

切花菊 3 个品种的飞燕草素苷合成能力分析

于凯丽, 吴慧莹, 曲爱爱, 王艺光, 房伟民, 蒋甲福, 陈发棣, 陈素梅*
(南京农业大学园艺学院, 农业部景观农业重点实验室, 南京 210095)

摘要: 为了评价不同切花菊品种花瓣飞燕草素苷合成能力, 以 3 个粉色系切花菊品种为材料, 采用飞燕草素前体二氢杨梅素 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液对花瓣进行离体添加培养, 建立菊花飞燕草素苷超高效液相 UPLC 分析技术, 并用于菊花花瓣中飞燕草素苷的鉴定。结果表明, 菊花花青苷可采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸甲醇及同体积的 10% 甲酸水提取, $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤。通过洗脱条件的优化可在 9 min 内实现飞燕草素苷与其他花青苷的分离, 当飞燕草素在 $2.5 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时与色谱峰面积具有良好的线性关系, 相关系数为 0.997。3 个粉色系菊花品种均具有催化二氢杨梅素合成飞燕草素的能力, 且飞燕草素含量均在 $220 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 以上, 表明 3 个品种均可作为蓝色花色转基因候选品种。

关键词: 菊花; 二氢杨梅素; 飞燕草素苷; 超高效液相; 蓝色花色

中图分类号: S 682.1⁺¹

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 10-2045-07

Delphinidin Synthesis Ability in Three Cut Chrysanthemum Cultivars

YU Kaili, WU Huiying, QU Aiai, WANG Yiguang, FANG Weimin, JIANG Jiafu, CHEN Fadi, and CHEN Sumei*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Landscape Agriculture, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: To evaluate the delphinidin biosynthesis ability of different chrysanthemum varieties, three varieties of pink flowers were employed, and the petals were fed with $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DHM. The delphinidin content in DHM fed petals was determined. By optimizing the analysis conditions, we established an effective way of quantitative determination of delphinidin via UPLC. The results showed that anthocyanin of chrysanthemum flowers can be extracted by $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid methanol, and 10% formic acid in a ratio of 9:1 (v/v), and followed by filtering through $0.22 \mu\text{m}$ filter membrane. Through the optimization of elution conditions, delphinium can be separated from other anthocynins within nine minutes. Based on optimized UPLC analysis method, delphinium concentration within $2.5 - 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ has a good linear relationship with peak area, and the correlation coefficient is 0.997. We found that all the varieties could produce delphinidin when fed with DHM, the contents of delphinidin in three varieties are all over $220 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, inferring the tested varieties are promising host varieties for blue flower genetic modification.

收稿日期: 2018-07-28; **修回日期:** 2018-09-15

基金项目: 江苏省重点研发计划项目 (BE2017412); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (16) 1025]; 中央高校基本科研业务费创新产业链项目 (KYCYL201501); 中央高校基本科研业务费重大专项 (KYTZ201401)

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

Keywords: chrysanthemum; dihydromyricetin; delphinidin; ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC); blue flower color

花青素苷是花呈色的物质基础,其中矢车菊素苷元(Cyanidin)、飞燕草素苷元(Delphinidin)、天竺葵素苷元(Pelargonidin)、芍药花素苷元(Peonidin)、矮牵牛素苷元(Petunidin)和锦葵素苷元(Malvidin)为基础花青素苷元基。迄今,自然界中分离和鉴定的600多种花青素苷均由上述6种基础花青素苷衍生而来(Kong et al., 2003)。飞燕草素苷元(Delphinidin)是蓝色花呈色合成路径积累的第一类花青素苷,是最关键的基础色素(Turnage et al., 2002; Tanaka et al., 2010)。

菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)花色丰富,但是缺少蓝色(李鸿渐和邵健文,1990)。以往的研究表明,菊花类黄酮-3'-羟化酶(F3'H)相对于二氢黄酮还原酶(DFR)具有过强的底物竞争能力,能催化柚皮素合成圣草酚,阻断了二氢勘非醇(DHK)的合成,使得天竺葵素苷的合成途径中断(Schwinn et al., 1993; Nakayama et al., 1997)。菊花DFR酶的特异底物是二氢槲皮素(DHQ),催化合成的最终代谢产物为矢车菊素(Nakayama et al., 1997)。由于菊花中缺少F3'5'H基因,因此不能合成二氢杨梅素(DHM),无法合成飞燕草素苷从而缺少蓝色菊花。Brugliera等(2013)利用体外DHM饲喂试验,从75个菊花品种中筛选出16个能够催化合成飞燕草素苷的品种,并利用F3'5'H基因对筛选出的部分品种进行了蓝色花色遗传改良。Noda等(2017)报道,不同物种来源启动子及催化合成蓝色花青素基因的共同转化可获得转基因蓝色菊花。本研究通过添加飞燕草素前体DHM,对自主选育的3个菊花品种花瓣进行离体培养,采用超高效液相色谱(UPLC)测定处理后的花瓣中飞燕草素苷含量,分析该品种利用DHM合成飞燕草素苷的能力,为蓝色菊花的转基因培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菊花材料及其花色的测定

供试材料为南京农业大学“中国菊花种质资源保存中心”保存的切花菊品种‘南农绯玉’、‘QX-087’和‘南农宫粉’。于2013年10月采集处于开放阶段III(舌状花成45°开展,着色完全)的花用作试验材料,每品种15朵。

采用英国皇家园艺学会的比色卡(RHSCC)对选定的3个切花菊品种进行花色测定,确定花色编号。

1.2 菊花花瓣的二氢杨梅素(DHM)饲喂培养

二氢杨梅素(DHM)为色谱纯,购自上海源叶生物科技有限公司。参照Brugliera等(2013)体外DHM饲养实验,取处于开放阶段III的花最外轮舌状花花瓣,切取中部花瓣,每个花瓣方片约200 mg,置于玻璃培养皿中,向培养皿中加入浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DHM溶液15 mL,浸没花瓣培养。空白对照组加入15 mL去离子水。置于20 °C、湿度70%、持续光照的培养箱中培养40 h。每处理设3重复。培养结束后,用英国皇家园艺学会比色卡(RHSCC)对花瓣进行颜色测定,并拍照记录。

1.3 二氢杨梅素 (DHM) 饲喂花瓣中飞燕草素苷的提取

将经 DHM 培养和去离子水培养后的花瓣用吸水纸吸干表面水分, 称取 200 mg 花瓣放入研钵, 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸甲醇 2 mL 研磨, 转入 2 mL 离心管中, 置于冰上避光浸提 30 min 后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液 1 mL, 加入等体积的 10% 甲酸水 (甲酸: 水 = 1:9, 体积比), 颠倒混匀, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 3 次重复。

1.4 飞燕草素苷超高效液相色谱测定

称取 1 mg 飞燕草素苷标准品 [delphinidin chloride, $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_7$, 相对分子质量 338.7, 含量 94.7%, 购自 ChromaDex (MSA)] 公司, 用色谱级甲醇 (methanol) 溶解并定容至 10 mL, 制备成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的飞燕草母液素苷标准品母液, 置于棕色瓶中遮光低温保存备用。

取飞燕草素母液 25、50、100、200 和 400 μL , 用 10% 的甲酸水 (甲酸: 水 = 1:9, 体积比) 稀释至 1 mL, 配制成 2.5、5.0、10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准品工作液。采用超高效液相进行测定, 根据峰面积和飞燕草素苷工作液浓度计算标准曲线方程, 用于菊花飞燕草素苷定量分析。

流动相以色谱纯乙腈作为 A 相, 10% 的甲酸作为 B 相进行梯度洗脱: 0 min, 5% B; 1 min, 5% B; 6 min, 30% B; 6.1 min, 5% B; 9 min, 5% B。

高效液相分析采用 Agilent 超高效液相色谱仪 (Acquity UPLC) 进行。色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C18 柱 (Rapid Resolution HT $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm} \text{ 1.8-Micron } 600\text{Bar}$); 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长: 530 nm; 上样量: $2.0 \mu\text{L}$; 流速: $0.30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。花青素苷检测流动相为: 流动相 A, 100% 的乙腈; 流动相 B, 10% 的甲酸水 (1:9, 体积比) (褚云霞 等, 2014; Santiago et al., 2014)。

将各样品色谱峰面积的平均值代入飞燕草素苷标准曲线方程, 计算测定样品液中飞燕草素苷浓度, 进一步计算菊花花瓣样品中所含飞燕草素苷的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。

2 结果与分析

2.1 不同菊花品种花瓣 DHM 培养后的花色变化

与对照相比, 经飞燕草素苷前体 DHM 培养后 3 个菊花品种的花瓣颜色均发生了变化 (图 1)。

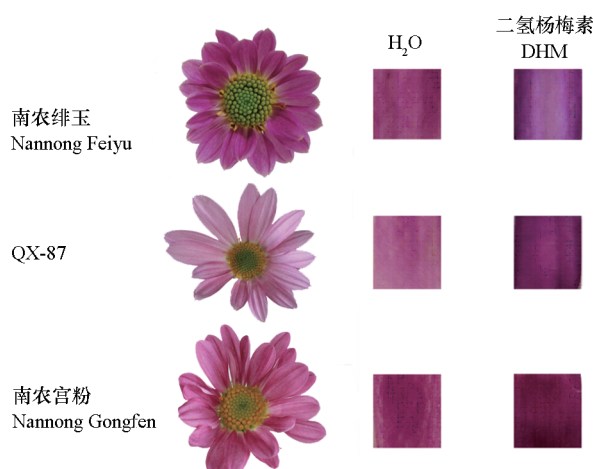


图 1 去离子水和 DHM 培养后菊花各品种花瓣的颜色变化

Fig. 1 The color change in petal observed after incubation of cut petal segments in water and DHM

RHSCC 比色分析显示, ‘南农绯玉’ 去离子水培养的花瓣颜色为 Red-purple N66-D, 而 DHM 培养的花瓣颜色为 Purple-violet N81-A, ‘QX-087’ 和 ‘南农宫粉’ 花瓣花色分别由对照的 Red-purple 72-D 和 Red-purple N74-C 转变为 Red-purple 72-B 和 Purple N79-C。

2.2 不同菊花品种 DHM 培养后花瓣中飞燕草素苷的含量

飞燕草素苷标准品 UPLC 检测显示其保留时间为 3.4 ~ 3.5 min, 同一浓度标准品 6 次重复的相对标准偏差为 2.47%, 表明分析条件稳定, 可用于菊花样品飞燕草素苷的分析。

对经过 DHM 和去离子水培养的花瓣进行 UPLC 分析, 检测飞燕草素苷含量。如图 2 所示, ‘南农绯玉’、‘QX-087’ 和 ‘南农宫粉’ 在去离子水 (对照) 花瓣中未检测到飞燕草素苷, 经 DHM 培养的花瓣中可检测到飞燕草素苷, 保留时间分别为 3.453、3.466 和 3.457 min。

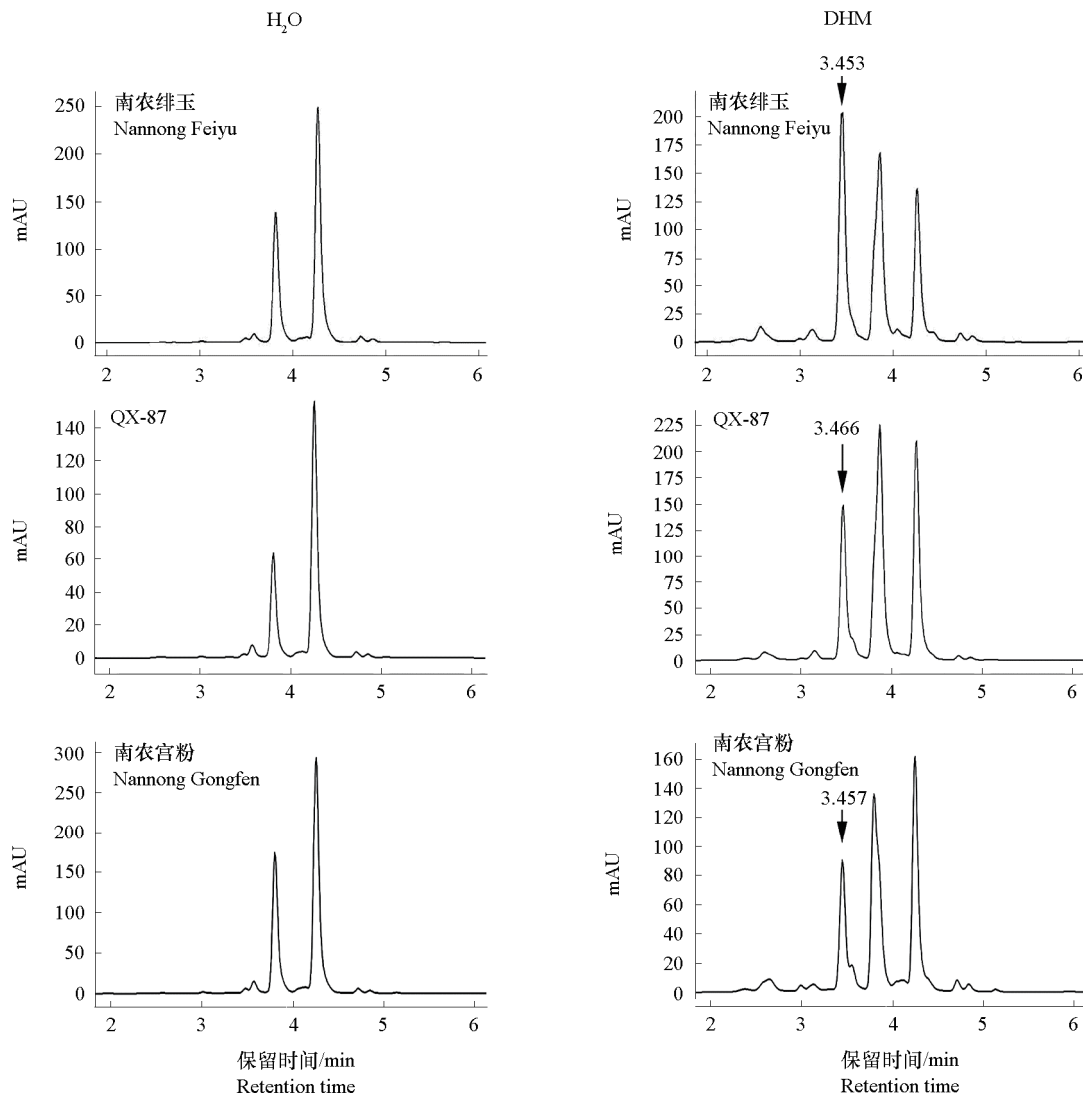


图 2 ‘南农绯玉’、‘QX-087’、‘南农宫粉’ 飞燕草素苷含量的色谱图

Fig. 2 The delphinidin chromatogram of petal segments of ‘Nannong feiyu’, ‘QX-087’ and ‘Nannong gongfen’ chrysanthemums

根据飞燕草素苷标准品浓度及其峰面积, 绘制标准曲线计算出飞燕草素苷含量回归方程为 $Y = 56.763X - 43.751$, 相关系数为 0.9997 (图 3)。

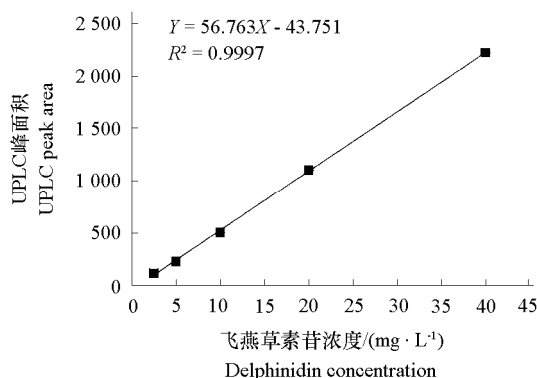


图 3 飞燕草素苷含量标准曲线

Fig. 3 Relationship between UPLC peak area and delphinidin concentration

根据回归方程计算出每个菊花品种经 DHM 饲喂的花瓣中的飞燕草素苷含量, ‘南农绯玉’、‘QX-087’、‘南农宫粉’分别为 (441.6 ± 47.4) 、 (281.2 ± 19.4) 、 $(334.8 \pm 44.7) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ (表 1)。

表 1 DHM 饲喂后不同品种花瓣中飞燕草素苷含量

Table 1 The concentration of delphinidin in petal segments of different varieties after DHM feeding

品种 Variety	飞燕草素苷含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW})$ Concentration of delphinidin
南农绯玉 Nannong Feiyu	441.6 ± 47.4 a
QX-87	281.2 ± 19.4 b
南农宫粉 Nannong Gongfen	334.8 ± 44.7 b

注: 不同字母表示邓肯检验 5%显著水平。

Note: Different letters mean significant difference at 0.05 level by Duncan's test.

3 讨论

超高效液相色谱 (UPLC) 是以 $1.7 \mu\text{m}$ 的超细色谱柱填料为核心技术的新型色谱分离分析技术 (陈佳 等, 2008; 杨智勇 等, 2013), 增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量。以往 HPLC 测定单个样品花青苷的含量需要 20 ~ 60 min (岳喜庆 等, 2010; Zhao et al., 2013), 孙翊等 (2011) 通过优化洗脱条件将单个样品的检测时间缩短 15 min。本试验中利用 UPLC 对菊花花瓣飞燕草素苷的快速定量研究, 使得单个样品分析时间仅需 9 min, 大大提高了检测效率。

百合、月季、菊花等不具有 $F3'5'H$ 基因, 因而不能催化 DHM 的合成, 导致蓝色花色素苷合成受阻, 因而花色中缺少蓝色 (张萍, 2011; 洪艳, 2012)。百合 ‘罗宾娜’ 和东方百合 ‘贝尼尼’ 较适宜转入蓝色基因, 因其花瓣中矢车菊色素含量少, 黄酮醇含量高, 液泡 pH 值高 (张萍 等, 2010)。在花色素苷生物合成途径中, $F3'H$ 羟化酶 (矢车菊色素形成途径中的关键酶) 与 $F3'5'H$ 羟化酶共同竞争作用底物, 故当矢车菊色素含量低, 即 $F3'H$ 活性弱时, 导入外源蓝色基因易于合成大量飞燕草色素, 形成蓝色花 (张萍, 2011)。Katsumoto 等 (2007) 在筛选转基因蓝色月季品种时, 没有选择深色品种和红色品种, 因为它们黄酮醇含量低且 pH 值也很低。也不会选择黄色、白色品种, 因为其

花瓣无法积累花色苷, 所以通过视觉主要选择了粉红色至紫红色的品种, 然后检测其中 169 个品种中的类黄酮成分以及液泡 pH 值, 进而选择适宜转蓝色基因的品种。孙卫等 (2010) 以不同花色菊花中最终形成的矢车菊素苷占矢车菊素苷途径类黄酮量的百分比来衡量矢车菊素苷在代谢流中分配水平的高低发现, 相比于红、紫、红紫和墨色菊中, 粉色菊花瓣中矢车菊素苷的含量比较低。Brugliera 等 (2013) 采用花瓣圆片添加 DHM 试验, 发现粉红色品种在添加 DHM 后, 花色转换成了淡紫色或紫色, 并检测到了飞燕草素的合成, 表明供试品种的 DFR 具有催化 DHM 的能力, 以及具备下游蓝色花色苷飞燕草素的合成路径。而深红色、青铜色、红色或黄色品种不适合作为选择受体, 暗示着粉红色的菊花是蓝色花色转基因的适宜受体品种。

本研究中供试粉色品种‘南农绯玉’菊花的花瓣经 DHM 培养后颜色明显向蓝紫色 Purple-violet 转变, 且飞燕草素苷含量较高, ‘QX-087’和‘南农宫粉’菊花的花瓣经 DHM 培养后花瓣颜色也变为红紫、紫色系, 也检测到飞燕草素苷存在, 表明供试的 3 个菊花品种均具有催化 DHM 合成飞燕草素苷的能力。但是不同品种 DHM 培养后花色呈色不同, 推测不同品种促进蓝色呈色的因子不同, 或者 DFR 催化 DHM 的能力、液泡 pH 值高低及辅助金属离子等存在差异所致 (徐清燊 等, 2004; Yoshida et al., 2009)。综合花瓣颜色变化及花瓣中飞燕草素苷含量分析, 认为‘南农绯玉’为最适宜进行蓝色花色关键基因 *F3'5'H* 转基因的受体品种。

References

- Brugliera F, Tao G Q, Tems M, Kalc G, Mouradova E, Price K, Stevenson K, Nakamura N, Stacey I, Katsumoto Y, Tanaka Y, Mason J G. 2013. Violet/blue *Chrysanthemums*-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant & Cell Physiology*, 54 (10): 1696 - 1710.
- Chen Jia, Wang Gang-li, Yao Ling-wen, Lin Rui-chao. 2008. Recent applications of ultra performance liquid chromatography (UPLC) in pharmaceutical analysis. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 28 (11): 1976 - 1981. (in Chinese)
- 陈佳, 王钢力, 姚令文, 林瑞超. 2008. 超高效液相色谱 (UPLC) 在药物分析领域中的应用. *药物分析杂志*, 28 (11): 1976 - 1981.
- Chu Yun-xia, Rao Qin-xiong, Chen Hai-rong, Wu Ai-zhong. 2014. Determination of anthocyanidins in petunia by UPLC. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science)*, 32 (2): 55 - 61. (in Chinese)
- 褚云霞, 饶钦雄, 陈海荣, 吴爱忠. 2014. 超高效液相色谱法测定矮牵牛中花青苷含量. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 32 (2): 55 - 61.
- Hong Yan, Bai Xin-xiang, Sun Wei, Jia Feng-wei, Dai Si-lan. 2012. The numerical classification of *Chrysanthemum* flower color phenotype. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1330 - 1340. (in Chinese)
- 洪艳, 白新祥, 孙卫, 贾锋炜, 戴思兰. 2012. 菊花品种花色表型数量分类研究. *园艺学报*, 39 (7): 1330 - 1340.
- Katsumoto Y, Fkuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton T.A, Karan M, Nakamura N, Sakakibara KY, Togami J, Pigeaire A, Tao G Q, Nehra N S, Lu C Y, Dyson B K, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason J G, Tanaka Y. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol*, 48: 1589 - 1600.
- Kong J M, Chia L S, Goh N K, Chia T F, Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64 (5): 923.
- Li Hong-jian, Shao Jian-wen. 1990. Investigation, collection and classification of chrysanthemum germplasm resources in China. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 13 (1): 30 - 36. (in Chinese)
- 李鸿渐, 邵健文. 1990. 中国菊花品种资源的调查收集与分类. *南京农业大学学报*, 13 (1): 30 - 36.
- Nakayama M, Koshioka M, Shibata M, Hiradate S, Sugie H, Yamaguchi M. 1997. Identification of Cyanidin 3-*O*- (3",6"-*O*-Dimalonyl- β -glucopyranoside) as a flower pigment of *Chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum)*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 61 (9): 1607 - 1608.
- Noda N, Yoshioka S, Kishimoto S, Nakayama M, Douzono M, Tanaka Y, Aida R. 2017. Generation of blue *chrysanthemums* by anthocyanin B-ring

- hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Eu Enlargement Law & Socioeconomic Perspectives*, 3 (7): e1602785.
- Santiago M C P D A, Godoy R L D O, Borguini R G, Pacheco S, Nogueira R I, Freitas S P. 2014. Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. *Braz J Food Technol.* 17 (1): 51 - 57.
- Schwinn K E, Markham K R, Giveno N K. 1993. Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry*, 35 (1): 145 - 150.
- Sun Wei, Li Chong-hui, Wang Liang-sheng, Dai Si-lan. 2010. Analysis of anthocyanins and flavones in different-colored flowers of chrysanthemum. *Chinese Bulletin of Botany*, 45 (3): 327 - 336. (in Chinese)
- 孙 卫, 李崇晖, 王亮生, 戴思兰. 2010. 菊花不同花色品种中花青素苷代谢分析. *植物学报*, 45 (3): 327 - 336.
- Sun Yi, Li Hui, Wang Liang-sheng, Dai Si-lan. 2011. Rapid, effective method for anthocyanin analysis in tobacco corolla. *Chinese Bulletin of Botany*, 46 (2): 189 - 196. (in Chinese)
- 孙 翊, 李 慧, 王亮生, 戴思兰. 2011. 一种快速有效分析烟草花冠中花青素苷的方法. *植物学报*, 46 (2): 189 - 196.
- Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, Katsumoto Y, Chandler S. 2010. Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 74 (9): 1760 - 1769.
- Turnage S, Fukui Y, Nakamura N, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Kusumi T, Tanaka Y. 2002. Flower color modification of *Petunia* commercial varieties by metabolic engineering. *The Plant Journal*, 30 (1): 107 - 114.
- Xu Qing-yu, Dai Si-lan. 2004. Blue flowers molecular breeding molecular. *Plant Breeding*, 2 (1): 93 - 99. (in Chinese)
- 徐清楠, 戴思兰. 2004. 蓝色花卉分子育种. *分子植物育种*, 2 (1): 93 - 99.
- Yang Zhi-yong, Li Xin-sheng, Ma Jiao-yan, Han Hao, Liu Shui-ying, Gao Yue. 2013. Anthocyanin composition and content in "Heijingang" purple potato. *Food Science*, 34 (14): 271 - 275. (in Chinese)
- 杨智勇, 李新生, 马娇燕, 韩 豪, 刘水英, 高 玥. 2013. 紫色马铃薯“黑金刚”中花青素组分和含量分析. *食品科学*, 34 (14): 271 - 275.
- Yoshida K, Mori M, Kondo T. 2009. Blue flower color development by anthocyanins. *Natural Product Reports*, 26 (7): 884 - 915.
- Yue Xi-qing, Zhang Chao, Wang Yu-bin, Ma Yue, Zhao Xiao-yan. 2010. Determination of anthocyanin content of purple corn (*Zea mays* L.) by two standards HPLC. *Method Food Research and Development*, 31 (6): 126 - 129. (in Chinese)
- 岳喜庆, 张 超, 王宇滨, 马 越, 赵晓燕. 2010. 双标样高效液相色谱法测定紫玉米花青素的含量. *食品研究与开发*, 31 (6): 126 - 129.
- Zhang Ping. 2011. Selection of lily transformation varieties with the blue genes and a study of genetic transformation. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 张 萍. 2011. 百合转蓝色基因品种的选择及其遗传转化研究[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Zhang Ping, Liu Ya-li, Qi Yin-yan, Hua Zhan-yong. 2010. The selection of lily cultivars suitable for being transformed blue genes by using the grey correlation analysis. *Chineses Agricultural Science Bulletin*, 26 (20): 52 - 56. (in Chinese)
- 张 萍, 刘雅莉, 祁银燕, 化占勇. 2010. 利用灰色关联分析法选择适宜转蓝色基因的百合品种. *中国农学通报*, 26 (20): 52 - 56.
- Zhao X, Yuan Z, Fang Y, Fang Y, Yin Y, Feng L. 2013. Characterization and evaluation of major anthocyanins in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel of different cultivars and their development phases. *European Food Research and Technology*, 236 (1): 109 - 117.