

# 油松苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析

魏 宁, 樊军锋\*, 杨培华, 刘永红, 刘春英

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**利用同源克隆的方法,从油松(*Pinus tabulaeformis*)中克隆得到苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的 cDNA 和 DNA 序列, cDNA 序列全长 2 157 bp, 编码 718 个氨基酸, 包含有完整的 ORF, 命名为 *TaPAL* (GenBank 登录号: JX280460)。通过核苷酸序列多重比较表明, *TaPAL* 基因与其他植物 PAL 基因高度同源, 预测的蛋白序列包含与水稻、玉米 PAL 相同的脱氨基位点和催化活性位点。PAL 系统进化树显示, *TaPAL* 与松科类植物 PAL 聚类关系最近。另外, 对比发现 *TaPAL* 基因组 DNA 序列与 cDNA 序列完全一样, 表明该基因无内含子。

**关键词:**油松; 苯丙氨酸解氨酶; 克隆; 序列分析

**中图分类号:** S791.254

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-7461(2013)03-0098-06

## Molecular Cloning and Sequence Analysis of Phenylalanine Ammonia-lyase Gene in *Pinus tabulaeformis*

WEI Ning, FAN Jun-feng, YANG Pei-hua, LIU Yong-hong, LIU Chun-ying

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The cDNA and DNA sequence of phenylalanine ammonia-lyase gene was cloned from *Pinus tabulaeformis* for the first time by the method of homology cloning. The full length of cDNA was 2 157 bp, containing a complete open reading frame and 718 amino acids were encoded, designated as *TaPAL* (Accession number: JX280460). It was indicated that the nucleic acid sequence of *TaPAL* shared a high identity with other plants' via multiple alignment. The domination sites and catalytic active sites appeared in PAL protein of *Oryza* and *Zea mays* were also found in that of inferred protein sequence. Phylogenetic tree analysis suggested that *TaPAL* was much closer to PALs from Pinaceae than that from other plants. Moreover, this gene was found to be intronless because the cDNA and genomic DNA sequence of *TaPAL* were completely the same.

**Key words:** *Pinus tabulaeformis*; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); cloning; sequence analysis

油松(*Pinus tabulaeformis*)具有生长迅速、耐贫瘠、耐干旱等优良特性,在水土保持、涵养水源等方面均具有重要作用,是我国北方地区造林绿化的先锋树种。油松自然分布区广泛,地域跨陕西、山东、辽宁等 14 个省区,生态适应区达  $3 \times 10^6 \text{ km}^2$ <sup>[1]</sup>。油松经济价值高,用途广,不仅被称为用材树种,还具有一定的药用和观赏价值。但油松受到红脂大小蠹、立枯病和阿扁叶蜂等病虫害侵袭后,易出现嫩梢

枯萎,球果干瘪,针叶提前脱落,生长量萎缩,甚至整株死亡的现象<sup>[2-3]</sup>,对西北地区的荒山造林十分不利。关于油松的病虫害防治已经有了一定的研究,但多运用生理生化指标进行测定,在基因水平的研究较少,因此依靠基因工程技术开展对油松抗虫性及抗逆性的研究具有重要意义。

苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)是植物苯丙烷类代谢途径的关键酶和限

收稿日期: 2013-02-03 修回日期: 2013-03-19

基金项目: 林业公益性行业科研专项(200704039)。

作者简介: 魏宁,男,在读硕士,研究方向: 油松遗传改良。E-mail: weining1203@163.com

\* 通信作者: 樊军锋,男,博士,研究员,研究方向: 杨树、油松基因工程、新品种选育与遗传改良。E-mail: fanjf28@163.com

速酶,是连接生物体初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶<sup>[4]</sup>。植物在紫外照射、病虫害侵袭、低温、机械损伤、毒素处理等胁迫诱导下,都会增强 PAL 的表达<sup>[5]</sup>。PAL 在细胞分化和木质化、植物黄酮类化合物的合成以及根瘤的形成中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。PAL 活性的高低与植物的抗病性呈正相关关系,PAL 代谢途径中木质素、植保素以及多酚化合物的积累能够有效抵抗病虫害的侵袭<sup>[7]</sup>,这些化合物的形成都与 PAL 含量存在间接关系,所以 PAL 被认为在植物抗病抗虫过程中发挥着重要作用。

目前,已对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、豌豆(*Pisum sativum*)、杨树(*Populus tremula*)、水稻(*Oryza sativa*)、甜荞(*Fagopyrum esculentum*)、毛竹(*Phyllostachys edulis*)、南欧海松(*Pinus pinaster*)等多种植物 PAL 进行了 cDNA 克隆和序列分析,然而关于油松 PAL 尚未报道。本研究以油松为试材,采用同源克隆的方法,克隆其 PAL cDNA 开放阅读框(open reading frame,ORF)和 DNA 序列,并进行生物信息学分析,以期利用基因工程技术改良油松积累一定的分子生物学依据,同时也为深入研究 PAL 结构、表达和调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试油松于 2011 年 3 月采自西北农林科技大学南校区;RNA 提取试剂盒与高效琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州宝赛生物科技公司;质粒小量提取试剂盒 RQ1 RNase-Free DNase 购自 Promega;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas;载体系统 PUCM-T 购自上海生工;2×Taq MasterMix(含染料)购自康为世纪;引物由 Invitrogen 合成;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 油松叶片基因组 DNA 的提取 油松嫩叶 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法。提取的 DNA 经 0.8%琼脂糖电泳检测,纯度和浓度通过 NANO-100 核酸蛋白测定仪检测。

1.2.2 油松叶片总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成 采用植物总 RNA 提取试剂盒提取新鲜油松嫩叶的 RNA,经 RQ1 RNase-Free DNase 消化后,参照试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.3 PAL 基因的扩增 参照 GenBank 中已登录的其他植物 PAL 基因序列设计一对特异性引物。

上游引物 TaPALS:5'-ATGGTTGCAGCAG-CAGAAAT-3'

下游引物 TaPALA:5'-TCAGAATGGGC-CAGGAGTTC-3'

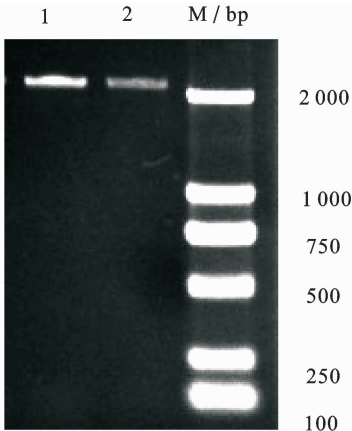
分别以油松基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,以 DNA 为模板的反应体系:2×Taq MasterMix 25 μL、10 pmol·L<sup>-1</sup>上下游引物各 1 μL、模板 DNA 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 22 μL、总体积 50 μL;以 cDNA 为模板的反应体系:2×Taq MasterMix 25 μL、10 pmol·L<sup>-1</sup>上下游引物各 1 μL、模板 cDNA 2 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。PCR 反应条件:94℃、4 min;95℃、30 s;60℃、1 min;72℃、150 s,共 35 个循环;72℃、10 min;4℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测胶回收后连接至 PUCM-T 载体,然后将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒送上海生工生物工程公司测序。

1.2.4 TaPAL 序列的生物信息学分析 通过在线工具 NCBI 中的 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 TaPAL DNA 序列和氨基酸序列相似性分析,利用软件 ORF Finder 查找序列的开放阅读框。使用软件 MEGA5 对 TaPAL 氨基酸进行多序列对比并构建系统进化树。借助在线蛋白分析工具 ExPASy(<http://expasy.org/>)对推测的蛋白进行相关生物信息学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 油松 PAL 基因 cDNA 序列的克隆

以油松总 RNA 为模板,采用特异性引物经 RT-PCR 扩增,得到长度约 2 200 bp 左右的条带(图 1)。克隆测序结果表明,该 cDNA 片段长度为 2 157 bp。



1, 2: PCR 产物; M: Dm2 000 DNA Marker

图 1 TaPAL cDNA 序列的扩增

Fig. 1 PCR product of TaPAL cDNA

### 2.2 油松 PAL 基因 DNA 序列的克隆

以油松基因组 DNA 为模板,通过特异性引物进行 PCR 扩增得到约 2 200 bp 左右的条带(图 2),

经克隆测序表明,该 DNA 片段长度为 2 157 bp。

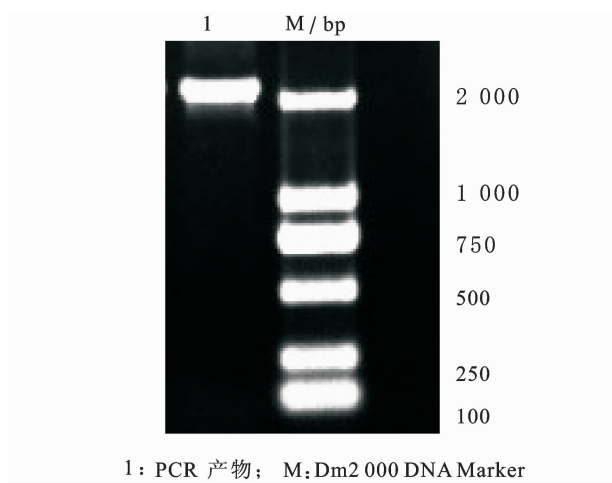


图 2 TaPAL DNA 序列的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR product of TaPAL DNA

### 2.3 油松 PAL 的序列分析

根据 GenBank 中已登录的其他植物 PAL 序列设计一对特异性引物,从油松幼嫩针叶 cDNA 和基因组 DNA 中分别扩增出一特异性条带,长度均为 2 157 bp,包含一个完整的开放阅读框,编码 718 个氨基酸(图 3)。对比发现,油松基因组 DNA PAL 序列与 cDNA 序列完全一致,即 TaPAL 无内含子。BlastN 比对结果表明, TaPAL 与马尾松 (*Pinus massoniana*, GQ142010)、南欧海松 (*Pinus pinaster*, AY641535)、火炬松 (*Pinus taeda*, U39792)、欧洲赤松 (*Pinus sylvestris*, AF353983)、北美云杉 (*Picea sitchensis*, HM202961)、西部白松 (*Pinus monticola*, AF019965)的 PAL 同源性均为 90% 以上,其中与马尾松 PAL 同源性高达 99%。

### 2.4 油松 PAL 氨基酸序列及其空间结构分析

将推导的氨基酸序列经 BlastP 对比发现, TaPAL 与其他植物 PAL 高度同源。其中与马尾松、南欧海松,欧洲赤松一致性达 90% 以上,其次与银杏 (*Ginkgo biloba*, ABU49842)同源性为 84%,与麻黄 (*Ephedra sinica*, BAG74770)同源性为 77%,与黄芩 (*Scutellaria baicalensis*, ADN32767)同源性为 66%,说明 PAL 在不同物种进化过程中存在保守位点。在线工具 ScanProsite(<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)和 Blastp 分析共同表明: TaPAL 序列具有典型的苯丙氨酸/组氨酸解氨酶蛋白标签,即 [GS]-[STG]-[LIVM]-[STG]-[SAC]-S-G-[DH]-L-x-[PN]-L-[SA]-x(2,3)-[SAGVTL][8], 与该蛋白含有的典型苯丙氨酸解氨酶活性中心特征序列 GTITASGDLVPLSYIAG 相符,该活性序列位于第 199~216 氨基酸。此外,该蛋白还存在其他酶活性位点(图 3 和图 4),这些活性位点与水稻<sup>[9]</sup>、

拟南芥<sup>[10]</sup>、甜荞<sup>[11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>、银杏<sup>[13]</sup> 相同或相似,说明 TaPAL 属于 PAL 家族成员。另外,在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/prot-param/protparam>)分析表明: TaPAL 含有 718 个氨基酸,分子量为 78-243.6 Da,理论等电点 PI 为 6.04, GRAVY 值为-0.171(亲水性蛋白),与已知其他植物 PAL 性质相似。

使用 SOPMA 软件对 TaPAL 氨基酸序列进行二级结构预测,结果表明,该序列包含 57.1% 的  $\alpha$ -螺旋,5.57% 的  $\beta$ -转角,29.39% 的无规卷曲和 7.94% 的延伸链。以欧芹 PAL 为模型,利用 Swiss-model 对 TaPAL 进行三维建模,并通过 Pymol 软件分析,结果如图 5。SignalP 3.0 分析表明,该序列不含信号肽,说明该蛋白不属于胞外分泌蛋白。TMPred 在线工具预测 TaPAL 跨膜结构域表明在第 261~286 氨基酸序列可能存在一个由内到外的跨膜区。

### 2.5 TaPAL 系统进化树分析

利用 MEGA5 中 Clustalw 模块将 TaPAL 氨基酸序列与其他植物 PAL 氨基酸序列进行对比后,再用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树(图 5),经过 100 次 bootstrap 校验。结果显示, PAL 在裸子植物、单子叶植物、双子叶植物、蕨类植物、苔藓植物中各自聚成 1 大类,与植物学分类系统一致。进一步分析表明,油松与同为松属的马尾松和欧洲赤松处于同一分支,说明它们亲缘关系较近,而与银杏、麻黄遗传距离稍远。美国树木分类学家 Little 和遗传学家 Critchfield 对松属进行分类时,曾将油松、马尾松和欧洲赤松统一归属于欧洲松亚组<sup>[1]</sup>,与此处聚类相符,且 TaPAL 与马尾松和欧洲赤松的 PAL 一致性均为 99%,推测其中 2 种植物可能是另 1 种植物的变种。另外,同属禾本科的玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和毛竹 (*Phyllostachys edulis*)处于同一分支,但水稻和毛竹的亲缘关系更近;双子叶植物中,伞形科的胡萝卜 (*Daucus carota*) 和唇形科的紫苏 (*Perilla frutescens*)聚为一支,说明胡萝卜和紫苏亲缘关系较其它双子叶植物更近。

## 3 结论与讨论

利用同源克隆的方法首次从油松中克隆得到 PALcDNA 和 DNA 序列。分析表明,该基因长 2 157 bp,编码 718 个氨基酸,分子量为 78.24 kD,包含有一个完整的开放阅读框。对比发现,油松基因组 PAL DNA 无内含子,该结构特征与班克松、银杏 PAL 序列一致<sup>[13-14]</sup>。然而,已报道被子植物的基因组 PAL 序列都具有一个或两个内含子<sup>[10]</sup>,

1 ATGGTTGCAGCAGCAGAAATGACGCAGGCCAATGAAGTTCAAGTTAAAAGCACTGGGCTGTGCACGGACTTCGGCTCGTCTGGCAGCGAT  
1 M V A A A E M T Q A N E V Q V K S T G L C T D F G S S G S D  
91 CCACTGAATGGGTTGAGCAGCCAAGGCCATGGAAGGAAGTCACTTTGAAGAAGTGAAAGCGATGGTGGATTTCGTATTGGGAGTCAAG  
31 P L N W V R A A K A M E G S H F E E V K A M V D S Y L G V K  
181 GAGATTTTCATTGAAGGGAAGTCTCTGACAATCTCAGACGTTGCTGCCGTTGCTCGAAGATCGCAAGTGAAAGTGAAATTGGATGCTGAA  
61 E I F I E G K S L T I S D V A A V A R R S Q V K V K L D A E  
271 GCTGCCAATCTAGGGTCGAGGAGAGTTCAAAGTGGTCTCACCAGATGACCAAGGGGACGGATACCTATGGTGTCACTACTGGTTTC  
91 A A K S R V E E S S N W V L T Q M T K G T D T Y G V T T G F  
361 GGAGCCACTTCTCAGAGGAGAACGAACAGGGAGCCGAGCTTCAGAAGGAGCTGATCCGCTTCTTGAATGCCGGGGTTCTTGGCAATGCG  
121 G A T S H R R T N Q G A E L Q K E L I R F L N A G V L G K C  
451 CCAGAAAATGTTTGTCCGAAGATACTACCCGGGCTGCCATGCTGGTTCGGACGAATACTCTGCTGCAGGGCTACTCGGGCATAAGGTGG  
151 P E N V L S E D T T R A A M L V R T N T L L Q G Y S G I R W  
541 GACATTTCTGAAACTGTGGAGAAGCTGTGTGAATGCCGGGGCTGACCCCAAAGCTGCCCTTAAGAGGAACCATAACTGCTTCTGGTGATCTG  
181 D I L E T V E K L L N A G L T P K L P L R G T I T A S G D L  
631 GTTCCCTGTCTTATATTGCTGGGCTCTTGACCGGGAGGCCTAATTCAGAGTCAGATCCAGAGATGGAATTGAAATGAGCGGAGCCGAA  
211 V P L S Y I A G L L T G R P N S R V R S R D G I E M S G A E  
721 GCGCTCAAGAAAGTGGGCTGGAAAAGCCCTTGAATTGCAGCTTAAAGAAGGTCTGGCCATTGTTAATGGCACTTCAGTGGGAGCAGCA  
241 A L K K V G L E K P F E L Q L K E G L A I V N G T S V G A A  
811 CTGGCTTCCATTGTGTGCTTCGATGCCAATGTCTTGTCTGCTCTGCTGAAGTAATCTCTGCCATGTTCTGCGAGGTATGAATGGGAAG  
271 L A S I V C F D A N V L A L L S E V I S A M F C E V M N G K  
901 CCTGAGTTTACGGATCCATTAAGCTCACAAGCTGAAGCACCATCCTGGCCAAATGGAAGCTGCAGCGATCATGGGGTATGCTTGGACGGG  
301 P E F T D P L T H K L K H H P G Q M E A A A I M G Y V L D G  
991 AGTTCTTATATGAAACACGCTGCTAAGCTCCATGAGATGAATCCTCTGCAGAAGCCAAAGCAGGATCGCTATGCGCTTCGCACTTCGCTT  
331 S S Y M K H A A K L H E M N P L Q K P K Q D R Y A L R T S P  
1081 CAGTGGCTCGGCCCTCAGGTGGAGATTATCAGATCTGCAACTCAGATGATTGAGCGGAAATCAATTCTGTGAATGACAATCCAGTAATT  
361 Q W L G P Q V E I I R S A T H M I E R E I N S V N D N P V I  
1171 GATGTTGCCAGAGACAAAGCTCTACATGGAGGGAATTTCCAGGGCACACCTATTGGTGTTCATGGATAACCTTCGTCTGTCAATTTC  
391 D V A R D K A L H G G N F Q G T P I G V S M D N L R L S I S  
1261 GCAATTTGGGAAATTGATGTTGCTCAATTCTCAGAGCTTGTGAATGATTACTACAATGGAGGCTTGCCCTCGAATCTAAGTGGCGGGCTT  
421 A I G K L M F A Q F S E L V N D Y Y N G G L P S N L S G G P  
1351 AATCCAGCCTGGATTATGGACTGAAAGGGGCGAGATCGCTATGGCTTCTTACACTTCTGAGCTTCTTACCTGGCAAACTCTGTCACC  
451 N P S L D Y G L K G A E I A M A S Y T S E L L Y L A N P V T  
1441 AGCCATGTACAGAGCGCCGAACAGCATAACCAGGATGTGAATTCTCTGGGTCTTGTTCAGCTAGAAAATCTGCCAGGCCATCGATATT  
481 S H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L V S A R K S A E A I D I  
1531 CTGAAGCTGATGCTCTCCACATACCTGACAGCTCTGTGCCAGGCTGTGGATTAAAGGCATCTGGAAGAAAACATGCTGGTCACTGTGAAG  
511 L K L M L S T Y L T A L C Q A V D L R H L E E N M L V T V K  
1621 CAGATTGTTTCTCAGGTAGCCAAGAAAACCTTGAGCACAGGGCTCAACGGGGAGCTTTTGCCAGGCCGTTTCTGCGAAAAGGATTGCTT  
541 Q I V S Q V A K K T L S T G L N G E L L P G R F C E K D L L  
1711 CAGGTAGTGGATAACAGCATGTTTTCTCTTACATTGACGATCCCTGCAATGCCAGCTACCCATTGACTCAGAACTGAGAAACATCTGT  
571 Q V V D N E H V F S Y I D D P C N A S Y P L T Q K L R N I L  
1801 GTGGAACACGCCTTCAAGAACGGAGAAGGTGAGAAGGATCCCAACACTTCCATTTTCAATAAGATTCTCTGTTGAAGCCGAGCTGAAG  
601 V E H A F K N G E G E K D P N T S I F N K I P L F E A E L K  
1891 GCACAGCTTGAAGTGAAGTTAGTCTGGCCAGGGAAGTTATGACAAAGGGACCAGCCCTCTGCCCAACAGAAATCCAGGAATGCAGGTCT  
631 A Q L E L Q V S L A R E S Y D K G T S P L P N R I Q E C R S  
1981 TATCTCTCTATGAATTTGTGAGAAAGCAGCTCGGTACCAAGCTTCTGTCTGGAAGTGGAGGCTTCTCTGCTGGAAGTGAAGTGAAGTG  
661 Y P L Y E F V R K Q L G T K L L S G T R T T S P G E V I E V  
2071 GTTTACACGCTATCAGTGAGGACAAGGTCTATGTCCTCTCTTCCAATGCTGGATGGGTGGAAGGAAGTCTGCGCCATTCTGA  
691 V Y D A I S E D K V I V P L F Q C L D G W K G T P G P F \*

注:灰色背景字体分别为起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA;虚线部分表示 PAL 活性中心特征序列;加粗字体表示脱氨基位点;下划线部分表示催化活性位点。

图 3 TaPAL cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 3 TaPAL cDNA and its deduced amino acid sequences

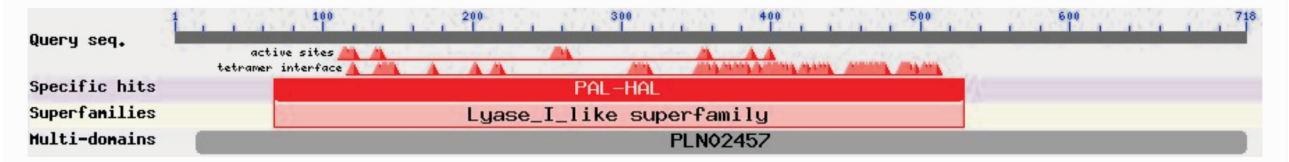


图 4 TaPAL 蛋白包含的保守区域

Fig. 4 Conserved domains of TaPAL protein

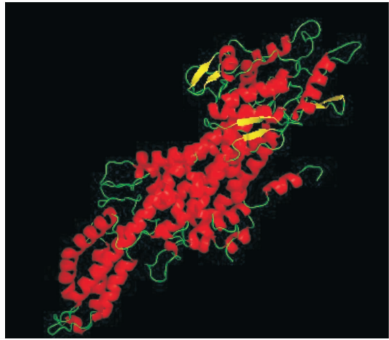


图 5 TaPAL 蛋白 3D 结构

Fig. 5 3D structure of TaPAL protein

内含子在基因转录表达过程中发挥调控作用<sup>[15]</sup>,而 *PAL* 有内含子对植物代谢的影响及裸子植物 *PAL* 内含子是否在进化过程中丢失还需进一步研究。

*PAL* 普遍由小的多基因家族组成,一般有 2~5 个家族成员<sup>[16]</sup>,且该基因的表达具有组织特异性,就同一植株来说,不同组织 *PAL* 的活性也不尽相同,通常愈幼嫩的组织 *PAL* 表达量愈大<sup>[17]</sup>。对于 *TaPAL* 的组织特异性表达以及是否由多基因家族组成还有待于进一步验证。张江涛<sup>[18]</sup>研究表明,植

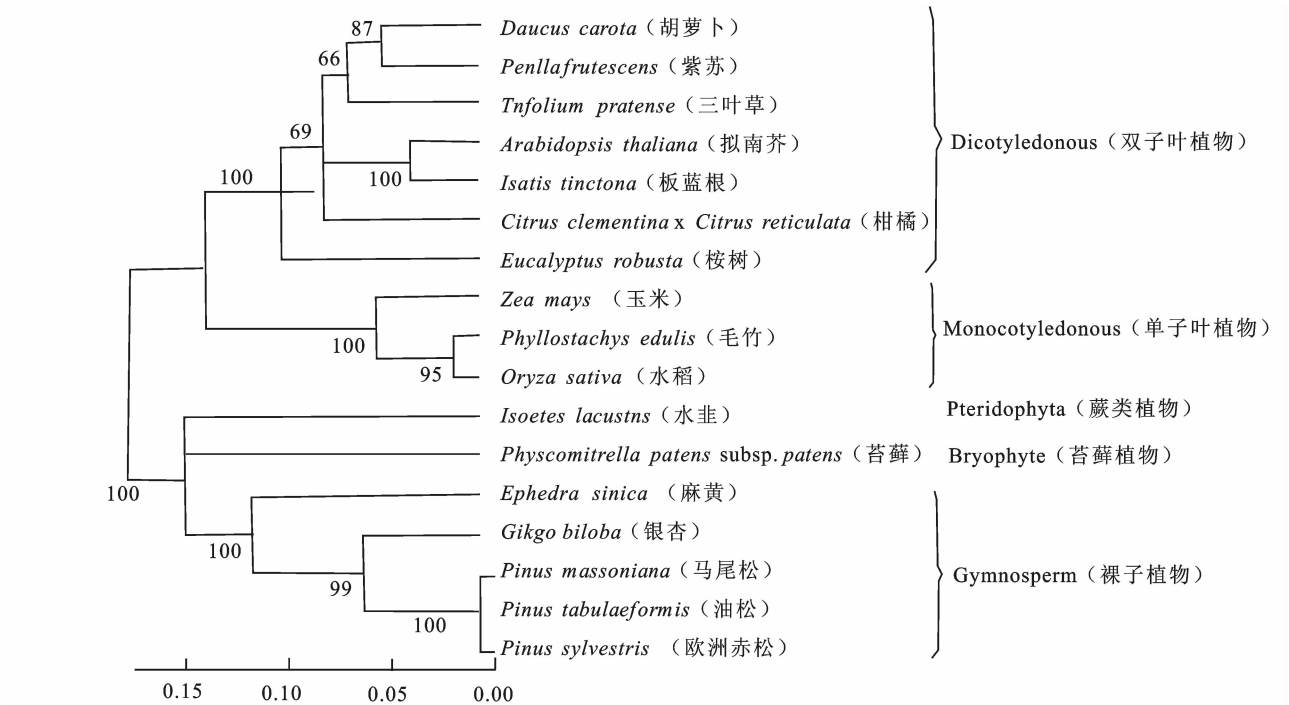


图 6 基于 Neighbor-Joining 方法构建的 TaPAL 与其他植物 PAL 系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree between TaPAL and PALs from other plants based on Neighbor-Joining method

物受致病菌感染后,*PAL* 活性会发生规律性变化,其活性通常会在几小时后其活性急剧上升。*PAL* 是苯丙烷类代谢途径中关键酶和限速酶,催化 L-苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,反式肉桂酸参与木质素、植保素等次级代谢产物的合成<sup>[19]</sup>,这些次级代谢物的生成量与 *PAL* 活性呈正相关<sup>[20-21]</sup>。而木质素的形成可以增加细胞壁的厚度,形成病原菌入侵的天然屏障<sup>[19]</sup>,植保素对草食性昆虫具有毒害和趋避作用<sup>[22]</sup>。由此可见,*PAL* 活性的增强,可以在一

定程度上提高植物对病虫害的抵御能力。

尽管苯丙氨酸解氨酶在植物生长发育过程和抗病虫过程中起着非常重要的作用,但关于该基因启动子及相关转录因子的研究较少,需要进一步开展更深入和广泛的研究。本研究从油松中分离得到 *PAL* 基因,并进行了生物信息学分析,为进一步利用基因工程技术提高油松对不良环境的抵御能力积累了一定的分子生物学依据。

参考文献:

[1] 徐化成. 油松[M]. 北京:中国林业出版社,1993:18-21.

[2] 张海风,王鸿喆,王全坡,等. 西北地区红脂大小蠹危害规律的研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(4):154-167.

ZHANG H F, WANG H ZH, WANG Q P, *et al.* Damaging regularity of red turpentine bark beetle(Scolytidae;*Dendroctonus valens* Le Conte) in northwest China[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(4):154-167. (in Chinese)

[3] 马西寅,严海峰,周卷华,等. 楼观台森林公园油松松阿扁叶蜂化学防治技术研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(4):132-135.

MA Y Y, YAN H F ZHOU J H, *et al.* Chemical control of *Acantholyda posticalis* at Louguantai Forest Park[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(4):132-135(in Chinese)

[4] 欧阳光察,薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J]. 植物生理学通讯,1988,24(3):9-16.

OUYANG G C, XUE Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanosd metabolism in plant [J]. Plant Physiology Communications,1988,24(3):9-16. (in Chinese)

[5] 李莉,赵越,马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、G4H、4CL 研究新进展[J]. 生物信息学,2007(4):187-189.

LI L, ZHAO Y, MA J L. Recent progress on key enzymes: PAL, C4H, 4CL of phenylalanine metabolism pathway[J]. China Journal of Bioinformatics,2007(4):187-189. (in Chinese)

[6] 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):15115-15119,15112.

[7] HARTLEY S E, FIRN R D. Phenolic biosynthesis, leaf damage, and insect herbivory in birch (*Betula pendula*) [J]. Journal of Chemistry and Ecology,1989,15(1):275-283.

[8] MAHESH V, RAKOTOMALALA J J, GAL L L, *et al.* Isolation and genetic mapping of a *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids[J]. Plant Cell Rep. ,2006,25:986-992.

[9] MINAMI EI, OZEKI Y, MATSUOKA M, *et al.* Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants[J]. European Journal of Biochemistry,1989,185(1):19-25.

[10] WANNER L A, LI G Q, WARE D, *et al.* The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology,1995,27(2):327-338.

[11] 李成磊,蒙华,张晓伟,等. 甜荞苯丙氨酸解氨酶基因 PAL 的克隆及序列分析[J]. 食品科学,2011,32(7):255-257.

LI C L, MENG H, ZHANG X W, *et al.* Cloning and sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene from *Fagopyrum esculentum* [J]. Food Science,2011,32(7):255-257. (in Chinese)

[12] ROSLER J, KREKEL F, AMRHEIN N, *et al.* Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity [J]. Plant Physiol. ,1997,113(1):175-179.

[13] 许峰. 银杏 GbPAL 和 GbANS 基因的克隆与表达及 ALA 对类黄酮含量的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2005.

[14] BUTLAND S L, CHOW M L, ELLIS B E. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures[J]. Plant Molecular Biology,1998,(37):15-24.

[15] 李江涛,杨世湖,陈苗苗,等. 内含子 1、2 对水稻 pib 基因启动子活性影响的转基因分析[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):15-19.

[16] LEE S W, ROBB J, NAZAR R N. Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Journal of Biology and Chemistry,1992,267(17):11824-11830.

[17] RITTER H, SCHULZ G F. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. The Plant Cell,2004,16(12):3426-3436.

[18] 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.

ZHANG J T, DUAN G M, YU Z Y. Relationship between phenylalanine ammonia-lyase(PAL) activity and resistance to rice blast[J]. Plant Physiology Communications,1987,13(6):34-37. (in Chinese)

[19] FERRER J L, AUSTIN M B, STEWART C, *et al.* Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. Plant Physiology and biochemistry,2008,46(3):356-370.

[20] RUBERY R H, NORTHCOTE D H. Site of phenylalanine ammonia-lyase activity and synthesis of lignin during xylem differentiation[J]. Nature,1968,219:1230-1234.

[21] REINOLD S, HAHNBROCK K. Biphasic temporal and spatial induction patterns of defense-related mRNA and protein in fungus-infected parsley leaves [J]. Plant Physiology,1996,112:131-140.

[22] NANCY L, PAIVA. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication[J]. Journal of Plant Growth Regulation,2000,19:131-143.