

综述 Review

红豆杉分子生物学研究进展

周华¹, 朱祺¹, 杨艳芳^{2,*}, 余发新¹, 邱德有^{2,*}¹江西省科学院生物资源研究所, 江西省观赏植物遗传改良重点实验室, 江西南昌330096; ²中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京100091

摘要: 红豆杉作为抗癌药物紫杉醇的药源植物得到了国际上的广泛关注。本文综述了近年来国内外关于红豆杉分子生物学方面的研究进展, 主要包括编码紫杉醇生物合成的紫杉二烯合成酶、羟基化酶、酰基转移酶等功能基因以及相关转录因子编码基因的分离克隆、表达转化的研究, 红豆杉遗传多样性、紫杉醇含量相关的分子标记研究, 红豆杉谱系地理学的研究以及解析紫杉醇合成分子机理的红豆杉转录组和代谢组研究等; 最后对当前研究的不足和对今后利用分子手段研究红豆杉的发展前景进行了展望。

关键词: 红豆杉; 基因克隆; 转录因子; 分子标记; 转录组测序

Progress in Molecular Biology Study of *Taxus*ZHOU Hua¹, ZHU Qi¹, YANG Yan-Fang^{2,*}, YU Fa-Xin¹, QIU De-You^{2,*}¹Key Laboratory of Horticultural Plant Genetic and Improvement of Jiangxi, Institute of Biology and Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi 330096, China; ²State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: *Taxus* L. has been widely recognized as an important plant because it can produce a number of chemicals with anticancer properties, especially Taxol, which was widely used in clinical of lung, ovarian and breast cancer. This paper summarized several aspects about the recent progress in the application of molecular biology technology in *Taxus*, included isolating and cloning of Taxol biosynthesis genes, molecular markers in genetic diversity, phylogeography, transcriptome and metabolome. Finally, the problems and the limitation of current study were discussed and proposed the future molecular biology research on *Taxus*.

Key words: *Taxus* L.; gene cloning; transcription factor; molecular markers; transcriptome sequencing

红豆杉(*Taxus* L.)又名紫杉, 为红豆杉科红豆杉属植物, 多年生小乔木或灌木, 主要分布于北半球的温带至亚热带地区, 我国云南、江西、福建以及东北等地具有栽培或野生。红豆杉全世界共有11个种, 中国拥有其中4个种和1个变种, 即: 东北红豆杉(*T. cuspidata* Sieb. Et. Zucc)、云南红豆杉(*T. yunnanensis* Cheng et L. K. Fu)、西藏红豆杉(*T. wallichiana* Zucc)、中国红豆杉[(*T. chinensis* (Pilger) Rehd)]和南方红豆杉[*T. chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et lev) Cheng et L. K. Fu]。1971年Wini等从红豆杉中分离出了一种复杂的二萜类次生代谢物质紫杉醇(Taxol), 发现其具有很强的抗癌能力, 尤其在治疗乳腺癌、肺癌和卵巢癌等方面疗效显著。当前, 随着癌症患者日益增加, 紫杉醇作为目前最为有效的天然抗癌药物之一, 需求不断扩大, 作为其药源植物的红豆杉更是成为国内外的研

究热点。近年来研究者利用多种分子生物学手段全面展开了红豆杉遗传多样性、系统分类、蛋白质组学和功能基因组学等多项研究。这些研究为深入阐明红豆杉的生长发育机理、提高生物量以及进一步探讨紫杉醇生物合成分子机理奠定了基础。本文综述了近年来国内外科研工作者利用分子生物学手段对红豆杉展开的一系列研究, 并对今后未来红豆杉分子生物学研究的前景进行了展望。

1 紫杉醇生物合成途径功能基因和调节基因的分离克隆

紫杉醇是公认的近30年来发现的最有效的抗

收稿 2013-12-03 修定 2014-02-19

资助 江西省观赏植物遗传改良重点实验室开放基金(2011-KLB-02)和国家自然科学基金项目(31300567和31170628)。

* 通讯作者(E-mail: echoyyf@caf.ac.cn, Tel: 010-62889672; E-mail: qiudy@caf.ac.cn, Tel: 010-62889641)。

癌药物之一, 红豆杉作为其药源植物, 其合成紫杉醇的分子机理早已得到了较为充分的研究, 其中美国华盛顿大学Croteau教授领导的实验室进行的工作最有成效。该实验室不仅论证了从紫杉醇合成前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)到紫杉醇的合成约需20步酶促反应, 并且完成了其中包含编码羟基化酶和酰基化酶在内的14个基因的克隆(Croteau等2006)(表1)。此后, 国内外学者对于紫杉醇生物合成相关的关键酶基因进行了大量的研究, 获得了多个与紫杉醇生物合成相关的基因, 并对这些基因转录水平的表达与紫杉烷类化合物的合成之间的关系展开了相关的研究(Katkovcinová等2008; 高明波等2011; Onrubia等2011, 2013)。

紫杉二烯合成酶(taxadiene synthase, TS)是第一个被详细研究和迄今为止所发现的最重要的紫杉醇合成代谢酶, 催化GGPP环化形成紫杉-4(5),11(12)-二烯, 该反应为紫杉醇生物合成中的第一个定向、慢速的步骤。研究者最早从太平洋红豆杉(*T. brevifolia*)树苗以及加拿大红豆杉(*T. canadensis*)悬浮细胞中分离出了TS, 并对其催化活性进行了鉴定(Hezari等1995, 1997)。编码TS的cDNA序列最早则是通过同源序列克隆的方法从太平洋红豆杉中得到(Wildung和Croteau 1996), 此

后, 从中国红豆杉、南方红豆杉(愈伤组织)、东北红豆杉(愈伤组织)以及曼地亚红豆杉中都分离克隆出了TS基因的cDNA全长或片段(石青等1999; 胡国武等2000; Wang等2002; Kai等2005; 肖颖等2006)。并且, Köksal等(2011)对TS的晶体结构进行了分析。此外, Zhao等(2010)通过Southern杂交技术初步证实TS存在于内生真菌之中。目前有关TS基因转化红豆杉细胞的研究报道较少, 韩国研究者报道将TS基因转化到人参细胞系中, 在每克干重转基因人参细胞中可得到9.1 μg 紫杉二烯, 在经过茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)诱导3或6 d后, 每克干重转基因人参细胞紫杉二烯含量可分别达到14.6或15.9 μg (Cha等2012)。Ajikumar等(2010)利用上游MEP途径(methylerythritol-phosphate pathway, MEP途径)以及下游萜类化合物合成通路中已知基因信息, 成功在大肠杆菌中过量表达包括TS基因在内的多个合成紫杉醇前体的基因, 促进紫杉二烯的合成量达到约1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 大大增加了大肠杆菌中紫杉二烯的水平。尽管上述有关TS基因的研究工作为进一步研究紫杉二烯合成酶的作用机理和紫杉醇生物合成代谢调控机制奠定了良好基础, 但是也不难看出, 利用分子生物学手段调控TS基因还只是停留在促进紫杉二烯合成的阶段, 距离实现提高紫杉醇的含量还存在着很长

表1 已获得的14个紫杉醇生物合成途径相关关键酶

Table 1 Information of the 14 related taxol biosynthetic enzymes in *Taxus*

中文名	英文名	缩写	基因库登录号	完整编码区/bp	参考文献
牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶	geranylgeranyl diphosphate synthase	GGPPS	AF081514	1 182	Hefner等1998
紫杉二烯合成酶	taxadiene synthase	TS	U48796	2 586	Wildung和Croteau 1996
紫杉二烯-5 α -醇-乙酰基转移酶	taxadien-5 α -ol-O-acetyl transferase	TAT	AF190130	1 317	Walker等2000
紫杉烷2 α -O-苯甲酰转移酶	taxane 2 α -O-benzoyltransferase	TBT	AF297618	1 320	Walker和Croteau 2000b
3-氨基-3-苯基丙酰转移酶	baccatin III: 3-amino-3-phenyl-propanoyltransferase	BAPT	AY082804	1 335	Walker等2002a
去乙酰基巴卡亭III-10 β -O-乙酰基转移酶	10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyltransferase	DBAT	AF193765	1 320	Walker和Croteau 2000a
紫杉烷-C13-侧链-N-苯甲酰转移酶	3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase	DBTNBT	AF466397	1 323	Walker等2002b
紫杉烷2 α -羟基化酶	taxane 2 α -hydroxylase	T2 α H	AY518383	1 488	Chau和Croteau 2000
紫杉烷5 α -羟基化酶	taxane 5 α -hydroxylase	T5 α H	AY289209	1 503	Jennewein等2004a
紫杉烷7 β -羟基化酶	taxane 7 β -hydroxylase	T7 β H	AY307951	1 509	Chau等2004
紫杉烷10 β -羟基化酶	taxane 10 β -hydroxylase	T10 β H	AF318211	1 494	Schoendorf等2001
紫杉烷13 α -羟基化酶	taxane 13 α -hydroxylase	T13 α H	AY056019	1 458	Jennewein等2001
紫杉烷14 β -羟基化酶	taxane 14 β -hydroxylase	T14 β H	AY188177	1 530	Jennewein等2003
苯丙氨酸氨基变位酶	phenylalanine aminomutase	PAM	AY582743	2 094	Jennewein等2004b

一段路程, 因此, 这方面的研究仍然是科研工作者今后的研究重点。

紫杉醇的生物合成是一个复杂的多步骤过程, 主要包括四环骨架的构建和加入各种羟基和酰基基团, 其中羟基的加入由细胞色素P450氧化酶催化。紫杉醇生物合成途径的19步反应中有将近一半由细胞色素P450氧化酶催化。自研究者从太平洋红豆杉和东北红豆杉中最早发现细胞色素P450氧化酶以来(Hefner等1996; Wheeler等2001), 目前已经克隆出了*T2 α H*、*T5 α H*、*T7 β H*、*T10 β H*、*T13 α H*和*T14 β H*等6个编码细胞色素P450氧化酶的基因(表1), 还有C1位的细胞色素P450氧化酶编码基因目前尚未被克隆。尽管一个C9位的T9 α H (taxoid 9 α -hydroxylase, T9 α H)的cDNA序列已经报道被克隆, 但功能尚待进一步确定(Croteau等2006)。研究发现*T2 α H*、*T5 α H*、*T7 β H*、*T10 β H*和*T13 α H*的序列具有70%以上的相似性, 然而与其他植物来源的细胞色素P450氧化酶编码基因的序列相似性却低于35% (Jennewein等2004b; Kaspera和Croteau 2006)。因此, 发现新的潜在的紫杉烷类细胞色素P450氧化酶编码基因也许可以从序列相似性角度展开相关研究工作。按照此思路, Jennewein等(2004b)利用cDNA文库方法找到了序列相似性>75%的10条新的紫杉烷类细胞色素P450氧化酶候选基因, 而且, 他们还鉴定分离了一个新的*T10 β H*基因(GenBank accession no. AY563635)。中国的红豆杉研究者也从中国红豆杉和中国红豆杉愈伤组织细胞中克隆出了*T10 β H*基因和细胞色素P450还原酶基因, 并分别在酿酒酵母或大肠杆菌中进行了表达研究(Tu等2004; 阮仁余等2010), 为建立具有高效的电子传递和羟基化反应的紫杉醇中间体代谢工程途径奠定理论基础。紫杉烷13 α -羟基化酶(T13 α H)编码基因也从曼地亚红豆杉和南方红豆杉中被克隆(滕文静等2008; 黄仕杰等2010b; Zhang等2010), 并发现其在曼地亚红豆杉叶子中的表达量较高, 在茎中的表达量较低, 而在果实中没有检测到其表达(Zhang等2010)。燕丽娜等(2009)从南方红豆杉中克隆了紫杉烷7 β -羟基化酶(T7 β H)基因的DNA序列, 并对红豆杉属细胞色素P450基因家族成员进行了进化分析, 发现该家族的成员所受选择压力各异。由于紫杉烷14 β -羟基化酶处

在紫杉醇生物合成竞争的分支途径中, 抑制其表达则很有可能促进紫杉醇类物质的产量。研究者从中国红豆杉基因组中克隆了紫杉烷14 β -羟基化酶(T14 β H)基因前半段序列, 并将其利用反义RNA和RNAi抑制表达技术转化曼地亚红豆杉细胞系, 结果发现C14位氧化产物明显减少(胡新玲等2006; 李凤岚等2009; Li等2011)。综上所述可以看出, 细胞色素P450氧化酶对紫杉醇生物合成起到了多步催化作用, 为采用基因工程手段和联合其他调控因子, 如茉莉酸甲酯(MeJA), 转化红豆杉细胞, 利用细胞培养技术大量生产紫杉醇提供了坚实的理论基础。同时, 还应看到C1位的羟基化酶基因的序列至今尚未获得, 为何已克隆的红豆杉的羟基化酶基因序列高度相似, 却与其他植物来源的细胞色素P450氧化酶的序列相似性很低? 这些未解之谜都需要人们在未来通过包括分子生物学在内的各种研究手段进行努力探索。

酰基转移酶在紫杉醇生物合成的19步反应中催化其中的5步, 在紫杉醇生物合成的代谢途径中也起到了至关重要的作用。例如, 3-氨基-3-苯基丙酰转移酶(3-amino-3-phenyl-propanoyltransferase, BAPT)专一性地催化 β -苯丙氨酰辅酶A与巴卡亭III上C13羟基反应生成去苯甲酰紫杉醇(3'-N-debenzoylatxol), 紫杉烷-C13-侧链-N-苯甲酰转移酶(3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase, DBTNBT)催化苯甲酰CoA和去苯甲酰紫杉醇合成紫杉醇, 是紫杉醇生物合成途径中的最后一个酰基转移酶, 因此, 它们在决定紫杉醇合成量上具有举足轻重的作用。从表1中可以看出, 大约10年前Croteau实验室就已经完成了这5个酰基转移酶基因的分离克隆以及功能鉴定的工作, 并且在后续的工作中, 他们还继续利用建立cDNA文库的方法等得到了包含之前克隆的5个酰基转移酶基因在内的16个相关的克隆(Jennewein等2004b)。国内研究者也对这5个酰基转移酶基因进行了克隆, 并对其在大肠杆菌中的表达进行了研究(Guo等2007; 韩丽等2008; 黄仕杰等2010a; 张志建等2010; 苗莉云等2012)。此外, Hampel等(2009)从红豆杉中分离出了2个促进红豆杉支链代谢物紫杉素(taxusin)酰基化的酰基转移酶基因(*TAX9*和*TAX14*), 为利用基因敲除等方法促进紫杉醇及其相关前体的合成

提供了新思路。

紫杉醇的合成前体GGPP主要通过上游MEP和MVA途径(mevalonic acid pathway, MVA途径)生成的法呢基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)和异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)在GGPP合成酶的作用下而生成(Hefner等1998)。对于红豆杉紫杉醇生物合成的上游途径MEP和MVA中的关键酶的编码基因,检索到的国外文献较少,国内一些研究者进行了相关的报道。例如郑清平等(2004)从中国红豆杉中克隆了MEP途径中的*DXR*基因。Li等(2009)利用荧光定量PCR技术,对*DXR*、*HMGR*、*GGPPS*和*DBAT*基因在长期培养(3年)的红豆杉细胞中的表达进行了研究,发现4个基因都呈现了表达下降的趋势,并推测多个基因转录水平表达量的降低或许是导致长期培养细胞系中紫杉醇含量下降的原因。*GGPPS*基因也分别被国内研究者从曼地亚红豆杉、南方红豆杉和西藏红豆杉中克隆(肖明贵等2004; 兰小中和孙敏2006; 韩飞等2011),同时*GGPPS*基因的5'端侧翼序列也被从曼地亚红豆杉中克隆,并将其转化烟草,验证了其启动子的活性(郭佳玉等2010)。这为建立红豆杉转基因表达时、空、量三维调控系统、为功能基因组研究和运用基因工程方法调控紫杉醇的合成提供了理论基础。

除了上述紫杉醇生物合成途径关键酶基因之外,研究者还对红豆杉中的转录因子展开了相关研究。转录因子通常是由基因编码的一类蛋白质,主要以同源或异源二聚体的形式同顺式作用元件特异结合,通过和某些辅助调控因子发生作用而影响转录复合体的形成,从而调节植物基因的特异性表达(Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 2006)。目前,研究较多的与植物次生代谢途径相关的转录因子主要有AP2/EREBP、MYB、bHLH、WRKY、bZIP和MADS-box等几大类。近年来,一些关于转录因子调控紫杉醇生物合成的报道已经被发表。国外有研究者对MADS-box转录因子调控影响红豆杉果实的发育进行了相关研究(Englund等2011; Lovisetto等2012),而国内研究者在红豆杉转录因子的研究方面也取得了一定进展。例如,姚瑞枫等(2009)利用酵母单杂交文库对与紫杉醇生物合成途径中的*dbat*基因启动子的顺式元件

结合的转录因子进行了筛选探索工作,得到了6个可编码结合蛋白的基因。戴怡龄(2008)从东北红豆杉中分离克隆出2个AP2类转录因子,其中TcDREB还能与紫杉醇合成途径中的*TS*、*T5aH*、*T10βH*和*T13aH*四个关键酶基因的启动子相结合。Li等(2013)利用从中国红豆杉细胞中克隆的*DBAT*基因5'端片段为饵,他们通过酵母单杂交方法成功获取得到了一个WRKY转录因子TcWRKY,并发现过量表达或者抑制RNAi, TcWRKY都相应地增强或者降低了*DBAT*基因的表达。转录因子在植物次生代谢途径中起到多步调控作用,能够调控多个酶编码基因的表达,进而能够影响整个植物次生代谢网络,因此,结合基因工程的方法调控转录因子的表达,将是一个非常重要的调控紫杉醇生物合成的有效途径。本实验室也已经针对此研究方向展开相关研究,克隆获得了包括bHLH在内的多个转录因子基因,相关的功能研究工作正在进行中。

2 分子标记研究

分子标记(molecular marker)是遗传标记中非常重要的一种,它是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,是基于基因组DNA存在及其丰富的多态性而发展的一类可以直接反应生物个体间DNA水平上差异信息的遗传标记方法。21世纪以来,分子标记技术已经在植物研究中得到广泛应用,例如植物分子遗传图谱的构建、植物遗传多样性分析与种质鉴定、重要农艺性状基因定位与图位克隆以及分子标记辅助育种等多方面。

国外有关分子标记技术在红豆杉中应用的研究报道不是很多, Collins等(2003)利用RAPD技术和*trm-F*序列对欧洲红豆杉(*T. baccata*)、加拿大红豆杉(*T. canadensis*)和东北红豆杉(*T. cuspidata*)的19份样品和31份杂交种进行了鉴定研究。国内红豆杉分子标记研究起初阶段主要围绕红豆杉遗传变异和亲缘关系方面展开(王艇等2000; 张宏意等2003; 茹文明等2008; 江建铭等2009; 李乃伟等2010, 2011)。例如,周其兴等(1998)在15年前就对红豆杉属的遗传变异和亲缘关系进行了研究,茹文明等(2008)也发现南方红豆杉自然种群具有较高的遗传多样性。另一方面,研究者对紫杉醇含

量性状相关的分子标记进行了研究(陈毓亨等1999; 苏建荣等2009), 同时, 也针对遗传变异和紫杉醇含量的相关性展开研究。于晓芹等(2009)应用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法研究了云南红豆杉的遗传多样性与紫杉醇含量之间的关系, 发现紫杉醇含量在红豆杉居群间和居群内个体差异都较大。在居群水平上, 遗传多样性和紫杉醇含量有一定程度的关联, 但在个体水平上明显无对应关系。此外, 研究者针对红豆杉雌雄异株的特性, 也利用AFLP等技术对其性别早期鉴定的标记进行了研究(肖璐等2011a, b)。近年来, 研究者也利用分子标记技术对红豆杉的系统进化进行了研究。例如, 王艇等(2001)利用限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法对红豆杉科及相关类群14种植物叶绿体*rbcL*基因PCR产物进行限制酶酶切分析, 初步探讨了红豆杉科、三尖杉科和罗汉松科之间的系统关系。中国科学院昆明植物研究所李德铎研究员实验室则一直致力于红豆杉资源保护和生物地理学的研究。例如, 该实验室结合形态学、分子生物学以及气候资料对兴都库什-喜马拉雅地区红豆杉属物种的分类和分布进行研究, 通过对来自46个居群和47份馆藏标本的743个样本的27个形态性状的主成分分析和15个气候因子的生态位模拟, 同时结合对*ITS*和*trnL-F*序列的最大简约法分析, 发现该地区分布有3种红豆杉属植物(Poudel等2012)。此外, 他们还以红豆杉为例, 对新兴起的DNA条形码(DNA-barcoding)技术的改进, 并对其在红豆杉潜在的新种鉴定的应用进行了探索(Liu等2011, 2012)。同时, 国内研究人员在红豆杉的谱系地理学方向上也取得了一定进展。例如, 张雪梅等(2012)通过对南方红豆杉18个居群499个个体叶绿体基因组的*trnL-F*片段进行了RFLP分析, 结果表明仅有26.39%的遗传变异存在于居群间, 居群内的遗传变异为73.61%, 南方红豆杉现在的遗传结构可能源于居群的片段化效应。国外有研究者报道了利用AFLP和简单重复序列或微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)技术研究了生境断裂对欧洲红豆杉的遗传结构的影响(Chybicki等

2011)。而国内Miao等(2013)也利用微卫星标记技术对来自14个居群的288个个体南红豆杉生境断裂谱系地理学和遗传效应进行了研究, 结果发现生境断裂导致了云南红豆杉显著的遗传瓶颈、近亲繁殖和种群分化。值得一提的是, AFLP以及在此基础上发展起来的甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术也被国内研究者用于红豆杉长期组织培养和脱分化的遗传和表观遗传变异的研究(李丽琴等2009; Fu等2012)。

随着科学技术的发展, 研究者针对红豆杉展开的分子标记的研究方法也从传统的RAPD、AFLP和SSR标记等技术的利用以及展开的技术体系优化, 转向利用高通量测序(high-throughput sequencing)技术平台发掘新的分子标记。例如, 吴琼等(2012)利用基于红豆杉转录组进行高通量测序, 进而发掘基因表达谱多态性标记(EST-SSRs)。总体来讲, 红豆杉分子标记研究取得了一定的成果, 基于目前快速发展的高通量测序技术平台, 今后可以开展相关的红豆杉单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)等新型分子标记研究, 进一步探讨红豆杉系统进化以及紫杉醇含量性状相关等方面的分子机制。

3 转录组学和代谢组学研究

高通量测序技术, 相对于传统的Sanger测序而言, 又被称为“下一代测序技术”, 具有高输出量和高度解析度的特性。高通量测序一般一次可以完成几十万到几百万条DNA分子序列的测定, 目前也被积极地应用于红豆杉的研究中。华中农业大学余龙江教授实验室和中国林业科学研究院邱德有研究员实验室分别对茉莉酸甲酯(MeJA)诱导下的中国红豆杉和曼地亚红豆杉细胞进行了转录组测序分析, 以期进一步阐明MeJA诱导紫杉醇产生的机理。余龙江等的研究结果表明多个网络途径受到了调控, 包括植物组蛋白生物合成和苯丙氨酸合成途径(Li等2012)。邱德有等的研究结果表明在29个已知的二萜类化合物骨架和紫杉醇生物合成相关的基因发现18个基因在受到MeJA诱导后表达量升高, 通过实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)实验验证了其中9个紫杉醇生物合成相关基因的表达显著上调, 并且鉴定

了多个紫杉醇未知步骤中的候选基因和发现了一些有关紫杉醇运输和降解相关的基因,并对潜在的miRNA进行了分析,表明miRNA在MeJA诱导后的基因表达调控中也起到了重要的作用(Sun等2013)。植物小RNA通过控制转录后基因表达对植物的生长、发育以及新陈代谢等具有很大负调控作用。Qiu等(2009)利用illumina测序技术对MeJA作用下中国红豆杉细胞产生紫杉醇的miRNA的进行了鉴定和表达研究,鉴定出了分属于25个家族的58个miRNA,并发现MeJA显著影响了某些miRNA的表达,有14个miRNA表达上调,同时3个miRNA表达下调。Hao等(2012)以曼地亚红豆杉叶子为材料也进行了小RNA测序分析,研究获得了871个成熟miRNA,869个已知植物miRNA家族的前体,并且他们还发现了T13 α H和T2 α H分别是miRNA 164和miR171的剪切靶标。除了illumina测序平台之外,454测序平台也被利用到红豆杉转录组研究中。Wu等(2011)利用454测序技术对东北红豆杉的针叶进行了转录组测序研究,共获得了81148条高质量的短reads,组装出了20557条无重复序列,包括12975条singletons和7582条contigs,发现了多个紫杉醇生物合成的推测的基因。尽管之前已有国外研究者利用消减抑制杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)方法对不同MeJA处理时间的东北红豆杉的悬浮细胞进行分析,获取得到了331个unigene的信息(Lenka等2012),相比较而言,转录组学在红豆杉上的应用得到的信息资源则显得更为广泛和全面,为今后展开红豆杉相关功能基因克隆和分子标记等研究奠定了坚实的基础。

此外,代谢组学技术也开始被研究者尝试用于红豆杉的研究。国外Tanaka等(2011)利用高分辨率多级质谱(LC-IT-TOF-MS)的手段对1~5年生的南方红豆杉小苗中的紫杉烷类化合物进行了鉴定和分离。国内研究者也发表了相关报道。Han和Yuan(2009)对在层流剪切力的作用下的东北红豆杉细胞进行了代谢轮廓谱分析,鉴定出了65个细胞内的代谢物。Hao等(2011)首先利用illumina测序平台对南方红豆杉进行了转录组测序研究,并利用基因表达谱技术分析了红豆杉根、茎、叶中紫杉烷生物合成相关基因的表达,发现这些基

因在根中的表达量要高于茎、叶中的表达量。进而,他们利用代谢组学超快速液相色谱(ultra fast liquid chromatography, UFLC)和质谱(mass spectrometry, MS)对包括紫杉醇在内的6种典型的紫杉类化合物在根、针叶中的含量进行了测定比较,结果证实紫杉烷类物质在根中的含量要明显高于针叶中含量。

4 小结与展望

综上所述,不难看出科研工作者在过去的20多年里,在红豆杉分子生物学研究方面取得了很大进展,然而,也应看到在目前的研究工作中仍存在着一些问题和需要进一步加强。当前虽然已经克隆获得了多个紫杉醇生物合成相关基因,但是围绕这些基因开展的转基因调控工作却很少,并且,转录因子调控紫杉醇生物合成途径的研究也需要深入展开。紫杉醇整个的生物合成途径中还有很多未解之谜,例如C1位的催化酶和D环形成的基因至今尚未被分离克隆。在当前高通量测序等科学技术的快速发展的背景下,我们在获得了前所未有的大批量的红豆杉基因资源信息的基础上,应综合利用基因工程、生物信息学、化学以及组织培养等多学科技术手段来破解这些未解之谜,深入发掘、充分利用现有的红豆杉基因资源信息,培育具有优良性状的红豆杉新品种,进一步阐明紫杉醇生物合成网络途径和途径中的关键酶的作用以及与其他诱导子之间的相互影响,对于提高紫杉醇产量、实现紫杉醇产业化生产乃至拯救更多的癌症病人都具有非比寻常的重要意义。

参考文献

- 陈毓亨,白守梅,程克棣,章菽,李吉学(1999). 南方红豆杉紫杉烷高含量植株系RAPD初步研究. 植物学报, 41 (8): 829~832
- 戴怡龄(2008). 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的AP2类转录调控因子的克隆与功能研究[学位论文]. 上海: 复旦大学, 26~80
- 高明波,张卫,李兴泰,阮成江,范圣第(2011). 中国红豆杉细胞经重复诱导和蔗糖饲喂后云南紫杉烷C生产的相应基因表达变化. 生物工程学报, 27 (1): 101~107
- 郭佳玉,李佟清,李书涛,张鹏,付春华,余龙江(2010). ggpps 5'-侧翼序列的克隆及其启动子功能验证. 现代生物医学进展, 10 (16): 3001~3003
- 韩飞,康林芝,郭丽琼,陈晓阳,林俊芳(2011). 南方红豆杉GGPP合酶基因的克隆与生物信息学分析. 食品与生物技术学报, 30 (5): 728~733
- 韩丽,胡鸾雷,祝建波,林忠平(2008). 三种红豆杉BAPT基因的克隆及序列分析. 石河子大学学报(自然科学版), 26 (5): 562~565

- 胡国武, 温廷益, 元英进(2000). 紫杉醇合成代谢途径中紫杉烯合成酶cDNA的克隆. 生物工程学报, 16 (2): 158~160
- 胡新玲, 徐妙云, 刘德虎, 邱德有(2006). 紫杉烷14 β -羟基化酶基因片段的克隆及其植物表达载体的构建. 分子植物育种, 4 (2): 243~250
- 黄仕杰, 程抒劫, 郭心悦, 郭丽琼, 林俊芳(2010a). 曼地亚红豆杉3'-N-去苯甲酰-2-脱氧紫杉醇苯甲酰转移酶基因的克隆与序列分析. 生物技术通报, (12): 191~195
- 黄仕杰, 程抒劫, 郭心悦, 辛燕花, 郭丽琼, 林俊芳(2010b). 南方红豆杉紫杉烷13 α -羟基化酶基因的克隆与序列分析. 生物技术, 20 (6): 10~14
- 江建铭, 沈宇峰, 孙乙铭(2009). 红豆杉种质资源遗传多样性的 AFLP分析. 中国野生植物资源, 28 (5): 37~40
- 兰小中, 孙敏(2006). 红豆杉香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因克隆分析. 西南农业大学学报(自然科学版), 28 (4): 537~543
- 李凤岚, 邱德有, 马小军, 刘敏, 许德荣(2009). 利用RNAi抑制曼地亚红豆杉细胞紫杉烷14 β -羟基化酶基因的表达. 中国生物工程杂志, 29 (5): 55~60
- 李丽琴, 付春华, 赵春芳, 吴文娟, 余龙江(2009). 红豆杉脱分化过程中的遗传和表观遗传变异. 植物生理学通讯, 45 (6): 544~548
- 李乃伟, 贺善安, 束晓春, 汪庆, 夏冰, 彭峰(2011). 基于ISSR标记的南方红豆杉野生种群和迁地保护种群的遗传多样性和遗传结构分析. 植物资源与环境学报, 20 (1): 25~30
- 李乃伟, 束晓春, 何树兰, 江玉梅, 夏冰, 彭峰(2010). 南方红豆杉的 ISSR遗传多样性分析. 西北植物学报, 30 (12): 2536~2541
- 苗莉云, 张鹏, 付春华, 余龙江(2012). 紫杉醇合成关键酶*dbt1*的克隆及原核表达. 湖北农业科学, 51 (9): 1912~1915
- 茹文明, 秦永燕, 张桂萍, 张金屯(2008). 濒危植物南方红豆杉遗传多样性的RAPD分析. 植物研究, 28 (6): 698~704
- 阮仁余, 孔建强, 郑晓东, 张书香, 秦咸蕴, 程克棣, 王建明, 王伟(2010). 中国红豆杉细胞色素P450还原酶的基因克隆、表达与活性分析. 遗传, 32 (11): 1187~1194
- 石青, 李吉学, 程克棣(1999). 中国红豆杉愈伤组织紫杉烯合成酶cDNA片段的分离. 植物生理学通讯, 35 (4): 285~287
- 苏建荣, 缪迎春, 张志钧(2009). 云南红豆杉紫杉醇含量变异及其相关的RAPD分子标记. 林业科学, 45 (7): 16~20
- 滕文静, 胡新玲, 王伟, 程克棣, 邱德有(2008). 紫杉烷13 α -羟基化酶基因的克隆及其转化烟草的研究. 中国生物工程杂志, 28 (2): 53~58
- 王艇, 苏应娟, 朱建明, 范国宽, 黄超(2000). 红豆杉科及其相关群类的RAPD分析. 中山大学学报(自然科学版), 39 (5): 129~130
- 王艇, 苏应娟, 朱建明, 黄超, 李雪雁(2001). 红豆杉科及相关类群*rbcL*基因PCR-RFLP分析. 植物学通报, 18 (6): 714~721
- 吴琼, 段小群, 陈旭, 肖培根(2012). 基于高通量测序的红豆杉EST-SSRs标记研究. 中国中药杂志, 37 (24): 3728~3733
- 肖璐, 刘继生, 刘宪虎, 郑大浩, 许明子(2011a). 东北红豆杉性别相关的AFLP标记研究. 延边法农学学报, 33 (1): 45~48
- 肖璐, 刘宪虎, 刘继生, 李美善, 许明子(2011b). 东北红豆杉不同性别基因组的RAPD标记. 林业科学, 47 (5): 168~170
- 肖明贵, 余龙江, 刘智, 华向福, 周智德(2004). 曼地亚红豆杉植株中GGPP合成酶的克隆与分析. 中国生物工程杂志, 24 (2): 45~50
- 肖颖, 赵冬, 王刚(2006). 紫杉醇合成途径中紫杉烯合成酶cDNA的克隆. 中国农业科学, 39 (10): 2138~2146
- 燕丽娜, 苏应娟, 王艇(2009). 南方红豆杉紫杉烷7 β -羟基化酶基因全长序列的克隆和进化分析. 中山大学学报(自然科学版), 48 (5): 120~130
- 姚瑞枫, 张蒙, 张鹏, 李书涛, 陈丽, 付春华, 余龙江(2009). 筛选*dbat*启动子顺式元件蛋白的酵母单杂交文库的构建. 生物技术通报, (9): 117~120
- 于晓芹, 刘锡葵, 顾志建(2009). 不同地理种源云南红豆杉的遗传多样性与紫杉醇含量相关性分析. 云南植物研究, 31 (6): 493~498
- 张宏意, 陈月琴, 廖文波(2003). 南方红豆杉不同居群遗传多样性的 RAPD 研究. 西北植物学报, 23 (11): 1994~1997
- 张雪梅, 李德铎, 高连明(2012). 南方红豆杉谱系地理学研究. 西北植物学报, 32 (10): 1983~1989
- 张志建, 郭佳玉, 张鹏, 徐盼盼, 刘博, 张焯, 付春华, 余龙江(2010). 紫杉醇合成关键酶*BAPT*基因的克隆及原核表达. 现代生物医学进展, 10 (16): 3011~3014
- 郑清平, 余龙江, 刘智, 李默怡, 向福, 杨秦(2004). 红豆杉细胞非甲羟戊酸途径关键酶基因*dxr*的克隆与分析. 生物工程学报, 20 (4): 548~553
- 周其兴, 葛颂, 顾志建, 岳中枢(1998). 中国红豆杉属及其近缘植物的遗传变异和亲缘关系分析. 植物分类学报, 36 (4): 323~332
- Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. Science, 330 (6000): 70~74
- Cha M, Shim SH, Kim SH, Kim OT, Lee SW, Kwon SY, Baek KH (2012). Production of taxadiene from cultured ginseng roots transformed with taxadiene synthase gene. BMB Rep, 45 (10): 589~594
- Chau M, Croteau R (2004). Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. Arch Biochem Biophys, 427 (1): 48~57
- Chau M, Jennewein S, Walker K, Croteau R (2004). Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 β -hydroxylase. Chem Biol, 11 (5): 663~672
- Chybicki IJ, Oleksa A, Burczyk J (2011). Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. Heredity, 107 (6): 589~600
- Collins D, Mill RR, Möller M (2003). Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. Am J Bot, 90 (2): 175~182
- Croteau R, Ketchum RE, Long RM, Kaspera R, Wildung MR (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochem Rev, 5 (1): 75~97
- Englund M, Carlsbecker A, Engström P, Vergara-Silva F (2011). Morphological "primary homology" and expression of AG-subfamily MADS-box genes in pines, podocarps, and yews. Evol Dev, 13 (2): 171~181
- Fu CH, Li LQ, Wu WJ, Li MT, Yu XQ, Yu LJ (2012). Assessment of genetic and epigenetic variation during long-term *Taxus* cell culture. Plant Cell Rep, 31 (7): 1321~1331
- Guo BH, Kai GY, Gong YF, Jin HB, Wang YC, Miao ZQ, Sun XF, Tang KX (2007). Molecular cloning and heterologous expression of a 10-deacetylbaconin III-10-O-acetyl transferase cDNA from

- Taxus×media*. Mol Biol Rep, 34 (2): 89~95
- Hampel D, Mau CJ, Croteau R (2009). Taxol biosynthesis: Identification and characterization of two cetyl CoA: taxoid-O-acetyl transferases that divert pathway flux away from Taxol production. Arch Biochem Biophys, 487 (2): 91~97
- Han PP, Yuan YJ (2009). Metabolic profiling as a tool for understanding defense response of *Taxus cuspidata* cells to shear stress. Biotechnol Prog, 25 (5): 1244~1253
- Hao DC, Ge G, Xiao P, Zhang Y, Yang L (2011). The first insight into the tissue specific taxus transcriptome via Illumina second generation sequencing. PLoS One, 6 (6): e21220
- Hao DC, Yang L, Xiao PG, Liu M (2012). Identification of *Taxus* microRNAs and their targets with high-throughput sequencing and degradome analysis. Physiol Plant, 146 (4): 388~403
- Hefner J, Ketchum REB, Croteau RB (1998). Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. Arch Biochem Biophys, 360 (1): 62~74
- Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum RE, Gibson DM, Williams RM, Croteau R (1996). Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. Chem Biol, 3 (6): 479~489
- Hezari M, Ketchum RE, Gibson DM, Croteau R (1997). Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. Arch Biochem Biophys, 337 (2): 185~190
- Hezari M, Lewis NG, Croteau R (1995). Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. Arch Biochem Biophys, 322 (2): 437~444
- Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R (2004a). Cytochrome p450 taxadiene 5 α -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. Chem Biol, 11 (3): 379~387
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB (2001). Taxol biosynthesis: taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proc Natl Acad Sci USA, 98 (24): 13595~13600
- Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R (2003). Taxoid metabolism: taxoid 14 β -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. Arch Biochem Biophys, 413 (2): 262~270
- Jennewein S, Wildung MR, Chau M, Walker K, Croteau R (2004b). Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 101 (24): 9149~9154
- Kai GY, Zhao LX, Zhang L, Li ZG, Guo BH, Zhao DL, Sun XF, Miao ZQ, Tang KX (2005). Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*. J Biochem Mol Biol, 38 (6): 668~675
- Kaspera R, Croteau R (2006). Cytochrome P450 oxygenases of taxol biosynthesis. Phytochem Rev, 5 (2-3): 433~444
- Katkovcinová Z, Lázárová M, Brunáková K, Kosuth J, Cellárová E (2008). Expression of *dbat* and *dbtbt* genes involved in paclitaxel biosynthesis during the growth cycle of *Taxus baccata* L. callus cultures. Z Naturforsch C, 63 (9-10): 721~730
- Köksal M, Jin Y, Coates RM, Croteau R, Christianson DW (2011). Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. Nature, 469 (7328): 116~120
- Lenka SK, Boutaoui N, Paulose B, Vongpaseuth K, Normanly J, Roberts SC, Walker EL (2012). Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. BMC Genomics, 13: 148
- Li FL, Ma XJ, Hu XL, Hoffman A, Dai JG, Qiu DY (2011). Antisense-induced suppression of taxoid 14 β -hydroxylase gene expression in transgenic *Taxus×media* cells. Afric J Biotechnol, 10 (44): 8720~8728
- Li LQ, Fu CH, Zhao CF, Xia J, Wu WJ, Yu LJ (2009). Efficient extraction of RNA and analysis of gene expression in a long-term *Taxus* cell culture using real-time RT-PCR. Z Naturforsch C, 64 (1-2): 125~130
- Li S, Zhang P, Zhang M, Fu C, Yu L (2013). Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of the *DBAT* gene in *Taxus chinensis*. Plant Biol, 15 (1): 19~26
- Li ST, Zhang P, Zhang M, Fu CH, Zhao CF, Dong YS, Guo AY, Yu LJ (2012). Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. BMC Genomics, 13: 295~305
- Liu J, Möller M, Gao LM, Zhang DQ, Li DZ (2011). DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species. Mol Ecol Resour, 11 (1): 89~100
- Liu J, Provan J, Gao LM, Li DZ (2012). Sampling strategy and potential utility of indels for DNA barcoding of closely related plant species: a case study in *Taxus*. Int J Mol Sci, 13 (7): 8740~8751
- Lovisetto A, Guzzo F, Tadiello A, Toffali K, Favretto A, Casadoro G (2012). Molecular analyses of MADS-box genes trace back to gymnosperms the invention of fleshy fruits. Mol Biol Evol, 29 (1): 409~419
- Miao YC, Lang XD, Zhang ZZ, Su JR (2013). Phylogeography and genetic effects of habitat fragmentation on endangered *Taxus yunnanensis* in southwest China as revealed by microsatellite data. Plant Biol, doi: 10.1111/plb.12059
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Cusidó RM, Goossens A, Palazón J (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. J Plant Physiol, 170 (2): 211~219
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Palazón J, Goossens A, Cusidó RM (2011). The relationship between *TXS*, *DBAT*, *BAPT* and *DBT-NBT* gene expression and taxane production during the development of *Taxus baccata* plantlets. Plant Sci, 181 (3): 282~287
- Poudel RC, Möller M, Gao LM, Ahrends A, Baral SR, Liu J, Thomas P, Li DZ (2012). Using morphological, molecular and climatic data to delimitate yews along the Hindu Kush-Himalaya and adjacent regions. PLoS One, 7 (10): e46873
- Qiu D, Pan X, Wilson IW, Li F, Liu M, Teng W, Zhang B (2009). High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor

- methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene*, 436 (1-2): 37~44
- Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB (2001). Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (4): 1501~1506
- Sun GL, Yang YF, Xie FL, Wen JF, Wu JQ, Wilson IW, Tang Q, Liu HW, Qiu DY (2013). Deep sequencing reveals transcriptome reprogramming of *Taxus media* cells to the elicitation with methyl jasmonate. *PLoS One*, 8 (4): e62865
- Tanaka K, Li F, Morikawa K, Nobukawa T, Kadota S (2011). Analysis of biosynthetic fluctuations of cultured *Taxus* seedlings using a metabolomic approach. *Phytochemistry*, 72 (14-15): 1760~1766
- Tu J, Zhu P, Chen KD (2004). Taxol biosynthesis: molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus chinensis* and expression in *Saccharom cerevisiae*. *J Huazhong Agricul Univ*, 23 (1): 173~174
- Walker K, Croteau R (2000a). Molecular cloning of a 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (2): 583~587
- Walker K, Croteau R (2000b). Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (25): 13591~13596
- Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R (2002a). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (20): 12715~12720
- Walker K, Long R, Croteau R (2002b). The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (14): 9166~9171
- Walker K, Schoendorf A, Croteau R (2000). Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 374 (2): 371~380
- Wang W, Shi Q, Zhu P, OUYang T, Li N, Chen KD (2002). cDNA Cloning, expression and characterization of taxadiene synthase, a diterpene cyclase from *Taxus chinensis*. *Acta Bot Sin*, 44 (2): 181~187
- Wheeler AL, Long RM, Ketchum RE, Rithner CD, Williams RM, Croteau R (2001). Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 α -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. *Arch Biochem Biophys*, 390 (2): 265~278
- Wildung MR, Croteau R (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 271 (16): 9201~9204
- Wu Q, Sun C, Luo H, Li Y, Niu Y, Sun Y, Lu A, Chen S (2011). Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 pyrosequencing. *Planta Med*, 77 (4): 394~400
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Ann Rev Plant Biol*, 57: 781~803
- Zhang R, Yang S, Liao P, Tang KX, Kai GY (2010). Molecular cloning and characterization of a new cDNA encoding taxane 13- α -hydroxylase from *Taxus media*. *J Shanghai Nor Univ (Nat Sci)*, 39 (1): 94~99
- Zhao K, Wang X, Li XL, Zhang XJ, Xiao S, Ping WX, Zhou DP (2010). Cloning of taxadiene synthase cDNA from *Taxus cuspidata* and its southern hybridization with the genome DNA of taxol producing fungus. *J Nat Sci Heilongjiang Univ*, 27 (6): 747~753