

荔枝果皮中 4 种酚类代谢酶活性的测定方法

李晓静, 黄旭明, 胡桂兵, 王惠聪

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:为了改进酚类物质生物合成途径中关键酶活性的测定方法,以南方重要常绿果树荔枝 *Litchi chinensis* 果皮为材料,采用两点法和酶动力学 2 种酶活性研究方法,结合分光光度法和高效液相色谱法检测产物浓度变化,优化了 4 种酚类代谢常见酶[包括苯丙氨酸解氨酶(PAL)、查儿酮异构酶(CHI)、二氢黄酮醇还原酶(DFR)和类黄酮糖基转移酶(UFGT)]的测定方法,指出了酶液的纯化、酶活性的保护以及反应底物的溶解方法等对试验结果的稳定性和可靠性的影响,介绍了试验过程中常遇到的问题和具体的解决方法以及试验过程中的注意事项.应用改进后的方法测定荔枝发育过程中果皮 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 的酶活性,结果发现活性变化趋势与前人的报道基本一致.改进的 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 酶活性的测定方法可靠,可为相关的研究提供重要的参考.

关键词:荔枝; 酚类代谢酶; 苯丙氨酸解氨酶(PAL); 查儿酮异构酶(CHI); 二氢黄酮醇还原酶(DFR); 类黄酮糖基转移酶(UFGT); 酶活性测定方法

中图分类号:Q946.5; S667.1 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)04-0531-06

Methods for Determination of the Activities of Four Enzymes Involving Phenolic Metabolism in the Pericarp of Litchi

LI Xiaojing, HUANG Xuming, HU Guibing, WANG Huicong

(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The objective of this study was to establish improved methods for determination of the activities of the key phenolic biosynthesis enzymes. The pericarp of litchi (*Litchi chinensis*), an important ever-green fruit crop cultivated in south China, was used as material. Two-point method and enzymatic kinetic method combined with the use of photospectrometry and high performance liquid chromatography to analyze the formation of end products were applied. The key phenolic biosynthesis enzymes included phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone flavanone isomerase (CHI), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT). The enzyme purification from crude extracts, enzyme activity protection and methods to dissolve substrates were all critical for reliable enzyme activity determinations. The possible problems during the activity determination of these enzymes and corresponding solutions were mentioned. The changes in PAL, CHI, DFR and UFGT activities measured by the improved methods in the pericarp of litchi during fruit development were generally consistent with previous reports. The improved methods are reliable and will provide important reference for phenolic biosynthesis studies.

Key words: *Litchi chinensis*; phenolic metabolism; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); chalcone flavanone isomerase (CHI); dihydroflavonol 4-reductase (DFR); UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT); enzyme activity assay method

植物体中存在各种不同的多酚类化合物,包括具有1个芳香环的简单多酚类化合物(Simple phenols),2个芳香环的类黄酮(Flavonoids)和花色素(Anthocyanidins),多个芳香环原花青素(Proanthocyanidin)等^[1]. 由于多酚类化合物具有抗氧化、清除自由基、控制人类慢性病的发病率、保护DNA和抗突变、抑制癌症发生等方面的功效,近年来备受关注,被誉为继水、蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质和膳食纤维之后的第八大必需营养^[2]. 花色素作为赋予植物颜色的四大天然色素(叶绿素、类胡萝卜素、花色素和甜菜碱)之一,是决定果实和观赏植物颜色的一类重要色素^[3]. 此外,多酚类物质还与果实的采后褐变关系密切^[4],还参与植物的应逆反应,胁迫条件往往会增加植物组织的多酚类物质的含量^[5-6].

植物的酚类代谢途径是研究最为清楚的植物次生物质代谢之一. 多酚类物质的生物合成在许多植物中均有深入的研究,有学者先后克隆了相关的结构基因,并研究了它们在果实发育过程中的表达^[7-9]. 酶是基因表达的产物,在多酚物质代谢中苯丙氨酸解氨酶(PAL)催化苯丙氨酸产生肉桂酸,是酚类物质合成的第1个酶,也是关键酶;类黄酮合成相关的酶主要是查儿酮合成酶(CHS)和查儿酮异构酶(CHI);原花青素和花色素苷合成密切相关的酶主要是二氢黄酮醇还原酶(DFR)和类黄酮糖基转移酶(UFGT). 酶活性是基因表达结果最直接的体现,往往与qPCR一起用于揭示酚类物质代谢的内在机制,但在实际工作中,由于酚类代谢底物较难获得,试验方法对研究者的试验技能要求较高等原因,许多研究者在研究中往往选择qPCR而放弃酶活性的测定,然而目前一些知名的国际杂志往往要求基因表达结果和酶活性相互印证.

荔枝是南方重要的常绿果树,荔枝果实的多酚类物质与采后的褐变^[4]、果实着色^[9]以及天然功能性成分的开发利用^[10]等关系密切,是荔枝果实品质研究的一个重要方面. 本研究组多年从事荔枝果实酚类和花青苷代谢研究,建立了多酚类和花青苷生物合成关键酶活性的测定方法. 之前发表的相关文章由于篇幅限制,未能详细介绍酶活性的测定方法,近年我们又对测定方法进行了改进,许多国内同行专家发邮件咨询酚类代谢酶的测定方法,有鉴于此,本文以荔枝果皮为材料,详细介绍4个酚类代谢关键酶的酶活性测定方法及注意事项,以期相关的研究提供依据.

1 材料与方法

1.1 植物材料

研究选取‘黑叶’荔枝品种作为试验材料,每个处理选取3棵树,在盛花后42 d开始采样直至果实成熟,采样时将果皮和果肉分开,打孔器取果皮圆片装入锡纸袋,用液氮速冻后带回实验室,于-80℃冰箱保存备用.

1.2 PAL提取和活性测定

PAL的提取和测定参考Lister等^[11]报道的方法,并加以改进. 取2个果皮圆片(约0.2 g)在液氮中迅速研磨成粉末,加入1.8 mL提取液[含100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8),质量浓度为20 g·L⁻¹的牛血清蛋白(BSA),5 mmol·L⁻¹二硫苏糖醇(DTT)],匀浆后迅速转移到2 mL的离心管中. 在4℃条件下,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取1 mL上清液过PD10(GE. Healthcare®, Buckinghamshire, UK)脱盐柱后,备用. 过脱盐柱的具体操作为:先用平衡液[含100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8),5 mmol·L⁻¹ DTT]冲洗柱子,平衡液降到隔板下后加入1 mL酶提取液,酶提取液降到隔板后加入1.8 mL平衡液,不收集滤液,等平衡液降到隔板后(此时取2 mL冻存管于柱子下端准备接收滤液),再加入2 mL平衡液并收集滤液,作为纯化酶液.

酶反应体系包括纯化酶液0.5 mL、平衡液0.7 mL和100 mmol·L⁻¹的苯丙氨酸100 μL,在37℃条件下反应45 min后,用200 μL质量浓度为350 g·L⁻¹的三氯乙酸终止反应,10 000 r·min⁻¹离心5 min除去变性的蛋白质. 取上清液在290 nm下测定光密度,对照试验用不加苯丙氨酸的反应液代替正常的反应液进行,酶活性用反应生成的肉桂酸含量表示,单位为μmol·g⁻¹·min⁻¹:

$$\text{PAL 活性} = \frac{\Delta D_{290 \text{ nm}} \times 1.8 \times 2 \times 1.5}{19.207 \times 0.5 \times m_{\text{鲜}}},$$

其中,19.207为肉桂酸在290 nm下的μmol吸光系数;1.8为加入提取液的体积(mL);2为酶液在过脱盐柱后的稀释倍数;1.5为反应体系的体积(mL);0.5为反应体系中酶液的体积(mL); $m_{\text{鲜}}$ 为样品的鲜质量(g).

1.3 CHI和DFR提取和活性测定

CHI和DFR的提取在Lister等^[11]报道方法的基础上有所改进. 取2个果皮圆片(约0.2 g)在液氮中迅速研磨成粉末,加入1.8 mL提取液[含100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5),质量浓度为20

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的BSA, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT], 匀浆后迅速转移到2 mL的离心管中. 在4℃条件下, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取1 mL上清液过PD10脱盐柱后备用. 平衡液含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5) 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 脱盐的程序同1.2.

CHI活性测定的反应体系为1 mL, 包括酶液25 μL 、Tris-HCl (pH 7.5, 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCN) 965 μL 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 查尔酮 (Aldrich 136123) 10 μL , 室温下370 nm处测定酶动力, 以每分钟光密度变化0.01所需的酶量为1个活性单位, 即1U.

CHI 活性 =
$$\frac{\Delta D_{370 \text{ nm}} \times 1.8 \times 2}{0.01 \times 0.025 \times m_{\text{鲜}}},$$

其中, 0.01为规定的1个酶单位的光密度变化量; 1.8为加入提取液的体积 (mL); 2为酶液在过脱盐柱后的稀释倍数; 0.025为反应体系中酶液的体积 (mL), $m_{\text{鲜}}$ 为样品的鲜质量 (g).

DFR活性的测定参考 Stafford 等^[12]的方法, 并加以改进. 反应体系1 mL, 包括酶提取液600 μL , $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氢槲皮素 (Dihydroquercetin, Fluka 78666) 20 μL , $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NADPH 40 μL , $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH7.5) 340 μL . 以600 μL 酶液沸水浴5 min 冷却后加入其他反应液为对照. 在30℃条件下反应1 h, 之后加入1 mL的乙酸乙酯终止反应, 在振荡器上充分振荡, 静置分层后取上层液到玻璃试管中, 重复加入乙酸乙酯提取3次, 合并上层液, RapidVap® (Labconoco, MO, USA) 旋转蒸发系统中蒸干后, 加入1 mL正丁醇-HCl溶液 [$V(\text{正丁醇}) : V(\text{HCl}) = 95 : 5$], 95℃水浴15 min, 测定550 nm的光密度, 以每分钟光密度变化0.01所需的酶量为1个酶活性单位, 即1U.

DFR 活性 =
$$\frac{\Delta D_{550 \text{ nm}} \times 1.8 \times 2}{0.01 \times 0.6 \times m_{\text{鲜}}},$$

其中, 0.01为规定的1个酶单位的光密度变化量; 1.8为加入提取液的体积 (mL); 2为酶液在过脱盐柱后的稀释倍数; 0.6为反应体系中酶液的体积 (mL); $m_{\text{鲜}}$ 为样品的鲜质量 (g).

1.4 UFGT 提取和活性测定

UFGT的提取和活性测定在 Ford 等^[13]报道方法的基础上加以改进. 取2个果皮圆片 (约0.2 g) 在液氮中迅速研磨成粉末, 加入1.8 mL提取液 [含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟, 质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的BSA, 体积分数分别为10%的甘油和0.1%的TritonX-100], 匀浆后迅速转移到2 mL的离心管中, 4

℃条件下, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取1 mL上清液过PD10脱盐柱后备用. 平衡液含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Hcl (pH 8.0)、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 脱盐的程序同1.2.

酶反应体系包括100 μL 酶液和100 μL 反应液 [含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH8.0), $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG(4000), $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DTT, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Cyanidin (Sigma79457) 和 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的脲苷二磷酸葡萄糖 (UDPGlu, Sigma U4625)]. 30℃反应20 min, 150 μL 体积分数为5%的HCl终止反应, 以100 μL 酶液加入反应液后立即加入150 μL 的HCl为对照, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液过0.45 μm 水系滤头, 用HPLC测定反应生成的花青苷.

花青苷含量的检测参考 Wei 等^[9]报道的方法, 使用 Angilent 1200 HPLC 系统 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), 配有四元泵、DAD 检测器 (G1315D)、馏分收集器 (G1364C)、柱温箱、自动进样器, 使用250 mm $\times$ 4.6 mm NUCLEODUR® C18 色谱柱 (Macherey-Nagel GMBH&Co. KG, Germany), 检测波长520 nm, 进样量10 μL , 采用梯度洗脱方式: 流动相A用体积分数为1.6%的甲酸甲醇溶液, 流动相B用体积分数为1.6%的甲酸水溶液, 梯度洗脱时间见表1. 采用HPLC系统分离早熟荔枝果皮提取液, 馏分收集器收集矢车菊色素-3-葡萄糖苷, 旋转减压蒸干后作为标样, 对反应生成的花青苷进行定量.

表1 荔枝果皮花色苷 HPLC 分离检测梯度洗脱时间表
Tab.1 The gradient elution program for HPLC separation of anthocyanins in the pericarp of litchi

t/min	流动相 A 占比/%	流动相 B 占比/%
0 ~ 5	15	85
5 ~ 10	20	80
10 ~ 28	28	72
28 ~ 35	0	100

2 结果与分析

2.1 荔枝果皮中 PAL、CHI 和 DFR 活性

在花后42~56 d‘黑叶’荔枝果皮中 PAL 活性变化不大, 活性介于 $5.5 \sim 7.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 在花后63 d活性明显下降, 随后在果实成熟着色时活性明显增加 (图1a). 在花后42 d‘黑叶’荔枝果皮中 CHI 活性较低, 随着果实发育活性增加, 着色前 (花后63 d) 活性降低, 此后随着果实的成熟着色活性增加 (图1b). ‘黑叶’荔枝果皮中 DFR 活性在果实

发育中期较高,在果实着色过程中活性下降(图 1c).

2.2 荔枝果皮中 UFGT 活性

如图 2a,酶反应对照液仅在 23.4 min 左右出峰,峰面积为 61.2,该峰是反应液中加入的矢车菊色素,本研究使用的是花后 70 d 的‘黑叶’荔枝果皮样品,果皮已经开始着色,经过了脱盐去杂处理后,未检测到在 14 和 16 min 左右出峰的矢车菊色素-3-葡萄糖苷和矢车菊色素-3-芸香糖苷,说明酶提取液纯化后很好地去除了本底的干扰.反应液终止反应 10 min 后检测到较少的矢车菊色素(23.4 min),峰面积为 8.296,而且在 13.9 min 出现了对照未出现的峰,经标样确定该峰是反应产生的矢车菊色

素-3-葡萄糖苷(图 2b);将反应液放置近 2 h 后再次进样(图 2c),发现 23.4 min 的矢车菊色素峰值明显变小,而 13.9 min 的矢车菊色素-3-葡萄糖苷峰面积变化不大,说明在反应液中矢车菊色素很不稳定,容易降解,而反应产生的矢车菊色素-3-葡萄糖苷则相对稳定.

如图 1d,在‘黑叶’荔枝果实发育的早期,果皮中基本上检测不到 UFGT 活性,在谢花后 56 d 果皮中的 UFGT 活性仅为 $(0.04 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,此后,随着果实成熟着色 UFGT 活性迅速增加,在果实成熟采收时果皮中的 UFGT 活性达到最高,即 $(2.19 \pm 0.23) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

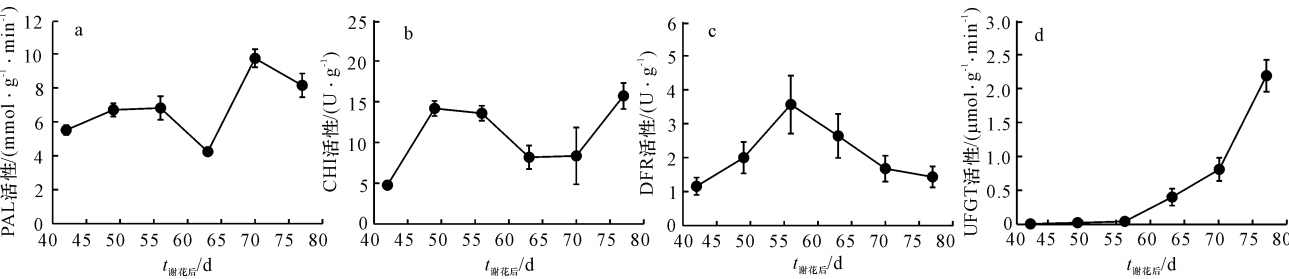
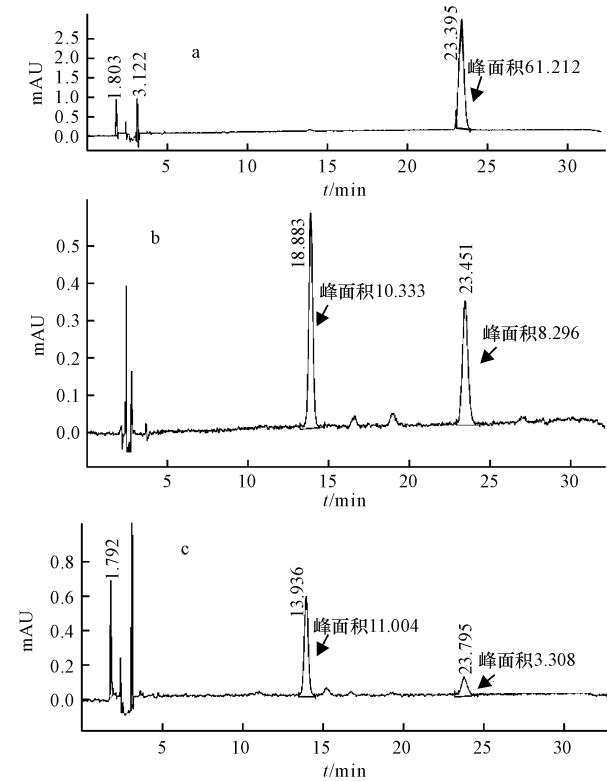


图 1 ‘黑叶’荔枝果皮发育过程中 PAL、CHI、DFR 和 UFGT 活性的变化

Fig. 1 Changes in the activities of PAL, CHI, DFR and UFGT in the pericarp of *Litchi chinensis* cv. Heiye during fruit development



a:对照;b:体积分数为 5% 的 HCl 终止反应后 10 min 进样;c:体积分数为 5% 的 HCl 终止反应后 2 h 进样.

图 2 花后 70 d‘黑叶’荔枝果皮 UFGT 反应液 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC spectra of UFGT reaction mixture in the pericarp of *Litchi chinensis* cv. Heiye 70 d after flowering

3 讨论

3.1 PAL 测定方法

‘黑叶’荔枝果实发育的早中期 PAL 活性较低,随后在果实成熟着色时活性明显增加.测定结果与前人的研究基本一致.‘妃子笑’荔枝果皮着色过程中 PAL 活性也有较明显的增加^[14].在草莓、苹果和梨等果实成熟着色的过程中果皮的 PAL 活性明显增加^[15-17].

与之前的测定方法相比,本研究中 PAL 的测定方法主要在 3 个方面做了改进:1)利用过 PD10 脱盐柱的方法对酶提取液进行纯化,去掉酶提取液中的杂质,杂质包括酚类物质和小分子的盐和糖,使结果更加稳定和可靠;2)加入 BSA 对酶蛋白进行保护,以 DTT 代替巯基乙醇,减少试验过程中刺激性的气味;3)利用与反应液一致的平衡液,增加纯化酶液的使用量,适用于少样品或酶活性低的试验.本研究中使用了 0.5 mL 纯化酶液,在样品量少或酶活性偏低的样品中可以通过增加纯化酶液降低平衡液的使用量来增加测定的稳定性.

在试验的过程中应注意:1)设置对照试验;2)反应底物苯丙氨酸较难溶于水,可先加入少量的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液,溶解后再加水定容;3)加入三氯乙酸后蛋白质变性有沉淀析出,在比色前要离心.

3.2 CHI的测定方法

在花后42 d‘黑叶’果皮中CHI活性较低,随着果实发育活性增加,着色前(花后63 d)活性降低,此后随着果实的成熟着色活性增加.这与前人在果实成熟过程中CHI活性增加的报道基本一致^[16].

之前由于购买不到查尔酮作为CHI反应的底物,而采用Moustafa等^[18]报道的方法,由柚皮素加入质量浓度为 $500\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KOH后酸化,然后用乙醇进行重结晶备用反应底物2',4,4,6'-四氢苯基苯乙烯酮,制备的方法较难掌握,增加了CHI活性测定的难度.目前可以从Sigma-Aldrich直接购买CHI反应的底物,反应底物的纯度也更有保证.在CHI的酶反应体系中除了加入BSA保护酶活性外,还应加入KCN防止多酚氧化酶对查尔酮的降解.KCN属于剧毒试剂,在试验结束后,应对废液和剩余的试剂进行无害化处理.首先将废液用水稀释,再按每升加约35 mL的比例加入次氯酸钠,混匀,敞开过夜,使 CN^- 氧化成 CO_2 和 N_2 挥发,或水解成 CO_3^{2-} 和 NH_4^+ ,再排入下水道.

在试验过程中,反应底物的溶解往往是测定成败的关键.查尔酮不溶于水,可溶于碱和醇:查尔酮溶于碱后,随着时间推移溶液由黄色转为棕褐色,作为底物加入反应体系后,对照的 $D_{370\text{ nm}}$ 不降低反而增加,因此不能作为底物;查尔酮溶于无水乙醇后保持黄色,加入反应体系后, $D_{370\text{ nm}}$ 降低,活性与加入的酶量成正比.

3.3 DFR的测定方法

与在‘妃子笑’荔枝果皮中测定的结果^[14]一致,‘黑叶’荔枝果皮中DFR活性在果实发育中期活性较高,在果实着色过程中活性下降.Ju等^[19]在苹果上的研究发现,果皮的DFR活性随着果实成熟着色而增加,但其研究中DFR活性是以每毫克蛋白计算的,本研究的DFR活性是以每克鲜质量计算的,而荔枝果皮的蛋白含量是随着果皮的发育成熟而明显下降.

与PAL活性的测定类似,本研究DFR活性的测定也增加了酶纯化和酶液的使用量,适用于酶活性较低和样品量较小的材料,底物脱氢槲皮素应采用甲醇溶解,配成高浓度储存.

3.4 UFGT的测定方法

‘黑叶’荔枝果皮随着果实成熟着色UFGT活性迅速增加,这与前人在草莓和葡萄上的研究结果^[15,20]相一致,也与在‘妃子笑’荔枝上的研究结果^[14]一致.

本试验在酶液提取和酶反应体系上均有改进,采用缓冲液提取加酶纯化去杂代替 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 丙酮加缓冲液溶解的方式,在提取缓冲液中加入PMSF、BSA、甘油和TritonX-100,保护酶活性并保证提取效率;反应体系中加入渗透调节物质PEG(4000)以及 β -巯基乙醇和DTT保护酶活性.

由于不同物种UFGT对于糖供体如UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的亲合性有很大的差异^[21],在具体的试验中应根据样品特点选择正确的糖基供体.与其他3个酶试验一样,在反应体系中反应底物的配制十分重要,在UFGT试验中底物矢车菊色素可溶于水,但溶解性较差,且在水溶液中很快降解,正确的方法是用乙二醇甲醚配成100倍以上的母液冻存,在反应前配制反应液,现配现用.由于反应液中的底物矢车菊色素和UDPG价格昂贵,因此应控制反应体系的量,在进行HPLC检测反应产物的过程中可在常规样品瓶中加内插管以适应微量样品的进样.

参考文献:

- [1] 孙达旺.植物单宁化学[M].北京:中国林业出版社,1992:15-18.
- [2] 马雯,刘玉环,阮榕生,等.膳食多酚类化合物的研究进展[J].中国酿造,2012,31(4):11-14.
- [3] STYEYN W J. Prevalence and functions of anthocyanins in fruits[C]//GOULD K, DAVIES K, WINEFIELD. Anthocyanins: Biosynthesis, functions and applications. New York:Springer Science Business Media, LLC., 2009:86-105.
- [4] SUN Jian, JIANG Yue-ming, PENG Hongxiang, et al. Influencing factors on property of browning substrate(-)-epicatechin from litchi pericarp tissues[J]. J Fruit Sci, 2010, 27(1):45-49.
- [5] CLÉ C, HILL L M, NIGGEWEG R, et al. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*: Consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance[J]. Phytochemistry, 2008, 69(11):2149-2156.
- [6] COLARIC M, STAMPAR F, HUDINA M. Effects of branch bending on the levels of carbohydrates and phenolic compounds in ‘Conference’ pear leaves[J]. J Horticult Sci Biotechnol, 2007, 113(3):815-821.
- [7] HONDA C, KOTODA N, WADA M, et al. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin[J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40(11):955-962.
- [8] NIU Shanshan, XU Changjie, ZHANG Wangshu, et al. Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit by a R2R3 MYB

- transcription factor[J]. *Planta*, 2010, 231(4):887-899.
- [9] WEI Yongzan, HU Fuchu, HU Guibing, et al. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn. [J/OL]. *PLoS ONE*, 2011, 6(4): e19455. [2012-08-25]. doi: 10.1371/journal.pone.0019455. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0019455>.
- [10] WANG Huicong, HU Zhiqun, WANG Yan, et al. Phenolic compounds and the antioxidant activities in litchi pericarp: Difference among cultivars[J]. *Sci Hort*, 2011, 129:784-789.
- [11] LISTER C E, LANCASTER J E, WALKER J R L. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars[J]. *J Sci Food Agric*, 1996, 71:313-320.
- [12] STAFFORD H A, LESTER H H. Flavan-3-ol biosynthesis: The conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3,4-cis-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of douglas fir [J]. *Plant Physiol*, 1984, 76(1): 184-186.
- [13] FORD C M, BOSS P K, HOJ P B. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* Locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(15): 9224-9233.
- [14] 王惠聪,黄旭明,胡桂兵,等. 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(12): 2028-2032.
- [15] GIVEN N K, VENIS N A, GRIERSON D. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit[J]. *J Plant Physiol*, 1988, 133(1): 25-30.
- [16] LISTER C E, LANCASTER J E, WALKER J R L. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1996, 121(2):281-285.
- [17] STEYN W J, HOLCROFT D M, WAND S J E, et al Regulation of pear color development in relation to activity of flavonoid enzymes [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 2004, 129(1):6-12.
- [18] MOUSTAFA E, WONG E. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soy bean seed [J]. *Phytochemistry*, 1967, 6(2): 625-632.
- [19] JU Zhiguo, YUAN Yongbing, LIU Chenglian, et al. Dihydroflavonol reductase activity and anthocyanin accumulation in 'Delicious', 'Golden Delicious' and 'Indo' apples [J]. *Sci Hort*, 1997, 70(1):31-43.
- [20] BOSS P K, DAVIES C, ROBINSON S P. Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour [J]. *Aust J Grape Wine Res*, 1996, 2(3):163-170.
- [21] KUBO A, ARAI Y, NAGASHIMA S, et al. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by single point mutation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 429(2):198-203.

【责任编辑 李晓卉】