

‘黄花’梨及其芽变‘绿黄花’梨 *HHT* 基因克隆与表达分析

吕照清, 任丹丹, 周 贺, 乔玉山*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 该试验以砂梨品种‘黄花’梨(果皮褐色)及其芽变‘绿黄花’梨(果皮绿色)盛花后第8周的果皮为试材, 利用常规PCR和巢式PCR技术克隆了 ω -羟基棕榈酸O-阿魏酰转移酶(ω -hydroxypalmitate O-feruloyl transferase, *HHT*)基因cDNA的全长, 命名为*PpyHHT*(登录号为KX131155)。序列分析结果表明, 该基因开放阅读框(ORF)为1 335 bp, 编码444个氨基酸。生物信息学分析显示, 推定的*PpyHHT*蛋白质相对分子质量为49.91 kD, 等电点是4.75, 与白梨相似性高达98%, 亲缘关系最近。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)表达分析显示, 2种梨果皮中*PpyHHT*基因在盛花后6~9周的4个转色关键期表达量不断变化, 在‘黄花’梨果皮中的表达量明显高于‘绿黄花’梨。推测*PpyHHT*基因可能参与砂梨果实褐色/绿色性状的形成。

关键词: 砂梨; *HHT* 基因; 克隆; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: Q78

文献标志码: A

Cloning and Expression of *HHT* Gene in ‘Huanghua’ Pear and Its Bud Mutant ‘Lühuanghua’ Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)

LÜ Zhaoqing, REN Dandan, ZHOU He, QIAO Yushan*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The study used fruit peel of sand pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cultivars ‘Huanghua’ pear (russet fruit) and its bud mutant ‘Lühuanghua’ pear (green fruit) at 8 weeks after full bloom (WAFB) as experiment materials. the cDNA full-length of *HHT* gene, which was named *PpyHHT* (GenBank accession No. KX131155), was cloned by conventional and nest PCR techniques. Sequence analysis showed that the full-length of the *PpyHHT* ortholog consisted of a 1 335 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide containing 444 amino acid residues. The molecular weight of deduced amino acids was 49.91 kD, with an isoelectric point (*pI*) of 4.75, which had the highest similarity (98%) and closest relationship with that in *Pyrus bretschneideri*. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) analysis demonstrated that the expression of *PpyHHT* gene in ‘Huanghua’ and ‘Lühuanghua’ pear peel were changing constantly during the key period (6–9 weeks), and significantly higher in ‘Huanghua’ pear peel than that in ‘Lühuanghua’. *PpyHHT* gene involved in the formation of sand pear russet/green traits, its expression level differences may play a role in the formation of sand pear skin color.

Key words: *Pyrus pyrifolia* Nakai; *HHT* gene; cloning; bioinformatics; gene expression

砂梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)原产中国, 其果皮呈褐色、绿色和红色等类型, 且以褐色和绿色为

主。红皮梨果实的色泽受花青素控制, 而砂梨果实褐色/绿色的形成机理与红皮梨不同^[1-2]。研究发

收稿日期: 2016-03-28; 修改稿收到日期: 2016-05-05

基金项目: 国家自然科学基金(31272140); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(14)3009)

作者简介: 吕照清(1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: 1304971536@qq.com

* 通信作者: 乔玉山, 教授, 博士生导师, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: qiaoyushan@njau.edu.cn

现,砂梨果实的褐色是由于角质层和表皮细胞破损后木栓层的积累形成的^[3-4]。

木栓层由木栓质片层结构组成,木栓质是由木栓聚酚结构域[suberin poly(phenolic) domain, SP-PD]和木栓聚酯结构域[suberin poly(aliphatic) domain, SPAD]组成的大分子结构。SPPD主要是羟基阿魏酸及其衍生物共价连接而成,调控苯丙烷-阿魏酸途径的酶主要有:苯丙氨酸解氨酶(PAL)、 ω -羟基棕榈酸 O-阿魏酰转移酶(HHT)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)和肉桂酰 CoA 氧化还原酶(CCR)等^[5-6]; SPAD 主要由甘油、 α 、 ω 二羟基羧酸和长链脂肪酸等以酯键或醚键交联而成^[6-8],参与长链脂肪酸代谢的酶主要有:长链脂肪酸酰基 CoA 合成酶(LACS)、 β -酮酰 CoA 合酶(KCS)、脂肪酸 ω -羟化酶(FA ω H)和 CYP86A 脂肪酸 ω -羟化酶等^[9-12]。目前已克隆的梨木栓质合成相关基因有 PAL、C4H 和 CCR 等^[13-15]。

ω -羟基棕榈酸 O-阿魏酰转移酶(ω -hydroxy-palmitate O-feruloyl transferase, HHT)是苯丙烷生物合成途径中的关键酶,催化阿魏酰辅酶 A 生成 ω -羟基棕榈酸和 1-伯醇^[16],拟南芥 HHT 体外试验证实也会促进阿魏酰棕榈酸和烷基阿魏酸酯的形成^[17]。HHT 直接或间接影响阿魏酸及其衍生物的表达,从而影响 SPAD 和 SPPD 大分子的结构组成。本试验通过对‘黄花’梨及其芽变‘绿黄花’梨转录组数据的分析,发现 HHT 基因在‘黄花’及‘绿黄花’梨果实色泽形成关键期的表达量存在显著差异,因此本试验克隆了‘黄花’及‘绿黄花’梨果皮 HHT 基因,分析其在果实色泽形成关键期的表达情况,以期探讨砂梨果皮褐色形成机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以江苏省南京市溧水果园‘黄花’及其芽变‘绿黄花’梨盛花后第 6、7、8、9 周果实为试材,削取果皮,液氮速冻后-80℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 HHT 基因克隆 采用改良 CTAB 法提取果皮总 RNA^[18],1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取 1 μ g 总 RNA,利用 Prime-scriptTM reagent Kit with gDNA Eraser (中国 TaKaRa 公司生产)反转录试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。根据 NCBI 上已登录的白梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd.) HHT 基因序列(XM_009379727),利用 Primer Premier 5 设计 1 对特异

引物,对‘黄花’梨及‘绿黄花’梨 HHT 基因片段进行 PCR 扩增,引物为 HHT-F(5'-TCTCCTTTC-CATTCGTCA-3')和 HHT-R(5'-AGCATCAG-CAATCTCAGTG-3')。PCR 反应体系总体积为 25 μ L,包含模板 1 μ L,引物各 0.5 μ L,dNTP Mixture 2.0 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,用 ddH₂O 补足。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 20 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖胶电泳检测。使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit(中国 Axygen 公司所生产)胶回收试剂盒对目的片段回收。与载体 pMD19-T 连接后转化 DH5 α 感受态大肠杆菌细胞进行蓝白斑筛选。选取白色单菌落进行 PCR 检测,阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.2 目的基因 3' 端序列克隆 根据扩增产物的测序结果设计 2 条正向巢式特异引物 3W(5'-ACT-TGGTCTAAGCTGTCGTT-3')和 3N(5'-ACT-GAGATTGCTGATGCTTT-3'),反向引物为 R16326(5'-GGTGGTAGAGCTCGCAGGACTGCAGCT-GACTG-3')和 R16324(5'-AGAGCTCGCAG-GACTGCAGCTGACTGACTAC-3'),利用接头引物 R11466(5'-GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT₃₀VN-3')以 3 μ g 总 RNA 为模板合成第一链 cDNA。PCR 扩增采用巢式 PCR 策略,进行两轮 PCR 扩增。第一轮以 cDNA 为模板,以 3W 和 R16326 为上下游引物,第一轮 PCR 产物稀释 10 倍后作为第二轮 PCR 模板,以 3N 和 R16324 为上下游引物。第一轮/第二轮 PCR 程序:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 20 s,60/56℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,经克隆后送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 借助 Clustal X 和 Mega 5 软件,对所得序列与 GenBank 中其他物种的 HHT 基因序列进行同源性分析,挑选典型物种进行多序列比对,Clustal X 生成比对结果,利用 Mega 5 对比对结果构建系统发育树,进行系统发育分析。采用 DNAMAN 对 *PpyHHT* 基因翻译和氨基酸序列分析,在 NCBI 网站上进行 Blast 和保守结构域分析,Mega 5 软件进行进化树的构建。

1.2.4 *PpyHHT* 基因定量 PCR 分析 分别以盛花期后第 6 至第 9 周的梨果实总 RNA,反转录得到的 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR 反应。根据已克隆的 *PpyHHT* 基因序列设计 1 对特异引物 CO-F

```

1  ATGTTTGCTGAATTCGGAGAGTCTGTGCGGATGGACAACACCACCAATGGTGACGCGTTCACGCTGAGAGTGAAG
   M V A E F G E S V A M D N T T N G D A F Q L R V K
76  CAAGGAGAGCCAACTCTGGTTTCCCTGCGAGTTGAAACAGAGAAGGTTTGTACTTCTCGAATCTCGATCAA
   Q G E P T L V S P A V E T E K G L Y F L S N L D Q
151 AACATTGCGGTGACTGTTCTGACTATTTACTGCTTCAAGTCCGGATGATAAGGGAAAATGACCAGCGAGGGGAAAGTG
   N I A V T V R T I Y C F K S D D K G N D Q A G E V
226 ATAAAGGATGCCTTGAAGAAGGTTCTGTCCACTATTACCCTCTTTCGCGGGGGTTATCAAAATTAGCGCAGAGGGA
   I K D A L K K V L V H Y Y P L A G R L S I S A E G
301 AAGCTCATTTGGATTGCAACGGGGGAAAGGACTATTTTCGTCCAGGGCTGAAGCAGATTGTCGGATAGAAGAGATT
   K L I V D C T G E G A I F V E A E A D C A I E E I
376 GGTGACATAACAAAGCCGGACCCGAGACTCTTGGGAGGCTGGTTTATGATGTTCTGGTGGCAAAAAACATACTG
   G D I T K P D P E T L G R L V Y D V P G A K N I L
451 GAGATGCCTCCTCGTGGTGCAGGTGACTAAATTCAAATGTGGAGGATTTTCTCTTGGCTGTGCATGAATCAT
   E M P P L V V Q V T K F K C G G F S L C M N H
526 TGTATGTTTACGGCCTCGGTGCAATGGAATTCGTGAACCTCGTGGGGTAAAAATGCCATAGGTTTCCATTGACA
   C M F D G I G A M E F V N S W G K I A I G L P L T
601 GTTCTCCGTTTTTACAGCAGAAAGCATACTCAAAGCGGAAAACCCACCAAGGATAGAGTACCCGCATCAGGAATTC
   V P P P L D R S I L K A R N P P R I E F
676 TCAGAGATTACCGGCACCTTCTTGCACCAACAATGACCTTGTGAGGAAAAATGACAGTACAGATCCTTTCAGTTTC
   S E I T G T S C T N N D L C E E K M Q Y R S F S F
751 GACAGTGCAGAGCTTGCAGAACTCAAATGAAAGCCAGGAAAGACGGGGCTTGAATAATGCACTACCTTGGAA
   D S E K L E K L K M K A R E D G A L E N C T T F E
826 GCCCTCTGCGATTCTGTGGAAAGCTCGGACCAGAGCGCTAAATTCGTGCTGCTGAGCAACAATAAAGCCCTCTG
   A L S A F V W K A R T R A L N L L P E Q Q I K L
901 TTTGCTGTTGACGGGAGCGCTAAATTCAGGCCCGCCCTGCCAAAAGGGTACTTTGGCAATGGCATTGTGCTGACA
   F A V D G R R K F R P P L P K G Y F G N G I V L T
976 AATTCCGCTGCGCAGGCGAGTACTTACTGGACAAGCCGCTGTCAAATGCACTCGGACTAGTTCAAAGATGCAATC
   N S V C Q A G D L L D K P L S N A V G L V Q D A I
1051 AAGATGGTCACTGACAGTTACATGAGATCTGCCATAGATTATTTCCAGCTGACCGGAGCTAGGCCCTTCGCTGGCC
   K M V T D S Y M R S A I D Y F E L T R A R P S L A
1126 TCCACTCTTGTATCAGCACTTGGTCTAAGCTGTGCTTACACGACTGATTTTGGTGGGAGAGCCCTGTGCTA
   S T L L I T T W S K L S F Y T T D F G W G E V L
1201 TCAGGTCGGTGGCATTGCGGAGAAAGGAAGTGATCTTGTTCCTTTCTAATGGGACAGAAAAGAAACATAAAC
   S G P V A L P E K E V I L F L S N G T E K K N I N
1276 GTGCTTCTGGGCTTCCGCTTCTGCAATGATGCTTCCAAAGAACTGATGAAACCGCTTAGAGTTCAAACCAACACC
   V L L G L P A S A M N V F Q E L M N G *
1351 GGCGGAAAATGTTTTTCGAACTAAAGCTCTGTGATTTTCGAAAATGTTGTCAGTGTGTGTAATATTTTTATTAT
1426 TTGTTTGTACTGCTGCAAAAACCTTTATGCATACAGTCACTGAGATTGCTGATGCTTTAACTGTGTGATGGTTCA
1501 TTTATCATCTTTTGTCTGTAATAAGAGTGAATAATGTCATTTACATTAATAAATAAATAACTAATTTCCAAAAAAA
1576 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

ATG. 起始密码子;TAG. 终止密码子;阴影. 保守结构序列

图 1 *PpyHHT* 基因的核苷酸序列及氨基酸序列

ATG. Start codon; TAG. Stop codon; Shadow. Conserved domain sequence

Fig. 1 The nucleotide acid sequence and amino sequence of *PpyHHT* gene

(5'-TCTTGTTCCTTTCTAATGGG-3')和 CO-R (5'-GGGCTCTTTCACCCACTT-3')。以砂梨 *Ubiquitin* 基因为内参基因,引物为 CO138 (5'-GCTCGCAGTGCTCCAGTTCTAC-3')和 CO139 (5'-AACATAGGTCAACCCGCACTT-3')。参照 SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 试剂盒(中国 TaKaRa 公司所生产)说明进行 qRT-PCR 反应。反应体系为 10 μL SYBR Premix Ex Taq™ II, 0.3 μL 上、下游引物,1 μL cDNA, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 40 个循环。实时荧光定量 PCR 试验使用 ABI7300 cycler(美国)仪器完成,试验数据由 2^{-ΔΔT} 公式计算处理,测定样本均设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 *PpyHHT* 基因克隆与序列分析

用常规 PCR 技术从‘黄花’和‘绿黄花’梨第 8

周果实果皮中扩增得到部分基因片段,测序并在 NCBI 上进行比对分析表明,该片段为 *PpyHHT* 基因的部分片段。根据所得序列设计 3'端特异引物,进行巢式 PCR 扩增(第一轮引物为 3W 和 R16326,第二轮引物为 3N 和 R16324),获得了 3'端目的片段。利用 DNAMAN6.0 软件进行拼接,获得了包含完整开放阅读框的核苷酸序列 1599 bp (图 1),而且‘黄花’和‘绿黄花’cDNA 序列完全一致;包括编码 444 个氨基酸的编码区,264 bp 的 3'非翻译区(图 1),命名为 *PpyHHT*,提交 GenBank,登录号为 KX131155。根据 DNAMAN6.0 软件推测该蛋白分子量是 49.91 kD,等电点是 4.75。

2.2 *PpyHHT* 基因生物信息学分析

利用 NCBI 蛋白保守结构域数据库(conserved domain database, CDD)对 *PpyHHT* 基因编码蛋白的保守区进行预测,结果表明,该蛋白在 11~443 氨基酸残基之间有一个 HHT 家族结构域 (PLN02481, E 值 0e+00)(图 2)。将 *PpyHHT* 基

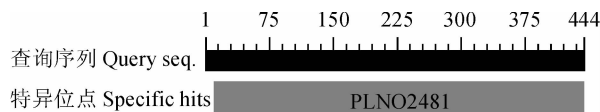


图2 *PpyHHT* 基因预测蛋白的结构域分析
Fig. 2 Conserved domain analysis of predicted protein of *PpyHHT* gene

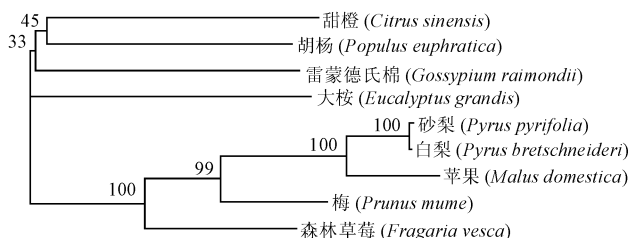


图3 ‘黄花’梨与其他物种 *HHT* 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the amino acid residues encoded by *HHT* gene in ‘Huanghua’ pear and other species

因编码的氨基酸序列进行比对分析,发现 *PpyHHT* 与多种植物 *HHT* 的相似性在 76.6% 和 98% 之间,其中相似性在 92% 以上的有白梨 (*Pyrus bretschneideri*)、苹果 (*Malus domestica*)、梅 (*Prunus mume*)、森林草莓 (*Fragaria vesca*) 等,且白梨最高达 98%。分析结果还发现, *PpyHHT* 基因编码的氨基酸序列具有 *HHT* 的 2 个保守结构区域,即 HXXXD(第 175~179 位氨基酸残基)活性位点和 D(N)F(V)GWG(第 392~396 位氨基酸残基)活性位点(图 1),这 2 个保守区域为酰基转移酶所特有,在植物中高度保守^[19-21]。

利用 Mega 5 软件将这些基因编码的氨基酸序列进行聚类分析,构建系统进化树。从图 3 可以看出 *PpyHHT* 基因编码的氨基酸与其他近源物种在氨基酸水平上高度同源,与白梨亲缘关系最近,这与氨基酸序列比对结果一致,表明 *PpyHHT* 基因为 *HHT* 的同源基因。

2.3 在不同发育时期梨果皮中 *PpyHHT* 的表达

在所取样的 4 个时期,‘黄花’梨 *PpyHHT* 基因的表达量均高于‘绿黄花’梨,在第 7 周表达量差异达到最大,非常有趣的是,此时‘黄花’梨果实褐色开始呈现出来,提示该基因的高表达可能与果皮褐色形成有关。在不同时期‘黄花’梨果皮中,第 6 周和第 7 周表达量较高,而第 8 周和第 9 周表达量较低,其中第 7 周的表达量约为第 8 周的 4 倍,褐色呈现后的第 8 周和第 9 周间表达量相差无几,究其原因可能是 *PpyHHT* 需要与相关因子协同作用才能

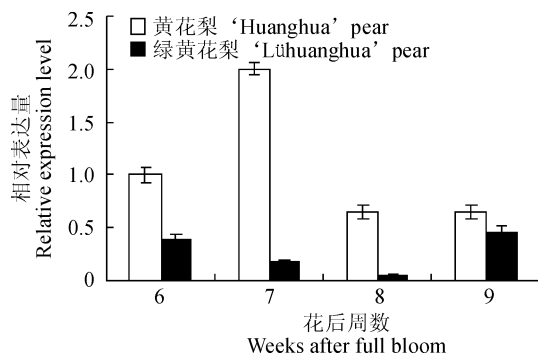


图4 不同时期‘黄花’梨和‘绿黄花’梨果皮 *PpyHHT* 基因表达量

Fig. 4 The relative expression of *PpyHHT* in the peel of ‘Huanghua’ and ‘Lü Huanghua’ pear at different stages

促成褐色前体物质的形成,随着果实色泽的逐渐形成,协同作用减弱,其含量也逐步减少并趋于稳定。*PpyHHT* 基因在‘绿黄花’梨果皮中表达量在第 8 周最低,为最高表达量的 0.25 倍,表达量随果实发育呈“先减后增”趋势,这可能是由于在色泽形成关键期相关物质抑制了 *PpyHHT* 基因的表达,至第 9 周‘黄花’梨果实表皮褐色比较明显时,‘绿黄花’梨 *PpyHHT* 基因的表达量又增高,这个并没有促进果实形成褐色,最合理的解释可能是除该酶(基因)外,褐色的形成还需要其他因子的参与。

3 讨论

本试验成功从‘黄花’梨和‘绿黄花’梨中克隆到一个含有完整阅读框的砂梨 *PpyHHT* 基因,生物信息学分析表明, *PpyHHT* 基因编码的氨基酸序列与蔷薇科植物相似性较高(92% 以上),其中白梨最高(98%),与其他科植物相似度较低(77% 左右)。这说明 *PpyHHT* 基因属于转移酶类基因家族成员,同时也说明不同物种 *HHT* 氨基酸的相似度高与物种之间的亲缘关系相一致。

Lotfy 等^[16]研究表明 *HHT* 促进马铃薯组织的木栓化,也促进木栓质前体的形成^[22];木栓化组织的酶解及提取物分析表明阿魏酸及阿魏酸酯是木栓质大分子结构的主要成分^[6],因此, *HHT* 可能是通过促进这些主成分的形成而影响木栓质的形成的。本研究显示,‘黄花’梨在果皮色泽形成关键期的 *HHT* 表达量明显高于‘绿黄花’梨,这就有可能影响木栓质成分阿魏酸等的形成,进而影响砂梨果皮褐色的形成。

本试验克隆的 2 个砂梨品种(系)的 *PpyHHT*

基因的 cDNA 序列完全一致,从这个角度上看,‘黄花’梨的绿皮芽变‘绿黄花’梨性状出现差异不是该功能基因发生了突变,但其基因的表达量和表达谱存在明显差异,出现这种情况的原因:一是两个品种(系)间调控该基因表达的调控因子如转录因子基因可能发生了突变。Uauy 等^[23]研究发现,在栽培小麦品种中转录因子 *NAM-B1* 基因由于 1 个碱基的

插入引起移码突变而丧失功能,导致营养成分的降低;二是该基因位点的启动子区域出现了差异。Buzeli 等^[24]在大豆的研究中发现启动子顺式元件完整与否调控着 *Bip* 基因的表达。由此推测,‘黄花’梨及其芽变‘绿黄花’梨 *PpyHHT* 基因在转色关键期的差异表达可能受上述两个因子的影响,究竟是哪个因子在起作用还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] DU PREEZ M G, REES D J G. Investigating the molecular mechanism of anthocyanin production in ‘Bon Rouge’ *Pyrus communis* L. [J]. *Acta Horticulturae*, 2008, 800: 383-390.
- [2] 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(3): 485-492.
ZHANG D, TENG Y W. Germplasm resources of red pears and research progress in pear coloring mechanism[J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(3): 485-492.
- [3] 滕元文,沈玉英,周先章. 砂梨果皮锈斑成因及解决对策[J]. 中国南方果树, 2005, 34(3): 52-54.
- [4] SUGAR D, BASIL S R. Color and russet variation among selections of ‘Bosc’ pear[J]. *Journal of the American Pomological Society*, 2008, 62(2): 77-81.
- [5] GANG D R, WANG J, DUDAREVA N, et al. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(2): 539-555.
- [6] BERNARDS M A. Demystifying suberin[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2002, 80(3): 227-240.
- [7] GRACA J, SANTOS S. Suberin: a biopolyester of plants: skin[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7(2): 128-135.
- [8] GRACA J. Hydroxycinnamates in suberin formation[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2010, 9(1): 85-91.
- [9] HOFER R, BRIESEN I, BECK M, et al. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(9): 2 347-2 360.
- [10] SOLER M, SERRA O, MOLINAS M, et al. A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1): 419-431.
- [11] SERRA O, SOLER M, HOHN C, et al. Slicing of *StKCS6* in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 697-707.
- [12] SOLER M, SERRA O, FLUCH S, et al. A potato skin SSH library yields new candidate genes for suberin biosynthesis and periderm formation[J]. *Planta*, 2011, 233(5): 933-945.
- [13] 张士鸿,金青,等. 砵山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.
ZHANG S H, JIN Q, et al. Cloning and sequencing of a phenylalanine ammonia-lyase cDNA from *Pyrus bretschneideri* cv[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2010, 19(1): 97-103.
- [14] FISCHER T C, GOSCH C, et al. Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*) [J]. *Trees*, 2007, 21(5): 521-529.
- [15] LU X P, LIU Y Z, et al. Isolation of a cinnamoyl CoA reductase gene involved in formation of store cells in pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(2): 585-591.
- [16] LOTFY S, JAVELLE F, NEGREL J. Distribution of hydroxycinnamoyl-CoA: ω -hydroxypalmitic acid O-hydroxycinnamoyltransferase in higher plants [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(2): 389-391.
- [17] GOU Y G, YU X H, LIU C J. A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(44): 18 855-18 860.
- [18] 王西成,乔玉山,欧春青,等. 三种梨果皮总 RNA 提取方法的比较研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(2): 91-94.
WANG X C, QIAO Y S, OU C Q, et al. Extraction of total RNA from pericarp of pears with three methods[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010, 45(2): 91-94.
- [19] EI-SHARKAWY I, MANRIQUEZ D, et al. Function characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(2): 345-362.
- [20] LEPELLEY M, CHEMINADE G, TREMILLON N, et al. Chlorogenic acid synthesis in coffee: an analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of *HCT*, *HQT*, *C3H*, and *CCoAMT1* genes during grain development in *C. canephora* [J]. *Plant Science*, 2007, 172(5): 978-996.
- [21] HOFFMANN L, MAURY S, et al. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(1): 95-103.
- [22] SCHMUTZ A, JENNY T, RYSER U. A caffeoyl-fatty acid-glycerol ester from wax associated with green cotton fiber suberin [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(6): 1 343-1 346.
- [23] UAUY C, DISTELFELD A, et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat [J]. *Science*, 2006, 314(5 803): 1 298-1 301.
- [24] BUZELI R A A, CASCARDO J C M, RODRIGUES L A Z, et al. Tissue-specific regulation of *BiP* genes: a cis-acting regulatory domain is required for *BiP* promoter activity in plant meristems [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(4): 757-771.