

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.02.008

陈凯利, 班文卓, 杜灵娟, 等. 蓝星睡莲花瓣类黄酮分析及花色形成关键基因鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(2): 71-80.

蓝星睡莲花瓣类黄酮分析及 花色形成关键基因鉴定

陈凯利¹, 班文卓¹, 杜灵娟², 周兴华¹, 张雄飞³1. 西南大学 水产学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100;
3. 西南大学 荣昌校区党工委、管委会, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为明确蓝星睡莲(*Nymphaea colorata*)蓝色、白色两种花色花瓣在不同发育时期的类黄酮物质含量、成分及其代谢途径中的关键基因, 本研究采用高效液相色谱法(HPLC)和超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱(UPLC-Triple TOF-MS/MS)技术, 分析了蓝星睡莲 5 个发育时期花瓣的花青苷和黄酮醇苷含量和成分。结果表明, 蓝、白花瓣中类黄酮含量差异明显, 白花花瓣花青苷和黄酮醇苷含量均保持在较低水平, 尤其是在 S4, S5 时期与蓝花达到了显著性差异, 可能是造成蓝白花色差异的物质成因。在蓝星睡莲花瓣中, 两种花色花瓣类黄酮成分相同, 共鉴定出 3 种花青苷和 11 种黄酮醇苷。花青苷为飞燕草素-3-O- β -半乳糖苷、飞燕草素-3-O-(2''-O-没食子酰-6''-O-乙酰- β -半乳糖苷)和飞燕草素-3'-O-(2''-O-没食子酰-6''-O-乙酰- β -半乳糖苷); 黄酮醇苷主要有槲皮素 3-O- α -L-(3''-O-丙二酰)-鼠李糖苷、杨梅素 3-O- α -L-鼠李糖苷、杨梅素 3-O- α -L-(3''-O-乙酰)-鼠李糖苷、槲皮素 3-O- α -L-(3''-O-丙二酰)-鼠李糖苷等。通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术进一步分析了类黄酮代谢途径相关基因在两种花色花瓣中的转录表达情况, 结果表明, 在蓝花花瓣 5 个发育时期, 类黄酮 3'5'-羟化酶基因(*F3'5'H*)、黄酮醇合成酶基因(*FLS*)、二氢黄酮醇 4-还原酶基因(*DFR*)的转录表达变化与花青苷积累趋势一致, 推测其可能是蓝色花瓣花青苷积累的关键结构基因; *F3'5'H* 和糖基转移酶基因(*GT*) 在蓝花中的表达量均明显高于白花, 推测其是造成蓝白花色差异的重要基因。本研究为进一步解析蓝星睡莲花色形成分子机理提供了新的证据, 为睡莲蓝色花分子育种提供了参考。

关键词: 睡莲; 花青苷; 黄酮醇苷; 高效液相色谱;
液质联用; 基因表达

中图分类号: S682.32

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)02-0071-10



Analysis of Flavonoid in Waterlily (*Nymphaea colorata*) Flower Petals and Identification of Key Genes for Flower Color Formation

CHEN Kaili¹, BAN Wenzhuo¹, DU Lingjuan²,
ZHOU Xinghua¹, ZHANG Xiongfei³

收稿日期: 2023-07-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32171863); 重庆市“大学生创新创业训练计划”(重点支持领域)项目(S202110635232)。

作者简介: 陈凯利, 博士, 讲师, 主要从事水产经济动植物分子育种研究。

1. College of Fishery, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;
2. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;
3. Management Committee of Rongchang Campus, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: In order to determine the flavonoid content, components and key genes in the flavonoid metabolic pathway of waterlily (*Nymphaea colorata*) petals at different developmental stages, high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF-MS/MS) were used to analyze the content of anthocyanin and flavonol glycosides in the petals of *N. colorata* in five developmental stages (S1-S5). The results showed that the difference on flavonoid content between blue and white petals was obvious. The content of anthocyanin and flavonol glycosides in white petals remained at a low level, especially in S4 and S5 stages, while the flavonoids of blue petals were significantly higher than that of white. This may be the cause of white and blue color of petal. Three anthocyanins and 11 flavonol glycosides were identified from the petals of *N. colorata*. The flavonoid compositions of blue petals and white petals were the same. The three anthocyanins were delphinidin 3-O- β -galactopyranoside, delphinidin 3-O-(2''-O-galloyl-6''-O-acetyl- β -galactopyranoside), and delphinidin 3'-O-(2''-O-galloyl-6''-O-acetyl- β -galactopyranoside). The flavonol glycosides mainly included quercetin 3-O-galactoside, myricetin 3-O- α -L-(3''-O-malonyl)-rhamnopyranoside, myricetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside, myricetin 3-O- α -L-(3''-O-acetyl)-rhamnopyranoside, and quercetin 3-O- α -L-(3''-O-malonyl)-rhamnopyranoside. Besides, Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to further analyze the expression of genes related to flavonoid biosynthetic pathway. We found that during the five developmental stages of blue flower petals, the genes's transcriptional expression patterns of flavonoid 3'5'-hydroxylase ($F3'5'H$), flavonol synthetase (FLS) and dihydroflavonol 4-reductase (DFR) were consistent with the trend of anthocyanin accumulation, indicating that these genes might be responsible for anthocyanin accumulation in blue petals. Moreover, the expression levels of $F3'5'H$ and glycosyltransferase gene (GT) in blue flowers were much higher than those in white flowers, suggesting that $F3'5'H$ and GT play the roles in the color difference between blue and white flowers in *N. colorata*. This study provides new evidence for further understanding the molecular mechanism of color formation of *N. colorata* flower, and lays a foundation for molecular breeding of blue color flower in waterlily.

Key words: waterlily; anthocyanin; flavonol glycosides; high performance liquid chromatography; LC-MS/MS; gene expression

睡莲(*Nymphaea* spp.)是睡莲科(Nymphaeaceae)睡莲属(*Nymphaea*)多年生浮叶水生观赏草本的统称,50多个种或变种广布在从热带到寒带的各个区域,按其生态型主要分为热带睡莲和耐寒睡莲^[1-2]。睡莲因其多样的花香、花色和独特的花型,广泛应用于园林水景、室内外花卉装饰、鲜切花等。睡莲生长发育对氮、磷等需求量大,根系发达,对水体中的一些重金属如铬、镍有较强的吸附能力,在水体生态修复方面具有较突出的优势^[3-4]。睡莲根茎可入药作为麻醉剂、收敛剂、抗炎剂等治疗疾病,一些种类的花、嫩叶、叶柄可用于餐饮^[5-8]。睡莲属于基部被子植物,是研究植物进化的重要材料^[9-10]。睡莲栽培历史悠久,尤其是在西方文明中被视为圣洁的象征^[11]。因此,睡莲集观赏、生态、药用、食用、科研和文化价值于一身,成为水生观赏植物研究的重点和热点。

花色是观赏植物最重要的性状之一^[12],决定了观赏植物的价值。睡莲的花色不但有常见的红、白、黄、紫色系,还有其他植物稀缺的蓝色系,这使其在蓝色花育种方面备受关注^[2, 10-11, 13]。关于睡莲的花色研究,已有报道解析了常见的热带和耐寒睡莲花瓣类黄酮含量、组分与花色的关系,综述了睡莲花色研究进展,为睡莲花色育种研究提供了有力支撑^[2, 10-11, 13-20]。类黄酮是植物花色的主要呈色物质之一,主要包括花青

苷、黄酮醇苷、黄酮类等. 在类黄酮生物合成途径中, 编码查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、黄酮 3-羟化酶(F3H)、类黄酮 3'-羟化酶(F3'H)、类黄酮 3'5'-羟化酶(F3'5'H)、黄酮醇合成酶(FLS)、二氢黄酮醇 4-还原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)、糖基转移酶(GT)等类黄酮生物合成的核心结构基因, 同时, 调控这些结构基因的转录因子 MYB, bHLH 和 WD40 也起到了重要作用^[21-22]. 因此, 研究植物花瓣中类黄酮的组分和含量、花色遗传规律、生物合成途径以及花色关键基因及其功能, 解析花色形成的物质基础、分子机理和基因调控网络, 可为培育花色新品种提供理论参考^[2, 23]. 在花色分子育种方面, 对类黄酮合成途径相关基因进行遗传调控是实现花色改良的主要途径^[22], 如利用基因工程技术进行花色改良培育出了蓝色月季(*Rosa chinensis*)和菊花(*Chrysanthemum* × *moriifolium*)新品种^[24-25].

近年来, 随着对睡莲花色形成分子机理的深入研究, 目前已鉴定了睡莲类黄酮代谢途径的一些关键结构基因如 *F3H*^[26], *GT6*^[27] 和 R2R3 型 MYB 转录因子基因 *MYB6*^[28], 并进行了功能分析. 但是关于蓝星睡莲(*N. colorata*)的类黄酮成分和含量以及花色发育关键基因的深入分析与挖掘, 还鲜见报道. 蓝星睡莲属于广热带亚属睡莲, 有本种蓝色花和天然突变体白色花两种花色, 基因组小, 为 2 倍体, 是研究睡莲蓝色花形成的理想模式材料^[10]. 本研究以蓝、白两种花色的蓝星睡莲为试材, 解析不同花发育时期花瓣类黄酮成分和含量, 同时对类黄酮生物合成途径核心基因进行实时定量 PCR(RT-qPCR)分析, 鉴定蓝星睡莲蓝色花形成和蓝白花色差异的关键基因, 为进一步阐明蓝星睡莲类黄酮生物合成机制奠定基础, 同时也为睡莲蓝色花分子育种提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蓝花和白花蓝星睡莲种球购于南京艺莲苑, 种植于西南大学水产学院水生植物资源圃. 材料采样时间为 7—8 月, 分别采集 5 个发育时期的花瓣. 花瓣的 5 个发育时期划分以花瓣着色程度为依据, S1: 未着色的花瓣; S2: 花瓣中部以上着色; S3: 花瓣全部呈紫红色; S4: 花瓣全部为蓝紫色但未开放; S5: 花开放第 1 天. 将试验材料置于液氮中速冻后放于 -80 °C 超低温冰箱中保存备用.

1.2 蓝星睡莲不同发育时期花青苷和黄酮醇含量与成分的测定

新鲜蓝星睡莲花瓣经液氮研磨后采用提取液提取花青苷和黄酮醇苷, 提取方法参照 Wu 等^[13]的方法. 花青苷和黄酮醇苷含量采用 Agilent 1260 (Agilent, 美国)测定. 梯度洗脱程序为: 流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为乙腈; 0 min 5% B, 6 min 45% B, 9 min 90% B, 9.1 min 10% B, 13 min 10% B, 13.5 min 5% B, 20 min 5% B. 流速 0.5 mL/min, 进样量为 7 μ L. 色谱柱为 Agilent TC-C18 column (5 mm, 4.6 mm × 250 mm), 柱温 35 °C, 样品室温度 10 °C. 以矢车菊素 3-O-葡萄糖苷(Cyanidin 3-O-glucoside, Cy3G)和芦丁(Rutin)作为标准品. 以每克鲜质量(FW)中含有的毫克数为单位计算, 3 个生物学重复, 使用 SPSS 20.0 对数据进行 Turkey 方差分析, 显著性分析水平为 $p < 0.05$.

花青苷和黄酮醇苷成分采用 UPLC-Triple-TOF/MS 系统. AcquityTM ultra 型高效液相色谱仪 (Waters, 美国)和 Triple TOF 5600⁺ 型飞行时间质谱以及电喷雾离子源 (AB SCIEX, 美国)系统进行测定, 具体方法参考文献[22]. 仅梯度洗脱程序稍加改动: 流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为乙腈; 0 min 5% B, 6 min 45% B, 7 min 90% B, 7.1 min 10% B, 10 min 10% B, 10.2 min 5% B, 13 min 5% B. 流速 0.4 mL/min, 进样量为 7 μ L. 花青苷和黄酮醇苷物质通过质谱结果, 结合软件数据库搜索、出峰顺序以及对应参考文献^[5, 10, 13-17, 20]进行成分鉴定.

1.3 蓝星睡莲不同发育时期总 RNA 提取及 cDNA 合成

蓝色、白色蓝星睡莲 5 个发育时期的花瓣经液氮充分研磨后, 使用 Omega Plant RNA Kit (Omega, 美国)提取 Total RNA. 获得的 Total RNA 经质检合格后, 采用反转录试剂 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit (Takara, 日本)进行反转录, 获得相应的 cDNA 后分别稀释 5 倍后用于荧光定量

PCR 试验.

1.4 蓝星睡莲花色形成过程中相关基因表达分析

分别以类黄酮生物合成途径相关基因(*CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*, *F3'H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *GT*, *MYB1*, *bHLH1*, *WD40*)和内参基因 *NcACT11* 的 RT-qPCR 引物(表 1), 分析它们在蓝星睡莲不同花发育时期(S1~S5)的转录表达情况. RT-qPCR 采用 ABI QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems(ABI, 美国)测定. 荧光染料为 NovoStart® SYBR qPCR Super Mix Plus(novoprotein, 中国), 反应体系和反应程序按说明书进行. 试验设置 3 个生物学重复, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量, 使用 SPSS 20.0 对数据进行 Turkey 方差分析, 显著性分析水平为 $p<0.05$.

表 1 本文荧光定量 PCR 所用相关引物

基因编号	基因名称	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
LOC116266774	<i>NcACT11</i>	GTCTGGATTGGAGGGTCTA	CTCATCATATTCTGCCTTCGC
LOC116265581	<i>NcCHS</i>	TGGAGGAGGCGATGTTGGAGAA	CATGGAAGTCGGCACCAGGAAG
LOC116256153	<i>NcCHI</i>	GGCTCCTTGACCATTGCGTTCT	CCGTGTTTCCCGATGACTGACT
LOC116253956	<i>NcF3H</i>	GAAC TTCTACCCGAGGTGCC	CCCGTTGCTCAAGAAGTGAG
LOC116261229	<i>NcFLS</i>	GTACGGCACCAGGCTTCAGAA	ACGGCGAAGTTGATGCGAGAA
LOC116247785	<i>NcF3'H</i>	GCACGGATTTGGGAACGACAAC	CGGTGACGGAGGAGTTCTACGA
LOC116264369	<i>NcF3'5'H</i>	GGCGATGGCTGAGTTGCTCTAT	GGCGTATGTCCGATTCTCTCCAG
LOC116268364	<i>NcDFR</i>	GCTGACCTGTTGCGGAGGAAGT	AGTG GTTGTCTTTCGCGGCTTGG
LOC116260841	<i>NcANS</i>	CTTGATAATCCATGTGGGCG	CCTCACCTTCTCCTTGTTTC
LOC116258810	<i>NcGT</i>	CCAGCCGACCAACTGTAGATA	GCACTCTCTTTCATTCGT
LOC116263260	<i>NcMYB1</i>	GCTGTAGACTGAGATGGCTGAATT	CAGGCTCGGCACTTGAATCC
LOC116265702	<i>NcbHLH1</i>	GCGATGGCAACCAGCAGTC	CGTGAGGAAAGCATACAACAGTCT
LOC116261468	<i>NcWD40</i>	AAGAGGGACCCCAGGTACATT	CTGTTCGGCATCTCCCAGATAAG

2 结果与分析

2.1 蓝星睡莲不同发育时期花瓣花青苷和黄酮醇苷含量

采用高效液相色谱法对两种花色蓝星睡莲 5 个发育时期花瓣(S1~S5, 图 1)的花青苷、黄酮醇苷含量进行了测定. 结果表明, 蓝、白花瓣花青苷和黄酮醇苷在各个时期的成分一致. 蓝、白蓝星睡莲花瓣除在 S1 时期无花青苷积累, 其他时期均检出花青苷, 其含量均呈现出先升高后降低的趋势(图 2a). 具体地讲, 在未着色的 S1 时期未检测到花青苷, 随着花发育进程, 花青苷在 S2 时期开始积累, 花瓣呈蓝紫色; 花青苷从顶部逐渐向基部扩展, 蓝花花瓣花青苷含量在 S3 时期达到最大值(0.015 mg/g FW), 花色仍为蓝紫色; 在 S4 和 S5 时期, 花青苷含量逐渐降低, 花瓣呈蓝色. 蓝花花瓣花青苷含量在 S3~S5 时期无显著性差异, 但与其他时期均有显著性差异. 白花花瓣花青苷含量在 S4 时期达到最大值, 仅 0.040 mg/g, 5 个时期的花青苷含量无显著性差异. 在着色的花瓣中, 除 S2 时期, 蓝花花瓣花青苷含量均显著高于白花.

同时测定了两种颜色花瓣黄酮醇苷含量, 结果表明, 随着花发育进程, 蓝星睡莲蓝花花瓣黄酮醇苷含量呈先缓慢升高后快速上升的趋势, 在 S5 时期达到最大值(1.327 mg/g), 与其他时期花瓣黄酮醇苷含量均有显著性差异. 而白花花瓣黄酮醇苷含量在 5 个花发育时期变化不大, 含量均在 0.100 mg/g 左右浮动. 蓝、白花瓣的黄酮醇苷含量在 S1, S2 时期相当, 但在 S3 时期前者比后者增加了 1 倍, 到 S4, S5 时期, 蓝花花瓣黄酮醇苷含量与白花的均呈现出显著性差异, 在 S5 时期, 蓝花是白花的 10 倍(图 2b).

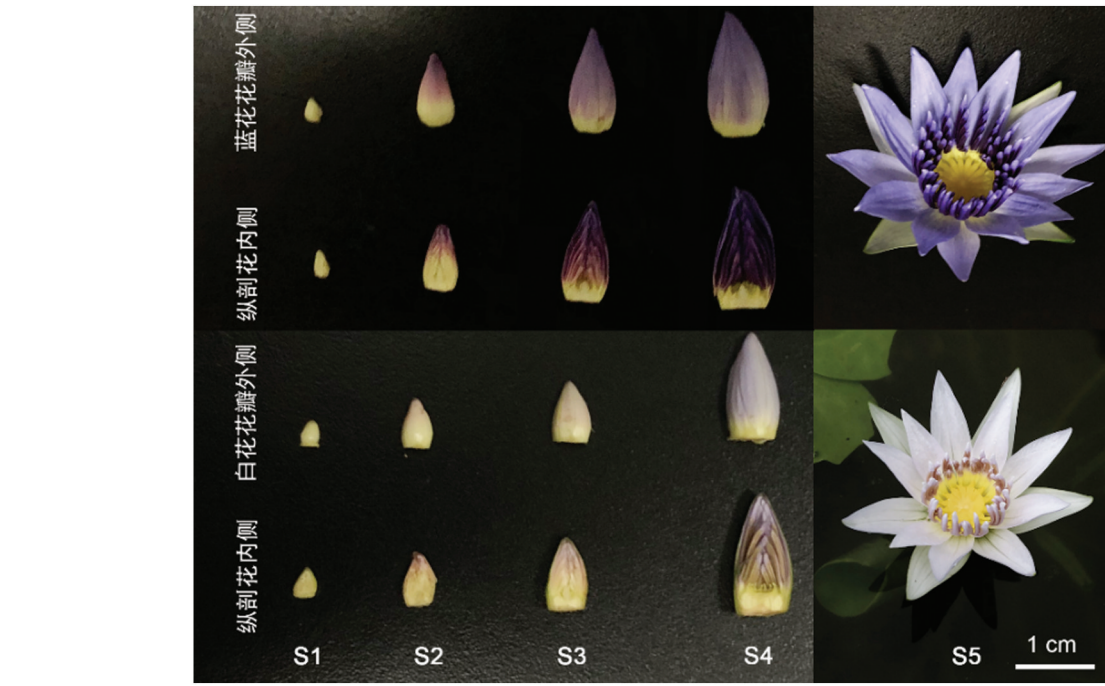


图 1 蓝星睡莲 (*Nymphaea colorata*) 5 个发育时期花朵 (S1~S5) 的形态

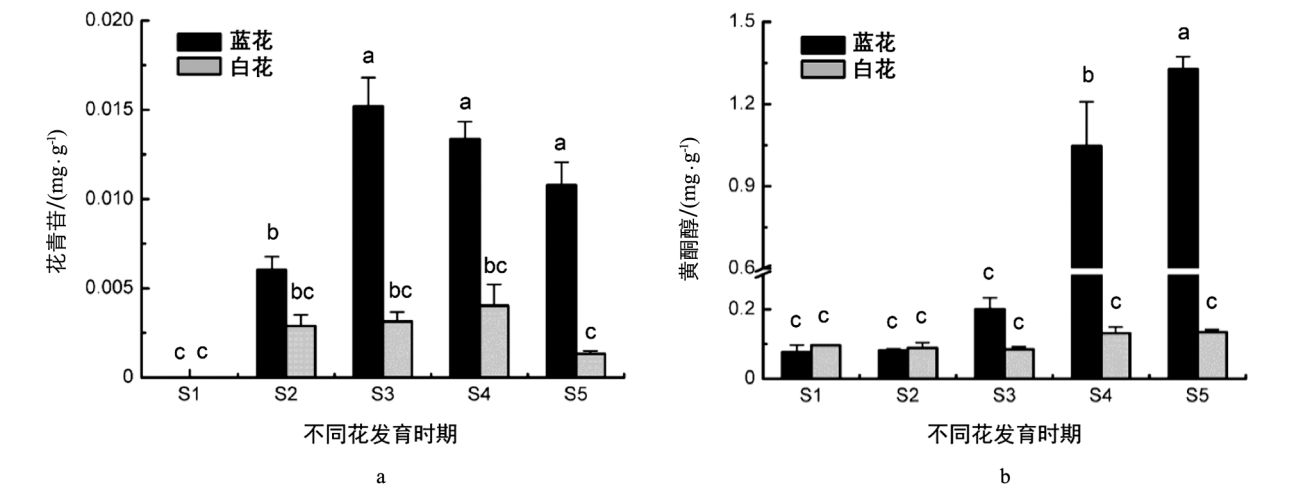


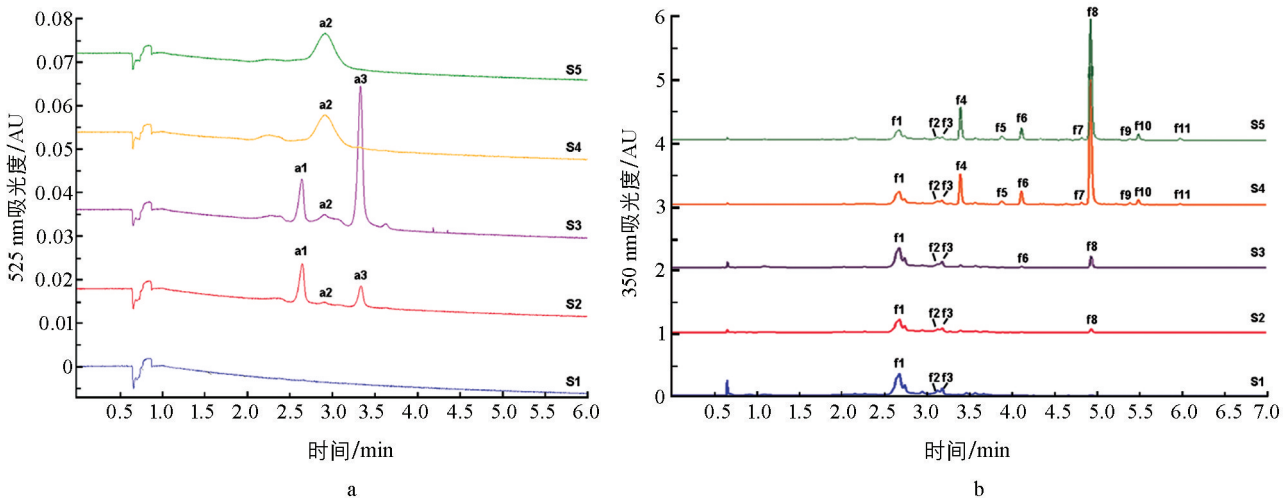
图 2 HPLC 测定蓝星睡莲 5 个发育时期花瓣的花青苷和黄酮醇苷质量分数

2.2 蓝星睡莲不同发育时期花青苷和黄酮醇苷成分分析

通过 UPLC-Triple-TOF/MS 系统测定了花瓣花青苷和黄酮醇苷的主要成分, 在正离子模式下, 共推定了蓝星睡莲花瓣中的花青苷主要有 3 种(图 3a, 表 2, a1~a3). 花瓣在 S1 时期无花青苷积累, 在 S2,S3 时期主要呈色花青苷为 a1 飞燕草素-3-O-β-半乳糖苷(delphinidin 3-O-β-galactopyranoside, Dp3Ga), 其次为 a3 飞燕草素-3-O-(2''-O-没食子酰-6''-O-乙酰-β-半乳糖苷)(delphinidin 3-O-(2''-O-galloyl-6''-O-acetyl-β-galactopyranoside), Dp3galloyl-acetyl-Ga); 在 S4 和 S5 时期, 花青苷 a1 和 a3 含量明显减少, 主要呈色花青苷为 a2 飞燕草素-3'-O-(2''-O-没食子酰-6''-O-乙酰-β-半乳糖苷)(delphinidin 3'-O-(2''-O-galloyl-6''-O-acetyl-β-galactopyranoside), Dp3'galloyl-acetyl-Ga)(图 3a, 表 2).

在负离子模式下, 在蓝星睡莲花瓣中共鉴定出 11 种黄酮醇苷(图 3b, 表 2, f1~f11), 主要为杨梅素、槲皮素和山奈酚的衍生物. 组分 f1~f3 在所有时期的花瓣中均存在, 其中组分 f1 槲皮素 3-O-半乳糖苷(quercetin

3-*O*-galactoside, Qu3Ga)是 S1~S3 时期的主要黄酮醇苷。随着花发育进程,其他组分也逐渐被检出。在花发育后期 S4,S5 时期,其主要黄酮醇苷为组分 f8 杨梅素 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-丙二酰)-鼠李糖苷(myricetin 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-malonyl)-rhamnopyranoside, My3malonyl-Rh),其次是组分 f4 杨梅素 3-*O*- α -*L*-鼠李糖甘(myricetin 3-*O*- α -*L*-rhamnopyranoside, My3Rh)、组分 f6 杨梅素 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-乙酰)-鼠李糖苷(myricetin 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-acetyl)-rhamnopyranoside, My3acetyl-Rh)、组分 f1 Qu3Ga、f10 槲皮素 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-丙二酰)-鼠李糖苷(quercetin 3-*O*- α -*L*-(3''-*O*-malonyl)-rhamnopyranoside, Qu3malonyl-Rh)。



S1~S5 为花瓣的 5 个花发育时期; a1~a3 表示花青苷组分, f1~f11 表示黄酮醇苷组分。

图 3 蓝星睡莲蓝色花瓣花青苷(a)和黄酮醇苷(b)色谱图

表 2 蓝星睡莲花瓣花青苷和黄酮醇苷质谱参数及推断结构

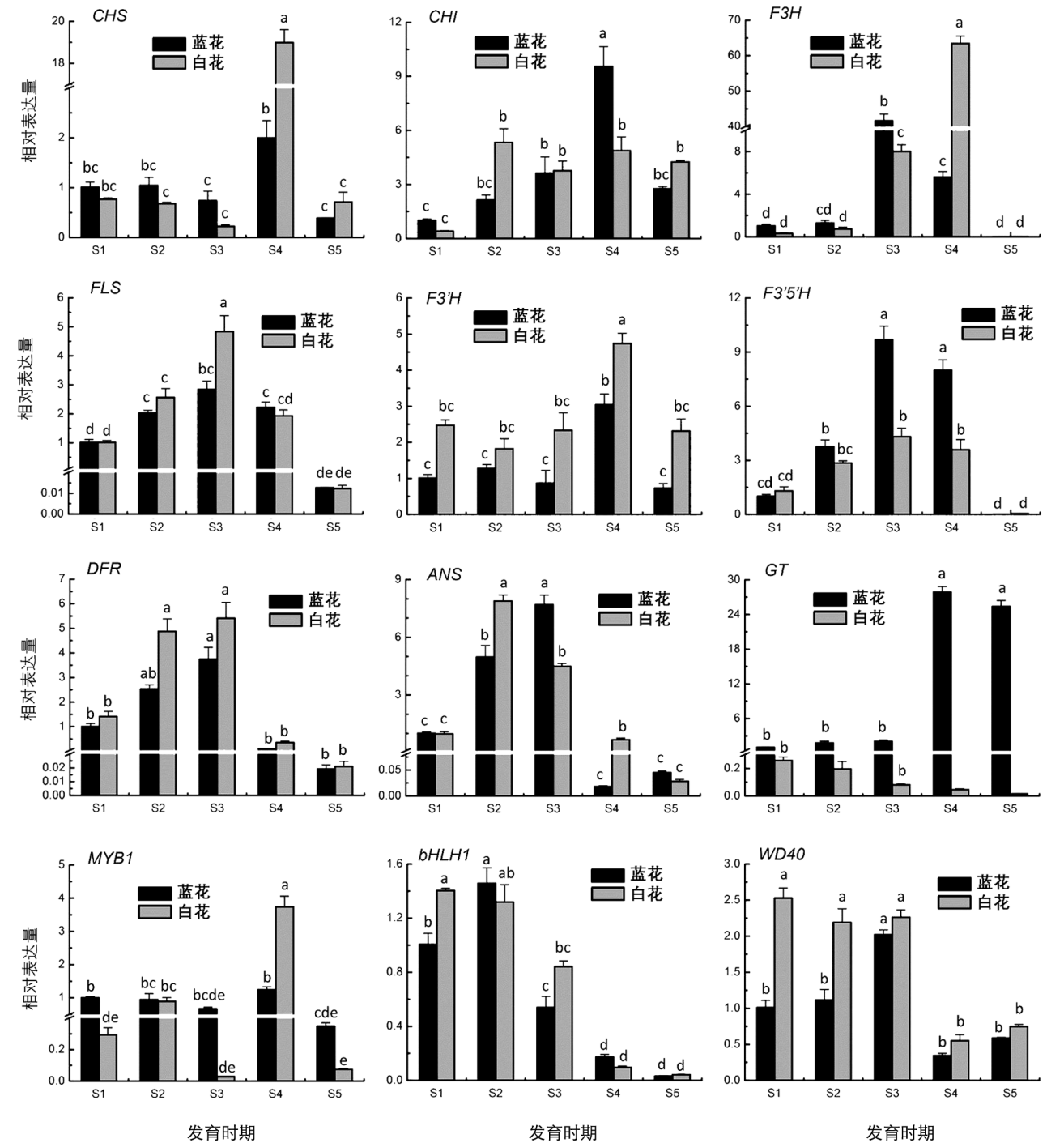
组分	保留时间/ min	<i>m/z</i>		推定结果	参考文献
		母离子[M] ⁺	主要碎片离子		
a1	2.64	463.051 3	303.013 4	飞燕草素-3- <i>O</i> - β -半乳糖苷	[13]
a2	2.90	659.115 3	303.013 8	飞燕草素-3'- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -没食子酰-6''- <i>O</i> -乙酰- β -半乳糖苷)	[10][13][15][16]
a3	3.40	659.125 7	303.050 1	飞燕草素-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -没食子酰-6''- <i>O</i> -乙酰- β -半乳糖苷)	[13][15][16]
f1	2.67	463.057 4	301.000 3	槲皮素 3- <i>O</i> -半乳糖苷	[14]
f2	3.13	479.085 1	316.021 7	杨梅素 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -半乳糖苷	[13][15]
f3	3.18	463.055 1	300.998 7	槲皮素 7- <i>O</i> -半乳糖苷	[13][15]
f4	3.40	463.089 5	316.022 0	杨梅素 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -鼠李糖苷	[5][13][16][17]
f5	3.88	505.101 2	316.023 4	杨梅素 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(2''- <i>O</i> -乙酰)-鼠李糖苷	[13][15][16]
f6	4.16	505.101 2	316.022 0	杨梅素 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(3''- <i>O</i> -乙酰)-鼠李糖苷	[5][13][15]
f7	4.70	489.106 2	300.028 1	槲皮素 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -(3''- <i>O</i> -乙酰)- α - <i>L</i> -鼠李糖苷	[5][13][15][16][20]
f8	4.88	547.115 1	316.022 6	杨梅素 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(3''- <i>O</i> -丙二酰)-鼠李糖苷	[13]
f9	5.28	699.128 8	574.114 5, 316.023 2	杨梅素 3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -没食子酰-6''- <i>O</i> -丙二酰- β -半乳糖苷)	[13]
f10	5.51	531.119 2	300.028 4	槲皮素 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(3''- <i>O</i> -丙二酰)-鼠李糖苷	[13]
f11	6.03	515.123 3	284.033 3	山奈酚 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(3''- <i>O</i> -丙二酰)-鼠李糖苷	[13]

注: S1~S5 为花瓣的 5 个花发育时期; a1~a3 表示花青苷组分, f1~f11 表示黄酮醇苷组分。

2.3 RT-qPCR 分析蓝星睡莲不同发育时期类黄酮合成途径基因的表达变化

为了探索蓝星睡莲花青苷和黄酮醇苷含量变化与物质合成途径相关基因表达的关系,依据本研究花青

苷和类黄酮醇苷分析结果与课题组前期转录组数据, 本研究选择了类黄酮生物合成途径中的编码核心酶和调控蛋白的基因进行转录表达分析。结果表明, *F3'5'H*, *FLS*, *DFR* 随着蓝色花瓣发育进程均呈现出逐渐升高, 在 S3 时期达到峰值, 然后下降的趋势, 与其花青苷积累变化趋势相似。此外, *F3'5'H* 和 *GT* 在蓝色蓝星睡莲花瓣中的表达量均高于白色种, *F3'5'H* 和 *GT* 分别在蓝色花瓣 S3, S4 时期和 S4, S5 时期的表达量显著高于其他时期, 而 *F3'H*, *DFR* 则在白色花瓣中的表达量略高于蓝色种 (图 4)。



S1~S5 为花瓣的 5 个花发育时期; *NcACT11* 为内参基因, 每列代表 3 次生物学重复的平均值, 误差线表示平均结果的标准误 (SE)。方差分析采用 Turkey 统计方法, 小写字母不同表示基因在不同发育时期蓝白花瓣中的表达在 $p < 0.05$ 水平有显著差异。

图 4 类黄酮合成途径结构基因和转录因子基因在蓝星睡莲 5 个花发育时期花瓣中的转录表达分析

3 讨论与结论

花瓣的呈色是多因素综合的结果,其中色素种类和含量是最主要的因素^[12, 22-23, 29]. 本研究中,蓝星睡莲不同花发育时期花色出现变化,在 S2~S3 时期花瓣呈蓝紫色,主要呈色花青苷为 Dp3Ga,其次为 Dp3galloyl-acetyl-Ga;在 S4~S5 时期花瓣呈蓝色,主要呈色花青苷为 Dp3'galloyl-acetyl-Ga. Zhu 等^[15]认为热带睡莲花瓣呈蓝紫色主要是因为飞燕草素 3 位被酰基化糖苷修饰,而呈蓝色则是飞燕草素 3'位发生酰基化糖苷修饰. 在 S2,S3 时期,正是由于飞燕草素 3 位发生了糖苷和酰基化糖苷的修饰,导致花瓣主要呈蓝紫色;在 S4,S5 时期,主要是飞燕草素 3'位发生酰化糖苷修饰,而使花瓣主要呈蓝色. 这与朱满兰^[30]对 35 种热带睡莲花青苷成分的分析结果一致,该研究结果认为热带蓝色系睡莲大部分只有 Dp3Ga,少数品种以 Dp3'Ga 为主, Dp3Ga 次之,而蓝星睡莲属于这其中的少数品种.

本研究在蓝星睡莲花瓣中只检出了 1 种花青素苷元即飞燕草素,但其衍生物花青苷有 3 种,其中 S4,S5 时期的主要呈色物质为 Dp3'galloyl-acetyl-Ga,与先前报道的结果一致^[10]. 本研究细化了蓝星睡莲花色发育过程,在该物种中检测到了另外 2 种花青苷物质 Dp3Ga 和 Dp3galloyl-acetyl-Ga,它们在其他热带睡莲中也有报道^[13, 15]. 蓝星睡莲花瓣黄酮醇苷以杨梅苷为主,达 6 种;其次是槲皮苷,共 4 种;只检测到了 1 种山奈酚苷. 朱满兰^[30]认为,在热带蓝色系睡莲中,绝大多数品种以槲皮苷型色素为主,少数以山奈酚苷为主,极少部分以杨梅苷为主;而本研究中,在花瓣发育过程中,黄酮醇苷的主要成分由前期以槲皮苷为主逐渐转变为后期以杨梅苷为主,这说明共色素黄酮醇苷的种类和含量也随花色发育进程而发生变化.

在类黄酮含量方面,蓝星睡莲花瓣着色从顶端开始向基部蔓延,蓝花花青苷积累随花发育进程出现先稳步上升后逐渐降低的趋势,在 S3~S5 时期显著高于白花品种;在含量差异最大的 S3 时期,蓝花花瓣花青苷含量比白花高约 50 倍. 黄酮醇苷作为花青苷的共色素,可以提升植物的显色^[31]. 本研究中,蓝星睡莲蓝花花瓣黄酮醇含量随花发育进程逐渐增加,其中,在 S4,S5 时期急剧增加,显著高于同时期的白花花瓣. 在蓝花花瓣中,花青苷和黄酮醇苷含量和主要呈色物质随发育进程而出现变化,从而导致花色也随之改变,而在白花花瓣中,虽在 S2~S5 时期检测到了花青苷,但含量显著低于蓝花;此外,白花花瓣中的黄酮醇苷含量在 5 个花发育时期变化不大,在 0.100 mg/g 附近轻微浮动,尤其是在 S4~S5 时期,含量远低于蓝花花瓣. 因此,花青苷成分变化是引起蓝花花色变化的直接原因,而花青苷含量的巨大差异是造成蓝、白花色差异的主要原因,黄酮醇苷含量差异加剧了这种花色差异.

研究表明,CHS, CHI, F3H, FLS, F3'H, F3'5'H, DFR, ANS, GT 这一系列催化酶和转录复合物 MYB-bHLH-WD40 在类黄酮合成路径中发挥重要作用^[21-22]. 本研究中,通过 RT-qPCR 分析编码这些酶的结构基因和调控基因在蓝、白色花瓣中的表达情况,结果发现,随着花发育进程的推进, F3'5'H, FLS, DFR 表达变化与蓝色花瓣花青苷积累变化趋势一致,推测其可能是蓝色花形成的关键基因. 通过对蓝星睡莲 MYB1-bHLH1-WD40 转录复合物进行转录表达分析,发现它们与花色发育关系不大,可能不是影响蓝星睡莲花色发育的调控因子,具体的关键调控因子还有待进一步挖掘. 吴倩^[27]和田洁^[28]推定 GT6 和 MYB6 是“泰国王”睡莲花色形成的关键结构基因和转录因子. 在葡萄风信子亚美尼亚(*Muscari armeniacum*)蓝色花发育过程中, R2R3-MYB 转录因子基因 MaAN2 与 MaDFR 和 MaANS 协同表达,且与花瓣花青苷积累趋势一致,表明它们可能是葡萄风信子花瓣花色发育的关键基因^[32],进一步的研究表明转录因子 MaMybA, MaAN2 与 MabHLH1 互作靶向 MaDFR 和 MaANS,协作调控蓝色花瓣花青苷的积累^[33].

Zhang 等^[10]通过对蓝星睡莲盛开的(等同于本研究中的 S5 时期)蓝白花瓣转录组测序,推测 ANS 和 GT 可能是造成蓝白花色差异的关键基因. 本研究通过动态检测类黄酮合成途径中关键基因在不同发育时期的蓝白花瓣中的表达,结果表明, ANS 在蓝白花瓣各时期的表达差异不明显,而 F3'5'H 和 GT 在蓝花中的表达量均高于白花, DFR 和 F3'H 则刚好相反,推测在蓝花中表达上调的 F3'5'H 将底物向飞燕草素

方向分流,且 *GT* 将不稳定的花青素转变为稳定的花青苷;而在白花中上调的 *DFR* 将底物向无色花青素方向催化, *F3'H* 将底物向黄酮醇方向催化,且 *GT* 在白花中低表达,导致白花花青苷和黄酮醇苷积累减弱,花色减淡. Liu 等^[34]通过研究不同花色毛茛的基因表达情况发现,红色花品种中 *F3H*, *F3'H*, *3GT*, *5GT* 和 *FMT2*(类黄酮-*O*-甲基转移酶 2 基因)上调表达,而紫色花品种中, *F3'5'H* 和 *3MAT*(花色苷 3-*O*-葡萄糖苷-6-*O*-丙二酰基转移酶基因)转录水平升高,说明不同花色毛茛中的高表达基因不同. 葡萄风信子亚美尼亚蓝白花色差异的主要原因是白色葡萄风信子 *DFR* 低表达和 *FLS* 高表达, *FLS* 强势竞争底物导致白色葡萄风信子无法合成飞燕草素^[35]. 由此可见,植物花色丰富,花色形成差异的原因也因物种不同而不同. 因此,只有有针对性地解析不同物种花色形成的机理,总结花色发育规律,才能更好地为花色分子育种提供可靠的理论参考.

参考文献:

- [1] 黄国振,邓惠勤,李祖修,等. 睡莲 [M]. 北京:中国林业出版社,2009.
- [2] 吴倩,张会金,王晓晗,等. 睡莲花色研究进展 [J]. 园艺学报,2021,48(10):2087-2099.
- [3] CHOO T P, LEE C K, LOW K S, et al. Accumulation of Chromium (VI) from Aqueous Solutions Using Water Lilies (*Nymphaea spontanea*) [J]. Chemosphere, 2006, 62(6): 961-967.
- [4] ZAHEDI R, DABBAGH R, GHAFOURIAN H, et al. Nickel Removal by *Nymphaea alba* Leaves and Effect of Leaves Treatment on the Sorption Capacity: a Kinetic and Thermodynamic Study [J]. Water Resources, 2015, 42(5): 690-698.
- [5] AGNIHOTRI V K, ELSOHLY H N, KHAN S I, et al. Antioxidant Constituents of *Nymphaea caerulea* Flowers [J]. Phytochemistry, 2008, 69(10): 2061-2066.
- [6] PARIMALA M, SHOBA F G. In Vitro Antimicrobial Activity and HPTLC Analysis of Hydroalcoholic Seed Extract of *Nymphaea nouchali* Burm. F [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14: 361.
- [7] ANAND A, KOMATI A, KATRAGUNTA K, et al. Phytometabolomic Analysis of Boiled Rhizome of *Nymphaea nouchali* (Burm. F.) Using UPLC-Q-TOF-MS^E, LC-QqQ-MS & GC-MS and Evaluation of Antihyperglycemic and Antioxidant Activities [J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128313.
- [8] YIN D D, YUAN R Y, WU Q, et al. Assessment of Flavonoids and Volatile Compounds in Tea Infusions of Water Lily Flowers and Their Antioxidant Activities [J]. Food Chemistry, 2015, 187: 20-28.
- [9] POVILUS R A, DACOSTA J M, GRASSA C, et al. Water Lily (*Nymphaea thermarum*) Genome Reveals Variable Genomic Signatures of Ancient Vascular Cambium Losses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(15): 8649-8656.
- [10] ZHANG L S, CHEN F, ZHANG X T, et al. The Water Lily Genome and the Early Evolution of Flowering Plants [J]. Nature, 2020, 577(7788): 79-84.
- [11] 李淑娟,尉倩,陈尘,等. 中国睡莲属植物育种研究进展 [J]. 植物遗传资源学报,2019,20(4): 829-835.
- [12] ZHAO D Q, TAO J. Recent Advances on the Development and Regulation of Flower Color in Ornamental Plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 261.
- [13] WU Q, WU J, LI S S, et al. Transcriptome Sequencing and Metabolite Analysis for Revealing the Blue Flower Formation in Waterlily [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 1-13.
- [14] 朱满兰,王亮生,张会金,等. 耐寒睡莲花瓣中花青素苷组成及其与花色的关系 [J]. 植物学报,2012,47(5): 437-453.
- [15] ZHU M L, ZHENG X C, SHU Q Y, et al. Relationship between the Composition of Flavonoids and Flower Colors Variation in Tropical Water Lily (*Nymphaea*) Cultivars [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34335.
- [16] FOSSEN T, ANDERSEN Ø M. Delphinidin 3'-Galloylgalactosides from Blue Flowers of *Nymphaea caerulea* [J]. Phytochemistry, 1999, 50(7): 1185-1188.
- [17] FOSSEN T, ÅGE FRØYSTEIN N, ANDERSEN Ø M. Myricetin 3-Rhamnosyl(1→6)Galactoside from *Nymphaea x marliacea* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(7): 1997-2000.

- [18] FOSSEN T, LARSEN Å, ANDERSEN Ø M. Anthocyanins from Flowers and Leaves of *Nymphaea × marliacea* Cultivars [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(5): 823-827.
- [19] FOSSEN T, LARSEN P, KIREMIRE B, et al. Flavonoids from Blue Flowers of *Nymphaea caerulea* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(8): 1133-1137.
- [20] HSU C L, FANG S C, YEN G C. Anti-Inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Flowers of *Nymphaea mexicana* Zucc [J]. *Food & Function*, 2013, 4(8): 1216-1222.
- [21] ZHANG Y, BUTELLI E, MARTIN C. Engineering Anthocyanin Biosynthesis in Plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 19: 81-90.
- [22] 陈凯利. 葡萄风信子 MYB 和 bHLH 转录因子对花青苷合成的调控研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [23] 戴思兰, 洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(3): 529-542.
- [24] NODA N, YOSHIOKA S, KISHIMOTO S, et al. Generation of Blue Chrysanthemums by Anthocyanin B-Ring Hydroxylation and Glucosylation and Its Coloration Mechanism [J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1602785.
- [25] TANAKA Y, BRUGLIERA F, CHANDLER S. Recent Progress of Flower Colour Modification by Biotechnology [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(12): 5350-5369.
- [26] CHAIPANYA C. Isolation and Expression Analysis of the Flavanone 3-Hydroxylase Genes in Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), Waterlily (*Nymphaea* sp.) and Transient Silencing in Waterlily [J]. *Chiang Mai Journal of Science*, 2017, 44(2): 427-437.
- [27] 吴倩. 睡莲类黄酮糖基转移酶基因克隆及功能分析 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2018.
- [28] 田洁. 睡莲花瓣转录组分析及转录因子 MYB6 的功能研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [29] 安田齐. 花色的生理生物化学 [M]. 傅玉兰译. 北京: 中国林业出版社: 1989.
- [30] 朱满兰. 睡莲花瓣类黄酮成分分析及其花色形成的化学机制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [31] SHI J, SIMAL-GANDARA J, MEI J F, et al. Insight into the Pigmented Anthocyanins and the Major Potential Co-Pigmented Flavonoids in Purple-Coloured Leaf Teas [J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130278.
- [32] CHEN K L, LIU H L, LOU Q A, et al. Ectopic Expression of the Grape Hyacinth (*Muscari armeniacum*) R2R3-MYB Transcription Factor Gene, MaAN2, Induces Anthocyanin Accumulation in Tobacco [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 965.
- [33] CHEN K L, DU L J, LIU H L, et al. A Novel R2R3-MYB from Grape Hyacinth, MaMybA, which is Different from MaAN2, Confers Intense and Magenta Anthocyanin Pigmentation in Tobacco [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 390.
- [34] LIU Y F, ZHANG J H, YANG X H, et al. Diversity in Flower Colorations of *Ranunculus asiaticus* L. Revealed by Anthocyanin Biosynthesis Pathway in View of Gene Composition, Gene Expression Patterns, and Color Phenotype [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(14): 13785-13794.
- [35] LOU Q, LIU Y L, QI Y Y, et al. Transcriptome Sequencing and Metabolite Analysis Reveals the Role of Delphinidin Metabolism in Flower Colour in Grape Hyacinth [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(12): 3157-3164.

责任编辑 王新娟