

细辛甲基丁香酚合成相关酶基因的克隆与序列分析

王 鹰, 杨 悦, 李 赫, 李 强, 王丽娟, 吴秀菊*

东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘 要: 目的 基于细辛转录组测序结果, 克隆甲基丁香酚合成相关酶基因, 了解相应的序列信息。方法 以细辛叶片为材料, 通过 RT-PCR 扩增得到苯丙氨酸裂解酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H)、4-羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶 (4CL)、肉桂醇脱氢酶 (CAD) 等基因的 cDNA 全长, 并进行生物信息学分析。结果 AhPAL、AhC4H、Ah4CL 和 AhCAD 基因的 ORF 长度分别为 2 157、1 278、1 623、1 071 bp, 编码 718、425、540、356 个氨基酸。4 种蛋白均具有各自的保守结构域。除 AhC4H 外, AhPAL、Ah4CL 和 AhCAD 与已报道的其它物种相应酶的氨基酸序列相似性都较高。结论 对细辛甲基丁香酚合成相关酶基因进行克隆和生物信息学分析, 为后续基因功能分析及甲基丁香酚生物合成调控机制的解析奠定基础。

关键词: 细辛; 甲基丁香酚; 基因克隆; 序列分析; 系统发生分析

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)14-3420-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.023

Cloning and sequence analysis of enzyme genes relevant to biosynthesis of methyl-eugenol in *Asarum heterotropoides*

WANG Ying, YANG Yue, LI He, LI Qiang, WANG Li-juan, WU Xiu-ju

College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Objective To clone the enzyme genes related with methyl eugenol synthesis and characterize the corresponding sequence information based on the transcriptome sequencing of *Asarum heterotropoides*. **Methods** RT-PCR was performed to obtain the full length cDNA of the phenylalanine lyase (PAL) gene, cinnamic acid-4-hydroxylase (C4H) gene, 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4CL), and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes by using young leaves as materials. The acquired enzyme genes were analyzed by bioinformatics. **Results** The ORF lengths of AhPAL, AhC4H, Ah4CL, and AhCAD were 2 157, 1 278, 1 623 and 1 071 bp, which respectively encoded 718, 425, 540, and 356 amino acids. Four proteins had respective conserved domains. The amino acid sequences of AhPAL, Ah4CL, and AhCAD were similar to those of other reported species except for AhC4H. **Conclusion** Four enzyme genes related with methyl-eugenol synthesis in *A. heterotropoides* were separated and analyzed using bioinformatics method. These results would lay the important foundation for functional analysis of corresponding genes and for elucidating the regulation mechanism of methyl-eugenol biosynthesis.

Key words: *Asarum heterotropoides* Miq.; methyl-eugenol; gene cloning; sequence analysis; phylogenetic analysis

细辛 *Asarum heterotropoides* Miq. 为马兜铃科细辛属多年生药用植物^[1], 又名北细辛、辽细辛、细参等, 主要分布于东北地区。由于过度采挖和生境破坏, 目前野生细辛的蕴储量较少, 导致临床用药紧张。细辛具有抗菌抗炎、解热镇痛、平喘祛痰等多种药理作用^[2], 其主要药用成分是以甲基丁香酚为主的挥发油^[3]。

甲基丁香酚是通过苯丙烷途径生成的次生代谢产物, 初级代谢产物苯丙氨酸依次在苯丙氨酸解氨酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase, EC: 4.3.1.24)、肉桂酸-4-羟化酶 (C4H, *trans*-cinnamate 4-monooxygenase, EC: 1.14.13.11)、4-羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶 (4CL, 4-coumarate-CoA ligase, EC: 6.2.1.12)、肉桂醇脱氢酶 (CAD, cinnamyl-alcohol

收稿日期: 2019-01-03

基金项目: 国家基础科学人才培养基金能力培养与科研训练项目 (J1210069); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目计划 (12531030); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项 (2012RFLXN003)

作者简介: 王 鹰 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源学。Tel: (0451)55190866 E-mail: m18845793851@163.com

*通信作者 吴秀菊 (1972—), 女, 教授, 研究方向为植物资源学。Tel: (0451)55190866 E-mail: xiujuwu@neau.edu.cn

dehydrogenase, EC: 1.1.1.195)、咖啡酸 3-*O*-甲基转移酶 (COMT, caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, EC: 2.1.1.68)、丁香酚合酶 (EGS, eugenol synthase, EC: 1.1.1.318) 等酶催化而生成^[4]。其中 PAL 是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶^[5], 在华细辛、金银花、夏枯草、姜黄等药用植物中已有报道^[6-9]。C4H 催化肉桂酸生成 4-香豆酸, 属于细胞色素 P450 氧化酶 (cytochrome P450, CYP450) 超家族, 现已从多种植物中克隆得到编码该酶的基因^[10-12]。4CL 是连接苯丙酸途径与木质素特异合成途径的关键酶, 4-香豆酸通过 4CL 生成 4-香豆酸 CoA。比对发现甲基丁香酚与木质素的合成途径基本一致, 只是经 CAD 催化合成松柏醇后才进入不同的代谢支路, 或合成木质素, 或合成丁香酚、甲基丁香酚^[13-15]。

目前有关细辛研究多集中在化学成分提取鉴定、药理作用及再生体系建立等方面^[16-18], 少有次生代谢产物合成调控的报道。本研究拟基于细辛不同部位的转录组测序结果, 筛选获得甲基丁香酚合成相关酶基因的序列信息, 以 RT-PCR 法克隆 AhPAL、AhC4H、Ah4CL、AhCAD 等酶基因, 并进行相应生物信息学分析, 为后续的基因功能分析及甲基丁香酚生物合成机制的解析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试细辛栽植于黑龙江省森林植物园药用植物园。取幼嫩叶片迅速置于液氮中冷冻, 于 -80 °C

保存用于总 RNA 的提取。

柱式植物 RNAout 试剂盒购于北京全式金基因科技有限公司, TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒购自海基生化科技有限公司; T3 载体购自北京全式金生物公司; Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒和 Axy Prep 质粒 DNA 小量试剂盒均购自欧米伽生物技术有限公司; 所需引物由哈尔滨博仕生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 根据北京全式金基因科技有限公司的柱式植物 RNAout 试剂盒说明书提取总 RNA, 以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 UV-240 紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。用 TIANScript Reverse Transcriptase 试剂盒按照说明书反转录为 cDNA。

1.2.2 cDNA 克隆 根据课题组前期获得的细辛根、根茎和叶转录组数据, 筛选到甲基丁香酚合成相关酶基因的 Unigene, 以 Primer 5.0 设计特异性引物 (表 1)。PCR 反应体系按照全式金 TopTaq 酶说明书操作, PCR 反应程序为 94 °C 变性 30 s, 相应退火温度 30 s, 72 °C 延伸 (1~2 kb/min), 共 35 个循环, 电泳回收后将回收产物连接到 Peasy-T3 载体上, 转入 DH5 α 感受态细胞, 在含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 平板上挑取阳性克隆, 进一步经菌液 PCR 和电泳检测验证后, 送交哈尔滨博仕生物公司测序。

表 1 细辛甲基丁香酚合成相关酶基因扩增引物信息

Table 1 Information of primers used in this study

目的基因	引物名称	退火温度/°C	引物序列 (5'→3')
AhPAL	AhPAL-F	54	CCTCATCCCATATCATTCT
	AhPAL-R		GTACAAATAGAGCCCCTAAA
AhC4H	AhC4H-F	56	TGAGAGTAGTAGCCACGCCC
	AhC4H-R		CCTCTAGGAACCTCTCCGGCC
Ah4CL	Ah4CL-F	57	TCTCTCTCTCTCTTAATTTGGCT
	Ah4CL-R		AATCCTTTCTTCTTTCTTTGTTCTT
AhCAD	AhCAD-F	57	ATGAGCAACTCCGATGGTGG
	AhCAD-R		TCAATGGAGGTTGCTACCTGC

1.2.3 生物信息学分析 利用 NCBI ORF Find (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 及 Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析序列的 ORF 和保守结构; 以 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) 进行结构域的三维同源建模; 以 Clustalx 进行氨基酸序列比对; 利用 MEGA 6.0 软件以邻接法

(neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 细辛幼叶总 RNA 质量检测

以细辛叶片为材料提取总 RNA, 利用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。由图 1 可以看出, 28 S 和 18 S 2 条谱带清晰, 说明叶片总 RNA 具有较好的完整性。另外 A_{260}/A_{280} 为 1.93, A_{260}/A_{230} 为 2.10, 因

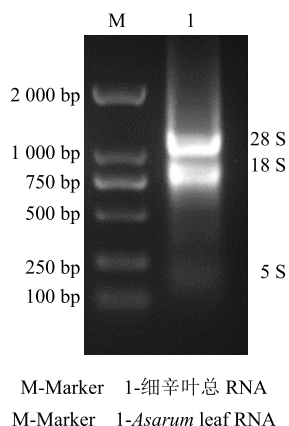


图 1 细辛叶片总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoretic detection of RNA isolated from *A. heterotropoides* leaves

此提取的总 RNA 可以用于后续研究。

2.2 AhPAL、AhC4H、Ah4CL、AhCAD 基因克隆

以细辛叶片总 RNA 反转录所得到的 cDNA 为模板,用相应引物(表 1)进行 PCR 扩增。产物经电泳检测,均获得清晰的单一条带,大小在 1 000~2 000 bp(图 2)。测序后经氨基酸序列分析,结果表明这些扩增片段为 AhPAL、AhC4H、Ah4CL、AhCAD 基因的 cDNA 全长,相应的 GenBank 登录号为 MH018853、MH051558、MH051559、MH051560,长度分别为 2 157、1 278、1 623、1 071 bp。

2.3 生物信息学分析

2.3.1 相关酶基因编码蛋白的特性分析 4 个酶基因编码蛋白的基本特性如表 2 所示。由表 2 可知, PAL、4CL 和 CAD 基因编码的蛋白均偏酸性,具有

表 2 细辛甲基丁香酚合成相关酶的基本特性

Table 2 General characteristic of related enzymes

酶	氨基酸残基	相对分子质量	等电点	不稳定指数	疏水性平均值
PAL	718	78770	4.86	37.06	-0.162
C4H	425	49090	9.15	44.23	-0.247
4CL	540	58670	5.70	34.11	0.042
CAD	356	38250	6.02	35.67	0.000

较好的稳定性,但 C4H 基因编码的蛋白偏碱性,为不稳定性蛋白。由疏水系数可以看出 PAL、C4H、CAD 为亲水性蛋白,而 4CL 为疏水性蛋白。

2.3.2 蛋白的三级结构特征分析 以 SWISS-MODEL 在线软件进行 4 种蛋白三级结构的预测(图 3),其中 AhPAL 与 Ah4CL 分别以欧芹 *Petroselinum crispum* Mill. 和烟草 *Nicotiana tabacum* L. 为参考模板构建,同源性分别为 81.59% 和 79.21%,AhC4H 与 AhCAD 均按照细胞色素 P450 2C9 及山杨 *Populus davidiana* Dode 的 CAD 构建。此外,AhPAL、Ah4CL、AhC4H、AhCAD 的全球性模型质量评估(GMQE)分别为 0.89、0.87、0.63 和 0.78,说明建立的 4 种蛋白三维模型均较可靠。

2.3.3 氨基酸序列比对及系统进化树分析 多重序列比对(图 4)结果表明 PAL、C4H、4CL、CAD 均具有特定的保守结构域,其中 PAL 含有苯丙氨酸和组氨酸解氨酶的标志性模式;C4H 具有 P450 保守结构域,即富含脯氨酸的保守区;4CL 负责催化木质素合成途径中 4-香豆酸和辅酶 A 的连接,具有 AMP 结合功能域和催化活性区域;CAD 则具有木质素单元结合位点。进一步比对发现细辛与华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的 PAL 和 CAD 同源性均高达 99%,AhPAL 与 AsPAL 仅有 2 个氨基酸差异(第 236 个氨基酸 AhPAL 为苏氨酸 T,AsPAL 为丙氨酸 A;第 716 个氨基酸 AhPAL 为异亮氨酸 I,AsPAL 为甲硫氨酸 M),AhCAD 与 AsCAD 仅在第 59 个氨基酸位置有差异,其中 AhCAD 为缬氨酸 V,AsCAD 为丙氨酸 A。利用 MEGA 6.0 分别构建了 PAL、C4H、4CL 和 CAD 系统进化树(图 5)。结果显示,AhPAL 与华细辛 AsPAL(ASH96760.1)聚在一起,亲缘关系最近,与野蕉(BAG70992.1)和土肉桂(AFG26322.1)的相似性高达 86%(图 5-A);AhC4H 与其他物种的相似度不高(图 5-B);Ah4CL 仅与土肉桂(AFG26323.1)亲缘关系较近,相似性为 98%(图 5-C);AhCAD 与华细辛 AsCAD(AMB21218.1)亲缘关系最近,与其他物种亲缘关系较远(图 5-D)。

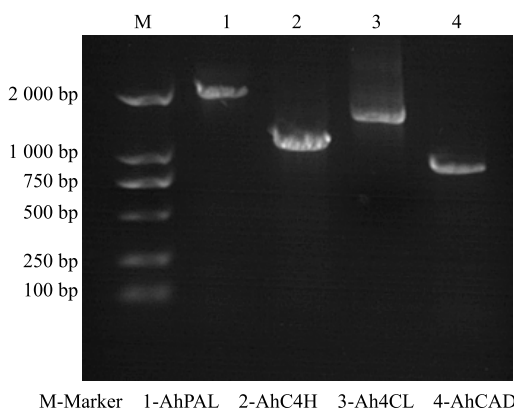


图 2 AhPAL、AhC4H、Ah4CL、AhCAD 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of AhPAL, AhC4H, Ah4CL, and AhCAD

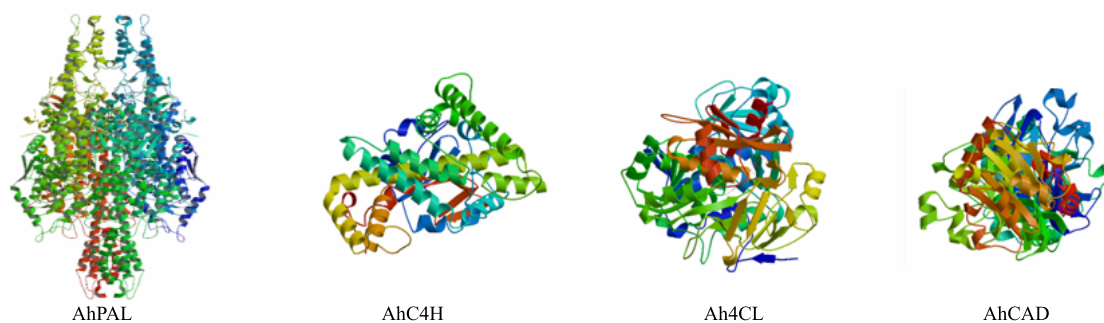


图 3 4 种蛋白三级结构预测

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of four proteins

VvPAL	171	EILEAITKLLNHNITECLPLRGTVTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVGPSGEVVNAEE
CsPAL	172	EILEAITKFLNKDITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVGPTGETLRPDE
PsPAL	172	EMLEAITKLLNHNITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVGPNCEPLSPAEE
AhPAL	179	EIMEAIALSLNHNITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVTADGKTIDATE
AsPAL	179	EIMEAIALSLNHNITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVTADGKTIDAAE
CoPAL	169	EILEAITSLNHSITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKATAPDGRVIDAVE
MbPAL	173	EILEAIALSLNNGITECLPLRGTTTASGDLVPLSYIAGILTGRPNKAVGPDCKVIGAAE
HcC4H	1	MDLLLLLEKVLISLFFETIIFAILVAKLRGKRYKIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
TcC4H	1	MDLLLLLEKALVSLFITVLLAILISKLRSKRFRIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
BnC4H	1	MDLLFVEKLLLSLFFATLLAIAVSKLRGRFRIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
LIC4H	1	MDLLLLLEKTLGLFFAAVVAIAVSKLRGKRFKIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
LeC4H	1	MDLLLLLEKALIGLFFSFITIAIVISKLRGKFKIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
SIC4H	1	MVMVMDLLLLLQKALFAIFFATILALISLSKFRGKKKIPPGPIPVPIFGNLQVGGDLNHR
AhC4H	1	MDLLLLLQKALLLFFASVIAAVVAKFRGKRFKIPPGPIPTPIFGNLQVGGDLNHR
Ah4CL	172	PEVEINADDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHRGQVTSVAQQVDGDNPNLYFHSEDEVLCVL
Co4CL	171	PEVDISDDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHKGLTTSVAQQVDGDNPNLYFKKEDVLCVL
Re4CL	180	PTVKINRDDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHRGQVTSVDQQVDGDNPNLYFHSEDEVLCVL
Vv4CL	180	PTVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHRGQVTSVAQQVDGDNPNLYFHSEDEVLCVL
Jr4CL	174	PAVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHKGLVTSVAQQVDGDNPNLYFHSEDEVLCVL
Bp4CL	174	PAVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHRGVTSVAQQVDGDNPNLYFHSGDEVLCVL
Mi4CL	176	PEVKINPNDVVALPYSSGTTGLPKGVM LTHKGLVTSVAQQVDGDNPNLYFHCEDVLCVL
Ah4CL	352	EIKSGSCGTVVRNAELKISDPEGTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATORTIDKD
Co4CL	351	EIKSGSCGTVVRNAELKIVDPEGTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATKMTIDKE
Re4CL	360	EIKSGSCGTVVRNAQMKIDDPDTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATERTIDKE
Vv4CL	360	EIKSGSCGTVVRNAQMKIDDPDTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATERTIDKE
Jr4CL	354	EIKSGACGTVVRNAEMKIVDPEGTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATERTIDKD
Bp4CL	354	EIKSGACGTVVRNAQMKIVDPEGTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATERTIDKD
Mi4CL	356	PIKPGACGTVVRNAEMKIVDPEGTGASLPRNQAGEICIRGQOIMKGYLNDPEATKRTIDSE
AhCAD	300	IGSVETETELDFWGEKGLTSMIEVVKMEYVVKAMERLEKNDVRYRFVLDVAGSNLH---
AsCAD	300	IGSVETETELDFWGEKGLTSMIEVVKMEYVVKAMERLEKNDVRYRFVLDVAGSNLH---
VvCAD	296	IGSMEETQELDFWAEKGLTSMIEIVKMDYVVKAFERMERSDVRYRFVVDVAGSNLE---
CpCAD	297	IGSMEETQELDFWAEKGLTSMIEIVKMDYVVKAFERMERKNDVRYRFVVDVAGSNLQEV
OeCAD	297	IGSMKDVQELDFWAGKGLTSMIEVVKMSYVVKAFERMERKNDVRYRFVLDVAGSNLE---
LiCAD	300	IGSMEETQELDFWAEKGLTSMIEIVTMDYVVKAMERLEKNDVRYRFVVDVAGSNLSP---
EgCAD	300	IGSMDETTEMLDFCEKGLTSMIEVVKMEQINEAMERLEKNDVRYRFVVDVAGSKLDP---

图 4 4 种蛋白的多重氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple alignment of amino acid sequences of four proteins

3 讨论

甲基丁香酚是细辛的主要药用成分，是经由苯丙烷途径合成的次生代谢产物。PAL 是苯丙素类生物合成途径第一步反应的关键酶，在维持植物结构、生长发育、抵抗病害、抵御紫外线等方面具有重要作用^[19-21]。本研究发现 AhPAL 编码的氨基酸

序列与其他物种具有很高的相似性，与 AsPAL 亲缘关系最近，推测 PAL 在进化过程中保持了足够的遗传稳定性和演化趋同性^[22-23]。

C4H 是植物苯丙烷代谢通路中的第 2 个关键酶，该酶在植物中的含量可以影响黄酮、木质素及芳香族类物质合成等多条代谢支路^[24-25]。AhC4H 具

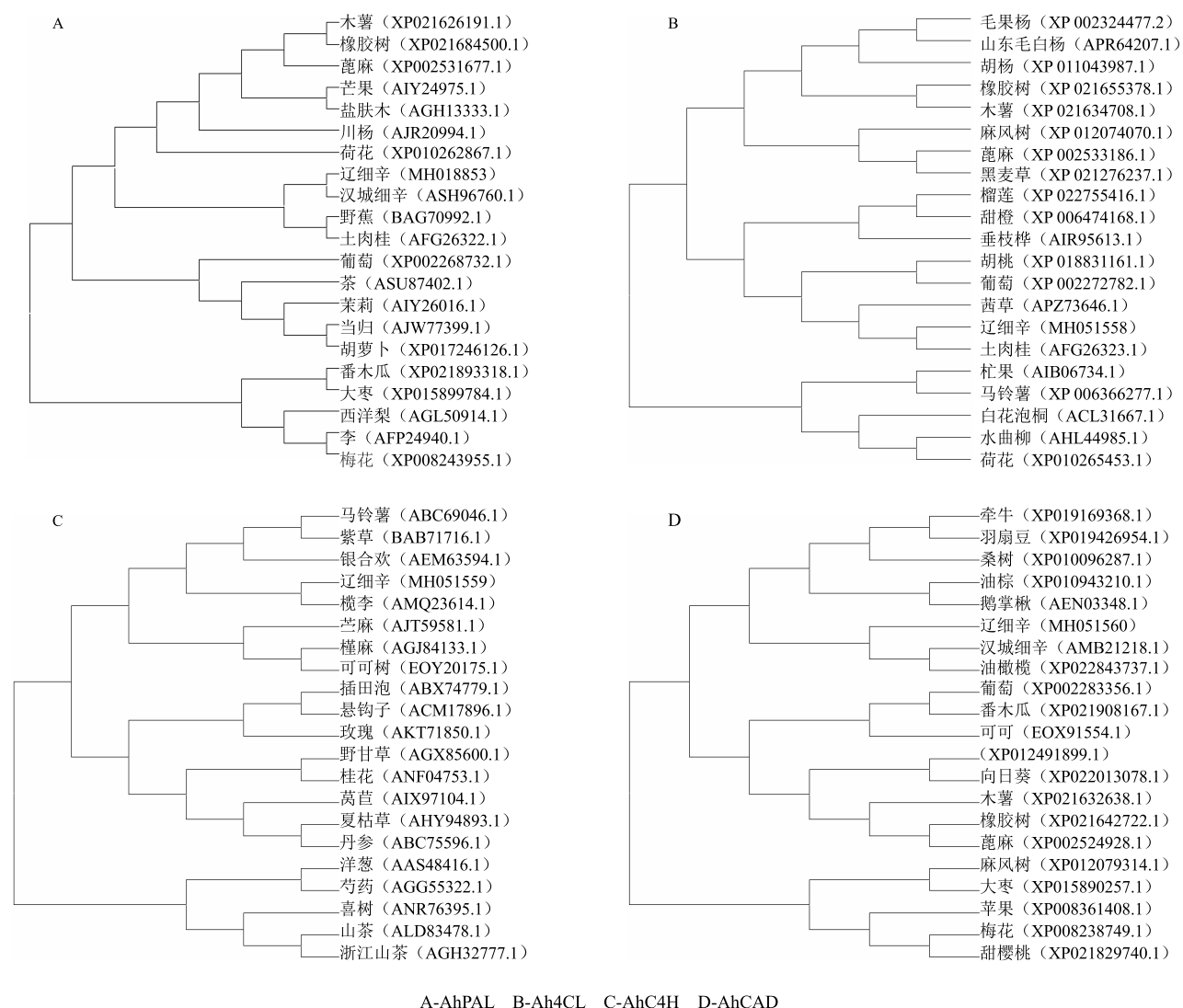


图 5 细辛与其他植物 PAL、C4H、4CL、CAD 的系统发生分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of PAL, C4H, 4CL, and CAD in *A. heterotropoides* and other plants

有 P450 的保守序列, 如富含脯氨酸的保守区 PPGPIPIP, 但氨基酸序列比对结果发现 AhC4H 蛋白与其他植物 C4H 蛋白的序列同源性不高, 有待于进一步验证。4CL 是木质素生物合成的关键酶之一, 位于苯丙烷代谢途径与木质素特异合成途径的转折点^[26-28], 属于腺苷酸形成酶家族。通过杨树 4CL 基因家族研究分析发现, 只有同时具有保守结构域 SSGTTGLPK 和催化活化中心 GEICIRG 的 4CL 基因才能够调控木质素的合成, 只具其一则参与黄酮类物质的合成^[29]。本研究获得的 Ah4CL 同时具有保守结构域 SSGTTGLPK 和催化活化中心 GEICIRG, 暗示 Ah4CL 主要参与木质素合成方向的代谢流。CAD 在植物生长发育、抵抗环境胁迫、抗病等方面具有重要作用, 已有研究多集中在木质素生物合成中的作

用^[30-31], 本研究发现 AhCAD 也具有木质素结合位点, 且与华细辛 AsCAD 亲缘关系最近。

实时荧光定量 PCR 结果表明, 本研究克隆的 4 个基因于细辛展叶期在叶中表达量均高于根中, 而华细辛在花期前和花期这些酶基因均为地下部分的表达量高于地上部分^[32], 推测是由于取样时期不同所致, 花期前后次生代谢产物甲基丁香酚可能主要在地下部分合成和积累, 具体原因有待研究。今后将进一步明确各酶的催化功能, 了解其在甲基丁香酚生物合成途径中的作用, 以期细辛代谢工程研究与应用奠定基础。

参考文献

- [1] Hwang S M, Lawrence M K, Michael G G. *Aristolochiaceae* [M]. 北京: 科学出版社, 2013.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Ramalingam M, Kim S J. Phytochemical, toxicological and pharmacological studies of *Asiasari Radix et Rhizoma* [J]. *Trop J Pharm Res*, 2015, 14(3): 545-554.
- [4] 赵晓冰. 华细辛肉桂醇脱氢酶基因 CAD 的克隆、表达分析和功能验证 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017.
- [5] 董艳珍. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2006(S1): 31-33.
- [6] 林懋怡, 郑柳, 刘晋杰, 等. 华细辛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 38-43.
- [7] Yuan Y, Wang Z Y, Jiang C, et al. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera japonica* and their substitutes [J]. *Gene*, 2014, 534(2): 408-416.
- [8] 许锋, 曹腾, 宁迎晶, 等. 夏枯草苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析 [J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 39-44.
- [9] 刘建福, 钟书淳, 王明元, 等. 姜黄苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3141-3148.
- [10] 曾祥玲, 郑日如, 罗靖, 等. 桂花 C4H 基因的克隆与表达特性分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(3): 525-537.
- [11] Chen Z, Tang N, You Y, et al. Transcriptome analysis reveals the mechanism underlying the production of a high quantity of chlorogenic acid in young leaves of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz. [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): 1-18.
- [12] 赵乐, 马利刚, 杨泽岸, 等. 独行菜 C4H 基因克隆与表达分析 [J]. 药学报, 2017, 52(5): 821-831.
- [13] 王丽华, 李杰勤, 詹秋文, 等. 高粱 SbCAD4 基因的克隆与序列分析及原核表达分析 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2015, 41(6): 595-601.
- [14] Wyrmbik D, Grisebach H. Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures [J]. *Eur J Biochem*, 1975, 59(1): 9-15.
- [15] 曹佳强, 李波, 杨洋, 等. 木质素生物合成中肉桂醇脱氢酶基因 (CAD) 的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2014, 12(5): 1034-1043.
- [16] 何朋, 刘思好, 王宏宇, 等. 北细辛叶柄愈伤组织的增殖培养及器官分化研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2341-2345.
- [17] 刘思好, 杨悦, 王鹰, 等. 北细辛悬浮培养体系的建立及优化 [J]. 草业科学, 2017, 34(11): 2254-2260.
- [18] Jing Y, Zhang Y F, Shang M Y. Chemical constituents from the roots and rhizomes of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* and the *in vitro* anti-inflammatory activity [J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 125-144.
- [19] Wong J H, Namasivayam P, Abdullah M P. The *PAL2* promoter activities in relation to structural development and adaptation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2012, 235(2): 267-277.
- [20] Wanner L A, Li G Q, Ware D, et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(2): 327-338.
- [21] 孙海燕, 全雪丽, 付爽, 等. 拟南芥苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 基因的研究进展 [J]. 延边大学农学学报, 2016, 38(1): 88-92.
- [22] 宋修鹏, 黄杏, 莫凤连, 等. 甘蔗苯丙氨酸解氨酶基因 (PAL) 的克隆和表达分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2856-2868.
- [23] Fukasawa-Akada T, Kung S D, Watson J C. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(4): 711-722.
- [24] Sykes R W, Gjersing E L, Foutz K, et al. Down-regulation of *p*-coumaroyl quinate/shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* leads to improved sugar release [J]. *Biotechnol Biof*, 2015, 8: 128-138.
- [25] Baek M H, Chung B Y, Kim J H, et al. cDNA cloning and expression pattern of cinnamate-4-hydroxylase in the Korean black raspberry [J]. *BMB Rep*, 2008, 41(7): 529-536.
- [26] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis [J]. *Annual Review Plant Biol*, 2003, 54(1): 519-546.
- [27] Whetten R W, Mackay J J, Sederoff R R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis [J]. *Annual Review Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49(49): 585-609.
- [28] 丁霄, 曹彩荣, 李朋波, 等. 植物木质素的合成与调控研究进展 [J]. 山西农业科学, 2016, 44(9): 1406-1411.
- [29] Cukovic D, Ehlting J, Vanaiffle J A. Structure and evolution of 4-coumarate: Coenzyme a ligase (4CL) gene families [J]. *Biol Chem*, 2001, 382(4): 645-654.
- [30] 史经昂, 张兵, 肖晓琳, 等. 结缕草肉桂醇脱氢酶基因家族全基因组序列鉴定和表达分析 [J]. 草业学报, 2017, 26(6): 111-119.
- [31] 朱金鑫, 孙金金, 原晓龙, 等. 巴拉圭瓜多竹 CAD 基因的克隆与分析 [J]. 西部林业科学, 2017, 46(1): 6-11.
- [32] 潘磊, 林懋怡, 赵晓冰, 等. 细辛苯丙素类化合物生物合成相关酶基因的挖掘及其表达分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 735-740.