

桉树基因组和功能基因组

沈君辉, 宋东亮, 赵运军, 李来庚*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

Eucalyptus Genomics and Functional Genomics

SHEN Jun-Hui, SONG Dong-Liang, ZHAO Yun-Jun, LI Lai-Geng*

Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

摘要: 本文就桉树基因组和功能基因组的研究进展作介绍。

关键词: 桉树; 基因组; 功能基因组; 林木改良

桉树起源于澳大利亚, 现在在亚洲、南美洲、欧洲和非洲均有种植, 是世界上种植面积最大的阔叶树种。目前世界桉树人工林的面积为 2 000 万公顷(陈少雄和吴志华 2008)。我国桉树人工林面积在 2006 年就已经达到 200 多万公顷, 是亚洲最大的桉树种植国(祈树雄 2006)。

桉树具有优良的遗传特性和生物性状。首先桉树种质遗传多样性高。迄今发现的桉属植物超过 700 种(Brooker 2000), 种内和种间的生物性状差异明显, 而且种间杂交现象普遍, 人工杂交容易, 杂种优势突出。其次桉树基因组相对较小(~650 Mbp), 这为桉树的基因组研究和分子操作提供了便利(Grattapaglia 和 Sederoff 1994)。第三, 桉树具有速生、纤维含量高和纤维质均一性好等特点, 可为木材生产、纸浆生产和生物能源制备提供大量和高质量的原材料。

在过去 20 年左右时间里, 速生人工林已成为生产木材和纤维材料的主要途径。采用 RFLP、AFLP、RAPD、SSR 等分子标记辅助育种方法培育出的新树种在生长速度、木材质量、抗逆性等方面的性状都得到了显著的提高, 极大提高人工林的生产效率(陈考科和黄少伟 2005; 欧阳乐军和曾富华 2008; Poke 等 2005; Grattapaglia 和 Kirst 2008)。但是进一步的提高还存在困难。随着现代基因组学研究的深入和转基因技术的发展, 桉树性状改良的空间也得到进一步扩大。美国能源部和日本的有关公司已启动了桉树基因组计划。这

将为人们了解桉树生长发育的遗传基础和改良桉树性状提供大量信息。本文就桉树基因组和功能基因组的研究进展作介绍。

1 桉树的基因组

桉树基因组的研究主要包括: 桉树基因组测序、大规模 EST 数据库的建立、桉树基因组表达谱的分析等。目前巨桉已被美国能源部联合基因组研究中心选择为模式树种对其进行基因组测序, 并将于 2010 年完成(DOE 2008)。其他方面的工作也取得了重大的进展。

1.1 大规模 EST 数据库的建立 桉树基因组序列的释义依赖于 EST 数据库和其他基因组信息资源, 如: 拟南芥、水稻和杨树等。巴西政府于 2001 年实施了“ForEST”研究计划(Poke 等 2005; Vicentini 等 2005)。该计划的主要目标是组织多方面的研究人员, 包括遗传学、生物化学、分子生物学、育种学、统计学、植物病理学和木材学等, 对桉树的改良进行多学科联合研究(Grattapaglia 2004)。计划中的一个重要任务即是建立大规模的桉树 EST 数据库。目前已获得了数量超过 15 万的 EST 序列, 约 1.2 万个有效的基因信息, 通过对这些基因序列的比较结合基因芯片的分析, 已鉴定了一些重要性

收稿 2009-09-18 修定 2009-11-15

资助 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-N-070、KSCX2-YW-G-033)和国家杰出青年科学基金(30725025)。

* 通讯作者(E-mail: lgli@sippe.ac.cn; Tel: 021-54924151)。

状的等位基因,为树种的定向改良提供了重要的分子基础。鉴于桉树具有重要的经济价值,一些国家的公司也投入了巨额资金开发桉树的基因组。目前国际上至少已经建立了5个大规模的EST数据库,但这些数据大多不公开。在公共的NCBI数据库中,已有15 077个桉树基因信息。

Novaes等(2008)运用454测序技术测序和整合巨桉148 Mbp的EST,发现其中大约有一半的基因与拟南芥基因具有同源性,并对转录的等位基因变异进行了全面的分析。通过比对来自多个基因型的序列读码,检测到了23 742个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs),其中83%在样品中得到了证实。这一工作为美国能源部正在测定的巨桉基因组的释义提供了参考。Rengel等(2009)构建了冈尼桉(*E. gunnii*)发育中的次生木质部的cDNA文库,同时构建了蓝桉(*E. globulus*)幼树(4年龄)和成材树(10年龄)次生木质部的差减文库。通过对10 000个EST进行测序、拼接,最终获得了3 857个与木材形成相关的EUCAWOOD基因。这是迄今最完整的桉树木材形成相关基因的数据库,为桉树功能基因组研究和分子育种提供了有价值的资源。EST数据库的建立将为功能基因组和蛋白组学的研究,以及对调控桉树重要性状的功能基因的鉴定提供了线索。

1.2 桉树木质部表达谱中关键基因的鉴定 基因组学研究初始普遍采用抑制差减杂交法(SSH)和cDNA-AFLP技术。近年来应用这2种方法分离到了一系列在桉树木质部表达的基因。

SSH通过消减两组文库中相同的基因从而有效地分离出2组不同材料中特异表达的基因。Paux等(2004)构建了冈尼桉次生木质部和叶片的cDNA文库,运用抑制差减杂交法结合芯片方法对基因表达进行验证分析,检测了次生木质部中的基因表达情况,获得了224个独立的EST序列,其中81%的基因在木质部中表达。这些基因大致可以分为两类:与生长素信号相关和与细胞壁合成相关。Foucart等(2006)构建了冈尼桉木质部与韧皮部的cDNA文库,采用上述类似的方法鉴定到了263个特异的EST序列,其中87个基因在木质部中特异表达,它们参与激素信号传导、代谢、次生壁的加厚以及蛋白质降解等过程。这些特异表达

基因的发现对深入了解木材形成的调控机制有一定的价值。

cDNA-AFLP技术是基于RT-PCR结合图像分析的技术对表达相对丰度的基因片段进行定量比较分析。基因芯片法是基因组学研究后期采用的另一种方法。通过比较不同材料中基因表达的差异来确定与生物性状相关的特异基因。Barros等(2009)用cDNA-AFLP结合芯片技术开发了一种新的基因型分析及表达谱分析技术,采用该技术对7株木质素含量不同的巨桉的木质部组织进行了表达谱分析,发现了一系列表达差异明显的基因。这些基因可能对桉树的生长具有调控作用。

1.3 桉树应力木表达谱中关键基因的鉴定 应力木包括应拉木(tension wood)和应压木(compression wood)。两者是直立的树干在受到风等外力的作用下,发生弯曲倾斜时形成的。树干上侧受到牵拉力,形成应拉木;下侧受到压缩力,形成应压木。与正常木材相比,应拉木纤维素含量升高,木质素含量降低,而应压木则正好相反(Plomion等2001; Pilate等2004)。应拉木和应压木具有如此特殊的性状,因而是一种理想的研究植物细胞壁合成调控机制的模式系统。

Toyota等(1997)用差减杂交的方法从赤桉(*E. camaldulensis*)中分离鉴定了31个在应拉木木质部中特异表达的cDNA片段。Paux等(2005)用cDNA芯片的方法研究了蓝桉木质部中特异表达的231个基因的变化情况。在应拉木形成的6小时至1周的时间内,有196个基因的表达受到不同程度的影响。分析还发现一些基因表达的变化与木质部结构改变相关。比如,纤维素合酶基因的表达与应拉木细胞胶质层(G层)的形成有很好的相关性。Qiu等(2008)用cDNA芯片对亮果桉(*E. nitens*)应拉木的基因表达谱进行了研究,鉴定出一批与应拉木形成相关的基因,这些基因与细胞壁的合成及信号转导等过程相关。分析桉树应拉木形成过程中的转录谱可了解到一些未知的有意义的分子,它们参与调节应拉木形成过程的基因网络。这可为寻找控制木材质量的关键基因指明方向。

2 桉树的功能基因组

解析控制木材质量的关键基因是桉树功能基因组学的目标之一。木材的质量由木材的组成、

结构等因素决定。而这些因素又与细胞壁中的纤维素、半纤维素和木质素三大化学组份的含量以及排布等密切相关。解析调控三大组分合成途径中的关键酶基因和转录因子基因的功能可以为快速、定向地改良桉树提供分子基础, 例如为造纸工业培育纤维素含量高、木质素含量低的树种等。目前此项研究主要集中于对纤维素和木质素的合成调控这两方面。另外控制桉树抗逆品质相关基因的研究也取得了进展, 这些研究为提高桉树的抗虫和抗病能力, 拓展桉树的种植面积和范围提供了一定的理论基础。

2.1 纤维素合成相关基因

2.1.1 纤维素合酶 目前桉树纤维素合酶基因的研究主要集中在分离鉴定与木材形成相关特异基因的克隆以及表达分析方面。高等植物的纤维素合酶 (cellulose synthase A, Cesa) 组成纤维素合酶复合体 (cellulose synthase complex, CSC), 负责细胞壁中纤维素的合成。不同类型的复合体合成的微纤丝在长度、结晶度和角度上也不相同。分离和鉴定桉树木质部中特异表达的纤维素合酶基因是解析桉树纤维素合酶组成的前提。

Ranik 和 Myburg (2006) 从巨桉中克隆了 6 个 *Cesa* 的全长 cDNA。这 6 个基因编码的蛋白具有 Cesa 蛋白所有的功能性区域, 氨基酸残基数目在 978~1 097 之间, 相似性为 61%~70%。采用定量 PCR 技术分析它们表达模式的结果显示: *EgCesa1~3* 在次生生长组织 (如木质部) 中的转录丰度较高, 而在初生生长的组织 (如刚刚展开的叶片) 中较低; *EgCesa4* 和 *EgCesa5* 在初生壁的快速分化的组织中表达上调; *EgCesa6* 在所有的组织中的表达均较弱。这些结果表明 *EgCesa1~3* 基因参与了桉树木质部的发育。

Lu 等 (2008) 从巨桉中克隆了 3 个 *Cesa* 基因 (*EgraCesa1*、*EgraCesa2* 和 *EgraCesa3*)。Northern 检测表明这 3 个基因在分化的木质部细胞中特异表达。将这 3 个基因的启动子融合 *GUS* 基因在烟草中检测 *GUS* 酶活性的结果显示: *EgraCesa2* 和 *EgraCesa3* 启动子控制的 *GUS* 基因在烟草茎的次生木质部中表达。而 *EgraCesa1* 启动子控制的 *GUS* 基因则不表达。在应拉木中, *EgraCesa2* 和 *EgraCesa3* 基因在木质部细胞中的表达上调。

EgraCesa1 基因却没有受到机械力的影响而发生变化。因此认为 *EgraCesa2*、*EgraCesa3* 与 *EgraCesa1* 所表达的纤维素合酶都参与了桉树木质部的形成。但是它们所组成的纤维素合酶复合体不相同。

Creux 等 (2008) 对拟南芥、杨树和桉树的 *Cesa* 基因启动子进行序列比较分析的结果表明这 3 种被子植物的 *Cesa* 基因启动子中存在保守的顺式调节元件, 表明在维管植物中调节纤维素生物合成具有保守的转录网络。

深入研究木质部特异表达和受机械力影响的纤维素合酶基因的表达以及它们所组成复合体的结构与功能将最终阐明桉树纤维素合成的机制。

2.1.2 皮层微管 微纤丝是纤维素结构与功能的基本单位, 它的方向和角度直接影响着木材强度和柔韧性等品质。目前的研究表明高等植物微纤丝的合成受到皮层微管的指导, 因此研究桉树皮层微管蛋白基因很有意义。Spokevicius 等 (2007) 从巨桉中分离和鉴定了一个在木质部特异表达的 β -微管蛋白基因 *EgrTUB1*。在枝条上侧, 微纤丝角度小, *EgrTUB1* 的表达上调。在枝条下侧, 微纤丝角度大, *EgrTUB1* 的表达下调。用基因干扰和过表达的方法对 *EgrTUB1* 基因的表达水平进行调节也发现微纤丝的角度与 *EgrTUB1* 基因的表达水平呈负相关性。这项研究暗示, 微管对微纤丝角度的调节影响到微纤丝在细胞壁中的定向, 进而可以影响到木纤维的张力、硬度等特性, 表明微管在木材形成中是有作用的。

2.2 木质素合成途径中的酶 木质素的含量和组成直接影响着木材的材性及其利用。多年来, 人们一直希望通过调控木质素的合成途径来降低木质素的总含量, 提高 S-木质素 (syringyl lignin) 和 G-木质素 (guajacyl lignin) 的 S/G 比例。迄今木本植物杨树中的木质素合成代谢途径已经得到深入的研究和阐明 (Li 等 1997, 1999, 2000, 2001, 2005, 2006; Osakabe 等 1999)。主要有以下 8 类酶参与了木质素的合成途径: (1) 苯丙氨酸氨基裂解酶 (PAL)、(2) 肉桂酸-4-羟基化酶 (C4H)、(3) 香豆酸-3-位羟基化酶 (C3H)、(4) 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL)、(5) 咖啡酰辅酶 A 3-O-甲基转移酶 (CCoAOMT) 和 5-羟基松柏醛 5-O-甲基转移酶 (COMT/AldOMT)、(6) 肉桂酰辅酶 A 还

原酶(CCR)、(7)阿魏酸-5-羟化酶(F5H)/松柏醛-5-羟化酶(CAlD5H)、(8)肉桂醇脱氢酶(CAD)和芥子醇脱氢酶(SAD)。其中4CL控制着植物木质素单体的总含量。CCR是木质素单体合成途径中第一个特异性的酶。CAD控制G-单体木质素合成过程中的最后一步反应。CAlD5H、AlD5H和SAD控制着S-木质素单体的生物合成途径。现在桉树中的CCR和CAD基因已有了初步的研究。

CCR催化肉桂醇辅酶A酯转化为肉桂醛。Lacombe等(1997)克隆了冈尼桉CCR基因的cDNA。分析Promoter_{EgCCR}::GUS在烟草中的表达表明,EgCCR启动子的活性在木质化的器官中最强,如茎和根中(Lacombe等2000)。拟南芥中Promoter_{EgCCR}::GUS在所有木质化细胞(导管、木质部纤维等)中均有表达(Baghdady等2006)。采用启动子缺失分析和功能获得分析的结果显示-119至-77之间的区域是茎维管组织中表达所必需的。凝胶阻滞实验表明,烟草茎中的核蛋白可以特异识别这一区域(Lacombe等2000)。这些结果表明,EgCCR基因是特异性地参与冈尼桉木质部中木质素合成的。

CAD催化松柏醛转化为松柏醇。Feuillet等(1993)从冈尼桉中纯化2个CAD的同工酶(CAD1和CAD2)的研究表明,它们的生化功能存在差异。以烟草的异源探针筛选冈尼桉悬浮细胞的cDNA文库,分离得到了编码CAD2的cDNA。序列分析表明,其蛋白序列与烟草的CAD具有78%的同源性,与火炬松的CAD有81%的同源性。Samaj等(1998)以免疫金定位的方法检测的结果表明,CAD2组织定位于茎形成层细胞、射线细胞和未成熟木质部细胞中,亚细胞定位于内质网和高尔基体囊泡上。Feuillet等(1995)从桉树中分离CAD2基因的基因组序列,并将CAD2基因的启动子与GUS报告基因融合再以农杆菌介导转化杨树,而后对8个独立的转化体进行荧光定量分析的结果表明,GUS活性在根、茎和叶中都有表达。进一步的GUS组织化学分析表明,CAD2的启动子在根、茎、叶的维管系统中有较强的表达。Baghdady等(2006)构建并检测了Promoter_{EgCAD2}::GUS在拟南芥中表达的结果显示,冈尼桉EgCAD2基因启动子在所有木质化细胞中均有表达。Goffner等(1998)的分子克隆和

鉴定CAD1 cDNA的结果表明CAD1在木质化和非木质化的组织和细胞中均有表达。这些结果表明,EgCAD2基因在桉树细胞木质化过程中发挥作用,是桉树木质素单体合成途径中的关键酶基因。

克隆与鉴定桉树中木质素合成途径中其他关键酶基因(如4CL、CAlD5H和SAD)将有助于利用RNAi的技术来降低桉树中木质素的含量,提高S/G比值,为造纸工业和生物能源产业提供优质的原材料。

2.3 转录因子 近年来,桉树中控制次生生长的转录因子基因已有了初步的研究,主要有两类:调控木质素合成的R2R3-MYB和响应环境温度变化的CBF。至于其他植物中已知的调控次生生长的转录因子(如:HD-ZIPIII、NAC等)尚无报道。

MYB转录因子是目前已知的植物中最庞大的基因家族,这也反映了这一家族的功能多样性。Goicoechea等(2005)从冈尼桉中克隆了一个转录因子基因EgMYB2,它属于R2R3-MYB基因亚家族,在遗传图谱上与控制木质素含量的一个QTL连锁。定量PCR检测表明其在分化中的木质部中特异性的表达。体外重组的EgMYB2蛋白能够特异性地结合2个木质素生物合成途径中基因CCR和CAD的启动子的顺式调节区,并且在烟草中能够诱导与CCR和CAD的启动子融合的GUS基因的表达。过量表达EgMYB2的转基因的烟草株高降低,次生壁加厚明显,木质素总量没有发生明显变化,但是S/G比值升高。木质素单体生物合成途径中一些特异的酶基因的转录丰度有着不同程度的增加。这些表明,EgMYB2基因是通过调控木质素单体合成途径中不同酶基因的转录而调节木质素的合成以及植物次生细胞壁形成的。

Legay等(2007)从冈尼桉cDNA文库中克隆了另一个R2R3-MYB基因亚家族的转录因子基因EgMYB1。研究表明,它在桉树的根和茎的次生木质部中优先表达。EgMYB1蛋白定位于细胞核内。体外条件下能够特异性地结合在木质素合成基因CCR和CAD基因启动子的MBSIIIG位点,并且在烟草中EgMYB1抑制CCR和CAD基因启动子控制下的GUS基因的表达。实验表明,EgMYB1是一个木质素代谢途径的负调节因子。在桉树木质部中与转录激活子EgMYB2协调表达,相互竞争,

从而调控木质素沉积的时空特异性,实现对木质素生物合成和次生壁形成过程中的精细调节(Legay等2007)。

冷害会导致细胞壁脱水伤害,影响植物的生长发育。由于桉树对冷较敏感,目前其推广和种植主要局限于南方地区。抗寒基因的分离和鉴定将有助于桉树种植范围的扩大。冈尼桉是最耐寒的桉树品种之一,其成年树可以忍受低至 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温。因此,冈尼桉抗寒基因的研究一直备受关注。Gamboa等(2007)从蓝桉(*E. globulus*)中分离到一个CBF(CRT/DRE-binding factor)的全长cDNA克隆。序列分析表明,它编码一个CBF转录激活子,具有CBF蛋白的特征性的结构域。半定量PCR分析表明,在蓝桉幼苗中*EgCBF1*的表达受低温的瞬时诱导,但不受盐或干旱胁迫的诱导。Kayal等(2006)从冈尼桉中分离鉴定出2个受冷诱导的CBF同源基因,分别命名为*EguCBF1a*和*EguCBF1b*。序列分析表明,该基因的启动子和编码序列具有的CBF转录因子的典型特征。细胞亚定位分析表明,该基因编码的蛋白质定位于核内。这2个基因对冷诱导的速度和强度表现出明显不同的反应。*EguCBF1a*在直接强烈的冷处理条件下诱导会瞬时表达,而*EguCBF1b*则在较温和的冷处理下诱导表达,并表现出更长的反应时间。光照条件对冷诱导产生负效应,在光照条件下,这2个基因的诱导比暗条件下低3~9倍。Navarro(2009)从冈尼桉中分离到另外2个CBF基因,*EguCBF1c*和*EguCBF1d*。序列分析表明,*EguCBF1c*蛋白的AP2-DBD(AP2-DNA结合结构域)与其他3个CBF1蛋白有明显不同。定量PCR的方法分析表明,这4个基因都不同程度地受到冷胁迫的诱导。这些CBF转录因子对冷处理的不同反应暗示,它们是以互补调节的方式应对自然环境条件下温度变化的。另外还发现*EguCBF1c*对盐胁迫和伤害胁迫也有响应,而且相对于冷胁迫来说,更为敏感。这表明*EguCBF1c*也有可能桉树盐胁迫和伤害胁迫的信号通路中发挥一定的作用。

克隆与鉴定桉树中*EgCBF*转录因子下游基因将有助于认识桉树响应冷信号、盐胁迫信号和伤害胁迫信号的分子机制,所以对此仍应该深入探讨。

2.4 抗病蛋白基因 桉树对许多病害敏感,桉树抗病

性的转基因研究对于产业化种植非常重要。近年来在桉树中已克隆了一种PGIP基因,它编码一种多聚半乳糖醛酸酶活性抑制蛋白(polygalacturonase-inhibiting protein),这种蛋白在植物抗病防御反应中发挥作用。在尾叶桉(*E. urophylla*)、赤桉、亮果桉和柳叶桉(*E. saligna*)中已得到部分序列(Chimwamurombe等2001),在巨桉已得到全长序列(Bhoora等2003)。总之,更多的桉树抗病基因的克隆和深入研究对今后培育具有更强抗病性的桉树来说是重要的。

3 结语

桉树基因组的研究为发现和鉴定桉树特有的优良性状基因提供了前提。采用比较基因组学的方法将桉树基因组与已测序的模式物种拟南芥、水稻和杨树基因组进行比较将有利于发现多年生木本植物和一年生植物在发育和进化中的相关基因,同时也可为此问题的研究提供新的视角。从而有目的地调节这些基因的表达或者改造这些基因的功能,最终实现桉树的定向改良。

功能基因组的研究最终目的是用转基因的技术调控关键基因的表达,实现对桉树木材质量、抗病虫性、耐冻性、耐旱性和耐盐碱特性的提高。现在,桉树转基因主要采用农杆菌介导的愈伤组织转化技术,其效率和稳定性较差,而且受桉树基因型的影响,因此如何提高桉树转基因的效率还有一系列的问题需要解决。另外,引入一些桉树种质资源库中的异源基因,将会从根本上改变桉树林产品的特性。如将*Bt*基因导入桉树会有可能极大的提高桉树的抗虫性。目前,桉树功能基因组的研究尚处于起步阶段,因此如何借鉴其他物种中已知功能的基因信息也是值得考虑的。总之,从分子水平上解析桉树的经济性状将可加速桉树的遗传改良,提高桉树生产力和木材质量以及扩展桉树的种植范围。

参考文献

- 陈考科,黄少伟(2005). 桉树的分子标记技术及遗传图谱构建进展. 分子植物育种, 3 (2): 255~260
- 陈少雄,吴志华(2008). 桉树分子育种研究进展. 中南林业科技大学学报, 28 (4): 42~48
- 欧阳乐军,曾富华(2008). 桉树分子育种研究进展. 分子植物育种, 6 (6): 1146~1152
- 祁述雄(2006). 中国桉树. 北京: 中国林业出版社, 23~24

- Baghdady A, Blervacq AS, Jouanin L, Grima-Pettenati J, Sivadon P, Hawkins S (2006). *Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 44: 674~683
- Barros E, Van Staden CA, Lezar S (2009). A microarray-based method for the parallel analysis of genotypes and expression profiles of wood-forming tissues in *Eucalyptus grandis*. *BMC Biotech*, 9: 51~62
- Bhoora R, Berger DK, Wingfield MJ, Wingfield BD (2003). PCR cloning by genome walking of a complete polygalacturonase-inhibiting protein gene from *Eucalyptus grandis*. *South African J Sci*, 99 (9~10): 410~412
- Brooker MIH (2000). A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Aust Systematic Bot*, 13: 79~148
- Chimwamurombe PM, Botha AM, Wingfield MJ, Wingfield BD (2001). Molecular relatedness of the polygalacturonase-inhibiting protein genes in *Eucalyptus* species. *Theor Appl Genet*, 102 (4): 645~650
- Creux NM, Ranik M, Berger DK, Myburg AA (2008). Comparative analysis of orthologous cellulose synthase promoters from *Arabidopsis*, *Populus* and *Eucalyptus*: evidence of conserved regulatory elements in angiosperms. *New Phytol*, 179: 722~737
- DOE Joint Genome Institute Announces 2008 Genome Sequencing Targets. *Eucalyptus*, Foxtail Millet, Red Algae, and Novel Microbial Communities Added to Growing Bioenergy and Carbon Cycling Portfolio. [http://www.jgi.doe.gov/News/news_6_8_07.html]
- Feuillet C, Boudet AM, Grima-Pettenati J (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus*. *Plant Physiol*, 103: 1447
- Feuillet C, Lauvergeat V, Deswarte C, Pilate G, Boudet A, Grima-Pettenati J (1995). Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol Biol*, 27: 651~667
- Foucart C, Paux E, Ladouce N, San-Clemente H, Grima-Pettenati J, Sivadon P (2006). Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. *New Phytol*, 170: 739~752
- Gamboa MC, Rasmussen-Poblete S, Valenzuela PDT, Krauskopf E (2007). Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globulus*. *Plant Physiol Biochem*, 45: 1~5
- Goffner D, Doorselaere JV, Yahiaoui N, Samaj J, Grima-Pettenati J, Boudet AM (1998). A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol Biol*, 36 (5): 755~765
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N et al (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J*, 43: 553~567
- Grattapaglia D (2004). Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. *Genet Mol Res*, 3: 369~379
- Grattapaglia D, Kirst M (2008). *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytol*, 179 (4): 911~929
- Grattapaglia D, Sederoff R (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137 (4): 1121~1137
- Kayal WE, Navarro M, Marque G, Keller G, Marque C, Teulieres C (2006). Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *J Exp Bot*, 57 (10): 2455~2469
- Lacombe E, Doorselaere JV, Boerjan W, Boudet AM, Grima-Pettenati J (2000). Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J*, 23 (5): 663~676
- Lacombe E, Hawkins S, Doorselaere JV, Piquemal J, Goffner D, Poeydomenge O, Boudet A, Grima-Pettenati J (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J*, 11 (3): 429~441
- Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, Briere C, Seguin A, Mackay J, Grima-Pettenati J (2007). Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci*, 173 (5): 542~549
- Li L, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperm dicots is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell*, 13 (7): 1567~1585
- Li L, Cheng XF, Lu S, Nakatsubo T, Umezawa T, Chiang VL (2005). Clarification of cinnamoyl co-enzyme A reductase catalysis in monolignol biosynthesis of aspen. *Plant Cell Physiol*, 46 (7): 1073~1082
- Li L, Lu S, Chiang VL (2006). A genomic and molecular view of wood formation. *Crit Rev Plant Sci*, 25: 213~233
- Li L, Osakabe Y, Joshi CP, Chiang VL (1999). Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol Biol*, 40: 555~565
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL (2000). 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem*, 275: 6537~6545
- Li L, Popko JL, Zhang XH, Osakabe K, Tsai CJ, Joshi CP, Chiang VL (1997). A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 5431~5466
- Lu S F, Li L, Yi XP, Joshi CP, Chiang VL (2008). Differential

- expression of three eucalyptus secondary cell wall-related cellulose synthase genes in response to tension stress. *J Exp Bot*, 59 (3): 681~695
- Navarro M, Marque G, Ajax C, Keller G, Borges JP, Marque C, Teulieres C (2009). Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *J Exp Bot*, 60 (9): 2713~2724
- Noavaes E, Drost DR, Farmerie WG, Pappas Jr GJ, Grattapaglia D, Sederoff RR, Kirst M (2008). High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. *BMC Genomics*, 9: 312
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chiang VL (1999). Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 8955~8960
- Paux E, Carocha V, Marques C, Sousa A M, Borralho N, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2005). Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol*, 167 (1): 89~100
- Paux E, Tamasloukht M, Ladouce N, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2004). Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. *Plant Mol Biol*, 55: 263~280
- Pilate G, Dejardin A, Laurans F, Leple JC (2004). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytol*, 164: 63~72
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol*, 127: 1513~1523
- Poke FS, Vaillancourt RE, Potts BM, Reid JB (2005). Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica*, 125 (1): 79~101
- Qiu DY, Wilson, IW, Gan, SM, Washusen R, Moran GF, Southerton SG (2008). Gene expression in *Eucalyptus* branch wood with marked variation in cellulose microfibril orientation and lacking G-layers. *New Phytol*, 179: 94~103
- Ranik M, Myburg AA (2006). Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiol*, 26, 545~556
- Rengel D, Clemente HS, Servant F, Ladouce N, Paux E, Wincker P, Couloux A, Sivadon P, Grima-Pettenati J (2009). A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol*, 9: 36~49
- Samaj J, Hawkins S, Lauvergeat V, Grima-Pettenati J, Boudet A (1998). Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of CAD 2 promoter in transgenic poplar shoots. *Planta*, 204: 437~443
- Spokevicius AV, Southerton SG, MacMillan CP, Qiu D, Gan S, Tibbits JF, Moran GF, Bossinger G (2007). β -tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. *Plant J*, 51: 717~726
- Toyota J, Baba K, Hibino T, Itoh T (1997). Molecular cloning of cDNAs of the genes expressed in differentiating xylem of tension wood formation in *Eucalyptus camaldulensis* L. *Wood Res*, 84: 31~33
- Vicentini R, Sasaki FT, Gimenes MA, Maia IG, Menossi M (2005). *In silico* evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome. *Genet Mol Biol*, 28 (3) (suppl): 487~495