

津田芜菁和赤丸芜菁苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)的克隆和表达

许志茹*, 崔国新, 李春雷, 孙燕, 李玉花

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 以UV-A处理津田芜菁和赤丸芜菁块根24 h后提取总RNA, 再用RT-PCR方法分别克隆*BrPAL1*和*BrPAL2*基因的结果表明, *BrPAL1*和*BrPAL2*的开放读码框为2 169 bp, 编码722个氨基酸。氨基酸序列分析显示, *BrPAL1*和*BrPAL2*与甘蓝型油菜苯丙氨酸解氨酶(PAL)的同源性达99%, 第61~559的肽段具有PAL结构域。*BrPAL1*和*BrPAL2*的核苷酸序列在9个位置上存在差异, 而推导的氨基酸序列仅在3个位置上有差异。*BrPAL1*和*BrPAL2*基因有高度同源性。Northern杂交结果显示, UV-A可以诱导*BrPAL1*和*BrPAL2*表达, 基因的表达量与处理时间呈相关。

关键词: 芜菁; 花青素; 苯丙氨酸解氨酶基因; 基因克隆与表达; 序列分析

Cloning and Expression of PAL Genes in 'Tsuda' Turnip and 'Yurugi Akamaru' Turnip (*Brassica rapa* L.)

XU Zhi-Ru*, CUI Guo-Xin, LI Chun-Lei, SUN Yan, LI Yu-Hua

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The roots of 'Tsuda' turnip and 'Yurugi Akamaru' turnip (*Brassica rapa*) were irradiated with UV-A light for 24 h, then the total RNA was isolated and *BrPAL1* and *BrPAL2* genes were cloned by RT-PCR method. The *BrPAL1* and *BrPAL2* genes included an open reading frame (ORF) of 2 169 bp and encoded a protein of 722 amino acid. Amino acid sequence analysis showed that *BrPAL1* and *BrPAL2* were 99% identity to PAL of *Brassica napus*, and the PAL domain was in the sequence from 61 to 559. The nucleotides of *BrPAL1* and *BrPAL2* genes had 9-bp differences, as well as 3 in deduced amino acid sequence. *BrPAL1* and *BrPAL2* genes had high identity. The Northern blotting results showed that the expression of *BrPAL1* and *BrPAL2* could be induced by irradiation of UV-A and the gene expression was correlated with light-exposure time.

Key words: turnip; anthocyanin; phenylalanine ammonialyase gene (PAL); gene cloning and expression; sequence analysis

植物的苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)催化苯丙氨酸脱氨生成肉桂酸, 是一系列苯丙酸类化合物代谢中的第一个催化酶, 在植物花青素、木质素、香豆醇、松柏醇、芥子醇及其他亚类的植物酚类物质合成途径中起关键作用(Buchanan等2004)。

花青素是类黄酮的一个亚类, 由一系列附着于细胞膜上的酶催化合成, 积累在维管植物液泡中, 决定花、果实和种子的颜色。苯丙氨酸在PAL、查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)、苯基苯乙烯酮黄烷酮异构酶(chalcone-flavanone isomerase, CHI)、黄烷酮-3-羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)、二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、花色素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)和类黄酮3-葡萄糖基转移酶(UDP glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase,

UFGT)的催化下产生天竺葵色素(pelargonidin)、矢车菊色素(cyanidin)、飞燕草色素(delphinidin)、芍药色素(peonidin)、牵牛色素(petunidin)和锦葵色素(malvidin)及其衍生物(刘仕芸等2006)。花青素的生物合成还需要转录因子的调控(万小荣和李玲2002; Schwinn等2006; Bogs等2007; Khar等2008)。

植物花和果实的着色过程除了受内在因素影响外, 外界环境尤其光照条件也起作用(Weiss和Halevy 1991)。光是影响植物生长发育的环境因子

收稿 2008-03-31 修定 2008-05-20

资助 国家自然科学基金(30700560)和国家自然科学基金重点项目(30730078)。

* E-mail: xuzhiru2003@126.com; Tel: 0451-82191783

之一,花青素合成与光受体和光信号转导因子密切相关(Sheehan等2004;Vanderauwera等2005)。另外,蓝光和紫外光对花青素生物合成相关酶基因的表达也有调节作用(Bieza和Lois2001;Frohnmeier和Staiger2003;Chatterjee等2006)。迄今,对不依赖光的植物花卉和果实的着色机制研究得还不清楚。

茺菁别名小蔓菁,十字花科芸苔属茺菁亚种。有花青素合成依光型津田茺菁('Tsuda'turnip,块根着色时需要光,受光一侧呈紫红色,背光一侧呈白色)和非依光型赤丸茺菁('YurugiAkamaru'turnip,块根无论受光与否都呈红色,块根在黑暗条件下即可着色)两类。本文以这两种茺菁为试材,用RT-PCR方法克隆两种茺菁的PAL基因,并用基因片段合成探针,以Northern杂交检测UV-A处理条件下两种茺菁中PAL基因的表达变化,以期为研究依光型和非依光型花青素生物合成机制建立基础。

材料与方 法

取温室种植的茺菁(*Brassica rapa* L.)品种津田和赤丸自交纯系,块根始终在土中避光生长,块根开始膨大后用锡纸遮蔽整个栽培钵,进一步避光。块根膨大2个月后用352 nm的UV-A(光照强度为 $13.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)处理两种茺菁膨大块根0、6、12、18、24和48 h,取处理块根和未照光的对照块根进行试验。

取经UV-A处理24 h的津田茺菁和赤丸茺菁块根皮提取总RNA(许志茹和李玉花2006)。用从津田茺菁削减文库中筛选到的花青素合成催化酶基因片段PAL在Database数据库中进行同源性比对,选取高度同源的十字花科植物的PAL基因序列设计RT-PCR引物(F:5'CGATATTGTAATGGAG-GTTAACGG3';R:5'CTCTTAACATATAG-GAATGGGAGC3')。

离心管中加入1 μL 总RNA、2.5 μL Oligo(dT)(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和6.5 μL H₂O。混合后于70 $^{\circ}\text{C}$ 中保温3 min,立即放入冰中。然后加入4 μL 5 \times 第一链合成缓冲液、2 μL dNTP(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和2 μL 二硫苏糖醇(DTT,100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。混合后离心,加入1.0 μL PowerScript反转录酶(Clontech公司)和1.0 μL RNase抑制剂,混合。42 $^{\circ}\text{C}$ 中保

温1.5 h。于70 $^{\circ}\text{C}$ 中保温15 min后终止反应。

以反转录产物为模板,用RT-PCR引物和LA-Taq DNA聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司)进行全长PAL cDNA的克隆。用TOYOBO(东洋纺上海生物科技有限公司)凝胶回收纯化试剂盒回收纯化PCR产物,纯化产物与pBS-T载体(北京TIANGEN生化科技有限公司)连接后转化大肠杆菌感受态细胞Top 10,经Amp⁺抗性及蓝白斑筛选,挑取阳性克隆提取质粒。重组质粒经PCR鉴定后由上海生工生物工程技术有限公司完成测序。

在NCBI数据库中,将测得的津田茺菁和赤丸茺菁的PAL全长cDNA序列和推测的蛋白质序列进行BLAST比对。用开放阅读框(open reading frame,ORF)程序查找序列的ORF。用BioEdit软件比较津田茺菁和赤丸茺菁PAL基因的异同。SignalP 3.0预测蛋白的信号肽。软件ProtParam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算蛋白的分子量、净电荷和理论等电点。BLASTP预测保守区,应用Scan Prosite和HNN(Hierarchical Neural Network)程序进行轮廓和基序分析。

探针用地高辛标记。探针合成的引物序列:F,5'TCAAGTCGCCAAGAAAGT3';R,5'CCTCCCTCACAAACCTAT3'。以质粒为模板进行对照PCR合成目的片段。利用地高辛标记的dNTP以质粒为模板合成探针。通过Northern杂交检测两种茺菁试材中PAL基因的表达模式(许志茹和李玉花2006)。

实验结果

1 RT-PCR 扩增

从图1可见,28S rRNA和18S rRNA的亮度比接近2:1,说明提取的总RNA没有降解,完整性良好。总RNA在波长260和280 nm处的吸光度比值为1.96,均一性较好,可以用于RT-PCR和Northern杂交。

采用设计的基因特异性引物,以提取的津田



图1 茺菁中总RNA

Fig.1 Total RNA of turnip

芜菁和赤丸芜菁总 RNA 为模板, 分别进行 RT-PCR 反应, 结果(图 2)表明, 津田芜菁和赤丸芜菁中, 扩增的 cDNA 产物在 2 100 bp 附近, 分子量大小与预期结果吻合。

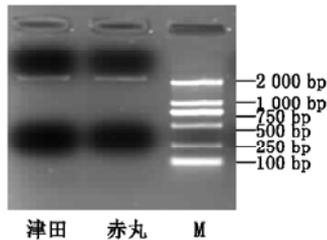


图2 津田芜菁和赤丸芜菁中 PAL 基因的 RT-PCR 反应产物
Fig.2 The RT-PCR products of PAL genes in 'Tsuda' turnip and 'Yurugi Akamaru' turnip

2 序列分析

将津田芜菁和赤丸芜菁的 RT-PCR 产物纯化、连接、转化后挑取转化平板上的白色菌斑, 经液体培养后提取重组质粒(图 3)。

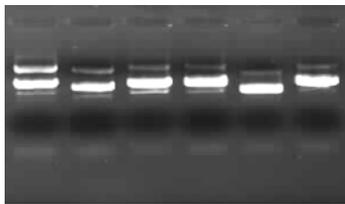


图3 重组质粒的电泳图谱
Fig.3 Electrophoresis of recombinant plasmid DNA

以提取的质粒为模板, 用基因特异性引物进行 PCR 扩增, 以此鉴定重组质粒中是否插入了外源片段。扩增结果(图 4)显示, 重组质粒扩增条带的分子量大小符合预期结果, 说明重组质粒中

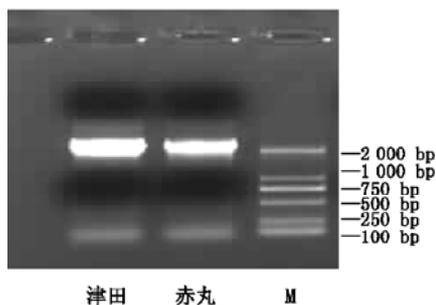


图4 重组质粒的 PCR 鉴定
Fig.4 PCR identification of recombinant plasmid DNA

插入了 RT-PCR 扩增产物。选取带有扩增条带的重组质粒进行序列测定。

津田芜菁和赤丸芜菁中 RT-PCR 获得的 DNA 片段测序后证实为 PAL 基因全长 cDNA 序列。津田芜菁的 PAL cDNA (*BrPAL1*) 序列在 GenBank 中的登录号为 EU402423, 赤丸芜菁的 PAL cDNA (*BrPAL2*) 序列的登录号为 EU402424。Blast 比对结果显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因与甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) *PAL1-1* 的 mRNA 序列有 99% 的同源性, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 由 722 个氨基酸组成, 含有完整的 ORF (图 5)。

氨基酸序列的 Blast P 分析显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 编码的蛋白质具有 PAL 结构域, 第 61~559 的肽段与 PAL 具有高度同源性(图 6)。氨基酸同源性比对显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 与多种植物的 PAL 蛋白高度同源, 与甘蓝型油菜 PAL (ABC69916) 的同源性为 99%, 与拟南芥 PAL1 (NP_181241) 的同源性为 94%, 与花叶木薯 PAL (AAK60275) 和美洲山杨 PAL (AAN52279) 的同源性为 85%, 与大豆、烟草、矮牵牛和小麦的 PAL (P27991、P25872、AAV98199、CAA68036) 的同源性分别为 84%、82%、80% 和 77%。

ProtParam 程序预测 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 的分子量分别为 78.239 和 78.3152 kDa, 理论 pI 值是 5.97 和 5.9, 氨基酸组成中 Ala 占最大比例, 高达 9.3%, 蛋白不稳定系数是 30.82 和 31.35, 属于稳定蛋白。SignalP 3.0 Server 检测结果显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 不含信号肽序列, 为非分泌蛋白。ScanProsite 分析显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 在 204~220 的氨基酸序列是 GTITASGDLvPLSyiaG, 符合标签序列 [GS]-[STG]-[LIVM]-[STG]-[SAC]-S-G-[DH]-L-x-[PN]-L-[SA]-x(2,3)-[SAGVTL]。此基序也包含在 BlastP 程序查找出的 PAL 蛋白结构域内。*BrPAL1* 和 *BrPAL2* 的 722 个氨基酸中, 形成 α -螺旋的氨基酸占 45.98% 和 45.29%, 形成随意盘绕序列的氨基酸占 46.26% 和 46.68%, 形成伸展序列的氨基酸占 7.76% 和 8.03%。两种蛋白中不含其他二级结构。

BioEdit 软件比对结果显示, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因具有 99% 的同源性。核苷酸序列仅在 9 个位置上存在差异, 而推导的氨基酸序列仅在 3 个位置上存在差异(表 1)。

```

1  atggaggtaacggattatcacacggaggagaagtgcacgctatggtatgcgggagagatcaagaagatgocacgggtggtgggct
M E V N G L S H G G E V D A M L C G G E I K K N A T V V G A
91  gatcctctcaactggggagctgcagcggagcaaatgaaagggagccatttggatgaggtagaagaatggtagaaggagtttaggagcca
D P L N W G A A A E Q M K G S H L D E V K R M V K E F R R P
181  gtggtagaatctcggaggcagactctcagatcggacaagtggcagcaatctcgacccttgaaacgggtgtagagtgagttgtcggag
V V N L G G E T L T I G Q V A A I S T L G N G V K V E L S E
271  acggcagagacgggtgtaaacgogagtgtgatgggtgtagagatggcacaaggaacogtagttatggtggtactactggtttt
T A R A G V K A S S D W V M E S M G K G T D S Y G V T I G F
361  ggtgctactctcacggagaaccaagAACGGTGTGCTCTCAGAAAGAGCTTATAAGATTCTGAACGCCGAATATTCCGCAGCAC
G A T S H R R T K N G V A L Q K E L I R F L N A G I F G S T
451  aaggaaacatcccacacattaccacactccgccacaagagccgcctgctctacgtatcaacactctctcgaaggatactccggcata
K E T S H T L P H S A T R A A M L V R I N T L L Q G Y S G I
541  cgtttcagatcctcagagccataaacaagtttctcaacaacaacatcactccttccctccctcctccggcaccatcaccgctccgg
R F E I L E A I T S F L N N N I T P S L P L R G T I T A S G
631  gacctcgtccctctcctacatcggcggactcttAACCGGACGTCCTCAACTCCAAGCCACCGGTCCTCAACGGCGAAGCCCTAACGCA
D L V P L S Y I A G L L T G R P N S K A T G P N G E A L N A
721  gaggaaacctcAAAATGGCTGGAGTCACTCCGGCTTCTCGACCTCCAGCCTAAGAAAGCCTCGCCTAGTCAACGGCACGGCCGTT
E E A F K M A G V T S G F P D L Q P K E G L A L V N G T A V
811  ggtccggcattggcgtcgtatgaggaacaaagctcctcgtcctggcaggttttatcagcgtcttccggaggtgatg
G S G M A S M V L F E A N V L S V L A E V L S A V F A E V M
901  agcgggaagccggagtccaccgatcatttgactcaccgctgaagcaccaccggcagatagaaagccggcgtatgatgaaacatt
S G K P E F T D H L T H R L K H H P G Q I E A A A I M E H I
991  ctccagggagctcgtacatgaagctagctcagaagcttcacgagatggatcgttacaaaacccaacaagaccgttacctctacgt
L D G S S Y M K L A Q K L H E M D P L Q K P K Q D R Y A L R
1081  acctctcccactggctaggtcctcagatagaagtgatccgttacgcgaccaagtcctcagcgtgagataaactccgtcaccgacaac
T S P Q W L G P Q I E V I R Y A T K S I E R E I N S V N D N
1171  cctttgatcgtatctcagaaacaagccattcaggttgtaactccagggaacaccatcgtgtgtctatggacaaacacgtttta
P L I D V S R N K A I H G G N F Q G T P I G V S M D N T R L
1261  gctatcggccatagggaagctcagttcctcagctcagttctcagagctggtcaacgattattacaacaacggtcttctcgaacctaac
A I A A I G K L M F A Q F S E L V N D Y Y N N G L P S N L T
1351  gcttcgaggaaccctagtttgactacggtttcAAAGGAGCGGAGATCGCGATGGCTTCTACTGTTCAGAGCTTCAGTACTTGGCCAAC
A S R N P S L D Y G F K G A E I A M A S Y C S E L Q Y L A N
1441  cccgtgactagccatgtaaatcagcagagcaacacaaccaagcgtgaactcttttaggactaatctcctctcgaagacatcagaagct
P V T S H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T S E A
1531  gtagacatactcaactcatgtcacaacgttcttctcggaaatctcgaagccatcgtatctacgacacttggaggaatctaaaaca
V D I L K L M S T T F L V G I C Q A I D L R H L E E N L K Q
1621  acggtcaagaacacagttctcgaatcggcaagaaagttctcaccactggagtcaacggtagcttcacccatcagcttctcggagaa
T V K N T V S Q V A K K V L T T G V N G E L H P S R F C E K
1711  gacttactcaagtgctgaccgtgagcaagttcaccgtacggcagaccatgacgcccagtaaccgttgcagaaagctgagg
D L L K V V D R E Q V Y T Y A D D P C S A T Y P L I Q K L R
1801  caagtcacgttgaccatgctttggtcaacggtagagcagagaagaatgcaatgacttgcattctccatagattggagccttcgaggag
Q V I V D H A L V N G E S E K N A M T S I F H K I G A F E E
1891  gagctcaaggcgggtctacctaaagaagtggagcagctagagcggcgtatgataaacgaaacagctgcataccgaacaggatcaaggag
E L K A V L P K E V E A A R A A Y D N G T A A I P N R I K E
1981  ttaggtcgtatcctttgtataggtttgaggaggagcttggaaacagagcttttgaccggagagaagcagctcggccggagagag
C R S Y P L Y R F V R E L G T E L L T G E K A T S P G E E
2071  ttgataaggttttcaccgcatgttgaaggaagattatggctcgttggatggagtgctcgtatgagtggaacggagctccattcct
F D K V F T A I C E G K I I G P L M E C L D E W N G A P I P
2161  atatgttaa 2169
I C *
    
```

图5 *BrPAL1* 基因cDNA全长序列和推导的氨基酸序列

Fig.5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *BrPAL1* cDNA
箭头标示区域为津田芜菁消减文库中筛选到的 *PAL* 基因片段的序列。

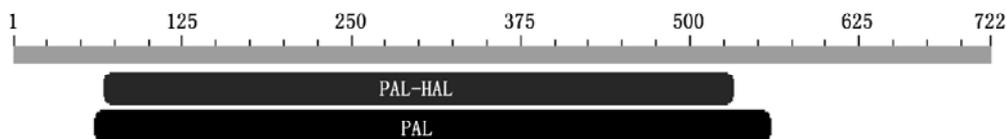


图6 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 含有的结构域

Fig.6 The domains of *BrPAL1* and *BrPAL2*

表1 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 核苷酸和氨基酸位点的差异Table 1 Differences of nucleotide and amino acid sequences between *BrPAL1* and *BrPAL2*

核苷酸位点	<i>BrPAL1/BrPAL2</i>	氨基酸位点	<i>BrPAL1/BrPAL2</i>
574	C/T	192	Leu/Phe
753	C/A	522	Leu/Pro
762	C/T	705	Gly/Asp
777	A/G		
1 467	A/T		
1 565	T/C		
1 594	C/A		
2 094	T/C		
2 114	G/A		

3 探针制备和 Northern 杂交

选取 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 核苷酸序列高度保守区设计引物制备探针得到的结果(图7)显示, 地高

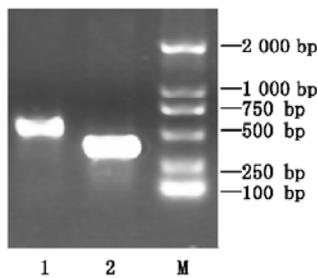
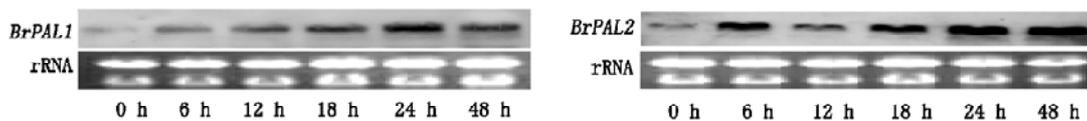


图7 PAL 探针

Fig.7 The probe of PAL gene

1: 探针; 2: 对照; M: 分子量标记(DL2000)。

图9 UV-A 处理不同时间后 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因的表达Fig.9 Expressions of *BrPAL1* and *BrPAL2* genes after treatments by UV-A for different times

讨 论

PAL (EC4.3.1.5)是植物次生物质代谢系统中的关键酶, 花青素、香豆素及木质素等物质的合成均与 PAL 活性密切相关(Buchanan 等 2002)。本文克隆津田茺菁 *BrPAL1* 基因和赤丸茺菁 *BrPAL2* 基因并进行生物信息学分析, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列之间有微弱差异说明二者高度同源。

辛标记的探针比对照 PCR 的电泳条带滞后, 这是由于地高辛标记的探针比未标记的 PCR 产物的分子量大的缘故。

UV-A 处理津田茺菁和赤丸茺菁 0 和 48 h 后, 检测 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 的 PAL 表达量的变化。在未见光的块根皮中, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因的表达量很低, UV-A 处理 48 h 后, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 的表达量明显增加(图 8)。

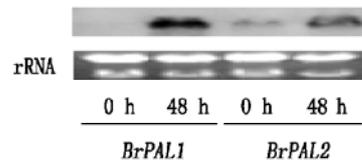


图8 UV-A 处理 0 和 48 h 后 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因的表达
Fig.8 Expressions of *BrPAL1* and *BrPAL2* genes after treatments by UV-A for 0 and 48 h

为了更好地了解 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因的表达量和 UV-A 处理时间长短的关系, 用不同的光照时间处理两种茺菁进行 Northern 杂交的结果(图 9)显示, *BrPAL1* 基因的表达量在光照 6 h 后增强, 光照 24 h 后表达量达到最高水平; *BrPAL2* 基因的表达在光照后明显增强, 光照 48 h 后表达量达到最高水平。以上试验结果说明 UV-A 处理能够诱导 *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因表达, 基因的表达量与光照时间相关。

植物在进化过程中产生一系列的减轻太阳射线伤害的方法, 其中之一就是在叶子和根的表皮层细胞中积累诸如花青素之类的保护性色素, 由此削弱 UV-B 辐射对内部细胞的伤害(Braun 和 Tevini 1993)。我们实验室的相关研究已经证明, UV-A 可以诱导津田茺菁块根皮中花青素的积累和催化酶基因的表达(Zhou 等 2007)。以 UV-A 处理两种茺菁后, *BrPAL1* 和 *BrPAL2* 基因的表达有相似性, 说明 UV-A 处理可以诱导这两个 PAL 基因

的表达, 表达量与处理时间存在相关关系。已有研究表明, 光照诱导的类黄酮类化合物积累之前, 几种类苯丙醇(phenylpropanoid)和类黄酮合成途径的酶类基因, 如 *PAL* 和 *CHS*, 就开始受到诱导表达, 这可以解释黑暗条件下 *PAL* 基因仍有极微弱表达的原因(Hahlbrock 和 Scheel 1989; Schmelzer 等 1988)。Lo 和 Nicholson (1998)用恒定光处理高粱(*Sorghum bicolor*)白化苗后, 其中胚轴内花青素积累过程中 *PAL* 的表达量也有类似现象, 在一定时间范围内, *PAL* 基因的表达量随光照时间的延长而逐渐增加。这与果实成熟过程中有花青素生物合成关键酶基因 *PAL* 表达的报道是类似的(Jaakola 等 2002)。

迄今非依光型花青素的生物合成机制尚未得到阐明。Cone 等(1993)的研究表明, 玉米的 *pl* 基因是 MYB 型转录因子家族中的成员, 可控制玉米花青素生物合成途径中许多结构基因的转录。显性 *Pl* 等位基因能促使植物性器官和花器官强烈非依赖光的着色; 而隐性等位基因 *pl* 则是光依赖性的, 它只能促使接受光照的组织着红色。从生物学特性而言, 赤丸茺菁块根皮着色属于非依光型, 而 Northern 杂交结果显示 UV-A 可以诱导 *BrPAL2* 基因的表达, 由于 *PAL* 是家族基因, 从而推测在赤丸茺菁中有可能存在不同的花青素生物合成途径或相关基因家族成员, 有的基因负责非依光型花青素的生物合成, 而有些基因的表达则负责应答光诱导。这显示津田茺菁和赤丸茺菁花青素合成之间也可能存在不同的光信号转导因子和途径, 对此问题今后似可以通过 Southern 杂交分析两类的 *PAL* 基因的拷贝数, 分离家族基因和调控基因, 研究它们在块根着色过程中的作用和涉及的光信号转导途径, 以探明依光型和非依光型花青素生物合成机制。

参考文献

- 刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍(2006). 植物花青素生物合成中的调控基因. 植物生理学通讯, 42 (4): 747~754
- 万小荣, 李玲(2002). 植物的 MYB 蛋白. 植物生理学通讯, 38 (2): 165~170
- 许志茹, 李玉花(2006). 利用 cDNA 微阵列分离津田茺菁花青素生物合成相关基因. 遗传, 28 (9): 1101~1106
- Buchanan BB, Gruijssem W, Jones RL (2004). 瞿礼嘉, 顾红雅, 白书农, 赵进东, 陈章良主译. 植物生物化学与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1057~1082
- Bieza K, Lois R (2001). An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol*, 126 (3): 1105~1115
- Bogs J, Jaffe FW, Takos AM, Walker AR, Robinson SP (2007). The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol*, 143 (3): 1347~1361
- Braun J, Tevini M (1993). Regulation of UV-protective pigment synthesis in the epidermal layer of rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Kustro). *Photochem Photobiol*, 57 (2): 318~323
- Chatterjee M, Sharma P, Khurana JP (2006). Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol*, 141 (1): 61~74
- Cone KC, Cocciolone SM, Burr FA, Burr B (1993). Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant. *Plant Cell*, 5 (12): 1795~1805
- Frohnmeyer H, Staiger D (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol*, 133 (4): 1420~1428
- Hahlbrock K, Scheel D (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40 (6): 347~369
- Jaakola L, Maatta K, Pirttila AM, Torronen R, Karenlampi S, Hohtola A (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol*, 130 (2): 729~739
- Khar A, Jakse J, Havey MJ (2008). Segregations for onion bulb colors reveal that red is controlled by at least three loci. *J Am Soc Hort Sci*, 133 (1): 42~47
- Lo SC, Nicholson RL (1998). Reduction of light-induced anthocyanin accumulation inoculated sorghum mesocotyls. *Plant Physiol*, 116 (3): 979~989
- Schmelzer E, Jahnen W, Hahlbrock K (1988). *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (9): 2989~2993
- Schwinn K, Venail J, Shang Y, Mackay S, Alm V, Butelli E, Oyama R, Bailey P, Davies K, Martin C (2006). A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the Genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 18 (4): 831~851
- Sheehan MJ, Farmer PR, Brutnell TP (2004). Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. *Genetics*, 167 (3): 1395~1405
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Gruijssem W, Inze D, Van Breusegem F (2005). Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol*, 139 (2): 806~821
- Weiss D, Halevy AH (1991). The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in *Petunia* corollas. *Physiol Plant*, 81 (1): 127~133
- Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S (2007). Ultraviolet-A specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *J Exp Bot*, 58 (7): 1771~1781