# 硕士学位论文

**大果水晶梨及其褐色果皮突变体*pal*基因**

**克隆及表达分析**

**Cloning and Expression of *pal* Genes in Suisho Pear and Its Brown Peel Mutant**

**一级学科： 园 艺 学二级学科： 果 树 学 研究生： 李 义 红 指导教师： 于凤鸣 教授**

**张立彬 教授**

**河北科技师范学院**

**2013年6 月**

分类号：密级：

UDC: 单位代码：10798

**大果水晶梨及其褐色果皮突变体*pal*基因克隆及表达分析**

**Cloning and Expression of *pal* Genes in Suisho Pear and Its Brown Peel Mutant**

二级学科：果树学

研究方向：果树种质资源与分子生物学研究生：李义红

指导教师：于凤鸣张立彬所在院所：园艺科技学院

2013年6 月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的

研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 **河北科技师范学院** 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡

献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：签字日期：年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 **河北科技师范学院**有关保留、使用学位论

文的规定。特授权**河北科技师范学院**可以将学位论文的全部或部分内容编入

有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：导师签名：

签字日期：年 月 日签字日期：年 月 日

**缩略词**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文名称 |
| CTAB | Cetyltrimethylammonlum Bromid | 十六烷基三甲基溴化铵 |
| PAL | Phenylalanine Ammonia-lyase | 苯丙氨酸解氨酶 |
| DIECA | Sodium diethyldithiocarbamate  trihydrate | 二乙胺基二硫代甲酸钠 |
| EB | Etllidillmbromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetie Acid | 乙二胺四乙酸 |
| PVP | Polyvinyl pyrrolidone | 聚乙烯吡咯烷酮 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethy-1,3-propane  diol | 三羟甲基氨基甲烷 |
| VC | VitaminC | 维生素 C(抗坏血酸) |

摘 **要**

大果水晶梨褐色果皮突变体与大果水晶梨原品种相比，在果皮表面有一层木栓层。木栓层中的木质素是苯丙烷类代谢途径产生的酚类化合物的聚合物。苯丙氨酸解氨酶（PAL）是苯丙烷代谢过程中的第一个关键酶。因此，研究*pal*基因对于探索大果水晶梨褐色果皮突变体的形成具有重要意义。

以大果水晶梨及其褐色果皮突变体的叶片为材料提取DNA，分别以原品种和突变体的DNA为模板克隆*pal*。分别在幼果期（果点、果皮均未变褐）、果点变褐期、果皮变褐期和采收期采取果实样品，测定果皮PAL的活性、蛋白质含量、比活力及其*pal*的基因表达。结果如下：

在果实幼果期、果点变褐期和果皮变褐期突变体果皮中的PAL活性和蛋白含量略高于原品种。在果点变褐期和果皮变褐期，大果水晶梨突变体果皮的PAL比活力均高于原品种。

分别以大果水晶梨及其褐色果皮突变体叶片的DNA为模板，使用引物Ⅰ克隆得到大果水晶梨及其突变体的*pal*1的基因片段，序列分析表明两者没有差异。以3对简并引物Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ分别克隆得到大果水晶梨及其褐色果皮突变体的*pal*2基因的片段。利用DNAMAN软件对序列进行拼接，得到2414 bp的大果水晶梨

*pal*2序列，其中外显子1997 bp，内含子417 bp；翻译得到的氨基酸序列由665

个氨基酸组成。得到2411 bp的大果水晶梨突变体的*pal*2序列，其中外显子2001

bp，内含子410 bp；翻译得到的氨基酸序列包含666个氨基酸。大果水晶梨*pal*2

的内含子长于突变体的7 bp。

大果水晶梨及其褐色果皮突变体在不同时期的*pal*表达结果显示，大果水晶梨*pal*1的表达量在各个时期均高于突变体，表明*pal*1与果皮变褐呈负相关的趋势。而大果水晶梨*pal*2的表达量在果点变褐期、果皮变褐期、采收期均低于突变体，表明*pal*2与果皮变褐呈正相关的趋势。

根据序列分析和定量表达的结果，推测大果水晶梨突变体*pal*2的内含子由于碱基的突变或内含子长度变短，导致调控元件的积极响应，是引起PAL的表达增强，使得木质素含量增加，导致褐色果皮形成的原因之一。

**关键词：**基因克隆；苯丙氨酸解氨酶；大果水晶梨；基因表达

**Abstract**

Compared Suisho pear with its brown peel mutant, there is a cork layer in mutant Suisho pear. Lignin of the cork layer is the polymer of phenolic compounds synthesized via phenylpropanoid pathway. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the first key enzyme in the phenylpropanoid pathway. Therefore, the study of pal has an important role in the formation of brown peel mutant of Suisho pear.

The leaves of normal and mutant Suisho pears were used to extrate DNA, which were used to clone *pal*. The peels of mutant and normal Suisho pears in different fruit growth stage (young fruit stage, fruit dot browning stage and pericarp browning stage )

Were used to test the PAL activity, protein content, specific activity and the *pal* gene

expression.

PAL activity and protein content of the mutant species was higher than the normal species in young fruit stage, fruit dot browning and pericarp browning stage. The PAL specific activity of the mutant species was higher than the normal species in fruit dot browning stage and pericarp browning stage.

DNA from the normal and mutant Suisho pears leaves were used as template to clone *pal*1 with primeⅠ, and no difference exsited between the normal and the mutant Suisho pear *pal*1. In addition, *pal*2 was cloned with prime Ⅱ，Ⅲand Ⅳ, and

*Pal*2 gene sequences was spliced by DNAMAN software. As a result, the *pal*2 sequence of normal Suisho pear is 2414 bp, including 1997 bp exon and 417 bp intron. Its codes 665 aa. The *pal*2 sequence of mutant Suisho pear is 2411 bp, including 2001 bp exon and 410 bp intron. Its codes 666 aa. The intron of the normal Suisho pear is 7 bp longer than the intron of the mutant.

The results showed that, the *pal*1 gene expression of the normal Suisho pear is higher than the mutant, which means the negative correlation between *pal*1 gene expression and brown pericarp generation. On the contrary, *pal*2 gene expression of the normal Suisho pear is lower than the mutant in fruit dot browning stage, pericarp browning and the ripe stage, which means positive correlation between *pal*2 gene

Expression and the brown pericarp generation.

According to the result of the sequences analysis and the quantitative expression of *pal*, it was speculated that the base mutation or length shorten of the *pal*2 intron led to the positive response of the regulatory elements and enhanced the *pal*2 expression, resulted in the lignin content increasing and the brown pericarp formation. Maybe this is one of the reasons.

**Key words:** Gene cloning; PAL; Suisho pear; Expression

目 录

[硕士学位论文](#_Toc686116504) 1

[摘](#_Toc686116505)[要](#_Toc686116505) 4

**[Abstract](#_Toc686116506)** 4

[第一章 绪论](#_Toc686116507) 5

[1.1 苯丙氨酸解氨酶研究现状](#_Toc686116508) 5

[1.1.1 苯丙氨酸解氨酶的存在与分布](#_Toc686116509) 5

[1.1.2 苯丙氨酸解氨酶的基本性质](#_Toc686116510) 6

[1.1.3 PAL的酶学性质](#_Toc686116511) 6

[1.1.4 PAL的催化机制](#_Toc686116512) 6

[1.1.5](#_Toc686116513) *[pal](#_Toc686116513)*[基因的结构特点与表达调控](#_Toc686116513) 6

[1.1.6 PAL与木质素、木栓层及褐色果皮形成的关系](#_Toc686116514) 6

[1.1.7 苯丙烷类代谢途径的调控](#_Toc686116515) 7

[1.1.8 PAL的其他Th理作用](#_Toc686116516) 7

[1.2 果树PAL的研究现状](#_Toc686116517) 7

[1.3 本研究的目的和意义](#_Toc686116518) 8

[1.3.1 大果水晶梨及其褐色果皮突变体的研究现状](#_Toc686116519) 8

[1.3.2 本研究的目的与意义](#_Toc686116520) 8

[第二章 材料与方法](#_Toc686116521) 8

[2.1 试验材料](#_Toc686116522) 8

[2.2 试剂与药品](#_Toc686116523) 8

[2.3 主要仪器设备](#_Toc686116524) 8

[2.4 试验方法](#_Toc686116525) 8

[2.4.1 苯丙氨酸解氨酶的提取及活性测定](#_Toc686116526) 8

[3.4.1 蛋白质含量测定](#_Toc686116527) 9

[3.4.2 苯丙氨酸解氨酶的比活力](#_Toc686116528) 11

[3.4.3 叶片DNA的提取](#_Toc686116529) 11

[2.4.5 大果水晶梨](#_Toc686116530)*[pal](#_Toc686116530)*[的克隆](#_Toc686116530) 11

[2.4.6 果皮RNA的提取](#_Toc686116531) 13

[2.4.7 反转录反应](#_Toc686116532) 14

[2.4.8 荧光定量PCR反应](#_Toc686116533) 15

[第三章 结果与分析](#_Toc686116534) 15

[3.1 大果水晶梨及其突变体果皮颜色变化与部分Th理Th化指标分析](#_Toc686116535) 15

[3.1.1 不同时期果皮颜色变化](#_Toc686116536) 15

[3.1.2 苯丙氨酸解氨酶的活性、蛋白含量和比活力分析](#_Toc686116537) 15

[3.2 总DNA的提取及](#_Toc686116538)*[pal](#_Toc686116538)*[基因克隆](#_Toc686116538) 17

[3.2.1 大果水晶梨及其突变体叶片DNA的提取](#_Toc686116539) 17

[3.2.2](#_Toc686116540) *[pal](#_Toc686116540)*[1基因的克隆及Th物信息学分析](#_Toc686116540) 17

[3.2.3](#_Toc686116541) *[pal](#_Toc686116541)*[2的克隆及Th物信息学分析](#_Toc686116541) 18

[3.3 PAL的同源性比较与进化分析](#_Toc686116542) 30

[3.4 总RNA的提取及](#_Toc686116543)*[pal](#_Toc686116543)*[基因的表达分析](#_Toc686116543) 30

[3.4.1 大果水晶梨及其突变体果皮总RNA的提取](#_Toc686116544) 30

[3.4.2](#_Toc686116545) *[pal](#_Toc686116545)*[基因的表达分析](#_Toc686116545) 31

[第四章 讨论与结论](#_Toc686116546) 32

[4.1 讨论](#_Toc686116547) 32

[4.1.1 自然突变是果树选择育种的基础](#_Toc686116548) 32

[4.1.2 PAL与大果水晶梨褐色果皮形成的关系](#_Toc686116549) 32

[4.1.3 大果水晶梨褐色果皮突变体形成原因分析](#_Toc686116550) 32

[4.2 结论](#_Toc686116551) 32

[参考文献](#_Toc686116552) 33

[发表论文和参加科研情况说明](#_Toc686116553) 35

[附 录](#_Toc686116554) 36

[附录一：](#_Toc686116555) 36

[附录二：](#_Toc686116556) 38

# 第一章 绪论

## 1.1 苯丙氨酸解氨酶研究现状

### 1.1.1 苯丙氨酸解氨酶的存在与分布

1961年，Koukol和Conn[1]第一次在绿色植物中分离并纯化了苯丙氨酸解氨酶（PAL），而后关于PAL的研究迅速展开。目前认为PAL主要存在高等植物、真菌、细菌和某些藻类中。随着分离纯化方法和技术的不断更新和完善，现已从多种植物中分离纯化得到PAL如小麦、水稻、番茄。在梨属的鸭梨、砀ft酥梨等多个品种中也提取到了PAL。有研究认为，不同植物来源的PAL活性不同，同一植株不同组织的PAL活性也不相同，一般越嫩的部分活性越高[2]。例如，萌发5 d的黄化水稻幼苗植株体，幼叶、根胚芽鞘中的PAL活性逐渐降低，而在胚乳中PAL没有活性[3]。在植物中，PAL分布在表皮下的细胞和微管组织细胞中，定位于细胞质、叶绿体、线粒体、过氧化酶体等[4]。免疫细胞化学研究表明，PAL在栅栏细胞和海绵细胞中合成[5]。

### 1.1.2 苯丙氨酸解氨酶的基本性质

PAL是一种寡聚酶，是分子量介于220~330 kDa之间的酸性蛋白。一般认为，一个PAL酶蛋白由4个均一的亚基构成，亚基分子量在55～88 kDa之间，每个亚基有一个作用点。如芥菜PAL分子量为240 kDa，亚基分子量55～60 kDa。然而在欧芹中发现PAL的4个亚基的分子量并不相同，分别为83 kDa、65 kDa、56 kDa和42 kDa。在土豆和链霉菌中亚基以不同的聚合状态而形成两种不同的形式，并且这两种形式不能互相转换[6]。PAL亚基间的结合是非常牢固的，只有SDS-巯基乙醇、氯化胍或者高浓度的尿素可以将结合的亚基分开。亚基一旦分开，再复性就很困难。不同植物的PAL的氨基酸组成不同，最适pH也不同，一般介于8.0～9.5之间[2]。如菜豆[8]PAL最适pH为8.8～9.2，水稻的为9.2，小麦[9]的是8.8。

各种来源的PAL的米氏常数（Km）不同，大多数PAL的Km在0.3×10-4～1.5×10-2 mmol/L. 如水稻PAL的Km为5.94×10-4 mmol/L，红酵母为3.87×10 -4

mmol/L，芥菜叶为3.8×10-2 mmol/L. 小麦[10]PAL有2个Km，分别是0.625×

10-4 mmol/L和3.1×10-4 mmol/L. 豆PAL 的4种同工酶的Km分别为0.077

Mmol/L、0.122 mmol/L、0.256 mmol/L和0.302 mmol/L。

### 1.1.3 PAL的酶学性质

苯丙氨酸解氨酶是催化L-苯丙氨酸（L-Phe）经非氧化脱氨反应，生成反式肉桂酸的关键酶，是苯丙烷代谢途径中的第一步反应。L-Phe进入苯丙烷代谢途径，生成的中间产物香豆酸、阿魏酸、芥子酸等可以进一步转化为香豆素、绿原素，还可以形成CoA酯，进一步转化为类黄酮、木质素等次生代谢产物。

PAL 有酪氨酸解氨酶（Tyrosine ammonia-lyase, TAL）活性，催化酪氨酸

（Tyrosine, Tyr）生成香豆酸。但PAL和TAL最适pH不同。如程水源报道[2]，玉米的PAL有很低的TAL活性。据此推测PAL具有PAL和TAL两种酶形式，PAL/ TAL比取决于两种形式酶的比例。

大多数生物的PAL动力学曲线并不遵循经典的米氏方程。原因有两个方面：一是多种底物如酪氨酸和苯丙氨酸会竞争PAL的活性位点；二是PAL具有别构酶的特征，在与一些配体结合时各亚基之间表现出协同效应。

### 1.1.4 PAL的催化机制

1970年，Hason和Havir[11]首先提出PAL的米切尔加成反应机理（Michael Addition Reaction），即去氢丙氨酸（DHA）是PAL的活性中心。该机理的关键步骤是L-苯丙氨酸的氨基由米切尔加成到DHA的β位。1994年Schuster 和

Retey[12]提出了第二种机理—傅氏反应机理，即辅基DHA以傅氏反应方式攻击

L-苯丙氨酸芳环邻位，造成C+，使β位质子被酸化，从而有利于酶催化去碱基。

2004年杨顺楷[13]等提出可以用一对非芳香L-苯丙氨酸异构体做探针，证实PAL

的催化中心是3, 5-二氢-5-次甲基-4H-咪唑-4-酮（MIO），而非DHA。

### 1.1.5 *pal*基因的结构特点与表达调控

植物*pal*基因结构的特点是由小的多基因家族组成。在1个染色体中含有 1

至多个*pal*基因，并因不同植物而异。欧芹[14] PAL家族有4个基因、菜豆[15]有

3个基因、番茄[16]有5个基因，而在马铃薯[17]中估计达到40～50个。*pal*基因的编码区长度变化不大，一般在2000 bp左右。例如，水稻[18]*pal*编码区长2103

bp，菜豆[15] *pal*2编码区长2136 bp, *pal*3编码区长2130 bp。

有人用小麦*pal*基因的PCR片段为探针，从小麦核DNA基因库中筛选出

*pal*1与*pal*2两个高度同源、紧密连锁、转录方向相同的小麦*pal*基因，同源性高达93%。同时利用*pal*1特异片段进行Southern杂交，发现该基因具有多个拷贝。有研究表明，豆角[19]（*Phaseolus vulgaris L*.）的DNA中含有3个不同的*pal*基因，其中2个基因（gPAL2 和gPAL3）的核苷酸序列已测定完成。gPAL2 含

一个开放阅读框和1720个碱基对的内含子，编码的多肽含有712个氨基酸。而

gPAL3有一个447 bp的内含子，编码含710个氨基酸的多肽。两者同源性为72%。

Whetten[20]研究发现火炬松和被子植物水稻、豆、甘薯的cDNA的同源性为60～

62%。而在松树[20]（*Pinus banksiana*）中发现PAL基因家族有8～10个成员，其中5个基因（PAL1～PAL5）已被测序，同源性在68.8～90.4%之间。

植物PAL的表达具有组织特异性。菜豆[15]的3个基因在根部都大量表达，在芽和花瓣中PAL1和PAL2均表达，在叶中只有PAL1表达。*pal*基因表达也受发育的调控。苹果、草莓、梨的果实发育过程中，PAL活性有两个高峰，分别出现在幼果期和果实成熟期[21]。Shufflebottom[22]将菜豆*pal*基因APL-GUS的启动子转到马铃薯和烟草中，至少在发育中的木质部、皮层、表皮和根管细胞进行表达。

PAL多基因家族成员在表达上的差异，是由于它们的启动子所包含cis-elements和相应的转录因子的共同作用，使得不同的*pal*基因能在不同时间和组织中表达。Sablowski[23]研究认为，只在花中表达的Myb类转录因子与PAL2启动子的P-box结合后能活化该启动子，而且这种活化具有组织特异性。

### 1.1.6 PAL与木质素、木栓层及褐色果皮形成的关系

梨果实成熟时果皮色泽一般为绿黄色（或绿色、黄色）、红色或褐色，其中绿黄色最为常见。褐色是木栓层覆盖果面而形成的，而非色素所致[24]。有研究表明，褐色果皮有助于果实抵抗病虫害和恶劣天气，更耐贮运[25]。褐色果皮的砂梨品种，有日本梨品种“长十郎”、“丰水”、“今村秋”、“市原早生”和“晚三吉”，中国砂梨品种“苍溪雪梨”、“三花”和“黄花梨”等。褐色果皮不再是砂梨系统独有。近年来，衡伟[26]在白梨系统中也发现了砀ft酥梨的芽变品系——褐色果皮的锈酥。

从解剖学的角度看，果皮属于周皮，由多层细胞组成，包括表皮、木栓层、木栓形成层和栓内层[27]。表皮的外面是由蜡质覆盖的角质层，角质层中间由简单酚类物质和木质素所填充[28]。

梨果皮褐色（包括锈斑）就其本质来说是角质层和表皮细胞破损后果皮木栓层积累的结果[29]。木质素是植物体内的一类次生代谢物质，经由苯丙烷代谢途径合成（如图1-1 所示）。参与木质素合成的酶主要有：苯丙氨酸解氨酶

（Phenylalanine ammonia-lyase, PAL）、4–香豆酸辅酶A 连接酶

（4-hydroxycinnamate-CoA ligase, 4CL）、肉桂醇脱氢酶（Cinnamyl alcohol

dehydrogenase，CAD）、过氧化物酶（Peroxidase, POD）等。



图1-1 植物苯丙烷代谢途径

Fig. 1-1 model of the pathway leading to lignin biosynthesis

### 1.1.7 苯丙烷类代谢途径的调控

苯丙烷类代谢途径的内部调控有两方面。一方面是代谢产物的反馈调节；另一方面是植物体内的PAL内源性抑制物质（PAL-Ⅰ）的调节。被子植物PAL活性受到各种酚类化合物尤其是其反应产物肉桂酸的反馈抑制。王燕[31]等研究发现，不同浓度的末端产物对PAL活性的影响不同。100 mmol/L反式肉桂酸、

6.25 mmol/L 4, 5,7-三羟黄烷酮和50 mmol/L阿魏酸对PAL的抑制作用最强；而100 mmol/L3,5-二氢肉桂酸能微弱增加酶活性，100 mmol/L阿魏酸也能增加酶活性。

PAL-Ⅰ是一种非透析蛋白，具有热稳定性，参与PAL活性的调节，对PAL是竞争性抑制。水稻中PAL-Ⅰ不仅能抑制水稻PAL，还能抑制玉米、小麦和马铃薯块茎的PAL，但不能抑制水稻中提取的多酚氧化酶和α-淀粉酶[4]。

苯丙烷类代谢途径的外部调控主要有光、机械损伤和病原菌感染等。据报道，红光能诱导玉米PAL活性增高，但对甘薯块茎PAL没有影响[31]。有研究表

明，烟草在正常生长条件下，*pal*基因表达量较低；受到伤害时，*pal*基因有短暂的增强表达；当受到烟草花叶病毒感染或真菌激发子作用时，*pal*基因强烈表达[32]。受到切割伤害后，大多数植物PAL的活性增强[33]。金庆超[35]等发现，在受纹枯病菌侵染后，抗病玉米品种（R15）PAL活性增加的速度和程度明显高于感病品种（K09）。此外，生长素（IAA）、赤霉素（GA3）、乙烯和激动素（BAP）都能诱导PAL活性的升高。Rickey[36]用乙烯处理马铃薯后，PAL的活性增加，

mRNA的表达水平增加。程水源发现6种生长调节剂中乙烯利对离体银杏叶PAL

活性的诱导效果最高[2]。

### 1.1.8 PAL的其他Th理作用

#### 1.1.8.1 在细胞分化和木质化中的作用

20世纪70年代以来，PAL与细胞分化关系的报道屡见不鲜。有人发现愈伤组织分化过程中PAL活性有所增高，在分化组织中形成管状分子，主要原因是木质素在细胞壁中的积累[37-39]。1968年，Tubery等发现在多种植物的木质化组织中PAL活性较高，而在这些植物的非木质化组织中则检测不到PAL活性[23]。

1980年，Jin Nakashmia等[40]以分离的百日草叶肉细胞为材料，研究发现在百日草细胞分化过程中，木质素的合成及管状分子形成与PAL活性的增加呈正相关；细胞溶质中的PAL活性在木质化之前迅速上升，而微粒体和细胞壁的PAL活性在木质化期间快速增加[41]。

#### 1.1.8.2 在植物色素形成过程中的作用

植物花朵、果实和叶片色素的重要组成成分是花色素、花色苷、花青素，这些物质是由苯丙烷类代谢产物反香豆酞辅酶A经过类黄酮途径合成的[42]，与

PAL的活性密切相关。花色素是由反香豆酰CoA经类黄酮途径合成的，PAL 是

该途径的关键酶之一[43]。花色苷是一类从红到紫到蓝的植物色素，由与PAL密切相关的苯丙烷途径合成[44]。早在1960年，Neish[45]证实了PAL能催化花青素的合成。苋红素是中央种子目植物所特有的色素，应初衍[46]研究发现，用白光、蓝光或红光照射尾穗苋黄化苗后，PAL活性均有不同程度的上升，并有苋红素的积累。

#### 1.1.8.3 参与酚类物质的合成

酚类物质也是苯丙烷类代谢的产物。尚庆茂[47]研究发现，在感染灰霉病的黄瓜组织中随着PAL活性升高，总酚的含量也升高。说明PAL活性增高与酚类物质的合成有一致性。李默怡[48]研究发现，用多糖组分处理红豆杉后，植物体内酚类物质和可溶性蛋白含量有所增加，并且PAL的活性也被激活。

#### 1.1.8.4 在植物根瘤形成中的作用

苯丙烷类代谢途径可以产生黄酮类物质，因此，黄酮类物质含量与苯丙烷类代谢中的第一个关键酶PAL密切相关。黄酮类化合物对根瘤菌有趋化作用[49]，有些类黄酮化合物还可作为根瘤菌结瘤基因的诱导物质[50]。有研究表明[3]，在根瘤菌的形成过程中常伴随着PAL活性逐渐增加。

#### 1.1.8.5 参与植物抗病作用

关于PAL活性变化和植物抗病性的关系有3种观点：正相关、负相关和不相关。研究发现，水稻PAL活性与抗稻瘟病性呈正相关[51]，小麦的PAL活性与抗赤霉菌病呈负相关[52]，大麦PAL活性与粉状霉菌的抗性关系不密切。

PAL与植物抗病性有六大特点：1.在感染最初几个小时上升缓慢，随后活性急剧上升并达到顶峰，然后活性又急剧下降。2.致病菌对PAL活性的影响大于非致病菌。3.毒素处理也能刺激PAL活性升高，且比病原菌的作用更强烈。4. 从真菌培养液和菌丝细胞壁制备的激发因子也能诱导PAL活性的增加。5.感病后植物PAL活性的增加幅度与病原菌、毒素或真菌培养液的浓度有关。6.诱导子诱导后，随着PAL活性的升高，苯丙烷类代谢途径及其下游途径中的某些酶的活性也升高。

#### 1.1.8.6 与植物抗虫有关

关于PAL参与植物抗虫方面的报道较少，但苯丙烷类代谢与植物抗虫性的报道很多，主要是苯丙烷类代谢的产物木质素和植保素与植物抗虫性之间有关系。当植物体受到虫害时，受害部位的周围细胞PAL的表达量就会增多，进一步合成大量的木质素，沉积在细胞壁中，使细胞壁增厚，成为食草动物取食的机械障碍，从而阻碍虫害进一步扩大；吴龙火等[54]研究发现PAL活性提高与蚜虫取食诱导密切有关；食草类动物的取食也可以诱导PAL活性升高[55]；李润植等研究发现，不同类型品种棉花在棉蚜危害胁迫下，PAL、PPO和多酚类物质含量均有不同程度升高，且抗蚜品种上升快，防御反应及时。

## 1.2 果树PAL的研究现状

据报道，草莓、葡萄的有色品种及苹果、梨[56-58]的果实在发育过程中，PAL活性有两个高峰，一个出现在幼果期，一个出现在果实成熟期。鞠志国[59]提取并纯化了莱阳茌梨的PAL，测定其最适pH为7.5，Km值小于其他农作物。

Blankenship SM等[60]发现在苹果提取液中有PAL抑制因子存在，能抑制PAL活性。光照时间、光质、光强及机械损伤均对苹果果实、银杏叶片中的PAL活性及活性周期有重大影响[2]。

赵宗方[61]发现在巨峰葡萄中花青素含量与PAL活性呈指数函数曲线相关，

而苹果的花青素含量与PAL活性呈线性相关。因此，提高PAL活性，能增进着色程度。李正国[62]等研究表明，涂蜡、损伤处理都能提高果实的果皮褐变率，而低温贮藏则显著降低其发生率。此外，张士鸿还发现砀ft酥梨果实发育过程中PAL活性的高峰期最先出现，之后木质素含量和石细胞含量相继出现高峰。刘志浩[63]以鸭梨果实cDNA为模板，克隆得到478 bp的苯丙氨酸解氨酶基

因片段。张士鸿[64]等以砀ft酥梨果实为材料，通过基于同源性的RT-PCR方法，克隆得到585 bp的*pal*基因片段，推断其编码195个氨基酸序列。

果实发生褐变或受到机械损伤后，*pal*2、*pal*6基因的表达均比对照明显增强，并且脐橙果实PAL活性变化以及*pal*2基因的表达与果皮褐变具有非常密切的关系[62]。孙百灵等[65]研究发现，苹果梨的套袋果在果实成熟期PAL的表达量明显高于未套袋果。

综上所述，国内外对果树PAL的研究主要集中在提取、纯化、抗逆境、生理作用等方面。尽管分子生物学技术已广泛应用于基因的克隆、表达与分析，但对果树PAL基因克隆、表达和调控方面的研究较少，且深度与进展相对滞后。

## 1.3 本研究的目的和意义

### 1.3.1 大果水晶梨及其褐色果皮突变体的研究现状

砂梨果实不论成熟时表现什么颜色，它们在幼果期的果皮颜色都为绿色。只是达到一定的发育阶段后，由于果实表面和果皮气孔（果点）周围木栓层的聚集与否及聚集多少，最终决定果皮的颜色是绿色、褐色或者中间色。果点是一团凸出果面的木栓化细胞，是在气孔保卫细胞破裂后形成的空洞内产生的次生保护组织。果皮木栓化是从果皮气孔破裂形成果点开始的。因此，从本质上，梨褐色果皮（包括锈斑）的形成是角质层和表皮细胞破损后果皮木栓层积累的结果，而非色素变化所致[24]。

大果水晶梨属于砂梨系统，正常果皮为绿色。2007年，课题组在河北省抚宁县戴庄“大果水晶”梨园中两个单株上，发现了个别枝条的果实由原品种的绿色果皮变异为褐色果皮；2008年春季相互嫁接后，褐色变异被确认为遗传性变异，即褐色果皮突变体（褐色芽变）。褐色果皮突变体与原品种相比，除果皮变成褐色外，二者的遗传背景理论上是相同的，这对研究褐色果皮的形成机制具有重要价值。课题组已有的研究结果表明：突变体果皮PAL的活性均高于原品种，显著性差异主要表现在果点变褐期。在果实发育前期，果皮PAL活性的增加，使得木质素的含量增加，为果点和果皮木栓化打下基础。研究证实，突

变体褐色果皮的形成正是木栓层形成的结果[66]。

### 1.3.2 本研究的目的与意义

目前，对大果水晶梨褐色果皮突变体的研究主要是形态结构观察，以及与木质素合成相关的PAL酶活性等生理指标的测定，从分子生物学的角度研究尚未见报道。寻找大果水晶梨及其褐色果皮突变体在基因水平上的差异，对进一步解析PAL在木栓层形成中的作用，以及褐色果皮突变体形成的分子机制具有重要意义。本试验以大果水晶梨及其褐色果皮突变体为材料，克隆两者的*pal*基因，寻找大果水晶梨及其褐色果皮突变体在*pal*基因组成及表达水平上的差异，为研究梨褐色果皮形成机制，并为以后在实践中通过调控栽培条件，获得贮藏性好、品质优良的梨果实提供理论依据。

# 第二章 材料与方法

## 2.1 试验材料

以抚宁县戴庄大果水晶梨（*Pyrus pyrifolia* s*uisho*）变异母株上，经鉴定为稳定遗传的变异枝与原枝上的果实及叶片为材料。叶片是春季新长出的幼叶，经液氮速冻后，在-80℃保存备用。大果水晶梨及其褐色果皮突变体的果实分别在6月11日（幼果期：果点和果皮均未变褐）、7月4日（果点变褐期）、8月4日（果皮变褐期）、10月4日（采收期）随机采取果实，立即放入冰壶，带回实验室，在-80℃保存备用。

## 2.2 试剂与药品

所用药品PCRbuffer、Taq酶、特异性引物、dNTP、DNA Marker12均采用北京赛百盛生物有限公司产品，CTAB、SDS、EDTA、琼脂糖、Tris、PVP、β-巯基乙醇等均为Amresco产品，DNA胶回收试剂盒为天根公司产品，RNA提取试剂盒是博迈德公司产品，PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）和SYBR Premix Ex TaqTMⅡ（Perfect Real Time）为大连宝生物公司产品，其余试剂均为北京化工厂的产品（分析纯）。测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

## 2.3 主要仪器设备

紫外分光光度计、恒温水浴锅、高速冷冻离心机、制冰机、电子天平、水浴锅、漩涡混匀器、超净工作台、电泳设备、-80℃超低温冰箱、PCR扩增仪、凝胶成像系统、实时定量PCR仪等。

## 2.4 试验方法

### 2.4.1 苯丙氨酸解氨酶的提取及活性测定

采用肉桂酸反应法[67]。

称取果皮0.5 g，立即转入冷冻好的研钵中，加入4 mL 5 mmol/L的巯基乙醇硼酸缓冲液和0.5 g PVP，加入少量石英砂，快速研磨。再用缓冲液（3 mL）洗涤研棒和研钵，将匀浆液全部转入离心管中，8000 r/min，4℃离心20 min，取上清液，低温保存备用。

PAL活性测定：按表2-1中所述加样（0号为对照管，1号为测定管），重复

3次。以对照管在紫外分光光度计290 nm处调零点。测试管在加入酶液后，立

即于0 min测定在290 nm处吸光度OD2901. 在30℃恒温水浴保温30 min，立即测定在290 nm处吸光度OD2902.

OD值在1 min内变化0.01作为一个酶活力单位。PAL酶活力（U）用1 g

鲜样1 min内使反应体系在290 nm处吸光度升高的数值表示。即：

△*OD*

1*U*＝290

*V*1 100

*Wt* *v*2

△OD290是起始时间和终止时间的反应液的吸光度的差值，即△OD290=OD2902－OD2901；W（g）是样品重量；t（min）是反应时间；V1（mL）是提取时酶液的总体积；V2（mL）是测定时使用的酶液的体积。

表2-1 苯丙氨酸解氨酶（PAL）活性测定反应体系

Table 2-1 The measure reaction system of the PAL activity

| 试管编号 | 0 | 1 |
| --- | --- | --- |
| 5 mmol/l 硼酸缓冲液（mL） | 4 | 3.9 |
| 酶液（mL） |  | 0.1 |
| 0.02 mol/l 苯丙氨酸（mL） | 1 | 1 |

### 3.4.1 蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝染色法[68]。

#### 3.4.1.1 标准曲线的制作

取6支具塞试管，编号后，按表2-2加入试剂。摇匀，放置2 min后在595 nm波长下比色，记录消光值。以牛血清蛋白浓度为横坐标，消光值为纵坐标，绘制标准曲线。

表 2-2 蛋白质标准曲线的反应体系

Table 2-2 The measure reaction system of protein standard curve

| 操作项目 |  |  |  | 管号 |  | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 |  | 4 | 5 | 6 |
| 标准蛋白质溶液（mL） | 0 | 0.2 | 0.4 |  | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 蒸馏水(mL) | 1.0 | 0.8 | 0.6 |  | 0.4 | 0.2 | 0 |
| G-250 试剂（mL）  蛋白质含量（μg） | 0 | 20 | 40 | 各 5 | 60 | 80 | 100 |

#### 3.4.1.2 样品中蛋白质含量的测定

取1支具塞试管，准确加入l mL样品提取液，5 mL考马斯亮蓝G-250试剂，充分混合，放置2 min后，以标准曲线1号试管做参比，在595 nm波长下比色，

记录消光值。每个样品重复3次。根据所测的消光值，在标准曲线中找到对应的蛋白浓度C（μg/mL）。按下式计算样品的蛋白含质量（μg/g）。

蛋白含量＝

*CV W*1000

W（g）是样品重量；V（mL）是提取时酶液的体积。

### 3.4.2 苯丙氨酸解氨酶的比活力

酶的比活力是指每单位质量样品中的酶活力。即比活力=总活力（U）/总蛋白（mg）。

### 3.4.3 叶片DNA的提取

叶片DNA提取采用改良的CTAB法[69]，具体步骤具体如下：

1.取0.5 g幼嫩叶片放入遇冷的研钵中，迅速加入液氮进行充分研磨至粉末发白色后，立即转入10 mL离心管中。

2.加入8 mL冰预冷的细胞匀浆液（5 mmol/L EDTA, 0.35 mol/L葡萄糖，100 mmol/L pH8.0 Tris-Cl, 0.1% DIECA, 2% PVP, 0.1% VC, 0.2% 琉基乙醇），在漩涡振荡器上充分混合后于4℃，8000 rpm离心10 min，弃上清液。

3.在沉淀中加入4 mL预热的细胞核裂解液（100 mmol/L pH8.0 Tris-Cl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mmol/L NaCl, 2% CTAB, 0.1% VC, 0.1% DIECA, 2% PVP，

0.2% 琉基乙醇）于65℃水浴30 min，水浴过程中不断轻轻晃动直至摇匀。

4.加入等体积的氯仿/异戊醇（24: 1），轻轻旋转摇动至充分混匀，于室温下

8000 rpm离心10 min后，将上层液相转移到另一离心管。

5.重复步骤4一次。

6.加入2/3倍体积冰预冷的异丙醇，上下轻轻翻转至充分混合，于-25℃放置30 min后，8000 rpm离心10 min，弃去上清。

7.得到的DNA沉淀用70%酒精冲洗三次后转至1.5 mL离心管中，吸干残存酒精，于超净工作台上干燥。

8.干燥后加入300μL TE（1 mmol/LEDTA, 10 mmol/L Tris-Cl, pH8.0）溶解。

9.加入1μL的RNA酶（10 mg/μL），37℃水浴15-20 min。

10.重复步骤6、7一次。

11.用200μL TE溶解，-25℃保存备用。

### 2.4.5 大果水晶梨*pal*的克隆

#### 2.4.5.1 梨属*pal*基因序列的获得

在GeneBamk中筛选梨属*pal*基因序列，并进行同源性比对。

#### 2.4.5.2 引物的设计与合成

利用DNAMAN软件对GeneBank中已公布的梨属苯丙氨酸解氨酶的碱基序列进行同源性分析，根据保守区设计并合成大果水晶梨*pal*基因的简并引物。

表2-3 引物序列

Table 2-3 prime sequences

| 引物编号 | 引物序列 |
| --- | --- |
| Ⅰ | F:5'- GC(C/T)GC(A/G)GCAAT(A/T)ATG(T/G)A(C/A)CA -3' |
|  | R：5'- TACTCCTCTCCTTGTCACCATT AACCGTGACGTGCTA-3' |
| Ⅱ | F: 5'-A(T/G)GA(T/C)CC(A/G)TTGAACTGG-3' |
|  | R:5'-AC(A/G)TCTTG(G/A)TTGTG(C/G)TG(C/T)T-3' |
| Ⅲ | F: 5'-ATGGAGGCG(A/G)A(G/A)ACCATCAC-3' |
|  | R：5'-AACCGTGACGTGCTAACAGATAGG-3' |
| Ⅳ | F: 5'- GC(C/T)GC(A/G)GCAAT(A/T)ATG(T/G)A(C/A)CA-3' |
|  | R：5'-AACCGTGACGTGCTAACAGATAGG-3' |

#### 2.4.5.3 优化后PCR反应条件

1. PCR扩增反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| DNA 模板（50 ng/μL） | 4.0 μL |
| 10×PCR Buffer（含 Mg2+） | 2.0 μL |
| DNTPs（10 mmol/L each） | 0.4 μL |
| Primer-F（5 μmol/L） | 1.0 μL |
| Primer-R（5 μmol/L） | 1.0 μL |
| Taq DNA 聚合酶（5 U/μL） | 0.2 μL |
| 灭菌双蒸水 | to20 μL |

2. PCR反应程序：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Step 1 | 预变性 | 95 ℃ | 5 min |
| Step 2 | 变性 | 95 ℃ | 30 s |
| Step 3 | 退火 | 58 ℃ | 45 s |
| Step 4 | 延伸 | 72 ℃ | 2 min |
| Step 5 | Go to step2 |  | 35 cycles |
| Step 6 | 延伸 | 60 ℃ | 10 min |
| Step 7 |  | 4 ℃ | 10 min |

#### 2.4.5.4 PCR产物的电泳分析

取2μL PCR产物加入适量的6×Loading buffer混匀，在1%琼脂糖凝胶上点样，用0.5%的TBE缓冲液电泳进行检测，120 V稳压，电泳时间为45 min。

#### 2.4.5.5 凝胶中PCR产物的回收

1. 紫外灯下从凝胶上切下目的片段称重，转入1.5 mL的Eppendorf管中。

2. 加入胶块重量3倍的溶胶液，50℃水浴5-10 min。

3. 将溶胶液移入吸附柱，12000 rpm离心1 min，倒掉收集管中的液体。

4. 加入600μL洗脱液，12000 rpm离心1 min，倒掉收集管中溶液。

5. 重复步骤4一次。

6．空吸附柱12000 rpm，离心2 min。

7. 将吸附柱放入一个新1.5 mL离心管中，在吸附柱中央加入20μL无菌水，离心1 min，收集离心管中的液体。

8. 重复步骤7一次。

9. 离心管中的液体即为从凝胶中回收的PCR产物。

### 2.4.6 果皮RNA的提取

采用改良的CTAB法[70]提取梨果皮中的RNA。1.将研钵和研棒用酒精燃烧，使RNA酶失活。

2.将冷冻果皮加液氮研磨成细粉后，迅速转入到830μL预热的（60 ℃）的

CTAB抽提液（3% CTAB, 2 mol/L NaCl, 0.025 mol/L EDTA, pH=8.0, 4% PVP，

0.1 mol/L Tris-Cl, pH=8.0，3% β-巯基乙醇（52μL现加））的2 mL离心管中，摇匀。

3.将离心管于65℃温浴30 min，每10 min上下颠倒一次。

4.取出离心管，待冷至室温后，加入等体积的氯仿，颠倒使之充分混匀，冰上静置10 min，至有机相由无色——绿色——暗绿色。

5.于4 ℃，12000 rpm离心10 min，将上清液转至另一离心管中。

6.重复步骤4、5。

7.取上清液于1.5 mL离心管中，加1/2体积的6 mol/L LiCl，摇匀，于-20℃沉淀30 min以上。

8.于4 ℃，12000 rpm离心10 min。

9.弃上清，用500μL 75%乙醇洗涤沉淀2次。

10.吹干RNA，用30μL无RNase dH2O溶解。

11.电泳检测片段大小和质量。

### 2.4.7 反转录反应

#### 2.4.7.1 基因组DNA的除去反应

提取的总RNA中常常混有痕量的基因组DNA，直接作为荧光定量PCR反应的模板会造成试验结果不准确。因此要对总RNA进行DNA消化。采用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒中gDNA Eraser可以有效除去基因组DNA，按照表2-4加样，通过42℃，2 min即可除去基因组DNA。处理之后可以直接进行反转录反应合成cDNA。

表2-4 去除DNA的反应体系

Table 2-4 The measure reaction system of wiping off DNA

| 试剂 | 使用量 |
| --- | --- |
| 5×gDNA Eraser Buffer | 2 μL |
| GDNA Eraser | 1 μL |
| **Total RNA** | 4~6 μL |
| RNase Free dH2O | Up to 10 μL |

#### 2.4.7.2 反转录反应

反转录反应的反应液须在冰上进行配制。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应液+1的量配制，然后再分装到每个反应管中。反转录cDNA的反应体系见表2-5。

表2-5 反转录cDNA的反应体系

Table 2-5 The measure reaction system of reverse transcription cDNA

| 试剂 | 用量 |
| --- | --- |
| 5×Prime Script Buffer 2(for Real Time) | 4 μL |
| Prime Script RT Enzyme MIN1 | 1 μL |
| RT Primer MIN4 | 1 μL |
| 除去基因组 DNA 的 RNA 反应液 | 10 μL |
| RNase Free dH2O | Up to 20μL |

在PCR仪中的反应程序：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Step 1 | 37 | ℃ | 15 min |
| Step 2 | 85 | ℃ | 5 s |

### 2.4.8 荧光定量PCR反应

采用的是两步法，参照SYBR Premix Ex TaqTMⅡ（Perfect Real Time）试剂盒说明进行操作。扩增*pal*1的引物为F: 5’-GCAAAGAGGACTTTAACAACTG G-3'和R: 5’-TACTCCCTATCGACAACTTTAAGC-3'，目的片段的长度为

45 bp. 扩增*pal*2的引物为F: 5’-CCGGGAAATAACCAAACC-3'和R: 5’-AT GGCTCCCTTTCATTGC-3'，目的片段的长度为93 bp. 以Actina（GU830959）为内参基因。PCR反应程序为：95℃预变性10 s，95℃变性5 s，60℃退火

34 s，40次循环，每次循环第3步进行荧光采集。实验使用AB7500cycle（r Applied

Biosystems, Foster City，CA，USA）仪器完成，实验数据由7500 softwarev2.0.4

软件自动处理，测定样本均设4个重复。

# 第三章 结果与分析

## 3.1 大果水晶梨及其突变体果皮颜色变化与部分Th理Th化指标分析

### 3.1.1 不同时期果皮颜色变化

分别在6月11日（幼果期：果点和果皮均未变褐）、7月4日（果点变褐期）、

8月4日（果皮变褐期）、10月4日（采收期）随机采取大果水晶梨及其褐色果

皮突变体的果实，各时期果皮颜色如图3-1所示。

大果水晶梨原品种的果点在幼果期和果点变褐期都是白色，在果皮变褐期和采收期果点为褐色；果皮在幼果期、果点变褐期、果皮变褐期都是绿色，在采收期为黄色（套袋影响果皮由绿色变为黄色）。大果水晶梨突变体的果点在幼果期是白色，在果点变褐期、果皮变褐期和采收期都为褐色；果皮在幼果期、果点变褐期都是绿色，在果皮变褐期和采收期都是褐色（套袋并不影响突变体的果皮颜色）。



图3-1 大果水晶梨及其突变体果实发育过程中果点、果皮的色泽变化

Fig. 3-1 The color changes during the development of the mutant and normal Suisho pears

### 3.1.2 苯丙氨酸解氨酶的活性、蛋白含量和比活力分析

在幼果期（果点、果皮均未变褐）、果点变褐期、果皮变褐期，测定了大果水晶梨及其褐色果皮突变体果皮中的PAL活性、蛋白质含量和PAL比活力，结果表明：大果水晶梨的褐色果皮突变体中果皮的PAL活性（图3-2）和蛋白质含量（图3-3）均高于大果水晶梨原品种。除幼果期（果点、果皮均未变褐）之外，大果水晶梨的褐色果皮突变体中果皮的PAL的比活力均高于大果水晶梨原品种

（图3-4）。

图3-2 原品种与突变体不同时期PAL活性分析

Fig. 3-2 Comparison of the PAL activity between mutant and normal*Suisho* pear

图3-3 原品种与突变体不同时期蛋白含量分析

Fig. 3-3 Comparison of the protein content between mutant and normal*Suisho* pear

图3-4 原品种与突变体不同时期PAL比活力分析

Fig. 3-4 Comparison of the PAL specific activity between mutant and normal*Suisho* pear

运用DPS软件进行显著性分析表明：原品种和突变体的PAL活性在幼果期和果皮变褐期差异不显著，在果点变褐期差异显著（附录一表1）。因为突变体的褐色果皮的形成是由果点变褐形成锈斑开始，逐步粘连成片至覆盖整个果皮形成的，在果点变褐期PAL活性差异显著说明PAL活性与褐色果皮形成密切相关。原品种和突变体的蛋白质含量在果点变褐期和果皮变褐期差异不显著，在幼果期差异达到极显著（附录一表2），表明突变体在幼果期蛋白质合成旺盛。原品种和突变体的PAL比活力在幼果期、果点变褐期和果皮变褐期差异不显著（附录一表3）。表明PAL比活力与果皮变褐不相关。

同时可以分析得出，大果水晶梨原品种在果皮变褐期与幼果期PAL活性和蛋白质含量差异极显著，PAL比活力差异显著。大果水晶梨褐色果皮突变体在果点变褐期与果皮变褐期PAL活性和蛋白质含量差异极显著，PAL比活力差异显著。

## 3.2 总DNA的提取及*pal*基因克隆

### 3.2.1 大果水晶梨及其突变体叶片DNA的提取

采用改良CTAB法提取大果水晶梨及其褐色果皮突变体幼叶的总DNA，用

0.8%琼脂糖凝胶，在稳压120 V，电泳30 min后，用EB颜色，在紫外灯下观察，结果显示DNA完整无降解（图3-5），可以作为后续PCR的模板。



图3-5 大果水晶梨及其突变体的基因组DNA

Fig. 3-5 Genomic DNA extracted from mutant and normal*Suisho* pear

### 3.2.2 *pal*1基因的克隆及Th物信息学分析

#### 3.2.2.1 *pal*1的克隆

分别以提取大果水晶梨及其褐色果皮突变体的DNA为模板，用特异引物Ⅰ进行PCR扩增，得到清晰、单一的片段，如图3-6A所示。该片段长度为1000 bp左右，与预期目的片段大小一致。



图3-6 PCR产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3-6 Agrose electrophoresis of product of PCR product

M: DNA Marker 12；A：引物Ⅰ的扩增结果；B：引物Ⅱ的扩增结果；C：引物Ⅲ的扩增结果；D：引物Ⅳ的扩增结果。1：原品种；2：突变体

用DNA凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物，并送交北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定，测序得到的片段长度为858 bp。将测序得到的两条序列进行比对（图3-7），结果显示除原品种比突变体多3个碱基外，两个序列完全相同。



图3-7 大果水晶梨及其突变体*pal*1基因片段的比对

Fig. 3-7 *pal*1 blast of the mutant and normal fruit

利用DNAMAN软件对大果水晶梨*pal*1基因序列进行限制性内切酶酶切位点分析。结果表明，在识别序列长度≥6 bp的116种限制性内切酶中，25种酶有1个以上的酶切位点，分别是：AflII（1, 740），AlwNI（1, 817），BbvII（1, 656），BclI（1, 138），Bsc91I（1, 656），BstXI（1, 455），ClaI（1, 777），Ecl136II

（1, 445），EcoICRI(1, 445)，EcoNI(1, 740)，MfeI(1, 294)，NcoI(2, 264, 423)，NruI(1, 535)，NsiI(1, 844)，PflMI(1, 118)，PvuII(1, 41)，SacI(1, 447)，SalI(2, 554, 749)，SapI(1, 632)，SpeI(1, 829)，SphI(1, 842)，SpoI(1, 535)，SstI（1, 447）。

使用DNAMAN软件推出的285个氨基酸序列为：EHILAGSDYVKAAEKVHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAATK MIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVAMDNTRLAIAAIGKLMFA QFSELVNDFYNNGLPSNLTASSNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLGNPVTN HVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTTEAVDILKLMSSTFLVALCQAIDLRHLEEN LKSTVKTTVSQVAKRVLTVGFNGELHPSRFCEKDLLKVVDREYVFAYIDDPC SATYPLMQKLRHVLVEHALSNGD

#### 3.2.2.2 PAL1部分肽链的Th物信息学分析

通过Blast程序在GeneBank中进行比对分析，显示大果水晶梨*pal*1基因片段（长度为858 bp），靠近*pal*1全长序列的3‘端。且由此序列翻译得到的氨基酸序列不存在PAL的标签序列GTITASGDLVPLSYIAG。（图3-8）。



图3-8 PAL1的保守域分析

Fig. 3-8 Putative conserved domains of PAL1 from Suisho pear

通过DNAMAN软件分析，大果水晶梨的*pal*1基因片段翻译得到的285个氨基酸，等电点为6.41，分子量31553.2。含量最丰富的4种氨基酸种类、数量及比例分别为Leu（L），31, 6.82%；Ala（A），24, 5.83%；Val（V），22, 7.03%；

Ser（S），22, 6.3%。多肽链中亲水氨基酸169个，疏水氨基酸89个，亲水氨基酸多于疏水氨基酸，表现亲水性。对氨基酸序列的跨膜结构域进行预测，大果水晶梨PAL1克隆得到的部分肽链不存在跨膜结构域（图3-9）。



图3-9 大果水晶梨PAL1蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 3-9 Predicted transmembrane segments of PAL1 from Suisho pear

利用SOPMA在线工具预测大果水晶梨PAL1的二级结构，α-螺旋占59.65%，随机卷曲占30.88%，延伸链占7.02%，β-转角占2.46%。因此，随机卷曲和α-螺旋是大果水晶梨PAL1多肽链中的主要结构元件（图3-10）。



图3-10 大果水晶梨PAL1蛋白的二级结构预测

Fig. 3-10 Predicted secondary structure of PAL1 from Suisho pear

### 3.2.3 *pal*2的克隆及Th物信息学分析

#### 3.2.3.1 *pal*2的克隆

以提取的DNA为模板，用特异引物Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ进行PCR扩增，得到清晰、单一的片段，如图3-6B、C、D所示。片段长度分别为1500 bp、2000 bp和1000

bp左右，与预期目的片段大小一致。用DNA凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物，并送交北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定（序列见附录二）。将所得到序列用DNAMAN 软件进行拼接，由于原品种的个别碱基不能确

定，重新设计引物（F: 5‘-TCAGAAGGAGCTAATTAGGTAAGC-3'，R ：

5'-TGTGGCCTGATTCTGTAGCAC-3‘）得到一段500 bp左右的序列，通过和拼接得到的序列比对，进一步准确确定原品种*pal*2序列，长度2414 bp，其中外显子1997 bp，内含子417 bp。翻译得到由665个氨基酸组成的肽链（图3-11）。突

变体的*pal*2序列长度为2411 bp，其中外显子2001 bp，内含子410 bp。翻译得

到包含666个氨基酸的序列（图3-12）。

大果水晶梨原品种*pal*2序列及其翻译的肽链为：

1 CTTGGATGAGGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGTGAAGCTCGGCGG

1 L D E V K R M V A E Y R K P V V K L G G

61 AGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCACTCATGACACCGGGGTCAAGGT

21 E S L T I S Q V A A I A T H D T G V K V

121 TGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGGGTCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAG

41 E L S E S A R A G V K A S S D W V M D S

181 CATGGGCAAAGGGACTGACAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCG

61 M G K G T D S Y G V T T G F G A T S H R

241 GAGAACAAAGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGGTAAGCTAAACTTTACCG

81 R T K Q G A A L Q K E L I R

301 AACATCCATTTACAGTTCCTAATGCATGTCGATATTTTATTAATATATATACTAACATAC

361 GGTCACACACAAAGTTAATTGAGCGAATAATTTTGGACTAATTATTTTGGACCAATTACT

421 GTAGTTAATTAGTGTGCATATATCAAACTCTTAACTTTACACAGATACGTGCTGTTATAA

481 TTCACTTAAAAATATATTTTTAAAAATTAATTAAGCTAATCATTTTGGACAAATTAACCA

541 ATTACGGTAGTTAATTTGAAGCTACCAACTTGCTACTTTTAGCTGCTTATATCTATAAAT 601 TGTTGTTGGAGTTGGACTTTTTTTTTTCTGAACCCTTAATAATTTTGAATTATTGTCAAA 661 TTATGGCTTCTAATTATGCTTTAATTTTCTTTGATTCAAATTCTTGAACGCTGGAGTGTT

221 F L N A G V F

721 TGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACACCAAGCAACAAGAGCAGCCATGTT

241 G S A T E S G H T L P H Q A T R A A M L

781 GGTCCGAATCAACACACTCCTCCAAGGCTACTCCGGCATAAGATTCGAAATCTTGGAAGC

261 V R I N T L L Q G Y S G I R F E I L E A

841 CATCACCAAGTTCTTGAACAACAACGTTACTCCATGCTTGCCCCTACGCGGTACTATTAC

281 I T K F L N N N V T P C L P L R G T I T

901 CGCCTCCGGAGATCTTGTCCCGCTATCCTACATTGCCGGATTACTCACCGGCAGGCCTAA

301 A S G D L V P L S Y I A G L L T G R P N

961 TTCCAAAGCAGTCGGACCAAATGGGCAGACCCTCAGTGCCTCAGAAGCTTTTGAGCTAGT

321 S K A V G P N G Q T L S A S E A F E L V

1021 AGGGATCAATTGCGGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAGGGTTAGCTCTTGTGAACGG

341 G I N C G F F E L Q P K E G L A L V N G

1081 CACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGCGTT

361 T A V G S G L A S T V L F E T N I L A L

1141 GCTAGCGGAGATTTTATCAGCGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCGGAGTTTAC

381 L A E I L S A I F A E V M Q G K P E F T

1201 TGATCACTTGACGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTAT

401 D H L T H K L K H H P G Q I E A A A I M

1261 GGAACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGCAGGA

421 E H I L D G S S Y V K A A K K L H E Q D

1321 TCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCTGGG

441 P L Q K P K Q D R Y A L R T S P Q W L G

1381 ACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTCAGT

461 P Q I E V I R F S T K S I E R E I N S V

1441 TAATGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCAACTTCCA

481 N D N P L I D V S R N K A L H G G N F Q

1501 GGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCATCCATTGGCAA

501 G T P I G V S M D N T R L A I A S I G K

1561 GCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTTTGCCTTC

521 L M F A Q F S E L V N D F Y N N G L P S

1621 AAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAATCGC

541 N L S G G R N P S L D Y G F K G A E I A

1681 CATGGCATCTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGTCCA

561 M A S Y C S E L Q F L A N P V T N H V Q

1741 GAGTGCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAGGAAAAC

581 S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T

1801 AGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTTGGTTGCGCTTTGTCA

601 A E A V D I L K L M S S T F L V A L C Q

1861 GTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAGGAACACTGTGAAGAACACGGTGAG

621 S I D L R H L E E N L R N T V K N T V S

1921 CCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAGGTT

641 Q V A K R T L T T G V N G E L H P S R F

1981 CTGTGAGAAGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGACGA

661 C E K D L L K V V D R E Y V F A Y I D D

2041 CCCCTGCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAACATGC

681 P C S A T Y P L M Q K L R E V L V E H A

2101 TTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTTCCAAAAGATTGGAGC

701 L T N G E S E K N A S T S I F Q K I G A

2161 TTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGCAAT

721 F E E E L K A L L P K E V E S A R S A I

2221 TGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTTGTA

741 E S G N A A V P N R I A E C R S Y P L Y

2281 CAAGTTTGTGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTCACC

761 K F V R E E L G G E Y L T G E K V R S P

2341 GGGCGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCGACCCAAT

781 G E E C D K V F Q A I C Q G K I I D P I

2401 TCTGGGTGCCTCGA

801 L G A S

图3-11 大果水晶梨原品种*pal*2序列和翻译

Fig. 3-11 *pal*2 and its amino acid sequence of normal *Suisho* pear

利用DNAMAN软件对大果水晶梨原品种*pal*2基因序列进行限制性内切酶酶切位点进行分析。结果表明，在识别序列长度≥6 bp的116种限制性内切酶中，

65种酶有1个以上的酶切位点，分别是：AccIII（1, 905），AclI（1, 864），AhaIII

（1, 501），AlwNI(1, 1375)，ApaBI(1, 2214)，AsuII(1, 825)，BamHI(1, 1318)，BbvII(1, 1824)，BclI(1, 1201)，BglII(1, 910)，Bpu1102I(1, 1746)，Bsc91I(1, 1824)，BsmI(2, 2131, 2264)，Bsp1407I(1, 2277)，BspHI(1，

100），BspMI(1, 2253)，BspMII(1, 905)，BstD102I(1, 2226)，BstEII(1，

2334），BstXI(3, 1132，1843, 2153)，ClaI(2, 1458, 1866)，Csp45I(1, 825)，DraI(1, 501)，DrdI(1, 110)，Ecl136II(1, 124)，Eco31I(1, 1115)，Eco47III

（1, 2181），Eco57I(3, 1191，1824, 248)，EcoICRI(1, 124)，EcoNI(2, 266, 1056)，EcoRV(1, 1816)，EspI(1, 1746)，HindIII(1, 1005)，HpaI(1，

1768），MfeI(3, 1027，1509, 2217)，NcoI(2, 1521, 1680)，NheI(1, 1141)，NsiI(1, 326)，PacI(1, 511)，PstI(4, 1329，1707，2048, 2239)，PvuII(2, 1250, 1802)，SacI(1, 126)，SapI(1, 2163)，SciI(1, 2412)，SstI(1, 126)，StuI(2, 955, 1478)，VspI(2, 340, 507)，XhoI(1, 2410)，XmnI（1, 1395）。

大果水晶梨突变体的*pal*2序列及其翻译的肽链为：

1 CTTGGATGAGGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGTGAAGCTCGGCGG

1 L D E V K R M V A E Y R K P V V K L G G

61 AGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCACTCATGACACCGGGGTCAAGGT

21 E S L T I S Q V A A I A T H D T G V K V

121 TGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGGGTCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAG

41 E L S E S A R A G V K A S S D W V M D S

181 CATGGGCAAAGGGACTGACAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCG

61 M G K G T D S Y G V T T G F G A T S H R

241 GAGAACAAAGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGGTAAGCTAAACTTTACCGA

81 R T K Q G A A L Q K E L I R

302 ACATCCATTTACAGTTCCTAATGCATGTCGATATTTTATTAATATATATACTAACATACG

362 GTCACACACAAAGTTAATTGAGCGAATAATTTTGGACTAATTATTTTGGACCAATTACTG

422 TAGTTAATTAGTGTGCATATATCAAACTCTTAACTTTACACAGATACGTGCTGTTATAAT

482 TCACTTAAAAATATATTTTTAAAAATTAATTAAGCTAATCATTTTGGACAAATTAACCAA

542 TTACGGTAGTTAATTTGAAGCTACCAACTTGCTACTTTTAGCTGCTTATATCTATAAATT 602 CTTGTTGGAGTTGGACTTTTTTTTTTCTGAACCCTTAATAATTTTGAATTATTGTCAAAT 662 TATGGCTTCTAATTATGCTTTAATTTTCTTGATTCTTGAACGCTGGTGTGTTTGGAAGTG

220 F L N A G V F G S

722 CTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACATCAAGCAACTAGAGCAGCTATGTTGGTCAGAA

240 A T E S G H T L P H Q A T R A A M L V R

782 TCAACACACTCCTCCAAGGCTACTCTGGCATAAGATTCGAAATCTTGGAAGCCATCACCA

260 I N T L L Q G Y S G I R F E I L E A I T

842 AGTTCTTGAACAACAACGTCACTCCATGCTTGCCCCTACGCGGTACTATTACCGCCTCCG

280 K F L N N N V T P C L P L R G T I T A S

902 GAGATCTTGTCCCGCTATCCTACATTGCCGGATTACTCACCGGCAGGCCTAATTCCAAAG

300 G D L V P L S Y I A G L L T G R P N S K

962 CAGTCGGACCAAATGGGCAGACCCTCAGTGCCTCAGAAGCTTTTGAGCTAGTAGGGATCA

320 A V G P N G Q T L S A S E A F E L V G I

1022 ATTGCGGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAGGGTTAGCTCTTGTGAACGGCACTGCTG

340 N C G F F E L Q P K E G L A L V N G T A

1082 TTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGCGTTGCTAGCGG

360 V G S G L A S T V L F E T N I L A L L A

1142 AGATTTTATCAGCGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCGGAGTTTACTGATCACT

380 E I L S A I F A E V M Q G K P E F T D H

1202 TGACGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTATGGAACATA

400 L T H K L K H H P G Q I E A A A I M E H

1262 TTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGCAGGATCCCCTGC

420 I L D G S S Y V K A A K K L H E Q D P L

1322 AGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCTGGGACCTCAAA

440 Q K P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q

1382 TTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTCAGTTAATGACA

460 I E V I R F S T K S I E R E I N S V N D

1442 ACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCAACTTCCAGGGGACCC

480 N P L I D V S R N K A L H G G N F Q G T

1502 CAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCATCCATTGGCAAGCTCATGT

500 P I G V S M D N T R L A I A S I G K L M

1562 TTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTTTGCCTTCAAATCTGT

520 F A Q F S E L V N D F Y N N G L P S N L

1622 CAGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCAT

540 S G G R N P S L D Y G F K G A E I A M A

1682 CTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGTCCAGAGTGCTG

560 S Y C S E L Q F L A N P V T N H V Q S A

1742 AGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAGGAAAACAGCTGAAG

580 E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T A E

1802 CTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTTGGTTGCGCTTTGTCAGTCCATCG

600 A V D I L K L M S S T F L V A L C Q S I

1862 ATTTGAGGCATTTGGAGGAGAACTTGAGGAACACTGTGAAGAACACGGTGAGCCAAGTAG

620 D L R H L E E N L R N T V K N T V S Q V

1922 CAAAGAGGACTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAGGTTCTGTGAGA

640 A K R T L T T G V N G E L H P S R F C E

1982 AGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGACGACCCCTGCA

660 K D L L K V V D R E Y V F A Y I D D P C

2042 GTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAACATGCTTTGACAA

680 S A T Y P L M Q K L R E V L V E H A L T

2102 ATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGG

700 N G E S E K N A S T S I F Q K I G A F E

2162 AAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGCAATTGAGAGCG

720 E E L K A L L P K E V E S A R S A I E S

2222 GAAATGCTGCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTTGTACAAGTTTG

740 G N A A V P N R I A E C R S Y P L Y K F

2282 TGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTCACCGGGCGAGG

760 V R E E L G G E Y L T G E K V R S P G E

2342 AGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCGACCCAATTCTGGGTG

780 E C D K V F Q A I C Q G K I I D P I L G

2402 CCTCGAGGGT

800 A S R

图3-12 大果水晶梨突变体的*pal*2序列和翻译

Fig. 3-12 *pal*2 and its amino acid sequence of mutant *Suisho* pear

对大果水晶梨突变体*pal*2基因序列进行限制性酶切分析。在识别序列长度≥6 bp的116种限制性内切酶中，找到65个酶切位点，分别是：AccIII（1, 897），AhaIII（1, 500），AlwNI（1, 1367），ApaBI（1, 2206），AsuII（1, 817），BamHI

（1, 1310），BbvII(1, 1816)，BclI(1, 1193)，BglII(1, 902)，Bpu1102I(1, 1738)，Bsc91I(1, 1816)，BsmI(2, 2123, 2256)，Bsp1407I(1, 2269)，BspHI

（1, 99），BspMI(1, 2245)，BspMII(1, 897)，BstD102I(1, 2218)，BstEII

（1, 2326），BstXI(3, 1124，1835, 2145)，ClaI(2, 1450, 1858)，Csp45I

（1, 817），DraI(1, 500)，DrdI(1, 109)，Ecl136II(1, 123)，Eco31I(1, 1107)，Eco47III(1, 2173)，Eco57I(3, 1183，1816, 247)，EcoICRI(1, 123)，EcoNI(2, 265, 1048)，EcoRV(1, 1808)，EspI(1, 1738)，HindIII(1, 997)，HpaI(1, 1760)，MfeI(3, 1019，1501, 2209)，NcoI(2, 1513, 1672)，NheI

（1, 1133），NsiI(1, 325)，PacI(1, 510)，PstI(4, 1321，1699，2040, 2231)，PvuII(2, 1242, 1794)，SacI(1, 125)，SapI(1, 2155)，SciI(1, 2404)，SstI

（1, 125），StuI(2, 947, 1470)，VspI(2, 339, 506)，XcmI(1, 801)，XhoI

（1, 2402），XmnI（1, 1387）。

#### 3.2.3.2 大果水晶梨及其褐色果皮突变体*pal*2外显子序列比较

将大果水晶梨及其褐色果皮突变体的*pal*2基因的外显子进行比对，结果如图3-13所示。原品种和突变体的外显子的一致性达到99%以上，在相对应的位点上有8个位点碱基不同。其中2处原品种*pal*2基因的碱基为T，在突变体的同样位置碱基为C；1处原品种*pal*2基因的碱基为C，在突变体的同样位置碱基为A；3处原品种*pal*2基因的碱基为C，在突变体的同样位置碱基为T；2处原品种*pal*2基因的碱基为A，在突变体的同样位置碱基为T。这些位点可能是单核苷酸多态性位点，也可能是突变的位点。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 原品种外显子 | CTTGGATGAGGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGTGAAGCTCGGCGG | 60 |
| 突变体外显子 | CTTGGATGAGGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGTGAAGCTCGGCGG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 60 |
| 原品种外显子 | AGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCACTCATGACACCGGGGTCAAGGT | 120 |
| 突变体外显子 | AGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCACTCATGACACCGGGGTCAAGGT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 120 |



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 原品种外显子 | TGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGGGTCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAG | 180 |
| 突变体外显子 | TGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGGGTCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 180 |
| 原品种外显子 | CATGGGCAAAGGGACTGACAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCG | 240 |
| 突变体外显子 | CATGGGCAAAGGGACTGACAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 240 |
| 原品种外显子 | GAGAACAAAGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGATTCTTGAACGCTGGAGT | 300 |
| 突变体外显子 | GAGAACAAAGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGATTCTTGAACGCTGGTGT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\* | 300 |
| 原品种外显子 | GTTTGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACACCAAGCAACAAGAGCAGCCAT | 360 |
| 突变体外显子 | GTTTGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACATCAAGCAACTAGAGCAGCTAT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\* \*\* | 360 |
| 原品种外显子 | GTTGGTCCGAATCAACACACTCCTCCAAGGCTACTCCGGCATAAGATTCGAAATCTTGGA | 420 |
| 突变体外显子 | GTTGGTCAGAATCAACACACTCCTCCAAGGCTACTCTGGCATAAGATTCGAAATCTTGGA  \*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 420 |
| 原品种外显子 | AGCCATCACCAAGTTCTTGAACAACAACGTTACTCCATGCTTGCCCCTACGCGGTACTAT | 480 |
| 突变体外显子 | AGCCATCACCAAGTTCTTGAACAACAACGTCACTCCATGCTTGCCCCTACGCGGTACTAT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 480 |
| 原品种外显子 | TACCGCCTCCGGAGATCTTGTCCCGCTATCCTACATTGCCGGATTACTCACCGGCAGGCC | 540 |
| 突变体外显子 | TACCGCCTCCGGAGATCTTGTCCCGCTATCCTACATTGCCGGATTACTCACCGGCAGGCC  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 540 |
| 原品种外显子 | TAATTCCAAAGCAGTCGGACCAAATGGGCAGACCCTCAGTGCCTCAGAAGCTTTTGAGCT | 600 |
| 突变体外显子 | TAATTCCAAAGCAGTCGGACCAAATGGGCAGACCCTCAGTGCCTCAGAAGCTTTTGAGCT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 600 |
| 原品种外显子 | AGTAGGGATCAATTGCGGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAGGGTTAGCTCTTGTGAA | 660 |
| 突变体外显子 | AGTAGGGATCAATTGCGGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAGGGTTAGCTCTTGTGAA  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 660 |
| 原品种外显子 | CGGCACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGC | 720 |
| 突变体外显子 | CGGCACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGC  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 720 |
| 原品种外显子 | GTTGCTAGCGGAGATTTTATCAGCGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCGGAGTT | 780 |
| 突变体外显子 | GTTGCTAGCGGAGATTTTATCAGCGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCGGAGTT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 780 |
| 原品种外显子 | TACTGATCACTTGACGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAAT | 840 |
| 突变体外显子 | TACTGATCACTTGACGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAAT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 840 |
| 原品种外显子 | TATGGAACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGCA | 900 |
| 突变体外显子 | TATGGAACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGCA  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 900 |
| 原品种外显子 | GGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCT | 960 |
| 突变体外显子 | GGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 960 |

原品种外显子GGGACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTC 1020

突变体外显子GGGACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTC 1020



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 原品种外显子 | \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*  AGTTAATGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCAACTT | 1080 |
| 突变体外显子 | AGTTAATGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCAACTT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1080 |
| 原品种外显子 | CCAGGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCATCCATTGG | 1140 |
| 突变体外显子 | CCAGGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCATCCATTGG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1140 |
| 原品种外显子 | CAAGCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTTTGCC | 1200 |
| 突变体外显子 | CAAGCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTTTGCC  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1200 |
| 原品种外显子 | TTCAAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAAT | 1260 |
| 突变体外显子 | TTCAAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAAT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1260 |
| 原品种外显子 | CGCCATGGCATCTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGT | 1320 |
| 突变体外显子 | CGCCATGGCATCTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1320 |
| 原品种外显子 | CCAGAGTGCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAGGAA | 1380 |
| 突变体外显子 | CCAGAGTGCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAGGAA  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1380 |
| 原品种外显子 | AACAGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTTGGTTGCGCTTTG | 1440 |
| 突变体外显子 | AACAGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTTGGTTGCGCTTTG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1440 |
| 原品种外显子 | TCAGTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAGGAACACTGTGAAGAACACGGT | 1500 |
| 突变体外显子 | TCAGTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAACTTGAGGAACACTGTGAAGAACACGGT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1500 |
| 原品种外显子 | GAGCCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAG | 1560 |
| 突变体外显子 | GAGCCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1560 |
| 原品种外显子 | GTTCTGTGAGAAGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGA | 1620 |
| 突变体外显子 | GTTCTGTGAGAAGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGA  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1620 |
| 原品种外显子 | CGACCCCTGCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAACA | 1680 |
| 突变体外显子 | CGACCCCTGCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAACA  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1680 |
| 原品种外显子 | TGCTTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTTCCAAAAGATTGG | 1740 |
| 突变体外显子 | TGCTTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTTCCAAAAGATTGG  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1740 |
| 原品种外显子 | AGCTTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGC | 1800 |
| 突变体外显子 | AGCTTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGC  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1800 |
| 原品种外显子 | AATTGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTT | 1860 |
| 突变体外显子 | AATTGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTT  \*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\* | 1860 |
| 原品种外显子 | GTACAAGTTTGTGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTC | 1920 |

突变体外显子GTACAAGTTTGTGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTC 1920

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种外显子ACCGGGCGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCGACCC 1980

突变体外显子ACCGGGCGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCGACCC 1980

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种外显子 AATTCTGGGTGCCTCGA 1997

突变体外显子AATTCTGGGTGCCTCGAGGGT 2001

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

图3-13 大果水晶梨及其突变体*pal*2外显子基因的比对

Fig. 3-13 *pal*2 expressed region blast of the mutant and normal fruit

分别将其翻译得到的氨基酸序列进行比对（图3-14），原品种和突变体的

PAL2的氨基酸序列基本相同，只是扩增得到的突变体的氨基酸序列比原品种多一个氨基酸。同时说明序列中出现的碱基差异并不影响编码氨基酸的种类，属于同义突变或同义编码区单核苷酸多态性位点。

原品种蛋白 LDEVKRMVAEYRKPVVKLGGESLTISQVAAIATHDTGVKVELSESARAGVKASSDWVMDS 60

突变体蛋白 LDEVKRMVAEYRKPVVKLGGESLTISQVAAIATHDTGVKVELSESARAGVKASSDWVMDS 60

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 MGKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGAALQKELIRFLNAGVFGSATESGHTLPHQATRAAM 120

突变体蛋白 MGKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGAALQKELIRFLNAGVFGSATESGHTLPHQATRAAM 120

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 LVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNNVTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRP 180

突变体蛋白 LVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNNVTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRP 180

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 NSKAVGPNGQTLSASEAFELVGINCGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASTVLFETNILA 240

突变体蛋白 NSKAVGPNGQTLSASEAFELVGINCGFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASTVLFETNILA 240

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 LLAEILSAIFAEVMQGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAAKKLHEQ 300

突变体蛋白 LLAEILSAIFAEVMQGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYVKAAKKLHEQ 300

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 DPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF 360

突变体蛋白 DPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF 360

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 QGTPIGVSMDNTRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEI 420

突变体蛋白 QGTPIGVSMDNTRLAIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEI 420

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 AMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSTFLVALC 480

突变体蛋白 AMASYCSELQFLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSTFLVALC 480

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白 QSIDLRHLEENLRNTVKNTVSQVAKRTLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVDREYVFAYID 540

突变体蛋白 QSIDLRHLEENLRNTVKNTVSQVAKRTLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVDREYVFAYID 540

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白DPCSATYPLMQKLREVLVEHALTNGESEKNASTSIFQKIGAFEEELKALLPKEVESARSA 600

突变体蛋白DPCSATYPLMQKLREVLVEHALTNGESEKNASTSIFQKIGAFEEELKALLPKEVESARSA 600

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白IESGNAAVPNRIAECRSYPLYKFVREELGGEYLTGEKVRSPGEECDKVFQAICQGKIIDP 660

突变体蛋白IESGNAAVPNRIAECRSYPLYKFVREELGGEYLTGEKVRSPGEECDKVFQAICQGKIIDP 660

\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*\*

原品种蛋白ILGAS- 665

突变体蛋白ILGASR 666

\*\*\*\*\*

图3-14 大果水晶梨及其突变体PAL2的比对

Fig. 3-14 PAL2 blast of the mutant and normal fruit

阴影部分的序列为PAL活性位点；框中的序列为PAL标签序列

#### 3.2.3.3 大果水晶梨及其褐色果皮突变体*pal*2内含子序列比较

高等植物基因内含子的长度一般在60~1000个核苷酸，对组织特异性表达既有负调控作用，也有正调控作用[79]。除去转基因烟草sus3 5'-UTR基因的内含子，可以使其在花粉中的表达提高100倍[80]。而内含子增强基因表达的现象被称为内含子的增强效应[79]（IME），如玉米的*adh*1和*sh*1内含子使转基因玉米中报告基因的表达水平提高100倍[79]，AmCBL1基因5‘UTR内含子在基因表达中起增强的作用[81]。

将大果水晶梨及其褐色果皮突变体*pal*2基因的内含子进行比对（图3-15），两者的一致性达97.84%左右。原品种*pal*2基因内含子的AT含量是73.2%，突变体*pal*2基因内含子的AT含量75.9%，多于原品种的，并且AT含量均高于70%，符合内含子中AT含量高的特点[82]。

大果水晶梨原品种*pal*2的内含子与突变体相比，有1处发生G-C颠换和1处T-G颠换，且比突变体的长7个碱基。原品种比突变体内含子长的7个碱基序列为GATTCAA，其中GAT在原品种内含子中有3处重复，TCAA有3处重复，而突变体中均只有2处重复，推测突变体内含子序列的缩短可能是由于重复序列的缺失造成的。



图3-15 大果水晶梨及其突变体*pal*2内含子基因的比对

Fig. 3-15 *pal*2 introns blast of the mutant and normal fruit

#### 3.2.3.4 大果水晶梨PAL2的Th物信息学分析

大果水晶梨原品种和突变体的PAL2的氨基酸序列相同，均编码665 aa。通过ProtParam软件分析，PAL2的相对分子质量为72192.2，等电点为6.29，含量最丰富的4种氨基酸的种类、数量和比例分别为Leu（L），71，10.7%；Ala（A），60，9.0%；Ser （S），54, 8.1%和Gly （G），53, 8.0%。负电氨基酸数74，正电氨基酸数68，不稳定指数36.00，脂肪族系数91.98，亲水性平均数-0.165。用

Scanprosite对PAL2氨基酸序列进行结构分析显示，在158-174的氨基酸序列为GTITASGDLVPLSYIAG（图3-14），符合苯丙氨酸解氨酶标签序列的特征[87]，证明扩增得到的序列为苯丙氨酸解氨酶基因序列。通过序列比对发现，大果水晶梨原品种和突变体的PAL2的氨基酸序列中存在N60、G61、N180、D181、N182、

H196、HNQDV活性位点，这些活性位点与水稻、玉米的苯丙氨酸解氨酶活性位点相同（如图3-14）[89]，再次证明扩增得到的片段是苯丙氨酸解氨酶的序列。

利用ProtScale对PAL2进行疏水性预测（图3-16），结果发现此多肽链中含亲水氨基酸381个，疏水氨基酸274个，亲水氨基酸多于疏水氨基酸，整体表现亲水性。



图3-16 大果水晶梨原品种PAL2蛋白质的疏水性预测

Fig. 3-16 Predicted hydropathy/hydrophilicity plot of PAL2 from normal *Suisho* pear

利用TMHMM Server v.2.0对PAL2氨基酸序列的跨膜结构域进行预测，结果显示，大果水晶梨PAL2肽链片段不存在跨膜结构域，都存在于细胞膜内侧的细胞质中（图3-17）。



图3-17 大果水晶梨PAL2蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 3-17 Predicted transmembrane segments of PAL2 from normal*Suisho* pear

利用SOPMA在线工具预测大果水晶梨PAL2的二级结构（图3-18），发现在PAL2的二级结构中α-螺旋占56.84%，随机卷曲占29.92%，延伸链占7.07%，β-转角占6.17%。因此，α-螺旋和随机卷曲是PAL2多肽链中的主要结构元件，延伸链散布于整个蛋白质中。用SWISS-MODEL对原品种的PAL2氨基酸序列进行三维结构同源性建模（molecular homologous modeling），获得PAL2的3-D结构（图3-19）。



图3-18 大果水晶梨PAL2蛋白的二级结构预测

Fig. 3-18 Predicted secondary structure of PAL2 from normal*Suisho* pear



图3-19 大果水晶梨PAL2的三级结构

Fig. 3-19 The predicted tertiary structure of normal*Suisho* pear PAL2 protein

## 3.3 PAL的同源性比较与进化分析

分别将得到的大果水晶梨的PAL1、PAL2的氨基酸序列和GeneBank中其他品种梨（*Conference*）、烟草、甜樱桃等8种植物的PAL氨基酸序列在DNAMAN软件中进行同源性分析，得知大果水晶梨PAL1与水稻、柠檬（Q42667）、毛果杨（ACC63889）的PAL同源性较高，分别为94%、92%和89%。大果水晶梨PAL2与西洋梨品种（DQ230992）、甜樱桃（AF036948）、树莓（AA F40224）的PAL同源性较高，分别为98%、93%和89%。将上述树种的PAL氨基酸序列进行发育树分析，发现大果水晶梨PAL1 和水稻的亲缘关系较近（图3-20），而PAL2与西洋梨的亲缘关系较近（图3-21）。



图3-20 PAL1氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 3-20 Phylogenetic analysis of PAL 1amino acid sequence



图3-21 PAL2氨基酸序列的系统进化分析

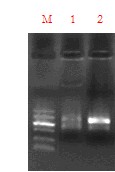
Fig. 3-21 Phylogenetic analysis of PAL2 amino acid sequence

## 3.4 总RNA的提取及*pal*基因的表达分析

### 3.4.1 大果水晶梨及其突变体果皮总RNA的提取

采用改良CTAB法提取大果水晶梨及其突变体果皮中的总RNA，取5μL稀释液在1%琼脂糖凝胶电泳上进行检测，稳压为150 V，电泳时间为15 min，电泳结果如图3-22所示。提取的RNA样品基本无蛋白质和DNA污染，28S与18S两条带清晰、整齐，说明RNA完整性良好，无降解。

28S



18S

图3-22 大果水晶梨及其突变体果皮的总RNA电泳图

Fig. 3-22 Extraction of total RNA from Suisho pear and its brownmutant peel M：DNA Marker 12；1：大果水晶梨原品种果皮RNA；2：大果水晶梨突变体果皮RNA

### 3.4.2 *pal*基因的表达分析

大果水晶梨*pal*1、*pal*2的表达分析采用相对定量PCR方法，分别将大果水晶梨采收期的*pal*1、*pal*2基因的实际表达量定义为1，大果水晶梨其他时期及其突变体各时期的基因表达量用实际表达量与该样本实际表达量的比值表示。测定结果表明，大果水晶梨及其突变体的*pa1*1表达有两个高峰——幼果期和果皮变褐期。大果水晶梨*pal*1的表达量在各个时期均高于突变体，说明*pal*1与褐色果皮形成呈负相关的趋势（图3-23）。

大果水晶梨*pal*2的表达量呈逐渐下降的趋势，突变体*pal*2的表达量在果点变褐期出现高峰，之后呈逐渐下降的趋势。除幼果期外，大果水晶梨*pal*2的表达量均低于突变体。说明*pal*2与褐色果皮形成呈正相关的趋势（图3-24）。

图3-23 大果水晶梨及其突变体不同时期果皮中*pal*1基因相对定量表达

Fig. 3-23 Expression of*pal*1of Suisho pear in different period

图3-24 大果水晶梨及其突变体不同时期果皮中*pal*2基因相对定量表达

Fig. 3-24 Expression of*pal2* of the mutant in different period

# 第四章 讨论与结论

## 4.1 讨论

### 4.1.1 自然突变是果树选择育种的基础

由于大多数果树树种的世代时间长以及遗传上的复杂性，通常采用无性繁殖如插条、芽接、枝接等方法保持所选的基因型。突变育种是果树育种的方法之一，可以将高度杂合性和无性繁殖相结合，在仅改变一、两种性状的情况下，获得优良的新品种。大果水晶梨褐色果皮突变体是在自然条件下突变形成的，并且是可以稳定遗传的。大果水晶梨褐色果皮突变体和大果水晶梨的遗传背景相同，在保持了大果水晶梨果肉脆嫩汁多，风味甜，具香气等优良性状的同时，褐色果皮的木栓化程度高，可以减少运输过程中因机械损伤导致的果实腐烂，延长保质期，提高商品性。

### 4.1.2 PAL与大果水晶梨褐色果皮形成的关系

在果实生长发育过程中，大果水晶梨褐色果皮突变体的果皮中PAL活性均高于原品种。说明大果水晶梨褐色果皮突变体的PAL酶催化木质素相关反应的能力总体高于原品种。虽然梨果实褐皮形成与木质素合成有关，但张智涛的研究结果显示，木质素合成关键酶PAL活性与果皮中木质素含量并未表现出密切相关的规律，再加上本研究发现大果水晶梨有2个PAL，且表达规律不同，说明大果水晶梨突变体果实褐皮形成机制较为复杂。

李晓峰[21]研究表明，锈酥果皮中PAL、4CL、CAD、POD4种酶活性均相对较高，其中PAL和4CL酶活性与木质素增量变化呈显著正相关，并且在果实生长发育各个时期，锈酥果皮中CCoAOMT（咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶）相对表达量均高于砀ft酥梨。衡伟[26]研究发现，在锈酥果皮褐色形成的关键时期，果皮木质素含量增加，其表皮层虽没有形成木栓层，但细胞木栓化程度较高。因此，PAL活性的升高可能只是影响大果水晶梨突变体果皮褐色产生的诸多因素之一。

PAL是木质素合成途径中的第一个关键酶。张智涛[66]研究认为，PAL活性的增加导致木质素合成的增加，引起褐色果皮的形成，但*pal*基因表达与木质素和褐色果皮形成之间的关系还未见报道。

李正国[62]发现，PAL活性和*pal*基因表达与脐橙果皮褐变之间有密切关系，

且不同PAL同工酶对果皮褐变的影响不同。在果皮褐变初期，PAL活性急剧上升。果皮一旦发生褐变，*pal*2基因的表达即迅速增强。此外，机械损伤可以强烈促进果皮褐变的发生，同时也强烈增强*pal*2基因的表达，但对*pal*6基因表达的增强作用要弱得多。苯丙氨酸解氨酶基因是一个多基因家族，家族成员的数目因物种而异，且不同家族成员的表达模式也不相同。

本研究发现，*pal*2基因表达量与大果水晶梨突变体褐色果皮的形成呈正相关，而*pal*1基因表达量与突变体褐色果皮的形成呈负相关。*pal*基因表达的调控机制有待进一步研究。

### 4.1.3 大果水晶梨褐色果皮突变体形成原因分析

大多数高等植物基因含有内含子，不同基因的内含子数目不同，5’的剪辑位点具有AG/GTAAGT的保守序列，3’剪辑位点具有TGCAG/G的序列。但是植物内含子中分枝位点（位于3’剪辑位点上游）序列的保守性较弱。长期以来，人们普遍认为内含子没有功能。但是随着分子生物学技术的发展，发现内含子对基因表达的调控不仅具有正调控作用，也存在负调控作用。如番茄蛋白酶抑制剂II基因的内含子TPI能增强基因gusA的表达活性[79]，水稻oSBP-73基因的内含子序列能增强基因oSEBP-89弱启动子的启动表达活性。除去转基因烟草sus3 5'-UTR基因的内含子，可以使其在花粉中的表达提高100倍[80]。但Chee[93]发现菜豆蛋白基因的表达水平与内含子的存在与否没有必然的关系。

大果水晶梨及其突变体的*pal*2基因内含子中均含有TATA-box、CAAT-box调控元件，说明内含子与*pal*2基因的转录调控有关。丁红梅[84]认为内含子具有TATA盒样结构（TATAA）和CA盒样结构（CAAT）可能具有启动子的功能，如玉米泛素基因的第一个内含子能够启动gusA的表达。此外，在许多基因的内含子中都发现了转录调控元件，其中大多为增强元件[83]。例如，Chang[85]等发现猪的MyHC（Myosin Heavy Chain）基因内含子中存在转录调控元件，可以通过调控转录的起始来增强基因的表达。虽然有些内含子含有一些类似增强子或其它顺式作用调控元件（TATA-box），对基因的表达起到了正调控作用，但是在提高基因表达上，内含子的作用机理不同于增强子[94]。原品种与内含子的调控元件之间没有差别，但基因的转录调控是否存在差异还有待进一步研究。

原品种和突变体*pal*2基因的内含子比较有1处发生G-C颠换。碱基G-C的颠换，可能是非编码区单核苷酸多态性位点，也可能与PAL表达有关的调控位点，如Okura研究发现，ESRot第1内含子中有T-C（PvII）和A-G（Xba）两个位点突变，其中A-G位点突变个体在腰部和腹部的脂肪沉积量比野生型个体分别高20％和9％；位点T-C突变也具有相同的影响趋势[86]。

已有研究结果表明内含子长度与基因表达呈负相关[82]。本试验结果表明原品种比突变体内含子长的7个碱基序列为GATTCAA，其中GAT在原品种内含子中有3处重复，TCAA有3处重复，而突变体中均只有2处重复，推测突变体内含子序列的缩短可能是由于重复序列的缺失造成的。

课题组已有的研究及本研究发现，褐色果皮突变体主要是在果皮表面形成了加厚的木栓层，PAL活性与褐色果皮的形成有关，且*pal*2的表达与褐色果皮的形成呈正相关。扩增的到的大果水晶梨及其褐色果皮突变体的*pal*2基因序列基本相同，编码的氨基酸序列相同，三维结构一致。但褐色果皮突变体的内含子序列与原品种不同。上述结果表明，在自然条件下，可能由于大果水晶梨*pal*2基因的内含子碱基的突变或者缺失导致调控元件的积极响应，引起PAL表达的增强，使得木质素合成增加，是导致褐色果皮形成的重要原因之一。

木质素合成途径中还有诸如4CL（4-香豆酸辅酶A连接酶）、CAD（肉桂醇脱氢酶）、CCoAOMT（咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶）、POD（过氧化物酶）等几种关键酶，它们在大果水晶梨褐色果皮突变体形成中的作用还有待进一步研究。

## 4.2 结论

1.大果水晶梨PAL家族至少有两个成员，即PAL1和PAL2。

2.大果水晶梨果皮*pal*1与褐色果皮的形成呈负相关的趋势；除未形成褐色果点的幼果期外，*pal*2与褐色果皮的形成呈正相关的趋势。

3.大果水晶梨突变体*pal*2的内含子碱基的突变和长度变短，引起调控元件的积极响应，使得*pal*2的表达增强，从而促进木质素的合成，是导致褐色果皮形成的重要原因之一。

参考文献

[1] Koukol J, Conn EE. The metabolism of aromatic compounds in high plant,Ⅳ. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Herdeum vulagure[J]. Journal of Biology and Chemistry, 1961, 236: 2692-2698.

[2]程水源， 陈昆松， 刘卫红等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树

学报, 2003, 20(5): 351-357.

[3]江昌俊， 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展（综述）[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(5)：425-430.

[4]马俊彦， 杨汝德， 敖立刚. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展[J]. 现代食品科技，

2007, 23(7): 71-74.

[5] Laura Jane M, Santiago, Ricardo Louro, et al. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus Roxb*. and their induction by copper sulphate [J]. Annals of Botany, 2000, 86(5): 1023.

[6] Camm EL, Towers GHN. Review article: phenylanine ammonia lyase [J]. Phytochemisty, 1973, 12: 961-973.

[7]徐晓梅， 杨曙光。 苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31):

15115-15119.

[8] Cunha A. Purification, characterization and induction of L-Phenylalanine ammonial-lyase in

*Phaseolus vulgaris*[J]. European Journal of Biochemistry, 1988, 178(1): 243-248.

[9]欧阳光察，应初衍. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究Ⅳ水稻、小麦的纯化及基本特性[J]. 植物生理学报, 1985, 11(2)：204-214.

[10] Subramaniam R, Reinold S, Molitor EK, et al. Structure, inheritance and expression of hybrid poplar(*Populus trichocarpa*×*Populus deltoids*) phenylalanine ammonia-lyse genes[J]. Plant Physiology, 1993, 102: 71-83.

[11] Hanson K R, Havir E A. Phenylalanine Ammonia-Lyase[J]. The Biochemistry of Plants, 1981, 7: 578-621.

[12] Schuster B, Retey. Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of Phenylalanine ammonia-lyase, Side-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum L*.)[J]. FEBS Lett, 1994, 349: 252-254.

[13]杨顺楷， 杨亚力， 杨维力. 苯丙氨酸解氨酶反应机理研究新进展[J]. 生物加工过程，

2004, 2(4): 1-5.

[14] Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, et al. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements[J]. EMBO Journal, 1989, 8(6): 1641-1648.

[15] Cramer CL, Edwards K, Dron M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12(4): 367-383.

[16] Yeo Y S, Lee S W, Kim Y H, et al. Restriction mapping of phenylalanine ammonia-lyase gene family in tomato(*Lycopersicon esculentum*)[J]. RDA Journal of Agricultural Science, 1994, 36(2): 187-192.

[17] Joosh J, Hahlbrock K. Phenylalanine ammonia-lyase in potato(*Solanum tuberosum L*.): genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 204(2): 621-629.

[18] Minam I E, Ozek I Y, Matsuoka M. Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants[J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 185: 19-25.

[19] Bolwell GP, Bell JN, Cramer CL, et al. Phenylalanine ammonia-lyase from Phaseolus vulgaris[J]. European Journal Biochemistry, 1985, 149: 411-419.

[20] Whetten RW, Sederoff RR. Phenylalanine Ammonia-Lyase from Loblolly Pine[J]. Plant physiol, 1992, 98: 380-386.

[21]李晓峰，李雪，贾兵等. ‗砀ft酥梨‘褐皮芽变木质素含量及相关酶活性与CCoAOMT 表

达量分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(5): 828-836.

[22] Shufflebttom D, Bevan MW. Expression and functional domains of a phenylalanine ammonia-lyase promoter[A]. Annual report, AFRC institute of plant science research [C]. John Innes Institute and Sainsbury Lab, 1989, 57-60.

[23] Sablowski RWM. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropaniod biosynthetic genes[J]. EMBO J, 1994, 13: 128-137.

[24]滕元文， 沈玉英. 砂梨果皮锈斑成因及解决对策[J]. 中国南方果树, 2005, 34(3): 52-56.

[25]刘剑锋，李国怀，彭抒昂等. 秋子梨的果皮结构与果实的耐贮性[J]. 园艺学报, 2007, 34(4)：10073-1010.

[26]衡伟， 贾兵， 叶振风等. 砀ft酥梨褐皮芽变品系锈酥果皮结构分析[J]. 中国果树, 2011，

5: 20-22.

[27] Fahn Al. Plant Anatomy Academic Press [D]. 1977, 402.

[28]鞠志国. 酚类物质与梨果实品质的研究进展[J]. 莱阳农学院学报, 1988, 5(3)：59-65.

[29]林真二. 果树栽培生理新书[D]. 东京： 朝仓书店, 1960。

[30]王燕，刘卫红，杜何为等. 底物、末端产物对离体银杏叶苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J]. 果树学报, 2004, 21(5)：443-446.

[31]贺立红， 张进标， 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 7: 31-34.

[32] Pellegrini L, Rohfritsch O. Phenylalanine Ammonia-Lyase in Tobacco[J]. Plant Physiol, 1994, 106: 877-886.

[33]高雪. 植物苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 现代农业科技, 2009, 1: 30-33.

[34] David JA, Fort heringham LG, liu WG, et al. Large-scale unnatural amino acid synthesis[J]. Speciality Chemicals, 1999, Reprinted.

[35]金庆超， 叶华智， 张敏. 苯丙氨酸解氨酶活性与玉米对纹枯病抗性的关系[J]. 四川农业

大学学报, 2003, 21(2): 116-118.

[36] Rickey TM, Belknapk WR. Comparison of the expression of several stress responsive geges in potato tubes[J]. Plant Molecular Biology, 1961, 16(6): 1009-1018.

[37] Rubery R H, Northcote D H. Site of phenylalanine ammonia-lyase activity and synthesis of

Lignin during xylem differention[J]. Nature(London), 1968, 210: 1230-1234.

[38] Fukuda H, et al. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*[J]. Plant Physiology, 1980, 65: 57-60.

[39]余沛涛， 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)在细胞分化中的作用[J]. 植物生理学报，

1987, 13(1): 14-19.

[40] Nakashima J, Awano T, Takabe K, et al. Immunocy tochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamylaleoho dehydrogenase in differentiating trachearyel ements derived from *Zinnia mesophyll* cells[J]. Plant Cell Physiology, 1997, 38(2): 113-123.

[41]余沛涛， 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶(PAL)在细胞分化中的作用[J]. 植物生理学报，

1986, 12(1): 37-38.

[42]宋婷婷，沈红香，姚允聪等. 苹果属观赏海棠McCHS 基因的克隆及实时定量表达[J]. 园艺学报, 2010, 37(2)：269-276.

[43]周爱琴，祝军，生吉萍等. 苹果花青素形成与PAL活性及蛋白质含量的关系[J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(3)：97-99.

[44]刘艳娜. 苹果属观赏海棠McMYB16、McMYB12的克隆及表达分析[D]. 秦皇岛：河北科技师范学院, 2012。

[45] Neisha C. Biosynthesis pathway of aromatic compounds[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1960, 11: 15.

[46]应初衍， 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究Ⅴ. PAL 活性与尾穗苋黄化苗中红素积累

的相关性[J]. 植物生理学报, 1984, 10(3): 241-246.

[47]尚庆茂，张志刚. 亚精胺对黄瓜幼苗灰霉病的油糠作用[J]. 应用生态学报, 2008, 19(4)：825-830.

[48]李默怡， 余龙江， 陈超. 黑曲霉及其多糖组分诱导红豆杉叶子产生抗病反应之比较[J].

植物研究, 2003, 1: 72-76.

[49] Hartwing VA, Phillips DA. Release and modification of mod gene inducing flavonoids from alfalfa seeds[J]. Plant Physiol, 1991, 95: 804-807.

[50] Kozuku EN, Kozukue E, Kishiguchim, et al. Change in the contents of phenolic substances, phenylalanine ammonia-lyase(PAL) and tyrosine ammonia-lyase(TAL) accompanying chilling injury of eggplant fruit[J]. Scientia Horticulture, 1979, 11(1): 51-59.

[51]张江涛， 段光明， 于泽英. 苯丙氨酸解氨酶（PAL）与水稻抗稻瘟病的关系[J]. 植物生理

学报, 1987, 13(6): 34-37.

[52]王雅平. 小麦抗赤霉病性的生化研究及其机制探讨[J]. 作物学报, 1994, 20(3)：327-333.

[53]欧阳光察. 稻瘟病菌孢子和毒素对水稻抗病性的诱导与苯丙烷类代谢途径的关系[J].

植物生理学通讯, 1987, 13(4): 40-42.

[54]吴龙火，李庆，杨群芳等. 禾谷缢管蚜取食5种ft羊草的诱导性抗性[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1)：102-107.

[55] Hartley SE, Firn RD. Phenolic biosynthesis leaf damage and insect herbivory in birch(*Betula pendula*)[J]. Journak of Chemistry and Ecolofy, 1989, 15: 275-283.

[56] Cheng GW, Breen PJ. Activity of phenylalanine ammonia-lyase and concentration of anthocyanins and Phenolics in developing strawberry fruit[J]. Journal of the American

Society for Horticul, 1991, 116(5): 865-869.

[57] Kataoka L, Kubo Y, Svgiura A, et al. Changes in L-PAL activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1983, 52(3): 273-279.

[58] Viljoen MM, Hoysame RM. Biochemical and regulatory as spects of anthocyanin synthesis in apple and pears[J]. Journal of the Southern African Society for Horticultural Sciencess, 1995, 5(1): 1-6.

[59]鞠志国， 苗德全. 莱阳茬梨苯丙氨酸解氨酶基本特性的研究[J]. 莱阳农学院学报, 1988，

5(1): 1-5.

[60] Blankenship SM, Vnrath CR. PAL and dethylenecontent during maturation of Red and Golen Delicious apples[J]. Phyto Chemistry, 1987, 27(4): 1001-1003.

[61]赵宗方， 赵勇， 吴桂法. 果实花青素含量与PAL 活性关系的研究[J]. 园艺学报, 1994，

21(2): 199-200.

[62]李正国，高雪，樊晶等. 奉节脐橙果实苯丙氨酸解氨酶活性及其基因表达与果皮褐变的关系[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3)：381-386.

[63]刘志浩. 鸭梨苯丙氨酸解氨酶基因cDNA片段的克隆与序列分析[D]. 河北： 河北农业大学, 2010。

[64]张士鸿. 砀ft酥梨果实PAL酶学特性的研究及PAL基因克隆[D]. 安徽：安徽农业大学, 2010。

[65]孙百灵， 曲柏宏， 李伟等. 苹果梨果实着色相关酶基因片段克隆及表达分析[J]. 吉林农

业大学学报, 2012, 34(4): 423-427.

[66]张智涛. 大果水晶梨褐色突变体木栓层形成及其相关酶研究[D]. 秦皇岛：河北科技师范学院, 2011。

[67]李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京： 高等教育出版社, 2000。

[68]杨晓玲， 于凤鸣， 郭守华等. 植物生理生化实验[M]. 北京： 中国农业科技出版社, 2002。

[69]宋立琴. 桃果实成熟期基因的SSR标记与定位[D]. 秦皇岛： 河北科技师范学院, 2010。

[70]葛文雅，惠伟，闫洪波等. 鸭梨PbHCT3基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(5): 0871-0875.

[71] Dondini L, Pierantoni L, Ancarani V, et al. The inheritance of the red color character in European pear (*Pyrus communis*) and its map position in the mutated cultivar‗Max Red Bartlett'[J]. Plant Breeding, 2008, 127(5): 524-526.

[72]张士鸿， 金青， 樊洪泓等. 砀ft酥梨果实苯丙氨酸解氨酶基因cDNA 克隆及序列分析

[J]. 激光生物学报, 2010, 19(1): 97-103.

[73] Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 6: 5905-5909.

[74]宋伟， 王彩虹， 田义轲等. 梨果实褐皮性状的SSR 标记[J]. 园艺学报, 2010, 37(8) :

1325-1328.

[75] Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 533.

[76]黄颖. DWF4影响茉莉素信号及其内含子调控基因表达的研究[D]. 湖南： 湖南农业大学，

2009.

[77] Callis J, Fromm M, Walbot V, et al. Introns increase gene expression in cultured maize cells[J]. Genes Dev, 1987, 1(10): 183-200.

[78] Pellegrini L, Rohfritsch O. Phenylalanine Ammonia-Lyase in Tobacco[J]. Plant Physiol, 1994, 106: 877-886.

[79] 谢先芝， 吴乃虎. 高等植物基因的内含子[J]. 科学通报, 2002, 47(10): 731-738.

[80] Callis J, Fromm M, Walbot V. Intron inereases gene expression in cultured maize cells[J]. Genes Dev, 1987, 1: 1183-1200.

[81] Suan R N, et al. [J]. Plant Mol. Biol, 1993, 21: 895-906.

[82] 单耀军.内含子与序列间隔长度及基因表达量间关系的研究[D]. 保定： 河北大学, 2011。

[83] 王悦兵， 郎志宏， 黄大昉. 内含子对真核基因表达调控的影响[J]. 生物技术通报, 2008, 4: 1-4.

[84] 丁红梅， 邵根宝， 徐银学. 内含子与基因表达调控[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38: 50-53.

[85] Chang KC. iron[J]. Cell Mol, 2000, 21: 451-461.

[86] Okura T, Koda M, Ando F, et al. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution[J]. Int JObes Relat Metab Disord, 2003, 27: 1020-1027.

[87]曹福祥， 王猛， 龙绛雪. 马尾松苯丙氨酸解氨酶基因cDNA全长克隆与序列分析[J]. 湖

南师范大学自然科学学报, 2010, 33(1): 91-93.

[88]雷建军. 游离氨基酸和苯丙氨酸解氨酶活性与芥菜原生质细胞分化的关系[J]. 西南农业大学学报, 1991, 13(2)：157-159.

[89]王燕，张凤霞，朱俊等. 核桃苯丙氨酸解氨酶基因克隆与序列分析[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6)：622-626.

[90] Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19: 1720-1730.

[91]房婉萍， 张玥， 阮光兴等. 茶树CsH1 基因结构及其内含子信息分析[J]. 南京农业大学

学报, 2012, 35(4): 37-40.

[92]张东，滕元文. 红梨资源及其果实着色机制研究进展[J]. 果树学报, 2011, 28(5)：485-492.

[93] Chee P, Klassy R, Slightom J. Expression of a bean storage protein‗phaseolin minigene' in foreign plant tissues[J]. Gene, 1986, 41(1): 47-57.

[94]栾薇. 内含子及其在基因表达中的作用[J]. 云南农业科技, 2008，(增刊)：182-186.

[95]章霄云，郭安平，贺立卡等. 木质素生物合成及其基因调控的研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(3)：431-437.

[96] Campos R, Nonogaki H, Suslow T, et al. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 121: 429-438.

[97] Jens R, Florian K, Nikolaus A, et al. Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity[J]. Plant Physiol, 1997, 113: 175-179．

[98] Fu H, Kim S Y, Park W D. A potato Sus3 sucrose aynthase gene contains a conte dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects[J]. Plant Cell, 1995, 7: 1395-1403.

[99]张夏南，杨绍兰，王成荣等. ―黄金梨‖果实木质素合成途径相关酶基因的克隆及其在果实发育中的表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 38(增刊)：2469。

[100] Campos R, Nonogaki H, Suslow T, et al. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 121: 429-438.

[101]宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶基因（SmPAL1）的克隆及其功能初探[D]. 陕西： 陕西师范

大学, 2007.

[102] 高东饶. 高ft红景天苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及遗传转化[D]. 吉林: 吉林大学, 2006.

[103] Pierantoni L, Dondini L, Musacchi S, et al. Gene expression patterns underlying red skin colour in‗Max Red Bartlett ' (*Pyrus communis*) a‗Williams'bud mutation[J]. Acta Horticulturae, 2009, 814: 567-570.

# 发表论文和参加科研情况说明

在读期间发表的论文：

李义红（第一作者）《梨苯丙氨酸解氨酶基因的生物信息学分析》载于《安徽农业科学》2012年32 期

参研课题：

1.―大果水晶梨褐色果皮突变体PAL、MYB 基因的克隆与表达‖—河北省高等学校科学技术研究重点项目（项目编号：ZH2012005）

附 录

附录一：

表1 PAL酶活性的显著性检验

| 字母标记表示结果 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 处理 | 均值 | 5%显著水平 | 1%显著水平 |
| 突变体果点褐变期 | 0.0009 | a | A |
| 突变体幼果期 | 0.0008 | a | A |
| 原品种幼果期 | 0.0007 | ab | AB |
| 原品种果点褐变期 | 0.0005 | bc | ABC |
| 突变体果皮褐变期 | 0.0003 | c | BC |
| 原品种果皮褐变期 | 0.0003 | c | C |

表2 蛋白质含量的显著性检验

| 字母标记表示结果 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 处理 | 均值 | 5%显著水平 | 1%显著水平 |
| 突变体幼果期 | 3.7842 | a | A |
| 突变体果点褐变期 | 3.5105 | b | AB |
| 原品种果点褐变期 | 3.3162 | bc | BC |
| 原品种幼果期 | 3.0860 | c | CD |
| 突变体果皮褐变期 | 2.7705 | d | DE |
| 原品种果皮褐变期 | 2.6243 | d | E |

表3-3 PAL酶比活力的显著性检验

| 字母标记表示结果 |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 处理 | 均值 | 5%显著水平 | 1%显著水平 |
| 突变体果点褐变期 | 0.0002 | a | A |
| 原品种幼果期 | 0.0002 | a | A |
| 突变体幼果期 | 0.0002 | ab | A |
| 原品种果点褐变期 | 0.0001 | abc | A |
| 突变体果皮褐变期 | 0.0001 | bc | A |
| 原品种果皮褐变期 | 0.0001 | c | A |

附录二：

大果水晶梨原品种*pal*1的序列用引物Ⅰ扩增得到的序列：

5'-TATGGAACACATTTTAGCTGGAAGTGATTATGTAAAAGCAGCTGAGAA AGTGCATGAGATGGACCCTCTCCAGAAGCCAAAACAGGACAGGTATGCT CTTAGAACATCTCCCCAATGGTTGGGTCCACAGATTGAGGTGATCAGAGC AGCAACAAAGATGATTGAGAGGGAGATTAACTCAGTGAATGACAACCCT TTAATTGATGTCTCAAGAAACAAGGCATTACATGGCGGAAACTTTCAGGG CACACCGATTGGTGTTGCCATGGACAACACCAGATTAGCCATTGCTGCAA TTGGAAAACTCATGTTTGCACAGTTCTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACA ACAATGGCTTGCCTTCAAATCTCACAGCAAGCAGCAATCCCAGCTTGGAT TATGGGTTCAAAGGTGCGGAAATCGCCATGGCGTCCTACTGCTCGGAGCT CCAATTCCTTGGCAACCCTGTCACAAACCATGTCCAGAGTGCAGAGCAAC ACAACCAAGATGTCAACTCCTTGGGATTGATTTCTTCGCGAAAAACCACC GAGGCGGTCGACATATTGAAGCTCATGTCATCCACATTCCTAGTTGCACT GTGCCAAGCTATTGATTTAAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAAGAGCACAG TGAAGACCACCGTGAGTCAGGTTGCCAAGAGAGTCCTCACCGTGGGCTTC AACGGCGAGCTTCACCCCTCTCGGTTCTGCGAAAAAGACCTCCTTAAGGT CGTCGACCGTGAGTATGTTTTCGCCTACATCGATGATCCTTGCAGTGCTAC ATATCCACTGATGCAGAAACTGAGGCATGTACTAGTTGAGCATGCATTGA GCAATGGTGACAG-3‘

大果水晶梨原品种*pal*2的序列

用引物Ⅱ扩增得到的序列：

5'-CTTGGATGAGGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGT GAAGCTCGGCGGAGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCA CTCATGACACCGGGGTCAAGGTTGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGG GTCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAGCATGGGCAAAGGGACTG ACAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCGGAGAACA AAGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGGTAAGCTAAACTTTA CCGAACATCCATTTACAGTTCCTAATGCATGTCGATATTTTATTAATATAT ATACTAACATACGGTCACACACAAAGTTAATTGAGCGAATAATTTTGGAC TAATTATTTTGGACCAATTACTGTAGTTAATTAGTGTGCATATATCAAACT CTTAACTTTACACAGATACGTGCTGTTATAATTCACTTAAAAATATATTTT TAAAAATTAATTAAGCTAATCATTTTGGACAAATTAACCAATTACGGTAG TTAATTTGAAGCTACCAACTTGCTACTTTTAGCTGCTTATATCTATAAATT CTTGTTGGAGTTGGACTTTTTTTTTTCTGAACCCTTAATAATTTTGAATTAT

TGTCAAATTATGGCTTCTAATTATGCTTTAATTTTCTTGATTCAGATTCTTG AACGCTGGTGTGTTTGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACA TCAAGCAACTAGAGCAGCTATGTTGGTCAGAATCAACACACTCCTCCAAG GCTACTCTGGCATAAGATTCGAAATCTTGGAAGCCATCACCAAGTTCTTG AACAACAACGTCACTCCATGCTTGCCCCTACGGGGCACGATCACCGCCTC TGGTGATCTTGTCCCGCTGTCCTACATTGCCGGCTTACTCACCGGCAGGCC AAACTCCAAAGCTGTCGGACCAAACGGTCAGACCCTCAATGCCTCTGAAG CTTTTGAGCTAGTAGGGATCAATTCTGGGTTTTTCGAGTTGCAGCCTAAAG AAGGGTTAGCTCTTGTGAACGGCACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCGTCCA CGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGCGTTGCTTGCAGAGATTTTGTCAG CGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAGCCGGAGTTTACTGATCACTTG ACGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTAT GGAACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTGAAAGCTGCTAAGAAGTTGC ATGAGCAGGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGA ACATCACCTCAGTGGCTAGGACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTACTCCAC CAAATCCATTGAGAGGGAAATCAACTCAGTTAATGACAACCCTTTGATCG ATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTGCACGGAGGCAACTTCCAGGGGACCCCA ATTGGAGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCCTCCATTGGGAA GCTCATGTTTGCGCAATTTTCCGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGG TTTGCCTTCAAATCTGTCCGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTT CAAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCATCTTATTGTTCCGAGCTGCAGTTCT CGCAA-3‘

用引物Ⅲ扩增得到的序列：

5'-TTAAAAGTTAATTAAACTAATAATTTTGCACCAATTACATCGATACGTG TTGTGACAATCAACCGGGACTTTCCGATCTCTAACTATACTGTAGTTGATT GTTGTTGAAGTAGCACCCTTGTTTTTAAGCCCTTAATTTTGGATTATTCAT CAAATTATGGCTTCTAATTGTGGCTTAATTTTCTTTGTTCAGATTCTTGAAC GCTGGAGTGTTTGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACACCA AGCAACAAGAGCAGCCATGTTGGTCCGAATCAACACACTCCTCCAAGGCT ACTCCGGCATAAGATTCGAAATCTTGGAAGCCATCACCAAGTTCTTGAAC AACAACGTTACTCCATGCTTGCCCCTACGCGGTACTATTACCGCCTCCGGA GATCTTGTTCCGCTATCCTACATCGCCGGATTACTCACCGGCAGGCCTAAT TCCAAAGCAGTCGGACCAACTGGGCAGACCCTCAGTGCCTCAGAAGCTTT TGAGCTAGTAGGGATCAATTGCGGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAG GGTTAGCTCTTGTGAACGGCACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGG TTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGCGTTGCTAGCGGAGATTTTATCAGCGA

TTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAACCGGAGTTTACTGATCACTTGACG CACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTATGGA ACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATG AGCAGGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAAC ATCACCTCAGTGGCTGGGACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCA AATCCATTGAGAGGGAGATCAACTCAGTTAATGACAACCCTTTGATCGAT GTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCAACTTCCAGGGGACCCCAAT TGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCATCCATTGGCAAGC TCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTT TGCCTTCAAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTC AAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCATCTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTC GCAAATCCGGTAACTAACCATGTCCAGAGTGCTGAGCAGCACAACCAAG ATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAGGAAAACGGCTGAAGCTGTT GATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTTGGTTGCGCTCTGTCAGTCC ATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAGGAACACTGTGAAGAACAC GGTGAGCCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAG CTTCACCCGTCAAGGTTCTGTGAGAAGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAG GGAGTATGTTTTTGCCTACATTGACGACCCCTGCAGTGCCACTTACCCATT GATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAACATGCTTTGACAAATGGC GAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTT CGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGG AGTGCAATTGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAAT GCAGGTCTTATCCCTTGTACAAGTTTGTGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAG TACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTCACCGGGCGAGGAGTGTGACAAGG TGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCGACCCAATTCTGGGTGCC TCGAGACTGATCGCTGCGTTGG-3‘

用引物Ⅳ扩增得到的序列：

5'-AGCTGCTAGAGTTGCATGAGCAGGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGG ATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCTGGGACCTCAAATTGAA GTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTCAGTTAA TGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCA ACTTCCAGGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCG ATTGCATCCATTGGCAAGCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAAT GACTTTTACAACAATGGTTTGCCTTCAAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCC TAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCATCCTATT GTTCTGAGCTGCAGTTTCTTGCAAATCCGGTAACTAACCATGTCCAGAGT

GCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAG GAAAACAGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTT GGTTGCGCTTTGTCAGTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAATTTGA GGAACACTGTGAAGAACACGGTGAGCCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAAC AACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAGGTTCTGTGAGAAGGATC TGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGACGACCCCT GCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAA CATGCTTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTT CCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAG AGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGCAATTGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCC AAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTTGTACAAGTTTGTGAGGG AGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTCACCGGG CGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCG ACCCAATTCTGGGTGCCTCGAGGG-3‘

大果水晶梨突变体*pal*1的序列

用引物Ⅰ扩增得到的序列：

5'-GGAACACATTTTAGCTGGAAGTGATTATGTAAAAGCAGCTGAGAAAGT GCATGAGATGGACCCTCTCCAGAAGCCAAAACAGGACAGGTATGCTCTTA GAACATCTCCCCAATGGTTGGGTCCACAGATTGAGGTGATCAGAGCAGCA ACAAAGATGATTGAGAGGGAGATTAACTCAGTGAATGACAACCCTTTAAT TGATGTCTCAAGAAACAAGGCATTACATGGCGGAAACTTTCAGGGCACAC CGATTGGTGTTGCCATGGACAACACCAGATTAGCCATTGCTGCAATTGGA AAACTCATGTTTGCACAGTTCTCTGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAAT GGCTTGCCTTCAAATCTCACAGCAAGCAGCAATCCCAGCTTGGATTATGG GTTCAAAGGTGCGGAAATCGCCATGGCGTCCTACTGCTCGGAGCTCCAAT TCCTTGGCAACCCTGTCACAAACCATGTCCAGAGTGCAGAGCAACACAAC CAAGATGTCAACTCCTTGGGATTGATTTCTTCGCGAAAAACCACCGAGGC GGTCGACATATTGAAGCTCATGTCATCCACATTCCTAGTTGCACTGTGCCA AGCTATTGATTTAAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAAGAGCACAGTGAAGA CCACCGTGAGTCAGGTTGCCAAGAGAGTCCTCACCGTGGGCTTCAACGGC GAGCTTCACCCCTCTCGGTTCTGCGAAAAAGACCTCCTTAAGGTCGTCGA CCGTGAGTATGTTTTCGCCTACATCGATGATCCTTGCAGTGCTACATATCC ACTGATGCAGAAACTGAGGCATGTACTAGTTGAGCATGCATTGAGCAATG GTGACAG-3‘

大果水晶梨突变体*pal*2的序列

用引物Ⅱ扩增得到的序列：

5'-CTTGGATGAGTGAAGCGTATGGTGGCGGAGTACAGAAAGCCGGTGGTG AAGCTCGGCGGAGAGAGCCTCACCATTTCCCAAGTTGCAGCAATAGCCAC TCATGACACCGGGGTCAAGGTTGAGCTCTCTGAGTCGGCCAGGGCTGGGG TCAAGGCCAGCAGTGATTGGGTCATGGACAGCATGGGCAAAGGGACTGA CAGCTATGGTGTCACCACCGGGTTTGGTGCAACCTCCCACCGGAGAACAA AGCAAGGCGCTGCCCTTCAGAAGGAGCTAATTAGGTAAGCTAAACTTTAC CGAACATCCATTTACAGTTCCTAATGCATGTCGATATTTTATTAATATATA TACTAACATACGGTCACACACAAAGTTAATTGAGCGAATAATTTTGGACT AATTATTTTGGACCAATTACTGTAGTTAATTAGTGTGCATATATCAAACTC TTAACTTTACACAGATACGTGCTGTTATAATTCACTTAAAAATATATTTTT AAAAATTAATTAAGCTAATCATTTTGGACAAATTAACCAATTACGGTAGT TAATTTGAAGCTACCAACTTGCTACTTTTAGCTGCTTATATCTATAAATTC TTGTTGGAGTTGGACTTTTTTTTTTCTGAACCCTTAATAATTTTGAATTATT GTCAAATTATGGCTTCTAATTATGCTTTAATTTTCTTGATTCAGATTCTTGA ACGCTGGTGTGTTTGGAAGTGCTACAGAATCAGGCCACACACTGCCACAT CAAGCAACTAGAGCAGCTATGTTGGTCAGAATCAACACACTCCTCCAAGG CTACTCTGGCATAAGATTCGAAATCTTGGAAGCCATCACCAAGTTCTTGA ACAACAACGTCACTCCATGCTTGCCCCTACGGGGCACGATCACCGCCTCT GGTGATCTTGTCCCGCTGTCCTACATTGCCGGTTTACTCACCGGCAGGCCA AACTCCAAAGCTGTCGGACCAAACGGTCAGACCCTCAATGCCTCTGAAGC TTTTGAGCTAGTAGGGATCAATTCTGGGTTTTTCGAGTTGCAGCCTAAAGA AGGGTTAGCTCTTGTGAACGGCACTGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCGTCCAC GGTTCTTTTCGAGACCAACATTTTGGCGTTGCTTGCAGAGATTTTGTCAGC GATTTTCGCTGAAGTGATGCAGGGGAAGCCGGAGTTTACTGATCACTTGA CGCACAAGTTGAAGCACCACCCTGGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTATG GAACATATTTTGGATGGCAGCTCTTATGTGAAAGCTGCTAAGAAGTTGCA TGAGCAGGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAA CATCACCTCAGTGGCTAGGACCTCAAATTGAAGTGATTCGTTACTCCACC AAATCCATTGAGAGGGAAATCAACTCAGTTAATGACAACCCTTTGATCGA TGTTTCGAGGAACAAGGCCTTGCACGGAGGCAACTTCCAGGGGACCCCAA TTGGAGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCGATTGCCTCCATTGGGAAG CTCATGTTTGCGCAATTTTCCGAGCTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGT TTGCCTTCAAATCTGTCCGGAGGCAGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTC AAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCATCTTATTGTTCCGAGCTGCAGTTCTC GCAAATC-3‘

用引物Ⅲ扩增得到的序列：

5'-TACGCGGTACTATTACCGCCTCCGGAGATCTTGTTCCGCTATCCTACAT CGCCGGATTACTCACCGGCAGGCCTAATTCCAAAGCAGTCGGACCAACTG GGCAGACCCTCAGTGCCTTAGAAGCTTTTGAGCTAGTAGGGATCAATTGC GGGTTTTTTGAGTTGCAGCCTAAAGAAGGGTTAGCTCTTGTGAACGGCAC TGCTGTTGGTTCTGGCTTGGCCTCCACGGTTCTTTTCGAGACCAACATTTT GGCGTTGCTAGCGGAGATTTTATCAGCGATTTTCGCTGAAGTGATGCAGG GGAAACCGGAGTTTACTGATCACTTGACGCACAAGTTGAAGCACCACCCT GGACAGATTGAGGCAGCTGCAATTATGGAACATATTTTGGATGGCAGCTC TTATGTCAAAGCTGCTAAGAAGTTGCATGAGCAGGATCCCCTGCAGAAGC CAAAGCAGGATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCTGGGACCT CAAATTGAAGTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAA CTCAGTTAATGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTAC ATGGAGGCAACTTCCAGGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACT CGCTTGGCGATTGCATCCATTGGCAAGCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAG CTTGTCAATGACTTTTACAACAATGGTTTGCCTTCAAATCTGTCAGGAGGC AGGAATCCTAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAATCGCCATGGC ATCTTATTGTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGT CCAGAGTGCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCT CTTCAAGGAAAACAGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCC ACATTTTTGGTTGCGCTTTGTCAGTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAG AATTTGAGGAACACTGTGAAGAACACGGTGAGCCAAGTAGCAAAGAGGA CTTTAACAACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAGGTTCTGTGAG AAGGATCTGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGAC GACCCCTGCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCT GGTTGAACATGCTTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACT TCGATCTTCCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTT GCCTAAAGAGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGCAATTGAGAGCGGAAATGCT GCAGTCCCAAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTTGTACAAGTT TGTGAGGGAGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGG TCACCGGGCGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAA GATTATCGACCCAATTCTGGGTGCCTCGAGGGTGATCGGGCCTTG-3‘

用引物Ⅳ扩增得到的序列：

5'-AGCTGCTAGAGTTGCATGAGCAGGATCCCCTGCAGAAGCCAAAGCAGG ATCGCTACGCTCTCCGAACATCACCTCAGTGGCTGGGACCTCAAATTGAA GTGATTCGTTTCTCCACCAAATCCATTGAGAGGGAGATCAACTCAGTTAA TGACAACCCTTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCTTACATGGAGGCA

ACTTCCAGGGGACCCCAATTGGGGTTTCCATGGACAACACTCGCTTGGCG ATTGCATCCATTGGCAAGCTCATGTTTGCACAATTTTCTGAGCTTGTCAAT GACTTTTACAACAATGGTTTGCCTTCAAATCTGTCAGGAGGCAGGAATCC TAGCTTGGATTACGGTTTCAAGGGGGCTGAAATCGCCATGGCATCTTATT GTTCTGAGCTGCAGTTTCTCGCAAATCCGGTAACTAACCATGTCCAGAGT GCTGAGCAGCACAACCAAGATGTTAACTCTTTGGGGTTGATCTCTTCAAG GAAAACAGCTGAAGCTGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCTTCCACATTTTT GGTTGCGCTTTGTCAGTCCATCGATTTGAGGCATTTGGAGGAGAACTTGA GGAACACTGTGAAGAACACGGTGAGCCAAGTAGCAAAGAGGACTTTAAC AACTGGGGTTAATGGAGAGCTTCACCCGTCAAGGTTCTGTGAGAAGGATC TGCTTAAAGTTGTCGATAGGGAGTATGTTTTTGCCTACATTGACGACCCCT GCAGTGCCACTTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGGAAGTGCTGGTTGAA CATGCTTTGACAAATGGCGAAAGTGAGAAGAATGCAAGCACTTCGATCTT CCAAAAGATTGGAGCTTTCGAGGAAGAGCTGAAAGCGCTTTTGCCTAAAG AGGTTGAGAGTGCAAGGAGTGCAATTGAGAGCGGAAATGCTGCAGTCCC AAACAGGATTGCGGAATGCAGGTCTTATCCCTTGTACAAGTTTGTGAGGG AGGAGTTGGGGGGAGAGTACCTAACCGGGGAGAAGGTCAGGTCACCGGG CGAGGAGTGTGACAAGGTGTTCCAAGCCATCTGCCAGGGTAAGATTATCG ACCCAATTCTGGGTGCCTCGAGGGTG-3‘

致 谢

在论文完成之际，顿笔沉思，三年来，从毕业论文的选题开始，到论文的完成，我得到了太多老师和同学的无私帮助，在这里有太多感谢的话要表达。首先感谢我的导师于凤鸣教授和张立彬教授。在三年的研究生学习期间，

于老师丰富的试验经验、一丝不苟的治学态度、对试验数据充分的挖掘分析、热忱宽厚的处事待人作风，使我受益匪浅，感触颇多。张老师渊博的专业知识、不懈的探索精神、宽厚的处事待人作风、严以律己宽以待人的高尚风范，深深感染了我。衷心感谢两位恩师一直以来对我的学习、试验、工作等方面给予的指导和帮助！

同时感谢，河北科技师范学院分析测试中心闫立英、宋晓飞老师；园艺科技学院肖萧、宋立琴老师；动物科技学院史秋梅、张艳等老师。河北省农林科学院遗传生理研究所关军锋所长、程玉豆老师等。衷心感谢各位老师对我毕业论文和实验技术上的指导。

手足之情不可忘。在同窗好友的支持、鼓励和帮助下，我顺利的完成了研究生学业。在此我还要特别感谢本课题组的王彬彬师兄、赵慧敏、王晓青师妹。另外还有河北省农林科学院遗传生理研究所的何近刚、葛文雅、张彩霞、赵哲，谢谢你们给予我在校外做实验时候的帮助。我和你们的感情，将是我这一生最宝贵的财富，是我最珍惜的情谊。

最后，感谢我的父母和家人，感谢你们多年的无私奉献、鼓励和始终如一默默无闻的支持。你们将是我一生最珍惜的人！