



植物萜类次生代谢及其调控

王凌健, 方欣, 杨长青, 李建戌, 陈晓亚*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: xychen@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-09-19; 接受日期: 2013-10-21

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB127000)和国家自然科学基金(批准号: 31300255, 31200222)资助项目

doi: 10.1360/052013-307

摘要 植物次生代谢在植物生长发育、环境适应、抵御病虫害等方面发挥着重要作用, 这些天然产物组成地球上最丰富的有机化合物的宝库。萜类是植物代谢产物中种类最多的一类, 具有重要的生理和生态功能, 一些成分还有应用价值。近十几年来, 人们在萜类化合物的分离、鉴定、应用、生物合成、相关基因与基因簇、酶蛋白结构和功能、代谢调控以及代谢工程等各方面取得了重大进展。本文概述了植物萜类化合物代谢及其调控领域的研究进展与发展趋势。

关键词

次生代谢
萜类
生物合成
代谢调控
基因工程

植物固着生活, 不可移动, 通过产生种类繁多的次生代谢产物(secondary metabolites)适应瞬息万变的生存环境。这些次生代谢产物往往贮存在植物的某一特定器官或组织中, 具有类群物种特异性, 在植物抵御逆境胁迫与病虫害、生物间相互作用以及传递信息等方面发挥重要作用。特别值得一提的是在与昆虫或食草动物的协同进化过程中, 植物产生的各种次生代谢产物也与人类的营养与健康密切相关。目前有超过 60% 的抗癌药和 75% 治疗感染性疾病的药物来源于天然产物或其类似物^[1], 这些天然产物绝大部分属于植物次生代谢物, 在植物体内一般含量较低。虽然现有的作物已被驯化长达上千甚至上万年, 但人类对次生代谢产物的定向选择才刚开始。越来越多的工作显示, 植物对病害和虫害的抗性在很大程度上取决于细胞内植保素的合成调控, 次生代谢与植物的抗性与品质紧密相关。

次生代谢产物根据其生物合成的起始分子不同,

被分为萜类、生物碱、苯丙烷类和相关苯基化合物。迄今为止, 人类从事次生代谢产物的分离已近 200 年, 鉴定了近 10 万种分子结构, 但是大部分化合物的代谢途径仍不清楚。

萜类是由异戊二烯(C₅)为基本单元构成的一类烃类化合物, 根据其异戊二烯单元的数目分为单萜(C₁₀)、倍半萜(C₁₅)、二萜(C₂₀)、三萜(C₃₀)、四萜(C₄₀)和多萜(C>40); 同时还可再根据萜类分子结构中碳环的有无和数目, 进一步分为链萜、单环萜、双环萜、三环萜、四环萜等。许多萜类是含氧衍生物, 所以萜类化合物又可分为醇、酸、酮、羧酸、酯及苷等萜类。在植物次生代谢产物中萜类的结构与种类最为丰富, 迄今已有近 5 万多个萜类分子及其衍生物的结构被解析^[2]。许多半萜、单萜和倍半萜成分具有挥发性, 在植物中合成后直接释放到环境中, 还有的经过后续的氧化、还原、甲基化、交联等修饰, 形成结构各异的萜类化合物家族存储在植物中。

引用格式: 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 1030–1046

Wang L J, Fang X, Yang C Q, et al. Biosynthesis and regulation of secondary terpenoid metabolism in plants. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 1030–1046, doi: 10.1360/052013-307

1 植物萜类化合物的功能

按照萜类化合物在植物体内的功能, 可分为初生代谢物和次生代谢物. 初生代谢物种类较少, 包括甾类、胡萝卜素类、植物激素、多聚萜醇等, 它们是植物生长发育和行使生理功能所必需的. 例如, 三萜类成分甾醇是细胞膜结构中重要的组成成分, 参与生物膜的构建; 四萜类的胡萝卜素是植物光合作用必不可少的色素, 起着吸收与传递光能以及抗氧化的作用; 而赤霉素、脱落酸、油菜素内酯和独角金内酯等植物激素也都是萜类衍生物.

然而, 绝大多数萜类化合物属于次生代谢化合物. 不同植物产生不同种类、高度特异化的萜类化合物, 并在植物与环境因子的互作中发挥重要作用. 例如, 许多单萜和倍半萜化合物是植物香味的重要成分, 对于吸引昆虫传粉具有重要意义, 或参与植物的间接防御反应, 当植物受到侵害时吸引害虫的天敌前来捕食; 单萜成分芳樟醇等与果实的香味密切相关; 棉酚、燕麦素、除虫菊酯等化合物是重要的植保素, 可以减少病菌和昆虫侵害. 一些萜类化合物具有重要的药用价值或促进健康的功能, 如抗肿瘤药物紫杉醇、抗疟疾特效药物青蒿素、抗炎的雷公藤内酯、血小板活化因子拮抗剂银杏内酯(二萜)以及具有多种药理活性的三萜类化合物(如人参皂甙)等; 类胡萝卜素是天然的食品添加剂和化妆品的着色剂, 月桂烯、橙花醇、香叶醇、薄荷醇、柠檬烯和芳樟醇等是植物精油和香料的主要成分; 多萜化合物橡胶是反式连接的异戊二烯类长链化合物, 除虫菊酯是广泛使用的杀虫剂(图 1).

因此, 对萜类化合物的各个方面, 如它们在生物体内的合成途径、生理功能、代谢过程及代谢产物的结构等进行深入的研究具有重要意义.

2 植物萜类的生物合成

萜类的生物合成途径通常被分为 3 个阶段: C5 前体异戊烯基二磷酸酯(isopentenyl diphosphate, IPP)及其双键异构体二甲基烯丙基二磷酸酯(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)生成阶段; 直接前体(法尼基二磷酸 FPP、牻牛儿基二磷酸 GPP、牻牛儿基牻牛儿基二磷酸 GGPP 等)生成阶段; 萜类生成及修饰阶段(氧化还原、酰化、糖基化等). 其中, 前两个阶段已经比

较清楚, 且为所有的萜类化合物所共享. 第三个阶段决定了萜类化合物结构多样性, 是植物次生代谢研究的重点领域.

2.1 C5 单位的形成

五碳(C5)的异戊烯基二磷酸(IPP)和其异构体——二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的合成是通过两条位于不同亚细胞空间的途径进行的, 分别是位于细胞质中的以乙酰辅酶 A 为原料的甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径, 以及位于质体中的以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸为原料的脱氧木酮糖-5-磷酸(DXP)或甲基赤藓醇-4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径. MVA 途径提供了合成倍半萜、三萜以及甾醇类(如油菜素内酯)的前体(FPP, C15)^[3], MEP 途径则提供了合成单萜的前体(GPP, C10)以及合成二萜、植醇、赤霉素和类胡萝卜素的前体(GGPP, C20)^[4]. 这两条生物合成途径已经研究得很清楚.

值得一提的是, 除了高等植物外, MEP 途径也存在于蓝藻^[5]、绿藻^[6,7]、细菌^[8]、真菌^[9]和一些原生动物^[10]中. 在一些类群中, MEP 途径是其合成包括甾醇类等在内的各种萜类化合物的唯一代谢途径^[11]. 有趣的是, 疟原虫(*Plasmodium falciparum*)也利用 MEP 途径合成自身的异戊二烯类化合物, 这暗示 MEP 途径的一些抑制剂有可能成为新的抗疟药物^[12]. 萜类合成的两条途径并非孤立存在, 烟草、拟南芥和金鱼草等植物的 IPP 可以在胞质和质体之间交互使用^[13,14]. 通常认为, 植物生成倍半萜烯的异戊二烯二磷酸是来自 MVA 途径. Bartram 等人^[15]发现, 菜豆叶被害虫危害后生成的倍半萜烯的异戊二烯二磷酸却有 80% 来自 MEP 途径.

2.2 C5 单位的聚合

C5 单位 IPP 和 DMAPP 进一步在短链反式-异戊烯转移酶催化下, 分别形成单萜、倍半萜和二萜的前体: GPP, *E*, *E*-FPP, GGPP^[16]. GPP 作为单萜(C10)的前体是由一分子的 IPP 和一分子 DMAPP 在牻牛儿基二磷酸合成酶(GPS)催化下合成的. 法尼基二磷酸合酶(FPS)催化两分子的 IPP 和一分子的 DMAPP 经过两步缩合反应生成 FPP(C15), 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶(GGPS)催化三分子的 IPP 和一分子的 DMAPP 经过三步缩合反应生成 GGPP(C20)^[17]. GPP, *E*, *E*-FPP, GGPP 分子中的碳-碳双键为反式结构, 最近

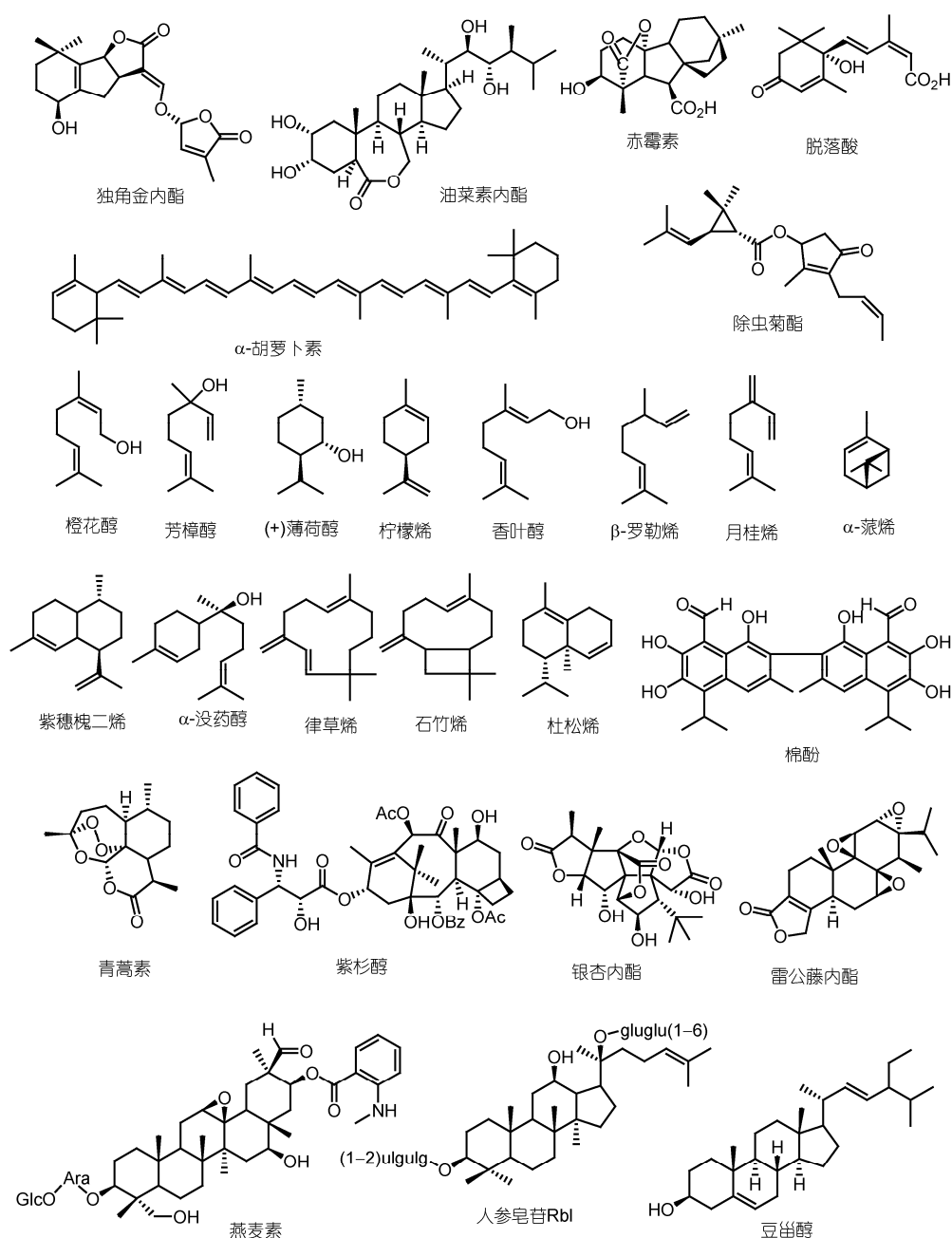


图1 萜类化合物及其结构

在番茄中先后分离鉴定了碳-碳双键为顺式结构的NPP, Z, Z-FPP和NNPP, 它们分别由顺式-异戊烯基转移酶NDPS^[18], zFPS^[19]和NNDPS^[20]催化形成。

GPS, GGPS, FPS这3种异戊烯基转移酶的存在位置与人们所认识的萜类生物合成途径不尽相同: GPS不仅存在于叶绿体, 还存在于不含叶绿素的分泌腺细胞中。有研究表明, GPS可能具有质体与细胞

质双重靶向性^[21]; GGPS存在于植物叶绿体、线粒体和细胞质中^[22]; 在植物细胞质、叶绿体、线粒体、过氧化物酶体中都发现了FPS的存在^[23]。这表明植物细胞质和质体中, 单萜、倍半萜、二萜等萜类的合成可能有一定交流, 没有非常严格的定位。

GPP合成酶、FPP合成酶和GGPP合成酶都以二聚体形式存在。GPS二聚体存在形式有较多变化, 在

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和挪威云杉(*Picea abies*)中, GPS 与其他异戊二烯转移酶一样形成同源二聚体;但在薄荷的叶子(*Mentha×piperita*)、金鱼草的花(*Antirrhinum majus*)和啤酒花(*Humulus lupulus*)中则以异源二聚体形式存在^[24,25]。最近发现拟南芥中的 GPS 还存在另外的异源二聚体形式, GPS 可以通过与 GGPS 的相互作用形成异源二聚体,从而使 GGPS 催化合成单萜的前体 GPP,而不是二萜的前体 GGPP^[26]。拟南芥 GPS 和聚异戊二烯二磷酸合酶(PPPS)作用,可以催化形成中/长链萜类化合物(C25-C45),而非起初认为的合成单萜前体 GPP(C10)^[27]。

FPS 和 GGPS 都以同源二聚体形式存在。目前还发现了一些双功能的异戊烯基转移酶,在体外酶活性反应中发现玉米的 FPS 同时具有少量的 GGPS 活性,兰花的一个 GPS 具有显著的 FPS 活性,云杉的一个 GPS 还同时具有 FPS 和 GGPS 活性^[25,28],另外一个异戊烯基转移酶 PaIDS1 可催化生成约 9:1 的 GPP 和 GGPP^[29]。这些双功能酶在植物体内的生物活性和功能有待深入探索。

2.3 萜类合成及修饰

萜类直接前体 DMAPP(C5), GPP(C10), FPP(C15), GGPP(C20), SPP(C45)及 PPP(C50)在另一大类酶基因——萜类合酶(terpene synthases, TPS)催化下分别形成单萜、倍半萜、二萜以及多萜骨架(图 2);三萜由 2 分子 FPP 在角鲨烯合酶 SQS 催化下合成,而类胡萝卜素合成关键酶八氢番茄红素合成酶(PSY)催化 2 分子 GGPP 形成八氢番茄红素(C40)^[30]。

TPS 位于类异戊二烯途径的分支点上,因此是萜类化合物合成的关键酶。TPS 结构上的细微改变可以产生新的催化活性,能催化单一底物形成多种产物,是自然界萜类化合物结构多样性的主要诱因^[31-33]。此外,某些 TPS 还可催化不同的底物, FaNES1 和 SBS 既可以利用 GPP 为底物也可以选择 FPP 为底物催化产生单萜和倍半萜的混合物^[19,34]。生物信息学和亚细胞定位研究表明,倍半萜合酶一般无信号肽,定位于细胞质以及胞质和内质网的交界处;而单萜和二萜合酶有一段定位于质体的信号肽,定位于质体上^[35]。人们也发现了定位在细胞质和内质网上的单萜和二萜合酶^[22],表明单萜和二萜不仅在质体中催化生成,也可以在细胞质及内质网中催化生成。

总体来说,上游前体化合物的合成途径(MVA 途径、MEP 途径、用于合成 GPP, FPP, GGPP 等底物的异戊烯基转移酶)在不同植物中比较保守,编码基因的数量和催化功能差异不大;而决定化合物结构的萜类合酶虽然序列上具有一定的保守性,但是它们的催化活性和产物差异巨大。

很多 TPS 的直接产物,如单萜、倍半萜和少量二萜是挥发性成分,但植物中萜类化合物,还可能被进一步修饰,如羟化、糖基化、甲基化、异构化、环氧化、加成和还原、卤化等,甚至其骨架结构发生重排。这些后修饰反应大幅度地增加了萜类化合物的种类、结构的多样性以及生物活性。植物中后修饰酶包括细胞色素 P450 单加氧酶、脱氢酶、还原酶、糖基转移酶、酰基转移酶和甲基转移酶等^[36]。

由于植物次生代谢具有种属特异性,模式植物突变体筛选等正向遗传学技术在萜类后修饰酶基因筛选和功能鉴定中应用较少,而修饰次生代谢物的酶种类繁多,催化机制复杂。由于它们参与特定次生代谢中间产物的修饰,专一性强,需要寻找合适的底物才能鉴定酶活功能。许多后修饰酶在细胞内呈区域分布,酶促反应过程中还需要其他一些因子共同参与,研究难度较大。以往主要通过微生物中表达和富集前体化合物,进而鉴定参与下一步生物反应的酶的功能,这些手段在青蒿素、紫杉醇、丹参酮等萜类生物合成途径的研究中发挥了重要作用。目前,随着测序成本降低,一些药用植物的基因组或转录组序列较之前更易获得,反向遗传学方法正成为植物次生代谢研究的重要手段^[37]。

3 植物萜类合酶结构与功能

萜类合酶以异戊二烯二磷酸(GPP, FPP 和 GGPP)为底物合成萜类化合物。自 1992 年在烟草中克隆了 2 个倍半萜合酶基因以来,已在 40 多种植物中克隆了 200 多个单萜和倍半萜合酶基因^[31]。但相对于数量巨大的萜类化合物来说,目前已知的萜类合酶仍只是非常小的一部分。萜类合酶的数量和活性决定了植物萜类化合物结构的多样性。在植物基因组中,萜类合酶基因数量差异很大。例如低等植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)基因组中仅含一个双功能的 CPS/KS 基因^[38],而被子植物拟南芥基因组中有 32 个萜类合酶基因^[39],葡萄(*Vitis vinifera*)基因组中有 152

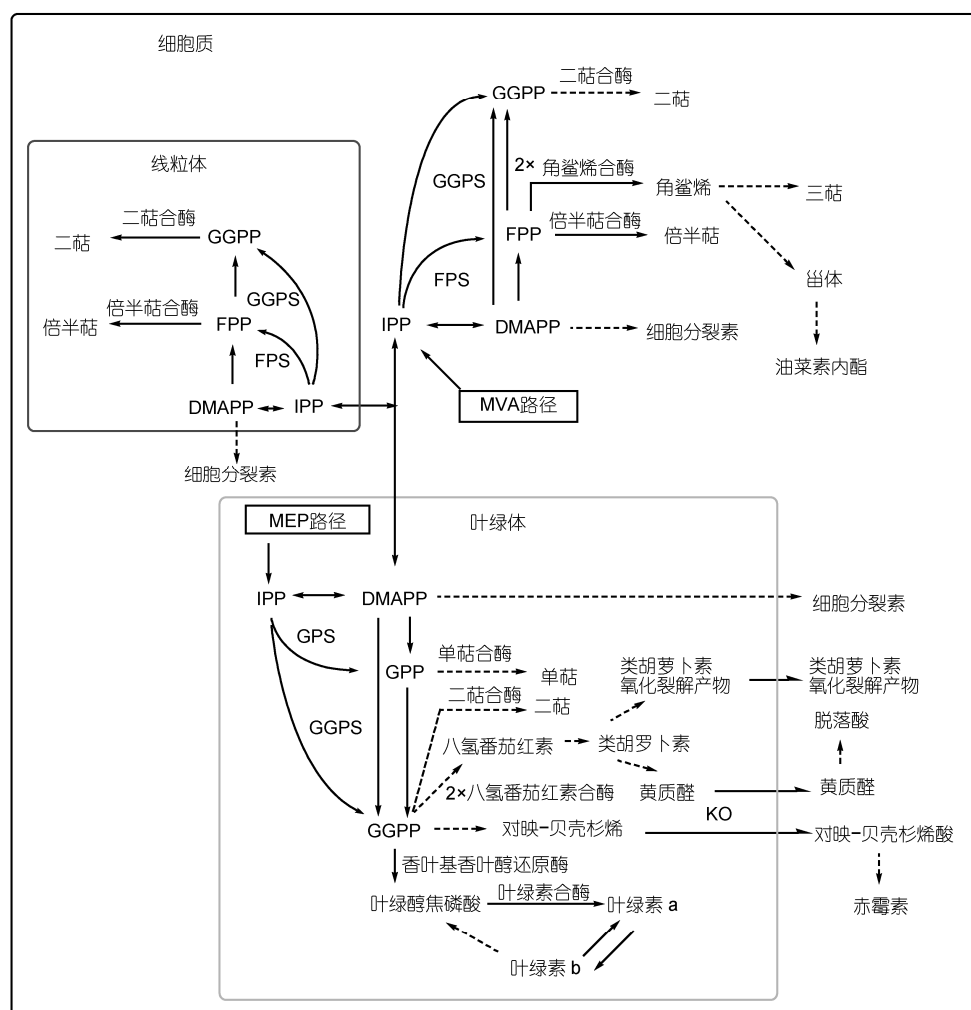


图2 萜类合成(MVA 和 MEP)及亚细胞定位

个萜类合酶基因^[40]. 另外, 萜类合酶可以利用同一种底物产生除主产物外的多种副产物, 大约有接近一半的萜类合酶可以产生多种副产物.

萜类合酶催化机制复杂^[41]。首先,萜类合成酶结合金属离子作为辅因子,使异戊二烯二磷酸发生亲电反应。同时底物疏水基团进入酶活性中心,异戊二烯和二磷酸基团间的共价键发生断裂,形成异戊烯碳正离子中间体。而后,碳正离子发生重排,经过一系列的异构化、环化和重排,最后经过去离子化或加水形成环状或非环状的萜类化合物^[31,42]。倍半萜与单萜的反应机制相同,但由于底物 FPP 比 GPP 的碳骨架大,且双键由 2 个变为 3 个,因此极大地增加了产物结构的多样性。通过一些萜类合酶结构的解析,可以更详细地了解底物与酶反应的催化活性位

点, 从而更全面地了解萜类合酶的反应机制.

3.1 蒽类合酶的分类

萜类合酶数量众多, 根据其催化产物的类型、氨基酸序列相似性以及基因组序列的相似性分别进行了归纳和分类(表 1)^[35,43,44].

由于萜类合酶基因的快速进化, 还形成了物种特异的基因群. 譬如在拟南芥基因组中, 十几个倍半萜和二萜合酶基因彼此之间的相似性比它们与其他被子植物倍半萜和二萜合酶更高^[45,46]. 除了这种物种特异的基因分支进化外, 也经常发生萜类基因功能的趋同进化. 比如, 异戊烯和其他通过相对简单的催化机制形成非环状产物的萜类合酶通常发生趋同进化^[47]. 从水稻中分离的(E)- β -石竹烯合酶与从玉米

表 1 萜类合酶的分类

分类依据	分类结果	特点
催化产物	单萜合酶、倍半萜合酶、二萜合酶和三萜合酶等	根据产物结构决定
氨基酸序列	TPSa, TPSb, TPSc, TPSd, TPSe, TPSf, TPSg 共 7 个亚家族	亚家族内部 40%氨基酸同源性
基因组序列	第一类(裸子植物的二萜合酶、倍半萜合酶和被子植物二萜合酶) 第二类(裸子植物的单萜及倍半萜合酶) 第三类(被子植物单萜、倍半萜和二萜合酶)	11~14 个内含子及 N 端 CDIS domain 9 个内含子和 10 个外显子, 无 CDIS domain 6 个内含子和 7 个外显子, 无 CDIS domain

里鉴定的倍半萜合酶有较高的同源性, 氨基酸水平上有 40%~42%的相似性^[33,48]. 而与其他已经报道的从青蒿^[49]、拟南芥^[50]和黄瓜^[51]中分离的(E)- β -石竹烯合酶的相似性都小于 40%. 这表明与催化产物的相关性相比, 萜类合酶的序列相似性与物种的亲缘关系更密切.

3.2 萜类合酶的结构

(1) 萜类合酶的一级结构. 萜类合酶基因一般编码有 550~850 aa 残基. 通常单萜合酶含有 600~650 aa, 比倍半萜合酶长 50~70 aa, 这是因为单萜合酶包含一个用于质体定位的 N 端信号肽; 多数二萜合酶比单萜合酶大约长 210 aa, 因为多数二萜合酶还有一个在序列和位置上都保守的内部结构单元^[52]. 单萜和二萜合酶的 N 端信号肽序列富含丝氨酸和苏氨酸残基, 酸性氨基酸的含量却很少, 但并没有发现保守的序列元件, 其功能也未知, 它也许是这类萜类合酶共同起源的一个古老的特征^[35].

(i) 萜类合酶的 N 端结构域. 萜类合酶包含一个 C 端活性结构域和一个 N 端结构域. 其 N 端结构域与一些糖基水解酶的结构类似, 但并没有发现保守的元件^[53]. 突变分析表明, N 端结构域提供了一个支架, 可以使 C 端催化活性结构域更易于正确折叠^[33]. 烟草 5-*epi*-马兜铃烯合酶(TEAS)和 *vetispiradiene* 合酶(HVS)结构域互换的实验表明, HVS 的 N 端用 TEAS 的 N 端置换后拥有完整的功能; 将 TEAS 的 N 端换作 HVS 的 N 端, 酶活性大大降低^[54].

(ii) 萜类合酶的 C 端活性结构域. 萜类合酶的 C 端是具有催化活性的结构域. 萜类合酶所含有的最典型的保守结构域是富含天冬氨酸残基的 DDxxD, 实际上这个结构域在异戊烯基二磷酸合酶及微生物萜类合酶中都存在. 萜类合酶和异戊二烯基转移酶都具有在拓扑结构上一致的 DDxxD 镁离子结合结构域, 这两类酶可能起源于共同的祖先^[55]. 点突变及 X-射线晶体衍射结构实验表明, DDxxD 结构域结合

二价金属离子, 参与协调二价金属离子和底物分子二磷酸基团的结合. DDxxD 结构域位于催化位点的入口, 对反应底物的定位起关键作用. 然而, (-)-copalyl diphosphate 合酶没有 DDxxD 结构域, 而是带有另外一个富含天冬氨酸的 DxDD 结构^[55]. 一些二萜合酶, 如来自巨冷杉的双功能 *abietadiene* 合酶^[56], 来自真菌的贝壳杉烯合酶^[57]以及水稻的 *ent-copalyl diphosphate* 合酶^[58]同时包含 DxDD 和 DDxxD 结构. 在秋麒麟草属植物具有完全活性的香叶烯合酶((+)*germacrene D synthase*)中发现了 DDxxD 结构域的天然变异 NDxxD 序列, 这颠覆了以前关于萜类合酶必须具有高度保守的 DDxxD 结构域才有活性的推测^[59].

X-射线晶体衍射的结构分析发现了另外一个金属离子辅助结合的结构域——NSE/DTE 结构域, 它位于活性位点入口的反面. 这个结构域也富含天冬氨酸, 它的保守序列是(L, V)(V, L, A)-(N, D)D(L, I, V)x(S, T)xxxE(黑体示结合金属离子的氨基酸残基)^[60,61]. DDxxD 和 NSE/DTE 结构域都能在固定底物二磷酸基团时结合一个三环镁离子簇, 不同的是几乎所有的萜类合酶都有 DDxxD 结构域, 而 NSE/DTE 结构域的保守性要差一些. 一些裸子植物的萜类合酶以及苹果的 α -法尼烯合酶需要钾离子才能使酶具有催化活性^[35]. 最近一项研究表明, 位于 NSE/DTE 结构域附近的 H- α 1 loop 能够与钾离子结合, 使其稳定并更好地与底物结合^[62].

在 DDxxD 结构域上游约 35 个氨基酸残基是一个保守的 RxR 结构域, 其功能是在底物离子化后的二磷酸上阻止任何对碳正离子中间体的亲核攻击^[63]. 第二个富含精氨酸的 RRX8W 结构域是在许多单萜合酶中发现的串联精氨酸(RR), 在 N 端大约 60 个氨基酸的地方. 如果将薄荷(*Mentha piperita*)柠檬烯合酶 N 端开始到 RR 前面的氨基酸残基全部删除, 酶活不受影响甚至略有提高; 但如果不包括这两个串联的 RR, 突变的酶就不能使用 GPP 为底物, 但可以将

外加的芳樟基二磷酸转化为柠檬烯, 说明 RR 结构域可能参与 GPP 异构化为环化的中间产物^[64]。后来的研究证明, RRX8W 结构域在成熟单萜合酶的 N 端经常出现, 但并非一定存在。

(2) 萜类合酶的三级结构。萜类合酶中已经解析晶体结构的有: 单萜的乙酸龙脑二磷酸合酶(bornyl diphosphate synthase)^[65]、倍半萜的 pentalenene 合酶(pentalenene synthase)^[66]、表马兜铃烯合酶(5-epi-aristolochene synthase)^[63]以及 α -没药醇合酶(α -bisabolol synthase)^[67]、二萜的紫杉烯合酶(taxadiene synthase)^[68]及三萜的角鲨烯环化酶(squalene cyclase)^[69]等。通过对几种萜类合酶的 3D 结构的分析表明, 尽管在反应机制上有不同之处, 但这些酶在结构上有很多相似性。一般认为, 萜类合酶包含 2 个不同的 α -螺旋结构域: 一是 C 端具有催化活性的 α -螺旋折叠束结构域, 这个结构域和 FPP 合酶有同源性; 另外一个 N 端结构域, 它和糖基水解酶催化核心有结构上的相似性。虽然在蛋白序列上有很大的差异性, 但植物和真菌、细菌萜类合酶的 3D 结构中 α -螺旋折叠束结构域是高度保守的, 因此这个结构域被称为萜类合酶折叠(terpene synthase fold)^[61,66,70]。萜类合酶的活性位点就是由 C 端 6 个 α -螺旋形成的疏水口袋及外侧两个 loop 形成的闭合结构。通过对不同萜类合酶的结构分析, 还发现了一些对萜类合酶的催化活性有重要作用的 loop 区(loop region), 包括 A-C, H- α 1 和 J-K loop^[63,65,70]。

通过萜类合酶结构与功能的研究发现, 萜类合酶的少数几个氨基酸残基就能决定产物的特异性, 这些残基也被称为可塑性氨基酸残基。例如, 北美冷杉的蒎烯合酶的丝氨酸 485 和半胱氨酸 480 作为最终质子受体在 pinyll 阳离子去质子化形成 α -和 β -蒎烯中起重要作用, 同时半胱氨酸 372 和苯丙氨酸 579 影响了产生 α -和 β -蒎烯的比例^[71]。结构域置换实验表明, 北美冷杉蒎烯合酶和柠檬烯合酶的产物特异性由活性部位腔的 D-F 螺旋中的氨基酸残基所决定^[72]。有研究利用北美冷杉律草烯(γ -humulene)合酶 4 个可塑性氨基酸残基的饱和突变, 成功构建了 7 个有特异活性的酶, 它们能通过不同的反应途径产生不同的特异产物^[73]。这项研究展示了一种构建新酶的思路和方法。另外一种解析萜类合酶中影响产物特异性的氨基酸残基的系统性方法是相似性高的酶的比较分析。利用 TEAS 和 HPS 这两个序列高度相似的倍半萜

合酶, 通过同源建模和计算, 发现了在这两个酶中不同的 9 个氨基酸残基可以影响这 2 个倍半萜合酶产物的特异性。这些位点的作用似乎并不是提供催化活性的基团, 而是改变活性位点疏水口袋的形状^[74]。通过对这 9 个氨基酸残基不同组合的建库分析表明, 并没有一个比其他都重要的位点来控制产物的分布, 而是随着连续突变有趋向于亲本的效应。TEAS 突变后经常有副产物产生, 本实验室认为现存的酶可能是由祖先混杂而产生的^[75]。

前面提到接近一半的萜类合酶能够产生多种产物, 而另一半只能产生单一产物, 这说明并非反应机制问题, 而是在蛋白上有些特征与多产物的形成相关。不同的萜类合酶可能有不同的产生多产物的方式。例如, 北美冷杉的律草烯(γ -humulene)合酶能够产生 52 种不同的倍半萜, 而它有 2 个 DDxxD 结构域位于活性位点开口的相对方向, 因此不同的产物可能由底物不同的结合方式所造成^[76]。在有些萜类合酶中, 位于第 2 个 DDxxD 结构域位置的 NSE/DTE 结构域可能也会增加副产物的产生。玉米 TPS4 可以产生 14 种倍半萜, 将其活性位点疏水口袋进行建模和用 FPP 类似的底物进行分子对接后发现, 两种不同活性口袋中的反应顺序是不关联的, 而点突变实验证明口袋 1 可能与形成单环的 bisabolyl 活性有关, 口袋 2 则有催化形成双环 bisabolyl 的活性^[77]。形成多产物也与活性中心的可塑性相关, 如果反应中心允许反应生成多种中间体, 那么就可以产生多种产物。同时, 一些与主产物相比需要更少反应步骤或反应时间的副产物也更容易产生^[78]。萜类合酶的反应更容易被动力学而非热力学所控制^[61], 因此形成多产物可能是在反应早期便被决定了。

本实验室近期从青蒿中克隆鉴定了一个 α -没药醇合酶(α -bisabolol synthase, AaBOS), 其蛋白序列与 ADS 有很高的一致性, 达到 82%。通过对 AaBOS 和 ADS 进行结构域置换和点突变后的体外酶活性实验发现, AaBOS 4 个位点(V373, I395, N398 和 L399)的突变能改变 AaBOS 产物特异性。AaBOS 399 位点的氨基酸残基能够与水分子相互作用, 从而影响酶与底物的结合作用; 同时, 399 位点位于催化活性中心疏水口袋的 Helix G, 也能影响酶活性中心与底物的相互作用。通过结构分析和氨基酸突变, 将 AaBOS 从 α -没药醇合酶变为了另外一个新倍半萜合酶。进一步实验发现, 将 ADS 中位点 T399 用不同的氨基酸

残基取代后, 可以改变 ADS 产物特异性及催化活性. 将 ADS 399 位的苏氨酸突变为丝氨酸, 突变后的 ADS 催化活性提高了约 70%. 此 ADS 突变体蛋白对利用植物基因工程或微生物发酵工程生产青蒿素具有应用价值^[67].

4 植物萜类生物合成的调控

4.1 组织特异性

植物萜类的合成与释放具有空间特异性(组织器官)和时间特异性(发育时期). 在细胞水平上, 植物在细胞不同区室中合成不同种类的萜类及其衍生物. 这是由于 MVA 途径和 MEP 途径中大多数酶的亚细胞定位不同, 造成了萜类化合物代谢在细胞内的区室化: 胞质中合成甾体和倍半萜, 质体中合成类胡萝卜素、叶绿醌, 线粒体中合成泛醌, 特定的液泡中合成橡胶颗粒等^[79].

植物的花是挥发性萜类含量比较丰富的器官之一. 在金鱼草生殖生长阶段, 其上唇瓣和下唇瓣会释放罗勒烯和月桂烯吸引传粉昆虫; 腺毛是合成和储存特异代谢产物最主要的场所, 主要分布在茎、叶、花等地上组织^[18]. 薄荷的盾状腺毛是合成萜类的主要场所, 青蒿素代谢途径上的酶在腺毛的顶部细胞中表达, 此结果也解释了青蒿素及其前体为何在腺毛多的组织中高水平积累^[80]. 但并非所有特异的代谢产物都在腺毛中合成并储存, 柠檬醛主要在柠檬香茅(*Cymbopogon citratus*)近轴面叶片边缘的木质化细胞(parenchymatic cell)中合成储存^[81].

萜类的合成、积累随植物的发育阶段而不同, 例如: 薄荷不同发育阶段的叶片中单萜含量及组成不同: 叶片早期发育的前 21 天单萜迅速累积, 之后含量保持稳定; 幼年期叶片以柠檬烯为主, 随着叶片年龄的增长, 薄荷酮成为主要成分^[82,83]. 金鱼草花香的主要成分芳樟烯和罗勒烯在开花后第 2 天迅速上升, 第 6 天达到顶峰后逐渐下降^[84].

4.2 昼夜节律性

植物萜类的合成和释放通常具有昼夜节律性, 有时这种节律性受到其他因子(如昆虫侵袭)的影响. 青蒿(-)- β -pinene 合酶的表达受到昼夜节律的调控, 表达水平在光照条件下比黑暗中高^[85]. 棉花被甜菜

叶蛾取食后所诱导产生的许多萜类(罗勒烯、蛇麻烯等)的释放具有明显的昼夜节律性, 且移走昆虫后这种节律性仍能保持^[86]. 这些呈昼夜节律性释放的萜类一般与昆虫的取食行为以及授粉昆虫的生活习性和出没时间有着紧密的关系. 若授粉者是在夜间活动的昆虫, 如夜蛾和蝙蝠等, 则花中挥发性物质包括萜类物质的最大释放量出现在夜间; 若授粉者是在白天活动的昆虫, 如黄蜂和蝶类, 花中萜类物质的最大释放量则出现在白天^[87]. 这种机制是植物为适应外界环境和后代的繁衍, 而与昆虫长期协同进化的结果.

4.3 诱导合成(植物与昆虫、微生物等的互动)

萜类的生物合成及调控在很大程度上受到昆虫或微生物诱导, 例如, 挥发性萜类能够吸引植食性昆虫的天敌, 科学家称之为植物的间接防御反应^[88]. 玉米的地上部分和地下部分通过不同的萜类合酶参加防御反应^[48,89]. 当玉米植株受到玉米螟等昆虫取食时, 会诱导 *TPS10* 基因表达, 进而合成和释放 (E)- α -bergamotene 和 (E)- β -farnesene 等萜类化合物吸引寄生蜂(*Cotesia marginiventris*)^[90]. 萜类挥发性物质也能直接驱避植食性昆虫取食或改变昆虫的生理发育状态, 发挥直接防御的作用. Toong 等人^[91]从碎米莎草中分离了倍半萜类物质——昆虫保幼激素, 其可以干扰昆虫的生长发育, 如孵化和繁殖. 此外, 当植物受到生物和非生物胁迫后, 叶中释放出萜类物质可作为报警信号传递给周围同种植物, 例如, 玉米被夜蛾(*Spodoptera littoralis*)幼虫侵食后释放的萜类物质能够有效提高周围其他植株的直接和间接防御能力^[92].

来自植食性昆虫的化学诱导物质和机械损伤被认为是诱导植物挥发性物质合成的两大因素^[93]. 害虫诱导的萜类化合物生成是一个非常复杂的过程, 有多种信号途径的参与. 不同害虫诱导植物萜类挥发物的组成和量有着明显的不同^[94,95]. 钙离子信号途径、JA 信号途径、SA 信号途径、乙烯信号途径等各种信号途径的互动在萜类挥发物代谢过程中起着重要作用^[96].

此外, 环境因素(如光、温度、湿度和营养平衡等)都可以很大程度地影响挥发性化合物的合成和释放^[97]. 例如, 5-磷酸脱氧木酮糖还原异构酶(DXR)只

在光照下参与磷酸脱氧木酮糖(DXP)途径, 从而影响 DXP 途径的活性, 影响单萜的生物合成^[4]. 生长在低光强条件下的薄荷(*Mentha piperita*), 会选择性地储存和大量积累(+)-薄荷呋喃在分泌细胞内; 在正常的生长条件下, (+)-薄荷呋喃则稳定在非常低的水平^[98]. 稍微提高温度和湿度, 薄荷能合成和释放更多的单萜类挥发性成分^[82].

4.4 转录因子调控

基因的转录调控是植物代谢领域的一个研究热点. 转录因子在萜类生物合成中也起着重要的调控作用, 在很大程度上决定了酶基因的时空表达和诱导表达的特异性和高效性.

棉花杜松烯合成酶 CAD 是合成倍半萜植保素途径的一个关键酶. 本实验室对亚洲棉(*Gossypium arboreum*)的研究表明, 一个含有亮氨酸拉链的 WRKY 类转录因子 GaWRKY1 能够与 CAD-A 启动子区域的 W-box 结合, 并且激活该启动子表达, 从而参与对棉酚生物合成途径的调控^[99]. 与棉花类似, 青蒿中的 AaWRKY1 通过与倍半萜合酶 Amorpha-4, 11-diene synthase(ADS)启动子区域中的 W-box 结合, 从而激活 ADS 基因表达来促进青蒿素的生物合成^[100].

大量研究表明, 茉莉酸酯(JA)对于倍半萜类化合物代谢具有重要的调控作用, 可以诱导萜类合酶基因表达和化合物合成与释放. 青蒿中的 AP2 类转录因子 AaERF1 和 AaERF2 受到茉莉酸(JA)的诱导, 它们通过与 ADS 和下游 P450 单加氧酶 CYP71AV1 基因启动子区域中的 CRTDREHVCBF2(CBF2)和 RAV1-AAT(RAA)元件结合, 正向调控青蒿素生物合成^[101]. 青蒿中另一个在表皮毛特异表达的 AP2/ERF 类转录因子 AaORA 也可以促进青蒿素的生物合成, 在转基因植物中过表达 AaORA 或 AaERF1, 可以提高植物对灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抗性^[102,103].

MYC2 是 JA 信号重要的转录因子, 同时参与了多种信号途径之间的互作, 如脱落酸(ABA)、乙烯和光信号等. 本实验室研究发现, 在拟南芥中, MYC2 通过与 JAZ, DELLA 类蛋白互作整合激素信号传导途径中的信息, 并与倍半萜合酶(如 AtTPS21)启动子区域中的顺式作用元件结合, 调控萜类合酶基因表达和挥发性倍半萜合成^[104].

4.5 转录后或翻译水平的调控

萜类合酶对萜类代谢的决定作用并不仅仅发生在基因转录水平上. 在转录后或翻译水平上也受到不同的调控. 例如, 在受真菌激发子诱导的烟草细胞中, 角鲨烯合酶的活性受到抑制, 但无论是在处理的细胞还是未处理的细胞中, 角鲨烯合酶 mRNA 水平都没有发生明显的变化, 表明角鲨烯合酶基因的表达受到转录后水平的调控^[105]. 番茄 HMGR 有 2 个跨膜结构, 且 N 和 C 端都在胞质中. 体外实验表明, HMGR2 的天冬氨酸可以进行糖基化修饰^[106]. 在金鱼草的花中, 单萜的生物合成和 GPP 合酶小亚基的表达水平密切相关, 表明在花发育过程中用于单萜合成的 GPP 底物也受到严格的调控^[107]. 在 MEP 途径 HDR 的突变体 *clab6* 中, *DXS*, *HDS*, *HDR* 基因的表达与对应蛋白含量并不一致, 这暗示 MEP 途径中也存在着转录后调控^[108].

4.6 基因簇方式的调控

操纵子是原核生物中功能相关而序列不相关的基因簇, 同一个操纵子中的基因共表达, 它们是由基因的横向转移产生的. 真核生物中存在一些操纵子样基因簇(operon-like gene cluster), 这些基因簇中的基因共表达, 但是与原核操纵子不同的是, 它们是由基因倍增、新功能化和基因重组而来的. 植物功能基因簇(functional gene clusters)通常编码专一的代谢途径中的酶蛋白, 共同调控植物某一个代谢过程, 如玉米中的苯并恶嗪酮^[109]、燕麦三萜成分 *strigosa*^[110]、水稻、木薯和高粱中生氰糖苷^[111]及罂粟生物碱诺斯卡品^[112]等.

近年来, 随着基因组学工作的进展, 对植物的萜类代谢调控有了新的认识. 在拟南芥、水稻和番茄等植物中, 先后发现存在一些萜类代谢的基因簇, 这些基因簇中的基因共表达, 并分别催化萜类化合物连续的生化反应. Field 和 Osbourn^[113]在拟南芥中发现了一个和三萜类物质 *thalianol* 合成相关的基因簇, 它由一个氧鲨烯环化酶基因(*THAS*), 2 个 P450 基因(*CYP705A5*, *THAD*; *CYP708A2*, *THAD*)和一个 BAHD 家族的酰基转移酶基因构成, 这 4 个基因的表达高度相关. 通过对过表达和 T-DNA 插入突变体植株进行代谢产物分析, 结合体外酶活实验, 发现 *THAS*, *THAH* 和 *THAD* 在 *thalianol* 的合成和修饰中依次发挥功能, 而 BAHD 家族的酰基转移酶则可能

参与后续的修饰. 而类似的结构在水稻中也有发现, 水稻的 2 号染色体上存在一个 P450 的基因簇, 有 4 个 P450 属于 CYP76M 亚家族, 2 个属于 CYP71Z7 亚家族. CYP76M 亚家族的 4 个成员, 依次命名为 CYP76M5~CYP76M8, 它们参与了二萜类抗真菌植保素的合成, 这些基因都能受到水稻防御反应的诱导^[114]. CYP71Z 亚家族的两个成员 CYP71Z6 和 CYP71Z7 分别参与了水稻中抗细菌植保素 oryzalides 和抗真菌植保素 phytocassane 的合成^[115].

研究发现, 数量不等的萜类合酶基因分散在基因组的各条染色体上可能聚集成簇, 例如水稻的 4 号染色体上一段 480 kb 的区域里, 分布着 14 个萜类合酶基因, 而在葡萄中有 45 个萜类合酶聚集在 18 号染色体上 690 kb 的区域, 形成一个大型基因簇. 在番茄 8 号染色体上一段集中了 5 个萜类合酶(TPS18, TPS19, TPS20, TPS21, TPS41)和 2 个异戊烯基转移酶基因(CPT1, 2)^[116]; 通过比较了不同茄科植物的基因组序列, 推测它们分别由原始的 CPS 和 KS 萜类合酶通过基因重复和分歧进化而来^[117]. 此外, 研究发现这些功能基因簇中常含有重复基因, 同一个基因簇在不同植物中控制的代谢途径也有所不同^[118].

5 萜类代谢基因工程研究

由于萜类化合物参与植物的防御反应, 希望通过萜类代谢的基因工程来提高植物的抗病虫害能力. 如将水稻(*E*)- β -石竹烯合酶基因 *OsTPS3* 过量表达后, 转基因水稻株系比野生型植株对缨小蜂具更强的引诱作用, 而缨小蜂是水稻的害虫稻飞虱的寄生蜂^[119]. 在转基因青蒿中过表达 *AaORA* 或 *AaERF1*, 可以提高植物对灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抗性^[102,103]. 可见, 如果将萜类及其衍生物成功应用于农业及林业病虫害防治, 将可以大大减少农药的使用量, 更加有利于环境保护.

通过植物转基因工程提高萜类次生代谢物的有效含量, 主要策略包括生物合成途径关键基因的过量表达、转录因子调控、抑制竞争性的代谢旁路以及多基因共转化等. 中国科学家在青蒿转基因研究中做了大量工作, 通过在转基因青蒿过表达 *FPS* 基因^[120]、抑制鲨烯合酶基因的表达^[121]、抑制石竹烯合酶基因的表达^[122]以及过表达青蒿素生物合成途径中的转录因子^[101]等“开源”和“节流”措施, 或通过光信

号途径^[123]来提高转基因青蒿中的青蒿素含量. Zhang 等人^[124]利用 RNAi 技术抑制类固醇合成途径, 使转基因青蒿中青蒿素的含量达到 3.14%干重. 此外, 改变倍半萜合酶的亚细胞定位(由胞质定位变为质体定位)可以取得非常理想的效果, 将 *FaNES1* 定位于线粒体后, 转基因拟南芥中橙花叔醇含量大大提高^[125]. 在法尼基二磷酸合酶(FPS)以及相应的倍半萜合酶(如广藿香醇合酶、紫穗槐二烯合酶)的 5'端各加一段质体定位信号序列后共同转化烟草, 结果表明带有质体定位信号的转基因烟草产生的广藿香醇或紫穗槐二烯的含量大大高于不带定位信号的转基因烟草^[126].

棉酚是一种倍半萜醛类衍生物, 作为植保素在棉花的抗病抗虫反应中起重要作用. 但它也是具有普遍毒性的多酚类化合物, 严重影响棉子油和棉子饼的食用和饲料应用价值. 本实验室先后克隆了棉酚代谢途径中的法尼基二磷酸合酶, (+)- δ -杜松烯合酶(CAD), (+)- δ -杜松烯-8-羟化酶(CYP706B1). 这 3 个酶催化从 5 碳原子的异戊二烯前体到 8-羟基杜松烯的 3 步连续的反应, 其中(+)- δ -杜松烯合酶是棉花倍半萜生物合成的关键酶; (+)- δ -杜松烯-8-羟化酶为细胞色素 P450 单加氧酶, 杜松烯的 8 位羟基化反应是棉酚等倍半萜醛类形成的关键步骤^[127]. 2006 年, Sunilkumar 等人^[128]在种子中特异表达 CAD 基因的 DsRNA 抑制 CAD 基因在种子中的表达, 从而降低棉酚在棉籽中的含量, 获得了一个极具应用价值的棉花新种质^[129].

萜类代谢领域的研究进展也为运用生物技术或者分子标记育种改良农作物的特殊营养品质提供了基础. 对胡萝卜素代谢途径分析发现, 水稻种子中只能合成 GGPP, 将胡萝卜素合成途径的酶在稻米的胚乳中表达成功培育了黄金大米(golden rice)^[130,131], 为提高某些不发达地区人群胡萝卜素摄入量开辟了一个新的途径. 研究发现, 独特的类胡萝卜素生物合成调控因子能促进有色体的发育, 如在番茄中发现的 HSP21 能够促进叶绿体向有色体的转化, 过量表达 HSP21 促进了果实提前积累类胡萝卜素^[132]; 在花椰菜中发现的 OR 蛋白具有类似 DnaJ 的锌指结构, 能够控制白色体向有色体的转化, 促进 β -胡萝卜素积累^[133]. 由于类胡萝卜素与植物激素(赤霉素、脱落酸)的合成相关联, 通过基因工程改变类胡萝卜素代谢途径中关键基因的表达往往会引起植物生

长发育的异常. 因此, 利用 *Or* 等调控基因促进作物中类胡萝卜素积累可能是解决这一难题的有效途径.

由于对萜类基因及其代谢途径认识的加深, 萜类的代谢工程有了长足进展. 近 10 年来, 青蒿素合成生物学取得突破, 通过微生物发酵生产青蒿素前体已接近工业化规模, 但目前还不能实现青蒿素在微生物体内的全合成. 2003 年, 加州伯克利大学 Keasling 实验室在大肠杆菌中表达 ADS, 首次在细菌体内合成出青蒿素的第一个关键前体——紫穗槐-4, 11-二烯^[134]; 2006 年, 他们通过合成生物学方法, 利用人工改造的酵母产生 FPP, 在该酵母中表达青蒿的 ADS 和 *CYP71AV1* 基因, 并对相关代谢途径做了优化设计, 解决了次生代谢物大量积累对宿主的毒性问题, 改造后的菌株合成青蒿酸的能力提高到 100 mg/L^[135]. 2013 年, Paddon 等人^[136]利用合成生物学技术, 在原来的工程酵母中再导入新发现的 P450 酶 CYB5 和一个醇脱氢酶 ADH1, 使发酵生产青蒿酸的产量高达 25 g/L; 然后通过优化的化学半合成技术避开了繁琐的光氧化反应步骤, 成功生产出青蒿素, 为通过人工发酵生产青蒿素的产业化进程拉开序幕. 紫杉醇是重要抗肿瘤药物, 利用类似研究理念, 麻省理工学院的 Stephanopoulos 研究组在大肠杆菌中大量生产左旋海松二烯及紫杉醇的前体获得成功, Taxadien-5 α -ol 产量达到 58 mg/L^[137,138].

6 展望

植物次生代谢在其生长发育、环境适应、抵御病虫害等方面发挥着重要作用, 这些天然产物也是地球上最丰富的有机化合物的宝库. 萜类是植物次生代谢产物中种类最多的一类化合物, 具有重要的生理和生态功能以及众多的应用价值. 随着基因组学、转录组学、蛋白质组学以及代谢组学的快速发展, 为人们从整体水平上定性、定量和动态地分析代谢过程和代谢产物创造了良好条件. 近十几年来, 人们在萜类化合物的分离、鉴定和应用、萜类生物合成相关功能基因研究、酶蛋白结构和功能、代谢调控的分子机制以及代谢基因工程等各方面取得了巨大进展.

拟南芥、水稻、玉米、番茄等众多植物全基因组序列信息的公布为研究植物次生代谢, 包括萜类生物合成及其调控基因提供了明确的靶标和参考. 次生代谢的一个重要特征是具有很强的类群(科属, 甚

至种)特异性, 模式植物的代表性十分有限. 地球上被子植物约有 400 科, 10,000 多属, 近 30 万种. 次生代谢研究与代谢工程不可能面面俱到, 只能本着“有所为、有所不为”的原则, 把有限的资源集中在一些重要天然产物的代谢途径和调控上. 尤其是需要量大、资源紧缺的药用和香料成分, 以及主要农作物中与抗性、品质相关的次生代谢途径, 应当重点研究.

萜类次生代谢研究的重点主要包括以下几个方面:

(i) 萜类生物合成途径的研究. 分离各种萜类合成酶和后修饰酶, 通过底物和产物的鉴定, 解析若干重要萜类次生代谢化合物的生物合成途径; 通过酶蛋白活性的比较研究和人工改造, 获得活性高、应用价值大的基因元件.

(ii) 转录因子及其调控机制和调控网络的研究. 转录因子可以同时调控一条代谢途径上的一个甚至多个合成酶基因, 在萜类次生代谢中起重要调控作用, 在阐明调控机制的基础上, 利用功能基因组学、蛋白质组学和代谢组学方法揭示代谢流的分配规律以及不同代谢途径间的互作机制.

(iii) 萜类代谢基因工程的研究. 利用对代谢途径和代谢调控网络的了解, 指导次生代谢的基因工程研究, 实现代谢调控的可预测性. 使用特异启动子、多基因转化和不同细胞定位等技术, 尽可能地使转基因植物具有预期的优良性状, 如增加有效成分的积累, 改良植物自身的性状和品质, 增强植物抵抗病虫害、防御天敌的能力, 维系植物与其他生物类群的互惠关系及交感作用等. 黄金大米也是代谢工程的亮点, 改良特殊营养品质是萜类代谢工程任务之一.

(iv) 萜类代谢合成生物学的研究. 通过工程酵母生产青蒿酸, 并利用有机半合成技术成功转化成青蒿素, 这项成果改变了青蒿素原料的生产方式, 是近年来萜类代谢研究最大的亮点之一. 在微生物中表达和富集萜类前体化合物, 可以用来鉴定萜类合成酶特别是后修饰酶的功能; 从系统生物学的角度出发, 将植物次生代谢途径在微生物中重构并进行重要生物活性物质的生产, 无疑具有重要应用价值.

(v) 萜类次生代谢的化学生态学研究. 这也是近来生命科学的一个热点. 通过对植保素、分泌化合物和挥发性成分生物合成、释放和活性的研究, 深入探索植物-植物、植物-昆虫、昆虫-昆虫之间的化学信号关系和协同进化, 从而在生物防治、生态保护和环境监测等方面有所贡献.

参考文献

- 1 Cragg G M, Newman D J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Rev*, 2009, 8: 313–331
- 2 Thulasiram H V, Erickson H K, Poulter C D. Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science*, 2007, 316: 73–76
- 3 Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1999, 34: 95–106
- 4 Lichtenthaler H K. The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 47–65
- 5 Disch A, Schwender J, Muller C, et al. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J*, 1998, 333: 381–388
- 6 Schwender J, Seemann M, Lichtenthaler H K, et al. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J*, 1996, 316: 73–80
- 7 Schwender J, Gemunden C, Lichtenthaler H K. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta*, 2001, 212: 416–423
- 8 McAteer S, Coulson A, McLennan N, et al. The *lytB* gene of *Escherichia coli* is essential and specifies a product needed for isoprenoid biosynthesis. *J Bacteriol*, 2001, 183: 7403–7407
- 9 Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, et al. Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol*, 2000, 182: 891–897
- 10 Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 1999, 285: 1573–1576
- 11 Lichtenthaler H K. The non-mevalonate DOXP/MEP pathway (deoxyxylulose 5-phosphate/methylerythritol 4-phosphate pathway) of chloroplast isoprenoid biosynthesis. In: Rebeiz C A, Benning C, Bohnert H J, eds. *The Chloroplast: Basics and Applications*. Heidelberg: Springer, 2010. 95–118
- 12 Lichtenthaler H K, Zeidler J, Schwender J, et al. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Z Naturforsch C*, 2000, 55: 305–313
- 13 Dudareva N, Andersson S, Orlova I, et al. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 933–938
- 14 Hemmerlin A, Hoeffler J F, Meyer O, et al. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 26666–26676
- 15 Bartram S, Jux A, Gleixner G, et al. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1661–1672
- 16 Liang P H, Ko T P, Wang A H. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3339–3354
- 17 McGarvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 1995, 7: 1015–1026
- 18 Schillmiller A L, Schauvinhold I, Larson M, et al. Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10865–10870
- 19 Sallaud C, Rontein D, Onillon S, et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell*, 2009, 21: 301–317
- 20 Akhtar T A, Matsuba Y, Schauvinhold I, et al. The tomato cis-prenyltransferase gene family. *Plant J*, 2013, 73: 640–652
- 21 Li S M, Hennig S, Heide L. Shikonin: a geranyl diphosphate-derived plant hemiterpenoid formed via the mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39: 2721–2724
- 22 Okada K, Saito T, Nakagawa T, et al. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1045–1056
- 23 Szkopinska A, Plochocka D. Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52: 45–55
- 24 Bouvier F, Suire C, d'Harlingue A, et al. Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *Plant J*, 2000, 24: 241–252
- 25 Schmidt A, Gershenzon J. Cloning and characterization of two different types of geranyl diphosphate synthases from Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry*, 2008, 69: 49–57
- 26 Wang G, Dixon R A. Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9914–9919

- 27 Hsieh F L, Chang T H, Ko T P, et al. Structure and mechanism of an *Arabidopsis* medium/long-chain-length prenyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiol*, 2011, 155: 1079–1090
- 28 Hsiao Y Y, Jeng M F, Tsai W C, et al. A novel homodimeric geranyl diphosphate synthase from the orchid *Phalaenopsis bellina* lacking a DD(X)2-4D motif. *Plant J*, 2008, 55: 719–733
- 29 Schmidt A, Wachtler B, Temp U, et al. A bifunctional geranyl and geranylgeranyl diphosphate synthase is involved in terpene oleoresin formation in *Picea abies*. *Plant Physiol*, 152: 639–655
- 30 Vranova E, Coman D, Gruissem W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant*, 2013, 5: 318–333
- 31 Degenhardt J, Kollner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1621–1637
- 32 Keeling C I, Weisshaar S, Lin R P, et al. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1085–1090
- 33 Kollner T G, Schnee C, Gershenzon J, et al. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell*, 2004, 16: 1115–1131
- 34 Aharoni A, Giri A P, Verstappen F W, et al. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*, 2004, 16: 3110–3131
- 35 Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4126–4133
- 36 Li J L, Luo X D, Zhao P J, et al. Post-modification enzymes involved in the biosynthesis of plant terpenoids. *Acta Botanica Yunnanica*, 2009, 31: 461–468
- 37 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of multiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108–12113
- 38 Hayashi K, Kawaide H, Notomi M, et al. Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett*, 2006, 580: 6175–6181
- 39 Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 730–745
- 40 Martin D M, Aubourg S, Schouwey M B, et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 226
- 41 Yue Y C, Fan Y P. The terpene synthases and regulation of terpene metabolism in plants. *Acta Horti Sin*, 2011, 38: 379–388
- 42 Zulak K G, Bohlmann J. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52: 86–97
- 43 Chen F, Tholl D, Bohlmann J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J*, 2011, 66: 212–229
- 44 Trapp S C, Croteau R B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 2001, 158: 811–832
- 45 Aubourg S, Lecharny A, Bohlmann J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 730–745
- 46 Tholl D, Chen F, Petri J, et al. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant J*, 2005, 42: 757–771
- 47 Sharkey T D, Yeh S, Wiberley A E, et al. Evolution of the isoprene biosynthetic pathway in kudzu. *Plant Physiol*, 2005, 137: 700–712
- 48 Schnee C, Kollner T G, Gershenzon J, et al. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiol*, 2002, 130: 2049–2060
- 49 Cai Y, Jia J W, Crock J, et al. A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002, 61: 523–529
- 50 Chen F, D'Auria J C, Tholl D, et al. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J*, 2003, 36: 577–588
- 51 Mercke P, Kappers I F, Verstappen F W, et al. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2012–2024
- 52 Xu M, Hillwig M L, Prsic S, et al. Functional identification of rice syn-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. *Plant J*, 2004, 39: 309–318
- 53 Dudareva N, Cseke L, Blanc V M, et al. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell*, 1996, 8: 1137–1148
- 54 Back K, Chappell J. Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6841–6845

- 55 Ait-Ali T, Swain S M, Reid J B, et al. The LS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme ent-kaurene synthase A. *Plant J*, 1997, 11: 443–454
- 56 Vogel B S, Wildung M R, Vogel G, et al. Abietadiene synthase from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 1996, 271: 23262–23268
- 57 Kawaide H, Imai R, Sassa T, et al. Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem*, 1997, 272: 21706–21712
- 58 Pristic S, Xu M, Wilderman P R, et al. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4228–4236
- 59 Prosser I, Altug I G, Phillips A L, et al. Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 432: 136–144
- 60 Cane D E, Kang I. Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376: 354–364
- 61 Christianson D W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev*, 2006, 106: 3412–3442
- 62 Green S, Squire C J, Nieuwenhuizen N J, et al. Defining the potassium binding region in an apple terpene synthase. *J Biol Chem*, 2009, 284: 8661–8669
- 63 Starks C M, Back K, Chappell J, et al. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science*, 1997, 277: 1815–1820
- 64 Williams D C, McGarvey D J, Katahira E J, et al. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry*, 1998, 37: 12213–12220
- 65 Whittington D A, Wise M L, Urbansky M, et al. Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15375–15380
- 66 Lesburg C A, Zhai G, Cane D E, et al. Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science*, 1997, 277: 1820–1824
- 67 Li J X, Fang X, Zhao Q, et al. Rational engineering of plasticity residues of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua*: product specificity and catalytic efficiency. *Biochem J*, 2013, 451: 417–426
- 68 Koksall M, Jin Y, Coates R M, et al. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature*, 2010, 469: 116–120
- 69 Wendt K U, Poralla K, Schulz G E. Structure and function of a squalene cyclase. *Science*, 1997, 277: 1811–1815
- 70 Shishova E Y, Di Costanzo L, Cane D E, et al. X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate. *Biochemistry*, 2007, 46: 1941–1951
- 71 Hyatt D C, Croteau R. Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 439: 222–233
- 72 Katoh S, Hyatt D, Croteau R. Altering product outcome in *Abies grandis* (-)-limonene synthase and (-)-limonene/(-)-alpha-pinene synthase by domain swapping and directed mutagenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 425: 65–76
- 73 Yoshikuni Y, Ferrin T E, Keasling J D. Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*, 2006, 440: 1078–1082
- 74 Greenhagen B T, O'Maille P E, Noel J P, et al. Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9826–9831
- 75 O'Maille P E, Malone A, Dellas N, et al. Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene synthases. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 617–623
- 76 Steele C L, Crock J, Bohlmann J, et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 2078–2089
- 77 Kollner T G, O'Maille P E, Gatto N, et al. Two pockets in the active site of maize sesquiterpene synthase TPS4 carry out sequential parts of the reaction scheme resulting in multiple products. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448: 83–92
- 78 Vedula L S, Rynkiewicz M J, Pyun H J, et al. Molecular recognition of the substrate diphosphate group governs product diversity in trichodiene synthase mutants. *Biochemistry*, 2005, 44: 6153–6163
- 79 Jorgensen K, Rasmussen A V, Morant M, et al. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 280–291
- 80 Olsson M E, Olofsson L M, Lindahl A L, et al. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1123–1128
- 81 Lewinsohn E, Dudai N, Tadmor Y, et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus*)

- (DC.) Stapf., Poaceae). *Annals of Botany*, 1998, 81: 35–39
- 82 Gershenzon J, McConkey M E, Croteau R B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiol*, 2000, 122: 205–214
- 83 Turner G W, Gershenzon J, Croteau R B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol*, 2000, 124: 655–664
- 84 Dudareva N, Martin D, Kish C M, et al. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell*, 2003, 15: 1227–1241
- 85 Lu S, Xu R, Jia J W, et al. Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol*, 2002, 130: 477–486
- 86 Loughrin J H, Manukian A, Heath R R, et al. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11836–11840
- 87 Yu F, Utsumi R. Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 3043–3052
- 88 Unsicker S B, Kunert G, Gershenzon J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 479–485
- 89 Kollner T G, Held M, Lenk C, et al. A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 2008, 20: 482–494
- 90 Schnee C, Kollner T G, Held M, et al. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 1129–1134
- 91 Toong Y C, Schooley D A, Baker F C. Isolation of insect juvenile hormone III from a plant. *Nature*, 1988, 333: 170–171
- 92 Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, et al. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J*, 2007, 49: 16–26
- 93 Gatehouse J A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, 2002, 156: 145–169
- 94 Ozawa R, Arimura G, Takabayashi J, et al. Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 391–398
- 95 Leitner M, Boland W, Mithofer A. Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol*, 2005, 167: 597–606
- 96 Arimura G, Garms S, Maffei M, et al. Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta*, 2008, 227: 453–464
- 97 Gouinguene S P, Turlings T C. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1296–1307
- 98 Rios-Esteva R, Turner G W, Lee J M, et al. A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpeneoid essential oil composition in peppermint. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2818–2823
- 99 Xu Y H, Wang J W, Wang S, et al. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. *Plant Physiol*, 2004, 135: 507–515
- 100 Ma D, Pu G, Lei C, et al. Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorph-4, 11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 2146–2161
- 101 Yu Z X, Li J X, Yang C Q, et al. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Mol Plant*, 2012, 5: 353–365
- 102 Lu X, Jiang W, Zhang L, et al. AaERF1 positively regulates the resistance to *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua*. *PLoS One*, 2013, 8: e57657
- 103 Lu X, Zhang L, Zhang F, et al. AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. *New Phytol*, 2013, 198: 1191–1202
- 104 Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, et al. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell*, 2012, 24: 2635–2648
- 105 Devarenne T P, Shin D H, Back K, et al. Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 349: 205–215
- 106 Denbow C J, Lang S, Cramer C L. The N-terminal domain of tomato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases. Sequence, microsomal targeting, and glycosylation. *J Biol Chem*, 1996, 271: 9710–9715
- 107 Tholl D, Kish C M, Orlova I, et al. Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. *Plant Cell*, 2004, 16: 977–992

- 108 Guevara-Garcia A, San Roman C, Arroyo A, et al. Characterization of the *Arabidopsis clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell*, 2005, 17: 628–643
- 109 Frey M, Chomet P, Glawischnig E, et al. Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science*, 1997, 277: 696–699
- 110 Qi X, Bakht S, Leggett M, et al. A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 8233–8238
- 111 Takos A M, Knudsen C, Lai D, et al. Genomic clustering of cyanogenic glucoside biosynthetic genes aids their identification in *Lotus japonicus* and suggests the repeated evolution of this chemical defence pathway. *Plant J*, 2011, 68: 273–286
- 112 Winzer T, Gazda V, He Z, et al. A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*, 2012, 336: 1704–1708
- 113 Field B, Osbourn A E. Metabolic diversification-independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science*, 2008, 320: 543–547
- 114 Wang Q, Hillwig M L, Okada K, et al. Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *J Biol Chem*, 2012, 287: 6159–6168
- 115 Wu Y, Hillwig M L, Wang Q, et al. Parsing a multifunctional biosynthetic gene cluster from rice: biochemical characterization of CYP71Z6 & 7. *FEBS Lett*, 2011, 585: 3446–3451
- 116 Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, et al. The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol*, 2011, 157: 770–789
- 117 Matsuba Y, Nguyen T T, Wiegert K, et al. Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum*. *Plant Cell*, 2013
- 118 Osbourn A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends Genet*, 2010, 26: 449–457
- 119 Cheng A X, Xiang C Y, Li J X, et al. The rice (E)-beta-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 2007, 68: 1632–1641
- 120 Chen D, Ye H, Li G. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*, 2000, 155: 179–185
- 121 Yang R Y, Feng L L, Yang X Q, et al. Quantitative transcript profiling reveals down-regulation of a sterol pathway relevant gene and overexpression of artemisinin biogenetic genes in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Med*, 2008, 74: 1510–1516
- 122 Chen J L, Fang H M, Ji Y P, et al. Artemisinin biosynthesis enhancement in transgenic *Artemisia annua* plants by downregulation of the beta-caryophyllene synthase gene. *Planta Med*, 2011, 77: 1759–1765
- 123 Hong G J, Hu W L, Li J X, et al. Increased accumulation of artemisinin and anthocyanins in *Artemisia annua* expressing the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27: 334–341
- 124 Zhang L, Jing F, Li F, et al. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52: 199–207
- 125 Kappers I F, Aharoni A, van Herpen T W, et al. Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 2005, 309: 2070–2072
- 126 Wu S, Schalk M, Clark A, et al. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1441–1447
- 127 Mao Y B, Lu S, Wang L J, et al. Biosynthesis of gossypol in cotton. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2006, 1: 1–12
- 128 Sunilkumar G, Campbell L M, Puckhaber L, et al. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18054–18059
- 129 Palle S R, Campbell L M, Pandeya D, et al. RNAi-mediated Ultra-low gossypol cottonseed trait: performance of transgenic lines under field conditions. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 296–304
- 130 Ye X, Al-Babili S, Kloti A, et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287: 303–305
- 131 Paine J A, Shipton C A, Chaggar S, et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 482–487
- 132 Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, et al. Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell*, 2005, 17: 1829–1838
- 133 Lu S, Van Eck J, Zhou X, et al. The cauliflower Or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *Plant Cell*, 2006, 18: 3594–3605
- 134 Martin V J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 796–802
- 135 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006,

440: 940–943

- 136 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- 137 Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330: 70–74
- 138 Leonard E, Ajikumar P K, Thayer K, et al. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13654–13659

Biosynthesis and Regulation of Secondary Terpenoid Metabolism in Plants

WANG LingJian, FANG Xin, YANG ChangQing, LI JianXu & CHEN XiaoYa

National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

As the most diverse natural organic compounds, plant secondary metabolites play critical roles in regulating plant growth and development, facilitating environmental adaptation and defending against insects and pathogens. Terpenoids constitute one of the largest families of secondary metabolites, and have important physiological and ecological functions. Some of them even show great pharmaceutical values. In recent decades, great achievements have been made in isolation and characterization of terpenoids, elucidation of their biosynthetic pathways and regulation mechanisms, as well as genetic engineering. This review discusses recent progress in terpenoid metabolism and regulation.

secondary metabolism, terpenoid, biosynthesis, regulation, genetic engineering

doi: 10.1360/052013-307