

蓝色瓜叶菊花青苷在花发育过程中的积累和变化规律

孙 卫^{1,2} 李崇晖^{3,4} 王亮生³ 戴思兰¹

(1 北京林业大学园林学院 2 乌鲁木齐市植物园 3 中国科学院植物研究所北京植物园 4 中国科学院研究生院)

摘要:蓝色瓜叶菊开花从初现蕾到花被片完全展开分为 6 个阶段,用高效液相色谱-光电二极管阵列检测技术(HPLC-PAD)和高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)分析不同开花阶段花瓣中花青苷组成及含量。结果表明:在瓜叶菊蓝色品种中含有 3 种以上的飞燕草苷;蓝色瓜叶菊总花青苷和主要的花青苷开花前 4 个阶段表现为线性上升,其后 3 个阶段表现为线性下降。通过分析,认为瓜叶菊花青苷积累与变化规律是植物提高传粉效率的一种适应机制,同时这种机制也符合多年生植物充分利用营养物质的原则。

关键词:瓜叶菊;花青苷;黄酮;花色;HPLC-MS

中图分类号:S682.1 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2010)03-0128-07

SUN Wei^{1,2}; LI Chong-hui^{3,4}; WANG Liang-sheng³; DAI Si-lan¹. **Accumulation and variation of anthocyanins in blue flowers of *Senecio cruentus* at different flowering stages.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(3) 128-134 [Ch, 24 ref.]

1 College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 Urumqi Botanical Garden, Xinjiang 830011, P. R. China;

3 Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 100093, P. R. China;

4 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, P. R. China.

We analyzed the composition and amount of anthocyanins in blue flowers of *Senecio cruentus* at different stages of flower development. High performance liquid chromatography with a photodiode array detector (HPLC-PAD) and HPLC-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) methods were employed for qualitative and quantitative analyses of anthocyanins. The results show that there are more than three kinds of delphinidins in the blue flowers of *S. cruentus*. The amount of anthocyanins in blue flowers of *S. cruentus* quickly increased before the 4th flower stage. The amount of anthocyanin and flower stages were positively correlated, but a negative linear relationship was found after the 4th flower stage. The results indicate that the variation of anthocyanins in blue petals of *S. cruentus* is a mechanism adapted to pollination and complies with the rule of using nutrition in perennial herbage.

Key words *Senecio cruentus*; anthocyanin; flavone; flower color; HPLC-MS

影响花色的因素主要有花瓣所含色素种类和含量。此外,细胞液泡的 pH 值和金属离子、花瓣内部或表皮细胞构造等也是几种主要影响因素^[1]。在诸多因素中,花瓣中花色素含量是大多数花中的主要影响因素。相关研究显示牡丹(*Paeonia suffruticosa*)、芍药(*P. lactiflora*)等植物的花色和花

青苷含量之间存在显著线性相关^[2-3]。

瓜叶菊(*Senecio cruentus*)属于菊科千里光属多年生草本,品种繁多,具有除黄色系以外的主要色系,特别是具有其他花卉中不常有的蓝色。瓜叶菊蓝色花品种还具有纯净单一的特点,利于开展花瓣中花青苷种类与含量变化规律的研究。蓝色花花瓣

收稿日期:2009-05-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30671714)、中国科学院方向性项目(KSCX2-YW-N-043)、林业公益性行业科研专项(200904050)。

第一作者:孙卫,博士生,高级工程师。主要研究方向:花色生理和遗传育种。电话:010-62380563 Email:xjsunwei@yahoo.com.cn 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学园林学院。

责任作者:戴思兰,教授,博士生导师。主要研究方向:园林植物资源和遗传育种。电话:010-82371556-8023 Email:silandai@gmail.com 地址:同上。王亮生,研究员。主要研究方向:植物花色生理。电话:010-62836654 Email:wanglsh@ibcas.ac.cn 地址:100093 北京市香山南辛村中国科学院北京植物园。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

表皮细胞的液泡中飞燕草色素的存在与否往往是判别蓝色花出现与否的一个条件^[4]。已有研究表明:蓝色瓜叶菊花青素代谢途径中苯丙氨酸解氨酶基因(*PAL*)、查尔酮合成酶基因(*CHS*)、查尔酮异构酶基因(*CHI*)、黄烷酮 3'5'-还原酶基因(*F3'5'H*)、二氢黄酮醇 4-还原酶基因(*DFR*)和花青素苷合成酶基因(*ANS*)、糖基化转移酶基因(*GT*)等是蓝色花青苷形成通路中由上而下的主要结构基因,其表达随花朵开放进程而发生变化^[5],但对蓝色瓜叶菊舌状花中花青素含量随花朵开放进程变化的规律始终未见报道。结合基因表达研究,分析蓝色瓜叶菊中飞燕草色素苷含量及其变化规律,对于进一步深入了解基因表达规律与花青苷含量变化的关系,研究蓝色花呈色和基因表达机理具有重要作用。

在生物进化过程中,花色的出现具有很多生理功能。其中以花青苷为主的黄酮类化合物最明显的作用之一是引诱传粉者为花朵授粉,完成繁殖过程,因此在进化中起到重要作用^[6-7]。对于花青苷在花器官发育过程中动态变化及其含量和水平的动态变化目前无相关报道。在植物的生长发育过程中,植物的营养生长和生殖生长是对立统一的过程。一年生植物往往明显分为营养生长和生殖生长 2 个不同阶段。多年生植物在发育到开花阶段时,其营养生长和生殖生长并重,在开花初期营养物质会流向花器官,孕育种子,开花末期会出现营养回流和储藏到根和茎中的现象^[8]。花青苷在瓜叶菊中积累和变化规律属于次生代谢物的变化,其开花从蕾期到末期是否存在营养物质循环利用式的变化,有待于进一步研究。

本研究以瓜叶菊舌状花为研究对象,分析瓜叶菊花发育从蕾期到舌状花完全展开为止,不同开花阶段舌状花花青苷含量的变化规律,进而对瓜叶菊花发育过程中黄酮类化合物含量与生殖器官保护机制和授粉关系进行探讨。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以大花型瓜叶菊品种‘春潮’系列为试验材料,选择长势一致、花蕾均匀的植株,采集现蕾后不同开花阶段的蓝色瓜叶菊舌状花进行花色测定和花青苷分析^[9]。设定瓜叶菊花发育阶段见表 1。

1.2 花色素提取

摘取蓝色瓜叶菊舌状花,立即放在研钵中用液氮快速研磨样品,直到成为细粉末状。待液氮挥发后,用花青苷提取液(*V*(甲醇):*V*(水):*V*(甲酸):

表1 瓜叶菊花发育阶段形态特征
Tab. 1 Phenotype features of *S. cruentus* at different stages of flower development

生长期	舌状花 长度/mm	形态特征
1	0	舌状花尚被苞片包被,未见舌状花花色
2	<5	舌状花初显花色,瓣形针状
3	5~8	舌状花明显伸出苞片,花序呈收缩状
4	8~12	舌状花瓣伸长变宽,花瓣呈立瓣状或稍打开
5	12~18	舌状花基本长成,基本呈打开状
6	16~20	舌状花舒展开放,花瓣平展或下垂

V(三氟醋酸)=70:27:2:1)萃取花青苷,置于低温处放置,浸提 24 h^[3,10-11]。之后用中速滤纸过滤提取液,然后用 0.2 μm 的过滤器(中国上海安谱公司)过滤提取液,过滤后得到待测样品。

1.3 花色素含量测定

采用高效液相色谱(HPLC)测定花青苷成分^[11]。使用 DIONEX 高效液相色谱仪,泵为 P680 型,自动进样器为 UltiMate 3000,紫外可见光检测器为 DAD-100;柱温箱为 TCC-100;色谱柱为 TOSOH 公司的 TSK-GEL 型 ODS-80Ts QA (4.6 mm×150 mm)。

HPLC 测定条件:流动相为 A、B 两相。A 相为 *V*(水):*V*(甲酸):*V*(三氟醋酸)=97.9:2:0.1;B 相为 *V*(水):*V*(乙腈):*V*(甲酸):*V*(三氟醋酸)=62.9:35:2:0.1。流动相在进样前经过超声脱气和 0.2 μm 超微过滤。进样体积为 10 μL,柱温 25℃,流速为 0.8 mL/min。流动相的洗脱梯度为 B 相:0~20 min 30%~53%;20~40 min 53%~53%;40~45 min 53%~30%;45~50 min 30%~30%;分别以检测波长 530 和 350 nm 同时检测花瓣中花青苷和黄酮吸收的峰面积(黄酮醇和黄酮)。采用标准品半定量法计算,以 mg/kg 新鲜花瓣计算花瓣中的花青苷与黄酮类含量^[12]。

标准品为锦葵素 3,5-*o*-葡萄糖苷(malvidin-3,5-di-*o*-glucoside,Mv3G5G)购于法国 Extrasynthese 公司;芦丁(queracetin-3-*o*-rutinoside,rutin)购于中国药品生物制品检定所。

HPLC-MS 分析条件:采用高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用仪(HPLC-ESI-MS)对典型样本进行花青苷和黄酮醇的结构分析。采用 Agilent 1100 LC/MSD Trap VL 液质联用仪进行 HPLC-ESI-MS 分析。液相色谱分析条件同上,分析程序同上。质谱分析条件:电喷雾离子化(ESI),离子阱分析器,正离子检测模式,全质量扫描范围(*m/z*):100~1 600;毛细管电压 3 500 V,喷雾器压力 241.3 kPa,毛细管出口电压 117.9 V,干燥温度 350℃,干燥气(*N*₂)流速 6.0 L/min。用 LC/MSD Trap 软件(5.2 版本)分析质谱结果。

1.4 数据分析及作图

分析不同开花阶段下花青苷含量变化及作图,每个阶段取样 4 个重复,以消除测定误差。应用 Microsoft Office Excel 2003 进行数据整理及作图,建立不同开花阶段与花青苷含量之间的回归关系。

2 结果与分析

2.1 蓝色瓜叶菊中花青苷种类与含量变化规律

应用 HPLC-PAD 测定瓜叶菊花青苷提取液,在检测波长 530 nm 处的色谱图中出现 4 个主要峰(图 1),按保留时间顺序,分别定义为 A1、A2、A3、A4。根据花青苷光谱吸收特征判定检测峰的性质。酰基化花青苷紫外光区有 2 个吸收峰,在可见光区 485 ~ 550 nm 之间有 1 个吸收峰^[1]。而瓜叶菊的花青苷在 280 至 350 nm 之间的吸收峰有 2 个,在 530 nm

左右有 1 个吸收峰^[13]。图 2 中吸收峰与文献[4]显示的瓜叶菊花青苷吸收峰特征吻合,显示 A1 ~ A4 均为花青苷吸收峰。

通过 HPLC 分析得到蓝色瓜叶菊中主要花青苷有 4 种(图 1 ~ 2)。通过质谱分析得到 4 种成分的分子离子和主要特征离子质荷比(图 3 和表 2)。

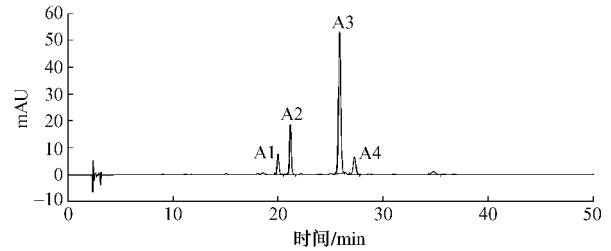


图 1 蓝色瓜叶菊中主要花青苷的含量

Fig. 1 Amounts of major anthocyanins in blue flowers of *S. cruentus*

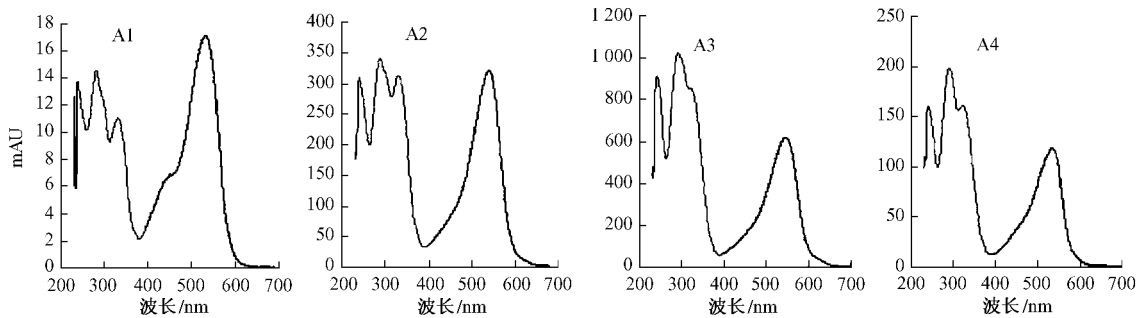


图 2 蓝色瓜叶菊中 4 种主要成分可见光与紫外吸收波长

Fig. 2 Absorption peaks of light and ultraviolet light of four major anthocyanins in blue flowers of *S. cruentus*

花青苷形成的质谱中分子离子常带 1 个氢离子,以 $[M + H]^+$ 形式存在,花青苷种类的区分主要从其质谱中苷元离子 $[Y_0]^+$ 的质荷比判定其花青苷的类型^[13-15]。从 4 个质谱图(见图 3)归纳各花青苷碎片离子(表 2)。花青苷 A1,经一级质谱得到分子离子 m/z 875.1 ($[M + H]^+$),释放出飞燕草苷元(Y_0)特征碎片离子 m/z 303.1 ($[Y_0]^+$),释放出碎片离子 m/z 627.1 ($[M - Glu - Mal + H]^+$)为分子离子减去 1 个己糖基(Glu)和 1 个丙二酰基(Mal)的结果。花青苷 A2,经一级质谱得到分子离子 m/z 1 199.2 ($[M + H]^+$),释放出飞燕草苷特征碎片离

子 m/z 303.1 ($[Y_0]^+$),释放出碎片离子 m/z 163.1 ($[Glu + H]^+$)为己糖基离子, m/z 465.1 ($[Dp + 162 + H]^+$)与飞燕草己糖苷一致。花青苷 A3,经一级质谱得到分子离子 m/z 1 523.2 ($[M + H]^+$),释放出飞燕草苷特征碎片离子 m/z 303.1 ($[Y_0]^+$),释放出碎片离子 m/z 163.1 ($[Glu + H]^+$)为己糖基离子。A4,经一级质谱得到分子离子 m/z 1 507.2 ($[M + H]^+$),释放出飞燕草苷特征碎片离子 m/z 287.1 ($[Y_0]^+$),释放出碎片离子 m/z 163.1 ($[Glu + H]^+$)为己糖基离子。

表 2 瓜叶菊主要花青苷的 HPLC-PAD、HPLC-ESI-MS 分析
Tab. 2 HPLC-PAD and HPLC-ESI-MS analysis of the anthocyanins in *S. cruentus*

组分	保留时间/min	分子离子质荷比(m/z)	碎片离子质荷比(m/z)	参考文献
A1	19.93	875.1	627.1, 551.1, 303.1	[16]
A2	21.09	1 199.2	1 037.2, 875.2, 465.1, 303.1, 163.1	
A3	25.75	1 523.2	1 361.2, 1 119.2, 875.1, 627.1, 551.1, 303.1, 163.1	
A4	27.09	1 507.2	1 345.2, 1 183.2, 859.2, 287.1, 163.1	

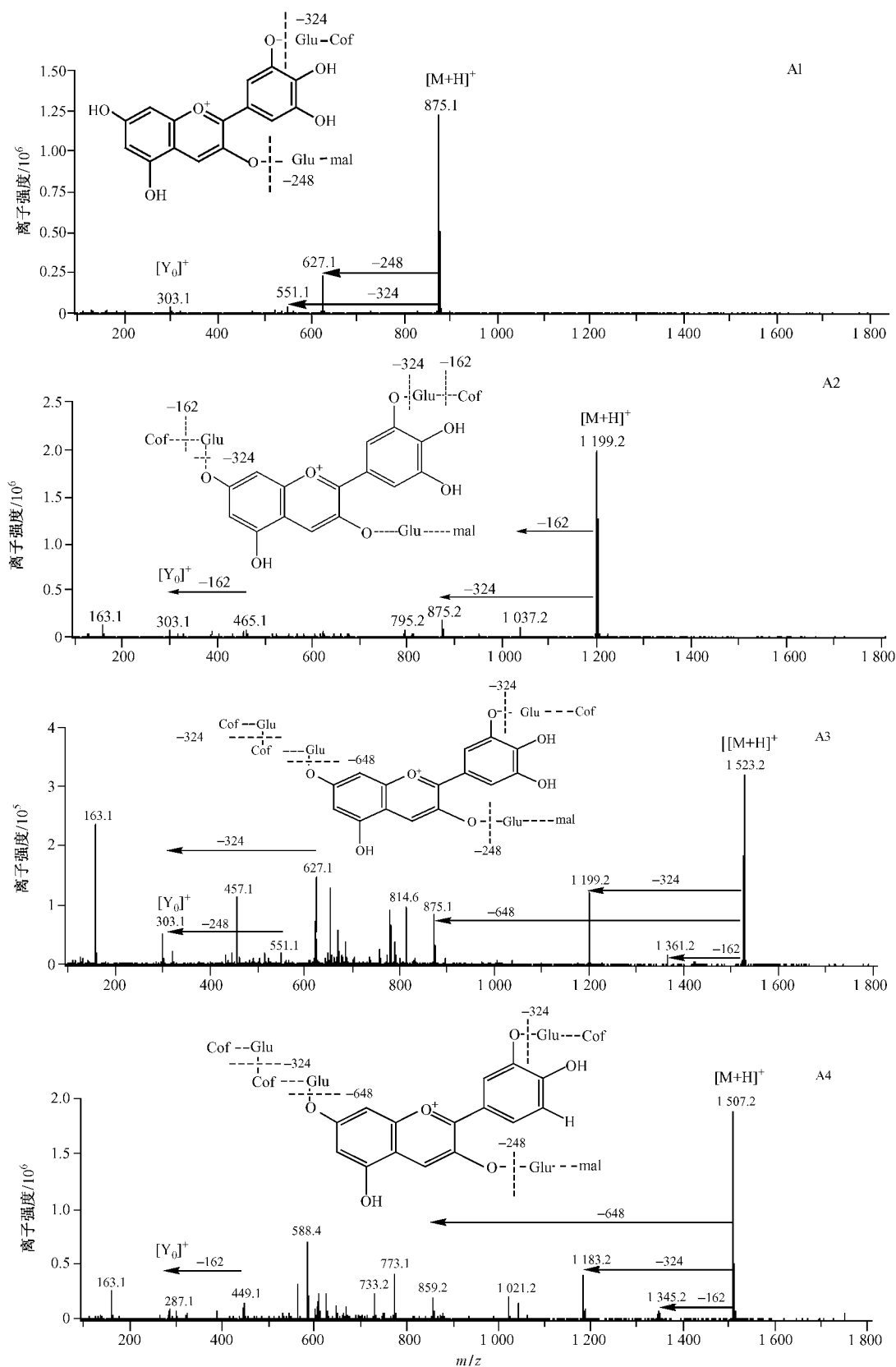


图3 花青苷 A1、A2、A3、A4 的质谱和结构图

Fig.3 Mass spectra and structure of anthocyanin A1 ,A2 ,A3 ,A4

对花青苷 A3 质谱的分析已有报道^[4],其分子离子峰为 m/z 1 523 ($[M+H]^+$),具有飞燕草苷元特征质荷比 303 (Dp),是目前自然存在的最复杂的花青苷成分^[17]。其分子组成以飞燕草苷元 (Dp) 为

核心,带有 4 个糖基、3 个咖啡酰基、1 个丙二酰基。已报道瓜叶菊花青苷均具有花青素苷元为核心,具有糖基、咖啡酰基、丙二酰基修饰的特征^[16,18-19]。根据同一植物中所带有的配基具有相似性,结合紫

外吸收光谱和质谱的碎片离子组成,可以推测 A1、A2、A3 的花青素苷元为飞燕草色素苷元,分别具有配基如表 3。从碎片离子可以看出,A1 的分子离子质荷比在 A2 的碎片离子中出现,A1、A2 的分子离子质荷比均在 A3 的碎片中出现。说明 A1、A2 和 A3 具有很高相似性,在结构上也具有相似性。因为该种植物中糖基化酶和酰基化酶是特有的,在花青苷的代谢途径上不同的位点所带有的糖基和酰基是相对固定的,因此,可以推测 A1 和 A2 的结构与 A3 存在修饰基团数量上的差异,在与花青素苷元结合位点上应当相似。花青苷紫外光吸收波长 2 个峰是受 A 环和 C 环结构不同和酰基化的影响所致,其在可见光区域的吸收是 B 环所致,比较吸收波长可以推定花青苷的结构特点^[16,18]。参考已报道过的 A3 的结构式,结合紫外吸收波长分析,A3 与 A4 由于具有相似的修饰基团,因此可以推断 A4 与 A3 的区别除了花青素苷元不一样外,其他的修饰基团位置应当一致。结合质谱数据和紫外吸收数据,可以得到 A1、A2 的基团组成。A2 与 A3 的区别在于少了 1 个糖基和 1 个咖啡酰基。A1 与 A2 之间也存在 1 个糖基和 1 个咖啡酰基的差别(表 3)。

表 3 蓝色瓜叶菊主要花青苷组成
Tab. 3 Composition of anthocyanins
in blue flowers of *S. cruentus*

	A1 特征离子 质荷比(<i>m/z</i>)	A2 特征离子 质荷比(<i>m/z</i>)	A3 特征离子 质荷比(<i>m/z</i>)	A4 特征离子 质荷比(<i>m/z</i>)
分子离子	875	1 199	1 523	1 507
花青素苷元	303	303	303	287
糖基	324	486	648	648
咖啡酰基	162	324	486	486
丙二酰基	86	86	86	86

2.2 蓝色瓜叶菊开花过程中总花青苷和 A3 含量的变化

根据质谱分析可知,A1、A2、A3 均具有飞燕草色素苷元,属于飞燕草色素苷。依据标准品定量,对 6 个不同发育阶段瓜叶菊舌状花中飞燕草色素苷定量,得知蓝色瓜叶菊中飞燕草色素苷 A1 ~ A3 占总花青苷含量稳定维持在 80% 以上(表 4)。因此蓝色瓜叶菊中飞燕草花青苷是瓜叶菊呈色的主要成分。对瓜叶菊花发育过程中总花青苷的积累量进行统计,发现第 4 阶段总花青苷达到最大值(表 4)。总花青苷含量在最高水平(第 4 阶段)时为 2 283.50 mg/kg,在第 6 阶段时为 1 111.25 mg/kg,末花期的总花青苷含量维持在最高水平的 50% 左右。

对花发育前 4 个阶段和后 3 个阶段的总花青苷含量变化进行分析,发现其线性趋势如式(1)和(2):

表 4 不同开花阶段的总花青苷和主要花青苷变化与积累规律

Tab. 4 Variation and accumulation of anthocyanins at different flowering stages in *S. cruentus*

发育阶段	总花青苷 平均含量/ (mg · kg ⁻¹)	A1 平均 含量/ (mg · kg ⁻¹)	A2 平均 含量/ (mg · kg ⁻¹)	A3 平均 含量/ (mg · kg ⁻¹)	A1 ~ A3 占 全部花青苷 百分率/%
1	44.67	0.00	2.33	38.00	90.28
2	567.50	51.00	110.75	314.50	83.92
3	1 744.00	90.25	326.25	1 022.75	82.53
4	2 283.50	96.25	364.50	1 422.25	82.46
5	1 521.75	39.75	181.50	1 029.50	82.19
6	1 111.25	18.75	124.50	776.50	82.77

$$y = 78.93x - 81.333 \quad R^2 = 0.9739 \quad (1)$$

$$y = -58.612x + 456.95 \quad R^2 = 0.9709 \quad (2)$$

从瓜叶菊开花第 1 阶段开始,飞燕草花青苷含量快速增加,到开花第 4 阶段后,舌状花中花青苷含量明显下降。通过对此上下趋势进行拟合,发现瓜叶菊中花青苷含量变化符合线性变化。

通过拟合曲线可以精确测定总花青苷变化的拐点。图 4 拟合的曲线如式(3):

$$y = -32.452x^3 + 118.97x^2 + 773.3x - 13.56 \quad R^2 = 0.9033 \quad (3)$$

通过多项式取导数求出极值,经推导可知:在发育阶段约 4.5 处,瓜叶菊总花青苷含量发生上升和下降的转换。这个阶段,刚好是瓜叶菊舌状花展开的初期,筒状花开始有部分授粉完成。

在瓜叶菊蓝色花品种开花过程中,作为主要花青苷成分 A3 变化前 4 个阶段和后 3 个阶段也同样表现出先升后降趋势。其变化规律与总花青苷变化规律一致。

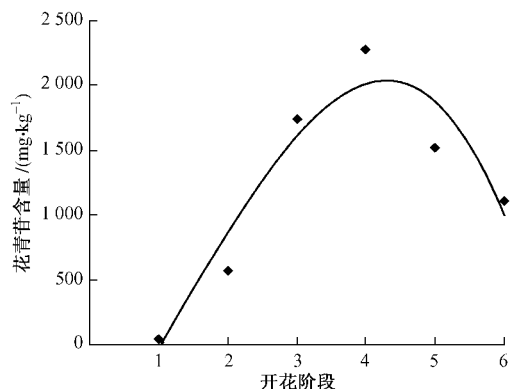


图 4 总花青苷变化拟合曲线

Fig. 4 Variation curve of amounts of anthocyanin in *S. cruentus*

2.3 蓝色瓜叶菊开花过程中 A1、A2、A3 含量的变化

对蓝色瓜叶菊中的花青苷 A1、A2、A3 含量与开花阶段联合分析(表 4),3 种花青苷均表现出开花前 4 个阶段,花青苷含量呈上升趋势,后 3 个阶段呈

下降趋势。说明各种花青苷含量独立变化是瓜叶菊主动作用产生的结果,因此花青苷在开花第4阶段就开始主动转移分解花青苷,造成开花后期花青苷含量下降。

2.4 影响花色的花青苷起始量的分析

对瓜叶菊开花第1阶段花青苷含量分析表明:开花初期花青苷含量种类少,含量很低(图5)。对花色表型分析发现,此时瓜叶菊舌状花已呈现蓝色。由此阶段的花色分析可以判知:以飞燕草色素苷元为基础的A3是瓜叶菊呈现蓝色的重要和主要因素;当飞燕草色素苷含量为40 mg/kg左右时,即达到鲜花瓣质量的2.5万分之一时,瓜叶菊花瓣就已经明显表现为蓝色。

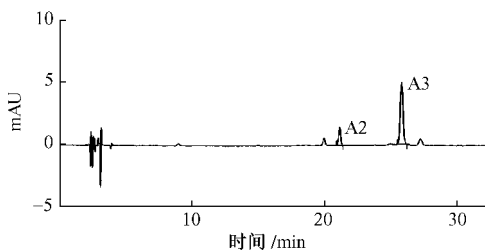


图5 A3在开花第1阶段吸收峰

Fig. 5 Absorbed spectrum of anthocyanin at flower stage 1 in *S. cruentus*

3 结论与讨论

3.1 蓝色花卉中花青苷主要成分

能够形成蓝色花的花青苷成分有飞燕草苷(存在于风铃草(*Campanula medium*)、翠雀(*Delphinium grandiflorum*)、乌头(*Aconitum carmichaeli*)、鼠尾草(*Salvia farinacea*)等常见蓝色花植物中)、矢车菊苷(存在于绿绒蒿属(*Meconopsis*)植物的蓝色花中)、芍药苷(存在于裂叶牵牛(*Pharbitis hederacea*)中)、矮牵牛苷(存在于矮牵牛(*Petunia hybrida*)中)、锦葵色素苷(存在于鸢尾属(*Iris*)蓝色花中)^[17]。飞燕草苷是蓝色花形成的常见花青苷,以飞燕草苷为色素母体的蓝色花植物数量远多于其他花青苷形成的蓝色花数量,因此飞燕草苷元的存在和衍生而来的花色苷的积累一直被视为蓝色花形成的首要原因^[1,20]。

本研究发现蓝色瓜叶菊的呈色基础是飞燕草苷,在其蓝色品种中含有3种以上飞燕草苷。飞燕草苷主要成分同此前研究结果一致^[4,21]。通过紫外吸收光谱和质谱确定在蓝色瓜叶菊中除具有花青苷A3外,还存在另外2种飞燕草苷,其分子量分别为875和1199,另有少量的分子量为1507的矢车菊苷在瓜叶菊中被首次报道。本文根据此前报道的A3的结构式结合A1、A2和A4的紫外和可见光吸

收,参考质谱图对3种花青苷的组成进行了推定,对其结构进行了初步推测。

3.2 瓜叶菊花青苷含量变化与相关基因表达的关系

本研究分析表明,当瓜叶菊处于花蕾期时,花青苷含量达到鲜花瓣质量2.5万分之一以上时,花瓣明显呈现蓝色。瓜叶菊的花青苷积累在花蕾期已开始,并明显呈色。此前随花发育开展的花色基因研究均从初花期开始研究,未包括花蕾期研究^[5,22]。基因表达应在产物出现之前,因此相关基因的研究有必要提前到花蕾期或初蕾期,能够从更全面的角度反映花色基因变化过程。

在对蓝色康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)的研究过程中,Florigene公司将矮牵牛的外源F3'5'H和DFR导入到康乃馨中,随着导入基因表达强度增加花色逐步加深^[23],在以花青苷为主要呈色物质的花中,花色深浅主要与花青苷含量正相关^[12,20]。说明在基因表达强度与花青苷含量之间存在相关性。

结合瓜叶菊在开花前4个阶段花青苷快速上升,随后3个阶段表现为快速下降的现象,分析瓜叶菊基因表达强度变化。前人在同一个瓜叶菊品种中应用同样的分级标准,对瓜叶菊2~6级花瓣研究了CHS、CHI、F3H、F3'H、F3'5'H、DFR、3MaT 7个基因在不同开花阶段中表达强度变化^[5]。其中与飞燕草苷紧密相关的F3'5'H基因仅在蓝色花2级花瓣中高丰度表达,而在其后级别的花瓣中没有表达。

从蓝色花基因表达强度变化与花青苷含量之间的变化比较来看,在开花初期(第2阶段),F3'5'H基因表达强度较高^[5],这个基因确定了飞燕草色素苷元的产生;而从花青苷积累来看,到第4阶段飞燕草苷积累量达到最高。这说明在瓜叶菊飞燕草苷F3'5'H基因的表达强度高峰相对花青苷产物高峰之间提前了至少2个阶段。

前人研究了观赏向日葵(*Helianthus annuus*)在不同开花阶段基因表达量的变化,特别是增加了对ANS基因的研究^[10]。瓜叶菊和观赏向日葵均属菊科,均在不同开花阶段研究基因表达变化,有一定参照性。在观赏向日葵开花基因的研究过程中,把花蕾到未花分为4个阶段,ANS在观赏向日葵开花阶段第2和第3阶段含量较高^[10]。比较两者基因和花青苷之间的含量,多个基因中只有ANS的基因表达强度和花青苷的积累量之间存在着上升再下降类似规律。其原因可能在于ANS属于花青苷代谢通路下游基因,和花青苷产物在发生通路中较接近,因此和花青苷产物相关性较强,产生类似变化。

3.3 瓜叶菊花青苷含量动态变化的生物学意义

从传粉生物学来看,花青苷含量的主动变化是

和植物传粉生物学紧密相关的。在珙桐 (*Davidia involucrata*) 的相关研究中发现在4月20日到5月16日之间分为7个开花时期。不同开花时期的珙桐花苞片中总黄酮化合物在开花后出现初期上升随后下降,此后一直处于低水平状态^[7]。珙桐相关研究说明花发育过程中存在总黄酮量由低到高再降低的变化。本实验分析发现,在蓝花瓜叶菊中存在前4阶段花青苷快速上升,随后3个阶段表现为快速下降,花青苷上升下降的转折点发生,正是瓜叶菊的筒状花部分完成授粉的时间。因此这种花青苷积累的变化应当是对昆虫授粉的一种适应机制。前人研究认为黄酮类化合物(包括花青苷)在植物开花过程中和开花后均会在不同位置发生量的变化,其目的是吸引昆虫授粉,同时避免昆虫的第2次“浪费的”访花过程,提高传粉效率^[22,24]。即开花前期,总花青苷快速积累,一方面通过吸收大量的紫外线,降低紫外线对幼嫩花器官伤害;另一方面随着花瓣打开花青苷含量增加,吸引昆虫授粉。在吸引昆虫完成部分授粉后,在花发育的后3个阶段则减少花青苷合成,分解转运花青苷,使花瓣中总花青苷含量降低,避免低效授粉,增加瓜叶菊花序中其他新开放花高质量授粉机会。因此,瓜叶菊从蕾期到花开放6个阶段中花青苷积累与变化规律应当是瓜叶菊提高传粉效率的一种适应机制。

从生物体营养物质动态循环利用来看,瓜叶菊属于多年生草本,在生殖策略和生物量分配上存在营养物质循环利用^[8]。在开花前期,瓜叶菊植株的营养向繁殖器官输送;在开花后期,对花器官的营养物质进行回流循环利用或者是进行储存。这种机制也符合多年生植物充分利用同化物质,提高营养物质循环利用的原则。

参 考 文 献

- [1] 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,1989:9-51.
- [2] WANG L S, HASHIMOTO F, SHIRAIISHI A, et al. Petal coloration and pigmentation of tree peony cultivars of Xibei (the Northwest of China) [J]. *J Jpn Soc Hort Sci* 2000 69 (Suppl. 2): 233.
- [3] JIA N, SHU Q Y, WANG L S, et al. Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars [J]. *Scientia Horticulturae* 2008 117:167-173.
- [4] GOTO T, KONDO T, KAWAI T, et al. Structure of cinerarin, a tetra-acylated anthocyanin isolated from the blue garden cineraria, *Senecio cruentus* [J]. *Tetrahedron Letters*, 1984, 25: 6021-6024.
- [5] 胡可, 孟丽, 韩科厅, 等. 瓜叶菊花青素合成关键结构基因的分离及表达分析[J]. 园艺学报 2009 36 (7): 1013-1022.

- [6] 黄双全, 郭友好. 传粉生物学的研究进展[J]. 科学通报, 2000 45(3): 225-237.
- [7] 胡进耀, 张素兰, 苏智先, 等. 珙桐传粉诱导物(I): 花色[J]. 植物生态学报 2007 31 (1): 166-171.
- [8] 武维华. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 260-262, 378-383.
- [9] 孟丽. 蓝色花形成关键基因分离与表达分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [10] 张剑亮, 潘大仁, 周以飞, 等. 观赏向日葵花青素苷合成途径同源基因的克隆与表达[J]. 园艺学报 2009 36(1): 73-80.
- [11] 李崇晖, 王亮生, 舒庆艳, 等. 迎红杜鹃花色色素组成及花色在开花过程中的变化[J]. 园艺学报 2008 35(7): 1023-1030.
- [12] WANG L S, SHIRAIISHI 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 114:33-43.
- [13] BEATRIZ A G, BERRUETA L A, SERGIO G L, et al. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography*, 2009 1216(28): 5398-5415.
- [14] STOBIECKI M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides [J]. *Phytochemistry* 2000 54(3): 237-256.
- [15] CUYCKENS F, CLAEYS M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids [J]. *J Mass Spectrom*, 2004, 39 (1): 1-15.
- [16] YOSHITAMA K. Caffeic acid 4- β -glucoside as the acyl moiety of the senecio cruentus anthocyanin [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20 (1): 186-187.
- [17] 杨少勇, 安银岭, 樊国盛, 等. 蓝色花植物花色素的着色机理[J]. 北京林业大学学报 2003 25(5): 68-75.
- [18] YOSHITAMA K, ABE K. Chromatographic and spectral characterization of 3'-glycosylation in anthocyanidins [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16(5): 591-593.
- [19] YOSHITAMA K, HAYASHI K. Concerning the structure of cinerarin, a blue anthocyanin from garden cineraria: Studies on anthocyanins, LXVI [J]. *Journal of Plant Research*, 1974, 87 (1): 33-40.
- [20] 徐清燊, 戴思兰. 蓝色花卉分子育种[J]. 分子植物育种, 2004 2(1): 93-99.
- [21] 孙卫, 李崇晖, 王亮生, 等. 花青苷成分对瓜叶菊花色的影响[J]. 园艺学报 2009 36(12): 1775-1782.
- [22] 哈本 J B. 黄酮类化合物[M]. 戴伦凯, 译. 北京: 科学出版社, 1983: 20-35.
- [23] MOL J, CONISH E, MASON J. Novel coloured flowers [J]. *Curr Opin Biotech*, 1999, 10: 198-201.
- [24] WEISS M R. Floral colour changes as cues for pollinators [J]. *Nature*, 1991 354: 227-229.

(责任编辑 董晓燕)