

贴梗海棠花青苷组成及其与花色的关系

张洁^{1,2}, 王亮生^{2,*}, 高锦明^{1,*}, 李圣波³, 徐彦军⁴, 李崇晖^{2,5}, 杨瑞珍^{2,5}

(¹西北农林科技大学理学院, 陕西杨凌 712100; ²中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093; ³山东亚特生态技术有限公司, 山东临沂 276017; ⁴中国农业大学理学院, 北京 100193; ⁵中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以贴梗海棠 [*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai] 不同花色的 24 份种质为材料, 调查了其花色在 CIE $L^*a^*b^*$ 表色系的分布状况, 利用高效液相色谱—光电二极管阵列检测 (HPLC-DAD) 和高效液相色谱—电喷雾离子化—多级质谱联用技术 (HPLC-ESI-MSⁿ) 定性定量分析其花青苷组分, 运用多元线性回归方法分析了花色与花青苷组成之间的关系。结果表明, 贴梗海棠花瓣中共含有 6 种花青苷, 分别是矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷 (Cy3Ga)、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、天竺葵素-3-*O*-半乳糖苷、天竺葵素-3-*O*-(半乳糖葡萄糖苷) [Pg3 (Ga-G)]、矢车菊素-3-*O*-(半乳糖葡萄糖苷) 以及矢车菊素-3-*O*-琥珀酸-阿拉伯糖苷 (Cy3SucAra)。Cy3SucAra 为首次发现。其中, Cy3Ga、Pg3 (Ga-G) 和 Cy3SucAra 是决定贴梗海棠花色的主要色素, 这 3 种色素含量的增加导致花色显著变红。基于花青苷的组成信息, 探讨了贴梗海棠的花色改良和蓝色花创制的策略。

关键词: 贴梗海棠; 花青苷; 高效液相色谱; 质谱; 花色形成机制

中图分类号: S 685.99

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 03-0527-08

Identification of Anthocyanins Involving in Petal Coloration in *Chaenomeles speciosa* Cultivars

ZHANG Jie^{1,2}, WANG Liang-sheng^{2,*}, GAO Jin-ming^{1,*}, LI Sheng-bo³, XU Yan-jun⁴, LI Chong-hui^{2,5}, and YANG Rui-zhen^{2,5}

(¹College of Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³Shandong Yate Eco-tech Co. LTD., Linyi, Shandong 276017, China; ⁴College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ⁵Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Coloration and anthocyanins of petals collected from *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai of 24 accessions were determined. Color was measured by CIE $L^*a^*b^*$ scale and anthocyanins composition of *C. speciosa* was determined using high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC-DAD) and HPLC electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MSⁿ). Cyanidin-3-*O*-galactoside (Cy3Ga), cyanidin-3-*O*-glucoside, pelargonidin-3-*O*-galactoside, pelargonidin-3-*O*-(galactose-glucose) [Pg3 (Ga-G)], cyanidin-3-*O*-(galactose-glucose) and cyanidin-3-*O*-succinylarabinoside (Cy3SucAra) were detected. Cy3SucAra was identified in *C. speciosa* for the first time. We explored the relationship between petal colors and anthocyanin contents by multiple linear regression analyses. The results indicated that Cy3Ga, Pg3 (Ga-G) and Cy3SucAra were important pigments, high

收稿日期: 2010-11-22; 修回日期: 2011-03-14

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wanglsh@ibcas.ac.cn; jinminggaocn@yahoo.com.cn)

contents of which significantly enhanced the red color of petals. Based on anthocyanins constitutions, flower color modification and blue color breeding for *C. speciosa* were discussed.

Key words: *Chaenomeles speciosa*; anthocyanin; HPLC - DAD; MS; petal coloration

贴梗海棠 [*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai] 为蔷薇科木瓜属落叶灌木, 因花朵似海棠且紧贴枝梗着生而得名 (龙雅宜, 2003)。近年来, 红色贴梗海棠在道路两侧及庭院绿化、盆景制作等方面应用广泛, 深受人们的喜爱。选育鲜红色贴梗海棠成为其育种的重要目标之一。

然而, 关于贴梗海棠的花色形成机制至今尚未清楚。过去的研究只集中在贴梗海棠花瓣花青苷成分的探索。Hayashi (1944) 发现其含有矢车菊素 (cyanidin, Cy) - 3 - 双糖苷。Timberlake 和 Bridle (1971) 利用纸层析证明其含有天竺葵素 (pelargonidin, Pg) 和 Cy 的 3 - 葡萄糖苷和 3 - 半乳糖苷, 以及 Pg 和 Cy 的半乳糖和葡萄糖双糖苷。贴梗海棠的花青苷组成与花色的关系不明确, 制约了其鲜红花色育种的顺利开展。

本研究的目的是利用高效液相色谱—质谱联用技术 (HPLC - ESI - MSⁿ) 鉴定贴梗海棠花瓣中的未知花青苷成分; 结合花色表型分析, 阐明花色与花青苷组成之间的关系, 揭示贴梗海棠鲜红色表现的物质基础, 为新花色育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及试剂

贴梗海棠栽培品种按果实形态等分为金宝亚特 (JBYT) 和金宝萝青 (JBLQ) 两大系列。其系列内不同品种花型分单瓣、半重瓣和重瓣, 花色分粉、猩红和红色。以上述两系列不同花色的 24 份种质的新鲜花瓣为试材, 于 2009 年 4 月上旬采自山东省临沂市山东亚特生态技术有限公司药用植物生态园木瓜种质资源库。植株生长环境相同, 长势一致, 均处于盛花期。每份种质取 1 株作为采样树, 分别采集 3 个枝条, 随机选取 5 朵花进行花色测定, 每个枝条上分别取适量花瓣进行花青苷分析。

有机溶剂包括分析纯甲醇、三氟醋酸 (TFA)、甲酸、盐酸, 购自北京化工厂。色谱纯甲醇和乙腈购于北京先明乐施科技发展有限公司。HPLC 级水由 Milli-Q 超纯水系统 (Millipore, Billerica, MA, USA) 制备。花青苷标准品: 锦葵素 - 3, 5 - 二葡萄糖苷 (malvidin-3, 5-*O*-diglucoside, 简称 Mv3G5G; 纯度 93.8%) 购自法国 Extrasynthese (Genay, France)。黄酮醇标准品: 芦丁 (纯度 91.7%) 购自中国药品生物制品检定所。花青苷对照品: 矢车菊素 - 3 - *O* - 葡萄糖苷 (cyanidin-3-*O*-glucoside, 简称 Cy3G) 和天竺葵素 - 3 - *O* - 葡萄糖苷 (pelargonidin-3-*O*-glucoside, 简称 Pg3G) 来自牡丹品种 ‘芳纪’ 和 ‘青龙卧墨池’ 的花青苷混合溶液 (Wang et al., 2001)。

1.2 花色测定

新鲜花瓣采集后立即测定花色。按照国际照明委员会制定的 CIE $L^*a^*b^*$ 表色系规定, 利用分光色差计 (NF333, spectrophotometer, Nippon Denshoku Industries Co. Ltd.) 测定花瓣的明度 L^* 、色相 a^* 和 b^* , 并计算着色强度 C^* 和色调角 h , 实现花色的数字化测定。测定位置均为花瓣上表皮中央部位, 测定光源为 C/2°。每份种质分别测量 5 朵花的花色参数, 取其平均值 (Uddin et al., 2004; Byamukama et al., 2006)。

1.3 色素定性分析及结构鉴定

称取测色后的新鲜花瓣 0.9~1.2 g, 加液氮研磨成粉末, 溶于甲醇:水:甲酸:TFA (70:27:2:1, 体积比) 的抽提溶剂 (Hashimoto et al., 2000)。每隔 12 h 振荡 1 次, 24 h 后依次用滤纸及 0.22 μm 的滤膜过滤。滤液保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 供 HPLC 分析。

利用 Dionex 的 HPLC-DAD 分析系统进行色素分析, 包括泵(P680)、自动进样器(UltiMate 3000)、柱温箱 (TCC-100)、光电二极管阵列检测器 (PDA-100) 及变色龙色谱工作站 (Chromeleon, 6.60 版本)。色谱柱为 C_{18} TSK gel ODS-80Ts QA (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm , Tosoh Co. Ltd., 日本)。流速: 0.8 mL \cdot min $^{-1}$, 进样量: 10 μL 。流动相: A, 甲酸:水 (10:90, 体积比); B, 乙腈:甲醇 (85:15, 体积比)。洗脱梯度为: 0 min, 5%B; 26 min, 10%B; 35 min, 28%B; 45 min, 5%B。温度: 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长: 花青苷, 520 nm; 黄酮和黄酮醇, 350 nm (Buchert et al., 2005)。

利用 Agilent 1100 LC/MSD Trap VL 液质联用色谱仪(HPLC - ESI - MS n), 结合混合对照品 Cy3G 和 Pg3G 共洗脱试验, 完成花青苷结构鉴定。色谱条件与上述色素定性分析条件一致。质谱分析条件: 电喷雾离子化 (ESI), 离子阱分析器, 正离子模式, 全离子扫描, 扫描范围 (m/z): 50~1 000 u。氮气是干燥和喷雾气体, 干燥温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 氮气流速: 10.0 L \cdot min $^{-1}$; 喷雾器压力: 241.3 kPa; 毛细管电压: 3 500 V; 毛细管出口电压: 120.4 V; 八级射频电压振幅: 150 Vpp; 统计软件: LC/MSD Trap 软件 (5.20 版本)。

1.4 色素定量分析

利用标准品 Mv3G5G 和芦丁分别对花青苷各个组分、花青苷总量 (TA) 和黄酮/黄酮醇总量 (TF) 进行半定量分析, 重复 3 次, 单位为每克新鲜花瓣中含有的毫克数。同时计算每份种质的花青苷各个组分的相对百分含量, 以便比较种质之间色素组成差异。

应用 SigmaPlot 10.0 对数据进行分析并作盒须图。

用 DPS 7.55 进行多元逐步回归分析 (stepwise)。

2 结果与分析

2.1 花色分布

贴梗海棠的花色分为粉色、猩红色、红色 3 类 (图 1)。粉色花瓣具有白底粉晕特征, 随着晕的大小不同, 花色表现也稍有差异 (图 1, a、b)。

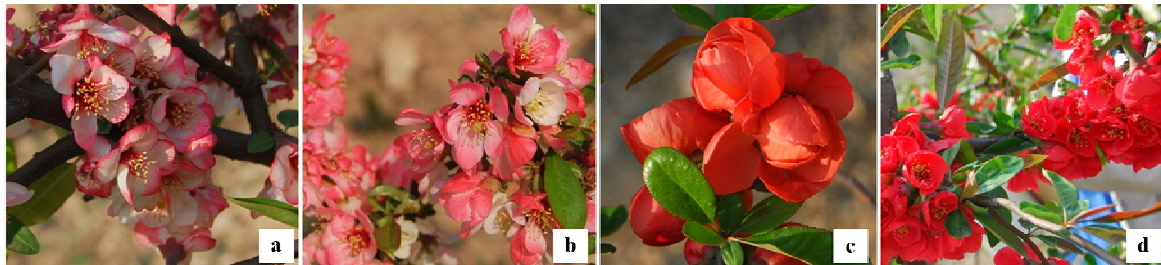


图 1 贴梗海棠的典型花色

a、b: 粉色; c: 猩红色; d: 红色。

Fig. 1 Representative petal colors from *C. speciosa*

a, b: Pink; c: Scarlet; d: Red.

图 2 显示了 24 份种质的花色在由色相 a^* 和 b^* 值构成的二维色度空间的分布情况, 从中可见其花色集中分布在第 I 和第 II 象限内, 归为两群。第一群在第 I 象限及第 II 象限内围绕 b^* 轴分布, a^* 值较小, 包括白底带粉晕的粉色贴梗海棠; 第二群在第 I 象限内, 远离 b^* 轴, 其 a^* 值较大, 为红色贴梗海棠。而 ‘JBYT048’ 位于第一群和第二群之间, 呈猩红色, 其 a^* 值为 22.38, b^* 值为 19.28。

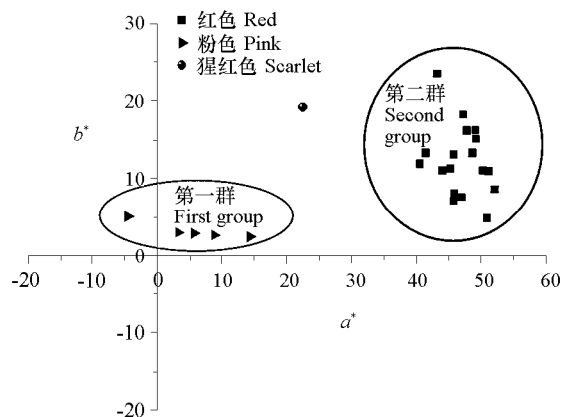


图 2 贴梗海棠的花色分布

Fig. 2 Distribution of flower colors from *C. speciosa*

2.2 花青苷定性分析

利用 HPLC - ESI - MSⁿ 在贴梗海棠花瓣中共检测出 6 种花青苷成分 (图 3), 花青苷的紫外—可见光谱及质谱数据如表 1 所示。

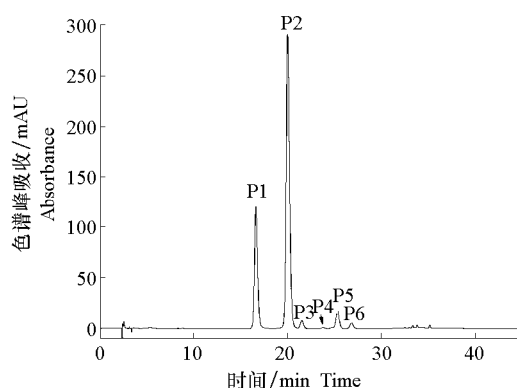


图 3 贴梗海棠花青苷组成的 HPLC 图谱 (检测波长: 520 nm)

Fig. 3 HPLC chromatogram of anthocyanins from petals of *C. speciosa* detected at 520 nm

根据 Cy 与 Pg 糖苷分别在 513 ~ 520 nm 和 500 ~ 508 nm 有特征吸收峰, 可推测峰 P1、P2、P4 和 P6 为 Cy 型花青苷, 峰 P3 和 P5 为 Pg 型花青苷 (Lopes-da-Silva et al., 2007; Oh et al., 2008; Vasco et al., 2009)。由于花青苷在 440 nm 与 $\lambda_{\text{vis-max}}$ 两处的吸收值之比 $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ 的变化范围为 32% ~ 43%, 因此确定这 6 种花青苷均为 3 - O - 糖苷类型 (Harborne, 1958)。

峰 P2 和峰 P4 的质谱数据相同, 均含有分子离子 m/z 449 ($[M]^+$) 和碎片离子 m/z 287 ($[Y_0]^+$)。 m/z 287 是 Cy 的特征质荷比, 其裂解释放 162 u 对应一分子的己糖残基。葡萄糖和半乳糖是参与花青苷形成常见的己糖。根据峰 P4 与对照品 Cy3G 的共洗脱特性, 以及花青素半乳糖苷的洗脱时间小于花青素葡萄糖苷 (Lopes-da-Silva et al., 2007), 可判定峰 P2 为矢车菊素 - 3 - O - 半乳糖苷 (t_R , 20.0 min), 简称 Cy3Ga, 峰 P4 为 Cy3G (t_R , 23.8 min)。

峰 P5 [m/z 433 ($[M]^+$), m/z 271 ($[Y_0]^+$)] 具有与峰 P2、峰 P4 相同的质谱裂解特征, 释放 162 u 对应于一分子己糖, m/z 271 是 Pg 的特征质荷比, 推测峰 P5 为 Pg3G 或天竺葵素-3-*O*-半乳糖苷 (Pg3Ga)。根据峰 P5 的保留时间小于对照品 Pg3G, 则判定 P5 为 Pg3Ga。

峰 P1 的质谱数据为分子离子 m/z 611 ($[M]^+$) 和碎片离子 m/z 287 ($[Y_0]^+$)。 m/z 287 是 Cy 的特征质荷比, 裂解丢失质量单位 324 u, 对应于两分子己糖。由于无碎片离子 m/z 449, 且结合紫外吸收特征 $A_{440}/A_{vis-max}$ (32%), 确定峰 P1 为矢车菊素-3-*O*-双糖苷。根据 Timberlake 和 Bridle(1971) 的报道, 贴梗海棠中花青素双糖苷经水解后同时生成葡萄糖和半乳糖。并且, 在同科植物蚊子草属 *Filipendula formosa* 的地上部分检测到槲皮素-3-*O*-半乳糖葡萄糖苷 (Quercetin-3-*O*-glucosylgalactoside) (Whang et al., 1999), 因此, 判断葡萄糖和半乳糖共同参与了贴梗海棠中花青素双糖苷的形成, 推定峰 P1 为矢车菊素-3-*O*- (半乳糖葡萄糖苷), 简称 Cy3 (Ga-G)。峰 P3 [m/z 595 ($[M]^+$), m/z 271 ($[Y_0]^+$)] 表现出与峰 P1 相同的质谱裂解行为, 则推定峰 P3 为天竺葵素-3-*O*- (半乳糖葡萄糖苷), 简称 Pg3 (Ga-G)。

峰 P6 的质谱数据为分子离子 m/z 519 ($[M]^+$) 和碎片离子 m/z 287 ($[Cy]^+$), 裂解释放 232 u。它与草莓中天竺葵素-3-*O*-琥珀酸-阿拉伯糖苷 (Pg-3-*O*-succinylarabinoside) 的裂解特征相同 (Lopes-da-Silva et al., 2007), 因此推测峰 P6 为矢车菊素-3-*O*-琥珀酸-阿拉伯糖苷 (Cy-3-*O*-succinylarabinoside), 简称 Cy3SucAra。

表 1 贴梗海棠花青苷组分的紫外—可见吸收光谱与质谱数据
Table 1 Chromatographic and spectral data of anthocyanins from flowers of *C. speciosa*

色谱峰 Peaks	保留时间/min Retention time	最大吸收波长/nm λ_{max}	$A_{440}/A_{vis-max}/\%$	分子离子 (m/z)[M] ⁺	碎片离子(m/z) Fragments	化合物的结构 Tentative identification
P1	16.6	516	32	611	287	矢车菊素-3- <i>O</i> - (半乳糖葡萄糖苷) Cy-3- <i>O</i> -(galactose-glucose)
P2	20.0	516	32	449	287	矢车菊素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 Cy-3- <i>O</i> -galactoside
P3	21.5	501	43	595	271	天竺葵素-3- <i>O</i> - (半乳糖葡萄糖苷) Pg-3- <i>O</i> -(galactose-glucose)
P4	23.8	514	-	449	287	矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Cy-3- <i>O</i> -glucoside
P5	25.3	501	43	433	271	天竺葵素-3- <i>O</i> -半乳糖苷 Pg-3- <i>O</i> -galactoside
P6	26.8	513	32	519	287	矢车菊素-3- <i>O</i> -琥珀酸-阿拉伯糖苷 Cy-3- <i>O</i> -succinylarabinoside

注: -: 未得到数据。
Note: -: Data were not available.

2.3 花青苷定量分析

本研究鉴定出的 Cy3SucAra 在贴梗海棠中属首次发现, 其它 5 种与以前的报道一致, 但并未检测出 Pg3G。表 2 显示了贴梗海棠的 24 份种质的花青苷组成。Cy3Ga 和 Cy3 (Ga-G) 是贴梗海棠花瓣中的主要色素成分, 两者的平均含量占总花青苷含量的 91.1%。其它 4 种花青苷为微量成分。其中, Cy3Ga 的平均含量为 69.2%, Cy3 (Ga-G) 的平均含量为 21.9%, 在 ‘JBYT092’、‘JBYT084’、‘JBYT102’、‘JBYT140’、‘JBYT104’ 和 ‘JBYT125’ 的花瓣中, Cy3 (Ga-G) 的含量占 40% 以上。通过计算 Pg 和 Cy 的花青苷总量, 可知 ‘JBYT048’ 的 Pg 相对含量为 55.9%, Cy 占 44.1%, 色素类型为 Pg 型; 而其它贴梗海棠的 Cy 平均相对含量达到 95.1%, Pg 只占 4.9%, 色素类型为 Cy 型。此外, 总花青苷含量 (TA) 随种质不同表现出明显差异。‘JBLQ120’ 的 TA 值最大, 可达到 44.7 mg · g⁻¹ 的花青苷。红色贴梗海棠的 TA 的平均含量是 25.6 mg · g⁻¹。贴梗海棠花瓣中黄酮/黄酮醇总量 (TF) 也很丰富, 变化范围为 9.2 ~ 95.5 mg · g⁻¹。

表 2 贴梗海棠的花青苷组成及定量分析

Table 2 Pigment constitutions and relative quantity of anthocyanins in *C. speciosa*

种质代号 Accession No.	花青苷组分/%		Anthocyanin components							相对含量/(mg·g ⁻¹)	
	Cy3Ga	Pg 3(Ga-G)	Cy 3SucAra	Cy 3(Ga-G)	Cy3G	Pg3Ga	Cy	Pg		TA	TF
JBLQ120	74.0±0.08	0.70±0.00	1.7±0.01	21.4±0.10	0.3±0.01	1.9±0.00	97.4±0.02	2.6±0.00		44.7±0.28	89.8±0.55
JBYT125	49.3±0.14	1.13±0.01	1.23±0.02	46.2±0.13	0.4±0.00	1.83±0.01	97.1±0.02	2.9±0.00		22.9±0.00	54.8±0.10
JBYT078	59.7±0.20	0.73±0.00	1.83±0.01	35.8±0.17	0.4±0.00	1.7±0.01	97.7±0.03	2.3±0.00		25.8±0.11	56.2±0.24
JBYT084	45.1±0.06	1.20±0.01	1.1±0.01	50.6±0.05	0.4±0.00	1.6±0.02	97.2±0.01	2.8±0.03		22.3±0.19	95.5±0.88
JBYT088	76.3±0.22	—	2.0±0.00	19.1±0.28	—	2.6±0.08	97.4±0.07	2.6±0.08		2.3±0.20	40.3±3.59
JBYT100	85.5±0.08	—	2.0±0.01	0.2±0.01	0.6±0.01	11.6±0.03	88.3±0.06	11.7±0.03		30.8±0.78	63.2±1.63
JBYT092	55.4±1.10	—	1.1±0.07	43.1±0.57	—	0.3±0.00	99.6±0.67	0.4±0.67		3.2±0.18	57.3±3.28
JBYT104	46.1±0.32	0.60±0.03	1.2±0.01	51±0.05	0.1±0.02	1±0.01	98.4±0.16	1.6±0.05		18.1±0.53	44.2±1.39
JBYT103	63.6±0.20	2.20±0.04	1.6±0.03	29±0.43	0.3±0.00	3.3±0.00	94.5±0.26	5.5±0.03		17.9±0.07	18.4±0.06
JBYT102	55.6±0.28	1.10±0.01	1.4±0.00	40.1±0.25	0.2±0.00	1.5±0.00	97.3±0.14	2.7±0.00		24.3±1.26	46.4±2.49
JBYT112	90.7±0.24	—	1.7±0.03	—	0.6±0.03	7±0.31	93.0±0.24	7.0±0.31		27.5±0.73	71.9±2.30
JBYT127	88.2±0.28	—	2.3±0.01	0.2±0.00	0.6±0.00	8.8±0.28	91.3±0.30	8.7±0.28		25.4±0.91	42.7±1.53
JBYT071	80.8±0.10	0.50±0.01	1.6±0.00	12.1±0.07	0.6±0.00	4.4±0.05	95.1±0.04	4.9±0.06		40.2±0.27	53.0±0.39
JBLQ106	66.8±0.34	1.80±0.03	1.4±0.03	25.8±0.29	0.3±0.00	3.9±0.05	94.3±0.10	5.7±0.07		21.5±0.55	52.6±1.31
JBLQ107	90.9±0.18	—	1.9±0.00	0.2±0.02	0.6±0.01	6.4±0.06	93.6±0.16	6.4±0.06		18.9±0.25	36.0±0.49
JBYT129	78.4±0.66	—	0.7±0.00	20.8±0.42	—	—	99.9±0.00	0.1±0.00		1.7±0.11	54.1±0.46
JBYT130	58.6±0.29	2.40±0.04	1.6±0.01	33.7±0.26	0.2±0.00	3.4±0.00	94.1±0.21	5.9±0.04		37.0±0.94	37.1±0.90
JBYT051	93.2±0.11	—	2±0.00	0.1±0.00	0.5±0.11	4.1±0.00	95.8±0.01	4.2±0.00		17.8±0.00	60.6±0.02
JBLQ108	93.7±0.19	—	1.7±0.06	—	—	4.5±0.13	95.4±0.12	4.6±0.13		3.4±0.04	66.5±0.80
JBYT028	96.1±0.08	—	1.8±0.02	—	0.5±0.01	1.6±0.03	98.4±0.09	1.6±0.03		14.1±0.31	58.0±1.37
JBYT138	70.6±0.64	—	1.2±0.05	26.1±0.55	—	2.1±0.03	97.9±0.03	2.1±0.03		4.1±0.11	88.0±2.78
JBYT140	38.3±0.14	9.90±0.14	1.3±0.02	41.3±0.11	—	9.2±0.00	80.9±0.00	19.1±0.00		29.7±0.10	19.4±0.07
JBYT048	12.0±0.05	46.30±0.25	2.5±0.05	29.6±0.24	—	9.5±0.04	44.1±0.04	55.9±0.04		3.2±0.07	9.2±0.22
JBYTHXY	91.5±0.08	—	1.9±0.01	—	0.3±0.00	6.4±0.06	93.7±0.10	6.3±0.06		43.5±0.14	62.9±0.19

注: JBYT, 金宝亚特; JBLQ, 金宝萝青; HXY, 黄香玉。Cy3 (Ga-G), 矢车菊素-3-O- (半乳糖葡萄糖苷); Cy3Ga, 矢车菊素-3-O-半乳糖苷; Pg3 (Ga-G), 天竺葵素-3-O- (半乳糖葡萄糖苷); Cy3G, 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; Pg3Ga, 天竺葵素-3-O-半乳糖苷; Cy3SucAra, 矢车菊素-3-O-琥珀酸-阿拉伯糖苷; Cy, 矢车菊素; Pg, 天竺葵素; TA, 花青素总量 (mg·g⁻¹); TF, 黄酮/黄酮醇总量 (mg·g⁻¹); —, 未检测到。

Note: JBYT, Jinbao Yate; JBLQ, Jinbao Luoqing; HXY, Huangxiangyu. Cy3 (Ga-G), Cy-3-O- (galactose-glucose); Cy3Ga, Cy-3-O-galactoside; Pg3 (Ga-G), Pg-3-O- (galactose-glucose); Cy3G, Cy-3-O-glucoside; Pg3Ga, Pg-3-O-galactoside; Cy3SucAra, Cy-3-O-succinylarabinoside; Cy, cyanidin; Pg, pelargonidin; TA, total anthocyanins contents (mg·g⁻¹); TF, total flavones and flavonols contents (mg·g⁻¹); —, not identified.

2.4 花色与花青苷组成的关系

盒须图直观地显示了不同表型的贴梗海棠花瓣中花青苷组成的特点。如图 4 所示, 红色和粉色的花青苷组成的主要差异在于 Cy3 (Ga-G) 和 Cy3Ga 的含量, 红色贴梗海棠中 Cy3 (Ga-G) 和 Cy3Ga 的含量远远大于粉色贴梗海棠。因此, Cy3 (Ga-G) 和 Cy3Ga 含量是影响贴梗海棠的花色表型的重要因素。

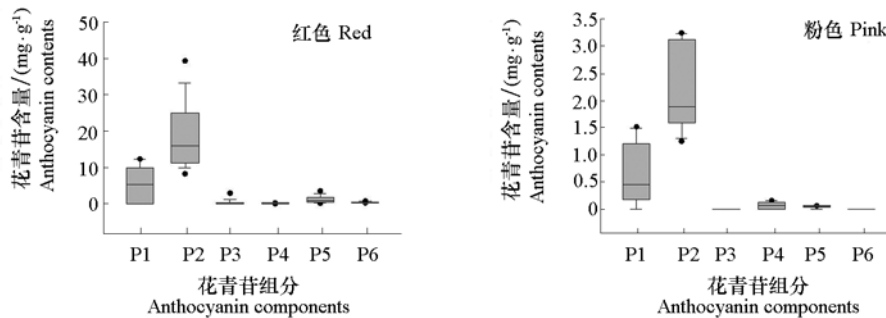


图 4 不同表型的贴梗海棠的花青苷组成 (P1~P6 色谱峰见表 1)

Fig. 4 Anthocyanin constitutions from different phenotypes of *C. speciosa* (P1 - P6 peaks see Table 1)

为了进一步探讨贴梗海棠色素组成与花色的关系,以描述花色的变量 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h 作为因变量,以花青苷 Cy3Ga、Pg3 (Ga-G)、Cy3SucAra、Cy3 (Ga-G)、Cy3G、Pg3Ga 的含量、总花青苷含量 TA 和总黄酮和黄酮醇含量 TF 作为自变量,分别对应自变量 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 、 x_6 、 x_7 、 x_8 ,进行了多元逐步回归分析 (stepwise)。回归方程式为: $L^* = 65.4 - 0.9 x_1 - 6.6 x_2$, $R = 0.8025$, $P = 0.0001$; $a^* = 15.2 + 58.6 x_3$, $R = 0.6993$, $P = 0.0001$; $b^* = 7.1 + 0.3 x_1 + 5.4 x_2 - 0.06 x_8$, $R = 0.8810$, $P = 0.0001$ 。

由方程的回归系数 R 和显著程度 P 可以看出,贴梗海棠的花色与色素组分之间存在极显著的相关 ($P < 0.01$),且回归方程系数的绝对值大小可直接判断色素组成对花色贡献的大小。

明度 L^* 值表示花色的明亮程度,回归方程表明, Cy3Ga 和 Pg3 (Ga-G) 与 L^* 呈显著负相关,且 Pg3 (Ga-G) 的回归系数的绝对值远大于 Cy3Ga,因此, Pg3 (Ga-G) 含量的积累可显著降低花瓣的亮度。

色相 a^* 值正的方向反映花瓣红色程度, a^* 值越大,花色越红。回归方程表明, Cy3SucAra 与色相 a^* 值呈显著正相关。

色相 b^* 值正的方向表示花色黄色的程度,当 a^* 值较小时 ($a^* < 30$), b^* 值越大,花色越趋向黄色;当 a^* 值较大时 ($a^* > 30$), b^* 值越大,花色越趋向红色。回归方程表明 Cy3Ga、Pg3 (Ga-G) 与色相 b^* 值呈显著正相关, TF 值与色相 b^* 值呈负相关,但相关系数的绝对值很小。

因此, Cy3Ga、Pg3 (Ga-G) 和 Cy3SucAra 是决定贴梗海棠花色的主要成分,这 3 种花青苷的积累有利于贴梗海棠花色的红色化。

3 讨论

3.1 花青苷组成和花色的关系

贴梗海棠的花色比较少,只有粉色、猩红色和红色,其中猩红色极为少见。Cy3 (Ga-G) 和 Cy3Ga 的含量差异是影响贴梗海棠粉色和红色的重要因素。多元线性回归结果表明, Cy3Ga、Pg3 (Ga-G) 和 Cy3SucAra 是决定贴梗海棠花色的主要花青苷,这 3 种色素的含量增加有利于花色变得更红,然而它们对呈色的贡献是不一样的。Cy3Ga 和 Pg3 (Ga-G) 影响 b^* 值,其含量越高, b^* 值增大,花色变红,为色素含量的加和效应。而 Cy3SucAra 的微小波动显著地影响 a^* 值,其含量增加,显著促进 a^* 值增加,呈现色素含量的倍增效应。

Pg 和 Cy 同为红色色素,但其呈现的色调是有差异的。Cy 型贴梗海棠表现为红色,而 Pg 型 ‘JBYT048’ 偏向猩红色,且其颜色差异容易被肉眼所分辨。因此, Pg 及 Cy 色素的比例直接影响了花瓣红色的程度。此结论与一串红及月季的花色呈色规律相一致 (Tomás-Barberán et al., 1987; Mikanagi et al., 2000)。

3.2 花色改良及蓝色花的育种

‘JBYT048’ 是少见的猩红色贴梗海棠。因此,可将其作为亲本,通过育种手段培育猩红色系的品种,丰富贴梗海棠花色。蓝色系是自然界较少的花卉色系,世界上许多园艺育种家都将蓝色花卉的培育作为研究重点。然而,在贴梗海棠的花色育种中,传统的杂交育种手段只能在红色系和粉色系内进行花色改良,花色变异难以扩大,蓝色花育种难以取得突破。飞燕草素 (Dp) 是花卉呈现蓝色系的关键花青素, Dp 色素的缺乏是自然界缺少蓝色贴梗海棠的重要原因。类黄酮-3', 5'-羟基化酶基因 ($F3'5'H$) 是合成 Dp 的关键酶基因,利用基因工程手段导入 $F3'5'H$ 并促使其在花瓣中

表达将为蓝色贴梗海棠的产生提供重要的技术支持。这种技术已成功应用于蓝色系康乃馨的培育 (Fukui et al., 2003)。此外, 如果 *F3'5'H* 表达量不高, 可考虑同时导入细胞色素 b5 基因 (*CYTb5*), 促进 *F3'5'H* 的大量表达, 有利于花色趋向蓝色 (Holton et al., 1993)。

3.3 功能色素资源及其应用

除了具有着色效应外, 花青苷还表现出重要的生物活性, 如抗氧化、抗炎症、抗有害微生物、抑制血小板凝聚和抗肿瘤活性等 (Bomser et al., 1996; Bravo, 1998; Juranić & Žižak, 2005; Stone et al., 2007)。研究表明, B 环上具有邻二羟基苯结构 (ortho-dihydroxyphenyl) 的花青苷如 Cy 和 Dp 的衍生物, 可有效抑制肿瘤的生长 (Hou et al., 2004)。贴梗海棠花瓣中约 90% 的花青苷为 Cy 衍生物, 且平均总花青苷含量达到 $25.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此, 贴梗海棠花瓣是提取功能色素的资源, 具有较大的开发利用价值。

References

- Bomser J, Madhavi D L, Singletary K. 1996. *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med*, 62: 212 – 216.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56: 317 – 333.
- Buchert J, Koponen J M, Suutarinen M, Mustranta A, Lille M, Törrönen R, Poutanen K. 2005. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *J Sci Food Agric*, 85: 2548 – 2556.
- Byamukama R, Jordheim M, Kiremire B. 2006. Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars. *Sci Hort*, 109: 262 – 266.
- Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Iwashita T, Nomoto K. 2003. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3, 5'-hydroxylase gene. *Phytochemistry*, 63: 15 – 23.
- Harborne J B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem J*, 70: 22 – 28.
- Hashimoto F, Tanaka M, Maeda H. 2000. Characterization of cyanic flower color of *Delphinium* cultivars. *J Jpn Soc Hort Sci*, 69: 428 – 434.
- Hayashi K. 1944. Studies about anthocyanins, XII. Study on an anthocyanin from the flowers of *Chaenomeles lagenaria*. *Acta Phytochim*, 14: 47 – 53.
- Holton T A, Brugllera F, Lester D R. 1993. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower color. *Nature*, 366: 276 – 279.
- Hou D X, Kai K, Li J J. 2004. Anthocyanidins inhibit activator protein1 activity and cell transformation: Structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25: 29 – 36.
- Juranić Z, Žižak Ž. 2005. Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, 23: 207 – 211.
- Long Ya-yi. 2003. *Chaenomeles speciosa*. *China Flowers & Horticulture*, (5): 40. (in Chinese)
- 龙雅宜. 2003. 贴梗海棠. *中国花卉园艺*, (5): 40.
- Lopes-da-Silva F, Escribano-Bailón M T, Pérez-Alonso J J, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Sci Technol*, 40: 374 – 382.
- Mikanagi Y, Saito N, Yokoi M, Tatsuzawa F. 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections Cinnamomeae (= *Rosa*), Chinenses, Gallicanae and some modern garden roses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 887 – 902.
- Oh Y S, Lee J H, Yoon S H, Oh C H, Choi D-S, Choe E, Jung M Y. 2008. Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea. *J Food Sci*, 73: 378 – 389.
- Stone S Z, Yasmin T, Bagchi M. 2007. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*, 51: 675 – 683.
- Timberlake C F, Bridle P. 1971. Anthocyanins in petals of *Chaenomeles speciosa*. *Phytochemistry*, 10: 2265 – 2267.
- Tomás-Barberán F A, Harborne J B, Self R. 1987. Dimalonated anthocyanins from the flowers of *Salvia splendens* and *S. coccinea*. *Phytochemistry*, 26: 2759 – 2760.
- Uddin A F M J, Hashimoto F, Miwa T, Ohbo K, Sakata Y. 2004. Seasonal variation in pigmentation and anthocyanidin phenetics in commercial *Eustoma* flowers. *Sci Hort*, 100: 103 – 115.
- Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Elidin A. 2009. Phenolic compounds in Rosaceae fruits from Ecuador. *J Agric Food Chem*, 57: 1204 – 1212.
- Wang L S, Shiraishi A, Hashimoto F. 2001. Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon island (Japanese) tree peony 49 cultivars. *J Plant Res*, 114: 33 – 43.
- Wang W K, Ham I, Sung H K, Lee M T. 1999. Flavonol glycoside from the aerial part of *Filipendula formosa*. *Yakhak Hoechi*, 43: 5 – 10.