

## 植物萜类代谢工程

# Metabolic Engineering of Terpenoids in Plants

韩军丽<sup>1,3</sup> 李振秋<sup>2,3</sup> 刘本叶<sup>3</sup> 王 红<sup>3</sup> 李国凤<sup>3</sup> , 叶和春<sup>3\*</sup>

HAN Jun-Li<sup>1,3</sup> , LI Zhen-Qiu<sup>2,3</sup> , LIU Ben-Ye<sup>3</sup> , WANG Hong<sup>3</sup> , LI Guo-Feng<sup>3</sup> and YE He-Chun<sup>3\*</sup>

1 天津市食品生物技术重点实验室 , 天津商学院生物技术与食品科学学院 , 天津 300134

2 河北大学生命科学学院 , 保定 071002

3 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室 , 北京 100093

1 Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology , College of Biotechnology and Food Science , Tianjin University of Commerce , Tianjin 300134 , China

2 College of Life Sciences , Hebei University , Baoding 071002 , China

3 Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology , Institute of Botany , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100093 , China

**摘 要** 植物萜类化合物不仅在植物生命活动中起重要作用 , 而且具有重要商业价值。随着近年来萜类代谢途径和调控机理研究的深入 , 代谢工程已成为提高萜类产量最有潜力的途径之一。对萜类代谢工程领域具代表性的研究结果进行了全面回顾 , 然后讨论了萜类代谢工程的研究方法和策略 , 其中重点探讨了功能基因组学方法在萜类代谢途径及调控机理研究方面的应用。

**关键词** 萜类化合物 , 代谢工程 , 功能基因组学 , 研究策略

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0561-09

**Abstract** Terpenoids are present in all organisms but are especially abundant in plants , with more than 30 000 compounds . Not only do they play an important role in the life of plant , but also have high commercial values . However , the content of many important terpenoids in plant is very low . Therefore , how to improve the inefficient production of terpenoids is an urgent task . Metabolic engineering has been one of the most potential technologies to improve terpenoids production in recent years , following the study of metabolic pathway and regulation mechanism of terpenoids . Although there are some breakthroughs , metabolic engineering of terpenoids is still full of challenges because of the lack of knowledge on metabolic control of most terpenoids . Functional genomics approaches , including transcriptomics , proteomics and metabolomics , are potential tools for exploring of metabolic engineering . Integrating transcriptomics and metabolomics is an effective way to discover new genes involved in metabolic pathway . In this paper , the representative research outcomes about the metabolic engineering of terpenoids in plant were reviewed concisely and then the application of functional genomics approaches to study metabolic pathway and regulation mechanism of terpenoids and the strategies for metabolic engineering of terpenoids were discussed .

**Key words** terpenoids , metabolic engineering , functional genomics approaches , strategies

植物萜类化合物是以异戊二烯为结构单位的一大类植物天然产物 , 包括含有两个异戊二烯单位的

单萜类化合物 , 如柠檬烯、芳樟醇 ; 含有三个异戊二烯单位的倍半萜类化合物 , 如青蒿素、橙花叔醇 ; 含

Received : January 11 2007 ; Accepted : March 8 2007 .

This work was supported by a grant from the Youth Research Training Foundation of Tianjin University of Commerce .

\* Corresponding author . Tel : 86-10-62836249 ; Fax : 86-10-82591016 ; E-mail : hcyeye@ibcas . ac . cn

天津商学院青年科研培育基金资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

有四个异戊二烯单位的双萜类化合物,如赤霉素、叶绿醇、紫杉醇,含有六个异戊二烯单位的三萜类化合物,如植物甾醇、油菜素类甾醇;含有八个异戊二烯单位的四萜类化合物,如类胡萝卜素;以及含有多于八个异戊二烯单位的多萜类化合物,如异戊二烯化的醌类电子载体——质体醌和泛醌、多萜醇、橡胶。植物萜类包括初生代谢物和次生代谢物。前者在植物基本生命活动中起重要作用,例如植物甾醇参与生物膜的构建,泛醌参与呼吸作用;类胡萝卜素、叶绿素和质体醌参与光合作用;赤霉素、脱落酸、细胞分裂素和油菜素内酯调节植物生长发育;多萜醇和异戊二烯基团参与蛋白修饰。次生萜类代谢物的作用主要表现在植物和环境之间的相互作用方面,如防御食草动物和病原微生物;吸引传粉动物和播种动物,作为种间感应化合物参与种间竞争。除了对植物的重要作用,萜类还具有重要的商业价值,例如,紫杉醇是治疗多种癌症最有效的化疗剂之一<sup>[1]</sup>;青蒿素是治疗疟疾的特效药<sup>[2]</sup>;β-胡萝卜素、番茄红素、虾青素等类胡萝卜素具有很高的营养价值<sup>[3,4,5]</sup>;柠檬烯是重要的防癌化合物;薄荷醇、香柏酮、香紫苏醇等可作为食品和化妆品中的香料;芳樟醇是花朵和果实香味的主要成分;杀虫菊酯是高效杀虫剂。因此,提高植物萜类产量的研究一直都是一个热点课题,主要包括化学合成、细胞培养和代谢工程三种途径。由于化学合成成本高、毒性大,细胞培养物中目的产物含量不高或高产细胞系稳定性差<sup>[6]</sup>;因此随着近年来萜类代谢途径及其调控机理研究的深入,以基因工程技术为基础的代谢工程成为提高萜类产量最有潜力的途径之一,其中类胡萝卜素代谢工程<sup>[3,4,5,7]</sup>和青蒿酸代谢工程<sup>[8,9]</sup>取得突破性进展。目前植物萜类代谢工程存在的主要问题是缺乏对大多数萜类代谢途径及调控机理的深入研究。本文对萜类代谢工程领域中的代表性研究结果进行全面回顾,然后讨论了萜类代谢工程的研究方法和策略,其中重点探讨了功能基因组学方法在萜类代谢途径及调控机理研究方面的应用。

## 1 植物萜类的生物合成途径

植物萜类的生物合成有两条途径,即甲羟戊酸(MVA)途径和2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径(图1)<sup>[10]</sup>。MVA途径存在于细胞质中,以糖酵解产物乙酰辅酶A作为原初供体;MEP途径存在于质体中,原初供体是丙酮酸和甘油醛-3-磷酸。两条途径都生成萜类结构单位——异戊烯基焦磷酸

(IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)。在MVA途径中,首先由3个乙酰辅酶A缩合生成3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA(HMG-CoA),这一反应由乙酰辅酶A硫解酶和HMG-CoA合成酶完成,随后HMG-CoA在HMG-CoA还原酶(HMGR)的作用下生成MVA,后者经焦磷酸化和脱羧作用生成异戊烯基焦磷酸(IPP),IPP在异构化酶的作用下生成二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)<sup>[11]</sup>。在MEP途径中,丙酮酸和焦磷酸硫胺素(TPP)反应,产生一个两碳的片段——羟乙基-TPP,它与甘油醛-3-磷酸缩合,释放出TPP,生成一个五碳中间产物——1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DXP),该反应由1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(DXS)催化,接着DXP在1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)的作用下发生重排和还原,形成MEP,后者在hydroxymethylbutenyl焦磷酸还原酶(HDR)的作用下同时形成IPP和DMAPP<sup>[12]</sup>。在异戊烯基转移酶的作用下,IPP和DMAPP缩合生成牻牛儿基焦磷酸(GPP),即单萜的前体;GPP加上第二个IPP单元生成法呢基焦磷酸(FPP),即倍半萜的前体;FPP加上第三个IPP单元生成牻牛儿基焦磷酸(GGPP),即双萜的前体;两个FPP缩合生成鲨烯,即三萜的前体;两个GGPP缩合生成八氢番茄红素,即四萜的前体。单萜、倍半萜、双萜的前体在萜类合酶的作用下生成各种萜类的基本骨架,然后在修饰酶的作用下生成终产物。异戊烯基转移酶包括牻牛儿基焦磷酸合酶(GPS)、法呢基焦磷酸合酶(FPS)、牻牛儿基焦磷酸合酶(GGPS)等;萜类合酶包括单萜合酶、倍半萜合酶、双萜合酶等;修饰酶包括细胞色素P450羟化酶、脱氢酶、还原酶、糖基转移酶和甲基转移酶等。尽管越来越多的证据表明细胞中各区室之间存在中间产物的交换,单萜、双萜、四萜以及一些异戊二烯化的醌类大多数都产生于质体中,倍半萜、三萜和多萜基本上都产生于细胞质中<sup>[13]</sup>。

## 2 植物萜类代谢工程

### 2.1 单萜

单萜代谢工程的靶酶包括上游调控酶、异戊烯基转移酶、单萜合酶和修饰酶。DXS是MEP途径的限速酶,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中上调或下调DXS基因的表达量,结果影响叶绿素、生育酚、类胡萝卜素、赤霉素和脱落酸等多种萜类相关物质的含量<sup>[14]</sup>。但是在单萜代谢工程中还未见以此酶为靶酶的报道。在胡椒薄荷(*Mentha piperita*)中过量表

达 DXR 基因,富含单萜的精油产量增加 40% ~ 60%<sup>[15]</sup>。单萜代谢途径相关的异戊烯基转移酶包括 GPS 和 GGPS,那么提高 GPS 活性或者降低 GGPS 活性或二者同时进行有可能提高单萜产量,但是后两种策略要谨慎实施,因为 GGPP 是重要代谢产物如赤霉素、类胡萝卜素、异戊二烯化的醌类和叶绿素的前体<sup>[16]</sup>。单萜合酶,如柠檬烯合酶和芳樟醇合酶,是单萜代谢工程最常用的靶酶。在胡椒薄荷中过量表达荷兰薄荷(*Mentha spicata*)柠檬烯合酶基因,转基因植株萜类组成没有显著改变<sup>[17]</sup>。而在另一项相关的研究中,同样的基因在胡椒薄荷和日本薄荷(*Mentha arvensis*)中表达,结果转基因植株单萜产量增加并且组成改变<sup>[18]</sup>。在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中组成性表达山字草(*Clarkia breweri*)芳樟醇合酶基因,转基因植株合成的芳樟醇进一步生成非挥发性物质<sup>[19]</sup>。在康乃馨中(*Dianthus caryophyllus*)组成性表达同样的基因,转基因植株合成芳樟醇及其氧化物,但是产量很低,不足以影响植株的气味<sup>[20]</sup>。在番茄(*Lycopersicon esculentum*)正在成熟的果实中特异性表达同样的基因,转基因植株的果实中合成芳樟醇及其衍生物,可改变果实的风味<sup>[21]</sup>。在拟南芥中表达草莓(*Fragaria ananassa* cv Elsanta)芳樟醇/橙花叔醇合酶基因,转基因植株产生芳樟醇及其衍生物<sup>[22]</sup>。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中同时表达柠檬(*Citrus limon*)三种单萜合酶基因,转基因植株叶片和花释放三种相应的单萜及其衍生物<sup>[23]</sup>。以修饰酶为靶酶的单萜代谢工程也有报道。薄荷味喃对薄荷品质有不利影响,在胡椒薄荷中抑制薄荷味喃合酶基因的表达,可以将薄荷味喃的含量减少 35% ~ 55%<sup>[15]</sup>。为了增加柠檬烯的含量,利用共抑制效应降低胡椒薄荷中柠檬烯羟化酶基因的表达量,结果转基因植株精油中柠檬烯含量是野生型植株的 40 倍<sup>[24]</sup>。

## 2.2 倍半萜

倍半萜代谢工程的热点是抗疟特效药——青蒿素的代谢工程。青蒿素(artemisinin)生物合成途径如图 1 和图 2(A)。将棉花(*Gossypium arboreum*)FPS 基因在青蒿(*Artemisia annua* L.)025 株系(青蒿素含量约为 0.30% 干重)中过量表达,结果转基因青蒿植株的青蒿素含量比非转基因青蒿提高了 1 ~ 2 倍,转基因青蒿的青蒿素含量最高可达 1.0% 干重<sup>[25]</sup>。而将青蒿 FPS 基因在青蒿高产株系 001(青蒿素含量约为 0.60% 干重)中过量表达,结果转基因青蒿植株的青蒿素含量比非转基因青蒿提高了 24.2%

~ 34.4% 转基因青蒿的青蒿素含量最高可达 0.9% 干重<sup>[26]</sup>。除了 FPS,倍半萜合酶也是常用的靶酶。在烟草中过量表达青蒿 Amorphadiene 合酶,结果 amorphadiene 的含量为 0.2 ~ 1.7ng/g 鲜叶<sup>[27]</sup>。在拟南芥中过量表达菊苣(*Cichorium intybus*)germacrene A 合酶基因,结果转基因植株中仅有痕量 germacrene A<sup>[22]</sup>。在拟南芥质体中表达草莓芳樟醇/橙花叔醇合酶基因,每株转基因拟南芥每天产生 0.02 ~ 0.16 $\mu$ g 橙花叔醇<sup>[22]</sup>,而在拟南芥线粒体中表达相同的基因,转基因拟南芥橙花叔醇的释放量是前者的 20 ~ 30 倍<sup>[28]</sup>。提高倍半萜产量的另一条途径是应用微生物代谢工程。例如在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中建立酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)MVA 代谢途径,由此途径取代 MEP 途径产生 IPP 和 DMAPP,然后在大肠杆菌中过量表达大肠杆菌 FPS 和青蒿 amorphadiene 合酶,结果工程菌中 amorphadiene 的含量达到 112.2mg/L<sup>[8]</sup>。通过调控酵母 MVA 代谢途径使之产生大量 FPP,同时过量表达青蒿 amorphadiene 合酶和细胞色素 P450 单加氧酶基因,后者通过三步氧化将 amorphadiene 转化成青蒿酸(artemisinic acid),结果转基因酵母中青蒿酸的含量为 4.5% 干重<sup>[9]</sup>。这些前期工作为利用发酵工程生产青蒿素奠定了基础。

## 2.3 双萜

双萜代谢工程方面的研究较少,抗癌特效药——紫杉醇的代谢工程有初步研究。紫杉醇(taxol)的生物合成途径如图 2(B),GGPP 在 taxadiene 合酶(TXS)的作用下生成 taxadiene,后者经过大约 12 步酶促反应最终合成紫杉醇。在拟南芥中组成性表达紫杉(*Taxus baccata*)TXS 基因,转基因植株积累 taxadiene 的同时表现出生长迟缓,而且光合色素的含量减少;采用诱导表达系统,用糖皮质激素处理后 taxadiene 含量可达 600ng/g 干重,比组成性表达得到的转基因植株 taxadiene 的含量提高 30 倍<sup>[29]</sup>。上游调控酶对 taxadiene 的产量也有影响,将组成性表达紫杉 TXS 基因的转基因拟南芥分别和组成性表达番茄 HDR 基因的转基因拟南芥和表达拟南芥 DXS 基因的转基因拟南芥杂交,其后代 taxadiene 的含量分别是组成性表达紫杉 TXS 基因的转基因拟南芥的 13 倍和 6.5 倍<sup>[30]</sup>。以修饰酶为靶酶的双萜代谢工程也有报道。在烟草中抑制 cembratriene-ol 羟化酶基因的表达,转基因植株 cembratriene-diol 的含量减少,而它的前体 cembratriene-ol 含量增加<sup>[31]</sup>。

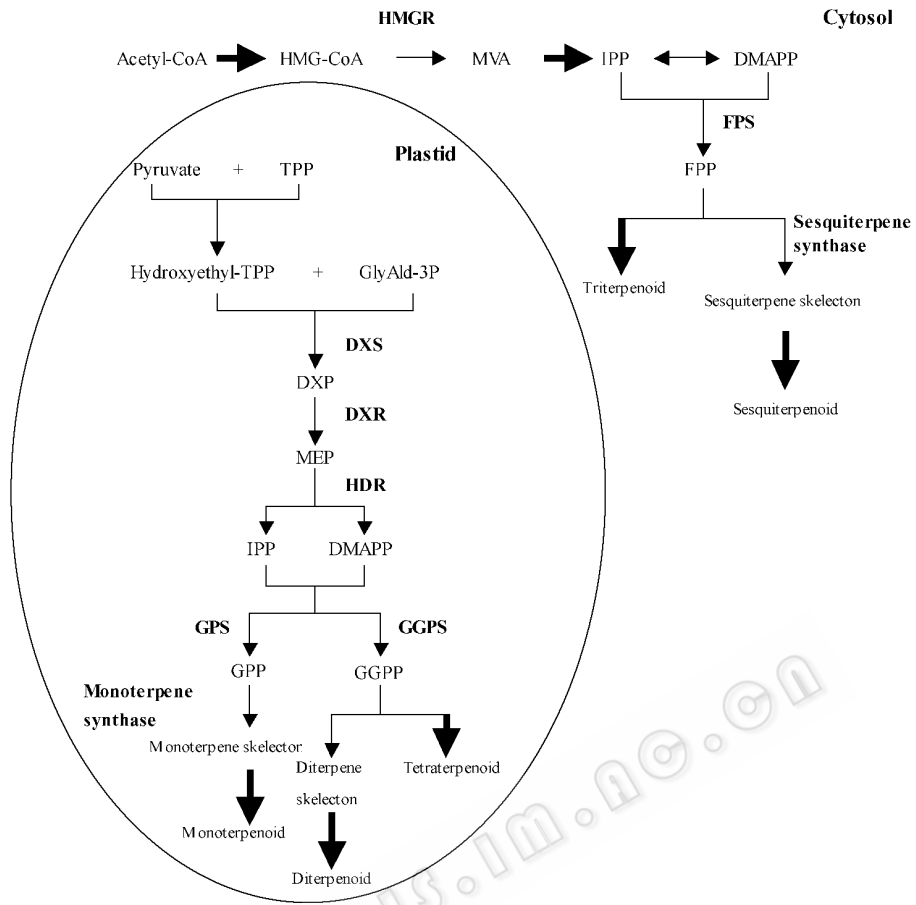


图 1 植物萜类生物合成途径示意图

Fig. 1 The simplified diagram of the isoprenoid pathway in plants

Thin arrows and thick arrows represent single and multiple enzymatic steps respectively.

HMG-CoA  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A 3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA ;MVA ,mevalonic acid ,甲羟戊酸 ;IPP ,isopentenyl diphosphate ,异戊烯基焦磷酸 ;DMAPP ,dimethylallyl diphosphate ,二甲基烯丙基焦磷酸 ;GPP ,geranyl diphosphate ,牻牛儿基焦磷酸 ;FPP ,farnesyl diphosphate ,法呢基焦磷酸 ;GGPP ,geranylgeranyl diphosphate ,牻牛儿牻牛儿基焦磷酸 ;TPP 焦磷酸硫胺素 ;DXP ,1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate ,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 ;MEP 2-C- methyl-D-erythritol-4-phosphate 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸 ;HMGR , $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 ;FPPS ,farnesyl diphosphate synthase 法呢基焦磷酸合酶 ;DXS ,1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase ,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 ;DXR ,1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase ,1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 ;HDR ,hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase ,hydroxymethylbutenyl 焦磷酸还原酶 ;GPS ,geranyl diphosphate synthase 牻牛儿基焦磷酸合酶 ;GGPS ,geranylgeranyl diphosphate synthase 牻牛儿牻牛儿基焦磷酸合酶 .

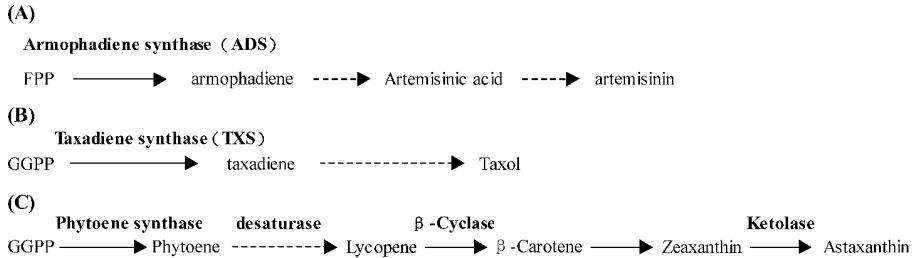


图 2 几种萜类生物合成途径示意图

(A)青蒿素 (B)紫杉醇 (C) $\beta$ -胡萝卜素和虾青素 ;实线箭头代表一步反应 ,虚线箭头代表多步反应。

Fig.2 The simplified biosynthetic pathway of artemisinin (A) ,Taxol (B)  $\beta$ -carotene and astaxanthin (C)

Solid arrows and broken arrows represent single and multiple enzymatic steps respectively.

## 2.4 三萜

三萜代谢工程的研究集中在提高植物甾醇生物合成的前体供应方面。在烟草中过量表达橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) HMGR 基因,转基因烟草 HMGR 活性提高 3~8 倍,总甾醇含量提高 6 倍<sup>[32]</sup>。将仓鼠 HMGR 基因置于 CaMV35S 启动子下转入烟草,转基因烟草的 HMGR 活性增加 3~6 倍,同时总固醇类物质的积累也增加了 3~10 倍,其中谷固醇、油菜固醇和豆固醇的含量仅增加了 2 倍,而固醇类物质生物合成的中间产物环阿屯醇的含量却增加了 100 多倍<sup>[33]</sup>。在拟南芥中过量表达拟南芥 HMGR 基因,转基因拟南芥甾醇含量提高<sup>[34]</sup>。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<sup>[35]</sup>。在拟南芥中过量表达拟南芥 FPS 基因,结果 FPS 酶活性是野生型的 8~12 倍,但是植物总甾醇的含量没有提高,而且由于转基因植物体内细胞分裂素的含量减少,导致植物出现早衰症状<sup>[36]</sup>。

## 2.5 四萜

类胡萝卜素生物合成途径如图 2(C),GGPP 在八氢番茄红素合酶 (phytoene synthase) 的作用下生成八氢番茄红素 (phytoene); 后者在八氢番茄红素脱饱和酶 (phytoene desaturase) 和  $\zeta$ -胡萝卜素脱饱和酶 ( $\zeta$ -carotene desaturase) 的作用下,经过两步反应生成番茄红素 (lycopene),到这里代谢途径出现分支,分别合成  $\beta$ -胡萝卜素 ( $\beta$ -carotene) 和叶黄素等类胡萝卜素。在番茄红素  $\beta$ -环化酶 ( $\beta$ -cyclase) 的作用下番茄红素生成  $\beta$ -胡萝卜素。植物类胡萝卜素生物合成途径是萜类代谢途径中研究最透彻的途径,几乎所有代谢途径相关酶都已被克隆<sup>[37]</sup>。因此,类胡萝卜素代谢工程是植物萜类代谢工程中进展最迅速的领域<sup>[38,39]</sup>,涉及植物有水稻<sup>[3,7]</sup>、油菜<sup>[40]</sup>、番茄<sup>[4,41]</sup>、马铃薯<sup>[42]</sup>、烟草<sup>[5]</sup>等,其中部分研究取得突破性进展。水稻胚乳中不含类胡萝卜素,只含有 GGPP,在水稻 (*Oryza sativa*) 胚乳中同时表达水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*) 八氢番茄红素合酶、细菌 (*Erwinia uredovora*) 脱饱和酶和水仙番茄红素  $\beta$ -环化酶,转基因水稻胚乳中  $\beta$ -胡萝卜素的含量约为 2 $\mu$ g/g。如果只表达前两者,并不积累番茄红素,而是形成  $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄质 (zeaxanthin)。鉴于颜色和营养价值,转基因稻米被称为“金米”<sup>[43]</sup>。在进一步的研究中将玉米 (*Zea mays*) 八氢番茄红素合酶和细菌 (*E. uredovora*) 脱饱和酶在水稻胚乳中同时表达,产生的“金米二代”类胡萝卜素的总量是金米的 23

倍,且主要积累  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[7]</sup>。油菜 (*Brassica napus*) 种子含有痕量  $\beta$ -胡萝卜素,在油菜种子中过量表达细菌 (*E. uredovora*) 八氢番茄红素合酶,类胡萝卜素的总量增加 50 倍,其中主要为  $\alpha$ -胡萝卜素和  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[40]</sup>。在番茄植株中组成性表达细菌 (*E. uredovora*) 八氢番茄红素脱饱和酶,和对照相比转基因番茄并不积累更多的番茄红素,而且类胡萝卜素的总量减少,不过此时类胡萝卜素中有约 50% 的  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[41]</sup>。在番茄果实中特异性表达细菌 (*E. uredovora*) 八氢番茄红素合酶基因,转基因番茄中类胡萝卜素的总量比非转基因番茄提高 2~4 倍,其中八氢番茄红素、番茄红素、 $\beta$ -胡萝卜素分别增加 2.4 倍、1.8 倍、2.2 倍<sup>[41]</sup>。在马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 块茎中表达细菌 (*E. uredovora*) 八氢番茄红素合酶,转基因块茎类胡萝卜素总量约提高 6 倍,其中  $\beta$ -胡萝卜素的含量由原来的痕量增加到 11 $\mu$ g/g 干重,叶黄素含量比对照提高 19 倍<sup>[42]</sup>。在类胡萝卜素代谢工程中,虾青素 (astaxanthin) 代谢工程也取得突破性进展。在烟草中特异表达单细胞绿藻 (*Haematococcus pluvialis*)  $\beta$ -胡萝卜素酮酶 ( $\beta$ -carotene ketolase) 转基因烟草蜜腺积累虾青素和其他酮基类胡萝卜素,蜜腺的颜色由黄色变为红色<sup>[5]</sup>。

## 3 功能基因组学方法在植物萜类代谢工程中的应用

目前,植物萜类代谢工程仍是一项极富挑战性的工作。除了类胡萝卜素 (初生代谢产物) 代谢工程取得较快进展,其他多数次生萜类代谢工程仍然进展缓慢,多数研究达不到预期结果,甚至结果出乎预料<sup>[17,26,29,36]</sup>。其根本原因在于缺乏对代谢途径及其调控机理以及代谢网络的认识。随着基因组学的发展,功能基因组学方法为代谢途径及其调控机理的研究开辟新途径。功能基因组学方法,包括转录组学、蛋白质组学、代谢组学方法,是对生物系统进行广泛深入研究的重要工具<sup>[6]</sup>。目前功能基因组学方法在代谢工程中已有初步应用。

代谢组学方法用于分析代谢网络或分析某条代谢途径。前者主要表现在对转基因植株代谢网络的分析方面。例如运用代谢产物轮廓分析方法 (metabolite profiling) 对表达异源蔗糖分解代谢相关酶的转基因马铃薯块茎进行分析,结果发现外源蔗糖分解代谢相关酶不仅影响蔗糖代谢,而且引起诸如 shikimate 积累、纤维醇含量大量减少等多效性影响<sup>[43]</sup>。在萜类代谢方面,对转基因拟南芥进行代谢

组分析,探讨过量表达芳樟醇/橙花叔醇合酶基因引起受体植株生长发育迟缓的可能原因<sup>[22]</sup>。除了在分析代谢网络方面的应用,代谢组学方法也用于分析某条代谢途径。例如,对用多种除草剂处理后的胡椒薄荷油腺分泌细胞进行分析,探讨分泌细胞中单萜生物合成途径及调控方式<sup>[44]</sup>。对紫杉(*Taxus cuspidata*)悬浮培养细胞的戊烷提取物进行代谢组分析,研究紫杉醇生物合成途径的中间产物<sup>[45]</sup>。

转录组学方法常和代谢组学方法结合,用来研究代谢途径相关基因的表达模式,寻找参与次生代谢调控的目的基因。用茉莉酸甲酯处理烟草悬浮培养细胞,然后比较分析处理后一段时间内基于cDNA扩增片段长度多态性的转录轮廓(cDNA-amplified fragment length polymorphism transcript profiling)和目标代谢物。结果在2万个检测到的基因中有591个为激发子诱导转录的基因,其中58%的基因具有已知的功能,包括了几乎所有已知的、参与尼古丁生物合成的基因,如鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶和quinolinate acid phosphoribosyltransferase等。对其余未知基因功能的研究将有助于阐明尼古丁生物合成途径及其调控机理<sup>[46]</sup>。对处于不同发育阶段草莓果实释放的挥发性酯类进行测定,同时进行cDNA微阵列比较分析,结果找到了一个在草莓果实成熟过程中风味物质合成相关基因<sup>[47]</sup>。对矮牵牛花进行不同时间的光照处理,然后进行多种挥发性代谢产物的含量分析和cDNA微阵列比较分析,结果找到苯丙氨酸脱氨酶基因家族的8个基因<sup>[48]</sup>。此类研究也有一些萜类代谢方面的报道。对玫瑰(*Rosa hybrida*)两个栽培种进行挥发性代谢物分析和微阵列分析,发现了大根香叶烯D合酶基因等一系列花香相关基因<sup>[49]</sup>。通过检索EST数据库,从紫花苜蓿(*Medicago truncatula*)cDNA文库中分离鉴定皂角苷生物合成途径中、上游的三个关键基因,即鲨烯合酶基因、鲨烯环氧酶基因和 $\beta$ -香树素合酶基因。然后对用茉莉酸甲酯处理后的紫花苜蓿根细胞悬浮培养物进行代谢产物分析和相关基因表达模式分析,结果表明处理后的细胞皂角苷含量增加约10倍, $\beta$ -香树素合酶基因转录水平的表达量增加到30倍,同时鲨烯合酶基因和鲨烯环氧酶基因的表达量也都大幅提高<sup>[50]</sup>。最近报道的一例关于黄瓜(*Cucumis sativus*)释放挥发性物质的研究,用统计学方法将转录组和代谢组分析有机结合,为代谢途径相关基因的寻找提供更有效的方法。对小蜘蛛侵染后的黄瓜植株和未侵染植株进行挥发性代谢产物分析和

cDNA微阵列分析,然后用相关系数结合自组织图(SOMs, self organizing maps)方法对四种挥发性物质生物合成相关基因进行聚类分析,最后克隆并鉴定了挥发性萜类物质合成相关基因,即(E,E)-法呢烯合酶基因和(E)- $\beta$ -石竹烯合酶基因<sup>[51]</sup>。

将转录组学方法和代谢组学方法结合不仅可以寻找代谢途径相关基因,而且可用于分析经代谢工程改造的植株。Kristensen等人在拟南芥蜀黍苷(dhurrin)代谢工程的研究中,用此方法对具有蜀黍苷部分代谢途径和蜀黍苷完整代谢途径的两种转基因拟南芥进行分析,结果表明具有完整蜀黍苷代谢途径的转基因拟南芥积累4%干重蜀黍苷,而且转入的基因对拟南芥植株的其他成分和其他基因的表达几乎没有影响,而只表达蜀黍苷代谢途径部分关键酶基因的转基因拟南芥形态异常,植株转录组和代谢组都有变化<sup>[52]</sup>。

目前,蛋白质组学方法在代谢工程中的应用鲜有报道。Decker用蛋白质组学方法研究罂粟蒴果乳液蛋白的组成,并将吗啡生物合成相关酶——可待因酮还原酶进行定位<sup>[53]</sup>。

## 4 萜类代谢工程的研究策略

### 4.1 代谢途径的分子调控

代谢途径的分子调控有如下几种策略:提高限速酶的表达水平或酶活性,阻止代谢流向竞争路径发展,阻止代谢产物对限速酶的反馈抑制,减少目的产物的分解<sup>[6]</sup>。代谢途径分子调控的另一个角度是开辟新途径。例如通过代谢工程手段表达几个关键酶基因,在水稻胚乳中开辟类胡萝卜素合成代谢途径,结果转基因稻米不仅可以合成类胡萝卜素,而且此类物质含量较高<sup>[3,7]</sup>。此类代谢工程成功的例子较多,除了类胡萝卜素合成代谢外,还包括蜀黍苷合成代谢<sup>[52]</sup>、芳樟醇合成代谢<sup>[19,20,21]</sup>等等。除了在植物中开辟新途径,在微生物如大肠杆菌和酵母中,也可以开辟新途径。例如微生物类胡萝卜素代谢工程和青蒿酸代谢工程<sup>[8,9]</sup>。

### 4.2 转录因子

由于代谢途径通常有多个限速酶,而且限速步骤很难确定,因此通过调节转录因子的表达量来从整体角度调控代谢途径进而提高目的代谢物的产量具有诱人前景<sup>[54]</sup>。例如在番茄果实中特异表达玉米花青素合成途径转录因子,结果果实中类黄酮的含量增加<sup>[55]</sup>。虽然目前已经发现参与次生代谢的多个转录因子,但是其中多数和花青素代谢途径相

关<sup>[54]</sup>。萜类代谢途径相关酶基因的表达在转录水平上常常呈正相关,因此在萜类代谢途径中很可能存在转录因子<sup>[16]</sup>。最近报道的棉花转录因子 GaWRKY1 是目前唯一一例参与萜类代谢的转录因子,该转录因子调节倍半萜合酶——杜松烯合酶基因的表达<sup>[56]</sup>。

从转录因子角度进行代谢工程还有另外一种策略,即调节控制腺毛发育的转录因子。许多萜类物质如薄荷精油<sup>[57]</sup>、青蒿素<sup>[58]</sup>储存在腺毛中,腺毛的发育受转录因子调控<sup>[59]</sup>。调节转录因子的活性可以增加腺毛的密度,进而增加腺毛中储存物质的产量。

### 4.3 转运蛋白

次生代谢产物通常从源细胞运输到周边细胞,甚至运输到其他组织或器官中<sup>[60]</sup>。例如尼古丁在烟草根部合成,通过木质部运输到植株其他部位<sup>[61]</sup>。参与异喹啉类生物碱——黄连素运输的运输蛋白基因已经克隆<sup>[62]</sup>。参与烟草抗真菌二萜——香紫苏醇分泌的质膜结合 ATP 卡盒型转运蛋白是目前唯一报道的参与萜类代谢物运输的转运蛋白<sup>[63]</sup>。单萜具有挥发性和亲脂性,一般认为单萜释放是简单的扩散过程,不需要转运蛋白或透性酶的参与,但是也没有有力证据否定转运蛋白参与单萜运输的可能性<sup>[60]</sup>。倍半萜和双萜在亲水和疏水基质中都能溶解,因此在它们的运输过程中很可能有转运蛋白的参与。关于亲脂性三萜运输的机理还不清楚,推测可能是以囊泡运输的方式进行的。转运蛋白在代谢产物的运输和积累过程中至关重要,因此在代谢工程中,尤其是那些积累在特化器官中、具有毒性的次生代谢产物的代谢工程中,转运蛋白可能是一个重要的限制因素。

### 4.4 代谢途径限制作用

代谢途径限制作用(metabolic channeling)是指参与某一代谢途径的多种酶(通常是代谢途径中催化连续反应步骤的酶)相互作用形成一个蛋白质复合体,从而更有效地催化和调节代谢途径<sup>[64]</sup>。代谢途径限制作用是在初生代谢的研究中发现的,后来的研究表明此现象也存在于次生代谢中,如苯丙烷类生物合成途径、蜀黍苷生物合成途径<sup>[52]</sup>。萜类生物合成途径很可能也存在此作用<sup>[13]</sup>。因此,可以用代谢工程手段将萜类代谢途径的多个相关酶构建成人工蛋白质复合体,利用代谢途径限制作用提高催化反应的效率。

## 5 小结

植物萜类化合物是一类重要的天然产物。在阐明萜类代谢途径及其调控机理的基础上进行的代谢工程是提高萜类产量的有效途径。虽然目前多数萜类的代谢途径及调控机理尚不完全清楚,但是随着基因组学的发展,功能基因组学方法为此领域的研究开辟新途径。其中转录组学方法和代谢组学方法的结合应用将成为寻找萜类代谢途径相关基因的有效途径。萜类代谢工程可以从限速酶、转录因子、转运蛋白以及代谢途径的限制作用等方面入手。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Suffness M. Taxol: Science and Applications. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- [2] Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1995, **228**: 1049 - 1055.
- [3] 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.
- [4] Romer S, Fraser PD, Kiano JW, et al. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 666 - 669.
- [5] Mann V, Harker M, Pecker I, et al. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 888 - 892.
- [6] Oksman-Caldentey K-M, Inze D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* 2004, **9**: 433 - 440.
- [7] Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* 2005, **23**: 482 - 487.
- [8] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 2003, **21**: 796 - 802.
- [9] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 2006, **440**: 940 - 943.
- [10] Lichtenthaler HK. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 47 - 65.
- [11] Chen DH (陈大华), Ye HC (叶和春), Li GF (李国凤), et al. Advances in molecular biology of plant isoprenoid metabolic pathway. *Acta Bot Sin (植物学报)* 2000, **42**: 551 - 558.
- [12] Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 2002, **130**: 1079 - 1089.
- [13] Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci*, 2005, **10**: 594 - 602.

- [ 14 ] Estevez JM , Cantero A , Reindl , *et al.* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase , a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* 2001 **276** :22901 – 22909.
- [ 15 ] Mahmoud SS ,Croteau R. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 **98** :8915 – 8920.
- [ 16 ] Mahmoud SS ,Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 2002 **7** :366 – 373.
- [ 17 ] Krasnyanski S ,May RA ,Loskutov A ,*et al.* Transformation of the limonene synthase gene into peppermint ( *Mentha piperita* L. ) and preliminary studies on the essential oil profiles of single transgenic plants. *Theor Appl Genet* ,1999 **99** :676 – 682.
- [ 18 ] Diemer F ,Caissard JC ,Moja S ,*et al.* Altered monoterpene composition in transgenic mint following the introduction of 4S-limonene synthase. *Plant Physiol Biochem* 2001 **39** :603 – 614.
- [ 19 ] Lucker J ,Bouwmeester HJ ,Schwab W ,*et al.* Expression of Clarkia S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl-b-Dglucopyranoside. *Plant J* ,2001 **27** :315 – 324.
- [ 20 ] Lavy M ,Zuker A ,Lewinsohn E ,*et al.* Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Mol Breed* 2002 **9** :103 – 111.
- [ 21 ] Lewinsohn E ,Schalechet F ,Wilkinson J ,*et al.* Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol* 2001 **127** :1256 – 1265.
- [ 22 ] Aharoni A ,Giri AP ,Deuerlein S ,*et al.* Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* ,2003 **15** :2866 – 2884.
- [ 23 ] Lucker J ,Schwab W ,Hautum B ,*et al.* Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol* ,2004 **134** :510 – 519.
- [ 24 ] Mahmoud SS ,Williams M ,Croteau R. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. *Phytochemistry* 2004 **65** :547 – 554.
- [ 25 ] Chen DH ,Ye HC ,Li GF. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci* , 2000 **155** :179 – 85.
- [ 26 ] Han JL ,Liu BY ,Ye HC ,*et al.* Effects of overexpression of the endogenous farnesyl diphosphate synthase on the artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Journal of Integrative Plant Biology* 2006 , **48** :482 – 487.
- [ 27 ] Wallaart TE ,Bouwmeester HJ ,Hille J ,*et al.* Amorpho-4 ,11-diene synthase : cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 2001 **212** :460 – 465.
- [ 28 ] Kappers IF ,Aharoni A ,van Herpen TWJM ,*et al.* Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* 2005 **309** :2070 – 2072.
- [ 29 ] Besumbes O ,Sauret-Gueto S ,Phillips MA ,*et al.* Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene , the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol Bioeng* 2004 **88** :168 – 175.
- [ 30 ] Botella-Pavia P ,Besumbes O ,Phillips MA ,*et al.* Regulation of carotenoid biosynthesis in plants : evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J* 2004 **40** :188 – 199.
- [ 31 ] Wang E ,Wang R ,DeParasis J ,*et al.* Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. *Nat Biotechnol* 2001 **19** :371 – 374.
- [ 32 ] Schallar H ,Grausem B ,Benveniste P ,*et al.* Expression of the *Hevea brasiliensis* ( H. B. K. ) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl -coenzyme A reductase I in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol* ,1995 **109** :761 – 770.
- [ 33 ] Chappell J ,Wolf F ,Proulx J ,*et al.* Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol* ,1995 **109** :1337 – 1343.
- [ 34 ] Manzano D ,Fernandez-Busquets X ,Schaller H ,*et al.* The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase ( isoform 1S ) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* 2004 **219** :982 – 992.
- [ 35 ] Daudonnet S ,Karst F ,Tourte Y. Expression of the farnesyl diphosphate synthase of *Saccharomyces cerevisiae* in tobacco. *Mol Breed* ,1997 **3** :137 – 145.
- [ 36 ] Masferrer A ,Arro M ,Manzano D ,*et al.* Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase ( FPS1S ) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J* 2002 **30** :123 – 32.
- [ 37 ] Cunningham FX ,Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol* ,1998 **49** :557 – 583.
- [ 38 ] Giuliano G ,Aquilani R ,Dharmapuri S. Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci* 2000 **5** :406 – 409.
- [ 39 ] Sandmann G ,Romer S ,Fraser PD. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* 2006 **8** :291 – 302.
- [ 40 ] Shewmaker CK ,Sheehy JA ,Daley M ,*et al.* Seed-specific overexpression of phytoene synthase : increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* ,1999 **20** :401 – 412.
- [ 41 ] Fraser PD ,Romer S ,Shipton CA ,*et al.* Biochemical evaluation of transgenic tomato plants expressing an addition phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 **99** :1092 – 1097.
- [ 42 ] Ducreux LJ ,Morris WL ,Hedley PE ,*et al.* Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of  $\beta$ -carotene and lutein. *J Exp Bot* 2005 **56** :81 – 89.
- [ 43 ] Roessner U ,Luedemann A ,Brust D ,*et al.* Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 2001 **13** :11 – 29.
- [ 44 ] Lange BM ,Ketchum REB ,Croteau RB. Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. *Plant Physiol* ,2001 **127** :305 – 314.
- [ 45 ] Ketchum REB ,Rithner CD ,Qiu D ,*et al.* Taxus metabolomics : methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures. *Phytochemistry* ,



- [ 46 ] Goossens A ,Hakkinen ST ,Laakso I ,*et al.* A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 **100** : 8595 – 8600.
- [ 47 ] Aharoni A ,Keizer LCP ,Bouwmeester HJ ,*et al.* Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 2000 **12** : 647 – 661.
- [ 48 ] Verdonk JC ,Ris de Vos CH ,Verhoeven HA ,*et al.* Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry* 2003 **62** : 997 – 1008.
- [ 49 ] Guterman I ,Shalit M ,Menda N ,*et al.* Rose scent : genomic approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 2002 **14** : 2325 – 2338.
- [ 50 ] Suzuki H ,Achnine L ,Xu R ,*et al.* A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 2002 **32** : 1033 – 1048.
- [ 51 ] Mercke P ,Kappers IF ,Verstappen FWA ,*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 ] Kristensen C ,Morant M ,Olsen CE ,*et al.* Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 **102** : 1779 – 1784.
- [ 53 ] Decker G ,Wanner G ,Zenk MH ,*et al.* Characterization of proteins in latex of the opium poppy ( *Papaver somniferum* ) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* 2000 **21** : 3500 – 3516.
- [ 54 ] Broun P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2004 **7** : 202 – 209.
- [ 55 ] Bovy A ,de Vos R ,Kemper M ,*et al.* High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *Cl* . *Plant Cell* 2002 **14** : 2509 – 2526.
- [ 56 ] Xu YH ,Wang JW ,Wang S ,*et al.* Characterization of GaWRKY1 a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene( + )- $\sigma$ -cadinene synthase-A. *Plant Physiol* ,2004 **135** : 507 – 515.
- [ 57 ] Lange B M ,Wildung M R ,Stauber E J ,*et al.* Probing essential oil biosynthesis by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 **97** : 2934 – 2939.
- [ 58 ] Duke SO ,Paul RN ,Elshohly HN ,*et al.* Localization of artemisinin and artemisitene in folial tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci* ,1994 **155** : 365 – 372.
- [ 59 ] Szymanski DB ,Lloyd AM ,Marks MD. Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis* . *Trends Plant Sci* 2000 **5** : 214 – 219.
- [ 60 ] Yazaki K. Transporters of secondary metabolites. *Curr Opin Plant Biol* 2005 **8** : 301 – 307.
- [ 61 ] Hashimoto T ,Yamada Y. New genes in alkaloid metabolism and transport. *Curr Opin Biotechnol* 2003 **14** : 163 – 168.
- [ 62 ] Yazaki K ,Shitan N ,Takamatsu H ,*et al.* A novel *Coptis japonica* multidrug resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *J Exp Bot* 2001 **52** : 877 – 879.
- [ 63 ] Jasinski M ,Stukkens Y ,Degand H ,*et al.* A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 2001 **13** : 1095 – 1107.
- [ 64 ] Winkel BSJ. Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol* , 2004 **55** : 85 – 107.