

任丹丹, 张普娟, 吕照清, 等. 黄花梨及其绿皮芽变绿黄花梨果实木质素、总酚含量及相关酶活性差异分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1364-1371.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.024

黄花梨及其绿皮芽变绿黄花梨果实木质素、总酚含量及相关酶活性差异分析

任丹丹¹, 张普娟^{1,2}, 吕照清¹, 李浩男¹, 乔玉山¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院果树研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了探索黄花梨及其绿皮芽变绿黄花梨在盛花后 6~10 周(WAFB)果皮色泽差异的原因, 本研究测定了黄花梨和绿黄花梨果皮果肉的木质素、总酚类含量及其 *POD*、*PPO*、*PAL*、*4CL* 和 *CAD* 活性。结果表明: 黄花梨和绿黄花梨在 8 WAFB 时果皮色泽出现差异, 且褐色逐渐加深; 在 6~10 WAFB 时黄花梨和绿黄花梨果皮果肉的木质素含量变化趋势一致、不断上升, 且黄花梨高于绿黄花梨; 黄花梨和绿黄花梨果皮果肉的总酚类含量变化趋势相似, 均表现为先降低后升高再降低的特点, 且黄花梨总体上高于绿黄花梨; 黄花梨果皮 *POD*、*PAL*、*4CL* 和 *CAD* 活性均高于绿黄花梨, 而 *PPO* 活性与绿黄花梨接近。黄花梨和绿黄花梨果皮的木质素和总酚类含量变化趋势, 与出现色泽差异的步调基本一致, 推测木质素等酚类参与了褐色果皮的形成。

关键词: 黄花梨; 绿黄花梨; 木质素; 酚类; 酶活性

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1364-08

Differences of lignin and total phenol compound content and the activities of enzymes in Huanghua pear and its mutant (*Pyrus pyrifolia* Nakai)

REN Dan-dan¹, ZHANG Pu-juan^{1,2}, LYU Zhao-qing¹, LI Hao-nan¹, QIAO Yu-shan¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Fruit Trees, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To explore the differences of skin color between Huanghua pear and its bud mutant Lühuanghua pear, and to provide an experimental basis for finding the metabolites from russet sand pear during 6–10 weeks after full blossom (WAFB), the content of lignin and total phenol compound in skin and pulp and the activities of peroxidase (*POD*), polyphenol oxidase (*PPO*), phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), 4-coumarate: coenzyme A ligase (*4CL*) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) were measured. The result showed that the 8 WAFB was the critical period of skin color changing for Huanghua pear and Lühuanghua pear, skin color changing appeared and then deepened to brown gradually. During 6–10 WAFB, the lignin content in skin and pulp was increased both in Huanghua pear and Lühuanghua pear, but Huanghua pear had a higher lignin content than Lühuanghua pear. The content of phenolic compound had similar trend in skin and pulp of Huanghua pear and Lühuanghua pear, which were decreased first, then increased and finally decreased again. The total phenol compound content in skin and pulp were higher in Huanghua pear than Lühuanghua pear. The activities of *POD*, *PAL*, *4CL* and *CAD* in skin were higher in Huanghua

收稿日期: 2017-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272140)

作者简介: 任丹丹 (1990-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 果树生物技术。(Tel) 15895995981; (E-mail) 946205028@qq.com

通讯作者: 乔玉山, (Tel) 025-84395320; (E-mail) qiaoyushan@njau.edu.cn

pear than Lühuanghua pear, and the activity of *PPO* in Huanghua pear was close to that in Lühuanghua pear. The main results showed that a significant skin color changing appeared in 8 WAFB in Huanghua pear and Lühuanghua pear. The lignin content and total phenol compound content had the same trend, which was coincident with the color changing in Huanghua pear and Lühuanghua pear. Therefore, it's proba-

ble that the lignin and total phenol compound in skin were involved in the russet color formation in sand pear.

Key words: Huanghua pear; Lühuanghua pear; lignin; phenolic compound; enzyme activities

梨(*Pyrus* spp.)在成熟时果皮的色泽一般有褐色、黄绿色(或绿色、黄色)以及红色等,褐色是其常见的类型,其果皮褐色的形成机理与红皮梨色泽不同^[1-3]。砂梨褐色果实在幼果期的颜色亦呈绿色,待发育到一定阶段,果实表面和果皮气孔(果点)周围木栓层的聚集与否及聚集多少,最终决定了果皮是绿色、褐色或者中间色^[1,4-5]。砂梨果皮的表皮由三部分组成,从外到内依次是角质层、表皮层和木栓层^[5-6]。绿皮梨的形成是由于果皮细胞内叶绿体的积累引起的,褐皮梨是由于外界压力等因素造成角质层出现微观龟裂,随后形成木栓层^[5]。除了木栓质(含量33%~50%)和蜡质(含量约5%),木栓层细胞的细胞壁结构物质还包括木质素、木酚素、单宁和其他酚醛树脂类物质等^[6-7]。木质素是一类仅存于高等植物中的复杂酚醛型聚合物,也是植物细胞壁在次生加厚过程中的主要结构物质,有对羟基苯基(H)、愈创木基(G)和紫丁香基(S)3类主要单体,另外还有3,4-二羟基苯基(C)和5-羟愈创木基(5H)2类不常见单体,其合成起始于苯丙氨酸的脱氨基作用,即苯丙烷代谢途径^[8-10]。酚类物质是所有植物体内常见的化合物,可分为简单酚类、香豆素、单宁、木酚素、酚酸、类黄酮和木质素等几大类,与黄酮类物质的功能相似,参与植物花、茎和果实的色泽形成,抗病虫害和抗逆等,也参与果实风味的形成,如糖基化黄酮类化合物的苦味、单宁化合物的涩味、查耳酮的甜味等的形成^[11-14]。

目前,一般认为梨褐皮的形成是果面木栓层积累的结果^[1,5,15]。梨褐皮形成的组织结构以及生理生化机理已有一些研究^[5-7,16-17],如通过显微观察到褐皮梨有明显的2~3层细胞壁加厚的细胞组成的木栓层,绿皮梨有明显的1~2层矩形细胞组成的角质层^[7]。褐色砂梨果皮的木质素、纤维素和半纤维素含量高于绿皮梨^[5,7]。砀山酥梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd)的褐皮芽变‘锈酥’可能是木质素的积累和相关酶活性的提高导致褐皮的形成^[16-17]。黄花梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai Huanghua)是中国南方地区较受欢迎的水果之一,属于褐皮梨,以皮薄、肉质细嫩松脆、汁液多、风味好为人们所喜爱。绿黄花梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai Lühuanghua)(暂定名)为黄花梨稳定的芽变,其果皮为绿色。黄花梨及其绿皮芽

变绿黄花梨的果皮色泽直观上存在差异,其木质素和总酚类物质含量是否也存在差异呢?本研究以这对材料为研究对象,测定了6~10 WAFB(Weeks after full blossom,即盛花后的周数)时期的砂梨果皮和果肉的木质素和总酚类物质含量的变化,旨在为砂梨褐色的形成提供一些理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

取样树为生长于南京市溧水果园的14年生黄花梨树和11年生绿黄花梨树。2016年5~6月,在盛花后6~10周,即5月13日(6 WAFB)、5月20日(7 WAFB)、5月27日(8 WAFB)、6月3日(9 WAFB)、6月10日(10 WAFB),分别取黄花梨和绿黄花梨大小一致、形状相近的果实,保存于冰盒中带回实验室,用手术刀片分离0.1~0.2 cm厚的果皮和果肉,液氮速冻后保存至-70℃的冰箱备用。测定时4个果实为1个重复,重复3次。主要仪器有CR-400便携式色差仪(Konica Minolta)、UV-2450紫外分光光度计(上海惠普有限公司生产)、Illumina HiSeq™2000测序仪、7300 Real Time PCR System。

1.2 试验方法

1.2.1 果皮颜色的测定 清洗果实表面,自然晾干后,使用CR-400便携式色差仪测定果实赤道部位果皮的 L 、 a 、 c 和 h 值。其中, L 值代表亮度, L 值越大,亮度越高; a 值代表红绿色差,正值越大,颜色越红,负值越小,颜色越绿; c 值代表纯度, c 值越大,表示果皮的颜色越纯; h 值代表色调, h 值0~180依次为紫红、红、橙、黄、黄绿、绿、蓝绿色($h=0$,紫红色; $h=90$,黄色; $h=180$,蓝绿色)。

1.2.2 木质素含量的测定 采用紫外分光光度法^[18]。改进之处是利用木质素标准品溶液制作木质素的吸光度标准方程,将平行测定结果线性回归,以木质素标准溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作图,线性关系为 $Y = 0.3069x - 0.0142$, $R^2 = 0.9993$ 。以此计算样品中木质素含量 $[(A \cdot L)/g]$ 。

1.2.3 总酚类物质的测定 采用Folin-酚法测定总酚含量^[19]。标准曲线采用没食子酸制作,将平行测

定结果线性回归,以没食子酸溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作图,线性关系为 $Y = 0.0457x + 0.1084$, $R^2 = 0.9996$ 。以此计算样品中总酚类含量 ($\mu\text{mol/g}$)。

1.2.4 酶活性测定 过氧化物酶 (POD) 活性的测定,采用愈创木酚比色法^[20];多酚氧化酶 (PPO) 活性的测定,采用比色法^[19];苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的测定,采用肉桂酸反应法^[21];辅酶 A 连接酶 (4CL) 和肉桂醇脱氢酶 (CAD) 活性的测定分别参考文献[22]和[23]。

1.2.5 数据处理 采用 Excel 软件和 SPSS 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 果皮颜色

6~10 WAFB 黄花梨和绿黄花梨果实色泽发育见图 1,从 8 WAFB 开始黄花梨果皮的果点数明显多于

绿黄花梨,且黄花梨果皮颜色与绿黄花梨果皮相比已略显褐色。这与张振铭等^[24]通过对砀山酥梨果实表皮外在差异的研究,得出果点大小、密度是褐皮(果锈)形成的主要原因的结论一致。由表 1 可知,试验观察期内,黄花梨果皮 L 值均小于同期的绿黄花梨,且 6~9 WAFB 差异显著 ($P < 0.05$),表明黄花梨果皮亮度小于绿黄花梨;黄花梨果皮 a 值均大于同期的绿黄花梨,且均达显著水平 ($P < 0.05$),表明黄花梨果皮绿色程度小于绿黄花梨,黄花梨发育至 8 WAFB 时 a 值 (-14.76 ± 1.55) 升高显著,说明此时期是黄花梨果皮出现褐色的关键期;黄花梨果皮 c 值普遍小于绿黄花梨,且 8~10 WAFB 差异显著 ($P < 0.05$),表明后期黄花梨果皮颜色纯度小于绿黄花梨,这与前述 8 WAFB 是出现褐色的关键期相吻合;两者果皮 h 值均逐渐减小,但黄花梨果皮 h 值均小于绿黄花梨,且 6~10 WAFB 差异显著 ($P < 0.05$)。观察结果与色差仪测定结果一致,8 WAFB 是果皮转色的关键期。

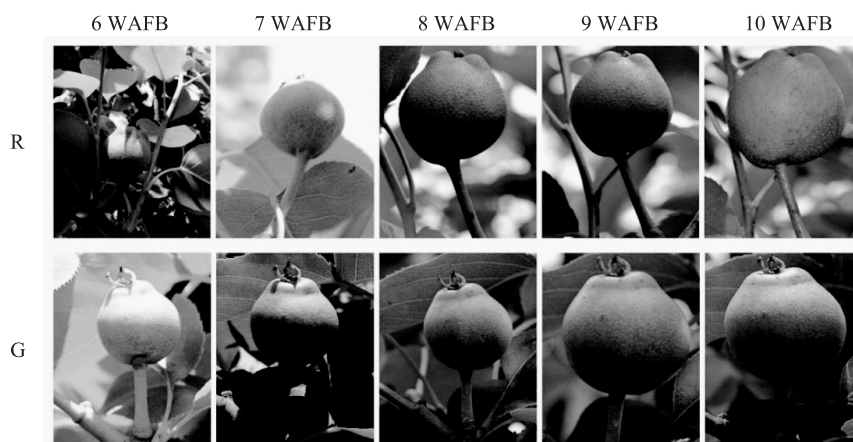


图 1 盛花后 6~10 周 (6~10 WAFB) 黄花梨 (R) 和绿黄花梨 (G) 果实发育过程色泽变化

Fig.1 The color changing during fruit development of Huanghua pear (R) and Lühuanghua pear (G) in 6-10 weeks after full blossom (WAFB)

2.2 黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉中木质素含量

转色关键期前后黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉的木质素含量变化趋势一致,在取样期内总体呈上升趋势,且果皮的木质素含量均高于果肉,大体是果肉的 2 倍,如 6 WAFB 黄花梨果皮的木质素含量是 $38.22 (\text{A} \cdot \text{L})/\text{g}$,果肉是 $19.21 (\text{A} \cdot \text{L})/\text{g}$;黄花梨果皮和果肉的木质素含量均高于同期的绿黄花梨(图 2)。8 WAFB 后,黄花梨果皮的木质素含量增长速度较绿黄花梨快,这与 8 WAFB 后黄花梨果皮褐色较绿黄花梨逐渐加重相一致。褐皮中可能含有大量的木

质素,这与李建花等^[25]报道的金冠苹果的果锈形成相似,暗示着黄花梨褐皮形成期间,果皮组织次生细胞细胞壁加厚,柔韧性和延展性下降,脆度上升,在受到内部细胞压力时,细胞容易崩裂、破裂,这可能是导致其褐皮形成的重要机制。果肉的木质素大部分来源于石细胞,而果皮的木质素主要源自木栓层细胞,褐色果皮内的木质素含量高于绿色果皮^[15,26]。随着果实的逐渐膨大,果皮木栓层细胞和果肉中的石细胞越来越多,其中木质素含量上升^[26],这与本试验结果一致。

表 1 盛花后 6~10 周黄花梨 (R) 和绿黄花梨 (G) 果皮转色期果皮着色情况

Table 1 Fruit skin coloration of Huanghua pear (R) and Lühuanghua pear (G) in 6-10 WAFB

时间(盛花后周数)	样品	L 值	a 值	c 值	h 值
6	R	50.16±1.361e	-15.71±0.99cd	40.07±1.51e	113.07±0.75e
	G	56.73±0.25b	-20.72±0.18g	47.73±1.26a	115.75±0.97a
7	R	53.93±0.23d	-16.97±0.79de	43.75±1.09cd	112.82±0.53e
	G	55.31±0.20c	-19.16±0.70fg	44.28±0.81c	115.63±0.51a
8	R	53.93±0.72d	-14.76±1.55bc	41.74±1.65de	110.69±1.42d
	G	56.61±0.32b	-19.18±0.54fg	45.42±0.07bc	114.98±0.77ab
9	R	53.66±0.77d	-12.78±1.91a	41.78±1.68de	107.77±2.09e
	G	57.36±0.25b	-18.21±0.58ef	45.39±0.89bc	113.65±0.53bc
10	R	58.63±0.34a	-13.18±0.69ab	42.17±0.42de	108.21±0.88e
	G	59.27±0.34a	-17.90±1.18ef	46.47±1.14ab	112.65±1.00c

R:黄花梨;G:绿黄花梨。表中同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

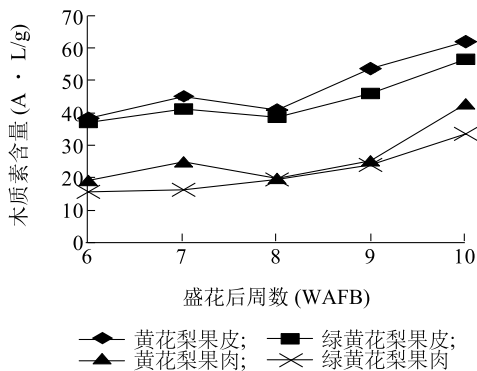
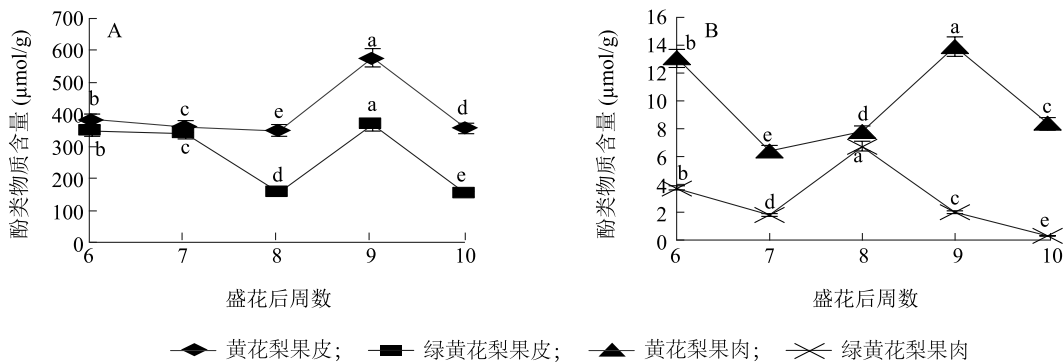


图 2 盛花后 6~10 周黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉中木质素含量

Fig.2 The lignin content in fruit skin and pulp of Huanghua pear and Lühuanghua pear in 6-10 WAFB

2.3 黄花梨和绿黄花梨梨果皮和果肉中总酚类物质含量

黄花梨和绿黄花梨果皮的总酚类物质含量变化趋势基本一致,均表现为先降低后升高再降低,两者果皮的总酚类物质含量均在 9 WAFB 时达到高峰,此时黄花梨总酚类物质含量是 575.11 $\mu\text{mol/g}$,绿黄花梨含量是 367.47 $\mu\text{mol/g}$,且黄花梨和绿黄花梨总酚类物质含量均是果皮高于果肉。无论是果皮还是果肉,黄花总酚类物质含量均高于同期的绿黄花梨(图 3A、图 3B),与张智涛等^[27]的研究结果一致。黄花梨果皮总酚类物质含量在果皮转色关键期(8 WAFB)较低,而此时果皮中木质素的含量不断上升,说明在果皮转色期,黄花梨内总酚类物质含量的降低,可能是转化成了木质素合成的前体物质,促使木质素含量快速增加,而木质素可能参与了褐色木栓组织的形成^[28]。



A:果皮;B:果肉。

图 3 盛花后 6~10 周黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉中总酚类物质含量

Fig.3 The total phenol content in fruit skin and pulp of Huanghua pear and Lühuanghua pear in 6-10 WAFB

2.4 黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉中 *POD*、*PPO*、*PAL*、*4CL* 和 *CAD* 活性差异

转色关键期前后,黄花梨和绿黄花梨果皮和果肉中 *POD*、*PPO*、*PAL*、*4CL* 和 *CAD* 活性测定结果如图 4。在 7~9 WAFB,黄花梨果皮中 *POD* 活性明显高于绿黄花梨(图 4A);在 6 WAFB 绿黄花梨果皮中 *PPO* 活性虽高于黄花梨,但整体上活性大小与绿黄花梨接近(图 4C);黄花梨果皮中 *PAL* 活性在 6~9 WAFB 高于绿黄花梨,且与绿黄花梨变化趋势相反(图 4E);在 6~7 WAFB,黄花梨果皮中 *4CL* 活性远高于绿黄花梨(图 4G);在 6~7 WAFB 期间黄花梨果皮中 *CAD* 活性高于绿黄花梨,之后两者酶活性差异减小(图 4I)。黄花梨果肉中 *POD* 活性在 7~8 WAFB 低于绿黄花梨,其他时期高于绿黄花梨(图 4B);黄花梨果肉中 *PPO* 活性在 6~7 WAFB 高于绿黄花梨,而后在 8~10 WAFB 低于绿黄花梨(图 4D);黄花梨果肉中的 *PAL* 活性高于绿黄花梨,且与绿黄花梨变化趋势不同(图 4F);黄花梨果肉中 *4CL* 活性在 6 WAFB 先高于绿黄花梨,随后绿黄花梨持续增高,至 10 WAFB 是黄花梨的 4 倍(图 4H);黄花梨果肉中 *CAD* 活性整体上低于绿黄花梨(图 4J)。

PAL 和 *4CL* 参与苯丙烷途径合成木质素单体,抑制其活性可使木质素含量降低,同时 *PAL* 和 *4CL* 也是多酚类前体物质生物合成的关键酶;*CAD* 催化木质素单体合成的最后一步;*POD* 主要参与木质素单体的氧化聚合,使植物组织内所含有的 $C_6 \sim C_8$ 化合物转化为木质素而增强组织木质化程度,也参与催化酚类物质等氧化而使果皮变色;*PPO* 参与催化的香豆酸向咖啡酸的转化是木质素合成的必要前提^[26,29-30]。从图 4E 和 4G 看,黄花梨果皮中与木质素和酚类物质合成相关的 *PAL* 和 *4CL* 活性均较大且均高于绿黄花梨,推测这是黄花梨合成的木质素和总酚类物质高于绿黄花梨的原因(图 2、图 3)。

3 讨论

黄花梨果皮在 8 WAFB 初显褐色且果点明显比绿黄花梨大,经色差仪测定,黄花梨在 8 WAFB 果皮的 a 值较 7 WAFB 和 9 WAFB 差异显著,且与同期的绿黄花梨果皮相比也差异显著,表明 8 WAFB 是果皮转色的关键期,这比长十郎果皮显褐色稍晚,品种间存在差异^[1]。代谢产物的测定作为研究功能基因的有效手段,可以放大基因表达的变化,从而可

以在基因型和表现型之间的相关性研究中建立一座桥梁。通过显微结构观察和傅里叶变换红外光谱学(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)的方法,分析了褐皮砂梨和绿皮砂梨组织的结构和生物化学组分,结果是二者光谱吸收范围相同,但吸收峰面积差异较大,褐色果皮主要的组成成分是木质素、纤维素和半纤维素,绿色果皮的主要组成成分是角质层的长链脂肪酸和果胶多糖,且褐皮梨的木质素、纤维素和半纤维素物质含量均显著高于绿皮梨^[7,17]。这与本试验中黄花梨果皮的木质素含量高于绿黄花梨的结果一致。植物角质层、皮孔、木栓层、木栓形成层和栓内层等的形成与酚类物质代谢相关,且一些特定酚类物质是木质素合成的前体^[31]。由于酚类物质的氧化和黄酮类物质的降解,许多果实在发育过程中可能要经历几次颜色变化^[14]。褐色果皮的总酚类物质在果皮褐色开始显现(8 WAFB)时降低,其果皮的总酚类物质的含量达到最低值,而此时果皮的木质素含量开始上升,推测果皮显出褐色后,这类特殊的酚类物质在 *PPO* 作用下酶促氧化,转化成了参与褐皮形成的木质素^[14,28]。

一般来说木质素的最终含量是长期积累而形成,相关酶活性的降低也并不会降解已形成的木质素^[29]。如 6 WAFB 时黄花梨果皮中 *POD* 活性虽然相对较低,但此时期果皮的木质素含量开始升高,是由于高活性 *PAL* 已通过苯丙烷类代谢积累了大量的木质素单体,在随后而来的高活性 *POD* 作用下,木质素单体聚合形成木质素。本试验中,黄花梨果皮中 *PPO* 活性大小与绿黄花接近,不过这并不排除 *PPO* 在木质素合成中的作用,因为木质素合成过程中酶和底物是缺一不可的^[29]。*PAL* 催化苯丙氨酸脱氨基生成肉桂酸,肉桂酸在肉桂酸-4-羟基化酶等一系列酶的催化下生成其羟基衍生物或甲氧基衍生物,随后这些物质在 *4CL* 催化下生成相应的辅酶 A 酯,而这些活性形式的硫酸酯辅酶 A 是后续各分支途径合成如木质素和酚酸类化合物的直接前体^[32]。本试验结果表明,转色关键期前后的褐色果皮中 *4CL* 活性高于绿色果皮,和褐皮梨的木质素含量高于绿皮梨吻合。*CAD* 是苯丙烷类代谢途径中催化木质素单体合成的最后一步,催化多种不同的肉桂醛(香豆醛、芥子醛、松柏醛等)还原成相应的肉桂醇(香豆醇、芥子醇、松柏醇等)^[33]。在玉米和高粱

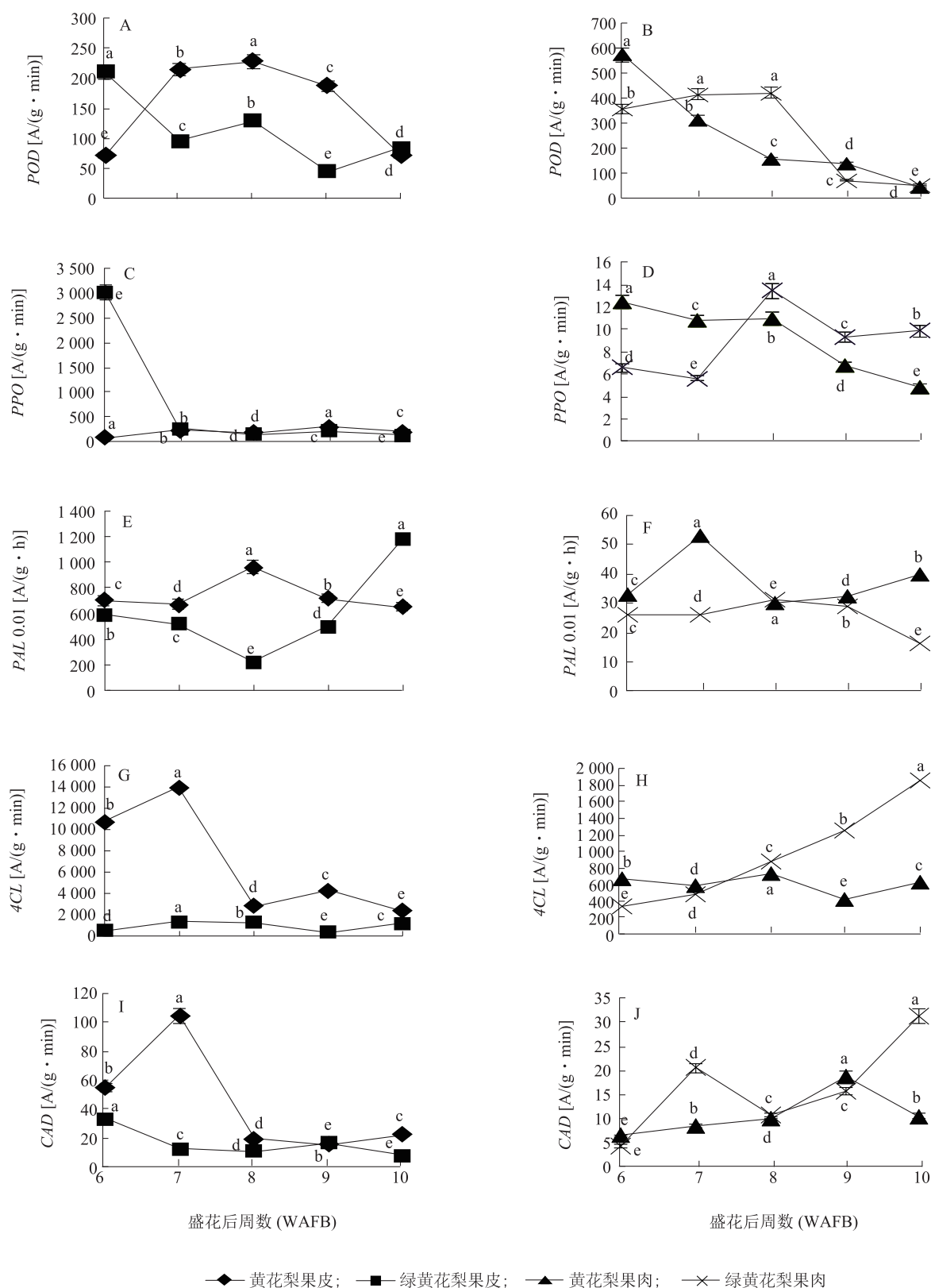


图4 盛花后6~10周黄花和绿黄花梨果皮和果肉中5种酶活性的变化

Fig.4 The activity of five enzymes in fruit skin and pulp of Huanghua pear and Lühuanghua pear in 6-10 WAFB

研究中发现, *CAD* 活性降低会引起木质素减少^[34]。本试验黄花梨果皮中 *CAD* 在 8~10 WAFB 活性减小, 但木质素含量仍增加。由于木质素生物合成过程步骤繁多、影响因素复杂, 故不能将黄花梨及其绿皮芽变绿黄花梨果皮中木质素等酚类含量与酶活性变化归纳为简单的线性关系, 可能是存在其他酶类(如 *PAL*)或非酶类物质的参与和调节^[16]。结合前人对梨果皮色泽相关的研究结果, 在黄花梨褐色果皮内除了果皮木质素等酚类物质含量高于绿黄花梨, 其木栓层内的木栓质含量也高于绿黄花梨^[4, 15]。因此, 木质素等酚类物质的积累可能只是影响黄花梨果皮褐色产生的诸多原因之一, 具体机制需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 滕元文, 沈玉英, 周先章. 砂梨果皮锈斑成因及解决对策[J]. 中国南方果树, 2005, 34(3): 52-56.
- [2] DUSSI M C, SUGAR D, WROLSTAD R E. Characterizing and quantifying anthocyanins in red pears and effect of light quality on fruit color[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1995, 120(5): 785-789.
- [3] 薛华柏, 王芳芳, 杨健, 等. 红皮梨研究进展[J]. 果树学报, 2016, 33(S1): 24-33.
- [4] 李浩男, 王宏, 贾晓东, 等. ‘黄花’及其芽变‘绿黄花’梨成熟果皮代谢物鉴定与比较分析[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1118-1127.
- [5] WANG Y Z, ZHANG S J, DAI M S, et al. A review for the molecular research of russet/semi-russet of sand pear exocarp and their genetic characters[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 210: 138-142.
- [6] WANG Y Z, DAI M S, ZHANG S J, et al. Exploring candidate genes for pericarp russet pigmentation of sand pear (*Pyrus pyrifolia*) via RNA-Seq data in two genotypes contrasting for pericarp color[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e83675.
- [7] WANG Y Z, ZHANG S, DAI M S, et al. Pigmentation in sand pear (*Pyrus pyrifolia*) fruit: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis with exocarp pigmentation mutant[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 85: 123-134.
- [8] QIAO Z. Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(8): 713-721.
- [9] 张晓燕, 赵广杰, 刘志军, 等. 木质生物质的生物分解及生物转化研究进展[J]. 林业科学, 2006, 42(3): 85-91.
- [10] VOXEUR A, WANG Y, SIBOUT R. Lignification: different mechanism for a versatile polymer[J]. Plant Biology, 2015, 23: 83-90.
- [11] KHODDAMI A, WILKES M A, ROBERTS T H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds[J]. Molecules, 2013, 18(2): 2328-2375.
- [12] RANDHIR R, LIN Y T, SHETTY K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2004, 13(3): 295-307.
- [13] SANTOS-BUELGA C, GONZALEZ-MANZANO S, DUENAS M, et al. Extraction and isolation of phenolic compounds[J]. Natural Products Isolation, 2012, 864: 427-464.
- [14] SOTO-VACA A, GUTIERREZ A, LOSSO J N, et al. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(27): 6658-6677.
- [15] 王新卫. 黄花梨及其绿皮芽变果皮发育特性和差异表达基因的克隆与功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [16] 李晓峰, 李雪, 贾兵, 等. ‘砀山酥梨’褐皮芽变木质素含量及相关酶活性与 *CCoAOMT* 表达量分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(5): 828-836.
- [17] HENG W, LIU L, WANG M D, et al. Differentially expressed genes related to the formation of russet fruit skin in a mutant of ‘Dangshansuli’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd) determined by suppression subtractive hybridization[J]. Euphytica, 2014, 196(2): 285-297.
- [18] 李靖, 程舟, 杨晓伶, 等. 紫外分光光度法测定微量人参木质素的含量[J]. 中药材, 2006, 29(3): 239-241.
- [19] 张志良, 吴光耀. 植物生理生化技术和方法[M]. 北京: 北京农业出版社, 1986.
- [20] 杨晓玲, 于凤鸣, 郭守华. 植物生理生化实验[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002.
- [21] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [22] KNOBLOCK K H, HAHNBROCK K. Isoenzymes of *p*-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of glycine max[J]. European Journal of Biochemistry, 1975, 52(2): 311-320.
- [23] GOFFNER D, JOFFROY I, GRIMA-PETTENATI J, et al. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from eucalyptus xylem[J]. Planta, 1992, 188(1): 48-53.
- [24] 张振铭, 张绍铃, 乔勇进, 等. 不同果袋对砀山酥梨果实品质的影响[J]. 果树学报, 2006, 23(4): 510-514.
- [25] 李建花, 高晶晶, 冯新新, 等. ‘金冠’苹果与其无锈芽变的果皮性状比较和防锈技术研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(1): 35-43.
- [26] TAO S T, KHANIZADEH S, ZHANG H, et al. Anatomy, ultra-

- structure and lignin distribution of stone cells in two pyrus species [J]. Plant Science, 2009, 176(3): 413-419.
- [27] 张智涛,张立彬,于凤鸣,等. 大果水晶梨与其褐色突变体多酚氧化酶及过氧化物酶同工酶差异[J]. 河北科技师范学院学报,2011,25(2):31-33.
- [28] QUEIROZ C, MENDES LOPES M L, FIALHO E, et al. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control [J]. Food Reviews International, 2008, 24(4): 361-375.
- [29] 陶书田,张绍铃,乔勇进,等. 梨果实发育过程中石细胞及几种相关酶活性变化的研究[J]. 果树学报,2004,21(6):516-520.
- [30] 薛应钰,师桂英,徐秉良,等. 美洲南瓜 (*Cucurbita pepo*) 种皮发育形态观察及其相关酶活性测定[J]. 草业学报,2011,20(2): 23-30.
- [31] 丛 斌,杨茂成,栗 波,等. 小麦根尖细胞分化过程中木质素合成及其相关酶的活性变化[J]. 复旦学报,1997,36(5):550-554.
- [32] 赵淑娟,刘 涤,胡之璧. 植物 4-香豆酸:辅酶 A 连接酶[J]. 植物生理学通讯,2006,42(3):529-538.
- [33] SIBOUT R, EUDES A, MOUILLE G, et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2005, 17(7): 2059-2076.
- [34] VEMERRIS W, SHEMAN D M, MCLNTYRE L M. Phenotypic plasticity in cell walls of maize brown midrib mutants is limited by lignin composition[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(9): 2479-2490.

(责任编辑:陈海霞)