

引文格式: 张祥, 刘雨婷, 张婧柔, 等. 涮辣与昆明皱皮椒苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的生物信息学及表达分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(2): 320–329. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202103102](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202103102)

涮辣与昆明皱皮椒苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的生物信息学及表达分析*

张 祥¹, 刘雨婷¹, 张婧柔¹, 李平平¹, 谢志和¹, 张芮豪¹, 邓明华^{1,2**}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南省通海县经济作物工作站, 玉溪市邓明华专家基层科研工作站, 云南 通海 652700)

摘要:【目的】解析涮辣与昆明皱皮椒苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的差异, 研究不同发育时期、不同环境和外源因子处理下 PAL 基因表达规律。【方法】基于基因克隆和生物信息学方法研究 PAL 基因和蛋白特性; 利用荧光定量 PCR 及酶活性测定方法测定 PAL 表达量及酶活性。【结果】克隆得到涮辣 PAL 基因为 2 166 bp, 昆明皱皮椒 PAL 基因为 2 154 bp, 分别编码 721 和 717 个氨基酸。顺式元件预测结果显示: 辣椒 PAL 可能受赤霉素、光与干旱的影响。PAL 蛋白预测结果表明: PAL 为脂溶性、亲水性的稳定蛋白, 主要定位于质膜, 无信号肽与跨膜结构, 含 58 个磷酸化位点。在进化上 PAL 有保守性, 但在亚组上存在一定差异。在不同发育阶段, 2 种辣椒 PAL 表达水平与酶活性的趋势都为先升高后急剧降低, 且在大部分发育阶段均表现为露地栽培高于大棚栽培; 同一环境条件下, 涮辣 PAL 表达与酶活性整体高于昆明皱皮椒; 且不同外源物质在一定时间内可影响涮辣 PAL 的表达。【结论】涮辣与昆明皱皮椒 PAL 基因和蛋白特性相似但存在差异, 在辣椒生长发育、环境和外源物质响应方面有重要功能。

关键词: 涮辣; 昆明皱皮椒; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL); 生物信息学; 外源因子

中图分类号: S641.301

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 02-0320-10

Bioinformatics and Expression Analysis of Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) from ShuanLa (*Capsicum chinense*) and Kunming Wrinkled Pepper (*C. annuum*)

ZHANG Xiang¹, LIU Yuting¹, ZHANG Jingrou¹, LI Pingping¹,

XIE Zhihe¹, ZHANG Ruihao¹, DENG Minghua^{1,2}

(1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. DENG Minghua Expert Basic Scientific Research Workstation of Yuxi City, Economic Crop

Workstation of Tonghai County, Tonghai 652700, China)

Abstract: [Purpose] To analyze the differences between ShuanLa and Kunming wrinkled pepper phenylalanine ammonia-lyase (PAL), exploring the change rules of ShuanLa and Kunming wrinkled pepper PAL expression in different development stages, different environments and different exogen-

收稿日期: 2021-03-29

修回日期: 2022-01-03

网络首发日期: 2022-03-28

*基金项目: 云南省科技厅重大专项 (2018BB020); 玉溪市专家基层科研工作站。

作者简介: 张祥 (1995—), 男, 陕西渭南人, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

E-mail: 1427392042@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 邓明华 (1974—), 男, 湖南岳阳人, 博士, 教授, 主要从事园艺植物生物学研究。E-mail: dengminghua2013@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220325.1609.005.html>



ous factors. [Methods] The *PAL* gene and protein characteristics were studied based on gene cloning and bioinformatics methods. The relative expression level and enzyme activity of *PAL* were determined by qPCR and enzyme activity assay. [Results] The *PAL* gene of ShuanLa and Kunming wrinkled pepper was 2 166 bp and 2 154 bp, encoding 721 and 717 amino acids, respectively. The *cis*-element prediction results showed that the pepper's *PAL* gene might be regulated by gibberellin, light and drought. The *PAL* protein prediction showed that it was fat soluble, hydrophilic and stable protein. *PAL* proteins had no signal peptide, no transmembrane structure, and both had 58 phosphorylation sites. It was evolutionarily conservative, but there were some differences in subgroups. At different developmental stages, the expression of *PAL* and enzyme activity increased first and then decreased sharply, and in most developmental stages, the expression of *PAL* and enzyme activity were higher in open field than in greenhouse. Under the same environmental conditions, the expression and enzyme activity of ShuanLa *PAL* were higher than those of Kunming wrinkled pepper. Different exogenous substances affected the expression of shabulipal in a certain time. [Conclusion] The *PAL* gene and protein characteristics of ShuanLa and Kunming wrinkled pepper were similar but different, which played an important role in pepper growth and development, environment and response to exogenous factor.

Keywords: ShuanLa; Kunming wrinkled pepper; phenylalanine-ammonia-lyase (*PAL*); bioinformatics; exogenous factor

苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*) 属于 lyases 家族, 最近此类酶被重新命名为 EC 4.3.1.24 (苯丙氨酸解氨酶)、EC 4.3.1.25 (酪氨酸解氨酶) 和 EC 4.3.1.26 (苯丙氨酸/酪氨酸解氨酶), 该酶催化苯丙氨酸的非氧化脱氨基反应, 产生反式肉桂酸和 NH_3 ^[1]。*PAL* 是苯丙烷途径中的第 1 步反应酶, 同时也是此途径的限速酶^[2-3]。苯丙烷途径中产生的中间产物可直接或间接合成多种植物次生代谢物质, 包括类黄酮、木质素、酚类、植物抗毒素和辣椒素等, 这些次生代谢物在植物生长发育及抗逆方面起重要作用^[4-7]。因此, 研究不同辣椒材料、发育时期和栽培环境下的 *PAL* 酶活性及基因表达对解析辣椒次生代谢物质合成和积累有重要价值。

马铃薯未成熟块茎组织中的 *PAL* 表达水平和酶活性最高^[8]。BALDI 等^[9]研究表明: 苯丙烷类和类黄酮生物合成相关基因可能在调控苹果早期果实发育中起重要作用, 并指出在苹果果实发育前期, *PAL* 表达水平显著上调。同样, 在葡萄果实发育的一定阶段呈现出 *PAL* 依赖性^[10]。对拟南芥 *PAL* 基因的研究显示: *PAL* 在植物生长、发育和对环境胁迫的反应中不可或缺^[11]。由此可知, 除不同发育时期外, *PAL* 在应对不同环境因子胁迫

中也发挥着一定的作用。目前许多研究表明: *PAL* 类基因在应对环境刺激反应中受到不同的调节^[12-13], 同时相关植物激素如脱落酸、赤霉素和茉莉酸等也会影响 *PAL* 基因的表达量和酶活性^[14]。

涮辣是云南的特色辣椒品种, 为小米辣的栽培变种, 分布于云南省德宏、保山和西双版纳等地, 是已知报道中中国最辣的辣椒^[15-16]。王姣等^[17]通过研究得到云南涮辣中 *PAL* 酶活性与辣椒素含量的变化基本一致, 表明 *PAL* 是影响涮辣辣椒素积累的重要因素。本实验室通过测定涮辣和昆明皱皮椒辣椒素和二氢辣椒素含量, 经辣度换算后发现涮辣辣度为昆明皱皮椒的 42.4 倍 (数据未发表), 两者同为云南本地特色辣椒, 但辣椒素积累差异较大。*PAL* 作为影响辣椒素合成的主要酶之一, 尽管在不同发育时期、环境和物种对 *PAL* 作用有许多相关研究, 但对于地方特色辣椒 (如云南高辣度涮辣) 辣椒素积累现象的分子水平解释较少。因此, 本研究将涮辣与昆明皱皮椒进行对比, 运用生物信息学方法构建系统发育树, 基于 qPCR 与报道的 *PAL* 酶活性测定方法, 测定不同发育时期、不同栽培环境下 *PAL* 的表达水平与酶活性, 并测定不同外源物质处理下涮辣 *PAL* 表

达水平,旨在解析涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 基因及蛋白的差异,探究不同发育时期、不同栽培环境下 *PAL* 基因表达及酶活性的变化规律,为研究 *PAL* 在云南特色涮辣辣椒素积累中的作用提供借鉴与参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

涮辣与昆明皱皮椒来源于云南农业大学园林园艺学院番茄辣椒实验室,于露天和大棚 2 种不同环境中正常栽培。以花后每 10 d 为 1 个发育时期,选择 7 个发育时期的辣椒果实作为试验材料,分别构建 2 种辣椒的 cDNA 混池进行 *PAL* 基因克隆。选择辣椒不同发育时期的果实测定 *PAL* 表达水平及酶活性,对涮辣花后 30 d 果实进行不同外源物质处理并测定 *PAL* 表达水平,所有试验均设置 3 个生物学重复。

1.2 试验方法

1.2.1 *PAL* 基因分离与鉴定

使用 RNA 提取试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司)提取涮辣与昆明皱皮椒总 RNA,利用 Takara 公司反转录试剂盒合成第 1 链 cDNA,并以此为模板,使用 KIM 等^[18]报道的 *PAL* RT-PCR 特异性引物(表 1)进行 RT-PCR 特异性扩增,回收特异性 PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序,使用 ORF Finder 软件预测 *PAL* 开放阅读框,在线 BLAST 进行验证。

表 1 反应引物

Tab. 1 Primers involved in the reaction

引物 primer	序列(5'→3') sequence	反应 reaction
PAL1	F: ATTGATTTTTCGAAGAAATCAATTC	qPCR
	R: GCTCCACTTTAGCCCCAC	
PAL2	F: ATTCGCGCTGCAACTAAGAT	
	R: CACCGTGTAAGGCCTTGTTT	
Actin	F: GCCTAGAAATTTGAGCCTCATT	RT-PCR ^[18]
	R: AAGATGGTATTGTTGCTGATGG-	
PAL	F: GGTTTTGGTGCAACATCACATAGGAG	
	R: ATTGTCAAAGTTCTCTTAGCTACTTGCC	

注: PAL1. 昆明皱皮椒 *PAL*; PAL2. 涮辣 *PAL*。
Note: PAL1. Kunming wrinkled pepper *PAL*; PAL2. ShuanLa *PAL*.

1.2.2 涮辣与昆明皱皮椒的 *PAL* 基因特性分析

基于 Pepper Hub 与 NCBI 公共数据库查找辣椒(GeneID: 107843098)与其他茄科植物 *PAL* 基

因的上游 2 000 bp 序列,在 plant CARE 软件上预测上游顺式元件,用 Microsoft Excel 365 筛选整理, TBtools 软件进行顺式元件可视化。使用 DNAMAN 9 对涮辣和昆明皱皮椒 *PAL* 序列进行同一性分析,使用 MEGA X 进行序列比对。

1.2.3 涮辣与昆明皱皮椒的 *PAL* 蛋白特性分析

使用在线软件 MEME 分析各物种 *PAL* 氨基酸序列 motif,并在 TBtools 软件中进行可视化。蛋白结构域预测基于 DART 与 PFAM 工具;使用 PORTPARAM 工具对涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 蛋白理化性质进行预测;使用 SOPMA 预测涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 蛋白二级结构;基于 SWISS-MODEL 在线工具对涮辣与昆明皱皮椒的 *PAL* 蛋白三级结构进行预测,在预测结果中以 GMQE(全局模型质量估计)值和 QMEAN Z 得分衡量模型的准确性。GMQE 估计模型质量,其分数表示为介于 0 和 1 之间的数字,反映使用该对齐模板构建模型的预期准确性以及目标的覆盖范围,数字越大,即可靠性越高;QMEAN Z 得分在 0 左右表示模型结构和类似大小的试验结构之间良好一致,-4.0 或以下分数表示模型质量低。用 Py-mol 2.4.1 软件对三级结构模型进行 3D 渲染;使用 SignalP-5.0、TMHMM 和 NetPhos 预测二者 *PAL* 蛋白的信号肽、跨膜结构和磷酸化位点;运用 PSORT Prediction 预测涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 的亚细胞定位。

1.2.4 进化树构建

在 NCBI BLAST 上选择不同物种但同一性大于 70% 的 *PAL* 氨基酸序列,使用 MEGA X 软件基于邻接法并设置 Bootstrap method 为 1 000,选择 Poisson model 模型检验构建系统发育树,并使用 ITOL 软件作图。

1.2.5 不同发育时期涮辣与昆明皱皮椒的 *PAL* 表达水平及酶活性测定

利用 Primer-blast 设计 qPCR 引物(表 1),基于 qPCR 测定 *PAL* 表达水平,使用 KOUKOL^[19]和王姣等^[17]报道的方法提取不同发育时期的涮辣和昆明皱皮椒果实 *PAL* 酶;使用分光光度计于 290 nm 下测定其 OD 值, *PAL* 活性以 1 mL 酶液在 1 h 内 OD_{290 nm} 的变化表示。

1.2.6 不同外源因子处理涮辣及 *PAL* 表达水平测定

选择脱落酸(ABA, 0.5 mmol/L)、赤霉素

(GA₃, 0.5 mmol/L)、过氧化氢 (H₂O₂, 30% 水溶液)、茉莉酸甲酯 (MeJA, 0.1 mmol/L)、水杨酸 (SA, 0.1 mmol/L) 和褪黑素 (MT, 0.1 mmol/L) 6 种外源物质分别对果实胎座进行浸泡处理 (处理时间: 0、3、6、12 和 15 h), 其中 0 h 为未处理样品, 以管家基因 *Actin* 作为校正, 测定 *PAL* 表达量。

2 结果与分析

2.1 涮辣与昆明皱皮椒的 *PAL* 基因分析

2.1.1 涮辣和昆明皱皮椒的 *PAL* 基因碱基序列对比分析

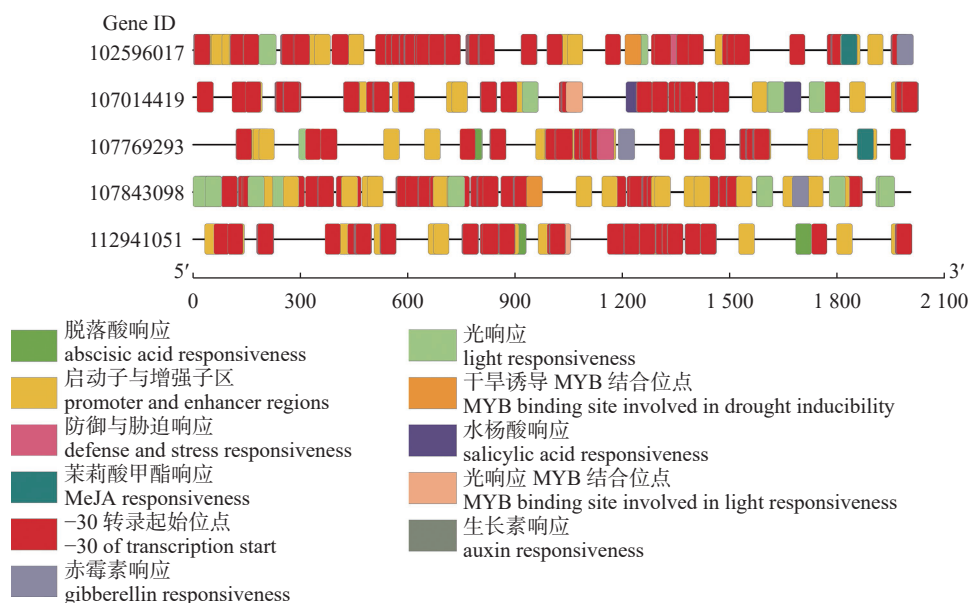
涮辣和昆明皱皮椒 *PAL* 进行 RT-PCR 特异性扩增并测序后, 经 BLAST 验证, 二者与 NCBI 数据库中 GeneID: 107843092 的辣椒 *PAL* 类基因序列同一性高达 99% 以上。开放阅读框预测显示: 涮辣 *PAL* 基因 2 166 bp, 编码 721 个氨基酸残基; 昆明皱皮椒 *PAL* 基因 2 154 bp, 编码 717 个氨基酸残基。同一性分析结果显示: 涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 碱基序列同一性为 98.71%。涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 基因序列对比结果表明: 涮辣存在 12 个碱基插入, 且涮辣 *PAL* 存在 16 个 SNP 位点, 分别为: 20 (A-T)、53 (T-G)、239 (C-G)、

452 (G-A)、771 (G-A)、786 (A-C)、1095 (A-T)、1527 (A-G)、1711 (T-C)、1759 (A-C)、1917 (T-C)、1992 (G-C)、2091 (G-C)、2103 (G-A)、2104 (A-G) 和 2106 (T-C)。

2.1.2 辣椒及其他常见茄科植物 *PAL* 上游顺式元件预测

对茄科中除辣椒外的番茄、马铃薯、潘那利番茄和普通烟草的 *PAL* 基因上游顺式元件进行预测, 结果共预测到 447 个顺式元件, 其中马铃薯 109 个, 潘那利番茄 78 个, 普通烟草 71 个, 番茄 79 个, 辣椒 109 个 (图 1)。所有预测到的顺式元件共有 11 种, 按类型可分为: ① 核心启动元件: 启动子和增强子区、-30 转录起始位点; ② 植物激素响应元件: 脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA)、水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和生长素 (Auxin) 响应元件; ③ 环境响应元件: 防御与胁迫响应、光响应元件; ④ 转录因子响应结合位点: 光响应 MYB 结合位点、干旱诱导 MYB 结合位点。

在辣椒中除存在核心启动元件外, 还存在 1 个 GA 响应元件, 10 个光响应元件和 1 个干旱诱导 MYB 结合位点。由预测结果可推测: 在辣椒 *PAL* 基因的表达调控中, 其受 GA 等植物激素



注: 马铃薯 (102596017); 潘那利番茄 (107014419); 普通烟草 (107769293); 一年生辣椒 (107843098); 番茄 (112941051)。

Note: *Solanum tuberosum* (102596017); *S. pennellii* (107014419); *Nicotiana tabacum* (107769293); *Capsicum annuum* (107843098); *S. lycopersicum* (112941051).

图 1 辣椒及其他常见茄科植物 *PAL* 基因上游顺式元件预测

Fig. 1 Prediction of *cis*-element upstream of *PAL* genes in pepper and other Solanaceae plants

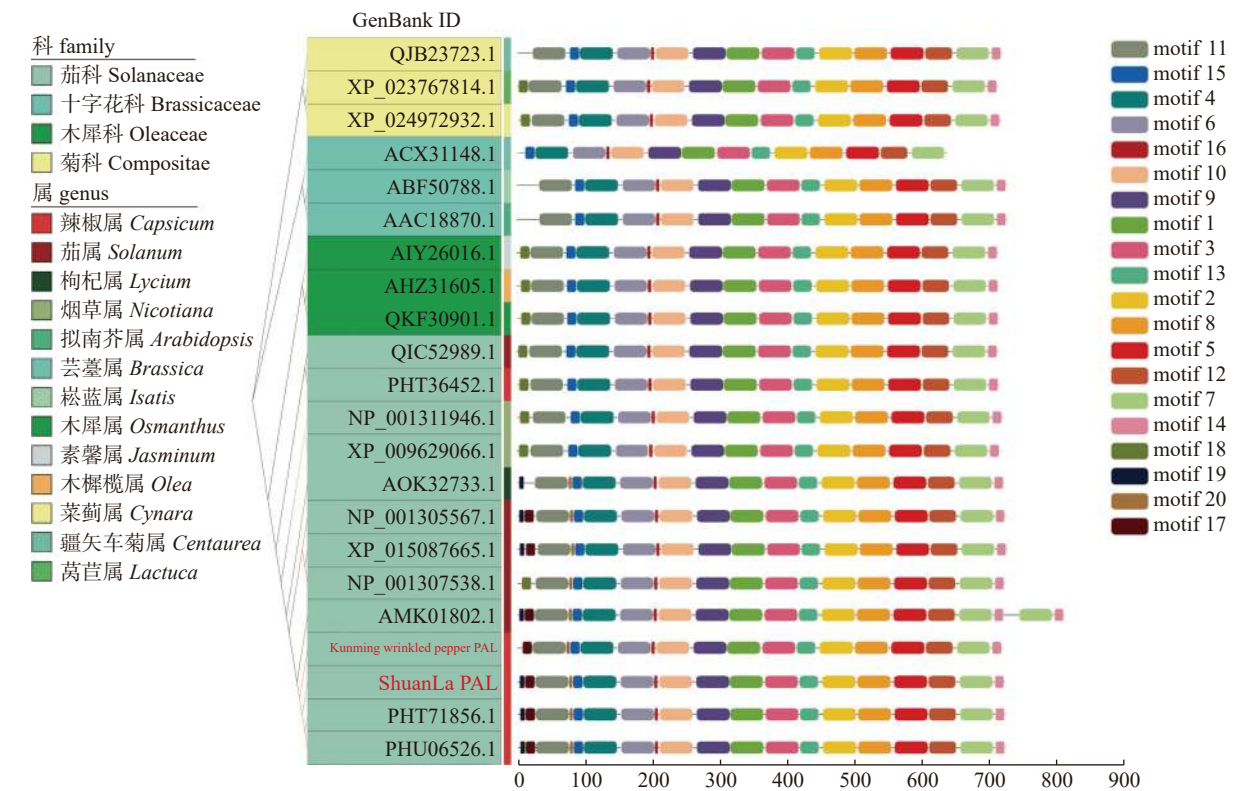
和光的调控，另外在对于旱胁迫响应过程中，MYB 类转录因子也参与此调控过程。

2.2 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 蛋白特性分析

2.2.1 不同物种 PAL 蛋白保守结构分析

选取包括茄科、十字花科、木犀科和菊科 4 个科共 22 条 PAL 氨基酸序列进行保守 motif 分析，结果(图 2)显示：共得到 20 个显著保守的 motif，其中，包括涮辣与昆明皱皮椒在内的所有植物都含有 15、4、6、16、10、9、1、3、13、2、8、5、12 和 7 等 14 个不同保守 motif。由此

可推测：以上 14 个保守 motif 是 PAL 蛋白结构的重要组成部分，且是保证不同物种之间 PAL 功能相似的决定性结构。对辣椒而言，除 *Capsicum baccatum* 之外的辣椒含有 17 和 20 两个特有保守 motif，而 *C. chinense*、*C. annuum* 和涮辣相对于昆明皱皮椒含特有的 motif 19。蛋白结构域分析结果显示：涮辣和昆明皱皮椒 PAL 属于 cl30215 超家族中 PLN02457 保守蛋白结构域家族，存在 PLN 0457 结合位点，同时属于 lyases 家族，包含芳香裂解酶结构域。



注：茄科：中国辣椒 (PHU06526.1)，一年生辣椒 (PHT71856.1)，浆果状辣椒 (PHT36452.1)，马铃薯 (NP_001305567.1)，茄子 (AMK01802.1)，番茄 (NP_001307538.1)，潘那利番茄 (XP_015087665.1)，枸杞 (AOK32733.1)，绒状烟草 (XP_009629066.1)，普通烟草 (NP_001311946.1)，龙葵 (QIC52989.1)；十字花科：拟南芥 (AAC18870.1)，芥菜 (ACX31148.1)，板蓝根 (ABF50788.1)；木犀科：桂花 (QKF30901.1)，茉莉花 (AIY26016.1)，油橄榄 (AHZ31605.1)；菊科：洋蓟 (XP_024972932.1)，矢车菊 (QJB23723.1)，莴苣 (XP_023767814.1)；下同。

Note: Solanaceae: *Capsicum chinense* (PHU06526.1), *Capsicum annuum* (PHT71856.1), *Capsicum baccatum* (PHT36452.1), *Solanum tuberosum* (NP_001305567.1), *S. melongena* (AMK01802.1), *S. lycopersicum* (NP_001307538.1), *S. pennellii* (XP_015087665.1), *Lycium chinense* (AOK32733.1), *Nicotiana tomentosiformis* (XP_009629066.1), *N. tabacum* (NP_001311946.1), *S. nigrum* (QIC52989.1); Brassicaceae: *Arabidopsis thaliana* (AAC18870.1), *Brassica juncea* subsp. napiformis (ACX31148.1), *Isatis tinctoria* (ABF50788.1); Oleaceae: *Osmanthus fragrans* (QKF30901.1), *Jasminum sambac* (AIY26016.1), *Olea europaea* (AHZ31605.1); Compositae: *Cynara cardunculus* var. scolymus (XP_024972932.1), *Centaurea cyanus* (QJB23723.1), *Lactuca sativa* (XP_023767814.1); the same as below.

图 2 不同物种 PAL 蛋白氨基酸 motif 分析

Fig. 2 Motif analysis of amino acids in PAL proteins of different species

2.2.2 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 理化性质分析

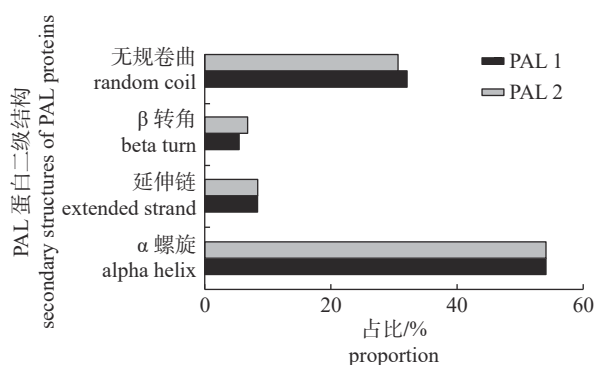
蛋白理化性质预测结果显示：涮辣与昆明皱皮椒 PAL 蛋白分子式分别为 $C_{3436}H_{5533}N_{965}O_{1057}S_{32}$ 和 $C_{3418}H_{5509}N_{959}O_{1051}S_{33}$ ，分子量分别为 78.30 和

77.91 ku，理论等电点 (IP) 为 6.26 和 6.31，均为脂溶性、亲水性的稳定蛋白。亚细胞定位预测结果显示：两者 PAL 定位在质膜的确定性为 0.700，在微体 (过氧化物酶体) 的确定性为 0.300，在内

质网膜上的确定性为 0.200, 在线粒体内膜上的确定性为 0.100。

2.2.3 涮辣与昆明皱皮椒的 PAL 蛋白二级结构分析

预测结果 (图 3) 显示: 2 个品种辣椒 PAL 蛋白含有 4 种二级结构, 包括 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规卷曲, 其中 α 螺旋与无规卷曲占主要部分 (涮辣: 85.02%; 昆明皱皮椒: 86.19%)。昆明皱皮椒 PAL 蛋白中无规卷曲与延伸链多于涮辣, α 螺旋和 β 转角却少于涮辣 PAL。



注: PAL1. 昆明皱皮椒 PAL; PAL2. 涮辣 PAL。

Note: PAL1. Kunming wrinkled pepper PAL; PAL2. ShuanLa PAL.

图 3 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 蛋白二级结构

Fig. 3 Secondary structures of PAL proteins in ShuanLa and Kunming wrinkled pepper

2.2.4 涮辣与昆明皱皮椒的 PAL 蛋白三级结构分析

SWISS-MODEL 预测结果 (图 4) 显示: 涮辣的 PAL 蛋白模型 GMQE 值为 0.85, QMEAN Z 得分为 -0.66; 昆明皱皮椒的 GMQE 值为 0.85, QMEAN Z 得分为 -1.82, 表明本次预测的涮辣和昆明皱皮椒 PAL 蛋白质三级结构准确性高, 模型可靠。

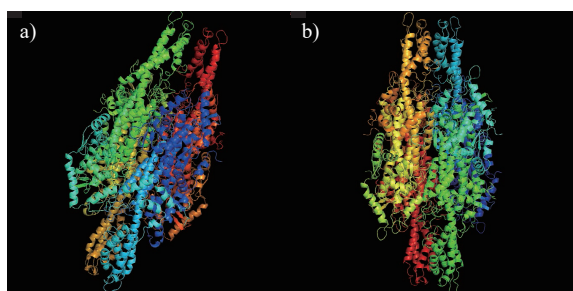


图 4 涮辣 (a) 与昆明皱皮椒 (b) PAL 蛋白三级结构预测图

Fig. 4 Prediction of tertiary structures of PAL proteins in ShuanLa (a) and Kunming wrinkled pepper (b)

2.2.5 涮辣与昆明皱皮椒的 PAL 蛋白信号肽、跨膜结构分析和磷酸化位点预测

SignalP-5.0 与 TMHMM Server v. 2.0 预测结果 (图 5) 显示: 涮辣和昆明皱皮椒的 PAL 蛋白均无信号肽与跨膜结构。使用 NetPhos 3.1 Server 对涮辣与昆明皱皮椒 PAL 蛋白磷酸化位点预测, 同时对预测位点在 0~1 区间内进行打分, 预测位点可信度随得分从 0.5 到 1 增加而增加, 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 中评分大于等于 0.5 的磷酸化位点均为 81 个。对同一位点, 以最高得分的氨基酸残基类型为准进行筛选, 涮辣与昆明皱皮椒均筛选到 58 个得分最高的磷酸化位点; 在涮辣中 S 型 30 个, T 型 21 个, Y 型 7 个; 昆明皱皮椒中 S 型 31 个, T 型 20 个, Y 型 7 个。

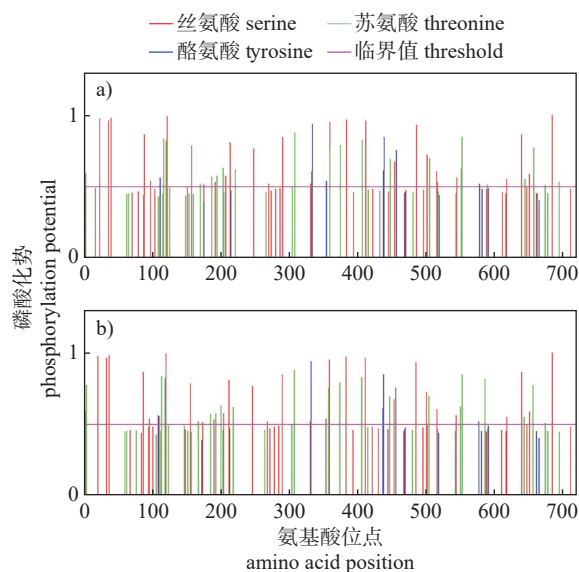


图 5 涮辣 (a) 与昆明皱皮椒 (b) PAL 蛋白磷酸化位点预测结果

Fig. 5 Results of predicting the phosphorylation sites of PAL protein in ShuanLa (a) and Kunming wrinkled pepper (b)

2.2.6 不同物种 PAL 系统发育树构建与分析

以选取的包括涮辣和昆明皱皮椒在内共 22 条 PAL 序列构建进化树, 结果 (图 6) 表明: PAL 序列在系统发育上按照 4 个不同的科, 聚为四大类群。其中, 茄科植物中 PAL 又分出众多亚支。涮辣和昆明皱皮椒 PAL 与同科同属的 *C. chinense* 和 *C. annuum* 在系统发育上亲缘关系最近, 与 *C. baccatum* 最远; 不同属中, 与茄属的亲缘关系最近; 不同科中, 与木犀科最近, 与十字花科亲缘关系最远。

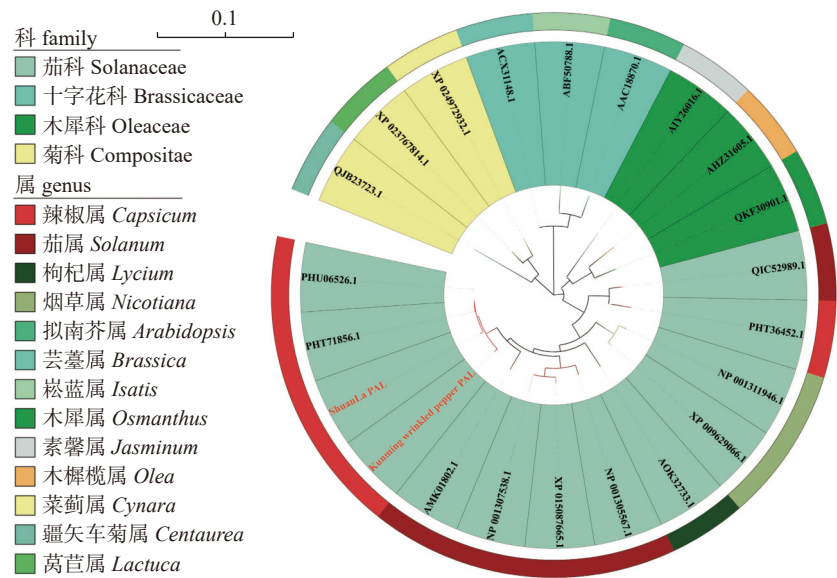


图 6 不同植物 PAL 蛋白系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic trees of PAL proteins of different plants

2.3 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 基因表达及酶活性分析

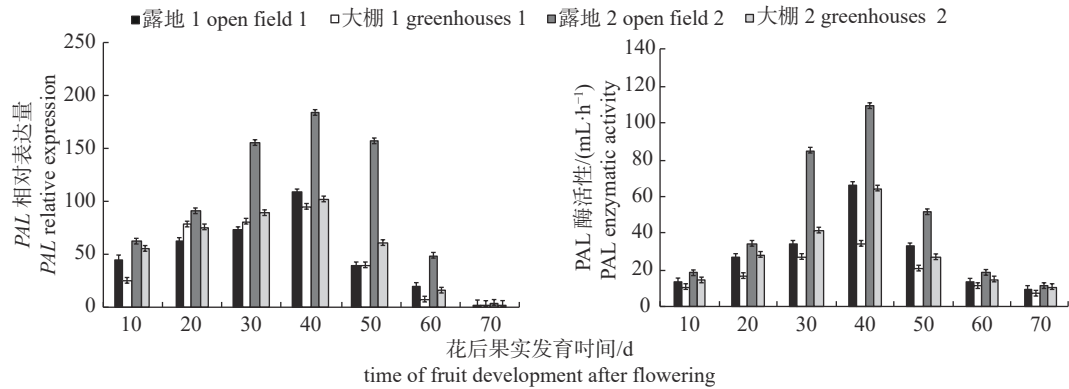
2.3.1 不同材料与环境条件下 PAL 基因表达分析

由图 7 可知: PAL 基因的表达在不同栽培环境下及 2 种辣椒之间差异十分明显。PAL 基因在辣椒果实发育中的表达趋势为先缓慢升高后急剧降低。在果实发育前期 (10 d), 该基因的表达处于较高阶段; 在果实发育中期 (20~40 d), 该基因的表达处于高位, 在第 40 天达到峰值; 在辣椒果实发育后期, 该基因的表达急剧下降, 在第 70 天达到最低。同一环境下, 涮辣 PAL 表达水

平整体高于昆明皱皮椒, 且在第 50 天时, 露地条件下涮辣 PAL 的表达量是昆明皱皮椒的 4 倍。而在果实整个发育时期, 露地栽培环境下的涮辣 PAL 表达量皆高于大棚栽培; 而在发育的大部分阶段, 露地栽培条件下昆明皱皮椒 PAL 的表达量也高于大棚栽培。

2.3.2 在果实不同发育阶段和环境条件下 PAL 酶活性差异

由图 7 还可知: 在辣椒果实发育过程中, PAL 酶活性先缓慢升高后急剧降低。在果实发育的中期 (20~40 d), 该酶活性处于高位, 并在第



注: 1. 昆明皱皮椒; 2. 涮辣。
Note: 1. Kunming wrinkled pepper; 2. ShuanLa.

图 7 涮辣与昆明皱皮椒 PAL 在不同发育时期、不同环境下相对表达量与酶活性

Fig. 7 The relative expression levels and enzyme activities of PAL in ShuanLa and Kunming wrinkled pepper at different developmental stages and under different environments

40 天时达到峰值; 之后, 随发育时间的延长该酶活性急剧下降, 在第 70 天达到最低。在栽培环境中, 涮辣 PAL 酶活性皆高于昆明皱皮椒, 在发育至 30 d 时, 其露地栽培条件下的酶活性是昆明皱皮椒的 2.5 倍。就同种材料不同环境而言, 大棚栽培条件下 PAL 酶活性在发育的 7 个阶段都低于露地栽培。

2.4 不同外源物质对涮辣 *PAL* 基因表达的影响

由图 8 可知: 除 GA_3 处理为外, 其他 5 个外源物质对涮辣 *PAL* 表达的影响总体趋势均为先升高后降低。从整体上看, *PAL* 基因的表达对 ABA、 GA_3 、MeJA 和 SA 处理的反应较为明显, 对 H_2O_2 和 MT 处理响应较低。在 ABA 和 MeJA 处理下, *PAL* 在 3 h 时表达量最高, 随后随时间增加而降低; 在 H_2O_2 与 SA 处理下, *PAL* 在 6 h 时表达量最高; 对于 GA_3 处理而言, 涮辣 *PAL* 在处理 0~3 h 内呈升高趋势, 在 3~6 h 内呈下降趋势, 且在 6 h 时表达量几乎降为 0, 而后在 6~15 h 内, 其表达量随时间增加而增加, 直至 15 h 表达量最高; 在 MT 处理下, *PAL* 表达水平随处理时长变化而变化, 在 3~6 h 持续下降, 随后直到 12 h 持续上升, 然后至 15 h 内下降。

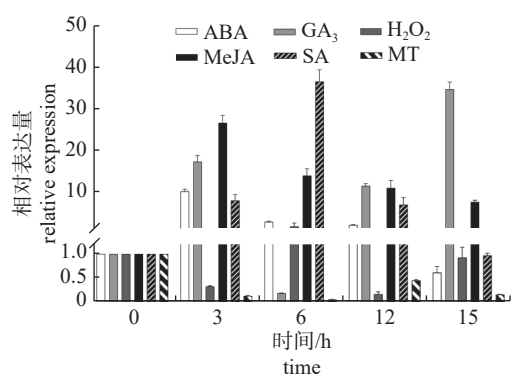


图 8 不同外源因子对涮辣 *PAL* 表达的影响

Fig. 8 Influence of different exogenous substances on the expression of ShuanLa *PAL*

3 讨论

3.1 涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 基因及蛋白特性存在差异

PAL 广泛分布于高等植物中, 是苯丙烷途径中的关键酶, 参与苯丙烷类化合物前体的生物合成^[20-21]。本研究利用同源克隆的方法从涮辣与昆明皱皮椒中分离鉴定出 *PAL* 基因开放阅读框, 其

中涮辣 *PAL* 基因共 2 166 个碱基, 编码 721 个氨基酸残基; 昆明皱皮椒 *PAL* 基因共 2 154 个碱基, 编码 717 个氨基酸残基。基于生物信息学方法, 对涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 基因、蛋白特性与进化关系进行预测和分析。上游顺式元件预测结果揭示了辣椒 *PAL* 可能受 GA 调控, 另外辣椒 *PAL* 具有光响应元件与干旱诱导 MYB 结合位点, 结果与前人研究结果^[14]相符。

涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 蛋白分子量分别为 78.30 和 77.91 ku; 理论等电点分别为 6.26 和 6.31; 2 种辣椒 *PAL* 蛋白带负电荷残基总数大于带正电荷残基总数; 二者皆是脂溶性、亲水性的稳定蛋白。*PAL* 细胞定位主要在质膜上, 而在微体、内质网膜和线粒体膜上的可能性较小, 与黄小贞等^[22]的研究相似。通过对不同物种 *PAL* 氨基酸序列保守 motif 分析, 在一定程度上反映了 *PAL* 具有较高的保守性, 但部分物种 *PAL* 包含特有 motif, 也说明了不同物种对 *PAL* 蛋白功能的需求存在差异。同时, 不同辣椒 *PAL* 蛋白保守结构之间的差异可能是辣椒素生物合成产生差异的重要原因。

蛋白保守结构域预测结果显示: 涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 存在 PLN 0457 结合位点, 包含芳香裂解酶结构域 (lyase aromatic), 与玉米、山葡萄和荸荠等^[23-25]植物中 *PAL* 基因报道一致, 可知涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 属于 lyases 家族的一员。在辣椒 *PAL* 蛋白二级结构中含有大量 α 螺旋与无规卷曲, 与冯立娟等^[26]对石榴 *PAL* 的预测结果相符。CALABRESE 等^[27]用 X 射线晶体学描述了 *PAL* 的三维结构, 结果显示: 每个亚基含有 716 个残基, 其分子质量为 76.88 ku, 每个亚基呈海马形状, 与其他 2 个亚基头尾相连, 最大限度地增加了相邻亚基的相互作用, 并产生 1 个紧密配合的四聚体。涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 蛋白三级结构的预测结果符合 *PAL* 晶体学结构。涮辣与昆明皱皮椒 *PAL* 蛋白无信号肽与跨膜结构, 结果与马铃薯 *PAL*^[28]相符。*PAL* 蛋白磷酸化位点预测显示: 二者都具有 58 个磷酸化位点, 而在枸杞和马铃薯等茄科^[2,26]植物皆预测到 *PAL* 磷酸化位点, 但现有磷酸化蛋白质组学研究未能证实 *PAL* 磷酸化^[29-30], 所以对于 *PAL* 蛋白是否进行磷酸化还需要进一步研究。*PAL* 系统发育树结果表明: *PAL* 在遗传过程中保守性较高, 结果与盖江

涛等^[4]的报道相符。

3.2 PAL 参与环境、外源因子对辣椒的调控并且影响辣椒素积累

由 PAL 参与的苯丙烷途径在植物发育过程中发挥重要作用,其产生的次生代谢物如辣椒素和木质素等参与植物发育过程中相关结构的构成^[11,31]。本研究测定了不同发育时期和环境条件下涮辣与昆明皱皮椒 PAL 相对表达量与酶活性,结果表明:PAL 在辣椒果实发育过程中的酶活性基本和表达水平成正比,趋势为先缓慢升高后急剧降低,并在果实发育中期达到最高,说明 PAL 在辣椒果实发育的前、中期影响较大。植物进化出多种防御信号途径应对环境胁迫和病原体攻击,苯丙烷途径为其中 1 条重要的代谢途径^[32]。相关研究结果表明:低温等外界环境因子可诱导 PAL 快速表达^[33-35]。在本研究中,就同一材料而言,露地栽培的辣椒 PAL 表达量与酶活性高于大棚栽培,故推测露地与大棚 2 种不同的栽培条件下环境因子的差异对 PAL 酶活性及表达有影响,如低温等因素可能诱导辣椒 PAL 较高表达,以产生较多次生代谢物质来抵御环境胁迫。通过不同外源物质对涮辣进行处理,从整体上看,除 H₂O₂ 和 MT 对涮辣 PAL 表达影响较小外,ABA、GA₃、MeJA 和 SA 处理的影响都较为明显。相关研究也报道了在一定时间内 ABA、GA、SA 和 MeJA 等植物外源激素能够诱导植物 PAL 表达增加^[35-37]。PAL 作为辣椒素生物合成的关键酶,已有研究报道涮辣中 PAL 酶活性与辣椒素含量成正比^[17]。同一栽培环境下,涮辣 PAL 的表达量与酶活性高于昆明皱皮椒,结合本研究中涮辣 PAL 表达量与其酶活性的正比关系,暗示涮辣 PAL 基因的高表达可能是其辣椒素含量极高的原因。

4 结论

涮辣与昆明皱皮椒 PAL 基因和蛋白存在差异,在进化关系上具有保守性。同时 PAL 在涮辣和昆明皱皮椒生长发育过程中有重要功能,并且参与外源物质的调控。

[参考文献]

- [1] CUI J D, QIU J Q, FAN X W, et al. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2014, 34(3): 258. DOI: [10.3109/07388551.2013.791660](https://doi.org/10.3109/07388551.2013.791660).
- [2] 乔枫,耿贵工,张丽,等.枸杞苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析[J].中国农业大学学报,2017,22(12): 64. DOI: [10.11841/j.issn.1007-4333.2017.12.08](https://doi.org/10.11841/j.issn.1007-4333.2017.12.08).
- [3] NAG S, KUMARIA S. In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.[J]. Phytochemistry, 2018, 156: 176. DOI: [10.1016/j.phytochem.2018.09.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.09.012).
- [4] 盖江涛,沈建凯,王鹏.主要作物中PAL基因家族的鉴定和序列分析[J].江苏农业科学,2016,44(6): 45. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.010](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.010).
- [5] BARROS J, DIXON R A. Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(1): 66. DOI: [10.1016/j.tplants.2019.09.011](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.011).
- [6] SHI R, SHUFORD C M, WANG J P, et al. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family in wood forming tissue of *Populus trichocarpa*[J]. Planta, 2013, 238(3): 487. DOI: [10.1007/s00425-013-1905-1](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1905-1).
- [7] OLSEN K M, LEA U S, SLIMESTAD R, et al. Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis[J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(14): 1491. DOI: [10.1016/j.jplph.2007.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.11.005).
- [8] NAVARRE D A, PAYYAVULA R S, SHAKYA R, et al. Changes in potato phenylpropanoid metabolism during tuber development[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 65: 89. DOI: [10.1016/j.plaphy.2013.01.007](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.007).
- [9] BALDI P, MOSER M, BRILLI M, et al. Fine-tuning of the flavonoid and monolignol pathways during apple early fruit development[J]. Planta, 2017, 245(5): 1021. DOI: [10.1007/s00425-017-2660-5](https://doi.org/10.1007/s00425-017-2660-5).
- [10] CHEN J Y, WEN P F, KONG W F, et al. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(2): 115. DOI: [10.1016/j.jplph.2005.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.07.006).
- [11] HUANG J L, GU M, LAI Z B, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. Plant Physiology, 2010, 153(4): 1526. DOI: [10.1104/pp.110.157370](https://doi.org/10.1104/pp.110.157370).
- [12] CHANG A, LIM M H, LEE S W, et al. Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(48): 33591. DOI: [10.1074/jbc.M804428200](https://doi.org/10.1074/jbc.M804428200).
- [13] 董春娟,李亮,曹宁,等.苯丙氨酸解氨酶在诱导黄瓜幼苗抗寒性中的作用[J].应用生态学报,2015,26(7): 2041. DOI: [10.13287/j.1001-9332.20150527.006](https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.20150527.006).
- [14] 仪丹.茶树两个响应低温与干旱胁迫的苯丙氨酸解氨酶基因克隆、表达与功能分析[D].重庆:西南大学,2020.

- [15] 顾晓振, 郑宇峰, 张正海, 等. 云南地方辣椒品种涮辣和雀辣的植物学分类[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5): 809. DOI: [10.13430/j.cnki.jpgr.2016.05.003](#).
- [16] 杨照辉, 熊荔芳. 不同栽培环境下涮辣生理性状研究[J]. 现代农业科技, 2019(4): 53. DOI: [10.3969/j.issn.1007-5739.2019.04.026](#).
- [17] 王姣, 邵贵芳, 张水, 等. 云南涮辣辣椒素积累与苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究[J]. 湖南生态科学学报, 2018, 5(1): 7. DOI: [10.3969/j.issn.2095-7300.2018.01-007](#).
- [18] KIM D S, HWANG B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(9): 2295. DOI: [10.1093/jxb/eru109](#).
- [19] KOUKOL J, CONN E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236(10): 2692. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)61721-7](#).
- [20] KHAKDAN F, ALIZADEH H, RANJBAR M. Molecular cloning, functional characterization and expression of a drought inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (*ObPAL*) from *Ocimum basilicum* L.[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130: 464. DOI: [10.1016/j.plaphy.2018.07.026](#).
- [21] MACDONALD M J, D'CUNHA G B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2007, 85(3): 273. DOI: [10.1139/O07-018](#).
- [22] 黄小贞, 赵德刚. 植物苯丙氨酸解氨酶表达调控机理的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 16. DOI: [10.3969/j.issn.1001-3601.2017.04.005](#).
- [23] ROSLER J, KREKEL F, AMRHEIN N, et al. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity[J]. Plant Physiology, 1997, 113(1): 175. DOI: [10.1104/pp.113.1.175](#).
- [24] 陈蒙, 张雪, 张宇, 等. 山葡萄苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*) 的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2018, 33(6): 64. DOI: [10.7668/hbnxb.2018.06.009](#).
- [25] 宋慕波, 帅良, 段振华, 等. 荸荠苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和表达[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 77. DOI: [10.7671/j.issn.1001-411X.201804020](#).
- [26] 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. DOI: [10.11869/j.issn.100-8551.2018.07.1320](#).
- [27] CALABRESE J C, JORDAN D B, BOODHOO A, et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis[J]. Biochemistry, 2004, 43(36): 11403. DOI: [10.1021/bi049053+](#).
- [28] 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]. 现代农业研究, 2018(6): 5. DOI: [10.19704/j.cnki.xdnyyj.2018.06.001](#).
- [29] LIU C C, LIU C F, WANG H X, et al. Identification and analysis of phosphorylation status of proteins in dormant terminal buds of poplar[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 1. DOI: [10.1186/1471-2229-11-158](#).
- [30] CHEN H C, SONG J, WILLIAMS C M, et al. Monoglucol pathway 4-coumaric acid: coenzyme A ligases in *Populus trichocarpa*: novel specificity, metabolic regulation, and simulation of coenzyme A ligation fluxes[J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1501. DOI: [10.1104/pp.112.210971](#).
- [31] VANHOLME R, DEMEDTS B, MORREEL K, et al. Lignin biosynthesis and structure[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 895. DOI: [10.1104/pp.110.155119](#).
- [32] ZHANG C Z, WANG X, ZHANG F, et al. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 7242. DOI: [10.1038/s41598-017-07832-2](#).
- [33] DIXON R A, PAIVA N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 1085. DOI: [10.1105/tpc.7.7.1085](#).
- [34] 杜欣谊. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 现代化农业, 2016(7): 24. DOI: [10.3969/j.issn.1001-0254.2016.07.017](#).
- [35] 郝向阳, 孙雪丽, 王天池, 等. 植物 *PAL* 基因及其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. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2018.07.028](#).
- [36] 崔北米, 梁宗锁, 刘岩, 等. ABA及其生物合成抑制剂对丹参毛状根酚酸类成分和关键酶的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 754. DOI: [10.4268/cjcm.2012.0614](#).
- [37] 汤崑, 白云赫, 胡雨晴, 等. 葡萄木质素相关基因 *PAL*、*4CL* 和 *CAD* 特征鉴定及其应答赤霉素在果实发育过程中的作用[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(3): 430. DOI: [10.7685/jnau.201802028](#).

责任编辑: 何承刚