

桑叶经霜前后总黄酮积累量与苯丙氨酸解氨酶活力及气温相关性分析

于小凤^{1,2}, 李韵竹³, 张魏琬麒², 王笃军², 魏 渊², 欧阳臻^{2,*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013;

3. 江苏大学京江学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 为研究经霜对桑叶总黄酮积累量影响的机制, 分析桑叶经霜前后总黄酮积累量合成关键酶苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 活力的动态变化, 并对总黄酮积累量及气候温度进行相关性分析。在 6 mL pH 8.8、0.1 mol/L 硼砂-盐酸缓冲液中加入 0.2 g 桑叶叶片、0.2 g 聚乙烯吡咯烷酮, 底物 L-苯丙氨酸浓度为 0.04 mol/L, 40 °C 条件下水浴反应 40 min 后测定经霜前后桑叶 PAL 活力, 采用紫外分光光度法测定经霜前后桑叶总黄酮积累量。结果表明: PAL 活力与平均气温呈极显著负相关, 与总黄酮积累量呈极显著正相关, 较低的温度有利于黄酮类物质的积累。

关键词: 桑叶; 苯丙氨酸解氨酶; 经霜; 气温; 总黄酮积累量

Mulberry Leaves Harvested before and after Frost: Correlation between Phenylalanine Ammonia Lyase Activity and Total Flavonoid Content as well as Air Temperature

YU Xiaofeng^{1,2}, LI Yunzhu³, ZHANG Weiwanqi², WANG Dujun², WEI Yuan², OUYANG Zhen^{2,*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Jingjiang College, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In order to explore the mechanism underlying the influence of frost on the total flavonoid content in mulberry leaves, the dynamic changes in phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity as a key enzyme in the biosynthesis of flavonoids was analyzed in mulberry leaves harvested before and after frost as well as the correlation between PAL activity and total flavonoid content or air temperature. For the determination of PAL activity in mulberry leaves, 0.2 g mulberry leaf powder was homogenized with 0.1 mol/L borax hydrochloric acid buffer (6 mL, pH 8.8) added with 0.2 g of polyethylene (PVP) and centrifuged, and the supernatant was allowed to react with 0.04 mol/L L-phenylalanine as substrate at 40 °C for 40 min. At the same time, the total flavonoid content of mulberry leaves was measured by UV spectrophotometry. The results showed that PAL activity in mulberry leaves harvested after frost was higher than in those harvested before frost. PAL activity showed a very significantly negative correlation with temperature, whereas it was significantly positively correlated with total flavonoid content. Lower temperature had a significant positive effect on the accumulation of total flavonoids.

Key words: mulberry leaves; phenylalanine ammonia-lyase; frost; temperature; total flavonoids content

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621004

中图分类号: R932

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 21-0021-05

引文格式:

于小凤, 李韵竹, 张魏琬麒, 等. 桑叶经霜前后总黄酮积累量与苯丙氨酸解氨酶活力及气温相关性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 21-25. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621004. <http://www.spkx.net.cn>

YU Xiaofeng, LI Yunzhu, ZHANG Weiwanqi, et al. Mulberry leaves harvested before and after frost: correlation between phenylalanine ammonia lyase activity and total flavonoid content as well as air temperature[J]. Food Science, 2016, 37(21): 21-25. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621004. <http://www.spkx.net.cn>

桑叶为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥叶, 药
用历史悠久; 味苦、甘, 性寒, 归肺、肝经, 具有疏散

风热、清肺润燥、清肝明目的功能, 主要用于治疗风热
感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花等^[1]。桑叶营养丰

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81072985; 81373480; 81573529); 江苏大学第14批大学生科研立项一般项目 (14A045)

作者简介: 于小凤 (1979—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为中药活性成分。E-mail: coler@ujs.edu.cn

*通信作者: 欧阳臻 (1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为中药资源活性成分及新药开发。E-mail: zhenouyang@ujs.edu.cn

富, 被我国卫生部列入“既是食品又是药品”名单, 在功能性食品领域研究开发中也具有广阔前景^[2]。中医历来认为霜桑叶具有上乘品质, 古代众多医药典籍中采用的桑叶也多为经霜后采收(霜桑叶), 历版《中国药典》中收录的桑叶药材也为“霜桑叶”。本课题组前期研究发现经霜后桑叶中总黄酮积累量变高, 同时发现气候温度与总黄酮积累量呈极显著负相关^[3]。总黄酮为桑叶主要活性成分之一^[4-7], 具有消炎、抗菌作用。相关研究表明较低的温度有利于黄酮类物质的积累, 主要原因是低温可以使总黄酮合成途径中相关酶的活力提高^[8-9]。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)为合成途径参与黄酮类物质合成的第1个关键酶^[10-13]。因此本课题组选取PAL关键酶, 优选了桑叶中PAL活力测定条件, 分析桑叶经霜前后PAL活力动态变化, 并研究经霜前后PAL活力的变化与气候温度和总黄酮积累量之间的相关性, 为阐明经霜对桑叶黄酮类活性成分影响的分子机制提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑叶: 2015年4—12月采自江苏大学桑树种植园, 取顶端幼叶1~3片。经江苏大学药学院欧阳臻教授鉴定为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶。鲜桑叶液氮速冻后放入-80℃超低温冰箱中保存备用, 用于PAL活力测定。同时阴干桑叶, 粉碎, 过20目筛用于总黄酮积累量测定。

对照品芦丁(100080-200707) 中国食品药品检定研究院; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

AE240分析天平 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; HHS-1恒温水浴锅 上海浦东跃欣科学仪器厂; ZF超声波清洗机 上海致丰科技有限公司; Beckman冷冻离心机 北京东迅天地医疗仪器有限公司; 超低温冰箱 上海实维实验仪器技术有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司; UV-2550型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 PAL活力测定及条件优化

1.3.1.1 PAL活力测定

PAL活力测定方法参照陈雷等^[14]方法并适当修改。称取桑叶叶片0.2 g, 加入0.05 mol/L pH 8.8的硼砂-盐酸缓冲液(含巯基乙醇5 mmol/L) 6 mL, 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.2 g, 在冰浴中研磨匀浆, 匀浆液于4℃、12 000 r/min条件下离心15 min。取0.2 mL上清液、0.02 mol/L 1 mL苯丙氨酸、0.05 mol/L 3.8 mL硼砂-盐酸缓冲液检测PAL活力。对照组不加苯丙

氨酸只加0.2 mL上清液、4.8 mL硼砂-盐酸缓冲液。混匀后置30℃恒温水浴中静置30 min, 加入6 mol/L 0.5 mL盐酸溶液终止反应。在290 nm波长处测吸光度($A_{290\text{ nm}}$), 以每小时 $A_{290\text{ nm}}$ 值变化0.1为一个酶活力单位(U), 按下式计算PAL活力。

$$\text{PAL活力}/(\text{U/g}) = \frac{\Delta A_{290\text{ nm}} \times V_T \times V_l}{V_s \times 0.1 \times m \times t}$$

式中: V_T 为反应液的总体积/mL; V_l 为提取上清液(粗酶液)的体积/mL; V_s 为测定时粗酶液的用量/mL; m 为样品的质量/g; t 为反应时间/h。

1.3.1.2 正交试验设计优化PAL活力测定条件

在单因素试验的基础上, 以PAL活力为响应值, 对影响PAL活力的底物浓度、水浴时间、水浴温度进行三因素三水平的正交试验, 确定测定经霜前后桑叶样品PAL活力的最佳条件。

1.3.2 桑叶总黄酮积累量测定

1.3.2.1 芦丁对照品溶液的制备

精密称取105℃干燥至恒质量的芦丁对照品12.9 mg, 加体积分数70%乙醇溶解, 定容至50 mL, 得质量浓度为258 μg/mL的芦丁对照品溶液, 备用。

1.3.2.2 样品溶液的制备

称取桑叶药材粉末1.0 g, 加20倍生药量的70%乙醇溶液, 85℃回流提取2次, 每次2 h。合并2次提取液, 过滤, 滤液定容至50 mL容量瓶中, 用70%乙醇稀释至刻度, 得样品溶液, 备用。

1.3.2.3 芦丁标准曲线的绘制

精密量取对照组溶液0.0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL置于10 mL容量瓶, 分别加入0.3 mL 5 g/100 mL NaNO_2 溶液后摇匀放置6 min, 再加入0.3 mL 10 g/100 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液后摇匀放置6 min, 4 mL 4 g/100 mL NaOH溶液后摇匀放置15 min, 最后用70%乙醇溶液定容至刻度, 于510 nm波长处测定吸光度, 以芦丁对照组质量浓度 x 对吸光度 y 进行线性回归, 得回归方程为 $y=0.011\ 3x-0.001\ 1$, $R^2=0.999\ 9$ 。结果表明, 在12.9~103.2 μg/mL之间芦丁质量浓度与吸光度呈良好线性关系。

1.3.2.4 桑叶总黄酮积累量测定^[15]

取23批次桑叶样品, 按1.3.2.2节方法制备样品溶液, 测定其吸光度, 并计算桑叶中总黄酮积累量。

1.3.3 经霜前后桑叶PAL活力的动态变化与平均气温的相关性分析

以经霜前后对应日期的平均气温作图, 得到不同日期平均气温的变化趋势图。采用SPSS 20.0软件进行PAL活力与平均气温的相关性分析, 考察气候温度对桑叶PAL活力的影响。

1.3.4 经霜前后桑叶PAL活力的动态变化与总黄酮积累量相关性分析

采用SPSS 20.0 软件分析桑叶经霜前后PAL活力与总黄酮积累量的相关性。

1.4 数据处理

桑叶PAL活力测定和总黄酮积累量测定实验重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正交试验方差分析采用Excel 2010 软件, 相关性分析采用SPSS 20.0软件。

2 结果与分析

2.1 经霜前后桑叶PAL活力测定及条件优化

2.1.1 正交试验结果

表1 正交试验设计及结果
Table 1 Orthogonal with experimental

试验号	A底物浓度/ (mol/L)	B水浴 时间/min	C水浴 温度/℃	PAL活力/ (U/g)
1	1 (0.03)	1 (30)	1 (30)	82.00
2	0.03	2 (40)	2 (40)	94.80
3	0.03	3 (50)	3 (50)	68.28
4	2 (0.04)	30	40	140.16
5	0.04	40	50	124.80
6	0.04	50	30	124.00
7	3 (0.05)	30	50	53.32
8	0.05	40	30	61.08
9	0.05	50	40	67.80
k_1	81.69	91.83	89.03	
k_2	129.65	93.56	100.92	
k_3	60.73	86.69	82.13	
R	68.92	6.87	18.79	

表2 正交试验方差分析
Table 2 Analysis of variance of the orthogonal array design

来源	离差平方和	自由度	均方差	F	显著性
A底物浓度	7 489.449 6	2	3 744.724 8	1 740.976 7	**
B水浴时间	76.506 7	2	38.253 3	17.784 5	
C水浴温度	541.908 3	2	270.954 1	125.970 5	**
误差	4.301 9	2	2.150 9		
总和		8			

注: **, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

由表1可知: $R_A > R_C > R_B$, 各因素对桑叶PAL活力影响大小依次为: 底物浓度 > 水浴温度 > 水浴时间。此结果与表2的方差分析结果一致。底物浓度和水浴温度对桑叶PAL活力影响极显著 ($P < 0.01$); 水浴时间影响不显著。故根据表1中 k 值可以得到PAL活力最佳测定件为 $A_2B_2C_2$ 。

按以上 $A_2B_2C_2$ 条件做3次平行实验, 桑叶PAL活力为142.26 U/g, 表明该优化试验方案可行。故最终确定桑叶PAL活力测定条件为: 固定pH 8.8、0.05 mol/L的硼砂-盐酸缓冲液为提取液, 加入0.2 g/6 mL的PVP, 底物L-苯丙氨酸浓度为0.04 mol/L, 水浴温度为40 ℃, 水浴时间为40 min。

2.1.2 经霜前后桑叶PAL活力和总黄酮积累量

表3 经霜前后桑叶PAL活力和总黄酮积累量
Table 3 PAL activity and total flavonoid content in mulberry leaves harvested before and after frost

日期	平均气温/℃	PAL活力/(U/g)	总黄酮积累量/(mg/g)
2015-04-15	16.5	158.4±3.9	39.8±0.3
2015-04-25	21.0	171.6±4.2	35.4±0.9
2015-05-05	18.0	145.2±5.5	29.9±0.6
2015-05-15	26.5	132.0±4.0	29.2±0.2
2015-05-25	24.5	158.4±2.7	31.3±0.9
2015-06-05	24.5	132.0±4.7	28.6±0.9
2015-06-15	25.0	118.8±2.1	25.6±0.6
2015-06-25	25.5	132.0±3.2	27.7±0.7
2015-07-05	23.0	105.6±5.9	25.8±1.0
2015-07-15	28.5	105.6±5.0	28.1±0.2
2015-07-25	27.5	118.8±3.0	26.2±0.2
2015-08-05	31.5	92.4±3.1	21.4±0.2
2015-08-15	27.0	39.6±1.0	20.9±0.4
2015-08-25	25.5	66.0±2.0	23.3±0.3
2015-09-05	24.5	52.8±2.0	28.6±0.7
2015-09-15	22.5	79.2±3.0	31.8±0.9
2015-09-25	23.0	105.6±2.0	36.2±1.0
2015-10-05	21.0	118.8±3.8	33.4±0.5
2015-10-15	19.5	132.0±4.9	38.7±0.1
2015-10-25	19.5	145.2±4.0	39.0±0.5
2015-11-05	19.5	171.6±5.9	40.1±0.8
2015-11-15	15.0	158.4±4.0	43.5±0.5
2015-11-25	25.0	184.8±2.8	33.9±1.0

由表3可知, 不同生产季节的23批桑叶PAL活力处于动态变化中。桑叶PAL活力在2015年4—5月份较高, 之后随气温升高有所下降, 到8月份活力达到最低。9月份后PAL活力逐渐上升, 特别是霜降(10月23日)后桑叶PAL活力增加明显。桑叶中总黄酮积累量与生长季节有关, 4月份积累量较高, 5月份之后积累量逐渐降低, 8月份积累量达到最低, 9月份之后积累量又逐渐升高, 11月15号总黄酮积累量达到最高值, 为43.5 mg/g。

2.2 桑叶经霜前后PAL活力的动态变化与气候温度的相关性分析

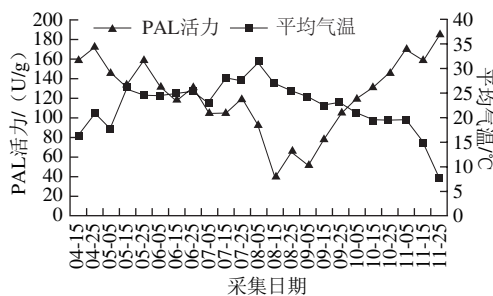


图1 经霜前后桑叶PAL活力及平均气温变化

Fig. 1 Changes in PAL activity in mulberry leaves and average temperature before and after frost

由图1可知, 在温度较低的4—5月份PAL活力较高, 随着气温的升高, PAL活力降低。温度最高的8月份PAL活力降到最低。随后温度逐渐下降, PAL活力逐步上升。

PAL活力与平均温度呈极显著负相关, 相关系数为-0.614。推测经霜前后环境温度变化影响PAL活力, 较低的平均气温有利于PAL活力的增加。

2.3 桑叶经霜前后PAL活力的动态变化与总黄酮积累量相关性分析

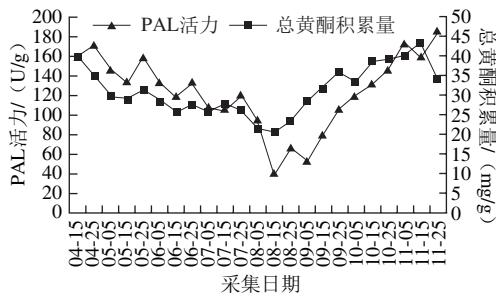


图2 经霜前后桑叶PAL活力及总黄酮积累量变化图

Fig. 2 Changes in PAL activity and total flavonoid content in mulberry leaves before and after frost

由图2可知, 经霜前后桑叶PAL活力和总黄酮积累量变化趋势基本一致。4—5月份时PAL活力较高, 总黄酮积累量也高; 5月份之后PAL活力逐渐降低, 8月达到最低, 总黄酮积累量也逐渐下降至8月份达到最低; 9月份后PAL活力又逐渐上升, 总黄酮积累量也同样上升。

PAL活力与总黄酮积累量呈极显著正相关, 相关系数为0.660 ($P < 0.01$)。该分析结果表明, 在桑叶黄酮类化合物的生物合成途径中PAL是合成关键酶, PAL活力的增加可以促使桑叶中黄酮类物质增加。

3 讨论

桑叶为疏散风热、清肺润燥、清肝明目的常用中药, 药用以采收于初霜后为佳。有研究表明桑叶中总黄酮积累量在霜降后会继续上升^[16-18]。本课题组前期研究了桑叶经霜前后次生代谢产物的表达差异, 发现桑叶经霜后黄酮类物质积累量显著升高, 同时发现气候温度与总黄酮积累量呈极显著负相关^[3]。且相关研究也表明较低的平均温度有利于黄酮类物质的积累, 主要原因可能是低温可以使总黄酮合成途径中相关酶的活力大幅度提高^[8-9]。

PAL是参与桑叶生物合成途径中黄酮类物质形成的第1个关键酶, 且PAL是一种诱导酶, 受多种外界因素的诱导。各种类型的低温^[19-20]、机械损伤^[21]、 CO_2 ^[22]等都可以诱导PAL基因的表达, 影响其活力。本实验优化了桑叶PAL活力测定条件, 采用6 mL pH 8.8、0.1 mol/L的硼砂-盐酸缓冲液, 加入0.2 g桑叶叶片、0.2 g PVP, 底物L-苯丙氨酸浓度为0.04 mol/L、40 °C条件下水浴反应40 min。采用优化PAL活力测定条件分析了不同生长季节及经霜前后桑叶PAL活力的动态变化规律。结果表明不同生长

季节桑叶中PAL活力在4—5月份较高, 之后随气温升高有所下降, 到8月份活力达到最低。9月份后随气温下降, PAL活力逐渐上升, 特别是霜降节气(霜降10月23日)后桑叶PAL活力增加明显。

对不同生长季节及经霜前后桑叶PAL活力的动态变化与总黄酮积累量及气候温度进行相关性分析, 结果显示, 不同季节桑叶中PAL活力与气温呈极显著负相关, 与总黄酮积累量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。桑叶经霜前后主要是环境温度发生变化, 温度是影响植物生长发育的重要影响因素之一^[23-24]。外界温度的改变, 将影响植物细胞内胁迫蛋白的表达, 尤其是调控包括碳水化合物生物合成与代谢在内的能量代谢途径, 调整自身的生理状态以适应环境^[25]。本课题组研究结果证实低温可以诱导桑叶生物合成途径中PAL活力, 有利于黄酮类物质的积累。经霜对桑叶生物合成途径黄酮类功效物质和其他相关酶活力及基因表达的影响正在进一步研究之中, 为从植物生源途径阐明经霜过程对桑叶功效物质影响的科学内涵提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册)[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 2779.
- [2] 欧阳臻, 陈钧. 桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2003, 24(6): 39-44. DOI:10.3969/j.issn.1671-7775.2003.06.010.
- [3] 张魏婉麒, 欧阳臻, 赵明, 等. 桑叶经霜前后次生代谢产物表达差异研究[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 109-114. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201508019.
- [4] DOI K, KOJIMA T, MAKINO M, et al. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L.[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2001, 49(2): 151-153. DOI:10.1248/cpb.49.151.
- [5] 邱进, 王晓静, 王元书, 等. 桑叶化学成分的研究[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1-2. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2008.09.056.
- [6] 王晓静, 王元书, 邱进, 等. 桑叶化学成分研究[J]. 食品与药品, 2007(1): 9. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2007.09.001.
- [7] NGUYEN T D, PHUNG T X B, LE T P Q, et al. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*[J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 1224-1227. DOI:10.1016/j.fitote.2010.08.006.
- [8] AZUMA A, YAKUSHIJI H, KOSHITA Y, et al. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions[J]. Planta, 2012, 236(4): 1067-1080. DOI:10.1007/s00425-012-1650-x.
- [9] WANG Guibin, CAO Fuliang, CHANG Li, et al. Temperature has more effects than soil moisture on biosynthesis of flavonoids in *Ginkgo (Ginkgo biloba* L.) leaves[J]. New Forests, 2014, 45(6): 797-812. DOI:10.1007/s11056-014-9437-5.
- [10] HOLGER R, GEORG E S. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. Plant Cell, 2004, 16(12): 3426-3436. DOI:10.1105/tpc.104.025288.
- [11] 徐文燕, 高微微, 何春年. 环境因子对植黄酮类化合物生物合成的影响[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2006, 8(6): 68-72.

- [12] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508. DOI:10.3969/j.issn.2095-0837.2007.05.015.
- [13] CHEYNIER V, COMTE G, DAVIES K M, et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 72: 1-20. DOI:10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
- [14] 陈雷, 常丽, 曹福亮, 等. 银杏叶黄酮类化合物含量及相关酶活性对温度和干旱胁迫的响应[J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 755-762. DOI:10.3969/j.issn.1000-4025.2013.04.017.
- [15] 徐秀泉, 许源, 汤建, 等. 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 35-38. DOI:10.3969/j.issn.1005-9903.2011.14.011.
- [16] 游元元, 万德光. 川产桑叶“经霜为上”合理性的LC-MS法验证[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2596-2598. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.
- [17] 张丽丽, 白永亮, 宿树兰, 等. 不同品种不同生长期桑叶中生物碱类与黄酮类化学成分的积累动态分析评价[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4822-4828. DOI:10.4268/cjcmm20142424.
- [18] 李瑞雪, 王钰婷, 胡飞, 等. 桑树总黄酮含量变化规律分析[J]. 中国蚕业, 2015, 36(4): 30-34. DOI:10.3969/j.issn.1007-0982.2015.04.006.
- [19] LEYVA A, JARILLO J A, SALINAS J, et al. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner[J]. Plant Physiology, 1995, 108(1): 39-46.
- [20] LENG P, ITAMURA H, YAMAMURA H. Changes of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in twig tissues of two *Diospyros* species during cold acclimation[J]. Environment Control in Biology, 1995, 33(1): 43-48. DOI:10.2525/ecb1963.33.43
- [21] BROWN G E. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, soluble phenolics and lignin in injured orange exocarp[A]. Proceeding of the Annual Meeting of the Florida State Horticulture Society, 1990, 103: 234-237.
- [22] JAAFAR H Z, IBRAHIM M H, KARIMI E. Phenolics and flavonoids compounds, phenylalanine ammonia lyase and antioxidant activity responses to elevated CO₂ in *Labisia pumila* (Myrsinaceae)[J]. Molecules, 2012, 17(6): 6331-6347. DOI:10.3390/molecules17066.
- [23] 李彦, 周晓东, 楼浙辉, 等. 植物次生代谢产物及影响其积累的因素研究综述[J]. 江西林业科技, 2012(3): 54-60. DOI:10.3969/j.issn.1006-2505.2012.03.018.
- [24] 侯娅, 马阳, 邹立思, 等. 生态因子对药用植物次生代谢物的影响及其研究方法[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 187-190. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2015.01.076.
- [25] 龚映雪. 植物响应温度胁迫蛋白质组学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 18038-18040. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2010.32.020.