

闽楠 PLR 基因家族鉴定及响应激素的表达分析

王倩清, 张毓婷, 张俊红, 刘 慧, 童再康

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】解析闽楠 *Phoebe bournei* 木脂素合成途径关键酶基因 *Pinoresinol-lariciresinol reductase* (PLR) 特征及不同激素处理下的表达模式, 探索闽楠 PLR 基因家族的生物学功能。【方法】利用生物信息学方法鉴定闽楠基因组中的 PLR 基因家族成员, 分析基因结构、保守基序、染色体定位、系统进化、启动子顺式作用元件和激素响应。【结果】从闽楠全基因组内共鉴定出 8 个闽楠 PLR (*PbPLR*) 成员, 不均匀地分布于第 1、2、5 和 10 号染色体。系统进化分析表明: *PbPLR* 功能可能与底物立体选择性有关。启动子元件分析发现: *PbPLRs* 启动子区域存在脱落酸、水杨酸和茉莉酸甲酯等激素响应元件; 基因表达分析表明: *PbPLRs* 基因的表达具有组织特异性和激素响应特征, 其中 *PbPLRs* 基因在根中表达量最高, 其次茎, 叶中表达量较低; 3 种激素处理时, *PbPLR2* 表达诱导最强。【结论】从闽楠基因组中鉴定出的 8 个 *PbPLRs* 基因, 其基因特征和不同成员可能具有不同催化酶立体选择性, 成员表达模式多样化, 可能受多种激素诱导, 具有组织特异性。图 6 表 2 参 25

关键词: 闽楠; PLR 基因家族; 系统进化; 激素处理; 表达分析

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)06-1173-10

Identification of PLR gene family and expression of responsive hormones in *Phoebe bournei*

WANG Qianqing, ZHANG Yuting, ZHANG Junhong, LIU Hui, TONG Zaikang

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] *Pinoresinol-lariciresinol reductase* (PLR) is a key enzyme gene involved in lignan biosynthesis. This study aims to clear the characteristics of PLR gene family in *Phoebe bournei* and the expression patterns under different hormone treatments, so as provide basis for further exploring the biological function of PLR gene family in *P. bournei*. [Method] The members of PLR gene family in *P. bournei* genome were identified by bioinformatics methods, and the gene structure, conserved motifs, chromosome location, phylogeny, cis acting elements of promoter and hormone response were analyzed. [Result] A total of 8 PLR (*PbPLR*) members were identified from the genome of *P. bournei*, which were unevenly distributed on chromosomes 1, 2, 5 and 10. Phylogenetic analysis indicated that *PbPLR* function may be related to substrate stereoselectivity. Promoter element analysis showed that there were hormone response elements such as abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and methyl jasmonate (MeJA) in the promoter region of *PbPLRs*. Gene expression analysis showed that the expression of *PbPLRs* gene had the characteristics of tissue specificity and hormone response. The expression of *PbPLRs* gene was the highest in roots, followed by stems and leaves. The expression of *PbPLR2* was the strongest when treated with 3 hormones. [Conclusion] The 8 *PbPLRs* gene

收稿日期: 2022-05-16; 修回日期: 2022-07-15

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大专项 (2021C2070-10); 国家自然科学基金资助项目 (32171828)

作者简介: 王倩清 (ORCID: 0000-0003-0116-0551), 从事闽楠遗传学研究。E-mail: 974317348@qq.com。通信作者: 童再康 (ORCID: 0000-0002-0202-6496), 教授, 博士, 从事林木新品种选育与定向培育研究工作。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

identified from the genome of *P. bournei* have different gene characteristics, and different members may have different stereoselectivity of catalytic enzymes. The expression patterns of members are diverse, which may be induced by various hormones and have tissue specificity. [Ch, 6 fig. 2 tab. 25 ref.]

Key words: *Phoebe bournei*; PLR gene family; phylogenetics; hormone treatment; expression analysis

不同树种木材的天然耐腐性差异大, 据统计每年全球因木材腐朽造成的损失占采伐利用木材的10%以上, 严重影响木材的加工利用^[1]。木材腐朽主要由腐朽菌和变色菌等真菌侵蚀木材细胞所引起, 而木材的天然耐腐性则依靠自身代谢物的生物杀菌、抑菌活性来实现^[2]。闽楠 *Phoebe bournei* 为樟科 Lauraceae 楠属 *Phoebe* 植物, 是中国特有的珍稀用材与绿化树种。楠木具有极强耐腐性, 阴沉木历经千年不腐, 被誉为“木中之玉”, 市场俗称“金丝楠乌木”^[3]。闽楠和桢楠 *Phoebe zhennan* 作为“金丝楠木”最主要的产材树种, 树干挺拔, 木材颜色呈淡黄色, 坚硬细密, 纹理美观具有芳香香气, 属上等家具良材^[4]。因此, 闽楠可作为研究木材天然耐腐性的良好材料, 闽楠全基因组测序的完成为基因挖掘和功能研究提供了重要基础。

已有研究发现: 从木材分离的木脂素 (lignan) 类化合物具有抗菌活性, 参与植物防御系统, 增强木材耐久性和抗真菌能力。例如北美乔柏 *Thuja plicata* 心材中提取的木脂素通过清除自由基和螯合亚铁来干扰真菌氧化还原循环提高木材耐腐性^[5], 南洋杉 *Araucaria araucana* 中提取的松脂素 (pinoresinol) 和开环落叶松脂素 (secoisolaricresinol) 对木材腐朽菌具有较好抗性^[6]。然而, 关于木脂素生物合成调控途径尚不明确, 从而限制其深入研究与生产应用。

松脂素还原酶 *Pinoresinol-laricresinol reductase* (PLR) 是一种编码松脂醇的落叶松脂素还原酶基因, 属木脂素生物合成的关键酶, 一分子松脂素在 PLR 松脂素-落叶松脂素还原酶作用下经两步还原成落叶松脂素和异落叶松脂素, 也是木脂素生物合成途径中重要限速步骤之一。目前已从模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[7] 和富含木脂素的植物 (连翘 *Forsythia suspense*^[8-9]、菘蓝 *Isatis indigotica*^[10]、亚麻属 *Linum*^[11-13]) 中克隆得到 PLR 基因。迄今为止, 所有以重组纯化蛋白为特征的 PLR 均可以将松脂素还原为落叶松脂素以及将落叶松脂素还原为异落叶松脂素, 但 AtPrR1 对落叶松脂素的活性比松脂素低约 35 倍, AtPrR2 对作为底物的落叶松脂素完全没有催化活性。因此, MIN 等^[14] 将它们命名为松脂素还原酶, 而不是松脂醇-落叶松脂醇还原酶。PLR 的表达受激素的调控, 不同物种在不同激素处理下松脂醇-落叶松脂醇还原酶的表达模式有所不同。在脱落酸 (ABA) 处理下, *LuPLR1* 的表达增强, *LuPLR1* 的表达似乎是由在种子成熟和休眠中起关键作用的植物激素 ABA 触发的^[12-13]。所以赤霉素 (GA) 对 *LuPLR1* 的表达具有相反的调节作用^[13]。在茉莉酸甲酯 (MeJA) 的处理下, *LuPLR2* 的表达量有明显提高, 因为亚麻在 MeJA 处理和伤害后, *LuPLR2* 基因表达和叶酸蛋白产量增加, 这与这些木脂素参与植物防御反应一致。本研究选择耐腐性强的闽楠解析木脂素合成重要限速酶 PLR 基因, 利用闽楠基因组数据, 对 PLR 基因家族成员进行鉴定和基因结构、保守基序及染色体定位分析, 构建系统发育进化树预测闽楠 PLR (*PbPLR*) 催化酶的立体选择性, 为进一步研究 *PbPLR* 基因在闽楠木脂素合成过程中的生物学功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 闽楠 PLR 基因家族成员鉴定

采用 BLAST 和 hmmsearch 鉴定闽楠 PLR 家族成员。首先在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载拟南芥 PLR 家族蛋白序列, 通过 BLASTP 同源比对检索, 用 HMMER 3.1 软件^[15] 搜索闽楠 PLR 基因家族的候选序列。搜索获得的基因成员在人工筛选后提交至 SMART 数据库^[16] 确认保守结构域, 确定 PLR 基因成员, 并依据染色体位置进行命名。

1.2 *PbPLR* 基因染色体定位与基因复制分析

采用 MapChart 软件绘制 *PbPLR* 基因在闽楠基因组上的位置信息, 并利用 MCScanX 软件分析 *PbPLR* 基因的共线性区域和复制情况。

1.3 *PbPLR* 基因结构及蛋白保守基序分析

根据 *PbPLR* 基因编码区序列和基因组序列，采用在线 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org>) 分析 *PbPLR* 基因结构。并通过在线工具 MEME Suite (<http://meme-suite.org/>) 分析 *PbPLR* 氨基酸序列中保守基序，设置保守基序个数为 20。最后利用 SnapGene 软件进行 *PbPLR* 蛋白序列比对。

1.4 *PbPLR* 家族成员的系统发育树构建及聚类分析

利用植物蛋白数据库下载的拟南芥、亚麻、台湾杉 *Taiwania cryptomerioides* 等物种 PLR 蛋白序列，与 *PbPLR* 家族成员进行系统进化分析。利用 MEGA X 软件构建进化树，采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ)，重复 1 000 次 (Bootstrap 为 1 000)，利用在线工具 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 美化 MEGA X 软件输出的进化树。

1.5 *PbPLR* 基因的启动子分析

根据闽楠基因组数据，利用 TBtools 软件提取 *PbPLR* 基因序列转录起始位点上游 2 000 bp 序列，使用在线软件 PlantCARE (<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/>) 预测 *PbPLR* 基因启动子序列中的顺式调控元件。

1.6 *PbPLR* 基因对激素处理的响应

选取 1.5 年生长势一致的闽楠半同胞家系苗进行激素处理，分别采集叶、茎和根进行 *PbPLRs* 基因表达分析。基于前期预实验结果，本研究分别使用 1 mmol·L⁻¹ ABA、1 mmol·L⁻¹ 水杨酸 (SA) 和 2 mmol·L⁻¹ MeJA 处理闽楠实生苗，对土壤上部植株均匀喷洒激素，使土壤表面被激素浸湿，同时，以喷洒水为对照 (ck)。激素喷施时间为 2021 年 10 月 1 日 9:30、10 月 2 日 11:00、10 月 3 日 11:30、10 月 3 日 22:00、10 月 4 日 9:00、10 月 4 日 9:30。在处理 1、3、12、24、48 和 72 h 取样并液氮速冻。采用 CTAB 法提取 RNA，使用 Takara 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒反转录合成 cDNA。利用在线网站 (<http://primer3.ut.ee/>) 设计 *PbPLRs* 特异性引物 (表 1) 用于实时荧光定量 PCR 实验。定量 PCR 反应体系 (10 μL) 为：SYBR Green 5.0 μL，上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.2 μL，模板 0.8 μL，双蒸水 3.8 μL。反应程序为：95 ℃ 预变性 3 min，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s (此步完成时采集荧光信号)，共 40 个循环。利用 CFX96TM Real-Time PCR 检测系统 (Bio-Rad，美国)。内参基因为 *PbEF1α*，按照 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因相对表达量。运用 SPSS 软件对定量数据进行分析。

表 1 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物信息

Table 1 RT-qPCR primer information

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>PbPLR1</i>	F: GGCACAAATCTCATCAGCAA; R: GCCAGCTTTTATGGCCTGTA
<i>PbPLR2</i>	F: TCTGGATTACGTGCAACAGG; R: AGCGTTTGAGATAGTCCTTCG
<i>PbPLR3</i>	F: AGGTCTGGATTACGCACAGC; R: CGTTTGAGATAGTCCTTCACTCG
<i>PbPLR4</i>	F: GGAATTCCTTGCTCAAAATGAAA; R: TTTCGAAATTTGCCAGACAAC
<i>PbPLR5</i>	F: GTGGAACAAGAGCCCAATG; R: CTGGCAAGTGGGTGAAAAAT
<i>PbPLR6</i>	F: ATGGGGTGGATAGCAATGAC; R: CCATAACACGCTCTTTATATGAACC
<i>PbPLR7</i>	F: AAGCAAGCAGTCAAAACAACC; R: AAAGAAGCCTACGGCATGG
<i>PbPLR8</i>	F: GTCGCCGGAACCACTTG; R: AGTTATTTGGTAAACCAACCTTGA
<i>PbEF1α</i>	F: CATTCAAGTATGCGTGGGT; R: ACGGTGACCAGGAGCA

2 结果与分析

2.1 闽楠 PLR 家族成员鉴定

基于拟南芥 AtPrRs 蛋白序列，应用 BLAST 和 HMMER 3.1 软件在闽楠基因组中搜索 PLR 家族成员。利用 BLAST 在闽楠基因组中鉴定出 12 个候选 *PLR* 基因，通过 HMMER 3.1 鉴定出 10 个成员，去除重复和结构域鉴定后，共鉴定出 8 个 PLR 基因家族成员 (表 2)，按照其在染色体上位置命名为 *PbPLR1*~*PbPLR8*。

表 2 闽楠 PLR 基因家族的基本信息

Table 2 Basic information of PLR gene family in *P. bournei*

基因名称	平均分子量/kDa	等电点	起始位置	染色体位置	氨基酸数量/个
<i>PbPLR1</i>	35 441.98	5.90	82085409~82088341	chr01	336
<i>PbPLR2</i>	35 320.24	6.23	82091009~82098484	chr01	312
<i>PbPLR3</i>	35 378.05	6.32	111385794~111390362	chr02	312
<i>PbPLR4</i>	37 844.40	7.74	80076163~80082267	chr05	312
<i>PbPLR5</i>	35 378.05	6.32	81056124~81058143	chr05	284
<i>PbPLR6</i>	34 970.24	6.41	52893843~52901318	chr10	316
<i>PbPLR7</i>	34 910.23	6.10	52876836~52885817	chr10	316
<i>PbPLR8</i>	13 320.63	8.76	52801277~52802274	chr10	123

2.2 *PbPLR* 基因染色体定位与基因复制分析

PbPLRs 基因不均匀地分布在闽楠第 1、2、5 和 10 号染色体, 其中 10 号染色体上数目最多, 含 3 个 *PbPLRs* 成员, 2 号染色体仅 1 个成员。闽楠基因复制事件检测结果表明: *PbPLR1* 和 *PbPLR3* 经历了片段复制, 而 *PbPLR1* 和 *PbPLR2* 以及 *PbPLR6*、*PbPLR7* 和 *PbPLR8* 经历了串联复制。

2.3 *PbPLR* 基因结构及蛋白保守基序的分析

利用 GSDS 软件绘制 *PbPLRs* 基因结构图 (图 1A) 可见: 8 个 *PbPLRs* 均含有至少 2 个外显子, 其中 *PbPLR2*、*PbPLR3*、*PbPLR4* 和 *PbPLR7* 各含 4 个外显子, 每个成员均有内含子。

对 *PbPLR* 蛋白序列进行保守基序 (Motif) 分析, 共检测到 14 个保守基序 (图 1B)。多序列比对分析发现: *PbPLRs* 都具有保守的 NADPH 结合位点和赖氨酸 (Lys) 活性位点 (图 1C), *PbPLR1* 含有特异 Motif 11、Motif 13 和 Motif 14; *PbPLR 6* 和 *PbPLR 8* 含有特有的 Motif 10。

2.4 *PbPLR* 家族系统进化分析

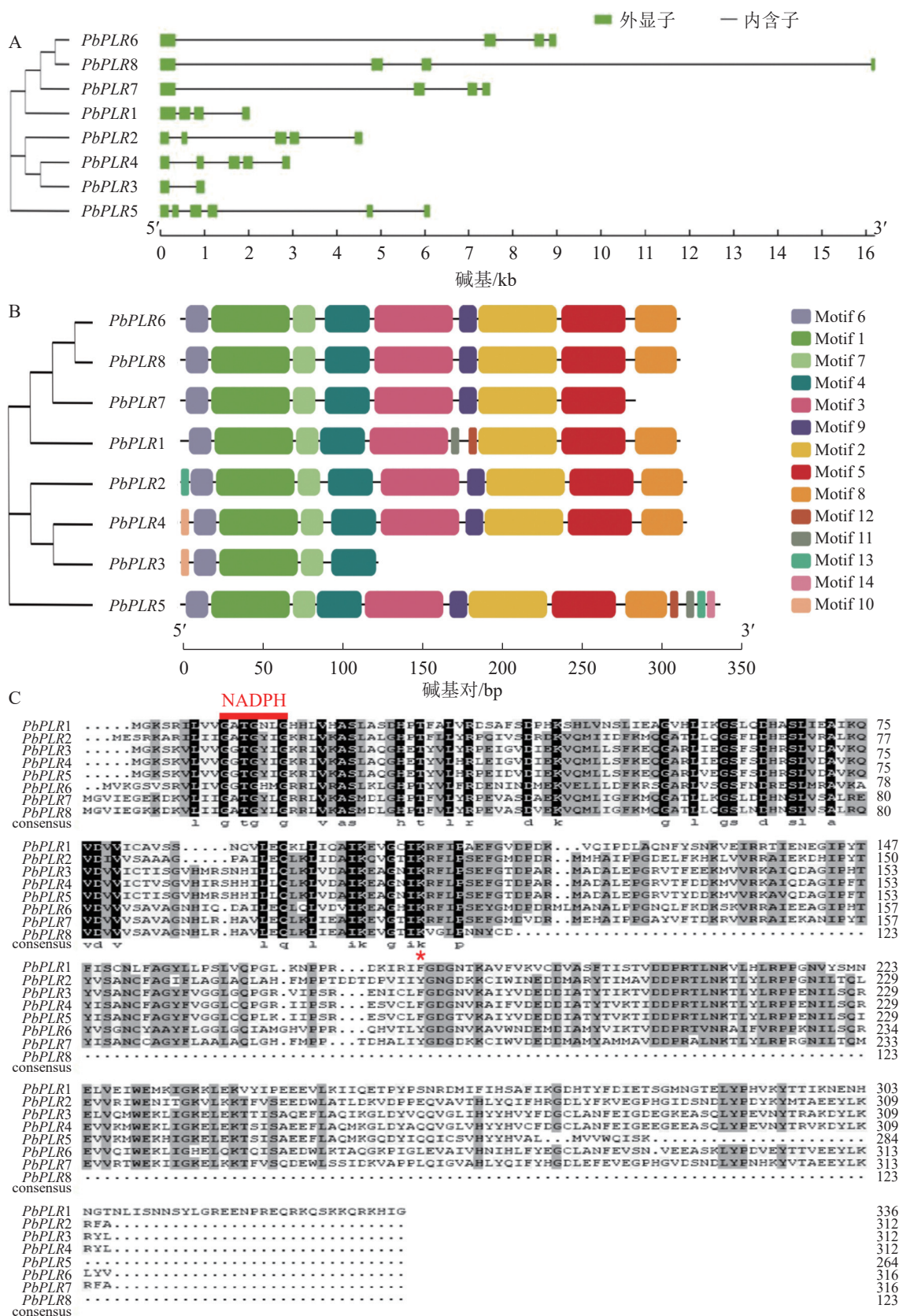
为研究 *PbPLRs* 家族的进化关系并预测其催化酶功能, 选取裸子植物台湾杉、北美乔柏, 以及被子植物拟南芥、连翘和亚麻等物种的 PLR 蛋白序列构建系统进化树 (图 2)。系统进化分析表明: 裸子植物的台湾杉 *TcPLRs* 和北美乔柏 *TpPLRs* 属同一分支, 即裸子植物和被子植物 PLRs 不论其底物立体选择性如何, 均可分为 2 分支群^[17-20]。然而, 被子植物 PLRs 根据其底物立体选择性而分属不同支群, 根据位于同一分支的 *LcPLR1*、*LaPLR1* 和 *LuPLR2* 的底物偏好, 推测 *PbPLR1*、*PbPLR6*、*PbPLR7* 和 *PbPLR8* 偏好 (+)-松脂醇 [(+)-pinoresinol] 和 (+)-落叶松脂醇 [(+)-lariciresinol]; 而 *PbPLR2*、*PbPLR3* 和 *PbPLR4* 同属于一个小分支, 与偏好 (-)-松脂醇和 (-)-落叶松脂醇的 *LuPLR1* 和偏好 (+)-松脂醇和 (-)-落叶松脂醇的 *LpPLR1* 亲缘关系较近, 推测 *PbPLR2*、*PbPLR3* 和 *PbPLR4* 可将 (-)-松脂醇还原为 (-)-落叶松脂醇。*PbPLR5* 与其他 PLR 成员亲缘关系较远, 不能预测其选择性。

2.5 *PbPLR* 基因顺式作用元件分析

启动子区域的顺式调控元件可能影响基因表达模式。分别提取 *PbPLR* 基因上游 2 000 bp 序列进行顺式作用元件分析, 发现启动子区域具多种类型响应元件 (图 3A), 主要包括激素响应元件如脱落酸 (ABA) 响应元件、赤霉素 (GA) 响应元件、茉莉酸甲酯 (MeJA) 响应元件和水杨酸 (SA) 响应元件, 与环境胁迫响应元件等, 对 *PbPLR* 基因启动子区的激素响应元件统计分析表明: *PbPLRs* 含有 5 种激素响应元件: 脱落酸、水杨酸、赤霉素、茉莉酸甲酯和生长素 (Auxin), 每个 *PbPLRs* 至少含有 2 个激素响应元件, 其中 *PbPLR2* 激素响应元件最多 (6 个), *PbPLR4* 仅 2 个 (图 3B)。在全部 *PbPLR* 启动子区域的响应元件中, 激素响应元件最多的是脱落酸 (9 个), 其次为赤霉素 (7 个), 生长素最少仅 2 个 (图 3C)。

2.6 不同激素处理下的 *PbPLR* 表达分析

应用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 反应检测了 ABA、SA 和 MeJA 处理后根、茎和叶中的 *PbPLRs* 基因的表达水平 (图 4~6)。结果表明: 8 个 *PbPLRs* 基因对 ABA、SA 和 MeJA 均有响应, 处理 1~48 h, 基因表达水平显著上调, 48 h 时达最高值, 之后上调幅度降低。其中, ABA 处理 48 h 后根部



A. 闽楠 *PbPLRs* 基因结构; B. 基因编码的结构域图; C. 多序列比对分析图。NADPH 结合位点以红色底线表示, 赖氨酸活性位点以红色星号表示

图 1 *PbPLR* 基因结构及蛋白保守基序分析

Figure 1 Analysis of *PbPLR* gene structure and protein conserved motifs

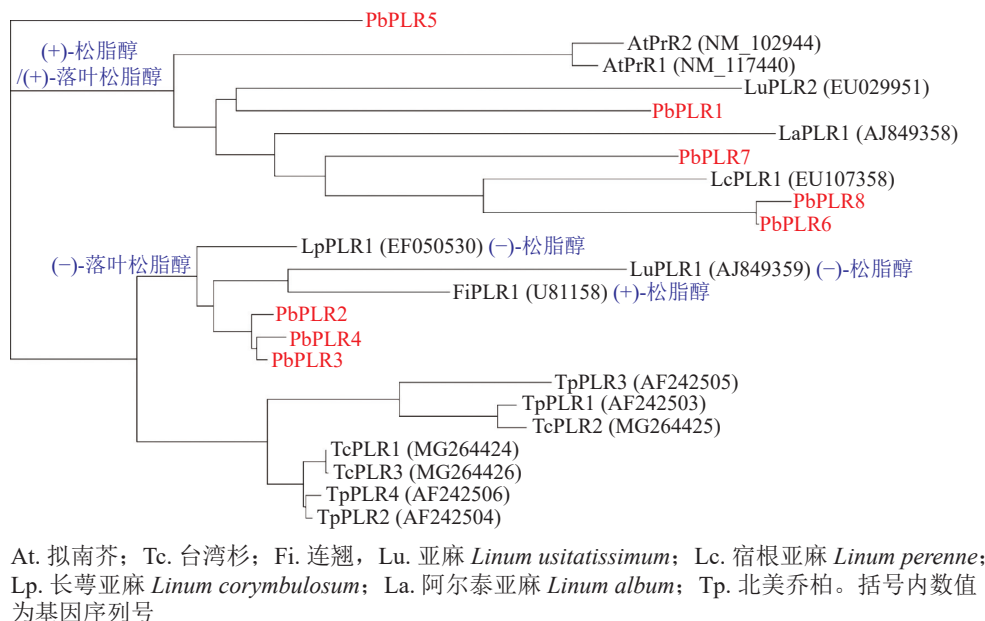


图 2 闽楠和多个物种的 PLR 家族系统发育树

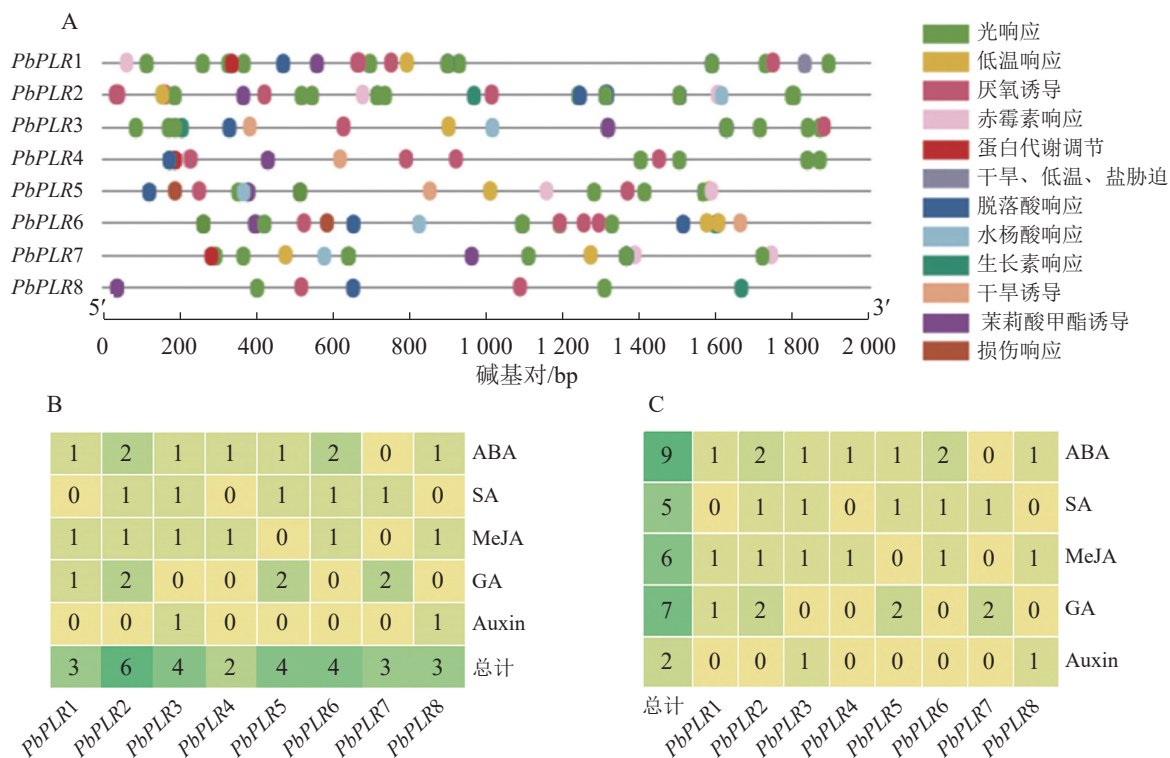
Figure 2 PLR family phylogenetic tree of *P. bournei* and several species

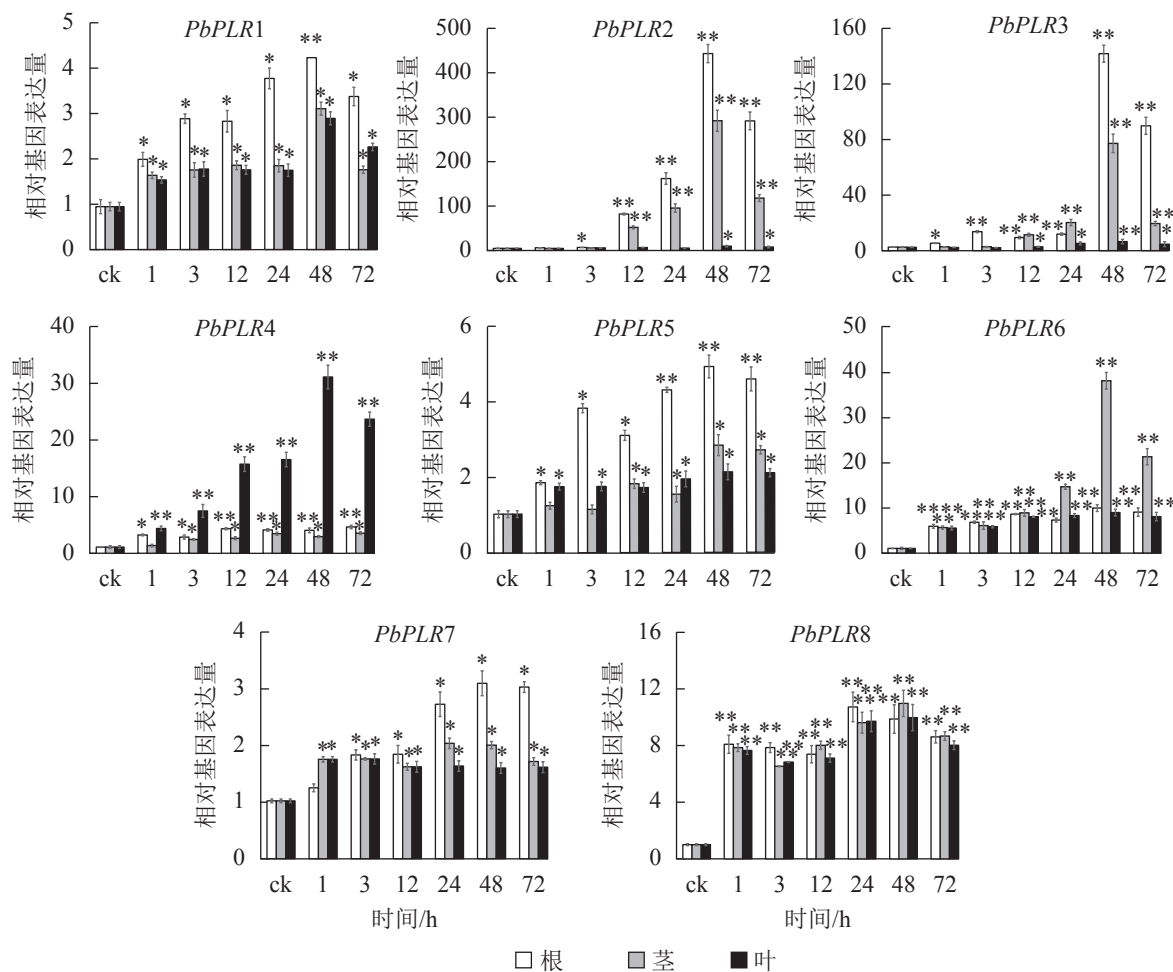
图 3 PbPLR 家族基因的顺式作用元件分析

Figure 3 Analysis of putative *cis*-elements in the promoter regions of PbPLRs

PbPLR2 表达量上调倍数最大, 为 ck 的 400 倍, 茎部表达水平上调为 ck 的 300 倍, 但叶片中表达上调不明显。相较于在根部和叶部, ABA 处理后的 *PbPLR6* 在茎部表达量上调倍数最大, 48 h 时的表达量上调倍数为 ck 的 35 倍; ABA 处理 48 h 后的 *PbPLR4* 在叶中上调倍数最大, 为 ck 的 30 倍 (图 4)。

SA 处理后, 根中 *PbPLR2* 表达量上调倍数最大, 为 ck 的 400 倍, *PbPLR6* 在根、茎、叶中均上调表达, 而 *PbPLR1*、*PbPLR4* 和 *PbPLR8* 上调倍数较低 (图 5)。

MeJA 处理 48 h 后, 根中 *PbPLR2* 表达量上调倍数为 ck 的 500 倍, 且茎中也达 400 倍; *PbPLR3* 在根中表达上调为 ck 的 140 倍 (图 6)。*PbPLR5* 对 MeJA 处理响应不明显, 茎和根中表达量上调幅度均较



* 表示与 ck 相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与 ck 相比差异极显著 ($P < 0.01$)

图 4 *PbPLRs* 基因在 ABA 处理下的表达模式

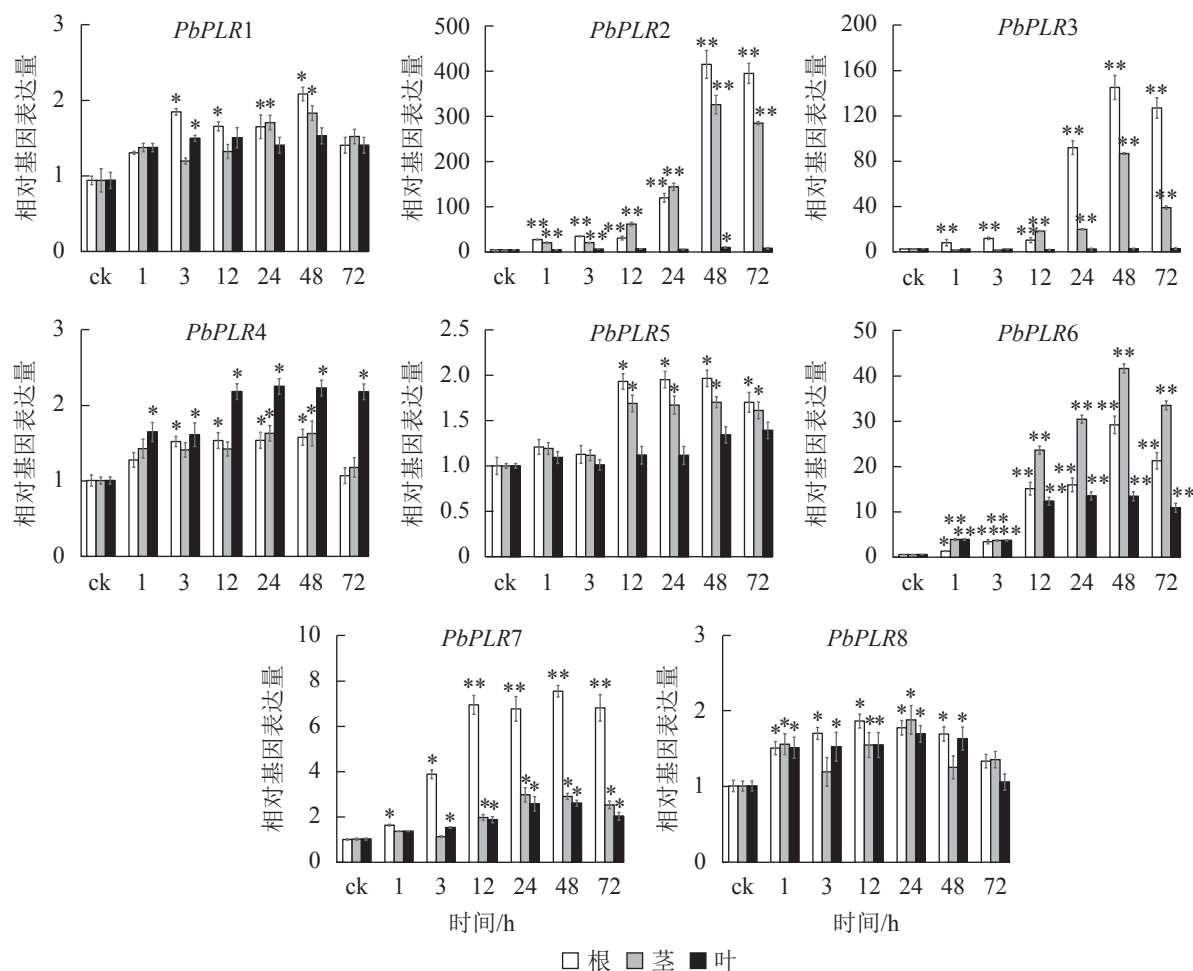
Figure 4 Expression patterns of *PbPLRs* under ABA treatment

低, 但 ABA(图 4) 和 SA(图 5) 处理后 *PbPLR5* 的表达量上调显著 ($P < 0.05$), 该结果与 *PbPLR5* 启动子区域含有的激素响应元件一致。

3 讨论

木脂素类化合物具有较为广泛的应用前景, PLR 作为植物木脂素生物合成的重要限速酶基因之一, 引起了广泛的关注。例如, 在亚麻中鉴定到 2 个 *PLR* 基因 (*LuPLR1* 和 *LuPLR2*)^[12], 模式植物拟南芥中共有 2 个 *PrR* 基因 (*AtPrR1* 和 *AtPrR2*)^[7], 台湾杉中发现了 3 个 *PLR* 基因 (*TcPLR1*、*TcPLR2* 和 *TcPLR3*) 等^[21]。本研究从闽楠基因组中共鉴定到 8 个 *PbPLRs* 基因, 不均等分布于闽楠的 4 条染色体上, 且均含有 *PLR* 家族保守的 NADPH 结合位点和赖氨酸活化位点。PLR 属于 short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) 超级家族, 该家族广泛参与植物初级代谢和次级代谢过程, 且在高等植物中具有明显功能分化^[22]。闽楠中数量较多的 *PLR* 成员可能参与不同代谢通路, 并发生功能分化。

利用不同物种 *PLR* 蛋白构建系统进化树, 发现裸子植物 *PLR* 蛋白单独聚为一类, 而被子植物 *PLR* 系统聚类与催化酶的立体选择性相关, 该结果与前人研究结果相一致。NAKATSUBO 等^[7] 发现被子植物 *PLR* (*FiPLR1*、*LaPLR1*、*LuPLR1*、*LpPLR1*、*AtPrR1* 和 *AtPrR2*) 和裸子植物 *PLR* (*TpPLR1* 和 *TpPLR2*) 分别聚类。*PLR* 催化酶的底物立体选择性直接决定了下游木脂素的结构骨架, 是形成木脂素类化合物结构多样性的关键节点。*PLR* 立体选择性最早是在金钟连翘 *Forsythia intermedia* 中发现, 功能研究发现 2 个 *FiPLR* 都偏好选择催化 (+)-松脂醇和 (+)-落叶松脂醇为 (-)-异落叶松脂醇^[9]。随后, 在其他物种中鉴定的 *PLRs* 同样具有明显立体选择性^[23]。拟南芥 *AtPrR1* 可催化 2 种松脂醇异构体, 而 *AtPrR2* 仅



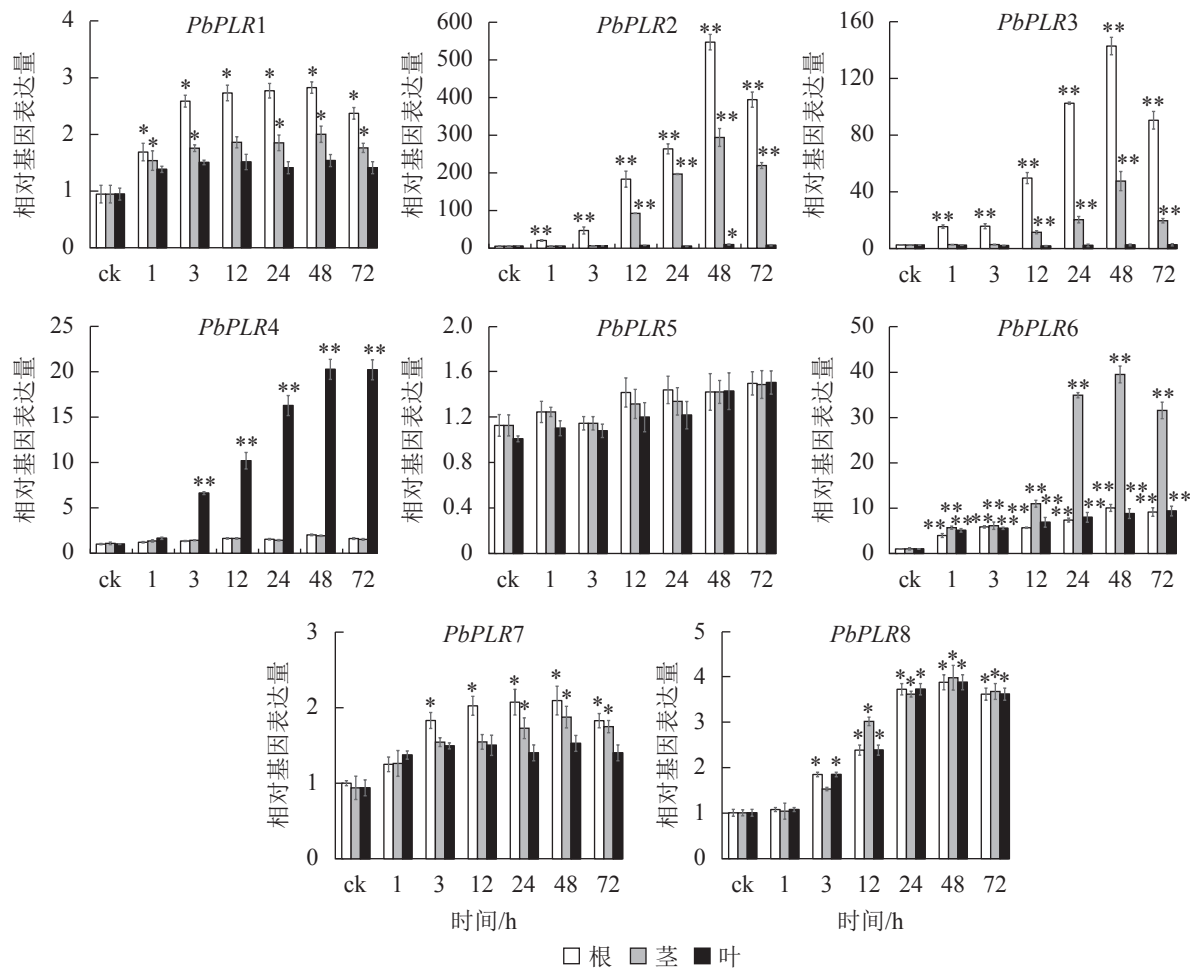
* 表示与 ck 相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与 ck 相比差异极显著 ($P < 0.01$)

图5 *PbPLRs* 基因在 SA 处理下的表达模式

Figure 5 Expression patterns of *PbPLRs* under SA treatment

能催化 (-)-松脂醇形成 (-)-落叶松脂醇^[7]。根据已有催化酶的功能研究,推测闽楠 *PbPLR1*、*PbPLR6*、*PbPLR7* 和 *PbPLR8* 偏好选择 (+)-松脂醇和 (+)-落叶松脂醇,而 *PbPLR2*、*PbPLR3*、*PbPLR4* 和 *PbPLR5* 聚类的 *PLR* 蛋白的立体选择性不同,无法通过系统进化树推测其底物偏好性。FUJITA 等^[24] 研究发现:北美乔柏的 *TpPLRs* 聚类为一个分支却具有相反的立体选择性。*PLR* 家族成员的蛋白序列差异与底物立体选择性并不完全等同,对底物的选择偏好性可能随物种共同经历多次进化;或形成于物种进化的早期,随后的碱基突变并不影响其催化功能^[25]。

通过启动子顺式作用元件分析发现:*PbPLR* 基因的启动子区域具有多种响应元件,推测 *PbPLR* 表达模式可能受生物及非生物因素调控。例如光响应、厌氧诱导、耐旱和防御等响应元件,推测 *PbPLR* 表达可能受光信号及非生物胁迫等因素影响,并通过次生代谢物的催化合成而参与植物防御系统。此外, *PbPLRs* 基因启动子区域具有多种激素响应调控元件,其中 ABA、MeJA 和 SA 等 3 种响应元件数目最多。不同物种 *PLR* 基因表达受不同激素调控。例如,ABA 处理下亚麻 *LuPLR1* 和菘蓝 *LiPLR1* 表达显著上调^[10, 12-13]; MeJA 诱导 *LuPLR2*、*liPLR1* 和鬼臼草 *Podophyllum hexandrum* *PhPLR* 表达量上调^[10, 25]; 而 GA 对 *LuPLR1* 表达起抑制作用^[21]。对 *PbPLR* 表达分析表明: *PbPLR* 对 ABA、MeJA 和 SA 均有响应,这与启动子元件分析相吻合。MeJA 处理下 *PbPLR2* 响应最显著,在处理 48 h 根部表达量最高; ABA 处理下 *PbPLR4* 响应最为显著,在处理 48 h 时叶片表达量最高; SA 处理下 *PbPLR6* 响应最为显著,在处理 48 h 时茎表达量最高。本研究表明: *PbPLR* 调控模式较为复杂,可能受不同植物激素诱导,同时 *PbPLRs* 组织特异性表达可能与其结构功能分化相关但与系统进化分支无关。推测闽楠木脂素合成具有较为复杂的调控网络,需进一步研究其生物合成调控机制。



* 表示与 ck 相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与 ck 相比差异极显著 ($P < 0.01$)

图 6 *PbPLRs* 基因在 MeJA 处理下的表达模式

Figure 6 Expression patterns of *PbPLRs* under MeJA treatment

4 参考文献

- [1] 金重为, 邵彪生, 尤纪雪. 天然耐腐木材的抗腐力及其在腐朽过程中化学成分的变化[J]. *林业科学*, 1989, **25**(5): 447 – 452.
JIN Zhongwei, TAI Diesheng, YOU Jixue. Decay resistance of natural durable species and the changes in amounts of major components during decay of wood by *Coriolus versicolor* and *Gloeophyllum trabeum* [J]. *Sci Silv Sin*, 1989, **25**(5): 447 – 452.
- [2] SCHULTZ T P, NICHOLAS D D, HENRY W P, *et al.* Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism [J]. *Wood Sci Technol*, 2005, **37**: 175 – 184.
- [3] 周妮, 齐锦, 王燕高, 等. 桢楠现代木和阴沉木精油化学成分的 GC-MS 分析[J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2015, **43**(6): 136 – 140.
ZHOU Ni, QI Jin, WANG Yangao, *et al.* GC-MS analysis of chemical components of essential oils from recent and ancient buried *Phoebe zhennan* woods [J]. *J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed*, 2015, **43**(6): 136 – 140.
- [4] 吴大荣, 朱政德. 福建省罗卜岩自然保护区闽楠种群结构和空间分布格局初步研究[J]. *林业科学*, 2003, **39**(1): 23 – 30.
WU Darong, ZHU Zhengde. Preliminary study on structure and spatial distribution pattern of *Phoebe bournei* in Luoboyan Nature Reserve in Fujian Province [J]. *Sci Silv Sin*, 2003, **39**(1): 23 – 30.
- [5] STIRLING R, MORRIS P I. Potential contributions of lignans to decay resistance in western red cedar [J]. *Wood Sci Technol*, 2016, **50**: 399 – 412.

- [6] 贾贤, 黄秋生, 刘光华, 等. 我国楠木资源的研究现状[J]. *中国园艺文摘*, 2014, **30**(10): 55 – 59.
JIA Xian, HUANG Qiusheng, LIU Guanghua, *et al.* Research status of *Phoebe* resources in China [J]. *Chin Hortic Abstr*, 2014, **30**(10): 55 – 59.
- [7] NAKATSUBO T, MIZUTANI M, SUZUKI S, *et al.* Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283**(23): 15550 – 15557.
- [8] DINKOVA-KOSTOVA A T, GANG D R, DAVIN L B, *et al.* (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia* [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(46): 29473 – 29482.
- [9] CHU A, DINKOVA A, DAVIN L B, *et al.* Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia* [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(36): 27026 – 27033.
- [10] XIAO Ying, JI Qian, GAO Shouhong, *et al.* Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that *LiPLR1* plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica* [J]. *J Exp Bot*, 2015, **66**(20): 6259 – 6271.
- [11] von HEIMENDAHL C B I, SCHAFER K M, EKLUND P, *et al.* Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereo specificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum* [J]. *Phytochemistry*, 2005, **66**: 1254 – 1263.
- [12] RENOUEARD S, CORBIN C, LOPEZ T, *et al.* Absciscic acid regulates pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol accumulation in developing fax (*Linum usitatissimum* L.) seeds [J]. *Planta*, 2012, **235**: 85 – 98.
- [13] CORBIN C, RENOUEARD S, LOPEZ T, *et al.* Identification and characterization of cis-acting elements involved in the regulation of ABA- and/or GA-mediated *LuPLR1* gene expression and lignan biosynthesis in fax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures [J]. *J Plant Physiol*, 2013, **170**(5): 516 – 522.
- [14] MIN T, KASAHARA H, BEDGAR D L, *et al.* Crystal structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(50): 50714 – 50723.
- [15] SUN Yanni, BUHLER J. Designing patterns and profiles for faster HMM search [J]. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 2009, **6**(2): 232 – 243.
- [16] LETUNIC I, BORK P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**: 493 – 496.
- [17] HEMMATI S, SCHMIDT T J, FUSS E, *et al.* (+)-Pinoresinol/(–)-lariciresinol reductase from *Linum perenne* Himmelszelt involved in the biosynthesis of justicidin B [J]. *FEBS Lett*, 2007, **581**: 603 – 610.
- [18] RICKLEFS E, GIRHARD M, URLACHER V B. Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (–)-pinoresinol via kinetic resolution[J/OL]. *Microb Cell Fact*. 2016, **15**: 78 [2022-01-20]. doi: 10.1186/s12934-016-0472-0.
- [19] HANO C, MARTIN I, FLINIAUX O, *et al.* Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing fax (*Linum usitatissimum*) seeds [J]. *Planta*, 2006, **224**: 1291 – 1301.
- [20] HEMMATI S, von HEIMENDAHL C B I, KLAES M, *et al.* Pinoresinol-lariciresinol reductases with opposite enantiospecificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L. [J]. *Planta Med*, 2010, **76**: 928 – 934.
- [21] CHIANG N T, MA Liting, LEE Y R, *et al.* The gene expression and enzymatic activity of pinoresinol-lariciresinol reductase during wood formation in *Taiwania cryptomerioides* Hayata [J]. *Holzforschung*, 2019, **73**(2): 197 – 208.
- [22] MOUMMOU H, KALLBERG Y, TONFACK L B, *et al.* The plant short-chain dehydrogenase (SDR) superfamily: genome-wide inventory and diversification patterns[J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2012, **12**: 219 [2022-02-25]. doi: 10.1186/1471-2229-12-219.
- [23] MARKULIN L, CORBIN C, RENOUEARD S, *et al.* Pinoresinol-lariciresinol reductases, key to the lignan synthesis in plants [J]. *Planta*, 2019, **249**(6): 1695 – 1714.
- [24] FUJITA M, GANG D R, DAVIN L B, *et al.* Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 618 – 627.
- [25] CORBIN C, DROUET S, MATELJAK I, *et al.* Functional characterization of the pinoresinol-lariciresinol reductase-2 gene reveals its roles in yatein biosynthesis and fax defense response [J]. *Planta*, 2017, **243**: 405 – 420.