

[27] ZHANG J J, WANG L S, SHU Q Y. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony[J]. Sci. Horticult. , 2007, 114: 104-111.

[28] 周琳,王雁,律春燕,等. 云南野生黄牡丹花色成分的鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(8): 52-54.

ZHOU L, WANG Y, LV C Y, *et al.* Identification of components of flower pigments in petals of *Paeonia lutea* wild population in Yunnan [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2011, 39(8): 52-54 (in Chinese).

[29] SHI Q Q, ZHOU L, WANG Y, *et al.* Transcriptomic analysis of *Paeonia delavayi* wild population flowers to identify differently expressed genes involved in purple-red and yellow petal pigmentation[J]. PLOS ONE, 2015, 10(8): 1-20

[30] 孟丽,周琳,张明珠,等. 一种有效的花瓣总 RNA 的提取方法[J]. 生物技术, 2006, 16(1): 38- 40.

MENG L, ZHOU L, ZHANG M Z, *et al.* An efficient and economic method for preparation total RNA of petals [J]. Biotechnology, 2006, 16(1): 38- 40 (in Chinese).

[31] 李志银,刘雅莉,杨慧萍,等. 葡萄风信子转录因子 MaMYB2 的克隆及表达模式分析[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(2): 15-21.

LI Z Y, LIU Y L, YANG H P, *et al.* Identification of a MYB transcription factor and analysis of its expression in grape hyacinths (*Muscari botryoides*) [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(2): 15-21 (in Chinese).

[32] SMITH T F, GAITATZES C, SAXENA K, *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions [J]. Trends. Biochem. Sci. , 1999, 24(5): 181-185.

[33] LARKIN J C, OPPENHEIMER D G, LLOYD A M, *et al.* Roles of the glabrous1 and transparent testa glabra genes in *Arabidopsis trichome* development [J]. Plant Cell, 1994, 6 (8): 1065-1076.

[34] LARKIN J C, WALKER J D, BOLOGNESI-WINFIELD AC, *et al.* Allele-specific interactions between ttg and gl1 during trichome development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 1999, 151(4): 1591-1604.

[35] WALKER A R, DAVISON PA, BOLOGNESI-WINFIELD AC, *et al.* The transparent testa glabra1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein [J]. Plant Cell, 1999, 11(7): 1337-1349.

[36] PAYNE C T, ZHANG F, LLOYD A M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 [J]. Genetics, 2000, 156 (3): 1349-1362.

[37] PARK K, HOSHINO A. A WD40-repeat protein controls proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in the seed coats of the Japanese morning glory [J]. J. Plant Physiol. , 2012, 169: 523-528.

[38] AN XH, TIAN Y, CHEN KQ, *et al.* The apple WD40 protein MdTTG1 interacts with bHLH but not MYB proteins to regulate anthocyanin accumulation [J]. J. Plant Physiol. , 2012, 169(7): 710-717.

[39] BROUN P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis* [J]. Curr. Opin. Plant Biol. , 2005, 8(3): 272-279.

[40] KOES R, VERWEIJ W, QUATTROCCHIO F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [J]. Trends Plant Sci. , 2005, 10(5): 236-242.