

基于代谢组学分析云南滇红和墨红玫瑰花色差异^{*}

施蕊¹, 钱晓慧¹, 栾云鹏¹, 陈黎², 陈龙清^{1△}

(1. 西南林业大学园林园艺学院, 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;
2. 大理花之隐农业发展有限公司, 云南 大理 671003)

摘要: 以云南滇红(ZY)玫瑰与墨红玫瑰(DH)为研究对象, 基于超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测平台, 利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据, 以数据库和多元统计分析相结合, 研究滇红和墨红玫瑰的代谢特征。从中共检测到 174 种类黄酮代谢物, 主要有黄酮类 67 种(39%), 黄酮醇类 37 种(21%)。最后, 利用 KEGG 数据(Kanehisa et al. 2000) 分析发现差异代谢物显著富集在黄酮和黄酮醇的生物合成和类黄酮的生物合成途径中, 其中类黄酮生物合成途径中(-)-表没食子儿茶素、牡荆素、山奈酚、木犀草素、松黄烷酮、芹菜素显著上调; 五羟黄酮和(-)-表阿夫儿茶精显著下调; 黄酮和黄酮醇生物合成途径中牡荆素、丁香亭、山奈酚、木犀草素、牡荆素-2-O-鼠李糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素、金圣草黄素、金合欢素显著上调, 这些不同的代谢产物和相应的代谢途径调节了滇红和墨红玫瑰颜色的差异。通过代谢组学检测方法探讨了两种食用玫瑰中黄酮类代谢组的差异, 揭示玫瑰色差异的原因, 可为玫瑰花色的进一步开发和食品利用提供参考。

关键词: 玫瑰; 类黄酮代谢组; 多元统计分析

中图分类号: S685.12

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)02-0018-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.02.004

Metabolomics Reveals the Causes of Different Flower Colors about Yunnan Roses

SHI Rui¹, QIAN Xiaohui¹, LUAN Yunpeng¹, CHEN Li², CHEN Longqing¹

(1. Functional Flower Resources of Yunnan Province and Engineering Research Center of Industrial Technology, Horticulture and Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;
2. Dali Huayin Agriculture Development Company Limited, Dali 671003, China)

ABSTRACT: Based on UPLC-MS/MS detection platform, software Analyst 1.6.3 was used to process mass spectrum data, and combined database and multivariate statistical analysis was used to study the metabolic characteristics of Rosa L. 'Crimson Glory' (DH) and *R. gallica* L. 'Dianhong' (ZY). A total of 174 flavonoids metabolites were detected, including 67 flavonoids (39%) and 37 flavonols (21%). Finally, KEGG data (Kanehisa et al. 2000) were used to analyze and find that differential metabolites were significantly enriched in the biosynthesis of flavonoids and flavonols, flavonoid biosynthesis metabolites. In the flavonoid biosynthesis pathway, the (-)-epigallocatechin, viciin, kaempferol, luteolin, pine flavanone and apigenin were significantly up-regulated. Pentahydroxy flavone and (-)-Epiafzelechin was significantly down-regulated. In the biosynthetic pathway of flavonoids and flavonols, viciin, eugenol, luteolin, Vindicin -2-o-rhamnoside, luteolin -7-o-glucoside, apigenin and golden sainfoin, Acacetin were significantly up-regulated. These different metabolites and corresponding metabolic pathways regulated the difference in the color of DH and ZY. Through metabonomics method discussed the differences of two edible roses in flavonoids metabolic group, reveal the reason of the different color of rose, for the further development of roses colors and the food we provide reference.

KEY WORDS: rose; flavonoid metabolomes; multivariate statistical analysis

收稿日期: 2020-03-02

^{*} 基金项目: 云南省千人计划高端外国专家专项资助(000019); 云南省教育厅科学研究基金项目(2019Y0147); 2020 年省级财政林业科技推广示范专项(2020)ts09 号

第一作者简介: 施蕊(1982-), 女, 博士, 副教授, 主要从事天然药物化学研究。

△通信作者: 陈龙清, E-mail: chenlq@swfu.edu.cn

近年来,大多数人对植物的次生代谢产物进行了研究^[1-3]。黄酮类化合物作为最大的次级代谢产物,有着重要的生物学功能,在植物的花瓣中可以产生大量的次生代谢产物,这不仅为花朵提供各种颜色和香味,促进受粉完成繁殖,还成为植物代谢组学中研究的理想模型系统^[4]。中国的玫瑰品种很多,如苦水玫瑰^[5]、中国玫瑰、墨红^[6]等,但是大部分可以食用的是重瓣玫瑰。因为单瓣玫瑰中单宁酸含量是重瓣玫瑰得几十倍以上,多吃不宜。以前研究发现,滇红和墨红花色不同,口感也稍有不同,种植方式、生长周期与环境适应性也不同,但尚未研究两种玫瑰花瓣中所含的黄酮类物质的组成、含量,以及黄酮类物质的代谢途径有何差异。

墨红 *Rosa* L. ‘Crimson Glory’ 和滇红 *R. gallica* L. ‘Dianhong’ 属于云南主栽的可食用重瓣玫瑰^[7]。它们花瓣数多,而且层厚,可用来制茶,做酱汁,酿葡萄酒等^[8],也适合提取其色素以及糖类、蛋白质、微量元素等营养成分^[9]。滇红和墨红花瓣的颜色是分别为紫色和红色,植物的花色主要由3种类型的物质决定:类黄酮,类胡萝卜素和生物碱^[10]。黄酮类化合物是苯丙烷类化合物的次生代谢产物,可使花朵呈现粉红色、红色、蓝色、紫色和黄色^[11]。类胡萝卜素的颜色范围较广,是形成黄色、橙色至红色花的主要色素物质^[12]。对整个植物代谢组的更全面了解将有助于理解不同花色植物中的色素化学及其相关的生物合成途径^[13]。黄酮具有清除羟基自由基,超氧阴离子自由基和脂质过氧自由基的能力,这表明许多黄酮具有促进人体健康的功能^[14]。但是,并非所有的类黄酮及其作用都是有益的。一些类黄酮具有诱变和促氧化剂作用,并会干扰基本的生化途径^[15]。因此,采用代谢组学检测方法探讨了两种食用玫瑰中黄酮类代谢组的差异,揭示玫瑰色差异的原因,为玫瑰花色的进一步开发和食品利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料 供试材料墨红(DH)和滇红(ZY)玫瑰采自云南省大理白族自治州(N25°44′14″,E100°9′50″),海拔1 970 m,见图1。

甲醇(Merck)、乙腈(Merck)、乙醇(Merck)为色谱纯。

研磨仪(MM 400,Retsch);微孔滤膜(0.22 μm

pore size);色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (1.8 μm,2.1 mm×100 mm);超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography,UPLC);串联质谱(Tandem mass spectrometry,MS/MS)。



注:图片上编号 ZY 代表滇红玫瑰,DH 代表墨红玫瑰

图1 DH 和 ZY 玫瑰表型性状图

1.2 试验方法

1.2.1 样品提取 花瓣先真空冷冻干燥,再利用研磨仪研磨(30 Hz,1.5 min)至粉末状后称取100 mg的粉末,溶解于1.0 mL提取液(70%的甲醇水溶液)中;溶解后的样品4℃冰箱过夜,期间涡旋3次,提高提取率;离心(转速10 000 g,10 min)后,吸取上清,用微孔滤膜过滤样品,并保存于进样瓶中,用于LC-MS/MS分析。

1.2.2 样品测定 液相条件主要为流动相:水相为超纯水(加入0.04%的乙酸),有机相为乙腈(加入0.04%的乙酸);洗脱梯度:0 min 水/乙腈(95:5 V/V),11.0 min 为5:95 V/V,12.0 min 为5:95 V/V,12.1 min 为95:5 V/V,15.0 min 为95:5 V/V;流速0.4 mL/min;柱温40℃;进样量5 μL;质谱条件主要为:电喷雾离子源(electrospray ionization,ESI)温度550℃,质谱电压5 500 V,帘气(curtain gas,CUR)25 psi。

1.3 数据分析 基于UPLC-MS/MS检测平台,利用软件Analyst 1.6.3处理质谱数据,数据库和多元统计分析相结合,研究两个品种之间的代谢组差异。

2 结果与分析

2.1 类黄酮代谢产物的定性和定量分析 对滇红(ZY)和墨红(DH)玫瑰花瓣进行类黄酮代谢组检测,2组样本中共检测到174种黄酮类代谢产物。包括67种黄酮类、37种黄酮醇类、11种黄烷酮类(二氢黄酮类)、14种花青素类、3种异黄酮类、12种黄烷醇

类、7 种黄酮碳糖苷类,14 种原花青素类,2 种查耳酮类,4 种二氢黄酮醇类,3 种鞣质类。

2.2 主成分分析 主成分分析(PCA)是一种多元统计分析工具,可以利用更少的主成分以显示多个变量之间的内在与结构^[16]。PCA 结果显示 3 组之间黄酮

类代谢物呈分离趋势,组间呈聚集状。在图 2 中 3 个主要成分 PC1,PC2 和 PC3 分别为 83.79%,7.55%和 4.96%。结果表明,不同处理样品之间存在明显差异,组内稳定性良好。进而说明不同颜色的玫瑰中黄酮类化合物的积累方式也不同。

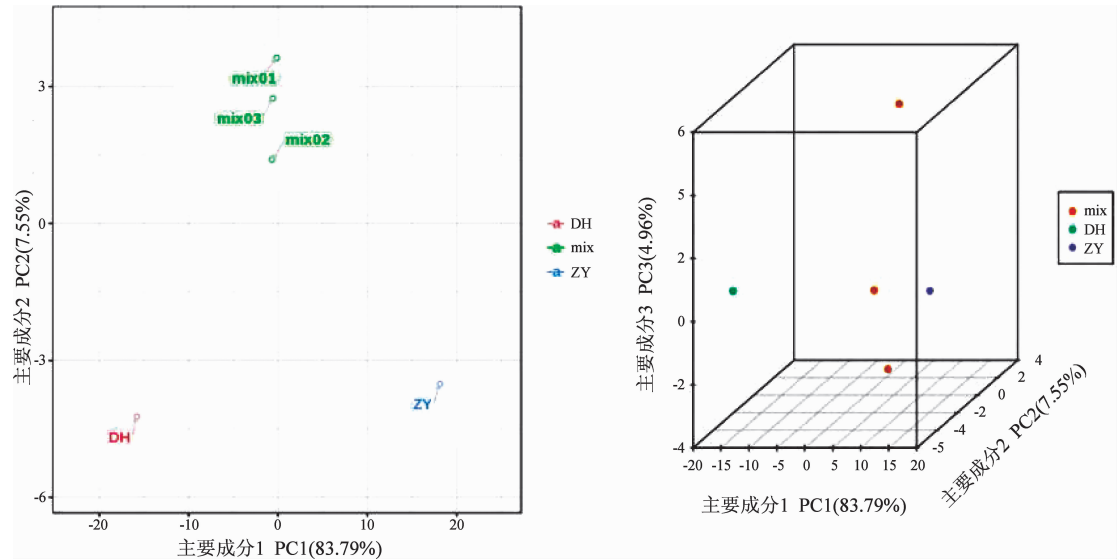


图 2 各组样本与质控样本质谱数据的二维和三维主成分分析

2.3 聚类相关性分析 聚类图显示,两个品种之间的类黄酮积累模式存在显著差异(图 3)。DH(墨红),mix01(滇红和墨红混样 01),mix02(滇红和墨红混样 02)和 mix03(滇红和墨红混样 03)分组为一个群集,ZY(滇红)分组为另一群集(图 4)。

2.4 差异代谢物筛选及分析 差异代谢物筛选标准为 $VIP \geq 1$ 且 $FC \geq 2$ 和 $FC \leq 0.5$ 。与对照相比,滇红(ZY)产生的显著差异代谢物共 96 种,其中上调差异代谢物 73 种,主要为黄酮醇类和黄酮类,其中异黄酮类、黄酮碳糖苷和鞣质这 3 类只参与上调(图 5)。下

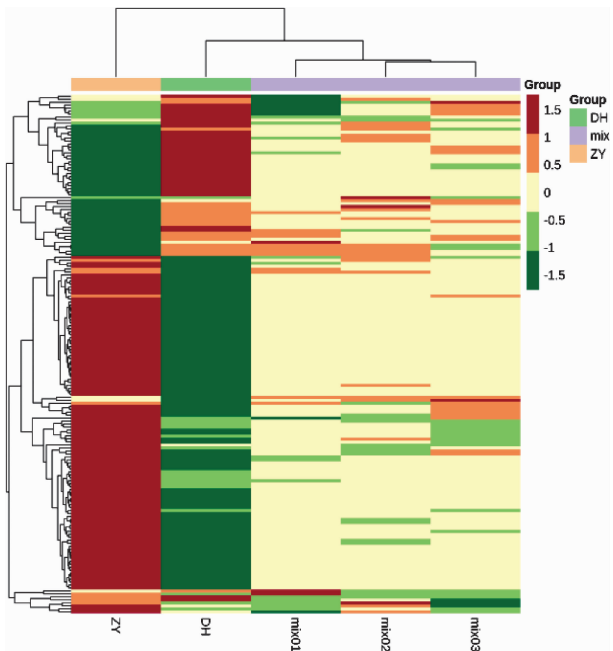


图 3 不同样品中类黄酮的聚类图

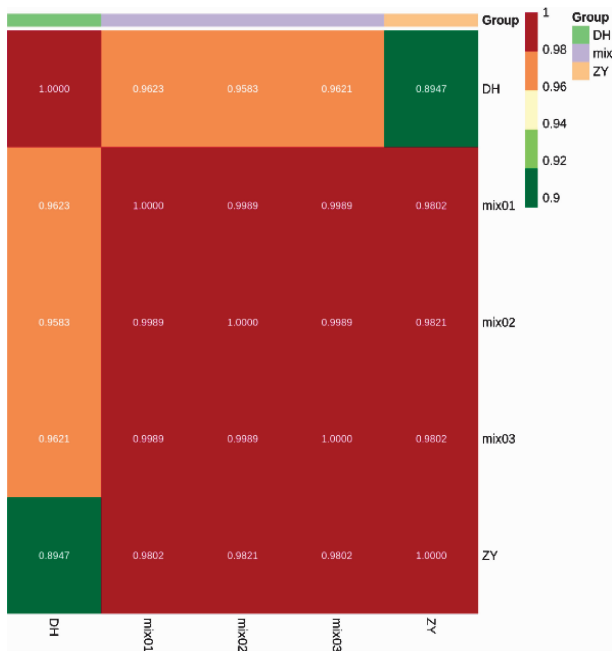


图 4 样品之间的相关性

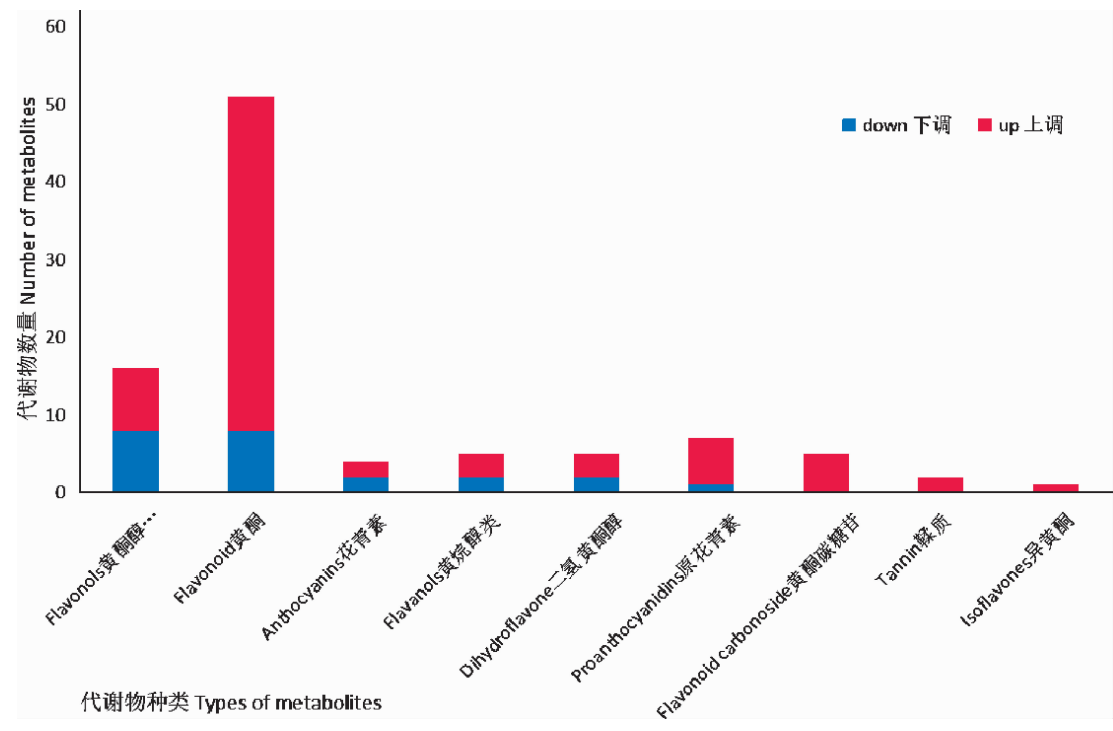


图 5 滇红(ZY)和墨红(DH)玫瑰相比差异代谢物种类及数量

调差异代谢物 23 种, 主要为黄酮醇类和黄酮类。如图 6, 筛选出 DH 与 ZY 先相比差异倍数较大的代谢物, 上调的前 10 依次分别为山奈酚-O-乙酰葡萄糖、二氢异鼠李素-O-戊糖苷、木犀草素-7-葡萄糖醛酸苷、金圣草黄素、异泽兰黄素葡萄糖苷、杨梅黄酮 3- α -L-阿拉伯呋喃糖苷、5,7,4',5'-四羟基-3',6-二甲氧基黄酮、鹰嘴豆素 7-O-葡萄糖苷(印度黄檀苷)、芹菜素、槲皮素(金合欢素-7-O- β -D-葡萄糖苷); 下调的前 10 依次分别为原花青素 A3、木犀草素 O-芥子酰己糖苷、金圣草黄素 5-O-己糖苷、3-O-(5-葡萄糖基-3-羟基-3-甲基谷氨酸)-葡萄糖、(-)-表阿夫儿茶精、山奈酚-O-戊糖苷、乙酰己糖苷异鼠李素、没食子酸 O-阿魏酰己糖苷-O-己糖苷、异鼠李素 O-乙酰己糖苷。

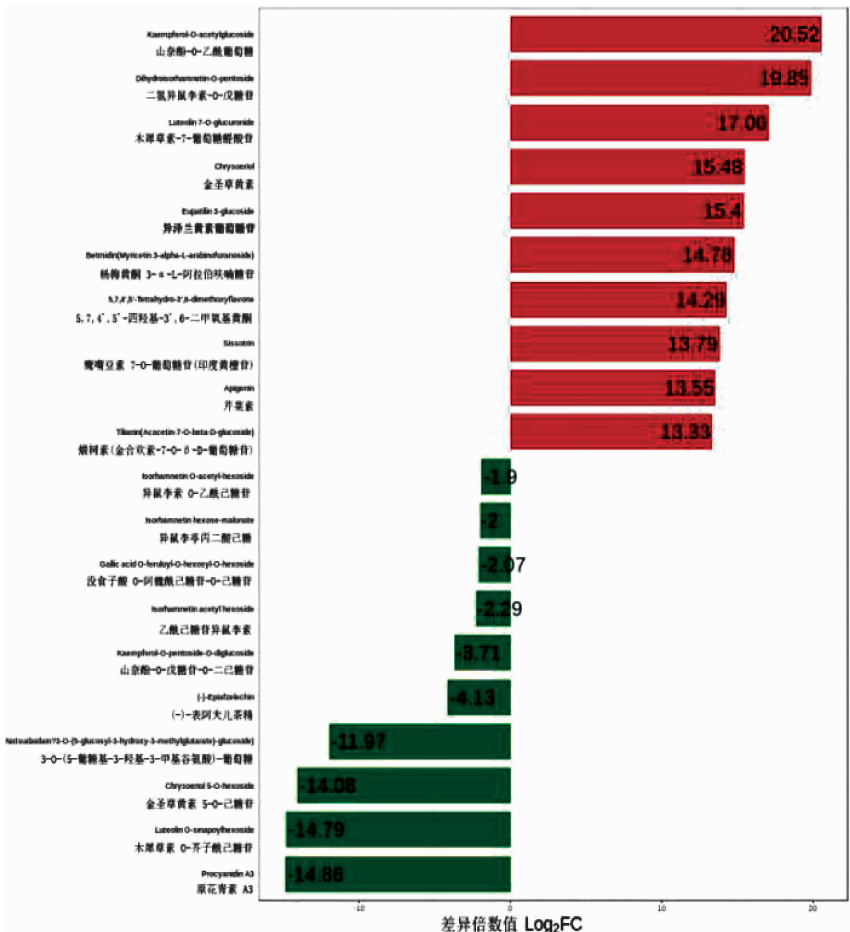


图 6 ZY 与 DH 相比差异倍数大的前 20 种代谢物

2.5 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析 利用 KEGG 数据^[17]进行分析发现,差异代谢物不止参与 1 条代谢通路,有可能 2 条甚至多条代谢通路。(–)–表没食子儿茶素参与了类黄酮生物合成和次生代谢产物的生物合成 2 条代谢途径;牡荆素参与了类黄酮生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成两条代谢途径;金合欢素参与了黄酮和黄酮醇生物合成 1 条代谢途径;氯化天竺葵色素苷参与了花青素的生物合成 1 条代谢途径;李属异黄酮(樱黄素)参与了异黄酮的生物合成 1 条代谢途径;五羟黄酮参与了类黄酮生物合成 1 条代谢途径;丁香亭参与了黄酮和黄酮醇生物合成 1 条代谢途径;山奈酚参与了类黄酮生物合成、次生代谢产物的生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、花青素的生物合成、异黄酮的生物合成、苯丙烷的生物合成、代谢途径 5 条代谢途径;(–)–表阿夫儿茶精参与了类黄酮生物合成、次生代谢产物的生物合成 2 条代谢途径;木犀草素参与了类黄酮生物合成、次生代谢产物的生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、代谢途径 4 条代谢途径;牡荆素-2-O-鼠李糖苷参与了黄酮和黄酮醇生物合成 1 条代谢途径;鹰嘴豆素 7-O-葡萄糖苷(印度黄檀苷)参与了异黄酮的生物合成 1 条代谢途径;木犀草素-7-葡萄糖醛酸苷参与了黄酮和黄酮醇生物合成 1 条代谢途径;五没食子酰葡萄糖参与了苯丙烷的生物合成一条代谢途径;松黄烷酮参与了类黄酮生物合成 1 条代谢途径;芹菜素参与了类黄酮生物

合成、次生代谢产物的生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、异黄酮的生物合成、苯丙烷的生物合成、代谢途径 6 条代谢途径;金圣草黄素参与了黄酮和黄酮醇生物合成 1 条代谢途径。

这些差异代谢物及相应的代谢途径调控了云南滇红和墨红玫瑰颜色的差异。参与差异代谢物调节的代谢通路共有 7 条,分别是类黄酮生物合成、次生代谢产物的生物合成、黄酮和黄酮醇生物合成、花青素的生物合成、异黄酮的生物合成、苯丙烷的生物合成、代谢途径。利用 KEGG 数据进行分析发现差异代谢物显著富集在黄酮和黄酮醇生物合成,类黄酮生物合成和次生代谢产物的生物合成(图 7)。其中注释到黄酮和黄酮醇生物合成下的代谢物个数占被注释上的代谢物总数比例最大,其次为类黄酮生物合成和次生代谢产物的生物合成(图 8)。

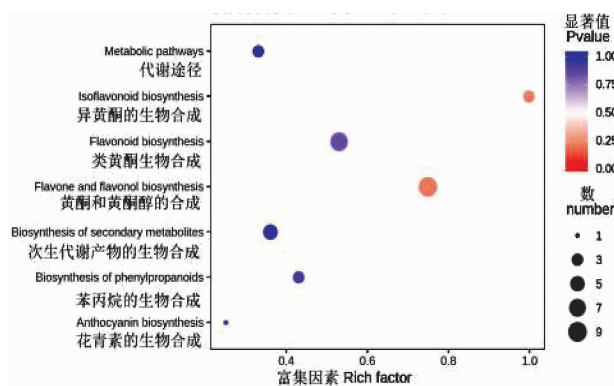


图 7 KEGG 富集统计图

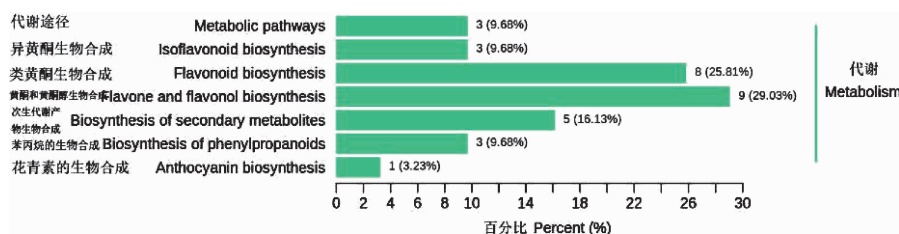


图 8 KEGG 分类

获得以上结果后进一步将差异代谢物在 KEGG 图上标注,类黄酮生物合成途径中(–)–表没食子儿茶素、牡荆素、山奈酚、木犀草素、松黄烷酮、芹菜素显著上调;五羟黄酮和(–)–表阿夫儿茶精显著下调(图 9)。黄酮和黄酮醇生物合成途径中牡荆素、丁香亭、山奈酚、木犀草素、牡荆素-2-O-鼠李糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素、金圣草黄素、金合欢素显著上调。这些不同的代谢产物和相应的代谢途径

调节滇红和墨红玫瑰颜色的差异(图 10)。

3 讨论与结论

墨红和滇红含有 174 种类黄酮代谢物,黄酮类化合物大部分具有不同作用。异黄酮代谢性地来自黄烷酮,同时异黄酮是参与植物抗毒素生物合成的许多重要化合物的前体^[18]。原花青素不仅对蛋白质代谢具有有益的作用,还能改善动物健康,并以可持续的方式改善农业^[19],它也可用于食品工业,例如葡萄籽中的

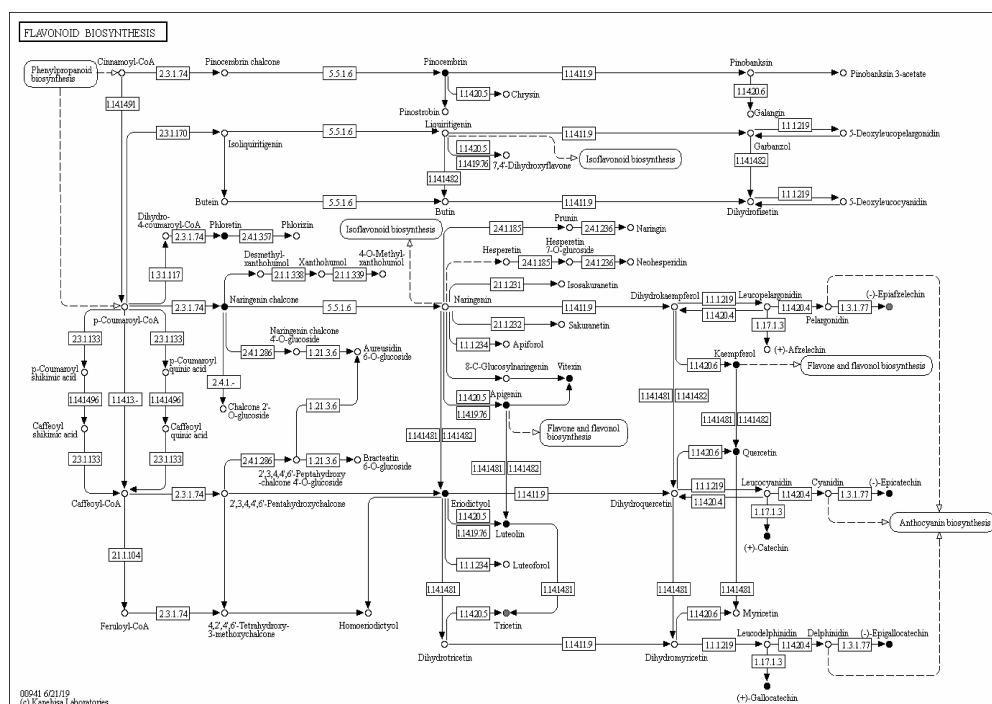


图9 类黄酮生物合成途径

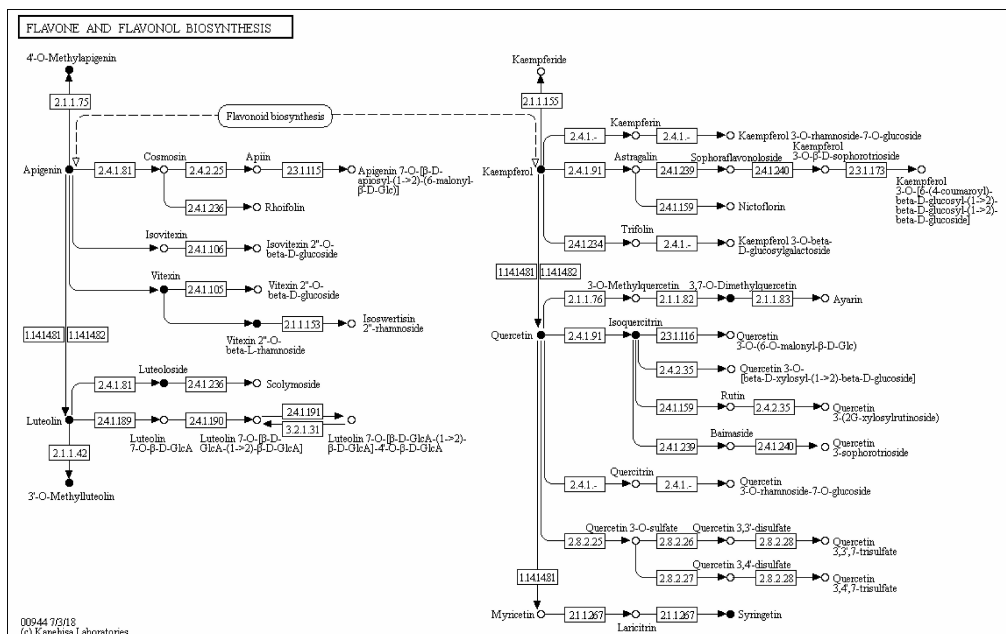


图10 黄酮和黄酮醇生物合成途径

原花青素,作用于抗氧化剂,抗微生物剂,抗肥胖,抗肥胖糖尿病,抗神经变性,抗骨关节炎,抗癌和保护心脏和眼睛等^[20]。此外,差异代谢物芹菜素参与了6种代谢途径。芹菜素的致畸变毒性与其它黄酮类化合物比相对较低,还能够通过多靶点、多通路潜在改善炎症、心血管疾病、神经退行性疾病、肿瘤和糖尿病等^[21]。花青素是水溶性色素,不仅有色彩和营养特性,还具有作用于食品的感官特性^[22]。可见滇红和墨红作为

可食用的经济作物,对于进一步发展为天然色素,成为有食用或保健功能食品,以及天然食材的调味料具有很大潜力。

通过功能注释和差异代谢物的富集分析,笔者发现差异代谢物主要参与了黄酮和黄酮醇生物合成,类黄酮生物合成和次生代谢物的生物合成。黄酮和黄酮醇生物合成,类黄酮生物合成中差异积累的代谢产物可能是两种玫瑰之间色差的关键。这为进一步解释两

种玫瑰的花色、口感以及营养成分的不同提供了参考,也为这两种玫瑰进一步进行花色遗传育种奠定了基础。

云南滇红玫瑰与墨红玫瑰是世界玫瑰花卉市场上比较著名的两个品种,本研究发现,两种花瓣中所含的黄酮类物质基本相同,但所含黄酮类物质比例、黄酮类代谢物以及黄酮类化合物的积累、代谢模式都有差异。本研究为两种近亲植物在食用玫瑰深加工方向的研究奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] FAKHRI S, MORADI S Z, FARZAEI M H, et al. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020.
- [2] KOMAL J, SUJATA B, SUNIL P. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants [J]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2018, 9: 26–38.
- [3] SITI F M, KAMALRUL A A, SYARUL N B, et al. GC-MS and LC-MS analyses reveal the distribution of primary and secondary metabolites in mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) fruit during ripening [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 262: 109004.
- [4] CHEN D Z, LIU Y, PAN Q, et al. De novo transcriptome assembly, gene expressions and metabolites for flower color variation of two garden species in Brassicaceae [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018(240): 592–602.
- [5] WU M, FENG H, SONG J, et al. Structural elucidation and immunomodulatory activity of a neutral polysaccharide from the Kushui Rose (*Rosa setata* x *Rosa rugosa*) waste [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020(232): 115804.
- [6] 金敬宏. 玫瑰的综合开发 [J]. *中国野生植物资源*, 2000(6): 21–23.
- [7] 王珍珍, 王其刚, 唐开学, 等. 云南主栽食用玫瑰花香成分及关键花香基因表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(7): 1038–1046.
- [8] 黄树增, 陈青, 赵多雷, 等. 大理州种植的加工型玫瑰品种及规范种植技术 [J]. *现代园艺*, 2018(9): 41–42.
- [9] 陈伟, 宣景宏, 孟宪军. 玫瑰花色色素提取与性能的研究进展 [J]. *北方园艺*, 2006(2): 54–56.
- [10] MORL M, KONDO T, YOSHIDA K. Anthocyanin components and mechanism for color development in blue Veronica flowers [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(10): 2329–2331.
- [11] 金晶, 阳鑫, 周薇, 等. 玫瑰类黄酮研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2019; 47(16): 14–17.
- [12] 陆晨飞, 刘钰婷. 类胡萝卜素代谢调控与植物颜色变异 [J]. *北方园艺*, 2016(16): 193–199.
- [13] PAN Q, DAI Y, NURINGTYAS T R, et al. Investigation of the chemomarkers correlated with flower colour in different organs of *Catharanthus roseus* using NMR-based metabo-lomics [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(1): 66–74.
- [14] FERGUSON L R. Role of plant polyphenols in genomic stability [J]. *Mutat Res*, 2001, 475(1–2): 89–111.
- [15] HODEK P, TREFIL P, STIBOROVÁ M. Flavonoids—potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450 [J]. *Chem Biol Interact*, 2002, 139(1): 1–21.
- [16] LI J, SHAKHAWAT H, HONGCHI M, et al. Comparative metabolomics reveals differences in flavonoid metabolites among different coloured buckwheat flowers [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020(85): 103335.
- [17] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27–30.
- [18] MARIN F R, FRUTOS M J, PÉREZ-ÁLVAREZ J A, et al. Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation [J]. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2002(26): 741–778.
- [19] ROB J A, TOM N B, WARREN C M. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages [J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1999, 75(1): 1–12.
- [20] NURHAN U. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 67: 103861.
- [21] 徐魏, 罗非君. 芹菜素生物学活性及其机理研究进展 [J]. *生命科学*, 2019, 31(10): 1077–1087.
- [22] PAISSONI M A, WAFFO -TEGUO P, MA W, et al. Chemical and sensorial investigation of in-mouth sensory properties of grape anthocyanins [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 17098.