彩叶桂叶片发育过程中叶色表型与色素成分变化

崔　祺[1],吴　昀[1],李东泽[1*],吴　凡[1],韩蕊莲[1,2],黄均华[1],胡绍庆[1]

(1.浙江理工大学建筑工程学院,浙江　杭州　310018;2.西北农林科技大学草业与草原学院,
陕西　杨凌　712100)

摘要:【目的】探究彩叶桂叶片发育过程中叶色表型与色素成分的关系。【方法】以彩叶桂品种'虔南桂妃'(*Osmanthus fragrans* 'Qiannan Guifei')5 个发育时期(S1—S5)的叶片为研究对象,选用英国皇家园艺学会比色卡和色差仪测量其叶色表型,同时采用可见光分光光度法对 5 个时期的叶片进行叶绿素和类胡萝卜素的测定,利用超高效液相色谱-串联三重四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF/MS)联用技术定性定量分析叶片中类黄酮成分与含量,进一步分析了叶色与各色素成分之间的相关性。【结果】随着叶片不断发育,彩叶桂叶片颜色变化大致分为两个阶段:第 1 个阶段由红转黄(S1—S3),第 2 个阶段由黄转绿(S3—S5)。叶片颜色参数明度 L^* 值和蓝度 b^* 值先增加后下降,而红 a^* 值和彩度 C^* 值则呈下降趋势。在叶片中共鉴定出了 8 种类黄酮,包括 1 种花青素(Cy3R)、3 种黄酮(Ap7G、Ap7R 和 vicenin-2)以及 4 种黄酮醇(Km3R、Km7G、Km3G7R、Qu3R)。定量分析发现:叶绿素和类胡萝卜素在 S1—S3 时期含量较低且较为稳定,在 S3—S5 时期二者含量及其比值呈显著增加的趋势;Cy3R 的含量在 S1—S3 时期显著降低,在 S3—S5 时期含量极低,未检测出;Qu3R、Km3R、Km7G 和 Ap7G 含量从 S1—S5 显著降低,而 vicenin-2 和 Km3G7R 含量则呈现出持续增加的趋势;Ap7R 的含量在 S1—S3 时期较为稳定,之后先下降后增加。【结论】彩叶桂'虔南桂妃'叶色由红转黄主要是因为花青素(Cy3R)、黄酮(Ap7G)和黄酮醇(Qu3R、Km3R 和 Km7G)含量的降低,由黄转绿则是因为叶绿素和类胡萝卜素含量的比值增加。

关键词:彩叶桂;叶色;叶绿素;类黄酮;花青素;'虔南桂妃'
中图分类号:S685.13　　**文献标志码**:A　　**开放科学(资源服务)标识码(OSID)**:
文章编号:1000-2006(2023)02-0079-08

Changes of coloration and pigment compositions during leaf development of *Osmanthus fragrans* colour group cultivar

CUI Qi[1], WU Yun[1], LI Dongze[1*], WU Fan[1], HAN Ruilian[1,2], HUANG Junhua[1], HU Shaoqing[1]

(1.School of Civil Engineering and Architecture, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. College of Grassland Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract:【Objective】This study aimed to explore the relationship between leaf color changes and pigment composition in *Osmanthus fragrans* color group during the leaf development.【Method】Different-colored leaves of the *O. fragrans* color group cultivar 'Qiannan Guifei' were selected from five developmental stages (S1-S5) for phenotype mensuration using the Royal Horticultural Society Color Chart and colorimeter. Chlorophyll and carotenoid concentrations of the leaves were determined using visible light spectrophotometry. Flavonoids were qualitatively and quantitatively characterized using ultra-performance liquid chromatography triple-time-of-flight/mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF/MS). The correlation between leaf color and pigment components was also analyzed.【Result】The results indicated that the changes in leaf color could be roughly divided into two stages in relation to the leaf development: the first stage was from red to yellow (S1-S3), and the second stage was from yellow to green (S3-S5). The color parameters L^* and b^* initially increased and then decreased, while the values of a^* and C^* decreased. Eight flavonoids were detected in the leaves of 'Qiannan Guifei', including one anthocyanidin (Cy3R), three flavones (Ap7G, Ap7R and vicenin-2), and

收稿日期 Received:2021-09-28　　**修回日期** Accepted:2021-12-05
基金项目:浙江省自然科学基金项目(LQ20C150003);浙江省一流学科(土木工程)建设项目(11141131282001)。
第一作者:崔祺(cuiqivivi@zstu.edu.cn),讲师。*通信作者:李东泽(dongzeli06@163.com),讲师。
引文格式:崔祺,吴昀,李东泽,等. 彩叶桂叶片发育过程中叶色表型与色素成分变化[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2023,47(2):79-86.CUI Q, WU Y, LI D Z, et al. Changes of coloration and pigment compositions during leaf development of *Osmanthus fragrans* colour group cultivar[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition),2023,47(2):79-86.DOI:10.12302/j.issn.1000-2006.202109057.

four flavonols (Km3R, Km7G, Km3G7R and Qu3R). The quantitative analysis showed that chlorophyll and carotenoid concentrations were relatively low and stable during stages S1-S3, whereas the concentrations and ratios of the two pigments increased significantly during stages S3-S5. Cy3R concentration significantly decreased from stages S1 to stage S3, and it occurred in undetectable trace amounts in stages S3-S5. The concentrations of Qu3R, Km3R, Km7G and Ap7G also decreased from stage S1 to stage S5, while vicenin-2 and Km3G7R showed a continuous increase. Ap7R was stable from stage S1 to stage S3, and then it initially decreased and then increased. 【Conclusion】The decrease of anthocyanidin (Cy3R), flavone (Ap7G) and flavonols (Qu3R, Km3R and Km7G) was critical in promoting changes in leaf color from red to yellow in 'Qiannan Guifei', while the increase in the ratio of chlorophylls to carotenoids resulted in the leaves changing from yellow to green.

Keywords: *Osmanthus fragrans* colour group; leaf color; chlorophyll; flavonoid; anthocyanin; 'Qiannan Guifei'

桂花(*Osmanthus fragrans*)是中国传统名花,因其绝佳的观赏效果和怡人清香广泛应用于园林绿化中。依据其花色和花期,通常将桂花划分为金桂(Luteus Group)、银桂(Albus Group)、丹桂(Aurantiacus Group)和四季桂(Asiaticus Group)4大品种群[1],近年来在广西桂林地区出现了很多叶色变异的新品种,形成了彩叶桂品种群(Colour Group)[2]。截至2021年,共有27份彩叶桂资源通过了新品种审定,这些品种主要是从传统桂花播种苗、扦插苗及芽变中选育而来,其新叶多为红色和黄色,且在春夏生长季中颜色绚丽多变,观赏期持久,同时兼具传统桂花的优良性状,因此应用前景非常广阔[3-4]。

植物叶色形成机理非常复杂。对许多彩叶植物进行研究发现,叶片色素的种类和比例决定了叶片的呈色,叶片色素主要为叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮等。叶绿素包括叶绿素a和叶绿素b,是叶片呈现绿色的主要色素;类胡萝卜素通常和叶绿素共同作用,使植物叶片呈现黄色至橘色;类黄酮主要包括花青素、黄酮、黄酮醇等,它们能使植物叶片呈现红色至蓝色等颜色[5-6],其中花青素是主要的呈色物质,在红叶和紫叶植物叶片呈色中起主导作用。例如朱书香等[7]以4种李属(*Prunus*)植物叶片为材料,探究植物色素含量与叶色参数的关系,发现随着花青素含量比例的"高—低—高"变化,叶色呈现"红—绿—红"的过渡。冯露等[8]发现花青素是紫叶紫薇(*Lagerstroemia indica*)叶片呈现紫红色的决定色素,并且花青素含量比值决定了叶片红色呈现的程度,而叶绿素和类胡萝卜素的积累对叶片紫红色的加深发挥了重要作用。Yang等[9]发现海棠(*Malus* spp.)品种'India magic'叶片中花青素的主要成分为矢车菊素,该色素是其幼叶呈现紫红色的关键色素。

彩叶桂品种'虔南桂妃'(*Q. fragrans* 'Qiannan Guifei')幼叶呈现红色,随着叶片发育红色逐渐消退,依次呈现粉红、淡黄、黄绿的颜色变化,成年叶最终变为绿色,彩叶期长达3~4个月,广泛应用于江西、广西、广东等地区的园林观赏[10]。目前关于彩叶桂的研究主要集中在繁育栽培方面[11-13],对于叶色的研究尚处于起步阶段。陈碧露等[14]通过两个彩叶桂品种中的叶绿素和花青素含量测定,发现未成熟叶片中叶绿素含量最低、而花青素含量最高,且未成熟叶片中花青素含量在每年的3、5和10月都会出现峰值,此时期亦为两种彩叶桂的最佳观赏期。Chen等[15]对彩叶桂品种'银壁双辉'(*O. fragrans* 'Yinbi Shuanghui')不同发育时期斑色叶和绿色叶中的色素含量进行了测定,发现幼叶时期绿色叶中花青素含量显著高于斑色叶,且随着叶片的不断发育,两种类型的叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量显著增加。但对于彩叶桂生长发育过程中花青素、黄酮和黄酮醇成分和含量变化与叶色变化之间的关系尚不清楚。本研究以'虔南桂妃'5个叶色期的叶片作为对象,分析叶片颜色表型、色素成分和含量,探讨叶色变化的物质基础,以期对解析桂花叶色变异机理提供方向和基础,也为今后桂花叶色的遗传改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验以生长在浙江理工大学种质资源圃(120.35°E,30.31°N)中的彩叶桂品种'虔南桂妃'2年生扦插苗为研究材料,于2019年3—6月选取生长健壮、长势一致、无病虫害的植株进行取样,共采集5个不同叶色时期(S1.红色;S2.粉色;S3.淡黄色;S4.浅绿色;S5.绿色)的叶片样本,取样时间分别为3月18日、4月1日、4月15日、5月10日和6月2日。每一时期至少选取10株,每株取当年生主枝上的第1对叶片。将叶片清洗干净后,用无菌纱布吸干表面水渍,保存于-20 ℃冰箱中以备色素含量的测定。

1.2　指标测定

1.2.1　叶色测定

分别使用英国皇家园艺学会比色卡(RHSCC)及色差仪(CR-10, Konica-Minolta, Japan)对'虔南桂妃'不同时期新鲜叶片的颜色进行定性和定量分析。在 CIE $L^*a^*b^*$ 体系中,L^* 代表明暗程度,数值越大说明亮度越高;a^* 为红度,有正负之分,正值表示偏红,负值表示偏绿,绝对值越大代表颜色的饱和度越高;b^* 为蓝度,同样有正负之分,正值表示偏黄,负值表示偏蓝,绝对值越大代表颜色的饱和度越高;C^* 代表颜色的鲜艳程度,数值越大,颜色越深。通过测定颜色参数红度 a^* 和蓝度 b^* 值,计算出彩度 C^*,C^* 的计算公式为 $C^* = [(a^*)^2+(b^*)^2]^{1/2}$。每一时期选取 3 片叶子(3 次生物学重复)测定其颜色参数。

1.2.2　叶绿素与类胡萝卜素的提取与含量测定

称取叶片样品 0.2 g,将叶片置于液氮中研磨成粉末,加入 10 mL 80%的丙酮,静置于 4 ℃冰箱避光萃取 24 h,然后在 12 000 r/min 条件下离心 5 min,吸取上清液为待测液,利用 DU800 紫外/可见分光光度计(Beckman Coulter,USA)分别测定其在波长 663、645 和 470 nm 处的吸光值,据此计算叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量,叶绿素总量为叶绿素 a 与叶绿素 b 含量之和[16]。

1.2.3　类黄酮的提取与测定

称取叶片样品 0.6 g,将叶片研磨成粉末,按照 Hashimoto 等[17]的方法加入 3 mL 提取液(甲醇、盐酸、水体积比为 70.0∶0.1∶29.9)摇匀,避光静置提取 5 min,然后在 4 ℃下以 10 000 r/min 转速离心 10 min,吸取上清液,将上清液依次经过孔径为 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜过滤,获得类黄酮提取液,随后装入 1.5 mL 进样瓶中。

采用 UPLC-Triple-TOF/MS 系统(日本岛津公司)对叶片中类黄酮成分及含量进行分析。色谱柱为 waters HSS-SB C_{18},以 0.1%(体积分数)甲酸水溶液(A 液)和 0.1%(体积分数)甲酸化乙腈(B 液)为流动相,进样量为 2 μL,柱温为 50 ℃,流速 0.4 mL/min。洗脱程序为:0~17 min,2%~40% B 液;17~23 min,40%~95% B 液;23~24 min,95%~2% B 液。花青素的检测波长为 350 nm,其他类黄酮物质为 520 nm。在质谱分析中,电喷雾电离离子源,花青素分析采用正离子模式,其他类黄酮物质分析采用负离子模式,质谱扫描范围为 100~1 500 m/z,以高纯度氮气作为喷雾气体和干燥气体。雾化气 1(GS1)和雾化气 2(GS1)压强均为 50 psi,气帘气(CUR)35 psi,离子源温度(TEM) 550 ℃,离子源电压(IS)-4 500 V,一级扫描中去簇电压(DP) 100 V,聚焦电压(CE) 10V,二级扫描 CID 能量为-20、-40 和-60 V,使用 TOF MS-Product Ion-IDA 模式采集质谱数据,进样前用 CDS 泵做质量轴校正。

通过标准品半定量法分别计算叶片中含有的类黄酮成分相对于标准品的含量[18-19]。花青素标准品为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷,其他类黄酮成分标准品为斛皮素-3-*O*-芸香糖苷(均购于上海源叶生物有限公司),两种标准品的标准曲线分别为 $y=49\ 476.000\ x-326.060$ ($R^2=0.999\ 5$) 和 $y=16\ 911.000\ x-12.463$ ($R^2=0.999\ 3$)。

1.3　数据分析

叶色参数及色素含量测定均进行 3 次生物学重复,使用 Excel 2010 进行实验数据统计,数据以平均值±标准差的形式表示。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、邓肯多重比较分析(Duncan)及叶色表型与色素含量间的相关性分析。

2　结果与分析

2.1　不同叶色时期'虔南桂妃'叶色表型变化

彩叶桂'虔南桂妃'叶片在春季和夏季呈现出明显的颜色变化(图 1)。'虔南桂妃'叶色变化大致分为由红转黄(S1—S3)和由黄转绿(S3—S5)两个阶段。具体来讲,幼叶为红色(S1,比色卡号 34A),随着叶片生长发育,红色逐渐消退,依次变为粉色(S2,170D)、淡黄色(S3,2D)、浅绿色(S4,145C)和绿色(S5,137D)。叶片颜色的明度 L^* 值和蓝度值 b^* 呈现出一致的变化趋势,随着叶片的发育逐渐增加,在 S3 时期达到最大值,表明叶片亮度逐渐增大,颜色逐渐变为淡黄色,在此之后有所下降。叶片红度 a^* 值和彩度 C^* 值在 S1 时最大,此时叶片颜色最红、最鲜艳,之后 a^* 值呈现出下降

图 1　'虔南桂妃'不同叶色期叶片的表型

Fig.1　The leaf phenotype of 'Qiannan Guifei' at different leaf color stage

的趋势,由正值变为负值,这与目测所见的叶片颜色由红色转为绿色相一致。同样,C^*值整体上也呈现出下降的趋势(表1)。

表1 '虔南桂妃'不同叶色期叶片的颜色参数

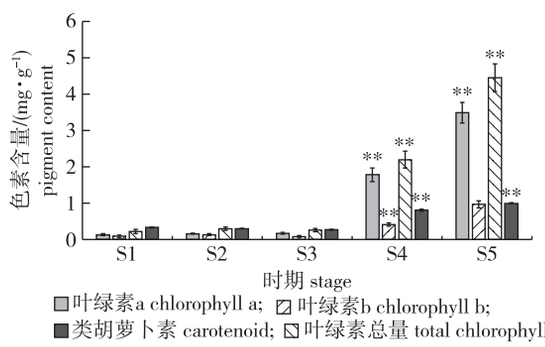
Table 1 Color parameters of 'Qiannan Guifei' at different leaf color stages

时期 stage	比色卡色号 RHSCC No.	L^*	a^*	b^*	C^*
S1	34A	38.77± 2.30 d	28.89± 1.68 a	10.10± 1.77 d	30.64± 1.84 a
S2	170D	53.20± 2.28 c	15.62± 1.19 b	17.63± 1.60 c	23.60± 1.32 b
S3	2D	68.70± 1.69 a	0.16± 1.47 c	29.82± 1.08 a	29.85± 1.10 a
S4	145C	55.00± 2.38 b	−7.61± 2.28 d	24.67± 1.91 b	25.90± 1.99 b
S5	137D	35.06± 1.28 e	−7.90± 0.72 d	16.47± 1.29 c	18.28± 1.31 c

注:同列数据后不同字母代表不同时期间叶色参数差异显著($P<0.05$)。The different letters within the same column represent significant differences among different leaf color stages at a 0.05 level.

2.2 '虔南桂妃'不同叶色期叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

对'虔南桂妃'不同叶色期叶片中的叶绿素和类胡萝卜素含量进行测定,结果如图2所示。从S1—S3时期叶绿素a和叶绿素b的含量未见显著变化,之后开始呈显著增加的趋势。在S4时期叶绿素a、叶绿素b含量同S1时期相比分别增加了12.0倍和3.7倍,S5时期则增加了25.0倍和10.0倍,叶绿素总量变化情况与叶绿素a、叶绿素b较为一致。同样,类胡萝卜素含量也在S4和S5时期显著增加,同S1时期相比分别增加了1.4倍和2.0倍。叶绿素与类胡萝卜素含量的比值也呈增加的趋势,从S1—S3时期二者比值分别为0.67、0.96、0.98,在S4和S5时期分别达到了2.71和4.47。



代表叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量与S1时期相比差异显著($P<0.01$)。 indicates statistically significant differences of chlorophyll and carotenoid contents between S1 stage and other stages at a 0.01 level.

图2 '虔南桂妃'不同叶色期叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量

Fig.2 The chlorophyll and carotenoid contents of 'Qiannan Guifei' leaves at different leaf color stages

2.3 '虔南桂妃'叶片中类黄酮在不同叶色期含量的变化

由于红色叶片中可能含有更多的类黄酮物质,因此选用'虔南桂妃'S1时期的红色叶片进行类黄酮成分的鉴定。花青素在波长520 nm下具有特征吸收峰,利用UPLC图谱,该波长下从'虔南桂妃'红色叶片中只检测出了1种花青素成分(图3A),花青素成分P1质谱数据为准分子离子特征质荷比(记为m/z)595,碎片离子m/z 287和m/z 449,其中m/z 287是矢车菊素苷元的特征质荷比(表2),与王宁杭[20]鉴定的矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷质谱数据相同,推定其为矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷(cyaindin-3-*O*-rutinoside, Cy3R)。

类黄酮等物质中,除花青素以外的其他物质在350 nm处具有特征吸收峰,参考相关文献和数据库,在叶片中共检测出7种类黄酮成分及3种酚类物质(图3B,表2)。成分P2准分子离子m/z 354、碎片离子m/z 191,为咖啡酰奎宁酸类化合物的特征离子,根据Scifinder和Reaxy数据库检索推测该化合物为绿原酸(chlorogenic acid)。成分P3准分子离子m/z 594,依据碎片离子m/z 353、m/z 383、m/z 413、m/z 473和m/z 503判定化合物结构中存在碳苷,检索数据库后推测该化合物为葡萄糖基芹菜素(vicenin-2),与Silva等[21]鉴定的葡萄糖基芹菜素结果相同。成分P4准分子离子m/z 368、碎片离子m/z 191为奎宁酸类化合物的特征离子,m/z 193、m/z 173、m/z 134和m/z 93为阿魏酰类化合物的特征离子,推测该化合物为5-阿魏酰奎尼酸(5-feruloylquinic acid)[22]。成分P5准分子离子m/z 624、碎片离子m/z 315和m/z 461,结合数据库和参考文献[23],推测为阿克苷(acteoside)。

成分P6—P11均为不同类黄酮物质,推测其分别为斛皮素-3-*O*-芸香糖苷(quercetin-3-*O*-rutinoside, Qu3R)[24],山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷(kaempferol-7-*O*-glucoside, Km7G)[25],山柰酚-3-*O*-葡萄糖基-7-*O*-鼠李糖苷(kaempferol-3-*O*-glucopyranosyl-7-*O*-rhamnopyranoside, Km3G7R)[26],山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(kaempferol-3-rutinoside, Km3Ru)[27],芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷(apigenin-7-*O*-glucoside, Ap7G)[28]和芹菜素-7-*O*-芸香糖苷(apigenin-7-*O*-rutinoside, Ap7R)[29]。

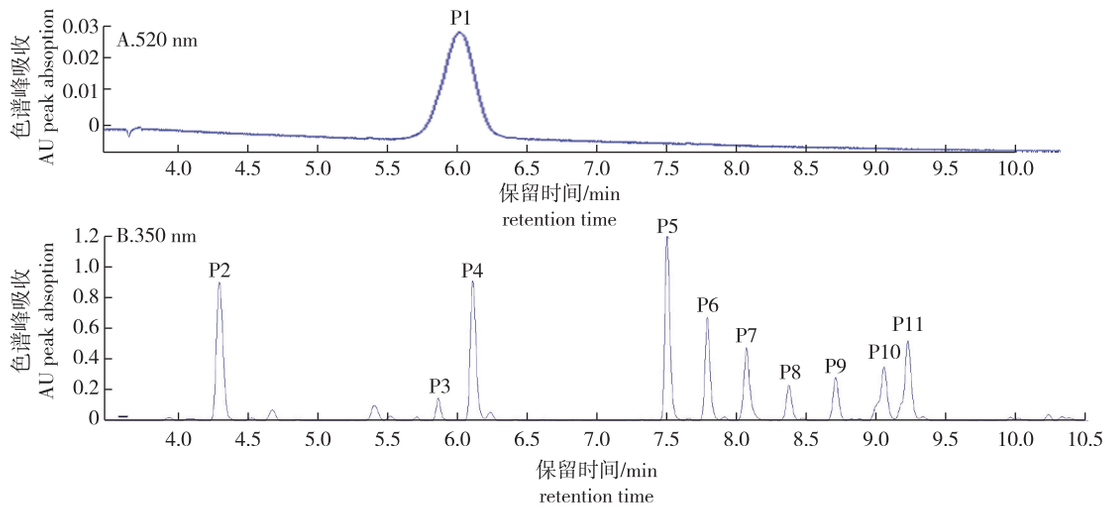


图 3　‘虔南桂妃’红色叶片中花青素（A）和其他类黄酮及酚类物质（B）的 UPLC 色谱图

Fig.3　The UPLC chromatogram of anthocyanin（A）and other flavonoids and phenolic compounds（B）in red leaves of ‘Qiannan Guifei’

表 2　‘虔南桂妃’红色叶片中类黄酮和酚类化合物的质谱数据

Table 2　The chromatographic data of flavonoids and phenolic compounds in red leaves of ‘Qiannan Guifei’

成分编号 No. of component	保留时间/min retention time	准分子离子（*m/z*）molecular ions	碎片离子（*m/z*）fragment ions	推定物质 tentative compound	推定依据 constructive basis
P1	6.06	595	287、449、596	矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷 cyaindin-3-*O*-rutinoside，Cy3R	参考文献[20]
P2	4.30	354	191、353	绿原酸 chlorogenic acid	Scifinder 和 Reaxy 数据库
P3	5.86	594	353、383、413、473、503、593	葡萄糖基芹菜素 vicenin-2	Scifinder 和 Reaxy 数据库；参考文献[21]
P4	6.11	368	93、134、173、191、193、367	阿魏酰奎尼酸 5-feruloylquinic acid	参考文献[22]
P5	7.50	624	623、461、315	阿克苷 acteoside	Scifinder 和 Reaxy 数据库；参考文献[23]
P6	7.79	610	609、301	槲皮素-3-*O*-芸香糖苷 quercetin-3-*O*-rutinoside，Qu3R	参考文献[24]
P7	8.07	448	447、285	山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷 kaempferol-7-*O*-glucoside，Km7G	参考文献[25]
P8	8.38	594	593、447、285	山柰酚-3-*O*-葡萄糖基-7-*O*-鼠李糖苷 kaempferol-3-*O*-glucopyranosyl-7-*O*-rhamnopyranoside，Km3G7R	参考文献[26]
P9	8.71	594	593、285	山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 kaempferol-3-rutinoside，Km3R	参考文献[27]
P10	9.06	432	431、269	芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷 apigenin 7-*O*-glucoside，Ap7G	参考文献[28]
P11	9.22	578	577、269	芹菜素-7-*O*-芸香糖苷 apigenin-7-*O*-rutinoside，Ap7R	参考文献[29]

对 8 种类黄酮成分，包括 1 种花青素（矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷，Cy3R），3 种黄酮（芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷，Ap7G；芹菜素-7-*O*-芸香糖苷，Ap7R；葡萄糖基芹菜素，vicenin-2），以及 4 种黄酮醇（山柰酚-3-*O*-芸香糖苷，Km3R；山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷，Km7G；山柰酚-3-*O*-葡萄糖基-7-*O*-鼠李糖苷，

Km3G7R;斛皮素-3-*O*-芸香糖苷;Qu3R)含量进行测定,结果表明Cy3R的含量从S1—S2显著降低,S3—S5时期含量极低,并未检测出。Qu3R、Km3R、Km7G和Ap7G含量从S1—S5呈显著下降的趋势,vicenin-2和Km3G7R含量则持续增加,而Ap7R的含量在整个叶色变化期波动较大,前3个时期较为稳定,S4时期显著下降,在S5时期达到峰值。类黄酮总量在S1时期最高,之后呈现出先降低后增加的趋势(表3)。

表3 '虔南桂妃'不同叶色期叶片中类黄酮的含量

Table 3 Flavonoid contents of 'Qiannan Guifei' leaves at different leaf color stages 单位:mg/g

时期 stage	Cy3R	Ap7G	Ap7R	Vicenin-2	Qu3R	Km7G	Km3G7R	Km3R	合计 total
S1	0.47±0.01 a	1.51±0.01 a	1.99±0.01 b	0.43±0.01 d	2.04±0.04 a	1.68±0.01 a	0.69±0.04 b	0.85±0.14 a	9.19±0.04 a
S2	0.19±0.01 b	1.36±0.01 a	2.06±0.01 b	0.47±0.01 d	1.94±0.02 a	1.31±0.03 b	0.69±0.02 b	0.96±0.02 a	8.80±0.07 b
S3	—	0.99±0.01 c	2.05±0.03 b	0.62±0.01 c	1.78±0.01 b	1.41±0.02 b	0.95±0.02 b	0.73±0.02 a	8.53±0.07 c
S4	—	0.50±0.03 d	1.47±0.03 c	1.25±0.02 b	0.91±0.01 c	1.16±0.01 c	0.83±0.01 b	0.25±0.01 b	6.37±0.04 d
S5	—	0.61±0.04 d	2.91±0.05 a	1.84±0.03 a	0.67±0.01 c	1.09±0.01 c	1.25±0.02 a	0.27±0.01 b	8.64±0.07 c

注:同列数据后不同字母代表不同时期间类黄酮含量在$P < 0.05$水平差异显著。— 代表未检测到。The different letters within the same column represent significant difference among different leaf color stages at 0.05 level by Duncan test. — represents not identified.

2.4 '虔南桂妃'叶色表型与色素含量的相关性分析

将所测定的'虔南桂妃'5个时期叶片颜色参数与色素成分进行相关性分析(表4),判定叶色表型与色素间的关系。

表4 '虔南桂妃'叶片颜色参数与色素成分含量的相关系数

Table 4 The correlation coefficient of leaf color parameters and pigment composition content of 'Qiannan Guifei'

色素成分 pigment composition	L^*	a^*	b^*	C^*
叶绿素 chlorophyll	−0.469	−0.704**	−0.035	−0.603*
类胡萝卜素 carotenoid	−0.519*	−0.714**	−0.206	−0.626*
总类黄酮 total flavonoids	−0.102	0.608*	0.181	0.429
Cy3R	−0.447	0.936**	−0.306	0.475
Ap7G	0.009	0.903**	−0.019	0.508
Ap7R	−0.219	−0.275	0.312	−0.200
Vicenin-2	−0.370	−0.786**	0.018	−0.586*
Qu3R	0.321	0.814**	0.046	0.614*
Km7G	0.016	0.852**	−0.072	0.834**
Km3G7R	−0.037	−0.785**	0.333	−0.279
Km3R	0.291	0.782**	0.077	0.464

注:*. $P<0.05$;* *. $P<0.01$。

从表4可以看出,除芹菜素-7-*O*-芸香糖苷(Ap7R)以外,所有色素成分均与红绿值a^*显著相关,其中叶绿素、类胡萝卜素、葡萄糖基芹菜素(vicenin-2)和山柰酚-3-*O*-葡萄糖基-7-*O*-鼠李糖苷(Km3G7R)的含量与a^*呈极显著负相关,总类黄酮与a^*值显著正相关,而矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷(Cy3R)、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷(Ap7G)、斛皮素-3-*O*-芸香糖苷(Qu3R)、山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷(Km7G)和山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(Km3R)与a^*值极显著正相关。另外,Qu3R和Km7G与彩度C^*显著正相关,而vicenin-2、叶绿素和类胡萝卜素与其显著负相关,大部分色素成分同明度L^*和蓝度值b^*相关性较小。

依据上述分析可以得到,随着叶色由红转绿,变绿程度与叶绿素、类胡萝卜素、vicenin-2和Km3G7R的含量呈显著的正相关,而与总类黄酮、Cy3R、Ap7G、Qu3R、Km7G和Km3R的含量呈显著负相关。

3 讨 论

影响植物叶色的色素主要包括叶绿素、类胡萝卜素和类黄酮[30]。依据观测可知,随着彩叶桂'虔南桂妃'叶片不断发育,叶色变化由红转黄(S1—S3),之后由黄转绿(S3—S5)。在第1个阶段(S1—S3),叶绿素和类胡萝卜素含量较低且较为稳定,叶色转变主要由于类黄酮物质含量降低引起。本研究首先利用超高效液相色谱-串联三重四级杆-飞行时间质谱联用技术对彩叶桂红色叶片中类黄酮物质进行了定性分析,共检测到8种类黄酮成分。Wang等[31]对传统桂花4大品种群共22个品种叶片中类黄酮成分进行了鉴定,共发现了15种类黄酮成分,且这些成分在每个品种中均存在,只是相对含量存在差异。然而彩叶桂叶片中仅有3种成分(槲皮素3-*O*-芸香糖苷、山柰酚7-*O*-葡萄糖苷及芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷)与传统桂花叶片中类黄酮成分相同。可见彩叶桂与传统桂花品种间的类黄酮成分的构成存在明显差异,通过研究叶片

类黄酮成分可为桂花的化学分类及种质鉴定提供参考。

在类黄酮物质中,花青素常与黄酮、黄酮醇等辅助色素形成色素复合体,使植物呈现红、蓝、紫、黄等颜色[32]。彩叶桂叶片为红色时,部分类黄酮物质的含量较其他时期明显增加,通过相关性分析发现,矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、斛皮素-3-*O*-芸香糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷与红绿值 a^* 极显著正相关,其含量越高,a^* 值越大,叶色越红,且矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷的相关系数最大,说明在这些物质中,矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷是决定叶色呈现红色的关键色素成分,而其他的黄酮、黄酮醇物质作为辅助色素,在彩叶桂红色叶的呈现中具有增色效应。

在第 2 个阶段,'虔南桂妃'叶色由黄转绿(S3—S5),通过对比前一个阶段叶片中色素含量,发现随着绿色程度的增强,花青素含量显著减少,叶绿素和类胡萝卜素的含量显著增加,且叶绿素与类胡萝卜素含量的比值亦呈增加的趋势。叶绿素大量积累,同时花青素合成减少,也是引起牡丹(*Paeonia suffruticosa*)[16]叶片颜色由紫红色转为绿色的关键色素。与彩叶桂不同的是,很多观赏植物的叶片在发育后期会出现叶绿素降解、颜色变红的现象,例如糖槭(*Acer saccharum*)[32]和黄栌(*Cotinus coggygria*)[33]。

类胡萝卜素在植物所有质体中均能合成,但主要在叶绿体中积累,在光合作用中作为光吸收的辅助色素,能够将能量传递给叶绿素,同时还可有效清除自由基,缓解叶绿体遭受光氧化,具有光保护功能[34]。随着彩叶桂叶片的发育,类胡萝素的含量上升,这与紫叶茶(*Camellia sinensis*)品种[35]叶色变绿过程中类胡萝卜素合成量增加的结果相似。因此,类胡萝素的有效积累可能对于彩叶桂维持叶绿体功能以及叶绿素水平发挥了正向调控作用,间接促进了叶色变绿。

综上所述,彩叶桂生长发育过程中叶片变色的现象涉及多种色素代谢途径,'虔南桂妃'叶片颜色变化的可能机制为:在彩叶桂叶片发育初期,环境温度较低,诱导新叶大量合成类黄酮,包括花青素(矢车菊素-3-*O*-芸香糖苷)和部分黄酮(芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷)、黄酮醇(斛皮素-3-*O*-芸香糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和山柰酚-7-*O*-葡萄糖苷),这些物质可以提高植物的抗寒性,使叶片呈现红色;随着叶片发育,环境温度逐渐升高,类黄酮合成量相应减少,叶片颜色由红转黄。与此同时,叶片中叶绿素与类胡萝卜素的产生与积累削弱了类黄酮对彩叶桂叶片颜色的影响,且叶绿素与类胡萝卜素含量的比值显著增加,从而导致了叶片颜色由黄转绿。除了温度,影响彩叶桂叶片颜色变化的环境因素还有如湿度、光照和土壤条件等。另外,与普通桂花相比,彩叶桂品种发生了遗传物质上的改变,因此内外因素共同作用导致了叶色变异。

参考文献(reference):

[1] 向其柏,刘玉莲.中国桂花品种图志[M].杭州:浙江科学技术出版社,2008.XIANG Q B,LIU Y L.An illustrated monograph of the sweet osmanthus cultivars in China[M].Hangzhou:Zhejiang Science & Technology Press,2008.

[2] 向民,段一凡,向其柏.木犀属品种国际登录中心年报(1)彩叶桂品种群的建立[J].南京林业大学学报(自然科学版),2014,38(1):2,187.XIANG M,DUAN Y F,XIANG Q B.Establishment of a new group-*Osmanthus fragrans* Colour Group[J].J Nanjing For Univ(Nat Sci Ed),2014,38(1):2,187.

[3] 冯园园,李清莹,胡绍庆.彩叶桂品种资源与研究现状[J].浙江理工大学学报(自然科学版),2019,41(6):793-798.FENG Y Y,LI Q Y,HU S Q.Resources and research status of *Osmanthus fragrans* Colour Group cultivars[J].J Zhejiang Sci Tech Univ(Nat Sci Ed),2019,41(6):793-798.

[4] 冯园园,李清莹,黄均华,等.25 个彩叶桂无性系(品种)的数量分类研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(1):107-115.FENG Y Y,LI Q Y,HUANG J H,et al.Numerical classification of 25 color-leafed *Osmanthus fragrans* clones(cultivars)[J].J Nanjing For Univ(Nat Sci Ed),2021,45(1):107-115.DOI:10.12302/j.issn.1000-2006.201911045.

[5] 商彩丽,刘青,王明晓,等.植物叶色变异的分子机理研究进展[J].山东农业科学,2021,53(7):127-134.SHANG C L,LIU Q,WANG M X,et al.Research progress on molecular mechanisms of leaf color variation in plants[J].Shandong Agric Sci,2021,53(7):127-134.DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2021.07.021.

[6] 张磊,曹德美,胡建军.植物叶色形成调控机制研究进展[J].植物遗传资源学报,2021,22(2):293-303.ZHANG L,CAO D M,HU J J.Advance of the regulation mechanism of leaf color formation in plants[J].J Plant Genet Resour,2021,22(2):293-303.DOI:10.13430/j.cnki.jpgr.20200805001.

[7] 朱书香,杨建民,王中华,等.4 种李属彩叶植物色素含量与叶色参数的关系[J].西北植物学报,2009,29(8):1663-1669.ZHU S X,YANG J M,WANG Z H,et al.Relationship between pigment contents and leafcolor parameters of four leaf-colored species of *Prunus*[J].Acta Bot Boreali Occidentalia Sin,2009,29(8):1663-1669.DOI:10.3321/j.issn:1000-4025.2009.08.026.

[8] 冯露,吴际洋,鞠易倩,等.紫叶紫薇呈色生理及光合特性研究[J].北京林业大学学报,2017,39(12):93-101.FENG L,WU J Y,JU Y Q,et al.Leaf color characteristics and photosynthetic characteristics of purple-leafed *Lagerstroemia indica* 'Ebony Ember'[J].J Beijing For Univ,2017,39(12):93-101.DOI:10.13332/j.1000-1522.20170238.

[9] YANG T,LI K T,HAO S X,et al.The use of RNA sequencing and correlation network analysis to study potential regulators of crabapple leaf color transformation[J].Plant Cell Physiol,2018,59(5):1027-1042.DOI:10.1093/pcp/pcy044.

[10] 江军,谭志明,王海涛,等.彩叶桂花新品种'虔南桂妃'[J].园艺学报,2015,42(6):1219-1220.JIANG J,TAN Z M,WANG H T,et al.A new colorful sweet *Osmanthus* cultivar 'Qiannan Guifei'[J].Acta Hortic Sin,2015,42(6):1219-1220.DOI:10.

16420/j.issn.0513-353x.2014-0517.
[11] 马立辉,杨琼,谢英赞,等.3个彩叶桂花品种的扦插繁殖试验[J].林业调查规划,2015,40(5):153-156.MA L H,YANG Q,XIE Y Z,et al.Cutting propagation experiment of three colorful sweet-scented *Osmanthus*[J].For Invent Plan,2015,40(5):153-156.DOI:10.3969/j.issn.1671-3168.2015.05.033.
[12] 杨国栋,陈林,程岩.彩叶桂品种“虔南桂妃”嫩枝扦插技术研究[J].林业调查规划,2018,43(2):42-46,53.YANG G D,CHEN L,CHENG Y.Study on softwood cutting techniques of *Osmanthus fragrans* “QiannanGuifei”[J].For Invent Plan,2018,43(2):42-46,53.DOI:10.3969/j.issn.1671-3168.2018.02.008.
[13] 禹霖,柏文富,李建挥,等.‘彩虹’彩桂扦插繁殖技术研究[J].林业科技,2019,44(1):35-38.YU L,BAI W F,LI J H,et al.Research on the propagation of *Osmanthus fragrans* Siji Group ‘Caihong’ cuttings[J].For Sci Technol,2019,44(1):35-38.DOI:10.19750/j.cnki.1001-9499.2019.01.011.
[14] 陈碧露,张远福,罗永松,等.两种彩叶桂花新品种叶绿素和花青素的比较分析[J].农业科学,2018(9):1040-1044.CHEN B L,ZHANG Y F,LUO Y S,et al.Comparative analysis of chlorophyll and anthocyanin in two new colorful sweet *Osmanthus cultivars*[J].Hans J Agric Sci,2018(9):1040-1044.
[15] CHEN X,YANG X L,XIE J,et al.Biochemical and comparative transcriptome analyses reveal key genes involved in major metabolic regulation related to colored leaf formation in *Osmanthus fragrans* ‘Yinbi Shuanghui’ during development[J].Biomolecules,2020,10:549.DOI:10.3390/biom10040549
[16] LUO J R,SHI Q Q,NIU L X,et al.Transcriptomic analysis of leaf in tree peony reveals differentially expressed pigments genes[J].Molecules,2017,22(2):324.DOI:10.3390/molecules22020324.
[17] HASHIMOTO F,TANAKA M,MAEDA H,et al.Changes in flower coloration and sepal anthocyanins of cyanic *Delphinium* cultivars during flowering[J].Biosci.Biotechnol.Biochem.,2002,66(8):1652-1659.DOI:10.1271/bbb.66.1652.
[18] WANG L S,SHIRAISHI A,HASHIMOTO F,et al.Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars[J].J Plant Res,2001,114(1):33-43.DOI:10.1007/PL00013966.
[19] 钟培星,王亮生,李珊珊,等.芍药开花过程中花色和色素的变化[J].园艺学报,2012,39(11):2271-2282.ZHONG P X,WANG L S,LI S S,et al.The changes of floral color and pigments composition during the flowering period in *Paeonia lactiflora* Pallas[J].Acta Hortic Sin,2012,39(11):2271-2282.DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2012.11.023.
[20] 王宁杭.望春玉兰花瓣类黄酮组成及转录组分析[D].杭州:浙江农林大学,2019.WANG N H.The flavonoid components and transcriptome analysis of *Magnolia biondii*[D].Hangzhou:Zhejiang A & F University,2019.
[21] SILVA D B,TURATTI I C C,GOUVEIA D R,et al.Mass spectrometry of flavonoid vicenin-2,based sunlight barriers in *Lychnophora* species[J].Sci Rep,2014,4:4309.DOI:10.1038/srep04309.
[22] MENOZZI-SMARRITO C,WONG C C,MEINL W,et al.First chemical synthesis and *in vitro* characterization of the potential human metabolites 5-*O*-feruloylquinic acid 4′-sulfate and 4′-*O*-glucuronide[J].J Agric Food Chem,2011,59(10):5671-5676.DOI:10.1021/jf200272m.
[23] BLAZICS B,ALBERTI Á,KURSINSZKI L,et al.Identification and LC-MS-MS determination of acteoside,the main antioxidant compound of *Euphrasia rostkoviana*,using the isolated target analyte as external standard[J].J Chromatogr Sci,2011,49(3):203-208.DOI:10.1093/chrsci/49.3.203.
[24] 李辛雷,王佳童,孙振元,等.金花茶和白色山茶及其3个杂交品种类黄酮成分与花色的关系[J].园艺学报,2019,46(6):1145-1154.LI X L,WANG J T,SUN Z Y,et al.Flavonoid components and their effects on flower colors in *Camellia nitidissima*,white *C. Japonica* and their three hybrid cultivars[J].Acta Hortic Sin,2019,46(6):1145-1154.DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0603.
[25] BERGANTIN C,MAIETTI A,CAVAZZINI A,et al.Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in red chicory (*Cichorium intybus*)[J].J Funct Foods,2017,33:94-102.DOI:10.1016/j.jff.2017.02.037.
[26] LUAN G X,WANG H L,LV H H,et al.Separation and purification of five flavone glucosides and one lignan from *Caragana korshinskii* Kom.by the combination of HSCCC and semi-preparative RPLC[J].Chromatographia,2016,79(13/14):823-831.DOI:10.1007/s10337-016-3090-4.
[27] VIEIRA G S,MARQUES A S F,MACHADO M T C,et al.Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts[J].J Food Sci Technol,2017,54(7):2135-2144.DOI:10.1007/s13197-017-2653-1.
[28] NAIR V D,GOPI R,PANNEERSELVAM R.Isolation and structure elucidation of natural antioxidants from leaves of *Rauvolfia beddomethe*:an endemic/endangered medicinal plant from southwestern Ghats of India[J].Pharm Chem J,2012,46(1):35-44.DOI:10.1007/s11094-012-0730-3.
[29] SEO O N,KIM G S,PARK S,et al.Determination of polyphenol components of *Lonicera japonica* Thunb.using liquid chromatography-tandem mass spectrometry:contribution to the overall antioxidant activity[J].Food Chem,2012,134(1):572-577.DOI:10.1016/j.foodchem.2012.02.124.
[30] TANAKA Y,TSUDA S,KUSUMI T.Metabolic engineering to modify flower color[J].Plant Cell Physiol,1998,39(11):1119-1126.DOI:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029312.
[31] WANG Y G,FU J X,ZHANG C,et al.HPLC-DAD-ESI-MS analysis of flavonoids from leaves of different cultivars of sweet *Osmanthus*[J].Molecules,2016,21(9):1224.DOI:10.3390/molecules21091224.
[32] 孙明霞,王宝增,范海,等.叶片中的花色素苷及其对植物适应环境的意义[J].植物生理学通讯,2003,39(6):688-694.SUN M X,WANG B Z,FAN H,et al.Anthocyanins of leaves and their enviromental significance in plant stress responses[J].Plant Physiol Commun,2003,39(6):688-694.DOI:10.13592/j.cnki.ppj.2003.06.051.
[33] 葛雨萱,周肖红,刘洋,等.黄栌属种质资源、栽培繁殖、化学成分、叶色调控研究进展[J].园艺学报,2014,41(9):1833-1845.GE Y X,ZHOU X H,LIU Y,et al.Recent advances in germplasm,cultivation,propagation,chemical components and leaf color regulation of *Cotinus*[J].Acta Hortic Sin,2014,41(9):1833-1845.DOI:10.16420/j.issn.0513-353x.2014.09.015.
[34] SHEN J,JIANG C Q,YAN Y F,et al.Effect of increased UV-B radiation on carotenoid accumulation and total antioxidant capacity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves[J].Genet Mol Res,2017,16(1):2017Mar8;16(1).DOI:10.4238/gmr16018438.
[35] SHEN J Z,ZOU Z W,ZHANG X Z,et al.Metabolic analyses reveal different mechanisms of leaf color change in two purple-leaf tea plant (*Camellia sinensis* L.) cultivars[J].Hortic Res,2018,5:7.DOI:10.1038/s41438-017-0010-1.

(责任编辑 郑琰燚 孟苗婧)