



植物遗传资源学报  
*Journal of Plant Genetic Resources*  
ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

## 《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: ‘中油蟠9号’桃套袋果实花色苷合成的转录组-代谢组联合分析  
作者: 丁体玉, 马欣欣, 于雪丽, 周瑞金, 王力荣, 赵亚林  
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20240705002  
收稿日期: 2024-07-05  
网络首发日期: 2024-12-11  
引用格式: 丁体玉, 马欣欣, 于雪丽, 周瑞金, 王力荣, 赵亚林. ‘中油蟠9号’桃套袋果实花色苷合成的转录组-代谢组联合分析[J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240705002>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# ‘中油蟠9号’桃套袋果实花色苷合成的转录组-代谢组联合分析

丁体玉<sup>1</sup>, 马欣欣<sup>1</sup>, 于雪丽<sup>1</sup>, 周瑞金<sup>1</sup>, 王力荣<sup>2</sup>, 赵亚林<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河南科技学院园艺园林学院/河南省特色园艺植物开发利用工程技术研究中心/新乡市果树种质资源与遗传育种重点试验室,

新乡 453003; <sup>2</sup>中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450000)

**摘要:** 油蟠桃‘中油蟠9号’果实套袋后外果皮有花色苷合成呈现色泽微红, 此类型桃适宜套袋栽培, 满足消费者对色泽品相的追求。本研究以‘中油蟠9号’盛花后89天和102天套袋果实外果皮为试验材料, 对‘中油蟠9号’果实套袋后色泽形成进行转录组、代谢组以及双组学联合分析。结果表明, 转录组分析共鉴定2652个显著差异基因, 其中与花色苷合成相关的差异表达基因有16个, 如花色苷合成途径早期结构基因 *PpPAL*, *PpC4H*, *Pp4CLs*, *PpCHSs*, *PpCHIs*, *F3H*, *F3'H*, 花色苷合成途径晚期结构基因 *PpDFR*, *PpANS*, *PpUFGT*, *PpGST*, 以及56个特异性上调表达的转录因子和光受体基因 *PpCRY3* 和 *PpUVR8.3*, 这些基因均上调表达, 表达模式与花色苷含量相关。高效液相串联质谱法检测发育阶段外果皮中类黄酮代谢物的相对含量变化, 共检测到112种显著差异代谢物, 其中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷显著上调,  $\text{Log}_2\text{FC}$  差异倍数最高为16.8。矢车菊素-3,5-O-葡萄糖苷是‘中油蟠9号’套袋果实外果皮呈现红色的主要代谢物。结合双组学联合分析和转录因子结果, 推测套袋遮光下 *PpBL*、*PpNAC1* 上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达, 促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷, 使‘中油蟠9号’外果皮呈现红色。研究结果有助于分析遮光下桃果实花色苷合成模式, 为筛选更多适宜套袋栽培的优质蟠桃品种提供理论依据。

**关键词:** 套袋; ‘中油蟠9号’; 花色苷; 转录组-代谢组联合分析; qRT-PCR

## Combined Transcriptome-Metabolome Analysis of Anthocyanin

### Synthesis in 'Zhongyoupan 9' Peach Fruits Under Bagging

#### Condition

DING Tiyu<sup>1</sup>, MA Xinxin<sup>1</sup>, YU Xueli<sup>1</sup>, ZHOU Ruijin<sup>1</sup>, WANG Lirong<sup>2</sup>, ZHAO Yalin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology / Henan Engineering Research Center of the Development and Utilization of Characteristic Horticultural Plants / Xinxiang Key Lab of Germplasm Resources and Genetic Breeding in Pomology, Xinxiang 453003; <sup>2</sup>Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450000)

**Abstract:** Bagging-produced flat peaches are increasingly favored by consumers because of their light fruit cracking, good appearance and golden or slightly reddish fruit surface. The cultivar ‘Zhongyoupan 9’ shows a reddish color under bagging conditions due to the synthesis of anthocyanins. This type of peach is suitable for bagging cultivation to meet consumers' pursuit of color and appearance. In this study, the exocarp of bagged fruits of ‘Zhongyoupan 9’ was used as the material at 89 and 102 DAFB, and the color formation of bagged fruits of ‘Zhongyoupan 9’ was analyzed by a combination of transcriptomic, metabolomic, and bi-histological analyses. The results showed that a total of 2652 significant differential genes were identified by transcriptome analysis, including 16 differentially expressed genes related to anthocyanin biosynthesis, such as *PpPAL*, *PpC4H*, *Pp4CLs*, *PpCHSs*, *PpCHIs*, *F3H*, *F3'H*, *PpDFR*, *PpANS*, *PpUFGT*, *PpGST*, 56 specifically up-regulated transcription factors, and phyto receptors *PpCRY3*, *PpUVR8.3*, all of which were up-regulated and expressed in a pattern that correlated with anthocyanin content. High performance liquid tandem mass spectrometry was used to detect changes in the relative content of flavonoid metabolites in the exocarp, and a total of 112 significantly different metabolites were detected,

**收稿日期:** 2024-07-05

第一作者研究方向为桃果实色泽形成机理解析, E-mail: dingtiyu@hist.edu.cn

通信作者: 赵亚林, 研究方向为桃芽休眠和果实色泽形成机理解析, E-mail: zhaoyalin@hist.edu.cn

**基金项目:** 2022年度河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(222102110440); 2023年度河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(232102111083, 232102111087)

**Foundation projects:** Key R&D and Promotion Special Programmes (Technology Tackling Key) of Henan Province Project in 2022 (222102110440); Key R&D and Promotion Special Programmes (Technology Tackling Key) of Henan Province Project in 2023 (232102111083, 232102111087)

with a significant up-regulation of cyanidin-3,5-O-diglucoside, with the highest multiplicity of difference of 16.8 in Log<sub>2</sub>FC. The cyanidin-3,5-O-glucoside was the main metabolite responsible for the red colour of the exocarp after bagging of 'Zhongyoupan 9'. Combined with Two-omics integrated analysis and transcription factor results, it was predicted that *PpBL* and *PpNAC1* up-regulated and activated anthocyanin regulatory gene *PpMYB10.1*, promoted anthocyanin structural gene to catalyse synthesis of cyanidin-3, 5-O- diglucoside under bagging conditions, which results in red colouration of 'Zhongyoupan 9'. The project's progression will contribute to analyzing the mode of anthocyanin accumulation in peach fruits under bagging, providing a theoretical basis for selecting more suitable peach varieties for bagging cultivation.

**Key words:** bagged; 'Zhongyoupan 9'; anthocyanin; transcriptomics-metabolomics combined analysis; qRT-PCR

桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 是世界温带地区栽培的重要果树之一, 起源中国, 是我国重要落叶果树。作为一种鲜食水果, 桃果皮及果肉颜色是影响消费者选择和反映其营养成分的重要指标<sup>[1]</sup>。近年来, 随着桃产业不断升级, 桃品种更新换代加速, 油蟠桃进入人们的视野。然自然生长的蟠桃果实外观粗糙、易裂果、售价低, 生产上多采用套袋提高果实品相。因此, 套袋后的优质蟠桃品种‘中蟠桃 11 号’、‘中油蟠 7 号’和‘中油蟠 9 号’深受消费者喜爱<sup>[2-3]</sup>。花色苷是决定果实色泽的关键次生代谢物, 提高果实花色苷含量可显著影响果实色泽<sup>[4]</sup>。Kapoor 等<sup>[5]</sup>发现花色苷属于水溶性色素的一种, 是广泛存于植物体内的次生代谢产物, 在植物体内主要以糖苷形式积累于细胞液泡中, 是花、茎、叶、果实等植物组织呈现颜色的主要原因之一。此外, 花色苷还具有抗炎、抗癌、抗老、抗肥胖等功能<sup>[6]</sup>, 是一种具有高营养价值和潜在健康益处的天然抗氧化剂<sup>[7-8]</sup>。在自然界中, 花色苷至少分为 20 多种, 其中常见的有六种(矮牵牛色素、芍药色素、矢车菊色素、飞燕草色素、天竺葵色素和锦葵色素), 这六种花色苷及其衍生物约占自然界花色苷总量的 95%<sup>[4,9]</sup>。与花色苷生物合成相关的结构酶基因已经被鉴定, 包括苯丙氨酸解氨酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL, 4-Coumarate:coenzyme A ligase)、查耳酮合酶 (CHS, chalcone Synthase)、查耳酮异构酶 (CHI, chalcone isomerase)、二氢黄酮醇 4-还原酶 (DFR, dihydroflavonol 4-reductase)、黄烷酮 3-羟化酶 (F3H, flavanone 3-hydroxylase)、花色素合酶/无色花色素双加氧酶 (ANS, anthocyanidin synthase) 和 UDP-葡萄糖: 类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (UFGT, UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase)。花色苷生物合成通过 MYB、bHLH 和 WD40 形成不同的 MBW 复合物在花色素和其他类黄酮生物合成途径的调节中发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。

目前桃果实中花色苷组成、分布以及生物合成代谢途径已基本清楚<sup>[11]</sup>。Tsuda 等<sup>[12]</sup>研究发现 *PpCHS*、*PpDFR*、*PpUFGT* 是桃花色素生物合成过程中的关键结构基因。Zhao 等<sup>[13]</sup>最新研究发现, 编码花色苷转运蛋白(谷胱甘肽 S-转移酶 *PpGSTI* 基因) 不仅参与桃果实花色苷的积累, 还在其第 3 个外显子上发现两个功能等位基因缺失导致桃白花的形成。Zhao 等<sup>[14]</sup>发现调控桃花色素合成的转录因子主要集中在 MYB、bHLH 和 WD40 这三类蛋白质组成的 MBW 蛋白复合体上, 参与到花色苷合成基因的转录调控。

果实套袋积累花色苷这一现象不仅在桃上存在, 其他植物也有发现。如‘京艳’葡萄中发现 COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1, COP1) 蛋白无论在光下还是黑暗中均定位于细胞质中, 不能介导 HY5 靶蛋白在黑暗中的降解, 因此即使套袋情况仍然积累花色苷<sup>[15]</sup>。樱桃<sup>[16]</sup>、梨<sup>[17]</sup>和芒果<sup>[18]</sup>的果实, 辣椒<sup>[19]</sup>、茄子<sup>[20]</sup>、芸豆<sup>[21]</sup>的可食用部位和经过 T-DNA 插入或 EMS 诱变的芜菁地下膨大肉质根<sup>[22-23]</sup>, 以及菊花<sup>[24]</sup>和百合<sup>[25]</sup>的观赏部位在套袋后均积累花色苷, 但对上述植物的花色苷合成相关基因、光受体蛋白 (PHYB、URV8 等) 和光信号途径关键转录因子 (COP1、HY5 等) 等进行转录水平的表达分析, 并没有发现规律性的变化。也有研究表明, 拟南芥 *AtPHYB* 蛋白第 276 个氨基酸由络氨酸突变为组氨酸后, 形成的显性错义等位基因 *AtYHB* 异源过表达番茄幼苗黑暗生长的下胚轴积累大量的花色苷<sup>[26]</sup>。

本研究中, 为了解套袋桃果实果皮色泽形成原因, 以‘中油蟠 9 号’套袋果实为材料, 利用转录组学结合代谢组学的方法分析与套袋果实外果皮颜色相关的差异基因及差异代谢物, 同时利用 qRT-PCR 进行验证。研究结果有助于理解套袋下桃果实花色苷合成模式, 为筛选更多适宜套袋栽培的优质蟠桃品种提供理论依据, 具有重要科学意义。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

实验所用材料种植于中国农业科学院郑州果树研究所新乡基地。盛花后 40 天，采用内黑外棕的双层不透明纸袋（150mm×180mm）对‘中油蟠 9 号’果实进行套袋遮光处理，于果实成熟期观察表型并拍照。每个品种选择大小和成熟度一致的 5 个果实作为试验材料，采集下来后立即转移到实验室。削下外果皮立即液氮速冻-80℃保存，用于后续转录组学和代谢组学分析。

## 1.2 试验方法

1.2.1 果实外果皮色泽测定 选取结果部位相同的果实，每棵果树取 5 个果实，共 3 棵树。用色差仪在果实赤道位置测定色差值  $L^*$ （明亮度）， $a^*$ （红绿偏值）， $b^*$ （蓝黄偏值）值<sup>[4]</sup>。以  $a^*/b^*$  比值从负值转为正值表示桃外果皮的颜色由绿色变为红色<sup>[27]</sup>。数据为测量 5 个果实，每个果实 6 个着色区域色差的平均值。

1.2.2 转录组学分析 Total RNA、文库构建与质检、测序工作由北京诺和致源科技股份有限公司参与完成。盛花后 89 天的‘中油蟠 9 号’桃外果皮组织命名为 ZYP9\_89\_DAFB，盛花后 102 天的‘中油蟠 9 号’桃外果皮组织命名为 ZYP9\_102\_DAFB。DAFB 表示盛花后天数。

经数据质控得到高质量 Cleans reads，使用 HISAT2 将测序结果与参考基因组 (<https://www.rosaceae.org/>)<sup>[4]</sup> 进行比对。FeatureCounts 过滤掉比对质量低于 10 的 reads 后统计比对到参考基因组上的 read count 值。随后根据基因长度计算每个基因的 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)，DeSeq2 筛选比较组合之间的差异表达基因，采用校正后  $p < 0.05$  值以及  $|\log_2FC| \geq 1$  作为筛选显著差异表达基因的条件。使用 GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行功能注释和代谢通路富集分析， $p < 0.05$ 。

1.2.3 代谢组学分析 取‘中油蟠 9 号’不同发育时期套袋桃果实外果皮样品，冻干机真空冷冻干燥后研磨至粉末状，称取 50mg 粉末溶解于 1.2mL 70% 甲醇提取液中，30min 涡旋一次每次 30s，共 6 次，12000rpm 离心 3min 后，吸取上清，用微孔滤膜（0.22  $\mu\text{m}$ ）过滤后保存，用于后期 UPLC-MS/MS 分析。采用 UPLC-MS/MS（超高效液相色谱串联质谱）进行数据采集。基于迈维自建数据库 MWDB，根据二级谱信息进行物质定性分析；基于本地代谢数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、MoToDB (<http://www.ab.wur.nl/moto/>) 和 METLIN (<http://metlin.scripps.edu/index.php>) 对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正<sup>[28-29]</sup>。校正后的  $p < 0.05$  值以及  $|\log_2\text{foldchange}| \geq 1$  作为显著差异代谢物的筛选标准。

1.2.4 转录组和代谢组关联性分析 分别将转录组和代谢组学筛选出的差异基因与差异代谢物进行 KEGG 注释（富集）分析，找出共同富集通路，并绘制与外果皮颜色相关的关键基因和代谢物之间的网络图。

1.2.5 qRT-PCR 验证 为验证数据准确性，对外果皮花色苷合成相关的 9 个显著差异表达基因进行实时定量 PCR 验证。以 *Actin* 作为内参基因<sup>[30]</sup>，NCBI 中 Primer blast 设计引物， $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对表达量计算。引物如表 1。

表 1 相对荧光定量 PCR 引物

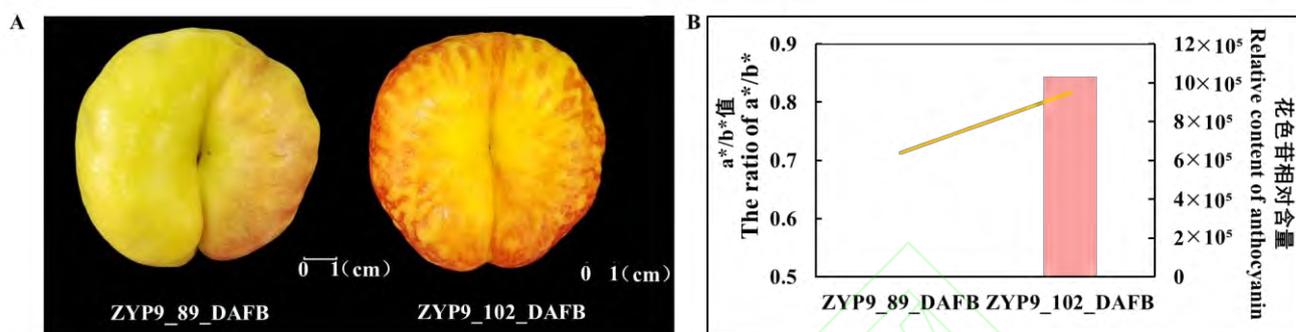
Table 1 Oligo nucleotide sequences for qRT-PCR primers

引物名称 Primer name	基因名称 Gene ID	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>Actin</i>	Prupe.8G132000	TGCCATTGAAATCCTGAAAC	ACCAATTGGATCATCCTCCT
<i>PAL</i>	Prupe.6G235400	CAGAGCAGACAACCAAGACG	CTCCAAATGCCTCAAATCAATG
<i>C4H</i>	Prupe.6G040400	GGACGCTCAGCAGAAGGGA	TGGATCTCAGGGTGGTTACACA
<i>4CL</i>	Prupe.2G326300	AGATGAGGCTGCTGGTGAAGT	TTGGAATGGCATGGATGAAGT
<i>CHS</i>	Prupe.1G002900	AACAAGGGTGCTCGTGTCTC	GCTGCACCATCACCGAATAAG
<i>CHI</i>	Prupe.2G225200	GAGATCGTTACAGGTCCATTTG	GTGGGAAGTTTTGATCCTTGA
<i>F3H</i>	Prupe.7G168300	GGACTGGACACAGAGGCATT	AAATTGTGCCTGGGTGAGTGT
<i>F3'H</i>	Prupe.5G203600	CTCTCGCTCAAAGAGGATGC	CCATTCCACTGTGCTTGTATG
<i>DFR</i>	Prupe.1G376400	CGCCTCCAAGACTCTAGCTG	CCAGTGAGTGGGAAAGTCC
<i>ANS</i>	Prupe.5G086700	AGGAGTTGAAGAAGGCAGCA	GCCTGGTCATTGGCATACTT

## 2 结果与分析

## 2.1 ‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮着色表现

盛花后 89 天‘中油蟠 9 号’果实外果皮色泽开始变红，至盛花后 102 天（成熟期）着色稳定，说明套袋遮光后果实外果皮依然有花色苷合成（图 1A），代谢物检测也显示桃中主要花色苷（矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷）显著上升（图 1B）。此外，通过色差仪测定套袋果实外果皮色泽变化，发现  $a^*/b^*$  比值呈上升趋势（图 1B），与外果皮色泽变化和花色苷含量表现出类似的趋势。



A: ‘中油蟠 9 号’套袋果实不同发育时期着色情况。B: ‘中油蟠 9 号’不同发育时期花色苷含量和果实外果皮着色区域色泽变化；以桃果皮中主要花色苷（矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷）代表花色苷含量变化趋势。ZYP9\_89\_DAFB: ‘中油蟠 9 号’盛花后 89 天果实；ZYP9\_102\_DAFB: ‘中油蟠 9 号’盛花后 102 天果实；数据为测量 3 个果实，每个果实 6 个着色区域色差的平均值；DAFB 表示盛花后天数

A: Coloring of bagged fruits of 'Zhongyoupan 9' at different developmental periods. B: Changes in anthocyanin content and fruit color at different developmental stages of 'Zhongyoupan 9'; The main anthocyanins of cyanidin n-3,5-O-glucoside in peach peel were used to represent the change trend of anthocyanin content. ZYP9\_89\_DAFB: The bagged fruits of 'Zhongyoupan 9' at 89 days after flower bloom; ZYP9\_102\_DAFB: The bagged fruits of 'Zhongyoupan 9' at 102 days after flower bloom; Values are the means of three fruits with 6 color regions; DAFB: Days after flower bloom

图 1 ‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮着色表现

Fig. 1 Phenotypes of exocarp coloring of 'Zhongyoupan9' under bagging conditions

## 2.2 转录组学分析

2.2.1 测序质量分析 对盛花后 89 天和盛花后 102 天‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮 RNA 样品进行 cDNA 文库构建并测序，raw data 经过滤后共获得 26.51G clean data，各样品 clean data 均在 5.88Gb 以上（表 2）。样本错误率  $\leq 0.03\%$ ，Q20（测序准确度在 99%）均大于 97%、Q30（测序准确略在 99.9%）的均大于 93%。4 个时期的 clean data 与参考基因组的特异比对率在 95% 左右。两个时期共鉴定出 2652 个差异基因。

表 2 转录组测序质量分析

Table 2 Transcriptome sequencing quality analysis

样本 ID Sample ID	干净读数 Clean bases	测序准确度 99% (%) Q20	测序准确度在 99.9% (%) Q30	G 和 C 两种碱基 占总碱基的百分 比 (%) GC	错误率 Error rate	总比对率 Total map (%)	特异比对率 Unique map (%)
ZYP9_89_DAFB_1	6.83G	98.08	94.12	45.56	0.02	97.57	95.41
ZYP9_89_DAFB_2	6.77G	97.99	93.91	45.39	0.03	97.35	95.17
ZYP9_102_DAFB_1	7.03G	98.00	93.95	45.28	0.03	97.89	95.46
ZYP9_102_DAFB_2	5.88G	98.21	94.34	45.65	0.02	97.85	94.94

2.2.2 差异表达基因筛选 主成分分析结果显示盛花后 89 天样品和盛花后 102 天样品在第一主成分上生物学重复较好，第一主成分贡献率达 89.89%（图 2A）。因此，以  $|\log_2FC| > 1$  和  $padj < 0.05$  为筛选标准，共筛选到 2652 个显著差异基因，包括上调差异表达基因 1153 个，下调差异表达基因 1499 个（图 2B）。对 2652 个显著差异基因进行聚类分析，热图显示这些基因聚为 2 类（图 2C）。经注释，差异比较组合中共筛选出 16 个与花色苷生物合成相关基因（表 3），花色苷合成途径早期结构基因 *PpPAL* (Prupe.6G235400)，*PpC4H* (Prupe.6G040400)，*Pp4CLs* (Prupe.2G326300、Prupe.5G154100)，*PpCHSs* (Prupe.1G002900、Prupe.1G003000、Prupe.I005800、Prupe.I005700)，*PpCHIs* (Prupe.2G225200、Prupe.2G263900)，*PpF3H* (Prupe.7G168300)，*PpF3'H* (Prupe.5G203600)，花色苷合成途径晚期结构

基因 *PpDFR* (Prupe.1G376400), *PpANS* (Prupe.5G086700), *PpUGT* (Prupe.2G324700), *PpGST* (Prupe.3G013600) 等 16 个基因均上调表达, 表达模式与花色苷含量相关, 其中 *PpGST* 套袋后表达量在所有结构基因中最高 (FPKM > 750), 显著高于盛花后 89 天 ( $\text{Log}_2\text{FC}$  为 9.38)。上述基因均是花色苷合成通路中的结构基因, 表明‘中油蟠 9 号’果实套袋遮光后花色苷生物合成相关酶依然发挥功能, 促进外果皮呈现红色。

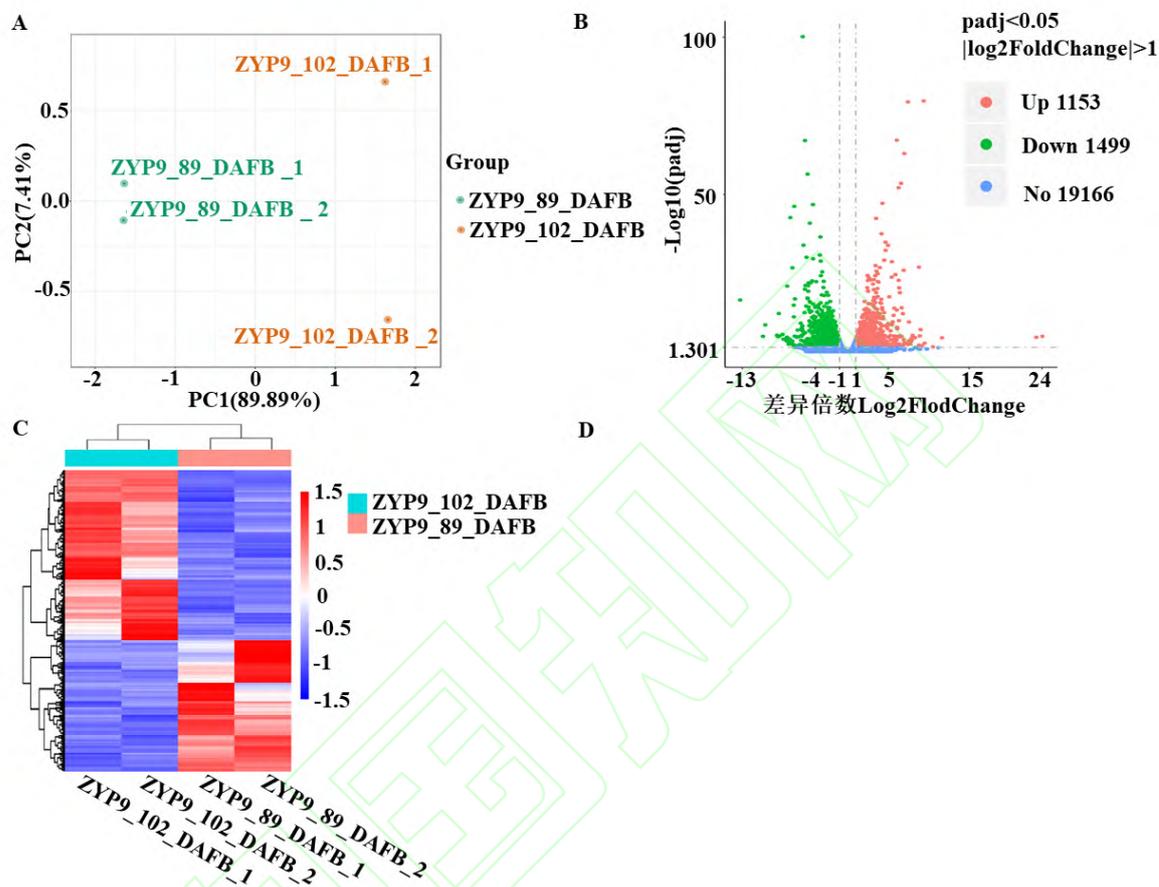


图 2 ‘中油蟠 9 号’不同发育时期套袋果实差异基因分析

Fig. 2 Analysis of differential genes of 'Zhongyoupan 9' at different developmental stages under bagging conditions.

转录因子在花色苷生物合成中起重要调控作用。差异表达基因中筛选出与桃花色苷合成相关的调节基因仅有 *PpMYB10.1* (Prupe.3G163100),  $\text{Log}_2\text{FC}$  约为 3.51, 表明套袋后仅 *PpMYB10.1* 被诱导上调表达, (表 3)。除此之外, 通过相关性分析筛选与花色苷合成相关基因共表达的差异转录因子, 发现共有 56 个转录因子套袋后特异性上调表达, 分别属于 MYB、bHLH、WD40、bZIP、C2H2、COP1、ERF、NAC、BL、WRKY 转录因子家族。已有被报道 NAC 家族中 *PpNAC1* (Prupe.4G187100) 与 *PpBL* (Prupe.5G006200) 蛋白形成二聚体诱导 *PpMYB10.1* 的表达, 促进桃果肉中花色苷积累并导致血桃性状的形成<sup>[25]</sup>。据此推测 *PpBL* 可能通过与 *PpNAC1* 互作上调 *PpMYB10.1* 的表达促进套袋果实外果皮花色苷生物合成。

表 3 与花色苷合成相关结构基因和转录因子转录水平

Table 3 Transcription levels of structural genes and transcription factors related to anthocyanin biosynthesis

关键差异基因 The major DEGs	基因号 Gene_id	注释 Annotation	ZYP9_102_DAFB (FPKM)	ZYP9_89_DAFB (FPKM)	$\text{Log}_2\text{FC}$	上下调类型 Type
	Prupe.6G235400	( <i>PAL</i> ) Phenylalanine ammonia-lyase	20.47	0.66	4.98	up
结构基因 Structural genes	Prupe.6G040400	( <i>C4H</i> ) Cinnamic acid 4-hydroxylase	53.81	10.19	2.42	up
	Prupe.2G326300	( <i>4CL</i> ) 4-Coumarate:coenzyme A ligase	35.38	2.84	3.66	up
	Prupe.5G154100	( <i>4CL</i> ) 4-Coumarate:coenzyme A ligase	43.91	20.45	1.12	up

	Prupe.1G002900	( <i>CHS</i> ) Chalcone Synthase	287.41	1.67	7.45	up
	Prupe.1G003000	( <i>CHS</i> ) Chalcone Synthase	91.15	2.10	5.46	up
	Prupe.I005800	( <i>CHS</i> ) Chalcone Synthase	248.57	3.07	6.36	up
	Prupe.I005700	( <i>CHS</i> ) Chalcone Synthase	23.86	0.28	6.43	up
	Prupe.2G225200	( <i>CHI</i> ) Chalcone isomerase	174.85	85.38	1.06	up
	Prupe.2G263900	( <i>CHI</i> ) Chalcone isomerase	14.22	2.34	2.62	up
	Prupe.7G168300	( <i>F3H</i> ) Flavanone 3-hydroxylase gene	174.67	66.19	1.42	up
	Prupe.5G203600	( <i>F3'H</i> ) Flavonoid 3'-hydroxylase	461.93	144.53	1.70	up
	Prupe.1G376400	( <i>DFR</i> ) Dihydroflavonol 4-reductase	373.64	8.62	5.46	up
	Prupe.5G086700	( <i>ANS</i> ) Anthocyanidin synthase	912.98	103.04	3.17	up
	Prupe.2G324700	( <i>UFGT</i> ) UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase	337.62	5.12	6.07	up
	Prupe.3G013600	( <i>GST</i> ) Glutathione S-transferase	764.23	1.16	9.38	up
转录因子	Prupe.3G163100	<i>MYB10.1</i>	45.57	4.07	3.51	up
Transcription factors	Prupe.5G006200	( <i>BL</i> ) BLOOD	6.43	0.58	3.51	up
	Prupe.4G187100	( <i>NAC</i> ) NAM, ATAF1/2, CUC1/2	769.33	279.90	1.48	up

已知套袋遮光影响果实花色苷合成。作者从差异表达基因中筛选出 4 个与光受体和光信号转导相关基因（表 4），其中光受体 *PpPHYE*（Phytochrome E, PHYE）和 *PpPIF*（Phytochrome interacting factor, PIF）表达模式均呈下降，而光受体 *PpCRY3*（Cryptochrome, CRY）和 *PpUVR8.3*（UV Resistance locus8, UVR8）表达量有不同程度的增加，表明 *PpCRY3* 和 *PpUVR8.3* 可能在‘中油蟠 9 号’果实套袋后对果皮花色苷的积累起到了重要作用。

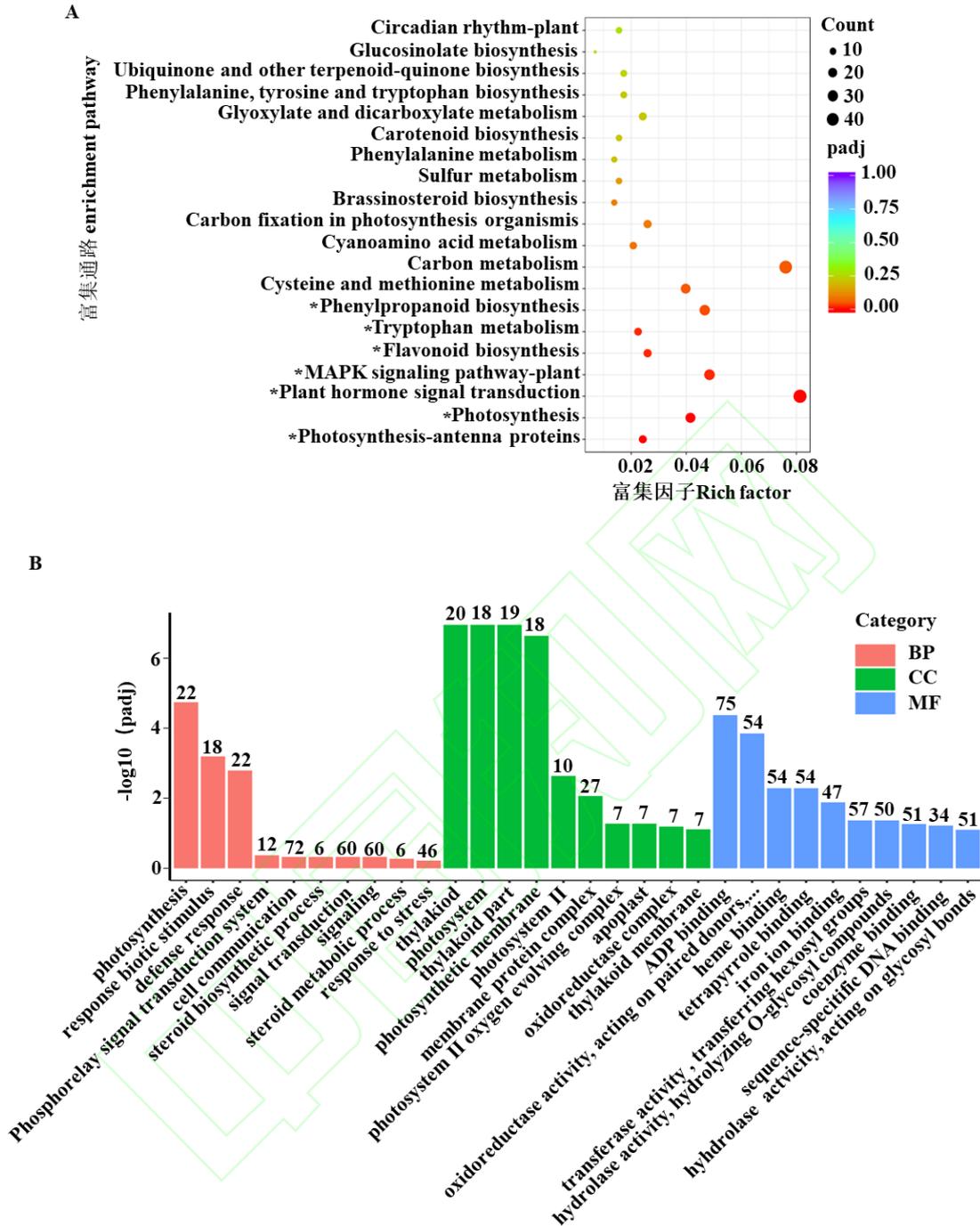
表 4 光受体相关基因转录水平

Table 4 Transcription levels of genes associated with light receptors

名称 Gene_id	注释 Annotation	ZYP9_102_DAFB (FPKM)	ZYP9_89_DAFB (FPKM)	log <sub>2</sub> FC	上下调类型 Type
Prupe.3G179800	<i>PpPIF</i> (Phytochrome interacting factor)	2.11E-01	2.82E+00	-3.40	down
Prupe.4G073900	<i>PpPHYE</i> (Phytochrome E)	5.30E+00	1.94E+01	-1.82	down
Prupe.1G462400	<i>PpCRY3</i> (Cryptochrome)	7.92E+00	3.45E+00	1.07	up
Prupe.1G239800	<i>PpUVR8.3</i> (UV Resistance locus8)	1.18E+02	5.15E+01	1.15	up

2.2.3 KEGG 和 GO 富集分析 对 2652 个差异表达基因进行 KEGG 富集分析，共富集到 108 条通路，选择其中 7 条显著富集通路进行分析。分别为光合作用天线蛋白（Photosynthesis - antenna proteins）、光合作用（Photosynthesis）、植物激素信号转导（Plant hormone signal transduction）、MAPK 信号通路（MAPK signaling pathway—plant）、类黄酮生物合成（Flavonoid biosynthesis）、色氨酸代谢（Tryptophan metabolism）、苯丙烷类生物合成（Phenylpropanoid biosynthesis）（图 3A），基因数目分别为 14 个、24 个、47 个、28 个、15 个、13 个和 27 个。其中植物激素信号转导通路（Plant hormone signal transduction）富集到的基因最多。

为进一步分析差异表达基因的生物功能，对 2652 个差异表达基因进行 GO 富集分析，通过 Nr 注释得到与花色苷生物合成有关基因并将其与 Go Terms 进行对应（图 3B）。结果表明 5 条 Go Term 富集到与花色苷生物合成相关的基因，其中 transferase activity, transferring hexosyl groups (GO:0016758)、oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen (GO:0016705)、coenzyme binding (GO:0050662) 富集到的差异表达基因最多，分别为 57 个、54 个、51 个。发现 1 个 *C4H* (Prupe.6G040400)，2 个 *CHIs* (Prupe.2G225200, Prupe.2G263900)，1 个 *F3'H* (Prupe.5G203600)，1 个 *DFR* (Prupe.1G376400)，1 个 *UFGT* (Prupe.2G324700)，1 个 *SPL* (Prupe.4G050400)。



(A) KEGG 前 20 条富集通路。(B) GO 注释前 30 个富集结果。BP: 生物过程, CC: 细胞组成, MF: 分子功能。数值代表注释到 GO 编号上的差异基因数

(A) The top 20 enriched of KEGG pathways. (B) GO annotated of the top 30 biological processes. BP: Biological Process; CC: Cellular Component; MF: Molecular Function. Values represent the number of DEGs annotated Go

\* 代表显著富集到的 KEGG 通路; 下同

\* Represents the significant KEGG pathways; The same as below

图 3 '中油蟠 9 号' 不同发育时期套袋果实差异表达基因富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of differentially expressed genes of 'Zhongyoupan 9' at different developmental periods under bagging conditions

### 2.3 代谢组学分析

相对于盛花后 89 天，盛花后 102 天果实共检测到 514 种差异代谢物，其中显著差异代谢物 112 种。热图显示上调差异代谢物 53 种，下调差异代谢物 59 种（图 4A）。按照黄酮类物质不同合成路径，112 种代谢物分为查耳酮、二氢黄酮、二氢黄酮醇、酚酸类、花色苷、黄酮、黄酮醇、黄烷醇类等 13 大类（图 4B）。对 112 种差异表达代谢物进行 KEGG 富集分析，共富集到 15 条通路（图 4C），其中显著富集到花色苷生物合成途径（ko00942）和类黄酮生物合成途径（ko00941）。涉及代谢物有矢车菊素-3-O-芸香糖苷、矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-芸香糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷、柚皮素、柚皮素查耳酮、根皮素、5-O-对香豆酰奎宁酸、表没食子儿茶素、花旗松素（二氢槲皮素）、槲皮素、表阿夫儿茶精、3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷、香橙素（二氢山柰酚）、没食子儿茶素等 16 种（表 5）。

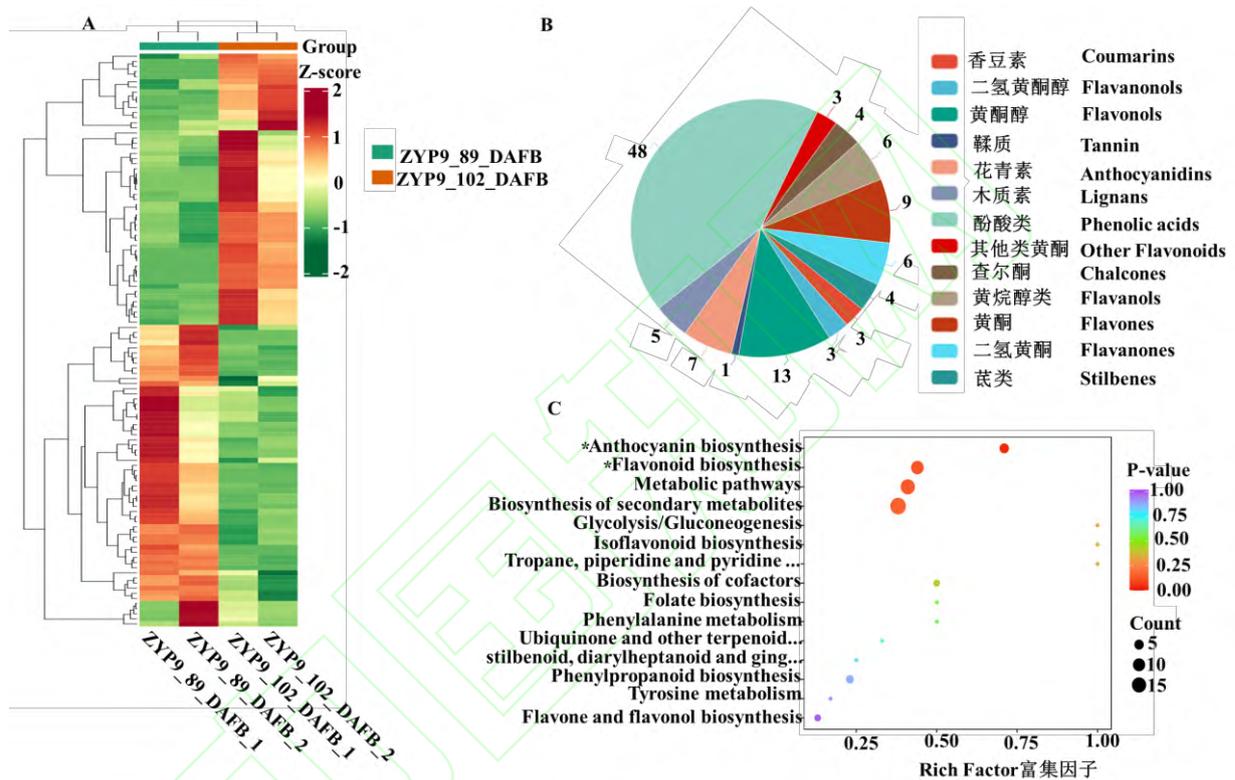


图 4 ‘中油蟠 9 号’不同发育时期套袋果实差异代谢物分析

Fig.4 Analysis of differential metabolites of 'Zhongyoupan 9' at different developmental periods under bagging conditions

表 5 ‘中油蟠 9 号’不同时期套袋果实差异代谢物富集到的花色苷和类黄酮通路代谢物

Table5 Significant accumulation of metabolites and their up- and down-regulation in 'Zhongyoupan9' at differential periods

KEGG 通路 KEGG pathway	代谢物 Compounds	名称 Name	ZYP9_89_DAFB	ZYP9_102_DAFB	Log <sub>2</sub> FC	P-value	上下调类型 Type
花色苷合成 Anthocyanin biosynthesis	Cyanidin-3,5-O-diglucoside (Cyanin)	矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷	9.00E+00	1.03E+06	16.80	4.02E-02	up
	Cyanidin-3-O-rutinoside (Keracyanin)	矢车菊素-3-O-芸香糖苷	2.68E+07	1.10E+07	-1.29	8.54E-02	down
	Delphinidin-3-O-glucoside (Mirtilin)	飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	1.31E+06	2.78E+06	1.09	1.82E-02	up
	Delphinidin-3-O-rutinoside	飞燕草素-3-O-芸香糖苷	1.09E+05	4.95E+04	-1.14	2.99E-01	down
	Pelargonidin-3-O-glucoside	天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	4.20E+06	1.23E+07	1.55	1.71E-02	up
类黄酮合成 Flavonoid biosynthesis	Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanone)	柚皮素	4.09E+05	1.26E+05	-1.70	5.97E-01	down
	Naringenin chalcone; 2',4,4',6'-	柚皮素查耳酮*	4.15E+05	1.56E+05	-1.42	6.25E-01	down

Tetrahydroxychalcone*						
Phloretin	根皮素	6.06E+03	3.12E+04	2.36	9.42E-02	up
5-O-p-Coumaroylquinic acid	5-O-对香豆酰奎宁酸	9.71E+06	4.18E+06	-1.22	3.90E-01	down
Epigallocatechin	表没食子儿茶素	7.45E+04	2.90E+04	-1.36	1.12E-01	down
Taxifolin (Dihydroquercetin)	花旗松素(二氢槲皮素)	3.51E+04	1.07E+05	1.60	7.76E-02	up
Quercetin	槲皮素	1.13E+05	5.26E+04	-1.11	1.75E-01	down
Epiafzelechin	表阿夫儿茶精	4.42E+04	9.30E+04	1.07	5.46E-01	up
3,4,2',4',6'- Pentahydroxychalcone- 4'-O-glucoside	3,4,2',4',6'-五羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷	2.01E+05	3.35E+06	4.06	1.51E-01	up
Aromadendrin (Dihydrokaempferol)	香橙素(二氢山奈酚)	2.74E+04	1.05E+04	-1.38	6.32E-01	down
Gallocatechin	没食子儿茶素	3.59E+05	1.47E+06	2.03	1.87E-01	up

结合 KEGG 通路富集结果，差异代谢物中有 5 种花色苷被显著富集（图 5）。其中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷作为桃中主要的花色苷<sup>[26]</sup>，在果实套袋后显著上调积累，上调倍数约 16.8。飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和天竺葵素-3-O-葡萄糖苷也显著上调，上调倍数分别为 1.09、1.55。而矢车菊素-3-O-芸香糖苷和飞燕草素-3-O-芸香糖苷显著下调，下调倍数分别为-1.29、-1.14。结合‘中油蟠 9 号’套袋果实外果皮红色表型，表明下调积累的花色苷并未影响‘中油蟠 9 号’套袋果实着色，因此外果皮中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷的持续积累是其呈现红色的主要原因。

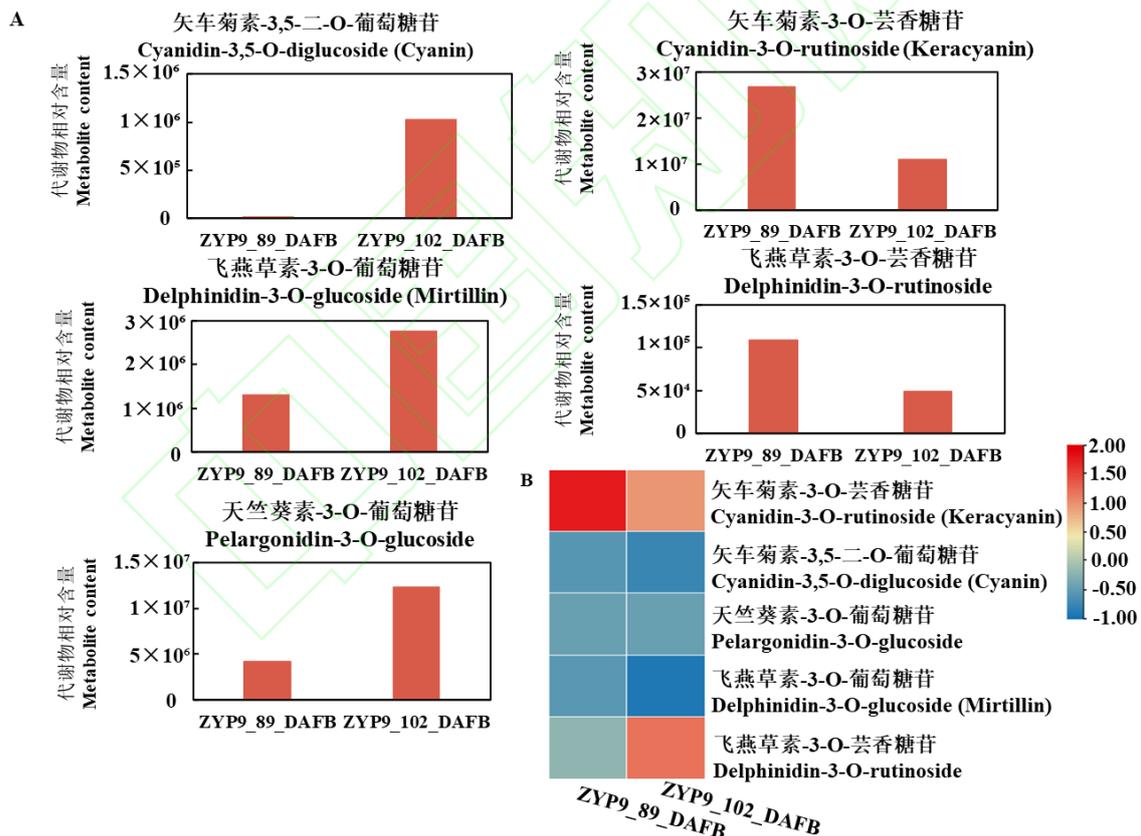


图 5 ‘中油蟠 9 号’不同发育时期套袋果实花色苷差异代谢物分析

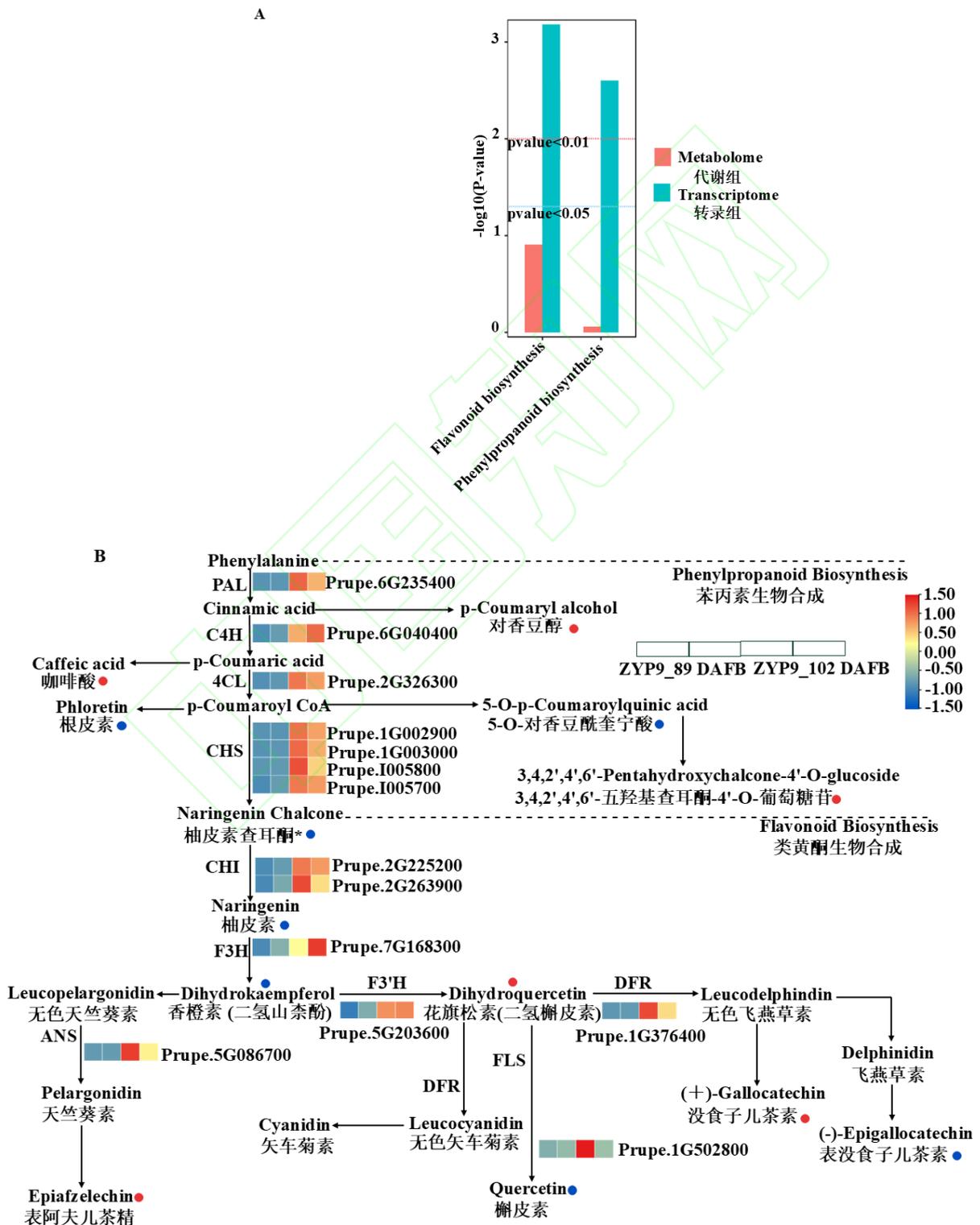
Fig 5 Analysis of differential metabolites of anthocyanin of 'Zhongyoupan 9' at different developmental periods under bagging

#### 2.4 转录组与代谢组的联合分析

转录组与代谢组联合分析共同富集到了类黄酮通路 (ko00941) 和苯丙素生物合成 (ko00940)，包含 14 个差异表达基因和 13 个差异代谢物（图 6A）。其中 13 个差异表达基因均上调表达参与花色苷合成（图 6B），如花色苷合成早期结构基因 *PAL* (Prupe.6G235400)、*C4H* (Prupe.6G040400)、*4CL*

(Prupe.2G326300)、*CHS* (Prupe.1G002900、Prupe.1G003000、Prupe.I005800、Prupe.I005700)、*CHI* (Prupe.2G225200、Prupe.2G263900)、*F3H* (Prupe.7G168300)、*F3'H* (Prupe.5G203600) 和花色苷合成途径晚期结构基因 *DFR* (Prupe.1G376400)、*ANS* (Prupe.5G086700)。这些基因上调表达与显著富集到差异代谢物矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷上调积累结果一致,表明‘中油蟠9号’套袋果实中花色苷合成相关结构基因上调表达,促进花色苷积累,外果皮颜色呈现红色。

结合转录因子结果,推测套袋遮光下 *PpBL*、*PpNAC1* 上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达,促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷,使‘中油蟠9号’外果皮呈现红色。



(A) 联合分析富集通路柱状图。(B) 类黄酮代谢通路差异表达代谢物和差异表达基因；红色表示上调的差异代谢物，蓝色表示下调的差异代谢物

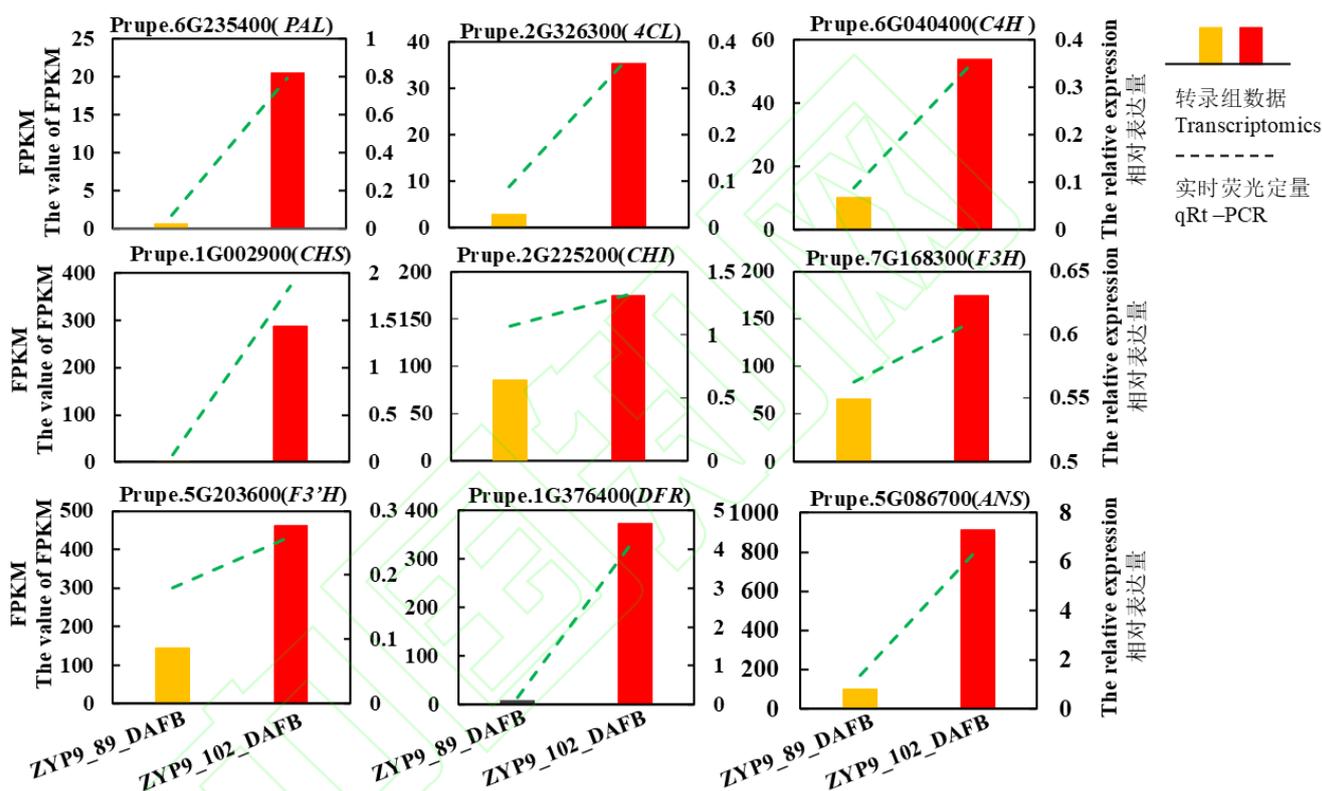
(A) Histogram of enriched pathways for co-analysis. (B) Differentially expressed metabolites and genes in the flavonoid metabolic pathway; Red indicates up-regulated differential metabolites, blue indicates down-regulated differential metabolites

图 6 转录组与代谢组联合分析

Fig.6 Combined analysis of transcriptome and metabolome

### 2.5 qRT-PCR 验证关键差异表达基因。

选择联合分析富集到的花色苷合成通路中的 9 个基因进行 qRT-PCR 验证。发现花色苷合成途径早期结构基因 *PpPAL*、*PpC4H*、*Pp4CL*、*PpCHS*、*PpCHI* 和晚期结构基因 *PpF3H*、*PpF3'H*、*PpDFR*、*PpANS* 在‘中油蟠 9 号’盛花后 102 天均上调表达，qRT-PCR 结果与转录组数据表现出相似的表达趋势（图 7）。



左 Y 轴表示转录组学中的 FPKM 值，右 Y 轴表示 qRT-PCR 中样本的相对表达量

The left Y-axis indicates the FPKM values in transcriptomics and the right Y-axis indicates the relative expression of the samples in qRT-PCR

图 7 9 个关键基因的 qRT-PCR 验证

Fig.7 qRT-PCR validation of nine key genes

## 3 讨论

桃是世界温带地区具有重要价值的栽培果树之一，起源中国，是我国重要落叶果树，兼具食用和观赏价值。作为一种鲜食水果，桃外果皮及果肉颜色是影响消费者选择和反映桃营养成分的重要指标<sup>[1]</sup>。本研究选择的品种‘中油蟠 9 号’套袋后外果皮色泽微红，有花色苷合成这种现象还未得到深入研究。研究结果表明‘中油蟠 9 号’果实套袋积累花色苷现象主要受矢车菊素、天竺葵素和飞燕草素及其衍生物的影响。

### 3.1 ‘中油蟠 9 号’果实套袋积累花色苷的原因

很多园艺植物在遮光条件下可以积累花色苷。如‘京艳’葡萄套袋后果实外果皮依然为紫色，花色苷积累较多<sup>[15]</sup>。樱桃<sup>[16]</sup>、梨<sup>[17]</sup>和芒果<sup>[18]</sup>的果实，辣椒<sup>[19]</sup>、茄子<sup>[20]</sup>、芸豆<sup>[21]</sup>的可食用部位和经过 T-DNA 插入或 EMS 诱变的芜菁地下膨大肉质根<sup>[22,23]</sup>，以及菊花<sup>[24]</sup>和百合<sup>[25]</sup>的观赏部位在套袋后均积累花色苷。本研究材

料‘中油蟠 9 号’套袋果实在盛花后 89 天果实外果皮色泽开始变红，至盛花后 102 天（成熟期）着色稳定。色差值结果表明‘中油蟠 9 号’的  $a^*/b^*$  的比值呈上升趋势，与外果皮色泽变化表现出类似的趋势。类黄酮差异代谢物分析发现‘中油蟠 9 号’套袋果实发育过程中矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷显著上调积累。因此推测遮光下主要是由于花色苷的不断积累使‘中油蟠 9 号’外果皮呈现红色的。

### 3.2 花色苷代谢途径基因上调表达促进‘中油蟠 9 号’套袋果实花色苷的积累

桃果实花色苷的合成受多个基因控制。‘中油蟠 9 号’果实套袋后，花色苷代谢途径中早期结构基因 *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI* 和晚期结构基因 *F3H*、*F3'H*、*DFR*、*FLS*、*ANS* 均上调表达，并与其代谢物含量检测结果一致（图 7），为花色苷合成提供了前期产物积累。而其他遮光积累花色苷园艺植物关键基因与之不同。如在研究中发现‘京艳’葡萄中光信号途径关键抑制因子 *COPI*（*CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1*, *COPI*）蛋白无论在光照条件下还是黑暗条件下均定位于细胞质中，不能介导 *HY5*（*LONG HYPOCOTYL 5*, *HY5*）靶蛋白在黑暗中的降解，因此即使套袋情况下，该类型葡萄仍然积累花色苷<sup>[15]</sup>。拟南芥 *AtPHYB*（*Phytochrome B*, *PHYB*）蛋白第 276 个氨基酸由缬氨酸突变为组氨酸后，形成的显性错义等位基因 *AtYHB* 异源过表达番茄幼苗表现出非光依赖表型，即黑暗生长的下胚轴积累大量的花色苷<sup>[26]</sup>。深入分析转录组结果，我们也发现‘中油蟠 9 号’果实套袋后花色苷合成相关通路基因整体表达水平发生变化，进一步显示关键调节基因应该是存在于花色苷合成途径的上游信号通路中，从而使遮光条件下的桃果实积累花色苷。发现共有 56 个转录因子套袋后特异性上调表达，分别属于 *MYB*、*bHLH*、*WD40*、*bZIP*、*C2H2*、*COPI*、*ERF*、*NAC*、*WRKY* 转录因子家族。其中仅有 *NAC* 家族中 *PpNAC1* 被 Zhou 等<sup>[31]</sup>报道与 *PpBL* 蛋白形成二聚体诱导 *PpMYB10.1* 的表达，促进桃果肉中花色苷积累并导致血桃性状的形成。除此之外，差异表达基因中光敏色素蛋白 *PpPHYE*（*Phytochrome E*, *PHYE*）、隐色素蛋白 *PpCRY3* 和 UV-B 受体蛋白 *PpUVR8.3*，以及光信号转导因子 *PpSPA3*（*SUPPRESSOR OF PHYA*, *SPA*）、*PpPIF2*、*PpHY5* 在‘中油蟠 9 号’中均上调表达，作为后续研究的关键转录因子，这部分内容还需要深入研究。

以上结果表明，套袋遮光下 *PpBL* 可能与 *PpNAC1* 互作上调表达激活花色苷调节基因 *PpMYB10.1* 的表达，促进花色苷结构基因催化合成矢车菊素-3,5-二-O-葡萄糖苷，使‘中油蟠 9 号’套袋果实果皮呈现红色。本研究中检测到的花色苷及其相关基因为花色苷生物合成途径在油蟠桃果皮着色中发挥重要的代谢和功能作用提供了依据。研究结果将有助于分子育种工作者改良油蟠桃果实品质。

### 参考文献

- [1] Hara-Kitagawa M, Unoki Y, Hihara S, Oda K. Development of simple PCR-based DNA marker for the red-fleshed trait of a blood peach ‘Tenshin-suimitsuto’. *Molecular Breeding*, 2020, 40 (1) : 5
- [2] 王力荣. 我国桃产业现状与发展建议. *中国果树*, 2021, 216 (10) : 1-5  
Wang L R. Current situation and development suggestions of peach industry in China. *China Fruit Trees*, 2021, 216 (10) : 1-5
- [3] 王力荣. 中国桃品种改良历史回顾与展望. *果树学报*, 2021, 38 (12) : 2178-2195  
Wang L R. Historical review and prospect of peach variety improvement in China. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38 (12) : 2178-2195
- [4] 赵云. 两品种桃外果皮花色苷积累差异及光照调控机制. 杭州: 浙江大学, 2019  
Zhao Y. Differences in anthocyanosises' accumulation in peach pericarp of two varieties and light regulation mechanism. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [5] Kapoor L, Simkin A J., George Priya Doss C, Siva R. Fruit ripening: dynamics and integrated analysis of carotenoids and anthocyanins. *BMC Plant Biology*, 2022, 22 (1) : 27
- [6] Li Y X, Lu Y P, Tang D G, Hu B, Zhang Z Y, Wu H W, Fan L J, Cai K W, Tang C, Zhang Y Q, Hong L, Dong J J, Guan B Z, Yin L H, Dai Y, Bai W B, Zheng Z H, Zhu T. Anthocyanin improves kidney function in diabetic kidney disease by regulating amino acid metabolism. *Journal of Translational Medicine*, 2022, 20 (1) : 510
- [7] Zhang Y, Butelli E, Martin C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 19: 81-90
- [8] Chen L, Wang X S, Cui L, Li Y B, Liang Y H, Wang S S, Chen Y B, Zhou L, Zhang Y B, Li F. Transcriptome and metabolome analyses reveal

anthocyanins pathways associated with fruit color changes in plum (*Prunus salicina* Lindl.) .PeerJ, 2022, 10: e14413

- [9] Zhao Y, Dong W Q, Wang K, Zhang B, Allan A C, Lin-Wang K, Chen K S, Xu C J. Differential sensitivity of fruit pigmentation to ultraviolet light between two peach cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 282287
- [10] Ma C Q, Liang B W, Chang B, Yan J Y, Liu L, Wang Y, Yang Y Z, Zhao Z Y. Transcriptome profiling of anthocyanin biosynthesis in the peel of 'Granny Smith' apples (*Malus domestica*) after bag removal. *BMC Genomics*, 2019, 20: 353
- [11] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126 (2) : 485-493
- [12] Tsuda T, Yamaguchi M, Honda C., Moriguchi T. Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit. *Journal of The American Society for Horticultural Science*, 2004, 129 (6) : 857-862
- [13] Zhao Y, Dong W Q, Zhu Y C, Allan A C, Wang L K, Xu C J. *PpGST1*, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (5) : 1284-1295
- [14] Zhao L, Sun J L, Cai Y M, Yang Q R, Zhang Y Q, Ogutu C O, Liu J J, Zhao Y, Wang F R, He H Q, Beibei Zheng, Han Y P. *PpHYH* is responsible for light-induced anthocyanin accumulation in fruit peel of *Prunus persica*. *Tree Physiology*, 2022, 42 (8) : 1662-1677
- [15] 郭少剑.去光条件下葡萄果皮中 VvHY5 和 VvCOPI 的转录和蛋白表达分析. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉植物园), 2016  
Guo S J. Transcription and protein expression analysis of VvHY5 and VvCOPI in grape peel under light-removing conditions. Wuhan: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Wuhan Botanical Garden), 2016
- [16] Guo X, Wang Y T, Zhai Z F, Huang T J, Zhao D, Peng X., Feng C, Xiao Y H, Li T H. Transcriptomic analysis of light-dependent anthocyanin accumulation in bicolored cherry fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 663-677
- [17] Zhu Y F, Su J, Yao G F, Liu H N, Gu C, Qin M F, Bai B, Cai S S, Wang G M, Wang R Z, Shu Q, Wu J. Different light-response patterns of coloration and related gene expression in red pears (*Pyrus L.*) . *Scientia Horticulturae*, 2018, 229: 240-251
- [18] Shi B, Wu H X, Zheng B, Qian M J., Gao A P, Zhou K B. Analysis of light-independent anthocyanin accumulation in mango (*Mangifera indica* L.) . *Horticulturae*, 2021, 7 (11) : 423
- [19] Tang B Y, L L, Hu Z L, Chen Y N, Tan T T, Jia Y H, Xie Q L, Chen G P. Anthocyanin accumulation and transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in purple pepper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (43) : 12152-12163
- [20] He Y J, Chen H, Zhou L, Liu Y, Chen H Y. Comparative transcription analysis of photosensitive and non-photosensitive eggplants to identify genes involved in dark regulated anthocyanin synthesis. *BMC Genomics*, 2019, 20: 1-14
- [21] Hu J T, Chen G P, Zhang Y J, Cui B L, Yin W C, Yu X H, Zhu Z G, Hu Z L. Anthocyanin composition and expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in kidney bean pod. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 97: 304-312
- [22] Wang X Z, Wang Y, Chen B W, Kawabata S, Fang Z Y, Li Y H. Construction and genetic analysis of anthocyanin-deficient mutants induced by T-DNA insertion in 'Tsuda' turnip (*Brassica rapa*) . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 131: 431-443
- [23] Yang J F, Chen Y Z, Saneyuki K, Li Y H, Yu W. Identification of light-independent anthocyanin biosynthesis mutants induced by ethyl methane sulfonate in turnip "Tsuda" (*Brassica rapa*) . *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (7) : 1288
- [24] Huang H, Li Y, Dai S. Investigation of germplasm in chrysanthemum cultivars with light-independent coloration. In: *II International Symposium on Germplasm of Ornamentals*, 2016, 1185: 55-64
- [25] Nakatsuka A, Yamagishi M, Nakano M, Tasaki K, Kobayashi N. Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121 (1) : 84-91
- [26] Hu W, Figueroa-Balderas R, Chi-Ham C, Lagarias J C. Regulation of monocot and dicot plant development with constitutively active alleles of phytochrome B. *Plant Direct*, 2020, 4: e00210
- [27] Yao G F, Ming M L, Allan A C, Gu C, Li, L T, Wu X, Wang R Z, Chang Y J, Qi K J, Zhang S L, Wu J. Map-based cloning of the pear gene MYB 114 identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis. *The Plant Journal*, 2017, 92 (3) : 437-451
- [28] Daccord N, Celton J, Linsmith G, Becker C, Choisine N, Schijlen E, Geest H, Bianco L, Micheletti D, Velasco R, Erica Adele Di Pierro E, Gouzy J, D J G, Guéif P, Muranty H, Durel C, Laurens F, Lespinasse Y, Gaillard S, Aubourg S, Quesneville H, Weigel D, Weg E, Troglio M, Bucher E. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics*,

2017, 49 (7) : 1099-1106

- [29] Fraga C G, Clowers B H, Moore R J, Zink E M. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (10) : 4165-4173
- [30] Zhao L, Zhang Y Q, Sun J L, Yang Q R., Cai Y M, Zhao C P, Wang F R, He H P, Han Y P. PpHY5 is involved in anthocyanin coloration in the peach flesh surrounding the stone. *The Plant Journal*, 2023, 114 (4) : 951-964
- [31] Zhou H, Wang K L, Wang H L, Gu C, Dare A P, Espley R V, He H P, Allan A C, Han Y P. Molecular genetics of blood-fleshed peach reveals activation of anthocyanin biosynthesis by NAC transcription factors. *The Plant Journal*, 2015, 82 (1) : 105-121

