

严娟, 宋志忠, 蔡志翔, 等. 3种果肉颜色桃原花青素积累[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(3) : 651-656.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.025

3种果肉颜色桃原花青素积累

严娟, 宋志忠, 蔡志翔, 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮

(江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 以瑞光19号(白肉)、浙金3号(黄肉)、红肉大红袍(*DBF*-基因型, 红肉)桃果实为试验材料, 研究了3种果肉颜色的桃原花青素积累动态及其机制。结果表明, 在果实发育过程中, 3种不同肉色的桃原花青素含量和积累趋势差异明显。白肉桃和黄肉桃中原花青素积累都伴随着果实成熟而降低; *DBF*-基因型红肉桃则恰好相反, 含量随果实发育急剧升高, 成熟时达到最高。无色花青素还原酶(*LAR*)、花青素还原酶(*ANR*)的酶活力及其编码基因在转录水平的表达量, 分别在3种肉色桃中与原花青素积累趋势一致; 在白肉桃和黄肉桃中, *LAR*与原花青素的积累更为密切; 而在红肉桃中, *ANR*与原花青素的积累更为密切。

关键词: 桃; 肉色; 原花青素; *LAR*酶; *ANR*酶

中图分类号: S662.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)03-0651-06

Proanthocyanidin accumulation in peach fruit with three types of flesh color

YAN Juan, SONG Zhi-zhong, CAI Zhi-xiang, SHEN Zhi-jun, MA Rui-juan, YU Ming-liang

(Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: Three types of peach cultivars ‘Ruiguang19hao’ (white-flesh), ‘Zhejin3hao’ (yellow-flesh) and ‘Hongroudahongpao’ (blood-flesh) were researched to understand the characteristics and mechanisms of proanthocyanidin accumulation. During the stages of fruit development, proanthocyanidin concentrations and accumulation significantly differed among the peaches with three kinds of flesh color. The accumulation of proanthocyanidin in white-flesh and yellow-flesh peach decreased with fruit maturation. However, the proanthocyanidin accumulation of the blood-flesh peach rapidly increased with fruit development and reached maximum at maturation. In addition, the activities of leucoanthocyanidin reductase (*LAR*) and anthocyanidin reductase (*ANR*) and the relative expression of their coding genes at transcriptional level were consistent with the accumulation of proanthocyanidin in each type of flesh color. The activities of *LAR* were closely related to proanthocyanidin accumulation in white and yellow-flesh peaches. In blood-flesh peach, *ANR* was closely related to proanthocyanidin accumulation.

Key words: peach; flesh color; proanthocyanidin; leucoanthocyanidin reductase; anthocyanidin reductase

原花青素广泛存在于植物树干、叶、花、果和种子中, 对植物的生长发育和人体动物健康均有重要

作用^[1-2]。通过对拟南芥、西班牙三叶草和葡萄等几个模式植物的研究, 原花青素合成机制已经比较明晰^[3]。从苯丙烷途径开始, 通过无色花青素还原酶(Leucoanthocyanidin reductase, *LAR*)和花青素还原酶(Anthocyanidin reductase, *ANR*)2个途径形成原花青素, 因此 *LAR* 和 *ANR* 是直接调控原花青素单体以及聚合结构单元形成的关键酶基因。

收稿日期: 2017-09-05

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5014]; 国家自然科学基金项目(31471848)

作者简介: 严娟(1983-), 女, 四川内江人, 博士, 副研究员。从事桃种质资源研究。(E-mail) yanjuanjaas@aliyun.com

原花青素在果品中含量极为丰富,其生理作用显得尤为突出^[1]。一是可为果树防御生物及非生物伤害,保证其生长发育和产量;二是与果实品质和风味密切相关,赋予鲜食果品果肉以及果汁、葡萄酒等加工产品独特的口感;三是原花青素还是影响果品与葡萄酒等储藏期的关键因素之一;四是相较于果品中维生素和花色苷等有益成分,其具有更高的抗氧化能力,为人类抵御各种疾病。因此,原花青素现已成为研究与培育富含有益成分果品的重要指标。

桃[*Prunus persica* (L.) Batsch]是全球重要的蔷薇科果树,栽培广泛,生产中心国包括中国、意大利、西班牙和美国等。桃种质资源丰富,果实按肉色主要分为白肉桃、黄肉桃、红肉桃(包括 *b/bf*-基因型和 *DBF*-基因型)3 种类型^[4]。桃果实富含抗氧化成分,与可可、葡萄酒、茶及苹果、草莓等一样,桃,特别是 *DBF*-基因型红肉桃果实中原花青素含量丰富,鲜果中总含量约为 90~700 mg/kg^[5],现已分离出儿茶素和表儿茶素单体以及各种低聚和高聚产物,对其中主要成分作了定性定量分析^[6-7]。桃果实中原花青素随发育期的积累和代谢机理的相关报道甚少,且相关研究均是以白肉桃为材料^[8-10],红肉桃和黄肉桃相关研究尚未涉及,*LAR* 和 *ANR* 等关键酶的酶学特性亦未见报道。

作者在前期研究中发现,白、黄、红 3 种肉色桃成熟果肉中的原花青素单体儿茶素和表儿茶素含量存在显著差异^[11]。因此,本研究将以瑞光 19 号(白肉)、浙金 3 号(黄肉)、红肉大红袍(*DBF*-基因型,红肉)为材料,进行 3 种果肉颜色的桃原花青素积累动态的生理数据采集,测定调控原花青素合成的关键酶 *LAR* 和 *ANR* 的酶活力;克隆关键酶编码基因(*LAR*、*ANR*),并分析其在果实发育过程中的表达。旨在从生理、生化(酶)和转录水平解析不同肉色桃原花青素积累动态及其机制,为探讨桃原花青素合成机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及取样

本研究材料瑞光 19 号(白肉)、浙金 3 号(黄肉)、红肉大红袍(*DBF*-基因型,红肉)均取自国家果树种质南京桃资源圃,按照常规栽培方法种植,统一田间管理。每个品种从盛花后 30 d 开始,每隔 7 d 取 1 次样品,每次分别取 18 个果,分为 3 组,称量每

个果实大小,快速削皮,果肉切碎混合液氮冻存。参照 Lombardo 等^[12]的方法,根据每个品种每个发育期的果实大小平均值拟合各桃品种发育的 S 曲线(图 1),确定各品种的果实发育阶段和样品点(表 1)。

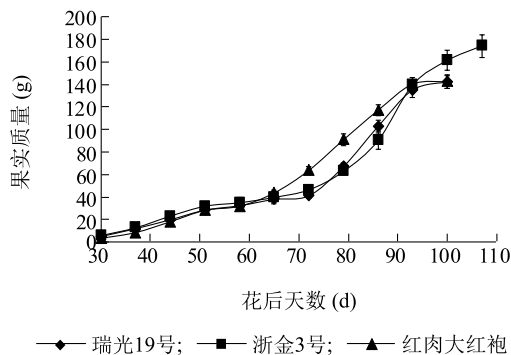


图 1 桃果实发育曲线图

Fig.1 The growth curve of peach fruit

表 1 桃果实发育期采样点

Table 1 Sampling points of peach fruit during fruit development period

品种	果实发育期 (d)				
	S1	S2	S3	S4	H
瑞光 19 号	30	58	79	93	100
浙金 3 号	30	58	86	100	107
红肉大红袍	30	58	79	93	100

S1、S2、S3、S4、H 分别表示果实发育天数。

1.2 原花青素的提取与测定

将适量样品烘干至恒质量,粉碎,过 40 目筛之后,称取约 0.05 g,加入 1.25 ml 60%乙醇提取液,用超声提取法进行提取,超声功率 300 W,破碎 5 s,间歇 8 s,提取 30 min, 12 000 r/min, 25 ℃,离心 10 min,取上清液,用提取液定容至 1.25 ml,待测。吸取 40 μl 待测液和 160 μl 工作液(工作液试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司),混匀,30 ℃水浴 30 min,在酶标仪(Berthold TriStar LB941,德国)上进行 500 nm 单波长测定。以 40 μl 待测液和 160 μl H₂O 的混合液为对照。原花青素含量单位为 mg/g(干质量,DW),计算公式如下:

标准曲线: $Y = 0.0194x + 0.0006$, $R^2 = 0.999$

原花青素含量 = $\frac{A_{500} - 0.0006}{0.0194} \times 5.0 \times 2.5 / \text{样品质量} \times 10^{-3} = 0.6450 \times (A_{500} - 0.0006) / \text{样品质量}$

1.3 ANR 和 LAR 的提取和酶活力测定

取 1 g 果肉加入等量的 PVPP,液氮研磨后加入 pH7.4 的 PBS 缓冲液 4 ℃ 离心,上清液即为粗酶液。参考 Xie 等^[13]和杨琴等^[14]的方法,并作一定修改。200 μl 反应体系包括 0.1 mol/L 的柠檬酸磷酸缓冲盐(pH6.5)、粗酶液、反应底物[其中无色花青素还原酶的反应底物为二氢斛皮素(0.6 mol/L),花青素还原酶的反应底物为矢车菊素(0.6 mmol/L)]、辅酶 NADPH (2 mmol/L) 和 pH7.0 的 Tris · HCl 缓冲液(0.1 mol/L),于 40 ℃ 下分别反应 30 min,10 倍体积乙酸乙酯终止反应,经萃取浓缩后,甲醇定容至 0.5 ml。在酶标仪(Berthold TriStar LB941,德国)上进行 280 nm 单波长测定。利用原花青素标准品做标准曲线计算相对酶活力,单位为 mg/g(鲜质量,FW),试验重复 3 次。

1.4 果肉总 RNA 的提取和荧光定量 PCR

果肉总 RNA 提取利用 EASYapin Plus Plant

RNA Kit 试剂盒(钟鼎,RK16-20T),提取步骤按照试剂盒说明书进行,总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳以及紫外分光光度计检测纯度合格后备用。第一链 cDNA 合成采用 AMV First Strand cDNA 合成试剂盒(钟鼎,PC01-50T),方法参考说明书,反应条件设置:25 ℃ 10 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min。荧光定量 RT-PCR 引物和内参基因参考 Daniela 等^[9]和 Tong 等^[15]的研究。引物序列(表 2)委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。荧光定量 RT-PCR 在 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪中进行,利用 HiScript QRT SuperMix 同引物(正反向引物各 0.4 μl)和 cDNA 模板(2 μl)配置 20 μl 反应体系,设置 3 次重复。荧光定量 RT-PCR 扩增条件设置:扩增程序为 94 ℃ 30 s;94 ℃ 20 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s 循环 45 次,72 ℃ 单点检测信号。溶解程序为:95 ℃ 0 s,60 ℃ 15 s,95 ℃ 0 s,连续检测信号。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行相对定量分析。

表 2 荧光定量 PCR 扩增引物

Table 2 Primers of real-time quantitative PCR

基因	序列号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
ANR	AM288300	ACTTCAAGGCTAAGGGGCTGCTG	CCAAGCCAGATAAACGCCAATCAC
LAR	AJ872926	CATCCACGGGGAAATTCACCTG	ACCCCTCCAGAGTTACCATCACTGA
Actin	TC1223	GTTATCTTCATCGGGCTCTTCG	CTTCACCATTCCAGTTCCATTGTC

2 结果与分析

2.1 桃果实发育过程中果肉原花青素的积累变化

桃果肉原花青素含量随果实发育的积累变化见图 2。3 个桃品种原花青素含量差异很大,在发育过程中含量分布分别为 0.22~0.53 mg/g, DW、0.14~0.34 mg/g, DW 和 0.10~0.90 mg/g, DW;原花青素积累变化趋势差异明显。瑞光 19 号含量变化趋势呈倒 V 形,初期较低,在 S4 时期急剧积累($P<0.01$),达到 0.53 mg/g, DW,在成熟时又快速下降,含量为 0.22 mg/g, DW。浙金 3 号初期含量最高,为 0.34 mg/g, DW,S2 到 S3 时期快速降低($P<0.01$),在果实发育的后期含量趋于平稳,成熟时含量为 0.15 mg/g, DW。红肉大红袍的原花青素含量在果实发育前期均处于很低的水平,甚至在 S2 时期明显下降,但随着果实发育,其含量急剧增加,成熟时达到最高,高

达 0.90 mg/g, DW。在 S1 时期,原花青素含量表现为浙金 3 号>瑞光 19 号>红肉大红袍,其中浙金 3 号是红肉大红袍的 2 倍($P<0.01$);到了 H 时期,原花青素含量则为红肉大红袍>瑞光 19 号>浙金 3 号,红肉大红袍是瑞光 19 号和浙金 3 号的 5 倍($P<0.01$)。

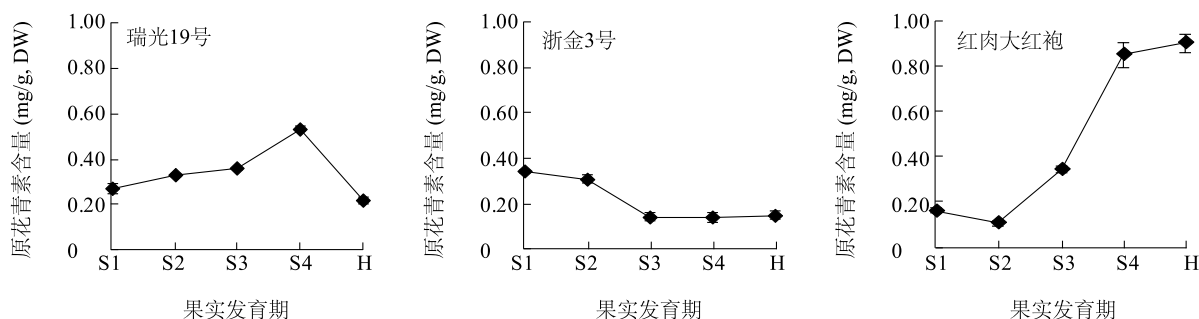
2.2 桃果实发育过程中 LAR 和 ANR 的酶活力

LAR 和 ANR 随桃果实发育的酶活力变化见图 3。同一桃品种中 LAR 和 ANR 的酶活力大小有差异,但变化趋势基本一致;而 3 个桃品种之间 LAR 和 ANR 酶活力变化趋势差异明显,在发育不同时期活力差异大。

瑞光 19 号 LAR 和 ANR 的酶活力变化趋势较一致,均是在 S1 至 S3 时期升高($P<0.05$),在 S4 时期急剧升高($P<0.01$),然后急剧下降($P<0.01$);但 LAR 的酶活力(0.28~0.74 mg/g, FW)在各个发育阶段均略高于 ANR (0.11~0.61 mg/g, FW)。浙金

3 号 *LAR* 和 *ANR* 的酶活力 ($0.20 \sim 0.43$ mg/g, FW 和 $0.15 \sim 0.46$ mg/g, FW) 和变化趋势均基本相同, 表现为随着果实发育逐渐降低, H 时期达到最低 ($P < 0.01$)。红肉大红袍 *LAR* 和 *ANR* 的酶活力分别为 $0.17 \sim 0.36$ mg/g, FW 和 $0.12 \sim 0.80$ mg/g, FW, 除了 S1 和 S2 时期 *LAR* 酶活力略高于 *ANR* 外, 其他

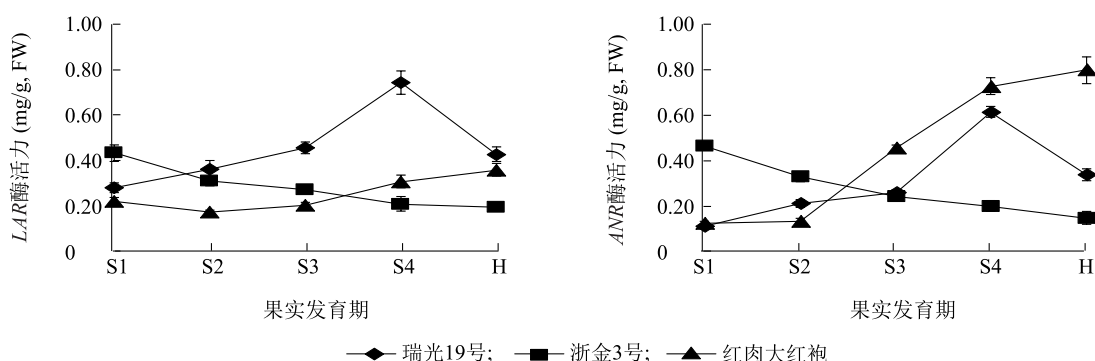
时期, 特别是果实成熟期, *ANR* 酶活力远远大于 *LAR*; 2 个酶的酶活力变化趋势也有轻微差异, *LAR* 酶活力在 S1 至 S3 时期没有显著差异, 在 S4 和 H 时期则显著升高 ($0.01 < P < 0.05$); *ANR* 酶活力在 S1 至 S2 时期没有显著差异, 从 S3 时期开始显著增强 ($P < 0.01$)。



S1, S2, S3, S4, H 见表 1。

图 2 桃果肉中原花青素含量变化

Fig.2 The changes of proanthocyanidin content in flesh of peach



S1, S2, S3, S4, H 见表 1。

图 3 桃果实发育过程中 *LAR* 和 *ANR* 酶活力

Fig.3 The activities of *LAR* and *ANR* during fruit development period

在 S1 时期, *LAR* 的活性表现为浙金 3 号 > 瑞光 19 号 > 红肉大红袍, 其中浙金 3 号是红肉大红袍的 2.0 倍; 到了 H 时期, *LAR* 的活力则为瑞光 19 号 > 红肉大红袍 > 浙金 3 号。 *ANR* 的活力和 *LAR* 相似, 即在 S1 时期, *ANR* 的活力为浙金 3 号 > 瑞光 19 号 > 红肉大红袍, 浙金 3 号的 *ANR* 酶活力是瑞光 19 号和红肉大红袍的 5.0 倍; 到了 H 时期, *ANR* 的活力则为红肉大红袍 > 瑞光 19 号 > 浙金 3 号, 红肉大红袍是瑞光 19 号的 2.5 倍、浙金 3 号的 7.0 倍。

2.3 桃果实发育过程中 *LAR* 和 *ANR* 的基因表达

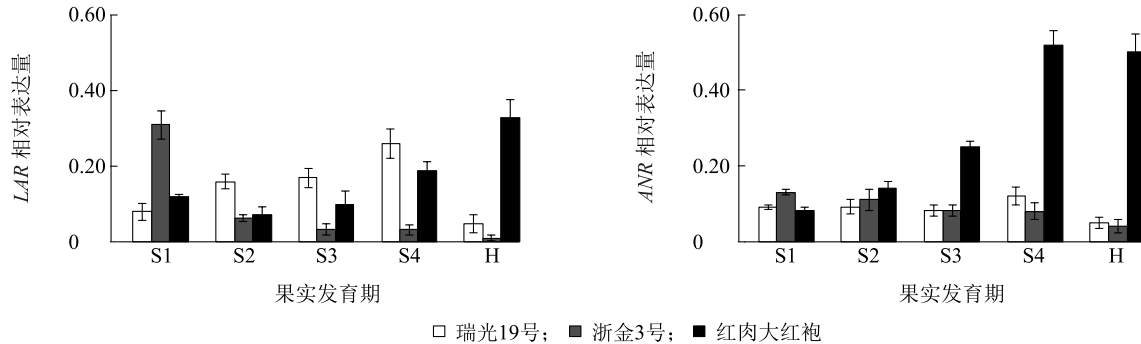
定量 PCR 结果见图 4。结果表明同一桃品种中 *LAR* 和 *ANR* 基因在转录水平的表达量有差异, 但变化趋势基本一致。瑞光 19 号 *LAR* 和 *ANR* 表达量均

是在 S4 时期达到最高 ($P < 0.05$), 然后在 H 时期急剧下降 ($P < 0.01$)。浙金 3 号 *LAR* 基因在转录水平的表达量在 S1 时期最高, 并在 S2 时间急剧降低 ($P < 0.01$), 之后, 随着果实发育变化不显著; 然而, *ANR* 基因在 S1 至 S4 各时期的表达量没有显著差异, 但显著高于 H 时期 ($P < 0.05$)。红肉大红袍 *LAR* 和 *ANR* 表达量变化趋势有轻微差异, *LAR* 基因在 S1 至 S3 时期的表达水平没有显著差异 ($P > 0.05$), 但从 S4 时期开始至 H 时期则显著升高 ($P < 0.01$); *ANR* 基因的表达水平则随着果实不同发育时期而显著升高, 在 S4 时期达到最高水平 ($P < 0.01$)。

3 个桃品种之间 *LAR* 和 *ANR* 表达量变化趋势差异明显, 在发育不同时期表达量差异大。在 S1 时

期,*LAR* 基因在转录水平的表达量由高到低依次为浙金 3 号>红肉大红袍>瑞光 19 号,其中浙金 3 号 *LAR* 的表达量是红肉大红袍和瑞光 19 号的 2 倍 ($P<0.01$);而在 H 期,*LAR* 的表达量由高到低依次为红肉大红袍>瑞光 19 号>浙金 3 号。然而,*ANR*

的表达量在 S1 时期表现为浙金 3 号>瑞光 19 号>红肉大红袍,但到 H 时期,则恰好相反,表现为红肉大红袍>瑞光 19 号>浙金 3 号,其中红肉大红袍的 *ANR* 表达量约为瑞光 19 号和浙金 3 号的 10 倍 ($P<0.01$)。



S1、S2、S3、S4、H 见表 1。

图 4 桃果实发育过程中 *LAR* 和 *ANR* 基因表达

Fig.4 Relative expression of *LAR* and *ANR* during fruit development period

3 讨论

原花青素的相关研究在其他果品中已非常深入和广泛,如葡萄^[16]、柿子^[17]、苹果^[18]、草莓^[19]、杏^[20]、黑莓^[21]等,相关报道涉及原花青素在果实中的组成和随发育期的含量变化,各种栽培措施、激素和贮藏条件对其组分的影响,生物合成关键酶 *LAR* 和 *ANR* 的酶学特性和基因表达、以及功能验证等。相较而言,桃果实中原花青素随发育期的积累以及代谢机理研究报道鲜少,特别是关于红肉或黄肉桃果实中原花青素的积累尚未报道。

在前人研究中,白肉桃晚蜜随着果实成熟,原花青素总量逐渐降低^[8];白肉桃 Stark Red Gold 和 Baifeng 的原花青素总量随着果实发育先积累,随后又逐渐下降^[9-10]。本研究以 3 种肉色桃果实为试验材料,发现原花青素在不同肉色桃的果实发育过程中积累趋势完全不同。在白肉桃中表现为先升高后降低,在黄肉桃中表现为逐渐下降,说明在所试验的白肉桃和黄肉桃中原花青素的积累都伴随着果实成熟而降低,这与前人研究结果一致^[8-10],也与葡萄、草莓和黑莓等其他果品研究结果相似^[21-22]。而 *DBF*-基因型红肉桃则恰好相反,随果实发育急剧增加,在成熟时达到最高,且远远高于白肉桃和红肉桃。这一结果在前期研究中也有所体现,即白肉桃和黄肉桃成熟果肉中原花青素单体儿茶素和表儿茶

素的含量均远远低于红肉桃中儿茶素和表儿茶素的含量^[11]。在桃育种实践工作中,红肉桃果实在口感上普遍存在涩味,这可能与成熟时含有大量原花青素有关。针对红肉桃中原花青素有别于在白肉桃、黄肉桃以及其他果品中的积累规律,其相关机制需要进行进一步深入研究和探讨。

LAR 和 *ANR* 基因是直接调控果品原花青素单体以及聚合结构单元形成的关键酶基因^[23-24]。具体地,*LAR* 途径合成 2,3-反式黄烷-3-醇,如儿茶素,*ANR* 途径生成 2,3-顺式黄烷-3-醇,如表儿茶素。Daniela 等^[9]提出 *CHS*、*CHI*、*FSH*、*DFR*、*LDOX*、*UGT*、*ANR*、*LAR*、*FLS1* 结构基因的表达与原花青素合成有关,调控因子 *PA1* 对 *ANR* 和 *LAR* 的表达具有调控作用;而 Zhou 等^[10]的研究则着重提出调控因子 *MYB7* 调控 *LAR* 基因的表达,而非 *ANR*。本研究则以 3 种肉色桃为材料,探讨了原花青素积累与关键酶 *LAR*、*ANR* 的酶活力和酶基因表达量的关系。结果表明,在同一材料中,*LAR*、*ANR* 的酶活力及其编码基因在转录水平的表达情况与原花青素积累趋势一致。本研究结果很好地证实 *LAR* 和 *ANR* 是桃果实中原花青素合成的关键调控基因。此外,本研究发现在白肉桃和黄肉桃中,*LAR* 的酶活力和基因表达量与原花青素的积累相关性更为密切,而在红肉桃中,*ANR* 与原花青素的积累更为密切,这一结果可部分解释严娟等^[11]报道的儿茶素含量在白肉桃

和黄肉桃高,而表儿茶素在红肉桃中高。本研究结果初步明确了不同果肉颜色的桃原花青素积累与 *LAR*、*ANR* 酶活力及其编码基因之间的内在联系,为进一步探讨桃原花青素合成机理提供了基础。

参考文献:

- [1] DIXON R A, XIE D Y, SHASHI B S. Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? [J]. New Phytologist, 2005, 165: 9-28.
- [2] 李先良,赵志常,高爱平,等.芒果 *ANR* 基因的克隆及其表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):22-25.
- [3] ZHAO J, PANG Y Z, DIXON R A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization [J]. Plant Physiology, 2010, 153:437-443.
- [4] SHEN Z J, CONFOLENT C, LAMBERT P P, et al. Characterization and genetic mapping of a new blood-flesh trait controlled by the single dominant locus DBF in peach [J]. Tree Genetics & Genomes, 2013, 9:1435-1446.
- [5] 严娟,沈志军,蔡志翔,等.桃果实中酚类物质研究进展[J]. 果树学报,2014,31(3):477-485.
- [6] ASAMI D K, HONG Y J, BARRET D M, et al. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83:56-63.
- [7] HONG Y J, DIANEL M, BARRET A E, et al. Liquid chromatography/Mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52:2366-2371.
- [8] 周君,陈宗玲,张琼,等.套袋对桃果实成熟过程中酚酸类和类黄酮类物质积累的影响[J]. 园艺学报,2009,36(12):1717-1724.
- [9] DANIELA R, RICHARD V E, REBECCA A H, et al. Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13:68.
- [10] ZHOU H, WANG K L, LIAO L, et al. Peach MYB7 activates transcription of the proanthocyanidin pathway gene encoding leucoanthocyanidin reductase, but not anthocyanidin reductase [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:908.
- [11] 严娟,蔡志翔,沈志军,等.三种肉色桃中10种酚类物质测定及比较[J]. 园艺学报,2014b,41(2):319-328.
- [12] LOMBARDO V A, OSORIO S, BORSANI J, et al. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage [J]. Plant Physiology, 2011, 157:1696-1710.
- [13] XIE D Y, SHARMA S B, DIXON R A. Anthocyanidin reductases from medicago truncatula and arabidopsis thaliana [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 422:91-102.
- [14] 杨琴,赵磊,刘亚军,等.茶树花青素还原酶的酶学特性研究[J]. 茶叶科学,2013,33(3):221-228.
- [15] TONG Z, GAO Z, WANG F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR [J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10:71.
- [16] SETH D C, JULIE M T, GREG A G, et al. Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2655-2665.
- [17] TAKASHI A, AYAKO K, KEIZO Y. Proanthocyanidin biosynthesis of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130:373-380.
- [18] REBECCA A, HENRY-KIRK T K, MCGHIE, et al. Transcriptional analysis of apple fruit proanthocyanidin biosynthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(15):5437-5450.
- [19] JAN G S, CHRISTIAN D, IRENE R D L F, et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits [J]. New Phytologist, 2013, 197(2):454-67.
- [20] CLAUDIA N, SYLVAIN G, NATHALIE M, et al. Characterization of plum procyanidins by thiolytic depolymerization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56:5188-5196.
- [21] CHEN Q, YUA H W, TANGA H R, et al. Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 141:61-68.
- [22] KENNEDY J A, HAYASAKA Y, VIDAL S, et al. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 5348-5355.
- [23] BOGS J, MARK O D, JOHN S H, et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. Plant Physiology, 2005, 139:652-663.
- [24] LIAO L, VIMOLMANGKANG S, WEI G, et al. Molecular characterization of genes encoding leucoanthocyanidin reductase involved in proanthocyanidin biosynthesis in apple [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:243.

(责任编辑:陈海霞)