

宋 杨, 刘红弟, 王海波, 等. 越橘原花青素合成相关基因 *VcLAR* 和 *VcANR* 的克隆和功能鉴定[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 682-688.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.03.025

## 越橘原花青素合成相关基因 *VcLAR* 和 *VcANR* 的克隆和功能鉴定

宋 杨, 刘红弟, 王海波, 张红军, 刘凤之

(中国农业科学院果树研究所/农业部园艺作物种质资源利用重点实验室/辽宁省落叶果树矿质营养与肥料高效利用重点实验室, 辽宁 兴城 125100)

**摘要:** 本研究以越橘(*Vaccinium corymbosum* Duke)为试验材料, 克隆原花青素合成基因 *VcLAR* 和 *VcANR*, 分析其表达模式及其对水杨酸和茉莉酸甲酯的响应, 鉴定其在原花青素合成过程中的作用。结果表明, 成功获得了越橘 *VcLAR* (GenBank 登录号为 MH321470) 和 *VcANR* (GenBank 登录号为 MH321471) 基因。*VcLAR* 和 *VcANR* 在根、茎、幼叶、花以及不同发育阶段果实中均可表达, 但相对表达量存在差异, 在绿果中的相对表达量最高。在不同发育阶段果实中, 原花青素含量在绿果中最高, 在蓝果中最低。水杨酸处理可促进 *VcLAR* 和 *VcANR* 基因的表达, 茉莉酸甲酯处理可抑制 *VcLAR* 和 *VcANR* 基因的表达。在转 *VcANR* 基因拟南芥株系中, 原花青素的含量显著高于野生型。在转 *VcLAR* 基因拟南芥株系中, 原花青素含量与野生型相比无明显变化。由此推测, *VcLAR* 和 *VcANR* 在越橘果实原花青素积累过程中发挥重要作用, 并受水杨酸和茉莉酸甲酯的调控。

**关键词:** 越橘; *VcLAR* 基因; *VcANR* 基因; 水杨酸; 茉莉酸甲酯; 原花青素

中图分类号: S663.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2019)03-0682-07

## Molecular cloning and functional identification of proanthocyanidin synthesis related genes *VcLAR* and *VcANR* of blueberry

SONG Yang, LIU Hong-di, WANG Hai-bo, ZHANG Hong-jun, LIU Feng-zhi

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Fruit Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture/Laboratory of Mineral Nutrition and Efficient Fertilization for Deciduous Fruits, Liaoning Province, Xingcheng 125100, China)

**Abstract:** In this study, using *Vaccinium corymbosum* Duke as experimental material, proanthocyanidin synthesis genes *VcLAR* and *VcANR* were cloned, the expression patterns and their responses to salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA) were analyzed, and their roles in proanthocyanidin synthesis were identified. The results showed that

收稿日期: 2018-07-19

基金项目: 山东农业大学作物生物学国家重点实验室开放课题项目(2018KF08); 中国农业科学院科技创新工程资助项目; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目; 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划项目(2015059); 国家自然科学基金项目(31301754)

作者简介: 宋 杨(1982-), 男, 吉林长春人, 博士, 副研究员, 主要从事果树生物技术与遗传育种研究。(E-mail) songyang1225@163.com

通讯作者: 刘凤之, (E-mail) liufengzhi6699@126.com; 张红军, (E-mail) zhjcaas@163.com

*VcLAR* (GenBank accession No. MH321470) and *VcANR* (MH321471) were cloned from blueberry. The quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis results indicated that *VcLAR* and *VcANR* expressed in roots, stems, young leaves, flowers and different development stages of fruits. However, the expression levels were different, and the highest expression level was in green fruits. The content of proanthocyanidin was highest in green fruits and lowest in blue fruits during different development stages of fruits. The expression of *VcLAR* and *VcANR* was induced by SA treatment and suppressed by MeJA treatment. The

content of proanthocyanidins in transgenic *VcANR Arabidopsis* was significantly higher than that in wild type. There was no significant change in proanthocyanidin content between wild type and transgenic *VcLAR Arabidopsis* lines. It is speculated that *VcLAR* and *VcANR* play an important role in the accumulation of proanthocyanidins in blueberry fruits and are regulated by SA and MeJA.

**Key words:** blueberry; *VcLAR*; *VcANR*; salicylic acid; methyl jasmonate; proanthocyanidin

越橘亦称蓝莓,其果实中含有丰富的黄酮类化合物,原花青素是黄酮类化合物的重要组成部分,在提高植物抵御逆境胁迫能力和提高人体免疫力等方面具有一定作用<sup>[1-3]</sup>。明确越橘果实中原花青素的代谢调控机理对果实品质改良具有重要意义。

植物黄酮类化合物合成途径起始于苯丙氨酸代谢,在此过程中有许多结构基因和调控基因参与原花青素的生物合成。其中,具有 NADPH 结合域的花青素还原酶(*ANR*)和无色花青素还原酶(*LAR*)是原花青素生物合成途径中的关键酶,能够催化无色花青素生成原花青素。目前,已经在许多植物中发现了 *ANR* 和 *LAR* 基因,其表达变化与原花青素积累情况紧密相关<sup>[4-5]</sup>。

国内外已有多位学者对越橘中原花青素等黄酮类化合物的合成调控机理进行了研究。有学者利用 de novo 转录组测序技术,分析了黄酮类化合物合成相关基因在越橘果实不同发育时期及其在果皮和果肉中的差异表达情况<sup>[6-8]</sup>。Zifkin 等<sup>[9]</sup>建立了越橘果实不同发育阶段的表达序列标签(EST)数据库,并分析了原花青素和花青素合成途径中关键基因在各个时期的表达情况,指出脱落酸对于越橘果实中花青素的生物合成和果实成熟非常重要。目前,对越橘原花青素的合成机理知之甚少,*ANR* 和 *LAR* 基因与越橘果实中原花青素生物合成是否相关还不清楚。本研究拟从越橘中分离并鉴定 *VcLAR* 和 *VcANR* 基因,通过表达模式和转基因分析,阐释他们在原花青素生物合成过程中的重要作用,以期对越橘果实黄酮类化合物代谢调控机制的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

试验于 2016 年 7 月-2018 年 4 月在中国农业科学院果树研究所(辽宁省兴城市)进行。

### 1.1 试验材料

试验所用的材料为 7 年生越橘(*Vaccinium corymbosum* Duke)。选取长势一致的越橘植株,分别采集花后 40 d(绿果)、60 d(粉果)和 75 d(蓝果)

花絮顶端的果实,采后立即用液氮速冻, -70 ℃ 保存。使用浓度为 10 mmol/L 的水杨酸(SA)和 50 μmol/L 的茉莉酸甲酯(MeJA)处理长势一致的花后 40 d 果实,分别在处理后 0 h、3 h、6 h、9 h 取样,液氮速冻后保存,清水处理为对照。用野生型拟南芥(*Arabidopsis* ecotype Columbia)进行遗传转化试验。

### 1.2 基因克隆和序列分析

根据在越橘转录组数据库(Song 等<sup>[10]</sup>)中获得的序列来设计引物 *VcLAR*-F/R 和 *VcANR*-F/R,扩增开放读码框序列(ORF),引物序列如表 1 显示。以 Duke 越橘果实的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5.0 min;95 ℃ 变性 30.0 s,57 ℃ 退火 30.0 s,72 ℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10.0 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带,连接到克隆载体 pEAST blunt zero 进行测序。

利用软件 CLC Sequence Viewer 6 分析 *VcLAR* 和 *VcANR* 蛋白的保守序列。采用软件 MEGA 5 引入多个物种的 *LAR* 和 *ANR* 蛋白,对 *VcLAR* 和 *VcANR* 蛋白进行聚类分析。

### 1.3 RNA 的提取与实时荧光定量 qRT-PCR 分析

采用 TaKaRa 公司的植物总 RNA 提取试剂盒(Code No.9769)提取越橘果实的 RNA。以提取的 RNA 为模板,反转录合成 cDNA。用普通 PCR 进行序列验证,目的基因经 PCR 扩增、回收、转化大肠杆菌后,由华大基因完成测序。基因序列确定后,进行实时荧光定量 qRT-PCR 分析。以 *VcGAPDH* 为管家基因,计算其他基因在越橘中的相对表达量。以拟南芥 *AtUBQ10* 为管家基因,计算 *VcLAR* 和 *VcANR* 在转基因拟南芥和野生型拟南芥中的相对表达量。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 CFX Connect PCR system,所用试剂为 ThermoFisher 公司的 PowerUp<sup>TM</sup> SYBR<sup>R</sup> Green Master Mix(Code No.A25742)。所有 PCR 均设 3 个重复。反应体系:SYBR Mixture 10.0 μl, cDNA 2.0 μl,上、下游引物各 0.5 μl,加去离子水至 20.0 μl。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃

变性 15 s, 58 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 40 个循环, 在每次循环的第 2 步进行荧光采集。最后采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析定量数据。实时荧光定量 qRT-PCR 引物见表 1。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')
VcANR-F	ATGGCAGCTTCGAAGACGGCTT
VcANR-R	TCAGTTCTGCAAAATCCCTT
VcLAR-F	ATGACTGTGTCGAGTTTATTG
VcLAR-R	TCAAGCGCACATTGCAGTG
VcANR-RT-PCR-F	CTTTGAAGATTTCCCTTCCAAAG
VcANR-RT-PCR-R	GACACACAGTGTATATTAGAAAAGG
VcLAR-RT-PCR-F	CCTGATGAAGTTGAAGTGTGCGAAC
VcLAR-RT-PCR-R	GCAATTCCATTGGCGTTACGCC
VcGAPDH-RT-PCR-F	GGTTATCAATGATAGCTTTGGCA
VcGAPDH-RT-PCR-R	CAGTCTTGCTTGATGGACC
AtUBQ10-RT-PCR-F	CGTTAAGACGTTGACTGGGAAAAC
AtUBQ10-RT-PCR-R	GCTTTCACGTTATCAATGGTGTCA
VcANR-pRI101-F	GGAATTCATATGATGCGAGCTTCGAAGACGGCTT
VcANR-pRI101-R	ACGCGTCGACTCAGTTCTGCAAAATCCCTT
VcLAR-pRI101-F	GGAATTCATATGATGACTGTGTCGAGTTTATTG
VcLAR-pRI101-R	ACGCGTCGACTCAAGCGCACATTGCAGTG

#### 1.4 原花青素含量测定

参照文献[11]的测定方法,使用高效液相色谱法测定越橘 3 个发育时期果实中的原花青素含量。拟南芥种子中原花青素的测定:称取 0.5 g 样品,液氮研磨,加入 1.0 ml 70.0%丙酮溶液(含 0.1%抗坏血酸),4 ℃ 黑暗条件下静置 30 min,离心后取上清液,沉淀中再加入 1.0 ml 70.0%丙酮溶液,4 ℃ 条件下静置 30 min,离心后取上清液,合并 2 次上清液,加入 3.0 ml 乙醚,-20 ℃ 条件下静置 1 h。取 2.0 ml 下层相,加入 1.0 ml 甲醇和 0.5 ml 2.0%的 4-二甲基氨基肉桂醛(4-dimethylaminocinnamaldehyde, DMACA)染色液,于室温下静置 20 min,用紫外分光光度计在 643 nm 处测量吸光度。定量标准品为儿茶素(Catechin)。

#### 1.5 拟南芥转化和鉴定

构建 VcLAR-pRI101 和 VcANR-pRI101 过量表达载体,将这 2 个重组载体分别转化至农杆菌

GV3101,利用农杆菌侵染花序法分别转化野生型拟南芥。在含有卡那霉素的 MS(Murashige and skoog)固体培养基上筛选 T1 代转基因植株。将抗性苗移栽至基质中,并置于光照培养箱中培养,收获的 T2 代种子用于试验。载体构建时使用的引物见表 1。

#### 1.6 统计学分析

每个试验设 3 个重复,使用 SPSS 软件进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 越橘 VcLAR 和 VcANR 基因的克隆、编码的蛋白质结构域及进化树分析

通过 RT-PCR 技术分别获得 2 条约 1 100 bp 和 1 000 bp 的条带。对克隆所得片段进行测序分析,结果显示,VcLAR 和 VcANR 基因的 ORF 长度分别为 1 056 bp 和 1 002 bp,分别编码含有 352 个和 334 个氨基酸的蛋白质。

使用软件 CLC Sequence Viewer 6 分析越橘 VcLAR 和 VcANR 蛋白及其他植物 LAR 和 ANR 蛋白的保守结构域。结果(图 1)显示,VcLAR 和 VcANR 是短链脱氢/还原酶超家族成员,均包含 NADPH 结合域。

将 VcLAR 和 VcANR 蛋白序列与拟南芥、葡萄、苹果、柿等多个不同物种的 LAR 和 ANR 蛋白序列进行分析并构建进化树。进化树分析结果(图 2)表明,越橘的 VcLAR 和 VcANR 分别与葡萄的 VvLAR1 和柿的 DkANR 同源性最高。

### 2.2 VcLAR 和 VcANR 基因的表达分析

利用实时荧光定量 qRT-PCR 分析 VcLAR 和 VcANR 在越橘不同植物器官以及在果实不同发育时期的表达情况。结果(图 3)显示,VcLAR 在绿果中的相对表达量最高,在粉果中的相对表达量次之,在蓝果中的相对表达量最低。VcANR 在绿果中的相对表达量最高,在根中的相对表达量次之,在花托中的相对表达量最低。

图 4 显示,在果实发育过程中,花后 40 d 的绿果中,原花青素含量最高,随着果实成熟,原花青素含量持续下降。VcLAR 相对表达量的变化趋势与原花青素含量的变化趋势相似,VcANR 的相对表达量呈先急剧下降后略有上升的趋势。说明,VcLAR 和 VcANR 相对表达量的下调与原花青素含量的减少有一定关系。

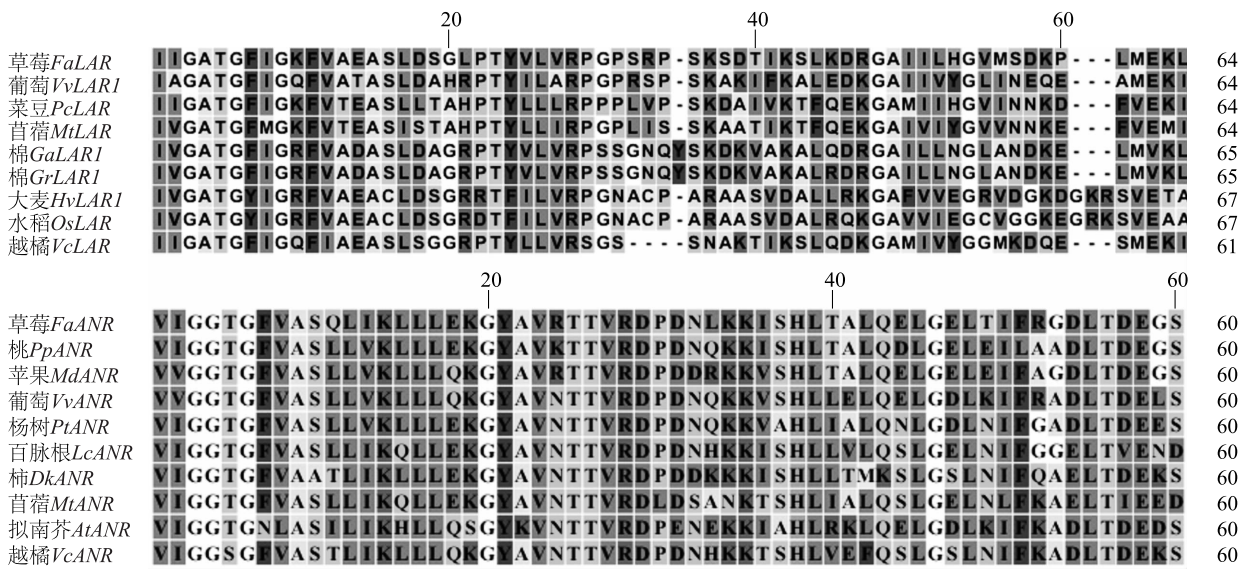


图1 越橘 *VcLAR* 和 *VcANR* 与其他同源基因编码 NADPH 结合域序列的比较  
Fig.1 Sequence alignment of NADPH binding domains of *VcLAR* and *VcANR* in blueberry with their homologous genes

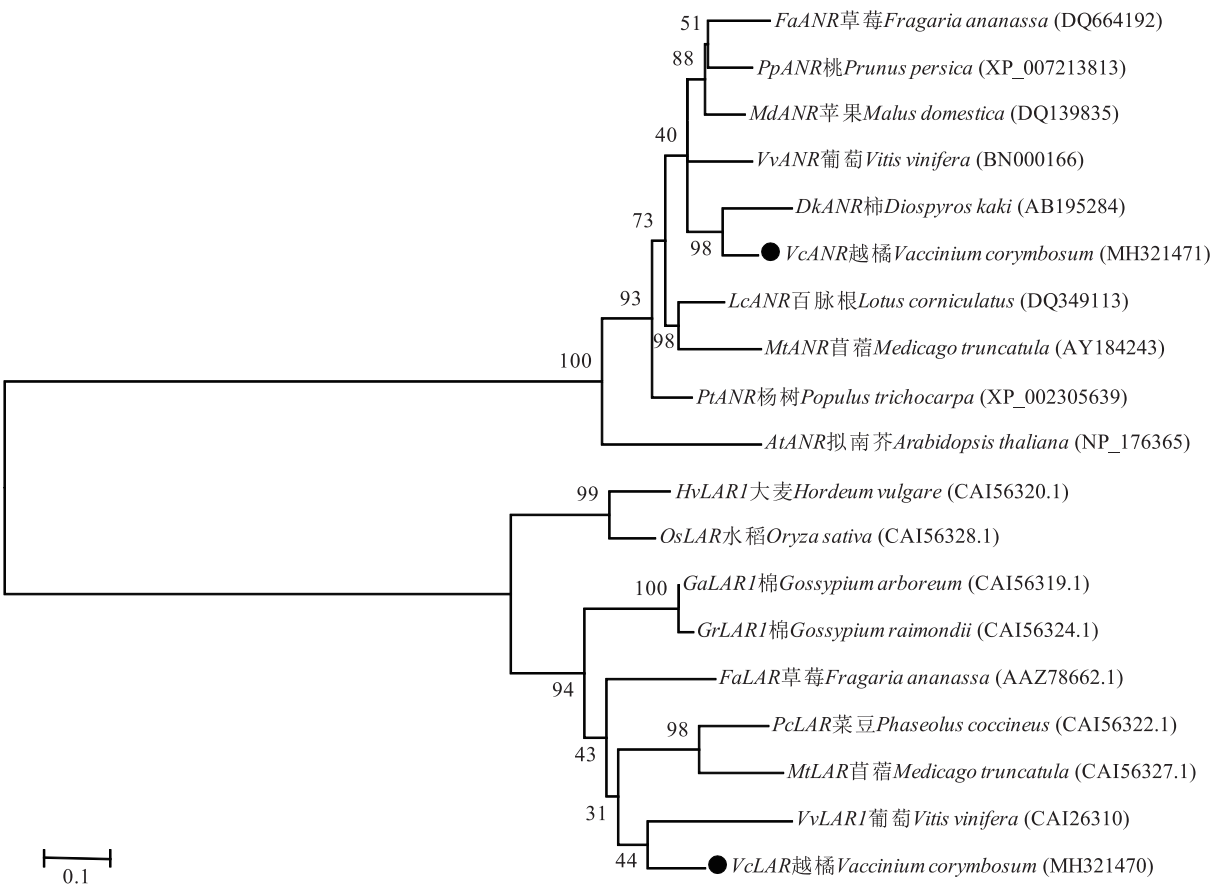


图2 越橘 *VcLAR* 和 *VcANR* 与其他同源基因的进化树分析  
Fig.2 Phylogenetic tree analysis of *VcLAR* and *VcANR* in blueberry with their homologous genes

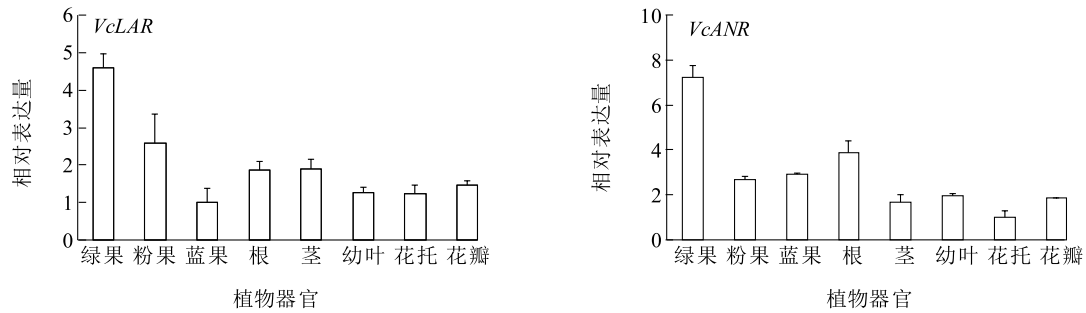


图 3 不同植物器官中 *VcLAR* 和 *VcANR* 转录水平的表达分析

Fig.3 Expression analysis of *VcLAR* and *VcANR* in different organs of blueberry at transcriptional level

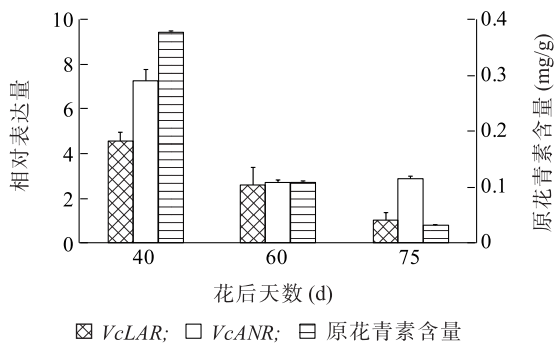


图 4 果实发育过程中原花青素含量以及 *VcLAR* 和 *VcANR* 相对表达量的变化

Fig.4 Changes of proanthocyanidin content and relative expression of *VcLAR* and *VcANR* during fruit development

采用实时荧光定量 qRT-PCR 分析 *VcLAR* 和 *VcANR* 对水杨酸和茉莉酸甲酯的响应,结果(图 5)表明,在水杨酸(10 mmol/L SA)处理下,随着处理时间的延长,*VcLAR* 的相对表达量先升高后降低,但始终高于对照,在处理 6 h 达到最大。*VcANR* 在水杨酸的诱导下,相对表达量持续升高。在茉莉酸甲酯(50  $\mu$ mol/L MeJA)处理下,*VcLAR* 和 *VcANR* 的相对表达量均低于对照。

### 2.3 *VcLAR* 和 *VcANR* 的过量表达对原花青素含量的影响

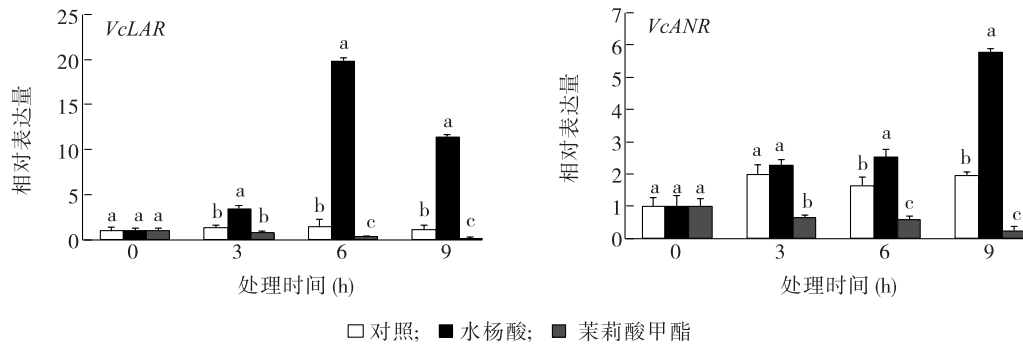
为进一步研究 *VcLAR* 和 *VcANR* 的功能,分别构建了 *VcLAR* 和 *VcANR* 的植物过量表达载体。用重组表达载体转化农杆菌 GV3101,利用农杆菌介导的遗传转化方法侵染野生型拟南芥,分别获得 4 个转基因株系。图 6 显示,在转 *VcANR* 基因拟南芥株系中,*VcANR* 的相对表达量显著高于野生型,转基因株系中原花青素的含量显著高于野生型。在转 *VcLAR*

基因拟南芥株系中,*VcLAR* 的相对表达量显著高于野生型,转基因株系中原花青素含量与野生型相比无显著变化。

## 3 讨论

越橘在中国的种植面积和产量稳步增长<sup>[12]</sup>。越橘果实中含有丰富的原花青素,作为一种重要的次生代谢产物,在植物抗逆及清除人体内自由基等方面起重要作用<sup>[13-16]</sup>。

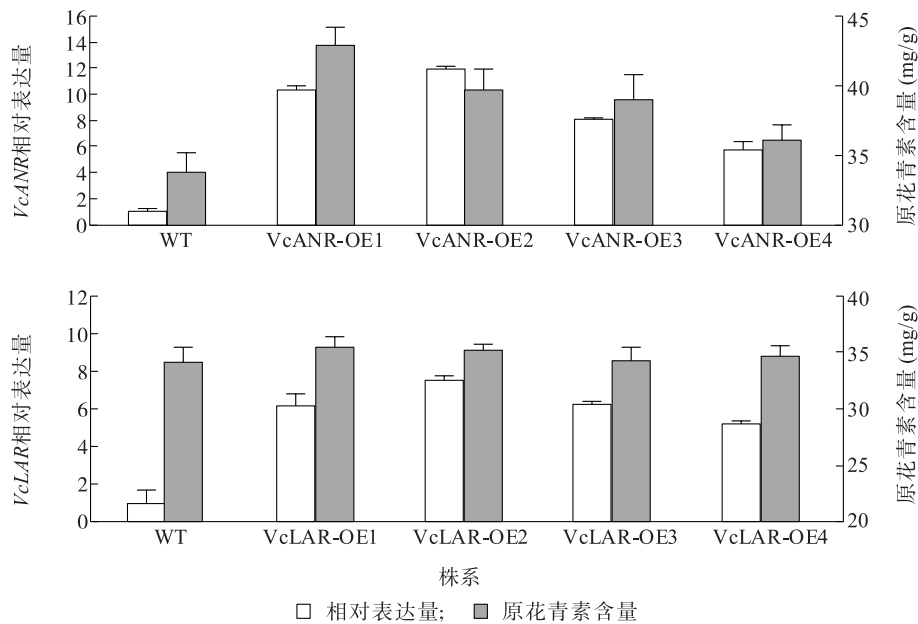
*LAR* 和 *ANR* 基因是调控植物原花青素合成的关键基因。本研究分离获得的 *VcLAR* 和 *VcANR* 基因属于典型的短链脱氢/还原酶超家族基因,编码的蛋白质含有保守的 NADPH 结合域。越橘的 *VcLAR* 和 *VcANR* 分别与葡萄的 *VvLAR1* 和柿的 *DkANR* 同源性最高,说明 *VcLAR* 和 *VcANR* 可能与葡萄、柿及其他物种中的同源基因具有相似的生物学功能。原花青素的生物合成受多种植物激素的影响<sup>[17]</sup>。虽然前人的研究表明,植物激素可调节花青素、原花青素和黄酮醇等类黄酮物质的合成<sup>[18-19]</sup>。但是,水杨酸和茉莉酸甲酯在调节原花青素合成过程中的作用及分子机制还不清晰。本研究发现,在果实发育过程中,*VcLAR* 相对表达量的变化趋势与原花青素含量的变化趋势相似。*VcLAR* 和 *VcANR* 对水杨酸和茉莉酸甲酯处理均有明显响应。水杨酸处理下,随着处理时间的延长,*VcLAR* 的相对表达量呈先升高后降低的趋势,*VcANR* 的相对表达量持续升高。茉莉酸甲酯处理下,*VcLAR* 和 *VcANR* 的相对表达量均低于对照。通过在拟南芥中过量表达 *VcANR*,发现转基因植株种子中原花青素的积累显著高于野生型,而过量表达 *VcLAR* 拟南芥植株中原花青素含量与野生型相比无显著变化。



图中不同小写字母表示相同处理时间的不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图5 *VcLAR* 和 *VcANR* 对水杨酸及茉莉酸甲酯的响应

Fig.5 Response of *VcLAR* and *VcANR* to salicylic acid and methyl jasmonate



WT:野生型株系;VcANR-OE1~VcANR-OE4:*VcANR* 过量表达株系;VcLAR-OE1~VcLAR-OE4:*VcLAR* 过量表达株系。

图6 *VcLAR* 和 *VcANR* 在拟南芥中过量表达对原花青素含量的影响

Fig.6 Effects of *VcLAR* and *VcANR* genes over-expression on proanthocyanidin accumulation in *Arabidopsis thaliana*

对很多植物的研究结果表明, R2R3-MYB、bHLH (basic helix-loop-helix) 和 WD40 (WD-repeat protein) 蛋白质复合体可调控 *LAR* 和 *ANR* 的转录, 从而影响原花青素的合成<sup>[20-21]</sup>。越橘中是否存在这样的调控模式? 后期将通过酵母杂交和电泳凝胶迁移率试验, 筛选以 *VcLAR* 和 *VcANR* 为靶基因的转录因子, 进一步解析越橘原花青素的合成途径。

#### 参考文献:

[1] BASU A, RHONE M, LYONS T J. Berries: emerging impact on cardiovascular health [J]. Nutrition Reviews, 2010, 68 (3):

168-177.

[2] GORDILLO G, FANG H, KHANNA S, et al. Oral administration of blueberry inhibits angiogenic tumor growth and enhances survival of mice with endothelial cell neoplasm [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2009, 11(1): 47-58.

[3] 张宇, 张丙秀, 魏媛媛, 等. 土壤 pH 值对蓝莓叶片生理生化的影响 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 107-109.

[4] BOGS J, DOWNEY M O, HARVEY J S, 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 (2): 652-663.

[5] PAOLOCCI F, ROBBINS M P, MADEO L, et al. Ectopic expres-

- sion of a *basic helix-loop-helix* gene transactivates parallel pathways of proanthocyanidin biosynthesis. structure, expression analysis, and genetic control of *leucoanthocyanidin 4-reductase* and *anthocyanidin reductase* genes in *Lotus corniculatus* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 504-516.
- [6] LI X, SUN H, PEI J, et al. De novo sequencing and comparative analysis of the blueberry transcriptome to discover putative genes related to antioxidants [J]. *Gene*, 2012, 511(1): 54-61.
- [7] SUN H, LIU Y, GAI Y, et al. De novo sequencing and analysis of the cranberry fruit transcriptome to identify putative genes involved in flavonoid biosynthesis, transport and regulation [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 652.
- [8] LI L, ZHANG H, LIU Z, et al. Comparative transcriptome sequencing and de novo analysis of *Vaccinium corymbosum* during fruit and color development [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 223.
- [9] ZIFKIN M, JIN A, OZGA J A, et al. Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(1): 200-224.
- [10] SONG Y, LIU H D, ZHOU Q, et al. High-throughput sequencing of highbush blueberry transcriptome and analysis of basic helix-loop-helix transcription factors [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(3): 591-604.
- [11] PRIOR R L, LAZARUS S A, CAO G, et al. Identification of pro-cyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3): 1270-1276.
- [12] 李亚东,孙海悦,陈 丽. 我国蓝莓产业发展报告 [J]. *中国果树*, 2016(5): 1-10.
- [13] 曹 森,王 瑞,赵成飞,等. 采前喷施哈茨木霉菌对采后蓝莓贮藏品质及生物活性的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(2): 424-431.
- [14] NETO C C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51(6): 652-664.
- [15] RENDEIRO C, VAUZOUR D, KEAN R J, et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats [J]. *Psychopharmacology*, 2012, 223(3): 319-330.
- [16] 尉莹莹,梁 晨,赵洪海,等. 华东地区蓝莓采后病害病原鉴定及其多样性分析 [J]. *山东农业科学*, 2017, 49(7): 112-115.
- [17] QI T, SONG S, REN Q, et al. The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23: 1795-1814.
- [18] NARAYAN M S, THIMMARAJU R, BHAGYALAKSHMI N. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(1): 351-358.
- [19] DEIKMAN J, HAMMER P E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 47-57.
- [20] WANG N, XU H, JIANG S, et al. MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*) [J]. *The Plant Journal*, 2017, 90(2): 276-292.
- [21] BOGS J, JAFFÉ F W, TAKOS A M, et al. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3): 1347-1361.

(责任编辑:王 妮)