

小佛肚竹生氰糖苷合成关键酶 CYP79 家族 同源基因的克隆和鉴定

王月圆, 刘向敏, 周明兵, 汤定钦

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 生氰糖苷是由氰醇衍生物的羟基和 D-葡萄糖缩合形成的糖苷, 已在 2 000 多种植物中发现, 分属于蕨类植物、裸子植物和被子植物的 130 个家族。生氰糖苷的主要生物学功能在于阻止食草动物和病原体对植物的侵害。通过反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术从小佛肚竹 *Bambusa ventricosa* 幼笋中克隆到 CYP79 家族同源基因的 cDNA 全长, 命名为 *BvCYP79*。*BvCYP79* 共有 1 913 个碱基对, 翻译起始点为 193 碱基处, 终止子位于 1 752 bp, 包含 1 个 1 559 bp 的完整编码区, 开放阅读框共编码 519 个氨基酸。具有 PERF 和 SFSTGRRGICIA 保守结构域, 属于典型的单子叶植物 CYP79 家族基因。生氰糖苷途径可能也存在于竹类植物, 因而在食用笋的安全性评估上具有一定指导意义。图 3 参 12

关键词: 分子生物学; 生氰糖苷; 小佛肚竹; CYP79 家族

中图分类号: S718.3; Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2012)04-0510-06

Cloning and characterization of the CYP79 homolog-key enzyme gene involved in biosynthesis of cyanogenic glycosides in *Bambusa ventricosa*

WANG Yue-yuan, LIU Xiang-min, ZHOU Ming-bing, TANG Ding-qin

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Cyanogenic glycosides, a molecule in which a sugar is bound to a non-carbohydrate moiety, usually a small organic molecule, and found in more than 2 000 higher plant species, including ferns, gymnosperms, and angiosperms making up 130 plant families, have been used as defense compounds against herbivores and pathogens. In order to investigate whether there is cyanogenic glycosides pathway in the *Bambusa ventricosa*, the CYP79 homolog gene was aimed to be characterized. In this study, a CYP79 homolog gene (named *BvCYP79*) was cloned from the shoot tip of *B. ventricosa* McClure by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE), which was 1 913 base pairs (bp) in length encoding 519 amino acids. The start codon was located at 193 bp, and the stop codon was located at 1 752 bp. Results showed that the translated *BvCYP79* contained the typical plant CYP79 domains including PERF and SFSTGRRGICIA motifs. The obtained data showed a possible cyanogenic glucoside pathway in *B. ventricosa* by blast and functional prediction. This could be helpful for safety evaluation with bamboo shoots. [Ch, 3 fig. 12 ref.]

Key words: molecular biology; cyanogenic glycosides; *Bambusa ventricosa*; CYP79

生氰糖苷(cyanogenic glycosides)亦称氰苷、氰醇苷, 是由氰醇衍生物的羟基和 D-葡萄糖缩合形成的

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2011-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070590; R303420)

作者简介: 王月圆, 从事林学研究。E-mail: tiantian815237@163.com。通信作者: 汤定钦, 教授, 博士, 从事植物学研究。E-mail: tang@zafu.edu.cn

糖苷,已在 2 650 多种植物中发现,分属于蕨类植物(蕨类)、裸子植物和被子植物(开花植物)的 130 个家族^[1-2]。生氰糖苷的主要生物学功能在于阻止食草动物和病原体的对植物侵害。当生氰植物(本身含有生氰糖苷的植物)外部受损时,生氰糖苷将会产生有毒的氰化氢(HCN),从而阻止食草动物和病原体的进一步伤害^[3]。生氰糖苷的生物合成过程比较简单,一般包括 3 个步骤,催化生氰糖苷合成的酶主要是 2 种细胞色素 P450,属于 CYP79 家族和 CYP71 家族,另外还有一种葡萄糖转移酶 UGT85B1^[4]。本研究首次在竹子中发现和鉴定到生氰糖苷合成的关键酶 CYP79 家族同源基因(DQ409175),表明在竹亚科 Bambusoideae 也可能存在生氰糖苷途径,为研究竹类植物生氰糖苷的生物合成,人为控制生氰糖苷生物合成,从而干扰其毒性的产生,保证食笋的安全性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Taq DNA 聚合酶,三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs),Agarose Gel DNA Extraction Kit,PCR Product Extraction Kit 等均为上海生工公司产品,大肠埃希菌 *Escherichia coli* 转化的受体为大肠埃希菌 DH5 α 菌株,克隆质粒载体为 pMD18-T。在浙江省临安市太湖源观赏竹种园采集小佛肚竹 *Bambusa ventricosa* 幼嫩的笋作为基因克隆的起始材料。

1.2 总 RNA 提取

采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取小佛肚竹幼笋的核糖核酸(RNA),用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒 Su-perScriptTM First Strand Synthesis System for RT-PCR 合成 cDNA。

1.3 基因的克隆与序列分析

根据已知 CYP79 家族同源基因序列设计上游引物 PF(5'-CCG TGG AAG GAG ACG CTG TCG -3')和下游引物 PR (5'-GGG GTC GCA GTG CGG ACC GGT GCC -3'),由上海生工生物工程有限公司合成。以小佛肚竹 cDNA 为模板,片段扩增温度反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。聚合酶链式反应(PCR)产物克隆到 pMD18-T 载体,转化大肠埃希菌 DH5 α 菌株,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析后,再将单克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

基因序列的 3' 端延伸和 5' 端延伸分别采用 Invitrogen 公司的 3' RACE kit 和 TaKaRa 公司的 BD SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit。3'-RACE 的 2 条特异引物分别为 P3-1:5'-GGC GAC CAG TGG AAG AAG ATG -3'和 P3-2:GCG GCT ACA AGA ACG CAG TT,精简的通用扩增引物(AUAP):5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'。5'-RACE 的特异引物分别为 P5-1:5'-TTC ACC ATA GCC TCC TAC AGT CCA ACC AAA-3',通用套式引物(NUP):AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT。

3'末端扩增反应条件同中间序列扩增一致,5'末端扩增反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,5 个循环;70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,27 个循环。聚合酶链式反应(PCR)产物克隆到 pMD18-T 载体,送上海生工生物工程有限公司测序。根据中间扩增片段、3'末端扩增片段和 5'末端扩增片段的序列利用 Vector NTI Advance 9 软件拼接成全长序列。设计一对引物(CICR-5:CTGAAGGACTAGGAGACATCAGC 和 CICR3:GGGCACCATAGCC-TCCTACAG)一次性将全长序列扩增出来,克隆到 pMD18-T 载体后,测序验证。利用 DNASTAR 和 Clustl W 等生物软件分析测定 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点,并与美国国家生物技术信息中心(NCBI)蛋白质数据库进行 Blast 比较分析。

1.4 系统树的构建

采用邻位相连法(neighbor-joining, N-J 法)绘制系统树,并对其进行自展(bootstrap value 1000)性评估;最后用 TreeView 软件观看、输出图形化的系统树,每个类群出现的概率用百分数表示。

2 结果与分析

2.1 小佛肚竹 BvCYP79 基因的克隆

以小佛肚竹 cDNA 为模板,上游引物(PF)和下游引物(PR)扩增出 400 bp 左右有 1 条片段(图 1A),

与预测的基因片段长度基本相符,初步确定为目的基因片段。

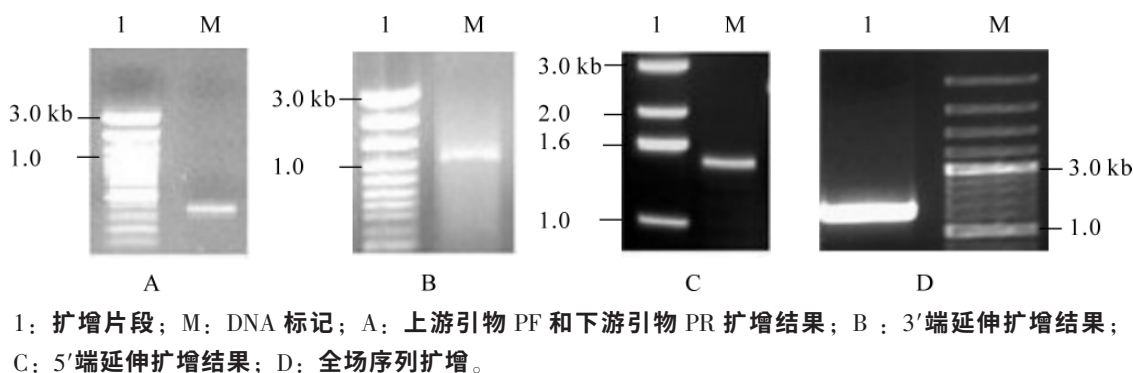


图1 聚合酶链式反应(PCR)产物电泳检测

Figure 1 Gel electrophoresis of amplification fragments of *BvCYP79*

测序结果表明:插入片段为 379 bp。应用 NCBI Blast 在线软件,将测序的序列与已报道的基因进行同源比较,发现编码的氨基酸编码序列含有 CYP79 蛋白家族的保守域,初步确认为扩增的部分基因序列来源于 CYP79 家族基因。

再次以小佛肚竹cDNA为模板,用特异引物P3-1, P3-2和精简的通用扩增引物(AUAP)扩增出1 411 bp左右的条带,特异引物P5-1和通用套式引物(NUP)扩增出1 102 bp左右的条带(图1B, C),经测序后,与中间片段拼接得小佛肚竹CYP79家族基因的全长cDNA,根据两端序列设计相应的引物,进行全长序列扩增(图1D),测序结果与拼接结果一致,遂命名为*BvCYP79*。该全长cDNA序列为1 913 bp(图2),翻译起始点为193碱基处,终止子位于1 752 bp,包含1个1 559 bp的完整编码区,开放阅读框共编码519个氨基酸(图2)。

2.2 小佛肚竹 *BvCYP79* 氨基酸序列分析

应用 ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)对上述推测的氨基酸序列进行分析。*BvCYP79* 编码蛋白质的分子量(MW)58 149.8 D, 理论等电点(theoretical PI)为 6.00, 分子式(formula)为 $C_{2594}H_{4101}N_{741}O_{738}S_{21}$ 。用 PBIL Network Protein Sequence Analysis 对基因编码蛋白质产物的二级结构进行了分析,*BvCYP79* 的二级结构中 41.43%为螺旋结构(helices), 5.78%为线状结构(strands), 52.79%为卷曲结构(coils), 卷曲结构和螺旋结构是 *BvCYP79* 蛋白质二级结构的骨架。

应用 Blast 进行氨基酸序列相似性比较,*BvCYP79* 与大麦 *Hordeum vulgare* 的 *HvCYP79A8* (ACJ70085), 琴叶拟南芥 *Arabidopsis lyrata* 的 *AtCYP79B2* (XP-002866896) 以及拟南芥 *A. thaliana* 的 *AtCYP79B2* (NP-195705) 的相似性最高, 均达 99%, 其次为甘蓝型油菜 *Brassica napus* 的 *BnCYP79B5* (AF453287-1), 相似性为 98%, 和甘蓝 *B. oleracea* 的 *BoCyp79B1* (ADW54459) 相似性为 97%, 和杨毛果 *Populus trichocarpa* 的 *PtCYP79D8* (XP-002305081) 相似性为 96%。上述蛋白质序列都聚具有 CYP79 家族特有的 PERH 区域和与处在血红素结合区的保守序列(S/T)F(S/T)TGRRGCXG。

2.3 小佛肚竹 *BvCYP79* 聚类分析

植物细胞色素 P450 家族(the cytochrome P450 superfamily)又称之为 CYP 家族,其基因总数尚不清楚,至今已鉴定 90 多个植物 P450 基因,分属于 27 个基因(*CYP51*, *CYP71*, *CYP72*, ..., *CYP96*)^[5]。选取 34 个与 *BvCYP79* 同源关系最近的 P450 基因的氨基酸与 *BvCYP79* 氨基酸序列做聚类分析,结果表明:*BvCYP79* 与高粱 *Sorghum bicolor* 的 *SbCYP79A1* 进化关系最近,喻示着它们之间有类似的生物学功能(图 3)。高粱的 *SbCYP79A1* 是在生氰糖苷合成中首先被分离和鉴定的酶,是从高粱黄化苗的微粒体中分离出来^[6]。在高粱黍蜀氰苷代谢过程中,*CYP79A1*, *CYP71E1* 和 *UGT85B1* 作为一个联合体共同起作用,在 NADPH(细胞色素 P450 还原酶)的参与下,由氰醇衍生物的羟基和 D-葡萄糖催化缩合形成的糖苷。*BvCYP79* 基因在小佛肚竹的克隆和鉴定表明生氰糖苷途径也可能存在于竹类植物。


```

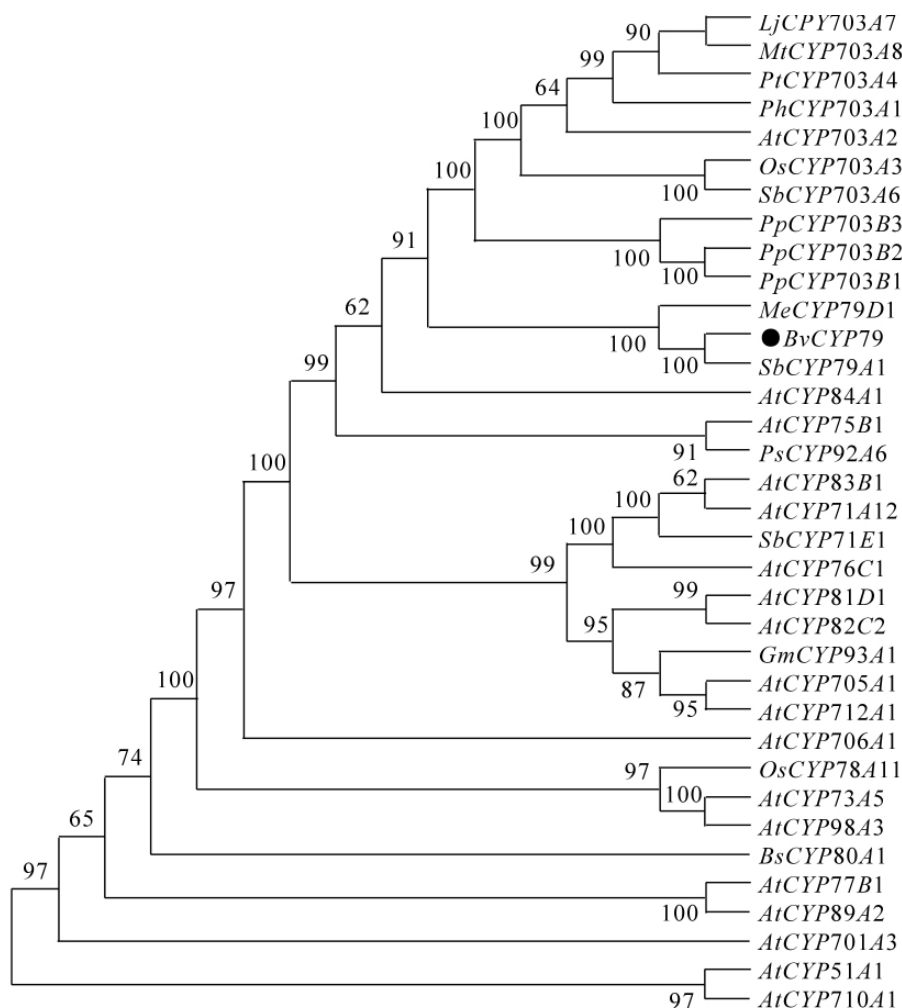
1      cacgcgggggagcttcccatctgttctcttcttcttgccttttatttttaaacgtgctccccggcc
67     gctaccagtgactgtgtagtgacacaagcaagcactattaatttctcactgtcacagtgacacat
133    ggagctaggggctccacaatgcttgaacgatccctgcttttgactttgtgaaagcaATGGTG
1      M V
199    ATCGCAATAACGTTCAATTTACTTCGTCCAAAGGCTTAGGCCGCGAGAGGAAGATCAGCGGTTGCGCG
3      I A I T F I Y F V Q R L R P Q R K I S G C A
265    TCTTCGGTTCGCGCGCTCCCGCCGGGACCGGTGCGGTGGCCAGTCTGTGGGAAACGTGCCGAGAATG
25     S S V A P L P P G P V P W P V V G N V P R M
331    ATGCTCAACAAGCCGGCGTTCCGAATGGATACATCTGATGATGAAAAGGAGATGGGCACCGACATC
47     M L N K P A F R M D T S D D E K E M G T D I
397    GCCTGCGTCCGGTCAGGCGGCATCCACGTCGTCGCGGTACCTGCCCAAGATCGCGCGGGAGGTG
69     A C V R S G G I H V V A V T C P K I A R E V
463    CTCAAGAAGCAGGACGCCAATTCGTGTCGCGCCCCCTCACCTTCGCGTCAAGGACGTTAGCTGC
91     L K K Q D A N F V S R P L T F A S R T F S C
529    GGCTACAAGAAGCAGTTCCTCTCGCCGTTTCGGCGACCAAGTGAAGAAGATGCGCCGGGTGCTCACC
113    G Y K N A V L S P F G D Q W K K M R R V L T
595    TCCGAGATCATCTGCCCTCCCGCCACAAGTGGCTCCACGACAAGCGCGACGACGAGGCCGACAAC
135    S E I I C P S R H K W L H D K R D D E A D N
661    CTGACCCGCTACGTCCTACAACCTCACCAGGAGGTACGGCGCCAGCGTTGATGTCAGGCACGTTGCC
157    L T R Y V Y N L T R R S G A S V D V R H V A
727    CGGCACTACTCGGCAACGTCACTCCGCGGCTTGCTTCGGCAAGCGCTACTTCGGCGAGCCGCGAG
179    R H Y C G N V I R R L V F G K R Y F G E P Q
793    CCCGACGAGGGCGCGGGCGCTCGAGGTGCGGCACGTGGACGCCGTGTTACCTCCCTAGGGCTC
201    P D G G P G P L E V R H V D A V F T S L G L
859    CTCTACGCGTTCGTCATCTCCGACTACCTCCCGTGGCTGCTCGGCCTCGACCTCGACGCCACGAG
223    L Y A F C I S D Y L P W L L G L D L D G H E
925    AAGGTCATCAAGGAGGCCAACCGGACGGTGAACAGGCTGCACGACACGGTCATCGACGAGCGGTGG
245    K V I K E A N A T V N R L H D T V I D E R W
991    AGGCAGTGAAGAGCGGCGAGAGGCAGGAGCTCGAGGACTTCCTCGACGTGCTCATCACGCTCAAA
267    R Q W K S G E R Q E L E D F L D V L I T L K
1057   GACGCCGACTCCGAGGGCAACCCGCTGCTCACCATCGAGGAGGTCAAAGCACAGTCTCAGGATATC
289    D A D S E G N P L L T I E E V K A Q S Q D I
1123   ACGTTCGCGCGGTGGACAACCCGTCGAACCCGTCGAGTGGGCGCTGGCGGAGATGATGAACAAC
311    T F A A V D A N P S N A A V E W A L A E M M N N
1189   CCGGAGGTGCTGCAGACGGCGGTGGATGAGATCGACCGGGTGGTGGGCGGGAGCGGCTGGTGCAG
333    P E V L Q T A V D E I D R V V G R E R L V Q
1255   GAGTCGGACATCCTGCGGCTCAACTACGTGAAGGCGTGCATCCGCGAGGCGTTCGGGCTGCACCCC
355    E S D I L R L N Y V K A C I R E A F R L H P
1321   GTCGCGCCATTCAACGTGCCGACGTCGCGCTCGCCGACACCACCATCGCCGGCTACCGCGTGCCC
377    V A P F N V P H V A L A D T T I A G Y R V P
1387   AAGGGCAGCCACGTATCTCAGCCGACAGGGTTGGGCGCAACCCGAGGGTCTGGGACGAGCCG
399    K G S H V I L S R T G L G R N P R V W D E P
1453   CTCCGGTTCAGGCGGAGCGCCACATGGCTGCTGACCCGACCTCGGCGGTGGCGCTCACGGAGAAC
421    L R F R P E R H M A A D P T S A V A L T E N
1519   GAGCTGCGGTTCACTCTCTTCAGCACCGGCGCGGGTGCATCGCGCGTCTCGTTCGGGACGGCG
443    E L R F I S F S T G R R G C I A A S L G T A
1585   ATGAGCGTGATGCTCTTCGGCAGGCTCCTGCAGGGCTTACCTGGAGCATGCCGGCTGGGGTGGCG
465    M S V M L F G R L L Q G F T W S M P A G V A
1651   GCTGTCGAGCTGAGTGAAGTCGACGACGACACCTTCTGGCCAAGCCGCTGGTGTGTCACGCCCAG
487    A V E L S E S T H D T F L A K P L V L H A Q
1717   CCGCGCTGCCGGTGCACCTCTACCCGGGCATCTAAttaattaattaattggggatttctacggct
509    P R L P V H L Y P G I *
1783   atgtgtcctactactactactactctttttgtctccgatgttgaagtcttgtctccgatcagcta
1849   taataaagagctccccggccaatcgccacgcacgaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

PERH和SFSTGRRGICIA保守序列用矩形方框标示。

图 2 小佛肚竹 *BvCYP79* 碱基序列和推测的氨基酸序列

Figure 2 Sequence of *BvCYP79*



树的分支程度来源于1 000个重复的自展率,用百分数表示。来源于不同物种的CYP家族基因的简称:At: *Arabidopsis thaliana*, Bs: *Berberis stolonifera*, Gm: *Glycine max*, Lj: *Lotus japonicas*, Me: *Manihot esculenta*, Mt: *Medicago truncatula*, Os: *Oryza sativa*, Ph: *Petunia x hybrida*, Pp: *Physcomitrella patens*, Pt: *Pinus taeda*, Sb: *Sorghum bicolor*。

图3 小佛肚竹 *BvCYP79* 与 34 个植物 P450 基因的氨基酸序列采用邻位相连法构建系统树

Figure 3 Phylogenetic relationships of the translated *BvCYP79* and 34 plant cytochrome P450 protein sequences collected in databanks

3 讨论

生氰糖苷在 2 000 多种植物中发现,分布于蕨类植物、裸子植物和被子植物。生氰的蕨类植物和裸子植物含有芳香族生氰糖苷,源自酪氨酸或苯丙氨酸,而被子植物含有脂肪族以及芳香族生氰糖苷分别来自于异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或酪氨酸、苯丙氨酸。另外,一些植物如西番莲 *Passiflora caerulea* 含有生氰糖苷来自蛋白氨基酸环戊烯甘氨酸。当含有生氰糖苷的植物组织受损害时,生氰糖苷将被 β -糖苷酶和 α -羟肟酶降解,释放出有毒的氰化氢以及葡萄糖和醛或酮,使植物对草食动物和病原体造成的组织损伤进行即时的化学防御反应^[7-8];转基因植物也可以容纳其他植物的生氰糖苷合成途径,积累产生生氰糖苷,达到阻止特殊昆虫危害的目的。如在转基因拟南芥异源表达 3 个高粱基因的研究中,发现专食十字花科 *Cruciferae* 植物的跳蚤甲虫不吃含有黍蜀氰苷的拟南芥。这清楚地显示代谢工程在生产所需特性的农作物方面的潜力^[9]。小佛肚竹是优良的观赏竹类,在园林观赏上具有广泛的应用前景,调查 *BvCYP79* 功能,为增强小佛肚竹的病害防御功能及通过基因工程手段调控小佛肚竹生氰糖苷生物合成奠定了基础。

生氰糖苷在分子水平上的进化信息, 目前在植物中只限于 CYP79 家族。从植物中选定 71 个 CYP79 家族成员进行系统发育重建工作, 表明 CYP79 家族在被子植物和裸子植物分化前 (3 亿年前) 起源于共同祖先, 反映了生氰糖苷的古老性^[10]。本研究利用小佛肚竹 *BvCYP79* 和 34 个植物 P450 基因的氨基酸的聚类分析结果也表明 P450 基因应该起源的共同祖先, 并在单子叶植物和双子植物分化之前就开始了功能的歧化。

与其他家族的植物色素 P450 相比, CYP79 家族的特点是一般具有保守的“PERF”和血红素结合域^[11]。在单子叶植物 CYP79 家族的 PERF 区域, 保守的非极性的和芳香族的苯丙氨酸残基被带正电荷的氨基酸残基组氨酸所取代而使单子叶植物 CYP79 家族保持着 PERH 区域。同样, 在血红素结合区保守序列 PFGXGRRXCXG, 疏水性氨基酸用极性的丝氨酸或苏氨酸残基进行 3 种替换, 提供了单子叶植物 CYP79 家族相应保守序列为 (S/T)F(S/T)TGRRGCI^[6,12], 小佛肚竹 *BvCYP71* 的编码氨基酸在上述 2 个保守域分别为 PERF 和 SFSTGRRGCI, 属于典型的单子叶植物 CYP79 家族基因 (图 3)。本课题计划通过原核和真核表达分析 *BvCYP71* 催化功能, 探讨生氰糖苷对小佛肚竹生长发育的影响。

参考文献:

- [1] CONN E E. Cyanogenic glycosides [J]. *Biochem Plants*, 1981, **7**: 479 – 500.
- [2] SIEGLER D S, BRINKER A M. Characterisation of cyanogenic glycosides, cyanolipids, nitroglycosides, organic nitro compounds and nitrile glycosides from plants [G] // DEY P M, HARBORNE J B. *Methods of Plant Biochemistry, Alkaloids and Sulfur Compounds*. New York: Academic Press, 1993: 51 – 93.
- [3] WINKEL B S J. Metabolic channeling in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 85 – 107.
- [4] HANSEN K S, KRISTENSEN C, TATTERSALL D B, *et al.* The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyano-hydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor* [J]. *Phytochemistry*, 2003, **64**: 143 – 151.
- [5] MORANT M, BAK S, MØLLER B L, *et al.* Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 151 – 162.
- [6] BAK S, KAHN R A, NIELSEN H L, *et al.* Cloning of three A-type cytochromes P450, *CYP71E1*, *CYP98*, and *CYP99* from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of *CYP71E1* as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, **36**: 393 – 405.
- [7] JONES P R, ANDERSEN M D, NIELSEN J S, *et al.* The biosynthesis, degradation, transport and possible function of cyanogenic glucosides [G] // ROMEO J T, IBRAHIM R, VARIN L, *et al.* *Evolution of Metabolic Pathways*. New York: Elsevier Science, 2000: 191 – 247.
- [8] TATTERSALL D B, BAK S, JONES P R, *et al.* Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis [J]. *Science*, 2001, **293**: 1826 – 1828.
- [9] MORANT A V, JØRGENSEN K, JØRGENSEN B, *et al.* Lessons learned from metabolic engineering of cyanogenic glucosides [J]. *Metabolomics*, 2007, **3**: 383 – 398.
- [10] BAK S, PAQUETTE S, MORANT M, *et al.* Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450 [J]. *Phytochem Rev*, 2006, **5**: 309 – 329.
- [11] WERCK-REICHHART D, BAK S, PAQUETTE S. Cytochrome P450 [R] // SOMERVILLE C R, MEYEROWITZ E M. *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002.
- [12] ANDERSEN M D, BUSK P K, SVENDSEN I, *et al.* Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin: cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 1966 – 1975.