



铁筷子花瓣中花青素苷成分及含量对其呈色的影响

陈思琪, 孟 晗, 衡 蒙, 金雪花*, 孔祥莹

(昆明理工大学 建筑与城市规划学院, 昆明 650504)

摘 要: 该研究以 7 个品种铁筷子(*Helleborus thibetanus* Franch.)为试验材料, 借助目视测色、RHSCC 比色卡、色差仪进行花色表型的测定, 采用高效液相色谱法-光电二极管阵列检测方法(HPLC-DAD)及高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)测定分析铁筷子花瓣中花青素苷成分及含量, 以探究不同品种铁筷子的花色与花青素苷成分及含量之间的关系。结果显示: (1) 紫色系品种花瓣的 a^* 值最高 b^* 值最低, 黄色系品种花瓣的 b^* 值最高 a^* 值最低, 不同品种的铁筷子花色越深 L^* 值越低。 (2) 从 5 个有花青素苷积累的铁筷子品种中检测出 11 种花青素苷成分, 分别为 6 种矢车菊素苷, 4 种飞燕草素苷, 1 种矮牵牛素苷; 供试的铁筷子材料中红色系 2 个品种的花青素苷含量最高, 紫色系品种次之; 矢车菊素苷与飞燕草素苷为影响铁筷子花瓣呈色的主要色素物质。 (3) 不同种类的花青素和修饰基团的差异, 导致铁筷子花瓣呈现不同的色彩, 含有多种酰基化修饰的飞燕草素苷使铁筷子花色蓝移进而使花色加深。 (4) 相关分析表明, 铁筷子花瓣的 L^* 值与 a^* 值呈显著负相关关系, 与 b^* 值呈显著的正相关关系; L^* 值与总花青素苷含量呈显著负相关关系, 且随着花青素苷含量的累积 a^* 值增加, 花色红移。研究表明, 花青素苷的成分及含量是导致铁筷子花瓣呈现不同颜色的主要原因, 矢车菊素苷和飞燕草素苷的互作以及酰基化的修饰使铁筷子呈现不同程度的紫色, 花青素苷的不同累积量影响了花瓣颜色的明暗变化, 从而使铁筷子花瓣颜色丰富。

关键词: 铁筷子; 花色; 花青素苷; 高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用技术

中图分类号: Q946.83⁺6; Q949.746.5

文献标志码: A

Effect of Anthocyanin Composition and Content on the Color of *Helleborus thibetanus* Petals

CHEN Siqi, MENG Han, HENG Meng, JIN Xuehua*, KONG Xiangying

(Faculty of Architecture and City Planning, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650504, China)

Abstract: In this study, seven varieties of *Helleborus thibetanus* were used as research materials for the determination of floral phenotypes with the aid of visual colorimetry, RHS Large Colour Chart and chroma meter. We determined anthocyanins in the petals of *H. thibetanus* by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS to explore the relationship between color and anthocyanin composition and content of different varieties of *H. thibetanus*. The results showed that: (1) purple line variety has the highest a^* value and the lowest b^* value, the yellow line variety has the highest b^* value and the lowest a^* value, and the darker the flower color of different varieties of *H. thibetanus* the lower with the L^* value. (2) Eleven anthocyanin glyco-

收稿日期: 2022-04-22; 修改稿收到日期: 2022-10-12

基金项目: 国家自然科学基金(31760587, 31560568)

作者简介: 陈思琪(1995—), 女, 在读研究生, 主要从事园林技术与植物应用研究。E-mail: sq47277@126.com

* 通信作者: 金雪花, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园林植物研究。E-mail: xhkim2021@163.com

sides were detected in five varieties of *H. thibetanus* with anthocyanin glycosides accumulation, there are six cyanidin glycosides, four delphinidin glycosides and one petunia glycoside; the two varieties of the red family had the highest content of anthocyanin glycosides among the *H. thibetanus*, followed by the purple variety; cyanidin glycosides and delphinidin glycosides were the main pigment substances affecting the coloration of the petals of *H. thibetanus*. (3) Differences in anthocyanins and modification groups of different species lead to different colors of *H. thibetanus* petals, and delphinidin glucosides containing various acylated modifications make *H. thibetanus* flowers blue-shifted and thus deepen their color. (4) Correlation analysis showed that the L^* value of *H. thibetanus* petals has a significant negative correlation with the a^* value and a significant positive correlation with the b^* value; the L^* value showed a negative correlation with the total anthocyanin glycosides content, and the flower color shifted red as the accumulated a^* value of anthocyanin glycosides content increased. The study showed that the composition and content of anthocyanin glycosides were the main reasons for the different colors of *H. thibetanus* petals. The interactions of cyanidin glycosides and delphinidin glycosides also with acylated modifications made *H. thibetanus* show different degrees of purple, the different accumulation of anthocyanin glycosides affected the light and dark changes of petal colors, thus making *H. thibetanus* petals rich in color.

Key words: *Helleborus thibetanus* Franch.; flower color; anthocyanin; HPLC-ESI-MS

铁筷子(*Helleborus thibetanus* Franch.)别名黑嚏根草、九牛七、小桃儿七,作为观赏植物又称之为圣诞玫瑰,为毛茛科铁筷子属多年生常绿草本^[1-2],因其在冬季开花、花期长,且花型叶型颇具观赏价值,近年来逐渐成为深受人们喜爱的观赏植物,但因该植物多为国外引种栽培,市价普遍居高,国内对于铁筷子观赏价值的研究鲜有报道,因此开展铁筷子观赏性状方面的研究工作迫在眉睫。

目前有关于毛茛科植物花色的研究已有不少记载,但对于毛茛科铁筷子属植物花色的研究还未见详细报道,前人对铁筷子的研究多以其种子培育^[3]、药用价值^[4]、叶^[5]及根茎化学成分^[6-8]方面为主,其观赏性状方面的研究甚少,花色呈色机理尚未清楚。植物花色的呈色与其色素有关^[9-11],这些色素包括三大类:类黄酮、类胡萝卜素和生物碱,花青素苷是类黄酮中最重要的一类水溶性色素^[12-13]能够使植物呈现从红到蓝的不同颜色,主要包含了矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、锦葵素、天竺葵素和芍药素等6类;此外花色的呈色还受金属离子的螯合^[14]、液泡 pH 等^[15]多方面因素的影响。本研究选用 7 个

不同花色的铁筷子作为试验材料,对不同品种花瓣中色素成分及含量进行分析,以期解析铁筷子花色呈色机理,为该物种花色改良、新品种培育提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试植物材料均于 2020 年 12 月下旬至 2021 年 1 月上旬期间收集并栽培在昆明理工大学园林植物温室中直至花朵开放,选择处于盛花期的不同单株且着色均匀的花瓣作为研究材料。按照颜色将 7 个品种铁筷子分为红色系(A、B)、紫色系(C)、粉色系(D、E)和黄色系(F、G)(图 1)。

1.2 花色表型测定

每个品种选择 3 个长势相近的不同单株采集花瓣,利用英国皇家园艺学会比色卡(RHSCC)进行比色和色差仪进行测色,测量环境选择于室内避免阳光直射的区域。使用 RHSCC 比色卡测色时将花瓣中间部分与比色卡进行比色,以 3 人在相同的角度和距离条件下观察到的结果为依据记录色系范围。

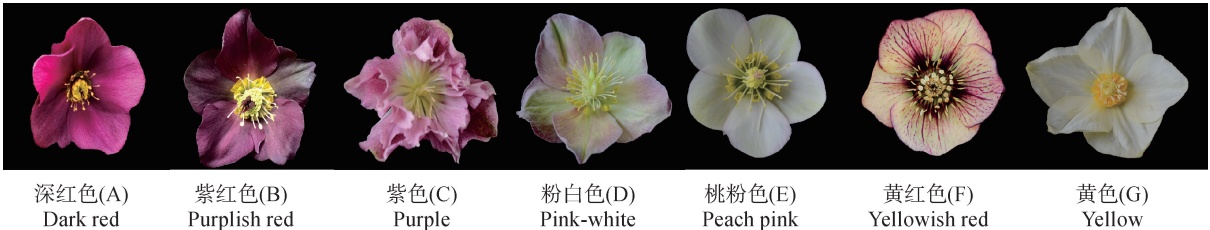


图 1 铁筷子各色系品种及编号

Fig. 1 The different varieties and numbers of *H. thibetanus*

使用色差仪(CR-400Konica Minolta China investment Ltd.)以光源 C/2°为条件测量花色,测量时将花瓣正面平置于干净的白纸上,将激光口对准花瓣中间部位进行测量,每个单株测量 3 次取平均值。记录测量出的明度(L^*)、红度(a^*)和黄度(b^*),并利用公式 $C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$; $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$ 计算出彩度 C^* 和色相角的值 h° 。

1.3 色素种类及含量分析

1.3.1 花青素苷提取 将存于-80℃条件下的铁筷子样品取出,放入研钵内用液氮迅速研磨至细粉末状,待液氮挥发后加入配制好的花青素苷提取液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{甲酸}}:V_{\text{三氟醋酸}}=70:27:2:1$)提取花青素苷^[16]。每 250 mg 样品加入 1 mL 提取液,将样品和提取液放入离心管混合,并置于震荡器上充分震荡后放置于 4℃冰箱内浸提,期间每隔 12 h 震荡一次,待浸提 24 h 后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤上清液得到样品,保存于-80℃环境下以待检测。

1.3.2 花青素苷成分及含量测定 花青素苷含量的测定采用高效液相色谱法-光电二极管阵列检测方法(HPLC-DAD),检测仪器为 Agilent Q-TOF 6540 液相色谱质谱联用仪,泵为 P680 型,自动进样器(UltiMate 3000),紫外可见光检测器(DAD-100),柱温箱(TCC-100),色谱柱为 Agilent 公司的 ZORBAX 型 SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm),滤镜为 5 μm。HPLC 测定条件为:设置流动相 A、B 两项,A 相为水:甲酸:三氟醋酸=97.9:2:0.1;流动相 B 相为水:乙腈:甲酸:三氟醋酸=62.9:35:2:0.1。进样前先进行超声脱气和 0.2 μm 超微过滤,进样量为 10 μL,柱温 25℃,流速 0.8 mL/min。流动相 B 的洗脱梯度为:0~3 min,10%~10%;3~30 min,10%~20%;30~40 min,20%~45%;40~45 min,45%~80%;45~56 min,80%~10%;56~65 min,10%~10%;在波长为 525 nm 处检测花瓣中花青素苷吸收的峰面积^[17-18]。采用半定量法计算花青素苷含量,根据 HPLC-DAD 分析结果,对氯化矢车菊素(Cyanidin chloride)进行线性回归分析,绘制其浓度与峰面积之间的标准曲线,利用待测样品的峰面积计算花青素苷浓度及铁筷子花瓣中花青素苷的含量。所用标准品购于成都普思生物科技股份有限公司。

花青素苷成分的定性分析采用高效液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)选取具有典型特征的样本进行测定,再根据特征离子进行花青素苷结构的推定。液相色谱分析条件及程序

同上,质谱检测条件为:电喷雾离子化(ESI),离子阱分析器,全质量扫描范围(m/z):100~1 700 u;正离子检测模式,毛细管电压为 3 500 V,喷雾器压力 200 kPa,毛细管出口电压 100 V,保护盖出口电压 117 V,干燥温度 350℃,干燥气体流速为 8.0 L/min^[19]。

1.4 数据处理

采用 Excel 2019 软件进行数据统计,用 SPSS 22 软件对数据进行差异显著性分析和逐步多元回归分析。

2 结果与分析

2.1 花色表型分析

通过分析 7 个品种铁筷子花瓣的明度(L^*)、红度(a^*)和黄度(b^*)值发现不同品种的铁筷子花色越深则 L^* 值越低(表 1),其中黄色(G)、黄红色(F)及桃粉色(E)的品种 L^* 值相比于深红色(A)、紫红色(B)及紫色(C)品种的 L^* 值较高,且颜色最深的 B 品种 L^* 值为 7 个品种中最低的。紫色(C)品种的 a^* 值最高,其次是深红色(A)品种,而两个黄色系品种红度值(a^*)是最低的。反观 b^* 值,黄色品种(G)的 b^* 值最高,紫色品种(C)的 b^* 值最低。由于彩度值(C^*)是通过 a^* 值和 b^* 计算得到的,因而红度和黄度值对 C^* 值影响比较大,在所测品种中黄色品种的彩度值较高,而紫红色品种的彩度值最低。

对 7 个品种的铁筷子所测的 L^* 、 a^* 、 b^* 值和 C^* 值进行拟合曲线分析,经过相关性检验及分析得出 L^* 值与 a^* 值呈显著的负相关($R^2=0.8142$), (图 2,A); L^* 值与 b^* 值呈显著的正相关($R^2=0.7042$), (图 2,B); L^* 值与 C^* 值呈显著的正相关($R^2=0.5522$), (图 2,C),由此说明铁筷子花瓣的 b^* 、 C^* 值均为其花色的明暗程度变化的影响因素。

2.2 铁筷子花青素苷结构的推定分析

采用高效液相色谱法在波长 525 nm 处对铁筷子样品进行检测,结果(表 2)显示在供试的 7 个品种中有 2 个品种未检测出花青素苷的成分,为桃粉色(E)和纯黄色(G),其余的 5 个品种共检测出 11 种不同类型的花青素苷成分,将它们按保留时间由短到长依次编号为:S1~S11。

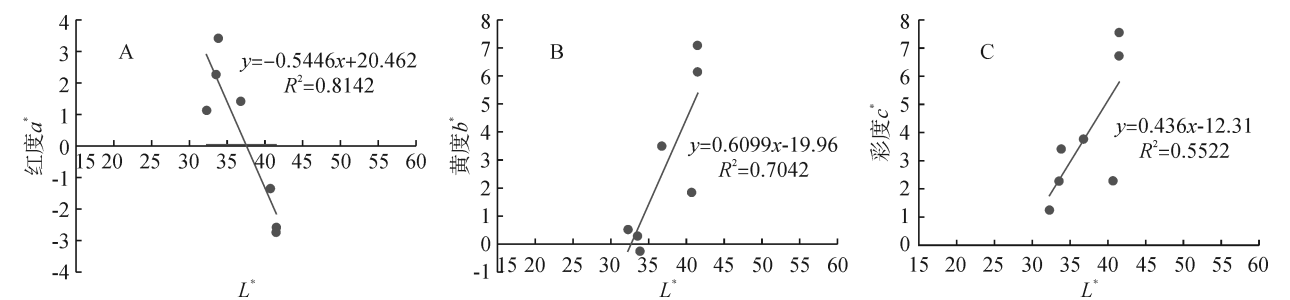
利用 HPLC-ESI-MC 技术辅助获得样品的特征峰,根据不同保留时间的出峰情况和特征离子的质荷比(m/z)进行推算花青素苷的种类和结构;参照紫外可见光谱 440 nm 波长下吸收峰与最大波长

表 1 铁筷子各品种花瓣花色表型
Table1 Data of various *H. thibetanus* flower

编号 No.	花色 Color	RHSCC	明度 L^*	红度 a^*	黄度 b^*	彩度 C^*	色相角 h°
A	深红色 Dark red	72C	33.55±1.57Cc	2.26±0.09Bb	0.29±0.03Ff	2.28±0.09Ee	7.23±0.77Cc
B	紫红色 Purplish red	N75B	32.3±0.69Cc	1.13±0.01Cd	0.52±0.02Ee	1.25±0.00Ff	24.85±1.06Bb
C	紫色 Purple	73B	33.86±0.68Cc	3.41±0.10Aa	-0.25±0.03Gg	3.42±0.10Dd	-4.13±0.36Dd
D	粉白色 Pink-white	70B	36.79±2.48Bb	1.41±0.32Cc	3.49±0.00Cc	3.77±0.11Cc	68.05±4.64Aa
E	桃粉色 Peach pink	145D	40.70±0.38Aa	-1.35±0.05De	1.85±0.04Dd	2.29±0.03Ee	-53.95±1.45Ee
F	黄红色 Yellowish red	145C	41.48±0.26Aa	-2.72±0.08Ef	6.14±0.10Bb	6.71±0.13Bb	-66.14±0.27Ff
G	黄色 Yellow	157C	41.50±0.10Aa	-2.59±0.06Ef	7.08±0.08Aa	7.54±0.10Aa	-69.88±0.20Fg

注:表中数据为平均值±标准误差。同列不同大写字母代表不同品种多重比较 Duncan's 检验在 0.01 水平差异显著,同列不同小写字母代表不同品种多重比较 Duncan's 检验在 0.05 水平差异显著

Note: The data in the table are the mean ± standard error. Different capital letters in the same column represent significant differences at the 0.01 level in Duncan's test for multiple comparisons of different varieties, and different lowercase letters in the same column represent significant differences at the 0.05 level in Duncan's test for multiple comparisons of different varieties



A 为 L^* 值与 a^* 值的相关性分析;B 为 L^* 值与 b^* 值的相关性分析;C 为 L^* 值与 C^* 值的相关性分析

图 2 铁筷子花瓣 L^* 与 a^* 、 b^* 和 C^* 的关系

Fig. A is the correlation analysis between L^* value and a^* value; Fig. B shows the correlation analysis between L^* value and b^* value. Fig. C shows correlation analysis between L^* value and C^* value

Fig. 2 The relationship between L^* and a^* , b^* , C^* of *H. thibetanus* flowers

下吸收峰的比值($A_{440}/A_{vis-max}$)判断花青素苷是否发生 5 位取代,若比值小于 20% 则 5 位被糖苷化,比值大于 30% 时花青素苷的结构为 3-O-糖苷类型且 5 位处未发生糖苷化^[20];根据 290~340 nm 处是否有肩峰的出现判断化合物是否被芳香酸酰基化^[21],以往的研究表明同科植物具有相似的代谢途径,在毛茛科植物中发现含有槐糖修饰的花青素苷^[22],推测在铁筷子花瓣色素成分中可能含有槐糖基团的修饰。

自然条件下的花青素极不稳定,需要与糖类结合形成稳定的花青素苷,再进一步甲基化、酰基化修饰形成不同种类的花青素苷^[28],从而影响植物花色的呈色。花青素的糖基化修饰首先在 C-3 位^[20],有时进一步 C-5、C-7 位糖基化^[24],花青素苷经过酰基化修饰可形成更具稳定性和显色性的花青素苷,酰基化的基团分为脂肪酰基(主要有乙二酰基、丙二酰

基、丁二酰基、乙酰基等)与芳香酰基(主要有肉桂酰基、香豆酰基、咖啡酰基等)^[29-30]。

本研究检测出的 11 种花青素苷中有 6 种矢车菊素苷(S1、S3、S4、S7、S10、S11);4 种飞燕草素苷(S2、S5、S8、S9)以及一种矮牵牛素苷(S6),它们分别使植物呈红色、蓝色和紫色。通过紫外可见光分析发现供试的铁筷子品种中所含花青素均只在 C-3 位置上发生了糖苷化,酰基化修饰多以芳香酰基为主,脂肪酰基为辅。深红色品种的色素成分中有 5 种花青素苷被芳香酰基修饰,紫红色和紫色品种中均含有 4 种酰基修饰的花青素苷,粉白色品种中含有 3 种酰基修饰的花青素苷,黄红色品种中仅含 2 种酰基修饰的花青素苷。不同糖基、酰基的修饰是导致铁筷子花色差异的一个原因,本研究在铁筷子花瓣中发现含有芳香酰基化修饰的品种花瓣蓝移进而使花色加深。

表 2 铁筷子花瓣中花青素苷 HPLC-ESI-MS 分析及结构推定

Table 2 HPLC-ESI-MS analysis and structural presumption of the anthocyanins in petals of *Helleborus thibetanus* Franch.

编号 No.	保留时间 Retention time/min	$A_{440}/A_{VIS-max}/\%$	分子离子质荷 Molecular ion mass/(m/s)	碎片离子质荷 Fragment ion /(m/s)	推定结果 Presumption result	品种代号 Cultivar code	参考文献 Reference
S1	4. 21	30. 9	743. 1999	581. 1473 449. 1083 287. 0541	矢车菊素-3-咖啡酰葡萄糖-阿拉伯糖苷 Cyanidin-3-caffeioyl-glucoside-arabinoside	A、B、C	[24]
S2	7. 65	30. 4	789. 2046	627. 1549 465. 1008 303. 0487	飞燕草素-3-咖啡酰葡萄糖-葡萄糖苷 Delphinidin-3-feruloyl-glucoside-glucoside	C	[12、25、27]
S3	11. 09	25. 0	611. 1588	287. 0536	矢车菊素-3-槐糖苷 Cyanidin-3-sophoricoside	C、D、F	[24]
S4	12. 07	30. 7	581. 1455	287. 0538	矢车菊素-3-葡萄糖-阿拉伯糖苷 Cyanidin-3-glucoside-arabinoside	A、B、F	[21、24、26]
S5	12. 26	33. 3	627. 1580	465. 1028 303. 0484	飞燕草素-3-咖啡酰葡萄糖苷 Delphinidin-3-caffeioyl-glucoside	A、D	[12、25、27]
S6	13. 19	30. 0	479. 1167	317. 0637	矮牵牛素-3-葡萄糖苷 Petunidin-3-glucoside	C	[23]
S7	14. 83	37. 5	773. 1891	449. 0969 287. 0540	矢车菊素-3-咖啡酰槐糖苷 Cyanidin-3-caffeioyl-sophoricoside	A	[24]
S8	16. 86	28. 0	713. 1546	551. 1066 465. 1019 303. 0486	飞燕草素-3-丙二酰葡萄糖-葡萄糖苷 Delphinidin-n-3-malonyl-glucoside-glucoside	B	[12、27]
S9	20. 62	24. 0	727. 1706	565. 1179 465. 0997 303. 0496	飞燕草素-3-丁二酰葡萄糖-葡萄糖苷 Delphinidin-3-succinyl-glucoside-glucoside	B、C、D、F	[12、27]
S10	20. 74	30. 2	697. 1591	287. 0550	矢车菊素-3-香豆酰阿拉伯糖-阿拉伯糖苷 Cyanidin-3-coumaroyl-arabinoside-arabinoside	A	[20、24]
S11	26. 47	25. 6	711. 1830	287. 0538	矢车菊素-3-肉桂酰葡萄糖-阿拉伯糖苷 Cyanidin-3-cinnamyl-glucoside-arabinoside	A、B、C、 D、F	[24]

2.3 铁筷子花瓣花青素苷含量分析

采用标准品半定量法计算 7 种铁筷子花瓣中总花青素苷含量(TA),结果显示(表 3)品种 A(深红色花瓣)中总花青素苷含量最高,品种 B(紫红色花瓣)次之,然后依次是品种 C(紫色花瓣)、品种 D(粉白色花瓣)、品种 F(黄红色花瓣),但在 G(黄色花瓣)、E(桃粉色花瓣)中未检测出花青素苷成分。所检测出含有花青素苷的 5 个品种均含有矢车菊素和飞燕草素,在品种 C(紫色花瓣)中除了飞燕草素和矢车菊素之外,还检测到矮牵牛素成分。其中品种 A(深红色花瓣)矢车菊素的含量占总花青素苷含量的 84. 96%,植物呈现出深红色;品种 B(紫红色花瓣)中,飞燕草素的含量占总花青素苷含量的 75. 91%,花瓣呈现出紫红色;品种 C(紫色花瓣)中矢车菊素含量占总花青素苷含量的 56. 79%,矮牵牛素含量占总花青素苷含量的 25. 10%,飞燕草素含量仅占总花青素苷含量的 18. 11%;品种 D(粉白色花瓣)中,矢车菊素和飞燕草素含量分别占总花青素苷含量的 53. 11%和 46. 89%,品种 F(黄红色花

瓣)中分别为 54. 54%和 45. 46%。综上,矢车菊素苷和飞燕草素苷为铁筷子总花青素苷含量的主要贡献者。

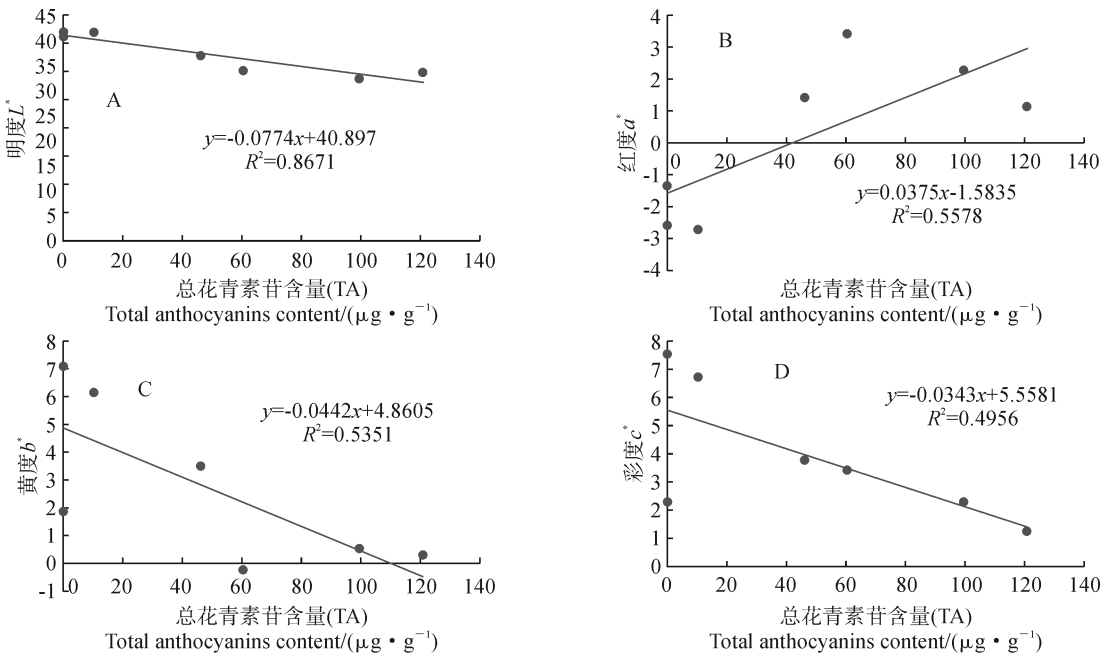
进一步通过制作拟合曲线来分析花青素苷含量与不同花色之间的关系,将总花青素苷的含量(TA)作为自变量,以所测的 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 值作为因变量形成拟合曲线(图 3,A~D)。图 3 显示,总花青素苷含量与红度值(a^*)呈正相关,与 L^* 、 b^* 、 C^* 值呈负相关关系,其中与 L^* 值之间的相关性显著(回归系数为 0. 8671)与 a^* 、 b^* 、 C^* 值之间的相关性不显著。当总花青素苷含量的累积,则 a^* 值增加,花瓣的颜色越趋向红色。

将矢车菊素苷、飞燕草素苷含量分别与 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 值进行相关性分析,以矢车菊素苷和飞燕草素苷作自变量, L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 值作因变量绘制拟合曲线,以此推导数量关系发现色素含量除与红度值(a^*)呈正相关外,与 L^* 、 b^* 、 C^* 均呈现负相关,但单一种类的花青素苷含量与 L^* 、 a^* 、 b^* 值之间未见显著的相关性,除飞燕草素苷与 L^* 值之间

表 3 不同品种铁筷子的总花青素苷含量和主要花青素苷含量

Table 3 Variation and accumulation of anthocyanins in cultivars of *H. thibetanus*

品种 Cultivar	总花青素苷含量(TA) Total anthocyanins content /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	矢车菊素苷含量(Cy) Cy anthocyanins content /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	飞燕草素苷含量(Dp) Dp anthocyanins content /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	矮牵牛素苷含量(Pt) Pt anthocyanins content /($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
A	120.78±22.98	102.62±18.84	18.16±7.77	—
B	99.50±17.80	23.97±18.11	75.53±35.80	—
C	60.40±90.95	34.30±68.72	10.94±2.84	15.16±27.83
D	46.15±0.05	24.51±0.10	21.64±0.05	—
E	0	—	—	—
F	10.30±5.79	5.62±9.25	4.68±15.05	—
G	0	—	—	—



A 为总花青素苷含量与 L^* 值的相关性分析;B 为总花青素苷含量与 a^* 值的相关性分析;C 为总花青素苷含量与 b^* 值的相关性分析;D 为总花青素苷含量与 C^* 值的相关性分析

图 3 铁筷子花瓣 TA 与 L^* 、 a^* 、 b^* 和 C^* 的关系

A shows the correlation analysis between total anthocyanin content and L^* value; B shows the correlation analysis between total anthocyanin content and a^* value; C shows the correlation analysis between total anthocyanin content and b^* value. Fig. D shows correlation analysis between total anthocyanin content and C^* value

Fig. 3 The relationship between TA and L^* , a^* , b^* , C^* of *H. thibetanus* Franch. flowers

的回归系数 $R^2=0.511$ 以外,其他系数均小于 0.5。

3 讨论

植物花青素苷的累积量不同影响着植物花色明度、红度、黄度和彩度的变化^[12,31],本研究供试的 7 种铁筷子花瓣的 L^* 值由低到高分别为紫红色、深红色、紫色、粉白色、桃粉色、黄红色、纯黄色,且 L^* 值与总花青素苷的含量 TA 值呈显著负相关,即随着花青素苷的积累明度下降,这与前人研究的紫花

含笑(*Michelia crassipes*)^[32]、丽格海棠(*Rieger begonia*)^[33]有关花青素苷含量对花色明度影响的结果一致,说明花青素苷含量的变化是影响铁筷子花色明暗变化的重要因素之一。从花青素苷含量与花瓣的彩度值、红度值方面的分析来看,随着总花青素苷含量增加铁筷子花瓣的彩度值下降,这与王欢等^[34]对双色百合(bicolor lily)研究的结论一致;花青素苷含量的增加铁筷子花瓣的红度值也增加,植物花瓣所呈现的颜色越向红色偏移,该结果与前人

对贴梗海棠[*Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai]^[21]研究中花青素苷含量的累积有助于红色形成的结论相符。值得注意的是品种 B 中总花青素苷含量不是本研究所有品种中最高,但其颜色却是最暗,在关于深色花的相关研究中发现致使花色变深的原因不仅有花青素苷的高积累,还有花瓣显微结构下色素的分布^[35]、花瓣的结构特点、不同花青素苷对呈色的贡献^[36]以及其他色素(如原花青素苷)的作用等多方面因素,因此本研究中 B 品种铁筷子颜色深的原因有待进一步研究。

花青素苷的不同成分是影响其花色变化的重要因素,不同的花青素、修饰基团的数量和修饰方式都对植物花色呈色产生不同程度的影响。在检测出花青素苷的 5 个品种中矢车菊素为主要的色素物质,其次为飞燕草素,在石蒜属(*Lycoris* Herb)植物^[31]和耐寒睡莲(*Nymphaea* spp.)^[13]中也发现矢车菊素和飞燕草素两类花青素为影响呈色的主要物质。矢车菊素苷和飞燕草素苷分别是使植物呈红色和蓝色的重要物质,两者同时存在时可使植物呈现出紫红色。花瓣着色会向含量更高的色素偏移,而其他色素成分则起到辅助作用^[37],在供试材料 B 品种中检测出 2 种飞燕草素衍生物和 3 种矢车菊素衍生

物,该品种中飞燕草素衍生物的含量是矢车菊素衍生物含量的 3 倍多,在两种色素的共同作用下花色呈现紫红色。酰基化的作用使植物蓝色加深^[38-40],本研究发现含有多种酰基化修饰的飞燕草素苷^[41]的铁筷子所呈现的紫色越深,即品种 B、C 中含有 2 类酰基化飞燕草素苷,而品种 A 中仅含有 1 类,品种 B、C 比 A 的颜色越向蓝色偏移呈现出越深的紫色。此外,脂肪族酰基化和芳香族酰基化修饰对铁筷子花色的呈现也有影响,通常情况下脂肪族酰基化对花青素苷的颜色变化影响较小^[42],芳香酰基化花青素苷比脂肪酰基化的稳定性更强^[43],在铁筷子花瓣的色素结构分析中发现酰基修饰多以芳香酰基为主,咖啡酰、香豆酰、肉桂酰的修饰可能是铁筷子花色产生差异的因素。

综上,花青素苷的成分及含量是导致铁筷子花瓣呈现不同颜色的主要原因,矢车菊素苷和飞燕草素苷的互作以及酰基化的修饰使铁筷子呈现不同程度的紫色,花青素苷的不同累积量影响了花瓣颜色的明暗变化,从而使铁筷子花瓣颜色丰富。本研究的结果为铁筷子花色呈色机理的研究奠定了基础,为进一步挖掘花色基因、花色改良、培育花色新品种提供一定的参考。

参考文献:

[1] SALOPEK-SONDI B, KOVAČ M, PREBEG T, *et al.* Developing fruit direct post-floral morphogenesis in *Helleborus niger* L. [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53** (376): 1 949-1 957.

[2] ŠUŠEK A. Morphological descriptors of Christmas rose (*Helleborus niger* L.) [J]. *Agricultura (Slovenia)*, 2008, **5**: 27-31.

[3] NIIMI Y, HAN D S, ABE S. Temperatures affecting embryo development and seed germination of Christmas rose (*Helleborus niger*) after sowing[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, **107**(3): 292-296.

[4] 李朋收, 范冰舵, 刘洋洋, 等. 铁筷子化学成分及药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2014, **32**(6): 1 286-1 289.

LI P S, FAN B D, LIU Y Y, *et al.* Research progress of chemical composition and pharmacological effectiveness of *Helleborus thibetanus* Franch. [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2014, **32**(6): 1 286-1 289.

[5] VITALINI S, BRACA A, FICO G. Study on secondary metabolite content of *Helleborus niger* L. leaves[J]. *Fitoterapia*, 2011, **82**(2): 152-154.

[6] 杨 健. 铁筷子根茎化学成分的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2007.

[7] 张艳红. 铁筷子根茎化学成分的研究(Ⅱ)[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2008.

[8] 张家俊. 铁筷子根茎化学成分研究(Ⅲ)[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2010.

[9] 刘安成, 尉 倩, 王峰伟, 等. 几种忍冬属植物开花过程中花色和色素的变化[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, **42** (1): 22-29.

LIU A C, YU Q, WANG F W, *et al.* Changes of floral color and pigment content during flowering in several species of *Lonicera* L. [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2020, **42**(1): 22-29.

[10] 杨 晨. ‘凤丹’牡丹花色变化过程中花瓣色素组成及相关基因表达分析[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2020.

[11] 李崇晖, 王亮生, 舒庆艳, 等. 迎红杜鹃花色色素组成及花色在开花过程中的变化[J]. *园艺学报*, 2008, **35**(7): 1 023-1 030.

LI C H, WANG L S, SHU Q Y, *et al.* Pigments composition of petals and floral color change during the blooming period in *Rhododendron mucronulatum* [J]. *Acta Horticultu-*

- rae Sinica*, 2008, **35**(7): 1 023-1 030.
- [12] 许 倩, 张 晨, 吴嘉维, 等. 花青素的生物合成研究进展[J]. 林产化学与工业, 2020, **40**(3): 1-11.
XU Q, ZHANG C, WU J W, *et al.* Research progress in biosynthesis of anthocyanins[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2020, **40**(3): 1-11.
- [13] 朱满兰, 王亮生, 张会金, 等. 耐寒睡莲花瓣中花青素苷组成及其与花色的关系[J]. 植物学报, 2012, **47**(5): 437-453.
ZHU M L, WANG L S, ZHANG H J, *et al.* Relationship between the composition of anthocyanins and flower color variation in hardy water lily (*Nymphaea* spp.) cultivars[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, **47**(5): 437-453.
- [14] 刘国元, 方 威, 余春梅, 等. 花青素调控植物花色的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2021, **49**(3): 1-4.
LIU G Y, FANG W, YU C M, *et al.* Research progress on anthocyanins regulated plant flower color[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, **49**(3): 1-4.
- [15] 张盖天, 祁 惠, 杨锁宁, 等. 花器官液泡 pH 调控花色形成的研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, **37**(4): 204-210.
ZHANG G T, QI H, YANG S N, *et al.* Research progress of floral organ vacuole pH regulating flower color formation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, **37**(4): 204-210.
- [16] 孙 卫, 李崇晖, 王亮生, 等. 蓝色瓜叶菊花青苷在花发育过程中的积累和变化规律[J]. 北京林业大学学报, 2010, **32**(3): 128-134.
SUN W, LI C H, WANG L S, *et al.* Accumulation and variation of anthocyanins in blue flowers of *Senecio cruentus* at different flowering stages[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, **32**(3): 128-134.
- [17] JIA N, SHU Q Y, WANG L S, *et al.* Analysis of petal anthocyanins to investigate coloration mechanism in herbaceous peony cultivars[J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, **117**(2): 167-173.
- [18] 王 卅, 张 畅, 李玉花. 花瓣锥形表皮细胞形成及对授粉昆虫吸引作用机制研究进展[J]. 园艺学报, 2012, **39**(9): 1 781-1 792.
WANG S, ZHANG Y, LI Y H. Research progress on the mechanism of petal conical epidermal cells formation and attraction to pollinating insects[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(9): 1 781-1 792.
- [19] 宋 洋, 雷 霆, 金雪花, 等. 蓝亚麻花瓣中类黄酮化合物及代谢途径分析[J]. 广西植物, 2017, **37**(11): 1 368-1 377.
SONG Y, LEI T, JIN X H, *et al.* Flavonoid related compounds and their biosynthesis pathways in *Linum perenne* [J]. *Guihaia*, 2017, **37**(11): 1 368-1 377.
- [20] 张 洁, 李崇晖, 王亮生, 等. 植物花青苷液质联用方法的分析鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, **4**(3): 760-768.
ZHANG J, LI C H, WANG L S, *et al.* Golden rules of separation and characterization of plant anthocyanins by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2013, **4**(3): 760-768.
- [21] 张 洁, 王亮生, 高锦明, 等. 贴梗海棠花青苷组成及其与花色的关系[J]. 园艺学报, 2011, **38**(3): 527-534.
ZHANG J, WANG L S, GAO J M, *et al.* Identification of anthocyanins involving in petal coloration in *Chaenomeles speciosa* cultivars[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, **38**(3): 527-534.
- [22] LIU Y F, ZHANG J H, YANG X H, *et al.* Diversity in flower colorations of *Ranunculus asiaticus* L. revealed by anthocyanin biosynthesis pathway in view of gene composition, gene expression patterns, and color phenotype[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, **26**(14): 13 785-13 794.
- [23] 徐怡倩, 袁 媛, 陶秀花, 等. 小苍兰花瓣主要花色苷组分研究[J]. 植物研究, 2016, **36**(2): 184-189.
XU Y Q, YUAN Y, TAO X H, *et al.* Main anthocyanin profiles in petals of *Freesia hybrida* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, **36**(2): 184-189.
- [24] 谢 烨, 孙 毅, 黄继荣. 拟南芥中花青素的修饰[J]. 植物生理学报, 2013, **49**(2): 101-110.
XIE Y, SUN Y, HUANG J R. Anthocyanin modification in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, **49**(2): 101-110.
- [25] 孙 卫, 李崇晖, 王亮生, 等. 花青苷成分对瓜叶菊花色的影响[J]. 园艺学报, 2009, **36**(12): 1 775-1 782.
SUN W, LI C H, WANG L S, *et al.* Anthocyanins present in flowers of *Senecio cruentus* with different colors[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, **36**(12): 1 775-1 782.
- [26] 葛雨萱, 王亮生, 徐彦军, 等. 蜡梅的花色和花色素组成及其在开花过程中的变化[J]. 园艺学报, 2008, **35**(9): 1 331-1 338.
GE Y X, WANG L S, XU Y J, *et al.* Flower color, pigment composition and their changes during flowering in *Chimonanthus praecox* link [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, **35**(9): 1 331-1 338.
- [27] TOKI K, TAKEUCHI M, SAITO N, *et al.* Two malonylated anthocyanidin glycosides in *Ranunculus asiaticus* [J]. *Phytochemistry*, 1996, **42**(4): 1 055-1 057.
- [28] 徐 德, 郑远静, 高方平, 等. 花色苷的生物合成及其影响因素研究进展[J]. 江苏农业学报, 2019, **35**(5): 1 246-1 253.
XU H, ZHENG Y J, GAO F P, *et al.* Advances in the biosynthesis and influencing factors of anthocyanins[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, **35**(5): 1 246-1 253.
- [29] HOPP W, SEITZ H U. The uptake of acylated anthocyanin

into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*[J]. *Planta*, 1987,**170**(1): 74-85.

[30] 张 丽, 范维娟, 郑臻颖, 等. 花青素糖基化、甲基化和酰基化修饰的研究现状[J/OL]. 分子植物育种, 2022: 1-13. (2022-03-08). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220304.1758.014.html>.

ZHANG L, FAN W J, ZHENG Z Y, *et al.* Research progress of anthocyanin glycosylation, methylation and acylation modification in plants[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022: 1-13. (2022-03-08). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220304.1758.014.html>.

[31] 廖望仪, 沈芳杰, 周洋丽, 等. 石蒜属种质资源花色多样性与花色苷相关性分析[J]. 植物生理学报, 2021,**57**(10): 2 024-2 032.

LIAO W Y, SHEN F J, ZHOU Y L, *et al.* Correlation analysis of flower color diversity and anthocyanins in *Lycoris* germplasm resources[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, **57**(10): 2 024-2 032.

[32] 余秋岫, 金晓玲, 罗 峰, 等. 紫花含笑花被呈色过程中色素含量与超微结构的变化特征[J]. 西北植物学报, 2021,**41**(1): 123-131.

YU Q X, JIN X L, LUO F, *et al.* Changes of pigment content and ultrastructure of perianth during color formation in *Michelia crassipes* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021,**41**(1): 123-131.

[33] 吴艳梅, 吴艺萍, 金雪花, 等. 丽格海棠花青素苷成分及分布对花色的影响[J]. 西北植物学报, 2020,**40**(1): 58-68.

WU Y M, WU Y P, JIN X H, *et al.* Effects of anthocyanin composition and distribution on flower color of rieger *Begonia* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, **40**(1): 58-68.

[34] 王 欢, 孔 滢, 窦晓莹, 等. 不同类型双色百合的花色形成分析[J]. 西北植物学报, 2021,**41**(4): 606-614.

WANG H, KONG Y, DOU X Y, *et al.* Analysis of flower color formation in different types of bicolor lilies[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, **41**(4): 606-614.

[35] 雷 霆. 彩色马蹄莲佛焰苞呈色物质及其分布特征研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.

[36] DEGUCHI A, TATSUZAWA F, HOSOKAWA M, *et al.* Quantitative evaluation of the contribution of four major anthocyanins to black flower coloring of *Dahlia* petals[J]. *The Horticulture Journal*, 2016,**85**(4): 340-350.

[37] 唐东芹, 徐怡倩, 袁 媛, 等. 理化因素对风信子花色苷稳定性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016,**40**(4): 69-73.

TANG D Q, XU Y Q, YUAN Y, *et al.* Effects of physical and chemical factors on anthocyanin stability in *Hyacinthus* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Sciences Edition), 2016,**40**(4): 69-73.

[38] JIE, LUO, YASUTAKA, *et al.* Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2007,**50**(4): 678-695.

[39] YOSHIDA K, MORI M, KONDO T. Blue flower color development by anthocyanins: From chemical structure to cell physiology[J]. *Natural Product Reports*, 2009,**26**(7): 884-915.

[40] 宋 洋. 蓝色花种质筛选及其花瓣片类黄酮化合物分析研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.

[41] 孟 晗, 付灯祥, 吴艳梅, 等. 花毛茛和银莲花花瓣中花青素苷组成及含量与其花色的关系[J]. 园艺学报, 2020,**47**(12): 2 362-2 372.

MENG H, FU D X, WU Y M, *et al.* Relationship between the composition and content of anthocyanin in petals of *rannunculus asiaticus* and *anemone cathayensis* and their flower color [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020,**47**(12): 2 362-2 372.

[42] 李 云, 赵昶灵, 杨晓娜, 等. 花色苷分子结构与其稳定性以及呈色关系的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2010,**25**(5): 712-720.

LI Y, ZHAO C L, YANG X N, *et al.* Research advances in the relationship between the molecular structures of anthocyanins and their stability and colorations[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University* (Natural Science), 2010, **25**(5): 712-720.

[43] BAKOWSKA-BARCZAK A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants-a review[J]. *Polish Journal of Food & Nutrition Sciences*, 2005,**14**(2): 107-116.

(编辑:潘新社)