

# 水曲柳 *FmPAL* 基因的克隆及表达模式的分析

李吉祥,陈晓慧,马铭浩,王恒涛,詹亚光,曾凡锁\*

(东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘 要:**在催化苯丙烷类代谢途径的第一步反应中,苯丙氨酸解氨酶(PAL)起到关键酶和限速酶的作用,对植物有非常重要的生理意义。对水曲柳 *FmPAL* 基因进行了生物信息学以及表达模式分析,包括时空及其在 NaCl、低温、IAA、ABA 以及 GA3 处理下的特异性表达特征。结果表明,水曲柳 *FmPAL* 编码区全长为 1 674 bp,编码 557 个氨基酸。*FmPAL* 蛋白为稳定的亲水性蛋白,不存在信号肽但具有跨膜结构域。*FmPAL* 基因与樟子松的 PAL 遗传距离比较近,说明它们亲缘关系比较近。*FmPAL* 基因在新生枝和叶中相对表达量高于花、芽、叶柄等部位,并在新生枝中表达量最高,具有组织特异性。水曲柳新生枝和叶片中 *FmPAL* 基因在 5 月表达量相对较高。在非生物胁迫和激素诱导下,*FmPAL* 基因的表达量随处理时间而改变,但其变化趋势不尽相同。在低温(4℃)、盐(NaCl)2 种非生物胁迫下,*FmPAL* 基因在处理 12 h 后表达量最高,分别为对照组的 34.3、24.3 倍;在低温(4℃)和盐(NaCl)处理 1 h 后,*FmPAL* 基因表达量最低。*FmPAL* 基因在脱落酸(ABA)处理 1 h 后表达量最高,为对照组的 11.9 倍;生长素(IAA)处理 12 h 后表达量最高,为对照组的 37.2 倍;赤霉素(GA)处理 24 h 后表达量最高,为对照组的 21.5 倍;而 *FmPAL* 基因在脱落酸(ABA)、生长素(IAA)和赤霉素(GA)处理 3 h 后表达量皆为最低。研究结果表明 *FmPAL* 基因响应非生物胁迫以及植物激素信号诱导。

**关键词:**水曲柳;*FmPAL*;生物信息学分析;非生物胁迫

**中图分类号:**S792.12      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2019)05-0010-07

## Cloning and Expression Pattern Analysis of PAL Gene in *Fraxinus mandschurica*

LI Ji-xiang, CHEN Xiao-hui, MA Ming-hao, WANG Heng-tao, ZHAN Ya-guang, ZENG Fan-suo\*

(Institute of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

**Abstract:** In the first step of catalyzing the metabolic pathway of phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase (PAL) plays a key role in enzymes and rate-limiting enzymes, and has important physiological significance for plants. This study analyzed the bioinformatics and expression pattern of *FmPAL* gene of *Fraxinus mandshurica*, including time and space and in low temperature, NaCl, IAA, ABA and GA3 specific expression characteristics under treatment. The results showed that the coding region of *FmPAL* was 1 674 bp in length and encoded 557 amino acids. *FmPAL* protein is a stable hydrophilic protein. It has no signal peptide but has transmembrane domain. The genetic distances of *FmPAL* gene and *Olea europaea* var. *sylvestris* were relatively close, indicating that their genetic relationship was relatively close. The relative expressions of *FmPAL* gene in fresh branches and leaves were higher than those in flowers, buds and petiole, and it was the highest in the new fresh branches. The *FmPAL* gene in the fresh branches and leaves was relatively high in May. Under the abiotic stress and hormone induction, the expression level of *FmPAL* gene changed with the treatment time, but the change trend was not the same. Under the abiotic stresses of

收稿日期:2018-12-03    修回日期:2019-04-01

基金项目:中央高校基本科研业务费(2572017DG03);黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19B201)。

作者简介:李吉祥,男,硕士在读,研究方向:植物逆境分子生物学。E-mail:1207289030@qq.com

\* 通信作者:曾凡锁,男,教授,研究方向:林木遗传改良和逆境分子生物学。E-mail:zengfansuo@126.com

low temperature (4℃) and salt (NaCl), the expression level of *FmPAL* gene was the highest after treatment for 12 hours, which was 34.3 times and 24.3 times of that of the control group, respectively. The expression of *FmPAL* gene was the highest after treatment with abscisic acid (ABA) for 1 hour, which was 11.9 times of that of the control group. The expression of *FmPAL* gene was the highest after auxin (IAA) treatment for 12 hours, which was 37.2 times of the control group; the expression level was the highest after gibberellin (GA) treatment 24 hours, which was 21.5 times of the control group; while the *FmPAL* gene was the lowest after 3 hours of treatment with abscisic acid (ABA), auxin (IAA) and gibberellic acid (GA). The results of this study indicated that the *FmPAL* gene was involved in abiotic stress and phytohormone signal induction.

**Key words:** *Fraxinus mandshurica*; *FmPAL*; bioinformatics analysis; abiotic stress

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类代谢中的关键酶和限速酶,在植物中木质素合成含苯丙烷骨架物质中起到关键性的作用<sup>[1]</sup>。在苯丙烷类代谢途径第一步中,苯丙氨酸解氨酶催化苯丙氨酸的非氧化脱氨基以形成肉桂酸。在之后的途径中,苯丙烷类代谢可通过 CA4H, 4CL 等酶的作用产生中间体,例如香豆酸、阿魏酸和芥子酸。这些酸可以进一步转化为香豆素、绿原酸,形成苯丙烷酸的 CoA 酯,为进一步转化为类黄酮、木质素等物质提供物质基础<sup>[2]</sup>。有学者 1961 年首次从植物中发现了这种酶,苯丙氨酸解氨酶的研究在不同物种中得到了迅速发展<sup>[1-2]</sup>。其在拟南芥中的生物因素和非生物因素影响表达研究证明苯丙氨酸解氨酶为苯丙烷类代谢途径中重要的环节,该途径产生的物质在植物受到生物和非生物胁迫条件下发挥了重要作用<sup>[3]</sup>。现已在松树<sup>[2]</sup>、水稻<sup>[4]</sup>、小麦<sup>[5]</sup>、马铃薯<sup>[6]</sup>、芒果<sup>[7]</sup>、鸭梨<sup>[8]</sup>、石榴<sup>[9]</sup>、豌豆和象草<sup>[10]</sup>等多种植物中分离纯化得到 PAL 并对其进行研究。

研究表明,同一植物中不同的 PAL 基因表达特性及表达调控机制具有显著的差异性。在拟南芥中具有 4 个不同的 PAL 基因,其表达具有组织特异性和时空表达特异性。4 个 *AtPAL* 基因在种子、幼苗、叶、花等部位都进行表达。*AtPAL1* 和 *AtPAL2* 表达模式相似程度较高,2 种基因在拟南芥的根和花序茎中表达水平较高,而 *AtPAL3* 的表达水平在相同部位几乎没有表达<sup>[11]</sup>。同一植物在不同的部位 PAL 基因表达量差距也很大。例如,杨树中在幼叶、顶芽、幼茎中具有较高的 PAL 活性,但在成熟组织中活性很低<sup>[12]</sup>。在水稻中测定的 PAL 活性远高于小麦等其他物种,由此证明在不同物种植物中 PAL 活性具有差异。水稻中的 *OsPAL1* 和 *OsPAL5* 表达情况相似,在 ABA 和低温胁迫的处理下表达量极显著的上升<sup>[11-13]</sup>。植物的苯丙烷类代谢途径能够通过外界逆境条件的胁迫下被激活,从而增加 PAL 基因的活性,提高植物抗逆境能力,起

到保护和调节的作用。

水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)为木樨科桦属(又称为白蜡属)落叶乔木,是东北珍贵的阔叶用材树种之一。由于地域特征水曲柳能够抵御寒冷,干旱和盐碱,且纹理美丽,木质优良,因而用途广泛,具有很高的经济价值<sup>[14]</sup>。本研究从转录组中鉴定并克隆了水曲柳 *FmPAL* 基因,使用多种生物信息学软件对 *FmPAL* 基因进行分析,包括氨基酸序列理化性质分析及蛋白质二级结构域、信号肽及跨膜结构的预测和分析及进化树的构建,同时研究该基因在不同时间和不同部位的表达模式,并进一步研究了其在非生物胁迫以及激素处理下的表达模式。本研究在非生物胁迫和植物激素信号诱导的条件下揭示了 *FmPAL* 的表达特征,同时为水曲柳 *FmPAL* 基因在木质素生物合成中的作用的进一步研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

于东北林业大学实验林场中采集 5—9 月水曲柳皮、新生枝、花、芽、叶、叶柄样本作为试验材料,置于 80℃ 的冰箱中冷藏待用。取水曲柳组织培养的幼苗,试验组分别用非生物胁迫低温(4℃)、NaCl (200 mmol · L<sup>-1</sup>) 处理以及生物胁迫 ABA(脱落酸, 100 μmol · L<sup>-1</sup>)、GA(赤霉素, 100 μmol · L<sup>-1</sup>) 和 IAA(吲哚乙酸, 100 μmol · L<sup>-1</sup>) 处理,对照组未进行任何胁迫处理,在处理的 1、3、6、12、24 h 和 48 h 进行取样,重复 3 次。所有的样品都冷藏于 -80℃ 的冰箱。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *FmPAL* 基因的克隆 应用 CTAB 法提取水曲柳总 RNA<sup>[15]</sup>,并使用逆转录试剂盒将可用的 RNA 逆转录成 cDNA;根据已经获得的水曲柳转录组数据设计简并引物(表 1)。利用 PCR 扩增 *FmPAL* 的 cDNA。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s;55℃ 30 s;70℃ 2.0 min, 30 cycles;72℃ 10.0 min。

回收纯化 PCR 产物,送上海生工生物公司对 PCR 产物进行基因测序。

表 1 克隆 *FmPAL* 基因编码区对应引物

Table 1 Cloning primers corresponding to coding region of <i>FmPAL</i> gene	
引物名称	引物序列
<i>FmPAL</i> -1F	5'GCCACATTCAACAACAAGAGC3'
<i>FmPAL</i> -1R	5'GGCAATCCGTTGTTGTAGTAATC3'
<i>FmPAL</i> -2F	5'ATGATTACTACAACAACGGATTGC3'
<i>FmPAL</i> -2R	5'AGGAAGTTTTAGTCCCAAAGTCT3'

1.2.2 *FmPAL* 基因的生物信息学分析 将测序结果中所获得的水曲柳 *FmPAL* 基因片段利用 SeqMan 软件进行序列拼接,后对完整 *FmPAL* 基因核苷酸以及氨基酸序列进行分析。分别应用 Protparam<sup>[15-16]</sup>、ProtScale<sup>[17]</sup>、SignalP<sup>[18]</sup>、TMPred<sup>[19]</sup> 和 GOR4 等<sup>[20]</sup>在线软件对 *FmPAL* 蛋白质的基本理化性质、亲水疏水性、跨膜结构域、二级结构以及 *FmPAL* 基因是否具有分泌蛋白所需的疏水性 N 端信号肽进行分析预测。利用 NCBI、ClustalX、MEGA5.0 等生物信息学工具分析 *FmPAL* 氨基酸序列。

1.2.3 *FmPAL* 的转录表达定量分析 利用 CTAB 法提取 1.1 中处理的水曲柳材料的 RNA 并反转录成 cDNA。

将稀释 10 倍的 cDNA 作为模板,使用实时定量 TOYOBO (SYBR Green) 试剂盒,总体系为 20  $\mu$ L;无菌去离子水 6.8  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L,引物见表 2,2 $\times$  TransStart Top Green qPCR SuperMix:10  $\mu$ L,Passive Reference Dye(50 $\times$ ):0.4  $\mu$ L,cDNA 模板 2  $\mu$ L。

利用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR,试验重复 3 次。反应程序:

95 $^{\circ}$ C 30 s  
95 $^{\circ}$ C 5 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 34 s(40 cycles)  
95 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 15 s

利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法和 2<sup>- $\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法计算基因相对表达量,公式中的  $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub>=(CT *qFmPAL*-CT *TU*)处理组-(CT *qFmPAL*-CT *TU*)对照组, $\Delta$ C<sub>t</sub>=(CT *qFmPAL*-CT *TU*)。

表 2 实时荧光定量 PCR 采用的引物序列

Table 2 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR	
引物名称	引物序列
<i>TU</i> -F	5'AGGACGCTGCCAACAACCTTT3'
<i>TU</i> -R	5'TTGAGGGGAAGGGTAAATAGTG3'
<i>qFmPAL</i> -F	5'TTCTTGCGAAACCCTGTC3'
<i>qFmPAL</i> -R	5'GCAACTTGGCTAACTGTATTCT3'

## 2 结果与分析

### 2.1 氨基酸序列理化性质分析及蛋白质二级结构域的预测

通过 PCR 测序结果进行拼接得到的 *FmPAL* 开放阅读框长度为 1 674 bp,共编码 557 个氨基酸。使用在线分析软件 Protparam 对 *FmPAL* 基因编码的蛋白质的基本理化性质进行初步分析。*FmPAL* 蛋白分子量是 60 927.68;不稳定系数为 33.14(不稳定系数<40 时,预测蛋白质稳定,反之为不稳定),为稳定类蛋白;预测的理论等电点(*pI*)是 5.55;带负电荷残基总数(Asp+Glu)为 66;正电荷残基总数(arg+lys)为 54;蛋白总的平均疏水性是-0.150,表明该蛋白质是亲水性蛋白。

*FmPAL* 蛋白含有 41.65%的  $\alpha$  螺旋(Alpha-helix)、12.39%的延伸链(Extended strand)和 45.96%的无规则卷曲(Random coil)。

### 2.2 信号肽及跨膜结构的预测和分析

信号肽一般由 15~30 个氨基酸残基组成,其结构包括中间疏水序列、信号肽的 C 端(较长,带负电)和一个带正电的 N 端(碱性氨基末端)等 3 部分,位于蛋白质的 N 端<sup>[21]</sup>。利用 SignalP 在线软件对 *FmPAL* 蛋白进行分析。结果表明 *FmPAL* 蛋白不存在信号肽。跨膜结构是含有 19 个疏水氨基酸残基的肽段,它卷曲成一个  $\alpha$  螺旋,N 端是长的亲水结构,C 端是较短的亲水结构<sup>[21-22]</sup>。使用 TMPred 在线软件对 *FmPAL* 蛋白质的跨膜结构进行分析,由图 1 可见,*FmPAL* 蛋白可能存在 4 个跨膜结构域。其中由内到外(i $\rightarrow$ o)的跨膜结构域有 4 个分别位于 41~59、108~135、255~275 位和 348~366 位,分数分别为 484、1226、38 和 704;由外到内(o $\rightarrow$ i)的跨膜结构域有 3 个分别位于 39~58、99~123

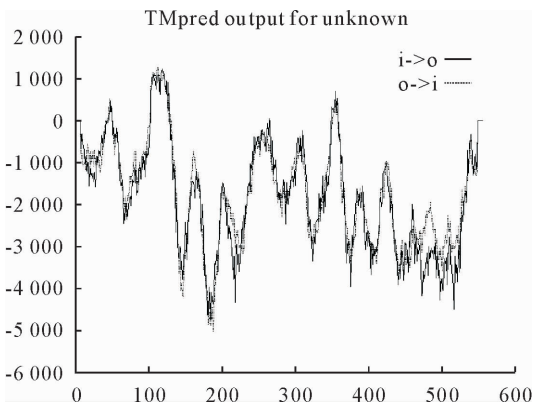


图 1 *FmPAL* 蛋白跨膜结构域的预测和分析  
Fig. 1 Prediction and analysis of *FmPAL* protein transmembrane domain

位和 348~366 位,分数分别为 507、1267 和 419(分数>500 为显著跨膜结构)。其由内到外的跨膜结构域与由外到内的跨膜结构域基本重合,由此可知 *FmPAL* 既有由外到内的跨膜能力,又有由内到外的跨膜能力。

2.3 氨基酸序列比对及系统进化树构建

先应用 Blast 对 *FmPAL* 序列进行同源比对,根据比对最大得分(max score)按顺序选择具有与 *FmPAL* 同源性高的 *PAL* 基因的物种,再利用 MEGA5.0 软件最大似然法(ML)构建系统发育进化树,结果显示,*FmPAL* 蛋白与其在樟子松(*Pinus sylvestris*)中的直系同源物具有较高的同源性。

来自不同物种的 31 条 *PAL* 蛋白质序列可以分为 2 类:其中樟子松(*Pinus sylvestris*)和水曲柳聚成一条分支,油橄榄(*O. europaea*)、紫花牵牛(*Ipo-*

*moea purpurea*)、甘薯(*I. nil*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、紫花风铃木(*Handroanthus impetiginosus*)、野生烟草(*Nicotiana attenuata*)、黄灯笼辣椒(*Capsicum chinense*)、香蜂花(*Melissa officinalis*)、红椒(*Capsicum baccatum*)、当归(*Angelica sinensis*)、彩叶草(*Plectranthus scutellarioides*)、赤藓(*Erythranthe guttata*)、紫苏(*Perilla frutescens*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、胡萝卜(*Daucus carota*)、潘那利番茄(*S. pennellii*)、普通烟草(*N. tabacum*)、美花烟草(*N. sylvestris*)、甜辣椒(*Capsicum annuum*)、黄胡萝卜(*D. carota* subsp. *sativus*)、广藿香(*Pogostemon cablin*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等成另一条分支(图 2)。水曲柳 *FmPAL* 蛋白与樟子松具有较近的遗传距离;而与当归、甘薯、紫苏和红椒等有着较远的遗传距离。

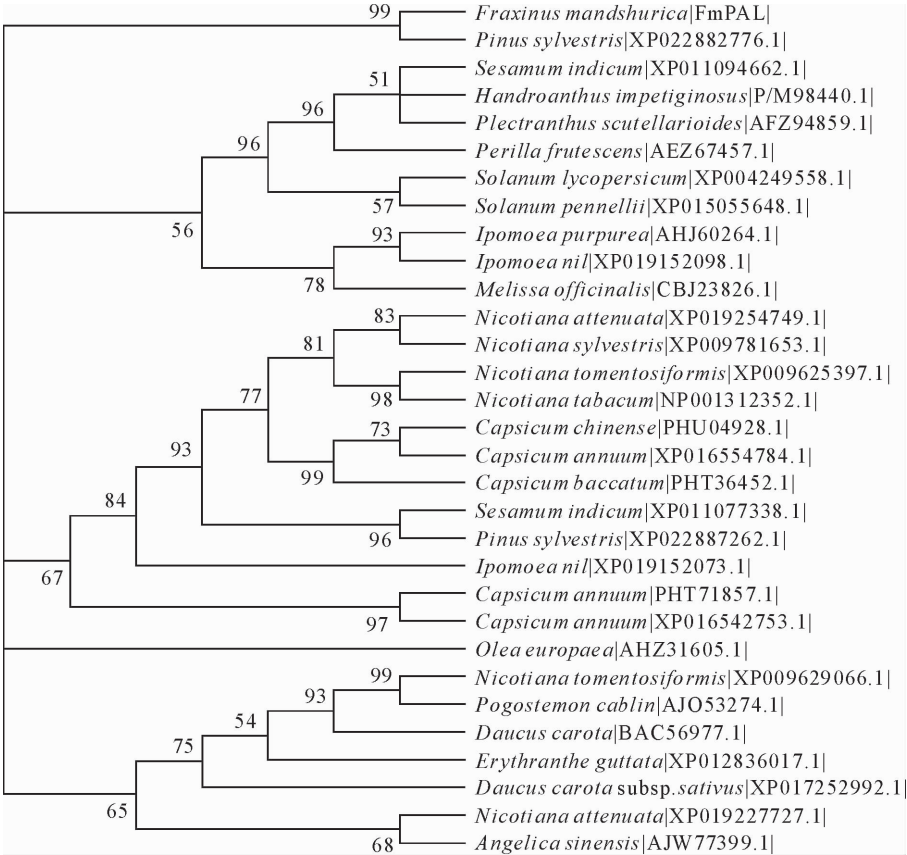


图 2 *FmPAL* 基因系统发育进化树

Fig. 2 *FmPAL* gene phylogenetic tree

2.4 *FmPAL* 在水曲柳中的表达模式分析

2.4.1 *FmPAL* 在水曲柳中的时空表达分析 通过荧光定量 PCR 分析 *FmPAL* 基因在水曲柳不同部位的表达水平。结果表明,*FmPAL* 基因在新生枝中的表达量最高约为 2.27,在叶和花表达量次之,而叶柄、芽和皮中表达水平较低(图 3)。其中水曲柳新生枝中 *FmPAL* 基因表达量约为树皮中

*FmPAL* 基因表达量 408 倍,水曲柳新生枝中 *FmPAL* 基因表达量在皮中表达最低(图 3)。

对不同月份的水曲柳的叶和新生枝取材进行荧光定量 PCR,分析 *FmPAL* 基因表达水平。水曲柳 5 月的新生枝 *FmPAL* 基因表达量最高,在 6、8 月和 9 月中表达量显著低于 5 月。在 5 月 *FmPAL* 基因表达量为 8 月 *FmPAL* 基因表达量的 14.4 倍。

水曲柳叶片在 5 月和 6 月时 *FmPAL* 的基因表达量较高,随着月份的增加基因表达量逐渐下降,在 9 月时表达量最低。在 5 月 *FmPAL* 基因表达量最高为 9 月 *FmPAL* 基因表达量的 69.4 倍(图 4)。

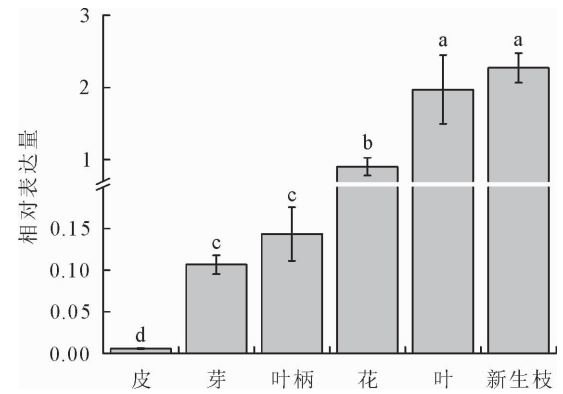


图 3 不同组织中 *FmPAL* 的转录水平  
Fig. 3 Transcript levels of *FmPAL* in different tissues of *F. mandshurica*

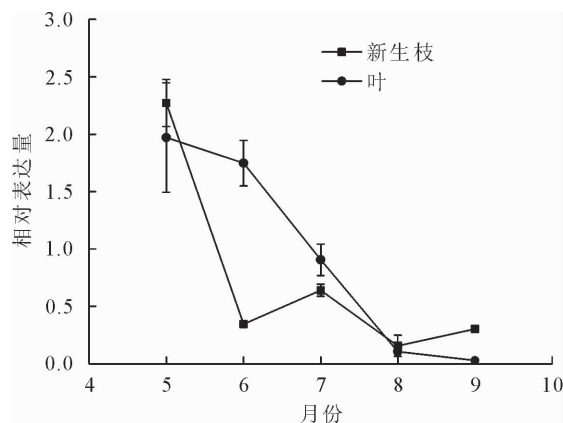


图 4 不同月份新生枝和叶中 *FmPAL* 基因的转录水平  
Fig. 4 Transcript levels of *FmPAL* gene in new shoots and leaves of different months

2.4.2 非生物胁迫下 *FmPAL* 在水曲柳中的表达模式分析 非生物胁迫处理下, *FmPAL* 基因的表达量随处理时间的增加而产生波动。 *FmPAL* 基因的表达在低温(4℃)处理下增加,在处理 12 h 时达到峰值,约为对照组 *FmPAL* 表达量的 34.3 倍,随后表达水平下降(图 5)。在处理 3 h 时表达量达到最低,约为对照组 *FmPAL* 表达量的 22.6%; *FmPAL* 基因的表达水平在 NaCl 胁迫处理 12 h 时升至最高,约为对照组的 22.3 倍,然后随胁迫时间的增加表达量下调。在 NaCl 胁迫处理 3 h 时表达量最低,约为对照组的 40.1%。在低温(4℃)和 NaCl 2 种非生物胁迫下 *FmPAL* 表达水平的变化趋势相似,均在 12 h 表达升至最高,远高于对照组水曲柳 *FmPAL* 的表达水平(图 5)。因此表明水曲柳 *FmPAL* 基因对这 2 种非生物胁迫有响应。

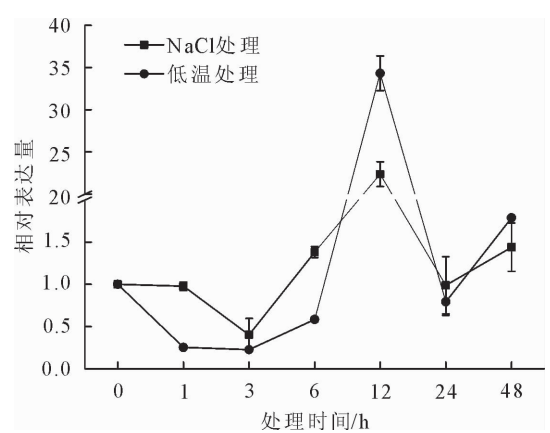


图 5 非生物胁迫下 *FmPAL* 的相对表达量  
Fig. 5 Relative expression of *FmPAL* under abiotic stress

2.4.3 植物激素信号诱导下 *FmPAL* 在水曲柳中的表达模式分析 *FmPAL* 基因的表达水平在 ABA 处理 1 h 时升至最高,约为对照组表达量的 11.9 倍,后胁迫诱导时间的增加表达水平逐渐降低,但在处理 12 h 时又有所升高,接近于处理 1 h 时的表达水平,随后下降(图 6)。 *FmPAL* 基因表达水平在处理 3 h 时达到最低,约为对照组表达量的 8%;在 IAA 的处理后, *FmPAL* 基因的表达水平在处理 1 时有少量提升,但在处理 3 h 时表达量降至最低,约为对照组表达量的 5%,随后 *FmPAL* 基因表达水平随激素诱导胁迫具有明显升高的趋势,在 12 h 表达水平升至最高约为对照组的 37.3 倍,随后表达量有所降低;在 GA<sub>3</sub> 的处理下, *FmPAL* 基因表达水平在处理 1 h 后表达量明显>对照组,但在处理 3 h 后表达量达到最低,降至为对照组的 5.9%,随后 *FmPAL* 基因表达水平不断升高,在 12 h 和 24 h 时表达水平远超过对照组。 *FmPAL* 基因表达水平在 24 h 达到最高约为对照组的 21.5 倍。3 种植物激素诱导水曲柳幼苗 *FmPAL* 基因的表达水平皆产生不同趋势的波动,在不同的处理时间时,表达水平与对照组具有显著差异,由此说明水

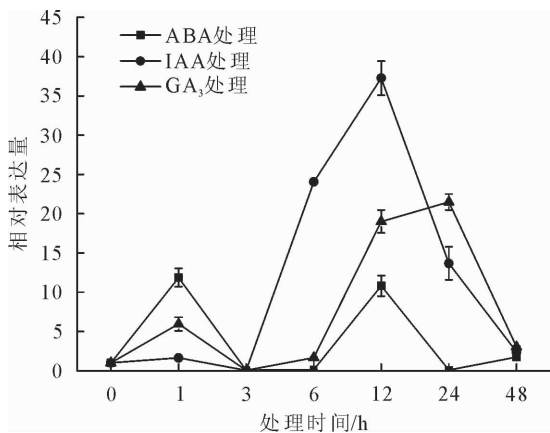


图 6 *FmPAL* 基因在植物激素信号下的相对表达量  
Fig. 6 *FmPAL* relative expression in plant hormone signal



曲柳 *FmPAL* 基因明显响应 ABA、IAA 和  $GA_3$  信号刺激。

### 3 结论与讨论

利用在线软件及工具对 *FmPAL* 蛋白的预测及生物信息学分析的结果显示,*FmPAL* 蛋白是一种稳定的亲水性蛋白,通过 SignalP 和 TMPred 在线软件分析 *FmPAL* 蛋白不具有信号肽,但存在跨膜结构域,具有由内到外和由外到内的跨膜能力;利用各种生物信息学分析软件,表明 *FmPAL* 蛋白只含有  $\alpha$ -螺旋、延伸链、无规则卷曲;水曲柳 *FmPAL* 蛋白与其在樟子松的直系同源物具有最高的同源性。

苯丙烷类代谢途径产生了植物所需要的所有含苯丙烷骨架的物质,包括木质素、苯甲酸脂糖苷、黄酮、异黄酮、缩酚酸类脂以及其他 15 碳化合物<sup>[23-25]</sup>。苯丙氨酸解氨酶作用于苯丙烷类代谢途径的第 1 个环节。在此环节中苯丙氨酸解氨酶应用于催化莽草酸途径合成中的脱氨作用。L-苯丙氨酸(L-Phe)脱氨生成反式肉桂酸,为后续代谢产物的反应合成的前体<sup>[26-27]</sup>。根据荧光定量 PCR 分析基因表达水平显示,*FmPAL* 基因表达具有明显的时空差异,其在新生枝中表达量最高,而在水曲柳皮和芽等部位的表达量显著<新生枝。由此可见,水曲柳 *FmPAL* 基因具有组织特异性,可能是在新生枝的生长发育过程中木质素含量增加,丙氨酸解氨酶是合成木质素过程中关键酶和催化酶,此过程中 PAL 活性较高<sup>[28-29]</sup>。

许多研究表明,在受到生物或非生物胁迫的作用下,植物的苯丙氨酸代谢途径被激活,PAL 的活性迅速上升,提高了抗逆境能力。苯丙氨酸解氨酶参与苯丙烷代谢途径,催化植保素的前体合成。植保素主要包括酚类、异黄酮类和萜烯类,是植物受到胁迫或侵染的情况下产生的一类低分子量抗微生物的化合物<sup>[2,30]</sup>。本研究中,*FmPAL* 基因的表达水平在低温(4℃)处理 12 h 时升至峰值,远高于对照组的基因表达水平,约为对照组的 34.3 倍。说明 *FmPAL* 基因对低温胁迫产生响应。另外,*FmPAL* 基因的表达量在 NaCl 处理 12 h 时升至峰值,约为对照组的 22.3 倍,随后表达量下调,在处理 3 h 时表达量最低,约为对照组的 40.1%,表明 *FmPAL* 基因对盐胁迫条件具有响应。植物在受到非生物胁迫后,其苯丙烷代谢途径可以对外界环境变化产生的胁迫做出相应的应答,以保护植物自身的正常生长<sup>[31-32]</sup>。在受到外界的非生物胁迫的情况下 *FmPAL* 的表达量显著上升。由此推测水曲柳幼苗在响应这些环境的胁迫途径中,*FmPAL* 的表达量显

著增加,加快自身植保素的合成,提高抗逆性。

本研究所涉及的 3 种植物激素脱落酸(ABA)、生长素(IAA)与赤霉素( $GA_3$ )在植物的多种生长发育过程中起到重要的调节作用,以植物激素信号的形式在胁迫条件下诱导植物对其产生应答<sup>[33]</sup>。例如,丹参中苯丙氨酸解氨酶 *SmPAL1* 浸泡 ABA 后转录水平上调约 10 倍<sup>[32]</sup>;甘薯块茎在 IAA 处理作用下 PAL 活性为对照的 2.6 倍<sup>[34]</sup>;  $GA_3$  对草莓果实不同发育阶段的 PAL 活性均有影响<sup>[35]</sup>。在本研究中,3 种植物激素信号均影响 *FmPAL* 的表达水平,但变化趋势有差异。在 ABA 处理中,*FmPAL* 基因的表达水平产生波动的现象,在受到胁迫 1 h 时表达量达到峰值,但在随后的 3 h 和 6 h 时基因表达水平远低于对照组表达水平,基因表达水平最低时仅为对照组表达水平的 8%。在胁迫处理达到 12 h 时又有所升高接近于 1 h 基因表达水平,随后表达水平明显下降。*FmPAL* 基因对 ABA 胁迫响应迅速,随着胁迫的时间的增加 *FmPAL* 的表达水平上升来应对逆境对植物的负面影响。表明 *FmPAL* 对植物激素 ABA 胁迫产生了一定程度的响应,起到了在逆境中的调节和保护作用。同理 *FmPAL* 基因的表达量在 IAA 处理 12 h 时其基因表达量约为对照组表达量的 37.3 倍达到峰值,在处理 3 h 时表达量约为对照组的 5%,在 3 h 后 *FmPAL* 的表达水平均显著>对照组。对于外界 IAA 激素的胁迫 *FmPAL* 基因产生了显著的响应表达;*FmPAL* 基因在  $GA_3$  处理条件下其表达量峰值位于 24 h 处,不同于 ABA 和 IAA 胁迫下表达水平峰值处理时间,其表达水平约为对照组的 21.5 倍。这些结果意味着 *FmPAL* 基因对这 3 种植物激素信号诱导有响应,且不同激素的不同时间响应的程度具有差异。在植物激素信号诱导下,*FmPAL* 基因表达量显著上升,可能原因是植物在植物激素信号诱导的作用下通过增加 *FmPAL* 的表达量,进而间接增加植物中的植保素合成来对植物激素做出应答。

综上所述,*FmPAL* 基因的表达受到非生物胁迫(低温和盐胁迫)以及激素信号(ABA、IAA 和  $GA_3$ )的影响。本研究为进一步研究苯丙烷类代谢途径中 *FmPAL* 基因对非生物逆境胁迫条件以及植物激素信号诱导的响应机制和调控进行初步分析,为后续深入研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 江昌俊,余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2001,28(4):425-430.
- [2] 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(3):9-16.

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

[4] 刘家林,欧阳林娟,曾嘉丽,等. 水稻 *SOD* 基因家族的全基因组分析及逆境胁迫下表达研究[J]. 分子植物育种,2018,16(9): 2753-2760.

[5] 虞光辉,王桂平,王亮,等. 小麦 *PAL* 基因的克隆及赤霉菌诱导下的表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(5):1055-1061.

[6] 常燕楠,刘洁,梁金太. 马铃薯 *PAL* 基因的生物信息学初步分析[J]. 农村实用科技信息,2018(6):5-8.

[7] 赵志常,高爱平,陈业渊,等. 芒果 *PAL* 基因的克隆与序列分析[J]. 安徽农业大学学报,2015,42(5):825-830.

[8] 李会宣,许冬倩,闫洪波. 鸭梨 *PAL* 基因的反义遗传转化及表达分析[J]. 广西植物,2018,38(4):492-500.

[9] 冯立娟,尹燕雷,焦其庆,等. 石榴 *PAL* 基因的克隆与表达分析[J]. 核农学报,2018,32(7):1320-1329.

[10] 陈卫卫,唐然,吴昱煜,等. 象草 *PAL* 基因克隆及其蛋白质结构与功能预测[J]. 草地学报,2016,24(1):137-145.

[11] 孙海燕,全雪丽,付爽,等. 拟南芥苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)基因的研究进展[J]. 延边大学农学学报,2016,38(1):88-92.

[12] SUBRAMANIAM R,REINOLD S,MOLITOR E K,*et al.* Structure,inheritance,and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes[J]. Plant Physiology,1993,102(1):71-83.

[13] 欧阳光察,应初衍,沃绍根,等. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究——Ⅵ. 水稻、小麦 *PAL* 的纯化及基本特性[J]. 植物生理学报,1985,11(2):94-104.

[14] 左龙林. 水曲柳种植培育的科学方法分析[J]. 农民致富之友, 2019(4):193.

[15] 杨堃,张朝红,李树秀,等. 葡萄 *SVP* 类 *MADS-box* 基因的克隆及表达模式分析[J]. 西北林学院学报,2012,27(4):117-123.

[16] 马辉,韩永涛,高玉荣,等. 葡萄中 *RPW8.2* 同源基因克隆与表达模式分析[J]. 西北林学院学报,2015,30(1):60-68. .  
MA H,HAN Y T,GAO Y R,*et al.* Molecular cloning and expression analysis of *RPW8.2 homologous* genes in grapevine [J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(1): 60-68. (in Chinese)

[17] WAKER J M. Protein protocols handbook[M]. New York: Humana Press Inc. ,2002.

[18] PETERSEN T N,BRUNAK S,VON H G,*et al.* SignalP 4. 0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods,2011,8(10):785-6.

[19] HOFMANN K. TMbase-A database of membrane spanning protein segments[J]. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1993, 374 (1):1-3.

[20] SEN T Z,JERNIGAN R L,GARNIER J,*et al.* GOR V server for protein secondary structure prediction[J]. Bioinformatics, 2005,21(11):2787-2788.

[21] 王镜岩,朱圣庚,徐长法,等. 生物化学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002. 229-231.

[22] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 4 版. 北京:高等教

育出版社,2000. 138-139.

[23] HARRISON C J,LANGDALE J A. A step by step guide to phylogeny reconstruction[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology,2006,45(4):561-72.

[24] TANAKA Y,URITANI I. Purification and properties of *phenylalanine ammonia-lyase* in cut-injured sweet potato[J]. Journal of Biochemistry,1977,81(4):963.

[25] WHETTEN R W,SEDEROFF R R. *Phenylalanine ammonia-lyase* from loblolly pine:purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. [J]. Plant Physiology, 1992,98(1):380-386.

[26] KOZUKUE N,KOZUKUE E,KISHIGUCHI M. Changes in the contents of phenolic substances, *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) and *tyrosine ammonia-lyase* (*TAL*) accompanying chilling-injury of eggplant fruit[J]. Scientia Horticulturae,1979,11(1):51-59.

[27] LENG P. 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.

[28] GIVEN N K,VENIS M A,GRIERSON D. Purification and properties of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* from Strawberry fruit and its synthesis during ripening[J]. Journal of Plant Physiology,1988,133(1):31-37.

[29] LIM H W,PARK S S,LIM C J. Purification and properties of *phenylalanine ammonia-lyase* from leaf mustard[J]. Molecules & Cells,1997,7(6):715.

[30] 郝向阳,孙雪丽,王天池,等. 植物 *PAL* 基因及编码蛋白的特征与功能研究进展[J]. 热带作物学报,2018,39(7):1452-1461.

[31] LEYVA A,SALINAS J,MIGUEL J M Z. 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.

[32] RUBERY P H,NORTHCOTE D H. Site of *phenylalanine ammonia-lyase* activity and synthesis of lignin during xylem differentiation. [J]. Nature,1968,219(5160):1230-1234.

[33] GAO Z M,WANG X C,PENG Z H,*et al.* Characterization and primary functional analysis of *Phenylalanine Ammonia-Lyase* gene from phyllostachys edulis[J]. Plant Cell Reports, 2012,31(7):1345-1356.

[34] SONG J,WANG Z. Molecular cloning expression and characterization of a *phenylalanine ammonia-lyase* gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*[J]. Molecular Biology Reports,2009, 36(5):939-952.

[35] 王敬文,薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 I. 植物激素对甘薯块根苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸 4-羟化酶活性变化及其伴随性的影响[J]. 植物生理学报,1981,7(4):76-83.

[36] 张琳,黄志远,苏少文,等. 外源激素对荷花生长及相关基因表达的影响[J]. 西北林学院学报,2019,34(2):35-41.  
ZHANG L,HUANG Z Y,SU S W,*et al.* Effects of exogenous hormones on the growth of lotus and expression of related genes[J]. Journal of Northwest Forestry University,2019, 34(2):35-41. (in Chinese)