

CHARAKTERYSTYKA BARWNIKÓW I ICH ROZMIESZCZENIE W KWIATACH ZWARTNICZY CHMIELA (*Hippeastrum* × *chmielii* Chm.)

Irena Olszewska-Kaczyńska, Henryk Chmiel

Streszczenie. Obiektem badań były kwiaty pięciu klonów mieszańca międzygatunkowego *Hippeastrum* × *chmielii* uzyskanego z nasion otrzymanych w wyniku skrzyżowania *Hippeastrum hybridum* z *Hippeastrum pratense*. Zawartość oraz rozmieszczenie chlorofilu, karotenoidów i antocyjanów w świeżych liściach okwiatu oznaczono metodami spektrofotometrycznymi. Rozdział i identyfikację wyekstrahowanych antocyjanidyn przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach celulozowych wobec wzorców. Ilość oznaczonych barwników przeliczono na gram suchej masy liści okwiatu. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że kwiaty badanych klonów charakteryzowały się zróżnicowanym natężeniem barwy. Określenie zawartości 3 grup barwników oraz ustalenie ich składu i procentowego udziału pozwala wykazać i może częściowo wyjaśnić odrębności barwy występujące pomiędzy badanymi klonami. Na różnice w intensywności i odcieniu barwy liści okwiatu miały wpływ różne zawartości, rozmieszczenie oraz kopigmentacja występujących antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu.

Słowa kluczowe: *Hippeastrum* × *chmielii*, barwniki, karotenoidy, antocyjany, chlorofile, chromatografia cienkowarstwowa

WSTĘP

Barwa kwiatów jest jednym z celów hodowli roślin o ozdobnych kwiatach, stąd znajomość i rozmieszczenie występujących barwników jest ważne dla ukierunkowania zabiegów hodowlanych. Na podstawie badań biochemicznych można przewidzieć dziedziczenie określonej barwy, jak i możliwość uzyskiwania nowych pożądaných barw [Martha i Weiss 1995].

Zależność, jaka istnieje między barwą kwiatów a ilością i rozmieszczeniem barwników, wskazuje na konieczność oparcia hodowli roślin ozdobnych na analizie występowania tych związków [Hwang i in. 1992].

W Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW prowadzone są prace hodowlane mieszańców zwartnicy (*Hippeastrum* Herb.). W 1993 r. w wyniku skrzyżowania zwartnicy mieszańcowej *Hippeastrum hybridum* – roślina mateczna i *Hippeastrum pratense* – roślina

ojcowska uzyskano mieszańca międzygatunkowego *Hippeastrum* × *chmielii* [Chmiel i Mynett 1997].

Na podstawie barwy kwiatu, wielkości kwiatostanów, wczesności zakwitania oraz wielkości cebul, wyselekcjonowano i rozmnożono wegetatywnie klony *Hippeastrum* × *chmielii*. Klony te charakteryzowały się znacznie mniejszymi kwiatami niż forma matczna, ale kwitły średnio co cztery miesiące, tak jak forma ojcowska [Chmiel 2000].

Celem pracy była identyfikacja i rozmieszczenie barwników w okwiatach *Hippeastrum* × *chmielii* oraz określenie zależności między barwą a składem występujących barwników.

MATERIAŁ I METODY

Materiał doświadczalny stanowiły kwiatostany klonów mieszańca międzygatunkowego *Hippeastrum* × *chmielii*. Spośród 38 klonów rosnących w szklarni Katedry Roślin Ozdobnych wybrano po 6 roślin z pięciu klonów (P 7, P 14, P 24, P 28, P 30) charakteryzujących się najciekawszym zabarwieniem kwiatów. Doświadczenie założono w marcu 2000 r.

Określenia barwy kwiatów dokonano wg katalogu barw [The Royal Horticultural Society Colour Chart, 1966], oznaczając barwę podstawową wewnętrznych powierzchni liści okwiatu, pomijając zabarwienie gardzieli i żyłkowania. Kwiaty badanych klonów *Hippeastrum* × *chmielii* charakteryzowały się zróżnicowanym natężeniem barwy (tab. 1). Klon P 7 barwy cynobrowej bez przebarwień, klon P 14 czerwony z ciemniejszą gardzielią i białymi smugami wewnątrz, klon P 24 z wyraźnym żyłkowaniem i białymi smugami w gardzieli, najjaśniejszy z całej populacji. W klonie P 30 o liściach okwiatu pomarańczowo-czerwonych występowała zielona gardziel i duża biała plama w kształcie gwiazdy, klon P 28 intensywnie karminowy z ciemną gardzielią był najciemniejszy z badanych.

Tabela 1. Barwa kwiatów badanych klonów
Table 1. Flower colour of examined clones

Klon Clone	R. H. S Colour Chart ¹	
	Numer katalogowy Catalogue number	Barwa i jej natężenie Colour and its intensity
P 7	40B	Cynobrowy świecący Shiny vermilion
P 14	46C	Purpurowo – czerwony bladej Pale purple red
P 24	31A	Ceglasty intensywny Intense brick
P 28	53B	Karminowy intensywny Intense carmine
P 30	33B	Pomarańczowo – czerwony świecący Shiny orange-red

¹ The Royal Horticultural Society Colour Chart; 1966

Przedmiotem badań były świeże liście okwiatu, z 3 kwiatów każdej rośliny (ścinaanych w pełni kwitnienia), po odcięciu załąźni, które przecinano w połowie długości, uzyskując część wierzchołkową (A) i dolną (B). W obu tych częściach równolegle

oznaczano zawartość barwników. Chlorofile i karotenoidy ekstrahowano oziębionym 80% acetonem, a zawartość oznaczano metodą spektrofotometryczną [Lichtenthaler i Wellburn 1983].

Związki antocyjanowe ekstrahowano 1% HCl w metanolu przez 24 h. Ilościowe oznaczenie zawartości antocyjanów [Elbanowska i Napierała 1989] polegało na pomiarze różnicy ekstynkcji dwóch roztworów buforowych o pH 1 i pH 4,5, które wykazują różne zabarwienie w zależności od kwasowości roztworu, wykorzystując stałą przeliczeniową wg Fuleki i Francis [1968]. Rozdział i identyfikację związków antocyjanowych przeprowadzono przy zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach celulozowych (Celuloza MN300G, Mechery Nagel) wobec wzorców pelargonidyny, cyjanidyny i delphinidyny firmy Roth.

Na płytki nanoszono ilościowo 0,1 ml 5-krotnie zatężonego w wyparce ekstraktu metanolowego. Płytki rozwijano w układzie: kwas octowy–kwas solny–woda (30:3:10).

Otrzymane i zidentyfikowane na podstawie wzorców plamy antocyjanidyn wydrapowano i ilościowo eluowano metanolem. W tak otrzymanych roztworach przeprowadzono pomiar ekstynkcji dla pelargonidyny przy długości fali 510 nm, dla cyjanidyny 520 nm, dla delphinidyny 540 nm. Zawartość poszczególnych antocyjanidyn odczytywano z krzywych wzorcowych dla wyżej wymienionych antocyjanidyn. Pomiar ekstynkcji wykonywano na spektrofotometrze firmy Shimadzu UV1601PC. Ilość oznaczanych barwników przeliczano na 1 g suchej masy (s.m.) liści okwiatu.

Wyniki opracowano statystycznie metodą jednoczynnikową (ANOVA 1) analizy wariancji. Do porównania średnich użyto testu Duncana.

WYNIKI

Zawartość chlorofilu a+b była wyższa w części dolnej liści okwiatu u wszystkich badanych klonów. Spośród dwóch form chlorofilu występujących w okwiatach, większy udział miał chlorofil a w obu badanych częściach. Najwyższą zawartość chlorofilu a+b w części wierzchołkowej stwierdzono w liściach okwiatu klonu P 14 (0,31 mg·g⁻¹s.m.), a najniższą u klonu P 7 (0,08 mg·g⁻¹s.m), u którego nie występowały żadne zielonkawe przebarwienia. W części dolnej najwięcej chlorofilu a+b zawierały liście okwiatu klonu P 28 (0,57 mg·g⁻¹ s.m.), a najmniej, podobnie jak w części wierzchołkowej klon P 7 (0,16 mg·g⁻¹ s.m.) – tab. 2.

Tabela 2. Zawartość chlorofilu a i b w liściach okwiatu, mg·g⁻¹ s. m.

Table 2. Chlorophyll a and b content in perianth leaves, mg·g⁻¹ d.w.

Klon Clone	Część wierzchołkowa (A) Upper part (A)			Część dolna (B) Lower part (B)		
	Chlorofil a Chlorophyll a	Chlorofil b Chlorophyll b	Stosunek a/b Ratio a/b	Chlorofil a Chlorophyll a	Chlorofil b Chlorophyll b	Stosunek a/b Ratio a/b
	P 7	0,059	0,027	2,18	0,122	0,044
P 14	0,173	0,134	1,29	0,383	0,154	2,48
P 24	0,111	0,043	2,58	0,414	0,123	3,36
P 28	0,076	0,077	0,98	0,401	0,174	2,36
P 30	0,166	0,012	13,83	0,152	0,098	1,55
NIR _{0,05}	0,01	0,01		0,01	0,01	
LSD _{0,05}						

Podobnie jak w przypadku chlorofili, wyższe zawartości karotenoidów stwierdzono w dolnych częściach (tab. 3). Największą ilością karotenoidów w całych liściach okwiatu charakteryzował się klon P 24 ($1,22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m.}$), najniższą klon P 28 ($0,24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) (tab. 4).

Tabela 3. Zawartość karotenoidów w części wierzchołkowej (A) i dolnej (B) liści okwiatu, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s. m.}$
Table 3. Carotenoids content in upper (A) and lower (B) part of perianth leaves, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ d.w.}$

Klon Clone	Karotenoidy – Carotenoids	
	Część wierzchołkowa (A) Upper part (A)	Część dolna (B) Lower part (B)
P 7	0,223	0,271
P 14	0,194	0,305
P 24	0,466	0,758
P 28	0,115	0,124
P 30	0,237	0,820
NIR _{0,05}	0,01	0,02
LSD _{0,05}		

Tabela 4. Zawartość oznaczonych barwników w całych liściach okwiatu, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s. m.}$
Table 4 Identified pigment contents in the whole perianth leaves, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ d.w.}$

Barwniki Pigments	Klony – Clones					NIR _{0,05}
	P 7	P 14	P 24	P 28	P 30	
Antocyjany Anthocyanins	18,34	16,80	6,80	24,13	10,92	0,09
Karotenoidy Carotenoids	0,49	0,49	1,22	0,24	1,05	0,06
Chlorofil a+b Chlorophyll a+b	0,25	0,71	0,64	0,65	0,41	0,07

Ilość związków antocyjanowych inaczej niż chlorofili i karotenoidów, we wszystkich badanych klonach była wyższa w części wierzchołkowej niż w części dolnej (tab. 5).

Najwyższą zawartość tych barwników oznaczono w klonie 28 zarówno w części wierzchołkowej – $15,12 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m.}$, jak i w części dolnej – $9,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s.m.}$ Kwiaty roślin z tego klonu oznaczono według katalogu barw jako intensywnie karminowe, najciemniejsze z badanych.

Tabela 5. Zawartość antocyjanów w części wierzchołkowej (A) i części dolnej (B) liści okwiatu, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ s. m.}$

Table 5. Anthocyanins content in upper (A) and lower (B) part of perianth leaves, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ d.w.}$

Klon Clone	Antocyjany – Anthocyanins	
	Część wierzchołkowa (A) – Upper part (A)	Część dolna (B) – Lower part (B)
P 7	12,29	6,25
P 14	12,83	4,79
P 24	4,67	1,89
P 28	15,12	9,01
P 30	8,42	2,72
NIR _{0,05}	0,07	0,07
LSD _{0,05}		

Najniższą zawartością antocyjanów w obu badanych częściach okwiatu charakteryzuje się klon P 24, w części wierzchołkowej – 4,67 mg·g⁻¹ s.m., w części dolnej – 1,89 mg·g⁻¹ s.m. (tab. 5). Na barwę liści okwiatu tego klonu prawdopodobnie wpływa wyższa niż u pozostałych klonów zawartość karotenoidów (tab. 3).

Procentowe udziały oznaczonych karotenoidów, antocyjanów i chlorofili uzupełniają wyjaśnienie różnic w barwie kwiatów badanych klonów (tab. 6).

Tabela 6. Procentowy udział oznaczonych barwników w liściach okwiatu
Table 6. Percentage rates of identified pigments in perianth leaves

Klon Clone	Część wierzchołkowa (A) – Upper part (A)			Część dolna (B) – Lower part (B)		
	Antocyjany Anthocyanins	Karotenoidy Carotenoids	Chlorofil a+b Chlorophyll a+b	Antocyjany Anthocyanins	Karotenoidy Carotenoids	Chlorofil a+b Chlorophyll a+b
P 7	97,75	1,76	0,68	93,16	4,20	2,57
P 14	96,24	1,45	2,30	82,64	6,30	11,09
P 24	88,76	8,44	2,78	59,37	23,68	16,80
P 28	98,30	0,74	0,99	92,78	1,27	5,92
P 30	95,23	2,75	2,06	71,62	21,75	6,63
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	0,09	0,10	0,08	0,13	0,12	0,13

W wyniku rozdziału chromatograficznego i oznaczeń spektrofotometrycznych stwierdzono, że w obu badanych częściach liści okwiatu u wszystkich badanych klonów przeważała pelargonidyna, odpowiedzialna przede wszystkim za karminowoczerwoną barwę. Najwyższe wartości oznaczono w klonie P 28 (w części A – 14,50 mg·g⁻¹ s.m., w części B – 8,04 mg·g⁻¹ s.m.), najniższe u klonu P 24 (w części A – 4,24, w części B – 1,70 mg·g⁻¹ s.m.), przy czym zawartości tej antocyjanidyny w częściach dolnych były niższe.

Tabela 7. Zawartość antocyjanidyn w liściach okwiatu, mg·g⁻¹ s. m.
Table 7. Anthocyanidin content in perianth leaves, mg·g⁻¹ d.w.

Klon Clone	Część wierzchołkowa (A) – Upper part (A)			Część dolna (B) – Lower part (B)		
	Pelargonidyna Pelargonidin	Cyjanidyna Cyanidin	Delfinidyna Delphinidin	Pelargonidyna Pelargonidin	Cyjanidyna Cyanidin	Delfinidyna Delphinidin
P 7	11,31	0,50	-	5,0	0,41	-
P 14	11,30	0,30	0,51	2,31	0,50	0,95
P 24	4,24	0,20	0,32	1,70	-	0,20
P 28	14,50	0,40	-	8,04	0,40	-
P 30	7,70	0,20	-	2,20	0,20	-
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	0,27	0,15	0,04	0,15	0,03	0,05

Cyjanidyny nie wykryto tylko w części dolnej liści okwiatu klonu P 24, u pozostałych klonów w części wierzchołkowej i dolnej występowała w niewielkich ilościach od 0,20 do 0,50 mg·g⁻¹ s.m.. Delfinidyna wystąpiła tylko w obu badanych częściach liści okwiatu klonów P 14 i P 24 (tab. 7). Występowanie tego barwnika wyraźnie wpłynęło na zabarwienie klonu P 24, u którego były widoczne fioletowo-niebieskie smugi. Kwiaty klonu P 14 charakteryzowały się jednolitą barwą różowofioletową.

DYSKUSJA

Występowanie i rozmieszczenie barwników w roślinie odgrywa ważną rolę w ustaleniu pokrewieństwa między gatunkami, dostarcza informacji o ich dziedziczeniu.

Prace hodowlane mające na celu uzyskanie nowych odmian roślin, ozdobnych z kwiatów, opierają się na badaniach dotyczących jakościowej i ilościowej analizy barwników oraz ich rozmieszczeniu.

Na podstawie analiz składu barwników można stwierdzić, jakie barwniki mają najistotniejszy wpływ na barwę, jej odcień oraz przebarwienia kwiatów.

Uzyskane wyniki badań, w których określono zawartość oraz rozmieszczenie antocyjanów, karotenoidów i chlorofili w kwiatach 5 klonów *Hippeastrum* × *chmieli* są zgodne z wynikami badań Griesbach i Batdorf [1995] oraz Yamaguci i in. [1990]. Na intensywnie karminową barwę kwiatów *Hippeastrum* × *chmieli* klonu P 28 wpłynęła wysoka zawartość antocyjanów ogółem (24,13 mg g⁻¹) w tym głównie pelargonidyny (22,54 mg g⁻¹).

Yamaguci i in. [1990] stwierdzili również, że za intensywnie czerwoną barwę kwiatów *Zinia elegans* odpowiada głównie pelargonidyna.

Griesbach i Batdorf [1995], oznaczając skład barwników w kwiatach 3 odmian *Hemerocallis fulva* L., stwierdzili, że za pomarańczową barwę kwiatów *Hemerocallis fulva* fm. *fulva* odpowiada cyjanidyna i 2 karotenoidy: zeaksantyna i luteina. Różowe kwiaty *H. fulva* fm. *rosea* zawierały głównie cyjanidynę i śladowe ilości karotenoidów. W brązowych kwiatach *H. fulva* fm. *districha* wystąpiła tylko delfinidyna i 2 karotenoidy: zeaksantyna i luteina. Autorzy ci uważają, że różnice w barwie kwiatów odmian *H. fulva* spowodowane są głównie różnymi proporcjami występujących antocyjanidyn i karotenoidów oraz rodzajem antocyjanidyny.

W ceglanych kwiatach klonu P 24 zawartość antocyjanów (6,80 mg g⁻¹), w tym pelargonidyny była najniższa (5,94 mg·g⁻¹) w porównaniu z kwiatami pozostałych badanych klonów, a obecność delfinidyny i karotenoidów wyraźnie wpłynęła na natężenie barwy i niebieskie przebarwienie. Wyniki badań Saito i Harborne (1992) potwierdzają, że delfinidyna jest odpowiedzialna za niebieskie zabarwienie kwiatów w rodzinie *Labiateae*.

Pelargonidyna wystąpiła we wszystkich kwiatach badanych klonów *Hippeastrum* × *chmielii* i w zależności od jej zawartości była odpowiedzialna za tworzenie ceglasto-czerwonej aż do purpurowoczerwonej barwy. Za różnice w natężeniu barwy kwiatów *H. × chmielii* odpowiada głównie kopigmentacja między występującymi rodzajami antocyjanidyny i karotenoidów.

WNIOSKI

1. W przebadanych kwiatach 5 klonów *Hippeastrum* × *chmielii* na różnice w intensywności i odcieniu barwy okwiatów miały wpływ różne zawartości, rozmieszczenie oraz zjawisko kopigmentacji występujących antocyjanów, karotenoidów i chlorofili.
2. Wyższe zawartości chlorofili i karotenoidów obserwowano w dolnej, antocyjanów zaś w górnej części liści okwiatu.
3. Wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych, w których określono zawartość 3 grup barwników, oraz ustalenie ich składu i procentowego udziału pozwalają wykazać i może częściowo wyjaśnić odrębności barwy występujące pomiędzy klonami.
4. Analiza barwników może stanowić też dokumentację ich dziedziczenia oraz zmian barwy w wyniku prac hodowlanych.

PIŚMIENNICTWO

- Chmiel H., Mynett K., 1997. Nowe odmiany mieszańcowe *Hippeastrum* otrzymane w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW. Biuletyn SPORC 6, 55–66.
- Chmiel H., 2000. Uprawa roślin ozdobnych. PWRiL Warszawa
- Elbanowska A., Napierała A., 1989. Antocyjany w owcach *Aronia melanocarpa*. Herba polonica 35 (4), 188–189.
- Fuleki F., Francis F. J., 1968. Quantitative methods for anthocyanins 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. J. Food Sci. 33, 72–77.
- Griesbach R. J., Batdorf L., 1995. Flower Pigments within *Hemerocallis fulva* fm. *fulva*, fm. *rosea* and fm. *disticha*. Hort Science 30(2), 353–354.
- Hwang Y.-J., Yoshikawa K., Miyajima I., Okubo H., 1992. Flower colors and pigments in hybrids with *Camellia chrysantha*. Sci. Hort. 51 (3–4): 251–260
- Lichtenthaler H. K., Wellburn A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transaction 603 meeting Liverpool, 591–592.
- Martha R., Weiss, 1995. Floral color change: A widespread functional convergence. Am. J. Bot. 82 (2), 167–185.
- Saito N., Harborne J. B., 1992. Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the *Labiatae*. Phytochemistry 31, 3009–3015.
- The Royal Horticultural Society Colour Chart, 1966. London.
- Yamaguchi A. A., Terahara N., Shizukuishi K., 1990. Acylated anthocyanins in *Zinnia elegans* flowers. Phytochemistry 29(4), 1269–1270.

CHARACTERISTICS AND DISTRIBUTION OF PIGMENTS IN FLOWERS OF THE NEW INTERSPECIFIC HYBRID *Hippeastrum × chmielii*

Abstract. Five clones of a new interspecific hybrid *Hippeastrum × chmielii* Chm. obtained by crossing *Hippeastrum hybridum* with *Hippeastrum pratense* were compared. Content and distribution of chlorophylls, carotenoids and anthocyanins were determined in fresh perianth leaves using spectrophotometric method and calculated on dry mass basis. Separation and identification of anthocyanidins were done by TLC on cellulose plates against standards. Variations in intensity and shade of perianth leaves colour were due to differences in content and distribution as well as copigmentation in three studied classes of the pigments.

Key words: *Hippeastrum × chmielii*, pigments, carotenoids, anthocyanins, chlorophylls, TLC – thin layer chromatography

Irena Olszewska-Kaczyńska, Henryk Chmiel, Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166