

不同色泽甜樱桃果实花色苷积累与其相关酶活性之间的关系

魏海蓉, 谭钺, 宗晓娟, 朱东姿, 陈新, 徐丽, 王甲威, 刘庆忠*

山东省果树研究所/山东省果树生物技术育种重点实验室, 山东泰安271000

摘要: 为探明不同色泽甜樱桃果实发育期间花色苷的积累及其与相关酶活性之间的关系, 本研究以红色甜樱桃品种‘美早’和纯黄色品系‘13-33’为试材, 对果实发育期间花色苷总量及相关酶活性进行了测定, 并且采用超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)对各花色苷组份进行了定性和定量分析。结果表明, 从‘美早’果实中检测出7种花色苷, 各组份含量伴随着果实的发育逐渐升高; 从‘13-33’中仅检测出4种花色苷, 各组份含量随果实的发育逐渐降低, 到果实成熟期其含量已甚微。两个品种的花色苷总量与各组份含量的变化趋势相同; ‘美早’中花色苷总量随着果实的发育逐渐升高, 特别是在转色期后急剧升高; ‘13-33’的花色苷总量随着果实的发育变化不明显, 并且一直维持在极低水平。‘美早’的PAL、CHI、DFR和UFGT酶活性在果实发育后期均显著高于‘13-33’。相关性分析结果表明, ‘美早’的花色苷总量与PAL和DFR酶活性之间无显著相关性, 而与CHI和UFGT酶活性呈显著正相关。

关键词: 甜樱桃; 果实; 花色苷; 超高效液相色谱-串联质谱; 酶活性

色泽作为果实的重要经济性状和外观品质之一, 直接影响消费者的购买欲望, 在一定程度上决定其商品价值(张茜2012)。甜樱桃果实色泽艳丽, 成熟时呈黄色、黄底红晕、红色或深紫色等颜色。甜樱桃果实的红色主要是由花色苷的含量和比例所决定(González-Gómez等2010)。花色苷不仅可以使果实具有艳丽的色泽, 而且在抗氧化、防止冠状动脉心脏疾病、抗肿瘤、抗紫外辐射和抵御病原体等方面具有重要的营养和药理作用(Reis等2016; Liu等2014; Kelebek和Selli 2011; Peiffer等2016)。由于红色甜樱桃品种艳丽的色彩、丰富的营养和较高的保健价值, 一直受到消费者的广泛青睐。因此, 培育品质优良的红色甜樱桃品种是现代育种的重要方向。

在自然界中, 目前已发现了600多种花色苷, 植物中主要含有芍药素、矢车菊素、天竺葵素、飞燕草素、牵牛花素、锦葵色素等6种类型的花色苷(张茜2012; Zhao等2017)。不同物种的果实中花色苷的种类和含量不同, 不同品种之间也存在差异。Liu等(2011)对10个不同色泽甜樱桃品种的17种酚类物质进行了检测, 其中包括10种花色苷类物质, 研究表明, 矢车菊素-3-芸香糖苷为樱桃的主要花色苷物质, 并且不同颜色品种之间花色苷的种类和含量存在显著差异。20世纪90年代初, 通过对玉米、金鱼草和矮牵牛等模式植物进行花色苷突变体的筛选, 其生物合成途径已基本明确(Tanaka等2008)。花色苷的生物合成是类黄酮代谢途径的一个分支, 是转录因子调节下的花色苷

合成结构基因协调表达的过程, 主要由MYB转录因子单独或与bHLH和WD40结合形成MYB-bHLH-WD40三元复合体调控, 同时也受环境因子的影响(Lepiniec等2006)。MYB调控花色苷合成上游结构基因的表达, 而MYB-bHLH-WD40三元复合体主要通过调控下游结构基因的表达而影响花色苷的积累(王华等2015)。结构基因编码合成代谢相关酶类, 直接参与花色苷的生物合成。花色苷的生物合成与苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、二氢黄酮醇还原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)和类黄酮糖基转移酶(UDP glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT)关系密切(冯丽娟等2009; He等2010)。但是, 花色苷生物合成与其相关酶活性关系复杂, 同种酶在不同树种、不同品种的花色苷合成途径中的作用不尽相同(Bashandy等2015; 成果等2017)。与苹果、梨、葡萄、草莓等果树相比(Zhang等2016; 冯守千等2008; 刘金等2012; 罗赞等2014), 目前关于甜樱桃果实花色苷组份、含量的测定及其与相关酶关系的研究报道还很少, 这方面有待深入探索。

本文旨在了解甜樱桃果实发育过程中花色苷

收稿 2016-10-20 修定 2017-02-28

资助 “十二五”国家科技支撑计划(2013BAD02B03-3-2)、山东省现代农业产业技术体系果品产业创新团队专项基金(SDAIT-06-04)和山东省农业科学院青年科研基金项目(2014QNM33)。

* 通讯作者(E-mail: qzliu001@126.com)。

组份、含量和相关酶活性的变化及其之间的关系,探讨果实着色的生理机制,为甜樱桃色泽调控提供理论依据。

材料与方 法

1 试验材料

本试验于2014年5~7月在山东省果树研究所进行。供试品种分别为纯黄色甜樱桃品系‘13-33’(*Prunus avium* L. cv. ‘13-33’)和深红色甜樱桃品种‘美早’(*P. avium* L. cv. ‘Tieton’)。树龄为6年生,南北行栽植,生长结果正常,全园统一正常水肥管理。选择长势基本一致的树体,从花后20 d开始,每隔1周采样1次,每次采集30~50个果实,放入冰盒迅速带回实验室。所有样品均从果实表面切取1~2 mm厚果肉(包含果皮),立即用液氮速冻,存于-80℃冰箱中,用于各生理指标测定。所有实验均设置3次重复。

2 测定方法

2.1 花色苷总量的测定

取果实鲜样0.5 g,加液氮研磨成粉末后,置于50 mL离心管中,准确加入甲醇-0.1%甲酸水提取液15 mL,超声波震荡10 min后,放入4℃冰箱浸提24 h。13 400×g离心15 min,收集上清液。参考王惠聪等(2004)的方法,采用分光光度计测定提取液在553和600 nm处的吸光值,两者之差即为花色苷的相对含量。差值每增加0.01定义为一个单位U。

2.2 花色苷组分定性定量测定

利用2.1方法制备的样品提取液在35℃条件下旋转蒸发至浸膏状,甲醇-0.1%甲酸水(2:8, V/V)回溶,定容至2 mL,过0.22 μm有机微孔滤膜,压入2 mL进样瓶,放入-20℃冰箱中保存,用于UP-LC-MS/MS测定。

7种花色苷类标准品分别为购置于法国Extrasynthese公司的矢车菊素-3-葡萄糖苷(CAS: 7084-24-4)、矢车菊素-3-芸香糖苷(CAS: 18719-76-1)和美国Sigma公司的芍药素-3-葡萄糖苷(CAS: 6906-39-4)、芍药素-3-芸香糖苷(CAS: 27539-32-8)、天竺葵素-3-芸香糖苷(CAS: 33978-17-5)、矢车菊素-3-木糖苷(CAS: 29761-24-8)和飞燕草素-3-葡萄糖苷(CAS: 6906-38-3)。

UPLC条件:色谱柱为Phenomenex Kinetex (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm);柱温35℃,进样量5 μL,

流速0.3 mL·min⁻¹;流动相A为含0.1%甲酸的水溶液(含5 mmol·L⁻¹甲酸铵),流动相B为100%甲醇。采用梯度洗脱,梯度洗脱程序:0~1.0 min, 20% B; 1.0~5.5 min, 20%~70% B; 5.5~7.8 min, 80% B; 7.8~8.0 min, 80% B~20% B; 8.0~9.0 min, 20% B。

MS/MS条件:电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式;多重反应监测(MRM)参数:气帘气275.79 kPa,离子化电压+4 500 V,离子源温度550℃,电喷雾气344.74 kPa,辅助加热气379.21 kPa,碰撞气55.16 kPa,驻留时间40 ms。

2.3 PAL和CHI酶活性测定

准确称取0.5 g果实鲜样,加液氮粉碎研磨,然后加入5 mL提取液[0.05 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.0)、0.05 mol·L⁻¹ 抗坏血酸、0.018 mol·L⁻¹ β-巯基乙醇] 4℃条件下,13 400×g离心20 min,上清液即为酶粗提液,用于检测PAL和CHI酶活性。PAL和CHI酶活性测定参照Lister和Lancaster (1996)的方法进行。

2.4 DFR和UFGT酶活性测定

取果实样品1 g加液氮研磨后,转移至50 mL离心管中,加入5 mL -20℃的丙酮混匀,4℃条件下,4 845×g离心20 min,弃去上清液,用4 mL -20℃丙酮再提取一次。沉淀用4 mL [0.1 mol·L⁻¹ 硼酸缓冲液(pH 8.8)、5 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸]溶液提取,上清液即为DFR和UFGT的粗提液。DFR酶活性测定参照Stafford等(1984)的方法,UFGT酶活性测定参照Lister和Lancaster (1996)的方法。

3 数据分析

采用SPSS 16.0进行邓肯式新复极差法多重比较和差异显著性分析($P<0.05$),分析作用的所有数据均为3次重复的平均值。

实验结果

1 果实发育期间不同色泽甜樱桃花色苷总量的变化

甜樱桃品种‘美早’和‘13-33’果实发育期间花色苷含量的变化趋势见图1。两品种果实发育过程中的花色苷总量变化趋势不同。‘美早’果实中的花色苷总量在花后41 d之前增加缓慢,41 d之后急剧上升,直至果实成熟。花色苷总量由果实发育早期(20 d DAF)的0.67 U·g⁻¹ (FW)上升至完熟期(55 DAF)的197.4 U·g⁻¹ (FW),增长约300倍。然而,‘13-33’果实中花色苷总量在整个果实发育期间变

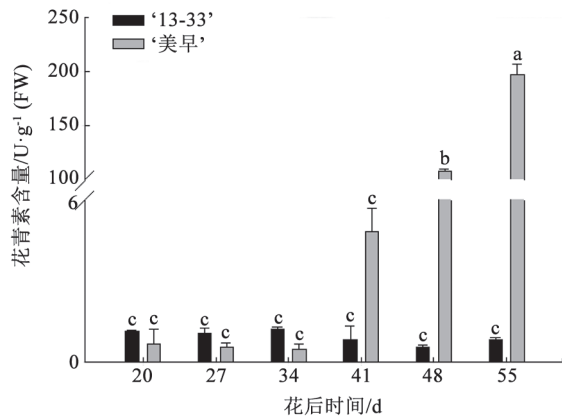


图1 果实发育期间不同色泽甜樱桃花色苷总量变化

Fig.1 Changes in total anthocyanins contents during development of fruits in different color of sweet cherry cultivars fruits

不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。下图同此。

化不明显,并且一直保持在极低水平。在果实成熟期,‘美早’果实中花色苷的总量显著高于‘13-33’,两者差异达极显著水平。

2 果实发育期间不同色泽甜樱桃花色苷组份和含量分析

采用优化好的UPLC/MS/MS检测方法,通过对保留时间、液相图谱、分子碎片的分析,和各个色谱峰的结构推断,并进一步与标准物质进行比对,对甜樱桃果实中花色苷类物质的组份进行定性分析。从‘美早’成熟果实中共检测出7种花色苷,分别为矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-芸香糖苷、天竺葵素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和飞燕草素-3-葡萄糖苷(表1)。从‘13-33’的成熟果实中仅检测出矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-

表1 不同色泽甜樱桃果实发育期间花色苷类物质的含量

Table 1 The contents of anthocyanins in different color of sweet cherry cultivars during fruit development

品种	花后时间/d	花色苷含量/mg·100 g ⁻¹ (FW)						
		矢车菊素-3-芸香糖苷	矢车菊素-3-葡萄糖苷	矢车菊素-3-木糖苷	飞燕草素-3-葡萄糖苷	芍药素-3-葡萄糖苷	芍药素-3-芸香糖苷	天竺葵素-3-芸香糖苷
'美早'	20	0.12 ^d	3.09 ^{de}	0.06 ^d	0.62 ^c	0 ^c	0.56 ^c	0 ^c
	35	26.20 ^c	9.46 ^c	0.07 ^{cd}	0.39 ^{de}	0.75 ^b	0.62 ^c	0.01 ^c
	45	66.80 ^b	39.86 ^b	0.23 ^b	1.17 ^b	0.69 ^b	0.95 ^b	1.50 ^b
	55	74.00 ^a	58.25 ^a	0.44 ^a	1.40 ^a	1.01 ^a	1.48 ^a	3.40 ^a
'13-33'	20	0.12 ^d	5.46 ^d	0.14 ^c	0.49 ^{cd}	0 ^c	0 ^d	0 ^c
	35	0.29 ^d	1.49 ^{ef}	0.10 ^{cd}	0.25 ^{ef}	0 ^c	0 ^d	0 ^c
	45	0.52 ^d	0.75 ^{ef}	0.11 ^{cd}	0.24 ^{ef}	0 ^c	0 ^d	0 ^c
	55	0.33 ^d	0.50 ^f	0.07 ^{cd}	0.15 ^f	0 ^c	0 ^d	0 ^c

不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。

葡萄糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和飞燕草素-3-葡萄糖苷4种花色苷(表1)。

由表1可知,‘美早’和‘13-33’果实中不仅含有的花色苷种类不同,而且同一物质在两个品种中的含量差异显著,在果实发育期间的变化趋势也不同。‘美早’中的7种花色苷的含量均随果实的发育逐渐升高。矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷的含量在果实转色期(35 DAF)后迅速增加,到果实成熟期,矢车菊素-3-芸香糖苷已增加到74 mg·100 g⁻¹ (FW),占总含量的52.86%,为‘美早’中含量最高的一种花色苷。矢车菊素-3-葡萄糖苷的含量为58.25 mg·100 g⁻¹ (FW),占总含量的41.61%,

仅次于矢车菊素-3-芸香糖苷。矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷在果实成熟期显著高于其它5种花色苷,是‘美早’中的2种主要花色苷。芍药素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-芸香糖苷、天竺葵素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和飞燕草素-3-葡萄糖苷的含量在整个果实发育期间一直比较低,其中芍药素-3-葡萄糖苷和天竺葵素-3-芸香糖苷在果实发育前期(20 DAF)可能是由于含量太低,未检测到。

从表1还可以看出,‘13-33’果实中的4种花色苷的含量均显著低于‘美早’。其中,矢车菊素-3-芸香糖苷的含量随着果实的发育先增加后降低,但

一致保持在较低水平。矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和飞燕草素-3-葡萄糖苷的含量随着果实的发育逐渐降低,到果实成熟期其含量已甚微。

3 不同色泽甜樱桃果实发育期间PAL、CHI、DFR和UFGT酶活性变化

如图2所示,‘美早’与‘13-33’果实中PAL酶活性的变化趋势不同。‘美早’果实中PAL酶活性随着果实的发育逐渐升高至果实成熟。‘13-33’果实中PAL酶活性在果实发育前期升高,在花后27 d时达到高峰,之后急剧下降。

在整个果实发育期间,‘美早’果实中CHI酶活性显著高于‘13-33’,其变化趋势与PAL相同,随着果实的发育逐渐升高。在‘13-33’果实中,CHI酶活性随着果实的发育,略有降低,但差异不显著。

‘13-33’果实中,DFR酶活性在果实发育前期逐渐升高,在花后34 d时达到高峰,之后急剧下降(图2)。“美早”果实中DFR酶活性,随着果实的发育,呈现出波动性上升的变化趋势(图2)。

‘13-33’和‘美早’的UFGT酶活性在整个果实发育期间的变化趋势相同,但是‘13-33’的UFGT酶活性在整个果实发育期间上升缓慢。‘美早’的UFGT

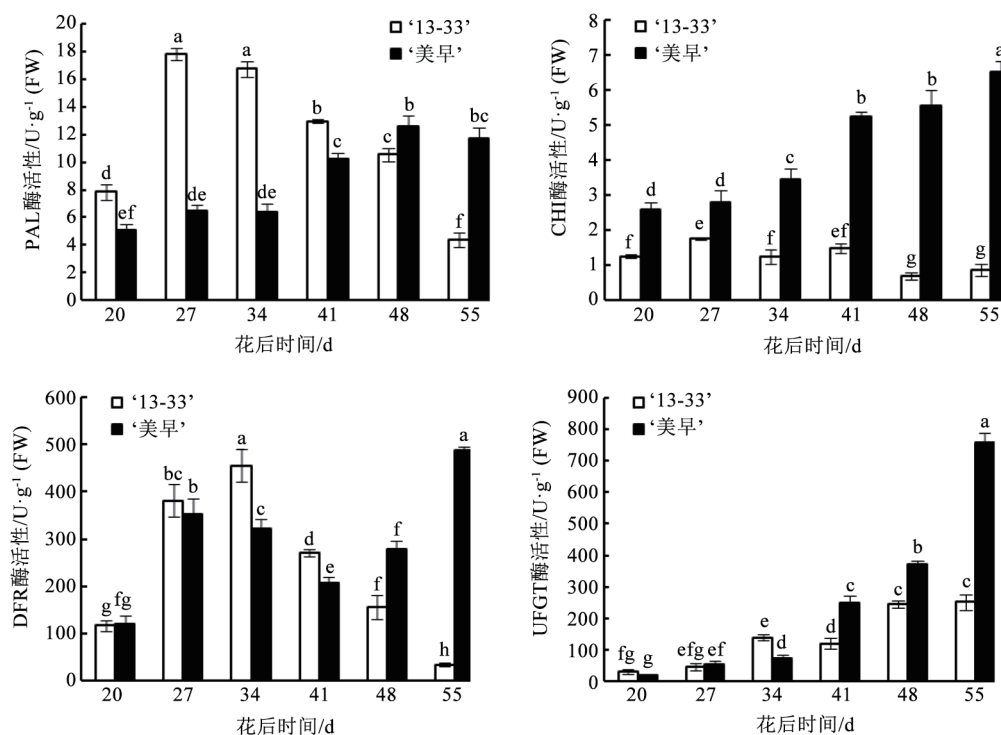


图2 果实发育期间不同色泽甜樱桃PAL、CHI、DFR和UFGT酶活性变化

Fig.2 The activity changes in PAL, CHI, DFR and UFGT during development of the fruits in different color of sweet cherry cultivars fruits

酶活性在果实着色(花后34 d)之前,缓慢上升,进入果实着色期后(花后34 d)急剧升高。果实成熟期,‘美早’的UFGT活性显著高于‘13-33’。

4 花色苷含量与PAL、CHI、DFR和UFGT酶活性的相关性分析

从表2中可以看出,在整个果实发育期间,‘美早’中花色苷含量与CHI和UFGT酶活性的相关系数分别为0.827和0.957,达到显著和极显著水平,

与PAL和DFR的相关性不显著。‘13-33’的花色苷含量与UFGT酶活性呈负相关,与PAL、CHI和DFR活性呈正相关,但未达到显著水平。

讨论

关于花色苷的检测方法,目前常用紫外可见分光光度法、液相色谱法和液相色谱串联质谱法(Usenik等2008;刘仁道等2008;宋亚等2016)。其

表2 果实发育期间不同色泽甜樱桃花色苷含量与花色苷合成相关酶的相关性系数

Fig.2 The correlation coefficient of anthocyanin contents and enzymes activities of anthocyanin biosynthesis during fruit development in different color of sweet cherry cultivars

合成相关酶	花色苷总量	
	‘美早’	‘13-33’
PAL	0.765	0.406
CHI	0.827*	0.597
DFR	0.687	0.537
UFGT	0.957**	-0.747

*表示显著差异($P<0.05$), **表示极显著差异($P<0.01$)。

中, 高效液相色谱串联质谱法相比较其它方法在快速分离、准确定性和灵敏度等方面更具有优势。Serradilla等(2011)采用HPLC-DAD/ESI-MS技术从红色甜樱桃品种‘Ambrunés’中检测出矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-葡萄糖苷、天竺葵素和锦葵色素5种花色苷类物质。Ballistreri等(2013)对24个意大利甜樱桃品种的花色苷类物质进行了分析, 共检测出矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-芸香糖苷和天竺葵素-3-芸香糖苷4种花色苷, 并且认为矢车菊素-3-芸香糖苷是樱桃最主要的花色苷物质, 其次是矢车菊素-3-葡萄糖苷。Liu等(2011)研究表明矢车菊素-3-芸香糖苷为樱桃的主要花色苷物质, 并且不同颜色品种之间花色苷的种类和含量存在显著差异。本研究从‘美早’果实中检测出矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-葡萄糖苷、芍药素-3-芸香糖苷、天竺葵素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-木糖苷和飞燕草素-3-葡萄糖苷7种花色苷类物质。从‘13-33’中仅检测出矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-木糖苷4种花色苷类物质。‘美早’中各花色苷组分的含量伴随着果实的发育逐渐升高, ‘13-33’中4种花色苷的含量除了矢车菊素-3-芸香糖苷的含量随着果实的发育先增加后降低, 其它3种均随着果实的发育逐渐降低。到果实成熟期, ‘美早’中各花色苷组分含量显著高于‘13-33’, 但是两品种中含量最高的两种成份均是矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷, 这与前人的研究结果一致(Ballistreri等2013)。

甜樱桃果实发育周期短, 在成熟过程中果实颜色经历了一个很快的变化过程, 其果实的红色主要是由于花色苷积累的结果(Liu等2011; Ballistreri等2013)。本实验结果表明, 红色品种‘美早’果实中的花色苷总量在整个果实发育期内逐渐升高, 特别是在果实着色期后迅速升高, 而黄色品种‘13-33’的花色苷总量在整个果实发育期间含量变化不明显, 并且一直保持在极低含量水平。

PAL是花色苷生物合成途径中上游的第一个酶, 它催化苯丙氨酸生成肉桂酸。关于PAL与花色苷合成的关系, 存在较多争议。前人研究表明, 苹果摘袋后果实的花色苷含量与PAL活性的相关性未达到显著水平, 而在贮藏期间PAL活性与花色苷合成代谢显著相关(Liu等2013; 李秀芳等2014)。Mori等(2014)研究表明PAL酶活性与草莓花色苷含量密切相关。本研究中, ‘美早’的PAL活性随着果实的发育逐渐升高, 但是与花色苷含量变化的相关性不显著。‘13-33’的PAL活性在花后41 d之前一直高于红色品种‘美早’, 但是在果实发育后期逐渐降低。这可能是由于PAL酶的催化产物不仅仅是花色苷合成的前体物质, 同时也是其它酚类物质合成的前体物质。

CHI的催化产物黄烷酮是第一个类黄酮类化合物, 但是植物体内即使没有CHI的催化查尔酮也可以慢慢的向黄烷酮转化。紫皮大蒜鳞茎外皮中的CHI酶活性与花色苷的积累呈极显著的线性关系(闫伟明等2014)。红色砂梨的CHI酶活性与花色苷的合成密切相关(冯守千等2008)。但是荔枝的CHI酶活性与花色苷生物合成关系不密切(王惠聪等2004)。本研究结果表明, 整个果实发育期间‘美早’的CHI酶活性一直高于‘13-33’, 并且‘美早’的CHI酶活性与花色苷含量呈显著正相关。这表明CHI可能是‘美早’果实花色苷生物合成的关键酶。

DFR是催化生成无色花青素的酶, 该步骤是花色苷合成过程中的一个关键步骤。王惠聪等(2004)研究表明DFR酶活性与荔枝果皮花色苷合成无密切关系。大蒜鳞茎外皮中的花色苷积累与DFR酶活性无显著相关性(闫伟明等2014)。Kim等(2005)研究表明, 洋葱鳞茎黄色突变体中, 由于DFR基因转录失活而导致花色苷的缺乏。本研究中, ‘美早’的DFR酶活性呈升-降-升的变化趋势,

‘13-33’的DFR酶活性随着果实的发育逐渐升高,但是果实发育后期(转色期之后)急剧降低。在果实发育后期,‘美早’的DFR酶活性虽然显著高于‘13-33’,但是两品种中花色苷含量与DFR酶活性的相关系数均未达到显著水平。

UFGT是花色苷生物合成过程中最后一个步骤的关键酶,它使不稳定的花青素通过糖基化作用转变为稳定的花色苷(张茜2012)。前人研究表明,UFGT与苹果、红色砂梨、葡萄果实花色苷合成密切相关(冯守千等2008;刘金等2012;Ali等2011;李丽琼等2014)。本研究中,‘美早’的UFGT酶活性在果实转色期后迅速升高与花色苷含量的达到极显著正相关。‘13-33’的UFGT酶活性随着果实的发育也呈缓慢升高的变化趋势,与花色苷含量呈负相关。

综上所述,不同色泽甜樱桃品种中花色苷种类和含量存在显著差异,‘美早’中花色苷总量显著高于‘13-33’,并且与CHI和UFGT酶活性呈显著正相关,可能与甜樱桃果实花色苷的积累密切相关。

参考文献

- Ali MB, Howard S, Chen S, Wang Y, Yu O, Kovacs LG, Qiu W (2011). Berry skin development in norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biol*, (11): 7
- Ballistreri G, Continella A, Gentile A, Amenta M, Fabroni S, Rapisarda P (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem*, 140 (4): 630–638
- Bashandy H, Pietiäinen M, Carvalho E, Lim KJ, Elomaa P, Martens S, Teeri TH (2015). Anthocyanin biosynthesis in gerbera cultivar ‘Estelle’ and its acyanic sport ‘Ivory’. *Planta*, 242 (3): 601–611
- Cheng G, Zhou SH, Huang Y, Zhang Y, Guan JX, Yang Y, Wen RD, Zhang J (2017). Analysis of anthocyanin composition characteristics and gene expression patterns of ‘Guipu No. 6’ grape. *Plant Physiol J*, 53 (1): 103–114 (in Chinese with English abstract) [成果, 周思泓, 黄羽, 张瑛, 管敬喜, 杨莹, 文仁德, 张劲(2017). ‘桂葡6号’葡萄花色苷组成特点与基因表达规律解析. *植物生理学报*, 53 (1): 103–114]
- Feng LJ, Yuan ZH, Yin YL, Zhao XQ, Xu XK, Xu R, Li ZF (2009). Anthocyanin content and the relevant enzymes activities during leaf color changing of two acer species. *Sci Silvae Sin*, 45 (8): 56–60 (in Chinese with English abstract) [冯立娟, 苑兆和, 尹燕雷, 招雪晴, 许鑫科, 徐榕, 李自峰 (2009). 槭属2品种叶变色期花青苷含量与相关酶活性的变化. *林业科学*, 45 (8): 56–60]
- Feng SQ, Chen XS, Zhang CY, Liu XJ, Liu ZC, Wang HB, Wang YL, Zhou CH (2008). A study of the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes activity in *Pyrus pyrifolia* ‘Mantianhong’ and its bud sports ‘Aoguan’. *Sci Agric Sin*, 41 (10): 3184–3190 (in Chinese with English abstract) [冯守千, 陈学森, 张春雨, 刘晓静, 刘遵春, 王海波, 王延玲, 周朝华(2008). 砂梨品种‘满天红’及其芽变品系‘奥冠’花青苷合成与相关酶活性研究. *中国农业科学*, 41 (10): 3184–3190]
- González-Gómez D, Lozano M, Fernández-León MF, Bernalte MJ, Ayuso MC, Rodríguez AB (2010). Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *J Food Compos Anal*, (23): 533–539
- He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15 (12): 9057–9091
- Kelebek H, Selli S (2011). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Int J Food Sci Tech*, 46 (12): 2530–2537
- Kim S, Yoo KS, Pike LM (2005). Development of a PCR-based marker utilizing a deletion mutation in the dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene responsible for the lack of anthocyanin production in yellow onions (*Allium cepa*). *Theor Appl Genet*, 110 (3): 588–595
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, (57): 405–430
- Li LQ, Liao MA, Yang SY (2014). Effects of the different altitudes and canopies on coloration and enzyme activity of golden delicious apple (*Malus domestica* Borkh. cv.). *Acta Agri Nucl Sin*, 28 (3): 0512–0517 (in Chinese with English abstract) [李丽琼, 廖明安, 阳世莹(2014). 不同海拔和树冠层次对金冠苹果着色及相关酶活性的影响. *核农学报*, 28 (3): 0512–0517]
- Li XF, Rao JP, Ma QS, Sun ZY, Han Y (2014). Effects of 1-MCP treatment on the pericarp pigment and the activity of related enzymes of ‘red fuji’ apple. *Acta Horti Sin*, 41 (3): 447–455 (in Chinese with English abstract) [李秀芳, 饶景萍, 马秋诗, 孙振营, 韩叶(2014). 红富士苹果采后1-MCP处理对果皮色素及其相关酶活性的影响. *园艺学报*, 41 (3): 447–455]
- Lister CE, Lancaster JE (1996). Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *J Sci Food Agric*, 71: 313–320
- Liu J, Wei JL, Liu MY, Song Y, Feng SQ, Wang CZ, Chen XS (2012). The relationships between the enzyme activity of anthocyanin biosynthesis, ethylene release and anthocyanin accumulation in fruits of precocious apple cultivars. *Acta Horti Sin*, 39 (7): 1235–1242 (in Chinese with English abstract) [刘金, 魏景立, 刘美艳, 宋杨, 冯守千, 王传增, 陈学森(2012). 早熟苹果花青苷积累与其相关酶活性及乙烯生成之间的关系. *园艺学报*, 39 (7): 1235–1242]
- Liu RD, Zhang M, Li XX (2008). Comparisons of extraction solvents and quantitative methods for analysis of anthocyanins in strawberry and blueberry fruits. *Acta Horti Sin*, 35 (5): 655–660 (in Chinese with English abstract) [刘仁道, 张猛, 李新贤(2008). 草莓和蓝莓果实花青素提取及定量方法的比较. *园艺学报*, 35 (5): 655–660]
- Liu WH, Xu JM, Liu YL, Yu XP, Tang X, Wang Z, Li X (2014). Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human

- epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Med Rep*, 10: 1921–1926
- Liu Y, Liu X, Zhong F, Tian R, Zhang K, Zhang X, Li T (2011). Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *J Food Sci*, 76 (4): C633–C638
- Liu Y, Che F, Wang L, Meng R, Zhang X, Zhao Z (2013). Fruit coloration and anthocyanin biosynthesis after bag removal in non-red and red apples (*Malus domestica* Borkh.). *Molecules*, 18 (2): 1549–1563
- Luo Y, Chen ZL, Song WT, Wang HQ (2014). Identification and analysis for anthocyanins compositions in strawberry. *J China Agric Univ*, 19 (5): 86–94 (in Chinese with English abstract) [罗贇, 陈宗玲, 宋卫堂, 王红清(2014). 草莓果实花色苷成分组成鉴定及分析. *中国农业大学学报*, 19 (5): 86–94]
- Zhang Q (2012). Variations of coloring and soluble sugar content in red-skinned pear fruit and the influences affected by soluble sugars spraying treatments measurement during different fruit development stages [Master's thesis]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [张茜(2012). 红皮梨果实着色与可溶性糖的关系和喷施外源糖的增色效果 (硕士学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Mori T, Sakurai M, Sakuta M (2000). Changes in PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) activity during anthocyanin synthesis in suspension culture of *Fragaria ananassa*. *Plant Cell Tiss Org*, 62 (2): 135–139
- Peiffer DS, Wang LS, Zimmerman NP, Ransom BW, Carmella SG, Kuo CT, Chen JH, Oshima K, Huang YW, Hecht SS, et al (2016). Dietary consumption of black raspberries or their anthocyanin constituents alters innate immune cell trafficking in esophageal cancer. *Cancer Immunol Res*, 4 (1): 72–82
- Reis JF, Monteiro VVS, Gomes RS, Carmo MM, Costa GV, Ribera PC, Monteiro MC (2016). Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *J Transl Med*, 14: 315
- Serradilla M J, Lozano M, Bernalte M J, Ayuso M C, López-Corrales M, González-Gómez D (2011). Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of 'Ambrunés' sweet cherry cultivar. *LWT-Food Sci Technol*, 44 (1): 199–205
- Song Y, Yang J, Zhu ZJ (2016). Identification and analysis of the functional compounds in red cabbage. *Acta Hortic Sin*, 43 (1): 100–108 (in Chinese with English abstract) [宋亚, 杨静, 朱祝军(2016). 紫结球甘蓝功能性成分的提取、鉴定与分析. *园艺学报*, 43 (1): 100–108]
- Stafford HA, Lester HH (1984). 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. *Plant Physiol*, 78 (1): 184–186
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J*, 54 (4): 733–749
- Usenik V, Fabčič J, Štampar F (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem*, 107 (1): 185–192
- Wang H, Li MF, Yang GY, Jin WM (2015). Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits. *Plant Physiol J*, 51 (1): 29–43 (in Chinese with English abstract) [王华, 李茂福, 杨媛, 金万梅(2015). 果实花青素生物合成分子机制研究进展. *植物生理学报*, 51 (1): 29–43]
- Wang HC, Huang XM, Hu GB, Huang HB (2004). Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes in *Litchi pericarp*. *Sci Agric Sin*, 37 (12): 2028–2030 (in Chinese with English abstract) [王惠聪, 黄旭明, 胡桂兵, 黄辉白(2004). 荔枝果皮花青苷合成与相关酶的关系研究. *中国农业科学*, 37 (12): 2028–2030]
- Yan WM, Meng HW, Zhong YQW, Cheng ZH (2014). Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and environment condition and related enzymes in the outer scales of purple garlic. *Acta Hortic Sin*, 41 (2): 285–292 (in Chinese with English abstract) [闫伟明, 孟焕文, 钟杨权威, 程智慧(2014). 紫皮大蒜鳞茎外皮花色苷生物合成影响因素和相关酶的研究. *园艺学报*, 41 (2): 285–292]
- Zhang L, Xu YS, Jia Y, Wang JY, Yuan Y, Yu Y, Tao JM (2016). Effect of floral cluster pruning on anthocyanin levels and anthocyanin-related gene expression in 'Houman' grape. *Hortic Res*, 10 (3): 16037
- Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ, Wen GS, Wei FG, Zheng Q, Wang CD, Xiao XL (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chem*, 214 (1): 119–128

Relationship between anthocyanin accumulation and the activities of anthocyanin biosynthesis enzymes in different color of sweet cherry fruits

WEI Hai-Rong, TAN Yue, ZONG Xiao-Juan, ZHU Dong-Zi, CHEN Xin, XU Li, WANG Jia-Wei, LIU Qing-Zhong*

Shandong Institute of Pomology/ Key Laboratory for Fruit Biotechnology Breeding of Shandong, Tai'an, Shandong 271000, China

Abstract: In order to explore the relationship between the anthocyanins accumulation and the activities of anthocyanins biosynthesis enzymes during development of the sweet cherry fruits, two sweet cherry cultivars *Prunus avium* 'Tieton' and '13-33' with the different fruit color were used to detect the total anthocyanins content and anthocyanins biosynthesis related enzymes activities including phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone isomerase (CHI), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT). The independent component analysis of anthocyanin was also detected using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in this study. The results showed that seven types of anthocyanins were identified in 'Tieton' fruits and the content of each component increased during the fruit development period, while four types of anthocyanins were identified from '13-33' fruits, the content of each component decreased during fruit development and anthocyanin was barely detectable in mature fruits. Comparison of total anthocyanins content in these two cultivars revealed similar changing trend during fruit maturity. The total contents of anthocyanins in 'Tieton' fruits increased during fruits development and approached to a very high level at the late stage of fruit maturity. However, low level of total anthocyanins contents were detected across '13-33' fruits development period and no obvious changes was revealed. The activities of PAL, CHI, DFR and UFGT in 'Tieton' fruits were significantly higher than that in '13-33' at the late stage of fruit development. Correlation analysis showed that no significant correlation was observed in anthocyanin accumulation with the changes of PAL and DFR activities in 'Tieton' fruits. However, it was significantly and positively correlated with the activities of CHI and UFGT.

Key words: sweet cherry (*Prunus avium*); fruit; anthocyanin; UPLC-MS/MS; enzyme activities

Received 2016-10-20 Accepted 2017-02-28

This work was supported by National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (Grant No. 2013BAD02B03-3-2), Special Fund for Innovation Teams of Fruit Trees in Agricultural Technology System of Shandong Province (Grant No. SDAIT-06-04), and Science Fund for Young Scholars of Shandong Academy of Agricultural Sciences (Grant No. 2014QNM33).

*Corresponding author (E-mail: qzliu001@126.com).