

杉木纤维素合成酶基因 *CesA* 的克隆及表达分析

庞 景, 童再康, 黄华宏, 林二培, 刘琼瑶

(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: 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 从杉木 *Cunninghamia lanceolata* 中克隆到 2 个全长为 3 235 bp 和 3 876 bp 的纤维素合成酶基因 cDNA 序列, 被分别命名为 *ClCesA1* 和 *ClCesA2*, GenBank 登录号分别为 JQ844574 和 JQ844575。相应编码蛋白分别包含 992 和 1 092 个氨基酸残基, 推测分子量为 111 845.3 D 和 123 105.7 D, 等电点为 6.04 和 6.65。氨基酸序列分析发现, 它们具有植物纤维素合成酶基因相应的结构特征——锌指结构, 2 个易变区 CSRI 和 CSRII, 2 个保守区 CRI 和 CRII, 纤维素合成酶底物结合结构域 “D, D, D, QVLRW”, 以及 8 个跨膜区。荧光定量 PCR 分析表明: *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 基因在茎中表达丰度均为最高, 且成熟木质部中表达量均高于皮层中的相应数值; 2 个基因在根和针叶中的表达量相对较低。以具特殊材质性状的矮生杉木和正常杉木木质部为材料的进一步表达分析发现: *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 在正常杉木木质部中的表达量大约是矮生杉木表达量的 2~12 倍。2 个杉木 *CesA* 基因可能在杉木木材形成过程中具有重要作用。图 5 参 19

关键词: 林木育种学; 杉木; *CesA* 基因; 基因克隆; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S722.3; Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2015)01-0040-07

Isolation and expression analysis of cellulose synthase genes in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*)

PANG Jing, TONG Zaikang, HUANG Huahong, LIN Erpei, LIU Qiongyao

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

Abstract: In this study, two full-length cDNAs encoding cellulose synthase (CESA) were isolated from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) using RT-PCR and RACE technology, and their sequence lengths were 3 235 bp and 3 876 bp, respectively. They were named *ClCesA1* and *ClCesA2*, and the corresponding GenBank accession numbers were JQ844574 and JQ844575 respectively. The encoded proteins are composed of 992 and 1 092 amino acids, with theoretical molecular weight of 111 845.3 and 123 105.7 D, whose isoelectric points are 6.04 and 6.65, respectively. Amino acid sequences contain typical motifs of plant CESA proteins: a ring finger domain, two class specific regions CSRI and CSRII, two conserved regions CRI and CRII, cellulose synthase substrate binding domain “D, D, D, QVLRW”, and eight transmembrane regions. The expression analysis showed that *ClCesA1* and *ClCesA2* genes exhibited the high transcript abundance in stem, the corresponding expression levels in mature xylem were higher than that in cortex. The two genes had the lower expression levels in root and leaf. The further expression analysis was conducted using the dwarf Chinese fir with the specific wood properties. The results showed that the expression levels of *ClCesA1* and *ClCesA2* in the xylem of normal fir were about 2–12 times than that of the dwarf. Two *ClCesA* genes may be play important

收稿日期: 2013-12-30; 修回日期: 2013-05-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2011AA100203); 浙江省农业科技重点项目(2012C12908-11, 2011C12014); 浙江农林大学亚热带森林资源培育研究中心预研项目(CCSFR2013002)

作者简介: 庞景, 从事林木遗传育种研究, E-mail: 294144351@qq.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 博士生导师, 从事林木遗传育种研究。 E-mail: zktong@zafu.edu.cn

roles in the wood formation of Chinese fir. [Ch, 5 fig. 19 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Cunninghamia lanceolata*; *CesA* gene; cloning; sequence analysis; expression analysis

纤维素是木材的主要成分之一, 约占木材干质量的 40% 以上, 是木材品质的主要决定因子。纤维素是由 β -1,4-葡萄糖残基组成的不分支多糖, 它的合成涉及一个复杂的酶系, 其中由纤维素合成酶催化亚基(CESA)组成的复合酶是关键酶之一。因此, *CesA* 基因的克隆及其功能解析一直是植物分子生物学领域中的一个研究热点。1996 年, Pear 等^[1]分离鉴定了高等植物中的第 1 个 *CesA* 基因, 即来自棉花 *Gossypium hirsutum* 的 *GhCesA1*。美国的密歇根大学 2000 年从欧洲颤杨 *Populus tremuloides* 中克隆到了林木中的第 1 个纤维素合成酶基因 *PtrCesA1* 基因, 它是一个在木质部特异表达的纤维素合成酶基因, 与次生壁的形成有关^[2]。此后来自拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 10 个 *AtCesA*, 毛果杨 *Populus trichocarpa* 的 18 个 *PtrCesA*, 以及欧洲颤杨、赤桉 *Eucalyptus camaldulensis* 等植物的部分 *CesA* 基因相继被鉴定^[3-5], 尤其是通过突变体分析, 来自拟南芥的 9 个 *AtCesA* 功能已基本被解析^[6], 其中 *AtCesA1*, *AtCesA3*, *AtCesA6* 与细胞初生壁的形成相关, 而 *AtCesA4*, *AtCesA7*, *AtCesA8*^[7]都只在有次生壁的细胞中表达, 可能与细胞次生壁的形成有关。欧洲颤杨中的 *PtrCesA2*^[8]和 *PtrCesA5*^[9]基因主要在正在发育的木质部表达, 参与次生壁的形成。来自赤桉的 *EcCesA4*, *EcCesA5* 与初生壁合成有关, *EcCesA1*, *EcCesA2* 和 *EcCesA3*^[10]则参与次生壁合成。这些基因的研究为其他植物纤维素合成机制的解析奠定了坚实的基础。杉木 *Cunninghamia lanceolata* 是中国南方重要的针叶速生用材树种, 用途广泛。近年来有关杉木材性性状形成分子机制的研究取得了明显进展^[11-13], 然而涉及其纤维素生物合成分子机制的研究报道甚少, 仅彭沙沙等^[14]克隆了杉木纤维素合成酶类似蛋白 *ClCsID1*, 并对它进行了生物信息学分析。本研究利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)结合 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术, 分离克隆了 2 个杉木 *CesA* 基因, 对它们进行了生物信息学分析, 以及在不同器官(或组织)表达差异分析, 以期为进一步的功能解析提供实验依据, 同时也为杉木分子辅助育种提供重要基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为杉木速生无性系 B057 和矮生无性系, 均栽植于浙江省临安市横畈林场。在 2012 年 6 月下旬, 采集正常速生无性系的当年生成熟针叶、茎、根, 以及正常速生杉木和矮生杉木 1 年生茎段的皮层、正常发育的木质部。所有材料液氮速冻之后存放在 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 实验试剂

克隆用的大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 为本实验室保存; SMARTTM RACE cDNA-amplification-kit (Clontech); PureLinkTM plant RNA reagent 提取试剂盒(上海英俊生物技术有限公司); Peasy-T1 simple cloning kit(TransGen Biotech); AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AxyGEN); PCR 反应试剂 10 \times buffer(缓冲液), 脱氧核苷三磷酸(dNTPs), *Taq* DNA 聚合酶均购自上海生物工程有限公司; 引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

总 RNA 的提取采用 PureLinkTM plant RNA reagent 试剂盒进行; cDNA 第 1 链的合成则采用购自大连 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM RT reagent kit 反转录试剂盒进行。

1.4 *ClCesA* 基因的扩增

根据已报道的其他植物 *CesA* 基因序列, 在纤维素合成酶保守区域设计 RT-PCR 上游引物 RR: 5'>TGYTAYGTNCARTTYCCWC<3', 下游引物 RF: 5'>GANCRTADATCCANCC<3'(Y: C or T; N: A or T or C or G; R: A or G; W: A or T; D: A or G or T)。 *ClCesA* 基因中间片段的获得参照 RrimscriptTM RT-PCR kit 试剂盒(TaKaRa)步骤来进行。PCR 产物回收后连接到 Peasy-T1 simple cloning vector(TransGen Biotech)上, 转化大肠埃希菌 DH5 α , 筛选阳性克隆后送华大基因公司测序。根据 RT-PCR 片段的序列测定结果以及局部序列的比对结果, 分别合成 *ClCesA* 5'RACE 和 3'RACE 特异引物。

ClCesA1-GSP1: 5'>TACTGGACCTTGGATGCCGTCTAAC<3';
ClCesA1-GSP2: 5'>TGCATCGACACTAATGGAGAGTGGC<3';
ClCesA2-GSP1: 5'>CTGTGCCAACATAAACAGGTCCCTG<3';
ClCesA2-GSP2: 5'>CTAATGGAAGATGCTGCTCCTC<3'.

5'RACE 和 3'RACE 具体步骤均参照 SMATR™ RACE cDNA amplification kit(Clontech)的说明书进行, PCR 产物经回收测序后, 与已克隆的 *ClCesA* 基因片段拼接, 从而获得全长 cDNA 序列。根据拼接得到的 *ClCesA* 全长 cDNA 序列设计特异引物, 经 PCR 扩增、测序, 验证其准确性。相应引物序列如下。

ClCesA1-U: 5'>TGGAGGGGTGTAATGGCTACT<3';
ClCesA1-L: 5'>ATTGAATTGCTATTTAGAAAG<3';
ClCesA2-U: 5'>TTCAAGTAGTAGTGGTAGCGG<3';
ClCesA2-L: 5'>TCCTGAGTTGTCTTTGCTAAG<3'.

1.5 生物信息学分析

利用 Nucleic Tools (<http://srs.ebi.ac.uk/tooLs>)分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成; 用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tooLs/protparam.html>)工具推测其分子量和等电点(PI); 用 ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>)工具推测其疏水性; 用 TMHMM (<http://www.cds.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对其跨膜区进行预测; 并用 SignalP (<http://www.cds.dtu.dk/services/SignalP/>)软件对其 N 端进行分析; 在 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Subloc/>)进行蛋白质亚细胞定位; 同时用 ExPASy 的 HNN (<http://www.expasy.org/tooLs/HNN.html>)预测其二级结构进行; 利用蛋白质保守结构域推测工具 InterProScan (<http://ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>)分析结构域; 利用 MEGA 4.0 的邻接(NJ)算法构建 *CesA* 蛋白的系统进化树。

1.6 基因表达的定量 PCR 分析

以正常杉木根、茎、叶、木质部和皮层, 矮生杉木木质部的 cDNA 为模板, 利用实时荧光定量 PCR 检测 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 在不同器官和组织中的表达变化, 采用 TaKaRa 公司的定量 PCR 专用的 PrimeScript® reagent kit 和 SYBR® Premix ex Taq™(Tli RNaseH Plus)试剂盒, 以 *ClActin* 作为内参。

ClCesA1 基因引物序列 5'端引物序列: 5'>GAGCAAATCTCAGACTCCTACTC<3'; 3'端引物序列: 5'>TATATCCCTACGACTCTGTCCAC<3'。 *ClCesA2* 基因引物序列 5'端引物序列: 5'>GCATC-CATTTTCTCCTTGCTTTG<3'; 3'端引物序列: 5'>ATTGCTGTTTGCCCAACATCAGT<3'。 *ClActin* 基因引物序列 5'端引物序列: 5'>CAGCAACTGGGATGATATGG<3'; 3'端引物序列: 5'>ATTTCGCTTTCAGCACTGGT<3'。

2 结果与分析

2.1 杉木 *ClCesA1*, *ClCesA2* 基因的克隆与生物信息学分析

本研究通过 RACE 技术, 成功克隆到杉木的 2 个 *ClCesA* 基因, cDNA 长度分别为 3 235 bp 和 3 876 bp, 分别编码 992, 1 092 个氨基酸残基, 其在美国国家生物技术信息中心(NCBI)上的登录号分别为 JQ844574, JQ844575。经与 NCBI 数据库比对分析, *ClCesA1* 氨基酸序列与火炬松 *Pinus taeda* (AAX18647.1), 光皮桦 *Betula luminifera* (ACJ38664.1), 巨桉 *Eucalyptus grandis* (AAY60843.1)等 *CesA* 家族中部分成员序列同源性高达 82%, 73%, 73%。 *ClCesA2* 氨基酸序列与苧麻 *Boehmeria nivea* (AAY78952.3), 马占相思 *Acacia mangium* (AAT66940.1), 巨桉 (AAY60847.1)等 *CesA* 家族中部分成员序列同源性高达 84%, 81%, 81%。

2 个推测 *ClCESA* 蛋白相对分子质量分别为 111 845.3 D, 123 105.7 D, 等电点分别为 6.04 和 6.65; 半衰期都大于 30 h, 不稳定系数分别为 35.15 和 39.02, 属于稳定蛋白。蛋白保守功能结构域的分析结果显示: 这 2 个蛋白都具有 1 个纤维素的合成功能域, 该结构域为纤维素合成酶蛋白家族的 1 个特征性结构域, 具有催化尿苷二磷酸形成的功能。通过与来自白桦 *Betula platyphylla*, 欧洲颤杨, 马占相思和巨桉等植物中已鉴定的 *CESA* 进行氨基酸序列比对和结构分析, 发现 2 个 *CESA* 蛋白与来自其他植物的 *CESA* 蛋白一样都含有锌指结合域; 2 个易变区域 CSRI 和 CSRII, CSRI 紧跟锌指结构域后面, 由 88~166 个氨基酸残基组成, CSRII 位于 CRI 和 CRII 之间, 相比 CSRI 略短; 2 个高度保守区域 CRI 和 CRII,

CRI 位于 CSRI 之后, 由 394 个氨基酸残基组成, 而 CRII 则邻近碳端, 由 316 或 317 个氨基酸残基组成。这 2 个保守区内含有纤维素合成酶底物结合结构域 “D, D, D, QVLRW” (图 1, D: 天冬氨酸, Q: 谷氨酸, V: 缬氨酸, R: 精氨酸, W: 色氨酸), 其第 1 个和第 2 个 D 残基位于 CRI 内, 第 3 个 D 残基和 QVLRW 序列位于 CRII 内。跨膜结构预测表明: *ClCesA1* 蛋白拥有 8 个跨膜区, 分别是 182~204, 211~230, 767~789, 801~823, 838~860, 885~907, 917~939 和 952~971, 跨膜螺旋长度最小 19 个氨基酸残基, 最大 22 个氨基酸残基, 平均长度为 21.25 个氨基酸残基。所有这些结果基本符合目前已知高等植物 CESA 蛋白的特征, 进一步说明了分离的 2 个 *ClCesA* 基因序列确实为杉木 *CesA* 基因。*ClCesA1* 蛋白的二级结构中, α -螺旋(helix)占 34.51%, β -折叠(sheet)占 14.03%, 无规则卷曲(coil)占 51.46%; 疏水性/亲水性分析结果表明: 疏水性最大值为 3.311, 最小值为-3.222, 总体看属于亲水性蛋白。*ClCesA2* 中 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲分别占 33.09%, 15.95%, 50.96%; 疏水性最大值和最小值分别为 3.278 和-3.544, 也属亲水性蛋白。此外, 蛋白质亚细胞定位预测认定这 2 个蛋白都属于细胞质蛋白质(可靠性指标为 2; 预期准确性为 74%), 而且 SignalP 软件分析 2 个蛋白都为非分泌蛋白, 不具有信号肽结构。

2.2 系统进化树的分析

将 2 个预测的 *ClCesA* 蛋白与来自 4 种双子叶植物、2 种单子叶植物和 3 种裸子植物全长 CESA 氨基酸序列进行比对和构建进化树^[15](图 2)。可以看出: *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 与对应的火炬松、拟南芥、欧洲颤杨、巨桉、水稻 *Oryza sativa* 等直系同源蛋白聚在一起, 分属于 2 个与细胞壁物质形成相关的类群。在每个类群中, 来自单、双子叶植物和裸子植物的 *CesA* 基因都分别聚类在一起, 暗示在裸子植物与被子植物, 或单子叶植物与双子叶植物分化之前, 多数 *CesA* 进化产生了不同的类型。*ClCesA1* 与 *PtCesA1* 同源性最高, 并与欧洲颤杨 *PtrCesA1*, 水稻 *OsCesA4*, 巨桉 *EgCesA1*, 拟南芥 *AtCesA8* 等聚类在一个大的分支内; *ClCesA2* 与玉米 *Zea mays ZmCesA2*, 欧洲颤杨 *PtrCesA4*, 水稻 *OsCesA1*, 巨桉 *EgCesA5*, 拟南芥 *AtCesA1* 等聚类在一个大的分支内。

2.3 不同器官中 *ClCesA* 的表达差异

首先, 利用 RT-PCR 和定量 PCR 产物的融解曲线分析和克隆测序等方法, 对设计的 2 对 *ClCesA* 定量 PCR 引物的特异性和正确性进行了验证, 结果发现: 扩增特异且产物大小、序列正确, 可用于后续定量 PCR 分析。通过对不同器官中 *ClCesA* 基因表达情况分析得出(图 3), 目的基因在杉木的根、茎、叶中都有表达, 但表达模式却不同: *ClCesA1*, *ClCesA2* 基因在茎中表达丰度最高, *ClCesA1* 在根中的表达量最低, 而 *ClCesA2* 基因在根和叶中的表达丰度无显著差异。为了初步探讨目的基因在木材形成中的作用, 进一步以茎的木质部和皮层为材料进行表达分析, 结果发现: 2 个 *ClCesA* 基因在木质部中表达丰度均显著高于在皮层中的相应数值(图 4)。同时, 本研究以具特殊材质表型的矮生杉木木质部为材料进行目的基因表达量测定, 发现 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 在正常杉木木质部中的表达量明显高于矮生杉木, 相应数值是矮生杉木表达量的 2~12 倍(图 5)。

3 讨论

本实验通过应用 RACE 技术, 2 个杉木 *ClCesA* 基因的 cDNA 序列被成功分离, 它们均具有完整的开放阅读框(ORF), 且编码的 CESA 均包含高等植物 CESA 蛋白应有序列特征。从基于氨基酸序列相似性的分析结果看, 分别来自拟南芥、杨树和巨桉的 *AtCesA8*, *PtCesA1*, *EgCesA1* 等是 *ClCesA1* 的直系同源基因。拟南芥 *AtCesA8*^[17]是次生壁形成所必需的基因, 主要在花序茎中表达, 在缺少次生木质部的幼叶和花等器官中微弱表达。从欧洲颤杨中克隆的 *PtCesA1*^[8]基因在已发育木质部的次生壁合成中特异表达, 但在韧皮部纤维中却不表达。*EgCesA1* 也主要在木质部中表达, 而在无次生壁发生的组织中微弱表达^[17]。荧光定量 PCR 分析发现: *ClCesA1* 在茎中的表达量最高, 且在茎的木质部部位优势表达。矮生杉木在解剖与生理方面不同于正常杉木, 矮生杉木木质部细胞分化缓慢, 木材中纤维素含量相对低^[18]。进一步的表达分析也发现: *ClCesA1* 在矮生杉木木质部的转录丰度显著低于正常杉木的相应数值。因此, 可以推测 *ClCesA1* 是参与杉木木材次生壁形成的重要基因。进化树分析显示 *ClCesA2* 与 *AtCesA1*, *PtCesA4*, *EgCesA5* 等聚在一起。*AtCesA1*^[16]几乎在拟南芥的各个部位都表达, 其表达量远远高于

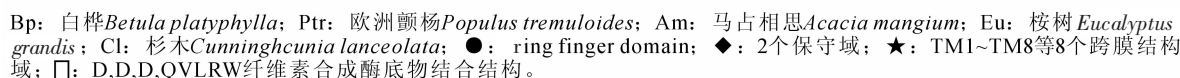
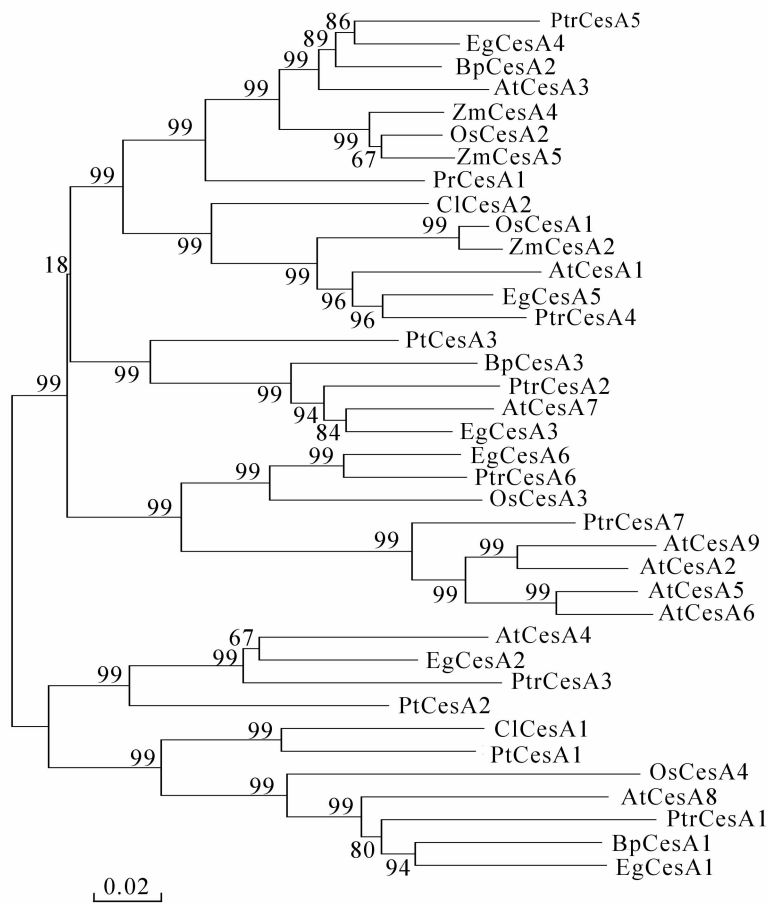


Figure 1 Amino acid residue alignment and motif analysis of different plant CESA sequences



Eg: 巨桉 *Eucalyptus*; Pr: 辐射松 *Pinus radiate*; Ptr: 欧洲颤杨 *Populus tremuloides*; Bp: 白桦 *Betula platyphylla*; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Os: 水稻 *Oryza sativa*; Pt: 火炬松 *Pinus taeda*; Cl: 杉木 *Cunninghamia lanceolata*; Zm: 玉米 *Zea mays*。

图 2 植物 CESA 蛋白的系统进化分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of CESA from different plant species

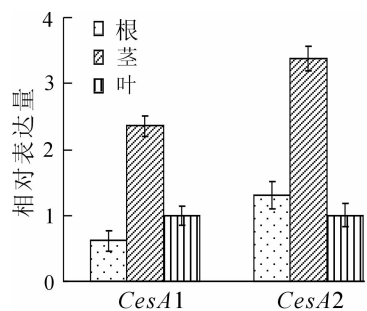


图 3 不同器官中 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 基因的相对表达量

Figure 3 Relative expression levels of *ClCesA1*, *ClCesA2* in different organs

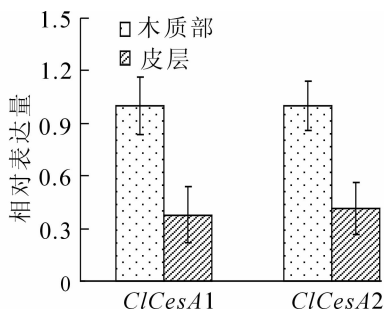


图 4 不同组织中 *ClCesA1* 和 *ClCesA2* 基因的相对表达量

Figure 4 Relative expression levels of *ClCesA1*, *ClCesA2* in different tissues

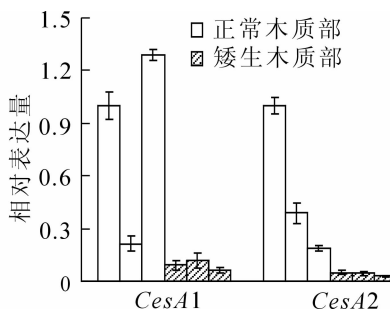


图 5 *ClCesA1*, *ClCesA2* 在正常杉木与矮生杉木木质部中的相对表达量

Figure 5 Relative expression levels of *ClCesA1*, *ClCesA2* in xylem

AtCesA9^[19], 被认为主要参与细胞初生壁的形成。*PtrCesA4*^[8]和 *EgCesA5*^[17]也被认为控制初生细胞壁中纤维素的合成。然而, 定量 PCR 分析结果显示, *ClCesA2* 呈现与 *ClCesA1* 相似的表达模式, 也主要在茎的木质部表达。可见, *ClCesA2* 是否直接参与细胞次生壁的形成有待验证。

植物 *CesA* 基因是以超基因家族存在的, 含有许多的基因成员, 不同的成员参与不同组织, 不同器官或不同细胞壁层次的纤维素合成。本研究虽从杉木中克隆到了 2 个 *CesA* 基因, 但其他 *CesA* 基因成员还未克隆到, 同时这 2 个基因的功能还需进行更深入的研究。

4 参考文献

- [1] PEAR J R, KAWAGOE Y, SCHRECKENGOST W E, *et al.* Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, **93**(22): 12637 – 12642.
- [2] WU Luguang, JOSHI C P, CHIANG V L. A xylem-specific cellulose synthase gene from aspen (*Populus tremuloides*) is responsive to mechanical stress [J]. *Plant J*, 2000, **22**(6): 495 – 502.
- [3] SUZUKI S, LI Laigeng, SUN Y H, *et al.* The cellulose synthase gene superfamily and biochemical functions of xylem-specific cellulose synthase-like genes in *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Physiol*, 2006, **142**(3): 1233 – 1245.
- [4] ENDLER A, PERSSON S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2011, **4**(2): 199 – 211.
- [5] RICHMOND T A, SOMERVILLE C R. The cellulose synthase superfamily [J]. *Plant Physiol*, 2000, **124**(2): 495 – 498.
- [6] BURN J E, HOCART C H, BIRCH R J, *et al.* Functional analysis of the cellulose synthase genes *CesA1*, *CesA2* and *CesA3* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, **129**(2): 797 – 807.
- [7] 陈鹏飞. 白桦纤维素合成酶基因克隆与表达特征分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
CHEN Pengfei. *Cloning of Cellulose Synthase Gene from Betula platyphylla and the Analysis of Their Expression Characteristic* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2008.
- [8] SAMUGA A, CHANDRASHEKHAR P. A new cellulose synthase gene (*PtrCesA2*) from aspen xylem is orthologous to *Arabidopsis AtCesA7* (*irx3*) gene associated with secondary cell wall synthesis [J]. *Gene*, 2002, **296**(1/2): 37 – 44.
- [9] KALLURI U C, JOSHI C P. Isolation and characterization of a new, full-length cellulose synthase cDNA, *PtrCesA5* from developing xylem of Aspen trees [J]. *J Exp Bot*, 2003, **54**(390): 2187 – 2188.
- [10] LIN Yen, KAO Yuying, CHEN Zenzong, *et al.* cDNA cloning and molecular characterization of five cellulose synthase a genes from *Eucalyptus camaldulensis* [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2014, **23**(2): 199 – 210.
- [11] 蒋向辉, 余朝文, 许栋, 等. 杉木 *CCoAOMT* 基因部分 cDNA 克隆与序列分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, **29**(6): 24 – 29.
JIANG Xianghui, SHE Chaowen, XU Dong, *et al.* Partial cDNA cloning and sequence analysis of *CCoAOMT* gene of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) [J]. *J Central South Univ For & Technol*, 2009, **29**(6): 24 – 29.
- [12] HUANG Huahong, XU Lili, TONG Zaikang, *et al.* De novo characterization of the Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) transcriptome and analysis of candidate genes involved in cellulose and lignin biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 648.
- [13] 吕运舟, 郑佳, 陈金慧, 等. 参与杉木次生壁合成调控的转录因子 CIMYB4 的克隆及在大肠杆菌中表达[J]. 分子植物育种, 2012, **10**(5): 512 – 519.
LÜ Yunzhou, ZHENG Jia, CHEN Jinhui, *et al.* Cloning transcription factor CIMYB4 involving in secondary cell wall biosynthesis from *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook and expressing in *E. coli* [J]. *Mol Plant Breed*, 2012, **10**(5): 512 – 519.
- [14] 彭沙沙, 童再康, 黄华宏, 等. 杉木纤维素合成酶类似蛋白基因 *CLCsID1* 的克隆及其生物信息学分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(1): 1 – 6.
PENG Shasha, TONG Zaikang, HUANG Huahong, *et al.* Clone and analysis of cellulose synthase-like protein D gene (*CSLD*) in *Cunninghamia lanceolata* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(1): 1 – 6.
- [15] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**(8): 1596 – 1599.
- [16] TAYLOR N G, SCHEIBLE W R, CUTLER S, *et al.* The irregular xylem 3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase are required for secondary cell wall synthesis [J]. *Plant Cell*, 1999, **11**(5): 769 – 779.
- [17] RANIK M, MYBURG A A. Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis [J]. *Tree Physiol*, 2006, **26**(5): 545 – 556.
- [18] 陈奋学, 黄华宏, 童再康, 等. 矮生杉木的解剖特性[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25**(5): 619 – 623.
CHEN Fenxue, HUANG Huahong, TONG Zaikang, *et al.* Anatomical characteristics of dwarf *Cunninghamia lanceolata* [J]. *J Zhejiang A For Coll*, 2008, **25**(5): 619 – 623.
- [19] BEECKMAN T, PRZEMECK G K H, STAMATIIOU G, *et al.* Genetic complexity of cellulose synthase a gene function in *Arabidopsis* embryogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2002, **130**(4): 1883 – 1893.