

基于转录组分析金属离子对绿绒蒿属 3 种植物花瓣呈色的影响

罗 军, 陈丽琦, 李拓键, 区 智, 屈 燕^①

(西南林业大学园林园艺学院 国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心
云南省功能性花卉资源及产业化技术工程研究中心, 云南 昆明 650224)

摘要: 为探究金属离子对绿绒蒿属 (*Meconopsis* Vig.) 3 种植物花瓣呈色的影响, 测定了盛花期全缘叶绿绒蒿 [*M. integrifolia* (Maxim.) Franch.]、红花绿绒蒿 (*M. punicea* Maxim.) 和川滇绿绒蒿 (*M. wilsonii* Grey-Wilson) 花瓣中 7 种金属离子 (包括 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+}) 含量, 对 3 个花期花瓣进行转录组分析。结果表明: 盛花期, 全缘叶绿绒蒿花瓣中 7 种金属离子含量显著 ($P < 0.05$) 高于红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿; 红花绿绒蒿花瓣中 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 含量显著低于川滇绿绒蒿, Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 含量显著高于川滇绿绒蒿。全缘叶绿绒蒿花瓣中, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 相关 GO 富集条目以及镁整合酶活性、钾离子稳态和对锌离子的反应条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中总体最多, 锌离子结合和锰离子结合条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最少, 整合钙离子释放到细胞溶质条目中仅全缘叶绿绒蒿花瓣的差异 unigene 明显表达。红花绿绒蒿花瓣中, 亚铁结合、镁离子结合、钙离子结合、钾离子结合、钾离子转运条目和锌离子结合条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多, 仅三价铁结合条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最少。川滇绿绒蒿花瓣中, 细胞钙离子稳态和锰离子结合条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多, Mg^{2+} 、 K^+ 和 Cu^{2+} 相关 GO 富集条目以及亚铁结合、铁离子的细胞内整合、对锌离子的反应、钙离子结合条目存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中总体最少。综上所述, 推测 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 影响全缘叶绿绒蒿花瓣呈色, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^+ 和 Cu^{2+} 影响红花绿绒蒿花瓣呈色, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 影响川滇绿绒蒿花瓣呈色。

关键词: 绿绒蒿属; 花色; 金属离子; 差异 unigene; 基因表达

中图分类号: Q786; S68 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)05-0016-12
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.05.02

Analysis on effects of metal ions on the petal color of three species in *Meconopsis* based on transcriptome LUO Jun, CHEN Liqi, LI Tuojian, OU Zhi, QU Yan^① [Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture (State Forestry and Grassland Administration), Yunnan Engineering Research Center for Functional Flower Resources and Industrialization, College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(5): 16-27

Abstract: In order to explore the effects of metal ions on the petal color of three species in *Meconopsis* Vig., contents of seven metal ions (including Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+}) in petals of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., *M. punicea* Maxim., and *M. wilsonii* Grey-Wilson at the blooming stage were measured, and transcriptome analyses were conducted for petals at three flowering stages. The

收稿日期: 2022-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160404; 31460218); 云南省万人计划青年拔尖人才项目 (YNWR-QNBJ-2019-211)

作者简介: 罗 军 (1998—), 男, 四川内江人, 硕士研究生, 主要从事园林植物资源开发与利用方面的研究。

^①通信作者 E-mail: flyersw@163.com

引用格式: 罗 军, 陈丽琦, 李拓键, 等. 基于转录组分析金属离子对绿绒蒿属 3 种植物花瓣呈色的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(5): 16-27.

results show that at the blooming stage, contents of seven metal ions are significantly ($P < 0.05$) higher in petals of *M. integrifolia* than in petals of *M. punicea* and *M. wilsonii*; contents of Fe^{3+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , and Zn^{2+} in petals of *M. punicea* are significantly lower than those of *M. wilsonii*, and contents of Cu^{2+} and Ca^{2+} are significantly higher than those of *M. wilsonii*. In petals of *M. integrifolia*, evidently expressed differential unigenes in Fe^{3+} -, Fe^{2+} -, and Cu^{2+} -related GO enrichment items, and magnesium chelatase activity, potassium homeostasis and response to zinc ion items are the most among three test species in *Meconopsis* in general, while those in zinc ion binding and manganese ion binding items are the least, and differential unigenes in the release of sequestered calcium ion into cytosol item only evidently express in petals of *M. integrifolia*. In petals of *M. punicea*, evidently expressed differential unigenes in ferrous iron binding, magnesium ion binding, calcium ion binding, potassium ion binding, potassium ion transport, and zinc ion binding items are the most among three test species in *Meconopsis*, and only those in ferric iron binding item are the least among three test species in *Meconopsis*. In petals of *M. wilsonii*, evidently expressed differential unigenes in cellular calcium ion homeostasis and manganese ion binding items are the most among three test species in *Meconopsis*, and those in Mg^{2+} -, K^+ - and Cu^{2+} -related GO enrichment items, and ferrous iron binding, intracellular sequestering of iron ion, response to zinc ion and calcium ion binding items are the least among three test species in *Meconopsis* in general. In conclusion, it is speculated that Cu^{2+} and Ca^{2+} affect the petal color of *M. integrifolia*, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , and Cu^{2+} affect the petal color of *M. punicea*, and Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Cu^{2+} affect the petal color of *M. wilsonii*.

Key words: *Meconopsis* Vig.; flower color; metal ion; differential unigene; gene expression

绿绒蒿属 (*Meconopsis* Vig.) 植物隶属于罂粟科 (Papaveraceae), 一年生或多年生草本, 主要分布在青藏高原, 是传统藏药植物^[1]。绿绒蒿属植物株型姿态优美, 花朵硕大秀丽, 花色丰富, 有黄色、白色、蓝色、蓝紫色、紫红色和酒红色等^[2]。花色是绿绒蒿属植物关键分类特征之一, 其中全缘叶绿绒蒿 [*M. integrifolia* (Maxim.) Franch.] 花黄色^[3], 红花绿绒蒿 (*M. punicea* Maxim.) 花红色^[4], 川滇绿绒蒿 (*M. wilsonii* Grey-Wilson) 花蓝紫色^[5], 是绿绒蒿属植物的典型花色, 为绿绒蒿属植物花色形成机制研究的理想材料。

花色作为植物的重要生物性状, 是多因子综合作用的结果, 除环境因子外, 还受细胞介质 pH 值^[6]、花色素种类和含量^[7]以及金属离子等影响。已有研究表明: 金属离子在越橘 (*Vaccinium vitis-idaea* Linn.)^[8]、金花茶组 (Sect. *Chrysantha* Chang) 植物^[9]和郁金香 (*Tulipa gesneriana* Linn.)^[10]等植物花瓣呈色中具有重要作用。高宇等^[11]认为, Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 对软枣猕猴桃 [*Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq.] 花青素稳定性无显著影响, 但 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 却促使花青素发生氧化反应, 降低花青素稳定性。Miller 等^[12]认为, 自然状态下法国万寿菊 (*Tagetes patula* Linn.) 的花瓣呈淡黄色, Cu^{2+} 使花色转变为褐色, Cr^{3+} 使花瓣呈暗橘色。在大花绿绒蒿

(*M. grandis* Prain) 中, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、黄酮醇和矢车菊素衍生物相结合能形成一种区别于常见花色素的新型金属复合体色素, 进而形成花瓣中的蓝色色素^[13]。Shoji 等^[14]认为, 自然条件下部分郁金香品种的花萼呈现紫红色, 在花瓣底部喷施外源 Fe^{3+} , 花萼颜色会转变为蓝紫色。由此表明金属离子的种类和含量与花瓣颜色的形成有密切联系, 研究不同颜色绿绒蒿属植物花瓣中的金属离子对探究绿绒蒿属植物花瓣的呈色有重要意义。

鉴于此, 本研究对不同花色的绿绒蒿属植物 (包括全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿) 盛开花瓣中金属离子含量进行测定, 同时利用转录组数据分析并筛选出这3种植物花瓣中金属离子相关的差异表达 unigene, 探究不同金属离子对绿绒蒿属3种植物花瓣呈色的影响, 以期绿绒蒿属植物的引种栽培、花色调控和园林应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试全缘叶绿绒蒿、红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿采集于2021年6月, 根据开花时期的形态及颜色等特征分为花蕾期 (花蕾里的花瓣完全着色)、开裂期 (花蕾裂开, 花瓣从花蕾露出) 和盛花期 (花瓣完全展开)

(图1)。在花开放过程中,全缘叶绿绒蒿花瓣黄色程度逐渐加深,红花绿绒蒿花瓣红色程度逐渐变浅,而川滇绿绒蒿花瓣蓝紫色程度先加深后变浅。每种植物选择长势相近的5株,各时期每株选择1朵生长状态及大小相似的花朵。自然光照下,使用英国皇家园艺协会比色卡(Royal Horticultural Society colour chart, RHSCC)确定各时期花瓣颜色。绿绒蒿属3种植物的采集信息见表1。

花蕾期和开裂期从3株植株分别取2g花瓣样品,盛花期从3株植株分别取5g花瓣样品,即为3次重复。采集前用体积分数75%乙醇对采样工具进行消毒,采集后迅速用锡箔纸包裹花瓣,装入密封袋后立即置于干冰桶中,带回实验室后移入-80℃超低温冰箱保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 花瓣中金属离子含量测定 参考黄奇等^[15]的



Mi: 全缘叶绿绒蒿 *M. integrifolia* (Maxim.) Franch.; Mp: 红花绿绒蒿 *M. punicea* Maxim.; Mw: 川滇绿绒蒿 *M. wilsonii* Grey-Wilson. 从左到右依次为花蕾期、开裂期和盛花期 From left to right are the bud stage, cracking stage, and blooming stage.

图1 不同花期绿绒蒿属3种植物的花部形态

Fig. 1 Floral morphology of three species in *Meconopsis* Vig. at different flowering stages

表1 绿绒蒿属3种植物花部的采集信息

Table 1 Collection information of flowers of three species in *Meconopsis* Vig.

种类 Species	采集地点 ¹⁾ Collection location ¹⁾	经度 Longitude	纬度 Latitude	花期 Flowering stage	英国皇家园艺协会比色卡卡号 Card No. of Royal Horticultural Society colour chart
全缘叶绿绒蒿 <i>M. integrifolia</i>	YL	E100°10'56"	N37°00'10"	花蕾期 Bud stage	黄绿色 145D Yellow-green 145D
				开裂期 Cracking stage	黄绿色 150D Yellow-green 150D
				盛花期 Blooming stage	黄绿色 150B Yellow-green 150B
红花绿绒蒿 <i>M. punicea</i>	SP	E103°20'01"	N32°56'08"	花蕾期 Bud stage	红色 45A Red 45A
				开裂期 Cracking stage	红色 43A Red 43A
				盛花期 Blooming stage	红色 43B Red 43B
川滇绿绒蒿 <i>M. wilsonii</i>	JZ	E102°50'05"	N26°05'01"	花蕾期 Bud stage	紫红色 75D Red-purple 75D
				开裂期 Cracking stage	紫罗兰色 N80A Purple-violet N80A
				盛花期 Blooming stage	蓝紫色 N81C Violet N81C

¹⁾ YL: 云南省丽江市玉龙雪山 Jade Dragon Snow Mountain in Lijiang City of Yunnan Province; SP: 四川省阿坝藏族羌族自治州松潘县 Songpan County in Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture of Sichuan Province; JZ: 云南省昆明市轿子雪山 Jiaozi Snow Mountain in Kunming City of Yunnan Province.

方法,取盛花期绿绒蒿属3种植物花瓣于60℃烘干24h,每种植物准确称取3份,每份0.5g,然后于700℃碳化0.5h,500℃灰化3.5h,冷却后以体积分数5%硝酸定容至50mL,待测。分别取质量浓度1000μg·mL⁻¹ Fe³⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺、Mn²⁺、Cu²⁺和Zn²⁺标准液,用超纯水配制不同梯度的标准工作液,其中,Fe³⁺、Mg²⁺、Ca²⁺和Zn²⁺工作液的质量浓度范围为1.0~10.0μg·mL⁻¹,K⁺工作液的质量浓度范围为10.0~100.0μg·mL⁻¹,Mn²⁺和Cu²⁺工作液的质量浓度范围为0.1~1.0μg·mL⁻¹。使用AA-7000型原子火焰吸收光谱仪(日本岛津公司)测定标准工作液的

吸光值,以吸光值为纵坐标(y)、各金属离子含量为横坐标(x)绘制标准曲线。Fe³⁺的线性回归方程为 $y=0.0075x-0.0087$ ($r=0.9997$),Mg²⁺的线性回归方程为 $y=0.0774x+0.7716$ ($r=0.9999$),Ca²⁺的线性回归方程为 $y=0.0519x+0.0289$ ($r=0.9996$),K⁺的线性回归方程为 $y=0.0092x+1.1805$ ($r=0.9995$),Mn²⁺的线性回归方程为 $y=0.0180x-0.0014$ ($r=0.9997$),Cu²⁺的线性回归方程为 $y=0.1532x-0.0049$ ($r=0.9995$),Zn²⁺的线性回归方程为 $y=0.0497x+0.0056$ ($r=1.0000$)。加标回收率良好,均在95%以上。测定盛花期花瓣样品待测液的吸光

值,根据标准曲线计算待测液金属离子含量,进一步计算花瓣样品中 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 7 种金属离子含量。

1.2.2 转录组数据分析

1.2.2.1 总 RNA 提取及检测 使用 TIANGEN 植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取各时期花瓣样品的总 RNA,经质量体积分数 1%琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计(美国 ThermoFisher 公司)检测其质量、浓度和纯度。

1.2.2.2 转录组测序及拼接 委托深圳华大基因科技有限公司建立 cDNA 文库,将质量检测合格的 cDNA 使用 HiSeq™ 2000 测序平台(美国 Illumina 公司)测序,利用 SOAPnuke 软件将测序所得 raw read 过滤,去除冗余与质量低的序列,得到 clean read,利用 Trinity(v2.0.6)软件组装,再利用 TGICL 软件对转录本进行聚类去冗余,获得最终的 unigene。

1.2.2.3 Unigene 功能注释 通过 BLAST 软件将所得 unigene 与 GO、KOG、KEGG、SwissProt、NT 和 NR 数据库比对,预测 unigene 的氨基酸序列之后,利用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对,获得 unigene 的注释信息。

1.2.2.4 差异 unigene 分析 利用 RSEM(v1.2.8)软

件计算各样品中 unigene 的表达水平。用 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)值表示 unigene 的相对表达量,基于 27 个花瓣样品转录本的相对表达量,以 $|\log_2 FC|$ 大于等于 1、FDR 小于等于 0.05 为基准[FC 为差异倍数(fold change),FDR 为错误发现率(false discovery rate)],利用 DESeq2 软件检测任意 2 个阶段间的差异表达转录本,筛出差异 unigene,将差异 unigene 进行 GO 功能分类,同时利用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析,计算 p 值,然后对 p 值进行 FDR 校正,通常 Q 值(p 值的错误发现率)小于等于 0.05 的功能视为显著富集,对其进行 GO 富集分析。

1.2.2.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证 参照“1.2.2.1”提取和检测花瓣样品的总 RNA,逆转录参照 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit 试剂盒(北京擎科生物科技有限公司)说明书,qRT-PCR 以 *actin* (CL3969.Contig4_All) 为内参基因,利用 Primer Premier 6.0 软件设计引物,引物序列见表 2。实时荧光定量 PCR 反应体系参照 $2 \times T5$ Fast qPCR Mix (SYBR Green I)(北京擎科生物科技有限公司),使用 LightCycler®480 实时荧光定量 PCR 仪(上海土森视觉科技有限公司)扩增,qRT-PCR 程序为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 30 s、56 °C 退火 15 s、72 °C 延伸

表 2 用于实时荧光定量 PCR 的引物
Table 2 Primers for real-time fluorescent quantitative PCR

Unigene ID	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
CL9348.Contig7_All	TGGCAGCTGCAAATGGAGTA	GCTCCCGATGCCTTAGATCC
CL9381.Contig32_All	AAGGATTTGGTACTGCTGGCC	GCCAGAGCCACCCTTATTGT
Unigene13589_All	ACCGCCACCATGATGATTT	TGGTCTTCTAGACGGGAG
Unigene37626_All	CCATGACTAGCTCGGCATGT	GCTGTACGCCTACTACGACC
Unigene44886_All	CCAGCAGTGGTACCAGACTG	TTGAGAAAGGAGCCGGTCAC
Unigene64395_All	TCTTGCGGAACTCTCCAAC	CGGATCACAGGTACACCTCG
CL3969.Contig4_All	TCAGCCCCTCGTCTGTGATA	GCCCCATACCAACCATCACA

30 s,35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[16] 计算 unigene 的相对表达量。

1.3 数据处理和统计分析

利用 EXCEL 2019 软件整理和分析数据,利用 SPSS 26.0 统计分析软件对数据进行统计分析,利用 Origin 2020 和 TBtools 软件作图,其中,利用 TBtools 软件中的 HeatMap 程序绘制 unigene 表达热图,均一化后的相对表达量大于 0.5 表示差异 unigene 明显

表达。

2 结果和分析

2.1 盛花期绿绒蒿属 3 种植物花瓣中金属离子含量的比较

盛花期绿绒蒿属 3 种植物花瓣中金属离子含量见表 3。由表 3 可见:盛花期绿绒蒿属 3 种植物花瓣

的7种金属离子中均为K⁺含量最高,Cu²⁺含量最低。全缘叶绿绒蒿花瓣中7种金属离子含量均显著($P < 0.05$)高于红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿;红花绿绒蒿花瓣中Fe³⁺、Mg²⁺、K⁺、Mn²⁺和Zn²⁺含量显著低于川滇绿绒蒿,Ca²⁺和Cu²⁺含量显著高于川滇绿绒蒿。从绿绒蒿属3种植物花瓣中金属离子含量的差异倍数来看,

全缘叶绿绒蒿与红花绿绒蒿之间以及红花绿绒蒿与川滇绿绒蒿之间金属离子含量差异倍数较大的均为Fe³⁺、Mn²⁺和Zn²⁺,全缘叶绿绒蒿与川滇绿绒蒿之间金属离子含量差异倍数最大的为Fe³⁺,其次是Ca²⁺和Mg²⁺,说明Fe³⁺含量在绿绒蒿属不同种类间的差异均较大。

表3 盛花期绿绒蒿属3种植物花瓣中金属离子含量($\bar{X} \pm SD$)

Table 3 Contents of metal ions in petals of three species in *Meconopsis* Vig. ($\bar{X} \pm SD$)

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	各金属离子含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) ²⁾ Content of each metal ion ²⁾						
	Fe ³⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
Mi	4 877.6±70.3a	4 280.7±22.4a	4 931.8±47.5a	49 496.9±184.4a	846.8±6.0a	63.3±1.5a	1 569.5±7.4a
Mp	675.5±27.2c	1 029.2±2.2c	1 734.6±9.2b	21 231.2±141.5c	48.5±0.2c	32.5±0.6b	52.3±0.8c
Mw	1 161.4±54.7b	1 404.4±52.8b	1 316.1±32.5c	22 898.3±443.6b	325.8±1.3b	24.4±0.4c	662.4±12.5b

¹⁾ Mi: 全缘叶绿绒蒿 *M. integrifolia* (Maxim.) Franch.; Mp: 红花绿绒蒿 *M. punicea* Maxim.; Mw: 川滇绿绒蒿 *M. wilsonii* Grey-Wilson.

²⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) differences.

2.2 绿绒蒿属3种植物花瓣的转录组数据分析

2.2.1 转录组测序数据质量 对不同花期绿绒蒿属3种植物27个花瓣样品进行转录组测序,获得了1 297.10 Mb的raw read,过滤并筛选后得到1 175.19 Mb的clean read,平均每个花瓣样品获得43.53 Mb的clean read,各花瓣样品的Q20和Q30的平均值分别为97.51%和90.22%。共获得411 557个unigene,平均长度为1 949 bp,N50值为2 754 bp,GC含量为38.49%。

2.2.2 数据库功能注释 将获得的411 557个unigene进行注释,被GO、Pfam、KOG、KEGG、SwissProt、NT和NR 7大数据库注释到的unigene共318 657个,占unigene总数的77.4%。其中注释到GO数据库的unigene共171 730个,占unigene总数的41.7%。被注释的unigene分为3大类,包括生物过程、细胞组成和分子功能,分别有98 560、116 067和194 385个,分别占unigene总数的23.9%、28.2%和47.2%,其中,分子功能中注释unigene数超过10 000的二级分类有结合(87 710)、催化活性(84 496)和转运蛋白活性(10 010)。

2.3 绿绒蒿属3种植物花瓣中金属离子相关差异unigene的GO富集分析

绿绒蒿属3种植物花瓣中金属离子相关差异unigene的GO富集结果见表4。由表4可见:Fe³⁺和Fe²⁺以及Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺相关差异unigene分别富集于5、3、3、3、1、2和2条GO条目中,

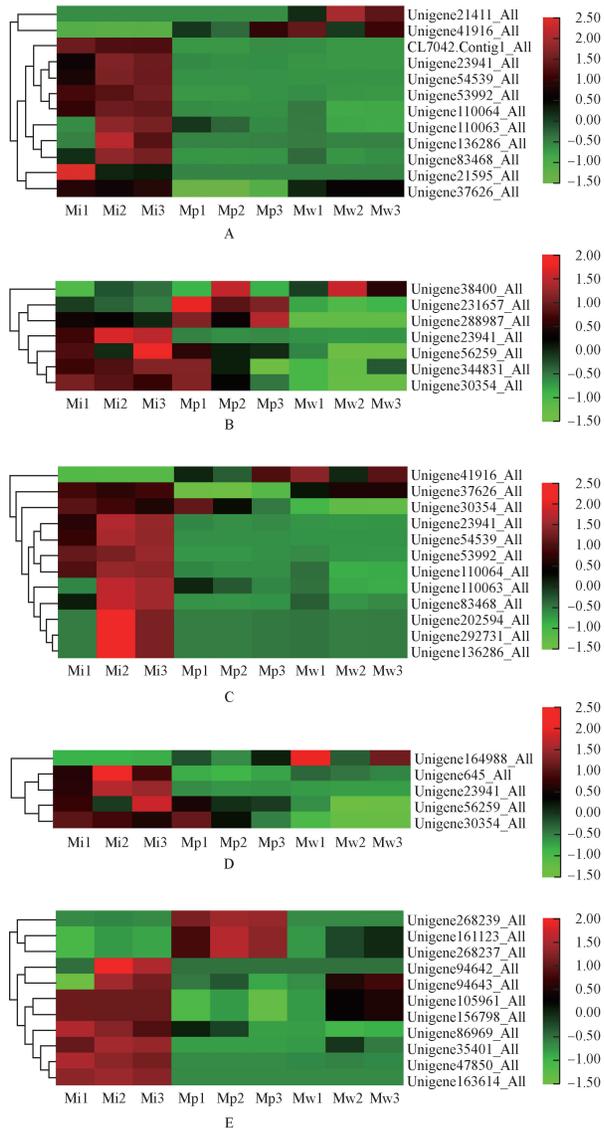
表4 绿绒蒿属3种植物花瓣中金属离子相关差异unigene的GO富集结果

Table 4 Result of GO enrichment of differential unigenes related to metal ions in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

金属离子 Metal ion	GO 条目 ID GO item ID	GO 条目 GO item	n ¹⁾
Fe ³⁺ , Fe ²⁺	GO:0008199	三价铁结合 Ferric iron binding	12
	GO:0008198	亚铁结合 Ferrous iron binding	7
	GO:0006826	铁离子转运 Iron ion transport	12
	GO:0006880	铁离子的细胞内整合 Intracellular sequestering of iron ion	5
	GO:0004325	亚铁螯合酶活性 Ferrocyclase activity	11
Mg ²⁺	GO:0000287	镁离子结合 Magnesium ion binding	14
	GO:0016851	镁螯合酶活性 Magnesium chelataase activity	8
	GO:0015693	镁离子转运 Magnesium ion transport	7
Ca ²⁺	GO:0005509	钙离子结合 Calcium ion binding	12
	GO:0051209	螯合钙离子释放到细胞溶质 Release of sequestered calcium ion into cytosol	3
	GO:0006874	细胞钙离子稳态 Cellular calcium ion homeostasis	11
K ⁺	GO:0030955	钾离子结合 Potassium ion binding	16
	GO:0055075	钾离子稳态 Potassium ion homeostasis	12
	GO:0006813	钾离子转运 Potassium ion transport	10
Mn ²⁺	GO:0030145	锰离子结合 Manganese ion binding	14
Cu ²⁺	GO:0005507	铜离子结合 Copper ion binding	14
	GO:0006825	铜离子转运 Copper ion transport	6
Zn ²⁺	GO:0008270	锌离子结合 Zinc ion binding	18
	GO:0010043	对锌离子的反应 Response to zinc ion	5

¹⁾ n: 差异unigene数量 Number of differential unigenes.

其中, Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 相关差异 unigene 富集的 GO 条目数量最多, 包括三价铁结合、亚铁结合、铁离子转运、铁离子的细胞内整合和亚铁螯合酶活性; 锌离子结合条



A: 三价铁结合 Ferric iron binding; B: 亚铁结合 Ferrous iron binding; C: 铁离子转运 Iron ion transport; D: 铁离子的细胞内整合 Intracellular sequestering of iron ion; E: 亚铁螯合酶活性 Ferrous iron chelation activity. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

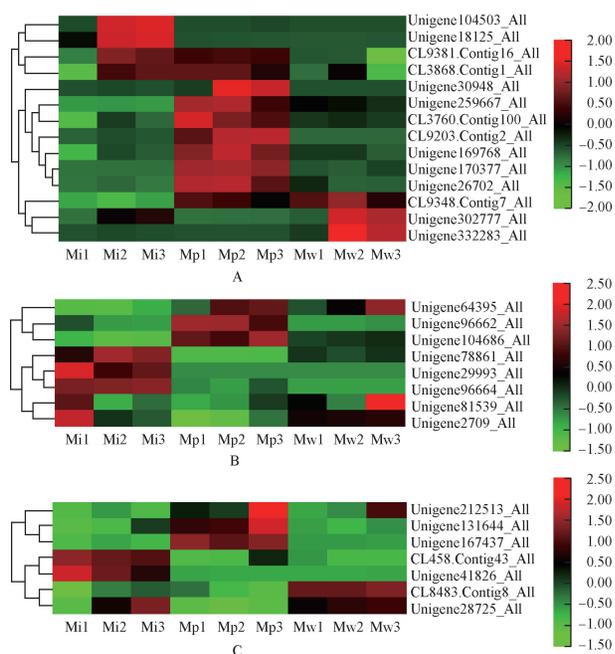
图2 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图

Fig. 2 Heat map of the expression of Fe^{3+} - and Fe^{2+} -related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

目中的差异 unigene 数量最多(18)。

2.3.1 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图见图 2。由图 2 可见: 全缘叶绿绒蒿花瓣中各条目明显表达的差异 unigene 数量均较多。三价铁结合条目中, 除 Unigene41916_All 外, 红花绿绒蒿花瓣中差异 unigene 的相对表达量较低; 川滇绿绒蒿花瓣中仅 Unigene21411_All 和 Unigene41916_All 明显表达。亚铁结合条目中, 红花绿绒蒿花瓣中仅 Unigene23941_All 在不同花期的相对表达量较低, 川滇绿绒蒿花瓣中仅 Unigene38400_All 在开裂期明显表达。铁离子转运条目中, 除 Unigene41916_All 外, 全缘叶绿绒蒿花瓣中差异 unigene 的相对表达量在开花过程中总体呈先升高后降低的趋势; 红花绿绒蒿花瓣中仅 Unigene41916_All 和 Unigene30354_All 有表达, 川滇绿绒蒿花瓣中仅 Unigene41916_All 和 Unigene37626_All 明显表达。铁离子的细胞内整合条目中, 红花绿绒蒿花瓣中 Unigene30354_All 在花蕾期明显表达, 川滇绿绒蒿花瓣中 Unigene164988_All 在花蕾期和盛花期明显表达。亚铁螯合酶活性条目中, 红花绿绒蒿花瓣中 Unigene268239_All、Unigene161123_All 和 Unigene268237_All 有明显表达, 且其相对表达量在开花过程中呈先升高后降低的趋势; 川滇绿绒蒿花瓣中除 Unigene94643_All、Unigene105961_All 和 Unigene156789_All 外, 其他差异 unigene 表达不明显。

2.3.2 Mg^{2+} 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Mg^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图见图 3。由图 3 可见: 镁离子结合条目中, 全缘叶绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 中, Unigene104503_All、Unigene18125_All 和 CL3868.Contig1_All 的相对表达量在开花过程中呈升高趋势; 红花绿绒蒿花瓣中差异 unigene 的相对表达量在开花过程中总体表现为先升高后降低; 川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 主要是 CL9348.Contig7_All、Unigene302777_All 和 Unigene332283_All, 其相对表达量在开花过程中也呈先升高后降低的趋势。镁螯合酶活性条目中, 全缘叶绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量较多; 而红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量较少, 其中, 红花绿绒蒿花瓣中 Unigene64395_All、Unigene96662_All 和 Unigene104686_All 明显表达, 川滇绿绒蒿花瓣中

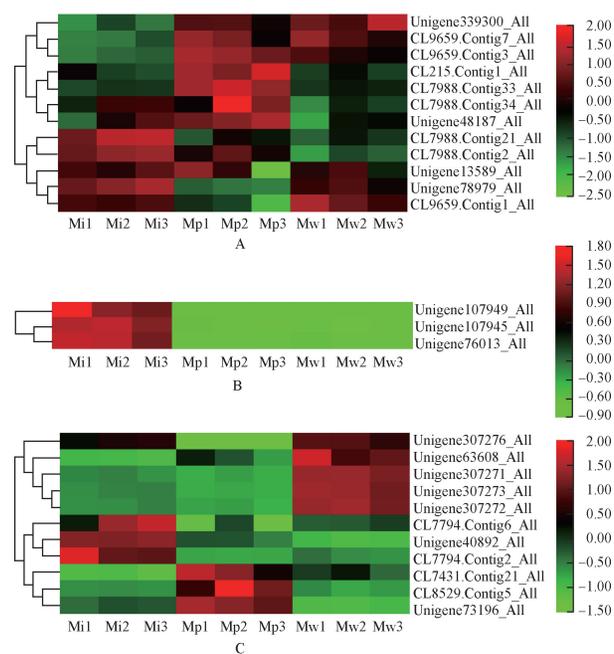


A: 镁离子结合 Magnesium ion binding; B: 镁螯合酶活性 Magnesium chelate activity; C: 镁离子转运 Magnesium ion transport. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 3 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Mg^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图
Fig. 3 Heat map of the expression of Mg^{2+} -related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

Unigene64395_All、Unigene81539_All 和 Unigene2709_All 明显表达。镁离子转运条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中 CL458. Contig43 _ All、Unigene41826 _ All 和 Unigene28725 _ All 明显表达,红花绿绒蒿花瓣中 Unigene212513 _ All、Unigene131644 _ All 和 Unigene167437 _ All 明显表达,川滇绿绒蒿花瓣中 Unigene212513 _ All、CL8483. Contig8 _ All 和 Unigene28725_All 明显表达。

2.3.3 Ca^{2+} 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Ca^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图见图 4。由图 4 可见:钙离子结合条目中,红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,其次为全缘叶绿绒蒿,而川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最少。螯合钙离子释放到细胞溶质条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中 Unigene107949_All、Unigene107945_All 和 Unigene76013_All 在开花过程中明显表达,红花绿

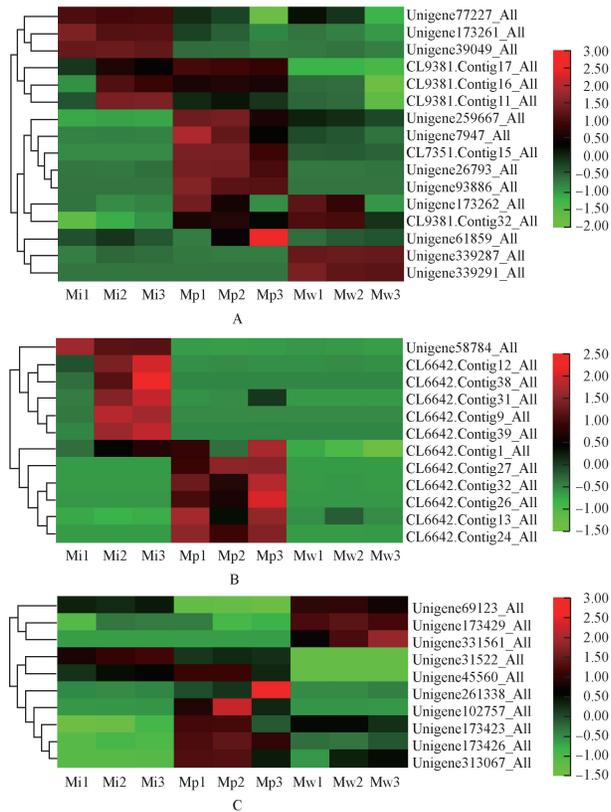


A: 钙离子结合 Calcium ion binding; B: 螯合钙离子释放到细胞溶质 Release of sequestered calcium ion into cytosol; C: 细胞钙离子稳态 Cellular calcium ion homeostasis. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 4 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Ca^{2+} 相关差异 unigene 的表达热图
Fig. 4 Heat map of the expression of Ca^{2+} -related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

绒蒿和川滇绿绒蒿花瓣中这 3 个差异 unigene 的相对表达量均较低。细胞钙离子稳态条目中,绿绒蒿属 3 种植物花瓣中明显表达的差异 unigene 差异较大,全缘叶绿绒蒿花瓣中 CL7794. Contig6 _ All、Unigene40892_All 和 CL7794. Contig2_All 明显表达,红花绿绒蒿花瓣中 CL7431. Contig21 _ All、CL8529. Contig5_All 和 Unigene73196_All 明显表达,川滇绿绒蒿花瓣中 Unigene307276 _ All、Unigene63608 _ All、Unigene307271 _ All、Unigene307273 _ All 和 Unigene307272_All 明显表达。

2.3.4 K^+ 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 K^+ 相关差异 unigene 的表达热图见图 5。由图 5 可见:钾离子结合条目中,红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多;其次为全缘叶绿绒蒿;川滇绿绒蒿仅 4 个差异 unigene 明显表达,其中 Unigene173262 _ All、CL9381. Contig32 _ All 和



A: 钾离子结合 Potassium ion binding; B: 钾离子稳态 Potassium ion homeostasis; C: 钾离子转运 Potassium ion transport. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 5 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 K⁺ 相关差异 unigene 的表达热图
Fig. 5 Heat map of the expression of K⁺-related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

Unigene339291_All 的相对表达量在开花过程中呈逐渐降低的趋势。钾离子稳态条目中,绿绒蒿属 3 种植物花瓣中明显表达的差异 unigene 差异较大,全缘叶绿绒蒿花瓣中 Unigene58784_All、CL6642.Contig12_All、CL6642.Contig38_All、CL6642.Contig31_All、CL6642.Contig9_All 和 CL6642.Contig39_All 在开裂期和盛花期明显表达,且除 Unigene58784_All 和 CL6642.Contig9_All 外,其他 4 个差异 unigene 的相对表达量在开花过程中呈逐渐升高的趋势;红花绿绒蒿花瓣中 CL6642.Contig1_All、CL6642.Contig27_All、CL6642.Contig32_All、CL6642.Contig26_All、CL6642.Contig13_All 和 CL6642.Contig24_All 明显表达,且除

CL6642.Contig27_All 外,其他 5 个差异 unigene 的相对表达量在开花过程中均呈先降低后升高的趋势;川滇绿绒蒿花瓣中无明显表达的差异 unigene。钾离子转运条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中差异 unigene 总体无明显表达(除 Unigene31522_All 外);红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,但其相对表达量在开花过程中的变化趋势存在差异;在开花过程中,川滇绿绒蒿花瓣中 Unigene69123_All 和 Unigene173429_All 的相对表达量呈先升高后降低的趋势,Unigene331561_All 的相对表达量呈逐渐升高的趋势。

2.3.5 Mn²⁺ 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Mn²⁺ 相关差异 unigene 的表达热图见图 6。由图 6 可见:锰离子结合条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中 Unigene336679_All、Unigene75693_All、Unigene66376_All 和 Unigene31339_All 明显表达,但其相对表达量在开花过程中的变化趋势不一致;红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量较多,且相对表达量在开花过程中总体呈降低趋势,如 Unigene257235_All 和 Unigene66186_All;川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,且在开花过程中,大部分差异 unigene 的相对表达量呈逐渐降低的趋势(如 Unigene66186_All 和 Unigene255534_All),少数差异 unigene 的相对表达量呈先升高后降低的趋势(如

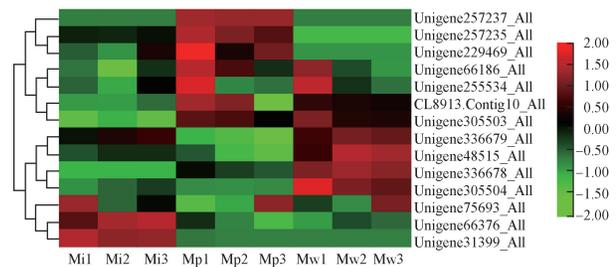
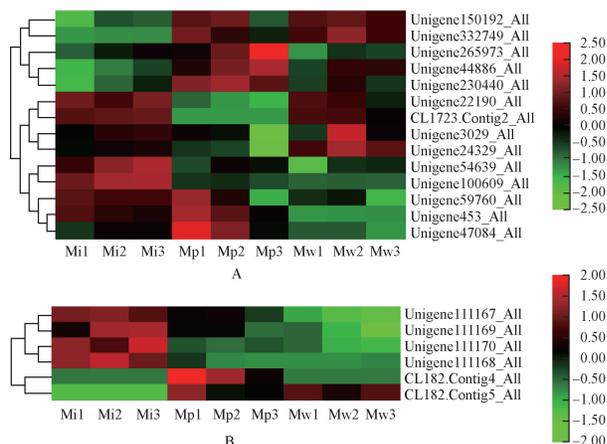


图 6 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Mn²⁺ 相关(锰离子结合)差异 unigene 的表达热图
Fig. 6 Heat map of the expression of Mn²⁺-related (manganese ion binding) differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

Unigene257235_All 和 Unigene66186_All;川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,且在开花过程中,大部分差异 unigene 的相对表达量呈逐渐降低的趋势(如 Unigene66186_All 和 Unigene255534_All),少数差异 unigene 的相对表达量呈先升高后降低的趋势(如

Unigene48515_All)。

2.3.6 Cu²⁺ 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Cu²⁺ 相关差异 unigene 的表达热图见图 7。由图 7 可见:铜离子结合条目中,绿绒蒿属 3 种植物花瓣均存在大量明显表达的差异 unigene,以全缘叶绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,且其中大部分差异 unigene 的相对表达量在开花过程中呈逐渐升高的趋势,如 CL1723.Contig2_All、Unigene3029_All 和 Unigene54639_All;红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 的相对表达量在开花过程中的变化趋势存在差异,部分差异 unigene 的相对表达量呈逐渐降低的趋势(如 Unigene332749_All、Unigene59760_All 和 Unigene453_All),部分差异 unigene 的相对表达量呈先升高后降低的趋势(如 Unigene150192_All 和 Unigene230440_All);川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 的相对表达量在开花过程中总体呈先升高后降低的趋势,如 Unigene332749_All、Unigene44886_All 和 Unigene24329_All。铜离子转运条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多(4),除

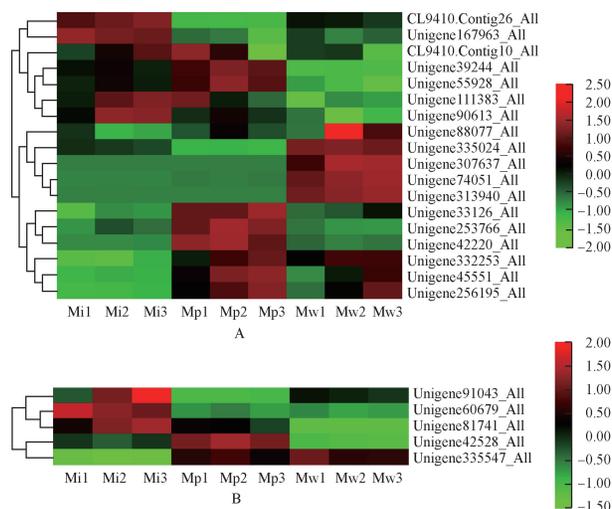


A: 铜离子结合 Copper ion binding; B: 铜离子转运 Copper ion transport. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 7 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Cu²⁺ 相关差异 unigene 的表达热图
Fig. 7 Heat map of the expression of Cu²⁺-related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

Unigene111170_All 外,其他 3 个差异 unigene 的相对表达量在开花过程中均呈先升高后降低的趋势;红花绿绒蒿花瓣中仅 CL182.Contig4_All 和 CL182.Contig5_All 明显表达,其相对表达量在开花过程中呈逐渐降低的趋势;川滇绿绒蒿仅 CL182.Contig5_All 明显表达,其相对表达量在开花过程中呈先降低后升高的趋势。

2.3.7 Zn²⁺ 相关 GO 富集条目 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Zn²⁺ 相关差异 unigene 的表达热图见图 8。由图 8 可见:锌离子结合条目中,全缘叶绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最少,其相对表达量在开花过程中的变化趋势差异较大;红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量最多,在开花过程中,Unigene39244_All、Unigene55928_All、Unigene253766_All 和 Unigene42220_All 的相对表达量呈先升高后降低的趋势,Unigene332253_All、Unigene45551_All 和 Unigene256195_All 的相对表达量呈逐渐升高的趋势,而 CL9410.Contig10_All 和 Unigene111383_All 的相对表达量呈逐渐降低的趋势;在开花过程中,川滇



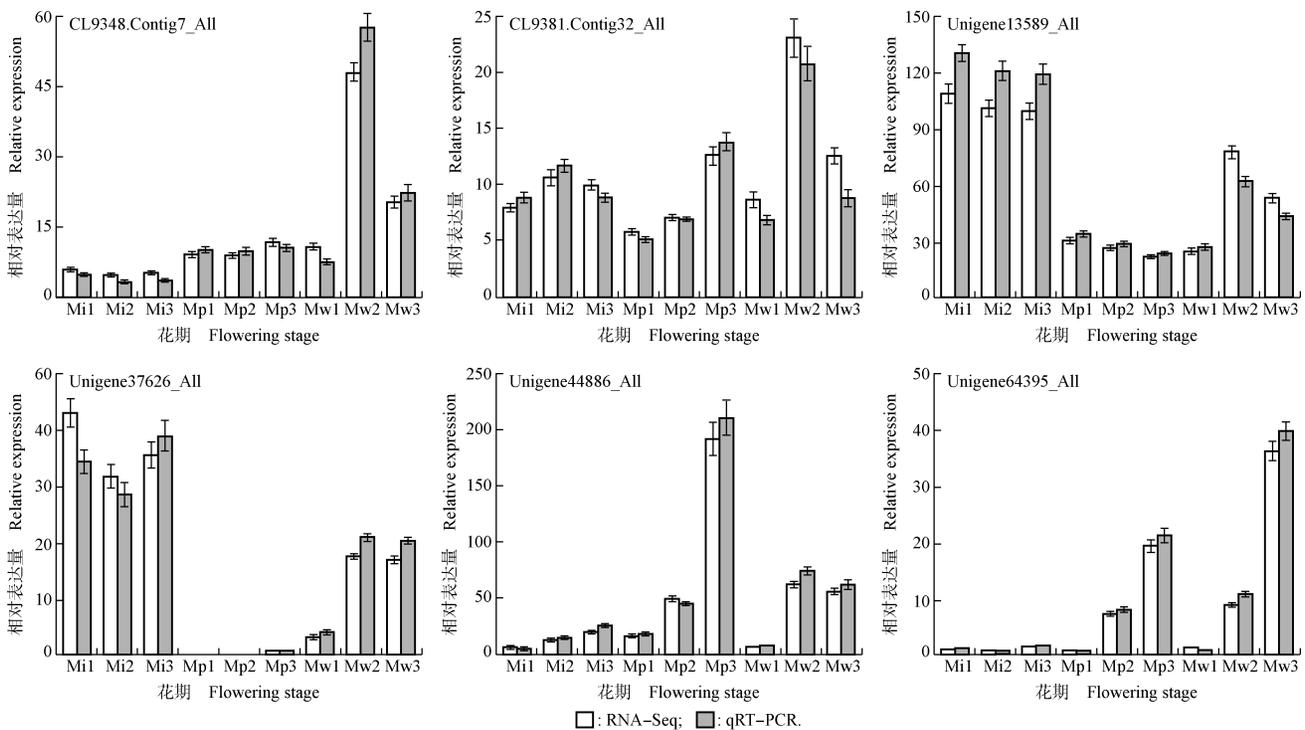
A: 锌离子结合 Zinc ion binding; B: 对锌离子的反应 Response to zinc ion. 图中标尺表示均一化后的相对表达量 The scale in the figure represents the relative expression after normalization. Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 8 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 Zn²⁺ 相关差异 unigenes 的表达热图
Fig. 8 Heat map of the expression of Zn²⁺-related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

绿绒蒿花瓣中 Unigene88077_All、Unigene335024_All、Unigene307637_All 和 Unigene332253_All 的相对表达量呈先升高后降低的趋势, Unigene74051_All、Unigene313940_All、Unigene45551_All 和 Unigene256195_All 的相对表达量呈逐渐升高的趋势。对锌离子的反应条目中, 全缘叶绿绒蒿花瓣中 Unigene91043_All、Unigene60679_All 和 Unigene81741_All 明显表达; 红花绿绒蒿花瓣中 Unigene42528_All 和 Unigene335547_All 明显表达; 川滇绿绒蒿花瓣中仅 Unigene335547_All 明显表达。

2.4 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中差异 unigene 的实时荧光定量 PCR 验证

从上述与绿绒蒿属 3 种植物花瓣中金属离子相关的差异 unigene 中, 随机挑选 6 个明显表达的差异 unigene 进行实时荧光定量 PCR 验证, 结果见图 9。由图 9 可见: 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中 6 个差异 unigene 的相对表达量在开花过程中的变化趋势与转录组数据基本一致, 说明转录组数据以及筛选出的与金属离子相关的差异 unigene 的表达具有较高的可靠性和准确性。



Mi1, Mi2, Mi3: 分别为全缘叶绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. integrifolia* (Maxim.) Franch., respectively; Mp1, Mp2, Mp3: 分别为红花绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. punicea* Maxim., respectively; Mw1, Mw2, Mw3: 分别为川滇绿绒蒿花蕾期、开裂期和盛花期 Bud stage, cracking stage, and blooming stage of *M. wilsonii* Grey-Wilson, respectively.

图 9 绿绒蒿属 3 种植物花瓣中金属离子相关的部分差异 unigene 的实时荧光定量 PCR 验证结果
Fig. 9 Verification results of real-time fluorescence quantitative PCR on some metal ion-related differential unigenes in petals of three species in *Meconopsis* Vig.

3 讨论和结论

花瓣中的金属离子含量对开花过程花瓣呈色有十分重要的影响, 是影响花色的主要因子之一。盛花期, 全缘叶绿绒蒿花瓣中 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 7 种金属离子含量均显著 ($P < 0.05$) 高于

红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿; 红花绿绒蒿花瓣中 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^+ 含量显著低于川滇绿绒蒿, Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 含量显著高于川滇绿绒蒿。菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 花色形成的表型研究表明: Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 和 Ca^{2+} 与菊花红色品种花瓣中的花青素共同作用对花瓣起到增色作用; 而菊花白色品种花瓣中以黄酮类化合物为主, 这 4 种金

属离子对其花瓣颜色无明显影响^[17]。本研究中,盛开期全缘叶绿绒蒿花瓣 Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 含量显著高于红花绿绒蒿和川滇绿绒蒿,且其花瓣富含黄酮类化合物^[18],并在 Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 相关 GO 富集条目中存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多,在 Mg^{2+} 相关 GO 富集条目中明显表达的差异 unigene 数量也较多,推测其花瓣中富含的 Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 与黄酮类化合物未共同作用,进而没有对花瓣起增色作用,说明 Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 并非黄色花形成的主要原因。红花绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量在亚铁结合和镁离子结合条目中较多,推测其花瓣中 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 与花青素共同作用对花瓣有增色作用,使其花瓣在开花过程中呈红色,并且红花绿绒蒿富集于亚铁螯合酶活性和镁螯合酶活性条目的差异 unigene 存在明显表达,可能 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 在花瓣中的螯合作用也影响其花色形成。对川滇绿绒蒿在 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 相关 GO 富集条目所富集的差异 unigene 整体分析,发现除三价铁结合条目外,川滇绿绒蒿花瓣中明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最少,镁离子结合条目上明显表达的差异 unigene 数量相对较多,如 CL9348. Contig7_All、Unigene302777_All 和 Unigene332283_All,且这 3 个差异 unigene 的相对表达量均呈现先升高后降低的趋势,与该种花瓣蓝紫色程度在开花过程先加深后变浅相吻合。已有研究表明:川滇绿绒蒿花瓣中矢车菊素可与 Fe^{3+} 形成蓝色复合物^[19],而在大花绿绒蒿的蓝色花瓣中影响花色形成的新型金属复合体色素是由 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 与黄酮醇、矢车菊素衍生物结合形成^[13],由此分析川滇绿绒蒿花瓣呈蓝紫色可能与 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 形成了金属复合物有一定的联系。

花色研究结果显示:白及 [*Bletilla striata* (Thunb. ex Murray) Rchb. f.] 花瓣中总花青素含量与 Zn^{2+} 含量呈显著正相关关系,而与 Mn^{2+} 含量则呈显著负相关关系^[20]。虽然全缘叶绿绒蒿花瓣中 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 含量最高,但 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 相关 GO 富集条目(对锌离子的反应条目除外)存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最少,分析该植物花瓣中 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 相关 unigene 的不明显表达可能影响了 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对花色的作用,这 2 种金属离子可能与全缘叶绿绒蒿花色无关;虽然红花绿绒蒿花瓣中 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 相关 GO 富集条目中明显表达的差异 unigene 较多,但其花瓣中 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 含量最低,推测红花绿绒

蒿花瓣中花青素的形成与 Mn^{2+} 有一定联系;川滇绿绒蒿花瓣中锌离子结合条目中存在明显表达的差异 unigene,但是对锌离子的反应条目仅 Unigene335547_All 明显表达,而 Mn^{2+} 相关 GO 富集条目中明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多,推测与 Zn^{2+} 相比较其花瓣颜色更受 Mn^{2+} 影响。

有关‘芙蓉李’(*Prunus salicina* ‘Furong’) 花色苷稳定性的研究结果表明:高含量 K^+ 有助于花色苷构型稳固^[21]。高赛等^[22]研究了长春花 [*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don] 的花色,认为随着 Ca^{2+} 含量的升高,花瓣的亮度逐渐升高,而红度降低,花色呈现变浅的趋势。赵雨滕等^[23]通过水培试验测定不同 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 含量下翅碱蓬 [*Suaeda salsa* (Linn.) Pall.] 的花青素和叶绿素含量,认为低含量 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 能够促进翅碱蓬花青素和叶绿素的合成及植株生长。李慧波^[24]认为,大量 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 与花色素(矢车菊素与飞燕草素的含量比为 10 : 1) 形成的螯合物可能是紫露草 (*Tradescantia ohiensis* Raf.) 花瓣呈蓝紫色的主要原因。全缘叶绿绒蒿花瓣中 Ca^{2+} 含量最高, Ca^{2+} 相关 GO 富集条目中钙离子结合和细胞钙离子稳态条目存在的明显表达差异 unigene 数量仅次于红花绿绒蒿,螯合钙离子释放到细胞溶质条目中仅全缘叶绿绒蒿花瓣中的差异 unigene 明显表达;该种类花瓣在 Cu^{2+} 相关 GO 富集条目中存在明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多,其中铜离子结合条目中明显表达的差异 unigene 主要呈逐渐升高的趋势,与开花过程中黄色花瓣颜色的加深相对应。结合高赛等^[22]的研究结果,全缘叶绿绒蒿花瓣中 Ca^{2+} 含量最高,其花瓣呈亮度较高的黄色,推测其花色形成与花瓣中 Ca^{2+} 含量相关,全缘叶绿绒蒿花瓣颜色可能受 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 及相关 GO 富集条目中差异 unigene 明显表达的影响。红花绿绒蒿花瓣在钙离子结合条目中明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属 3 种植物中最多,但螯合钙离子释放到细胞溶质条目中无明显表达的差异 unigene;其花瓣中 Ca^{2+} 含量仅次于全缘叶绿绒蒿,但其花瓣呈鲜艳的红色,推测花瓣中 Ca^{2+} 与其花色形成无关; K^+ 相关 GO 富集条目中,红花绿绒蒿花瓣明显表达的差异 unigene 数量除钾离子稳态条目仅次于全缘叶绿绒蒿外,其余条目均为最高;而该花瓣在铜离子结合条目有较多数量明显表达的差异 unigene,铜离子转运条目中 2 个差异 unigene 也存在表达,这些 unigene 相对表达量总体在

开花过程中随花期表现为持续降低,与花瓣的红色程度在开花过程中变浅相吻合,由此推测红花绿绒蒿的花色形成与 K^+ 和 Cu^{2+} 相关差异 unigene 的表达有密切联系。川滇绿绒蒿花瓣中 Ca^{2+} 含量最低,且其螯合钙离子释放到细胞溶质条目中无明显表达的差异 unigene,结合李慧波^[24]的研究结果,分析该花瓣呈蓝紫色未受到 Ca^{2+} 影响;川滇绿绒蒿花瓣在 K^+ 相关 GO 富集条目上明显表达的差异 unigene 数量在供试绿绒蒿属3种植物中均最少,故推测 K^+ 不是影响蓝紫色花形成的关键金属离子;该植物花瓣在铜离子结合条目中存在较多明显表达的差异 unigene,且其相对表达量总体在开花过程中呈先升高后降低的趋势,与川滇绿绒蒿蓝紫色花瓣在开花过程中呈先加深后变浅的变化相对应,而在供试绿绒蒿属3种植物中川滇绿绒蒿花瓣中 Cu^{2+} 含量最低,低含量 Cu^{2+} 又会促进花青素的合成,由此推测蓝紫色花的形成与低含量的 Cu^{2+} 及其相关差异 unigene 的表达有关。

绿绒蒿属不同种类开花过程中的花色存在明显差异,本研究从生理和分子2个方面联合探究了7种金属离子与花瓣呈色的关系,认为各金属离子及其相关的差异 unigene 对花色的形成具有不同程度的调控,尤其是 Fe^{3+} 和 Mg^{2+} 。目前对花色在分子层面的研究已经越来越受到重视,但更多的还是停留于KEGG通路及相关花色素合成的基因,金属离子方面还存在大量空白,需要进一步探究,进而为花色调控机制提供更全面的理论依据,推进植物花色调控的研究进程。

参考文献:

- [1] GREY-WILSON C, RANKIN D W H, WU Z K. 700. *Meconopsis wilsonii* subsp. *orientalis* [J]. Curtis's Botanical Magazine, 2011, 28 (1): 32-46.
- [2] 陈丽琦, 严朋飞, 贾维嘉, 等. 威氏绿绒蒿 (*Meconopsis wilsonii*) 花色相关基因 *MwF3H* 的克隆及表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(4): 854-861.
- [3] 钟 涛, 段旭宇, 姜银银, 等. 全缘叶绿绒蒿的花内热量来源和温度调节功能 [J]. 广西植物, 2020, 40(9): 1315-1322.
- [4] 陈红刚, 赵文龙, 晋 玲, 等. 红花绿绒蒿种子休眠及破除方法研究 [J]. 草地学报, 2021, 29(2): 402-406.
- [5] 严朋飞, 张莹欣, 贾维嘉, 等. 威氏绿绒蒿 *MwF3'H* 基因克隆与表达分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 6382-6387.
- [6] 翟宇慧, 吕嘉琪, 李 想, 等. 欧洲报春细胞液 pH 对花色形成的作用机理初探 [J]. 园艺学报, 2020, 47(3): 477-491.
- [7] 殷涵泰, 尹俊梅, 廖 易, 等. 基于秋石斛花朵颜色、色素分布及表皮细胞形态的表型分类 [J]. 园艺学报, 2021, 48(10): 1907-1920.
- [8] 张志博, 李安文, 李 勤, 等. 越橘花色苷稳定性研究 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(19): 5-8.
- [9] 姜丽娜, 李纪元, 童 冉, 等. 金花茶组植物花色与细胞内重要环境因子的关系 [J]. 广西植物, 2019, 39(12): 1605-1612.
- [10] SHOJI K, MIKI N, NAKAJIMA N, et al. Perianth bottom-specific blue color development in *Tulip* cv. *Murasakizuisho* requires ferric ions [J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(2): 243-251.
- [11] 高 宇, 刘怡菲, 苏宏伟, 等. 软枣猕猴桃花青素加工稳定性研究 [J]. 辽宁林业科技, 2019(3): 17-19, 78.
- [12] MILLER R, OWENS S J, RØRSLETT B. Plants and colour: flowers and pollination [J]. Optics and Laser Technology, 2011, 43: 282-294.
- [13] YOSHIDA K, KITAHARA S, ITO D, et al. Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(10): 992-998.
- [14] SHOJI K, MOMONOI K, TSUJI T. Alternative expression of vacuolar iron transporter and ferritin genes leads to blue/purple coloration of flowers in *Tulip* cv. 'Murasakizuisho' [J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(2): 215-224.
- [15] 黄 奇, 郭佳炜, 汪 琼, 等. 四种不同花色滇水金凤中金属元素含量测定与分析 [J]. 黑龙江农业科学, 2019(1): 86-89.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 白新祥. 菊花花色形成的表型分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2007: 71-78.
- [18] QU Y, OU Z, WANG S. Coloration differences in three *Meconopsis* species: *M. punicea*, *M. integrifolia* and *M. wilsonii* [J]. South African Journal of Botany, 2022, 150: 171-177.
- [19] 李瀚纯, 张大生, 刘青青, 等. 观赏植物蓝色花形成的机制 [J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(2): 155-162.
- [20] XIE C Z, HU C, DENG X Y, et al. Relationship between flower color and cellular physicochemical factors in *Bletilla striata* [J]. Horticulturae, 2023, 9(4): 426.
- [21] 周丹蓉, 林炎娟, 方智振, 等. 理化因子对'芙蓉李'花色苷稳定性的影响 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(2): 275-280.
- [22] 高 赛, 刘 佳, 唐玉情, 等. 长春花不同花色品种呈色的关键理化性质分析 [J]. 经济林研究, 2022, 40(1): 214-227.
- [23] 赵雨朦, 魏海峰, 李 悦, 等. Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对翅碱蓬生长的影响研究 [J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(10): 7-13.
- [24] 李慧波. 影响单子叶植物蓝色花蓝色形成主要因子的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013: 24-25.

(责任编辑: 张明霞)