

苏岳峰, 丁元昊, 郝朝运, 等. 胡椒 *PnPAL* 基因家族全基因组鉴定及表达模式分析 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (6): 619–628.

SU Y F, DING Y H, HAO C Y, et al. Whole-genome Identification and Bioinformatics of *PnPAL* Family in Black Peppers [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (6): 619–628.

胡椒 *PnPAL* 基因家族全基因组鉴定及表达模式分析

苏岳峰^{1,2}, 丁元昊¹, 郝朝运², 胡丽松², 郑其向^{2,3}, 范 睿^{2*}

(1. 海南大学, 海南 海口 570208; 2. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南 万宁 571533;

3. 云南农业大学热带作物学院, 云南 普洱 665000)

摘 要:【目的】胡椒瘟病是影响胡椒产量的第一大病害, 胡椒苯丙氨酸解氨酶 (*PnPAL*) 基因是胡椒抗瘟病的关键基因。探明胡椒 *PnPAL* 基因家族的基本特征、进化关系及表达模式, 以便于其功能研究。【方法】通过全基因组查找、鉴定得到 14 条胡椒 *PnPAL* 家族成员, 分别命名为 *PnPAL1*~*PnPAL14*, 并对这 14 条序列进行生物信息学及表达模式分析。【结果】蛋白质基本信息分析显示, 该家族理论等电点在 5.76~9.77, 分子量在 7.374 41~83.431 07 kDa。有 7 条胡椒的 *PnPAL* 基因含有 8 个 motif 和 PLN02457 保守结构域, 该 7 条胡椒 *PnPAL* 家族成员被进一步鉴定为胡椒 *PnPAL* 家族成员。胡椒 *PnPAL* 家族成员含有诸多胁迫响应元件, 特别是水杨酸、茉莉酸甲酯等与抵抗病原入侵的顺式作用元件。胡椒的 *PnPAL* 基因位于系统发生树基部位置, 表明胡椒的 *PnPAL* 基因较为古老, 与胡椒的系统地位相似。表达模式分析显示, *PnPAL10* 在受病原诱导后基本呈上调趋势, 表明 *PnPAL10* 可能是胡椒抗瘟病的关键基因。【结论】对胡椒 *PnPAL* 基因家族开展了生物信息学及表达模式分析, 证明其在抗瘟病中的潜在作用, 筛选到关键家族成员 *PnPAL3*。

关键词: 胡椒; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL); 生物信息

中图分类号: S 573

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 06-0619-10

Whole-genome Identification and Bioinformatics of *PnPAL* Family in Black Peppers

SU Yuefeng^{1,2}, DING Yuanhao¹, HAO Chaoyun², HU Lisong², ZHENG Qixiang^{2,3}, FAN Rui^{2*}

(1. Hainan University, Haikou, Hainan 570208, China; 2. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Wanning, Hainan 571533, China; 3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665000, China)

Abstract: 【Objective】Basic characteristics and evolutionary relationship on the phenylpropane metabolic pathway associated with the pepper blast disease that ill-affects the cultivation and production of the globally important spice, black peppers, were studied. 【Method】The phenylpropane metabolic pathway was believed to be key to the blast resistance of black peppers, and phenylalanine ammonialyase (PAL) to be the crucial, rate-limiting enzyme in the pathway. Hence, based on the transcriptomics of a resistant black pepper germplasm the sequences of 14 *PALs* were identified and named *PnPAL1*-*PnPAL14*. Their bioinformatics and expression patterns were analyzed. 【Result】The gene family had a theoretical isoelectric point between pH 5.76 and 9.77 with a molecular weight between 7.374 41 kDa and 83.431 07 kDa. Seven of the identified *PnPALs* contained 8 motifs and PLN02457 conserved domains. They belonged to the *PnPAL* family that consisted of many stress response elements, especially salicylic acid, methyl jasmonate, and other cis-acting elements, which are known to resist the pathogenic invasion. The *PnPALs* were located at the base of the phylogenetic tree, being relatively old and holding a status like black peppers. *PnPAL10* expressed in an up-regulation trend after a pathogenic induction suggesting a close relation of the gene to the blast resistance of the plant. 【Conclusion】A critical role the *PnPAL* family played in the blast resistance of black peppers was positively identified.

Key words: black pepper; phenylalanine ammonialyase; biological information

收稿日期: 2020-04-17 初稿; 2020-08-03 修改稿

作者简介: 苏岳峰 (1996-), 女, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究 (E-mail: suyuefeng1996@163.com)

* 通信作者: 范睿 (1983-), 女, 副研究员, 主要从事胡椒种质资源研究 (E-mail: tlf83@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601626); 中国热带农业科学院基本科研业务项目 (1630142020001)

0 引言

【研究意义】胡椒 (*Piper nigrum* L.) 被称为“香料之王”，是胡椒科胡椒属植物，主产我国海南、云南和广东等地区。胡椒瘟病是由辣椒疫霉菌感染胡椒的根系、叶片、花序、果穗、果实等部位而发病，具有气候依赖性且传染力极强的特点^[1]；病情严重时可导致全园毁灭，严重阻碍胡椒产业发展，缺乏抗瘟病种质是影响我国胡椒产业发展的主要问题^[2]。因此，筛选胡椒关键基因进行功能验证对植物材料的遗传改良尤为重要。【前人研究进展】次生代谢是植物生长发育以及适应环境的重要环节。苯丙烷途径是响应多种逆境的关键途径，如：紫外线损伤、病原侵染、机械损伤、低温胁迫等。苯丙氨酸解氨酶是苯丙烷途径的关键酶和入口酶^[3]。玉米的苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 抵抗甘蔗花叶病毒，与木质素和水杨酸合成有关，陆地棉和马铃薯等中也有 PAL 抵抗病菌侵染的报道^[3-4]。此外苯丙氨酸解氨酶还是合成花青素和类黄酮等重要的胁迫响应次生代谢物质的必要酶^[5]。目前，PAL 的生物信息学分析已在水稻、棉花、桑树等作物中开展，分析结果显示 PAL 基因响应生物和非生物胁迫反应^[6-8]。PAL 在单双子叶植物分化之前已完成分化，通常是一个多基因家族，含有 5 个左右家族成员^[9]。PAL 家族在不同作物中保守域不同，主要包括：苯丙氨酸保守结构域、PLN02457 和 PLN02457 super family、PAL-HAL、phe-am-lyase 和 Lyase aromatic 保守结构域、裂解酶 I 类超家族保守结构域等^[10-11]。然而，各物种所含保守域不同可能行使不同的生理功能，当归中 PAL 催化类似的 β 消除反应，与具有裂解酶 I 类超家族保守结构域有关^[12]。在柱花草中，PAL-HAL 是保守的脱氨位点^[11]。目前，胡椒瘟病防控多以预防为主，防控成本极高。在分子生物学方面对胡椒瘟病的研究也仅限于栽培种与野生近缘种的比较转录组研究和抗瘟病基因挖掘^[13]。项目组前期的转录学结果显示胡椒抗/感种质 (热引 1 号、黄花胡椒) 差异基因多富集于苯丙烷代谢途径，且组织化学显示苯丙氨酸解氨酶活性在抗性种质中较高^[13]。本研究首次开展胡椒 *PnPAL* 基因研究。【本研究切入点】苯丙氨酸解氨酶是苯丙烷途径的入口酶及限速酶，在植物与病原菌互作过程中具有重要意义。因此，研究胡椒 *PnPAL* 的家族特征、进化关系及表达模式，能够为进一步确定胡椒 *PnPAL* 基因在抗瘟病中的功能奠定基础。【拟解

决的关键问题】采用在线分析工具及 TB tools 工具，胡椒 *PnPAL* 的顺式作用元件、motif、外显子和内含子位置、保守结构域，亲缘关系及接种病原菌下 *PnPAL* 基因的表达模式，有利于了解胡椒 *PnPAL* 的基因功能，便于胡椒新品种选育。

1 材料与方法

1.1 试验材料

我国主栽胡椒品种热引 1 号 (*Piper nigrum* L.) 全基因组数据来自美国生物信息中心 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA529758>。

1.2 试验方法

1.2.1 *PnPAL* 基因家族成员鉴定 根据胡椒基因组注释文件信息，鉴定到胡椒 *PnPAL* 基因家族成员和胡椒 *PnPAL* 的蛋白序列及染色体定位信息，再利用在线预测蛋白信息工具 Expasy (<https://www.expasy.org/>) 分析各个 *PnPAL* 的蛋白质分子量、等电点和氨基酸个数，运用 BUSCA 在线分析工具预测各 *PnPAL* 亚细胞定位 (<http://busca.biocomp.unibo.it/59a16590-3506-4818-8017-7032b057b649/showresult/>)。

1.2.2 *PnPAL* 基因结构及进化分析 根据基因组注释信息中的外显子和内含子长度分布信息，结合基因结构显示在线分析工具 (GSDS) 绘制胡椒 *PnPAL* 外显子、内含子位置示意图。利用 Mega 5.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 的邻接法构建胡椒各 *PnPAL* 的亲缘关系。

1.2.3 胡椒 *PnPAL* 保守基序分析 运用 motif 基础上的序列分析工具 (MEME) 预测蛋白序列保守基序 (<http://meme-suite.org/>) 和美国生物信息技术中心的 CDD 工具分析所得 domain 和 TBtools 绘制成图 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)。

1.2.4 胡椒 *PnPAL* 启动子分析 利用在线数据库 Plant CARE 和 TB tools 分析胡椒 *PnPAL* 起始密码子上游 2 000 bp 的顺式作用元件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。

1.2.5 蛋白系统进化分析 运用美国生物信息中心的 Blast 工具，获得注释信息为苯丙氨酸解氨酶的蛋白序列，并结合拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、菠萝 (*Ananas comosus*)、香蕉 (*Musa nana* Lour.)、橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、棉花 (*Gossypium arboreum*)、油菜 (*Brassica napus* L.)、鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*)、牛樟 (*Cinnamomum micranthum* f.

kanehirae)、鳄梨 (*Persea americana*)、睡莲 (*Nymphaea colorata*)、无油樟 (*Amborella trichopoda*) 等作物的蛋白序列, 采用 Mega5.0 的邻接法分析物种间苯丙氨酸解氨酶的亲缘关系。数据来源于美国生物信息中心 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 拟南芥信息网站 (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>), 国家水稻数据中心 (<http://www.ricedata.cn/>)。

1.2.6 针刺法接种病原菌 在扦插苗靠近土层的地

上部用无菌注射器刺 3 个小洞, 呈三角形, 用打孔器取一块直径为 1 cm 的菌丝快, 将有菌丝的一面覆在刺破的洞上, 用浸湿的棉花缠绕固定菌块, 起到保湿和固定的作用。

1.2.7 *PnPAL* 表达模式分析 使用 Prime primer 5.0 设计引物, 引物见表 1。针刺法在胡椒茎基部接种辣椒疫霉菌 (参照 1.2.6), 以接种病原菌后 0、8、12、24、48 h 的胡椒根系为材料, 运用 Real Time PCR 的方法分析 7 条含有完整保守序列的 *PnPAL* 表达模式。

表 1 实时荧光定量 PCR 分析所用引物
Table 1 Primers used in RT-PCR analysis

基因名称 Gene name	正向引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 Revers primer sequence (5'-3')
<i>PnPAL1</i>	GCAAAGGCCGTGACTTTCG	TTCATCACCTCGCAGAAAACG
<i>PnPAL2</i>	CGCGGCCAGCTTGAAGAG	GCGAGGATGTTAGCGTCGTAGA
<i>PnPAL3</i>	CCGACCACTTGACCCATAAGC	GGTCCATCTCATGTGTCATTGCG
<i>PnPAL4</i>	GCTAGGCCCACTCATAGAAGTGA	AGTGTGTCCATGGACACACCA
<i>PnPAL10</i>	CAAAAGCTGAGAAATGTGCTGGT	CCGACTTCCC GTTCTCATACTC
<i>PnPAL13</i>	ACAACCAGGACGTCAACTCACTG	ACGATGTGCTTGACCACCTCTC
<i>PnPAL14</i>	GGCACAACCTCAAGGTTACGA	GTTGGCGTCGTAGCAAACG
内参序列	GTTGGAGATAGGAGCAAGCAGA	TCAAAGACCACCCCATCACCT

2 结果与分析

2.1 胡椒 *PnPAL* 全基因组鉴定

如表 2 所示, 根据基因组注释信息, 共鉴定到 14 条胡椒苯丙氨酸解氨酶 *PnPAL* 基因, 不均匀分布在 9 条染色体上, 其中有 4 条位于 2 号染色体上, 3 条位于 6 号染色体上, 3 号、5 号、8 号、9 号、18 号、28 号和 38 号染色体上各含有 1 条。理化性质分析表明, *PnPAL* 所含氨基酸残基数目在 72~736, 其中 *PnPAL14* 含有的氨基酸残基数目最多, *PnPAL8* 含有的氨基酸残基数目最少, 所编码氨基酸残基数量均值为 500 个。各个 PAL 蛋白质分子量在 7.37441~83.43107 kDa, 蛋白质平均分子量为 50.933 kDa。胡椒 *PnPAL* 编码的蛋白质等电点在 5.76~9.77, 平均等电点为 7.18, 其中 *PnPAL1*、2、3、4、10、13、14 为酸性蛋白 (理论等电点 $pI < 7$), *PnPAL5*、6、7、8、9、11、12 为碱性蛋白 (理论等电点 $pI > 7$)。亚细胞分析表明, *PnPAL1*、2、3、4、10 位于细胞质中, *PnPAL5*、7、8、9 位于细胞核中, *PnPAL6*、11 位于叶绿体中, *PnPAL12* 位于内膜系统中, *PnPAL13*、14 位于质膜中。

2.2 胡椒 *PnPAL* 基因结构及进化分析

如图 1 所示, 运用 mega 对鉴定到的 14 条 *PnPAL* 聚类分析表明, *PnPAL4*、10、3、13、14、1、2、5、7 聚为一类, *PnPAL11*、12 聚为一类, *PnPAL6*、8 聚为一类, 表明胡椒 *PnPAL* 家族可分为 3 个进化单元。运用 GSDS 分析基因结构结果表明, 家族成员外显子个数在 1~5 个, 内含子个数在 1~4 个, 其中 *PnPAL2*、7、8、12、13 没有内含子, *PnPAL3*、4、5、10、14 含有两个外显子, *PnPAL1* 含有 3 个外显子, *PnPAL6* 含有 4 个外显子, *PnPAL11* 含有 5 个外显子, 平均外显子个数约为 2 个。

2.3 胡椒 *PnPAL* 保守基序分析

如图 2 所示, 在线分析工具 MEME 鉴定到 8 个保守基序, 命名为 Motif1~Motif8。在 14 条胡椒 *PnPAL* 中, 每条家族成员所包含 motif 0~8 个不等, 其中 7 条 *PnPAL* 所含 motif 个数最多, 含有完整的 8 个 motif, 3 条不含有 motif, 1 条含有 5 个 motif, 1 条含有 3 个 motif。

如图 3 所示, NCBI CDD 结果表明, 7 条含有 PLN02457 结合位点, 4 条 *PnPAL* 属于 PLN02457 超家族, 1 条含有保守结构域 NEMP, 1 条属于 FNR

表 2 胡椒 *PnPAL* 基因家族成员的理化性质
Table 2 Physiochemical properties of *PnPAL* family in black peppers

名称 Gene name	基因编号 Sequence ID	染色体定位 Chromosome nambur	染色体位置 Chromosome location	编码氨基酸个数 AA	蛋白质分子量 Mw /kDa	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>PnPAL1</i>	Pn2.1119	2	14526770-14528898-	652	70.242 67	5.84	细胞质 Cytoplasm
<i>PnPAL2</i>	Pn2.1269	2	15529503-15531650+	715	76.798 79	5.76	细胞质 Cytoplasm
<i>PnPAL3</i>	Pn2.1585	2	18068679-18071787+	711	77.464 65	5.93	细胞质 Cytoplasm
<i>PnPAL4</i>	Pn2.1713	2	19171638-19174695+	711	77.495 66	5.87	细胞质 Cytoplasm
<i>PnPAL5</i>	Pn3.4768	3	37507112-37507766-	191	21.420 58	9.77	细胞核 Cytoplasm
<i>PnPAL6</i>	Pn5.1823	5	20214336-20215764-	312	34.470 96	7.75	叶绿体 Chloroplast
<i>PnPAL7</i>	Pn6.2505	6	23152346-23152648-	100	10.668 38	8.93	细胞核 Nucleus
<i>PnPAL8</i>	Pn6.2507	6	23155823-23156041-	72	7.374 41	8.93	细胞核 Nucleus
<i>PnPAL9</i>	Pn6.2506	6	23155093-23155674-	193	20.389 72	7.72	细胞核 Nucleus
<i>PnPAL10</i>	Pn8.2617	8	29114372-29118271-	730	79.494 98	6.04	细胞质 Cytoplasm
<i>PnPAL11</i>	Pn9.116	9	18656999-18659720-	147	16.374 80	7.77	叶绿体 Chloroplast
<i>PnPAL12</i>	Pn18.280	18	240046-240597-	507	57.052 64	8.05	内膜系统 Endometrial system
<i>PnPAL13</i>	Pn28.318	28	2239516-2241801-	761	83.431 07	6.08	质膜 Plasma membrane
<i>PnPAL14</i>	Pn38.78	38	621136-623422+	736	80.379 55	6.08	质膜 Plasma membrane

like 超家族，1 条属于 bHLH-MYC-N 超家族。
综上，7 条含有完整 motif 的家族成员均含有
PLN02457 结合位点，推测此 7 条家族成员为胡椒

PnPAL 家族成员。
2.4 胡椒 *PnPAL* 启动子分析
如图 4 所示，胡椒 *PnPAL* 基因家族成员除基本

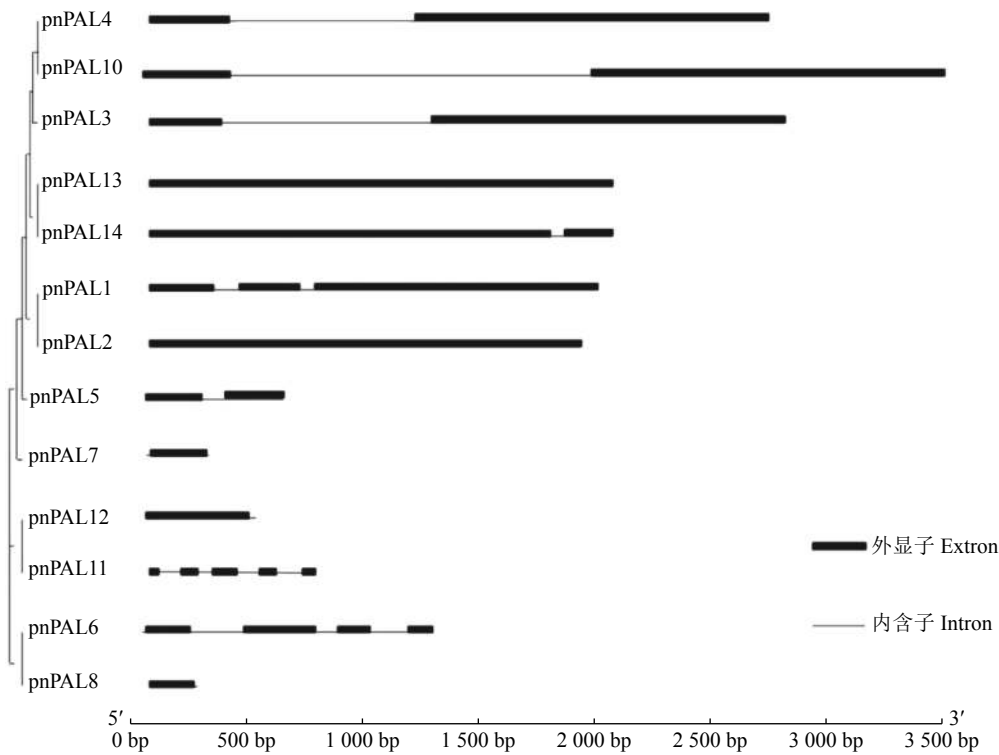
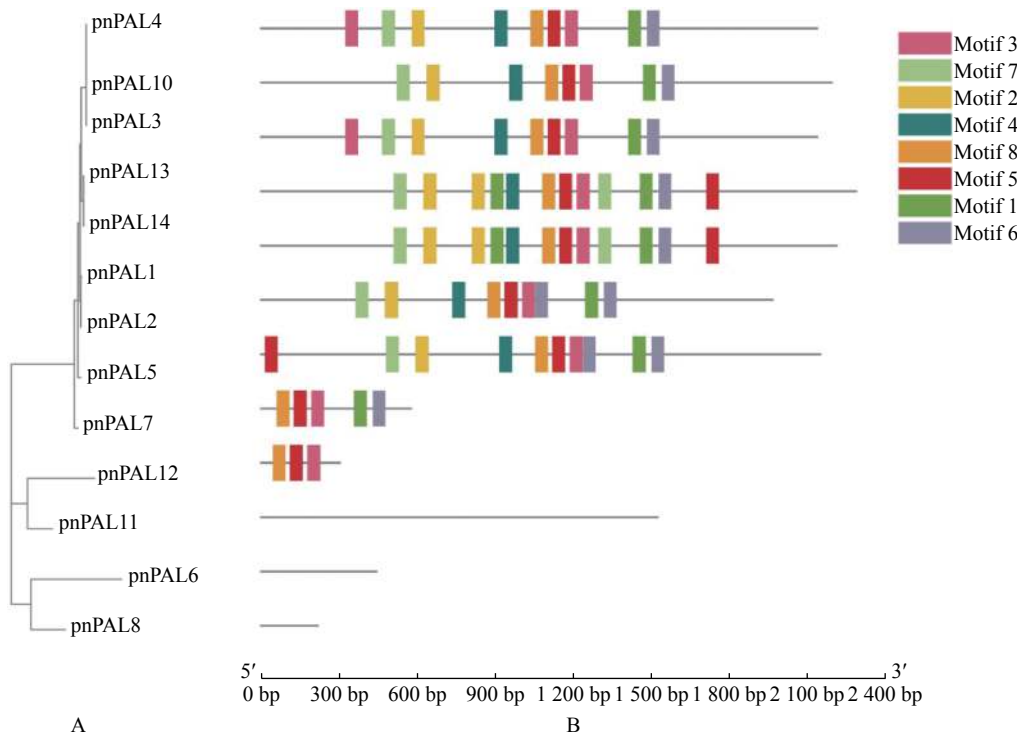
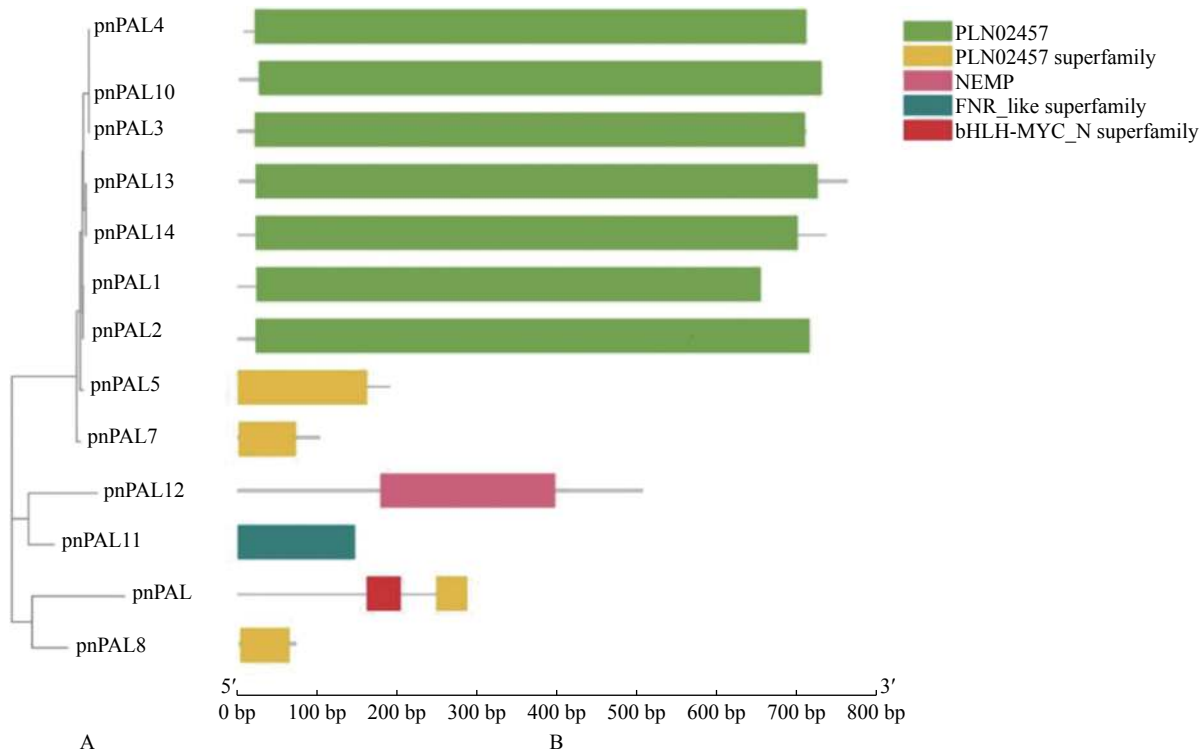


图 1 胡椒 *PnPAL* 基因家族基因结构分析
Fig. 1 Structure of *PnPAL* family in black peppers



注：A 为胡椒 *PnPAL* 进化树，B 为 motif 分析。
Note: A: *PnPAL* phylogenetic tree; B: motif analysis.

图 2 胡椒 *PnPAL* motif 分析
Fig. 2 *PnPAL* motifs of black peppers



注：A 为胡椒 *PnPAL* 进化树，B 为 domain 分析。
Note: A: *PnPAL* phylogenetic tree; B: domain analysis.

图 3 胡椒 *PnPAL* domain 分析
Fig. 3 *PnPAL* domain of black peppers

的顺势作用元件之外, 还包括多个与激素和胁迫有关的顺式作用元件, 包括低温响应元件、防御和应激相关元件、光反应元件以及水杨酸、茉莉酸甲酯响应元件等, 其中含有脱落酸响应元件的 *PnPAL* 最多, 达 13 条, 含有茉莉酸甲酯响应元件的 *PnPAL* 次之, 有 11 条, 8 条含有生长素响应元件, 5 条含有赤霉素响应元件, 5 条含有防御和胁迫相关的元件, 4 条含有水杨酸响应元件, 4 条含有低温响应元件,

1 条含有机械损伤响应元件, 表明 *PnPAL* 参与生物和非生物胁迫响应, 在植物防御和激素信号转导方面至关重要。*PnPAL1* 所含顺式作用元件最多, 达 36 个; *PnPAL8* 所含顺式作用元件最少, 仅为 17 个, 平均顺式作用元件个数约为 23 个, 表明 *PnPAL* 响应多项逆境, 其中 *PnPAL1* 含有启动子元件明显多于其他家族成员, *PnPAL1* 可能响应多项逆境。

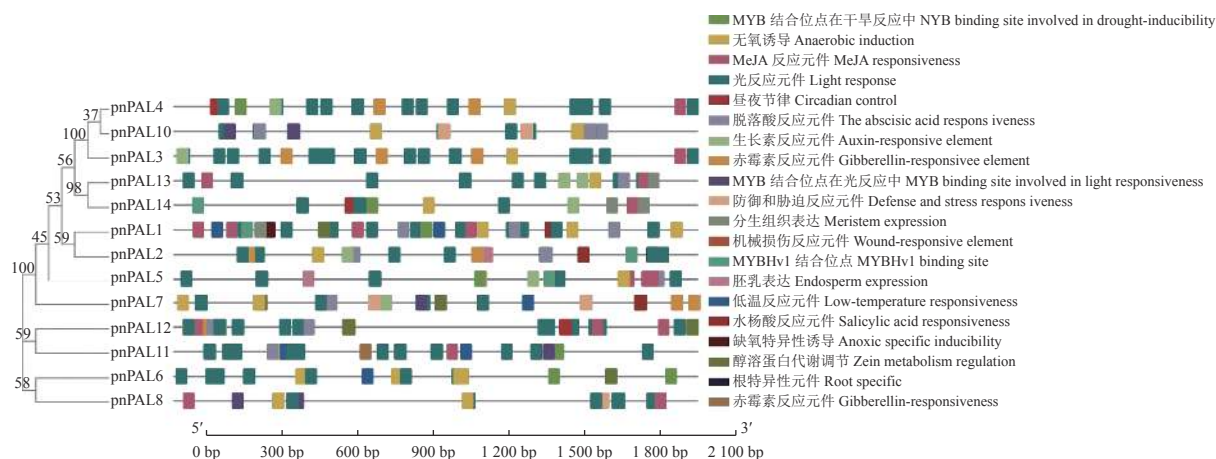


图 4 胡椒 *PnPAL* 启动子分析

Fig. 4 *PnPAL* promoter of black peppers

2.5 蛋白系统进化分析

苯丙烷途径是在裸子植物向被子植物进化过程中形成的, 如图 5 所示, 本研究将具有完整结构的 7 个胡椒 *PnPAL* 基因与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、菠萝 (*Ananas comosus*)、香蕉 (*Musa nana* Lour.)、橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、棉花 (*Gossypium arboreum*)、油菜 (*Brassica napus* L.)、鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*)、牛樟 (*Cinnamomum micranthum* f. *kanehirae*)、鳄梨 (*Persea americana*)、睡莲 (*Nymphaea colorata*)、无油樟 (*Amborella trichopoda*) 等植物的 *PAL* 基因进行进化分析, 这些基因主要分为单子叶与双子叶两类。然而, 胡椒的 *PnPAL* 基因均处于双子叶植物的位置, 且与木兰类的植物亲缘关系较为接近。此外, *PnPAL1*, *PnPAL2*, *PnPAL13*, *PnPAL14* 位于系统发生树的基部, 表明这 4 个基因属于较原始的类型; 另一方面, *PnPAL3*, *PnPAL4*, *PnPAL10* 位于离系统发生树基部较近的位置, 且与木兰类的植物聚在一起。现

代植物学家普遍承认“真花学说”, 认为木兰类的植物属于较原始的类群, 因此, 胡椒的 *PnPAL* 基因较为古老, 与胡椒的系统地位相似^[14-15]。

2.6 胡椒 *PnPAL* 表达模式分析

对筛选到完整的 7 条 *PnPAL* 进行表达模式分析, 结果表明 *PnPAL3*、*PnPAL10* 有表达, 其余 5 条未检测到信号。其中 *PnPAL3* 和 *PnPAL10* 在接种后 0、8、12、24、48 h 的根系中均有表达。如图 6 所示, *PnPAL3* 在接种病原菌初期表达相对较高, 这可能与植物的应激反应有关。如图 7 所示, *PnPAL10* 表达在处理组中基本呈上调趋势, 特别是在接种病原菌后的 24、48 h 显著高于对照组基因的相对表达, 表明该基因可能在病原菌侵染胡椒根系过程中起主要作用。

3 讨论

基因组测序技术的不断深入以及功能基因组学的日渐成熟为基因鉴定提供了便利条件, 生物信息学的地位也日益重要。苯丙氨酸解氨酶基因家族应对各项生物和非生物胁迫, 目前, 叶小真等在桉树中克隆获得了 *PAL* 基因序列并分析其表达模式, 发现该基因在高抗抗焦枯病菌品种中表达最高^[16]; 吴远航等克隆了木薯的 *MePAL* 基因, 并发现该基因可

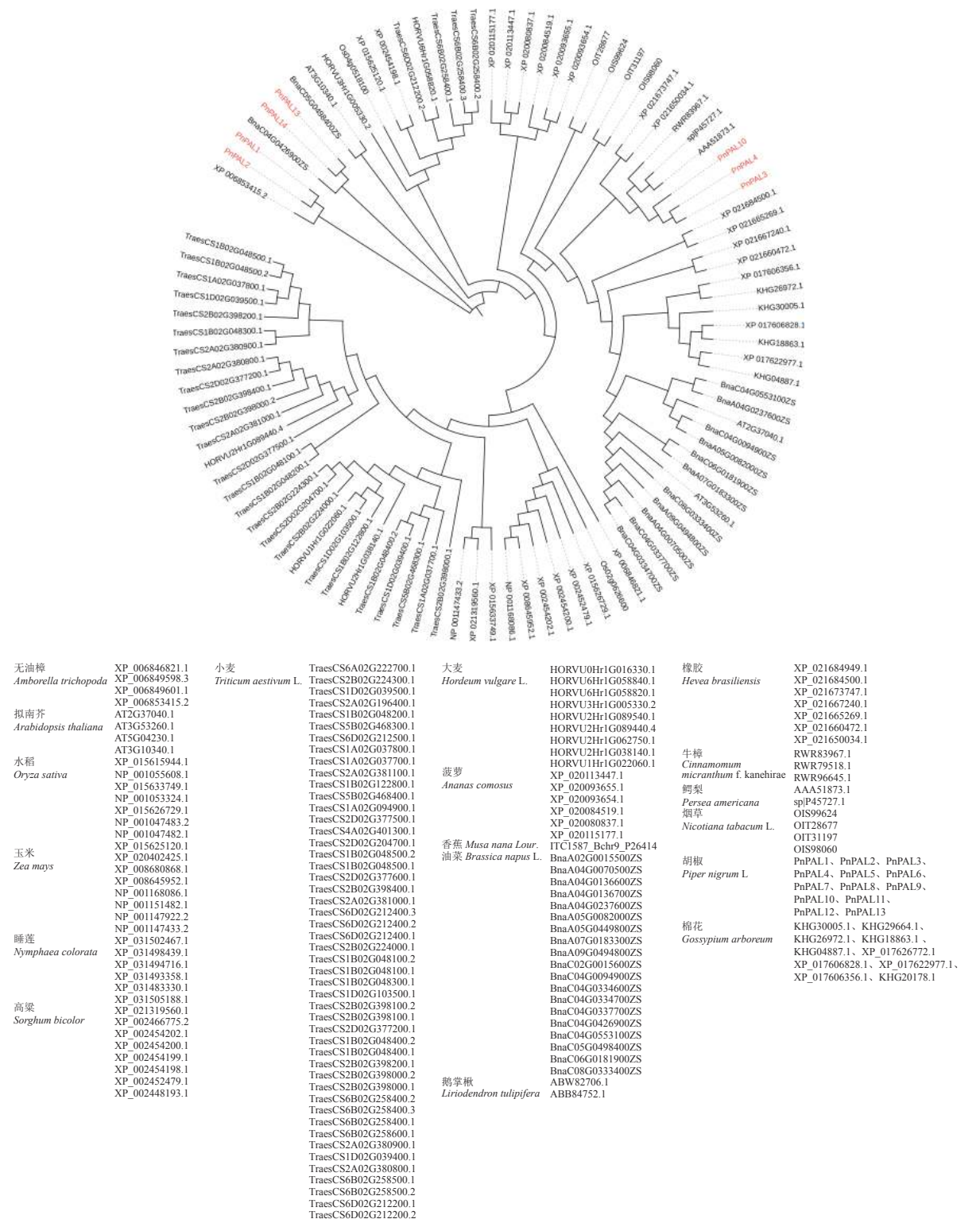
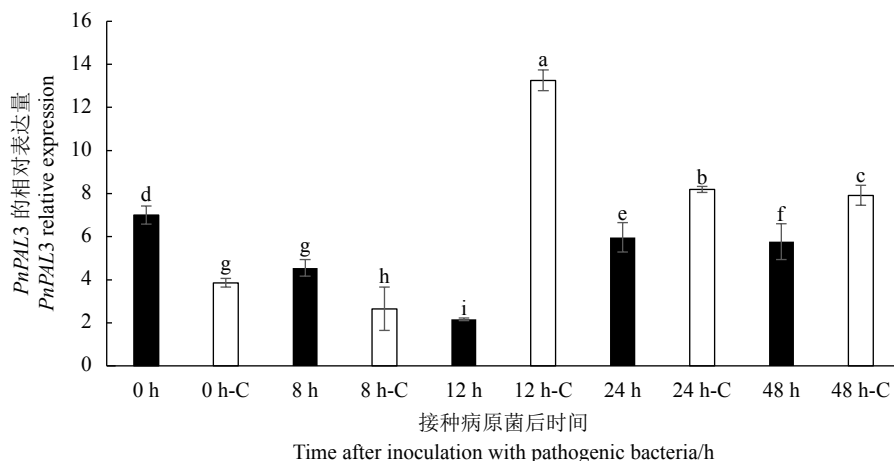


图 5 胡椒 *PnPAL* 系统发育树

受低温胁迫诱导增强表达^[17]；高红胜等克隆了黄瓜的 *CsPAL* 基因，发现其在受白粉菌诱导后显著高于对照^[18]。本研究在胡椒中鉴定到 14 条 *PnPAL*，其中 7 条为完整结构，略多于拟南芥、水稻等家族，可能与胡椒基因组复制有关^[19-20]。植物在进化过程中一般都比较保守，保守序列可能调控基因表达且含有相同保守序列的基因行使相同功能，甚至一些属于

相同超家族的蛋白功能也相同^[21]。笔者发现 7 条胡椒 *PnPAL* 均含有保守的基序，推测它们可能行使相同功能。

由一个祖先通过基因复制或突变为适应不同环境而产生一个基因家族^[22]。在植物进化过程中，某个祖先的倍增和变异可以产生多个家族成员，这些家族成员可能成簇的分布在一条染色体上，也可能



注：0 h、8 h、12 h、24 h、48 h 表示接种病原菌不同时间点的表达模式；0 h-C、8 h-C、12 h-C、24 h-C、48 h-C 表示接种无菌水不同时间点的表达模式。图中不同小写字母表示接种病原菌、无菌水基因表达量的显著性水平 ($P < 0.05$)；图 7 同此。

Note: 0 h, 8 h, 12 h, 24 h, and 48 h are expressions at respective time after pathogenic inoculation; 0 h-C, 8 h-C, 12 h-C, 24 h-C, and 48 h-C, expressions at respective time after sterile water inoculation. Data with different lowercase letters indicate significant difference in expressions between inoculation with pathogens and sterile water ($P < 0.05$). The same as Fig. 7.

图 6 胡椒 *PnPAL3* 基因相对表达分析

Fig. 6 Relative expressions of *PnPAL3* in black peppers

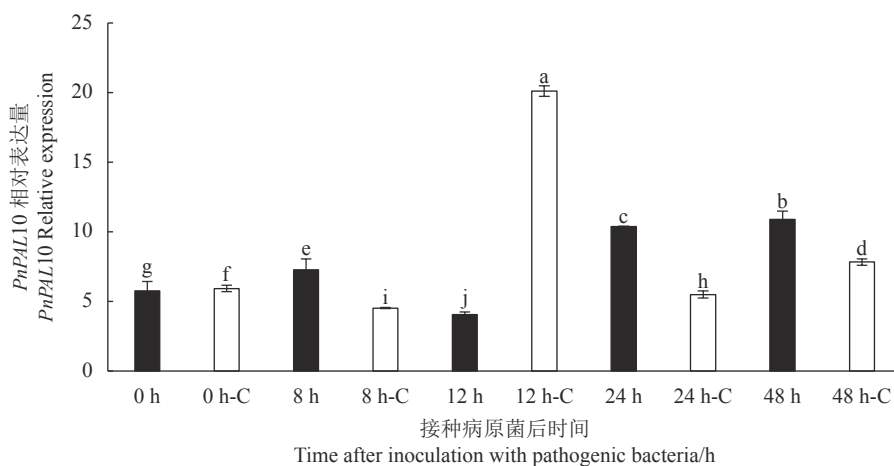


图 7 胡椒 *PnPAL10* 基因相对表达分析

Fig. 7 Analysis on relative expressions of *PnPAL10* in black pepper

分布在不同染色体上^[23]。胡椒的 *PnPAL* 家族成员在染色体上不均匀分布，可能与基因组复制及染色体重复有关，基因组和染色体重复对物种进化有重要意义^[24]。内含子的非法交换和变异可能是基因家族形成的原因^[25]，如植物 12-氧-植物二烯酸还原酶（12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR）家族基因各内含子的位置和长度存在较大差异，故胡椒 *PnPAL* 成员之间基因结构的差异较大^[26]。

苯丙氨酸解氨酶普遍存在于植物体中，鉴定到的胡椒 PAL 蛋白理化性质、亚细胞定位、酸碱性质、分子量、编码长度等不同，表明胡椒 *PnPAL* 有较高的遗传多样性。伴随着物种进化能力逐渐增强，环境适应能力愈强，均是遗传变异丰富造成的，故遗传变异是导致遗传多样性的根本原因^[27]。近年来，

越来越多研究表明基因表达调控对基因表达差异起重要作用^[28]。在胡椒 *PnPAL* 中，各家族成员之间启动子略有差异，每个 *PnPAL* 在不同的生物或非生物胁迫中起作用；家族成员之间启动子的差异可能是进化过程中遗传变异导致的；由于各个家族成员所含启动子不同，启动子对基因表达的调控又有一定差异，进而表现出 *PnPAL* 家族成员参与应对不同的生物和非生物胁迫环境。

胡椒苯丙氨酸解氨酶家族各基因功能还尚不清晰。本文首次运用胡椒基因组信息，鉴定到胡椒的 *PnPAL* 家族成员，结合生物信息学方法分析胡椒 *PnPAL* 基因家族的结构差异，进化关系及表达模式并筛选到抵抗病原菌的关键家族成员，为进一步验证胡椒 *PnPAL* 基因功能及响应各项逆境研究提供基础。

参考文献：

- [1] 刘进平, 郑成木, 郑服丛. 胡椒瘟病与辣椒疫霉 [J]. *热带农业科学*, 2001, 21 (5): 57–61.
LIU J P, ZHENG C M, ZHENG F C. Black pepper foot rot and *Phytophthora capsica* [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2001, 21 (5): 57–61. (in Chinese)
- [2] 桑利伟, 刘爱勤, 谭乐和, 等. 海南省胡椒瘟病病原鉴定及发生规律 [J]. *植物保护*, 2011, 37 (6): 168–171.
SANG L W, LIU A Q, TAN L H, et al. Pathogen identification and occurrence of the pepper *Phytophthora* foot rot in Hainan Province [J]. *Plant Protection*, 2011, 37 (6): 168–171. (in Chinese)
- [3] YUAN W, JIANG T, DU K T, et al. Maize phenylalanine ammonia-lyases contribute to resistance to sugarcane mosaic virus infection, most likely through positive regulation of salicylic acid accumulation [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20 (10): 1365–1378.
- [4] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究——II 苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用 [J]. *植物生理学报*, 1982 (1): 35–43.
WANG J W, XUE Y L. Study on plant phenylalanine ammonia lyase — II the role of phenylalanine ammonia lyase in resistance to potato late blight [J]. *Plant Physiology Communications*, 1982 (1): 35–43. (in Chinese)
- [5] DIXON R. A Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7 (7): 1085.
- [6] 康晓慧, 雷桅, 张梅. 水稻苯丙氨酸解氨酶的生物信息学分析 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, 33 (4): 89–94.
KANG X H, LEI W, ZHANG M. Bioinformatic analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Oryza sativa* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2010, 33 (4): 89–94. (in Chinese)
- [7] 杨郁文, 李双, 黄俊宇, 等. 陆地棉苯丙氨酸解氨酶家族基因的鉴定及分析 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15 (4): 1184–1191.
YANG Y W, LI S, HUANG J Y, et al. Identification and analysis of the gene family of phenylalanine ammonia-lyase in upland cotton [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 (4): 1184–1191. (in Chinese)
- [8] 范丽. 桑树木质素合成基因的生物信息和功能分析[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
FAN L. Biological information and function analysis of mulberry lignin synthesis gene[D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [9] 宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶基因(SmPAL1)的克隆及其功能初探[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
SONG J. Molecular cloning of a phenylalanine ammonia—lyase gene(SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza* and the primary study on its function[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2007. (in Chinese)
- [10] 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.
FENG L J, YIN Y L, JIAO Q Q, et al. Cloning and expression analysis of PAL gene in pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32 (7): 1320–1329. (in Chinese)
- [11] 郭鹏飞, 雷健, 罗佳佳, 等. 柱花草苯丙氨酸解氨酶(SgPALs)对生物胁迫与非生物胁迫的响应 [J]. *热带作物学报*, 2019, 40 (9): 1742–1751.
GUO P F, LEI J, LUO J J, et al. Response of phenylpropane ammonia-lyase on biotic and abiotic stress in *Stylosanthes* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40 (9): 1742–1751. (in Chinese)
- [12] 雒军, 王引权, 温随超, 等. 当归苯丙氨酸解氨酶基因片段克隆和组织特异性表达分析 [J]. *草业学报*, 2014, 23 (4): 130–137.
LUO J, WANG Y Q, WEN S C, et al. Cloning and tissue-specific expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene fragment in *Angelica sinensis* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23 (4): 130–137. (in Chinese)
- [13] HAO C, XIA Z, FAN R, et al. De novo transcriptome sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) and an analysis of genes involved in phenylpropanoid metabolism in response to *Phytophthora capsici* [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1): 822.
- [14] 文印. 基部被子植物水力结构进化及其与光合的关联[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
WEN Y. Evolution of hydraulic structure in basal angiosperms and its relation to photosynthesis - case studies[D]. Nanning: Guangxi University, 2019.
- [15] 杨永, 傅德志, 王祺. 被子植物花的起源: 假说和证据 [J]. *西北植物学报*, 2004 (12): 2366–2380.
YANG Y, FU D Z, WANG Q. Origin of flowers: hypotheses and evidence [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2004 (12): 2366–2380. (in Chinese)
- [16] 叶小真, 杨婕, 冯丽贞, 等. 桉树PAL基因克隆及焦枯病菌诱导下的表达分析 [J]. *林业科学研究*, 2019, 32 (6): 99–105.
YE X Z, YANG J, FENG L, et al. Cloning of PAL Gene from *Eucalyptus* and Its Expression under *Calonectria pseudoreteauidii* Stress [J]. *Forest Research*, 2019, 32 (6): 99–105. (in Chinese)
- [17] 吴远航, 刘秦, 刘攀道, 等. 木薯苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及其对低温胁迫的响应 [J]. *热带作物学报*, 2019, 40 (3): 483–489.
WU Y H, LIU Q, LIU P D, et al. Cloning of Cassava Phenylalanine Ammonia Lyase Genes and Their Responses to Low Temperature Stress [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40 (3): 483–489. (in Chinese)
- [18] 高红胜, 张仁英, 许学文, 等. 黄瓜苯丙氨酸解氨酶基因CsPAL的克隆及响应白粉菌侵染的表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17 (6): 1757–1762.
GAO H S, ZHANG R Y, XU X W, et al. Cloning of CsPAL Gene and Its Expression Analysis in response to Powdery Mildew Infection [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17 (6): 1757–1762. (in Chinese)
- [19] 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.
SUN H Y, QUAN X L, FU S, et al. Research progress of Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, 2016, 38 (1): 88–92. (in Chinese)
- [20] 方长句, 王清水, 余彦, 等. 不同胁迫条件下化感与非化感水稻

- PAL多基因家族的差异表达 [J]. 生态学报, 2011, 31 (16): 4760-4767.
- FANG C X, WANG Q S, YU Y, et al. Differential expression of PAL multigene family in allelopathic rice and its counterpart exposed to stressful conditions [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31 (16): 4760-4767. (in Chinese)
- [21] 王燕, 石强, 薛志东. 蛋白质结构域划分方法及在线服务综述 [J]. 广州大学学报 (自然科学版), 2019, 18 (1): 20-29.
- WANG Y, SHI Q, XUE Z D. a review of protein domain partitioning methods and online services [J]. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2019, 18 (1): 20-29. (in Chinese)
- [22] DE GRASSI A, LANAVE C, SACCONI C. Genome duplication and gene-family evolution: The case of three OXPHOS gene families [J]. *Gene*, 2008, 421 (1/2): 1-6.
- [23] 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.
- [24] YONA A H, MANOR Y S, HERBST R H, et al. Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress [J]. *PNAS*, 2012, 109 (51): 21010-21015.
- [25] 张古文, 刘莉莉, 王显瑞, 等. 谷子HSP70基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析 [J]. *浙江农业学报*, 2015, 27 (7): 1127-1133.
- ZHANG G W, LIU L L, WANG X R, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of HSP70 genes in foxtail millet [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2015, 27 (7): 1127-1133. (in Chinese)
- [26] 李文燕. 植物OPR基因家族系统发育分析及水稻OPR家族基因分子生物学功能研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.
- LI W Y. Phylogenetic analysis of OPR gene family in plants and study of molecular biological functions of OPR family genes in rice[J]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2010.
- [27] OHTA T. Evolution and Variation of Multigene Families[M]// Evolution and variation of multigene families/. Springer-Verlag, 1980.
- [28] BAJIC V B, BRENT M R, BROWN R H, et al. Performance assessment of promoter predictions on ENCODE regions in the EGASP experiment [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 (S1): S3.1-S313.

(责任编辑: 吴宇琳)