

基于广泛靶向代谢组学技术的不同花色秋石斛中花青素差异分析

武美卿^{1,2}, 廖易^{2,3}, 陆顺教^{2,3}, 殷涵泰^{1,2}, 余文刚^{1*}, 李崇晖^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点实验室/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南海口 571101; 3. 海南省热带观赏植物种质创新利用工程技术研究中心, 海南儋州 571737

摘要: 为了深入研究不同花色秋石斛品种花青素合成途径的差异性, 本研究利用广泛靶向代谢组学技术对蓝紫色、浅桃红色、红色、紫红色和深紫红色 5 个不同花色秋石斛品种的花青素苷组成和含量进行了分析。结果表明: 从供试秋石斛中共鉴定出 38 个代谢产物, 主要为矢车菊素 (Cy)、芍药花素 (Pn)、天竺葵素 (Pg)、飞燕草素 (Dp) 和矮牵牛素 (Pt) 的糖苷及其酰基化衍生物。5 个秋石斛品种中花青素苷组成和含量存在显著差异。代谢物差异分析表明, 紫红色花中 Cy 和 Dp 型糖苷显著高于浅桃红色花 ($P < 0.05$); 蓝紫色花的差异花青素中 3 种 Dp 型糖苷含量均显著高于其他颜色; 仅筛选出 1 种 Cy 型糖苷在浅桃红色花中富集。绝大多数样品的 Cy 型糖苷含量最高, 随着 Cy 和 Dp 及其衍生物含量增加, 花色会加深并转向红紫色, 推测 Cy 型糖苷使秋石斛偏向紫红色, 而 Dp 糖苷赋予秋石斛蓝紫色调。基于以上结果推测秋石斛存在上述 5 种花青素苷的酰基化修饰途径, 研究结果可为秋石斛花色形成机制和花色改良提供依据。

关键词: 秋石斛; 花色; 代谢组; 花青素

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Metabolomics Analysis of Anthocyanin in Different Flower Colors of *Phalaenopsis*-Type *Dendrobium*

WU Meiqing^{1,2}, LIAO Yi^{2,3}, LU Shunjiao^{2,3}, YIN Hantai^{1,2}, YU Wengang^{1*}, LI Chonghui^{2,3*}

1. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Tropical Crop Germplasm Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Hainan Provincial Engineering Technology Research Center of Tropical Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: In order to further investigate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Phalaenopsis*-type *Dendrobium* (Den-Phals) varieties with different flower color, this study used widely targeted metabolomics technology to analyze the anthocyanin composition and content of five Den-Phals varieties with blue-purple, light peach-red, red, purple-red and deep purple-red floral color, respectively. The results showed that a total of 38 metabolites were identified from the tested Den-Phals, most of which were glycosides and acylated derivatives of cyanidin (Cy), peonidin (Pn), pelargonidin (Pg), delphinidin (Dp) and petunidin (Pt). There were significant differences in the composition and content of anthocyanin in five Den-Phals varieties. Metabolite difference analysis showed that Cy and Dp glycosides in purple flowers were significantly higher than those in light peach red flowers. The contents of three Dp-type glycosides in blue-purple flowers were significantly higher than those in other colored varieties. Only one Cy-type glycoside was screened out, and the content of which in light pink flowers was high.

收稿日期 2023-07-26; 修回日期 2023-09-12

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630032022002); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 321RC648)。

作者简介 武美卿 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 观赏园艺学。*通信作者 (Corresponding author): 李崇晖 (LI Chonghui), E-mail: blchh@sina.com; 余文刚 (YU Wengang), E-mail: yuwg2008@hainanu.edu.cn。

The content of Cy-type glycosides was the highest in most samples. With the increase of cyanidin and delphinidin and the derivatives, the color of flowers deepened and turned to red-purple. It was speculated that Cy-type glycosides made Den-Phals tend to purple while Dp glycosides gave Den-Phals a blue-purple tone. Based on the above results, it is speculated that there are acylation synthesis pathways of the above five anthocyanins in Den-Phals, which can provide a basis for flower color formation mechanism and flower color improvement of Den-Phals.

Keywords: *Phalaenopsis*-type *Dendrobium*; flower color; metabolome; anthocyanins

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.004

花色是观赏植物极为重要的观赏性状之一。植物花色的呈现受花色素种类和含量、色素在花部组织中的分布、液泡 pH、辅助色素、金属离子络合、表皮细胞形状等的影响,其中色素的种类和含量是首要因素^[1]。花青素苷 (anthocyanin) 赋予观赏植物从粉红、红、紫红到蓝颜色变化,其基本结构是 2-苯基苯并吡喃的糖基化多羟基或聚甲氧基衍生物。常见的花青素苷为以天竺葵素 (pelargonidin, Pg)、矢车菊素 (cyanidin, Cy)、飞燕草素 (delphinidin, Dp)、芍药花素 (peonidin, Pn)、矮牵牛素 (petunidin, Pt) 和锦葵素 (malvidin, Mv) 6 种花青素苷元糖苷化修饰后产生,进而可以发生酰基化修饰^[2]。Pg 类色素为橙红色调, Cy 类色素为深红色调和 Dp 类色素为蓝色调提供了基础^[3]。研究花色素组成和含量是解析花色形成和变异机理,定向改良花色的前提。

石斛兰为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 植物,广泛分布于热带及亚热带地区,拥有大量原生种和人工杂交种,极具观赏价值^[4]。秋石斛是以蝴蝶石斛 (*Den. phalaenopsis* Fitzg.) 为主要亲本杂交而成的蝴蝶石斛系 (*Phalaenopsis*-type)^[5]。因其花形俏丽、花色鲜艳和瓶插期长等优良特性,成为热带兰中极为重要的盆花和切花产品^[6]。商品化秋石斛花色单一,以紫红色系为主,缺少亮橙、火红、天蓝等花色^[5, 7]。其色素组成主要有两大类:花青素苷使花色呈现紫红、蓝紫、粉红等颜色^[7-8];类胡萝卜素使花色呈黄绿色、金黄色等^[9];二者共同作用产生棕色^[5, 7]。长期以来,对秋石斛花青素苷组成了解极少,仅从其花中分离并鉴定到 4 种 Cy 型酰基化的花青素苷^[10-12],在苷元水平,秋石斛的近缘种和部分杂交种中仅检测到 Cy、Pn 和 Pg 共 3 种类型的花青素,且以 Cy 为绝对主要色素,Pn 含量很低,而 Pg 仅存在于极少数桃红色种质中^[7]。课题组前期利用 HPLC-MS 技术推定了几种秋石斛的花青素苷均为 Cy 型酰基化糖苷^[8],近年研究人员利用 UPLC-

QTOF-MS 从紫红色的三亚阳光品种中鉴定出 Cy、Pn、Dp、Pt、Mv 的 8 种 3-糖苷^[13]。然而,目前不同花色秋石斛中花青素苷的组成和含量差异仍缺乏系统认知。

代谢组学技术在植物及其次生代谢物研究领域中具有举足轻重的作用。对植物代谢组的研究包括代谢物积累模式、代谢物积累的遗传基础、功能基因鉴定、代谢途径解析及自然变异的遗传分析等方面的研究^[14]。利用代谢组学技术对植物体内的次生代谢物进行定性定量,同时结合数据处理软件对植物整体进行相关分析,从生物样本中检测并筛选出具有重要生物学意义和统计学显著差异的代谢物,从而揭示和阐明植物次生代谢物的合成途径和代谢网络调控机制^[15]。通过代谢组学技术可以鉴定观赏植物中的差异代谢物,解析花色差异形成的机理。如 Mv 型糖苷使鸳鸯茉莉花瓣呈蓝紫色^[16],也是紫色鹿角杜鹃花瓣的关键花青苷^[17]。Pn 型糖苷是红色系长春花的呈色物质,Dp 型糖苷的增加促使红紫色系长春花花色向紫色转变^[18]。

本研究通过花青素苷广泛靶向代谢组学研究 4 个色系 5 个秋石斛品种的差异代谢物,探究不同花色秋石斛花青素合成的差异,旨在为秋石斛花色形成机制和花色改良及新品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 于 2022 年 11 月采自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带花卉研究中心的热带兰品种资源圃,收集 5 个代表性秋石斛品种水蜜桃 (*Den. Airey Peach*, SMT, 浅桃红色)、红珍珠 (*Den. Udomsri Beauty*, HZZ, 紫红色)、迷你 (*Den. Yaya Victoria*, MN, 紫红色)、黑猫 (*Den. Black Cat*, HM, 深红色)、蓝天使 (*Den. Blue Sapphire*, T114, 蓝紫色)。进行广泛靶向代

谢组分析, 挑选植株健壮且无病虫害的具有典型特征的新鲜花朵, 摘下花瓣、萼片及唇瓣放入 50 mL 离心管中, 置于液氮干燥冷冻后, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.1.2 代谢物提取 将新鲜样品置于液氮中研磨, 将研磨后的样品置于冷冻干燥机中冷冻干燥, 取干燥后的样品精确称量适量样本于 2 mL 离心管中, 加入 1000 μL 60% 甲醇溶液 (含 0.1 mol/L 盐酸和质量分数 0.1% 乙二胺四乙酸二钠盐), 涡旋振荡 60 s; 加入 2 颗钢珠, 放入组织研磨器 (美壁 MB-96) 中, 50 Hz 研磨 120 s; 60% 超声功率在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下超声 10 min; 12 000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液 100 μL , 加入 400 μL 60% 甲醇溶液 (含 0.1 mol/L 盐酸和质量分数 0.1% 乙二胺四乙酸二钠盐), 混匀, 过 0.22 μm 膜过滤, 滤液加至棕色进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 检测。

1.2 方法

1.2.1 色谱质谱采集条件 色谱条件: Thermo Vanquish (Thermo Fisher Scientific, USA) 超高效液相系统, 使用 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm , Waters, Milford, MA, USA) 色谱柱, 流速为 0.25 mL/min, 柱温为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 2 μL 。正离子模式, 流动相为 1% 甲酸水 (A) 和 1% 甲酸甲醇 (B), 梯度洗脱程序为: 0.0~2.0 min, 5% B; 2.0~15.0 min, 5%~70% B; 15.0~15.1 min, 70%~95% B; 15.1~18.0 min, 95% B; 18.0~20.0 min, 95%~5% B; 20.0~25.0 min, 5% B。

质谱条件: Thermo Q Exactive 质谱检测器 (Thermo Fisher Scientific, USA), 电喷雾离子源 (ESI)。正离子喷雾电压为 3.50 kV, 鞘气流速为 47 arb, 辅助气流速为 15 arb。毛细管温度为 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, 以分辨率 70 000 进行一级全扫描, 一级离子扫描范围 150~1300 m/z , 并采用 HCD 进行二级裂解, 碰撞能量为 10、50、60 eV, 二级分辨率为 17 500, 采集信号前 4 离子进行碎裂, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

1.2.2 花色表型的测定 利用分光色差仪 (NF555 型, 日本电色工业株式会社) 以光源 C/2 $^{\circ}$ 为条件测量秋石斛花朵的颜色^[8]。每个品种选取具典型颜色特征的花朵 3~4 朵, 拆分出花瓣和唇瓣平置于白纸上, 将集光孔对准花瓣的主要显色位置进行测量, 按 CIE Lab 表色系统测定花瓣的明度 (L^*), 色相 a^* 、 b^* 值。每朵花测定 3 次, 取平均

值。唇瓣同上操作。根据所测计算彩度 (C) 和色相角 (h), 根据公式计算: $C=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$, $h=\arctan(b^*/a^*)$ 。并将其换算为红葡萄酒颜色指数 CIRG=(180- h)/(L^*+C), 此参数与花青素苷呈指数关系, 能很好地应用于对紫色的颜色描述^[19]。

1.2.3 总花青素的提取 将收集好的秋石斛花朵拆解出花瓣和唇瓣, 用剪刀剪碎后放于培养皿中, 避光, 在冷冻干燥机 (Labconco Freezone Plus, USA) 中干燥 12 h 以上, 取出干样, 用电子天平准确称取 0.1 g 或 0.08 g, 分装至 2 mL 离心管, 每管放 2 颗钢珠, 提前用液氮遇冷离心管和托盘, 放于组织研磨机 (Tissuelyser-96, 上海净信实业) 中 60 Hz 功率研磨约 90 s 至粉末状, 取出钢珠, 将干样置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。花瓣和唇瓣各重复 3 次。每个离心管中分装约 0.1 g 秋石斛冻干样品, 再加入 1 mL 甲醇: 盐酸: 水=70: 0.1: 29.9 ($V/V/V$) 的提取液, 涡旋 10 s 并搅拌均匀后再加入 1 mL 提取液放入超声清洗器中避光放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 提取 24 h, 取出后离心 5 min (6000 r/min), 转移 300 μL 上清液至新的离心管中。加入 50 μL 氯仿以及 300 μL HCl 溶液 (0.1%), 剧烈震荡。再次离心 5 min (12 000 r/min), 取 200 μL 上清液至酶标板中, 利用酶标仪 (TECAN Spark 10 mol/L, CH) 测量在 525 nm 处供试花瓣中的总花青素苷含量 (total anthocyanins content, TA)。称取 1 mg 矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷 (购自北京索莱宝科技有限公司) 溶于 1 mL 上述提取液中, 制备成 1 mL 的母液。将矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷稀释成 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625、0.7812 $\mu\text{g/mL}$ 9 个浓度梯度, 根据吸光值绘制成标准曲线, 采用半定量法计算每 1 mg 干重花瓣或唇瓣中未经过水解处理的花青素苷的相对含量, 以总花青素苷含量表示。

1.3 数据处理

依据公共数据库 KNApSACk、HMDB、LipidMaps、PubChem、KEGG 及诺米代谢自建物质库 (苏州帕诺米克生物医药科技有限公司) 进行物质鉴定, 对样本的代谢物进行质谱定性分析, 采用 R XCMS 软件包进行峰检测、峰过滤、峰对齐处理, 得到物质峰面积列表以及对应物质的相对含量。数据质控中过滤掉 QC 样本中 RSD>30% 的物质。采用 R 语言分别对样本数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。根据统计检验计算 P 值, OPLS-DA 降维方法计算变量

投影重要度 (variable importance in projection, VIP), 结合差异倍数 (fold change, FC) 值, 衡量各花青素组分含量对样本分类判别的影响强度和解释能力, 辅助标志花青素的筛选。采用 SAS Studio 软件 Duncan's 法评估主要花青素代谢物含量的差异显著性。

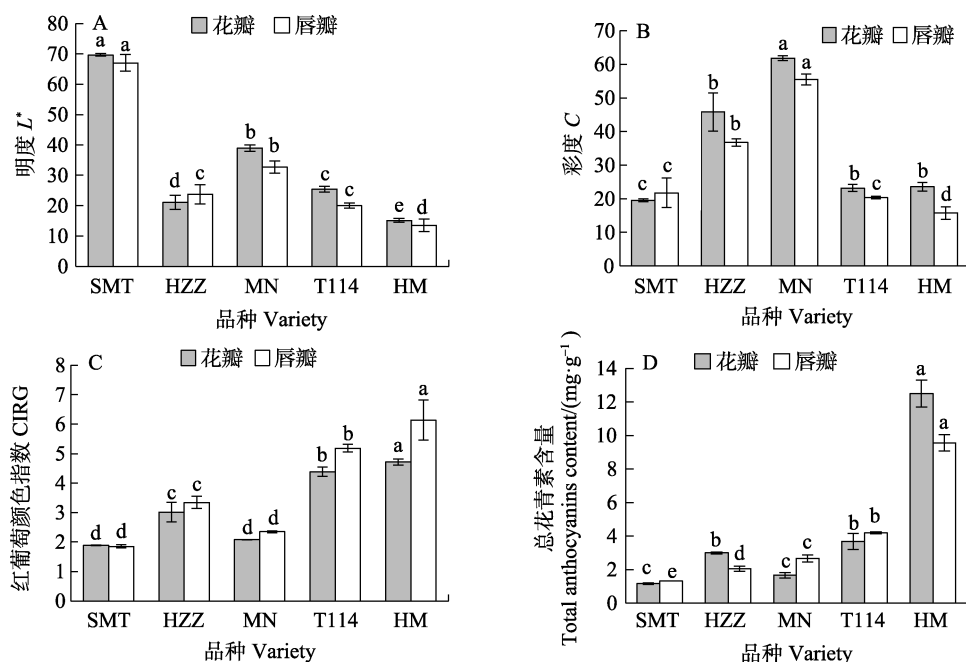
2 结果与分析

2.1 不同品种的花色和总花青素苷含量

5 个秋石斛品种间的花色呈显著差异, 通过对 5 个品种花瓣和唇瓣的 L^* 、 C 和 CIRG 颜色参数进行分析发现, 浅桃红色品种水蜜桃的花瓣和

唇瓣的 L^* 值显著大于其他品种 (图 1A), 而其花瓣 C 值显著小于其他品种 (图 1B); 紫红色品种迷你的 C 值显著高于其他品种; 深红色品种黑猫的花瓣和唇瓣的 CIRG 指数最高 (图 1C), 而 C 值显著低于其他品种。

测定其盛花期花朵的总花青素苷含量结果表明, 黑猫品种的总花青素苷的含量显著高于其他品种, 其含量为其他品种的 3~10 倍; 水蜜桃、迷你和蓝天使的唇瓣的总花青素苷含量高于花瓣, 而红珍珠和黑猫品种则相反; 水蜜桃品种的花瓣和唇瓣的总花青素苷含量分别为黑猫品种的 9.2% 和 13.8% (图 1D)。



不同小写字母表示品种间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among varieties ($P < 0.05$).

图 1 不同品种秋石斛花瓣和唇瓣的花色和总花青素苷含量

Fig. 1 Flower color and total anthocyanin content of petals and labellums of different varieties of *Phalaenopsis*-type *Dendrobium*

2.2 广泛靶向花青素代谢组分析

2.2.1 数据结果评估 对 5 种秋石斛盛花期花进行靶向代谢谱分析。经色谱分离流出的组分不断进入质谱, 质谱连续扫描进行数据采集。每一次扫描得到一张质谱图, 将每个时间点质谱图中所有离子的强度加和后连续描绘, 得到总离子流色谱图 (图 2), 结果显示总离子流的曲线重叠性高, 表明质谱信号稳定性较好。

2.2.2 花青素定性和定量分析 花青素鉴定首先根据精确分子量进行确认, 后续根据 MS/MS 碎片模式对 KNApSACK (<http://metabolomics.jp>), HMDB

(<https://hmdb.ca>), LipidMaps (<https://lipidmaps.org>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), KEGG (<https://www.genome.jp>) 以及诺米代谢自建标准品数据库进行算法注释获得花青素成分结果。对 5 个秋石斛品种的花青素成分进行分析, 共鉴定出 38 种代谢物, 包括 31 种花青素苷、4 种花青素元和 3 种其他花青素 (表 1)。对花青素种类与含量进行统计, 14 种矢车菊素和 13 种飞燕草素是构成这 5 个品种花青素的主要成分, 可达全部代谢物种类的 70%, 其余为 2 种天竺葵素、3 种芍药花素、3 种矮牵牛素及 3 种其他花青素 (图 3A)。

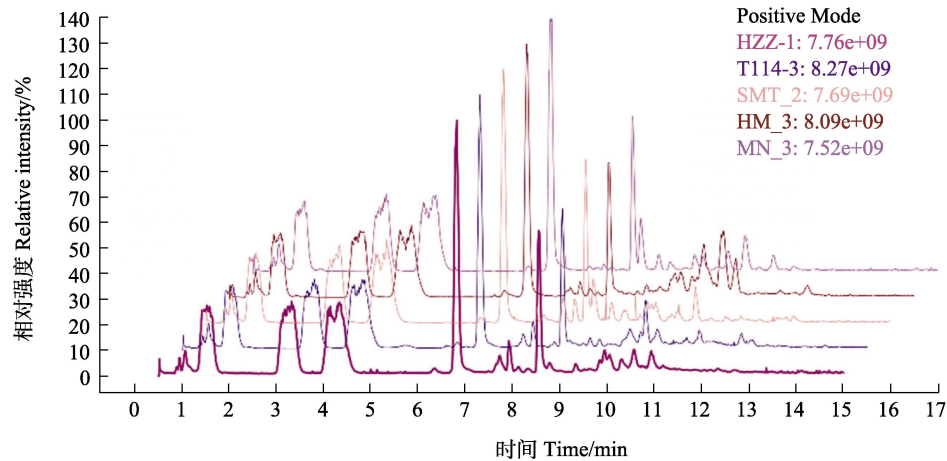


图 2 正离子检测模式的 TIC 重叠图

Fig. 2 Total ions chromatograms (TIC) of positive ion detection mode

表 1 供试秋石斛中的花青素成分

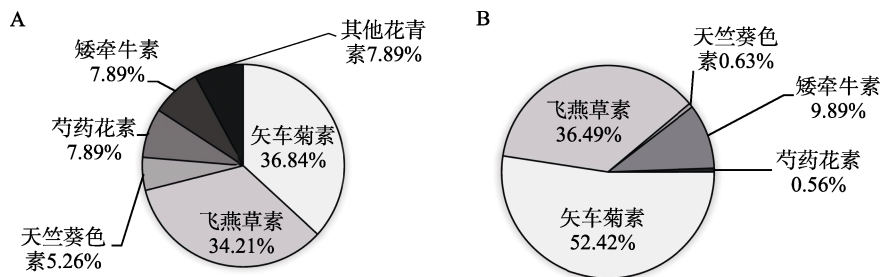
Tab. 1 The anthocyanin components in *Phalaenopsis-type Dendrobium*

序号 Code	代谢物 Metabolite	质荷比 m/z	保留时间 Retention time/min	分子量 Molecular weight	分子式 Formula	花青素分类 Chemotaxonomic	电离模式 Precursor type
1	矢车菊素 3-O-半乳糖苷	449.109	8.3	449.108	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	cyanidin	[M] ⁺
2	芍药花素 3-芸香糖苷	609.178	9.3	609.182	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	peonidin	[M] ⁺
3	矢车菊素	287.055	9.8	287.056	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	cyanidin	[M] ⁺
4	矢车菊素 4'-葡萄糖苷	449.107	5.3	449.108	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	cyanidin	[M] ⁺
5	飞燕草素 3-半乳糖苷	465.101	8.0	465.103	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	delphinidin	[M] ⁺
6	矢车菊素 3-芸香糖苷	595.164	8.3	595.166	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	cyanidin	[M] ⁺
7	矢车菊素 3,5-二葡萄糖苷	611.160	7.3	611.161	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	cyanidin	[M] ⁺
8	飞燕草素 3-槐糖苷	627.154	7.8	627.156	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₇	delphinidin	[M] ⁺
9	飞燕草素 3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷	773.205	8.0	773.214	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₁	delphinidin	[M] ⁺
10	飞燕草素	303.050	8.3	303.050	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	delphinidin	[M] ⁺
11	飞燕草素 3-(6-鼠李糖基半乳糖苷)	611.160	7.7	611.161	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	delphinidin	[M] ⁺
12	天竺葵素	271.060	10.5	271.061	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	pelargonidin	[M] ⁺
13	天竺葵素 3-(6"-丙二酰糖苷)	519.112	10.2	519.114	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃	pelargonidin	[M] ⁺
14	矢车菊素 3-半乳糖苷-5-葡萄糖苷	611.160	8.3	611.161	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	cyanidin	[M] ⁺
15	飞燕草素 3-槐糖苷-5-葡萄糖苷	789.219	7.6	789.209	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₂	delphinidin	[M] ⁺
16	矮牵牛素 3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	479.116	9.2	479.119	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	petunidin	[M] ⁺
17	芍药花素	301.071	10.6	301.071	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	peonidin	[M] ⁺
18	矢车菊素 3-半乳糖酸木糖甙	581.147	8.6	581.151	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	cyanidin	[M] ⁺
19	飞燕草素 3-葡萄糖苷 5-咖啡酰葡萄糖苷	789.188	7.6	789.188	C ₃₆ H ₃₇ O ₂₀	delphinidin	[M] ⁺
20	参薯素 I	817.226	10.3	817.219	C ₃₈ H ₄₁ O ₂₀	other anthocyanidin	[M] ⁺
21	飞燕草素 3-(6-丙二酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	713.150	8.3	713.157	C ₃₀ H ₃₃ O ₂₀	delphinidin	[M] ⁺
22	矢车菊素 3-葡萄糖基芸香糖苷	757.223	8.7	757.219	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	cyanidin	[M] ⁺
23	矢车菊素 3-槐糖苷-5-葡萄糖苷	773.205	9.1	773.214	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₁	cyanidin	[M] ⁺
24	矢车菊素 3-刺槐双糖苷	595.164	9.3	595.166	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	cyanidin	[M] ⁺
25	飞燕草素 3-葡萄糖苷-5-(6-乙酰葡萄糖苷)	669.173	8.7	669.167	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₈	delphinidin	[M] ⁺

续表 1 供试秋石斛中的花青素成分

Tab. 1 The anthocyanin components in *Phalaenopsis*-type *Dendrobium* (continued)

序号 Code	代谢物 Metabolite	质荷比 <i>m/z</i>	保留时间 Retention time/min	分子质量 Molecular weight	分子式 Formula	花青素分类 Chemotaxonomic	电离模式 Precursor type
26	木樨黄定 5,7-二葡萄糖苷	595.165	5.9	595.166	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	other anthocyanidin	[M] ⁺
27	飞燕草素 3-[6-(咖啡酰葡萄糖苷)]-5-[6-(丙二酰葡萄糖苷)]	875.178	8.2	875.188	C ₃₉ H ₃₉ O ₂₃	delphinidin	[M] ⁺
28	龙胆花青素 A	773.184	9.1	773.193	C ₃₆ H ₃₇ O ₁₉	other anthocyanidin	[M] ⁺
29	牵牛花色素 3-槐糖苷	641.166	9.1	641.172	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₇	petunidin	[M] ⁺
30	飞燕草素 3-[6-(4-(咖啡酰鼠李糖基)葡萄糖苷)]-5-葡萄糖苷	935.261	7.8	935.246	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄	delphinidin	[M] ⁺
31	矢车菊素 3-(6"-咖啡酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	773.189	8.0	773.193	C ₃₆ H ₃₇ O ₁₉	cyanidin	[M] ⁺
32	矮牵牛花素 3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷	787.236	9.0	787.230	C ₃₄ H ₄₃ O ₂₁	petunidin	[M] ⁺
33	矢车菊素 3-刺槐双糖苷-5-(6- <i>p</i> -对香豆素葡萄糖苷)	903.270	8.7	903.256	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₂	cyanidin	[M] ⁺
34	矢车菊素 3-(6"-丙二酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	697.169	8.8	697.162	C ₃₀ H ₃₃ O ₁₉	cyanidin	[M] ⁺
35	飞燕草素 3-(6"-丙二酰糖苷)	551.101	11.0	551.104	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₅	delphinidin	[M] ⁺
36	芍药花素 3-芸香糖苷-5-葡萄糖苷	771.237	10.5	771.235	C ₃₄ H ₄₃ O ₂₀	peonidin	[M] ⁺
37	飞燕草素 3-[6'-(4"- <i>p</i> -对香豆酰鼠李糖基)葡萄糖苷]5-葡萄糖苷	919.248	12.2	919.251	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₃	delphinidin	[M] ⁺
38	矢车菊素 3-(6"-丙二酰糖苷)	535.106	10.0	535.109	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄	cyanidin	[M] ⁺



A: 花青素种类; B: 花青素含量。

A: Anthocyanins classification; B: Anthocyanins contents.

图 3 花青素种类与含量统计

Fig. 3 Classification and content statistics of anthocyanins

秋石斛所含的 5 种花青素中矢车菊素含量最高, 可达所有花青素含量的一半以上, 飞燕草素含量次之, 矮牵牛素、天竺葵素、芍药花素较少, 其中芍药花素含量最少, 仅占所有花青素含量的 0.56% (图 3B)。

鉴定出的所有代谢物均能在 5 个秋石斛品种中发现, 但每个品种的花青素含量不同。蓝天使品种的 Cy 型糖苷占花青素比例最高, Dp 型糖苷则在迷你品种中相对含量最高; 黑猫品种的 Cy 与 Dp 型糖苷的含量近似, 而水蜜桃品种的花青素主要由 Cy、Dp 和 Pt 型糖苷构成; 与水蜜桃品种的糖苷组成比例类似, 但红珍珠品种的 Dp 型糖苷含量较高。

2.2.3 各组样品与质控样本的主成分分析 对各

组样本与质控品质谱数据进行主成分分析 (图 4)。利用主成分分析对 15 个秋石斛样本和 3 个 QC 样本的代谢产物进行多元统计分析, 显示出各组间的分离趋势及组内差异, 小组内 3 个样品被聚集到一起, 此结果表明样品重复性较好, 组内样本点距离近, 一致性高; 组间样本点相距较远, 分离趋势明显, 差异性好。QC 样本密集分布, 说明数据可靠。

2.2.4 不同品种秋石斛的共有差异代谢物分析 通过对鉴定出的花青素进行筛选, 从鉴定列表中寻找差异物质。选择的相关差异花青素筛选条件为 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$, 统计 5 个品种间的差异代谢物数量, 通过维恩图可展示各组差异代谢物之间的关系。

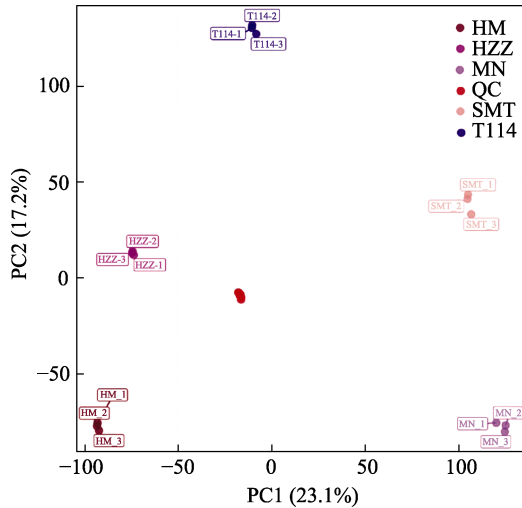


图 4 各组样品与质控样品质谱数据的 PCA 得分图
Fig. 4 PCA score of quality spectrum data of each group and quality control samples

由共同差异韦恩图可知，蓝紫色品种蓝天

使与其余 4 个品种的共同差异代谢物共有 13 种（图 5A）。差异代谢物整体的调控类型一致，说明蓝紫色品种较为独特。通过对共同差异代谢物（表 2）分析发现，其中共同上调的差异代谢物为矮牵牛素-β-D-吡喃葡萄糖苷、飞燕草素 3-槐糖苷、飞燕草素 3-葡萄糖苷-5-(6-乙酰葡萄糖苷)、矢车菊素 3-葡萄糖基芸香糖苷、飞燕草苷 3-[6'-(4''-p-对香豆酰鼠李糖基)葡萄糖苷]5-葡萄糖苷，主要差异花青素由 Dp 型糖苷和 Pt 型糖苷组成，且 3 种 Dp 型糖苷含量均显著高于其他颜色。而矢车菊素 3-刺槐双糖苷-5-(6-p-对香豆素葡萄糖苷)显著下调。

深红色品种黑猫与红珍珠、迷你和浅桃红色品种水蜜桃的共同差异代谢物有 12 种（图 5B）。筛选其共同差异代谢物可知（表 3），3 种 Dp 型糖苷在黑猫中代谢类型为上调，另外矢车菊素 3-

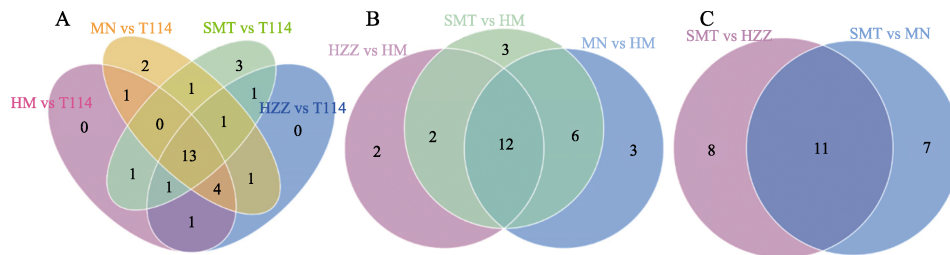


图 5 秋石斛组间共同差异韦恩图

Fig. 5 Common differential metabolites Wayne diagram between *Phalaenopsis-type Dendrobium* groups

表 2 蓝紫色蓝天使与其他品种的共同差异代谢物

Tab. 2 Common differential metabolites of blue-pulper cultivar *Den.* Blue Sapphire and other cultivars

序号 Code	代谢物 Metabolite	T114 vs HM		T114 vs HZZ		T114 vs MN		T114 vs SMT	
		log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type
1	矮牵牛素-β-D-吡喃葡萄糖苷	4.10	up	1.84	up	4.01	up	5.61	up
2	飞燕草素 3-槐糖苷	5.18	up	2.64	up	4.12	up	2.98	up
3	飞燕草素 3-葡萄糖苷-5-(6-乙酰葡萄糖苷)	0.57	up	2.67	up	1.95	up	3.09	up
4	矢车菊素 3-葡萄糖基芸香糖苷	5.66	up	4.71	up	5.65	up	5.64	up
5	参薯素 I	-1.72	down	-3.08	down	-3.11	down	-4.58	down
6	飞燕草素 3-[6-(咖啡酰葡萄糖苷)]-5-[6-(丙二酰葡萄糖苷)]	-5.56	down	-1.72	down	-5.22	down	-4.46	down
7	矢车菊素 3-刺槐双糖苷-5-(6-p-对香豆素葡萄糖苷)	-6.78	down	-4.86	down	-11.21	down	-11.48	down
8	矢车菊素 3-半乳糖酸木糖苷	-1.01	down	-1.33	down	1.19	up	-1.55	down
9	木樨黄定 5,7-二葡萄糖苷	-0.50	down	-1.08	down	-0.79	down	-1.84	down
10	矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷	-2.48	down	-2.41	down	3.16	up	-1.86	down
11	飞燕草素 3-[6'-(4''-p-对香豆酰鼠李糖基)葡萄糖苷]5-葡萄糖苷	3.12	up	2.71	up	-1.26	down	1.68	up
12	天竺葵素 3-(6'-丙二酰糖苷)	-0.79	down	-1.15	down	1.48	up	-0.79	down
13	飞燕草素 3-(6'-丙二酰糖苷)	-1.23	down	0.73	up	-3.78	down	-3.84	down

表 3 深红色黑猫分别与红珍珠、迷你和水蜜桃的共同差异代谢物
Tab. 3 Common differential metabolites of dark red cultivar *Den. Black Cat* vs *Den. Udomsri Beauty*, *Den. Yaya Victoria*, *Den. Airey Peach*

序号 Code	代谢物 Metabolite	HM vs HZZ		HM vs MN		HM vs SMT	
		log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type
1	矢车菊素 3-(6"-咖啡酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	3.39	up	3.38	up	8.58	up
2	龙胆花青素 A	2.68	up	2.73	up	6.36	up
3	飞燕草素 3-槐糖苷-5-葡萄糖苷	3.62	up	2.71	up	12.33	up
4	飞燕草素 3-[6-(4-(咖啡酰鼠李糖基)葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷]	1.89	up	5.88	up	2.13	up
5	芍药花素	-2.73	down	-2.69	down	-3.48	down
6	矮牵牛素 3-槐糖苷	-6.28	down	-2.71	down	-4.80	down
7	矢车菊素 3-刺槐双糖苷-5-(6- <i>p</i> -对香豆素葡萄糖苷)	1.92	up	-4.43	down	-4.70	down
8	飞燕草素 3-(6"-丙二酰糖苷)	1.96	up	-2.55	down	-2.61	down
9	矢车菊素 3-半乳糖酸木糖苷	-0.32	down	2.20	up	-0.54	down
10	矢车菊素 3-半乳糖苷-5-葡萄糖苷	-1.25	down	5.87	up	0.39	up
11	飞燕草素 3-葡萄糖苷-5-(6-乙酰葡萄糖苷)	2.10	up	1.37	up	2.52	up
12	矢车菊素 3-(6"-丙二酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	-0.52	down	4.04	up	3.28	up

(6"-咖啡酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷为构成其上调差异花青素的主要成分。芍药花素和矮牵牛素 3-槐糖苷是黑猫品种共同下调的差异花青素,说明二者在深红色品种黑猫中的代谢水平低。

紫红色品种红珍珠、迷你与浅桃红色品种水蜜桃的共同差异代谢物有 11 种(图 5C),共同差

异代谢物中上调的有 5 种(表 4),以 Cy 型糖苷和 Dp 型糖苷为主,矢车菊素上调的种类较多,在紫红色品种中富集矢车菊素,其中飞燕草素 3-槐糖苷-5-葡萄糖苷的上调倍数显著高于其他代谢物。在紫红色品种中共同下调的花青素仅有矢车菊素 3-半乳糖酸木糖苷和木樨黄定 5,7-二葡萄糖苷。

表 4 红珍珠和迷你分别与浅桃红色品种水蜜桃的共同差异代谢物
Tab. 4 Common differential metabolites of light peach red cultivar *Den. Airey Peach* vs *Den. Udomsri Beauty*, *Den. Yaya Victoria*

序号 Code	代谢物 Metabolite	MN vs SMT		HZZ vs SMT	
		log ₂ FC	调控类型 Regulation type	log ₂ FC	调控类型 Regulation type
1	飞燕草素 3-葡萄糖苷-5-(6-乙酰葡萄糖苷)	1.15	up	0.42	up
2	矢车菊素 3-(6"-咖啡酰葡萄糖苷)-5-葡萄糖苷	5.20	up	5.19	up
3	飞燕草素 3-槐糖苷-5-葡萄糖苷	9.62	up	8.71	up
4	矢车菊素 3-(6"-丙二酰糖苷)	1.71	up	0.62	up
5	矢车菊素 3-芸香糖苷	1.73	up	3.29	up
6	矢车菊素 3-半乳糖酸木糖苷	-2.74	down	-0.22	down
7	木樨黄定 5,7-二葡萄糖苷	-1.05	down	-0.76	down
8	天竺葵素 3-(6"-丙二酰糖苷)	-2.27	down	0.36	up
9	矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷	-5.02	down	0.55	up
10	矢车菊素 3-半乳糖苷-5-葡萄糖苷	-5.48	down	1.63	up
11	矮牵牛素 3-槐糖苷	-2.09	down	1.48	up

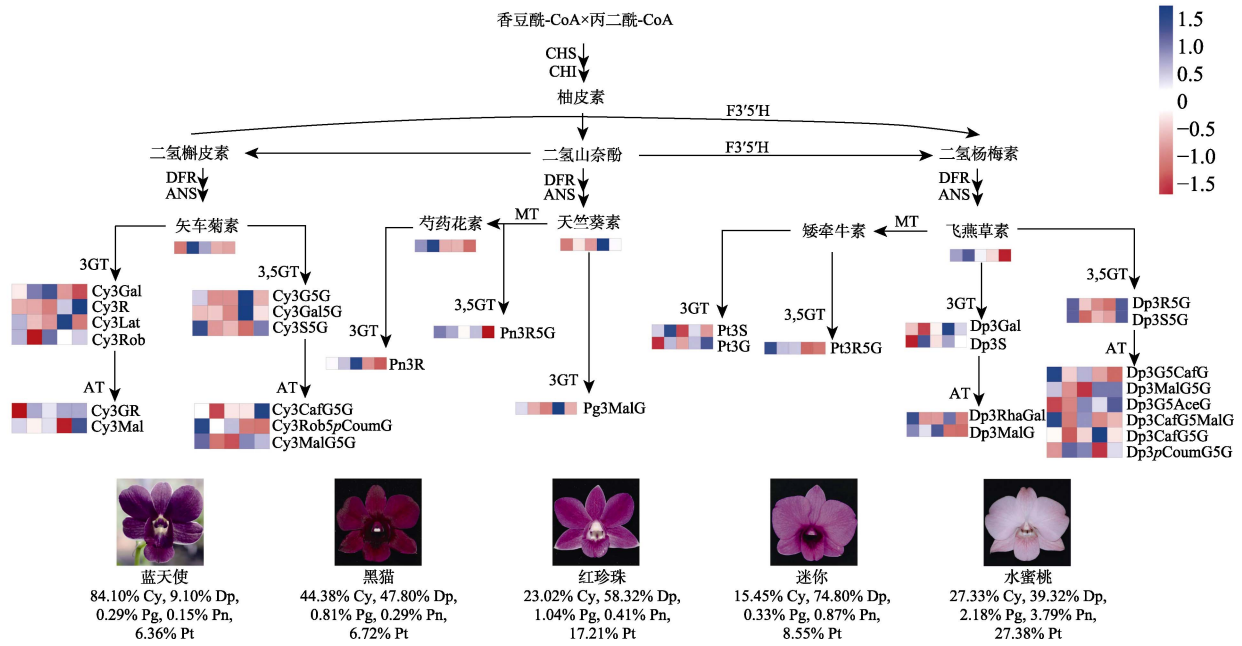
2.3 秋石斛花青素生物合成途径解析

基于以上结果推测出秋石斛花青素生物合成途径,并根据 5 个不同品种的秋石斛花青素的相对值为代谢水平进行聚类分析,表明不同花色秋

石斛中花青素代谢水平存在差异(图 6)。

3 讨论

本研究采用广泛靶向代谢组学技术研究了不



不同颜色表示相对含量的大小。Cy: 矢车菊素; Pn: 芍药花素; Pg: 天竺葵素; Pt: 矮牵牛素; Dp: 飞燕草素; R: 芸香糖苷; G: 葡萄糖苷; Gal: 半乳糖苷; S: 槐糖苷; Rob: 刺槐双糖苷; Lat: 半乳糖酸木糖苷; Mal: 丙二酰; Rha: 鼠李糖; Ace: 乙酰; Caf: 咖啡酰; Coum: 香豆酰; CHS: 查尔酮合成酶; CHI: 查尔酮异构酶; F3'H: 黄酮醇-3'-羟化酶; F3'5'H: 类黄酮-3',5'-羟基化酶; DFR: 二氢黄酮醇还原酶; ANS: 花青素合成酶; GT: 花青素葡萄糖转移酶; AT: 花青素苷酰基转移酶; MT: 花青素苷甲基转移酶。Different colors indicate the relative content. Cy: Cyanidin; Pn: Peonidin; Pg: Pelargonidin; Pt: Petunidin; Dp: Delphinidin; R: Rutinoid; G: Glucoside; Gal: Galactoside; S: Sophoroside; Rob: Robinobioside; Lat: Lathyroside; Mal: Malonyl; Rha: Rhamnose; Ace: Acetyl; Caf: Caffeoyl; Coum: Coumaroyl; CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; F3'H: Flavonone-3'-hydroxylase; F3'5'H: Flavonoid-3',5'-hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol reductase; ANS: Anthocyanin synthase; GT: Anthocyanin glucose transferase; AT: Anthocyanin acyltransferase; MT: Anthocyanin methyltransferase.

图 6 秋石斛花青素生物合成途径

Fig. 6 Anthocyanin biosynthesis pathway (ABP) of *Phalaenopsis-type Dendrobium*

同品种秋石斛花中花青素代谢物的组成和差异，从代谢产物水平初步揭示了不同花色秋石斛品种间的花色形成机制。

本研究发现秋石斛花青素苷主要是 Cy、Pn、Pg、Dp 和 Pt 的糖基化及酰基化衍生物。相较于 KANCHIT^[7]仅发现 Cy、Pn 和 Pg 三种类型的花青素，吕晓帆等^[12-13]用 UPLC-MS 鉴定出几种 3-糖苷，本研究利用代谢组手段检测到秋石斛中更多花青素代谢物种类，发现不同花色各种类花青素组成比例差异，丰富了目前对其组成及含量的认知。然而本研究鉴定出的花青素苷并不包括前人从秋石斛中分离得到的 4 种主要成分——酰化的矢车菊素糖苷^[10-12]。而且前期研究认为桃红色种质中的主要成分为 Pg 型花青素^[20]，与本研究中浅桃红色水蜜桃由 Cy 型花青素组成不一致。笔者将水蜜桃花青素苷水解后，利用 HPLC 仅检测到 Pg 苷元，可见其主要花青素为 Pg 型色素。这表明，目前流行的基于标准数据库的 UPLC-MS 方法在鉴定秋石斛花青素的组成方面存在明显不

足。其原因是数据库中构建的花青素标准品种有限。因此需要更多的花青素标准来补充定性分析数据库，才能深入和准确地研究秋石斛的花青素苷组成。

秋石斛花从小花芽到盛开过程中，花青素苷含量呈逐渐增加的趋势，到盛开期达到峰值^[21]，该时期各品种花色具有代表性，可作为花色评价的材料。各类花青素苷含量的变化是不同花色秋石斛品种间呈色差异的主要原因。花青素苷含量是影响花色明暗及色调的重要因素，随着花青素苷含量的增加，秋石斛花瓣颜色变暗，逐渐转为紫红色和紫色^[8]。本研究结果显示，矢车菊素和飞燕草素在秋石斛花青素苷中占 70%以上。随着供试秋石斛颜色由浅桃红、紫红向深红以及蓝紫色变化，Cy 型和 Dp 型色素含量显著增加，由于 Cy 型色素是秋石斛呈色的主要成分^[7]，也是诸多观赏植物中紫红色系花瓣呈色的物质基础^[22]。由此推测随着 Cy 型色素含量的增加，花色会加深为深红色。

绝大多数蓝色花是以 Dp 型色素为基础形成的。如飞燕草素-3-O-葡萄糖苷是绣球花蓝色形成的决定性物质,其含量变化与蓝色花的形成一致^[23]。飞燕草素-3-O-葡萄糖苷的含量与花色的深浅呈正相关,且随着薰衣草的花发育成熟,飞燕草素-3-O-葡萄糖苷的含量也逐渐增多^[24]。蓝紫色秋石斛品种蓝天使中的主要差异花青素由 Dp 型糖苷和 Pt 型糖苷组成,且 3 种 Dp 型糖苷含量均显著高于其他品种,Dp 的积累使花色向蓝色偏移^[25],因而推测飞燕草素赋予秋石斛的蓝紫色调。且前人和本研究均发现秋石斛花青素苷存在普遍的酰基化现象,酰基化也有利于花色蓝化^[26]。蓝色秋石斛的育种策略可以在专一积累 Dp 型色素的基础上,通过辅助着色、金属络合或芳香酰基化修饰进一步形成较为稳定的蓝色大分子,从而培育出蓝色的秋石斛新品种^[27]。

在深红色品种黑猫中共同下调的为 Pn 型色素。而在其他观赏植物中,Pn 型色素的积累使花色偏向蓝紫色。Pn 型色素是紫枝玫瑰花色形成紫色的主要因素^[28]。本研究中仅发现在浅桃红色品种中下调差异花青素有 5 种,以 Cy 型糖苷和 Dp 型糖苷为主,矢车菊素下调的种类较多。秋石斛原生种和杂交种水解后的花青素苷元中,发现以 Cy 为主,Pn 较少,而 Pg 仅能在桃红色种质中检测到^[20]。钱大伟等^[29]推测天竺葵色素是锦绣杜鹃粉花品种粉鹤花瓣呈现粉红色的主要原因。DENG 等^[30]研究发现红色非洲菊的关键花青素是天竺葵素。对于纯红色花的育种可以降低黄酮醇合成酶的活性,增加花青素苷的积累,减少类黄酮-3'-羟化酶的合成,阻断矢车菊素的通路,大量积累天竺葵素。如在白色的矮牵牛中成功转化其他观赏植物的 *DFR* 基因,使转基因植株的花瓣中积累了天竺葵色素苷,花色变成了红色^[31]。

由于秋石斛花青素苷的复杂性以及代谢组学现有数据库尚不完善,代谢通路不够全面,尚未能将秋石斛中花青素组成完全解析。随着代谢组学技术的不断发展,鉴定与识别代谢物的能力不断提高,将为阐明秋石斛花色的形成机理,为花色改良定向育种提供指导。

参考文献

[1] 李崇晖,尹俊梅. 蓝色花形成的基因工程进展与育种策略[J]. 生物技术通报, 2019, 35(11): 160-168.

- LI C H, YIN J M. Genetic engineering progress and breeding tactics on blue flowers[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(11): 160-168. (in Chinese)
- [2] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 733-749.
- [3] BOASE M R, LEWIS D H, DAVIES K M, MARSHALL G B, PATEL D, SCHWINN K E, DEROLE S C. Isolation and antisense suppression of flavonoid 3',5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(1): 107.
- [4] TEIXEIRA D S, JIN X H, DOBRÁNSZKI J, LU J J, WANG H Z, ZOTZ G, CARDOSO J C, ZENG S J. Advances in *Dendrobium* molecular research: applications in genetic variation, identification and breeding[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2016, 95: 196-216.
- [5] 殷涵泰,尹俊梅,廖易,陆顺教,李崇晖. 基于秋石斛花朵颜色、色素分布及表皮细胞形态的表型分类[J]. 园艺学报, 2021, 48(10): 1907-1920.
- YIN H T, YIN J M, LIAO Y, LU S J, LI C H. Phenotype classification based on flower color, pigment distribution and epidermal cell shape of *Dendrobium* hybrids[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(10): 1907-1920. (in Chinese)
- [6] 廖易. 秋石斛栽培与养护[J]. 中国花卉园艺, 2018(24): 28-30.
- LIAO Y. *Dendrobium* hybrids cultivation and conservation[J]. China Flowers & Horticulture, 2018(24): 28-30. (in Chinese)
- [7] KANCHIT T. Flower pigments in yellow *Dendrobium* species and hybrids[D]. Honolulu: University of Hawaii, 1984.
- [8] 李崇晖,任羽,黄素荣,黄少华,杨光穗. 蝴蝶石斛兰花色表型及类黄酮成分分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(1): 107-116.
- LI C H, REN Y, HUANG S R, HUANG S H, YANG G S. Floral colors of *Phalaenopsis*-type *Dendrobium* and their flavonoid composition[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(1): 107-116. (in Chinese)
- [9] SAITO N, TOKI K, UESATA K, SHIGIHARA A, HONDA T. An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*[J]. Phytochemistry, 1994, 37: 245-248.
- [10] WILLIAMS C A, GREENHAM J, HARBORNE J B, KONG J M, CHIA L S, GOH N K, SAITO N, TOKI K, TATSUZAWA F. Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv. 'Pompadour'[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30: 667-675.
- [11] TATSUZAWA F, YUKAWA T, SHINODA K, SAITO N. Acylated anthocyanins in the flowers of genus *Dendrobium* section *Phalaenanthe* (Orchidaceae)[J]. Biochemical Sys-

- tematics and Ecology, 2005, 33: 625-629.
- [12] 吕晓帆, 周新红, 王莹, 吴亚妮. 秋石斛花青素提取液成分分析及其体外抗氧化活性和刺激性研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(4): 374-381.
LYU X F, ZHOU X H, WANG Y, WU Y N. Component analysis of *Dendrobium phalaenopsis* anthocyanin extract and its antioxidant activity and irritation *in vitro*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2021, 29(4): 374-381. (in Chinese)
- [13] 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.
- [14] 刘贤青, 罗杰. 植物代谢组学技术研究进展[J]. 科技导报, 2015, 33(16): 33-38.
LIU X Q, LUO J. Advances of technologies and research in plant metabolomics[J]. Science & Technology Review, 2015, 33(16): 33-38. (in Chinese)
- [15] 王梦迪, 雍旭红, 印敏, 王奇志. 代谢组学技术在植物次生代谢调控研究中的应用[J]. 植物科学学报, 2023, 41(2): 269-278.
WANG M D, YONG X H, YIN M, WANG Q Z. Application of metabonomics in regulation study of plant secondary metabolites[J]. Plant Science Journal, 2023, 41(2): 269-278. (in Chinese)
- [16] 李敏. 鸳鸯茉莉花瓣褪色分子机理及光温调控技术的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
LI M. Study on the molecular mechanism of petal fading of *Brunfelsia acuminata* and the technology of adjusting light and temperature[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [17] 张卉, 沈守云, 廖秋林, 朱宁华. 基于代谢组学分析的紫色和白粉色花的鹿角杜鹃呈花色物质差异[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(4): 430-435.
ZHANG H, SHEN S Y, LIAO Q L, ZHU N H. Metabolomics-based analysis of flower color differences between white-pink *Rhododendron latoucheae* and purple *Rhododendron latoucheae*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2022, 48(4): 430-435. (in Chinese)
- [18] 高赛. 长春花不同花色品种呈色的理化特性及代谢基础研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2022.
GAO S. Study on the physicochemical characteristics and metabolic basis of different color varieties of *Catharanthus roseus*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022. (in Chinese)
- [19] ROLLE L, GUIDONI S. Color and anthocyanin evaluation of red winegrapes by CIE L^* , a^* , b^* parameters[J]. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 2007, 41(4): 193.
- [20] KUEHNLE A R, LEWIS D H, MARKHAM K R, MITCHELL K A, DAVIES K M, JORDAN B R. Floral flavonoids and pH in *Dendrobium* orchid species and hybrids[J]. Euphytica, 1997, 95: 187-194.
- [21] LI C H, QIU J, DING L, HUANG M Z, HUANG S R, YANG G S, YIN J M. Anthocyanin biosynthesis regulation of *DhMYB2* and *DhbHHLH1* in *Dendrobium* hybrids petals[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 112: 335-345.
- [22] 夏溪, 龚睿, 奉树成, 张春英. 映山红亚属内品种间杂交 F_1 代花色苷种类及定量分析[J]. 北京林业大学学报, 2022, 44(5): 105-114.
XIA X, GONG R, FENG S C, ZHANG C Y. Types and quantitative analysis of anthocyanins in F_1 hybrid among varieties in *Rhododendron* subgenus Tsutsusi[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2022, 44(5): 105-114. (in Chinese)
- [23] 彭继庆. 绣球花不孕花中色素物质形成的调控机制研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.
PENG J Q. The research the regulation mechanism of formation pigment in sterile flowers of *Hydrangea macrophylla*[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2021. (in Chinese)
- [24] 刘春玉, 李敏, 郭丹丽. 高效液相色谱法测定薰衣草花中花色苷含量[J]. 分子植物育种, 2022, 20(15): 5125-5129.
LIU C Y, LI M, GUO D L. Determination of anthocyanins in lavender flowers by HPLC[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(15): 5125-5129. (in Chinese)
- [25] TANAKA Y, BRUGLIERA F. Flower colour and cytochromes P450[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2013, 368: 20120432.
- [26] 李亚军. 蓝色瓜叶菊聚酰化花青素生物合成相关基因分离和功能分析[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
LI Y J. Isolation and functional analysis of genes involved in polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue *Senecio cruentus*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [27] 娄倩, 刘冰, 胡碧春, 侯婷, 刘雅莉. 单子叶植物蓝色花呈色机理研究进展[J]. 园艺学报, 2021, 48(10): 2018-2030.
LOU Q, LIU B, HU B C, HOU T, LIU Y L. Research progress on the color development of blue flowers of monocots[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(10): 2018-2030. (in Chinese)
- [28] 张玲, 徐宗大, 汤腾飞, 张辉, 赵兰勇. ‘紫枝’玫瑰(*Rosa rugosa* ‘Zi zhi’)开花过程花青素相关化合物及代谢途径分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(13): 2600-2611.
ZHANG L, XU Z D, TANG T F, ZHANG H, ZHAO L Y. Analysis of anthocyanins related compounds and their bio-

- synthesis pathways in *Rosa rugosa* 'Zi zhi' at blooming stages[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(13): 2600-2611. (in Chinese)
- [29] 钱大伟, 陈小梅, 李敏, 邱栋梁. 锦绣杜鹃花瓣色素及总酚含量分析[J]. *亚热带农业研究*, 2020, 16(1): 29-34.
QIAN D W, CHEN X M, LI M, QIU D L. Content analysis of anthocyanin pigment and total phenols in the petals of *Rhododendron pulchrum* Sweet[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2020, 16(1): 29-34. (in Chinese)
- [30] DENG X B, BASHANDY H, AINASOJA M, KONTTURI J, PIETIAINEN M, LAITINEN R A. E, ALBERT A V, VALKONEN J P T, ELOMAA P, TEERII T H. Functional diversification of duplicated chalcone synthase genes in anthocyanin biosynthesis of *Gerbera hybrida*[J]. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1469-1483.
- [31] 韩科厅, 胡可, 戴思兰. 观赏植物花色的分子设计[J]. *分子植物育种*, 2008(1): 16-24.
HAN K T, HU K, DAI S L. Flower color breeding by molecular design in ornamentals[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2008(1): 16-24. (in Chinese)