

# 洋葱苯丙氨酸解氨酶基因 *AcPAL2* 的克隆与表达分析

梁毅<sup>1</sup>, 刘小义<sup>2</sup>, 张洪伟<sup>1,\*</sup>, 谭武平<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京京研益农科技发展中心, 北京 100097; <sup>2</sup>中国质量认证中心, 北京 100070)

**摘要:** 利用简并 PCR 技术和 RACE 技术克隆得到了一条洋葱的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 基因全长 cDNA 序列。该 cDNA 序列全长 2 349 bp, 编码长 685 个氨基酸残基的多肽序列, 命名为 *AcPAL2*。Blast 分析表明该序列与虎眼万年青 *Galtonia saundersiae*、野蕉 *Musa balbisiana* 的相似性均较高。Real-time PCR 表达及花青素含量分析表明, 红皮洋葱该基因表达量最大, 而黄皮和白皮洋葱表达量极低; 在红皮洋葱中该基因在膨大初期大量表达, 并迅速降低至一定程度后趋于相对平稳表达, 且与花青素的积累过程相一致。

**关键词:** 洋葱; 花青素; *AcPAL2*; 基因表达

**中图分类号:** S 633.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 03-0505-08

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *AcPAL2* in Onion

LIANG Yi<sup>1</sup>, LIU Xiao-yi<sup>2</sup>, ZHANG Hong-wei<sup>1,\*</sup>, and TAN Wu-ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Vegetable Research Center of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops in North China, Beijing Jing Yan Yi Nong Sci-Tech Development Center, Beijing 100097, China; <sup>2</sup>China Quality Certification Center, Beijing 100070, China)

**Abstract:** A full-length cDNA of phenylalanine ammonia lyase-homologue (*AcPAL2*) was isolated from onion using degenerate PCR and the RACE (rapid amplification of cDNA ends) method. The full-length cDNA is 2 349 bp long, which encodes a polypeptide of 685 amino acids. Blast analysis indicate that the polypeptide shares a relatively high similarity with *Galtonia saundersiae* and *Musa balbisiana*. Real-time PCR analysis demonstrate that *AcPAL2* mRNA express abundantly in red onions, but extremely low in yellow and white onions; *AcPAL2* in different bulb swelling stage in red onion has a high expression during the initiation, then express stable after a rapid decrease. And anthocyanin content change also shows the same tendency with *AcPAL2* expression.

**Key words:** onion; anthocyanin; *AcPAL2*; gene expression

植物颜色主要是由类黄酮素 (Flavonoids)、类胡萝卜素 (Carotenoids) 和甜菜碱素 (Betalains) 的不同分布所决定, 其中类黄酮化合物花青素主要决定植物的红色、紫色和蓝色 (Field et al., 2001)。

**收稿日期:** 2014 - 11 - 28; **修回日期:** 2015 - 01 - 26

**基金项目:** 国家公益性行业科技项目 (20093018); ‘十二五’国家科技支撑计划项目 (2012BAD02B00, 2011BAD35B07, 2012BAD50G01); 北京市科委育种平台三期项目 (D111100001311002); 北京市常规育种财政专项 (2014-509)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhwwawzjcx@163.com)

花青素的生物合成以苯丙氨酸为直接前体, 经历一系列的酶促反应及不同的羟基化、糖基化、甲基化、酰基化修饰后在液泡中汇集 (Holton & Cornish, 1995), 其中苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 催化 L - 苯丙氨酸生成反式肉桂酸, 是花青素生物合成反应中的第一个酶, 也是多种次生代谢产物的关键酶和限速酶。

早在 1960 年, Neish 就证实了 PAL 可以催化花青素的合成 (Neish, 1960)。用白光、蓝光或红光照射尾穗苋的黄化苗, 可以使 PAL 活性不同程度上升, 并且发现其特有色素苋红素大量积累 (应初衍和薛应龙, 1984); Nakazawa 等 (2001) 研究发现在牵牛花花蕾中, PAL 基因转录水平的增加, 会使 PAL 活性升高, 进而使花青素含量也大量增加, 说明牵牛花花蕾 PAL 活性和转录水平均与花青素积累有关; 史宝胜等 (2007) 认为可以通过增加光照强度来增加紫叶李叶片 PAL 酶的活性, 促进花青素大量合成而使其叶片迅速呈现红色。另外, 还有人通过调节 PAL 基因的表达模式, 有效地改变了矮牵牛、烟草和菊花等植物的花色。洋葱 (*Allium cepa* L.) 根据鳞茎颜色的不同, 分为红皮、黄皮和白皮等不同种类。本研究中以红皮洋葱为试验材料, 利用 RT-PCR 与 RACE 技术分离并克隆了 1 条 PAL 基因全长 cDNA 序列, 并对其进行部分序列分析, 及其表达情况和花青素含量关系的分析, 为明确 PAL 基因与花青素合成之间的关系提供依据, 为进一步探究洋葱花青素的合成途径奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在北京市农林科学院蔬菜研究中心农场种植白皮洋葱品种 ‘白雪’、红皮洋葱品种 ‘中生赤玉’ 和黄皮洋葱品种 ‘黄金大玉葱’, 常规栽培管理。

于鳞茎开始膨大 (2013 年 4 月下旬) 后的不同时期采集红皮洋葱鳞茎, 于鳞茎开始膨大 30 d 时采集红、黄、白皮洋葱鳞茎, 采集后立即液氮速冻, 保存于 - 80 °C, 用以提取总 RNA。

### 1.2 基因全长 cDNA 序列克隆

从 NCBI 下载洋葱近缘植物 (玉米, 大蒜, 石蒜, 小果野蕉, 毛竹) 的 PAL 基因序列, 根据这些序列, 利用软件 Primer Premier 5.0 设计简并引物 (表 1)。

表 1 涉及到的引物及其序列  
Table 1 Primers involved in the study and its sequences

用途 Purpose	引物名称 Primer name	核苷酸序列* (5'→3') Nucleotide sequence*
中间片段扩增 Intermediate fragment amplification	PAL-de-F	GGHATYCGVTTYGARATCCT
	PAL-de-R	GTTGTCCATGGANACVCCRAT
全长 cDNA 扩增 Full-length cDNA amplification	P1FL	GAAAAGGAAAGGCCAATTGTTCATAT
5'-RACE PCR 扩增 5'-RACE amplification	P1R-1	AATCTGACCTGGATGATGTTTC
	P1R-2	ACTGCAAGAACATTGGCCTCA
<i>Actin</i> 内参引物 <i>Actin</i> Primers	AcActin-S	ACACGGCCTGGATAGCAACAT
	AcActin-A	AGAGCAGTATTCCAAGCAIT
Real-time PCR 引物 Specific primer for real-time PCR	P1-S	GGGCAACTTCGCATAGGAGG
	P1-A	GCTGTTCAAGAAAGCGGCAA

\* H = A/T/C; V = G/A/C; R = A/G; Y = C/T; N = A/T/C/G。

以开始膨大 30 d 后的红皮洋葱鳞茎作为试验材料, 使用试剂 TotalRNAExtractor (Trizol) (上海生工) 提取总 RNA, PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 合成 cDNA 第一链, 以简并引物 PAL-de-F 和 PAL-de-R 扩增 PAL 基因。

扩增体系为:  $10 \times$  LA PCR Buffer II ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus)  $2.0 \mu\text{L}$ , dNTP Mixture (各  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $3.2 \mu\text{L}$ , PAL-de-F ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , PAL-de-R ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , 模板 cDNA  $1.0 \mu\text{L}$ , TaKaRa LA Taq ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ , 加水补足  $20 \mu\text{L}$ 。

反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  3 min; 然后  $94^\circ\text{C}$  30 s、 $53^\circ\text{C}$  30 s、 $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。凝胶电泳检测 PCR 结果, 将目的条带切下并使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (TaKaRa) 回收目的片段, 将回收的 DNA 片段连接在载体 pMD18-T Vector (TaKaRa) 上, 并转化大肠杆菌 JM109 (TaKaRa)。经 PCR 鉴定和酶切鉴定后挑选合适的重组质粒克隆送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

使用软件 Primer Premier 5.0 和上述克隆得到的片段序列设计 5'-RACE 特异引物 P1R-1 和 P1R-2, 利用 5'-Full RACE Kit (TaKaRa) 进行嵌套 PCR 反应以获得目的基因的 5'-末端序列。利用 5'-末端序列设计引物 P1FL, 按照 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript<sup>TM</sup> RTase 说明书操作, 进行 PCR 反应, 并经回收、连接、转化、重组质粒鉴定及测序后得到全长 cDNA 序列。

### 1.3 序列的生物信息学分析

ORF 查找和核苷酸翻译等使用软件 Vector NTI; 蛋白质分子量和 pH 值预测使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>); N-端信号肽序列预测使用 Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 序列的同源比对和结构域预测使用 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 序列多重比对使用 Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)); 部分植物 PAL 蛋白质和 AcPAL2 的系统进化分析使用 Mega4.1 软件, 以 N-J 算法, 重复抽样 1 000 次来进行。

### 1.4 基于 Real-time PCR 的基因表达分析

以膨大开始后 10、20、30 和 40 d 的红皮洋葱‘中生赤玉’鳞茎为材料, 分析 *AcPAL2* 基因在洋葱鳞茎膨大不同时期的表达变化情况。以膨大开始 30 d 的红、黄、白皮洋葱(‘中生赤玉’、‘黄金大玉葱’、‘白雪’)鳞茎为材料, 分析 *AcPAL2* 基因在不同皮色洋葱鳞茎中的表达情况。

以洋葱  $\beta$ -Actin 基因(引物为 AcActin-S 和 AcActin-A)作为内参, 使用引物 P1-S、P1-A 和试剂 RealMasterMix (SYBR Green) (TaKaRa), 在 Light Cycler system (Roche LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪)上进行 Real-time PCR, 数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法 (Livak & Schmittgen, 2001)。

### 1.5 花青素含量分析

取膨大开始 30 d 的红、黄、白皮洋葱(‘中生赤玉’、‘黄金大玉葱’、‘白雪’), 以及膨大 10、20、30 和 40 d 的红皮洋葱‘中生赤玉’鳞茎各 1.0 g, 充分研磨后加入 10 mL 预冷的 0.005% 盐酸—甲醇溶液,  $4^\circ\text{C}$  避光静置 12 h; 收集上清液, 残渣再次以 10 mL 预冷的 0.005% 盐酸—甲醇溶液处理 6 h, 合并上清液并定容。按体积比 1:4 分别将上述溶液与  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl-HCl 缓冲液 (pH 1.0) 和 NaAc 缓冲液 (pH 4.5) 混合, 室温静置 20 min, 分光光度计检测 530 nm 和 700 nm 吸光值。花青素含量的计算参照杨兆艳 (2007) 所述 pH 示差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AcPAL2* cDNA 的克隆和序列分析

以开始膨大 30 d 的红皮洋葱鳞茎为试验材料, 经 RNA 提取、反转录、简并 PCR 扩增获得了 1 个 717 bp 的片段 (图 1, A)。

Blast 分析表明该片段与葡萄、烟草、枸杞 PAL 基因的相似性均较高, 故将其命名为 *AcPAL2*。利用该片段序列设计引物, 通过 5'-RACE 技术克隆得到该 cDNA 的 5'-末端 (图 1, B)。

根据 5'-末端序列设计引物, 利用 3'-RACE 技术得到该基因的完整 cDNA 序列 (图 1, C, GenBank 登录号 KF421111.1)。

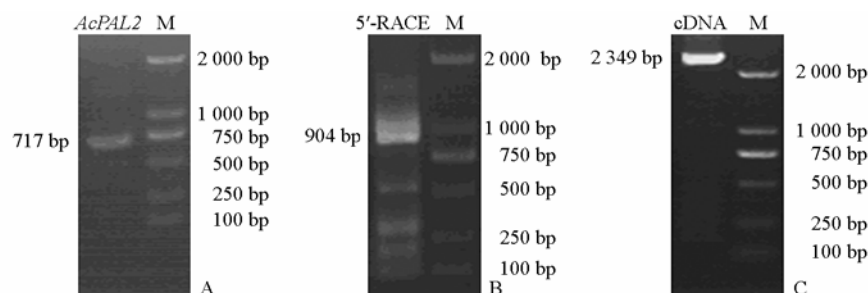


图 1 *AcPAL2* cDNA 中间片断 (A)、5'-RACE (B) 和全长 cDNA 片断 (C) 的扩增

Fig. 1 PCR amplification of *AcPAL2* cDNA intermediate fragment (A), 5'-RACE (B) and full-length fragment (C)

序列分析 (图 2) 发现, 该基因 cDNA 全长 2 349 bp, 其中 ORF 序列长 2 055 bp, 编码由 685 个氨基酸残基组成的蛋白质多肽, 5'-UTR 长度为 94 bp, 而 3'-UTR 序列长度为 200 bp (包含长度为 12 bp 的 polyA 尾巴)。

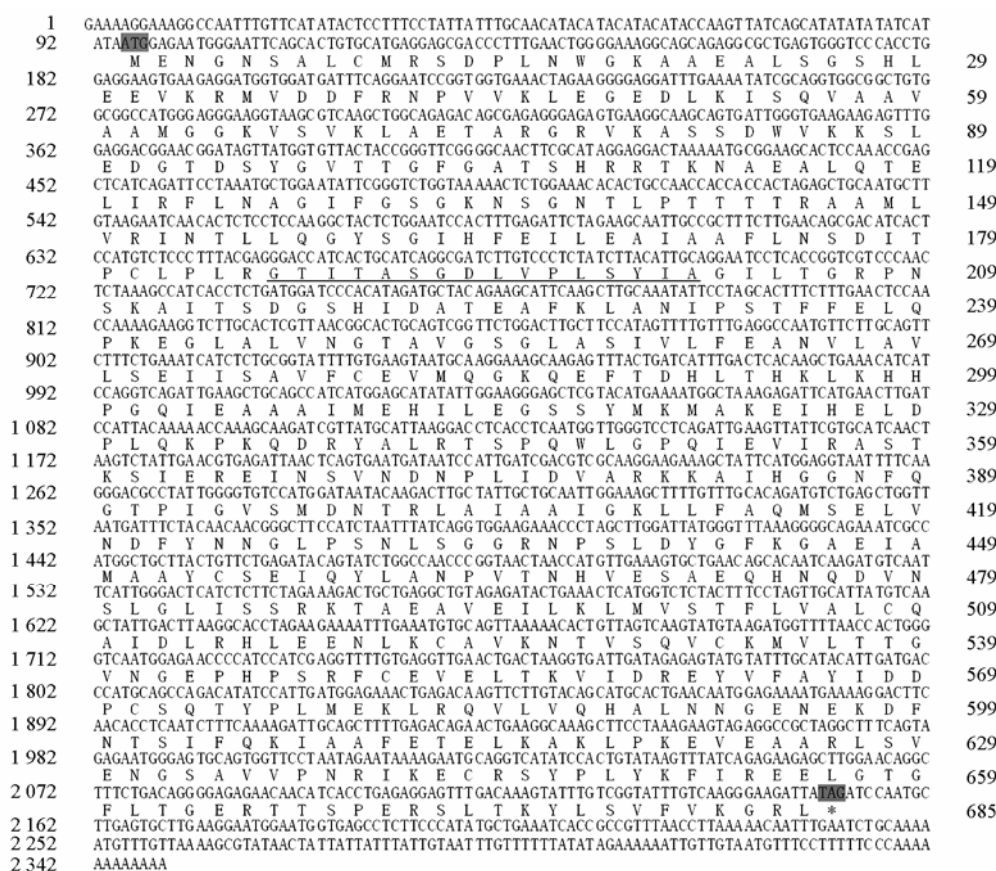


图 2 *AcPAL2* cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

阴影标注起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG, 下划线部分为 PAL 酶特征序列。

Fig. 2 *AcPAL2* cDNA nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence

The ATG start codon and TAG stop codon is marked in shade, and the PAL feature sequence is marked underlined.

Blastp 分析表明, 该序列与虎眼万年青 *Galtonia saundersiae* (AHG06396.1)、野蕉 *Musa balbisiana* (BAG70992.1) 的相似性分别为 82% 和 79%, 包含保守结构域 PAL-HAL 和 PLN02457, 以及苯丙氨酸解氨酶的酶活性中心特征序列 (GTITASGDLVPLSYIA), 是 Lyase\_I\_like 家族成员之一。

Signal4.1 分析表明该基因编码的蛋白质不含信号肽序列, 是一种非分泌蛋白。而 protparam tool 分析预测发现该多肽分子量为 74.76 kD, 理论 pI 值为 6.39。

## 2.2 *AcPAL2* 蛋白系统进化分析

为了研究 *AcPAL2* 蛋白和其它物种 PAL 蛋白质之间的进化关系, 从网上下载部分植物的 PAL 蛋白质序列, 及克隆得到的另一个洋葱 PAL 基因产物 *AcPAL1* (梁毅 等, 2014) 进行多重序列比对, 并构建 PAL 蛋白的系统进化树。如图 3 所示, 植物亲缘关系较近的 PAL 蛋白趋于分布在同一分支中, 如属于蔷薇科植物的西洋梨、苹果和李在同一分支, 豆科植物菜豆、大豆和豌豆也分在同一分支, 玉米、小麦、白绿竹、毛竹等禾本科植物 PAL 蛋白同样聚为一个分支。本试验获得的 *AcPAL2* 蛋白与虎眼万年青 PAL 蛋白聚为同一个分支, 与野蕉 PAL 蛋白的亲缘关系也较近, 但是和同属植物大蒜的 PAL 蛋白亲缘关系却相对较远, 而 *AcPAL1* 基因产物的进化与洋葱分类地位更加符合, 这可能是由于对洋葱近缘植物 PAL 基因研究较少, 且该基因家族普遍由小的多基因家族构成而导致的。

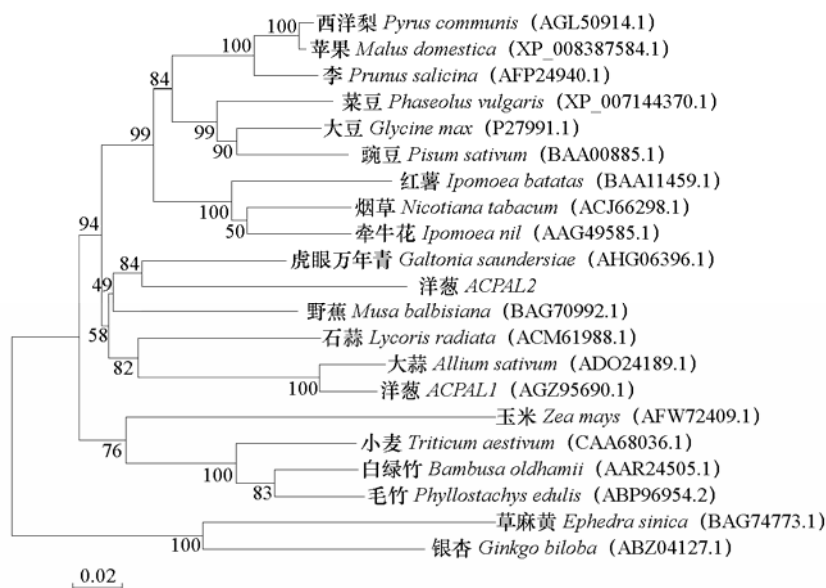


图 3 *AcPAL2* 及其他植物 PAL 蛋白构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by *AcPAL2* and other PALs

## 2.3 *AcPAL2* 表达及与花青素含量关系分析

为研究 *AcPAL2* 基因对不同皮色洋葱花青素积累及生长发育过程中花青素含量变化的影响, 分别以开始膨大 30 d 的白、黄、红皮洋葱 (‘白雪’、‘黄金大玉葱’、‘中生赤玉’) 鳞茎和开始膨大 10、20、30、40 d 的红皮洋葱 ‘中生赤玉’ 鳞茎为试验材料, 利用 Real-time PCR 研究了 *AcPAL2* 基因的表达情况, 并对这些材料的花青素含量进行分析。如图 4 所示, 膨大 30 d 的红皮洋葱鳞茎 *AcPAL2* 大量表达, 白皮和黄皮洋葱表达量极低; 而红皮洋葱花青素的含量远远高于黄皮和白皮洋葱。

对膨大不同时间红皮洋葱鳞茎基因表达的分析 (图 5) 发现, 鳞茎刚开始膨大时, *AcPAL2* 大量表达, 并随鳞茎膨大的过程迅速降低, 至膨大 20 d 时该基因表达量已经极低且继续缓慢降低, 这与

洋葱花青素的积累过程相一致，即在洋葱鳞茎膨大的前 10 d，花青素迅速且大量的积累，之后继续缓慢增加，至膨大 40 d，花青素含量却稍微降低，这可能是因为此时花青素的降解速率超过了其合成的速率所导致。以上试验结果说明，*AcPAL2* 在红皮洋葱鳞茎显色过程中发挥了重要作用，而黄皮和白皮洋葱鳞茎显色过程中不需或者只需要极少量的 *AcPAL2* 表达。

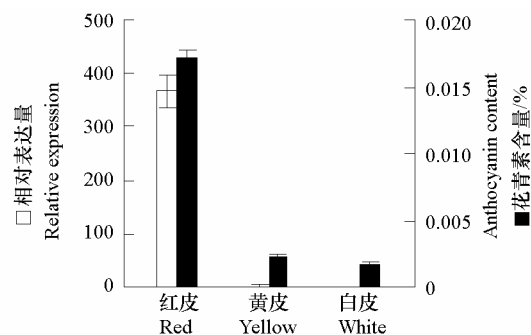


图 4 不同皮色 *AcPAL2* 基因的 Real-time PCR 及花青素含量分析

Fig. 4 Real-time PCR and anthocyanin content analysis of *AcPAL2* in different skin color in onion

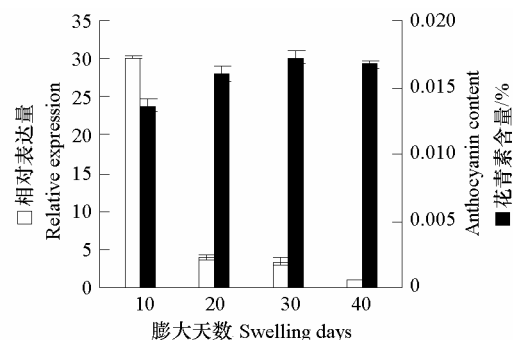


图 5 不同鳞茎膨大时期 *AcPAL2* 基因的 Real-time PCR 及花青素含量分析

Fig. 5 Real-time PCR and anthocyanin content analysis of *AcPAL2* in different bulb swelling stage in onion

### 3 讨论

#### 3.1 PAL 酶的发现及其性质

Koukol 和 Conn (1961) 最先在植物中发现并分离纯化了苯丙氨酸解氨酶 (PAL)，随着不断完善分离纯化方法的建立，该酶已在水稻、小麦 (欧阳光察 等, 1985)、马铃薯 (Tanaka & Uritani, 1977)、松树 (Whetten & Sederoff, 1992) 等多种植物中被分离纯化。到目前为止，PAL 已在所有绿色植物中发现，且在细菌、真菌、藻类中也有存在。PAL 酶是一种分子量为 220 ~ 330 kD 的酸性蛋白，多数由 4 个分子量在 55 ~ 88 kD 之间的相同亚基组成。不同植物中 PAL 的氨基酸组成不同，水稻的 PAL 酸性成分少于玉米、小麦和马铃薯，而中性成分却高于这 3 种植物 (欧阳光察 等, 1985)。植物 PAL 基因的典型特点是由小的多基因家族所组成，在 1 组染色体中，通常含有 2 ~ 6 个 PAL 基因，且分在 2 ~ 3 个不同的类群或亚族中，如菜豆有 3 个 PAL 基因，欧芹有 4 个，番茄有 5 个，马铃薯多达 40 个，而松树却只报道了 1 个；烟草的 4 个 PAL 基因中 *PAL1* 和 *PAL2* 属一个亚族，而 *PAL3* 和 *PAL4* 属另一个亚族。本试验中对几种洋葱近缘植物 PAL 基因序列进行多重比对，设计简并引物，克隆得到了一个洋葱的 PAL 基因 *AcPAL2*。序列分析发现 *AcPAL2* 蛋白与虎尾万年青 *Galtonia saundersiae*、野蕉 *Musa balbisiana* 的相似性分别为 82% 和 79%；系统进化分析发现 *AcPAL2* 蛋白与虎眼万年青 PAL 蛋白聚为同一个分支，但与同属植物大蒜的 PAL 蛋白亲缘关系相对较远，这可能是由于对洋葱近缘植物的 PAL 基因研究较少，且该基因普遍由小的多基因家族组成而导致的。

#### 3.2 PAL 酶活性与花青素合成

许多研究指出，花青素的合成与 PAL 酶活性有密切的关系。在苹果果实着色期间，随 PAL 酶活性的增加，花青素含量也增加，因此诱导 PAL 产生，提高 PAL 活性，便能诱导花色素的形成，增进着色程度 (周爱琴 等, 1997)；对葡萄和草莓的研究也发现，PAL 活性与花青苷合成显著正相关 (冯守千, 2011)。但也有报道认为 PAL 不是花青素合成的关键酶。Ju 等 (1995) 的研究表明只

有在缺少前体的条件下, 花青苷合成才与 PAL 的活性相关, 在花青素合成前体充足的成熟果实中, PAL 活性的变化并没有调节花青素的合成过程; 王惠聪等 (2004) 发现荔枝‘妃子笑’果实发育过程中, PAL 活性随果实发育而降低, 果实花青素含量不断增加时, 其活性也未见增加, 认为 PAL 不是花青苷合成的关键酶; Boss 等 (1996) 发现只有葡萄果皮中存在花青苷的积累, 但是 PAL 基因却在大部分组织中表达。本试验利用 Real-time 技术对不同皮色和鳞茎不同膨大时期洋葱 *AcPAL2* 基因的表达情况进行研究, 结果发现该基因在红皮洋葱中大量表达, 在膨大初期表达量最大, 而在迅速降低至一定程度后趋于相对平稳, 与洋葱花青素的积累过程基本保持同步, 这与周爱琴等 (1997) 对苹果的研究结果相一致。

### 3.3 PAL 基因表达功能多样化使花青素合成与其关系研究困难

PAL 酶催化 L - 苯丙氨酸脱去氨基, 生成反式肉桂酸, 从而进入苯丙烷类代谢途径, 是植物体内多种次生代谢产物的关键酶和限速酶 (贺立红 等, 2006), 在植物生长发育和抗病抗逆等过程中起着重要的作用。Nakashima 等 (1997) 用分离的百日草叶肉细胞为材料, 发现其在分化过程中, 木质素合成及管状分子形成与 PAL 活性增加正相关。苯丙烷类代谢途径与植物抗虫关系的报道很多, 其产物 (木质素、植保素等) 均参与植物的抗虫反应。李润植等 (1998) 根据棉蚜与棉花的互作关系, 研究并发现不同类型品种棉花幼苗在棉蚜胁迫下, PAL、PPO (多酚氧化酶) 活性、多酚含量均不同程度上升, 且抗蚜品种上升快, 防御反应及时有效。Hu 等 (2009) 在研究木本植物在被昆虫取食后的防御反应时发现, 被蛾类幼虫取食的杨树叶片及其附近叶片的 PAL 活性显著升高, 并引起了系统性防御反应。许多研究还表明 PAL 活性变化与植物抗病关系密切, 在植物感染病原菌后 PAL 活力表现出有规律的动态变化。王雅平等 (1994) 发现, 盛花期麦穗 PAL 活性很小, 但接种小麦赤霉菌 24 h 后达到高峰, 随后下降, PAL 活性与抗赤性呈极显著的负相关。此外, PAL 酶还参与植物的抗逆境作用, 如胡萝卜细胞受 UV-B 照射可引起其 PAL mRNA 的增加, 而冷胁迫下, 柑桔 PAL 活性也会升高。正是由于 PAL 酶的生物功能和表达模式的多样化, 为研究 PAL 酶与洋葱花青素合成的关系带来了一定的困难。从系统进化角度来看, 本试验中克隆得到的 *AcPAL2* 基因产物与虎眼万年青、野蕉的 PAL 蛋白的亲缘关系较近, 与大蒜 PAL 蛋白亲缘关系相对较远, 而 *AcPAL1* 基因产物的进化与洋葱分类地位更加符合; 另外, 两个洋葱 PAL 基因的表达模式也有差异, 要进一步的确定这两个基因与花青素合成的关系, 就需要更加深入地对他们进行研究, 如 RNAi 试验和过量表达试验等。

## References

- Boss P K, Davies C, Robinson S P. 1996. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology*, 32 (3): 565 - 569.
- Feng Shou-qian. 2011. Studies on the mechanism of red pigment development in red pear [Ph. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 冯守千. 2011. 红梨着色机理的研究 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Field T S, Lee D W, Holbrook N M. 2001. Why leaves turn red in autumn. the role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology*, 127 (2): 566 - 574.
- He Li-hong, Zhang Jin-biao, Bin Jin-hua. 2006. Research progress of phenylalanine ammonia-lyase. *Food Science and Technology*, (7): 31 - 34. (in Chinese)
- 贺立红, 张进标, 宾金华. 2006. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展. *食品科技*, (7): 31 - 34.
- Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 (7): 1071 - 1083.
- Hu Z H, Zhang W, Shen Y B, Fu H J, Su X H, Zhang Z Y. 2009. Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. *Journal of Forestry Research*, 20 (4): 372 - 376.

- Ju Z G, Yuan Y B, Liou C L, Xin S H. 1995. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple. *Scientia Horticulturae*, 61 (3): 215 – 226.
- Koukol J, Conn E E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, 236 (10): 2692 – 2698.
- Li Run-zhi, Mao Xue, Li Cai-xia, Gao Li-feng. 1998. The relationships between activities of secondary metabolism-related enzymes and induced resistance to aphids in cotton. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 18 (2): 165 – 168. (in Chinese)
- 李润植, 毛雪, 李彩霞, 高丽峰. 1998. 棉花诱导抗蚜性与次生代谢相关酶活性的关系. *山西农业大学学报*, 18 (2): 165 – 168.
- Liang Yi, Liu Xiao-yi, Zhang Hong-wei, Tan Wu-ping. 2014. Cloning and expression analysis of an anthocyanin biosynthesis-related gene (*AcPAL1*) in onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 22 (1): 47 – 54. (in Chinese)
- 梁毅, 刘小义, 张洪伟, 谭武平. 2014. 洋葱花青素合成相关基因 (*AcPAL1*) 的克隆和表达分析. *农业生物技术学报*, 22 (1): 47 – 54.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25: 402 – 408.
- Nakashima J, Awano T, Takabe K, Fujita M, Saiki H. 1997. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from zinnia mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology*, 38 (2): 113 – 123.
- Nakazawa A, Nozue M, Yasudal H, Takeba G, Kubo H. 2001. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Research*, 114: 323 – 328.
- Neish A C. 1960. Biosynthetic pathways of aromatic compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, 11 (1): 55 – 80.
- Ou-yang Guang-cha, Ying Chu-yan, Wo Shao-gen, Xue Ying-long. 1985. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL) VI. Purification and some properties of PAL from etiolings of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Acta Phytophysiology Sinica*, 11 (2): 204 – 214. (in Chinese)
- 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 薛应龙. 1985. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究——VI. 水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性. *植物生理学报*, 11 (2): 204 – 214.
- Shi Bao-sheng, Zhuo Li-huang, Yang Jian-min. 2007. Effects of light on leaf color of red leaf cherry plum. *Journal of Northeast Forestry University*, 35 (4): 16 – 18. (in Chinese)
- 史宝胜, 卓丽环, 杨建民. 2007. 光照对紫叶李叶色发育的影响. *东北林业大学学报*, 35 (4): 16 – 18.
- Tanaka Y, Uritani I. 1977. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase in cut-injured sweet potato. *Journal of Biochemistry*, 81 (4): 963 – 970.
- Wang Hui-cong, Huang Xu-ming, Hu Gui-bing, Huang Hui-bai. 2004. Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes in litchi pericarp. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (12): 2028 – 2032. (in Chinese)
- 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 – 2032.
- Wang Ya-ping, Wu Zhao-su, Liu Yi-qiang. 1994. Studies on biochemical assay and mechanism of resistance to scab in wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 20 (3): 327 – 333. (in Chinese)
- 王雅平, 吴兆苏, 刘伊强. 1994. 小麦抗赤霉病性的生化研究及其机制的探讨. *作物学报*, 20 (3): 327 – 333.
- Whetten R W, Sederoff R R. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine. Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiology*, 98 (1): 380 – 386.
- Yang Zhao-yan. 2007. Anthocyanin content in mulberry red pigment by pH-differential spectrophotometry. *Food Science and Technology*, (4): 201 – 203. (in Chinese)
- 杨兆艳. 2007. pH 示差法测定桑椹红色素中花青素含量的研究. *食品科技*, (4): 201 – 203.
- Ying Chu-yan, Xue Ying-long. 1984. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL) – V. The relationship between PAL activity and amaranthin accumulation in etiolated *Amaranthus caudatus* seedling. *Acta Phytophysiology Sinica*, 10 (3): 241 – 247. (in Chinese)
- 应初衍, 薛应龙. 1984. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究——V. PAL 活性与尾穗苋黄化苗中苋红素积累的相关性. *植物生理学报*, 10 (3): 241 – 247.
- Zhou Ai-qin, Zhu Jun, Sheng Ji-ping, Shen Lin, Sheng Zhao-jiang. 1997. The relationship of anthocyanidin formation, PAL activity and protein content during apple colouring. *Journal of China Agricultural University*, 2 (3): 97 – 99. (in Chinese)
- 周爱琴, 祝军, 生吉萍, 申琳, 生兆江. 1997. 苹果花青素形成与 PAL 活性及蛋白质含量的关系. *中国农业大学学报*, 2 (3): 97 – 99.