

银杏学术研讨会论文集

全国第二十次

QUANGUO DIERSHICI

YINXING XUESHU YANTAOHUI LUNWENJI

中国林学会银杏分会 郯城县林业局 编



中国林业出版社

《全国第二十次银杏学术研讨会论文集》

全国第二十次
银杏学术研讨会论文集

中国林学会银杏分会 郯城县林业局 编

5664.3
196.

中国林业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

全国第二十次银杏学术研讨会论文集/中国林学会银杏分会, 郯城县林业局编. - 北京: 中国林业出版社, 2014. 11

ISBN 978-7-5038-7696-7

I. ①全… II. ①中…②郯… III. ①银杏 - 学术会议 - 文集 IV. ①S664.3 - 53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 245792 号

责任编辑: 何增明 张 华

出版 中国林业出版社 (100009 北京市西城区德内大街刘海胡同 7 号)

http: //lycb. forestry. gov. cn 电话: (010) 83286967

发行 中国林业出版社

印刷 北京卡乐富印刷有限公司

版次 2014 年 11 月第 1 版

印次 2014 年 11 月第 1 次

开本 787mm × 1092mm 1/16

印张 23.5 彩插 2

字数 606 千字

印数 1 ~ 1000 册

定价 88.00 元

《全国第二十次银杏学术研讨会论文集》

编 委 会

顾 问：李正理 李 晔 王澄方 侯庆生 郭大孝
陈路旺 汤杨中 刘燕君 史继孔 褚生华
鞠章网

名誉主任委员：郑德明 徐 先 陈 鹏 林 协

主任委员：曹福亮

副主任委员：程水源 彭方仁 苏金乐 李登开 王义强

邓荫伟 李 群 李治民 葛成林

委 员：曹福亮 程水源 苏金乐 李登开 王义强

邓荫伟 李 群 彭方仁 李治民 汪贵斌

邢世岩 俞建国 赵洪亮 徐登奎 隋道庆

王 莉 宫玉臣 潘小平 葛成林 陈德贵

齐之尧

主 编：曹福亮 毛贵川

副 主 编：汪贵斌 郁万文 苏明洲

编 辑 人 员：曹福亮 毛贵川 汪贵斌 苏明洲 郁万文

前 言

2013年11月8日至9日，由中国林学会银杏分会、山东省林业厅、临沂市人民政府主办，山东银杏开发协会、临沂市林业局、郯城县人民政府承办的全国第二十次银杏学术研讨会暨首届中国（郯城）银杏产品交易会在银杏之乡——郯城县隆重举行。来自江苏、山东、湖北等16省（市、区）从事银杏研究、行业管理及生产等单位的300余名专家、管理者、种植户参加了此次盛会。中国林学会副理事长兼秘书长陈幸良，山东省林业厅厅长燕翔，中国林学会银杏分会主任委员曹福亮，临沂市副市长赵爱华，省林业厅副巡视员、中国林学会银杏分会副主任委员李登开，以及刘纪民、刘连栋等县领导出席有关活动。

开幕式由郯城县委副书记、县长刘连栋主持，县委书记、人大常委会主任刘纪民致辞，中国林学会副理事长兼秘书长陈幸良作重要讲话，银杏分会主任委员曹福亮宣读举荐银杏为国树的倡议书。陈幸良、曹福亮、燕翔、赵爱华、孙庆传共同按动开幕式启动球。启动仪式结束后，与会代表纷纷在横幅上签字表示支持举荐银杏为国树。会议期间，300多名来自全国科研院校的专家教授和从事银杏行业管理及生产企业的负责人，实地考察了郯城县银杏基地；银杏博物馆正式对外开放，省林业厅厅长燕翔、副市长赵爱华为银杏博物馆揭牌。首届中国（郯城）银杏产品交易会共吸引国内1万余名客商参展，当日交易额4300多万元；签约项目49个，计划总投资64.55亿元。

本次研讨会主要围绕“银杏之乡，美丽郯城，科技助推，强业富民”这一主题，针对银杏栽培、加工等方面的科研技术开发和产业化发展进行了深入交流与探讨。与会代表，主要围绕“银杏资源开发利用”方面的科学研究、技术开发和产业化进行了交流，为我国银杏产业的发展提出了极具建设性的意见。此次年会共收到48篇论文，涉及银杏基础研究、培育技术、资源加工利用及文化等方面，其中5篇获一等奖、14篇获二等奖、29篇获优秀论文奖。此论文集的出版，对加快银杏研究、产业化进程及产业链的延伸，提升银杏产业层次，实现银杏产业持续健康科学发展具有重要的现实意义。

编委会

2014年10月

目 录

银杏基础研究

银杏萜内酯成分生物合成的基因调控与表达的研究进展	王金艳 陈 鹏 蒋 菲 马江黎 (2)
银杏 <i>MECT</i> 基因启动子克隆及序列分析	程 华 袁红慧 李琳玲 廖咏玲 程水源 (14)
利用 Solexa 测序技术发掘银杏 microRNA	张 倩 邢世岩 李际红 桑亚林 (25)
银杏斑叶不同色斑的超微结构观察及叶绿素含量测定分析	蒋 菲 陈 鹏 马江黎 王金艳 梁国华 李 群 (33)
叶籽银杏种质遗传多样性的 AFLP 分析	吴岐奎 邢世岩 刘晓静 辛 红 (43)
银杏雌雄花芽抑制差减文库 (SSH) 构建及 EST 序列分析	张晓文 邢世岩 张 倩 吴岐奎 (50)

银杏培育技术

银杏塑料大棚快速育苗试验	李明光 高 森 苏明洲 高建玲 闫玉涛 邓世民 范 永 (58)
培育银杏大苗技术要点	倪金成 (65)
银杏根蘖苗扦插繁殖试验	邓荫伟 张 敏 蒋柏生 周新富 (67)
银杏嫁接后管理措施	项庆峰 李 斌 张 慧 (73)
沙地银杏栽植试验初报	宫永红 李连茹 刘 枫 姜立耘 (75)
银杏用材林胸径与冠幅相关性 & 合理经营密度研究	刘莉娟 邢世岩 曹福亮 汪贵斌 付兆军 吴岐奎 刘晓静 辛 红 (78)
银杏施肥指标体系建设试验初探	李明光 刘 丽 杨克圣 孙华铭 张竹青 高建玲 王 慧 (84)
银杏愈伤组织胚诱导条件初探	李琳玲 廖咏玲 程华 袁红慧 程水源 (91)
培育银杏大苗胸径与生长时期关系的试验	冯现林 项庆峰 石红卫 王克服 王振金 (101)

泰兴市银杏虫害普查及分析 印福女 (105)

银杏大蚕蛾发生规律及绿色综合防控技术
..... 冷 鹏 刘延刚 崔爱华 高 森 宿刚爱 王 斌 崔晓梅 (108)

银杏树三种袋蛾防治试验研究
..... 邹大颂 古立来 邵士娟 宗学美 冯艳霞 陈远亮 (112)

郯城银杏偶发性害虫的发生与防控对策
..... 古立来 陈远亮 邹大颂 宗学美 冯艳霞 (115)

丝棉木金星尺蠖在银杏上的危害及防治 印福女 (118)

邳州国家级银杏标准化示范区内有害生物调查及防治策略
..... 孔祥永 花春艳 王克服 张 敏 崔茂彬 张 慧 黄立民 (120)

银杏—茶树间作系统中土壤有机碳矿化 宋丽红 郁万文 黄诗卉 (123)

叶用银杏与万寿菊间作技术初探 李 峰 杜胜春 宗莲香 刘秀龙 (131)

一级古银杏树的养护管理措施
..... 田金余 李 群 袁 觉 匡立业 印 珏 奚明成 (134)

银杏采叶园剪枝销售与采叶销售比较试验
..... 李明光 高建玲 刘 丽 邓世民 王 慧 李 青 (137)

浅谈银杏大树移栽的“天时”与“地利” 李 峰 杜胜春 宗莲香 刘秀龙 (140)

影响银杏叶有效成分含量因素研究的综述 杨一强 李明光 高建玲 (142)

论银杏树在造林树种中的地位 李连茹 宫永红 刘 枫 (152)

银杏大树古树资源保护初探 张振学 孟宪红 苏明洲 殷瑞雪 陈国宪 (155)

银杏种质异地保存与品种初试园同步建立技术初探
..... 邵士娟 苏明洲 殷瑞雪 张振学 (158)

银杏资源加工利用

永春堂牌银杏虫草颗粒干预动物硅肺的研究
..... 李岱龙 邢盈盈 李 娟 王建伟 孙茂刚 朱 敏 贺 梅 (164)

金耳菌种与银杏发酵工艺的研究 陈 斌 蔡向群 马维新 (170)

Effect of Dietary Supplementation with Fermented Ginkgo-leaves on Performance, Egg Quality, Lipid Metabolism and Egg-yolk Fatty Acids Composition in Laying Hens
..... Xuhui Zhang Linguo Zhao Fuliang Cao Wanwen Yu Xiaohu Yang (174)

银杏叶发酵物对肉鸡抗氧化功能与脂类代谢的影响
..... 张旭晖 郁万文 逯 岩 曹福亮 赵林果 (190)

银杏种仁酚酸的纯化鉴定及其抑菌活性研究	
..... 吴海霞 吴彩娥 刘金达 范龚健 李婷婷 应瑞峰 (201)	
银杏叶发酵物对肉鸡小肠结构与功能的影响	
..... 曹福亮 张旭晖 郁万文 逯 岩 杨小虎 (211)	
纳他霉素对银杏果抑菌及保鲜效果的研究	
..... 李 昱 吴彩娥 范龚健 李婷婷 吴海霞 华 菁 (228)	
银杏叶提取物对动物免疫功能的调节	张旭晖 曹福亮 (238)
调节 C/N 及添加菌剂对银杏叶堆肥效果的影响	刘桂宁 郁万文 王柯迪 (249)

银杏产业

邳州银杏产业发展现状及前景分析	赵子健 赵洪波 (258)
永保银杏朝阳产业健康发展	赵化友 (263)
推进银杏产业化的实践与思考	潘小平 周 鹏 (265)
大力发展银杏产业 振兴尤溪“三农”经济	
..... 肖 笙 蔡尊巷 黄庆荣 陈兴旭 陈 养 黄少明 (268)	
对当前银杏生产形势的思考	皇甫桂月 李学勤 魏献强 程迎真 李广进 (273)
做好分类经营示范 助推银杏产业发展	孔祥永 (277)
邳州银杏种苗产业化的实践与探索浅析	孔祥永 许亮先 王振金 张邦伟 (280)
关于进一步提升国家级银杏博览园建设水平的思考和建议	赵子健 (284)
银杏园景观设计之我见	史记国 (289)
湖北安陆古银杏国家森林公园开发建设初探	潘小平 周 鹏 (291)
银杏在园林景观设计中的应用及建设实践	赵子健 (294)
银杏自然生态景观的传承和创新	赵子健 (301)
中国西部古银杏考察报告	董云岚 董玉山 (307)
安徽省银杏古树资源调查研究	
..... 刘晓静 邢世岩 辛红 吴岐奎 孙立民 臧立鹏 王萱 (313)	
福建银杏古树资源	付兆军 邢世岩 刘晓静 刘莉娟 吴岐奎 辛 红 (319)

银杏文化

博大精深 卷帙浩瀚	曲祚民 (332)
三株银杏寄深情	唐孟杰 (335)
银杏伴他夕阳红——记来安籍林业科学家林协	彭怀远 (338)

常熟市双银杏树·双银杏画·双银杏歌考略 曲祚民 (339)

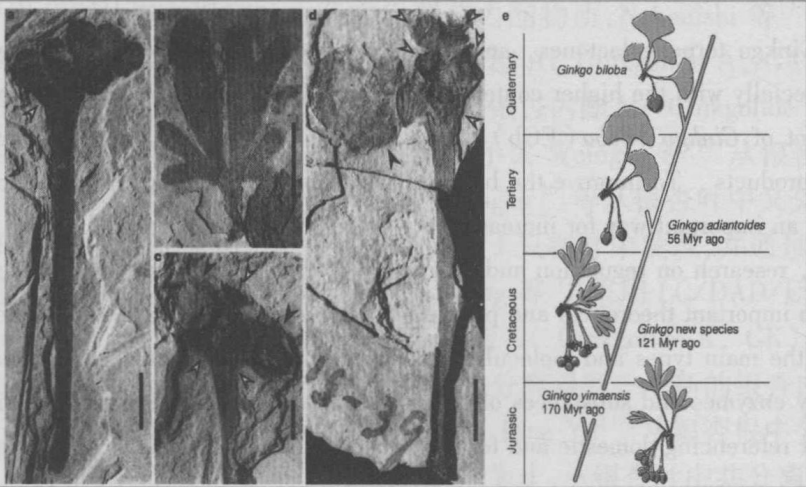
欧亚两洲 情系银杏 (综述) 曲祚民 (346)

把发展银杏融入生态文明建设大潮中 陈贞镇 (355)

广植银杏之歌——献给第二十次银杏学术研讨会 袁桂春 (363)

论银杏应称为中国的国树 彭怀远 (365)

银杏基础研究



银杏萜内酯成分生物合成的基因调控 与表达的研究进展

王金艳 陈 鹏 蒋 菲 马江黎

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225000)

摘要: 银杏萜内酯类化合物是银杏所特有的具重要生物活性的成分, 尤其银杏叶中含量较高, 是银杏叶提取物(EGb)中主要质量指标之一, 已被广泛用于制药和生产保健产品。应用生物技术提高银杏萜内酯类化合物生物合成效率是提高银杏叶中萜内酯类化合物含量的重要途径, 研究银杏萜内酯成分生物合成的相关基因的调控与表达具有重要理论与实践意义。本文结合作者的研究方向, 参考了国内外近年来发表的相关文献, 综述了银杏萜内酯类化合物的主要类型及其分子结构、生物合成代谢途径、部位与关键酶和关键物质, 根据该领域的研究结果和发展趋势, 提出了该领域研究需要解决的主要问题, 展望了利用生物技术提高银杏叶中萜内酯类化合物含量的研究利用前景。

关键词: 银杏; 萜内酯; 生物合成; 相关基因; 展望

Advances at Researches on Regulation and Expression of Genes to Biosynthesis of Ginkgo Terpene Lactones

Wang Jinyan Chen Peng Jiang Fei Ma Jiangli

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225000, China)

Abstract: Ginkgo terpene lactones, an important ingredient with biological activities only in Ginkgo, especially with the higher content in *Ginkgo biloba* leaves, is one of main quality indices for extract of *Ginkgo biloba* (EGb), have been widely used to make pharmaceutical and health care products. To improve the biosynthesis efficiency of ginkgo terpene lactones by biotechnology is an important way for increasing the content of ginkgo terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves, research on regulation and expression of genes for ginkgo terpene lactones biosynthesis has an important theoretical and practical significance. In this article, the advances at researches on the main types and molecular structures, the pharmacological action and the way, position, key enzymes and substances of biosynthesis etc. of ginkgo terpene lactones were summarized after referencing domestic and foreign related literatures published in recent years based on the author's research direction, and the main problems needing to be solved in this research field and the prospect of research and utilization for using the biotechniques to increase the con-

tent of ginkgo terpene lactones in leaves were proposed based on the research results and development trend in this field.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Terpene lactones; Biosynthesis; Relative genes; Prospect

银杏(*Ginkgo biloba* L.)俗称白果、公孙树等,为裸子植物门(Gymnospermae)银杏纲(Ginkgopsida)银杏目(Ginkgoales)银杏科(Ginkgoaceae)银杏属(*Ginkgo*)的唯一生存种,是世界上最古老的孑遗植物之一,被称为植物界的“活化石”。银杏叶的提取物成分十分复杂,其最有效成分是黄酮类、萜内酯化合物和聚戊烯醇^[1]。黄酮类化合物几乎存在于所有的绿色植物中^[2],而银杏萜内酯则是银杏提取物中所特有的,其独特的生理作用和治疗价值在世界范围的医疗行业引起了极大兴趣。然而,银杏内酯在银杏叶中含量很低^[3],且提取分离复杂;另一方面,人工合成途径的技术难度大,目前为止,人工合成银杏萜内酯还不能加以实践应用^[4]。因此,了解银杏萜内酯类化合物的主要类型及其分子结构、生物合成代谢途径、部位与关键酶和关键物质等,再用基因工程技术修饰银杏萜内酯生物合成途径已成为提高银杏萜内酯含量最具潜力的方法之一,对银杏的研究、利用、开发至关重要。

1 银杏萜内酯的主要成分及结构

银杏萜内酯根据结构不同,可分为银杏内酯和白果内酯。银杏内酯具有独特的二十碳骨架结构,称其为二萜,白果内酯有15个碳原子组成,称其为倍半萜。银杏内酯有6个五元环A、B、C、D、E、F形成的刚性骨架,其中包括1个螺环-[4,4]-壬烷(spiro-[4,4]-nonane),1个四氢呋喃环D,3个五元内酯环C、E、F。顺式的F、A、D和C环形成一个半球状笼式空洞,F环和C环为空洞的两平行边,四氢呋喃环D居于笼式的中心,螺环A、D处于空洞的顶部;环上的醚氧原子,F和C环上的酯氧原子,C-10羟基氧原子构成一个多齿系统,与冠醚有些相似。半球形笼式的空洞部分,宽为4Å,深为5Å,足够容纳Na⁺、K⁺、Ca²⁺等离子或有机小分子。半球状分子上的羰基、羟基又可和外部分子形成氢键,结合突出于骨架之外的叔丁基又增加了分子的亲脂性。因此,从分子生物学角度,可和多种受体结合,形成独特的生理作用^[5]。Furukawa^[6]首次从银杏根中分离得到萜内酯化合物,在20个世纪60年代,Nakanishi等^[7-12]和Sakabe^[13]分别从银杏根和叶中分离得到萜内酯物质,Nakanishi等^[14]通过¹H-NMR, CD以及其他物理测试技术和化学反应,阐明了银杏内酯A(Ginkgolide A, GA)、银杏内酯B(Ginkgolide B, GB)、银杏内酯C(Ginkgolide C, GC)和银杏内酯M(Ginkgolide M, GM)的化学结构(见图1),其中银杏内酯M只存在于根中,其后不久Weinges等^[15]从银杏叶中分离并鉴定倍半萜类白果内酯(Bilobalide, BB)(见图4);Weinges^[16]等从银杏叶中又分离出一种新的二萜内酯成分,即银杏内酯J(见图1),并且银杏内酯J只在叶中发现,并通过¹H-NMR和¹³C-NMR等波谱分析技术确定了其化学结构,最近Y. Wang等^[17]采用LC/DAD/ESI-MS联用技术从银杏内酯提取物中发现并鉴定了化学结构银杏内酯K(Ginkgolide K, GK)和银杏内酯L(Ginkgolide L, GL)(见图2)。张现涛等^[18]从银杏叶中分离得到一个新的银杏内酯化合物三羟基23,14-去氢银杏内酯并命名为银杏内酯N(见图3),Ping Yu^[19]从银杏根中分离得到一个新的倍半萜内酯命名为Bilobanol(见图5)。所以到目前为止,从银杏叶中共分离得到10个萜内酯化合物。这些化合物主要的区别在于碳环上羟基的数目和位置的不同。

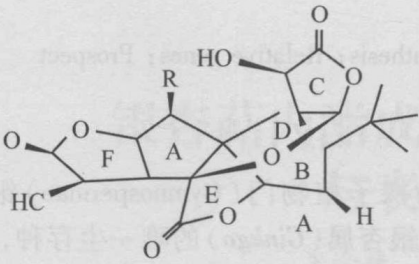


图 1 萜内酯结构

Fig. 1 Structure of Ginkgolide

	R ₁	R ₂	R ₃
Ginkgolide A (GA)	H	H	OH
Ginkgolide B (GB)	OH	H	OH
Ginkgolide C (GC)	OH	OH	OH
Ginkgolide J (GJ)	H	OH	OH
Ginkgolide M (GM)	OH	OH	H

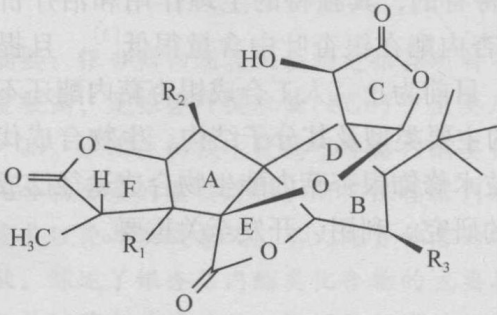


图 2 萜内酯结构

Fig. 2 Structure of Ginkgolide

	R ₁	R ₂	R ₃
Ginkgolide K (GK)			H
Ginkgolide L (GL)			OH

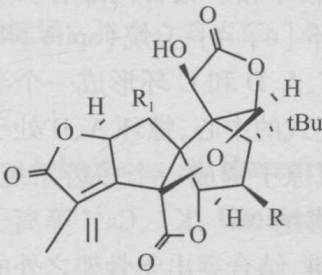


图 3 银杏内酯 N

Fig. 3 Ginkgolide N (GN)

	R ₁	R ₂	R ₃
Ginkgolide N (GN)	OH	OH	OH

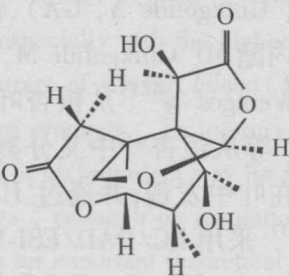


图 4 白果内酯

Fig. 4 Bilobalide

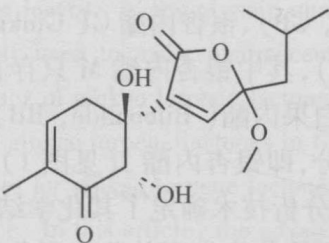


图 5 Bilobanol

Fig. 5 Bilobanol

2 银杏萜内酯化合物生物合成途径及其关键酶

2.1 银杏萜内酯化合物生物合成途径

2.1.1 MVA

长期以来,人们认为萜类物质是由甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)合成的,这条途径最早由 Bloch 和 Lynen(1958)首先在动物和酵母中发现的,因其主要在细胞质过氧化物酶体和内质网中,所以又称为细胞质途径^[20]。在这条途径中两个乙酰辅酶 A (acetyl-coenzyme A, CoA) 在乙酰 CoA: 乙酰 CoA C-酰基转运酶 (acetyl-CoA: acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 催化下缩合成乙酰乙酰 CoA (acetoacetyl-CoA)^[21], 然后乙酰乙酰 CoA 与乙酰 CoA 被 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGS) 催化缩合成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)^[22], 然后 HMG-CoA 还原酶 (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR) 催化 HMG-CoA 形成中间体甲羟戊酸 (mevalonate, MVA), 因该步反应不可逆, 这也是 MVA 途径中的限速步骤^[23]; 甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MK)^[24] 和磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, PMK)^[25] 在 ATP 和二价金属离子的参与下将 MVA 磷酸化, 形成 5-磷酸甲羟戊酸 (Mevalonate-5-phosphate, MVAP) 和 5-焦磷酸甲羟戊酸 (Mevalonate-5-diphosphate, MVAPP); 最后, 5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (mevalonate 5-diphosphate decarboxylase, MDC) 催化 MVAPP 脱梭形成 IPP^[26]; 在异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPP isomerase, IPI) 的作用下, IPP 和其异构体 DMAPP 在 IPI 的作用下可以相互转化^[27]。下游的异戊烯转移酶法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPS), 催化一分子的 DMAPP 和两分子的 IPP 缩合生成法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP)^[28], 为倍半萜合成提供前体, 主要合成倍半萜、三萜和甾醇等。

2.1.2 MEP

Rohmer 等^[29] 在真核细菌中首次发现了不依赖于甲羟戊酸的 IPP 合成途径, 其后 Schwarz 等^[30] 在研究银杏内酯的生物合成时, 在植物体中也发现了这样一条代谢途径, 存在于植物、多数真核细菌和一些寄生虫中^[31], 因其主要反应前体是 5-磷酸脱氧木酮糖/2C-甲基-4-磷酸-4D-赤藓糖醇 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, 所以也被称为 MEP。又因为这条代谢途径在质体中进行, 又被称为质体途径^[29]。MEP 途径其最原初的前体物质是丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (D-glyceraldehyde 3-phosphate, G3P)。丙酮酸和 G3P 在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 作用下生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP)^[32], 这是 MEP 途径中第一个限速反应^[33]。接着, 在 DXP 还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR) 作用下, DXP 经原子重排并还原生成 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)^[34], 该反应是 DXP 途径上最重要的限速反应, 也是萜类物质代谢工程最重要的靶点。经 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-磷酸脱氨转移酶 (MEP cytidyltransferase, MCT) 缩合生成 4-(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇 [4-(cytidine 5-diphospho)-2-C-methylerythritol, CDP-ME]^[35]。(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶 [4-(Cytidine 5-diphospho)-2-C-methylerythritol kinase, CMK]^[36] 催化 CDP-ME 磷酸化生成 4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2-磷酸 (CDP-MEP)。CDP-MEP 在 2-C-甲基赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸合成酶 (2-C-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MCS) 作用下转化为 2-C-甲基赤藓糖醇-2,4-环焦磷酸

(2-C-methylerythritol 2,4-cyclodiphosphate, ME-cPP)^[37]。羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶(hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase, HDS)催化 ME-cPP 生成 1-羟基-2-甲基-2(E)-丁烯基-4-焦磷酸[1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate, HMBPP]^[38], 最后 HMBPP 在异戊烯基焦磷酸/二甲基烯丙基焦磷酸合成酶(IPP/MAPP synthase, IDS)^[39]作用下转化为 IPP 和 DMAPP(5:1)。3 分子的 IPP 和 1 分子的 DMAPP 经香叶基香叶基焦磷酸酶(Geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)催化生成香叶基香叶基焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP), 它是所有二萜类化合物的共同前体, 随后在萜类合成酶左旋海松二烯合成酶(Levopimaradiene synthase, LPS)的作用下生成左旋海松二烯^[40]。另有研究认为, (+)-脱氢松香烷(Dehydroabietane)是银杏内酯类合成的中间体, 在各种萜类化合物的基本骨架形成后, 细胞色素 P450 会经过羟化、加氧等进一步的修饰作用, 最后生成各类萜类物质^[41]。

虽然这两条途径在细胞中的定位不同, 所涉及的基因和酶也不相同, 但是分隔的两条途径并不是绝对独立的, 其中少量代谢物可以在质体膜上相互交换^[42]。IPP 是两条途径的共同中间体, 所以它可以穿过质体膜进行交换^[43]。另外, 质体中 MEP 途径形成的 1-脱氧木酮糖可以进入细胞质中合成部分的甾醇分子; 而少量来自细胞质的 MVA 途径的产物也可以进入质体中, 参与萜类的形成^[44]。

2.2 银杏萜内酯化合物生物合成途径关键酶

到目前为止, 关于银杏萜内酯化合物生物合成途径的一些关键酶基因的克隆及表达调控, 相关人员都做了大量的研究工作, 各个已被收录的基因在 NCBI 核酸序列数据库的登陆号和表达如表 1 所示。

2.2.1 HMGR

HMGR 是 MVA 代谢途径中的重要酶类, 被认为是 MVA 途径中的第一个限速酶, 也是细胞质萜类代谢中的重要调控位点^[45]。目前已从拟南芥、烟草、番茄、红豆杉等分离出该酶基因。1986 年 HMGR 已被分离提纯, 为一种与膜结合的疏水蛋白质, 分子量 180kDa, 共有 4 个亚基, 均为 45kDa, 等电点为 5.9^[46]。植物中 HMGR 一般以基因家族形式存在, Sheng 等^[47]首先从银杏中分离得到编码 HMGR 的全长 cDNA, 命名为 *GbHMGR* (Genbank No. AY741133), 包含 1 个编码 571 个氨基酸的 1713bp 的 ORF。另外, 还获得 *GbHMGR* 基因组 DNA 序列, 揭示 *GbHMGR* 具有 4 个外显子和 3 个内含子。推断的 *GbHMGR* 蛋白与其他植物 HMGRs 具有很高的同源性, 包含 2 个跨膜区域和 1 个催化区域。Southern 杂交和 RT-PCR 分析结果表明 *GbHMGR* 属于小基因家族, 以组织特异性模式低水平表达, 只在根中存在。

2.2.2 DXS

DXS 虽是 MEP 途径中的第一个酶, 但也是植物萜类物质合成的第一个限速步骤。DXS 基因最早从大肠杆菌中分离^[48]。Gong^[49]等从裸子植物银杏中分离和鉴定了 DXS 2795bp 的全长 cDNA, 包含 1 个编码 717 个氨基酸的 2154bp ORF (开放阅读框)。通过比较和生物信息学分析, 表明 *GbDXS* 与其他植物种类来源的 DXSs 具有广泛的同源性, 与这些 DXSs 相似, 含有 1 个保守的质体运输的转运肽, 1 个公认的焦磷酸硫酸胺结合位点组氨酸残基和 1 个转羟乙醛酶基元。系统发育分析表明, *GbDXS* 属于植物 DXS1 群, 认为它比其他植物 DXSs 更古老。*GbDXS* 在根、茎、叶、果皮和种子等组织中均有表达。基因表达图谱分析表明, *GbDXS* 表达受外源的刺激物, 包括茉莉酸甲酯、花生四烯酸、乙酰水杨酸和硫酸高铈铵所诱导, 其转录水平与银杏内酯的积累相关, 暗示 DXS 可能在银杏细胞培养合成银杏内酯中的转录水

平上起重要的调控作用。

2.2.3 DXR

DXR 是催化 MEP 途径第二步限速反应的酶,该步反应是将 DXP 转化为 MEP,酶促反应需要 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的参与,其催化的反应可逆。由于 DXP 也可以用于硫胺和吡哆醇的生物合成,所以该步反应是“碳流”的分支点,认为该反应是 MEP 途径上最重要的限速反应,也是进行调控的有效靶点。植物基因编码的 DXR 酶的 N 端含有将其定位于质体的转运肽^[50],DXR 在 N 端还有一保守区 GSTGSIG。DXR 是 MEP 途径合成银杏内酯的第二个关键酶。Kim^[51] 等通过基于同源序列的 PCR 从银杏的胚根中克隆到 DXR 基因。银杏 DXR 的 cDNA 全长为 1720bp,包含了 1431bp 的 ORF 编码 477 个氨基酸,分子量为 52kDa,等电点是 6.58。*GbDXR* 在根中保持着比叶片较高的转录水平,可能使得银杏内酯成为地下部分萜内酯的主要成分。

2.2.4 FPPS

FPPS 催化 2 分子的 IPP 与 DMAPP 缩合生成 FPP,为萜类化合物合成提供 C15 骨架。植物的 FPPS 存在于细胞溶质、线粒体、过氧化物酶体和叶绿体中^[52]。FPPS 为同源二聚体,酶与底物的结合位点为 2 个富含 Asp 的模体“DDXX(XX)D”和“DDXXD”,这两个模体中的 Asp 和 Arg 残基对 FPPS 的活性起着至关重要的作用^[53]。自 Lynen 等在 1959 年首次发现 FPPS 后,多种编码该酶的基因被相继克隆,目前,利用 FPPS 进行萜类代谢工程研究已有很多成功的例子。在烟草中过量表达酵母 *FPS* 基因,结果转基因烟草中 FPS 的酶活性增加 12 倍,甾醇的含量提高 4 倍^[54]。Wang^[55] 等从银杏中克隆出 *GbFPS* cDNA 全长为 1731bp,其中 1170bp 的开放阅读框编码 390 个氨基酸残基,其与其他植物的 FPS 有同源性,包含有所有转移类异戊二烯链延伸酶的保守区。*GbFPS* 的结构模型显示有着 FPS 的典型结构,最明显的特征是 13 个中心螺旋围绕一个大的中央腔排列,Southern 杂交分析显示在银杏中存在 FPS 家族,表达分析显示 *GbFPS* 在根和叶子中表达量高,功能互补实验中 *GbFPS* 能够调节缺失 FPS 菌株的法尼稀焦磷酸的生物合成,从而证明了其功能。

2.2.5 GGPPS

GGPPS 催化 3 分子 IPP 与 DMAPP 形成 GGPP,为二萜、类胡萝卜素、类维生素 A 及叶绿素侧链等的形成提供 C20 骨架。植物的 GGPPS 存在于质体、线粒体和细胞溶质中^[56]。植物的 GGPPS 与 FPPS 相似,也含有“DDXX(XX)D”和“DDXXD”模体,在 N 端具有叶绿体信号肽。Liao Z.^[57] 等第一次从银杏中克隆到编码 GGPPS 的全长 cDNA,命名为 *GbGGPPS*,长度为 1657bp,含有 1 个 1176bp 的编码 391 个氨基酸的 ORF。比较分析表明,*GbGGPPS* 在 N 末端具有 79 氨基酸的转运肽,它指引 *GbGGPPS* 定位于质体。生物信息学分析表明,*GbGGPPS* 是多异戊烯基转移酶家族的成员之一,具有 2 个与其他植物 GGPPSs 高度保守的富含天冬氨酸的基元。系统树分析表明,植物 GGPPS 可分为两组,被子植物 GGPPS 和裸子植物 GGPPS,*GbGGPPS* 与裸子植物 GGPPS 关系更近。

尽管这两条代谢途径在被子植物中已十分清楚(如图 6),但是在裸子植物的相关研究还不够明了,并且在银杏代谢途径中是没有单萜物质生成的,对于银杏萜内酯的代谢途径过程中银杏内酯和白果内酯是由哪个途径合成的、白果内酯是经银杏内酯降解而来的还是由 MVA 途径合成、银杏内酯合成部位等问题还存在一定的分歧。Lange 和 Ghassemian^[58] 认为银杏内酯主要是由 MEP 途径合成的,但是 Carrier 和 Kang 等认为在未分化的银杏细胞中

MVA 是主要的^[59-60]。Penuelas 和 Munne'-Bosch^[61]认为白果内酯主要是由 MVA 途径合成的，是一种经 FPP 转化而来的倍半萜化合物。但是一些学者提出了白果内酯是由银杏内酯的部分降解产物而来，银杏内酯失去一个 5 碳单位，这样残余的羧基和乙酸功能基团形成内酯，即含有三个 5 碳单位的白果内酯^[62]。尽管银杏内酯在叶和根中都有，但是银杏萜内酯的合成部位尚不清楚。根据银杏内酯的分布，Huh 和 Staba^[63]认为银杏内酯在叶和根中分别合成。然而，Carayrade 等^[64]以银杏树苗为材料，通过同位素标记法，在根中最先检测到了带有标记的银杏内酯，然后是茎和叶，这说明根是银杏内酯的合成部位，随后转运到叶中贮存，同时还揭示了 GA 是最先合成的内酯化合物，GA 通过羧基异构产生了 GB、GC、GM 等。另外，Neau 等^[65]发现左旋海松二烯等前体物质只在根中被检测到。事实上，MEP 途径中形成 IPP 和 DMAPP 的酶和 LPS 都在根中的转录水平较高，Kim^[66]认为银杏内酯是在根中形成然后通过韧皮部转运到叶中的。在根中 GA 的含量最高，其次是 GC、GB 和 GJ，没有检测到白果内酯。

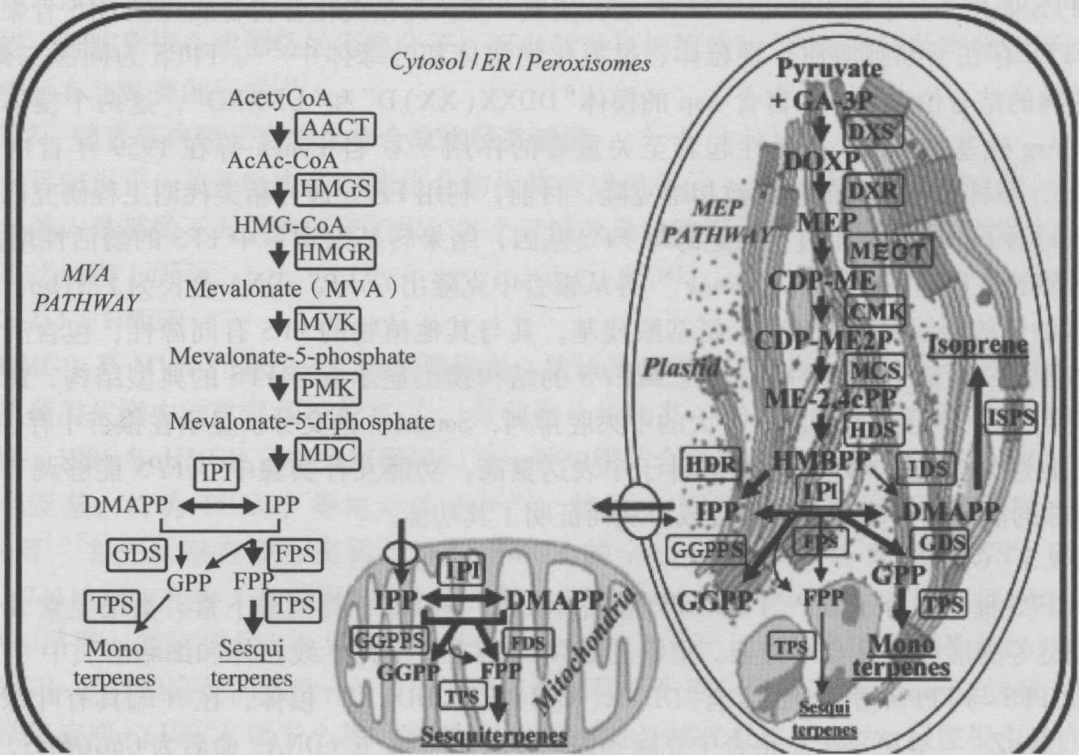


图 6 植物萜内酯生物合成途径及其相关酶

Fig. 6 Terpenoid lactones biosynthetic pathways and their relative genes in plants

MVA 途径: AACT, 乙酰乙酰辅酶 A 转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, EC 2.3.9); HMGS, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, EC 4.1.3.5); HMGR, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, EC 1.1.1.34); MK, 甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, EC 2.7.1.36); PMK, 磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, EC 2.7.4.2); MDC, 甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶 (mevalonate-5-diphosphate decarboxylase, EC 4.1.1.33); IPI, 异戊烯基焦磷酸异构酶 (IPP isomerase EC 5.3.3.2); FPPS, 法尼基焦磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, EC 2.5.10)