

杜鹃花花色苷遗传变异的研究

陈越^{1,2}, 李纪元^{2*}, 倪穗^{1*}, 林立³

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400;
3. 宁波城市职业学院, 浙江 宁波 315502)

摘要:采用高效液相色谱对7个杂交组合的父本、母本及其子代共27份杜鹃花样品进行分析,共检测到15种花色苷组分,其中,Cy3Ga、Cy3G和成分2、5、14为杜鹃花主要花色苷组分,累积含量占总花色苷的90%以上;而Dp3G花色苷仅在4份样品中出现。花色苷遗传变异模式的研究发现,Cy3G5G和成分15为增效基因占主导的多基因遗传控制模式,成分5、14和Cy3Ga为等效多基因遗传,成分2、4和Cy3G为减效基因占主导的多基因遗传控制模式,并以此推测类黄酮3-O-葡萄糖苷转移酶和类黄酮3-O-半乳糖苷转移酶基因的控制模式分别为减效基因占主导的多基因遗传模式和等效多基因遗传模式,而类黄酮5-O-葡萄糖苷转移酶基因为增效基因占主导的多基因遗传控制模式。花色比对结果显示,Dp花色苷与蓝紫花色呈现具有高度相关,成分14与洋红花色呈现具有密切关系,其余花色苷与大红花色呈现具有一定相关。最后初步探讨了杜鹃花花色的花色苷辅助育种策略。

关键词:杜鹃花;花色苷;高效液相色谱法;遗传变异

中图分类号:S718.46 S685.21 文献标识码:A

Research on Genetic Variations of Anthocyanins in Azalea Petals

CHEN Yue^{1,2}, LI Ji-yuan², NI Sui¹, LIN Li¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China;

2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

3. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo 315502, Zhejiang, China

Abstract: 27 azalea samples of seven pairs of azalea parents and their hybrids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV/Vis Detector, and 15 major anthocyanins were detected. The results of quantitative analysis show that Cy3Ga, Cy3G, pigment 2, pigment 5 and pigment 14 are the main anthocyanins in azalea petals, with accumulated content over 90% of total anthocyanins, and Dp3G was only detected in 4 samples. Inheritance analysis indicates that Cy3G5G and pigment 15 are multiple-gene inheritance pattern dominated by enhancer genes; pigment 5, pigment 14 and Cy3G are controlled by equivalent genes; pigment 2, pigment 4 and Cy3G are dominated by reductive genes. Therefore it is deduced that flavonoid 3-O-glucosyltransferase and flavonoid 3-O-galactosyltransferase are controlled respectively by reductive genes and equivalent genes; flavonoid 5-O-galactosyltransferase is controlled by enhancer genes. The results of color comparison show that Dp3G is highly correlated with blue-purple in azalea flowers; pigment 14 is correlated with magenta flowers, and other anthocyanins are correlated with scarlet flowers. The strategies for color breeding with anthocyanin assistance are brought forward.

Key words: azalea; anthocyanin; HPLC; genetic variations

收稿日期: 2012-04-26

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2011DFA30490)

作者简介: 陈越(1986—),男,浙江嵊州人,硕士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学。

* 通讯作者:李纪元,博士,研究员,主要研究方向:观赏植物育种。E-mail: jiyuan_li@126.com;倪穗(1965—),女,浙江宁波人,教授,主要研究方向为观赏植物学。E-mail: nbnisui@126.com。

为定量标准品,外标法建立标准曲线:

$$Y = 2.2823e^{-7X} (R^2 = 0.9986)$$

通过标准曲线校正,得到各花色苷组分的相对含量。

1.4 花色测定

采用英国皇家园艺学会比色卡法(RHS, The Royal Horticultural Society 2001版)测定。下午14:00—16:00时段,在朝北朝向且不受阳光直射窗口下进行花色比对。

2 结果与分析

2.1 花瓣中主要花色苷组分及相对含量

在27份杜鹃花样品中,共检测出15种花色苷

组分,其相对含量详见表2。从表2可以看出:组合I、IV、VII的F1代花色苷总含量比亲本的高,而组合VI的F1代花色苷总含量比亲本的低。此外,成分2、成分5、Cy3Ga、Cy3G、成分14是杜鹃花的主要花色苷组分,除了个别材料中不含成分2和Cy3G,其他所有材料中都含有成分5、CyGa和成分14,其中,组合I、IV、VI、VII的亲本和F1代中这3种花色苷的含量处于首位。Dp3G仅在0409-2、0409-3、‘粉毛鹃’、0410-1中检测出,但其含量比例大,占花瓣总花色苷含量的10%~18%。

表2 27份杜鹃花样品的花色苷组分及花色比色结果

项目	花色苷成分/%															总花色苷 (mg·g ⁻¹)	RHS	颜色描述
	成分1	成分2	成分3	成分4	成分5	Cy3 G5G	成分7	成分8	Dp3G	Cy3Ga	成分11	成分12	Cy3G	成分14	成分15			
组合I ♀ ‘世纪曙光’	6.36		13.04	16.27					18.60				22.82	22.91		0.10	19B	Light Yellowish Pink
♂ ‘丰丽’	6.02				28.30	3.55			35.04				1.29	23.91	0.86	11.13	44D	Deep Yellowish Pink
F1 0408-1	9.77				57.93	4.65			20.07				7.23	0.21		49.38	40A	Vivid Reddish Orange
0408-2	1.22				10.79	1.86			39.51				1.47	38.02	2.61	70.23	42A	Vivid Reddish Orange
0408-3	5.82				40.17	5.64			30.16				1.65	13.70	0.49	25.38	41A	Vivid Reddish Orange
0408-4	6.44				37.43	7.88			36.24				0.06	9.91	0.55	48.48	40A	Vivid Reddish Orange
组合II ♀ ‘世纪曙光’	6.36		13.04	16.27					18.60				22.82	22.91		0.10	19B	Light Yellowish Pink
♂ ‘紫金冠’	1.57				3.42				51.48				2.11	41.30	0.12	88.70	44A	Vivid Red
F1 0409-1	1.74				16.49	0.41			34.15				2.76	42.36	0.38	25.77	44B	Vivid Reddish Orange
0409-2	2.33	13.13	6.37	7.24	6.71	4.47			18.16	10.11		14.01	1.76	13.27		37.15	47B	Strong Red
0409-3	0.20	5.73	2.00	12.75	14.67	6.09	3.03	2.11	10.06	7.19	18.86	5.95	5.16	4.22		28.25	52A	Vivid Red
组合III ♀ ‘粉毛鹃’	3.67	0.70	12.70	20.10	3.69	0.99			12.03	12.97	6.18	3.79	9.47	10.09	0.01	2.21	55C	Light Purplish Pink
♂ ‘红百合’	3.87		10.78	11.57					17.46				29.59	24.24	0.05	55.96	46C	Deep Yellowish Pink
F1 0410-1	2.89		9.47	23.85		5.18			13.94	27.95			5.13	8.23	0.47	20.44	50A	Strong Red
0410-2	1.24			12.64	2.90				38.70				1.02	36.45	2.59	39.36	44B	Vivid Reddish Orange
组合IV ♀ ‘五彩鹃-红瓣’			0.28	0.63					56.55				0.67	41.88		2.93	38B	Moderate Yellowish Pink
‘五彩鹃-粉瓣’	6.57		12.75	32.07					16.97				9.44	20.52		1.63	29C	Light Yellowish Pink
♂ ‘凤冠’	8.23			48.81					21.98					20.97		0.78	29C	Light Yellowish Pink
F1 0414-1	0.92			5.57	2.51				47.38				1.43	30.83	6.18	22.73	44B	Vivid Reddish Orange
0414-2			5.45	3.17					12.37				33.75	42.37		6.34	43C	Deep Yellowish Pink
组合V ♀ ‘凤冠’	8.23			48.81					21.98					20.97		0.78	19B	Light Yellowish Pink
♂ ‘富士’	0.22		4.30	1.31					18.10				44.37	29.28	0.15	138.03	46C	Vivid Red
F1 0422-1	11.35			50.71	0.79				17.47				0.26	19.35	0.07	55.38	43C	Deep Yellowish Pink
0422-2	0.09		1.32	0.75					23.04				37.58	35.07		55.42	45C	Vivid Red
组合VI ♀ ‘春之舞’	7.42			73.55					4.44				2.91	11.67		0.87	50D	Light Pink
♂ ‘西施’	1.08			3.82					43.10				3.63	46.79		24.51	44C	Vivid Reddish Orange
F1 0514-1				6.14					35.38					58.48		0.75	29C	Light Yellowish pink
组合VII ♀ ‘雅士’	4.53			41.38					17.49				14.48	13.80		0.42	36A	Light Yellowish Pink
♂ ‘西施’	1.08			3.82					43.10				3.63	46.79		24.51	44C	Vivid Reddish Orange
F1 0515-1	0.16			0.41					17.28				40.70	36.83	0.29	30.14	43B	Vivid Reddish Orange
0515-2	0.43			2.41					46.19				3.30	46.79		35.98	44C	Vivid Reddish Orange
平均值	4.42			20.40					27.13				9.89	26.80		27.05		

2.2 亲代间花色苷的遗传变异分析

2.2.1 亲本与子代间花色苷的变异 对杜鹃花7个杂交组合的亲本与子代花色苷平均相对含量进行比较分析,结果见图1~7。

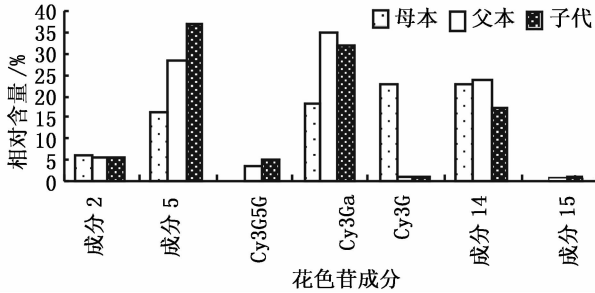


图1 杂交组合 I 亲本子代花色苷相对含量

图1 组合 I 子代中,花色苷成分 5 和 Cy3G5G 的平均相对含量均超过了双亲,成分 2、15 和 Cy3Ga

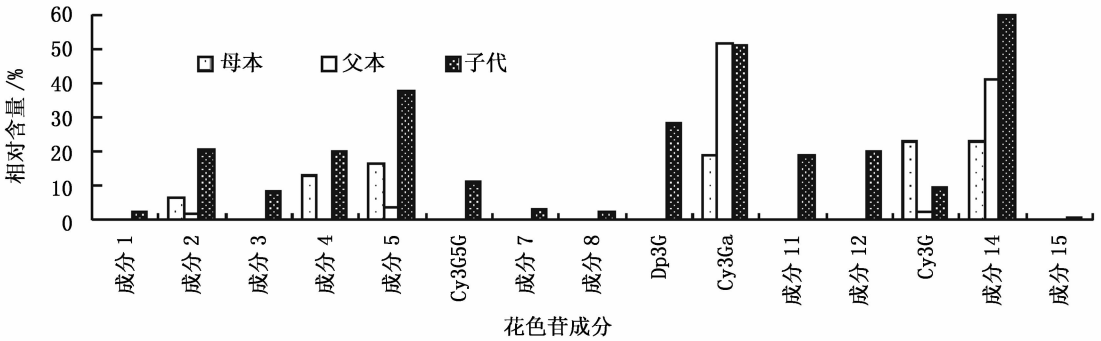


图2 杂交组合 II 亲本子代花色苷相对含量

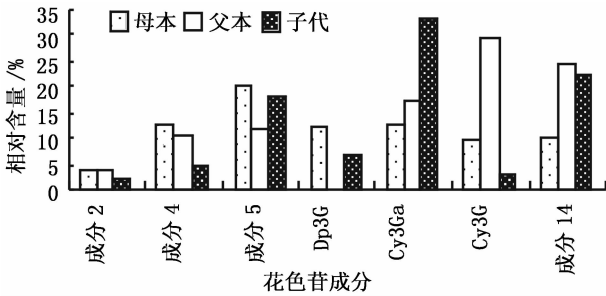


图3 杂交组合 III 亲本子代花色苷相对含量

则介于两亲本之间,而 Cy3G 略低于亲本。

图2 组合 II 子代中,花色苷成分较多,共检测出 14 种成分,其中,成分 2、4、5、14 和 Cy3Ga、Cy3G 的平均相对含量介于两亲本之间,而 Cy3G5G、Dp3G 和成分 1、3、7、8、11、12 这些在亲本中不存在的花色苷却在子代中表现出来。这表明亲本的起源也比较复杂,它可能是多物种杂交后形成的结果。从 Ando 等^[8]对 Cy3G 合成 Cy3G5G 的 5GT 基因和 Dp3G 前体二氢杨梅素合成的 F3'5'H 基因的研究结果中,可以认为这 2 个基因在亲本中的合成表达被抑制而没有表现出来,但在子代中这种抑制作用解除而得以表现。从遗传学分析,这是一种类似显隐性遗传模式,在亲本中被显性基因所掩盖,而在子代中出现了纯合现象,隐性基因得以表达。

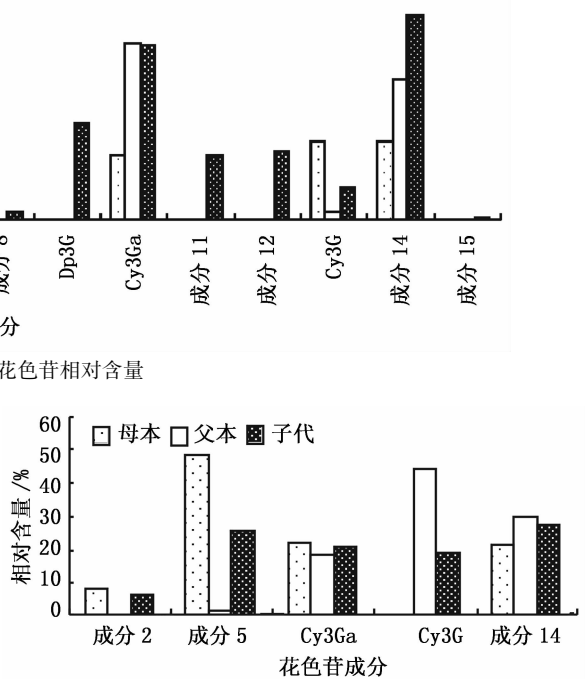


图5 杂交组合 V 亲本子代花色苷相对含量

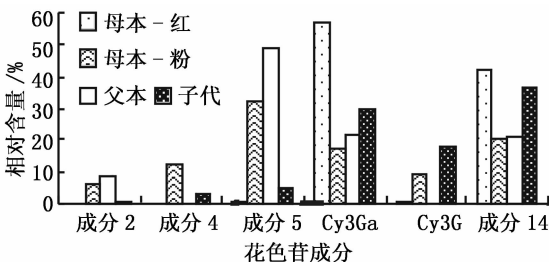


图4 杂交组合 IV 亲本子代花色苷相对含量

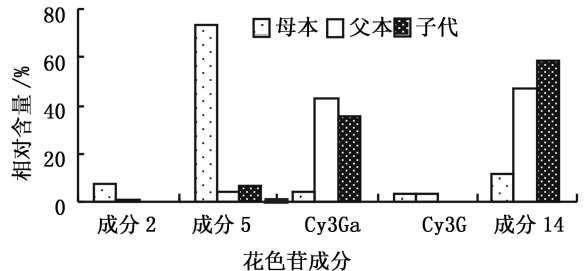


图6 杂交组合 VI 亲本子代花色苷相对含量

图3 组合 III 子代中,Cy3Ga 的平均相对含量远超过亲本,表现出超亲特性;成分 5、14 介于两亲本

之间,而成分 2、4 和 Cy3G 则低于亲本相对含量;Dp3G 则明显不同,它似乎表现出受母本的控制,因

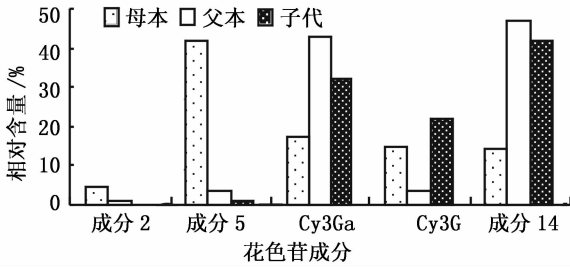


图7 杂交组合Ⅶ亲代花色苷相对含量

为在父本中没有检测到这种花色苷。

图4组合Ⅳ中,母本‘五彩鹃’具有红色和粉色2种花色。子代中除了Cy3G含量超过两亲本外,其余5种成分均介于两亲本之间,其中成分2、4、5、14明显受红花‘五彩鹃’母本的影响,因为在母本中这4个成分未检测到或极低,或极高,而在子代中同样表现极低或极高相对含量的特性,这些花色苷较少受父本的影响。

图5组合Ⅴ中,子代中花色苷成分5、Cy3Ga、Cy3G和成分14的平均相对含量介于两亲本之间,而成分2表现为更接近母本,Cy3G表现为更接近父本。

图6组合Ⅵ中,只有一份子代样品,亲本和子代中共检测出5种花色苷成分,其中成分14的相对含量超过了两亲,成分2完全受母本的影响;而Cy3G则在子代中没有检测到,抑或是一种误差,因为父本、母本中的含量也极低;成分5和Cy3Ga含量与父本更为接近。

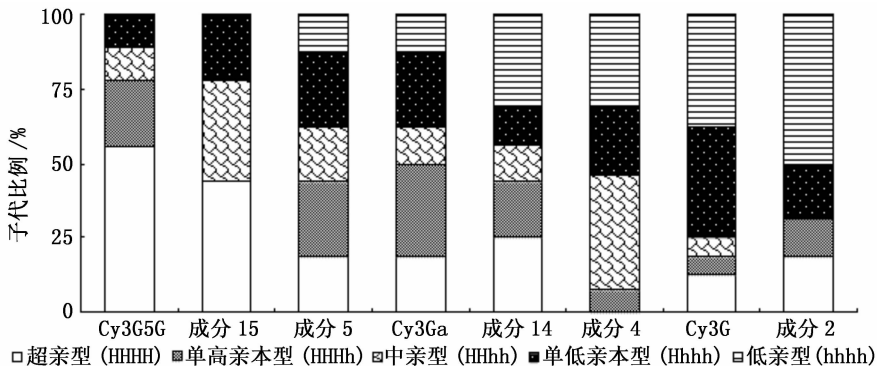


图8 子代Cy系列花色苷遗传趋势

由图8可看出: Cy3G5G和成分15具有类似的遗传趋势,其超亲型在子代中占了最大比例,其中, Cy3G5G超亲型、单高亲本型、中亲型、单低亲本型和低亲型子代个数的比例为5:2:1:1:0,显示增效基因H的贡献率非常高,很有可能为多基因中的主基因,根据Mather^[9]的多基因理论,可以认为

图7组合Ⅶ子代中,Cy3G的平均相对含量高于亲本,成分2、5低于亲本,而Cy3Ga、成分14介于两亲本之间,成分5、14的相对含量明显更接近于父本。

以上7个组合亲代花色苷遗传分析结果显示:在杜鹃花中Cy系列花色苷的父本遗传似乎比母本遗传更具优势,但需要两亲本反交实验进行进一步论证。

2.2.2 子代间花色苷的变异 对杜鹃花7个杂交组合中的16个子代的花色苷进行变异分析。因为Dp3G及成分1、3、7、8、11、12仅存在于4份杜鹃花样品中,没有足够数量亲代样品,因此未包含在子代间变异分析中。

子代中8种花色苷的相对含量除了接近双亲之外,也会出现超过亲本、低于亲本和介于亲本之间的表现类型,呈连续变化的数量性状,这说明其遗传受多基因控制。用H、h分别表示多基因中的增效基因和减效基因,确定了5种遗传变异模式,即超亲型(HHHH),即子代的含量超过双亲本;单高亲本型(HHHh),即子代的含量接近于双亲中含量较高者;单低亲本型(Hhhh),即子代的含量接近于双亲中含量较低者;中亲型(HHhh),即子代的含量介于双亲之间,不明显偏向于任何一个亲本;低亲型(hhhh),即子代的含量低于双亲本的含量。对样品中8种花色苷的变异进行模式归类,统计符合各模式的子代个数,结果详见图8。

Cy3G5G中该主基因为隐性遗传,而增效基因需要在主基因表达时才起调节作用。成分15中5种遗传类型的比例为4:0:3:2:0,增效基因同样占有较高的贡献率,而单高亲本型子代的缺失,很可能是由于总体样本过少造成的。

成分5、14和Cy3Ga的遗传趋势类似,5种遗传

类型的子代分布较为平均,比例接近 1:1:1:1:1,显示这 3 种花色苷的增效基因 H 和减效基因 h 很可能为等效基因,贡献率没有显著的差异。

成分 2 中 5 种遗传类型的比例为 3:2:0:3:8,成分 4 中其比例为 0:1:5:3:4, Cy3G 中其比例为 2:1:1:6:6,显示在这 3 种花色苷中减效基因的贡献率较高。

综上所述,在 Cy 系列花色苷中, Cy3G5G 和成分 15 为增效基因占主导的多基因遗传控制模式,子代中其含量往往会偏高甚至超亲;成分 5、14 和 Cy3Ga 为等效多基因遗传,子代类型分布均匀;而成分 2、4 和 Cy3G 为减效基因占主导的多基因遗传控制模式,子代中含量有偏低趋势。

结合花色苷合成的途径^[10],作者发现虽然 Cy3G 和 Cy3Ga 合成途径类似,都是以二氢槲皮素为前体转化而来,但控制类黄酮-3-O-葡萄糖苷转移酶和类黄酮-3-O-半乳糖苷转移酶基因的遗传模式区别较大,前者为减效基因占主导的多基因遗传控制模式,后者为等效多基因遗传。

另外, Cy3G5G 是以 Cy3G 为前体合成的,但二者有截然不同的遗传模式,造成这种差异的原因显然在于类黄酮-5-O-葡萄糖苷转移酶基因遗传模式为增效基因占主导的多基因遗传控制模式。

2.3 花色苷与花色的关系

表 2 中的 RHS 为花色比对结果。从表 2 中可看出:杜鹃花样品花色主要处于 RHS 比色卡大红色至紫红色范围。

2.3.1 蓝紫色形成与花色苷的关系 0409-2、0409-3 和 0410-1 这 3 个杜鹃花样品 RHS 比色卡颜色分别为 47B、52A、50A,偏向紫红色,而品种‘粉毛鹃’更是呈现 55C 的粉紫色。四者的花色成分具有一个明显的特征,即 Dp3G 及成分 1、3、7、8、11、12 这些其余杜鹃花中未检测到的花色苷含量较高;而 Dp 是造成杜鹃花呈蓝紫色的主要原因^[11],据此推测这些花色苷中除了 Dp3G,有可能存在其他 Dp 系列的花色苷。

除了花色苷种类对花色有影响以外,通过对比‘粉毛鹃’和 0409-3 样品发现,这 2 个样品花色苷组成较为相似,而颜色差距较大,唯一的区别是‘粉毛鹃’花瓣中含有的总花色苷仅 $2.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,远低于 0409-3 样品。Heursel^[12]研究认为,在杜鹃花中黄酮醇的辅助色素效应作用下,花色苷含量降低会使花色向蓝色偏移,这可能是造成 2 个样品之间花色差

异的原因。

2.3.2 大红色、洋红色形成与花色苷的关系 0408-1、0408-2、0408-3 和 0408-4 这 4 个杜鹃花品种花色分别为 40A、42A、41A、40A,为大红色。四者花色苷组成中成分 5 和 Cy3Ga 占了主要部分,而随着成分 14 的升高,花色由大红色开始向洋红色偏移,说明成分 14 与洋红花色关系密切。Mizuta 等^[7]和 de Loose^[13]研究发现,大红色杜鹃花中洋红色的产生与 Pt 和 Mv 花色苷密不可分,而 Pt 是属于 Cy 系列的花色苷,据此推测成分 14 很有可能为 Pt 花色苷的一种。

3 结论与讨论

3.1 杜鹃花花色苷的遗传方式

研究表明,杜鹃花亲生子代花色苷的遗传为多基因控制的数量遗传,这一结果比 Heursel 等^[14]提出的杜鹃花花色苷合成 2 对等位基因控制的假说能更好地解释花色苷在子代中的表现。此外,Heursel 等^[14]认为, Dp 花色苷为显性遗传, Cy 花色苷为隐性遗传,而本研究的结果显示 Dp3G 的遗传表现出隐性遗传的特征, Cy 兼具增效、等效和减效的多基因控制模式。造成这种差异的原因需要进一步研究。

3.2 关于杜鹃花花色育种策略

杜鹃花花色苷育种主要朝 3 个方向发展:蓝紫色调花色、洋红色调花色和大红色调花色。通过杂交育种的方法,可以使杂交子代的各种花色苷含量比例发生变化,从而表现出不同的花色。同样,也可根据目标育种花色,返演杂交亲本的选配,从而辅助提高杜鹃花花色育种的精准性和育种效率。

在选择培育新品种蓝紫色杜鹃花系列时,由于 Dp 花色苷为隐性遗传,应优先选用含有 Dp 花色苷的蓝花色品种为亲本,一些血缘复杂的品种也可以选作培育蓝紫色杜鹃花的亲本。除此以外,可以通过选择花色苷总量较低的品种作为亲本,使子代中花色苷含量降低,以增强黄酮醇辅助色素效应,从而使花色向蓝色偏移。平户杜鹃品系‘粉毛鹃’就是一个非常适合培育蓝紫色花系的品种,这也意味着糯杜鹃 (*R. macrosepalum* Maxim.), 岸杜鹃 (*R. ripense* Makino) 这些呈蓝紫花色的平户杜鹃祖先种类^[15]也适合培育蓝紫色杜鹃新品种。

在选择培育洋红色品种杜鹃花时,需要子代具有较高含量的花色苷成分 14。西洋杜鹃大多呈洋红色,花色苷成分 14 含量高,适合作为培育洋红色

亲本使用,但由于西洋杜鹃起源复杂,含有各种杜鹃花品系血统,往往是一些比较复杂的杂合子,相互间杂交花色变异非常大,此外成分14在后代中变异的分布较为平均,因此要适量增大杂交的数量,以便从中筛选出需要的花色;而选择培育大红色品种杜鹃花,主要目标是提高Cy系列花色苷的含量,由于Cy系列花色苷遗传父本控制较多,因此选择花色更红的父本品种,得到大红花色杜鹃花子代的可能性更高。

参考文献:

- [1] 方瑞征, 闵天禄. 杜鹃属植物区系研究[J]. 云南植物研究, 1995, 17(4): 359-379
- [2] 朱春燕, 包志毅, 唐宇力. 杜鹃花赏析[J]. 生物学通报, 2006, 41(6): 16-19
- [3] 李崇辉, 王亮生, 舒庆艳, 等. 迎红杜鹃花色色素组成及花色在开花过程中的变化[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 1023-1030
- [4] Li J B, Hashimoto F, Shimizu K, et al. Anthocyanins from red flowers of *Camellia reticulata* LINDL [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(11): 2833-2836
- [5] Hashimoto F, Tanaka M, Maeda H, et al. Characterization of cyanic flower color of *Delphinium* cultivars [J]. J Jap Soc Hort Sci, 2000, 69(4): 428-434
- [6] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 733-749
- [7] Mizuta D, Ban T, Miyajima I, et al. Comparison of flower color with anthocyanin composition patterns in evergreen azalea [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(4): 594-602
- [8] Ando T, Takahashi M, Nakajima T, et al. Delphinidin accumulation is associated with abnormal flower development in petunias [J]. Phytochemistry, 2004, 65(15): 2219-2227
- [9] Mather K. Variation and selection of polygenic characters [J]. J Genetics, 1941, 41(2): 159-193
- [10] 植物色素研究会. 植物色素研究法 [M]. 大阪: 大阪公立大学共同出版会, 2004
- [11] 顾林, 朱洪梅, 顾振新. 花青素的生物合成和成色机理及提高其稳定性的途径 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(11): 240-244
- [12] Heursel J. Diversity of flower colours in *Rhododendron simsii* Planch. and prospects for breeding [J]. Euphytica, 1981, 30(1): 9-14
- [13] de Loose R. The flower pigments of the Belgian hybrids of *Rhododendron simsii* and other species and varieties from *Rhododendron subsericeum* [J]. Phytochemistry, 1969, 8(1): 253-259
- [14] Heursel J, Horn W. A hypothesis on the inheritance of flower colors and flavonols in *Rhododendron simsii* Planch [J]. Plant Breeding, 1977, 79(3): 238-249
- [15] 朱春燕. 杜鹃花资源及其园林应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008