

岳圆圆,全英杰,任钺蓉,等. 贡菊不同花期 3 种活性物质含量及相关基因表达[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):165-168.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.040

贡菊不同花期 3 种活性物质含量及相关基因表达

岳圆圆,全英杰,任钺蓉,龔 晨,高 日

(延边大学农学院,吉林延吉 133002)

摘要:研究贡菊花蕾期、露白期、初花期和盛花期中木樨草苷、绿原酸和异绿原酸含量及其相关 *CmFNS1*、*CmC3H*、*CmHQT* 基因相对表达量的变化,为确定贡菊最佳采收时期提供理论依据。结果表明,绿原酸、木樨草苷和异绿原酸的含量都在露白期迅速下降,初花期上升,盛花期逐渐下降,其中在初花期含量最高,分别为 0.43%、0.27% 和 0.33%。利用实时荧光定量 PCR 检测 *CmFNS1*、*CmC3H*、*CmHQT* 基因的相对表达量发现,这些基因表达量变化呈现出横向“S”形,并在初花期达到最高值,与木樨草苷、绿原酸、异绿原酸含量的变化趋势相似,进一步表明贡菊在初花期木樨草苷、绿原酸、异绿原酸含量最高。

关键词:绿原酸;木樨草苷;异绿原酸

中图分类号: S682.1⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0165-04

菊花[*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvel.] 为菊科多年生草本植物,具有较高的观赏价值和药用价值,根据菊花的用途可分为观赏性菊和功能性菊。功能性菊包括药用菊、茶用菊和食用菊 3 种^[1]。贡菊是功能性菊花栽培的主要品种之一,其朵大瓣宽,中心为黄色,带呈绿色,生长在安徽省南部海拔较高的山区,贡菊不仅是茗饮佳品,还是名优药材。《中华人民共和国药典》规定绿原酸、异绿原酸和木樨草苷为药用菊的主要成分^[2]。绿原酸、异绿原酸和木樨草苷都是通过苯丙氨酸代谢途径合成的,木樨草苷合成的直接前体是 *p*-香豆酸酰 CoA 和 3-丙二酰 CoA,在一系列酶的催化作用下最终合成木樨草苷,其中关键的合成酶是黄酮合成酶(flavone synthase,简称 FNS)^[3];香豆酸-3-羟化酶(*p*-coumarate-hydroxylase,简称 C3H)和羟基肉桂酰辅酶 A 奎尼羟基肉桂转移酶(hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase,简称 HQT)等为绿原酸和异绿原酸合成的关键

酶^[4],编码这些酶的基因表达也同样反映物质的积累,在咖啡中 *HQT*、*C3H*、*HCT* 等基因的表达量增加,绿原酸含量也随之增加^[5],这些编码酶的功能基因表达主要受到植物发育期和外界环境等因素的影响。

不同的采收时间对药用菊主要活性成分含量的影响较大,陈志莲报道,野菊从花蕾期到盛花期黄酮含量逐渐降低^[5];梁迎暖等研究显示,随着怀菊花期的到来,黄酮和绿原酸含量呈现先升高后下降的变化,最佳的采收时期为 70% 的花开放时期^[6];杨俊等检测了杭白菊黄酮和绿原酸含量的变化,结果发现,绿原酸含量未发生变化,黄酮含量随采收期推迟呈下降趋势^[7]。由此可见,不同菊花品种在不同采收时期的活性物质含量变化不同。目前,关于贡菊采收时期与活性物质含量变化关系的研究未见报道。因此,本试验以贡菊为材料,研究花蕾期、露白期、初开期和盛花期 4 个时期花序中绿原酸、木樨草苷和异绿原酸含量的变化及其关键基因的表达量,为确定贡菊最佳采收期提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将贡菊扦插苗移栽到含腐殖土、珍珠岩(体积比为 3:1)的花盆中,移到延边大学农学院温室进行培养,温度为(25±2)℃,相对湿度为 70%。贡菊现蕾后按照蕾期、露白期、初花期和盛花期选择顶芽花进行采集(图 1),放到液氮中带回

收稿日期:2019-04-15

基金项目:吉林省教育厅科学技术项目(编号:JKH20180902KJ);延边大学青年基金[编号:延大科合字(2017)第 21 号];延边大学博士科研启动基金(2018)。

作者简介:岳圆圆(1997—),女,吉林白城人,硕士研究生,主要从事菊花遗传育种研究。E-mail:2018010532@ybu.edu.cn。

通信作者:高 日,博士,讲师,主要从事菊花遗传育种研究。E-mail:gaori@ybu.edu.cn。

[20] Hardegree S P, Emmerich W E. Partitioning water potential and specific salt effects on seed germination of four grasses[J]. *Annals of Botany*, 1990, 66(5): 587-595.

[21] 罗在荣,王 进,邱建生,等. 望漠红球油茶优树因子分析与评价[J]. *种子*, 2013, 32(1): 77-80.

[22] 张永福,董翠莲,韩 丽,等. 酸碱胁迫对凤仙花种子萌发及幼苗生长生理的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(12): 102-105.

[23] 金美芳,朱晓清. NaCl 胁迫对油菜种子萌发和幼苗生长的影响

[J]. *种子*, 2009, 28(9): 76-79.

[24] 张鹤山,刘 洋,田 宏,等. 黑麦种子在不同盐分胁迫下萌发特性的研究[J]. *种子*, 2009, 28(3): 14-17.

[25] 苑泽宁,石福臣. 盐胁迫对互花米草种子萌发及胚生长的影响[J]. *云南植物研究*, 2008, 30(2): 227-231.

[26] 马小卫,郭春会,罗 梦. 核壳、盐和水分胁迫对长柄扁桃种子萌发的影响[J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(4): 69-72.

[27] 张丽辉,赵骥民. NaCl 和 Na₂SO₄ 胁迫对萝卜种子萌发的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(1): 133-135.

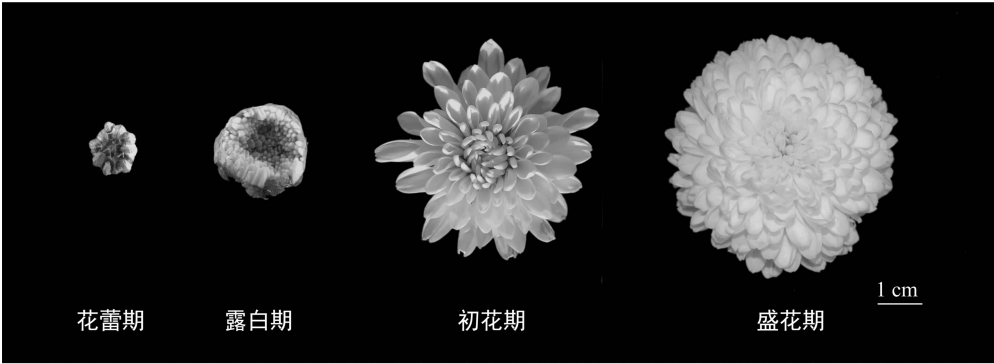


图1 贡菊的 4 个花期

实验室,于 -80 ℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备 称取绿原酸、木樨草苷和异绿原酸各 1.5 mg,分别加入 1.95 mL 70% 的甲醇溶液,振荡摇匀,使其充分溶解,获得标准对照品母液(0.769 mg/mL),再将其配制 0.25 mg/mL 的混合对照标准品母液,分别将其稀释成浓度为 0.250、0.200、0.125、0.100、0.062、0.031 和 0.017 mg/mL 的 7 种不同浓度的混合标准对照品溶液,用高效液相色谱仪(Agilent 1260)进行分析。色谱条件如下:以乙腈为流动相 A,0.1% 磷酸溶液为流动相 B,梯度洗提程序为 0~11 min,10%~18% A;11~30 min,18%~20% A;30~40 min,20% A;40~45 min,20%~10% A;流速为 1 mg/mL,检测波长为 350 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μL。记录峰面积,以各标准浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算绿原酸、木樨草苷和异绿原酸含量的线性关系。

1.2.2 样品溶液的制备与测定 取不同花期的干燥样品,分别用打碎机打碎,称取样品粉末 0.25 g,分别置于具塞锥形瓶中,加入 25 mL 70% 色谱级甲醇溶液,盖上塞子,封闭放置。超声处理(120 W,40 kHz)40 min,冰浴冷却至室温,5 000 r/min 离心 30 min,上清用旋转蒸发仪浓缩处理,冷却至室温,用 2.5 mL 70% 色谱级甲醇溶液溶解,取溶液经微孔滤膜过滤后测定。

1.2.3 贡菊 RNA 的提取及反转录 采用 RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)分别提取贡菊不同花期的 RNA,采用 NanoDrop ND-2000 型微量核酸蛋白定量测定仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]测定 RNA 浓度和质量。利用反转录试剂盒(天根生化科技有限公司),按照说明书将 1 000 ng RNA 合成 cDNA 第 1 链,于 -20 ℃ 保存备用。

1.2.4 相关基因的表达分析 根据菊花转录组数据,分别找到 *CmFNS1*、*CmC3H*、*CmHQT* 基因的序列,并在 3'端序列设计特异性引物 FNS1-F、FNS1-R、C3H-F、C3H-R、HQT-F、HQT-R(表 1),采用荧光定量 PCR 仪(Agilent 3005)进行定量分析,反应程序如下:95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s,56 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,40 个循环。最后加入溶解曲线程序,以 *EF1α* 基因为内参,每个样品重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算基因相对表达量。

1.3 数据分析

每个试验处理设 3 次重复,数据用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,采用邓肯氏新复极差法作显著性差异分析,显著水

表 1 荧光 PCR 扩增所需引物及其序列

引物名称	引物序列(5'→3')
FNS1-F	CAGTGCTTTGATTGGAACG
FNS1-R	CACGAACCGAAGGCACAAA
C3H-F	AGAAGAGTATGTCCAGGTGC
C3H-R	TCCACAGCGATGCGTTTG
HQT-F	CTCGTGGATTACCTGATGAT
HQT-R	TGTCAATGTGGAACGGA
EF1α-F	CCATTCAAGCGACAGACTCA
EF1α-R	TTTTGGTATCTGGTCTCTGGAG

平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 绿原酸、木樨草苷和异绿原酸标准曲线

将绿原酸、木樨草苷和异绿原酸标准样品配成不同浓度,分别取 5 μL 进样分析,分别以峰面积、质量浓度为纵、横坐标绘制标准曲线,得到回归方程(图 2)。绿原酸的回归方程为 $y=4\,521.6x+3.851\,5$ ($r^2=0.998\,7$),木樨草苷的回归方程为 $y=22\,136x-130.83$ ($r^2=0.992\,8$),异绿原酸的回归方程为 $y=12\,521x-50.123$ ($r^2=0.997\,1$),标准曲线在标准品浓度范围内线性良好。

2.2 不同花期绿原酸、木樨草苷和异绿原酸的含量分析

贡菊在花蕾期、露白期、初花期和盛花期时绿原酸、木樨草苷和异绿原酸含量发生较大变化(图 3)。绿原酸含量在花蕾期和初花期较高,分别为 0.33% 和 0.43%,在露白期和盛花期较低;木樨草苷在花蕾期和露白期含量较低,初花期含量达到最高值,为 0.27%,在盛花期含量又下降;异绿原酸含量同样也在初花期最大,为 0.33%,其次是花蕾期和盛花期。贡菊中绿原酸、木樨草苷和异绿原酸的含量都在初花期时最高。

2.3 *CmFNS1*、*CmHQT* 和 *CmC3H* 基因的相对表达量

CmFNS1 是木樨草苷合成的关键基因,它编码黄酮合成酶。由图 4 可见,*CmFNS1* 在贡菊花蕾期的相对表达量最高,露白期表达量降低,初花期表达量升高,盛花期表达量降低,呈现横向“S”形,这与不同花期木樨草苷含量的变化相一致;*CmHQT* 和 *CmC3H* 分别编码羧基肉桂酰辅酶 A 奎尼酸转移酶和香豆酸羟化酶,是绿原酸和异绿原酸合成的关键酶,*CmHQT* 和 *CmC3H* 基的因相对表达量在花蕾期最高,露白期迅速降低,初花期相对表达量缓慢升高,盛花期逐渐降低,

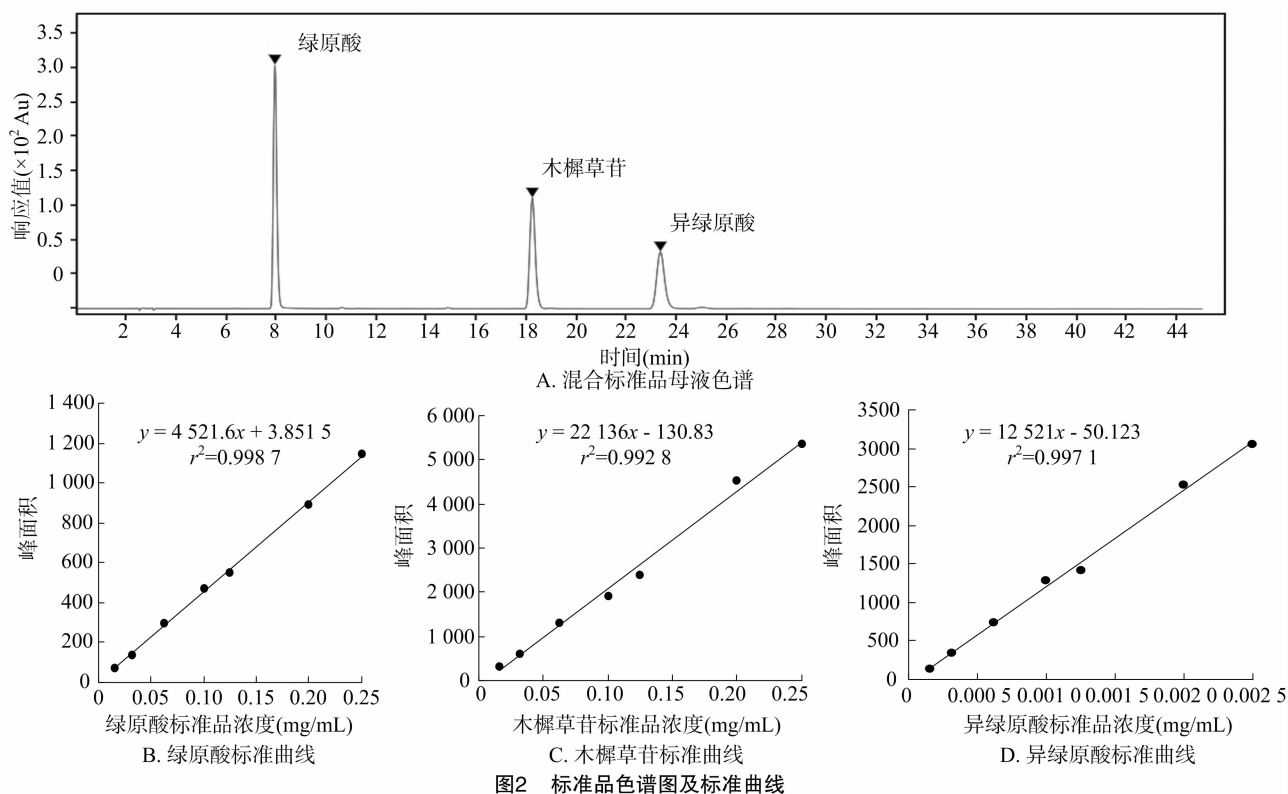


图2 标准品色谱图及标准曲线

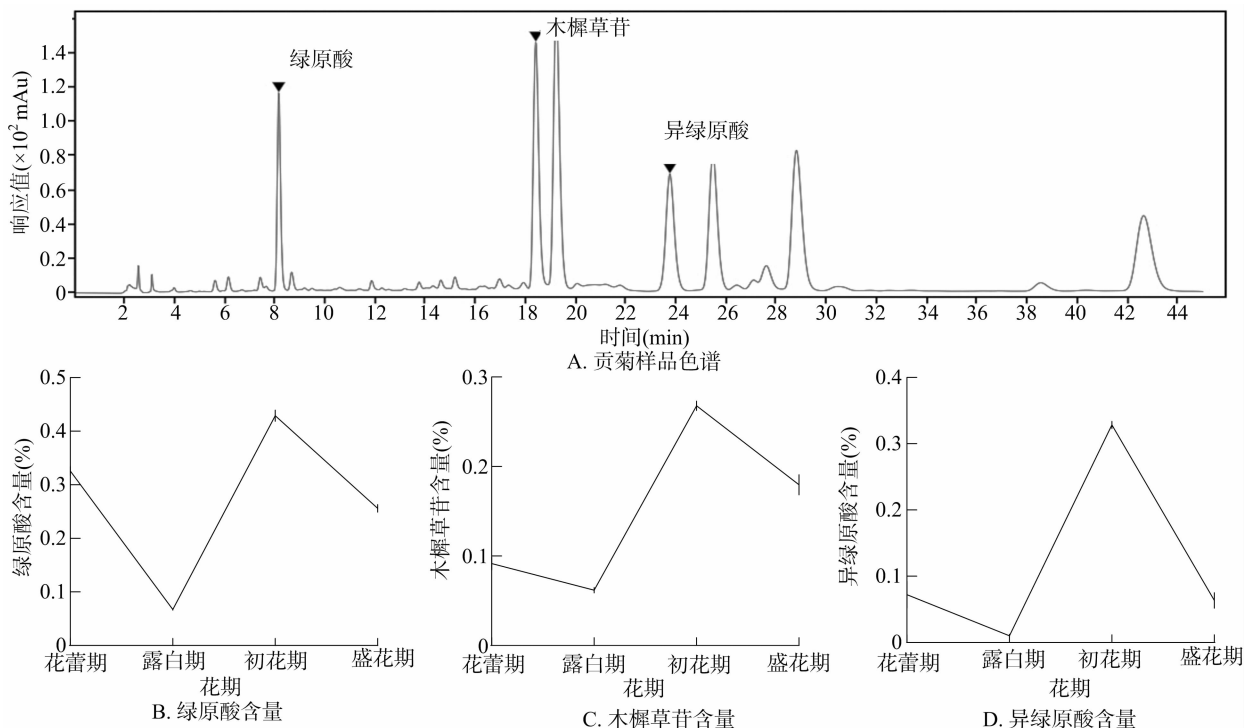


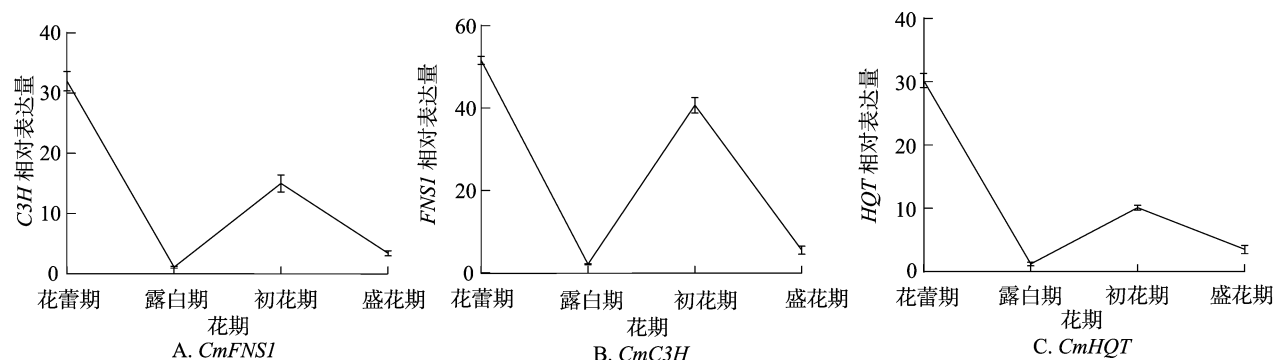
图3 贡菊样品色谱图(花蕾期)及贡菊不同花期绿原酸、木樨草苷、异绿原酸含量的变化

CmHQT 和 *CmC3H* 相对表达量的变化趋势与绿原酸和异绿原酸含量的变化趋势相似。

3 讨论与结论

3.1 绿原酸、木樨草苷和异绿原酸在不同花期含量的变化
药用菊的主要活性物质为绿原酸、木樨草苷和异绿原酸

等,影响这些活性物质含量的主要有品种、采收期、气候条件等。刘莉等研究杭菊、贡菊和亳菊3种药用菊花时发现,亳菊中木樨草素含量最高^[8];魏民等研究发现,野菊花中的菊花苷含量在花蕾期、初花期、盛花期、末花期中逐渐下降^[9];刘沁等发现,雪菊在采收中期时总黄酮含量最高,而在采收末期时绿原酸含量最高,总酚含量却在采收初期最高^[10]。在这些

图4 *CmFNS1*、*CmC3H*、*CmHQT*基因的相对表达量

影响因素中,采收期对活性物质影响较大而且容易调控。本研究发现,贡菊在不同采收期(花蕾期、露白期、初花期和盛花期)绿原酸、木樨草苷和异绿原酸活性物质含量均不同,都在初花期最高。贡菊花蕾期单花干质量低于盛花期干质量,单花木樨草苷、绿原酸含量在盛花期时分别为 182、262 $\mu\text{g}/\text{mg}$,在初花期时分别为 271、439 $\mu\text{g}/\text{mg}$,盛花期均小于初花期。并且盛花期的贡菊花色变淡,有些花粉散落,影响菊花品质,而初花期采摘后的贡菊,侧枝萌发的花朵比盛花期采收的侧枝花朵更大些,因此建议贡菊在初花期采摘。

3.2 绿原酸、木樨草苷和异绿原酸合成相关基因的表达

绿原酸、异绿原酸和木樨草苷合成都通过苯丙氨酸代谢途径,主要受到 *PAL*、*C3H*、*CHS*、*FNS*、*C3H*、*HQT* 等结构基因的表达影响。*FNS* 包括黄酮合成酶 I (*FNS I*) 和黄酮合成酶 II (*FNS II*)。*FNS I* 是一种可溶性的 2-酮戊二酸和依赖 Fe^{2+} 的双加氧酶,催化黄烷酮转化为黄酮,主要存在于伞形科中^[11],最近也在水稻和拟南芥中发现^[12-13]。*FNS II* 属于细胞色素 P450,它依赖于 NADPH 和氧分子的膜结合成单氧化酶,催化黄烷酮 C-2 和 C-3 之间形成双键转化为黄酮,存在于大多数植物中。在大豆^[14]、水稻^[15]、金银花^[16]中过表达 *FNS* 基因,可促进黄烷酮合成黄酮(5,7-二羟基黄酮、芹黄素和木樨草素)。本研究发现,贡菊含有 *FNS1* 和 *FNS2*,*FNS1* 在不同花期的相对表达量变化与木樨草苷含量一致,*FNS2* 的相对表达量未发生变化,这可能由于 *FNS2* 不参与木樨草苷合成。张静茹等研究发现,金银花愈伤组织中绿原酸的量随 *HQT* 基因表达量的升高而升高,*C3H* 基因能够催化苯丙烷类代谢产物 C3 位置的羟基化,是苯丙烷类代谢中的 1 个关键酶,可参与多种苯丙素类代谢产物的合成,如木质素、绿原酸、迷迭香等^[17]。荧光定量 PCR 检测结果显示,*C3H* 和 *HQT* 相对表达量变化趋势与绿原酸和异绿原酸含量相似,这表明 *C3H* 和 *HQT* 参与绿原酸和异绿原酸合成。此外,还发现 *FNS1*、*C3H* 和 *HQT* 的相对表达量在花蕾期最高,而相应的木樨草苷、绿原酸和异绿原酸含量在初花期最高,这还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 戴思兰,温小惠. 菊花的药食同源功效[J]. 生命科学,2015,27(8):1083-1090.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学

工业出版社,2005.

- [3] Yun C S, Nozawa T Y. Expression of parsley flavone synthase I establishes the flavone biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72(4): 968-973.
- [4] 代丽丽. 转 *AtMYB12* 基因提高马铃薯中绿原酸含量的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2013.
- [5] 陈志莲. 不同贮藏期、不同品种菊花中总黄酮的含量比较[J]. 基层中药杂志,2001,15(5):18-19.
- [6] 梁迎暖,郭巧生,张重义,等. 怀菊花期次生代谢物含量及同工酶活性动态变化研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(3):199-202.
- [7] 杨俊,蒋惠娣,戈震,等. 杭白菊绿原酸及其他成分的含量在采摘期中的动态变化[J]. 中国药理学杂志,2003,38(11):833-836.
- [8] 刘莉,龙娉,姚建忠. HPLC 法测定 3 种常见菊花中木樨草素的含量[J]. 药学实践杂志,2009,27(4):289-290,293.
- [9] 魏民,韩正洲,马庆,等. 基于超高效液相色谱技术确定野菊花适宜采收期[J]. 广州中医药大学学报,2018,35(3):519-524.
- [10] 刘沁,秦勇,陈安新. 雪菊不同开放程度对其品质的影响[J]. 黑龙江农业科学,2016(1):132-134.
- [11] Martens S, Forkmann G, Matern U, et al. Cloning of parsley flavone synthase I [J]. Phytochemistry, 2001, 58(1):43-46.
- [12] Falcone Ferreyra M L, Emiliani J, Jose Rodriguez E, et al. The identification of maize and *Arabidopsis* type I flavone synthases links flavones with hormones and biotic interactions [J]. Plant Physiology, 2015, 169(2):1090-1107.
- [13] Kim J H, Cheon Y M, Kim R G, et al. Analysis of flavonoids and characterization of the *OsFNS* gene involved in flavone biosynthesis in rice [J]. Plant Biology, 2008, 51:97-101.
- [14] Fliegmann J, Furtwangler K, Malterer G, et al. Flavone synthase II (*CYP93B16*) from soybean (*Glycine max* L.) [J]. Phytochemistry, 2010, 71(5/6):508-514.
- [15] Lee Y J, Kim J H, Kim B G, et al. Characterization of flavone synthase I from rice [J]. BMB Reports, 2008, 41(1):68-71.
- [16] Yuan Y, Wang Z Y, Jiang C, et al. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteoloside biosynthesis in *Lonicera japonica* and their substitutes [J]. Gene, 2014, 534(2):408-416.
- [17] 张静茹,吴敏琳,李卫东,等. 金银花 *HQT* 基因在真核植物细胞中对绿原酸生物合成的调控[J]. 中草药,2016,47(20):3683-3687.