

3种石斛属植物类胡萝卜素成分及代谢途径分析

黄昕蕾¹, 王雁^{1*}, 张辉²

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: [目的] 分析黄色花石斛兰盛开期花瓣中的类胡萝卜素种类和含量, 推定石斛属类胡萝卜素合成途径, 为探讨黄色花石斛的呈色机理和黄色花育种提供参考。 [方法] 以花色为黄色的鼓槌石斛、密花石斛和球花石斛的盛开期花瓣和唇瓣为试验材料, 采用英国皇家园艺学会比色卡进行花色描述, 利用合相色谱串联三重四极杆质谱仪(UPC²-MS/MS)进行类胡萝卜素定性、定量分析, 推测石斛属类胡萝卜素代谢途径。 [结果] 表明: 3种石斛属植物花瓣和唇瓣色系可分为白色系和淡黄-明黄-金黄色系, 花瓣和唇瓣中共鉴定出8个类胡萝卜素组分, 分别是 β -胡萝卜素、 α -隐黄素、 β -隐黄素、紫黄素、叶黄素、花药黄素、玉米黄素和叶黄素酯化物。定量分析显示: 球花石斛白色花瓣中类胡萝卜素含量极少, 总量约为 $52.26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 随着黄色加深, 类胡萝卜素总量逐渐增加, 球花石斛金黄色唇瓣中的类胡萝卜素总量最高, 达到 $3810.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。密花石斛淡黄色花瓣中以叶黄素为主; 球花石斛和密花石斛金黄色唇瓣中主要是 α -隐黄素、叶黄素和叶黄素酯化物; 明黄色鼓槌石斛花瓣中以玉米黄素、花药黄素和叶黄素为主。 [结论] α -胡萝卜素及其衍生物是淡黄色和金黄色石斛花瓣中的主要类胡萝卜素成分, 而 β -胡萝卜素及其衍生物是明黄色石斛花瓣的主要类胡萝卜素成分。结合类胡萝卜素代谢途径, 推测通过调控 *LCYE* 基因的表达, 可实现黄色花石斛的花色定向改良。

关键词: 石斛属; 黄色花; 类胡萝卜素; 类胡萝卜素代谢途径

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)05-0107-07

花色是观赏植物最重要的观赏性状之一, 是植物进化史上最具有适应意义的表型^[1]。植物的花色是多种因子协同作用的结果, 其中, 色素的组成和含量以及不同色素物质的时空组合起着决定性作用^[2-4]。花色素类物质主要有类黄酮、类胡萝卜素和花青素等, 类胡萝卜素是一类呈黄色、橙色和红色的脂溶性化合物, 目前分离和鉴定出的类胡萝卜素多达750余种, 是自然界中存在最广的色素^[4-8]。

色彩鲜艳的黄色花以其明朗和高贵的感觉而广受喜爱, 纯正的黄色花也是石斛兰花色育种的重要目标^[8-10]。目前, 市场上的黄色石斛兰多为乳白、乳黄和黄绿色, 而石斛兰原生种中不乏纯正明黄色种质^[9-11], 研究黄色花石斛兰原生种花瓣中的类胡萝卜素成分变化, 对于明确花色呈色机理及育种具有重要意义。

目前, 有关石斛属(*Dendrobium* Lindl.) 花瓣中

类胡萝卜素的研究鲜见报道。Kanchit^[12]于1984年利用HPLC对部分开黄色花的石斛兰杂交种盛花期花瓣进行了初步研究^[12], 分析结果表明, 类胡萝卜素和叶绿素是使石斛属呈现黄色和绿色的重要色素。Mudalige等^[13]调查了石斛兰花瓣中的色素分布, 发现黄色花瓣中主要含类胡萝卜素, 而其上的红色、深红棕色或褐色印记则是类胡萝卜素和花青素共同作用的结果。关于石斛属类黄酮和花青素合成相关基因的研究已逐渐深入^[14], 而关于类胡萝卜素合成相关基因的研究还鲜见报道。

鼓槌石斛(*Den. chrysotoxum* Lindl.) 花瓣明黄, 唇瓣上常有U型栗色斑块; 球花石斛(*Den. thyrsiflorum* Rchb. f.) 和密花石斛(*Den. densiflorum* Lindl.) 唇瓣皆呈金黄色, 球花石斛花瓣白色, 而密花石斛花瓣淡黄^[11]; 它们均花量大, 群体花期长, 是著名的春石斛观赏种, 也是重要的育种亲本^[11]。本研究以鼓

收稿日期: 2018-01-16 修回日期: 2019-04-22

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD01B0703)

* 通讯作者: 王雁, 博士, 研究员. E-mail: chwy8915@sina.com

槌石斛、密花石斛和球花石斛原生种为材料,定性、定量分析它们盛开期花瓣中的类胡萝卜素,为探讨石斛属黄色花呈色机理和花色育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

鼓槌石斛、密花石斛和球花石斛原生种引种自云南,种植于中国林业科学研究院科研温室。选取鼓槌石斛盛开期花瓣、密花石斛和球花石斛盛开期花瓣和唇瓣进行花色描述和类胡萝卜素成分测定。于2017年2—6月取样,选取花蕾均匀、花色一致、生长势一致的6个单株作为6次生物学重复,每个单株随机选取5朵花,将每朵花的花瓣和唇瓣取下,于液氮中快速冷冻后保存于 -80°C 超低温冰箱备用。每株选取3~5朵剩余小花进行花色描述。

1.1.1 化学试剂 质谱级甲醇购于上海西格玛奥德里奇公司;分析纯乙醇、正己烷购于北京先明乐施公司;质谱级超纯水取自 Milli-Q 净水器 (Millipore, Bedford, MA, USA)。

1.1.2 标准品 β -胡萝卜素 (β -carotene)、叶黄素 (Xanthophyll)、番茄红素 (Lycopene) 和玉米黄素 (Zeaxanthin),全部购自于西格玛奥德里奇公司和上海源叶生物科技有限公司,纯度90%及以上。

1.2 试验方法

1.2.1 花色描述 分别选取新鲜的鼓槌石斛盛开期花瓣、密花石斛和球花石斛盛开期花瓣和唇瓣,置于室内光线良好的地方,利用英国皇家园艺学会比色卡 (RHSCC) 与花瓣和唇瓣的中上部分进行比对,重复15次,选取出现频率最高的结果,对花色进行描述。

1.2.2 类胡萝卜素提取 类胡萝卜素的提取方法在 Jumaah 等^[15]的基础上优化而来。称取30 mg 冻干花瓣材料,1 mL 丙酮石油醚(1:2)溶液常温避光

提取,提取时间为30 min。每个提取进行3次重复。

1.2.3 类胡萝卜素定性、定量分析 采用 Waters 公司的合相色谱系统串联三重四极杆质谱仪 (ACQUITY UPC²-XEVO-TQ, Waters, USA) 进行类胡萝卜素分析,色谱条件为:采用 ACQUITY HSS C18 SB (100 mm \times 3 mm, 1.8 μm , Waters, USA) 色谱柱;检测波长450 nm;流动相组成:A相 CO_2 ,B相甲醇;梯度洗脱程序:0~0.5 min,5% B;0.5~5 min,5%至20% B;5~7 min,20% B;7~8 min,20%到5% B;8~10 min,5% B;流速1.5 mL \cdot min⁻¹;柱温40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为1 μL ;质谱电离源选用电喷雾电离 (ESI),在正离子模式下全扫描,扫描范围 (m/z) 150~800 u;毛细管电压:3.0 KV;锥孔电压:40 V;锥形气体流量:50 L \cdot H⁻¹;脱溶剂气流量:600 L \cdot H⁻¹。MassLynxTM (V 4.1, SCN779, Waters, UK) 软件用于 MS 数据采集与处理。

紫外-可见检测波长为450 nm,通过与标准物质的比对,以及紫外-可见吸收光谱保留时间和质谱信息的定性比较,确定类胡萝卜素结构。采用外标法计算各样品中 β -胡萝卜素、叶黄素、番茄红素和玉米黄素的含量,重复3次。采用结构相似化合物的外标法确定其它无标准品化合物的含量,重复3次。

2 结果与分析

2.1 花色描述

将鼓槌石斛花瓣、密花石斛和球花石斛花瓣和唇瓣与英国皇家园艺比色卡 (RHSCC) 进行比对,结果 (图1) 显示:球花石斛和密花石斛唇瓣皆为金黄色,比色卡代码分别为24A和23A;球花石斛花瓣为白色,比色卡代码为NN155B,基部偶带黄斑;密花石斛花瓣为淡黄色,比色卡代码为11A;鼓槌石斛花瓣为明黄色,比色卡代码为15A。



A:密花石斛 *Den. densiflorum*;B:球花石斛 *Den. thyrsiflorum*;C:鼓槌石斛 *Den. chrysotoxum*

图1 3种石斛属植物盛开期花色表型

Fig. 1 Flower color of three species of *Dendrobium* at fully opened stages

2.2 根据 UPC²-MS 质谱数据对类胡萝卜素化合物推定

类胡萝卜素分子通常由8个异戊二烯单位连接而成,根据其含氧与否常分为碳水化合物型类胡萝卜素(胡萝卜素)和氧化型类胡萝卜素(叶黄素)。常见的胡萝卜素有 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素和番茄红素等,极性稍弱。常见的叶黄素类有叶黄素、玉米黄质和类胡萝卜素酯等,极性稍强^[16]。

通常类胡萝卜素在正离子 ESI 源模式下电离,产生特征母离子和碎片离子,这些组分在 450 nm 附近都有强吸收,会产生特征吸收峰^[17-18],根据这些吸收峰可以初步推定样品中是否有类胡萝卜素存在。类胡萝卜素分离时,洗脱顺序往往与所测组分的极性密切相关,组分中的羟基数目越多,往往极性

越大,如 β -胡萝卜素(无-OH)会较早的洗脱,之后是 β -隐黄质(1个-OH),随后是玉米黄质(2个-OH)和紫黄质(2个-OH),角黄质(无-OH)也会早于虾青素(2个-OH)洗脱^[15]。根据以上推定原则,结合标准品,对3种石斛属植物花瓣和唇瓣中检测到的类胡萝卜素组分进行推定。合相色谱串联三重四极杆质谱仪(UPC²-MS/MS)分析检测到9个类胡萝卜素化合物吸收峰,可以推定的类胡萝卜素化合物结构有8种(表1),分别是 β -胡萝卜素(β -carotene)、 α -隐黄质(α -cryptoxanthin)、 β -隐黄质(β -cryptoxanthin)、紫黄质(Violaxanthin)、叶黄素(Lutein)、花药黄质(Antheraxanthin)、玉米黄质(Zeaxanthin)和叶黄素酯化物(Lutein-5,6-epoxide)。

表1 3种石斛属植物花瓣和唇瓣中类胡萝卜素结构推定

Table 1 Analysis of carotenoids in petals and labellums of three species of *Dendrobium*

保留时间 Retention time/min	检测波长 Detection wavelength	母离子 Parent ion	二级离子 (MS ²) Second ion	推定结果 Tentative Identification	推定依据 Constructive basis
2.52	435,461	536	444	β -胡萝卜素 β -carotene	标品
4.33	431,458	552	460	α -隐黄素 α -cryptoxanthin	[15]
4.50	436,462	552	-	β -隐黄素 β -cryptoxanthin	[15]
4.99	431,458	613	335	叶黄素酯化物 Lutein-5, 6-epoxide	标品
5.13	429,456	601	-	紫黄质 Violaxanthin	[15]
5.26	432,459	568	-	叶黄素 Lutein	标品
5.33	432,457	584	568	花药黄质 Antheraxanthin	[15]
5.55	438,463	568	-	玉米黄质 Zeaxanthin	标品

注:“-”:未检测到或不存在。 Notes:“-”:Not detected or not existed.

2.3 黄色花石斛兰类胡萝卜素化合物定量分析

对推定结构的8种类胡萝卜素进行定量分析,结果(表2、图2)表明:球花石斛白色花瓣中的类胡萝卜素总量最低,约为 $52.26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,随着黄色加深,类胡萝卜素总量逐渐增加,球花石斛金黄色唇瓣中的类胡萝卜素总量最高,达到 $3810.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

球花石斛白色花瓣中的类胡萝卜素主要是叶黄素,金黄色唇瓣中 α -隐黄素含量最高,约占54%;其

次是叶黄素,约占21%,叶黄素酯化物约占11%。密花石斛淡黄色花瓣中叶黄素含量最高,约占64%,其次是 α -隐黄素,约占18%,而叶黄素酯化物约占14%;金黄色唇瓣中 α -隐黄素含量最高,约占33%,其次是叶黄素酯化物,约占28%,叶黄素约占26%。明黄色鼓槌石斛花瓣中,玉米黄质含量最高,约占55%,其次是叶黄素,约占20%,花药黄质约占13%。

表2 3种石斛属植物类胡萝卜素组分的定性定量分析

Table 2 Quantitative analysis of carotenoids in petals and labellums of three species of *Dendrobium*

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组分 Component	密花石斛-唇瓣 <i>Den. densiflorum</i> labellums	密花石斛-花瓣 <i>Den. densiflorum</i> petals	球花石斛-唇瓣 <i>Den. thyrsiflorum</i> labellums	球花石斛-花瓣 <i>Den. thyrsiflorum</i> petals	鼓槌石斛-花瓣 <i>Den. chrysotoxum</i> petals
β -胡萝卜素 β -carotene	14.32 ± 1.38	2.99 ± 0.28	20.06 ± 0.56	0.64 ± 0.05	30.03 ± 2.46
α -隐黄素 α -cryptoxanthin	315.61 ± 28.94	29.02 ± 5.35	2056.96 ± 62.44	-	20.80 ± 1.92
β -隐黄素 β -cryptoxanthin	4.18 ± 0.09	-	13.78 ± 1.04	0.05 ± 0.01	23.04 ± 0.51
叶黄素酯化物 Lutein-5,6-epoxide	265.56 ± 24.43	23.30 ± 4.78	431.48 ± 31.12	-	3.89 ± 0.24
紫黄质 Violaxanthin	37.17 ± 4.55	2.84 ± 0.46	64.94 ± 0.85	-	10.44 ± 0.08
叶黄素 Lutein	247.82 ± 18.34	103.66 ± 10.72	812.20 ± 33.77	51.57 ± 0.72	166.09 ± 3.74
花药黄质 Antheraxanthin	41.20 ± 6.21	1.20 ± 0.06	265.57 ± 4.04	-	108.20 ± 4.63
玉米黄质 Zeaxanthin	24.36 ± 3.02	-	145.90 ± 3.80	-	451.00 ± 12.41
总计 Total	950.22	163.01	3810.89	52.26	813.49

注:“-”:未检测到或不存在。 Notes:“-”:Not detected or not existed.

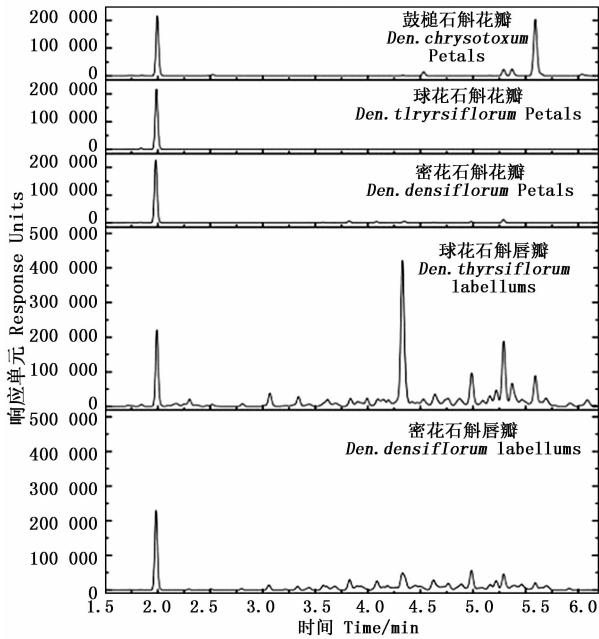


图2 3种石斛属植物花瓣和唇瓣中类胡萝卜素组分的UPC²图谱(检测波长450 nm)

Fig. 2 UPC² chromatogram of carotenoids compounds in petals and labellums of three species of *Dendrobium* (Detection wavelength 450 nm)

3 讨论

3.1 类胡萝卜素测定方法

类胡萝卜素分子由中央多聚共轭双烯链和位于两端的末端基团组成,类胡萝卜素的共轭双链不稳定,易降解,加热和光照都会加速它的异构化,同时天然类胡萝卜素异构体极为复杂,一个双键位置的移动,便会形成 α -胡萝卜素/ β -胡萝卜素或叶黄素/玉米黄质的切换。给分离、纯化与分析带来了极大的困难^[16]。

蔬菜、水果中的类胡萝卜素多以脂肪酸酯的形式存在,提取时常通过皂化处理水解类胡萝卜素酯,释放其包含的色素,同时避免叶绿素干扰,但皂化常使类胡萝卜素总量减少^[19-21]。花瓣中的类胡萝卜素多以含氧叶黄素的形式存在,提取时的皂化处理常造成类胡萝卜素水解,从而使分离到的类胡萝卜素组分和总量减少^[22]。

测定类胡萝卜素常用方法有薄层色谱法(TLC)、开放柱色谱法(OCC)、逆流液相色谱法(CCC)、高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱法(UPLC)和超临界流体色谱(SFC)^[15]。HPLC是目前国内外应用比较普遍的类胡萝卜素分析方

法,运用反相性强的C30柱可以测定出样品中痕量的类胡萝卜素,但分析时间长且一些异构体分离困难^[15]。SFC也常用于分离类胡萝卜素,其流动相以CO₂为主,对极性低的脂溶性物质有极强溶解力,可以有效地分离样品中的类胡萝卜素组分,同时采用的温和分析温度可避免类胡萝卜素受热分解^[15]。超高效液相色谱(UPC²)结合了UPLC和SFC技术优点,该方法以超临界CO₂为主要的流动相,具有溶剂用量省,分析时间短,分离效率高及检测灵敏度高优点,将分析物在色谱柱上发生降解的风险降到最低,可以有效地分离类胡萝卜素的同分异构体^[15]。

3.2 黄色花石斛兰的类胡萝卜素积累

目前,有关植物类胡萝卜素的主要代谢途径、代谢中间产物及参与合成的关键酶和基因已基本明确(图3)^[5-8],类胡萝卜素生物合成起始于两分子的GGPP,在八氢番茄红素合成酶(PSY)的作用下缩合形成无色八氢番茄红素,随后经八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、 ξ -胡萝卜素异构酶(Z-ISO)、 ξ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)和胡萝卜素异构酶(CRTISO)的共同作用形成全反式番茄红素^[5-8]。之后的番茄红素环化是类胡萝卜素代谢中的重要分支点,植物中存在2种番茄红素环化酶LCYB和LCYE,可分别催化番茄红素的一端生成 β 环和 γ 环^[5-8]。LCYB和LCYE催化番茄红素形成一端 β 环一端 γ 环的 α -胡萝卜素衍生物;而经LCYB的2次催化,番茄红素形成两端为 β 环的 β -胡萝卜素衍生物^[5-8]。 α -胡萝卜素在非血红素铁加氧酶类氢化酶(CYP97A)和细胞色素P450加氧酶(CYP97C)的共同作用下合成叶黄素。 β -胡萝卜素在 β -胡萝卜素氢化酶(CHYB)、玉米黄素环氧酶(ZEP)和新黄质合成酶(NSY)的作用下形成新黄质^[6-8]。

不同花色间的类胡萝卜素积累具有特异性,本研究发现,白色球花石斛花瓣中类胡萝卜素含量极少,淡黄色密花石斛花瓣中以 α -胡萝卜素衍生物叶黄素为主,约占类胡萝卜素总量的90%以上,这与Kanchit^[12]淡黄色石斛花中叶黄素极高的研究结果相似。金黄色球花石斛和密花石斛唇瓣中的 α -胡萝卜素衍生物如 α -隐黄素和叶黄素含量极高,约占类胡萝卜素总量的85%以上,这与金盏菊(*Calendula officinalis* Hohen.)^[23]、万寿菊(*Tagetes erecta* Linn.)^[24]和宫灯百合(*Sandersonia aurantiaca* Hook.)^[25]的研究结果相一致,在它们的花瓣中叶黄

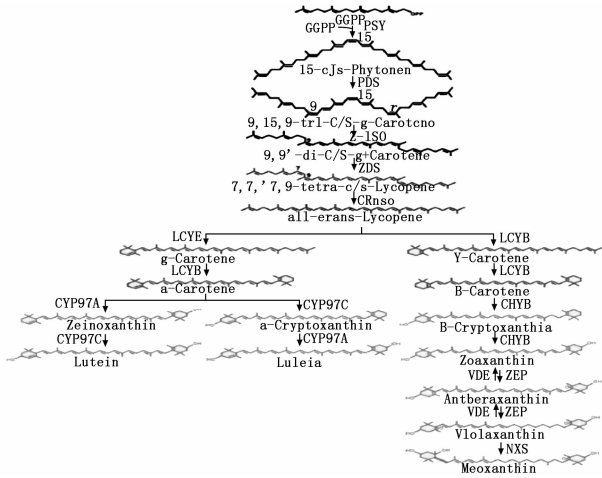


图3 植物类胡萝卜素合成途径

Fig. 3 Carotenoid biosynthesis pathway in plants

素及叶黄素衍生物达到花瓣总类胡萝卜素含量的90%以上。明黄色花瓣(鼓槌石斛花瓣)中 β -胡萝卜素衍生物玉米黄质和花药黄质含量较高,约占69%,同样的研究结果也出现在杂交文心兰(*Oncidium hybridum*)明黄色唇瓣中, β -胡萝卜素衍生物的含量较高^[26]。在Kanchit^[12]的研究结果中也有类似发现,亮黄色及橙黄色石斛兰杂交种的花瓣中 β -胡萝卜素衍生物如玉米黄质、花药黄质和新黄质含量较高^[12]。

3.3 黄色花石斛兰育种

目前,黄色花石斛兰的育种主要依赖于传统的杂交育种,以尖刀唇石斛(*Den. heterocarpum*)及黄喉石斛(*Den. signatum*)为黄花育种基础,配合金钗石斛(*Den. nobile*)杂交出*Den. Thwaitesiae*等近乎黄色的品种^[10]。在黄色花春石斛育种中,子代常常呈现不黄不白或初开时偏黄,越开越白的“褪色”现象^[10],可能与父母本中含有具强势遗传特性的白花血统有关^[10]。随着花色分子生物学研究的深入,分子育种已成为改良植物花色的重要途径,目前,有关植物类胡萝卜素合成相关途径的关键基因也已被分离鉴定^[5-8,27],这为通过导入外源基因或阻断其相关代谢途径来进行花色遗传性状改良提供了极大可能。结合本研究对黄色花石斛兰盛开期花瓣中类胡萝卜素种类和含量的分析结果,推测浅黄色和金黄色石斛花瓣中类胡萝卜素代谢途径以 α -胡萝卜素合成支路为主,而明黄色石斛花瓣中类胡萝卜素代谢途径以 β -胡萝卜素合成支路为主。在番茄红素环化的过程中,*LCYE*的表达水平一定程度上会决定 β -和 α -两个分支间的类胡萝卜素比例^[27-28]。推测

在黄色花石斛兰中通过调控*LCYE*基因的表达,有可能实现石斛的花色品质定向遗传改良,将对石斛兰黄色花育种具有重要意义。

4 结论

以花色为黄色的鼓槌石斛、密花石斛和球花石斛的盛花期花瓣和唇瓣为试验材料,进行类胡萝卜素的定性、定量分析。结果表明:3种石斛属植物花瓣和唇瓣的色系可分为白色系和浅黄-明黄-金黄色系,在黄色花石斛兰中共鉴定出8种类胡萝卜素组分,分别是 β -胡萝卜素、 α -隐黄质、 β -隐黄质、紫黄质、叶黄素、花药黄质、玉米黄质和叶黄素酯化物。定量分析显示:球花石斛白色花瓣中类胡萝卜素的含量极少,随着黄色加深,类胡萝卜素总量逐渐增加,球花石斛金黄色唇瓣中的类胡萝卜素总量达到最高。密花石斛淡黄色花瓣以叶黄素为主;球花石斛和密花石斛金黄色唇瓣中主要为 α -隐黄质、叶黄素和叶黄素酯化物;明黄色鼓槌石斛花瓣中以玉米黄质、花药黄质和叶黄素为主。根据前人研究的类胡萝卜素合成途径及黄色花石斛兰中的类胡萝卜素检测结果,推测淡黄色和金黄色石斛花瓣中类胡萝卜素主要是 α -胡萝卜素及其衍生物,而明黄色石斛花瓣中类胡萝卜素主要是 β -胡萝卜素及其衍生物。推测通过调控*LCYE*基因的表达,可能实现黄色花石斛的花色定向改良。

参考文献:

- [1] 戴思兰,洪艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学,2016,49(3):529-542.
- [2] Tanaka Y, Ohmiya A. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways[J]. Current Opinion in Biotechnology,2008,19(2):190-197.
- [3] 安田齐. 花色之谜[M]. 北京:中国林业出版社,1989.
- [4] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments[J]. Annual Review of Plant Biology,2006,57(1):761-780.
- [5] Nisar N, Li L, Lu S, et al. Carotenoid Metabolism in plants[J]. Molecular Plant,2015,8(1):68-82.
- [6] Ohmiya A. Qualitative and quantitative control of carotenoid accumulation in flower petals[J]. Scientia Horticulturae,2013,163(6):10-19.
- [7] Ohmiya A. Diversity of carotenoid composition in flower petals[J]. Japan Agricultural Research Quarterly,2011,45(2):163-171.
- [8] Zhu C F, Bai C, Sanahuja G, et al. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2010,504(1):132-141.
- [9] 王雁,李振坚,彭红明,等. 石斛兰—资源. 生产. 应用[M]. 北

- 京:中国林业出版社,2007.
- [10] 王 雁,周进昌,郑宝强,等. 石斛兰[M]. 北京:中国林业出版社,2014.
- [11] 吉占和,陈心启,罗毅波,等. 中国植物志 - 十九卷兰科(三)[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [12] Kanchit T. Flower pigments in yellow *Dendrobium* species and hybrids[D]. Honolulu:University of Hawaii,1984.
- [13] Mudalige R G,Kuehnle A R,Amore T D. Pigment distribution and epidermal cell shape in *Dendrobium* species and hybrids[J]. Hortscience,2003,38(4):573-577.
- [14] Silva J A T D,Aceto S,Liu W, et al. Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids[J]. Scientia Horticulturae,2014,175(1):74-86.
- [15] Jumaah F, Plaza M, Abrahamsson V, et al. A fast and sensitive method for the separation of carotenoids using ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2016,408(21):5883-5894.
- [16] 姜建国,王 飞,陈 倩. 类胡萝卜素功效与生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [17] Li X,Lu M,Tang D, et al. Composition of carotenoids and flavonoids in *Narcissus* cultivars and their relationship with flower color[J]. Plos One, 2014,10(11):e0142074.
- [18] Rosso V V D,Mercadante A Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(13):5062-5072.
- [19] 康迎春,尹 跃,赵建华,等. HPLC 法测定枸杞鲜果中主要类胡萝卜素组成[J]. 食品工业,2014,(12):270-273.
- [20] 储大燕. 烟草中类胡萝卜素及其异构体的分析研究[D]. 北京:中国科学技术大学,2009.
- [21] 陈敏敏,朱海生,温庆放,等. UPLC 测定草莓果实中类胡萝卜素含量[J]. 果树学报,2013,(4):706-711.
- [22] Ariizumi T,Kishimoto S,Kakami R, et al. Identification of the carotenoid modifying gene PALE YELLOW PETAL 1 as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato(*Solanum lycopersicum*) [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology,2014,79(3):453-465.
- [23] Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, et al. Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2005, 69(11):2122-2128.
- [24] Moehs C P,Li T,Osteryoung K W, et al. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development[J]. Plant Molecular Biology,2001,45(3):281-293.
- [25] 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.
- [26] Hieber A D, Mudalige-Jayawickrama R G, Kuehnle A R. Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross[J]. Planta,2006,223(3):521-531.
- [27] 高慧君,明家琪,张雅娟,等. 园艺植物中类胡萝卜素合成与调控的研究进展[J]. 园艺学报,2015,42(9):1633-1648.
- [28] Pogson B J,Rissler H M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2000, 355(1402):1395-1403.

Analysis of Carotenoids Compounds and Their Biosynthesis Pathways in Flowers of Three *Dendrobium* Species

HUANG Xin-lei¹, WANG Yan¹, ZHANG Hui²

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 2. Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: [Objective] To investigate the composition content and structure of carotenoids in yellow flower of native *Dendrobium* species and their biosynthesis pathways, thus proving references for further investigation of the floral pigment mechanism and molecular breeding of *Dendrobium*. [Method] The flower color in yellow petals and labellum of *Den. chrysotoxum*, *Den. densiflorum* and *Den. thyrsiflorum* were observed according to the Royal Horticultural Society Color Card (RHSCC). Besides, the carotenoids in the petals and labellum in 3 *Dendrobium* species at full opening stages were determined using UPC²-MS/MS. Based on the results of UPC²-MS/MS, the biosynthesis pathways of carotenoids in *Dendrobium* were proposed. [Result] The result indicated that the floral color of the 3 *Dendrobium* species could be divided into white group and pale yellow-yellow-golden yellow group. Totally, 8 kinds of carotenoids were detected from the petals and labellum in the 3 *Dendrobium* species, respectively, including β -carotene, α -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin, violaxanthin, lutein, antheraxanthin, zeaxanthin and lutein-5,6-epoxide. According to the results of quantitative analysis, white petals of *Den. thyrsiflorum* contained the lowest carotenoids ($52.26 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). The content of carotenoid increased with the enhancement of yellow color and the carotenoid compounds in the golden yellow labellum of *Den. thyrsiflorum* was the highest, reaching $3\,810.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Among 3 carotenoids contained cultivars, the lutein was majorly contained in pale yellow petals of *Den. thyrsiflorum*, while golden yellow labellum of *Den. densiflorum* and *Den. thyrsiflorum* majorly contained α -cryptoxanthin, lutein and lutein-5,6-epoxide. Yellow petals of *Den. chrysotoxum* contained violaxanthin, lutein and antheraxanthin. [Conclusion] The carotenoids in pale yellow and golden yellow petals are mainly α -carotene and its derivatives, while that in bright yellow petals are mainly β -carotene and its derivatives. Regulation of the *LCYE* genes which may cause carotenoid biosynthesis will result in flower color change in yellow flower of *Dendrobium*.

Keywords: *Dendrobium*; yellow flower; carotenoids; carotenoids pathway

(责任编辑:徐玉秀)