

葡萄风信子黄酮醇合酶基因克隆和表达分析

李海鸿,刘雅莉*,刘红利,娄 倩

(西北农林科技大学 风景园林艺术学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:以葡萄风信子‘亚美尼亚’的根、茎、叶、花为材料,采用 RT-PCR 技术克隆得到一条 *FLS* 基因,命名为 *MaFLS2*。生物信息学分析表明,该基因 cDNA 全长为 1 152 bp,含有完整的开放读码框 1 056 bp,编码 353 个氨基酸,*MaFLS2* 蛋白是一种亲水性蛋白,氨基酸序列含有典型的 DIOX_N 结构域(2-酮戊二酸-双加氧酶活性的 N 端区域)和 2OG-FeII_Oxy 超家族结构域,属于 2-酮戊二酸-双加氧酶(2-ODDs)蛋白家族。实时定量 PCR 结果显示,*MaFLS2* 基因在蓝白葡萄风信子中的表达存在组织特异性,蓝色品种‘亚美尼亚’中在花蕾未着色时表达量最高,而白色品种‘白丽人’在根中表达量最高,在花发育的不同阶段,*MaFLS2* 基因在‘亚美尼亚’中的表达峰值出现在花蕾未着色时期,基因表达总体呈现出先降低后升高再降低的趋势,而在‘白丽人’中的表达峰值出现在转色中期,总体呈现出先升后降的趋势。研究结果为开展单子叶植物花色育种提供了理论依据。

关键词:葡萄风信子;*FLS* 基因;基因克隆;表达分析

中图分类号:S682. 29 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2019)02-0116-06

Cloning and Expression Analysis of *FLS* Gene in *Muscari armeniacum*

LI Hai-hong, LIU Ya-li*, LIU Hong-li, LOU Qian

(College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: In this study, we cloned a flavonol synthase gene (*FLS*) from grape hyacinth *Muscari armeniacum* (*MaFLS2*) by using PCR technique. Bioinformatics analysis showed that the length of *MaFLS2* cDNA was 1 152 bp, including a complete open reading frame with 1 056 bp. *MaFLS2* codes 353 amino acids and belonging to hydrophilic protein. NCBI analysis showed that *MaFLS2* protein had the typical DIOX_N and 2OG-FeII_Oxy structure domains, therefore, *MaFLS2* belonged to 2-oxoglutarate-dioxygenase protein families. Real time PCR showed that *MaFLS2* gene was a tissue specific gene in grape hyacinths, and it had the highest expression level in flower buds at the period of starting to pigment in *M. armeniacum* while in *M. uscariauchi* ‘White Beauty’, its expression peak value appeared in roots. At different flowering developmental phases, *MaFLS2* gene expressed the highest in uncolored flower buds of *M. armeniacum*, whose flower was blue in color, its expression pattern showed a overall tread of reducing firstly, increasing before decreasing again to its minimum level. However, in *M. ‘White Beauty’*, whose flower was white in color, *MaFLS2* gene presented a different expression pattern as its expression peak value appeared in flower buds staying at the middle period of its changing color, and it showed a general expression trend of increasing before declining. This study could be used to explore the function of *FLS* gene in flower coloring.

Key words: grape hyacinth; *FLS* gene; gene cloning; expression analysis

类黄酮是植物次级代谢中很大的一个家族,其中黄酮醇(flavonol)是无色的次级代谢产物,以糖基

收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-06-30
基金项目:国家自然科学基金(31471905)。
作者简介:李海鸿,女,在读硕士,研究方向:分子育种。E-mail:313370296@qq.com
* 通信作者:刘雅莉,女,硕士,教授,博士生导师,研究方向:园林植物遗传育种。E-mail:lyl6151@126.com

化的形式存在于植物中^[1]。黄酮醇合酶 FLS(flavonol synthase)是类黄酮代谢中一个重要的节点酶,属于依赖铁离子和 2-酮戊二酸的双加氧酶^[2],能将二氢黄酮醇(二氢槲皮素、二氢山奈酚)催化合成相对的黄酮醇(槲皮素、山奈酚)。类黄酮合成途径中,黄酮醇合酶 FLS 和二氢黄酮醇 4-还原酶 DFR(dihydroflavonol 4-reductase)竞争底物二氢黄酮醇,分别生成无色的黄酮醇和有色的花青素,进而调控植物花色的形成^[3]。娄倩^[4]等通过转录组测序结合代谢谱分析发现蓝色品种‘亚美尼亚’DFR 基因高表达,FLS 基因低表达,白色品种‘白丽人’中 FLS 基因高表达,DFR 基因低表达,由此可以推定葡萄风信子中 FLS 基因和 DFR 基因的竞争分流最终导致花色的变异。L. Pin^[5]等通过研究发现,异源表达 *RrFLS1*(*Rosa rugosa*)、*PpFLS*(*Prunus pesica*)、*PhFLS*(*Petunia hybrida*),粉色烟草草会开出白花;异源表达 DFR 基因,烟草内源 FLS 基因的表达下调,同时花青素的合成增加,由此认为 FLS 基因和 DFR 基因的差异表达决定了烟草花朵中黄酮醇和花青素的不均衡积累,最终导致花色的变异的结论。M. Kevin^[6]等发现,过量表达 DFR 基因或抑制表达 FLS 基因都可导致矮牵牛中花青素的积累,使得开白色花矮牵牛开出生成粉色花;上调 DFR 基因表达的同时下调 FLS 基因表达会导致最大量花青素的生成,同时花青素合成过程下游路径中 3 个重要催化酶的活性下降,包括花青素合成酶(anthocyanidin synthase)、类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶(flavonoid 3-O-glucosyl-transferase)、花青素 3-O-鼠李糖基转移酶(anthocyanidin 3-O-glucosyl-transferase)。H. N. Nguyen^[7]等指出可以通过调控拟南芥 FLS1 的表达使类黄酮合成途径转向花青素积累的路径。K. Soichi^[8]等在龙胆中发现类黄酮合成过程中的早期基因包括查尔酮合成酶 CHS(chalcone synthase)基因、查尔酮异构酶 CHI(chalcone isomerase)基因、黄烷酮 3-羟基化酶 F3H(flavanone 3-hydroxylase)基因和 FLS 基因在花瓣和花药中都表达,但 FLS 基因只在花药中表达。K. Daniel^[9]等通过研究发现拟南芥基因组只有 FLS1 基因影响黄酮醇的合成水平。这些研究说明 FLS 基因在植物花色的形成过程中发挥着重要的作用。此外,FLS 基因还参与植物多种代谢活动,如植物花粉萌发和花粉管的伸长,响应营养胁迫,豆科植物肿瘤形成过程中调节生长素的运输^[10-12]。FLS 基因的表达不仅受到内源物质的调控,同时还受到外部环境的影响,如光、UV-B、根部重力信号等^[1,9,13]。

葡萄风信子属于单子叶植物纲(Monots)、天门

冬目(Asparagales)、天门冬(Asparagaceae)、绵枣儿亚科(Scilloideae)、葡萄风信子属(*Muscari*),有时也将其归为风信子科(Hyacinthaceae),是一种重要的早春球根观赏花卉,主要花色呈现蓝色^[14-15]。截至 2018 年 5 月 15 日,NCBI 共收录了 1 099 条绿色植物 FLS 基因,单子叶植物(monots)有 194 条,其中 67 条分布在天门冬目植物中,在天门冬科植物中仅发现了 2 条 FLS 基因。单子叶植物中,尤其在天门冬科植物中关于 FLS 基因功能的报道很少。

课题组前期已从葡萄风信子白色品种‘白丽人’中克隆出一条 FLS 同源基因 *MaFLS1*^[16],以葡萄风信子蓝色品种‘亚美尼亚’为试验材料,从 FLS 同源基因克隆、生物信息学分析和时空表达模式等方面开展了进一步的研究,以期研究利用 FLS 基因在开展单子叶植物花色育种过程中的机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和试剂

试验所用材料为葡萄风信子蓝色品种‘亚美尼亚’和白色品种‘白丽人’(图 1),种植于西北农林科技大学风景园林艺术学院试验田,根据不同花发育阶段,将葡萄风信子的花期分为 5 个阶段:1)花蕾未着色;2)花蕾开始着色;3)花蕾转色中期;4)花蕾完全着色;5)花蕾衰败(图 2)。2017 年 3 月上旬、中旬、下旬分别采集‘亚美尼亚’和‘白丽人’的根、茎、叶,以及不同时期的花蕾保存于液氮中备用。

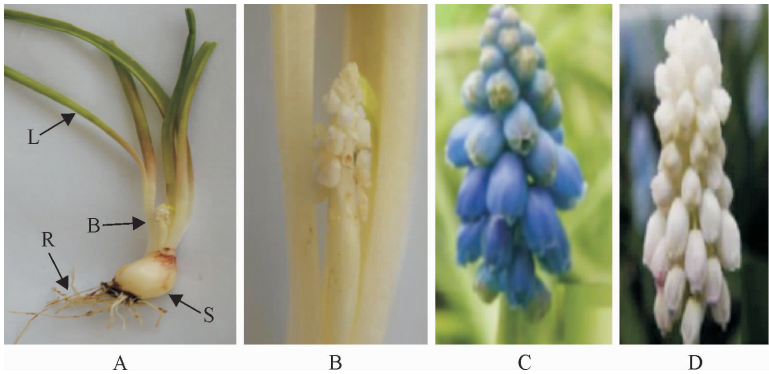
所用试剂:RNA 提取试剂盒(购于北京百泰克生物技术有限公司);Prime Script TMRT reagent Kit 试剂盒,pMD19-T 载体,2×Es Taq Master Mix(酶购于大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 葡萄风信子总 RNA 的提取和 *MaFLS2* 基因的克隆 分别以葡萄风信子‘亚美尼亚’的根、茎、叶,及不同时期的花蕾为材料提取 RNA,参照 Prime Script TMRT-PCR Kit 试剂盒说明书反转录出进行实时定量 PCR(Real Time-PCR)反应的 cDNA 第一链。以 cDNA 混合样为模板,设计引物(表 1)并扩增 FLS 基因同源序列,反应程序:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 0.5 min,59℃ 退火 0.5 min,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环,72℃ 延伸 2 min。反应体系(20 μL):cDNA 模板 1.0 μL(约 100 ng),正向引物和反向引物各 0.8 μL,2×Es Taq Master Mix 酶 10 μL,ddH₂O 7.4 μL。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收纯化后的目的片段,与 pMD19T 载体连接,4℃ 条件下 12 h,然后在无菌条

件下,取 10 μ L 连接产物转化到 30 μ L 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 Top10 中,在含有 Amp 的 LB 平板上通过蓝白斑筛选出阳性克隆,挑取大小适中、透明的白色菌落加入液体 LB 培养基中

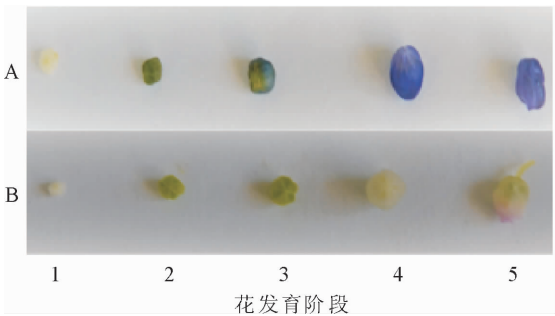
(含有 100 mg/L Amp),置于 37℃ 摇床培养 12~14 h (180 r/min),菌落 PCR 检测重组质粒,最后送北京奥科公司测序。



注:A. 葡萄风信子全株,L:叶;R:根;S:茎;B. 未着色的花序;C. ‘亚美尼亚’着色的花序;D. ‘白丽人’着色的花序。

图 1 葡萄风信子器官表型

Fig. 1 The phenotypes in different organs of grape hyacinth



注:A. ‘亚美尼亚’不同花发育阶段;B. ‘白丽人’不同花发育阶段。
1. 花蕾未着色;2. 花蕾开始着色;3. 花蕾转色中期;4. 花蕾完全着色;
5. 花蕾衰败。

图 2 葡萄风信子不同花发育阶段

Fig. 2 The different flowering developmental phases in grape hyacinth

1. 2. 2 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因生物信息学分析
在线工具 ORF Finder 检测 *MaFLS2* 基因的开放读码框,ProtParam 程序分析 *MaFLS2* 基因的氨基酸序列及其理化性质,ProtScale 程序预测 *MaFLS2* 蛋白的亲水性和疏水性,TMPred 程序分析 *MaFLS2* 蛋白的跨膜结构域,SignalP 4. 1 Server 分析 *MaFLS2* 蛋白信号肽;NetPhos 2. 0 Server 预测 *MaFLS2* 蛋白磷酸化位点。利用 Protein Blast 程序(NCBI)搜索 FLS 蛋白同源序列,DNAMAN 软件多重比对同源序列,MEGA5. 0 软件构建系统发育树。

1. 2. 3 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因时空表达模式分析
分别取‘亚美尼亚’和‘白丽人’的根、茎、叶,以及不同发育时期的花蕾 RNA 500 ng,反转录为 cDNA,参照 TaKaRa 公司的荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq TM II 说明书在荧光定量 PCR 仪

(BIO-RAD Cycler IQ5) 上进行实时定量 PCR 反应,反应体系和程序参照焦淑珍^[17] 等方法,葡萄风信子 *Actin* 基因为内参基因,反应引物参照表 1。

表 1 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因克隆及表达分析
所用的引物

Table 1 Primer sequences of <i>MaFLS2</i> gene used in cloning and real-time quantitative PCR		
引物名称	引物序列	用途
<i>MaFLS2</i> -S	ATGGATGAGGAA- CAAAAAAGCC	<i>MaFLS2</i> gene Amplification
<i>MaFLS2</i> -A	TCATGCAGCCT- TCAGCGAC	
<i>MaFLS2</i> -qRT-S	GACAACGACAAC- CAATCCAATC	Real-time PCR of <i>MaFLS2</i> gene
<i>MaFLS2</i> -qRT-A	TTGACAACCTG- GAAGAACCC	
<i>Actin</i> -S	AACATTCA- GAAGAGTCCACCC	Real-time PCR
<i>Actin</i> -A	GCTTACCAG- CAAAGATCAACCG	

2 结果与分析

2. 1 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因全长克隆及生物信息学分析

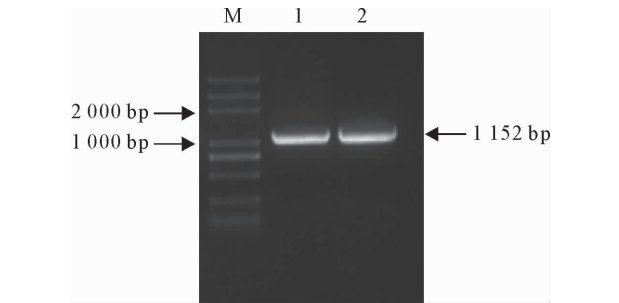
提取葡萄风信子‘亚美尼亚’根、茎、叶,及不同发育时期花蕾的 RNA,混合后作为模板扩增 *FLS* 基因全长,获得 1 条长度为 1 152 bp 的条带(图 3),测序后拼接。分析表明所得序列与转录组序列的相似性为 97%,ORF Finder 鉴定该基因含有完整的开放阅读框 1 056 bp,具有起始密码子和终止密码子,编码含有 353 个氨基酸的蛋白质,是一条完整的基因序列,将其命名为 *MaFLS2*(图 4)。生物信息

学分析表明: *MaFLS2* 基因理论分子量为 40.43 kD,理论等电点为 6.18,不稳定系数为 59.53,为不稳定蛋白; *MaFLS2* 蛋白的亲水性和疏水性的最大值均为 2.511,最小值为-2.478,在整个肽链中亲水性氨基酸残基比疏水性氨基酸残基多,由此推测葡萄风信子 *MaFLS2* 基因编码的蛋白为亲水性蛋白; *MaFLS2* 蛋白不具有跨膜区,也不具有信号肽,信号肽的存在与否决定含有这类肽段的新生肽链能否被分泌到细胞外,经过软件预测说明它可能不是分泌蛋白; *MaFLS2* 蛋白经预测有 21 个 Ser 磷酸化位点、3 个 Thr 磷酸化位点和 1 个 Tyr 磷酸化位点。

2.2 葡萄风信子 *MaFLS2* 蛋白序列同源性比对和同源性分析

NCBI 分析表明 *MaFLS2* 蛋白氨基酸序列含有典型的 DIOX_N 结构域(从第 52 个氨基酸到第 154 个氨基酸)和 2OG-FeII_Oxy 超家族结构域(从第 203 个氨基酸到第 311 个氨基酸),具有典型的依赖 2-酮戊二酸-双加氧酶(2-ODDs)蛋白的高保守氮端(图 5),属于 2-酮戊二酸-双加氧酶(2-ODDs)蛋白家

族; *MaFLS2* 蛋白具有相对保守的 DHQ 底物特异结合位点(Tyn 233, Phe 236, Phe 306, Asn 311)、FeII 结合位点(His 266, Asp 269, His 284)、2-酮戊二酸结合位点(Arg 357, Ser 359)(图 6),这些相对保守的功能域和特异的结合位点与其他物种的 FLS 蛋白相似,初步推断本试验克隆出的 *MaFLS2* 蛋白属于 FLS 蛋白超家族。



注: M. DNA 标准分子量(Trans2K Plus),泳道 1 为目的片段,约为 1152 bp,泳道 1 和 2 为设置的重复。

图 3 *MaFLS2* 基因全长电泳检测
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis of *MaFLS2* gene whole fragment

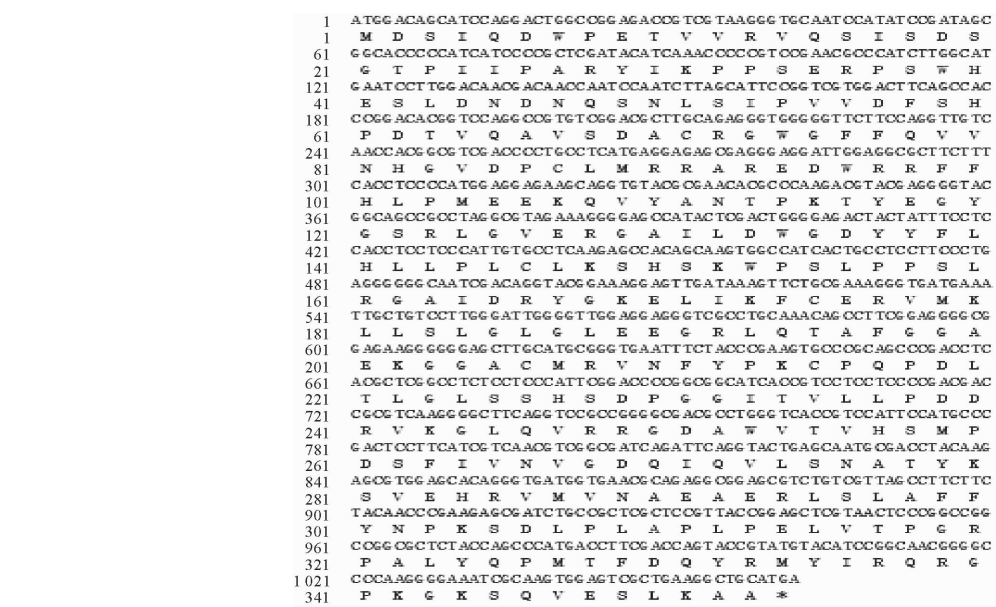
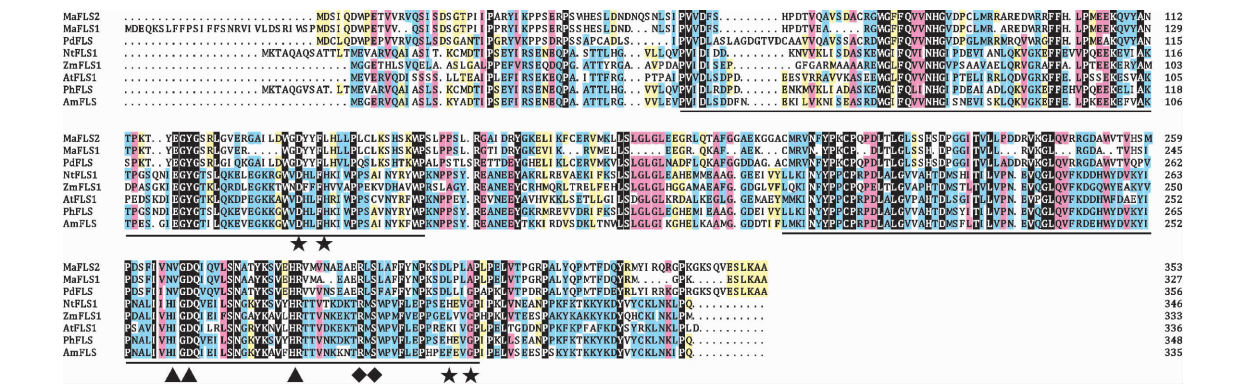


图 4 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列
Fig. 4 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *MaFLS2* gene in grape hyacinth

NCBI 上对葡萄风信子 *MaFLS2* 蛋白的氨基酸序列进行 BLASTP 比对,结果显示葡萄风信子 *MaFLS2* 蛋白与葡萄风信子 *MaFLS1* 蛋白同源性最高,达到 82%,与海枣(*Phoenix dactylifera*) FLS 蛋白的同源性较高,达到 74%,与欧洲葡萄(*Vitis vinifera*)、梅花(*Prunus mume*)、苹果(*Malus domestica*)、荷花(*Nelumbo nucifera*)、草莓(*Fragaria vesca*)、醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*)等 14 种植物的同源性达到 62%~64%。将 *MaFLS2* 蛋白的

氨基酸序列与其他 30 种物种的氨基酸序列构建系统进化树(图 6),结果表明,葡萄风信子 *MaFLS2* 基因编码的氨基酸序列首先与葡萄风信子 *MaFLS1* 蛋白聚为一枝,再与海枣聚为一枝,最后与小果野芭蕉聚为一枝,而与其他物种的亲缘关系较远。

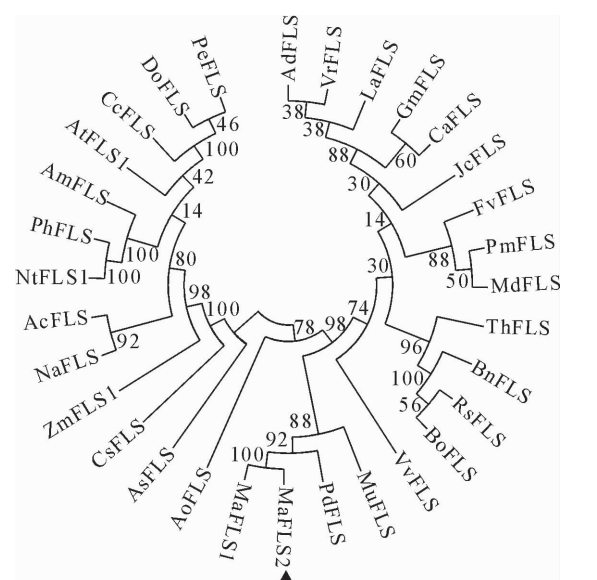
2.3 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因的时空表达模式分析
为了研究 *MaFLS2* 基因在蓝白葡萄风信子中不同组织的表达模式,分别提取‘亚美尼亚’和‘白丽人’的根、茎、叶,以及不同发育时期的花蕾 RNA



注:MaFLS2. 葡萄风信子;MaFLS1. 葡萄风信子;PdFLS. 海枣(XP_008789106.1);NtFLS1. 烟草(ABE28017.1);ZmFLS1. 玉米(BT039956.1);AtFLS1. 拟南芥(AAB41504.1);PhFLS. 矮牵牛(CAA80264.1);AmFLS. 金鱼草(ABB53382.1);黑色下划线:DIOX_N 结构域;红色下划线:2OG-FeII_Oxy 结构域;星号:DHQ 特异结合位点;三角形:FeII 结合位点;菱形:2-酮戊二酸结合位点。

图 5 葡萄风信子 *MaFLS2* 基因编码的氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 5 Blasting consequences of the deduced amino acid sequences of *MaFLS2* in grape hyacinth with other plants

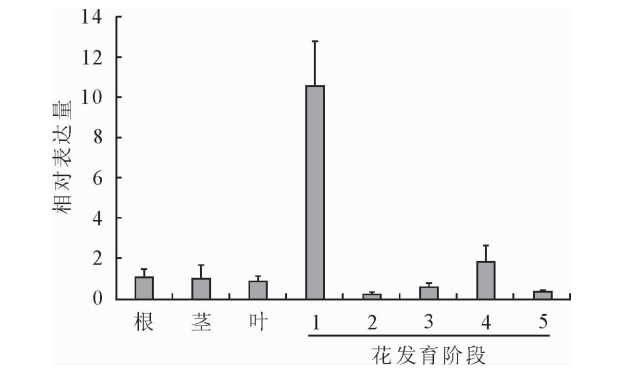


注:AdFLS. 蔓花生(XP_015944311.1);VrFLS. 绿豆(XP_014495382.1);LaFLS. 狭叶羽扇豆(XP_019449875.1);GmFLS. 大豆(XP_003544081.1);CaFLS. 鹰嘴豆(XP_004500496.1);JcFLS. 麻风树(XP_012087306.1);FvFLS. 草莓(XP_004307670.1);PmFLS. 梅花(XP_008233765.1);MdFLS. 苹果(XP_008343625.1);ThFLS. 醉蝶花(XP_010543724.1);BnFLS. 欧洲油菜(XP_013724066.1);RsFLS. 萝卜(XP_018473361.1);BoFLS. 羽衣甘蓝(XP_013623255.1);VvFLS. 葡萄(XP_002272995.1);MuFLS. 小果野芭蕉(XP_009404656.1);PdFLS. 海枣(XP_008789106.1);MaFLS2. 葡萄风信子;MaFLS1. 葡萄风信子;AoFLS. 石刁柏(XP_020257818.1);AsFLS. 拟兰(PKA63698.1);CsFLS. 山茶(ABM88786.1);ZmFLS1. 玉米(BT039956.1);NaFLS. 水仙(AFS63900.1);AcFLS. 玉葱(AAT68476.1);NtFLS1. 烟草(ABE28017.1);PhFLS. 矮牵牛(CAA80264.1);AmFLS. 金鱼草(ABB53382.1);AtFLS1. 拟南芥(AAB41504.1);CcFLS. 蕙兰(AIM58714.1);DoFLS. 铁皮石斛(ATD53725.1);PeFLS. 蝴蝶兰(XP_020573284.1)。

图 6 葡萄风信子 *MaFLS2* 蛋白与其他物种的 FLS 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *MaFLS2* protein and FLS proteins from other species

500 ng, 反转录为 cDNA, 通过实时定量 PCR 反应检测其表达。‘亚美尼亚’中, *MaFLS2* 在根和茎的表达量基本一致, 稍高于叶中的表达量。 *MaFLS2* 在花发育不同阶段的表达量不同, 花蕾未着色时表达量达到峰值, 开始着色时急剧减少, 随着花色加深, 表达量渐渐增加, 直到花蕾完全开放后表达量又开始逐渐减少, 花朵衰败期时表达量降到最低, 并且 *MaFLS2* 基因在未着色时期的表达量是叶中的 12 倍, 花蕾开始着色期的 50 倍, 基因表达总体呈现出先降低后升高再降低的趋势(图 7)。



注:1. 花蕾未着色;2. 花蕾开始着色;3. 花蕾转色中期;4. 花蕾完全着色;5. 花蕾衰败。图 8 同。

图 7 葡萄风信子‘亚美尼亚’*MaFLS2* 基因相对表达量分析

Fig. 7 The analysis of *MaFLS2* gene relative expression patterns in *Muscari armeniacum*

然而在 *MaFLS2* 基因在白色品种‘白丽人’中呈现了不同的表达模式, 表达量的峰值出现在根中, 远高于茎和叶中的表达量(茎和叶中表达量相似)。花发育的不同阶段, *MaFLS2* 基因在花蕾未着色时开始表达, 此后表达量逐渐增加, 直到花蕾转色中期后表达量开始减少, 衰败期时表达量降至最低, 基因表达总体呈现出先增加后减少的趋(图 8)。

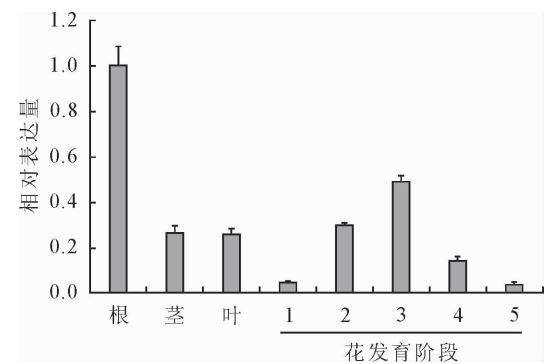


图 8 葡萄风信子‘白丽人’*MaFLS2* 基因相对表达量分析
Fig. 8 Analysis of *MaFLS2* gene relative expression
in *Muscari armeniacum* ‘White Beauty’

3 结论与讨论

黄酮醇合酶 FLS 是类黄酮代谢中一个重要的节点酶,属于依赖铁离子和 2-酮戊二酸的双加氧酶家族。本试验从葡萄风信子‘亚美尼亚’中成功克隆出 1 条 *FLS* 同源基因,命名为 *MaFLS2*,序列分析表明,*MaFLS2* 蛋白氨基酸序列存在典型的 DIOX_N 结构域和 2OG-FeII_Oxy 超家族结构域,具有依赖 2-酮戊二酸-双加氧酶(2-ODDs)蛋白的高保守氮端和相对保守的 DHQ 底物特异结合位点、FeII 结合位点、2-酮戊二酸结合位点,这些保守的功能域和特异的结合位点与其他物种的 *FLS* 蛋白相似,初步推断 *MaFLS2* 蛋白属于 *FLS* 蛋白超家族。

FLS 基因在不同植物不同组织中表达模式有显著差异,拟南芥中 *FLS1* 在花和角果中高表达,根、茎、叶中低表达^[9];紫山药中 *FLS* 基因在嫩叶中表达量最高^[18],在其他组织中表达量极低;甜樱桃中 *FLS* 基因在花中表达量最高^[19]。本研究中 *MaFLS2* 基因在蓝白葡萄风信子的不同组织部位的表达模式也存在显著差异:蓝色品种‘亚美尼亚’中,*MaFLS2* 基因在花蕾未着色时表达量最高,而杜灵娟^[19]等发现 *MaFLS1* 基因的表达高峰出现在完全着色的花蕾期,这反应出 *FLS* 家族基因表达的差异性;白色品种‘白丽人’中,*MaFLS2* 基因在根中表达量最高,与杜灵娟^[19]等的研究结果一致,这说明 *FLS* 家族基因表达的同源性。*MaFLS2* 基因在‘亚美尼亚’花蕾未着色时表达量显著高于其他时期,结合前期代谢谱分析出的结果:‘亚美尼亚’积累的主要色素物质是有色的花青素^[4],推测此时期 *FLS* 基因大量的表达,就会大量积累无色的二级代谢产物黄酮醇,使得花蕾呈现出无色状态。当花蕾开始着色时,*FLS* 基因和 *DFR* 基因竞争底物二氢黄酮醇^[4],*DFR* 基因开始大量表达,*FLS* 基因表达量减少,使得类黄酮代谢途径流向合成花青素的方向,

花蕾呈色的有色物质花青素开始大量积累,随着花蕾的发育,花朵最终呈现出蓝色。根据(Thomas Vogt1994)^[10]等的研究结果:当矮牵牛受到伤害诱导时,黄酮醇尤其是山奈酚在外层细胞层含量增加,当花朵的心皮、雄蕊、萼片受到伤害胁迫时,柱头中会积累山奈酚,说明黄酮醇可以响应伤害胁迫,可以推测出 *FLS* 基因的表达与植物抗逆性可能相关,本研究中 *MaFLS2* 基因在‘白丽人’中根中表达量最高,推测‘白丽人’中根中积累了大量的槲皮素或者山奈酚,保护其幼嫩的种球(茎)不受伤害胁迫。

参考文献:

[1] HIROFUMI I, TAKAYUKI T, PRISCA V, *et al.* Natural variation in flavonol accumulation in *Arabidopsis* is determined by the flavonol glucosyltransferase BGLU6[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(5): 1505-1517.

[2] AI X C, XIAO J H, YI F W, *et al.* The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2014, 15: 1080-1095.

[3] RONALD E K, FRANCESCA O, JOSEPH N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution[J]. *BioEssays*, 1994, 16(2): 123-132.

[4] LOU Q, QIAO S Z, QI Y Y, *et al.* Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveals the role of delphinidin metabolism in flower colour in grape hyacinth[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 3157-3164.

[5] PING L, GUO G N, ZHEN W, *et al.* Disequilibrium of flavonol synthase and dihydroflavonol-4-reductase expression associated tightly to white vs. red color flower formation in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(6): 1257.

[6] KEVIN M, DAVIES K, KATHY Ea, *et al.* Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase[J]. *Euphytica*, 2003, 131: 259-268.

[7] NGUNYEN H N, JUN H K, JAEYOUNG K, *et al.* Characterization of *Arabidopsis thaliana* flavonol synthase(*FLS1*)-overexpression plants in response to abiotic stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 103: 133-142.

[8] SOICHI K, TAKASHI N, ERI Y, *et al.* A flavonol synthase gene *GtFLS* defines anther-specific flavonol accumulation in gentian[J]. *Plant Biotechnology*, 2010, 28: 211-221 .

[9] DANIEL K , OWENS A, ANNE, A, *et al.* Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Physiology*, 2008: 1046-1061.

[10] THOMAS V, PEGGY P, NATHAN T, *et al.* Polliantion- or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production[J]. *The Plant Cell*, 1994(6): 11-23.

[11] CATHERINE L, UNNI S L, PETER R. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2008, 31: 587-601.

landscape pattern in Putian based on RS and GIS[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(1): 279-286. (in Chinese)

[16] 王吉斌,刘晓双,李才文. 基于 SPOT 影像的四川省剑阁县景观格局现状分析[J]. 西北林学院学报, 2014, 29(2): 257-261. WANG J B, LIU X S, LI C W. SPOT 5 based landscape pattern analysis of Jiange county in Sichuan Province[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(2): 257-261. (in Chinese)

[17] 徐明德,李静,彭静,等. 基于 RS 和 GIS 的生态系统健康评价[J]. 生态环境学报, 2010, 19(8): 1809-1814. XU M D, LI J, PENG J, *et al.* Ecosystem health assessment based on RS and GIS[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(8): 1809-1814. (in Chinese)

[18] 虞依娜,彭少麟. 生态系统服务价值评估的研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(9): 2246-2252. YU Y N, PENG S L. Review on evaluation of ecosystem services[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(9): 2246-2252. (in Chinese)

[19] 谢高地,鲁春霞,冷允法,等. 青藏高原生态资产的价值评估[J]. 自然资源学报, 2003, 18(2): 189-196. XIE G D, LU C X, LENG Y F, *et al.* Ecological assets valuation of the Tibetan Plateau[J]. Journal of Natural Resources, 18(2): 189-196. (in Chinese)

[20] 赵敏敏,周立华,陈勇,等. 生态政策驱动下的内蒙古自治区杭锦旗土地利用及生态系统服务价值变化[J]. 中国沙漠, 2016, 36(3): 842-850.

[21] 孙红卫,吕春燕,祁爱琴,等. 综合评价中数据标准化的原理研究[J]. 中国卫生统计, 2015, 32(2): 342-344, 349.

[22] 林倩. 辽河口湿地景观演变与生态系统健康评价研究[D]. 大连:大连理工大学, 2009.

[23] 郭锐利,郑钦玉,刘娟,等. 基于熵值法和 GM(1,1)模型的重庆城市生态系统健康评价[J]. 中国环境科学, 2012, 32(6): 1148-1152. GUO R L, ZHENG Q Y, LIU J, *et al.* Ecosystem health assessment of Chongqing city based on entropy and GM (1,1) model[J]. China Environment-al Science, 2012, 32(6): 1148-1152. (in Chinese)

[24] 朱卫红,苗承玉,郑小军,等. 基于 3S 技术的图们江流域湿地生态安全评价与预警研究[J]. 生态学报, 2014, 34(6): 1379-1390. ZHU W H, MIAO C Y, ZHENG X J, *et al.* Study on ecological safety evaluation and warning of wetlands in Tumen River watershed on 3S technology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(6): 1379-1390. (in Chinese)

(上接第 121 页)

[12] ZHANG J, SENTHIL S, GARY S, *et al.* Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*[J]. The Plant Journal, 2009, 57: 171-183.

[13] MARIA L F F, MARIA I C, JULIA I Q, *et al.* Evolution and expression of tandem duplicated maize flavonol synthase genes[J]. Frontiers in Plant Science, 2012(3): 1-26.

[14] 娄倩. 葡萄风信子(Muscari)花色形成与相关基因研究[D]. 杨陵:西北农林科技大学, 2014.

[15] QI Y Y, LOU Q, LI H, *et al.* Anatomical and biochemical studies of bicolored flower development in *Muscari latifolium*[J]. Protoplasma, 2013, 250: 1273-1281.

[16] 杜灵娟,陈凯利. 葡萄风信子 *FLS1* 基因克隆及其表达与花色性状之间的关联性分析[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(1): 106-113. DU L J, CHEN K L. Cloning of flavonol synthase gene (*FLS1*) and expression with the flower color in grape hyacinth[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(1): 106-113. (in Chinese)

[17] 焦淑珍,娄倩,姜玲,等. 葡萄风信子二氢黄酮醇 4- 还原酶基

因(*DFR*)的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 32(1): 106-113.

JIAO S Z, LOU Q, JIANG L, *et al.* Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene (*DFR*) from grape hyacinth(*Muscari armeniacum*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 32(1): 106-113. (in Chinese)

[18] 闫瑞霞,龚义勤,韩晓勇,等. 紫山药黄酮醇合成酶 *DaFLS1* 基因的克隆和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1448-1455. YAN R X, GONG Y Q, HAN X Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *DaFLS1* gene in purple yam(*Dioscorea alata* L.)[J]. Jiangsu Journal of Agriculture Science, 2014, 30(6): 1448-1455. (in Chinese)

[19] 柳爱玲,沈欣杰,刘芸,等. 甜樱桃黄酮醇合酶基因的克隆及其表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(2): 56-63. LIU A L, SHEN X J, LIU Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *PacFLS* in sweet cherry(*Prunus avium* L.)[J]. Journal of China Agriculture University, 2013, 18(2): 56-63. (in Chinese)