

分类号密级

UDC

昆明理工大学 专业硕士学位论文

# 彩色马蹄莲佛焰苞呈色物质及其分布特征研究

研 究 生 姓 名 雷霆

指导教师姓名、职称 金雪花（副教授）

学 科 专 业 农业信息化

研 究 方 向 花卉种质资源研究

论 文 工 作

起 止 日 期 2015 年 9 月～2017 年 4 月

论 文 提 交 日 期 2017 年 4 月



The studies on the pigments material and  
their distribution characteristics in  
*Zantedeschia hybrida*



A dissertation submitted to Kunming University of  
Science and Technology for  
the Master Degree of Agricultural

by  
**Lei Ting**

**Major: Agricultural informatization**

Faculty of Modern Agricultural Engineering  
Kunming University of Science and Technology  
Kunming, China  
April 2017



## 一遵守学术行为规范承诺

本人已熟知并愿意自觉遵守《昆明理工大学研究生学术规范实施细则（试行）》的所有内容，承诺所提交的毕业和学位论文是终稿，不存在学术不端行为，且论文的纸质版与电子版内容完全一致。

## 二独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得昆明理工大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

## 三关于论文使用授权的说明

本人完全了解昆明理工大学有关保留使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。（保密的论文在解密后应遵守此规定）

**本学位论文属于（必须在以下相应方框内打“√”，否则一律按“非保密论文”处理）：**

1、保密论文：☐ 本学位论文属于保密。

2、非保密论文：☐ 本学位论文属于内部论文，网上延后公开。

☐ 本学位论文不属于保密范围，适用本授权书。

**是否同意授权以下单位（必须在以下相应方框内打“√”，否则一律按“同意授权”处理）：**

☐ 同意授权 ☐ 不同意授权

将本人学位论文著作权中的数字化复制权、发行权、汇编权和信息网络传播权的专有使用权在全世界范围内授予中国学术期刊（光盘版）电子杂志社，并在《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和 CNKI 系列数据库中出版。

研究生本人签名：\_\_\_\_\_

签字日期：20 年 月 日

研究生导师签名：\_\_\_\_\_

签字日期：20 年 月 日



## 摘要

彩色马蹄莲 (*Zantedeschia hybrid Spr*) 天南星科马蹄莲属原产地非洲, 由于其奇特的花型、丰富艳丽的色彩在世界花卉市场广受欢迎, 是切花, 盆栽的佳品, 被誉为 21 世纪花卉之星。现今用于观赏的马蹄莲多为杂交品种。

花色是观赏植物最为主要的观赏性状, 直接影响花卉的市场价值。本研究以 27 个彩色马蹄莲为材料, 运用测色法、组织切片法、色素成分及色素含量分析方法对彩色马蹄莲佛焰苞色的形成进行研究。经分析研究得出以下结论:

(1) 使用色差仪对收集到的 27 个彩色马蹄莲品种进行花色评价, 使用聚类分析并结合色空间 (CIELab Space) 综合分析, 将彩色马蹄莲分成黑色系 (Black group)、紫红色系 (Amaranth group)、红色系 (Red group)、黄色系 (Yellow group)、粉白色系 (Pink group)、橙色系 (Orange group) 六大色系, 为彩色马蹄莲色系分类与定义提供理论依据。

(2) 本研究通过徒手制作植物组织切片, 对彩色马蹄莲佛焰苞组织结构进行显微观察, 分析彩色马蹄莲横切面解剖结构与呈色之间的关系。结果发现彩色马蹄莲佛焰苞横切面细胞呈扁平状砖形, 并且色素细胞层数越多, 佛焰苞的颜色越深。红色系与橙色系品种含有花青素苷与黄酮、黄酮醇, 花青素苷存在于上下表皮细胞, 黄酮、黄酮醇在中部叶肉组织内富集, 两种色素复合产生了不同程度的红色、橙色。

(3) 本研究通过利用高效液相色谱-光电二极管阵列检测 (HPLC-DAD) 和高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用 (HPLC-ESI-MS) 技术, 并采用标准品半定量的方法, 对所收集到彩色马蹄莲佛焰苞中主要的色素成分及含量进行定量与定性分析。分析彩色马蹄莲黑色品种花青素苷生物合成途径, 外部环境对花青素苷积累的影响, 色彩表型  $L^*a^*b^*$  值与色素成分含量关系显著,  $L^*$  值与总的花青素苷的含量呈负相关, 随花青素苷含量的升高, 亮度降低。运用紫外分光法对收集到的佛焰苞中的胡萝卜素进行测量 (UV-visible spectra), 结果表明, 所收集到的彩色马蹄莲品种中均未检测出胡萝卜素成分, 因此可以认定彩色马蹄莲黄色系、橙色系品种, 使其呈黄色和橙色的主要色素物质为黄酮、黄酮醇, 而不是类胡萝卜素, 并且黄度 ( $b^*$ ) 与黄酮、黄酮醇 (TF) 的含量呈正相关的关系。

(4) 利用 illumina/Solexa 第二代高通量转录组测序技术, 对彩色马蹄莲 ‘小黑妞’、‘浪漫’、‘范图拉’ 这三个品种进行转录组测序, 共获得 446340 条高质量转录组短数列, 平均长度为 785bp。在 Nr 数据库中有注释的共有 29816 条 Unigene, 将所得到的相关映射基因映射到 KEGG 数据库提供的参考目录中, 其中 55 条序列可能涉及彩色马蹄莲花

色形成：并结合代谢信息与代谢物质变化研究，阐述彩色马蹄莲花青素苷代谢途径。

**关键词：**彩色马蹄莲；花青素苷；色素分布；代谢谱；转录组测序



## Abstract

*Zantedeschia hybrida* Spr of araceae of zantedeschia spreng is originated from Africa, owing to its peculiar flower type and abundant and gay colors, it is extensively popular in the world flower market and ideal for cut-flower and potting, and it is praised as the star of flower in 21<sup>st</sup> century. Currently most of the ornamental zantedeschia are of hybrid variety.

Flower color is the most fundamental ornamental shape of ornamental plants, it directly affects the commercial value of the flower. This study took 27 *Zantedeschia hybrida* Spr as material, and adopted colourimetry, histocyte observation, pigment composition analysis and pigment content analysis to come to the following conclusions through an analysis on the effect of type and content of pigment of *Zantedeschia hybrida* Spr on the tristimulus values of presentation of *Zantedeschia hybrida* Spr and the effect of structure of plant tissue cell on the flower color:

(1) The colorimeter was used to evaluate the flower color of 27 varieties of *Zantedeschia hybrida* Spr being collected, the cluster analysis combined with CIELab space comprehensive analysis was used to divide the *Zantedeschia hybrida* Spr into six color systems, which were Black group、Amaranth group、Red group、Yellow group、Pink group and Orange group, providing a theoretical basis for the classification of color system of *Zantedeschia hybrida* Spr, meanwhile, providing a technical support for the molecular breeding and modification of flower color.

(2) Petal is a carrier of anthocyanidin, the difference in content and type of anthocyanidin will have a relatively great influence on the difference in color of spathe of *Zantedeschia hybrida* Spr, and the structure of petal tissue, particularly the shape of petal epidermal cells can also influence the reflex of incident light, thus leading to a variation of petal color. This study carried out a microscopic observation of the tissue structure of spathe of *Zantedeschia hybrida* Spr by manually making a plant tissue section, and analyzed the relationship between the anatomical structure of cross section of *Zantedeschia hybrida* Spr and color generation. The result showed that, the more the layers of chromatophore are, the darker the color of spathe is, the anthocyanin in epidermal cell of variety from orange and red group of *Zantedeschia hybrida* Spr is compounded with the anthoxanthin (flavone, flavonol ) in cell of middle mesophyll tissue to produce red and orange color of varying degrees.

(3) by the use of (HPLC-DAD) and (HPLC—ESI-MS<sup>n</sup>) technology and adoption of standard substance semiquantitative method, this study carried out a quantitative and qualitative analysis on the composition and content of primary pigments in the spathe of *Zantedeschia hybrida* Spr. The correlation between the phenotype parameters of flower color of variety from all the groups of *Zantedeschia hybrida* Spr and composition of anthocyanin and microstructure was analyzed. The biosynthetic pathway of anthocyanin of black group of *Zantedeschia hybrida* Spr and the effect of external environment on the accumulation of anthocyanin were analyzed. By understanding the formation mechanism of flower color of *Zantedeschia hybrida* Spr, a new thought was provided for the division and measurement of its phenotype, a theoretical support was provided for the analysis on pigment compound, identification of microscopic structure and modification of flower color. The ultraviolet spectrometry was used to measure the carotene in spathe of 27 *Zantedeschia hybrida* Spr that have been collected, of which the result showed that, none of the 27 varieties of *Zantedeschia hybrida* Spr being collected was found to have any content of carotene, thus it can be determined that, the primary pigments that are responsible for the generation of color of yellow and orange in yellow and orange group of *Zantedeschia hybrida* Spr were flavone and flavonol instead of carotenoid, moreover, the yellowness ( $b^*$ ) was positively correlated with the content of flavone and flavonol (TF).

(4) By the use of illumina/Solexa 2<sup>nd</sup>-generation high-flux transcriptome sequencing, the three varieties of *Zantedeschia hybrida* Spr, Little Black Girl, Romantic and Ventura, have undergone transcriptome sequencing, a total of 446340 high-quality transcriptome short sequences had been obtained, of which the mean length was 785bp. There are 29816 annotated Unigenes altogether in the Nr database, through a Go functional classification and Kegg metabolic pathway, the molecular function, biological process and cellular component of spathe of *Zantedeschia hybrida* Spr had been made clear, the genes related to the synthesis of anthocyanin had been summarized and analyzed, which found that, these genes largely existed in the form of multi-gene family.

**Key words:** *Zantedeschia hybrida*; Cyanin; Stained cell layers; Metabolic profiling; Transcriptomesequencing

## 目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 花色呈色机理 .....	1
1.1.1 花色素的种类 .....	1
1.1.1.1 类黄酮 .....	1
1.1.1.2 类胡萝卜素 .....	2
1.1.1.3 甜菜素 .....	3
1.1.2 植物液泡 pH 值对花瓣中花青素苷呈色的影响 .....	4
1.1.3 植物金属离子对花瓣中花青素苷呈色的影响 .....	4
1.1.4 花青素苷合成代谢途径 .....	4
1.2 植物花色表型的测定 .....	5
1.2.1 目视测色.....	6
1.2.2 R.H.S.C.C 比色卡比色法 .....	6
1.2.3 仪器测试法 .....	6
1.3 植物组织结构对花色的影响 .....	7
1.4 国内外相关研究概括 .....	8
1.4.1 花色形成机理研究现状 .....	8
1.4.2 彩色马蹄莲研究现状 .....	9
1.5 本研究的设计思路 .....	9
1.5.1 研究目的及意义 .....	9
1.5.2 本研究的技术路线 .....	10
第二章 彩色马蹄莲各色系品种的表型分析 .....	13
2.1 材料与方法.....	13
2.1.1 材料.....	13
2.1.2 方法.....	13
2.1.3 数据分析.....	13
2.2 结果与分析.....	13

2.2.1 彩色马蹄莲不同品种佛焰苞色彩表型特点分析 .....	13
2.2.2 彩色马蹄莲三刺激值之间的相关性分析 .....	17
2.3 讨论.....	19
2.3.1 彩色马蹄莲佛焰苞花色测量方法的比较 .....	19
2.3.2 彩色马蹄莲佛焰苞花色表型的分析 .....	20
2.4 本章小结.....	21
<b>第三章 彩色马蹄莲显微结构与色素分布对呈色的影响 .....</b>	<b>23</b>
3.1 材料与方法.....	23
3.1.1 材料.....	23
3.1.2 方法.....	23
3.2 结果与分析.....	23
3.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞显微结构的分析 .....	23
3.3 讨论.....	26
3.3.1 花色素在佛焰苞中的分布对花色的影响 .....	26
3.3.2 佛焰苞表皮细胞形状对花色的影响 .....	27
3.4 本章小结.....	28
<b>第四章 彩色马蹄莲佛焰苞色素种类与含量的分析 .....</b>	<b>29</b>
4.1 材料与方法.....	29
4.1.1 类黄酮化合物的提取 .....	29
4.1.2 胡萝卜素的提取.....	29
4.1.3 佛焰苞中类黄酮化合物含量测定及结构鉴定 .....	29
4.1.4 佛焰苞中类胡萝卜素的测定 .....	30
4.2 结果及分析.....	30
4.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞中类黄酮化合物成分及含量分析 .....	30
4.2.1.1 彩色马蹄莲佛焰苞中花青素苷成分及含量分析 .....	30
4.2.1.2 彩色马蹄莲佛焰苞中黄酮、黄酮醇含量分析 .....	34
4.2.2 彩色马蹄莲佛焰苞中胡萝卜素紫外-可见光分析 .....	35
4.2.3 彩色马蹄莲佛焰苞花青素苷代谢途径 .....	36
4.3 讨论.....	38
4.3.1 彩色马蹄莲不同色系品种花色形成的原因 .....	38

4.3.2 彩色马蹄莲主要色素物质及其表型之间的关系 .....	39
4.3.2.1 黑色系品种的形成 .....	39
4.3.2.2 紫红色系品种的形成 .....	40
4.3.2.3 红色系品种的形成 .....	40
4.3.2.4 黄色系品种的形成 .....	41
4.3.2.5 粉白色系品种的形成 .....	42
4.3.2.6 橙色系品种的形成 .....	42
4.3.3 彩色马蹄莲佛焰苞花青素苷代谢途径分析 .....	43
4.4 本章小结.....	46
<b>第五章 彩色马蹄莲转录组分析与基因挖掘 .....</b>	<b>46</b>
5.1 材料与方法.....	47
5.1.1 材料.....	47
5.1.2 RNA 的提取方法 .....	47
5.1.3 彩色马蹄莲转录组测序 .....	48
5.1.4 转录组组装 .....	48
5.1.5 转录组数据分析 .....	49
5.2 结果与分析.....	49
5.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞 RNA 的提取.....	49
5.2.2 转录组数据测序及拼接 .....	50
5.2.3 彩色马蹄莲转录组序列功能注释 .....	50
5.2.3.1 彩色马蹄莲转录组 Unigene 的 Nr 数据库注释 .....	51
5.2.4 彩色马蹄莲花色形成相关基因的筛选 .....	53
5.2.5 彩色马蹄莲花色差异表达基因的挖掘 .....	55
5.3 讨论.....	55
<b>第六章 全文总结与展望 .....</b>	<b>57</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>59</b>
<b>致谢.....</b>	<b>64</b>
<b>附表 A 研究生期间所获得的主要成果 .....</b>	<b>66</b>



## 第一章 绪论

### 1.1 花色呈色机理

花色作为植物进化史上最有适应意义的表型之一，是品种分类的重要依据和植物表观遗传学的重要研究内容<sup>[1-3]</sup>，花色的主要形成原因是当光线照射到花瓣上在穿透色素层时部分光线被吸收，再通过色素层折射映入我们的瞳孔我们所感知的，最终在我们大脑中产生的结果<sup>[3、4]</sup>。花色的呈色的原因是由色素种类与含量、色素在花瓣结构中的分布所影响的。同时色素细胞液的 pH 值和金属离子以及花瓣表皮细胞分布也能引起花色的改变<sup>[5]</sup>。不同花卉所显现的不同颜色是由多种因素的共同影响下所产生的。

#### 1.1.1 花色素的种类

根据目前研究已知黄酮类化合物、类胡萝卜素、甜菜素是花色、瓜果呈色的主要呈色物质<sup>[7]</sup>，具有维系植物繁衍与物种生存的同时具有一定的保健功效，其具有抗氧化活性、抗癌活性；防止脂质过氧化、抗变异原活性、改善视觉等相关功效，也是一种无毒无害的天然染色剂，被广泛的适用于食品、染色、护肤品等相关领域<sup>[8、9]</sup>。

##### 1.1.1.1 类黄酮

类黄酮是在化学结构上以黄酮为基础的一类物质的总称(图 1-1)。在类黄酮化合物中，绝大多数高等植物中广泛分布的类黄酮物质主要分为两个大类，即花青素苷 (Anthocyanins) 与花黄素 (Anthoxanthin)，其中花黄素包含黄酮与黄酮醇<sup>[10-13]</sup>类黄酮中的花青素苷元是植物花瓣重要的呈色因子，而花黄素则起到助色的效果。花青素苷是构成从红色、紫色、蓝色的重要呈色物质，天然状态下以糖苷形式存在于植物细胞液泡内，所以是水溶性色素。类黄酮除了以溶解于细胞液的状态存在以外，也以异常的形式产生。根据以往的研究发现花青素苷中矢车菊素 (Cy)、飞燕草素 (Dp)、锦葵素 (Mv)、天竺葵素 (Pg)、矮牵牛素 (Pt)、芍药素 (Pn) 六种花青素苷广泛存在于自然界的花卉中 (表 1)。各种各样的花青素苷呈现出丰富的色彩差异。这主要是由于花青素苷化学分子结构上的细微差异所决定的，一般状态下花青素常与糖苷结合，以稳定的糖苷形式存在，这些糖苷如葡萄糖、半乳糖、木糖等一个或多个的与花青素母核上的 1、3、7 位的羟基相结合<sup>[15]</sup>，形成了花青素的糖苷化修饰集团，通常花青素苷的糖基化使颜色变红，同时花青素的母核与糖苷的羟基还可以一个或多个与芸豆酸、咖啡酸、丙二酸、琥珀酸，发生酯化反应，从而产生酰基化修饰集团，酰基化能改变花色的吸收波长，使颜色更蓝<sup>[16-19]</sup>。在自然界植物中约 88% 的

被子植物着色与花青素苷等相关着色成分有关。

表 1-1 七种常见的花青素苷元  
Table 1-1 Seven common anthocyanin aglycones

花青素苷元	Anthocyanidin	R1	R2	颜色
矢车菊素 (Cy)	Cyanidin	H	OH	深红色
飞燕草素 (Dp)	Delphinidin	OH	OH	蓝-红紫色
锦葵素 (MV)	Malvidin	OMe	OMe	蓝-红色
天竺葵素 (Pg)	Pelargonidin	H	H	朱红色
矮牵牛 (Pt)	Petunidin	OMe	OH	蓝-红色
芍药花素 (Pn)	Peonidin	OMe	H	橙-红色

1.1.1.2 类胡萝卜素

类胡萝卜素 (Carotenoid) 是胡萝卜素 (Carotene) 和胡萝卜醇 (Xanthophyll) 的总称, 最早发现于胡萝卜中, 故得名类胡萝卜素, 类胡萝卜素是一种广泛存在于自然届中的着色物质, 是红色、橙色和黄色植物的主要显色色素, 在植物花、根、茎、叶以及果皮中广泛的分布<sup>[20]</sup>。类胡萝卜素不溶于水, 可溶于脂肪和类脂, 通常位于细胞质内的色素体上, 所以又被称为质体色素。与类黄酮存在于植物细胞液泡中不同, 通常情况下相同的细胞内, 类胡萝卜素存在于细胞质内, 胡萝卜素在植物花瓣中呈现出黄色或橙黄色, 植物花瓣的颜色与其含量有关含量越高, 黄度越高。

胡萝卜素的化学结构属于碳氢化合物, 可溶于石油醚、丙酮等油脂中, 而不溶于乙醇、甲醇等酒精; 胡萝卜醇是胡萝卜素的羟基衍生物, 故与石油醚的亲性和性低, 和醇的亲性和性高。胡萝卜素的化学性质是及不稳定的, 遇光与高温环境易降解, 一些胡萝卜素在碱中也是极不稳定的。类胡萝卜素主要分布于百合科与菊科植物花卉中, 在百合科花瓣中仅含有  $\beta$ -胡萝卜素群 ( $\beta$ -carotene) <sup>[22]</sup>。

迄今为止, 人类在自然届中发现了 700 余种胡萝卜素, 其中就包括叶黄素(Lutein)、番茄红素(Lycopene)、玉米花素 (Zeaxanthin)、以及  $\alpha$ -、 $\beta$ -胡萝卜素 ( $\alpha$ -/ $\beta$ -carotene) 等, 它们都是由相同的 C40 类异戊二烯骨架, 外部附带不同的修饰集团, 而通过修饰得到的衍生物, 这些修饰包括消除、环化以及重排等<sup>[20-23]</sup>。



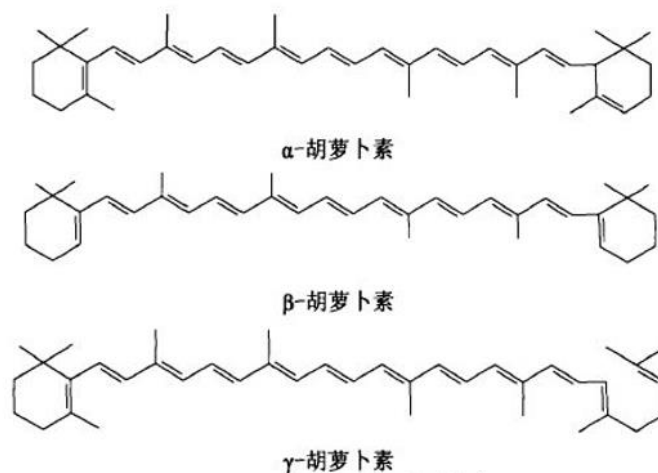


图 1-1 常见的胡萝卜素的结构式  
Fig 1-1 Carotenoids structures

### 1.1.1.3 甜菜素

甜菜色素是一种水溶性含氮化合物，最早由甜菜根中被发现因此而得名，属于吡嗪衍生物，其中包含了两种形式，甜菜黄素（Betaxanthin）和甜菜红素（Betacyanin）<sup>[24]</sup>，甜菜素通常以糖苷的形式存在，在早期的研究中由于其分子形状与花青素苷相似，曾被称做含氮花青素苷（Hetrogenous anthocyanin）。甜菜色素多存在于植物的花、果实和部分无性繁殖器官中，其水溶液呈红色或肉色。由于甜菜苷和花色素吸收光谱相似，在经碱处理后，花青素变蓝，甜菜苷变黄，并且甜菜素和花色素相互排斥，所以常将甜菜素用作一种重要的化学分析指标<sup>[25]</sup>。甜菜素主要存在于石竹目（Caryophyllales）的商路科（Phytolaccaceae）、中心子科（Centrosperniae）的仙人掌科的植物花瓣中，同时在一些真菌中也发现了甜菜素的积累如鹅膏菌、湿伞中<sup>[26、27]</sup>。通常将甜菜素分为甜菜红素与甜菜黄素，其中甜菜红素分为4类（1）甜菜类甜菜红素；（2）苋菜类甜菜红素；（3）千日紫类甜菜红素；（4）脱梭类甜菜红素。而甜菜黄素则分为两种类型，即氨基酸类甜菜黄素与胺类甜菜黄素<sup>[28]</sup>。

甜菜素在植物液泡中的积累，能够使植物呈现出缤纷多彩的花色吸引昆虫授粉，呈现不同程度的果实颜色，吸引动物取食，从而将种子带到更远的地方<sup>[28]</sup>同时甜菜素的快速积累，可以作为植物紫外线的过滤器，保护植物组织被紫外线所灼伤<sup>[29]</sup>。

一般情况下甜菜黄素的吸收波长在 465nm 附近，而甜菜红素受提取溶剂的差异则在 535-538nm 处会产生特征峰值，因此在对植物甜菜素定量分析时，通常在 465-538nm 处吸收光度来计算。

### 1.1.2 植物液泡 pH 值对花瓣中花青素苷呈色的影响

植物花瓣液泡中的 pH 值会对花色产生重要的影响，近些年来生物学家、化学家们使用微量比色法测量了近 300 种植物花瓣的 pH 值，结果发现其 pH 范围在 2.9~7.0 之间，酸性的增强可以使蓝色花瓣偏向于红色，研究发现蓝紫色品种月季花瓣液泡中的 pH 值要高于其它红色品种<sup>[30]</sup>。

### 1.1.3 植物金属离子对花瓣中花青素苷呈色的影响

金属离子能与能对花青素苷分子结构产生影响，使其变异为超分子花色素，从而使花色产生变异，甚至使花色趋近与蓝色<sup>[31]</sup>，经研究表明一些二价金属离子结合飞燕草素，可以使花瓣呈现出蓝紫色的呈色效果<sup>[33]</sup>，目前对金属离子与花青素苷螯合使花色趋向与蓝色的研究已经得到了广泛研究，其中就包含八仙花，一般情况下八仙花仅开粉白色的花瓣，在一定特定环境下其花瓣中的飞燕草素苷与铝离子发生络合反应可产生蓝色花的效果<sup>[19]</sup>。而 Mg 离子在加强观赏植物呈色方面也起到了重要作用，如袋鼠花 (*Anigozanthos Flavidu*) 螯合 Mg 离子，使花青素苷含量的增加使其呈红色；补血草通过 Mg 离子的螯合使其长出蓝色的佛焰苞；丝石竹则使其颜色变异呈粉白色，不同植物的花青素苷在通过 Mg 离子的螯合可以使颜色得到加深<sup>[34]</sup>。最近的研究已表明，通过对紫色郁金香  $Fe^+$  存储基因 *TgFer1 RNAi* 的抑制，能够使转基因后的紫色郁金香花瓣颜色改变为蓝色<sup>[35]</sup>。

### 1.1.4 花青素苷合成代谢途径

花色素苷的生物合成途径是多种多样的，矮牵牛、拟南芥等样本模式植物花青素合成途径已经得到广泛研究。在经苯丙氨酸酶促反应合成后经过不同的糖基化、酰基化修饰后在植物液泡中聚集<sup>[30-36]</sup>，通常将花青素苷的代谢途径分为 5 个阶段<sup>[37]</sup>，第一阶段为花青素苷次生代谢产物共有的由苯胺酸裂解酶 (*PAL*) 肉桂酸羟化酶 (*C4H*) 共同修饰。第二阶段受查尔酮合成酶 (*CHS*) 与黄烷酮-3 羟化酶 (*F3H*) 的联合调控，香豆酰 (*CoA*) 与丙二酰 (*CoA*) 二氢黄酮醇经过各种酶化反应在特定的条件下转化成各种类型的花青素苷和各类的黄酮类化合物<sup>[38][39]</sup>。第三阶段受二氢黄酮醇还原酶 (*DFR*)、花青素苷合成酶 (*ANS/LDOX*) 的影响能够将无色的二氢黄酮醇转换成无色的花青素苷，是合成未修饰花青素苷的关键步骤，同时也是花青素苷合成的关键<sup>[36]</sup>。第四阶段是花青素苷骨架合成之后的集团修饰，大多数花青素母核 1、3、7 位都要一个或多个经糖苷化、酰基化、羟基化修饰，不同的修饰能够形成不同的花青素苷比如黑色的大丽花与浅色系的大丽花品种相比，其 *DvFNS* 的表达受到抑制，使得黄酮的合成被切断，引起花青素苷含量的大量积累<sup>[2]</sup>，同时

在对红葡萄与绿葡萄的次生代谢产物的分析也发现,绿色葡萄 *UFGT* 不表达,而红葡萄中 *UFGT* 的表达量很高,也就说明了糖基化的调控可以决定花青素苷的积累<sup>[40]</sup>。第五阶段是花青素苷在液泡中的转运与汇集,花青素苷在细胞质内质网膜上与修饰集团反应完成后,转运到液泡中汇集储存,比如在转运 *MATE* 家族蛋白、谷胱甘肽转移酶 (*GST*) 均属于花青素液泡转移蛋白<sup>[41]</sup>。

花青素苷生物合成途径在 *F3H*、*F3' H* 和 *F3' 5' H* 三个关键酶作用下,形成 3 个分支。其中 *F3' H* 和 *F3' 5' H* 能够决定花青素 B 环羟基化类型,决定花色素的重要酶,在 *F3H* 的催化下柚皮素合成香橙素 (Dihydrokaempferol, *DHK*), *F3' H* 和 *F3' 5' H* 使香橙素羟基化,分别形成二氢栎皮酮与二氢杨梅素。因此 3 个羟化酶活性的强弱及 *DFR* 的底物催化选择成为了影响花色的主要原因。

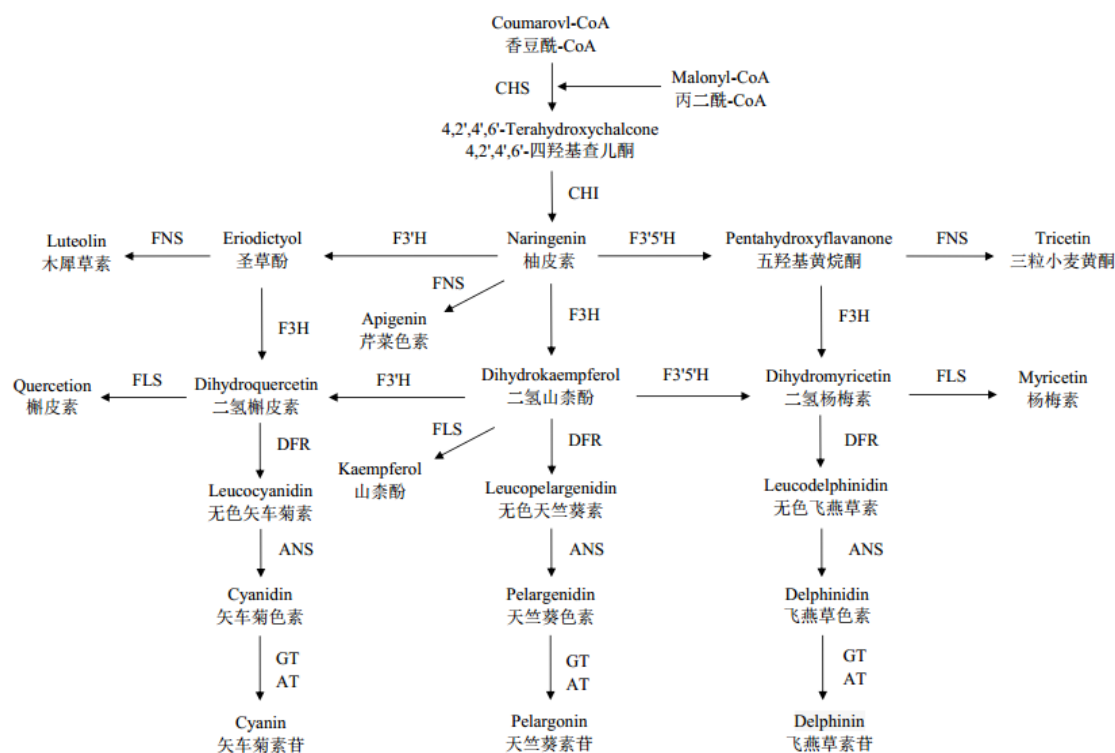


图 1-2 花青素苷通路代谢途径图  
Fig 1-2 Anthocyanin biosynthesis pathway

## 1.2 植物花色表型的测定

花色对提升花卉的观赏价值具有重要的意义,是不同花色品种分类与鉴定的重要依据,在花色分类与分子育种领域都具有指导意义。因此科学准确的对花色表型进行分类分析对研究花色呈色机理具有重要的意义。

目前常用的测色方法主要有三种，1.目视测色；2.比色卡比色法；3.色差仪测色法。

### 1.2.1 目视测色

目视测色是一种较古老的测色方法，这种方法主要通过人目视观测，全凭主管感觉对目标颜色做出色彩评价。因此就需要测试者对色彩拥有敏锐的判断能力，能识别出色彩的差距。目视测色法是一种简单快捷的测色方法，但该种方法受光照影响与测试者主观感受的影响具有很大的误差。

在通常情况下对测色样本进行目视测色时，最理想的测色方式是将标准色彩样本与受测试样本并排放置于标准光源照射条件下进行目视观测，以判断色彩差异。

### 1.2.2 R.H.S.C.C 比色卡比色法

R.H.S.C.C (Royal Horticultural Society Color Chart) 是英国皇家园艺学会比色卡，被广泛的运用于观赏植物颜色评价领域。植物新品种登记时要求登记观赏植物的 RHS.C.C 色彩编号。RHCC 根据颜色三刺激值（色度、明度、饱和度）进行分类，目前 RHS.C.C 比色卡已经收录了八百多种颜色提供给测试者进行对比评价，可满足现今园艺植物颜色测量基本要求。比色卡比对植物色彩，其优点是方便快捷拥有一定的准确性，便于野外进行考察时使用，缺点是受光源的条件，受观测主观性的影响，往往不同的观测者观测数据是有差异的。通常认为早上 10 点的光照是进行 RHSCC 比色卡比色的要求光源<sup>[4]</sup>。在进行比色时，测试者应当距离被测试样品约 15-30 米并且保证一定的观测角度（45 度）以判断其颜色。

### 1.2.3 仪器测试法

仪器测色法原理是用仪器测量来自花瓣反射的光线，并将这些光谱数据转换呈色彩数据，计算出颜色的三个刺激值（亮度  $L^*$ 、红度  $a^*$ ，黄度  $b^*$ ）。用  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、值来对颜色进行描述。目前测色仪器在花色测定领域使用的同时也广泛的运用于服装、纺织、印刷等行业。

根据国际照明委员会（International Commission on Illumination）制定的 CIE Lab 标准系统基于统一的视觉色空间（图 1-3），将所有的颜色定位与“色彩体”（Color Solid）上，“色彩体”（Color Solid）是一种三维坐标，自然界的所有色彩都可以在其坐标上定位<sup>[42]</sup>。这个色彩体，上部呈白色下部呈黑色，中间部分呈不同程度的灰色，色彩体周围部分呈现出红、黄、绿等不同的色相。越靠近中心轴的色相灰化的程度越高，而外围的颜色是最纯的<sup>[43]</sup>。

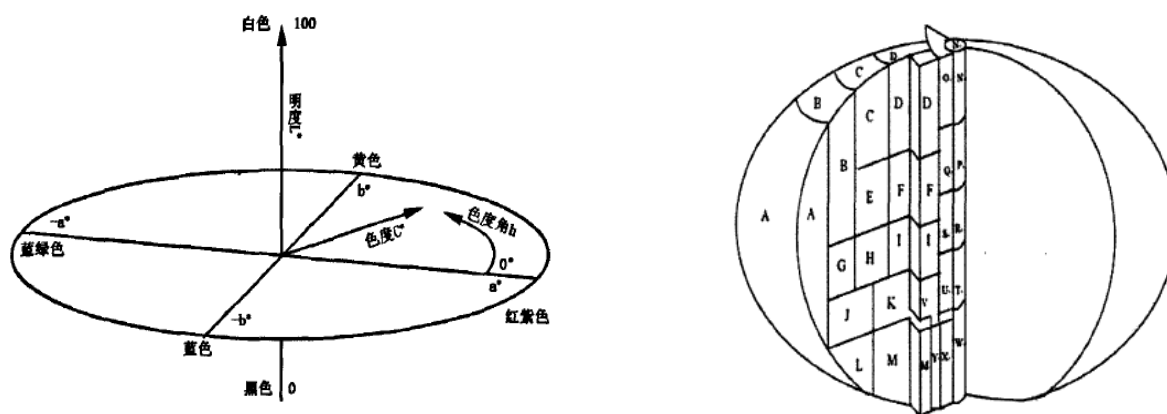
图 1-3 “色彩球”与 CIELAB 色空间的坐标分布<sup>[53]</sup>

Fig 1-3 Color solid and CIELAB square coordinates

同时 CIE Lab 还能用  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  色空间 (Color Space) 直角坐标轴表示。纵坐标  $L^*$  代表亮度, 从 0~100 亮度逐渐增强,  $a^*$  值与  $b^*$  值为正交水平轴,  $+a^* \sim -a^*$  的转变意味着红度的增强, 绿度的消退。 $+b^* \sim -b^*$  的转变意味着表蓝色减退, 黄色增强 (CIE, 1986)。 $C^*$  值彩度根据公式 ( $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ) <sup>[53]</sup> 计算得出, 随  $a^*b^*$  绝对值的增加而增加,  $C$  值表示原点的长度,  $C^*$  值越大距离原点越远色彩的纯度越高。 $h^*$  相色角根据公式:  $h = \arctan(b^*/a^*)$  计算得出, 表示色彩的变换,  $0^\circ$  附近为红紫色,  $90^\circ$  附近为黄色,  $180^\circ$  附近为蓝绿色,  $270^\circ$  为蓝色区域。 $0^\circ \sim 90^\circ$  由红色转变为黄色,  $90^\circ \sim 180^\circ$  由黄色渐变为蓝绿色,  $180^\circ \sim 270^\circ$  由蓝绿色渐变为蓝色,  $270^\circ \sim 360^\circ$  由蓝色渐变为紫红色 (图 1-3)。

### 1.3 植物组织结构对花色的影响

花瓣是花色的承载体。其组织结构直接影响着花色的变化。植物花瓣的组织结构是由上表皮 (Upper epidermal layer)、栅栏组织 (Palisade tissue)、海绵组织 (Spongy parenchyma)、和下表皮 (Lower epidermal layers) 组成的。通常情况下色素成分主要存在与上下表皮细胞中, 一些颜色较深的植物其色素成分在栅栏组织和海绵组织中也有分布<sup>[10]</sup>。

花瓣表皮细胞的形状也可以改变花瓣的颜色, 花瓣的表皮细胞形状与色素细胞层有一定的光学特性, 从而影响花瓣的视觉效果。多数被子植物花瓣上表皮细胞常呈圆锥状, 它们可以增加进入表皮细胞入射光的比例, 提高色素对光的吸收, 从而增加颜色的强度<sup>[44]</sup>, 比如金鱼草<sup>[45]</sup>、非洲菊<sup>[20]</sup>、莲属植物<sup>[46]</sup>等植物花卉都拥有锥形的表皮细胞, 增强入射光的反射能增强授粉着的吸引作用。而呈扁平状。扁平状的细胞结构能造成更多的反射光, 反而使花色变浅<sup>[47]</sup>。了解不同植物的组织解剖结构对于品种鉴别、植物分类学和进化研究都十分重要。

植物表皮细胞的形状是由其基因决定的，最早由 Noda 等在金鱼草突变体中发现<sup>[48]</sup>，该基因编码一个具有 *R2R3* 结构域的 *MYB* 类转录因子，该转录因子对金鱼草（Snapdragon）表皮细胞的锥形化有着重要的影响<sup>[49]</sup>。*MYB* 类转录因子不仅能使植物花瓣表皮细胞形状产生变化，而且还能使表皮产生类似天鹅绒的细小绒毛，甚至能够参与到植物花瓣的花青素的合成，能够影响到植物花瓣的呈色、气味、表型等一系列物理及化学特性。对植物的授粉及繁殖有重要的辅助作用。对 *MYB* 类转录因子的研究，观赏植物的分子育种与新色彩的创建具有重要的意义。

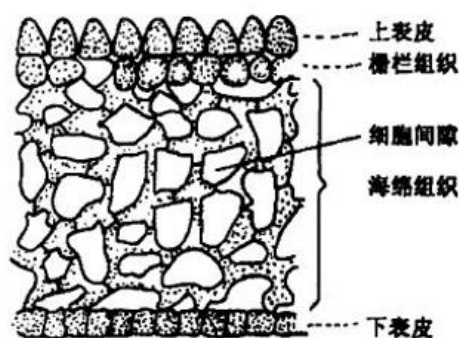


图 1-4 花瓣横切面显微结构图<sup>[11]</sup>  
Fig 1-4 The transverse section of the petals

## 1.4 国内外相关研究概括

### 1.4.1 花色形成机理研究现状

人类对植物花色呈色机理的研究历史较为悠久，早在 1644 年，罗伯特·波义耳第一次描述了酸、碱和盐基基团对植物呈色的巨大影响。1910 年-1930 年德国科学家维尔斯泰特（Richard Martin Willstätter）和瑞士学者卡勒（Paul Karrer）在类胡萝卜素的提取和类胡萝卜素结晶分离为此后的绝大部分类胡萝卜素结构探究做出了巨大贡献，进入 20 世纪，迈卡特（Marquart）、莫里斯（Molish）、贝特·史密斯（Bate Simith）和哈本（Harborne）等在类黄酮的化学结构和生物化学方面做出了巨大的贡献<sup>[42]</sup>。

随着花色表型与花色呈色机理研究的逐步成熟，对花色的成因提供了更为科学的解释，同时也提供了系统的为色素与表型的研究提供了指导方法。研究者借助各种测色仪器对花色表型进行测量分析，并开展对彩色马蹄莲花色参数空间分布规律的研究，使用高效液相色谱-光电二极管阵列检测（HPLC-DAD）和高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用（HPLC—ESI-MS）技术，对植物色素进行定量与定性分析，制作植物组织切片观察植物花瓣显微组织结构与色素的分布情况。目前花瓣色素的种类及含量作为影响花色形成的最

重要因素和对花色变异的影响问题引发了越来越多科学家和生物学家的关注<sup>[49]</sup>。

我国花色研究起步较晚，由于受科技条件，市场滞后，思想观念的影响。花色研究落后与荷兰、日本等花卉出口大国。现今由于人们生活水平的提高，花卉受到了人们的追捧。得益于花卉产业的兴起，芍药<sup>[50]</sup>、百合<sup>[51、52]</sup>、矮牵牛<sup>[61]</sup>等观赏植物呈色机理，得到了系统的分析研究。

### 1.4.2 彩色马蹄莲研究现状

彩色马蹄莲原产于东非地区，1980 年代以后我国开始从西欧国家引进可种植的彩色马蹄莲种球，据统计我国每年从欧洲、大洋洲地区进口种球大约 80 万枚左右。自 20 世纪末我国云南、广西、海南等温热潮湿地区也开始大规模的组培彩色马蹄莲种球，以云南省为例，到 20 世纪初，云南彩色马蹄莲种植面积达到全国种植面积的 50% 以上，具调查研究所得到的数据，云南省嵩明县是云南彩色马蹄莲主要产区，昆明真善美兰业有限公司所生产的彩色马蹄莲鲜切花远销国内外，获得了丰厚的经济效益。

但是目前我国彩色马蹄莲育种水平与国外花卉强国荷兰、日本、新西兰等国家差距较大，由于彩色马蹄莲多为白花马蹄莲与香水马蹄莲杂交品种。受国外种球知识产权保护的影响，我国彩色马蹄莲花卉种植业一直处于产业链的底端，以劳动密集种植业为主，存在利润低、产业结构不合理等诸多问题。

目前对彩色马蹄莲花色机理的研究还处于起步阶段，据黄胜忠的研究，其主要呈色色素为  $\beta$ -carotene 胡萝卜素与矢车菊素（Cy），其中  $\beta$ -carotene 胡萝卜素是黄色品种的主要呈色物质<sup>[38]</sup>，矢车菊（Cy）为唯一的花青素苷成分。但由于其选择品种实验样本量较少（8 种）并不具备代表的普适性。

因此本实验研究以 27 个彩色马蹄莲不同色系品种为实验样本，广泛全面的研究彩色马蹄莲的主要呈色物质与色素分布情况，为彩色马蹄莲分子育种提供理论基础，同时为打破彩色马蹄莲种球国际专利壁垒提供技术支撑。

## 1.5 本研究的设计思路

### 1.5.1 研究目的及意义

花色一般被认为是花最神秘的特征之一，既是植物提供给授粉者的视觉信号，能够提高传粉和繁殖效率，同时也是观赏植物在园艺上重要的观赏性状之一，影响着花卉作物的商业价值。随着 20 世纪以来，植物细胞培养和组织培养技术、转基因技术等现代生物技

术的普及推动了观赏植物种质资源的遗传分析、新品种开发培育和打破物种界限，定向选育等技术的使用。在社会经济高速发展的今天，花色作为花卉业产品在商品价值上体现最直观的品质性状之一,研究和改良花色不论对提升花卉产业的竞争力还是对现代生物技术为平台的分子育种技术与传统技术相结合的生物技术的发展都具有深远的意义。

彩色马蹄莲佛焰苞是在特有的佛焰花序中，包裹肉穗花序的形似花冠的总苞片，因其形似庙里面供奉佛祖的烛台而得名。本研究根据研究彩色马蹄莲不同色系间佛焰苞的相似和相异颜色特点，本研究选取 27 个品种的彩色马蹄莲，通过测色法，组织切片法，紫外分光光度法，高效液相分析法，转录组测序法，对佛焰苞表型的测定和分析，佛焰苞组织结构对其颜色影响，色素对佛焰苞颜色形成的影响进行研究。为彩色马蹄莲的起源系统进化、花色分类、分子育种提供参考意义，同时也为为彩色马蹄莲的起源和系统进化、新品种的鉴定和品质资源的调查与保护提供技术支撑。

### 1.5.2 本研究的技术路线



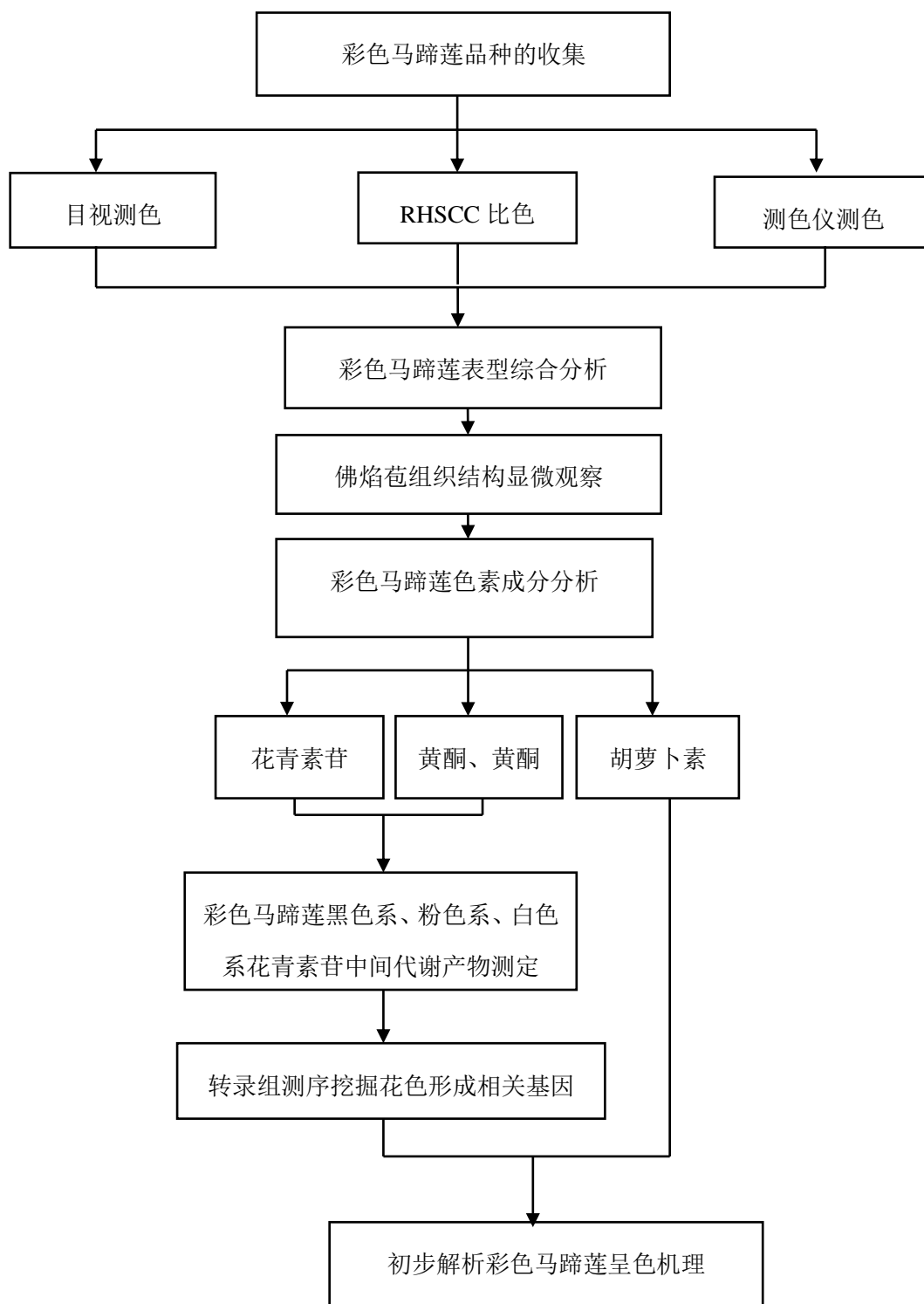


图 1-5 研究技术方案  
Fig 1-5. Research technical scheme



## 第二章 彩色马蹄莲各色系品种的表型分析

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 材料

项目组在云南昆明地区进行彩色马蹄莲资源调查时, 收集到 27 个品种, 一部分(盆栽)购自于云南真善美花卉科技有限公司的资源圃, 材料购回之后放置在实验室内, 定期浇水, 保持放置于适宜材料生长或保持活性的环境中以避免马蹄莲佛焰苞不同佛焰苞着色时期的色彩差异、佛焰苞因挤压或因鲜活程度产生的皱褶等问题, 另外有一部分(切花)购自于云南缤纷园艺有限公司苗圃。材料购回后立即处理, 以保证试验材料的新鲜。

#### 2.1.2 方法

使用色彩色差仪(CR-400Konica Minolta China Investment Ltd.)以  $C/2^\circ$  为条件测量佛焰苞的颜色。每个品种取 3 个不同的单株行取材, 提高品种的代表性, 减少生长环境差异所造成的误差, 每个单株测量 3 次, 取彩色马蹄莲佛焰苞中部着色均匀部位(一般选佛焰苞中部色素分布均匀部位)进行测色正面平置于干净的白纸上, 将集光口对准佛焰苞中部位置进行测量, 最终取平均值代表佛焰苞颜色。

RHSCC 比色卡比色, 将佛焰苞着色较均匀的中间部分与 RHSCC 进行对比。

#### 2.1.3 数据分析

利用 PASW Statistics 18 软件, 对使用色差仪测得的彩色马蹄莲佛焰苞花色表型值进行 Hierarchical 聚类分析和判别分析。聚类分析方法选用最远邻近法(Furthest neighbor), 用 Excel 对彩色马蹄莲佛焰苞三刺激值( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ )值进行相关性分析并制作图标。

### 2.2 结果与分析

#### 2.2.1 彩色马蹄莲不同品种佛焰苞色彩表型特点分析

本研究将收集到的 27 个彩色马蹄莲品种为材料, 用色差仪测定彩色马蹄莲不同颜色佛焰苞的  $CIEL^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 使用 Spass 进行聚类分析并结合色空间(Colour Space)并对其进行聚类分析, 在分类数为 6 处绘制跳变线, 建立彩色马蹄莲表型分类系统, 将彩色马蹄莲分成黑(Black group)、红(Red group)、紫红(Amaranth group)、粉白(Pink group)、橙(Orange group)、黄(Yellow group) 6 个色系(图 2-1; 表 2-1)。

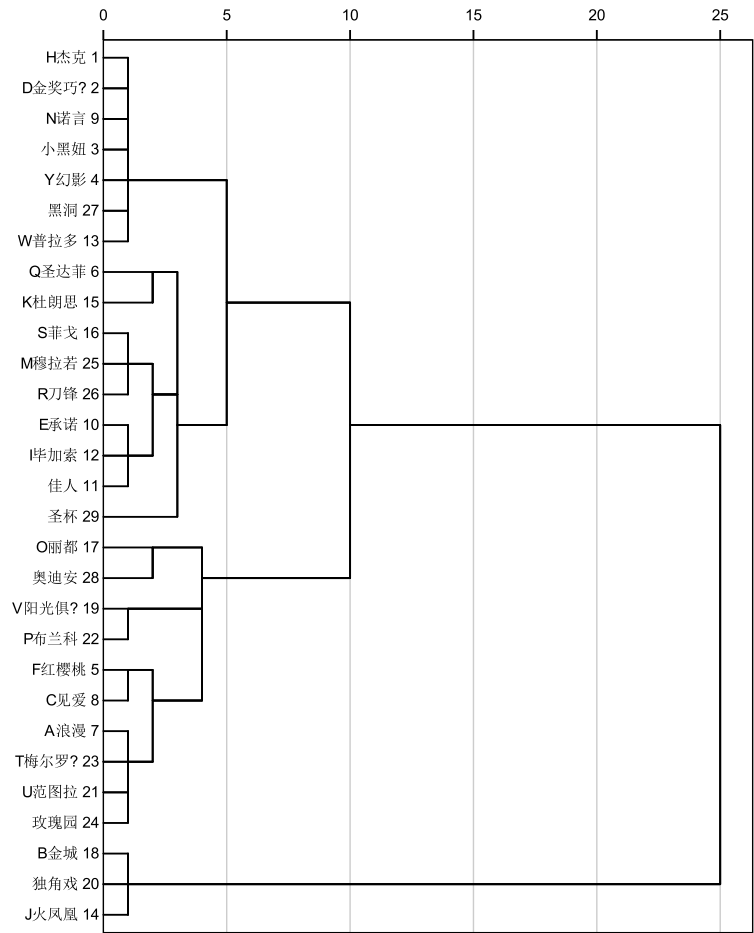


图 2-1 彩色马蹄莲品种 Q 型聚类分析图

Fig 2-1 Dendrogram of cluster of *Z. hybrid* cultivar

表 2-1 彩色马蹄莲花色分类

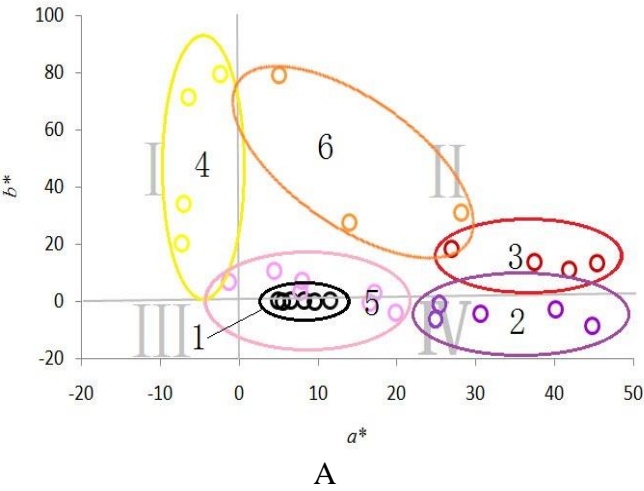
Table2-1 The clusters of flower color of *Z. hybrid* cultivars according to the flower to the flower color parameters

编号	色系	品种名称						
1	黑	‘小黑妞’	‘杰克’	‘金奖巧克力’	‘幻影’	‘诺言’	‘黑洞’	‘普拉多’
2	紫红	‘圣达菲’	‘承诺’	‘佳人’	‘毕加索’	‘圣杯’		
3	红	‘刀锋’	‘穆拉若’	‘菲戈’	‘杜朗思’			
4	黄	‘金城’	‘阳光俱乐部’	‘独角戏’	‘布兰科’			
5	粉白	‘浪漫’	‘见爱’	‘范图拉’	‘梅尔罗斯’	‘玫瑰园’	‘红樱桃’	
6	橙	‘丽都’	‘火凤凰’	‘奥迪安’				

27 个彩色马蹄莲品种佛焰苞颜色在  $a^*$ 、 $b^*$  色相坐标上，主要分布于 I、II、IV 象限，在蓝色区域的 III 象限没有分布（图 2-1）。在 I 象限分布黄色系，II 象限分布橙色系、红色系，IV 象限主要分布着黑色系与紫红色系，粉白色系分布于 I、II、IV 象限。 $a^*$  值（红度）的分布范围为：-7.25（‘布兰科’）~45.46（‘菲戈’）； $b^*$  值（黄度）分布范围为 -4.56（‘诺言’）~79.59（‘独角戏’）； $h_{ab}$ （色相角）分布范围为：-19°（‘毕加索’）~110°（‘布兰科’）（见表 2-2）。

表 2-2 彩色马蹄莲花色测定数据  
Table 2-2 Data of *Z. hybrida* flower color

品种名称	编号	RHSCC	CIELab coordinates				
			L*	a*	b*	C*	h°
‘幻影’	A	N77A	19.20	4.94	0.18	4.96	2.06
‘杰克’	B	N79A	22.53	9.53	0.03	9.53	0.02
‘金奖巧克力’	C	187A	22.67	8.26	0.13	8.26	0.85
‘黑洞’	D	N92A	23.89	5.56	-0.08	5.55	-0.82
‘小黑妞’	E	N187	20.77	6.58	0.10	6.58	0.80
‘普拉多’	F	N92	24.39	16.50	-0.39	16.49	-1.35
‘圣达菲’	G	64B	48.42	25.39	-1.00	25.39	-2.30
‘佳人’	H	71B	36.69	40.12	-2.75	40.17	-3.80
‘诺言’	I	22A	20.22	11.48	0.29	11.5	1.43
‘毕加索’	J	79A	28.46	24.91	-6.37	25.58	-19.0
‘圣杯’	K	N34	51.94	-6.92	48.15	48.5	33.56
‘杜朗思’	L	44A	48.08	26.94	18.19	32.78	34.01
‘菲戈’	M	53D	31.99	45.46	13.53	47.57	16.65
‘穆拉若’	N	53A	32.88	41.87	11.23	43.47	15.00
‘刀锋’	O	N45	35.65	37.50	13.91	40.17	20.33
‘阳光俱乐部’	P	2B	73.59	-6.98	34.02	35.21	102
‘独角戏’	Q	7A	81.22	-2.33	79.59	80.12	92
‘金城’	R	6A	83.80	-6.38	71.30	72.08	96
‘布兰科’	S	150D	74.15	-7.25	19.99	21.72	110
‘浪漫’	T	65B	71.37	7.76	3.17	8.57	22.19
‘玫瑰园’	U	27B	80.50	4.41	10.73	12.05	67
‘梅尔罗斯’	V	36B	69.51	7.94	7.04	10.93	41
‘范图拉’	W	N155D	78.38	-1.36	6.63	7.24	102
‘见爱’	X	55C	70.47	17.13	2.99	17.47	9.89
‘火凤凰’	Y	17B	74.22	5.1	79.36	80.02	86
‘丽都’	Z	N30D	58.89	14.01	27.76	31.53	63
‘奥迪安’	α	32B	69.27	37.1	32.79	49.80	73.2



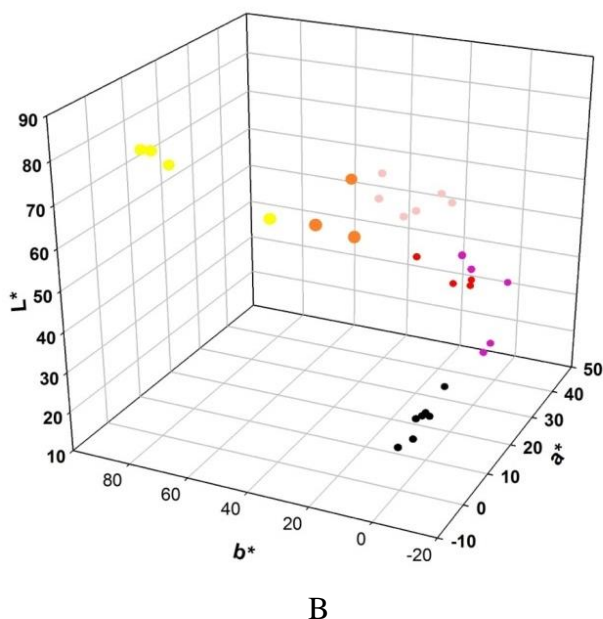


图 2-2 彩色马蹄莲色彩分布  
Fig 2-2 Flower color distribution of *Z. hybrida* cultivars  
A:  $a^*$ ,  $b^*$  二维坐标; B:  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  三维坐标.

1: 黑色系; 2: 紫红色系; 3: 红色系; 4: 黄色系; 5: 粉白色系; 6: 橙色系.

(1) 通过观察研究可发现, 本次研究所收集到的 27 个彩色马蹄莲品种, 不同色系品种的  $L^*$  值 (亮度) 随黄色系→粉白色系→橙色系→红色系→紫红色系→黑色系的顺序依次递减, 黄色系  $L^*$  值最大, 黑色系最小。

(2) 彩色马蹄莲品种  $a^*$  值 (红度) 的分布特征为, 黄色系品种在负值范围内分布, 其余色系品种均在正值范围分布,  $a^*$  值大小排序依次为红色系>紫红色系>黑色系>粉白色系>黄色系, 红色系品种  $a^*$  值最大。

(3)  $b^*$  值 (黄度) 的分布特征为紫红色系品种在负值范围内分布, 粉白色系与黑色系品种在正负值均有分布, 其它色系品种在正值范围内分布, 这与洪艳<sup>[62]</sup>研究的菊花品种花色的  $b^*$  值分布特点相似之处。 $b^*$  值大小依次为橙色系>黄色系>红色系>黑色系>粉白色系>紫红色系, 橙色系品种  $b^*$  值最大。

(4)  $h_{ab}$  值 (相色角) 的分布特征为黑色系、粉白色系、紫红色系、红色系相色角分布范围 (-19~34.5) 趋近与  $a^*$  轴附近, 黄色系与橙色系品种 (49°~110°) 分布与 90° 附近趋近于  $b^*$  轴, 这与 CIEL $L^*a^*b^*$  色空间中对应的各种颜色色相角分布范围大致相同。 $h_{ab}$  值大小依次为黄色系>橙色系>粉白色系>红色系>紫红色系>黑色系, 其中黄色系的相色角  $h_{ab}$  最大。

(5)  $C^*$  值 (彩度) 的分布大小依次为橙色系>红色系>黄色系>紫红色系>粉白色系>黑色系。

(6) 通过分析彩色马蹄莲黑色系与粉白色系品种之间  $L^*a^*b^*$  值发现, 黑色系与粉白色系

$a^*$ 值、 $b^*$ 值、 $C^*$ 值（彩度）分布相似，黑色系的  $L^*$  值较粉白色系小。

（7）黄色系与橙色系品种之间  $b^*$  值分布相似，但橙色系品种  $a^*$  值较黄色系品种高， $L^*$  值较黄色系品种低。

（8）红色系与紫红色系品种之间  $a^*$  值与  $L^*$  值分布相似，但紫红色系品种的  $b^*$  值比红色系低，这可能就是造成红色系与紫红色系品种颜色差异的主要原因。

### 2.2.2 彩色马蹄莲三刺激值之间的相关性分析

$L^*$  值是衡量植物花瓣明暗的重要指标， $a^*$  与  $b^*$  值也是决定花色变化的重要因素。 $a^*$  值、 $b^*$  值的变化会对植物花瓣的亮度产生很大的影响。

使用 Microsoft Office Excell 软件对各色系的  $L^*$  值与  $a^*$  值、 $L^*$  值与  $b^*$  值进行拟合曲线分析，拟合度  $R^2$  的大小是估测模型可靠度的重要指标，拟合度  $R^2$  越趋近与 1，说明模型的可靠性越高，经分析发现彩色马蹄莲各色系品种中紫红色、红色、粉色、橙色品种这四个色系品种  $L^*$  值与  $a^*$  值呈现出极显著的负相关（ $R^2=0.663$ ）（图 2-3）关系，说明随着红度的提高，佛焰苞的亮度  $L^*$  值随之降低。

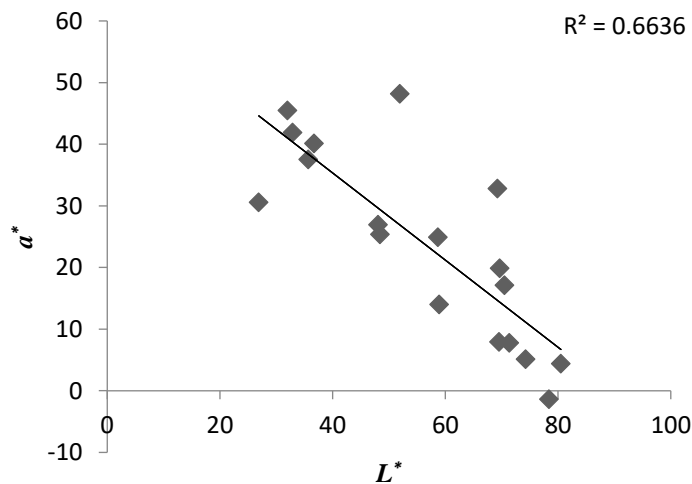


图 2-3 彩色马蹄莲紫红色、红色、粉色、橙色品种花色  $L^*$  与  $a^*$  的关系  
Fig 2-3 Relationships between  $L^*$  and  $a^*$  among red pink amaranth orange of *Z. hybrid*

而在黄色、橙色、红色这三个色系品种中  $L^*$  值与  $b^*$  值呈极显著的正相关关系（ $R^2 = 0.613$ ）说明随这  $b^*$ （黄度）的提高， $L^*$  值也随之升高（图 2-4）。

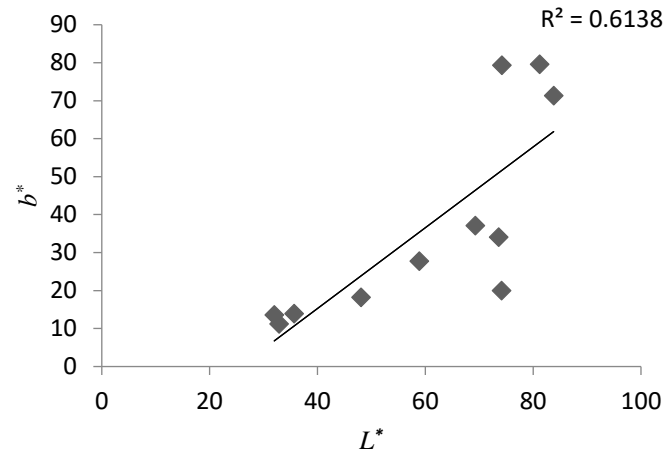


图 2-4 彩色马蹄莲红色、橙色、黄色品种  $L^*$  值与  $b^*$  值的关系  
Fig 2-4 Relationships between  $L^*$  and  $b^*$  among yellow orange red of *Z. hybrida*

$C^*$ 值表示了距离原点的长度，即距离原点越远， $C^*$ 值越大，色彩饱和度越高，颜色越纯。可知:橙色系于黄色系  $C^*$ 与  $L^*$ 值呈显著的正相关 ( $R^2=0.552$ ;  $R^2=0.844$ )，橙色系品种与黄色系品种随着彩度的增大，这主要是因为黄色系品种与橙色系品种的呈色物质是黄酮与黄酮醇，该色素呈色较为明快所导致的 (图 2-5)。红色系  $C^*$ 值与  $L^*$ 值呈显著的负相关 ( $R^2=0.904$ ) 表明随彩度的增大，亮度线性降低。其余的黑色系、紫红色系、粉白色这三个色系品种  $C^*$ 值与  $L^*$ 值线性回归拟合水平并不显著 ( $R^2=0.164$ ;  $R^2=0.217$ ;  $R^2=0.224$ ) (图 2-5)。

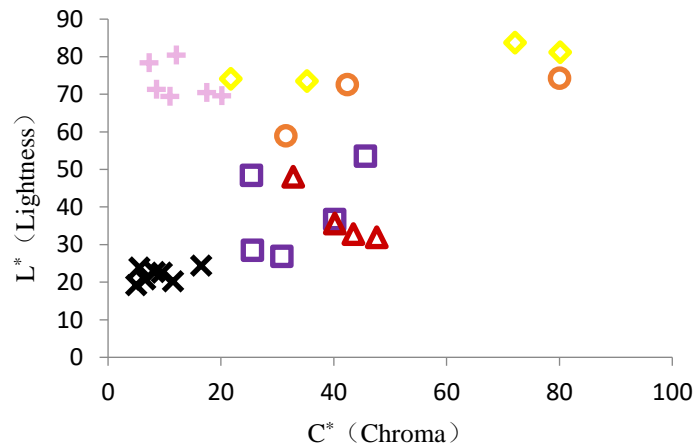


图 2-5 彩色马蹄莲品种  $L^*$ 与  $C^*$ 分布散点图  
Fig 2-5 The scatterplot according to  $L^*$  and  $C^*$  among *Z. hybrida* cultivars  
+: 粉白色系;  $\diamond$ : 黄色系;  $\triangle$ : 红色系;  $\square$ : 紫红色系;  $\times$ : 黑色系;  $\circ$ : 橙色系



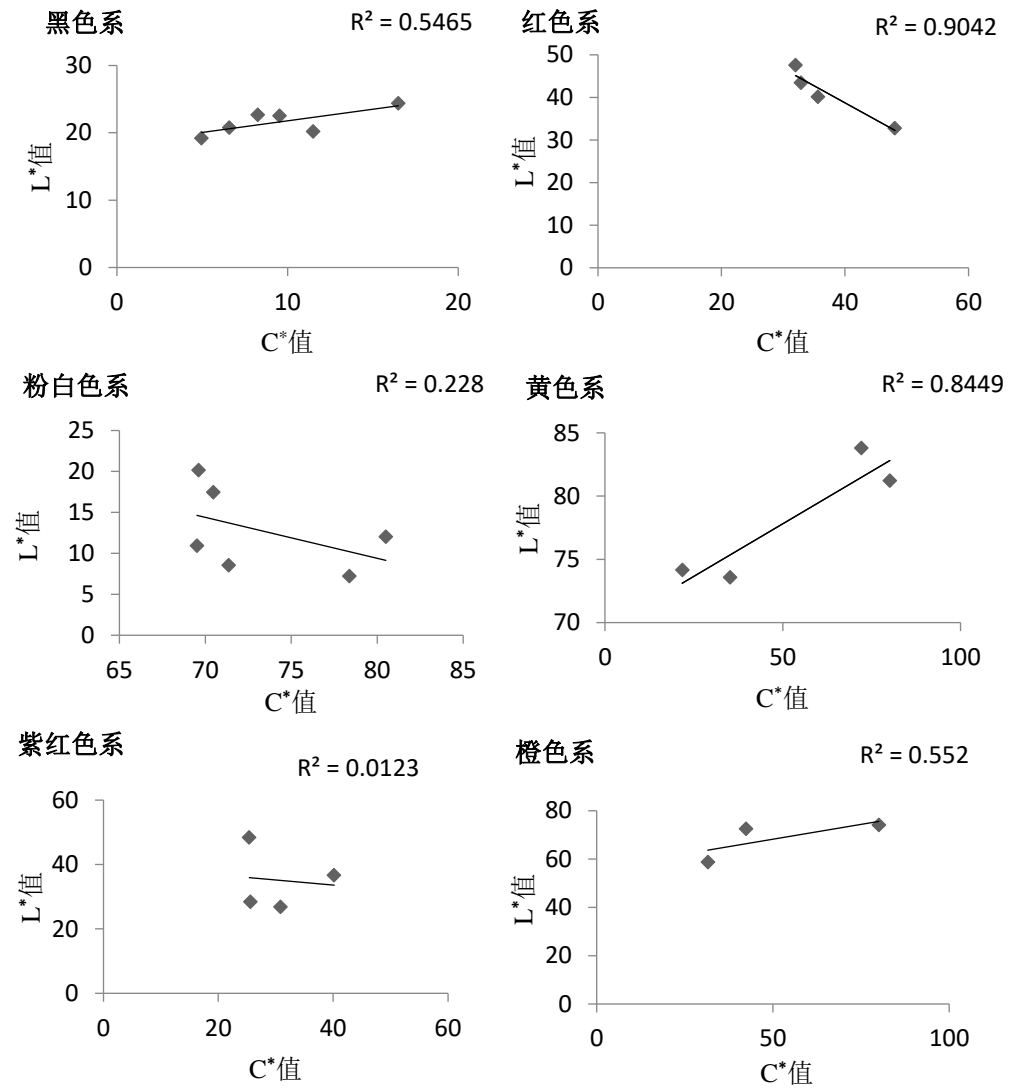


图 2-6 彩色马蹄莲各色系 L\* 与 C\* 分布散点图

Fig 2-6 The scatterplot according to L\* and C among each group *Z. Hybrida* cultivars

## 2.3 讨论

### 2.3.1 彩色马蹄莲佛焰苞花色测量方法的比较

在花色测定方法选择上，主要考虑以下几个因素（1）实验所需颜色数据的精度；（2）花色测定的工作环境（实验室或者野外）；（4）要结合受测植物的形状大小进行选择测量方法；（3）实验工作量和仪器设备费用及可移动性。

目视测色能满足对于实验精度达不到对花色进行定量分析时的定性分析。但存在主观性强，不同实验个体之间存在差异的缺点，所以常在无需进行定量分析，仅对花色进行简单分类和初步的性状描述时使用。目视测色法要求能在较长时间内保持稳定的限定光源，在野外进行观察时难以保证光源的限定，具有一定的局限性。

比色卡比色法的优点是使用方便、移动性强，采集的色彩数据相对准确，价格低廉，重量轻（892g），已经收录到 800 余种颜色可供比对测色，极大程度的满足园艺测色的需要，但是受采集测色人员色感的限制，误差较大，同时还受光照环境的限制，难以完美匹配植物的真实颜色<sup>[63]</sup>。另外随着比色卡使用时间的增加，比色卡颜色不可避免的产生减退现象，因此需要妥善保管与及时的更换。由于拥有轻便的优势，常常用于对植物花色进行初步判定，或用于野外采集时使用<sup>[43]</sup>。

测色仪器的使用能使颜色数字化输出，受外界影响小，花色数据精确度高，便于深入的统计分析数据。测色仪器测色时要注意仔细选择色差仪光源、几何条件及样品颜色的代表性<sup>[18]</sup>。因此，进行植物花色测量时，常将目视测色与仪器测色相结合，从而得出更加合理的测量数据。

本研究对花色表型  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值进行聚类分析得到的结果未能完全表征植物花色的分布特点，如没有将粉色和白色品种分开，二者归类于粉白色系中。以往研究使用聚类分析的方法对花色表型进行分类，也存在不能将白色系和粉色系等浅色系进行区分的问题<sup>[62]</sup>。而洪艳等（2012）使用 ISCC-NBS 色名表示法进行分类可以从色彩学角度有效地区分白色和粉色、黄色和黄绿色等色系，但这种方法也存在操作繁琐，费时费力等不足之处。

### 2.3.2 彩色马蹄莲佛焰苞花色表型的分析

近年来，很多研究者以花色表型数量化值为基础，对观赏植物花色形成机理与花色分级开展了大量的研究工作<sup>[63]</sup>。而做为新兴观赏花卉的彩色马蹄莲，关于随其花色表型数量化值进行分类的研究，在国内外观赏植物领域的研究还是比较罕见的。

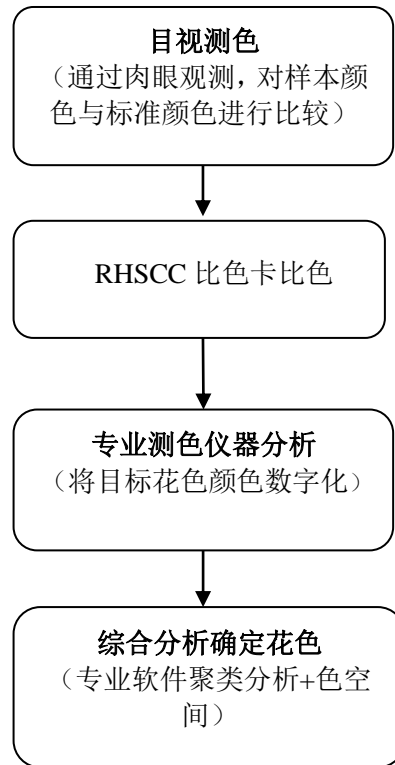
将颜色数字化是对花色研究的前提，本试验使用测色仪对 27 个彩色马蹄莲花色进行测量。测量结果发现紫红色、红色、橙色、粉白色、这四个色系品种  $L^*$  值（亮度）与  $a^*$  值（红度）呈极显著的负相关（ $R^2 = 0.663$ ）（图 2-3），黄色、橙色、红色、三个色系品种  $L^*$  值（亮度）与  $b^*$  值（黄度）呈现出极显著的正相关关系（ $R^2 = 0.613$ ）（图 2-4），这可能与这可能是由于色素成分与含量有关。

彩色马蹄莲不同色系品种明度  $L^*$  与彩度  $C^*$  之间的关系不同。橙色系与黄色系  $L^*$  值与  $C^*$  值呈显著正相关，红色系显著负相关，黑色系、紫红色系、粉白色系线性回归拟合水平不显著。洪艳等（2012）对 811 个菊花品种进行花色表型的  $L^*$  值与  $C^*$  值进行相关性分析发现，粉色、红色、紫色、墨色、橙色和棕色 6 个系，二者呈负相关（ $R^2 = 0.770$ ），而白色、黄色和黄绿色 3 个色系，回归拟合水平不显著（ $R^2 = 0.250$ ）。Hashimoto 等（2000）对 21 个白色、粉色、紫色和蓝色等色系的飞燕草品种花色表型的  $L$  值与  $C^*$  值进行相关性分析发现，二者呈显著负相关（ $R^2 = 0.980$ ）<sup>[64]</sup>。这可能是不同物种所积累的花青素苷成分及其分

布特征以及花瓣的解剖结构不同， $L^*$ 和 $C^*$ 之间表现不同的相关度。

## 2.4 本章小结

根据上述研究成果笔者建立了彩色马蹄莲佛焰苞花色测量评价体系。



颜色量化是进行花色呈色机理研究的前提，本文选取 27 个彩色马蹄莲品种作为目标样本，建立彩色马蹄莲佛焰苞花色测量评价体系，利用测色仪，测量彩色马蹄莲的三刺激值，用聚类分析并结合色空间将花色，黑色、紫红、红色、粉白、黄色、橙色，六大色系。



## 第三章 彩色马蹄莲显微结构与色素分布对呈色的影响

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 材料

本试验选取收集到的 6 大色系 27 个的品种的彩色马蹄莲，所选材料要求完全开放，均为新鲜盆栽。选取彩色马蹄莲佛焰苞着色较为均匀的中间部分用于制作植物切片，观察其显微结构，与色素分布情况。

#### 3.1.2 方法

将培养皿洗净并倒入少量的蒸馏水，清洗载玻片和盖玻片待用，将获得的彩色马蹄莲佛焰苞放置于操作台，用左手指压住，然后在佛焰苞切割处均匀的滴水，以保持材料的湿润，起到润滑的作用，右手夹紧两片刀片划过佛焰苞，获得一片可观察的佛焰苞切片，使用镊子夹取放置于载玻片上，盖上盖玻片，并将多余的水用滤纸吸干，擦拭载玻片周围的水渍放置于载玻片移到显微镜下观察。用目镜和物镜均为 10 倍镜的电子显微镜（Digital Sight DS-Fi2，尼康公司）<sup>[85]</sup>。分析佛焰苞结构和色素在佛焰苞中的分布情况对其颜色变异所造成的影响。

### 3.2 结果与分析

#### 3.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞显微结构的分析

通常情况下花色素存在与上表皮细胞中，颜色较深的花瓣中，叶肉组织或海绵组织细胞中也含有色素，当光线照射到花瓣上穿透色素层时，含色素细胞层数越多，吸收的光线就越多，从而花色更深<sup>[65、40]</sup>。同时花瓣的表皮细胞形状影响含有一定花青素苷细胞的光学特性，从而影响花瓣的视觉效果。多数被子植物花瓣上表皮细胞常呈凸起状，这类表型特质可以反射入射光，提高色素对光的吸收，从而增加颜色的强度<sup>[68、69]</sup>。而扁平状的表皮细胞结构能造成更多的反射光，从而使花色变浅。

通过观察本次试验的彩色马蹄莲佛焰苞徒手切片发现，彩色马蹄莲佛焰苞呈色物质分布在上下表皮细胞和靠近表皮细胞的多层叶肉细胞（栅栏组织和海绵组织）中，其上表皮的着色细胞层要明显的高于下表皮，以‘玫瑰园’品种为例（图 3-1），其上表皮细胞均匀分布一层着色细胞层，而下表皮几乎没有着色细胞分布，因此就造成了上下表皮的颜色

差异。

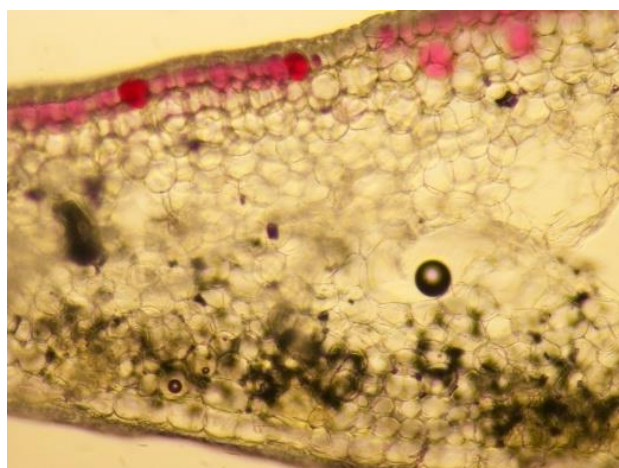


图 3-1 ‘玫瑰园’解刨结构图

Fig 3-1 ‘Roseland’ images of cross-section structures

不同色系品种积累呈色物质的细胞层数不同，色素分布层越厚颜色越深。并且还能看出彩色马蹄莲佛焰苞表皮细胞并没有锥形化，而是呈扁平状，因此就不能造成入射光进入细胞的比例增加，加深佛焰苞的颜色。

经观察彩色马蹄莲黑色系品种的解刨结构（图 3-2），发现粉白色系、紫红色系、黑色系、三个色系品种具有相同性，中间组织都趋近于无色。着色细胞层数差异也是佛焰苞颜色产生变异的重要原因，黑色系品种中含色素细胞层最多（3~4 层）上下表皮色素分布较为对称。紫红色系品种（2~3 层），粉白色系品种色素层仅有一层，上下表皮细胞中色素分布较为分散，并且在佛焰苞的横切面中含有大量的小气泡（由于花瓣中大量的小气泡使入射光线多次折射也是使颜色变浅的一个重要原因。

而黄色系、橙色系、红色系，三个色系品种中间组织被淡黄色的黄酮、黄酮醇完全充斥，因此佛焰苞在黄色的黄酮、黄酮醇、与红色的花青素共同的作用下形成了不同程度的橙色乃至红色、黄色系品种上下表皮以及栅栏组织中均呈现黄色，海绵组织中也分布着黄色的色素，含有黄酮、黄酮醇类色素。因此，黄色品种的彩色马蹄莲中，黄酮、黄酮醇为主要的呈色色素。

经过对彩色马蹄莲解刨结构的分析，发现色素细胞层的分布能够影响佛焰苞颜色的亮度，花青素苷在表皮分布的花瓣则佛焰苞亮度比内部叶肉组织多层花青素苷分布的花颜色相比亮度较高。

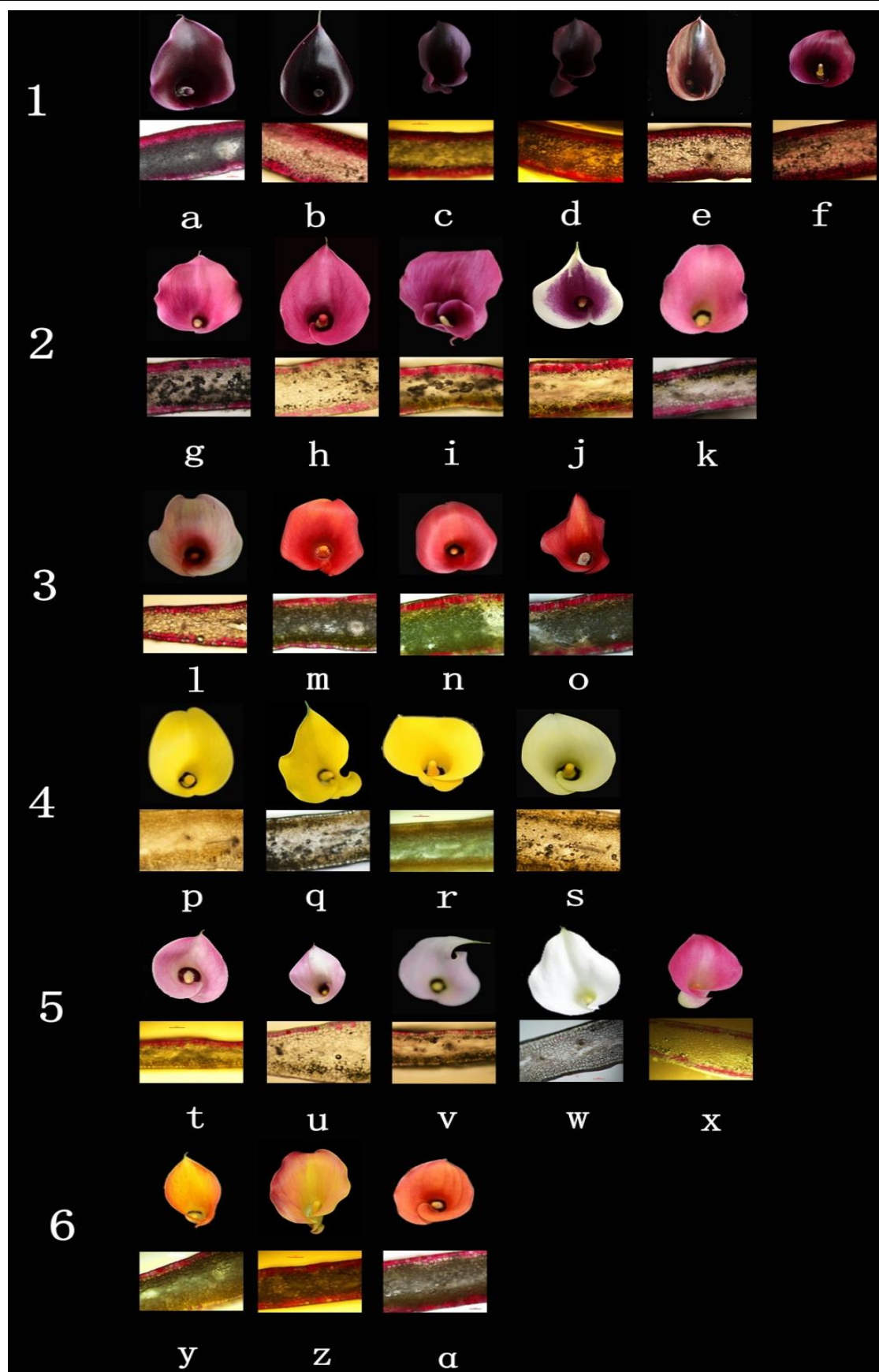


图 3-2 彩色马蹄莲各色系品种及横切面结构图

Fig 3-2 Images of *Z. hybrida* cultivars of each color group and their cross-section structures

1: 黑色系; 2: 紫色系; 3: 红紫色系; 4: 黄色系; 5: 粉色系; 6: 橙色系

a: ‘幻影’ (Mirages); b: ‘杰克’ (Jack); c: ‘金奖巧克力’ (Chocolate); d: ‘黑洞’ (Cantor); e: ‘小黑妞’ (Black girl); f: ‘普拉多’ (prado); g: ‘圣达菲’ (Stanta Fe); h: ‘佳人’ (Lover); i: ‘诺言’ (Promise); j: ‘毕加索’ (Picasso); k: ‘圣杯’ (Premio); l: ‘杜朗思’ (Durance); m: ‘菲戈’ (Figo); n: ‘穆拉若’ (Murano); o: ‘刀锋’ (Trinity); p: ‘阳光俱乐部’ (Sun Club); q: ‘独角戏’ (Solo); r: ‘金城’ (Jincheng); s: ‘布兰科’ (Blanc); t: ‘浪漫’ (Romance); u: ‘玫瑰园’; v: ‘梅尔罗斯’ (Melrose); w: ‘范图拉’ (Ventura); x: ‘见爱’ (Jian ai); y: ‘火凤凰’ (Premio); z: ‘丽都’ (Lido); α: ‘奥迪安’ (Odean)

### 3.3 讨论

#### 3.3.1 花色素在佛焰苞中的分布对花色的影响

佛焰苞作为彩色马蹄莲花色的最终载体, 观察其各色系品种佛焰苞横切面中的色素分布情况, 发现色素物质分布于上下表皮和叶肉细胞中, 且不同色系品种佛焰苞着色细胞层数不同, 颜色越深着色细胞层越厚 (图 3-2)。

其中通过对黑色系品种佛焰苞表皮细胞与横切面显微结构的观察可得知, 佛焰苞上表皮与下表皮均覆盖了色素物质, 且上下表皮色素物质均匀分布。上下表皮细胞和靠近上下表皮的 2-3 层叶肉组织细胞均富集了很高浓度的花青素苷, 中间叶肉组织细胞呈无色透明状。

通过对紫红色系品种佛焰苞表皮细胞与横切面显微结构的观测可得出, 佛焰苞上表皮细胞与叶肉组织细胞色素含量略高于下表皮, 且色素在背部表皮细胞内分布较为不均匀。色素分布于在表皮细胞和 2 层叶肉细胞中, 下表皮细胞及靠近下表皮的叶肉细胞较上表皮细胞积累量少, 中间叶肉细胞呈无色。

对红色系品种佛焰苞显微结构的观察可知, 佛焰苞上表皮细胞与叶肉细胞组织富集了浓度很高的红色色素物质且含量高于下表皮, 色素在下表皮细胞内分布较不均匀。色素分布于上表皮细胞和单层叶肉细胞中, 中间叶肉组织细胞分布了大量的黄色色素物质, 表面高浓度的花青素苷很大程度上覆盖了中间呈黄色叶肉组织细胞, 使佛焰苞呈现出红色。

对黄色系品种佛焰苞显微结构的观察得出, 黄色系的彩色马蹄莲佛焰苞表皮细胞与叶肉组织细胞均没有花青素苷的分布, 在表皮细胞与叶肉组织细胞中均匀的分布着黄色色素物质 (黄酮、黄酮醇)。

粉白色系品种的显微结构观察可知, 色素物质只分布于上表皮细胞中, 且上表皮细胞不均匀的分布着白色与红色, 在两种着色物质相互的作用下形成了不同程度的粉白色, 下表皮与叶肉组织细胞中无明显的花青素苷的分布, 中间叶肉组织呈现出白色, 带花青素苷的细胞分布是造成粉白色系颜色偏浅的重要原因。

通过对橙色系品种的显微结构观察可得出, 彩色马蹄莲橙色系品种佛焰苞上表皮细胞



与叶肉细胞组织富集了浓度很高的红色色素物质且含量高于下表皮细胞，从显微结构的色素分布情况来看，在表皮细胞内充满了不均匀的红色，部分细胞呈淡黄色，在红色花青素苷与黄色黄酮、黄酮醇的相互作用下，使佛焰苞呈不同程度的橙色。

通过对不同色系佛焰苞横切面对比分析表明，粉白色系、黑色系、紫红色系品种，中间叶肉组织细胞均呈无色透明状，上下表皮细胞覆盖有红色着色细胞层覆盖，着色细胞层厚度从厚到薄排序为黑色系>紫红色系>粉白色系，其上表皮着色细胞层越厚，花青素苷的浓度越高，亮度越低。对红色系、橙色系、黄色系品种佛焰苞横切面对比分析发现，其佛焰苞中间叶肉组织细胞均匀的分布着黄色物质，表皮细胞有含有花青素苷的色素细胞层覆盖，红色系品种带色素的表皮细胞层分布较为均匀，橙色品种色素表皮细胞层比较分散，黄色系表皮细胞中没有花青素苷的色素积累，花青素苷细胞分布的不均匀是造成橙色系品种与红色系品种差异的主要原因。

目前有很多的研究已经证明，不同观赏植物花瓣上下表皮中的色素分布情况是影响花色变异的一个重要因素，比如牵牛、杜鹃、八仙花<sup>[61]</sup>

### 3.3.2 佛焰苞表皮细胞形状对花色的影响

花瓣表皮细胞的形状是影响花色变异的一个重要的因素，多数被子植物花瓣上表皮细胞呈圆锥型，本研究对供试的 27 个品种佛焰苞进行其显微结构的观察，发现表皮细胞并没有锥形化，而呈扁平状。扁平状的细胞结构能造成更多的反射光，反而使花色变浅。在观察彩色马蹄莲佛焰苞显微结构中笔者还发现在浅色系品种（粉白色、黄色）的叶肉组织中含有大量的气泡，花瓣中含有大量的气泡能导致入射光线的多次折射能使我们所观察到的颜色由纯色向复色变化，甚至产生白色。这是其色系品种颜色较浅的一个重要原因。

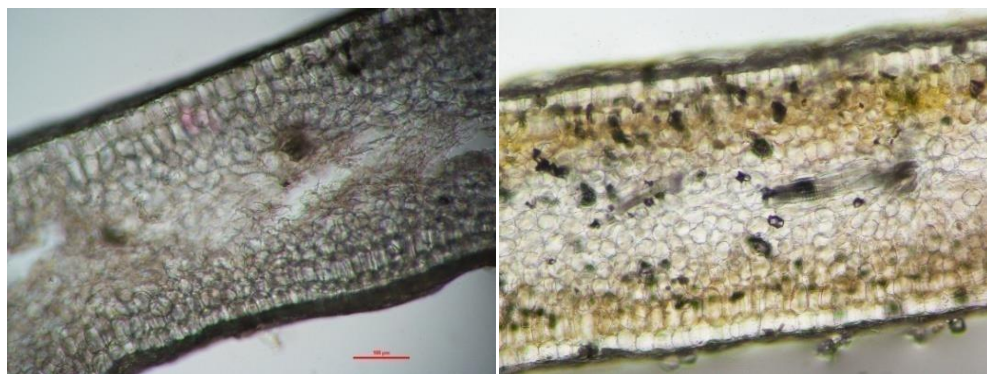


图 3-3 彩色马蹄莲横切面解剖结构图  
Figure 3-3 *Zantedeschia hybrida* cross-section structures

### 3.4 本章小结

经对彩色马蹄莲佛焰苞显微结构的观察发现，黑色系、紫红色系、粉白色系品种表皮细胞覆盖有色素细胞层，中间叶肉组织呈无色透明状。黄色系品种表皮细胞无红色素细胞层分布，叶肉组织呈淡黄色，表皮负有无色的角质层，叶肉组织内部有细小的气泡是入射光产生折射现象，从而增加了佛焰苞的亮度。橙色系、红色系品种，表皮细胞覆盖红色细胞层，中间叶肉组织细胞呈淡黄色，两种颜色复合产生了不同程度的橙色乃至红色。

## 第四章 彩色马蹄莲佛焰苞色素种类及含量的分析

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 类黄酮化合物的提取

取新鲜彩色马蹄莲佛焰苞中间着色均匀部分放入研钵内用液氮迅速研磨，直到成细粉末状。待液氮逐渐挥发后，用花青素苷提取液（V（甲醇）：V（水）：V（甲酸）：V（三氟醋酸）=70：27：2：1）萃取花青素苷<sup>[1]</sup>，每 250mg 新鲜佛焰苞放入 1ml 提取液提取黄酮、黄酮醇的样品处理方法于花青素苷相同，提取液为甲醇，每 100mg 鲜重加 1ml 甲醇提取，将离心管置于混合振荡器上充分震荡。两种提取液均置于 4℃处放置，浸提 24h，每隔 12h 震荡一次<sup>[51]</sup>，然后用 0.2μm 的过滤器过滤提取液，过滤后得到样品，放置于-80℃超低温冰箱待测。

#### 4.1.2 胡萝卜素的提取

取新鲜彩色马蹄莲佛焰苞中间着色均匀部分 0.1g 用液氮研磨加入提取液（V（石油醚（30℃-60℃））：V（丙酮）=1：1）5mL，将盛有提取液的离心管在混合器上充分震荡，用锡箔纸包裹避光，4℃避光过夜（浸提 8h 以上）过滤后取上清液并用中性滤纸对提取液进行过滤。将过滤后的胡萝卜素提取液放置于新的离心管内。并放在-80℃超低温冰箱内等待后续实验操作<sup>[49]</sup>。

#### 4.1.3 佛焰苞中类黄酮化合物含量测定及结构鉴定

采用高效液相色谱测定花青苷及黄酮、黄酮醇成分。花青素苷的测定使用 Agilent 高效液相色谱仪，泵为 P680 型，自动进样器为 UltiMate3000，紫外可见光检测器为 DAD-100；柱温箱为 TCC-100；色谱柱为 Agilent 公司的 ZORBAX 型 SB-Aq（4.6mm×250mm），滤径为 4μm。HPLC 测定条件：流动相为 A、B 两相。A 相为：水：甲酸：三氟醋酸= 97.9：2：0.1；B 相为：水：乙腈：甲酸：三氟醋酸= 62.9：35：2：0.1。流动相在进样前经过超声脱气和 0.2μm 超微过滤。进样量为 10μL，柱温 25℃，流速 0.8mL/min。流动相 B 的洗脱梯度为：0~20min，30%~53%；20~40min，53%~5%；40~45min，53%~30%；45~50min，30%~30%；检测波长 515 检测花瓣中花青苷吸收的峰面积<sup>[66, 67]</sup>，采用以标准品为基准的半定量的方法计算花青素的含量。

黄酮、黄酮醇的测定使用戴安公司生产的高效液相色谱仪（Ultimate 3000-API 3200 Q

TRAP)。色谱柱型号为 MS Lab HP-C18 (150\*4.6mm 5 $\mu$ m), HPLC 测定条件: 流动相为 A (水)、B (乙腈) 两相。进样量为 10 $\mu$ L, 柱温 50 $^{\circ}$ C, 流速 1ml/min。流动相 B 的洗脱梯度为: 0~1.5min, 90%; 1.5~7min, 70%; 7~8min, 40%; 8~10min, 5%; 10~15min, 90%, 检测波长 350nm 检测佛焰苞中黄酮、黄酮醇吸收的峰面积<sup>[26]</sup>。采用标准品半定量的方法计算, 以  $\mu$ mg/g 新鲜花瓣计算花瓣中的花青素苷。有标准品的化合物, 采用外标法分别计算各化合物的含量。

HPLC-MS 分析条件: 高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用仪 (HPLC-ESI-MS) 对典型样本对花青素苷的结构进行分析。采用 Agilent 6540Q-TOT 液质联用仪进行 HPLC-ESI-MS 分析。液相色谱的分析条件及程序同上。质谱分析条件: 电喷雾离子化 (ESI), 离子阱分析器, 全质量扫描范围 ( $m/z$ ); 100~1600; 正离子检测模式, 毛细管电压 3500V, 喷雾器压力 200kPa, 毛细管出口电压 100V, 毛细管出口电压 117V, 干燥温度 350 $^{\circ}$ C, 干燥气 ( $N_2$ ) 流速 6.0L/min。用 MZmine 软件分析质谱结果。

标准品为氯化矢车菊素 (Cyanidin)、柚皮素 (Naringenin)、芹菜色素 (Apigenin)、木犀草素 (Luteolin)、二氢杨梅素 (Dihydromyricetin)、二氢山柰酚 (Dihydrokaempferol)、二氢槲皮素、(Dihydroquercetin)、杨梅素 (Myricetin)、山柰酚 (Kaempferol) 和槲皮素 (Quercetin) 均购于上海源叶生物科技有限公司。

应用 Microsoft Office Excel 2007 进行数据整理及图表绘制并进行统计分析, 应用逐步回归方法进行分析。

#### 4.1.4 佛焰苞中类胡萝卜素的测定

使用双光束紫外-可见光分光光度计 (TU-1901, 北京普析通用仪器有限公司) 在波长范围为 400~500nm 处进行紫外-可见光光谱扫描<sup>[72, 73]</sup>。

### 4.2 结果及分析

#### 4.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞中类黄酮化合物成分及含量分析

##### 4.2.1.1 彩色马蹄莲佛焰苞中花青素苷成分及含量分析

采用 HPLC-PAD 方法对 6 大色系、27 个品种的彩色马蹄莲佛焰苞进行花青素苷种类的测定, 得到不同色系彩色马蹄莲 HPLC 图谱, 在检测波长 515nm 处的色谱图中, 根据花青苷特征峰可确定花青苷, 根据出峰的保留时间不同可确定花青苷的种类 (图 4-1)。测定结果得出, 收集到的 6 大色系品种中花青素苷共有两种, 根据保留时间的前后, 命名为 A1 (26min)、A2 (28min), 而在黄色系品种与粉白色系 (‘范图拉’) 中, 未检测到

花青素苷吸收特征峰。在红色系品种（‘杜朗斯’、‘穆拉若’、‘刀锋’）、橙色系（‘丽都’）中检测到 A1、A2 两个花青素苷吸收特征峰。

花青素苷的质谱中分子离子常被质子化，以 $[M+H]^+$ 质子化的形式存在，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<sup>[70, 71]</sup>。本研究对 2 种花青素苷进行质谱分析，花青素苷 A1 经一级质谱得到分子离子  $m/z 595$  ( $[M]+H^+$ )（图 4-2），其释放出的特征碎片离子  $m/z 287$  ( $[Y_0]^+$ ) 质荷比为矢车菊素苷元的特征碎片离子  $m/z$ ，和其他碎片离子  $m/z 491$  ( $[M-Rha-Caf+H]^+$ ) 为分子离子减去 1 个糖基 ( $[Rha]^+$ ) 和一个咖啡酰基 ( $[Caf]^+$ ) 的结果，根据质谱 (MS) 分析并结合以往的研究报道<sup>[38]</sup>可推出 A1 是以矢车菊素苷元为核心，带一个鼠李糖基和一个咖啡酰基，A1 矢车菊素是除黄色系品种外所有色系品种佛焰苞中共有成分，也是彩色马蹄莲佛焰苞花色的主要着色成分，这也说明了彩色马蹄莲各色系品种以红色、紫红色色系品种为主的原因。

A2 为以天竺葵素苷元为核心带一个糖基一个咖啡酰基（图 4-2）。因此可推定 A1 为矢车菊素-3-咖啡酰-鼠李糖苷 (Cy3caffeicRha)；花青素苷 A2 经一级质谱得到分子离子  $m/z 595$  ( $[M]+H$ )，其释放出天竺葵素特征碎片离子  $m/z 271$  ( $[Y_0]^+$ ) 和其他碎片离子  $m/z 433$  ( $[M-Glu-Caf+H]^+$ ) 为分子离子减去一个糖基 ( $[Glu]^+$ ) 和一个咖啡酰基 ( $[Caf]^+$ ) 的结果推定为天竺葵素-3-咖啡酰-葡萄糖苷 (Pg3caffeicGl)，A2 (Pg) 主要存在于红色系与橙色的部分品种 (Murano、Trinity、Durance 和 Lido) 中，‘穆拉诺’、‘刀锋’、‘杜朗斯’和‘丽都’四个品种中 Pg 占总花青素苷 (TA) 的比例分别为 38.5%、16.9%、12%、28.5%。

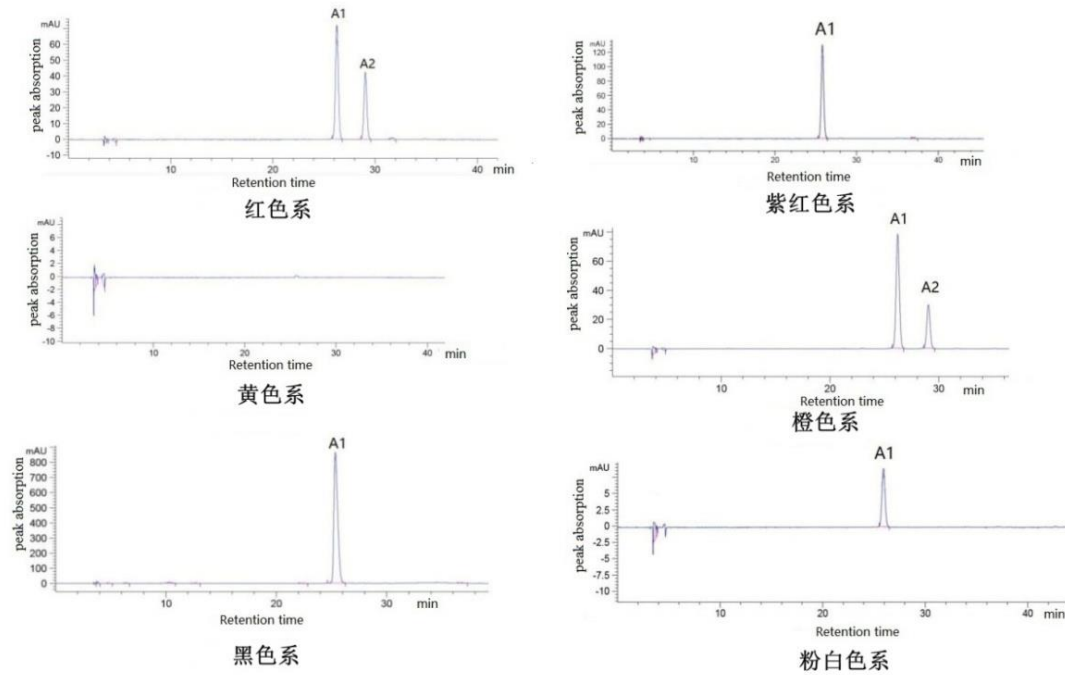
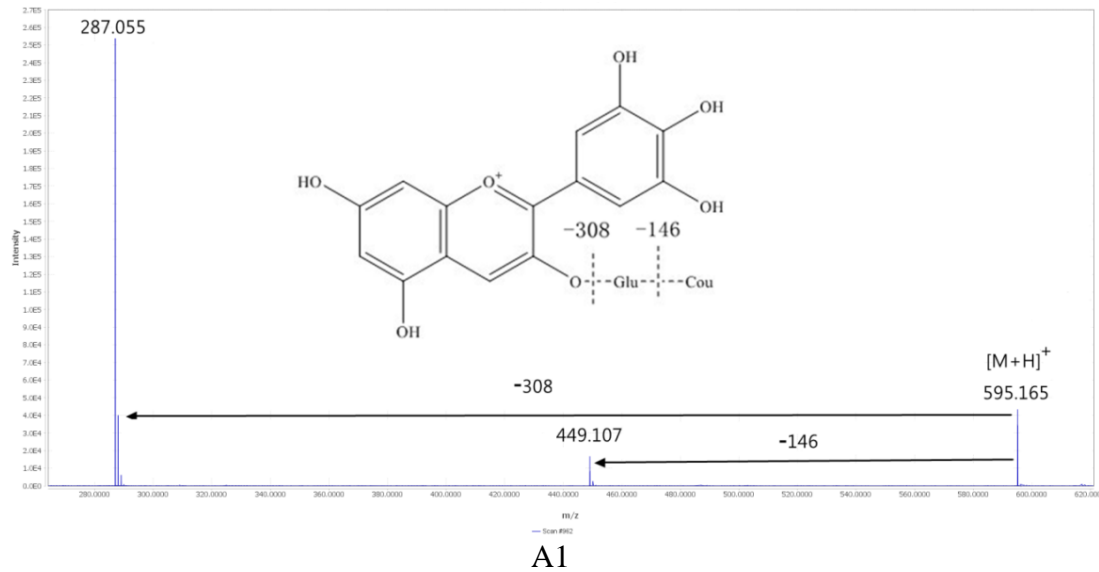


图 4-1 彩色马蹄莲主要花青素苷含量  
Fig 4-1 Amounts of major anthocyanins in *Z. hybrida*

根据由标准品氯化矢车菊素浓度与峰面积绘制的标准曲线（图），结果表明（表 1）在彩色马蹄莲含有花青素苷的 5 个色系中（图 4-1），花青素苷含量黑色系品种最多（208.9~1179.8 $\mu\text{g/g}$ ），且远多于其他 4 个色系，其次是紫红色系品种（100.3~110.9 $\mu\text{g/g}$ ），再其次是红色系品种（64.6~104.1 $\mu\text{g/g}$ ），最后是粉色系品种（5.7~39 $\mu\text{g/g}$ ）与橙色系品种（5.8~74.5 $\mu\text{g/g}$ ），且橙色系与粉色系花青素苷含量差距不大，黄色系品种与粉白色系‘范图拉’品种中未检测到花青素苷的成分。



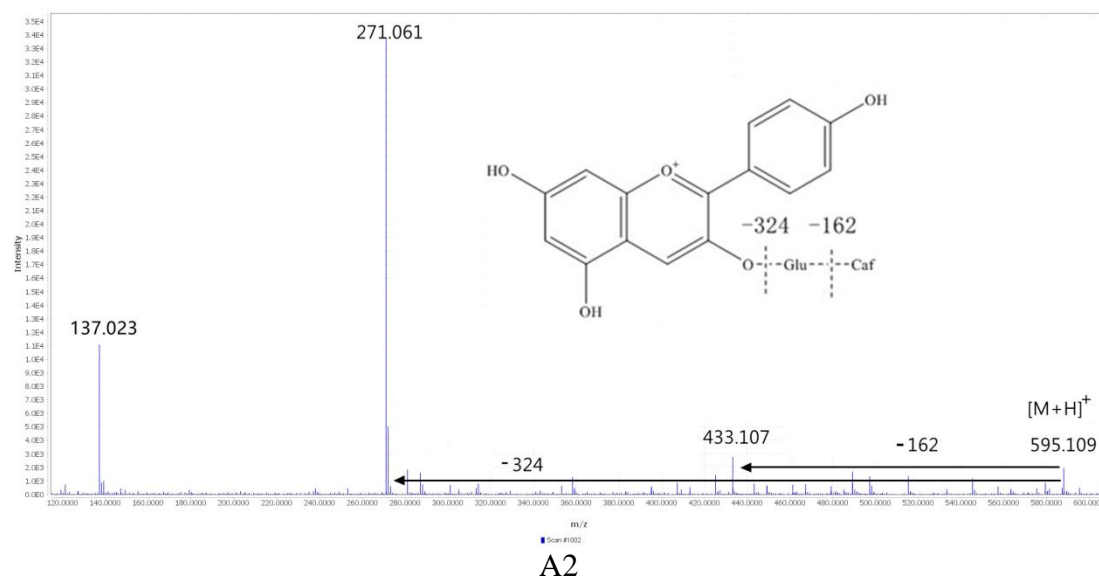


图 4-2 花青素苷 A1、A2 质谱及分子结构图

Fig 4-2 Mass spectra and structure of anthocyanin A1, A2

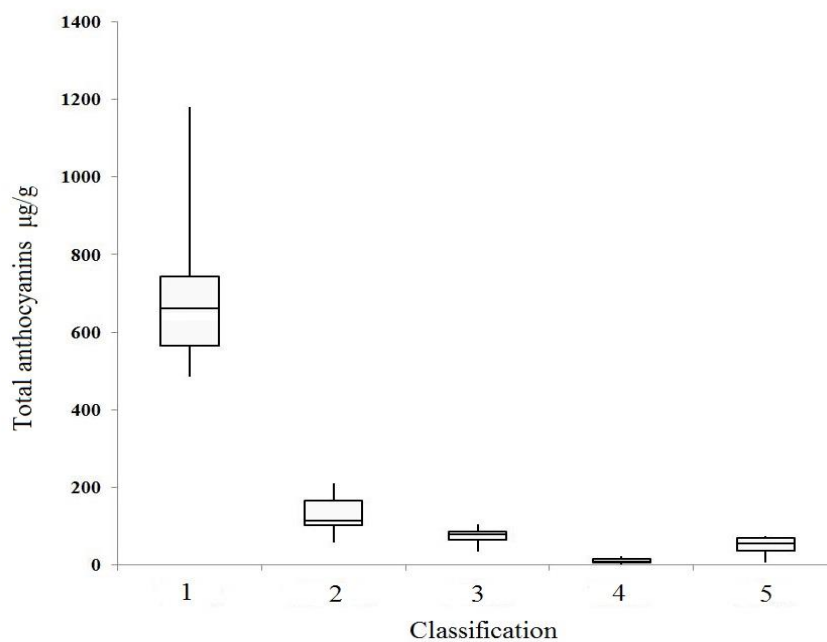


图 4-3 彩色马蹄莲各色系品种色素含量盒型图

Fig 4-3 Box plot of different color group of *Z. hybrida* cultivars

1:黑色系; 2: 紫红色系; 3: 红色系; 4: 粉白色系; 5: 橙色系

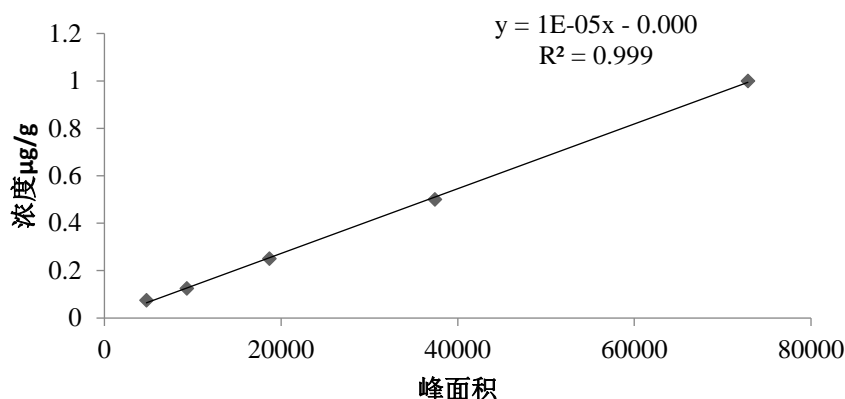


图 4-4 氯化矢车菊素标准曲线

Fig4-4 Cyanidin standard curve

#### 4.2.1.2 彩色马蹄莲佛焰苞中黄酮、黄酮醇含量分析

采用 HPLC-PAD 方法对 6 大色系、27 个品种的彩色马蹄莲佛焰苞进行黄酮、黄酮醇的测定，得到不同色系彩色马蹄莲 HPLC 图谱，在检测波长 350nm 处的色谱图中检测出佛焰苞黄酮、黄酮醇吸收的峰面积，再由标准品芦丁浓度与峰面积绘制标准曲线（图 4-5），计算出黄酮、黄酮醇的含量。

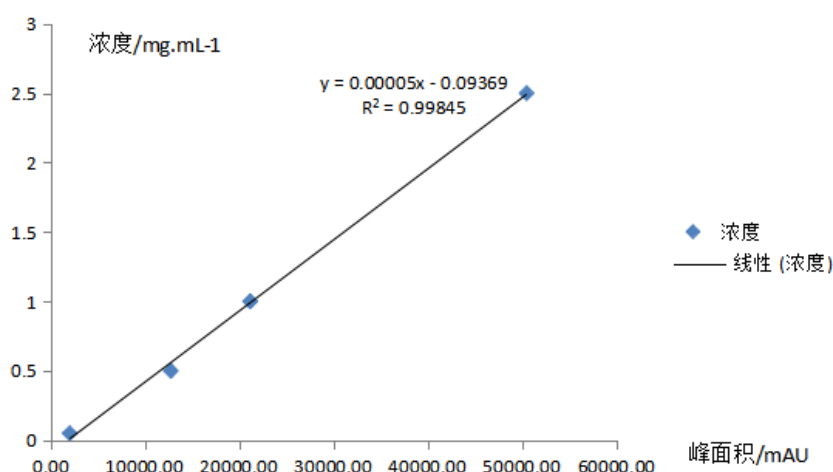


图 4-5 芦丁标准曲线

Fig 4-5 Rutin standard curve

在 350nm 处为黄酮类化合物特征吸收峰，可以看出所有品种的彩色马蹄莲都具有丰富的黄酮和黄酮醇。

根据定量分析，结果表明彩色马蹄莲各色系品种黄酮、黄酮醇的含量较高，且各品种之间有较大差异。其中黑色系品种（7013.3-9583.3 $\mu\text{g/g}$ ）、紫红色系（3775.3-10420.5 $\mu\text{g/g}$ ）、红色系（3185.0-6916.6 $\mu\text{g/g}$ ）、黄色系（773.8-8237.2 $\mu\text{g/g}$ ）、粉白色系（772.5-7299.3 $\mu\text{g/g}$ ）、橙色系（4201.0-4457.3 $\mu\text{g/g}$ ）。



表 4-1 27 个彩色马蹄莲品种中色素含量平均值 (占峰面积%)

Table 4-1 Petal anthocyanin mean values (in peak areas %) of 27 *Z. hybrida* cultivars

色系: 品种 <sup>a</sup>	Cy <sup>b</sup> (%)	Pg <sup>b</sup> (%)	TA <sup>c</sup> (μg/g)	TF <sup>c</sup> (μg/g)	CI <sup>c</sup>
1, 黑色系					
‘幻影’	100	—	485.1	7249.6	14.9
‘杰克’	100	—	617.2	8362.0	13.5
‘金奖巧克力’	100	—	546.0	7013.3	12.8
‘黑洞’	100	—	767.3	8757.0	11.4
‘小黑妞’	100	—	1179.8	9583.3	8.1
‘普拉多’	100	—	665.3	7749.3	11.6
2, 紫红色系					
‘圣达菲’	100	—	56.7	5021.2	88.4
‘佳人’	100	—	100.9	10420.5	103.2
‘诺言’	100	—	208.9	4312.7	20.6
‘毕加索’	100	—	100.3	3775.3	37.3
‘圣杯’	100	—	164.0	4668.6	28.4
3, 红色系					
‘杜朗思’	88	12.0	32.4	5360.0	165.4
‘菲戈’	100	—	75.4	6916.6	91.7
‘穆拉若’	61.5	38.5	104.1	3185.0	30.6
‘刀锋’	83.1	16.9	78.7	4243.4	53.9
4, 黄色系					
‘阳光俱乐部’	—	—	0	5589.9	—
‘独角戏’	—	—	0	1702.8	—
‘金城’	—	—	0	773.8	—
‘布兰科’	—	—	0	8237.2	—
5, 粉白色,					
‘浪漫’	100	—	14.2	4548.6	318.9
‘玫瑰园’	100	—	7.3	7299.3	989.1
‘梅尔罗斯’	100	—	5.7	1086.2	189.5
‘范图拉’	—	—	0	772.5	—
‘见爱’	100	—	20.8	4450.8	213.9
6, 橙色系					
‘火凤凰’	100	—	5.8	4457.3	768.5
‘丽都’	71.5	28.5	74.2	4312.6	58.1
‘奥迪安’	100	—	65.1	4201.0	64.5

a: 彩色马蹄莲品种分类.

b: cy: cyanidin 矢车菊素 pg: Pelargonidin 天竺葵素;

c: TA: 总的花青素苷的含量; TF: 总的黄酮、黄酮醇的含量; CI: 辅色指数 (CI= TF/TA)

#### 4.2.2 彩色马蹄莲佛焰苞中胡萝卜素紫外-可见光分析

紫外可见光扫描彩色马蹄莲 27 个品种佛焰苞的类胡萝卜素提取液, 结果如下

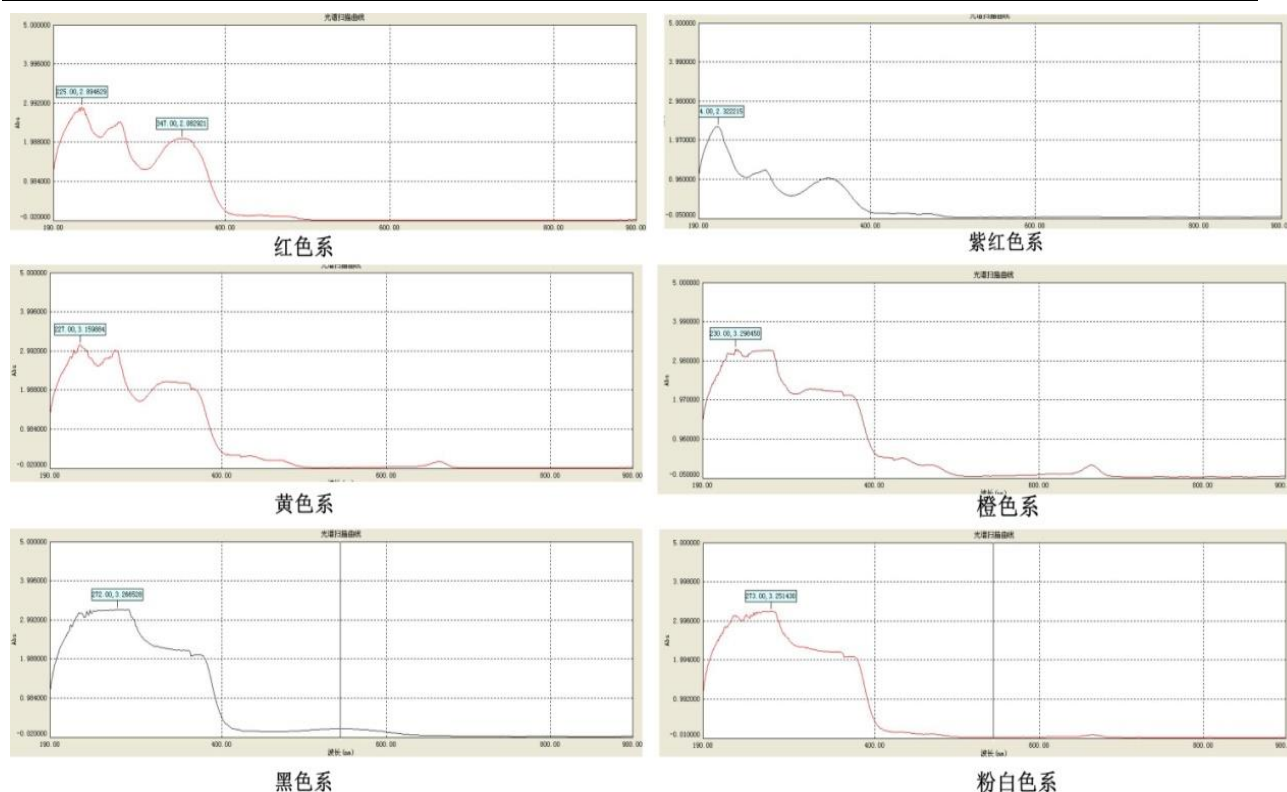


图 4-6 主要色系紫外-可见光谱扫描结果  
Fig 4-6 UV-visible spectra result of each color group

在紫外-可见光谱结果中能看出四个色系的马蹄莲都在 190-400nm 处有特征值。由图可以看出，粉白色系品种在 208nm 与 218nm 处有特征值，红色系品种在 214 与 226nm 处出现特征值，黑色系品种在 284nm 处出现特征值、橙色系品种在 394nm 与 217nm 处出现特征值、紫红色系品种在 228nm 处与 231nm 处出现特征峰、黄色系品种则在 228nm 处出现了特征值。

在类胡萝卜素紫外-可见光的特征值结果分析中，在 200-400nm 出现吸收带，其中 200-220nm 吸收带物质未知，340-390nm 吸收带为查尔酮类物质特征带<sup>[26]</sup>。粉色系和紫色系中，都能看出随着花瓣颜色加深，特征值吸收峰波长值增大。但是在类胡萝卜素提取液的紫外-可见光结果中没有观察到明显的类胡萝卜素特征值吸收峰（400-500nm）处。说明影响彩色马蹄莲佛焰苞呈红色、橙色和黄色的显色色素并不是类胡萝卜素。

#### 4.2.3 彩色马蹄莲佛焰苞花青素苷代谢途径

为了进一步解析彩色马蹄莲呈色形成原因，本研究比较了彩色马蹄莲‘小黑妞’、‘浪漫’、‘范图拉’三者之间的花青素苷成分及含量，对比实验发现黑色‘小黑妞’（TA=1179.8μg/g）与粉色的‘浪漫’（TA=14.2μg/g）含有矢车菊素，而白色品种‘范图拉’（TA=0μg/g）则没有发现含有花青素苷的衍生呈色物质。为分析彩色马蹄花青素苷合成途径，我们进行了类黄酮中间代谢产物的测定并进行了对比（表 4-2），结果发现三者

之间中间代谢产物量差异很大，其中黑色系品种的‘小黑妞’中间代谢产物均高于粉白色系品种的‘浪漫’，与白色品种‘范图拉’，中间代谢产物量的差异可能是造成花色差异的主要原因。而‘小黑妞’与‘范图拉’并无木犀草素（Luteolin）的合成，这可能是由于负责调控木犀草素（Luteolin）合成的 *DvFNS* 基因受到了抑制所造成的，所测三个品种中都是以山奈酚衍生物的含量最高。

表 4-2 ‘小黑妞’、‘浪漫’、‘范图拉’三个品种中间黄酮、黄酮醇含量  
Table 4-2 the intermediate metabolites of flavonoids in Black girl .Romance and Ventura

品种名称 黄酮、黄酮醇 (μg/g)	‘浪漫’	‘小黑妞’	‘范图拉’
柚皮素	0.80	4.60	1.10
木犀草素	3.0	0.0	0.0
杨梅素	75.7	41.2	190.0
二氢杨梅素	48.9	495.0	72.0
二氢山奈酚	234.0	1370.0	95.9
二氢槲皮素	17.2	40.4	0.20
山奈酚	1660.0	2540.0	862.0
槲皮素	21.9	163.0	0.30
儿茶素	255.0	1070.0	75.9
表儿茶素	351.0	5320.0	126.0

柚皮素: Naringenin; 木犀草素: Luteolin; 杨梅素: Myricetin; 二氢杨梅素: Dihydromyricetin; 二氢山奈酚: Dihydrokaempferol; 二氢槲皮素: Dihydroquercetin; 山奈酚: Kaempferol; 槲皮素 Quercetin; 儿茶素 Catechin; 表儿茶素 Epicatechin

## 4.3 讨论

### 4.3.1 彩色马蹄莲不同色系品种花色形成的原因

花色是观赏植物重要的观赏性状，决定花色的色素成分分为三类：类黄酮，类胡萝卜素和甜菜色素。花青素苷使花色呈现橙、粉、红、紫和蓝色，其中天竺葵素苷使花色呈现红色到砖红色，矢车菊素苷使花色呈现红色、深红色，而飞燕草素苷可使花色呈现蓝色，黄酮黄酮醇使花色呈现象牙白色至深黄色，类胡萝卜素使花色呈现由黄色至红色<sup>[10]</sup>。

本研究通过利用 HPLC-DAD 与 HPLC-ESI-MS 技术对彩色马蹄莲 27 个品种佛焰苞中花青素苷进行鉴定，发现除了黄色系和白色品种‘范图拉’不含花青素外，其他色系品种均含有花青素苷，且矢车菊苷（Cy）为主要成分，天竺葵素苷（Pg）只在 4 个品种‘杜朗思’、‘穆拉诺’、‘刀锋’、‘丽都’中积累，天竺葵素主要在呈色系品种与红色系品种中分布并且占总花青素苷（TA）的比重较小。矢车菊素苷（Cy）赋予了佛焰苞不同程度的红色，天竺葵色素苷（Pg）则赋予了佛焰苞不同程度的朱红色。而在彩色马蹄莲佛焰苞中未检测到飞燕草素的衍生物，这可能也是彩色马蹄莲无蓝色系的主要原因之一。经定量分析花青素含量可以发现彩色马蹄莲佛焰苞呈色的差异主要是由于花青素含量的差异所决定的。本研究供试的彩色马蹄莲佛焰苞中也没有检测到类胡萝卜素，这也说明了类黄酮类化合物（花青素苷与黄酮、黄酮醇）是影响彩色马蹄莲呈色的基本物质，因此认为，使其呈黄色和橙色的主要色素物质为黄酮黄酮醇。黄酮、黄酮醇做为花黄素是一种重要的助色素，在共着色指数（ $CI = TF/TA$ ）大于 5 时发挥共着色功能本研究供试品种的 CI 值均大于 5，说明在彩色马蹄莲呈色中黄酮与黄酮醇起着较大的作用。

在彩色马蹄莲佛焰苞中共检测出两种花青素苷成分，其中天竺葵素苷（Pg）在彩色马蹄莲佛焰苞中首次发现，矢车菊素苷在早期的文献中已有报道。

根据 Wollenweber et al（2003）的研究表明花青素苷与花黄素（黄酮、黄酮醇）共色并包含一定的金属离子复合作用可以使植物花瓣呈现出蓝色，根据往研究报道表明花青素苷与有机酸通过乙酰化反应可以使花瓣呈蓝色<sup>[74]</sup>，但就目前所收集与文献查阅还未发现蓝色品种的彩色马蹄莲，这可能是由于彩色马蹄莲佛焰苞中的花青素苷并未与有机酸产生乙酰化反应有关。自 Meyer et al（1987）首次通过基因工程对矮牵牛进行了花色改造后，基因工程大量的运用在对观赏植物的花色变异中如月季牡丹<sup>[75]</sup>等园艺观赏花卉，通过对彩色马蹄莲色素成分及含量的研究，可以帮助我们运用基因工程分子育种的方式来培育新型花色的彩色马蹄莲，对花色的变异有重要的指导意义。

### 4.3.2 彩色马蹄莲主要色素物质及其表型之间的关系

以往的研究已经证明了花瓣中花青素苷含量影响了光的吸收<sup>[76][77]</sup>。通过对彩色马蹄莲佛焰苞表型与花青素苷含量之间的关系，发现 TA（总花青素苷）含量与亮度  $L^*$  值呈显著负相关（ $R^2=0.615$ ），这同于瓜叶菊、芍药、菊花中的研究。

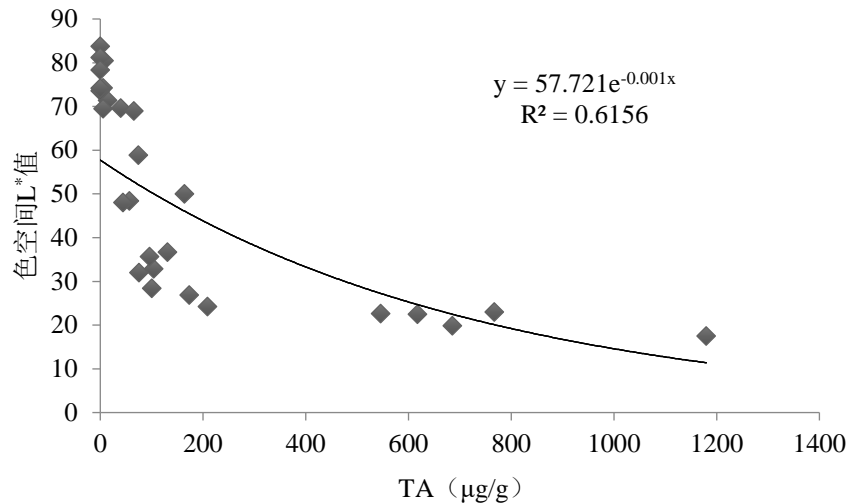


图 4-7 彩色马蹄莲各色系品种佛焰苞  $L^*$  值与 TA 相关性分析

Fig4-7 Relationship between  $L^*$  and TA in Z. *Hybrid* cultivars of different color groups

#### 4.3.2.1 黑色系品种的形成

在收集到的 27 个彩色马蹄莲品种中，共有幻影杰克 (Jack)；金奖巧克力 (Chocolate)；黑洞 (Cantor)；小黑妞 (Black girl)；普拉多 (Prado) 这 6 个品种被聚类为黑色，主要含有花青素苷与黄酮类化合物，其中花青素苷作为主要的着色物质，黄酮、黄酮醇做为主要辅助着色物质，其含量在所收集到的彩色马蹄莲色系中是最高的 (208.9~1179.8 µg/g)。黑色系品种佛焰苞表型与色素含量之间的关系为： $L^*$  值与 TA 含量呈极显著的负相关

( $R^2=0.637$ ) 证明黑色系品种随这佛焰苞中总的花青素苷含量的增加，亮度随之降低，总的花青素苷 TA 与  $a^*$  ( $R^2=0.016$ )，总的黄酮、黄酮醇 (TF) 与  $b^*$  ( $R^2=0.002$ ) 线性回归拟合水平并不显著，证明它们之间并无相关性。

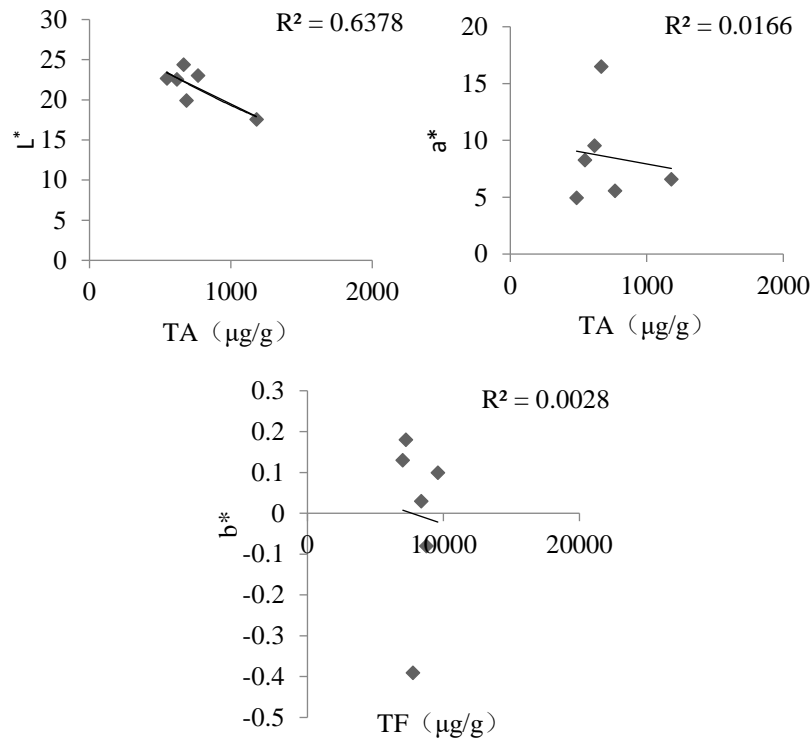


图 4-8 彩色马蹄莲黑色系品种  $b^*$  与 TA、TF 的关系

Fig 4-8 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among black cultivars of *Zantedeschia hybrida*

#### 4.3.2.2 紫红色系品种的形成

共有“圣达菲”、“佳人”、“诺言”、“毕加索”、“圣杯”这 5 个品种被聚为紫红色，主要含有花青素苷与黄酮类化合物，花青素苷作为主要的呈色物质，花黄素（黄酮、黄酮醇）做为主要的辅助着色物质。总的花青素苷（TA）与亮度  $L^*$  之间呈现出极显著的负相关（ $R^2 = 0.709$ ）（图 4-9），说明紫红色系品种佛焰苞中亮度  $L^*$  值随 TA 的含量的增加而下降。 $a^*$  值（红度）与总花青素苷含量（TA）呈极显著的负相关，预示这红度随花青素苷含量的上升而下降。

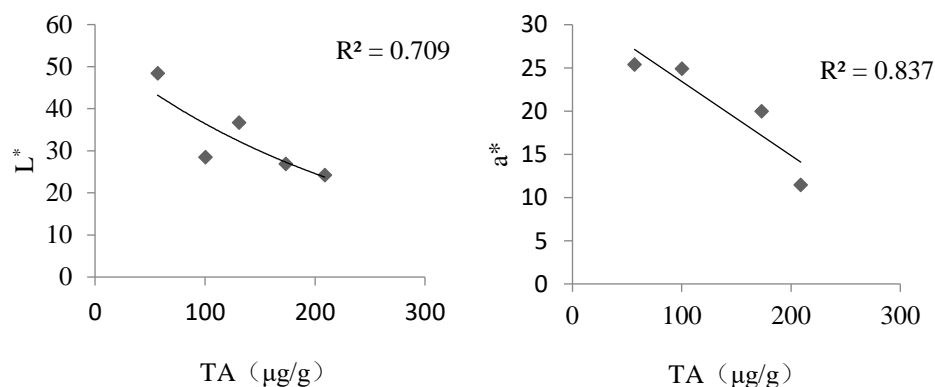


图 4-9 彩色马蹄莲紫红色系品种  $b$  与 TA、TF 的关系

Fig 4-9 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among amaranth cultivars of *Zantedeschia hybrida*

#### 4.3.2.3 红色系品种的形成

共有‘杜朗思’、‘菲戈’、‘穆拉若’、‘刀锋’4个品种聚类为红色。总的花青素苷(TA)与总的黄酮、黄酮醇(TF)对佛焰苞的着色有这重要的影响,特别是对佛焰苞亮度 $L^*$ 值的影响。在所收集到的4个红色系品种中,TA与亮度 $L^*$ 之间呈极显著的负相关( $R^2=0.661$ ) (图4-10),说明红色系品种佛焰苞中亮度 $L^*$ 值随TA的含量的增加而下降。同时花青素苷是佛焰苞呈红色的主要物质,在所收集到的红色系品种中 $a^*$ 与TA呈现出极显著的正相关( $R^2=0.667$ ),说明随这花青素苷含量的积累,佛焰苞越来越红。

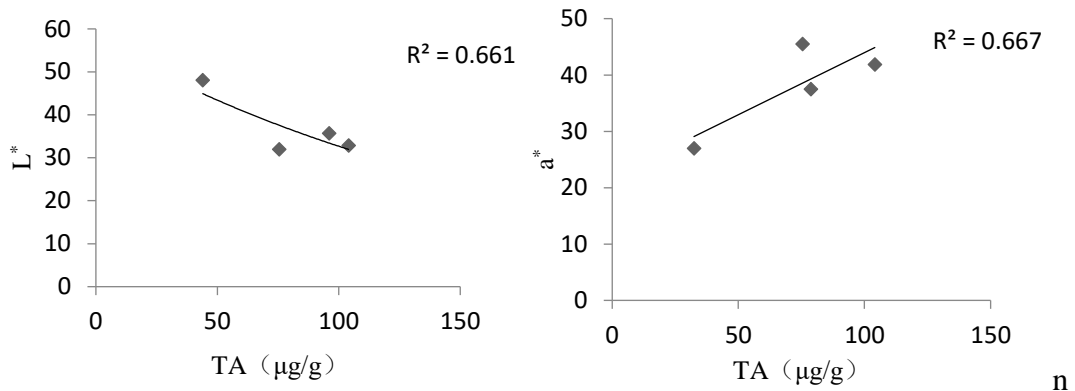


图 4-10 彩色马蹄莲红色系品种  $b^*$  与 TA、TF 的关系

Fig 4-10 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among red cultivars of *Zantedeschia hybrida*

#### 4.3.2.4 黄色系品种的形成

共有‘阳光俱乐部’、‘独角戏’、‘金城’、‘布兰科’这4个品种被聚类为黄色。黄色系的佛焰苞中主要含有黄酮、黄酮醇(TF)。由于未检测出胡萝卜素的积累,因此认为,使其呈黄色的主要色素物质为黄酮黄酮醇。衡量黄度的 $b^*$ 与黄酮、黄酮醇(TF)含量呈显著的正相关( $R^2=0.844$ ),说明彩色马蹄莲黄色系花色的形成与黄酮、黄酮醇的含量之间有着密切的关系,随黄酮、黄酮醇的逐渐积累而黄度随之增加。而亮度 $L^*$ 与黄酮、黄酮醇(TF)呈负相关,这表明佛焰苞随TF含量的积累而亮度下降。这进一步证明了TF与黄色系品种佛焰苞呈色之间的密切关系。

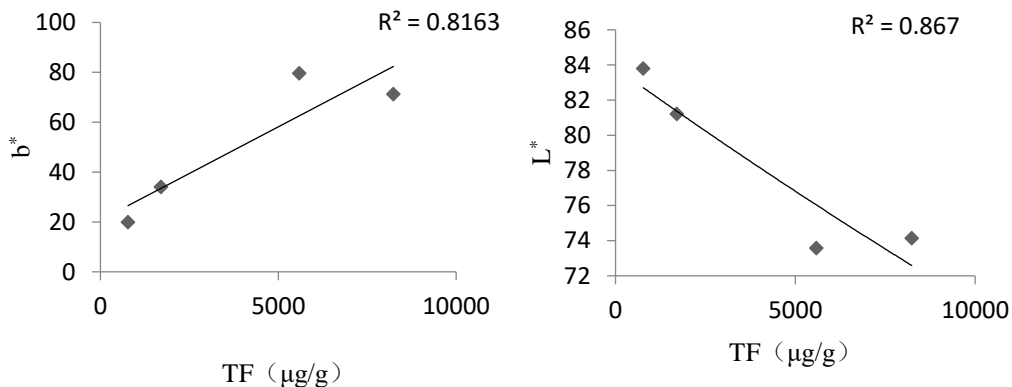


图 4-11 彩色马蹄莲黄色系品种  $b^*$  与 TA、TF 的关系

Fig 4-11 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among yellow cultivars of *Zantedeschia hybrida*

#### 4.3.2.5 粉白色系品种的形成

共有‘浪漫’、‘玫瑰园’、‘梅尔罗斯’、‘范图拉’4个品种被聚类为粉白色，该色系品种主要含有花青素苷与黄酮黄酮醇，其中花青素苷作为主要的呈色物质，黄酮、黄酮醇作为重要的辅助着色色素，彩色马蹄莲粉白色系品种总花青素苷（TA）的含量与亮度  $L^*$  值呈极显著的负相关（ $R^2 = 0.832$ ）（图 4-12），说明亮度  $L^*$  随 TA 的增加而下降，而红度（ $a^*$ ）与总的花青素苷的含量呈极显著的正相关（ $R^2 = 0.849$ ），说明粉白色系品种中，红度（ $a^*$ ）与花青素苷含量有着密切的关系，佛焰苞随总的花青素苷（TA）的增加而颜色越发红艳。

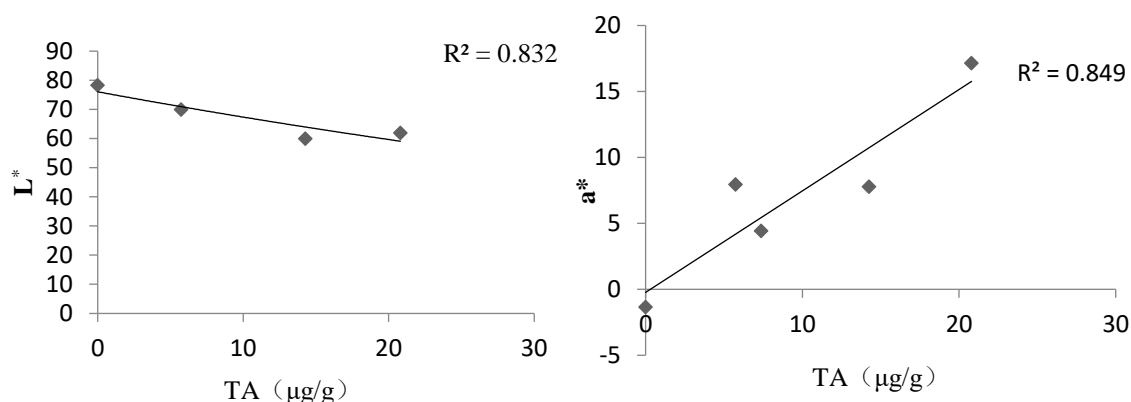


图 4-12 彩色马蹄莲粉白色系品种  $b^*$  与 TA、TF 的关系

Fig 4-12 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among pink cultivars of *Zantedeschia hybrida*

#### 4.3.2.6 橙色系品种的形成

在收集到的 27 个彩色马蹄莲佛品种中，共有‘火凤凰’、‘丽都’、‘奥迪安’3个品种被聚类为橙色，该色系品种主要含有花青素苷与黄酮、黄酮醇，经分析观察得出，彩色马蹄莲呈色系品种亮度  $L^*$  与总的花青素苷（TA）呈极显著的负相关，红度（ $a^*$ ）与总的花青素苷 TA 呈显著的正相关（ $R^2 = 0.511$ ），花青素苷是呈红色的主要着色物质，黄度（ $b^*$ ）与总的黄酮、黄酮醇（TF）含量呈显著的正相关（ $R^2 = 0.765$ ），黄酮、黄酮醇是彩色马蹄莲佛焰苞呈黄色的主要着色物质，说明彩色马蹄莲橙色系品种佛焰苞颜色形成是由 TA、TF，共同作用的结果。同时在不同含量的 TA 与不同含量的 TF 共同作用下，呈现出不同程度的橙色。



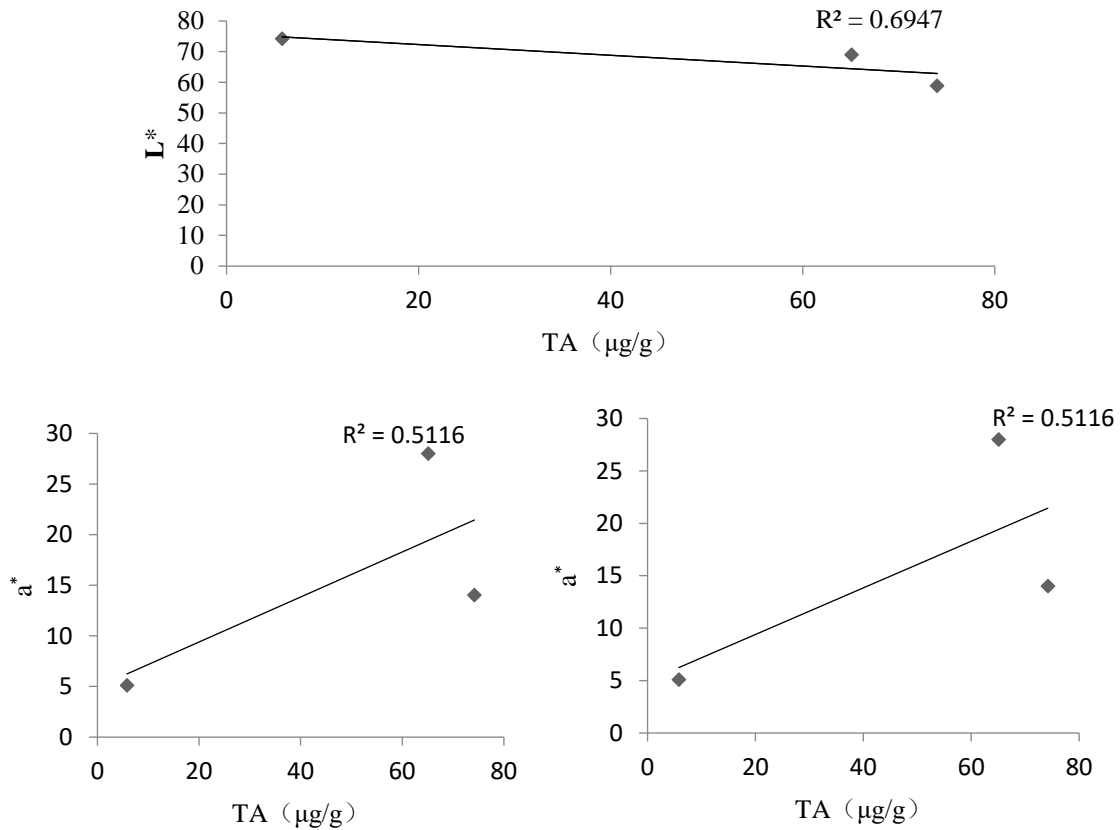


图 4-13 橙色系品种彩色马蹄莲  $L^*$  与 TA 关系;  $a^*$  与 TA 关系;  $b^*$  与 TF 关系  
Fig 4-13 Relationships between  $b^*$  and TA or TF among orange cultivars of *Z. hybrida*

#### 4.3.3 彩色马蹄莲佛焰苞花青素苷代谢途径分析

根据所测得的中间代谢产物推定了三者花青素苷的代谢途径图 (4-13 A, B, C) 显示了彩色马蹄莲中花青素苷合成途径的关键节点。发现‘小黑妞’ *FNS* 的表达受到抑制, 故在与花青素苷合成之间的竞争中, 黄酮合成被阻断, 导致花青素苷的高积累, 这与大丽花中的研究相似, 在大丽花中, 对黑色品种和其紫色突变体进行比较发现, 在黑色花中 *DvFNS* 受到抑制, 使花青素和黄酮合成之间的竞争消失, 原本用于合成黄酮的流量消失, 不能合成黄酮, 从而合成大量的矢车菊素, 形成了黑色的花色表型<sup>[77]</sup>。而白色品种“范图拉”没有矢车菊苷的积累, 其中间代谢产物均低于“浪漫”与“小黑妞”这两个色系品种, 通过分析“范图拉”通路途径, 虽然检测到了参与合成花青素苷的所有化合物酶, 检测出表儿茶素 (Epicatechin), 但该品种的花青素合成途径在较后的节点中被截断的, 这可能是由于中间代谢产物在合成花青素苷的过程中遭受了降解的影响, 无法形成稳定的色素苷。

同时在分析这三个品种中间代谢产物时, 也发现三个品种山奈酚 (Kaempferol) 含量均为代谢产物中最高的, 而山奈酚是由二氢山奈酚 (Dihydrokaempferol, DHK) 与 *FLS* 催化生成, *DHK* 同时也受 *F3'H* 和 *F3'5'H* 催化合成二氢槲皮素 (*DHQ*) 和二氢杨梅素 (*DHM*),

而本研究供试材料中未发现天竺葵素（Pg），这可能由于彩色马蹄莲 *DFR* 具有底物特异性。

结合上文对彩色马蹄莲表皮细胞形状的观察分析，可得出彩色马蹄莲佛焰苞黑色系形成与较高的花青素苷含量、多层的花青素苷积累细胞层密切相关，与表皮细胞形状无关。

而有意思的是，我们在两个品种中均检测到了二氢杨梅素和杨梅素，这说明彩色马蹄莲中存在 *F3' 5' H*，但其为何不能积累飞燕草素，不能呈现蓝色，因此将来培育彩色马蹄莲新花色品种，可以从花青素苷途经上的结构基因入手。

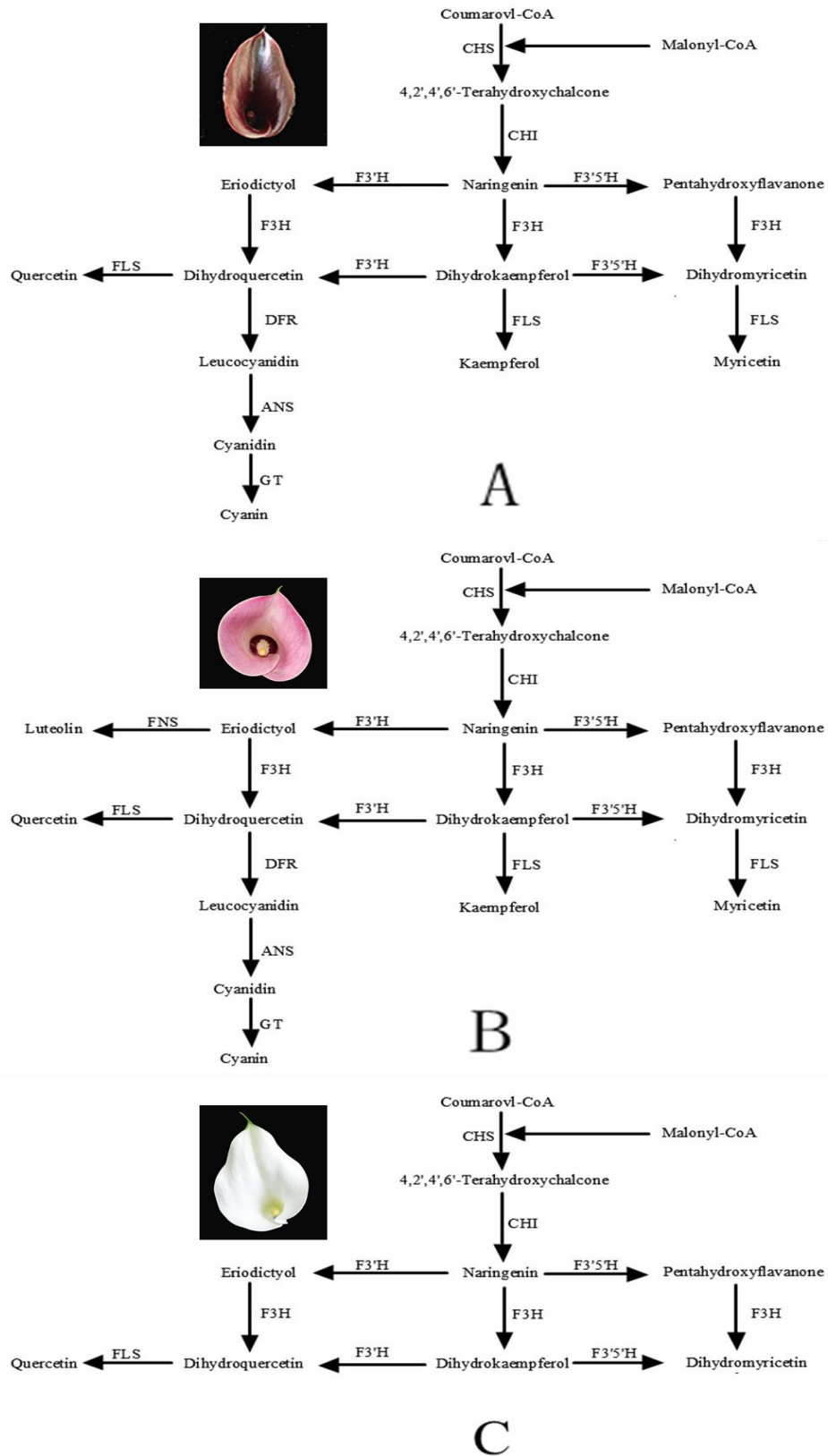


图 4-13 彩色马蹄莲佛焰苞中推定的花青素苷代谢途径  
Fig 4-13 Inferred metabolic pathways of anthocyanins in *Z.hybrida spathe*  
A: ‘小黑妞’；B: ‘浪漫’；C: ‘范图拉’

综上所述,今后在分子育种的方式培育新的彩色马蹄莲花色品种,可以从花青素苷合成代谢途径结构基因入手,如 *F3' 5' H*、*DFR* 基因,从而增加或减少花青素苷的成分与含量,创制出新的花色。

#### 4.4 本章小结

类黄酮是彩色马蹄莲主要的呈色物质,黑色系、紫红色系、红色系、粉白色系、橙色系品种中含有花青素苷,其中矢车菊素(Cy)是主要的花青素苷成分,在橙色系与红色系的部分品种中含有少量的天竺葵素(Pg)(12%~38.5%)。

总的花青素苷含量(TA)与亮度  $L^*$  呈极显著的负相关,亮度  $L^*$  随总花青素苷含量(TA)的增加而下降。红色系与橙色系品种红度  $a^*$  随总花青素苷含量的增加而上升,这可能由于这两个色系品种色素成分中含有呈朱红色的天竺葵素(Pg)。橙色系品种  $b^*$  值黄度与 TF(总的黄酮和黄酮醇)含量呈极显著的正相关。

经过对‘小黑妞’(黑色)‘浪漫’(粉色)‘范图拉’(白色)这三个品种中间代谢产物的对比测定,结果发现,‘小黑妞’中间代谢产物大部分显著高于‘浪漫’与‘范图拉’,且其不积累黄酮,可能小黑妞 *FNS* 的表达受到抑制,故在与花青素苷合成之间的竞争中,黄酮合成被阻断,导致花青素苷的高积累。

## 第五章 彩色马蹄莲转录组分析与基因挖掘

转录组测序技术是连接基因组遗传信息与生物功能的蛋白质组的必然纽带，其能够在最短的时间内获得大量的分子信息与基因数据是现今研究基因表达的重要手段<sup>[53-55]</sup>。利用 Illumina/Solexa 第二代高通量转录组测序技术，对彩色马蹄莲黑色系的‘小黑妞’、粉白色系‘浪漫’进行转录组测序比较，分析挖掘出造成彩色马蹄莲佛焰苞色彩差异的表达基因。

### 5.1 材料与方法

#### 5.1.1 材料

试验材料‘小黑妞’、‘浪漫’、‘范图拉’购自云南“真善美兰业有限公司”温室，供试材料均为新鲜盆栽。材料购回之后放置在实验室内，定期浇水，保持放置于适宜材料生长或保持活性的环境中，以减轻因环境差异所造成数据的误差。供试材料为下午 3 点摘取，每个品种取 3 个不同的单株，在佛焰苞中部着色较均匀处取 0.2g，用锡箔纸包裹编号迅速放入液氮中速冻，后放置于-80 冰箱储存备用。

#### 5.1.2 RNA 的提取方法

采用试剂盒提取（华越洋 0416-500k 型，中国）RNA 提取试验流程如下

（1）将所有实验用品（枪头、枪头盒、离心管、研钵）放入 0.1%外源 RNA 酶清除剂（北京华越洋生物科技有限公司）中浸泡 24h，用报纸包裹好后放入高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 30 min 后放入烘箱烘干备用。

（2）取事先准备好的 0.2g 材料放入研钵用液氮迅速研磨待液氮将要挥发干时间，将研钵后的植物粉末移至离心管，放入 1000μL 细胞裂解液，置于震荡器充分震荡使细胞裂解。

（3）上包含混合物的液体移至离心管中，加入 300μL 去蛋白液与 200μL 三氯甲烷（氯仿），并充分震荡混合。

（4）将混合液在 12000rpm 离心 10min，取 700μL 上清液移至新离心管中并加入 700μL 漂洗剂，充分颠倒混匀。

（5）将所得混合液分两次（每次不超过 700μL）加入同一个离心吸附柱中，每次加入后都 12000rpm 离心 3 min，丢弃废液。

(6) 向离心吸附柱加 500 $\mu$ L 洗柱液, 12000 rpm 离心 3 min, 丢弃废液 (重复一遍)。

(7) 直接在离心吸附柱中加 500 $\mu$ L 去酶液, 充分颠倒混合均匀, 12000 rpm 离心 1 min, 丢弃废液。

(8) 12000rpm 离心 5 min, 充分去除残留废液。

(9) 将离心吸附柱移到 RNase-free 离心收集管中, 加入 80 $\mu$ L RNA 洗脱液, 放置 5 min。12000rpm 离心 3min 充分洗脱, 以提高 RNA 产量。

(10) 取 5 $\mu$ L 提取好得 RNA 加入同等体积得 RNA loading buffer, 1.0% 得琼脂糖凝胶电泳检测完整型, 用成像仪检测 RNA 得浓度。

### 5.1.3 彩色马蹄莲转录组测序

将提取的彩色马蹄莲 RNA 与广州基迪奥生物科技有限公司进行文库数据比对, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA, 用六碱基随机引物 (random hexamers) 合成第一条 cDNA 链, 后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链, 在经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly (A) 并连接测序接头, 后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增, 建好的测序文库用 Illumina HiSeq<sup>TM</sup>2000 进行测序<sup>[79、80]</sup>。

### 5.1.4 转录组组装

由于经测序得到的原始数据文件 clean reads, 不都是真实有效, 含有接头、重复、低质量等问题, 因此需要对其进行过滤筛选得到高质量的 clean reads。数据处理流程为 1、去除含 adaptor 的 reads。2、去除 N 大于 10% 的 read。3、去除低质量 reads (质量值  $Q \leq 5$  的碱基数占整个 read 的一半以上)。我们使用短 reads 组装软件 Trinity<sup>[78]</sup> 做转录组从头组装。Trinity 首先将具有一定长度 overlap 的 reads 连成更长的片段, 这些通过 reads overlap 关系得到的不含 N (N 做为评价转录组测序质量的重要指标) 的组装片段作为组装出来的 Unigene。

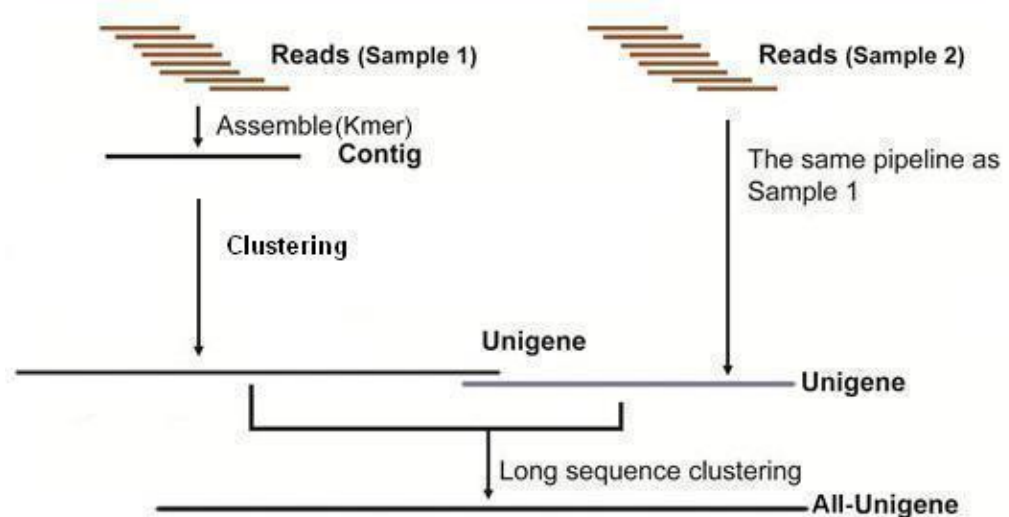


图 5-1 转录组组装流程<sup>[86]</sup>  
Figure 5-1 The procedure of transcriptome assemb<sup>[86]</sup>

5.1.5 转录组数据分析

将得到的 Unigene 通过 blaskx 进行蛋白组数据库比对，使用 Nr、SwissProt、KEGG 和 COG/KOG（evalue<0.00001）四大蛋白数据库，从而得到最具有相似性的蛋白序列，因而得到 Unigene 功能注释信息。其中 Nr 为非冗余蛋白序列数据库，Swissprot 是经过严格筛选去冗余的。KEGG 是分析基因在细胞液泡中的代谢通路以及基因产物的数据库，对研究生物学与基因的复杂行为具有指导意义。COG/KOG 数据库作用是对基因进行同源分类的，COG/KOG 蛋白基因数据库基于真核生物具有完整基因组的代码蛋白、系统进化关系进行构建。

5.2 结果与分析

5.2.1 彩色马蹄莲佛焰苞 RNA 的提取

彩色马蹄莲小黑妞与浪漫提取的 RNA 琼脂糖凝胶经过紫外分光光度仪检测，发现条带清晰且完整，说明所提取的 RNA 浓度较高，质量良好，基本满足转录组数据建库分析的要求。

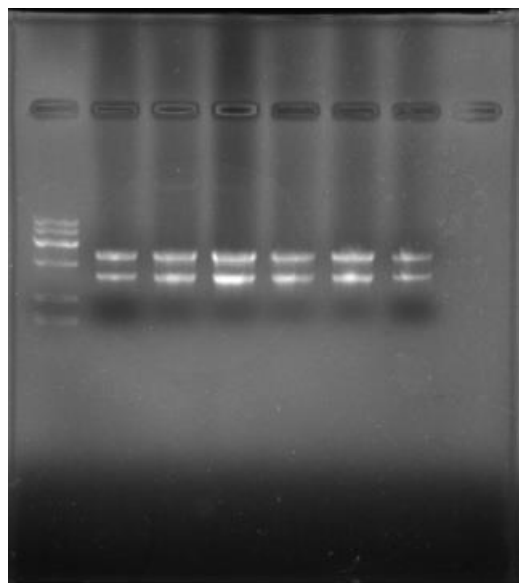


图 5-2 彩色马蹄莲 RNA 的琼脂凝胶电泳

Fig 5-2 Agarose electrophoresis of extracted total RNA from *Z. hybrida*

### 5.2.2 转录组数据测序及拼接

为了对比分析彩色马蹄莲不同色系基因表达的变化情况，分别选取小黑妞（黑色）、浪漫（粉白）、范图拉（白色）为材料，分别制备彩色马蹄莲 RNA 样品进行数据对比分析（表 5-1），发现“小黑妞”供进行了 73510006 次读数，GC 含量为 50.51%，Q20 比例（测试错误<1%）为 96.60%，Illumina 数据平台平均读长为 785bp，测序数据碱基数为。“浪漫”转录组测序总共进行了 41661782 次读数，其 GC 含量达到 50.55%，Q20 比例为 96.86%。“范图拉”转录组测序进行了 37623484 次读数，其中 GC 含量占比为 51.05%，Q20 的比例为 97.83%，经转录组分析的三个品种的彩色马蹄莲未知碱基序列的片段 N 均为 0。GC 含量较为相近，均 50.5%左右，因此说明测序质量较高，可以开展进一步分析。

表 5-1 彩色马蹄莲转录组测序组装结果统计表  
Table 5-1 summary for the transcriptomes of *Z. hybrida*

总基因数	最大长度	最小长度	平均长度	N50	GC 含量	Q20
Genes Num	Max length	Min length	Average length	N50	GC percentage	Q20
85907	15804	201	785	1557	44.63%	96.60%

### 5.2.3 彩色马蹄莲转录组序列功能注释

将彩色马蹄莲 Unigene 与 Nr、SwissProt、KEGG 和 COG/KOG 蛋白基因功能数据进行比对，共有 85907 Unigene 获得了注释，其中 Nr 数据库注释最多达到 29816 条，占总共 Unigene 的 34.7%，Swissprot 数据库注释 20897 条，占总共 Unigene 的 24.3%，KOG 数据库注释 18034 条，占总 Unigene 的 20.99%，KEGG 数据库注释 10322 条，占总 Unigene 的 12.0%，另外还有 54642 条基因未能获得注释，这可能是片段过短或者基因注释信息匮乏，



也有可能是天南星科植物中特有的基因。

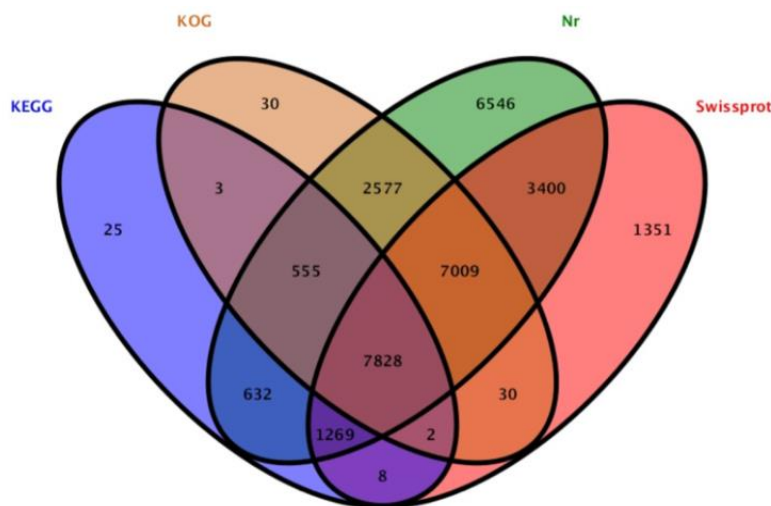


图 5-3 四大数据库注释韦恩图  
Fig5-3 Venn diagram of number of Transcripts annotated by four different flower transcriptomes

组装数据结果评估可以从 N50 数据来评估。将所有 Unigene 从长到短排列，并依次累加长度，当累加片段长度达到所有 Unigene 长度的百分之 50%时，对应那个片段的长度和数量，即为 Unigene N50 长度和数量。Unigene N50 越长，数量越少，就预示着质量越好。在对四大数据库产生的短数据进行拼接共获得 85907 条数据，最大长度 15804bp，最短长度为 201bp 平均长度 785 bp，N50 为 1557。

5.2.3.1 彩色马蹄莲转录组 Unigene 的 Nr 数据库注释

将所有 Unigene 在 Nr、Swiss-prot、KEGG 与 COG/KOG 四大蛋白数据库中的最佳对比结果的，将其分为 5 个范围，并统计每个范围的基因个数。利用 blastx 将组装出来的 Unigene 序列与 Nr 数据库进行对比后，选取每个 Unigene 在 Nr 库种对比结果最好（E 值最低）的那一条序列为对应同源序列（如果并列选取第一条），确定同源序列所选定物种，统计比对到各个物种的同源序列数量，在 Nr 数据库 E-evalue 值中 29.51%的 Unigene 分布于  $1E-20 < evalue \leq 1E-5$ ，22.46% 分布于  $1E-50 < evalue \leq 1E-20$ ，17.93% 分布于  $1E-100 < evalue \leq 1E-50$ ，10.94% 分布于  $1E-150 < evalue \leq 1E-100$ ，19.14% 分布于  $0 < evalue \leq 1E-150$ 。Swissprot 数据库 E-value 分布来看，所获得 20897 条 Unigene，其中 24.4% Unigene 分布于  $1E-20 < evalue \leq 1E-5$ ，27.42% 分布于  $1E-50 < evalue \leq 1E-20$ ，20.66 % 分布于  $1E-100 < evalue \leq 1E-50$ ，9.84% 分布于  $1E-150 < evalue \leq 1E-100$ ，17.65% 分布于  $0 < evalue \leq 1E-150$ 。根据 Nr 数据库注释结果，将彩色马蹄莲的测序数据与 Nr 数据库中注释次数最多，相似度最高植物物种序列进行比对排序，并按数据库中的序列对彩色马蹄莲

基因进行蛋白功能分析。

从物种匹配相似度来看，彩色马蹄莲共有 29816 种 Unigene 与其他植物样本已知基因具有同宗同源相似性(表 5-2)。其中注释序列分布最多的前 5 种为棕榈(*Elaeis guineensis*) 4679 条，海枣 (*Phoenix dactylifera*) 3941 条，莲 (*Nelumbo nucifera*) 2541 条，水稻梗稻系 (*Oryza sativa japonica group*) 1875 条，芭蕉亚种茛 (*Musa acuminata subs malaccensis*) 1788 条。从相似度包含量来看，彩色马蹄莲在 Nr 数据库中匹配度最好，由于缺少彩色马蹄莲相关的转录组数据及 Unigene 信息，一部分 Unigene 无法在四大数据库中匹配。另外一些模式植物如拟南芥、烟草 Unigene 并未发现局有同源性，因此也就说明模式植物的参考性十分有限。

表 5-2 彩色马蹄莲物种分布  
Table 5-2 Species distribution map of *Z. hybrida*

物种 Species	Unigene Num
棕榈 <i>Elaeis guineensis</i>	4679
海枣 <i>Phoenix dactylifera</i>	3941
莲 <i>Nelumbo nucifera</i>	2541
水稻梗稻系 <i>Oryza sativa Japonica Group</i>	1875
芭蕉亚种茛 <i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	1382
可可 <i>Theobroma cacao</i>	1382
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	1170
蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	973
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	735
木本棉 <i>Gossypium arboreum</i>	624
其他 Other	10514

彩色马蹄莲转录组数据 GO 分析显示，共有 (24321) 条 Unigene 相匹配，可以分为 3 类为分子功能 (Molecular)、生物过程 (Biological Process)、细胞组成 (Cellular Component)，大量的 Unigene 被归类为与细胞器官相关。在生物过程类中包括代谢途径 (Metabolic process) 10440 条；细胞途径 (Cellular process) 9759 条。

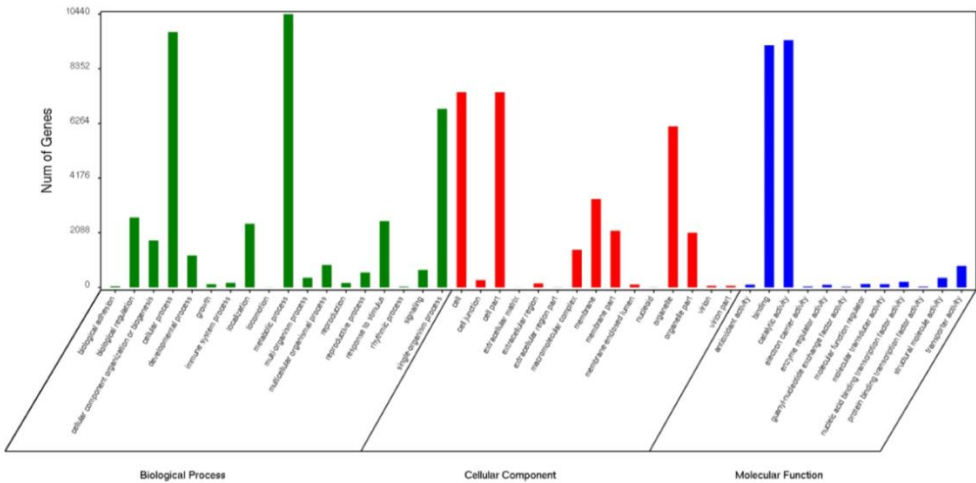


图 5-4 彩色马蹄莲转录组数据 GO 分类  
Fig 5-4 Histogram representation of GO classification for *Z.hybrida*

### 5.2.4 彩色马蹄莲花色形成相关基因的筛选

为分析彩色马蹄莲‘小黑妞’（黑色）、‘浪漫’（粉白色）、‘范图拉’（白色）三个品种花色形成的相关基因，根据转录组测序所提取得到的参与彩色马蹄莲呈色物质次生代谢通路的关键节点基因（花青素苷途径合成、花青素苷修饰集团合成途径、花黄素黄酮、黄酮醇合成途径）。通过比对 KEGG 数据库所收录的模式标准基因名称或同义词与彩色马蹄莲转录组数据注释结果进行比对分析，将所得到的相关映射基因映射到 KEGG 数据库提供的参考目录中。经检索比对 KEGG 数据库共有 13 种调控基因与彩色马蹄莲呈色相关（表 5-3），其中与花青素苷合成相关的基因共有 8 种，包括 *CHS*（查尔酮合成酶）、*CHI*（查尔酮异构酶）、*F3H*（黄烷酮 3 羟化酶）、*F3'H*（类黄酮 3'羟化酶）、*F3'5'H*（类黄酮 3'5'羟化酶）、*DFR*（二氢黄酮醇-还原酶）、*ANS*（花青素合成酶）、*UFGT*（花青素 3-O 糖基转移酶）。与花青素苷修饰相关的基因有 3 种，包括 *5AT*（花青素 5-酰基转移酶）、*GT1*（花青素 5, 3-O-葡萄糖基转移酶）、*5Mat1*（花青素 5-O-葡萄糖苷-6"-O-丙二酰转移酶）。与黄酮、黄酮类化合物相关的基因只有一种 *FLS*（黄酮醇合成酶），与黄烷酮相关的基因只有一种 *ANR*（花青素还原酶）。

表 5-3 彩色马蹄莲花色相关候选基因  
Table 5-3 Candidate genes related flower pigmentation *Zantedeschia hybrida*

Function 功能	Gene 基因	Enzyme	酶	KO id (EC no.) KO 号 (ECno.)	No. All <sup>a</sup> 所有基因量
Anthocyanin biosynthesis 花青素苷合成	<i>CHS</i>	Chalcone synthase	查尔酮合成酶	K00660 (2.3.1.74)	3
	<i>CHI</i>	Chalcone isomerase	查尔酮异构酶	K01859 (5.5.1.6)	3
	<i>F3H</i>	Flavanone 3-hydroxylase	黄烷酮 3 羟化酶	K00475 (1.14.11.9)	6
	<i>F3'H</i>	Flavonoid 3'-hydroxylase	类黄酮 3'羟化酶	K05280 (1.14.13.21)	2
	<i>F3'5'H</i>	Flavonoid 3',5'-hydroxylase	类黄酮 3'5'羟化酶	K13083 (1.14.13.88)	1
	<i>DFR</i>	Dihydroflavonol 4-reductase	二氢黄酮醇-还原酶	K13082 (1.1.1.219)	3
	<i>ANS</i>	Anthocyanidin synthase	花青素合成酶	K05277 (1.14.11.19)	1
	<i>UFGT</i>	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	花青素 3-O 糖基转移酶	K12930 (2.4.1.115)	17
Anthocyanin modification 花青素苷修饰	<i>5AT</i>	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	花青素 5-酰基转移酶	K12936 (2.3.1.153)	2
	<i>GT1</i>	Anthocyanidin 5, 3-O-glucosyltransferase	花青素, 5, 3-O -葡萄糖基转移酶	K12938 (2.4.1.-)	4
	<i>5MaT1</i>	Anthocyanin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase	花青素 5-O-葡萄糖苷-6''-O-丙二酰转移酶	K12934 (2.3.1.172)	2
Flavone and flavonol biosynthesis 黄酮和黄酮醇合成	<i>FLS</i>	Flavonol synthase	黄酮醇合成酶	K05278 (1.14.11.23)	5
Flavanone biosynthesis 黄烷酮合成	<i>ANR</i>	Anthocyanidin reductase	花青素还原酶	K08695 (1.3.1.77)	4

5.2.5 彩色马蹄莲花色差异表达基因的挖掘

在对彩色马蹄莲‘小黑妞’（B）、‘浪漫’（P）、‘范图拉’（W）三个不同色系的转录组测序数据差异表达基因分析得出，共有 25165 条差异基因（表 5-4），其中显著上调基因 10130 条，显著下调基因 15035 条。

范图拉（白色）与‘小黑妞’（黑色）显著差异基因共有 7890 条，其中显著上调基因 5228 条，显著下调基因 2662 条。‘范图拉’与‘浪漫’品种显著差异基因共有 8395 条，其中显著上调基因 6162 条，显著下调基因 2233 条。‘浪漫’与‘小黑妞’这两个品种显著差异基因共有 8880 条，其中显著上调基因 3645 条，显著下调基因 5235 条。

根据 KEGG 数据库提供的标准基因名称和同义词在彩色马蹄莲转录组注释结果中进行综合检索（表 5-4），根据所送测的三个品种彩色马蹄莲（‘浪漫’、‘小黑妞’、‘范图拉’）相映射到 KEGG 数据库共有 55 条基因获得注释，其中三个品种共有的基因一共有 25 条差异基因获得功能注释注释，通过观察获得注释的基因 RPKM（Read Per Kilobase per Million mapped read）来计算( $RPKM=(1000000 \times C)/(N \times L/1000)$ )相关基因的表达量可知，白色品种‘范图拉’至黑色品种‘小黑妞’，RPKM 值上调的基因共有 6 条说明这些基因可能与花青素苷合成相一致，其中功能注释为花青素苷合成的基因 2 条，功能注释为花青素苷修饰的基因 2 条，功能注释为黄酮一条、黄酮醇与黄烷酮合成基因的 1 条。RPKM 值下调基因共有 2 条，说明这些功能基因可能与彩色马蹄莲花青素苷量的合成相反，其中分别为功能注释为花青素苷合成 1 条与花青素苷修饰 1 条。

表 5-4 样品差异基因结果统计  
Table 5-4 Comparison of the gene expression profile among the different

比对 Pair	差异基因 All Diff Gene	差异基因（上调） Diff Gene(Up)	差异基因（下调） Diff Gene(Down)
W-VS-B	7890	5228	2662
W-VS-P	8395	6162	2233
P-VS-B	8880	3645	5235

5.3 讨论

目前有关植物花卉花色相关的基因如 *CHS*、*CHI*、*F3H* 和 *F3'H* 已经得到了广泛的挖掘与研究，但做为 21 世纪花卉之星的彩色马蹄莲转录组的研究尚未展开。

本试验通过运用 Illumina 数据平台对彩色马蹄莲转录组数据进行分析比对，其中‘浪漫’、‘小黑妞’、‘范图拉’三个品种 Q30 分别达到 92.86%、93.49%、95.43%，N50 达到 1557，充分满足转录组分析的要求。

研究彩色马蹄莲‘小黑妞’（黑色）与‘浪漫’（粉白色）、‘范图拉’（白色）花青素苷含量差异的原因可能由基因差异所造成。

通过对转录组数据的筛选，筛选出注释与花青素苷合成相关的基因有 36 条占所筛选基因的 67.9%，与花青素苷修饰相关的基因有 8 条占 15%，与黄酮黄酮醇合成相关的基因共 5 条占筛选出总基因数的 9.4%，与黄烷酮合成相关的基因共 4 条，占所筛选基因量的 7.5%。

## 第六章 全文总结与展望

本研究通过对彩色马蹄莲佛焰苞表型测定分析、佛焰苞显微结构对花色影响、花色素成分及含量定性定量分析、对转录组所得到的数据进行组装及功能注释,得出以下结论

(1) 将收集到的 27 个彩色马蹄莲品种进行测色仪测色法,运用 PASW Statistics 18 软件进行聚类分析并结合 CIEL<sup>\*</sup>a<sup>\*</sup>b<sup>\*</sup>色空间将收集到的彩色马蹄莲分为 6 大色系集群,建立了彩色马蹄莲花色表型分析系统。根据测色仪测得的  $L^*a^*b^*$  三刺激值进行相关性分析。根据相关性分析我们可以将彩色马蹄莲色系品种分为两类,第一类为紫红色系、粉白色系、橙色系、红色系品种  $L^*$  值与  $a^*$  值呈极显著的负相关关系,第二类为橙色系、红色系、黄色系品种  $L^*$  值与  $b^*$  值呈极显著的正相关关系。

(2) 花瓣是花色的载体,含色素的细胞层在花瓣中的分布情况是影响彩色马蹄莲花色变异的重要原因,通过对彩色马蹄莲横切面纤维结构的观察与分析发现,其中黑色系、紫红色系、粉白色系品种的上下表皮细胞和靠近上下表皮的层叶肉组织细胞均富集了很高浓度的花青素苷,中间叶肉组织细胞呈无色透明状;黄色系品种主要由黄酮、黄酮醇在表皮细胞与叶肉组织细胞中均匀的分布;橙色系、红色系品种在表皮覆盖红色细胞层中间部分叶肉组织富含丰富的黄酮、黄酮醇,在红色花青素苷与黄色黄酮、黄酮醇的相互作用下,使佛焰苞呈不同程度的橙色、红色。

(3) 花色素成分及含量是影响花色的主要因素,本次试验运用高效液相色谱-光电二极管阵列检测(HPLC-DAD)和高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用(HPLC-ESI-MS)技术与双光束紫外-可见光分光光度计对彩色马蹄莲黄酮类化合物、花青素苷、胡萝卜素进行定性定量分析,结果显示,在所收集的 27 个彩色马蹄莲品种中并未检测出胡萝卜素成分。彩色马蹄莲各色系品种佛焰苞中主要花青素苷的主要成分为矢车菊素苷(Cy),在橙色系与红色系的部分品种中少量的含有天竺葵素苷(Pg),黄色系品种并未检测出花青素苷的成分。

(4) 采用 Illumina 二代高通量数据测序平台对彩色马蹄莲佛焰苞进行转录组测序,共有 85907 条 Unigene 获得了注释,其中有 53 条可能与彩色马蹄莲佛焰苞呈色过程相关,结合彩色马蹄莲代谢途径,解析彩色马蹄莲花青素苷的形成。

综上,彩色马蹄莲佛焰苞呈色与色素成分、含量以及佛焰苞解剖结构特点密切相关。彩色马蹄莲佛焰苞黑色系形成与高的花青素苷含量、多层的花青素苷积累细胞层密切相关,与表皮细胞形状无关。分析彩色马蹄莲色素成分、含量以及色素分布特征与呈色之间的关

系，对解析彩色马蹄莲佛焰苞呈色机理以及分子育种花色改良具有重要指导意义。



## 参考文献

- [1]孙卫,李崇晖,王亮生,等.蓝色瓜叶菊花青苷在花发育过程中的积累和变化规律[J].北京林业大学学报,2010,32(3):128-134.
- [2]Deguchi A, Ohno S, Hosokawa M, et al. Endogenous post-transcriptional gene silencing of flavone synthase resulting in high accumulation of anthocyanins in black dahlia cultivars.[J]. *Planta*, 2013, 237(5):1325-35.
- [3]李美茹,陈金婷,孙梓健,等.花卉分子育种的研究进展[J].热带亚热带植物学报,2003,11(1):87-92.
- [4]程金水,刘青林.园林植物遗传育种学[M].中国林业出版社, 2010.
- [5]Li L, Van E J. Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink.[J]. *Transgenic Research*, 2007, 16(5):581.
- [7]赵昶灵,郭维明,陈俊愉.植物花色形成及其调控机理[J].植物学报, 2005, 22(1):70-81.
- [8]何佳珂,于洋,陈西敬,等.黄酮类化合物的药物代谢研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(21):2789-2794.
- [9]延玺,刘会青,邹永青,等.黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J].有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [10]安田齐著.花色生理生物化学[M].北京:中国林业出版社,1989.
- [11]戴思兰,黄河,付建新,等.观赏植物分子育种研究进展[J].植物学报,2013,48(6):589-607.
- [12]Clement J S, Mabry T J. Pigment Evolution in the Caryophyllales: a Systematic Overview\*[J]. *Botanica acta: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft = journal of the German Botanical Society*, 1996, 109(5):360-367.
- [13]胡可,韩科厅,戴思兰.环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理[J].植物学报,2010,45(3):307-317.
- [16]谢烨,孙毅,黄继荣.拟南芥中花青素的修饰[J].植物生理学报,2013,49(2):101-110.
- [17]王辉,龚淑英,刘蕾.花青素分布、合成和降解综述[J].茶叶,2009,35(4):203-206.
- [18]邓娇.2015.莲类黄酮色素分析及莲花瓣着色机理研究[D].武汉:中国科学院武汉植物园.
- [19]Hondo T, Yoshida K, Nakagawa A. Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*[J]. *Nature*, 1992, 358(8):515-518.
- [20]陈海霞,刘明月,吕长平.非洲菊花瓣色素分布对花色的影响[J].湖南农业大学学报(自科

版),2010,36(2):165-168.

- [22]Deli J, Molnár P, Matus Z, et al. Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-carotenoids from petals of *Lilium tigrinum*[J]. *Chromatographia*, 1998, 48(1):27-31.
- [23]Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, et al. Carotenoids. Handbook[J]. *Carotenoids Handbook*, 2004.
- [24]Strack D, Vogt T, Schliemann W. Recent advances in betalain research.[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(3):247-269.
- [25]王长泉,刘涛,王宝山.植物甜菜素研究进展[J].*植物学报*,2006,23(3):302-311.
- [26]Steglich, W., and Strack, D. 1990. Betalains. In the *Alkaloids*[M], Chemistry and Pharmacology. A.Brossi,ed(London :Academic press):1-62.
- [27]薛英利,赵庆师,黄由安,等.滇山茶的花色类型与细胞内环境关系初探[J].*云南农业大学学报自然科学*,2015,30(3):455-463.
- [28]Zhu M, Zheng X, Shu Q, 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.
- [29]Vogt T, Ibdah M, Schmidt J, et al. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(4):583-592.
- [30]Mol J, Cornish E, Mason J, et al. Novel coloured flowers.[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(2):198.
- [31]安田齐著.花色生理生物化学[M].北京:中国林业出版社,1989.
- [33]Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2008, 54(4):733.
- [34]Ada N L, Ovadia R, Izhak F, et al. Increased anthocyanin accumulation in ornamental plants due to magnesium treatment[J]. *Journal of Horticultural Science &Biotechnology*, 2007, 82(3):481-487.
- [35]Shoji K. Perianth Bottom-Specific Blue Color Development in Tulip cv. Murasakizuisho Requires Ferric Ions[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2007, 48(2):243-251.
- [36]Holton, Cornish E C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1071-1083.

- [37]张宁,胡宗利,陈绪清,等.植物花青素代谢途径分析及调控模型建立[J].中国生物工程杂志, 2008,28(1):97-105.
- [38]黄勝忠.彩色海芋花色素組成分之分析[J].臺中區農業改良場研究彙報, 2003,78:23-34.
- [39]Yang J, Gu H, Yang Z. Likelihood analysis of the chalcone synthase genes suggests the role of positive selection in morning glories (*Ipomoea*)[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2004, 58(1):54-63.
- [40]Gorton H L, Vogelmann T C. Effects of Epidermal Cell Shape and Pigmentation on Optical Properties of *Antirrhinum* Petals at Visible and Ultraviolet Wavelengths[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3):879-888.
- [41]吴江,程建徽,杨夫臣.植物花色素苷生物合成的转录调控[J].中国细胞生物学学报,2006, 28(3):453-456.
- [42]白新祥.菊花花色形成表型分析[D].北京:北京林业大学,2007.
- [43]Voss D H. Relating colorimeter measurement of plant color to the Royal Horticultural Society colour chart.[J]. 1992.
- [44]Baumann K, Perez-Rodriguez M, Bradley D, et al. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors[J]. *Development*, 2007, 134(9):1691-1701.
- [45]王卅,张旻,李玉花.花瓣锥形表皮细胞形成及对授粉昆虫吸引作用机制研究进展[J].园艺学报,2012,39(9):1781-1792.
- [46]刁英,胡蓉,游永宁,等.莲属植物叶片及花瓣的比较解剖学研究[J].湖北农业科学,2013,52(13):3059-3061.
- [49]韩科厅.花青素苷合成关键结构基因导入对菊花花色的影响[D].北京:北京林业大学,2010.
- [50]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]. *Journal of Plant Research*, 2001, 114(1):33-43.
- [51]Yamagishi M, Nakayama M. The transcription factor LhMYB12 determines anthocyanin pigmentation in the tepals of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) and regulates pigment quantity[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30(2):913-925.
- [52]Burchi G, Prisa D, Ballarin A, et al. Improvement of flower color by means of leaf treatments in lily[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(3):456-460.

- [53]Collins L J, Biggs P J, Voelckel C, et al. An approach to transcriptome analysis of non-model organisms using short-read sequences[C]. Genome Informatics International Conference on Genome Informatics. Genome Inform, 2008:3.
- [54]Forkmann G Flavonoids as flower pigments the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering[J]. Plant Breeding, 1991, 106:1-26.
- [55]Packer L. Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation[M]. Academic Press, 1992.
- [56]Perezrodriguez M, Jaffe F W, Butelli E, et al. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers[J]. Development. 2005, 132(2):359-370.
- [57]Prinsi B, Negri A S, Quattrocchio F M, et al. Proteomics of red and white corolla limbs in petunia reveals a novel function of the anthocyanin regulator ANTHOCYANIN1 in determining flower longevity[J]. Journal of Proteomics, 2016, 131:38-47.
- [58]Takeda K, Yamaguchi S, Iwata K, et al. A malonylated anthocyanin and flavonols in the blue flowers of *meconopsis*[J]. Phytochemistry, 1996, 42(3):863-865.
- [59]Takeda K. Metallo-Anthocyanins. II: Further Experiments of Synthesizing Crystalline Blue Metallo-Anthocyanins Using Various Kinds of Bivalent Metals[J]. Proceedings of the Japan Academy, 1977, 53:257-261.
- [60]邹丽秋,王彩霞,匡雪君.黄酮类化合物合成途径及合成生物学研究进展[J].中国中药杂志, 2016,41(22):4124-4128.
- [61]Prinsi B, Negri A S, Quattrocchio F M, et al. Proteomics of red and white corolla limbs in petunia reveals a novel function of the anthocyanin regulator ANTHOCYANIN1 in determining flower longevity[J]. Journal of Proteomics, 2015, 131:38.
- [62]洪艳,白新祥,孙卫,等.菊花品种花色表型数量分类研究[J].园艺学报,2012,39(7)1330-1340.
- [63]Gonnet J F. CIELab measurement, a precise communication in flower colour: an example with carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars.[J].Journal of Horticultural Science, 1993, 68(4):499-510.
- [64]Hashimoto F, Tanaka M, Maeda H, et al. Characterization of cyanic flower color of *Delphinium* cultivars.[J]. Engei Gakkai Zasshi, 2000, 69(4):428-434.
- [65]Noda K, Glover B, Linstead P, et al. Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor[J]. Nature, 1994, 369(6482):661.

- [66]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(2):167-173.
- [67]Wang S, Zhang Y, Yuhua L I. Research Progress on the Mechanism of Petal Conical Epidermal Cells Formation and Attraction to Pollinating Insects[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012.
- [68]王小菁,杨玉萍.我国观赏花卉品质形成的功能基因研究进展[J].*植物学报*,2013,48(5):471-480.
- [69]Chong-Hui L I, Wang L S, Shu Q Y, et al. Pigments Composition of Petals and Floral Color Change During the Blooming Period in *Rhododendron mucronulatum*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(7):1023-1030.
- [70]Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides[J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(3):237-256.
- [71]Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, 39(1):1-15.
- [72]Ahmed F, Fanning K, Netzel M, et al. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters[J]. *Food Chemistry*, 2014, 165(20):300.
- [73]Liu H L, Chen B H, Kao T H, et al. Carotenoids composition in *Scutellaria barbata*, D. Don as detected by high performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry-atmospheric pressure chemical ionization[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 8(1):100-110.
- [74]Wollenweber E, Stevens J F, Dörr M, et al. Taxonomic significance of flavonoid variation in temperate species of *Nothofagus*[J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(7):1125-1131.
- [75]Floyd S K, Bowman J L. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants[J]. *Nature*, 2004, 428(4):485-486.
- [76]Merzlyak M N, Chivkunova O B, Solovchenko A E, et al. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(14):3903-3911.
- [77]Deguchi A, Ohno S, Hosokawa M, et al. Endogenous post-transcriptional gene silencing of flavone synthase resulting in high accumulation of anthocyanins in black dahlia cultivars.[J].

Planta, 2013, 237(5):1325-1335.

- [78]金雪花.基于高通量测序的瓜叶菊花青素苷合成途径研究[D].北京林业大学.2013.
- [79]张振亚,裴翠明,马进.基于转录组和蛋白质组关联研究技术筛选紫花苜蓿耐盐相关候选基因[J].植物生理学报, 2016(3):317-324.
- [80]宫硇,薛静,张晓东.植物花青素合成途径中的调控基因研究进展[J].生物技术进展,2011,01(6):381-390.
- [81]周华.基于转录组比较的牡丹开花时间基因发掘[D].北京林业大学, 2015.
- [82]姜倩.葡萄风信子(*Muscari*)花色形成与相关基因研究[D].西北农林科技大学, 2014.
- [83]刘秀明,张宇,姚娜,等.红花(*Carthamus tinctorius* L.)不同开花时期的转录组测序及黄酮合成相关基因的验证[J].中国细胞生物学学报, 2015(9):1207-1215.
- [84]张振亚,裴翠明,马进.基于转录组和蛋白质组关联研究技术筛选紫花苜蓿耐盐相关候选基因[J].植物生理学报,2016(3):317-324.
- [85]金雪花,雷霆.一种制作植物切片的刀具:中国,ZL201520810074.1 [P].2016.03.30
- [86]Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome.[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7):644-52.
- [87]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.
- [88]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.
- [89]胡可.花青素苷合成途径中结构基因的表达对菊花和瓜叶菊花色的影响[D].北京林业大学,2010.
- [90]Jiao W, Zhang Y, Zhang H, et al. Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurens* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1):10-234.

## 致谢

时光荏苒，岁月如梭，三年的研究生学习生活就要结束了，还记的复试第一次来到昆明理工大学校园时的情景还历历在目恍如昨日。首先感谢昆明理工大学现代农业工程学院的全体老师，诸位老师的悉心教诲教会了很多知识。尤其是要感谢我的硕士生导师金雪花副教授，三年时间里教会了我很多，在金老师的耐心教诲下我获得了成长，恩师金老师治学严谨，业务熟练，工作精益求精。再次我衷心的祝愿您身体健康，事业有成。感谢我的室友及昆明理工大学现代农业工程学院 2014 级研究生的小伙伴们，认识你们是我研究生三年最大的收获，感谢我的同窗宋洋，在试验过程中与论文写作中给予我的帮助。感谢父母对我学业的支持。

最后感谢在百忙之中参与审稿、评审本论文的答辩委员会的老师。在今后的工作学习中我会继续加倍努力，勤奋学习、苦练本领，再次感谢所有关心与支持我的人。





## 附表 A 研究生期间所获得的主要成果

发表论文:

[1]雷霆,宋洋.食用菌母种培养基筛选的实验[J],贵州农业科学.

[2]宋洋,雷霆,金雪花,付灯祥.蓝亚麻花瓣中类黄酮化合物及代谢途径分析[J],广西植物(第二作者).

[3]Ting Lei, Yang Song, Xue-hua Jin, Effects of constituent of pigments and their distribution upon spathe coloration of *Zantedeschia hybrida*[J],*Hortscience* (在投小修)

授权专利:

[1]金雪花,雷霆.一种制作植物切片的刀具,实用新型(已授权),专利号:ZL201520810074.1

[2]金雪花,雷霆.一种可调节透气性的植物组织培养瓶盖,实用新型(已授权),专利号:ZL201520607834.9

[3]金雪花,雷霆.一种实验室用可更替匙头的药品匙,实用新型(已授权),专利号:CN206139218 U

参与项目

[1] 国家自然科学基金项目: 华丽龙胆花青素苷芳香酰基化修饰基因的挖掘及其对蓝色花呈色的调控机理(3156056)