

文章编号:1001-7380(2017)05-0018-04

羊蹄躅花期花瓣类胡萝卜素的含量变化

何丽斯,肖 政*,苏家乐,刘晓青,李 畅,陈尚平

(江苏省农业科学院休闲农业研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏 南京 210014)

摘要:为揭示羊蹄躅的花瓣花色形成机理和花色新品种选育提供参考。以羊蹄躅花发育的4个时期花瓣为材料,采用高效液相色谱法(HPLC法)测定4种类胡萝卜素的含量,并分析其变化规律。结果表明,高效液相色谱法可以对羊蹄躅花瓣中的叶黄质、玉米黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素完全分离并进行分析。羊蹄躅在花蕾期已经有大量类胡萝卜素积累。 β -胡萝卜素在花发育过程中,其含量远高于 α -胡萝卜素、叶黄质和玉米黄质, α -胡萝卜素的含量在整个花发育过程中含量均较低; β -胡萝卜素随着花的发育,其含量先降后升,在盛花期达到最高(95.25 $\mu\text{g/g}$ FW),占检测类胡萝卜素总量的92.89%;叶黄质和玉米黄质则相反,先升后降,在花朵膨大期含量最高(48.15 $\mu\text{g/g}$ FW和18.71 $\mu\text{g/g}$ FW),分别占检测类胡萝卜素总量的42.18%和16.39%,在盛花期含量均较低。认为 β -胡萝卜素是影响羊蹄躅花瓣着色的一个主要因素,其含量变化与羊蹄躅的花色形成密切相关。

关键词:羊蹄躅;类胡萝卜素;高效液相色谱;叶黄质; β -胡萝卜素

中图分类号:Q945.6⁺4

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2017.05.004

Changes of carotenoids content in flower petal of *Rhododendron molle* during flower development

HE Li-si, XIAO Zheng*, SU Jia-le, LIU Xiao-qing, LI Chang, CHEN Shang-ping

(Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The changes of carotenoids content in the flower petal of *Rhododendron molle* during flower development were investigated. Four kinds of carotenoids were separated and their contents were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that there were a large number of carotenoids accumulated in the petal during the flower early development. The content of β -carotene was much higher than the other carotenoids during the flower development while the content of α -carotene was always low. The content of β -carotene tended to decline at the flower expanding stage and then rise to 95.25 $\mu\text{g/g}$ FW at the full flowering stage, accounting for 92.89% of the total carotenoid content. On the contrary, the content of lutein and zeaxanthin rose to 48.15 and 18.71 $\mu\text{g/g}$ FW at the flower expanding stage, accounting for 42.18% and 16.39% of total carotenoid content, respectively whereas their contents were low at the full flowering stage. It was indicated that β -carotene played an important role in the coloring of *R. molle* flower, and the changes of β -carotene content was closely related with the flower color formation of *R. molle*.

Key words: *Rhododendron molle*; Carotenoids; High performance liquid chromatography; Lutein; β -Carotene

植物的花色是由于植物内不同色素物质的存在,主要与类黄酮(flavonoids)、类胡萝卜素(carote-

noids)和甜菜色素(betalains)等次生代谢物的积累有关^[1]。近年来,利用基因工程技术开展花色分子

收稿日期:2017-08-23;修回日期:2017-09-18

基金项目:国家自然科学基金“基于转录组学挖掘调控羊蹄躅花瓣黄色性状形成的关键基因”(31600570);江苏省自然科学基金“调控羊蹄躅花色突变体花瓣呈色的关键基因挖掘”(BK20150548);江苏省林业科技创新与推广项目“杜鹃花新品种‘蝶舞’、‘蝶恋’工厂化育苗技术及应用推广”(lykj[2017]48)

作者简介:何丽斯(1981-),女,广东中山人,副研究员,博士。主要从事观赏植物生物工程及生理方面的研究。E-mail: alichelisi@foxmail.com。

*通信作者:肖 政(1984-),男,福建三明人,副研究员,博士。主要从事花卉遗传育种研究。E-mail: xzforestry@163.com。

育种已经成为花卉新品种选育的重要途径^[2]。其中,蓝色花的形成机制研究最为深入,并取得重大进展^[3],而有关黄色花的形成机理的研究较少。大部分植物花瓣黄色的深浅与其积累类胡萝卜素的种类和含量有关。类胡萝卜素是胡萝卜素(carotene)和叶黄素(xanthophylls)的统称,广泛分布在植物的花、叶、根和果皮等部位,使其呈现黄色、橙色或红色^[4]。高效液相色谱法(HPLC)已经广泛应用于类胡萝卜素的测定和分析,该方法具有良好的分离和分析能力,重复性好,操作自动化^[5]。

杜鹃花虽然花色繁多,但主要以红、粉、白、紫为主,而黄色的杜鹃种质资源十分稀缺。羊蹄躑[*Rhododendron molle*(Blume) G.Don]又名黄杜鹃,隶属杜鹃花属羊蹄躑亚属,落叶灌木,是杜鹃花属植物中极少数开黄色花的珍贵物种^[6],是培育杜鹃花黄色新品种的重要种质资源。目前国内外学者对羊蹄躑的研究,还主要集中在具有药用价值的植物化学成分上^[7-12],对调控其花色的物质研究不够充分,尤其是对类胡萝卜素的研究还少见报道。本文拟用HPLC法,对羊蹄躑开花过程中,花瓣不同时期的类胡萝卜素含量进行测定,研究类胡萝卜素代谢规律与羊蹄躑花色形成的关系,以期揭示羊蹄躑花瓣花色形成机理奠定基础,为杜鹃花的花色新品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

羊蹄躑新鲜花瓣采自江苏省农业科学院杜鹃花种质资源圃。选取4株生长一致和花芽较多的植株,依次采集花蕾期(S1)、膨大期(S2)、初开期(S3)和盛开期(S4)的花瓣。每个时期采集样本3份,用液氮速冻后,置于-70℃冰箱备用。

1.2 试剂和设备

类胡萝卜素标准品 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、玉米黄质和叶黄质购自Sigma公司。丙酮、甲醇和甲基叔丁基醚为色谱纯。

高效液相色谱系统:Agilent 1100系列,VWD紫外检测器,YMC-C30色谱分析柱。

1.3 标准溶液的配制

准确称取各标准品,用丙酮溶解,配制质量浓度为100,50,5,1,0.1,0.05 mg/L的标准液及各标准品质量浓度为20,10,1,0.2,0.1 mg/L的混合标准溶液。

1.4 类胡萝卜素提取

准确称取0.8 g羊蹄躑花瓣,用液氮磨碎,加入

4 mL丙酮,避光4℃提取24 h,再16 000×g低温离心10 min,取上清液,经0.22 μ m有机滤头过滤,获得样品溶液。

1.5 HPLC分析

将色素提取液样品用Agilent 1100系统进行分析,样品重复测定3次。试验选用YMC-C30色谱柱,以甲基叔丁基醚和甲醇的混合液(体积比为30:70)为流动相等度洗脱,流速为1.0 mL/min,检测波长为450 nm,柱温25℃,进样量20 μ L^[13]。

1.6 类胡萝卜素含量的测定

用HPLC法测定,分析条件同HPLC分析。分别将各质量浓度的标准品及混合溶液进样分析,将峰面积与标准品含量进行线性回归分析,得到标准曲线回归方程。利用标准曲线回归方程,根据样品色素的峰面积,计算相应色素成分的含量。

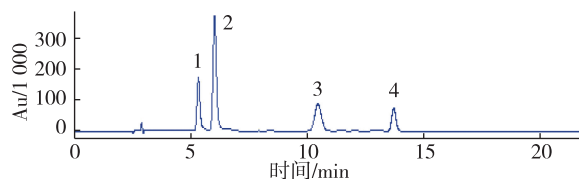
1.7 数据分析及作图

采用Microsoft Office Excel 2003进行数据整理及作图。

2 结果与分析

2.1 标准品及样品色谱图

采用HPLC法,在本试验的色谱条件下,标准品和样品溶液的色谱图基线平稳,各色谱峰分离度好(见图1,2)。



1:叶黄质;2:玉米黄质;3: α -胡萝卜素;4: β -胡萝卜素

图1 类胡萝卜素混合标准溶液HPLC图

2.2 类胡萝卜素标准品的检测

用HPLC法测定不同质量浓度的类胡萝卜素标准品,将各标准品的峰面积与对应的质量浓度分别进行线性回归分析,得到类胡萝卜素各标准品的线性回归方程见表1。从表1可以看出,在相应的线性范围内,各种类胡萝卜素的线性关系较好,相关系数达到0.999,准确性较高。

2.3 羊蹄躑花瓣中的类胡萝卜素组成

羊蹄躑花瓣在450 nm下检测到类胡萝卜素,其中有4个色谱峰与标准品相对应,依次是叶黄质、玉米黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素(见图2)。在羊蹄躑开花过程中, β -胡萝卜素是检测到含量最多的

| 表 1 回归方程和相关系数 | | | |
|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| 类胡萝卜素 | 回归方程 | 相关系数 (R^2) | 线性范围/ (mg/L) |
| 叶黄质 | $y=174.570x-4.590$ | 0.999 | 0.05—100 |
| 玉米黄质 | $y=392.066x+6.330$ | 0.999 | 0.05—100 |
| α -胡萝卜素 | $y=176.129x-4.015$ | 0.999 | 0.05—100 |
| β -胡萝卜素 | $y=70.182x+2.966$ | 0.999 | 0.05—100 |

一种类胡萝卜素,在羊蹄躑花发育的4个时期中,占检测到的类胡萝卜素总量的比例分别为61.01%,40.50%,85.23%,92.89%;其次是叶黄质,占检测到的类胡萝卜素总量的比例分别为25.39%,42.18%,9.24%,4.13%; α -胡萝卜素含量最少,占检

测到的类胡萝卜素总量的比例分别为2.57%,0.93%,1.31%,1.30%。

2.4 羊蹄躑开花过程中类胡萝卜素含量的变化

羊蹄躑在开花过程中,其类胡萝卜素含量变化存在显著差异(见表2)。 β -胡萝卜素含量先降后升,在膨大期含量最低为46.22 $\mu\text{g/g}$ FW,在盛开期含量最高为95.25 $\mu\text{g/g}$ FW,占检测类胡萝卜素总量的92.89%。 α -胡萝卜素含量也是先降后升,在初开期含量最低为1.05 $\mu\text{g/g}$ FW,仅占检测类胡萝卜素总量的0.93%,但在花蕾期含量最高为2.63 $\mu\text{g/g}$ FW。玉米黄质和叶黄质都是先升后降,在膨大期含量最高分别为18.71,48.15 $\mu\text{g/g}$ FW,在盛开期含量均较低。

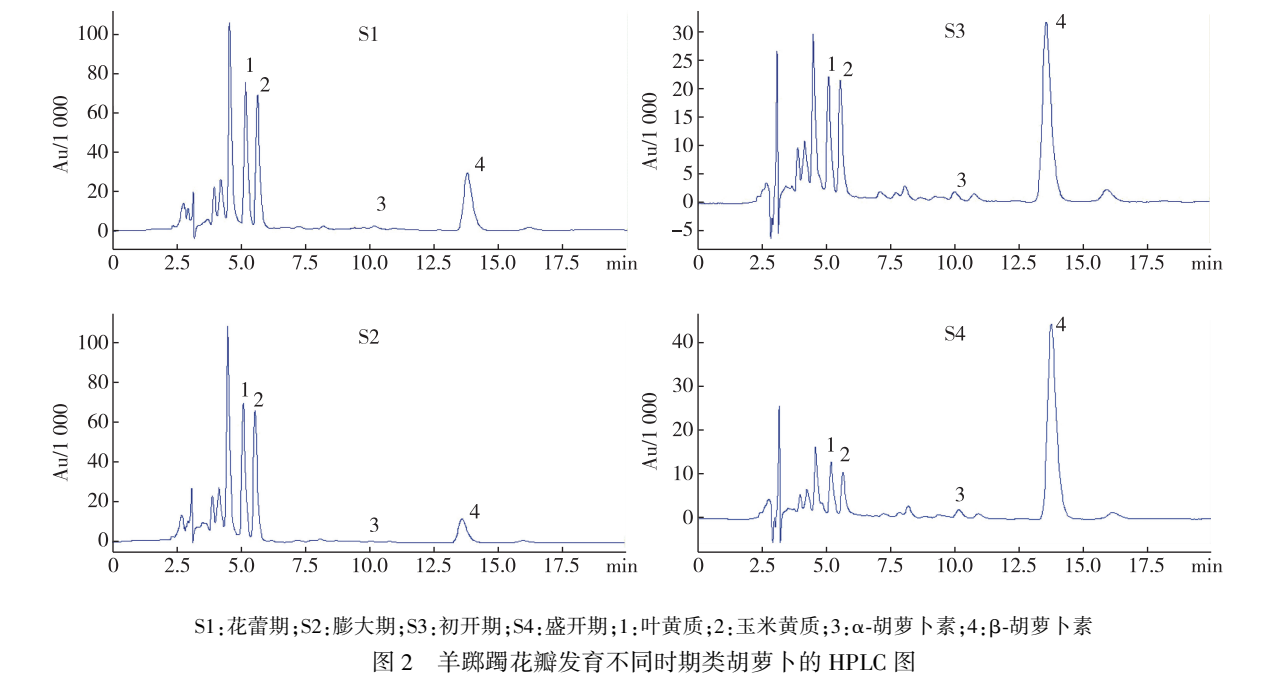


表 2 羊蹄躑不同花期花瓣类胡萝卜素的含量比较

| 花发育期 | 类胡萝卜素组分/($\mu\text{g/g}$ FW) | | | |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 叶黄素 | 玉米黄素 | α -胡萝卜素 | β -胡萝卜素 |
| 花蕾期(S1) | (26.01 \pm 0.17) ^b | (11.30 \pm 0.11) ^b | (2.63 \pm 0.04) ^a | (62.49 \pm 1.45) ^c |
| 膨大期(S2) | (48.15 \pm 1.53) ^a | (18.71 \pm 0.20) ^a | (1.06 \pm 0.10) ^{bc} | (46.22 \pm 1.20) ^d |
| 初开期(S3) | (7.44 \pm 0.31) ^c | (3.40 \pm 0.02) ^c | (1.05 \pm 0.03) ^c | (68.57 \pm 1.25) ^b |
| 盛开期(S4) | (4.24 \pm 0.18) ^d | (1.72 \pm 0.01) ^d | (1.33 \pm 0.25) ^b | (95.25 \pm 0.74) ^a |

同列数据右上角不同小写字母表示在 $p<0.05$ 水平上存在显著性差异

3 结论与讨论

黄色色素是由多种物质组成的混合物,其主要成分是类胡萝卜素^[14]。类胡萝卜素在大多数花中有助于黄色至橙色调的调整,除了在可见光谱中显现颜色,类胡萝卜素还能反射紫外光,使花瓣中

的花色素含量再次提高,花瓣变得更加有光泽^[15]。宫灯百合(*Sandersonia aurantiaca*)金黄色花瓣中主要为隐黄质和玉米黄质^[16];金盏菊(*Calendula officinalis*)花瓣中主要为毛茛黄素(flavoxanthin)和金黄质(auroxanthin)^[17];旱金莲(*Tropaeolum majus*)花瓣中以叶黄质为主,另外还含有少量的莖菜黄质和玉

米黄质^[18];万寿菊和菊花黄色花瓣中90%以上的类胡萝卜素为叶黄素及其衍生物,且叶黄素含量的不同是其花色由白色到深橙色变异的主要原因^[19-21]。这表明类胡萝卜素是影响大多数植物花瓣黄色性状形成的主要因素。

本研究采用HPLC法对羊蹄躑开花过程中,4个不同花发育时期的花瓣类胡萝卜素含量进行了测定。在羊蹄躑花发育的4个时期均检测到了大量类胡萝卜素积累。在羊蹄躑开花过程,其色素的含量是变化的,类似的现象在水仙(*Narcissus tazetta*)和洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)等花朵中均有发现^[22-23]。 β -胡萝卜素在羊蹄躑花发育的4个时期中,其含量均远高于叶黄质、玉米黄质和 α -胡萝卜素。 α -胡萝卜素含量最少,在盛开期,其含量仅占检测类胡萝卜素总量的1.30%。在羊蹄躑花的盛开期,其花色呈现明亮的黄色,此时 β -胡萝卜素的含量达到最高,占检测类胡萝卜素总量的92.89%,而 α -胡萝卜素、玉米黄质和叶黄质的含量均较低。Li等在研究洋水仙花色时,发现 β -胡萝卜素是花色的主要色素,花色的深浅与 β -胡萝卜素含量相关^[24],这表明羊蹄躑花瓣的呈色与 β -胡萝卜素的代谢密切相关,弄清羊蹄躑 β -胡萝卜素代谢途径将有助于揭示羊蹄躑花色的形成机理。

参考文献:

- [1] TANAKA Y, BRUGLIERA F. Flower colour and cytochromes P450[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences, 2013, 368(1612): 283-291.
- [2] 王小菁, 杨玉萍. 我国观赏花卉品质形成的功能基因研究进展[J]. 植物学报, 2013, 48(5): 471-480.
- [3] TANAKA Y, BRUGLIERA F, KALC G, et al. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(9): 1760-1769.
- [4] 周琳, 王雁, 彭镇华. 黄色花形成机制及基因工程研究进展[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 111-119.
- [5] 李浩霞, 尹跃, 安巍, 等. 枸杞果实发育阶段类胡萝卜素的变化[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(6): 139-142.
- [6] 顾地周, 陆爽, 巴春影, 等. 羊蹄躑嫩叶离体培养和植株高效再生技术研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(6): 189-200.
- [7] WANG X, HU Y W, YUAN D, et al. Chemical constituents from the flowers of *Rhododendron molle* G. Don[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2014, 23(2): 94-98.
- [8] LI Y, LIU Y B, ZHANG J J, et al. Antinociceptive grayanoids from the roots of *Rhododendron molle* [J]. Journal of Natural Prod-

- ucts, 2015, 78(12): 2887-2895.
- [9] ZOU H Y, LUO J, XU D R, et al. Tandem solid-phase extraction followed by HPLC-ESI/QTOF/MS/MS for rapid screening and structural identification of trace diterpenoids in flowers of *Rhododendron molle*[J]. Phytochemical Analysis, 2014, 25(3): 255-265.
- [10] ZHOU S Z, YAO S, TANG C, et al. Diterpenoids from the flowers of *Rhododendron molle* [J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(5): 1185-1192.
- [11] ZHI X, XIAO L, LIANG S, et al. Chemical constituents of *Rhododendron molle* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2013, 49(3): 454-456.
- [12] CHEN S N, BAO G H, WANG L Q, et al. Two new compounds from the flowers of *Rhododendron molle* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2013, 11(5): 525-527.
- [13] 严娟, 蔡志翔, 沈志军, 等. 黄肉桃果实中类胡萝卜素提取和测定方法研究[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1267-1274.
- [14] NAIK P, ARUNACHALAM C, KHURANA S M P, et al. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants [J]. Current Science, 2003, 85(25): 1423-1430.
- [15] MILLER R, OWENS S J, RORSLETT B. Plants and colour: Flowers and pollination [J]. Optics and Laser Technology, 2011, 43(2): 282-294.
- [16] NIELSEN K M, LEWIS D H, MORGAN E R. Characterization of carotenoid pigments and their biosynthesis in two yellow flowered lines of *Sandersonia aurantiaca* (Hook) [J]. Euphytica, 2003, 130(1): 25-34.
- [17] BAKO E, DELI J, TOTTH G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products [J]. Journal of biochemical and biophysical methods, 2002, 53(1): 241-250.
- [18] NIIZU P, RODRIGUEZ-AMAYA D B. Flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(9): S605-S609.
- [19] TANAKA Y, OHMIYA A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(2): 190-197.
- [20] MOEHS C P, TIAN L, OSTERYOUNG K W, et al. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development [J]. Plant molecular biology, 2001, 45(3): 281-293.
- [21] KISHIMOTO S, MAOKA T, NAKAYAMA M, et al. Carotenoid composition in petals of *chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) [J]. Phytochemistry, 2004, 65(20): 2781-2787.
- [22] 何炎森, 杨碧云, 李科, 等. 多花水仙花期类胡萝卜素物质和类黄酮物质的含量变化[J]. 热带作物学报, 2013, 34(3): 504-510.
- [23] UDDIN A F M J, HASHIMOTO F, NISHIMOTO S, et al. Flower growth, coloration and petal pigmentation in four *Lisianthus* cultivars [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2002, 71(1): 40-47.
- [24] LI X, LU M, TANG D Q, et al. Composition of carotenoids and flavonoids in narcissus cultivars and their relationship with flower color[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142074.