

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.24247

马铃薯 PAL 基因家族的全基因组鉴定及其在非生物胁迫下和块茎花色素苷合成中的表达分析

朱金勇¹ 刘震¹ 曾钰婷² 李志涛¹ 陈丽敏¹ 李泓阳¹ 史田斌¹
张俊莲³ 白江平¹ 刘玉汇^{1,*}

¹ 甘肃农业大学农学院 / 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室(甘肃农业大学) / 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070; ² 西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏拉萨 850032; ³ 甘肃农业大学园艺学院, 甘肃兰州 730070

摘要: 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是苯丙烷代谢途径的限速酶和关键酶, 在植物生长发育过程中发挥着重要作用。本研究在马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)全基因组水平下, 利用 BlastP 和 HMM 3.1 鉴定到 8 个 PAL 基因家族成员, 利用 ExPASy、CELLO、PlantCARE 等在线工具, 对 PAL 基因家族成员的进行生物信息学分析。利用 PGSC 数据库下载的 RNA-seq 数据, 分析了 *StPALs* 在双单倍体(DM)马铃薯不同组织部位和非生物胁迫下的表达模式。对 3 个不同颜色马铃薯块茎组织(皮和肉)进行 RNA-seq, 以及利用 3 个不同颜色块茎杂交子代的薯肉进行 qPCR 分析。结果表明, 8 个 *StPALs* 分布在 3、5、9 和 10 号染色体上, 它们与烟草(*Nicotiana tabacum*) PAL 的亲缘关系较近。*StPAL* 基因成员的启动子区域内含有多个顺式元件, 包括光响应、逆境胁迫响应、激素响应、生长发育相关和转录因子调控的多种顺式元件。*StPAL2* 在匍匐茎中特异表达, *StPAL3/5/8* 在块茎和匍匐茎中特异表达, *StPAL3* 在甘露醇处理下下调表达, *StPAL3* 和 *StPAL8* 在热胁迫中上调表达。它们可能参与了马铃薯块茎的发育和非生物胁迫响应。5 个 *StPALs* (*StPAL3/4/5/6/8*)基因在彩色薯肉中均上调表达, 可能参与马铃薯薯肉中花色素苷的生物合成。这些结果为进一步了解 *StPAL* 基因家族特征, 深入分析 *StPALs* 基因在马铃薯中的功能提供了理论依据。

关键词: 马铃薯; PAL 基因家族; 非生物胁迫; 花色素苷生物合成; 表达分析

Genome-wide identification of potato (*Solanum tuberosum* L.) PAL gene family and its expression analysis in abiotic stress and tuber anthocyanin synthesis

ZHU Jin-Yong¹, LIU Zhen¹, ZENG Yu-Ting², LI Zhi-Tao¹, CHEN Li-Min¹, LI Hong-Yang¹, SHI Tian-Bin¹, ZHANG Jun-Lian³, BAI Jiang-Ping¹, and LIU Yu-Hui^{1,*}

¹ College of Agronomy, Gansu Agricultural University / State Key Laboratory of Aridland Crop Science (Gansu Agricultural University) / Gansu Provincial Key Laboratory of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, Gansu, China; ² Institute of Vegetable Sciences, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, Tibet, China; ³ College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: The phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the rate limiting enzyme and key enzyme in phenylpropane metabolism pathway, which plays an important role in plant growth. In this study, a total of 8 gene family members (*StPALs*) in potato

本研究由国家自然科学基金项目(31860398), 甘肃省科技计划资助项目(22JR5RA834), 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-09-P14), 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室(甘肃农业大学)开放基金项目(GSCS-2021-Z02), 甘肃农业大学“伏羲人才”计划项目(Gaufx-02Y04)和甘肃农业大学招博士科研启动基金项目(GAU-KYQD-2020-11)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860398), the Science and Technology Program of Gansu Province (22JR5RA834), the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-09-P14), the State Key Laboratory of Aridland Crop Science of China (GSCS-2021-Z02), the Fuxi Talent Project of Gansu Agricultural University (Gaufx-02Y04), and the Scientific Research Startup Funds for Openly-recruited Doctors Agricultural University (GAU-KYQD-2020-11).

* 通信作者(Corresponding author): 刘玉汇, E-mail: lyhui@gsau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1259245907@qq.com

Received (收稿日期): 2022-11-05; Accepted (接受日期): 2023-04-17; Published online (网络出版日期): 2023-05-11.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20230510.1732.002.html>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(*Solanum tuberosum* L.) were identified by BlastP and Hmmer 3.1 software, and their bioinformation were analyzed by the ExPASy, CELLO, PlantCARE, and other online tool. We analyzed the relative expression pattern of *StPAL* genes in different tissues of double monoploid (DM) potato, as well as under abiotic stresses by RNA-seq in Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) database. We performed RNA-seq on white, red, and purple tuber skin and flesh of three potato cultivars, and the relative expression levels of *StPALs* genes in different colors tubers (flesh) of three hybrid progeny potatoes were detected by qPCR. *StPAL* genes were distributed on chromosomes 3, 5, 9, and 10, and eight *StPALs* were closely related to tobacco (*Nicotiana tabacum*) PAL. The *cis*-acting elements revealed that the promoter regions of *StPAL* genes contained many elements, including light response, stress response to adversity, hormone response, growth and development, and transcription factor binding elements. The results showed that *StPAL2* was specifically expressed in stolons, and *StPAL3/5/8* were mainly expressed in tubers and stolons. The relative expression level of *StPAL3* gene were down-regulated under mannitol treatment, and the relative expression levels of *StPAL3* and *StPAL8* genes were up-regulated under heat stress. The above results suggested that *StPALs* might be involved in the tuber growth and abiotic stress response. By transcriptomic and qPCR analysis, the relative expression levels of 5 *StPAL* genes (*StPAL3/4/5/6/8*) were up-regulated in the flesh of color potato, suggesting that they may participate in the biosynthesis of anthocyanins in flesh. These results provide a theoretical basis for further understanding the *StPAL* gene family and analyzing the function of *StPALs* in potato.

Keywords: potato; PAL genes family; abiotic stress; anthocyanin biosynthesis; expression analysis

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是苯丙烷类代谢途径起始反应中的关键酶和限速酶。该反应以 L-苯丙氨酸作为底物, 在 PAL 的催化下发生脱氨反应, 形成数种多酚化合物的前体, 如木质素、花色苷和植保素等^[1-2]。已有研究表明, 这些次生代谢产物具有多种生物功能, 不但参与植株的生长发育^[3-4]、色素生物合成^[5-6], 在植株响应生物^[7-8]和非生物胁迫^[9-12]方面也发挥着重要的作用。

1961 年, Koukal 和 Conn^[13]首次从大麦(*Hordeum vulgare*)中分离提取了 PAL 蛋白, 它是初生代谢和苯丙烷代谢途径的纽带, 对植物有非常重要的生理意义。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, *AtPAL1* 和 *AtPAL2* 同时缺失突变会使木质素和花青素含量减少导致植株发育迟缓^[14]。Olsen 等^[15]研究发现 *AtPAL1/2* 在拟南芥响应缺氮胁迫和低温胁迫中也发挥着作用。李元等^[16]研究发现, 水稻(*Oryza sativa*)受到 UV-B 辐射和稻瘟病菌胁迫后, 会诱导苯丙氨酸解氨酶活性上升, 类黄酮含量显著增加, 从而增强抗性。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中, *NtPAL4* 的表达显著受到 NaCl、甘露醇和低温处理诱导, *NtPAL4* 可能在烟草响应非生物胁迫和抗氧化信号转导中发挥调节作用^[17]。杨会晓等^[18]发现, 香蕉(*Musa acuminata*)大部分 PAL 成员不但响应低温、干旱和盐胁迫, 还参与了果实的发育。在苹果(*Malus domestica*)中研究发现, PAL 通过调节类黄酮等物质的含量参与调控果实的生长发育和成熟^[19]。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是仅次于水稻(*Oryza sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)的第三大粮食作物^[20], 因其耐贫瘠、适应性广、高产稳产等特点在世界范围内广泛种植。马铃薯块茎含有丰富的

营养成分, 包括淀粉、糖和蛋白质, 以及多种抗氧化剂, 如多酚、维生素 C、类胡萝卜素、硒^[21]等。彩色马铃薯不仅含有普通马铃薯的营养物质, 还拥有丰富花青素^[22]。花青素不但在植物的生长发育中参与许多生物学过程, 如使花器官具有特定的颜色来吸引传粉者^[23]、花粉管萌发^[24]和适应紫外线辐射^[25]等, 而且在植株响应非生物胁迫方面也发挥着重要作用^[26-27]。此外, 研究发现花青素具有较强的抗氧化性和清除自由基的能力, 在预防心血管疾病、控制肥胖、缓解糖尿病、保护肝脏、抗炎症反应、抗病毒和抗癌等方面具有一定功效, 备受人们的关注^[28-30]。

在马铃薯的实际生产中, 块茎的产量受到多种生物和非生物胁迫的影响, 如病虫害、高温、盐胁迫和干旱胁迫等, 它们严重制约着马铃薯产业的发展。目前, PAL 基因家族在多种作物中已有报道^[31-33], 研究表明大量的 PALs 参与了植物对病原菌、蚜虫、冷、热、盐和干旱等胁迫的响应^[7-12, 34], 但关于马铃薯 PAL 基因家族的研究尚未见报道。

本研究在马铃薯全基因组水平下共鉴定了 8 个 PAL 基因家族成员, 对其分子特征、基因结构、蛋白保守结构域进行分析, 并利用 PGSC 数据库下载的 RNA-seq 数据, 分析 *StPALs* 基因在双单倍体(doubled monoploid, DM)马铃薯不同组织部位、非生物胁迫处理下的表达模式。选用 3 个不同颜色马铃薯块茎组织(皮和肉)进行 RNA-seq 测序, 分析了 8 个 *StPAL* 在不同颜色块茎组织中的表达, 并利用 qPCR 技术, 进一步分析了 *StPALs* 在 3 个不同颜色杂交子代薯肉中的表达水平, 鉴定了可能参与花色苷生物合成的 *StPAL* 基因。这些结果为进一步了解

马铃薯 PAL 基因家族的特征, 探究其生物功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理

1.1.1 3 个不同颜色马铃薯块茎(薯皮和薯肉)

以‘新大坪’(XD, 白皮白肉)、“黑美人”(HM, 紫皮紫肉)、“铃田红美”(LT, 红皮红肉)为试验材料(图 1), 种植于甘肃省定西市农业科学研究院试验基地。待块茎成熟后, 每个品种取 6 个新鲜块茎(直径 4~5 cm), 用蒸馏水洗净, 在至少距离薯皮组织 10 mm 处取薯肉组织, 利用手术刀片仔细分离块茎的薯皮(Skin, S; 约 20 g)和薯肉(Flesh, F; 约 50 g)组织并取样, 所取样本为 1 个生物学重复, 共 3 个生物学重复。取样后立即用液氮冷冻, 并存放在-80℃冰箱待用。

1.1.2 3 个马铃薯杂交子代品系 试验材料种植

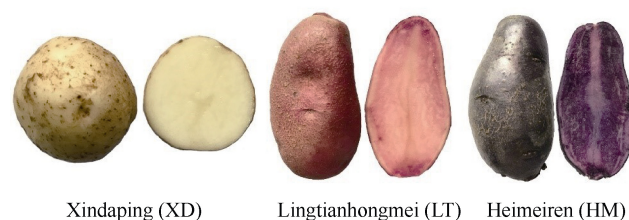


图 1 3 个不同颜色马铃薯品种的块茎^[35]

Fig. 1 Tubers of three potato varieties with different colors^[35]

于甘肃省定西市农业科学研究院试验基地, 3 个马铃薯品系从北方学院引进(北方学院引自国际马铃薯中心), 分别为白皮黄肉的 CIP 302281.17、红皮红肉的 CIP 302281.25 和紫皮紫肉的 CIP 302281.15, 命名为 Y、R 和 P (亲本: 388611.22 (C91.612) × Adg purple flesh bulk)。3 个杂交子代在生育时期块茎颜色(图 2)。在块茎形成期(S1)和块茎成熟期(S2)取 3 个品系的薯肉(取样标准同上), 共计 18 个样本, 样品液氮速冻后储存在-80℃冰箱保存。

1.2 马铃薯 PAL 基因家族成员鉴定及蛋白理化性质分析

从国际马铃薯基因组测序协会 PGSC (Potato Genome Sequencing Consortium, <http://spudb.uga.edu/>)下载马铃薯的蛋白质和核苷酸序列(PGSC_DM_v4.03)。根据文献报道的基因登录号, 在 TAIR 网站 (<http://www.arabidopsis.org/>)下载了 4 个 *AtPAL* 的基因序列和蛋白序列^[36]。本文采用了 2 种方法来鉴定马铃薯 PAL 成员: (1) 从 Pfam 网站下载的 PAL 结构域序列 (PF00221), 使用 HMMER 3.1 软件在马铃薯蛋白数据库中搜索含 PAL 结构域的序列。(2) 利用拟南芥 4 个 PAL 氨基酸序列, 在马铃薯蛋白数据库进行 BlastP 搜索(E 值 $\leq 1e^{-5}$), 查找 PAL 成员。然后, 将 2 种方法的搜索结果合并, 删除冗余序列, 将候选成员提交到 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI 保守域数据(CDD)中手动筛选, 去

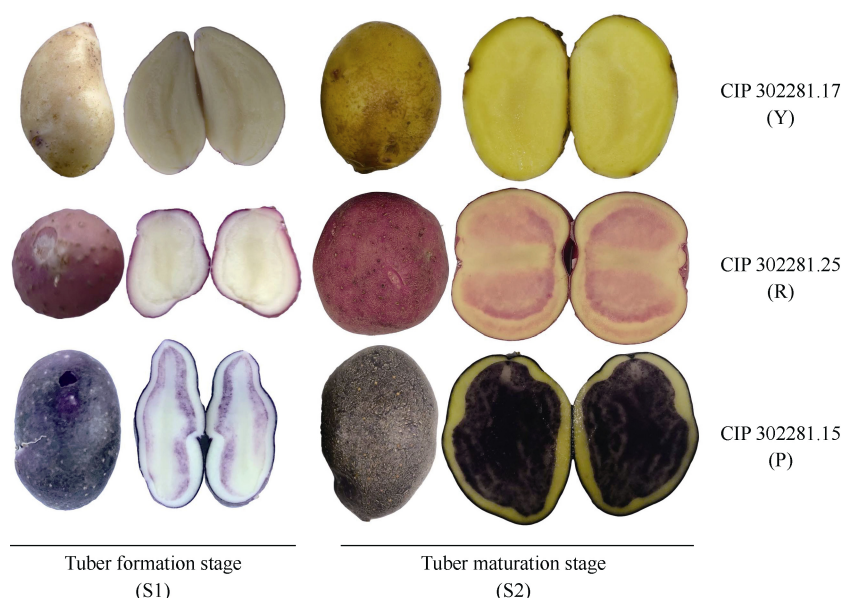


图 2 3 个马铃薯杂交子代的块茎表型

Fig. 2 Potato tuber phenotype of three hybrid progenies

除不包含 PAL 结构域的序列, 最终筛选得到马铃薯 PAL 基因家族成员。利用在线网站 ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>)^[37]分析 StPAL 的蛋白氨基酸数量、分子量(molecular weight, MW)、理论等电点(point isoelectric, pI), 利用 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)^[38]预测 StPAL 的亚细胞定位。

1.3 StPALs 的进化分析

使用 MEGA7.0 软件构建了马铃薯、拟南芥^[36]、烟草^[39]、葡萄^[33]、水稻^[40]、毛果杨^[41]、香蕉^[18]和大豆^[42]的系统进化树, 来探究多物种 PAL 蛋白的进化关系, 采用 Neighbor-Joining 法, 参数设置: 校验参数 Bootstrap 重复 1000 次, 模式为 p-distance model, 缺口设置为 partial deletion^[43]。同时, 使用 MEGA7.0 构建了 8 个 StPAL 成员的系统进化树。

1.4 StPALs 序列分析和结构特征

采用在线网站 MEME 程序(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对 StPAL 保守蛋白基序进行分析, 参数设置如下: 最大基序数为 10, 最佳基序宽度为 6~50 个氨基酸残基, 其余参数为默认值^[44]。利用 Gene Structure Display Server (GSDS 2.0, <https://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制 StPALs 成员的外显子和内含子结构^[45]。

1.5 StPALs 基因启动子序列分析

从马铃薯基因组测序协会中检索到 StPALs 基因转录起始位点的上游 2000 bp 区域, 并通过 PlantCARE 在线数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[46]分析 StPALs 基因启动子区域的顺式作用元件。

1.6 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

采用 RNA 提取试剂盒(天根 DP419)提取总 RNA,

并利用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop ND-2000 (Nanodrop Technologies, 美国)分光光度计检测 RNA 的完整性和浓度。使用带有 gDNase 的快速 RT 试剂盒 (天根 KR116)进行基因组 DNA 污染的消除和第一链 cDNA 的合成。使用天根的 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green FP205)试剂盒在 CFX96 (Bio-Rad, 美国)上进行 qPCR, 采用 3 次生物学重复。反应体系为 20 μL : 2 μL cDNA (50 ng μL^{-1})、上下引物(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)各 0.6 μL 、2 $\times$ SYBR Green Master Mix 10 μL 、ddH₂O 6.8 μL 。qPCR 条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测熔点曲线。以 *StEF-1a* (AB061263)作为内参基因^[47], 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量^[48], 使用 Origin 2021 绘图。由生工生物工程 (上海)股份有限公司设计并合成引物, 引物名称及序列详见表 1。

1.7 StPALs 在马铃薯中的表达分析

利用 PGSC 下载的 Illumina RNA-seq 数据, 分析双单倍体马铃薯中的 *StPAL* 基因在不同组织(叶、根、芽、块茎、萼片、雄蕊、匍匐茎、成熟花、叶柄、花瓣、心皮、愈伤组织、成熟果实和未成熟果实)中和非生物胁迫下(盐处理: 150 mmol L^{-1} NaCl, 24 h; 甘露醇处理: 260 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 甘露醇, 24 h; 热处理: 35 $^{\circ}\text{C}$, 24 h)的表达模式^[49]。使用 TBtools 软件绘制表达热图^[50]。

为进一步了解 StPAL 基因家族在不同颜色块茎中的表达模式, 本研究对 3 个不同颜色马铃薯块茎组织 (薯皮和薯肉)进行了高通量测序, 分析 8 个 *StPAL* 在不同颜色块茎组织中的表达, 并利用 qPCR 技术, 进一步分析 *StPALs* 在 3 个不同颜色杂交子代薯肉中的表达水平。由北京百迈客生物科技有限公

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 Primer for qPCR used in this study

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>StEF-1a</i>	GGTCGTGTTGAGACTGGTGTGATC	GCTTCGTGGTGCATCTCTACAGAC
<i>PG2021549</i>	CTCACAGCAGGAAGGAATCCAAGC	TGAAGTTCCGAGCAGTAAGAAGCC
<i>PG0031457</i>	CTCACAGCAGGAAGGAATCCAAGC	GCTCGGCACTCTGAACATGGTTAG
<i>PG0005492</i>	ATCCGACTAGGTGGTGGTGAGATG	ATCCAATCACTGCTCGCCTTGAC
<i>PG0023458</i>	CACAGCGTCTGGTGACTTGGTAC	GCGTCCAACAGTTCTCCATTAGGC
<i>PG1021549</i>	CTGCTGAGGCTGTGGACATCTTG	TTGGCTACTTGGCTTACGGTGTTC
<i>PG2021564</i>	TGGAACGGTCACTGCCTCAGG	CACTAACACCAGCCACACGGAAC
<i>PG0019386</i>	ACTGCCTCGGGTGATCTTGTC	ACTAATACCAGCAACACGGAACGC
<i>PG0031365</i>	GCCGAAGGAAGGACTTGCTCTTG	CGGGCTTTCATTCATCACCTCAG

PG: PGSC0003DMG40.

司完成 RNA-seq 文库的构建和测序。测序完成后将结果提交于 NCBI (PRJNA541919)。

2 结果与分析

2.1 StPALs 的鉴定及相应蛋白的特性分析

利用 HMM 3.1 和 BlastP 初步筛选了 StPAL 基因家族候选成员, 通过 SMART 和 NCBI (CDD)手动删除了不包含 PAL 结构域的候选成员, 最终获得了

8 个 StPAL 基因家族成员。它们分布在 3 号、5 号、9 号和 10 号染色体上。根据基因在染色体上的物理位置分布将得到的 StPALs 成员进行命名, 按顺序命名为 *StPAL1~StPAL8*。通过理化性质分析表明, StPAL 蛋白长度在 391~722 aa 之间, 分子量为 43.55~78.49 kD, 理论等电点为 5.41~6.62。亚细胞定位预测结果表明, 除 StPAL7 定位在叶绿体中, 其他成员均定位在细胞质中(表 2)。

表 2 StPAL 基因家族理化性质及亚细胞定位
Table 2 Physicochemical properties and subcellular localization of StPAL genes family

基因名称 Gene name	氨基酸长度 Amino acid length	相对分子量 Molecular weight (kD)	等电点 Point isoelectric (pI)	亚细胞定位 Subcellular localization	染色体定位 Chromosome localization
<i>PG0031457, StPAL1</i>	435	48.34	5.84	细胞质 Cytoplasmic	Chr03
<i>PG0005492, StPAL2</i>	667	73.69	5.41	细胞质 Cytoplasmic	Chr05
<i>PG0023458, StPAL3</i>	707	77.51	6.07	细胞质 Cytoplasmic	Chr05
<i>PG2021549, StPAL4</i>	391	43.55	6.62	细胞质 Cytoplasmic	Chr09
<i>PG1021549, StPAL5</i>	722	78.49	6.04	细胞质 Cytoplasmic	Chr09
<i>PG2021564, StPAL6</i>	719	78.23	6.15	细胞质 Cytoplasmic	Chr09
<i>PG0019386, StPAL7</i>	689	75.46	6.28	叶绿体 Chloroplast	Chr10
<i>PG0031365, StPAL8</i>	711	77.54	5.86	细胞质 Cytoplasmic	Chr10

2.2 StPALs 的进化分析与分类

为了解 StPAL 基因家族的进化关系, 将 8 个物种共 63 个 PAL 蛋白序列进行了多重比对并构建系统发育进化树。由图 3 可知, 63 个 PALs 分为 6 个类群(CI~CVI), 每个类群分别含有 4、9、14、7、12 和 15 个 PALs。8 个马铃薯 StPALs 均属于在 CIII 类群, 与其分在同一类群的还有 4 个烟草 PAL 成员(NtPAL1/2/3/4)和 2 个拟南芥的 PAL 成员(AtPAL3 和 AtPAL4)。表明, 马铃薯 PAL 基因家族成员与同为茄科的烟草亲缘关系较近, 与其他双子叶和单子叶植物亲缘关系相对较远。

2.3 StPALs 的基因结构与 Motif 分析

为了解 StPAL 基因家族成员的基因结构, 本研究分析了他们的外显子和内含子结构。由图 4 可知, 8 个 *StPALs* 具有相似的基因结构, 其中 2 个基因(*StPAL1/4*)不含内含子, 其余 6 个 *StPALs* 只含 1 个内含子。使用 MEME 在线程序, 进一步分析了 StPALs 蛋白的保守结构, 确定了 10 个保守基序, 将 10 个基序命名为 motif1~motif10。motif2、motif1、motif6、motif3、motif10 和 motif4 是 8 个 StPALs 蛋白所共有的; motif7 和 motif9 存

在于 6 个 StPALs 蛋白中(除 StPAL1 和 StPAL4)。本研究还发现 motif7、motif9、motif5、motif2、motif8、motif1、motif6 可以构成完整的 PAL 结构域, 其中 motif7 和 motif9 位于 C 端, motif1 和 motif6 位于 N 端。

2.4 StPALs 顺式作用元件分析

为进一步研究 *StPALs* 基因启动子区域的顺式作用元件, 本研究通过 PlantCARE 在线网站分析了转录起始位点上游 2000 bp 的序列。分析结果显示(图 5), 在 *StPALs* 启动子区域除了常见的元件 TATA-box、CAAT-box 外, 还发现了 21 种其他顺式作用元件, 这些元件与光响应、植物激素响应、逆境胁迫响应以及生长发育相关。这些顺式元件中, 有 10 种光响应元件 TCT-motif、G-box 和 GT1-motif 等), 2 种与逆境胁迫相关的顺式作用元件(干旱胁迫响应元件 MBS、防御和胁迫响应元件 TC-rich repeats), 3 种激素信号传导途径相关的元件(脱落酸响应元件 ABRE、水杨酸响应元件 TCA-element 和生长素响应元件 AuxRR-core), 2 种与生长发育相关的元件(HD-Zip 和 CAT-box)以及 4 个与 MYB、MYC、WRKY 转录因子有关的顺式元件。

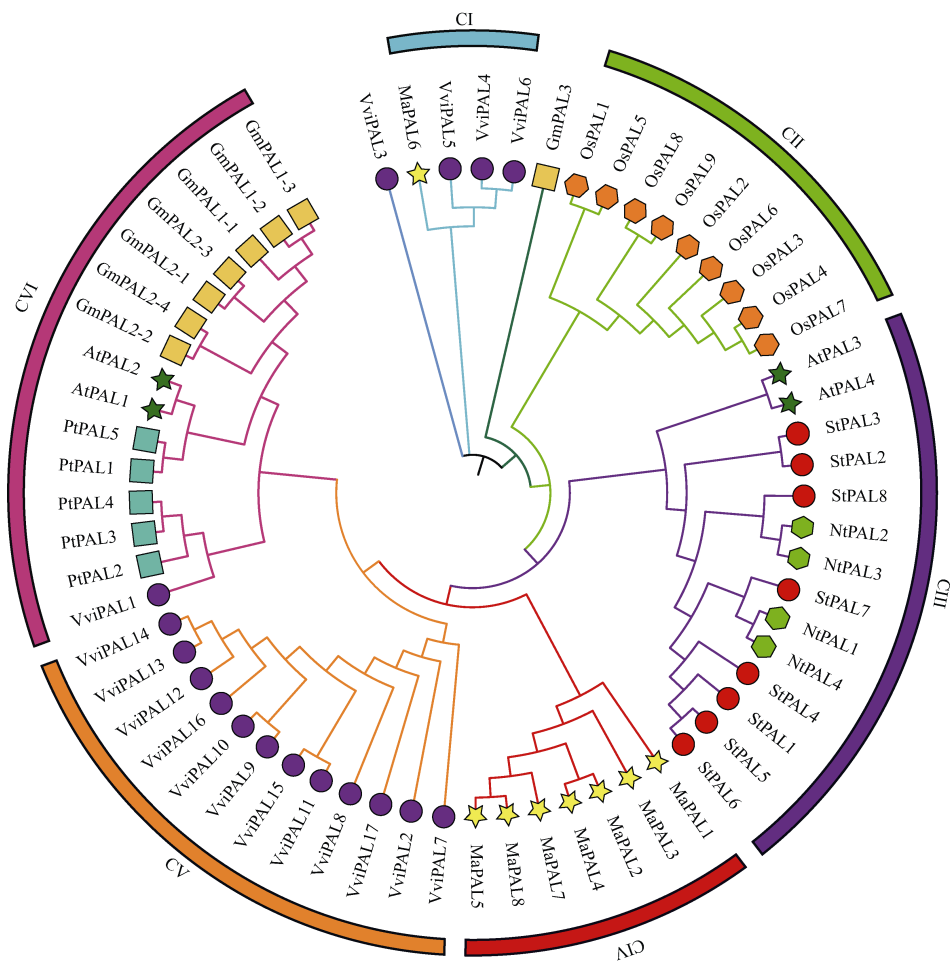


图 3 多个物种中 PALs 蛋白进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of PALs proteins of different species
红色圆表示 StPALs, 绿色五角星表示 AtPALs, 绿色六边形表示 NtPALs。
The red circles represent StPALs, the green pentagons represent AtPALs, and the green hexagons represent NtPALs.

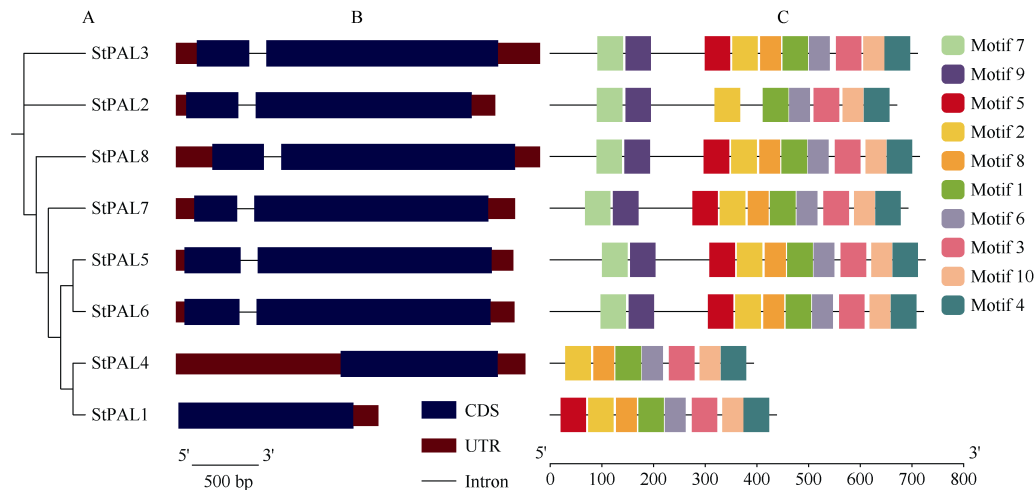


图 4 StPALs 基因家族的进化关系、基因结构和保守基序分析
Fig. 4 Evolutionary relationship, gene structure, and conserved motif of StPALs gene family
A: StPALs 进化树。B: *StPALs* 基因的外显子/内含子结构。蓝色框表示外显子, 相同长度的黑线表示内含子。上游/下游区域红色方框表示。C: StPALs 中保守基序的分布。不同颜色的框代表 10 个不同的基序。
A: StPALs evolutionary tree. B: the exon/intron structure of *StPALs*. The blue boxes represent exons, and the black lines of the same length represent introns. The upstream/downstream area is indicated by a red box. C: the distribution of conserved motifs in StPALs. Different colored boxes represent 10 motifs.

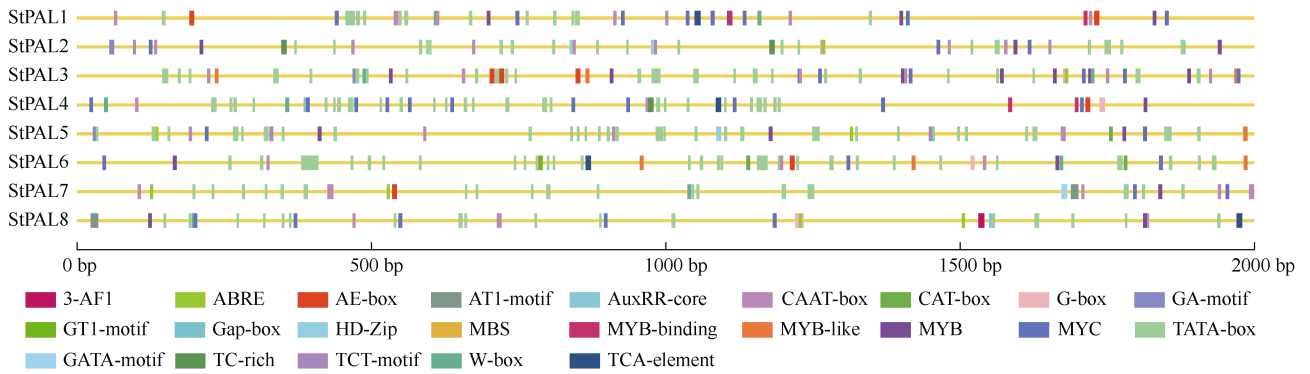


图 5 马铃薯 *PAL* 基因启动子顺式作用元件预测

Fig. 5 Putative *cis*-acting regulatory elements in the *StPAL* gene promoters

2.5 *StPALs* 在马铃薯不同组织中的表达分析

利用在 PGSC 网站中下载的 RNA-seq 数据, 分析了 *StPALs* 在二倍体马铃薯(DM)不同组织(未成熟

果实、成熟果实、心皮、花瓣、愈伤组织、叶柄、花、匍匐茎、雄蕊、萼片、块茎、芽、根和叶)中的表达模式。分析结果表明(图 6-A), 3 个 *StPALs*

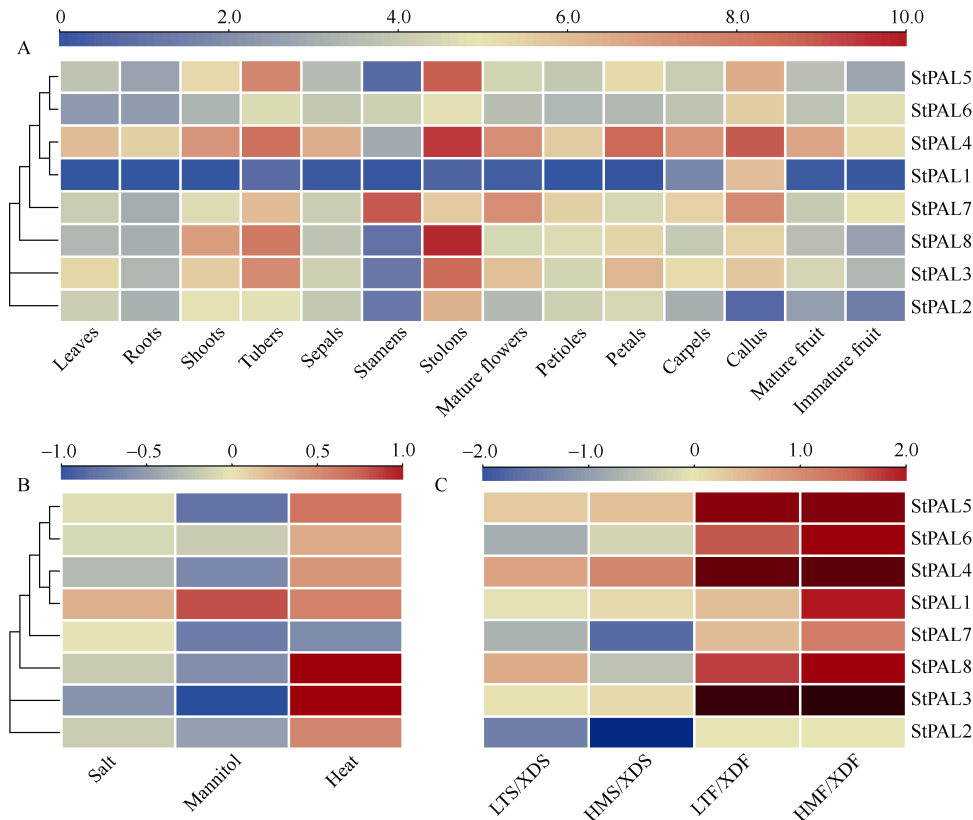


图 6 *StPALs* 在不同组织部位(A)、非生物胁迫(B)和不同薯皮薯肉(C)中的表达

Fig. 6 Relative expression pattern of *StPALs* genes in different tissues (A), different abiotic stresses treatments (B), and different potato skins and flesh (C)

A: 对 8 个 *StPALs* 基因表达量取以 2 为底的对数, 用 $\log_2$ FPKM 绘制色标。B: 在 3 种非生物胁迫(盐、甘露醇和热胁迫)中使用处理比对照的比值, 取以 2 为底的对数, 用 $\log_2$ FC 绘制色标。C: 在不同薯皮薯肉中使用彩色品种/白色品种的比值, 取以 2 为底的对数, 用 $\log_2$ FC 绘制色标。XDS、LTS 和 HMS 分别代表“新大坪”、“铃田红美”和“黑美人”的薯皮。XDF、LTF 和 HMF 分别代表“新大坪”、“铃田红美”和“黑美人”的薯肉。

A: the relative expression level of 8 *StPALs* is taken as the logarithm with base 2, and the color scale is plotted using the $\log_2$ FPKM of each gene. B: in the three abiotic stresses (salt, mannitol, and heat stress), the ratio of treatment to control is used. The logarithm based on 2 was taken, and the color scale is drawn with $\log_2$ FC. C: the ratio of color cultivar/white cultivar in different potato skins and meat, take the logarithm based on 2, and draw the color scale with $\log_2$ FC. XDS, LTS, and HMS represent the potato skins of “Xindaping”, “Lingtianhongmei”, and “Heimeiren”, respectively. XDF, LTF, and HMF represent the potato fleshes of “Xindaping”, “Lingtianhongmei”, and “Heimeiren”, respectively.

(*StPAL4/7/8*) 在所有组织中表达量相对较高(FPKM>5)。一些 *StPALs* 在个别组织部位中特异表达, 如 *StPAL1* 在愈伤组织中特异表达(FPKM>60); *StPAL2* 在匍匐茎中特异表达(FPKM>80); 3 个 *StPALs* (*StPAL3/5/8*) 在块茎和匍匐茎中特异表达(FPKM>180); *StPAL4* 在块茎、匍匐茎、花瓣和愈伤组织中均特异表达(FPKM>350); *StPAL7* 在雄蕊中特异表达(FPKM>450)。

2.6 *StPALs* 在非生物胁迫下的表达模式

为探究 *StPALs* 在非生物胁迫下的响应, 本研究利用 PGSC 下载的 RNA-seq 数据分析了 *StPALs* 在盐胁迫(150 mmol L⁻¹ NaCl, 24 h)、甘露醇处理(260 μmol L⁻¹, 24 h)和热胁迫(35℃, 24 h)下的表达模式。结果表明(图 6-B), 分别有 1 个和 2 个 *StPALs* 在甘露醇处理和热胁迫下差异表达(FPKM>1 和 |log₂(FC)|>1), 其中 *StPAL3* 在甘露醇处理下差异表达下调, *StPAL3* 和 *StPAL8* 在热胁迫中上调表达; 而在盐胁迫下, 8 个 *StPALs* 均未差异表达。

2.7 *StPALs* 在不同颜色块茎组织(薯皮和薯肉)中的表达分析

为分析 *StPALs* 在不同颜色马铃薯块茎中的表达模式, 本研究选取了 XD (白皮白肉)、LT (红皮红肉) 和 HM (紫皮紫肉) 的块茎组织进行了 RNA-seq 测序。结果表明(图 6-C), 在薯肉中, 5 个 *StPALs* (*StPAL3/4/5/6/8*) 在彩色品种(LT 和 HM)中上调表达(|log₂(FC)|>1 和 FPKM>1), *StPAL1* 仅在 HMF 中上调表达(|log₂(FC)|>1 和 FPKM>1), *StPAL7* 在薯肉中表达量较低(FPKM<1), 而 *StPAL2* 在薯肉中不表达(FPKM=0)。在薯皮中, 3 个 *StPALs* (*StPAL2/4/7*) 在彩色品种中差异表达(FPKM>1 和 |log₂(FC)|>1), 其中 *StPAL4* 仅 HMS 中上调表达。有趣的是, 在薯肉中不表达的 *StPAL2*, 在彩色薯皮 (LTS 和 HMS) 中下调表达(|log₂(FC)|>1 和 FPKM>1), 而薯肉中表达量较低

的 *StPAL7*, 则在 HMS 中下调表达(|log₂(FC)|>1 和 FPKM>1)。

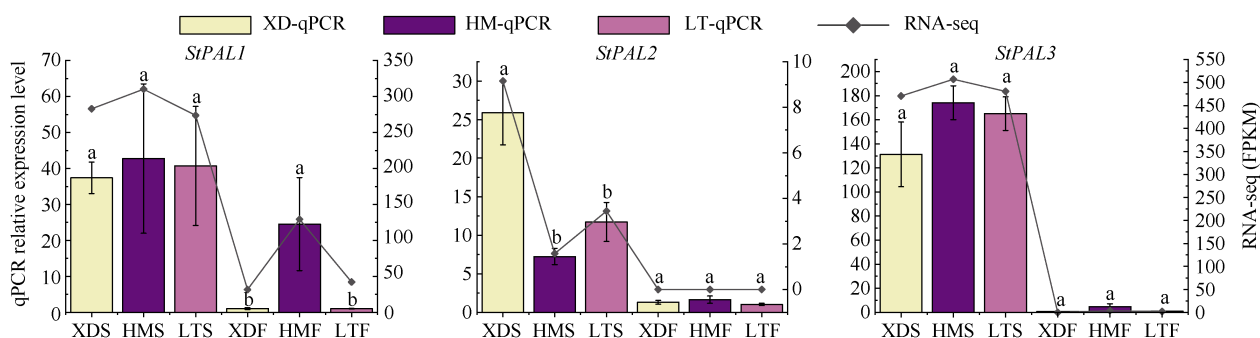
为验证 RNA-seq 数据的可靠性, 本研究对 8 个 *StPALs* 基因进行 qPCR 分析。结果发现, qPCR 结果与 RNA-seq 数据之间虽然存在一定差异, 但整体趋势一致。通过线性回归分析得到彩色马铃薯品种 RNA-seq 数据与 qPCR 的回归方程为 $y=0.9719x+0.7672$ ($R^2=0.833$) (图 7), 说明 qPCR 结果与 RNA-seq 之间具有较好的相关性, RNA-seq 数据真实可靠。

2.8 3 个杂交子代马铃薯薯肉 qPCR 验证

为进一步分析 *StPALs* 与马铃薯块茎花色素苷生物合成的关系, 本研究利用 qPCR 技术, 分析了 8 个 *StPALs* 在遗传背景差异较小的 3 个不同颜色杂交子代薯肉中的表达水平(图 8)。结果表明, 1 个 *StPAL* (*StPAL8*) 在块茎形成期 R 和 P 中的表达显著($P<0.05$) 高于 Y; 4 个 *StPALs* (*StPAL3/4/5/6*) 在块茎形成期(S1) 和成熟期(S2)的 R 和 P 中的表达水平均显著($P<0.05$) 高于 Y; 3 个 *StPALs* (*StPALs1/2/7*) 在 Y、R 和 P 薯肉中均不表达。整体来看, *StPALs* 在 3 个杂交子代(Y、R 和 P)和 3 个不同品种薯肉(XDF、LTF 和 HMF)中的表达规律非常相似, 如在 LTF 和 HMF 中差异表达的 5 个 *StPALs* (*StPAL3/4/5/6/8*) 在 R 和 P 中的表达水平也显著($P<0.05$) 高于 Y, 差异表达倍数在 3.81~159.20 倍之间, 而在 LTF 和 HMF 中低表达或不表达的 2 个 *StPALs* (*StPAL2/7*) 在 R、P 和 Y 中均不表达。与之不同的是, 在 HMF 中差异表达的 *StPAL1*, 在 Y、R 和 P 的薯肉均不表达, 说明 *StPAL1* 在 HMF 中差异表达可能与品种的特性有关。

3 讨论

在植物基因组进化中, 基因组重复、片段重复和串联重复是新基因家族成员和功能扩展的主要驱



(图 7)

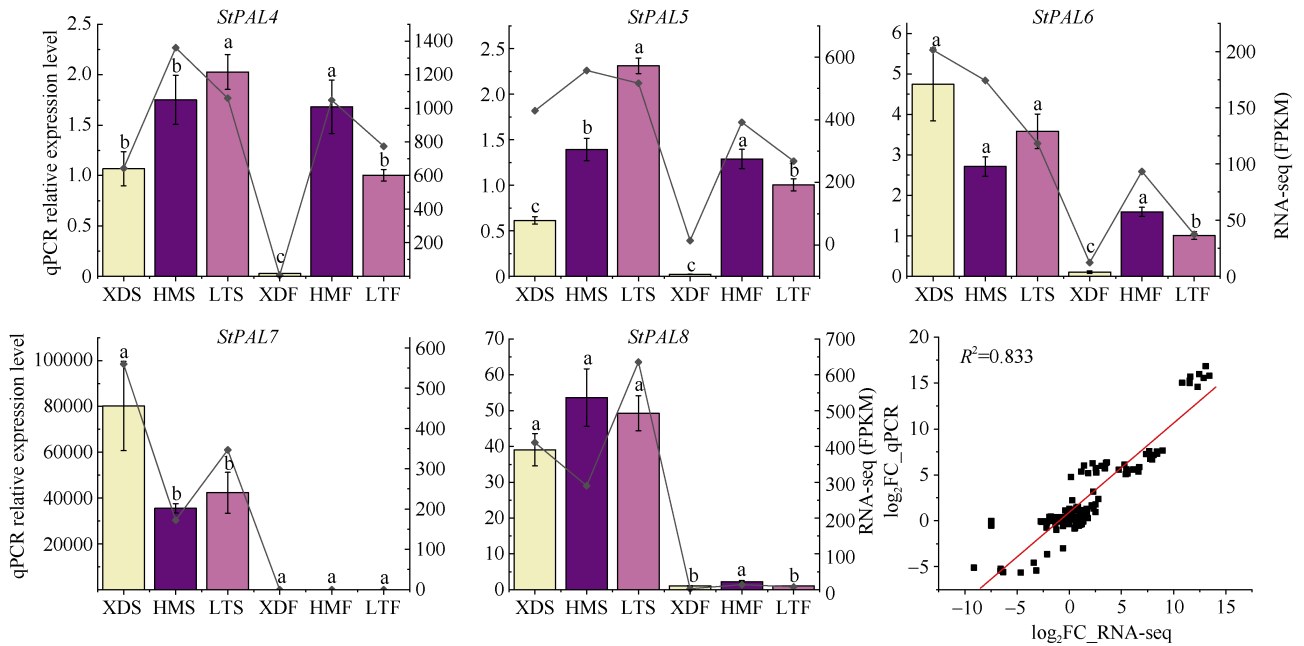


图 7 8 个 *StPAL* 基因在不同颜色块茎(薯皮和薯肉)中的 qPCR 分析

Fig. 7 Relative expression pattern of eight *StPAL* genes in potato tuber (skin and flesh) with different colors

对 8 个 *StPALs* 在白色和彩色薯皮和薯肉中的表达进行了 qPCR 分析。XDS、LTS 和 HMS 分别代表“新大坪”、“红美”和“黑美人”的薯皮。XDF、LTF 和 HMF 分别代表“新大坪”、“铃田红美”和“黑美人”的薯肉。数据为 3 个独立生物重复的平均值(±SE)。条形图上方的不同字母表示 $P < 0.05$ 时的显著差异。

The relative expression pattern of 8 *StPAL* genes in white and colored potato skins and flesh. XDS, LTS, and HMS represent the potato skins of “Xindaping”, “Lingtianhongmei”, and “Heimeiren”, respectively. XDF, LTF, and HMF represent the potato fleshs of “Xindaping”, “Lingtianhongmei”, and “Heimeiren”, respectively. Data are means (±SEs) from three independent biological replicates. Different letters above the bars denote significant difference at $P < 0.05$.

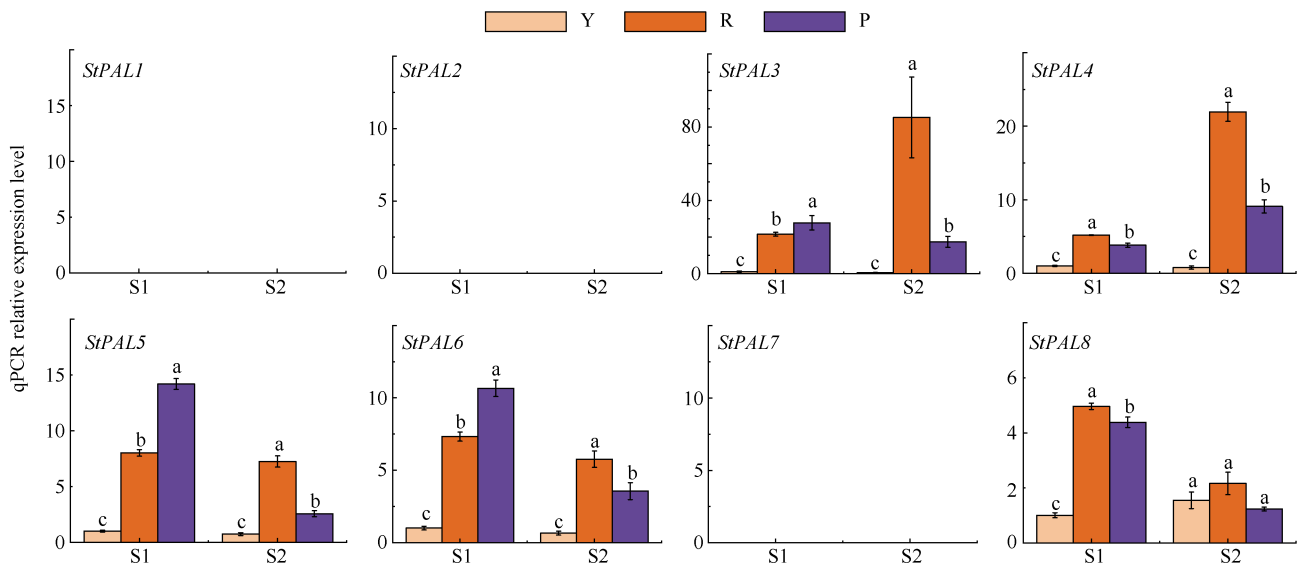


图 8 8 个 *StPAL* 基因在 3 个马铃薯杂交代(Y、R、P)薯肉中的 qPCR 分析

Fig. 8 Relative expression pattern of eight *StPAL* genes in potato flesh of three hybrid progenies (Y, R, P)

对 8 个 *StPALs* 在 Y、R 和 P 薯肉中的表达进行了 qPCR 分析。数据为 3 个独立生物重复的平均值(±SE)。条形图上方的不同字母表示 $P < 0.05$ 时的显著差异。缩写同图 2。

The relative expression pattern of 8 *StPAL* genes in Y, R, and P flesh. Data are means (±SEs) from three independent biological replicates. Different letters above the bars denote significant difference at $P < 0.05$. Abbreviations are the same as given in Fig. 2.

动力^[51]。AtPAL 基因家族可分为 2 个亚族, *AtPAL1/2* 属于 1 个亚族, *AtPAL3/4* 属于另 1 个亚族, 这种 2+2

方式可能是基因复制的结果^[52]。本研究中共发现 8 个 *StPAL* 基因家族成员, 分别分布在 4 条染色体

(Chr3、Chr5、Chr9 和 Chr10)上, 它们均和 AtPAL3/4 分在同一类群, 说明 8 个 StPALs 可能与拟南芥 AtPAL3/4 的亲缘关系更近, 并且 StPAL 基因家族成员数量是拟南芥的 2 倍, 这可能是由于在马铃薯的进化中发生了基因组的复制。

已有研究表明, AtPAL 基因家族在拟南芥生长发育中起着至关重要的作用。AtPAL1/2/4 与木质素的生物合成密切相关^[36,53], 而木质素是细胞次生壁主要成分, 对维持植物茎直立及传导水、矿物质和光合产物具有重要的作用^[54]。Huang 等^[14]研究发现, 在 AtPAL1、AtPAL2、AtPAL3 三突变体和 AtPAL1、AtPAL2、AtPAL3、AtPAL4 四突变体中没有发现花粉粒, 且这些突变体都是不育的, 这之前报道的反义抑制矮牵牛花药中黄酮类合成引起的雄性不育^[55]类似。本研究中 StPAL7 在雄蕊中特异表达, 它很可能参与了马铃薯花粉的发育。本研究还发现, StPAL1 在愈伤组织中特异表达, StPAL2 在匍匐茎中特异表达, 3 个 PALs (StPAL3/5/8)在匍匐茎和块茎中特异表达, 而 StPAL4 在匍匐茎、块茎、花瓣和愈伤组织中均特异表达, 它们很可能在马铃薯次生代谢和生长发育中起不同作用。

PAL 是苯丙烷代谢途径的关键酶, 其催化 L-苯丙氨酸(L-Phe)脱氨生成的反式肉桂酸, 是许多次级代谢产物的直接或间接前体^[56], 在植物响应非生物胁迫中也发挥着重要的作用^[57-59]。对大多数植物而言, 体内次生代谢产物的合成和积累是植物相关基因在环境条件诱导下共同作用的结果^[60]。次生代谢产物是植物在长期进化过程中与环境相互作用的结果, 在提高植物自身保护和生存竞争能力、协调与环境的关系上发挥着重要功能, 其合成和变化比初生代谢产物与环境间有更强的相关性和对应性^[61-65]。郭伟等^[66]研究发现, 盐碱混合胁迫下, 小麦叶片 PAL 活性的强弱与根系活跃吸收面积呈线性正相关。Chen 等^[67]发现, 香蕉果实在贮藏前的热处理增强了 PAL 活性, 减轻了冷藏冷害。王改利等^[10]发现, 随土壤相对含水量的降低, 酸枣叶片中 PAL 活性呈现逐渐增加的趋势。Huang 等^[14]发现, 拟南芥中 AtPAL1/2 双突变体的耐旱性强于野生型。本研究发现, 7 个 StPALs (除 StPAL1)在盐胁迫(150 mmol L⁻¹ NaCl, 24 h)、甘露醇处理 (260 μmol L⁻¹, 24 h)下的表达量较 CK 均有所下降, 其中 StPAL3 在甘露醇(260 μmol L⁻¹, 24 h)处理下下调表达; 在热胁迫(35℃, 24 h)处理下, StPAL3 和 StPAL8 上调表达, 它们很可能

参与了马铃薯对非生物胁迫的响应。

PAL 是花青素苷生物合成中重要结构基因^[68]。Gómez-Martínez 等^[69]在杏(*Prunus armeniaca*)中研究发现, PAL 的表达与果实着色密切相关。李云萍等^[70]在对紫心甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)中发现, PAL 活性与紫心甘薯花青素的合成密切相关, 花青素的含量随 PAL 活性的升高而增加。本研究中发现, StPALs 在彩色马铃薯组织中均差异表达, 其中 5 个基因(StPAL3/4/5/6/8)在彩色薯肉中上调表达, 2 个基因 (StPAL2/7)在彩色薯皮中下调表达。有趣的是, 在薯肉中差异表达的 5 个 StPALs, 除 StPAL4 在 HMS 里差异上调, 其余 StPALs 在薯皮中均未差异表达; 而在薯皮中差异表达的 2 个 StPALs, 在薯肉中不表达 (FPKM=0)或低表达 (FPKM<1), 说明 StPALs 在马铃薯块茎(薯皮和薯肉)花色素苷生物合成中可能发挥着不同的作用。本研究利用 qPCR 技术, 进一步分析了 8 个 StPALs 在遗传背景差异较小的 3 个不同颜色杂交子代薯肉中的表达水平, 筛选出了 5 个很可能参与马铃薯块茎薯肉中花色素苷的生物合成 StPALs (StPAL3/4/5/6/8)。

此外, 本研究发现 StPAL 基因家族成员在上游启动子区域中存在与光、植物激素、逆境胁迫、调控生长发育以及和转录因子(MYB、MYC、WRKY 等)结合的顺式作用元件。尽管 PALs 都催化苯丙烷类代谢途径的起始反应, 但它们是否受到不同的外界信号刺激诱导表达, 从而维持马铃薯中次生代谢产物的均衡, 有待我们进一步深入研究。

4 结论

本研究在马铃薯全基因组水平下共鉴定了 8 个 StPAL 基因家族成员, 对其进行生物信息学分析, 发现 StPAL 基因成员的启动子区域内含有光响应、逆境胁迫响应、激素响应、生长发育相关和转录因子调控的多种顺式元件。StPAL1 在愈伤组织中特异表达, StPAL2 在匍匐茎中特异表达, StPAL3/5/8 在块茎和匍匐茎中特异表达, StPAL7 在雄蕊中特异表达; StPAL3 在甘露醇处理下差异表达下调, StPAL3 和 StPAL8 在热胁迫中上调表达。本研究还对 3 个不同颜色马铃薯块茎组织(皮和肉)进行 RNA-seq 测序, 分析了 StPALs 的表达模式, 并选用遗传背景差异较小的 3 个不同颜色块茎杂交子代的薯肉为材料, 进行 qPCR 分析, 筛选出可能参与马铃薯薯肉花色素苷生物合成的候选 StPALs (StPAL3/4/5/6/8)基因。该

研究为深入了解 StPAL 基因家族的特征, 进一步探究其生物功能提供了重要的参考和线索。

References

- [1] 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. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 16–20.
Huang X Z, Zhao D G. Research progress in regulation and control mechanism of phenylalanine ammonia lyase in plants. *Guizhou Agric Sci*, 2017, 45(4): 16–20 (in Chinese with English abstract).
- [2] 冯凯, 陈颖, 刘瑞, 马娟娟, 赵斌. 银杏类黄酮代谢研究进展. 西南林业大学学报(自然科学版), 2022, 42(1): 178–188.
Feng K, Chen Y, Liu R, Ma J J, Zhao B. Advances in flavonoid metabolism of *Ginkgo biloba*. *J Southwest For Univ* (Nat Sci Edn), 2022, 42(1): 178–188 (in Chinese with English abstract).
- [3] Vanholme R, Demedts B B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, 2010, 153: 895–905.
- [4] 赵秀林, 王富荣, 徐凌云, 何华平, 臧程, 金伟. 红肉桃果实发育过程中色素含量及 PAL 活性的变化. 食品工业科技, 2012, 33(12): 125–127.
Zhao X L, Wang F R, Xu L Y, He H P, Zang C, Jin W. Changes of pigments content and PAL activity of blood-flesh peach during fruit development. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33(12): 125–127 (in Chinese with English abstract).
- [5] Jiang Y M, Joyce D C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regul*, 2003, 39: 171–174.
- [6] 李洁雅, 李红艳, 叶广继, 苏旺, 孙海宏, 王舰. 马铃薯储藏期花青素变化及合成相关基因表达分析. 作物学报, 2022, 48: 1669–1682.
Li J Y, Li H Y, Ye G J, Su W, Sun H H, Wang J. Changes of anthocyanins and expression analysis of synthesis-related genes in potato during storage period. *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 1669–1682 (in Chinese with English abstract).
- [7] 李进步, 方丽平, 张亚楠, 杨卫娟, 郭庆, 李雷, 毕彩丽, 杨荣志. 棉花抗蚜性与苯丙氨酸解氨酶活性的关系. 应用昆虫学报, 2008, 45: 422–425.
Li J B, Fang L P, Zhang Y N, Yang W J, Guo Q, Li L, Bi C L, Yang R Z. The relationship between the resistance of cotton against cotton aphid, *Aphis gossypii*, and the activity of phenylalanine ammonia-lyase. *Chin J Appl Entomol*, 2008, 45: 422–425 (in Chinese with English abstract).
- [8] Chen Y P, Li F J, Tian L, Huang M C, Deng R F, Li X L, Chen W, Wu P Z, Li M R, Jiang H W, Wu G J. The phenylalanine ammonia lyase gene *LjPAL1* is involved in plant defense responses to pathogens and plays diverse roles in *Lotus japonicus*-rhizobium symbioses. *Mol Plant Microbe Int*, 2017, 30: 739–753.
- [9] Pan Q H, Zhan J C, Liu H T, Zhang J H, Chen J Y, Wen P F, Huang W D. Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci*, 2006, 171: 226–233.
- [10] 王改利, 魏忠, 贺少轩, 周雪洁, 梁宗锁. 土壤干旱胁迫对酸枣叶片黄酮类代谢及某些生长和生理指标的影响. 植物资源与环境学报, 2011, 20(3): 1–8.
Wang G L, Wei Z, He S X, Zhou X J, Liang Z S. Effects of drought stress in soil on flavonoids metabolism in leaf and some growth and physiological indexes of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa*. *J Plant Resour Environ*, 2011, 20(3): 1–8 (in Chinese with English abstract).
- [11] 宋晓敏, 吕晓杰, 邱智敏, 邢建宏, 陈世品, 谭芳林, 陈伟. 红树植物秋茄类黄酮代谢及其抗氧化活性对高盐胁迫的响应. 西北植物学报, 2016, 36: 2461–2468.
Song X M, Lyu X J, Qiu Z M, Xing J H, Chen S P, Tan F L, Chen W. Flavonoid metabolism and antioxidant activity in response to salt stress in mangrove *Kandelia candel*. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2016, 36: 2461–2468 (in Chinese with English abstract).
- [12] Peng R H, Yao Q H, Xiong A S, Fan H Q, Li X, Peng Y L. Ubiquitin-conjugating enzyme (E2) confers rice UV protection through phenylalanine ammonia-lyase gene promoter unit. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 1351–1358.
- [13] 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 Biol Chem*, 1961, 236: 2692–2698.
- [14] Huang J L, Gu M, Lai Z B, Fan B F, Shi K, Zhou Y H, Yu J Q, Chen Z X. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1526–1538.
- [15] Olsen K M, Lea U S, Slimestad R, Verheul M, Lillo C. Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 1491–1499.
- [16] 李元, 高潇潇, 高召华, 何永美, 陈建军, 祖艳群. UV-B 辐射和稻瘟病菌胁迫对水稻幼苗苯丙氨酸解氨酶活性和类黄酮含量的影响. 中国生态农业学报, 2010, 18: 856–860.
Li Y, Gao X X, Gao Z H, He Y M, Chen J J, Zu Y Q. Effect of enhanced UV-B radiation and inoculated blast isolate (*Magnaporthe grisea*) on phenylalanine ammonia-lyase activity and flavonoid content in seedlings of two rice cultivars. *Chin J Eco-Agric*, 2010, 18: 856–860 (in Chinese with English abstract).
- [17] Han W, Wang M H. Phenylalanine ammonia-lyase gene (*NtPAL4*) induced by abiotic stresses in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Korean J Plant Res*, 2010, 23: 535–540.
- [18] 杨会晓, 孙媛媛, 贾彩红, 金志强, 徐碧玉, 王卓. 香蕉苯丙氨酸解氨酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析. 热带作物学报, 2019, 40: 1949–1957.
Yang H X, Sun Y Y, Jia C H, Jin Z Q, Xu B Y, Wang Z. Identification and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene family in banana. *Chin J Trop Crops*, 2019, 40: 1949–1957 (in Chinese with English abstract).
- [19] 张丽之, 樊胜, 安娜, 左希亚, 高彩, 张东, 韩明玉. 苹果全基因组 PAL 基因家族成员的鉴定及表达分析. 浙江农业学报, 2018, 30: 2031–2043.
Zhang L Z, Fan S, An N, Zuo X Y, Gao C, Zhang D, Han M Y. Identification and expression analysis of PAL gene family in apple. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2018, 30: 2031–2043 (in Chinese with English abstract).
- [20] Stokstad E. The new potato. *Science*, 2019, 363: 574–577.
- [21] Cho K, Cho K S, Sohn H B, Ha I J, Hong S Y, Lee H, Kim Y M, Nam M H. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation. *J Exp Bot*,

- 2016, 67: 1519–1533.
- [22] Brown C R, Wrolstad R, Durst R, Yang C P, Clevidence B. Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. *Am J Potato Res*, 2003, 800: 241–250.
 - [23] Davies K M, Albert N W, Schwinn K E. From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Funct Plant Biol*, 2012, 39: 619–638.
 - [24] Muhlemann J K, Younts T L B, Muday G K. Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E11188–E11197.
 - [25] Bhat R, Stamminger R. Impact of ultraviolet radiation treatments on the physicochemical properties, antioxidants, enzyme activity and microbial load in freshly prepared hand pressed strawberry juice. *Food Sci Technol Int*, 2015, 21: 354–363.
 - [26] Castellarin S D, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Gaspero G D. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 1381–1399.
 - [27] Christie P J, Alfenito M R, Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 1994, 194: 541–549.
 - [28] Igwe E O, Charlton K E, Roodenrys S, Kent K, Fanning K, Netzel M E. Anthocyanin-rich plum juice reduces ambulatory blood pressure but not acute cognitive function in younger and older adults: a pilot crossover dose-timing study. *Nutr Res*, 2017, 47: 28–43.
 - [29] Bontempo P, Masi L D, Carafa V, Rigano D, Scisciola L, Iside C, Grassi R, Molinari A M, Aversano R, Nebbioso A, Carputo D, Altucci L. Anticancer activities of anthocyanin extract from genotyped *Solanum tuberosum* L. “Vitelotte”. *J Funct Foods*, 2015, 19: 584–593.
 - [30] Zhou F, Wang T, Zhang BL, Zhao HF. Addition of sucrose during the blueberry heating process is good or bad? Evaluating the changes of anthocyanins/anthocyanidins and the anticancer ability in HepG-2 cells. *Food Res Int*, 2018, 107: 509–517.
 - [31] 郭英男, 刘月扬, 马静雨, 张敬, 马鑫彤, 张馨月, 刘建雨, 姚娜, 刘秀明, 李海燕. 红花 PAL 家族全基因组分析及其在悬浮细胞中的表达. *中草药*, 2021, 52: 3362–3372.
Guo Y N, Liu Y Y, Ma J Y, Zhang J, Ma X T, Zhang X Y, Liu J Y, Yao N, Liu X M, Li H Y. Genome analysis of PAL gene family from *Flos carthami* and its expression in suspension cells. *Chin Trad Herb Drugs*, 2021, 52: 3362–3372 (in Chinese with English abstract).
 - [32] 李雨哲, 邢淋雪, 刘梦洁, 刘苏瑶, 鲍梦楠, 刘震. 棉花苯丙氨酸解氨酶基因家族的生物信息学分析. *棉花学报*, 2021, 33(1): 66–74.
Li Y Z, Xing L X, Liu M J, Liu S Y, Bao M N, Liu Z. Bioinformatics analysis of the phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family in cotton. *Cott Sci*, 2021, 33(1): 66–74 (in Chinese with English abstract).
 - [33] 孙润泽, 张雪, 成果, 李强, 朱燕溶, 陈武, 潘秋红, 段长青, 王军. 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: 195–208.
Sun R Z, Zhang X, Cheng G, Li Q, Zhu Y R, Chen W, Pan Q H, Duan C Q, Wang J. Genome-wide characterization and expression analysis of the *phenylalanine ammonia-lyase* gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Acta Phytophysiol Sin*, 2016, 52: 195–208 (in Chinese with English abstract).
 - [34] 吴远航, 刘秦, 刘攀道, 郭鹏飞, 李敏, 蒋凌雁, 罗丽娟. 木薯苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及其对低温胁迫的响应. *热带作物学报*, 2019, 40: 483–489.
Wu Y H, Liu Q, Liu P D, Guo P F, Li M, Jiang L Y, Luo L J. Cloning of cassava phenylalanine ammonia lyase genes and their responses to low temperature stress. *Chin J Trop Crops*, 2019, 40: 483–489 (in Chinese with English abstract).
 - [35] Liu Z, Li Y M, Zhu J Y, Ma W J, Li Z T, Bi Z Z, Sun C, Bai J P, Zhang J L, Liu Y H. Genome-wide identification and analysis of the NF-Y gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Front Genet*, 2021, 12: e739989.
 - [36] Wong J H, Namasivayam P, Abdullah M P. The *PAL2* promoter activities in relation to structural development and adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2012, 235: 267–277.
 - [37] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S E, Wilkins M R, Appel R D, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker J M, eds. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. pp 571–607.
 - [38] Yu C S, Chen Y C, Lu C H, Hwang J K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, 2006, 64: 643–651.
 - [39] Reichert A I, He X Z, Dixon R A. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco *PAL* genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochem J*, 2009, 424: 233–242.
 - [40] 曾嘉丽, 欧阳林娟, 刘家林, 贺浩华, 朱昌兰, 彭小松, 贺晓鹏, 傅军如, 陈小荣, 边建民, 徐杰, 孙晓棠, 周大虎, 胡丽芳. 水稻 *PAL* 基因的全基因组分析及胁迫表达研究. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37: 3881–3888.
Zeng J L, Ou-Yang L J, Liu J L, He H H, Zhu C L, Peng X S, He X P, Fu J R, Chen X R, Bian J M, Xu J, Sun X T, Zhou D H, Hu L F. Whole genome analysis and stress expression research of *PAL* gene in rice. *Genomics Appl Biol*, 2018, 37: 3881–3888 (in Chinese with English abstract).
 - [41] 张晨, 臧颖, 许倩, 郑兆娟, 欧阳嘉. 毛果杨苯丙氨酸解氨酶活性比较及肉桂酸制备. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2020, 44(1): 97–104.
Zhang C, Zang Y, Xu Q, Zhen Z J, Ou-Yang J. Comparison on activities of phenylalanine ammonia-lyase from *Populus trichocarpa* and its application in *trans*-cinnamic acid production. *J Nanjing For Univ* (Nat Sci Edn), 2020, 44(1): 97–104 (in Chinese with English abstract).
 - [42] 侯鹏, 梁冬, 张卫国, 郭长军, 张小明, 程章, 张淑珍, 李冬梅, 李文滨, 张大勇. 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 W G, Gou Z J, Zhang X M, Cheng Z, Zhang S Z, Li W B, Zhang D Y. Study on temporospatial expression of *PAL* gene family in soybean. *Crops*, 2016, (2): 57–62 (in Chinese with English abstract).
 - [43] Hall B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 1229–1235.

- [44] Bailey T L, Mikael B, Buske F A, Martin F, Grant C E, Luca C, Ren J Y, Li W F, William S N. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: W202–W208.
- [45] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 罗静初. GSDS: 基因结构显示系统. 遗传, 2007, 29: 1023–1026.
Guo A Y, Zhu Q H, Chen X, Luo J C. GSDS: a gene structure display server. *Hereditas*, 2007, 29: 1023–1026 (in Chinese with English abstract).
- [46] Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325–327.
- [47] Tang X, Zhang N, Si H J, Calderón-Urrea A. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods*, 2017, 13: 85.
- [48] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [49] Xu X, Pan S, Cheng S, Zhang B, Mu D, Ni P, Zhang G, Yang S, Li R, Wang J. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 2011, 475: 189–195.
- [50] Chen C J, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y H, Xia R. Tbttools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194–1202.
- [51] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2004, 4: 10.
- [52] Cochrane F C, Davin L B, Lewis N G. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1557–1564.
- [53] Ohl S, Hedrick S A, Chory J, Lamb C J. Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1990, 6: 837–848.
- [54] Baucher M, Halpin C, Petit-Conil M, Boerjan W. Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, 38: 305–350.
- [55] Meer I M V D, Stam M E, Tunen A J V, Mol J N M, Stuitje A R. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell*, 1992, 4: 253–262.
- [56] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989, 40: 347–369.
- [57] Dehghan S, Sadeghi M, Pöppel A, Fischer R, Lakes-Harlan R, Kavousi H R, Vilcinskas A, Rahnamaeian M. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Biosci Rep*, 2014, 34: e00114.
- [58] 宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶基因 (*SmPAL1*) 的克隆及其功能初探. 陕西师范大学硕士学位论文, 陕西西安, 2007.
Song J. Molecular Cloning of a Phenylalanine Ammonia-lyase Gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza* and the Primary Study on Its Function. MS Thesis of Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi, China, 2007 (in Chinese with English abstract).
- [59] Ritter H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell*, 2004, 16: 3426–3436.
- [60] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 欧晓昆. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的關係. 中草药, 2005, (9): 139–142.
Su W H, Zhang G F, Li X H, Ou X K. Relationship between accumulation of secondary metabolism in medicinal plant and environmental condition. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2005, (9): 139–142 (in Chinese with English abstract).
- [61] Sun M Y, Gu X D, Fu H W, Zhang L, Chen R Z, Cui L, Zheng L H, Zhang D W, Tian J K. Change of secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* L. in response to UV-B induction. *Innov Food Sci Emerg*, 2010, 11: 672–676.
- [62] Shin Y, Liu R H, Nock J F, Holliday D, Watkins C B. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biol Technol*, 2007, 45: 349–357.
- [63] Solar A, Colarič M, Usenik V, Stampar F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci*, 2006, 170: 453–461.
- [64] Agrawal A A. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends Ecol Evol*, 2007, 22: 103–109.
- [65] 顾永华, 冯煦, 夏冰. 水分胁迫对茅苍术根茎生长及挥发油含量的影响. 植物资源与环境学报, 2008, 17(3): 23–27.
Gu Y H, Feng X, Xia B. Effect of water stress on growth and essential oil content of *Atractylodes lancea* rhizome. *J Plant Resour Environ*, 2008, 17(3): 23–27 (in Chinese with English abstract).
- [66] 郭伟, 于立河. 盐碱胁迫对小麦幼苗根系活力和苯丙氨酸解氨酶活性的影响. 作物杂志, 2012, (1): 31–34.
Gou W, Yu L H. Effects of salinity-alkalinity stress on root activity and phenylalanine ammonia-lyase activity of wheat seedlings. *Crops*, 2012, (1): 31–34 (in Chinese with English abstract).
- [67] Chen J Y, He L H, Jiang Y M, Wang Y, Joyce D C, Ji Z L, Lu W J. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiol Planta*, 2010, 132: 318–328.
- [68] Chen X J, Wang P J, Gu M Y, Hou B H, Zhang C R, Zheng Y C, Sun Y, Jin S, Ye N X. Identification of PAL genes related to anthocyanin synthesis in tea plants and its correlation with anthocyanin content. *Acta Horti Sin*, 2022, 8: 381–394.
- [69] Gómez-Martínez H, Gil-Muñoz F, Bermejo A, Zuriaga E, Badenes M L. Insights of phenolic pathway in fruits: transcriptional and metabolic profiling in apricot (*Prunus armeniaca*). *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3411.
- [70] 李云萍, 郭晋雅, 高峰. 紫心甘薯花青素积累与 PAL 活性的关系. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(2): 68–72.
Li Y P, Guo J Y, Gao F. The relationship between anthocyanidin accumulation and phenylalanine ammonia-lyase activity in purple-fleshed sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *J Southwest Univ (Nat Sci Edn)*, 2010, 32(2): 68–72 (in Chinese with English abstract).