

· 农业生物技术 ·

## 云锦杜鹃苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析

吕思佳, 吴月燕, 贾永红, 何凡, 蒋宝鑫, 杨国霞, 谢晓鸿

浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

吕思佳, 吴月燕, 贾永红, 何凡, 蒋宝鑫, 杨国霞, 谢晓鸿. 云锦杜鹃苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 374-385.

LÜ SJ, WU YY, JIA YH, HE F, JIANG BX, YANG GX, XIE XH. Cloning and functional analysis of the phenylalaninammo-nialyase gene from *Rhododendron fortunei*. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 374-385.

**摘要:** 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalaninammo-nialyase, PAL) 是植物香气化合物中苯甲酸甲酯合成途径的关键酶。为探究云锦杜鹃 *Rhododendron fortunei* *RhPAL* 基因的功能, 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术克隆 *RhPAL* 基因全长 cDNA 序列, 并应用高效液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 联用技术分析云锦杜鹃不同发育阶段的不同组织中 *RhPAL* 基因表达水平和代谢物含量变化关系。结果表明, 从云锦杜鹃花 cDNA 中克隆得到 *RhPAL* 基因, 含有完整的 cDNA 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列长 2 145 bp, 编码 715 个氨基酸, 与其他物种的 PAL 蛋白质氨基酸序列具有较高的同源性; qRT-PCR 分析表明, 在不同花期的花瓣中, *RhPAL* 表达量呈上升趋势, 在衰败期表达量最高, 雌蕊的表达量远远高于雄蕊, 同时, 新叶高于老叶, 叶片的表达量高于花瓣和花蕊。通过酶联免疫法检测分析云锦杜鹃不同花期的花瓣中 PAL 酶活性, 在花苞期酶活性最高, 衰败期最低, 总体呈下降趋势。通过 LC-MS 技术, 检测分析云锦杜鹃中苯丙氨酸 (phenylalanine, L-Phe) 和肉桂酸 (cinnamic acid, Ca) 的含量, 发现在云锦杜鹃不同组织中苯丙氨酸和肉桂酸的含量变化趋势与 *RhPAL* 基因表达水平相一致, 且均与 *RhPAL* 基因表达量呈高度相关。推测 *RhPAL* 在云锦杜鹃花香物质合成中发挥关键作用, 本研究结果可为研究杜鹃花香物质分子调控机制提供理论依据。

**关键词:** 杜鹃; 高效液相色谱-质谱联用; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 肉桂酸

**Received:** January 7, 2021; **Accepted:** September 3, 2021; **Published online:** September 10, 2021

**Supported by:** Key Research and Development Project in Zhejiang Province, China (2021C02053); “Bioengineering” First Class Student Innovation Project in Zhejiang Province, China (CX2020017)

**Corresponding author:** WU Yueyan. E-mail: wyy2000@zwu.edu.cn

**基金项目:** 浙江省重点研发计划项目 (2021C02053); 浙江省“生物工程”一流学科学生创新计划项目 (CX2020017)

# Cloning and functional analysis of the phenylalaninammo-nialyase gene from *Rhododendron fortunei*

LÜ Sijia, WU Yueyan, JIA Yonghong, HE Fan, JIANG Baoxin, YANG Guoxia, XIE Xiaohong

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

**Abstract:** Phenylalaninammo-nialyase (PAL) is a key enzyme in the synthesis of methyl benzoate - a plant aroma compound. In order to understand the function of this enzyme in the formation of fragrance in the scented *Rhododendron* species-*Rhododendron fortunei*, we cloned a gene encoding this enzyme and subsequently examined the gene expression patterns and the profile of enzyme activity during development in various tissues. The full length of *RhPAL* gene was cloned by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The expression levels of *RhPAL* gene were measured by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and the amount of phenylalanine and cinnamic acid were assayed with LC-MS. The results showed that the ORF sequence of *RhPAL* gene amplified from the cDNA templates of flower buds had 2 145 bp, encoding 715 amino acids, and shared 90% homology to the PAL amino acid sequences from other species. qRT-PCR analysis showed that the expression of *RhPAL* in petals during flowering kept in rising even until the flowers wilted. The expression of *RhPAL* in pistil was much higher than that in stamen, while the expression in the younger leaves was higher than in old leaves. However, the expression level was relatively lower in petal and stamen compared to that in leaves. We also measured the PAL activity by Enzyme-linked immuno sorbent assay in the petals of flowers at different flowering stages. The results showed that PAL activity reached the highest at the bud stage and then decreased gradually to the lowest when the flowers wilted, which followed a similar trend in the emission of the flower fragrance. The phenylalanine and cinnamic acid contents measured by LC-MS were highly correlated to the expression level of *RhPAL* in various tissues and at different flowering stages, implying that *RhPAL* plays an important role in the formation of the flower fragrance. This work may facilitate the breeding and improvement of new fragrant *Rhododendron* cultivars.

**Keywords:** *Rhododendron*; LC-MS; PAL; gene clone; bioinformatics analysis; cinnamic acid

杜鹃花是闻名于世的观赏花卉，素有“花中西施”之美称，是中国十大传统名花之一，但中国的杜鹃花资源研究和开发利用存在不足<sup>[1]</sup>。‘云锦’杜鹃 *Rhododendron fortunei* 为杜鹃花科 Ericaceae 杜鹃花属 *Rhododendron* 植物，为中国特有的杜鹃属物种，是常绿杜鹃亚属的代表种之一，主要生长在海拔 600–2 000 m 的山脊阳处或林下<sup>[2]</sup>。云锦杜鹃叶形大，花形美丽且清

香，有较高的园艺观赏价值<sup>[3]</sup>。杜鹃花属中具有香气的品种甚少，云锦杜鹃开发潜力巨大，具有良好的产业化前景。

植物香气物质由许多低分子量、易挥发的化合物组成，包括类异戊二烯、类苯丙酸和脂肪酸衍生物<sup>[4]</sup>，是次生代谢的产物<sup>[5-6]</sup>。近年来，本研究团队分析了云锦杜鹃花瓣中香气组成，发现云锦杜鹃特征香气成分主要是苯环型

物质、萜烯类物质和醇类物质，其中苯环型物质相对含量最高，萜烯类物质种类最多，在所有特征香气成分中苯甲酸甲酯香气值最高<sup>[7]</sup>，苯甲酸甲酯是由苯丙烷类代谢途径合成。

苯丙烷类代谢途径的第一步是芳香氨基酸苯丙氨酸 (L-Phe) 在苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的催化下脱氨形成肉桂酸，再由肉桂酸 (Ca) 形成一系列有气味的挥发性化合物<sup>[8]</sup>。PAL 是苯丙烷类代谢途径的第一限速酶<sup>[9]</sup>，是植物次生代谢研究最多的酶<sup>[10]</sup>。现已成功地从白及、茶树、葡萄、洋葱和小麦等多种植物中分离克隆出 *PAL* 基因<sup>[11-15]</sup>，其中 Gonda 等<sup>[16]</sup>发现 L-Phe 在甜瓜果实中被 PAL 代谢为芳香物质，且外源 L-Phe 处理后其芳香挥发物的产生水平增加<sup>[17]</sup>；Tasaki 等<sup>[18]</sup>也发现 PAL 参与松茸芳香物质的合成；在牵牛花中过表达 *PhPAL*，与对照相比苯甲酸甲酯含量增加 100 倍<sup>[19]</sup>；将 PAL 抑制剂应用于绣球花组织后，挥发性苯甲醛和苯甲酸甲酯的排放大幅减少<sup>[20]</sup>。大多数植物香气化合物的生物合成过程非常复杂，是由多个酶在不同组织中共同完成<sup>[21]</sup>，在不同的植物中作用机制也不完全相同。在目前对杜鹃的研究中，PAL 对下游产生植物香气物质基因的调控机制尚未清晰。

本实验以云锦杜鹃为材料，首次克隆了云锦杜鹃 *PAL* 基因 (*RhPAL*) 的 cDNA 序列，并对

其进行生物信息学分析；运用实时荧光定量 PCR 技术分析云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段 *RhPAL* 的表达规律，并利用酶联免疫反应法测定其酶活性；结合 L-Phe 和 Ca 的含量变化分析结果，以了解香气挥发物释放的发育节律和花香形成的基本生化过程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

云锦杜鹃采集于浙江省宁波市四明山国家森林公园。随机选取 3 株 8 年生长势较好的植株，从中挑选无机械损伤、无病虫害的杜鹃花及花瓣附近的叶片 (新叶和老叶)。根据杜鹃花瓣张开的程度将杜鹃花的开花过程分为 4 个时期：花苞期，花瓣未张开；半开期，花瓣张开；盛开期，花瓣全部开放；衰败期，花瓣开始萎蔫，并将花瓣与花蕊 (雄蕊和雌蕊) 分离 (图 1)。处理好的样品放入液氮速冻后，置于 -80 °C 超低温冰箱保存，用于后续基因克隆和表达分析。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 云锦杜鹃总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用液氮研磨保存的杜鹃花花瓣样品，总 RNA 的提取过程参照 Rnaprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书 (TIANGEN,



图 1 云锦杜鹃不同花期花瓣及其他组织的形态

Figure 1 The characteristics of petals and other tissues of *Rhododendron fortunei* in different flowering stages.

China)。按照 (NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 第一链合成试剂盒 (Novoprotein, China) 说明书合成第一链 cDNA。根据试剂盒 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'Kit (TaKaRa, China) 说明书, 以杜鹃总 RNA 为模板, 分别合成 3'RACE 和 5'RACE cDNA。

### 1.2.2 *RhPAL* 基因的克隆

通过对 GenBank 中茶树 (KY865305.1)、芒果 (KF929403.1)、当归 (KP257432.1) 和长春花 (AB042520.1) 等植物 *PAL* 基因完整 CDS 序列进行同源比对, 找出高度保守区段, 利用 Primer 6.0 软件设计一对简并引物 (表 1: F1, R1), 进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化后连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa, China), 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (Novoprotein, China)。筛选阳性克隆, 经菌液 PCR 鉴定后选取 2–4 个阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司测序验证。

根据测序得到的云锦杜鹃 *PAL* 基因保守区片段设计 3' RACE 引物和 5' RACE 引物 (表 1: F2, R2)。分别进行 PCR 扩增, 回收产物连接至 pEASY-Blunt zero Cloning Kit (北京全式金生物技术有限公司), 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。经阳性筛选及菌液 PCR 鉴定后选取 2–4 个阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司测序验证。

证, 得到云锦杜鹃 *PAL* 基因 3' RACE 序列和 5' RACE 序列。测序结果应用 DNAMAN 软件和 NCBI 在线工具 Blast 对 *RhPAL* 与其他物种 *PAL* 基因进行同源比对分析。

### 1.2.3 云锦杜鹃 *PAL* 蛋白生物信息学预测分析

采用 ORF finder 查询 ORF 并预测 *RhPAL* 氨基酸序列; 采用 DNAMAN 软件进行同源蛋白质序列比对; 采用 MEGA6.0 软件构建系统进化树; 采用 SOPMA 软件分析蛋白质序列的二级结构; 采用 ExPASy ProtParam 和 ProtScale 预测蛋白质的理化性质和疏水性/亲水性; 采用 NetPhos 分析蛋白质的磷酸化位点; 采用 Swiss-Model 预测蛋白质的三级结构; 采用 NCBI 网站中 Conserved domains Research 软件对云锦杜鹃 *PAL* 蛋白进行结构域预测。

### 1.2.4 *RhPAL* 实时荧光定量表达

分别提取云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段的总 RNA, 反转录合成 cDNA 第一链, 以此为模板进行 qRT-PCR 扩增, 每个样品设置 3 次生物学重复。根据 *RhPAL* 的 CDS 区应用 Primer 6.0 软件设计 qRT-PCR 正向引物和 qRT-PCR 反向引物 (表 1: F3, R3), 参考 TransStart Tip Green qPCR SuperMixS 说明书 (北京全式金生物技术有限公司) 进行 qRT-PCR 扩增, 样本和内参分别设 3 个重复。

表 1 *RhPAL* 克隆及表达分析引物

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis of *RhPAL*

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
F1	AGTGATTGGGTGATGGABAGCA	22
R1	CATAACCAAGATGTGAACTC	20
F2	GATGCCGCAGAAGCGT TCCGCCTAGCCG	28
R2	CCTAGTGAATGGCACGGCTGTTGGG	25
F3	GGCTCTGGCTTCGATTGGTAACTC	25
R3	GGACATGATTGGTGACAGGGTTAGC	25
<i>EF1<math>\alpha</math>-F</i>	CTCGATTGCCACACTTCCCA	20
<i>EF1<math>\alpha</math>-R</i>	CATCTTACCATCCCAGCGT	20

### 1.2.5 云锦杜鹃 PAL 酶活性测定

取云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段的样品于液氮中研磨,称取 0.1 g 研磨后样品,加入 1 mL PBS (pH 7.4) 缓冲液,进行 3 个生物学平行。4 °C、8 000 r/min 离心 30 min,取上清液为粗酶液,于 4 °C 保存。按照植物酶联免疫试剂盒 (上海科兴生物科技有限公司) 说明书进行 PAL 酶活性测定。

### 1.2.6 云锦杜鹃花瓣中 L-Phe 和 Ca 含量测定

取云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段的样品于液氮中研磨,称取 0.1 g 研磨后样品,加入 1 mL 甲醇 (色谱纯) 溶液,涡旋混匀后置于冰浴中超声破碎 15 min。将破碎后的组织匀浆在 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上层液体进行旋转蒸发有机溶剂,最后取得样品于 45 μm 过滤器中过滤后进行测定,每个样品进行 3 个生物学平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取结果

云锦杜鹃花瓣中总 RNA 凝胶成像呈清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带 (图 2A)。NanoDrop 法测得核酸浓度  $A_{260}/A_{280}$  为 1.97,  $A_{260}/A_{230}$  为 2.03,说明提取的总 RNA 纯度较高。

### 2.2 云锦杜鹃 PAL 基因的克隆分析

采用 RT-PCR 方法和 RACE 方法扩增 *RhPAL* 全长 cDNA,先通过 RT-PCR 克隆云锦杜鹃 *RhPAL* 基因保守区得到长度 1 191 bp 的片段。根据测序结果分别设计 3' RACE 与 5' RACE 引物,经 PCR 扩增后将纯化产物连接转化至大肠杆菌中。将 3 段测序结果拼接得到长 2 700 bp 的 *RhPAL*,拼接所得的 *RhPAL* 包含一个 ATG 起始密码子和 TAG 终止密码子,以及 28 bp 的 polyA 尾,使用特异性引物 (表 1: F4, R4) 进行 PCR 扩增,得到 2 175 bp 的 PCR 产物,与

拼接所得序列一致。ORF 阅读框全长 2 145 bp (图 2B),编码 715 个氨基酸,GenBank 登录号为 MW735988。使用 DNAMAN 软件将云锦杜鹃 PAL 蛋白质序列和白梨 (NP001306736.1)、山茶 (ASU87404.1)、绚丽 (AFG30054.1)、淫羊藿 (AFU90757.1)、中国李 (AFP24940.1) 的 PAL 蛋白质序列进行多重比较,相似度达 90.0% (图 3)。根据比较结果,应用 MEGA 7.0 软件,选择 18 种植物 PAL 氨基酸序列构建系统进化树,发现云锦杜鹃 PAL 蛋白与其他物种 PAL 蛋白有较高的保守性 (图 4),其中云锦杜鹃 PAL 蛋白与猕猴桃、山茶亲缘关系最近。

### 2.3 云锦杜鹃 PAL 蛋白质的生物信息学分析

通过 ExPasy 网站中的 ProtParam 软件预测 *RhPAL* 编码的蛋白质序列的基本理化性质,云锦杜鹃 PAL 蛋白的分子量为 77.58 kDa;理论等电点为 6.03,该蛋白为酸性蛋白;总的负电荷残基 (天冬氨酸+谷氨酸) 为 84;总的正电荷残基 (精氨酸+赖氨酸) 为 74;亲水性平均值为 -0.138,表明为亲水性蛋白;不稳定系数为 35.95,是不稳定蛋白。

利用 NetPhos3.0 推测云锦杜鹃 PAL 蛋白质的磷酸化位点 (图 5),在多肽链上存在 49 个磷酸化位点,其中丝氨酸 (Ser) 48 个、苏氨酸 (Thr) 36 个、酪氨酸 (Tyr) 13 个。

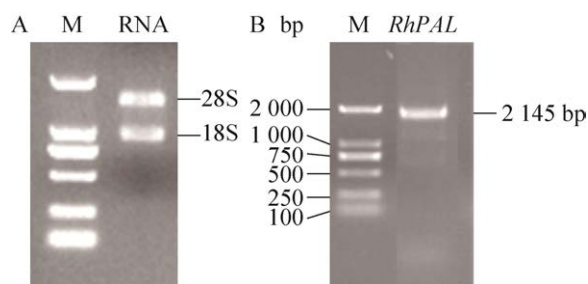


图 2 云锦杜鹃 PAL 基因 PCR 扩增  
Figure 2 PCR amplification of *PAL* gene from *Rh. fortunei*.

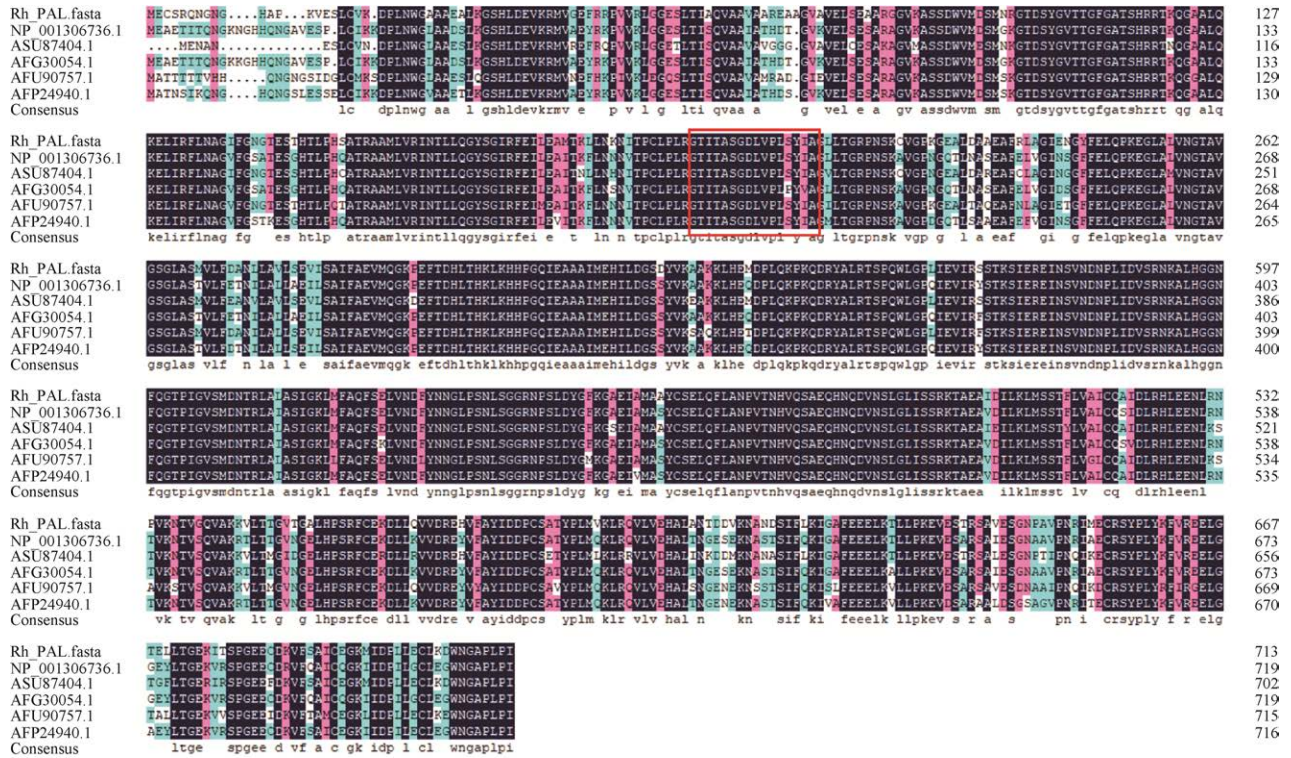


图3 云锦杜鹃与其他植物 PAL 氨基酸序列的多重比较

Figure 3 Multiple alignment of deduced amino acids sequences of PAL from *Rh. fortunei* and other plants.

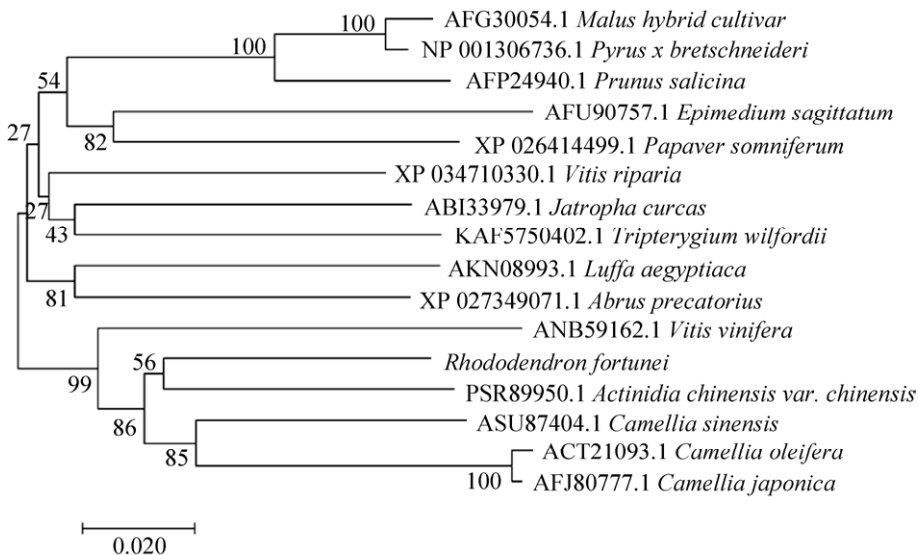


图4 云锦杜鹃 PAL 与其他物种 PAL 蛋白质的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of PALs from *Rh. fortunei* and other species.

利用 SOPMA 对 *RhPAL* 编码蛋白质进行二级结构预测, 该蛋白的二级结构含有  $\alpha$ -螺旋,  $\beta$ -转角、延伸链和无规则卷曲, 其占比分别为 56.70%、5.87%、7.96% 和 29.47%, 表明云锦杜鹃 PAL 蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲结构组成。运用 SWISS-MODEL 工具对云锦杜鹃 PAL 编码蛋白进行三级结构预测, 在蛋白质数据库中选择与云锦杜鹃 PAL 蛋白序列一致性较高的蛋白为模板进行同源模建, 得到云锦杜鹃 PAL 蛋白结构模型。与二级结构预测相符, 含有大量  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲。

通过 NCBI 网站中 Conserved domains search 软件对云锦杜鹃 PAL 蛋白进行结构域预测, 第 11–714 氨基酸的位置处含有一个甲基转移酶基因家族特有的 PLN02457 保守结构域, 属于 Lyase\_I\_Like 超家族; 此外, 云锦杜鹃 PAL 蛋白具有保守的酶活性中心序列, 与拟南芥、葡萄、茉莉和烟草等植物的酶活性中心序列一致, 包含高度保守的 Ala-Ser-Gly 氨基酸三联体, 其位于苯丙氨酸/组氨酸解氨酶的活性中心<sup>[22]</sup>。ASG 氨基酸三联体可以通过自身环化脱水而自动转化为 3,5-二氢-5-亚甲基-4H-咪唑

-4-酮 (MIO) 辅基 (3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-one, MIO) 作为 PAL 的重要辅助因子发挥作用<sup>[23]</sup>, 进一步说明云锦杜鹃 PAL 蛋白属于 PAL 家族。

#### 2.4 云锦杜鹃 *PAL* 基因在杜鹃不同组织中的时空表达分析

利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 以杜鹃 *EF1 $\alpha$*  (DUH018457.1) 作为内参基因, 得到 *RhPAL* 在云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段的相对表达水平 (图 6)。结果表明, *RhPAL* 在云锦杜鹃的花瓣、花蕊和叶片中均有表达, 但表达量存在明显差异。*RhPAL* 在云锦杜鹃花瓣不同发育阶段中表达量呈上升趋势, 花苞期最低, 衰败期最高, 衰败期 *RhPAL* 的表达量约为花苞期的 10 倍; *RhPAL* 在云锦杜鹃叶片不同发育阶段表达量呈下降趋势, 新叶中表达量较高, 且约为老叶的 2 倍; *RhPAL* 在云锦杜鹃花蕊中雌蕊表达量较高, 在雄蕊中较低, 盛开期雌蕊 *RhPAL* 的表达量为雄蕊的 3 倍; 在云锦杜鹃不同组织中, 新叶 *RhPAL* 的表达量最高, 与盛开期雌蕊表达量相近, 约为盛开期花瓣和盛开期雌蕊的 3 倍。

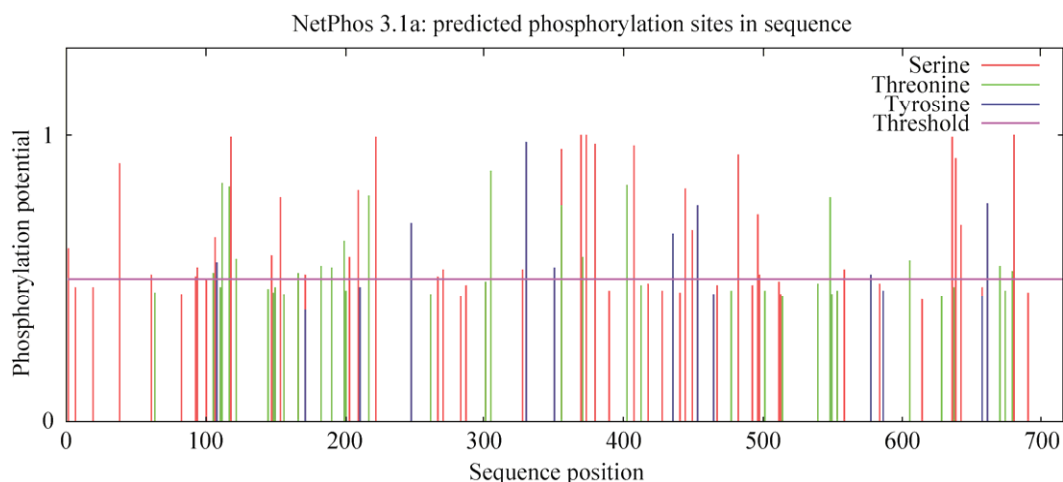


图 5 云锦杜鹃 PAL 蛋白质氨基酸翻译后磷酸化修饰预测

Figure 5 Prediction of the post-translational phosphorylation sites of PAL in *Rh. fortunei*.

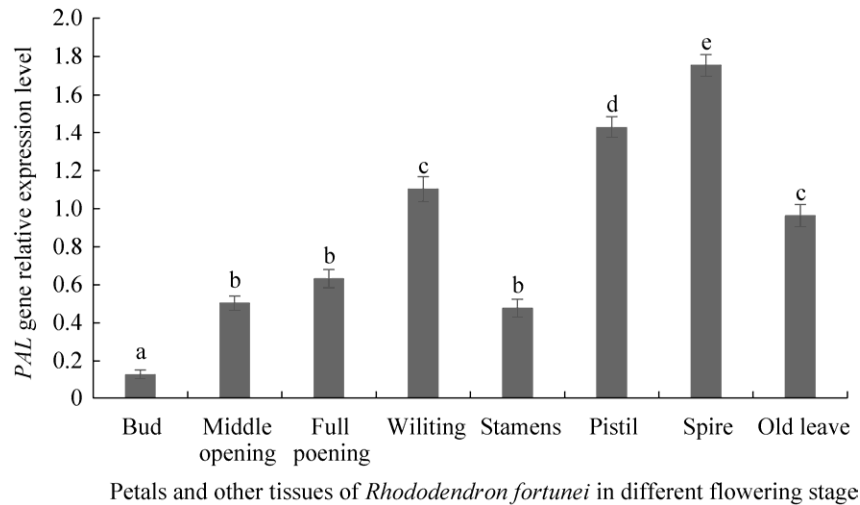


图 6 云锦杜鹃不同花期的花瓣及其他组织的 *RhPAL* 表达量分析

Figure 6 Expression analysis of *RhPAL* content in petals and other tissues of *Rh. fortunei* at different flowering stages. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

## 2.5 云锦杜鹃 PAL 酶活性测定分析

应用 Elisa 试剂盒法, 分析云锦杜鹃不同组织在不同发育阶段中 PAL 酶活性时空变化(图 7)。云锦杜鹃不同组织中 PAL 酶活性变化与 *RhPAL* 表达趋势并不相同。PAL 酶活性在云锦杜鹃花瓣不同发育阶段中酶活性呈明显下降趋势, 花苞期最高衰败期最低, 花苞期 PAL 酶

活性约为衰败期的 1.5 倍; PAL 酶活性在云锦杜鹃叶片不同发育阶段呈下降趋势, 新叶中酶活性较高, 且约为老叶的 2 倍; PAL 酶活性在云锦杜鹃花蕊中雌蕊酶活性较高, 在雄蕊中较低, 盛开期雌蕊 PAL 酶活性为雄蕊的 1.2 倍; 在云锦杜鹃不同组织中, 花苞期花瓣 PAL 酶活性最高, 约为新叶的 2 倍, 约为盛开期雄蕊的 1.5 倍。

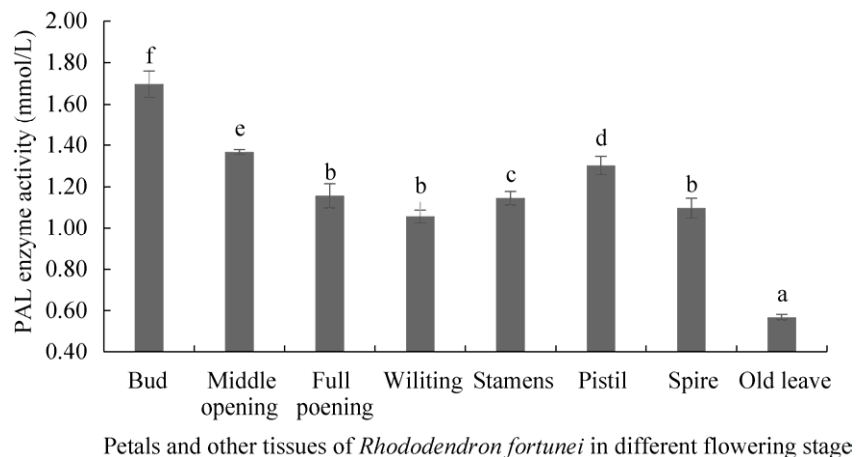


图 7 云锦杜鹃不同花期的花瓣及其他组织 PAL 蛋白酶活性

Figure 7 The activities of PAL in petals and other tissues of *Rh. fortunei* at different flowering stages. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).



## 2.6 云锦杜鹃花瓣中 L-Phe 和 Ca 含量测定分析

根据 LC-MS 分析结果, 在云锦杜鹃 4 个花期的花瓣中, L-Phe 含量呈现升高的变化趋势 (图 8A), 与 *RhPAL* 的表达水平变化趋势相一致, 花苞期含量最低衰败期最高, 衰败期 L-Phe 含量约为花苞期的 2 倍; 在盛开期的花蕊中, 雄蕊的 L-Phe 含量略低于雌蕊; L-Phe 在云锦杜鹃叶片不同发育阶段表达量呈下降趋势, 新叶中含量较高, 且约为老叶的 4 倍。在

云锦杜鹃 4 个花期的花瓣中, Ca 含量的变化趋势与 L-Phe 相同 (图 8B), 花苞期含量最低衰败期最高, 衰败期 Ca 含量约为花苞期的 2 倍; 在盛开期的花蕊中, 雄蕊的 Ca 含量低于雌蕊, 雌蕊中的含量约为雄蕊的 3 倍; 新叶中 Ca 的含量略高于老叶。

## 2.7 相关性分析

运用 SPSS 软件分析云锦杜鹃不同花期的花瓣及其他组织中 *RhPAL* 基因表达水平和 L-Phe、Ca 含量之间的相关性, 发现 *RhPAL* 基

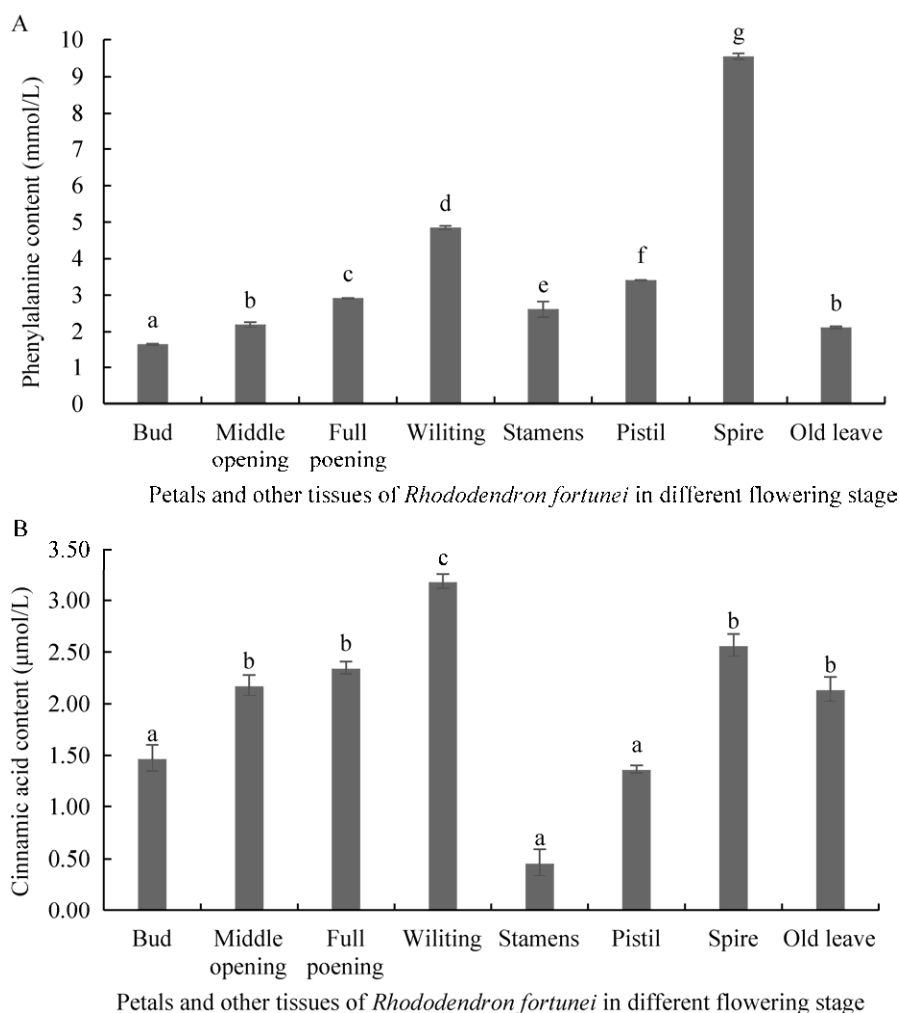


图 8 云锦杜鹃不同花期花瓣及其他组织 L-Phe 和 Ca 含量

Figure 8 L-Phe (A) and Ca (B) content in petals and other tissues of *Rh. fortunei* at different flowering stages. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

因表达水平和 L-Phe 含量的相关关系系数为 0.701\*\*, 与 Ca 含量相关关系系数为 0.624\*。表明 *RhPAL* 与 L-Phe、Ca 的合成分解密切相关, 推测 *RhPAL* 参与了 L-Phe 的代谢分解与 Ca 的生物合成。

### 3 讨论

为了了解云锦杜鹃挥发性香气物质释放的分子机制, 有必要对控制挥发性香气物质产生的酶和基因进行鉴定。由于云锦杜鹃花中的香气挥发物主要是苯甲酸甲酯, 我们决定研究苯类化合物合成途径中代表性酶 PAL 的酶活性及其转录水平。本研究克隆得到的 PAL 基因为首次从云锦杜鹃中获得的全 cDNA 序列, 并对 *RhPAL* 基因编码的单个蛋白进行一系列生物信息学分析, 发现云锦杜鹃 PAL 蛋白与同为双子叶植物纲的猕猴桃、山茶亲缘关系最近, 在保持物种特异性的同时可能还具有类似的生物学功能。

*PAL* 在植物不同组织中的表达具有组织特异性, 也受发育的调控; 在亚细胞水平上, *PAL* 定位于细胞质和一些膜细胞器如叶绿体、白色体和线粒体等<sup>[24]</sup>。侯鹏等<sup>[25]</sup>发现大豆 *PAL* 基因家族相对表达量最高的部位是叶片, 在花中其表达水平较低; 乔枫等<sup>[26]</sup>在研究枸杞中 *PAL* 基因的表达特性时也发现枸杞 *PAL* 基因在叶片中表达量最高, 其次在花, 且随枸杞生长表达量增加。与 *RhPAL* 在不同组织中表达量模式相同, 推测从早期幼苗到完全生长的成年植物中, *PAL* 在叶和花序茎的维管组织中高表达, 但在年轻幼嫩的组织如根尖或茎顶端分生组织中不活跃<sup>[27]</sup>。Shang 等<sup>[28]</sup>发现 PAL 酶活性在黄瓜雌花和雄花中高于果等部位; 玫瑰花瓣是玫瑰香气的主要来源, 在释放香气物质的过程中雄蕊也被发现有较大的贡献<sup>[29]</sup>, 推测云锦

杜鹃花蕊也有类似功能。通过对云锦杜鹃 PAL 酶活性的时空表达分析, 发现在花苞中酶活性最高。Bera 等<sup>[30]</sup>在研究茉莉花香气挥发物的酶促反应时发现, 随着茉莉花朵发育, 茉莉花瓣中 *PAL* 基因表达量逐渐增加, PAL 酶活性减弱, 与 *RhPAL* 在不同开放阶段花瓣中的表达模式和酶活性变化相似, 推测为将挥发物更好地挥发到空气中, 香气物质几乎都在花瓣和其他花器官的表皮细胞中合成<sup>[31]</sup>。通过对云锦杜鹃不同组织中酶活性的测定发现, 云锦杜鹃中 *RhPAL* 的表达量变化趋势与酶活性变化趋势相反, 可以认为酶活性呈下降趋势是器官衰老导致的。考虑到 PAL 为限速酶, 推测叶片中 *RhPAL* 表达可能有增强 PAL 酶活性的作用, 叶片中叶绿体发达, 可能是苯丙氨酸代谢的重要场所, *RhPAL* 的表达也影响叶片中木质素的累积。

云锦杜鹃作为杜鹃中有香品种, 因其带有怡人的清香而备受青睐。该基因的成功克隆为深入研究云锦杜鹃 *PAL* 基因生物学功能奠定基础。本研究克隆出云锦杜鹃 *PAL* 基因, 可以进一步确定其上游启动子的序列和功能, 通过转录因子调控目标基因在时间和空间上的特定表达, 测定花香化合物的组成与含量, 完成 *RhPAL* 基因对于云锦杜鹃花香气物质调控机制的探索。此外, 本研究在云锦杜鹃中只克隆得到 1 个 *PAL* 基因, 在杜鹃花中是否存在 *PAL* 家族基因, 仍需进一步研究。今后可进一步分析杜鹃花花香合成途径中关键基因的表达模式, 为探明杜鹃花 *PAL* 基因调控苯甲酸甲酯生物合成的机制提供证据。

### REFERENCES

- [1] 耿兴敏, 宦智群, 苏家乐, 等. 杜鹃花属植物种质创新研究进展. 分子植物育种, 2021, 19(2): 604-613.  
Geng XM, Huan ZQ, Su JL, et al. Researches advances

- in germplasm innovation of rhododendrons. *Mol Plant Breed*, 2021, 19(2): 604-613 (in Chinese).
- [2] 杨彬, 许蔷薇, 牛明月, 等. 云锦杜鹃转录组 SSR 分析及其分子标记开发. *核农学报*, 2018, 32(12): 2335-2345.
- Yang B, Xu QW, Niu MY, et al. Analysis of SSR information in transcriptome and development of SSR molecular markers in *Rhododendron fortunei*. *J Nucl Agric Sci*, 2018, 32(12): 2335-2345 (in Chinese).
- [3] 许蔷薇, 楼雄珍, 杨彬, 等. 云锦杜鹃转录组分析. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(6): 1190-1198.
- Xu QW, Lou XZ, Yang B, et al. Transcriptome sequencing and analysis of *Rhododendron fortunei*. *J Zhejiang A & F Univ*, 2019, 36(6): 1190-1198 (in Chinese).
- [4] Picchulla B, Pott MB. Plant scents—mediators of inter- and intraorganismic communication. *Planta*, 2003, 217(5): 687-689.
- [5] Guterman I, Shalit M, Menda N, et al. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2325-2338.
- [6] Pichersky E, Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(10): 439-445.
- [7] 章辰飞, 谢晓鸿, 汪庆昊, 等. 云锦杜鹃不同花期挥发性成分的 HS-SPME-GC-MS 检测与主成分分析. *广西植物*, 2020, 40(7): 1033-1045.
- Zhang CF, Xie XH, Wang QH, et al. Analysis of volatile components of *Rhododendron fortunei* at different flowering stages by HS-SPME-GC-MS and PCA. *Guihaia*, 2020, 40(7): 1033-1045 (in Chinese).
- [8] 王文静, 吕思佳, 汪庆昊, 等. 植物花香物质代谢与调控研究进展. *分子植物育种*, 2021, 19(22): 7612-7617.
- Wang WJ, Lv SJ, Wang QH, et al. Plant flowers metabolism and regulation is reviewed. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(22): 7612-7617 (in Chinese).
- [9] Barber MS, Mitchell HJ. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review of Cytology*. Amsterdam: Elsevier, 1997: 243-293.
- [10] Jones DH. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 1984, 23(7): 1349-1359.
- [11] 罗才林, 李林, 陈立, 等. 白及苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、序列特征及激素响应表达分析. *中草药*, 2019, 50(3): 694-701.
- Luo CL, Li L, Chen L, et al. Cloning, sequence characterization, expression profiling of hormones response of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Bletilla striata*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(3): 694-701 (in Chinese).
- [12] 丹仪. 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.
- Dan Y. Cloning, expression and functional analysis of two phenylalanine ammonia-lyase genes of *Camellia sinensis* in response to low temperature and drought stress[D]. Chongqing: Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [13] 孙润泽, 张雪, 成果, 等. 葡萄苯丙氨酸解氨酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析. *植物生理学报*, 2016, 52(2): 195-208.
- Sun RZ, Zhang X, Cheng G, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol J*, 2016, 52(2): 195-208 (in Chinese).
- [14] 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. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(5): 1055-1061.
- Yu GH, Wang GP, Wang L, et al. Cloning of *PAL* genes and their response to FHB in wheat. *J Plant Genet Resour*, 2015, 16(5): 1055-1061 (in Chinese).
- [15] 梁毅, 刘小义, 张洪伟, 等. 洋葱苯丙氨酸解氨酶基因 *AcPAL2* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2015, 42(3): 505-512.
- Liang Y, Liu XY, Zhang HW, et al. Molecular cloning and expression analysis of *AcPAL2* in onion. *Acta Horticult Sin*, 2015, 42(3): 505-512 (in Chinese).
- [16] Gonda I, Davidovich-Rikanati R, Bar E, et al. Differential metabolism of L-phenylalanine in the formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Phytochemistry*, 2018, 148: 122-131.
- [17] Gonda I, Bar E, Portnoy V, et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *J Exp Bot*, 2010, 61(4): 1111-1123.
- [18] Tasaki Y, Miyakawa H. Structure and expression of two phenylalanine ammonia-lyase genes of the basidiomycete mushroom *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, 2015, 56(5): 503-511.
- [19] Oliva M, Bar E, Ovadia R, et al. Phenylpyruvate contributes to the synthesis of fragrant benzenoid-phenylpropanoids in *Petunia*×*hybrida*

- flowers. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 769.
- [20] Majetic CJ, Sinka BN. Diverging pathways: differential benzenoid and phenylpropanoid volatile production in *Phlox subulata* L. cultivars. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 50: 75-81.
- [21] 赵印泉, 周斯建, 彭培好, 等. 植物花香代谢调节与基因工程研究进展. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(4): 381-390.
- Zhao YQ, Zhou SJ, Peng PH, et al. Research advances in metabolic regulation and genetic engineering of floral scent. *J Trop Subtrop Bot*, 2011, 19(4): 381-390 (in Chinese).
- [22] 乔枫, 张丽, 耿贵工, 等. CoCl<sub>2</sub>胁迫下青稞苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析. *中国农业大学学报*, 2021, 26(3): 18-27.
- Qiao F, Zhang L, Geng GG, et al. Cloning and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene of *Hordeum vulgare* var. *nudum* under CoCl<sub>2</sub> stress. *J China Agric Univ*, 2021, 26(3): 18-27 (in Chinese).
- [23] 何潇, 刘兴, 辛正琦, 等. 半夏 *PtPAL* 基因的克隆、表达与酶动力学分析. *作物学报*, 2021, 47(10): 1941-1952.
- He X, Liu X, Xin ZQ, et al. Molecular cloning, expression, and enzyme kinetic analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pinellia ternate*. *Acta Agron Sin*, 2021, 47(10): 1941-1952 (in Chinese).
- [24] 马俊彦, 杨汝德, 敖利刚. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展. *现代食品科技*, 2007, 23(7): 71-74, 97.
- Ma JY, Yang RD, Ao LG. Progress in biological research of phenylalanine ammonia-lyase (E.C.4.3.1.5). *Mod Food Sci Technol*, 2007, 23(7): 71-74, 97 (in Chinese).
- [25] 侯鹏, 梁冬, 张卫国, 等. 苯丙氨酸解氨酶基因家族在大豆中的时空表达研究. *作物杂志*, 2016(2): 57-62.
- Hou P, Liang D, Zhang WG, et al. Study on temporospatial expression of *PAL* gene family in soybean. *Crops*, 2016(2): 57-62 (in Chinese).
- [26] 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. *中国农业大学学报*, 2017, 22(12): 64-73.
- Qiao F, Geng GG, Zhang L, et al. Molecular cloning and expression patterns of *LcPAL* from *Lycium chinense*. *J China Agric Univ*, 2017, 22(12): 64-73 (in Chinese).
- [27] Zhang XB, Liu CJ. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 17-27.
- [28] Shang QM, Li L, Dong CJ. Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. *Planta*, 2012, 236(4): 1093-1105.
- [29] Chen XM, Baldermann S, Cao SY, et al. Developmental patterns of emission of scent compounds and related gene expression in roses of the cultivar *Rosa x hybrida* cv. 'Yves Piaget'. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 87: 109-114.
- [30] Bera P, Mukherjee C, Mitra A. Enzymatic production and emission of floral scent volatiles in *Jasminum sambac*. *Plant Sci*, 2017, 256: 25-38.
- [31] 徐瑾. 菊花香气成分及其挥发的细胞学基础研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- Xu J. Studies on the volatile components in flowers of *Chrysanthemum morifolium* and the cytological basis for volatile emissions[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)