

植物次生代谢物途径及其研究进展

王莉^{1,2}, 史玲玲¹, 张艳霞¹, 刘玉军^{1*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 西藏民族学院医学系, 西藏咸阳 712082)

摘要: 植物次生代谢是植物在长期进化过程中与环境相互作用的结果, 由初生代谢派生。萜类、生物碱类、苯丙烷类为植物次生代谢物的主要类型, 其代谢途径多以代谢频道形式存在, 具有种属、生长发育期等特异性。从植物次生代谢物的分类、代谢途径及代谢调控基因工程等方面展开论述, 重点介绍了次生代谢物的生物合成途径, 以及利用基因工程等技术对植物次生代谢途径进行遗传改良等方面的研究进展, 为全面认识植物代谢网络、合理定位次生代谢及其关键酶、促进野生植物资源可持续利用等提供理论依据。

关键词: 次生代谢; 代谢频道; 调控机制; 限速酶

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)05-0500-09

Biosynthesis and Regulation of the Secondary Metabolites in Plants

WANG Li^{1,2}, SHI Ling-Ling¹, ZHANG Yan-Xia¹, LIU Yu-Jun^{1*}

(1. College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Department of Medicine, Tibet Institute for Nationalities, Xianyang, Tibet 712082, China)

Abstract: Plant secondary metabolism is resulted from interactions between plants and environments during the long-term evolution process, and is derived from the so-called primary metabolism. Terpenoids, alkaloids and phenylpropanoids are the main three types of plant secondary metabolites, their metabolic pathways mostly exist in a way of metabolic channels, and the pathways possess characteristics of the species, the genus and the phase of growth and development. The present paper carried out discussions on the classification of plant secondary metabolites, the metabolic pathways and the gene engineering of metabolic regulations. In order to provide theoretical bases for comprehensively understanding the plant metabolism network, their reasonable positioning of secondary metabolism and its key enzymes, and for stimulating the sustainable exploration of wild plant resources, the discussions were emphasized on biosynthetic pathways of the secondary metabolites and some other aspects including genetic improvement strategies on plant secondary metabolic pathways by using gene-engineering technology.

Key words: Secondary metabolism; Metabolic channel; Regulation mechanism; Rate limiting enzyme

植物次生代谢 (secondary metabolism) 是由初生代谢 (primary metabolite) 派生的一类特殊代谢过程^[1] (见图 1), 是植物在长期进化中与环境相互作用的结果。近来的研究发现, 植物次生代谢物 (secondary metabolite) 在植物生命活动的许多方面均起着重要作用, 且部分是植物生命活动所必需的^[2]。例如, 吡啶乙酸、赤霉素直接参与生命活动的调节; 木质素为细胞次生壁的重要组成成分; 叶绿素、类胡萝卜素等萜类物质作为光合色素参与光合作用过程等^[3]。随着次生代谢产物在医药、食品、轻化工等领域的广泛应用, 其物质的种类、代谢途径, 以及代

谢机理等相关问题亦倍受研究者关注, 是植物生理学、植物化学等众多学科的主要研究内容之一。植物次生代谢物的产生和分布通常有种属、器官组织和生长发育期的特异性。目前其分类方法主要有如下三种: ①根据化学结构不同, 分为酚类、萜类和含氮有机物等^[4]; ②根据结构特征和生理作用不同, 分为抗生素 (植保素)、生长刺激素、维生素、色素、生物碱与植物毒素等; ③根据其生物合成的起始分子不同, 分为萜类、生物碱类、苯丙烷类及其衍生物等三个主要类型。笔者将按第三种分类方法对其物质种类、代谢类型等方面的研究进展进行概述。

收稿日期: 2007-02-09, 修回日期: 2007-09-20。

基金项目: 西藏自治区科技厅重大项目 (2002-66) 资助。

作者简介: 王莉 (1972-), 女, 讲师, 理学博士, 研究方向为药用植物学。

* 通讯作者 (E-mail: yjliu@163.com)。

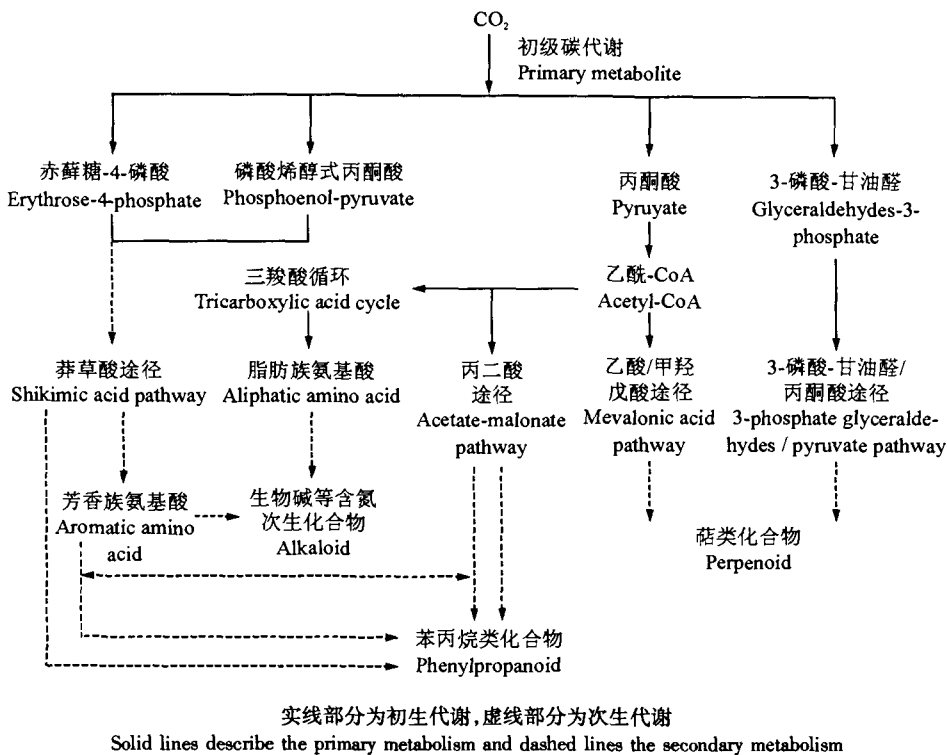


图1 植物初生代谢与次生代谢的关系(改自文献[5])

Fig. 1 Relationships between the primary metabolism and the secondary metabolism in plants

1 萜类化合物

萜类化合物(terpenoid)是所有异戊二烯聚合物及其衍生物的总称^[6],以异戊烷五碳类异戊二烯为基本单位,又称类异戊二烯(isoprenoid),以侧链重复连接方式递增,分开链类和环萜类两种。开链型类萜的分子组成通式为(C₅H₈)_n,包括半萜(C₅,即含一个异戊二烯单位,n=1)、单萜(C₁₀,n=2)、倍半萜(C₁₅,n=3)、双萜(C₂₀,n=4)、三萜(C₃₀,n=6)、四萜(C₄₀,n=8)、多萜(>C₄₀,n>8)及杂萜(含异戊二烯侧链)等。环萜型类萜因分子内碳环数的不同,可分为单环萜、双环萜、三环萜等。半萜、单萜及其简单含氧衍生物是挥发油的主要成分;双萜是形成树脂的主要成分;倍半萜是萜类的最大一族,约有7000多种,作用广泛;二萜、三萜多以皂甙形式存在。双萜类以上也称“高萜类化合物”,一般不具挥发性。植物萜类广泛分布于植物、微生物的初级代谢物和次级代谢物中^[7]。

1.1 萜类化合物的生物合成

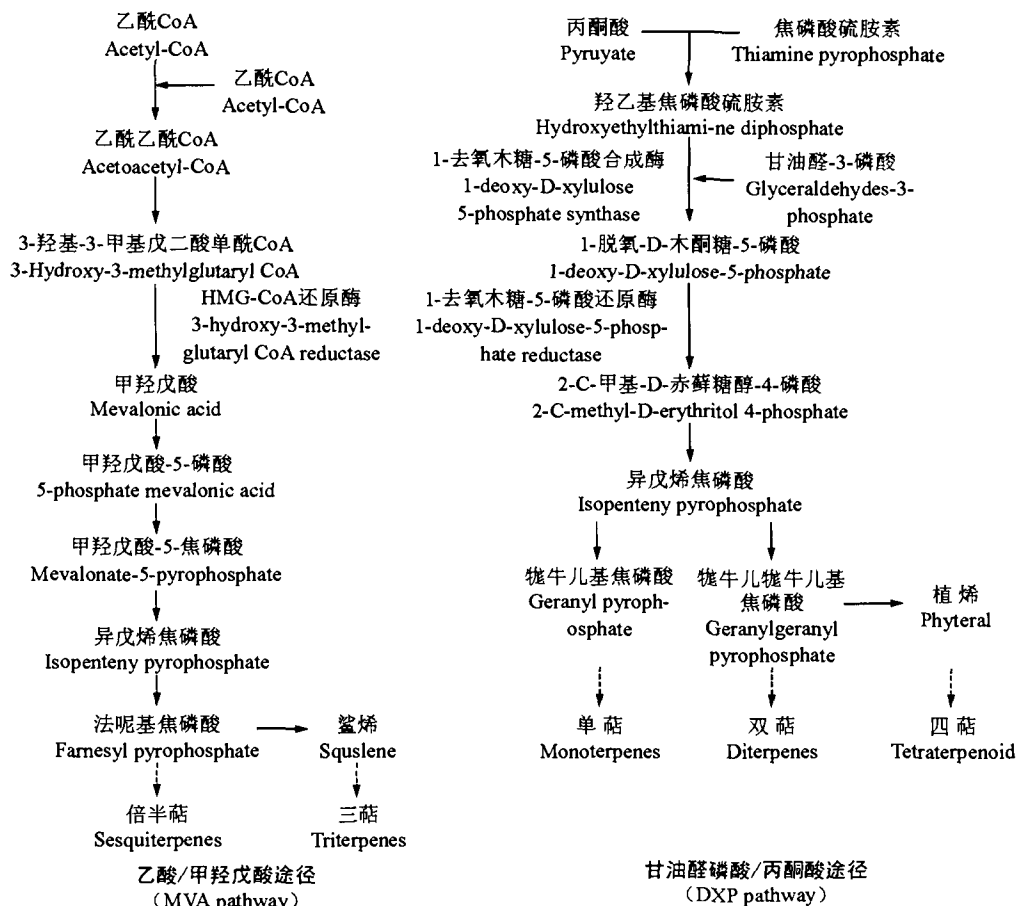
萜类化合物的生物合成过程从属于异戊二烯代谢途径,总体可分为四步:

(1) 前体物质异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)的合成:IPP或二甲丙烯焦磷酸

(dimethylallyl diphosphate, DMAPP, IPP的异构化产物)为萜类合成的基本前体,合成途径有两条,即甲羟戊酸途径(mevalonic acid pathway, MVA pathway)和甘油醛磷酸/丙酮酸途径(3-phosphate glyceraldehydes/pyruvate pathway, or 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway, DXP pathway)(见图2)。

经典的MVA途径存在于胞质和内质网中,3-羟基-3-甲基-戊二酸单酰CoA还原酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase, HMGR)为该途径的第一个限速酶^[8];DXP途径存在于质体中,参与此途径的两个限速酶分别是1-去氧木糖-5-磷酸合成酶和1-去氧木糖-5-磷酸还原酶^[9]。此外,线粒体亦可通过MVA途径产生泛醌异戊二烯基团,是第三类IPP生物合成区室。IPP合成途径的区室化特征可能与萜类代谢亚细胞水平特异性有关。

(2) 异戊二烯焦磷酸同系物的产生:IPP在异戊烯基转移酶的作用下发生亲电子延伸反应,使相应的中产物通过C₅单位头对尾、头对头等方式连续加成形成异戊烯焦磷酸同系物。如法呢基焦磷酸、牻牛儿基焦磷酸、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸等烯丙焦磷酸酯类物质,是构成各类萜化合物的直接前体。异戊烯基转移酶催化亲电耦合反应的过程为丙烯基焦磷酸酯首先离子化,再和IPP的末端双键反应形



虚线表示由多步反应完成

Dashed lines represent that it consists of actions more than one

图2 植物萜类生物合成的两条途径(改自文献[5])

Fig. 2 Two pathways of terpenoid biosynthesis in plants

成一个第3位C的阳离子化合物,最后脱去一个质子完成反应。现阶段研究最为广泛的异戊烯基转移酶为法呢基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase;)^[10]。

(3) 萜类基本骨架的构建:各类烯丙基焦磷酸酯经特异性萜类合酶作用可产生各种萜类的碳骨架,如植烯、鲨烯的形成等。

(4) 骨架的次级酶修饰:萜类碳骨架合成后,需经过附加不同含氧官能团、共振结构和环化作用等次级修饰过程,才可赋予萜类物质结构多样性、化学性质复杂性,以及功能特异性等特征^[11]。如(-)-柠檬烯在不同烯丙位上特异性引入一个氧原子,就会在辣薄荷中转化为(-)-薄荷醇,在留兰香中转变为(-)-香芹酮,二者分别为不同种植物精油的特征性成分。向萜类骨架引入氧原子的羟基化或环氧化反应,多由细胞色素P₄₅₀多功能氧化酶催化完成。

1.2 萜类化合物的代谢调控

植物次生代谢途径通常以不同类别的次生代谢物合成途径为单位即代谢频道(metabolic channel)的形式存在^[12]。植物萜类化合物,如单萜、倍半萜以及双萜等高级萜类不仅拥有单独的合成途径,且具独特的酶促反应机制。例如,番茄果实甾醇和胡萝卜素的合成分别由不同的HMG1等位基因所控制^[13];马铃薯中HMG1负责机械损伤诱导的甾醇合成,HMG2和HMG3则负责诱发因子作用下倍半萜植保素的合成^[14]。萜类的代谢频道不仅受植物发育进程的调控^[15],亦受不同诱发因子的启动^[16-18]。如气候条件是影响萜类物质形成的重要因素之一,其种类、数量、含量和释放量都会随季节的变化而变化^[19,20],多数热带植物含有大量挥发油成分^[21];亚热带松柏科植物树脂含量明显高于温带松柏科植物^[22]。

此外,萜类代谢与植物营养水平有关^[23]。Bry-

ant等提出的“碳-营养平衡”假说认为,植物体内以C为基础的次生代谢物质(如萜类、酚类等)与以N为基础的次生代谢物质(如生物碱等)基本保持一种平衡关系^[24]。在植物生长过程中,添加N可以导致以C为基础的次生代谢物质的减少^[25],其中单萜类化合物受营养水平的影响更为显著^[26-28]。

病虫害侵袭能诱导植物产生更多的挥发性物质,或改变植物挥发性物质成分的含量及组分浓度比。如青蒿素单萜合成酶cDNA的转录可被伤诱导^[29];华山松球果受害后,萜类各组分的含量明显增加^[30]。萜类物质的变化有利于植株进行自我保护及防御病虫害的侵袭^[31,32]。

植物萜类化合物的生物合成受关键酶与限速酶的调控,如转移酶、合酶、环化酶等^[33]。其中,关键酶的表达决定代谢途径的启动及相关特定物质的合成,而限速酶的表达则与物质的合成量相关。萜类合酶是萜类生物合成的关键酶,是研究萜类代谢途径的重点,目前主要研究方向为萜类合酶分子DNA序列分析。该酶具有多重特性,如一种植物中有多种萜类合酶基因^[34,35],其表达有时空特异性,在特定细胞和组织中表达,在生长发育的特定阶段表达,以及具防御反应诱导的瞬时表达等。但是,该合酶基因在植物中一般表达量较低,难于分离纯化。目前已从植物中得到约100个萜类合酶的cDNA,具备从一级结构分析萜类合酶的基础^[36]。HMGR、各种萜类环化酶、鲨烯合成酶是萜类代谢途径的限速酶。代谢频道内多个相关酶活性的协同提高,往往可显著地提高次生代谢物的产量。如McMullen等通过QTL分析发现玉米黄酮甙(flavone glycoside, 又称maysin)的生物合成量的提高与各种酶活性的协同表达有关^[37]。

近年来,人们已拓宽了对萜类化合物代谢工程的研究策略,利用增加萜类代谢途径中限速步骤酶编码基因的拷贝数,或通过反义RNA和RNA干涉等技术,以增加灭活代谢途径中具有反馈抑制作用的编码基因,在不影响细胞基本生理状态的前提下,阻断或抑制与目的途径相竞争的代谢流;利用已有的途径构建新的代谢旁路合成新的萜类化合物等。例如,将萜类代谢途径中的一系列关键酶基因导入大肠杆菌中可构建一条新的代谢途径,实现在无类胡萝卜素合成的大肠杆菌菌株中生成类胡萝卜素^[38]。研究表明,部分大肠杆菌菌株经DXP途径可以合成少量的类胡萝卜素,通过基因工程增加此代谢途径中关键酶基因的拷贝数后其合成量明显提

高^[39,40]。

2 生物碱

生物碱(alkaloid)属含氮有机次生代谢物中的最大一族,主要包括异奎啉类、吲哚类和多炔类等。大约20%的有花植物都能产生生物碱,目前已经分离到12000余种,其中许多种类是药用植物的有效成分。如喜树(*Camptotheca acuminata*)中喜树碱为一种有效的抗癌药物;罂粟(*Papaver somniferum*)中可待因具有止痛、镇咳功效;金鸡纳树(*Cinchona officinalis*)中奎宁为传统的抗疟疾药物,用来消除对其他抗疟疾药物产生的抗性;长春花(*Catharanthus roseus*)中长春花碱为抗肿瘤药物,可用于治疗淋巴瘤等。

2.1 生物碱类化合物的生物合成

大多数生物碱分子都是由L-氨基酸(如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和精氨酸等)单独合成,或者与类固醇、类裂环烯醚萜(如次番木鳖苷)或其他类萜配基结合生成。根据合成前体不同,生物碱可分为真生物碱、伪生物碱和原生物碱。真生物碱和原生物碱都是氨基酸衍生物,但后者不含杂氮环,而伪生物碱则不来源于氨基酸,是由萜类、嘌呤和甾类化合物转化而来。普通氨基酸经三羧酸循环一两次转变即可成为具高度特异性的生物碱合成前体。

目前研究发现,植物生物碱的主要类型为萜类吲哚生物碱、苜蓿基异喹啉生物碱、莨菪碱、烟碱和嘌呤生物碱等,这些生物碱在植物体内均有其特定的生物合成途径或代谢频道形式存在(见图3)。

萜类吲哚生物碱分子含有吲哚环和次番木鳖苷。异胡豆苷合酶是该途径关键酶之一,其中产物异胡豆苷(strictosidine),是该途径重要的分支点,可进一步转化为长春花碱、奎宁、番木鳖碱等多种同类生物碱(图3:A途径);四氢苯基异喹啉类生物碱合成途径的分支点为(S)-网状番荔枝碱,在特异性合酶的作用下可进一步合成黄连素、延胡索碱、吗啡等生物碱(图3:B途径)。烟碱和莨菪碱等生物碱的合成前体为鸟氨酸,腐胺-N-甲基转移酶、托品酮还原酶、东莨菪胺羟基化酶等为该类物质生物合成的关键酶^[42](图3:C途径)。

2.2 生物碱类化合物的代谢调节

植物生物碱代谢途径是一个动态的复杂过程^[43],既受到植物本身遗传背景和生长发育进程的调控,也受到病虫害侵染和取食、生态环境、营养水平、

如花色素苷(色素)、原花色素或缩合鞣质(阻食剂或木材保护剂)、异黄酮类化合物(防御产物和/或信号分子)、查尔酮、橙酮、黄酮、黄酮醇等。

简单酚类为含有一个羟基的苯环化合物,按其结构可分为3类,即①简单苯丙酸类(phenyl propanoid)化合物,具苯环-C3基本骨架,如*t*-桂皮酸(*trans*-cinnamic acid), *p*-香豆酸(*para*-coumaric acid)、咖啡酸(caffeic acid)和阿魏酸(ferulic acid)等;②苯丙酸内酯(phenyl propanoic lactone)类化合物,亦称香豆素A(coumarin A)类,含苯环-C3基本骨架,但C3与苯环通过氧化方式环化,如伞形酮(umbellifone),补骨脂内酯(psoralen lactone)和香豆素等;③苯甲酸(benzoid acid)衍生物类,具有苯环-C1基本骨架,例如水杨酸(salicylic acid)和香兰素(vanillin)等。许多简单酚类化合物在植物防御食草昆虫和真菌侵袭中起重要作用,某些成分还具有调节植物生长的作用。

醌类化合物是一类由苯式多环烃碳氢化物(如萘、蒽等)衍生的芳香二氧化物,是植物呈色因子之一。根据其环系统可分为苯醌、萘醌和蒽醌。部分醌类具有抗菌、抗癌等功效,如胡桃醌和紫草宁。

3.1 苯丙烷类化合物的生物合成

苯丙烷类化合物生物合成的起始分子为芳香族氨基酸,即苯丙氨酸和酪氨酸。研究表明,在大多数植物苯丙烷类化合物代谢途径中包含两个基本途径,即莽草酸(shikimic acid)途径和丙二酸(malonic acid)途径^[52]。

莽草酸途径主要参与高等植物的苯丙烷类代谢,丙二酸途径则为真菌或细菌的合成途径。在高等植物体中,通过莽草酸途径可将赤藓糖-4-磷酸(磷酸戊糖途径)与磷酸烯醇式丙酮酸(糖酵解途径)结合经中产物莽草酸(故名为“莽草酸途径”)转化为芳香族氨基酸——苯丙氨酸和酪氨酸。这两种芳香族氨基酸为苯丙烷类化合物生物合成的起始分子。由苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸,进而转化为木质素单体(monolignol)的一系列过程被公认为苯丙烷类化合物代谢的中心途径(图4)。

3.2 苯丙烷类化合物的代谢调节

苯丙烷中央代谢途径 condensed tannin 及类黄酮和异黄酮合成支路均以代谢频道存在^[53-55]。例如,拟南芥细胞中的查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查耳酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)、黄酮-3-羟化酮酶和二氢黄酮醇还原酶之间相互联系形成多酶复合体^[56],黄酮-3-羟化酮酶、肉桂酸-4-羟基化酶、阿魏酰-5-羟基化酶等细胞色素P₄₅₀酶多充当细胞膜“锚”的作用,将相关的酶组装固定在内质网膜上,从而构成了此类代谢途径的代谢频道^[57,58]。

研究表明,苯丙烷代谢途径中 PAL、CHS、芪合酶、异黄酮合酶等为形成特定立体结构的专一性酶,对底物具有较强的专一性。在大多数维管植物中苯丙氨酸是 PAL 偏爱的底物,但只有单子叶植物的

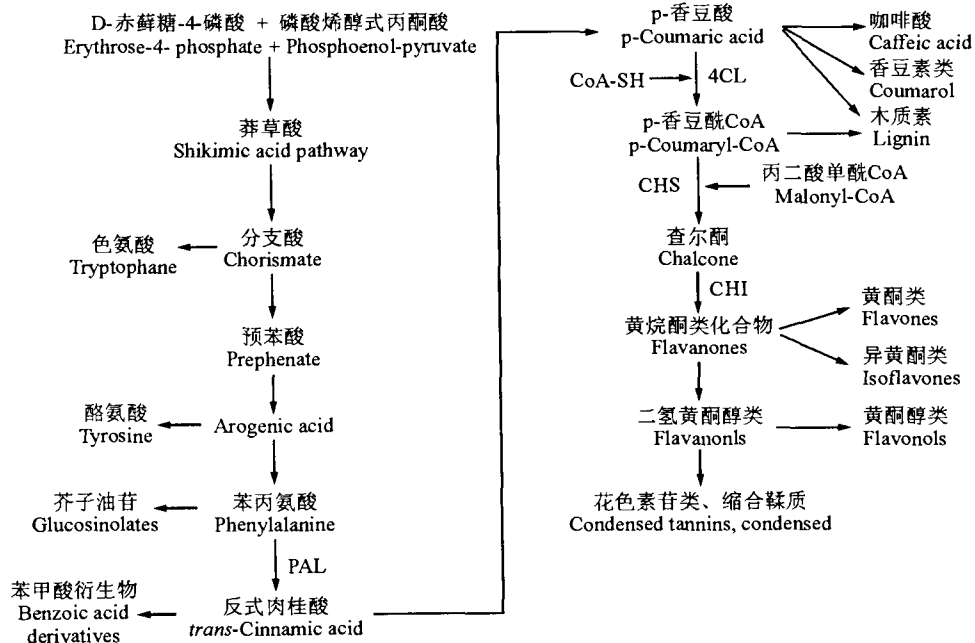


图4 植物苯丙烷类的生物合成途径(改自文献[5])
Fig.4 Phenylpropanoid biosynthesis pathway in plants

PAL才可以同时利用苯丙氨酸和酪氨酸。黄烷酮-7-O-甲基转移酶、异黄酮4-O-甲基转移酶、异黄酮(异黄酮)二甲烯丙基转移酶等为该途径的结构修饰酶类。PAL、肉桂酸4-羟基化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、4-香豆酰-CoA-连接酶(4-coumarate CoA ligase, 4CL)是苯丙烷类合成途径中的限速酶,位于代谢途径的分支点或者合成途径的下游,负责合成广义酚类物质的一般合成前体。

PAL是一种诱导酶,可受到多种因素的诱导。如低温、机械损伤、病原菌感染、光、毒素处理、昆虫取食等都可诱导PAL基因的表达,王莉等利用不同光质条件对长鞭红景天悬浮培养细胞进行较长时间的辐射处理,并检测其PAL活性的变化,通过比较分析得知长时间的红光处理有利于PAL酶活的提高^[59]。CHS是将苯丙烷类代谢途径引向黄酮类合成的第一个酶,该酶基因的表达也会受到病原菌的诱导,其活性受到植物激素、营养水平、光照、病原菌及机械损害等的影响。PAL位于初生代谢和次生代谢分界处,因此被定位为是苯丙烷类化合物代谢的中心酶。植物中,编码PAL的基因为单基因或一个多基因家族。分支酸(chorismic acid)是莽草酸途径的重要枢纽物质,将代谢分为色氨酸合成方向及苯丙氨酸(phenylalanine)和酪氨酸(tyrosine)合成方向。

日益成熟的植物基因工程技术和苯丙烷类代谢产物重要应用价值的不断阐明,促进了苯丙烷类代谢途径基因工程的研究。目前,主要的研究策略体现在关键酶基因工程及调节基因或转录因子基因工程等方面^[60],为提高限速酶活性或引入新的苯丙烷类代谢途径奠定了理论和技术基础。例如,He等将IOMT基因与CaMV35S连接后转入苜蓿,可使其合成苜蓿素(medicarpin)的速度较对照快,产量高,抗病水平显著提高^[61]。将花生芪合酶基因转入含反应底物的烟草细胞,可使外源基因表达并启动新途径合成芪类化合物,提高转基因植物的抗病水平。将拟南芥的IFS基因转入烟草和玉米等非豆科植物,可将柚皮素转化为染料木黄酮、大豆黄素(仅存在于豆科植物体中)等异黄酮类植保素^[62-64]。此外,可通过反义基因的遗传转化抑制部分关键酶基因的表达,降低饲料和树木中木质素的含量,提高饲料的饲用价值和木材的造纸质量和效益^[65],或通过CCoAOMT(caffeoyl coenzyme A-3-O-methyltransferase)反义基因的遗传转化,有效降低转基因烟草中木质素的含量^[66]。

综上所述,植物次生代谢途径的基本框架已初步探明,在代谢途径分子调控及代谢工程的研究方面也已取得了不少进展,但是一些限速步骤及同功酶的研究资料较少,转基因植株有效成分的安全性及有效性还尚未明确。随着生物科学研究的深入,一些未知代谢机制将被进一步揭示,以为植物次生代谢的正确定位和药用植物资源保护与可持续利用方案的制定等奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 陈晓亚,叶和春. 植物次生代谢及其调控[A]. 见:李承森主编. 植物科学进展(第1卷)[C]. 北京:高等教育出版社, 1998. 293-304.
- [2] Toni M, Kutchan. Ecological arsenal and developmental dispatcher: the paradigm of secondary metabolism[J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(1): 58-60.
- [3] 付洋,王洋,阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值[J]. 东北林业大学学报, 2003, **31**(6): 59-62.
- [4] 陈晓亚,刘培. 植物次生代谢的分子生物学及基因工程[J]. 生命科学, 1996, **8**(2): 8-9.
- [5] Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*[M]. 4th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, Publishers, 2006.
- [6] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991. 323-374.
- [7] 李薇,李岩,金雄杰. 白桦三萜类物质的抗肿瘤作用及其对免疫功能的增强效应[J]. 中医中药与免疫, 2000, **16**(9): 485-487.
- [8] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, **46**: 521-547.
- [9] Lange B M, Wildung M R, Mecaskill D, Croteau R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2100-2104.
- [10] 赵玉军,叶和春,李国风,陈大华,刘彦. 优系青蒿法呢基焦磷酸合酶基因的克隆和酶学分析[J]. 科学通报, 2003, **48**(2): 162-166.
- [11] Gershenzon J. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plant[J]. *J Chem Ecol*, 1994, **20**: 1281-1328.
- [12] 何水林,郑金贵,王晓峰,王燕华,许明,李斌莲,林明. 植物次生代谢:功能、调控及其基因工程[J]. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(5): 558-563.
- [13] Narita J O, Gruijssem W. Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening[J]. *Plant Cell*, 1989, **1**: 181-190.
- [14] Choi D, Ward B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid[J]. *Plant Cell*, 1992, **4**: 1333-1344.
- [15] Zhang Q H, Birgersson G, Zhu J, Löfstedt C, Löfqvist J, Schlyter F. Leaf volatiles from nonhost deciduous trees: variation by tree

- species, season and temperature, and electrophysiological activity in *Ips typographus* [J]. *J Chem Ecol*, 1999, **25**:1923 - 1943.
- [16] Yamaura T, Tanaka S, Tataba M. Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in thyme seedlings [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, **32**:603 - 608.
- [17] Llusà J, Peñuelas J. Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions [J]. *Am J Bot*, 2000, **87**:133 - 140.
- [18] Yazaki K, Matsuoka H, Shimomura K, Bechthold A, Sato F. A novel dark-inducible Protein, LeDI-2, and its involvement in root-specific secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**:1831 - 1841.
- [19] Owens M K, Lin C-D, Taylor Jr C A, Whisenant S G. Seasonal patterns of plant flammability and monoterpenoid content in *Juniperus ashei* [J]. *J Chem Ecol*, 1998, **24**:2115 - 2126.
- [20] 冷平生, 王天华, 苏淑钗, 蒋湘宁, 王沙生. 银杏黄酮苷和萜类内酯含量的季节变化 [J]. 植物资源与环境学报, 2001, **10** (3):15 - 18.
- [21] Ross J D, Sombero C. Environmental control of essential oil production in mediterranean plants [A]. In: Harborne J B eds. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids [M]. Oxford: Clarendon Press, 1991. 64 - 94.
- [22] Langenheim J H. Higher plant terpenoids: a phyto-centric overview of their ecological roles [J]. *J Chem Ecol*, 1994, **20** (6):1223 - 1280.
- [23] 徐涛, 孔垂华, 胡飞. 红藜化感作用研究 II. 挥发油对不同营养水平下植物的化感作用 [J]. 应用生态学报, 1999, **10**:748 - 750.
- [24] Bryant J P, Chapin F S III, Klein D R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory [J]. *Oikos*, 1983, **40**:357 - 368.
- [25] Gershenzon J, Croteau R. Terpenoids [A]. In: Rosenthal G A eds. Herbivores, Their Interactions with Secondary Metabolites: The Chemical Participants, Vol. 1 C [M]. New York: Academic Press, 1991. 165 - 219.
- [26] Guenther A B, Monson R K, Fall R. Isoprene and monoterpene emission rate variability: Observations with eucalyptus and emission rate algorithm development [J]. *J Geophys Res*, 1991, **96** (D6):10799 - 10808.
- [27] Hu M Y, Klocke J A, Chiu S F. Response of five insects to botanical insecticides, rhodajaponin-III [J]. *J Econ Entomol*, 1993, **86** (3):706 - 711.
- [28] Staudt M, Seufert G. Light-dependent emission of monoterpenes by holm oak (*Quercus ilex* L.) [J]. *Nat Urwissenschaften Ten*, 1995, **82**:89 - 92.
- [29] 许燕华, 骆萍, 卢山, 贾军伟, 蔡煜, 周向军, 林芝萍, 陈晓亚. 次生萜类生物合成的调控 [J]. 中国科学基金, 2000:197 - 199.
- [30] 李新岗, 马养民, 刘拉平, 候慧波, 马江平, 肖飞. 华山松球果挥发性萜类成分研究 [J]. 西北植物学报, 2005, **25** (10):2072 - 2076.
- [31] Dicke M. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-herbivore mutualism [J]. *J Plant Physiol*, 1994, **143**:465 - 472.
- [32] Shen B, Zheng Z, Dooner H K. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97** (26):14808 - 14812.
- [33] Cane D E. Comprehensive Natural Products Chemistry [A]. In: Cane D E ed. Isoprenoid Biosynthesis [M]. Oxford: Pergamon, 1998.
- [34] Bohlmann J, Croteau R. Diversity and variability of terpenoid defences in conifers: molecular genetics, biochemistry and evolution of the terpene synthase gene family in grand fir (*Abies grandis*) [J]. *Novartis Found Symp*, 1999, **223**:132 - 145.
- [35] Bohlmann J, Phillips M, Ramachandiran V, Katoh S, Croteau R. cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the *Tpsd* gene family from grand fir (*Abies grandis*) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **368**:232 - 243.
- [36] 杨涛, 曾英. 植物萜类合酶研究进展 [J]. 云南植物研究, 2005, **27** (1):1 - 10.
- [37] McMullen M D, Byrne P F, Snook M E, Wiseman B R, Lee E A, Widstrom N W, Coe E H. Quantitative trait loci and metabolic pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:1996 - 2000.
- [38] Wang C W, Oh M K, Liao J C. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **62** (2):235 - 241.
- [39] Lee P C, Mijts B N, Schmidt-Dannert C. Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**:538 - 546.
- [40] Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold F H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (7):750 - 753.
- [41] Dixon R A, Chen F, Guo D, Parvathi K. The biosynthesis of monolignols: "ametallic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? [J]. *Phytochemistry*, 2001, **57**:1069 - 1084.
- [42] Facchini P J, Huber Allanach K L, Tari L W. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications [J]. *Phytochemistry*, 2000, **54** (2):121 - 38.
- [43] 何水林, 郑金贵, 王晓峰, 王燕华, 许明, 李斌莲, 林明. 植物次生代谢: 功能、调控及其基因工程 [J]. 应用与环境生物学报, 2002, **8** (5):558 - 563.
- [44] Coley P D, Massa M, Lovelock C E, Winter K. Effects of elevated CO₂ on foliar chemistry of saplings of nine species of tropical tree [J]. *Oecologia*, 2002, **133**:62 - 69.
- [45] Gerson E A, Kelsey R G. Piperidine alkaloids in nitrogen fertilized *Pinus ponderosa* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1999, **25**:2027 - 2039.
- [46] 李霞, 阎秀峰, 刘剑锋. 氮素形态对黄檗幼苗三种生物碱含量的影响 [J]. 生态学报, 2005, **25** (9):2159 - 2164.
- [47] Keller H, Czernic P, Ponchet M, Ducrot P H, Back K, Chappell J.

- Sesquiterpene cyclase is not a determining factor for elicitor and pathogen-induced capsidiol accumulation in tobacco[J]. *Planta*, 1998, **205**:467-476.
- [48] Hashimoto T, Nakajima K, Ongena G, Yamada Y. Two tropinone reductases with distinct stereospecificities from cultured roots of *Hyoscyamus niger*[J]. *Plant Physiol*, 1992, **100**:836-845.
- [49] Van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism[J]. *Science*, 2000, **289**:295-297.
- [50] Canel C, Lopes-Cardoso M I, Whitmer S, van der Fits L, van der Heijden R, Hoge J H, Verpoorte R. Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*[J]. *Planta*, 1998, **205**:414-419.
- [51] Facchini P J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, **52**:29-66.
- [52] Klaus M Herrmann. The shikimate pathway[J]. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Bio*, 1999, **50**:473-503.
- [53] Rasmussen S, Dixon R A. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway[J]. *Plant Cell*, 1999, **11**:1537-1551.
- [54] Burbulis I E, Winkel-Shireley B. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**:12929-12934.
- [55] He X Z, Dixon R A. Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyl transferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa[J]. *Plant Cell*, 2001, **12**:1689-1702.
- [56] Dong X-Y, Braun E L, Grotewold E. Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes[J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**:46-57.
- [57] Winkel-Shirley B. Flavonoids biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology[J]. *Plant Physiol*, 2001, **126**:485-493.
- [58] Dixon R A. Natural products and plant disease resistance[J]. *Nature*, 2001, **411**(14):843-847.
- [59] 王莉, 史玲玲, 刘玉军. 不同光质对长鞭红景天悬浮细胞生长及苯丙氨酸解氨酶 PAL 的影响[J]. *林业科学*, 2007, **43**(6):49-51.
- [60] Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, Maddock S, Clair G St, Bowen B. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors[J]. *Plant Cell*, 1998, **10**:721-740.
- [61] He X Z, Dixon R A. Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyl transferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa[J]. *Plant Cell*, 2001, **12**:1689-1702.
- [62] Dixon R A, Steele C L. Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering[J]. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**:394-400.
- [63] Liu C J, Deavours B E, Richard S B, Ferrer J L, Blount J W, Huhman D, Dixon R A, Noel J P. Structural basis for dual functionality of isoflavonoid o-methyltransferases in the evolution of plant defense responses[J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(12):3656-3669.
- [64] Yu O, Jung W, Shi J, Croes R C, Fader G M, McGonigle B, Odell J T. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues[J]. *Plant Physiol*, 2000, **124**:781-793.
- [65] Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin[J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, **17**:125-197.
- [66] Atanassova R, Favet N, Martz F, Chabbert B, Tollier M-T, Monties B, Fritig B, Legrand M. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyl transferase sequences in sense and antisense orientation[J]. *Plant J*, 1995, **8**:465-477.