

黄酮类化合物生物合成途径的进化及其在淫羊藿中的研究展望

张华峰^{1,2}, 王 瑛^{1*}, 黄宏文¹

(1. 中国科学院武汉植物研究所/武汉植物园 植物保育遗传学重点实验室, 湖北 武汉 430074;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要:黄酮类化合物是植物最重要的次级代谢产物之一。大多数植物黄酮类化合物的生物合成具有相同的步骤, 其合成途径是植物进化过程中的保守代谢途径。迄今已经克隆、鉴定了多种植物黄酮类化合物生物合成相关酶的结构基因, 并进行了一些黄酮类化合物合成代谢的分子调控研究。结合本实验室研究实践, 综述了植物黄酮类化合物生物合成途径的进化研究进展, 并在此基础上初步比较研究了淫羊藿与其他植物的黄酮类化合物合成途径, 提出了研究淫羊藿黄酮类化合物生物合成的比较基因组学和比较代谢组学方法, 指出应当从最保守的代谢中间产物和结构酶入手, 结合淫羊藿种间和种内黄酮类化合物水平的比较, 研究淫羊藿黄酮类化合物的代谢途径及其调控机制。

关键词:黄酮类化合物; 生物合成; 进化; 淫羊藿

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1745-07

Evolution of flavonoid biosynthetic pathway and prospect of its research in plants of *Epimedium* L.

ZHANG Hua-feng^{1,2}, WANG Ying¹, HUANG Hong-wen¹

(1. Key Laboratory of Plant Conservation Genetics, Wuhan Institute of Botany, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Key words: flavonoids; biosynthesis; evolution; *Herba Epimedii*

黄酮类化合物(flavonoids, 本文简称黄酮类)是一类重要的植物次级代谢产物, 在植物花色形成、花粉萌发、吸引授粉虫媒和种子传播、抵抗紫外线辐射、防止病原微生物侵染以及植物与微生物互相识别等过程中均发挥重要作用^[1]。此外, 黄酮类还具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性^[2], 是一些重要中药的主要有效成分。已证实淫羊藿药用成分黄酮类化合物(简称“有效黄酮类”)具有调节雄性发育、阻止骨质疏松、调节免疫功能、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗肝毒素、舒张血管等生理功能, 因此淫羊藿被认为是我国应用最广泛、最悠久、最具开发潜力的中药之一^[3]。当前, 有关药用植物(如淫羊藿)黄酮类的研究主要集中在植物化学与生理效应等领域, 而关于合成代谢途径的进化生物学的报道则较少见。黄酮类合成代谢是植物中广泛存在的生物化学途径, 是植物进化过程中的保守代谢途径, 很早就被作为进化研究的实验模型^[4], 在代谢途径及其调控的进化研究中具有重大的理论意义^[5]。本文拟对黄酮类生物合成途径的进化生物学研究进展进行评述, 并结合本实验室的初步研究结果, 对淫羊藿的相关研究做简要的理论分析与展望。

1 黄酮类生物合成途径的保守性与特异性

1.1 生物合成部位与分布: 在自然界中, 黄酮类广泛分布于

植物的花、种子、坚果、根和树皮等部位^[2]。黄酮类的生物合成具有组织特异性, 受到植物发育阶段的调控, 能被多种环境因子诱导^[6]。淫羊藿黄酮类的主要合成部位为叶片。Liu等^[7]指出, 箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. 的朝藿定 C(epimedin C)集中存在于叶片中。郭宝林等^[8]发现, 《中国药典》内 5 种淫羊藿不同部位的 9 种黄酮类总量次序为: 根茎与根 > 叶 > 茎, 并且茎、叶中黄酮类的主要成分、相对量相似, 而根却极不相同, 这可能是叶片合成的黄酮类在转运至根时受到了不同的修饰。

1.2 生物合成过程: 迄今已经报道了八千多种天然黄酮类^[9]。所有黄酮类都具有“黄烷核”基本骨架(C₆-C₃-C₆结构)。黄烷核由 2 个芳香环(A 环和 B 环)通过 1 个中央三碳链连接而成, 中央三碳链往往也形成杂环(C 环)。大量实验证实, 植物黄酮类生物合成的前期途径是相同的, 都是以丙二酸单酰 CoA(malonyl CoA)与香豆酰 CoA(coumaroyl-CoA)为直接前体^[1], 如图 1。这两种前体分别与糖代谢、脂质代谢以及氨基酸代谢有关。除了这 3 种初级代谢外, 黄酮类的生物合成还与某些次级代谢有关。如番茄红素(lycopene)的生物合成以乙酰 CoA 为前体, 而乙酰 CoA 恰好也是类黄酮生物合成的直接前体丙二酸单酰 CoA 的来源。

收稿日期: 2006-03-31

基金项目: 中国科学院院长基金项目; 中国科学院武汉植物研究所“百人计划”项目(05045112); 武汉市晨光计划项目(20055003059-45)

作者简介: 张华峰(1975—), 男, 博士研究生, 讲师, 中国生物化学与分子生物学会会员, 主要从事生物化学与分子生物学研究工作。

E-mail: isaacsau@sohu.com

* 通讯作者 王 瑛 Tel: (027)87510675 E-mail: yingwang@wbpcas.cn

表 1 部分黄酮类生物合成相关基因或 cDNA 序列*

Table 1 Some genomic or cDNA sequences encoding enzymes involved in flavonoid biosynthesis*

基 因	植 物	登录号	参考文献
CHS 基因	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	AY647263、AY496931	16
	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	X14591、X14593、X14597	17
	玉米 <i>Zea mays</i>	X60205	
	圆叶牵牛 <i>Ipomoea purpurea</i>	U15946、U15947、U15949、AB004905、AB027534	17
	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>		17
	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AB015872、AB066275、AB066274	17
	簇生堇菜 <i>Viola cornuta</i>	AY294024、AY497407、AY497409、AT497410、AY497412、AY497413、AY497414、AY497415、AY497418、AY497419	17
	拟南芥属 <i>Arabidopsis</i>		17
	葛藤 <i>Pueraria montana</i>	AF462632、AF462632	18
	刺甘草 <i>Glycyrrhiza echinata</i>	D83718	18
CHI 基因	矮牵牛		19
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>		20
F3H 基因	水母雪莲 <i>Saussurea medusa</i>		21
	欧芹 <i>Petroselinum crispum</i>		22
	三花龙胆 <i>Gentiana triflora</i>	AB193311、AB193312	23
F3'H 基因	紫蝴蝶草 <i>Torenia hybrida</i>		24
	三花龙胆	AB193313	23
F3'5'H 基因	矮牵牛		
	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>		
	茄子 <i>Solanum melongena</i>		
	蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis amabilis</i>		25
	花叶蔓长春 <i>Vinca major</i>	AB078781	26
FNS 基因	三花龙胆	AB193314	23
DFR 基因	月季 <i>Rosa hybrida</i>	D85102	27
	葡萄	X75964	27
	酸果蔓 <i>Vaccinium macrocarpon</i>	AF483835、AF483836	27
	美洲山杨 <i>Populus tremuloides</i>		28
ANS 基因	拟南芥	U70478	29
	金鱼草		1
	矮牵牛		1
	葡萄	X75966	29
	玉米	X55314	29
	圆叶牵牛	AF028602	29
ANR 基因	多花菜豆 <i>Phaseolus coccineus</i>	BN000164	30
	亚洲棉 <i>Gossypium arboreum</i>	BN000165	30
	葡萄	BN000166	30
LAR 基因	金钱草 <i>Desmodium styracifolium</i>		1

* 近 5 年文献

* documents in recent five years

2.1.1 查耳酮合成酶: 查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 是植物黄酮类合成的第一个酶, 同时也是关键酶之一, 催化丙二酸单酰 CoA 与香豆酰 CoA 缩合成查耳酮的反应。多数植物的 CHS 具有很强的底物专一性。如茶树 CHS 对香豆酰 CoA 的催化活性要比咖啡酰 CoA (caffeoyl-CoA) 高得多^[31]。

各分类群的 CHS 基因结构很保守, 除金鱼草的 CHS 基因包括 2 个内含子外, 其余植物均包括 1 个内含子和 2 个外显子。一般地, 1 号外显子编码 37~64 个氨基酸残基, 2 号外显子编码约 340 个氨基酸残基并且包含几乎所有的活性部位。银杏 1 号外显子的长度与大豆、矮牵牛相同, 2 号外显子的长度与欧洲赤松 *Pinus sylvestris* Linn. 相同, 仅比拟南芥长 3 bp^[16]。CHS 基因内含子的位置一般比较保守, 但是不同植物种内含子的长度却大不相同。研究 CHS 基因内含子, 有

助于理解 CHS 基因在进化中的遗传冗余问题。在圆叶牵牛中, 至少存在 6 个 CHS 基因, 但是仅 CHS-D 与 CHS-E 基因可以编码 CHS, CHS-A 与 CHS-B 基因则编码合成 bisnoryangonin 的酶。不同 CHS-D 等位基因的 5'-上游区往往出现大量的转座子插入, 这可能是造成圆叶牵牛突变体花色表现型差异的主要原因^[4]。分子钟研究显示, 茄目中番薯属 (*Ipomoea* L.) 与碧冬茄属 (*Petunia* Juss.) 是由 7 000 万年前的共同祖先分化而来的, 番薯属仅有 3 个 CHS 基因与碧冬茄属同源, 这 3 个同源基因是在过去的 2 000 万年里通过基因重复形成的, CHS-A、CHS-B 和 CHS-C 基因的进化速度比 CHS-D 和 CHS-E 基因快 2.7 倍左右^[32]。Farzad 等^[17]根据簇生堇菜 CHS 催化区片段的核酸序列与葡萄、玉米、矮牵牛等植物的垂直同源基因序列构建了系统进化树, 发现核甘

酸分歧度在 0.3%~10.6%,并且主要为同义变化。

一般认为,CHS 是由参与脂肪酸生物合成的初级代谢酶进化而来的,而 CHS 也可能进化形成其他酶,例如二苯乙烯合成酶(stilbene synthase)^[16]。植物中 CHS 多基因家族的进化和演变可能与植物对多种逆境胁迫的适应能力有密切关系。

2.1.2 查耳酮异构酶、查耳酮还原酶:查耳酮异构酶(chalcone isomerase,CHI)与查耳酮还原酶(chalcone reductase,CHR)均以查耳酮为底物。由于查耳酮可以自发异构化成二氢黄酮,因此 Holton 等认为,CHI 不是黄酮类合成途径中的关键酶。但是,大豆 CHI 能使查耳酮异构化成二氢黄酮的反应速度提高 3.6×10^7 倍^[33];将编码矮牵牛 CHI 的 *chi* 基因转入番茄,能使果皮中总黄酮醇的量增加 78 倍^[19];在水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim. 中过量表达新疆雪莲 *S. involucrata* Kar. et Kir. 的 CHI 基因,可使芹菜素(apigenin)、总黄酮水平分别比野生型提高 12 和 4 倍^[34];抑制烟草 *chi* 基因,可以阻碍查耳酮转变成黄酮类的环化反应^[20];CHI 失活的洋葱 *Allium cepa* L. 突变体中槲皮素(quercetin)水平明显下降^[35]。这些都提示,CHI 在黄酮类合成代谢中是关键的,而不是可有可无的。CHR 则能将查耳酮转变成异甘草素(isoliquiritigenin)。异甘草素可被 HIC 转化成甘草素(liquiritigenin),继而可在异黄酮合成酶(isoflavone synthase,IFS)等的催化下转变成大豆苷元(daidzein)或其他异黄酮^[10]。在烟草中过量表达葛藤 CHR 基因,可使花中花青素量锐减,花由粉红色变为粉白色^[18]。

玉米 CHI 基因与水稻 *Oryza sativa* L. 相似,均由 4 个外显子和 3 个内含子组成,大麦 *Hordeum vulgare* Linn. 则没有 3 号内含子。这 3 种植物 5'-非编码区分别长约 70、81、72 bp;3'-非编码区分别长约 270、122、170 bp。他们的氨基酸同源性在 75%~80%,并且后两者处于同一进化枝^[36,37]。晶体结构解析表明,紫花苜蓿 *Medicago sativa* Linn. CHI 蛋白质具有独特的“三明治”折叠花式:一个大 β -折叠片(β 3a- β 3f)和一个 α -螺旋线(α 1- α 7)构成核心,在大 β -折叠片相反的一侧是 3 个短 β -折叠片(β 1a、 β 1b、 β 2),这种折叠花式为植物所独有。不同植物种 CHI 蛋白质的 β 3a、 β 3b、 α 4 和 α 6 结构中的氨基酸残基具有较高的保守性^[38]。

Sallaud 等^[39]从紫花苜蓿中得到了 3 个 cDNA 序列,全长依次为 1 202、1 115、1 134 bp,推测其可能编码含有 312 个氨基酸残基的 CHR 蛋白质。该 CHR 蛋白质的相对分子质量约为 3.5×10^4 ,氨基酸序列与大豆 CHR 的同源性超过 90%。Balance 等^[40]通过紫花苜蓿 CHR 的 cDNA 序列分析认为 CHR 属于 aldo-keto 还原酶家族。进一步研究发现,CHR 同已知的脂肪酸合成酶与 β -聚酮化合物合成酶(β -polyketide synthase)的酮还原酶 ketoreductase 结构域没有相关性,而同初级代谢的 aldo-keto 还原酶家族有较高的序列相似度。aldo-keto 还原酶家族包括 CHR、醛糖还原酶(aldose reductase)、3 α -羟甾类脱氢酶(3 α -hydroxy steroid dehydrogenase)以及生物碱生物合成相关的可待因酮还原酶(codeinone reductase)等,其中,CHR 与罂粟 *Papaver*

somniferum Linn. 可待因酮还原酶有 54% 的序列一致性,在进化树上位于同一进化枝^[41]。

2.1.3 异黄酮合成酶、异黄酮-O-转甲基酶、异黄酮葡萄糖基酶:异黄酮合成酶(isoflavone synthase, IFS)、异黄酮-O-转甲基酶(isoflavone-O-methyltransferase, IOMT)与异黄酮葡萄糖基酶(isoflavone glucosyltransferase, IGT)在异黄酮生物合成中具有重要作用。IFS 可将甘草素、柚皮素(naringenin)分别转化成大豆苷元、染料木黄酮(genistein)^[42],是异黄酮合成的关键酶。Akashi 等^[43]从刺甘草中克隆得到了 IFS 的一个全长 cDNA,被细胞色素 P450 酶命名委员会命名为 CYP93C2。CYP93C2 长 1 895 bp,编码 523 个氨基酸残基,与细胞色素 P450 酶家族中的大豆 CYP93C1、CYP93A1 以及刺甘草 CYP93B1、CYP81E1 分别具有 82.8%、42.4%、54.4%、29.7% 的蛋白质序列同一性。

2.1.4 二氢黄酮-3-羟化酶、黄酮类-3'-羟化酶、黄酮类-3',5'-羟化酶、黄酮合成酶:二氢黄酮-3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, F3H 或 FHT)、黄酮类-3'-羟化酶(flavonoid-3'-hydroxylase, F3'H)、黄酮类-3',5'-羟化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, F3'5'H)共同负责黄酮类的羟基化反应。晶体研究表明,矮牵牛 F3H 羟基端肽段在维持酶活性方面具有重要意义,能保护酶不被氧化或被蛋白酶水解^[44]。在柚皮素、五羟基二氢黄酮(pentahydroxyflavanone)和圣草酚(eriodictyol)3 种二氢黄酮中,茶树 F3H 对柚皮素的催化性最高。这提示,黄酮类的 3'-和 3',5'-羟基化作用优先发生在二氢山柰酚(dihydrokaempferol)底物上。在大多数植物中,黄酮类 B 环的 3',4'-二羟基化作用是通过 F3'H 对二氢黄酮或二氢黄酮醇的修饰实现的^[31]。

F3'H 和 F3'5'H 属于细胞色素 P450 酶家族。F3H 与黄酮合成酶(flavone synthase, FNS)则属于酮戊二酸依赖型加双氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase)家族,具有相同的底物(二氢黄酮)。欧芹的 FNS I 与 F3H 具有 90% 的多肽序列相似性;加双氧酶核酸序列与大阿米芹 *Ammi majus* L.、茴香 *Anethum graveolens* L.、旱芹 *Apium graveolens* L.、茴芹 *Pimpinella anisum* L.、毒芹 *Conium maculatum* L.、野胡萝卜 *Daucus carota* L. 等伞形科植物也具有较高相似性^[22]。这暗示, FNS I 可能是在进化过程中由 F3H 通过基因重复和功能分化而产生的。

将编码花叶蔓长春 F3'5'H 的 *VmFH1* 基因转入矮牵牛,可使花瓣积累 3'5'-羟基化花青素(野生型未检出),花呈深红色甚至出现深紫色斑^[26]。将外源 F3'5'H 基因转入康乃馨 *Dianthus caryophyllus* L.,可使飞燕草素型花青素苷(delphinidin-type anthocyanins)大量积累,液泡 pH 增高,花瓣变为蓝紫色^[45]。在大豆中,中间前体柚皮素既可经 IFS 催化生成异黄酮,亦可经 F3H 催化进入花青素合成支路(图 1)。通过表达玉米转录因子 Lc 和 Cl 抑制大豆 F3H 基因的表达,可以阻塞花青素合成支路,使异黄酮量明显提高^[46]。

2.1.5 二氢黄酮醇-4-还原酶、花青素合成酶、黄酮类-3-O-葡萄糖基酶、5-葡萄糖基酶、花青素还原酶、无色花青素

还原酶、异黄酮还原酶、转鼠李糖基酶、转酰基酶、转甲基酶、谷胱甘肽-S-转移酶；二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)、黄酮类-3-O-转葡萄糖基酶(flavonoid-3-glucosyltransferase, 3GT 或 FGT)、5-转葡萄糖基酶(5-glucosyltransferase, 5GT)、花青素还原酶(anthocyanidin reductase, ANR)、无色花青素还原酶(leucoanthocyanidin reductase, LAR)、转鼠李糖基酶(rhamnosyltransferase, RT)、转酰基酶(acyltransferase, AT)与转甲基酶(methyltransferase, MT)同花青素(anthocyanidin)及其衍生物的合成有关；谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)与液泡膜上的特异载体共同将花青素或衍生物转入液泡^[5]。其中, ANR 与 LAR 可能是原花青素(proanthocyanidin)合成的关键酶^[31]。

LAR、异黄酮还原酶(isoflavone reductase, IFR)、ANR 与 DFR 同属还原酶-差向异构酶-脱氢酶蛋白质超家族(reductase-epimerase-dehydrogenase protein superfamily)。Bogs 等^[47]构了葡萄、玉米、金钟连翘 *Forsythia × intermedia* Zabel 等植物 LAR、IFR、ANR 与 DFR 的系统发育树,发现,尽管 LAR 与 IFR 亲缘关系较近,但是他们却分属于不同的进化枝; ANR 与 DFR 也分属于不同的进化枝。石竹目植物彩虹菊 *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N. E. Br. 的甜菜素-5-O-转葡萄糖基酶(betanidin-5-O-glucosyltransferases)和甜菜素-6-O-转葡萄糖基酶既能催化甜菜素的糖基化反应,又能催化黄酮类的相应反应,并且,甜菜素-6-O-转葡萄糖基酶的氨基酸序列与其他植物黄酮类转葡萄糖基酶具有很高的相似性,而与甜菜素-5-O-转葡萄糖基酶仅有19%的同源性^[48]。据此推断,甜菜素-5-O-转葡萄糖基酶和甜菜素-6-O-转葡萄糖基酶很可能是由共同的黄酮类转葡萄糖基酶祖先进化而来的;黄酮类与甜菜拉因(betalain)生物合成途径在进化上很可能存在着联系。

将酸果蔓 DFR 基因转入烟草,可使花瓣由粉白色变为深粉红色^[27]。将金鱼草 DFR 基因和紫罗兰 *Matthiola incana* (L.) R. Br. ANS 基因同时转入金钟连翘,所得转化植物可以从头合成矢车菊素型花青素苷(cyanidin-derived anthocyanins),花瓣由黄色变为青铜色^[49]。

2.2 调节基因:玉米 *Lc* (leaf colour)基因与 *Cl* (colourless)基因是当前研究最深入的类黄酮生物合成调节基因之一。在拟南芥中, *PAP1* 基因可以调节 3GT、5GT、AT 和 GST 编码基因的表达^[50],转录因子 MYB12 可以调节 CHS 与黄酮醇合成酶(flavonol synthase, FLS)编码基因的表达^[51],而一些具有 MADS box、锌指结构或者 WRKY 结构域的调节蛋白则可能与 MYB、HLH、WD40 蛋白一道共同调节原花青素的生物合成^[5]。在小麦中, *R* 基因与 *Rc* 基因可以调节麦粒和胚芽鞘的着色,很可能是黄酮类合成前期途径的调节基因^[52]。在番茄中同时过量表达玉米转录因子 *Lc* 和 *Cl*,可使成熟果实果肉中总黄酮糖苷、山奈酚糖苷含量均显著提高^[53]。

3 淫羊藿研究展望

近些年来,植物药日益得到世界各国的重视。我国是世

界中医药大国,拥有丰富的药用植物资源,深入研究中草药黄酮类的生物合成与调控过程,对于实现中药现代化、发掘中医药深刻内涵具有重要意义。笔者认为,在淫羊藿黄酮类合成代谢研究中,应当注重以下问题。

3.1 阐明淫羊藿有效黄酮类的生物合成途径:目前,淫羊藿有效黄酮类(如淫羊藿苷)的生物合成与调控过程尚不明了。由于黄酮类生物合成是植物进化过程中的保守代谢途径,因此,可以运用比较代谢组学、比较基因组学、转录组学、蛋白质组学等方法,从黄酮类合成代谢途径中最保守的结构酶(如 CHS)和代谢中间产物(如查耳酮、二氢黄酮等)入手,通过淫羊藿种间和种内黄酮类水平的比较研究,阐明淫羊藿有效黄酮类的合成途径,揭示淫羊藿道地品质形成的分子机制,为淫羊藿的医药学应用提供理论依据。

另一方面,通过淫羊藿的基因组学和有效活性成分的数量遗传学研究,在基因组里定位控制黄酮类代谢的数量基因位点(quantitative traits loci, QTL),进而克隆相关的主效基因位点,并研究其遗传、表达和调控机制。利用该研究途径可以发掘具有淫羊藿物种特异性的类黄酮合成相关的新基因,深化淫羊藿次生代谢的分子生物学研究。

3.2 探讨淫羊藿的系统发育:淫羊藿是古老的原始双子叶植物,在进化树中属于双子叶植物和单子叶植物分离后的第一个分支,是古老的二倍体($2n=2x=12$)。淫羊藿属的系统发育问题十分复杂,箭叶淫羊藿的系统发育问题尤为复杂^[54]。在小檗科内,淫羊藿与多种近缘种和近缘属均可以合成黄酮类次生代谢产物,有的还具有药用价值。研究淫羊藿的系统发育与进化关系有望使之成为小檗科甚至进化树上同一分支中其他科的模式植物。目前,有关淫羊藿的系统进化研究主要以核糖体 RNA 或 DNA 为证据。如 Sun 等^[13]通过 5S rRNA 基因间隔序列分析认为,朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 与箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿 *E. wushanense* T. S. Ying、淫羊藿 *E. brevicornum* Maxim. 以及柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 之间存在较大的分歧度。随后, Sun 等^[15]又采用核糖体 DNA ITS 序列与 5S rRNA 基因间隔序列分析相结合的方法,探讨了来自中国、日本和地中海地区的 22 个淫羊藿样品之间的系统发育关系。然而,不同基因的进化历史各异,单纯研究一两种基因(如 rDNA)的进化可能难以全面反映淫羊藿的系统发育。因此,采用尽可能多的基因来确定淫羊藿的发育系统,尤其是分析黄酮类生物合成途径的进化,具有一定的可行性和有效性。此外,采用 HPLC、MS、NMR 等技术分析黄酮类种类与量,对淫羊藿进行化学分类,也有助于推进淫羊藿系统发育研究。

3.3 开展黄酮类生物合成代谢工程研究:通过生物化学方法和分子生物学手段均能调控黄酮类的合成代谢^[1,55]。近年来,通过遗传修饰调控植物黄酮类的生物合成已经成为代谢工程的研究热点之一。研究淫羊藿黄酮类合成代谢工程,不仅有助于合成代谢途径的阐明以及相关基因的功能鉴定,为淫羊藿黄酮类合成途径的分子进化提供参考,而且有望获得有效黄酮类产量丰富、种类合理的优质淫羊藿品种,并为大

规模细胞培养工程提供材料。由图1中淫羊藿黄酮类生物合成的推测途径可见,花青素及其衍生物可能与淫羊藿有效黄酮类竞争二氢黄酮或二氢黄酮醇等合成代谢的中间体,如果抑制F3'H基因的表达,可能使淫羊藿有效黄酮类的量有所提高。此外,通过基因工程调节苯丙氨酸、乙酰CoA的流向或流量,或者利用转录因子或调节基因调节关键酶编码基因的表达,或者过量表达关键酶编码基因,皆可能有助于淫羊藿有效黄酮类的大量合成。

References:

- [1] Schijlen E G W M, Ric de Vos CH, van Tunen A J, et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2631-2648.
- [2] Chen Z W, Hu Y Z, Wu H H, et al. Synthesis and biological evaluation of flavonoids vasorelaxant agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004(14): 3949-3952.
- [3] Li Z Z, Xu Y Q, Wang Y, et al. Status and prospect of research on medicinal plants of *Epimedium* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 289-295.
- [4] Clegg M T, Durbin M L. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution [J]. *PANS*, 2000, 97(13): 7016-7023.
- [5] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(5): 236-242.
- [6] Vvedenskaya I O, Vorsa N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 1043-1054.
- [7] Liu T Z, Chen C Y, Yiin S J, et al. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by Epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21 Cip1 and p27Kip1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 7: 12.
- [8] Guo B, Xiao P. Determination of flavonoids in different parts of five *Epimedium* plants [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(9): 523-525.
- [9] Moon Y J, Wang X, Morris M E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. *Toxicol in Vitro*, 2006, 20: 187-210.
- [10] Bruneton J, Hatton C K. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants* [M]. Paris: Lavoisier Publishing Inc., 1999.
- [11] Gudrun S, Wehinger E, Richard L, et al. Flavonoid methylation: a novel 4'-O-methyltransferase from *Catharanthus roseus*, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1085-1094.
- [12] Yamamoto H, Kimata J, Senda M, et al. Dimethylallyl diphosphate: Kaempferol 8-dimethylallyl transferase in *Epimedium diphyllum* cell suspension cultures [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(1): 23-28.
- [13] Sun Y, Fung K P, Leung P C, et al. Characterization of medicinal *Epimedium* species by 5S rRNA gene spacer sequencing [J]. *Planta Med*, 2004, 70(3): 287-288.
- [14] Nakai R, Shoyama Y, Shiraiishi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(1): 67-70.
- [15] Sun Y, Fung K P, Leung P C, et al. A phylogenetic analysis of *Epimedium* (Berberidaceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences [J]. *Mol Phylogen Evol*, 2005, 35(1): 287-291.
- [16] Pang Y Z, Shen G A, Wu W S, et al. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 1525-1531.
- [17] Farzad M, David F S H, Altura M, et al. Molecular evolution of the chalcone synthase gene family and identification of the expressed copy in flower petal tissue of *Viola cornuta* [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 1127-1134.
- [18] Joung J, Kasthuri G M, Park J, et al. An overexpression of chalcone reductase of *Pueraria montana* var. *lobata* alters biosynthesis of anthocyanin and 5'-deoxyflavonoids in transgenic tobacco [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2003, 303: 326-331.
- [19] Verhoeven M E, Bovy A, Collins G, et al. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(377): 2099-2106.
- [20] Nishihara M, Nakatsuka T, Yamamura S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene [J]. *FEBS Lett*, 2005, 9: 18.
- [21] Jin Z, Grotewold E, Qu W, et al. Cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Saussurea medusa* [J]. *DNA Seq*, 2005, 16(2): 121-129.
- [22] Gebhardt Y, Witte S, Forkmann G, et al. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family Apiaceae [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1273-1284.
- [23] Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, et al. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 1309-1318.
- [24] Ueyama Y, Suzuki K, Masaki F M, et al. Molecular and biochemical characterization of toronia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase I and modification of flower color by modulating the expression of these genes [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 253-263.
- [25] Su V, Hsu B D. Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 1933-1939.
- [26] Mori S, Kobayashi H, Hoshi Y, et al. Heterologous expression of the flavonoid 3', 5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida* [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(6): 415-421.
- [27] Polashock J J, Griesbach R J, Sullivan R F, et al. Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 241-251.
- [28] Peters D J, Constable C P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Plant J*, 2002, 32: 701-712.
- [29] Kim S H, Lee J R, Hong S T, et al. Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed apple skin [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 403-413.
- [30] Tanner G J, Francki K T, Abrahams S, et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31647-31656.
- [31] Punyasiri P A N, Abeyasinghe I S B, Kumar V, et al. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 431: 22-30.
- [32] Durbin M L, Lundy K E, Morrell P L, et al. Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations [J]. *Mol Phylogen Evol*, 2003, 29: 507-518.
- [33] Bednar R A, Hadcock J R. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans [J]. *J Biol Chem*, 1998, 263: 9582-9588.
- [34] Li F X, Jin Z P, Zhao D X, et al. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucreata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 553-560.
- [35] Kim S, Jones R, Yoo K S, et al. Gold color in onions (*Allium cepa*): a natural mutation of the chalcone isomerase gene resulting in a premature stop codon [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272(4): 411-419.

- [36] Grotewold E, Peterson T. Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavonone isomerase [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242(1): 1-8.
- [37] Druka A, Kudrna D, Rostoks N, et al. Chalcone isomerase gene from rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*): physical, genetic and mutation mapping [J]. *Gene*, 2003, 302: 171-178.
- [38] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase [J]. *Nat Struct Biol*, 2007, 7(9): 786-791.
- [39] Sallaud C, Joumana E T, Laurent B, et al. Nucleotide sequences of three chalcone reductase genes from alfalfa [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 869-870.
- [40] Balance G M, Dixon R A. *Medicago sativa* cDNAs encoding chalcone reductase [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1027-1028.
- [41] Bomati E K, Austin M B, Bowman M E, et al. Structural elucidation of chalcone reductase and implications for deoxy-chalcone biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(34): 30496-30503.
- [42] Yu O, Jung W, Shi J, et al. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 781-793.
- [43] Akashi T, Aoki T, Ayabe S. Cloning and functional expression of a Cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 821-828.
- [44] Wellmann F, Matern U, Richard L. Significance of C-terminal sequence elements for *Petunia* flavanone 3 β -hydroxylase activity [J]. *PEBS Lett*, 2004, 561: 149-154.
- [45] Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, et al. A rationale for the shift in colour towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3', 5'-hydroxylase gene [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63: 15-23.
- [46] Yu O, Shi J, Hession A O, et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(7): 753-763.
- [47] Bogs J, Downey M O, Harvey J S, et al. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 652-663.
- [48] Vogt T. Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5- and 6-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis* [J]. *Planta*, 2002, 214(3): 492-495.
- [49] Rosati C, Simoneau P, Treutter D, et al. Engineering of flower color in forsythia by expression of two independently-transformed dihydroflavonol 4-reductase and anthocyanidin synthase genes of flavonoid pathway [J]. *Mol Breed*, 2004, 13(2): 209-210.
- [50] Tohge T, Nishiyama Y, Hirai M Y, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor [J]. *Plant J*, 2005, 42(2): 218-235.
- [51] Mehrrens F, Kranz H, Bednarek P, et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 1083-1096.
- [52] Himi E, Nisar A, Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat [J]. *Genome*, 2005, 48(4): 747-754.
- [53] Le Gall G, DuPont M S, Mellon F A, et al. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(9): 2438-2446.
- [54] He S, Guo B, Wang X. Taxonomic study on *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae) [J]. *Guizhou Sci (贵州科学)*, 2003, 21(1-2): 102-106.
- [55] Martens S, Knott J, Seitz C A, et al. Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues [J]. *Biochem Eng J*, 2003, 14: 227-235.

白及的研究概述及其资源利用对策

李 嵘, 王喆之

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘 要: 白及作为我国民间的传统中药, 其药用历史源远流长。近年来, 由于人为的过度采挖和天然生境的破坏, 其野生自然资源急剧减少, 濒临灭绝, 被国家列为重点保护的野生药用植物之一。对白及的本草考证、生物学特性、化学成分、药理药效等方面的研究进行概述, 并对今后研究工作的开展和自然资源的合理利用、开发与保护提出了建议, 以期对大宗中药材的可持续利用、药物研发、道地药材的选育、药材质量的评估、生产管理及 GAP 规范化种植过程中 SOP 质量标准的制定提供一定的科学理论依据。

关键词: 白及; 资源利用; 资源保护

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)11-1751-05

Research survey and countermeasure on resources utilization in stem tuber of *Bletilla striata*

LI Rong, WANG Zhe-zhi

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Key words: the stem tuber of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.; resources utilization; resources conservation

收稿日期: 2006-04-03

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目资助(2004BA721A35)

作者简介: 李 嵘, 主要从事中药材种质资源方面的研究。 E-mail: lirong@snnu.edu.cn