

青稞 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因 *4CL* 的克隆及表达分析

杨晓云^{1,2}, 杨智敏¹, 罗小娇^{1,3}, 孔德媛¹, 袁金娥¹, 刘新春¹, 冯宗云¹

(1. 四川农业大学农学院大麦青稞研究中心, 四川成都 611130; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014; 3. 泸州市农业局, 四川泸州 646000)

摘要: 为了进一步了解 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate: CoA ligase; 4CL)基因在黄酮合成中的作用, 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得了青稞 *4CL* 基因(*Hv4CL*)的 cDNA 全长序列, 并利用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术, 对该基因在青稞 4 个胚乳发育时间段茎、叶和花中的表达情况进行研究。结果表明, *Hv4CL* 基因 cDNA 序列全长 2 107 bp, 该序列包含一个完整的开放阅读框(ORF, 1 662 bp), 编码 553 个氨基酸。Hv4CL 与小麦同源性最高(96%), 且该蛋白序列中包含 2 个保守的 box, 即 AMP 结合盒: box I (SSGTTGLPKGV) 和 box II (GEICIRG)。qRT-PCR 分析结果表明: *4CL* 基因在青稞不同发育时期、不同组织的表达丰度不同, 在茎中表达量最高, 其次是叶和籽粒。

关键词: 青稞; 黄酮; 4-香豆酸辅酶 A 连接酶; RACE; 表达模式

中图分类号: S512.3; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2014)12-1603-08

Cloning and Expression Analysis of 4-Coumarate: CoA Ligase Gene *4CL* in Hulless Barley

YANG Xiaoyun^{1,2}, YANG Zhimin¹, LUO Xiaojiao^{1,3},
KONG Deyuan¹, YUAN Jin'e¹, LIU Xinchun¹, FENG Zongyun¹

(1. Barley & Hulless Barley Research Centre, College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China; 3. Luzhou Agricultural Bureau, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: In order to further understand the role of 4-coumarate: CoA ligase (*4CL*) gene in flavonoids biosynthesis of barley, the full length cDNA encoding the *4CL* gene was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) in Qingke (hulless barley, *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.) and its expression was analyzed in different tissues (stem, leaf and flower) during 4 periods during endosperm development by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Sequence analysis indicated that the full-length cDNA of *4CL* was 2 107 bp, contained 1 662 bp in open reading frame (ORF) which encoded 553 amino acid residues. The deduced amino acid sequence contained two conserved boxes of the AMP binding box: box I (SSGTTGLPKGV) and box II (GEICIRG), which was most similar to *4CL* of wheat with 96% amino acid identity. The qRT-PCR results indicated that obvious differences in the expression level of the *4CL* gene were existed in different tissues at different developmental stages, and the expression level in stem was predominant, while the least in seeds, indicating that its expressive models in different tissues and organs of plant were different. The study could lay a

收稿日期: 2014-06-02

修回日期: 2014-09-16

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-05)

第一作者 E-mail: yangxiaoyun1987@163.com

通讯作者: 冯宗云 (E-mail: zvfeng49@126.com)

foundation to raise the content of flavonoids in barley by regulating the expression of *4CL* gene and provide reference to further investigate the expression models of *4CL* gene in different tissues and organs of plant.

Key words: Hulless barley; Flavonoids; 4-coumarate:CoA ligase; RACE; Expressive models

黄酮类化合物(Flavonoids)又称生物类黄酮(Bioflavonoids)或黄酮,是一类重要的天然次生代谢物,广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实等组织中^[1-3],影响花粉生育率、调节植物生长等^[4-5]。现代药理学研究表明,其还具有保肝、抗炎、抗菌、抗病毒、保护心血管等多种药理活性,是当前植物领域和医药领域中的研究热点^[6-7]。苯丙氨酸途径是黄酮类物质合成的重要阶段,包含相关多种酶的合成及大量的生化反应,因此成为黄酮类物质研究的重点^[8-9]。

4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4-coumarate:CoA ligase,4CL)位于苯丙烷类化合物生物合成途径的分支点上^[10],直接参与植物次生代谢物黄酮的合成,是连接苯丙烷代谢途径与木质素生物合成特异途径的关键酶,在木质素单体合成途径中为限速步骤^[11]。同时,其催化产物香豆酰辅酶 A 是查耳酮合成酶的底物,为类黄酮生物合成的第一步^[12]。Mansell 等^[13]首次从嫩柳枝的形成层中提取出 4-香豆酸 CoA 连接酶之后,对 4CL 的性质进行了详细的研究。Stuible 等^[14]对 4CL 蛋白质序列进行分析,发现在所有已知的 4CL 氨基酸序列中存在几个保守的多肽序列(motif),其中位于 N 端的肽基序列 box I (SSGTTGLPKGV)在 4CL 蛋白序列中几乎绝对保守,被认为是 4CL 催化反应中保守的 AMP 结合功能域。位于 C 端的肽基序列 box II (GEICIRG)在所有 4CL 中绝对保守,box II 主要存在于 4CL 酶蛋白中,可能为该酶的活性中心部分。

目前,已从多种植物中纯化或部分纯化得到了 4CL 酶蛋白,并已分离克隆到多种植物的 *4CL* 基因^[15]。裸大麦(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)也称青稞,是中国青藏高原重要的种质资源。目前,对青稞黄酮的研究主要集中在品种的传统选育、黄酮类化合物的分离提取^[16-17],以及作为保健食品的开发上^[18],而对青稞黄酮合成途径相关酶的研究较少。本实验拟通过对青稞黄酮合成关键基因 *4CL* 的克隆与时空表达模式的分析来研究 *Hv4CL* 基因的表达特性,可为 *4CL* 基因在植物不同组织器官的表达模式的进一步研究

及青稞黄酮的基因改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

青稞“94-19-1”受赠于甘肃省甘南藏族自治州农科所。材料水培至三叶一心期时,提取叶片总 RNA 用于 *4CL* 基因的克隆。提取种植于实验基地的青稞开花初期 4 个时期(开花后第 4、8、12、16 天)的茎、叶和籽粒样品的总 RNA 用于荧光定量分析。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

使用柱式植物 RNAout 提取试剂盒(北京天恩泽基因工程有限公司)提取总 RNA。用 DNase I 纯化处理后备用。其中,用于反转录(reverse transcription PCR, RT-PCR)和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术的第一链 cDNA 的合成按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)操作说明进行;5'RACE 和 3'RACE 的 cDNA 合成按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)的方法进行。

1.3 目的基因保守区的克隆

登录 GenBank 网站,参照稻属、黍属、天门冬目、栽培二棱大麦等 4CL 氨基酸序列的保守区域,用 Primer 5.0 设计简并引物 J4CLf: 5'-CAACGCCGTCCTCGG(A/C)CAGGG(G/C/A)TA(T/C)GG(G/A)AT-3'; J4CLr: 5'-TCGACGTAGCCGATGTC(T/G/C)CC(T/G)GTGTGCAGC-3'。

以 cDNA 第一链为模板进行 PCR,反应体系总体积为 30 μ L,包括引物各 2 μ L(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、模板 cDNA 2 μ L(25~40 μ g $\cdot$ mL⁻¹)、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 15 μ L、ddH₂O 9 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,54 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分离检测,并对目的条带进行回收、克隆、测序及分析。

1.4 5'RACE 和 3'RACE 的克隆

3' RACE 根据已获得的的目的基因保守区序列设计 3 条反向巢式 PCR 引物, GSP1: 5'-GTGCTGGCCATGTGCCTGGCGTTCG-3'; GSP2: 5'-CTCAAGATCGTCGACCCCGACACCG-3'; GSP3: 5'-CCTTAACGACCCAGAATCCACC AAG-3'。第一次 5'RACE 根据已获得的的目的基因保守区序列设计 3 条反向巢式 PCR 引物, GSP1-1: 5'-AACCTTTCATGATCTGCTCCCCG CG-3'; GSP1-2: 5'-CGAGGGAGGCGCCGGT GTCGGGGTC-3'; GSP1-3: 5'-CTTGACCTTG AACGGCTCCTTGCG-3'。第二次 5'RACE 根据第一次 5'RACE 测序结果设计 3 条反向巢式 PCR 引物 GSP2-1: 5'-ACATGACCATGCGG ATGGACGCG-3'; GSP2-2: 5'-GCCTGGG GGCTCTTGCGATCTC-3'; GSP2-3: 5'-GCA TGATCACCATCGCCGACCCG-3'。5'RACE 和 3'RACE 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 说明书进行操作。在 SMART Scribe™ 逆转录酶的作用下, 5'RACE 中以 5'-CDS primer 和 SMARTer II A oligo 为引物, 合成单链 cDNA, 分别以 UPM、5' GSP1 (GSP1-1、GSP1-2、GSP1-3) 和 UPM、5' GSP2 (GSP2-1、GSP2-2、GSP2-3) 为引物进行两次降落 PCR。3'RACE 以 oligo dT 为引物合成单链 cDNA, 以 UPM 和 3'GSP (GSP1、GSP2、GSP3) 为引物进行降落 PCR。

1.5 青稞 4CL 基因的克隆

用 DNAMAN 对保守片段、5'RACE 和 3'RACE 所得序列进行拼接得到 cDNA 全长, 跨 ORF 设计特异引物 4CLQf: 5'-ACACGCCCACTA ATCTAACCA-3'; 4CLQr: 5'-GAGCAGGAA GAACCAA CAACT-3'。以 4CLQf/4CLQr 为引物, 以青稞幼叶 cDNA 为模板进行青稞 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因序列的扩增。反应体系总体积为 25 μ L, 包括引物各 1 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、模板 cDNA 1 μ L (25~40 μ g $\cdot$ mL⁻¹)、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。利用电泳分离检测 PCR 产物后, 经回收、克隆及测序后, 对所得序列进行生物信息学分析。

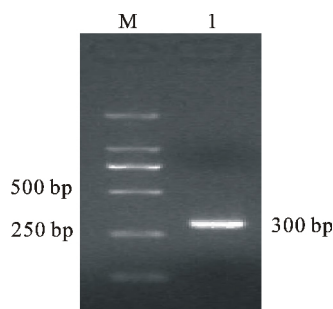
1.6 qRT-PCR 分析

根据 cDNA 全序列设计 4CL 荧光定量引物 Yf: 5'-GTTTCGCCAAGGAGCCGTT-3'; Yr: 5'-TGGTGGATTCTGGGTCGTT-3'。内参基因 β -actin 引物 ActF: 5'-TCACGCTCAAGTACC CCATCGA-3'; ActR: 5'-GGAGCTGTTCTTGG CAGTCTCCA-3'。内参基因 α -tubulin 引物 TubF: 5'-CTCCATGATGGCCAAGTGTG-3'; TubR: 5'-TGGAGATCATGCACACAGCC-3'。以各取样时间点的 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 扩增。反应体系: 第一链 cDNA 2 μ L (25~40 μ g $\cdot$ mL⁻¹), SYBR Rremix Ex Taq II (2 $\times$) (TaKaRa 公司) 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol $\cdot$ μ L⁻¹), 补水至总体积 25 μ L。每个样品的 4CL 的表达均以 β -actin 和 α -tubulin 为对照, 经过优化处理后, 4CL 基因的最佳反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 44 个循环; 随后进行熔解曲线分析, 温度以 1 $^{\circ}$ C/10 s 的速率从 60 $^{\circ}$ C 缓慢递增至 95 $^{\circ}$ C。扩增完成后, 启动融解曲线测试程序, 以此判断扩增过程特异性。qRT-PCR 过程中, 用 2 μ L 灭菌水代替 cDNA 样品作为阴性对照。每个样品 3 次重复。结果分析计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[19]。

2 结果与分析

2.1 青稞 4CL 基因的克隆

利用简并引物 J4CLf/J4CLr, 以青稞嫩叶的 cDNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到 300 bp 的目的片段 (图 1)。经 Blast 比对分析, 发现与已报道的 4CL 基因家族的保守区有较高的相似性, 其中与小麦的一致性达 95%, 将序列翻译成氨基酸序



M: DL 2000 (TaKaRa); 1: *Hv4CL* PCR 扩增产物

M: DL 2000 (TaKaRa); 1: The amplified product of the conserved sequence

图 1 *Hv4CL* 基因 cDNA 保守片段 PCR 产物

Fig. 1 PCR amplification of 4CL gene conserved sequence

列,其中包含4CL氨基酸保守域GEICIRG,初步确定获得的cDNA片段为青稞4CL基因的一部分序列。

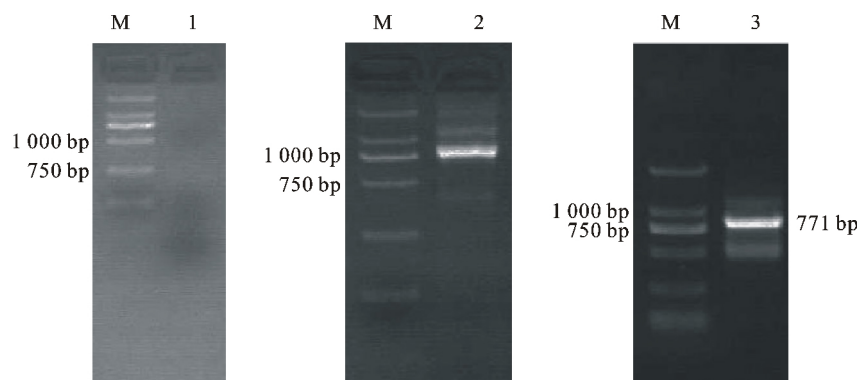
利用3′、5′GSP引物,经RACE-PCR分别克隆出4CL基因的3′末端和5′末端,3′末端771 bp(图2),包含终止密码子TAA、3′-UTR和Poly-A尾。5′末端两次扩增分别得到316 bp和949 bp的特异条带(图3),其中,5′末端第二次扩增序列包含起始密码子ATG和5′-UTR。用DNAMAN 5.0进行序列拼接,得到全长为2 107 bp的青稞4CL基因的cDNA序列,将该基因命名为*Hv4CL*(GenBank登录号:KF442977)。

为了进一步验证所拼接基因的正确性,使用特异引物4CLQF/4CLQR,以青稞幼叶cDNA为

模板扩增得到一段1 869 bp的特异片段(图4)。利用DNAMAN分析与原拼接全长序列一致,包含一个由ATG至TAA的完整ORF。以上结果表明,已成功获得青稞4CL基因。

2.2 *Hv4CL*基因的生物信息学分析

利用DNASTar软件对*Hv4CL*基因cDNA序列进行分析,该基因全长2 107 bp,包括156 bp的5′非编码区(5′-UTR),289 bp的3′非编码区(3′-UTR)和一个完整的开放阅读框(ORF)1 662 bp,该ORF编码553个氨基酸(图5)。氨基酸序列分析表明:*Hv4CL*编码蛋白质分子量为59.251 kDa,等电点(pI)为5.30,属酸性蛋白;在线网站<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>预测*Hv4CL*编码蛋白的功能结构域,结果

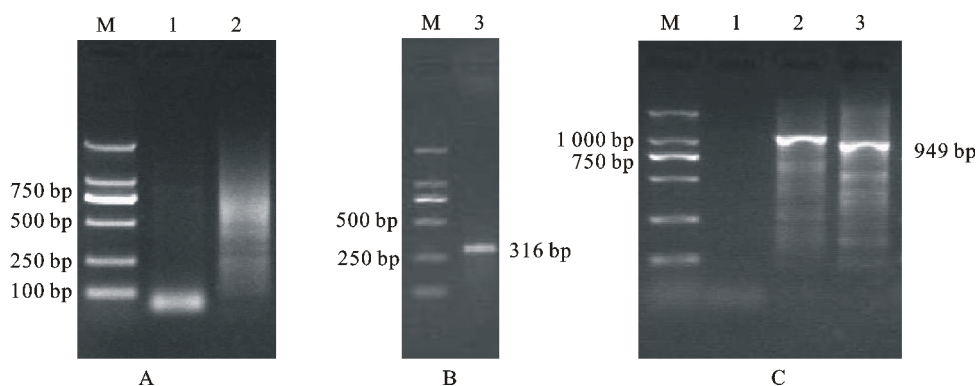


M:DL 2000(TaKaRa);1:第一轮扩增产物;2:第二轮扩增产物;3:第三轮扩增产物

M:DL 2000(TaKaRa); 1: The 1st round amplification; 2: The 2nd round amplification; 3: The 3rd round amplification

图2 *Hv4CL*3′RACE扩增产物的电泳图

Fig. 2 3′RACE PCR amplification of *Hv4CL*



A和B:第一次5′RACE扩增产物[M:DL 2000(TaKaRa);1:第一轮扩增产物;2:第二轮扩增产物;3:第三轮扩增产物];C:第二次5′RACE扩增产物[M:DL 2000(TaKaRa);1:第一轮扩增产物;2:第二轮扩增产物;3:第三轮扩增产物]

A and B:The amplified products by the first 5′RACE[M:DL 2000(TaKaRa); 1:The 1st round amplification; 2:The 2nd round amplification; 3:The 3rd round amplification];C:The amplified products by the second 5′RACE[M:DL 2000(TaKaRa); 1:The 1st round amplification; 2:The 2nd round amplification; 3:The 3rd round amplification]

图3 *Hv4CL*5′RACE扩增产物的电泳图

Fig. 3 The 5′RACE PCR amplification of *Hv4CL*

2.3 青稞与其他物种 4CL 蛋白的进化关系

利用 MEGA 5.0 软件对 *Hv4CL* 序列对应的蛋白序列和 GenBank 中其他物种的 20 个 4CL 蛋白序列进行系统进化树的构建(图 6)。分析表明,该进化树主要分为 2 个亚簇—Cluster I (单子叶植物)和 Cluster II (双子叶植物)。如图 6 所示,青稞与禾本科的短二柄草、水稻、柳枝稷、蒺藜草和玉米处在同一进化节点上,构成一个分支,表明它们之间的同源关系较为相近,而与双子叶植物如百合等的亲缘关系较远。各物种 4CL 的分子进化地位与其他生物学分离一致,因而得到的系统进化树反应了上述物种进化关系的远近。

2.4 *Hv4CL* 基因的组织特异性表达

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析计算结果,将开花后第 4 天籽粒中 4CL 基因的表达量作为对照(设定为 1),分析青稞材料 94-19-1 的 4 个胚乳发育时间段籽

粒、茎、叶的 4CL 基因表达量。结果显示, *Hv4CL* 基因在胚乳发育期的茎、叶、籽粒中均有表达,且存在组织差异性;在茎中表达量最高,叶次之,籽粒中表达量最少(图 7)。在茎中, *Hv4CL* 基因的表达量随发育过程的进行而逐渐升高,并且在开花 12 d 到 16 d 的过程中,表达水平急剧上升。在叶中, *Hv4CL* 基因在开花后 4 d 到 12 d 的过程中,表达量先降后增,在开花后 12 d 达到最大值,而后在开花后 16 d 开始降低。而在籽粒中, *Hv4CL* 基因在开花后 4 d 有较低的表达量,而随着发育的进行表达量越来越低,这表明青稞籽粒中的 4CL 表达较早,或者青稞籽粒中的 4CL 基因表达水平较低以致于不能被检测到。总体而言, *Hv4CL* 基因在青稞茎中优势表达,且在开花后 16 d 表达量达到绝对优势。

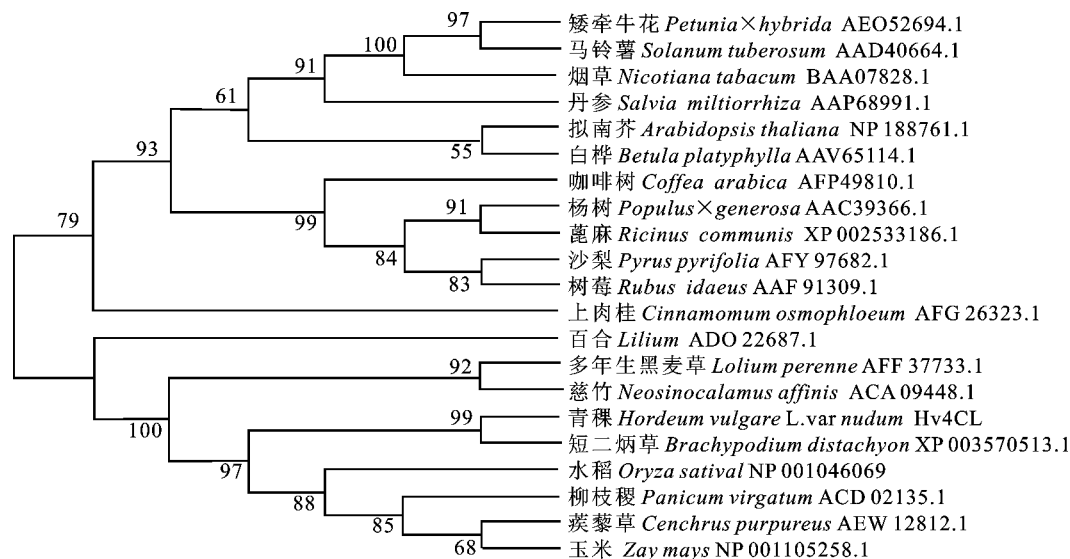


图 6 基于氨基酸序列的 4-香豆酸辅酶 A 连接酶进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the amino sequences of 4-ceoumarate: CoA ligase in plants

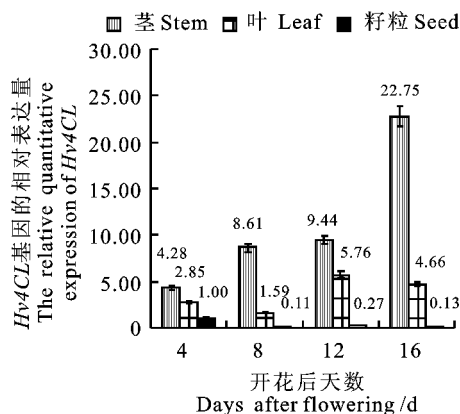


图 7 *Hv4CL* 基因 QRT-PCR 相对定量分析

Fig. 7 Relative qualitative expression of *Hv4CL* in different tissues by QRT-PCR

3 讨论

有关 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)基因克隆和遗传转化方面的研究在拟南芥^[20]、紫草^[21]、大豆^[22-23]、杨树^[24-26]等植物中已有相关报道。但对大麦而言,有关 4CL 基因克隆的研究未见报道。本研究参照禾本科其他物种的 4CL 序列的保守区设计简并引物,通过 RT-PCR 结合 RACE 方法成功获得了青稞 4-香豆酸辅酶 A 连接酶的全长 cDNA 序列 *Hv4CL*。

序列比对发现所获序列与禾本科其他物种的 4CL 序列相似性较高且非常保守,通过系统进化树可知, *Hv4CL* 对应的蛋白序列与禾本科的短二

柄草、水稻、柳枝稷、蒺藜草和玉米处在同一进化节点上,构成一个分支,表明它们之间的同源关系较为相近。

青稞 4CL 蛋白含有预测的 Amp-binding 保守结构域 box I 和催化活化中心 box II,是典型的 4CL 蛋白。这与 Lee 等^[27-28]研究的拟南芥 4CL 基因和 Zhang 等^[29]克隆的火炬松 4CL 基因的结果相一致。其中,box I 被认为是 4CL 催化反应中高度保守的 AMP 结合功能域,同时也是所有腺苷酸形成酶以及肽合成酶等共同的保守域,是腺苷酸形成酶系超基因家族的重要标志^[30]。而 box II 只在 4CLs 中高度保守,最早研究认为 box II 基序的中央半胱氨酸残基直接参与催化^[31]。后来 Stuible 等^[32]通过对拟南芥 4CL2 八个突变体的研究表明 box II 并不直接参与催化,可能与蛋白质空间构象稳定性有关。同时也表明了 4CL 与其他腺苷酸形成酶的亲缘关系较近。

此外,qRT-PCR 分析发现,*Hv4CL* 基因在胚乳发育期不同组织的表达量也不同。另外在同一时期内,不同组织内的表达量亦有较大差异。说明 *Hv4CL* 基因可能在不同组织中参与不同的生物合成途径,产生不同的苯丙烷类衍生代谢物。在茎和叶中,*Hv4CL* 的表达量在发育阶段的后期表达量增加,这与 Raes 等^[33]的研究结果一致。有研究表明,UV-B 增强可诱导植物细胞黄酮类物质的积累^[34-35]。因此 *Hv4CL* 在植物受到太阳紫外线照射的部位(茎和叶)表达量显著增加,其原因可能是茎和叶表面积较大直接受到 UV-B 的照射而启动代谢通路产生更多的黄酮来抵御紫外光的伤害^[36-37]。而在籽粒中,*Hv4CL* 基因在开花后 4 d 有较低的表达量,而后表达量降低,这表明青稞籽粒在形成初期 4CL 表达量较少。这与余春磊等^[38]研究发现花后籽粒黄酮含量呈上升趋势结论一致。Kumar 等^[39]的研究也表明覆盆子在花发育的不同时期中,*Ri4CL3* 仅在完全成熟的花中表达,在果实的发育不同阶段中,*Ri4CL3* 在完全成熟的红色果实中表达量非常高。以上结果表明,4CL 基因在不同组织和不同发育阶段中存在差异性表达。*Hv4CL* 表达量的增加可以提高黄酮类物质的合成,其不同组织中的作用仍需进一步研究。

参考文献:

- [1]Koes R E,Quattrocchio F,Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution [J]. *BioEssays*,1994,16(2):123-132.
- [2]Zhang D F(张丹凤). Molecular cloning and characterization of isoflavone synthase gene from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University(福州:福建农林大学),2004(in Chinese with English abstract).
- [3]Parr A J,Bolwell G P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2000,80(7):985-1012.
- [4]Forkmann G,Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids [J]. *Biotechnology*,2001,12(2):155-160.
- [5]Stafford H A. Flavonoid evolution: an enzymic approach [J]. *Plant Physiology*,1991,96(3):680-685.
- [6]Xu W Y(徐文燕),Gao W W(高微微),He C N(何春年). The influences of environmental factors on flavonoid biosynthesis [J]. *World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica* (世界科学技术-中医药现代化),2006,8(6):68-72(in Chinese with English abstract).
- [7]Yang T(杨涛),Zeng Y W(曾亚文),Xiao F H(萧凤回),et al. Research progress on medicinal barley and its active substance [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报),2007,27(6):1154-1158(in Chinese with English abstract).
- [8]Zhao Y(赵越),Lu J(芦佳),Huang K Y(黄坤央),et al. Tandem expression of the key genes in phenylalanine biosynthesis pathway [J]. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯),2012,23(4):488-493(in Chinese with English abstract).
- [9]Peng Y S(彭玉帅),Wang R F(王如峰),Zhang L J(张陆军). Key enzymes and their regulatory factors involved in biosynthesis of anthocyanins [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药),2014,45(1):131-137(in Chinese with English abstract).
- [10]Zhao H Y(赵华燕),Wei J H(魏建华),Zhu Y R(宋艳茹). Advances in research on lignin biosynthesis and its genetic engineering [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学学报),2004,30(4):361-370(in Chinese with English abstract).
- [11]Wei H Y,Rao G D,Wang Y K,et al. Cloning and analysis of a new 4CL-like gene in *Populus tomentosa* [J]. *Forest Science and Practice*,2013,15(2):98-104.
- [12]Cukovic D,Ehlting J,Ziffle J A V,et al. Structure and evolution of 4-coumarate:co-enzyme A ligase (4CL) gene families [J]. *Biological Chemistry*,2001,382(4):645-654.
- [13]Mansell R L,Babbel G R,Zenk M H. Multiple forms and specificity of coniferyl alcohol dehydrogenase from cambial regions of higher plants [J]. *Phytochemistry*,1976,15(12):1849-1853.
- [14]Stuible H P,Büttner D,Ehlting J,et al. Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes [J]. *FEBS Letters*,2000,467(1):117-

- 122.
- [15] Fang C B(方从兵), Wan X C(宛晓春), Jiang L J(江昌俊). Progress in biosynthesis of flavonoids(Review) [J]. *Journal of Anhui Agricultural University* (安徽农业大学学报), 2005, 32(4): 498-504(in Chinese).
- [16] Zeng Y W(曾亚文), Yang T(杨涛), Pu X Y(普晓英), et al. Transformation of γ -aminobutyric acid, total flavones and alkaloids content in barley grains during germination process [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2012, 32(1): 135-139(in Chinese with English abstract).
- [17] Markhan K R, Mitchell K A. The mis-identification of the major antioxidant flavonoids in young barley(*Hordeum vulgare*) leaves [J]. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 2003, 58(1/2): 53-56.
- [18] Suganuma H, Inakuma T, Kikuchi Y. Amelioratory effect of barley tea drinking on blood fluidity [J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2002, 48(2): 165-168.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Ehrling J, Büttner D, Wang Q, et al. Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms [J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(1): 9-20.
- [21] Yazaki K, Ogawa A, Tabata M. Isolation and characterization of two cDNAs encoding 4-coumarate: CoA ligase in *Lithospermum* cell cultures [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1995, 36(7): 1319-1329.
- [22] Uhlmann A, Ebel J. Molecular cloning and expression of 4-coumarate: coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(4): 1147-1156.
- [23] Lindermayr C, Möllers B, Fliegmann J, et al. Divergent members of a soybean(*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(4): 1304-1315.
- [24] Hu W J, Kawaoka A, Tsai C J, et al. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1998, 95(9): 5407-5412.
- [25] Fan B Y(范丙友), Hu S Y(胡诗宇), Lu H(陆海), et al. Soluble prokaryotic expression of 4-coumarate: coenzyme A ligase from *Populus tomentosa* and enzyme activity of recombinant 4CL [J]. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), 2006, 28(2): 1-8(in Chinese with English abstract).
- [26] Voelker S L, Lachenbruch B, Meinzer F C, et al. Antisense down-regulation of 4CL expression alters lignification, tree growth, and saccharification potential of field-grown poplar [J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 874-886.
- [27] Lee D, Ellard M, Wanner L A, et al. The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate: CoA ligase(4CL) gene: stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(5): 871-884.
- [28] Lee D, Meyer K, Chapple C, et al. Anti-sense suppression of 4-coumarate: coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(11): 1985-1998.
- [29] Zhang X H, Chiang V L. Molecular cloning of a 4-coumarate: coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood [J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 65-74.
- [30] Fulda M, Heinz E, Wolter F P. The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal-map and is a new member of the AMP-binding protein family [J]. *Molecular and General Genetics*, 1994, 242(3): 241-249.
- [31] Lamb C J, Lawton M A, Dron M, et al. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack [J]. *Cell*, 1989, 56(2): 215-224.
- [32] Stuible H P, Kombrink E. Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate: coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(29): 26893-26897.
- [33] Raes J, Rohde A, Christensen J, et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(3): 1051-1071.
- [34] Xue H J(薛慧君), Yue M(岳明). Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plant secondary metabolite [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 2004, 24(6): 1131-1137(in Chinese with English abstract).
- [35] Fan C X, Hu H Q, Wang L H, et al. Enzymological mechanism for the regulation of lanthanum chloride on flavonoid synthesis of soybean seedlings under enhanced ultraviolet-B radiation [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(14): 8792-8800.
- [36] Soltani B M, Ehrling J, Hamberger B, et al. Multiple cis-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members [J]. *Planta*, 2006, 224(5): 1226-1238.
- [37] Zhou G(周龚), Wang Y F(王玉锋), Lou L Q(娄来清), et al. Cloning, characterization and spatio-temporal expression analysis of 4-coumarate: CoA ligase genes(4CL) in sweet Sorghum [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 2014, 37(3): 9-19(in Chinese with English abstract).
- [38] Yu C L(余春磊), Qi G C(齐国昌), Zhang G P(张鹏飞), et al. Studies on the accumulation of four major flavonoids after flowering in barley [J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2014, 34(2): 222-226(in Chinese with English abstract).
- [39] Kumar A E, Ellis B E. 4-Coumarate: CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution and expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(3): 327-340.