

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201904083

高效液相色谱(HPLC)法测定紫花苜蓿叶片中 叶黄素循环组分的含量*

许超^{1,2}, 何承刚¹, 段新慧¹, 周凯¹, 韩博¹, 姜华^{1**}, 毕玉芬^{1**}

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南昆明 650201;

2. 昆明市农业广播电视学校, 云南昆明 650032)

摘要:【目的】建立适合紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)叶片叶黄素循环组分: 紫黄质(V)、环氧玉米黄质(A)和玉米黄质(Z)含量测定的方法。【方法】采用高效液相色谱(HPLC)法对紫花苜蓿叶片叶黄素循环的3个组分进行了测定, 并对试验方法进行了验证。【结果】V、A和Z三个组分的标准品在3~100 μg/mL范围内均与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数分别为 $r=0.999\ 49$ 、 $r=0.999\ 61$ 和 $r=0.999\ 60$, 精密度试验($n=5$)的RSD分别为0.96%、0.39%和0.87%, 稳定性试验($n=7$)的RSD值分别为3.33%、1.42%和1.86%, 重现性试验($n=5$)的RSD分别为0.48%、3.98%和2.59%, 平均回收率($n=3$)分别为99.55%、96.04%和94.08%, RSD分别为0.96%、1.38%和0.51%。【结论】HPLC法适于紫花苜蓿叶片叶黄素循环组分V、A和Z含量测定, 该方法精密度高、重复性和稳定性好, 回收率高。

关键词: 高效液相色谱; 叶黄素循环; 紫花苜蓿

中图分类号: S 541.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2019)05-0820-06

Determination of the Content of Xanthophyll Cycle Components in Leaves of *Medicago sativa* L. by HPLC

XU Chao^{1,2}, HE Chenggang¹, Duan Xinhui¹, ZHOU Kai¹,

HAN Bo¹, JIANG Hua¹, BI Yufen¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Kunming Agricultural Broadcast Television College, Kunming 650032, China)

Abstract: [Purpose] To provide an effective method which can accurately determine xanthophyll cycle components, violaxanthin (V), antheraxanthin (A) and zeaxanthin (Z) in alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaves. [Methods] Under high performance liquid chromatography (HPLC) method, the content of xanthophyll cycle components in alfalfa leaves was determined and the experimental method was validated. [Result] The content of xanthophyll cycle components was around 3-100 μg/mL and it had good linear relationship with the peak area, the correlation coefficients of V, A and Z were $r=0.999\ 49$, $r=0.999\ 61$ and $r=0.999\ 60$, respectively. The RSD of precision ($n=5$), stability

收稿日期: 2019-04-30

修回日期: 2019-06-07

网络首发时间: 2019-07-09 10:39:23

*基金项目: 国家自然科学基金(31660682); 云南省重点研发计划课题(2018BB002-02); 云南省技术创新人才(2018HB075)。

作者简介: 许超(1985—), 女, 云南东川人, 博士, 农艺师, 主要从事草种资源利用与种质创新的研究。E-mail: 846438725@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 姜华(1976—), 女, 吉林梅河口人, 博士, 教授, 主要从事牧草种质资源与遗传育种方面的研究。E-mail: jianghua15@163.com; 毕玉芬(1960—), 女, 内蒙古通辽市人, 博士, 教授, 主要从事草业科学的教学和科研工作。E-mail: biyufenynd@sina.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.s.20190708.1015.002.html>



($n=7$) and reproducibility ($n=3$) of V, A and Z were 0.96%, 3.33% and 0.48%; 0.39%, 1.42% and 3.98%; 0.87%, 1.86% and 2.59%, respectively. [**Conclusion**] This method is efficient with high precision, reproducibility, stability and high recovery which makes it suitable for determine xanthophyll cycle components in alfalfa leaves.

Keywords: HPLC; xanthophyll cycle; alfalfa

高效液相色谱法(HPLC)被广泛运用于植物的硫代葡萄糖苷类化合物^[1]、中草药有效成分^[2]、茶叶中的游离氨基酸^[3]、叶黄素^[4]和有机酸^[5-6]等成分含量的测定,且具有方法简便、数据准确和重复性好的特点,但未见有此法测定紫花苜蓿叶黄素循环组分含量的研究。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是豆科多年生草本植物,堪称“牧草之王”,既是中国草地农业的主要作物,也是生态治理的重要草种,更是畜牧业赖以发展的物质基础^[7-8]。植物在环境胁迫下各项生理活动能力都会降低,尤其是光合能力。一般情况下,植物体能够通过自身调节来避免过量光能对植物的伤害,其中植物体叶黄素循环保护机制与热耗散密切相关,是光保护的主要机制^[9]。植物依靠叶黄素循环(xanthophyll cycle)进行热耗散被认为是光保护的主要途径^[10]。YAMAMOTO^[11]提出,叶黄素循环即为叶黄素的3种组分:紫黄质(violaxanthin, V)、环氧玉米黄质(antheraxanthin, A)和玉米黄质(zeaxanthin, Z)在不同的光强和pH条件下,通过环氧和脱环氧化作用相互转化的循环机制。植物能通过叶黄素循环的热耗散,在紫黄质脱环氧化酶(VDE)的催化下,紫黄质(V)经中间物环氧玉米黄质(A)可转变成玉米黄质(Z)^[12],从而抵抗逆境对植物的伤害。本试验通过建立适合紫花苜蓿叶片中叶黄素循环组分含量测定的HPLC法,为进一步研究紫花苜蓿的耐热机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

云南野生紫花苜蓿种子是本研究团队繁殖的种子,为采自云南迪庆州德钦县奔子栏乡干热河谷地区的野生种;阿尔冈金紫花苜蓿种子引自加拿大。试验用0.1% HgCl₂对2个紫花苜蓿种子消毒30 min,然后将其置于人工气候箱中催芽24 h,白天(14 h)温度为25℃,夜间(10 h)温度为18℃。将发芽的种子种在介质为腐殖土和红土(对其进

行高温高压灭菌)为2:1的花盆中,3~4 d浇灌1次50%的Hoagland营养液,在植株高约10 cm时,选择长势较一致的幼苗,将其移栽到较大的花盆中,每个种设3个重复,每盆8株。在其生长至150 d时取成熟叶片,以HPLC法测定叶黄素循环组分。

叶黄素循环V、A和Z组分标准品购于CaroteNature公司,纯度99%。

1.2 试验方法

1.2.1 标准品溶液的配制

称取叶黄素(V)标准品0.768 mg,以甲醇溶解,用容量瓶定容至10 mL,配成质量浓度为76.8 μg/mL的母液,再分别稀释成质量浓度为0.076 8、0.153 6、0.307 2和1.536 0 μg/mL的溶液。称取叶黄素(A)标准品0.564 mg,以甲醇溶解,用容量瓶定容至10 mL,配成质量浓度为56.4 μg/mL的母液,再分别稀释成质量浓度为0.056 4、0.112 8、0.225 6和1.128 0 μg/mL的溶液。称取叶黄素(Z)标准品4.8 mg,以甲醇溶解,用容量瓶定容至10 mL,配成质量浓度为480 μg/mL的母液,再分别稀释成质量浓度为0.048 0、0.096 0、0.192 0和0.960 0 μg/mL的溶液。

1.2.2 高效液相色谱(HPLC)条件

用Agilent 1100高效液相色谱仪(美国:G1322ADEGASSER、G1311AQuatPump、G1316ACOLCOM、G1315B DAD)进行测定。Agilent Hypersil ODS (4.0×250 mm, 4.6 μm)色谱柱(美国),流动相A液为100%乙腈,B液为100%水,体积分数线性梯度洗脱程序为90% A液+10% B液洗脱15 min,接着在5 min内,90% A液体积分数线性递增至100%,之后再洗脱20 min,流速1 mL/min,检测波长445 nm,柱子温度30℃,取10 μL样品进样到色谱仪。

1.2.3 样品液的制备

取紫花苜蓿鲜叶0.1 g,倒入液氮研磨至粉末状,加入4 mL 85%丙酮,匀浆2~3 min,再加

入 1 mL 100% 丙酮, 匀浆 1 min 之后置于冰上 15 min, 1 200 g 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后即得样品液, 色素提取的全过程在黑暗中进行^[13]。

1.2.4 标准曲线的建立

分别取 10 μL 质量浓度为 3、10、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 按照上述色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 y , 质量浓度为横坐标 x , 建立回归方程。

1.2.5 精密度试验

精密吸取质量浓度为 1.92 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 V 标准品溶液、质量浓度为 1.41 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 A 标准品溶液和质量浓度为 9.6 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 Z 标准品溶液, 平行测定 5 次, 每次进样 10 μL , 按照 1.2.2 节色谱条件, 测定 3 种叶黄素循环组分的峰面积, 计算 RSD 值。

1.2.6 稳定性试验

取质量浓度为 1.92 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 V 标准品溶液、质量浓度为 1.41 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 A 标准品溶液和质量浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素 Z 标准品溶液, 分别在制备后的 0、3、6、9、12、18 和 24 h 进样, 每次进样 10 μL , 按照 1.2.2 节色谱条件, 测定 3 种叶黄素循环组分的峰面积, 计算 RSD 值。

1.2.7 重现性试验

称取同一样品 5 份, 按 1.2.3 节方法制备样品溶液, 每次进样 10 μL , 测定叶黄素循环各组分的峰面积, 计算 RSD 值。

1.2.8 回收率试验

按 1.2.3 节方法制备样品溶液, 测定样品中叶黄素循环各个组分 (V、A 和 Z) 的峰面积, 通过标准曲线分别计算出质量分数。再分别精确量取样品溶液适量, 依次加入叶黄素循环各组分 (V、A 和 Z) 的标准品溶液各 3 份。按照 1.2.2 节色谱条件进行检测, 每次进样 10 μL , 记录图谱, 通过计算得出加标回收率以及 RSD 值^[14-16]。

$$\text{RSD} = \left[\text{Spr} \left(\sum x_n - \bar{x} \right)^2 / (n - 1) \right] / \bar{x} \times 100\%;$$

回收率 = 加标后测量值 / (样品测定值 + 加标量) $\times 100\%$ 。

1.2.9 数据分析

紫花苜蓿叶片叶黄素循环组分的试验数据均以“平均值 $\pm$ 标准误”表示, 利用统计学软件 (SPSS

20.0) 进行单因素方差分析 (ANOVA) 及差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 3 种物质的标准图谱

叶黄素循环组分紫黄质 (V)、环氧玉米黄质 (A) 和玉米黄质 (Z) 的标准图谱见图 1~3。由图 1~3 可知: 3 种物质的保留时间分别为 6.706、9.945 和 14.852 min。

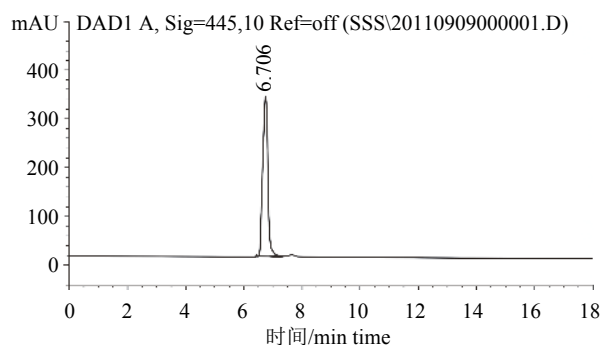


图 1 紫黄质的标准图谱

Fig. 1 Chromatogram of violaxanthin

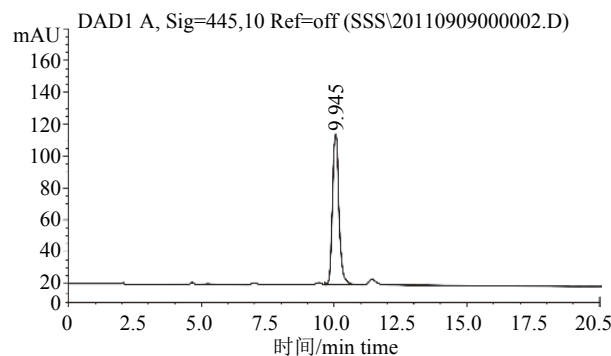


图 2 环氧玉米黄质的标准图谱

Fig. 2 Chromatogram of antheraxanthin

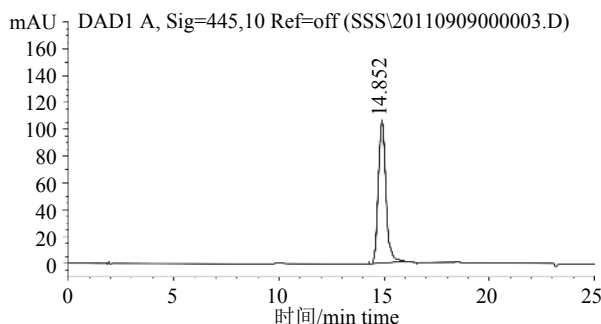


图 3 玉米黄质的标准图谱

Fig. 3 Chromatogram of zeaxanthin

2.2 紫花苜蓿叶片叶黄素循环组分离图谱

吸取样品溶液 10 μL 进入液相色谱仪,在 1.2.2 节色谱条件下,测定其峰面积,以标准品为对照,测定样品中叶黄素循环组分的含量,V、A 和 Z 含量分别为 9.868、6.978 和 5.771 $\mu\text{g/mL}$ 。色谱图如图 4 所示。

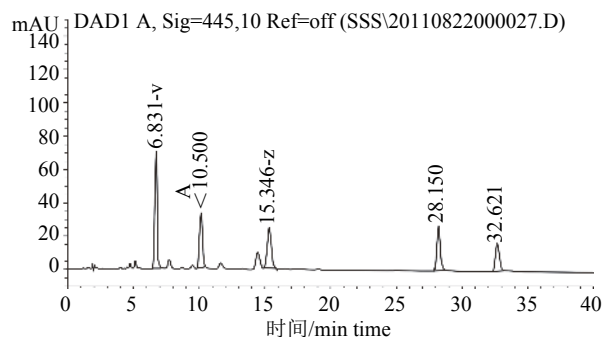


图 4 紫花苜蓿叶片紫黄质、环氧玉米黄质和玉米黄质的分离图谱

Fig. 4 Chromatogram of violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin

2.3 3 种物质标准曲线的绘制

通过梯度质量浓度标准品溶液的测定,色谱峰面积与质量浓度之间呈良好的线性关系(图 5~7),可以得到 3 种物质的线性回归方程:

V 物质的回归方程为 $y=77\,032.972\,61x-2.113\,31$ ($r=0.999\,49$)。

A 物质的回归方程为 $y=76\,728.788\,71x-1.498\,57$ ($r=0.999\,61$)。

Z 物质的回归方程为 $y=911\,43.207\,69x-1.345\,47$ ($r=0.999\,60$)。

由此,可通过测定 3 种物质的色谱峰面积,准确计算出样品中 3 种物质的浓度。

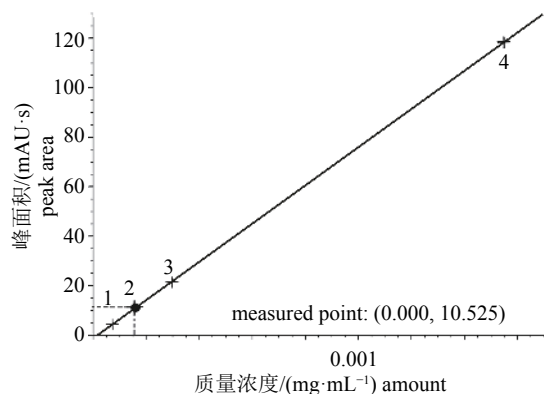


图 5 紫黄质的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of violaxanthin

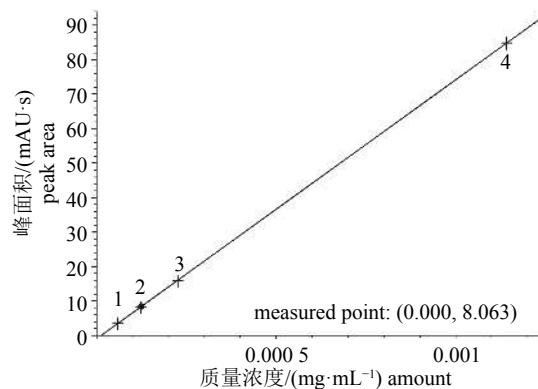


图 6 环氧玉米黄质的标准曲线

Fig. 6 Standard curve of antheraxanthin

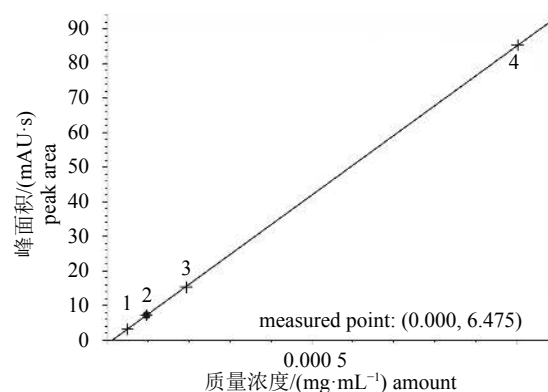


图 7 玉米黄质的标准曲线

Fig. 7 Standard curve of zeaxanthin

2.4 方法验证

按照 1.2.5 节的方法进行精密度试验,测定 V、A 和 Z 标准品溶液平均 ($n=5$) 峰面积 ($\text{mAU}\cdot\text{s}$) 分别为 140 7.17、102 0.50 和 948.55, RSD 分别为 0.96%、0.39% 和 0.87%,符合常规定量分析要求,表明仪器精密度良好。

按照 1.2.6 节的方法进行稳定性试验,测定室温下叶黄素循环各组分 V、A 和 Z 标准品溶液 ($n=7$) 的峰面积 ($\text{mAU}\cdot\text{s}$),结果分别在 1 241.97~1 378.39、1 077.32~1 040.56 和 1 180.41~1 123.47 范围内,且 0~24 h 叶黄素循环 3 种组分峰面积的 RSD 值分别为 3.33%、1.42% 和 1.86%,符合常规定量分析要求,表明供试样品溶液在 24 h 内稳定。

按照 1.2.7 节的方法进行重现性试验,测得样品溶液 ($n=5$) V、A 和 Z 的平均峰面积 ($\text{mAU}\cdot\text{s}$) 分别为 176.27、4.28 和 8.98, RSD 分别为 0.48%、3.98% 和 2.59%,符合常规定量分析要求,表明该方法的重复性良好。

取已知质量浓度的 3 种物质 (V、A 和 Z) 样品, 分别对应加入低、中、高^[17]3 个不同质量浓度水平的标准品溶液进行回收率测定 ($n=3$), 通过各自的回归方程得出相应的质量浓度, 并计算回收率, 结果见 表 1, 各组分回收率试验均良好, RSD 值符合常规定量分析要求。

表 1 加标回收实验结果
Tab. 1 The results of standard addition recovery

叶黄素循环的 3 个组分 three components of xanthophyll cycle	ρ (样品)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sample mass concentration	加标量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) adding standard matter amount	加标后测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) measured value	回收率/% rate of recovery	平均回收率/% average recovery	相对标准差/% RSD
V	2.123	6.144	8.304	100.44	99.55	0.96
		7.680	9.771	99.67		
		9.216	1.117	98.53		
A	1.098	4.512	5.318	94.80	96.04	1.38
		5.640	6.462	95.91		
		6.768	7.664	97.43		
Z	1.332	3.840	4.888	94.52	94.08	0.51
		4.800	5.774	94.17		
		5.760	6.635	93.57		

2.5 样品叶黄素循环 3 个组分含量的测定

按 1.2.3 节方法制备样品溶液, 在 1.2.2 节色谱条件下测定 2 个样品叶黄素循环组分的峰面积, 再以各组分的标准方程计算出质量比, 结果见

表 2。从表 2 可见: 2 种紫花苜蓿的叶黄素循环组分 V 和 Z、A+Z 与 V+A+Z 及其比值没有差异 ($P>0.05$), 只有 A 含量云南野生种显著高于阿尔冈金。

表 2 两种紫花苜蓿叶片叶黄素循环组分测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 2 The results of content determination of lutein constituents in two kinds of alfalfa leaves ($\bar{x} \pm s, n=3$)

品种	$w(V)/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$w(A)/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$w(Z)/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$w(A+Z)/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$w(V+A+Z)/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$[(A+Z)/(V+A+Z)]/\%$
云南野生种 wild species	0.168 83 $\pm$ 0.014 98 a	0.006 77 $\pm$ 0.000 55 a	0.010 72 $\pm$ 0.001 48 a	0.017 48 $\pm$ 0.001 64 a	0.186 31 $\pm$ 0.016 59 a	9.38 $\pm$ 0.14 a
阿尔冈金 Algonquin	0.157 84 $\pm$ 0.010 85 a	0.005 55 $\pm$ 0.000 45 b	0.011 42 $\pm$ 0.000 62 a	0.016 97 $\pm$ 0.000 97 a	0.174 81 $\pm$ 0.011 19 a	9.73 $\pm$ 0.64 a

注: 同列中不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著。
Note: Small letters indicate significant difference in the same column at 5% level.

3 讨论

植物叶黄素的 3 种组分在一定条件下相互转化, 可以减轻逆境胁迫对其造成的光抑制, 因此, 对 3 种组分含量的测定有利于了解植物光抑制的情况。有研究表明: Z 和 A 有耗散过剩光能和猝灭激发能的作用^[18]。本试验中, 相同条件下的云南野生种和阿尔冈金的叶黄素循环组分 V 和 Z、A+Z 与 V+A+Z 及其比值没有差异 ($P>0.05$), 是因为样品的生长条件正常, 未受到环境胁迫。但云南野生紫花苜蓿叶黄素循环所产生的 V、A 和 Z+A 均大于阿尔冈金, 可能是因为该种质资源较耐干热, 光耗散能力较强^[19]。叶黄素循环对过剩能量的耗散能力可以用叶黄素循环组分转化状态 (DPS) 表示, 即 $DPS=(A+Z)/(V+A+Z)$ ^[20]。

本试验中, 云南野生种的 DPS 值小于阿尔冈金, 是由于二者的 A+Z 转化量相近, 但云南野生紫花苜蓿的叶黄素循环库 (V+A+Z) 含量较高。有研究表明: 在高光胁迫条件下, 转基因拟南芥的 (A+Z)/(V+A+Z) 和 NPQ 降低, 其叶黄素循环功能减弱, 对光抑制的敏感性增强^[21]。在逆境条件下叶黄素循环的过剩能量耗散能力、光保护作用及机制等方面还有待进一步研究。

4 结论

云南野生紫花苜蓿叶黄素循环所产生的 V、A 和 Z+A 均大于阿尔冈金, 表明该种质资源具有较好的耐干热性。本研究利用 HPLC 法测定紫花苜蓿中叶黄素组分的含量, 建立了相应标准曲线测定叶黄素循环各组分含量的方法。该方法能依

据保留时间准确有效的区分组分峰和杂峰,在一定质量浓度范围内各组分均具有良好的线性关系,稳定性、重复性好,回收率高,能准确测量叶黄素循环组分的含量,且简单易操作。通过对2种紫花苜蓿叶片叶黄素循环3个组分含量的分析可知,该方法测得的数据符合叶黄素循环相关理论研究,适用于紫花苜蓿叶片中叶黄素循环3个组分含量的测定。

[参考文献]

- [1] GROSSER K, VAN DAM N M. A straightforward method for glucosinolate extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography (HPLC)[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(121): e55425. DOI: 10.3791/55425.
- [2] 施崇精,袁强华,谢凡,等. HPLC法同时测定加味四妙颗粒中6种成分[J]. *中成药*, 2019, 41(2): 266. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.005.
- [3] 王富花. HPLC分析测定不同茶叶中的游离氨基酸[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(1): 141. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2018.01.028.
- [4] 张关顺. HPLC法测定叶黄素的含量[J]. *海峡药学*, 2004, 16(6): 63. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3765.2004.06.034.
- [5] 陈洁丽,李凤,楼禹阳,等. 高效液相色谱法测定叶黄素的含量[J]. *广东化工*, 2015, 42(15): 210. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2015.15.103.
- [6] 许庆方,玉柱,韩建国,等. 高效液相色谱法测定紫花苜蓿青贮中的有机酸[J]. *草原与草坪*, 2007, 27(2): 63. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5500.2007.02.017.
- [7] 孙启忠,王宗礼,徐丽君. 旱区苜蓿[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- [8] 南丽丽,师尚礼,李玉珠. 根茎型清水紫花苜蓿特征特性研究[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [9] 叶尚红. 植物生理生化实验教程[M]. 第二版. 昆明: 云南科技出版社, 2007.
- [10] PFÜNDEL E, BILGER W. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle[J]. *Photosynthesis Research*, 1994, 42(2): 89. DOI: 10.1007/bf02187121.
- [11] YAMAMOTO H Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1979, 51(3): 639. DOI: 10.1351/pac197951030639.
- [12] JAHNS P, LATOWSKI D, STRZALKA K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2009, 1787(1): 3. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.09.013.
- [13] 韦朝领,江昌俊,陶汉之,等. 茶树鲜叶中叶黄素循环组分的高效液相色谱法测定研究及其光保护功能鉴定[J]. *茶叶科学*, 2004, 24(1): 60. DOI: 10.3969/j.issn.1000-369X.2004.01.012.
- [14] 韩锐,陈亚运,季君洋,等. HPLC测定番荔枝果实中酚类成分及抗氧化相关性研究[J/OL]. *食品科学*, 2018. [2019-04-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181018.1505.026.html>.
- [15] 陈长应. HPLC法测定黑绿豆中花青素的含量[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(23): 150. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2016.23.035.
- [16] 刘占云,刘晓秋,白淑芳,等. HPLC法测定不同产地黑豆皮中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的含量[J]. *食品科学*, 2011, 32(18): 256.
- [17] 陈建华,缪恩铭,耿永勤,等. 高效液相色谱法测定胶黏剂中防腐剂及抗氧化剂的含量[J]. *中国科技信息*, 2017(17): 66. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8972.2017.17.021.
- [18] GAO Z M, LIU Q, ZHENG B, et al. Molecular characterization and primary functional analysis of PeVDE, a violaxanthin de-epoxidase gene from bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(9): 1381. DOI: 10.1007/s00299-013-1450-1.
- [19] 毕玉芬,车伟光,顾垒. 德钦地区野生紫花苜蓿群落多样性特征及其来源分析[J]. *草地学报*, 2007, 15(4): 306. DOI: 10.11733/j.issn.1007-0435.2007.04.002.
- [20] ALONSO R, ELVIRA S, CASTILLO F J, et al. Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2001, 24(9): 905. DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00738.x.
- [21] LI X, ZHAO W C, SUN X Y, et al. Molecular cloning and characterization of violaxanthin de-epoxidase (CsVDE) in cucumber[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64383. DOI: 10.1371/journal.pone.0064383.

责任编辑: 何承刚