

蜡梅的花色和花色素组成及其在开花过程中的变化

葛雨萱^{1,2}, 王亮生^{1*}, 徐彦军³, 刘政安¹, 李崇晖^{1,2}, 贾妮^{1,2}

(¹中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³中国农业大学理学院, 北京 100094)

摘要: 以蜡梅的 4 个变种为材料, 对其在开花过程中的花色、花色素组成及含量的变化进行研究。花色测定采用英国皇家园艺学会比色卡 (RHSCC) 和分光色差计, 色素定性及定量分析采用高效液相色谱—二极管阵列检测技术 (HPLC - PAD) 和高效液相色谱—电喷雾离子化—质谱联用技术 (HPLC - ESI - MS)。结果表明, 在开花过程中, 各蜡梅变种的花色呈明显变化。黄色外瓣和红色内瓣彩度 C^* 值均变小, 黄色外瓣色相角 h 增大, 由黄色向浅黄方向变化, 而红色内瓣色相角 h 变小, 由红色向深红方向变化。在蜡梅红色内瓣中检测到 2 种花青苷和 3 种黄酮醇, 在黄色外瓣中检测到与红色内瓣相同的 3 种黄酮醇。其中花青苷为: 矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷和矢车菊素 3-*O*-芸香糖苷; 黄酮醇为: 槲皮素 3-*O*-芸香糖苷、山奈酚 3-*O*-芸香糖苷和槲皮素苷元。首次检测出蜡梅花瓣中含有矢车菊素 3-*O*-芸香糖苷。蜡梅各变种间及每个变种的各开花阶段, 色素种类没有差异, 但色素含量发生了明显变化。从蕾期到初花期, 黄色外瓣和红色内瓣的总黄酮醇 (TF) 含量迅速减少, 花朵开放后变化平稳。红色内瓣的总花青苷 (TA) 含量在开花过程中较稳定。

关键词: 蜡梅; 花色; 花青苷; 类黄酮; 高效液相色谱; 液质联用

中图分类号: S 685.99 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 09-1331-08

Flower Color, Pigment Composition and Their Changes During Flowering in *Chimonanthus praecox* Link.

GE Yu-xuan^{1,2}, WANG Liang-sheng^{1*}, XU Yan-jun³, LIU Zheng-an¹, LI Chong-hui^{1,2}, and JIA Ni^{1,2}

(¹Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The changes of flower color, pigment composition during flowering in four varieties of *Chimonanthus praecox* Link. were studied. The flower color was measured according to the Royal Horticultural Society Colour Chart (RHSCC) and by a NF333 spectrophotometer, respectively. A high performance liquid chromatography (HPLC) with a photodiode array detector (HPLC - PAD) and a HPLC - electrospray ionization - mass spectroscopy (HPLC - ESI - MS) were employed for qualitative and quantitative analysis of anthocyanins and flavonoids. The results indicated that the flower color of each variety showed significant difference during flowering. The chroma (C^*) of both perianths decreased, while the hue angle (h) of the yellow outer perianths increased from yellow to pale yellow, and the red inner perianths decreased from red to dark red. Two anthocyanins (cyanidin 3-*O*-glucoside and cyanidin 3-*O*-rutinoside) and three flavonols (quercetin 3-*O*-rutinoside, kaempferol 3-*O*-rutinoside and quercetin aglycone) were detected in the red inner perianths. The three flavonols in the red inner perianths were also detected in the yellow outer perianths. Cyanidin 3-*O*-rutinoside was detected from *C. praecox* petals for the first time. Although the kind of pigments kept unchanged during flowering, the pigment contents showed significant difference. Total flavonols (TF) content decreased rapidly

收稿日期: 2008 - 05 - 09; 修回日期: 2008 - 08 - 18

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wanglsh@ibcas.ac.cn)

致谢: 感谢中国科学院植物研究所植物园董保华研究员在取材树种鉴定方面给予的帮助。

from the alabastrum period to the initial flowering period, and then changed smoothly, while total anthocyanins (TA) content in the red inner perianths kept no remarkable changed.

Key words: *Chimonanthus praecox*; flower color; anthocyanin; flavonoid; HPLC - PAD; HPLC - ESI - MS

蜡梅 (*Chimonanthus praecox* Link.) 为我国特有的传统名花, 外轮花被多蜡黄色或黄白色, 内轮花被常具紫红条纹, 具有极佳的观赏特性、文化价值和应用前景。丰富蜡梅的花色是其育种的重要目标之一, 但目前国内外针对蜡梅花色及花色素组成的研究很少。盛爱武等 (1999) 报道了槲皮素为素心蜡梅花瓣的主要色素之一, Iwashina 等 (2001) 发现蜡梅原变种和罄口蜡梅花瓣中含有矢车菊素 3-O-葡萄糖苷等花青苷以及芦丁、槲皮素等类黄酮化合物。作者利用高效液相色谱和质谱联用技术对蜡梅的 4 个变种的花色素组成进行了分析鉴定, 并调查了花色和色素组成在开花过程中的变化, 以期对蜡梅花色育种提供科学依据, 也为阐明蜡梅花色形成机理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 花朵采集与处理

选取蜡梅中具有典型花色、花型的 4 个变种 (蒋英和李秉滔, 1979): 蜡梅原变种 (*C. praecox* var. *praecox*), 外轮花被纯黄色, 长圆形, 内轮花被深红紫色; 素心蜡梅 (*C. praecox* var. *concolor*), 花朵较大, 外内轮花被均为金黄色; 罄口蜡梅 (*C. praecox* var. *grandiflorus*), 花大, 外轮花被金黄色, 内轮花被有红紫色边缘或条纹, 花凋萎时花瓣仍不闭合, 宛如罄口; 狗蝇蜡梅 (*C. praecox* var. *intermedius*), 半野生类型, 花较小, 外轮花被黄白色, 内轮花被有红紫色条纹, 花瓣质地较薄, 尖似狗牙。材料于 2007 年 2 月采自中国科学院植物研究所北京植物园。蜡梅开花过程划分为 4 个阶段 (赵昶灵 等, 2005): 蕾期、初花期、盛花期和末花期 (图 1)。



图 1 不同蜡梅变种在开花过程中的形态及花色

Fig. 1 Flower morphological and color of different varieties of *C. praecox* during flowering

在晴天上午 9—10 时, 采集不同开花阶段的花朵, 装入塑料自封袋内, 于室内将黄色外瓣和红色内瓣分开, 分别进行花色测定后, 立即液氮研磨, 直接提取花色素。大量花瓣样品用液氮磨碎后置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 花色测定

取新鲜花瓣, 参照 Wang 等 (2004) 方法, 采用英国皇家园艺学会比色卡 (Royal Horticultural Society Colour Chart, RHSCC) 进行花色对比, 用分光色差仪 (NF333 spectrophotometer, Nippon Den-shoku Industries Co., Ltd.) 在 $C/2^{\circ}$ 光源下进行花色测量, 5 次重复。通过测定明度 L^* 值、色相的 a^* 值、 b^* 值, 计算出彩度 C^* 值和色相角度 h , 公式如下: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, $h = \arctan(b^*/a^*)$ 。

1.3 花瓣色素简易定性

选择具有 3 个不同花色的素心蜡梅、罄口蜡梅、狗蝇蜡梅盛开期花瓣, 参照安田齐 (1986) 的方法进行石油醚、盐酸和氨水测试, 初步鉴定蜡梅花瓣中是否存在类黄酮和 (或) 类胡萝卜素。其中, 罄口蜡梅和狗蝇蜡梅的黄色外瓣和红色内瓣分开测试。均取 0.1 g, 分别加石油醚、10% 盐酸和 30% 氨水各 5 mL, 迅速研磨至匀浆, 用滤纸过滤, 观察滤液颜色。

1.4 花瓣色素的定性和定量

称取 2 mg 左右新鲜花瓣, 液氮磨碎, 加入组成为甲醇: 水: 甲酸: 三氟醋酸 (70: 27: 2: 1) 提取液 5 mL (Zhang et al., 2007), 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光浸提 24 h, 取上清液用滤纸粗滤后, 经微孔滤膜 ($0.45\text{ }\mu\text{m}$) 过滤, 供花青苷和类黄酮的定性、定量分析用。

高效液相色谱仪 (HPLC) 为 Dionex 公司生产, PDA-100 二极管阵列检测器, P680A LPG-4 型二元梯度泵, TCC-100 色谱柱控温箱, Chameleon 6.60 工作站。色谱柱为日本 Tosoh 株式会社生产的 TSK gel ODS-80Ts QA 反相硅胶柱 ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)。

分析条件: 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.8\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$, 花青苷和类黄酮的检测波长分别为 516 nm 、 353 nm 。流动相 A 液为磷酸: 水 (1.5: 98.5); B 液为磷酸: 甲酸: 乙腈: 水 (1.5: 20: 25: 53.5)。乙腈为色谱级, 水为双蒸水, 磷酸、甲酸为分析纯。线性梯度洗脱, 程序如下: 0 min, 40% B; 60 min, 60% B; 70 min, 40% B。

标准品: 锦葵素 3, 5-*O*-葡萄糖苷 (malvidin-3, 5-di-*O*-glucoside, Mv3G5G) 购于法国 Extrasynthese 公司; 矢车菊 3-*O*-芸香糖苷 (cyanidin-3-*O*-rutinoside, Cy3G) 购于美国 Sigma 公司; 芦丁 (quercetin-3-*O*-rutinoside, Rutin) 购于中国药品生物制品检定所。

花色素含量的测定: 分别在最大吸收波长 516 nm 和 353 nm 同时检测总花青苷 (total anthocyanins, TA) 和总黄酮醇 (total flavonols, TF) 含量。花瓣中 TA 和 TF 的测定采用标准品半定量法, 分别计算每 100 mg 新鲜花瓣中含有的相对于标准品 Mv3G5G 和 Rutin 的 TA 和 TF 含量 (mg, %) (Wang et al., 2001)。色素结构鉴定: 采用高效液相色谱—电喷雾离子化—质谱联用仪 (HPLC-ESI-MS) 对蜡梅原变种末花期的红色内瓣及蜡梅原变种蕾期的黄色外瓣分别进行花青苷和黄酮醇的结构分析。使用 Agilent 1100 LC/MSD Trap VL 系统。分析条件: 色谱柱同上; 柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.8\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。流动相组成为 A 液: 0.1% 三氟乙酸的水溶液; B 液: 甲醇。三氟乙酸、甲醇为色谱级, 水为双蒸水。花青苷分析程序: 0 min, 22% B; 20 min, 40% B; 30 min, 55% B; 40 min, 22% B, 检测波长 516 nm 。黄酮醇分析程序: 0 min, 22% B; 50 min, 50% B; 60 min, 22% B, 检测波长 353 nm 。质谱分析条件: 电喷雾离子化 (ESI), 离子阱分析器, 正离子检测模式, 全离子扫描, 扫描范围 (m/z): $100 \sim 1\ 000$ 。毛细管电压 $3\ 500\text{ V}$, 喷雾器压力 35 psi, 毛细管出口电压 117.9 V , 干燥温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 干燥气 (N_2) 流速 $6.0\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。用 LC/MSD Trap 软件 (5.2 版本) 分析质谱结果。

2 结果

2.1 不同蜡梅变种开花过程中的花色变化

各蜡梅变种从蕾期到初开期花色变化较明显,之后未见明显变化。黄色外瓣和红色内瓣彩度 C^* 均变小,黄色外瓣色相角 h 增大,从黄色向浅黄色方向变化,红色内瓣色相角 h 较小,由红色向深红色方向变化。在开花过程中除素心蜡梅外其它变种的明度 L^* 值均有显著变化,这与肉眼观察结果相一致,较其它变种,素心蜡梅在开花过程中基本不褪色。蜡梅原变种和狗蝇蜡梅的红色内瓣 a^* 值有显著变化,罄口蜡梅红色内瓣 a^* 值变化不显著,这可能与花瓣开张角度最小有关(表1)。

表1 不同蜡梅变种在开花过程中的花色变化

Table 1 Flower color changes of different varieties of *C. praecox* during flowering

变种 Variety	部位 Position	阶段 Stage	RHSCC	L^*	a^*	b^*	C^*	$h/^\circ$
蜡梅原变种 <i>C. praecox</i> var. <i>praecox</i>	外瓣 Outer perianth	蕾期 Alabastrum period	6B	54.51c	-6.90a	46.23b	46.74b	98.49a
		初花期 Initial flowering period	8A	68.02a	-8.66a	52.27a	52.98a	99.40a
		盛花期 Profuse flowering period	8B	63.83b	-7.12a	45.01b	45.57b	98.98a
		末花期 Final flowering period	8B	63.20b	-7.09a	39.67c	40.30c	100.13a
	内瓣 Inner perianth	蕾期 Alabastrum period	59A	18.24ab	6.37ab	2.15a	6.72ab	18.69a
		初花期 Initial flowering period	59A	14.24c	8.26a	0.93a	8.31a	6.44a
		盛花期 Profuse flowering period	59A	20.94a	6.59ab	2.38a	7.01ab	19.85a
		末花期 Final flowering period	59A +	17.07bc	5.68b	1.29a	5.82b	12.80a
狗蝇蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>intermedius</i>	外瓣 Outer perianth	蕾期 Alabastrum period	10B	61.22b	-8.81a	53.07a	53.80a	99.43a
		初花期 Initial flowering period	10C	64.63b	-7.79a	44.27c	44.95c	99.98a
		盛花期 Profuse flowering period	10D	69.37a	-8.70a	48.76b	49.53b	100.12a
		末花期 Final flowering period	10D	63.91b	-7.16a	36.12d	36.82d	101.21a
	内瓣 Inner perianth	蕾期 Alabastrum period	59A	22.94ab	5.70b	11.73a	13.04a	64.09a
		初花期 Initial flowering period	59A	20.88ab	6.24b	2.46b	6.71b	21.55b
		盛花期 Profuse flowering period	59A	23.79a	8.01a	2.51b	8.39b	17.43b
		末花期 Final flowering period	59A	19.96b	7.10ab	1.87b	7.34b	14.77b
罄口蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>grandiflorus</i>	外瓣 Outer perianth	蕾期 Alabastrum period	7A	64.38a	-6.40a	59.16a	59.51a	96.17b
		初花期 Initial flowering period	12B	61.57ab	-7.52a	56.53a	57.02a	97.57a
		盛花期 Profuse flowering period	12C	62.46ab	-7.38a	55.46a	55.95a	97.58a
		末花期 Final flowering period	12C	60.72b	-7.44a	48.85b	49.42b	98.66a
	内瓣 Inner perianth	蕾期 Alabastrum period	59A	21.24b	10.43a	10.54a	14.83a	45.31a
		初花期 Initial flowering period	59A	22.27b	11.78a	5.36b	12.94b	24.47b
		盛花期 Profuse flowering period	59A	27.34a	10.50a	11.33a	15.45a	47.17a
		末花期 Final flowering period	59A	18.75c	11.60a	3.86b	12.22b	18.43b
素心蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>concolor</i>	外瓣 Outer perianth	蕾期 Alabastrum period	7A	61.71a	-6.44a	59.05a	59.40a	96.22a
		初花期 Initial flowering period	7B	62.88a	-6.63a	54.97b	55.37b	96.87a
		盛花期 Profuse flowering period	7C	65.23a	-5.57a	53.70b	53.99b	95.92a
		末花期 Final flowering period	7C	61.82a	-5.85a	47.09c	47.45c	97.09a

注: a, b, c 代表多重比较 SNK 检验在 $P=0.05$ 水平下的不同显著性差异。n=5。

Note: a, b, c show different significant difference at $P=0.05$ level in SNK test. n=5.

2.2 不同蜡梅变种花色素的特征颜色反应

氨水测试中,素心蜡梅、罄口蜡梅和狗蝇蜡梅的黄色外瓣均呈黄色,表明黄瓣中含有类黄酮,罄口蜡梅和狗蝇蜡梅的红色内瓣均呈黄绿色,黄绿色是由花青苷呈现的蓝色和类黄酮呈现的黄色混合而成,这意味着红瓣含有花青苷和类黄酮。石油醚测试中,素心蜡梅、罄口蜡梅和狗蝇蜡梅的黄色外瓣均呈淡黄色,表明黄瓣中含有类胡萝卜素,罄口蜡梅和狗蝇蜡梅的红色内瓣均无色,意味着红瓣中不含有类胡萝卜素(表2)。综合考虑以上测试结果,各蜡梅变种黄色外瓣花色素为类黄酮和类胡萝卜素,红色内瓣花色素为类黄酮和花青苷。

表 2 不同蜡梅变种花色素的颜色反应

Table 2 Color reactions of the flower pigments of different varieties of *C. praecox*

变种 Variety	部位 Position	石油醚 Petroleum ether	盐酸 Hydrochloric acid	氨水 Ammonia water
狗蝇蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>intermedius</i>	外瓣 Outer perianth	淡黄 Pale-yellow	未测试 Not test	黄 Yellow
	内瓣 Inner perianth	无色 Colorless	红 Red	黄绿 Yellow-green
罄口蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>grandiflorus</i>	外瓣 Outer perianth	淡黄 Pale-yellow	未测试 Not test	黄 Yellow
	内瓣 Inner perianth	无色 Colorless	红 Red	黄绿 Yellow-green
素心蜡梅 <i>C. praecox</i> var. <i>concolor</i>	外瓣 Outer perianth	淡黄 Pale-yellow	未测试 Not test	黄 Yellow

2.3 蜡梅花色素结构鉴定

经 HPLC - PAD 分析, 不同蜡梅变种各开花阶段的黄色外瓣在 353 nm 处均检出 3 种类黄酮化合物, 红色内瓣分别在 353 nm 和 516 nm 处均检出 3 种类黄酮化合物和 2 种花青苷类色素, 表明蜡梅各变种间及每个变种的各开花阶段, 色素种类没有差异, 且进一步证实了黄色外瓣中含有类黄酮, 而红色内瓣色素为花青苷和类黄酮的混合物 (图 2)。

为进一步确定这些色素的化学结构, 选取色素含量高的样本进行了 HPLC - ESI - MS 分析。用蜡梅原变种末花期的红色内瓣进行花青素的质谱分析 (总花青苷含量高达 1.04%), 用蜡梅原变种蕾期的黄色外瓣进行黄酮醇的质谱分析 (总黄酮醇含量高达 1.73%)。

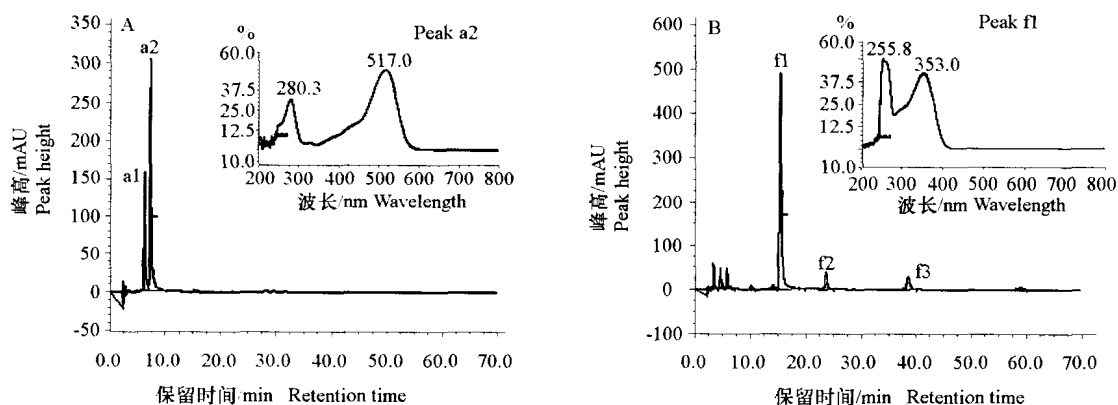


图 2 蜡梅原变种花色素的 HPLC 色谱图

A. 花青苷 (516 nm); a2 峰: 矢车菊素 3-O-芸香糖苷的全波长扫描图;

B. 黄酮醇 (353 nm); f1 峰: 槲皮素 3-O-芸香糖苷的全波长扫描图。

Fig. 2 HPLC chromatograms of flower pigments in *C. praecox* var. *praecox*

A. Anthocyanin profiles, detected at 516 nm and the UV-V is absorbance curve of cyanidin 3-O-rutinoside (peak a2);

B. Flavonol profiles, detected at 353 nm and the UV-V is absorbance curve of quercetin 3-O-rutinoside (peak f1).

蜡梅原变种花色素组成见表 3。花青苷 a1, 经一级质谱得到分子离子 m/z 448.8 ($[M]^+$), 释放出碎片离子 m/z 286.7 ($[Y_0]^+$, Y_0 为苷元), 为矢车菊苷元 (Cyanidin, 简称 Cy) 的特征质荷比, m/z 448.8 ($[Cy + 162]^+$) 与矢车菊己糖苷一致, 且与牡丹栽培品种 (‘芳纪’, ‘青龙卧墨池’ 的斑部分) 的 6 种花青苷可信对照样品 (Zhang et al., 2007) 中的矢车菊素 3-O-葡萄糖苷相在保留时间和紫外最大吸收上均一致, 推断为矢车菊素 3-O-葡萄糖苷。

花青苷 a2, 经一级质谱得到分子离子 m/z 594.9 ($[M]^+$), 释放出碎片离子 m/z 286.8 ($[Y_0]^+$), 为矢车菊 (Cy) 苷元的特征质荷比, m/z 594.9 ($[Cy + 308]^+$) 与矢车菊芸香糖苷一

致。在保留时间和紫外最大吸收上与标准品矢车菊 3-O-芸香糖苷氯化物一致，推定为矢车菊 3-O-芸香糖苷。

表 3 蜡梅原变种花色素的 HPLC-PAD、HPLC-ESI-MS 分析及其结构推定

组分 Peak	保留时间 /min Retention time	紫外最大 吸收/nm λ_{\max}	(准)分子离子 /(m/z) (Quasi-)molecular ions	碎片离子/(m/z) Fragment ions	推定结果 Identification	参考文献 Reference
a1	6.3	280.0/515.5	448.8[M] ⁺	286.7	矢车菊素 3-O-葡萄糖苷 Cyanidin 3-O-glucoside	Vinha et al., 2005; Dueñas et al., 2008
a2	7.3	280.3/517.0	594.9[M] ⁺	286.8	矢车菊素 3-O-芸香糖苷 Cyanidin 3-O-rutinoside	Kammerer et al., 2006; Manhita et al., 2006
f1	15.5	255.8/353.0	632.9[M+Na] ⁺	464.8, 302.7	槲皮素 3-O-芸香糖苷 Quercetin 3-O-rutinoside	Iwashina et al., 2001
f2	23.7	265.0/346.2	616.9[M+Na] ⁺	448.8, 286.8	山奈酚 3-O-芸香糖苷 Kaempferol 3-O-rutinoside	Iwashina et al., 2001
f3	38.6	254.9/365.7	303.3[M+H] ⁺	303.3	槲皮素苷元 Quercetin	Hakkinen & Auriola, 1998; Alonso-Salces et al., 2004

类黄酮化合物 f1 经一级质谱分析得到准分子离子为 m/z 632.9 ($[M+Na]^+$)，释放出碎片离子 m/z 302.7 ($[Y_0]^+$)，为槲皮素苷元的特征质荷比，糖苷键断裂得到的糖基离子为 m/z 308，即芸香糖基，且在保留时间和紫外最大吸收波长与标准品芦丁一致，推定 f1 为槲皮素 3-O-芸香糖苷。

化合物 f2，经一级质谱分析得到准分子离子为 m/z 616.9 ($[M+Na]^+$)，释放出质谱碎片离子 m/z 286.8 ($[Y_0]^+$)， m/z 286.8 与山奈酚和木犀草素特征质荷比一致。根据紫外吸收带 II 的 λ_{\max} ，山奈酚及其糖苷大多在 265 nm 左右，木犀草素及其糖苷大多在 255 nm 左右（中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译，1981），另参照 Iwashina 等（2001），推定 f2 的苷元为山奈酚。糖苷键断裂得到的糖基离子为 m/z 308，为芸香糖苷。最后推定 f2 为山奈酚 3-O-芸香糖苷。

化合物 f3，质谱碎片离子仅有 m/z 303.3 ($[M+H]^+$)， m/z 302.3 为槲皮素苷元的特征质荷比，推定为槲皮素苷元。

各蜡梅变种内瓣主要红色色素为矢车菊素 3-O-芸香糖苷，外瓣中主要黄色色素为芦丁即槲皮素 3-O-芸香糖苷（图 2），其相对含量在各阶段中分别占 70%、85% 以上（数据未列出）。

2.4 不同蜡梅变种在开花过程中花色素含量的变化

4 个蜡梅变种黄色外瓣的总黄酮醇含量在蕾期均达到最高峰，花瓣张开后便开始下降，花瓣颜色也开始变浅（图 3）。除无红色内瓣的素心蜡梅外，其它 3 个蜡梅变种的红色内瓣总黄酮醇含量也均在蕾期出现最高峰，从蕾期到初花期下降幅度较大，花朵开放后变化趋于平稳（图 4）。狗蝇蜡梅和馨口蜡梅的红色内瓣的总花青苷含量在开花过程中较稳定，蜡梅原变种呈现下降再上升的趋势（图 4）。各变种之间的差异，素心蜡梅黄色花瓣总黄酮醇含量最少，且在开花阶段中较稳定，而蜡梅原变种及狗蝇蜡梅的红色内瓣总花青苷含量较高。

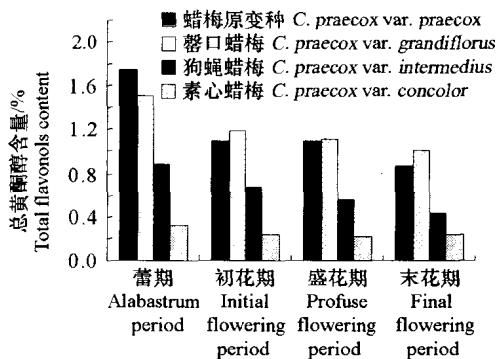


图 3 不同蜡梅变种在开花过程中黄色外瓣总黄酮醇含量的变化

Fig. 3 Changes of total flavonols content in different varieties of *C. praecox* during flowering

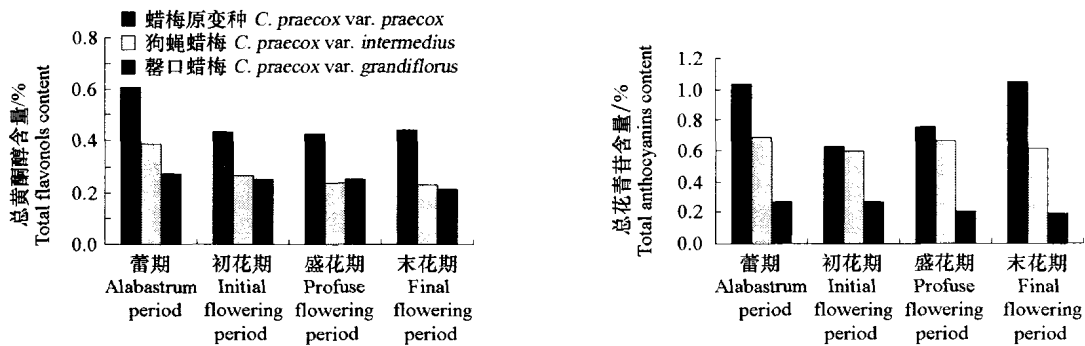


图4 不同蜡梅变种在开花过程中红色内瓣花色素含量的变化

Fig. 4 Changes of flower pigment content in different varieties of

C. praecox during flowering in red inner perianths

3 讨论

3.1 花瓣中主要色素种类

与 Iwashina 等 (2001) 对蜡梅花青素组成研究结果不同的是, 本试验发现蜡梅花青素的主要成分不是酰化矢车菊 3-O-葡萄糖苷, 而是矢车菊素 3-O-芸香糖苷。虽然在质谱信息上鼠李糖基和香豆酰基碎片的分子离子质荷比都为 146, 但花青素组分 a1 和 a2 的保留时间相隔很近 (仅差 1.0 min), 而如果是酰化的矢车菊素 3-O-葡萄糖苷保留时间则应明显推迟 (Kammerer et al., 2005; Manhita et al., 2006; Dueñas et al., 2008), 且组分 a2 在紫外 290~340 nm 波长范围内无特征吸收峰, 更加表明无芳香酸酰化 (Fossen & Andersen, 1998)。最后与标准品矢车菊 3-O-芸香糖苷做共色谱分析比较, 紫外全波长扫描的特征完全吻合, 进一步证实为矢车菊 3-O-芸香糖苷。

蜡梅的 4 个变种内瓣呈现红紫色, 为矢车菊素 3-O-葡萄糖苷和矢车菊素 3-O-芸香糖苷; 外瓣中主要黄色色素为槲皮素 3-O-芸香糖苷, 其黄酮醇含量的不同导致了各蜡梅变种外瓣黄色的深浅存在差异。另外, 黄色花色素组成一般为类黄酮和类胡萝卜素 (Iwashina et al., 2001), 特征颜色反应也表明, 蜡梅黄色外瓣色素中含有微量的脂溶性类胡萝卜素, 而其组成尚不清楚, 有待今后进一步研究。

3.2 花色变化的主要原因

在开花过程中, 每个蜡梅变种的色素种类均没有改变, 仅色素含量发生了明显变化, 黄色外瓣的总黄酮醇含量随着花瓣的张开逐渐下降。这表明黄色外瓣颜色逐渐变浅, 并不是由于花瓣细胞中色素组成发生变化, 而是与色素含量变化直接相关。色素含量的降低可能是由于花朵开放后暴露在日光和空气下, 引起色素的降解和氧化。另外, 花瓣面积的扩大速度比色素的合成速度要快, 也可能导致单位面积色素含量下降 (安田齐, 1986)。

3.3 花色改良育种的可能途径

蜡梅在冬春开放, 花期较长, 香气四溢, 但花色只有黄色或黄色紫红心, 如果能育成红色调为主的新品种, 将丰富冬春的蜡梅花色。蜡梅自身存在矢车菊素糖苷 (Cy 型色素) 为主的代谢途径, 问题在于它只在内瓣中表达, 故在红色蜡梅的分子育种方面需解决的关键问题之一是色素在花瓣分布上的不均一性, 推测通过调节控制部位表达的关键酶基因, 解除其抑制 Cy 型色素生成的作用, 有可能使其在黄色外瓣上积累。常规杂交育种方面, 蜡梅科夏蜡梅属内杂交已获得了花色紫红至粉红色的属内杂种 (Lasseigne et al., 2001; 姚青菊等, 2007), 故尝试以美国夏蜡梅 (褐红色) 或中国夏蜡梅 (浅粉色) 为育种材料与蜡梅杂交, 通过属间杂交来丰富蜡梅的花色存在一定的可能性。本研究

发现蜡梅原变种及狗蝇蜡梅的红色内瓣的总花青苷含量较其它变种高, 外轮黄瓣也稍淡, 因此, 可以用这两个变种作为母本选育红色系蜡梅新品种。

References

- Alonso-Salces R M, Ndjoko K, Queiroz E F, Ioset J R, Hostettmann K, Berrueta L A, Gallo B, Vicente F. 2004. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1046: 89 – 100.
- Dueñas M, Pérez-Alonso J J, Santos-Buelga C, Escribano-Bailón T. 2008. Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2): 107 – 115.
- Fossen T, Andersen Ø M. 1998. Cyanidin 3-*O*- (6" -succinyl- β -glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis*. *Phytochemistry*, 49 (4): 1065 – 1068.
- Hakkinen S, Auriola S. 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *Journal of Chromatography A*, 829: 91 – 100.
- Iwashina T, Konta F, Kitajima J. 2001. Anthocyanins and flavonols of *Chimonanthus praecox* (Calycanthaceae) as flower pigments. *Journal of Japanese Botany*, 76 (3): 166 – 172.
- Jiang Ying, Li Bing-tao. 1979. *Flora of China* 30 (2). Beijing: Science Press: 7 – 9. (in Chinese)
蒋英, 李秉滔. 1979. 中国植物志, 第三十卷, 第二分册. 北京: 科学出版社: 7 – 9.
- Kammerer D, Kljusuric J G, Carle R, Schieber A. 2005. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology*, 220: 431 – 437.
- Lasseigne F T, Fantz P R, Raulston J C. 2001. *Sinocalycanthus raulstonii* (Calycanthaceae): A new intergeneric hybrid between *Sinocalycanthus chinensis* and *Calycanthus floridus*. *HortScience*, 36 (4): 765 – 767.
- Manhita A C, Teixeira D M, da Costa C T. 2006. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 1129: 14 – 20.
- Phytochemistry Laboratory Shanghai Institute of Materia Medica, CAS. 1981. Identification handbook of flavonoid compounds. Beijing: Science Press: 448 – 475. (in Chinese)
中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译. 1981. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京: 科学出版社: 448 – 475.
- Sheng Ai-wu, Guo Wei-ming, Sun Zhi-hua. 1999. Study on dynamic of endogenous hormones and parameters concerned senescence in cut wintersweet flowers. *Journal of Beijing Forestry University*, 21 (2): 48 – 53. (in Chinese)
盛爱武, 郭维明, 孙智华. 1999. 蜡梅切花内源激素动态及衰老有关因子的研究. 北京林业大学学报, 21 (2): 48 – 53.
- Vinha A F, Ferreres F, Silva B M, Valentao P, Goncalves A, Pereira J A, Oliveira M B, Seabra R M, Andrade P B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89 (4): 561 – 568.
- Wang L S, Hashimoto F, Shiraishi A, Aoki N, Li J J, Sakata Y. 2004. Chemical taxonomy in Xibei tree peony from China by floral pigmentation. *Journal of Plant Research*, 117: 47 – 55.
- 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.
- Yao Qing-ju, Xia Bing, Ren Quan-jin, Sheng Ning, Sun Xiao-fang. 2007. Heterosis of intergeneric hybrid between *Sinocalycanthus chinensis* and *Calycanthus floridus*. *Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology*, 34 (4): 24 – 26. (in Chinese)
姚青菊, 夏冰, 任全进, 盛宁, 孙小芳. 2007. 夏蜡梅和美国蜡梅属间杂种的优势表现. 江苏林业科技, 34 (4): 24 – 26.
- Yasuda H. 1989. The riddle of the flower color. Zhang Zhi-cheng, Tong Li. Trans. Beijing: China Forestry Publishing House: 137 – 149. (in Chinese)
安田齐. 1989. 花色之谜. 张志承, 佟丽译. 北京: 中国林业出版社: 137 – 149.
- Zhang J J, Wang L S, Shu Q Y, Liu Z A, Li C H, Zhang J, Wei X L, Tian D K. 2007. Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony. *Scientia Horticulturae*, 114: 104 – 111.
- Zhao Chang-ling, Guo Wei-ming, Chen Jun-yu. 2005. Expression characteristics of the flower colors of *Prunus mume* 'Nanjing Hongxu' and *Prunus mume* 'Nanjing Hong'. *Guihaia*, 25 (5): 481 – 488. (in Chinese)
赵起灵, 郭维明, 陈俊愉. 2005. 梅花 '南京红须'、'南京红' 花色的呈现特征. 广西植物, 25 (5): 481 – 488.