

‘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

李晓峰, 李 雪, 贾 兵, 刘 莉, 叶振风, 衡 伟, 朱立武*

(安徽农业大学果树学重点实验室, 合肥 230036)

摘 要: 为了探讨‘砀山酥梨’芽变品系‘锈酥’果皮褐色形成机理, 采用分光光度法测定盛花后 25、50、75、100、125、150 和 175 d 果皮中木质素含量和相关酶活性变化; 从构建的‘锈酥’正向 SSH-cDNA 文库中筛选出与木质素生物合成密切相关的 *CCoAOMT*-EST, 通过实时荧光定量 PCR 测定了‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中 *CCoAOMT* 的相对表达量。结果表明: ‘锈酥’果皮发育前期木质素增量较大, 且木质素增量累计比‘砀山酥梨’高 12.2%; ‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中 PAL、4CL、CAD 酶活性均在花后 75 d 达到最大值, 而 POD 酶活性则在花后 125 d 出现高峰; 二者果皮中 4 种酶活性变化趋势基本一致, 但‘锈酥’果皮中均相对较高; ‘锈酥’果皮中的 PAL 和 4CL 酶活性与木质素增量变化均呈显著正相关, 而‘砀山酥梨’则未呈现出此规律; 在果实生长发育各个时期, ‘锈酥’果皮中 *CCoAOMT* 相对表达量均高于‘砀山酥梨’。因此推测, ‘锈酥’果皮褐色形成与果皮中木质素积累及相关酶活性提高有关, 果皮中 *CCoAOMT* 的增量表达是‘锈酥’果实褐皮形成的原因之一。

关键词: 梨; 果皮颜色; 木质素; 酶活性; *CCoAOMT*; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 661.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 05-0828-09

Analysis of Enzyme Activity and Lignin Content and Expression of *CCoAOMT* Gene in the Pericarp of ‘Dangshan Suli’ and Its Russet Mutant

LI Xiao-feng, LI Xue, JIA Bing, LIU Li, YE Zhen-feng, HENG Wei, and ZHU Li-wu*

(Key Laboratory of Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To investigate the mechanism of russet skin formation in ‘Xiusu’ pear, the sport of Chinese pear ‘Dangshan Suli’ (*Pyrus bretschneideri* Rehd.), the lignin content and activities of Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), 4-hydroxycinnamate Co-A ligase(4CL), Cinnamyl alcohol dehydrogenase(CAD) and Peroxidase (POD) related to lignin biosynthesis, in pericarp of ‘Dangshan Suli’ and ‘Xiusu’ pear at 25, 50, 75, 100, 125, 150 and 175 days after full bloom were tested by spectrophotometry, respectively. From the positive SSH-cDNA library of ‘Xiusu’ pear, *CCoAOMT*-EST was screened out and the relative quantity of its expression was analysed by Real-time PCR. The results showed that there were three peaks of lignin increment in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ pear, and lignin accumulation was 12.2% higher in

收稿日期: 2011 - 12 - 24; **修回日期:** 2012 - 04 - 28

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-29-14); 国家自然科学基金项目 (31101519); 高等学校省级优秀青年人才基金项目 (2012SQRL060ZD)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhuliwu@ahau.edu.cn)

‘Xiusu’ than that in ‘Dangshan Suli’ pear when the fruit matured. The activities of PAL, 4CL, CAD in pericarps of ‘Xiusu’ and ‘Dangshan Suli’ pear all reached to the maximum at 75 days after full bloom, which of POD attained the maximum at 125 days after full bloom. Although the trends of the four enzymes dynamic change in ‘Xiusu’ were similar as those in ‘Dangshan Suli’ pear, their activities in the former were higher than in the later. There was positive significant correlation between PAL or 4CL activities and lignin increment in ‘Xiusu’ but not in ‘Dangshan Suli’ pear. As the fruit developed, the relative quantity of *CCoAOMT* expression at each stage in the pericarp of ‘Xiusu’ was evidently higher than that of ‘Dangshan Suli’ pear. It was postulated that the mechanism of russet skin formation in ‘Xiusu’ pear was related to lignin accumulation and the relevant enzyme activity enhancement, and the expression increment of *CCoAOMT* gene may be a key factor contributed to the russet skin formation of ‘Xiusu’ pear.

Key words: pear; fruit skin color; lignin; enzyme activity; *CCoAOMT* gene; Real-time PCR

梨属 (*Pyrus* spp.) 植物果皮颜色有底色 (ground color) 和着色 (cover color) 之分, 底色有“黄色”、“绿色”两种, 着色有“褐色”和“红色”两类 (曹玉芬, 2001)。目前, 有关红皮梨的皮色遗传、皮色形成机制和调控机理研究较多 (Fischer et al., 2007; Dondini et al., 2008; Du Preez & Rees, 2008; Volz et al., 2008; Pierantoni et al., 2009; Feng et al., 2010; Zhang et al., 2011), 而有关梨褐色果皮性状的遗传, 虽有部分研究报道 (沈德绪 等, 1979; 王宇霖 等, 1991; Kim et al., 2005; 宋伟 等, 2010), 但结果差别较大。

Spencer (1965) 研究认为, 随着梨果实的成熟, 果皮颜色由“绿色”向“黄绿色”变化, 是果皮中叶绿素降解、类胡萝卜素增加所致。张华云等 (1996) 研究发现, 梨果皮褐色形成与木质素合成关系密切, 随着相关酶 PPO 和 POD 活性的降低, 木质素合成量减少, 果皮褐色明显降低。滕元文等 (2005)、Sugar 和 Basile (2008) 研究认为, 在一定的外部条件刺激下, 果实表皮细胞老化、坏死, 果肉细胞增大不一致, 使气孔保卫细胞破裂后形成的空洞内产生次生保护组织, 导致细胞壁增厚, 外层细胞破损, 进而形成果点, 造成果皮木栓化, 随着木栓化的积累就形成了果皮褐色。梨幼果期是褐色形成的关键时期, 该时期降雨量直接影响到梨果实表面果锈的覆盖面积 (Sugar & Basile, 2008)。目前关于梨果皮褐色形成过程中各种酶活性变化规律以及与果皮中木质素含量之间相关性的研究较少。

咖啡酰辅酶 A - O - 甲基转移酶 (Caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase, *CCoAOMT*) 是木质素生物合成苯丙酸途径中的一种关键酶, 对 G 木质素合成特异调控 (李潞滨 等, 2007)。Meyermans 等 (2000) 在抑制 *CCoAOMT* 表达的转基因杨树中发现木质素的含量降低了 12%, 而 Zhong 等 (1998) 获得了反义 *CCoAOMT* 表达的转基因烟草, 木质素的含量下降了 36% ~ 37%。研究表明, *CCoAOMT* 的表达活性与木质素含量密切相关。

在安徽省砀山酥梨自然保护区资源考察中发现一株 50 年生的‘砀山酥梨’芽变, 定名为‘锈酥’。‘砀山酥梨’果皮黄绿, 而变异品系‘锈酥’果皮表现褐色, 经 AFLP、ISSR 分子标记初步研究, 确定为遗传性变异 (Zhu et al., 2009; 朱立武 等, 2009)。

本试验中以‘砀山酥梨’和‘锈酥’为试材, 测定二者不同时期果皮中木质素含量和相关酶活性, 分析酶活性与木质素之间的相关性; 选择盛花后 100 d 的果实, 切取表面刚刚出现褐色的果皮, 通过抑制性消减杂交 (SSH) 技术构建‘锈酥’正、反向 SSH-cDNA 文库。在正向 SSH-cDNA 文库中筛选到木质素生物合成过程中关键酶基因 *CCoAOMT*, 进而克隆其部分核苷酸序列, 利用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 手段研究 *CCoAOMT* 在‘砀山酥梨’和‘锈酥’不同时期果皮中的表达差异, 进一步探讨果皮褐色形成的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为‘锈酥’（‘砀山酥梨’的褐皮芽变）不同发育时期的果实，样品取自安徽省砀山县园艺场。2010年分别在花后25、50、75、100、125、150和175 d，从‘锈酥’树冠外围东、南、西、北面及内膛枝条上随机摘取果实各2个，置入冰盒带回实验室，切取厚度为0.5~1.0 mm的果皮，经液氮处理后混合均匀，保存于-80℃冰箱中备用。以‘砀山酥梨’为对照，单株小区，4次重复。

1.2 果皮木质素含量及其酶活性的测定

木质素测定参照林葵等（1996）的方法进行，通过木质素标准品（Sigma-Aldrich, USA）曲线查得果皮中木质素含量，结果以鲜样质量百分比表示（%）。应用SPSS软件进行差异显著性分析，并进行相关性分析。

苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine ammonia-lyase, PAL）活性的测定参照薛应龙（1980）的方法，以每分钟在290 nm处吸光度变化0.01所需酶量为一个酶活性单位；4-香豆酸辅酶A连接酶（4-hydroxycinnamate co-A ligase, 4CL）活性的测定参照毕咏梅和欧阳光察（1990）的方法，以变化0.0001 OD值为一个酶活性单位；肉桂醇脱氢酶（Cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD）活性的测定参照Goffner等（1992）的方法进行，以1 min变化0.001吸光值为一个酶活性单位；过氧化物酶（Peroxidase, POD）活性的测定采用愈创木酚法（王学奎，2006），以每分钟A₄₇₀变化0.01为一个酶活性单位。

1.3 RNA提取与SSH-cDNA文库构建

采用改良的CTAB法提取盛花后100 d的‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮总RNA（张志良和瞿伟菁，2003），DNA I消化后保存于-80℃备用。

采用抑制消减杂交（suppression subtractive hybridization, SSH）方法（Liu et al., 2009），构建正、反向SSH-cDNA文库，从中筛选出与木质素生物合成密切相关的表达序列探针（expression sequence tags, ESTs）。

1.4 CCoAOMT 3'端序列获得与实时荧光定量 RT-PCR 分析

根据已知的CCoAOMT的一段中间序列设计特异引物（表1）；参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual试剂盒说明书步骤，以3'-CDS为接头（表1），反转录得到cDNA后进行3'端PCR的扩增。反应程序94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 60℃退火50 s, 72℃延伸3 min, 32个循环后，将PCR产物稀释10倍作为第二轮扩增模板，将引物UPM换为NUP，PCR反应体系程序同上。将得到的目的片段经回收、连接和阳性克隆筛选，送交上海生工生物技术有限公司测序。

根据CCoAOMT基因的3'端序列，设计荧光引物ygCCoAOMT-PF和ygCCoAOMT-PR（表1），GAPDH作为内参扩增引物，以盛花后75、100、125、150和175 d‘砀山酥梨’和‘锈酥’的果皮为试样，进行Real-time PCR扩增。

反应体系按TaKaRa SYBR Premix EX Taq试剂盒步骤进行操作。反应采用两步法，在AB Step One 实时荧光PCR仪上进行，95℃预变性90 s, 95℃变性30 s, 60.6℃退火和延伸40 s, 40个循环，在60.6℃进行荧光信号采集，反应结束后生成融解曲线。样品各设4个重复，分别对应一个内参，以ROX作为荧光校正，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量的测定。

表 1 PCR 扩增所需要的引物及其序列
Table 1 PCR amplification required primers and sequences

引物名称 Name of primer	引物序列 (5' to 3') Sequence of primer
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30 VN
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
<i>CCoAOMT</i>	GTCTACACTGGCTACTCCCTCCTT
yg <i>CCoAOMT</i> -PF	CAAATGAACCACCAACCCTAATTG
yg <i>CCoAOMT</i> -PR	GAACCATCCAAATACAAATACAAAGTAG

2 结果与分析

2.1 ‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中木质素含量比较

盛花后各个时期，‘锈酥’果皮中木质素含量均显著高于‘砀山酥梨’（图 1，I）。以某个时期木质素含量减去前一时期的木质素含量，差值称为木质素增量。随着果实的发育，‘锈酥’果皮木质素增量在前期逐渐增加，后期回落；而‘砀山酥梨’果皮中木质素增量则交替出现 3 次高峰。花后 75 ~ 125 d 之间，即 6 月中旬到 8 月上旬，是‘锈酥’果皮褐色产生的关键时期，其木质素增量也均明显高于‘砀山酥梨’（图 1，II）。果实整个生长发育过程中，‘锈酥’果皮中的木质素增量累计比‘砀山酥梨’高 12.2%，这可能是‘锈酥’果皮褐色产生的原因之一。

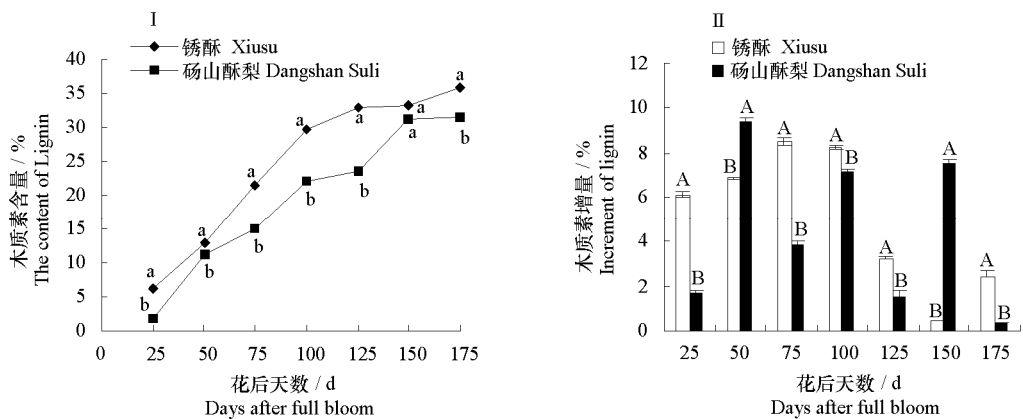


图 1 ‘砀山酥梨’与其芽变品系‘锈酥’果皮中木质素含量（I）及其增量（II）
不同小写字母表示差异达到显著水平（ $P \leq 0.05$ ）；不同大写字母表示差异达到极显著水平（ $P \leq 0.01$ ）。下同。
Fig. 1 Lignin content in the pericarp of ‘Dangshansuli’ and its russet mutant ‘Xiusu’
Different lower case letter indicates significant difference at $P \leq 0.05$ level; Different capital letter indicates extremely significant difference at $P \leq 0.01$. The same below.

2.2 ‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中酶活性比较

2.2.1 果皮中 PAL 酶活性的变化

‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中 PAL 酶活性均呈先平稳上升，后急剧下降的趋势。除盛花后 150 d 之外，‘锈酥’的 PAL 酶活性都高于‘砀山酥梨’（图 2）。

2.2.2 果皮中 4CL 酶活性的变化

在花后 25 ~ 75 d，‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中 4CL 酶活性上升趋势明显，花后 75 d 达到最

大值, 随后急剧下降。在盛花后 50~100 d, ‘锈酥’ 果皮中 4CL 酶活性高于 ‘砀山酥梨’ (图 3)。

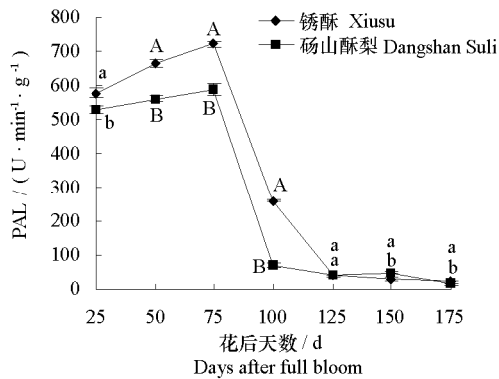


图 2 ‘砀山酥梨’ 与其芽变品系 ‘锈酥’ 果皮中 PAL 酶活性
Fig. 2 PAL enzyme activity in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and its russet mutant ‘Xiusu’

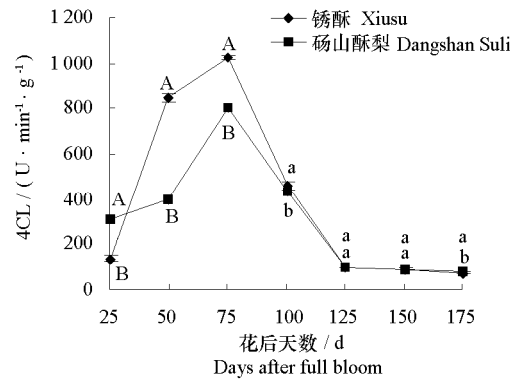


图 3 ‘砀山酥梨’ 与其芽变品系 ‘锈酥’ 果皮中 4CL 酶活性
Fig. 3 4CL enzyme activity in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and its russet mutant ‘Xiusu’

2.2.3 果皮中 CAD 酶活性的变化

随着幼果的生长发育, ‘砀山酥梨’ 和 ‘锈酥’ 果皮中 CAD 酶活性急剧升高, 在花后 75 d 达到最大值, 随后逐渐下降, 两者变化趋势几乎一致。除花后 25 和 125 d 外, ‘锈酥’ 果皮中 CAD 酶活性均高于 ‘砀山酥梨’ (图 4)。

2.2.4 果皮中 POD 酶活性的变化

‘砀山酥梨’ 和 ‘锈酥’ 果皮中 POD 酶活性, 在花后 25~125 d 处于较高水平后, 急剧下降。在花后 50~125 d, ‘锈酥’ 果皮中 POD 酶活性明显高于 ‘砀山酥梨’ (图 5)。

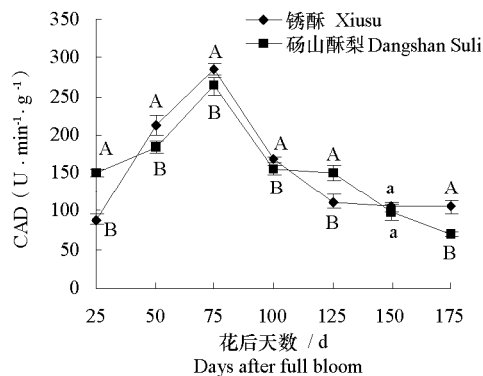


图 4 ‘砀山酥梨’ 其芽变品系 ‘锈酥’ 果皮中 CAD 酶活性
Fig. 4 CAD enzyme activity in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and its russet mutant ‘Xiusu’

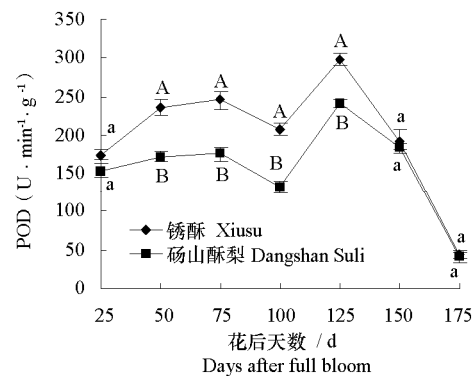


图 5 ‘砀山酥梨’ 与其芽变品系 ‘锈酥’ 果皮中 POD 酶活性
Fig. 5 POD enzyme activity in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and its russet mutant ‘Xiusu’

2.3 木质素增量与不同酶活性之间相关性分析

相关分析结果显示, ‘锈酥’ 果皮木质素增量分别与 PAL 酶、4CL 酶活性呈显著正相关; 且 PAL 与 4CL 酶活性呈显著正相关, 4CL 酶活性与 CAD 酶活性呈极显著正相关。‘砀山酥梨’ 果皮

中除 4CL 酶和 CAD 酶活性呈极显著正相关外, 其余各性状之间相关性均未达到显著水平 (表 2)。

表 2 ‘砀山酥梨’和‘锈酥’果皮中木质素增量与酶活性相关性分析
Table 2 The correlation analysis between enzyme activities and increment of lignin in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and ‘Xiusu’

指标 Item	木质素 Lignin	苯丙氨酸解氨酶 PAL	4- 香豆酸辅酶 A 连接酶 4CL	肉桂醇脱氢酶 CAD	过氧化物酶 POD
木质素 Lignin		0.1816	0.2544	0.2178	0.2507
苯丙氨酸解氨酶 PAL	0.7961*		0.7198	0.7514	0.1818
4- 香豆酸辅酶 A 连接酶 4CL	0.7622*	0.7995*		0.9144**	0.1032
肉桂醇脱氢酶 CAD	0.7047	0.6957	0.9771**		0.4478
过氧化物酶 POD	0.3129	0.2918	0.3903	0.3924	

注: **表示极显著相关; *表示显著相关。对角线右上角数据为‘砀山酥梨’; 左下角数据为‘锈酥’。

Note: ** mean extremely significant differences at 1% level; * mean extremely significant differences at 5% level. The data of 'Dangshan Suli' is in the upper right of the diagonal line, and that of 'Xiusu' is in the lower left of the diagonal line.

2.4 *CCoAOMT* 基因 3'端克隆及其 Real-time PCR 检测

在‘锈酥’正向 SSH-cDNA 文库中筛选出了 *CCoAOMT*-EST。通过 3'-RACE 进一步获取其基因 3'端核苷酸序列,长度为 746 bp。经过 NCBI Blast 比对,确定为 *CCoAOMT* 基因 3'端核苷酸序列(图 6)。

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
GTCTACACTGGCTACTCCCTCCTTCTCATCGATCTCTCAGTACTCTGCGTTGATACCACTGCTTTTGCCACTGCCCTTGCCATTCTCTGAT

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
GATGGAAAGATCTTGGCCATGGACATCAACAAAGAAAAATTATGAACTGGGTCTTCCGATAATCGAAAAGGCTGGTGTGCCCCACAAGATC

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
GACTTTAGAGAAGGCCCCGCGCTCCCAATGCTCGACTTATTGATCGAAGATAAGAAGAATCATGGGTCGTACGATTTCATTTCGTGGAC

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
GCAGACAAAGACAACATACATCAACTACCACAAGAGGCTGATTGATTGGTCAAGGTTGGGGGTCTCATTGGCTACGACAACACCCCTATGG

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AATGGGTCGTGGTCGCGCCCCCTGATGCTCCACTCGCAAGTACGTCAGGTACTACGGGACTTCGTGCTCGAGCTCAACAAGGCACTC

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
GCTGCTGACCCCTAGGATCGAGATCTGCATGCTTCCCGTTGGTGATGGCATCACTCTCTGCCGTGGAATCAAATGAACCACCAACCTTAAT

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
TGGCCTGCCAATCATATATGATGAAGAAAAAATGTGTTTCTTTTTATTATTTTCTTAATCTACTTTGTATTGTATTGGATGGTTCAT

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
CGTCAACGTTTCATGTGCGAGAACTATTACAAGGCAAAAAGAAAAAAATATTATAAGGCGGACAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

      730     740
AGTACTCTGCGTTGATACCACTGTTT

```

图 6 ‘锈酥’ *CCoAOMT* 基因 3' 端核苷酸序列

Fig. 6 The 3-end sequences of *CCoAOMT* gene in ‘Xiusu’ pear

在果实生长发育各个时期,‘锈酥’、‘砀山酥梨’果皮中 *CCoAOMT* 基因均有表达,‘锈酥’相对表达量均高于‘砀山酥梨’(图 7),说明该基因的增量表达是‘锈酥’褐皮形成的重要因子之一。

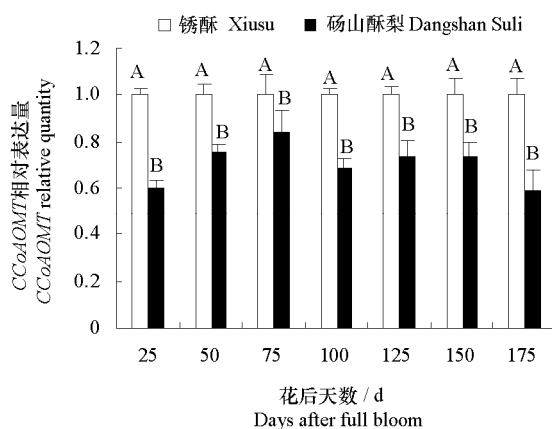


图 7 ‘砀山酥梨’与其芽变品系‘锈酥’果皮 *CCoAOMT* 基因相对表达量
Fig. 7 *CCoAOMT* relative expression quantity in the pericarp of ‘Dangshan Suli’ and its russet mutant ‘Xiusu’

3 讨论

3.1 木质素与相关酶在‘锈酥’果皮褐色形成中的作用

在果实生长发育过程中,除个别时期外,‘锈酥’果皮中 PAL、4CL、CAD 以及 POD 酶活性均高于‘砀山酥梨’。说明无论在木质素合成特异途径,还是木质素单体合成阶段,‘锈酥’果皮中酶催化木质素相关反应的能力总体高于‘砀山酥梨’;‘锈酥’果皮中的木质素增量累计,也比‘砀山酥梨’提高 12.2%。但相关分析结果显示,‘锈酥’果皮木质素增量仅分别与 PAL 酶、4CL 酶活性呈显著正相关;而‘砀山酥梨’果皮中相关酶活性与木质素增量变化的相关性并未达到显著水平。虽然梨果褐皮形成与木质素合成有关,但木质素合成关键酶 PAL、4CL、CAD、POD 的活性与木质素增量的相关关系分析,并未在‘砀山酥梨’、‘锈酥’中表现出相应一致的规律性,说明‘锈酥’果实褐皮形成机制较复杂。由于木质素生物合成过程步骤繁多、影响因素复杂,故‘砀山酥梨’木质素的增量变化趋势与‘锈酥’不同,同时也不能将‘砀山酥梨’、‘锈酥’果皮中木质素含量与酶活性变化归纳为简单的线性关系,其中是否存在其他酶类或者非酶类物质的参与和调节,需要进一步研究。

在‘锈酥’果皮褐色形成的关键时期,除了果皮木质素含量增加,其表皮层虽没有形成木栓层,但细胞木栓化程度较高(衡伟等,2011)。因此,木质素积累可能只是影响‘锈酥’果皮褐色产生的诸多原因之一。

3.2 *CCoAOMT* 基因表达与木质素生物合成关系

植物中木质素主要有 3 种单体合成,其结构差异主要在于甲基化程度,而 *CCoAOMT* 催化咖啡酰辅酶 A 进行甲基化反应(Meyermans et al., 2000)。抑制 *CCoAOMT* 表达,会使植物中木质素含量普遍降低,并伴随组分的改变(Li et al., 2000)。虽然‘锈酥’各个时期果皮中 *CCoAOMT* 基因的相对表达量均显著高于‘砀山酥梨’,但在花后 50 和 150 d,‘砀山酥梨’果皮中木质素增量却显著高于‘锈酥’,两者变化并不一致,表明‘砀山酥梨’果皮中木质素生物合成过程中还存在其它阶

段性促进因子, 均有待于进一步验证。

许多研究表明, 基因及其表达的中间产物 mRNA 水平, 并不能代表蛋白质(基因表达产物)水平的研究, 虽然 mRNA 与表达的蛋白质存在相关性, 但其相关程度并不高, 相关系数常低于 0.5 (Anderson & Seilhamer, 1997; Gygi et al., 1999)。对‘砀山酥梨’和‘锈酥’正、反向 SSH-cDNA 文库 ESTs 初步分析发现, ‘锈酥’果皮褐色产生还与几丁质、阿拉伯多糖、果胶等物质有关。‘锈酥’果皮褐色的形成机制, 尚需从蛋白质组学、代谢组学角度继续深入研究。

References

- Anderson L, Seilhamer J. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18: 533.
- Bi Yong-mei, Ou Yang Guang-cha. 1990. Properties of 4-coumarate CoA ligase in rice. *Plant Physiology Communications*, (6): 18 - 20. (in Chinese)
- 毕咏梅, 欧阳光察. 1990. 水稻 4 - 香豆酸 CoA 连接酶的基本性质. *植物生理学通讯*, (6): 18 - 20.
- Cao Yu-fen. 2001. Red pear germplasm resources in China. *China Seed Industry*, (1): 26 - 27. (in Chinese)
- 曹玉芬. 2001. 我国红皮梨种质资源. *中国种业*, (1): 26 - 27.
- Chen Jian-zhong, Ge Shui-lian, Wang You-nian, Ye Jia. 2008. Relationship between lignification of peach fruit endocarp and the activities of related enzyme. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, (9): 100 - 103. (in Chinese)
- 陈建中, 葛水莲, 王有年, 叶 嘉. 2008. 桃内果皮木质化与其相关酶的关系. *河南农业科学*, (9): 100 - 103.
- Dondini L, Pierantoni L, Ancarani V, D'Angelo M, Cho K H, Shin I S, Musacchi S, Kang S J, Sansavini S. 2008. The inheritance of the red color character in European pear (*Pyrus communis*) and its map position in the mutated cultivar ‘Max Red Bartlett’. *Plant Breeding*, 127 (5): 524 - 526.
- Du Preez M G, Rees D J G. 2008. Investigating the molecular mechanism of anthocyanin production in ‘Bon Rouge’ *Pyrus communis* L. *Acta Horticulturae*, 800: 383 - 390.
- Feng S Q, Wang Y L, Yang S, Xu Y T, Chen X S. 2010. Anthocyanin biosynthesis in pears is regulated by a R2R3-MYB transcription factor PyMYB10. *Planta*, 232: 245 - 255.
- Fischer T C, Gosch C, Pfeiffer J, Halbwirth H, Halle C, Stich K, Forkmann G. 2007. Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*). *Trees*, 21: 521 - 529.
- Goffner D, Joffroy I, Grima P J, Halpin C, Knight M E, Schuch W, Boudet A M. 1992. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol denhydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta*, 188 (1): 48 - 53.
- Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, Aebersold A. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19: 1720 - 1730.
- Heng Wei, Jia Bing, Ye Zhen-feng, Li Xiao-feng, Li Xue, Zhu Li-wu. 2011. Analysis of the pericarp structure of russet mutant of ‘Dangshansuli’. *China Fruit Trees*, (5): 20 - 22. (in Chinese)
- 衡 伟, 贾 兵, 叶振风, 李晓峰, 李 雪, 朱立武. 2011. 砀山酥梨褐皮芽变品系锈酥果皮结构分析. *中国果树*, (5): 20 - 22.
- Kim D, Hwang J H, Shin Y U, Shin I S, Lee H J, Hong S S, Kang S J. 2005. Development of molecular markers linked to several fruit traits in oriental pear. *Acta Hort*, 671: 315 - 321.
- Li Lu-bin, Liu lei, He Cong-fen, Dong Yin-mao, Peng Zhen-hua. 2007. Research progresses on the genes encoding the key enzymes in biosynthetic pathway of lignin. *Molecular Plant Breeding*, 6 (Supplement): 45 - 51. (in Chinese)
- 李潞滨, 刘 蕾, 何聪芬, 董银卯, 彭镇华. 2007. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展. *分子植物育种*, 6 (增刊): 45 - 51.
- Li L, Popko J L, Umezawa T, Chiang V L. 2000. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem*, 275: 6537 - 6545.
- Lin Kui, Huang Xiang-hui, Wang Long-hua, Li Ren-gui, Yan Ji-qiong. 1996. The change of PAL activity and lignin content during adventitious buds formation of cotyledon in *Cucumis melon* L. *Journal of East China Normal University: Natural Science*, (2): 92 - 97. (in Chinese)
- 林 葵, 黄祥辉, 王隆华, 李人圭, 颜季琼. 1996. 甜瓜子叶不定芽分化过程中PAL活性和木质素含量变化研究. *华东师范大学学报: 自然科学版*, (2): 92 - 97.
- Liu Q, Zhu A D, Chai L J, Zhou W J, Yu K Q, Ding J, Xu J, Deng X X. 2009. Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 60 (3): 801 - 813.

- Meyermans H, Morreel K, Lapierre C. 2000. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J Biol Chem*, 275 (47): 36899 – 36909.
- Pierantoni L, Dondini L, Musacchi S, Winkel B J S, Sansavini S. 2009. Gene expression patterns underlying red skin colour in ‘Max Red Bartlett’ (*Pyrus communis*) a ‘Williams’ bud mutation. *Acta Horticulturae*, 814: 567 – 570.
- Shen De-xu, Li Zai-long, Zheng Shu-qun. 1979. Inheritance of pear fruit appearance. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, 5 (1): 83 – 94. (in Chinese)
- 沈德绪, 李载龙, 郑淑群. 1979. 梨果实外观性状的遗传. *浙江农业大学学报*, 5 (1): 83 – 94.
- Song Wei, Wang Cai-hong, Tian Yi-ke, Tian Wei, Yin Hao. 2010. SSR molecular markers linked to the fruit russet skin of pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (8): 1325 – 1328. (in Chinese)
- 宋 伟, 王彩虹, 田义轲, 田 伟, 殷 豪. 2010. 梨果实褐皮性状的 SSR 标记. *园艺学报*, 37 (8): 1325 – 1328.
- Spencer M. 1965. Fruit ripening. *Plant biochemistry*. New York: Academic press: 793 – 823.
- Sugar D, Basile S R. 2008. Color and russet variation among selections of ‘Bosc’ pear. *Journal of the American Pomological Society*, 62 (2): 77 – 81.
- Teng Yuan-wen, Shen Yu-ying, Zhou Xian-zhang. 2005. Induced factor of russet on fruit skin in sand pear and its strategy of solution. *China Southern Fruit Trees*, 34 (3): 52 – 56. (in Chinese)
- 滕元文, 沈玉英, 周先章. 2005. 砂梨果皮锈斑成因及解决对策. *中国南方果树*, 34 (3): 52 – 56.
- Volz R K, White A G, Brewer L R. 2008. Breeding for red skin colour in interspecific pears. *Acta Horticulturae*, 800: 469 – 474.
- Xue Ying-long. 1980. *Plant physiology experiment guidance*. Shanghai: Higher Education Press: 104 – 108. (in Chinese)
- 薛应龙. 1980. *植物生理学实验指导*. 上海: 高等教育出版社: 104 – 108.
- Wang Xue-kui. 2006. *Plant physiology and biochemistry experiment principle and technology*. Beijing: Higher Education Press: 57 – 59. (in Chinese)
- 王学奎. 2006. *植物生理生化实验原理和技术*. 北京: 高等教育出版社: 57 – 59.
- Wang Yu-lin, Wei Wen-dong, Li Xiu-gen. 1991. Studies of the trends of inheritance of commercial characteristics of crossed Chinese pear in their progenies. *Journal of Fruit Science*, 8 (2): 75 – 82. (in Chinese)
- 王宇霖, 魏闻东, 李秀根. 1991. 梨杂种后代亲本性状遗传倾向研究. *果树科学*, 8 (2): 75 – 82.
- Zhang Hua-yun, Wang Shan-guang, Mou Qi-yun, Jiang Ming-xing, Sun Feng-lan. 1996. The effect of bagging on laiyangci peel pears in structure and PPO, POD activity. *Acta Horticulturae Sinica*, 23 (1): 23 – 26. (in Chinese)
- 张华云, 王善广, 牟其芸, 蒋明星, 孙凤兰. 1996. 套袋对莱阳在梨果皮结构和 PPO、POD 活性的影响. *园艺学报*, 23 (1): 23 – 26.
- Zhang X D, Allan A C, Yi Q, Chen L M, Li K Z, Shu Q, Su J. 2011. Differential gene expression analysis of Yunnan red pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration. *Plant Mol Biol Rep*, 29: 305 – 314.
- Zhang Xiao-yun, Guo An-ping, He Li-ka, Kong Hua. 2006. Advances in study of lignin biosynthesis and its genetic manipulation. *Molecular Plant Breeding*, 4 (3): 431 – 437. (in Chinese)
- 章霄云, 郭安平, 贺立卡, 孔 华. 2006. 木质素生物合成及其基因调控的研究进展. *分子植物育种*, 4 (3): 431 – 437.
- Zhang Zhi-liang, Qu Wei-jing. 2003. *Plant physiology experimental guiding*. Beijing: Higher Education Press: 290 – 292. (in Chinese)
- 张志良, 瞿伟菁. 2003. *植物生理学试验指导*. 北京: 高等教育出版社: 290 – 292.
- Zhong R Q, Herbert W, Negrel J. 1998. Dual methylafion pathway in lignin biosynthesis. *Plant Cell*, 10: 2033 – 2045.
- Zhu Li-wu, Wang Yan-fang, Jia Bing, Zhang Shui-ming, Huang Yong-feng, Yang Zhen-jiang. 2009. Study on the pear germplasm resources in Dangshan area, Anhui Province by AFLP technology. *Journal of Fruit Science*, 26: 145 – 150. (in Chinese)
- 朱立武, 王艳芳, 贾 兵, 张水明, 黄永丰, 杨振江. 2009. 安徽砀山酥梨自然保护区梨种质资源 AFLP 研究. *果树学报*, 26: 145 – 150.
- Zhu L W, Zhu Y D, Jia B, Zhang S M. 2009. Study on pear (*Pyrus* spp.) germplasm resources collected at the protection district of ‘Dangshansuli’ by ISSR markers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 50 (4): 334 – 340.