

综述

类西柏烷二萜代谢机理及调控研究进展

王冬, 张小全, 杨铁钊, 薛刚, 李丽华

河南农业大学烟草学院, 郑州市文化路 95 号, 450002

摘 要: 综述了类西柏烷二萜合成的生化途径及其调控因素, 并阐述了其在改善作物香味和植物抗虫方面的作用及研究利用前景。类西柏烷二萜主要存在于烟草属植物的腺毛分泌物中, 在西柏三烯醇合酶 (CBTS) 和细胞色素 P450 加氧酶 (CYP450) 的催化下经脱氧木酮糖磷酸代谢途径 (DXP) 合成, 这一过程受到基因和多种外界因素的调控。

关键词: 类西柏烷二萜; 西柏三烯醇合酶; 细胞色素 P450 加氧酶; 香味风格; 抗虫性

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2014.03.019

中图分类号: TS413

文献标志码: A

文章编号: 1004-5708 (2014) 03-0113-06

Research progress on metabolic mechanism of cembranoid diterpenes and its regulation

WANG Dong, ZHANG Xiaoquan, YANG Tiezhao, XUE Gang, Li Lihua

Tobacco College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Biosynthetic and metabolic pathway and regulatory factors of cembranoid diterpenes were introduced, and its application prospective on aroma-improving and insect-resistant were also discussed. Cembranoid diterpenes mainly exists in glandular trichome secretion of Nicotiana plant. It was produced through plastidic deoxyxylulose phosphate (DXP) pathway with cembratrien-ol synthase (CBTS) and cytochrome P450 oxygenase (CYP450) as catalyzer. This process was regulated by gene and various external factors.

Keywords: cembranoid diterpenes; cembratrien-ol synthase; cytochrome p450 monooxygenase; aroma style; insect resistance

类西柏烷二萜 (Cembranoid diterpenes) 较多地存在于烟草属植物叶片和花的表面分泌物中, 主要包括西柏三烯醇 (Cembratrien-ol, CBT-ol) 和西柏三烯二醇 (Cembratrien-diol, CBT-diol)^[1], 由香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 在植物体代谢途径中的西柏三烯醇合酶 (Cembratrien-ol synthase, CBTS)^[2] 和细胞色素 P450 加氧酶 (Cytochrome P450 hydroxylase, CYP450)^[3] 的催化作用下合成。这两种醇分别具有 2 种同分异构体: (1S,2E,4R,7E,11E) - 和 (1S,2E,4S,7E,11E) - 西柏-2,7,11-三烯-4(,6)-(二)醇, 即 α -和 β -西柏三烯(二)醇^[4]。通常 CBT-diol 比 CBT-ol 含量更

多而且分布更加广泛, 在栽培利用的烟草品种中, 前者的含量至少比后者高出 100 倍, 是西柏烷二萜最主要的成分^[5]。CBT-diol 的 2 种的同分异构体含量比例接近 3:1, 在烟叶的生长和调制过程中, 可降解成多种物质, 包括茄酮、氧化茄酮、酮酸和分支的脂肪族酸^[6]。类西柏烷二萜及其降解衍生物不仅与人体感官关系密切 (如烟草香味和吸食质量以及一些植物表面清香气味等)^[1,7], 而且与昆虫和微生物具有互动性能, 具有很好的杀虫和杀菌活性^[3,8-10]。

1 类西柏烷二萜的生物合成

1.1 类西柏烷二萜的生物合成途径

类西柏烷二萜通常是由植物体内的 GGPP 经过 CBTS 和 CYP450 的催化作用在脱氧木酮糖磷酸代谢途径 (1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway, DXP) 中形成的, GGPP 是植物萜类代谢 DXP 途径的一种中间产物, 由异戊烯焦磷酸

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目 (110201002008)

作者简介: 王冬 (1985—), 博士研究生, 研究方向为烟草遗传育种与生理, Email: wangdong0629@163.com

通讯作者: 杨铁钊 (1955—), 教授, 博士生导师, 主要从事烟草遗传育种研究, Email: yangtiezhao@126.com

收稿日期: 2013-04-16

(Isopentenyl diphosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (Dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 合成, 而其最初的供体是植物糖酵解过程中产生的丙酮酸 (Pyruvic acid) 和 3-磷酸甘油醛 (3-phosphoglyceraldehyde) [11]。

在烟草中, 西柏烷二萜的合成反应大致分为两步: 第一步, GGPP 为 CBT-ol 的形成提供了西柏烷骨架结构, 在 CBTS 的作用下, GGPP 发生环化反应, 形成 α -和 β -CBT-ol [5]; 第二步, 经过 CYP450 作用, CBT-ol 的第 6 位碳发生羟化反应形成 α -和 β -CBT-diol [3]。除 CBT-ol 之外, 还有至少两种双萜物质由 GGPP 发生环化作用而形成, 分别是顺-冷杉醇 (cis-abienol) 和类赖百当二萜 (Labdenediol), 对它们的形成起催化作用的酶分别是顺-冷杉醇环化酶 (cis-abienol cyclase) [12] 和赖百当二萜环化酶 (Labdenediol cyclase) [13]。而且, 有研究表明这一系列反应只发生在腺毛的腺体中 [14-16]。

kD, 主要存在于烟草属植物叶片腺毛中, 能够催化 GGPP 直接发生环化反应而形成类西柏烷单醇 [5,19-20]。目前得到确认的 3 类双萜环化酶有西柏三烯醇合酶 (环化酶) (CBTS)、顺-冷杉醇环化酶 (Cis-abienol Cyclase) 和类赖百当二萜环化酶 (Labdenediol Cyclase), 它们具有共同的反应底物, 分别负责将 GGPP 转化合成西柏三烯醇、顺-冷杉醇和赖百当烯二醇 (图 1), 有研究表明, 这些酶之间存在竞争关系, 因为当 CBTS 活性受到抑制时, 会导致 CBT-ol 和 CBT-diol 的减少, 而与之使用共同底物的顺-冷杉醇和赖百当烯二醇的含量得到了升高 [2]。这些环化酶催化形成的代谢产物在生物体内发挥多种生理功能, 包括生长调节、抗病、抗虫和改善作物风味品质等方面 [10,21-23]。

Wang 和 Wagner 等 [2] 对 CBTS 的候选 cDNA 序列进行了鉴定, 并进行了基因沉默处理后的转基因, 在转基因植株中发现一些 CBT-ol 和 CBT-diol 含量极低的个体腺毛中都具有 CYC-1 基因缺失的 mRNA 片段, 说明这个基因 (CYC-1, Genebank Accession No. AY049090) 的确编码了 CBTS。

1.2.2 CYP450

细胞色素 P450 羟化酶是一类在温和条件下能够把底物中反应惰性的碳氢键氧化的单加氧酶, 广泛地存在于动物、微生物和植物体内 [24-25]。在真核生物中, CYP450 作为一种膜结合蛋白, 主要分布在内质网、微粒体和线粒体内膜上 [26]。CYP450 被誉为高等植物中最大的酶蛋白家族 [27], 家族成员催化的反应广泛而复杂, 主要有烷基的羟化, 烯基的环氧化, 烃基的氧化, 氮、硫、氧位的脱烷基化, 氮位的羟化和氧化, 硫位的氧化, 氧化性脱氨、脱卤和脱氢, 氧化性的碳碳键断裂及一些还原反应等 [28]。在烟草中, 对于 CYP450 及其相关基因的研究大多数与抗虫性有关。Mao 等 [29] 构建 CYP450 基因 CYP6AE14 的 RNAi 载体转化烟草, 转基因烟草叶片喂食棉铃虫幼虫后发现 CYP6AE14 转录水平明显下降, 并且幼虫对棉酚的敏感性增强, 棉铃虫的生长明显被抑制, 从而提高了害虫防治效果; 张保龙等 [30] 采用同样的方法, 选取 Q 型烟粉虱体内的一个 CYP450 基因 CYP6CM1 的特异序列, 构建 RNAi 载体并转化烟草, 喂食烟粉虱后实现了抗虫效果。

烟草中负责催化 CBT-ol 发生羟化反应形成 CBT-diol 的羟化酶来自 CYP450 酶蛋白家族, 有研究表明 [3,18], 这个酶仅存在于作物腺毛中, 其编码基因为 CYP71D16 (GenBank Accession No. AF166332), 对

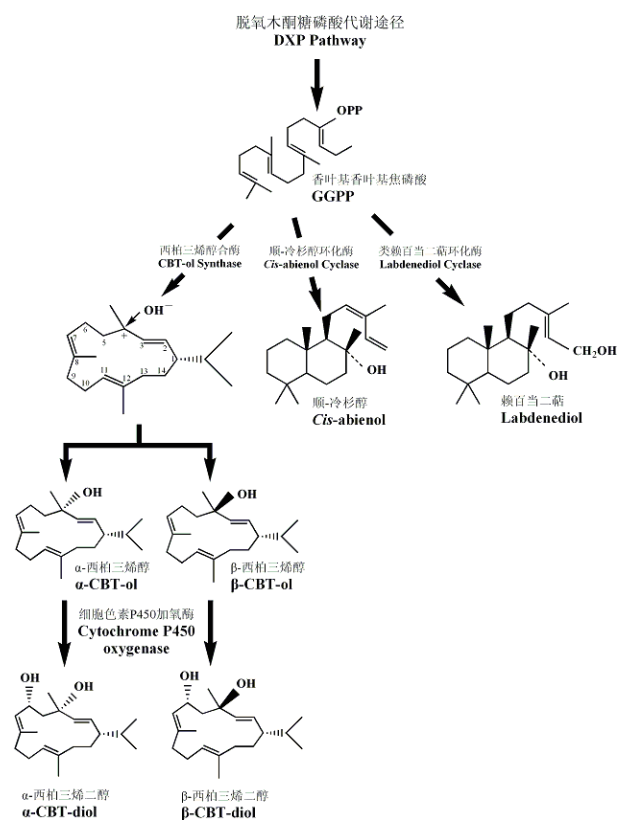


图 1 烟草类西柏烷二萜合成途径 [2,3,5,17-18]

Fig. 1 Biosynthetic pathway of cembranoid diterpenes

1.2 类西柏烷二萜合成途径中两个主要酶

1.2.1 CBTS

CBTS 即西柏三烯醇合酶或西柏三烯醇环化酶, 是一种可溶的单分子构造的酶, 分子质量为 58

该基因进行抑制会导致 CBT-diol 的减少和 CBT-ol 含量的增加。

1.3 类西柏烷二萜生化途径的调控

1.3.1 CBTS 和 CYP450 基因的调控作用

CBTS 以 GGPP 为底物催化合成西柏三烯醇, 直接决定着植物腺毛分泌物中 CBT-ol 和 CBT-diol 的含量。除 CBTS 外, 在植物中以 GGPP 为底物发生环化作用形成的二萜还有顺-冷杉醇和赖百当二萜, 但 GGPP 环化作用的具体走向以及所占比例如何, 一方面由底物 GGPP 的丰富程度决定, 另一方面则取决于 CBTS 以及相关酶的基因调控作用。在烟草中, CYC-1 基因与 CBT-ol 的积累密切相关, CYC-1 的沉默表达大大减少了 CBT-ol 的积累, 进而影响 CBT-diol 的形成^[2]; 在对真菌中的 CYC-1 基因进行研究时发现该基因表达情况受 2 价镁离子的调控^[31]。CBT-ol 虽然具有丰富的生物活性, 但相对含量较低, 绝大多数 CBT-ol 经 CYP450 催化形成了类西柏烷二萜的主要成分: CBT-diol。作为编码 CYP450 的基因, CYP71D16 在类西柏烷二萜合成中发挥着更加重要的作用。在对烟草中的 CYP71D16 进行沉默处理后发现, CBT-diol 含量骤减, 同时 CBT-ol 获得了大量积累, 而且植株的抗虫性得到了提高^[3]。因此, 利用包括植物类西柏烷二萜在内的萜类代谢工程通过分子牧场制造有益的自然产物, 具有极高的经济价值和研究前景。

1.3.2 外界环境因素的调控作用

许多外界因素如施肥、水分、机械损伤、光照、土壤和温度等对类西柏烷二萜的出现、表面沉积和稳定性都有可能造成影响^[1]。有研究表明, 施氮量对腺毛分泌物的含量有显著影响, 增施氮肥, 植物腺毛分泌物中 CBT-diol 含量将会减少^[32-33]; 时向东等研究表明, 饼肥、腐殖酸与化肥配施能增加烟草叶面腺毛密度^[34], 但是关于作物叶片腺毛密度与其分泌物含量的关系, 研究意见不一, 陈淑珍等^[35]认为腺毛数量与整叶分泌物量正相关, 而 Nielsen 等^[36]的研究结果表明在烟草中一些腺毛密度很小的品系, 其腺毛分泌物的含量与腺毛密度呈正相关, 而腺毛密度大的品系, 其腺毛分泌物的含量与腺毛密度无关。适度的水分胁迫能提高烟叶表面 CBT-diol 和蔗糖酯等腺毛分泌物的含量, 强降雨会显著降低烟叶表面化合物的含量^[1,37]。关于外部刺激, 似乎没有任何证据证明, 当烟草属植株受到昆虫或者病原体的攻击时, 叶片中包括类西柏烷二萜物质在内的抗毒素会发生诱发分泌, 这可能是由于当因外部胁迫诱发而大量产生植物抗毒素时, 叶面分泌物作为第一道防线已经存在于成熟的

叶片中^[1,21]。有研究表明, 缩短日照时数不利于蜡质成分的形成, 但是可提高叶片中萜烯类物质的产生^[38]; 而遮荫条件下, 烟草 CBT-diol 的含量明显低于正常光照条件^[39-40]。Severson 等^[1]研究认为, 低温不利于类西柏烷二萜的合成, 高温环境能促进腺毛生长和腺毛分泌物的合成与转化。

有研究表明, CBTS 在 pH 低于 6.8 时, 活性急剧降低, pH6.8-7.5 是其活性适宜范围^[5], 与类赖百当环化酶和顺冷杉醇环化酶^[13]一样, 2 价阳离子是其活性发挥的必要条件^[20]。CYP450 同样受多种因素调控而且是极易失活的。目前, 已获得 CYP71D16 的启动子, 可以此调控植株类西柏烷二萜的合成途径, 提高植株的抗病能力和香味品质^[41]。不同的外界因素均可调控植物特定 CYP450 的表达, 植物 CYP450 基因的表达表现出生长发育控制, 一般认为其表达与其功能的需要相一致^[26]; 与此同时, 植物 CYP450 基因的表达还受到光、胁迫^[42-45]以及外来物质的诱导^[45-47]。

2 类西柏烷二萜的生物降解

目前国内外关于烟叶中 CBT-diol 的生物降解途径的研究比较少, 而得到众多学者公认的降解产物主要成分是茄酮 (Solanone)^[48]。茄酮的化学名称为 8-甲基-5-异丙基-6,8-壬二烯-2-酮, 它是 1965 年美国烟草化学家 Johnson 和 Nicholson 从调制后的烟叶中发现的^[49]。Demole 和 Dietrich 在 1977 年对 CBT-diol 的生物降解进行了阐述 (图 2)^[50], 在酶解或加热等条件下, CBT-diol 降解, 在键的断裂过程中, 可产生多种降解产物, 其中 C₁₃ 的产物为茄酮。Arnarp 等^[51]对 CBT-diol 的生物转化进行了研究, 发现在细胞培养的过程中, CBT-diol 的第 11 位和 12 位碳之间的双键受到酶的催化, 可形成一种不稳定的环氧化合物。结合 Demole 等人的研究结果不难发现, 此处的环氧键位置即 CBT-diol 产生茄酮的断键位置。

关于茄酮的去向, 大致可分为 3 个方面: 在单线态氧化作用下, 茄酮发生分子重排反应, 形成一种具有香味的环状化合物——茄尼呋喃 (图 2 路线 A); 与此同时, 在酸的催化下, 茄酮烯键与水作用形成醇, 然后在过氧酸的作用下, 形成不稳定的环氧化合物, 在酸的催化下这种环氧化合物的酮基和环氧基发生反应, 进一步氧化形成一种具有特殊香味的杂氧双环化合物 (图 2 路线 B); 除了烯键, 茄酮的羰基位置也较易发生反应, 在过氧酸氧化后, 再进行碱性还原可得到一种 C₁₁ 的醇, 该醇再经氧化作用, 可形成含羟

基的 C_{10} 不饱和酮, 这种酮在酸性介质中可环化成为四氢吡喃的羰基衍生物, 经进一步氧化, 可得到重要的香味物质 α -异丙基丁内酯 (图 2 路线 C)。

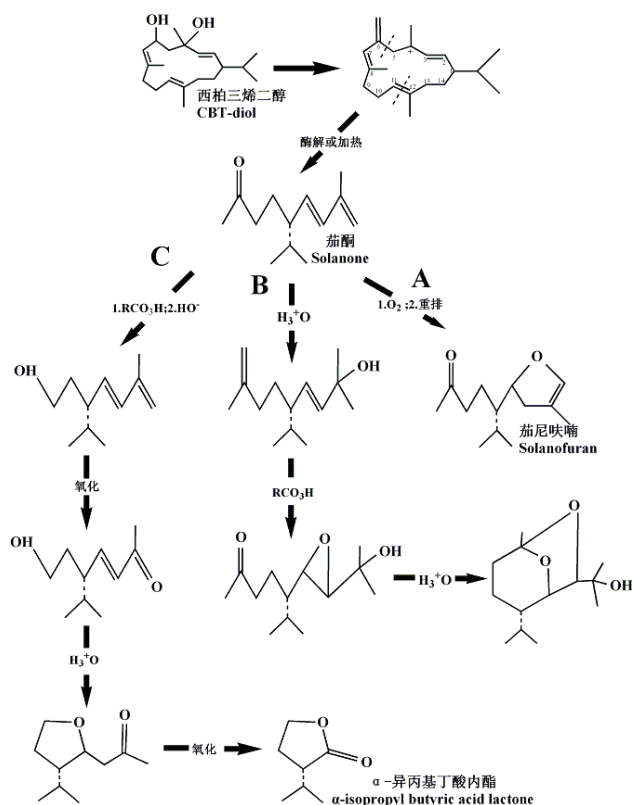


图 2 烟草类西柏烷二萜降解途径^[48,50]

Fig. 2 Degradation pathway of cembranoid diterpenes

3 类西柏烷二萜的生物活性

3.1 改善作物风味品质

许多作物如薄荷^[52]、香椿^[53]、烟草^[54]等腺毛分泌物与香气关系密切, 这种关系在烟草属作物上表现得尤为明显。有研究人员曾对成熟期烤烟进行叶面分泌物的浸提, 发现叶面分泌物的缺失对烤烟香味成分和感官质量均产生了负面影响, 将提取物还原后烟叶的香气得到了部分恢复^[55], 而类西柏烷二萜是烟叶叶面分泌物的主要成分, 能占到分泌物总量 60% 左右^[2], 并在调制后大部分降解产生茄酮及其衍生物等多种香味成分^[6], 其中茄酮本身就具有很好的香气, 具有类似胡萝卜的香味和甘草、茶样芳香, 经烟草的调制、陈化进一步降解后可产生对卷烟吃味有重要影响的茄醇、茄尼呋喃、降茄二酮等物质, 其中降茄二酮具有弱的坚果香及甜香, 在卷烟中可以明显增加似可可和白肋烟一样的香味^[56]。

3.2 提高植物抗性

腺毛主要分布在植物的茎叶表面, 它们的分泌物构成了一道潜在的防御害虫的壁垒, 并且这种壁垒的防御性能可以通过代谢工程学的手段进行提升。Wang 等^[3,57]在用代谢工程学手段对烟叶腺毛抗虫能力的研究中发现, 通过反义基因和共抑制的手段对编码 CYP450 的 cDNA 进行下调, 导致了 CBT-diol 的减少, 同时 CBT-ol 得以积累增加, 而植物 CBT-ol 的过量产生可以提高其对某些昆虫的抗性, 这可能是由于 CBT-ol 对这些昆虫可以产生毒性所致。通常, 包括 CBT-ol 在内的二萜和蔗糖酯是被植物表面的角质层所覆盖的, 但当害虫对植株表面进行破坏时, 这些非挥发性成分就会摆脱角质层的束缚而释放到外部, 从而实现抗虫效果^[58]。有时类西柏烷二萜具有杀虫或抗虫性, 而有时情况恰恰相反, 能够积极参与昆虫的生活周期, 如 CBT-ol 和 CBT-diol 可作为活性剂, 刺激烟草夜蛾产卵, 然而这些活性剂对于幼虫的生长却具有毒害作用^[59]。有研究人员评估了烟草腺毛分泌物对真菌 (烟草霜霉病) 的影响, 发现 CBT-diol 显示出抗真菌活性^[60-61]。

4 类西柏烷二萜的研究和应用前景与展望

在类西柏烷二萜的整个生化途径中, 有多个酶和基因可被调控, 在过去的研究中, 种种证据表明, 通过代谢工程或基因工程学手段调控这些酶和基因控制类西柏烷二萜的代谢途径以提高植物的天然抗虫性、香味和香气品质^[15,62]以及将作物作为“植物工厂”生产易于回收的商业产品等方面都具有很大的研究和应用潜力。如利用基因工程学手段对作物的品质进行遗传改良, 使其释放特定的香味, 甚至可以利用作物生产天然的而非人工合成的香料。随着人们对类西柏烷二萜代谢机理及分子调控认识的逐渐深入, 一种安全的、无公害的病虫害防治新途径可能被发现。如利用转基因手段使一些无西柏烷类物质产生的作物具有这种物质的分泌功能并产生抗性; 或构建作物多样性种植模式, 优化农田生态环境, 充分利用类西柏烷二萜的杀虫作用以降低同种害虫对其它作物的危害, 建立安全、和谐的农田或菜田生态系统等。

参考文献

- [1] Severson R F, Johnson A W, Jackson D M. Cuticular constituents of tobacco: factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality [J]. Adv Tob Sci, 1985, 11: 105-173.

- [2] Wang Erming, Wagner G J. Elucidation of the functions of genes central to diterpene metabolism in tobacco trichomes using posttranscriptional gene silencing [J]. *Planta*, 2003, 216: 686-691.
- [3] Wang Erming, Wang R, DeParasis J, et al. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance[J]. *Nat Biotech*, 2001, 19: 371-374.
- [4] Wahlberg I, Eklund A M. Cembranoids, pseudopteranolids, and cubitanoids of natural occurrence. In: *Fortschritte der Chemi Organischer Naturstoffe* [M]. New York: Springer Verlag, 1992, 59: 141-294.
- [5] Guo Zhenhua, Wagner G J. Biosynthesis of cembratrienols in cell-free extracts from trichomes of *Nicotiana tabacum* [J]. *Plant Science*, 1995, 110: 1-10.
- [6] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 56-95.
- [7] Enzell C R, Wahlberg I. Leaf composition in relation to smoking quality and aroma [J]. *Rec Adv Tobacco Sci*, 1980, 6: 64-122.
- [8] Johnson A W, Severson R F. Physical and chemical leaf surface characteristics of aphid resistant and susceptible tobacco [J]. *Tobacco Sci*, 1982, 26: 98-102.
- [9] Kennedy B S, Nielsen M T, Severson R F, et al. Leaf surface chemicals from *Nicotiana* affecting germination of *Peronospora tabacina* (ADAM) sporangia [J]. *J Chem Ecol*, 1992, 18: 1467-1479.
- [10] Cutler H C, Severson R F, Cole P D, et al. Secondary metabolites from higher plants: their possible role as biological control agents. In: *Natural Resistance of Plants to Pests: Role of Allelochemicals*, ACS Symposium Series No. 296 [M]. Washington DC: American Chemical Society, 1986, 178-196.
- [11] Lichtenthaler H K. The 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio*, 1999, 50: 47-55.
- [12] Guo Zhenhua, Severson R F, Wagner G J. Biosynthesis of the diterpene cis-abienol in cell-free extracts of tobacco trichomes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 308: 103-108.
- [13] Guo Zhenhua, Wagner G J. Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cell-free-extracts from trichomes of *Nicotiana-glutinosa* [J]. *Planta*, 1995, 197: 627-632.
- [14] Kandra L, Wagner G J. Studies of the site and mode of biosynthesis of tobacco trichome exudate components [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 265: 425-432.
- [15] Wagner G J. Secreting glandular trichomes: more than just hairs[J]. *Plant Physiol*, 1991, 96: 675-679.
- [16] Keene C K, Wagner G J. Direct demonstration of divatrienediol biosynthesis in glandular heads of tobacco trichomes[J]. *Plant Physiol*, 1985, 79: 1026-1032.
- [17] El Sayed K A, Laphookhieo S, Yousaf M, et al. Semisynthetic and Biotransformation Studies of (1S,2E,4S,6R,7E,11E)-2,7,11-Cembratriene-4,6-diol[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 117-122.
- [18] Ennajdaoui H, Vachon G, Giacalone C, et al. Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana sylvestris*) cembratrien-ol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions[J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 673-685.
- [19] Reid W W. The biosynthesis of terpenoids in two varieties of *Nicotiana tabacum*[J]. *Ann Tabac Sect. SEITA.*, 1974:156-176.
- [20] Gershenzon J, Croteau R B. Terpenoid biosynthesis: the basic pathways and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: TS. Moore (Ed.), *Plant Lipid Metabolism in Plants* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993, 339-388.
- [21] Davis D L, Nielsen M T. 烟草——生产, 化学和技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 251-269.
- [22] Shinozaki Y, Matsuzaki T, Suhara S, et al. New types of glycolipids from the surface lipids of *Nicotiana umbratica*[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(3): 751-757.
- [23] Cutler H G, Severson R F, Cole P D, et al. The biological activity of some mixed sucrose and glucose esters from exotic tobacco cultivars[J]. *Quarterly PGRSA*, 1992, 20: 18-28.
- [24] Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases[J]. *Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 311-343.
- [25] 刘宛, 李培军, 周启星, 等. 植物细胞色素 P450 酶系的研究进展及其与外来物质的关系 [J]. *环境污染治理技术与设备*, 2001, 2(5): 1-9.
- [26] 王斌, 李德远. 细胞色素 P450 的结构与催化机理 [J]. *有机化学*, 2009, 29(4): 658-662.
- [27] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story[J]. *Genome Biol*, 2000, 1(6): 1-9.
- [28] 余小林, 曹家树, 崔辉梅, 等. 植物细胞色素 P450[J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26: 561-566.
- [29] Mao Yingbo, Cai Wenjuan, Wang Jiawei, et al. Silencing acotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25: 1307-1313.
- [30] 张保龙, 胡雪红, 陈天子, 等. CYP6CM1 基因 RNA 干扰载体的构建及转基因烟草对烟粉虱抗药性的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(4): 717-721.
- [31] Hamano Y, Kuzuyama T, Itoh N, et al. Functional Analysis of Eubacterial Diterpene Cyclases Responsible for Biosynthesis of a Diterpene Antibiotic, Terpentecin[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (40): 37098-37104.
- [32] Court W A, Elliot J M, Hendel J G. Influence of applied nitrogen fertilization on certain lipids, terpenes and other characteristics of flue-cured tobacco[J]. *Tobacco Science*, 1984(28): 59-72.

- [33] Gamou K, Kawashima N. Studies on leaf surface lipid of tobacco: Compositional change in alkane during growth and senescence of leaf[J]. *Agri Biol Chem*, 1979, 43(10): 2163-2168.
- [34] 时向东, 刘国顺, 韩锦峰, 等. 不同类型肥料对烤烟叶片腺毛密度种类及分布规律的影响[J]. *中国烟草学报*. 1999, 5(2): 19-22.
- [35] 陈淑珍, 马长力, 高致明, 等. 烟草叶片腺毛发育及其分泌活动对烟叶品质的影响[J]. *烟草科技*, 1993, 101(4): 32-36.
- [36] Nielsen M T, Severson R F. Variation of flavor components on leaf surfaces of tobacco genotypes differing in trichome density[J]. *J Agric Food Chem*. 1990, 38(2): 467-471.
- [37] 朱显灵, 潘文杰, 陈懿, 等. 不同气候条件下烟叶腺毛分泌物主要成分的差异分析[J]. *烟草科技*. 2011, 282(1): 60-65.
- [38] 李章海, 李继新, 潘文杰, 等. 贵州不同生态区域烤后烟叶表面提取物差异及其对烟叶风格的影响[J]. *中国烟草科学*, 2011, 32(5): 1-5.
- [39] 翁梦苓, 梁志敏, 崔红, 等. 遮荫对烟草腺毛形态结构及其分泌物含量的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2008, 42(6): 613-618.
- [40] 邱慧慧, 史宏志, 张大纯. 烟草叶片腺毛及其分泌物研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2009, 37(8): 61-64.
- [41] Wang Erming, Gan S, Wagner G J. Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum*[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(376): 1891-1897.
- [42] Bolwell G P, Bozak K, Zimmerlin A. Plant cytochrome P450[J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1491-1506.
- [43] 赵剑, 杨文杰. 细胞色素 P450 与植物的次生代谢[J]. *生命科学*, 1999, 11(3): 127-131.
- [44] 彭芳. 细胞色素 P450 在有机磷农药研究中的作用[J]. *中国公共卫生*, 1993, 9(4): 156-157.
- [45] Korte F, Kvesitadze G, Ugrehelidze D, et al. Organic toxicants and plants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 47: 1-26.
- [46] Robert P D, Douglas G L. Multiple Forms of plant Cytochrome P450[J]. *Plant Physiology*, 1991, 96: 669-674.
- [47] Mary A S. Plant Cytochrome P450 monooxygenases[J]. *Critical Review in Plant Sciences*, 1996, 15(3): 235-284.
- [48] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 202-203.
- [49] Johnson R R, Nicholson J A. The structure, chemistry, and synthesis of solanone. A New Anomalous Terpenoid Ketone from Tobacco[J]. *J Org Chem*, 1965, 30: 2918-2921.
- [50] Demole E, Dietrich P. The chemistry of burley tobacco flavour[C]. *ACS National Meeting*, New Orleans. 1977.
- [51] Arnarp J, Chu W L A, Enzell C R, et al. Tobacco chemistry. 77: Biotransformations of a major tobacco cembratrienediol using plant cell cultures of *Nicotiana glauca*[J]. *Acta chemica scandinavica*, 1993, 47(7): 689-694.
- [52] 阎先喜, 胡正海. 薄荷盾状腺毛分泌过程的超微结构研究[J]. *西北植物学报*, 1998, 18(2): 256-261.
- [53] 陈铁山, 崔宏安, 童小燕, 等. 香椿嫩质、叶分泌结构的解剖学研究[J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(6): 85-88.
- [54] 史宏志, 官春云. 烟草腺毛分泌物的化学成分及遗传[J]. *作物研究*, 1995, 9(3): 46-49.
- [55] 冀浩, 李雪君, 赵永振, 等. 浸提叶面分泌物对烤烟品质的影响[J]. *中国烟草科学*, 2008, 29(2): 13-17.
- [56] Martens M, Dalen G A, Russwurm H. Flavour science and technology[M]. New York: John Wiley and Sons Ltd, 1987:101-106.
- [57] Wang Erming, Hall J T, Wagner G J. Transgenic *Nicotiana glauca* L. with enhanced trichome exudate cembratrieneols has reduced aphid infestation in the field[J]. *Mol Breed*, 2004, 13: 49-57.
- [58] Lin Y, Wagner G J. Surface disposition and stability of pest-interactive, trichome-exuded diterpenes and sucrose esters of tobacco[J]. *J Chem Ecol*, 1994, 20:1907-1921.
- [59] Severson R F, Chortyk O T, Stephenson M G, et al. Characterization of natural pesticides from *Nicotiana glauca*[M]. Washington, DC: Naturally Occurring Pest Bioregulators, ACS, 1993:1-21.
- [60] Menetrez M L, Spurr, Jr H W, Daneshmandi D A, et al. Influence of tobacco leaf surface chemicals on germination of *Peronospora tabacina* sporangia[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, 16(5): 1565-1576.
- [61] Kennedy B S, Severson R F, Nielsen M T. Biorationals from *Nicotiana glauca* protect cucumbers against *Colletotrichum lagenarium* (pass) ell and halst disease development[J]. *Journal of Chemical Ecology*. 1995, 21(2): 221-231.
- [62] Gadani F, Ayers D. Hemphling W. Tobacco: a tool for plant genetic engineering research and molecular farming[J]. *Agro-food-industry Hitech*, 1995, 6:1-19; 7:3-6.