

外源鲨烯和茉莉酸甲酯对印楝素生物合成代谢网络的影响

邱枫¹, 谢婷婷², 荀航², 王煜炜², 姚曦², 汤锋^{2*}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 国际竹藤中心, 国家林业和草原局竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要: 基于广泛靶向代谢组技术, 以印楝愈伤组织为材料, 研究了外源鲨烯和茉莉酸甲酯(MeJ)处理对印楝素生物合成代谢网络的影响。通过饲喂印楝愈伤组织鲨烯和茉莉酸甲酯, 结合超高效液相色谱和质谱分析手段, 对饲喂处理后的印楝愈伤组织代谢物进行定性定量分析。结果表明, MeJ和鲨烯显著影响印楝愈伤组织的代谢活动, MeJ处理后共检132种差异代谢物, 包括52种初生代谢物和80种次生代谢物。MeJ调控有机酸、脂质、氨基酸以及黄酮类和酚类物质的代谢, 抑制印楝素B、诺米林和葫芦素E的合成。鲨烯处理检出137种差异代谢物, 32种代谢物表达上调。MeJ和鲨烯均显著促进印楝素A、Azadiradione、Nimbin和Salannin的合成, 抑制印楝素B和D的合成。初步阐明了MeJ和鲨烯影响印楝素A合成的机制, 即二者通过调控初级代谢途径, 影响印楝素合成前体的供给; 通过抑制固醇类物质的次生代谢, 促使更多的前体进入印楝素A合成的代谢流, 进而调控印楝素的生物合成。

关键词: 印楝素A; 鲨烯; 茉莉酸甲酯; 代谢网络

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2021)04-0539-06

Metabolic profiling analysis of azadirachtin in *Azadirachta indica* (neem) callus elicited by squalene and methyl jasmonate

QIU Feng¹, XIE Tingting², XUN Hang², WANG Yuwei², YAO Xi², TANG Feng²

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. SFGA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Centre for Bamboo and Rattan, Beijing 100102)

Abstract: Based on extensive targeted metabolomics, the effects of azadirachtin biosynthetic networks treated with squalene and methyl jasmonate (MeJ) in *Azadirachta indica* (neem) callus were studied. By feeding squalene and MeJ from neem callus, combined with ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry analysis methods, the metabolites of neem callus after feeding treatment were analyzed qualitatively and quantitatively. The results showed that MeJ and squalene significantly affected the metabolic of neem callus. A total of 132 different metabolites were identified after MeJ treatment, including 52 primary metabolites and 80 secondary metabolites. MeJ regulates the metabolism of organic acids, lipids, amino acids, flavonoids and phenols, and inhibits the synthesis of azadirachtin B, nomilin and cucurbitacin E. In squalene treatment, 137 different metabolites were detected, and 32 metabolites were up-regulated. MeJ and squalene significantly promoted the synthesis of azadiradione, nimbin and salannin, and inhibited the synthesis of azadiradione B and D. The regulation mechanism of azadirachtin A biosynthesis by MeJ and squalene was preliminarily elucidated. The supply of precursors were affected by regulating the primary metabolic pathway while inhibited the secondary metabolism of sterols. Therefore, more precursors entered the metabolic flow of azadirachtin A biosynthesis.

Key words: azadirachtin A; squalene; methyl jasmonate; metabolic network

印楝素 (Azadirachtin) 是从印楝 (*Azadirachta indica*) 中提取的一类四环三萜类化合物, 具有拒食、趋避和干扰昆虫生长发育等多种生物活性, 是目前

开发最成功的植物源杀虫剂之一, 已在中国、美国、加拿大和印度等多个国家登记使用, 市场需求巨大^[1]。其主要活性成分是印楝素A和B, 约占99%,

收稿日期: 2021-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670581)资助。

共同第一作者: 邱枫, 硕士研究生。E-mail: 598435781@qq.com 谢婷婷, 博士, 讲师。E-mail: xie405315891@126.com

* 通信作者: 汤锋, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: fengtang@icbr.ac.cn

其中印楝素 A 的含量最高,活性最强^[2-3]。

目前对印楝素生物合成途径的认识,基本停留于推理和假说层面。Akhila 等利用 ¹⁴C 标记研究印楝素、nimbin 及茄碱苷的生物合成途径,证明甲羟戊酸参与了 3 种物质的合成^[4]; Seigler 等推测 2,3-环氧鲨烯在酶的催化下形成大戟二烯醇,再经一系列反应生成印楝素 A^[5]。谢婷婷等利用印楝素 A 无细胞合成体系,通过外源添加底物,证明羊毛甾醇不是印楝素 A 的合成前体,2,3-环氧鲨烯和丁酰鲸鱼醇是印楝素 A 的前体,nimbin、大戟二烯醇、脱乙酰茄碱苷和茄碱苷极可能是印楝素 A 的合成前体,并且茄碱苷位于合成途径较下游的位置^[6]。

印楝素生物合成涉及多种酶促反应,在植物体内开展研究难度极大,进展缓慢。因此,借助现代组学技术,探讨印楝素生物合成途径,受到科学家的关注。Krishnan 等完成了印楝基因组的测序,筛选出 8 个可能与印楝素生物合成相关的基因^[7-8]; Kurvadi 等通过高通量测序和 UPLC 技术,获得 150 余个可能涉及印楝素合成的候选基因^[9]。代谢轮廓分析是连接代谢组学和功能基因组学的纽带,无论是在细胞和植株层面上实施诱导,还是分子水平上操纵基因,都需要知道代谢产物的应答表现^[10]。

因此,本研究在前期研究基础上,以印楝愈伤组织为材料,研究前体(鲨烯)和诱导子(茉莉酸甲酯)处理后印楝代谢轮廓的变化,分析差异代谢产物,探讨鲨烯和 MeJ 对印楝素生物合成代谢网络的影响,以期揭示印楝素生物合成途径,深入认识印楝素代谢网络和调控机制提供依据,为利用生物技术合成和提高印楝素产量提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 印楝为 4 年生植株。印楝种子采于中国林业科学研究院资源昆虫研究所元江试验站(云南省元江县),常规消毒后,室温浸种 48 h,播种于营养钵中育苗。实生苗转盆后,置于中国林业科学研究院温室中常规盆栽。

1.1.2 主要试剂及仪器 (1) 主要试剂。Azadirachtin B、Azadirachtin D、Azadirachtin H、Azadiradoine、Nimbin 及 Salannin 为实验室分离制备所得^[11]; Azadirachtin A 购于 Sigma 公司。色谱级甲醇、乙腈及乙醇购于默克公司;超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制备得到。

(2) 主要设备仪器。超高效液相色谱系统(日本岛津实验器材有限公司 Shimadzu CBM30A);串

联四极杆-飞行时间质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)(美国赛默飞世尔科技有限公司);研磨仪(德国弗尔德仪器设备有限公司 MM 400)。

1.2 研究方法

1.2.1 样品制备与提取 愈伤组织分别饲喂 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJ、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲨烯及同时饲喂 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJ 和 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲨烯,培养 24 h 后收集,真空冷冻干燥 7 d 后备用,以无菌水为对照,每处理重复 3 次。

用研磨仪按 30 Hz 的频率,将冻干后的愈伤组织样品研磨 1.5 min,至粉末状。称取 100 mg 样品粉末,加 1.0 mL 70%甲醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置提取 24 h; 10 000 g 离心 10 min,收集上清液,经吸附柱(CNWBOND Carbon-GCB SPE, 250mg, 3mL)和微孔滤膜(0.22 μm)过滤,待检测。

1.2.2 检测条件 (1) 色谱条件。Waters Acquity UPLC HSS T3 C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱,流动相 A 和 B 分别为 0.04%乙酸水溶液和含 0.04%乙酸的乙腈溶液。采用梯度洗脱,梯度设置为: 0 min, A : B = 95 : 5; 11.0 min, A : B = 5 : 95; 12.0 min, A : B = 5 : 95, 12.1~15.0 min, A : B = 95 : 5。流速 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。

(2) 质谱条件。电喷雾正离子电离模式,质量扫描范围 50~2 000 Da,碰撞气为高纯氮气(N₂)。电喷雾离子源(ESI)温度 500 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 5 500 V,帘气 25 psi,碰撞诱导电离参数设置为高。通过去簇电压和碰撞能优化进行扫描检测。

1.2.3 定性定量分析 基于武汉迈特维尔生物科技有限公司自建数据库 MWDB (metware database) 及代谢物信息公共数据库,根据一级和二级谱信息,去除对数据分析有影响的同位素信号和含 K⁺、Na⁺ 和 NH₄⁺ 等离子及大分子量物质的碎片离子等重复信号,对代谢物进行定性。利用三重四级杆质谱的多反应监测模式,以特征离子峰面积进行定量。

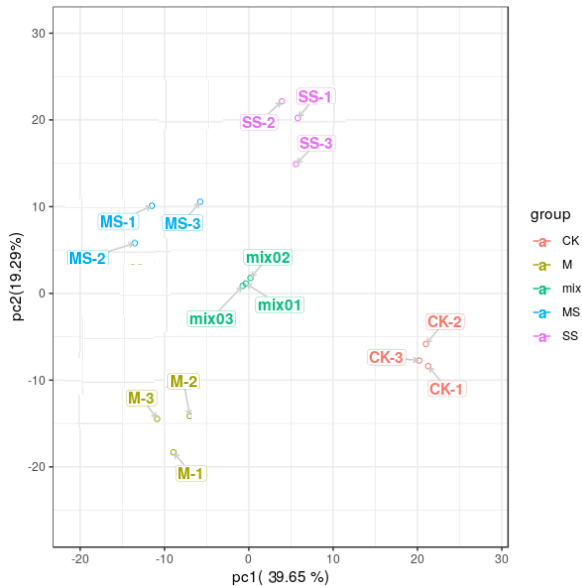
1.2.4 试验数据处理 运用主成分分析法(PCA)进行无监督分析,预判不同处理的整体趋势,随后利用有监督的正交偏最小二乘法(OPLS-DA)进行数据分析,验证 OPLS-DA 模型的拟合程度。基于 OPLS-DA 结果,差异倍数(fold change, FC)与 VIP 结合筛选差异代谢物。筛选标准为 FC \geq 1.5 或 \leq 0.66,且 VIP 值 \geq 1。

2 结果与分析

2.1 数据质量及代谢物总体分析

2.1.1 主成分分析结果 在 PC1 维中, MeJ、鲨烯

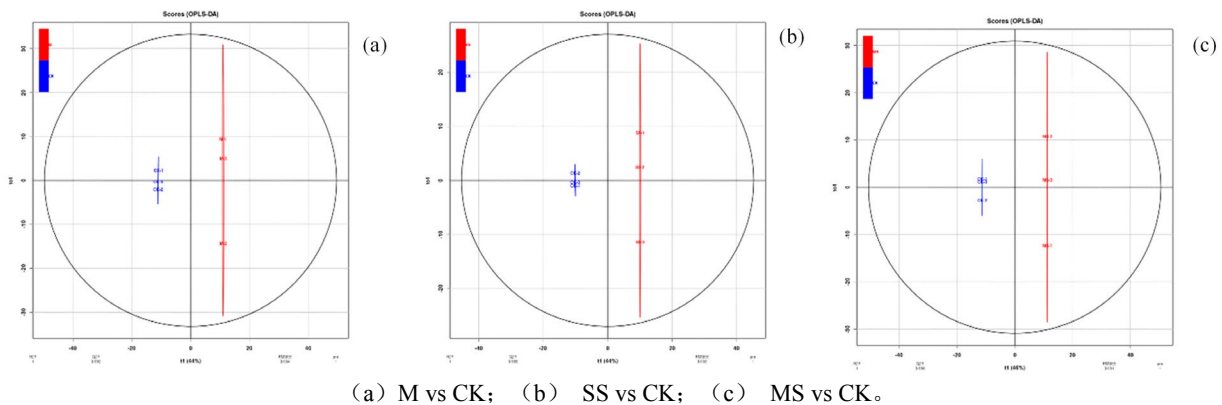
(SS) 以及 MeJ 和鲨烯共处理 (MS) 样品与对照组 (CK) 存在显著的分离趋势, 表明 3 种处理代谢物与对照组存在显著差异 (图 1)。SS 组与 MeJ 和 MS 组之间分离显著, 表明鲨烯对代谢物影响与 MeJ 存在差异。MeJ、SS、MS 和 CK 4 种处理在 PC2 维上分离显著。



1. X 轴表示第一主成分, Y 轴表示第二主成分; 2. M 表示 MeJ 处理; SS 表示鲨烯处理; MS 表示 MeJ 和鲨烯共处理; CK 为对照组; Mix 表示质控样本。

图 1 主成分分析结果

Figure 1 Results of principal component analysis



(a) M vs CK; (b) SS vs CK; (c) MS vs CK。

图 2 OPLS-DA 分析图

Figure 2 OPLS-DA analysis diagram

2.2.2 鲨烯对印楝愈伤组织初生代谢物的影响 鲨烯影响 49 种初生代谢物的合成, 其中 36 种表现为下调, 见图 4 (b)。共有 8 类差异代谢物, 对有机酸及衍生物影响最大 (15 种), 除 3,5-二羟基-3-甲基戊酸、6-氨基己酸、延胡索酸和 D-泛酸等 4 种上调, 其余有机酸均受到抑制。13 种胺类代谢物受到影响, 酚胺类物质受到抑制, 色胺类物质代谢增强。

2.2.3 鲨烯和 MeJ 共同作用对印楝愈伤组织初生代

2.1.2 OPLS-DA 分析结果 MeJ、鲨烯以及 MS 分别与对照组比较, 3 组的预测参数 R2X、R2Y 和 Q2 均接近 1, 表明模型稳定可靠, 可以做后续的差异成分的筛选 (图 2)。

2.1.3 代谢物种类及其分布 基于 MWDB 数据库及代谢物信息公共数据库, 通过质谱信息检索, 共鉴定出 767 种代谢物。442 个代谢物分布在初生代谢途径, 其中有机酸及其衍生物、氨基酸及其衍生物和脂质 3 类物质数目最多, 分别占初级代谢物的 26.7%、21.9% 和 15.6%。鉴定次生代谢产物 287 个, 其中黄酮类代谢物最多 (169 个), 占次生代谢物的 58.9%, 萜类代谢物 14 个。有 38 个代谢物未得到明确分类 (图 3)。

2.2 鲨烯和 MeJ 对印楝愈伤组织初生代谢的影响

2.2.1 MeJ 对印楝愈伤组织初生代谢的影响 MeJ 处理影响印楝 52 种初级代谢物, 27 种表达上调, 25 种表达下调, 见图 4 (a)。涉及糖类、氨基酸和脂类等 8 类, 其中对有机酸及衍生物 (17 种)、脂质 (14 种) 和氨基酸及衍生物 (10 种) 影响较大。除 5 种奎宁酸类物质外, 其余有机酸类均有明显的增加。MeJ 强烈促进脂肪酸十三烷内脂的合成, 多数甘油磷脂的代谢明显提高。L-高瓜氨酸、高精氨酸和 N-(3-吡啶乙酰基)-L-丙氨酸代谢降低, 其余氨基酸类代谢均增强。

谢物的影响 鲨烯和 MeJ 的协同作用显著调控愈伤组织的初生代谢, 影响 7 类 53 种初生代谢物, 34 种表现下调, 19 种为上调, 见图 4 (c)。有机酸及衍生物受影响最大 (17 种), 8 种表现为上调。与单独处理结果一致, 两者共处理抑制奎宁酸的代谢。其次为胺类物质 (10 种), 其中酚胺和色胺类物质的代谢受到抑制。10 种氨基酸及衍生物受到两者共同调控, 其中 4 种氨基酸的代谢上调。

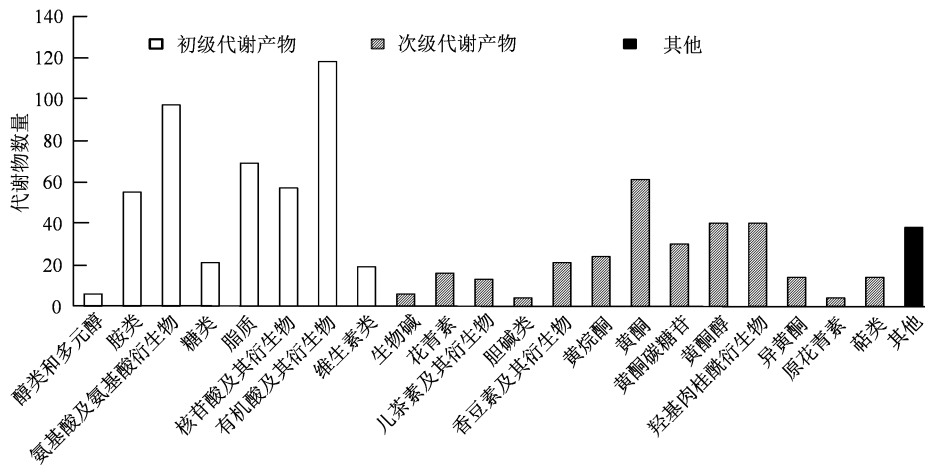
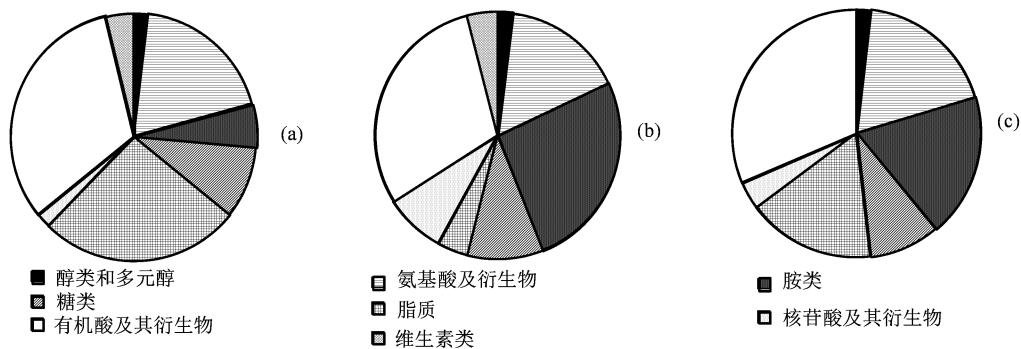
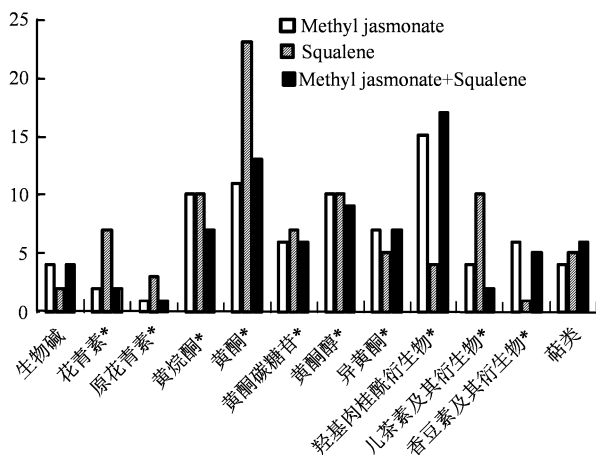


图 3 代谢物总分布
Figure 3 Metabolite profile



(a) 茉莉酸甲酯; (b) 鲨烯; (c) 茉莉酸甲酯和鲨烯共处理
图 4 MeJ 和鲨烯处理影响初生代谢物分布

Figure 4 The distribution of primary metabolites treated with MeJ and squalene



图中“*”标记物质为苯丙烷及衍生物。

图 5 MeJ 和鲨烯影响次生代谢物分布

Figure 5 The distribution of secondary metabolites treated with MeJ and squalene

2.3 鲨烯和 MeJ 对印楝愈伤组织次生代谢物影响

2.3.1 MeJ 对印楝愈伤组织次生代谢的影响 经 MeJ 处理后, 差异次生代谢物有 80 种, 47 表达上调, 33 种下调, 包括 4 种生物碱类、4 种萜类和 72

种苯丙烷类及衍生物。其中黄酮类物质最多 (47 种), 大部分受到抑制; 其次为酚类物质 (25 种), 13 种代谢上调。这与甘草、蒙古黄芪等植物中的研究结果一致^[12-15]。MeJ 调控的 4 种萜类物质为印楝素 B、诺米林、葫芦素 E 和 Azadiradione, 其中前 3 种代谢受到抑制。

表 1 MeJ 和鲨烯处理对柠檬苦素类代谢物的影响
Table 1 Effects of MeJ and squalene on 7 limonin metabolites

编号	物质	差异代谢倍数(FC)		
		M vs CK	SS vs CK	MS vs CK
1	Azadirachtin A	1.46	1.66	2.16
2	Azadirachtin B	0.51	0.54	0.54
3	Azadirachtin D	0.68	0.90	0.87
4	Azadirachtin H	0.86	1.59	1.20
5	Azadiradione	1.52	1.80	2.41
6	Nimbin	1.33	1.15	1.65
7	Salannin	1.37	1.58	1.37

2.3.2 鲨烯对印楝愈伤组织次生代谢物的影响 鲨烯处理后差异次生代谢物共 88 种, 20 种上调, 68 种下调 (图 5)。苯丙烷类及衍生物中差异代谢物最

多 (80 种), 其中黄酮类物质 65 种, 占 74.7%。其次为萜类物质, 包括印楝素 A、B、H 及 Salannin、Nimbin。除印楝素 B 外, 其余物质代谢均上调。

2.3.3 MeJ 和鲨烯对印楝愈伤组织次生代谢物的共同影响 MeJ 和鲨烯对印楝代谢有协同增效作用。

MeJ 和鲨烯共处理有 79 种差异次生代谢物, 33 种

上调, 46 种下调。6 种萜类物质代谢发生明显变化, 其中印楝素 A、Azadiradione 和 Nimbin 代谢上调, 印楝素 B、诺米林和葫芦素 E 代谢受抑制。此外, MeJ 和鲨烯的协同作用对 4 种生物碱的代谢也有明显调控。

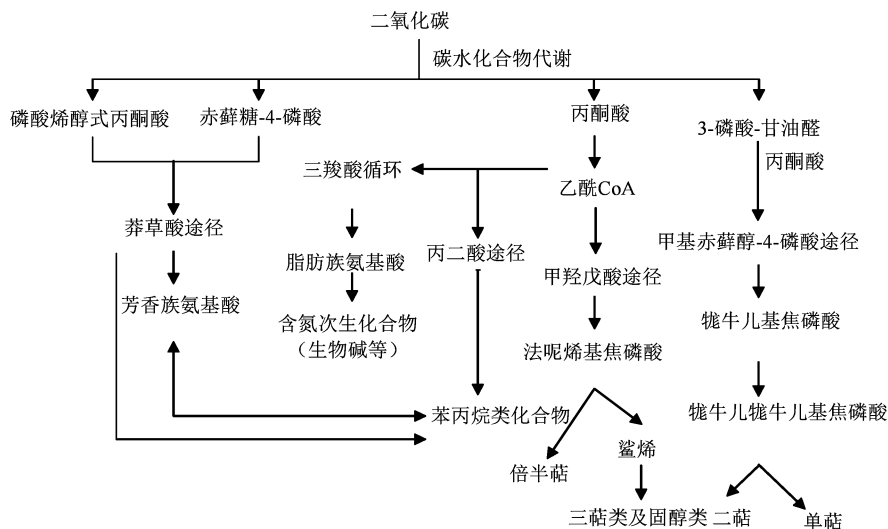


图 6 萜类代谢相关网络

Figure 6 Network diagram of terpenoids metabolism

2.4 种柠檬苦素类物质的靶向代谢分析结果

选取印楝素 A、B、D、H 及 Azadiradione、Nimbin、Salannin 等 7 种柠檬苦素类物质进行靶向代谢分析, 结果表明, 鲨烯、MeJ 以及两者共存时, 均能显著促进印楝素 A、Azadiradione、Nimbin 和 Salannin 的合成, 对印楝素 B、D 的合成具有抑制作用。鲨烯促进印楝素 H 的合成, MeJ 不仅抑制印楝素 H 的合成, 并能抵消鲨烯的作用 (表 1)。MeJ 和鲨烯处理后印楝素 A 合成增加, 印楝素 B、D 合成受到抑制, 表明其存在竞争关系。印楝素 A 和 B 结构相似, 仅丁烯酯部分环氧结构上的-H 和-OH 不同^[16]。说明 MeJ 可能通过调控印楝素 B 合成后期修饰酶活性, 使更多的前体进入印楝素 A 的代谢流。

前人研究发现, 紫外灯照射下, 印楝粗提物溶液通氧后 Salannin 和 Nimbin 可分别氧化为含有印楝素结构和高生物活性的 Isosalanninolide 和 Isonimbinolide, 在植物体内亦发现了此类物质^[17-18]。谢婷婷等亦发现, 以 Nimbin 和 Salannin 为底物时印楝素 A 的产量显著增加, 认为两者是印楝素 A 的合成前体^[6], 代谢物差异分析结果进一步验证 Nimbin 和 Salannin 是印楝素 A 合成前体。

Hansen 等发现, Azadirone 经氧化、环化及质子化等反应, 最终可合成 Salannin 和 Nimbin^[19]。由于具有特有的氧化模式, Azadiradione 和 Azadione 是许

多柠檬苦素类和四环三萜类化合物的合成前体^[20]。Azadiradione 合成与印楝素 A 变化趋势一致, 可推测 Azadiradione 亦为印楝素 A 合成前体。

2.5 鲨烯和 MeJ 对印楝素合成代谢网络的影响

2.5.1 MeJ 和鲨烯对印楝素合成初生代谢网络的影响 印楝中碳水化合物代谢为 MVA 及 MEP 途径提供乙酰 CoA、丙酮酸和 3-磷酸甘油醛。三萜类物质的前体主要来自 MVA 途径, MVA 途径和 MEP 途径在植物体中可通过 IPP 进行交流, 因此两种途径均调控三萜物质的合成 (图 6)。

MeJ 和鲨烯影响葡萄糖酸内酯、葡萄糖酸、D-果糖-6-磷酸和 D-葡萄糖-6-磷酸等 4 种糖类物质的代谢。葡萄糖酸内酯和葡萄糖酸可通过 Entner-Doudoroff pathway 反应产生 3-磷酸甘油醛, D-果糖-6-磷酸和 D-葡萄糖-6-磷酸经糖酵解过程生成丙酮酸。乙酰 CoA 不仅是 MVA 途径合成萜类物质的前体, 也是三羧酸循环不可或缺的参与者。经鲨烯处理后, 愈伤组织中延胡索酸和苹果酸含量有不同程度地增加, 而柠檬酸和 α -酮戊二酸含量减少, 表明 TCA 循环增强且向合成更多的乙酰 CoA 的方向进行, 释放大量的能量, 利于印楝素的合成。此外, 乙酰 CoA 还是一种重要的乙酰基供体^[21], 从鲨烯到印楝素的合成过程, 涉及多步乙酰化反应, 大量乙酰 CoA 的合成有利于鲨烯向印楝素的合成。

MeJ 和鲨烯调控豆蔻酸的代谢,且多种不饱和脂肪酸产量显著变化。研究表明,豆蔻酸调控 MVA 途径,不饱和脂肪酸通过提高胞压和影响酶活促进 MVA 途径的代谢^[22]。因此 MeJ 利用调控部分糖类和脂类的代谢影响印楝素的合成,鲨烯通过部分糖类和脂类的代谢以及 TCA 循环影响印楝素的合成。

2.5.2 MeJ 和鲨烯对印楝素合成次生代谢网络的影响 鲨烯是植物三萜和固醇类物质的共同前体,减少固醇类物质的合成有利于鲨烯参与三萜类化合物的合成。MeJ 处理后,愈伤组织中印楝素 A 合成增加,而固醇类物质维生素 D 的含量下降。同时添加 MeJ 和鲨烯,愈伤组织中维生素 D 含量仍明显减少,印楝素 A 的增加量高于 MeJ 单独处理,表明 MeJ 可通过抑制固醇类物质的合成促进印楝素代谢。磷酸吡哆醛是 140 多种细胞酶的辅酶,涉及氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶及合成酶 6 大酶类,在众多细胞代谢中不可或缺^[23]。印楝素生物合成涉及多种氧化、环化和异构等酶的参与,鲨烯促进磷酸吡哆醛的合成,有利于提高印楝素后期结构修饰相关酶的活性。

综上所述,MeJ 通过促进 Entner-Doudoroff pathway 反应,糖酵解等初生代谢,抑制固醇类物质合成等次生代谢,进而调控印楝素的合成。鲨烯除影响 Entner-Doudoroff pathway 反应和糖酵解外,还通过调控三羧酸循环、脂质代谢以及结构修饰相关酶的活性,影响印楝素的合成。

3 结论

MeJ 和鲨烯显著影响印楝愈伤组织的代谢活动,MeJ 处理后共检 132 种差异代谢物,包括 52 种初生代谢物和 80 种次生代谢物。MeJ 调控有机酸、脂质、氨基酸以及黄酮类和酚类物质的代谢,抑制印楝素 B、诺米林和葫芦素 E 的合成。鲨烯处理检出 137 种差异代谢物,32 种代谢物表达上调。靶向代谢组分析表明,MeJ 和鲨烯显著促进印楝素 A、Azadiradione、Nimbin 和 Salannin 的合成,对印楝素 B、D 的合成具有抑制作用。表明 Nimbin 和 Salannin 是印楝素 A 生物合成途径的中间代谢物,Azadiradione 参与印楝素 A 的合成。

基于差异代谢物的分析,绘制了 MeJ 和鲨烯影响印楝素合成的相关代谢网络,MeJ 通过促进 Entner-Doudoroff pathway 反应,糖酵解等初生代谢,抑制固醇类物质的次生代谢,调控印楝素 A 的合成。鲨烯影响 Entner-Doudoroff pathway 反应和糖酵解,通过干预三羧酸循环、脂质代谢以及结构修饰相关

酶的活性影响印楝素 A 的合成。

参考文献:

- [1] 徐汉虹,赖多,张志祥.植物源农药印楝素的研究与应用[J].华南农业大学学报,2017,38(4):1-11.
- [2] 樊会丹,张从海,严胜骄,等.印楝素的合成、结构修饰及生物活性研究进展[J].有机化学,2009,29(1):20-33.
- [3] LEY S V, DENHOLM A A, WOOD A. The chemistry of azadirachtin[J]. Nat Prod Rep, 1993, 10(2): 109-157.
- [4] AKHILA A, SRIVASTAVA M, RANI K. Production of radioactive azadirachtin in the seed kernels of *Azadirachta indica* (the Indian neem tree)[J]. Nat Prod Lett, 1998, 11(2): 107-110.
- [5] SEIGLER D S. Limonoids, quassinoids, and related compounds[M]//Plant Secondary Metabolism. Boston, MA: Springer US, 1998: 473-485.
- [6] 谢婷婷,汤锋,高全,等.印楝素 A 无细胞合成体系构建及其合成前体[J].林业科学,2019,55(9):50-60.
- [7] KRISHNAN N M, PATTNAIK S, DEEPAK S A, et al. De novo sequencing and assembly of *Azadirachta indica* fruit transcriptome[J]. Curr Sci, 2011, 101(12): 1553-1561.
- [8] KRISHNAN N M, PATTNAIK S, JAIN P, et al. A draft of the genome and four transcriptomes of a medicinal and pesticidal angiosperm *Azadirachta indica*[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 464.
- [9] KURAVADI N A, YENAGI V, RANGIAH K, et al. Comprehensive analyses of genomes, transcriptomes and metabolites of neem tree[J]. PeerJ, 2015, 3: e1066.
- [10] FIEHN O, KOPKA J, DÖRMANN P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(11): 1157-1161.
- [11] 高全,姜浩,荀航,等.印楝素类成分对照品的制备与鉴定[J].农药,2015,54(7):490-495.
- [12] 王有琼,马李一,张重权,等.印楝叶总黄酮的提取工艺研究[J].广东农业科学,2013,40(17):87-90.
- [13] 刘雅静.蒙古黄芪悬浮细胞系的建立及茉莉酸甲酯对其黄酮含量的调控[D].呼和浩特:内蒙古大学,2011.
- [14] 李丽,董银卯,姚霞,等.茉莉酸甲酯对植物酚类成分代谢影响研究进展[J].中药材,2014,37(11):2109-2112.
- [15] 杨英,郑辉,何峰,等.不同浓度茉莉酸甲酯对悬浮培养的胀果甘草细胞合成甘草总黄酮的影响[J].云南植物研究,2008,30(5):586-592.
- [16] 程东美,张志祥,徐汉虹,等.印楝素 B 的分离、结构鉴定及生物活性测定[J].南京农业大学学报,2007,30(3):135-138.
- [17] 赵淑英.印楝素的萃取、分离、改性及其生物活性研究[D].北京:中国林业科学研究院,2004.
- [18] 谭卫红.印楝种仁成分的化学及活性成分研究[D].北京:中国林业科学研究院,2007.
- [19] HANSEN D J, CUOMO J, KHAN M, et al. Advances in neem and azadirachtin chemistry and bioactivity[M]//Natural and Engineered Pest Management Agents. Washington, DC: American Chemical Society, 1993: 103-129.
- [20] LEY S V, DENHOLM A A, WOOD A. The chemistry of azadirachtin[J]. Nat Prod Rep, 1993, 10(2): 109.
- [21] 宋广浩.中国红豆杉细胞紫杉烷化和酰化产物形成规律及其调控.武汉:华中科技大学,2015.
- [22] 闫旭.脂肪酸对 MVA 途径的影响.北京:北京化工大学,2012.
- [23] PERCUDANI R, PERACCHI A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes[J]. EMBO Rep, 2003, 4(9): 850-854.