

# 蝴蝶石斛兰花色表型及类黄酮成分分析

李崇晖, 任羽, 黄素荣, 黄少华, 杨光穗\*

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南儋州 571737)

**摘要:** 利用分光色差计测定了不同颜色蝴蝶石斛兰品种的花色表型, 采用高效液相色谱—质谱联用技术检测花朵中类黄酮色素的组成, 探讨花色表型与所含类黄酮含量之间的关系。结果表明, 蝴蝶石斛兰品种花色主要分布在紫红色和粉红色区域, 且唇瓣颜色比花瓣和萼片暗。花色与类黄酮含量之间存在着线性关系, 而花青素苷是影响蝴蝶石斛兰花色的主要因素: 总花青素苷含量与花色的明度  $L^*$  值和色相  $b^*$  值以及色相角  $h$  值负相关, 与色相  $a^*$  值正相关。从蝴蝶石斛兰花朵中共检测出 28 种花青素苷 (均为酰基化的矢车菊素-3,7,3'-三葡萄糖苷) 和 19 种黄酮醇苷 (苷元有槲皮素、山奈酚和异鼠李素 3 种), 由此推测了蝴蝶石斛兰品种花中的类黄酮代谢途径。

**关键词:** 石斛兰; 蝴蝶石斛兰; 花色; 类黄酮

**中图分类号:** S 685

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 01-0107-10

## Floral Colors of *Phalaenopsis* Type Dendrobium and Their Flavonoid Composition

LI Chong-hui, REN Yu, HUANG Su-rong, HUANG Shao-hua, and YANG Guang-sui\*

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Hainan, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** The floral colors of commercial *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars with different colors were measured by a spectrophotometer, the flavonoid composition in the flowers were analyzed using a high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry, then, the relationship between the floral color parameters and the flavonoid contents were discussed. The results showed that the floral colors of commercial *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars mainly distributed in purple and pink region, and the color of labellum was darker than that of petal and sepal. Linear relationships between floral color parameters and flavonoid contents were discovered. The anthocyanins were the major factors affected the floral colors of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars: The total anthocyanin contents negatively correlated with lightness  $L^*$ , chromatic component  $b^*$  and hue angle  $h$ , however, positively correlated with chromatic component  $a^*$ . Furthermore, there were 28 anthocyanins (all were acylated cyanidin-3,7,3'-triglucoside) and 19 flavonol glycosides (the aglycones were quercetin, kaempferol, and

收稿日期: 2012-09-03; 修回日期: 2013-01-04

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31101578); 科技部科技成果推广专项 (2011GB2E200006); 中国热带农业科学院博士启动基金项目 (PZSB1003); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (PZS067)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: suiguangyang@yahoo.com.cn)

isorhamnetin) were tentatively identified, based on that, the metabolic pathway of flavonoids in *Phalaenopsis* type dendrobium flowers were speculated. The study also provided suggestion for the floral color breeding of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars.

**Key words:** *Phalaenopsis* type dendrobium; floral color; flavonoid

石斛兰为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生附生草本植物。该属植物是以热带东南亚为中心向亚热带性气候条件发展的类群, 多数种类具有观赏价值。在中国把石斛兰分为两种, 一种为春石斛, 春季开花, 花在每节茎节开出; 另一种为秋石斛, 夏末至冬季开花, 花梗由茎顶抽出, 每梗着花可达一、二十朵。秋石斛花色艳丽, 保鲜期长, 是热带兰重要的切花和盆花产品之一。目前中国种植的秋石斛品种主要为蝴蝶石斛系 (*Phalaenopsis* Type), 大多从泰国、新加坡等国引进, 国内育种工作起步较晚 (潘丽晶 等, 2009a)。国外已育成的秋石斛品种花色虽然多样, 但尚未见到深受市场欢迎的火红色和天蓝色品种, 新型花色育种成为了秋石斛育种的重要目标 (潘丽晶 等, 2009b)。

目前对石斛兰花色形成的机理了解不多, 国内外对秋石斛花色素组成的研究很少。20 世纪 80 年代, 利用高效液相色谱方法从 *D. crocatum* 等黄色秋石斛品种中鉴定出了 6 种类胡萝卜素, 认为其是黄色石斛兰的主要色素 (Kanchit, 1984)。随后, 通过研究 *D. gouldii*、*D. kultana* ‘blue’ 等 28 种秋石斛属及杂交后代的类黄酮苷元组成, 发现红色、蓝色、棕色等花瓣中含有矢车菊素 (cyanidin, 简称 Cy) 和芍药花素 (peonidin, 简称 Pn), 在桃红色花瓣中检出天竺葵素 (pelargonidin, 简称 Pg); 在蓝色品种 *D. gouldii* ‘K280-6’ 花瓣中检测到了山奈酚 (kaempferol, 简称 Km)、槲皮素 (quercetin, 简称 Qu)、异鼠李素 (isorhamnetin, 简称 Is)、丁香亭 (syringetin) 和杨梅黄素 (myricetin) 等 5 种黄酮醇苷元 (Kuehnle et al., 1997)。自然状态下, 类黄酮在植物中通常以糖苷形式存在, 苷元的糖基化和酰基化修饰对花色都会有不同程度影响 (Tanaka et al., 2008)。因此, 从糖苷水平上研究类黄酮组成更有利于了解秋石斛花色形成的机理。迄今鉴定出蝴蝶石斛兰花朵中的 4 种花青素苷均为 Cy 型糖苷 (Saito et al., 1994; Williams et al., 2002; Tatsuzawa et al., 2005), 9 种黄酮醇苷为 Qu 和 Km 型糖苷 (Williams et al., 2002), 且尚未见蝴蝶石斛兰花色与色素含量之间关系的报道。本研究中利用高效液相色谱—质谱联用技术 (HPLC-MS) 对不同颜色的蝴蝶石斛兰品种花朵中的类黄酮组成进行分析, 并研究了其花色分布特点及其与类黄酮含量的关系, 以期阐明蝴蝶石斛兰花色形成机理奠定基础, 并为其花色育种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用的蝴蝶石斛兰为石斛兰属蝴蝶石斛组 (genus *Dendrobium* section *Phalaenantha*) 24 个品种, 均为中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带兰花种质圃所收集、保存的资源, 根据目测, 参考洪艳等 (2012) 方法按照花瓣颜色分为 5 个色系: 紫色系 (4 个品种)、紫红色系 (9 个品种)、粉红色系 (5 个品种)、绿色系 (4 个品种) 和白色系 (2 个品种)。于 2011 年 7 月采集盛开的花朵, 用于试验。

### 1.2 花色测定

将蝴蝶石斛兰花朵分为花瓣、萼片、唇瓣 3 部分, 分别用分光色差计 (NF333 型, 日本电色工

业株式会社)在  $C/2^\circ$ 光源下测定正面中间部位在 CIELAB 表色系统下的明度  $L^*$ 值、色相  $a^*$ 值和  $b^*$ 值,并计算彩度  $C^*$ 值和色相角  $h$ ,重复 5 次(白新祥等,2006)。

表 1 蝴蝶石斛兰品种  
Table 1 *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars

色系 Color group	编号 No.	品种名 Cultivar name	色系 Color group	编号 No.	品种名 Cultivar name
紫色系 Violet	v1	紫眸 Coerulea Blue	绿色系 Green	g1	曼谷绿 Bangkok Green
	v2	蓝色星辰 Burana Star Blue		g2	玉翡翠 Burana Jade
	v3	紫背 265 Blue Sapphire		g3	绿色星辰 Burana Green Star
	v4	Copper King		g4	Hand Green
紫红色系 Purple	p1	幽兰 Sayuri	粉色系 Pink	k1	粉色浪漫 Sakura Pink
	p2	红牛 Red Bull		k2	扇贝兰 Burana Stripe
	p3	紫色火焰 Mangosteen		k3	宝贝 Cleopatra
	p4	三亚阳光 Sunya Sunshine		k4	甜心 Burana Sweet
	p5	畅想 Tay Sweet Keng	白色系 White	k5	Sonia Earsakul
	p6	红韵 Lucky Sanya		w1	白鸽子 Burana White Dove
	p7	熊猫 Ekapol Panda		w2	迷人娇 Burana Charming
	p8	纯真年代 Pure Red			
	p9	蓝晶 Ekapol $\times$ Sabin Blue			

### 1.3 类黄酮色素提取及定性分析

称取新鲜花瓣、萼片、唇瓣各 0.1 g,置于 2 mL 离心管内,加入液氮捣碎后,加 1.5 mL 含有 0.1%盐酸的甲醇溶液震荡,在 4  $^\circ\text{C}$  冰箱内浸提 24 h 后过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜。

每个色系选取几个代表品种——紫色:‘紫眸’;紫红色:‘幽兰’、‘红牛’、‘紫色火焰’、‘三亚阳光’;粉红色:‘粉色浪漫’;绿色:‘曼谷绿’;白色:‘白鸽子’,紫色、紫红色和粉红色品种将花瓣、萼片和唇瓣的提取液合并,绿色和白色品种将花瓣、萼片的提取液合并,采用 Agilent 1100 LC/MSD Trap VL 系统进行 HPLC-MS 分析。液相色谱条件:流动相,0.1%甲酸水(A),乙腈(B);洗脱程序,0 min,7% B,50 min,20% B,60 min,7% B;色谱柱 Kromasil 100-5C<sub>18</sub> (150 mm  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ );柱温 35  $^\circ\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,流速 0.8 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,检测波长 515 nm (花青素苷)和 350 nm (黄酮醇苷)。质谱条件:电喷雾离子化(ESI),离子阱分析器,毛细管电压 4 000 V,喷雾器压力 35 psi,干燥气体(N<sub>2</sub>)温度 350  $^\circ\text{C}$ ,流速 8 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>;全离子扫描范围 200~1 500  $m/z$ ;花青素苷分析采用正离子(PI)检测模式,黄酮醇苷分析采用正、负离子(NI)检测模式;用 LC/MSD Trap 软件(V5.2)记录分析 LC-MS 数据。

### 1.4 总花青素苷和总黄酮含量测定

总花青素苷含量(TAC)测定采用可见分光光度法(冯志彪等,2008),配制不同浓度的矢车菊素 3,5-二葡萄糖苷(购自 Sigma-Aldrich 公司)的 0.1%盐酸甲醇溶液,测定 515 nm 处的吸光值,求出线性回归方程。计算样品中相对于标准品的总花青素苷含量,结果以 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>FW (鲜样质量)表示,重复 3 次。

总黄酮含量(TFC)的测定采用 AlCl<sub>3</sub> 显色法(Qiu et al., 2010),以槲皮素 3-芸香糖苷(芦丁,购自 Sigma-Aldrich 公司)做标准曲线。吸取 200  $\mu\text{L}$  芦丁溶液或提取液,依次加 800  $\mu\text{L}$  水和 60  $\mu\text{L}$  50 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 NaNO<sub>2</sub> 混匀;5 min 后加 120  $\mu\text{L}$  100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 AlCl<sub>3</sub> 混匀,放置 6 min;加 400  $\mu\text{L}$  1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 NaOH 和 500  $\mu\text{L}$  水混匀,静置 15 min;测定 510 nm 处的吸光值;根据标准曲线计算样品中相对于芦丁的总黄酮含量,以 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>FW 表示,重复 3 次。

计算辅助色素效应指数  $CI = TFC/TAC$  (Wang et al., 2001)。利用 SPSS13.0 对数据进行花色与

类黄酮含量之间的相关性分析和多重逐步线性回归分析 (Zhang et al., 2008)。

2 结果与分析

2.1 不同色系蝴蝶石斛兰品种的花色在 CIE  $L^*a^*b^*$  表色空间的分布

不同色系蝴蝶石斛兰品种花瓣、唇瓣和萼片的颜色在 CIE  $L^*a^*b^*$  三维坐标上的分布规律不同。与花瓣 (图 1, A) 和萼片 (图 1, C) 颜色相比, 唇瓣 (图 1, B) 颜色更多集中在  $L^*$  轴的下部, 表明各品种唇瓣颜色比较接近, 而萼片颜色分布最松散, 在不同品种间的变化差异大。蝴蝶石斛兰各色系花瓣颜色参数分布范围如表 2。

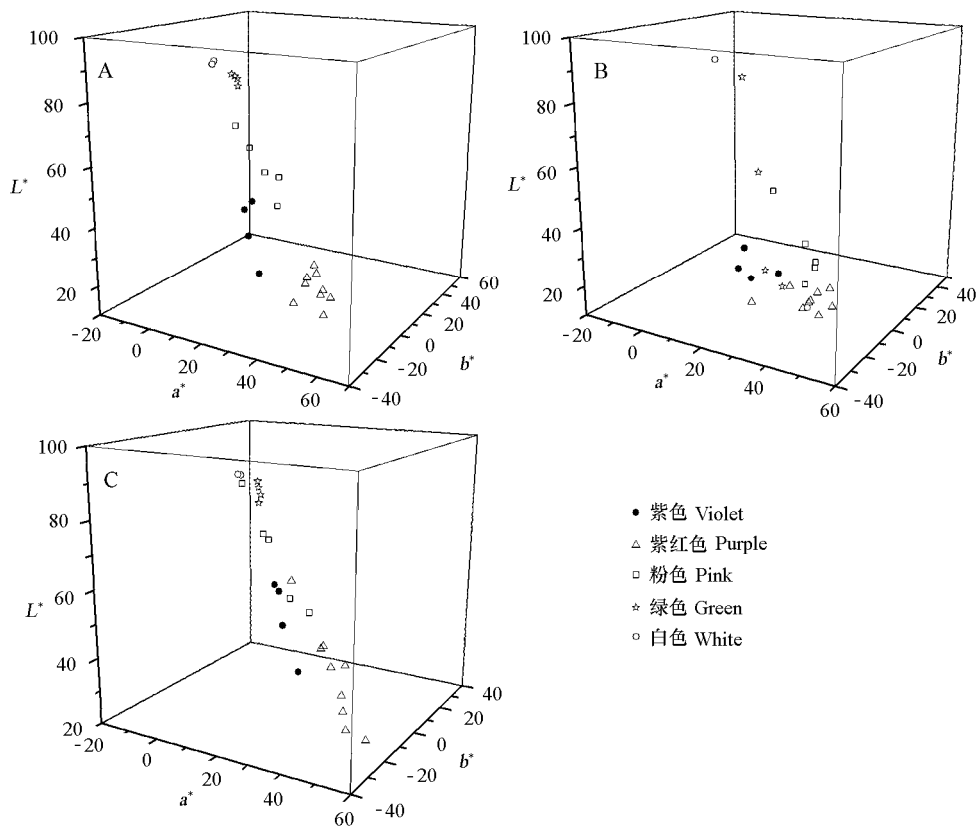


图 1 蝴蝶石斛兰品种花瓣 (A)、唇瓣 (B) 和萼片 (C) 颜色在 CIE  $L^*a^*b^*$  三维坐标上的分布 (色系以花瓣颜色划分)

Fig. 1 Distribution of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars by petal (A), labellum (B), and sepal (C) colors based on a trivariate CIE  $L^*a^*b^*$  coordinates (the color groups were differentiated by petal colors)

表 2 各色系蝴蝶石斛兰品种花瓣颜色  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值分布范围

色系 Color group	$L^*$	$a^*$	$b^*$
紫色系 Violet	29.88 ~ 51.22	19.85 ~ 31.10	- 22.75 ~ - 12.08
紫红色系 Purple	16.70 ~ 39.29	36.87 ~ 59.28	- 30.53 ~ - 10.21
粉色系 Pink	53.31 ~ 72.79	17.60 ~ 38.90	- 24.94 ~ - 13.19
绿色系 Green	73.42 ~ 79.10	- 16.56 ~ - 3.29	38.21 ~ 45.80
白色系 White	87.00 ~ 88.63	- 3.47 ~ - 5.38	8.28 ~ 9.92

如图 2 所示,  $L^*$  值在紫色、紫红色、粉红色和绿色系品种的唇瓣均小于花瓣和萼片;  $a^*$  值在紫色和紫红色系品种中, 唇瓣、花瓣和萼片的差别不大;  $b^*$  值在紫色系中, 萼片高于唇瓣和花瓣, 而在紫红色系中唇瓣较高。在粉红色系和绿色系中唇瓣  $a^*$  值均明显高于花瓣和萼片; 绿色系中花瓣和萼片的  $b^*$  值较高。

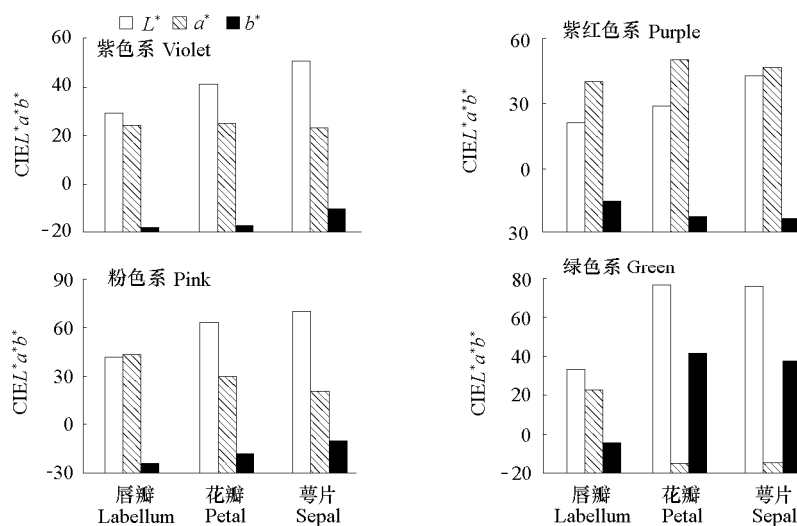


图 2 各色系蝴蝶石斛兰品种花朵不同部位的颜色差异

Fig. 2 The color differentiation in different floral part of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars

## 2.2 蝴蝶石斛兰品种花色与色素含量的关系

蝴蝶石斛兰花朵中的类黄酮色素含量与花色表型关系密切。明度  $L^*$  值与总花青素苷含量 (TAC) 和总黄酮含量 (TFC) 均呈极显著负相关, 相关系数分别为  $-0.637$  和  $-0.441$  ( $P < 0.001$ )。集合各品种花瓣、唇瓣和萼片的花色和色素含量数据, 以 TAC 和 TFC 为自变量, 分别以花色的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $C^*$  和  $h$  值为因变量, 应用多重逐步线性回归分析法得到以下关系式 ( $n = 72$ ):

$$L^* = -21.218\text{TAC} + 59.079 \quad (R = -0.637, P < 0.001) \quad (\text{I})$$

$$a^* = 9.596\text{TAC} + 22.024 \quad (R = 0.289, P = 0.014) \quad (\text{II})$$

$$b^* = -8.290\text{TAC} - 4.601 \quad (R = -0.264, P = 0.025) \quad (\text{III})$$

$$h = -27.917\text{TAC} + 17.196 \quad (R = -0.327, P = 0.005) \quad (\text{IV})$$

在逐步线性回归分析过程中, TFC 没有被纳入方程, 可知只有 TAC 与  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  和  $h$  均存在显著的线性关系。(I) 式表明, 随着花青素苷含量的增加, 花色的明度降低; (II) 式表明, 花青素苷的积累有助于提高花色的红色程度; (III) 式和 (IV) 式表明, 随着花青素苷含量的增加, 花色的蓝色程度加大, 并向紫红色方向变化。

## 2.3 蝴蝶石斛兰花朵中类黄酮组成分析

### 2.3.1 花青素苷

结合质谱数据, 在 515 nm 波长下从紫色、紫红色和粉红色蝴蝶石斛兰中检测并鉴定出 28 种花青素苷 (峰 a1 ~ a27) (图 3), 且所有化合物的苷元离子均为  $m/z$  287, 为矢车菊素苷元的特征碎片离子 (高锦明, 2003; Downey & Rochfort, 2008; Zhu et al., 2012)。各组分的结构推定结果详见表 3。

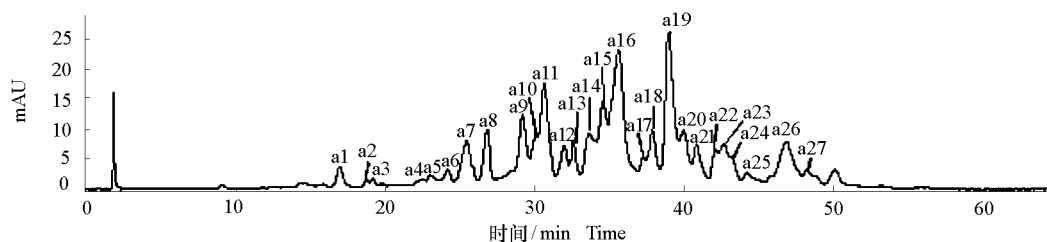


图 3 蝴蝶石斛兰品种‘幽兰’花朵中花青素苷的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of anthocyanins in *Phalaenopsis* type dendrobium cultivar ‘Sayuri’

表 3 蝴蝶石斛兰品种花朵中的花青素苷组成 HPLC - MS 分析及结构暂定

Table 3 HPLC - MS analysis and tentatively structural identification of anthocyanins in flowers of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars

峰号 No.	保留时间/min Retention time	[M] <sup>+</sup> (m/z)	碎片离子/(m/z) Fragment ions	暂定结构 Tentative identification	检出样品编号 Sample No.
a1	17.0	1423	979(38), 535(7), 449(38), 287(100)	Cy3MaG7pHGG3'pHGG	v1, p1, p2, p3, k1
a2	18.9	935	773(25), 611(42), 449(97), 287(58)	Cy3G7CaG3'G	p1
a3	19.3	1217	1055(4), 779(+Na <sup>+</sup> )(100), 617(+Na <sup>+</sup> )(11), 611(4), 449(19), 287(51)	Cy3G7GalpCG3'pCG	p1
a4	22.4	1303	1141(18), 979(23), 681(53), 611(31), 449(25), 287(100)	Cy3G7GalpCG3'MapCG	v1, p1
a5	23.1	949	787(95), 625(100), 611(34.13), 449(25), 287(58)	Cy3FeG7G3'G	v1, p1
a6	24.2	1261	817(22), 655(26), 611(28), 449(100), 287(85)	Cy3G7pHGG3'cisSiG	p1, p2, p3, p4, k1
a7	25.5	979	817(42), 655(29), 611(100), 449(35), 287(40)	Cy3G7G3'SiG	p1, p2, p3, p4, k1
a8	26.8	1261	979(100), 817(64), 655(6), 611(42), 449(77), 287(30)	Cy3G7pHGG3'transSiG	p1, p2, p3, p4, k1
a9	29.2	1141	979(27), 773(29), 611(29), 449(5), 287(13)	Cy3G7CaG3'cisSiG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a10	30.0	1347	1261(100), 1141(14), 979(16), 697(21), 535(4), 611(7), 449(11), 287(32)	Cy3MaG7MapHG3'pHGG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a11	30.7	1111	949(21), 773(16), 611(23), 449(6), 287(8)	Cy3G7CaG3'FeG	v1, p1, p4
a12	32.0	1141	979(28), 817(34), 655(25), 611(3), 449(4), 287(4)	Cy3G7CaG3'transSiG	p1, p2, p3, p4, k1
a13	32.6	1065	817(11), 697(30), 449(12), 287(11)	Cy3G7SiG3'MaG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a14	33.6	1155	993(28), 787(31), 625(21), 611(13), 449(3), 287(12)	Cy3FeG7SiG3'G	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a15	34.6	1185	1023(32), 979(6), 817(40), 655(34), 449(3), 287(4)	Cy3G7SiG3'SiG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a16	35.6	1125	963(24), 817(13), 655(11), 449(4), 287(16)	Cy3G7pCG3'SiG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a17	37.2	1167	1021(11), 859(52), 611(11), 449(13), 287(17)	Cy3MaG7pCG3'CaG	v1, p1, p4
a18	37.9	1099	937(18), 817(42), 655(23), 611(10), 449(26), 287(56)	Cy3G7pHG3'SiG	p1, p2, p3, p4, k1
a19	39.0	1271	903(71), 817(14), 655(16), 449(7), 287(13)	Cy3MaG7SiG3'SiG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a20	40.0	1211	1035(10), 873(50), 697(6), 625(10), 449(5), 287(10)	Cy3cisFeG7cisFeG3'MaG	v1, p1, p4
a21	40.8	1079	711(33), 549(5), 449(8), 287(12)	Cy3G7SiG3'SuG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a22	42.1	1241	1065(12), 903(100), 655(43), 449(8), 287(20)	Cy3SiG7FeG3'MaG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a23	42.7	1211	1035(18), 873(60), 625(10), 287(9)	Cy3transFeG7transFeG3'MaG	v1, p1, p4
a24	43.3	1241	1079(4), 1035(25), 873(74), 611(14), 449(3), 287(17)	Cy3CaG7SiG3'SuG	v1, p1, p2, p3, k1
a25	44.2	1181	1035(17), 873(66), 611(17), 449(8), 287(33)	Cy3CaG7pCG3'SuG	v1, p1
a26	46.8	1285	1079(40), 917(53), 655(24), 449(6), 287(31)	Cy3SiG7SiG3'SuG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
		1255	1049(13), 887(100), 625(21), 449(5), 287(22)	Cy3FeG7SiG3'SuG	v1, p1, p2, p3, p4, k1
a27	48.3	1169	887(62), 611(77), 449(25), 287(44)	Cy3G7pHG3'FeSuG	v1, p1

注：括号内数字表示碎片的相对丰度%；Cy：矢车菊素；G：葡萄糖苷；Ca：咖啡酰；Fe：阿魏酰；Gal：没食子酰；Ma：丙二酰；pC：对羟基香豆酰；pH：对羟基苯甲酰；Si：芥子酰；Su：琥珀酰；v1：‘紫眸’；p1：‘幽兰’；p2：‘红牛’；p3：‘紫色火焰’；p4：‘三亚阳光’；k1：‘粉色浪漫’。

Note: Numbers in brackets are the relative abundance % of fragments in MS spectra; Cy: cyanidin; G: glucoside; Ca: caffeoyl; Fe: feruloyl; Gal: galloyl; Ma: malonyl; pC: *p*-coumaryl; pH: *p*-hydroxybenzoyl; Si: sinapyl; Su: succinyl; v1: ‘Coerulea Blue’; p1: ‘Sayuri’; p2: ‘Red Bull’; p3: ‘Mangosteen’; p4: ‘Sunya Sunshine’; k1: ‘Sakura Pink’.

### 2.3.2 黄酮醇苷

根据 HPLC - MS 数据, 在 350 nm 波长下共检测到 19 种黄酮醇 (图 4), 其苷元离子共有 3 种, 即  $m/z$  303 (槲皮素)、287 (山奈酚) 和 317 (异鼠李素) (Kuehnle et al., 1997; Williams et al., 2002; Cuyckens & Claeys, 2004; Li et al., 2009)。各组分的结构推定结果详见表 4。

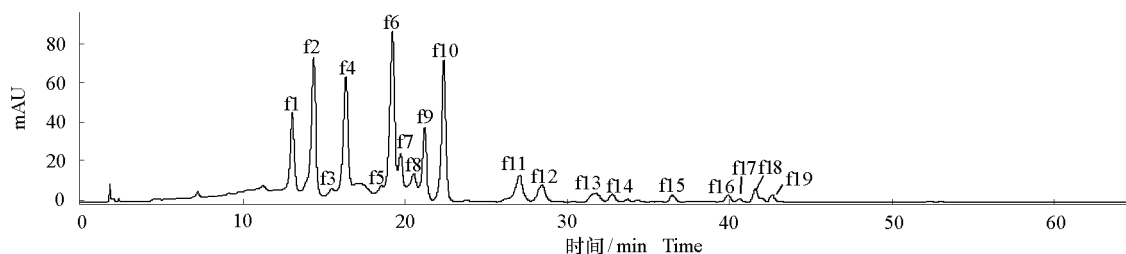


图 4 蝴蝶石斛兰品种‘曼谷绿’花朵中黄酮醇苷的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of flavonol glycosides in *Phalaenopsis* type dendrobium cultivar ‘Bangkok Green’

表 4 蝴蝶石斛兰品种花朵中的黄酮醇苷组成 HPLC - MS 分析及结构暂定

Table 4 HPLC - MS analysis and tentatively structural identification of flavonol glycosides in flowers of *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars

峰号 No.	保留时间/ min	$[M+H]^+/[M-H]^-$ ( $m/z$ )	PI/NI 碎片离子/ ( $m/z$ )	暂定结构 Tentative identification	检出样品编号 Sample No.
f1	13.1	773/771	627(24), 611(8), 465(100), 303(22)/	Qu3Ne7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1
f2	14.4	773/771	627(43), 611(7), 465(100), 303(15)/	Qu3Ru7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1
f3	15.4	757/755	611(27), 449(100), 287(30)/	Km3RGa7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f4	16.4	757/755	611(30), 595(3), 449(100), 287(20)/	Km3Ne7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f5	18.5	611/609	449(100), 287(78)/	Km3G7G	p1, p2, p3, p4, g1, w1
f6	19.2	757/755	611(38), 595(6), 449(100), 287(19)/	Km3Ru7G	v1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f7	19.8	787/785	641(19), 625(4), 479(100), 317(11)/	Is-RGG	p4, g1
f8	20.6	787/785	641(18), 625(3), 479(100), 317(18)/	Is-RGG	p3, p4, g1
f9	21.1	787/785	641(30), 625(4), 479(100), 317(14)/	Is-RGG	p3, p4, g1
f10	22.4	787/785	641(25), 625(3), 479(100), 317(15)/	Is-RGG	p4, g1
f11	27.1	627/625	303(100)/301(46)	Qu3Ga7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f12	28.4	627/625	303(100)/301(42)	Qu3G7G	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f13	31.4	633( $[M+Na]^+$ )/609	465(3), 303(36)/	Qu3RGa	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1
f14	32.6	633( $[M+Na]^+$ )/609	465(6), 303(42)/	Qu3Ru	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f15	36.4	617( $[M+Na]^+$ )/593	287(34)/	Km3RGa	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f16	39.8	595/593	287(38)/	Km3Ru	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f17	40.5	647( $[M+Na]^+$ )/623	317(36)/	Is-RG	g1
f18	41.5	647( $[M+Na]^+$ )/623	317(52)/	Is-RG	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1
f19	42.6	647( $[M+Na]^+$ )/623	479(5), 317(48)/	Is-RG	v1, p1, p2, p3, p4, k1, g1, w1

注: 括号内数字表示碎片的相对丰度%; Qu: 槲皮素; Km: 山奈酚; Is: 异鼠李素; G: 葡萄糖苷; Ga: 半乳糖苷; Ne: 新橙皮糖苷; R: 鼠李糖苷; Ru: 芸香糖苷; v1: ‘紫眸’; p1: ‘幽兰’; p2: ‘红牛’; p3: ‘紫色火焰’; p4: ‘三亚阳光’; k1: ‘粉色浪漫’; g1: ‘曼谷绿’; w1: ‘白鸽子’。

Note: Numbers in brackets are the relative abundance of fragments in MS spectra; Qu: quercetin; Km: kaempferol; Is: isorhamnetin; G: glucoside; Ga: galactoside; Ne: neohesperidoside; R: rhamnoside; Ru: rutinoside; v1: ‘Coerulea Blue’; p1: ‘Sayuri’; p2: ‘Red Bull’; p3: ‘Mangosteen’; p4: ‘Sunya Sunshine’; k1: ‘Sakura Pink’; g1: ‘Bangkok Green’; w1: ‘White Dove’.

2.4 不同色系蝴蝶石斛兰品种花朵中类黄酮的组成特征

由表 3 和表 5 可知, 不同色系蝴蝶石斛兰花朵中的花青素苷种类存在明显的差异。紫红色系中深紫色‘幽兰’含有所有检出的花青素苷, 共 28 种; 其次为紫色系‘紫眸’, 含有 21 种; 粉红色系‘三亚阳光’含有 20 种; 紫红色系‘红牛’和‘紫色火焰’与粉红色系的‘粉色浪漫’花青素苷组成相同, 含有 18 种。花青素苷的几种主要成分峰 a9、a10、a15 和 a19 等在不同色系的花中都存在。深紫红色品种和紫色品种具有其特殊的花青素苷组分, 例如峰 a2~a5、a25、a27 等, 但含量较低。

表 4 和表 5 显示, 各色系蝴蝶石斛兰品种都含有黄酮醇 3 种苷元类型, 但黄酮醇苷种类存在较大差异。绿色系‘曼谷绿’含有 19 种黄酮醇苷, 其次是粉红色系的‘三亚阳光’, 含有 18 种; 紫红色系的‘紫色火焰’含有 16 种, ‘红牛’含有 14 种; 紫色系‘紫眸’、紫红色系‘幽兰’和粉红色系‘粉色浪漫’含有 13 种; 白色系‘白鸽子’所含黄酮醇苷种类最少, 11 种。整体上, 除‘紫色火焰’和‘三亚阳光’外, 其他含有花青素苷的品种中黄酮醇苷组成比较接近。

表 5 各色系蝴蝶石斛兰品种花朵中的类黄酮组成  
Table 5 The flavonoid composition in *Phalaenopsis* type dendrobium cultivars flowers

色系	花青素苷	黄酮醇苷
Color group	Anthocyanins	Flavonol glycosides
紫色系 Violet	a1, a4, a5, a9~a11, a13~a17, a19~a27	f1~f4, f6, f11~f16, f18, f19
紫红色系 Purple	a1~a27	f1~f16, f18, f19
粉色系 Pink	a1, a6~a10, a12~a16, a18, a19, a21, a22, a24, a26	f1~f4, f6, f11~f16, f18, f19
绿色系 Green		f1~f19
白色系 White		f3~f6, f11, f12, f14~f16, f18, f19

3 讨论

3.1 由蝴蝶石斛兰花朵中的类黄酮成分推测其类黄酮代谢途径

此前针对蝴蝶石斛兰花朵中的类黄酮成分研究主要是在花青素苷成分分离的基础上, 对几种花青素苷进行结构解析。在苷元水平上, 共鉴定了 3 种花青素苷元和 4 种黄酮醇苷元 (Kuehnle et al., 1997); 在糖苷水平上, 仅报道了 4 种花青素苷和 9 种黄酮醇苷 (Williams et al., 2002; Tatsuzawa et al., 2005), 限制了对蝴蝶石斛兰花朵中类黄酮代谢的整体认识。本研究中利用 HPLC-MS 分析了蝴蝶石斛兰品种花朵中的类黄酮组成, 共鉴定和推定了 28 种矢车菊素糖苷和 19 种山奈酚、槲皮素和异鼠李素糖苷。本研究中发现, 蝴蝶石斛兰品种花朵中的花青素苷被高度酰基化, 除已报道的酰基化类型外, 咖啡酰、阿魏酰、*p*-羟基香豆酰、没食子酰和琥珀酰等也是蝴蝶石斛兰花青素苷的酰基化类型。此外, 本研究中检测到了多种 Is 糖苷, 但未检测到酰基化 Qu 糖苷以及 Pn 和 Pg 型花青素苷 (Kuehnle et al., 1997), 与前期报道相比可能是研究材料之间的遗传差异造成的。结合前人的研究成果, 推测蝴蝶石斛兰花朵中类黄酮代谢从香豆酰-CoA 和丙二酰-CoA 开始, 在查耳酮合成酶 (CHS) 和查耳酮异构酶 (CHI) 的催化下生成柚皮素, 进而分别受黄烷酮-3-羟化酶 (F3H) 和类黄酮-3'-羟化酶 (F3'H) 的作用, 向 B 环上有一个 4'-OH 的二氢山奈酚 (DHK) 和 3',4'两个 OH 的二氢槲皮素 (DHQ) 两个方向进行合成。DHK 和 DHQ 分别在黄酮醇合成酶 (FLS) 的催化下生成 Km 和 Qu, 进而在甲基转移酶 (MT) 作用下生成 Is。DHK 和 DHQ 在二氢黄酮醇还原酶 (DFR) 和花青素苷元合成酶 (ANS) 以及 MT 的先后作用下生成 Pg、Cy 和 Pn。花青素苷元和各种黄酮醇苷元在糖基转移酶 (GT) 和酰基转移酶 (AT) 的作用下, 生成各种类黄酮糖苷。目前在



蝴蝶石斛兰中尚未检测到以飞燕草素为苷元的花青素苷, 由于仅检测到黄酮醇苷, 推测其缺少黄酮合成途径。

### 3.2 类黄酮在不同色系蝴蝶石斛兰品种花朵中的分布规律

不同色系品种花朵中的类黄酮分布规律并不一致, 深紫红色和紫色品种中花青素苷各组分之间的比例差异较小, 花青素苷种类较多; 而紫红色和粉红色品种中以峰 a15 和 a19 两个主要成分为主, 花青素苷组分较少。紫红色系、紫色系和粉红色系花中的黄酮醇苷组成相似, 各组分含量均衡, 而绿色系和白色系花中的黄酮醇苷以 Qu、Km 和 Is 的 3,7-二糖苷为主(峰 f12 以前), 黄酮醇 3-糖苷含量很少(峰 f13~f19), 推测这些黄酮醇 3-糖苷的积累可能与花青素苷合成相关联。

### 3.3 类黄酮对蝴蝶石斛兰花色表型的贡献

根据蝴蝶石斛兰不同色系品种花色与类黄酮含量之间的关系, 总花青苷含量是影响花色的明暗程度和色调的重要因素。总花青素苷含量的增加, 可使花色变暗, 颜色向紫红色和紫色方向变化。这与瓜叶菊(孙卫等, 2009)等花卉相似。在紫红色和粉红色的花朵中, 主要的花青素苷成分是 a15 和 a19, 推测这些使花呈现红色的主要因素。在紫色系蝴蝶石斛兰花朵中, 除这两种花青素苷外, 还含有较多的 a9、a11 和 a16 使花色的紫色程度加深。

在花瓣中, 黄酮和黄酮醇通常表现出对花青素苷的辅助色素效应, 使花色的蓝色程度增加(Fossen & Andersen, 1998), 以辅助色素效应指数 CI 表示, 当 CI 大于 5 时可以认为黄酮和黄酮醇有明显的辅助色素作用(Sakata et al., 1995)。紫色系中只有‘Copper King’、紫红色中只有‘三亚阳光’的整个花朵 CI 值大于 5。而粉红色‘扇贝兰’整个花朵、‘宝贝’和‘粉色浪漫’花瓣和萼片的 CI 值均大于 5。这表明黄酮醇苷的辅助色素作用在蝴蝶石斛兰紫色系和紫红色系花朵中表现不明显, 而在粉红色系的花中则比较普遍。

### 3.4 蝴蝶石斛兰花色育种的建议

本研究中蝴蝶石斛兰不同品种的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  参数分布表明, 花色主要集中在紫红色和紫色区域, 缺少纯正的红色品种。花朵中花青素苷元也仅有矢车菊素一种, 虽然有多样化的酰基化修饰, 也很难使花色变异的范围扩大。蝴蝶石斛兰品种的花朵中缺少橙红—红色的天竺葵素, 而含有黄酮醇山奈酚, 推测二氢山奈酚到天竺葵素的合成途径受阻, 主要受生成无色天竺葵素的 *DFR* 基因和生成天竺葵素 *ANS* 基因所控制。因此, 可以考虑通过育种手段引入含有天竺葵素的种质(Kuehnle et al., 1997), 扩大蝴蝶石斛兰品种的花色变异。

## References

- Bai Xin-xiang, Hu Ke, Dai Si-lan, Wang Liang-sheng. 2006. Components of flower pigments in the petals of different color *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars. Journal of Beijing Forestry University, 28 (5): 84 - 89. (in Chinese)
- 白新祥, 胡可, 戴思兰, 王亮生. 2006. 不同花色菊花品种花色成分的初步分析. 北京林业大学学报, 28 (5): 84 - 89.
- Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. Journal of Mass Spectrometry, 39 (1): 1 - 15.
- Downey M O, Rochfort S. 2008. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. Journal of Chromatography A, 1201: 43 - 47.
- Feng Zhi-biao, Liu Chun-hong, Zhang Xiao-song. 2008. Fast determination of total anthocyanins of *Prunus maackii* by visible spectrophotometry. Science and Technology of Food Industry, 29 (8): 285 - 288. (in Chinese)
- 冯志彪, 刘春红, 张晓松. 2008. 可见分光光度法快速测定山桃稠李子总花色素. 食品工业科技, 29 (8): 285 - 288.
- Fossen T, Andersen M. 1998. Cyanidin 3-O-(6'-succinyl- $\beta$ -glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis*. Phytochemistry, 49

- (4): 1065 – 1068.
- Gao Jin-ming. 2003. Phytochemistry. Beijing: Science Press: 166. (in Chinese)
- 高锦明. 2003. 植物化学. 北京: 科学出版社: 166.
- Hong Yan, Bai Xin-xiang, Sun Wei, Jia Feng-wei, Dai Si-lan. 2012. The numerical classification of chrysanthemum flower color phenotype. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1330 – 1340. (in Chinese)
- 洪 艳, 白新祥, 孙 卫, 贾锋伟, 戴思兰. 2012. 菊花品种花色表型数量分类研究. *园艺学报*, 39 (7): 1330 – 1340.
- Kanchit T. 1984. Flower pigments in yellow *Dendrobium* species and hybrids [Ph. D. Dissertation]. Honolulu: University of Hawaii, HI, USA.
- Kuehnle A R, Lewis D H, Markham K R, Mitchell K A, Davies K M, Jordan B R. 1997. Floral flavonoids and pH in *Dendrobium* orchid species and hybrids. *Euphytica*, 95: 187 – 194.
- Li C H, Du H, Wang L S, Shu Q Y, Zheng Y R, Xu Y J, Zhang J J, Zheng J, Yang R Z, Ge Y X. 2009. Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony (*Paeonia* Section *Moutan*) yellow flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 8496 – 8503.
- Pan Li-jing, Cao You-pei, Xiao Yang, Fan Gan-qun, Chen Wei-ting. 2009a. Review of research on breeding technology of *Dendrobium*. *Journal of Guangdong Agricultural Science*, (9): 71 – 73. (in Chinese)
- 潘丽晶, 曹友培, 肖 杨, 范干群, 陈伟庭. 2009a. 观赏石斛育种技术研究综述. *广东农业科学*, (9): 71 – 73.
- Pan Li-jing, Fan Gan-qun, Zhang Miao-bin, Xiao Yang, Cao You-pei. 2009b. Plant expression vectors construction of *dfr* gene from *Dendrobium*. *Biotechnology Bulletin*, (8): 71 – 75. (in Chinese)
- 潘丽晶, 范干群, 张妙彬, 肖 杨, 曹友培. 2009b. 石斛兰 *dfr* 基因植物表达载体的构建. *生物技术通报*, (8): 71 – 75.
- Qiu J, Xue X, Chen F, Li C, Nuer B, Wang X, Baima Y, Zhao Q, Zhao D, Ma F. 2010. Quality evaluation of snow lotus (*Saussurea*): Quantitative chemical analysis and antioxidant activity assessment. *Plant Cell Reports*, 29: 1325 – 1337.
- Saito N, Toki K, Uesata K, Shigihara A, Honda T. 1994. An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*. *Phytochemistry*, 37: 245 – 248.
- Sakata Y, Aoki N, Tsunematsu S, Nishikouri H, Johjima T. 1995. Petal coloration and pigmentation of tree peony bred and selected in Daikon Island (Shimane Prefecture). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64 (2): 351 – 357.
- Sun Wei, Li Chong-hui, Wang Liang-sheng, Dai Si-lan, Xu Yan-jun. 2009. Anthocyanins present in flowers of *Senecio cruentus* with different colors. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (12): 1775 – 1782. (in Chinese)
- 孙 卫, 李崇晖, 王亮生, 戴思兰, 徐彦军. 2009. 花青苷成分对瓜叶菊花色的影响. *园艺学报*, 36 (12): 1775 – 1782.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54: 733 – 749.
- Tatsuzawa F, Yukawa T, Shinoda K, Saito N. 2005. Acylated anthocyanins in the flowers of genus *Dendrobium* section *Phalaenanthus* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 625 – 629.
- Wang L S, Shiraishi A, Hashimoto F, Aoki N, Shimizu K, Sakata Y. 2001. Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars. *Journal of Plant Research*, 114: 33 – 43.
- Williams C A, Greenham J, Harborne J B, Kong J M, Chia L S, Goh N K, Saito N, Toki K, Tatsuzawa F. 2002. Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv. 'Pompadour'. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 667 – 675.
- Zhang J, Wang L S, Gao J M, Shu Q Y, Li C H, Yao J, Hao Q, Zhang J J. 2008. Determination of anthocyanins and exploration of relationship between their composition and petal coloration in crape myrtle (*Lagerstroemia hybrid*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (5): 581 – 588.
- Zhu M L, Zheng X C, Shu Q Y, Li H, Zhong P X, Zhang H J, Xu Y J, Wang L J, Wang L S. 2012. Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars. *Plos One*, 7 (4): e34335.