

· 研究报告 ·

菊花不同花色品种中花青素苷代谢分析

孙卫^{1,3}, 李崇晖^{2,4}, 王亮生², 戴思兰^{1*}

¹北京林业大学园林学院国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083; ²中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093

³乌鲁木齐市植物园, 乌鲁木齐 830011; ⁴中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 应用高效液相色谱和多级质谱联用技术(HPLC-ESI-MSⁿ), 分析菊花(*Chrysanthemum × morifolium*)白色、粉色、红色、紫色、红紫色和墨色6个色系共计82个品种中花青素苷合成过程的中间产物和最终产物, 发现从白色、粉色、红色、紫色、红紫色到墨色花青素苷含量快速增加, 分别为4.68、111.60、366.89、543.56、1 220.36和2 674.95 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 不同色系间花青素苷的含量差异显著($P<0.01$), 花青素苷含量越高花色越深; 墨色菊花品种中总类黄酮含量显著高于其它花色品种($P<0.01$), 其它不同色系间总类黄酮含量差异不显著($P>0.05$); 随着菊花花色变深, 从柚皮素分支到圣草酚的代谢流, 以及从圣草酚分支到矢车菊素苷的代谢流比例增加。花青素苷成分分析发现: 菊花中只含有矢车菊素苷类化合物。根据花青素苷代谢成分分析结果绘制了菊花中花青素苷代谢路径图, 即在菊花类黄酮代谢途径中只存在矢车菊素苷代谢分支途径; 菊花不同色系在柚皮素和圣草酚2个关键代谢分支点上向不同方向代谢流的分配比例不同, 造成花青素苷产物含量不同, 导致不同花色。以上研究结果为菊花花色改良的分子育种提供了理论依据。

关键词 花青素苷, 菊花, 黄酮, 花色, 代谢途径

孙卫, 李崇晖, 王亮生, 戴思兰 (2010). 菊花不同花色品种中花青素苷代谢分析. 植物学报 45, 327–336.

通过对影响菊花(*Chrysanthemum × morifolium*)花色的类黄酮代谢途径中各环节产物的定性和定量研究, 分析菊花不同花色品种形成的化学机理和可能的分子机制, 可以为菊花种质资源的分析鉴定和新奇花色品种的培育提供理论依据(张莉俊和戴思兰, 2009)。影响植物花色的色素主要有3类: 类黄酮(flavonoid)、类胡萝卜素(carotenoid)和甜菜色素(betacyanin)(安田, 1989; 傅荣昭等, 1995)。其中类黄酮包括花青素苷(anthocyanin)和花黄素(anthoxanthin)两大类成分, 花黄素包括黄酮(flavone)和黄酮醇(flavonol)(安田, 1989)。类黄酮色素中花青素苷是主要的呈色因子, 花黄素主要表现为助色素效应(Asen et al., 1971)。迄今关于菊花花青素苷的研究结果表明, 菊花中含有3种矢车菊素苷, 分别是Cy-3-O- β -Glu、Cy-3-O-(6-O-malonyl- β -D-glu)和Cy-3-O-(3, 6-O-dimalonyl- β -Glu)(Nakayama et al., 1997)。此前对于菊花中黄酮和黄酮醇的研究也有

一些报道, 认为菊花中主要存在黄酮类化合物芹菜素苷(apigenin)、木犀草素苷(luteolin)、圣草酚苷(eriodicyol)、刺槐黄素苷(acacetin)和香叶木素苷(diosmetin)(Lin and Harnly, 2010)。关于花卉中的花青素苷代谢途径一般认为其上游底物合成途径相似, 从柚皮素开始分为3个支路, 即黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、类黄酮-3'-羟化酶(flavonoid 3'-hydroxylase, F3'H)和类黄酮-3', 5'-羟化酶(flavonoid 3', 5'-hydroxylase, F3'5'H)支路, 这3种酶可以分别在柚皮素不同位点进行羟基化, 形成二氢槲皮醇(dihydroquercetin, DHQ)、二氢茨非醇(dihydrokaempferol, DHK)和二氢杨梅黄酮(dihydromyricetin, DHM), 三者分别在二氢黄酮醇4-还原酶(dihydroflavonol reductase, DFR)和花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)作用下形成天竺葵素苷元(pelargonidin, Pg)、矢车菊素苷元(cyanidin, Cy)和飞燕草素苷元(delphinidin, Dp), 再

收稿日期: 2009-12-15; 接受日期: 2010-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(No.30671714)、国家林业局林业公益性行业科研专项(No.200904050)和中国科学院方向性项目(No.KSCX2-YW-N-043)

* 通讯作者。E-mail: silandai@gmail.com

在类黄酮糖基化转移酶(flavonoid glucosyl transferase, GT)和酰基化酶(acyltransferase, AT)的作用下进一步形成复杂的色素苷元和花青素成分(Katsumoto et al., 2007; Tanaka et al., 2008)。前人在代谢相关分析中发现, 月季(*Rosa hybrida*)中只存在形成Pg和Cy的代谢通路, 不存在形成蓝色的飞燕草素苷(Dp)的代谢通路, 因此在自然界的月季花中缺少蓝色花。在此研究基础上, 人工导入外源F3'5'H基因, 生成Dp产物, 可以形成蓝色月季花(Tanaka et al., 2008)。花色的遗传结构不是对单一位点的研究而是以其代谢途径来确定的(黄金霞等, 2006), 因此分析各种植物花色形成的代谢途径成为花色改良的前提。关于菊花类黄酮代谢途径中不同花色品种花青素苷和类黄酮产物的差异分析尚未见报道。此前对菊花花色的研究认为, 矢车菊素苷是菊花中的主要花青素苷(Nakayama et al., 1997); 在对药菊有效成分的相关研究中也涉及对菊花中类黄酮的定性研究(Lin and Harnly, 2010)。本文通过对中国传统菊花不同色系品种中花青素苷和类黄酮的定性和定量分析, 以及对类黄酮代谢产物的代谢流量和方向的变化分析, 解析了菊花中类黄酮代谢的规律和影响花色的原因。希望为广泛开展的花色形成机理研究提供参考资料, 也为菊花花色改良的分子育种提供帮助。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

2008年10月初至12月初, 在北京昌平北京林业大学菊花培育基地选择自然花期开花的菊花(*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.)品种进行分析。菊花主要有红、黄和白3类花色, 其中白色花不含或含有极少量花青素苷, 红色系呈色均受花青素苷影响, 黄色系呈色受类胡萝卜素影响(Nakayama et al., 1997)。本研究以随机选择的白色和红色系的82个菊花品种为研究对象。

1.2 花色的测定

在田间应用英国皇家园艺学会的比色卡(RHSCC)初步测定花色, 随机选取自然花期开放的菊花, 每个品种选择3株。在中国科学院北京植物园花卉生理与遗传育种实验室, 利用色差仪测定菊花花色表型色差

值。 L^* 值从0升至100时由小到大表明亮度增加, 明度由暗逐渐变亮; 而 $-a^*$ 到 $+a^*$ 的转变意味着绿色的减退, 红色的增强, a^* 值较大说明花色红度较高; $-b^*$ 到 $+b^*$ 的变化则代表了蓝色的逐渐消退, 同时伴随着黄色的增强, b^* 值由负到正和由小到大的变化, 表示由蓝色到黄色的变化, b^* 值增大则黄度增加(Gonnet, 1993)。

1.3 花青素苷和类黄酮的提取

称取测定过花色的新鲜菊花舌瓣花样品约1 g, 液氮急速冷却后直接研磨成粉末, 用5 mL花青素苷提取液($V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} : V_{\text{甲酸}} : V_{\text{三氟醋酸}} = 70 : 27 : 2 : 1$)浸提24小时(Zhang et al., 2007; Jia et al., 2008)。之后用中速滤纸过滤, 再用过滤器(0.2 μm)过滤待测, 母液直接用于实验测定。

1.4 花青素苷和类黄酮的测定

采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定花青素苷成分(李崇晖等, 2008)。高效液相色谱仪(DIONEX, 戴安公司), 泵为P680型, 自动进样器为UltiMate 3000, 二极管阵列检测器为PAD-100; 柱温箱为TCC-100; 色谱柱为TOSOH公司的TSK-GEL型ODS-80Ts QA(4.6 mm i.d.×150 mm)反相硅胶柱。

对文献报道的应用HPLC-ESI-MS分析药菊类黄酮成分的方法(Lai et al., 2007; Lin and Harnly, 2010)加以改进, 采用梯度洗脱同时测定菊花中的花青素苷与类黄酮。数据由变色龙色谱软件记录(戴安公司, Sunnyvale, CA, USA)。色谱分析时分别从2个波长通道(515和350 nm)同时记录吸收峰, 并对吸收峰从200到700 nm进行全波长扫描。所得的每个峰再以ESI源的HPLC-ESI-MSⁿ(安捷伦公司)对典型样本花青素苷和类黄酮进行结构分析。采用LC/MSD Trap软件(5.2版本)分析质谱结果。

花青素苷和类黄酮的判定: 将液相色谱的出峰保留时间和吸收光谱与此前已报道的结果相对比(Wang et al., 2001a; Lin and Harnly, 2010), 确定洗脱峰是否属于花青素苷和类黄酮, 继而根据质谱中的分子离子峰和特征离子峰判定菊花中花青素苷与类黄酮的种类。

花色素含量测定: HPLC测定过程中, 分别在最大吸收波长515和350 nm处同时检测总花青素苷

(total anthocyanins, TA)、各黄酮含量和总黄酮含量(total flavones, TF)。花瓣中TA、各黄酮含量和TF的测定采用标准品半定量法。标准品锦葵素3, 5-O-葡萄糖苷(malvidin-3, 5-di-O-glucoside, Mv3G5G)(购于法国Extrasynthese公司)用于计算TA; 标准品芦丁(querletin-3-O-rutinoside, rutin)(购于中国药品生物制品检定所)用于计算各黄酮含量和TF。TA、各黄酮含量和TF以 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 新鲜花瓣计, 计算分别相对于Mv3G5G和rutin的含量(Wang et al., 2001b)。每个样本测定3个重复。把TA和TF值相加得到总类黄酮(花青素苷与总黄酮之和)含量。

1.5 数据分析

以色差仪测定的色差值 L^* 、 a^* 和 b^* 为参数, 应用SPSS软件(13.0版本)对花色进行聚类分析。应用EXCEL2003对不同菊花花色品种之间总花青素苷和总黄酮含量的差异显著性进行分析。

2 结果与讨论

2.1 花色表型测定结果

使用色差仪对菊花品种进行花色表型测定。根据测定色差值CIE L^* 、 a^* 、 b^* 值聚类分析, 将花色分为墨色、红紫、紫、红、粉、白、淡黄和黄共8个色系(白新祥等, 2006)。本研究中的82个品种包含7个粉色、15个红色、14个紫色、13个红紫、15个墨色和18个几乎不含花青素苷的白色系, 共计6个色系。

2.2 菊花中类黄酮化合物的种类及含量

利用高效液相色谱技术, 按照1.4中的方法测定上述6个色系82个菊花品种中花青素苷和黄酮的种类及含量(表1和表2)。利用菊花花青素苷类化合物的特征吸收(515 nm波长处)对花青素苷进行检测, 在所获得的谱图中出现了不同保留时间的12个吸收峰。通过全波

长扫描发现, 各峰在280 nm处有第1个吸收峰, 在512或518 nm处有第2个吸收峰, 这些特征吸收峰符合花青素苷的光谱吸收特征(安田, 1989)。在12个吸收峰的质谱离子中均出现矢车菊素苷元特征离子 m/z 287(Abad-García et al., 2009), 因此可以判定12个峰均为矢车菊素苷类化合物(表1)。

根据HPLC保留时间、紫外光谱和质谱数据与已报道的菊花成分分析数据相比较(Lin and Harnly, 2010), 在HPLC分析中选择350 nm波长处检测黄酮类化合物。按保留时间先后, 共有21个吸收峰出现。依据保留时间、紫外光谱最大吸收值和质谱特征碎片分析, 确定21个峰含有5类化合物, 分别是芹菜素苷类、木犀草素苷类、刺槐黄素苷类、香叶木素苷类和圣草酚苷类, 它们均为黄酮苷类化合物(表1)。

进一步测定了6个色系菊花中的花青素苷和黄酮的含量(表2)。结果表明, 随着花色由深到浅, 从墨色变为白色, 花青素苷含量逐渐减少。

2.3 不同色系花色表型与花青素苷和黄酮含量的相关性分析

测定82个菊花品种的花色表型、总花青素苷含量(TA)和总黄酮含量(TF)。分别按6个色系计算色差值、花青素苷、黄酮和总类黄酮(总花青素苷与总黄酮之和)含量, 建立菊花花色表型值与对应的花青素苷、黄酮和总类黄酮含量表格(表3)。从表3中可以看出, 不同色系菊花随着花色由深到浅, L^* 值(25.03–90.78)逐渐增大, 表示明度由暗逐渐变亮; a^* 值(35.29– -8.22)逐渐变小, 表明花色的红度降低。

2.3.1 不同色系菊花花青素苷含量的差异性分析

分析不同色系菊花的花青素苷含量差异。结果表明, 无论是在红紫、紫、红、粉、白5种花色还是在墨色菊花中, 各花色之间花青素苷含量差异均极显著($P<0.01$)(表4)。随着花色由深变浅(由墨色变为粉色

表1 菊花中花青素苷与黄酮的成分分析

Table 1 Component analysis of the anthocyanins and the flavones in chrysanthemum

	Anthocyanins	Apigenin	Acacetin	Eriodicyol	Luteolin	Diosmetin
Peak number	12	5	4	1	8	3
Absorption of peak (γ^{0+}/γ^{0-})	281, 512 or 518 287/-	268, 339 271/269	268, 335 285/283	257, 355 289/287	255, 349 287/285	250, 346 301/299

表2 不同色系菊花中花青素苷与黄酮的含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**Table 2** The content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of anthocyanins and flavones in chrysanthemum of different flower color groups

Color group	Anthocyanins	Apigenin	Acacetin	Eriodicyol	Luteolin	Diosmetin
Dark-red	2 674.95±263.95	420.71±64.98	144.31±67.35	185.11±23.69	1 418.84±180.66	69.01±39.69
Reddish-purple	1 220.36±151.34	528.82±144.92	123.23±34.42	63.18±16.89	965.01±198.89	53.10±23.99
Purple	543.56±73.70	862.08±172.20	170.36±70.69	46.16±9.84	1 026.46±124.58	25.11±8.98
Red	366.89±57.38	733.22±83.62	197.75±53.21	31.15±7.88	948.15±89.03	37.42±9.27
Pink	111.60±27.04	705.33±140.64	441.37±100.69	9.64±3.49	1 174.74±308.18	155.60±68.47
White	4.68±3.07	1 144.02±184.85	161.99±33.95	11.52±2.77	975.59±106.08	36.06±8.39

表中数值为该色系实验品种数据平均值±标准误。

Data in the table are average values of the tested varieties of different color groups (mean±SE).

表3 不同色系菊花的花色表型均值及黄酮和总类黄酮含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**Table 3** The average value of L^* , a^* , b^* and the content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of total flavones and flavonoids in chrysanthemum of different flower color groups

Color group	Sample number	L^*	a^*	b^*	Total flavones	Total flavonoids
Dark-red	15	25.03±1.41	35.29±1.18	11.78±2.00	2 237.97±249.91	4 912.93±397.62
Reddish-purple	13	39.05±1.45	39.79±0.89	-0.46±2.60	1 733.35±293.44	2 953.71±371.48
Purple	14	52.91±1.62	33.32±1.20	-9.13±0.65	2 130.17±285.83	2 673.73±287.88
Red	15	61.00±1.40	24.15±0.91	-4.45±1.89	1 947.69±122.92	2 314.58±113.37
Pink	7	80.52±1.03	5.12±0.67	-0.39±0.66	2 486.69±455.32	2 598.29±443.79
White	18	90.78±0.77	-8.22±0.65	9.31±0.50	2 329.17±237.86	2 333.85±238.45

表中数值为该色系实验品种数据平均值±标准误。

Data in the table are average values of the tested varieties of different color groups (mean±SE).

表4 6个色系菊花总花青素苷含量的方差分析**Table 4** The ANOVA analysis of the content of total anthocyanins among six flower color groups of chrysanthemum

Variation source	SS	DF	MS	F	$F_{0.01}$
Among class	73 233 701	5	14 646 740	55.887 991	3.27
Inner class	19 917 557	76	262 073.12	-	-
Total	93 151 259	81	-	-	-

SS: 平方和; DF: 自由度; MS: 均方; F: 均方比; $F_{0.01}$: F在0.01水平上的临界值

SS: Square sum; DF: Degree of freedom; MS: Mean square sum; F: Mean square sum among class/mean square sum inner class; $F_{0.01}$: The threshold value of F at 0.01

至白色), 不同色系菊花中的花青素苷含量由多变少, 花色深浅与花青素苷的积累量呈正相关(图1A)。

2.3.2 不同色系菊花总类黄酮含量的差异性分析

对不同色系菊花花青素苷代谢途径中总类黄酮含量(总花青素苷与总黄酮含量之和)进行比较, 墨色品种与红紫、紫、红、粉、白色5个色系菊花品种之间总类黄酮含量差异极显著($P<0.01$)(图1B, 表5)。墨菊中总类黄酮含量达到4 912.93 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 几乎是其它花色菊花的2倍(图1B), 说明与另外5种花色相比, 墨菊中

有更多的类黄酮参与整个代谢过程。

红紫、紫、红、粉和白色这5种花色之间总类黄酮含量差异不显著($P>0.05$), 可以认为这5种花色之间总类黄酮含量相似(图1B, 表6), 即在这5个色系菊花的次生代谢循环中分配到类黄酮的代谢流没有显著差异。总类黄酮是总花青素苷与总黄酮的和, 根据前述总花青素苷的测定结果, 花青素苷含量随花色加深而增加, 说明菊花花色的差异是由于菊花类黄酮代谢流在花青素苷和黄酮两方面的分配比例不同造成的。

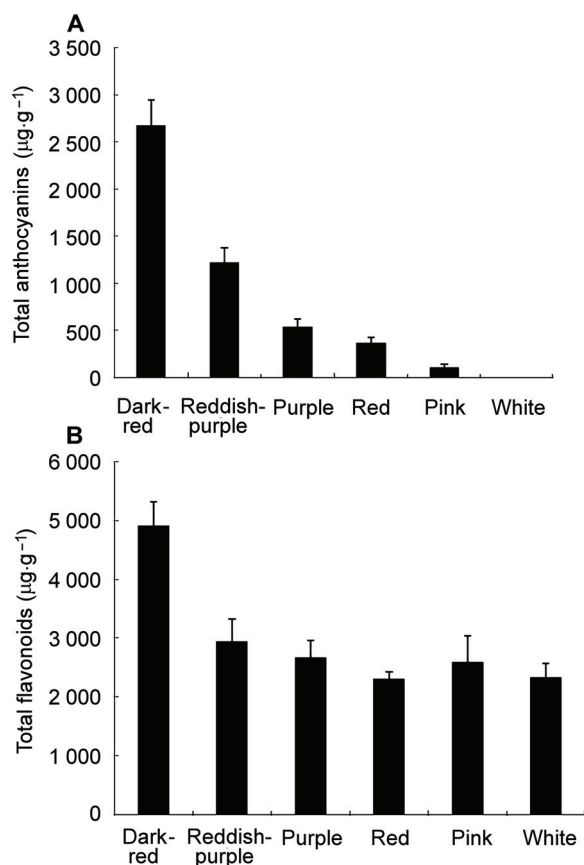


图1 不同色系菊花的总花青素苷含量(A)和总类黄酮含量(B)
Figure 1 The content of total anthocyanins (A) and flavonoids (B) in chrysanthemum of different flower color groups

2.3.3 不同色系菊花中类黄酮代谢流分配比例分析

在菊花HPLC-ESI-MSⁿ分析中,根据保留时间、质谱特征碎片离子与标准样品的比对判定,只检测到类黄酮代谢途径的最终产物木犀草素苷类、香叶木素苷类、圣草酚苷类和矢车菊素苷类产物,以及由柚皮素直接代谢产生的芹菜素苷类和刺槐黄素苷类,没有检测到从柚皮素出发的天竺葵素代谢途径和飞燕草素代谢途径的产物。

菊花类黄酮代谢过程中柚皮素向下的代谢流有4个可能的分支流向,分别形成矢车菊素苷、天竺葵素苷、飞燕草素苷和黄酮苷。为了研究其分配规律,我们将菊花类黄酮代谢过程中的产物分为2类:以柚皮素在F3'H酶作用下的产物设定为矢车菊途径代谢产物类(A)和其它代谢产物类(B),通过计算A/B的变化

来观察代谢流分支的变化。在我们的分析中,直接测定了菊花花瓣中的花青素苷和黄酮苷含量,进而获得总类黄酮量。总类黄酮量扣除矢车菊途径代谢产物量后的余量称之为其它代谢产物量。本文将A/B称为矢车菊途径代谢流向比值,其代表菊花类黄酮代谢过程中从柚皮素向矢车菊途径代谢方向产物量的相对丰度,计算结果列于表7中。

结果表明(表7),墨色菊花的矢车菊代谢途径产物量约为白色菊花的4倍,而其它代谢产物量约为白色菊花的一半,因此花色由白色到墨色,矢车菊代谢流向比值变化幅度近8倍。从柚皮素分支形成的产物在墨菊中有高达4 181.31 µg·g⁻¹的量用来合成矢车菊代谢方向产物,较少产生芹菜素和刺槐黄素等黄酮产物,矢车菊途径代谢流向比值在各种花色中也是最大的,为5.72:1,远大于其它花色的比值。红紫色花在这个方向的代谢产物量仅约为墨色花的一半。紫色、红色和粉色菊花则代谢量基本相近,约为墨色花的1/3。在白色花中流向矢车菊代谢方向的产物比值只有0.77:1,远小于其它色系的比值,矢车菊代谢途径明显受到抑制,而形成芹菜素苷产物方向则得到明显

表5 6个色系菊花总类黄酮含量的方差分析

Table 5 The ANOVA analysis of the content of total flavonoids among six flower color groups of chrysanthemum

Variation source	SS	DF	MS	F	F _{0.01}
Among class	72 542 095	5	14 508 419	11.23	3.27
Inner class	98 181 537	76	1 291 862	-	-
Total	170 723 632	81	-	-	-

SS、DF、MS、F和F_{0.01}同表4。

SS, DF, MS, F and F_{0.01} are the same as in Table 4.

表6 红紫、紫、红、粉、白5个色系菊花品种之间总类黄酮含量的方差分析

Table 6 The ANOVA analysis of the content of total flavonoids among reddish-purple, purple, red, pink and white chrysanthemum

Variation source	SS	DF	MS	F	F _{0.05}
Among class	4 021 535	4	1 005 384	0.96	2.52
Inner class	64 980 585	62	1 048 074	-	-
Total	69 002 120	66	-	-	-

SS、DF、MS和F同表4; F_{0.05}: F在0.05水平上的临界值。

SS, DF, MS and F are the same as in Table 4; F_{0.05}: The threshold value of F at 0.05.

表7 不同色系菊花中矢车菊素苷代谢途径与其它代谢途径的分配比例**Table 7** The distribution ratio of cyanidin(Cy) metabolic pathway to other pathways in different flower color groups of chrysanthemum

Color group	Total flavonoids ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Flavonoids in Cy pathway ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Flavonoids in other pathways ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ratio of flavonoids in Cy pathway to in other pathways	Percentage of cyanins in the flavonoids in Cy pathway (%)
Dark-red	4 912.93	4 181.31	731.62	5.72:1	63.97
Reddish-purple	2 953.71	2 244.79	708.92	3.17:1	54.36
Purple	2 673.73	1 599.75	1 073.98	1.49:1	33.98
Red	2 314.58	1 355.57	959.01	1.41:1	27.07
Pink	2 598.29	1 442.91	1 155.38	1.25:1	7.73
White	2 333.85	1 017.47	1 316.38	0.77:1	0.46

加强(表7)。

以不同花色菊花中最终形成的矢车菊素苷占矢车菊素苷途径类黄酮量的百分比来衡量矢车菊素苷在代谢流中分配水平的高低。如表7所示,在墨菊中,有高达63.97%的圣草酚被用来合成矢车菊素苷,表明墨菊中DFR酶合成矢车菊素苷的能力可能得到很大的加强。而白色菊花中从圣草酚向矢车菊素苷的代谢通路受到严重限制,几乎没有(0.46%)矢车菊素苷的产生。当菊花花色由白色向墨色逐渐转变时,矢车菊素苷含量急剧上升,白色与粉、红、紫、红紫和墨色菊花中矢车菊素苷含量的比值分别为1:23、1:78、1:116、1:260和1:572,从白色到墨色增加了近600倍。

2.4 讨论

2.4.1 不同菊花品种中类黄酮成分分析

通过对大量样本的分析,发现菊花中只含有矢车菊素苷元,与前人的研究结果相同。此前曾经有报道在菊花中发现了3种矢车菊素苷(Nakayama et al., 1997),本实验在HPLC中共检测到12个矢车菊素苷的色谱峰,具体的结构有待进一步研究。

本实验在菊花中检测到的黄酮类化合物有芹菜素苷、木犀草素苷、圣草酚苷、刺槐黄素苷和香叶木素苷,与此前报道一致(Lin and Harnly, 2010)。

2.4.2 菊花花青素苷代谢途径

一般花青素苷代谢从丙二酰和香豆酰开始,直到形成柚皮素,再从柚皮素分3支分别形成各种花青素苷。各代谢途径在柚皮素以上的合成途径相似,从柚皮素开始,代谢方向不同而形成不同的花青素苷。柚皮素

在F3'H、F3H和F3'5'H三个酶的作用下,进一步分别形成矢车菊素苷、天竺葵素苷和飞燕草素苷(Katsumoto et al., 2007; Tanaka et al., 2008)。

根据上述菊花花青素苷代谢通路最终产物和黄酮苷中间产物分析的结果,可以推测出菊花中花青素苷代谢途径(图2)。即菊花花青素苷代谢从柚皮素开始,受到类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)和黄酮合成酶(flavone synthase, FS)的作用,向2个方向分别形成矢车菊产物(圣草酚)和黄酮(芹菜素苷和刺槐黄素苷)。圣草酚向3个方向形成代谢产物:(1)圣草酚经过糖基化酶和酰基化酶作用,形成圣草酚苷;(2)圣草酚经过黄酮合成酶作用形成木犀草素苷;(3)圣草酚经过F3H、DFR和ANS酶的作用形成矢车菊素苷元,再经过甲基化、糖苷化和酰基化形成各种矢车菊素苷。

从菊花花青素苷代谢的中间产物和最终产物来看,除了黄酮苷类直接代谢为花黄素等辅助色素成分外,菊花的花青素苷代谢途径中只存在矢车菊素苷代谢途径。由于只有矢车菊素苷存在,菊花花色中除了黄、白色外仅表现为深浅不同的红色,从粉红到墨色(深红)。在我们的实验中没有检测到天竺葵素苷元的相关代谢产物,而菊花中存在F3H基因,可以推断在菊花花青素苷代谢途径中,F3H可能存在底物特异性,只对矢车菊代谢途径中的圣草酚起作用,或者存在对F3H基因的抑制因子。根据菊花花瓣代谢产物的测定结果和分析,可以推测在菊花中不存在Dp和Pg的花青素苷代谢途径,或者Dp花青素苷代谢途径受到严重抑制。从分子育种改变菊花花色的角度出发,可以采用引入外源基因(如F3'5'H基因)或调控菊花内F3H基因(韩科厅等, 2008)的方法,增加菊花中Pg和Dp

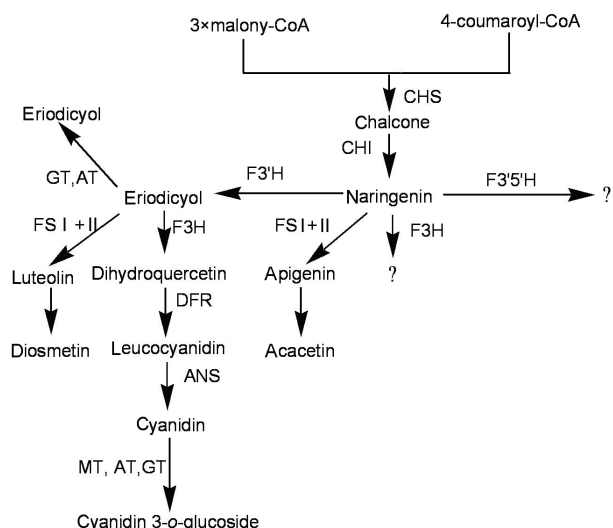


图2 菊花中花青素苷代谢途径

CHS: 查耳酮合成酶; CHI: 查耳酮异构酶; F3'H: 类黄酮-3'-羟化酶; F3',5'H: 类黄酮-3',5'-羟化酶; FSI: 黄酮合成酶I; FSII: 黄酮合成酶II; F3H: 黄烷酮-3-羟化酶; DFR: 二氢黄酮醇还原酶; ANS: 花青素苷元合成酶; MT: 甲基转移酶; AT: 酰基化酶; GT: 类黄酮葡萄糖苷转移酶

Figure 2 The anthocyanins metabolic pathway in chrysanthemum

CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase; F3',5'H: Flavonoid 3',5'-hydroxylase; FSI: Flavone synthase I; FSII: Flavone synthase II; F3H: Flavanone 3-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; MT: O-methyltransferase; AT: Acyltransferase; GT: Flavonoid glucosyl transferase

代谢途径的花青素苷产物, 进而增加菊花花色的多样性, 培育出全色系列的菊花, 丰富菊花的观赏性。

2.4.3 菊花花色差异的化学机理

采用HPLC方法测定菊花中的总类黄酮含量, 发现白色、粉色、红色、紫色和红紫色5种色系菊花的总类黄酮产物量差异不显著($P>0.05$)(图1B, 表6), 说明在类黄酮代谢途径的初始阶段, 这5种花色的花中类黄酮代谢量是相似的。同时, 也说明这5种花色的差异可能不是由类黄酮的积累决定的, 而是在类黄酮化合物总量不变的情况下, 通过接下来的不同代谢途径产生不同的花青素苷来调控花色表型的。进一步的花青素苷含量测定证实了这种推测。在从柚皮素向下的代谢过程中, 花色越浅则柚皮素更多形成非矢车菊素

苷方向的产物, 如芹菜素苷和刺槐黄素苷(表7)。在F3'H酶的作用下柚皮素形成圣草酚的比例增加则花色加深; 随着花色加深, 圣草酚也更高比例地形成了矢车菊素苷(表7)。在柚皮素和圣草酚这2个关键的代谢分支点上流向不同方向代谢产物的比例不同, 造成花青素苷产物量的不同, 形成不同的花色。花青素苷的含量与花色的亮度呈负相关, 与红度呈正相关(Zhang et al., 2007), 最终由于花瓣中花青素苷含量的不同形成菊花不同的红色花。由于缺少F3',5'H酶的作用, 在菊花中未形成飞燕草素苷类代谢产物, 因此在菊花中缺乏蓝色花。

从不同花色菊花的花青素苷代谢中间产物和最终产物测定结果来看, 墨菊的花青素苷代谢过程显著不同于其它花色的菊花, 表现为墨菊中总类黄酮的含量显著高于其它花色($P<0.01$)(图1B, 表5)。从类黄酮代谢途径来看, 墨菊中矢车菊方向代谢产物的比例相比其它花色更高。从最终产物来看, 墨菊中流向矢车菊代谢方向的底物形成矢车菊素苷的比例也是各花色中最高的(表7)。以上结果表明, 墨菊的色素积累能力比较强, 如圣草酚苷含量($185.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)是其它色系的3-20倍, 花青素苷含量($2\ 674.95 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)也是其它色系的2-24倍。墨菊积累花色素能力强的原因是我们下一步将探讨的问题。

白色系菊花的总类黄酮产物量与粉色、红色、紫色和红紫色没有显著差异($P>0.05$)(图1B, 表6), 说明白色花在柚皮素之前的代谢过程与其它花色相似。白色花类黄酮代谢从柚皮素向圣草酚的形成过程受阻, 更多的产物为非矢车菊代谢方向产物, 而从圣草酚向矢车菊素苷的代谢又进一步受阻, 主要形成木犀草素苷和香叶木素苷, 不形成或少量形成矢车菊素苷(表7), 因此表现为白色花。

2.4.4 菊花花色差异的遗传机理

查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)是将苯丙烷代谢途径引向类黄酮代谢途径的第1个酶, 因此, 植物次生代谢是否向花青素苷形成方向进行及形成产物的多少首先是由CHS基因决定的(陈晓亚, 2006; 季志平等, 2006)。CHS作用得到增强, 造成流向花青素苷合成途径的中间产物增加, 可能是花青素苷产物增加的主要原因。从代谢过程来看, 墨菊中向类黄酮方向代谢底物量的增加可能是墨菊花色不同于其它色

系菊花的重要原因。墨菊花青素苷代谢途径的特异性是否与*CHS*基因作用增强有关值得深入研究。这将有助于我们进一步理解菊花深色花形成的分子机制,进而在培育其它花卉的深色花中发挥理论指导作用。

此前对花色素代谢途径中基因的研究表明,*F3'H*和*DFR*基因的上调和抑制与花青素苷的积累和花色紧密相关(胡可等, 2009)。在蓝猪耳(*Torenia hybrida*)中过量表达*F3'H*基因可以增加矢车菊素苷的积累(Ueyama et al., 2002);在紫色矮牵牛(*Petunia hybrida*)中,人工干预下调*F3'H*和*DFR*基因表达会造成花色变淡或变白,这些结果清楚地表明在花色素代谢通路中基因表达对花青素苷积累和花色的调节作用(Fukuchi et al., 2004)。根据我们对菊花系列花色的研究结果,深色菊花的形成不仅可能与总花青素苷的积累有关(表4),而且另一个可能原因是代谢途径的柚皮素阶段高比例向矢车菊素苷方向分配(表7)。研究证据表明,随着花色加深,流向矢车菊素苷方向的代谢产物量相应增加,可能是*F3'H*基因的调节作用。在圣草酚的代谢过程中,深色花矢车菊素苷方向代谢产物量的比例也很高(表7),大量的矢车菊素苷产物积累可能是菊花形成深色花的重要原因,这也可能是由于*DFR*基因的调节作用。

白色花中类黄酮代谢到柚皮素后,代谢产物的比例已经产生变化,更多的产物为非矢车菊代谢方向产物,这可能是由于*F3'H*酶的作用受阻所致;从圣草酚向下的代谢途径中,主要形成木犀草素苷和香叶木素苷,不形成或形成极少量矢车菊素苷,导致花色为白色,这可能是由于*DFR*基因和下游*ANS*基因受到抑制,调控了代谢过程。白色菊花中类黄酮产物总量与除墨菊以外的其它花色相似,但存在矢车菊素苷代谢路径受抑制的现象,因此它是对菊花花色进行分子改良的理想材料,不仅可以通过导入相关基因提高矢车菊素苷代谢流来增加花的各种颜色变化,同时也可以通过导入外源基因(如*F3'5'H*基因等)来增加菊花中不存在的色素(如飞燕草色素等),以获得自然界中不存在的菊花色系,如蓝色系的菊花。

3 结论

经过分析,我们推测:菊花的类黄酮代谢途径中,除形成花黄素等成分外,在花青素苷的3个代谢分支途

径中,只存在矢车菊素苷代谢分支途径,不存在飞燕草素苷和天竺葵素苷代谢分支途径。

墨色菊花的总类黄酮含量显著高于其它色系,而白色、粉色、红色、紫色和红紫色5个色系之间总类黄酮量没有显著差异。菊花花色的形成与柚皮素代谢点上的代谢流分配比例相关,随着菊花从白色到墨色,通往矢车菊方向代谢途径的产物增多,花青素苷生成比例增高,花色加深;白色菊花在圣草酚代谢点受阻,基本不产生或很少产生矢车菊素类花青素苷是形成白色花的主要原因。

根据对代谢产物链的分析,结合此前相关研究结果认为*CHS*、*F3'H*和*DFR*基因在菊花花青素苷代谢过程中起着关键的调控作用,导致不同菊花品种中花青素苷比例产生差异而造成花色差异。白色菊花属于矢车菊素苷代谢通路受抑的色系,适合作为利用外源基因干扰改变花色的研究对象。

参考文献

- 白新祥, 胡可, 戴思兰, 王亮生 (2006). 不同花色菊花品种花色成分的初步分析. 北京林业大学学报 28(5), 84–89.
- 陈晓亚 (2006). 植物次生代谢研究. 世界科技研究与发展 28(5), 1–4.
- 傅荣昭, 马江生, 曹光诚, 李文彬, 孙勇如 (1995). 观赏植物色香形基因工程研究进展. 园艺学报 22, 381–385.
- 韩科厅, 胡可, 戴思兰 (2008). 观赏植物花色的分子设计. 分子植物育种 6, 16–24.
- 胡可, 孟丽, 韩科厅, 戴思兰 (2009). 瓜叶菊花青素合成关键基因的分离及表达的初步分析. 园艺学报 36, 1013–1022.
- 黄金霞, 王亮生, 李晓梅, 鲁迎青 (2006). 花色变异的分子基础与进化模式研究进展. 植物学通报 23, 321–333.
- 季志平, 苏印泉, 张存莉 (2006). 植物次生物的代谢途径. 生物学通报 41(3), 19–23.
- 李崇晖, 王亮生, 舒庆艳, 徐彦军, 张洁 (2008). 迎红杜鹃花色色素组成及花色在开花过程中的变化. 园艺学报 35, 1023–1030.
- 张莉俊, 戴思兰 (2009). 菊花种质资源研究进展. 植物学报 44, 526–535.
- 安田·齐 (傅玉兰译) (1989). 花色生理生物化学. 北京: 中国林业出版社. pp. 9–51.
- Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S (2009). 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 Chromatogr A* **1216**, 5398–5415.
- Asen S, Stewart RN, Norris KH** (1971). Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of Red Wingazalea. *Phytochemistry* **10**, 171–175.
- Fukuchi MM, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Holton T, Kusumi T, Tanaka Y** (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnol* **21**, 377–386.
- Gonnet JF** (1993). CIElab measurement, a precise communication in flower colour: an example with carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars. *J Hortic Sci* **68**, 499–510.
- Jia N, Shu QY, Wang LS, Du H, Xu YJ, Liu ZA** (2008). Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars. *Sci Hortic (Amsterdam)* **117**, 167–173.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y** (2007). Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* **48**, 1589–1600.
- Lai JP, Lim YH, Su J, Shen HM, Ong CN** (2007). Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. *J Chromatogr B* **848**, 215–225.
- Lin LZ, Harnly JM** (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Food Chem* **120**, 319–326.
- Nakayama M, Koshioka M, Shibata M, Hiradate S, Sugie H, Yamaguchi M** (1997). Identification of cyanidin 3-O-(3",6"-O-dimalonyl-beta-glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1607–1608.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* **54**, 733–749.
- Ueyama Y, Suzuki K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Miyazaki K, Ohkawa H, Kusumi T, Tanaka Y** (2002). Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. *Plant Sci* **63**, 253–263.
- Wang LS, Shiraishi A, Hashimoto F, Aoki N, Shimizu K, Sakata Y** (2001a). Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars. *J Plant Res* **114**, 33–43.
- Wang LS, Hashimoto F, Shiraishi A, Shimizu K, Aoki N, Li JJ, Sakata Y** (2001b). Phenetics in tree peony species from China by flower pigment cluster analysis. *J Plant Res* **114**, 213–221.
- Zhang JJ, Wang LS, Shu QY, Liu ZA, Li CH, Li A, Zhang J, Wei XL, Tian DK** (2007). Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Sci Hortic (Amsterdam)* **114**, 104–111.

Analysis of Anthocyanins and Flavones in Different-colored Flowers of Chrysanthemum

Wei Sun^{1,3}, Chonghui Li^{2,4}, Liangsheng Wang², Silan Dai^{1*}

¹College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

²Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

³Urumqi Botanical Garden, Urumqi 830011, China; ⁴Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract We analyzed the metabolic intermediate and final products, including anthocyanins and flavones, in 82 cultivars of Chinese chrysanthemum (*Chrysanthemum × morifolium*) divided into 6 groups by color: white, pink, red, purple, reddish-purple and dark-red. High-performance liquid chromatography (HPLC) with a photodiode array detector (HPLC-PAD) and HPLC-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MSⁿ) were used for qualitative and quantitative analysis of anthocyanin and flavone. The higher the cyanin accumulation in the chrysanthemum flower, the darker the color. The cyanin content in white, pink, red, purple, reddish-purple and dark-red flower groups was 4.68, 111.60, 366.89, 543.56, 1 220.36 and 2 674.95 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively, for a significant difference among groups ($P<0.01$). Quantitative analysis revealed no significant difference among color groups in flavonoid content ($P>0.05$), except for the dark-red group, which had notably higher content of flavonoids and anthocyanins than other groups ($P<0.01$). The darker the flower color, the higher the ratios of metabolic flux from the naringenin to eriodicyol and from the eriodicyol to cyanins on the basis of lightness colorimetric values. Thus, the cyanin pathway is the only flower-color metabolic pathway in chrysanthemum, although three different pathways lead to different flower colors. We provide a metabolic flux figure on the anthocyanin metabolic pathway in chrysanthemum comparing anthocyanin content in different flower colors. The different ratios to cyanins from naringenins and eriodicyol are the crucial metabolic points that induce the diverse cyanin products in flowers and then lead to the various flower colors. These results provide a theoretical basis for molecular breeding to improve flower color in chrysanthemum.

Key words anthocyanin, chrysanthemum, flavone, flower color, metabolic pathway

Sun W, Li CH, Wang LS, Dai SL (2010). Analysis of anthocyanins and flavones in different-colored flowers of chrysanthemum. *Chin Bull Bot* **45**, 327–336.

* Author for correspondence. E-mail: silandai@gmail.com